



Title	Identification of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein as novel biomarkers for sarcoidosis using proteomics of serum extracellular vesicles
Author(s)	Futami, Yu
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/89512">https://hdl.handle.net/11094/89512</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 論文内容の要旨

## Synopsis of Thesis

氏 名 Name	二見 悠
論文題名 Title	Identification of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein as novel biomarkers for sarcoidosis using proteomics of serum extracellular vesicles (エクソソームのプロテオミクスを駆使したサルコイドーシスの新規バイオマーカー同定)
<p>論文内容の要旨</p> <p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>サルコイドーシス（サ症）は非乾酪性肉芽腫が全身に形成される原因不明の難病である。血清バイオマーカーとして、従来よりACEやsIL-2レセプターが使用されているものの、診断における感度・特異度いずれも満足できるものとは言えない。</p> <p>サ症のような多様な表現型の疾患では、網羅的な解析による新規診断法の開発が望まれるが、血清プロテオミクスは、血清蛋白の複雑性から極めて難しいとされる。最近、細胞外小胞であるエクソソームは蛋白、核酸、代謝産物を内包するだけでなく、ドナー細胞からレシピエント細胞へと細胞間や臓器間を移動する新規メッセンジャーとして注目されている。本研究では、血清由来のエクソソームに対する最新プロテオミクスを駆使したアプローチにより従来のバイオマーカーより優れるサ症の新規バイオマーカー同定に挑戦した。</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>サ症患者7名と健常者5名の血清から、サイズ排除クロマトグラフィーによりエクソソームを単離し、LC-MS/MSによるショットガンプロテオミクスにより2292種類の蛋白を検出し、有意に増減するバイオマーカー候補蛋白を366種類同定した。その366種類の蛋白に対してパイオインフォマティクスによる解析 (IPA) を行ったところ、抗原提示反応や免疫反応が主体で、上流因子検索によるとTNF<math>\alpha</math>やTGF<math>\beta</math>1など肉芽腫形成に関わる因子が上位にランクするため、エクソソームの蛋白プロファイルがサ症の病態を反映していることが示唆された。</p> <p>366種類の蛋白から選択した25種類のバイオマーカーの有力候補蛋白について、サ症患者46名と健常者10名において、定量性と再現性に優れるSRM (Selected Reaction Monitoring) を用いたターゲットプロテオミクスにより検証した結果、CD14、LPS-binding protein (LBP) というマクロファージを主体とする免疫反応に関わる2分子がサ症患者において顕著な増加を示した。これら2種類の蛋白は、エクソソーム内に存在することを免疫電顕で確認するとともに、Western blotによる発現増加も確認した。さらに、サ症患者と健常者由来のリンパ節や肺における両蛋白の発現を確認したところ、サ症患者の肉芽腫を構成するマクロファージを主体とする単核球において発現の増加を認めた。とりわけ、肉芽腫のHallmarkとされ、マクロファージが融合して形成される多核巨細胞における発現増加が顕著であった。</p> <p>サ症における同定された両蛋白の病態意義を解明するために、マクロファージを用いたin vitro肉芽腫モデルを検討した。具体的には、マクロファージ細胞株 (Raw264.7) にLPSを加える多核巨細胞誘導モデルにおいて、多核巨細胞が形成されるとともにマクロファージにおけるCD14の発現が顕著に増加した。同時に、マクロファージ培養上清中のエクソソーム内におけるCD14やLBPの発現増加も認めたため、CD14、LBPはマクロファージ由来であると考えられ、サ症における肉芽腫形成に関与している事が示唆された。</p> <p>次にCD14、LBPのバイオマーカーとしての診断能を評価したところ、Area Under the Curve (AUC) はそれぞれ0.81、0.84であり、従来のバイオマーカーより優る診断能を示した。さらに従来のバイオマーカーと組み合わせる事でAUCが0.98にまで向上し、ACEやsIL-2Rがいずれも陰性のサ症患者を新たに診断できる可能性が示唆された。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>血清エクソソームにおけるプロテオミクスを駆使したアプローチにより、サルコイドーシスの新規バイオマーカーとしてCD14、LBPを同定した。サ症を含めた複雑多様な慢性炎症性疾患や有用なバイオマーカーのない疾患において、本ストラテジーは新規診断法開発だけでなく、病態解明や個別化医療を目指した治療にも有用性が示唆された。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 二見 悠				
論文審査担当者		(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	悠、御 淳	署 名
	副 査	大阪大学特任教授	樋 崎 雅 司	署 名
	副 査	大阪大学教授	新 谷 康	署 名
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究の成果は全身に非乾酪性肉芽腫が全身に形成される原因不明の難病であるサルコイドーシス（サ症）の新規バイオマーカーを同定した事である。血清プロテオミクスは血清蛋白の複雑性から課題が多いとされているため、細胞外小胞である血清エクソソームに着目し、最新プロテオミクスを用いて同定に挑戦した。少数例の血清から単離したエクソソームに対するショットガンプロテオミクスにより膨大な数の蛋白を検出し、そこから有力候補となる蛋白を絞り込んだ後、次世代プロテオミクスを用いて大規模検証を行った。結果としてCD14、LPS-binding protein (LBP) がバイオマーカーとして同定された。両蛋白の病態意義を解明するためにin vitro肉芽腫モデルを検討し、血清エクソソーム中のCD14、LBPはマクロファージ由来である事を示した。またバイオマーカーとしての精度を評価し、従来のバイオマーカーと組み合わせる事で診断率の向上に繋がる可能性を見出した。以上の結果から学位に値するものと認める。</p>				