

令和 2 年 7 月 10 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：17K09674

研究課題名(和文) 樹状細胞内オートファジーが規定する慢性閉塞性肺疾患病態

研究課題名(英文) Involvement of dendritic cells autophagy in the pathogenesis of COPD

研究代表者

橋本 典生 (Hashimoto, Mitsuo)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00771742

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)：COPDの成因に樹状細胞(DC)が末梢気道の炎症細胞浸潤の形成と線維化形成に重要であるが、DCのオートファジー活性がその後の獲得免疫の誘導と気道周囲のTh1、Th17、好中球を主体とする炎症反応の誘導と線維化の進展に重要である可能性を検討した。COPDのDC内では、ミトコンドリア特異的分解機構であるマイトファジーの低下、あるいは不十分である可能性が示唆された。また、マウスの骨髄からGM-CSFでBMDCが誘導されることを確認し、サイトカインの分泌は、CSE刺激群でより多く出る傾向が見られたが、Parkinノックアウトマウスから誘導したDCからは、サイトカインは抑制される傾向が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスの骨髄からGM-CSFでBMDCが誘導されることを確認した。このBMDCを使用した結果、サイトカインの分泌は、CSE刺激群でより多く出る傾向が見られたが、Parkinノックアウトマウスから誘導したDCからは、サイトカインは抑制される傾向が見られた。DC内のマイトファジーの低下がサイトカインの分泌抑制に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dendritic cells (DC) are thought to be important for the introducing inflammatory cells and fibrotic changes in the lung of COPD patients. We aimed to elucidate that autophagy activity inside DC might control the migration of Th1, Th17 and neutrophils into the lung. By examining the lung sample of COPD patients, ubiquitin and p62 expressions inside DC are more pronounce in COPD patients than normal patients, suggesting attenuated activity of autophagy inside DC. In vitro experiment, DC were differentiated from bone marrow by GM-CSF, and Cigarette smoke extract stimulations made DCs from WT mouse to produce more cytokines than Parkin knockout mouse-derived BMDC when LPS was added.

研究分野：COPD

キーワード：樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) COPD

加齢が発症危険因子である慢性閉塞性肺疾患(COPD)の患者数は、高齢化社会の到来による増加が予想されており、WHOの調査では全死因の第4位と医療経済的にも重要な疾患である。気管支拡張薬などの対症療法が現行治療の中心であり、今後のCOPD治療に要する医療費負担の増加を考えた場合、詳細な病態の解明、気道閉塞の進展を抑制する新規治療法の開発は急務と考えられる。

### 2) COPDとオートファジー

オートファジーはリソソームと協調した一連の細胞内分解処理機構であり、定常状態ではアミノ酸の供給などのエネルギー恒常性維持に作用する。蛋白凝集体や傷害小器官、さらには細菌やウイルスなどの分解除去や免疫応答においても重要な役割を果たす細胞内機構である。そのため細胞分化や、細胞老化、細胞死など細胞運命、さらには炎症や癌、線維化などの病態制御において中心的な役割を担っている。COPD病態における、肺上皮細胞における細胞老化や細胞死、筋線維芽細胞分化、肺泡マクロファジー機能異常などに、オートファジー活性が関与することが報告されている。我々はcigarette smoke extract(CSE)によるCOPDの気道上皮細胞の老化亢進に、不十分なオートファジー及びミトコンドリア選択的なマイトファジー分解が関与する可能性を報告している。

### 3) COPDと樹状細胞(DC)

DCはCOPD病態において重要な抗原提示細胞と考えられており、T細胞の活性化により炎症を制御する。気道周囲のDC集積はCOPDの重症度と相関している。また、活性化T細胞から分泌されるIL-17の受容体であるIL-17RAを欠損したマウスでは、cigarette smoke(CS)誘導の肺気腫が抑制される。獲得免疫がCS誘導の肺疾患に重要であることが示唆され、DCが獲得免疫を介してCOPDの特徴的病理像である細気管支周囲の慢性細胞浸潤と線維化に影響を及ぼしている可能性が考えられている。

