

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590125

研究課題名(和文)新規敗血症治療標的としてのATPシグナリング

研究課題名(英文)Purinergic signaling is a novel target of sepsis therapy

研究代表者

月本 光俊(Tsukimoto, Mitsutoshi)

東京理科大学・薬学部・講師

研究者番号：70434040

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)：セプシス(敗血症)とは高サイトカイン血症状態の全身性炎症反応症候群に感染症が重なった病態であり、多臓器不全や敗血症ショックにより高い死亡率を示すが、未だに有効な治療法が確立されていない。本研究では、セプシスの新たな治療標的としてATPシグナリングに注目し検討した。免疫細胞やマウス敗血症病態モデルを用いた検討の結果、敗血症病態におけるP2Y11受容体やP2X7受容体の重要性を明らかにした。本研究により、P2Y11受容体やP2X7受容体を介したATPシグナリングが新たなセプシス治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Sepsis is known as systemic inflammatory response syndrome (SIRS) with symptoms such as hypercytokinemia. Now, it is need to improve the therapy of sepsis. To establish effective therapy of sepsis, we investigated a role of purinergic signaling on sepsis by using immune cells and sepsis model mice in this study. We found that activation of P2Y11 receptor by exocytic ATP release in macrophage is involved in production of pro-inflammatory cytokine. P2Y11 receptor antagonist suppressed an increase of cytokine in LPS-treated mice. On the other hand, we also found that activation of P2X7 receptor play an important role in sepsis, suggesting that P2Y11 and P2X7 receptor antagonists would become a novel candidate of sepsis therapy.

研究分野：生物系薬学

キーワード：敗血症 炎症 プリン受容体 P2X7受容体 P2Y11受容体 ATP サイトカイン マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症における新規抗炎症剤開発の必要性

細菌感染によって引き起こされる全身性炎症反応である敗血症(セプシス)は、開腹手術後などに生じやすく、高サイトカイン血症を呈し、多臓器不全やショック症状によって死に至ることが多い非常に重篤な疾患である。発展途上国では死亡率が40-60%、米国でも30%であり、米国では年間20万人が死亡している。敗血症病態においてはマクロファージやT細胞による炎症性サイトカイン過剰産生(IL-6、TNF- α 等)が病態悪化に寄与しているため、免疫細胞過剰活性化の制御は敗血症治療において重要な課題である。そのため、治療には抗生剤投与に加え、免疫異常亢進によるショック症状を抑制する必要がある。しかし、現在十分な効果を示す治療法はないことから、過剰な免疫亢進状態を制御し、敗血症ショックを抑制する新規抗炎症剤の開発は、世界的需要が高く、また緊急性が高い。

(2) 細胞外ATPを介したオートクライン・パラクライン型情報伝達(ATPシグナリング)

通常、細胞外のATP濃度は低く保たれているが、細胞は物理的的刺激や増殖因子刺激に応じて、陰イオンチャネル、ヘミチャネル、あるいはATP含有小胞の開口放出(エキソサイトーシス)によってATPを放出する。その結果、細胞外ATP濃度は一過性に上昇し、ATPは細胞膜上に発現するP2受容体(イオンチャネル型P2X1-7およびGたんぱく共役型P2Y1-14)をオートクライン・パラクラインで活性化させ、細胞増殖やサイトカイン産生誘導など種々の生理作用を発現する。

P2受容体は、全身の細胞において発現が認められているが、その発現パターンは細胞種

によって異なる。マクロファージやT細胞などの免疫細胞で高発現しているサブタイプとしてはP2X7受容体があり、T細胞活性化やマクロファージからの炎症性サイトカイン(IL-1 β やIL-18)産生誘導に関与している。

近年の注目すべき研究として、2008年にATPを分泌小胞内に能動輸送するトランスポーターとしてSLC17A9が同定され、ATPは積極的に分泌小胞内に取り込まれ、開口放出されていることが証明された。また、神経および末梢での存在が示されたため、末梢細胞でのSLC17A9依存性小胞型ATP開口放出の存在と重要性も示唆された。

