

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390222

研究課題名(和文) セレクチンリガンドを有するKL-6/MUC1の発現機序の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Clinical application and expression mechanisms for KL-6/MUC1 having a 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円、(間接経費) 4,110,000円

研究成果の概要(和文)：重症肺障害である、成人呼吸促迫症候群(ARDS)ではDIC(血管内で凝固が生じる病態)が予後を決める重要な合併症である。後ろ向きの研究により、セレクチンリガンドを有するKL-6/MUC1の診断時の量が、ARDSのDIC発症を予測するより感度・特異度が高いバイオマーカーであることを明らかにした。その生成機序を検討する中で、マウスにはKL-6が発現しないが、ヒトMUC1を発現させたマウスにおいてはKL-6が発現していることを明らかにした。本マウスを用いてブレオマイシン肺線維症あるいはLPSによる急性肺障害モデルを作成し、KL-6がマウスモデルの肺障害のマーカーとなりうることを証明した。

研究成果の概要(英文)：DIC (blood coagulation occurring in vessels) is an important prognostic factor in a severe lung injury called acute respiratory distress syndrome (ARDS). A retrospective study demonstrated that KL-6/MUC1 having a selectin ligand (SLAK) can predict the onset of DIC in ARDS. The SLAK had the better sensitivity and specificity for prediction of mortality than previously known factors and thus is a good prognostic biomarker in ARDS. During investigation on the mechanism for the synthesis of the molecules, we demonstrated that KL-6 could be expressed in mice expressing the human MUC1, although KL-6 is never expressed in mice. We also demonstrated that KL-6 could be a biomarker in mouse models of acute lung injury and bleomycin pulmonary fibrosis by using this transgenic mouse.

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：バイオマーカー ムチン KL-6 肺障害

## 1. 研究開始当初の背景

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 など)。一方、従来から癌性ムチンにはトロンピ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) また癌性ムチンのなかには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うるものがあると報告されている。この血栓の生成は、抗 P-あるいは L-セレクトリ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リンリガンドが関与しているものと考えられる。

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る。

癌性ムチンのように、セレクトリンリガンドをもつ MUC1 も存在する可能性が高いと考え、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

そこで、本研究では、以下の4点を明らかにすることとした。

(1) 後ろ向き臨床研究で、多数例の血清 SLAK を測定し、その意義を考察する。

(2) MUC1 上のセレクトリンリガンドとなる糖鎖発現および制御機構の解明。また、セレクトリンリガンドを有する KL-6/MUC1 と DIC の因果関係の解明。

(3) 多施設共同の前向き臨床試験を実施する。

(4) 動物モデルの開発。

## 3. 研究の方法

血清、BALF 等の臨床検体の収集、SLAK 発現肺がん細胞株を用いた網羅的な糖転移酵素の発現比較を行った。また、ヒト MUC1 トランスジェニックマウスを用いて、間質性肺炎モデルを作成し、KL-6 や SLAK 発現を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 後ろ向きの研究により、セレクトリンリガンドを有する KL-6/MUC1 の診断時の量が成人呼吸促迫症候群 (ARDS) の汎発性血管内凝固症候群 (DIC) の発症を予測する可能性があることを明らかにした。ARDS (n=46)、細菌性肺炎 (n=17)、健康人 (n=60) について、KL-6/MUC1, SLAK (KL-6/MUC1 carrying sialyl Lewis<sup>a</sup>), SLXK (KL-6/MUC1 carrying sialyl Lewis<sup>x</sup>), および P-selectin glycoprotein

ligand-1 (PSGL-1) を測定した。ARDS 患者において血清のセレクトリンリガンドを有する KL-6/MUC1 は健康人に比べ有意に増加し、経過中 DIC を合併した 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有意に増加していた。PSGL-1 については、DIC 合併例において有意に低下していた。さらに ARDS 患者の年齢、性別、KL-6、LDH、CRP、人工呼吸器の設定、PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>、動脈血 pH、APACH-II スコアなどと比較して単変量、多変量解析を行ったところ、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 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。

