

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19079

研究課題名(和文) 接着分子を標的とする肺気腫治療の創薬シーズ探索

研究課題名(英文) Search for drug seeds for treatment of pulmonary emphysema targeting adhesion molecules

研究代表者

萩山 満 (HAGIYAMA, Mitsuru)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：60632718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺気腫罹患者の多くが喫煙者であるが、禁煙によって進行を止めることは難しい。その分子機序については未解明である。先行研究において、肺気腫では接着分子CADM1の酵素的切断(shedding)が亢進状態にあり、肺胞上皮のアポトーシスを誘導することを明らかにした。本研究では、喫煙誘起肺気腫マウスモデルを用いて、禁煙後も肺気腫が進行する機序について検討した。喫煙によって炎症反応が増強され、プロテアーゼ活性が上昇し、CADM1 sheddingが惹起する。禁煙後もプロテアーゼ活性上昇が継続することでCADM1 sheddingが亢進状態にあり、気腫化が進行することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary emphysema arises in cigarette smokers and also ex-smokers, indicating that alveolar structural destruction progresses even in the absence of oxidants. Lung-epithelial cell adhesion molecule 1 (CADM1) is extracellularly shed. This event contributes to the development of emphysema through accumulating the proapoptotic shedding products within alveolar cells. Here, we made an ex-smoker model using C57BL/6 mice. We calculated the mean linear intercepts in the lung histologic sections to estimate the alveolar space dilatation. The alveolar airspace was unchanged at the age of 18 weeks, but was significantly dilated at 30 weeks when compared with age-matched mice ($p=0.016$). Western blot analyses of the lung lysates revealed that the mice of both ages had more CADM1 shedding products than age-matched mice ($p<0.05$). Persisting increase in ectodomain shedding of CADM1 appeared to contribute to the development of emphysema in ex-smokers.

研究分野：実験病理

キーワード：アポトーシス 接着分子 shedding

1. 研究開始当初の背景

肺気腫は慢性閉塞性肺疾患の1つで、肺胞壁の破壊的变化を伴う疾患である。肺気腫の組織像は特徴的で、嚢胞状に拡張した気腔が菲薄な線維組織で隔壁されている。肺気腫の発症には、肺胞上皮アポトーシスの関与が証明され、患者の多くが喫煙者であるため、タバコの煙に含まれるオキシダントによる炎症の惹起(好中球やマクロファージ等の浸潤)が病因として想定されている。そのため治療法の第一歩として禁煙が挙げられるが、症状は不可逆的に進行し止めることは難しい。その分子メカニズムについては未だ解明されていない。一方、呼気中オキシダントの別の病原性としては、局所のプロテアーゼ活性を絶対的あるいは相対的に上昇させる作用が知られており、肺胞上皮のアポトーシスや肺胞中隔の破壊を不可逆的に進行させると考えられている。しかしながら、プロテアーゼ活性上昇と肺胞上皮アポトーシスとを結ぶ分子機序は不明であった。

CADM1 (cell adhesion molecule 1; 別名に TSLC1、SynCAM 等) は肺胞上皮に発現する IgCAM 型の接着分子である。先行研究において、我々は CADM1 が細胞外傍細胞膜領域において2か所で酵素的に切断 (shedding; 切断と切断) されることを見出し、切断部位を決定するとともに、切断責任酵素のひとつとして ADAM10 を同定した。また、肺気腫では CADM1 の shedding が亢進状態にあり、細胞側に産生される C 末断片 (CTF) がミトコンドリアに集積して、肺胞上皮のアポトーシスを誘導することを明らかにした。この発見は、プロテアーゼ活性上昇に引き続く病的分子機序の解明として注目されるとともに、CADM1 の shedding を特異的に阻害すれば、肺気腫の進行を抑制できる可能性を示している。

