

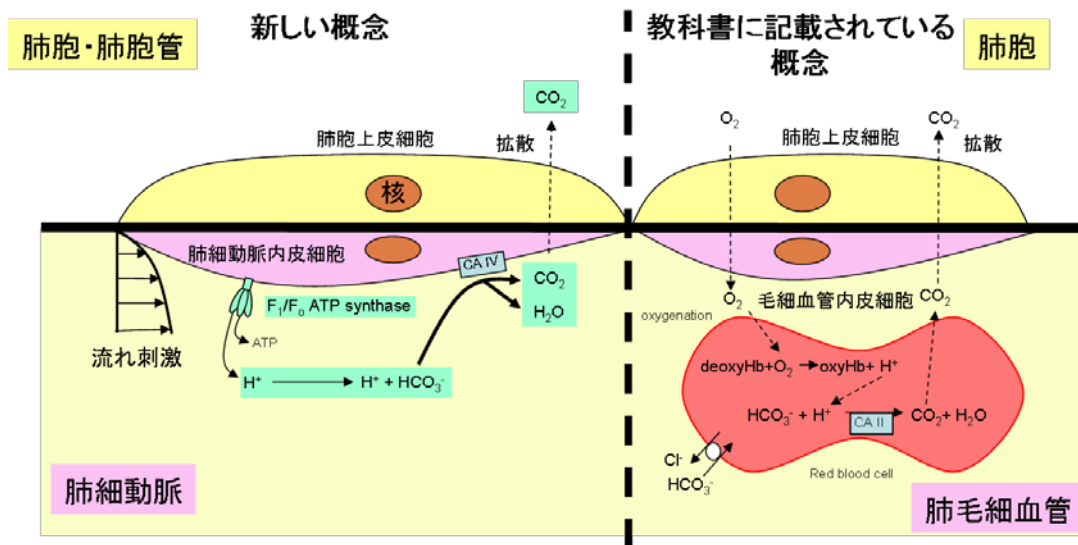
流れ刺激による脈管内皮細胞の生物学的特性の変化

信州大学 医学部 器官制御生理学講座
河合 佳子

1. 目的

血管内皮細胞は一般的に、血流の流れ刺激により細胞表面に存在する F_1/F_0 ATP synthase を仲介して ATP を分泌し、さまざまな生理機能を有していることが知られている。そこで私共は、ATP と共分泌されている水素イオンの生理機能に注目し、ヒト肺細動脈内皮細胞株を樹立し、流れ刺激により惹起されるずり応力刺激で活性化された F_1/F_0 ATP synthase によって分泌された水素イオンが肺での炭酸ガス化にどのように関与しているか解析を行ってきた。その結果、従来の肺胞における炭酸ガス化の概念（赤血球のヘモグロビン酸素化により分泌される水素イオンを用いた炭酸ガス化）とは異なり、肺細動脈領域こそが炭酸ガス化の中心的領域であることを証明し、新しい肺呼吸炭酸換気システムの新概念を提唱した（[Kawai Y, Yoshida K, Kaidoh M, Yokoyama Y, Ohhashi T. Shear stress-mediated \$F_1/F_0\$ ATP synthase-dependent \$CO_2\$ gas excretion from human pulmonary arteriolar endothelial cells. *J Cell Physiol.* 227: 5059–68, 2012](#)）。

本研究では、この新しい呼吸炭酸ガス換気の新概念を確立するために、これまでの研究をさらに発展させて、肺細動脈内皮細胞の流れ刺激により分泌される ATP の生理学的意義と、同時に分泌される水素イオンが炭酸ガス交換を担っている詳細な機構を解析することを目的とし、以下のように研究を実施した。



(参考文献 1 の図 6 を改変)

2. 方法

実験動物を用い、生体内での炭酸ガス産生の機序解明について研究を進めた。

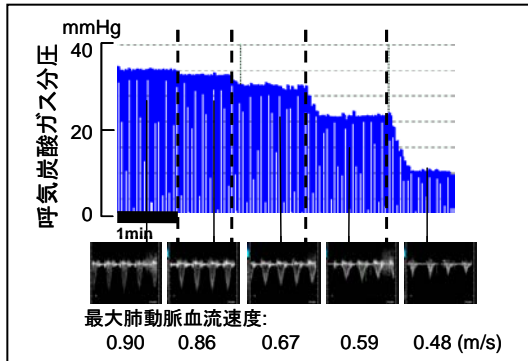
具体的には、白色家兎（体重 3 Kg 前後）に全身麻酔をかけ、気道を確保して呼吸炭酸ガス分圧測定プローブを用い、連続的に肺からの呼気内炭酸ガス濃度の測定を行った。また、循環動態の解析については、大腿動脈にカニューレーションを行い、経時的に動脈圧測定を行った。さらに、薬物投与や循環動態安定のための輸液用として大腿静脈にもカニューレーションを行い、静脈路を確保した。また、肺動脈血流速度については、当教室にすでに設置されている超音波ドップラー血流測定装置を用いて測定した。

