

厚生労働科学研究費補助金
(政策科学総合研究事業 (臨床研究等 ICT 基盤構築・人工知能実装研究事業))
分担研究報告書

課題名 : 新薬創出を加速する症例データベースの構築・拡充/創薬ターゲット推定アルゴリズムの開発
研究分担者名 : 西村 紳一郎
国立大学法人北海道大学大学院先端生命科学研究院 先端融合科学研究部門
新薬探索研究分野 教授

研究要旨

本研究チームは「血中エクソソームの由来臓器を糖鎖解析により推定する基盤技術」という基本的な研究課題を分担している。令和4年度はマウス主要臓器（脳・肝臓・肺・骨格筋）と大腿骨、腎臓、膵臓、脾臓、心臓、胃、腸（大腸および小腸）、皮膚、甲状腺、卵巣、子宮、睾丸、血清および血清から抽出したエクソソームの定量的糖鎖プロファイリングによって得られた世界初の「マウス組織・臓器糖鎖アトラス」に関する論文を完成して **Scientific Report** 誌に発表した（2022年10月24日）。さらにヒト組織糖鎖アトラスへの展開の第一歩として、徳島大学医学部附属病院呼吸器・膠原病内科から供与された「ヒト間質性肺炎および肺がん患者由来血清エクソソーム糖鎖の解析」を実施してヒト血清由来エクソソームの糖鎖プロファイリングが新たな疾患マーカー探索に有効であることを初めて実証した。

A. 研究目的

エクソソームが積載する様々な生体分子はいずれもそのエクソソームを放出した細胞内で合成されているため、エクソソームはそれらの細胞が分布する組織や臓器での異常を示唆する有効なバイオマーカーとなる可能性が高い。しかし、血液中のエクソソームは明らかに複雑なナノ微粒子の混合物であり、それらの由来組織・臓器を特定することはもとより推定すること自体困難である。我々は由来する組織や臓器と定量的に紐づいたエクソソームの情報を抽出できれば特定の組織・臓器での疾患特異的な変化を検知できると考えた。

本研究チームでは「血中エクソソームの由来臓器・組織を糖鎖解析により推定する基盤技術」を確立し、由来臓器・組織と定量的に紐づいたエクソソームの糖鎖構造情報を用いる新たな AI 支援型診断技術への応用、特に「ヒト特発性肺線維症や肺がんのバイオマーカー探索」への展開を将来的な目的としている。昨年度までのに実施したマウスの組織グライコームアトラスの結果を受けて、ヒトの（主要）臓器・組織、培養細胞、血清、および血中エクソソームの定量的糖鎖プロファイルを取得して「ヒトグライコームアトラス」の構築を実現する必要性が強く示唆されている。

本年度はその第一弾として肺疾患マーカーの探索を指向する「肺に焦点を絞ったヒトグライコームデータベースの構築」を開始した。ヒト患者血清および血清由来エクソソームの糖鎖プロファイリングについて徳島大学病院呼吸器・膠原病内科、西岡安彦先生・荻野広和先生からお預かりした「ヒト間質性肺炎および肺がん患者由来血清エクソソーム糖鎖の解析」を実施した。

B. 研究方法

特発性肺線維症 (IPF)、非特異性間質性肺炎 (NSIP)、間質性肺炎合併非小細胞肺癌 (IP-NSCLC)、間質性肺炎合併小細胞肺癌 (IP-SCLC)、腺がん (Ad; 非小細胞癌)、扁平上皮がん (Sq 非小細胞がん)、小細胞がん (Sm) 患者および健常者血清 (昭和大学北横浜病院中央検査室木村聡先生より提供頂いた健常者血清ライブラリ)、さらにそれらから精製したエクソソームの糖鎖プロファイルを実施した (解析に用いた検体の基本情報を下図に示す)。

IPF 特発性肺線維症		NSIP 非特異性間質性肺炎		IP-NSCLC 間質性肺炎合併非小細胞肺癌		IP-SCLC 間質性肺炎合併小細胞肺癌	
Gender	male 4 female 2	Gender	male 4 female 2	Gender	male 4 female 1	Gender	male 4 female 1
Age	40-49 0 50-59 0 60-69 1 70-79 4 80-89 1	Age	40-49 1 50-59 1 60-69 2 70-79 1 80-89 0	Age	40-49 0 50-59 0 60-69 2 70-79 2 80-89 1	Age	40-49 0 50-59 0 60-69 0 70-79 4 80-89 1
Total	6	Total	6	Total	5	Total	5

