

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790284

研究課題名（和文）自己免疫性肝炎における ATP による肝炎悪化のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Extracellular ATP aggravates concanavalin A-induced liver injury 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：ATP（アデノシン三リン酸）は全ての細胞内で生産され、エネルギー産生に欠かせない細胞内成分である。本研究により、肝臓の炎症で細胞外に放出された ATP が白血球のマクロファージや T 細胞に結合することにより活性化を誘導して、正常組織を破壊する更なる炎症悪化の経路が示唆された。さらに、この炎症の経路は肝炎だけでなく、肺や腎臓やその他のマクロファージや T 細胞が関わっている炎症全般に起こりえる経路であり、多くの炎症制御研究に応用できると期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：免疫学、感染免疫学

科研費の分科・細目：実験病理学・疾患モデル動物

キーワード：肝炎、マクロファージ、T 細胞、ATP

1. 研究開始当初の背景

ATP および NAD は全ての細胞内で生産され、生命維持に欠かせない細胞内成分である。また、ATP と NAD は、*in vitro* でマクロファージや T 細胞上の P2X₇ 受容体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。近年、関節リウマチの炎症によって細胞外に放出された ATP が、マクロファージの活性化を誘導して症状の悪化を招いている可能性が報告されたしかし、

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、どのような経路でマクロファージや T 細胞を活性するか不明な点が多い。そこで本研究は、T 細胞 (NKT 細胞を含む) の活性化に起因する自己免疫性肝炎モデルマウスを用いて、肝炎で肝細胞から放出された ATP によるマクロファージと T 細胞の活性化と相互作用に焦点をあて、肝炎の発症メカニズムの解明を検討した。

2. 研究の目的

本実験は、炎症で細胞外に放出された ATP や NAD によって活性化されたマクロファージや T 細胞が、正常組織を破壊する更なる炎症悪化の経路を明らかにすることを目的とした。そこで、目標を 3 つの項目に分け、Concanavalin A (Con A) 誘導性肝炎発症のメカニズムを検討した。また、Con A 誘導性肝炎モデルマウスは、マウスに 15mg/kg の Con A を尾静脈より接種して作製した。

(1) 傷害された肝細胞内成分の ATP が引き起こす「肝炎発症のメカニズム」を明らかにする。

- ① 肝炎によって血清中の ATP 値が上昇するのか？
- ② 血液中に ATP が増加すると肝炎が悪化するのか？

(2) ATP と Con A によるマクロファージの活性化を明らかにする。

- ① マクロファージのサイトカイン産生に影響するのか？
- ② マクロファージ上の認識機構は？
- ③ マクロファージの活性化経路は？

(3) 自己免疫性肝炎におけるマクロファージと白血球の相互作用を明らかにする。

- ① ATP により活性化したマクロファージと他の白血球の関係は？

ATP と Con A による T 細胞や NKT 細胞への影響は？

3. 研究の方法

(1) Con A 単独または ATP 併用の肝炎モデルを作製して ALT 測定、HE 染色で肝炎発症状態を検討する。

(2) 血中の ATP 値、各種サイトカインを ELISA 法で測定する。

(3) Thioglycolate 誘導性腹腔内マクロファージを用いて、*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。

(4) 肝臓のリンパ球を用いて、*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。

(5) ATP と Con A による他の白血球への影響を、フローサイトメーターを用いて検討する。

4. 研究成果

(1) 傷害された肝細胞内成分の ATP が引き起こす肝炎悪化の経路

Con A を投与後、8 時間から 24 時間の間に肝炎の指標である血清 ALT 値の著しい上昇が認められた (図 1A)。同時に、16 時間をピークとする血清 ATP 値の上昇が確認された (図 1B)。このことから、Con A 投与によるリンパ球性の肝炎により、傷害された肝細胞から ATP が放出されたことが示唆された。

