

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09672

研究課題名(和文) シャペロン介在性オートファジーによるCOPD病態の制御

研究課題名(英文) Chaperone-mediated autophagy modulates epithelial cell apoptosis in COPD pathogenesis

研究代表者

沼田 尊功 (Numata, Takanori)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：30366257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙関連疾患である慢性閉塞性肺疾患の病態解明のため、恒常性維持機構の1つであるシャペロン介在性オートファジー(CMA)について検討した。ヒト気管支上皮細胞(HBEC)と肺組織を使用し、喫煙刺激によりNrf2依存性にLAMP2A発現とCMA活性化を誘導した。免疫組織化学ではNrf2とLAMP2Aが非COPD肺と比較してCOPD末梢気道上皮細胞で減少した。COPDから分離されたHBECでは、Nrf2とLAMP2A両方が低下し、LAMP2Aは肺機能と正の相関を認めた。この結果、喫煙刺激により傷害されたCMAがアポトーシスを介してCOPD病態と関係があると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は喫煙を原因とし、酸化ストレス増加に関連した細胞老化や細胞死の亢進が重要な役割を果たす。COPD病態におけるシャペロン介在性オートファジー(CMA)の蛋白質恒常性維持機構としての役割解明を目的に検討を行った。

Nrf2-LAMP2A axisがUPRとアポトーシス制御によりCOPD病態進展に関与する可能性が示された。また、LAMP2A発現量は呼吸機能検査結果と相関した点から、CMAのCOPD病態の気道閉塞への関与の可能性が強く示唆され、今後CMA活性化を標的としたCOPD治療法開発が重要な検討課題と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Chaperon-mediated autophagy (CMA) is a type of selective autophagy for lysosomal degradation of proteins. CMA has been implicated in maintaining nutritional homeostasis. We sought to examine the role of CMA in regulating cigarette smoke(CS)-induced apoptosis linked to UPR during COPD pathogenesis by using human bronchial epithelial cells (HBEC) and lung tissues. CS extract (CSE) induced LAMP2A expression and CMA activation through Nrf2 dependent manner in HBEC. Immunohistochemistry showed that Nrf2 and LAMP2A levels were reduced in small airway epithelial cells in COPD compared with non-COPD lungs. Both Nrf2 and LAMP2A levels were significantly reduced in HBEC isolated from COPD and LAMP2A levels in HBEC were positively correlated with pulmonary function tests. These findings suggest impaired CMA during CSE exposure may be causally associated with COPD pathogenesis through enhanced UPR-mediated apoptosis in epithelial cells.

研究分野：呼吸器

キーワード：シャペロン介在性オートファジー LAMP2A 慢性閉塞性肺疾患 ヒト気道上皮細胞 細胞死 アポトーシス

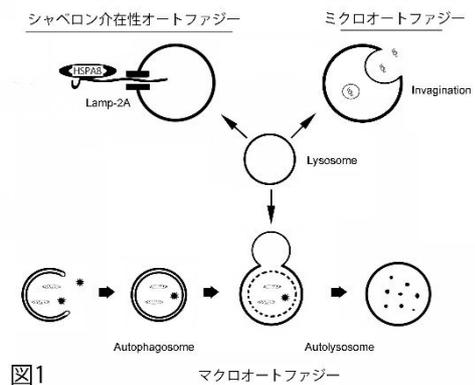
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺患(COPD)は、加齢を発症危険因子とし、喫煙による慢性進行性の気流閉塞を機能的特徴とする治療抵抗性の呼吸器疾患である。喫煙による酸化ストレスの増加とミトコンドリア傷害誘導による細胞機能異常が、病態進展において重要である。COPD 病態における酸化ストレスと細胞老化の亢進及びその制御機構について、これまでに我々はマクロオートファジーや、ミトコンドリア選択的なマイトファジーの関与を報告してきた。

オートファジーはリソソームと協調した細胞内分解処理機構である。オートファジーにはマクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーと、3種類の異なる機序のオートファジーが存在する(図1)。マクロオートファジーは、その機序解明により、最も検討が進んでおり、細胞死や細胞老化と炎症制御などにより COPD 病態進展に関与すると考えられている。一方シャペロン介在性オートファジー (CMA) の COPD での役割は明らかでない。

CMA では、細胞内で構成的に発現している分子シャペロンの heat shock protein family A(Hsp70) member 8(HSPA8)が重要な役割を果たす。KFERQ 様モチーフが分子表面に出した基質タンパク質に HSPA8 が結合、リソソーム上の膜貫通蛋白 LAMP2A とシャペロン分子複合体を形成する。結果基質タンパク質はリソソーム膜を通過し内部へ取り込まれ、リソソーム内の加水分解酵素により分解される。CMA の特徴として、HSPA8 の作用により分解する基質タンパク質の選択性が非常に高く、LAMP2A 発現量が機能制御にもかかわる点、ストレス下では細胞質における傷害タンパク質の特異的な分解により、凝集体の形成予防など細胞機能恒常性維持で重要な役割を果たす点にある。



CMA はマクロオートファジーと相補的に作用し、マクロオートファジーの機能低下に対して CMA は機能亢進で対応する。このように細胞機能そしてミトコンドリア機能恒常性維持には、マクロオートファジーと CMA の両方が適切にかつ相補的に作用することが必要と思われる。しかしながら、COPD 病態における CMA の役割については全く検討されていない。

Regulated cell death(RCD)の亢進は COPD 病態の根幹をなし、喫煙刺激による小胞体ストレス応答が重要であると考えられている。近年小胞体ストレス応答 (UPR) が、LAMP2A のリン酸化により CMA 機能を亢進させることが報告された。また UPR はマクロオートファジーを誘導することが示されている。

COPD 病態ではマクロオートファジーが不十分であり、つまりマクロオートファジー代償機構として作用する CMA 機能が COPD 進展上重要と思われる。そこで COPD 病態への CMA の関与を、UPR は RCD 特にアポトーシスの点から明らかにすることを本検討の課題とする。

### 2. 研究の目的

喫煙刺激時の CMA 活性の変化に関して LAMP2A 発現の重要な転写因子である Nrf2 との関係から明らかにする。また喫煙刺激の際の CMA の役割を、UPR やアポトーシスなどの制御因子としての点から検討する。COPD の病態への CMA の関与を明らかにするとともに、新たな COPD 治療開発のための手がかりを得ることを目的として本検討を行う。

### 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 (HBEC) および BEAS2B 細胞を検討に用いた。Cigarette Smoke Extract(CSE)によるタバコ刺激を行い、LAMP2A 発現を検討した。CMA 活性は代表的な基質である GAPDH 発現量で検討した。LAMP2A 発現における Nrf2 の関与を明らかにするため、siRNA による LAMP2A ノックダウンによる検討を行った。UPR は Bip、pelf2、ATF4、CHOP 発現により評価した。アポトーシスは LDH 細胞傷害 assay、MTT assay、TUNEL 染色、caspase-3 ウェスタンブロット、FACS による PI、annexinV の 2 重染色で評価した。

CHOP のアポトーシスへの関与は、CHOP siRNA で評価した。CMA の機能をさらに明らかにするため、LAMP2A 発現ベクターを用いた過剰発現による検討を行った。

(2) 患者肺組織を用いた検討：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(ホルマリン固定)を用いて(正常、non-COPD smoker、COPD)検討を行った。Nrf2、LAMP2A、LAMP1、Bip の発現は免疫組織学的に評価した。

(3) 患者由来 HBEC を用いて、Nrf2 と LAMP2A 発現量を定量的に評価し、その発現量と臨床的指標との関連を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 喫煙刺激 (CSE) は Nrf2 依存性に LAMP2A を誘導する。

CSE 刺激により、約 48 時間をピークに LAMP2A 発現誘導が認められた (図 2)。LAMP2A 発現量が CMA 活性化の指標と考えられている。喫煙刺激時の CMA 活性化に亢進は GAPDH 発現低下により示された。近年、抗酸化物質のマスター転写因子の Nrf2 が LAMP2A 発現を制御していることが明らかとなっている。そこで Nrf2 をノックダウンし、同様の検討を行った結果、CSE 刺激による LAMP2A 発現誘導は、明らかな抑制が認められた (図 2)。以上検討から喫煙刺激による CMA 機能亢進 (LAMP2A 発現) は Nrf2 依存性であることが示された。

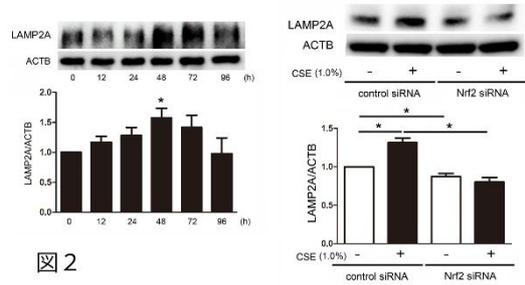


図 2

##### (2) CMA は CSE によるアポトーシスを制御する。

CSE 刺激はアポトーシスを誘導するため、LAMP2A ノックダウンにより CMA の役割を検討した。CSE により誘導されるアポトーシスは LAMP2A ノックダウンにより亢進し、CMA がアポトーシスに対して抑制的に作用していることが示された (図 3)。

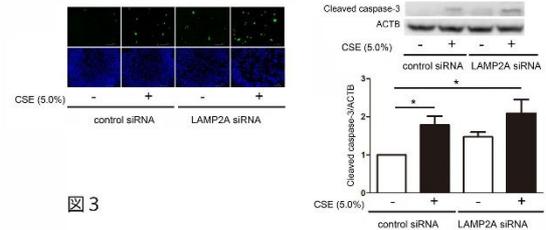


図 3

##### (3) CSE 刺激は UPR を誘導し、CMA は UPR を制御している

CSE 刺激による UPR との関連性を明らかにするため、LAMP2A ノックダウンの UPR への影響を検討した。CSE は UPR として Bip、ATF4、CHOP 発現を誘導し、LAMP2A ノックダウンは UPR をさらに亢進させることが示された (図 4)。つまり CMA は喫煙刺激の際の UPR 制御で重要である可能性が示唆された。

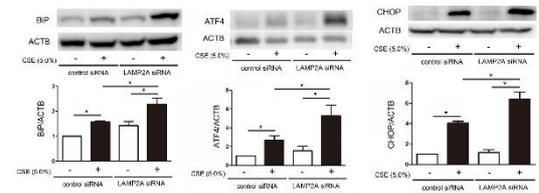


図 4

##### (4) CMA 活性化は、UPR とアポトーシスを抑制する。

CMA 活性の UPR とアポトーシスへの関与をさらに明らかにするため、LAMP2A 発現ベクターを使用した。LAMP2A 発現ベクターにより CMA を活性化すると、CSE 刺激による UPR と、CSE によるアポトーシス誘導は抑制された (図 5)。

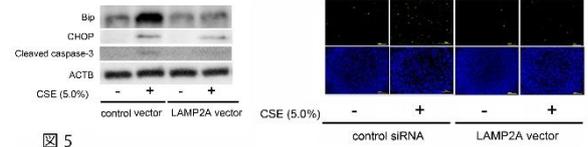


図 5

##### (5) CHOP は、CMA 活性低下時のアポトーシス誘導に関与する。

次に UPR の CHOP 発現亢進が CMA 活性低下時のアポトーシス亢進に関与することを明らかにするため、siRNA による CHOP ノックダウンを用いて検討をおこなった。結果、LAMP2A ノックダウンにより増加したアポトーシスは CHOP ノックダウンにより抑制されることが示された (図 6)。

