

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591162

研究課題名(和文) 肺線維症病態におけるオートファジーと小胞体ストレス応答が制御する細胞運命

研究課題名(英文) The cell fate regulated by autophagy and ER stress in idiopathic pulmonary fibrosis.

研究代表者

荒屋 潤 (Araya, Jun)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90468679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、リソソームを介した細胞内の蛋白分解機構である。今回、我々は上皮細胞の細胞老化亢進と線維芽細胞の筋線維芽細胞分化において、不十分なオートファジー活性が、これらに共通する誘導機序である可能性を見出した。またIPF肺組織におけるオートファジー活性を免疫組織学的に検討し、特に早期線維化巣の老化した化生上皮細胞と筋線維芽細胞でオートファジーが不十分であることも見出した。このオートファジーの細胞特異的な作用は、特発性肺線維症病態を理解する上で重要な手がかりになると思われた。

研究成果の概要(英文)：Autophagy, a process of lysosomal degradation, plays an important regulatory role in cellular senescence and differentiation. Here we examine the regulatory role of autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) pathogenesis. Using biochemical evaluation of in vitro models, we find that autophagy inhibition is sufficient to induce acceleration of epithelial cell senescence and myofibroblast differentiation in lung fibroblasts. Immunohistochemical evaluation of IPF lungs reveals that epithelial cells show increased cellular senescence. Insufficient autophagy is demonstrated in both overlaying epithelial cells and fibroblasts in fibroblastic foci (FF). These findings suggest that insufficient autophagy is an underlying mechanism of both accelerated cellular senescence and myofibroblast differentiation in a cell-type specific manner and is a promising clue for understanding the pathogenesis of IPF.

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：オートファジー

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症(IPF)は加齢とともにその頻度が増加する老化関連肺疾患である。近年 replicative cell senescence を規定するテロメア機能と IPF の病態との関連性が報告されている。我々は以前 IPF 肺組織における上皮細胞の細胞老化亢進を、代表的な細胞老化の指標である senescence associated (SA)- β -galactosidase (Gal)染色と p21 の発現から明らかにし報告した。またこの細胞老化亢進が、senescence associated secretory phenotype(SASP)としてのインターロイキン(IL)-1 β 産生の亢進により IPF 病態に関与している可能性も明らかにした。しかしながら、IPF における細胞老化制御機構は十分に解明されていない。

オートファジーとは、細胞内の分解処理機構である。オートファゴソームと呼ばれるリン脂質の2重膜様構造からなる小胞によりタンパク質や細胞小器官を囲い込み、リソソームに移送し分解する。オートファジーは、生理的なアミノ酸供給だけではなく、細胞内環境維持、免疫応答、感染症制御、発癌抑制、プログラム細胞死、様々な病態においても重要である。オートファジーが、細胞内に蓄積する異常な蛋白質や小器官の除去において中心的な役割を果たす点から、細胞老化制御における重要性も注目されている。また IPF 組織の上皮細胞において小胞体ストレスの亢進が報告されているが、この小胞体ストレスも適応反応としてオートファジーを誘導し、オートファジーは小胞体の分解によりストレスを緩和する。しかしながら IPF 病態へのオートファジーの関与は小胞体ストレスとの関連性を含め、これまで十分には検討されていない。

2. 研究の目的

オートファジーの役割を、上皮細胞に関しては細胞老化の制御、線維芽細胞に関しては筋線維芽細胞への分化の観点から明らかにする。またその臨床的な重要性は、IPF 肺組織を用いた免疫組織学的な検討により評価する。IPF 病態におけるオートファジーの役割を解明することを目的とし、本検討を行う。

3. 研究の方法

(1)オートファジーの制御と評価: LC3、ATG5 を siRNA でノックダウンし、オートファジーは阻害した。オートファジーの亢進には Torin1 を用いた。オートファジーは LC3 の活性化 (LC3-I から LC3-II への変換) 及び p62 の発現量により評価した。

(2)培養細胞を用いた検討: 肺癌手術患者由来の肺組織の正常部分より分離した気道上皮細胞及び肺線維芽細胞を検討に用いた。

(2-) 分離培養ヒト気道上皮細胞の検討: 小胞体ストレスを亢進させたときに誘導され

る細胞老化に対するオートファジーの影響を検討した。糖鎖付加の阻害剤であるツニカマイシンにより小胞体ストレスを誘導し、SA β -Gal 染色により細胞老化を評価した。

(2-) 分離培養線維芽細胞の検討: 筋線維芽細胞分化におけるオートファジーの果たす役割について検討した。Transforming growth factor (TGF)- β で刺激し、筋線維芽細胞への分化を誘導した。筋線維芽細胞への分化は α -smooth muscle actin(SMA) と type I collagen の発現により評価した。

(3) 免疫組織学的検討: IPF 合併肺癌患者の手術検体から、胸膜直下で UIP パターンを呈する病変部位のパラフィンブロックを使用した(5例)。また正常コントロールとして IPF 非合併肺癌患者からの手術検体を使用した(5例)。コントロールと IPF 患者間での年齢、呼吸機能、血液ガスに関して有意差を認めず、喫煙指数のみ IPF 患者で有意に高値を示した。オートファジーはオートファジー関連蛋白である、抗 microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)抗体、抗 Beclin1 抗体を用いた免疫組織染色により検討した。

