

学位論文（博士）

血漿細胞外小胞中の vWF による
うつ病の病相予測

氏名 山田 典宏

所属 山口大学大学院医学系研究科
医学専攻 高次脳機能病態学講座

令和 7 年 1 月

目 次

1. 要旨	2
2. 研究の背景	2
3. 目的	4
4. 方法	4
(1) 対象	4
(2) 方法	4
(3) 解析	7
5. 結果	7
6. 考察	11
7. 結語	12
8. 謝辞	12
9. 参考文献	12
10. 図表	17

1.要旨

大うつ病性障害（MDD）の臨床診断は依然として気分に関する様々な症状の主観的評価に依存しており、客観的な評価は含まれていないのが現状である。細胞外小胞（EV）は細胞間のシグナル伝達に関与しており、がんや自己免疫性疾患、神経変性疾患などの早期診断のための血液由来のバイオマーカーとなりうるということが知られている。さらに、中枢神経系から放出された EV は血液脳関門（BBB）を通過することができるため末梢血より検出することができ、精神疾患への応用の可能性も示唆されている。そのため、血液中の EV の特徴を解明することは MDD 患者のうつ状態を反映する診断バイオマーカーを見出すことにつながる可能性がある。本研究では、MDD 患者から抽出した血漿 EV の糖鎖構造に関する結果を報告する。MDD 患者と健常対照者（HC）の血漿からサイズ排除クロマトグラフィーを用いて EV を分離し、レクチンブロットを用いて糖鎖構造を比較した。N-アセチルグルコサミン（GluNAc）、N-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）に結合するレクチンである wheat germ agglutinin（WGA）の濃度は MDD 患者のうつ状態では対照群と比較して有意に低下していた。また、プロテオーム解析の結果、WGA によって認識される von Willebrand 因子（vWF）が重要な因子であることが明らかになった。さらに、WGA 結合 vWF 抗原（シアル酸化 vWF）は、MDD 患者と HC の識別に加えて同一 MDD 患者におけるうつ状態、寛解状態の区別にも有用であることが示唆された。本研究の結果から、血漿 EV に含まれる糖タンパク質の変化パターンは治療中のうつ病患者の病相評価の有用性を示唆された。

2.研究の背景

うつ病は、メンタルヘルスにおいて世界中で大きな障害となっている代表的な疾患である¹。the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 11th（ICD-11）や the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth Edition Text Revision（DSM-5-TR）のような国際的なコンセンサスを得た診断基準においても大うつ病性障害（MDD）の診断は症状の組み合わせによる操作型の診断方法が用いられている。しかし、これらの診断基準には客観的な検査所見が含まれていない²。MDD の診断や症状評価は医師の臨床経験や患者の自己評価といった主観的な情報に依存しており、誤診につながる可能性が否定できない³。この状況を改善するために、MDD の

病態生理を解明し、新たな診断マーカーを発見することが強く望まれている。これまでの研究からプロテオミクス解析を用いることで MDD の病態生理に関与すると考えられている脳機能や炎症、神経可塑性、ストレスに関わるタンパク質の役割を調べるのが可能である。例えば IL-6 や TNF- α 、CRP などの炎症性サイトカインは、MDD 患者において変化を認めており、MDD の炎症性仮説を支持する証拠となっている⁴。また、神経可塑性に関与する脳由来神経栄養因子 (BDNF) と血管内皮増殖因子 (VEGF) の変化も MDD 患者で認めている^{5,6}。さらに、MDD 患者では視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 系の調節異常が多くみられ、ストレス応答や内分泌調整に関与するタンパク質の変化が認められており、これらのタンパク質は MDD 患者における慢性的なストレスの影響を説明する上で役立つ可能性がある⁷。しかし、これらのバイオマーカーを臨床応用するためには、より大規模で多様な集団で検証する必要がある。

細胞外小胞 (EV) は様々な種類の細胞から放出される脂質二重膜からなる小胞でタンパク質、核酸、脂質、代謝産物を含んでいる⁸。EV は細胞間のシグナル伝達に関与しており細胞間コミュニケーションを研究するための貴重なツールとされている⁹。また、がんや自己免疫性疾患、神経変性疾患などの早期診断のための血液由来のバイオマーカーとなりうることで報告されている^{10,11}。さらに、中枢神経系から放出された EV は血液脳関門 (BBB) を通過するため、末梢血で検出可能であり、精神疾患への応用の可能性も示唆されている¹²。これまでの研究では MDD の発症における中枢神経系 (CNS) の代謝経路、神経炎症、神経可塑性に関連する EV 中のタンパク質やマイクロ RNA に焦点が当てられている¹³⁻¹⁵。しかし、MDD の診断のために末梢血から EV を抽出するための標準化されたプロトコールはまだ確立されておらず、実験や施設間でばらつきが生じる可能性がある。グリコシル化されたタンパク質、脂質、神経伝達物質、ホルモンは細胞間のコミュニケーションにおいて重要な役割を果たしている¹⁶。これらの糖鎖分子は有望な疾患バイオマーカーとして期待されており¹⁷⁻²¹、特に N-グリコシル化は生物学的過程、特に免疫系において重要な機能を担っている。MDD の発症や経過は免疫応答の変化と関連が示唆されていることから、血清や血漿中の N-結合型糖鎖の形成が、女性のうつ状態の診断や抗うつ薬への反応性と関連することが報告されている^{22,23}。また我々はこれまでに MDD モデルマウスおよび MDD 患者の血漿中のレクチンアレイ解析により、糖鎖構造の

変化が診断マーカーとなる可能性が示唆されることを報告している²⁴。さらに、EVはその表層や内部に糖タンパク質や糖脂質を有しており、その糖鎖パターンは疾患や生物学的過程によって変化することが知られている²⁵。しかし、うつ状態におけるEVの糖鎖形成の重要性については現時点でほとんど解明されていない。

3.目的

これらの知見をふまえ、本研究では、うつ状態あるいは寛解状態にあるMDD患者と健常対照者(HC)との間で血漿中EVの糖鎖パターンが異なるかどうかを検討した。さらにMDD患者に特徴的な糖鎖構造を持つ糖タンパク質を調べた。

4.方法

4.1 参加者

本研究は、山口大学医学部附属病院の倫理委員会によって承認され、ヘルシンキ宣言に従って実施された。なお、研究説明を行った後、すべての参加者から書面によるインフォームドコンセントを取得した。MDD患者およびHCは既報の通りに募集した²⁴。参加者は2012年4月～2013年6月に募集され2014年8月まで追跡された。MDD患者のスクリーニングには、the Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I、日本語版 5.0.0;大坪ら 2005)を含む構造化面接によって鑑別診断が行い²⁶、精神科医によってMDDと診断された患者を対象とした。また、うつ病の重症度はハミルトンうつ病評価尺度(HDSR)²⁷の構造化インタビューガイドを用いて精神科医によって評価され8点以上をMDD患者とした。また、社会機能の評価には、Global Assessment of Functioning Scale (GAF)²⁸を用いた。Mini-Mental State Examination (MMSE)を実施し、認知症の可能性のある患者(スコア<24)を除外した²⁹。DSM-5の完全寛解の基準に基づいて寛解患者を分類した。HCは地域の広告で募集し、M.I.N.I.および臨床面接を用いてスクリーニングを実施した。精神疾患の家族歴を有するHCは除外した。

4.2 ヒト血漿からのEVの抽出

9時から12時の間に被験者の末梢静脈血を採取した。全血(10ml以下)を2400×gで5分間遠心分離を行い、血漿と末梢血細胞を分離した。血漿は1mlずつ分注し、-80℃で保存した。

ヒト血漿から EV を抽出する際、リポタンパクの混入を最小限に抑えるため、qEV サイズ排除カラム (qEVoriginal-70 Gen2,Izon Science) を使用した^{30,31}。500 μ l の血漿を qEV カラムに直接添加し、続いてフィルター処理した PBS を流した。流出液を 400 μ l 毎に 1.5ml チューブに回収した。抽出した EV の各分画を確認するために、EV マーカー (CD9、CD63) および細胞質マーカー (シトクロム c) に対する抗体を用いてウエスタンブロットを実施した。粒子数、および EV マーカーの濃度が最も高い分画をレクチンブロット、ウエスタンブロット、ELISA に使用した。また、タンパク質濃度の測定には Micro BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた。

4.3 ナノ粒子トラッキング解析 (NTA)

Videodrop (Myriade, Paris, France) を用いて、粒子のサイズ分布と濃度を測定した。各条件における粒子の濃度とサイズを測定するために、各 EV 分画 7 μ l を使用した。マクロ粒子の除去のため閾値は 4.2 に設定し、各フレームの露光時間は 0.90ms とした。各条件で 100~300 個の粒子を測定した。

4.4 レクチンブロット

Mem-PER Plus タンパク質抽出試薬 (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、EV からタンパク質を抽出した。SDS-PAGE により 1 レーンあたり 400ng のタンパク質を泳動し、分離したタンパク質をポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写した。その後、ビオチン化レクチンキット 1 (#BK-1000,Vector Laboratories, CA,USA) をインキュベートした。洗浄後、HRP-ストレプトアビジン (Proteintech Group Inc, IL, USA) を 1:5000 に希釈し、室温で 20 分間インキュベートした。メンブレンを検出試薬 Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva, MA, USA) で処理した後、Amersham Imager 680 (Cytiva) を用いてバンドを検出した。バンドの強度解析には Fiji (ImageJ 1.53t) を使用した。

