

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08632

研究課題名(和文) 特発性肺線維症病態におけるミトコンドリアUPRの役割

研究課題名(英文) mitochondria UPR in Idiopathic interstitial pneumonia

研究代表者

原 弘道 (hara, hiromichi)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70398791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは傷害蛋白の蓄積、ミトコンドリア傷害に対して、ミトコンドリアUPRと呼ばれる適応反応により細胞内恒常性を維持している。SSBP-1は、ミトコンドリアUPRの重要な調節因子の1つで、核内に移行し、各種シャペロンの転写を促進する。IPF肺組織ではSSBP-1、Sirtuin 3(ミトコンドリアUPRの下流調節因子) 蛋白発現が低下しており、ミトコンドリアUPRは低下していると考えられた。SSBP-1ノックダウンによるミトコンドリアUPR抑制はTGF- β 誘導筋線維芽細胞分化を促進した。ミトコンドリアUPR低下は線維化を促進し、IPF病態に関連すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症(idiopathic interstitial pneumonia:IPF)肺組織では、種々の刺激により傷害された蛋白の蓄積やミトコンドリア傷害に対する適応反応であるミトコンドリアUPR(Unfolded Protein Response)が低下していた。ミトコンドリアUPR低下は線維化を促進し、IPF病態に関連すると考えられた。ミトコンドリアUPRを促進することがIPFの治療の新たな選択肢となる可能性が示唆された

研究成果の概要(英文)：Mitochondria play important roles in the maintenance of intracellular homeostasis by responding to accumulation of damaged protein and mitochondrial damage. These adaptive responses are named 'mitochondrial UPR'. SSBP-1, a key regulator of mitochondria UPR, translocates to nucleus and promotes transcription of chaperons. In this study, we demonstrated that SSBP-1 and sirtuin 3 (a downstream regulator of mitochondria UPR) were decreased in IPF lung. Suppression of mitochondrial UPR by knockdown of SSBP-1 in fibroblasts promoted myofibroblast differentiation. Decreased mitochondrial UPR in IPF may be associated with IPF pathogenesis.

研究分野：びまん性肺疾患

キーワード：IPF ミトコンドリアUPR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) ミトコンドリア UPR

細胞内外の刺激により細胞内蛋白は傷害を受ける。傷害蛋白は蓄積すると細胞傷害を引き起こすため、細胞は傷害蛋白の修復(分子シャペロンの転写促進、蛋白合成抑制)あるいは、傷害蛋白、小器官の除去(オートファジー、マイトファジー、プロテアソーム促進)により恒常性を維持している。傷害蛋白に対する細胞の反応はUPR(Unfolded protein response)と呼ばれ、ERが重要な役割を果たしている。しかし、近年、ERだけでなく、ミトコンドリアも傷害蛋白の蓄積、ミトコンドリア傷害に対して、ミトコンドリアUPRと呼ばれる適応反応により傷害蛋白の修復、分解を促進し、細胞内恒常性維持に寄与していることが明らかとなった。ミトコンドリアUPRは特異的で、ERにおけるUPRとは誘導刺激も異なる。線虫では、転写因子ATFS-1がミトコンドリアUPRの制御に重要であり、ATFS-1は生理的条件下ではミトコンドリアで分解されているが、傷害蛋白の蓄積などミトコンドリアにストレスがかかる条件では核内へ移行し、種々の転写を誘導する。一方、哺乳類においては、線虫のATFS-1と同様の役割を果たすミトコンドリアUPR制御因子がこれまで同定されていなかった。しかし、近年、傷害蛋白蓄積、ミトコンドリア傷害時に、SSBP-1あるいはATF-5が、核内に移行、各種シャペロンの転写を促進し、ミトコンドリアUPRに重要であることが報告された。(Nat Commun. 2015, Curr Biol. 2016)

2) IPFにおける傷害蛋白蓄積、ミトコンドリア傷害、ミトコンドリアUPR

ミトコンドリアUPRの各種疾患における役割についてはこれまで明らかとなっていない。加齢とともに傷害蛋白は蓄積し、ミトコンドリアの機能は低下することから、ミトコンドリアUPRは老化関連疾患の病態と関連する可能性が高く、実際にパーキンソン病ではミトコンドリアUPRの異常が報告されている。

