

令和 元年 5 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08723

研究課題名(和文) 糖尿病に伴う腸管神経変性における接着分子CADM1の病的意義

研究課題名(英文) Pathogenic action of CADM1 shedding in neurodegeneration

研究代表者

米重 あづさ (YONESHIGE, Azusa)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：70586750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Cell adhesion molecule 1 (CADM1)は神経細胞に高発現する接着分子で、神経軸索と髄鞘との接着を司りシナプス形成に必須の分子である。本研究では担癌によって管腔が拡張した大腸癌手術検体の腸管神経系では、腸管の拡張率(腸内圧)上昇によって神経節細胞数および神経線維密度が減少し、CADM1の細胞膜上での酵素的切断が亢進していることを見出した。独自に開発した圧力負荷培養装置を用いて、圧力上昇によってCADM1の切断が亢進し、切断断片が神経線維上に蓄積凝集することによって神経変性を招くことを実験的に証明した。また、切断断片の凝集には特定のアミノ酸配列が関わることも示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筆者らの研究グループはこれまでに肺気腫や間質性肺炎の肺、2型糖尿病の膵臓におけるCADM1 sheddingの亢進と各CADM1発現細胞の変性/細胞死との関わりを研究してきた。本研究は神経変性疾患においても同様の現象が起こっていることを示し、細胞接着分子のsheddingが慢性疾患の病態形成において普遍的な現象である可能性を示唆した点において意義深い。また新規に開発した培養装置を用いて、病的内圧上昇と神経変性との直接的な関連を証明し、緑内障など、より社会的要求性の高い疾患研究への応用可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：CADM1 is an adhesion molecule expressed abundantly in neurons and epithelial cells. We have revealed that ectodomain shedding of CADM1 is occurred in emphysema, interstitial pneumonia and diabetes and that CADM1 shedding leads to cell apoptosis. In this study, to elucidate pathogenic action of CADM1 shedding in neurodegeneration, we investigated the correlation between enteric nerve degeneration and CADM1 shedding in dilated colon with tumor-induced stenosis. CADM1 shedding rate was increased proportionately with colon dilation in association with decrease of ganglion cells and neurites. Using two-chamber cell culture system enable to loading modest static pressure to the cultured cells, we showed that increasing pressure induced CADM1 shedding and the decreases of neurite density and thickness. Exogenous expression of CADM1 shedding product resulted in neurites loss, suggesting its involvement in neurodegeneration.

研究分野：実験病理学

キーワード：神経変性 接着分子 腸管神経系 緑内障 病的内圧上昇

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Cell adhesion molecule 1 (CADM1)は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞間接着分子で(図1)、肺上皮細胞では細胞の形態・極性維持を司る。一方、CADM1は別名 Synaptic adhesion molecule 1 (SynCAM 1)と呼ばれ神経系に高発現していることが知られており、末梢神経系においては神経軸索と髄鞘シュワン細胞との接着を司る。CADM1は細胞膜上で酵素的に切断(shedding)されて、細胞内にα切断断片(α C-terminal fragment, α CTF)とβ切断断片(β CTF)が生成され、これらの切断断片がさらに細胞膜内で切断されてγ切断断片(γ CTF)を生じる(図1)。

これまでに研究代表者らは気腫状肺ではCADM1のsheddingが亢進しており、肺上皮細胞においてCADM1のsheddingを亢進させると、αCTFがミトコンドリアに集積し、ミトコンドリア膜電位の低下を介してアポトーシスが誘導されることを明らかにした(図1)。さらに、αCTFから産生されるγCTFもミトコンドリアに局在してアポトーシス誘導に関わることを示した(図1)。また、特発性間質性肺炎においてもCADM1のsheddingが亢進しており、その結果全長型の発現低下がもたらされて、肺上皮細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにした。肺気腫と間質性肺炎は喫煙や炎症によりプロテアーゼ活性上昇が病態形成に関わるとされてきたが、申請者の発見はプロテアーゼ活性上昇と肺上皮細胞のアポトーシスを結び付ける新しい分子機序として注目された。また、先行研究において研究者らは2型糖尿病膵ではCADM1のshedding亢進と全長型の発現低下が見られ、CADM1の発現異常と耐糖能異常とが相関することを明らかにした(科研費若手B課題番号26860267)。

