

主論文の要旨

Real-time imaging of mechanically and chemically induced ATP release in human lung fibroblasts

〔 ヒト肺線維芽細胞からの機械的および化学的刺激による
ATP 放出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 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)

高橋 光太

【緒言】

生体肺内の線維芽細胞は持続的に機械刺激や化学刺激を受けており、これら刺激により様々な細胞機能が影響を受ける。細胞外 ATP は肺臓器内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、肺線維症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、肺臓器内の ATP 放出源としての線維芽細胞の役割は不明である。本研究ではヒト肺線維芽細胞の ATP 放出に対する機械的伸展（ストレッチ）刺激や化学的刺激の影響について検討した。

【方法】

正常培養ヒト肺線維芽細胞を使用した。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。浸透圧を 30% に調整した蒸留水を用いて低浸透圧刺激を与えた。また、PDGF-BB10ng/ml を上清中に加える薬理刺激を与えた。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。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±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 20% の周期的ストレッチ刺激（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 1)。ストレッチ（20%, 30 回/分）刺激を 5 分間、10 分間加えても ATP 濃度に差はみられなかった(Figure 1)。

トリパンブルー染色を用いて、ストレッチ（20%, 30 回/分）刺激を 10 分間加えた細胞が生存していることを確認した。

(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、24 箇所からの ATP 放出が観察された(Figure 2A)。ATP はストレッチ刺激後 500 ミリ秒以内に速やかに放出された(Figure 2B)。ATP 濃度が最大値となる時間は、ストレッチ刺激後 4 秒から 35 秒までとばらつきがみられた。ATP 濃度はストレッチ約 18 秒後に最大となり、次第に低下した(Figure 2C)。

(4) 低浸透圧刺激による ATP 放出のリアルタイムイメージング

浸透圧が 30% になるよう蒸留水を添加し低浸透圧刺激を与えた。無数の ATP 放出箇所が観察され、周囲へ広がった(Figure 3A)。ストレッチ刺激と比較して均一な ATP 放出がみられた(Figure 3A)。ATP 濃度の経時的変化を 12 分までと 3 分までのものをそれぞれ測定した(Figure 3B,3C)。

(5) PDGF 刺激による ATP 放出

PDGF-BB(10ng/ml)による化学的な刺激を加えた際の ATP 放出反応を実験した。観察範囲内において、9 か所の ATP 放出反応がみられた(Figure 4A)。ストレッチ刺激と低浸透圧刺激と異なり、即座な ATP 放出反応ではなく ATP が放出されるタイミングも不均一であった。9 か所の ATP 放出反応の経時的变化を測定した(Figure 4B)。

【考察】

本研究でヒト肺線維芽細胞が単相性ストレッチ刺激や低浸透圧刺激、PDGF 刺激に反応して ATP を放出し、ATP リアルタイムイメージング法を使って個々の線維芽細胞から ATP が放出される様子を初めて観察することに成功した。ストレッチ刺激と PDGF 刺激による ATP 放出は不均一であり、それと比較し低浸透圧刺激による ATP 放出は均一であった。細胞レベルにおいて ATP 放出反応の不均一性を評価するうえで、本研究のリアルタイムイメージ観察は有益である。

ATP は様々な細胞から放出されるメディエーターとして広く認識されている。本研究により、生体肺内の細胞外 ATP の由来の一つとして線維芽細胞が該当することがわかった。細胞外 ATP 量は分解酵素により厳密にコントロールされているが、過剰な細胞外 ATP は、肺障害時における Danger-associated molecular patterns として働いている。PDGF は肺線維化を促進する因子として知られている。PDGF 刺激による ATP 放出反応は機械的刺激と比較すると弱かったが、PDGF は部分的に肺線維化に関与していることが示唆される。刺激による ATP 放出反応は異なるものの、肺線維化や重症肺障害の病態にそれぞれの刺激が関与していることが推察された。

本研究における低浸透圧刺激により生じた細胞膜の持続的進展状態は、溺水時や肺水腫や重症肺障害などの臨床病態で生じた細胞レベルでの異常を想定している。ストレッチ刺激の振幅の違いは、正常呼吸運動状態と肺過膨張を引き起こす人工呼吸管理状態との違いを想定している。肺線維症や ARDS の臨床病態においては、肺実質臓器の構造や硬さが局所で不均一な状態である。この構造上の不均一性は、そこにかかるストレスも不均一であることを表している。最近、ラット肺モデル実験で、肺膨張時に生じる生体肺内からの ATP 放出反応の分布が不均一であることが報告された。この生体実験結果は、試験管内での本研究結果と合致するものであった。しかし、生体肺から放出された ATP が呼吸器系にどのような影響を与えるかについてはまだ詳しくわかっていない。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】

ヒト肺線維芽細胞がストレッチ刺激や低浸透圧刺激、PDGF 刺激に反応して ATP を放出することが示され、その放出反応が不均一であることがわかった。