

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15113

研究課題名(和文) 内圧上昇が病変形成に至る分子基盤の解析

研究課題名(英文) To understand molecular bases of how intraluminal pressure elevation leads to the development of degenerative lesions

研究代表者

伊藤 彰彦 (ITO, Akihiko)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：80273647

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)：腔内圧(眼内圧や尿路内圧等)の上昇は神経変性や粘膜変性を惹起する。その閾値は30 cm水柱程度と比較的低値であり一定である。細胞にこの程度の圧を負荷できるtwo-chamber培養装置を新規に考案した。初代培養神経細胞は30 cm水柱以上の圧負荷で軸索変性を来すことがわかった。この際には軸索の細胞膜上に存在するIgCAM型接着分子CADM1の細胞外切断が亢進し、その細胞側産物の蓄積が変性誘因の1つであった。一方、円柱状の上皮細胞では30 cm水柱以上の圧負荷で形状は扁平化するとともに、増殖が抑制されることがわかった。本研究は軽微な圧負荷が病変を形成するに至る病態生理の解明に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Elevation of intraluminal, such as intraocular and intra-renal pelvic, pressure causes neuronal and mucosal degeneration. The threshold is fairly low and constant, approximately 30 cmH₂O. A new two-chamber culture system was devised wherein cells were cultured on a semipermeable membrane and subjected to increased medium height (water pressure up to 60 cmH₂O). Primary cultured mouse neurons were found to fall into axonal degeneration when loaded with 30 cmH₂O or more, in association with increased ectodomain shedding of CADM1, an IgCAM member expressed on neuritic cell membrane. The cell-side remnant produced by shedding appeared to be involved in axonal degeneration. Columnar epithelial cells were flattened and growth suppressed when loaded with 30 cmH₂O or more. This work contributes to our understanding the pathophysiology of the development of degenerative lesions caused by low static pressure burden.

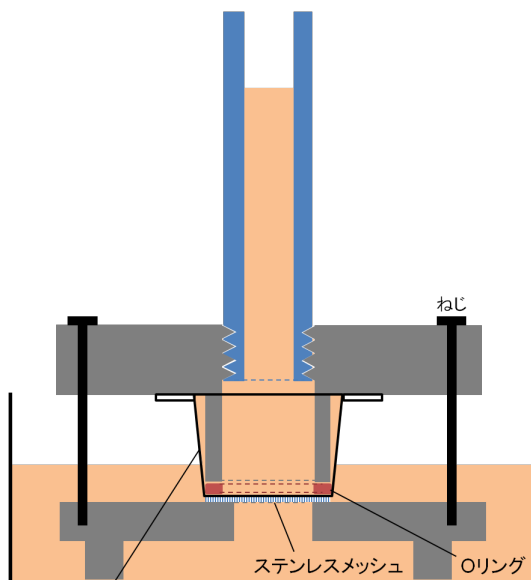
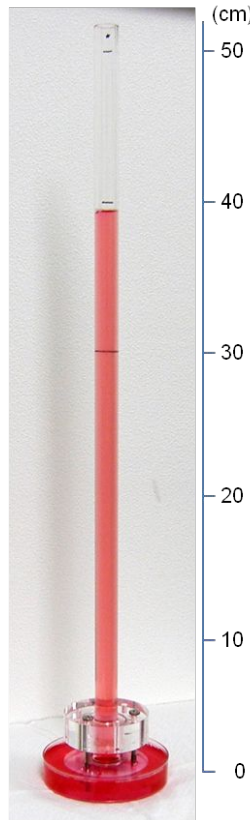
研究分野：病変解析の実験病理学、接着分子の病態学