Ad 腺癌		Sq 扁平上皮癌		Sm 小細胞癌	
Gender	male 7 female 1	Gender	male 5 female 0	Gender	male 6 female 0
Age	40-49 0 50-59 0 60-69 5 70-79 3 80-89 0	Age	40-49 0 50-59 0 60-69 3 70-79 2 80-89 0	Age	40-49 0 50-59 0 60-69 0 70-79 6 80-89 0
Total	8	Total	5	Total	6

マウス血清からのエクソソーム精製プロトコルに従って、各検体 8 グループの血清 (約 5 mL) からエクソソーム画分を得た。また、それぞれ (20 mL) を血清の糖鎖プロファイリングに用いた。

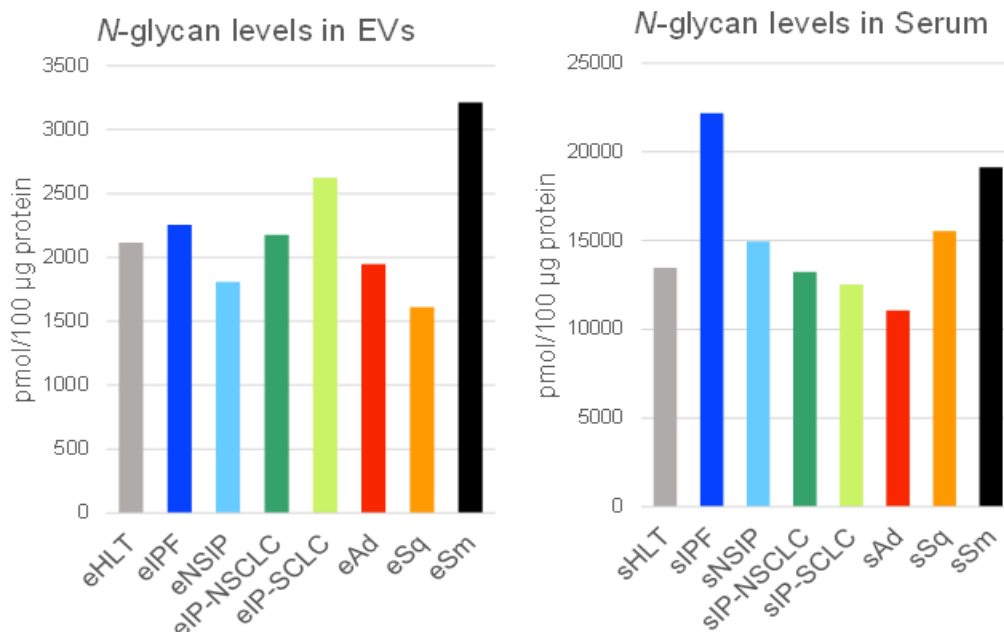
エクソソームの糖鎖構造プロファイリングについてはマウス血清由来エクソソームにおいて確立したプロトコルに従い、各検体についての糖鎖解析を行った。次ページの図はそれぞれの検体についての総糖鎖 (糖タンパク質の N-グリカンの総量) 発現量 (pmole/100 total protein) を表している。

(倫理面への配慮)

