

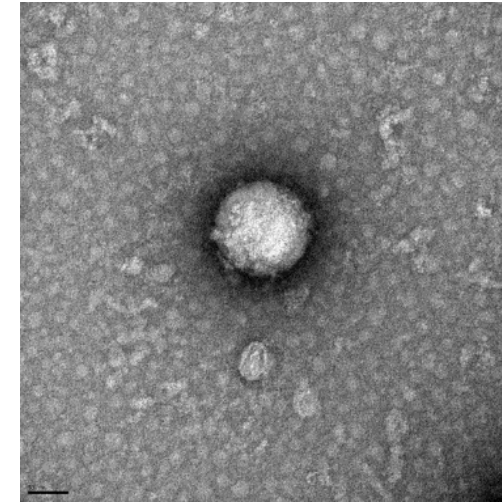
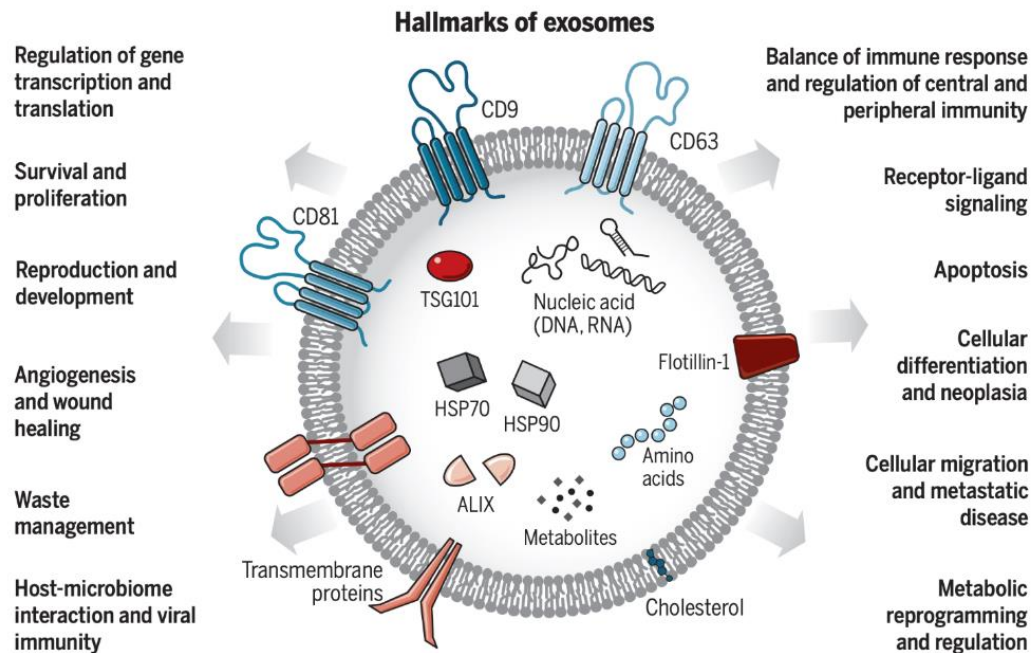
エクソソーム治療開発経験から生まれた バイオマーカー

新潟大学大学院医歯学総合研究科 消化器内科学分野
未来医療研究開発センター (F-EDC)
准教授 土屋淳紀

2023年11月7日

細胞外小胞(エクソソーム)について

CD9, 63, 81等が共通マーカー



電子顕微鏡像

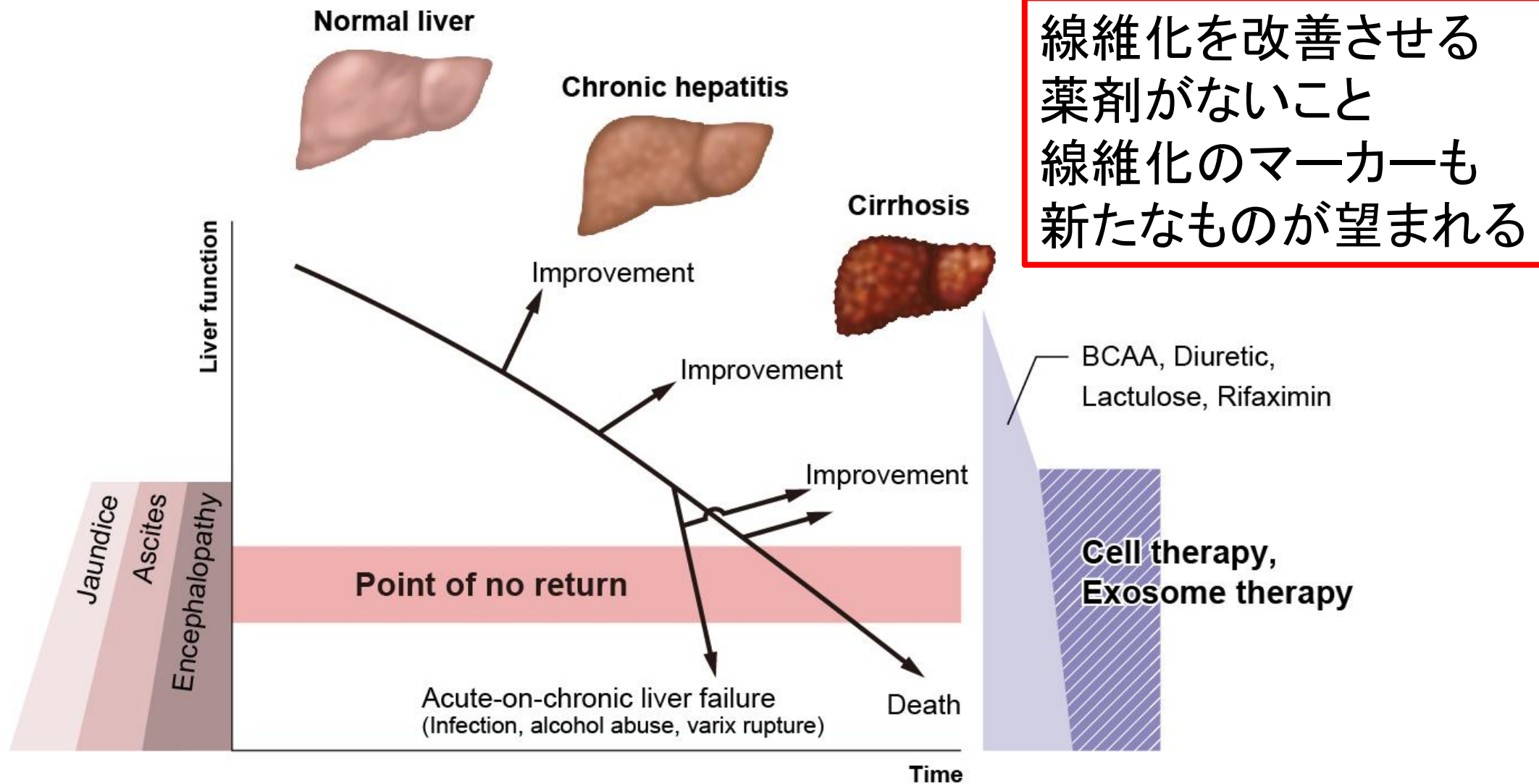
- 脂質二重膜に覆われ、安定
- タンパクや核酸を含む
- 表面分子で特定の細胞を認識

Size : 40~160nm (100nm)の細胞外小胞

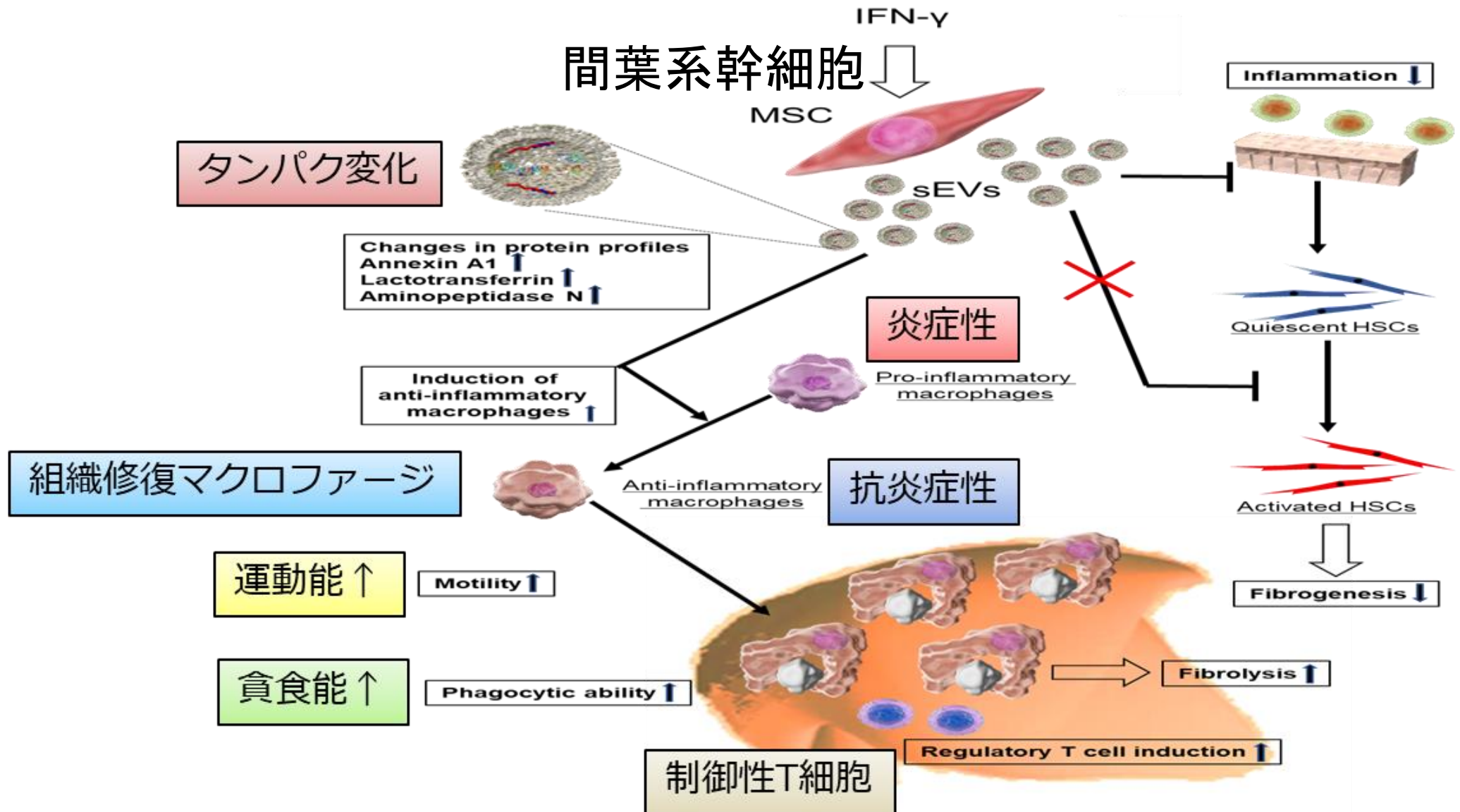
有効物質を効率良く運搬する、細胞間伝達物質我々は治療薬や、バイオマーカーの可能性を探索している