4.5 ウエスタンブロット

EV 中のタンパク質を、DTT を含む SDS サンプルバッファーで 99°C、5 分間加熱 (還元型)、または DTT なしで 37°C、30 分間 (非還元型) インキュベートし変性させた。SDS-PAGE により 1 レーンあたり 400ng のタンパク質を泳動し、分離したタンパク質を PVDF 膜に転写した。PVDF 膜をブロッケーアス (DS ファーマバイオメディアカル, Osaka, Japan) でブロッキングした。一次抗体

(抗 CD63、抗 CD9、抗チトクローム c、抗 vWF) と 4℃で一晩インキュベートした。洗浄後、二次抗体 HRP-linked Rabbit/Mouse IgG (Cell signaling Technology, MA, USA) を 1:5000 に希釈し、室温で 1 時間インキュベートした。その後、メンブレンを検出試薬で処理し、Amersham Imager 680 を用いてバンドを検出した。バンドの強度解析には Fiji (ImageJ 1.53t) を使用した。

4.6 血漿 EV の試験管内での脱グリコシル化酵素処理

HC の血漿 EV (400ng) を α 2-3,6,8 ノイラミニダーゼ (P0720, New England Biolabs, MA, USA) で 37℃、1 時間処理した。粒子トラッキング解析の結果、大部分の EV が酵素消化後も小胞構造を維持していることを確認した。

4.7 酸素結合免疫吸着測定法 (ELISA)

血漿 EV とタンパク質抽出試薬を均等に配合し、EV からタンパク質を分離した。vWF Human ELISA Kit (#EHVWF, Invitrogen, CA, USA) を用いて、メーカーのプロトコールに従って測定を行った。WGA 結合 vWF を定量化するため、サンドイッチ ELISA に使用する 96 ウェルプレートにヒト vWF に対する抗体をコーティングし、PNGaseF (P0704, New England Biolabs) を加えて 37℃で 4 時間インキュベートし N-結合型糖鎖を除去した。洗浄後、EV をプレートに加えて、4℃でインキュベートした。次にプレートを室温に戻し 1:1000 に希釈した WGA と 1 時間インキュベートした後、HRP-ストレプトアビジンで 45 分間インキュベートした。TMB 基質を添加し反応開始から 30 分以内に Flexstation 3 (Molecular Devices, CA, USA) を用いて吸光度を測定した。

4.8 質量分析とプロテオーム解析

EV ライセートを同量の M-PER バッファーで溶解し、DTT を含む SDS-PAGE サンプルバッファーで懸濁した。サンプルを 99℃で 5 分間加熱し、SDS-PAGE で泳動した。ゲルを Silver Stain KANTO III (関東化学, Tokyo, Japan) で染色後、スライスし、37℃でインキュベートしトリプシン処理を行った。回収したペプチドを Ziptip C18 (Merck Millipore, MA, USA) を用いて脱塩化処理を行った。サンプルは nanoLC/MS/MS システム (DiNa HPLC system, KYA TECH Corporation/QSTAR XL, Applied Biosystems) を用いて分析した。得られたデータを Mascot search (MS/MS Ion Search) で解析しタンパク質を同定した。

4.9 透過型電子顕微鏡 (TEM)

JFC-1600 オートファインコーター (JEOL, Tokyo, Japan) を用いて、

Formvar/Carbon コート銅グリッド（日新 EM, Tokyo, Japan）を親水化処理した。PBS 中の EV3 μ l を親水化グリッド上に滴下し、3 分間吸着させた。その後、500 μ l の二重蒸留 H₂O を 4 回連続で滴下して洗浄し、2.0%酢酸ウラニル 30 μ l を 4 回連続で滴下してネガティブ染色を行った。染色後、余分な酢酸ウラニルを濾紙で取り除き、グリッドを風乾させた。撮像には Tecnai G2 Spirit Bio TWIN 電子顕微鏡（FEI,OR,USA）を使用し、Fiji（ImageJ 1.53t）を使用してデータ解析を行った。

4.10 定量化と統計分析

統計解析およびデータの可視化には R ソフトウェア（v4.3.1）を使用した。2 群間の比較には Student's *t* 検定または Mann-Whitney *U* 検定を用いた。また、3 群間の分散の差についてはバートレット検定と一元配置分散分析（ANOVA）を用いた。グラフは平均値 $\pm$ 標準偏差（SD）で示した。診断予測値の推定には R ソフトウェアの pROC パッケージ（v1.18.5）を用い、ROC 曲線下面積（AUC）を解析し、予測モデルの精度を評価した。カットオフ値の推定には（0,1）に最も近い点を用いた。

5.結果

5.1 MDD 患者および HC の血漿 EV の特徴

実験から得られた参加者の人口統計学的データと臨床データを（表 1）に示す。年齢、性別、HDRS、GAF はすべての群間で有意な差を認めなかった。MDD 患者における抑うつ状態と寛解状態それぞれで抗うつ薬のイミプラミン換算量においても有意な差はなかった。

特定のプロトコールに従い、qEV カラムを用いて血漿 EV を抽出した（図 1）。EV はサイズ排除クロマトグラフィーを用いて、HC（n=20）および MDD 患者（n=21）の血漿から抽出した。EV が濃縮された分画を回収するために、BCA タンパク質アッセイを用いてタンパク質濃度を測定し、さらに EV マーカーである CD63 と CD9 に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、血漿タンパク質は F7-9 よりも F10-12 で多く検出された。一方、EV 特異的マーカーである CD63 および CD9 がより発現したのは F7-9 であったため、本実験では F7-9 の分画を使用した。

うつ状態における血漿 EV の特徴を評価するため、MDD 患者と HC の血漿

EV をそれぞれウエスタンブロットを行い、CD63 と CD9 の発現を検出した (図 S1)。精製された EV を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察したところ、MDD 患者と HC に共通する形態が認められた (図 2A)。粒度分布の解析により、各サンプル群の EV サイズは 50~300 nm の範囲にあり、150 nm 付近にピークを示すことが確認された (図 2B)。さらに、EV の粒子径と粒子数は、MDD 患者と HC で類似していた (図 2C)。一方、MDD 患者の血漿 EV 中のタンパク質量は、HC よりも有意に減少していた。同一患者の抑うつ状態と寛解状態で、粒子径、粒子数、タンパク質濃度を比較したところ、統計学的に有意な差は認めなかった (図 2D)。これらの結果から、血漿中 EV のタンパク質量は、うつ病急性期に減少または変化する可能性が示唆された。また、寛解期には血漿 EV のタンパク質濃度の増加は認められなかったものの、抗うつ薬などの要因により機能的なタンパク質組成が変化している可能性があると考えられる。

5.2 抑うつ状態の MDD 患者における EV の糖鎖パターンの解析

うつ状態の MDD 患者における EV の糖鎖構造を明らかにするため、レクチンブロットを用いて糖鎖構造を解析した。各レクチンが結合する特異的な糖鎖構造を (表 S1) に示す。血漿 EV 中には多様なタンパク質が混在していることが明らかとなった。*Ulex europaeus* agglutinin 1 (UEA-1)、*Arachis hypogaea* agglutinin (PNA)、Soybean Agglutinin (SBA)、*Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) のグリコシル化パターンは、MDD 患者 と HC のいずれにおいてもほとんど検出されなかった (図 S2)。一方、Concanavalin A (ConA)、*Ricinus communis* agglutinin (RCA120)、wheat germ agglutinin (WGA) によって認識される糖鎖構造は検出された (図 3A)。次に、ConA、RCA120、WGA を用いたグループ間比較のため、分子量 37kDa から 250kDa 以上の 5 つの識別可能なバンドを選択した (バンド#1~5)。WGA で認識される分子量 250kDa 以上の糖化タンパク質 (バンド#2) の量は、MDD 患者の血漿 EV において HC と比較して有意に減少していた (図 3B、シグナル強度値: HC, 6221.34 ± 1422.17 、DP, 2833.87 ± 1254.72 ; $p = 0.00727$)。さらに、この結果を検証するために、MDD 患者 (n=21) と HC (n=20) の比較を行った。WGA のシグナル強度は、MDD 患者では HC より有意に低かった (図 3C、シグナル強度値: HC 5162.67 ± 3360.85 、DP 1338.97 ± 1898.61 ; $p = 0.00008$)。ROC 曲線解析の結果、WGA のシグナル強度による MDD 患者と HC の特異度は高く、AUC 0.87 (95%CI: 0.76 - 0.97) を示した (図 3D)。次に、抑うつ状態の診断評価を目的として、同一 MDD 患者 (n=10) の抑うつ状態と寛解状態における血漿 EV 中の分子量 250kD 以上の WGA 結合タンパク質量をレクチンブロットで比較した (図 3E)。その結果、

抑うつ状態にある患者の血漿 EV では、分子量 250kDa 以上の糖タンパク質のシグナル強度が、寛解状態の患者と比較して有意に低かった（図 3F、シグナル強度値：DP, 1390.40 ± 1993.23 and REM, 4723.40 ± 2277.96 ; $p = 0.0040$ ）。さらに、ROC 曲線解析において、血漿 EV のシグナル強度は AUC 0.88 (95%CI: 0.72 - 1.00) を示し、各病相を識別する能力が示された（図 3G）。先行研究では、MDD 患者と HC の末梢血から得た白血球を用いたレクチンアレイの結果を報告²⁴しており、その結果では、ConA、RCA120、WGA などの異なるシアル酸結合性レクチンによる MDD 患者と HC の間に差はなかった（図 S3）。これらの結果から、血漿 EV 中の WGA で検出される糖タンパク質の減少がうつ病の診断および抑うつ状態の評価につながる可能性が示唆された。

