

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590274

研究課題名(和文)細胞外ATP放出の機能とメカニズムの解明

研究課題名(英文)Physiological roles and mechanisms of ATP release revealed by ATP imaging

研究代表者

古家 喜四夫(FURUYA, Kishio)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40132740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ATPシグナリング研究にイメージングが大事と考え、放出ATPを生物発光でリアルタイムにイメージングできる装置を開発したが、本研究ではさらに発光と蛍光の同時測定または高速切り替え測定できるように改良した。それを用い、ヒト表皮細胞において伸展刺激がヘミチャネルを介したATP放出と、TRPC6を介したCa²⁺の持続的な流入を引き起こし、傷の治癒を促進していること、いろいろな機械刺激を受けている肺の各種細胞が伸展刺激でATPを放出することなど、種々の細胞、組織におけるATP放出とその時間的变化や空間的分布を明らかにした。これによりATP放出の多様性を明らかにしイメージング法の有効性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：ATP is now recognized as a ubiquitous extracellular messenger in whole body. ATP-releases are often induced by mechanical stresses, implying important roles of ATP in mechano-transduction. We had developed a real-time ATP luminescence imaging system with simultaneous DIC imaging using infrared under an upright microscope. Herein, the system was improved to enable a simultaneous or fast exchangeable imaging of luminescence and fluorescence images. Using this system, we found that wound closure was accelerated by stretch stimulation in keratinocytes and the acceleration was due to ATP release via hemichannels and sustained Ca²⁺ increase via TRPC6 activation. We also found that in several types of cells and tissues, ATP was released by stretch or mechanical stimulations and its time courses and spatial distribution were depended on the cell types. These findings demonstrate a diversity of ATP release mechanisms and confirm an effectiveness of the ATP real-time imaging.

研究分野：細胞生理学

キーワード：ATPシグナリング 機械受容 ATPイメージング メカノバイオロジー 創傷治癒 ATPイメージング ケラチノサイト ルシフェリン

1. 研究開始当初の背景

ATP などのヌクレオチド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参与しており、細胞間情報伝達物質として生体におけるその普遍性、重要性が明らかとなってきた。これら ATP シグナリング系の解明は ATP 受容体分子ファミリーが同定されたことによりここ 10 年の間に一気に進んだ。しかし一方でそれに関与する ATP がどこからどのように放出されるかは ATP シグナリング系での情報発信源というキーポイントにもかかわらず明らかにしていない。現在、経路としては開口放出、TRP チャネル、Cl⁻ チャネル、ヘミチャネル、トランスポーター等々が考えられているがいろいろなデータはいまだ controversial であり ATP 放出機序の全体像や制御機序は明らかになっていない。

細胞内 Ca²⁺シグナリングの研究がその蛍光指示薬が開発され、可視化によって大きく発展したように、細胞間 ATP シグナリング系においても見ることが必須と考え、我々は Luciferin -Luciferase 反応による ATP ルミネッセンスを超高感度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、同じ細胞にもキネティクスの異なった ATP 放出経路が存在することや ATP 放出経路の局在を明らかにすることが出来、イメージング法の有用性を示してきた。

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が、そのシグナルの発生源、即ち ATP 放出の機序はまだ明らかではない。細胞内 Ca²⁺シグナリング系におけるシグナル発生源である Ca²⁺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 の働きの多様さが生み出されていると考えられる。

本研究は ATP 放出の経路、その制御機構を我々の開発した 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。

3. 研究の方法

我々の開発したルシフェリン・ルシフェラーゼ生物発光を用いた ATP リアルタイムイメージング装置を改良した。蛍光光源として瞬時の ON-OFF や波長切り替え可能な LED 光源を導入、さらに赤色の Ca²⁺指示薬を使用可能にするため、633nm の励起光と 633nm のノッチフィルターを精度よく組み合わせた蛍光システムを組み込み、明るさが桁違いに異なる発光と蛍光の同時、あるいは時間差を高速の切り替えにより少なくした測定系を構築した。また生体組織、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を用いた ATP イメージングシステムを構築し