IPFは、加齢とともに頻度が増加し、また、上皮細胞の細胞老化が病態に重要な役割を果たしていることから、代表的な老化関連呼吸器疾患と考えられている。IPFでは、加齢に加え、喫煙、酸化ストレス、ウイルス感染などの様々な要因で蛋白やミトコンドリアが傷害される。一方で、IPFでは蛋白分解機構であるオートファジー、傷害ミトコンドリアの除去機構であるマイトファジーはいずれも低下している(Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011, J Clin Invest. 2015)。その結果、IPFでは傷害蛋白や機能低下した異常なミトコンドリアが蓄積し、傷害ミトコンドリアから産生されるROSなどを介して線維化が進展する。IPFでは、さらに、ミトコンドリアUPRが不十分であることが異常蛋白の蓄積、ミトコンドリア傷害を促進し、肺線維化を促進している可能性がある。ミトコンドリアUPRによりHSP70やSirtuin3の転写が促進されるが、HSP70、Sirtuin3の低下が肺線維化を促進するため、ミトコンドリアUPRの低下は肺線維化を促進する可能性が高い。

ミトコンドリアUPRの生体内での役割や分子機構はいまだ明らかとなっておらず、現在まさに研究が進行している状況である。そのため、疾患における役割についてはほとんど報告されていない。ミトコンドリアUPRの重要な制御因子であるSSBP-1、ATF-5はシグナル伝達の上流であり、より重要な分子と考えられるが、これまで、疾患における役割は検討されていない。呼吸器疾患におけるミトコンドリアUPR、SSBP-1、ATF-5の役割の検討は、我々がはじめて着目する、独自性、創造性の高い研究である。

2. 研究の目的

IPF病態におけるミトコンドリアUPRの役割を明らかとし、さらに、IPFの新規治療開発の知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

1) IPF肺組織におけるミトコンドリアUPRの評価

公開されているデータベースをもとに、正常肺組織とIPF肺組織におけるSSBP-1 RNA発現を比較した。続いて、実際の手術肺組織を用いて正常肺組織、IPF肺組織におけるSSBP-1蛋白発現を免疫組織染色にて比較した。さらに、ミトコンドリアUPRにより誘導されるSirtuin3についても同様の検討を行った。

2) 各種細胞におけるミトコンドリアUPRの役割

分離培養した気道上皮細胞、肺胞上皮細胞、線維芽細胞を用いて各種細胞におけるミトコンドリアUPRの役割を検討した。喫煙刺激やTGF-刺激により細胞死、細胞老化、筋線維芽細胞分化を誘導した。siRNAにてSSBP-1、Sirtuin3をノックダウンし、ミトコンドリアUPR抑制による細胞表現型への影響を検討した。

4. 研究成果

1) IPF肺組織におけるミトコンドリアUPR

公開されているマイクロアレイデータベースGSE47460を用いて、正常肺組織とIPF肺組織でのSSBP-1 RNA発現を比較した。Control 91例、IPF122例を比較するとIPF群で有意にSSBP-1 RNA発現が増加していた。(Figure 1)

Figure 1

SSBP-1

*

* p=0.01

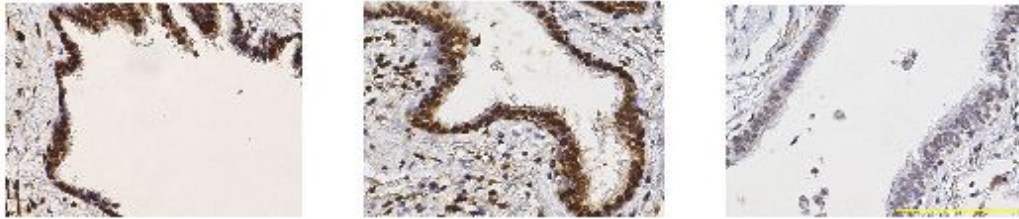
Control n=91
IPF n=122

GSE47460

RNA 発現と、蛋白発現は必ずしも一致しないため、手術肺組織における SSBP-1 の蛋白発現を検討した。IPF 肺組織ではコントロールと比べ SSBP-1 の発現が低下しており、ミトコンドリア UPR が低下、あるいは不十分である可能性が示唆された。興味深いことに、IPF と同じ老化関連呼吸器疾患である COPD では SSBP-1 は低下しておらず、SSBP-1 低下は IPF に特異的であった。(Figure 2)

