

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月2日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790771

研究課題名（和文）慢性閉塞性肺疾患の発症、進展におけるオートファジーの果たす役割の検討

研究課題名（英文）The role of autophagy in COPD pathogenesis

研究代表者

原 弘道 (HARA HIROMICHI)

東京慈恵会医科大学 医学部 助教

研究者番号：70398791

研究成果の概要（和文）：喫煙刺激による気道上皮細胞老化亢進に対して、オートファジーが抑制的に働いていることを明らかにした。クレアチンキナーゼ B(CKB)は、オートファジーとの関連は認めなかったが、その発現低下は喫煙誘導細胞老化と関連していた。COPD 患者由来の気道上皮細胞では、非喫煙者の気道上皮細胞と比較して CKB の発現が低下していた。以上より、肺での CKB の発現低下が細胞老化亢進を介して COPD 病態に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated the inhibitory role of autophagy in bronchial epithelial cell senescence induced by cigarette smoke extract (CSE) exposure. Although creatine kinase B (CKB) was not involved in regulation of autophagy function, decrease of CKB expression enhanced CSE-induced cellular senescence. Furthermore, CKB expression levels were reduced in bronchial epithelial cells isolated from COPD patients compared to those from non-smokers. Taken together, reduced CKB expression levels in lung may be involved in COPD pathogenesis through the acceleration of cellular senescence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患、オートファジー、クレアチンキナーゼ B(CKB)

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞内蛋白分解機構の一つで、細胞内に長く停滞する蛋白、細胞内小器官などの細胞質成分を融解、分解し、生理的な恒常性の維持に重要な役割を果たしている。これまで、神経変性疾患、腫瘍の進展、老化、感染防御など様々な病態にオートファジーが関与していることが報告されている。オートファジー機能の低下は、細胞老

化の指標である、傷害蛋白、小器官の蓄積と関連するため、オートファジーは細胞老化制御の中心的役割を果たしていると考えられている。慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、喫煙が主な原因であり、世界の死亡原因の第4位を占める公衆衛生上重要な呼吸器疾患である。現在まで、その発症、進行を確実に抑制する治療法はなく、その病態の理解と新たな治療法の開発は急務である。COPDの原因

である喫煙刺激は細胞老化を誘導し、また、COPD の肺組織での細胞老化の亢進が報告されている。つまり細胞老化の亢進は COPD の主要な病態の一つであると考えられる。オートファジーが細胞老化の制御を介して、COPD の発症、進行に関与している可能性が示唆されるが、その詳細は明らかではない。

一方、クレアチンキナーゼ B (CKB) は、エネルギー代謝に関わる重要な酵素であり、細胞内の局所で必要な ATP を供給することが報告されている。オートファジーは、ダイナミックな膜構造の変化を特徴とし、局所でのエネルギーを必要とすると考えられるため、オートファジー過程の進行に CKB による ATP 供給が関与し影響を及ぼす可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

喫煙刺激により誘導される気道上皮細胞老化における、オートファジーの役割を明らかにする。さらに、CKB が、オートファジーを介して、細胞老化に及ぼす影響についても明らかにする。

## 3. 研究の方法

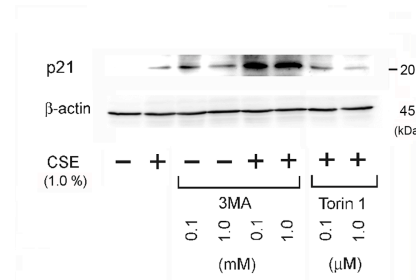
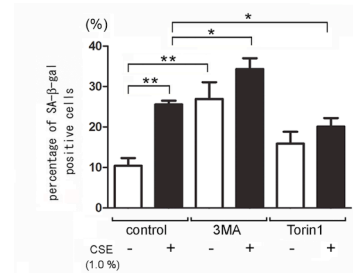
倫理委員会による承認の下、手術肺組織と分離培養した気道上皮細胞を用い検討を行った。cigarette smoke extract(CSE)による細胞老化誘導に対する、オートファジー、CKB の及ぼす影響について検討した。細胞老化は、senescence-associated  $\beta$ gal(SA- $\beta$ gal)染色と p21 の発現で細胞老化を評価した。

オートファジーは Torin1 により亢進させ、3MA もしくは LC3 に対する siRNA により抑制し、細胞老化への影響を検討した。次に、CKB ノックダウン及び、cyclocreatine(Ccr)にて CKB 発現、活性をそれぞれ抑制し、そのオートファジーへの影響、細胞老化への影響を検討した。実際の肺組織においても、CKB の発現を正常肺と COPD 肺で比較検討した。

## 4. 研究成果

**(1) CSE による細胞老化に対し、オートファジーは抑制的に作用する。**

CSE 刺激にて気道上皮細胞に老化を誘導した。3MA 投与もしくは LC3 に対する siRNA でオートファジー機能を抑制すると、CSE による細胞老化はさらに亢進した。一方、Torin1 によりオートファジーを誘導すると CSE による細胞老化亢進が抑制されることが明らかとなった。

