

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09545

研究課題名(和文) 肺胞マクロファージの小胞体ストレスは肺線維化の治療ターゲットとなりうるか

研究課題名(英文) Can endoplasmic reticulum stress on alveolar macrophages be a therapeutic target for lung fibrosis?

研究代表者

森本 浩之輔 (MORIMOTO, Konosuke)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：50346970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アポトーシス細胞の貪食除去の抑制が、慢性呼吸器疾患と肺の繊維化の病態にどのように影響しているのかを研究した。まずマクロファージ cell line、マウスの肺胞マクロファージを用いて、喫煙などにより生じる小胞体ストレスがアポトーシス細胞クリアランスを抑制することを明らかにした。肺の慢性疾患の発症に関連していると考えられている喫煙は、肺胞マクロファージに小胞体ストレスを生じ、これに反応して unfolded protein response 蛋白である PERK-eIF2 経路を介して RhoA を活性化し、アポトーシスの貪食除去を抑制していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺気腫や肺線維症などの慢性肺疾患は、進行性に悪化し現在の医療では健康な肺に戻すことは不可能である。これまで炎症を抑制する薬剤や線維化を直接抑制する薬剤が開発され、試されてきているが満足できる効果は得られていない。本研究では肺の炎症終息時に生じる死んだ細胞(アポトーシス)をいかに速やかに処理できるかがこのような疾患の発生機序に重要であるという仮説のもと研究を行なった。アポトーシス細胞を除去するマクロファージの処理機能が、喫煙などにより生じた小胞体ストレスによって抑制された。このような疾患と関連する細胞の機能異常のメカニズムを明らかにすることは、難治な疾患の創薬や、より詳細な疾患の理解に繋がる。

研究成果の概要(英文)：We studied how impaired removal of apoptotic cells contribute to the pathogenesis of chronic respiratory disease and fibrosis of the lung. First, using macrophage cell lines and mouse alveolar macrophages, we showed that endoplasmic reticulum (ER) stress inhibited apoptotic cell clearance via activation of RhoA. ER stress caused by cigarette smoke induced unfolded protein responses (UPR). We proved that ER stress inhibited apoptotic cell clearance through PERK-eIF2, one of UPR pathways.

研究分野：細胞生物学

キーワード：肺胞マクロファージ アポトーシス efferocytosis 小胞体ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変異蛋白の産生や、急性炎症などでの過剰な蛋白の産生により誘導される小胞体ストレスは、その防御機構である蛋白質恒常性(以下, proteostasis)維持機構が破綻するとその細胞機能が損なわれ、糖尿病、動脈硬化、神経疾患、炎症性腸疾患など様々な慢性疾患の原因となることが知られている¹。呼吸器領域においても、*SFTPC* や *CFTR* の変異蛋白の蓄積から上皮に生じた小胞体ストレスが、それぞれ肺線維症や嚢胞性線維症の主要な原因ということが分かってきた。また喫煙により II 型肺胞上皮に生じた小胞体ストレスがアポトーシスや炎症惹起を介して肺気腫の原因となること²も報告され、小胞体ストレスは肺線維症や肺気腫などの慢性肺疾患の新しい治療ターゲットとなる可能性が高い³。

肺胞マクロファージ(以下, AM)は気腔における最も重要な細胞の一つである。II 型肺胞上皮のみならず、喫煙や粉塵吸入などによって生じた小胞体ストレスは AM においても重要である。したがって、小胞体ストレスによる AM の機能の変調を明らかにすることは、慢性肺疾患のメカニズムの理解につながるはずである。しかし動脈硬化におけるマクロファージの研究とは対照的に、AM に生じる小胞体ストレスは全く研究されてこなかった。

研究代表者はこれまで、AM を中心として肺の炎症終息と組織修復について研究を継続してきた。この中で AM はアポトーシス好中球を貪食(以下, efferocytosis)し、炎症を終息させ同時に肝細胞増殖因子(以下, HGF)を産生して傷害された肺胞上皮を再生すること⁴、efferocytosis に Rho-GTPase の RhoA の制御が重要であること⁵などを通じ、efferocytosis の障害が慢性肺疾患の一因であることを解明してきた。中でも、肺線維症患者において efferocytosis が抑制されていることを明らかにしたこと⁶と、アスベストによって生じる小胞体ストレスが肺の線維化に関与しているとの報告があり⁷、小胞体ストレスによる AM の機能低下が、肺組織線維化の治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

