

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460489

研究課題名(和文) プロテアソーム機能低下と老齢病態の形成に関する研究

研究課題名(英文) Dysfunction of proteasome and pathogenesis in age-related disorders

研究代表者

外丸 詩野 (Tomaru, Utano)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20360901

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)：老化によるプロテアソーム機能の低下はヒトを含む多くの動物種で観察されており、老化関連疾患の病態形成に関与していることが明らかになっている。ストレス応答に働くプロテアソームの機能異常はストレスに対する脆弱性を高め、変性タンパク質の蓄積、細胞老化を引き起こす。マウスモデルによる解析で、プロテアソーム機能低下マウスに短寿命や老化の表現型を認めた。本マウスに高脂肪食やタバコ煙等の環境因子を負荷すると、ヒト老化関連疾患に類似した脂肪代謝の異常や肺気腫を認めた。プロテアソームの機能低下は個体老化の重要な要因であり、様々な環境要因による細胞ストレスが相加的に疾患の病態形成に働くことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The proteasome plays a critical role in proteostasis by rapidly destroying misfolded and modified proteins generated by cellular stresses. Proteasome activity decreases with aging in many organs, and an age-related decline in proteasomal function has been implicated in various age-related pathologies. Recently, we have established a transgenic (Tg) mouse model with decreased proteasomal chymotrypsin-like activity, showing age-related phenotypes. Using this model, we demonstrate here that decreased proteasomal function accelerates cigarette smoke (CS)-induced pulmonary emphysema. CS-exposed Tg mice showed remarkable airspace enlargement and increased foci of inflammation compared with wild-type controls. Collective evidence suggests that CS exposure and impaired proteasomal activity coordinately enhance apoptotic cell death in the alveolar walls that may be involved in the development and progression of emphysema in susceptible individuals such as the elderly.

研究分野：実験病理

キーワード：プロテアソーム 老化 老化関連疾患 細胞ストレス 肺気腫

### 1. 研究開始当初の背景

プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を分解するための巨大なプロテアーゼ複合体であり、細胞周期や転写制御、シグナル伝達、ストレス応答、異常タンパク質の分解、免疫応答等、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。加齢に伴ってプロテアソーム機能が低下することが報告されているが、プロテアソームの機能低下は細胞ストレスに対する脆弱性を高めると考えられている。また、タンパク質代謝の異常による変性タンパク質凝集体の蓄積がアルツハイマー病等の神経変性疾患の病態に関連することが報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究は、申請者らが現在までに独自に作製したプロテアソーム活性を低下させたマウスを用いて、プロテアソーム機能の低下と老齢病態のメカニズムを明らかにする目的で行った。特に、加齢により発症リスクが高まる代表的疾患であり、現在までに有効な予防・治療法が開発されていない、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、老年期の神経的疾患 (記憶力障害等) の病態メカニズムを明らかにすることを目標とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 喫煙負荷マウスの作製

プロテアソーム機能低下マウス (5t-Tg) コントロールとして野生型 C57BL/6 の雄性、9 週齢、各 10 匹を用いた。喫煙曝露には SIS-CS system を用い、1 日 60 分の喫煙曝露 (5% cigarette smoke) を 5 日/週の曝露で、12 週間行った。喫煙負荷終了後に肺を主体にサンプリングを行い、組織学的解析及び分子生物学的な解析に用いた。アポトーシス細胞の検出には TUNEL 法を用いた。

#### (2) 肺構成細胞を用いた細胞ストレス試験

肺構成細胞として、肺線維芽細胞及び上皮細胞を用い、ニコチンとタールを除去したタバコ煙水抽出液 (CSE) を作製し、CSE、プロテアソーム阻害剤を単独、あるいは両方を添加し、アポトーシス細胞を annexin V、アポトーシス後期あるいはネクローシス細胞を annexin V/PI 陽性細胞として検討した。

#### (3) 行動解析

活動量や運動量をオープンフィールドテストで検討した。また、不安状態を測定する高架式十字迷路法による解析、痛覚検査、電気刺激によるストレス試験を定法により行った。

#### (4) 脳組織の解析

海馬領域を主体に、単位面積当りの神経細胞数をカウントした。

#### (5) ウェスタンブロット

組織は lysis buffer を加えて氷中にて homogenize し、15000 rpm 10 分遠心後、

上清をタンパク抽出液として調整した。タンパク抽出液に sample buffer を加えて 95℃、5 分ボイルし、サンプルを SDS-PAGE スクラブゲルにて 200V、約 60 分泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。転写後は室温にて、ブロッキング、一次抗体の反応、二次抗体の反応をそれぞれ 1 時間ずつ行った。洗浄は各反応後 10 分、TBS-T にて 3 回行った。最後に基質を 5 分反応後、露光して写真撮影を実施した。一次抗体の希釈には Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBOKU)、ブロッキング溶液と二次抗体の希釈には 2% スキムミルク TBS-T を用いた。二次抗体には HRP-conjugated anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch) を用いた。ストレスマーカー GRP78、アポトーシス関連分子 AIF 等の抗体を一次抗体として用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) COPD の病態メカニズム

