

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 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：25461181

研究課題名(和文)肺線維化におけるプロテアソームの役割

研究課題名(英文)The role of proteasome in pulmonary fibrosis

研究代表者

長井 桂 (Nagai, Katsura)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：40374293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺線維症患者の気管支肺胞洗浄液(BALF)では健常群やサルコイドーシス患者と比較し20Sプロテアソーム活性が高い傾向があった。プロテアソーム活性の増加と肺線維症との関連が示唆された。一方、12週間の喫煙曝露を行ったプロテアソーム抑制マウスは野生型と比較し有意に気腔が拡大し、アポトーシス細胞の増加がみられ、プロテアソーム抑制は喫煙に対する肺胞破壊が増強することが示された。線維芽細胞はタバコ煙刺激後にプロテアソーム阻害薬を加えることによってアポトーシス細胞の増加がみられ小胞体ストレスも増加した。

研究成果の概要(英文)：The activity of 20S proteasome in bronchoalveolar labage fluid tend to be higher in the patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) than normal subjects or sarcoidosis patients. Increased proteasome activity suggests a link to fibrotic reaction. In contrast, cigarette smoke-exposed Tg mice with decreased proteasomal chymotrypsin-like activity showed remarkable air space enlargement and increased apoptotic cells compared with wild type controls. Impaired proteasomal activity also enhanced apoptosis and endoplasmic reticulum stress in cigarette smoke extract (CSE)-exposed fibroblastic cells.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

本邦では人口の高齢化に伴い呼吸器疾患が増加しており、呼吸器疾患の制御は重要な課題である。酸化ストレスの増加は慢性閉塞性肺疾患 (COPD) や肺線維症などの炎症性肺疾患で報告されている。肺線維症は高齢の男性に多く進行性で、中でも特発性間質性肺炎は平均生存期間 2.5~5 年と予後不良の疾患であり、呼吸困難で生活が著しく障害されるが、未だに有効な治療法はない。申請者は酸化ストレスを受けた蛋白の処理機構に注目するに至った。蛋白酸化は可逆的な酸化と不可逆的な酸化があるが、不可逆的な酸化蛋白の処理は主にユビキチン・プロテアソームシステムにより行われている。近年プロテアソーム活性と肺疾患の関係を示した論文が散見される。例えば、COPD 患者の肺や急性肺障害患者の BALF 中ではプロテアソーム活性の低下が報告されている。一方、肺線維症モデルマウスではプロテアソーム阻害薬により線維化が抑制されるという報告があり、プロテアソーム活性の増加と線維化の悪化が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、1) 臨床的側面からは、ヒトの肺線維症におけるプロテアソームの役割を検討することを目的とする。2) 基礎的研究として、*in vitro* においてプロテアソーム抑制時の各種肺細胞における線維化促進因子や抑制因子を調べる。3) プロテアソーム活性の低下したマウスを用いて、肺疾患モデルにおけるプロテアソームの線維化における役割について検討する。

3. 研究の方法

プロテアソームが肺の線維化に与える影響を明らかにするために、生体における肺線維症患者の BAL 液でのプロテアソーム活性や発現を調べ、予後に与える影響を検討する。動物実験ではブレオマイシン肺線維化モデルを作成し、プロテアソーム活性の低下した、特異的に 5t を発現させた Tg マウスと野生型を比較検討することで肺線維化抑制因子の検討を行う。

4. 研究成果

プロテアソームが肺の線維化に与える影響を明らかにするために、生体における肺線維症患者の気管支肺胞洗浄液 (BALF) でのプロテアソーム活性や発現を調べた。プロテアソーム活性は Proteasome-Glo™ assay systems, Promega を用いて 20S proteasome の発光強度をスタンダードとし BALF あたりの活性を測定した。プロテアソーム抑制薬なしの値とありの値の差を結果に用いた。特発性肺線維症患者 (IIP) 36 名、薬剤性肺障害患者 7 名、膠原病関連間質性肺炎 (CVD-IP) 23 名では Chymotrypsin-様活性は 3 群に変化がなかったものの、Trypsin-様活性と Caspase-様活性

