

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08213

研究課題名(和文)TFEB活性化を介したオートファジーを標的とするIPFとCOPDの治療法開発

研究課題名(英文)The development of therapeutic strategy against IPF and COPD through TFEB activation

研究代表者

桑野 和善 (Kuwano, Kazuyoshi)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：40205266

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)：COPD、IPFはともに加齢関連呼吸器疾患であり、不十分なオートファジー分解及び細胞老化の亢進が病態に關与する。オートファジー・リソソーム系制御の中心的な調節転写因子であるTFEBの誘導作用を持つ可能性のあるSPPARMであるpemafibrateを用いた検討を行った。pemafibrateは、COPDモデルマウス、IPFモデルマウスの両方で、病態抑制効果を示した。培養細胞、モデルマウスにおいて、TFEB発現増加によるオートファジー・ミトファジーの活性化を介した抗老化作用を示した。PPAR modulatorが、COPDやIPFに対する新規の抗細胞老化治療となりうる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

pemafibrateは、COPDモデルマウス、IPFモデルマウスの両方で、病態進展抑制効果を示した。本研究結果からはPPAR modulatorが高脂血症治療薬としてだけではなく、COPDやIPFに対する新規の抗細胞老化治療となりうる可能性が示されたと考えている。不可逆的な病態であるIPFやCOPDに対して、抗老化作用を介した、病態を改善させる画期的な治療となる可能性がある。今後は呼吸器疾患治療薬として、吸入療法など局所療法の開発が重要な課題となる。

研究成果の概要(英文)：Inadequate autophagy promotes smoking-induced cellular senescence involved in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) pathogenesis. Transcription factor EB (TFEB) is a master regulator of the autophagy-lysosome axis. We investigated the therapeutic potential of pemafibrate, a putative TFEB inducer. Pemafibrate enhanced autophagy/mitophagy flux and restored lysosomal acidification observed during cigarette smoke (CS) extract exposure in human bronchial epithelial cells, resulting in reduced cellular senescence. Pemafibrate induced TFEB expression, mitigated alveolar enlargement/airflow obstruction, and increased static lung compliance in a long-term CS-exposed mouse model. It reduced the CS exposure-induced cellular senescence, possibly through mitophagy. In conclusion, pemafibrate is a promising therapeutic agent against COPD and IPF that acts via TFEB-autophagy/mitophagy axis regulation.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 特発性肺線維症 細胞老化 オートファジー TFEB PPAR

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) と慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、加齢が発症危険因子であり、ともに予後を改善させる有効な治療法の存在しない治療抵抗性呼吸器疾患である。オートファジーはリソソーム依存性の細胞内蛋白・小器官分解系であり、細胞機能恒常性維持で重要な役割を果たす。我々は IPF 及び COPD 病態ではオートファジー活性が不十分であること、特にミトコンドリア選択的マイトファジー機能が不十分であることと、細胞死、細胞老化、筋線維芽細胞分化誘導、また病態進展との関連性を報告してきた。オートファジー機能はオートファゴソーム形成による分解対象の隔離と、その後のリソソームとの融合によるオートライソソーム形成とで調整される。このオートファジー・リソソーム系制御の中心的な調節転写因子が Transcription factor EB (TFEB) である。

TFEB はリソソームの生合成、リソソーム内の酵素産生や、酸性化、オートファジータンパク発現、オートファジー・リソソーム融合をも制御する重要な転写因子であると考えられている。代表的な肺線維症モデルである、プレオマイシンモデルでも、TFEB 活性低下が肺線維化進展に関与することが示されている。COPD 病態では TFEB が核周囲で凝集体を形成し、核内移行が抑制され、TFEB 転写活性が低下することで、COPD 病態におけるオートファジー機能低下と関連する可能性が示されている。つまり TFEB の発現及び活性化障害によるオートファジー・リソソーム系の機能異常が、IPF・COPD 病態の重要な規定因子であることが示唆される。我々の single cell transcriptome 解析でも、COPD での TFEB 発現低下が示されている。

これまでの検討から TFEB 発現誘導・活性化が、オートファジー・リソソーム系の亢進により、これら呼吸器病態を改善する可能性が報告されている。肺線維症モデルにおいて、変異型 1 アンチトリプシンを発現するトランスジェニックマウスにおいて、異常タンパク蓄積による肺線維化進行が、TFEB 過剰発現により改善することが示されている。また COPD モデルでも、Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) 活性化薬である Gemfibrozil に TFEB 発現誘導作用があり、gemfibrozil 投与によりオートファジー活性は亢進し、喫煙暴露による細胞老化や COPD モデルの改善が認められることが報告されている。PPAR α は TFEB 発現誘導の中心的な転写因子であり、TFEB 発現誘導治療を確立する上で重要な分子となる。このように TFEB 発現誘導・活性化は、COPD・IPF の治療法開発で有望な標的となると考えられる。

