

令和 5 年 6 月 21 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：20K08578

研究課題名（和文）Mieap液滴によるCOPD病態の制御

研究課題名（英文）Role of Mieap in COPD pathogenesis

研究代表者

和久井 大（Wakui, Hiroshi）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：10773533

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）：Mitochondria-eating protein (Mieap)はp53依存性に発現誘導され、ミトコンドリア恒常性に作用する。慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者肺および気道上皮細胞におけるMieap発現の低下を認めた。培養細胞での検討から喫煙刺激はMieap発現を誘導し、ミトコンドリア電子伝達系の恒常性維持に作用し、ミトコンドリアROS産生及び、細胞老化の制御に関与していることが明らかとなった。Mieapノックアウトマウスでの検討では、炎症や細胞老化の亢進と肺気腫様病変進展の悪化を認めた。COPD肺におけるMieap発現低下は、細胞老化亢進により病態進展に寄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

加齢関連疾患であるCOPDは、細胞老化の亢進が病態に関与する、治療抵抗性呼吸器疾患である。今回MieapのCOPDへの関与が、細胞老化の制御の点から示されたことは、病態解明だけでなく、新規治療法開発のための手掛かりになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mitochondria-eating protein (Mieap) is induced in a p53-dependent manner and affects mitochondrial homeostasis. In this study, we found that Mieap expression was decreased in lung and airway epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Cigarette smoke extract (CSE) induced Mieap expression in airway epithelial cells, which was involved in the regulation of mitochondrial electron-transfer homeostasis, mitochondrial ROS production, and cellular senescence. Mieap knockout mice showed increased inflammation and cellular senescence accompanied by worsened emphysema-like lesion development. It is likely that reduced Mieap expression is involved in the COPD pathogenesis through enhancing cellular senescence.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 細胞老化 Mieap ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)
課題名 : Mieap 液滴による COPD 病態の制御
課題名 (英文) : Role of Mieap in COPD pathogenesis

研究成果の概要 (和文) : Mitochondria-eating protein (Mieap) は p53 依存性に発現誘導され、ミトコンドリア恒常性に作用する。今回、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者肺および気道上皮細胞における Mieap 発現の低下を認めた。培養細胞での検討から喫煙刺激は Mieap 発現を誘導し、ミトコンドリア電子伝達系の恒常性維持に作用し、ミトコンドリア ROS 産生及び、細胞老化の制御に関与していることが明らかとなった。Mieap ノックアウトマウスでの検討では、炎症や細胞老化の亢進と肺気腫様病変進展の悪化を認めた。COPD 肺における Mieap 発現低下は、細胞老化亢進により病態進展に寄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 : 加齢関連疾患である COPD は、細胞老化の亢進が病態に関与する、治療抵抗性呼吸器疾患である。今回 Mieap の COPD への関与が、細胞老化の制御の点から示されたことは、病態解明だけでなく、新規治療法開発のための手掛かりになると考えられる。

研究成果の概要 (英文) : Mitochondria-eating protein (Mieap) is induced in a p53-dependent manner and affects mitochondrial homeostasis. In this study, we found that Mieap expression was decreased in lung and airway epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Cigarette smoke extract (CSE) induced Mieap expression in airway epithelial cells, which was involved in the regulation of mitochondrial electron-transfer homeostasis, mitochondrial ROS production, and cellular senescence. Mieap knockout mice showed increased inflammation and cellular senescence accompanied by worsened emphysema-like lesion development. It is likely that reduced Mieap expression is involved in the COPD pathogenesis through enhancing cellular senescence.

研究分野 : 呼吸器病学

キーワード : 慢性閉塞性肺疾患, 細胞老化, Mieap, ミトコンドリア

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。本邦での疫学調査からは、その患者数は 500 万人以上と推定され、医療経済的にも重要な疾患である。本邦では COPD の原因は主に喫煙であるが、細胞傷害機序は十分には解明されていない。タバコ煙 1 吸入は、約 1017 個のオキシダントを含有し、慢性喫煙刺激は過剰な酸化ストレスを誘導する。内因性抗酸化物質と酸化ストレスとのバランスが失われ、結果的に肺上皮細胞において細胞老化の亢進が起こることが COPD 病態進展に関与すると考えられている。細胞老化は組織幹細胞における再生治癒能力を低下させ、かつ体細胞における細胞老化は、その特性である老化随伴分泌現象 (SASP) により過剰なサイトカインや成長因子を産生し、COPD 病態進展に寄与する。COPD 病態での細胞老化亢進に、ミトコンドリア恒常性維持機構の破綻が関与する可能性が報告されている。

