

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860302

研究課題名(和文) 肺気腫の新規発症機序：接着分子CADM1の細胞内断片による肺胞上皮アポトーシス

研究課題名(英文) Increased ectodomain shedding of lung-epithelial cell adhesion molecule 1 as a cause of increased alveolar cell apoptosis in emphysema

研究代表者

萩山 満 (HAGIYAMA, Mitsuru)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：60632718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺気腫の原因である蛋白分解酵素活性上昇と肺胞上皮アポトーシスを結び付ける分子機序は不明であった。肺胞上皮の接着分子CADM1の機能的制御に細胞外切断(shedding)がある。ウエスタン法にて肺気腫ではsheddingが亢進し、TUNEL法にて肺胞上皮アポトーシスの上昇が判明した。ヒト肺上皮細胞株NCI-H441細胞においてCADM1のsheddingを惹起させた所、shedding産物である α CTFがミトコンドリアに局在し、アポトーシスが上昇することを見出した。肺気腫ではCADM1のsheddingが亢進し、 α CTFがミトコンドリアに集積して肺胞上皮アポトーシスを促進していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Alveolar epithelial cell apoptosis and proteolysis play central roles in the pathogenesis of emphysema, but molecular mechanisms underlying these two events are not yet clearly understood. CADM1 is a lung-epithelial cell adhesion molecule and generates membrane-associated C-terminal fragments (CTFs) through protease-mediated ectodomain shedding. Western blot analyses revealed that CADM1-CTFs increased in human emphysematous lungs in association with increased ectodomain shedding. Increased apoptosis of alveolar epithelial cells in emphysematous lungs was confirmed by TUNEL assays. NCI-H441 lung epithelial cells expressing mature CADM1 but not CTFs were induced to express α CTF by shedding inducers; phorbol ester and trypsin. Immunofluorescence and TUNEL assays revealed that CADM1- α CTF was localised to mitochondria and increased cell apoptosis. CADM1 shedding appeared to cause alveolar cell apoptosis in emphysematous lungs by producing α CTF that accumulated in mitochondria.

研究分野：実験病理

キーワード：細胞障害 接着分子 プロテアーゼ アポトーシス 肺気腫

1. 研究開始当初の背景

肺気腫は慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の一種で、肺胞壁の破壊的变化を伴う疾患である。組織学的には、細気管支から末梢にかけての気腔が異常に拡張している。この組織破壊は一般に緩徐に進行するが、不可逆性である。現時点では根本的な治療法はなく、進行すると気腔がさらに拡張し、重篤な呼吸不全を来す。罹患者の 8 割以上が喫煙者であることから、過度の喫煙が肺気腫発症の誘因と見なされている。組織破壊の機序としては、煙に含まれるオキシダント自身による肺胞上皮の細胞膜や DNA の酸化という直接的な作用の他に、アンチプロテアーゼの酸化を介した肺胞壁におけるプロテアーゼ活性の相対的な上昇、或いは炎症性メディエーターによって炎症局所に誘引された肺胞マクロファージや好中球からのプロテアーゼ放出によるプロテアーゼ活性の絶対的な上昇が重要視されている。このプロテアーゼ活性の上昇は、肺胞上皮細胞のアポトーシスを病的に進行させ、その結果さらに蛋白分解が加速して肺胞壁全体の破壊に至ると考えられている。しかしながら、プロテアーゼ活性の亢進とアポトーシスの進行との間を結び付ける分子機序については不明である。

Cell adhesion molecule-1 (CADM1、別名に SgIGSF や Necl-2 等) 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、肺の上皮 (肺胞上皮と細気管支上皮) 細胞、胆管細胞、神経、マスト細胞など様々な細胞に発現している。上皮細胞ではその側方細胞膜に発現し、隣り合う細胞間でホモフィリックに trans 結合することにより上皮細胞の極性の維持を司っている。申請者らは、CADM1 が転写後調節としてプロテアーゼによって切断 (shedding) されることを最近報告した。即ち、①CADM1 は細胞外ドメインの shedding (α 切断と β 切断) に続いて γ -secretase によって細胞膜貫通領域で切断