2. 研究の目的

PPAR 活性化薬が TFEB 発現誘導・活性化により、オートファジー活性を亢進させ、細胞老化を抑制することで、IPF・COPD 病態を抑制する有効な治療となりうるかどうかを明らかにするのが、本研究の目的である。PPAR 活性化薬として、近年選択的 PPAR modulator (Selective Peroxisome Proliferator-activated receptor- modulator : SPPARM) として作用し、高脂血症治療薬として臨床現場で使用されている pemafibrate に着目して検討を行った。また今回の検討において機序解明に関しては、主に COPD 病態に関して詳細な検討を行った。

3. 研究の方法

喫煙暴露 COPD モデル及びマウスプレオマイシン肺線維症モデルに対する Pemafibrate の有効性の検討 (動物モデル) :

COPD マウスモデル: 6~10 週齢の (C57BL/6) 野生型マウスを使用し、小動物用暴露吸入システムを用いた。喫煙群はチャンパー内でタバコ 1 日 5 本を週 5 日間計 26 週喫煙暴露した後、肺の摘出を行った。Pemafibrate は day0 より連日混餌投与した。肺気腫は mean linear intercept (MLI) 測定で、また呼吸生理学的な指標も flexivent により計測した。免疫染色とホモジネート蛋白検討により細胞老化 TFEB 発現を評価した。

肺線維症モデル: 6~10 週齢マウス (C57BL/6) 野生型を用いて、day0 にプレオマイシン 2.5U を経気道的に注入した。day7 に Pemafibrate の混餌投与を開始した。day21 に気管支肺胞洗浄液 (BALF) の採取と肺の摘出を行った。Hematoxylin-Eosin、EVG 染色を行い、ヒドロキシプロリン定量により肺線維化を評価した。

TFEB 発現制御と Pemafibrate による、喫煙刺激誘導性細胞老化制御の検討 (培養系) : 手術検体の気管支から気道上皮細胞を分離培養し検討に用いた。COPD モデルとしてタバコ煙抽出液 (CSE) を細胞刺激に使用した。細胞老化は老化関連 β ガラクトシダーゼ染色、Histone H2AX 染色、p16 と p21 発現で検討した。TFEB siRNA によるノックダウンにより、TFEB 発現制御し、CSE 刺激による細胞老化誘導での TFEB の役割とオートファジー活性との関連性を検討した。オートファジー活性は LC3 のコンバージョンと EGFP-LC3 のドット形成、p62 及びユビキチン化蛋白発現で評価した。マイトファジーはミトコンドリアを示す TOMM20 染色と EGFP-LC3 ドットの共局在により評価した。

COPD 肺組織における TFEB 発現の検討 :

マイクロアレーのデータベース解析を行い COPD での TFEB 発現を検討した。

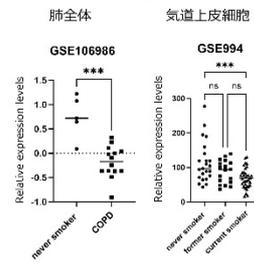
COPD 肺組織のホルマリン固定標本を用いて、免疫染色により TEEB 発現を検討した。

4. 研究成果

喫煙暴露 COPD モデル及びマウスプレオマイシン肺線維症モデルに対する pemaflibrate の有効性の検討(動物モデル) :

COPD モデルとして、6 か月間の喫煙暴露により、有意な MLI の拡大と、閉塞性呼吸機能障害と静肺コンプライアンスの増加を認め、肺気腫様病変の進展を確認できた。pemaflibrate の混餌投与により、いずれの指標も明らかな改善を認めた(図 1)。また喫煙暴露により誘導された細胞老化の亢進も、pemaflibrate 投与により抑制された(図 2)。摘出肺から RNA を抽出し、RNA sequence を行い、pemaflibrate 投与群でオートファジー関連遺伝子発現の亢進を認めた。また KEGG enrichment 解析では、マイトファジーが上位に位置していた。免疫組織学的な検討では、特に気道上皮細胞において TFEB 発現の増加が観察された。pemaflibrate による TFEB 発現を介したオートファジー・マイトファジーの亢進が、抗細胞老化作用により、肺気腫様病態進展を抑制している可能性が示唆された。IPF モデルで、プレオマイシン投与により、形態学的及びヒドロキシプロリン測定により肺線維化が誘導され、day7 からの pemaflibrate の混餌投与により有意な抑制が認められた(図 3)。その機序に関しては現在さらに検討中である。

図6 マイクロアレイデータのGEO2R解析 (TFEB発現)



TFEB 発現制御と pemaflibrate による、喫煙刺激誘導性細胞老化制御の検討(培養系) :

CSE 刺激は気道上皮細胞において TFEB 発現及び、その核内への移行を誘導することが認められた(図 4)。TFEB をノックダウンすることで、CSE によるオートファジー活性化が抑制され、細胞老化誘導が亢進することが明らかになった。つまり喫煙刺激による TFEB 活性化がオートファジー誘導により細胞老化に対して抑制的に作用していると考えられた。次に pemaflibrate の作用機序の検討を行った。pemaflibrate は濃度依存性に TFEB 発現を誘導し、オートファジーを活性化した。CSE 刺激により誘導されるオートファジー・マイトファジー活性化を pemaflibrate は、さらに増強させ、同時に細胞老化の進展を抑制した。これら pemaflibrate の作用への TFEB の関与を明らかにするため、TFEB ノックダウンによる検討を行った。TFEB ノックダウンにより、pemaflibrate のマイトファジー誘導および細胞老化抑制は、認められなくなった(図 5)

