

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08680

研究課題名(和文) 圧付加による神経変性：水柱下培養装置を用いた分子基盤の解析

研究課題名(英文) Nerve degeneration by modest static pressure: a new water-pressure-loadable culture system

研究代表者

萩山 満 (Man, Hagiya)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：60632718

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)：緑内障や腸閉塞などでは内圧上昇によって細胞変性が生じるが、その分子機序は未解明である。この現象を検証するため、独自に考案した培養系を樹立した。円柱形の形態を示す上皮細胞では、圧上昇に伴って細胞増殖が抑制された。細胞は扁平化し体積が増加したため、細胞骨格であるアクチン線維の分布が疎になることを見出した。また、Hippo経路の主要分子であるYAPのリン酸化が亢進し、細胞質局在量が増加していた。以上より、円柱形の上皮細胞ではその増殖に細胞形態と細胞骨格とが深く関わるということが明らかになった。内圧上昇はこの連関及びHippo経路に直接的に作用し上皮変性を惹起すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内圧上昇による組織・細胞傷害は古くより知られており、その病理学的な組織所見も詳細に記述されているが、傷害発生の分子機序に関する研究は少ない。その主たる理由の1つは、発症原因となる内圧上昇が疾患や病態に関わらず非常に小さく、その軽微な加圧を可能にする培養装置が一般的には普及していないからと思われる。申請者らが考案した培養装置は、非常に安価でありながら、静的圧力の大きさを容易かつ任意に設定可能であり、速やかに普及して広く用いられるものと思われる。緑内障などの発症の分子機序解明に貢献するものと期待され、発症機序に基づく創薬シーズの探索へと発展する可能性を秘めており、社会還元点でも意義深い。

研究成果の概要(英文)：Intraluminal pressure elevation can be pathogenic to mucosal epithelia even at a few tens cmH₂O, but its effect on cell growth has not been examined intensively. A two-chamber culture system was modified to make cells receive water pressure. The cells with columnar epithelial morphology were growth-suppressed in a manner dependent on water pressure. Phalloidin staining revealed that a pressure load vertically flattened and laterally widened columnar epithelial cells and made actin fiber distribution sparse. In addition, a pressure load enhanced serine-127 phosphorylation and cytoplasmic retention of YAP, the major constituent of the Hippo pathway, suggesting that Hippo pathway was involved in the pressure-induced cell growth suppression. These results provide evidence that cell morphology and the cytoskeleton are closely linked to cell growth. Pathological intraluminal pressure elevation may cause mucosal degeneration by acting directly on this linkage and the Hippo pathway.

研究分野：実験病理

キーワード：細胞変性 内圧上昇

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内に存在する内腔は健常時において一定の内圧を有している。その内圧が何らかの機序で上昇すると、種々の疾患や病態が生じる。その際に生じる病変には共通性があり、病理組織所見の基本は細胞変性(最終的にはアポトーシス)である。代表的な例として、緑内障や水頭症などの神経変性、腸閉塞や水腎症などの上皮変性が挙げられる。興味深いことに、これらの疾患や病態の発症原因となる内圧の上昇には一定の閾値があり、その閾値は病態や細胞種に関わらず、概ね一定で約 30 cm 水柱 (= 0.03 気圧 = 30 ヘクトパスカル) である。この圧力は、日常的に経験される高気圧と低気圧との気圧差程度であり、ヒトの体表面での感覚からすると、非常に軽微な力である。にもかかわらず、30 cm 水柱程度の圧力が細胞変性の原因となる。

内圧上昇による組織・細胞傷害は現象としては古くより知られており、その病理学的な組織所見も詳細に記述されているが、傷害発生の分子機序に関する研究は少ない。その主たる理由の1つは、発症原因となる内圧上昇は疾患や病態に関わらず約 30 cm 水柱と非常に小さく、その 30 cm 水柱程度の軽微な加圧を可能にする培養装置が一般的には普及していないからと思われる。

本研究ではこの現象を解析するため、水柱の高さ分の圧力を細胞が受ける培養装置を作製した(図1)。あらかじめ通常の6ウェルプレートで0.4又は1.0 μmの穴あき透過膜付き培養インサート内で細胞を培養し、これを2枚の亚克力製円盤で挟み、上の円盤に亚克力製の細長い円筒を垂直に接続して、培養液の水柱圧が直接細胞に付加されるようにした。装置の下の円盤を10センチシャーレ内に置き、穴あき透過膜が十分浸るように培養液を注いで、上下チャンパー間でガス交換が行われるようにした。実際に装置全体をCO₂インキュベーター内に設置して細胞を培養したところ、円筒内の温度やCO₂濃度、O₂濃度、pHは通常培養時と変わらないことがわかり、圧付加の影響を評価する培養装置として有用と判明した。

2. 研究の目的

緑内障や腸閉塞などでは、内圧の上昇に伴って不可逆的な細胞変性が生じる。その圧の閾値は20 - 30 cm 水柱と低圧で、臓器によらずほぼ一定である。この圧付加に対する細胞応答の分子基盤は未解明である。申請者らは半透膜付き培養インサートに細長い円筒を垂直に接続することにより、円筒内の水柱の高さ分の圧力を細胞が受ける2チャンパー培養装置を作製した(図1)。水柱50 cm下での培養時に半透膜直上のO₂・CO₂ガス分圧は下チャンパーと変わらないことを確認した。本研究では、独自に考案した水柱下培養装置を用いて、圧力上昇に伴う細胞の形態的变化や蛋白発現の変化を解析することにより、軽微な圧が細胞変性を惹起する分子経路の解明を目指した。

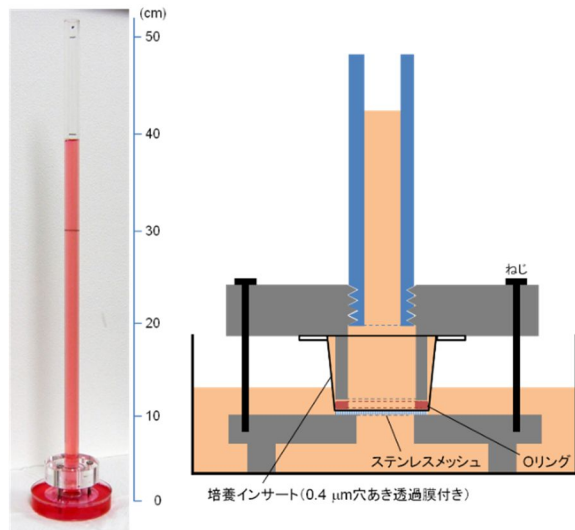


図1 水柱下培養装置の全体像(左)とその細胞培養部位の拡大模式図(右)

左の写真では、約 40 cm 水柱の静的圧力が透過膜上の培養細胞に付加されている。

3. 研究の方法

水柱下細胞培養の樹立と形態的評価

通常の6ウェルプレートで1.0 μmの穴あき透過膜付き培養インサート内で上皮由来の細胞株(MDCK、NCI-H441、Caco-2、KATO-III、NUGC-4細胞)間葉系細胞株(NIH3T3、TIG-1細胞)を

培養した。これを2枚のアクリル製円盤で挟み、上の円盤にアクリル製の細長い円筒を垂直に接続し、培養液の水柱の高さ分の圧 (cm 水柱) を直接細胞に付加させた (図1)。CO₂ インキュベーター内で3日間培養した後 PBS で3回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。ファロイジン染色およびDapiによる核染色を行い、ニコン共焦点顕微鏡C2+でZ-スタック撮影した。細胞数、細胞の高さや面積および蛍光強度は搭載されている解析ソフトを用いて計測した。

4. 研究成果

静水圧による細胞増殖抑制

数10 cm 高の水柱下で細胞を培養する上下2チャンバー装置を用いて、この閾値相当の水圧が上皮細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。MDCK 腎上皮細胞を上チャンバーの半透膜上で2、15、30、50 cm 水柱下で1、2、3日間培養後の細胞数を計測した。付加圧を増加させると、増殖曲線はゆるやかに上昇し、細胞倍化時間は有意に延長した (図2)。その他の細胞を2、50 cm 水柱下で培養したところ、NCI-H441 肺上皮、Caco-2 腸上皮細胞ではMDCK細胞と同様の結果が得られたが、KATO-III、NUGC-4 胃上皮細胞や NIH3T3、TIG-1 線維芽細胞では有意な変化はなかった (図2)。

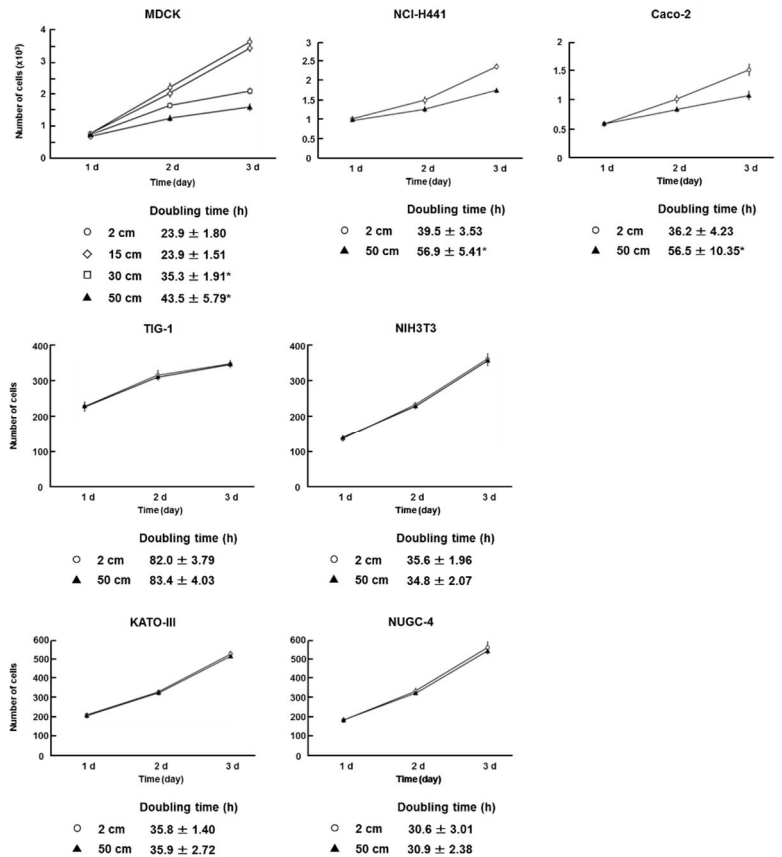


図2 増殖曲線と細胞倍化時間

MDCK、NCI-H441、Caco-2 細胞は圧付加によって細胞増殖が抑制された。

静水圧による細胞の扁平化

MDCK 細胞を半透膜上で培養すると、2 cm 水柱下では円柱状の形態を示した。15、30、50 cm と付加圧を増加させると、細胞は扁平化して体積は50 cm 水柱下で約1.5倍になった (図3)。ファロイジン染色を解析したところ、50 cm 水柱下でXY平面の蛍光強度が著しく減少した。体積増加を考慮すると1細胞当たりの総量は変化しなかったため、アクチン線維の分布が疎になったと考えられた。NCI-H441、Caco-2 細胞でも同様の結果が得られた。KATO-III、NUGC-4 細胞

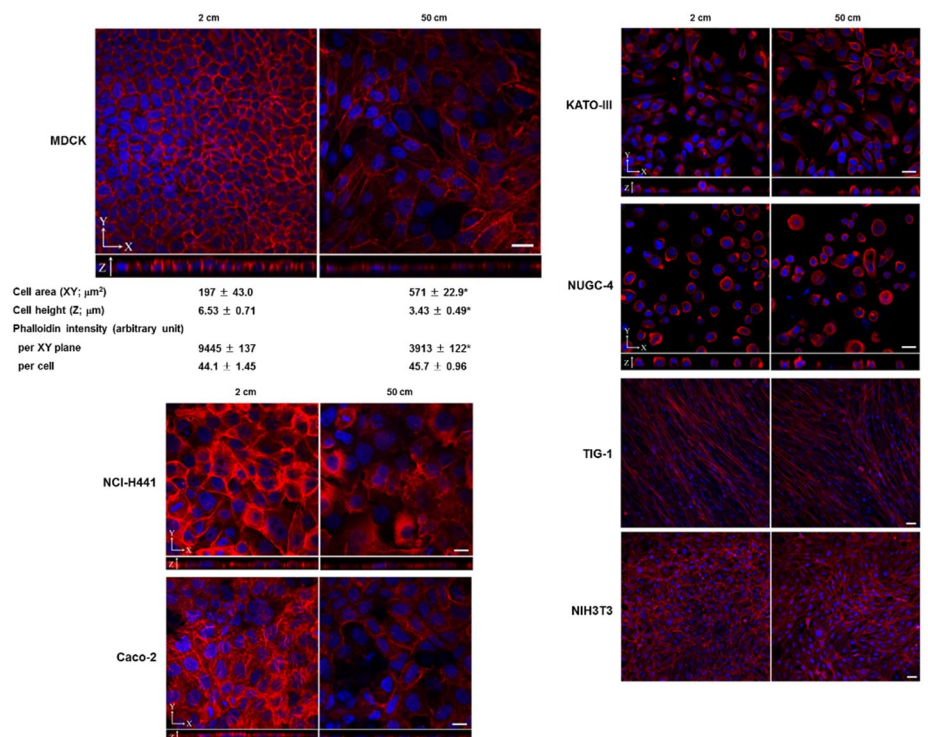


図3 ファロイジン染色のXY平面像とZ軸方向面
円柱状上皮細胞は圧付加によって細胞が扁平化し、XY平面ではファロイジン染色の蛍光強度が減少した。

胞は 2 cm 水柱下で上皮由来ながら球状の形態を取り、50 cm 水柱下でわずかに扁平化したが、ファロイジン染色に明らかな変化はみられなかった。紡錘形の間葉系細胞株 NIH3T3、TIG-1 細胞では有意な変化はなかった (図 3)。

静水圧による Hippo 経路の主要分子 YAP のリン酸化

多くの細胞種で Hippo 経路が細胞密度と増殖を制御していることが知られている。圧付加によって形態的变化がみられた MDCK、NCI-H441、Caco-2 細胞を 2、50 cm 水柱下で培養し、細胞質と核画分のタンパク質を抽出した。Hippo 経路における主要分子である MST2、LATS1、LATS2、YAP、TAZ のウエスタン解析を行った。両画分を 2、50 cm 水柱下でそれぞれ比較したところ、MST2、LATS1、LATS2、TAZ 発現に明らかな変化はなかった。一方、YAP 発現は 50 cm 水柱下において核画分で減少した。また、セリン 127 番目のリン酸化をみたところ、細胞質画分で YAP のリン酸化の亢進を認めた。(図 4)。以上より、円柱状上皮細胞ではその増殖に細胞形態と細胞骨格とが深く関わるということが明らかになった。内圧上昇はこの連関及び Hippo 経路に直接的に作用し上皮変性を惹起すると考えられた。

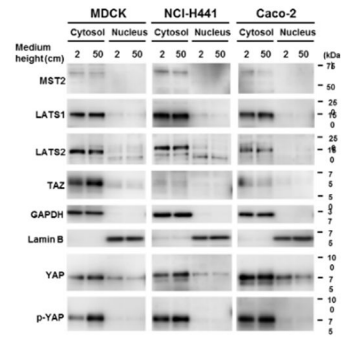


図4 Hippo 経路分子の発現解析
円柱状上皮細胞では YAP のリン酸化が亢進し、細胞質局在が増加した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kato T, Hagiyaama M, Ito A.	4. 巻 6
2. 論文標題 Renal ADAM10 and 17: their physiological and medical meanings.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3389/fcell.2018.00153.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura R, Yoneshige A, Hagiyaama M, Otani T, Inoue T, Shiraishi N, Yanagihara K, Wakayama T, Ito A.	4. 巻 213
2. 論文標題 Expression of cell adhesion molecule 1 in gastric neck and base glandular cells: possible involvement in peritoneal dissemination of signet ring cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Life Sci	6. 最初と最後の頁 206-213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ri A, Hagiyaama M, Inoue T, Yoneshige A, Kimura R, Murakami Y, Ito A.	4. 巻 6
2. 論文標題 Progression of pulmonary emphysema and continued increase in ectodomain shedding of cell adhesion molecule 1 after cessation of cigarette smoke exposure in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.3389/fcell.2018.00052.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueno S, Yoneshige A, Koriyama Y, Hagiyaama M, Shimomura Y, Ito A.	4. 巻 59
2. 論文標題 Early gene expression profile in retinal ganglion cell layer after optic nerve crush in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci	6. 最初と最後の頁 370-380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1167/iovs.17-22438.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 3.Hagiyama M, Yabuta N, Okuzaki D, Inoue T, Takashima Y, Kimura R, Ri A, Ito A.	4. 巻 8
2. 論文標題 Modest static pressure suppresses columnar epithelial cell growth in association with cell shape and cytoskeletal modifications.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Front Physiol	6. 最初と最後の頁 997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2017.00997.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoneshige A, Hagiyama M, Inoue T, Tanaka T, Ri A, Ito A.	4. 巻 54
2. 論文標題 Modest static pressure can cause enteric nerve degeneration through ectodomain shedding of cell adhesion molecule 1.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Neurobiol	6. 最初と最後の頁 6378-6390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-016-0166-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 萩山満、木村竜一郎、李在俊、伊藤彰彦
2. 発表標題 数10センチ水柱圧による円柱上皮腺癌細胞の増殖抑制
3. 学会等名 第77回日本癌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 萩山満、伊藤彰彦
2. 発表標題 内圧上昇による粘膜変性: 数10センチ水柱圧で円柱上皮細胞は増殖が抑制される
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋山満、米重あづさ、井上敬夫、木村竜一朗、高島康利、伊藤彰彦
2. 発表標題 病的内圧を再現する培養装置の開発：圧付加は接着分子CADM1のsheddingと神経変性を惹起する
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考