され、細胞内断片 (Intracellular domain, ICD) が産生されること、②CADM1 の shedding は TPA (ホルボールエステル) やトリプシン処理によって促進されることを明らかにした。さらに、質量分析によって CADM1 の α 切断部位を決定するとともに、CADM1 の shedding を惹起する酵素の 1 つとして ADAM10 を同定した。

以上の研究経過を背景として、CADM1 と疾患病態との関連に注目したパイロットスタディーを最近開始した。肺組織を抗 CADM1 C 末抗体によるウエスタン法にて解析した所、全長型の 100 kDa の他に、35 kDa と 25 kDa の 2 つのバンドが検出された。これらは、細胞外ドメインの shedding 産物 (β 切断と α 切断) である。肺気腫では全長フォームに対して shedding 産物の量が相対的に増加しており、CADM1 の shedding 亢進が示唆された。この予備的データを受けて、本研究課題では、CADM1 の shedding 産物が肺胞上皮細胞のアポトーシスを誘導する分子機序について解析を行う。

2. 研究の目的

肺気腫は慢性閉塞性肺疾患の一種で、プロテアーゼの絶対的或いは相対的な上昇による肺胞壁の破壊的变化を特徴とする。IgCAM 型の接着分子 CADM1 は、肺胞上皮の側方細胞膜に発現し、上皮細胞の極性の維持を司っている。CADM1 の機能不全は極性維持不全を惹起し、結果的にアポトーシスを誘導する。CADM1 の機能制御機構としてプロテアーゼによる細胞外領域の切断 (shedding) がある。肺気腫の肺胞上皮では CADM1 の shedding が亢進状態にあり、その結果として肺胞上皮の病的なアポトーシスが惹起されている可能性が考えられる。本研究課題では、この可能性を検証して、肺気腫発症に関する新しい分子機序の提案を目指す。具体的には、肺気腫の肺胞上皮におけるアポトーシスの実態

と CADM1 の shedding 亢進の有無を病理組織学的及び分子生物学的に解析し、肺胞上皮アポトーシスと CADM1 shedding との間の因果性について、shedding 産物の機能解析の観点から調べる。

3. 研究の方法

肺気腫病理組織検体の収集

近畿大学医学部附属病院において、肺気腫症例の病理解剖時、及び肺気腫合併肺癌症例の手術時に肺気腫病変を速やかに採取して 2 分割し、ひとつは TUNEL 法用にホルマリン固定し、もうひとつは組織蛋白抽出用に凍結保存した。対照群としては、肺に著変のない症例の解剖例を用いた。なお、本研究の開始に当たっては近畿大学医学部にて倫理審査委員会の承認を得た。

細胞培養

ヒト肺胞上皮細胞株 NCI-H441 細胞は ATCC より入手した(ロット番号 58294188)。推奨の通りに RPMI-1640 に 10% FBS、100 units/ml ペニシリンおよび 100 g/ml ストレプトマイシン、5 mM HEPES バッファーを添加した培地で培養した。

Terminal nucleotide nick-end labelling (TUNEL) 法

In Situ Cell Death Detection Kit (Roche) を用いて、ホルマリン固定パラフィンブロックの肺組織と培養細胞を、推奨プロトコールに従って TUNEL 法に供した。DAPI によって核染色された細胞で TUNEL シグナルが検出された場合、TUNEL 陽性と見なした。

4. 研究成果

肺気腫における CADM1 shedding の亢進

肺気腫と健常肺の肺組織ライセートを調整し、抗 CADM1 C 末抗体でのウェスタンブロットに供した。CADM1 全長型とその

shedding によって産生された 2 つの C-terminal fragments (α CTF と β CTF) が約 100、20、37 kDa にそれぞれ検出された (図 1A)。両者を β -actin と上皮マーカーである E-cadherin によって標準化した。全長型に対する 2 つの shedding 産物の割合を算出し、両者を比較したところ、肺気腫では α CTF と β CTF の発現量が増加していた ($P < 0.05$) (図 1B)。以上の結果から、肺気腫では CADM1 shedding が亢進していることを明らかにした。

