

令和 4 年 6 月 27 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：19K08666

研究課題名(和文) TOLLIPによる蛋白凝集体の分解除去(アグリファジー)とIPF

研究課題名(英文) Aggresome-selective autophagy (aggrephagy) by TOLLIP in IPF.

研究代表者

金子 由美 (Kaneko, Yumi)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：50646669

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)：TOLLIPはTLRシグナル制御に関わるだけでなく、蛋白凝集体(アグリゾーム)選択的オートファジー(アグリファジー)においても重要な役割を果たしている。不十分なオートファジーはIPF病態に関与することから、TOLLIP発現低下が喫煙などのストレス時の蛋白凝集体蓄積を介して細胞運命を規定し、IPF病態に関与する可能性を考えた。免疫組織染色の結果、IPF肺の気道上皮ではTOLLIP発現が低下していた。分離気道上皮細胞を用いた検討では、TOLLIPのノックダウンは喫煙による細胞死、蛋白凝集体蓄積を促進した。TOLLIP低下によるアグリゾーム蓄積、細胞死亢進がIPF病態に関連する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TOLLIPの役割を、自然免疫応答や蛋白凝集体制御による細胞運命の規定の点から明らかにすることで、IPF病態の理解と解明が進み、治療法開発はのみならず、予防についての新たな観点の発見につなげられる事も期待される。

研究成果の概要(英文)：TOLLIP plays important roles in not only TLR signaling pathway, but also aggresome-selective autophagy (aggrephagy). Insufficient autophagy is involved in the pathogenesis of IPF, hence, we hypothesized that decreased TOLLIP expression might contribute to IPF pathogenesis by determining cell fate through stress-induced aggresome accumulation. TOLLIP expression in bronchial epithelia was decreased in IPF by immunohistochemistry. Knockdown of TOLLIP in isolated epithelial cells promoted cigarette smoke-induced cell death and aggresome accumulation. Decreased TOLLIP expression and subsequent aggresome accumulation and accelerated cell death might be associated with IPF pathogenesis.

研究分野：間質性肺疾患

キーワード：TOLLIP 特発性肺線維症(IPF) 遺伝子多型 環境因子 アグリゾーム アグリファジー

1. 研究開始当初の背景

(1) IPF の疫学及び臨床的重要性

特発性肺線維症(IPF)は肺実質の線維化が進行し、結果として呼吸不全を来す原因不明の呼吸器疾患である。有病率は10万人あたり10-20人程度とされているが、早期病変の患者数はその10倍以上とされ、かつ3年生存率が約50%と予後不良な社会的に重要な疾患である。反復するストレス刺激により肺胞上皮細胞に細胞死や細胞老化が誘導され、それに引き続く筋線維芽細胞の異常増生により、コラーゲンなど細胞外物質が過剰に沈着することで肺胞構造の改変が進展すると考えられている。しかしながら、IPFの進行を抑制し、十分な予後改善が得られる治療法は存在せず、病態解明と新たな治療法の確立は急務である。

(2) IPF 病態と遺伝子多型

IPFは、環境因子と遺伝的要因とが複雑に絡み合って発症すると考えられている。環境因子としては喫煙や粉塵暴露などが重要である。遺伝的要因として遺伝子多型が関与し、genome-wide association study (GWAS)による検討から、11番遺伝子短腕にIPF発症の危険因子となる領域が存在すること、そして同部位にmucin 5B (MUC5B)とtoll-interacting protein (TOLLIP)がコードされ、MUC5Bプロモーター領域における遺伝子多型(rs35705950)が、MUC5B発現を増加させることが報告された。MUC5B遺伝子多型(rs35705950)の存在は、IPF発症の危険性を6から8倍に増加させるが、一方で予後は改善することが示された。MUC5B遺伝子多型(rs35705950)の存在しないIPF患者において、テロメア長を規定するテロメア関連遺伝子のrare variantを認め、テロメア長の短縮及び予後悪化との関連性が示されている。TOLLIP遺伝子多型(rs111521887, rs5743894)はMUC5Bと独立したIPF発症危険因子となることが報告されており、IPF肺での蛋白発現の低下が示されている。またIPFの死亡率と関連する遺伝子多型(rs5743890)の存在も報告されている。さらに興味深いことにTOLLIP遺伝子多型(rs3750920: TT genotype)では抗酸化剤であるN-acetylcystein(NAC)が有効であり、一方TOLLIP遺伝子多型(rs3750920: CC genotype)ではむしろ危険である可能性が報告されている。このように様々な遺伝子多型の存在が、発症危険因子や、予後予測因子となるだけでなく、治療反応性を規定する要因となる可能性が報告されている。その中でもTOLLIPは、IPF病態における最も重要な因子の一つと考えられている。

