

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08528

研究課題名(和文)小胞体選択的オートファジーによる特発性肺線維症の病態制御

研究課題名(英文) the role of endoplasmic reticulum selective autophagy in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

沼田 尊功 (NUMATA, Takanori)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30366257

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)：特発性肺線維症(Idiopathic pulmonary fibrosis:IPF)の肺上皮細胞では異常蛋白蓄積によるERストレスが増加している。過剰なERストレスは上皮細胞死、細胞老化を誘導し肺線維化を促進する。ER選択的オートファジーのERファジーは、ERストレス応答の軽減により肺線維化を制御する可能性がある。IPF肺組織ではERのアダプター蛋白であるTEX264発現が低下していた。TEX264ノックダウンによるERファジー抑制はERストレス誘導上皮細胞死とTGF- β 誘導筋線維芽細胞分化を促進した。ERファジー低下は線維化を促進し、IPF病態に関連する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症(idiopathic interstitial pneumonia:IPF)では過剰なERストレスが病態に重要であることがこれまでの報告で明らかとなっていたが、治療的介入は困難であった。本検討にてERファジーの低下が病態に関連することが明らかとなり、ERファジーの促進がIPFの治療の新たな選択肢となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum (ER) stress induced by accumulation of intracellular damaged protein is increased in lung epithelial cell in IPF (Idiopathic pulmonary fibrosis). Excessive ER stress promotes lung fibrosis by inducing epithelial cell death and cell senescence. It is likely that ERphagy (ER-selective autophagy) alleviates ER stress response and inhibits lung fibrosis. In this study, we demonstrated that expression of TEX264 (an adaptor protein that connects ER with LC3) was decreased in IPF lung. Suppression of ERphagy by knockdown of TEX264 promoted ER stress-induced epithelial cell death and TGF- β induced myofibroblast differentiation. Decreased ERphagy in IPF may play important roles in IPF pathogenesis.

研究分野：呼吸器

キーワード：オートファジー 特発性肺線維症 小胞体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) ER ファジー

細胞内外の刺激により傷害を受けた蛋白が ER に蓄積すると、細胞は UPR(Unfolded protein response)と呼ばれる適応反応(1 .シャペロン誘導による蛋白質高次構造の修復、2 . 蛋白翻訳抑制、3 . 異常な蛋白の分解)により細胞内恒常性を維持する。しかし、これらの適応反応を超える過剰な ER ストレスが加わると、細胞死が誘導される。

オートファジーは、傷害蛋白、小器官を隔離膜で囲み、オートファゴゾームを形成し、さらにリソソームと融合し、内容物が分解する細胞内蛋白、小器官の分解機構である。近年、小器官選択的オートファジーの存在が報告され、ER も ER 選択的オートファジー(ER ファジー)により分解されることが明らかとなった。しかし、ER ファジーの過程の詳細は現時点では十分に明らかとなっていない。FAM134B, CCPG1 などの ER 蛋白がオートファゴゾームを形成する LC3 と結合し、ER ファジーが進行するが、本年、新たに、TEX264 が重要な役割を果たしていることが報告された。(Chino et al, Molecular Cell 2019)

2) IPF における ER ストレス、ER ファジー

家族性肺線維症患者では SPC 遺伝子の異常が報告されている。この遺伝子異常により上皮細胞に異常な蛋白が蓄積し、ER ストレスが過剰となり、細胞死が誘導され、その結果肺の線維化が進展する。

IPF 患者においても同様の機序が想定され、実際に、肺上皮細胞では ER ストレスが増加し、細胞死も増加している。ER ファジーは、ER ストレスを軽減し、細胞死を抑制することで IPF の発症、進展を抑制する可能性があるが、これまで IPF における ER ファジーの状態について検討されていない。

2. 研究の目的

IPF 病態における ER ファジーの役割を明らかとし、その結果、IPF の新規治療開発の知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

IPF 肺組織における ER ファジーの評価

正常肺組織と IPF 肺組織での TEX264 RNA 発現を公開データベースをもとに比較した。続いて、実際の手術肺組織を用いて正常肺組織、IPF 肺組織における TEX-264 蛋白発現を免疫組織染色にて比較した。TEX264 だけでなく、さらに、FAM134B, CCPG1 についても同様の検討を行った。

