

分子構造的特性解析による

Krebs von de Lungen-6/Mucin-1の

肺胞-血液間動態に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

Krebs von de Lungen-6 (KL-6) は、1985年に Kohno らによって発見された抗 KL-6 抗体が認識するシアル化糖鎖抗原で、mucin-1 (MUC1) の一部である。MUC1 の細胞外ドメインにはアミノ酸の繰り返し配列の領域が存在し、この領域には糖鎖が多数存在する。抗 KL-6 抗体はこの糖鎖のシアル酸部位を認識しており、KL-6 はこうしたシアル化糖鎖抗原の量を反映している。肺では II 型肺胞上皮細胞や気管支腺細胞などで産生され、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中にも高濃度で存在する。また移行機序は不明であるが KL-6 の一部は血中を循環しており、再生 II 型肺胞上皮細胞が増加するような間質性肺疾患では血清中 KL-6 値が上昇する。そのため、血清中 KL-6 の測定は間質性肺疾患の診断と病勢の評価に広く使われている。しかし、血清中 KL-6 値が臨床経過と乖離したり、他の間質性肺疾患の血清マーカーと異なる動きをする症例が報告されている。肺胞上皮由来タンパク質の肺胞 - 血液間動態はそのタンパク質の分子サイズや荷電状態と関係があることから、こうした現象の要因の一つに KL-6/MUC1 の分子構造的特性の関与が考えられる。MUC1 の分子サイズは MUC1 遺伝子多型 (rs4072037) と関連があり、また MUC1 の糖鎖修飾は高分子サイズの MUC1 の方が低分子サイズの MUC1 よりも多いと報告されている。これらの報告に加えて、最近、サルコイドーシスにおいて rs4072037 と血清中 KL-6 値との関係が報告されている。

本研究の目的は、KL-6/MUC1 の分子構造的特性を解析して KL-6/MUC1 の分子構造的特性と肺胞 - 血液間動態との関係を明らかにすることである。

【対象と方法】

対象は、北海道大学病院第一内科の研究において BALF と血清の両方が保存されていた間質性肺疾患患者 125 例と健常者 22 例である。間質性肺疾患患者の内訳は、特発性肺線維症 13 名、非特異性間質性肺炎 15 名、薬剤性肺炎 10 名、器質化肺炎 12 名、好酸球性肺炎 10 名、過敏性肺臓炎 2 名、サルコイドーシス 63 名である。これらの対象を用いて、BALF と血清の両方のウエスタンブロットから KL-6/MUC1 の肺胞 - 血液間動態を推定し、またサルコイドーシス患者においては KL-6/MUC1 の分子構造的特性と rs4072037 遺伝子型との関係についても検討した。

【結果】

BALF 中 KL-6/MUC1 は、抗 KL-6 抗体を用いたウエスタンブロットにより、分子量の大きさから L, M, H の 3 種類のバンドのひとつもしくはいずれかの組み合わせ (L/L, L/M, L/H, H/H, M/H) で検出された。BALF 中 KL-6/MUC1 バンドパターンが L/L の対象者では、健常者および間質性肺疾患患者ともに血清中 KL-6/MUC1 は L バンドのみ検出されたが、BALF 中のバンドパターンが non-L/L の対象者の血清では、健常者では L バンドのみ検出されたが、間質性肺疾患患者では 48 例中 18 例の症例で L バンドに加えて M バンドあるいは H バンドの二つのバンドが検出された。サルコイドーシス患者における KL-6/MUC1 バンドパターンと rs4072037 遺伝子型との関係を検討したところ、遺伝子型 AA 症例は 38 例中 36 例が L/L であったのに対し、AG 症例では 23 例中 3 例が L/M、19 例が L/H、1 例が M/H ですべて non-L/L パターンであった。また GG 症例では 2 例全例が H/H であった。以上の結果から A アレルは L バンドと G アレルは H バンドと関係があると推定された。次に、KL-6/MUC1 バンドパターンと KL-6 値との関係を検討したところ、健常者と間質性肺疾患患者の BALF と血清中 KL-6 値は BALF 中のバンドパターンが L/L よりも L/H のほうが有意に高値を示した。これに加えて、間質性肺疾患患者の血清中 KL-6 値は健常者と比較して BALF 中のバンドパターンが同じパターン同士の比較においても有意に高値を示した。次に BALF 中のバンドパターンが non-L/L の症例を対象に、BALF と血清中のバンドパターンが一致する症例と一致しない症例に分けて両者の BALF 中アルブミン値を検討したところ、BALF と血清のパターンが一致した症例の BALF 中アルブミン値は一致しない症例と比較して有意に高値を示した。