5.3 プロテオーム解析による、うつ状態の MDD 患者に特徴的な糖タンパクの同定

WGA は、末端 N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) と N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) を含む糖鎖に結合することが知られている。本研究では、末端 GlcNAc およびシアル酸を含む N-結合型糖鎖を有するタンパク質を特定するために質量分析を実施した。まず、HC の血漿 EV について銀染色を行った（図 4A）。次に、検出されたタンパク質を質量分析により解析し、特徴的なタンパク質として von Willebrand 因子(vWF)を同定した（図 S4）。vWF は、内皮細胞の細胞外マトリックスと血小板表面レセプター複合体との間で分子架橋を形成することにより、血管傷害部位における止血の維持に関与する糖タンパク質である³²。ウエスタンブロットで検出された vWF は、HC と MDD 患者の血漿 EV において分子量 250kDa 以上のタンパク質として検出された（図 4C）。ヒト vWF は末端が負に荷電したシアル酸残基を有することが知られている³³。*in vitro* でシアリダーゼ消化を行ったところ、vWF のレベルが低下し、分子量 250kDa 未満へとシフトした（図 4D）。これらの結果は、血漿 EV が末端シアル酸を有する vWF を含むことを示唆している。

MDD 患者および HC の血漿 EV 中の vWF 濃度を評価するため、ヒト vWF 抗原をサンドイッチ ELISA 法により測定した。その結果、うつ状態の MDD 患者の血漿 EV における vWF 濃度（平均濃度 $0.187 \pm 0.220 \mu\text{g/mL}$, $n=21$ ）は HC（平均濃度 $0.376 \pm 0.143 \mu\text{g/mL}$, $n=20$ ）と比較して有意に低かった（図 4E）。また、抑うつ状態の MDD 患者と HC との ROC 曲線解析では、AUC が 0.77 (95%CI 0.60-0.93) を示した（図 4F）。さらに、血漿 EV 中の vWF 濃度は、

寛解状態になると増加し（平均濃度 $0.572 \pm 0.104 \mu\text{g/mL}$ 、 $n=10$ ）（図 4G）、抑うつ状態と寛解状態の ROC 曲線解析において AUC 0.87（95%CI 0.71-1.00）を示した（図 4H）。これらの結果は、血漿 EV 中の vWF 濃度が、MDD 患者の抑うつ状態の経過と相関していると考えられた。

vWF は、血管障害部位に反応するために、二量体または多量体として血液中に豊富に存在することが知られている³⁰。本研究にて使用した血漿中に存在する vWF は MDD 患者 ($3.998 \pm 0.336 \mu\text{g/mL}$ 、 $n=21$) と HC ($4.072 \pm 0.267 \mu\text{g/mL}$ 、 $n=20$) の間に有意差は認められなかった（図 S5）。したがって血漿 EV 中の vWF 濃度の変動は血漿全体の vWF 量に依存せず、MDD 患者特有の変化である可能性が示唆された。

5.4 WGA-vWF の発現レベルと MDD 患者の状態の相関性

WGA 結合 vWF（WGA-vWF）を含む血漿 EV を、臨床における MDD の診断マーカーとして応用するために、WGA と vWF 抗原の両方を検出するサンドイッチ ELISA システムを構築した（図 5A）。この ELISA では、PNGase F 処理により N-結合型糖鎖を除去した抗 vWF 抗体を 96 ウェルプレートに固定化し、血漿 EV を添加後、ビオチン化 WGA を用いて検出した。本アッセイが WGA-vWF を特異的に検出するものか確認するために、シアリダーゼ処理後に WGA-vWF の吸光度を測定したところ、未処理のものと比較して吸光度が低下していた（図 5B）。したがって、我々が考案した ELISA は、血漿 EV 中の WGA と vWF の両方の濃度を検出するのに有用であることが確認された。本アッセイを用いて、血漿 EV 中の WGA-vWF 濃度がうつ病の診断に利用できるか検討したところ、抑うつ状態の MDD 患者の血漿 EV 中の WGA-vWF 濃度（平均濃度 $0.068 \pm 0.104 \mu\text{g/mL}$ 、 $n=21$ ）は、HC（平均濃度 $0.274 \pm 0.212 \mu\text{g/mL}$ 、 $n=20$ ）と比較して有意に低下していた（図 5C）。さらに、ROC 曲線解析を行ったところ、MDD 患者と HC の AUC は 0.92（95%CI 0.82 - 1.00）を示し、MDD 患者の診断に高い精度を持つことが明らかになった（図 5D）。また、WGA-vWF 濃度は、抑うつ状態（平均濃度 $0.030 \pm 0.029 \mu\text{g/mL}$ ）から寛解状態（平均濃度 $0.419 \pm 0.260 \mu\text{g/mL}$ ）にかけて有意な増加が認められた（図 5E）。抑うつ状態と寛解状態の AUC は 0.98（95%CI 0.93 - 1.00）を示し、寛解状態を診断する高い予測精度を有することが示された（図 5F）。以上の結果から、我々が構築した血漿 EV 中の WGA-vWF 濃度を検出する ELISA 法は、抗 vWF 抗体のみを

用いた ELISA 法よりも高い精度で MDD 患者を判別できることがわかった。

6. 考察

本研究では病相別の MDD 患者および HC の血漿 EV における糖鎖構造をレクチンブロットにより解析した結果、WGA を用いることで MDD 患者と HC が識別でるだけでなく、MDD 患者のうつ状態と寛解状態を評価できる可能性が示唆された。さらに末梢血中の EV 上の vWF が MDD 患者において有意に減少していることがわかった。これは糖タンパク質を含む EV が MDD 患者の状態を反映するバイオマーカーとなる可能性を示唆した初めての報告である。

vWF は A 型ドメインと D 型ドメインを有する大きなマルチドメインタンパク質であり^{34,35}、主に血漿中に存在する内皮細胞と巨核球で産生され³⁶、血小板受容体を介して血小板と結合し凝集を阻止する重要な役割を果たしている³⁷⁻³⁹。多量体 vWF はゴルジ体で構築され、脂質二重膜を介して輸送された後、Weibel-Palade body (WPB) 内に貯蔵される⁴⁰。WPB は EV マーカーでもある CD63 が発現しており、血管内皮細胞から分泌される EV の産生元となっていることが報告されている。したがって、血中に存在する EV 中の vWF は、内皮細胞の WPB から放出された EV 由来の可能性が高いと考えられる。

MDD 患者において vWF の発現が抑うつ症状の原因となっているのかを明らかにする必要がある。慢性ストレスは神経系や内分泌系に様々な影響を引き起こすが⁴³、MDD 患者では、視床下部-下垂体-副腎皮質 (HPA) 軸が亢進し、副腎皮質から分泌されるグルココルチコイド (GC) が高値になることで海馬などの脳部位に影響を与え抑うつ気分を引き起こすことが報告されている⁴⁴。GC は vWF のプロモーター領域に結合し、vWF の発現を促進することが知られており、クッシング症候群では GC と vWF の間に正の相関関係があることが示されている⁴⁵。しかし、本研究において抑うつ状態の MDD 患者では血漿 EV 中の vWF 濃度が減少していることから HPA 軸亢進がこの減少に直接関与している可能性は低いと考えられる。一方、炎症は中枢神経系を介して脳のシグナル伝達系を変化させる。例として、脳の免疫系を制御するミクログリアから分泌される TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカイン⁴⁶⁻⁴⁸は、セロトニントランスポーターを活性化させることが報告されている⁴⁹。そのため、MDD 患者はストレス誘発性の炎症性サイトカインの発現レベルが高い⁵⁰。多量体 vWF の分泌は血管損傷に伴う血栓形成時の炎症反応により増加するが⁵¹、血管内皮細胞に

における vWF の発現は *in vitro* において TNF- α によって低下することが示されている⁵²。したがって、炎症経路を介したストレス反応によって血管内皮細胞から血中へ分泌される EV 中の vWF 濃度が低下している可能性が考えられる。本研究の限界として、MDD は臨床症状による表現型であり、双極症や統合失調症などの他の精神疾患と比較されていない点が挙げられる。HC と比較して、血漿中の vWF 濃度は双極症や統合失調症患者において有意に増加しており、2 つの疾患間に差はなかった⁵³。しかし、血漿 EV を用いた MDD や他の精神疾患との比較については報告されていない。MDD における血管内皮細胞の活性化と双極症や統合失調症との相違についての検討は今後の課題である。

7. 結語

本研究では、MDD 患者の血漿中 EV に発着する糖鎖構造と糖タンパク質を調べ、WGA 結合 vWF を同定した。この発見は MDD の病相のバイオマーカーとなりうる可能性を示唆し、内皮機能障害に起因する MDD の病態に独自の知見を提供した。MDD のバイオマーカーとして臨床応用が可能か検証するために、サンプルサイズの拡大と他の精神疾患の鑑別に焦点を当てたさらなる研究が必要である。また、縦断的研究によって、抗うつ薬治療が血漿 EV 中の vWF にどのような影響を与えるか評価し、臨床転帰と相関するかどうか調べる必要がある。

