様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　5 年　5 月 17 日現在

機関番号：３４４１９
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０７４３４

研究課題名（和文）接着分子CADM1が基軸となる慢性腎臓病の尿細管間質病変形成

研究課題名（英文）Tubulointerstitial lesion formation in chronic kidney disease mediated by renal adhesion molecule CADM1

研究代表者
萩山　満（Hagiyama, Man）

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：６０６３２７１８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：慢性腎臓病では尿細管間質病変の重篤度が残腎機能を規定するが、腎生検以外にその重篤度を知るのは難しい。慢性腎臓病では尿細管上皮のIgCAM型接着分子cell adhesion molecule 1（CADM1）の細胞外切断（shedding）が亢進しており、上皮アポトーシスを誘導する。shedding産物である細胞外断片NTFに注目し、尿中CADM1濃度を測定するサンドイッチELISAを樹立した。尿細管間質病変の重篤度と糸球体濾過率とは、尿中NTF濃度が高ければ高い程、非常に強く逆相関した。従って、尿中CADM1濃度が高い時は糸球体濾過率から尿細管傷害の重篤度を推測できると判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
慢性腎臓病では尿細管間質病変の重篤度が残腎機能を規定する。近年、新規尿中バイオマーカーが確立されているが、尿細管間質障害の全体を反映しているとは言い難く、腎生検以外にその重篤度を知るのは難しい。国内で1300万人を超える慢性腎臓病患者の治療においては尿細管間質の慢性炎症とそれに続く線維化を制御する必要性が重要視されているが、国内外の多くの研究にもかかわらず、病態の分子機序、特に慢性炎症の引き金となる上位分子は確定していない。本研究は接着分子結合を介した特異性の高い慢性炎症誘導モデルを提唱しており、極めて独創的かつ重要な課題と認識される。

研究成果の概要（英文）：In chronic kidney disease (CKD), tubulointerstitial damage correlates with progressive decline in renal function, but it is difficult to monitor the severity without renal biopsy. Tumor suppressor CADM1/TSLC1, an IgCAM-type adhesion molecule, is expressed on renal tubular cells, and its increased ectodomain shedding is suggested to contribute to tubular degeneration. A sandwich ELISA for urinary CADM1 was developed using two anti-ectodomain antibodies. Urinary CADM1 concentrations in patients with CKD were measured. Renal biopsy specimens of all patients were pathologically scored for tubulointerstitial lesions using epithelial degeneration, interstitial inflammation, and fibrosis. There was a weak inverse correlation between pathological scores and elevated GFR (eGFR). Notably, this correlation gradually increased in patients with increasing CADM1 concentrations. CADM1 appeared to be a useful marker indicating tubulointerstitial damage from eGFR levels in CKD.

研究分野：実験病理

キーワード：上皮変性・アポトーシス　慢性腎臓病　接着分子　細胞外切断

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

慢性腎臓病では尿細管上皮変性・炎症細胞浸潤・間質線維化より成る尿細管間質病変が生じ、その重篤化が不可逆的な腎機能障害を導くと認識されているが、本病態の分子機序解明は十分ではない。申請者が所属する研究グループは、IgCAM 型接着分子 CADM1（Cell Adhesion Molecule 1）が本病態に関与する可能性を最近示した。