実際の実験は、以下のごとく行った。

- ①開胸して肺動脈を物理的に狭窄させ、肺動脈血流速度と呼気炭酸ガス分圧の変化を解析。
- ②脱血を行い、重症貧血モデルを作成した上で、肺動脈血流速度と呼気炭酸ガス分圧の変化について解析。
- ③ F_1/F_0 ATP synthase 阻害薬である piceatannol、炭酸脱水酵素阻害薬である acetazolamide が肺動脈血流速度と呼気炭酸ガス分圧の変化に及ぼす作用について解析。

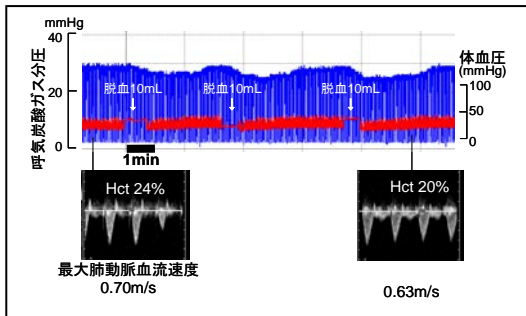
3. 結果

①ウサギ肺動脈基始部の狭窄度を変化させることで肺の血流量を順次減少させたところ、血流量の変化とともに急激に呼気の炭酸ガス分圧が低下することが確認できた。



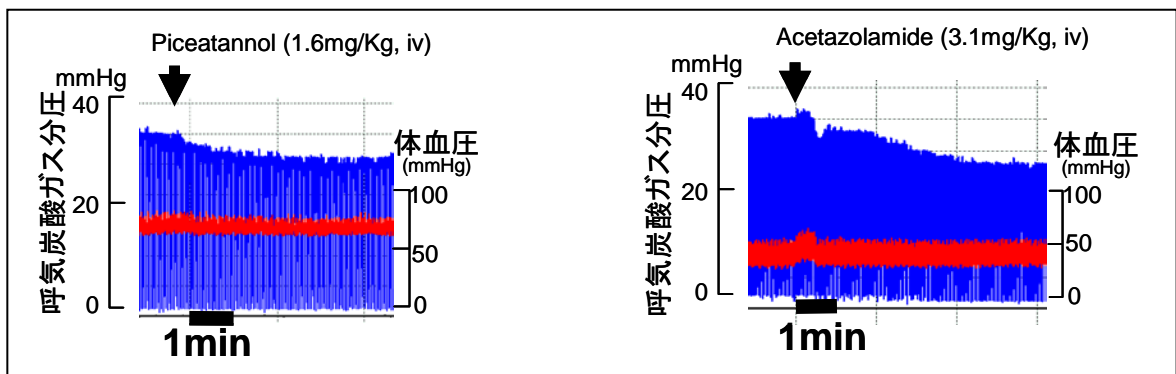
投稿中の論文の図を改変。

②ウサギ大腿動脈から順次脱血を行い、ヘマトクリット値を通常の半分以下に低下させたところ、循環動態に変化は見られず、呼気炭酸ガス分圧も低下しなかった。



脱血60mLから90mLのデータ。投稿中の論文の図を改変。

③ F_1/F_0 ATP synthase阻害薬：piceatannol、炭酸脱水酵素阻害薬：acetazolamideを投与したところ、循環動態にはほぼ変化がないにもかかわらず、呼気炭酸ガス分圧の低下が確認できた。



投稿中の論文の図を改変。

4. 考察

培養の血管内皮細胞およびリンパ管内皮細胞では、流れ刺激により細胞表面に存在する F_1/F_0 ATP synthase から ATP が分泌されることは、私共の実験の他、数多くの報告で実証されている。もともと F_1/F_0 ATP synthase はミトコンドリアの内膜に存在し、エネルギー源である ATP を産生するとともに水素イオンを共分泌する分子である。分泌される ATP については、エネルギー源としてだけでなく、シグナル伝達物質として増殖制御など様々な生理機能を有していることが今までに報告されていた。しかし、共分泌される水素イオンの生理学的意義については今までに全く報告がなかったのが現状である。そこで私共は必ずり応力刺激によって脈管内皮細胞から ATP と共