8. 謝辞

山口大学大学院高次脳機能病態学講座の中川伸教授には、研究実施の機会を設けていただき、御指導、御鞭撻頂ましたことを深謝申し上げます。本研究にあたり直接の御指導を戴いた山口大学大学院高次脳機能病態学講座の富永香菜先生に感謝申し上げます。山口大学大学院医学系研究科高次脳病態学講座、山形弘隆先生、原田健一郎先生、樋口文宏先生に御指導頂きました。山口大学大学院医学系研究科病態検査学領域の富永直臣先生、宮城雄太さん、新野千宏さんに感謝申し上げます。また、実験のサポートいただいた古林亜由美さんに感謝申し上げます。最後になりますが、本研究にご協力いただいた被験者の方々に感謝申し上げます。

9. 参考文献

1.Herrman, H. *et al.* Reducing the global burden of depression: a Lancet–World Psychiatric

- Association Commission. *The Lancet* vol. 393 e42–e43 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32408-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32408-5) (2019).
- 2.Malhi, G. S. & Mann, J. J. Depression. *The Lancet* vol. 392 2299–2312 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31948-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31948-2) (2018).
 - 3.Mitchell, A. J., Vaze, A. & Rao, S. Clinical diagnosis of depression in primary care: a meta-analysis. *www.thelancet.com* 374, (2009).
 - 4.Osimo, E. F. *et al.* Inflammatory markers in depression: A meta-analysis of mean differences and variability in 5,166 patients and 5,083 controls. *Brain, Behavior, and Immunity* vol. 87 901–909 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.02.010> (2020).
 - 5.Cavaleri, D. *et al.* The role of BDNF in major depressive disorder, related clinical features, and antidepressant treatment: Insight from meta-analyses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* vol. 149 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105159> (2023).
 - 6.Tseng, P. T., Cheng, Y. S., Chen, Y. W., Wu, C. K. & Lin, P. Y. Increased levels of vascular endothelial growth factor in patients with major depressive disorder: A meta-analysis. *European Neuropsychopharmacology* 25, 1622–1630 (2015).
 - 7.Kunugi, H., Hori, H. & Ogawa, S. Biochemical markers subtyping major depressive disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* vol. 69 597–608 Preprint at <https://doi.org/10.1111/pcn.12299> (2015).
 - 8.Tominaga, N. Anti-cancer role and therapeutic potential of extracellular vesicles. *Cancers* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers13246303> (2021).
 - 9.Xu, R., Greening, D. W., Zhu, H. J., Takahashi, N. & Simpson, R. J. Extracellular vesicle isolation and characterization: Toward clinical application. *Journal of Clinical Investigation* vol. 126 1152–1162 Preprint at <https://doi.org/10.1172/JCI81129> (2016).
 - 10.Wu, W. C., Song, S. J., Zhang, Y. & Li, X. Role of Extracellular Vesicles in Autoimmune Pathogenesis.*Frontiers in Immunology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.579043> (2020).
 - 11.Delpech, J. C., Herron, S., Botros, M. B. & Ikezu, T. Neuroimmune Crosstalk through Extracellular Vesicles in Health and Disease. *Trends in Neurosciences* vol. 42 361–372 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.02.007> (2019).
 - 12.Saeedi, S., Israel, S., Nagy, C. & Turecki, G. The emerging role of exosomes in mental disorders. *Translational Psychiatry* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0459-9> (2019).
 - 13.Li, L. Di *et al.* Abnormal expression profile of plasma-derived exosomal microRNAs in patients with treatment-resistant depression. *Hum Genomics* 15, (2021).
 - 14.Gelle, T. *et al.* BDNF and pro-BDNF in serum and exosomes in major depression: Evolution after antidepressant treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 109, (2021).
 - 15.Hung, Y. Y. *et al.* Exosomal let-7e, mir-21-5p, mir-145, mir-146a, and mir-155 in predicting

- antidepressants response in patients with major depressive disorder. *Biomedicines* 9, (2021).
- 16.Ohtsubo, K. & Marth, J. D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* vol. 126 855–867 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.019> (2006).
 - 17.Kronimus, Y. *et al.* Fc N-glycosylation of autoreactive A β antibodies as a blood-based biomarker for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia* 19, 5563–5572 (2023).
 - 18.Pradeep, P., Kang, H. & Lee, B. Glycosylation and behavioral symptoms in neurological disorders. *Translational Psychiatry* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02446-x> (2023).
 - 19.Paton, B., Suarez, M., Herrero, P. & Canela, N. Glycosylation biomarkers associated with age-related diseases and current methods for glycan analysis. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms22115788> (2021).
 - 20.Chandler, K. & Goldman, R. Glycoprotein disease markers and single protein-omics. *Molecular and Cellular Proteomics* vol. 12 836–845 Preprint at <https://doi.org/10.1074/mcp.R112.026930> (2013).
 - 21.Costa, J., Hayes, C. & Lisacek, F. Protein glycosylation and glycoinformatics for novel biomarker discovery in neurodegenerative diseases. *Ageing Research Reviews* vol. 89 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.101991> (2023).
 - 22.Boeck, C. *et al.* Alterations of the serum N-glycan profile in female patients with Major Depressive Disorder. *J Affect Disord* 234, 139–147 (2018).
 - 23.Park, D. I. *et al.* Blood plasma/IgG N-glycome biosignatures associated with major depressive disorder symptom severity and the antidepressant response. *Sci Rep* 8, (2018).
 - 24.Yamagata, H. *et al.* Altered plasma protein glycosylation in a mouse model of depression and in patients with major depression. *J Affect Disord* 233, 79–85 (2018).
 - 25.Nishida-Aoki, N., Tominaga, N., Kosaka, N. & Ochiya, T. Altered biodistribution of deglycosylated extracellular vesicles through enhanced cellular uptake. *J Extracell Vesicles* 9, (2020).
 - 26.Otsubo, T. *et al.* Reliability and validity of Japanese version of the Mini-International Neuropsychiatric Interview. *Psychiatry Clin Neurosci* 59, 517–526 (2005).
 - 27.HAMILTON, M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 23, 56–62 (1960).
 - 28.Moos, R. H., McCoy, L. & Moos, B. S. Global Assessment of Functioning (GAF) ratings: Determinants and role as predictors of one-year treatment outcomes. *J Clin Psychol* 56, 449–461 (2000).
 - 29.Folstein, M. F., Folstein, S. E. & Mchugh, P. R. 'MINI-MENTAL STATE' A PRACTICAL METHOD FOR GRADING THE COGNITIVE STATE OF PATIENTS FOR THE CLINICIAN*. *J. psychiat. Res* vol. 12 (1975).
 - 30.Pang, B. *et al.* Quality assessment and comparison of plasma-derived extracellular vesicles separated by three commercial kits for prostate cancer diagnosis. *Int J Nanomedicine* 15, 10241–10256 (2020).
 - 31.Stranska, R. *et al.* Comparison of membrane affinity-based method with size-exclusion

chromatography for isolation of exosome-like vesicles from human plasma. *J Transl Med* 16, (2018).

32. Peyvandi, F., Garagiola, I. & Baronciani, L. Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfusion* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.2450/2011.002S> (2011).

33. Ward, S., O'Sullivan, J. M. & O'Donnell, J. S. von Willebrand factor sialylation—A critical regulator of biological function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* vol. 17 1018–1029 Preprint at <https://doi.org/10.1111/jth.14471> (2019).

34. Gogia, S. & Neelamegham, S. Role of fluid shear stress in regulating VWF structure, function and related blood disorders. *Biorheology* vol. 52 319–335 Preprint at <https://doi.org/10.3233/BIR-15061> (2015).

35. Denorme, F., Vanhoorelbeke, K. & De Meyer, S. F. von Willebrand Factor and Platelet Glycoprotein Ib: A Thromboinflammatory Axis in Stroke. *Frontiers in Immunology* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02884> (2019).

36. Leebeek, F. W. G. & Eikenboom, J. C. J. Von Willebrand's Disease. *New England Journal of Medicine* 375, 2067–2080 (2016).

37. Bockenstedt, P., Greenberg, J. M. & Handin, R. I. Structural basis of von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib and collagen. Effects of disulfide reduction and limited proteolysis of polymeric von Willebrand factor. *Journal of Clinical Investigation* 77, 743–749 (1986).

38. Ju, L. *et al.* Von Willebrand factor-A1 domain binds platelet glycoprotein Ib α in multiple states with distinctive force-dependent dissociation kinetics. *Thromb Res* 136, 606–612 (2015).

39. Bonazza, K. *et al.* Von Willebrand factor A1 domain stability and affinity for GPIb α are differentially regulated by its O-glycosylated N-and C-linker. *Elife* 11, (2022).

40. Valentijn, K. M., Valentijn, J. A., Jansen, K. A. & Koster, A. J. A new look at Weibel-Palade body structure in endothelial cells using electron tomography. *J Struct Biol* 161, 447–458 (2008).

41. Streetley, J. *et al.* Stimulated Release of Intraluminal Vesicles from Weibel-Palade Bodies. *Regular Article VASCULAR BIOLOGY (Blood)* vol. 133 <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/133/25/2707/1557511/blood874552.pdf> (2019).

42. Sabbagh, Q. *et al.* The von Willebrand factor stamps plasmatic extracellular vesicles from glioblastoma patients. *Sci Rep* 11, (2021).

43. Smith, S. M. & Vale, W. W. *The Role of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Neuroendocrine Responses to Stress. Dialogues Clin Neurosci* vol. 8 www.dialogues-cns.org (2006).

44. Ignácio, Z. M., da Silva, R. S., Plissari, M. E., Quevedo, J. & Réus, G. Z. Physical Exercise and Neuroinflammation in Major Depressive Disorder. *Molecular Neurobiology* vol. 56 8323–8335 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01670-1> (2019).

