

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08214

研究課題名（和文）特発性肺線維症における鉄代謝によるミトコンドリアDNA放出機構と線維化の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism of Mitochondrial DNA Release Mediated by Iron Metabolism in Idiopathic Pulmonary Fibrosis

研究代表者

水村 賢司（MIZUMURA, Kenji）

日本大学・医学部・兼任講師

研究者番号：20761688

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）：本研究では、肺の線維化を制御するセカンドメッセンジャーとしてmtDNAに着目し、鉄代謝によるmtDNAの細胞外放出メカニズムと線維化について解明することを目的とした。本研究で、鉄代謝経路が、タバコ煙によるmtDNAの肺胞上皮細胞外への放出を制御していることが示された。細胞外に放出されたmtDNAは肺胞上皮細胞に作用し、肺線維症の病態に重要なIL-6やIL-8の産生を増強する。生体内においては、鉄代謝経路が肺の線維化を制御していることが示唆された。これらの結果により、タバコ煙によるmtDNA放出を介した肺の線維化を、鉄代謝経路が制御するメカニズムが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症は肺の線維化を特徴とし、予後不良であるが、治療法は限られている。本研究は、肺線維化の新たなメカニズムとして鉄代謝とmtDNAに着目し、診断と治療応用への研究基盤を確立することを目的とした。本研究により、タバコ煙によるmtDNA放出を介した肺の線維化を、鉄代謝経路が制御するメカニズムが明らかとなった。肺線維症の病態形成において、mtDNAの細胞外放出が肺の線維化に関わり、鉄代謝がその病態生理に中心的な役割を果たしていると考えられ、鉄代謝経路の制御は、新たな特発性肺線維症の治療薬やバイオマーカーの開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on mtDNA as a second messenger in the control of pulmonary fibrosis, aiming to elucidate the mechanism by which iron metabolism mediates the extracellular release of mtDNA and its implications for fibrosis. We demonstrated that the iron metabolism pathway regulates the release of mtDNA from alveolar epithelial cells induced by cigarette smoke. The extracellular mtDNA acts on alveolar epithelial cells, enhancing the production of critical inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8, which are important in the pathophysiology of pulmonary fibrosis. In vivo, our findings suggest that the iron metabolism pathway regulates the development of pulmonary fibrosis. These results clarify the mechanism by which the iron metabolism pathway regulates pulmonary fibrosis through the release of mtDNA induced by cigarette smoke.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：特発性肺線維症 鉄代謝 ミトコンドリアDNA タバコ煙 線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis: IPF) は、原因不明の間質性肺炎の中で約半数を占める頻度の高い疾患であり、線維化が進行して予後は不良である。加齢や喫煙が危険因子であり、肺胞上皮の損傷と、それに続く修復過程の上皮間葉転換が病態として提唱されているが不明な点が多い。

代表者らは、以前、タバコ煙暴露が肺のミトコンドリア損傷を引き起こし、その結果、ネクロプトーシスによる肺上皮細胞死を誘導することを世界で初めて報告した (引用文献 1)。IPF 患者の II 型肺胞上皮細胞においては、ミトコンドリア損傷が起きていることが報告されている (引用文献 2)。また、代表者らは、生体微量元素である鉄に着目し、喫煙により肺のミトコンドリアに鉄が沈着し、その結果、肺上皮細胞死や炎症を引き起こすことも報告している (引用文献 3)。ミトコンドリア由来ダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns: DAMPs) であるミトコンドリア DNA (mitochondrial DNA: mtDNA) は、血中を循環し、その量が外傷や敗血症患者の重症度と相関することが報告されている (引用文献 4)。IPF 患者では、健常者と比較して気管支肺胞洗浄液中の mtDNA が上昇していることが最近、報告された (引用文献 5)。これらの知見をもとに、進行する肺の線維化を制御するセカンドメッセンジャーとして mtDNA に着目し、IPF における鉄代謝による mtDNA の放出メカニズムと線維化について検討を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では、進行する肺の線維化を制御するセカンドメッセンジャーとして mtDNA に着目し、鉄代謝による mtDNA の細胞外放出メカニズムと線維化について解明し、臨床応用への研究基盤を確立することを目的とした。mtDNA の細胞外放出が肺の線維化に関わり、鉄代謝がその病態生理に中心的な役割を果たしているのであれば、本メカニズムの制御による新たな IPF の治療薬やバイオマーカーの開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) タバコ煙による mtDNA 細胞外放出の鉄代謝経路による制御