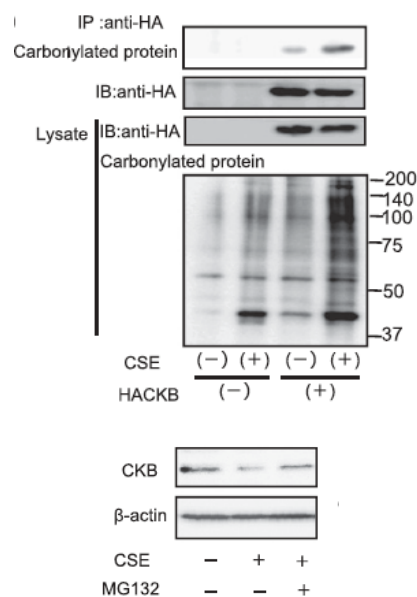


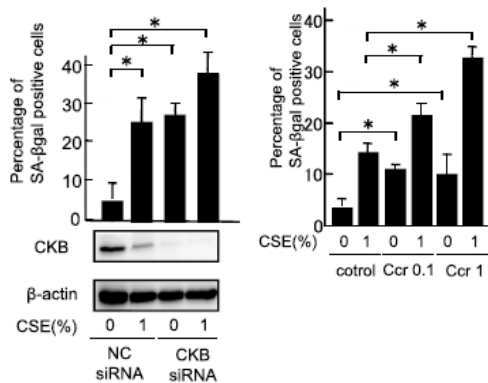
**(2) CKB はオートファジー機能へ影響を及ぼさない。**

気道上皮細胞を用いて、CKB ノックダウン、cyclocreatine(Ccr)にて CKB をそれぞれ抑制し、オートファジー活性への影響をオートファゴソーム形成や、LC3-II のウェスタンブロットにて評価したが、明らかな影響を認めなかった。

**(3) CKB は、喫煙刺激により酸化され、低下し、喫煙誘導細胞老化を亢進する。**

CSE 刺激により CKB はカルボニル化されることを CKB の強制発現、免疫沈降法にて確認した。また、CKB は CSE により傷害を受けると、プロテアソーム系での分解が亢進し、発現と活性が低下した。さらに CKB の抑制 (CKB ノックダウン、CK 阻害剤: Ccr) により細胞老化は亢進した。



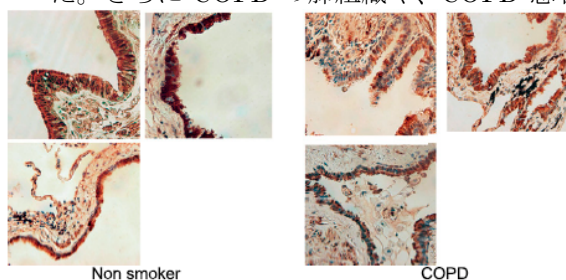


**(4)CKB 発現は COPD 肺組織及び、COPD 由来の気道上皮細胞で低下している。**

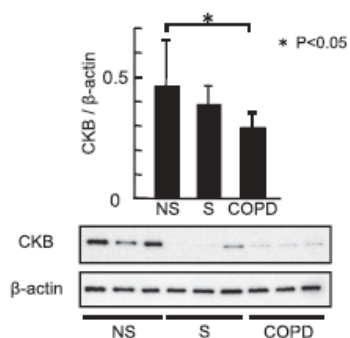
正常肺組織、COPD 肺組織において CKB 発現量を免疫組織学的に比較検討したところ、COPD 肺組織では CKB 発現が低下していた。また、正常肺組織由来の気道上皮細胞と、COPD 肺組織由来の気道上皮細胞とを比較すると、COPD 由来の気道上皮細胞で CKB 野発現が有意に低下していた。

**(結論)**

喫煙刺激により誘導される細胞老化に対し、オートファジーは抑制的に作用していた。喫煙刺激はカルボニル化と引き続くプロテアソームでの分解により CKB の発現を低下させ、細胞老化の亢進に関与すると考えられた。さらに COPD の肺組織や、COPD 患者



から分離した気道上皮細胞では CKB 発現が



低下しており、CKB 発現低下が細胞老化亢進と関連して COPD 病態に関与する可能性が考えられた。

**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 3 件)

① Hara H, Araya J, Takasaka N, Fujii S, Kojima J, Yumino Y, Shimizu K, Ishikawa T, Numata T, Kawaishi M, Saito K, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Hano H, Nakayama K, Kuwano K. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012 Mar;46(3):306-312. 査読あり

② Fujii S, Hara H, Araya J, Takasaka N, Kojima J, Ito S, Minagawa S, Yumino Y, Ishikawa T, Numata T, Kawaishi M, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Nishimura S L, Nakayama K, Kuwano K. *Oncoimmunology in press.* 査読あり

③ 原弘道, 藤井さと子, 荒屋 潤, 皆川俊介, 弓野陽子, 小島淳, 沼田尊功, 河石真, 中山勝敏, 桑野和善 分子呼吸器病学、査読なし Vol.15、No.1、2011、pp.94-96、

[学会発表] (計 3 件)

① H Hara, J Araya, N Takasaka, J Kojima, Y Yumino, S Fujii, T Numata, M Kawaishi, J Hirano, M Odaka, T Morikawa, K Nakayama, and K Kuwano ; Cigarette smoke-induced oxidative modification of CKB is involved in the pathogenesis of COPD in terms of acceleration of bronchial epithelial cell senescence.

European Respiratory Society Annual congress. *Amsterdam.* 2011 年 9 月 28 日.

② H Hara, S Nojiri, J Araya, Y Yumino, S Minagawa, J Kojima, T Numata, M Kawaishi, M Odaka, K Nakayama, T Morikawa, K Kuwano ; The Involvement of Autophagy in Cigarette Smoking Extract-induced Cellular Senescence in Human Bronchial Epithelial Cells American Thoracic Society International Conference. *New Orleans.* 2010 5 月 18 日.

③ 原 弘道, 荒屋 潤、高坂 直樹、弓野陽子、藤井 さと子、小島 淳、石川 威夫、沼田 尊功、河石 真、中山 勝敏、桑野 和善 ; COPD における細胞老化とクレアチニンキナーゼに関する検討 日本呼吸器学会総会 東京 2011 年 4 月 22 日

[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

原 弘道 (HARA HIROMICHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：70398791

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：