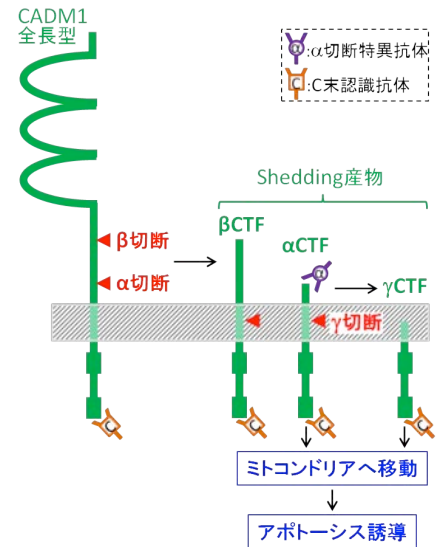


図1 CADM1のshedding

以上のことから研究者は神経変性疾患においてもCADM1のshedding亢進が病態形成に関与するのではと考え本研究課題の着想に至った。CADM1とヒト神経変性疾患に関する研究分野では、自閉症スペクトラム患者でCADM1遺伝子変異が報告されたのみで、病態形成に至る分子機序はほとんど不明である。研究開始当初は糖尿病性ニューロパチーを対象としていたが、糖尿病患者由来の神経組織の検体数は限られており基準を満たすことが困難なことが明らかになり、研究対象は腸管拡張を伴う大腸癌手術検体にした。癌性の腸管拡張を伴う大腸組織では、担癌により管腔が狭窄して腸内圧が上昇し、その結果、腸管神経系に機械的高圧が負荷されて神経変性状態に陥ると考えられた。本研究は研究者らのグループによる一連のCADM1sheddingに関わる分子病態学研究の最後のピースであるだけでなく、機械的高圧と神経変性疾患との関連を検証するという観点からも興味深い。

2. 研究の目的

本研究は、担癌によって拡張した大腸癌手術検体の腸管神経におけるCADM1発現と神経変性の実態を明らかにし、CADM1のshedding亢進及びshedding産物が神経変性を惹起するという仮説を検証するとともに、shedding現象が機械的高圧状態と直接的な因果関係を持つことを実験的に証明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 拡張大腸組織における腸管神経系の変性とCADM1発現変化

① 拡張大腸手術検体の収集

2007年から2016年の間に近畿大学医学部附属病院(承認番号26-93)および泉大津市立病院(承認番号26-4)にて、横行(n=7)・下行(6)・S状結腸癌(13)の手術検体26例の手術断端(口側および肛門側)を収集した。大腸癌の肉眼分類は0型=1, 2型=22, 3型=3で、組織分類は高分化型=4, 中分化型=22であった。各検体の肉眼写真から口側および肛門側断端の腸管の直径を計測し、管腔の拡張率(口側/肛門側)を算出した。

② 拡張大腸腸管神経系の組織学的解析

上記検体のパラフィン切片にHE染色またはシナプトフィジンの免疫染色を施し、組織学的解析に用いた。アウエルバッハ神経叢の神経節細胞数および神経叢の面積を計測して、面積あたりの神経節細胞数を算出した。画像解析ソフトウェアを用いて筋層内のシナプトフィジン陽性の神経線維の面積を計測し、1視野あたりの神経線維密度を算出した。

③ 拡張大腸筋層内の神経におけるCADM1発現解析

大腸組織における主要なCADM1高発現細胞は腸上皮細胞と腸管神経細胞で、筋層内に存在するCADM1蛋白質のほとんどは神経細胞に由来すると考えられる。そこで、大腸パラフィン切片から肉眼的に筋層をダイセクションし、蛋白質を抽出してCADM1のウエスタンブロットを行い、全長型CADM1、shedding産物であるαCTFおよびβCTFの発現量を検出してshedding率(αCTFまたはβCTF/全長)を算出した。