タバコ煙による mtDNA 細胞外放出の鉄代謝経路による制御を検討するために、鉄キレート剤 Deferoxamine (DFO) 処理した肺上皮細胞株 Beas 2B 細胞を、タバコ煙抽出液 (Cigarette Smoke Extract: CSE) で刺激し、細胞上清中の mtDNA を測定した。mtDNA の定量は、ミトコンドリア DNA 遺伝子である human NADH dehydrogenase 1 をターゲットとしたプライマーを用いてリアルタイム PCR で測定した。

(2) mtDNA による肺胞上皮細胞における炎症惹起のメカニズム

Beas 2B 細胞から、ミトコンドリア DNA 精製キット (BioVision) を使用してミトコンドリア DNA を精製した。抽出したミトコンドリア DNA を Lipofectamin LTX Reagent (Invitrogen) を用い Beas 2B 細胞に遺伝子導入し、ELISA kit で細胞上清中の IL-6 と IL-8 を測定した。

(3) 鉄代謝経路による肺線維化の制御

12~15 週齢の C57BL/6J マウスにブレオマイシン (BLM) を 2 mg/kg 気管内投与し、肺線維症モデルマウスを作成した。DFO は、BLM 投与 1 週間前から 28 日目まで 100 mg/kg body weight を週に 3 回気道内投与した。DFO を投与しない群にはハンクス平衡塩溶液 (HBSS) (Nacalai Tesque) を同様の方法で投与した。肺の生化学的な線維化評価のため、Hydroxyproline assay kit (K555-100; BioVision, Inc., CA, USA) を用いた。組織学的な肺の線維化評価は、Ashcroft スコアを用いた。

4. 研究成果

(1) 鉄代謝経路は、タバコ煙による mtDNA の肺胞上皮細胞外への放出を制御する

タバコ煙による肺胞上皮細胞外への mtDNA 放出を評価するために、CSE 処理した Beas 2B 細胞上清中の mtDNA 量をリアルタイム PCR を用いて定量した。CSE はコントロールと比較して細胞培養上清中の mtDNA 量を有意に増加させたが、DFO によって CSE による mtDNA の細胞外への放出は有意に抑制された (図 1)。これらの結果は、鉄代謝が CSE による細胞外 mtDNA 放出を調節していることを示唆している。

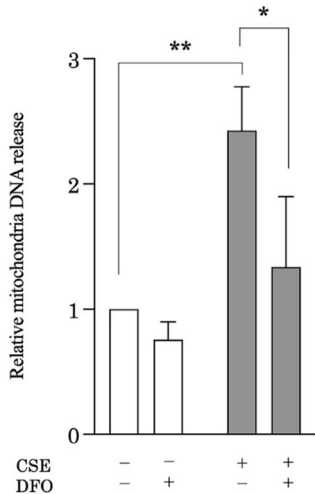


図1. 鉄キレート剤DFOは肺上皮細胞におけるCSEによるmtDNA細胞外放出を抑制する
Beas 2B細胞を鉄キレート剤であるDFO (50 μ M) で1時間処理した後に、5% CSEで6時間処理し、細胞外のmtDNAをリアルタイムPCRで定量した。All data are presented as the mean \pm SEM. * P < .05 and ** P < .01, based on two-way ANOVA with the Newman-Keuls post-hoc test.

