

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860661

研究課題名(和文) 気道上皮細胞の喫煙誘導細胞老化におけるマイトファジー、ミトコンドリア動態の役割

研究課題名(英文) Role of mitophagy and mitochondrial dynamics in cigarette smoke-induced bronchial epithelial cell senescence.

研究代表者

原 弘道(Hara, Hiromichi)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70398791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000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分裂を促進し、活性酸素種ROSの産生を増加させ、細胞老化を誘導した。ミトコンドリア分裂促進自体もROSの産生を増加させ、細胞老化を誘導した。抗酸化剤は喫煙誘導細胞老化、ミトコンドリア分裂促進による細胞老化を抑制した。マイトファジー低下による分裂ミトコンドリアの蓄積、ROS増加は細胞老化を促進した。電子顕微鏡による肺組織の検討ではCOPD患者では、非喫煙者の気道上皮細胞と比較してより多くの断片状のミトコンドリアを認めた。以上より、肺でのミトコンドリア分裂促進、マイトファジー低下がROS増加、細胞老化亢進を介してCOPD病態に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the role of mitochondrial dynamics in human bronchial epithelial cell (HBEC) senescence induced by cigarette smoke extract (CSE) exposure. CSE induced mitochondrial fragmentation and mitochondrial ROS production, which were responsible for acceleration of cellular senescence. Mitochondrial fragmentation itself increased mitochondrial ROS production and cellular senescence. Treatment of antioxidant inhibited both CSE-induced and mitochondria fragmentation-induced cellular senescence. Accumulation of fragmented mitochondria with increased ROS by decreased mitophagy accelerated cellular senescence. Mitochondria in bronchial epithelial cells were prone to be more fragmented in COPD lung tissues in electron microscopic evaluation. Taken together, mitochondrial fragmentation and decreased mitophagy in lung may be involved in COPD pathogenesis through the acceleration of cellular senescence.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：COPD ミトコンドリア動態 マイトファジー

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、細胞内の重要なエネルギーである ATP を産生する一方で、その副産物として、活性酸素種(Reactive Oxygen Species;ROS)を産生する。さまざまな刺激により、ミトコンドリアは傷害を受け、傷害を受けたミトコンドリアでは ATP の産生が低下し、ROS の産生は増加する。生体にはミトコンドリア傷害に対する幾つかの防御機構が存在する。ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返す動的な小器官であり、融合はその防御機構の一つである。傷害を受けたミトコンドリアは、正常なミトコンドリアと融合することにより機能が回復する。また、ミトコンドリア特異的オートファジーであるマイトファジーは細胞内の主要なミトコンドリア除去機構の一つであり、傷害を受けたミトコンドリアを特異的に分解処理することで、その蓄積に伴う細胞傷害を防ぐ。これらのミトコンドリア品質管理機構の働きが不十分であると、傷害を受けたミトコンドリアが蓄積し、ROS が増加、細胞内の恒常性維持が困難となる。

細胞老化は、生理的な恒常性維持調節機構の低下に起因する細胞運命の一つである。以前より提唱されているフリーラジカル仮説では、ROS が細胞老化の原因と考えられている。また、ROS の主要な産生源であるミトコンドリアの機能不全は細胞老化と関連するとすることも報告されている。以上より、ミトコンドリアの品質管理が不十分であることがミトコンドリア機能不全、ROS 増加を介し、細胞老化と関連している可能性がある。

慢性閉塞性肺疾患 (COPD;Chronic Obstructive Pulmonary Disease)は喫煙を主な原因とし、肺胞の破壊、消失を特徴とする呼吸器疾患である。正常肺は、アポトーシスによる細胞の消失と、代償性の細胞増殖によりバランスを保っている。一方、COPD 肺ではそのバランスが崩れ、喫煙によるアポトーシスが増加するにもかかわらず、代償性の細胞増殖が不十分であり、結果として肺胞が消失すると考えられている。近年、COPD 肺における細胞増殖の低下や慢性炎症に、細胞老化が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。そこで、我々は、COPD の病態に、ミトコンドリアの品質管理機構である、ミトコンドリア融合、マイトファジーが ROS 制御を介して重要な役割を果たしていると考えた。