(3) これまでの申請者の研究

これまで申請者は、さまざまな細胞(T細胞、マクロファージ、腎メサングウム細胞、脳ミクログリア、表皮ケラチノサイト、がん細胞)におけるP2受容体の生理機能とそのメカニズムについて検討を行ってきた。昨年、申請者は、SLC17A9依存的なATPの小胞型開口放出とP2X7およびP2Y6受容体活性化がT細胞受容体を介したT細胞活性化過程において決定的な役割を担うことを明らかにした。また、ATPの代謝産物アデノシンによって活性化されるA2b受容体が制御性T細胞分化に重要であることも突き止めた。これらの成果より、T細胞活性化時、開口放出によって放出されるATPとその代謝産物であるアデノシンがT細胞活性化・分化に重要であることを明らかにした。

一方、抗原提示細胞であるマクロファージ活性化過程におけるATPシグナリングの重要性については明らかでない。しかし、当時、申請者はマクロファージにおいてもSLC17A9の発現を確認したことから、SLC17A9依存性ATP開口放出がP2X7受容体とともに生理機能に重要な役割を担っている可能性が示唆された。免疫細胞活性化メカニズムに関してはこれまでに多くの研究が

なされているが、ATP シグナリングを介した活性化機序は最先端の概念であり、世界的にもまだ認知されていない先見性の高い研究分野であり、新たな治療標的となる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究の第一の目標は、将来的な臨床応用を目指して、分子薬理学的解析を基盤とし、臨床データをふまえた上で動物モデルによる検討を行い、敗血症病態における ATP シグナリングの重要性を総合的に評価し、有効な敗血症治療薬候補を提示することである。新規治療薬の提示は、敗血症治療を向上させ、将来多くの患者を救う可能性があり、社会的意義が非常に高い。

また、これまで免疫細胞における SLC17A9 依存的 ATP 開口放出の重要性については、申請者が T 細胞活性化過程で明らかにしたのみである。そこで、本研究の第二の目標として、マクロファージ活性化過程および全身性過剰免疫応答（敗血症）における SLC17A9 依存的 ATP 開口放出の重要性についても明らかにする。本目標は、これまで注目されてこなかった免疫細胞における ATP 開口放出という新規概念を提示し、免疫学の発展に寄与することから学術的意義が高い。

3. 研究の方法

(1) マクロファージ活性化過程における

ATP シグナリングの解明

リポ多糖 (LPS) によるマクロファージ活性化過程における ATP シグナリングの重要性を明らかにし、活性化に重要な P2 受容体を同定する。

マクロファージの活性化方法

ヒト単球由来 THP-1 細胞およびマウス腹腔マクロファージを LPS および IFN- γ 存在下で 24 時間培養し活性化させた。

LPS 刺激による ATP 放出の検討

活性化マクロファージを LPS で刺激し、数分後の培養上清を回収し、ATP 濃度を luciferin-luciferase 反応を用いて測定した。

ATP 含有小胞の検出

蛍光 ATP アナログである MANT-ATP および酸性細胞内小器官染色薬 quinacrine を処置し、共染色される部位 (ATP 含有小胞) を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

SLC17A9 発現の検討

SLC17A9 特異的抗体を用いたウェスタンブロッティング法によって SLC17A9 の発現を検討した。

LPS 誘発サイトカイン産生に対する P2 受容体阻害薬の効果の検討

LPS 刺激 24 時間後に培養上清を回収し、各種サイトカイン濃度を ELISA によって測定した。

マクロファージ M1 型分化に対する P2 受容体阻害薬の効果の検討

LPS および IFN- γ による M1 型 (炎症性) マクロファージへの分化を CCR7 の発現を指標としてフローサイトメトリーにより解析した。

LPS によるサイトカイン産生誘導における SLC17A9 依存性 ATP 開口放出の関与の検討

SLC17A9 を RNAi 法によって発現抑制し、LPS 誘発 ATP 放出、サイトカイン産生、M1 分化への影響を検討し、SLC17A9 依存的 ATP 開口放出の関与を検討した。