肺の線維化を呈する慢性呼吸器疾患のメカニズムの一つと考えられる小胞体ストレスが引き起こす efferocytosis の抑制について、その分子メカニズムを明らかにし、改善効果を有する薬剤の探索を行う。これにより、肺の線維化を伴う慢性呼吸器疾患の新しい治療戦略の基礎となる知見を得る。

3. 研究の方法

マウスと肺胞マクロファージ:

マウス J774.1 マクロファージ (J774 細胞) および RAW264.7 マクロファージ (RAW 細胞) を ATCC から購入して使用した。10%熱不活化ウシ胎児血清 (FBS)、2mM L-グルタミン、100mg/ml ストレプトマイシン、および 100 U/ml ペニシリンを添加した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) を用いて培養した。ヒト白血病 Jurkat T 細胞は ATCC から購入し、RPMI 1640 を用いてマクロファージと同様に培養した。

8~10 週の ICR マウス (メス) を用いて、麻酔薬で安楽死させた後気管切開をして気管にカニュレを挿入し、100mMEDTA を含む PBS で肺胞洗浄して肺胞マクロファージ (AM) を回収した。肺胞マクロファージは PBS で洗ったのち、上記マクロファージ cell line と同様に培養した。

小胞体ストレスの検出:

ER ストレスを定量するため、リアルタイム RT-PCR により UPR シグナル伝達分子の mRNA レベルを検出した。細胞 ($1-2 \times 10^6$) を、無血清、アルブミン含有 DMEM を用いて 6 穴プレート中で培養した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、cDNA は SuperScript III (Invitrogen) を用いて合成した。合成した cDNA をリアルタイム PCR のテンプレートとして使用した。反応酵素として SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX (Bio-Rad) を、CHOP、BiP、sXBP-1、total XBP-1 および α -アクトニンに使用したプライマーは、以前に報告されているものを用いた²。

貪食実験：

Jurkat T 細胞は 312 nm (Fotodyne) の UV 照射を 10 分間照射後 FCS を含まない RPMI1640 中で 37 °C、5%CO₂ 中で 3 時間培養することによって誘導した。

アポトーシス細胞貪食実験は、J774 細胞または RAW 細胞を、 3×10^5 個の細胞を 24 ウェルプレートにガラスカバースリップ上に培養して行なった。TM、TG および salubrinal の効果を試験する場合はアッセイの 6 時間前に TM または TG を添加し Y27632 はアッセイの 15 分前に細胞に添加した。GSK2606414 および irestatin9389 の効果を試すときは、TM による刺激の開始時に細胞に添加した。

貪食実験は、各ウェルにアポトーシス Jurkat T 細胞 3×10^6 個をマクロファージに添加し、37 °C の 5%CO₂ 中で 60 分間共培養した後、氷で冷やした PBS で 3 回洗浄し Diff Quik で染色して油浸レンズを用いて顕微鏡でカウントし、貪食された細胞/カウントしたマクロファージ = 貪食率で算出した。マウス AM は、 1×10^5 細胞/ウェルの濃度で 8 穴 Lab-Tek チャンバーガラススライド上で培養して、 5×10^5 アポトーシス Jurkat T 細胞を使用した。

ROCK アッセイ：

J774 細胞における RhoA/Rho-キナーゼ(ROCK)活性を評価するために、市販の ROCK 活性 EIA キット(Cell Biolabs)を使用した。

