

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：34438

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19581

研究課題名(和文) IL-33依存性気道炎症における血小板関与の解析

研究課題名(英文) Analysis of platelet involvement in IL-33-dependent airway inflammation

研究代表者

竹田 知広 (Takeda, Tomohiro)

関西医療大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：20717665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー疾患の病態形成に血小板が関連することが知られているが、そのメカニズムについては、不明である。本研究では、血小板中に全長のIL-33が発現することを見出した。さらに、血小板由来IL-33は、マウス喘息モデルを用いての検討により、生物学的活性を有しており、Type2炎症に深く関わり、アレルギー性気道炎症の病態形成に関与することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Platelets are known to be involved in the pathogenesis of allergic diseases, but the mechanism is unknown. In this study, we found that full-length IL-33 is expressed in platelets. In addition, platelet-derived IL-33 was confirmed to have biological activity by examination using the mouse asthma model, deeply involved in Type 2 inflammation, and to be involved in the pathogenesis of allergic airway inflammation.

研究分野：免疫

キーワード：IL-33 血小板

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息の本態であるアレルギー性炎症の形成には、炎症細胞と組織構成細胞の複雑な相互作用が重要であることが知られている。近年、喘息患者では、発作時に血小板機能亢進が認められることや、喘息患者血液中に血小板活性化マーカーである血小板マイクロパーティクルと重症度が相関することが報告された。これらの論文は、喘息発作増悪に血小板の活性化が誘導されていることを示している。一方、鶏卵白アルブミン(OVA)感作した、IgE 依存性マウス喘息モデルを用いての検討では、抗癌剤を用いて血小板減少を誘導すると、好酸球炎症が軽減することが示されている。これらの報告は、血小板が、止血作用のみならず喘息の発作の増悪に何らかの役割を演じていることを強く示唆している。

また、気管支喘息などアレルギー疾患の発症に IL-33 が深く関与すると考えられており、マウスにおいては、IL-33 欠損マウスにおけるプロテアーゼ惹起気管支炎症モデルでは、好酸球浸潤が軽減することが知られている。また、ヒト喘息患者において、気管支洗浄液中の IL-33 蛋白の増加と重症度が相関することが報告されており、IL-33 のアレルギー疾患の病態形成における自然免疫への関与が次々と明らかになり、病態に対する理解が進みつつある。

これまでに、IL-33 を培養血管内皮細胞に添加すると血管内皮細胞の IL-8 発現が上昇することを報告している。同様に、血小板と血管内皮細胞を共培養すると IL-8 の発現が上昇することから、血小板に IL-33 が有する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

喘息発作時に血小板の活性化や凝固系の亢進を認めること、血小板を減少させることにより喘息が軽症化することが報告されており、喘息発作の増悪に血小板の活性化が関与することが示唆される。しかし、その詳細については、不明である。抗血小板薬が喘息に有効との報告もあり、血小板がアレルギー性炎症の形成に関与する可能性がある。本研究の目的は、血小板における IL-33 の発現の有無、病態への関与の可能性を検討し、血小板がアレルギー性炎症に関与するメカニズムを明らかとすることである。

3. 研究の方法

(1) 血小板における IL-33 の発現の有無

ヒト血小板における検討

洗浄血小板とヒト巨核球細胞株 MEG-01 細胞を用いて Western blotting 法にて IL-33 蛋白の検出をおこなった。

マウス巨核球を用いての検討

野生型マウス及び IL-33 欠損マウスの骨

髄より巨核球を分離し蛍光染色にて IL-33 の局在を検出した。

活性化血小板の IL-33 分泌

ヒト洗浄血小板 ($1 \times 10^7 / \mu\text{l}$) を作成し、20IU/ml トロンピンで刺激後の上清中 IL-33 を ELISA にて測定を行った。

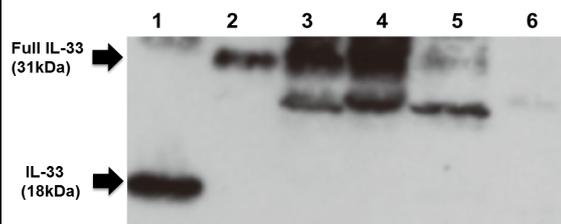
IL-33 依存性プロテアーゼ誘導気道炎症モデルを用いての検討

野生型マウス及び IL-33 欠損マウスに抗 CD41 抗体を投与し、血小板減少モデルを作成した。その後、プロテアーゼであるパピンを 3 日間吸入し、気道炎症の程度を気管支肺胞洗浄液中の好酸球数、肺組織中の IL-4、IL-5、IL-13、IFN- γ mRNA を測定し炎症の程度を評価した。

4. 研究成果

血小板は、巨核球の細胞質より産生され無核の細胞である。IL-33 の局在は核内にあることが知られている。洗浄血小板およびヒト巨核球細胞株 MEG-01 の核分画、細胞質分画の Western blotting 法を用いた検討では、血小板および、MEG-01 細胞細胞質内に全長の IL-33 蛋白の発現を認めた (図 1)。MEG-01 核分画に全長 IL-33 蛋白を認めず、細胞質や血小板に認めたことより、血小板中に全長 IL-33 蛋白が発現することが明らかになった。次に、マウス血小板における IL-33 蛋白の発現と局在を明らかとするため、マウス骨髄より巨核球を分離し、蛍光染色にて評

