

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08159

研究課題名(和文) COPDにおけるネクロプトーシスによるミトコンドリアDNA放出と気道炎症の解明

研究課題名(英文) The role of necroptosis-regulated mitochondrial DNA release in the pathogenesis of COPD

研究代表者

水村 賢司 (MIZUMURA, Kenji)

日本大学・医学部・兼任講師

研究者番号：20761688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、COPDにおける気腫性変化と気道炎症の相互関係をネクロプトーシスとミトコンドリアDNAに着目することで解明し、診断と治療への研究基盤を確立することを目的とした。本研究で、タバコ煙がミトコンドリアDNAをミトコンドリアから細胞質に移行させ、細胞質に移行したミトコンドリアDNAはネクロプトーシスにより細胞外に放出されることが明らかとなった。この過程にはタバコ煙によるミトコンドリア損傷が関与している。細胞外に放出されたミトコンドリアDNAはセカンドメッセンジャーとしてIL-6を制御した。本成果によりネクロプトーシスとミトコンドリアDNAがCOPDの診断と治療へ応用できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、アポトーシス研究で明らかにできなかったCOPDにおける気腫性変化と気道炎症の関係をネクロプトーシスに着目することで解明し、診断と治療応用の基盤を確立することを目的とした。本研究で、タバコ煙によるミトコンドリア損傷と気道炎症を結ぶセカンドメッセンジャーとしてミトコンドリア由来DAMPsであるミトコンドリアDNAがCOPDの病態生理に関与することが明らかとなった。本メカニズムにネクロプトーシスが重要な役割を果たしており、DAMPs放出の少ないアポトーシス研究にはなかった側面であり、学術的独自性がある。本メカニズムの制御により新たなCOPDの診断、治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of COPD has not yet been fully elucidated. Previously, we demonstrated that cigarette smoke (CS) causes mitochondrial dysfunction in the lungs and subsequently induces necroptosis. Accumulating evidence indicates that mitochondrial dysfunction causes the extracellular leakage of mitochondrial DNA (mtDNA). However, the molecular mechanisms underlying CS-induced extracellular leakage of mtDNA are not fully understood. In this study, we demonstrated that CS induces mtDNA release to the extracellular space in pulmonary epithelial cells. The necroptosis inhibitor, necrostatin-1, reduced CS induced extracellular mtDNA release, but not from mitochondria to the cytosol. Notably, the transfection of mtDNA into pulmonary epithelial cells reduced IL-6 production. These findings suggest that necroptosis regulates CS-induced extracellular mtDNA release in pulmonary epithelial cells, which may impact airway inflammation in COPD by downregulating IL-6 production.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：COPD タバコ煙 ネクロプトーシス ミトコンドリア ミトコンドリアDNA 気腫性変化 気道炎症

## 1. 研究開始当初の背景

COPD はタバコ煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することで生じた肺の炎症性疾患である。気流閉塞が、末梢気道病変と気腫性病変がさまざまな割合で複合的に作用することにより起こるが、病態生理は不明な点が多い。40 歳以上の人口の 8.6%、約 530 万人の患者が存在すると推定されているが、大多数が未診断、未治療の状態であり、本邦では死亡原因の 9 位を占めている。薬物治療として、気管支拡張薬などが用いられているが、症状の改善、進行の抑制にとどまっており、新規の治療薬の開発が期待されている。

COPD の気腫性変化は、肺上皮細胞のアポトーシスが中心に検討されてきたが、アポトーシスは Damage-associated molecular patterns (以下、DAMPs と略す) の放出の少ない、炎症反応が乏しい細胞死である。一方、COPD は、気道炎症を特徴としているが、アポトーシスによる肺上皮細胞死と気道炎症の関係については不明な点が多く、アポトーシス後の 2 次性ネクローシスなどがモデルとして提唱されていた。ネクローシスは長い間、「偶発的な細胞死」とされ、特異的な分子細胞学的イベントは必要ないと考えられてきた。しかし、最近となり Receptor-interacting protein kinase 3 (RIP3) とよばれるキナーゼの活性依存的に誘導されるカスパーゼ非依存性のプログラムネクローシス(以下、ネクロプトーシスと略す) が報告された。ネクロプトーシスはアポトーシスと比較し、DAMPs の放出の多い、炎症反応の強いプログラム細胞死とされている。申請者は、最近、タバコ煙曝露がミトコンドリアの損傷を引き起こし、その結果、ネクロプトーシスによる肺上皮細胞死を誘導し、肺の気腫性変化に關与することを世界で初めて報告した(引用文献 1)。これらの知見をもとに、今回、タバコ煙によるミトコンドリア損傷と気道炎症を結びつけるセカンドメッセンジャーとしてミトコンドリア DNA に着目し、ネクロプトーシスによるミトコンドリア DNA の放出メカニズムと気道炎症について検討を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究では、タバコ煙によるミトコンドリア損傷と気道炎症を結ぶセカンドメッセンジャーとしてミトコンドリア DNA に着目し、ネクロプトーシスによるミトコンドリア DNA の細胞外放出メカニズムと気道炎症について解明し、診断と治療応用への研究基盤を確立することを目的としている。具体的には タバコ煙曝露によるミトコンドリア DNA 放出とネクロプトーシスの関係、ミトコンドリア DNA による気道炎症の制御機構について検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 肺上皮細胞におけるタバコ煙抽出液(Cigarette smoke extract: CSE)によるミトコンドリア DNA の細胞質移行メカニズム

