

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590898

研究課題名 (和文) セレクチンリガンドを有する KL-6/MUC1 分子の臨床病理学的意義

研究課題名 (英文) Clinicopathological role of kl-6/muc1 with selectin ligand

研究代表者

横山 彰仁 (YOKOYAMA AKIHITO)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：30191513

研究成果の概要 (和文)：間質性肺炎のマーカーとして既に臨床応用されている KL-6 (可溶性 MUC1) の中に、セレクチンリガンドを持つ分子 (SLAK と命名) が存在する。SLAK は急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) で高値であり、経過中の DIC の合併を予測する優れたマーカーであることを明らかにした。今後、SLAK を測定することで、死亡に直結しうる DIC の発症を診断時に予知し、早期に低分子ヘパリンなどを用いることで、極めて不良の ARDS の予後改善に寄与する可能性がある。

研究成果の概要 (英文)：KL-6/MUC1 is a sensitive biomarker for interstitial pneumonias. We found KL-6/MUC1 mucins with selectin ligand (designated as SLAK). SLAK was found to be significantly elevated in ARDS patients. Furthermore, SLAK was discovered to be a sensitive, specific and independent predictor for DIC complication in ARDS. Therefore, measurement of SLAK level at diagnosis may be able to predict accurately future complications of DIC in ARDS. Early intervention with anti-DIC medication such as low-molecular-weight heparin in the patients with elevated level of SLAK may improve the prognosis of ARDS, which is currently extremely poor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：MUC1 ムチン、KL-6、急性呼吸窮迫症候群、セレクチン、汎発性血管内凝固症候群

1. 研究開始当初の背景

- (1) これまで MUC1 ムチン上のエピトープである KL-6 抗原が、種々の間質性肺疾患で上昇することを見出し、間質性肺炎の診断や病勢の判断に有用であることを明らかにしてきた (Kohno N, et al. *Am Rev Respir Dis* 1993; Yokoyama A, et al. *Am J Respir Crit Care Med* 1998)。
- (2) 従来から、癌性ムチンにはトロンビンなどで活性化された血小板を凝集させる作用が知られており (Kim YJ, et al. *Am J Pathol* 1999)、また癌性ムチンをマウスに投与することで血小板に富んだ血管内血栓を生じることが報告されている。この血栓の生成は、抗 P-あるいは L-セレクトイン抗体で抑制可能であることから、その機序として癌性ムチン上のセレクトインリガンドが関与しているものと考えられた。
- (3) MUC1 ムチンは巨大分子であり、その分子上には種々のエピトープが存在すると想定され、先の癌性ムチンのように、セレクトインリガンドをもつ MUC1 も存在する可能性が高いと考えた。そうした分子を検出する系を確立すべく検討した結果、少なくともシアリルルイス a を有する KL-6/MUC1 亜分子 (CA19-9 または ST272 抗体と KL-6 抗体でサンドイッチされる分子: SLAK と命名) を測定することが出来た。

2. 研究の目的

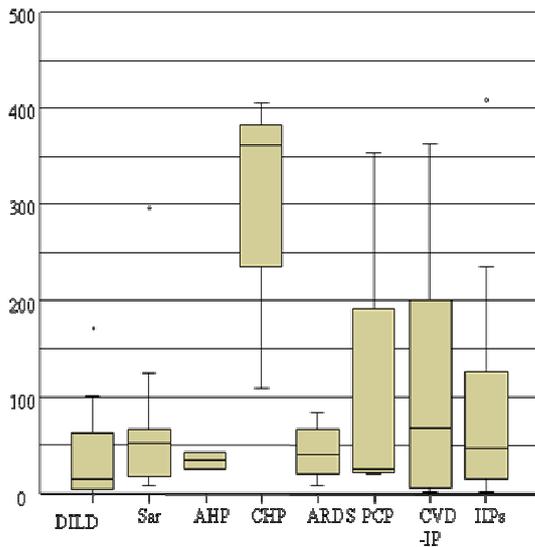
- (1) ARDS のほか、特発性間質性肺炎 (IIPs) や過敏性肺炎など KL-6 が上昇するような疾患における SLAK の測定意義を臨床的に明らかにする。その際、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の濃度をあわせて測定し、SLAK の由来 (肺であるか、あるいは肺以外か) を明確にする。
- (2) 臨床的に、肺癌 (非小細胞肺癌) および ARDS 患者、特発性肺線維症 (IPF) の急性増悪において、SLAK 測定により、DIC の合併および予後の予測がどの程度可能か明らかにする。
- (3) SLAK の発現機序、制御機構を明らかにする。
- (4) SLAK を精製し、DIC を引き起こす原因分子である可能性を明確にする。また、可能であれば KL-6/MUC1、SLAK を発現する動物モデルの開発を行う。

