

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：32651  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K08158  
研究課題名(和文) リソファジーによる慢性閉塞性肺疾患病態の制御

研究課題名(英文) Impaired lysophagy in COPD pathogenesis.

## 研究代表者

荒屋 潤 (ARAYA, JUN)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：90468679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： リソソーム傷害のCOPD病態における役割は明らかでない。我々は喫煙刺激がリソソーム損傷を誘導し、TRIM16介在性リソファジーによるリソソーム恒常性維持が、リソソーム機能と細胞老化亢進の制御で重要な役割を果たしていることが明らかになった。TRIM16発現が低下した場合には、喫煙刺激によるリソソーム損傷は十分に回復せず、損傷リソソームが蓄積し、リソソーム機能は低下し、結果的に細胞老化を誘導した。COPD肺組織や、分離気道上皮細胞ではGalectin3発現の増加と、TRIM16発現の低下を認めた。不十分なリソファジーがリソソーム傷害を蓄積させCOPD病態に関与している可能性が示唆された。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

老化関連呼吸器疾患であるCOPDは、高齢化社会に伴いその患者数は増加し、社会的にも医療経済的にも、その病態解明と有効な治療法の開発は重要な課題である。

我々はCOPD病態における細胞老化の亢進に、リソソーム傷害の蓄積が関与することを見出した。このリソソーム傷害の機序として、TRIM16という蛋白が関与するリソソーム選択的なオートファジー分解である、リソファジーの機能低下の影響を明らかにした。

リソファジー誘導が、COPD病態の制御に有効である可能性が示されており、今後の治療法開発につながる結果と考えている。

研究成果の概要(英文)： Cigarette smoke (CS)-induced functional deterioration of lysosomes may be associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) pathogenesis. Lysosomal membrane permeabilization (LMP) is indicative of damaged lysosomes. Galectin-3 and tripartite motif proteins (TRIM)16 play a cooperative role in recognizing LMP and inducing lysophagy. TRIM16 was involved in CSE-induced lysophagy, with impaired lysophagy associated with lysosomal dysfunction and accelerated cellular senescence. Airway epithelial cells in COPD lungs showed an increase in galectin-3 puncta reflecting lysosomal damage with concomitantly reduced TRIM16 expression levels. HBEC isolated from COPD patients showed reduced TRIM16 but increased galectin-3, and a negative correlation between TRIM16 and galectin-3 protein levels was demonstrated. Increased LMP, which can be attributed to impaired TRIM16-mediated lysophagy, may be responsible for COPD pathogenesis through the enhancement of cellular senescence.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：リソファジー 慢性閉塞性肺疾患 細胞老化 リソソーム オートファジー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、慢性の喫煙暴露により気流閉塞が進行する、治療抵抗性呼吸器疾患である。加齢と喫煙刺激による老化細胞の増加は、創傷治癒遅延や老化随伴分泌現象 (SASP) により、COPD 病態の進展で重要と考えられているが、細胞老化誘導機序の詳細は解明されていない。オートファジーは細胞内蛋白分解系であり、細胞機能恒常性維持で重要な役割を果たす。我々はオートファジー、特にミトコンドリア選択的マイトファジー機能が不十分であることと、喫煙刺激による細胞老化誘導との関連性を報告してきた。オートファジー機能はオートファゴゾーム形成による分解対象の隔離と、その後のリソソームとの融合によるオートライソソーム形成により調整される。つまりオートファジー機能は最終的にリソソームに制御され、つまりリソソーム機能自体が COPD 病態で重要である可能性がある。

リソソームは細胞内の様々な分子、受容体から小器官、さらには病原体に至るまでを分解除去する細胞内小器官である。近年の検討から、リソソームは単なる分解処理器官ではなく多岐にわたる細胞機能制御に密接に関与することが明らかとなっている。そのためリソソーム機能異常は多くの病態で認められ、lysosome storage disease (LSD) だけでなく、加齢に伴う神経変性疾患であるパーキンソン病やアルツハイマー病の進展にも関与する。リソソーム機能異常では、傷害タンパク産生と分解のアンバランスにより、細胞内凝集体の蓄積や、酸化された凝集体が脂質と反応し合成される lipofuscin の蓄積を認め、これらは細胞老化を進展させると考えられている。加齢によりリソソーム機能は低下し、COPD の原因となる喫煙刺激により細胞内凝集体や lipofuscin 蓄積することが報告されており、COPD 病態にリソソーム機能異常が関与する可能性が示唆される。

オートファジーによる不要な細胞内小器官の選択的な分解はオルガネロファジーと言われ、現在広く検討が進んでいる。損傷を受けたリソソームからの分解酵素の流出は細胞に傷害を与えるため、傷害リソソームはリソファジーにより速やかに分解除去される必要がある。つまり損傷を認識し、速やかにオートファジーが誘導される効率的な機序が存在する。リソファジーの遂行には受容体が重要な役割を果たし、近年の研究から TRIM タンパク質 (tripartite motif protein) が、この制御性受容体として作用し、TRIM16 のリソファジーへの関与が報告された。リソソーム損傷はガレクチン 3 に認識され、TRIM16 はガレクチン 3 を介して損傷リソソームと結合する。TRIM16 は損傷リソソームのコピキチン化を促進し、オートファゴソーム誘導を進めると考えられている。しかしながら COPD 病態におけるリソソーム機能や、リソソーム損傷、またその恒常性維持機構としての TRIM16 を介したリソファジーの関与について検討はこれまで十分に行われていない。そこで我々は COPD 病態の、特に細胞老化亢進への、リソファジーによるリソソーム機能制御の関与の観点からの検討を行った。