(2) 静的圧負荷培養装置(水柱下培養装置)の開発

① 培養装置の構築

従来の加圧装置は特殊な圧付加装置を必要とし、且つ軽微な圧(30-50cm H₂O)を発生させることが困難であった。そこで、軽微な圧負荷が可能で、通常のインキュベータ内でも使用できる簡便な装置を構築することにした(図 2)。培養インサート上の培養細胞に水柱の高さと同じ圧力が負荷できるように、インサートを自作の亚克力板で挟み、上部に亚克力の筒を装着できるようにした。装置の下部では空気交換ができるように、培養インサートの底部が 10cm デッシュ上に浸るよう設計した(図 2)。

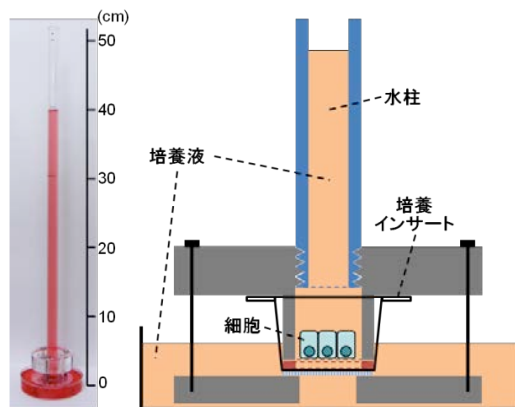


図 2 水柱下培養装置の写真(左)と装置下部の模式図(右) 水柱の高さに相当する静的圧力が培養インサート上の細胞に負荷される。

② 水柱下培養装置を用いた細胞培養方法の確立
 肺胞上皮細胞株 H441 または RLE-6TN 細胞を通常の 6 ウェル培養インサートデッシュ上で 50-80% コンフルエントになるまで培養した後、水柱下培養に供した。予め培地は CO₂ インキュベータ内で保温し、培養装置の 2 枚の亚克力板の間に培養インサートを設置して、任意の圧力負荷に相当する高さになるまで培地を亚克力筒内に注入した。50cm H₂O の水柱下で 3 日間細胞を培養したところ、培養インサートの半透膜のポアサイズが 1.0mm のものを用いれば培地中の酸素分圧、二酸化炭素分圧、pH は通常培養と変わらないことが分かった。

③ 水柱圧付加による初代神経細胞の変性と CADM1 発現変化
 ① 水柱下培養装置を用いた初代マウス後根神経節細胞培養
 新生仔マウスから後根神経節を採取し、トリプシン処理によって細胞分離した後、マトリゲルを塗布したインサート上に播種し、NGF および AraC 含有グリア培地で 2 日間培養した。培養インサートを水柱下培養装置に設置し、N2 サプリメントおよび AraC 含有 DMEM 中で任意の圧力の下培養した。

(3) 水柱圧付加による初代神経細胞の変性と CADM1 発現変化

① 水柱下培養装置を用いた初代マウス後根神経節細胞培養

新生仔マウスから後根神経節を採取し、トリプシン処理によって細胞分離した後、マトリゲルを塗布したインサート上に播種し、NGF および AraC 含有グリア培地で 2 日間培養した。培養インサートを水柱下培養装置に設置し、N2 サプリメントおよび AraC 含有 DMEM 中で任意の圧力の下培養した。

② 水柱下培養初代マウス後根神経節細胞における CADM1 発現解析

水柱下培養後、マウス後根神経節細胞をウエスタンブロットおよび蛍光多重免疫染色に供した。培養細胞中のミトコンドリア局在解析には MitoTracker を用いた。マウス後根神経節細胞への遺伝子導入には、pCX4 レトロウイルスベクターを用いて $\phi 2$ 細胞によりウイルスを産生して神経節細胞へ感染させた。