近年ユビキチン化された細胞内小器官や蛋白凝集体が、アダプター蛋白である 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報告された。つまりユビキチン化蛋白と p62 が同時に蓄積することは、オートファジーによる分解が不十分であることの一つの指標と考えられている。そこで抗 p62 抗体及び抗ユビキチン抗体を用いた免疫組織染色もオートファジー機能の指標とした。

細胞老化は、老化関連 cyclin-dependent kinase inhibitor である p21 に対する染色及び SA β -Gal 染色により評価した。

免疫組織染色は、正常肺実質、正常気道、早期線維化巣、軽度から中等度線維化部位、蜂窩肺部位で上皮細胞と線維芽細胞に分けて評価した。400 倍で、それぞれの部位を 5 視野撮影し、全体と染色陽性細胞数をカウントし、平均陽性パーセントを ;0 (10%以下)、1 (11~49%)、そして 2 (50%以上)として半定量的に評価した。

4. 研究成果

(1) 気道上皮細胞老化のオートファジーによる制御: ツニカマイシンは細胞老化を誘導し、mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤である Torin1 によるオートファジーの亢進は、小胞体ストレスと細胞老化を抑制した。一方、LC3B と ATG5 に対する siRNA を用いてオートファジーを阻害すると、小胞体ストレスによる細胞老化が増強した。つまり、小胞体ストレスを受けた上皮細胞ではオートファジー機能が細胞老化を規定する上で、重要である可能と考えられた。

(2) 筋線維芽細胞分化のオートファジーに

よる制御：TGF- β は、 α -SMA と type I collagen の 発現を亢進させ、筋線維芽細胞分化を誘導した。興味深いことに LC3B と ATG5 に対する siRNA を用いてオートファジーを阻害すると、TGF- β の刺激なしでも、 α -SMA と type I collagen の 発現が亢進した。またオートファジーの阻害は TGF- β による筋線維芽細胞への分化をさらに促進した。逆に mTOR 阻害剤である Torin1 によるオートファジー亢進は TGF- β による筋線維芽細胞化の誘導を抑制した。しかしながら気道上皮細胞とは異なり細胞老化に対する影響は認めなかった。

(3) 免疫組織学的検討： IPF 肺組織では、ほぼ正常構造と思われる領域の II 型肺胞上皮において、ドット状に LC3 発現亢進を認めた。IPF 肺組織の他の部位及び正常肺組織では LC3 発現亢進を認めなかった(図 1A, B)。一方 Beclin1 は IPF と正常の両肺組織でびまん性に高度に染色された。しかしながら IPF 肺組織の構造的に正常と思われる領域の II 型肺胞上皮においてはやや強い染色性を認めた(図 1C, D)。

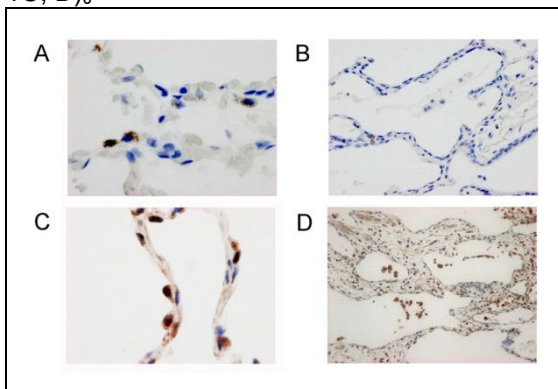


図1 LC3 と Beclin1 の免疫組織学的検討 (IPF 肺組織)
A.抗 LC 3 染色 1000 倍 B. 抗 LC3 染色 400 倍
C.抗 Beclin1 染色 1000 倍 D. 抗 Beclin1 染色 200 倍

正常肺組織ではユビキチン化蛋白の発現は認めなかった。一方 IPF 肺組織では、ほぼ構造正常と思われる領域の II 型肺胞上皮細胞において、p62 とユビキチン化蛋白が軽度発現していた。IPF 肺組織の軽度(早期)から中等度の線維化進展部位を覆う化生上皮細胞において p62 とユビキチン化蛋白の高発現を認めた(図 2 A,B,C,D)。一方、高度に線維化進展した蜂窩肺の部位では陽性細胞をわずかに認めるのみであった。SA- β -Gal と p21 の染色は、p62 及びユビキチン化蛋白陽性上皮細胞にほぼ一致して強い傾向があると思われた(図 2 E,F)。以上所見より、IPF 肺の構造正常と思われる領域の II 型肺胞上皮細胞から化生上皮細胞まで、傷害蛋白(ユビキチン化蛋白)が蓄積するようなストレス下にあることが推察される。オートファジーが亢進していると考えられる構造正常な領域の II 型肺胞上皮細胞では細胞老化の亢進を認めなかったことは、オートファジーによる分解が不

