

令和 6 年 9 月 6 日現在

機関番号：32206  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2018～2023  
課題番号：18K07025  
研究課題名（和文）肺破壊性疾患（肺気腫）における新規バイオマーカーの開発  
  
研究課題名（英文）Identification of Emphysema Specific Degradation Marker  
  
研究代表者  
潮見 隆之（Shiomi, Takayuki）  
  
国際医療福祉大学・医学部・教授  
  
研究者番号：80348797  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究計画は、肺気腫におけるMMP1による細胞外基質分解産物をはじめとした肺組織構築破壊と相関を示す特異的生体分子の同定と、それらを用いたバイオマーカーとしての検出系の確立を目指した。MMP1トランスジェニックマウスを用いて肺組織、BAL、血清から質量分析法を用いてスクリーニングを行い、最終的に6分子の特異的生体分子を同定し、そのうち3分子はMMP1の直接的な基質であることを生化学的に確認した。加えて、これらの分子についてELISA測定系の確立を試みた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、肺気腫の臨床診断で用いられている放射線画像診断手法および生理学的肺機能検査法は不可逆的組織構築変化後の構造および機能変化を検出する系であり、この過程・程度をin vivoでモニターする方法は確立されていない。また正常肺組織構造・機能への修復が起こりうる初期の肺組織構築変化過程を検出することは不可能である。本研究の成果は、肺気腫の分子病理学的機構の解明および新規治療法の開発に貢献すると事が期待される。

研究成果の概要（英文）：The goal of this research project was to find specific biomolecules related to the destruction of lung tissue structure in emphysema. We focused on identifying the degradation fragment of the extracellular matrix by MMP1 and developing a detection method using these biomolecules as biomarkers. In the end, we identified six specific biomolecules, three of which were confirmed to be direct targets of MMP1. Additionally, we attempted to establish an ELISA assay system for these molecules.

研究分野：人体病理学

キーワード：細胞外基質 分解酵素 肺気腫 スクリーニング バイオマーカー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺気腫は、日本国内における男性の死亡原因第8位(男女合わせて約16,000人/年)、世界では第4位(300万人/年)を占め、2030年には虚血性心疾患、脳血管障害に次いで世界第3位になると予測される重要な疾患である。形態学的には、正常肺組織構築の不可逆的破壊として特徴づけられる。同疾患の発症および進行には、喫煙が最も重要なリスク因子として知られている。しかし詳細な分子病理学的機構は不明であり、これを標的とした治療法は未だに確立されていない。肺気腫の発症および進行に関わる因子は複数あると考えられているが、結果として細胞成分の消失および細胞外基質の分解が引き起こされる。このプロセスこそが、肺気腫の組織学的な特徴を作り出している。肺組織構築改変過程においては、タンパク分解酵素の発現亢進と内因性インヒビターの抑制による細胞外基質代謝のバランスの変化が、細胞死および細胞外基質の消失を引き起こすことが明らかにされてきた。肺実質における主要な細胞外基質であるコラーゲンおよびエラスチンを消化できる分解酵素は、炎症細胞だけではなく、肺上皮細胞からも産生されることが報告されている。種々の細胞外基質分解酵素の中で、組織コラーゲナーゼ1(Matrix metalloproteinase-1; MMP1)はヒト肺気腫症例での発現亢進が知られており、かつ肺上皮細胞において発現している。これは肺気腫以外の多くの炎症性肺疾患でも認められる、好中球およびマクロファージをはじめとした炎症細胞で発現亢進を認める他の細胞外基質分解酵素とは対照的である。更に、MMP1は肺上皮細胞においてタバコの煙によりTLR4-MAPK系を介してその発現が亢進することが明らかにされてきた。これらのデータは、MMP1が肺気腫における組織構築改変において特異的であり、かつ重要な細胞外基質分解酵素であることを示唆している。しかしMMP1は細胞外基質に対する結合性が高く肺組織のホモジネートからのみ検出が可能であり、その測定の臨床利用は困難である。

### 2. 研究の目的

そこで本研究計画では、MMP1発現亢進により気管支肺胞洗浄液(以下BAL)及び血清に遊離する細胞外基質分解産物をはじめとした特異的タンパク質の検出を目指す。これらの分子は肺気腫のバイオマーカーとなるだけでなく、肺気腫の分子機構の解明および患者のマネジメントに大きな意義を持つ可能性がある。具体的には、1)他の炎症細胞由来の細胞外基質分解酵素と比較し、より疾患特異的なパラメータとなりうる、2)現在利用可能な画像診断手法および生理的肺機能検査と比較し、より早期の段階での肺気腫発症を検出できる可能性がある、3)疾患進行のモニタリングおよび予後予測を放射線被曝無く頻回に実施可能であり、更に患者個人および施設間でのバラツキが大きい生理機能検査と比べて客観的に評価可能であること、などが挙げられる。これまで細胞外基質分解産物を対象としたバイオマーカーとして、心疾患における13型コラーゲン分解産物、関節リウマチにおけるアグリカネース分解産物などが同定され、臨床で利用されている。肺気腫の発症には、MMP1をはじめとした細胞外基質分解酵素の発現を制御する上流の分子機構が存在し、これらを標的とした治療法の開発も期待される。しかし、現時点では画像診断及び肺機能検査以外の客観的な肺組織破壊を反映する検査法が存在しないため、新規治療法の有効性の評価が難しい。その観点からも、本研究提案の目的であるMMP1肺気腫モデルを用いた肺気腫特異的生体分子の同定が、重要な意味を持つと考える。

