

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(A)
 研究期間： 2007 ～ 2009
 課題番号： 19689017
 研究課題名（和文） 肺気道リモデリングにおけるメカニカルストレスの役割
 研究課題名（英文） Role for mechanical stress in lung and airway remodeling

研究代表者
 伊藤 理 (ITO SATORU)
 名古屋大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号： 60378073

研究成果の概要（和文）：培養ヒト気道平滑筋細胞、肺微小血管内皮細胞において、細胞伸展（ストレッチ）刺激が細胞を活性化させ、ストレッチ活性化型 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入を引き起こすこと、サイトカイン(IL-6)、ケモカイン(IL-8, MCP-1)産生を誘導することを見出した。過剰なメカニカルストレスが肺構成細胞に作用し細胞機能変化を生じることにより、肺気道リモデリングの病態形成に関与する可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that mechanical stretch activates Ca^{2+} influx via stretch-activated channels and induces production of cytokine/chemokines (IL-6, IL-8, and MCP-1) in human airway smooth muscle cells and pulmonary microvascular endothelial cells. Thus, excessive mechanical strain would contribute to the pathogenesis of lung and airway remodeling via altering cellular properties of pulmonary cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2008 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	10,700,000	3,210,000	13,910,000

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：気管支喘息、リモデリング、メカニカルストレス、ARDS、TRP、カルシウムイオン

1. 研究開始当初の背景

我々の呼吸器系は、生体内環境で常に

様々なタイプの機械的刺激（メカニカルストレス）にさらされている。メカニカルス

トレスは呼吸器系の発達・分化、正常機能のみならず、多くの呼吸器疾患の病態生理に影響していると考えられる。重要なことに、呼吸器系の細胞群が過剰なメカニカルストレスを受け続ける環境下では、メカニカルストレスが特に気道肺リモデリングの形成および炎症反応など呼吸器疾患に深く関与することが予測される。しかしながら、メカニカルストレスを受けた呼吸器系細胞がどのような機序でメカニカル刺激を感知し細胞内にシグナルとして伝えるか、どのような形質転換を来すことで病態につながるかについての解明は十分になされていない。

2. 研究の目的

メカニカルストレスが気道肺リモデリング・気道炎症に与える影響とその機序について明らかにする。

(1) 喘息における気道リモデリングの主要な病理組織像は慢性の気道炎症および気道収縮刺激に伴う気道平滑筋層の増生である。

(2) ARDS を初めとした呼吸不全ではしばしば機械的人工呼吸器による人工換気が必要となるが、人工呼吸器による肺の繰り返しは肺毛細血管内皮機能障害などを介して更なる肺傷害(ventilator-induced lung injury; VILI)を生じ得る。

本研究では気道平滑筋細胞と肺毛細血管内皮細胞に焦点をあて、メカニカルストレスによる細胞機能制御について追究した。

3. 研究の方法

(1) シリコン膜上に培養したヒト気道平滑筋細胞もしくはヒト肺毛細血管内皮細胞に対して、細胞伸展装置(ST-150, Strex 社製)を用いて単回伸展(ストレッチ)

刺激を与えた時の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を fura-2 蛍光強度変化によって測定した。ストレッチ活性型 Ca^{2+} チャネルの候補遺伝子 TRPV 群の mRNA 発現を RT-PCR 法で検討した。

(2) ヒト気道平滑筋細胞に対して endothelin-1 による持続的収縮刺激を与えた際のサイトカイン(IL-6)産生を ELISA 法で測定し、mRNA 発現変化を RT-PCR 法で検討する。MAP-kinase 活性化を Western-blot 法で検討した。

(3) ヒト肺毛細血管内皮細胞に対して細胞伸展装置(ST-140, Strex 社製)を用いて繰り返し細胞ストレッチ刺激(伸展強度 ~20%, 50 回/分, ~24h)を与えた際の細胞からのサイトカイン・ケモカイン(IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1)産生を ELISA 法で測定し、mRNA の発現を RT-PCR 法及び real-time PCR 法で検討する。またストレッチによる接着分子(ICAM-1, VCAM-1)発現の変化を RT-PCR 法で検討した。ストレッチ刺激後の細胞形態の変化、細胞骨格の変化をアクチン蛍光染色法で検討した。

4. 研究成果

(1) シリコン膜上に培養したヒト気道平滑筋細胞もしくはヒト肺毛細血管内皮細胞の細胞単回伸展(ストレッチ)刺激は、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こした。この反応はストレッチ強度依存性であり、細胞外 Ca^{2+} 依存性であった。いずれの細胞においてもストレッチによる Ca^{2+} 濃度上昇はストレッチ活性型 Ca^{2+} チャネル阻害剤 Gd^{3+} もしくは TRPV チャネル阻害剤 ruthenium red により抑制された。両細胞において TRPV-2, TRPV-4 の mRNA 発現を認めた。細胞内 Ca^{2+} 濃度は普遍的な細胞内

セカンドメッセンジャーであることから、以上の結果から、過剰なメカニカルストレスはストレッチ活性型 Ca^{2+} チャネル活性化を介して呼吸器系細胞機能およびメカニカルストレス関連呼吸器疾患の病態に影響することが示唆された。

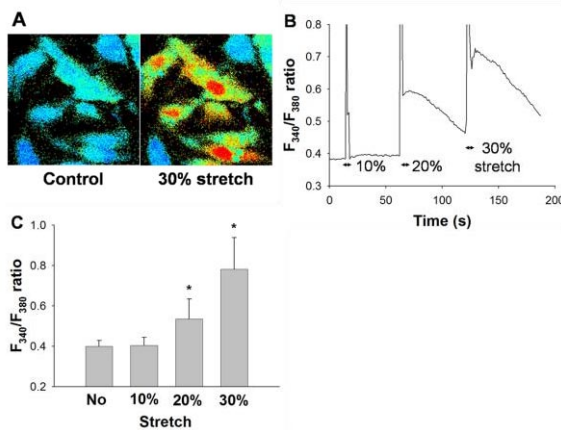


図 1. ヒト肺微小血管内皮細胞におけるストレッチによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇

(2) ヒト気道平滑筋細胞に対する endothelin-1 刺激は、濃度依存性 (~10 μM) に細胞からの IL-6 産生を増強した。MAP-kinase (ERK1/2, p38)の活性化および複数の Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入が IL-6 産生に必須であることが示された。Endothelin-1 は慢性喘息の気道上皮に強く発現しており、喘息の病態において endothelin-1 は気道平滑筋細胞に作用することで収縮刺激のみならず IL-6 産生など気道炎症反応にも寄与している可能性が考えられた。

(3) ヒト肺毛細血管内皮細胞に対する繰り返しストレッチ刺激により、伸展強度依存性に細胞からの IL-6, IL-8, MCP-1 産生が増強した。一方で IL-1 β 産生、接着分子(ICAM-1, VCAM-1)発現に関しては変化を認めなかった。ストレッチによる肺毛細

血管内皮細胞からの IL-8 産生は、p38 MAP-kinase により制御されることが見出された。一方で、ERK1/2, JNK, ストレッチ活性型 Ca^{2+} チャネルの関与は見られなかった。伸展強度 20%のストレッチ刺激はストレッチ方向に対し垂直方向への細胞整列を引き起こした。この反応はアクチン重合の亢進を伴っていた。形態学的にはストレッチによる明らかな内皮細胞傷害は認められなかった。IL-8 は極めて強い好中球活性化因子であり、ARDS, VILI の病態形成に重要な役割を果たすと考えられている。人工呼吸器による肺の過剰な伸展は肺毛細血管内皮に作用した場合、内皮からの IL-8 産生を介して更なる肺傷害を引き起こす可能性が考えられた。

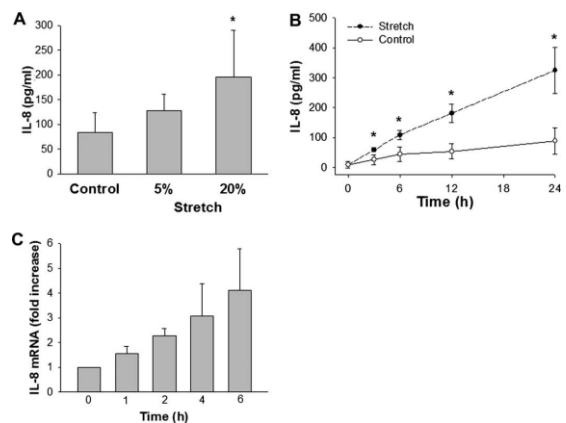


図 2. ヒト肺微小血管内皮細胞におけるストレッチによる IL-8 産生増強効果

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 7 件)

- ① Ito S, Suki B, Kume H, Numaguchi Y, Ishii M, Iwaki M, Kondo M, Naruse K, Hasegawa Y, Sokabe M. Actin cytoskeleton regulates stretch-activated Ca^{2+} influx in human pulmonary microvascular endothelial cells.

- Am J Respir Cell Mol Biol* doi:10.1165/rcmb.2009-0073OC.査読有
- ② Iwaki M, **Ito S**, Morioka M, Iwata S, Numaguchi Y, Ishii M, Kondo M, Kume H, Naruse K, Sokabe M, Hasegawa Y. Mechanical stretch enhances IL-8 production in pulmonary microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 389: 531–536, 2009.査読有
 - ③ Perez-Zoghbi JF, Karner C, **Ito S**, Alrashdan YA, Shepherd M, Sanderson M. Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function. *Pul Pharmacol Ther* 22:388-397, 2009. [Review]査読有
 - ④ Iwata S, **Ito S**, Iwaki M, Kondo M, Sashio T, Takeda N, Sokabe M, Hasegawa Y, Kume H. Regulation of endothelin-1-induced interleukin-6 production by Ca²⁺ influx in human airway smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 605:15-22,2009.査読有
 - ⑤ Shiraki A, Kume H, Oguma T, Makino Y, **Ito S**, Shimokata K, Honjo H, Kamiya K. Role of Ca²⁺ mobilization and Ca²⁺ sensitization in 8-iso-PGF2 α -Induced contraction in airway smooth muscle. *Clin Exp Allergy* 39:236-245, 2009.査読有
 - ⑥ **Ito S**, Kume H, Shiraki A, Kondo M, Makino Y, Kamiya K, Hasegawa Y. Inhibition by the cold receptor agonists menthol and icilin of airway smooth muscle contraction. *Pulm Pharmacol Ther* 21:812-817, 2008.査読有
 - ⑦ **Ito S**, Kume H, Naruse K, Kondo M, Takeda N, Iwata S, Hasegawa Y, Sokabe M. A novel Ca²⁺ influx pathway activated by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38:407-413, 2008. 査読有
- ① **伊藤理**、他. ヒト肺微小血管内皮細胞におけるストレッチ活性型 Ca²⁺流入と TRPV-4 チャンネルの関連. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 秋田 2009.10.29.
 - ② **Ito S**, et al. Role of Ca²⁺ influx pathways in airway smooth muscle cell functions. *The 49th Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society*, Tokyo, June 14, 2009. [English Mini Symposium]
 - ③ **伊藤理**、他. ヒト肺微小血管内皮における stretch-activated Ca²⁺流入の制御機構：アクチン細胞骨格の役割. 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会 東京 2009.6.13.
 - ④ **Ito S**, et al. Actin cytoskeleton regulates mechanical stretch-activated Ca²⁺ influx in human lung microvascular endothelial cells. *ATS 2009 International Conference*, San Diego, California, USA, May 17, 2009.
 - ⑤ **伊藤理**、他. 気道平滑筋細胞の機能解析：細胞内 Ca²⁺シグナルの役割. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2008. 11.28.
 - ⑥ **伊藤理**、他. ヒト微小血管内皮細胞における Ca²⁺流入機構. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京 2008.11.27.
 - ⑦ **伊藤理**、他. ヒト微小血管内皮細胞における stretch-activated Ca²⁺ influx の制御. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会 神戸 2008.6.17.
 - ⑧ **伊藤理**. 学会奨励賞受賞講演 “A novel Ca²⁺ influx pathway activated by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells.” 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会 神戸 2008.6.15.
 - ⑨ **Ito S**, et al. Mechanical stretch activates Ca²⁺ influx in human lung microvascular endothelial cells. *ATS 2008 International*

Conference, Toronto, Ontario, Canada, May 21, 2008.

- ⑩ **Ito S.**, et al. Mechanobiology of airway smooth muscle cells: A novel Ca²⁺ influx pathway activated by mechanical stretch. *6th International Young Investigators' Symposium on Smooth Muscle*, Sydney, NSW, Australia, Nov. 7, 2007.
- ⑪ **Ito S.**, et al. A role of the cold receptor for menthol-induced relaxation of airway smooth muscle. *ATS 2007 International Conference*, San Francisco, California, USA, May 22, 2007.
- ⑫ **Ito S.**, et al. Effects of airway and tissue heterogeneity for partitioning of airway and tissue properties in normal mice. *ATS 2007 International Conference*, San Francisco, California, USA, May 20, 2007.
- ⑬ **伊藤理**、他。Menthol は寒冷受容体を介して気道平滑筋を弛緩させる。第 47 回日本呼吸器学会学術講演会 東京 2007.5.12.
- ⑭ **Ito S.**, et al. *The 47th Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society*, Tokyo, May 11, 2007. [English Mini Symposium]

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/102/p10218.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 理 (ITO SATORU)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60378073