CADM1 は尿細管上皮に発現しており、細胞外領域が酵素的に切断（shedding）される。慢性腎臓病ではこの CADM1 shedding が亢進しており、全長型の CADM1 が減少するとともに C 末断片 CTF が細胞内に過剰に蓄積し、アポトーシスが誘導される。一方、shedding により細胞外に放出される N 末断片 NTF は細胞膜を貫通する全長型 CADM1 の細胞外ドメインと結合し、細胞の接着や形態変化を誘導する（Am J Pathol 2009;174:2278-89)。糖尿病性腎症や膜性腎症などで、間質へのマスト細胞浸潤が、間質の炎症、線維化、ならびにそれに基づく腎機能低下との間に関連のあることが報告されている（Am J Kidney Dis 1998;32:593-9)。マスト細胞は全長型 CADM1 を発現しており、間質に存在する NTF がマスト細胞の接着に寄与する可能性が考えられる。実際、マスト細胞は CADM1 を介して線維芽細胞に接着し、細胞増殖シグナル（膜結合型 stem cell factor → c-kit 受容体）を受け取るとともに細胞内顆粒の合成を行っている（Blood 2003;101:2601-8 等)。従って、NTF がマスト細胞の脱顆粒を誘導し、分泌されたトリプターゼ等を介して間質の線維化を促進させると可能性がある。また、CADM1 のヘテロフィリックな結合パートナーとして CRTAM（class I-restricted T cell-associated molecule；IgCAM 型接着分子）が知られている（Blood 2005;106:779-86)。CRTAM は細胞傷害性 T リンパ球に発現しており、例えば、表皮に発現している CADM1 と結合すると、T リンパ球の細胞傷害活性は高まり、上皮傷害を通じて自己免疫性脱毛症の発症に関わる（J Immunol 2012;188:1514-22)。NTF は全長型 CRTAM と結合できるので、T リンパ球の細胞傷害活性を増強するように働く可能性がある。以上の背景により、慢性腎臓病では皮質間質に存在する NTF が尿細管間質病変形成のキー分子となっているとの仮説が導かれる。慢性腎臓病の尿細管間質病変は上皮変性・消失とそれを埋める炎症・間質線維化であり、これは種々の慢性炎症巣で見出される普遍的な病変である。従って、本研究課題は、慢性炎症巣形成の上位機構として CADM1 の shedding 現象を広く提唱する。

２．研究の目的

CADM1 shedding が慢性腎臓病における尿細管間質病変形成に関与するか明らかにする。研究内容は所属研究室の研究成果に申請者独自の視点を加味して着想したものであり、極めて独創的と言える。特に、上皮細胞接着分子の切断産物が慢性炎症のトリガー分子となるとの仮説の検証は、慢性腎臓病の病態理解に新機軸をもたらすにとどまらず、上皮－間質組織構築とその破綻機構を説明する新しい概念を提唱するものとして期待される。

３．研究の方法

サンドイッチ ELISA

先行研究において作製した CADM1 細胞外認識抗体 2 クローンのうち、片方を捕捉抗体（固相化用抗体)、もう片方を検出抗体（ビオチン標識抗体）として用いたサンドイッチ ELISA を樹立した。ヒト IgG1 Fc が結合した分泌型 CADM1 を標準化用タンパク質として使用し、測定内の精度（Intra-assay precision）および測定間の精度（Inter-assay precision）を確認した（Table 1)。

Table 1. Validation of the CADM1 ELISA kit.

Sample		Intra-assay precision		Inter-assay precision	
	Spiked conc. (pg/mL)	Measured conc. (pg/mL)	CV (%)	Measured conc. (pg/mL)	CV (%)
A	3,000	3,077 ± 108	1.4 ± 0.7	3,080 ± 20	3.3 ± 0.8
B	1,500	1,476 ± 65	2.7 ± 2.1	1,485 ± 25	3.6 ± 1.4
C	300	306 ± 11	5.5 ± 2.9	303 ± 15	4.5 ± 4.0

For all measurements, the samples were prepared in triplicate. Measured concentrations (conc.) and coefficients of variation (CV) are expressed as the mean ± standard deviation calculated from three independent intra-assays and inter-assays. CADM1, cell adhesion molecule 1; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

４．研究成果

サンドイッチ ELISA を用いた尿中 CADM1 濃度測定

慢性腎臓病では CADM1 shedding が亢進し、shedding 産物である細胞外断片 NTF が尿中および間質中に放出されていると考えられた。この仮説を検証するため、尿中 CADM1 濃度を測定するサンドイッチ ELISA を樹立した。健常者 23 名のうち 16 名は測定下限値 213 pg/mL 以下で、残り 7 名は平均値 269 pg/mL だった。これにより尿中 CADM1 の正常上限値は 362 pg/mL と算出された。慢性腎臓病患者サンプルは近畿大学病院において腎生検を行う患者から腎生検 30 分前に採尿した。慢性腎臓病患者 127 名のうち 44 名（35%）が正常上限値 362 pg/mL を超える濃度が検出され、平均値は 1727 pg/mL、最大測定値は 14899 pg/mL だった（Figure 1）。127 名のうち 64 名（50%）は測定下限値以下であった。慢性腎臓病患者は原疾患によって 10 のグループに分けられ（Table 2）、数の少ないグループ（アミロイド腎、ループス腎炎）を除けば少なくとも 1 名は正常上限値 362 pg/mL を超える患者が含まれていた。尿中 CADM1 濃度と原疾患で分けたグループとの相関関係は見られなかった。

Table 2. Patient characteristics.