4. 研究成果

(1) 拡張大腸組織における腸管神経系の変性と CADM1 発現変化

① 拡張大腸におけるアウエルバッハ神経叢神経節細胞密度および筋層神経繊維密度の低下
 シナプトフィジンの免疫染色により神経節細胞および神経繊維密度を算出して、腸管の拡張率との相関を解析したところ、拡張率の上昇によって神経節細胞および神経繊維密度は減少することが分かった(図 3)。また神経節細胞と神経繊維密度は互いに相関していた。

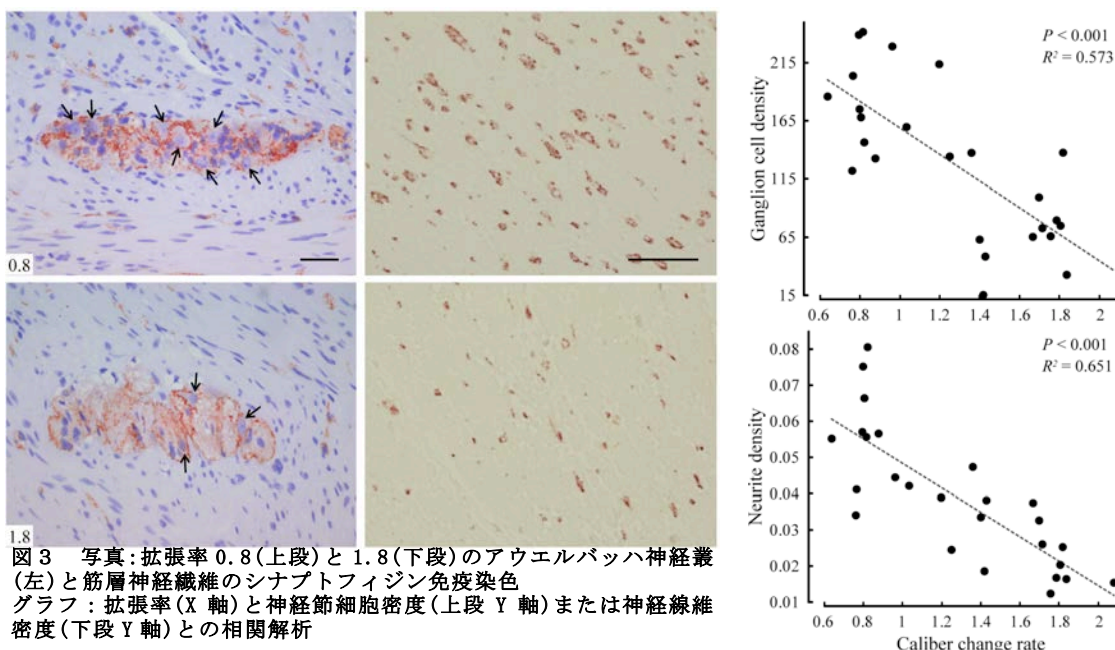


図 3 写真: 拡張率 0.8(上段)と 1.8(下段)のアウエルバッハ神経叢(左)と筋層神経繊維のシナプトフィジン免疫染色
 グラフ: 拡張率(X 軸)と神経節細胞密度(上段 Y 軸)または神経線維密度(下段 Y 軸)との相関解析

② 拡張大腸神経系における CADM1 shedding の亢進

筋層からの蛋白質抽出液を用いたウエスタンブロットによって、拡張率の上昇に伴って、 α -shedding 率、 β -shedding 率共に亢進していることが分かった(図 4)。また、神経特異的エノ

ラーゼ(NSE)の発現量を調べたところ、拡張率の上昇によりNSE発現量は減少しており、組織学的解析結果と一致した。NSEの発現量を用いて神経細胞あたりの α CTFおよび β CTFの蛋白質量を算出したところ、拡張率が高くなるほど神経細胞あたりの α CTFおよび β CTF量は増加していることが分かった(図4)。