### 2. 研究の目的

本研究ではリソファジーによるリソソーム恒常性維持機構が、喫煙刺激時のリソソーム損傷や細胞運命に与える影響を明らかにするため以下の項目に関して検討を行った。喫煙刺激はリソソーム損傷を誘導するかどうか？②喫煙刺激は TRIM16 介在性リソファジーを誘導するかどうか？③TRIM16 介在性リソファジーは、喫煙刺激によるリソソーム機能と細胞老化の制御に関与するかどうか？④喫煙暴露マウスモデルでリソソーム傷害は増加するか？ COPD 肺組織ではリソソーム損傷が増加しているのか？ COPD 由来気道上皮細胞 (HBEC) では TRIM16 介在性リソファジーが低下し、リソソーム機能が低下しているのか？

### 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、リソソーム損傷、リソファジー、細胞老化を検討した。リソソーム損傷は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、リソソーム (LAMP1) への Galectin3 の共局在により評価した。リソソーム機能はリポフスチンの蓄積、lysotracker Red 染色による pH 評価、蛋白凝集体の検出により検討した。TRIM16 によるリソファジーの制御は、TRIM16siRNA と発現ベクターによる、オートファジー機能や、リソソーム損傷と機能への影響から評価した。細胞老化は、老化関連 ガラクトシダーゼ染色、p21 発現、及び Histone H2A 染色により検討した。

(2) マウスモデルの検討：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した。喫煙群はチャンバー内でタバコ 1 日 5 本を週 5 日間計 26 週喫煙暴露した後、肺を摘出しホルマリン固定標本を作成した。蛋白発現の検討によりライソゾーム損傷 (Galectin3) と、リソファジー (TRIM16) を評価した。さらに lipofuscin や細胞内凝集体蓄積によりリソソーム機能を検討した。

(3) 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、COPD) 検討を行った。Galectin3 と、TRIM16 の発現は免疫組織学的に評価した。電子顕微鏡を用いてリソソーム数を検討した。

(4) 患者由来 HBEC を用いて、LAMP1、Galectin3 と TRIM16 発現を検討した。その発現量と

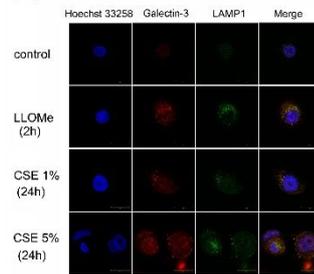
臨床的指標との関連性を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 喫煙刺激 (CSE) はリソソーム損傷と機能低下を誘導する。

リソソーム損傷を誘導する LLOMe で、リソソーム (LAMP1) への Galectin3 の共局在の増加が観察された。CSE 刺激により、同様の所見を認めた。(図 1)。CSE 刺激による細胞内 lipofuscin の蓄積と、lysotracker Red 染色性の低下が認められた。以上検討から喫煙刺激がリソソーム損傷を引き起こし、リソソーム機能低下を誘導することが示された。

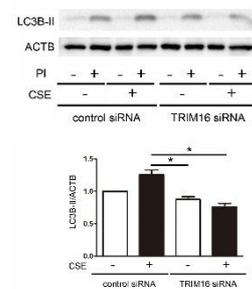
図 1



##### (2) 喫煙刺激は TRIM16 介在性リソファジーを誘導する。

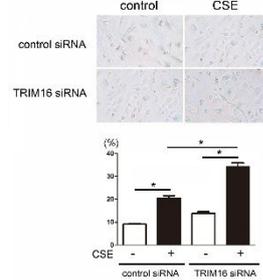
TRIM16 の喫煙によるリソファジー誘導への関与の可能性を明らかにするため、TRIM16 ノックダウンによる検討を行った。CSE 刺激は LC3 の conversion(I から II)、EGF-LC3 による dot 形成により評価するオートファジーを誘導し、TRIM16 ノックダウンにより、このオートファジー誘導は抑制された(図 2)。TRIM16 ノックダウンにより、CSE によるリソソーム損傷と、リソソーム機能低下の増強が認められ、同時に細胞老化の亢進を認めた(図 3)。

図 2



一方 TRIM16 強制高発現は、喫煙刺激によるリソソーム損傷 (リソソーム (LAMP1) への Galectin3 の共局在) と、リソソーム機能低下 (細胞内 lipofuscin の蓄積と、lysotracker Red 染色性の低下) の誘導を抑制した。また喫煙刺激による細胞老化誘導の抑制も観察された。以上検討から、TRIM16 介在性のリソファジーが、喫煙刺激によるリソソーム損傷を制御することで、リソソーム機能低下と関連する細胞老化を抑制している可能性が示唆された。

