

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790381

研究課題名（和文） エンドトキシンショックにおける ATP のマクロファージ活性化メカニズム

研究課題名（英文） The effect of extracellular ATP on LPS-induced endotoxin shock in mice.

研究代表者

川村 宏樹 (KAWAMURA HIROKI)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：20333495

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。しかし、ATP 活性化 M ϕ が組織損傷の免疫反応を調整するか不明なままである。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 を産生して好中球を遊走する経路が示唆された。しかしながら、この経路は多種の P2purinergic 受容体が関与しており更なる検討が必要とされた。

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. However, it remains unclear whether such ATP-activated macrophages modulate the magnitude of immune responses to actual tissue injury. Thus, we investigated the role of ATP-mediated inflammatory response by macrophages in LPS-induced endotoxin shock. This study indicated that the binding of extracellular ATP to P2purinergic receptors on macrophages increases neutrophil infiltration via the production of MIP-2. However, in this pathway, further examination was required because P2purinergic receptor of the having many kinds was related.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、エンドトキシン、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 および NAD は、in vitro でマクロファージや T 細胞上の P2X₇ 受容体 (P2X₇R) に主に結合して、細胞の活性化と細胞死を誘導することが報告されている。また、関節リウマチの炎症によって細胞外に放出された ATP が、マクロファ

ージを活性化し、炎症性サイトカインを誘導させ症状の悪化を招いている可能性が報告された。申請者らは、これまでに精製 ATP と精製 NAD は T 細胞, NKT 細胞, マクロファージに 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産生を増強させる, 3. サイトカ

ン産生の増強が concanavalin A (Con A)誘導性肝炎の発症と悪化に関与する可能性を報告した。これらの研究成果から、「実際の感染症等による炎症で、細胞外に放出された ATP によって活性化されたマクロファージが、更なる炎症悪化を誘発する経路」が示唆された。しかし、実際の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 ATP が、マクロファージをどのような経路で活性するか、どの細胞傷害機能に関与しているかなど不明な点が多い。一方、マクロファージは敗血症において、炎症性サイトカインなどの多量の炎症性因子を産生しエンドトキシンショックを引き起こす。現在でもその治療が困難なのは、マクロファージ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。

2. 研究の目的

本研究目的は先に示した、敗血症性ショックの炎症反応により、傷害された細胞から放出される ATP によって更に活性化したマクロファージによる炎症悪化の経路を明らかにすることである。この目的を達成する為に、本研究は研究目標を以下の3つの項目に分けて解析する。

- (1) LPS と ATP 刺激によるマクロファージの機能亢進を明らかにする。炎症を起こしている細胞から放出された ATP が、既に LPS で活性化されているマクロファージを更に活性化させて、サイトカインやケモカインの産生亢進を検討する。
- (2) LPS と ATP 刺激によるマクロファージの活性化経路を明らかにする。LPS による Toll-like receptor (TLR) 4 を介したマクロファージの活性化シグナル伝達は、多くの報告がなされている。ATP の P2X₇R を介したシグナルは Ca²⁺ flux を誘導し、アポトーシスを誘導する。一方で ATP の活性化シグナルは LPS の活性化シグナルと重複する経路があるので、お互いに影響しあう経路があると推測される。そこで ATP によるマクロファージの活性化シグナル伝達への影響を検討する。
- (3) エンドトキシンショックによる肝炎のマクロファージ (kupffer 細胞を含む) と肝内リンパ球の相互作用を明らかにする。エンドトキシンショックモデルマウスにおいて、傷害された肝細胞から放出された ATP が、マクロファージまたはマクロファージを介した肝内白血球の変動を検討する。

3. 研究の方法

- ・ 敗血症性ショックの主な原因物質であるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide: LPS) と補助剤の D-ガラクトサミン (D-galactosamine: GalN) の作製して、ALT 測定、HE 染色で肝炎発症状態を検討する。
- ・ 血中の ATP 値、各種サイトカインを ELISA 法で測定する。
- ・ Thioglycolate 誘導性腹腔内マクロファージ (PEMs) を用いて、*in vitro* で ATP と Con A と共に培養し、上清中の各種サイトカインを測定する。また、シグナル経路を検討する。
- ・ ATP と LPS/GaIN による肝白血球への影響を、フローサイトメーターを用いて検討する。

4. 研究成果

(1) LPS/GaIN 誘導性エンドトキシンショックにおける血清中の ATP 値の上昇

LPS/GaIN を投与後、6 時間から肝炎の指標である血清 ALT 値の著しい上昇が認められ、その後、10 時間以内に死亡した。一方、血清 ATP 値の上昇が、LPS/GaIN 投与後 1 時間後から確認された (図 1A)。このことから、LPS/GaIN 投与による ATP の上昇は傷害された肝細胞からの放出だけでなく、他の傷害された組織や細胞からもあるとが示唆された。

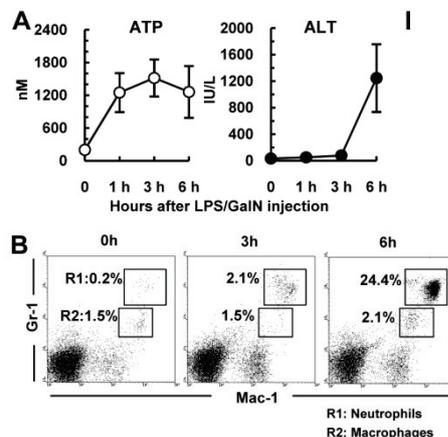


図 1 : LPS/GaIN 誘導性エンドトキシンショックにおける血清中 ALT 値と ATP 値の推移と肝内好中球の増加

そこで肝内の白血球分画をフローサイトメーターを用いて検討したところ、好中球分画が増加していた (図 1B)。このことから、ATP が好中球遊走因子に関与している可能性も考えられた。