肝硬変での治療の可能性とバイオマーカー

HBV, HCV, NASH, Alcohol等



細胞外小胞の治療薬としての可能性

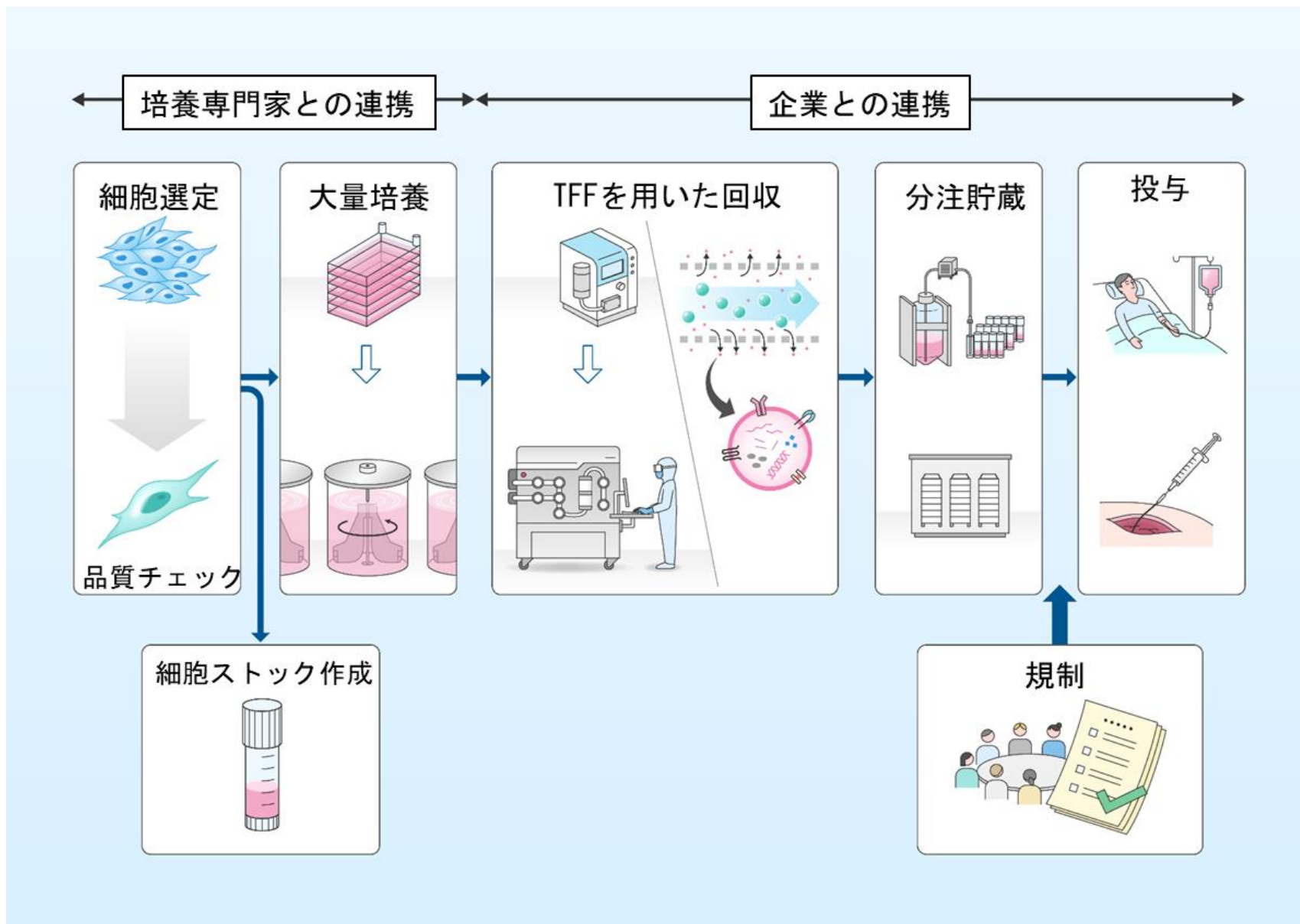


Takeuchi S, Tsuchiya A, Terai et al. Npj Regenerative Medicine 2021

組織修復マクロファージを誘導して線維化を改善させる

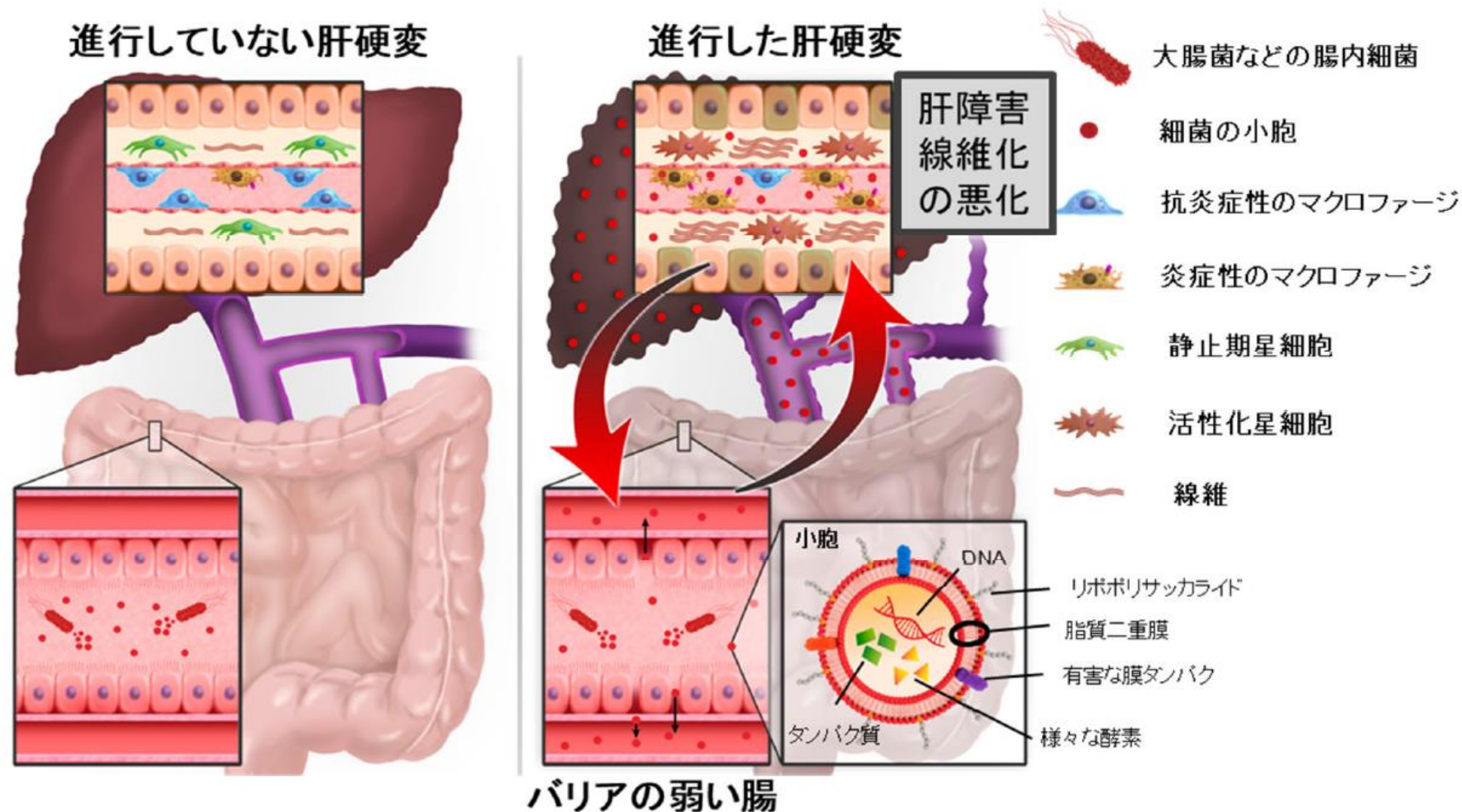
細胞外小胞の治療薬としての可能性

私見

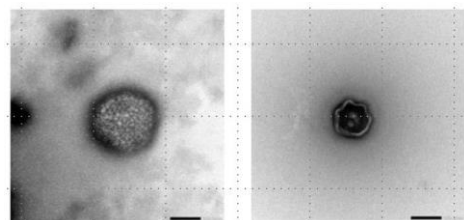


細胞外小胞を使用した治療法開発を目指している。

腸内細菌の小胞に関する研究



細菌の小胞



Natsui K, Tsuchiya A et al. Liver International 2023

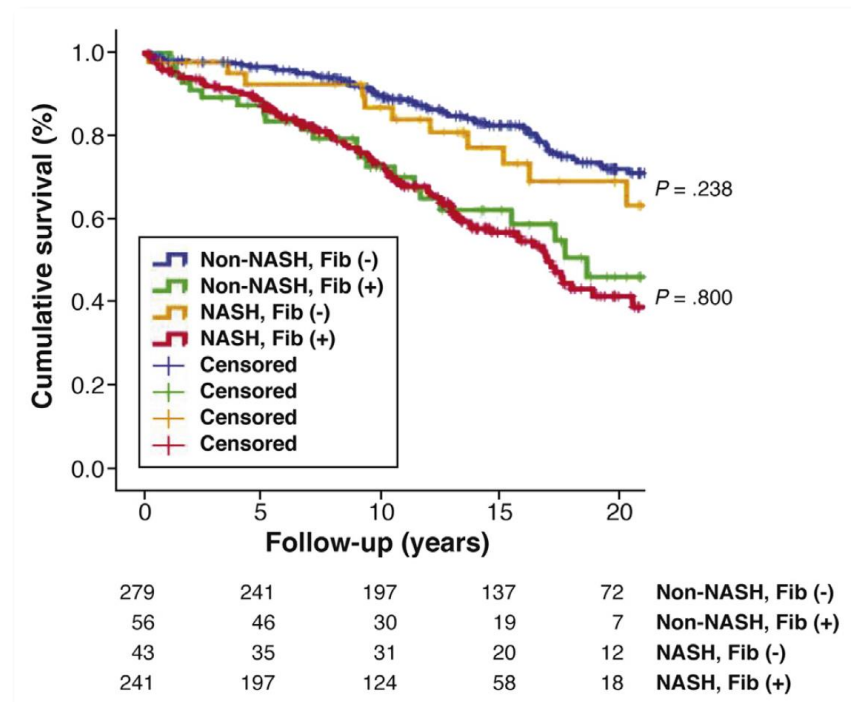
腸内細菌の小胞は肝硬変時に侵入し、
肝障害を悪化させる

線維化は予後を決める重要な指標



Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease

Paul Angulo,¹ David E. Kleiner,² Sanne Dam-Larsen,³ Leon A. Adams,⁴ Einar S. Bjornsson,⁵ Phunchai Charatcharoenwitthaya,⁶ Peter R. Mills,⁷ Jill C. Keach,⁸ Heather D. Lafferty,⁷ Alisha Stahler,⁸ Svanhildur Hafliadottir,⁹ and Flemming Bendtsen¹⁰