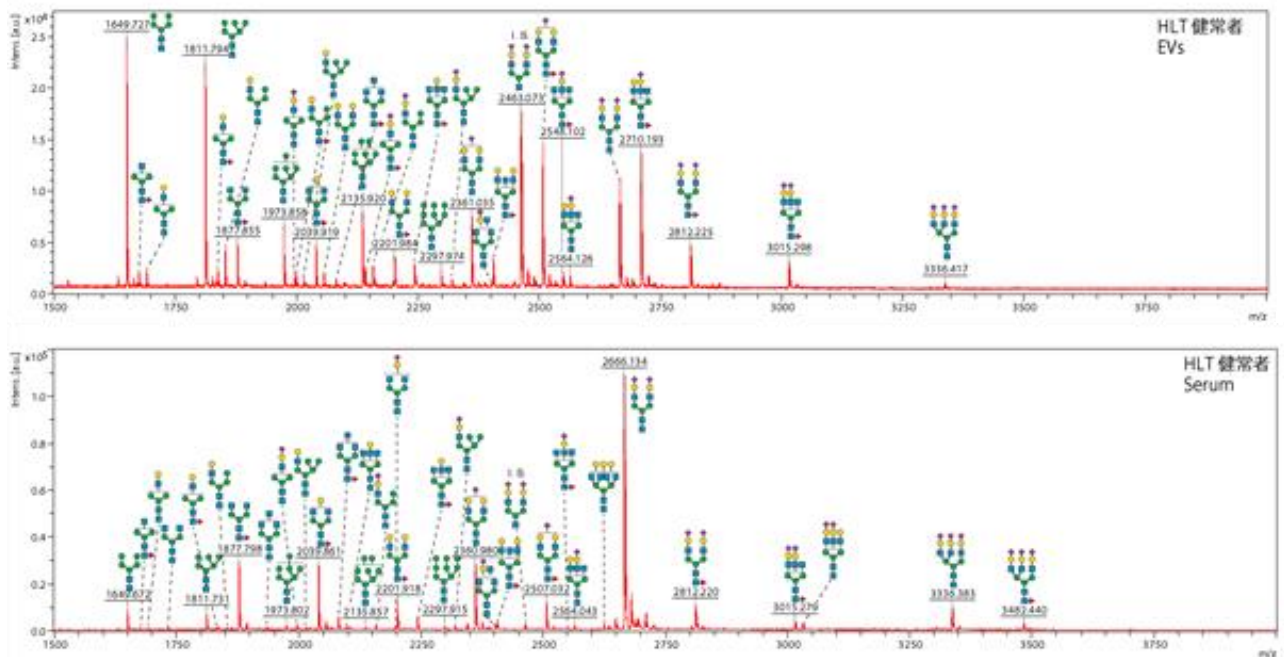
動物実験に際しては、動物愛護管理法及び関係基準等を遵守し、動物福祉の基本概念である 3 R: Replacement, Reduction, Refinement の原則及び動物実験倫理に基づいて適正に実施した。