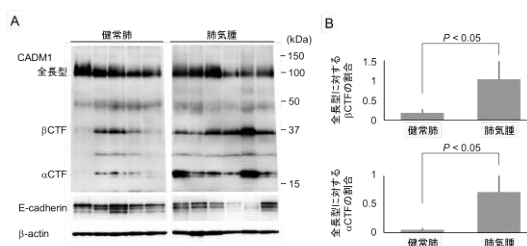


図 1 肺気腫における CADM1 shedding の亢進

健常肺と肺気腫のウェスタンブロット (A) と NIH ImageJ によって算出した全長型に対する shedding 産物 (α CTF と β CTF) の割合 (B)

肺気腫の肺胞上皮細胞におけるアポトーシスの増加

ホルマリン固定パラフィンブロックの肺組織切片を TUNEL 法 (緑) に供し、次いで抗 E-cadherin 抗体による蛍光免疫染色 (赤) と DAPI による核染色 (青) を行った (図 2A)。E-cadherin シグナルが細胞膜上に検出された細胞を肺胞上皮細胞と同定し、肺胞上皮細胞数 500 個中の TUNEL 陽性細胞数を算出した。健常肺ではほとんど全ての上皮細胞が TUNEL 陰性であったが、肺気腫では 10% 以上の細胞が TUNEL 陽性であった ($P < 0.01$) (図 2B)。

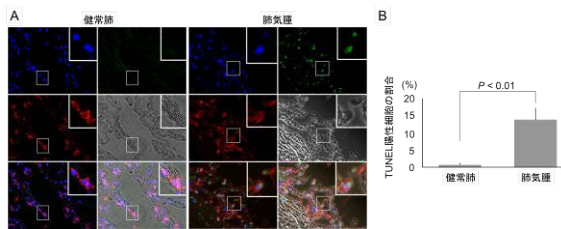


図 2 肺気腫における肺胞上皮細胞アポトーシスの増加

健常肺と肺気腫の TUNEL 法 (緑)、E-cadherin (赤)、DAPI (青) による蛍光免疫染色の代表的な結果 (A) と両群における TUNEL 陽性肺胞上皮細胞の割合 (B)

CADM1 αCTF のミトコンドリア局在とアポトーシス誘導

CADM1 shedding 亢進と肺胞上皮細胞アポトーシス増加の因果性を証明するため、ヒト肺胞上皮細胞株である NCI-H441 細胞を用いて実験を行った。NCI-H441 細胞を TPA (200 nM) とトリプシン (0.0125%) の両方で 20 分間処理して CADM1 の shedding を惹起させると、CADM1 全長型がわずかに減少し、αCTF が検出された (図 3A)。TPA とトリプシン処理の細胞と通常培養の細胞を抗 CADM1 C 末抗体による蛍光免疫染色とミトコンドリアマーカである Mitotracker 蛍光色素による染色を行った。通常培養の細胞では、CADM1 シグナルは主に細胞膜上に検出され、Mitotracker シグナルとの共局在は見られなかった (図 3B 上段)。一方、TPA とトリプシン処理した細胞では、細胞膜上の CADM1 シグナルがわずかに低下し、細胞質にシグナルが検出され、しばしば Mitotracker シグナルと共局在しているのが観察された (図 3B 下段)。CADM1 shedding 亢進によってアポトーシスが誘導されるか調べるため、NCI-H441 細胞を TPA とトリプシン処理後 48 時間通常培養した後 TUNEL 法に供した。処理した細胞では、通常培養の細胞と比較して、TUNEL 陽性細胞の割合が約 5 倍増加した ($P < 0.01$) (図 3C)。

以上の結果から、CADM1 αCTF のミトコンドリア局在によって肺胞上皮細胞のアポトーシスが誘導される可能性が示唆された。

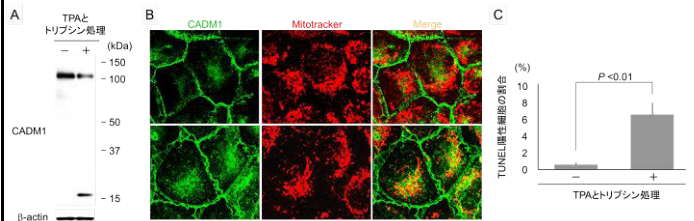


図 3 CADM1 αCTF のミトコンドリア局在とアポトーシスの誘導

TPA とトリプシン処理した NCI-H441 細胞のウエスタンブロット (A)、通常培養の細胞 (上) と TPA とトリプシン処理の細胞 (下) における蛍光免疫染色の代表的な結果 (B)、TPA とトリプシン処理後 48 時間通常培養した細胞における TUNEL 陽性細胞の割合 (C)

