

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860209

研究課題名(和文) メカニカルストレスの関与するALI/ARDSの病態解明

研究課題名(英文) To identify pathogenesis of ALI/ARDS affected by mechanical stress

研究代表者

麻生 裕紀 (Aso, Hiromichi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：80635590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円

研究成果の概要(和文)：正常ヒト気道平滑筋細胞を用いた実験においてメカニカルストレス刺激により細胞内からのATP放出が認められ、強度・時間依存性に認められた。

正常ヒト肺線維芽細胞を用いた実験において、細胞伸展装置を用いて伸展刺激を与え、さらに繰り返し伸展刺激を与えた後の細胞上清のATP濃度を測定した。細胞伸展刺激によりCa濃度は速やかに上昇し、強度依存的に認められた。またCa濃度の上昇とともにATP濃度の上昇も認められた。以上の知見よりメカニカルストレスにより気道平滑筋細胞や肺線維芽細胞においてCaシグナルを介したATP放出が認められ、肺炎症疾患の病態に関してのメカニカルストレスの関与が推測された。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to determine whether mechanical stretching affects lung disease such as ALI/ARDS, asthma, COPD and interstitial pneumonia. We investigated whether mechanical stretch induces ATP release from airway smooth muscle cells. Concentrations of ATP in cell culture were significantly elevated by cyclic stretch. We further visualized the stretch-induced ATP release from the cells in real time using a luminescence imaging system. In primary human lung fibroblasts, the intracellular Ca²⁺ concentration transiently increased in a strain-dependent manner following mechanical stretching and subsequent unloading. Moreover, cyclic stretching induced significant ATP releases from fibroblasts. Our findings suggest that increased intracellular Ca²⁺ concentration in airway smooth muscle cells and lung fibroblasts in response to mechanical stress would play a role in physiology and pathophysiology of asthma, COPD, ALI/ARDS and interstitial pneumonia.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：メカニカルストレス ATP カルシウム

1. 研究開始当初の背景

ALI/ARDS は肺の炎症と血管透過性亢進を基本病態とした疾患群である。様々な臨床研究がなされているが、薬物治療として全身ステロイド療法・好中球エラスターゼ阻害剤・抗凝固療法などが挙げられるが確立されたものはなく、死亡率は約 40%と予後の悪い病態であり、病態解明・治療開発が緊急の臨床課題となっている。生存する上で様々なストレスを受けているが、この多様なストレスの中でメカニカルストレスは生体内の細胞や組織に負荷される物理的な刺激である。ALI/ARDS においては、呼吸による肺の過伸展や末梢血管の血流・血圧の増加によりメカニカルストレスにさらされている。さらに呼吸不全に対して人工呼吸器による機械換気が必要となるが、この呼吸器管理による肺の受動的な伸展・弛緩の繰り返しは肺微小血管内皮細胞傷害などを介して VILI を生じる。このような ALI/ARDS の病態の条件下において、肺微小血管内皮細胞は過剰なメカニカルストレスを受け続ける環境下にある。このような病態においては過剰な伸展刺激が与えられ、傷害と線維化がさらに進行する。この機械的伸展刺激と ALI/ARDS の重症化のメカニズムにおいて明らかにされていない。

気道壁内の気道平滑筋細胞は持続的機械刺激を受けており、この機械刺激によりさまざまな細胞機能が影響を受ける。細胞外 ATP は気道におけるメディエーターとして働くことに加え、喘息や COPD の病態に重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、気道内の ATP 放出に関わる気道平滑筋細胞の役割は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ALI/ARDS・COPD・喘息・間質性肺炎などの肺炎症疾患の病態における機械的刺激（メカニカルストレス）による肺線維芽細胞・気道平滑筋細胞などのヒト正常細胞における Adenosine Triphosphate (ATP) の産生、さらにこれらの肺炎症疾患における ATP の役割を解明することである。具体的には申請者が以前より実験手法として確立している培養細胞伸展装置を使用して、ヒト肺線維芽細胞やヒト気道平滑筋細胞における ATP 産生を確認し、そのメカニズムを解明する。このことにより肺炎症疾患における ATP の役割を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 正常ヒト気道平滑筋細胞を使用し、細胞伸展装置を使用して水平方向の伸展刺激を与えた。細胞上清 ATP 濃度は、ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応による発光測定で評