組織学的解析結果とCADM1蛋白質の発現量との相関解析を行ったところ、 α -shedding率または神経細胞あたりの α CTF量が上昇するほど、神経節細胞数または神経線維密度は減少することが分かった。以上のことから腸管の拡張率(腸内圧)の上昇に伴ってCADM1のsheddingが亢進しており、腸管神経系の変性が進行していることが示唆された。

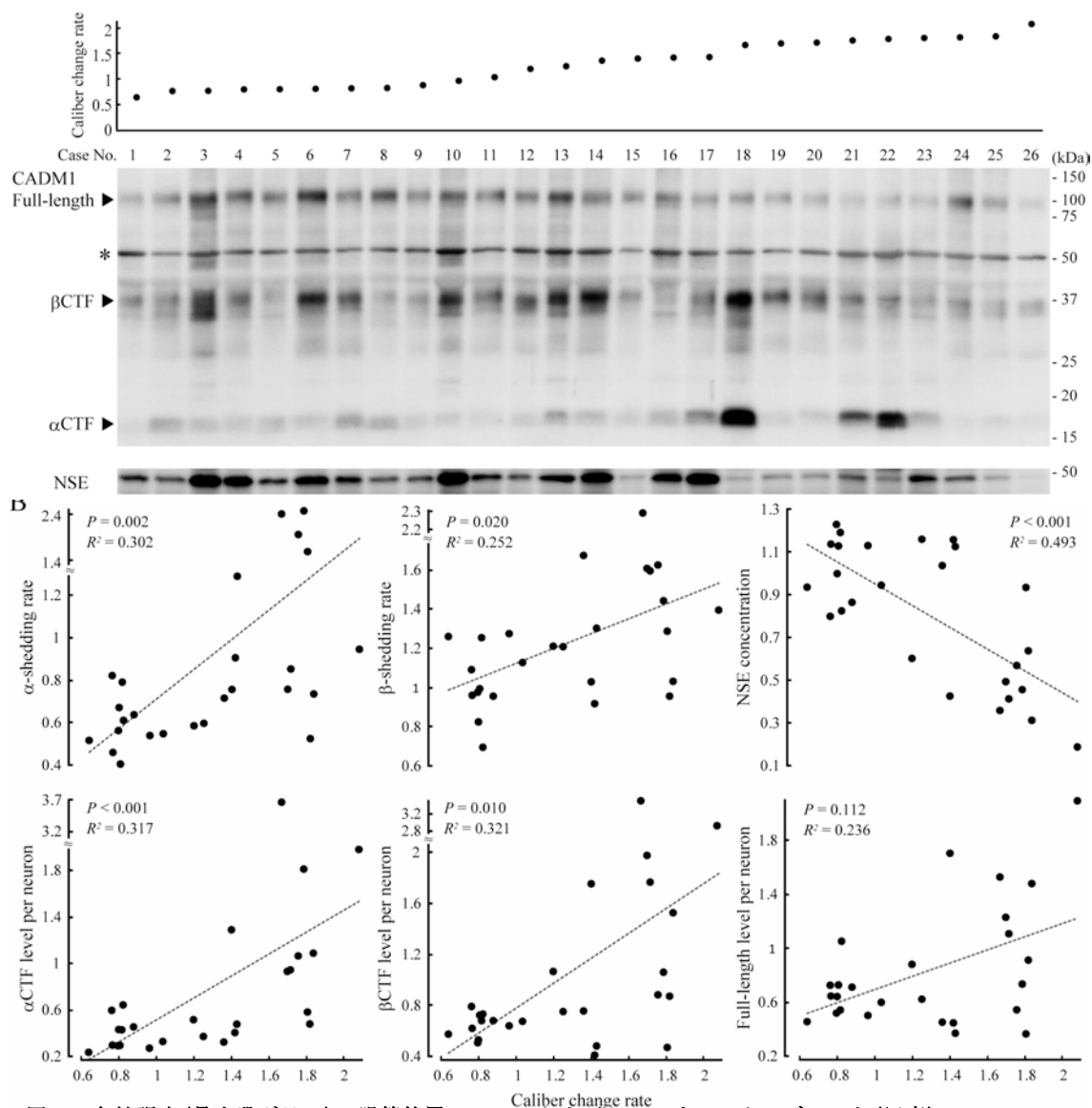


図4 各拡張率(最上段グラフ)の腸管筋層のCADM1およびNSEのウェスタンブロット(写真)
下段のグラフは拡張率(X軸)と α -shedding率、 β -shedding率、NSE量、神経細胞あたりの α CTF、 β CTF、全長型の発現量(各Y軸)との相関解析結果

(2) 水柱圧付加による初代神経細胞の変性とCADM1発現変化

① 水柱圧上昇による神経繊維の菲薄化と減少およびCADM1とミトコンドリアの局在変化

マウス後根神経節細胞を2, 15, 30, 45cm水柱下で3日間培養したところ、2, 15cm下では神経線維網は密に構築され、CADM1は神経繊維上に均一に存在していたが、30, 45cm下では神経繊維の密度は減少し、神経繊維自体も菲薄化していた(図5)。さらにCADM1は神経線維上で散在し、部分的な凝集が見られた(図5)。ミトコンドリアの局在も同様に変化しており、30, 45cm下では神経線維上のミトコンドリア数は減少し、CADM1の凝集が見られる箇所に凝集が多く見られた(図5)。これらの細胞を用いてウェスタンブロットを行ったところ、水柱下の上昇に伴って α -sheddingの亢進が見られた。