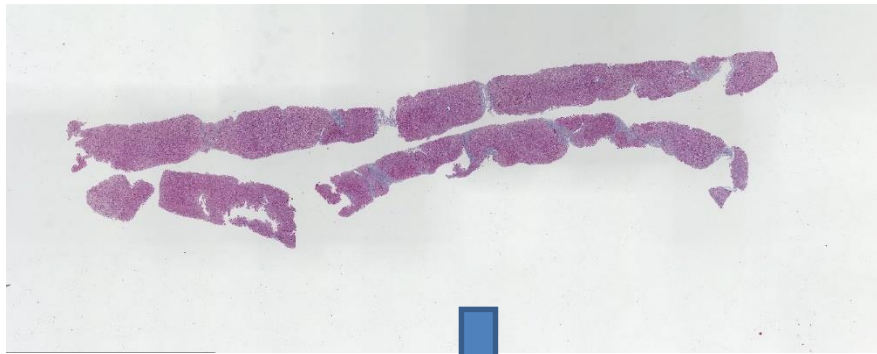
線維化の進展がNAFLDの予後を決める

細胞外小胞のマーカーとしての可能性

- 今回新たな線維化マーカーのFibulin-4の可能性
- 測定計の開発が向上すれば新たなマーカーは更に増える

細胞外小胞をきっかけとしたバイオマーカーの開発
測定系の向上を通して新たなマーカーの探索
臨床への方方向性を探って行きたい

肝線維化の評価に関して

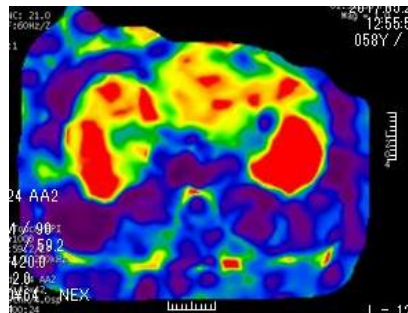
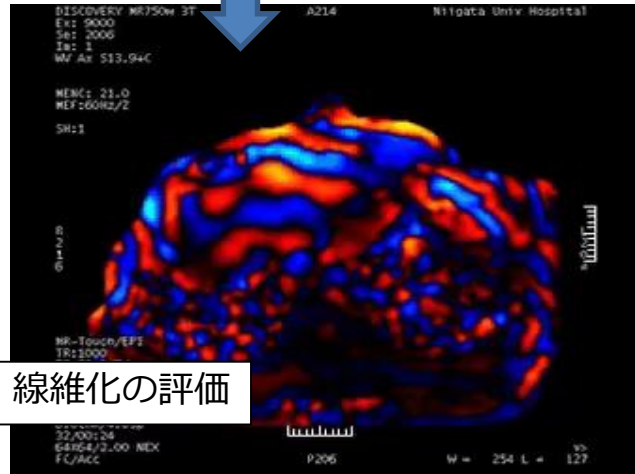


→ 血小板・IV型コラーゲン・7S・ヒアルロン酸
P-III-P・M2BPGi・ATX

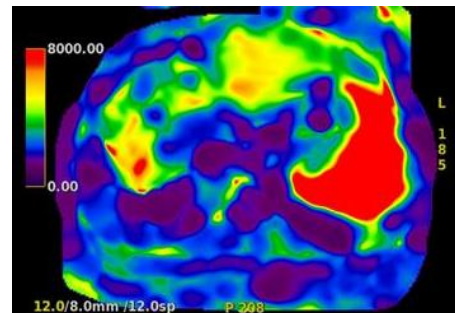
→ FIB-4(数式)

→ フィブロスキャン

→ 超音波



7129 Pa



5826 Pa

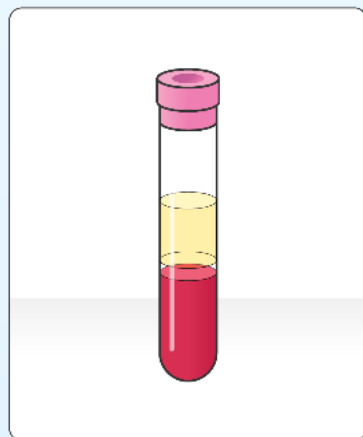
欠点

炎症を合わせて反映してしまう
線維化の現時点での進行が？
大型の機器を要する
計測ごとの誤差が大きい

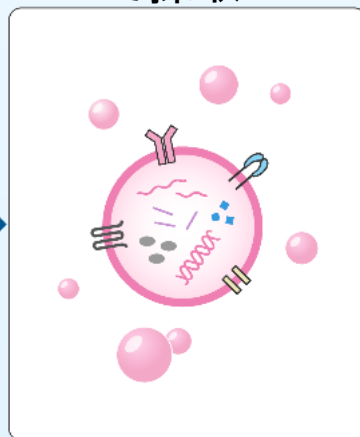
今回新たな線維化マーカーのFibulin-4の開発

エクソソーム解析の流れ

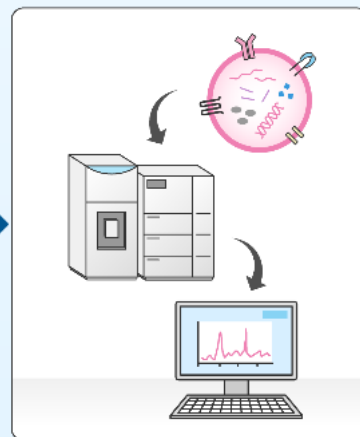
血清を使用
(代表的な少数検体)