(2) LPS 投与による endotoxin shock モデルマウスにおける検討 (急性敗血症モデル)

LPS はグラム陰性菌由来の膜成分であり、マウスに多量の LPS を投与することでマクロファージなどの免疫細胞を活性化させ高サイトカイン血症を伴ったエン

ドトキシンショックを誘発できる。

LPS をマウス腹腔に投与し、3~12 時間後に血液を採取した。また腹腔内も生理食塩水で洗浄し、サンプルとした。血清中および腹腔洗浄液中のサイトカイン濃度を ELISA にて測定した。このモデルを用いて P2 受容体サブタイプ特異的阻害薬の影響を検討した。

(3) 盲腸結紮穿孔 (cecal ligation and puncture: CLP) による腹膜炎由来敗血症モデルにおける検討(慢性敗血症モデル)

麻酔下マウスの腹部を 1 cm 切開し、盲腸を摘出し、結紮する。その後、21 G 針を刺し貫通させる。盲腸を腹腔内に戻し切開部を縫合した後、数日間飼育する。手術後、腹腔内に腸内細菌を含めた内容物が漏出し続けることで、腹膜炎が生じ、高サイトカイン血症、体重減少が起こる。

手術後数日間の体重変化および各臓器障害マーカー、血清中および腹腔洗浄液中のサイトカイン濃度を検討した。このモデルを用いて P2X7 受容体阻害薬およびその他の P2 受容体サブタイプ特異的阻害薬の影響を検討した。

(4) 肝マクロファージにおける P2X7 受容体機能の解析

木谷裕博士ら(農業生物資源研究所)により確立された不死化肝マクロファージ/Kupffer 細胞を用いて P2X7 受容体の機能について検討を行った。

ATP 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化

Fluo4-AM を負荷した後、ATP を処置し、細胞内 Ca^{2+} の濃度変化を蛍光分光光度計により測定した。

ATP 刺激による小孔の形成

臭化エチジウム (EtBr) を添加した細胞に ATP を処置し、細胞中の EtBr 蛍光量をフローサイトメーターにより測定した。ATP 刺激による細胞死誘導

ATP 刺激後の培養上清中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 漏出量を測定し、細胞障害度を算出した。

ATP 刺激による細胞外への IL-1 β 放出

ATP 刺激後の培養上清中 IL-1 β 量を ELISA 法にて測定した

ATP 刺激後の細胞外への PGE2 放出

ATP 刺激後の培養上清中 PGE2 量を EIA 法にて測定した。

ATP 刺激による細胞外への High Mobility Group Box 1 (HMGB1) 放出

ATP 刺激後の培養上清中 HMGB1 量を Western Blotting 法を用いて検出した。

(5) ConA 誘導性自己免疫性肝炎モデルの病態評価および P2X7 受容体阻害薬の効果の検討

マウスの尾静脈内にコンカナバリン A (ConA) を投与し、ConA 投与数時間後に血液を回収した。肝炎病態の指標として血清中 ALT/AST 活性量(肝障害マーカー)と炎症性サイトカイン濃度を測定した。また、P2X7 受容体阻害薬を ConA 投与 2 時間前に腹腔内投与し、血清中 ALT/AST 活性量および炎症性サイトカイン濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) マクロファージ活性化過程における ATP 開口放出と P2Y11 受容体を介した ATP シグナリングの関与

敗血症病態における ATP シグナリングの重要性と新規治療標的を明らかにするため、まず、マクロファージ活性化過程における SLC17A9 依存性 ATP 開口放出と P2 受容体の関与を検討した。ヒト単球由来 THP-1 細胞およびマウス腹腔マクロファージをリポ多糖 (LPS) および IFN- γ 存在下で 24 時間培養し活性化させた活性化マクロファージを LPS で刺激した結果、10-20 分後をピークに培養上清中 ATP 濃度が増加した。この ATP

放出は、ATP 開口放出の阻害薬を前処置することにより抑制された。さらに、マクロファージにおいて MANT-ATP および quinacrine で共染色される ATP 含有小胞の存在および ATP を分泌小胞内に取り込ませる輸送体 SLC17A9 の発現が確認された。この SLC17A9 をノックダウンすることによって LPS による ATP 放出は抑制された。これらの検討により、LPS によって開口放出を介して ATP が放出されることが明らかとなった。

