

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790810

研究課題名 (和文) 樹状細胞の機能と遊走における血小板の役割に関する研究

研究課題名 (英文) A study for roles of platelets in the function and recruitment of dendritic cells

研究代表者

峠岡 理沙 (MINEOKA RISA)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80464585

研究成果の概要 (和文)：血小板は樹状細胞の血中から皮膚組織への遊走動態において重要な役割を果たしていることが解明された。その機序として、血中での P-セレクトリンを介した血小板-樹状細胞複合体の形成が、血中から皮膚組織への樹状細胞の遊走動態に重要であると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：Platelets play important roles in the recruitment of dendritic cells from blood to skin by forming platelet-dendritic cell complexes via P-selectin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：血小板、樹状細胞、接触皮膚炎、P-セレクトリン

1. 研究開始当初の背景

- (1) 血小板は多くの生理活性物質を有し、止血だけでなく炎症を含むさまざまな生体反応に深くかかわっていることが近年知られるようになった。活性化血小板は血中で白血球と結合し、炎症巣や組織損傷部位に到達し、さまざまな生理活性物質を放出することによって、炎症反応に関与していることが報告されている。しかし、皮膚の定常状態の維持や皮膚を反応の場とする免疫・炎症反応における血小板の役割に関する研究報告はこれまでにほとんどみられていない。

アレルギー性皮膚炎の成立や皮膚のホメオスターシスの維持には、皮膚の抗原提示細胞である真皮樹状細胞やランゲルハンス細胞が重要な働きをすることが知られているが、皮膚組織の樹状細胞の機能におよぼす血小板の役割は明らかでない。

- (2) 本研究代表者は、皮膚の即時型アレルギーモデルマウスおよび慢性接触皮膚炎モデルマウスを用いて、血中の血小板を著しく減少させた状態では即時型アレルギー反応の遅発相および慢性接

触皮膚炎における皮膚への白血球の浸潤が著しく減少することを明らかにしている (Tamagawa-Mineoka R et al, J Allergy Clin Immunol. 2009;123:581. Tamagawa-Mineoka R et al, Am J Pathol. 2007;170:2019.)。その機序として、血中での血小板表面の P-セレクトインを介した血小板-白血球複合体形成と血管への接着、炎症局所での血小板からのケモカインなどの可溶性物質の遊離が皮膚炎組織への白血球遊走に重要であることを解明している。

- (3) 未熟な樹状細胞は末梢血から皮膚組織へ遊走してそこにとどまり、真皮樹状細胞やランゲルハンス細胞へと分化し、皮膚のホメオスタシスの維持に重要な役割を担っている。これらの樹状細胞は定常状態では未熟だが、抗原による刺激を受けると活性化して成熟し、真皮リンパ管を経て所属リンパ節へと遊走し、そこで T 細胞に抗原提示を行う。近年、in vitro において活性化血小板存在下で培養したヒト単球由来未熟樹状細胞の CD80、CD83、CD86 分子の発現や抗原提示能増強作用 (Hasegawa M et al, J Immunol. 2004;172:5297. Hamzeh-Cognasse H et al, BMC Immunol. 2008;9:54.) が報告されたが、皮膚炎において血小板が樹状細胞の機能におよぼす影響については明らかではない。
- (4) また、皮膚炎に伴って皮膚組織からリンパ管に遊走した後は、減少した樹状細胞を補うため末梢血から皮膚組織に樹状細胞が供給されることが明らかにされているが、その際に、樹状細胞は血管内皮細胞の P-セレクトインを介して皮膚へ遊走することが報告されている (Pendl GG et al, Blood. 2002;99:946. Robert C et al, J Exp Med. 1999;189:627.)。P-セレクトインは血管内皮細胞と血小板に発現する接着分子であるが、皮膚へ遊走する樹状細胞と血小板 P-セレクトインとの関連性については解明されていない。
- (5) 本研究代表者はハプテンによる皮膚炎において皮膚組織や末梢血中で血小板が活性化していること (Tamagawa-Mineoka R et al, J Allergy Clin Immunol. 2009;123:581. Tamagawa-Mineoka R et al, Am J Pathol. 2007;170:2019.) やアトピー性皮膚炎や乾癬などの慢性炎症性皮膚疾患患者の血漿中の血小板活性化マーカー値が上

昇していること (Tamagawa-Mineoka R et al, J Am Acad Dermatol. 2010;62:621. Tamagawa-Mineoka R et al, Clin Immunol. 2009;131:495. Tamagawa-Mineoka R et al, Allergol Int. 2008;57:391.) を既に報告しており、このように皮膚炎において活性化している血小板が樹状細胞の活性化や遊走に何らかの影響を与えている可能性があるが、炎症時の樹状細胞の機能におよぼす血小板の役割は明らかでない。

