

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860660

研究課題名(和文) SIRT6によるオートファジーと細胞老化の制御のCOPDの病態における意義

研究課題名(英文) Autophagy induction by SIRT6 is involved in the regulation of HBEC senescence in COPD pathogenesis.

研究代表者

小島 淳 (Jun, Kojima)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00408395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙による細胞老化の亢進は、慢性閉塞性肺疾患(COPD)病態で重要で、脱アセチル化酵素のSIRT6は抗老化作用を示す。我々はSIRT6によるオートファジー制御が、喫煙誘導性細胞老化で果たす役割を検討した。結果COPD患者由来肺組織ではSIRT6発現が低下しており、喫煙刺激はSIRT6発現を低下させた。SIRT6がインスリン様成長因子(IGF)-Akt-mTORシグナル伝達系の抑制によりオートファジーを誘導し、気道上皮細胞における細胞老化制御に関与することが明らかとなった。SIRT6の発現調整によるオートファジー誘導は、COPDの新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cigarette smoke (CS)-induced cellular senescence has been implicated in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and SIRT6 antagonizes this senescence. Autophagy controls cellular senescence. We sought to investigate the regulatory role for SIRT6 in autophagy activation during CS-induced cellular senescence. We demonstrated that SIRT6 expression levels were decreased in lung homogenates from COPD patients. CS extract suppressed SIRT6 expression and SIRT6 was involved in suppression of CSE-induced HBEC senescence via autophagy induction, which can be attributed to attenuation of IGF-Akt-mTOR signaling in HBEC. Autophagy induction achieved via SIRT6 modulation is a potential effective medical intervention for the prevention of accelerated cellular senescence in COPD pathogenesis.

研究分野：医師薬学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 細胞老化 SIRT6

1. 研究開始当初の背景

I 研究の学術的背景

1) COPD の疫学と臨床的重要性

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は主に喫煙が原因の、慢性進行性の気流閉塞を呈する治療抵抗性疾患である。加齢とともに頻度が増加する老化関連呼吸器疾患であり、高齢化社会の到来はさらなる患者数の増加を意味する。1996 年の厚生省の患者調査によると COPD 患者は約 22 万人と報告されているが、日本 COPD 疫学調査 (Nippon COPD Epidemiology Study; NICE Study) では、40 歳以上全体の約 8.5% が COPD 患者と推定され、我が国の人口構成から計算すると約 530 万人の COPD 患者が存在することとなる。つまり医療経済的にも重要な疾患といえるが、予後を改善させる有効な薬物療法は充分ではなく、分子病態の解明は急務である。

2) COPD と細胞老化

加齢は細胞老化を誘導する最も重要な因子であり、かつ COPD の危険因子である。さらに COPD の最も重要な原因であるタバコ煙は、酸化ストレスを含む細胞障害因子により炎症、老化を誘導し、肺気腫や気道のリモデリングをきたす。実際、COPD 肺では II 型肺胞上皮細胞やクララ細胞での細胞老化の亢進が報告されている。細胞老化の亢進は、細胞増殖の停止による創傷治癒の遅延、senescence-associated secretory phenotype (SASP) による炎症の遷延により COPD 病態に関与すると考えられている。つまり、細胞老化の制御機構の解明が、COPD 病態の理解と新たな治療法の開発の上で重要と思われるが、そのメカニズムは複雑であり、十分に解明されていない。

