

主論文の要旨

**Real-Time Imaging of ATP Release Induced by Mechanical
Stretch in Human Airway Smooth Muscle Cells**

〔 ヒト気道平滑筋細胞における機械的伸展刺激による
ATP リアルタイムイメージング法 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：長谷川 好規 教授)

高原 紀博

【緒言】

気道壁内の気道平滑筋細胞は持続的機械刺激を受けており、この機械刺激により様々な細胞機能が影響を受ける。細胞外ATPは気道におけるメディエーターとして働くことに加え、喘息やCOPDの病態に重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、気道内のATP放出源としての気道平滑筋細胞の役割は不明である。本研究では気道平滑筋細胞のATP放出に対する機械的伸展（ストレッチ）刺激の影響について検討した。

【方法】

正常培養ヒト気道平滑筋細胞を使用した。細胞ストレッチ装置を用いて水平方向のストレッチ刺激を与えた。細胞上清 ATP 濃度をルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光測定で評価した。TRPV4 チャンネルの mRNA の発現を real-time PCR 法で、蛋白の発現を Western blot 法で検討した。siRNA 導入により TRPV4 チャンネルの遺伝子発現を knockdown した。細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を fura-2 蛍光強度比 (F_{340}/F_{380} ratio) で測定した。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で観察した。結果は平均値 \pm SD で示し、統計学的分析として *t* 検定もしくは分散分析を用い $P<0.05$ を有意とした。

【結果】

(1) 繰り返しストレッチ刺激による ATP 放出

細胞上清 ATP 濃度はストレッチ強度12%、20%の周期的ストレッチ刺激（10回/分および30回/分）によって有意に増加したが強度4%では増加しなかった (Figure 1A, B)。ストレッチ（20%, 30回/分）による ATP 濃度上昇は10-15分ではほぼ最大になった (Figure 1C)。

(2) ストレッチ刺激による ATP リアルタイムイメージング画像

強度 22%, 1 秒間のストレッチ刺激によって数個の細胞から ATP が放出され周囲へ拡散する様子が観察された。ATP 放出箇所の分布は不均一であった (Figure 2)。

(3) ストレッチ刺激による ATP リアルタイムイメージングの経時的変化

強度 22%, 1 秒間のストレッチ刺激後、28 箇所からの ATP 放出が観察された (Figure 3A)。ATP 濃度はストレッチ約 30 秒後に最大となり、次第に低下した (Figure 3B)。ATP 放出時間は発光強度変化率の最大値と最小値を呈した時点の時間差で計算され、Figure 3C で示した代表例では 29 秒間であった。28 箇所の ATP 放出時間の範囲は 29-94 秒（平均 66.5 秒）であった。

(4) 複数回ストレッチ刺激による ATP 放出のリアルタイムイメージング

15分以上の間隔を開けて、14%, 22%, 31%の順に連続した3回のストレッチ刺激を与えた。14%ストレッチ刺激により観察範囲内で1箇所 ATP 放出を認めた (Figure 4A, D)。22%, 31%ストレッチ刺激による ATP 放出細胞数はそれぞれ28, 22 箇所で ATP 濃度の最大値は同等であった (Figure 4B-D)。22%と31%ストレッチに

応答して一部 ATP 放出の重複を認めたが、多くは1回のみ ATP を放出した(Figure 4E)。

(5) ストレッチ刺激による ATP 放出機序における vesicular exocytosis の役割

Ca^{2+} 依存性 vesicular exocytosis を阻害する作用を有する薬剤 (BAPTA, *N*-ethylmaleimide, monensin, bafilomycin)はいずれも繰り返しストレッチ刺激(20%, 30 回/分)による細胞上清 ATP 濃度の増加を抑制した(Figure 5A-D)。一方、pannexin hemichannel 阻害剤(carbenoxolone)はストレッチ刺激による細胞上清 ATP 濃度の増加に影響を与えなかった(Figure 5E)。

(6) ストレッチ刺激による ATP 放出における TRPV4 の役割

TRPV4 チャネルを標的とした siRNA (siTRPV4)の導入により TRPV4 の mRNA ならびに蛋白の発現を有意に抑制した(Figure 6A-C)。更に、選択的 TRPV4 アゴニスト GSK1016790A により生じる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、siTRPV4 の導入によって有意に抑制された(Figure 6D)。一方で、siTRPV4 の導入は繰り返しの 20%ストレッチ刺激による ATP 放出と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇をいずれも抑制しなかった(Figure 6E, F)。

(7) ストレッチ刺激による ATP 放出に対する ruthenium red の効果

TRPV チャネルファミリー阻害薬 ruthenium red は GSK1016790A による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を抑制した (Figure 7A)。一方、20%ストレッチ刺激による細胞上清 ATP 濃度の増加を抑制しなかった (Figure 7B)。

【考察】

本研究でヒト気道平滑筋細胞がストレッチ刺激に応答して ATP を放出することを初めて見出した。更に、ATP リアルタイムイメージング法を使って個々の気道平滑筋細胞から ATP が放出される様子を観察することに成功した。ストレッチ刺激による ATP 放出は vesicular exocytosis 阻害剤により抑制されるものの pannexin hemichannel 阻害剤により抑制されないことより、hemichannel を通じてではなく主に vesicular exocytosis によって放出されることが示唆された。またストレッチ刺激による ATP 放出と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は siTRPV4 の導入に影響されず、いずれにおいても TRPV4 の関与は否定的であった。機械的刺激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 などの病態生理に寄与すると考えられていることから、どのような機序で制御されるかについての更なる詳細な研究が必要である。

【結語】

ヒト気道平滑筋細胞がストレッチ刺激に応答して ATP を放出すること、また、その機序が vesicular exocytosis によることが示された。また、ストレッチ刺激による ATP 放出と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇に関する TRPV4 の関与は否定的であった。