た。これらを用いて各種細胞、組織での主として伸展等の機械刺激による ATP 放出を観察した。ATP イメージング法の基本的な説明は文献にまとめ発表した。

4. 研究成果

(1) ヒト表皮細胞における伸展刺激による創傷治癒促進のメカニズム(雑誌論文)。

培養表皮細胞(HaCaT 細胞)に傷をつけて、修復の時間経過を観察すると伸展刺激を加えた細胞の修復が促進された。細胞外 ATP と細胞内 Ca²⁺をリアルタイムイメージングしたところ、伸展刺激によって傷に面した細胞のみから ATP が放出され拡散し(図 1A)、後続の細胞に伝播していく Ca²⁺波が誘起された(図 1B)。これはパネキシンを介した ATP 放出(図 1C、1D)と P2Y2 型 ATP 受容体の活性化とそれに続く TRPC6 を介した Ca²⁺流入によっていることを明らかにした。

この持続的な Ca²⁺流入とそのグラディエントが創傷治癒を促進していると考えられるが、非常に興味深いことにこの機序は伸展刺激を与えない通常の創傷治癒過程においても働いていることが、ATP-Ca²⁺シグナリング系を抑制する薬物によって治癒が遅延することから示唆された。このことは創傷治癒過程において遊走していく細胞とそれに連なる後方の細胞間でメカニカルな相互作用があり、ATP-Ca²⁺シグナリングを介して治癒に寄与していると考えられる(図 1E,F)。

TRPC6 の促進薬であるハイパフォリン(伝承薬オトギリソウ抽出物)はこの傷の治癒を促進した。慢性皮膚炎であるアトピーにこれらの過程が関与していることが最近示唆され、治療の観点からも興味深い結果である。

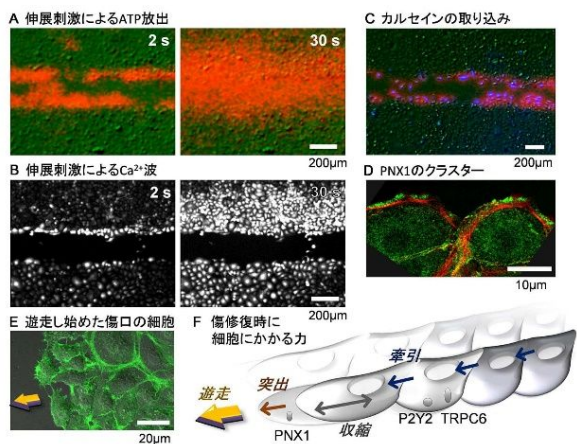


図 1 表皮細胞の創傷治癒を促進する ATP シグナリング。A 培養ケラチノサイト(HaCaT 細胞)を創傷後 3 時間で図の縦方向に 20%伸展刺激した時の ATP 放出の様子(赤色)と赤外線で見えた微分干渉像(緑)。B 同様の刺激での細胞内 Ca²⁺上昇伝播の様子。C ATP 放出した細胞(赤色)にのみヘミチャネル透過性の蛍光色素カルセイン(青色)が取り込まれた。

図1 説明の続き

D 傷口最前線の細胞にはパネキシンPNX1抗体のクラスターが観測された(緑色)。E 傷口の細胞の遊走の様子とその模式図(F)。緑色はアクチン線維。F 傷修復時の遊走によって細胞に発生する力の模式図。

(2) 小腸メカノセンサーとしての絨毛上皮下線維芽細胞と絨毛運動(雑誌論文)

小腸は消化器官であるとともに、メカノ、ケモセンサーを備えた運動器官であり、最大の免疫器官でもある。そのすべての機能にATPシグナリング系が関与している。小腸内面を覆う絨毛は消化吸収の面積を増やすだけではなく、食べ物の検知や、ゆっくりかつスムーズな輸送のための表面の形成を行っており自律的に動いている。