に分泌されてくる水素イオンの生理的意義や意味を解明する研究の過程で、この水素イオンが肺の細動脈における炭酸ガスの産生、排出にきわめて重要な生理学的役割を果たしていることを発見したので、今回は以上のように動物実験で証明を行った。

血管内皮細胞に流れ刺激を負荷すると細胞表面の F_1/F_0 ATP synthase から ATP が分泌され、その反応は動・静脈の内皮細胞の中で、ヒト肺動脈がもっとも顕著であると報告されている。そこで私共はなぜ肺動脈で最も顕著なのか、その生理学的意義を検討している中で、流れ刺激によって肺動脈内皮細胞から ATP と共分泌される水素イオンが肺の重要な機能である炭酸ガスの排出に関与しているのではないかという作業仮説を持つに至った。これまでの呼吸生理学の教科書的定説として知られている肺における炭酸ガス産生・排出の機序は、肺毛細血管を通過している赤血球に酸素が取り込まれると、酸素化されたヘモグロビンから水素イオンが遊離し、赤血球内において、塩素イオンと交換して血漿中より流入した重炭酸イオンと反応し、二酸化炭素を合成、それが肺毛細血管から肺胞に拡散して、炭酸ガスが肺から排出されてくるという考え方であった。しかし、30年くらい前に行われた動物実験で、赤血球を含まない人工保生液で肺を灌流した場合でも、血液灌流時と全く同じ量の二酸化炭素が排出されるという報告や、ヒトでも重篤な貧血の患者さんの場合においても、肺の炭酸ガス排出能に異常をきたすという報告は見当たらず、この理由については長い間全く不明のままであった。そこで、私たちは、肺動脈内皮細胞よりもずり応力の強い肺細動脈の内皮細胞を用いて、流れ刺激を行うのが妥当であるとの結論に至った。その細胞を用いて細胞表面に存在するはずの F_1/F_0 ATP synthase のずり応力感受性、ならびに共分泌されるはずの水素イオンが炭酸ガス産生・排出に関与しているか否かについて解析する研究を企画した。しかし、ヒト肺細動脈内皮細胞は市販されていなかったため、まず信州大学医学部倫理委員会の承認を得て、肺癌で摘出した肺の中で正常組織と思われる部分を一部いただき、肺細動脈内皮細胞を分離培養した。培養したヒト肺細動脈内皮細胞表面に生理的範囲のずり応力刺激を負荷すると二酸化炭素が顕著に排出されてくることを発見した。肺細動脈表面には、 F_1/F_0 ATP synthase が高発現しており、しかも、水素イオンと重炭酸イオンを反応させて二酸化炭素を作る酵素であるIV型炭酸脱水酵素も細胞表面に多く存在していることを免疫細胞染色および mRNA の発現解析によって確認した。このことから、今までの「赤血球の酸素化により炭酸ガスが産生される」という考え方よりも、「肺細動脈内皮細胞に流れ刺激が加わると炭酸ガスが産生される」という新しい概念の方が、過去の実験データや臨床的矛盾を一元的に説明できることを報告した。

また、培養細胞で得られた上記の知見が実際に生体内でも行われているかについて、全身麻酔下のウサギを用いて検証し、肺血管内への流れ刺激を減少させると、それに伴い瞬時に呼気炭酸ガスの濃度が低下することを見出した。さらに、従来の考え方であった、肺毛細血管における赤血球を介した炭酸ガスの排出機構と今回の新概念のどちらが生理的状态において主に差動しているのかを検証するため、ウサギの血液を生理食塩水で置換して、赤血球における炭酸ガス排洩機能を低下させて呼気炭酸ガス濃度の変化を測定してみた。その結果、血液の赤血球数を正常の3分の1程度に低下させても炭酸ガスの排出能にはほとんど影響しないことが確認できた。このことから、私共の見出した肺細動脈への流れ刺激により炭酸ガスが排出される機構が、生体内では主体をなしている可能性を証明することができたと考えている。

この概念を用いて肺動脈の循環動態に異常を来すような疾患の病態を再考することにより、新たな治療法の確立に役立てられればこの上ない幸せと考えられる。

5. 参考文献

1. Kawai Y, Yoshida K, Kaidoh M, Yokoyama Y, Ohhashi T. Shear stress-mediated F_1/F_0 ATP synthase-dependent CO_2 gas excretion from human pulmonary arteriolar endothelial cells. *J Cell Physiol* 227: 2059-2068, 2012
2. Kawai Y, Ajima K, Kaidoh M, Sakaguchi M, Kimura H, Ohhashi T. Validation of the new concept of pulmonary blood flow-mediated CO_2 gas excretion in the lungs. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, in submission, 2013