

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860267

研究課題名(和文) 糖尿病の新規発症機序：細胞接着分子CADM1の細胞外切断

研究課題名(英文) Increased ectodomain shedding of cell adhesion molecule 1 in the lung of idiopathic interstitial pneumonia and in the pancreata of type 2 diabetes mellitus

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Cell adhesion molecule 1 (CADM1)は肺呼吸上皮細胞や膵島内分泌細胞に発現する細胞間接着分子で、プロテアーゼによる切断(shedding)を受ける。本研究では特発性間質性肺炎(IIP)と2型糖尿病(T2DM)を対象にCADM1の発現異常と病態形成との関連を解析した。IIP肺ではCADM1のshedding率が上昇して全長型CADM1の発現量が低下しており、肺胞上皮細胞死と関連していた。同様にT2DM膵でもshedding率の上昇が見られ、HbA1c値と関連していた。慢性疾患の病態形成において接着分子のshedding亢進が関わることを示し、新たな発症機序を提案した。

研究成果の概要(英文)：Cell adhesion molecule 1 (CADM1) is expressed by lung alveolar cells and pancreatic islet cells, and is enzymatically shed at its juxtamembranous ectodomain. In the present study, we examined CADM1 expression in the lung of idiopathic interstitial pneumonia (IIP) and in the pancreata of type 2 diabetes mellitus (T2DM), and found that CADM1 ectodomain shedding increased in both cases. In IIP lungs, the increase of CADM1 shedding resulted in the decrease of full length CADM1 and led alveolar epithelial cell apoptosis, which assumed to be an early pathogenic event in the development of IIP. In T2DM, the CADM1 shedding rates and haemoglobin A1c levels were correlated, suggesting that increased CADM1 shedding in pancreata contributed to blood glucose dysregulation. Interestingly, in those disease, an imbalanced protease activity has been reported. Our studies lead us to identify the protease-mediated shedding of adhesion molecule as an important pathogenic process for tissue degeneration.

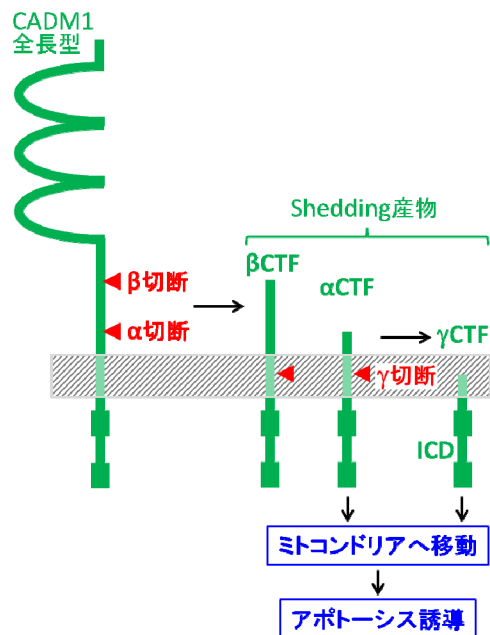
研究分野：実験病理学

キーワード：細胞間接着分子 細胞死 間質性肺炎 糖尿病

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、肺呼吸上皮細胞や膵島内分泌細胞に発現し、細胞の形態・極性維持や細胞間情報伝達を司る。

CADM1は細胞外領域の2箇所プロテアーゼにより切断(shedding)され、細胞側にα切断断片(αC-terminal fragment, αCTF)とβ切断断片(βCTF)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(γCTF)を生じる¹。



先行研究において、我々は気腫状に肺胞壁が破壊された肺組織で CADM1 の shedding が亢進していることを見出した。また、肺胞上皮細胞において CADM1 の shedding を亢進させると、生成された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肺胞上皮細胞のアポトーシスが誘導されることを明らかにした²。気腫状肺の成因としては、喫煙に伴う局所のプロテアーゼ活性上昇が肺胞上皮細胞死の要因になると長らく信じられてきたが、これら2つの現象の背景にある分子機序は不明であった。我々の発見は、プロテアーゼ活性上昇と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。プロテアーゼ活性異常やアポトーシス亢進は種々の病態で認められる現象なので、本機序は肺気腫以外の疾患においてもその発症や病態形成に関与している可能性があった。

