

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591178

研究課題名(和文)肺損傷と線維化におけるエクソソームを介する情報伝達の意義

研究課題名(英文)The significance of signaling pathways by exosome in lung injury and fibrosis

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：COPDおよびIPFの病態におけるmiRNAの関与を、細胞老化制御やexosomeを利用したSASPファクターとしての作用の点から明らかにした。

患者由来の気管支肺胞洗浄液を用いた網羅的検討：気管支肺胞洗浄液は、遠心およびフィルターにて濾過後、超遠心機にてexosomeを分離採取した。BALF液中におけるexosomeは、個体差はあるものの、解析可能なexosomeが回収可能であった。

肺癌手術検体から分離培養した気道上皮細胞及び線維芽細胞を用いた検討：miRNA microarrayから抽出された複数のmiRNAは気道上皮細胞における老化誘導に関連していることが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：AIM: To verify the role of microRNA in COPD and IPF pathogenesis, especially the regulation of cellular senescence and SASP using exosome

1. Extraction and analysis of exosome in BALF from patients with COPD and IPF: Exosome was isolated from BALF using ultracentrifuge and filtration. Exosome obtained from BALF was successfully obtained and suitable for analysis.

2. Analysis of microRNA using bronchial epithelial cells and fibroblasts: isolated from patients with lung cancer. microRNA isolated by microarray analysis were associated with senescence induction in bronchial epithelial cells.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：COPD pulmonary fibrosis senescence micro RNA exosome lung injury

1. 研究開始当初の背景

代表的な呼吸疾患である肺気腫(COPD)と特発性肺線維症(IPF)は、いずれも加齢に伴い発症が増加する老化関連呼吸器疾患と言われている。これら疾患では、肺上皮細胞老化が亢進しており、その病態に積極的に関与する可能性が報告されている。しかしながら、呼吸器疾患における細胞老化の分子生物学的な制御機構や、その病態における役割の詳細は明らかでない。細胞老化には生理的または病理的な働きがあり、それは細胞増殖の抑制と senescence associated secretory phenotype (SASP)により説明される。SASP によるサイトカイン、成長因子、タンパク分解酵素の産生は、細胞老化の維持、免疫応答、細胞外マトリックスの制御により治癒過程や個体の老化に影響すると考えられる。

近年、様々な疾患との関連において、小分子非翻訳 RNA である microRNA(miRNA)が重要な役割をもつことが明らかとなり注目を集めている。miRNA は、20-24 塩基からなる RNA であり、その主作用としてメッセンジャーRNA(mRNA)の 3' 非翻訳領域に結合し、タンパク質産生を制御するとされている。一つの miRNA が多数の遺伝子発現を調節しており、これらが発生や細胞死、細胞増殖といった多くの生命現象の制御に関する報告が相次いでいる。一方で、miRNA が細胞内のみならず血液中にも存在することが判明し、新たな疾患バイオマーカーとして診断や治療への応用が期待されている。現在までに、COPDおよびIPFの病態に関連する miRNA や喫煙関連 miRNA が多く報告されており、これら老化関連呼吸器疾患における病態に深く関与していると考えられており、世界中で研究が進んでいる。さらにこれら血中に存在する miRNA や mRNA が、細胞から分泌する小胞であるエクソソーム(exosome)中に存在し体液中を循環していることが報告された。これまでは、細胞間コミュニケーションの担い手として、サイトカインやケモカイン、接着分子など、タンパク質を中心とした研究が主体であったが、exosome はその概念を新たにし、疾患特異的なバイオマ-

ーカーとしての役割だけでなく、様々な疾患の調節因子である miRNA を細胞から細胞、ひいては個体から個体へと移送することにより、パラクラインファクターとしての可能性を秘めている。このような背景から、老化関連 miRNA は exosome という情報伝達手段により、SASP のオートクライン、パラクラインファクターとしても作用して COPD と IPF の病態に深く関与する可能性がある