45. Casonato, A. *et al.* Polymorphisms in von Willebrand factor gene promoter influence the glucocorticoid-induced increase in von Willebrand factor: The lesson learned from Cushing syndrome. *Br J Haematol* 140, 230–235 (2008).

- 46.Steinmetz, C. C. & Turrigiano, G. G. Tumor necrosis factor- α signaling maintains the ability of cortical synapses to express synaptic scaling. *Journal of Neuroscience* 30, 14685–14690 (2010).
- 47.Zhu, C. Bin, Blakely, R. D. & Hewlett, W. A. The proinflammatory cytokines interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α activate serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology* 31, 2121–2131 (2006).
- 48.Recasens, M. *et al.* Chronic exposure to IL-6 induces a desensitized phenotype of the microglia. *J Neuroinflammation* 18, (2021).
- 49.Baganz, N. L. & Blakely, R. D. A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chemical Neuroscience* vol. 4 48–63 Preprint at <https://doi.org/10.1021/cn300186b> (2013).
- 50.Uddin, M. *et al.* Epigenetic and inflammatory marker profiles associated with depression in a community-based epidemiologic sample. *Psychol Med* 41, 997–1007 (2011).
- 51.B. Boneu, M. Abbal, J. Plante & R. Bierme. *FACTOR-VIII COMPLEX AND ENDOTHELIAL DAMAGE. Am. J. Roentgenol. Radium Ther. nucl. Med* vol. 116 (1975).
- 52.Li, Y. *et al.* Plasma von Willebrand factor level is transiently elevated in a rat model of acute myocardial infarction. *Exp Ther Med* 10, 1743–1749 (2015).
- 53.Hope, S. *et al.* Similar immune profile in bipolar disorder and schizophrenia: Selective increase in soluble tumor necrosis factor receptor I and von Willebrand factor. *Bipolar Disord* 11, 726–734 (2009).

10.図表

	Baseline			After follow-up in MDD cohort		
	HCS	MDD	<i>p</i> - value	MDD-DP	MDD-REM	<i>p</i> - value
Sample size	20	21		11	10	
Age (y)	55.5 ± 7.6	57.6 ± 6.0	0.249	59.6 ± 5.6	56.5 ± 5.5	0.234
Male/Female	7/13	9/12	0.606	6/5	3/7	0.256
Onset age (y)	-	49.0 ± 12.7	-	53.0 ± 10.8	45.5 ± 13.4	0.200
HDRS	1.1 ± 1.0	23.8 ± 3.6	9.85e ⁻²⁷	22.4 ± 2.1	3.0 ± 2.2	2.16e ⁻¹⁰
GAF	92.0 ± 4.3	51.2 ± 6.7	6.64e ⁻²⁴	53.0 ± 5.7	86.5 ± 7.8	2.69e ⁻⁹
Antidepressants (equivalent dose of imipramine) (mg)	-	220.1 ± 104.8	-	230.3 ± 100.7	209.3 ± 116.6	0.229

表1.健常対照者（HC）および大うつ病性障害（MDD）患者の背景と臨床的特徴

MDDのフォローアップ終了後、うつ病の急性期抑うつ状態（MDD-DP）、寛解状態（MDD-REM）の診断を行った。データは平均値±標準偏差または各グループの人数として示す。年齢、発症年齢、ハミルトンうつ病評価尺度（HDRS）、社会機能評価尺度（GAF）、抗うつ薬（イミプラミン換算量）（mg）については独立標本t検定、男女の人数についてはピアソンのカイ二乗検定を行った。

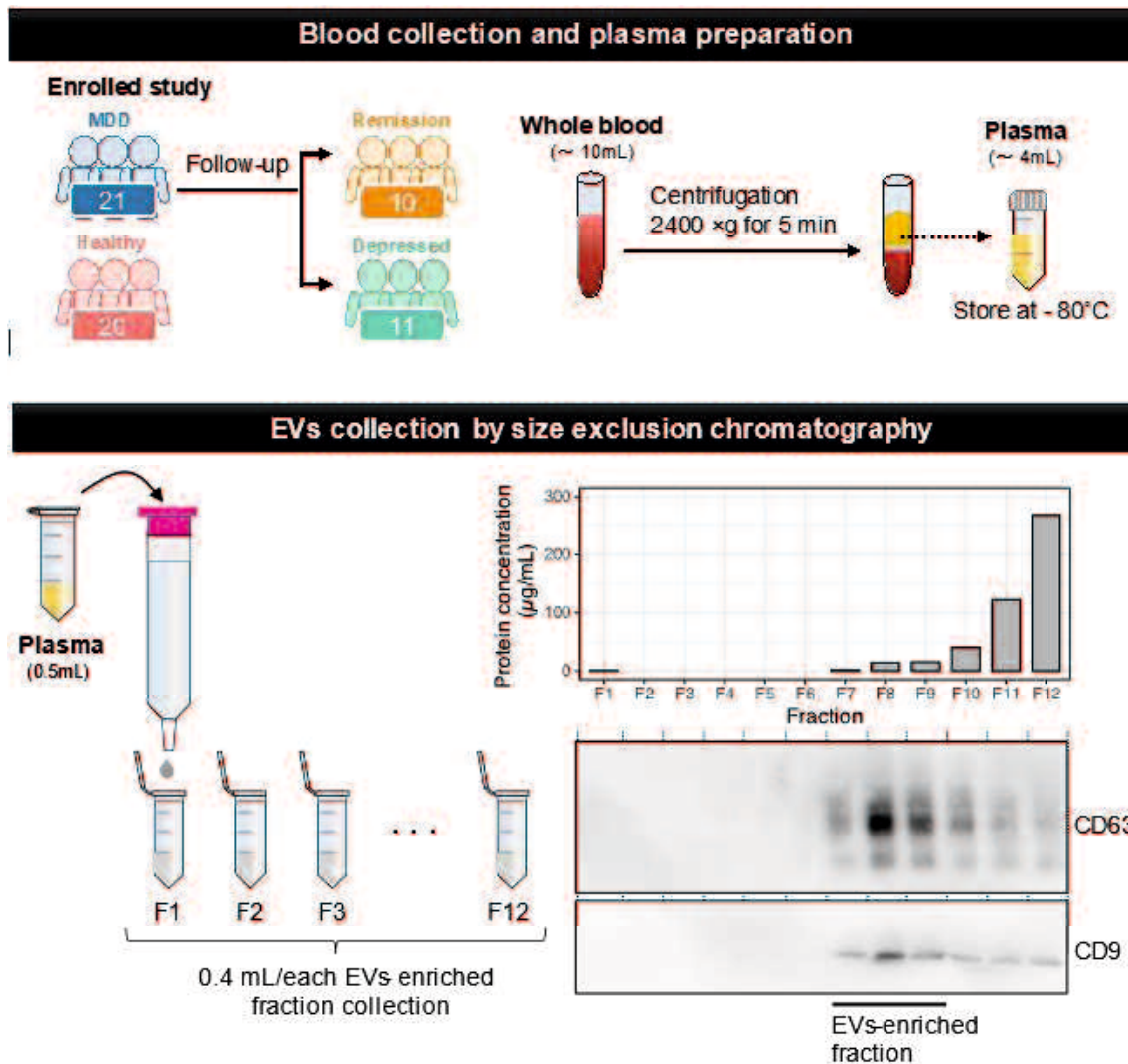


図 1. サイズ排除クロマトグラフィーによる EV 抽出の概要

HC (n=20) または MDD 患者 (n=21) の血漿から遠心分離、濾過およびサイズ排除クロマトグラフィーを通すことにより EV を抽出した。例として健常者 1 名の血漿 EV のプロファイルを示す。

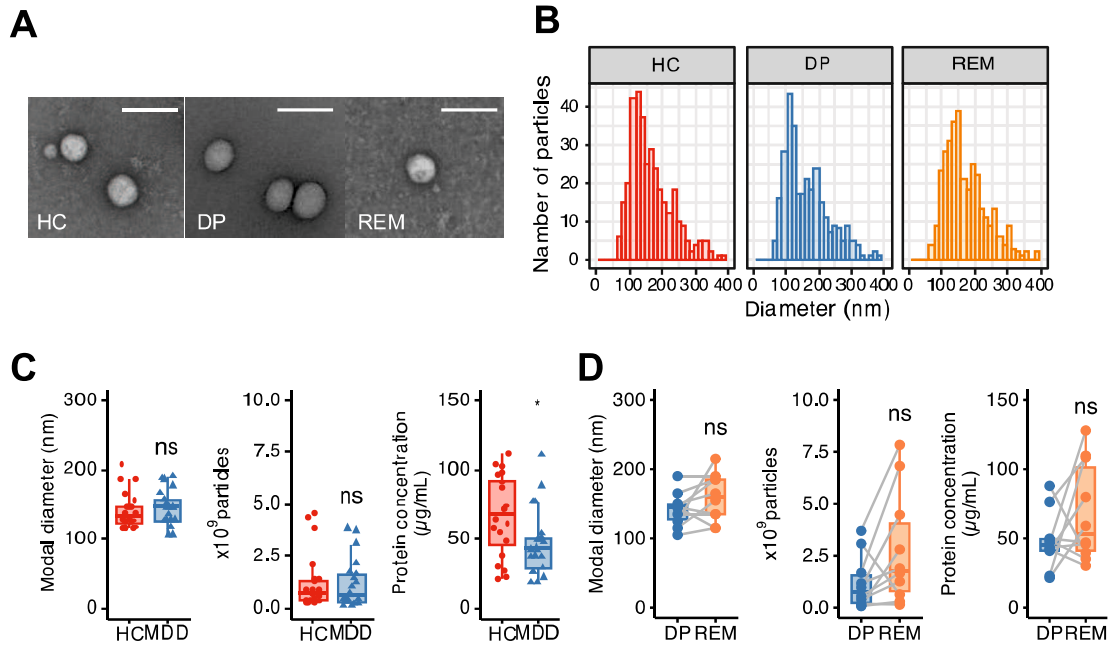


図 2.HC,MDD-DP、MDD-REM の血漿 EV の特徴と比較

(A) HC、MDD-DP、MDD-REM の血漿 EV の CryoEM を用いて現像化した顕微鏡画像。(B) NTA による HC、MDD-DP、MDD-REM の血漿 EV の粒子径ヒストグラム。(C) HC(n=20)、MDD (n=21) 血漿 EV のサイズ、粒子濃度、タンパク質濃度のボックスプロット (D) 同一 MDD (n=10) の DP および REM におけるサイズ、粒子濃度、タンパク質濃度のペアボックスプロット。Mann-Whitney U 検定、Student's t 検定を用いて有意性を検証した。* $p < 0.05$