2. 研究の目的

本研究課題では、CADM1 発現細胞が関与する疾患として特発性間質性肺炎(IIP)と2型糖尿病(T2DM)を解析した。

びまん性肺疾患の一つである IIP は肺胞壁における炎症や線維化を特徴とする。肺胞上皮細胞の細胞死が IIP の病態形成と進展に関

与するとの報告は多いが^{3,4}、肺胞上皮細胞死の病因学的解析は未だ少ない。

糖尿病膵では膵島内の硝子様変性が古くから知られていたが、この所見に一致して、近年糖尿病膵島ではβ細胞のアポトーシスが亢進していることが示された⁵。β細胞のアポトーシス亢進は、β細胞の機能不全や数の減少を介して耐糖能低下の原因になると考えられるが、この現象の分子機構に関する研究はほとんどない。

本研究課題では、IIP 肺および T2DM 膵における CADM1 の発現の実態を明らかにし、CADM1 の shedding 亢進が肺胞上皮細胞またはβ細胞のアポトーシスを惹起するという仮説を検証することを目的とした。本研究は、間質性肺炎または糖尿病発症の新規機序として局所的なプロテアーゼ活性異常の関与を提唱するものである。

3. 研究の方法

(1) 特発性間質性肺炎肺における CADM1 の発現変化と肺上皮細胞死

①特発性間質性肺炎肺の収集

2006-2012年に近畿大学附属病院にて病理解剖された症例から IIP 症例 36 例を収集した。組織型の内訳は、急性(AIP, n=10)、線維型非特異性(f-NSIP, n=10)、器質化(COP, n=9)、通常型(UIP, n=10)であった。対象群として組織診断上著変の無い症例を 10 例収集した。(近畿大学医学部倫理委員会承認番号 25-088)

②特発性間質性肺炎肺における CADM1 の発現解析

パラフィンブロックからの蛋白質抽出は Rodriguez-Rigueiro T らの方法を改変して行った⁶。ミネラルオイル中で 95°C に熱してパラフィンを溶解し、組織片を遠心分離した。沈殿に対してクエン酸 SDS バッファーを加え、100°C および 80°C に熱して蛋白質を抽出した。CADM1 の C 末端を認識する抗体を用いてウエスタンブロットにより CADM1 の発現量解析を行った。組織内の上皮成分の内部標準として cytokeratin 7 (CK7), thyroid transcription factor 1 (TTF1) 抗体を用いて同様にウエスタンブロットを行った。転写後のゲルを用いてクーマシーブリリアントブルー(CBB)染色にて蛋白質量を確認した。

IIP 肺組織切片の免疫染色は、クエン酸バッファー中で抗原賦活化処理を行い CADM1 抗体反応後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体の呈色反応は AEC 基質を用いた。

③特発性間質性肺炎肺における 2 型肺胞上皮細胞死の検出

一本鎖 DNA (ssDNA) 抗体を用いた免疫染色および TUNEL 法を用いて IIP 肺組織切片上の細胞死を検出した。光学顕微鏡下での観察では、肺胞腔に面する細胞のうち立方状の形態で 12 μm 以上の大きさの細胞を 2 型肺胞上皮細胞(AECII)として計測した。蛍光顕微鏡下での多重染色の観察では、サーファクタ

ント A (SP-A)陽性細胞を AECII として計測した。

④肺上皮細胞株における CADM1 の発現抑制によるアポトーシスの検出

ヒト肺上皮細胞株 NCI-H441, A549 細胞において CADM1 に対する siRNA 発現ベクターを導入し⁷、ウエスタンブロットにより CADM1 の発現量を解析した。CADM1 の発現抑制が確認された細胞において TUNEL 法またはカスパーゼ 3 切断特異抗体を用いた免疫染色によりアポトーシス細胞を計測した。

先行研究¹に基づき γ CTF のアミノ酸配列を予測し、細胞内断片 (intracellular domain, ICD, 55 アミノ酸) および変異 ICD ペプチド合成した (7 アミノ酸置換および 2 アミノ酸欠失)。これらのペプチドを蛍光 (FITC) 標識し、NCI-H441, ラット肺上皮細胞株 RLE-6TN に細胞内導入して、ミトコンドリア局在およびアポトーシスを解析した。