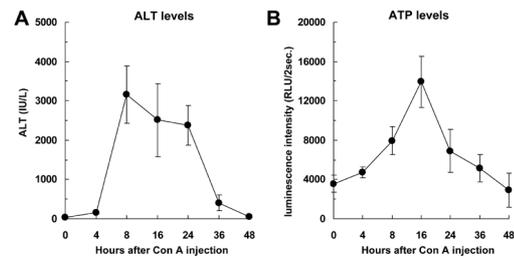


図 1: Con A 誘導性肝炎における血清中 ALT 値と ATP 値の推移

そこで、ATP を直接投与して Con A 肝炎の悪化を検討した。その結果、ATP の予備刺激による肝炎の悪化は認められなかったが、Con A 投与後に ATP 投与すると ALT 値の有意な増加を認め、さらに 4 割近いマウスが死亡した (図 2A, B)。これらのことから、ATP は肝炎の誘発を助長するより、肝炎の悪化に関与している可能性が示唆された。

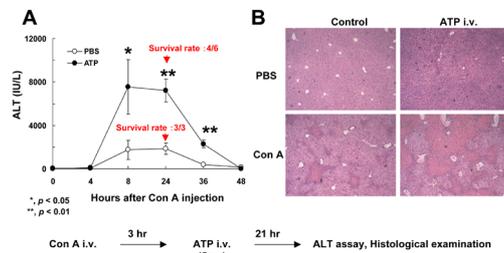


図 2: ATP 接種による Con A 誘導性肝炎の悪化

(2) ATP と Con A によるマクロファージの活性化

① *in vitro* で ATP と Con A 刺激によるマクロファージのサイトカイン産生

in vitro で ATP が、マクロファージを活性化する事が報告されている。そこで、*in vitro* で ATP と Con A 刺激によるマクロファージのサイトカイン産生能を測定した。その結果、IL-1 β と TNF α が、Con A 単独刺激より ATP を加えると有意に産生が増強された (図 3)。このことから、ATP は炎症性サイトカインの産生を増加させ、肝炎の悪化を助長していると考えられた。

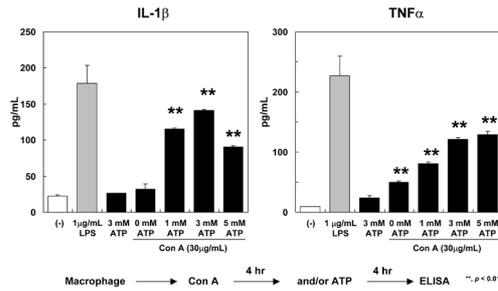


図 3: ATP と Con A 刺激によるマクロファージのサイトカイン産生能

② *in vitro* で ATP と Con A 刺激によるマクロファージのサイトカイン産生とそのシグナル経路

in vitro での ATP 刺激によるマクロファージのサイトカイン産生は、マクロファージ上の主に P2X₇ 受容体に ATP が結合することが重要であると報告されている。そこで、P2Xs 受容体の antagonist である KN-62 と agonist である Bz-ATP を用いて、ATP 受容体を検討した。その結果、IL-1β 産生に P2X₇ 受容体が重要であることが示された。一方、TNFα 産生には P2X₇ 受容体だけでなく、その他の P2X 受容体への結合も関与していることが示唆された (図 4)。