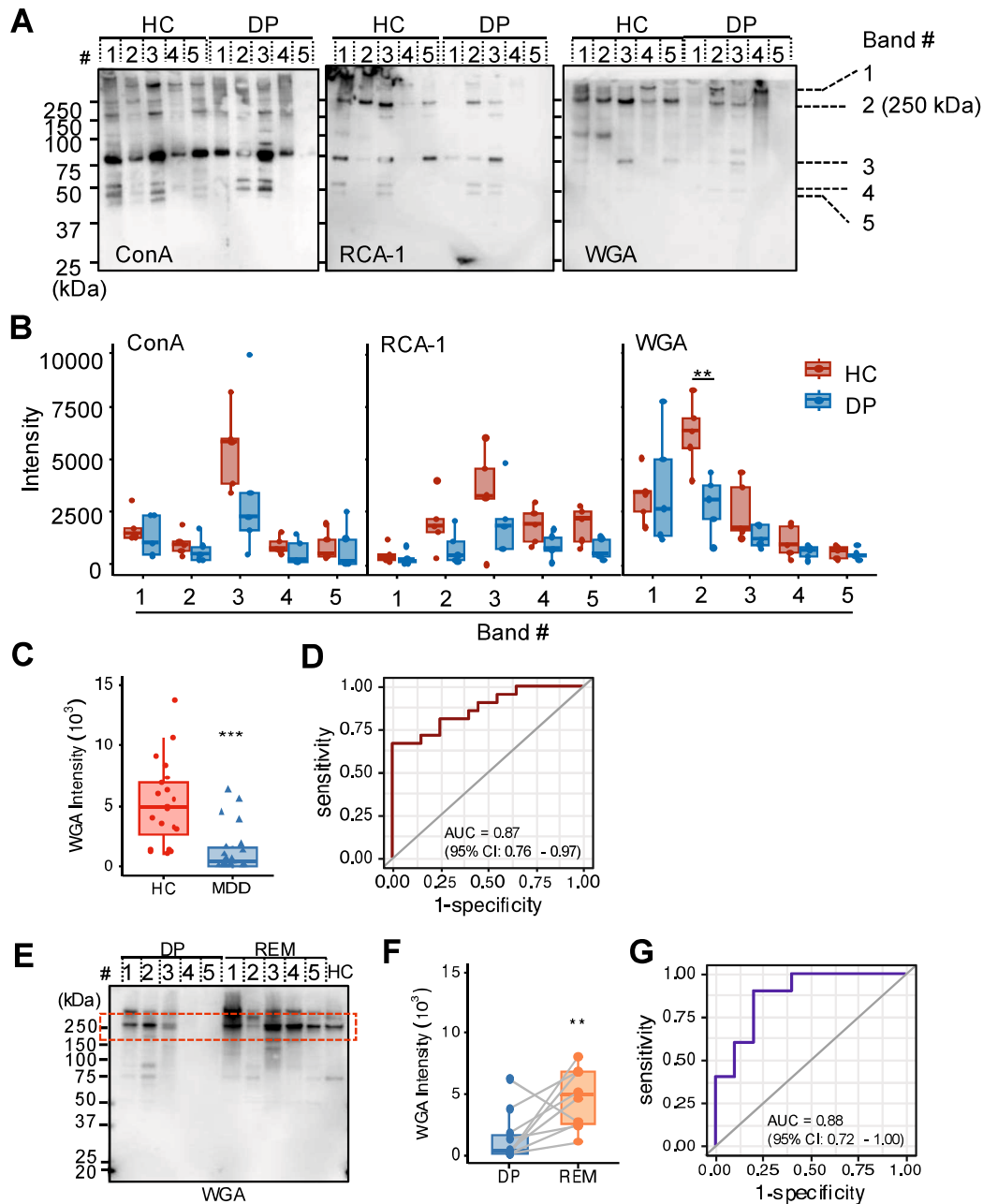


図 3. レクチンブロットによる MDD (DP、REM) および HC の血漿 EV 糖鎖構造

(A) ConA、RCA120、WGA を用いたレクチンブロットによる HC と MDD-DP の血漿 EV 糖鎖構造。タンパク質濃度は 400ng/lane で一定化した。バンドの番号は可視化されたバンドを示す。(#1-5) (B) ImageJ によりバンド #1-5 のシグナル強度を分析した。(C) WGA により検出されたシグナル強度を示すボックスプロット。(D) WGA のシグナル強度を用いた HC と MDD の ROC 曲線。(E) WGA による DP および REM の血漿 EV 糖鎖構造。HC を対照をとして

使用した。(F) DP と REM の患者個々のを表すペアボックスプロット。(G) WGA のシグナル強度を用いた HC と MDD の ROC 曲線。Mann-Whitney U 検定、Student's t 検定を用いて有意性を検証した。** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$

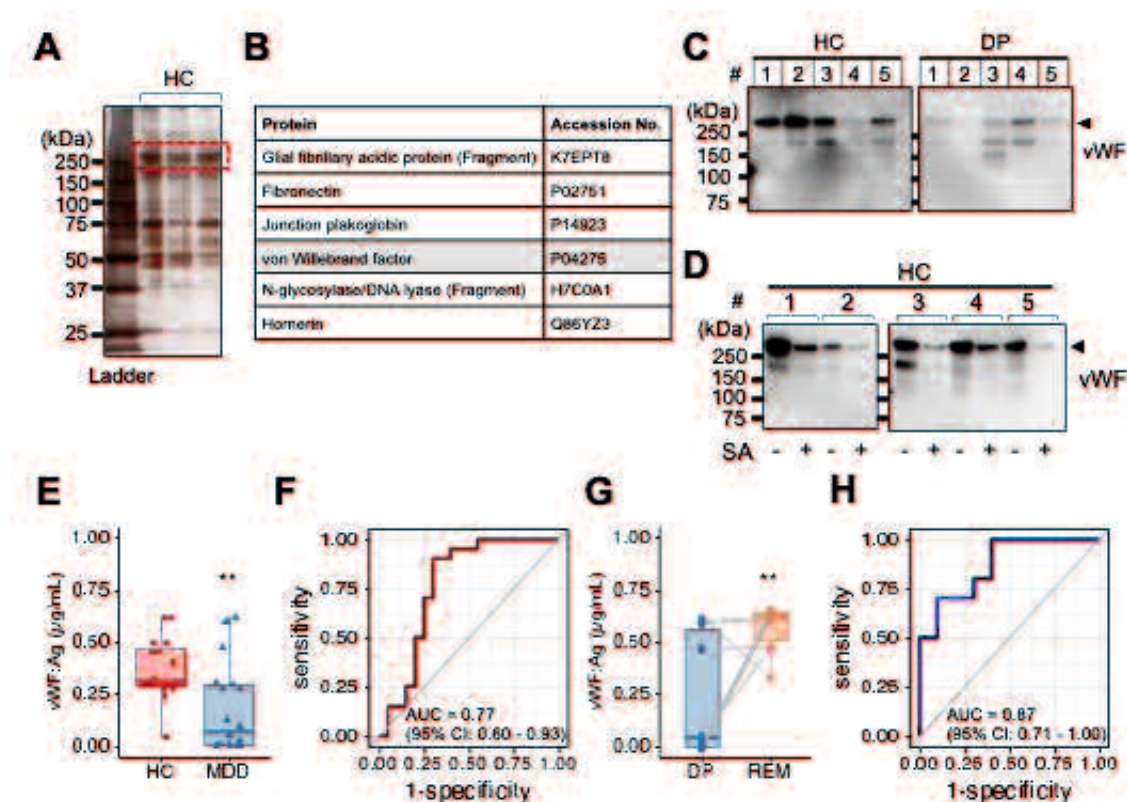


図 4.プロテオーム解析により明らかとなった MDD の病相に関連する EV の vWF

(A) 銀染色を行った SDS-PAGE ゲル。タンパク質スタンダード (lane1)、HC (lane2-4) (B) プロテオミクス解析で同定された、250kDa 以上のタンパク質に含まれるポリペプチドのリスト。(C) ウェスタンブロットにより検出された HC (n=5) および MDD (n=5) の血漿 EV における vWF。(D) シアリダーゼ処理を行った後、ウェスタンブロットにより検出された HC (n=5) の血漿 EV における vWF。(E) サンドイッチ ELISA による HC (n=20) および MDD (n=21) の血漿 EV 中の vWF 抗原濃度のボックスプロット。(F) vWF のシグナル強度を用いた MDD と HC の ROC 曲線分析。(G) DP および REM (n=10) の個々の変化を表すペアボックスプロット。(H) vWF のシグナル強度を用いた DP と REM の ROC 曲線分析。Mann-Whitney U 検定、Student's t 検定を用いて有意性を検証した。** $p < 0.01$