この絨毛の運動や消化・吸収には、絨毛上皮皮下でネットワークを形成する上皮下線維芽細胞(subepithelial fibroblast)が関与していることを我々は明らかにして来た。この細胞はメカノ刺激を感知しATPを放出するメカノセンサーとして機能するだけではなく、ATP(P2Y1)、substance-P(NK1)の受容体を持ちそれらによって自ら収縮し、絨毛の機械的な性質と運動を担っている。さらにその足(突起)を上皮、神経、血管、平滑筋、免疫細胞に広げ相互作用しており、絨毛の機能を司る要となる細胞であることがわかってきた。

図2にその模式図を示す。絨毛にはsubstance-Pをもつ知覚神経が神経突起を伸ばしてきており、その神経がもつP2X(2または3)によって上皮下線維芽細胞からのATPシグナルを受け取る。また逆に神経が出したsubstance-Pを上皮下線維芽細胞がNK1受容体を介して受け取る。この相互作用が絨毛の微妙な動きと絨毛間の協調した動きを制御していると考えられる。

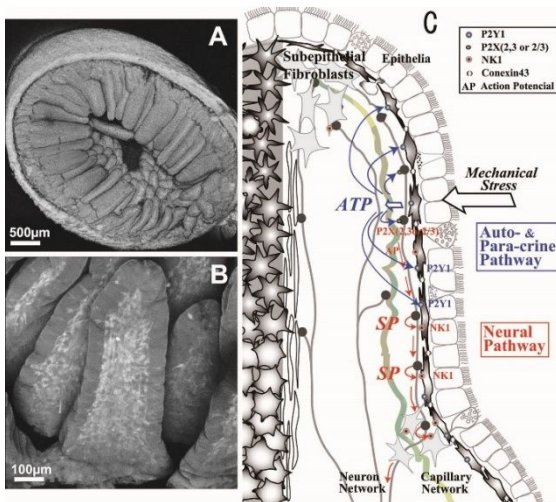


図2 小腸絨毛のメカノセンシングと絨毛運動に果たす上皮下線維芽細胞を介したATPシグナリングの役割

(3) 肺および気道の各種細胞における伸展刺激によるATP放出(雑誌論文)

肺および気道は種々のメカノ刺激を生理的、病的に受けているが、それらにATPシグナリングが関与している。気道での異物を排出する粘膜纖毛クリアランスでは盃細胞からのムチン分泌や纖毛運動に関わっているし、慢性閉塞性肺疾患(COPD)における炎症や線維化さらには肺がんなどの病態にも関わっている。

我々は肺胞の上皮細胞であるA549細胞、気道平滑筋細胞、線維芽細胞においてそれぞれ伸展刺激によってATPが放出されCa²⁺応答が誘起されることを明らかにし、その機序、生理的役割について考察した。図3は1例で培養肺胞上皮細胞を20%(1s)伸展刺激した時のATP反応の様子を強度プロファイルの3次元表示したもので、限られた数の細胞が100µmを超える濃度のATPを放出し、数100µmの距離に拡がりATP雰囲気形成していることがわかる。このようにATPは生体内で局所的に拡がりパラクラインシグナルを担っている。

さらに肺におけるATPの役割を明らかにするため、ラット肺を血管灌流後摘出し、その組織からのATPイメージングを行い、肺の気道を介して膨張させることにより肺組織からATP放出の検出にはじめて成功した。このような組織レベルでのATP放出のイメージングはATP放出の生理的役割を知る上で重要な手段となってくる。