2. 研究の目的

喫煙刺激により誘導される気道上皮細胞老化における、ミトコンドリア動態(分裂、融合)、マイトファジーの役割を明らかにする。

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気道上皮細胞を用い検討を行

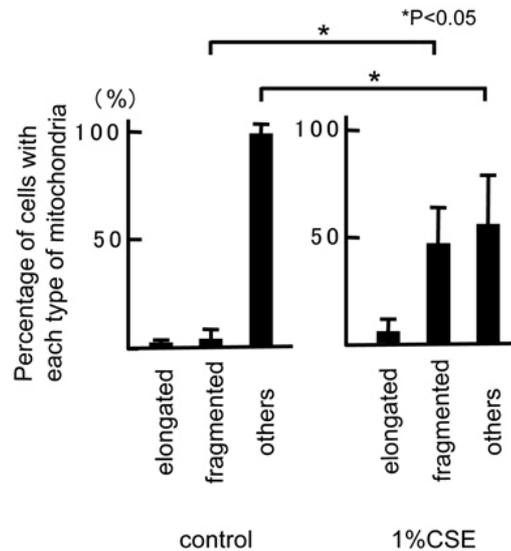
った。まず、分離した気道上皮細胞にて、Cigarette smoke extract(CSE)による細胞老化誘導におけるミトコンドリア動態、マイトファジーの果たす役割について検討した。ミトコンドリアの形態は TOM 染色し、蛍光顕微鏡にて観察し、分類した。ミトコンドリア ROS は細胞を mitosox 染色し、蛍光強度をフローサイトメトリーにて測定した。細胞老化は、senescence-associated βgal(SA-βgal)染色と p21 の発現で評価した。ミトコンドリア融合蛋白である OPA1、Mitofusin1,2 のノックダウンによりミトコンドリアの分裂を促進した。Parkin、PINK1 のノックダウンにより、マイトファジーを抑制した。抗酸化剤は N-acetylcysteine (NAC)、Mitotempo を用いた。また、肺組織におけるミトコンドリアの形態を電子顕微鏡にて観察し、正常肺と COPD 肺で比較検討した。

4. 研究成果

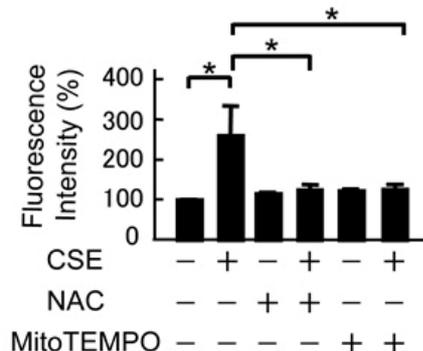
(1)喫煙刺激はミトコンドリアの分裂を促進し、ROS 産生を増加し、細胞老化を誘導する

分離した気道上皮細胞で、喫煙刺激はミトコンドリアの分裂を促進し、ミトコンドリア ROS を増加させ、細胞老化を誘導した。抗酸化剤 (NAC、Mitotempo) は喫煙刺激による ROS の産生、細胞老化誘導を抑制した。

ミトコンドリア形態



ミトコンドリア ROS



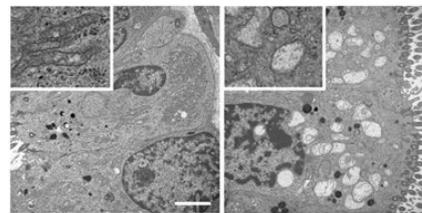
細胞老化

(3) Parkin, PINK1 ノックダウンは細胞老化を促進する

Parkin, PINK1 ノックダウンによりマイトファジーを抑制すると分裂ミトコンドリアが増加し、ROS 産生が増加、細胞老化が促進した。

(4) COPD の気道上皮細胞では断片状のミトコンドリアが増加している

肺組織における気道上皮細胞のミトコンドリアの形態を電子顕微鏡にて観察した。有意な差はないものの、COPD では腫大した断片上のミトコンドリアが多く、その長径は短い傾向にあった。



