

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790789

研究課題名（和文）慢性閉塞性肺疾患における TGF- β によるオートファジー制御と老化

研究課題名（英文）The role of autophagic regulation of cellular senescence in COPD pathogenesis

研究代表者

荒屋 潤 (ARAYA JUN)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：90468679

研究成果の概要（和文）：オートファジーが、タバコ煙抽出液による気道上皮細胞老化誘導に対して抑制的に働いていることが示された。さらに p62 を介したユビキチン化蛋白の選択的な分解がその機序として重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that autophagy is involved in the suppression of cigarette smoke extract(CSE)-induced cellular senescence in human bronchial epithelial cells. Furthermore, p62-mediated selective autophagic degradation of ubiquitinated proteins is implicated in the regulation of cellular senescence in association with COPD pathogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患、オートファジー、TGF- β

1. 研究開始当初の背景

老化に伴う細胞機能変化は、アポトーシス抵抗性や、過剰なサイトカイン産生 senescence-associated secretory phenotype (SASP)により COPD の病態に関与している。オートファジーは細胞小器官など細胞質成分を膜構造で包み込み、ライソゾームまで移送分解する細胞内蛋白分解機構である。傷害された蛋白質や細胞小器官の蓄積は細胞老化の指標であり、その処理過程にオートファジーは重要である。これまで細胞老化に伴いオートファジー機能が低下するとの報告がなされている。COPD の原因である喫煙刺激は細胞老化を誘導する。Transforming

growth factor (TGF)- β は、気道リモデリング線維化における中心的なサイトカインであり、かつ上皮細胞に対しては老化促進作用を持つ。しかしながらこれまで COPD の病態におけるオートファジーの役割は、細胞老化制御の点からは十分な検討がなされていない。

2. 研究の目的

喫煙刺激が誘導する上皮細胞老化に及ぼすオートファジーの役割を細胞内傷害蛋白蓄積の点から検討し、TGF- β の影響も併せ明らかにする。細胞老化の機序の一端を明らかにし、COPD を含む老化関連呼吸器疾患の病態理解と、新たな治療法の開発の手がかりと

することを目的とする。

3. 研究の方法

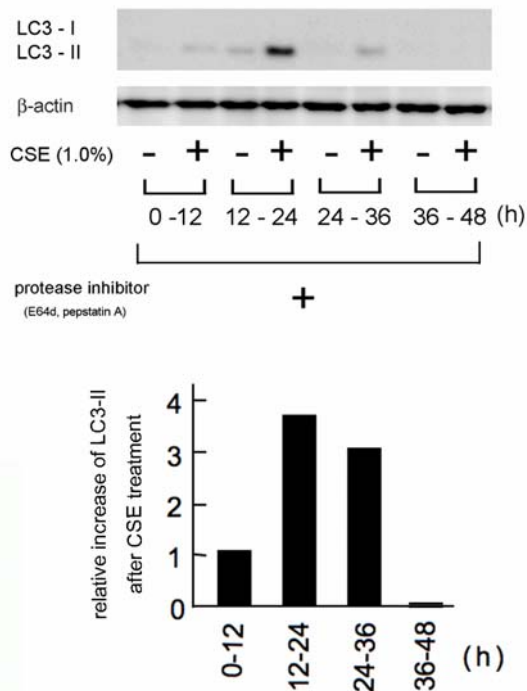
倫理委員会による承認の下、肺組織と分離培養ヒト気道上皮細胞を用い検討を行った。cigarette smoke extract(CSE)による細胞老化誘導におけるオートファジーの役割を明らかにするため、オートファジーは Torin1 により亢進させ、3MA、Bafilomycin A 及び LC3 ノックダウンにより抑制した。オートファジー活性化は、GFP-LC3 安定発現細胞における dot の形成の蛍光顕微鏡による検出、western blotting 法による LC3 蛋白質及び p62 の発現で検討した。

senescence-associated βgal 染色と p21 の発現で細胞老化を評価した。傷害蛋白質蓄積の指標としてユビキチン化蛋白質を用いた。

4. 研究成果

(1) CSE はオートファジーを一過性に機能亢進させる。

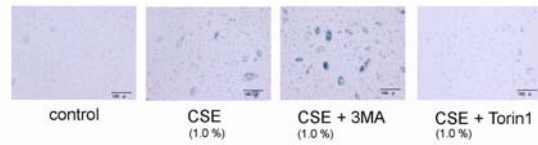
LC3 蛋白質による検討から CSE によるオートファジー機能亢進は一過性であり、12 時間から 24 時間後にピークを認め、その後は低下する事が明らかとなった。LC3-GFP の dot 形成からも、CSE によるオートファジーの誘導が明らかとなった。



(2) CSE による細胞老化をオートファジーが制御する。

CSE は刺激 48 時間後に、気道上皮細胞に老化を誘導した。3MA 投与もしくは LC3 に対す

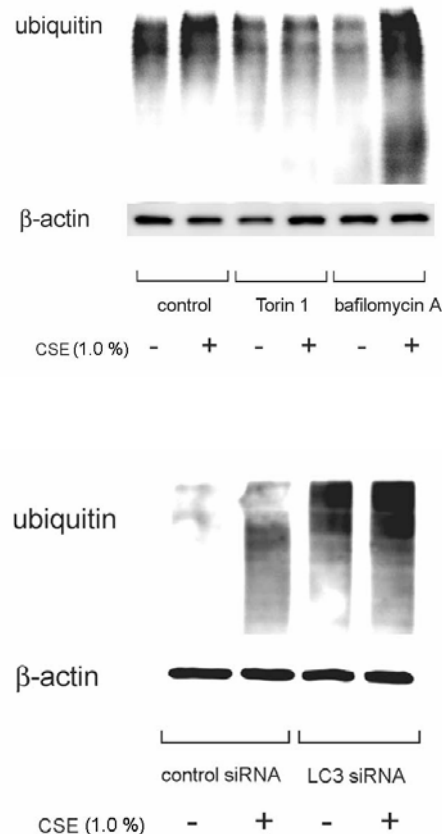
る siRNA でオートファジー機能を抑制すると、CSE による細胞老化はさらに亢進した。一方、Torin1 によりオートファジーを誘導すると CSE による細胞老化亢進が抑制されることが明らかとなった。