(2) mtDNA は、セカンドメッセンジャーとして肺上皮細胞で炎症を惹起する

mtDNA が、セカンドメッセンジャーとして機能するかを検討するため、ミトコンドリア DNA を Beas 2B 細胞にトランスフェクションし、細胞上清中の IL-6 と IL-8 を測定した。IL-6 と IL-8 は mtDNA トランスフェクション 24 時間後に有意に上昇した (図 2 および図 3)。

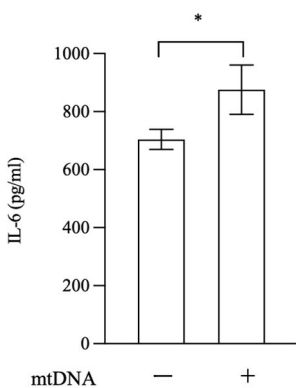


図2. mtDNAは肺上皮細胞におけるIL-6産生を増強する
Beas 2B細胞にmtDNA (1 μ g/ml) を遺伝子導入し、24時間後に細胞上清中のIL-6をELISAで測定した。All data are presented as the mean \pm SEM. ** P < .01, based on unpaired t test.

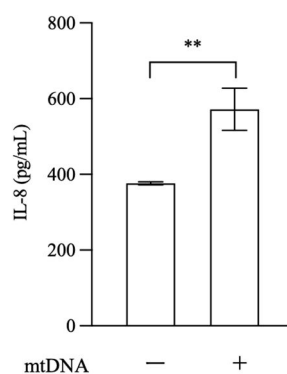


図3. mtDNAは肺上皮細胞におけるIL-8産生を増強する
Beas 2B細胞にmtDNA (1 μ g/ml) を遺伝子導入し、24時間後に細胞上清中のIL-8をELISAで測定した。All data are presented as the mean \pm SEM. ** P < .01, based on unpaired t test.

(3) 鉄代謝経路は、肺の線維化を制御する

肺組織の HE 染色では、コントロール群に比べ BLM 投与群で肺胞構造の破壊、間質肥厚が顕著に認められた (図 4A) .BLM 投与マウスに DFO を経気道投与すると、肺の肺胞構造の破壊、間質肥厚ともに抑制された (図 4A) . BLM 投与マウスでは、マッソン・トリクローム染色により肺の膠原線維の増加が認められたが、DFO 経気道投与により膠原線維の増加が抑制されていた (図 4B) . 肺線維化の病理評価である Ashcroft スコアは、BLM 投与群で増加するが、DFO 経気道投与により増加は抑制されていた (図 4C) . さらに肺のコラーゲン量をヒドロキシプロリンで定量化したところ、BLM 投与マウスで増加したヒドロキシプロリン量は、DFO 経気道投与によって抑制された (図 4D) . 以上より DFO は、マウス肺線維症モデルにおいて肺の線維化を抑制しており、生体内でも鉄代謝が肺の線維化を制御している可能性が示唆された .

