

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：33111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790436

研究課題名(和文) エンドトキシン肝障害におけるATPの好中球誘導による炎症悪化の機序

研究課題名(英文) The effect of extracellular ATP-induced neutrophil on endotoxin hepatitis in mice

研究代表者

川村 宏樹 (KAWAMURA, Hiroki)

新潟医療福祉大学・医療技術学部・講師

研究者番号：20333495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外ATPは、マクロファージ(M ϕ)やT細胞などの細胞や組織で免疫反応を引き起こす。私たちは以前、傷害された組織や細胞から放出されたATPは、M ϕ を活性化させMIP-2を産生すること示した。そこで、LPS誘導エンドトキシンショックにおけるM ϕ によるATP媒介の炎症反応の役割を検討した。本研究によりATPは、M ϕ の活性酸素経路を活性化させMIP-2を産生し好中球を遊走する経路が示唆された。しかしながら、残念なことにATP刺激によるMIP-2産生経路は、疾患発症への有意な関与は示さなかった。

研究成果の概要(英文)：Extracellular ATP leads to immune responses in a wide spectrum of cell types (e.g., macrophages, T cells) and tissues. Our previous study shows that extracellular ATP-stimulated macrophages produce MIP-2. Thus, we investigated the role of ATP-mediated inflammatory response by macrophages in LPS-induced endotoxin shock model mouse. This study indicated that an increased production of reactive oxygen species by ATP-stimulated macrophages activates the signalling pathways that promote MIP-2 production which, in turn, induces neutrophil migration. Unfortunately, this pathway did not affect pathogenic mechanism in LPS-induced endotoxin shock model mouse.

研究分野：免疫学、感染免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：マクロファージ ATP 好中球 MIP-2

1. 研究開始当初の背景

近年、生命維持に欠かせない ATP は、*in vitro* でマクロファージ (M) や T 細胞の細胞膜上の P2X₇ 受容体 (P2X₇R) に結合して、細胞の活性化、細胞死、M から IL-1β 産生を誘導などを引き起こすことが報告されている。また、P2X₇R 欠損 (KO) マウスでは関節リウマチを誘導してもコントロールと比べ症状が緩和されることが報告された。このように組織傷害や炎症によって破壊された細胞から放出された細胞外 ATP は、様々な疾病の炎症機序に深く関与していることが判明した。しかし、実際、多くの炎症性疾患で ATP が、M や T 細胞などをどのような経路で活性化し、どの細胞が障害機序に関与しているかなど不明な点が多く、解明していかなければならない。

2. 研究の目的

申請者らは、これまでに精製 ATP と精製 NAD は T 細胞, NKT 細胞や M の細胞上の P2X₇R に主に結合し刺激して、【1. ネクロシスとアポトーシスを同時に引き起こす、2. mitogen と同時刺激によりサイトカインとケモカイン (MIP-2) 産生を増強させる、3. 2 の経路で MIP-2 による好中球遊走の可能性などを報告または結果を得た。以上のこれまでの研究成果から、「実際の感染症等による炎症性疾患で、細胞外に放出された ATP が活性化 M の好中球誘導を亢進することにより、更なる炎症悪化を誘発する経路」が示唆された。感染症の中で、敗血症によるエンドトキシンショックは M から過剰な炎症性因子産生が深刻な要因であり、M の活性経路が複雑で不明な点もあることが一因とされている。そこで本研究は、エンドトキシンショックモデルマウスを使用して、エンドトキシンと細胞外 ATP による M の活性化経路と好中球誘導を検討する。

3. 研究の方法

本研究は、以下のように検討方法を大きく 3 つに分けておこなった。

1) *in vitro* でチオグリコレート誘導 M を用いて、ATP 刺激により MIP-2 を産生する受容体の同定、シグナル経路の同定、活性化経路の同定をおこなう。また、同定したシグナル経路が全ての M に共通なのか、他の M (細胞株) を用いて検討する。