ミトコンドリアは電子伝達系により細胞内エネルギーの ATP 合成を担う細胞小器官であり、かつ内因性活性酸素種 (ROS) の産生源となる。ミトコンドリアはエネルギー需要やストレス刺激に対応するため、分裂と融合を繰り返す動的な小器官であり、その恒常性維持において傷害ミトコンドリアの分裂と、ミトコンドリア選択的なオートファジーであるマイトファジーによる分解除去が重要な役割を果たす。我々は COPD 肺上皮細胞において分裂、膨化した傷害ミトコンドリアの蓄積を電子顕微鏡で確認している。また COPD 肺では、E3 コピキチンリガーゼである Parkin 発現低下によりマイトファジーが不十分となり、ミトコンドリア ROS (mROS) 産生が増加することで細胞老化進展に関与する可能性を報告している。しかしながら特にストレス刺激時のミトコンドリア恒常性維持機構は十分に解明されておらず、近年 mitochondria-eating protein (Mieap) による Mitochondrial quality control (MQC) の重要性が注目されつつある。DNA 損傷応答の一環として、p53 はいくつかの下流遺伝子を発現誘導、活性化する。最近の検討結果から、p53 の下流遺伝子の一つである Mieap が MQC に関与していることが明らかになってきた。Mieap は、損傷したミトコンドリアの修復や除去など、いくつかのメカニズムを通じて、MQC に作用すると考えられている。酸化されたミトコンドリアタンパク質を除去することによる修復は、Mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria (MALM) により行われる。異常なミトコンドリアの除去は、Mieap-induced vacuole (MIV) 形成によって行われ、これはマイトファジーの一種とも理解されている。Mieap 欠損細胞では、ROS 産生の増加とミトコンドリア ATP 合成の減少が見られ、これはミトコンド

リア電子伝達系の歪みを反映していると推測されている。MALM と MIV がガンマ線照射に対するストレス応答として作用することは示されている。また Mieap を介した MQC の病態への関与は、主に胃、腸、乳、甲状腺腫瘍などの悪性腫瘍の進行において検討されてきた。しかし、COPD 発症への Mieap の関与や、タバコ煙曝露時の Mieap を介した MQC の詳細なメカニズムと役割については、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

Mieap による MQC の、喫煙刺激による細胞老化制御への関与や、COPD 病態における役割を明らかにするのが、本研究の目的である。そのため以下の3項目に関する検討を行った。 COPD 肺及び培養気道上皮細胞における Mieap 発現の検討②Mieap 発現を制御することが、喫煙刺激による肺上皮細胞での mROS 産生や細胞老化誘導に影響するのかどうかの検討 野生型、Mieap KO マウスを用いて喫煙暴露による細胞老化と COPD 病態進展に差異を認めるかどうかの検討。

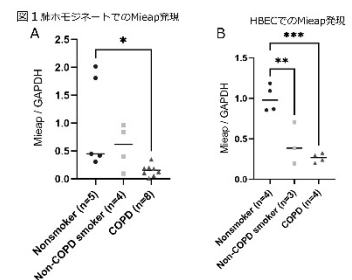
3. 研究の方法

(1) COPD 肺における Mieap 発現の検討： 正常及び non-COPD 喫煙者、COPD 患者肺組織のホモジネートを用いて肺全体として Mieap 発現を定量的に評価した。患者気道から分離培養した気道上皮細胞 (HBEC) における Mieap 発現量を検討した。
 (2) 培養細胞を用いた検討： HBEC および BEAS2B 細胞を検討に用いた。Mieap siRNA を遺伝子導入し、Cigarette Smoke Extract (CSE)によるタバコ刺激を行い、ミトコンドリア機能評価の観点から、Flux analyzer により酸素消費速度 (OCR: Oxygen Consumption Rate) 測定を行い、ROS 産生は H2DCFDA assay, MitosoxRed 染色で検討した。細胞老化は老化関連 β ガラクトシダーゼ染色、Histone H2AX 染色、p16 と p21 発現で検討した。
 (3) マウスモデルの検討： 6~10 週齢マウス (C57BL/6 バックグラウンド) 野生型、Mieap KO マウスを使用し、小動物用暴露吸入システム付属の WholeBody チャンバーを用いた。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、肺の摘出を行う。肺気腫は mean linear intercept (MLI)測定で評価する。、SA β ガラクトシダーゼ染色、Histone H2AX 染色、p16 と p21 発現で細胞老を評価する。気管支肺胞洗浄液 (BALF) では、細胞数、細胞分画を測定する。酸化ストレスは 8-OHdG 及び 4-ヒドロキシ-2-ノネナル (4-HNE) 発現で評価する。

4. 研究成果

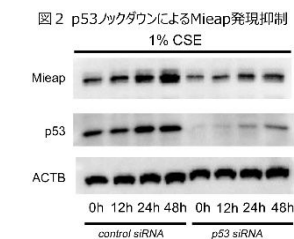
(1) COPD 肺及び COPD 患者由来気道上皮細胞における Mieap 発現低下。