3. 研究の方法

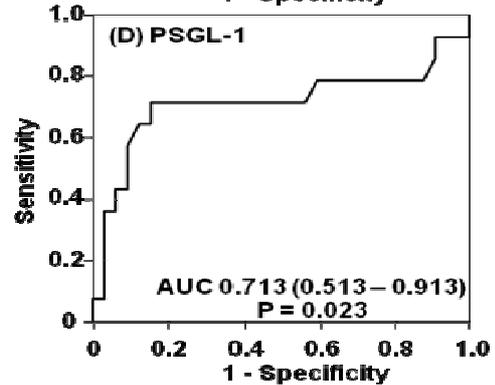
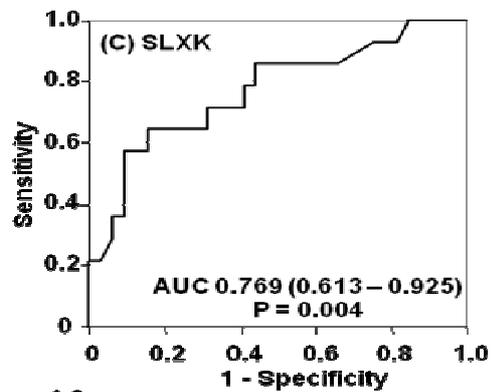
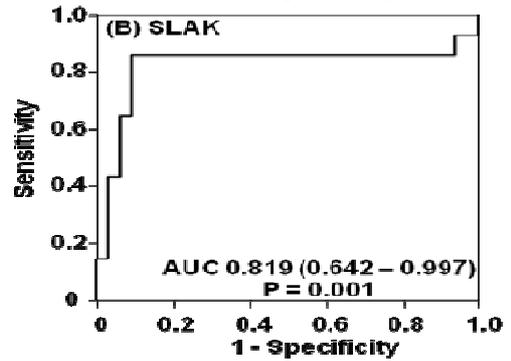
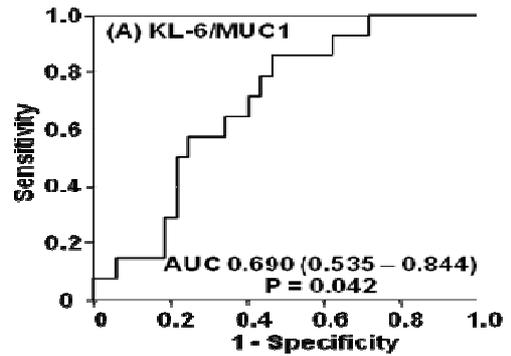
- (1) KL-6 が上昇するような肺疾患における血清および BALF 中 SLAK 濃度の測定。IIPs、膠原病肺、過敏性肺炎など KL-6 が上昇することが知られている肺疾患患者の臨床情報がデータベース化された保存血清および BALF を用いて、SLAK のほか、KL-6、CA19-9、ST272 を測定する (横山)。BALF については、微量アルブミンや尿素を測定し、補正する。
- (2) 肺癌および ARDS、IPF 急性増悪患者において、SLAK 値は DIC の合併および予後の予測因子となるのか。Retrospective に測定した SLAK の値と以下の項目について検討する。ARDS 患者については、性別、年齢、KL-6、LDH、CRP、人工呼吸器の設定、PaO₂/FiO₂、pH、APACHEII のほか、DIC の合併の有無 (DIC スコア) を経時的に調査し、また予後をカルテベースで検索する。予後について多変量解析を行う。肺癌については、年齢、性別、喫煙歴、組織型、TNM 因子、病期 (TNM 分類)、パフォーマンスステータス、d-dimer、CEA、CYFRA、Pro-GRP を調査する。未測定のものについては CA19-9、KL-6 についても測定する。
- (3) SLAK の発現機序、制御機構。分子機序を明らかにする目的で、腺癌細胞株を用いて、培養上清中の SLAK、KL-6 を測定し、KL-6 を産生する細胞株のうち、SLAK 産生細胞株と非産生細胞株をそれぞれ 2 株程度選定する。これらの細胞株を用いて、microarray を用いて網羅的に mRNA を解析する。またさらに、TNF- α ・IFN- γ などのサイトカイン添加時の SLAK 分子産生能を培養上清中の SLAK 分子を測定することにより検討する。
- (4) 上記の SLAK 産生細胞株と非産生細胞株を大量培養し、培養液から MUC1 を精製し、動物に投与する。ヒト MUC1 トランスジェニックマウスなどにおいて、血中 KL-6、SLAK が検出されるか検討する。