(2) 2 型糖尿病膵における CADM1 の発現変化と耐糖能異常

①2 型糖尿病膵の収集

2007-2013 年に近畿大学附属病院にて病理解剖された症例から生前臨床的に T2DM と診断され、組織学的に炎症性または腫瘍性病変を伴わない T2DM 膵を 12 例収集した。対象群として膵疾患の無い症例を 8 例収集した。各症例について、生前の血液検査結果よりヘモグロビン A1c (HbA1c) 値を収集した。(近畿大学医学部倫理委員会承認番号 25-088)

②2 型糖尿病膵における CADM1 の発現解析

(1) -①と同様の方法にて CADM1 のウエスタンブロットを行った。 β -アクチンの発現量によって蛋白質量を確認した。膵組織切片を用いて単位面積あたりの膵島細胞数を計測し、膵島細胞あたりの CADM1 発現量を算出した。

インスリンまたはグルカゴン抗体と CADM1 抗体を用いた蛍光多重免疫染色法により、膵島 β 細胞または α 細胞における CADM1 の細胞膜局在を観察した。

③膵島 β 細胞株のグルコース応答性インスリン分泌能に対する CADM1 の C 末断片高発現の影響

マウス膵島 β 細胞株 MIN6-m9 細胞⁸において α CTF または変異 α CTF (11 アミノ酸置換および 2 アミノ酸欠失)² 高発現遺伝子を導入した。これらの細胞株に対して、培地中のグルコース濃度を 2 mM から 25 mM に上げて 15 分、1 時間、2 時間後の培地を回収した^{9,10}。各時間の培地に含まれるインスリン量を ELISA 法により定量した。インスリン定量後の細胞を回収し、BCA 法により蛋白質量を測定した。

④膵島 β 細胞株における CADM1 の C 末断片高発現によるアポトーシスの解析

α CTF 高発現遺伝子導入またはプロテアーゼ活性化処理を施した MIN6-m9 細胞において蛍光ミトコンドリア染色色素と CADM1

蛍光免疫染色により細胞内局在を解析した。また、 α CTF または変異 α CTF 高発現 MIN6-m9 細胞において TUNEL 法によりアポトーシス細胞を計測した。

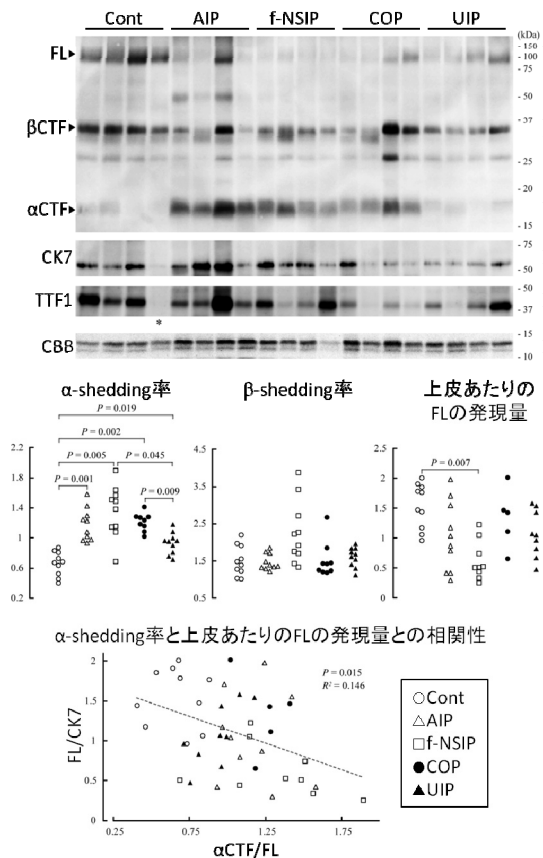
4. 研究成果

(1) 特発性間質性肺炎肺における CADM1 の発現変化と肺上皮細胞死

①特発性間質性肺炎肺における CADM1 の α -shedding 亢進と全長型の発現低下

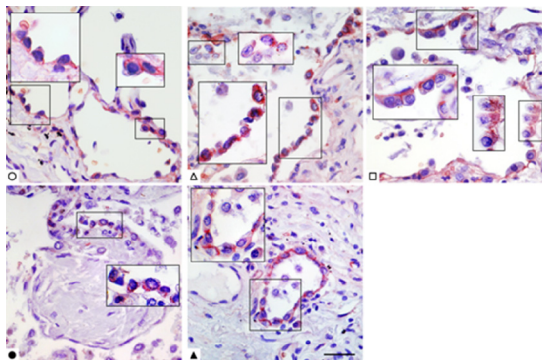
IIP 肺パラフィン切片から蛋白質を抽出し、ウエスタンブロットにより CADM1 の発現量を解析した。それぞれ全長型 (FL)、 β CTF、 α CTF に相当する分子量 100, 35, 18 kDa のバンドが検出された。

