

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350505

研究課題名(和文)リモデリング進行解明に向けた伸展負荷時の肺胞上皮細胞の構造と機能変化に関する研究

研究課題名(英文)The relationship between the morphological change and the function change of alveolar cell during mechanical stretch

研究代表者

世良 俊博 (SERA, TOSHIHIRO)

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：40373526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺胞を覆っている肺胞上皮細胞には呼吸に伴って伸展刺激が負荷されている。換気により細胞に過度な力が加わると、肺サーファクタント分泌能が低下することが考えられている。一方で、進展刺激に対して細胞骨格を再構築させ形態変化を行う。本研究では、肺胞上皮細胞を弾性薄膜上に培養し、伸展負荷による細胞骨格変化と分泌能変化関係を調べた。本研究結果より、伸展刺激によりアクチンが細胞全体に存在に現れると細胞内の小胞輸送が阻害されている可能性が示唆された。さらに、血管内皮細胞と肺胞上皮細胞の共培養マイクロデバイスを作製した。このマイクロデバイスには、圧力を調整することによって細胞に伸展刺激を加えることが可能である。

研究成果の概要(英文)：Alveolar cells secrete pulmonary surfactant by vesicles to prevent lung collapse. Previous studies reported that this function could decrease due to the high mechanical force, such as a ventilator. On the other hand, the force would lead the cytoskeleton reconstruction and morphological change. In this study, we investigated the relationship between the morphological change and the function change. A549 cells were cultured on the PDMS membrane and loaded by 20% strain. When the cytoskeleton was reconstructed by the strain, the vesicles were observed in the cell more than control, suggesting that the cytoskeleton might inhibit the intracellular transport by vesicles. Additionally, we developed the MEMS device for co-cultures of endothelial and alveolar cells. In this system, each cell was cultured on the opposite sides of the PDMS membrane, respectively. Furthermore, the membrane could be stretched, resulting that the cells were loaded by the strain of breathing motion.

研究分野：生体工学

キーワード：肺胞上皮細胞 細胞骨格 小胞輸送 力学刺激

1. 研究開始当初の背景

肺は、生体エネルギー代謝を行うのに必要な酸素を摂取し二酸化炭素を排出する唯一の臓器である。酸素・二酸化炭素は気道を経由して吸入・呼出されるが、気道の大部分は単なる空気の通り道であり、実際ガス交換を行っているのは直径 200~300 ミクロンの肺胞だけである。肺胞は気道の末梢に存在し、一本の終末細気管支に肺胞管を介して複数の肺胞が房状につながって肺細葉を形成している。肺上皮細胞には I 型と II 型の 2 種類存在する。I 型肺胞上皮細胞は肺胞壁に存在し、基底膜を介して毛細血管内皮細胞を接している。主にガス交換に関係し、肺胞内の酸素を拡散によって毛細血管内を流れる赤血球に取り込む。肺胞壁の空気と接する面は、肺サーファクタントと呼ばれる表面活性物質で覆われているが、II 型肺胞上皮細胞は界面活性を持ったリン脂質である肺サーファクタントを産生し、肺胞の表面張力を調整し肺胞が虚脱するのを防ぐ役割がある。

肺胞上皮細胞は非常に大きな力学負荷を受けている。一般に細胞は力学負荷にตอบสนองして、自身の機能や構造を変化させ、リモデリングを引き起こすことが知られており、肺胞上皮細胞も例外でない。人工呼吸の連続的高圧力負荷による肺組織や細胞が徐々に損傷していくことや、肺組織が破壊される肺気腫の進行には力学負荷が関与しているという報告がある。また、リモデリングが進行すると、肺胞上皮細胞 - 血管内皮細胞間の透過率が増加するという報告もある。一方、最近のリモデリングシグナルに関する研究によると、細胞内タンパク質 PKC が重要な因子であるという報告がある。力学負荷によって肺胞上皮細胞のリモデリングが進行するメカニズムを解明するためには、細胞レベルの構造と機能の変化を両側面から明らかにしていく必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、肺胞上皮細胞を弾性薄膜上に培養し、単軸伸展時の細胞骨格の変化と細胞内小胞を観察し、伸展負荷による細胞骨格変化と分泌能変化の関係を調べた。実験では、細胞骨格の一つであるアクチン繊維と、分泌物を貯蔵および輸送する小胞の局在変化を蛍光標識し観察した。

3. 研究の方法

本実験では、A549 細胞 (ヒト由来腺ガン化肺胞上皮 II 型細胞) (JCRB, Japan) を使用した。PDMS 製のチャンバー上に細胞を播種し、70%~100%コンフルエントとなった状態で実験に用いた。実験では 20%の伸展負荷を与えた。静置伸展装置は圧縮バネを付けた伸展部分マイクロメータで長さを調整することによって静置伸展刺激を負荷し、刺激時間は、静置伸展は 1、3、6 時間とした。

細胞内から分泌物を放出する小胞の染色

にはキナクリン二塩酸塩二水和物 (Wako, Japan) を用いた。キナクリンは酸性域に蓄積し、小胞内に取り込まれると緑色蛍光を発する。キナクリン導入後の細胞は、伸展前、伸展負荷後に共焦点顕微鏡で蛍光画像をそれぞれ取得した。伸展実験を行った細胞の小胞を観察した後、細胞に 3.8%パラホルムアルデヒド PBS によって固定し、ローダミンフロイジン溶液を 40 分負荷して細胞骨格を染色した。観察には共焦点蛍光顕微鏡を用いた。

4. 研究成果

図 1 に静置した場合の時間経過に伴う細胞内の小胞の変化を示す。小胞は時間の経過とともに細胞内の輝度が減少することから、細胞外に排出されていることが分かる。1 時間経過で上部の小胞の 4 割が排出、6 時間後に残留する小胞は開始時の 3 割に減少していた。

図 2 に伸展刺激前には細胞内に多数存在していたが、伸展刺激を負荷せずに 3 時間静置した場合 (コントロール) は細胞外に排出されるため減少した。静置伸展負荷時では、負荷時間が 1 時間の場合、コントロール同様に細胞内の小胞はほとんど見られないが、負荷時間が 3、6 時間の場合は細胞内に残っている傾向がみられた。周期伸展負荷時では、同じ時間刺激した静置伸展に比べると細胞内に残っている小胞は多い。また、負荷時間が 1 時間と 3 時間を比較すると、静置伸展同様に負荷時間が長いほうが小胞は細胞内に残っていた。

伸展刺激時に伴う小胞とアクチンの関係を図 2・3 示す。小胞は、伸展刺激 1 時間後は細胞上部から 10 ミクロンの位置にピークあるのに対し、アクチンのピークは細胞上部から 8 ミクロンの位置のピークがあった。伸展刺激 3 時間は、細胞内の小胞が減少しているが、アクチンも減少していた。さらに伸展刺激を加えると、細胞上部にて小胞の残留量がわずかに増加しているのに対し、アクチン

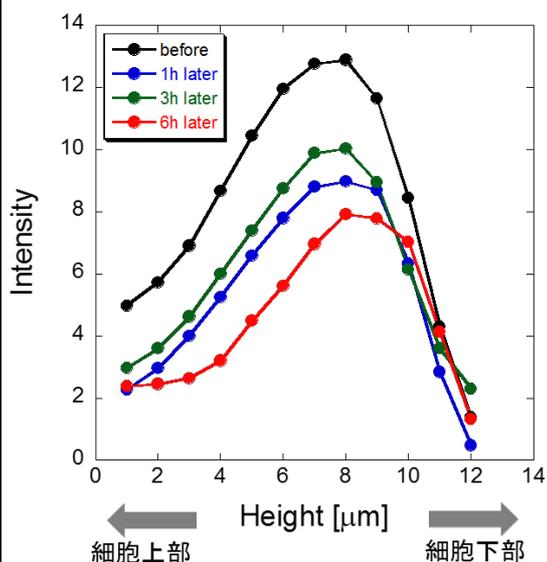


図 1 静置時の小胞の変化

は細胞全体で増加し再重合していた。

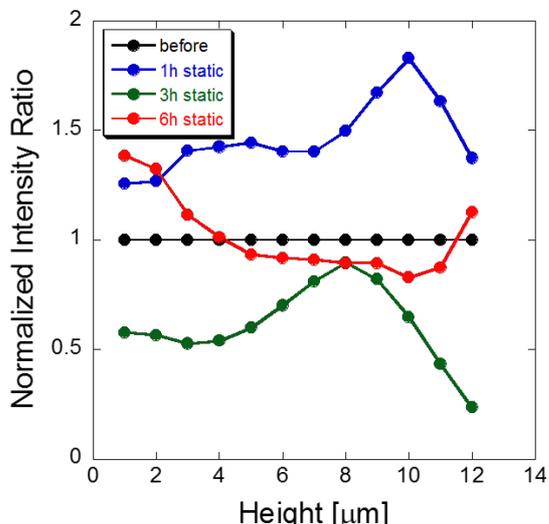


図2 伸展刺激時の小胞の変化

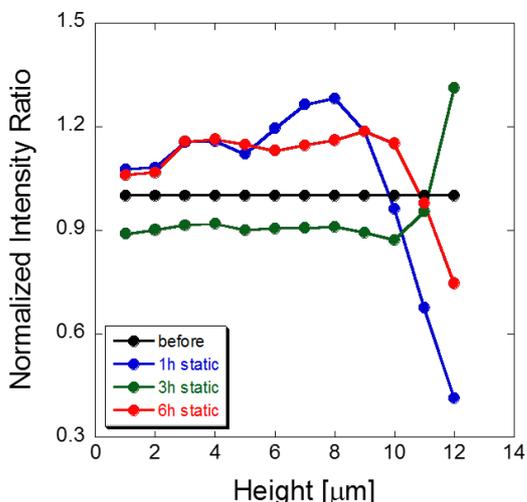


図3 伸展刺激のアクチンの変化

以上の結果から伸展刺激の細胞骨格と小胞輸送の関係を模式図に表した(図4)。以上の結果から伸展刺激によって細胞骨格が脱重合・再重合することによって小胞輸送が促進・阻害されている可能性が示唆された。

上記の実験は、免疫染色によって細胞骨格のイメージを行ったため、細胞骨格と小胞を同時にライブイメージングが不可能であり直接細胞骨格が小胞輸送を阻害しているかわからなかった。そのため、遺伝子導入試薬を用いた生細胞にローダミンファロイジンを導入し、小胞とアクチンのライブイメージング方法を確立した。

さらに、血管内皮細胞と肺胞上皮細胞の共培養マイクロデバイスを作製した(図5)。直径10ミクロンの穴があいたPDMS膜の上下に血管内皮細胞と肺胞上皮細胞を培養できるようにした。さらに、このマイクロデバイスには、細胞培養チャンバーの両サイドに圧力調整チャンバーが設定されており、圧力調整チャンバー内の圧力を負圧にするとPDMS膜が伸び細胞に伸展刺激

を加えることが可能である。

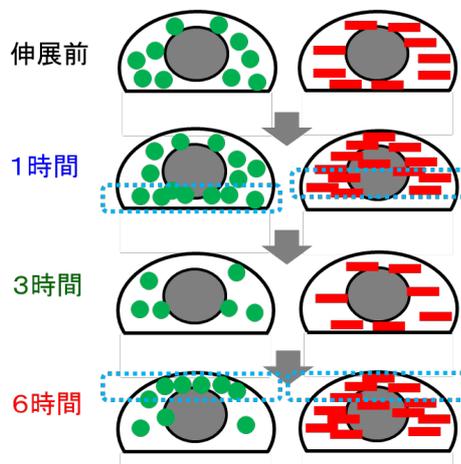


図4 伸展刺激時の小胞とアクチンの関係

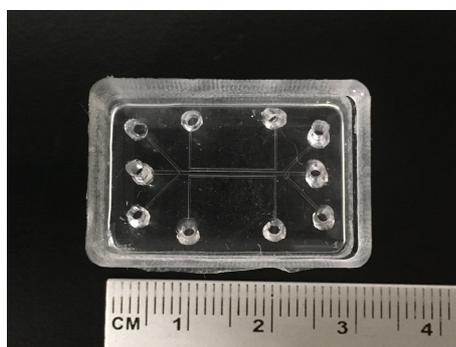


図5 血管内皮細胞と肺胞上皮細胞の共培養マイクロデバイスの共培養マイクロデバイス

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 3件)

1. Toshihiro Sera, Ryosuke Higashi, Hisashi Naito, Takeshi Matsumoto, Masao Tanaka, Distribution of nanoparticle depositions after a single breathing in a murine pulmonary acinus model, International Journal of Heat and Mass Transfer, 108, 730-739, 2017
2. Luosha Xiao, Toshihiro Sera, Kenichiro Koshiyama, and Shigeo Wada, Morphological characterization of acinar cluster in mouse lung using a multiscale-based segmentation algorithm on synchrotron micro-CT images, The Anatomical Record, 299(10), 1424-34, 2016
3. Ryosuke Higashi, Toshihiro Sera, Hisashi Naito, Takeshi Matsumoto, Masao Tanaka, Pulmonary kinematic analysis with non-rigid deformable registration for detecting localized emphysema, Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering: Imaging & Visualization,

DOI:10.1080/21681163.2015.1008649,
2015

〔学会発表〕(計 4件)

1. 世良俊博, 阿部琢磨, 西山大貴, 中嶋和弘, 工藤奨, 伸展負荷による肺胞上皮細胞内の細胞骨格と小胞の関係, 第24回バイオフィジオロジー研究会, 2016.03.04
2. 西山大貴, 阿部琢磨, 中嶋和弘, 世良俊博, 工藤奨, 静置伸展刺激時の肺胞上皮細胞内小胞小輸送と細胞骨格の関係, 日本生理人類学会2015年度日本生理人類学会研究奨励発表会(九州地区), 2016.02.05
3. 阿部琢磨, 西山大貴, 中嶋和弘, 世良俊博, 工藤奨, 伸展刺激時の肺胞上皮細胞内小胞輸送と細胞骨格の関係, 日本機械学会第26回バイオフロンティア講演会, 2015.10.02
4. 阿部琢磨, 鶴田敬大, 中嶋和弘, 世良俊博, 工藤奨, 伸展刺激に対する肺胞上皮細胞の構造変化, 日本生理人類学会2014年度日本生理人類学会研究奨励発表会(九州地区), 2015.02.21

6. 研究組織

(1)研究代表者

世良 俊博 (SERA TOSHIHIRO)
九州大学大学院工学研究院機械工学部
門・准教授
研究者番号: 40373526

(2)研究分担者

工藤 奨 (KUDO SUSUMU)
九州大学大学院工学研究院機械工学部
門・教授
研究者番号: 70306926