(senescence-associated βgal 染色)

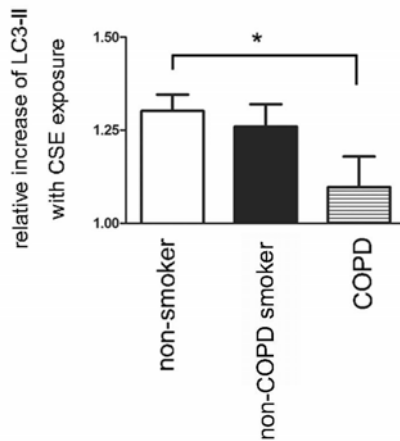
(3) オートファジーは細胞内ユビキチン化蛋白質の蓄積を制御する。

ユビキチン化蛋白質が分解されず蓄積することは細胞老化制御の上で重要である。近年、ユビキチン化蛋白質が、p62 を介して選択的にオートファジーで分解されることが明らかとなった。そこでオートファジー機能とユビキチン化蛋白質の蓄積に関して検討を行った。CSE はユビキチン化蛋白質と p62 を蓄積させ、時間的経過からその蓄積はオートファジー機能の低下に一致していた。オートファジー機能を bafilomycin A もしくは LC3 に対する siRNA で抑制するとユビキチン化蛋白質及び p62 はさらに蓄積した。一方 Torin1 によりオートファジー機能を亢進させると CSE によるユビキチン化蛋白質の蓄積が抑制された。



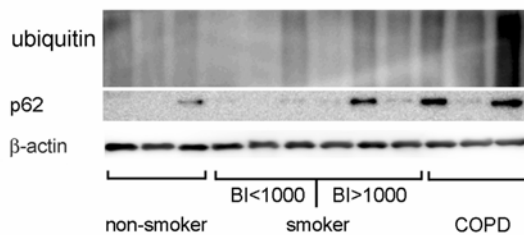
(4) COPD 患者由来気道上皮細胞におけるオートファジー誘導の低下

COPD と non-COPD 患者由来の気道上皮細胞でのオートファジーを比較検討した。COPD 患者由来の気道上皮細胞では baseline のオートファジーは亢進していたが、CSE による誘導は明らかに低下していた。



(5) COPD 肺組織における p62 及びユビキチン化蛋白の発現。

臨床的な重要性を明らかにするため、COPD と non-COPD 患者由来の肺組織のホモジネートを検討した。COPD 患者肺組織からの検体では、p62 及びユビキチン化蛋白の発現が増加していた。



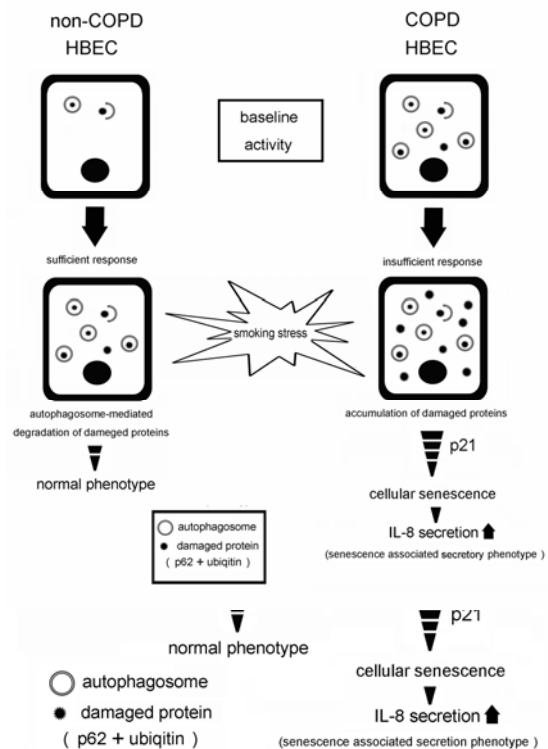
(6) TGF-βの影響について

TGF-βは気道上皮細胞に対して細胞老化を誘導し、同時にオートファジーも亢進させた。しかしながら両者の関連性に関しては明らかに出来なかった。

(結論)

喫煙刺激後の、オートファジーによる処理機能の絶対的もしくは相対的な低下により、細胞内に傷害を受けたユビキチン化蛋白質

が蓄積し、これが細胞老化誘導の引き金となる可能性が示された。



[雑誌論文] (計 2 件)

- ①Minagawa S, Araya J, Numata T, Nojiri S, Hara H, Yumino Y, Kawaishi M, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Nakayama K, Kuwano K. Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF-β-induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011 Mar;300(3):L391-401. 査読あり
- ②原弘道, 藤井さと子, 荒屋 潤, ほか 分子呼吸器病学、査読なし Vol.15, No.1, 2011, pp.94-96、

[学会発表] (計 3 件)

- ①日本呼吸器学会学会総会 2011 年 4 月 22 日
- ②American Thoracic Society International Conference. *New Orleans*. 2010 5 月 18 日.
- ③日本呼吸器学会学会総会 2010 年 4 月 23 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒屋 潤 (ARAYA JUN)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：90468679

(2) 連携研究者

森川 利昭 (MORIKAWA TOSHIAKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：60292025