2. 研究の目的

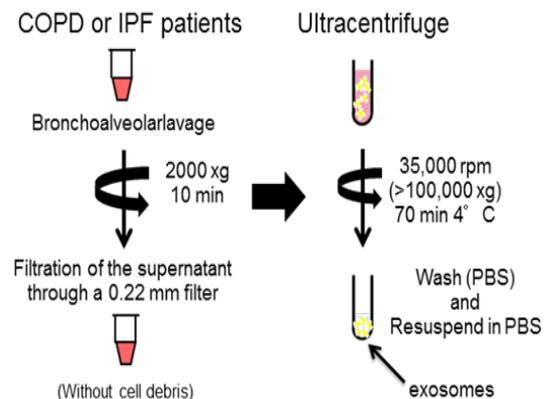
本研究の目的は、COPD および IPF の病態における miRNA の関与を、細胞老化制御や exosome を利用した SASP ファクターとしての作用の点から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法及び結果

患者由来の気管支肺胞洗浄液を用いた網羅的検討

患者から得られた気管支肺胞洗浄液は、遠心およびフィルター(0.22 μm)にて濾過後、超遠心機にて 35,000 rpm (70 分、4 $^{\circ}\text{C}$) 施行し、exosome を分離採取し解析を行った(以下図1参照)。

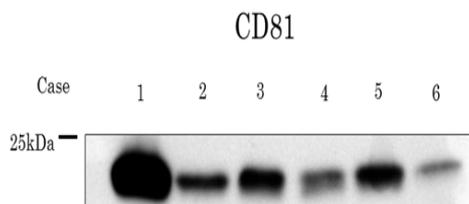
図1



解析に用いたサンプルは、臨床経過および画像所見よりCOPDもしくはIPFと診断された患者であり、気管支内視鏡検査を施行し得られた気管支肺胞洗浄液(BALF 液)を用いた解析を行った。BALF 液は、上記の分離回収法を用いて exosome の回収を行った。対象症例は 6 例であった。BALF 液 11ml より 1.8 ~ 24.9 $\mu\text{g/ml}$ と固体差はあるものの、少量で解析に十分な exosome

が採取可能であった。次に、回収した exosome において、exosome marker である CD81 および CD9 (date not shown) における Western blot 法により exosome 発現量を評価した(図 2)。

図 2



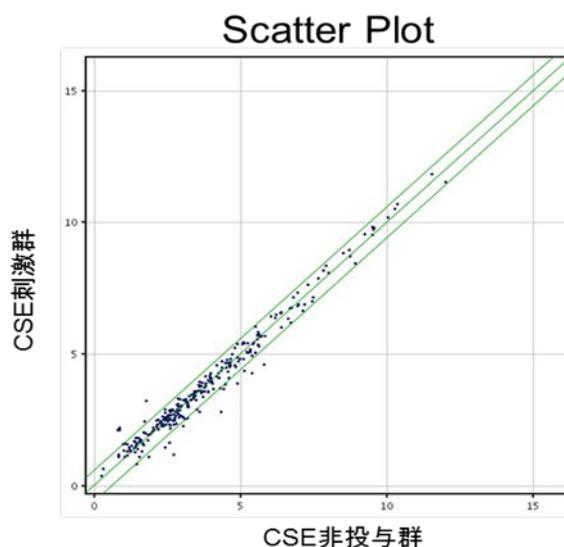
以上の結果より BALF 液中における exosome は、臨床サンプルによる個体差はあるものの、十分に解析可能な exosome が回収可能であり、生体内における exosome の分子生物学的役割が示唆された。今後症例を増やし exosome 中の miRNA microarray 解析やプロテオーム解析を行い、老化関連呼吸器疾患に特異的な exosomal miRNA およびタンパク質の同定など、BALF サンプルを用いて解析していく予定である。

