

平成 30 年 5 月 31 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：15K09232

研究課題名(和文) 老化関連肺疾患におけるエクソソーム中 microRNAによる細胞間情報伝達

研究課題名(英文) Intracellular communication mediated by exosomal micro RNA in aging-related lung diseases

研究代表者

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

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)：本研究は、COPD及びIPFの病態におけるエクソソームの関与を、気道上皮細胞と線維芽細胞の相互作用に注目し明らかにすることを目的とした。喫煙刺激によって老化した気道上皮細胞由来のエクソソーム中のmiR210は、筋線維芽細胞分化を促進した。IPFの線維芽細胞由来のエクソソームは、気道上皮細胞に細胞老化、ミトコンドリア機能不全をもたらした。エクソソーム中のmiRNAにたいしてマイクロアレイを行い、細胞老化とミトコンドリア機能不全をもたらすmiRNAを同定した。ミトコンドリア機能不全は、SIRT3に対する阻害作用を介していた。

研究成果の概要(英文)：COPD and IPF are chronically progressive and lethal lung diseases. Extracellular vesicles (EVs), including exosome and microvesicle, are recognized as important mediators of intercellular communication. We investigated the involvement of EV-mediated intercellular communication between lung fibroblasts (LFs) and human bronchial epithelial cells (HBECs) in COPD and IPF pathogenesis. We confirmed that they were internalized when incubated with HBECs or fibroblasts. Cigarette smoking extracts (CSE) induced cellular senescence in HBEC. EVs derived from senescent HBEC induced myofibroblast differentiation. We identified miR210 in exosome derived from senescent HBEC as an effector miRNA. EVs derived from IPF-LFs induced mitochondrial dysfunction and ROS accompanied by cellular senescence in HBECs. Three upregulated EV miRNAs from IPF-LF regulated cellular senescence and mitochondrial dysfunction via targeting SIRT3 in HBEC.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：細胞老化 ミトコンドリア エクソソーム 慢性閉塞性肺疾患 特発性肺線維症

1. 研究開始当初の背景

代表的な呼吸器疾患である慢性閉塞性肺疾患(COPD)と特発性肺線維症(IPF)は、いずれも加齢に伴い発症が増加する老化関連呼吸器疾患である。両者の病態には、細胞老化の亢進および細胞老化随伴分泌現象 (senescence-associated secretory phenotype: SASP) が関与すると考えられている。特に、タバコ煙などの外界の刺激を受ける気道上皮細胞の細胞老化亢進がいずれの病態でも報告されているが、分子生物学的な制御機構はいまだ明らかでない。

COPD 病態において気道リモデリングは閉塞性呼吸機能障害の主な原因であり、病理学的に気道の線維性肥厚を呈する。また、IPF 病態では慢性かつ進行性の線維化を呈する。これら分子生物学的機序は未だ不明な点が多いが、線維芽細胞と、気道上皮細胞をはじめとしたパラクラインファクターを介する細胞間相互作用が寄与している可能性がある。

近年、100nm 前後の細胞外小胞であるエクソソームは、従来のサイトカインやケモカインなどに加わる新たな細胞間情報伝達物質として注目されている。エクソソームはマイクロ RNA(miRNA)を始めとした核酸やタンパク質、代謝産物を内包し、それら分子は受容側の細胞で機能することが証明された。また、低酸素や酸化ストレスといった細胞の置かれた環境によって、エクソソームの内包物のプロファイルが変化する。加えてがん細胞など各疾患の原因に寄与する細胞が分泌するエクソソームは、その疾患特異的な分子を内包している。以上から、エクソソームは恒常性や様々な病態形成に関与すると考えられている。

以上の背景から、COPD 及び IPF 病態において、エクソソームを介した気道上皮細胞と線維芽細胞の相互作用が病態形成に関与する可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、COPD 及び IPF の病態におけるエクソソームの関与を、気道上皮細胞と線維芽細胞の相互作用に注目し明らかにすることを目的とする。

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ヒト気道上皮細胞 (HBE) と線維芽細胞 (LF) を用いた。喫煙刺激には 1% cigarette smoke extract (CSE) を用いた。エクソソームは超遠心法にて回収した。エクソソームはエクソソームマーカー (CD63, CD9), Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) で評価した。エクソソームから miRNeasy RNA isolation kit (Qiagen) を用いてマイクロ RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。筋線維芽細胞分化は  $\alpha$ -SMA, collagen type I の発現で評価した。細胞老化は