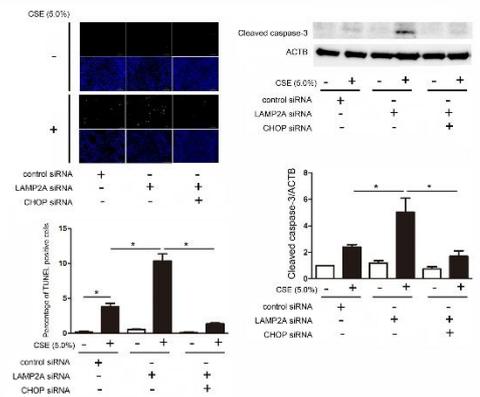


図 6

##### (6) HBEC における Nrf2 と LAMP2A 発現

HBEC において、Nrf2 と LAMP2A 発現量には相関関係を認め、COPD 病態における Nrf2 による CMA の制御の可能性が示唆された。また、LAMP2A 発現量は呼吸機能検査結果と相関し、CMA の COPD 病態の気道閉塞への関与が示唆された (図 7)。

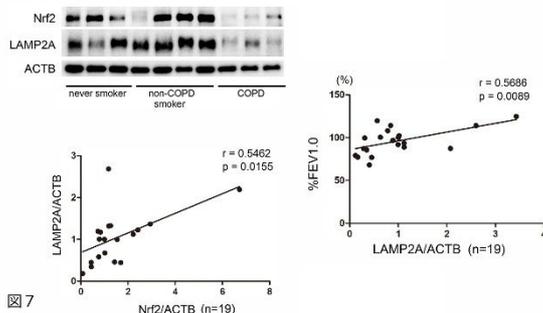


図 7

(結論)

CSE 刺激が誘導する UPR 及びアポトーシス亢進に CMA が関与することが明らかとなった。CMA 活性化に、Nrf2 による LAMP2A 発現誘導が関与し、COPD 肺では Nrf2 発現低下が報告されている点から、Nrf2-LAMP2A axis が UPR とアポトーシス制御により COPD 病態進展に関与する可能性が示された。実際分離培養した気道上細胞においても Nrf2 と LAMP2A 発現量には相関関係を認めた。また、LAMP2A 発現量は呼吸機能検査結果と相関した点から、CMA の COPD 病態の気道閉塞への関与の可能性が強く示唆された

さらにマクロオートファジーと CMA を同時に阻害した検討により UPR とアポトーシスの亢進を認め (data not shown) マクロオートファジーの低下した状態では CMA 機能が、UPR 及びそれによる細胞死制御の重要な規定因子となると考えられた。今後 CMA 活性化を標的としたような COPD 治療法開発が重要な検討課題と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsubouchi K, Araya J, Yoshida M, Sakamoto T, Koumura T, Minagawa S, Hara H, Hosaka Y, Ichikawa A, Saito N, Kadota T, Kurita Y, Kobayashi K, Ito S, Fujita Y, Utsumi H, Hashimoto M, Wakui H, Numata T, Kaneko Y, Mori S, Asano H, Matsudaira H, Ohtsuka T, Nakayama K, Nakanishi Y, Imai H, Kuwano K.	4. 巻 203
2. 論文標題 Involvement of GPx4-Regulated Lipid Peroxidation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2076-2087
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1801232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida M, Minagawa S, Araya J, Sakamoto T, Hara H, Tsubouchi K, Hosaka Y, Ichikawa A, Saito N, Kadota T, Sato N, Kurita Y, Kobayashi K, Ito S, Utsumi H, Wakui H, Numata T, Kaneko Y, Mori S, Asano H, Yamashita M, Odaka M, Morikawa T, Nakayama K, Iwamoto T, Imai H, Kuwano K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Involvement of cigarette smoke-induced epithelial cell ferroptosis in COPD pathogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-10991-7	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 -