手術肺検体を溶解し、肺ホモジネートを作成し、Mieap 発現を検討した。結果 COPD 肺は、非喫煙者由来肺と比較して、有意な発現低下を認めた (図 1A)。また分離培養した HBEC での検討では、非喫煙群に比べ、非 COPD 喫煙群と COPD 群での有意な Mieap 発現低下を認め、COPD 群での発現はより低値であった (図 1B)。



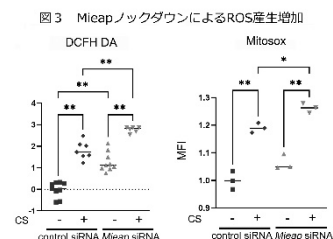
(2) 喫煙刺激は p53 依存性に Mieap 発現を誘導する

HBEC を用いて CSE 刺激を行ったところ、day2 をピークとする Mieap 発現上昇を認めた。Mieap は p53 の下流遺伝子であり、CSE 刺激は p53 活性化を誘導する可能性がある。CSE による Mieap 発現誘導への p53 の関与は p53siRNA を用いて検討を行った。p53 ノックダウンにより、CSE での p53 発現誘導だけでなく、Mieap 発現も抑制された (図 2)。



(3) Mieap ノックダウンにより、CSE 刺激による ROS 産生と細胞老化誘導は亢進する。

COPD 肺における Mieap 発現低下の病態への関与を明らかにするため、Mieap siRNA によるノックダウンの検討を行った。Mieap siRNA により、Mieap は効率よくノックダウンされた。CSE 刺激による ROS 産生は Mieap ノックダウンにより有意な増加を認めた (図 3)。また CSE 刺激による細胞老化誘導も Mieap ノックダウンにより有意な亢進を認めた (図 4)。



(4) CSE 刺激及び Mieap ノックダウンにより、OCR は低下する。

Mieap の MQC における役割を明らかにするため、Flux analyzer による検討を行った。CSE 刺激と Mieap ノックダウンは、それぞれ OCR 及び ATP 合成を抑制したが、その抑制は Mieap ノックダウンで、より顕著に認められた (図 5)

(5)喫煙暴露による肺気腫様変化誘導は、Mieap ノックアウトマウスで悪化する。

半年間の喫煙暴露は肺気腫様変化を誘導し、野生型と比べて Mieap ノックアウトマウスでの有意な増悪を認めた (図 6 A)。また気管支肺胞洗浄液による検討では、総細胞数、マクロファージ及び好中球数に関しては、野生型と比べて Mieap ノックアウトマウスでの有意な増加を認めた (図 6 B)。また p21 発現などから、Mieap ノックアウトマウスでの細胞老化の亢進も確認された。

図 4 Mieap ノックダウンによる細胞老化の誘導

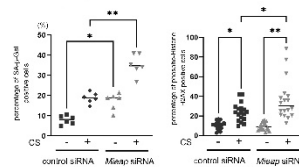
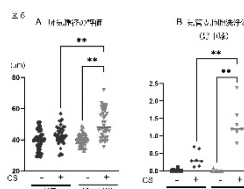
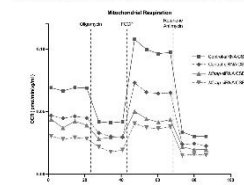


図 5 CSE刺激及びMieap ノックダウンによるOCR低下



(考察と結論)

細胞老化が、COPD 病態進展に寄与する可能性に関しては広く認識されている。また喫煙刺激が細胞老化を亢進させることに関しても、これまで多くの報告があるが、その制御機構についての解明は不十分である。今回我々は、COPD 肺の特に気道上皮細胞における Mieap の発現低下を確認した。また喫煙刺激は Mieap 発現を誘導し、これが従来の報告通り、p53 依存性であることが示された。

喫煙刺激で誘導される Mieap の発現の役割を明らかにするため、Mieap ノックダウンによる検討を行った。その結果、Mieap が喫煙刺激時の細胞内全体、また mtROS 産生及び、細胞老化の制御に作用していることが明らかとなった。さらに Flux analyzer による検討結果から、Mieap がミトコンドリア電子伝達系の恒常性維持に作用しており、ミトコンドリア ROS 産生の機序としてのミトコンドリア電子伝達系異常が関与する可能性は示唆された。

さらに Mieap 発現低下の COPD 病態における生理的な役割を明らかにするため、Mieap ノックアウトマウスによる検討を行い、炎症や肺気腫様病変進展の悪化と細胞老化の亢進を認めた。つまり COPD 肺における Mieap 発現低下は、ミトコンドリア障害、ミトコンドリア ROS 産生、細胞老化亢進により病態進展に寄与している可能性が示唆され、COPD 病態の一端が解明されたと考えられる。しかしながら、Mieap の MQC における正確な役割や、COPD での発現低下の機序は明らかでなく、今後の検討課題と思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Araya Jun, Saito Nayuta, Wakui Hiroshi, Kuwano Kazuyoshi et al.	4. 巻 207
2. 論文標題 Impaired TRIM16-Mediated Lysophagy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Pathogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 65 ~ 76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2001364	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)	

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