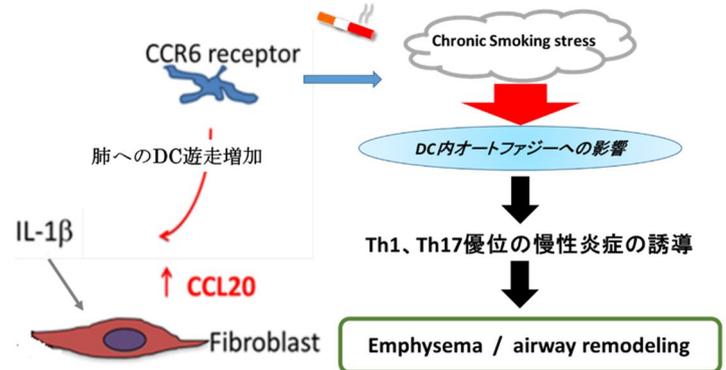


図1. IL-1 $\beta$ は、DC遊走因子CCL20の放出を誘導し、CCR6受容体を介してDCの肺への遊走を増加させる。その後、DCはTh1、Th17細胞が関与する獲得免疫を引き起こすと考えられるが、肺内オートファジーの機能変化がその誘因となると推測する。

私たちは、IL-1により誘導される好中球主体のCOPD炎症モデルにおいて、DCが末梢気道の炎症細胞浸潤の形成と線維化形成に重要であることを示した。さらにDCの遊走因子であるCCL20に対する受容体のCCR6をノックアウトすることで、末梢気道における好中球やIL-17を産生するTh17細胞の誘導を抑制することを報告した(図1)。DCがCOPDの慢性気道炎症の発症と線維化形成に重要であることを示したが、DC活性化によるTh1とTh17細胞誘導に至る機序は不明であった。そこで今回我々は、COPD病態へのオートファジーの関与に着目し、DCのオートファジー活性がその後の獲得免疫の誘導と気道周囲のTh1、Th17、好中球を主体とする炎症反応の誘導と線維化の進展に重要である可能性を明らかにすることを検討課題とすることとした(図1)。

## 2. 研究の目的

本研究ではDCにおけるオートファジーが、COPD病態のTh1、Th17、好中球を主体とした炎症反応を制御する可能性を検討する。COPDの病態理解だけでなく、現在の対処療法中心の治療薬に変わり、DCを標的とする新たな治療法開発の手がかりを得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

COPD 肺組織を用いた DDC 内のオートファジー活性の評価

公開されているデータベースをもとに、健常人の肺組織からの DC と COPD 患者からの肺組織からの DC における PARK2 mRNA の発現を比較した。

続いて、実際の手術肺組織を用いて正常肺組織、COPD 肺組織におけるユビキチンと P62 の発現量を免疫組織染色にて比較した。

マウス肺から分離培養した DC を用いて喫煙刺激によるサイトカイン産生に対するオートファジーの影響の検討

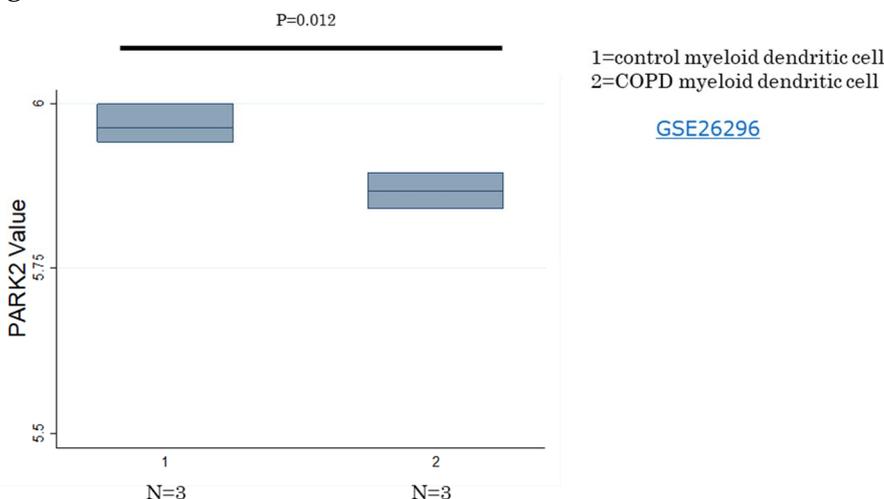
野生型マウスの肺から主に DC で発現している CD11c 受容体により DC を分離培養し、喫煙刺激産生サイトカインプロファイル(IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-17 など)を網羅的に検討した。