Renal disease	n	Sex M	Sex F	Age range (median)
Diabetic nephropathy	14	10	4	40-84 (64)
Arterionephrosclerosis	11	7	4	28-82 (75)
Membranous nephropathy	16	9	7	42-81 (71)
Minor change disease	12	4	8	36-80 (67)
Mesangioproliferative glomerulonephritis	22	13	9	20-79 (56)
Pruritic nephritis	8	4	4	31-85 (67)
IgA nephropathy	29	14	15	19-79 (43)
Membranoproliferative glomerulonephritis	10	6	4	23-85 (74)
Amyloid nephropathy	4	1	3	57-76 (70)
Lupus nephritis	1	1	0	28
Total	127	69	58	19-85 (63)

M, male; F, female.

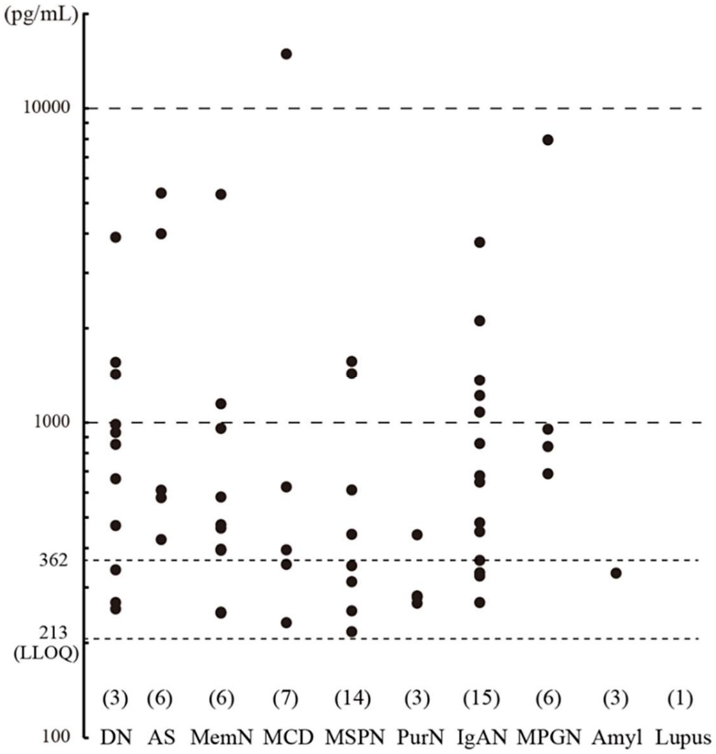

Figure 1　慢性腎臓病患者の尿中 CADM1 濃度

（ ）内は測定下限値（LLOQ）以下の症例数を表す。

DM，糖尿病性腎症；AS，腎硬化症；MemN，膜性腎症；MCD，微小変化群；MSPN，メザンギウム増殖性糸球体腎炎；PurN，紫斑病性腎炎；IgAN，IgA 腎症；MPGN，膜性増殖性糸球体腎炎；Amyl，アミロイド腎；Lupus，ループス腎炎

尿細管間質病変を有する患者の尿中 CADM1 濃度と腎機能マーカーとの相関

全患者の腎生検は病理学的に評価し、尿細管間質障害を 0～3 でスコア化した。間質線維化、炎症細胞浸潤、尿細管上皮変性について重篤度をそれぞれ 0～3 でスコア化した。尿細管間質病変の重篤度（total pathological score）は各患者における 3 つのスコア（間質線維化、炎症細胞浸潤、尿細管上皮変性）を合計して評価した。全患者のコホート解析において、尿中 CADM1 濃度は 4 つのスコアおよび腎機能マーカーである糸球体濾過率 estimated GFR（eGFR）と相関しなかったが、total pathological score と eGFR は弱く逆相関した（R^2 = 0.292）。この total pathological score と eGFR の逆相関は、尿中 CADM1 濃度が高ければ高い程、強まった（362 pg/mL 以上で R^2 = 0.449、1569 pg/mL 以上で R^2 = 0.899）。従って、尿中 CADM1 濃度が高い時は糸球体濾過率から尿細管間質傷害の重篤度を推測できると判明した。

