

令和元年6月6日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09578

研究課題名(和文) 基質硬度に起因する肺および気道リモデリング制御機構と細胞基質力学検知機構の解明

研究課題名(英文) Searching for mechanisms underlying lung and airway remodeling and mechano-sensing processes regulated by substrate stiffness.

研究代表者

伊藤 理 (Ito, Satoru)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60378073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が足場として利用している基質の硬度が細胞機能に与える影響とその制御機構について検討した。

ヒト肺線維芽細胞は、硬い基質上では軟らかな基質上で培養した場合と比べ遊走能が増強し、筋線維芽細胞への分化が進むことを見出した。肺線維症の病態機序として、線維化に伴う肺の硬化が線維芽細胞の活性化を介して線維化を更に促進する可能性が示唆された。肺がん細胞株においては、基質の硬さによってPD-L1発現が影響をうけた。がん組織の硬さが微小環境として肺がん細胞のPD-L1発現を制御し、がんの免疫回避機構に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞が足場として利用している基質の硬度を感知する基質力学検知機構を明らかにし、肺や気道の線維化やリモデリングや病態や肺がんの免疫回避機構の機序を解明することを目的として研究を行った。

研究成果の概要(英文)：We investigated mechanisms underlying substrate stiffness regulates cellular functions.

In human lung fibroblasts, migration and differentiation to myofibroblasts were enhanced by stiff substrate.

Expression of PD-L1 and cell growth were affected by matrix stiffness in human lung cancer cells. It is suggested that stiffness as a tumor environment regulates PD-L1 expression, which leads to evasion of the immune system and tumor growth. Activation of lung fibroblasts by the stiff lung and positive feedback may be involved in the mechanisms of progression of pulmonary fibrosis.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：メカニカルストレス リモデリング 気管支喘息 肺線維症 肺線維芽細胞 肺癌 気道平滑筋 メカノバイオロジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

呼吸器の構造や生理機能は、硬度、弾性、保水性によって決定される肺組織や気道組織の機械特性によって厳密に制御されている。呼吸器疾患における機械特性の例を挙げると、気道リモデリングでは気道壁硬化を生じ、特発性肺線維症(IPF)など線維化した肺では基質量の増加と質の変化(コラーゲン沈着)によって硬く、肺気腫では基質の脆弱化特に弾性線維(エラスチン)の破壊と分解などにより軟らかくなる。重症肺気腫では基質脆弱化により気腫進行が起こる基質機械特性の負の連鎖がある。肺、気道、肺血管など呼吸器の組織機械特性は、基質機械特性に加えて、細胞の機械特性(硬度、収縮力)細胞と基質との接着状態や連関・相互作用によって制御されている。また、肺がん組織においてはがん関連線維芽細胞などの働きにより、極めて硬い環境が作り出されている。この硬い環境ががんの進行や悪性度に関連している。しかしながら、呼吸器系細胞が基質硬度を感知する「基質力学検知機構」についてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、呼吸器系細胞が基質硬度を感知する「基質力学検知機構」を特定することによってリモデリングに起因する呼吸器疾患の病態機序を解明し、将来の新たな治療法開発に道筋をつけることである。

3. 研究の方法

接着系培養細胞(ヒト気道平滑筋細胞、ヒト肺線維芽細胞、ヒト肺がん細胞株)を用いた研究を行い、細胞を異なる基質硬度や環境の下で培養した。基質硬度により生じる細胞形態・機能、遺伝子発現への影響を検討した。

(1) ヒト肺線維芽細胞を異なる硬さのゲル上で培養する実験を行った。軟らかなゲル(1kPa, 2kPa)上で培養した細胞と比較すると、硬いゲル(25kPa, 50kPa)やプラスチック上で培養した。細胞の形態、 α -smooth muscle actin 発現ならびに遊走能の変化を検討した。

(2) ヒト肺がん細胞株(HCC827 細胞)を異なる硬さのゲル上、もしくは細胞が接着できないFalcon チューブ内で培養し、免疫チェックポイント機構 PD-L1 発現への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト肺線維芽細胞において、軟らかなゲル(2kPa)上で培養した細胞と比較すると、硬いゲル(25kPa)やプラスチック上で培養した細胞では活性化した線維芽細胞(筋線維芽細胞)のマーカーである α -smooth muscle actin (α -SMA)蛋白発現が有意に増強することを見出した(図1A)。

更に、硬いゲル(25kPa)上で培養した肺線維芽細胞は軟らかなゲル(2kPa)で培養した細胞と比べ細胞遊走能の増強を認めた(図1B)。この α -smooth muscle actin 遺伝子に対して siRNA を導入して発現を抑制することにより、細胞遊走が抑制された。

以上の結果から、硬い基質の環境では線維芽細胞が活性化し、筋線維芽細胞へ分化し、遊走能が増強すること、 α -smooth muscle actin が遊走能の亢進を制御することが示された。

肺線維症の病態機序として、線維化に伴う肺の硬化が線維芽細胞の活性化を介して線維化を更に促進する、正のフィードバック機構が存在することが示唆された。

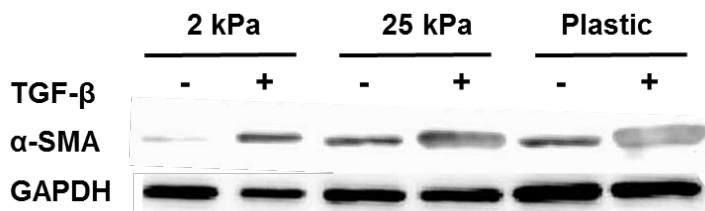


図 1A. ヒト肺線維芽細胞における基質硬度による α -smooth muscle actin (α -SMA)蛋白発現への影響。2kPa ゲルと比べ、25kPa ゲル、plastic では α -SMA 発現が増強した。TGF- β 刺激は positive control として用いた。

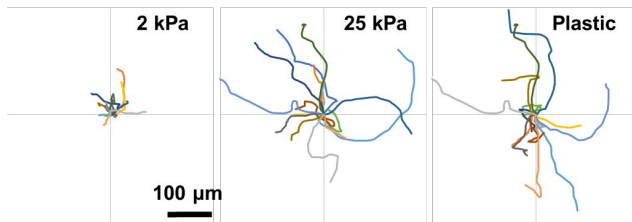


図 1B. Random walk migration assay 法で評価したヒト肺線維芽細胞の遊走能に対する基質硬度の影響。細胞を異なる基質 (2kPa ゲル、25kPa ゲル、plastic) 上で 4 日間培養した後、plastic dish に移して遊走能を評価した。2kPa で培養した細胞は遊走能が抑制された。

(2) PD-L1 を強発現するヒト肺がん細胞株 (HCC827 細胞)において、がん細胞を軟らかなゲル (2kPa) 上で培養することで、硬い環境で培養した場合と比較して PD-L1 発現が有意に抑制されることを見出した (図 2A)。硬い基質上で培養することにより生じる PD-L1 発現は cytochalasin D によるアクチン重合阻害により抑制された (図 2BC)。

以上より、肺がんではがん組織の硬さが微小環境として肺がん細胞の PD-L1 発現を制御しており、その機序として細胞接着を介したアクチン細胞骨格が関与することが示唆された。肺がん微小環境である基質硬度が肺がん細胞の PD-L1 発現を増強することで、腫瘍の免疫逃避や増殖につながるという肺がん進行の機序が示唆された。

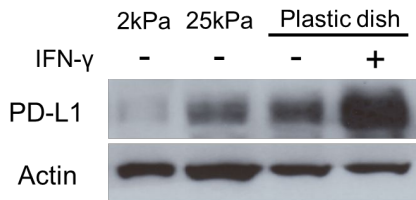


図 2A. ヒト肺がん HCC827 細胞株における基質硬度による PD-L1 蛋白発現への影響。2kPa ゲル上で培養すると 25kPa ゲル、plastic dish での培養と比べ、PD-L1 発現が低下した。IFN- γ 刺激は positive control として用いた。

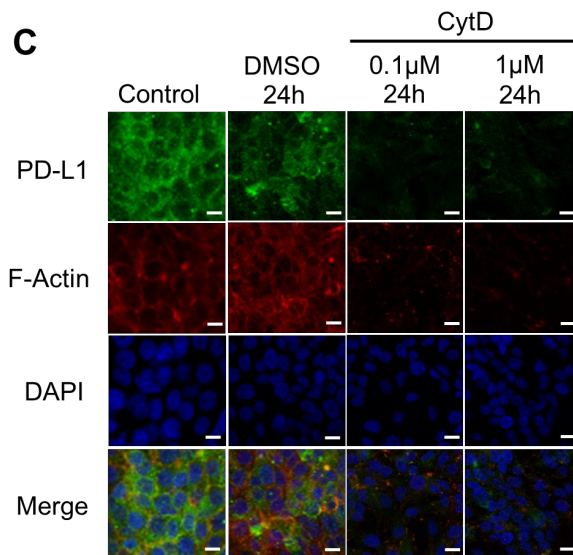
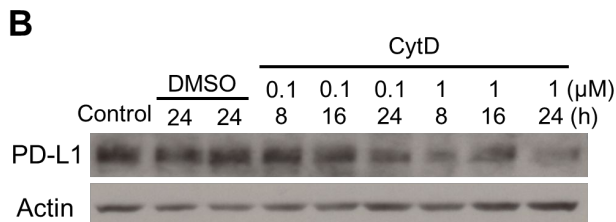


図 2B, C. ヒト肺がん HCC827 細胞株におけるアクチン細胞骨格による PD-L1 蛋白発現の制御。
B: Western-blot 法による評価。C: PD-L1、重合アクチン(F-actin)を免疫蛍光染色法で評価した。
Cytochalasin D (CytD)によるアクチン重合阻害により、PD-L1 発現が抑制された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)(*corresponding, #equal first author)

1. Asano S, Ito S*, Morosawa M, Furuya K, Naruse K, Sokabe M, Yamaguchi E, Hasegawa Y. Cyclic stretch enhances reorientation and differentiation of 3-D culture model of human airway smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;16:32-38.
2. Miyazawa A, Ito S*, Asano S, Tanaka I, Sato M, Kondo M, Hasegawa Y. Regulation of PD-L1 expression by matrix stiffness in lung cancer cells *Biochem Biophys Res Commun* 2018;495:2344-2349.
3. Asano S, Ito S*, Takahashi K, Furuya K, Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y. Matrix stiffness regulates migration of human lung fibroblasts. *Physiol Rep* 2017;5. pii: e13281.
4. Takahashi K, Ito S*, Furuya K, Asano S, Sokabe M, Hasegawa Y. Real-time imaging of mechanically and chemically induced ATP release in human lung fibroblasts. *Respir Physiol Neurobiol* 2017;242:96-101.
5. Sakamoto K, Ito S*#, Hashimoto N, Hasegawa Y. Pirfenidone as salvage treatment for refractory bleomycin-induced lung injury: a case report of seminoma. *BMC Cancer* 2017;17:526. [Case Report]
6. 伊藤理. 特集：呼吸器科医に役立つ最先端のメカノバイオロジー研究 2) 各論：気道肺のリモデリングと線維化のメカノバイオロジー. *呼吸臨床* 2017;1:e00022.
7. 伊藤理. 特集：呼吸器科医に役立つ最先端のメカノバイオロジー研究 1) 総論：呼吸器メカノバイオロジーの概説. *呼吸臨床* 2017;1:e00017.
8. Ito S*, Furuya K, Sokabe M, Hasegawa Y. Cellular ATP release in the lung and airway. *AIMS Biophys* 2016;3:571-584. [Review]

[学会発表](計 12 件)

1. Ito S, Asano S, Morosawa M, Furuya K, Naruse K, Sokabe M, Yamaguchi E, Hasegawa Y. Mechanomedicine: effects of stretch on 3-D culture model of airway smooth muscle cells. 第 59 回日本呼吸器学会学術講演会 [English Poster Discussion] 2019 年
2. Miyazawa A, Ito S, Asano S, Tanaka I, Sato M, Kondo M, Hasegawa Y. Cancer Mechanobiology: Regulation of PD-L1 Expression by Matrix Stiffness in Human Lung Cancer Cells. 第 59 回日本呼吸器学会学術講演会 [English Poster Discussion] 2019 年
3. 諸沢美佳、伊藤理、浅野周一、森田康之、長谷川好規. 気道平滑筋のメカノバイオロジー：幾何学的環境操作による細胞形態の制御. 第 59 回日本呼吸器学会学術講演会 2019 年
4. 宮沢亜矢子、伊藤理、田中一大、近藤征史、佐藤光夫、長谷川好規. 肺がん細胞のメカノバイオロジー：基質硬度による PD-L1 発現制御. 第 59 回日本肺癌学会学術集会 2018 年
5. Miyazawa A, Ito S, Asano S, Tanaka I, Sato M, Kondo M, Hasegawa Y. Mechanobiology of Lung Cancer Cells: Regulation of PD-L1 Expression by Matrix Stiffness. IASLC 19TH WORLD CONFERENCE ON LUNG CANCER 2018 年 (Toronto, Canada)
6. 諸沢美佳、浅野周一、森田康之、平野勇勝、長谷川好規、伊藤理. 気道平滑筋の細胞工学：幾何学的力学的環境操作による細胞配向性の制御. 第 67 回日本アレルギー学会学術大会 2018 年
7. Ito S, Takahashi K, Furuya K, Asano S, Sokabe M, Hasegawa Y. Mechanobiology of lung fibroblasts: real-time imaging of ATP release. 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会 [English Poster Discussion] 2018 年
8. 浅野周一、伊藤理、諸沢美佳、長谷川好規. 気道平滑筋のメカノバイオロジー：3 次元培

養法による組織工学. 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会 2018 年

9. Ito S. Mechanomedicine of the lung. 第 95 回日本生理学会大会 (招待講演) 2018 年
10. Asano S, Ito S, Takahashi K, Sokabe M, Furuya K, Hasegawa Y. Mechanobiology of lung fibroblasts: activation by matrix stiffness. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 [English Poster Discussion] 2017 年
11. 高橋光太、伊藤理、浅野周一、近藤征史、長谷川好規. 肺線維芽細胞のメカノバイオロジー：細胞ストレッチ刺激による ATP 放出. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 2017 年
12. 浅野周一、高橋光太、伊藤理、長谷川好規. 気道平滑筋の組織工学：細胞 3 次元培養とストレッチ刺激による制御. 第 57 回日本呼吸器学会学術講演 2017 年

〔図書〕(計 1 件)

1. 伊藤理. 2 章 気管支喘息の危険因子と病態生理 気管支喘息の気道炎症のメカニズム 平滑筋. 井上博雅編 呼吸器疾患 診断治療アプローチ 1「気管支喘息」. 中山書店, 東京, 2017, pp98-103. (分担)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060703/07.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：浅野周一、高橋光太、宮沢亜矢子 (名古屋大学大学院医学系研究科：大学院生)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。