は IIP 群や CVD-IP 群に比べて薬剤性肺障害群が有意に高値であった (Trypsin-様活性 $p < 0.001$, Caspase-様活性 $p = 0.006$)。健常者 17 名、サルコイドーシス患者 27 名および IIP 群の検討では有意ではなかったものの、IIP 群が他の 2 群に比べて Chymotrypsin-様活性が高い傾向があった ($p = 0.089$)。年齢とプロテアソーム活性には相関を認めなかったが、健常者 (53 ± 3 SE 歳)、サルコイドーシス (57 ± 2)、IIP (65 ± 2) と有意に IIP の年齢が高値であった。IIP 患者の BALF における Chymotrypsin-様活性が高い傾向であったことは、Chymotrypsin-様活性が肺線維化形成に何らかの影響を与えていると考えられる。薬剤性肺障害は IIP 群や CVD-IP 群と比べ Chymotrypsin-様活性は変わりなく Trypsin-様活性と Caspase-様活性が高値であったことは、プロテアソームの活性首座の変化が種類の異なる間質性肺炎の発症や障害メカニズムに影響している可能性がある。

喫煙刺激に対しプロテアソーム機能の抑制がどのような影響を及ぼすかを調べるため、C57BL/6 の野生型マウス (WT) もしくはプロテアソーム活性が減弱したトランスジェニックマウス (Tg) に 5%、60 分間の喫煙曝露 (柴田化学 SIS-CS) を週 5 日間で 12 週間行った。Mean linear intercept を測定すると喫煙曝露を行った Tg マウスは WT と比較し有意に気腔が拡大しており、プロテアソーム抑制は喫煙に対する肺胞破壊が増強することが示された。TUNEL 染色を行ったところ、Tg マウスでは WT と比較し有意にアポトーシス細胞の増加がみられた。そこで、プロテアソーム活性抑制の有無で喫煙刺激によるアポトーシスが異なるかどうかを検討した。Primary mouse lung fibroblast cell line, 皮下から分離した fibroblast をプロテアソーム阻害薬 (PS-341: 10nM) の有無で 32 時間プレインキュベートした後、1% タバコ煙抽出液を含む培地で 16 時間培養した。動物種別や採取した部位に関わらず、タバコ煙刺激後の fibroblast はプロテアソーム阻害薬を加えることによって annexin V 陽性細胞が増加した。しかし、primary 肺胞上皮細胞ではプロテアソーム阻害薬の有無で差はなかった。Tg マウスと WT マウスより採取した fibroblast を 1% タバコ煙抽出液で培養すると、Tg マウスから得られた fibroblast では WT と比較し annexin V 陽性細胞と propidium iodide 陽性細胞の陽性比率が増加していた。プロテアソーム活性低下ではタバコ煙という酸化ストレス下で aggresome formation も増加することが確認された。タバコ煙がもたらす細胞死のメカニズムを検討するため ER ストレスの指標を検討したところ、glucose-regulated protein 78 はタバコ煙を曝露した Tg マウスの fibroblast で増加していたが、caspase-3 は変化がなく、アポトーシスは caspase 非依存性経路で起こっている

と考えられた。

ブレオマイシン肺繊維化モデルにおけるプロテアソーム抑制マウスの線維化について見当するため、8週令の5t-Tgマウスおよび同腹のWild typeマウスに0.05 Uのブレオマイシンを経気管支投与した。5t-TgマウスではMasson-trichrome染色の染まりが弱くみられた。また、肺組織におけるTotal soluble collagenは5t-Tgマウスでは21日後にはブレオマイシン投与前の値と同じであったが、同腹のWTは高値を示した。Collagen 3 mRNA発現はWTマウスが高い傾向がみられたが、5t-Tgマウスはブレオマイシン経気管支投与による死亡回避が難しく統計的に有意な検討は困難であった。

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 37件)

Kawakami T, Yoon SY, Takeuchi S, Soma Y, Kuroha S, Yoshida S, Shida H, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A. Novel monoclonal antibodies that recognize both rat and mouse phosphatidylserine/prothrombin complexes. *Mod Rheumatol*. 2016;26:470-1. doi: 10.3109/14397595.2015.1054090. 査読あり。

Nakazawa D, Shida H, Kusunoki Y, Miyoshi A, Nishio S, Tomaru U, Atsumi T, Ishizu A. The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis. *J Autoimmun*. 2016;67:19-28. doi: 10.1016/j.jaut.2015.08.018. 査読あり。

Yoshida T, Yamashita K, Watanabe M, Koshizuka Y, Kuraya D, Ogura M, Asahi Y, Ono H, Emoto S, Mizukami T, Kobayashi N, Shibasaki S, Tomaru U, Kamachi H, Matsushita M, Shiozawa S, Hirono S, Todo S. The Impact of c-Fos/Activator Protein-1 Inhibition on Allogeneic Pancreatic Islet Transplantation. *Am J Transplant*. 2015;15:2565-75. doi: 10.1111/ajt.13338. 査読あり。