4. 研究成果

- (1) BALF 中の SLAK は下図 (各疾患における SLAK 値の分布) のように特に慢性過敏性肺炎において高値を示すことが明らかになった。



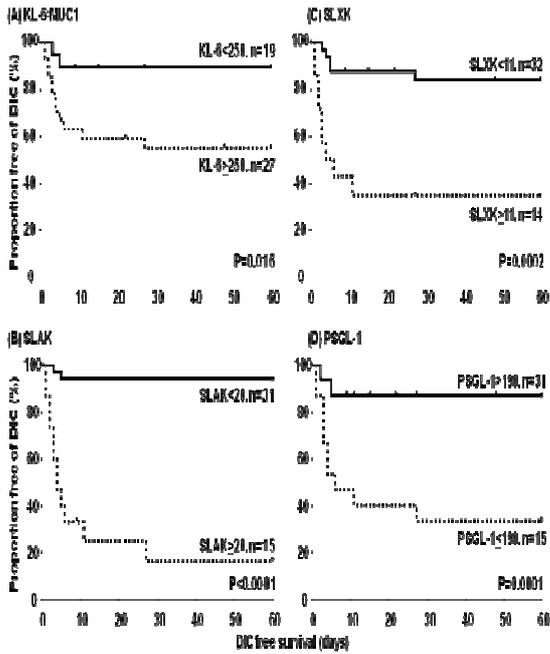
(2) ARDS (n=46)、細菌性肺炎(n=17)、健常人(n=60)について、KL-6/MUC1, SLAK (KL-6/MUC1 carrying sialyl Lewis^a), SLXK (KL-6/MUC1 carrying sialyl Lewis^x), および P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) を測定した。血清のセレクチンリガンドを有するムチンは健常人に比べ有意に増加し、DICを合併ARDSにおいては、診断時のSLAK、SLXKがDICを合併しないものに比較して増加していた。PSGL-1については、DIC合併例において有意に低下していた。SLAKがARDSにおけるDIC発症の予測因子となるか明確にするために、ARDS患者の年齢、性別、KL-6、LDH、CRP、人工呼吸器の設定、PaO₂/FiO₂、動脈血pH、APACH-IIスコアなどと比較して単変量、多変量解析(上記表)を行った。SLAKはARDSにおけるDIC合併を予測する独立した因子であることが明らかになった。また下記のROC解析の結果、諸因子のなかでSLAKは最も高いAUCを有しており、これらを用いてカットオフ値を決定すると、最も高い感度、特異度を有していた。さらにDIC free survivalについてKaplan-Meier解析を行うと、下図のようにSLAKが最も差が大きかった。



多変量解析

項目	HR	95%CI		p
		Lower	Upper	
KL-6/MUC1 (≥324 U/ml)	1.163	0.183	7.403	0.873
SLAK (≥10.1 U/ml)	8.722	1.546	49.204	0.014

SLXK (≥6.4 U/ml)	1.155	0.226	5.904	0.862
LIS (≥2.67 APACHE II score (≥20) ARDSの原因 (direct))	1.288	0.286	5.804	0.742
	3.986	0.894	17.779	0.698
	1.736	0.304	9.897	0.535



以上のことから、SLAKはARDSにおけるDIC合併を予測する新規のバイオマーカーとなりうるものであり、ARDSにおけるDIC発症に関与している可能性が考えられた。以上については現在投稿 (revise) 中である。