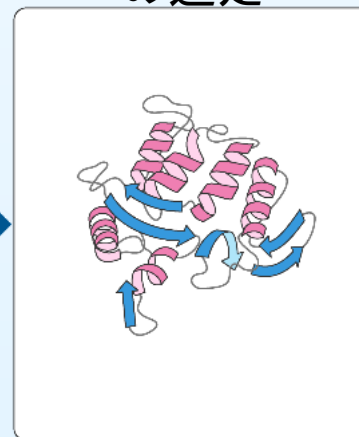
MagCapture
で採取



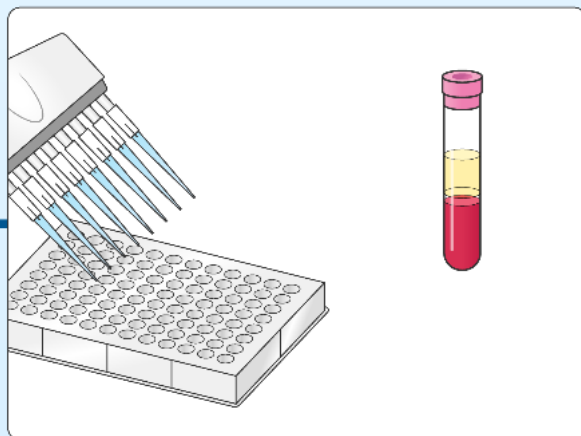
プロテオミクス



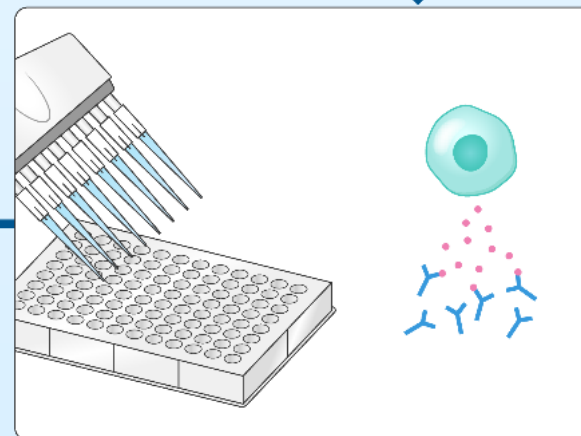
候補タンパク
の選定



臨床データ
解析



多検体血清を用いて
ELISAにて測定



目的タンパクの
発現するcell line
を用いて抗体の検定

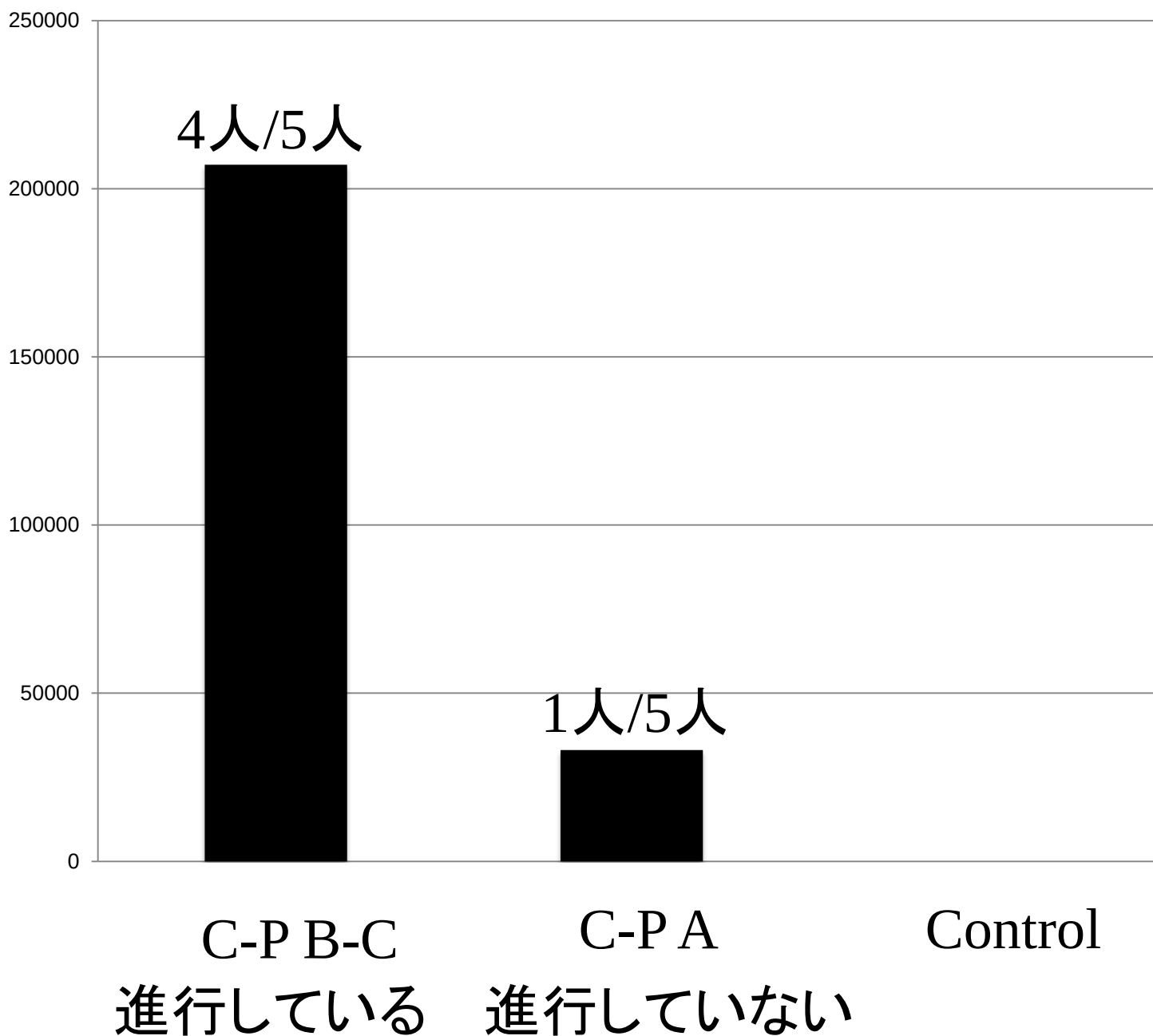
プロテオミクス解析

Mag captureを用いて患者血清中のエクソソームを
回収し、がん研究会の植田幸嗣先生の下で
プロテオミクスをおこなって頂いた。

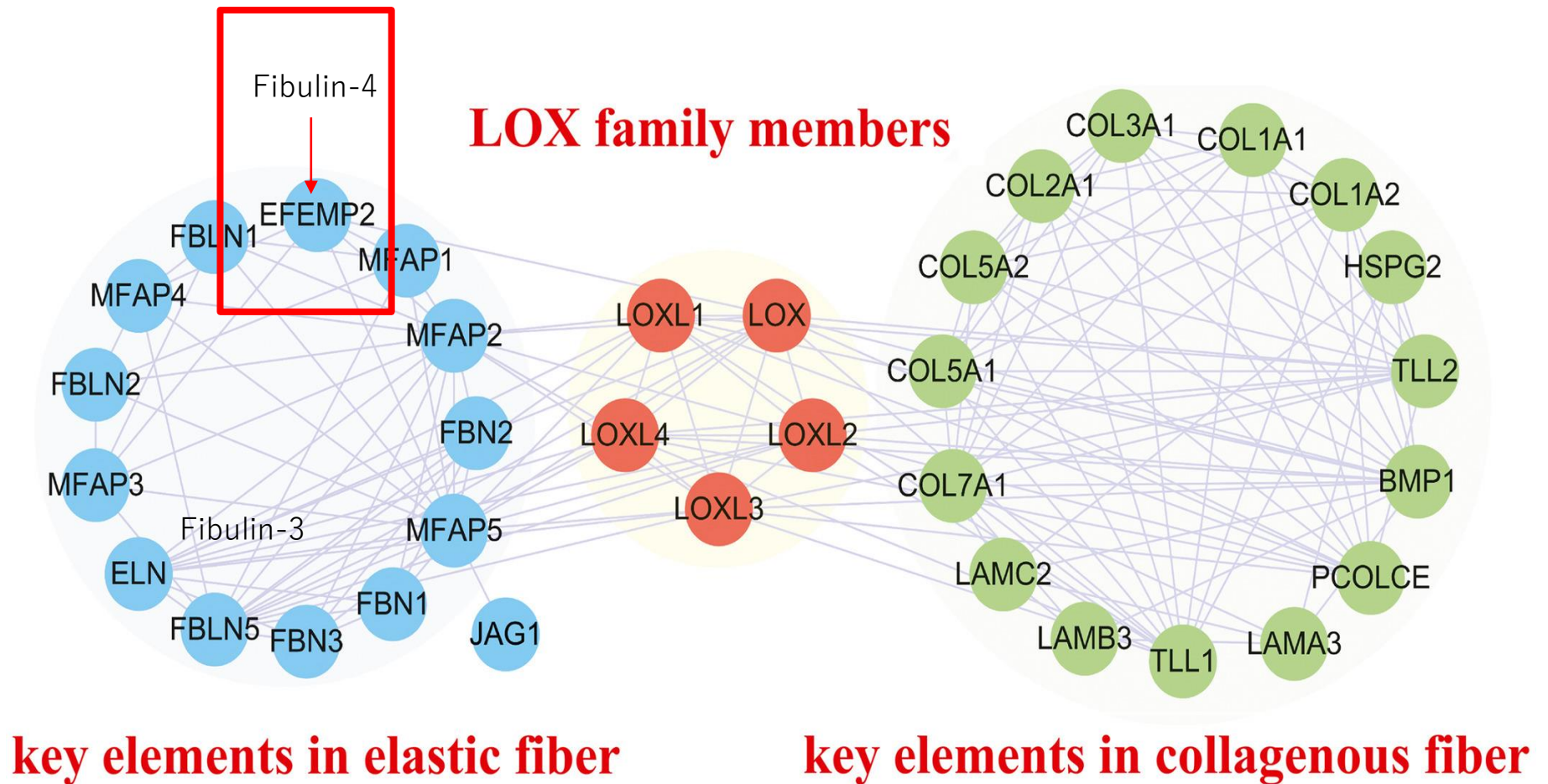
【Human】

- 進行肝硬変患者 (Child-Pugh Grade B-C) : 5名 2,182個
- 進行していない肝硬変患者 (Child-Pugh Grade A) : 5名 2,198個
 - コントロール : 5名 2,068個

EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2; EFEMP2 (Fibulin-4; FIBL-4)の発見



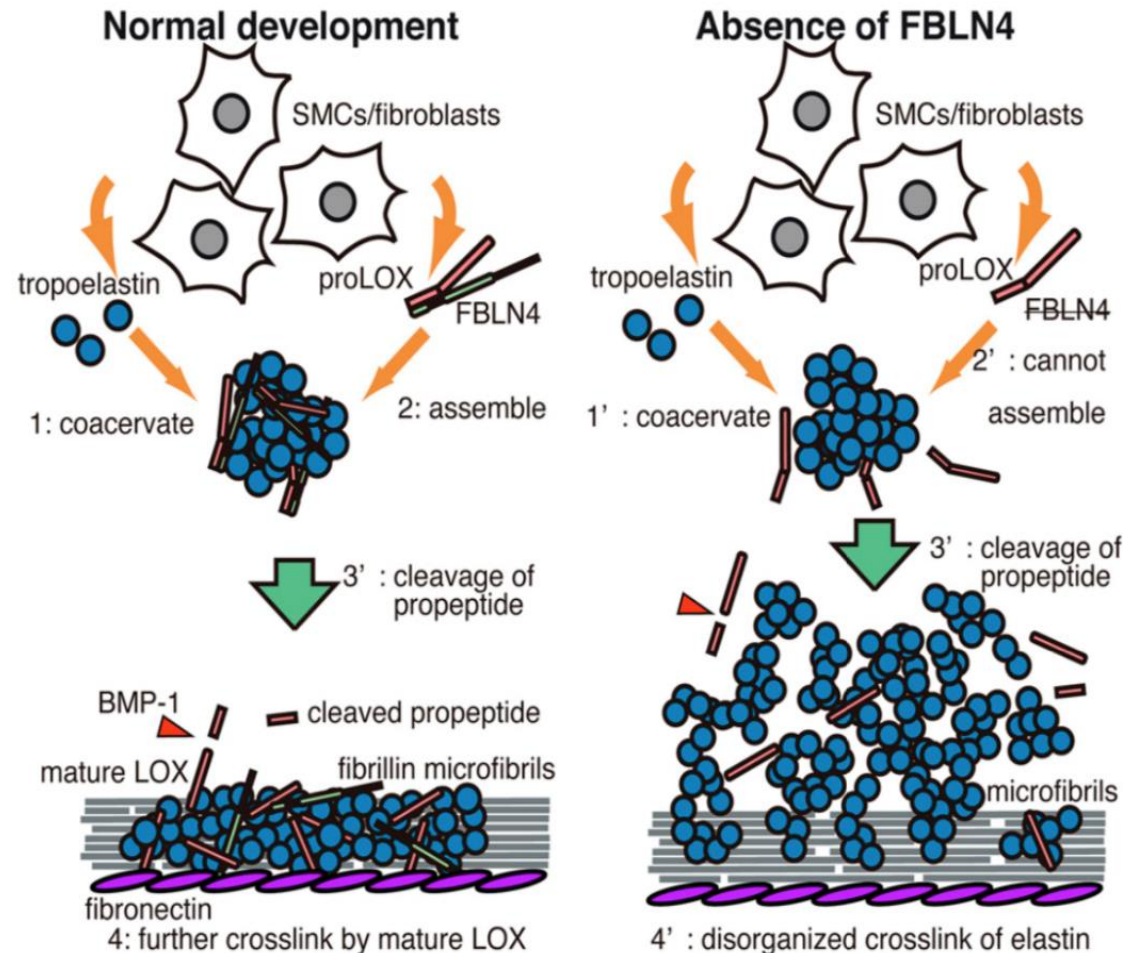
Fibulin-4はLOX familyに属する



Hepatology, Volume: 72, Issue: 2, Pages: 729-741, First published: 16 March 2020, DOI: (10.1002/hep.31236)