### 4. 研究成果

COPD 肺組織を用いた DC 内のオートファジー活性の評価

異常なミトコンドリアを選択的に除去するオートファジーはマイトファジーと呼ばれているが、その機能には Parkin(Park2)が重要な役割を担っている。そこで、まず、公開されているマイクロアレーデータベース (GSE26296) をもとに、健常人の肺組織からの DC と COPD 患者からの肺組織からの DC における PARK2 RNA の発現を比較した (Fig 1)。症例数は各群ともに 3 例と少ないが、COPD 肺組織からの DC での Park2 RNA 発現が明らかに低下しており、オートファジーの一種であるマイトファジーの低下が示唆された。

Fig 1



次に、手術肺組織における DC 内のマイトファジーの指標を示すユビキチンと P62 の発現を健常人と COPD 患者とで蛋白発現を比較検討した。COPD 肺組織での DC は、コントロール肺内の DC と比べユビキチンと P62 の発現が亢進しており、COPD の DC 内でのマイトファジーの低下、あるいは不十分である可能性が示唆された (Figure 2, 3)。

Fig 2. DC 内にユビキチン発現

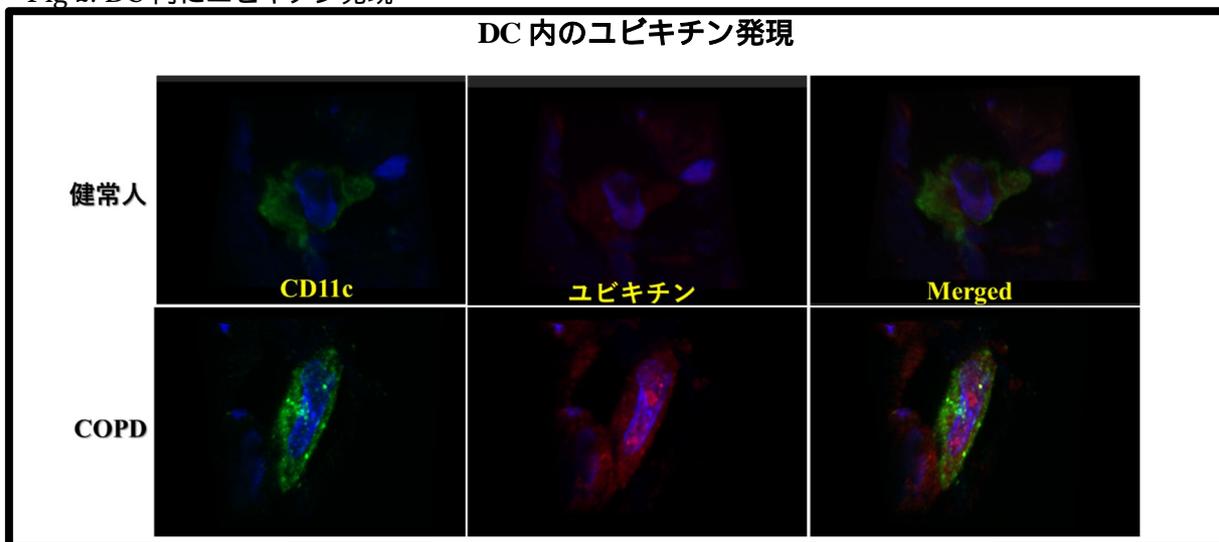
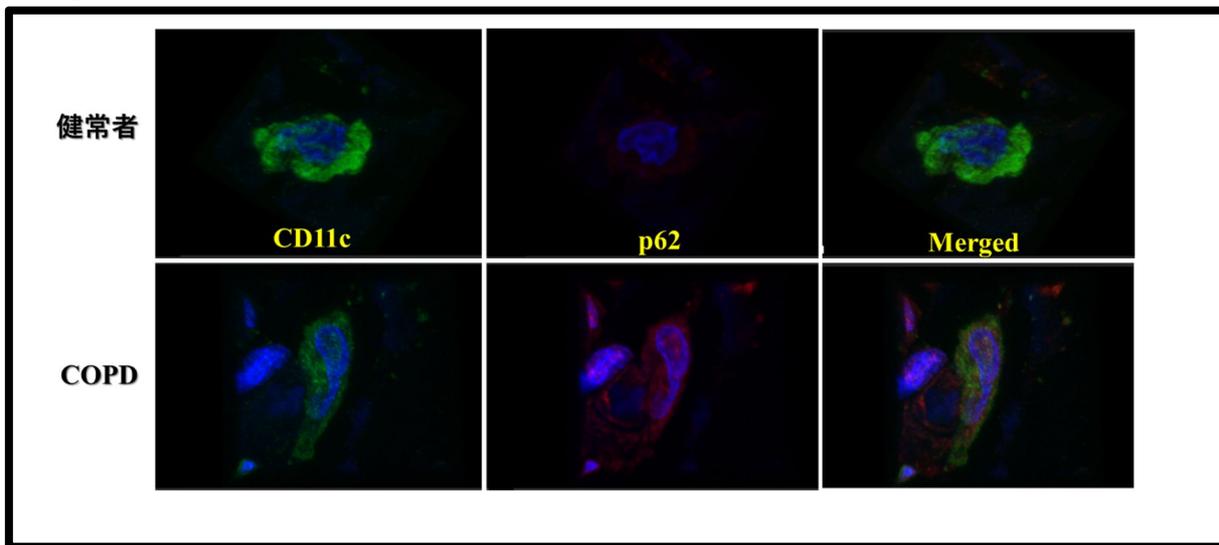
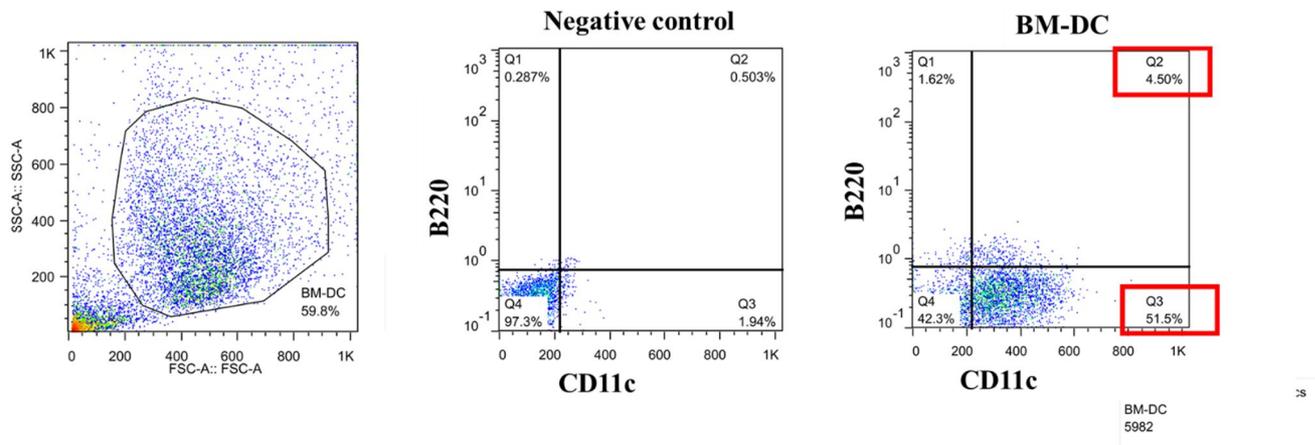