CSE 処理により肺上皮細胞株 Beas 2B 細胞でミトコンドリア DNA がミトコンドリアから細胞質に移行するかを検討するため、ミトコンドリアと細胞質を Cell fractionation kit (Abcam) を用いて分離する。細胞質分画でミトコンドリア DNA 遺伝子である human NADH dehydrogenase 1 をターゲットとしたプライマーで DNA 量を測定しミトコンドリア DNA の細胞質移行量とした。CSE 処理によるミトコンドリア DNA の細胞質移行にネクロプトーシスが關与するかを検討するため、ネクロプトーシス阻害剤 Necrostatin-1 存在下で CSE 処理によるミトコンドリア DNA 細胞質移行量を測定する。

### (2) 肺上皮細胞における CSE によるミトコンドリア DNA の細胞外放出メカニズム

Beas 2B 細胞に CSE 処理を行い、細胞上清中のミトコンドリア DNA 量を human NADH dehydrogenase 1 をターゲットとしたプライマーで測定しミトコンドリア DNA の細胞外放出量とした。CSE 処理によるミトコンドリア DNA 細胞外放出にミトコンドリア損傷やネクロプトーシスが關与するかを検討するため、ミトコンドリア標的抗酸化薬 MitoQ と Necrostatin-1 存在下で CSE 処理によるミトコンドリア DNA 細胞外放出量を測定する。

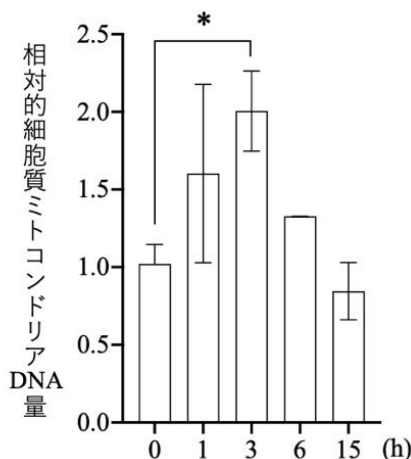
### (3) ミトコンドリア DNA の肺上皮細胞での炎症メカニズム

Beas 2B 細胞から、ミトコンドリア DNA 精製キット (BioVision) を使用してミトコンドリア DNA を精製する。抽出したミトコンドリア DNA を Lipofectamin LTX Reagent (Invitrogen) を用い Beas 2B 細胞に遺伝子導入し、ELISA kit で細胞上清中の IL-1, IL-6, IL-18, CXCL12, IFN, TNF を測定した。

## 4. 研究成果

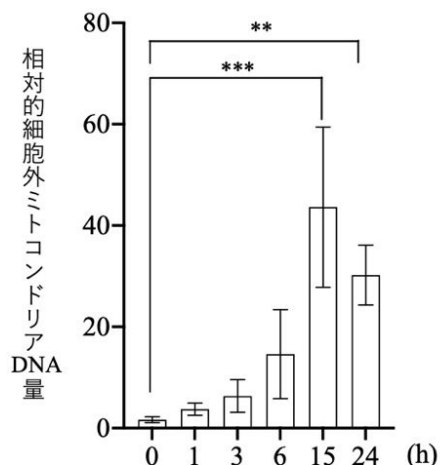
(1) Beas 2B 細胞を CSE で処理すると細胞質(図 1)と細胞上清中(図 2)のミトコンドリア DNA が有意に上昇し、CSE はミトコンドリアからの細胞質へのミトコンドリア DNA 移行と細胞外へのミトコンドリア DNA 放出を誘導することが示唆された。ミトコンドリア DNA の細胞質移行のピー