キーワード：内圧上昇 変性 緑内障 接着分子 メカノバイオロジー メカノバソロジー two-chamber培養装置

1. 研究開始当初の背景

生体内のある種の組織や細胞には健常時において一定の内圧が付加されている。その内圧が何らかの機序で上昇すると、種々の疾患や病態が生じる。その際に生じる病変には共通性があり、病理組織所見の基本は細胞変性（アポトーシスを含む）である。代表的な例を次表に掲げる。興味深いことに、これらの疾患や病態の発症原因となる内圧力の上昇には一定の閾値があり、その閾値は疾患や病態に関わらず、概ね一定で約 30 cm 水柱 (= 0.03 気圧 = 30 ヘクトパスカル) である。この圧力は、日常的に経験される高気圧と低気圧との気圧差程度であり、ヒトの体表面での感覚からすると、“非常に弱い力”である。にもかかわらず、30 cm 水柱程度の圧力が細胞変性の原因となるのである。研究者は、この現象を解析するための培養装置を単純な発想により考案した(図)。本装置は開放系の two-chamber 培養系より成り、培養液の水柱(高さ 30~50 cm)が 1.0 microm 穴あき透過膜の上に水漏れなく垂直に連結されており、透過膜上で培養した細胞に対して 30~50 cm 水柱の圧力が静的に数日間付加される。

一方研究者は、病的な細胞変性・アポトーシスに IgCAM 型の接着分子 CADM1 (cell adhesion



培養インサート(0.4 μm穴あき透過膜付き)
図 水柱下培養装置(上)とその構造模式図(下)

molecule 1) が関与することを見出した。肺気腫の肺胞上皮、及び 2 型糖尿病の膵島細胞では、CADM1 細胞外領域の酵素的切断 (shedding) が亢進し、その結果細胞内に産生される断片 (CTF) が肺胞上皮と細胞のアポトーシスを誘導する (Thorax, 2014; Plos One, 2014)。また、CADM1 は中枢及び末梢の神経細胞軸索に広く発現しており、マウス後根神経節細胞を用いた予備的実験において、30~40 cm 水柱の圧付加で CADM1 の shedding 亢進が認められた。

2. 研究の目的

眼内圧の上昇は緑内障の原因となり、網膜神経節細胞のアポトーシスを惹起する。人工陽圧換気時に気道内圧が上昇すると肺胞上皮が変性に陥る。これらの病態を惹起する内圧には共通の閾値があり、概ね 30 cm 水柱 (= 0.03 気圧) 程度で、日常感覚からすると非常に軽微である。本研究課題では、培養液水柱の下で培養する装置を開発し、30 cm 水柱相当の圧力に対して種々の上皮細胞や神経細胞がどのように応答するのかを分子レベルで解析する。肺気腫における肺胞上皮変性誘導因子 CADM1 (IgCAM 型接着分子) に注目するとともに、圧力上昇に伴う遺伝子・蛋白発現の変化を網羅的に解析することにより、軽微な圧が病変形成に至る分子基盤の全容解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 培養液の水柱(高さ 30~50 cm)が 0.4 microm 穴あき透過膜の上に水漏れなく垂直に立つ培養装置を作製し、透過膜上で培養した細胞に対して 30~50 cm 水柱の圧力が静的に数日間付加される培養系を樹立する。

(2) 種々の上皮細胞(肺胞上皮や消化管腸上皮)や神経細胞(網膜神経節細胞や後根神経節細胞)を透過膜上で培養し、圧付加によって細胞数や増殖速度、アポトーシスや神経突起変性の頻度、CADM1 などの接着分子や神経特異的分子の細胞内局在などがどのように変化するか調べる。

(3) CADM1 については、圧付加によって細胞外ドメイン shedding が亢進し、全長型が減少することを示し、shedding の阻害によって細胞変性・アポトーシスを抑制できるか検討する。

(4) 圧付加による遺伝子・蛋白発現の変化を DNA マイクロアレイとプロテオミクス (2D-DIGE と LC-MS/MS) により網羅的に解析し、細胞変性の分子経路を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 新規に考案した装置が培養系として有用であるかの検定を行った。

機械的検定：水柱の高さが数日~1 週間程度保持されるか検討した。水柱液面の低下は 1 日当たり 2 ミリ以下にとどまっていた。実質

的な水漏れはなく、透過膜通過による液面低下と考えられ、少なくとも数日間ほぼ一定の外圧力下での培養が可能と判断された。

化学的検定：CO₂インキュベーター内に設置した後翌日に透過膜直上の培養液について、O₂・CO₂分圧、pH を測定し、標準的な培養液の基準値とほぼ同等であるとわかった。