2. 研究の目的

- (1) 皮膚炎に伴って樹状細胞が皮膚からリンパ管へ遊走した後は、減少した皮膚の樹状細胞を補うため血中から皮膚組織へ樹状細胞が供給される。前述の通り、本研究代表者は皮膚炎部位での血中から皮膚組織への白血球遊走には血中での血小板-白血球複合体形成が重要であることを解明しており、樹状細胞の血中から皮膚組織への分布においても血小板が関与している可能性が推測されるが、この現象における血小板の役割については明らかでない。
- (2) そこで、本研究では、アレルギー性接触皮膚炎モデルマウスを用いて、抗血小板抗体および薬剤を用いて血中の血小板を著しく減少させることにより、末梢血から皮膚組織への樹状細胞の遊走動態におよぼす血小板の役割について検討する。そして、そのメカニズムとして、血小板-白血球複合体形成に重要な接着分子である P-セレクトインの関与について解析する。さらに、抗血小板薬を用いて血小板活性を抑制することによる皮膚組織への樹状細胞の遊走への影響について検討する。

3. 研究の方法

- (1) マウスの耳介皮膚にハプテンを塗布することにより感作させ、その7日後に耳介皮膚にハプテンを再び塗布することにより接触過敏反応を惹起させ、アレルギー性接触皮膚炎モデルマウスを作製した。
- (2) 一部のマウスに抗血小板抗体または薬剤 (ノイラミニダーゼ) を投与することにより、末梢血の血小板を 15%以下にまで減少させた。
- (3) 蛍光で標識したマウス骨髄由来の

樹状細胞を、ハプテン再塗布 24 時間後のマウスに静脈注射した。

- (4) 樹状細胞を静脈注射した6時間後にマウスの耳介皮膚を採取し、蛍光顕微鏡を用いて皮膚組織へ分布した樹状細胞数を解析した。
- (5) 血小板を減少させたマウスに正常マウス血小板を静脈注射した後に蛍光標識した樹状細胞を静脈注射し、皮膚組織へ分布した樹状細胞数を解析した。
- (6) 血小板減少マウスに P-セレクチンノックアウトマウス由来の血小板または抗 P-セレクチン抗体で処理した血小板を静脈注射した後に蛍光標識した樹状細胞を静脈注射し、皮膚組織へ分布した樹状細胞数を解析した。
- (7) 血小板数が正常なマウスに抗血小板薬 (アスピリン、クロピドグレル) を投与した後に蛍光標識した樹状細胞を静脈注射し、樹状細胞の皮膚組織への分布におよぼす抗血小板薬の影響について検討した。

4. 研究成果

- (1) 蛍光標識した樹状細胞をマウスに静脈注射すると、血小板を減少させたマウスでは血小板数の正常なコントロールマウスに比べて皮膚組織へ分布した樹状細胞数は有意に減少していた。
- (2) また、血小板を減少させたマウスに正常マウス血小板を静脈注射してから蛍光標識した樹状細胞を静脈注射すると、皮膚組織へ分布した樹状細胞数は有意に増加した。これらの結果より、血小板が樹状細胞の血中から皮膚組織への遊走において重要な役割を果たしていることが明らかになった。
- (3) そして、血小板を減少させたマウスに P-セレクチンの欠損した血小板を静脈注射してから蛍光標識した樹状細胞を静脈注射した場合には、皮膚組織へ分布した樹状細胞数は増加しなかった。この結果より、血中から皮膚組織への樹状細胞の遊走には血中での P-セレクチンを介した血小板—樹状細胞複合体形成が重要であることが示唆された。
- (4) 最後に、マウスに抗血小板薬を投与

してから蛍光標識した樹状細胞を静脈注射した場合には、皮膚組織への樹状細胞の分布は著しく抑制され、抗血小板薬による血小板の活性制御は皮膚組織への樹状細胞の遊走を抑制することが解明された。

- (5) この研究結果より、血小板は樹状細胞の血中から皮膚組織への分布において重要な役割を果たしていることが解明された。そして、その機序として、血中での P-セレクチンを介した血小板—樹状細胞複合体の形成が、血中から皮膚組織への樹状細胞の遊走動態に重要であると考えられた。
- (6) 末梢血から皮膚組織への樹状細胞の遊走において、血小板の関与に着目した研究報告はこれまでに国内外に無く、本研究成果は生体が有する免疫・炎症制御機構の研究において非常に重要であると考えられる。また、皮膚の樹状細胞の機能におよぼす血小板の役割が明らかになることで、接触皮膚炎での樹状細胞の活性化と遊走における機序がさらに解明され、さらには免疫・炎症制御機構の研究に新たな展開をもたらし、血小板の活性制御によるアレルギー疾患の新たな治療の開発へとつながる可能性が期待される。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 峠岡理沙、他. Platelets play important roles in recruitment of dendritic cells to skin in contact hypersensitivity. The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2009 年 12 月 4-6 日. 福岡.
- ② 峠岡理沙、他. An important role for platelets in leukocyte recruitment to skin in allergic skin inflammation. The 17th International Contact Dermatitis Symposium. 2009 年 11 月 5-8 日. 京都.
- ③ 峠岡理沙、他. 循環血中から皮膚組織への樹状細胞の供給における血小板の役割に関する研究. 第 19 回日本樹状細胞研究会. 2009 年 7 月 10-11 日. 兵庫.
- ④ 峠岡理沙、他. 皮膚の樹状細胞の機能と遊走における血小板の役割に関する研究.

第 108 回日本皮膚科学会総会. 2009 年 4
月 24-26 日. 福岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峠岡 理沙 (MINEOKA RISA)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80464585

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：