C. 研究結果及び考察

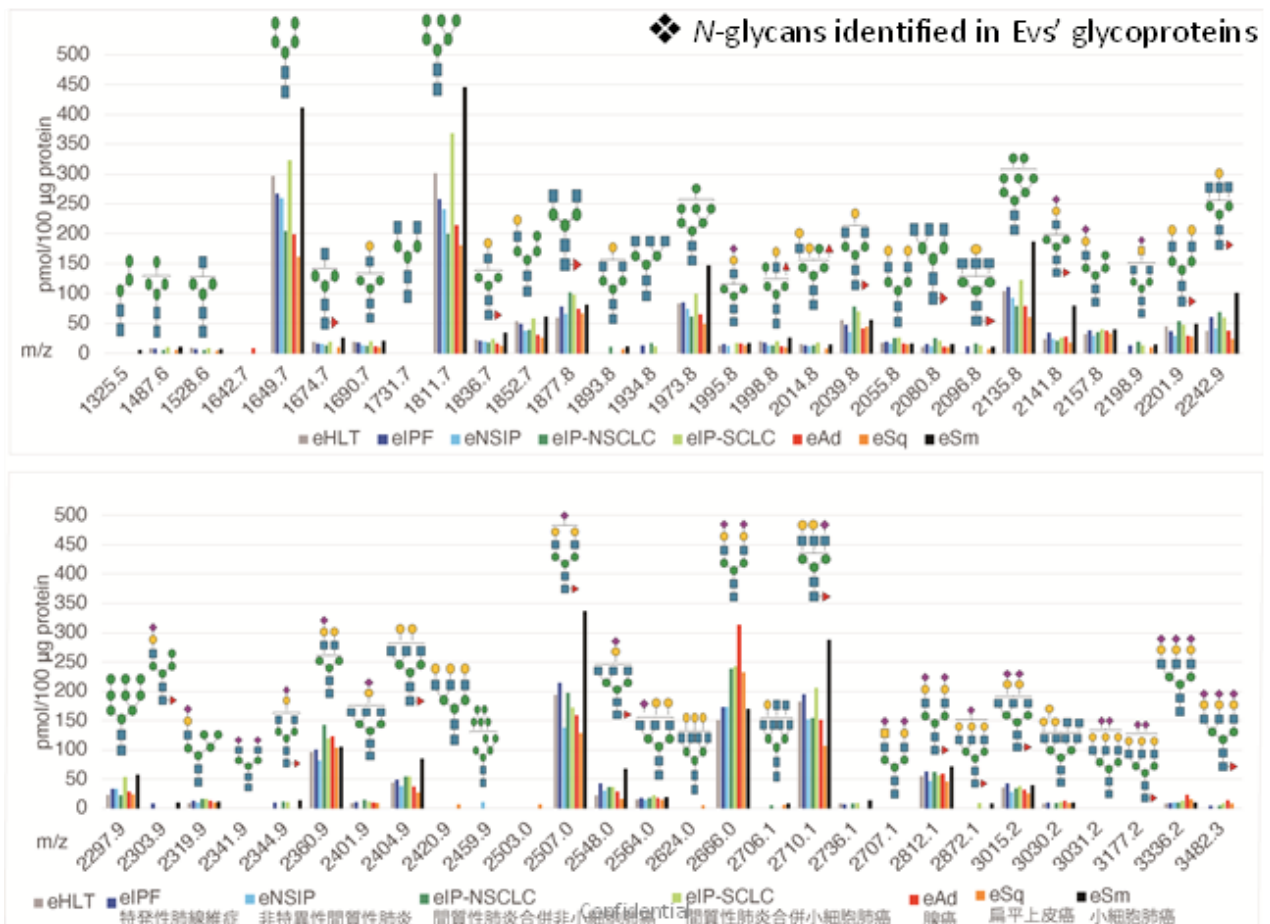
エクソソームに積載されたタンパク質の糖鎖修飾量は血清タンパク質の糖鎖総量に比べて明らかに著しく低い値であることが明らかになった (約 1/10 程度)。しかし興味あることに、特発性肺線維症 (IPF) と間質性肺炎合併小細胞肺癌 (IP-SCLC) さらに小細胞がん (Sm) において血清 (右図) とエクソソーム (左図) での相違が顕著であった。