4. 研究成果

小胞体ストレスはマクロファージ細胞株の efferocytosis を阻害した。

N-linked protein glycosylation を阻害することで小胞体ストレスを促進する tunicamycin(以下、TM) は、J774 と RAW264.7 に対して UPR 遺伝子 BiP、CHOP、sXBP-1 の発現を誘導することを確認したうえで、efferocytosis に対する ER ストレスの影響を検証した。その結果、小胞体ストレスが efferocytosis を抑制すること(図 1 ab) が明らかになった。J774 細胞によるカルボキシル化ビーズの貪食も TM により抑制された(図 1 c)。小胞体 Ca²⁺ ATPase 阻害剤を阻害して小胞体ストレスを誘導する Thapsigargin(TG) も J774 細胞の貪食を抑制した(図 1 d)。

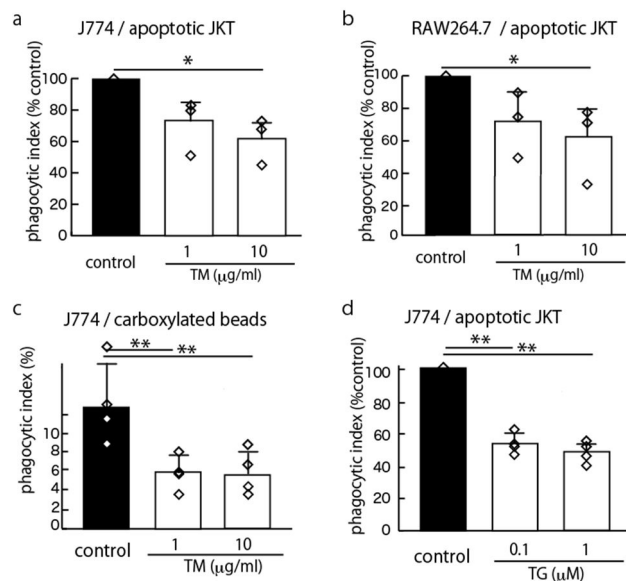


図 1 efferocytosis は ER ストレスによって抑制される

小胞体ストレスによるマクロファージの efferocytosis 抑制は、RhoA の活性化による。

RhoA の活性化は efferocytosis を抑制することが知られているため、TM で処理した J774 の RhoA 活性を測定した。その結果、TM を 1g/ml または 10g/ml で処理すると、用量依存的に RhoA 活性が増加することがわかった(図 2 a)。TM が RhoA/ROCK 依存的に efferocytosis を抑制することを確認するために、Y27632 が TM(10 μg/ml) の存在下で J774 細胞の efferocytosis の障害から救うことができるかどうかを試験した。図 2 b に示すように、10 μM の Y27632 は TM によって誘発された efferocytosis を回復させることができた。

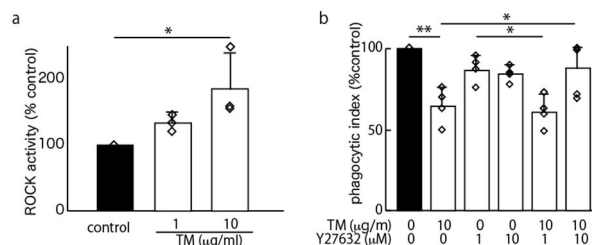


図 2 ER ストレスによる efferocytosis 抑制は RhoA 依存的

PERK-eIF2 α 経路は、ER ストレスによる細胞の活性化を阻害する上で重要な役割を果たしている。

小胞体ストレスは、細胞の恒常性を回復するために3つのUPR経路であるPERK、転写因子6(ATF6)、イノシトール要求酵素1(IRE1)が活性化される。eIF2 α 脱リン酸化阻害剤(salubrinal, EC50 \approx 15M)とIRE1阻害剤(irestatin 9389)の効果をTMで処理したJ774細胞で検討した。興味深いことに、100 μ Mのsalubrinalはefferocytosisを強く抑制したが、2.5 μ Mのイレスタチン9389は未刺激の細胞とTM処理細胞ではefferocytosisに影響を与えなかった(図3a)。PERK/eIF2 α が、ERストレスによるefferocytosis阻害のメカニズムに重要な役割を果たしている可能性があると考え、ERK阻害剤であるGSK260641425を用いて、TM誘発性のEfferocytosis抑制に対する効果を検討したところ、用量依存的に改善させることがわかった(図3b)。