② α CTF高発現による神経線維変性

①で見られた高圧条件下における α CTF蓄積の影響を調査するため、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入によってマウス後根神経節細胞に α CTFを高発現させた。 α CTF高発現神経細胞では神経線維密度の低下、CADM1の凝集と凝集箇所でのミトコンドリア蓄積が再現され、 α CTFの蓄積凝集が神経線維変性を惹起することが示唆された(図7)。興味深いことに、 α CTFのアミノ酸配列ADDAADADTAIをGGGGGGGAGVに置き換えた変異体(α CTFmut)では神経線維上で

の凝集や神経変性は見られず、この現象には α CTF の特定のアミノ酸配列が必須であることが分かった。

[総括]

本研究は CADM1 の shedding という細胞変性/細胞死の一現象を介して、腸内圧の上昇が腸管神経系変性を惹起するという仮説を検証した点において意義深い。加えて、高圧負荷モデルとして新たに安価で簡便な装置を開発した点も重要な成果である。本培養装置は不死化細胞株や初代培養細胞だけでなく、組織培養にも応用可能であり、将来的に多様な研究分野での発展が見込まれる。本研究成果は神経科学専門誌 *Molecular Neurobiology* に発表した。また本研究を含めた研究者らのグループによる一連の研究成果は科学系一般紙 *Science Impact* において紹介されている。

