

# 平成29年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	接着分子に着目した慢性変性疾患発症機序の解析と創薬シーズの探索	
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部 病理学 教授 伊藤 彰彦 共同研究者：医学部 腎臓内科 教授 有馬 秀二 医学部 腫瘍内科 教授 田村 孝雄 (現 近大奈良病院)	

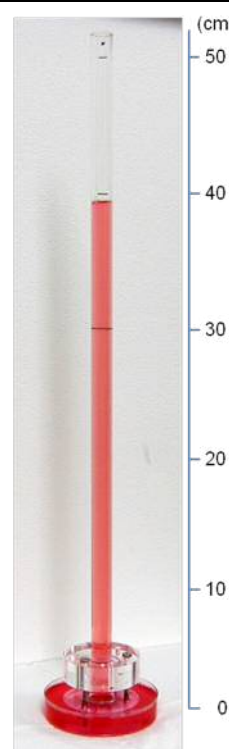
## 1. 研究目的・内容

IgCAM型の接着分子 CADM1 は細胞膜近傍の細胞外領域で酵素的切断 shedding を受ける。本研究の目的は、CADM1 shedding が亢進すると、CADM1 の接着分子機能が低下し、切断断片が細胞内に蓄積するために病的変性が生じるとの仮説を検証することである。対象となる疾患は、肺気腫、間質性肺炎、慢性腎臓病、2型糖尿病、イレウス性腸神経変性、緑内障等である。

## 2. 研究経過及び成果

### 1. 病的内圧上昇を再現する水圧負荷培養装置の作出

神経変性は圧負荷によって惹起されることが知られている。疾患としては、眼圧上昇による緑内障、脳室内圧上昇による水頭症が挙げられる。陽圧換気に伴う気道内圧上昇時には肺胞上皮が変性に陥ることが知られている。興味深いことに、これらの疾患や病態において神経変性・上皮変性を惹起する内圧上昇には共通する閾値があり、大よそ 0.02~0.03 気圧 (約 20~30 cmH<sub>2</sub>O) 程度である。研究代表者は通常の6ウェルプレートの2-chamber 培養系を用い、その半透膜付き培養インサートに細長いシリンダーを垂直に連結することにより、半透膜上の細胞に 10~50 cmH<sub>2</sub>O (培養液水柱) の圧を負荷できる培養系を作製した (右図；特許審査請求中)。



### 2. イレウス性腸神経変性の解析

大腸癌が閉塞機転となると、その口側の大腸は内圧上昇の結果拡張する。そのような手術検体を用いて、CADM1 の発現をウエスタン法にて調べたところ、筋間神経叢における CADM1 shedding の程度は内腔の拡張率 (∝内圧上昇) とよく相関することがわかった。加えて、筋間神経叢の神経節細胞数や軸索密度とは逆相関することも明らかとなった。内圧上昇→CADM1 shedding 亢進→腸筋間神経叢変性という機序が示唆された。

### 3. 圧上昇に起因する神経変性機序の解析

上述の水圧負荷培養装置にてマウス後根神経節細胞 (DRG) を培養したところ、30 cmH<sub>2</sub>O 以上の水柱圧を負荷すると、神経軸索数が減少するとともに、CADM1 shedding が亢進し細胞側 shedding 産物 αCTF の量が増加した。また CADM1 とミトコンドリアマーカである Mitotracker と共染色すると、両者は軸索上で凝集し、しばしば共局在した。さらに DRG に αCTF を遺伝子導入し shedding 亢進状態を再現すると、水圧負荷培養と同様の結果が得られた。以上の結果から、圧付加によって神経軸索では、CADM1 の shedding が亢進し、αCTF が過剰に産生され凝集する、その結果ミトコンドリア輸送が障害され、神経変性が惹起されることが示唆された。

### 4. タバコ煙暴露による肺気腫マウスモデルの樹立と CADM1 shedding の関与

マウスにタバコ煙暴露 (受動喫煙に相当) を連日行くと 12 週間で肺には気腫状の変化が現れ、その後禁煙 (通常飼育) にしてもさらに 12 週間後には気腫が増悪することがわかった。本モデルの肺においては、CADM1 shedding はタバコ煙暴露により亢進し、禁煙後も shedding 亢進状態が持続した。線維筋芽細胞の出現など肺中隔の変化が原因と考えられ、既喫煙者における肺気腫進行の機序として新知見がもたらされた。

### 5. 慢性腎臓病の解析

糸球体腎炎に依らない慢性腎臓病の原因として高血圧性腎硬化症と糖尿病性腎症がある。剖検症例の解析によりこれらの罹患腎ではCADM1 shedding が亢進していることを見出した。腎におけるCADM1 発現は尿細管上皮に現局している（神経を除く）。従って、CADM1 shedding の亢進は尿細管上皮の変性、及びそれに続く尿細管間質病変の形成に寄与している可能性がある。実際、CADM1 shedding の程度と尿細管間質病変の病理学的な重篤度との間に正の相関性が見出された。この相関性の機序として、CADM1 shedding によって細胞外に放出される N 末断片 (N-terminal fragment, NTF) の寄与が考えられる。NTF は尿中に放出されると想定されるので、尿中の NTF を測定するサンドイッチ ELISA を樹立した。腎生検が行われる患者の尿を採取し、ELISA にて尿中 NTF 濃度を測定したところ、慢性腎臓病患者での濃度上昇が明らかとなった。さらに、尿中 NTF 濃度は慢性腎臓病の尿細管間質病変の病理学的な重篤度とも有意な相関があることがわかった (ELISA を含めて特許申請中)。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

#### 1. CADM1 shedding 産物 $\alpha$ CTF の分子的特性の解析

$\alpha$ CTF はアスパラギン酸に富む領域 (ADDAADAD) を内包している。この配列はアスパラギン酸の異性体転換が生じやすいことが知られている。アスパラギン酸の D 体化は分子凝集の機序として知られており、異性体化→分子の凝集→細胞変性との機序が想定される。今後、解析予定 (科研費取得済み)。

#### 2. 尿中 CADM1 濃度の臨床的意義の解析

症例を蓄積し、尿細管変性に関する既存の尿中バイオマーカー ( $\beta$ ミクログロブリンや  $\beta$ -D-N アセチルグルコサミニダーゼ等) に対する優位性を明らかにする。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Front Cell Dev Biol	雑誌	2018.5.18
Am J Physiol - Renal Physiol	雑誌	2018.3.1
Invest Ophthalmol Vis Sci	雑誌	2018.1.1
Front Physiol	雑誌	2017.12.5