

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461198

研究課題名(和文) COPDにおけるインフラマソーム活性化機序とマイトファジーによる制御

研究課題名(英文) Role of mitophagy in inflammasome activation during COPD pathogenesis.

研究代表者

清水 健一郎 (Shimizu, Kenichiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：80385327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙刺激は気道上皮細胞においてミトコンドリア傷害を引き起こし、活性酸素種(ROS)の産生を増加させ、インフラマソーム活性化と細胞老化を誘導した。傷害ミトコンドリアの除去機構であるマイトファジーは喫煙刺激により誘導された。PARK2ノックダウンにより喫煙誘導マイトファジーを抑制すると、ROS産生が増加し、細胞老化誘導が促進された。一方、PARK2強制発現によりマイトファジー誘導を促進させると、喫煙刺激によるROS産生は減少し、細胞老化は抑制された。不十分なマイトファジーが傷害ミトコンドリアの蓄積、ROS増加を介してCOPDの病態に関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cigarette smoke accelerates epithelial cell senescence in the lung, which has been implicated in COPD pathogenesis. Cigarette smoke extract (CSE) induces mitochondrial damage and ROS production, resulting in inflammasome activation and cellular senescence in human bronchial epithelial cell (HBEC). Mitophagy, a mechanism for maintaining cellular homeostasis by removing damaged mitochondria, is induced by CSE exposure. CSE-induced mitophagy is inhibited by PARK2 knockdown with concomitantly enhanced mitochondrial ROS production and cellular senescence. Inversely, PARK2 overexpression inhibits CSE-induced ROS production and cellular senescence. PARK2 expression levels are decreased in COPD lungs compared with non-COPD lungs. Insufficient mitophagy is a part of the pathogenic sequence of COPD development via increased ROS production, resulting from accumulation of damaged mitochondria.

研究分野：医歯薬学

キーワード：インフラマソーム 慢性閉塞性肺疾患 マイトファジー

1. 研究開始当初の背景

COPD は長期間の喫煙暴露により引き起こされる慢性進行性の呼吸器疾患である。加齢とともにその頻度は増加し、また、COPD の肺組織では肺上皮細胞の老化が亢進していることから、喫煙誘導細胞老化が COPD の病態に重要な役割を果たしていると考えられている。喫煙刺激は活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) を介して気道上皮細胞 (Human bronchial epithelial cells; HBEC) の細胞老化を促進し、老化した細胞は Senescence associated secretary phenotype (SASP) と呼ばれる表現型を呈し、種々のサイトカインと成長因子を産生し、老化病態と関連する。

COPD の病態と関連する主要なサイトカインの一つが Interleukin (IL)-1 である。喫煙刺激により気道上皮細胞からの産生される IL-1 は、気道炎症、線維化を促進する。近年、インフラマソームと呼ばれるタンパク複合体が、IL-1 の活性化を制御していることが明らかとなり、その構成や活性化機序についても解明されつつある。喫煙刺激によるインフラマソームの活性化は、COPD の病態に関与すると考えられるが、その実際の関連性と病態特異的な制御機構は十分には検討されていない。

喫煙刺激は、ミトコンドリア傷害、ROS の増加により、ミトコンドリア DNA の酸化を引き起こす。修復能の低い酸化ミトコンドリア DNA は細胞質に移行し、NOD-like receptors, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) に結合しインフラマソームを活性化することが知られている。すなわち、喫煙刺激により、ミトコンドリア傷害に伴う酸化 DNA の増加、NLRP3 インフラマソーム活性化が誘導され、IL-1 が活性化、分泌される可能性がある。

以上の背景から、我々は、喫煙刺激が細胞老化を促進し、老化細胞が SASP として IL-1 を産生する、その過程でインフラマソームが活性化している可能性を考えた。

喫煙による細胞老化促進、インフラマソーム活性化のいずれにおいてもミトコンドリア傷害、ROS が重要な役割を果たしている。ミトコンドリア選択的オートファジーのオートファジーは、傷害ミトコンドリアの分解処理、ROS の制御に重要な役割を果たしており、その低下は老化関連疾患の病態と関連する。そこで、我々は、**オートファジーが低下、あるいは不十分であることが傷害ミトコンドリア蓄積、ROS 増加を介して、喫煙による細胞老化促進、インフラマソーム活性化を誘導し、COPD 病態と関連する**可能性を考えた。

2. 研究の目的

COPD 病態に重要な役割を果たしている喫煙誘導気道上皮細胞老化、インフラマソーム活性化の機序を明らかとする。

3. 研究の方法

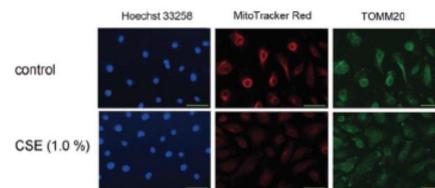
倫理委員会による承認の下、手術肺組織と分離培養した HBEC を用いた。Cigarette smoke extract (CSE) による細胞老化誘導におけるオートファジーの果たす役割について、HBEC を用いて検討した。ミトコンドリアの形態は TOMM20 染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。ミトコンドリアの膜電位は Mitotracker Red 染色にて評価した。ミトコンドリア ROS は、Mitox Red、DHR123 染色にて評価した。インフラマソーム活性化は、活性型 caspase-1 の発現にて評価した。細胞老化は、senescence-associated β gal (SA- β gal) 染色と CDKN1A の発現で評価した。pEGFP-LC3B を発現した BEAS-2B 細胞を用いて、オートファジーの状態を評価した。PARK2 のノックダウンにより、オートファジーを抑制し、HA-PARK2 発現プラスミドのトランスフェクションによりオートファジーを促進した。免疫組織染色により、正常肺と COPD 肺での PARK2 発現を比較検討した。

