

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09231

研究課題名(和文) LaminB1が制御する細胞老化と慢性閉塞性肺疾患

研究課題名(英文) Involvement of Lamin B1 reduction in accelerated cellular senescence during COPD pathogenesis.

研究代表者

荒屋 潤 (Jun, Araya)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90468679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)は喫煙を原因とし、細胞老化の亢進が病態に關与する。LaminB1の発現低下は、細胞老化進展で重要である。我々は、喫煙刺激がLaminB1発現を低下させ、Deptor発現抑制によりmTORを活性化することで細胞内ミトコンドリア量を増加させ、細胞老化を誘導することを見出した。またCOPD患者肺ではLaminB1発現が低下し、呼吸機能の低下と正相関することを明らかにした。LaminB1の発現低下が細胞老化の亢進によりCOPD病態進展に關与する可能性が示唆された。

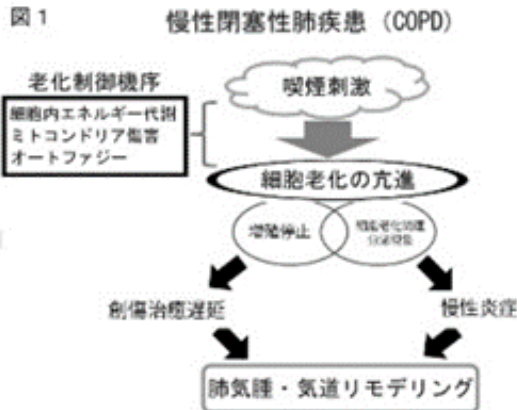
研究成果の概要(英文)：Accelerated cellular senescence has been implicated in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) pathogenesis. Downregulation of lamin B1 has been recognized to be a crucial step for development of full senescence. We showed that laminB1 was reduced by cigarette smoke (CS) and lamin B1 reduction was linked to mTOR activation through Deptor downregulation, resulting in accelerated cellular senescence. Aberrant mTOR activation was associated with increase in mitochondrial mass. Lamin B1 protein levels in lung homogenates showed positive correlations with pulmonary function tests. These findings suggest that lamin B1 reduction is involved in the mechanisms for progression of cellular senescence during COPD pathogenesis through aberrant mTOR activation.

研究分野：医歯薬学・内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：細胞老化 オートファジー mTOR Lamin B1 Deptor

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、喫煙による慢性進行性の気流閉塞を特徴とする治療抵抗性の呼吸器疾患である。加齢は COPD 発症の危険因子であり、細胞老化の亢進を重要な病態とする老化関連呼吸器疾患である。我々はこれまで、COPD 病態における細胞老化の亢進及び制御機構とその役割に関して、細胞内エネルギー恒常性やミトコンドリア傷害、さらにはそれらの制御に関する細胞内蛋白分解系であるオートファジーとの関連性から検討を行ってきた(図 1)。



幹細胞を含む細胞老化の亢進は細胞増殖治癒能の低下と、サイトカインや成長因子を過剰に産生する senescence-associated secretory phenotype (SASP)により、老化関連病態における発癌や組織再構築障害リモデリングと、最終的な機能障害に参与する(図 1)。COPD 病態において mammalian target of rapamycin (mTOR)の活性化が細胞老化の制御に参与する可能性が報告されているが、その活性化機序の詳細は明らかでない。

細胞老化は複雑な細胞表現型であり、経時的に、また段階的に進展し、その段階により表現型と役割は異なることが明らかとなった。この細胞老化の段階的な進展に参与し、その発現低下が不可逆かつ最終段階の細胞老化の指標となる蛋白質として、核ラミナを構成する laminB1 の役割が注目されている。核膜の裏打ち構造である核ラミナは、核構造の維持だけでなく、DNA 複製、修復、転写、細胞分裂、さらにはエピジェネティックな遺伝情報発現の制御など様々な細胞過程で重要な役割を果たす。核ラミナを構成する蛋白質として laminA(体細胞系のみ) /C、laminB1、B2、B3(生殖細胞系のみ)があり、特に laminA の遺伝子変異は早老症であるハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群(HGPS)の原因となることが知られている。一方 laminB1 の欠損は致死的と考えられ、発現低下による先天異常の報告はない。近年老化した細胞で laminB1 発現が低下し、不可逆的な細胞老化進展の指標となり、かつエピジェネティックな遺伝情報発現の制御により SASP にも参与する可能性が報告された。しかしながら、COPD 病態での喫煙による細胞

老化亢進や、老化細胞の機能的変化への laminB1 発現低下の関与は明らかでない。

2. 研究の目的

COPD 病態における喫煙誘導性細胞老化亢進とその機能的変化への、laminB1 発現の影響を、mTOR 活性化制御の点から明らかにすることを目的に、検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた検討: 肺癌手術患者由来の肺組織の正常部分より分離した気道上皮細胞を検討に用いた。Cigarette Smoke Extract(CSE)によるタバコ刺激を行い、laminB1 発現と細胞老化亢進と SASP に与える影響を検討した。細胞老化は SA- $\beta$ -gal 染色、p21 の発現、Histone H2AX 染色により評価した。SASP に関しては、代表的なサイトカインである interleukin(IL)- 8 発現を検討した。laminB1 発現低下の機序として、プロテアソームとオートファジーの関与を評価した。laminB1 の siRNA によりノックダウンし、laminB1 が CSE により誘導される細胞老化に与える影響を、mTOR 活性化とオートファジー活性化、さらにミトコンドリア量と活性化酸素(ROS)発現と与える影響から検討した。

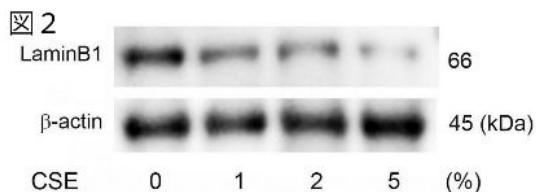
(2) マウスを用いた検討: 6~10 週齢マウス(C57BL/6)を使用し、小動物用暴露吸入システム付属の WholeBody チャンバーにて COPD マウスモデルを作成する。喫煙群はチャンパー内でタバコ 1 日 5 本を週 5 日間計 24 週にわたって喫煙暴露する。肺の摘出を行い、ホルマリン固定標本と凍結標本を作成する。ホルマリン固定肺は Hematoxylin-Eosin、EVG 染色により肺気腫を評価し、免疫染色により laminB1、p-S6K、Ubiquitin、p62 発現を評価した。凍結切片を用いて、細胞老化(Histone H2AX)を検討し、さらに肺ホモジネートを作成し、ウエスタンブロットによりミトコンドリア量も評価した。

(3)患者肺組織を持ちいた検討: 肺生検および肺癌の手術によって得られた癌病変を含まない肺組織(凍結、ホルマリン固定、グルタルアルデヒド固定)を用いて(正常、non-COPD smoker、COPD)検討を行った。laminB1 及び p-S6K の発現は免疫組織学的に評価した。細胞老化は、Histone H2AX 染色により検討した。グルタルアルデヒド固定標本は電子顕微鏡によるミトコンドリア量の検討に用いた。免疫組織学的な蛋白発現の検討結果は、超音波破砕法で作成した肺組織ホモジネートを用いた western blotting 法で確認した。肺ホモジネートでの laminB1 発現量を、COPD 患者の各種臨床所見(年齢、喫煙歴、呼吸機能検査)との関連性から比較検討した。

4. 研究成果

(1) CSE によるオートファジー活性が laminB1 発現低下に關与する

CSE 刺激は濃度依存性に laminB1 発現を低下させた(図 2)。laminB1 発現低下の機序をプロテアソームとオートファジーの關与から検討した。CSE 刺激はオートファジーを一過性に誘導し、ATG5 のノックダウンによりオートファジーを阻害すると、CSE による laminB1 発現低下が抑制された。また免疫沈降による検討から LC3B と laminB1 の結合が示され、さらに共焦点顕微鏡での検討から LC3B と laminB1 の共局在が示された。以上検討から CSE 刺激によるオートファジー活性化が、laminB1 発現低下に關与する可能性が示唆された。



(2) LaminB1 ノックダウンは、CSE 誘導性細胞老化を亢進させる: ヒト気道上皮細胞で laminB1 をノックダウンすると、mTOR の活性化を認めた。そこで、laminB1 ノックダウンによる mTOR 複合体蛋白発現の検討を行った。結果 mTOR 複合体の構成要素であり、かつ mTOR 活性の重要な阻害因子である、Deptor の発現低下を認めた。Deptor の発現低下は、mRNA でも確認された。laminB1 ノックダウンは、mTOR 活性化とともに CSE 刺激によるオートファジー誘導を抑制し、さらにミトコンドリア合成の重要な転写因子のコファクターである PGC-1β 発現誘導が明らかとなった。同時にミトコンドリア量と ROS の増加も認められたため、不十分なミトファジーと合成亢進によるミトコンドリア増加が細胞老化亢進に關与する可能性が示唆された。

さらに、Deptor をノックダウンすると mTOR の活性化を認め、喫煙により誘導されるオートファジーが阻害され、PGC-1β 発現が亢進し、ミトコンドリア量と ROS の増加も認めた。つまり laminB1 低下は、Deptor 発現抑制により mTOR を活性化することでミトコンドリア量と ROS と細胞老化を制御している可能性が示唆された。

(3) 喫煙曝露マウスモデルでも laminB1 の発現は低下し細胞老化は亢進した: 6 か月間の喫煙曝露により COPD モデルを作成した。COPD 表現型は気腫性変化と気道壁の肥厚から示された。マウス肺のホモジネートでの laminB1 の発現は喫煙曝露により低下し、免疫組織学的にも特に気道上皮細胞における発現低下を認めた。また Deptor 発現は低下し、p6 と ubiquitin 発現でみるオートファジー分解は不十分となっており、同時に mTOR 活性化に指標となる p-S6K の発現を認めた。マウス肺のホモジネートでは PGC-1β とミト

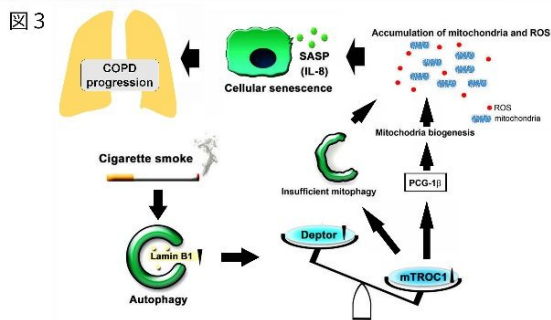
コンドリア量の増加を認めた。細胞老化の指標である p21 とヒストン H2AX の発現亢進を認めた。つまり喫煙マウスモデルでも、laminB1 発現低下が mTOR を活性化し、オートファジー阻害とミトコンドリア合成により、細胞老化を亢進させ、COPD 病態進展に關与する可能性が示唆された。

(4) COPD 肺の気道上皮細胞では laminB1 発現が低下し、laminB1 発現量は呼吸機能と正相関する

免疫組織学的な検討では COPD 肺の気道上皮細胞において、LaminB1 の核膜裏打ち構造が不明瞭となっていた。COPD 肺ホモジネートでも LaminB1 発現は低下し、呼吸機能の一秒率と正相関を示した。また COPD 肺組織でも、Dptor 発現低下と mTOR 活性化が示され、同時に PGC-1β とミトコンドリア量の増加を認めた。

(結論)

以上より COPD 病態では lamin B1 発現が低下しており、その機序にオートファジー分解の關与すること。また lamin B1 が Deptor 制御により mTOR 活性化を調整している可能性が示された。さらに mTOR がミトファジー制御と PGC-1β を介した合成により、ミトコンドリア量と ROS を調整し、細胞老化を制御することが示された。Lamin B1 低下が COPD 病態における mTOR 活性化と細胞老化亢進に關与する可能性が示唆された(図 3)。



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 6 件)

Lee JM, Yoshida M, Kim MS, Lee JH, Baek AR, Jang AS, Kim DJ, Minagawa S, Chin SS, Park CS, Araya J, Kuwano K, Park SW. Involvement of Alveolar Epithelial Cell Necroptosis in IPF Pathogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018 Feb 14. doi: 10.1165/rcmb.2017-00340C. 査読あり

Tsubouchi K, Araya J, Minagawa S, Hara H, Ichikawa A, Saito N, Kadota T, Sato N, Yoshida M, Kurita Y, Kobayashi K, Ito S,

Fujita Y, Utsumi H, Yanagisawa H, Hashimoto M, Wakui H, Yoshii Y, Ishikawa T, Numata T, Kaneko Y, Asano H, Yamashita M, Odaka M, Morikawa T, Nakayama K, Nakanishi Y, Kuwano K. Azithromycin attenuates myofibroblast differentiation and lung fibrosis development through proteasomal degradation of NOX4. *Autophagy*. 2017 Aug 3;13(8):1420-1434. 査読あり

Kurita Y, Araya J, Minagawa S, Hara H, Ichikawa A, Saito N, Kadota T, Tsubouchi K, Sato N, Yoshida M, Kobayashi K, Ito S, Fujita Y, Utsumi H, Yanagisawa H, Hashimoto M, Wakui H, Yoshii Y, Ishikawa T, Numata T, Kaneko Y, Asano H, Yamashita M, Odaka M, Morikawa T, Nakayama K, Kuwano K. Pirfenidone inhibits myofibroblast differentiation and lung fibrosis development during insufficient mitophagy. *Respir Res* 2017 Jun 2;18(1):114. 査読あり

Kobayashi K, Araya J, Minagawa S, Hara H, Saito N, Kadota T, Sato N, Yoshida M, Tsubouchi K, Kurita Y, Ito S, Fujita Y, Takasaka N, Utsumi H, Yanagisawa H, Hashimoto M, Wakui H, Kojima J, Shimizu K, Numata T, Kawaishi M, Kaneko Y, Asano H, Yamashita M, Odaka M, Morikawa T, Nakayama K, Kuwano K. Involvement of PARK2-Mediated Mitophagy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis. *J Immunol*. 2016 Jul 15;197(2):504-16. 査読あり

Fujita Y, Araya J, Ito S, Kobayashi K, Kosaka N, Yoshioka Y, Kadota T, Hara H, Kuwano K, Ochiya T. Suppression of autophagy by extracellular vesicles promotes myofibroblast differentiation in COPD pathogenesis. *J Extracell Vesicles*. 2015 Nov 11;4:28388. 査読あり

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 T, Harada T, Nishimura SL, Kaneko Y, Nakayama K, Kuwano K. PARK2-mediated mitophagy is involved in regulation of HBEC senescence in COPD pathogenesis. *Autophagy*. 2015;11(3):547-59. 査読あり

〔学会発表〕(計 6件)

日本呼吸器学学会総会 2015年4月  
American Thoracic Society International

Conference. Denver. 2015.

日本呼吸器学学会総会 2016年4月  
American Thoracic Society International  
Conference. San Francisco. 2016.

日本呼吸器学学会総会 2017年4月  
The European Respiratory Society  
International Congress. Milano 2017.

〔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

荒屋 潤 (Araya Jun)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90468679

### (2) 研究協力者

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

### (3) 研究協力者

伊藤 三郎 (Ito Saburo)  
東京慈恵会医科大学・医学部・大学院生

斎藤 那由多 (Saito Nayuta)  
東京慈恵会医科大学・医学部・大学院生