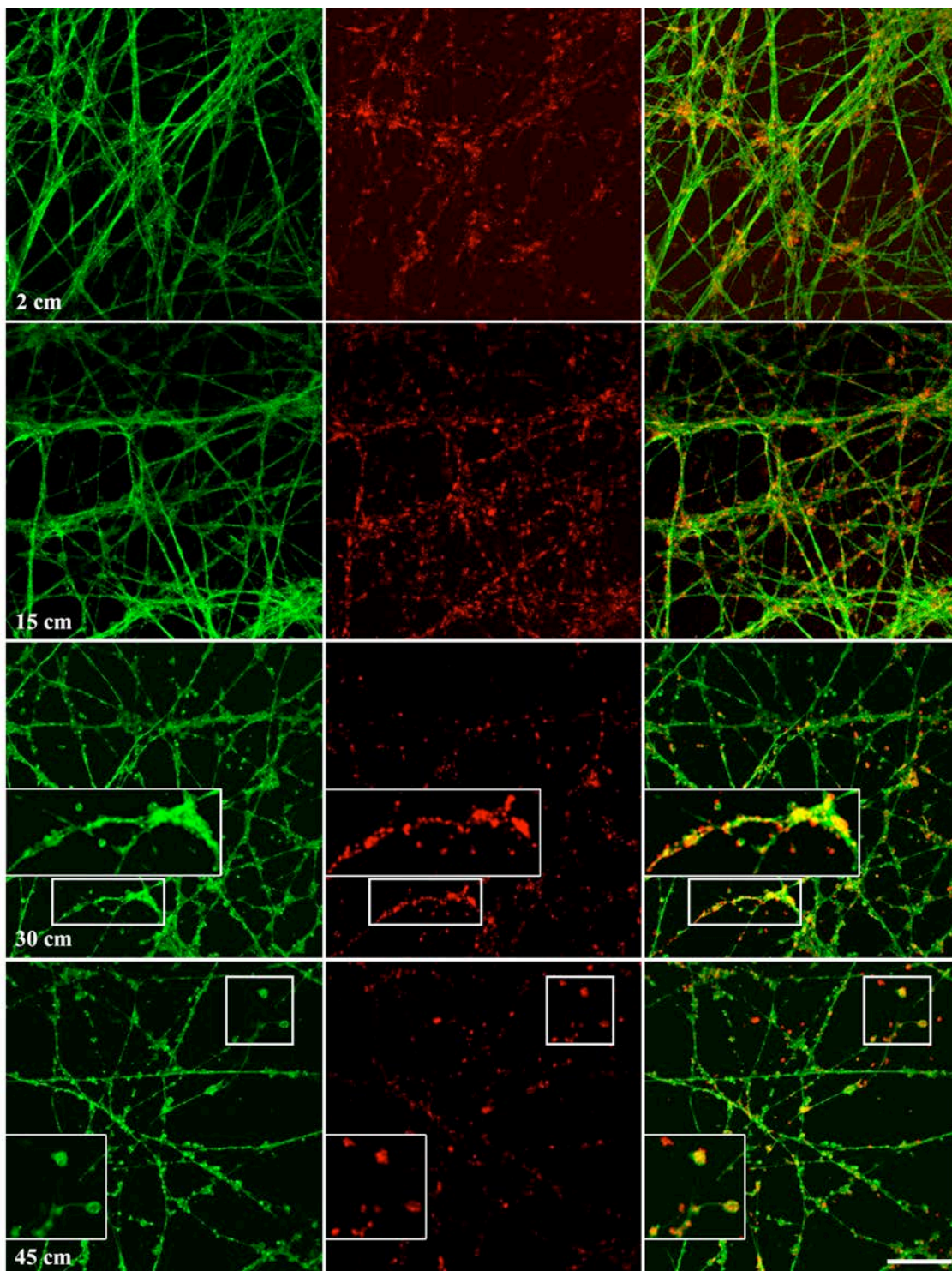


図5 水柱 2, 15, 30, 45cm 培養後のマウス後根神経節細胞の CADM1 免疫染色(緑)および MitoTracker(赤)染色

(3) 緑内障発症誘導因子の探索

以上の研究成果から、研究者らが考案した加圧培養装置は実験モデルとして有用であることが証明された。そこで新たな研究展開として、内圧上昇と神経変性との関連がより明確であり、

確立された動物モデルが多い緑内障を選択することにした。
アレイ解析において1.5倍以上の発現変化が見られた遺伝子群を用いてGO解析を行ったところ、損傷後4日までにアポトーシスや免疫応答、細胞周期、機械的刺激に関わる遺伝子群の発現が上昇し、視覚やイオン輸送に関わる遺伝子群は低下していた。中でも Atf3, Lcn2, Tnfrsf12a は網膜神経節細胞層を用いたリアルタイムPCR解析においても20倍以上発現量が増加していることが分かり、ウエスタンブロットおよび免疫染色によっても発現上昇が確認された。