Honma R, Kinoshita I, Miyoshi E, Tomaru U, Matsuno Y, Shimizu Y, Takeuchi S, Kobayashi Y, Kaga K, Taniguchi N, Dosaka-Akita H. Expression of fucosyltransferase 8 is associated with an unfavorable clinical outcome in non-small cell lung cancers. *Oncology*. 2015;88:298-308. doi: 10.1159/000369495. 査読あり。

Tsuchisaka A, Kaneko S, Imaoka K, Ota

M, Kishimoto K, Tomaru U, Kasahara M, Ohata C, Furumura M, Takamori S, Morita E, Hashimoto T. Presence of autoimmune regulator and absence of desmoglein 1 in a thymoma in a patient with pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol*. 2015;173:268-71. doi: 10.1111/bjd.13617. 査読あり。

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;95:625-34. doi: 10.1038/labinvest.2015.43. 査読あり。

Maki K, Nagai K, Suzuki M, Inomata T, Yoshida T, Nishimura M. Temporal changes in glutaredoxin 1 and protein s-glutathionylation in allergic airway inflammation. *PLoS One*. 2015 Apr 13;10:e0122986. doi: 10.1371/journal.pone.0122986. eCollection 2015. 査読あり。

Nagai K, Makita H, Suzuki M, Shimizu K, Konno S, Ito YM, Nishimura M; Hokkaido COPD Cohort Study Investigators. Differential changes in quality of life components over 5 years in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015 13;10:745-57. doi: 10.2147/COPD.S77586. 査読あり。

Konno S, Taniguchi N, Makita H, Nakamaru Y, Shimizu K, Shijubo N, Fuke S, Takeyabu K, Oguri M, Kimura H, Maeda Y, Suzuki M, Nagai K, Ito YM, Wenzel SE, Nishimura M; Hi-CARAT Investigators. Distinct Phenotypes of Cigarette Smokers Identified by Cluster Analysis of Patients with Severe Asthma. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12:1771-80. doi: 10.1513/AnnalsATS.201507-4070C. 査読あり。

Iinuma C, Waki M, Kawakami A, Yamaguchi M, Tomaru U, Sasaki N, Masuda S, Matsui Y, Iwasaki S, Baba T, Kasahara M, Yoshiki T, Paletta D, Herrmann T, Ishizu A. Establishment of a vascular endothelial cell-reactive type II NKT cell clone from a rat model of autoimmune vasculitis. *Int Immunol*. 2015;27:105-14. doi: 10.1093/intimm/dxu088. 査読あり。

Honma R, Kinoshita I, Miyoshi E, Tomaru U, Matsuno Y, Shimizu Y, Takeuchi S, Kobayashi Y, Kaga K, Taniguchi N, Dosaka-Akita H.

Expression of Fucosyltransferase 8 Is Associated with an Unfavorable Clinical Outcome in Non-Small Cell Lung Cancers. *Oncology*. 2015;88:298-308. doi: 10.1159/000369495. 査読あり。

Shimizu K, Makita H, Hasegawa M, Kimura H, Fuke S, Nagai K, Yoshida T, Suzuki M, Konno S, Ito YM, Nishimura M. Regional bronchodilator response assessed by computed tomography in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Radiol*. 2015. pii: S0720-048X.00114-X. doi: 10.1016/j.ejrad.2015.02.022. 査読あり。

Suzuki M, Makita H, Östling J, Thomsen LH, Konno S, Nagai K, Shimizu K, Pedersen JH, Ashraf H, Bruijnzeel PL, Maciewicz RA, Nishimura M; Lower leptin/adiponectin ratio and risk of rapid lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11:1511-9. doi: 10.1513/AnnalsATS.201408-3510C. 査読あり。

Tsuchisaka A, Kaneko S, Imaoka K, Ota M, Kishimoto K, Tomaru U, Kasahara M, Ohata C, Furumura M, Takamori S, Morita E, Hashimoto T. Presence of autoimmune regulator and absence of desmoglein 1 in thymoma associated with a pemphigus foliaceus patient. *Br J Dermatol*. 2014. doi: 10.1111/bjd.13617. 査読あり。