Fig 3. DC 内の P62 発現



マウス肺から分離培養した DC を用いて喫煙刺激によるサイトカイン産生の検討  
 マウスの下肢から骨髓を採取し、GM-CSF 20ng/ml の濃度で 8 日間培養を行った結果 CD11c 陽性であり、B220 陰性である BM-DC 群が約 51% の割合で分化誘導されるのを確認した ( Figure 4 )

Fig.4 BMDC



次に、CSE 刺激後の DC からのサイトカイン分泌を Elisa で確認した ( Fig 5 )

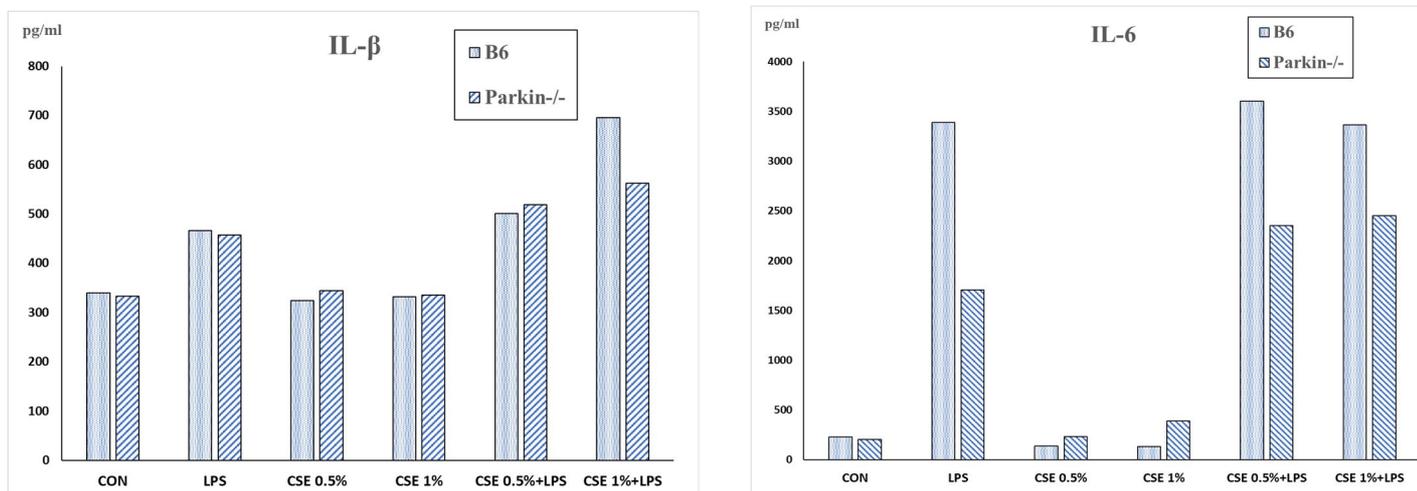


Fig 5. DC からのサイトカイン分泌

サイトカインの分泌は、CSE 刺激群でより多く出る傾向が見られたが、Parkin ノックアウトマウスから誘導した DC からは、サイトカインは抑制される傾向が見られた。

(結論)

COPD の DC 内でのマイトファジーの低下、あるいは不十分である可能性が示唆された。

マウスの骨髄から GM-CSF で BMDC が誘導されることを確認した。

サイトカインの分泌は、CSE 刺激群でより多く出る傾向が見られたが、Parkin ノックアウトマウスから誘導した DC からは、サイトカインは抑制される傾向が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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)	