COPD 肺組織における TFEB 発現の検討

過去のマイクロアレイのデータベース解析を行い、結果 COPD 肺での TFEB 発現低下を認め、分離した気道上皮細胞を用いた検討でも、current smoker での発現低下が認められた(図 6)。さらに COPD 肺における TFEB 発現状況を、患者肺組織を用いて免疫組織学的に評価を行った結果、COPD 肺に気道上皮細胞において有意な TFEB 発現低下が認められた。

考察と結論

COPD、IPF はともに加齢関連呼吸器疾患であり、不十分なオートファジー分解及び細胞老化の亢進が病態に関与すると考えられている。今回我々は、オートファジー・リソソーム系制御の中心的な調節転写因子である TFEB の役割に注目し、その誘導作用を持つ可能性のある SPPARM である pemaflibrate を用いた検討を行った。

pemaflibrate は、COPD モデルマウス、IPF モデルマウスの両方で、病態進展抑制効果を示した。特に COPD モデルマウスにおいては、細胞老化の抑制作用を認め、TFEB 発現増加によるオートファジー・マイトファジーの亢進が関与する可能性が示唆された。

培養細胞を用いた詳細な検討から、喫煙刺激で活性化される TFEB は、オートファジー・マイトファジー活性化に重要であることが示された。pemaflibrate は、TFEB 発現増強によるオートファジー・マイトファジー活性化を介して抗老化作用を示すことが明らかとなった。つまり本研究結果からは PPAR modulator が高脂血症治療薬としてだけではなく、COPD に対する新規の抗細胞老化治療となりうる可能性が示されたと考えている。今後は呼吸器疾患治療薬として、吸入療法など、肺局所療法の開発が重要な課題となる。

図1 PemaflibrateによるCOPD様表現型の抑制

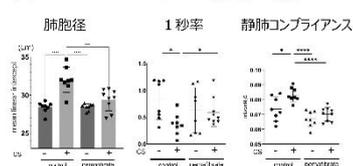


図2 Pemaflibrateによる喫煙誘導性細胞老化の抑制

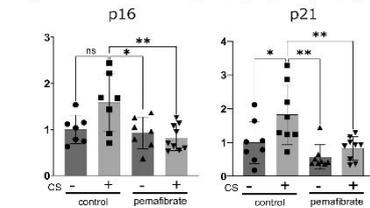


図3 Pemaflibrateによるプレオマイシン誘導性肺線維化の抑制

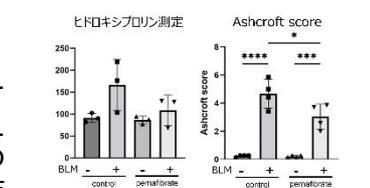


図4 喫煙刺激でのTFEB核内移行

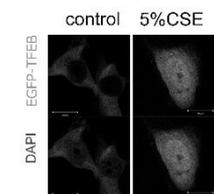
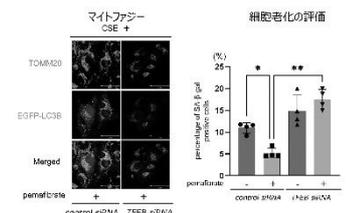


図5 TFEBノックダウンによるマイトファジー誘導及び抗細胞老化作用の抑制



しかしながら、PPAR 活性化薬にも FGF21 を介する作用など様々な機序も存在し、TFEB 以外の作用機序解明も今後の検討課題である。さらに IPF モデルでも抗線維化作用を認めたが、その作用機序に関しては明らかでなく、今後詳細な検討が必要であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujita Yu, Fujimoto Shota, Miyamoto Atsushi, Kaneko Reika, Kadota Tsukasa, Watanabe Naoaki, Kizawa Ryusuke, Kawamoto Hironori, Watanabe Junko, Utsumi Hirofumi, Wakui Hiroshi, Minagawa Shunsuke, Araya Jun, Ohtsuka Takashi, Ochiya Takahiro, Kuwano Kazuyoshi	4. 巻 online ahead of print
2. 論文標題 Fibroblast-Derived Extracellular Vesicles Induce Lung Cancer Progression in the IPF Microenvironment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1165/rcmb.2022-02530C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松林沙知, 保坂悠介, 伊藤三郎, 荒屋潤, 佐々木諒子, 藤本祥太, 川本浩徳, 伊藤晶彦, 渡邊直昭, 門田宰, 藤田雄, 橋本典生, 竹越大輔, 皆川俊介, 原弘道, 沼田尊功, 桑野和善
2. 発表標題 TFEBによるオートファジー・リソソーム制御の喫煙誘導性細胞老化およびCOPD病態への関与
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 呼吸器疾患治療剤	発明者 荒屋潤、桑野和善、伊藤三郎、松林沙知	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-059884	出願年 2022年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 呼吸器疾患治療剤	発明者 荒屋潤、桑野和善、伊藤三郎、松林沙知	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-059884	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------