(3) TOLLIP と IPF 病態

TOLLIPは、Toll-like 受容体(TLR)による自然免疫応答の制御因子であり、TLR2やTLR4シグナル制御に作用する。気道上皮細胞におけるTOLLIP遺伝子多型(rs5743899)による発現低下が、ライノウイルス感染によるNF- κ B活性化とサイトカイン産生亢進に関与すると報告されている。さらに肺線維化病態で重要な成長因子であるtransforming growth factor (TGF)- β の受容体分解を促進し、SMAD7蛋白発現も制御し、TGF- β シグナルを抑制することが示されている。IPF肺では細胞内蛋白分解系のオートファジー機能が不十分であり、細胞死や細胞老化の亢進により病態進展に関与する可能性が考えられており、これは細胞内の異常なタンパクや小器官の分解除去が不十分であることに起因すると推測されている。興味深いことにTOLLIPが選択的オートファジー分解の際のアダプター蛋白となり、LC3に結合して蛋白凝集体の分解除去(アグリファジー)に作用することが報告されている。つまり、TOLLIP発現低下は自然免疫応答の異常や、過剰な線維化シグナル、さらには蛋白凝集体の蓄積による細胞傷害によりIPF病態進展に関与する可能性を示唆する。しかしながらIPFにおけるTOLLIP発現低下の、免疫応答、細胞運命、線維化制御などにおける病態規定因子としての役割は十分に検討がなされていない。

2. 研究の目的

TOLLIPの役割を、自然免疫応答や蛋白凝集体制御による細胞運命の規定の点から明らかにし、IPF病態の理解と新たな治療法開発の手がかり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 TOLLIP 発現の評価

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TOLLIP RNA発現を比較した。さらに、手術肺検体を用いて、正常肺組織、IPF肺組織におけるTOLLIP

蛋白発現を免疫組織染色にて比較した。

(2)上皮細胞における TOLLIP の役割

喫煙などの刺激による上皮細胞損傷と引き続き異常な修復が IPF の病態に重要である。そこで、本検討では、喫煙による上皮細胞死における TOLLIP の役割を検討した。siRNA にて TOLLIP をノックダウンし、喫煙誘導上皮細胞死に及ぼす影響を検討した。

(3)アグリゾーム蓄積における TOLLIP の役割

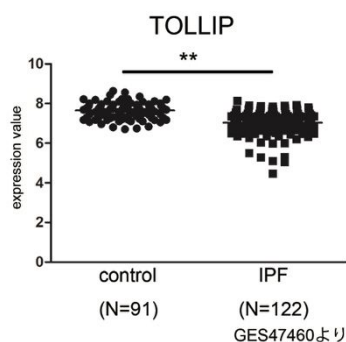
IPF では異常な蛋白、傷害蛋白が蓄積し、その結果、ER ストレスが亢進し、細胞死が誘導される。蛋白凝集体 (アグリゾーム) は TOLLIP を介して分解、処理されることが知られている。そこで、本検討では上皮細胞における喫煙刺激によるアグリゾーム蓄積を検討し、さらに、siRNA にて TOLLIP をノックダウンし、TOLLIP のアグリゾーム蓄積における役割を検討した。

4 . 研究成果

(1)IPF 肺組織における TOLLIP 発現

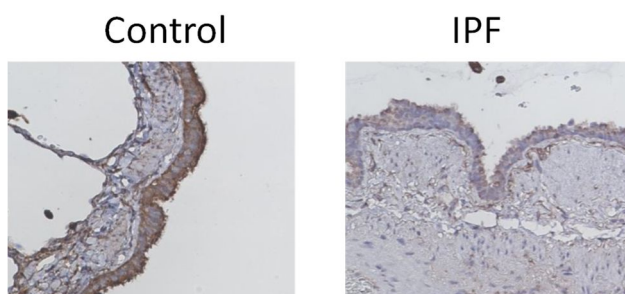
公開されているマイクロアレイデータベース GES47460 を用いて、正常肺組織と IPF 肺組織での TOLLIP RNA 発現を比較した。正常群と比べ IPF 群で有意に TOLLIP RNA 発現が低下していた。(Figure 1)

Figure 1



次に、手術肺組織における TOLLIP 蛋白発現を免疫組織染色にて検討した。IPF 肺組織の上皮細胞ではコントロールと比べ TOLLIP の発現が低下していた。(Figure 2)

Figure 2



気道上皮細胞における TOLLIP の役割

気道上皮細胞に喫煙刺激 (cigarette smoke extract:CSE) により細胞死を誘導した。さらに、siRNA を用いて TOLLIP 発現を抑制し、喫煙誘導細胞死における TOLLIP の影響を検討した。細胞死は PI, annexin V を用いて FACS による評価 (Figure3) 及び、TUNEL 染色 (Figure4) による評価を行った。喫煙刺激による細胞死は TOLLIP のノックダウンにて増加した。