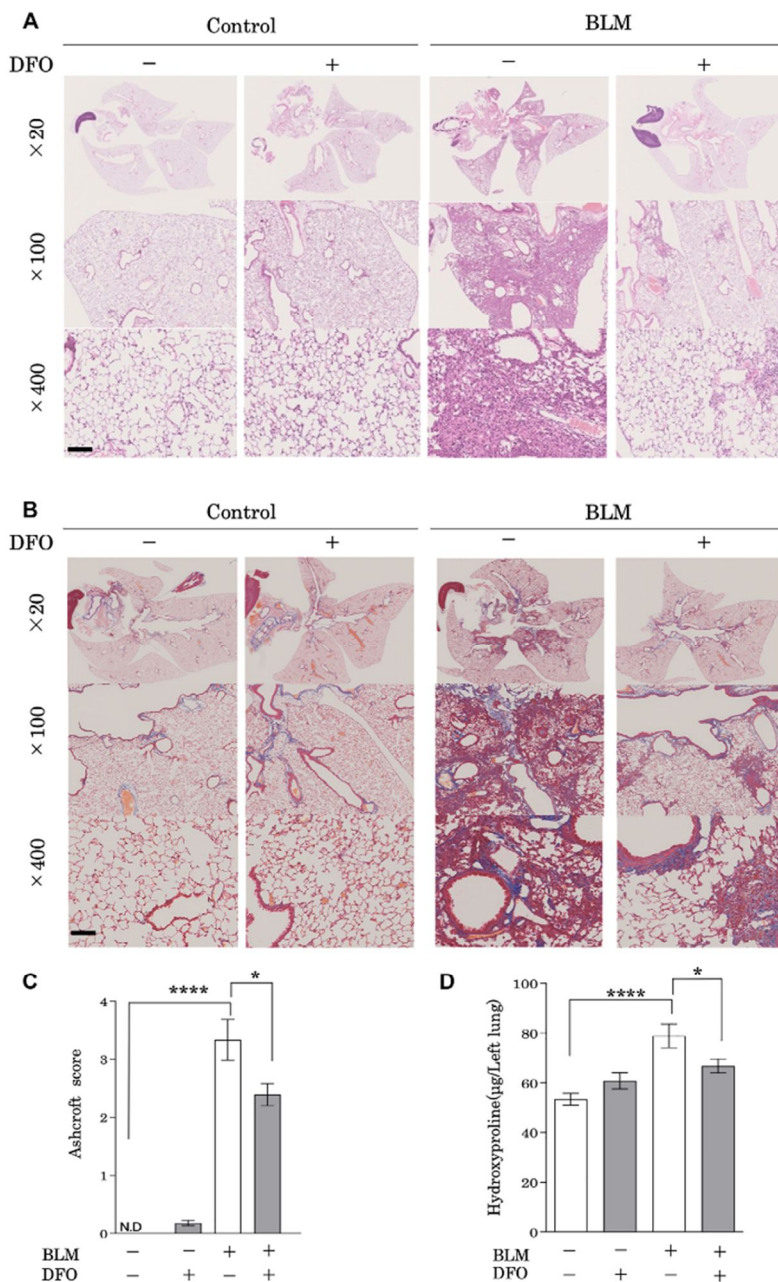


図4. 鉄キレート剤DFOは、プレオマイシン肺線維症モデルにおいて肺の線維化を抑制する

12~15週齢のC57BL/6JマウスにBLM 2 mg/kgを気管内投与し、DFOは、BLM投与1週間前から28日目まで100mg/kg body weightを週に3回気道内投与した。肺の切片は、(A) HEおよび (B) マッソン・トリクロームで染色した。スケールバー：100 μm。 (C) HE染色した切片を用いAshcroftスコアで肉眼的な線維化所見を定量化した。検定はStudent's t testにて行った。* $P<.05$ 。 (D) ヒドロキシプロリン量を測定した。二元配置分散分析およびNewman-Keuls法を用いて検定した。* $P<.05$ 、*** $P<.0001$ 。

本研究では、鉄代謝経路が、タバコ煙による mtDNA の肺胞上皮細胞外への放出を制御していること示した。細胞外に放出された mtDNA は肺胞上皮細胞に作用し、肺線維症の病態に重要な IL-6 や IL-8 の産生を増強する。生体内においては、鉄代謝経路が肺の線維化を制御していることが示唆された。これらの結果により、タバコ煙による mtDNA 放出を介した肺の線維化を鉄代謝経路が制御するメカニズムが明らかとなった。鉄代謝経路の制御により、新たな IPF の治療薬やバイオマーカーの開発につながる可能性がある。

