

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07862

研究課題名(和文) 老化関連疾患としての肺気腫に対するLTBP-4の抗炎症・抗老化作用の解明

研究課題名(英文) LTBP4 has a critical role in the pathogenesis of emphysema as the age-related disease

研究代表者

石井 正紀 (Ishii, Masaki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20724438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴う弾性線維の減少や変性は、皮膚の弾力低下や、肺気腫や動脈中膜硬化などの直接原因となる。特に、LTBP-4のノックアウトマウスの肺では、肺気腫の表現型を呈することがすでに知られている。本実験では、ヒト肺線維芽細胞(L299)を使用しsiRNAを用いたLTBP-4発現制御により、LTBP-4とelastinとの相互作用やLTBP-4における抗炎症・組織保護効果の検証したところ、siRNAでは、エラスチンは低下し、MMP-1、MMP-2、TIMP-1の増加を認めた。プロテオーム解析では、siLTBP4においてGSTM3、SODの低下を認め、LTBP4における抗酸化作用との関連も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LTBP-4はelastinによる肺弾性線維形成や肺弾性収縮力の維持に必要であるほか、ミトコンドリア機能保持を介した抗炎症・抗酸化効果、抗老化の役割を担い、肺気腫進展予防も含めた肺組織再生の上で、重要な因子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：LTBP4 belongs to the LTBP family of proteins and plays an important role as a structural component of extracellular matrix. LTBP4-related cutis laxa is characterized by cutis laxa, early childhood-onset pulmonary emphysema and other evidence of a generalized connective tissue disorder as the age-related disease. However, the role of LTBP4 remains unclear in the pathogenesis of emphysema. RT-PCR analysis showed that the decreased expression of elastin and increased expression of TNF- α , MMP and TIMP-1 were observed in human lung fibroblast cells by siRNA treatment. The cell contraction assay demonstrated the decreased level of elasticity and the increase of SA-gal staining of cells were observed. The shotgun proteomics and RT-PCR showed that the oxidoreductases such as SOD and GSTM3 were decreased in the treatment LTBP4 siRNA by using exosome of cell culture supernatant.

研究分野：老年医学

キーワード：肺気腫 LTBP-4

1. 研究開始当初の背景

日本には、500 万人以上の慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD) の患者がいると推定され、超高齢社会を迎えた現状で、今後も増え続けると予測されているが、その多くは、未診断の状態、十分な治療が受けられていないのが現状であり、世界的に、COPD に対する取り組みが急務となっている。多くの気管支拡張薬の効果が大規模な臨床試験で実証されているが、いまだ COPD の進行とその慢性炎症を根本的に治癒させる方策はない。COPD は喫煙を主因とし、呼吸機能検査で非可逆性の閉塞性障害をきたす疾患であるが、特に、COPD における肺気腫型の患者は、COPD の特徴的なフェノタイプであり、COPD の中でも QOL や予後の悪いサブグループを示唆すると考えられる。これまで、collagen, elastin, fibrillin の cross-linkage に関わる lysyl oxidase (LOX) の選択的阻害剤により幼若ラットに肺気腫を形成 (Am J Pathol 1981) 成熟後も改善せず (Am Rev Respir Dis 1980) 大動脈瘤も高率に発症、しばしば破裂し急死することを確認されている。これは、Marfan 症候群と病態が類似し、fibrillin-TGF- β 経路の COPD 病態への関与が考えられる。一方、LTBP4 遺伝子は、近年 in vitro で、皮膚線維芽細胞を用いて弾性線維形成促進能が報告され (PNAS 2013) その変異は、老化関連疾患の表現型の一つであるヒト肺気腫合併皮膚弛緩症 (cutis laxa) の原因とされる (Hum Mol Genet 2006) 喫煙により LTBP4 の発現が低下することや遺伝的な要因で Latent transforming growth factor beta binding protein 4 (LTBP4) 発現量が低下することで、老化関連疾患の一つである肺気腫の表現型を呈することが予測されるが、本研究では、これまで行われていないヒト肺線維芽細胞を用いて、LTBP4 と elastin の cross-linkage について、抗炎症や抗老化の観点から検証することは、老年医学として学術的に極めて重要と考えられる。LTBP-4 (のノックアウトマウスの肺では、肺気腫の表現型を呈することがすでに知られている (Genes Dev. 2002) ほか、LTBP-4 はヒトの COPD 形成における一塩基多型 (SNP) との関連性も報告されている (Am. J. Res Crit Care Med. 2006) 同遺伝子は、近年 in vitro で弾性線維形成促進能が報告され、変異はヒト肺気腫合併 Cutis laxa (皮膚弛緩症：常染色体優性遺伝) の原因とされる (Am. J. Hum. Genet. 2009) が、ヒト肺気腫形成における機序については不明である。