各バンドの強度を画像ソフトで算出し、 α -shedding 率 (α CTF/FL)、 β -shedding 率 (β CTF/FL)、上皮あたりの FL の発現量 (FL/CK7) を求めた。対照群 (Cont) に比して IIP 肺では組織型に限らず α -shedding 率の有意な上昇が見られ、f-NSIP では上皮あたりの FL の低下が見られた。また、 α -shedding 率と FL の発現量は負に相関しており、肺上皮では shedding の亢進に伴って FL が低下していることが分かった。



免疫染色により、対照群では CADM1 は肺上皮細胞膜に局在しているのに対し、IIP 肺では細胞膜および細胞質への局在もしくは発現減弱が観察された。

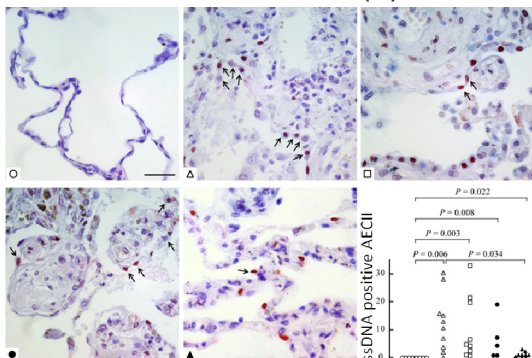
IIP肺におけるCADM1の経織内分布



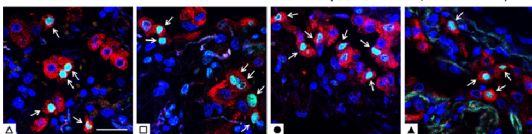
②特発性間質性肺炎肺における2型肺胞上皮細胞死の増加とCADM1のα-shedding亢進

ssDNA 抗体による免疫染色により IIP 肺における AECII 細胞死数を計測した。対照群ではほとんど細胞死が検出されないのに対し、IIP 肺では陽性率が増加(~30%)していた。蛍光多重染色により、これらの ssDNA 陽性細胞が SP-A 発現 AECIIであることを確認した。ssDNA 陽性率を①の結果との相関解析を行ったところ、α-shedding とは正に、FL/CK7 とは負に相関しており、α-shedding 亢進による FL の発現低下に伴い、細胞死が増加していることが分かった。

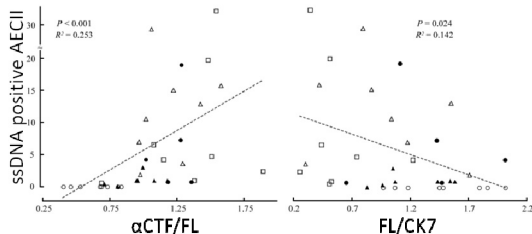
IIP肺のAECIIにおけるssDNA陽性像(赤)と陽性率



IIP肺のAECIIにおけるssDNA陽性像(緑: ssDNA, 赤: SP-A)



CADM1の発現異常とAECIIのssDNA陽性率との相関性

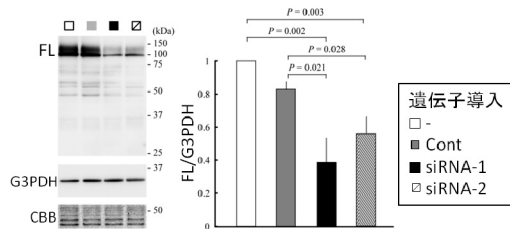


③肺上皮細胞株におけるCADM1の発現抑制または細胞内断片のミトコンドリア局在とアポトーシス細胞の増加

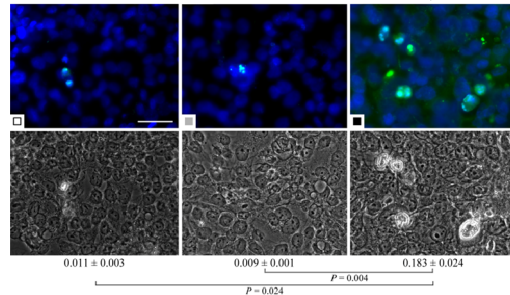
NCI-H441 細胞において siRNA を用いて CADM1 発現を低下させ、TUNEL 法によりアポトーシス細胞数を計測した。CADM1 の