生物学的検定：オートクレーブを適切に行うことにより、3 日間の培養にて雑菌のコンタミネーションは観察されなかった。

(2) 本装置を用いて、静的圧力に対する各種細胞の応答性を解析した。

上皮細胞の応答：種々の上皮細胞 (NCI-H441, RLE-6TN, Caco2, MDCK など) を 0.1 microm 穴あき透過膜付き培養インサートに播種し、30~50 cm 水柱下で 3 日間培養した。細胞は扁平化し、細胞倍加時間は延長した。

神経細胞の応答：1.0 microm 穴あき透過膜付き培養インサート内で、マウス後根神経節細胞を神経増殖因子 NTF 存在下に 2 日間培養し、神経突起のネットワークを形成させた後、30~50 cm 水柱下で 3 日間培養した。神経突起の密度が減少し、個々の突起は細くなった。

(3) 圧負荷による神経変性の分子機序を解析した。

マウス後根神経節細胞の神経突起ネットワークを 30~50 cm 水柱下で 3 日間培養すると、接着分子 CADM1 (別号 SynCAM) の細胞外切断 shedding が亢進し、その細胞側産物である C 末断片 (CTF) が増加した。

CTF は神経突起上にドット状に検出され、分子凝集が疑われた。

CTF を強制発現させると圧負荷と同様の所見が得られたので、CTF の凝集現象が神経変性の原因であると考えられた。

(4) 遺伝子・蛋白発現を比較解析した。圧負荷群と非圧負荷群間でプロテオミクスやマイクロアレイによる蛋白発現・遺伝子発現の網羅的比較解析を行った。その結果、神経損傷後の細胞内シグナル制御因子 collapsin response mediator protein 4 (CRMP4, or Dihydropyrimidinase-like 3)、分裂期チェックポイント蛋白 Bub3、接着分子 vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)、中間系フィラメント cytokeratin 14 等、機能的に興味深い分子がノミネートされた。これらの候補分子について、MDCK、RLE-6TN 等の細胞での発現検討を行ったが、細胞種に依存せず普遍的に圧負荷に応答する分子を同定するには至らなかった。

(なお、本水柱下培養装置は、平成 27 年 4 月に特許申請し、現在審査請求中です。)

5. 主な発表論文等
(研究代表者には下線)

(雑誌論文)(計 25 件)

1. Yoneshige A, Hagiyaama M, Inoue T, Tanaka T, Ri A, and Ito A: Modest static pressure can cause enteric nerve degeneration through ectodomain shedding of cell adhesion molecule 1. **Mol Neurobiol**, in press. doi: 10.1007/s12035-016-0166-y. 査読有
2. Takashima Y, Murakami T, Inoue T, Hagiyaama M, Inoue T, Yoneshige A, Nishimura S, Akagi M, and Ito A: Manifestation of osteoblastic phenotypes in the sarcomatous component of epithelial carcinoma and sarcomatoid carcinoma. **Tumor Biol**, in press. 査読有
3. Kawakami H, Tanizaki J, Tanaka K, Haratani K, Hayashi H, Takeda M, Kamata K, Takenaka M, Kimura M, Chikugo T, Sato T, Kudo M, Ito A, and Nakagawa K: Imaging and clinicopathological features of nivolumab-related cholangitis in patients with non-small cell lung cancer. **Invest New Drugs**, in press. doi: 10.1007/s10637-017-0453-0. 査読有
4. Ohta M, Hosokawa Y, Hatano N, Sugano A, Ito A, and Takaoka Y: Efficacy of femtosecond lasers for application of acupuncture therapy. **Lasers in Med Sci**, in press. doi: 10.1007/s10103-016-2124-3. 査読有
5. Kato T, Mizuguchi N, and Ito A: Candesartan suppresses proteinuria and decrease of nephrin expression but hydralazine does not in hypertensive nephropathy. **J Biomed**, 2:57-63, 2017. 査読有
6. Mizukami T, Togashi Y, Naruki S, Banno E, Terashima M, de Velasco MA, Sakai K, Yoneshige A, Hayashi H, Fujita Y, Tomida S, Nakajima TE, Fujino T, Boku N, Ito A, Nakagawa K, and Nishio K: Significance of FGF9 gene in resistance to anti-EGFR therapies targeting colorectal cancer: A subset of colorectal cancer patients with FGF9 upregulation may be resistant to anti-EGFR therapies. **Mol Carcinog**, 56:106-117, 2017. 査読有
7. Tanizaki J, Hayashi H, Kimura M, Tanaka K, Takeda M, Shimizu S, Ito A, and Nakagawa K: Report of two cases of pseudoprogression in patients with non-small cell lung cancer treated with nivolumab – including histological analysis of one case after tumor regression. **Lung Cancer**, 102:44-48, 2016. 査読有
8. Kato T, Oka K, Nakamura T, and Ito A: Decreased expression of Met during differentiation in rat lung. **Eur J Histochem**, 60:2575, 2016. 査読有
9. Nakagawa K, Asamura H, Tsuta K, Nagai K, Yamada E, Ishi G, Mitsudomi T, Ito A, Higashiyama M, Tomita Y, Inoue M, Morii E,

- Matsuura N, and Okumura M: Novel method (OSNA) for the diagnosis of lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC): Results of a multicenter prospective study. **Lung Cancer**, 97:1-7, 2016. 査読有
10. Tong KI, Ota K, Komuro A, Ueda T, Ito A, Anne Koch C, and Okada H: Attenuated DNA damage repair delays therapy-related myeloid neoplasms in a mouse model. **Cell Death Dis**, 7:e2401, 2016. 査読有
 11. Hibi M, Kaneda H, Tanizaki J, Sakai K, Togashi Y, Terashima M, De Velasco M, Fujita Y, Banno E, Nakamura Y, Takeda M, Ito A, Mitsudomi T, Nakagawa K, Okamoto I, Nishio K: *FGFR* gene alterations in lung squamous cell carcinoma are potential targets for the multikinase inhibitor nintedanib. **Cancer Sci**, 107:1667-1676, 2016. 査読有
 12. Iino T, Hagiyaama M, Furuno T, Ito A, and Hosokawa Y: Time-course statistical evaluation of intercellular adhesion maturation by femtosecond laser impulse. **Biophys J**, 111:2255-2262, 2016. 査読有
 13. Mimae T, and Ito A: New challenges in pseudopodial proteomics by a laser-assisted cell etching technique. **Biochim Biophys Acta-Proteins Proteomics**, 1854:538-546, 2015. 査読有
 14. Kano H, Okada K, Morimoto K, Bao W, Fukase K, Ito A, and Okita Y: Prediction of reversibility of intestinal mucosal damage after ischemia-reperfusion injury by plasma intestinal fatty acid-binding protein levels in pigs. **Perfusion**, 30:617-625, 2015. 査読有
 15. Sakai K, Yoneshige A, Ito A, Ueda Y, Kondo S, Nobumasa H, Fujita Y, Togashi Y, Terashima M, de Velasco MA, Tomida S, and Nishio K: Performance of a novel *KRAS* mutation assay for formalin-fixed paraffin embedded tissues of colorectal cancer. **SpringerPlus**, 4:7, 2015. 査読有
 16. Kato T, Mizuguchi N, and Ito A: Blood pressure, renal biochemical parameters and histopathology in an original rat model of essential hypertension (SHRSP/Kpo strain). **Biomed Res**, 36:169-177, 2015. 査読有
 17. Kato T, Mizuguchi N, and Ito A: Characteristics of podocyte injury in malignant hypertensive nephropathy of rats (SHRSP/Kpo strain). **Biomed Res**, 36: 313-321, 2015. 査読有