2) *in vitro* の 1) で同定した経路などが *in vivo* でも同様に起こりうるのか、また好中球を誘導する事が出来るのか、検討した。

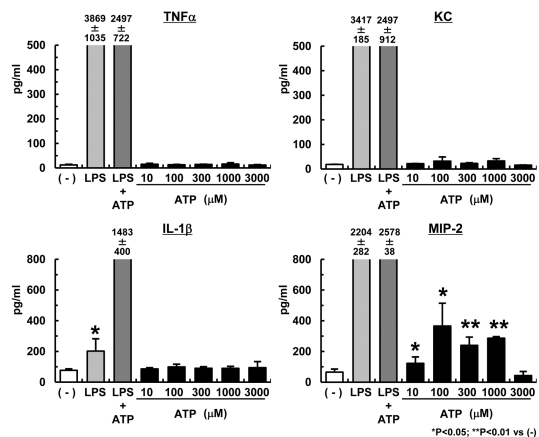
3) エンドトキシンショックモデルマウスを使用して、1) と 2) の関与の検討をおこなった。

4. 研究成果

1) *in vitro* における M の ATP 刺激による MIP-2 産生経路の同定

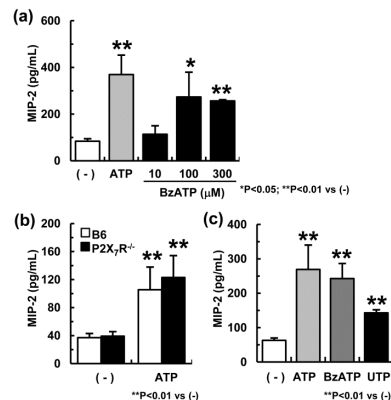
(1) チオグリコレート誘導 M (PEMs) の ATP 刺激によるサイトカイン産生

PEMs に ATP 刺激し、培養上清中のサイトカインとケモカインを測定した。その結果、TNFα, IL-1β の産生は認められず、好中球遊走因子の MIP-2 の産生のみが認められた。また、好中球遊走因子の KC は認められなかった。



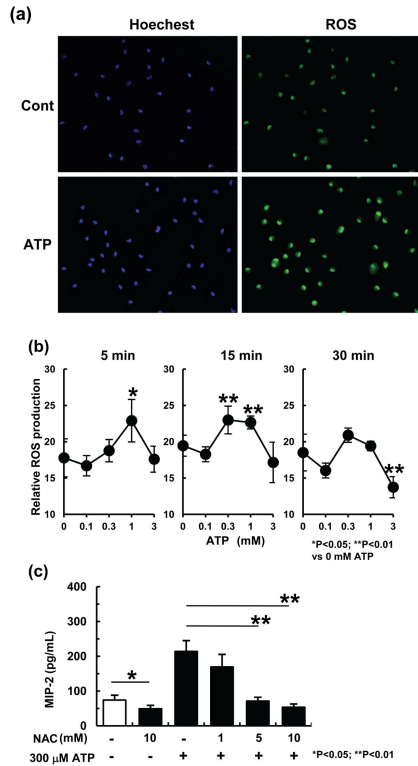
(2) ATP 刺激 PEMs における Purinergic 2 受容体 (P2Rs) の検討

各 P2Rs のアゴニストを使用して検討した。その結果、P2X₇ 受容体と P2Y₂ 受容体がこの経路に関与していた (a), (c)。また P2X₇R マウスでは MIP-2 産生が認められたが、これは P2Y₂R の経路だと考えられた (b)。



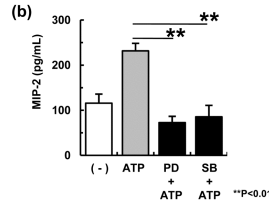
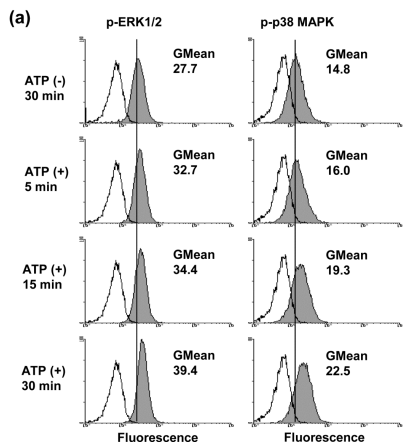
(3) ATP 刺激 PEMs における MIP-2 産生の活性化経路

ATP 刺激の活性化経路を検討した結果、活性酸素 (ROS) 経路が活性化されていた (a) (b)。また、ROS 経路が MIP-2 産生に關与しているか ROS 抑制剤を使用した結果、MIP-2 産生が低下した。以上のことから、ATP 刺激により ROS が活性化し、MIP-2 を誘導する事が示唆された (c)。



(4) ATP 刺激 PEMs における MIP-2 産生のシグナル経路

ATP 刺激のシグナル経路を検討した結果、ERK1/2 と p38-MAPK が活性化していた (a)。また、これらのシグナル経路が MIP-2 産生に關与を各抑制剤を使用し検討した (b)。その結果、ERK1/2 と p38-MAPK が活性化して MIP-2 産生が誘導されることが示唆された。



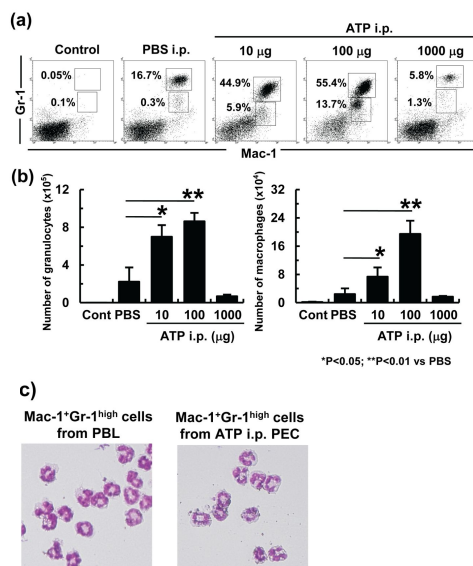
(5) ATP 刺激による他の M による MIP-2 産生経路

Mφ 細胞株である RAW264.7 で TP 刺激による MIP-2 産生経路を検討した。その結果、受容体のアゴニストを用いた研究により、Mφ の P2X7R と P2Y1,12R の関与が明らかになった。また、ATP 刺激の Mφ の MIP-2 産生は細胞内で ROS から ERK 1/2 のシグナル経路が重要であり、p38-MAPK の関与は示唆されなかった。

2) in vivo における ATP 刺激による好中球誘導

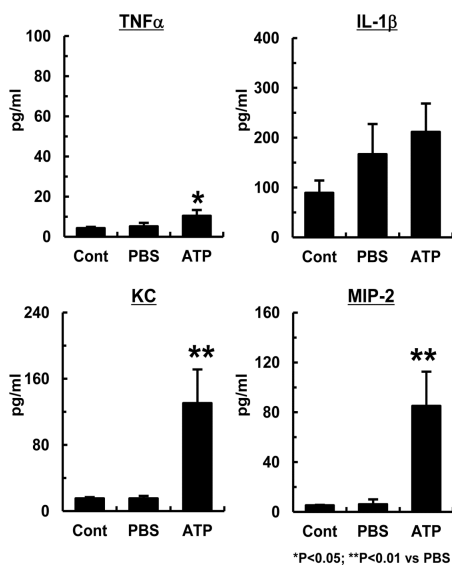
(1) マウス腹腔内 ATP 投与による好中球増加

マウス腹腔内に ATP を投与した後、腹腔内を洗浄し洗浄液中の細胞分画を検討した。その結果、好中球分画および実数が増加した (a)(b)。また、増加した細胞分画が本当に好中球であるか確認するために、好中球分画を抽出し、メイ・ギムザ染色をおこなった。その結果、増加した細胞分画は好中球であった (c)。



(2) マウス腹腔内 ATP 投与による腹腔内洗淨液中の MIP-2 と KC の検出

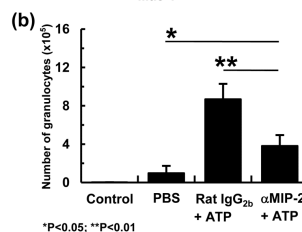
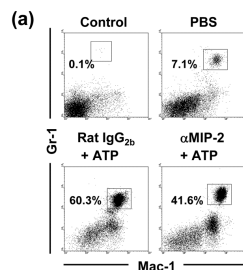
マウス腹腔内に ATP を投与した後、腹腔内を洗淨し洗淨液中のサイトカインとケモカインを測定した。その結果、TNF α の産生は認められたが、IL-1 β の産生は認められなかった。また、好中球遊走因子の MIP-2、KC の産生のみが認められた。



しかしながら、TNF α と KC の産生は *in vitro* で PEMs を ATP 刺激したときには認められなかった。よって、KC は M からでなく他の細胞から産生された可能性が示唆された。加えて、*in vivo* なので ATP が M 以外の細胞を刺激してサイトカイン等の連鎖によって、M から最終的に産生された経路も考えられた。

(3) マウス腹腔内 ATP 投与による好中球増加と MIP-2 との関連性

マウス腹腔内に ATP を投与した後、腹腔内を MIP-2、KC の産生がおり、好中球誘導が認められた。この現象は本当に MIP-2 によるものなのか否か、MIP-2 の中和抗体を用いて検証した。その結果、ATP 投与前に MIP-2 中和抗体を投与した群は好中球分画の顕著な減少がおり、実数も減少していた (a)(b)。ただ、完全には好中球誘導が、非中和抗体投与群に比べて完全には抑えられなかったことから、腹腔内の KC の作用も好中球誘導に関与していると考えられた。



3) エンドトキシンショックモデルマウスを使用して、1) と 2) の関与の検討

In vitro の検討で、M の種類が変わっても ATP 刺激による MIP-2 産生は P2X₇R が共通して関与していた。そこで、P2X₇R 欠損マウスで、D-ガラクトサミンと LPS で誘導するエンドトキシン肝障害モデルマウスを作製し、WT マウスで 24 時間生存数を比較検討した。その結果、今までの予想とは反して、WT マウスと P2X₇R 欠損マウスの間では有意な差は認められなかった。

	WT	P2X ₇ R KO
ATP (ng)		
1000	5/5	5/5
100	4/5	4/5
10	2/5	1/5
1	0/5	0/5

また、LPS 単独と LPS+ATP 併用を使用し、*in vitro* で M 細胞を刺激しても MIP-2 産生は変わらなかった。

4) まとめ

ATP 刺激による M から MIP-2 産生は、P2X₇R を中心に M の細胞のタイプが違っていても起こる。また、そのシグナル経路は ERK1/2 のシグナル経路と ROS 活性のつながりが重要であると示唆された。また、好中球も *in vivo* で誘導が確認された。しかしながら、残念なことにエンドトキシンモデルマウスでは、この経路の関与を示す結果は得られなかった。これは LPS という TLR を介した刺激が強力すぎて、ATP の影響が隠れてし

まった可能性が考えられる。今後、マイトジェンを使用しない実験系などで、「実際の感染症等による炎症性疾患で、細胞外に放出された ATP が活性化 M の好中球誘導を亢進することにより、更なる炎症悪化を誘発する経路」を検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

- 1) Imai M, Higuchi M, Kawamura H, Yoshita M, Takahashi M, Oie M, Matsuki H, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii M. Human T cell leukemia virus type 2 (HTLV-2) Tax2 has a dominant activity over HTLV-1 Tax1 to immortalize human CD4(+) T cells. *Virus Genes*. 2013;46(1):39-46. 査読あり. doi: 10.1007/s11262-012-0831-9.
- 2) Kawamura H, Kawamura T, Kanda Y, Kobayashi T, Abo T. Extracellular ATP-stimulated macrophages produce macrophage inflammatory protein-2 which is important for neutrophil migration. *Immunology*. 2012;136(4):448-58. 査読あり. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03601.x.
- 3) Kobayashi T, Kawamura H, Kanda Y, Matsumoto H, Saito S, Takeda K, Kawamura T, Abo T. Natural killer T cells suppress zymosan A-mediated granuloma formation in the liver by modulating interferon- γ and interleukin-10. *Immunology*. 2012;136(1):86-95. 査読あり. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03562.x.

[学会発表](計 4件)

- 1) 川村宏樹, Extracellular ATP 刺激によるマクロファージからの MIP-2 産生と炎症悪化の経路, 第 22 回日本生体防御学会学術集会, 2011 年 6 月 29 日 ~ 7 月 1 日,

てんぶす那覇(沖縄)

- 2) 川村宏樹, Extracellular ATP-stimulated macrophages produce macrophage inflammatory protein-2 which is important for neutrophil migration. , 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011 年 11 月 27 日 ~ 29 日, 幕張メッセ(千葉)
- 3) 川村宏樹, Extracellular ATP 刺激によるマクロファージからの MIP-2 産生と好中球遊走, 第 23 回日本生体防御学会学術集会, 2012 年 7 月 9 日 ~ 19 日, 品川区民会館きゅりあす(東京)
- 4) 川村宏樹, Extracellular ATP-stimulated macrophages produce macrophage inflammatory protein-2 which is important for neutrophil migration. , 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012 年 12 月 5 日 ~ 7 日, 神戸国際会議場(兵庫)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者

川村宏樹 (KAWAMURA Hiroki)
新潟医療福祉大学・医療技術学部臨床技術
学科・講師
研究者番号：20333495

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：