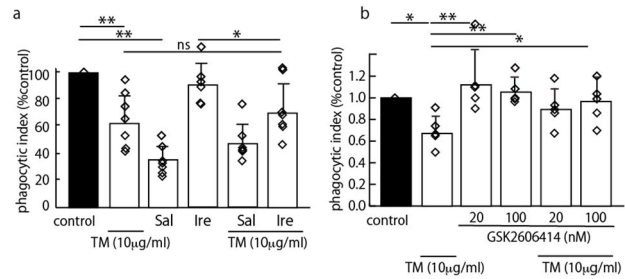


図3 ER ストレスによる efferocytosis 抑制と PERK-eIF2 α 経路 (J774 細胞)

GSK2606414 と TUDCA は CSE 誘導 RhoA 活性化を減少させた。

次に、慢性呼吸器疾患の原因として関連の強い喫煙との関連を調べた。タバコの煙抽出物(CSE)を作成し、喫煙による小胞体ストレスが同様に efferocytosis を抑制することと、それを改善させる薬剤を検討した。CSEはUPR遺伝子BiP, CHOP, sXBP-1の発現を用量依存的に増加させ、20%のCSEが適当な濃度であると確認した。

J774細胞をGSK2606414で30分間前処理した後、6時間20% CSEで処理した細胞を用いてROCK活性を測定した。その結果GSK2606414はCSEによるROCK活性を抑制し、これまでに報告されているCSEによるRhoA活性化にPERK/eIF2 α 経路が関与していることを示唆した(図4b)。次に、化学シャペロンと抗酸化剤の両方として知られ、哺乳類にも安全に使用できるTUDCAを試したところ、CSEによって誘発されたROCK活性が用量依存的に低下した(図4a)。

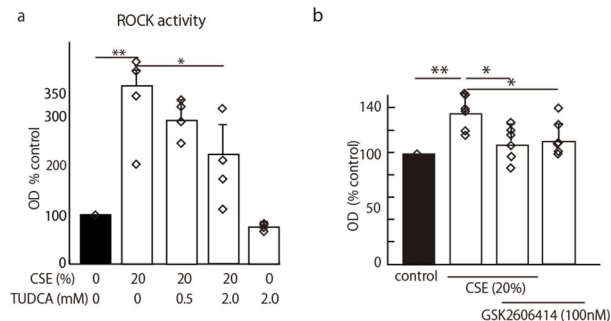


図4 CSEによるRhoA活性化はTUDCAとPERK阻害剤で抑制される(J774細胞)

TMはマウスAMsのefferocytosisをPERK-eIF2 α 経路依存的に抑制した。

最後に、以上の知見をマウスAMで再現できるかを検討するために、ICRマウスから採取したマウスAMを用いて実験を行った。最初に、10 μ g/mlのTMの効果をマウスAMで再現した(図5a)。次に、マウスAMを10g/mlのTM、100 μ Mのsalubrinal、GSK2606414で処理した実験でも、上記と同様に小胞体ストレスのefferocytosis抑制を認め(図5b)、PERK-eIF2 α 経路が重要であることを確認した。

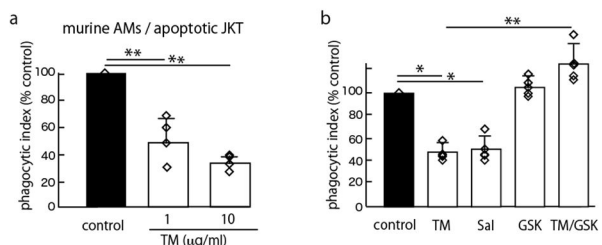


図5 ER ストレスによる efferocytosis 抑制と PERK-eIF2 α 経路 (マウス AM)

考察

タバコの煙への曝露は、マウスやヒトの細胞でマクロファージによる efferocytosis の障害を引き起こすことが知られており、いくつかのメカニズムが示唆されている^{8,9}。特に喫煙においては、RhoA活性が重要⁸だが、細胞の機能維持に極めて重要なRhoAを標的とした薬剤は安全性に大きな懸念がある。酸化ストレスはRhoA/ROCK経路を活性化することにより、efferocytosisを阻害するとされ、抗酸化剤が煙曝露による efferocytosis の障害を回復させることが報告されている¹⁰。慢性肺疾患における小胞体ストレスと酸化ストレスは、その病態に