十分であることが細胞老化亢進の機序の一端である可能性を示唆する所見である。

IPF の早期線維化巣など線維化進展部位の筋線維芽細胞と考えられる細胞を中心に、p62 とユビキチン化蛋白の高発現を認め、一方、高度に線維化進展した蜂窩肺の部位では陽性細胞をわずかに認めるのみであった(図 2 A,B,C,D)。またこれらの細胞には SA- β -Gal と p21 の染色による細胞老化を認めなかった(図 2 E,F)。これは IPF の線維芽細胞でもオートファジー機能が不十分であるが、上皮細胞とは異なり細胞老化は誘導されず、むしろ筋線維芽細胞への分化が促進されている可能性を示唆する所見と思われた。

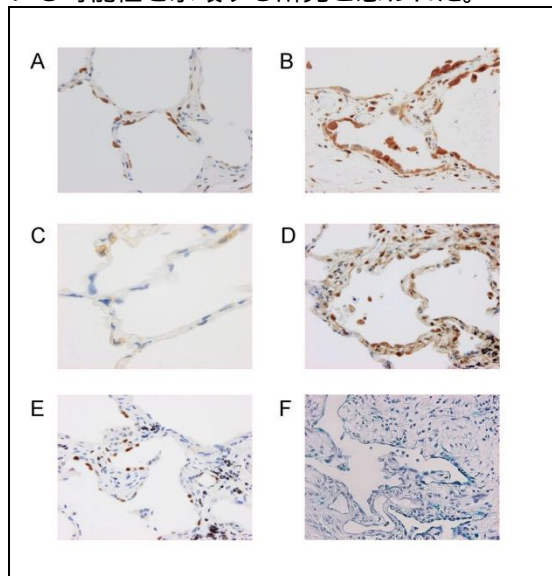


図2 p62、ubiquitin、p21 の免疫組織学的検討及び老化関連 β ガラクトシダーゼ染色
A.抗 p62 染色 400 倍 B. 抗 p62 染色 400 倍
C.抗 ubiquitin 染色 1000 倍 D.抗 ubiquitin 染色 400 倍
E.抗 p21 染色 400 倍 F. 老化関連 β ガラクトシダーゼ染色 400 倍

(結論)

以上よりオートファジー機能が低下しているか相対的に不十分であることが IPF 病態の背景に存在する可能性がある。しかしながらオートファジーの役割が、上皮細胞に対しては細胞老化の制御に、また線維芽細胞に対しては筋線維芽細胞分化へと、それぞれ細胞特異的に作用する機序の詳細に関しては今後の検討課題である。オートファジーがすべての細胞が持つ普遍的な細胞内蛋白分解機構であるにも関わらず、それぞれの細胞に特異的な作用を併せ持つことは非常に興味深い。その機序の理解と適切な制御は IPF の病態理解と新たな治療戦略の開発の上で重要と考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Araya J, Kojima J, Takasaka N, Ito S,

Fujii S, Hara H, Yanagisawa H, Kobayashi K, Tsurushige C, Kawaishi M, Kamiya N, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Kawabata Y, Hano H, Nakayama K, Kuwano K. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.2013.Jan 1;304(1):L56-69. 査読あり

Fujii S, Hara H, Araya J, Takasaka N, Kojima J, Ito S, Minagawa S, Yumino Y, Ishikawa T, Numata T, Kawaishi M, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Nakayama K, Kuwano K. Insufficient autophagy promotes bronchial epithelial cell senescence in chronic obstructive pulmonary disease. *Oncoimmunology*. 2012 Aug 1;1(5):630-641.査読あり

Kojima J, Araya J, Hara H, Ito S, Takasaka N, Kobayashi K, Fujii S, Tsurushige C, Numata T, Ishikawa T, Shimizu K, Kawaishi M, Saito K, Kamiya N, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Hano H, Arai S, Miyazaki T, Kaneko Y, Nakayama K, Kuwano K. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) expression in alveolar macrophages in COPD. *Respir Res* 2013,14:30 査読あり

Hara H, Araya J, Ito S, Kobayashi K, Takasaka N, Yoshii Y, Wakui H, Kojima J, Shimizu K, Numata T, Kawaishi M, Kamiya N, Odaka M, Morikawa T, Kaneko Y, Nakayama K, Kuwano K. Mitochondrial fragmentation in cigarette smoke-induced bronchial epithelial cell senescence. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013. Nov 15;305(10):L737-46.査読あり

Takasaka N, Araya J, Hara H, Ito S, Kobayashi K, Kurita Y, Wakui H, Yoshii Y, Yumino Y, Fujii S, Minagawa S, Tsurushige C, Kojima J, Numata T, Shimizu K, Kawaishi M, Kaneko Y, Kamiya N, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Nakayama K, Kuwano K. Autophagy Induction by SIRT6 through Attenuation of Insulin-like Growth Factor Signaling Is Involved in the Regulation of Human Bronchial Epithelial Cell Senescence. *J Immunol*. 2014. Feb 1;192(3):958-68.査読あり

〔学会発表〕(計 2件)

1. 日本呼吸器学学会総会 2012年6月
2. American Thoracic Society International Conference. *San Francisco*. 2012.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

桑野和善 (Kuwano Kazuyoshi)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：40205266