【考察】

本研究では、健常者と間質性肺疾患における KL-6/MUC1 の肺胞-血液間動態が異なっていた。これは、高分子サイズの KL-6/MUC1 が健常者では肺胞腔から血中へ移行しづらい動態にあるのに対し、間質性肺疾患では肺胞血液関門での移行動態が破綻するような障害をうけた場合に移行しやすくなるためと考えられた。一方、血清中 KL-6 値は KL-6/MUC1 の分子サイズと関係があり、さらに肺胞血液関門における KL-6/MUC1 の移行動態も血清中 KL-6 値に影響を与えていた。この現象は、特に BALF 中 KL-6/MUC1 の分子サイズが高分子サイズの KL-6/MUC1 を有する症例で顕著に認められた。

間質性肺疾患の血清マーカーについては、その疾患特異性、感度、病勢に伴う推移などさまざまな検討がなされている。血清中 KL-6 は間質性肺疾患の血清マーカーである surfactant protein (SP) -A や SP-D と同時に検査するとその濃度上昇の程度や時間経過に乖離がみられる症例が報告されているが、その原因は明らかにされていない。しかし、本研究で得られた知見はこうした乖離原因を説明できる可能性がある。Leth-Larsen らは、SP-D 遺伝子多型が分子構造上のオリゴマー形成 (分子サイズ) に関係しており、このことが血清中 SP-D 値にも影響を与えていると報告している。したがって、SP-D の肺胞-血液間動態も、KL-6/MUC1 と同様に、遺伝的に規定された分子サイズの違いで異なり、その異なった肺胞-血液間動態が血清中 SP-D 値にも影響を与えている可能性が示唆される。このように、マーカータンパク質の肺胞-血液間動態をその分子サイズとの関係で推定することは、それぞれの血清マーカーの異なった挙動を説明する上で有用な手段になりえると考えられる。

【結論】

BALF 中 KL-6/MUC1 の分子サイズに基づくバンドパターンは MUC1 遺伝子多型によって規定されており、血清中 KL-6/MUC1 のバンドパターンは、それに加えて KL-6/MUC1 の肺胞-血液間動態の影響を受けていた。さらに、血清中 KL-6 値も、KL-6/MUC1 のバン

ドパターン、肺胞血液関門における KL-6/MUC1 の移行動態双方の影響を受けていた。本研究によって得られた知見は、KL-6/MUC1 の肺胞 - 血液間動態の理解や血清 KL-6 値の解釈に留まらず、あらゆる肺胞上皮由来タンパク質の肺胞 - 血液間動態の理解あるいは血中濃度を解釈する上でも重要、かつ臨床的に有用な知見となりうると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	川口	秀明
副査	教授	西村	正治
副査	教授	丸藤	哲
副査	教授	筒井	裕之
副査	教授	松野	吉宏