発現量は 60%以下に減少し、これらの細胞ではアポトーシス陽性率が上昇(5-18 倍)していた。A549 細胞でも同様の結果が得られた。

NCI-H441細胞におけるsiRNAによるCADM1発現抑制



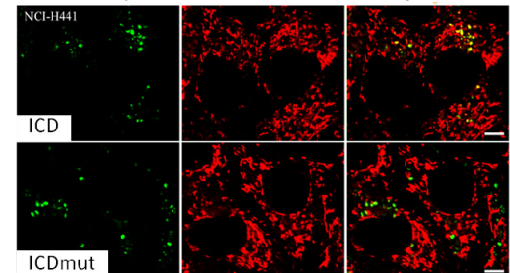
CADM1発現抑制NCI-H441細胞におけるアポトーシス(緑: TUNEL)



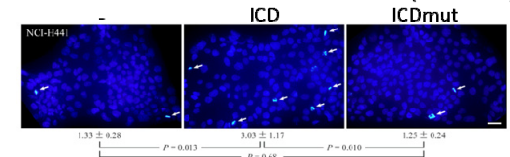
NCI-H441 細胞に FITC 標識 CADM1-ICD を細胞内導入したところ、ICD のミトコンドリア局在が観察され、アポトーシス陽性率が上昇(2.3 倍)していた。一方で変異ペプチド(ICDmut)はミトコンドリア局在せず、アポトーシス陽性率は変化しなかった。RLE-6TN 細胞でも同様の結果が得られた。また、線維芽細胞様株 NIH3T3, COS7 細胞ではこの現象は見られなかった。

以上の研究成果は英専門誌 Respiratory Research および台湾専門誌 Journal of Biomedical Science に論文報告した。

NCI-H441細胞におけるCADM1-ICDの局在(緑: FITC-ICDs, 赤: ミトコンドリア)



ICD導入NCI-H441細胞におけるアポトーシス(緑: TUNEL)

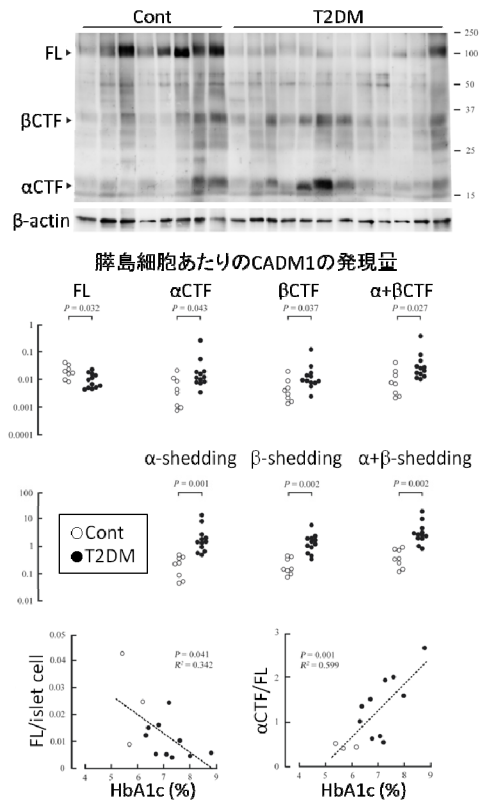


(2) 2型糖尿病肺におけるCADM1の発現変化と耐糖能異常

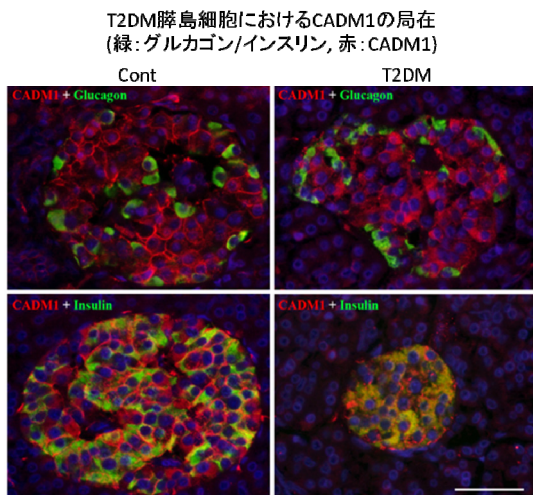
①2型糖尿病肺におけるCADM1のshedding亢進と全長型の発現低下およびヘモグロビンA1c値との相関