肺癌手術検体から分離培養した気道上皮細胞及び線維芽細胞を用いた検討

In vitro における本研究の検討として、ヒト肺手術検体より分離培養した気道上皮細胞 (human bronchial epithelial cell: HBEC) および線維芽細胞を用い、タバコ煙水抽出液 (cigarette smoke extract: CSE) による喫煙刺激による細胞老化の誘導を行った。手術検体から分離培養した HBEC (計 5 症例) を、CSE 刺激、および CSE(-) の 2 群に分け、各細胞培養上清を回収した。Exosome の回収方法は、図 1 と同様に超遠心法を用いて回収した。Exosomal RNA は Agilent RNA 6000 Pico kit (Agilent Technologies) を用いて RNA の quality および濃度を計測し、計 5 症例において CSE 刺激群および CSE 非投与群の各 2 群の RNA サンプルはそれぞれ混合した。その後 Exosomal microRNA の網羅的解析目的にて miRNA microarray (Agilent Technologies) 解析を施行した。各群における miRNA の発現は、以下の図のように scatter plot において相関関係を認

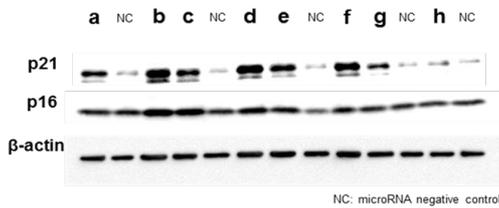
めた(図 3)。アレイ解析の結果では CSE 非投与群と比較して CSE 刺激群にて発現が上昇 (Fold change > 1.5) していた miRNA は 14 種類、発現が減少 (Fold change < 1.5) していた miRNA は 45 種類において統計学的な有意差を認めた。

図 3



これらの発現変動を認めた 59 種類の miRNA のうち、提出した RNA サンプルにおいて validated qRT-PCR を行ったところ、8 種類の miRNA において発現変動が再確認された (miRNA-a, b, c, d, e, f, g, h とここでは表記する)。miRNA-a、miRNA-b、miRNA-c、miRNA-d、miRNA-e、miRNA-f、miRNA-g の 7 つの miRNA は CSE 刺激群にて発現低下している miRNA であり、miRNA-h は CSE 刺激群にて発現上昇している miRNA であった。これらの miRNA において、まずヒト気道上皮細胞株である BEAS-2B を用いてこれらの miRNA の transfection を行い、老化関連シグナルである p21 および p16 の発現解析を Western blot 法により検討を行った(図 4)。miRNA-a, b, c, d, e, f, g は anti-miR を用いて発現抑制を行い、miR-h は pre-miR を用いて発現亢進を誘導した。図 4 にしめすように、これらの結果からは、miRNA-a, b, c, d, e, f, g において p21 および p16 の発現が亢進している事が判明した。

図 4



これらの p21 および p16 などの老化関連タンパク質発現解析から、miRNA microarray から抽出された複数の miRNA は気道上皮細胞における老化誘導に関連していることが明らかにされた。注目すべきことに、microRNA-a、b、c、d、e、f は miRNA family であり、この family が気道上皮細胞の老化、線維化などに深く関与している可能性も示唆された。現在、senescence associated-galactosidase 染色、細胞周期分析、さらに phospho-Histone H2A.X (Ser139)染色により評価検討中である。今後、分離培養されたヒト由来の HBEC においてもこれらの miRNA の transfection を行い、同様の phenotype が示されるか検討していく。さらにこれらの miRNA を内包した exosome が周囲の recipient cell である線維芽細胞などに取り込まれ老化を誘導しているかを検討し、呼吸器老化疾患における exosome および exosomal miRNA が細胞間コミュニケーションにおける重要な役割を果たしている可能性を究明していく予定である。

4. 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 17 件)

1. Hara H, Araya J, Nakayama K, Kuwano K. et al. Involvement of creatine kinase B in cigarette smoke induced-bronchial epithelial cell senescence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46:306-312, 2012.
2. Fujii S, Hara H, Araya J, Nakayama K, Kuwano K et al. Insufficient autophagic clearance promotes bronchial epithelial cell senescence in chronic obstructive pulmonary disease. *Oncimmunology* 1:5, 630-641, 2012.

