

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590272

研究課題名(和文) 流れ刺激によるヒト肺細動脈内皮細胞からの炭酸ガス排出機構と呼吸生理学的意義の解明

研究課題名(英文) New concept of pulmonary blood flow-mediated CO₂ gas excretion in the lungs

研究代表者

河合 佳子 (KAWAI, Yoshiko)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：10362112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺では従来、赤血球内のヘモグロビンの酸素化により排出される水素イオンと赤血球内の重炭酸イオンが反応して炭酸ガスを産生しているとされてきたが、この概念では説明できない現象も知られていた。そこで、私共は培養系に移行したヒト肺細動脈由来血管内皮細胞に流れ刺激を負荷し、炭酸ガスの産生について検討を行った。さらに、白色家兎を用い肺細動脈の血行動態変化が炭酸ガス産生機構に及ぼす影響について検討し、血管内皮細胞への流れ刺激が生体内でも炭酸ガス産生に大きな影響を与えているという新事実を得ることができた。将来、原発性肺高血圧症の新規治療法の開発や運動の有効性を予測する健康科学への応用につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied physiological roles of flow through pulmonary arterioles in CO₂ gas exchange. We established human pulmonary arteriolar endothelial cells (HPAoEC). Shear stress stimulation caused the co-release of H⁺ and ATP via the activation of F₁/F₀ ATP synthase on the HPAoEC. Next, to further examine the validity of this concept in in vivo rabbit lungs, we investigated the effects of stenosis-induced changes in pulmonary blood flow on the end-expiratory CO₂ gas pressure (PECO₂), the maximal velocity of the pulmonary artery of anesthetized rabbits. In the experiment in which small pulmonary arteries were subjected to stenosis, the PECO₂ fell rapidly. The flow-dependent changes in the PECO₂ were reduced by the treatment with the F₁/F₀ ATP synthase antibody. In conclusion, we have proposed a new concept of CO₂ exchange, flow-mediated F₁/F₀ ATP synthase-dependent H⁺ secretion, resulting in the facilitation of a dehydration reaction involving HCO₃⁻ in plasma and the excretion of CO₂ gas.

研究分野：生理学

キーワード：呼吸生理学 流れ刺激 F₁/F₀ ATP synthase 炭酸ガス

1. 研究開始当初の背景

肺では従来、赤血球内のヘモグロビンの酸素化により排出される水素イオンと赤血球内の重炭酸イオンが反応して炭酸ガスを産生していると言われてきた。しかし一方で、実験動物の摘出肺の血管内に赤血球を含まないクレプス液を灌流しても炭酸ガスが排出されるという報告や、重症貧血患者でも呼吸性アシドーシスの合併症を起こさないことなど、従来の炭酸ガス化の概念では説明できない現象も知られていた。

また、血管内皮細胞に流れ刺激を加えると、内皮細胞表面にある F_1/F_0 ATP synthase から ATP が分泌され、その ATP が情報伝達物質として増殖能など多岐にわたる生物学的機能を制御しているという報告は多く見られたが、ATP と共に分泌される水素イオンについての生理学的意義については報告がなかった。

2. 研究の目的

上記のような背景をもとに、私共は培養系に移行したヒト肺細動脈由来血管内皮細胞に流れ刺激を負荷し、炭酸ガスの産生についての詳細な検討についての研究を行った。最終年度は、上記のような新事実が実際に生体内でも成立するか否かを解析するため、白色家兎を用い肺細動脈の血行動態変化が炭酸ガス産生機構に及ぼす影響について検討した。その基礎実験結果を踏まえて肺での炭酸ガス産生機構に関する診断・治療法を新しく開発し、臨床応用を目指すことが本研究の最終目的である。

3. 研究の方法

3.0Kg 前後の白色家兎に気道確保を行い、ガス吸入麻酔薬イソフルランと笑気ガスを用いて全身麻酔を施行した。呼吸管理および循環動態のモニターをセットし、全身状態が一定条件になるように管理しながら in vivo 実験を行った。

肺の循環動態と産生される二酸化炭素の産生量を解析するために、循環動態はドップラー血流計を用いて肺動脈の血流速度を測定し、二酸化炭素は呼気炭酸ガスモニターを用いて測定し、下記の条件での解析を行った。

肺動脈の狭窄および薬理学的方法を用いて肺の血流を変化させた上で、二酸化炭素の産生量を測定した。

血液を希釈して体内の赤血球を減少させ、同様に二酸化炭素の産生量の変化につき測定した。

肺動脈内に選択的に F_1/F_0 ATP synthase の阻害薬投与や F_1/F_0 ATP synthase の抗体処理を行い、二酸化炭素の産生量の変化につき測定した。

さらに、家兎の肺細動脈内皮細胞を分離培

養して、その生物学的特徴を解析するとともに、流れ刺激による炭酸ガス産生の調節機構を in vitro 実験でも検証した。

4. 研究成果

白色家兎の肺動脈および肺細動脈への血流を物理的（肺動脈を外側から圧迫して狭窄させる方法と、肺動脈内にバルーンを挿入して内腔を狭窄させる方法）および、肺動脈や生体内の血管に作動して動脈圧や血液還流量を変化させる薬物を投与することによる薬理学的手法を用いて変化させたところ、血流量の低下に伴い肺での炭酸ガス産生が有意に抑制された。また、人工的に貧血状態にし、ヘモグロビンからの水素イオン排出が低下すると考えられる状態にしても、血流が維持されていれば炭酸ガス産生量にほぼ影響が出ないことが確認できた。

さらに、肺細動脈内への F_1/F_0 ATP synthase の阻害薬投与や F_1/F_0 ATP synthase 抗体処理により、血流が維持されていても炭酸ガスの産生が抑制されることが確認できた。

このことから、生体においても、肺での炭酸ガス産生には、従来説明されてきた赤血球内のヘモグロビン酸素化時の水素イオン排出による二酸化炭素の産生機構だけでなく、肺細動脈内皮細胞への血流による F_1/F_0 ATP synthase への流れ刺激が重要な役割を果たしていることが証明できた。

本研究結果から、肺の血流量と二酸化炭素の産生量に関連性があることがわかったため、本研究結果に鑑みて原発性肺高血圧症をはじめとする循環および呼吸器疾患の病態を再検討することにより、新たな病態の解明や新治療法の開発に寄与することができる研究結果が得られた。

本研究結果は、現在国際有名雑誌に投稿中である。

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17件)

1) Kawai Y, Ajima K, Kaidoh M, Sakaguchi M, Tanaka S, Kawamata M, Kimura H, and Ohhashi T: In vivo support for the new concept of pulmonary blood flow-mediated CO₂ gas excretion in the lungs. Am. J. Physiol. Lung Mol. in press, 2015, 査読有

2) Ohhashi T, Kawai Y. New lymphology combined with lymphatic physiology, innate immunology, and oncology (Commentary). J. Blood & Lymph. in press, 2015, 査読有

3) Ohhashi T, Kawai Y. Proposed new lymphology combined with lymphatic physiology, innate immunology, and oncology (Review). *J. Physiol. Sci.* 65(1):51-66, 2015, 査読有

4) Kawai Y, Kaidoh M, Yokoyama Y, Ohhashi T. Pivotal roles of lymphatic endothelial cell layers in the permeability to hydrophilic substances through collecting lymph vessel walls: Effects of inflammatory cytokines. *Lymphat. Res. Biol.* 12(3) 124-135, 2014, 査読有

5) 大橋俊夫, 河合佳子 循環器病学・免疫学・腫瘍学を連結した新しいリンパ学～リンパ疾患の病態理解のために～ *Skin Cancer* 29(2): 137-139, 2014, 査読有

6) Kimizuka K, Kawai Y, Maejima D, Ajima K, Kaidoh M, Ohhashi T: Sphingosine 1-phosphate (S1P) induces S1P2 receptor-dependent tonic contraction in murine iliac lymph vessels. *Microcirculation* 20:1-16, 2013, 査読有

7) Kawai Y, Kaidoh M, Yokoyama Y, Ohhashi T. Cell surface F1/F0 ATP synthase contributes to interstitial flow-mediated development of the acidic microenvironment in tumor tissues. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 305: C1139-C1150, 2013, 査読有

8) Hosaka K, Yang Y, Seki T, Nakamura M, Andersson P, Rouhi P, Yang X, Jensen L, Lim S, Feng N, Xue Y, Li X, Larsson O, Ohhashi T, Cao Y. Tumour PDGF-BB expression levels determine dual effects of anti-PDGF drugs on vascular remodelling and metastasis. *Nat. Comm.* 4, article number: 2129, 2013, 査読有

9) 大橋俊夫 日本発汗学会 20 年のあゆみと将来展望 - 自らの手掌部発汗研究のあゆみと照らし合わせて - *発汗学* 20(1): 2-11, 2013, 査読有

10) 河合佳子 ずり応力刺激による脈管内皮細胞機能の制御機構 (総説) *信州医学雑誌* 61(2): 45-56, 2013, 査読有

11) 河合佳子, 大橋俊夫 リンパ管の解剖・生理学の最近のトピックス *Angiology Frontier* 12(2): 91-96, 2013, 査読有

12) Kawai Y, Yoshida K, Kaidoh M, Yokoyama

Y, Ohhashi T. Shear stress-mediated F1/F0 ATP synthase-dependent CO₂ gas excretion from human pulmonary arteriolar endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 227(5): 2059-2068 2012, 査読有

13) Ohhashi T. The establishment of new lymphology: Overview. *Ann. Vasc. Dis.* 5: 247-248, 2012, 査読有

14) Kawai Y, Kaidoh M, Yokoyama Y, Ohhashi T. Pivotal roles of shear stress in the microenvironmental changes that occur within sentinel lymph nodes. *Cancer Sci.* 103(7): 1245-1252, 2012, 査読有

15) Ikomi F, Kawai Y, Ohhashi T. Recent advance in lymph dynamic analysis in lymphatics and lymph nodes. *Ann. Vasc. Dis.* 5: 258-268, 2012, 査読有

16) Kawai Y, Ohhashi T. Current topics of immunohistochemical and biological properties of human lymphatic endothelial cells. *Ann. Vasc. Dis.* 5: 269-274, 2012, 査読有

17) 河合佳子, 大橋俊夫 リンパ管内皮細胞の機能についての新知見 *リンパ学* 35(1): 18-19, 2012, 査読有

[学会発表](計 13 件)

1) 河合佳子, 大橋俊夫 癌原発巣の微小環境酸性形成に及ぼす流れの効果 第 39 回日本リンパ学会総会(東京・ソラシティカンファレンスセンター: 2015 年 3 月 27-28 日)

2) 河合佳子, 大橋俊夫 リンパ管機能に及ぼす流れ刺激の影響について 第 92 回日本生理学会大会(神戸市・神戸国際会議場: 2015 年 3 月 21-23 日)

3) 河合佳子, 大橋俊夫 流れ刺激によるリンパ管内皮細胞の生物学的機能変化および臨床応用に向けた基礎研究 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会(松本市・キッセイ文化ホール: 2014 年 10 月 9-10 日)

4) 大橋俊夫 新しいリンパ学の創生 - リンパ生理学、自然免疫学、腫瘍学との連携 - 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会(松本市・キッセイ文化ホール: 2014 年 10 月 9-10 日)

5) 大橋俊夫, 河合佳子 循環器病学・免疫学・腫瘍学を連結した新しいリンパ学～リンパ疾患の病態理解のために～ 第 30 回日本皮膚悪性腫瘍学会(東京・学術総合センター: 2014 年 7 月 4-5 日)

6) 河合佳子、大橋俊夫 リンパ管生理機能制御におけるリンパの流れの役割 第 38 回日本リンパ学会総会 (東京・北里大学白金キャンパス: 2014 年 6 月 20-21 日)

7) 河合佳子 流れ刺激による肺の炭酸ガス排出機構における新しい概念 日本学術会議中部地区講演会 (松本市・信州大学理学部: 2013 年 7 月 12 日)

8) 河合佳子、大橋俊夫 肺での炭酸ガス発生における流れ刺激の役割: 新呼吸概念の提言 第 14 回関東心・血管フォーラム (東京・アーク森ビル: 2013 年 6 月 1 日)

9) 河合佳子 リンパ管やリンパ節の生理・病態生理学的役割におけるリンパの流れの意義について 第 14 回リンパ微小循環研究会 特別講演 (大分市・レンブラントホテル大分: 2012 年 11 月 7 日)

10) 大橋俊夫 日本発汗学会 20 年のあゆみと将来展望 - 自らの手掌部発汗研究のあゆみと照らし合わせて - 第 20 回日本発汗学会総会 特別講演 (奈良市・奈良女子大学: 2012 年 8 月 24-25 日)

11) 大橋俊夫 リンパ浮腫の外科治療に関連したリンパ動態学の基礎知識 第 47 回日本形成外科学会中部支部学術集会 特別講演 (松本市・信州大学旭総合研究棟講義室: 2012 年 7 月 7 日)

12) 河合佳子、大橋俊夫 流れ刺激によるリンパ管内皮細胞の特性変化とセンチネルリンパ節環境変化に関する研究 第 36 回日本リンパ学会総会 シンポジウム (東京・東京女子医科大学総合外来センター: 2012 年 6 月 29-30 日)

13) 大橋俊夫 私の研究の歩みとその根底に流れる研究哲学 - そこから見た循環器病学の将来展望 - 第 60 回循環力学研究会記念講演 (東京・興和創薬株式会社 本社会議室: 2012 年 5 月 26 日)

〔図書〕(計 3 件)

1) 河合佳子: 第 27 章 尿生成 リッピンコットシリーズ イラストレイテッド生理学 (栗原 敏・鯉淵典之 監訳) 丸善出版株式会社 pp398-415 東京 2014

2) 河合佳子、大橋俊夫: 間質とリンパ学 浮腫 医学ジャーナル社 pp38-45 大阪 2014

3) 河合佳子、大橋俊夫: リンパ管の生理 -

般社団法人リンパ浮腫療法士認定機構 (松尾 汎) 編 リンパ浮腫診断治療指針 pp9-11 東京 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 佳子 (KAWAI, Yoshiko)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号: 10362112

(2) 研究分担者

大橋 俊夫 (OHASHI, Toshio)
信州大学・医学部・特任教授
研究者番号: 80020832

安嶋 久美子 (AJIMA, Kumiko)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号: 70584051

(3) 連携研究者

なし