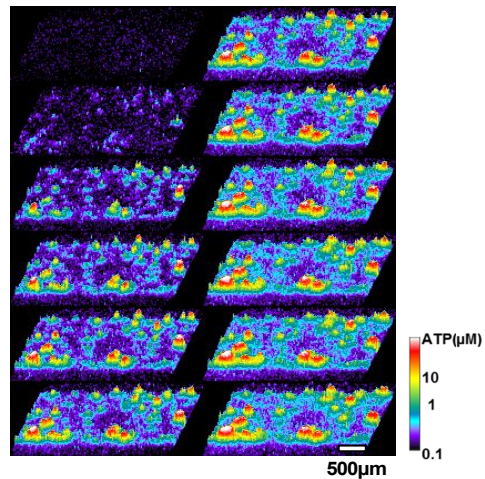


図3 肺胞上皮細胞における伸展刺激によるATP放出の様子。培養A549肺胞上皮細胞を20%(1s、上下方向に)伸展刺激後のATP反応を1秒ごと(左上から右下)に表示。これらは強度プロファイルの3次元表示で、右欄外に較正されたATP濃度を示す。

(4) 赤血球からのATP放出は主として融解によっている(雑誌論文)

赤血球は血管の中を流れている時に流れの乱れ等で刺激を受けるとATPを放出し、それが内皮に作用しNO依存性の血管の弛緩を起こすなど血流を局所的に制御していると考えられている。赤血球はシェアストレス

や酸欠、低張溶液などの刺激によって ATP を放出することが知られているが、その機序は不明であった。

本研究では血球融解の量を上清中のヘモグロビンの量で定量し、ATP 放出量と厳密に比較した。また ATP イメージング法で ATP と同時に、ATP 放出した細胞の形態変化を赤外光によってイメージングした。その結果、赤血球からの ATP 放出は定量的には血球の融解だけで説明がつくこと、また ATP を放出した赤血球は放出後必ず融解していること観測された。図 4 はその例を示す。これらのことから、血管中で赤血球は自己融解によって周りに ATP を供給し、血流をコントロールしているという新しい概念を提唱している。

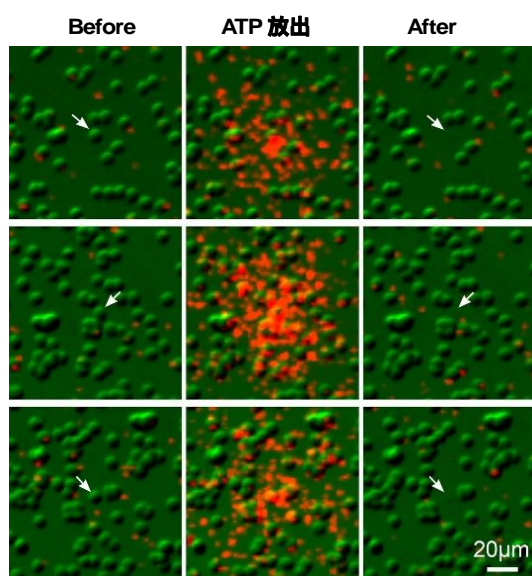


図 4 赤血球での ATP 放出は主として血球融解によっている。20%低張溶液刺激による ATP 放出(赤)と形態変化(緑)。ATP を放出(中央)した赤血球(左、矢印)は融解している(右、矢印)。上、中、下で 3 例を示す。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

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) (査読あり) (10.1182/blood-2015-01-622159).

Furuya K, Sokabe M, Grygorczyk R (2014) Real-time Luminescence Imaging of Cellular ATP Release. *Methods* 66: 330–344 (査読あり)(10.1016/j.ymeth.2013.08.007).

Takada H, Furuya K, and Sokabe M (2014) Mechanosensitive ATP release from hemichannels and Ca^{2+} influx through TRPC6 accelerate wound closure in keratinocytes. *J Cell Science* 127: 4159 – 4171 (査読あり) (10.1242/jcs.147314).

Takahara N, Ito S, Furuya K, Naruse K, Aso H, Kondo M, Sokabe M, and Hasegawa Y (2014) Real-Time Imaging of ATP Release Induced by Mechanical Stretch in Human Airway Smooth Muscle Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 51: 772–782 (査読あり) (10.1165/rcmb.2014-0008OC).

Murata N, Ito S, Furuya K, Takahara N, Naruse K, Aso H, Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y (2014) Ca^{2+} influx and ATP release mediated by mechanical stretch in human lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 453:101-105 (査読あり) (10.1016/j.bbrc.2014.09.063).