<引用文献>

1. Mizumura K, Cloonan SM, Nakahira K, Bhashyam AR, Cervo M, Kitada T, Glass K, Owen CA, Mahmood A, Washko GR, Hashimoto S, Ryter SW, Choi AM. Mitophagy-dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD. *J Clin Invest.* 2014 Sep;124(9):3987-4003.
2. Bueno M, Lai YC, Romero Y, Brands J, St Croix CM, Kanga C, Corey C, Herazo-Maya JD, Sembrat J, Lee JS, Duncan SR, Rojas M, Shiva S, Chu CT, Mora AL. PINK1 deficiency impairs mitochondrial homeostasis and promotes lung fibrosis. *J Clin Invest.* 2015 Feb;125(2):521-38.
3. Cloonan SM, Glass K, Laucho-Contreras ME, Bhashyam AR, Cervo M, Pabón MA, Konrad C, Polverino F, Siempos II, Perez E, Mizumura K, Ghosh MC, Parameswaran H, Williams NC, Rooney KT, Chen ZH, Goldklang MP, Yuan GC, Moore SC, Demeo DL, Rouault TA, D'Armiento JM, Schon EA, Manfredi G, Quackenbush J, Mahmood A, Silverman EK, Owen CA, Choi AM. Mitochondrial iron chelation ameliorates cigarette smoke-induced bronchitis and emphysema in mice. *Nat Med.* 2016 Feb;22(2):163-74.
4. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AM. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 2011 Mar;12(3):222-30.
5. Ryu C, Sun H, Gulati M, Herazo-Maya JD, Chen Y, Osafo-Addo A, Brandsdorfer C, Winkler J, Blaul C, Faunce J, Pan H, Woolard T, Tzouvelekis A, Antin-Ozerkis DE, Puchalski JT, Slade M, Gonzalez AL, Bogenhagen DF, Kirillov V, Feghali-Bostwick C, Gibson K, Lindell K, Herzog RI, Dela Cruz CS, Mehal W, Kaminski N, Herzog EL, Trujillo G. Extracellular Mitochondrial DNA Is Generated by Fibroblasts and Predicts Death in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017 Dec 15;196(12):1571-1581.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mai Takahashi, Kenji Mizumura, Yasuhiro Gon, Tetsuo Shimizu, Yutaka Kozu, Sotaro Shikano, Yuko Iida, Mari Hikichi, Shinichi Okamoto, Kota Tsuya, Asami Fukuda, Shiho Yamada, Kaori Soda, Shu Hashimoto, Shuichiro Maruoka	4. 巻 12
2. 論文標題 Iron-Dependent Mitochondrial Dysfunction Contributes to the Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 643980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2021.643980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Mizumura, Yasuhiro Gon	4. 巻 10
2. 論文標題 Iron-Regulated Reactive Oxygen Species Production and Programmed Cell Death in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox10101569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kenji Mizumura, Mai Takahashi, Mari Hikichi, Shiho Yamada, Asami Fukuda, Yusuke Kurosawa, Kaori Soda, Shuichiro Maruoka, Yasuhiro Gon
2. 発表標題 The mechanism of cigarette smoke-induced mitochondrial DNA release in pulmonary epithelial cell
3. 学会等名 THE 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Mizumura, Mai Takahashi, Shuichiro Maruoka, Tetsuo Shimizu, Yutaka Kozu, Sotaro Shikano, Yuko Iida, Mari Hikichi, Shinichi Okamoto, Kota Tsuya, Asami Fukuda, Shiho Yamada, Kaori Soda, Shu Hashimoto, Yasuhiro Gon
2. 発表標題 Iron-dependent mitochondrial dysfunction contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis
3. 学会等名 THE 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Mizumura, Augustine. M.K. Choi, Shu Hashimoto, Yasuhiro Gon
2. 発表標題 Mitochondria in COPD
3. 学会等名 THE 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水村賢司、神津悠、鹿野壮太郎、佐久間麻衣、引地麻梨、藤原大士、黒澤雄介、曾田香織、丸岡秀一郎、權寧博
2. 発表標題 タバコ煙曝露による気道上皮細胞からのミトコンドリアDNA放出機構の解明
3. 学会等名 第63回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

〔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	權 寧博 (GON Yasuhiro) (80339316)	日本大学・医学部・教授 (32665)	
研究分担者	丸岡 秀一郎 (MARUOKA Shuichiro) (80599358)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	

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
---------	---------