パラフィン切片のウェスタンブロットにより、T2DM 肺ではαおよびβ-shedding が

亢進していることが分かった。連続組織切片において膵島細胞の数を計測し、膵島細胞あたりの CADM1 発現量を算出したところ、CTF は増加し FL は減少していた。生前の HbA1c 値との相関解析を行った。 α -shedding 率とは正に、膵島あたりの FL 発現量とは負に相関しており、 α -shedding 亢進による FL の発現低下と耐糖能異常が関連することが示唆された。



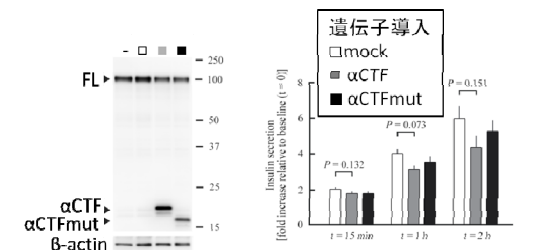
また、CADM1 とインスリン・グルカゴンに対する抗体を用いた蛍光共染色法により、対照群では CADM1 はインスリン・グルカゴン陽性膵島細胞の細胞膜に局在しているのに対し、T2DM 膵では CADM1 細胞膜陽性膵島細胞が 4 分の 1 程度に減少していることが分かった。



②膵島β細胞株のグルコース応答性インスリン分泌能における α CTF高発現の影響

MIN6-m9 細胞において α CTF または変異 α CTF (α CTFmut)遺伝子導入高発現株を製作し、グルコース応答性インスリン分泌能を時間変化に対して解析した。予想に反して、どの時間においてもインスリン分泌能は対象と同等であった。最近の報告で、T2DM 膵で高発現することが知られているマイクロRNA (miRNA)-375 が CADM1 の発現を抑制的に制御していることが明らかになった¹¹。加えて先行研究にて膵島細胞と神経細胞との相互作用に CADM1 が必須であることが示されている¹²。本実験については FL 発現量抑制の影響や神経細胞との情報伝達の検証が必要であろう。

MIN6-m9細胞における α CTF高発現とインスリン分泌能

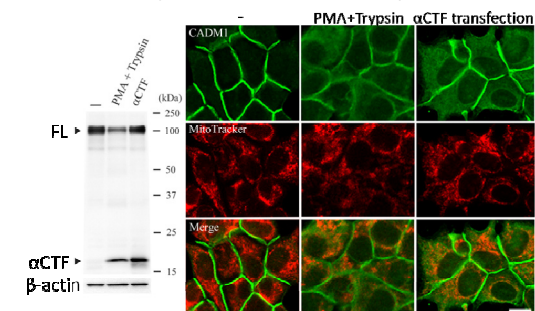


③ α CTF高発現膵島β細胞株におけるアポトーシス細胞の増加

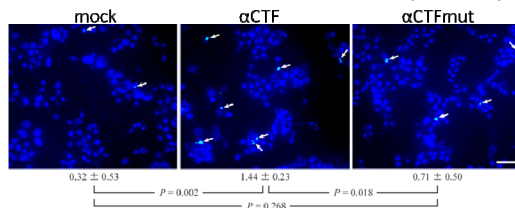
α CTF 高発現 MIN6-m9 細胞においてミトコンドリア局在とアポトーシス細胞数を解析した。プロテアーゼ活性化処理または α CTF 遺伝子導入による α CTF 高発現株において、 α CTF は細胞質全体に存在していたがミトコンドリアへの集積は認めなかった。しかしながら、 α CTF 高発現株ではアポトーシス陽性率が上昇(4.5 倍)していた。