線維性コラーゲンやエラスチンの架橋に関与し、線維化の進行
や線維化回復に対する抵抗性に強く関与している。

Fibulin-4はLOX familyに属する



細胞外マトリックスのフィブリンファミリーの一つで、タンパク質間相互作用に関与する

Matrix Biol. 2014 July ; 0: 142-149

弾性線維を形成に不可欠であり、正常な血管、肺、皮膚の発達に必要なためFibulin-4が欠損しているマウスは周産期に死亡し、発現が低下するマウスは動脈瘤を発症する

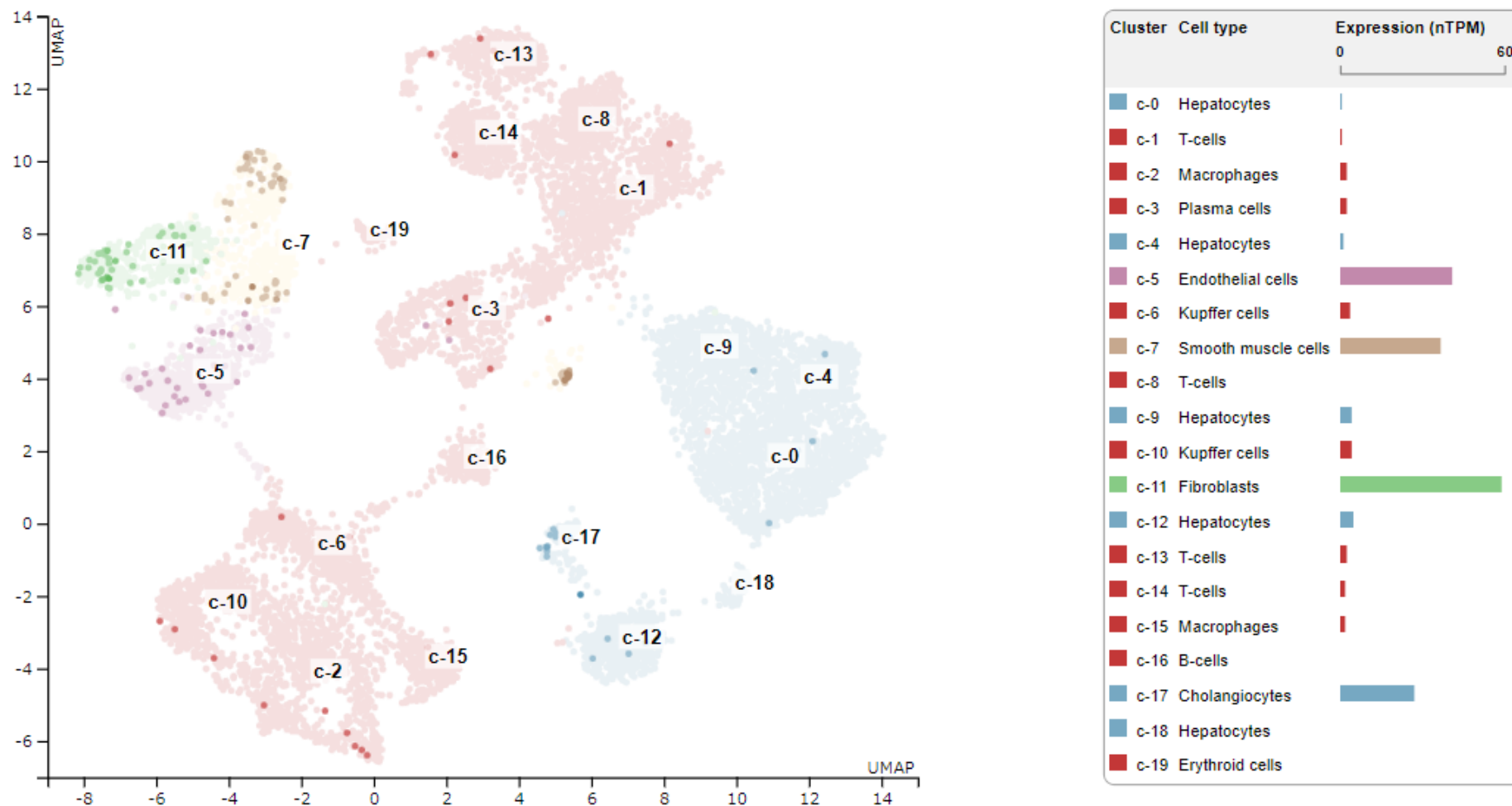
Journal of Biological Chemistry. 2009;284(36):24553-67.

Fibulin-4は、エラスチン分子の架橋を触媒する Lysyloxidase(LOX)のpropeptideとの相互作用を介してLOXをtropoelastinにつなぎ、弾性線維の適切な成熟を促進する上で特定の役割を示す

PNAS November 10, 2009 106 (45) 19029-19034

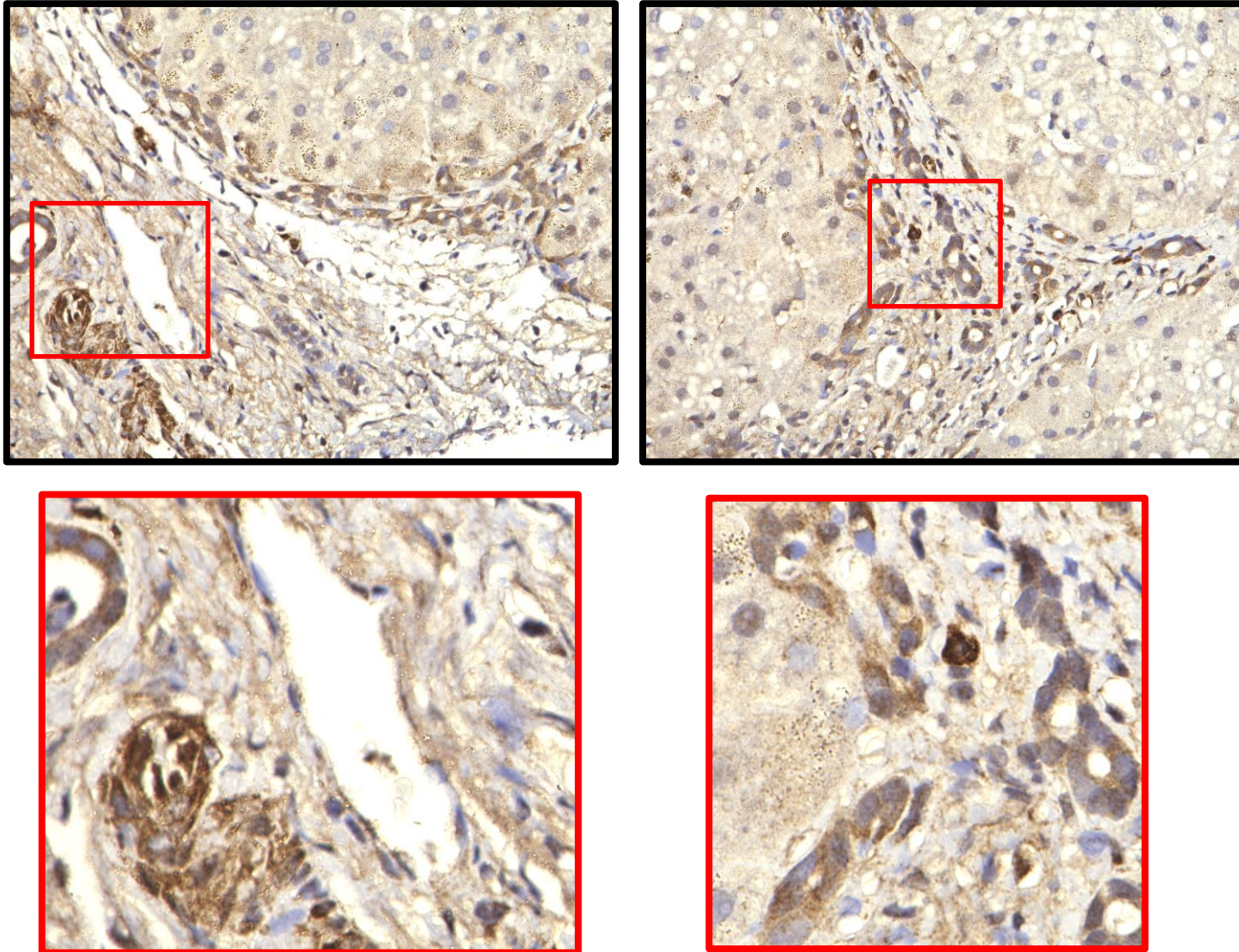
線維化回復に対する抵抗性に強く関与する可能性など
従来にはない特徴を持つ

Protein atlasでの肝臓内での発現 (Single cell RNA解析)