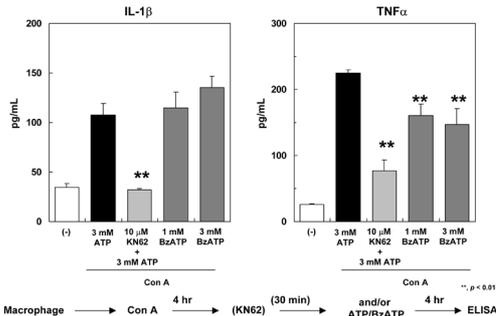


図 4: ATP の P2X₇ 受容体経路による IL-1β 産生

③ *in vitro* で ATP と Con A 刺激によるマクロファージのサイトカイン産生のシグナル経路

マクロファージ上の P2X₇ 受容体と ATP の結合と LPS 刺激は、ERK1/2 シグナル経路や p38MAPK 経路を利用してマクロファージの IL-1β 産生を誘導していることが報告されている。そこで、ATP と Con A 刺激による IL-1β 産生のシグナル経路を検討した。その結果、IL-1β の産生は ERK1/2 のシグナル経路が重要であることが示された (図 5)。一方、p38MAPK 経路の活性化は認められなかった。また、ERK1/2 阻害剤 (PD98056) を用いると IL-1β 産生が抑制された (図 6)。

これらのことから、ATP と Con A による

マクロファージの IL-1β 産生は、Con A がレクチンレセプター等に結合し、ATP が P2X₇ 受容体に結合して、ERK1/2 シグナル経路を経由して、IL-1β 産生が起こると示唆された。

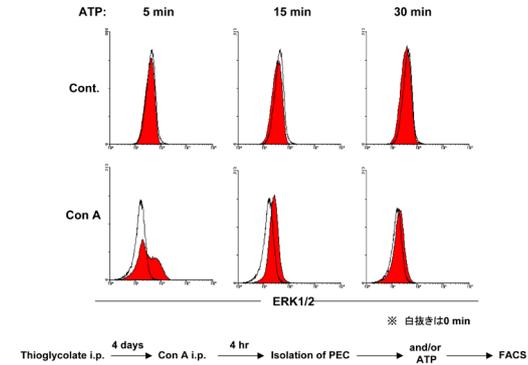


図 5: ATP の ERK1/2 シグナル経路の活性化

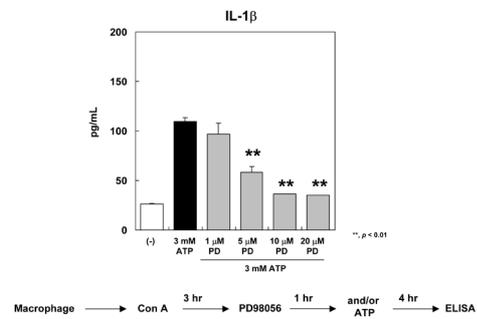


図 6: ERK1/2 シグナル経路抑制による IL-1β 産生の減少

(3) Con A 誘導性肝炎におけるマクロファージと白血球の相互作用

① *in vivo* での ATP 活性化マクロファージの好中球誘導

IL-1β と TNFα は血管内皮細胞上の E セレクチンの発現を誘導し、更に ICAM-1 も発現が増強される。また、E セレクチンは好中球のローリングに、ICAM-1 は好中球の付着に重要な接着分子である。よって、ATP 活性化マクロファージから産生される IL-1β と TNFα により好中球が誘導される可能性が考えられた。そこで、ATP 活性化マクロファージの好中球誘導を検討した。その結果、有意な好中球の増加が認められた (図 7)。以上のことから、ATP 活性化マクロファージから産生される IL-1β と TNFα は好中球が誘導し、好中球の活性酸素等による更なる炎症悪化の経路が推測された。

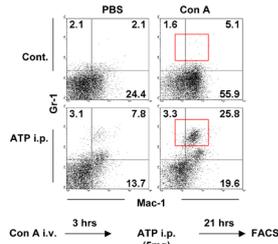


図 7: ATP 刺激による顆粒球誘導

② ATP と ConA 刺激による NKT 細胞および T 細胞への影響

in vitro で肝臓のリンパ球や脾臓のリンパ球を Con A で刺激すると、IFN- γ や IL-4 が NKT 細胞や T 細胞から産生されることが報告されている。そこで、ATP と Con A 刺激による NKT 細胞および T 細胞のサイトカイン産生能を測定した。その結果、IL-4 が、Con A 単独刺激より ATP を加えると有意に産生が増強された (図 8A)。一方、IFN- γ は Con A 単独刺激と ATP 添加群で有意な差は認められなかった。次に、IL-4 の産生増加を *in vivo* で検討をおこなった結果、血清中に有意な IL-4 の産生増加が認められた (図 8B)。