2. 研究の目的

COPD においては、多くの気管支拡張薬の効果が大規模な臨床試験で実証されているが、いまだその進行とその慢性炎症を根本的に治癒させる方策はない。現況としては、呼吸苦などの症状を改善する気管支拡張薬投与が主な治療法であり、喫煙により破壊された肺の再生を図る根本的な治療法は存在しない。また、COPD 患者の多くは高齢者であり、本研究により、肺の弾性線維形成を促進し細胞外器質の再生を図ることできれば、COPD の根本治療につながり、高齢患者の ADL、QOL の向上から、健康寿命の延伸にも寄与することが期待される。これまで、ヒトやマウスの肺組織や肺線維芽細胞を用いた肺気腫モデルとして、喫煙暴露や遺伝子発現抑制による LTBP4 の発現低下により、炎症や細胞老化にどのような影響を与えるかという研究は行われておらず、この病態進行を反映する新規バイオマーカーの同定も含め、本研究では肺組織における LTBP4 の抗炎症・抗老化効果を検証する予定である。本研究では、肺気腫合併 Cutis laxa (皮膚弛緩症) の原因タンパクとされる LTBP-4 に着目し、肺の弾性線維形成能および組織保護・抗炎症効果の観点から、ヒト肺線維芽細胞を用いて、老化関連疾患としての肺気腫に対する LTBP4 の抗老化関連因子の可能性につき、抗炎症および抗酸化作用の観点から検証した。

3. 研究の方法

ヒト肺線維芽細胞 (L299) を使用し、肺弾性収縮力の収縮力の検証として、コラーゲンベースの細胞収縮アッセイを用いて、LTBP-4 ノックダウンに伴う細胞収縮活性について評価した。L299 を使用し、siRNA を用いて LTBP4 のノックダウンを行い、弾性線維としての elastin や各種炎症性サイトカインの動態について RT-PCR を施行した。また、細胞培養液上清から抽出したエクソソームを用い、LTBP4 発現低下に関連するタンパクの網羅的解析 (プロテオーム解析) とミトコンドリア老化についても、抗酸化酵素の観点から検討を行った。

4. 研究成果

LTBP4 発現抑制に伴い、弾性線維の一部である elastin の発現が低下し、TNF- α や MMP-12、TIMP-1 も増加を示した。また、細胞収縮活性も低下し、SA-gal 染色で陽性率が増加した。細胞培養液上清中のエクソソームについてショットガン解析により、LTBP4 における酸化還元酵

素(SOD および GSTM3)のへ関与が認められ、RT-PCR でも LTBP4 発現低下に伴う SOD および GSTM3 の発現量は減少したが、recombinant LTBP4 や NAC の添加により、GSTM3 の回復を認めた。LTBP-4 は elastin による肺弾性線維形成や肺弾性収縮力の維持に必要であるほか、抗炎症・抗酸化効果、抗老化の役割を担い、肺気腫進展予防も含めた肺組織再生の上で、重要な因子である可能性が示唆された。

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	山口 泰弘 (Yamaguchi Yasuhiro) (60376473)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

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