切断酵素は未同定であるが、ADAM ファミリーの可能性がある。ADAM ファミリーは、特

定の認識アミノ酸配列を持たないとされ、基質と会合すると、細胞膜から一定の距離 (アミノ酸残基数) で基質を切断する。実際、我々は CADM1 の切断部位、また直前・直後にアミノ酸変異を導入したが、shedding 効率に変化は生じなかった。その点、CADM1 shedding 部位領域を認識する抗体は、酵素と基質との間に介在することで、切断反応を阻害すると考えられる。Liang らは、ADAM17 による糖蛋白 GPIb の shedding を shedding 部位特異的な抗体によって阻害できたと報告している。慢性閉塞性肺疾患の罹患者は 500 万人を越えると言われるが、その治療は対症療法のみで、根本的な治療法がない。本研究は、肺胞破壊の分子機序に立脚した肺気腫治療法の開発へと発展するものと期待される。

2. 研究の目的

肺気腫は肺胞壁の破壊を特徴とする慢性閉塞性肺疾患である。この組織破壊はプロテアーゼの相対的あるいは絶対的な上昇によって不可逆的に進行すると考えられている。罹患者の 8 割以上が喫煙者であることから、過度の喫煙が肺気腫発症の誘因と見なされている。しかし、禁煙によって進行を遅らせることはできるが止めることは難しい。その分子機序は解明されていない。

申請者は肺気腫の発症に肺胞上皮の IgCAM 型接着分子 CADM1 (cell adhesion molecule 1) が関与することを発見した。CADM1 は細胞外傍細胞膜領域において酵素的に切断 (shedding) される。肺気腫では CADM1 shedding が亢進状態にあり、その結果過剰に産生される C 末断片がミトコンドリアに集積して、肺胞上皮のアポトーシスを促進していることを見出した (図1)。

肺気腫罹患者は禁煙後も局所のプロテアーゼ不均衡が保たれ、その結果 CADM1 shedding が継続的に亢進している可能性が考えられた。本研究ではタバコ煙曝露マウス

モデルを用いて、禁煙後も肺気腫が進行する機序について形態学的、分子生物学的検討を行う。また、見出した発症機序に基づいて肺気腫治療の創薬シーズを探索し、根本的な治療法開発を目的とする。

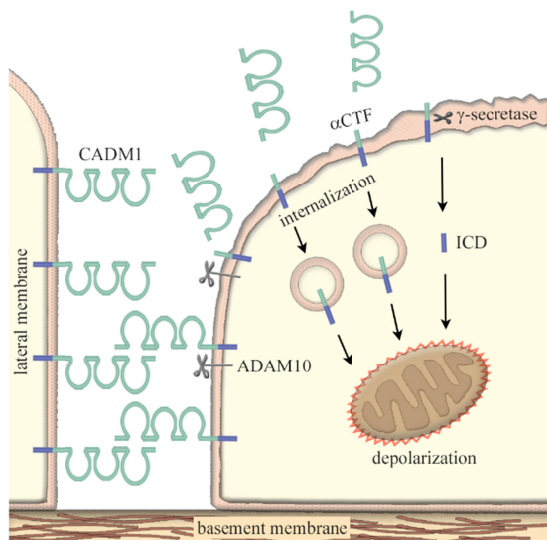


図1 CADM1 shedding 亢進によって誘導される肺胞上皮アポトーシス（業績3）

3. 研究の方法

タバコ煙曝露マウスモデル

6週齢の成体マウス（C57BL/6）を用いた。方法として、タバコ煙吸入実験装置に入れて1日8本（朝夕4本）、週5日で行った。曝露実験中は、酸素モニター（OXY-1）を用いて酸素濃度を観察し一定に保った。12週間喫煙曝露を行った喫煙群と12週間喫煙曝露した後12週間禁煙期間を設けた禁煙群に分けた。対称群として、同週齢のマウスを用いた（非喫煙群）。