Matsui Y, Tomaru U, Miyoshi A, Ito T, Fukaya S, Miyoshi H, Atsumi T, Ishizu A. Overexpression of TNF-converting enzyme promotes adipose tissue inflammation and fibrosis induced by high fat diet. *Exp Mol Pathol*. 2014;97:354-8. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.09.017. 査読あり

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 3;55:4682-90. doi: 10.1167/iovs.13-13272. 査読あり。

Hamano R, Baba T, Sasaki S, Tomaru U, Ishizu A, Kawano M, Yamagishi M, Mukaida N. Ag and IL-2 immune complexes efficiently expand Ag-specific Treg cells that migrate in response to chemokines and reduce localized immune responses. *Eur J Immunol*. 2014;44:1005-15. doi: 10.1002/eji.201343434. 査読あり。

- Araya N, Sato T, Ando H, Tomaru U, Yoshida M, Coler-Reilly A, Yagishita N, Yamauchi J, Hasegawa A, Kannagi M, Hasegawa Y, Takahashi K, Kunitomo Y, Tanaka Y, Nakajima T, Nishioka K, Utsunomiya A, Jacobson S, Yamano Y. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells. *J Clin Invest*. 2014;124:3431-42. doi: 10.1172/JCI75250. 査読あり。
- Yoshida T, Nagai K, Inomata T, Ito Y, Betsuyaku T, Nishimura M. Relationship between neutrophil influx and oxidative stress in alveolar space in lipopolysaccharide-induced lung injury. *Respir Physiol Neurobiol*. 2014.191:75-83. 査読あり。 doi: 10.1016/j.resp.2013.11.008.
- Matsui Y, Tomaru U, Miyoshi A, Ito T, Fukaya S, Miyoshi H, Atsumi T, Ishizu A. Overexpression of TNF-converting enzyme promotes adipose tissue inflammation and fibrosis induced by high fat diet. *Exp Mol Pathol*. 2014;97:354-8. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.09.017. 査読あり。
- 21 Imamoto T, Nakazawa D, Shida H, Suzuki A, Otsuka N, Tomaru U, Ishizu A. Possible linkage between microscopic polyangiitis and thrombosis via neutrophil extracellular traps. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32:149-50. 査読あり。
- 22 Imamoto T, Nakazawa D, Shida H, Suzuki A, Otsuka N, Tomaru U, Ishizu A. Ag and IL-2 immune complexes efficiently expand Ag-specific Treg cells that migrate in response to chemokines and reduce localized immune responses. *Eur J Immunol*. 2014;44:1005-15. doi: 10.1002/eji.201343434. 査読あり。
- 23 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 ;67:276-8. doi: 10.1136/jclinpath-2013-201930. 査読あり。
- 24 Tomaru U, Kasahara M. Thymoproteasome: role in thymic selection and clinical significance as a diagnostic marker for thymic epithelial tumors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013;61:357-65. doi: 10.1007/s00005-013-0234-1. 査読あり

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), 2015.11.18-20
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 (名古屋県・名古屋), 2015.4.30-5.2
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 (名古屋県・名古屋), 2015.4.30-5.2
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 (名古屋県・名古屋), 2015.4.30-5.2
Shizuka Kikuchi, 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) 2014.12.10
木内静香、外丸詩野、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、ANA クラウンプラザ (広島県・広島) 2014.4.24
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) 2013.11.21
Maki K, Nagai K, Suzuki M, Inomata T, Yoshida T, Nishimura M. Relationships between glutaredoxin 1 and cytokine levels in a murine model of allergic airway inflammation. the European Respiratory Society's 23rd Annual Congress. Internationales Congress Center (Barcelona・Spain)2013.9.7
眞木 賀奈子、長井 桂、鈴木 雅、猪又崇志、吉田貴之、西村正治。アレルギー性気道炎症における グルタレドキシニン 1 とサイトカインの検討。第 12 回肺サーファクタント分子病態研究会。札幌医科大学 (北海道・札幌) 2013.6.22
外丸詩野: プロテアソームの機能異常と病態 第 102 回日本病理学会総会 ロイ

トン札幌 (北海道・札幌) 2013.6.6

〔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
長井 桂 (NAGAI, Katsura)
北海道大学・医学研究科 (研究院)・客員研究員
研究者番号: 40374293

(2) 研究分担者
外丸 詩野 (TOMARU, Utano)
北海道大学・医学研究科 (研究院)・准教授
研究者番号: 20360901

(3) 連携研究者
()

研究者番号: