

令和元年6月4日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08174

研究課題名(和文)ATP放出の多様性の機序とその生理学的意義

研究課題名(英文)A wide variety of the ATP release: its mechanisms and physiological roles

研究代表者

古家 喜四夫 (Furuya, Kishio)

名古屋大学・総合保健体育科学センター・研究員

研究者番号：40132740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はATP放出の多様さがどのように生じそれが生理学的にどのような意味を持つのかを私たちの開発したATPリアルタイムイメージング法を主体に解明し、ATP細胞間シグナリング系の全体像解明に寄与することを目的とした。皮膚、乳腺、肺など細胞だけではなく組織からも伸展や膨張、低浸透圧(低張)刺激などいろいろなメカノストレスによってATP放出を観測することができた。それぞれATP放出のパターンやキネティクスあるいは薬理学的作用が異なり多様な放出機序が明らかになってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATPシグナリング系は生体の至るところで機能している事が明らかになってきたが、その放出経路の実体、制御機構は未だ不明である。私たちが開発した放出ATPのリアルタイムイメージングによって、初めて1つ1つの細胞からの放出の様子が明らかになった。本研究ではそれを駆使し多様な経路の性質を明らかにすることができた。ATPシグナリング系はがんを含め病理とも深く関わっており、放出経路の実体がわかれば創薬のターゲットともなりうる。またATPシグナリング系は特に組織/器官の円滑な働きに寄与していると考えられ、組織レベルでのATPイメージングを可能にしたことの意味は大きい。

研究成果の概要(英文)：ATP is now recognized as a ubiquitous extracellular messenger in whole body. The physiological roles of ATP release are diverse and its releasing mechanisms have a wide variety. We had developed a real-time ATP luminescence imaging system using luciferin-luciferase bio-luminescence with simultaneous transmission imaging using infrared light under an upright microscope or a macro-view microscope. This imaging system allows us to find differences of pattern and kinetics of the ATP release, which shows various ATP release mechanisms, in keratinocytes, mammary epithelial cells and a lung tissue. These findings demonstrate a diversity of the roles and mechanisms of the ATP release and confirm an effectiveness of the real-time imaging of ATP release.

研究分野：細胞生理学、生物物理学、メカノバイオロジー

キーワード：ATP放出、発光イメージング、Luciferin-Luciferase、ATPシグナリング、メカノバイオ、ケラチノサイト、乳がん細胞、肺

## 1. 研究開始当初の背景

細胞外の ATP は痛覚や免疫をはじめ生体の生存にも関わる様々な生理機能に関与しており、細胞間情報伝達物質としてその普遍性、重要性が明らかとなってきた。我々は授乳期の乳腺腺胞においてミルクによる腺胞の膨張やオキシトシンによる筋上皮の収縮が機械刺激となり分泌上皮から ATP が放出され、ミルクの分泌を制御していることや小腸絨毛下線維芽細胞は機械刺激によって ATP を放出し絨毛のメカノセンサーとして働いていることを明らかにしてきた[1]。細胞内では重要なエネルギー物質である ATP は細胞が生きている限り有しており、それを伝達物質として使うということはすべての細胞が情報発信源になり得ることを意味し、またほとんどすべての細胞は ATP 受容体を発現しており、その受け手にもなり得る。この大きな利点の他に、ATP シグナリングの特徴は細胞外の分解酵素によって  $ADP \rightarrow AMP \rightarrow$  アデノシンと分解されそれぞれが異なった受容体を活性化することにより多彩な情報伝達系を構成していることである。

これら ATP シグナリング系の解明において ATP 受容体に比べ、ATP がどこからどのように放出されるか ATP シグナリング系での情報発信源である ATP 放出に関しては未解明で緊急の課題となっている。現在、経路としては開口放出、Cl<sup>-</sup>チャネル、ヘミチャネル、トランスポーター等々多様な機序が分かってきたがいまだその制御機序、そして ATP 放出機序の全体像は明らかになっていない[発表図書#2]。我々は Luciferin-Luciferase 反応による ATP ルミネッセンスを高感度なカメラでリアルタイムにイメージングできるシステムを開発し、種々の細胞からの各種刺激による ATP 放出の様子をイメージングし、リアルタイム ATP イメージング法の有用性を示してきた[2]。

## 2. 研究の目的

細胞外 ATP は多くの生理機能に関わっており、重要な情報伝達物質として細胞間 ATP シグナリング系を形成している。それに関与する ATP(プリン)受容体は 19 種以上分子同定されているがそのシグナルの発生源、即ち ATP 放出の機序の解明が今急がれている。細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナリング系におけるシグナル発生源である Ca<sup>2+</sup>チャネルと同様、ATP 放出経路も多種多様で、複雑な制御機構によって ATP の働きが多様さが生み出されていると考えられる。本研究は ATP 放出の多様さがどのように生じそれが生理的にどんな意味を持つのかを私たちの開発した ATP リアルタイムイメージング法を主体に解明し、ATP 細胞間シグナリング系の全体像解明に寄与することを目的にする。

## 3. 研究の方法

ATP イメージングは ATP があると発光する Luciferin-Luciferase 溶液を細胞外に入れ、私たちの開発したルミネッセンスリアルタイムイメージング顕微鏡で観察した。このシステムは赤外光を用いた透過像を発光観察と同時に記録することができる[2]。本研究ではさらに生体組織、器官からの ATP 放出を観察するためにさらに低倍のマクロ顕微鏡(Olympus MVX10)を用いたシステムを構築した(図 1)。培養細胞としては、ケラチノサイト(HaCaT)、肺平滑筋細胞、肺線維芽細胞、乳腺上皮細胞(マウス初代培養&がん細胞株)、摘出組織としては正常およびアトピー性の皮膚、ラット灌流肺を用いた。



図 1 マクロ顕微鏡を用いた低倍のルミネッセンスイメージングシステム

#### 4. 研究成果

##### (1) 表皮細胞および摘出アトピー性皮膚における創傷治癒促進と ATP (発表論文#5)

私たちは培養表皮細胞(HaCaT 細胞)を用いてその創傷治癒が伸展刺激およびハイパフォリン(後述)処理によって促進されることをすでに示した[3]。創傷部位に面した細胞は感受性が強くなっており伸展刺激によってヘミチャネルを介して ATP を放出する。ATP は拡散しまわりの細胞の ATP 受容体を活性化、TRPC6 を介した  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を引き起こす。このことによって創傷部位からのグラディエントを持った持続的な  $\text{Ca}^{2+}$ 流入が起こり、それが創傷治癒に関与していると考えられる[3]。ハイパフォリンは傷を治すといわれている伝承薬オトギリソウの抽出物であり TRPC6 の促進薬としても知られている。今回、このハイパフォリンの可溶性高め、光に対する安定性を増強した化合物ハイパフォリン/ HP- $\beta$ -CD (hyperforin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin)の合成に成功し、その作用がハイパフォリンと変わらないかあるいはより安定的であることを細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ イメージング、放出 ATP イメージング、創傷治癒時間経過測定により明らかにした(図 2、図 3)。

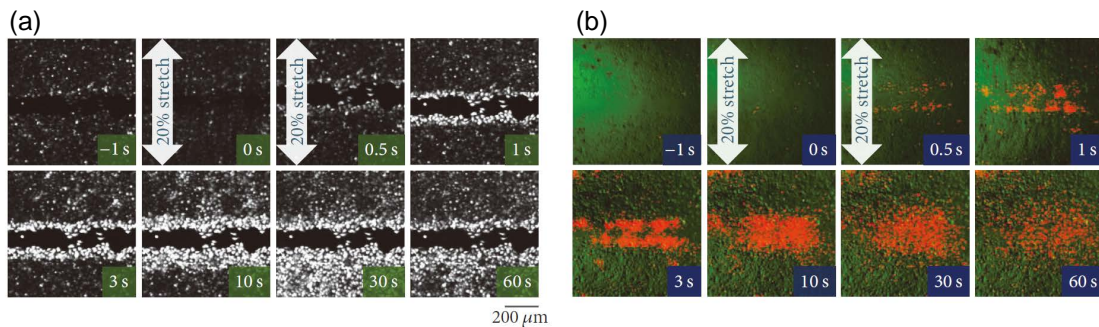


図 2 表皮細胞創傷治癒を促進する  $\text{Ca}^{2+}$ 伝播は放出 ATP の拡散によっている。

表皮ケラチノサイト(HaCaT 細胞)をハイパフォリン/ HP- $\beta$ -CD 処理下で培養し、線状に傷を付け3時間後に伸展刺激(20%、1 秒間)を図の縦方向に与えた。(a)細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇が創傷部位から後方へ伝播していく様子。 $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬 fluo-8 による蛍光イメージング。(b) 同じ刺激で ATP が創傷部位に面した細胞から放出されまわりに拡散していく様子。Luciferin-Luciferase による発光イメージング(赤色)。赤外線と同時に見た微分干渉像(緑)との重ね合わせ。

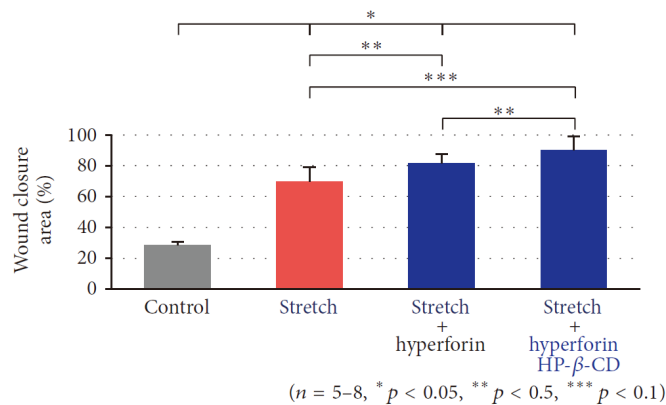


図 3 創傷治癒(線状傷の面積が閉鎖した割合)に対する伸展刺激とハイパフォリンおよびハイパフォリン/ HP- $\beta$ -CD の促進効果

さらに摘出皮膚標本を用いてハイパフォリン/ HP- $\beta$ -CD の表皮細胞に対する作用を調べた。アトピー性皮膚炎の皮膚では 20%の伸展刺激に対してほとんど  $\text{Ca}^{2+}$ 反応が見られなかったが(図 4(a))、ハイパフォリン/ HP- $\beta$ -CD で処理(オーバーナイト)すると正常な皮膚と同様の  $\text{Ca}^{2+}$ 反応が見られるようになった(図 4(b))

これらの結果はハイパフォリン/ HP- $\beta$ -CD が創傷治癒薬として機能することを示唆している。



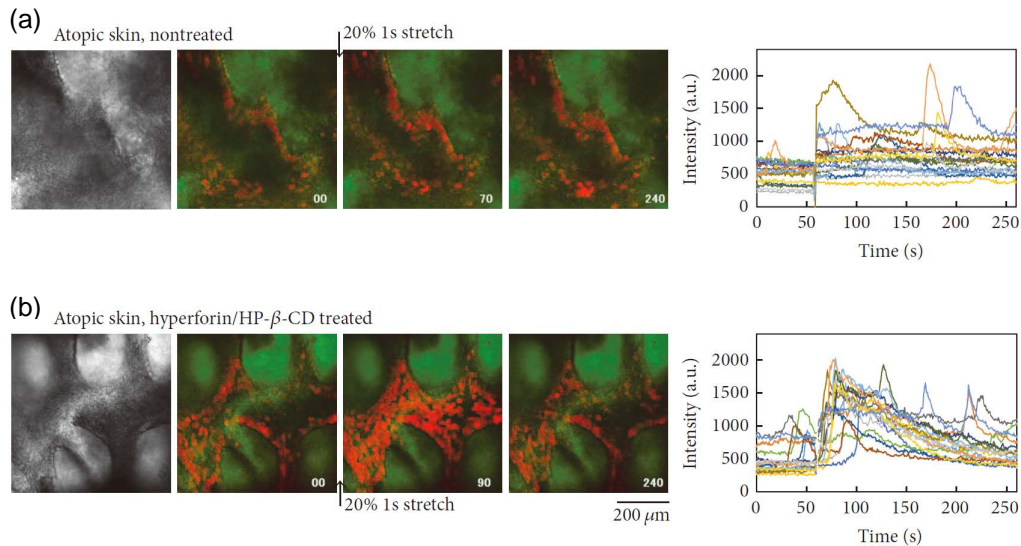


図 4 摘出アトピー性皮膚に対する伸展刺激(20%)の作用。アトピー性皮膚では  $\text{Ca}^{2+}$  反応が抑えられているが(a)、ハイパフォリン/HP- $\beta$ -CD 処理によって回復した(b)。Fluo-8 による蛍光イメージング。

(2) 肺組織における肺膨張メカノストレスによる ATP 放出のリアルタイムイメージング(発表論文#7 および未発表データ)

肺は呼吸や咳に伴い種々のメカノストレスを受ける。それらメカノストレスは ATP 放出を誘起する。細胞外の ATP は肺において様々な生理学的、病理学的作用をすることが知られている[発表論文#1、#6 の総説参照]。しかしその ATP がどこからどのように放出されどう機能しているのかは分かっていない。特に組織レベルでの測定は全くなされていなかった。本研究ではラット個体あるいは摘出組織における ATP 放出のイメージングをマクロ顕微鏡システムを用いて可能にした。心臓を介して肺血管を灌流し、気道を介して肺胞内腔を灌流した摘出肺サンプルを作製し Luciferin-Luciferase(L-L)試薬をどちらかの灌流液を介して肺組織に導入した。

肺胞に L-L 試薬を導入し、気道からシリンジによって 10-20 cm H<sub>2</sub>O (深い呼吸に相当)の圧で肺を膨らませた結果、いたるところ散漫的に ATP 反応が観測された(図 5)。この ATP 上昇は肺胞内で起こっておりいくつかの肺胞がクラスターを作った肺胞囊(alveolar sacs)以上には広がらなかった。このことは肺の機能単位は肺胞囊であることを示唆している。

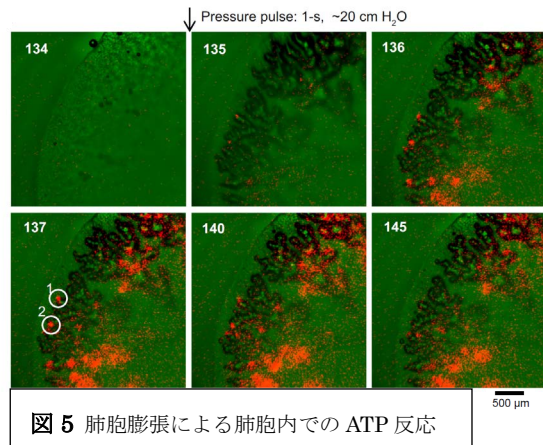


図 5 肺胞膨張による肺胞内での ATP 反応

一方、肺血管に L-L 試薬を導入し、同様に気道からの圧で肺を膨らませたところ血管内部にも ATP 反応が観測された。この反応は膨張した肺の広い領域で見られるがその反応の単位は肺胞囊の大きさであった(図 6)。血管は肺胞囊の周りを密に取り囲んでおり酸素/二酸

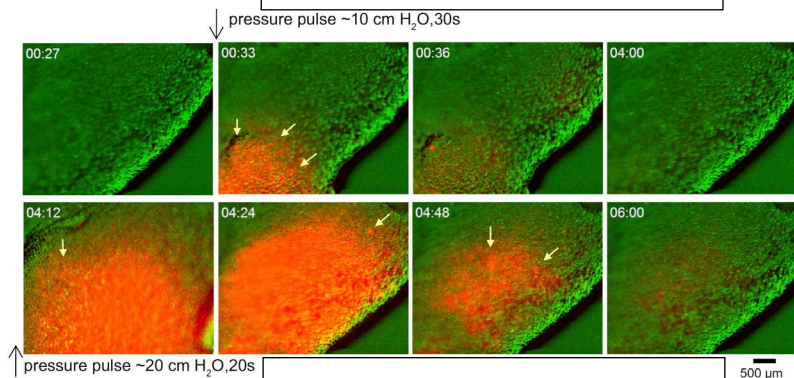


図 6 肺胞膨張による肺血管内での ATP 反応

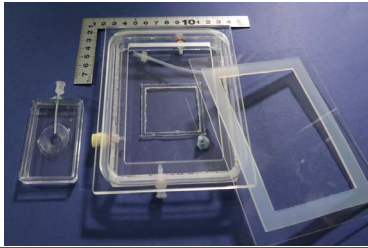


図 7 胸腔を模した陰圧チェンバー

化炭素の交換を行っている。肺胞の膨張に伴い肺胞内部およびまわりの血管で同時に ATP 上昇が起こっているということは肺機能に ATP が深く関わっていることを示唆している。

最近、より生理的な肺膨張刺激を与えるため胸腔を模した陰圧チェンバーを作成した(図 7)。-10 から-20 cm H<sub>2</sub>O の陰圧によって肺は膨張し、気道を介し陽圧で膨張させた時と同様の ATP 反応の観測に成功した。

(3) 正常細胞とがん株細胞は低張刺激によって異なった機序の ATP 放出を引き起こす(学会発表 #1、#2)。

細胞は低浸透圧刺激によって ATP を放出することが知られているが、リアルタイムイメージングすると正常乳腺細胞では、いくつかの細胞から強い短時間の一過性の放出が間欠的に見られるのに対し(図 8A; Transient-sharp パターン)、乳がん株細胞では、どの細胞からとは同定できない弱い ATP 上昇が細胞コロニー全体に起こりゆっくり上昇する(図 8B ; Diffuse パターン)。このように時間的空間的パターンはまったく異なるが、トータルの ATP 放出量としては同じように 6-7 分にピークを持ち徐々に減少する。ただ Diffuse なパターンの方がより持続的で多くの ATP を放出していることがわかる(図 8Ac と 8Bc)。この Diffuse な ATP 放出パターンは細胞容積感受性塩素チャネル(VRAC)の阻害剤である DCPIB によって完全に阻害されたが Transient-sharp パターンの方は抑えられず、2 つは異なった放出機序であることを示している。

がんは自らの周りに生存に適した微小環境を構築しておりそこには高濃度の ATP が存在し生体中でのがん組織のマーカーにもなっている。この ATP は、微小環境中に豊富に存在する ATP 分解酵素によって分解されアデノシンが生成されることによりがん細胞に対する免疫攻撃を抑制すると現在考えられている。この高い ATP 濃度を保つためにはがん細胞は ATP を持続的に放出しなければならないがその機序は全く分かっていない。私たちはがん細胞を含む未分化細胞で見られる Diffuse なパターンの ATP 放出機序、すなわち VRAC がそれに関与していると考えている。