(2) *in vitro* での ATP と LPS 刺激による

マクロファージの活性化

I. LPS/ATP 刺激による PEMs からの炎症性サイトカイン産生

PEMs を LPS または LPS/ATP 共刺激培養をおこない、上清中の炎症性因子の産生亢進を測定した。その結果、IL-1β は LPS 刺激または ATP 刺激のみでは産生が認められず、LPS/ATP 刺激で産生が認められた。TNFα は LPS 刺激のみでも産生が認められ、ATP 補助の必要が無いと考えられた。それに対して、MIP-2 は ATP 刺激のみでも産生されたことから、ATP による好中球誘導が示唆された。

II. LPS/ATP 刺激による PEMs からの炎症性サイトカイン産生シグナル

上記の I の検討より、ATP 刺激が関与する IL-1β と MIP-2 の産生に関与するシグナル経路を検討した。その結果、両サイトカイン共にフーサイトメーターとインヒビターを用いた解析により、ERK1/2 と p38 MAPK の活性化が上昇していた。

III. マクロファージ上の ATP 受容体の検討

PEMs は ATP 刺激により MIP-2 を産生した。ATP は細胞上の P2 purinergic 受容体 (P2X₁₋₇, P2Y_{1, 2, 4, 6, 11-14}) に結合することが知られている。そこで、どの P2 purinergic 受容体に結合するか検討した。PEMs は細胞表面上の P2purinergic 受容体の P2X₇, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ 受容体に ATP が結合すると MIP-2 が産生されることが明らかになった。

(3) in vivo での ATP による LPS/GaIN 誘導性エンドトキシンショックへの作用

I. ATP 投与による血清中の TNFα、IL-1β および MIP-2 の検討

in vitro の検討結果が in vivo においても確認できるか行なった。その結果、LPS/GaIN 接種後に血清中に TNFα と MIP-2 の急激な上昇が認められ、IL-1β はごくわずかな上昇であった (図2)。これらのことから、ATP はエンドトキシンモデルマウスの MIP-2 産生に関与している可能性が示唆された。

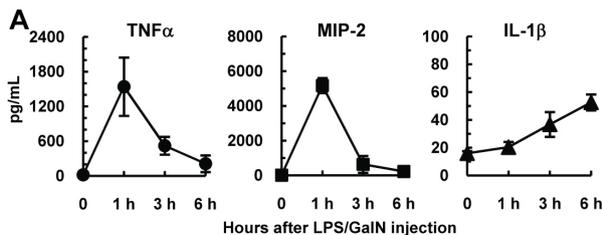


図2: エンドトキシンモデルマウスの血清 TNFα、IL-1β および MIP-2 の測定

II. P2X₇ 受容体欠損マウスのエンドトキシンショックへの感受性

エンドトキシンによる二次性肝不全を P2X₇ 受容体欠損マウスとコントロールマウスと比較したが、両マウス群に有意な差は認められなかった。

β. 好中球除去によるエンドトキシンショックへの影響

これまでの結果から、エンドトキシンショックマウスにおいて細胞外 ATP はマクロファージを刺激して、MIP-2 産生に関与して好中球を遊走させる可能性が示唆された。そこで、好中球がエンドトキシンショックマウスに重要であるか検討した。その結果、好中球除去群は非除去群に比べて延命した (図 3)。しかしながら、24 時間後に生存していたのは 1/8 匹のみであったことから、好中球除去はエンドトキシンショックへの治療に有用ではあるが、他の治療方法との併用がより良い成績につながると期待される。

Postinjection, h	Number of Viable Mice		
	IgG LPS/DaIN	αGr-1 Ab LPS/DaIN	αGr-1 Ab PBS
5	8	8	8
6	8	7	8
7	7	7	8
8	0	2	8
9	0	2	8
10	0	2	8
12	0	2	8
24	0	1	8

図 3: 好中球除去によるエンドトキシンマウスの生存率

(4) まとめ

本検討により、敗血症により傷害された組織や細胞から放出された ATP は Mφ を活性化させ MIP-2 を産生して好中球を遊走する経路が示唆された。しかしながら、この経路は多種の P2purinergic 受容体が関与しており更なる検討が必要とされた。

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 Matsumoto H, Kawamura T, Kobayashi T, Kanda Y, Kawamura H, Abo T. Coincidence of autoantibody production with the activation of natural killer T cells

in α -galactosylceramide-mediated hepatic injury. Immunology. 2011;133(1):21-8, 査読有.

② Kanda Y, Kawamura H, Matsumoto H, Kobayashi T, Kawamura T, Abo T. Identification and characterization of autoantibody-producing B220(low) B (B-1) cells appearing in malarial infection. Cell Immunol. 2010;263(1):49-54, 査読有.

③ Fujii Y, Kawamura H, Kawamura T, Kanda Y, Matsumoto H, Kobayashi T, Yamamoto T, Aoyama T, Abo T. Co-appearance of autoantibody-producing B220(low) B cells with NKT cells in the course of hepatic injury. Cell Immunol. 2010;260(2):105-12, 査読有.

[学会発表] (計 2 件)

① 川村宏樹、Extracellular ATP-activated macrophages aggravate Con A-induced liver injury in mice、2010年8月29日、15th International Symposium on Cell of the Hepatic Sinusoid、The Hilton Pasadena Hotel, Pasadena, CA, USA.

②川村宏樹、Extracellular ATP-activated NKT cells and macrophages aggravate Con A-induced liver injury in mice、2009年12月2日、第39回日本免疫学学会総会・学術集会、大阪

[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)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：20333495

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：