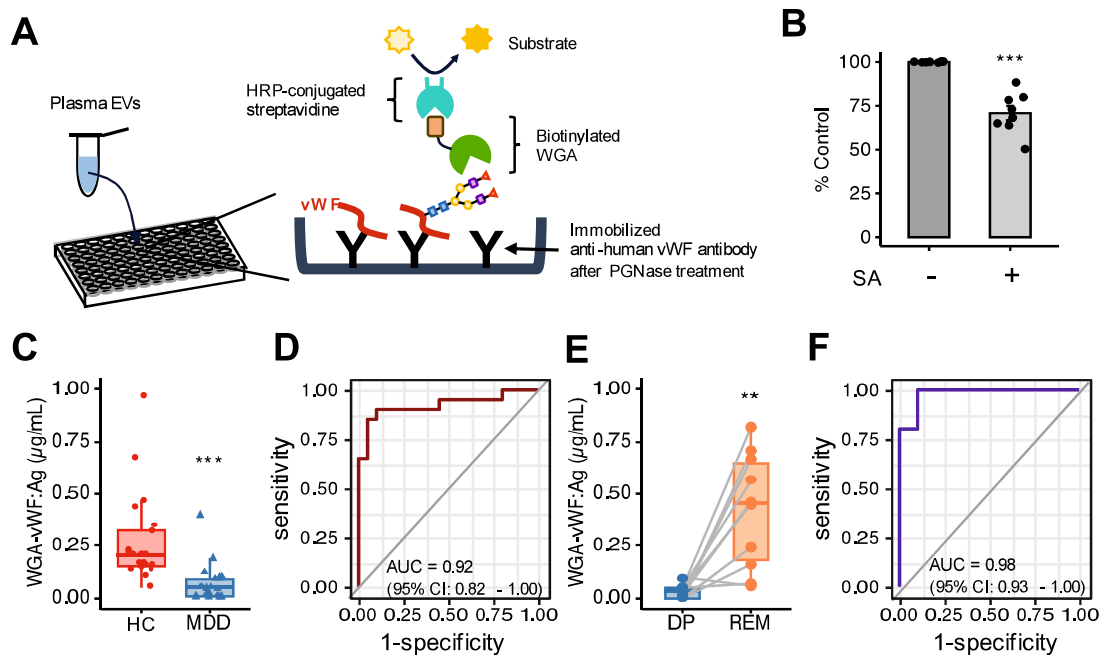


図 5.WGA-vWF はうつ状態と強く関連する

(A) WGA-vWF タンパク質の定量化のためのサンドイッチ ELISA の概略。

PNGase 処理後の結合した vWF 抗体は HRP 結合 WGA を用いて測定した。

(B) サンドイッチ ELISA による血漿 EV における WGA-vWF 抗原の吸光度。

脱シアル化の有無により有意な変化を認めた。(C) MDD (n=21) と HC (n=20)

の血漿 EV 中の WGA-vWF を測定したボックスプロット (D) WGA-vWF のシ

グナル強度を用いた MDD と HC の ROC 曲線分析 (E) 同一 MDD 患者にお

ける DP と REM (n=10) の血漿 EV 中の WGA-vWF を用いて比較したペアボ

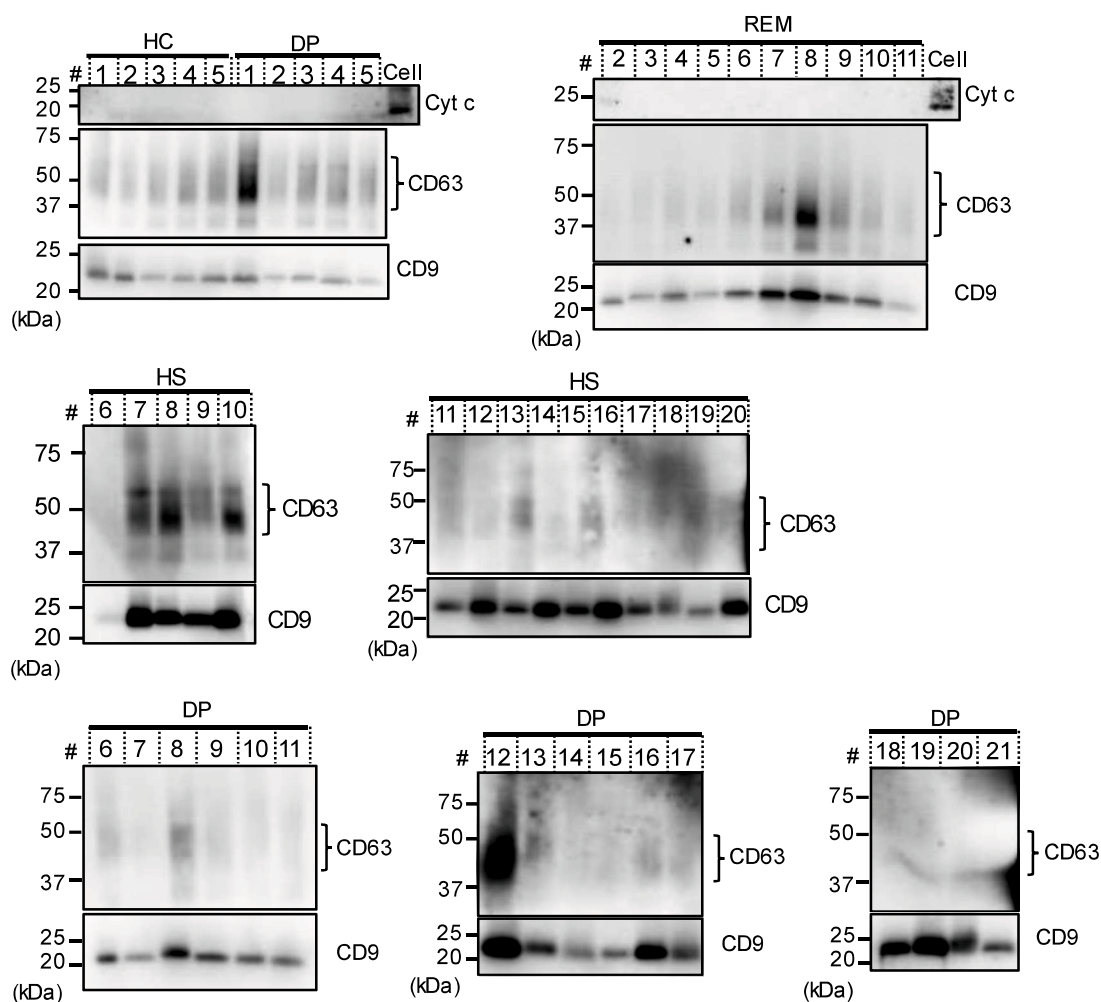
ックスプロット (F) WGA-vWF のシグナル強度を用いた DP と REM の ROC 曲

線分析。Mann-Whitney U 検定、Student's t 検定を用いて有意性を検証した。

p<0.01、*p<0.001

Lectins	Origin	Primary recognition sugars
Con A	Concanavalin A from <i>Canavalia ensiformis</i>	α -D-Man, α -D-Glc
SBA	<i>Soybean Agglutinin</i> Glycine max (soybean)	α - β GalNAc
WGA	<i>Triticum vulgaris</i> (wheat germ) agglutinin	D-GlcNAc, Neu5Ac
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin	α -GalNAc
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i> agglutinin 1	α -L-Fuc
RCA₁₂₀	<i>Ricinus communis</i> agglutinin	β -Gal
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> (peanut) agglutinin	Gal- β (1-3)-GalNAc

