

細胞外ATPによる活性化マクロファージの微生物排除機能に対する抑制機構

新潟医療福祉大学臨床技術学科・高野晃栄, 池上喜久夫,
川村宏樹

【背景】

ヒトの体は病原性微生物に感染すると、感染・炎症部にマクロファージや好中球などの食食細胞が集まり、微生物を捕食・分解して防御をおこなう。ATP および NAD などのヌクレオチドは全ての細胞内で生産され、エネルギーの基となる生命維持に欠かせない細胞内成分である。この細胞内の ATP は感染や外傷による炎症で細胞外に放出され、多くの免疫反応の誘導に関わっていることが明らかになってきた。細胞外 ATP は、マクロファージの ATP 受容体 (P2X₇受容体など) に主に結合してマクロファージの活性化と細胞死を誘導することが報告されていた。しかし、感染による炎症や組織傷害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の微生物の捕食に影響を与えているか不明な点が多い。そこで本研究は、細胞外 ATP によるマクロファージの活性化に焦点をあて、微生物に対する捕食機能への制御機構の解明を目的とした。

【方法】

1. ATP による食食能 (捕食能力) の検討

研究には多くの研究に用いられている、マクロファージの培養細胞: RAW264.7 細胞を使用する。精製 ATP で刺激後、酵母を加えて食食能を測定する。測定方法には PAS 染色を用いて、酵母、食食済みマクロファージ、非食食マクロファージを染め分けて細胞実数で検討する。

2. 食食能に影響をあたえる ATP 受容体の検索

マクロファージ上には多種の ATP に関する受容体が存在している。1 の結果を踏まえて、どの受容体が捕食・分解に関与しているか検討する。検討方法は、各受容体のアゴニストである ATP 分解物 (ADP など) を使用して、1 の検討をおこなう。

【結果】

マクロファージに酵母を食食させる 30 分前に各濃度の ATP を培養液に添加し、酵母を加え 3 時間または 6 時間培養した (図 1)。その結果、3 時間培養において、30 μ M ATP で有意な食食能低下がみられ、1mM ATP では 0.4% と低下は著明であった (図 2)。一方、6 時間培養において、30 μ M ATP で有意な食食能低下が継続された。しかし、1mM ATP では 3 時間培養での著明な食食能の低下は回復した (図 3)。また、3mM ATP では培養していたマクロファージが、スライドガラス上に全く認められなかった。

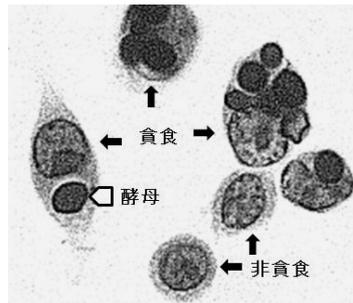


図 1. マクロファージによる酵母食食 (X400)

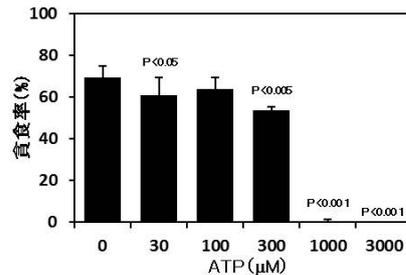


図 2. 3 時間培養によるマクロファージによる酵母食食率

p 値は ATP 非添加群と各濃度の添加群との比較である (n=5)

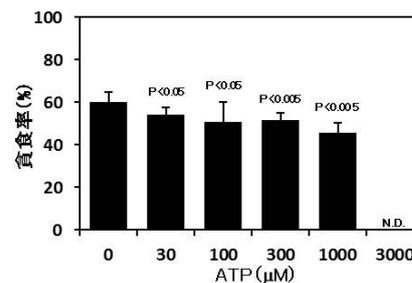


図 3. 6 時間培養によるマクロファージによる酵母食食率

p 値は ATP 非添加群と各濃度の添加群との比較である (n=5)

【考察】

これまで得られた結果より、ATP はマクロファージの食食能を早期より抑制し、抑制作用は ATP の濃度に比例することが示唆された。1mM ATP で 3 時間と 6 時間培養を比較すると、3 時間では食食が非常に低く (0.4%)、6 時間では食食が認められた (45.5%)。このことから ATP は早期の食食作用に対して、非常に強く関与していると推測される、これが ATP のどのような作用によるものなのか、現在検討中である。また、6 時間培養の 3mM ATP でデータが得られなかったのは、これまでの報告から ATP によるマクロファージのアポトーシスが誘導されたことが考えられ、合わせて検討している。

【結論】

炎症や傷害などにより細胞から放出された ATP は、マクロファージの食食能の抑制、特に早期の食食能に関与している。