Figure3

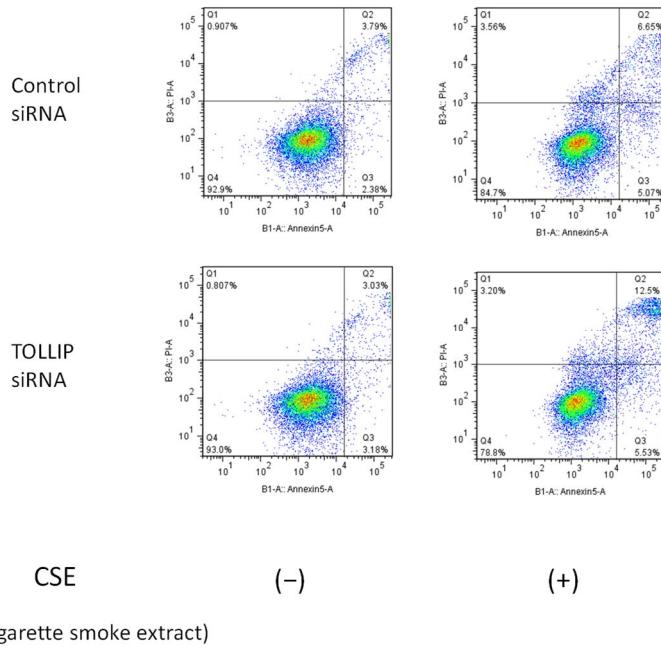
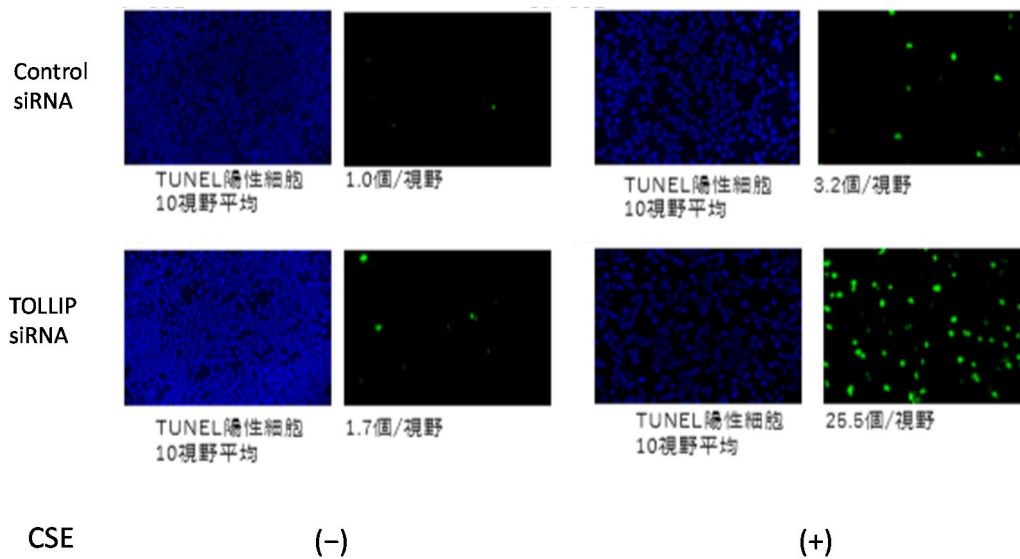
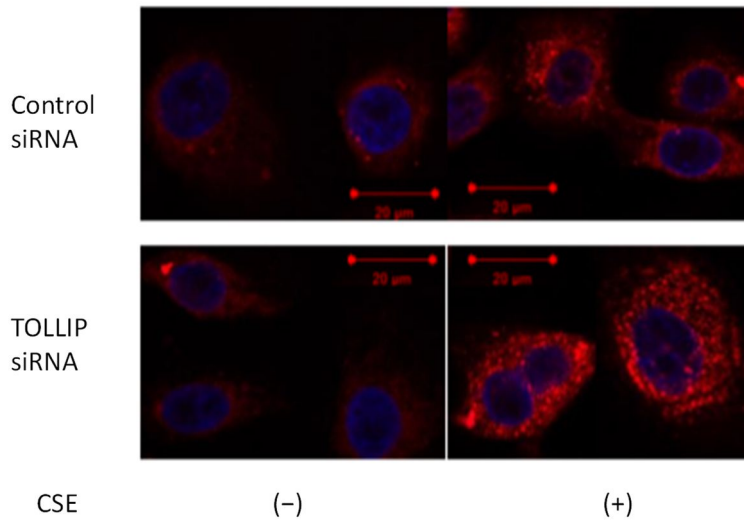


Figure4



アグリゾーム蓄積における TOLLIP の役割
 気道上皮細胞における喫煙刺激によるアグリゾーム蓄積を検討し、さらに、siRNA にて TOLLIP をノックダウンし、TOLLIP のアグリゾーム蓄積における役割を検討した。喫煙刺激により蛋白凝集体(アグリゾーム)が蓄積し、TOLLIP のノックダウンによりアグリゾームの蓄積はさらに増加した。

。



(結論)

IPF 肺の気道上皮細胞では TOLLIP 発現が低下していた。気道上皮細胞において TOLLIP 低下は喫煙による細胞死を促進し、アグリゾームの蓄積を促進した。TOLLIP はアグリゾームの分解を介して IPF の病態に関与している可能性があり、今後さらなる検討を進めたい。

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