学位論文題名

分子構造的特性解析による

Krebs von de Lungen-6/Mucin-1の

肺胞-血液間動態に関する研究

Krebs von de Lungen-6 (KL-6) は、1985年に Kohno らによって発見された抗 KL-6 抗体が認識するシアル化糖鎖抗原で、mucin-1 (MUC1) の一部とされている。肺では II 型肺胞上皮細胞や気管支腺細胞などで産生され、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中にも高濃度で存在する。また、移行機序は不明であるが KL-6/MUC1 の一部は血中を循環しており、再生 II 型肺胞上皮細胞が増加するような間質性肺疾患では血清中 KL-6 値が上昇する。このため、本邦では血清中 KL-6 の測定が間質性肺疾患の診断や病勢の評価に広く用いられている。しかし、検査上の問題点として、一部の症例では血清中 KL-6 値の動態が臨床経過や他の間質性肺疾患の血清マーカーと異なる挙動を示す症例が報告されている。肺胞上皮由来タンパク質の肺胞-血液間動態はタンパク質の分子サイズや荷電状態と関連があることから、こうした現象の要因の一つに KL-6/MUC1 の分子構造的特性の関与が考えられる。本研究の目的は、KL-6/MUC1 の分子構造的特性を解析して KL-6/MUC1 の分子構造的特性と肺胞-血液間動態との関係を明らかにすることである。

対象は、北海道大学病院第一内科の研究において BALF と血清の両方が保存されていた間質性肺疾患患者 125 例と健常者 22 例である。間質性肺疾患患者の内訳は、特発性肺線維症 13 名、非特異性間質性肺炎 15 名、薬剤性肺炎 10 名、器質性肺炎 12 名、好酸球性肺炎 10 名、過敏性肺臓炎 2 名、サルコイドーシス 63 名である。これらの対象を用いて、BALF と血清の両方のウエスタンブロットから KL-6/MUC1 の肺胞-血液間動態を推定し、また本研究と併せて遺伝子解析が可能であったサルコイドーシス患者においては KL-6/MUC1 の分子構造的特性と MUC1 遺伝子多型 (exon2, rs4072037) との関係についても検討した。

健常者と間質性肺疾患の BALF 中 KL-6/MUC1 は、抗 KL-6 抗体を用いたウエスタンブロットにおいて、分子量の大きさから L, M, H の 3 種類のバンドのひとつもしくはいずれかの組み合わせ (L/L, L/M, L/H, H/H, M/H) で検出された。サルコイドーシス患者における BALF 中 KL-6/MUC1 バンドパターンと rs4072037 遺伝子型との関係を検討したところ、A アレルは L バンドと G アレルは H バンドと関係があると推定された。BALF 中 KL-6/MUC1 バンドパターンが L/L の対象者では、健常者および間質性肺疾患患者ともに血清中 KL-6/MUC1 は L バンドのみ検出されたが、BALF 中のバンドパターンが non-L/L の対象者の血清では、健常者では L バンドのみ検出されたが、間質性肺疾患患者では一部の対象者、特に BALF 中アルブミン値が上昇するような対象者では、L バンドに加えて M バンドあるいは H バンドの二つのバンドが検出された。

審査にあたり、副査丸藤教授から KL-6/MUC1 の肺胞から血中への移行機序に関する質問があった。次に、副査松野教授より MUC1 の分子サイズと KL-6/MUC1 のバンドパターンとの関係についてのコメントと KL-6/MUC1 の分子サイズに影響を与える因子についての質問があった。さらに、副査筒井教授からは肺胞障害の程度と血清中 KL-6/MUC1 のバンドパターンとの関係に関する質問があった。また主査の川口教授よりサルコイドーシス患者の遺伝子多型性と血清中 KL-6/MUC1 のバンドパターンとの関係についての質問があった。最後に、副査西村教授から本研究の位置づけや将来の展望に対するコメントがあった。いずれの質問に対しても申請者は自験データや過去の文献を引用し、概ね適切に回答した。質疑応答の時間は約 30 分であった。

この論文は、1) BALF 中 KL-6/MUC1 の分子サイズに基づくバンドパターンが MUC1 遺伝子多型によって規定されていること、2) 血清中 KL-6/MUC1 のバンドパターンが KL-6/MUC1 の肺胞-血液間動態の影響を受けていること、3) 血清中 KL-6 値は KL-6/MUC1 の分子サイズと肺胞血液関門における移行動態の双方の影響を受けていることを初めて示した点で高く評価され、今後は KL-6/MUC1 を含むあらゆる肺胞上皮由来タンパク質に対する肺胞血液間動態の理解や臨床検査へのさらなる応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。