次に、放出された ATP が LPS によるマクロファージの活性化に関与しているか、またどの受容体を介しているかを検討した。マクロファージ M1 型分化および LPS 誘発 IL-6 産生は、P2Y11 受容体阻害薬および P2Y11 受容体ノックダウンによって顕著に抑制された。また SLC17A9 ノックダウンや ATP 開口放出阻害薬によって IL-6 産生や M1 分化は抑制された。これらの結果から、LPS によるマクロファージの活性化への P2Y11 受容体の関与が明らかになった。

さらに、急性敗血症モデルにおいて、P2Y11 受容体阻害薬投与によって血中 IL-6 濃度の上昇が抑制され、腹腔中および脾臓中のマクロファージの M1 分化も抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、P2Y11 受容体は、新たな急性敗血症症状を抑制する新たな治療標的となる可能性が示唆された（発表論文 2）。

（2）敗血症病態への P2X7 受容体の関与

P2X7 受容体は、免疫細胞に多く発現し、炎症性サイトカインの産生に重要な役割を担っていることが知られており、これまでに我々は P2X7 受容体の敗血症への関与を示唆する予備データを得ていたため、敗血症への P2X7 受容体の関与について検討を行った。敗血症モデルとしては、慢性敗血症モデルである盲腸結紮穿孔モデル（CLP）を用いた。

CLP セプシスモデルマウスにおいて持続的な体重の減少、脾臓重量の有意な増加がみ

られた。また、血清中 ALT 活性、クレアチニン値の増加がみられたことから、肝臓、腎臓での障害が示唆された。血清中・腹腔洗浄液中では、IL-6、IL-1、IL-18 産生量の増加が認められた。そこで、P2X7-KO マウスを用いてセプシス病態モデルマウスを作製したところ、このセプシス病態の P2X7-KO マウスでは、血清中・腹腔洗浄液中の IL-6、IL-1、IL-18 産生量も低いことが確認された。これらの結果から、セプシス病態における P2X7 受容体の関与が示唆された。

P2X7 受容体阻害薬によるセプシス病態抑制効果について検討を行った結果、P2X7 受容体阻害薬投与により生存率低下抑制、肝炎病態・腎炎病態の軽減が認められ、血中サイトカイン濃度増加も抑制された。

このうち、全身性炎症反応による肝炎病態における P2X7 受容体の役割について詳細に検討するため、肝マクロファージ（Kupffer 細胞）における P2X7 受容体機能を解析した。その結果、P2X7 受容体活性化は、IL-1 や PGE2 産生などを誘導していることが明らかとなり、炎症反応惹起に重要な役割を果たしている可能性が示唆された（発表論文 1）。さらに、自己免疫性肝炎病態モデルに対する P2X7 受容体阻害薬の効果を検討したところ、3 種の P2X7 受容体阻害薬によって肝炎発症が抑制出来ることを明らかにした。これらの結果、P2X7 受容体は、全身性炎症反応によるセプシス病態や、それに付随する肝障害において重要な役割を担っており、P2X7 受容体阻害薬は全身性炎症病態抑制に有効である可能性が示唆された。

また、マクロファージや樹状細胞において P2X7 受容体の炎症作用は、P2X4 受容体によって調節されていることも明らかにした（発表論文 3）。

以上、3 年間の研究成果から、セプシスなどの全身性炎症反応症候群の新たな治療標的として、P2X7 受容体や P2Y11 受容体を示

すことに成功した。

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)

*責任著者(corresponding author)

#共第一著者 (co-first author)

1. Y. Toki, T. Takenouchi, H. Harada, S. Tanuma, H. Kitani, S. Kojima, M. Tsukimoto*, Extracellular ATP induces P2X7 receptor activation in mouse Kupffer cells, leading to release of IL-1beta, HMGB1, and PGE2, decreased MHC class I expression and necrotic cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 458(4) (2015) 771-776 (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.011.