慢性腎臓病患者のパラフィン病理標本（近畿大学病院で行われた剖検・手術・生検）を用いて腎皮質間質に CADM1-NTF を検出し、慢性腎臓病にて変性に陥った遠位尿細管を包囲するように局在する CADM1-NTF を検出した。現在、間質病変の重篤度を上記同様に評価し、間質 NTF 量（免疫染色やウエスタンブロット法などで算出）との相関性を解析中である。今後、分泌型 CADM1-NTF トランスジェニックマウスを作製し、腎部分切除や腎動脈分枝結紮により機能糸球体数を減少させて慢性腎障害を引き起こし、間質 NTF と尿細管間質病変の重篤度の相関関係を解析することにより、CADM1-NTF が慢性炎症を誘導するとの仮説を証明する予定である。

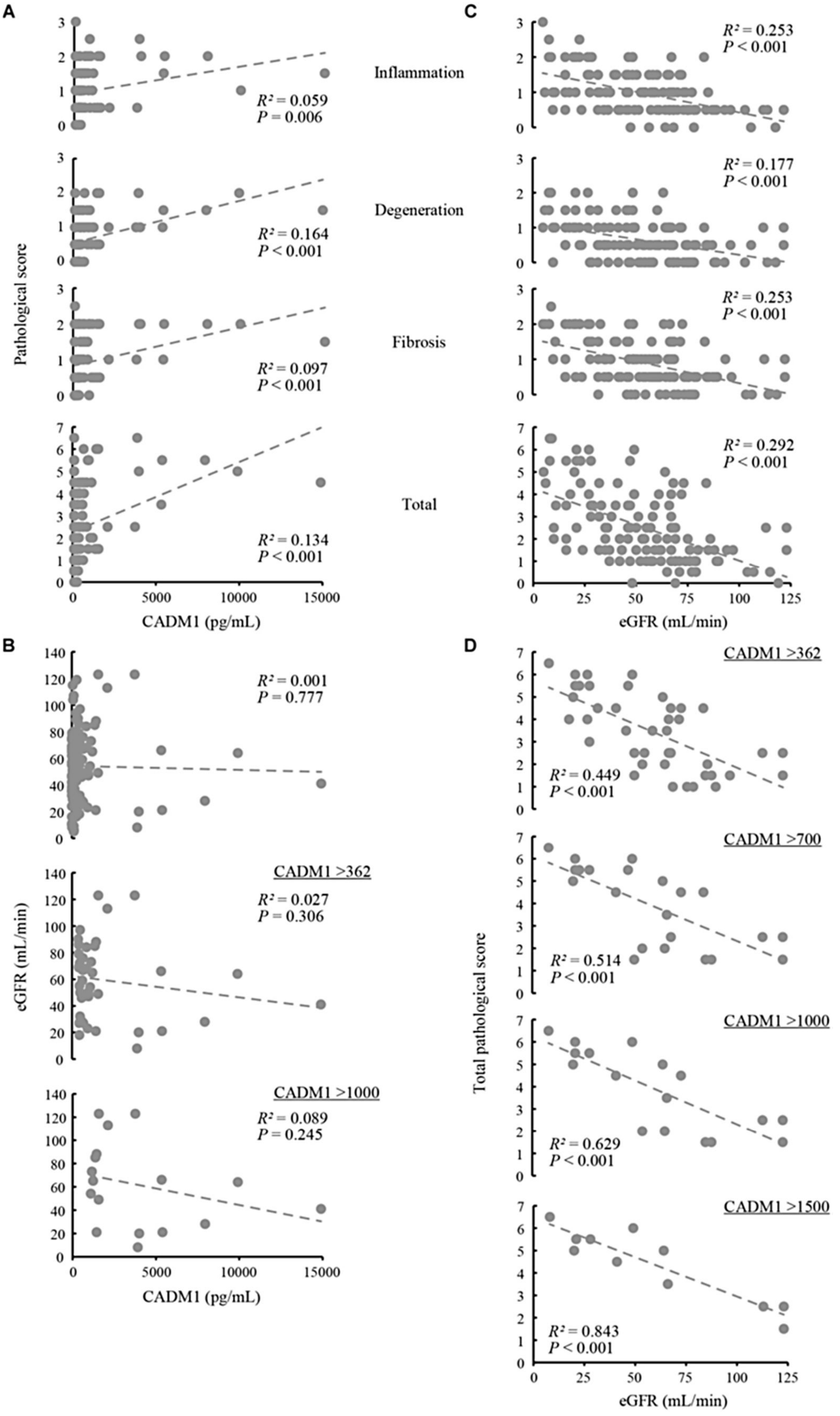

Figure 2　尿中 CADM1 濃度と病理スコアおよび糸球体濾過率の相関

（A-C）全患者における尿中 CADM1 濃度（pg/mL）との相関を示す。（D）右肩に提示した CADM1 濃度未満を切り捨てし、解析した結果を示す。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　5件）

1．著者名 Hagiyama M, Takeuchi F, Sugano A, Yoneshige A, Inoue T, Wada A, Kajiyama H, Takaoka Y, Sasaki K, Ito A.	4．巻 23
2．論文標題 Indigo Plant Leaf Extract Inhibits the Binding of SARS-CoV-2 Spike Protein to Angiotensin-Converting Enzyme 2.	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Exp Ther Med	6．最初と最後の頁 274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2022.11200.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Yoneshige A, Hagiyama M, Takashima Y, Ueno S, Inoue T, Kimura R, Koriyama Y, Ito A	4．巻 9
2．論文標題 Elevated hydrostatic pressure causes retinal degeneration through upregulating lipocalin-2.	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Front Cell Dev Biol	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.664327.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Kimura R, Otani T, Shiraishi N, Hagiyama M, Yoneshige A, Wada A, Kajiyama H, Takeuchi F, Mizuguchi N, Morishita K, Ito A	4．巻 283