クはCSE 処理後3時間(図1)細胞外放出のピークは15時間(図2)で、ミトコンドリア DNAがミトコンドリア内から細胞質を介して細胞外へ放出されるまでの時間的な動態変化を確認することができた。



**図1.CSEによりミトコンドリアDNAは細胞質に移行する**

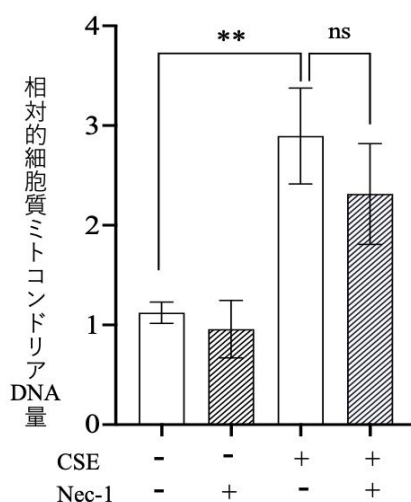
Beas 2B細胞を20%CSEで処理し細胞質のミトコンドリアDNA量をリアルタイムPCRで定量した。Data represent the mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  by one-way ANOVA with Tukey's post tests.



**図2.CSEによりミトコンドリアDNAは細胞外に放出される**

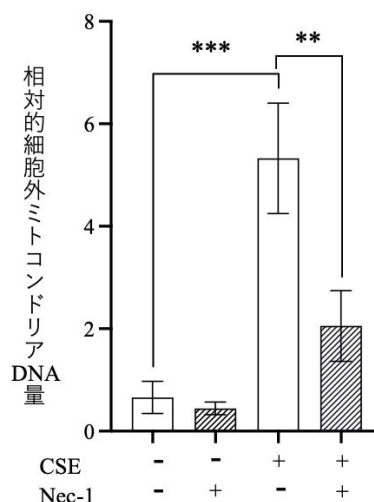
Beas 2B細胞を20%CSEで処理し細胞上清中のミトコンドリアDNA量をリアルタイムPCRで定量した。Data represent the mean  $\pm$  SEM. \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.005$  by one-way ANOVA with Tukey's post tests.

(2) ネクロプトーシス阻害薬である Necrostatin-1(Nec-1)はCSE 処理によるミトコンドリアの細胞質への移行は抑制しなかったが(図3)細胞外へのミトコンドリア DNA 放出を抑制(図4)し、ネクロプトーシスはCSEによるミトコンドリア DNAの細胞外放出を制御していることが示唆された。



**図3. ネクロプトーシス阻害薬Nec-1はCSEによるミトコンドリアDNA細胞質移行を抑制しない**

ネクロプトーシス阻害薬Necrostatin-1(Nec-1)存在下にBeas 2B細胞を20%CSEで3時間処理し細胞質のミトコンドリアDNA量をリアルタイムPCRで定量した。Data represent the mean  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.001$  by two-way ANOVA with Tukey's post tests.

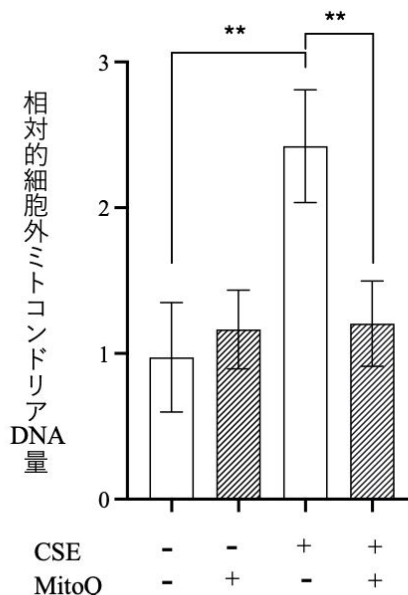


**図4. ネクロプトーシス阻害薬Nec-1はCSEによるミトコンドリアDNA細胞質外放出を抑制する**

ネクロプトーシス阻害薬Necrostatin-1(Nec-1)存在下にBeas 2B細胞を20%CSEで15時間処理し細胞上清中のミトコンドリアDNA量をリアルタイムPCRで定量した。Data represent the mean  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.005$  by two-way ANOVA with Tukey's post tests.