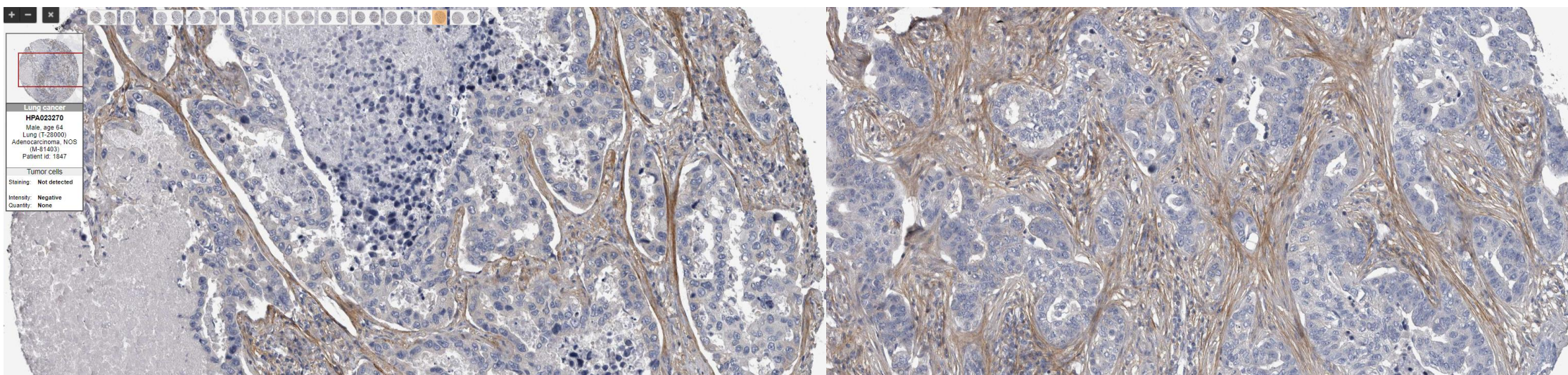


肝臓内では胆管や間葉系、血管内皮などに発現していそう

肝臓内での発現；免疫組織染色



肝臓内では胆管や間葉系、血管などに発現している



肺癌

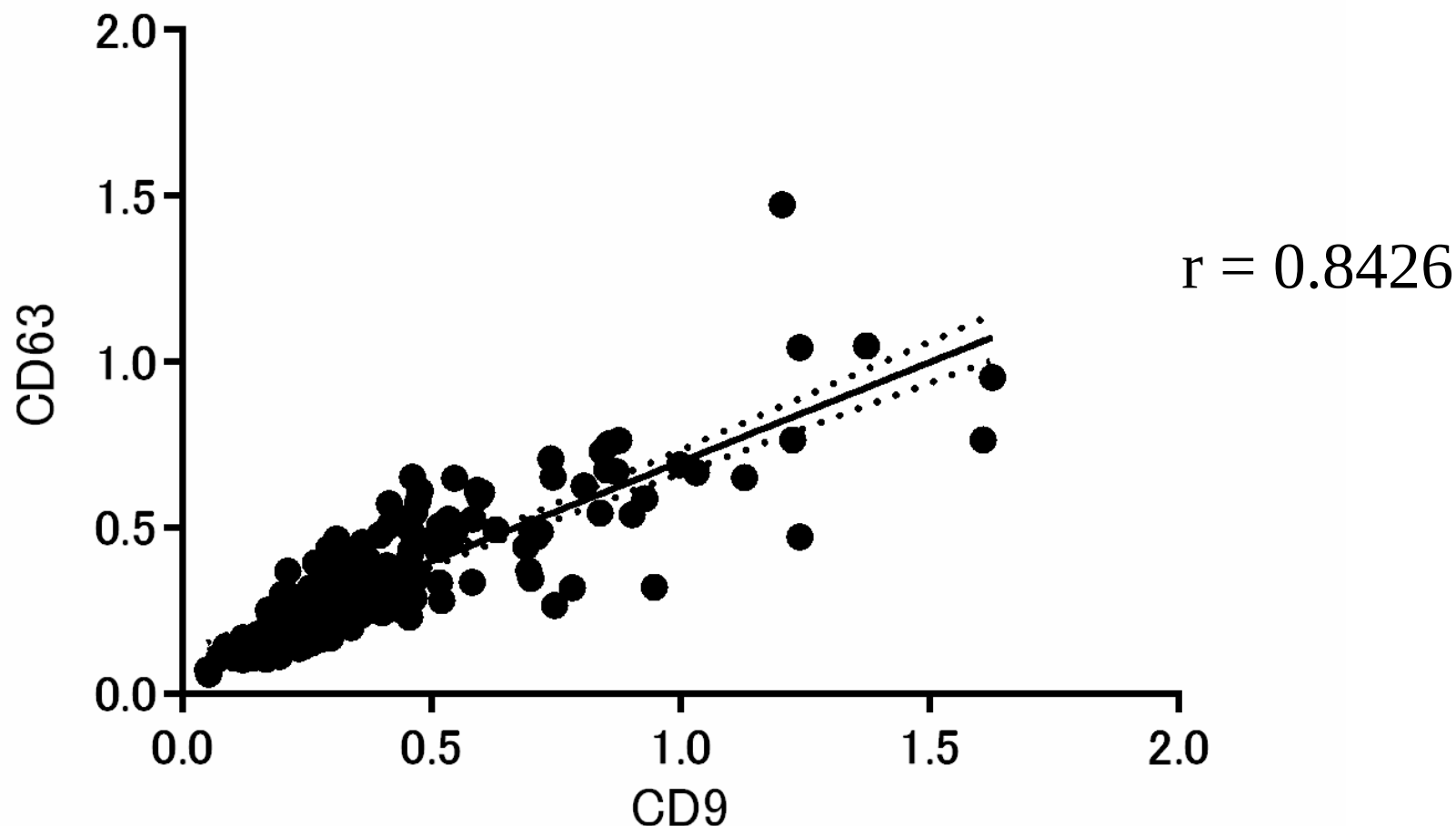
膵癌

線維が多い事で知られている、膵癌や肺癌の一部にも発現しており今後、癌の線維化が多い癌のマーカーになり得る可能性

CD9とCD63の関係(測定系の信頼性)

CD9-Capture ヒトエクソソームELISAキットを使用。CD63は抗体を変えて測定

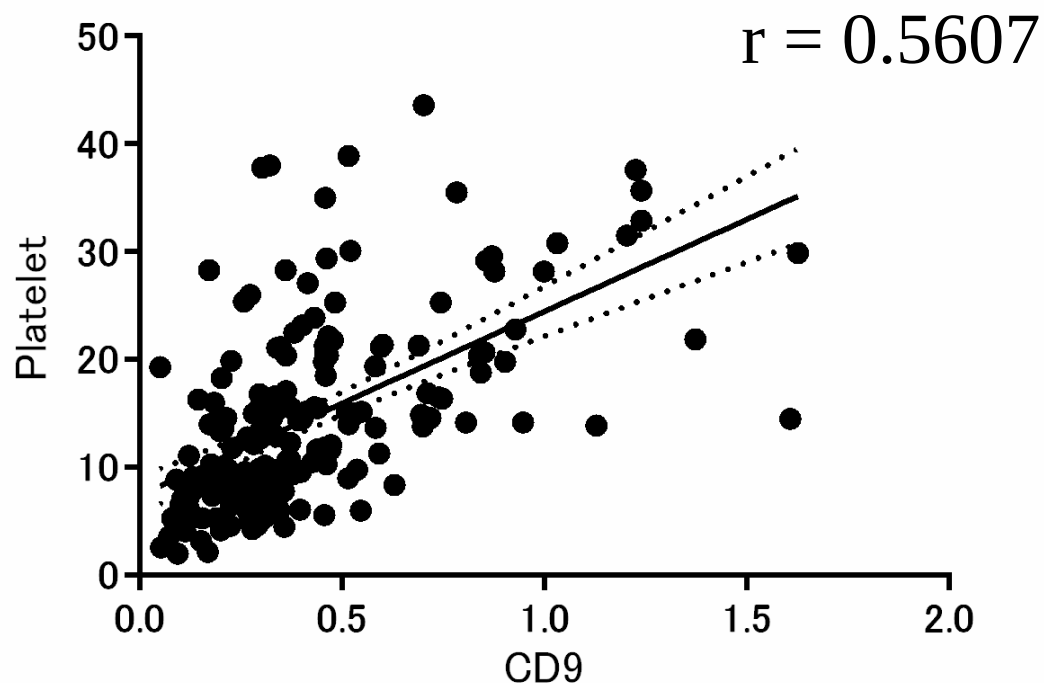
CD9とCD63の相関



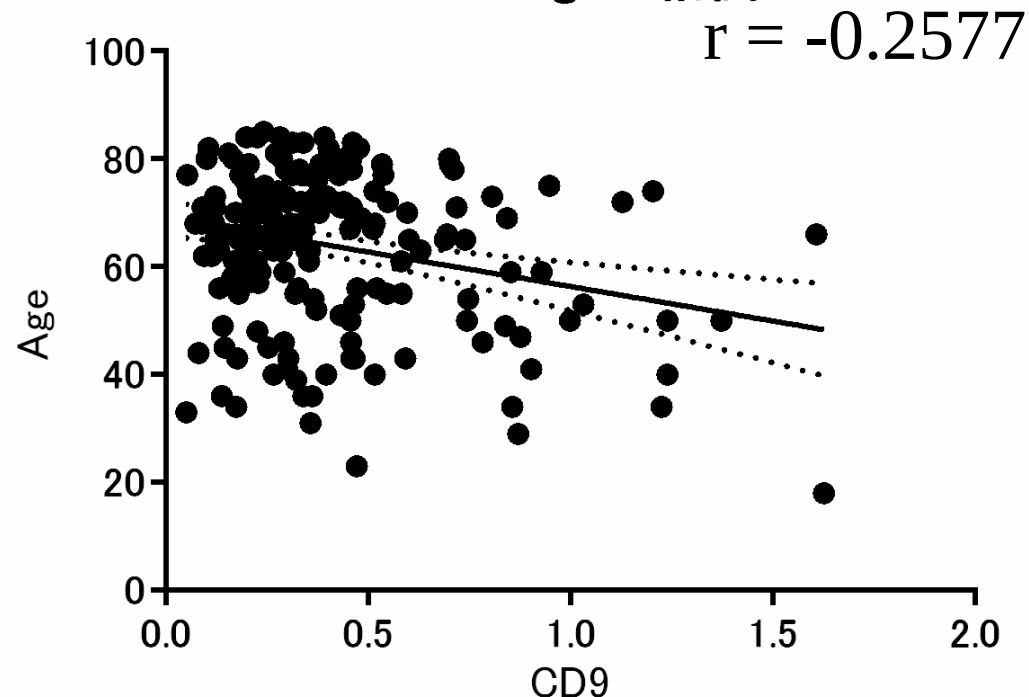
細胞外小胞(エクソソーム)に発現するCD9、63は相関性よく測定できる

CD9と血小板 (Platelet) 及びAgeとの関係

CD9とPlateletの相関



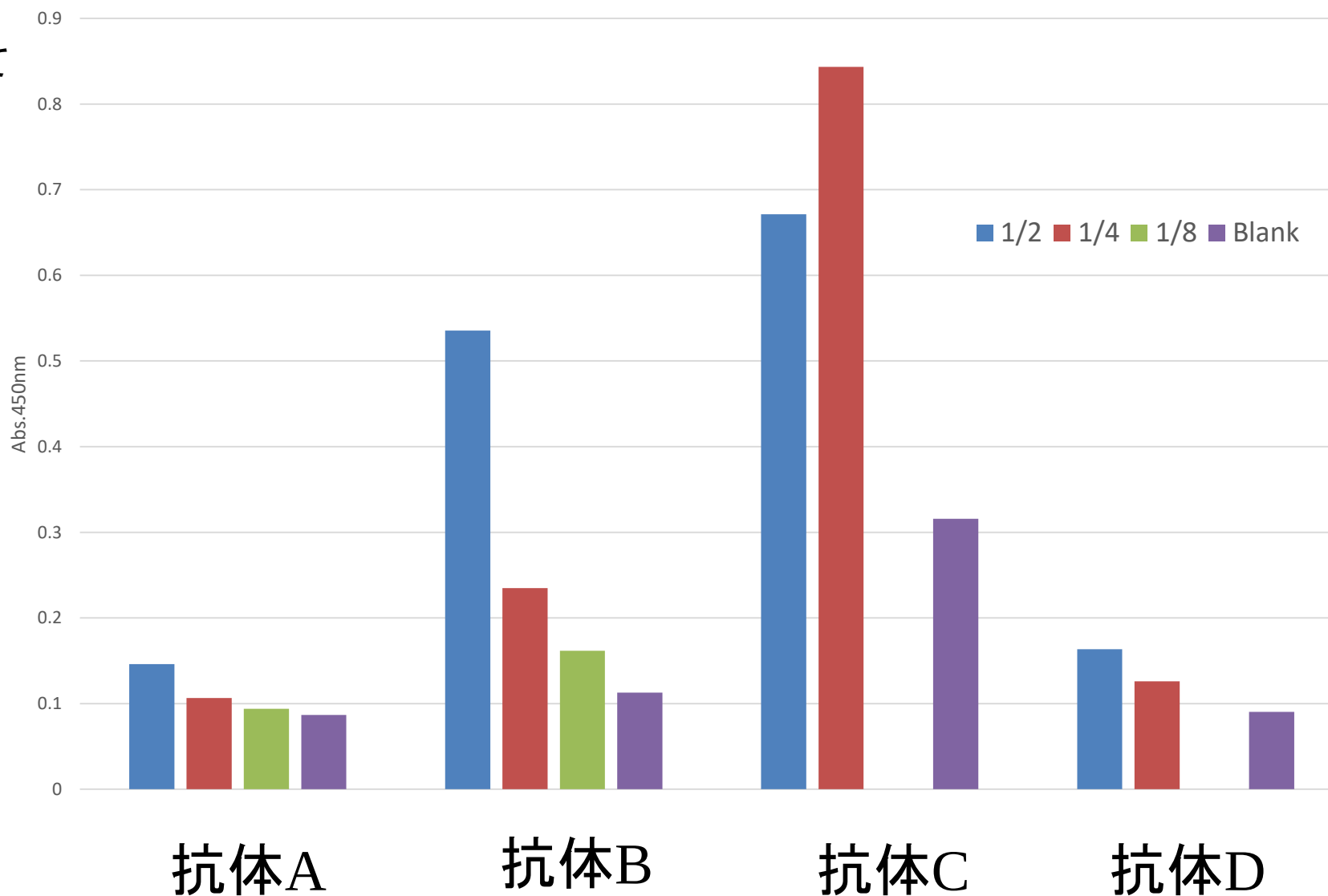
CD9とAgeの相関



細胞外小胞は血小板数と関連がある、年齢は高いほど低い傾向

一次抗体の選定

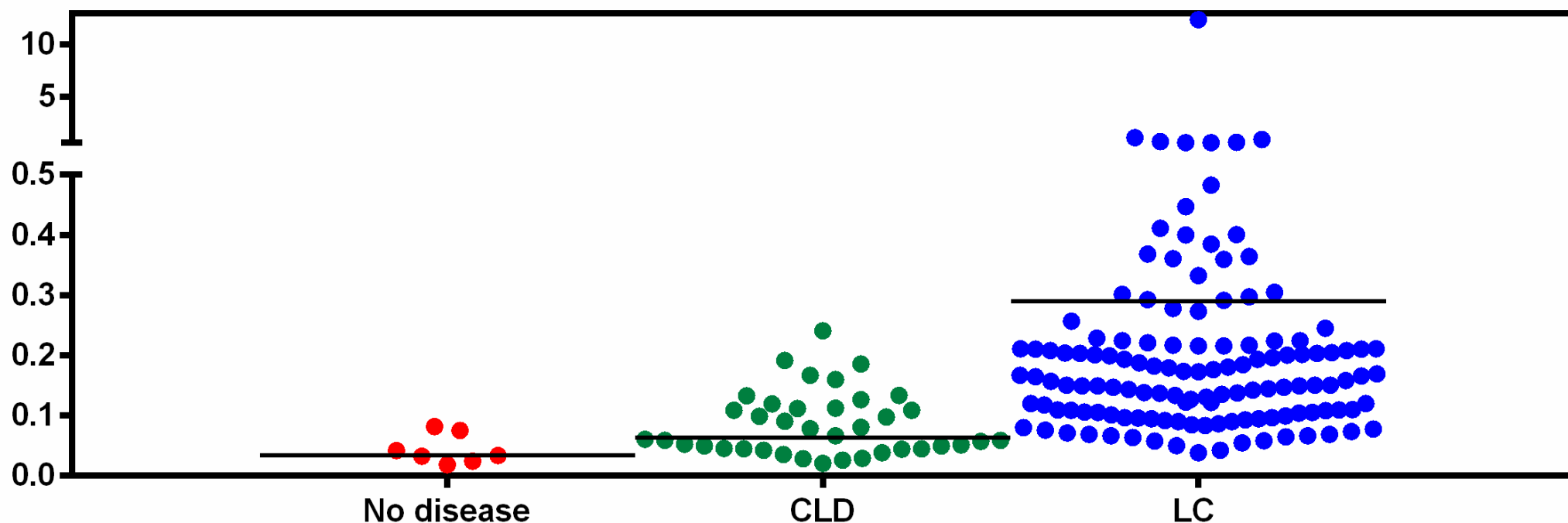
TIG3を用いて
検討



測定した患者背景

疾患なし	7人
肝疾患なし(他疾患)	16人
慢性肝疾患	38人
肝硬変 Child-Pugh A	肝細胞癌なし 36人
	肝細胞癌あり 29人
肝硬変 Child-Pugh B-C	肝細胞癌なし 39人
	肝細胞癌あり 26人

Fibulin-4/CD9と肝病変での変化



CLD; chronic liver disease; 慢性肝疾患
LC; Liver cirrhosis; 肝硬変

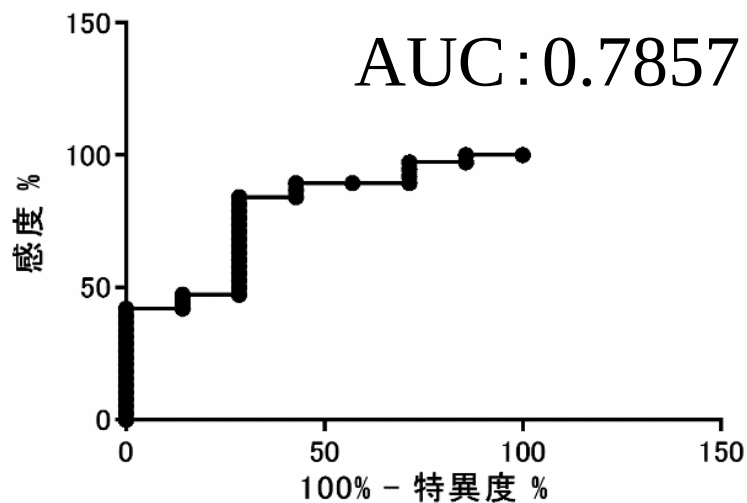
細胞外小胞は一般的に体内から速やかに消失する
細胞外小胞を測定している事でその時々
の線維化の度合いを反映しやすい可能性