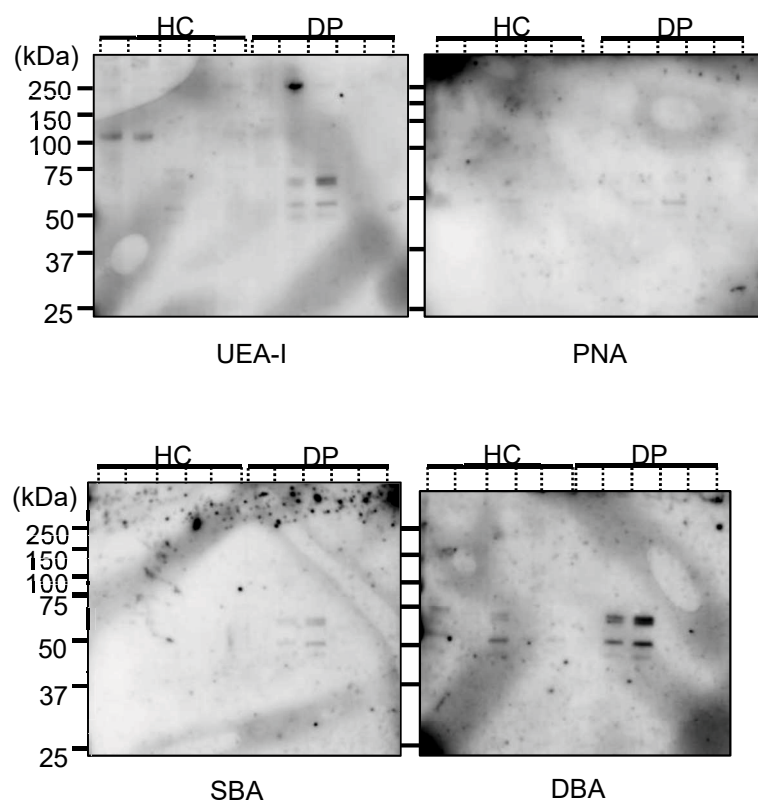
補足表 S1. 糖鎖の解析のために用いられたレクチン



補足図 S1.HC、DP、REM における血漿 EV の特徴

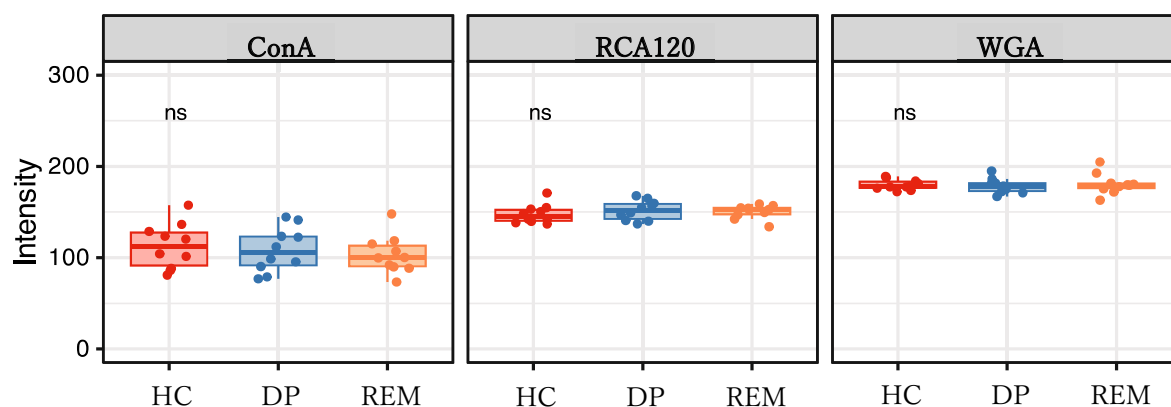
EV タンパク質のマーカー (CD63、CD9) およびミトコンドリアタンパク質マ

ーカー（シトクロム c）に対する抗体を用いて測定した。



補足図 S2.HC、DP の血漿 EV のレクチンブロット

ビオチン化レクチンで糖鎖を認識した後、HRP-ストレプトアビジンで検出した。



補足図 S3.HC、DP、REM のヒト白血球のレクチンアレイ

有意差は一元配置分散分析により評価された。

A.

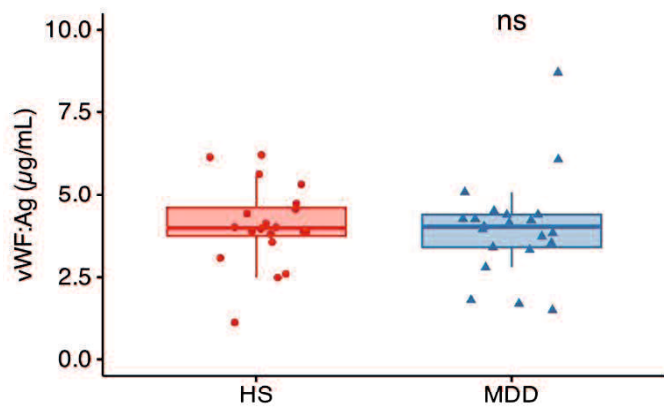
Protein	Uniprot Accession	Molecular Weight (kDa)	HC #1		HC #2	
			Score	Matches	Score	Matches
Glial fibrillary acidic protein (Fragment)	K7EPT8	50	82	3(2)	50	1(1)
Fibronectin	P02751	230	-	-	50	1(1)
Junction plakoglobin	P14923	23	37	2(1)	-	-
von Willebrand factor	P04275	260	36	3(1)	53	5(1)
N-glycosylase/DNA lyase (Fragment)	H7C0A1		-	-	34	3(0)
Hornerin	Q86YZ3	50	20	2(0)	-	-

B.

```
>sp|P04275|VWF_HUMAN von Willebrand factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VWF PE=1 SV=4
MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME
YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTTEPC VHSGRKYPGP TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECIV TGQSHFKSFD
NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD VQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
DWDGRGRLLV KLSVPYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTSG LAEPVVEDFG NAWKLHGDCQ DLQKQHSQPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCT SLSYPDEECN EACLEGCFPC PGLYMDERGD
CVPKACPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCI CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV CQDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGEQ YVLVQDYCGS
NPGTFRILVG NKGCSHPVSK CKKRVITLVE GGEIELFDGE VNVKRPMDK THFEVVESEGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPD SSPATCHNNI MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCES CESIGDCACF
CDTIAAYAHV CAQHKGKVVTV RTATLCPQSC EERNLRENGY ECEWRYNSCA PACQVTCQHP EPLACPVCVQ EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
VAGRRFASGK KVTILNPSDEP HCQICHCDVV NLTCEACQEP GGLVVPPTDA PVSPTTLYVE DISEPPLHDF YCSRLLDLVF LLDGSSRLSE AEFVLKAFV
VDMMERLRIS QKWVRVAVVE YHDGSHAYIG LKDRKRPSEL RRIASQVKYA GSQVASTSEV LKYTLFQIFS KIDRPEASRI TLLLMASQEP QRMSRNFRVRY
VQGLKKKKVI VIPVGIGPHA NLKQIRLIEK QAPENKAFVL SSVDELEQQR DEIVSYLCLD APEAPPPTLP PDMAQVTVGP GLLGVSTLGP KRNSMVLDA
FVLEGSCKIG EADFNRSKEF MEEVIQMDV GQDSIHVTVL QYSYMTVEY PFSEASQKGD ILQVRVREIRY OGGNRTNTGL ALRYLSDHSF LVSQGDREOA
PNLVYMTGN PASDEIKRLP GDIQVVPVIGV GPANVQELE RIGWPNAPIL IQDFETLPRE APDLVLQRC SGEGLQIPTL SPAPDCSQPL DVILLDGS
SFPASYFDEM KSFAKAFISK ANIGPRLTQV SVLQYGSITT IDVPWNVVPE KAHLLSLVDV MQREGGPSQI GDALGFAVRY LTSEMHGARP GASKAVVILV
TDVSVSDVDA AADAARSNRV TVFPIGIGDR YDAAQLRILA GPAGDSNVVK LQRIEDLPTM VTLGNSFLHK LSCGFVRICM DEDGNEKRPD DVWTLDPQCH
TVTCQPDGQT LLKSHRVNCD RGLRSPCPNS QSPVKVEETC GCRWTCPCVC TGSSTRHIVT FDGQNFKLITG SCSYVLFQNK EQDLEVILHN GACSPGARQG
CMKSIEVKHS ALSVELHSDM EVTVNGRLVS VPYVGNNMEV NVYGAIMEV RFNHLGHIFT FTPQNNFQL QLSPKTFASK TYGLCGICDE NGANDFMLRD
GTVTTDWKT LQEWTVQRPQ QTCQPILEEQ CLVPDSSHQ VLLPLFAEC HKVLAPATFY AICQQDSCHQ EQVCEVIASY AHLCRTNGVC VDWRTPDFCA
MSCPPSLVYN HCEHGCPRHC DGNVSSCGDH PSEGCFPCPD KVMLEGSCVP EEACTQCIGE DGVOHQFLEA WVPDHQPCQI CTCLSGRKVN CTTQPCPTAK
APTCLCEVA RLRQADQCC PEYECVCDPV SCDLPPVPHC ERGLQPTLTN PGECRPNFTC ACRKEECKRV SPPSCPPHRL PTLRKTQCCD EYECACNCVN
STVSCPLGYL ASTATNDGCG TTTTCLPDKV CVHRSTIYPV GQFWEEGCDV CTCTDMEDAV MGLRVAQCSQ KPCEDSCRSQ FTYVLHEGEC CGRCLPSACE
VVTGSPRGDS QSSWSVGSQ WASPENCLI NECVRVKEEV FIQQRNVSCP QLEVPVPCPSG FQLSCKTSAC CPSCRCERME ACMLNGTVIG PGKTVMIDVC
TTCRCMVQVG VISGFKLECR KTTNCNCPGL YKEENNTGEC CGRCLPTACT IQLRGGQIMT LKRDETLQDG CDTHFCVKNE RGEYFWEKRV TGCPPFDEHK
CLAEKGKIMK IPGTCCDTC EPECNDITAR LQYVKVGSCK SEVEVDIHYC QGKASKAMY SIDINDVQDQ CSCCSPTRTE PMQVALHCTN GSVVYHEVLN
AMECKSPRK CSK
```

補足図 S4.WGA により認識されたタンパク質

- (A) HC の血漿 EV より、質量分析法に基づいて vWF を同定した。
- (B) 質量分析法により同定されたヒト vWF(UniProt:P04275)の配列は赤で示す。



補足図 S5.HC と MDD 間において血漿中の vWF の有意差は認められなかった
MDD (n=21) と HC (n=20) の間で、サンドイッチ ELISA により vWF 抗原
を定量化した。有意差は Mann-Whitney U 検定を用いた。