各種細胞における ER ファジーの役割

培養した気道上皮細胞、肺上皮細胞に Tunicamycin (TM)、DTT、喫煙刺激を行い、ER ストレスを増加し、細胞死、細胞老化を誘導した。上記条件で、TEX264、FAM134B, CCPG1 ノックダウンにて ER ファジーを抑制、ER ファジーの ER ストレス誘導細胞死、細胞老化への影響を検討した。

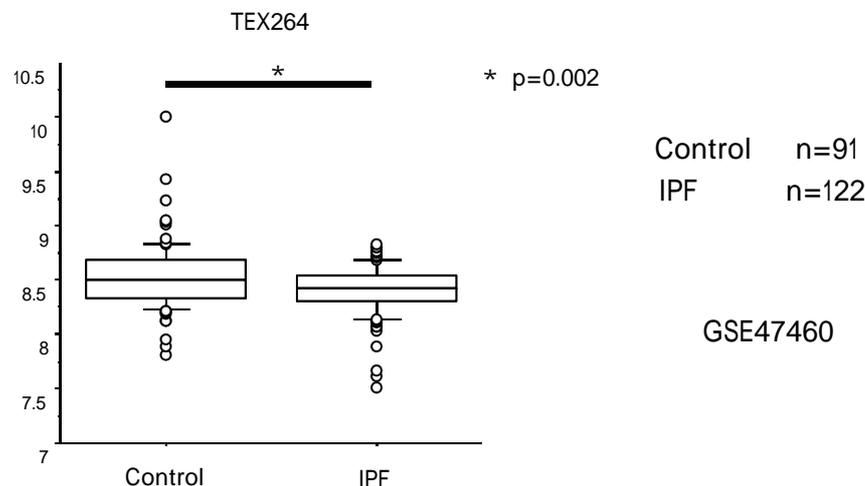
また、IPF では線維芽細胞において ER ストレスは筋線維芽細胞分化を誘導するため、筋線維芽細胞分化における ER ファジーの役割も同様に検討を行った。

4. 研究成果

IPF 肺組織における ER ファジー

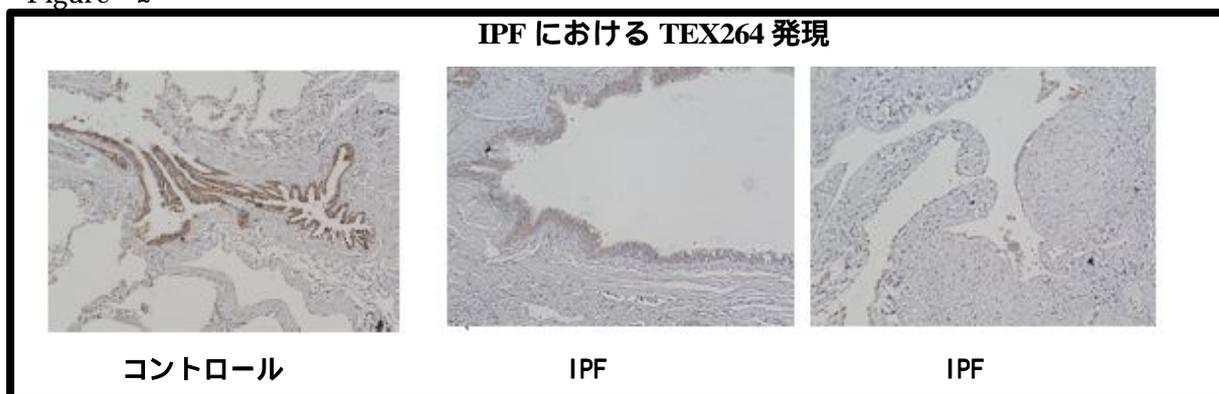
公開されているマイクロアレイデータベース GSE47460 を用いて、正常肺組織と IPF 肺組織での TEX264 RNA 発現を比較した。Control 91 例、IPF122 例を比較すると IPF 群で有意に TEX264 RNA 発現が低下していた。(Figure 1)

Figure 1



次に我々は、実際の手術肺組織における TEX264 の蛋白発現を検討した。IPF 肺組織ではコントロールと比べ TEX264 の発現が低下しており、ER ファジーが低下していると考えられた。(Figure 2) FAM134B, CCPG1 についても同様に検討を行ったが、評価可能な結果が得られなかった。

Figure 2



各種細胞における ER ファジーの役割

IPF 病態において上皮細胞の細胞死が重要であることがこれまで多く報告されている。そこで、本検討では、手術肺組織より分離培養した気道上皮細胞を用いて、ER ストレス誘導細胞死におけるミトコンドリア UPR の役割を検討した。ER ストレス負荷には TM を使用した。siRNA にて TEX264 をノックダウンし、ER ファジーを抑制した。TEX264 ノックダウンは気道上皮細胞の ER ストレスによる細胞死 (TUNEL 染色) を促進した (Figure 3)。

次に、線維芽細胞を用いて TGF- β 誘導筋線維芽細胞分化におけるミトコンドリア UPR の役割を検討した。TEX264 ノックダウンにより TGF- β による筋線維芽細胞分化 (type1 collagen、SMA) が増強されたことから、ER ファジー低下は線維化を促進し、IPF 病態に関連すると考えられた。(Figure 4) 一方、また、FAM134B, CCPG1 についても同様に検討したが、いずれも線維芽細胞、気道上皮細胞の筋線維芽細胞分化、細胞死、細胞老化に影響を及ぼさなかった。

Figure 3

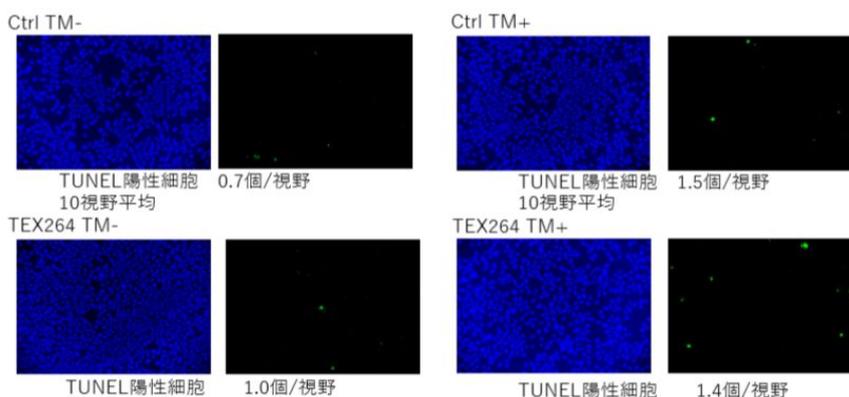
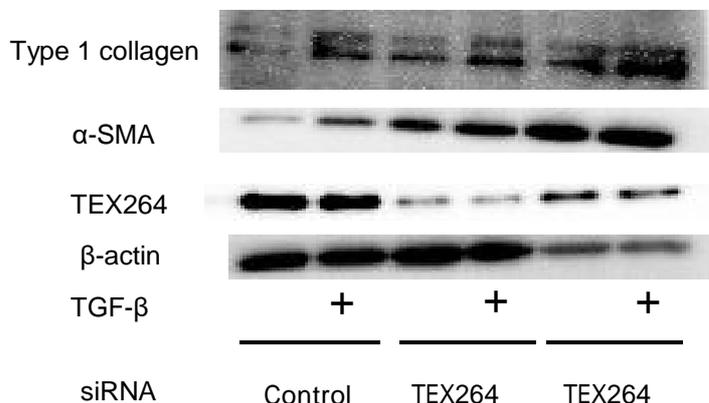


Figure 4



(結論)

IPF 肺組織では TEX264 が低下し、ER ファジーが低下していると考えられた。ER ファジーの低下は、上皮細胞死、筋線維芽細胞分化を誘導し、線維化進展に重要な役割を果たしている可能性がある。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

沼田尊功 (NUMATA TKANORI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 30366257

(2) 研究分担者

原 弘道 (HARA HIROMICHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 70398791

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	原 弘道 (HARA Hiromichi) (70398791)	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