において絡み合っている。タバコの煙刺激下では、酸化ストレスがタンパク質の過剰産生と酸化的タンパク質フォールディング干渉を介してタンパク質のミスフォールディングを引き起こし、最終的には小胞体ストレスを誘発する可能性がある。本研究では、酸化ストレスとは無関係に小胞体ストレスを誘導する TM と TG を用いて、小胞体ストレスが RhoA 活性化を誘導することを示した。また、CSE 誘導 RhoA 活性化は PERK 阻害剤である GSK2606414 と TUDCA により正常化されることを示した。TUDCA は、神経変性疾患や眼障害の動物モデルにおいて、化学シャペロンとしてだけでなく、抗酸化剤としても機能することが知られているが、ヒトにも安全に投与できる。これらの結果は、小胞体ストレスが efferocytosis のタバコの煙関連肺疾患の治療標的となる可能性を示している。

引用文献

- 1 Ozcan, L. & Tabas, I. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med* **63**, 317-328, doi:10.1146/annurev-med-043010-144749 (2012).
- 2 Somborac-Bacura, A. *et al.* Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress response and proteasomal dysfunction in human alveolar epithelial cells. *Experimental Physiology* **98**, 316-325, doi:10.1113/expphysiol.2012.067249 (2013).
- 3 Lawson, W. E. *et al.* Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 10562-10567, doi:10.1073/pnas.1107559108 (2011).
- 4 Morimoto, K. *et al.* Alveolar macrophages that phagocytose apoptotic neutrophils produce hepatocyte growth factor during bacterial pneumonia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**, 608-615, doi:10.1165/ajrcmb.24.5.4292 (2001).
- 5 Morimoto, K. *et al.* Lovastatin enhances clearance of apoptotic cells (efferocytosis) with implications for chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **176**, 7657-7665 (2006).
- 6 Morimoto, K., Janssen, W. J. & Terada, M. Defective efferocytosis by alveolar macrophages in IPF patients. *Respiratory medicine* **106**, 1800-1803, doi:10.1016/j.rmed.2012.08.020 (2012).
- 7 Ryan, A. J., Larson-Casey, J. L., He, C., Murthy, S. & Carter, A. B. Asbestos-induced disruption of calcium homeostasis induces endoplasmic reticulum stress in macrophages. *J Biol Chem* **289**, 33391-33403, doi:10.1074/jbc.M114.579870 (2014).
- 8 Richens, T. R. *et al.* Cigarette smoke impairs clearance of apoptotic cells through oxidant-dependent activation of RhoA. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **179**, 1011-1021, doi:10.1164/rccm.200807-1148OC (2009).
- 9 Hodge, S. *et al.* Cigarette Smoke-Induced Changes to Alveolar Macrophage Phenotype and Function Are Improved by Treatment with Procysteine. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **44**, 673-681, doi:10.1165/rcmb.2009-0459OC (2011).
- 10 Kenche, H., Baty, C. J., Vedagiri, K., Shapiro, S. D. & Blumental-Perry, A. Cigarette smoking affects oxidative protein folding in endoplasmic reticulum by modifying protein disulfide isomerase. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **27**, 965-977, doi:10.1096/fj.12-216234 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamashita Y, Kuroki R, Takaki M, Tanaka T, Senba M, Morimoto K, Amano H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Impairment of tissue repair in pneumonia due to -cell deficiency: role of endoplasmic reticulum stress in alveolar macrophages.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Res Notes	6. 最初と最後の頁 160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-019-4209-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤博之, 山下嘉郎, 泉田真衣, 高木理博, 田中健之, 森本浩之輔
2. 発表標題 小胞体ストレスはPERK経路を介してefferoctosisを抑制する
3. 学会等名 日本肺サーファクタント・界面医学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 健之 (TANAKA Takeshi) (30432967)	長崎大学・病院(医学系)・講師 (17301)	