1. 著者名 Numata T, Nakayama K, Utsumi H, Kobayashi K, Yanagisawa H, Hashimoto M, Minagawa S, Ishikawa T, Hara H, Araya J, Kuwano K.	4. 巻 19
2. 論文標題 Efficacy of mepolizumab for patients with severe asthma and eosinophilic chronic rhinosinusitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Pulm Med.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12890-019-0952-1	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 -

1. 著者名 Saito N, Araya J, Ito S, Tsubouchi K, Minagawa S, Hara H, Ito A, Nakano T, Hosaka Y, Ichikawa A, Kadota T, Yoshida M, Fujita Y, Utsumi H, Kurita Y, Kobayashi K, Hashimoto M, Wakui H, Numata T, Kaneko Y, Asano H, Odaka M, Ohtsuka T, Morikawa T, Nakayama K, Kuwano K.	4. 巻 202
2. 論文標題 Involvement of Lamin B1 Reduction in Accelerated Cellular Senescence during Chronic Obstructive Pulmonary Disease Pathogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Immunol.	6. 最初と最後の頁 1428-1440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1801293	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Araya J, Tsubouchi K, Sato N, Ito S, Minagawa S, Hara H, Hosaka Y, Ichikawa A, Saito N, Kadota T, Yoshida M, Fujita Y, Utsumi H, Kobayashi K, Yanagisawa H, Hashimoto M, Wakui H, Ishikawa T, Numata T, Kaneko Y, Asano H, Yamashita M, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Nakayama K, Kuwano K.	4. 巻 15
2. 論文標題 PRKN-regulated mitophagy and cellular senescence during COPD pathogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Autophagy.	6. 最初と最後の頁 510-526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2018.1532259	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 -

1. 著者名 Numata T, Nakayama K, Fujii S, Yumino Y, Saito N, Yoshida M, Kurita Y, Kobayashi K, Ito S, Utsumi H, Yanagisawa H, Hashimoto M, Wakui H, Minagawa S, Ishikawa T, Hara H, Araya J, Kaneko Y, Kuwano K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Risk factors of postoperative pulmonary complications in patients with asthma and COPD.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Pulm Med.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12890-017-0570-8.	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yusuke Hosaka, Jun Araya, Kazuya Tsubouchi, Shunsuke Minagawa, Hironichi Hara, Akihiro Ichikawa, Nayuta Saito, Tsukasa Kadota, Masahiro Yoshida, Takeo Ishikawa, Takanori Numata, Yumi Kaneko, Katsutoshi Nakayama, Kazuyoshi Kuwano
2. 発表標題 Role of chaperone-mediated autophagy in COPD pathogenesis
3. 学会等名 The European Respiratory Society International Congress. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 保坂悠介、荒屋潤、皆川俊介、原弘道、伊藤晶彦、中野貴之、市川晶博、斉藤那由多、吉田昌弘、橋本典生、沼田尊功、金子由美、浅野久敏、松平秀樹、大塚崇、桑野和善
2. 発表標題 COPD病態におけるシャペロン介在性オートファジーの役割の検討
3. 学会等名 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Hosaka, Jun Araya, Yu Fujita, Kazuya Tsubouchi, Shunsuke Minagawa, Hiromichi Hara, Takayuki Nakano, Akihiko Ito, Akihiro Ichikawa, Nayuta Saito, Tsukasa Kadota, Masahiro Yoshida, Mitsuo Hashimoto, Takanori Numata, Yumi Kaneko, Kazuyoshi Kuwano
2. 発表標題 Chaperone-mediated autophagy modulates epithelial cell apoptosis in COPD pathogenesis
3. 学会等名 The European Respiratory Society International Congress. (国際学会)
4. 発表年 2019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	荒屋 潤 (Araya Jun)  (90468679)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授   (32651)	