野生型および 5t-Tg にタバコ煙負荷を行った結果、5t-Tg で有意な肺破壊や炎症浸潤を認めた。また、アポトーシス細胞を TUNEL 法により検討した結果、喫煙負荷を行った 5t-Tg に陽性細胞の増加を認めた。

喫煙による酸化ストレスとプロテアソーム機能がアポトーシス誘導に与える影響について、*in vitro* の解析を行った結果では、CSE 単独、プロテアソーム阻害剤単独のいずれでも annexin V 陽性細胞は増加したが、両負荷で有意に annexin V 陽性細胞が増加した。以上より、プロテアソーム機能の低下と喫煙による酸化ストレスは相乗的に細胞死を誘導することが推定された。

CSE 負荷時のアポトーシス誘導のメカニズムについて検討を行ったところ、CSE を添加した細胞では小胞体ストレスマーカーである GRP78 に加え、AIF の増加を認め、さらに AIF の核内移行を観察した。

ヒトの肺気腫組織では、肺胞構成細胞のアポトーシスや細胞老化を認めること、肺胞構成細胞のアポトーシスは細胞老化により進行する、という報告がある。COPD の病態において、喫煙による炎症、プロテアーゼ、活性酸素の誘導、細胞老化やアポトーシスが病態に関与していると考えられ、さらにはプロテアソーム機能の低下が病態形成に影響している可能性が考えられた。

#### (2) 老年期の神経的疾患の病態メカニズム

脳神経機能を検討する目的で行動解析を行ったところ、活動量や運動量をオープンフィールドテストでモニタリングした結果、野生型と 5t-Tg に差を認めなかった。また、不安状態を測定する高架式十字迷路法による解析、痛覚検査にも異常は認めなかった。しかしながら、電気刺激によるストレス試験を行った結果、電気刺激を記憶することで生じる刺激翌日と 2 日目のすくみ行動が 5t-Tg

で野生型に比べて少なく、学習・記憶力の低下を示唆する結果を得た。組織学的解析では、5t-Tgでは6ヶ月以降で海馬のCA1~2領域における単位面積辺りの神経細胞数の減少していた。現在、プロテアソームの機能低下が神経細胞死を誘導している可能性をふまえ、神経細胞死にかかわる分子メカニズムを検討している。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- 1 Yamada Y, Tomaru U, Ishizu A, Ito T, Kiuchi T, Ono A, Miyajima S, Nagai K, Higashi T, Matsuno Y, Dosaka-Akita H, Nishimura M, Miwa S, Kasahara M. Decreased proteasomal function accelerates cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in mice. *Lab Invest.* 2015;95(6):625-34. doi: 10.1038/labinvest.2015.43. (査読あり)
- 2 Tomaru U, Tsuji T, Kiuchi S, Ishizu A, Suzuki A, Otsuka N, Ito T, Ikeda H, Fukasawa Y, Kasahara M. Decreased expression of thymus-specific proteasome subunit 5t in Down syndrome patients. *Histopathology.* 2015;67(2):235-44. doi: 10.1111/his.12642. (査読あり)
- 3 Ando R, Noda K, Tomaru U, Kamoshita M, Ozawa Y, Notomi S, Hisatomi T, Noda M, Kanda A, Ishibashi T, Kasahara M, Ishida S. Decreased proteasomal activity causes photoreceptor degeneration in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(7):4682-90. doi: 10.1167/iovs.13-13272. (査読あり)
- 4 Yamada Y, Tomaru U, Ishizu A, Kiuchi T, Kasahara M, Matsuno Y. Expression of thymoproteasome subunit 5t in type AB thymoma. *J Clin Pathol.* 2014;67(3):276-8. doi: 10.1136/jclinpath-2013-201930. (査読あり)
- 5 Ströbel P, Hartmann E, Rosenwald A, Kalla J, Ott G, Friedel G, Schalke B, Kasahara M, Tomaru U, Marx A. Corticomedullary differentiation and maturational arrest in thymomas. *Histopathology.* 2014;64(4):557-66. doi: 10.1111/his.12279. (査読あり)
- 6 Tomaru U, Kasahara M. Thymo proteasome: role in thymic selection and clinical significance as a diagnostic marker for thymic epithelial tumors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013;61(5):357-65. doi: 10.1007/s00005-013-0234-1. (査読あり)