これらの結果から、組織傷害での細胞から放出された ATP が NKT 細胞や T 細胞にも、更なる活性をもたらしていることが示された。

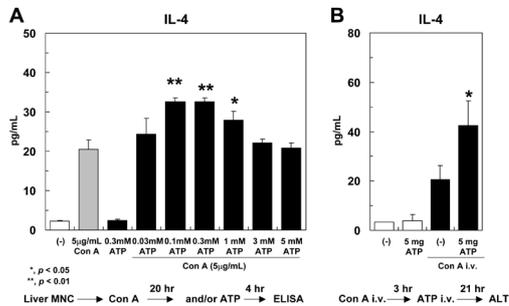


図 8: ATP と Con A 刺激による NKT 細胞と T 細胞からの IL-4 産生の増加

(4) 総括

Con A を用いた自己免疫性肝炎モデルは、NKT 細胞と T 細胞の過剰な活性化による細胞傷害を引き起こすと一般に知られている。また、研究の多くは NK 細胞、NKT 細胞および T 細胞の細胞傷害活性の経路やそれら細胞の活性抑制を中心に行われている。残念ながら、未だに自己免疫性肝炎の発症のメカニズムは不明な点が多く、炎症に重要なマクロファージの検討報告は少ない。そこで、本研究は、Con A 誘導性肝炎で起こっているマク

ロファージと T 細胞の作用を中心とした発生活悪化のメカニズムの解明を検討した。その結果、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からの IL-1 β と TNF α の産生増加や NKT 細胞と T 細胞からの IL-4 の産生増加が好中球を誘導して、正常組織を破壊する更なる炎症悪化の経路

(図 9) が示唆された。さらに、この炎症の経路は肝炎だけでなく、肺や腎臓やその他のマクロファージや T 細胞が関わっている炎症全般に起こりえる経路であり、多くの炎症制御研究に応用できると期待される。

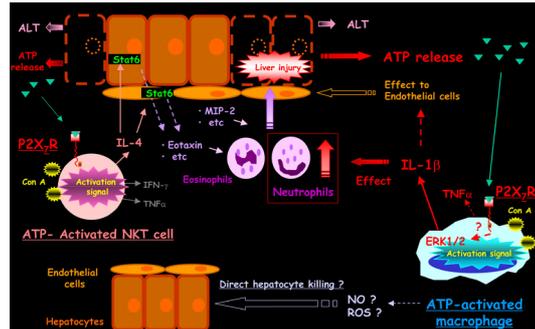


図 9: ATP による Con A 誘導性肝炎悪化の経路

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 2 件)

- ① Tachikawa S, Kawamura T, Kawamura H, Kanda Y, Fujii Y, Matsumoto H, Abo T. Appearance of B220^{low} autoantibody-producing B-1 cells at neonatal and older stages in mice. Clin Exp Immunol. 2008 ;153:448-455. Epub 2008 Jul 18.、査読有
- ② Abo T, Kawamura T, Kawamura H, Tomiyama-Miyaji C, Kanda Y. Relationship between diseases accompanied by tissue destruction and granulocytes with surface adrenergic receptors. Immunol Res. 2007;37:201-210.、査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 川村宏樹、Extracellular ATP aggravates concanavalin A-induced liver injury in mice, 2008 年 12 月 3 日、第 38 回日本免疫学学会総会・学術集会、京都
- ② 川村宏樹、ATP による Con A 誘導性肝炎

- の症状悪化の経路、2008年7月11日、
第19回日本生体防御学会学術集会、札幌
- ③ 川村宏樹、Extracellular ATP aggravates concanavalin A-induced liver injury in mice、2007年11月22日、
第37回日本免疫学学会総会・学術集会、
東京

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：