Control

COPD

(結論)

気道上皮細胞において、喫煙刺激はミトコンドリアの分裂を促進し、その結果、断片状のミトコンドリアが増加した。ミトコンドリアの分裂促進はミトコンドリア由来の ROS を増加させ、細胞老化を誘導した。マイトファジーを抑制すると、分裂ミトコンドリアが増加し、ROS 産生も増加、細胞老化が促進した。COPD の肺組織ではミトコンドリアは断片状のミトコンドリアが多く、ミトコンドリア動態の変化、マイトファジーの低下が COPD 病態に関与する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

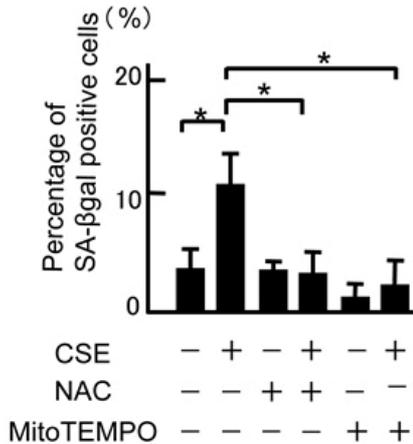
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4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 in press 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.

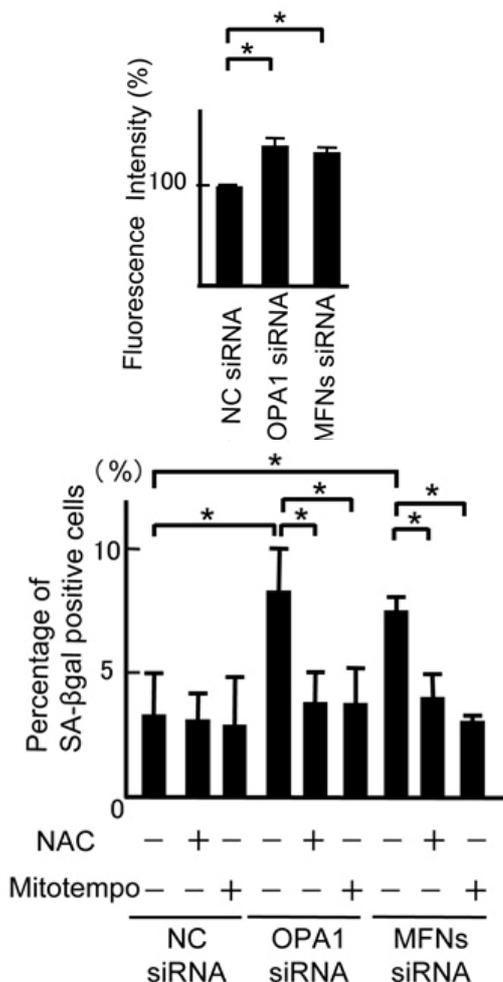
細胞老化



(2) ミトコンドリア分裂促進は ROS 産生を増加し、細胞老化を誘導する

ミトコンドリアの融合促進蛋白である OPA1、Mitofusin1,2 のノックダウンによりミトコンドリアの分裂を促進した。ミトコンドリアの分裂促進は ROS 産生を増加し、細胞老化を誘導した。抗酸化剤 (NAC、Mitotempo) はミトコンドリア分裂促進による細胞老化誘導を抑制した。

ミトコンドリア ROS



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

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

Araya J, Hara H, Kuwano K. Intern Med. 2013;52(20):2295-303.査読あり

〔学会発表〕(計2件)

日本呼吸器学会総会 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

原弘道 (HARA HIROMICHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 70398791

(2)研究分担者