### 3. 研究の方法

具体的な研究として、以下の2つの大項目を行った。

研究計画1 MMP1による肺気腫特異的細胞外基質分解産物をはじめとした特異的生体分子のスクリーニングと同定

研究計画2 上記候補分子のin vitro/vivoでの確認と、検出系の確立

以上の2つの計画により、肺組織破壊特異的バイオマーカーを同定し、さらに臨床応用可能な特異的測定系の確立を目指した。

本研究計画で使用予定のMMP1肺気腫モデルは、上記の目的に理想的な系である。マウス喫煙肺気腫モデルやヒト疾患からの検体では、肺気腫自体が多くの病因によって引き起こされること、また肺気腫以外の種々の肺疾患でも見られる炎症反応を伴うため、肺気腫に特異的ではない雑多な分子的变化を引き起こす。しかし本実験系では、肺気腫に特異的な細胞外基質分解酵素による変化のみを測定できる。もう1点は、マウスには遺伝子導入をするヒトMMP1に相当する有効な相同分子が存在しない点(マウスのMmp1a/b遺伝子は酵素活性中心のアミノ酸が置換されており、ヒトMMP1や他のMMP分子で認められる細胞外基質に対する酵素活性を欠いている)が挙げられる。従って、本研究計画で同定されるMMP1特異的分子シグネチャーはヒトMMP1に特異的なマーカーとなる。次に、それぞれの計画について具体的な方法を説明する。

計画1 1)初期スクリーニング ヒトMMP1トランスジェニック(以下MMP1TG)マウスおよび野生型マウス(以下WT)マウスより、肺組織、BALおよび血清をサンプリングする。これらの試料は、既に確立済みの質量分析計によるショットガンタンパク同定法のためのプロトコールに従い処理を行い、質量分析(LC-MS)による解析を行った。

2)2次スクリーニング 上記で同定した分子について、サンプルの数を増やして特にBALおよ

び血清サンプルの分析を行い、確実に同定可能であり、特異的な分子を同定した。

3) 3次スクリーニング 選抜された候補分子について、その特異性を検定する。MMP1 TG マウスに MMP1 特異的活性阻害剤である Ro-32-3555 を投与し、上記分子の量が特異的に変化することを確認し、MMP1 酵素活性に特異的な分子を同定した。

同定・分析には、いずれも label-free LC-MS による shotgun proteome 解析を利用予定した。概要としては質量分析装置のイオン化エネルギーを低エネルギー状態から高エネルギー状態まで可変させ、そのスペクトラムを対照群と比較し、特異的なピークを同定する。これらのピークについては、高エネルギーをかけてペプチド鎖を開裂し、そのアミノ酸配列まで決定可能であり、これによりタンパク質の特定を行った。

計画 2 1) 生化学的アッセイ MMP1 と候補タンパク質を用い生化学的にその分解活性を検定した。具体的には、分解活性の時間・量依存性を確認し、分解産物の切断箇所の同定を行った。続いて候補分子に関しては、マウスおよびヒト両方のタンパクを用い臨床応用する際に問題が生じないことを確認した。加えて、これらが MMP1 の直接的な基質でない分子については、pathway analysis を用い、MMP1 上昇による特異的分子の制御機構を試みた。

2) Neo-epidope 抗体の確立 上記の実験で同定した MMP1 の基質である候補分子に対して、neo-epidope をターゲットとした分解産物特異的抗体の樹立を行った。

3) 上記抗体の確認 確立した抗体について、計画 1 で得られた BAL および血清をサンプルとして western blot を用いて in vivo モデルからの分子を測定可能であることを確認し、続いて最終ステップとして ELISA 測定系の確立を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) 始めに初期スクリーニングの実験を遂行した。具体的には、MMP1TG マウスおよび WT マウス肺組織より、既に確立済みの質量分析計によるショットガンタンパク同定法のためのプロトコールに従い処理を行い、質量分析(LC-MS/MS)による解析し、候補分子を複数同定した。約 50% は細胞外基質分子であり、その他増殖因子なども見出した。これまで肺組織破壊を引き起こす疾患との関連が報告されていない分子も複数あった。当初、上記実験は所属施設で行う予定であったが施設整備の遅れが生じたため、米国コロンビア大学の協力研究者である Jeanine D'Armeiento 博士の支援および同大学の proteomics core を利用することによって実験を遂行した。

