

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461188

研究課題名(和文)メカノセンサー分子同定に基づく呼吸器疾患の病態解明

研究課題名(英文)Search for mechanosensors underlying pathophysiology of respiratory diseases

研究代表者

伊藤 理 (Ito, Satoru)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：60378073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：メカニカルストレスが呼吸器細胞の機能に与える影響とその制御機構について検討した。伸展刺激により気道平滑筋細胞がATPを放出することを見出し、伸展後のATP放出のリアルタイム観察にも成功した。伸展刺激により気道平滑筋細胞から気道内へATPが放出されることが、気道の生理機能の制御や喘息・COPDなどの病態生理に關与する可能性が示唆された。

肺線維芽細胞において、伸展刺激により活性化されるCa<sup>2+</sup>流入機構を見出した。この反応はアクチン細胞骨格に依存せず、放出されたATPによっても影響されなかった。伸展によるCa<sup>2+</sup>流入は肺線維芽細胞の活性化を介して肺線維化の病態機序に關与している可能性が推測された。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to investigate effects of mechanical stress on cellular functions of airway smooth muscle cells and lung fibroblasts and the underlying mechanisms of mechanically induced cellular properties.

We found that ATP is released from airway smooth cells in response to mechanical stretch. We successfully visualized mechanically induced ATP releases from individual cells. ATP released from airway smooth muscle cells in response to mechanical stretch may regulate homeostasis of the airway physiology and play a role in the pathophysiology of asthma and COPD.

We also found that mechanical stretch activates the Ca<sup>2+</sup> influx pathway independently of the actin cytoskeleton and released ATP in human lung fibroblasts. Our findings suggest that Ca<sup>2+</sup> influx in response to mechanical stress would play a role in the progression of pulmonary fibrosis via activating lung fibroblasts.

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 カルシウムイオン 気道平滑筋 肺線維芽細胞 ATP

### 1. 研究開始当初の背景

呼吸によって肺・気道は繰り返しての受動的伸展(ストレッチ)・気流ずり応力を受ける。更には気道収縮や咳反射に伴って圧縮刺激・圧負荷が生じる。このような機械的刺激(メカニカルストレス)は、呼吸器系の発達・分化の過程、および正常呼吸器機能のホメオスタシスを保つ上で必須である。一方で、過剰なメカニカルストレスは正常呼吸器機能に不具合を生じさせ、喘息、肺気腫、線維化など多くの呼吸器疾患の病態に影響していると考えられる。このため、メカニカルストレスに起因する呼吸器疾患における病態形成の機序を解明することは、極めて重要な課題とされてきた。しかしながら、呼吸器疾患の病態形成に關与する細胞メカノセンサー分子については、気道の知覚神経末端などを除いてほとんど同定されていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、メカニカルストレスが気道リモデリング、肺気道炎症、肺線維化、肺細胞破壊・修復を制御する機序を明らかにし、呼吸器疾患の病態解明に貢献することである。

### 3. 研究の方法

培養細胞(ヒト気道平滑筋細胞、ヒト肺線維芽細胞)を用いた研究を行い、メカニカルストレスの細胞機能および喘息・気道リモデリング・線維化の病態形成に果たす役割について検討した。

(1) シリコン膜上に接着したヒト気道平滑筋細胞に対し、細胞伸展装置を用いてストレッチ刺激を与えた。細胞からの ATP 放出を luciferin-luciferase 反応による発光測定で評価した。更には、画像強調と高感度 EM-CCD カメラ機能のある顕微鏡を用いて ATP 放出による発光をリアルタイム動画撮影した。

(2) シリコン膜上に接着したヒト肺線維芽細胞に対して細胞伸展装置を用いてストレッチ刺激を与えた際の細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度変化を fura-2 蛍光強度変化によって測定した。更には、細胞からの ATP 放出を、細胞上清の luciferin-luciferase 反応による発光測定で評価した。

### 4. 研究成果

(1) ヒト気道平滑筋細胞がストレッチ刺激に応答し ATP を放出することを見出した。更に、ATP 放出のリアルタイム観察にも成功した(図 1)。細胞上清 ATP 濃度はストレッチ強度依存性に有意に増加した。

この ATP 放出は細胞内  $Ca^{2+}$ キレート剤(BAPTA)および vesicular exocytosis 阻害薬(bafilomycin, monensin)で有意に抑制された。一方、pannexin hemichannel 阻害薬(carbenoxolone)では抑制されなかった。この

ことから、放出機序として  $Ca^{2+}$ 依存性 vesicular exocytosis が關与していると考えられた。

細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇の機序として TRPV4 チャンネルを介した  $Ca^{2+}$ 流入の關与について検討した。TRPV4 発現を siRNA 導入により抑制してもストレッチによる ATP 放出は抑制されなかった。

以上の結果から、メカニカルストレスに応答して気道平滑筋細胞から気道内へ放出される ATP が、気道の生理機能や喘息・COPD などの病態生理に關与する可能性が示唆された。

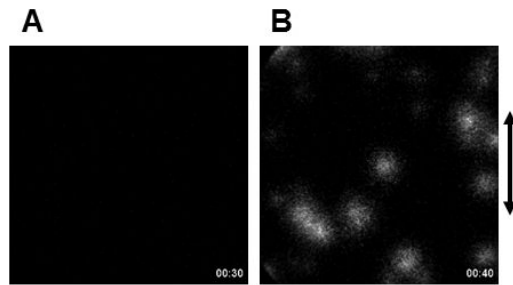


図 1. ヒト気道平滑筋細胞における単回ストレッチ刺激による ATP 放出。A: 刺激前、B: 22%ストレッチ刺激(矢印方向)10 秒後。放出された ATP (白色)が観察されている。

(2) ヒト肺線維芽細胞における細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度がストレッチ刺激に応答し上昇することを見出した(図 2A,B)。このストレッチによる  $Ca^{2+}$ 濃度上昇は細胞外液の  $Ca^{2+}$ 非存在下ではほぼ完全に抑制されたことから、細胞外からの  $Ca^{2+}$ 流入により引き起こされたと考えられた。

低浸透圧刺激による細胞膜伸展によっても細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度が認められた(図 2C)。一方で、アクチン重合阻害薬(cytochalasin D)によっては抑制されなかった(図 2D)。以上のことから、ストレッチ刺激はアクチン細胞骨格を介さず、細胞膜伸展により  $Ca^{2+}$ 流入を引き起こすと考えられた。

繰り返し細胞ストレッチ刺激により細胞上清 ATP 濃度が有意に増加した。一方、ストレッチによる細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇は ATP 分解酵素(apyrase)や ATP 受容体阻害薬(suramin)を加えても抑制されなかった。このことから、ストレッチにより放出された ATP が  $Ca^{2+}$ 流入を引き起こす autocrine/paracrine 作用は關与していないことが示唆された。

細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇は肺線維芽細胞の活性化を促進することから、ストレッチによる  $Ca^{2+}$ 流入は肺線維化の病態機序に關与している可能性が推測された。

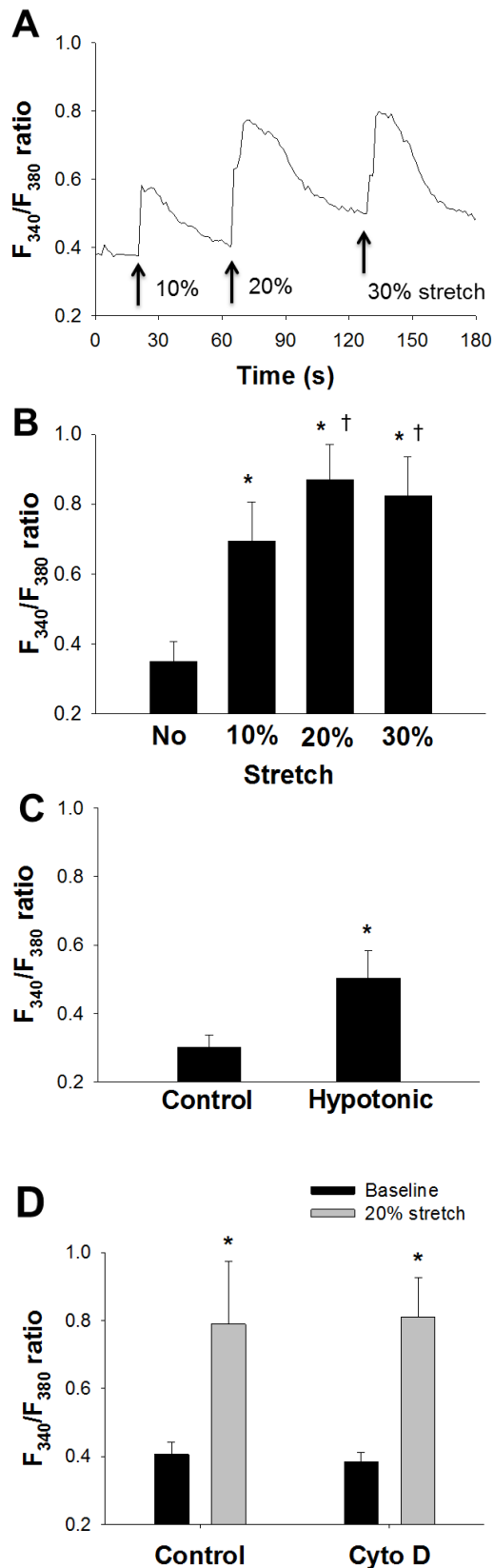


図 2. シリコン膜上に培養したヒト肺線維芽細胞における単回ストレッチ刺激(A,B)および低浸透圧刺激(C)による細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇。ストレッチ強度依存性の細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇を認めた。D: 20%ストレッチによる細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇はアクチン重合阻害薬

cytochalasin D (Cyto D)では抑制されなかった。

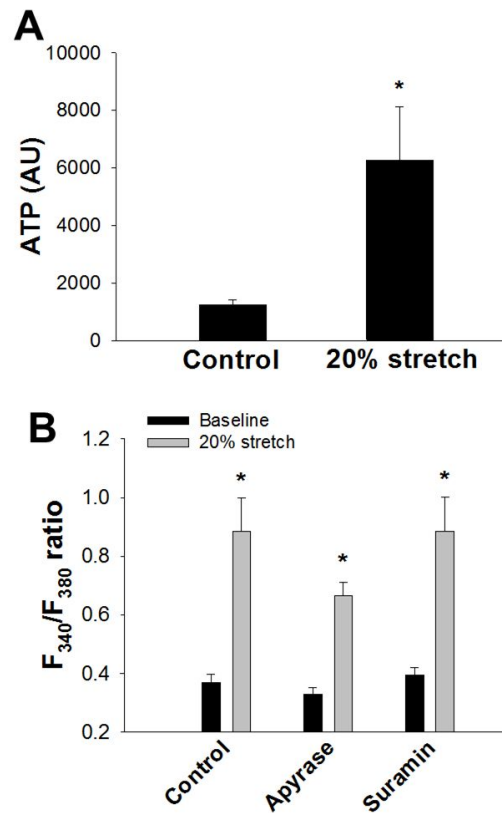


図 3. A: シリコン膜上に培養したヒト肺線維芽細胞における繰り返しストレッチ刺激（伸展強度 20%、30 回/分、10 分間）による ATP 放出。B: 20%ストレッチによる細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇は apyrase や suramin では抑制されなかった。

## 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 6 件)

1. Sokai R, Ito S, Iwano S, Uchida A, Aso H, Kondo M, Ishiguro N, Kojima T, Hasegawa Y. Respiratory mechanics measured by forced oscillation technique in rheumatoid arthritis-related pulmonary abnormalities: frequency-dependence, heterogeneity and effects of smoking. *SpringerPlus* 5:335, 2016. 査読有
2. 伊藤理、長谷川好規. 講座「研究手法入門：薬理生理」機械的ストレス実験. 呼吸 34:793-798, 2015. 査読無
3. Noble PD, Pascoe CD, Bo L, Ito S, Kistemaker LE, Tatler AL, Pera T, Brook BS, Gosens R, West AR. Airway smooth muscle in asthma: linking contraction and mechanotransduction to disease pathogenesis and remodeling. *Pulm Pharmacol Ther*

- 29:96-107, 2014. [Review] 査読有
- Murata N, Ito S, Furuya K, Takahara N, Naruse K, Aso H, Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y. Ca<sup>2+</sup> influx and ATP release mediated by mechanical stretch in human lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 453:101-105, 2014. 査読有
  - Takahara N, Ito S, Furuya K, Naruse K, Aso H, Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y. Real-time imaging of ATP release induced by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 51:772-782, 2014. 査読有
  - 伊藤理. 特集/咳と痰のサイエンス：気道平滑筋の病態と咳. *The LUNG perspectives* 21:338-342, 2013. 査読無

〔学会発表〕(計 11 件)

- 伊藤理. シンポジウム「知の未来：Future Directions with rising son and daughter」気道リモデリングの機序と分子標的. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会 国立京都国際会館 京都府京都市 2016 年 4 月 9 日.
- 浅野周一, 伊藤理, 高橋光太, 村田直彦, 近藤征史, 長谷川好規. 肺のメカノバイオリロジー：基質硬度による肺線維芽細胞の活性化. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会 国立京都国際会館 京都府京都市 2016 年 4 月 9 日.
- 伊藤理, 村田直彦, 麻生裕紀, 近藤征史, 長谷川好規. 肺線維芽細胞のメカノバイオリロジー：基質硬さによる制御機構. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 東京国際フォーラム 東京都千代田区 2015 年 4 月 19 日.
- Ito S, Murata N, Takahara H, Aso H, Kondo M, Furuya K, Naruse K, Sokabe M, Hasegawa Y. [English Poster Discussion] Mechanobiology of lung fibroblasts: Ca<sup>2+</sup> influx and ATP release mediated by mechanical stretch. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 東京国際フォーラム 東京都千代田区 2015 年 4 月 18 日.
- Murata N, Ito S, Hasegawa Y. Effects of mechanical stretch on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations in human lung fibroblasts. *7th World Congress of Biomechanics 2014*, Boston, USA, July 9, 2014.
- Ito S, Hasegawa Y. [Symposium] Mechanics of airway smooth muscle cells. *7th World Congress of Biomechanics 2014*, Boston, USA, July 8, 2014.
- Ito S, Hasegawa Y. [Symposium] Effects of mechanical stresses on airway smooth muscle functions. *International Symposium on Mechanobiology 2014*, 岡山大学 岡山県岡山市, May 23, 2014.
- Murata N, Ito S, Takahara N, Furuya K, Sokabe M, Hasegawa Y. [Symposium]

Stretch-activated Ca<sup>2+</sup> influx in human lung fibroblasts. *International Symposium on Mechanobiology 2014*, 岡山大学 岡山県岡山市, May 21, 2014.

- 伊藤理, 高原紀博, 麻生裕紀, 村田直彦, 近藤征史, 長谷川好規. ヒト肺微小血管内皮細胞におけるストレッチ誘導性 ATP 放出. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会 国立京都国際会館 京都府京都市 2014 年 5 月 10 日.
- 高原紀博, 伊藤理, 麻生裕紀, 村田直彦, 近藤征史, 長谷川好規. 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. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 ホテルニューオータニ 東京都千代田区 2013 年 11 月 28 日.
- Ito S, Takahara N, Furuya K, Sokabe M, Hasegawa Y. Real-time imaging of mechanical stress-induced ATP release in airway smooth muscle cells. *8th Young Investigators Symposium on Airway Smooth Muscle and Fibroblast Biology*, Groningen, the Netherland, Sep. 6, 2013.

〔図書〕(計 2 件)

- 伊藤理. (2015) DOJIN BIOSCIENCE シリーズ「メカノバイオリロジー」III. 医学におけるメカノバイオリロジー. 13. 呼吸器とがんのメカノバイオリロジー：気道, 肺, 肺胞. 曾我部正博編. 化学同人, 京都, pp173-184.
- Ito S. (2014) Role of RhoA/Rho-kinase and calcium sensitivity in airway smooth muscle functions. In: Wang YX (Ed) "Calcium Signaling In Airway Smooth Muscle Cells". Springer, New York, pp285-307.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/6391/6393/kokyuukinaikagaku.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 理 (ITO, Satoru)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  
研究者番号：60378073

(2)研究分担者

長谷川 好規 (HASEGAWA, Yoshinori)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20270986

(3)連携研究者

曾我部 正博 (Sokabe, Masahiro)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任教授  
研究者番号：10093428