

学位授与番号：甲 9 9 4 号

氏 名：伊藤 三郎

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 27 年 7 月 8 日

学位論文名：

PARK2 依存性ミトファジーによる喫煙誘導性気道上皮細胞老化の制御

主論文名：

PARK2-mediated Mitophagy is Involved in Regulation of HBEC Senescence in COPD Pathogenesis.

(PARK2 依存性ミトファジーによる喫煙誘導性気道上皮細胞老化の制御)

学位審査委員長：教授 南沢享

学位審査委員：教授 大橋十也 教授 井口保之

論文要旨

論文提出者名	伊藤三郎	指導教授名	桑野和善
--------	------	-------	------

PARK2-mediated Mitophagy is Involved in Regulation of HBEC Senescence in COPD Pathogenesis.

(PARK2 依存性マイトファジーによる喫煙誘導性気道上皮細胞老化の制御)

Saburo Ito, Jun Araya, Yusuke Kurita, Kenji Kobayashi, Naoki Takasaka, Masahiro Yoshida, Hiromichi Hara, Shunsuke Minagawa, Hiroshi Wakui, Satoko Fujii, Jun Kojima, Kenichiro Shimizu, Takanori Numata, Makoto Kawaishi, Makoto Odaka, Toshiaki Morikawa, Toru Harada, Stephen L Nishimura, Yumi Kaneko, Katsutoshi Nakayama, and Kazuyoshi Kuwano

Autophagy, 11:3, 547-559; March 2015.

喫煙により誘導される ROS 産生増加を伴うミトコンドリア傷害は細胞老化を加速させ COPD 病態に関与すると考えられている。マイトファジーは喫煙により傷害されたミトコンドリアの除去において重要な役割を果たしている可能性があり、PINK1-PARK2 経路はマイトファジーにおいて中心的な機序であると考えられている。そこで私は PINK1-PARK2 調節性マイトファジーの、COPD 病態における喫煙誘導性細胞老化への関与について検討を行った。ミトコンドリア傷害、ROS 産生、細胞老化を HBEC において評価した。マイトファジーは EGFP-LC3B 安定発現 BEAS-2B 細胞を用い、ミトコンドリア外膜蛋白の TOMM20 とドット状に発現しオートファゴソーム形成を表す LC3B との共局在を共焦点顕微鏡で観察することにより評価した。PINK1 と PARK2 のマイトファジーへの関与を検討するため、*PINK1* と *PARK2* のノックダウンおよび *PARK2* の過剰発現実験についても施行した。患者肺における PINK1 と PARK2 の蛋白発現は、ホモジネート肺検体と免疫組織染色により評価した。結果、CSE 刺激はミトコンドリア傷害を誘導するとともに、ROS 産生を増加させ、細胞老化を誘導した。CSE 刺激は HBEC においてマイトファジーを誘導した。CSE 刺激により誘導されたマイトファジーは、*PINK1* ノックダウンおよび *PARK2* ノックダウンで阻害され、その結果 HBEC での ROS 産生と細胞老化は亢進した。患者肺を用いた検討から、COPD 患者肺における PARK2 の発現は非 COPD 患者に比べ低下していることが分かった。これらの結果は PINK1-PARK2 調節性マイトファジーは気道上皮細胞における喫煙誘導性のミトコンドリア傷害と ROS 産生において中心的な制御を行っていることを示唆していると考えられた。COPD 肺における PARK2 の低下は、不十分なマイトファジーが COPD 病態へ関与していることを示している可能性がある。

論文審査の結果の要旨

大学院博士課程（呼吸器内科学）、伊藤三郎氏の学位審査論文「PARK2依存性マイトファジーによる喫煙誘導性気道上皮細胞老化の制御」は、2015年にAutophagy誌（インパクトファクター11.4, 2013）に掲載された「PARK2-mediated mitophagy is involved in regulation of HBEC senescence in COPD pathogenesis」と題される主論文を軸に、桑野和善教授のご指導の下、作成されている。平成27年6月15日、大橋十也教授、井口保之教授および南沢を審査員とする公開学位審査会を開催し、伊藤氏による研究概要の発表に続いて、口頭試験に準じる質疑応答を行った。以下、審査委員会における審査結果を記載する。

1. 本学位論文の科学的価値：慢性閉塞性肺疾患（以下、COPD）は有病率が高く、治癒困難な疾患である。特に喫煙が原因として重要視され、喫煙による活性酸素種（以下、ROS）の産生増加に伴うミトコンドリア障害が発症と病態進行に深く関与する。しかし、ミトコンドリア障害を起こす詳細な機序は不明であったが、本研究によって、気道上皮細胞におけるPINK1-PARK2制御下でのマイトファジーが、細胞老化を起こし、ミトコンドリア障害に中心的な役割を果たしていることが明らかとなった。本研究結果は、主としてヒト培養気道上皮細胞を使用した *in vitro* の実験系から得られており、組織免疫学のおよび電子顕微鏡による形態学的検討、遺伝子工学を用いた遺伝子発現調節法に基づく標的分子の機能解明によって、マイトファジーが不完全であることがCOPDの病態悪化に関わることを明らかにしている。さらにCOPD患者の肺切除標本を使った臨床的な検討も加えている。本研究はマイトファジーがCOPDの病態形成に重要であることを示す先駆的研究であり、学術的価値が極めて高いと考えられる。
2. 本研究は、研究上の倫理規範に準じて実行されている。
3. 以上の点を踏まえて、以下の項目を含む質疑が審査員より伊藤氏になされた。
 - Cigarette smoke extract に含まれている成分のうち、本実験結果に最も関与するものは特定出来るのか。
 - COPD患者でPARK2発現が低下する原因は何か。*In vitro*の実験では、PARK2発現はむしろわずかに増加しており、臨床結果と一致しないが、その点をどのように考えるのか。
 - Cigarette smoke extract でマイトファジーが増えるがオートファジー全体では低下しているように見えるが、その点をどのように考えるのか。
 - オートファジーを誘導する薬剤はあるのか。COPDに対してマイトファジーを促進することが治療に結びつくと考えるのか。

- PINK1 の過剰発現実験を行っているのか。

これらの質疑に対し、伊藤氏は研究結果及び文献的考察に基づき、適確に回答した。

4. 伊藤三郎氏の博士（医学）としての資質：本学位論文を桑野教授および責任著者である荒屋潤准教授の指導の下、研究全般を考案、実行し、第1著者として極めて質の高い科学誌に論文を掲載した点、口頭試験における専門領域に関する見識の深さ、医学・細胞生物学に関する学識の広さを認める点、などから伊藤氏の高い将来性が期待される。

以上の結果を踏まえ、大橋教授、井口教授とともに審議し、本研究はマイトファジーがCOPDの病態形成に重要であることを示す先駆的研究であり、将来の臨床的橋渡し研究にもつながる点でも重要である。本論文は学位申請論文として十分に価値あるものと審査委員会では認定した。