価した。細胞内 Ca^{2+} 濃度は fura-2 蛍光強度比で測定した。画像強調と高感度 EM-CCD カメラ機能を有する顕微鏡を使用し ATP 放出による発光をリアルタイムで観察した。

(2) 正常ヒト肺線維芽細胞をコラーゲンコーティングしたシリコン膜上で培養し、細胞伸展装置を用いて伸展刺激を与えた後に強度 10%~30%の単回伸展刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を fura-2 蛍光強度比により測定した。繰り返し伸展刺激を与えた後の細胞上清の ATP 濃度はルシフェリン・ルシフェラーゼ反応による発光にて測定した。Cytochalasin D のアクチン細胞骨格に対する効果は蛍光 phalloidin 染色にて観察した。

4. 研究成果

(1) ヒト気道平滑筋細胞による結果

①繰り返し伸展刺激による ATP 放出

細胞上清 ATP 濃度はストレッチ強度 12%、20%の周期的伸展刺激 (10 回/分および 30 回/分) によって有意に増加した。伸展刺激 (20%, 30 回/分) による ATP 濃度上昇は 10-15 分で最大となった。

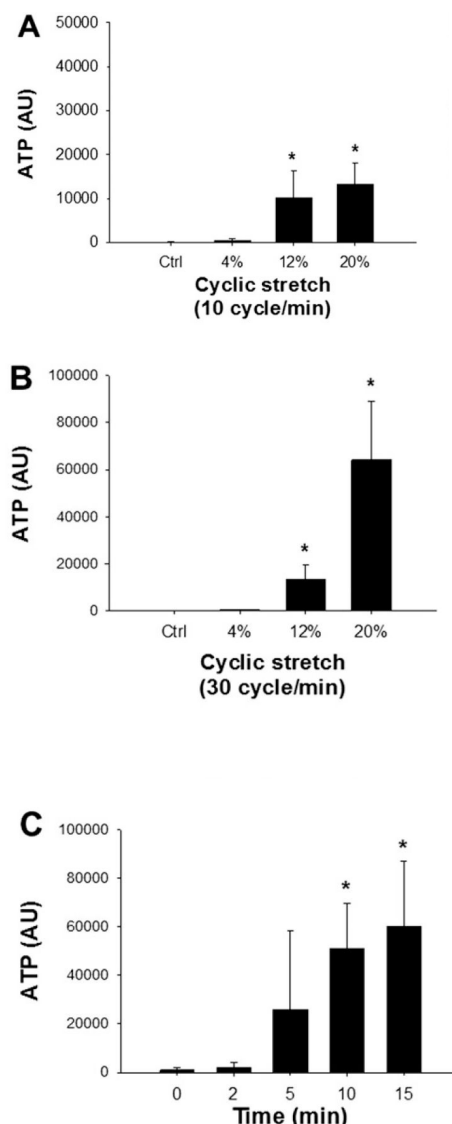


図1 ATP 放出におけるメカニカルストレスの効果

②伸展刺激による ATP リアルタイムイメージング画像

強度 22%、1 秒間の伸展刺激によって数個の細胞から ATP が放出され周囲へ拡散する様子が観察された。ATP 放出箇所の分布は不均一であった。

③伸展刺激による ATP リアルタイムイメージングの経時的変化

強度 22%、1 秒間の伸展刺激後、28 箇所から ATP 放出が観察された。ATP 濃度は伸展刺激約 30 秒後に最大となり、次第に低下した。ATP 放出時間は発光強度変化率の最大値と最小値を呈した時点の時間差で計算され、代表例では 29 秒間であった。28 箇所の ATP 放出時間の範囲は平均 66.5 秒であった。

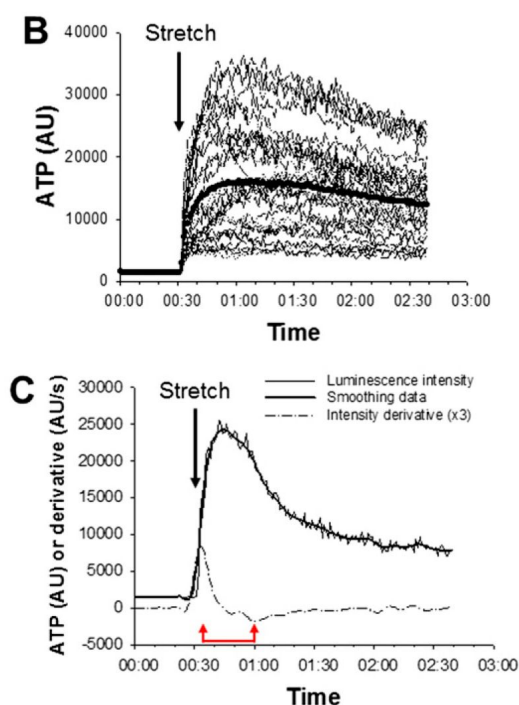


図2 ATP 放出の経時的変化

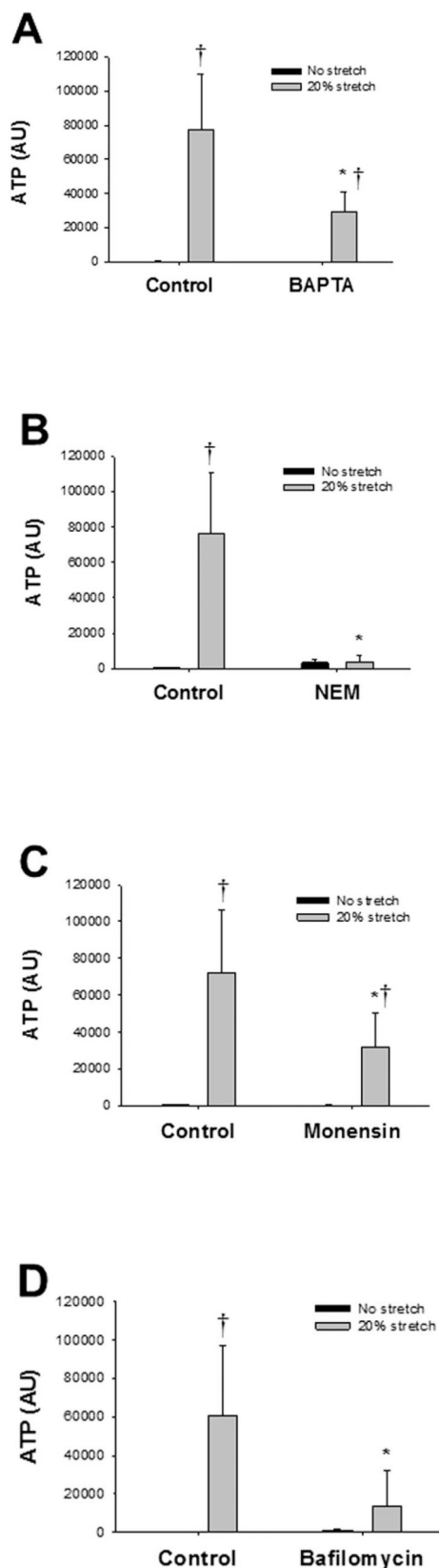
④複数回伸展刺激による ATP 放出のリアルタイムイメージング

15 分以上の間隔を開けて、14%、22%、31% の順に連続した 3 回の伸展刺激を与えた。14%伸展刺激により観察範囲内で 1 箇所 ATP 放出を認めた。22%、31%伸展刺激による ATP 放出細胞数はそれぞれ 28、22 箇所、ATP 濃度の最大値は同等であった。22%と 31%伸展刺激に応答して一部 ATP 放出の重複を認めたが、多くは 1 回のみ ATP を放出した。

⑤伸展刺激による ATP 放出機序における vesicular exocytosis の役割

Ca²⁺依存性 vesicular exocytosis を阻害する作用を有する薬剤 (BPTA, N-ethylmaleimide, monensin, bafilomycin) はいずれも伸展刺激 (20%, 30 回/分) によ

る細胞上清 ATP 濃度の増加を抑制した。一方、pannexin hemichannel 阻害剤 (carbenoxolone) は伸展刺激による細胞上清 ATP 濃度上昇との関連は認められなかった。



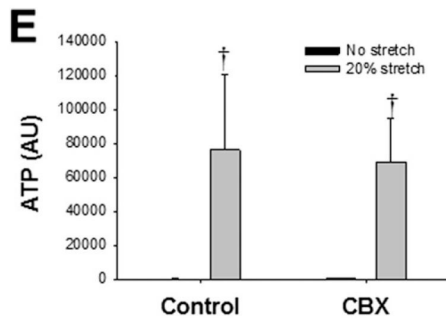


図3 Ca 阻害薬の効果

⑥ 伸展刺激による ATP 放出に対する ruthenium red の効果

TRPV チャンネルファミリー阻害薬 ruthenium red は GSK1016790A による Ca^{2+} 濃度の増加を抑制した。一方、20%伸展刺激による細胞上清 ATP 濃度の増加を抑制しなかった。

以上より、ヒト気道平滑筋細胞が伸展刺激に応答して ATP を放出し、その機序が vesicular exocytosis によることが示された。また ATP 放出と Ca^{2+} 濃度上昇における TRPV の関与は否定的であった。

(2) ヒト肺線維芽細胞による結果

① ヒト肺線維芽細胞は伸展刺激により Ca^{2+} 濃度が一過性に上昇する。

伸展刺激により Ca^{2+} 濃度は速やかに上昇しピークを形成し、ゆっくり低下した。この一過性 Ca^{2+} 濃度上昇は強度依存的(10%-30%)であった。低浸透圧刺激による細胞膜伸展刺激でも同様に Ca^{2+} 濃度上昇が認められた。

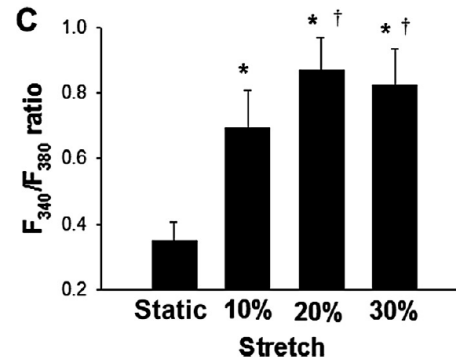
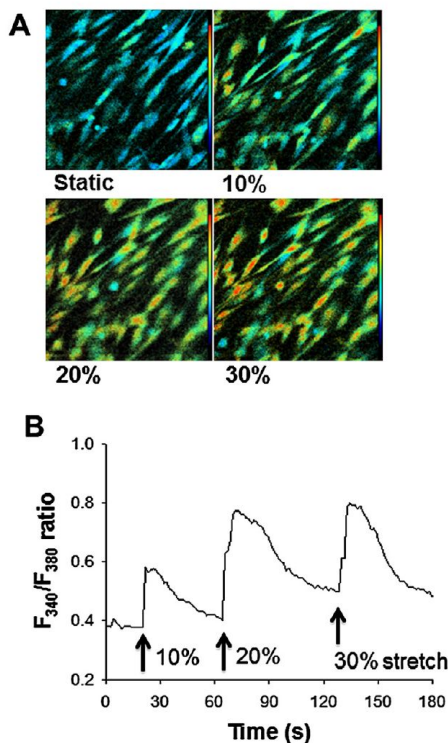


図4 Ca^{2+} 濃度におけるメカニカルストレスの効果

② Ca^{2+} 濃度上昇は細胞外からの Ca^{2+} 流入によりもたらされる

Ca^{2+} 未添加の細胞外液に EGTA を加えた細胞外液を作成し、伸展刺激を与えたところ、 Ca^{2+} 濃度上昇は著しく抑制された。また、選択的伸展活性型イオンチャネル阻害薬 GsMTx-4、伸展活性型チャネル阻害薬 Gd^{3+} 、非選択的 Ca^{2+} チャネル阻害薬 ruthenium red を加えたが Ca^{2+} 濃度上昇は抑制されなかった。

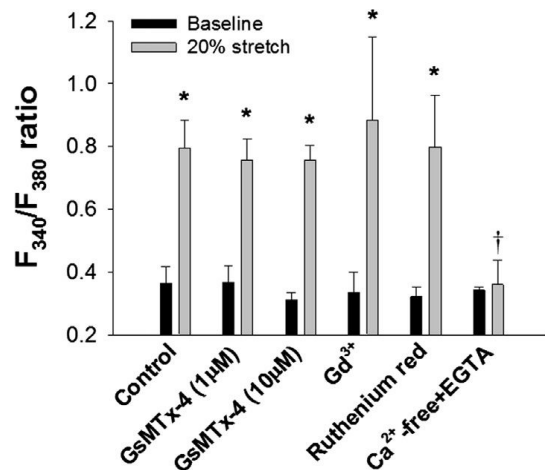


図5 Ca 阻害薬の効果

③ Ca^{2+} 濃度上昇と ATP 放出の関係

伸展刺激により細胞上清の ATP 濃度は有意に上昇した。しかし、ATP 分解酵素 apyrase やプリン受容体阻害薬 suramin において、伸展刺激による Ca^{2+} 濃度上昇は抑制されなかった。

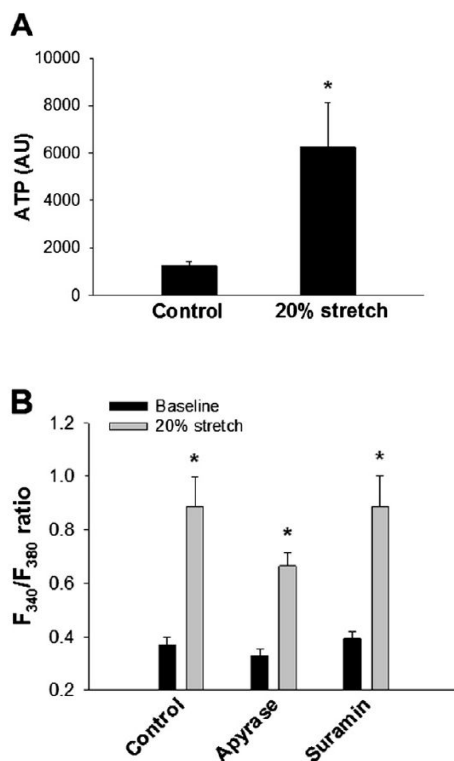


図6 ATP放出におけるメカニカルストレスの役割

④Ca²⁺流入とアクチン細胞骨格の関係
ヒト肺線維芽細胞のアクチン細胞骨格は、アクチン重合阻害薬 cytochalasin D において効果的に阻害されていることが確認された。次に cytochalasin D 処理後の肺線維芽細胞に伸展刺激を与えたところ、Ca²⁺上昇は抑制されなかった。

以上より、ヒト肺線維芽細胞は伸展刺激により、細胞外からの Ca²⁺流入による Ca²⁺濃度の上昇と ATP を放出することが示された。

本研究において、肺炎症疾患において細胞内 Ca²⁺濃度の上昇と ATP 放出を介したメカニカルストレスの関与が示唆された。

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 2 件)

①Takahara N, Ito S, Aso H. Real-time imaging of ATP release induced by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 査読有
2014 Dec;51(6):772-82.doi:10.1165/rcmb.2014-00080C.

②Murata N, Ito S, Aso H. Ca²⁺ influx and ATP release mediated by mechanical stretch in human lung fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2014 Oct 10; 453 (1): 101

-5.doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.063.

〔学会発表〕(計 1 件)

①高原 紀博 ヒト気道平滑筋細胞のメカニカルストレス誘導性 ATP 放出のリアルタイムイメージング 日本アレルギー学会秋季学術大会 2013 年 11 月 28 日～30 日 東京都千代田区 ホテルニューオータニ

6. 研究組織

(1)研究代表者

麻生 裕紀 (ASO Hiromichi)
名古屋大学医学部附属病院 病院助教
研究者番号：80635590

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

高原 紀博
名古屋大学医学部呼吸器内科 大学院生