2．論文標題 Expression of cell adhesion molecule 1 in human and murine endometrial glandular cells and its increase during the proliferative phase by estrogen and cell density.	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Life Sci	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2021.119854.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Hagiyama M, Kimura R, Yoneshige A, Inoue T, Otani T, Ito A.	4．巻 21
2．論文標題 Cell adhesion molecule 1 contributes to cell survival in crowded epithelial monolayers.	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Int J Mol Sci	6．最初と最後の頁 4123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21114123.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計6件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 萩山満、武内風香、伊藤彰彦
2．発表標題 接着分子CADM1/TSLC1は子宮内膜腺癌細胞の単層円柱状増殖に寄与する
3．学会等名 第81回日本癌学会総会
4．発表年 2022年

1．発表者名 萩山満、米重あづさ、武内風香、伊藤彰彦
2．発表標題 接着分子CADM1は子宮内膜腺上皮の増殖に寄与する
3．学会等名 第111回日本病理学会総会
4．発表年 2022年

1．発表者名 萩山満、伊藤彰彦
2．発表標題 接着分子CADM1の発現抑制は密集する上皮細胞にアポトーシスを誘導する
3．学会等名 第80回日本癌学会総会
4．発表年 2021年

1．発表者名 萩山満、米重あづさ、伊藤彰彦
2．発表標題 上皮単層における細胞生存への寄与：接着分子CADM1
3．学会等名 第110回日本病理学会総会
4．発表年 2021年

１．発表者名 萩山満、木村竜一朗、伊藤彰彦
２．発表標題 腎尿細管間質病変の新規バイオマーカー接着分子CADM1（別名腫瘍抑制因子TSLC1）
３．学会等名 第79回日本癌学会総会
４．発表年 2020年

１．発表者名 萩山満、木村竜一朗、米重あづさ、伊藤彰彦
２．発表標題 慢性腎臓病間質病変の新規バイオマーカー接着分子CADM1
３．学会等名 第109回日本病理学会総会
４．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関