続けて 2 次スクリーニングを行った。具体的には、肺気腫発症マウスモデルから BAL および血清を採取し、1 次スクリーニングで同定できた分子の検出可能性について検討した。結果、BAL で検出できた候補分子が 8 分子、BAL および血清の両方で検出できた分子が 5 分子であった。更に、どちらのサンプルからも検出できなかった分子は 4 分子であった。同定不能分子はいずれも細胞外基質分子であり、これらの物質は BAL 及び血清分画に出現していないことが示唆された。

最終段階の 3 次スクリーニングでは、MMP1 活性阻害剤をモデルマウスに投与し、これらの候補分子の量に変化があるかを検討した。候補となった 13 分子中、合計で 6 分子について、活性阻害剤量依存的に特異的生体分子の減少が確認された。

計画 1 がすべて終了した段階で、結果として 6 分子の肺気腫特異的生体分子の候補を確定した。次に計画 2 の 1) による生化学的アッセイにより 6 分子中 3 分子が精製した活性型 MMP1 による、基質として時間及び量依存的分解活性を確認した。また候補分子に関しては、マウスおよびヒト両方のタンパクを用い臨床応用する際に問題が生じないことも確かめた。引き続き、2) の neo-epidope 抗体樹立のためのペプチドを設計した。また基質活性が無かった残りの 3 分子については、pathway analysis による制御機構に関する仮説モデルを作成した。

計画 1 MMP1 による肺気腫特異的細胞外基質分解産物をはじめとした特異的生体分子のスクリーニングと同定：モデルマウスを用いた 1 次スクリーニング、2 次スクリーニングとして BAL および血清で同定可能な物質を選択(臨床応用を目標としているため、これらのサンプルから検出可能な分子を選択) さらに 3 次スクリーニングとして MMP1 阻害剤を用い MMP1 発現特異的な肺気腫関連分子の同定のステップを通して候補遺伝子を同定すを行った。この結果として 6 分子の肺気腫特異的生体分子候補を同定した。

(2) 同定に引き続き研究計画 2 を行った。まず上記 6 候補分子の生化学的アッセイとして、MMP1 と候補タンパク質を用い生化学的にその分解活性を検定した。結果、3 分子が精製した活性型 MMP1 による、基質として時間及び量依存的分解活性を確認した。

続いて、上記の実験で同定した候補分子の MMP1 による切断部位を中心に neo-epidope 抗体樹立のためのペプチドを設計し、モノクローナル抗体を作成した。サンドイッチ ELISA システム自体は in vitro で生成させた切断分子の検出に成功したが、上記動物モデルのサンプルでの検出に至らなかった。この理由に関しては、生体内サンプルからの検出には十分な検出感度が得られていないこと、また抗体結合部位が他の生体内分子と結合することによりマスクされている等の可能性があり、現在 ELISA 系の感度向上およびサンプルの前処理方法について検討を加えている最中である。

尚、また基質活性が無かった残りの 3 分子については pathway analysis による制御機構に関する仮説モデルを作成した。これによると 2 分子については、key regulator となっている事が示

唆され非酵素基質分子ながら肺気腫の病態形成に関わる特異的分子である可能性が考えられた。同因子については遺伝子改変動物モデルを用いた肺気腫発症の解析に進める状況であり、現在詳細な実験計画を作成中である。

以上より、期間内に完全に実験計画を完遂し結果を得るには至らなかったが、当初予定していた肺気腫をはじめとした肺組織構築改変(特に破壊性疾患)の程度を反映するバイオマーカーの確立、および新たな分解制御機構の解明という結果が得られる事が目前の状態である。また期間中、当該分野においては同様の内容の研究成果はなく、インパクトの大きな成果が期待出来る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okaba Keisuke, Inokuchi Go, Horioka Kie, Iwase Hirotarō, Inoue Hiroyuki, Motomura Ayumi, Ishii Namiko, Moue Chihiro, Shiomi Takayuki, Yajima Daisuke	4. 巻 138
2. 論文標題 Forensic application of three interstitial pneumonia markers: search for new pneumonia markers in dead bodies	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Legal Medicine	6. 最初と最後の頁 1583 ~ 1592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00414-024-03187-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Adam Gerber, Shiomi Takayuki, Monica Goldklang, Jarrod Sonett, Vincent Anguiano, Becky Mercer, Tina Zelonina, Jeanine D'Armiento	4. 巻 35
2. 論文標題 Suppression of cigarette smoke induced MMP1 expression by selective serotonin re uptake inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001966RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 潮見 隆之, Paul Elkington and Jeanine D' Armiento
2. 発表標題 MMP-1発現抑制による肺結核空洞形成の阻止
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 潮見 隆之
2. 発表標題 間質分泌因子 SFRP1 による肺組織構築変化の制御
3. 学会等名 第65回日本病理学会秋期 特別総会 / 日本肺病理学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	湯澤 聡 (Yuzawa Satoru)  (40515029)	国際医療福祉大学・医学部・講師  (32206)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Columbia University		