Figure 2

IPF における SSBP-1 発現



コントロール

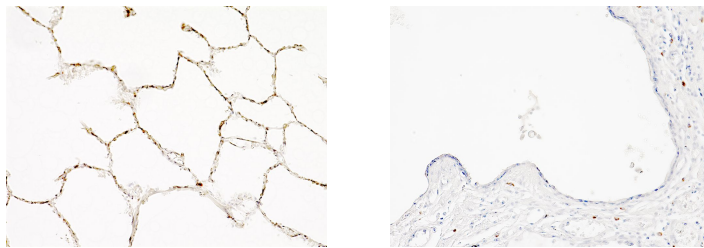
COPD

IPF

次に、我々は、正常肺組織と IPF 肺組織において、ミトコンドリア UPR により誘導される Sirtuin 3 発現を検討した。マイクロアレイデータベース GSE47460 を用いた解析では、IPF 肺組織では正常肺組織と比べ Sirtuin 3 RNA 発現が低下していた。免疫組織染色、蛍光組織染色では、Sirtuin 3 蛋白発現は IPF 肺組織で低下していた(免疫組織染色 Figure 3、蛍光組織染色 Figure 4)

以上の結果から、IPF 肺組織ではミトコンドリア UPR は低下していると考えられた。

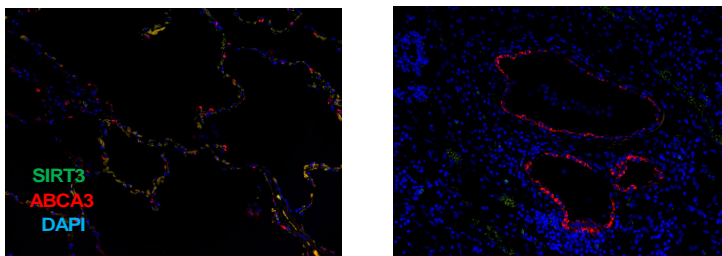
Figure 3



コントロール

IPF

Figure 4



コントロール

IPF

2) 各種細胞におけるミトコンドリア UPR の役割

上皮細胞と線維芽細胞は相互に影響を及ぼし、病態に関連する。これまで、我々は、IPF において老化上皮細胞が IL-1 を産生し、周囲の線維芽細胞の筋線維芽細胞を誘導することが線維化進展に寄与することを報告した。本検討では、手術肺組織より分離培養した気道上皮細胞を用いてミトコンドリア UPR の上皮細胞老化に対する影響を検討した。Sirtuin 3 ノックダウンによりミトコンドリア UPR を抑制すると上皮細胞老化が促進した。(Figure 5)

筋線維芽細胞は強い収縮能に加え、種々のサイトカインを産生し、IPF の病態に重要な役割を果たしている。線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化誘導には TGF- β が重要であり、実際に IPF 肺では TGF- β が増加している。そこで、我々は、手術肺組織より分離培養した線維芽細胞を用いて TGF- β 誘導筋線維芽細胞分化におけるミトコンドリア UPR の役割を検討した。siRNA にて SSBP-1 をノックダウンし、ミトコンドリア UPR を抑制した。SSBP-1 ノックダウンにより TGF- β による筋線維芽細胞分化 (SMA、type1 collagen) が増強された。(Figure 6)

以上より、ミトコンドリア UPR 低下は上皮細胞老化、筋線維芽細胞分化を誘導し、肺線維化を促進する可能性が示唆された。

Figure 5

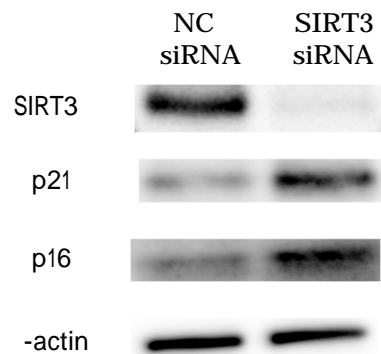
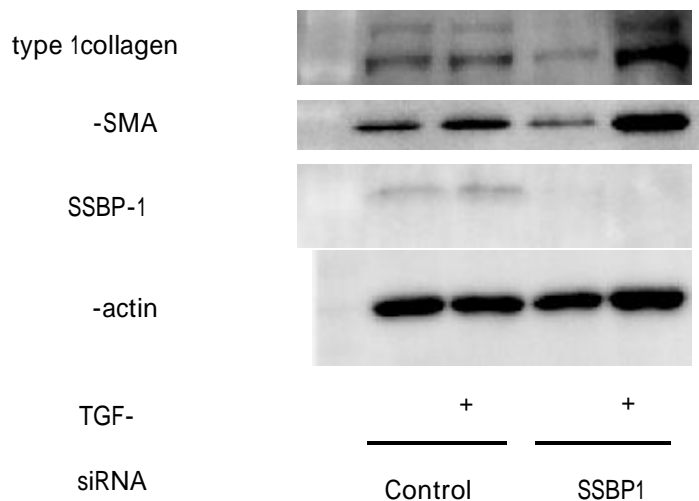


Figure 6



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	荒屋 潤 (araya jun) (90468679)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

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