(2) セレクトリンリガンドを有する KL-6/MUC1 は ARDS のみならず特発性肺線維症 (IPF) の急性増悪などでも上昇した。一方で、ニューモシスティス肺炎、過敏性肺炎などでは KL-6 の上昇に比較してやや低い。ただし、診断能の向上に結びつくほどの有用性は認めなかった。

(3) 多施設共同前向き臨床研究の実施に向けて、県内の各急性期病院共同研究プロトコルを作成したが、SLAK そのものの特許取得ができないことが判明し、これに代わるマーカーの開発を先に行う必要性が生じた。しかし、研究期間内に特許取得可能な組み合わせを見出すことはできなかった。

(4) 通常、マウスには KL-6 が発現しないが、ヒト MUC1Tg マウスにおいては血清・気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中に KL-6 が発現している。本マウスを用いてプレオマイシン肺線維症モデル、LPS による急性肺障害モデルを作成し、血清マーカー KL-6 が本マウスの肺障害のマーカーとなりうることを証明し、また KL-6 とサーファクタント蛋白の動態の差異を明らかにし、BBRC に報告した。

(5) MUC1 上のセレクトリンリガンドとなる糖鎖、特にシアリルルイス a の発現および制御機構を解明する目的でヒト MUC1 のトランスジェニック (Tg) マウスについて、チップを用いた網羅的な発現解析により検討した。ワイルドマウスと比較して、いくつかの糖鎖の合成酵素の発現が亢進していた (carbohydrate sulfotransferase 15, fucosyltransferase 4 など) が、シアリルルイス a などの合成にかかわる mRNA は検出されなかった。

(6) その他、日欧の血清を用いて MUC1 遺伝子多型 (SNP) と正常血清 KL-6 値の関係 (特定の SNP は発現の上昇と関連する) を明らかにし、DIC にかかわるトロンボモジュリンの治療効果と種々の作用のメカニズムの一端

も明らかにすることができた。

#### 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10件)

Sakai M, Kubota T, Ohnishi H, Yokoyama A. A novel lung injury animal model using KL-6-measurable human MUC1-expressing mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;432:460-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.123 (査読あり)

Ikezoe T, Takeuchi A, Chi S, Anabuki K, Kim T, Sakai M, Taniguchi A, Togitani K, Yokoyama A. Effect of recombinant human soluble thrombomodulin on clinical outcomes of patients with coagulopathy after hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 2013 ;91:442-447. doi: 10.1111/ejh.12188 (査読あり)

Takahashi T, Serada S, Ako M, Fujimoto M, Miyazaki Y, Nakatsuka R, Ikezoe T, Yokoyama A, Taguchi T, Shimada K, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doiki Y, Naka T, Nishida T. New findings of kinase switching in gastrointestinal stromal tumor under imatinib using phosphoproteomic analysis. *Int J Cancer*. 2013;133:2737-43. (査読あり)

Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, Kohno N. Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. *Respir Investig*. 2012;50:3-13. doi: 10.1016/j.resinv.2012.02.001 (査読あり)

Tanaka S, Hattori N, Ishikawa N, Shoda H, Takano A, Nishino R, Okada M, Arihiro K, Inai K, Hamada H, Yokoyama A, Kohno N. Krebs von den Lungen-6 (KL-6) is a prognostic biomarker in patients with surgically resected non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2012 15;130:377-87. (査読あり)

Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Kawase S, Tanaka S, Yoshioka K, Yokoyama A, Kohno N, Bonella F, Guzman J, Ohshimo S, Costabel U. Different MUC1 gene polymorphisms in German and Japanese ethnicities affect serum KL-6 levels. *Respir Med*. 2012;106:1756-64. doi: 10.1016/j.rmed.2012.09.001. (査読あり)

Ishikawa N, Hattori N, Tanaka S, Horimasu Y, Haruta Y, Yokoyama A, Kohno N, Kinnula VL. Levels of surfactant proteins A and D and KL-6 are elevated in the induced sputum of chronic

obstructive pulmonary disease patients: a sequential sputum analysis. *Respiration*. 2011;82:10-8. doi: 10.1159/000324539. (査読あり)