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 7 件)

1. Mimae T,* Hagiyama M,* Inoue T, Yoneshige A, Kato T, Okada M, Murakami Y, Ito A. Increased ectodomain shedding of lung-epithelial cell adhesion molecule 1 as a cause of increased alveolar cell apoptosis in emphysema. *Thorax*, 69(3): 223-231, 2014. (*Two authors contributed equally.) 査読有
2. Inoue T,* Hagiyama M,* Yoneshige A, Kato T, Enoki E, Maenishi O, Chikugo T, Kimura M, Satoh 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*, 9(6): e100988, 2014. (*Two authors contributed equally.) 査読有

3. Ito M,* Hagiyama M,* Mimae T, Inoue T, Kato T, Yoneshige A, Nakanishi J, Kondo T, Okada M, Ito A. α -parvin, a pseudopodial constituent, promotes cell motility and is associated with lymph node metastasis of lobular breast carcinoma. **Breast Cancer Res Treat**, 144(1): 59-69, 2014. (*Two authors contributed equally.) 査読有
4. Sakurai MA, Ozaki Y, Okuzaki D, Naito Y, Sasakura T, Okamoto A, Tabara H, Inoue T, Hagiyama M, Ito A, Yabuta N, Nojima H. Gefitinib and luteolin cause growth arrest of human prostate cancer PC-3 cells via inhibition of cyclin G-associated kinase and induction of miR-630. **PLoS One**, 9(6): e100124, 2014. 査読有
5. Mimae T, Ito A, Yamamoto YS, Hagiyama M, Nakanishi J, Ito M, Hosokawa Y, Okada M, Murakami Y, Kondo T. A novel approach to pseudopodia proteomics: excimer laser etching, two-dimensional difference gel electrophoresis, and confocal imaging. **Protoc exch**, 2014. doi:10.1038/protex.2014.007. 査読有
6. Hagiyama M, Inoue T, Furuno T, Iino T, Itami S, Nakanishi M, Asada H, Hosokawa Y, Ito A. Increased expression of cell adhesion molecule 1 by mast cells as a cause of enhanced nerve-mast cell interaction in a hapten-induced mouse model of atopic dermatitis. **Br J Dermatol**, 168(4): 771-778, 2013. 査読有
7. Inoue T, Hagiyama M, Enoki E, Sakurai AM, Tan A, Wakayama T, Iseki S, Murakami Y, Fukuda K,

Hamanishi C, Ito A. Cell adhesion molecule 1 is a new osteoblastic cell adhesion molecule and a diagnostic marker for osteosarcoma. **Life Sci**, 92(1): 91-99, 2013. 査読有

[学会発表] (計4件)

1. 萩山満、伊藤彰彦「アクチン結合性アダプター蛋白 α -parvinは偽足突起構成要素であり、小葉乳癌のリンパ節転移に関与する」第73回日本癌学会総会、2014年9月25~27日、パシフィコ横浜、横浜
2. 萩山満、井上敬夫、米重あづさ、伊藤彰彦「マスト細胞における接着分子CADM1の発現上昇：アトピー性皮膚炎のストレス感受性への関与」第103回日本病理学会総会、2014年4月24~26日、広島国際会議場・ANAクラウンプラザホテル広島、広島
3. 萩山満、伊藤彰彦「エキシマレーザーによる癌細胞偽足突起の選択的採取とプロテオミクス」第72回日本癌学会総会、2013年10月3~5日、パシフィコ横浜、横浜
4. 萩山満、伊藤彰彦「エキシマレーザーを用いた癌細胞偽足突起のプロテオミクス」第102回日本病理学会総会、2013年6月6~8日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩山 満 (HAGIYAMA Mitsuru)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：60632718