

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670628

研究課題名(和文)肺気腫発生・進展の新規メカニズムの解明：その発症・重症化の予防と新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the new mechanism of pulmonary emphysema: the prevention of the onset and progress followed by the development of the new therapeutic drug

研究代表者

岡田 守人 (Okada, Morihito)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：70446045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺気腫はオキシダント-プロテアーゼ優位な背景による肺胞壁破壊が特徴である。最近、我々は肺胞上皮接着分子Cell adhesion molecule 1 (CADM1)がプロテアーゼにより切断(shedding)を受けて産生される細胞内断片(CTF)が細胞内ミトコンドリアに蓄積して肺胞上皮のアポトーシスが誘導されることで肺胞壁が破壊され、肺気腫の発生・進展に寄与していることを突き止めた。次に単細胞内成分まで把握できる新開発の細胞ビデオ・マススコープ質量分析を用いて肺気腫の予防戦略と新規治療薬開発を試みた。

研究成果の概要(英文)：Cell adhesion molecule 1 (CADM1) is a lung epithelial cell adhesion molecule in the immunoglobulin superfamily. It generates two membrane associated C terminal fragments (CTFs), CTF and CTF, through protease mediated ectodomain shedding.

We explored the hypothesis that more CADM1-CTFs are generated in emphysematous lungs through enhanced ectodomain shedding, and cause increased apoptosis of alveolar epithelial cells.

CADM1 ectodomain shedding appeared to cause alveolar cell apoptosis in emphysematous lungs by producing CTF that accumulated in mitochondria. These data link proteolysis to apoptosis, which are two landmark events in emphysema.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺気腫 質量分析 CADM1

1. 研究開始当初の背景

肺気腫は世界中で年間 300 万人以上の命を奪いWHOの試算では死亡原因の第4位を占めており今後 10 年間でさらに 30%増加すると予測している。国内でも類縁疾患を含めると患者数は 500 万人を越えている。多数の肺胞が融合して大きな気腔を形成する気腫肺では肺胞壁の破壊、肺胞壁を構成するガス交換に重要な肺胞上皮細胞の障害が認められ、ガス交換効率が不良となり呼吸不全を来す。肺気腫患者の 8 割以上が喫煙者で、煙草の煙の中のオキシダントが肺胞腔や肺胞壁で様々なプロテアーゼを活性化させ(オキシダント・プロテアーゼ不均衡説)この作用により肺胞上皮細胞を代表とする肺胞壁構成細胞がアポトーシスに陥り肺胞壁破壊を来す(アポトーシス不均衡説)しかし、既存のプロテアーゼ阻害薬は複数の作用点を有するため、肺気腫に特異的治療薬としては不十分であった。

我々は肺気腫において肺胞上皮細胞がアポトーシスに陥る新たな機序を発見した(Thorax 2013。)肺胞上皮接着分子 Cell adhesion molecule 1 (CADM1)がプロテアーゼの切断(shedding)を受けて産生される細胞内断片(CTF)が、細胞内ミトコンドリアに蓄積して上皮のアポトーシスが誘導される。CADM1は肺胞上皮細胞の lateral membrane に恒常的発現を認める接着分子で、細胞上皮性の維持に必須であり、癌抑制遺伝子としても知られている。我々は癌抑制遺伝子としての CADM1 に関して有用な報告(Lab Invest 2008;88:504-14, Cancer 2003;98:1002-7, Lab Invest 2003;83:1175-83)をしてきており、CADM1分子を扱うことにも精通している。

2. 研究の目的

肺気腫はオキシダント-プロテアーゼ優位な背景による肺胞壁破壊が特徴である。最近、我々は肺胞上皮接着分子 Cell adhesion molecule 1 (CADM1)がプロテアーゼにより切断(shedding)を受けて産生される細胞内断片(CTF)が細胞内ミトコンドリアに蓄積して肺胞上皮のアポトーシスが誘導されることで肺胞壁が破壊され、肺気腫の発生・進展に寄与している可能性を探求している。しかし、CADM1 の shedding からアポトーシスが誘導されるまでの機序は未だ不明である。本研究では単細胞内成分まで把握できる新開発の細胞ビデオ・マススコープ質量分析を用いて詳細に解析することで、肺気腫の予防戦略と新規治療薬開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 抗 CADM1 抗体を用いた免疫沈降にて CADM1 関連分子(複合体形成する分子含む)を抽出

ヒト気腫肺症例からのタンパク抽出

手術時にヒト気腫肺症例を選出して約 1cm 角で手術摘出後直ぐに標本およびタンパク質抽出用に液体窒素を用いて凍結保存を行う。その後、必要量を取り出して一部は気腫肺の組織学的確認のために標本として HE 染色を、残りはタンパク質を小器官も含めた細胞質分画で抽出するコントロールとして正常肺も同様に採取しておく。

ヒト肺胞上皮細胞株からのタンパク抽出

我々は既に CADM1 CTF をクローニングしており、それが適切に機能することを確認している。加えて CTF を形質移入することで CADM1 shedding 亢進状態をつくるのが可能である。ヒト肺胞上皮 NCI-H441 細胞(CADM1 は全長型が恒常的に発現を認めるが CTF 発現は認めない)を用いて、CADM1 CTF 形質移入後と未処理細胞(コントロール)