Sikora J, Orlov SN, Furuya K, and Grygorczyk R (2014) Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes. *Blood* 124:2150- 2157 (査読あり) (10.1182 /blood-2014-05-572024).

Furuya, S, Furuya K (2013) Roles of substance-P and ATP in the subepithelial fibroblasts of rat intestinal villi. *Int Rev Cell Mol Biol* 304: 133-190 (査読あり) (10.1016/B978-0-12-407696-9.00003-8)

Grygorczyk R, Furuya K, Sokabe M (2013) Imaging and characterization of stretch-induced ATP release from alveolar A549 cells. *J Physiol* 591: 1195–1215 (査読あり) (10.1113/jphysiol.2012.244145).

Lee Hae Ung, Yamazaki Y, Tanaka KF, Furuya K, Sokabe M, Hida H, Takao K, Miyakawa T, Fujii S, Ikenaka K (2013) Increased astrocytic ATP release results in enhanced excitability of the hippocampus. *Glia* 61:210–224 (査読あり) (10.1002/glia.22427).

〔学会発表〕(計 23 件)

Furuya K, Takada H, Sokabe M: Stretch induced ATP release via hemichannels accelerates wound closure in keratinocyte by Ca^{2+} influx from TRPC6. *Purinergic Signaling (Purine 2016)* (2016.1.24) (Vancouver, Canada).

古家喜四夫、曾我部正博、Ryszard Grygorczyk: 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 (2016.3.23)(札幌コンベンションセンター、北海道・札幌)

古家喜四夫、高田弘弥、曾我部正博: 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 (2015.3.21) (神戸国際会議場、兵庫県・神戸)

Grygorczyk R, Sikora J, Orlov SN, Furuya K: ATP release in human erythrocytes is hemolysis a primary release mechanism? *Purines 2014* (2014. 7.23-27) (Bonn, Germany)

Furuya K, Takahashi Y, Sokabe M: ATP signaling as a mechano-transduction mechanism in mammary glands. Internat Sympo Mechanobiology (ISMB) 2014 (2014.5.22) (Junko Fukutake Hall、岡山県・岡山)

Furuya K, Furuya S, Sokabe M: Villous movement of intestine is regulated by mutual interaction of subepithelial fibroblasts and afferent neurons via ATP and substance-P. 37th Internat. Cong. Physiol. Sci.(IUPS2013) (2013.7.24) (Birmingham UK)

Furuya K, Furuya S, Sokabe M: Subepithelial Fibroblasts and afferent neurons in the intestinal villi interact mutually via ATP and sub-P to regulate villous movement and other functions. 第90回日本生理学会大会 (2013.3.28) (タワーホール船堀、東京都・江戸川区)

Furuya K, Furuya S, Sokabe M: Subepithelial fibroblasts and afferent neurons interact mutually via ATP and substance-P to form a cellular signaling system in the intestinal villi. Purine 2012 (2012. 5. 31) (九大医百年講堂、福岡県・福岡)

〔図書〕(計 1件)

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 総ページ数 332、pp85-100.

〔その他〕

ホームページ等

<https://globalmedicaldiscovery.com/key-medical-diagnostics-articles/real-time-luminescence-imaging-of-cellular-atp-release/> (Global Medical Discovery に雑誌論文が a top 50 among 645,000 papers in a month として選ばれた)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

古家 喜四夫 (FURUYA, Kishio)
名古屋大学・大学院医学系研究科・研究員
研究者番号：40132740

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

高田 弘弥 (TAKADA, Hiroya)
名古屋大学・大学院医学系研究科

古家 園子 (FURUYA, Sonoko)
自然科学研究機構・生理学研究所

Ryszard Grygorczyk
モントリオール大学・医学部

伊藤 理 (ITO, Satoshi)
名古屋大学・大学院医学系研究科

高橋 優子 (TAKAHASHI, Yuko)
大阪医科大学・医学部