

主論文の要旨

**Ca²⁺ influx and ATP release mediated by
mechanical stretch in human lung fibroblasts**

〔ヒト肺線維芽細胞における機械的伸展刺激を介したCa²⁺流入とATP放出〕

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)

村田 直彦

【背景】

特発性肺線維症（IPF）や急性呼吸促迫症候群（ARDS）の病態において、肺は線維化により不可逆的かつ進行性に機能が低下し、最終的に呼吸不全に至る。また、重篤な呼吸不全のため人工呼吸器による陽圧換気を受けている患者の病的肺においては、過剰な伸展刺激により、傷害と線維化がさらに進行する病態が知られている。過剰な組織の伸展は、肺線維化を促進する原因の1つと推測されている。肺線維芽細胞は活性化すると、コラーゲンなどの細胞外基質を産生するが、過剰に細胞外基質が産生され組織に集積することにより肺線維化は促進される。しかし、機械的伸展刺激と肺線維芽細胞の活性化の関係は明らかにされていない。

本研究では、普遍的な細胞内セカンドメッセンジャーとして働く Ca^{2+} と、肺の炎症を反映した細胞外メディエーターとして働く ATP に着目し、肺線維芽細胞が、機械的伸展刺激に対して細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇もしくは ATP 放出を誘導するかどうかを検討した。

【方法】

正常ヒト肺線維芽細胞をコラーゲンコーティングしたシリコン膜上で培養し、細胞伸展装置を用いて伸展刺激を与えた。強度 10% ~ 30% の単回伸展刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を fura-2 蛍光強度比 (F_{340}/F_{380} ratio) により測定した。繰り返し伸展刺激（強度 20%、頻度 30 回/分、10 分間）を与えた後の細胞上清の ATP 濃度をルシフェリン・ルシフェラーゼ反応による発光にて測定した。細胞外液は Ca^{2+} 濃度を 2 mM とした。低浸透圧刺激には、浸透圧を 50% に調整した細胞外液を使用した。Cytochalasin D のアクチン細胞骨格に対する効果を蛍光 phalloidin 染色にて観察した。

【結果】

(1) ヒト肺線維芽細胞は伸展刺激により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が一過性に上昇する

細胞伸展刺激により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は速やかに上昇してピークを形成し、ゆっくり減少した (Fig. 1A,B)。この一過性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は強度依存的 (10% ~ 30%) であった (Fig. 1C)。低浸透圧刺激による細胞膜伸展刺激でも同様に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が見られた (Fig. 1D)。

(2) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は細胞外からの Ca^{2+} 流入によりもたらされる

Ca^{2+} 未添加の細胞外液に EGTA (1 mM) を加えた Ca^{2+} -free 細胞外液を作成し、伸展刺激を与えたところ、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は著しく抑制された。また、選択的伸展活性型イオンチャネル阻害薬 GsMTx-4 (1 μM , 10 μM)、伸展活性型チャネル阻害薬 Gd^{3+} (10 μM)、非選択的 Ca^{2+} チャネル阻害薬 ruthenium red (10 μM) を加えたが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は抑制されなかった (Fig. 2)。

(3) Ca^{2+} 流入とアクチン細胞骨格の関係

肺線維芽細胞のアクチン細胞骨格は、アクチン重合阻害薬 cytochalasin D (10 μM) を作用させると、対照に比較し効果的に阻害されていることが確認された (Fig. 3A)。次に cytochalasin D 処理後の肺線維芽細胞に伸展刺激を与えたところ、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は抑

制されなかった (Fig. 3B)。

(4) $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と ATP 放出の関係

繰り返し伸展刺激により細胞上清の ATP 濃度は有意に上昇した (Fig. 4A)。しかし、ATP 分解酵素 *apyrase* やプリン受容体阻害薬 *suramin* を加えても、伸展刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は抑制されなかった (Fig. 4B)。

【考察】

本研究では、肺線維芽細胞は伸展刺激に反応して $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こし、また ATP を放出することが初めて示された。肺線維芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 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ると考えられた。しかし、既知の伸展活性型イオンチャンネル阻害薬、 Ca^{2+} チャンネル阻害薬では、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制することはできず、TRP チャンネルや *Piezo1* などの伸展活性型 Ca^{2+} チャンネルの関与は否定的と考えられた。アクチン細胞骨格は、細胞に加えられる張力を細胞内に伝える構造の 1 つである。このためアクチン細胞骨格の構造を変化させると、細胞の張力に対する感受性が影響を受けると考えられる。しかし $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する *cytochalasin D* の効果はなく、アクチン細胞骨格による制御は受けていないと考えられた。また、細胞伸展刺激により放出された ATP を加水分解する *apyrase* や、プリン受容体を阻害する *suramin* は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に影響を与えなかった。これらのことは、伸展による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には ATP 放出を介した *autocrine/paracrine* 作用は関与していないことを示していると考えられた。以上より肺線維芽細胞は細胞膜の伸展により $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が引き起こされるが、 Ca^{2+} 流入の機序については不明である。詳細な分子メカニズムの解明は今後の検討課題である。

$[Ca^{2+}]_i$ 上昇は肺線維芽細胞の活性化を促進する。また組織間隙の ATP 濃度上昇は肺線維化の関連が示唆されている。これらのことから、伸展刺激により生じる肺線維芽細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と ATP 放出は肺線維化の病態機序に関わっている可能性が推測される。

【結論】

肺線維芽細胞は伸展刺激により、未知の機序により、細胞外からの Ca^{2+} 流入による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と、ATP の放出を引き起こす。