(3) SLAKの発現機構を明らかにするために、肺癌の細胞株のスクリーニングを行った。すでにSLAKを産生することが明らかなPC-3のほかに、①RERF-LC-Ad1 (Ad1)、②RERF-LC-Ad2 (Ad2)、③RERF-LC-MS (MS) ④VMR-LCD (LCD)、⑤RCB0440 LC-2/Ad、⑥RCB0446 PC-14 について検討し、LC-2/AdとAd2がSLAKを産生しうることが明らかになった。今後、これらの細胞を用いて、mRNAのmicroarrayによる検討を行う。

(4) これまでマウス等の動物においてKL-6/MUC1の発現は認められず、動物実験が不可能であった。しかし、ヒトMUC1コア蛋白のトランスジェニックマウスでは、KL-6の発現が認められることを明らかにした。特許取得機関との調整が終了し、本マウスを米国より輸

入し繁殖し、本マウスは通常のマウスでは検出されないKL-6が人と同程度の血中濃度で検出されること、ブレオマイシンモデルにて血中にKL-6が増加することを明らかにした。今後、SLAK発現の有無を検討する。

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 40 件)

- ① Senoo T, Hattori N, Tanimoto T, Furonaka M, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Yokoyama A, Kohno N. Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis. *Thorax* 2010;65:334-40
- ② Iwamoto H, Yokoyama A, 他 7 名. Airflow Limitation in Smokers is Associated with Subclinical Atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:35-40
- ③ Onari Y, Yokoyama A, 他 5 名. IL-12p40 is Essential for the Down-regulation of Airway Hyperresponsiveness in a Mouse Model of Bronchial Asthma with Prolonged Antigen Exposure. *Clin Exp Allergy* 2009;39:290-8.
- ④ Ohtstuki Y, Kobayashi, M, Yoshida S, Kishimoto N, Kubo K, Yokoyama A, Lee G-H, Furihata, M. Immunohistochemical localization of surfactant proteins A and D, and KL-6 in pulmonary alveolar proteinosis. *Pathology* 2008;40:536- 539
- ⑤ Nakashima T, Yokoyama A, 他 6 名. Circulating KL-6/MUC1 as an independent predictor for disseminated intravascular coagulation in acute respiratory distress syndrome. *J Intern Med* 2008; 263:432-9
- ⑥ Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, 他 9 名. Usefulness of monitoring the circulating Krebs von den Lungen-6 levels to predict the clinical outcome of patients with advanced nonsmall cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Int J Cancer* 2008;122: 2612-20
- ⑦ Nakashima T, Yokoyama A, 他 7 名. Suppressor of cytokine signaling1 inhibits pulmonary inflammation and fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1269-76
- ⑧ Inata J, Hattori N, Yokoyama A, Ohshimo S, Doi M, Ishikawa N, Hamada H, Kohno N,

Circulating KL-6/MUC1 mucin carrying sialyl Lewis x oligosaccharide is an independent prognostic factor in patients with lung adenocarcinoma
Int J Cancer, 2007;120:2643-2649

〔学会発表〕(計 48 件)

- ① 横山彰仁：KL-6/MUC1 の基礎と臨床. 第 68 回日本癌学会学術総会 ランチョンセミナー2009年10月1-3日 横浜
- ② 横山彰仁：「間質性肺炎の血清マーカー UpToDate」第61回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会モーニングセミナー 2008年11月7日 沖縄

〔図書〕(計 4 件)

- ① 横山彰仁. グッドパスチャー症候群. 山口徹 総編集、今日の治療指針 2009 医学書院、東京、2009、pp598
- ② 横山彰仁. 「正常構造」「好酸球性肺炎」「肺性心」「アスピリン喘息」ほか。河野修興監修、横山彰仁、服部登編. 「まんがで読み解く呼吸器疾患 100」メディカルビュー者、東京、2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 彰仁 (YOKOYAMA AKIHITO)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：30191513

(2) 研究分担者

河野 修興 (KOHNO NOBUOKI)
広島大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：80215194
(H20 年度～連携研究者へ)

服部 登 (HATTORI NOBORU)
広島大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：00283169
(H20 年度～連携研究者へ)

石川 暢久 (ISHIKAWA NOBUHISA)
広島大学・附属病院・助教
研究者番号：90423368
(H20 年度～連携研究者へ)

岩本 博志 (IWAMOTO HIROSHI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：60457398
(H20 年度～H21 年度)

酒井 瑞 (SAKAI MIZU)
高知大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：40403886
(H20 年度～H21 年度)

大西 広志 (OHNISHI HIROSHI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：90553876
(H21 年度)