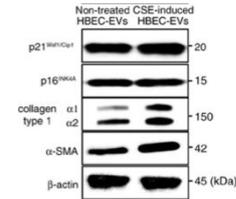
senescence-associated  $\beta$  gal (SA-gal) 染色と p16, p21 の発現で評価した。

4. 研究成果

(1) COPD 病態における気道上皮由来エクソソーム中 miRNA の役割解明

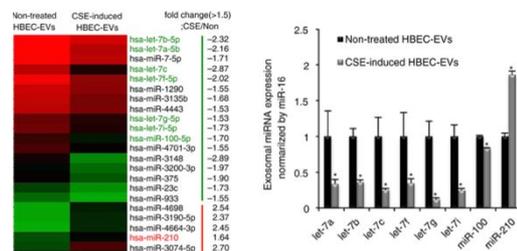
(1-1) 喫煙刺激した気道上皮細胞由来エクソソームは筋線維芽細胞分化を誘導した

HBE に 1% CSE を加えたエクソソームを線維芽細胞に添加したところ、筋線維芽細胞分化を誘導した。



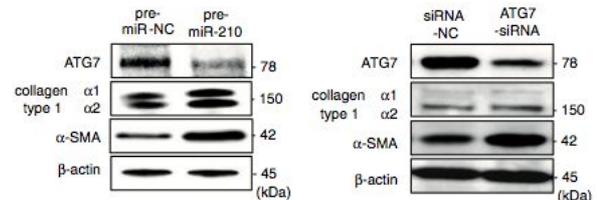
(1-2) 喫煙刺激により気道上皮細胞由来エクソソーム中で miR-210 の存在量が増加した

miRNA マイクロアレイ解析を用いて、エクソソーム内マイクロ RNA 発現プロファイルを検討した。変化のあったマイクロ RNA を qRT-PCR にて再度検証したところ、miR-210 のエクソソーム内での存在量が有意に増加した。



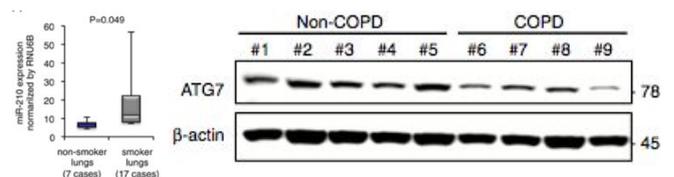
(1-3) miR-210 は ATG7 を介して筋線維芽細胞分化を誘導した

miR-210 はオートファジーに関与する ATG7 を直接標的とし発現を抑制した。オートファジーの低下は筋線維芽細胞分化に関与した。



(1-4) 喫煙患者肺では miR-210 量が増加し、ATG7 発現は低下した

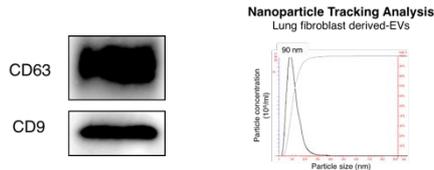
喫煙 非喫煙患者肺から RNA を抽出し miR-210 量を qRT-PCR にて測定したところ、喫煙患者で増加していた。ATG7 の発現を COPD 非 COPD 患者肺で Western blot 法にて確認したところ低下を認めた。



**(2) IPF 病態における線維芽細胞由来エクソソーム中 miRNA の役割解明**

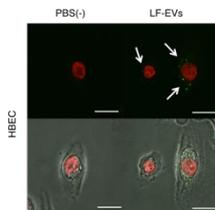
**(2-1) IPF 患者線維芽細胞由来エクソソーム回収**

IPF 患者線維芽細胞から回収したエクソソームをエクソソームマーカー (CD63, CD9) 及び NTA にて評価したところ, 100nm 前後の小胞を認めた。



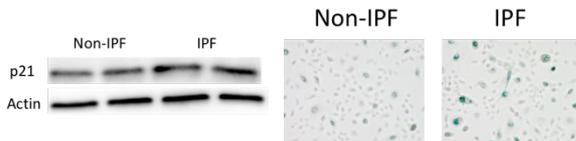
**(2-2) 線維芽細胞由来エクソソームは気道上皮細胞へ取り込まれる**

線維芽細胞由来エクソソームを PKH67 でラベルし気道上皮細胞に添加したところ, 6 時間後には気道上皮細胞内に取り込まれることを確認した。



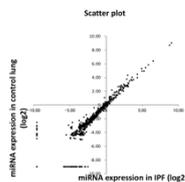
**(2-3) IPF 患者線維芽細胞由来エクソソームは気道上皮の細胞老化を誘導した**

IPF 患者と非 IPF 患者の線維芽細胞由来エクソソームを気道上皮細胞へ添加したところ, IPF 患者由来エクソソームでより細胞老化が亢進した。



**(2-4) IPF 患者線維芽細胞由来エクソソーム内マイクロ RNA の発現プロファイルの検討**

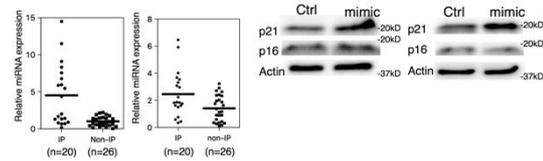
MiRNA マイクロアレイ解析にて IPF 患者線維芽細胞由来エクソソーム内マイクロ RNA の発現プロファイルを検討したところ, 複数のマイクロ RNA で変化を認めた。



**(2-5) 線維芽細胞由来エクソソーム内 miR-X, -Y の存在量が IPF 患者で増加し, 気道上皮細胞の細胞老化を誘導した**

マイクロアレイ解析で変化を認めた miRNA を qRT-PCR 法で再度検証を行った。存在量が増

加し有意差を認めた miRNA を気道上皮細胞において過剰発現させたところ, miR-X, -Y で細胞老化が誘導された。



**(2-6) miR-X, Y は共に遺伝子 Z を直接抑制し, Z の抑制は細胞老化を誘導した**

Mir-X, Y の標的遺伝子を検討したところ, 共に遺伝子 Z を抑制することが判明した。その遺伝子 Z は抑制することで細胞老化が亢進した。



**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9件)

1. 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. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015 Nov 11;4:28388.
2. Fujita Y, Araya J, Ochiya T. Extracellular vesicles in smoking-related lung diseases. *Oncotarget*. 2015 Dec 22;6(41):43144-5.
3. Fujita Y, Kosaka N, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis. *Trends in Molecular Medicine*. 2015 Sep;21(9):533-42.
4. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016 Oct 27;17(11). pii: E1801.
5. Kadota T, Yoshioka Y, Fujita Y, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular vesicles in lung cancer-From bench to bedside; *Semin Cell Dev Biol*, 67:39-47, 2017
6. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Kuwano K, Ochiya T. Emerging role of extracellular vesicles as a senescence-associated secretory phenotype: Insights into the pathophysiology of lung diseases. *Mol Aspects Med*. 2018 Apr;60:92-103. Epub 2017 Nov 20.
7. Fujita Y, Kadota T, Araya J, Ochiya T, Kuwano K. Extracellular Vesicles: New

Players in Lung Immunity; Am J Respir Cell Mol Biol. 2017 Nov 8.

8. 藤田雄, 吉岡祐亮, 荒屋潤, 桑野和善, 落谷孝広. COPDにおける細胞外小胞顆粒・エクソソームによる病態制御. 呼吸 34(9): 863-868, 2015.

9. 藤田雄, 荒屋潤, 桑野和善. エクソソームと心肺血管疾患. 血管医学 16(2): 141-147, 2015.

〔学会発表〕(計4件)

1. Tsukasa Kadota, Yu Fujita, Yusuke Yoshioka, Jun Araya, Saburo Ito, Kenji Kobayashi, Hiromichi Hara, Kazuyoshi Kuwano, Takahiro Ochiya. Suppression of autophagy by extracellular vesicles promotes myofibroblast differentiation in COPD pathogenesis. ISEV2016 Annual Meeting. 4-7 May, 2016.

2. Tsukasa Kadota, Yu Fujita, Yusuke Yoshioka, Jun Araya, Kazuyoshi Kuwano, Takahiro Ochiya. The role of extracellular vesicles in COPD. 3rd International Conference on Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 11-12 July, 2016.

3. Tsukasa Kadota, Yusuke Yoshioka, Yu Fujita, Jun Araya, Kazuyoshi Kuwano, Takahiro Ochiya. Myofibroblasts derived extracellular vesicles promotes epithelial cell senescence in idiopathic pulmonary fibrosis. ISEV2017 Annual Meeting. 18-21 May, 2017.

4. 門田幸, 吉岡祐亮, 荒屋潤, 桑野和善, 落谷孝広. 特発性肺線維症における細胞外小胞内マイクロ RNA の病態制御機構の解明. JSEV2017. 2017年8月30日-9月1日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (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