

主論文の要旨

**Matrix stiffness regulates migration of
human lung fibroblasts**

〔基質硬度はヒト肺線維芽細胞の遊走能を制御する〕

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)

浅野 周一

【緒言】

特発性肺線維症を始めとする肺線維化病態では、細胞外基質の過剰な沈着と、肺線維芽細胞の遊走、増殖による線維化巣への集積がみられる。線維化巣でみられる活性化した線維芽細胞は筋線維芽細胞と呼ばれ、 α -smooth muscle actin (α -SMA)の発現を特徴とする。筋線維芽細胞は高い収縮能をもち、過剰な細胞外基質を産生し基質の硬化、肺線維化の進展に重要な役割を果たしている。近年、肺基質の「硬さ」により肺線維芽細胞機能が制御される可能性が提唱されている。正常な肺の硬さ(0.5-5 kPa)と比較し、線維化を生じた肺は硬化がみられる(15-100 kPa)。細胞は周囲の硬さを感知応答しており、細胞遊走能、細胞伸展、増殖、分化など多くの細胞機能が基質の硬さによって制御される。肺線維化においては硬化した肺が線維芽細胞の分化に関与していることが報告されている。我々は硬い基質によって誘導された α -SMA により肺線維芽細胞が高い遊走能を獲得すると仮説を立て、硬さの調節できる基質として polyacrylamide hydrogel を用いて検証した。

【方法】

正常ヒト肺線維芽細胞を異なる硬さ(1-50 kPa)の polyacrylamide hydrogel もしくは plastic dish 上で培養し、細胞形態、増殖、筋線維芽細胞への分化、遊走能に与える影響を比較検討した。細胞の形態、増殖は培養 4、16、72 時間後に位相差顕微鏡で撮影し、ImageJ を用いて解析した。polyacrylamide hydrogel 上での細胞生存性を、生細胞について calcein により、死細胞について ethidium bromide により染色することで評価した。

筋線維芽細胞への分化に関しては α -SMA の発現を蛍光免疫染色法と Western blot 法で評価した。細胞遊走能に関しては、異なる硬さの基質上で 4 日間培養した細胞を用いて chemotaxis assay と random walk migration assay を行い、培養された基質の硬さが与える影響を比較した。Chemotaxis assay では platelet-derived growth factor で刺激を行い、6 時間の間に 8 μ m の小孔をもつ polycarbonate 膜を通り抜けた細胞の数をカウントした。random walk migration assay では time-lapse microscopy を用いて、plastic dish 上での細胞の移動の様子を播種 1 時間後から合計 12 時間観察した。 α -SMA の siRNA を plastic dish 上で培養した細胞に導入し、蛋白発現と細胞遊走能の変化を評価した。

【結果】

ヒト肺線維芽細胞を異なる硬さの polyacrylamide hydrogel 上で培養したところ、基質硬度が増加するのに伴い胞体を広げる細胞の割合が増加し、細胞面積、周囲長、縦横比が増加し、真円度が低下した(Figure 1,2)。軟らかい基質上では細胞増殖が抑制されたが、polyacrylamide hydrogel 上でも細胞生存性は保たれていた(Figure 3, 4)。

次に基質の硬さが肺線維芽細胞の分化に与える影響を検証した。硬い基質上(25 kPa, plastic dish)では軟らかい基質(2 kPa)と比べ、細胞内の actin stress fiber 形成と α -SMA 蛋白発現の増強が観察された(Figure 5)。軟らかい基質(2 kPa)上でも transforming growth factor- β により刺激をすると、 α -SMA 蛋白発現の増強を認めた(Figure 5)。

次に基質の硬さが肺線維芽細胞の遊走能に与える影響を検証した。Chemotaxis assay および random walk assay にて比較すると、硬い基質上(25 kPa, plastic dish)で4日間培養した細胞は、軟らかい基質(2 kPa)で培養した細胞と比較して、高い遊走能を認めた(Figure 6)。さらに、 α -SMA の siRNA 導入により、硬い基質における細胞遊走能は有意に抑制された(Figure 7)。Focal adhesion kinase 及び myosin light chain のリン酸化レベルは α -SMA siRNA 導入により変化を認めなかった(Figure 7A)。

【考察】

本実験では肺線維芽細胞を異なる硬さの基質上で培養し比較したところ、硬い基質上では、胞体を広げる細胞が増え、 α -SMA 発現が増強した。 α -SMA は 6 つの actin isoform の中の 1 つで主に平滑筋細胞に発現するが、筋線維芽細胞にも発現することが知られている。線維芽細胞における α -SMA の発現は筋線維芽細胞への分化の指標となり、高い収縮能力に関連することが分かっている。本研究では、肺線維芽細胞において硬い基質により細胞遊走能が亢進すること、さらに α -SMA が遊走能に関与していることが初めて明らかにされた。

肺線維化の病理像の特徴の一つに病変部への線維芽細胞と筋線維芽細胞の集積がある。既存の肺線維芽細胞の増殖、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化、そして病変部への遊走がこの集積に関与している。マウスを用いたブレオマイシン肺傷害モデルにおいては、肺線維芽細胞の増殖よりも遊走がより肺線維化に重要な役割を果たすという報告がある。また、特発性肺線維症の患者の病変から抽出した線維芽細胞は健康者から得られた線維芽細胞よりも高い遊走能を示すという報告もある。これらの知見や本実験の結果からは、肺線維芽細胞が線維化した硬い肺基質の下で高い遊走能を獲得し、線維化の進展に寄与している可能性が示唆される。

本実験では異なる硬さの基質上で4日間培養した細胞を trypsin で剥離したのち chemotaxis assay と random walk migration assay にて細胞遊走能を比較した。培養に用いられた基質の硬さを細胞が記憶し形質を保持することが報告されており、この“mechanical memory”により線維芽細胞が培養された基質による影響を保持し、細胞遊走能の差異を生じたと考えられた。本実験では行われていないが、異なる硬さの基質上で細胞遊走能を直接比較することも重要である。しかし、異なる硬さの基質の上では遊走する足場も異なるため、細胞の移動距離で遊走能力そのものを正確に比較することは困難である。基質の硬さが細胞遊走能に与える影響について、さらなる検証が望まれる。

【結語】

肺線維芽細胞を硬い基質上で培養することで筋線維芽細胞への分化がみられ、遊走能が亢進した。筋線維芽細胞への分化の指標である α -SMA が遊走能を制御した。肺線維化病態において肺の硬化が更なる線維芽細胞の活性化につながる positive feedback 機構が存在し、病態の進展に関与する可能性が示唆される。