4. 研究成果

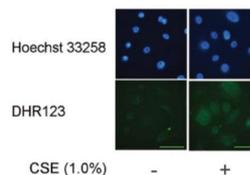
(1) 喫煙刺激は気道上皮細胞においてミトコンドリア傷害を引き起こし、ROS 産生を増加させ、インフラマソーム活性化、細胞老化を誘導した

分離した HBEC に 1% CSE 刺激を行った。CSE 刺激によるミトコンドリア傷害により膜電位は低下し (Mitotracker Red) ミトコンドリア ROS 産生を増加し (DHR123) さらに、インフラマソーム活性化 (Cleaved caspase-1) 細胞老化が誘導された (CDKN1A)。

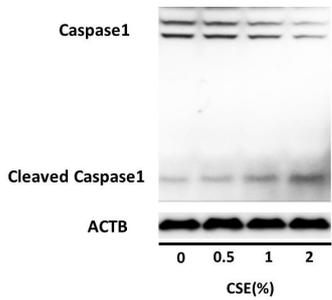
CSE によるミトコンドリア膜電位低下



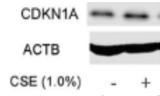
CSE によるミトコンドリア ROS 増加



CSE による cleaved Caspase-1 増加

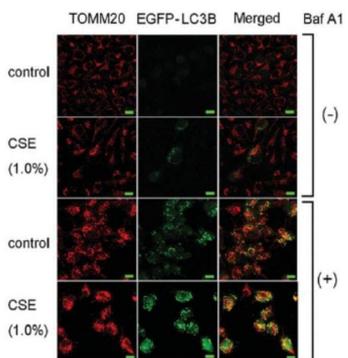


CSE による細胞老化誘導



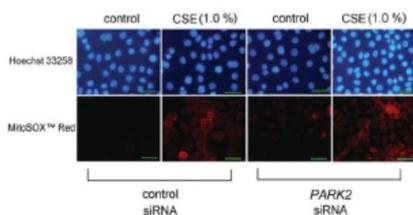
(2) 喫煙刺激はミトファジーを誘導した
 pEGFP-LC3B を安定発現した BEAS-2B 細胞を用いて、ミトファジー誘導を評価した。BafilomycinA にてオートファジーの flux を止めると、CSE 刺激により TOMM20 と LC3B の共局在が増加し、CSE によりミトファジーが亢進することが示された。

CSE によるミトファジー誘導

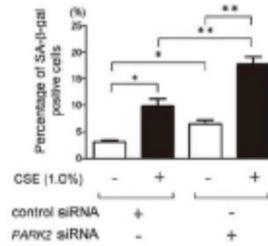


(3) PARK2 ノックダウンによりミトファジーを抑制すると、ROS 産生が増加し、喫煙誘導細胞老化が亢進した
 CSE 刺激に加え、PARK2 をノックダウンしてミトファジーを抑制すると ROS 産生が増加し (Mitotracker Red)、細胞老化がさらに亢進した (SA-βgal 染色)。

PARK2 ノックダウンによる ROS 増加



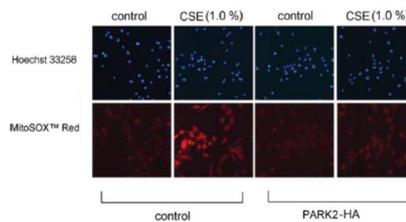
PARK2 ノックダウンによる細胞老化亢進 (SA-βgal 染色)



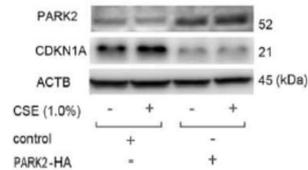
(4) PARK2 過剰発現は、CSE による ROS 産生、老化誘導を抑制した

PARK2-HA 発現プラスミドを HBEC にトランスフェクションして ROS 産生を Mitosox Red 染色、細胞老化を CDKN1A の発現で評価した。PARK2 発現は CSE による ROS 産生、細胞老化亢進を抑制した。

PARK2 発現による CSE による ROS 産生抑制

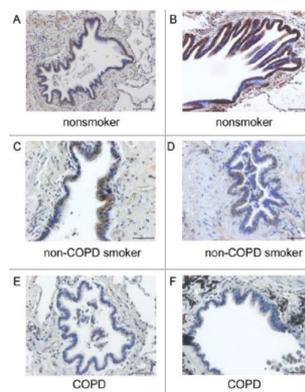


PARK2 発現による CSE 誘導細胞老化抑制



(5) PARK2 発現は COPD 肺では低下していた

PARK2 発現を免疫組織染色にて検討した。COPD 肺では non-smoker、non-COPD smoker と比べ、PARK2 発現が低下していた。



(結論)

不十分なミトファジーが傷害ミトコンドリアの蓄積、ROS 増加を介して COPD の病態に関連している可能性が示唆された。

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 3 件)

Ito S, Araya J, Kurita Y, Kobayashi K, Takasaka N, Yoshida M, Hara H, Minagawa S, Wakui H, Fujii S, Kojima J, Shimizu K, Numata T, Kawaishi M, Odaka M, Morikawa M, Harada T, Stephen L Nishimura, Kaneko Y, Nakayama K, and Kuwano K. Autophagy 2015;11(3):547-59. 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. 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. J Immunol. 2014 Feb 1;192(3):958-68 査読あり

[学会発表](計 2 件)

日本呼吸器学学会総会 2013 年 4 月 20 日

European Respiratory Society
Annual congress. *Barcelona*. 2013 年 9 月 10 日.

[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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水健一郎 (SHIMIZU KENICHIRO)
東京慈恵会医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：80385327

(2)研究分担者

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

(3)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