 18. Sakai K, Tsurutani J, Yamanaka T, Yoneshige A, Ito A, Togashi Y, de Velasco MA, Terashima M, Fujita Y, Tomida S, Tamura T, Nakagawa K, and Nishio K: Extended *RAS* and *BRAF* mutation analysis using next-generation sequencing. **Plos One**, 10: e0121891, 2015. 査読有
 19. Yoneshige A, Hagiyaama M, Inoue T, Mimae T, Kato T, Okada M, Enoki E, and 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**, 16: 19, 2015. 査読有
 20. Kato T, Oka K, Nakamura T, and Ito A: Bronchioalveolar morphogenesis of human bronchial epithelial cells depending upon hepatocyte growth factor. **J Cell Mol Med**, 19: 2818-2826, 2015. 査読有
 21. Yoshioka Y, Togashi Y, Chikugo T, Kogita A, Taguri M, Terashima M, Mizukami T, Hayashi H, Sakai K, de Velasco MA, Tomida S, Fujita Y, Tokoro T, Ito A, Okuno K, and Nishio K: Clinicopathological and genetic differences between low-grade and high-grade colorectal mucinous adenocarcinoma. **Cancer**, 121: 4359-4368, 2015. 査読有
 22. Hagiyaama M, Yoneshige A, Inoue T, Sato Y, Mimae T, Okada M, and Ito A: The intracellular domain of cell adhesion molecule 1 is present in emphysematous lungs and induces lung epithelial cell apoptosis. **J Biomed Sci**, 22:67, 2015. 査読有
 23. Fujita M, Matsui T, and Ito A: Biomedical insights into cell adhesion and migration — from a viewpoint of central nervous system tumor immunology. **Front Cell Dev Biol**, 10.3389/fcell.2015.00055, 2015. 査読有
 24. Takeda M, Sakai K, Terashima M, Kaneda H, Hayashi H, Tanaka K, Takahama T, Yoshida T, Iwasa T, Shimizu T, Nonagase Y, Kudo K, Tomida S, Mitsudomi T, Saigo K, Ito A, Nakagawa K, and Nishio K: Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing to therapeutic decision-making in lung cancer. **Ann Oncol**, 26: 2477-2482, 2015. 査読有
 25. Yoneshige A, Hagiyaama M, Fujita M, and Ito A: Pathogenic actions of cell adhesion molecule 1 in pulmonary emphysema and atopic dermatitis. **Front Cell Dev Biol**, 10.3389/fcell.2015.00075, 2015. 査読有
- [学会発表](計 16 件)
1. 米重あづさ、萩山満、伊藤彰彦. 肺上皮接着分子 CADM1/TSLC1 の細胞外切断亢進が特発性間質性肺炎における上皮アポトーシスの一因となる (Increased ectodomain shedding of CADM1/TSLC1 as a cause of epithelial apoptosis in idiopathic interstitial pneumonia). 第 75 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、神奈川、2016、10 月 6-8 日.