3) 細胞老化の制御

細胞老化の制御に関する因子としては、細胞内のエネルギー状態や、ストレスにより発生する細胞内の傷害蛋白や小器官の分解除去が重要である。オートファジーは細胞小器官や細胞質成分を膜構造で包み込み、ライソソームまで移送し分解する細胞内蛋白分解機構であり、エネルギー代謝や小器官の分解除去など細胞の恒常性維持の根幹をなす。酸化ストレスで傷害を受けた蛋白や小器官の蓄積は細胞老化を誘導し、オートファジーはその処理過程で重要である。我々は、喫煙刺激に対してオートファジー活性化が不十分であることが、細胞内に傷害蛋白や傷害小器官の蓄積を招き、結果的に細胞老化につながることを見出した。しかしながら細胞老化制御の点からオートファジー機能自体を調整する機序は明らかでない。そこで抗老化蛋白である Sirtuin family の特に SIRT6 に注目した。Sirtuin family は NAD 依存性 Histone deacetylase (HDAC) であり、Histone 及び p53 や NF- κ B など転写因子の脱アセチル化による転写制御により代謝、炎症、老化などの細胞機能を調整している。SIRT1, 6 のノックア

ウトマウスにおいて炎症や早老の表現型が認められており、COPD 患者由来肺組織での SIRT1 の発現低下と炎症、さらにはオートファジーとの関連性が明らかにされている。我々は、以前 transforming growth factor (TGF)- β により誘導される気道上皮細胞の老化を SIRT6 が抑制すること報告している。しかしながら、COPD 病態における SIRT6 の役割は十分に解明されていない。そこで、今回我々は SIRT6 がオートファジーを制御することで、COPD 病態における細胞老化と関連する可能性を考え検討を行うこととした。

2. 研究の目的

SIRT6 によるオートファジーの制御を、その機序を含め明らかにする。SIRT6 により制御されるオートファジーが、喫煙刺激により誘導される細胞老化を規定することを明らかにする。最終的に COPD 病態における SIRT6 の役割を細胞老化制御に点から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

肺組織と気道上皮細胞を用いた SIRT6 発現、オートファジー活性、細胞老化の検討。

肺組織から融解液を作成し SIRT6 発現や細胞老化、さらにオートファジー活性を評価し、臨床指標との関連性を検討する。気道から分離培養した気道上皮細胞を、タバコ煙抽出物で刺激し、SIRT6 発現や細胞老化、さらにオートファジー活性を評価検討する。

SIRT6 によるオートファジー制御の機序の検討。SIRT6 によるオートファジー制御の、喫煙誘導性気道上皮細胞老化への影響の検討。

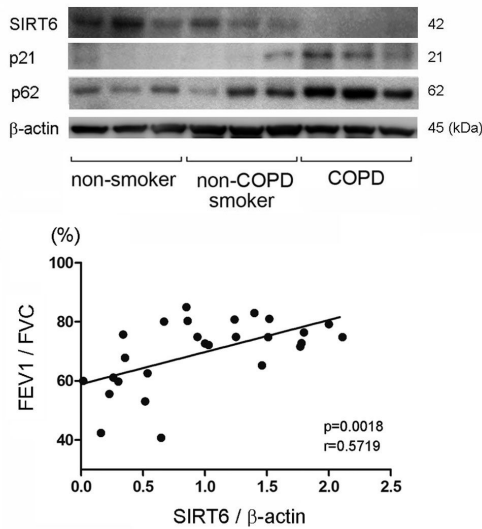
気道上皮細胞で、SIRT6 がオートファジーを制御する機序をインスリン様成長因子 (IGF) -Akt-mTOR シグナル伝達系に注目して検討する。各種阻害剤やオートファジー関連蛋白をノックダウンすることで SIRT6 によりオートファジーの調整が細胞老化の制御に関与することを明らかにする。

4. 研究成果

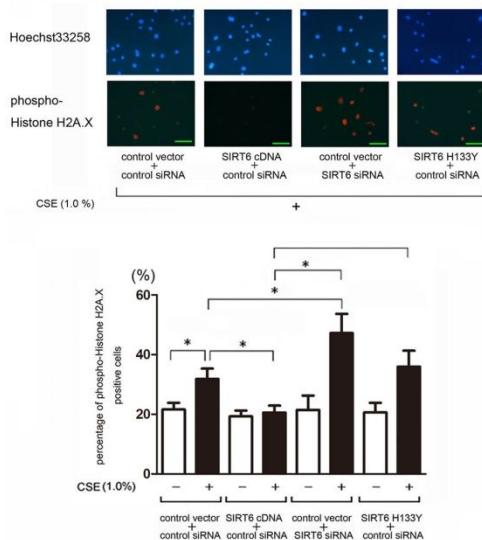
肺組織と気道上皮細胞を用いた SIRT6 発現、オートファジー活性、細胞老化の検討。

肺組織を COPD、non-COPD smoker、non-smoker に分け、ホモジナイザーを用いて肺組織の融解液を作成し SIRT6、老化の指標としての p21、オートファジー分解の指標として p62 の発現をそれぞれ検討した。結果 COPD 肺では SIRT6 発現は有意に低下し、p21 の発現からは老化の亢進が示唆された。また p62 の発現亢進からは、オートファジーによる分解が不十分であることが明らかとなった。さらに SIRT6 の発現量は呼吸機能の 1 秒率と正の相関を示しており、COPD 病態

への SIRT6 の関与が示唆された。(下図)



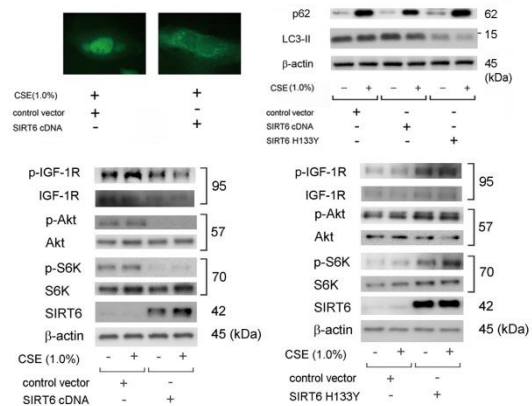
手術肺より分離培養した、ヒト気道上皮細胞を用いて検討を行った。喫煙刺激が SIRT6 の発現を低下させることが明らかとなった。プロテアソーム阻害剤での抑制からは、傷害を受け分解が亢進していると考えられた。タバコ抽出液 (CSE) 刺激が誘導する細胞老化を、SIRT6 が抑制することは、過剰発現やノックダウンによる検討から明らかになった。また SIRT6 の HDAC 活性を失った変異 SIRT6(H133Y) 過剰発現による検討から、SIRT6 による抗老化作用には HDAC 活性が必要であることが明らかとなった。(下図)



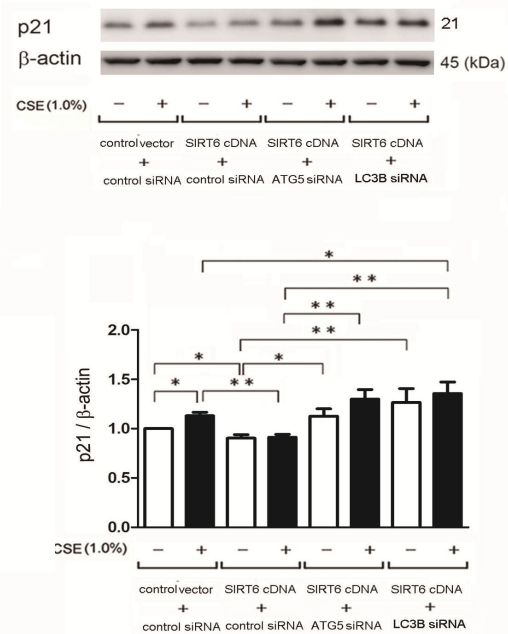
SIRT6 によるオートファジー制御の機序の検討。SIRT6 によるオートファジー制御の、喫煙誘導性気道上皮細胞老化への影響の検討。

ヒト気道上皮細胞を用いて SIRT6 によるオートファジー誘導に関して検討を行った。SIRT6 はオートファジーを亢進させ、その機序の少なくとも一部は IGF-Akt-mTOR シグナル伝達の抑制によることが明らかとなった。またオートファジーの亢進及び

IGF-Akt-mTOR シグナル伝達の抑制に、SIRT6 の HDAC 活性が必要であることも明らかとなった。(下図)



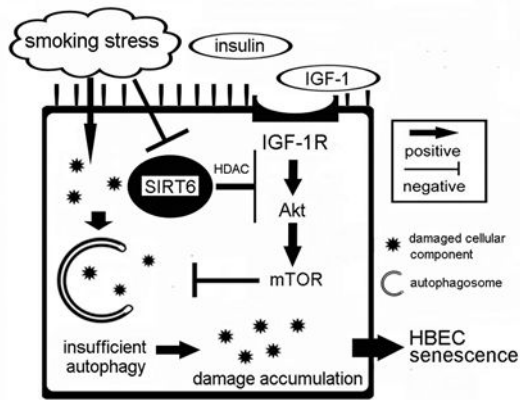
SIRT6 によるオートファジーの亢進が細胞老化の制御に関与するかどうかを、重要なオートファジー関連蛋白である、LC3 と ATG5 のノックダウンにより検討した。LC3 と ATG5 のノックダウンによるオートファジー阻害は SIRT6 過剰発現による抗老化作用を消失させた。(下図)



以上の検討から、SIRT6 は IGF-Akt-mTOR シグナル伝達の抑制により、オートファジーを調整し、COPD 病態における細胞老化の制御に関与する可能性が示唆された。(下図)

(結論)

SIRT6 の発現調整によるオートファジーの亢進は、COPD 病態における細胞老化の亢進を抑制する新たな治療戦略となる可能性が示唆された。



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4件)

Kojima J, Araya J, Hara H, Ito S, Takasaka N, Kobayashi K, Fujii S, Tsurushige C, Numata T, Ishikawa T, Shimizu K, Kawaishi M, Saito K, Kamiya N, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Hano H, Arai S, Miyazaki T, Kaneko Y, Nakayama K, Kuwano K. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) expression in alveolar macrophages in COPD. *Respir Res* 2013;14:30 査読あり

Hara H, Araya J, Ito S, Kobayashi K, Takasaka N, Yoshii Y, Wakui H, Kojima J, Shimizu K, Numata T, Kawaishi M, Kamiya N, Odaka M, Morikawa T, Kaneko Y, Nakayama K, Kuwano K. Mitochondrial fragmentation in cigarette smoke-induced bronchial epithelial cell senescence. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013. Nov 15;305(10):L737-46.

Araya J, Kojima J, Takasaka N, Ito S, Fujii S, Hara H, Yanagisawa H, Kobayashi K, Tsurushige C, Kawaishi M, Kamiya N, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Kawabata Y, Hano H, Nakayama K, Kuwano K. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013. Jan 1;304(1):L56-69.

Takasaka N, Araya J, Hara H, Ito S, Kobayashi K, Kurita Y, Wakui H, Yoshii Y, Yumino Y, Fujii S, Minagawa S, Tsurushige C, Kojima J, Numata T, Shimizu K, Kawaishi M, Kaneko Y, Kamiya N, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Nakayama K, Kuwano K. Autophagy induction by SIRT6 through attenuation of insulin-like growth factor signaling is involved in the regulation of human bronchial epithelial cell senescence. *J Immunol*. 2014 Feb 1;192(3):958-68.

[学会発表](計2件)

高坂直樹、小島淳、荒屋潤 等 「SIRT6によるオートファジー制御と気道上皮細胞老化」日本呼吸器学会総会 2013年4月 東京国際フォーラム

N Takasaka, J Kojima, J Araya et al. 「SIRT6-induced activation of autophagy inhibits CSE-induced bronchial epithelial cell senescence.」European Respiratory Society. Annual Congress, 2013 September, Barcelona. Spain

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小島 淳 (Kojima Jun)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：00408395

(2)連携研究者

なし