Kawase S, Hattori N, Ishikawa N, Horimasu Y, Fujitaka K, Furonaka O, Isono T, Miyoshi S, Hamada H, Yamane T, Yokoyama A, Kohno N. Change in serum KL-6 level from baseline is useful for predicting life-threatening EGF R-TKIs induced interstitial lung disease. *Respir Res*. 2011 Jul 26;12:97. (査読あり)

Nakashima T, Yokoyama A, Inata J, Ishikawa N, Haruta Y, Hattori N, Kohno N. Mucins carrying selectin ligands as predictive biomarkers of disseminated intravascular coagulation complication in ARDS. *Chest* 2011;139:296-304. doi: 10.1378/chest.09-3082. (査読あり)

Doi M, Hattori N, Yokoyama A, Onari Y, Kanehara M, Masuda K, Tonda T, Ohtaki M, Kohno N. Effect of mustard gas exposure on incidence of lung cancer: a longitudinal study. *Am J Epidemiol*. 2011;173:659-66. doi: 10.1093/aje/kwq426 (査読あり)

[学会発表](計6件)

Mizu Sakai, Tetsuya Kubota, Takashi Yamane, Naoki Shiota, Hiroshi Ohnishi, Akihito Yokoyama. Analysis of Lung Injury Models by Using Human MUC1 Transgenic Mice. American Thoracic Society International Conference May 18-23, 2012, San Francisco convention center, USA

Hiroshi Ohnishi, Kazuto Togitani, Mizu Sakai, Ayuko Taniguchi, Takayuki Ikezoe, Tetsuya Kubota, Akihito Yokoyama. Pulmonary complications in patients with hematologic diseases. September 1-5, 2012 Vienna convention center, Austria

大西広志, 山根高, 濱田典彦, 金月恵, 穴吹和貴, 荒川悠, 酒井瑞, 塩田直樹, 窪田哲也, 横山彰仁. COPDにおける肺胞上皮マーカーの検討. 第52回日本呼吸器学会学術講演会 4/20-22, 2012, 神戸コンベンションセンター, 神戸

酒井瑞, 窪田哲也, 大西広志, 横山彰仁. ヒトMUC1トランスジェニックマウスを用いた肺障害モデルの解析. 第52回日本呼吸器学会学術講演会 4/20-22, 2012, 神戸コンベンションセンター, 神戸

酒井瑞, 窪田哲也, 井坂真由香, 山根高, 塩田直樹, 大西広志, 岩本博, 河野修興,

横山 彰仁. ヒト MUC1 トランスジェニックマウスを用いた肺線維症モデルの解析. 第 51 回日本呼吸器学会学術講演会 2011 年 4 月 22-23 日, 東京国際フォーラム, 東京  
Mizu Sakai, Tetsuya Kubota, Mayuka Isaka, Takashi Yamane, Hiroshi Ohnishi, Hiroshi Iwamoto, Nobuoki Kohno, Akihito Yokoyama. Analysis of lung injury model using human *MUC1* transgenic mice. ATS annual international meeting, MAY14-18, 2011, Denver convention center, USA

〔図書〕(計 6 件)

横山 彰仁. 縦隔気腫. 今日の治療指針 2013, 医学書院 2013 : 322-323  
横山 彰仁. CO2 ナルコーシス. 今日の治療と看護. 南江堂 2013 : 404-405  
横山 彰仁. 薬剤性肺炎・ガス・粉じんによる肺疾患. 朝倉内科学 第 10 版 PP810-812  
横山 彰仁. 肺胞低換気症候群. 医歯薬出版 2013 : 402-404  
大西 広志、横山 彰仁. 一般検査所見の評価. 特発性間質性肺炎の治療と管理. 克誠堂出版 2013 pp25-30  
横山 彰仁. 血液検査の読み方. 間質性肺炎を究める. メディカルビュー社 2012, pp38-42

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

窪田 哲也 (KUBOTA, Tetsuya)  
高知大学教育研究部医療学系・准教授  
研究者番号 : 30274377

池添 隆之 (IKEZOE, Takayuki)  
高知大学教育研究部医療学系・講師  
研究者番号 : 30294833

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