2. 坪井裕見、尾山大明、秦裕子、伊藤彰彦、村上善則. がん抑制遺伝子 CADM1 による Cbp を介した Src 経路抑制機構の解析 (Roles of cell adhesion molecule 1 (CADM1) in Cbp-dependent inactivation of c-Src pathway). 第 75 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、神奈川、2016、10 月 6-8 日.
3. 萩山満、米重あづさ、伊藤彰彦. 癌による内腔狭窄に伴って拡張した大腸における腸管神経変性: CADM1/TSLC1 の関与 (Enteric nerve degeneration in the colon dilated due to the luminal stenosis by cancer: involvement of CADM1/TSLC1). 第 75 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、神奈川、2016、10 月 6-8 日.
4. 岡田斉、Kit T、太田一成、古室暁義、Koch A、伊藤彰彦. マウスモデルを用いた DNA 損傷修復機能抑制による治療関連白血病予防効果の検討 (Modest attenuation of DNA damage repair delays therapy-related cancer in mouse model). 第 75 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、神奈川、2016、10 月 6-8 日.
5. 武田真幸、坂井和子、林秀敏、田中薫、高濱隆幸、吉田健史、岩朝勤、光富徹哉、伊藤彰彦、西尾和人、中川和彦. 肺癌に於ける次世代シーケンサーを用いた変異解析に基づく分子標的薬適応決定 (Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing to therapeutic decision making in lung cancer). 第 75 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、神奈川、2016、10 月 6-8 日.
6. Inoue T, Takemori K, Mizuguchi N, Kimura M, Chikugo T, Hagiwara M, Yoneshige A, Mori T, Kometani T, Itoh T, Sato T, Ito A. Heart-bound adiponectin, not serum adiponectin, correlates with cardiac hypertrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. The 26th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Coex (Convention & Exhibition Center), Seoul, Korea, 2016, 9 月 26-28 日.
7. 萩山満、米重あづさ、井上敬夫、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 105 回日本病理学会総会、仙台国際センター、仙台、2016、5 月 12-14 日.
8. 米重あづさ、村上哲平、井上敬夫、西村俊司、伊藤彰彦. 悪性上皮性腫瘍内の肉腫様成分における骨芽細胞分化マーカーの発現. 第 105 回日本病理学会総会、仙台国際センター、仙台、2016、5 月 12-14 日.
9. 榊井理恵子、青松和輝、杉村直毅、勝野貴之、早川剛、栢谷洋和、山形知、伊藤彰彦. 急激な体重減少を来した糞線虫症の 1 例. 日本内科学会近畿支部主催第 210 回近畿地方会、神戸国際会議場、兵庫、2015、11 月 28 日.
10. 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 (Induction of lung epithelial cell apoptosis in emphysema by the intracellular domain of cell adhesion molecule 1). 第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、名古屋、2015、10 月 3-5 日.
11. 米重あづさ、村上哲平、西村俊司、伊藤彰彦. 上皮性癌種の肉腫様変化では骨肉腫/骨芽細胞様表現型が出現する (Manifestation of osteoblastic phenotypes in the sarcomatous components of epithelial carcinoma). 第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、名古屋、2015、10 月 3-5 日.
12. 水口信行、加藤貴史、堀奈津美、伊藤彰彦. 本態性高血圧症のモデルラット (SHRSP/Kpo) における腎障害. (Kidney injuries in an original rat model of essential hypertension (SHRSP/Kpo strain)). 第 62 回日本実験動物学会、京都テルサ、京都、2015、5 月 28-30 日.
13. 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 は細部外ドメインの切断が亢進している (Increased ectodomain shedding of CADM1 from pancreatic islets in type 2 diabetes mellitus). 第 104 回日本病理学会総会、名古屋国際会議場、名古屋、2015、4 月 30-5 月 2 日.
14. 萩山満、井上敬夫、米重あづさ、伊藤彰彦. アクチン結合性アダプター蛋白 α -parvin は偽足突起に局在し、小葉乳癌のリンパ節転移に関与する (Involvement of α -parvin, a pseudopodial constituent, in lobular breast carcinoma metastasis). 第 104 回日本病理学会総会、名古屋国際会議場、名古屋、2015、4 月 30-5 月 2 日.
15. 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 (Aberrant expression of lung-epithelial cell adhesion molecule 1 in idiopathic interstitial pneumonia). 第 104 回日本病理学会総会、名古屋国際会議場、名古屋、2015、4 月 30-5 月 2 日.
16. 榎木英介、筑後孝章、前西修、木村雅友、伊藤彰彦、佐藤隆夫. 肺癌の表層壊死部

にアスペルギルスの腐生が認められた 1 例 (Colonization of Aspergillus on the necrotic surface of lung cancer) . 第 104 回日本病理学会総会、名古屋国際会議場、名古屋、2015、4 月 30-5 月 2 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：培養装置及び該培養装置を用いた細胞培養法
発明者：伊藤彰彦
権利者：近畿大学
種類：特許権
番号：特願 2015-87897 号
出願年月日：平成 27 年 4 月 22 日
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/patho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 彰彦 (ITO, Akihiko)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：8 0 2 7 3 6 4 7