〔学会発表〕(計 15 件)

- 1 木内静香, 外丸詩野, 辻隆裕, 石津明洋, 鈴木昭, 大塚紀幸, 伊藤智樹, 池田仁, 深澤雄一郎, 笠原正典: ダウン症患者の胸腺におけるプロテアソームサブユニット 5t の発現低下. 第 34 回日本胸腺研究会, ユニコムプラザさがみはら(神奈川県・相模原市), 2015.2.7.
- 2 宮島祥太, 外丸詩野, 石津明洋, 木内静香, 大井智貴, 笠原正典: 胸腺 T 細胞選択におけるプロテアソームキモトリプシン様活性サブユニットの役割. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2015.4.30-5.2.
- 3 伊藤智樹, 外丸詩野, 大村優, 戸松留花, 石津明洋, 笠原正典: プロテアソーム機能低下マウスにおける記憶力障害の解析. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2015.4.30-5.2.
- 4 木内静香, 外丸詩野, 辻隆裕, 石津明洋, 鈴木昭, 大塚紀幸, 伊藤智樹, 池田仁, 深澤雄一郎, 笠原正典: ダウン症患者の胸腺におけるプロテアソームサブユニット 5t の発現低下. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2015.4.30-5.2.
- 5 安部樹太郎, 有賀茜, 外丸詩野, 木内静香, 石津明洋, 大塚紀幸, 清水知浩, 丸川活司, 松野吉宏, 笠原正典: Type B 胸腺腫、胸腺癌におけるカテプシンの発現. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2015.4.30-5.2.
- 6 木内静香, 外丸詩野, 石津明洋, 宮島祥太, 笠原正典: 胸腺 T 細胞におけるプロテアソームキモトリプシン様活性サブユニットの役割. 第 48 回北海道病理談話会(病理分科会), 札幌医科大学臨床第一講義室(北海道・札幌市), 2015.10.17.
- 7 Syota Miyajima, Utano Tomaru, Akihiro Ishizu, Shizuka Kiuchi and Masanori Kasahara: Aberrant expression of proteasomes affects thymic T cell selection. 第 44 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市), 2015.11.18-20.
- 8 木内静香, 外丸詩野, 紺野沙織, 石津明洋, 宮島祥太, 平川彩香, 笠原正典: 胸腺におけるプロテアソームキモトリプシン様活性サブユニットの発現と T 細胞選択. 第 103 回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANA クラウンプラザ(広島県・広島市), 2014.4.24-26.
- 9 伊藤智樹, 外丸詩野, 大村優, 石津明洋, 笠原正典: プロテアソーム機能異常と脳機能の低下. 第 103 回日本病理学会総会, 広島国際会議場・ANA クラウンプラザ(広島県・広島市), 2014.4.24-26.
- 10 伊藤智樹, 外丸詩野, 大村優, 戸松留花, 石津明洋, 笠原正典: プロテアソーム機能低下モデルマウスにおける脳機能障害の

解析. 第 47 回北海道病理談話会 (病理分科会), 旭川グランドホテル (北海道・旭川市), 2014.10.11.

- 11 Shizuka Kiuchi, Utano Tomaru, Saori Konno, Shota Miyajima, Akihiro Ishizu, Masanori Kasahara : Aberrant expression of proteasomal 5 subunit affects T cell repertoires in the thymus . 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会, 国立京都国際会館 (京都府・京都市), 2014.12.10-12.
- 12 紺野沙織, 外丸詩野, 岸本菜奈, 石津明洋, 笠原正典: プロテアソームの発現異常における免疫応答の変化. 第 102 回日本病理学会総会, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館 (北海道・札幌市), 2013.6.6-8.
- 13 紺野沙織, 外丸詩野, 石津明洋, 笠原正典: プロテアソームの発現異常による免疫応答の変化. 第 46 回北海道病理談話会 (病理分科会), 北海道大学 (北海道・札幌市), 2013.10.12.
- 14 外丸詩野: プロテアソームの機能異常と病理作用. 第 59 回日本病理学会秋期特別総会, 甲府富士屋ホテル (山梨県・甲府市), 2013.11.21-22.
- 15 Konno S, Tomaru U, Ishizu A, Kasahara M : Aberrant proteasomal expression affects T cell differentiation and functions . 第 42 回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ (千葉県・千葉市), 2013.12.11-13.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.path1-hokudai.jp/path1/Welcome.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

外丸 詩野 (TOMARU UTANO)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 20360901

### (2) 研究分担者

石津 明洋 (ISHIZU AKIHIRO)

北海道大学・大学院保健科学研究所・教授  
研究者番号: 60321957