2. H. Sakaki[#], M. Tsukimoto[#], H. Harada, Y. Moriyama and S. Kojima, Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y11 receptor, *PLoS One* 8(4) (2013) e59778 (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0059778.

3. H. Sakaki[#], T. Fujiwaki[#], M. Tsukimoto[#], A. Kawano, H. Harada, and S. Kojima, P2X4 receptor regulates P2X7 receptor-dependent IL-1beta and IL-18 release in mouse bone marrow-derived dendritic cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 432(3) (2013) 406-11 (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.135.

[学会発表](計 12 件)

- 久保木貴広、田沼靖一、月本光俊、骨髄由来肥満細胞におけるP2X7受容体を介した炎症性サイトカイン産生、**日本薬学会第135年会**、2015年3月25-28日(神戸学院大学、兵庫医療大学 兵庫県神戸市)
- 井山翔太、田沼靖一、月本光俊、パロキセチンによるP2X7受容体活性増強作用と炎症増悪化の可能性、**日本薬学会第135年会**、2015年3月25-28日(神戸学院大学、兵庫医療大学 兵庫県神戸市)
- 久保木貴広、小島周二、田沼靖一、月本光俊、骨髄由来肥満細胞におけるP2X7受容体の機能解析、第58回日本薬学会関東支部大会、2014年10月4日(昭和薬科大学 東京都町田市)
- 井山翔太、小島周二、田沼靖一、月本光俊、パロキセチンによるP2X7受容体活性促進作用、第58回日本薬学会関東支部大会、2014年10月4日(昭和薬科大学 東京都町田市)
- 田中里美、月本光俊、PELEGRIN Pablo, 原田均、小島周二、セプシスモデルマウスへのP2X7受容体阻害薬の効果、日本薬学会

第134年会、2014年03月27~30日(熊本大学他、熊本県熊本市)

- 田中里美、月本光俊、PELEGRIN Pablo, 原田均、小島周二、セプシス病態におけるP2X7受容体の関与、日本薬学会第133年会、2013年03月30日(パシフィコ横浜他 神奈川県横浜市)
- 月本光俊、榊隼人、原田均、森山芳則、小島周二、ATP開口放出とP2Y11受容体活性化を介した新規マクロファージ活性化機構、日本薬学会第133年会、2013年03月30日(パシフィコ横浜他 神奈川県横浜市)
- 月本光俊、原田均、小島周二、Regulation of P2X7 Receptor-Mediated Inflammatory Functions by Co-expression of P2X4 Receptor in Macrophages、第86回日本薬理学会年会 日本薬理学会・日本生理学会合同シンポジウム、2013年3月21日(福岡国際会議場他 福岡県博多市) **(招待講演)**
- 田中里美、月本光俊、小島周二、セプシスにおけるP2X7受容体の関与、第56回日本薬学会関東支部大会、2012年10月13日(昭和大学 東京都品川区)
- M. Tsukimoto, Extracellular nucleotides-mediated autocrine/paracrine signalling (purigenic signalling), 1st International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences 2012, 2012年06月29日(クアラルンプール(マレーシア)) **(招待講演)**
- M. Tsukimoto, A. Kawano, T. Noguchi, D. Mori, N. Hotta, H. Harada, T. Takenouchi, H. Kitani, S. Kojima, Regulation of P2X7 Receptor-Mediated Inflammatory Functions by Coexpression of P2X4 Receptor in Mouse Macrophages, Purine 2012, 2012年06月01日(九州大学 福岡県博多市)
- H. Sakaki, M. Tsukimoto, H. Harada, Y. Moriyama, S. Kojima, Involvement of Purinergic Signaling via Exocytosis in Cytokine Production by Activated Macrophages, Purine 2012, 2012年06月01日(九州大学 福岡県博多市)

[その他]

ホームページ

http://www.tus.ac.jp/fac_grad/p/intro.php?4d1d

6. 研究組織

(1) 研究代表者

月本 光俊 (TSUKIMOTO, Mitsutoshi)

東京理科大学・薬学部・講師 研究者番号: 70434040