各期間の曝露実験後のマウスを炭酸ガスによって安楽死させて速やかに肺組織を採取し、左肺をホルマリン固定し、右肺を凍結保存した。固定組織からは薄切切片を作製し、HE染色により組織病理解析を行った。凍結組織からは蛋白質を抽出し、ウエスタンブロットにより発現解析を行った。なお、本動物実験の実施に当たっては、近畿大学医学部動物実験委員会の承認を得た上で、同委員会が定

める規程を遵守して遂行した。

4. 研究成果

禁煙群の肺組織における肺胞壁の破壊と気腫化

各群のホルマリン固定パラフィンブロックの肺組織切片をHE染色に供した（図2）。形態学的に喫煙群では高度の炎症細胞浸潤とそれに伴う肺胞壁の肥厚が見られたが、肺胞平均径の増加はなかった（ $p = 0.496$ ）。一方、禁煙群では喫煙群に比べて目立った炎症細胞浸潤は認められなかったが、肺胞壁の破壊によって気腔が異常に拡張した（ $p = 0.016$ ）。以上の結果から、禁煙期間中に顕著な肺気腫を誘導する可能性が示唆された。

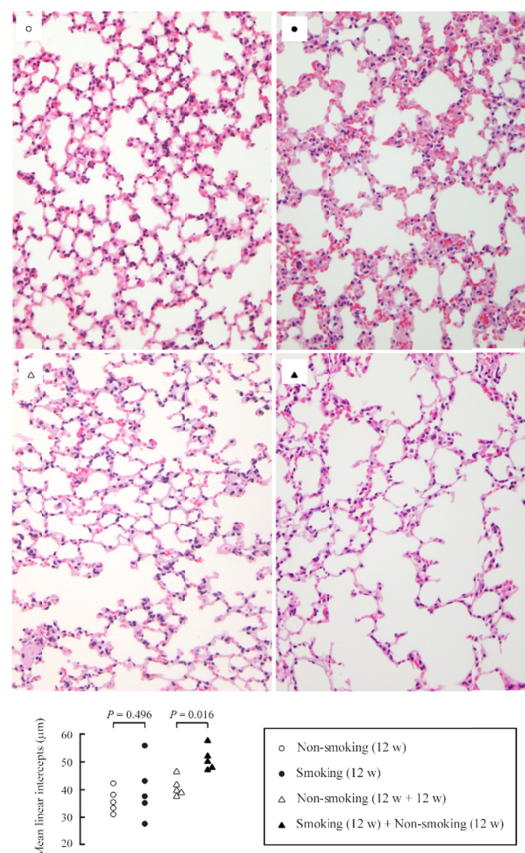


図2 禁煙群の肺組織における肺胞壁の破壊と気腫化

各群における肺組織のHE染色の代表的な結果を示す。肺胞腔長径を約100箇所測定し、そのmean linear intercepts (μm)を算出した。t-検定による非喫煙群とのp値を示す。

は喫煙群、 は禁煙群、 と はそれぞれ同週齢の非喫煙群を表す。

喫煙群と禁煙群の肺組織における CADM1 shedding の亢進

各群の肺組織ライセートを調整し、抗 CADM1 C 末抗体でのウエスタンブロットに供した。CADM1 全長型とその shedding によって産生された C-terminal fragment (CTF) が約 100、23 kDa にそれぞれ検出された(図 3)。両者を β -actin によって標準化した。全長型に対する shedding 産物 (CTF) の割合を算出し比較したところ、喫煙群と禁煙群共に CADM1 shedding 率が同週齢の非喫煙群よりも有意に上昇した ($p < 0.05$)。喫煙群と禁煙群では有意な差は見られなかった。以上の結果から、喫煙によって炎症反応が増強され、プロテアーゼ活性が上昇し、CADM1 shedding が惹起する。禁煙後もプロテアーゼ不均衡が継続することで CADM1 shedding が亢進状態にあり、気腫化が進行すると考えられた。