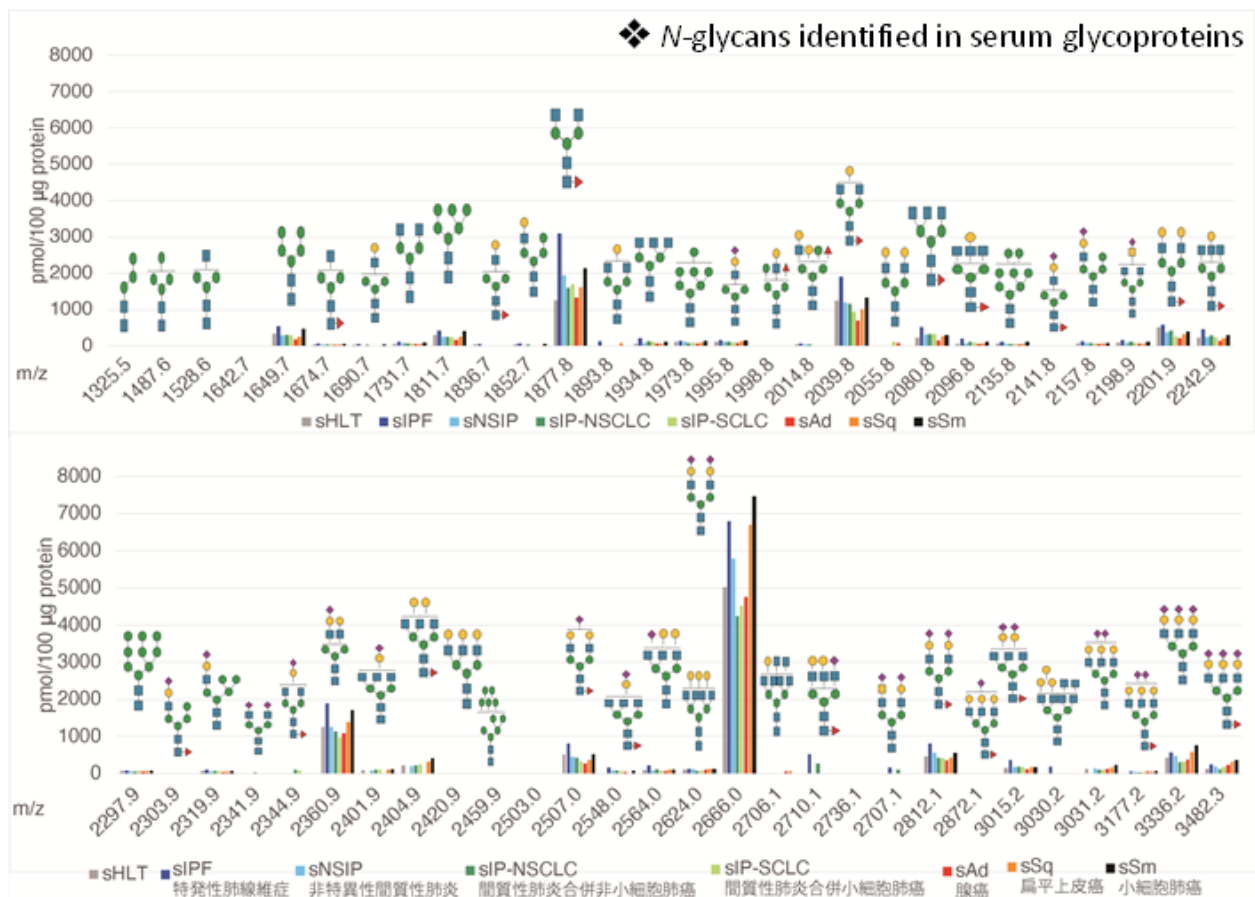


一例として、健常者血清およびその血清から精製したエクソソームの質量分析の結果（データチャート）を下図に紹介する。ピークが示す数値は個々の糖鎖構造に基づく分子量（ m/z 値）を表しており、その面積は発現量に相関している。検体中にスパイク（添加）した濃度既知の内部標準糖鎖を指標として個々の糖鎖構造を定量的にプロファイルする。



今回解析したすべての検体についての分子量（ m/z 値）1,300~3,500 の領域で検出されたエクソソームおよび血清糖タンパク質の糖鎖発現プロファイルを下図にまとめた。





D. 結論

非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腺がん、扁平上皮がん、および特発性肺線維症や間質性肺炎を併発しているこれらのがん患者などの血清から採取したエクソソームの糖鎖プロファイルは血清糖タンパク質の糖鎖プロファイルとは全く異なっており、新たなバイオマーカーや創薬の標的分子を探索する際の極めて有望な材料であることが実証された。

また、マウスで得られたこれまでの結果と今回のヒト肺疾患関連血清エクソソームについての結果から、同様な研究戦略をヒト臓器・組織糖鎖アトラスに拡張すれば患者血清のエクソソームの糖鎖プロファイルからの新しい診断技術の研究開発に展開できる可能性が高い。また、ヒト組織・臓器および細胞が放出する様々なエクソソームの糖鎖プロファイリングに加えてプロテオミクスを統合した体系的な構造・機能関連データベース構築により確度の高いバイオマーカー探索が実現することが期待される。

E. 結論

特定の組織・臓器や細胞から放出されるエクソソームの血中濃度は主要な臓器や組織の糖鎖プロファイルデータベースとの相関を解析することによって推定できることが様々な解析手法によって証明された。すなわち、正常マウスの臓器・組織糖鎖アトラスを健常ヒト臓器・組織糖鎖アトラスに拡張すれば患者血清のエクソソームの糖鎖プロファイルからの新しい診断技術の研究開発に展開できる可能性が高い。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Michiru Otaki, Nozomi Hirane, Yayoi Natsume-Kitatani, Mari Nogami Itoh, Masanori Shindo, Yoichi Kurebayashi, and Shin-ichiro Nishimura, Mouse tissue glycome 2022 highlights inter-organ variation in major N-glycan profiles, Scientific Reports 2022, 12, 17804 (Published online: October 24, 2022).

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし