

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462765

研究課題名(和文) 肺胞II型細胞の水分移送(ドーム形成)と肺水腫の発生機序に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the relationships between water transportation through alveolar type II epithelial cells (dome formation) and development of pulmonary edema

研究代表者

諏訪部 章 (Suwabe, Akira)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：20241713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肺水腫は肺胞II型細胞を介する肺胞側から間質・毛細血管側への水分移送の障害が推測されている。本研究では、II型細胞の水分輸送を反映する「ドーム形成」を、特殊な4分割チャンバーを用いて動画描出することで、その形成に及ぼす因子(アンプロキソールなど)の影響を調べる実験系を確立することができた。このシステムを用いれば、肺水腫の発生に影響を与える各種薬剤や生理活性物質の影響を検討しうることが示された。

研究成果の概要(英文)：Disturbance in water transportation through alveolar type II epithelial cells was suggested to be involved in the development of pulmonary edema. In the present study, we established the in vitro system to evaluate the agents affecting the dome formation which reflects the water transportation through alveolar type II epithelial cells, using our original cell dynamic recording system with a special four-divided chamber. Using our system, it was suggested the agents such as drugs or biological active materials affecting the development of pulmonary edema can be evaluated.

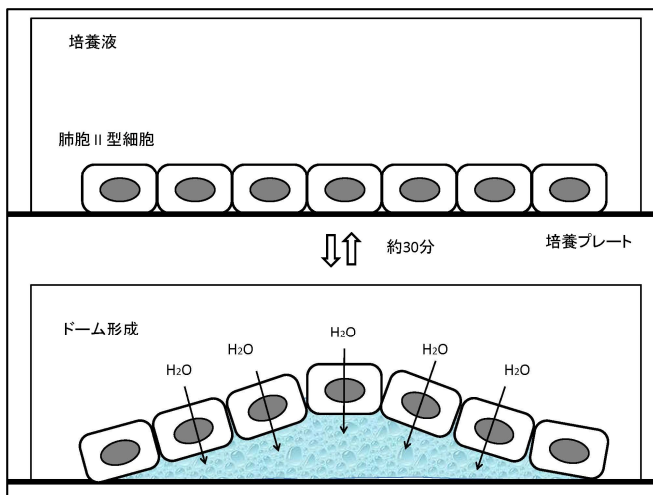
研究分野：医歯薬学

キーワード：肺水腫 肺胞II型上皮細胞 ドーム形成

1. 研究開始当初の背景

心不全や急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) では、血液中の水分が能動的または受動的に肺腔内に貯留して肺水腫状態が形成され、呼吸困難や労作時息切れ、胸部レントゲン陰影の出現、Ⅱ型呼吸不全 (PaO₂ 低下、PaCO₂ 正常または低下) などの重篤な臨床症状を呈する。肺水腫の多くは、基礎疾患の軽減とともに消失するが、その消失機序は未だによく解明されていない。もし、この消失機序を促進する薬剤や生体内因子が発見できれば、肺水腫の病態からいち早く脱却でき、患者予後の改善に大きく貢献できる可能性がある。

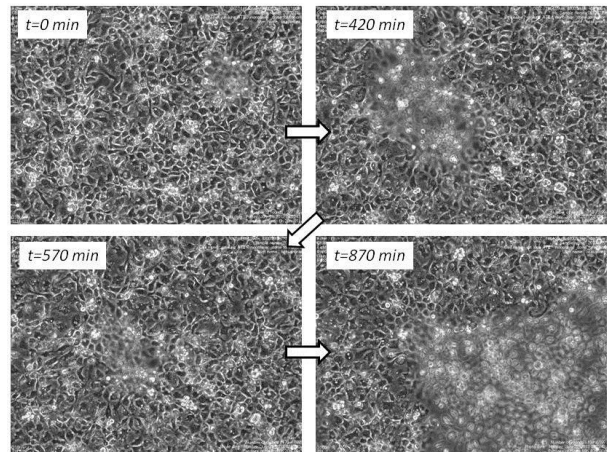
肺胞は、肺に特異的な上皮細胞 (Ⅰ型とⅡ型) によって被覆され、主にⅡ型細胞はガス交換に関与するとされている。しかし、これらが肺胞内の水分の間質側への水分移動によって、肺胞内に貯留した水分量を調整している点は意外に知られていない。この中で、Ⅱ型細胞内には、多数のミトコンドリアが存在し能動的に水分を間質に移動させている。この機能の表れとして、ラット肺から分離したⅡ型細胞の培養系では apical 側から basal 側への活発な水分移送により、培養細胞単層 (モノレイヤー) がプラスチック培養皿面から遊離し盛り上がる、いわゆる「ドーム形成」が観察されることが知られていた (図 1、Mason *et al*, Proc Natl Acad Sci USA, 79:6033-6037, 1982)。



【図 1】肺胞Ⅱ型細胞のドーム形成:ラット肺から分離したⅡ型細胞をプラスチック培養皿上で培養すると48時間ころから、活発なapical側からbasal側への水分移送により、細胞の単層(モノレイヤー)が盛り上がるいわゆる「ドーム形成」が認められる。



【図 2】培養装置付き蛍光・位相差顕微鏡セット (BioStation IMQ、ニコン) の構成図: 35mm プラスチック培養皿上の培養細胞を、長時間にわたり観察可能である。また、登録した多点ポイントを 100 倍 ~ 400 倍まで観察でき、縦軸 (Z 軸) 方向にもスキャンが可能である。さらに、撮像した写真を動画で再現することにより、ダイナミックな細胞の状態が観察できる。また、分割チャンバーを利用することで、多種類の薬剤や濃度による変化を同時に観察し解析できる利点がある。



【図 3】ドーム形成の動的観察:Ⅱ型細胞の単層からドームが形成されると、焦点から外れるためピンボケのような映像が捉えられる。ドーム形成は静的なものではなく、30 分以内に消失し、また他の部位から新しいドームが形成されるといったダイナミックな動きを示す。このように、Ⅱ型細胞の単層は盛んに水分移送を行っている様子がうかがえる。

この現象は、いったん形成されると消失しない静的現象と考えられていたが、我々は、培養装置付き蛍光・位相差顕微鏡セット (図 2、BioStation IMQ、ニコン) を用いて、Ⅱ型細胞の培養細胞を長時間観察する系を確立して観察したところ、このドーム形成が何度

も消退を繰り返し、活発に apical 側の水分を吸収している動画を捉えることができた (図 3)。このドームは最大径 400 μm 、高さ 200 μm にも達することが示された。1つの細胞は 30 分前後で自細胞容積の約 3.5 倍もの水分をくみ出していることを明らかにした (2013 年 11 月 16 日、第 49 回日本肺サーファクタント・界面医学会、東京で発表)。この系を用いることで、水分移送に促進的または抑制的に作用する生体内諸因子や諸薬剤をスクリーニングすることが可能になる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット肺より分離した II 型細胞を用いたドーム形成を長時間にわたり撮影するシステムにおいて、分割チャンバーを用いて、異なる条件の細胞を同時に長時間にわたり撮影する実験系を確立すること、その実験系を用いて主な薬剤や各種サイトカインをこの系に添加することで、ドーム形成に影響を与える諸因子をスクリーニングすることである。

3. 研究の方法

(1) ラット肺からの II 型細胞の分離

Dobbs らの方法 (Am Rev Respir Dis 118: 705-733, 1978) に従い、6 週令の雄性 Sprague Dawley ラットより、肺泡マクロファージへのフルオロカーボン貪食、エラストラーゼによる経気道的上皮剥離、メトリザミド比重遠心法により II 型細胞を分離し、35 mm のプラスチック培養皿に 1×10^6 cells/ml、1 ml/皿の濃度で培養する。

培養皿はニコンの BioStation (図 2) 内に設置され、5%CO₂ の条件で培養を開始する。

(2) ドーム形成の評価法の確立

培養開始後 48 時間後付近からドーム形成が観察されるが、培養開始後最初のドームが形成するまでの時間、単位視野あたりのドームの数、1つのドームの長径と高さ (μm)・面積 (μm^2)・体積 (μm^3)、消失までの時間、形態的特徴などを多角的に観察する。形態的定量には、専用の解析ソフトを購入して測定する。

II 型細胞には、アドレナリン作動性受容体、purinergic 受容体、さらにコリン作動性の受容体の存在が知られている。そこで、アゴニスト (Terbutaline)、アデノシン三リン酸 (ATP)、アセチルコリン (ACh) などの他、肺サーファクタント分泌を促進するとされるアンプロキソールなど薬剤を添加してドーム形成に対する影響を観察する。

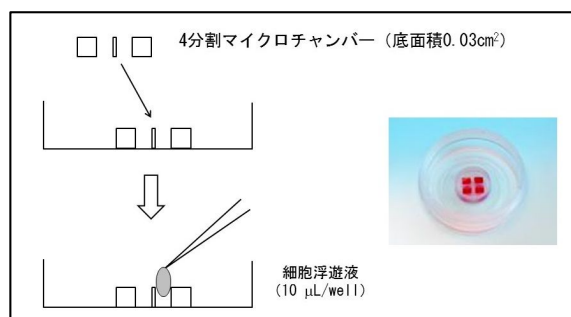
また、肺水腫の発生する病態では、種々の炎症性サイトカイン (IL-1、IL-8、TNF- α 、IFN など) が増加していることが知られているので、これらの諸因子を添加することで、

ドーム形成がどのように影響を受けるかを評価する。

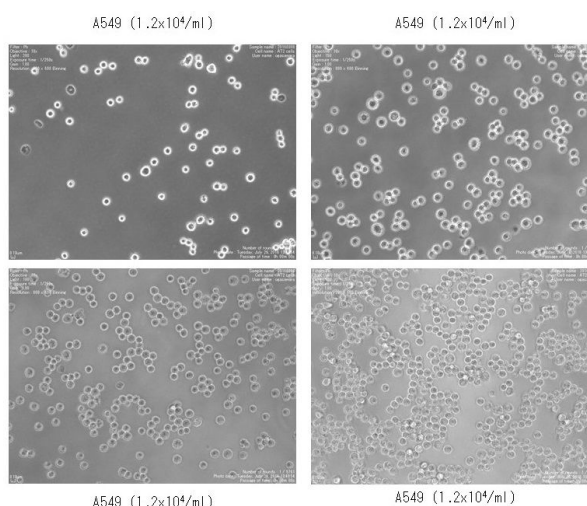
4. 研究成果

我々の実験系では、35 mm のプラスチック培養皿では、長時間にわたり II 型細胞のドーム形成を監視することができた (図 3) が、実際に市販されている分割チャンバーを用いた予備実験を行ったところ、観察する面積が狭く、長時間にわたり高倍率で多くのポイント (ドーム) を観察するとピントがずれてしまい、高画質の画像が得られない問題点につき当たった。

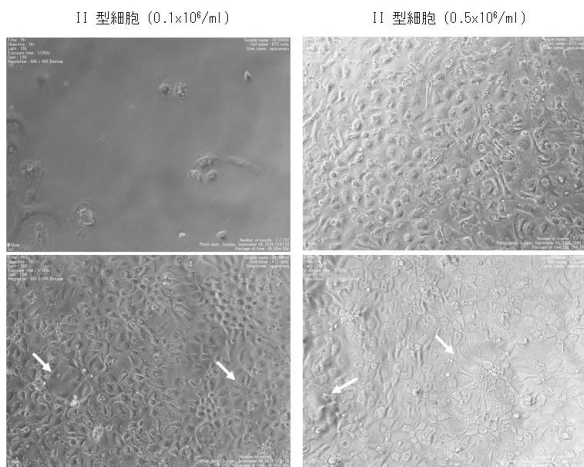
そこで、初年度 (2014 年度) と 2 年目 (2015 年度) の前半にかけて様々な分割チャンバーを用いて予備実験を繰り返した。その結果、2 年目 (2015 年度) の後半になり、ibidi 社製の 4 分割マイクロチャンバー (底面積 0.03cm²、ib80409) を探し出し (図 4)、A549 細胞を用いた予備的実験で、異なる細胞濃度で細胞分裂を行われる様子を長時間撮影することが可能であることが判明し、我々の実験系に適応できことが判明した (図 5)。



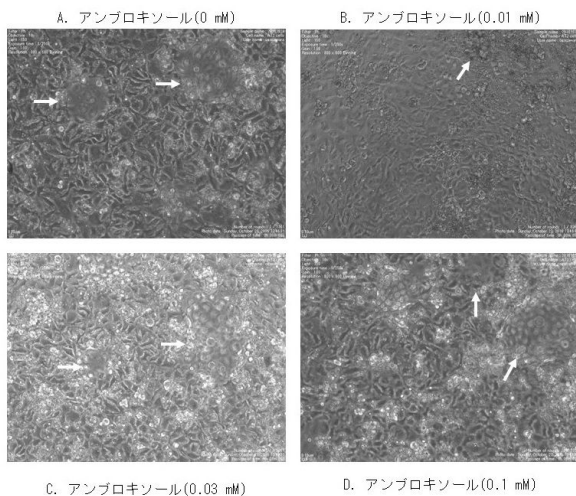
【図 4】4 分割マイクロチャンバーの設置と細胞培養の方法



【図 5】種々の細胞の濃度の A549 細胞を用いた長時間にわたる観察



II 型細胞 (1.0x10⁶/ml) II 型細胞 (0.5x10⁶/ml)
II 型細胞 (1.0x10⁶/ml) II 型細胞 (2.0x10⁶/ml)
【図 6】種々の細胞濃度のラット II 型細胞を用いた長時間観察 (矢印がドーム)



A. アンブロキシール (0 mM) B. アンブロキシール (0.01 mM)
C. アンブロキシール (0.03 mM) D. アンブロキシール (0.1 mM)
【図 7】種々の濃度のアンブロキシール存在下での II 型細胞のドーム形成 (矢印)

次に、この 4 分割マイクロチャンバーを用いた実験系で、どのような細胞濃度でドームが観察できるかを検討したところ、 1×10^6 /mL と 2×10^6 /mL で蒔いたウエルでは day2-day4 で活発にドーム形成が観察された。薬剤などの効果の観察には、 $1 \sim 2 \times 10^6$ /mL の細胞濃度が最適と考えられた (図 6)。

さらに、薬剤存在下で、このドーム形成が観察可能かを観察するために、肺サーファクタント分泌を促進するアンブロキシールを用いて実験を行ったところ、0.01~0.1 mM 濃度でもドーム形成を観察することができた (図 7)。

以上より、今回の研究で、ibidi 社製の 4 分割マイクロチャンバー (ib80409) を用いた培養装置付き蛍光・位相差顕微鏡 (BioStation IMQ) にて、異なる細胞濃度のラット肺胞 II 型細胞のドーム形成を同時に評価することができた。さらに薬剤 (アンブ

ロキソール) の存在下でもドーム形成は観察されたことから、このシステムを用いてドーム形成に及ぼす薬物や各種生理活性物質の影響が検討できる可能性が示された。

今回の研究では、4 分割チャンバーの選定に時間がかかり、また選定されたチャンバーでの実験条件の設定にも時間を要したため、後半に予定されていた、各種薬剤や生理活性物質の影響を検討するには至らなかった。しかし、今回確立された実験系では、アンブロキシールの存在下でもドーム形成が確認できたことから、今後様々な薬効評価に向けて研究を進めてゆく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

諏訪部章、小笠原理恵：培養装置付き蛍光・位相差顕微鏡によるラット分離肺胞 II 型細胞の観察 ~ 接着・サーファクタント分泌・ドーム形成までの経時変化 ~、分子呼吸器病、査読無、19(1)、2015、115-117

諏訪部章：呼吸器疾患に関する細胞生物学「肺胞上皮細胞」、Respiratory Medical Research、査読無、4(2)、2016、54-58

〔学会発表〕(計 3 件)

諏訪部章、小笠原理恵：肺胞 II 型上皮細胞の形態 (静的および動的) と機能、第 50 回日本肺サーファクタント・界面医学会学術研究会、2014.10.25、盛岡

諏訪部章、小笠原理恵：培養装置付き蛍光・位相差顕微鏡によるラット肺胞 II 型細胞の動的観察 ~ 4 分割マイクロチャンバーによるドーム形成の経時変化 ~、第 52 回日本肺サーファクタント・界面医学会学術研究会、2016.10.29、金沢

佐々木裕、小笠原理恵、吉野直人、長内和弘、諏訪部章、村木靖：A 型インフルエンザウイルスによる肺炎の発症機構の解析：コラーゲン収縮ゲル上で培養したラット肺胞 II 型細胞による検討、第 52 回日本肺サーファクタント・界面医学会学術研究会、2016.10.29、金沢

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

諏訪部 章 (SUWABE AKIRA)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：20241713

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小笠原 理恵 (OGASAWARA RIE)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：70347871