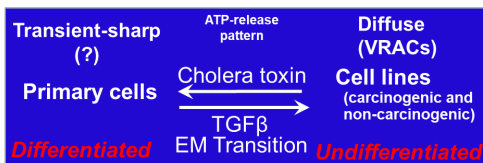


図 9 2つの異なった ATP 放出パターンは細胞の状態によって変換する。現在分かってきた変換の模式図。

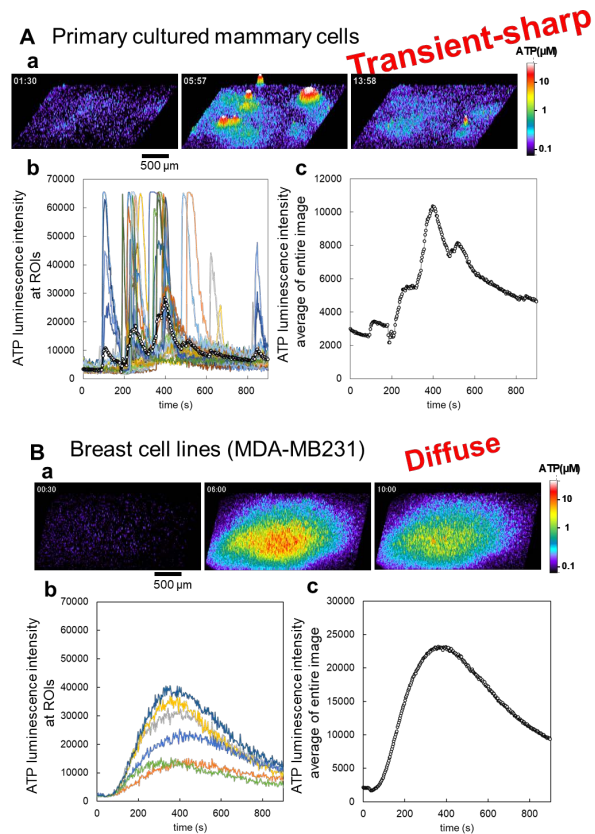


図 8 初代培養正常乳腺細胞(A)と乳がん株細胞(B)に低張刺激(30%)を与えたときの ATP 放出パターンは全く異なる。

現在その仮説を検証する研究を、幸いにも新たな科研費(18K06851)に引きつくことができ、実験を進めている(図 9)。

<引用文献>

- [1] Furuya S, Furuya K (2013) Int Rev Cell Mol Biol 304: 133-190
- [2] Furuya K, Sokabe M, Grygorczyk R (2014) Methods 66: 330-344
- [3] Takada H, Furuya K, Sokabe M (2014) J Cell Sci 127:4159-4171

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Grygorczyk R, Boudreault F, Tan J J, Ponomarchuk O, Sokabe M, Furuya K (2019) Mechanosensitive ATP release in the lungs: New insights from real-time luminescence imaging studies. *Current Topics in Membranes* vol 83, in press, available online 27 March 2019 (<https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2019.02.001>). 査読あり
2. Asano S, Ito, Morosawa M, K, Furuya K, Naruse, K, Sokabe M, Yamaguchi E, Hasegawa Y (2018) Cyclic stretch enhances reorientation and differentiation of 3-D culture model of human airway smooth muscle. *Biochemistry and Biophysics Reports* 16 (2018) 32–38 (<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.09.003>). 査読あり
3. Asano S, Ito S, Takahashi K, Furuya K, Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y (2017) Matrix stiffness regulates migration of human lung fibroblasts. *Physiol Rep* 5:e13281 (<http://dx.doi.org/10.14814/phy2.13281>). 査読あり
4. Takahashi K, Ito S, Furuya K, 他 3 人 (2017) Real-time imaging of mechanically and chemically induced ATP release in human lung fibroblasts. *Respir Physiol Neurobiol* 242: 96–101 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2017.04.008>). 査読あり
5. Takada H, Yonekawa J, Matsumoto M, Furuya K, and Sokabe M (2017) Hyperforin/HP- $\beta$ -cyclodextrin enhances mechanosensitive  $Ca^{2+}$  signaling in HaCaT keratinocytes and in atopic skin ex vivo which accelerates wound healing. *Biomed Res Internatl*, Vol 2017:ID 8701801 (<https://doi.org/10.1155/2017/8701801>). 査読あり
6. Ito S, Furuya K, Sokabe M, Hasegawa, Y (2016) Cellular ATP release in the lung and airway. *AIMS Biophysics*, 3(4): 571-584 (<https://doi.org/10.3934/biophy.2016.4.571>). 査読あり
7. Furuya K, Tan J J, Boudreault F, 他 3 人 (2016) Real-time imaging of inflation-induced ATP release in the ex vivo rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 311: L956-969 (<https://doi.org/10.1152/ajplung.00425.2015>). 査読あり
8. 古家喜四夫 (2016) ATP シグナリングと疾患 in 特集「メカノバイオロジーからメカノメディシンへ」*医学のあゆみ* 257(10):1023-1029 (ISSN:0039-2359 257-10). 査読なし
9. Sikora J, Orlov SN, Furuya K, and Grygorczyk R (2015) Hemolysis is a primary and physiologically relevant ATP release mechanism in human. *Blood* 125: 1845 (Response to a letter) (<https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-622159>). 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

1. Furuya K, Takahashi Y, Sokabe M (2019) Hypotonic Stress Induces ATP Release via Volume-regulated Anion Channels in Breast Cell Lines. 9th FAOPS (Federation of the Asian and Oceanian Physiological society) and The 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. Kobe, Japan
2. Furuya K, Takahashi Y, Sokabe M (2018) Hypotonic Stress Induced-ATP Release is via Volume-regulated Anion Channels in Undifferentiated Breast Cell Lines. *Asian Biophysics Association Symposium*. Melbourne, Austria
3. Furuya K, Grygorczyk R, Sokabe M (2016) Real-time Imaging of ATP Release Induced by Alveolar Inflation in the Rat Lung ex vivo. 4th International Symposium on Salivary Glands in Honor of Niels Stensen. Okazaki, Japan
4. Furuya K, Takada H, Sokabe M (2016) Stretch induced ATP release via hemichannels accelerates wound closure in keratinocyte by  $Ca^{2+}$  influx from TRPC6. *Purinergic Signaling (Purine 2016)*. Vancouver, Canada
5. 古家喜四夫、曾我部正博、Ryszard Grygorczyk (2016) ラット摘出肺において肺胞の膨張が ATP 放出を引き起こす. 第 93 回日本生理学会大会. 札幌
6. 古家喜四夫、Ryszard Grygorczyk、曾我部正博 (2016) ラット摘出肺において肺胞の膨張による ATP 放出のイメージング 第 20 回 Japan Purine Club Meeting. 東京
7. Grygorczyk R, Furuya K, Sokabe M (2015) Luminescence microscopy – a novel approach for real-time imaging of ATP release in cells and tissues. 1st Annual Meeting of the Biophysical Society of Canada. Waterloo, Canada
8. 古家喜四夫、高田弘弥、曾我部正博 (2015) ヘミチャネルによるメカノ感受性 ATP 放出は TRPC6 による  $Ca^{2+}$  流入を介して表皮細胞の創傷治癒を促進する. 第 92 回日本生理学会大会. 神戸

[図書] (計 2 件)

1. 古家喜四夫 (2017) ATP シグナリングと疾患. In 別冊・医学のあゆみ「メカノバイオロジーからメカノメディシンへ」(曾我部正博 編) 医歯薬出版 pp59-65.
2. 古家喜四夫 (2015) 細胞外シグナルのメカノバイオロジー: ATP シグナリング. In: 「メカノバイオロジー」(曾我部正博 編) 化学同人 pp85-100 (ISBN978-4-7598-1721-8).