以上の研究成果は米専門誌 PLoS One に論文報告した。

α -shedding亢進処理MIN6-m9細胞におけるCADM1の局在 (緑:CADM1, 赤:ミトコンドリア)



α CTF高発現MIN6-m9細胞におけるアポトーシス(緑:TUNEL)



<総括>

本研究は、肺気腫や間質性肺炎の肺、糖尿病の膵など、慢性疾患の実質臓器での組織学的病態形成において、接着分子の酵素的切断による細胞死誘導という共通の分子機序が存在する可能性を示した。直接的な因果関係は未解明ではあるが、今後切断不全モデルの構築や、プロテアーゼ活性化または細胞死情報伝達経路の探索を通して研究が発展すれば、酵素的切断阻害を標的とした新規治療法開発につながることも期待される。以上の本研究課題の総括と将来展望をスイス専門誌 *Frontiers in Cell and Developmental Biology* に総説論文として報告した。

<引用文献>

1. Nagara Y et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012, 417:462-7.
2. Mimae T et al. *Thorax.* 2014, 69:223-31.
3. Bardales RH et al. *Am J Pathol.* 1996, 149:845-52.
4. Uhal BD. *Eur Respir Rev.* 2008, 17:138-44.
5. Butler AE et al. *Diabetes.* 2003, 52:102-10.
6. Rodriguez-Rigueiro T et al. *Proteomics.* 2011, 11:2555-9.
7. Masuda M et al. *J Biol Chem.* 2010, 285:15511-22.
8. Minami K et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000, 279: E773-81.
9. Ishihara H et al. *Diabetologia.* 1993, 36: 1139-45.
10. Sharma G et al. *Endocrinology.* 2011, 152: 3030-39.
11. Li X. *Gene.* 2014, 533:1-4.
12. Koma Y et al. *Gastroenterology.* 2008, 134:1544-54.

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4件) 全て査読有り

1. Yoneshige A, Hagiya M, Fujita M, Ito A. Pathogenic Actions of Cell Adhesion Molecule 1 in Pulmonary Emphysema and Atopic Dermatitis. *Front Cell Dev Biol.* 2015, doi: 10.3389/fcell.2015.00075.
2. Hagiya M, Yoneshige A, Inoue T, Sato Y, Mimae T, Okada M, Ito A. The intracellular domain of cell adhesion molecule 1 is present in emphysematous lungs and induces lung epithelial cell apoptosis. *J Biomed Sci.* 2015, doi: 10.1186/s12929-015-0173-8.
3. Yoneshige A, Hagiya M, Inoue T,

Mimae T, Kato T, Okada M, Enoki E, Ito A. Increased ectodomain shedding of cell adhesion molecule 1 as a cause of type II alveolar epithelial cell apoptosis in patients with idiopathic interstitial pneumonia. *Respir Res.* 2015, doi: 10.1186/s12931-015-0255-x.

4. Inoue T, Hagiya M, Yoneshige A, Kato T, Enoki E, Maenishi O, Chikugo T, Kimura M, Satou T, Ito A. Increased ectodomain shedding of cell adhesion molecule 1 from pancreatic islets in type 2 diabetic pancreata: correlation with hemoglobin A1c levels. *PLoS One.* 2014, doi:10.1371/journal.pone.0100988.

[学会発表] (計4件)

1. 米重あづさ、村上哲平、西村俊司、伊藤彰彦 上皮性癌腫の肉腫様変化では骨肉腫/骨芽細胞様表現型が出現する 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8-10日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋)
2. 萩山満、米重あづさ、伊藤彰彦 接着分子cell adhesion molecule 1の細胞内断片による肺上皮アポトーシス誘導: 肺気腫発症への関与 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8-10日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋)
3. 米重あづさ、井上敬夫、萩山満、伊藤彰彦 特発性間質性肺炎における肺上皮接着分子CADM1の発現異常 第104回日本病理学会総会 2015年4月30日-5月2日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋)
4. 井上敬夫、萩山満、米重あづさ、榎木英介、前西修、筑後孝章、木村雅友、佐藤隆夫、伊藤彰彦 2型糖尿病患者の膵島における接着分子CADM1は細胞外ドメインの切断が亢進している 第104回日本病理学会総会 2015年4月30日-5月2日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋)

6. 研究組織

(1) 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