[総括]

本研究の結果は既報論文と一致しており、新奇性は無いものの過去の研究の再現性を確認し、今後の研究において有望な因子を明確に示した点において評価される。本件は近畿大学医学部眼科学教室および鈴鹿医療科学大学薬学部中枢神経薬理学教室との共同研究で、眼科学専門誌 Investigative Ophthalmology & Visual Science に発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件) 全て査読有り

1. Kimura R, Yoneshige A, Hagiya M, Otani T, Inoue T, Shiraishi N, Yanagihara K, Wakayama T, Ito A. Expression of cell adhesion molecule 1 in gastric neck and base glandular cells: Possible involvement in peritoneal dissemination of signet ring cells. *Life Sci.* 2018, 213:206-213. doi:10.1016/j.lfs.2018.10.017.
2. Ri A, Hagiya M, Inoue T, Yoneshige A, Kimura R, Murakami Y, Ito A. Progression of Pulmonary Emphysema and Continued Increase in Ectodomain Shedding of Cell Adhesion Molecule 1 After Cessation of Cigarette Smoke Exposure in Mice. *Front Cell Dev Biol.* 2018, 6:52. doi:10.3389/fcell.2018.00052.
3. Ueno S, Yoneshige A, Koriyama Y, Hagiya M, Shimomura Y, Ito A. Early Gene Expression Profile in Retinal Ganglion Cell Layer After Optic Nerve Crush in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018, 59(1):370-380. doi:10.1167/iovs.17-22438.
4. Kato T, Hagiya M, Takashima Y, Yoneshige A, Ito A. Cell adhesion molecule-1 shedding induces apoptosis of renal epithelial cells and exacerbates human nephropathies. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2018, 314(3):F388-F398. doi:10.1152/ajprenal.00385.2017.
5. Takashima Y, Murakami T, Inoue T, Hagiya M, Yoneshige A, Nishimura S, Akagi M, Ito A. Manifestation of osteoblastic phenotypes in the sarcomatous component of epithelial carcinoma and sarcomatoid carcinoma. *Tumour Biol.* 2017, 39(6):1010428317704365. doi:10.1177/1010428317704365.
6. Yoneshige A, Hagiya 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.* 54(8):6378-6390. doi:10.1007/s12035-016-0166-y.

[学会発表] (計 6 件)

1. 米重あづさ、萩山満、井上敬夫、木村竜一朗、高島康利、伊藤彰彦 腫瘍狭窄に伴う拡張結腸での筋層神経変性:接着分子 CADM1 の細胞外切断の関与 第106回日本病理学会総会 2017年
2. 萩山満、米重あづさ、井上敬夫、木村竜一朗、高島康利、伊藤彰彦 病的内圧を再現する培養装置の開発:圧付加は接着分子 CADM1 の shedding と神経変性を惹起する 第106回日本病理学会総会 2017年
3. 米重あづさ、萩山満、伊藤彰彦 肺上皮接着分子 CADM1/TSLC1 の細胞外切断亢進が特発性間質性肺炎における上皮アポトーシスの一因となる 第75回日本癌学会学術大会 2016年
4. 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回日本癌学会学術大会 2016年
5. 米重あづさ、村上哲平、井上敬夫、西村俊司、伊藤彰彦 悪性上皮性腫瘍内の肉腫様成分における骨芽細胞分化マーカーの発現 第105回日本病理学会総会 2016年
6. 萩山満、米重あづさ、井上敬夫、伊藤彰彦 接着分子 cell adhesion molecule 1 の細胞内切断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 2016年

[その他]

1. 英国科学系一般紙 Science Impact への記事投稿
(<https://www.ingentaconnect.com/content/sil/impact/2019/00002019/00000004/art00024>)

6. 研究組織

- (1) 研究分担者
- (2) 研究協力者

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。