ROC曲線

No disease vs CLD

ROC曲線: ROC曲線 -- Fibulin-4/CD9

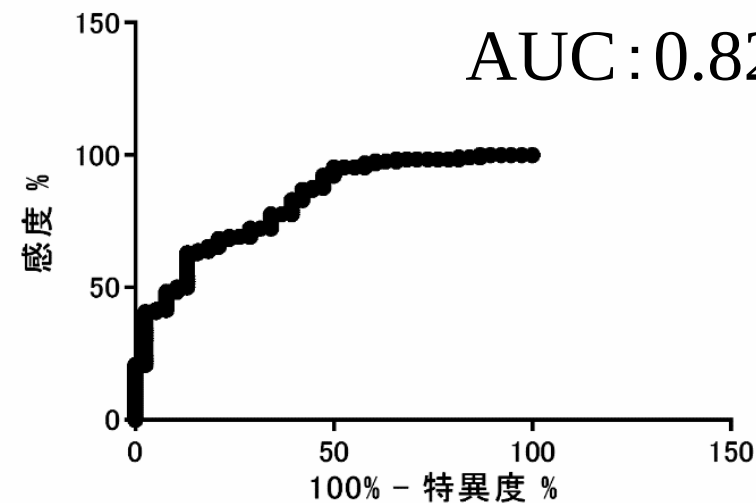
AUC: 0.7857



CLD vs LC

ROC曲線: ROC曲線 -- Fibulin-4/CD9

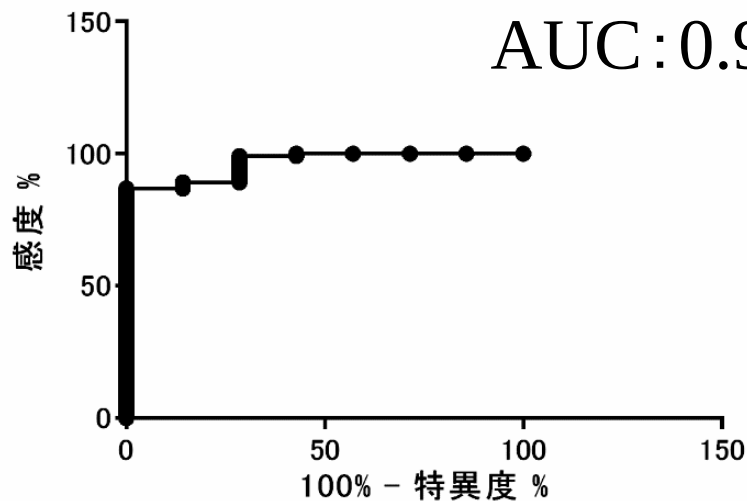
AUC: 0.8206



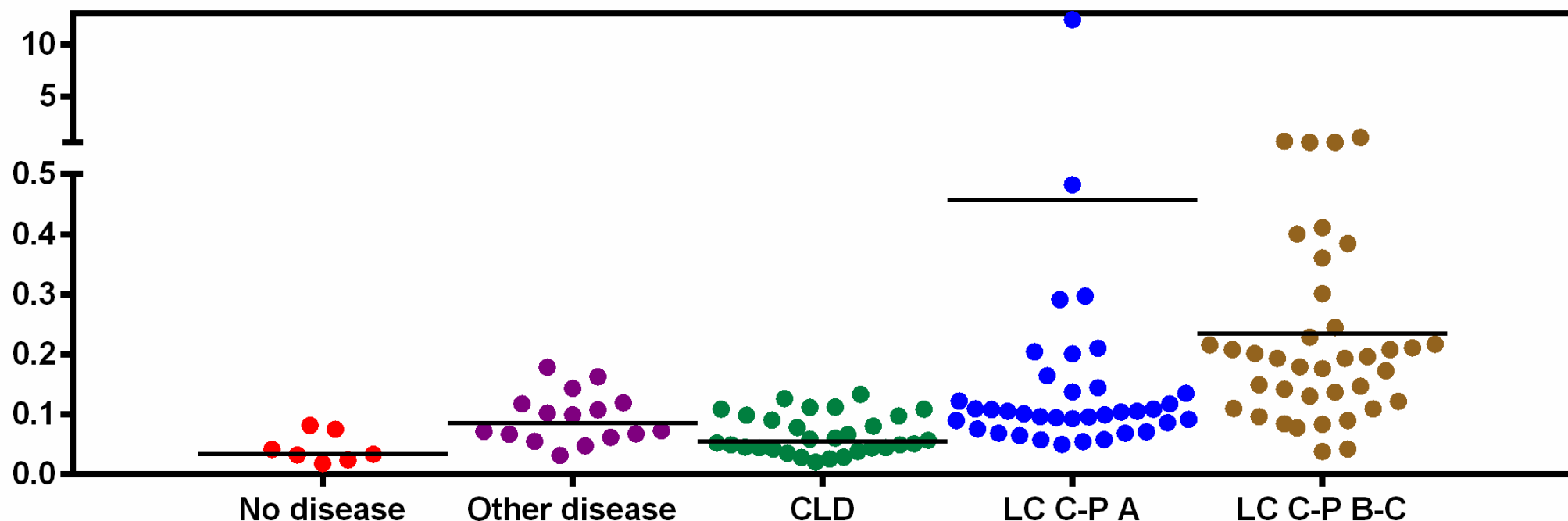
No disease vs LC

ROC曲線: ROC曲線 -- Fibulin-4/CD9

AUC: 0.9648



Fibulin-4/CD9と更に細かい肝病変での変化

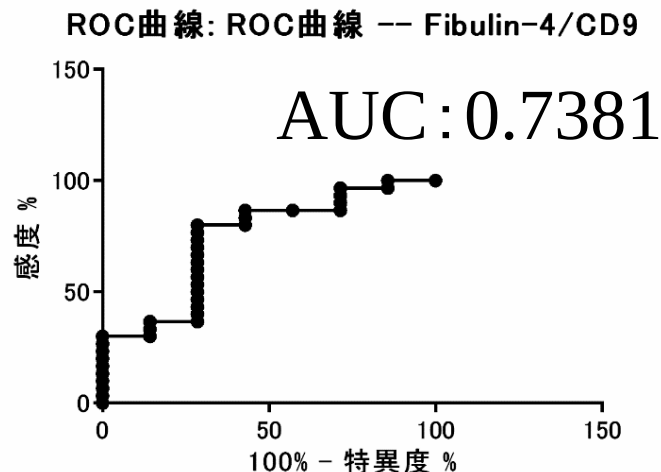


LC C-P; liver cirrhosis Child-Pugh grade X

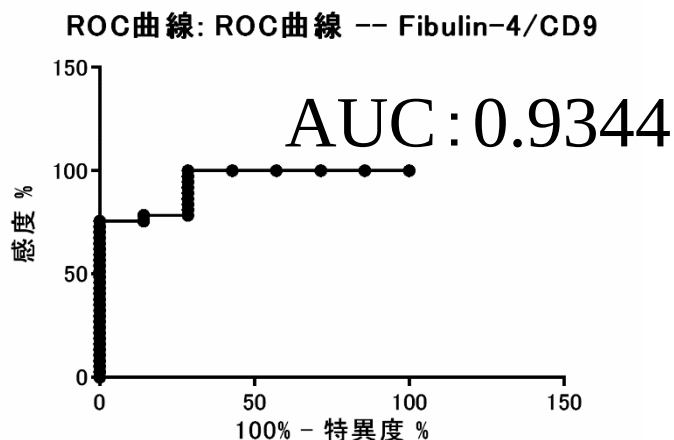
肝硬変が悪化するほど上がってくる。特定の患者では高値になるが、進行がしやすい患者が含まれていた

ROC曲線

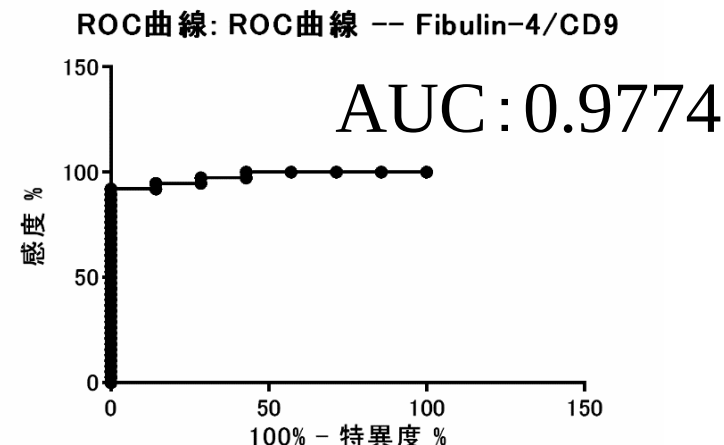
No disease vs CLD



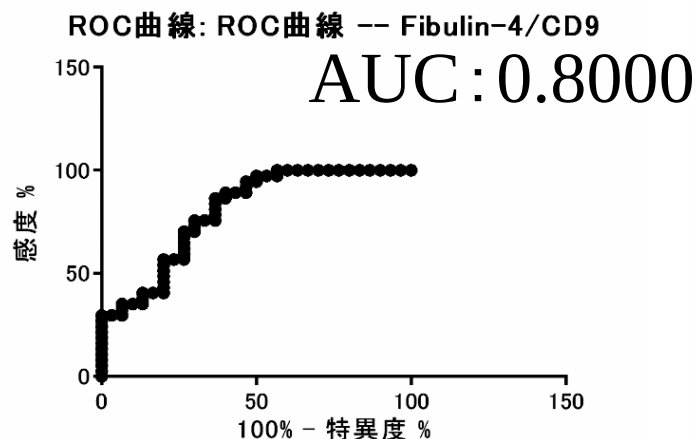
No disease vs CP-A



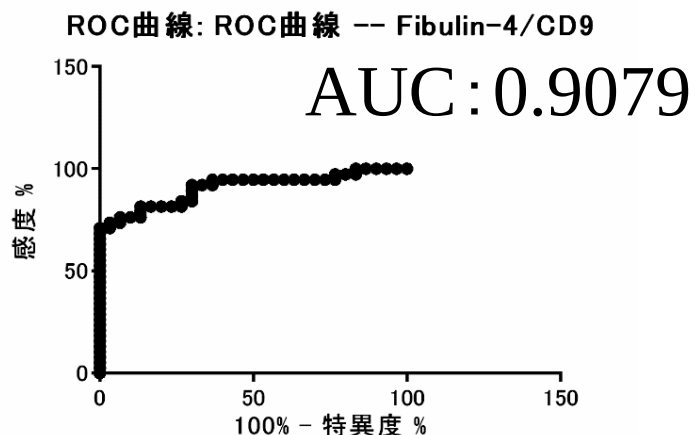
No disease vs CP-B



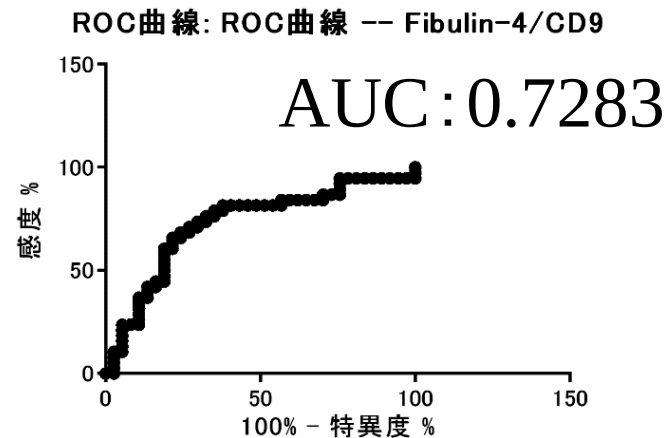
CLD vs CP-A



CLD vs CP-B



CP-A vs CP-B



- ・ 細胞外小胞を測定する事で新たな線維化マーカーの発見に至った。
- ・ 細胞外小胞を測定する事でその時々、強固な線維化の形成を予測できる。肝硬変でも進行しやすい患者を見抜ける可能性
- ・ 従来の測定法の問題であった、炎症の影響を受けない可能性がある。

想定される用途・実用化への課題・企業への期待

- ・ 本技術の特徴を生かすためには、**企業の持つ測定系の活用ができればありがたい**
- ・ Fibulin-4以外に、**細胞外小胞マーカーの候補は多数あり、同時に開発できるとありがたい**
- ・ 現在ELISA法で発現する表面蛋白を測定しているが、**細胞外小胞内の蛋白の測定系があればありがたい**

本技術に関する知的財産権

- ・ 発明の名称：臓器線維症の診断を補助する方法、被験者における臓器での強固な線維の構築しやすさを予測する方法、及び、臓器線維症の診断用試薬
- ・ 出願番号：特願2023-014537
- ・ 出願人：国立大学法人新潟大学、公益財団法人がん研究会
- ・ 発明者：土屋 淳紀、寺井 崇二、植田幸嗣

お問い合わせ先

新潟大学 社会連携推進機構

T E L 025-262 - 7554

F A X 025-262 - 7513

e-mail onestop@adm.niigata-u.ac.jp