3. Araya J, Nakayama K, Kuwano K et al. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 304:L56-69, 2013.
4. Hara H, Araya J, Nakayama K, Kuwano K et al. Mitochondrial fragmentation in cigarette smoke induced bronchial epithelial cell senescence. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013, 305(10):L737-46.
5. Fujita Y, Takeshita F, Mizutani T, Ohgi T, Kuwano K, Ochiya T. A novel platform to enable inhaled naked RNAi medicine for lung cancer. *Sci Rep.* 2013 Nov 25;3:3325. doi: 10.1038/srep03325
6. Takasaka N, Araya J, Nakayama K, Kuwano K et al. 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.* 192: 958-68, 2014.
7. Fujita Y, Yoshioka Y, Ito S, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Intercellular communication by extracellular vesicles and their microRNAs in asthma. *Clin Ther.* 36:873-81, 2014.
8. Araya J, Hara H, Kuwano K. Autophagy in the pathogenesis of pulmonary disease. *Intern Med.* 2013;52(20):2295-303.
9. Fujita Y, Takeshita F, Kuwano K, Ochiya T. RNAi Therapeutic Platforms for Lung Diseases. *Pharmaceuticals (Basel).* 6:223-50, 2013
10. 桑野和善, 中山勝敏, 荒屋 潤: 解説 臨床 肺の気腫化と線維化 呼吸 33:346-47, 2014.
11. 桑野和善, 荒屋 潤, 原 弘道: 特集 炎症凝固反応とオートファジー 呼吸器疾患とオートファジー Thrombosis

Medicine 4:228-233, 2014.

12. Fujita Y, Kuwano K, Ochiya T, Takeshita F. The impact of extracellular vesicle-encapsulated circulating microRNAs in lung cancer research. BioMed Research International article ID 486413

13. 原弘道、荒屋潤、桑野和善：特発性肺線維症(IPF)におけるオートファジー、マイトファジーの役割 最新医学 69:140-146, 2014.

14. 桑野和善、荒屋潤、原弘道：オートファジーと呼吸器疾患 Respiratory Medical Research 2(4):56-58, 2014.

15. 原弘道、荒屋潤、桑野和善：細胞老化と IPF Annual Review 呼吸器 2012 中外医学社、東京、pp19-26.

16. 桑野和善：オートファジーと呼吸器疾患別冊 呼吸器疾患-state of atrs- ver. 6 医歯薬出版株式会社、東京、pp54-57, 2013

17. 荒屋潤、原弘道、桑野和善：肺線維化におけるオートファジーの役割 Annual Review 呼吸器 2013 中外医学社、東京、pp8-15.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Kurita Y, Araya J, Nakayama K, Kuwano K, et al. Transcription factor EB (TFEB) regulates cigarette smoke extract (CSE)-induced cellular senescence. ERS 2014, Barcelona.

2. Kobayashi K, Araya J, Nakayama K, Kuwano K, et al. Mitophagic regulation of myofibroblast differentiation in lung fibroblasts. ERS 2014, Barcelona.

3. Ito S, Araya J, Nakayama K, Kuwano K, et al. PINK1-Parkin pathway-mediated mitophagy is involved in cigarette smoke extract (CSE)-induced cellular senescence in human bronchial epithelial cells (HBEC). ERS 2014, Barcelona.

4. Takasaka N, Araya J, Nakayama K, Kuwano K, et al. Metformin inhibits TGF- β -induced myofibroblast differentiation through AMPK activation. ERS 2014, Barcelona.

5. 小林賢司、荒屋潤、中山勝敏、桑野和善、等。オートファジーによる筋線維芽細胞分化の制御。日本呼吸器学会総会、大阪。

6. 伊藤三郎、荒屋潤、中山勝敏、桑野和善、等。Parkin 誘導性マイトファジーによる喫煙刺激気道上皮細胞老化の制御。日本呼吸器学会総会、大阪。

〔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：
出願年月日：
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
桑野和善 (KUWANO Kazuyoshi)
東京慈恵会医科大学・呼吸器内科・教授
研究者番号：40205266

(2)研究分担者
中山勝敏 (NAKAYAMA Katsutoshi)
東京慈恵会医科大学・呼吸器内科・教授
研究者番号：40321989

(3)研究分担者
荒屋潤 (ARAYA Jun)
東京慈恵会医科大学・呼吸器内科・教授
研究者番号：40321989