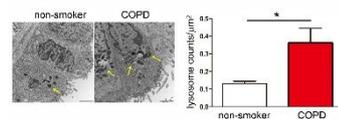
図 3



##### (3) 喫煙暴露マウスでのリソソーム損傷

6 か月の喫煙暴露後に、マウス肺の気道上皮細胞では TRIM16 発現低下と Galectin3 発現亢進を認めた。また lipofuscin 及び細胞内タンパク凝集体の蓄積を認め、COPD マウスモデルで、TRIM16 発現低下によるリソファジー低下が、リソソーム損傷と機能低下へ関与する可能性が示唆された。

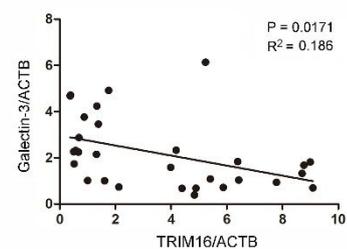
図 4



##### (4) COPD 肺組織でのリソソーム傷害の増加

COPD 肺組織を用いた検討でも、TRIM16 発現低下と Galectin3 発現亢進を認めた。また lipofuscin 及び細胞内タンパク凝集体の蓄積を認め、電子顕微鏡では COPD 細気管支上皮内におけるリソソームの増加が観察された(図 4)。

図 5



##### (5) COPD 由来気道上皮細胞 (HBEC) での TRIM16 介在性リソファジーとリソソーム機能。

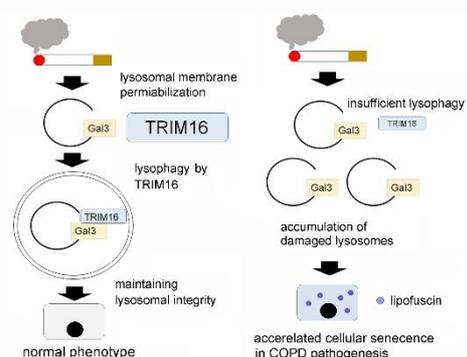
患者由来 HBEC を用いて、LAMP1、Galectin3 と TRIM16 発現を検討した。COPD 患者由来 HBEC では、損傷リソソーム量を反映する LAMP1 及び Galectin3 発現の増加と、TRIM16 発現の低下を認めた。TRIM16 と Galectin3 発現には負の相関関係を認め、リソファジー低下と損傷リソソーム蓄積の因果関係が示唆された(図 5)。また、COPD 由来 HBEC では、非喫煙者由来 HBEC と比較して、リソソーム機能低下 (細胞内 lipofuscin の蓄積と、lysotracker Red 染色性の低下、タンパク凝集体の増加) が認められた。

#### (結論)

CSE 刺激がリソソーム損傷を誘導し、TRIM16 介在性リソファジーによるリソソーム恒常性維持が、COPD 病態におけるリソソーム機能低下と細胞老化亢進の制御で重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

つまり TRIM16 発現が低下した場合には、喫煙刺激によるリソソーム損傷は十分に回復せず、損傷リソソームが蓄積し、リソソーム機能は低下し、結果的に細胞老化を誘導していると考えられた(図 6)。実際 COPD 肺組織や、分離 HBEC では Galectin3 発現の増加と、TRIM16 発現の低下を認めており、不十分なリソファ

図 6



ジーが COPD 病態に関与する可能性は十分にある。しかしながら TRIM16 発現低下の機序は明らかでなく、またリソファジー誘導の COPD 治療への応用の可能性を含め、今後の検討課題は多いと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hosaka Yusuke, Araya Jun, Fujita Yu, Kadota Tsukasa, Tsubouchi Kazuya, Kuwano Kazuyoshi	4. 巻 205
2. 論文標題 Chaperone-Mediated Autophagy Suppresses Apoptosis via Regulation of the Unfolded Protein Response during Chronic Obstructive Pulmonary Disease Pathogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1256 ~ 1267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000132	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 Tsubouchi Kazuya, Araya Jun, Yoshida Masahiro, Sakamoto Taro, Kuwano Kazuyoshi	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 Masahiro, Minagawa Shunsuke, Araya Jun, Kuwano Kazuyoshi	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 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3145~3159
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 Saito Nayuta, Araya Jun, Ito Saburo, Tsubouchi Kazuya, Kuwano Kazuyoshi	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 The Journal of Immunology	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 Jun, Tsubouchi Kazuya, Sato Nahoko, Ito Saburo, Kuwano Kazuyoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 PRKN-regulated mitophagy and cellular senescence during COPD pathogenesis	5. 発行年 2018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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 0件)

1. 発表者名 荒屋 潤
2. 発表標題 COPD病態におけるリソファジーの役割
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保坂悠介
2. 発表標題 TRIM16依存性リソファジーによる喫煙誘導性細胞老化の制御
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nayuta Saito
2. 発表標題 Lysosomal dysfunction in COPD pathogenesis
3. 学会等名 The European Respiratory Society International Congress.
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
研究協力者	斉藤 那由多  (Saito Nayuta)		
研究協力者	桑野 和善  (Kuwano Kazuyoshi)  (40205266)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授   (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------