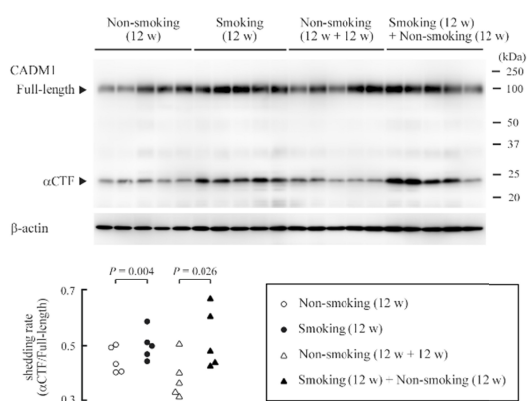


図 3 喫煙群と禁煙群の肺組織における CADM1 shedding の亢進

各群における肺組織の CADM1 抗体によるウエスタンブロットを示す。ストリップした後、各レーンに添加したタンパク量を示すために β -actin 抗体でリプローブした。NIH ImageJ によって全長型に対する shedding 産物 (CTF) の割合を算出し、t-検定による非喫煙群との p 値を示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

(*は共同筆頭著者を表す)

1. Yoneshige A, * Hagiyama M, * Inoue T, Tanaka T, Ri A, Ito A. Modest static pressure can cause enteric nerve degeneration through ectodomain shedding of cell adhesion molecule 1. *Mol Neurobiol*, Epub ahead of print, 2016, 査読有, doi: 10.1007/s12035-016-0166-y.
2. Iino T, Hagiyama M, Furuno T, Ito A, Hosokawa Y. Time-course statistical evaluation of intercellular adhesion maturation by single-cell adhesion measurement using femtosecond laser impulse. *Biophysical J*, 111(10): 2255-2262, 2016, 査読有, doi: 10.1016/j.bpj.2016.09.044.
3. Yoneshige A, Hagiyama M, Fujita M, Ito A. Pathogenic actions of cell adhesion molecule 1 in pulmonary emphysema and atopic dermatitis. *Front Cell Dev Biol*, 3: 75, 2015, 査読有, <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2015.00075>.
4. Hagiyama M, * Yoneshige A, * Inoue T, Sato Y, Mimae T, Okada M, Ito A. The intracellular domain of cell adhesion molecule 1 is present in emphysematous lungs and induces lung epithelial cell apoptosis. *J Biomed Sci*, 22(1): 67, 2015, 査読有, doi:10.1186/s12929-015-0173-8.
5. Yoneshige A, Hagiyama M, Inoue T, Mimae T, Kato T, Okada M, Enoki E, Ito

A. Increased ectodomain shedding of cell adhesion molecule 1 as a cause of type II alveolar epithelial cell apoptosis in patients with idiopathic interstitial pneumonia. *Respir Res*, 16(1): 90, 2015, 査読有, doi:10.1186/s12931-015-0255-x.

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 萩山満、米重あづさ、伊藤彰彦「癌による内腔狭窄に伴って拡張した大腸における腸管神経変性:CADM1/TSLC1 の関与」第 75 回日本癌学会総会(横浜、パシフィコ横浜)2016年10月6-8日
2. 萩山満、井上敬夫、米重あづさ、伊藤彰彦「接着分子 cell adhesion molecule 1 の細胞内断片による肺上皮アポトーシス誘導:肺気腫発症への関与」第 105 回日本病理学会総会(仙台、仙台国際センター)2016年5月12-14日
3. 萩山満、米重あづさ、伊藤彰彦「接着分子 cell adhesion molecule 1 の細胞内断片による肺上皮アポトーシス誘導:肺気腫発症への関与」第 74 回日本癌学会総会(名古屋、名古屋国際会議場)2015年10月8-10日
4. 萩山満、井上敬夫、米重あづさ、伊藤彰彦「アクチン結合性アダプター蛋白 -parvin は偽足突起構成要素であり、小葉乳癌のリンパ節転移に関与する」第 104 回日本病理学会総会(名古屋、名古屋国際会議場)2015年4月30日-5月2日

6. 研究組織

(1)研究代表者

萩山 満 (HAGIYAMA, Mitsuru)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号: 60632718