においてそれぞれタンパク質を小器官も含めた細胞質分画で抽出する。

抗 CADM1 抗体を用いた免疫沈降

上記で抽出したタンパク質において細胞内 (C 末端 15 アミノ酸) を認識する抗 CADM1 抗体を用いて免疫沈降を行う。免疫沈降の結果で精製されるタンパク質群は CADM1 および CADM1 と直接および間接的に複合体を形成していると予想されるグループである。

(2) 質量分析を用いた CADM1 関連分子の同定

サブトラクションによる質量分析後の候補 CADM1-ミトコンドリア輸送関連分子の同定

前記で精製された免疫沈降後のタンパク質群を質量分析に供し、同定された分子に関して気腫肺群より正常肺群を、CTF 形質移入細胞株群より形質移入なし細胞株群をサブトラクションして CADM1 CTF が産生されたことにより CADM1 と複合体を形成するようになった候補分子 (CADM1 CTF がミトコンドリアに輸送されるのに必要な分子である可能性が高い) を同定する。

ナノチップスプレーを用いたミトコンドリア成分の抽出および質量分析

ナノチップスプレーの技術を用いて細胞株におけるミトコンドリア成分の抽出を行う。CTF を形質移入した細胞株と形質移入していない細胞株において行い、質量分析に供して比較する。形質移入した細胞株でのみ認められる分子を選出する。前記で同定された分子の共通項は CADM1 をミトコンドリアに輸送する候補分子として非常に有望と考えられる。これら候補分子の中から既知のアミノ酸配列などからその機能を予想し、機能解析に移る。

(3) ミトコンドリア輸送における候補 CADM1 関連分子の機能解析

肺胞上皮細胞株を用いた候補 CADM1 関連分子の機能解析

同定された有望な分子のクローニングを行い siRNA も作製する。これらを用いて候補分子の高発現細胞株や発現抑制細胞株を作製し、CADM1 CTF がミトコンドリアへ輸送されるのに必要な分子であるか否かを検討する。また、その制御により上皮細胞のアポトーシス制御の可否について TUNEL 法を併用して検討する。

肺気腫マウスでの候補

CADM1 関連分子の機能解析 (新規 治療標的の模索)

前記でアポトーシス制御が可能であった場合、その候補分子の阻害剤の有効性に関して肺気腫モデルマウスを用いて検討する。阻害剤の投与あり群となし群で肺気腫の進行に関して評価し、最終的にヒトへの臨床適応も検討する。

4. 研究成果

肺気腫の成因において肺胞上皮細胞 apoptosis や protease の不均衡は中心的役割を担うが、詳細な機序は不明な点が多い。Cell adhesion molecule 1 (CADM1) は immunoglobulin superfamily に属する肺上皮細胞接着分子であり、肺胞上皮細胞構造保持における必須分子と考えられている。CADM1 は細胞外領域で protease による切断 (shedding) を受け、CTF (C 末端側フラグメント) が産生される。これまでの我々の研究により肺気腫の成因としての肺胞上皮細胞における CADM1 shedding による apoptosis 誘導を明らかにした。しかしその詳細な機序が不明であるため、本研究ではその機序解析に臨んだ。ヒト正常肺と肺気腫症例において western blotting にて

CADM1 発現様式を確認したところ肺気腫症例で有意に CADM1 の shedding(=CTF 産生)が亢進していることを確認の上でヒト標本を収集し、蛋白を回収した。並行して、ヒト肺胞上皮 NCI-H441 細胞における CTF を形質移入させた細胞株をもちいて免疫沈降に用いる蛋白を回収、精製した。この際に CTF は mitochondria に局在し、mitochondria 膜電位を低下させるとともに TUNEL 陽性細胞を増加させることが確認出来た細胞株を用いた。ヒト標本回収が研究の律速段階であり、その適切な症例選択、収集に時間を要したために以降の解析はこれからになる。肺気腫に特徴的な 2 大所見、protease 優位と肺胞上皮 apoptosis を結び付ける分子機構として肺胞上皮の CADM1 shedding 亢進、その機能分子として CADM1 CTF は重要であり、肺気腫の新たな予防法や治療法開発のために機序解析を継続していきたい。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. Takahiro Mima, Morihito Okada

Increased ectodomain shedding of lung epithelial cell adhesion molecule 1 as a cause of increased alveolar cell apoptosis in emphysematous lung.

American Association for Thoracic Surgery

2014 年 5 月 29 日

Toronto, CANADA

2. 見前隆洋、岡田守人

肺気腫の新規機序 : cell adhesion molecule

1 の shedding 亢進による細胞内ドメイン産生

第 114 回日本外科学会学術集会

2014 年 4 月 3 日

京都

3. 見前隆洋、岡田守人

肺気腫の新規機序 : cell adhesion molecule

1 の shedding 亢進と肺胞上皮細胞 apoptosis への関与

第 31 回日本呼吸器外科学会学術集会

2014 年 5 月 29 日

東京

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 守人 (OKADA MORIHITO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号 : 70446045