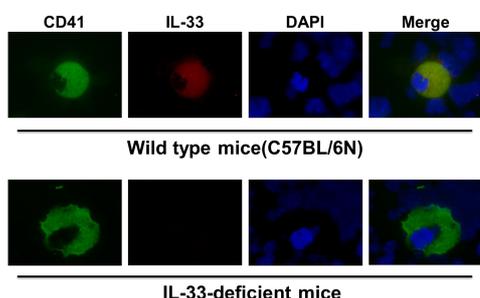
図 1. ヒト血小板およびヒト巨核球細胞株 MEG-01 における IL-33 の検出 (Western blotting)



1: Recombinant human IL-33
2: NHBE nuclear fraction (positive control)
3: Washed platelet_donor1
4: Washed platelet_donor2
5: MEG-01 cells (cytosol fraction)
6: MEG-01 cells (nuclear fraction)

価した。その結果、マウス骨髄巨核球細胞質内に IL-33 蛋白の発現を認めた (図 2)。これらのことより、ヒト、マウス双方の血小板中に IL-33 蛋白が発現することが明らかとなった。

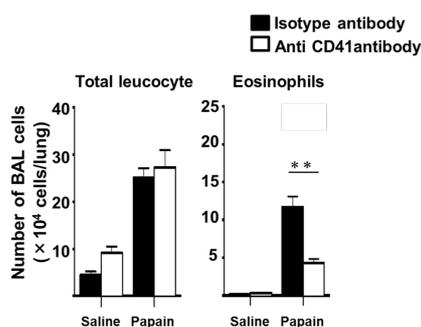
図 2. マウス骨髄巨核球における IL-33 の検出細胞株 MEG-01 における IL-33 の検出 (Fluorescent immunostaining)



次に血小板由来 IL-33 の分泌について検討を行った。ヒト洗浄血小板 (1 x 10⁷ / μl) を 20IU/ml トロンピンにて刺激後の上清中 IL-33 を ELISA にて測定を行った。刺激前に比して、刺激後に上昇した。

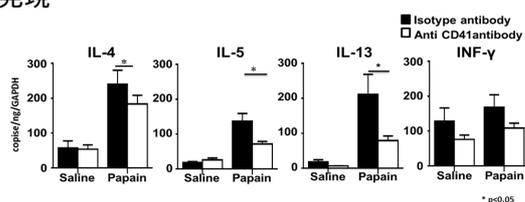
生体内での血小板由来 IL-33 について、IL-33 依存性プロテアーゼ誘導気道炎症モデルを用いての検討を行った。本モデルは、プロテアーゼであるパパインを連続 3 日間経鼻投与すると野生型マウスでは、好酸球炎症が惹起されるが、IL-33 欠損マウスでは炎症が低減する。本検討では、パパイン投与前および、2 日目に血小板抗体である CD41 抗体を腹腔内投与し、血小板減少モデルを用いた。投与開始後、4 日目に気管支肺胞洗浄液、肺組織を摘出し、気管支肺胞洗浄液中の白血球数、好酸球数、肺組織における各種サイトカイン mRNA 量を測定した。気管支肺胞洗浄液中の白血球数は、有意な変動を認めなかったが、好酸球数では、血小板減少群において有意に低下した (図 3)。

図 3. 気管支肺胞洗浄液中の白血球および好酸球数



また、肺組織中サイトカイン mRNA 発現では、血小板減少群で IL-4、IL-5、IL-13 mRNA の発現は、未処理群に比較して有意に低下した (図 4)

図 4. 肺組織におけるサイトカイン mRNA の発現



以上の結果から、血小板中に IL-33 蛋白が発現することが明らかとなった。IL-33 はこれまで核内に局在すると考えられてきたが、血小板は、巨核球細胞質より産生される無核の細胞であり、大変興味深い。また、IL-33 依存性プロテアーゼ誘導気道炎症モデルの検討では、血小板減少群で 2 型炎症が低減することから血小板由来 IL-33 がアレルギー疾患の病態形成に深く関与することが明らかとなった。これまで、アレルギー疾患に血小板が関与することが報告されていたが、そのメカニズムについては不明であった。今回、メカニズムの一端が明らかとなったことから、今後、アレルギー疾患の治療法開発においても有用と考えられる。

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)

Takeda T, Unno H, Morita H, Futamura K, Emi-Sugie M, Arae K, Shoda T, Okada N, Igarashi A, Inoue E, Kitazawa H, Nakae S, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Platelets constitutively express IL-33 protein and modulate eosinophilic airway inflammation. JACI.2016;138(5):1395-1403.

Takeda T, Morita H, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A.

Recent advances in understanding the roles of blood platelets in the pathogenesis of allergic inflammation and bronchial asthma. Allergol Int; 2017; doi: 10.1016/j.alit.2017.11.008.

[学会発表](計 1 件)

Takeda T. Platelets constitutively express IL-33 protein and modulate eosinophilic airway inflammation. Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology.2017. Seoul.

[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
竹田 知広 (TAKEDA Tomohiro)

研究者番号：20717665

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()