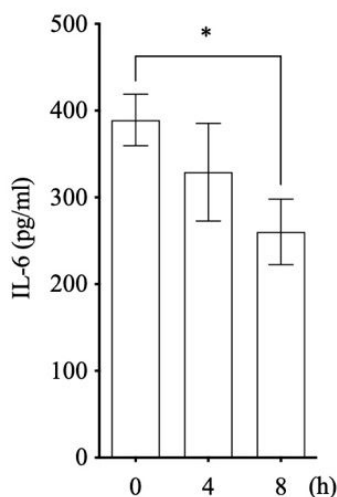
(3) ミトコンドリア標的抗酸化薬 MitoQ はCSE 処理による細胞外へのミトコンドリア DNA 放出を抑制(図5)し、CSEによるミトコンドリア損傷はミトコンドリア DNAの細胞外放出に関与し

ていることが示唆された。



**図5.ミトコンドリア標的抗酸化薬MitoQはCSEによるミトコンドリアDNA細胞質外放出を抑制する**  
 ミトコンドリア標的抗酸化薬MitoQ存在下にBeas 2B細胞を20% CSEで15時間処理し細胞上清中のミトコンドリアDNA量をリアルタイムPCRで定量した。Data represent the mean  $\pm$  SEM. \*\*P < 0.01 by two-way ANOVA with Tukey's post tests.

(4) ミトコンドリア DNA がセカンドメッセンジャーとして機能するかを検討するため、Beas 2B細胞から分離したミトコンドリア DNA を Beas 2B細胞にトランスフェクションし、細胞上清中のIL-1, IL-6, IL-18, CXCL12, IFN, TNF を測定した。IL-1, IL-18, CXCL12, IFN, TNF は測定下限値以下だったが、IL-6はミトコンドリア DNA トランスフェクション 8 時間後に優位に抑制された (図 6)。



**図6. ミトコンドリアDNA遺伝子導入はIL-6産生を抑制する**

Beas 2B細胞から分離したミトコンドリアDNAをBeas 2B細胞に遺伝子導入し細胞上清中のIL-6をELISAで測定した。Data represent the mean  $\pm$  SEM. \* P < 0.05 by one-way ANOVA with Tukey's post tests.

本研究で、タバコ煙がミトコンドリア DNA をミトコンドリアから細胞質に移行させ、細胞質に移行したミトコンドリア DNA はネクロプトーシスにより細胞外に放出されることが明らかとなった。この過程にはタバコ煙によるミトコンドリア損傷が関与している。細胞外に放出されたミト

ミトコンドリア DNA はセカンドメッセンジャーとして IL-6 を制御している。

<引用文献>

1 . Mizumura K, Cloonan SM, Nakahira K, Bhashyam AR, Cervo M, Kitada T, Glass K, Owen CA, Mahmood A, Washko GR, Hashimoto S, Ryter SW, Choi AM. Mitophagy-dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD. J Clin Invest 124(9):3987-4003, 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Mizumura Kenji, Maruoka Shuichiro, Shimizu Tetsuo, Gon Yasuhiro | 4. 巻<br>Volume 13         |
| 2. 論文標題<br>Autophagy, selective autophagy, and necroptosis in COPD        | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease  | 6. 最初と最後の頁<br>3165 ~ 3172 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2147/COPD.S175830                          | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Hikichi Mari, Mizumura Kenji, Maruoka Shuichiro, Gon Yasuhiro                            | 4. 巻<br>11                  |
| 2. 論文標題<br>Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by cigarette smoke | 5. 発行年<br>2019年             |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Thoracic Disease  | 6. 最初と最後の頁<br>S2129 ~ S2140 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.21037/jtd.2019.10.43  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |

〔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<br>高橋 麻衣、水村 賢司、丸岡 秀一郎、曾田 香織、権 寧博 |
| 2. 発表標題<br>ミトコンドリアを介した鉄代謝による肺線維化の病態制御    |
| 3. 学会等名<br>第59回日本呼吸器学会学術講演会              |
| 4. 発表年<br>2019年                          |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)            | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)      | 備考 |
|-------|--------------------------------------|----------------------------|----|
| 研究分担者 | 権 寧博<br>(GON Yasuhiro)<br>(80339316) | 日本大学・医学部・教授<br><br>(32665) |    |

6. 研究組織（つづき）

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------------------|---|---|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 丸岡 秀一郎<br><br>(MARUOKA Shuichiro)<br><br>(80599358) | 日本大学・医学部・准教授<br><br><br><br><br>(32665) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |