

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791081

研究課題名（和文） 免疫複合体病における治療ターゲットとしての血小板および接着因子の解析

研究課題名（英文） Analysis of platelets and cell adhesion molecules as therapeutic targets in the immune-complex diseases

研究代表者

原 肇秀 (HARA TOSHIHIDE)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90380956

研究成果の概要（和文）：

今回我々は炎症の代表例である免疫複合体病の一つであるアルサス反応の動物モデルを用いて炎症における血小板の役割を検討した。Busulfan による血小板抑制は、野生型マウスで有意に炎症反応を抑えた。細胞接着分子の欠損マウスを用いた同様の実験にて P-セレクチン欠損マウスおよび PSGL-1 欠損マウスでは busulfan 処理による炎症抑制作用は認められたが、E-セレクチン欠損マウスでは認められなかった。血小板は炎症反応を修飾している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To assess the role of platelets in the immune-complex diseases, the cutaneous Arthus reaction was examined in wild type mice and mice lacking E-selectin, P-selectin, or P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) with or without platelet depletion by busulfan. Edema and hemorrhage induced by immune complex challenge significantly decreased in busulfan-treated wild type mice compared with untreated mice. Busulfan treatment did not affect edema and hemorrhage in P-selectin- or PSGL-1-deficient mice, suggesting that the effect by busulfan is dependent on P-selectin and PSGL-1 expression. These results suggest that platelets induce leukocyte recruitment into skin by forming platelet-leukocyte aggregates and secreting chemokines at inflamed sites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：炎症、免疫複合体病、血小板、細胞接着分子、アルサス反応

1. 研究開始当初の背景

近年、炎症局所への炎症細胞浸潤のメディエーターとしての血小板の役割が注目されている。免疫複合体(IC)病での炎症細胞の浸潤過程における血小板や細胞接着分子の役割が明ら

かにされれば、それは血小板やその細胞接着分子を治療ターゲットとした新規治療に直結するものと期待される。

2. 研究の目的

ヒトにおける免疫複合体病の動物モデルである逆アルサス反応を用いて炎症細胞の炎症部位へのリクルートにおける血小板の関与を解析する。

3. 研究の方法

(1) マウスにおける血小板減少の誘導

骨髄の前駆細胞に作用し血球のうち血小板のみを特異的に減少させる busulfan をマウス腹腔内に投与し、血小板を抑制した。

(2) 皮膚アルサス反応の誘導

免疫複合体病の動物モデルである cutaneous reverse passive Arthus reactions を採用した。まず野生型マウスを用いて IC 投与後 4 および 8 時間経過してのサンプリングを行い busulfan 投与群、コントロール群間での比較検討を行った。

(3) 皮膚浮腫および出血の測定

IC 投与 4 時間後に浮腫、8 時間後に出血の計を肉眼的に測定して定量化し解析した。

(4) 浸潤細胞の評価

皮膚組織の H&E およびトルイジンブルー染色を行い、好中球、肥満細胞浸潤の程度を評価した。

(5) Real-time PCR による炎症性サイトカイン、血小板由来ケモカインの mRNA 発現の定量的解析

①炎症性サイトカインである IL-6、TNF- α 、②血小板由来ケモカインである PF-4、MCP-1、RANTES を測定した

(6) 血中の白血球-血小板凝集塊の同定

白血球-血小板間の接着・相互作用を検討するため、血中の白血球-血小板凝集塊をフローサイトメトリー法にて検出した。

(7) 各種細胞接着分子欠損マウスにおける血小板抑制による炎症抑制効果の解析

P-セレクチン欠損マウス、E-セレクチン欠損マウス、PSGL-1 欠損マウスを用いて同様の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 皮膚アルサス反応における busulfan 処理による炎症抑制効果 (Fig. 1, 2)

・皮膚アルサス反応において、浮腫反応および出血反応は、busulfan 処理野生型マウスで有意に抑制された。

・busulfan 処理による皮膚アルサス反応の抑制効果は、P セレクチン欠損マウスおよび PSGL-1 欠損マウスではみとめられたが、E セレクチン欠損マウスではみとめられなかった。

・浮腫と出血の抑制効果は好中球、マスト細胞浸潤の抑制と相関していた。

(2) 炎症性サイトカインおよび血小板由来ケモカインの定量的解析 (Fig. 3)

・皮膚アルサス反応の減弱と一致し、炎症制

現が増加していた。

・ busulfan 処理野生型マウスでは、血小板由来ケモカインである PF4, MCP-1, RANTES の発現も減少していた。

(3) 血中の白血球-血小板凝集塊の同定 (Fig. 4)

・野生型マウスでは皮膚アルサス反応の誘導 4 時間後まで白血球-血小板凝集塊は増加していたが、busulfan 処理野生型マウスでは 2 時間をピークとして 4 時間では有意に減少していた。

以上より、皮膚アルサス反応の炎症反応において、血小板は白血球とその表面に発現している細胞接着分子を介して接着・相互作用をきたすのみならず、活性化血小板由来ケモカインの産生を介して炎症反応を修飾している可能性が示唆された。

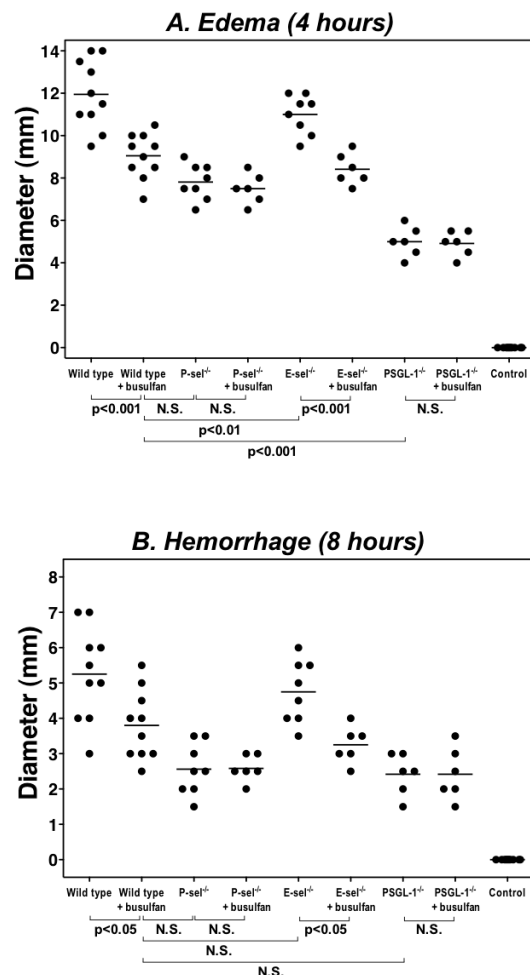


Fig. 1

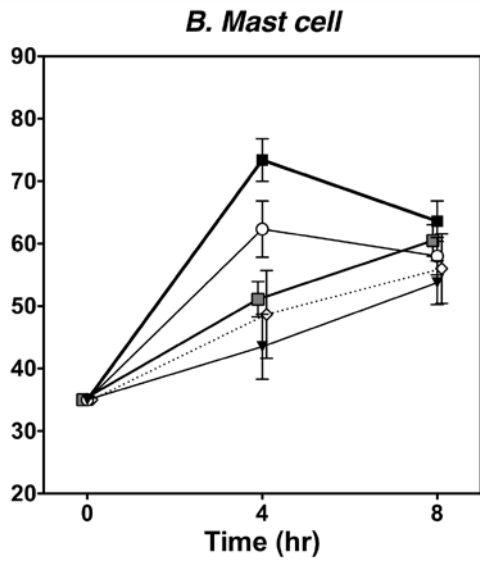
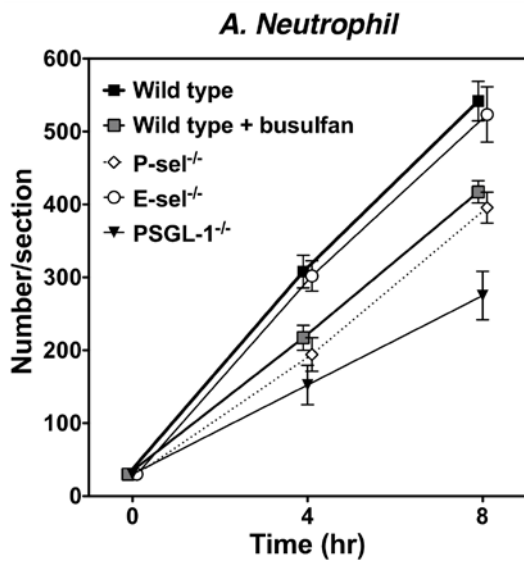


Fig. 2

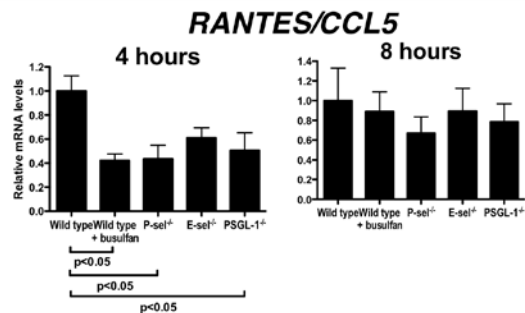
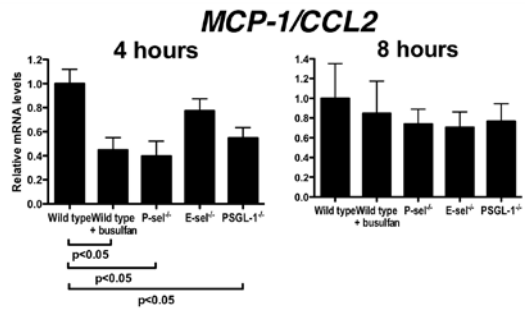
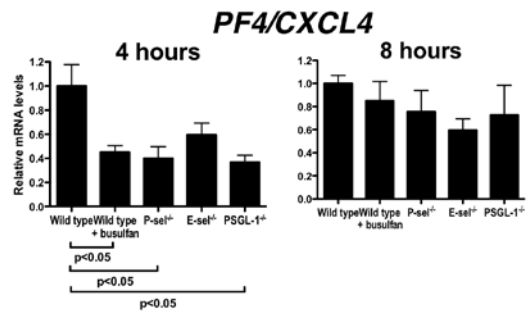
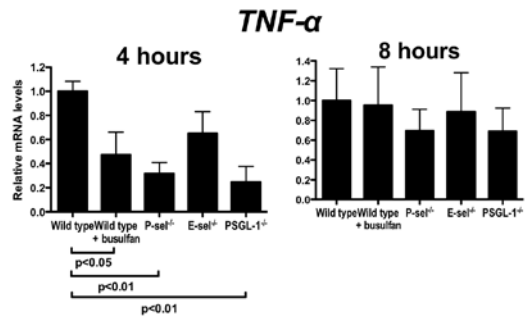
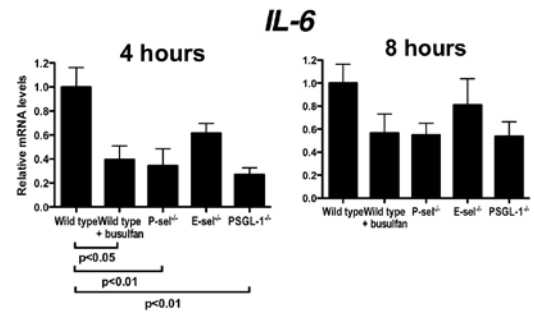


Fig. 3

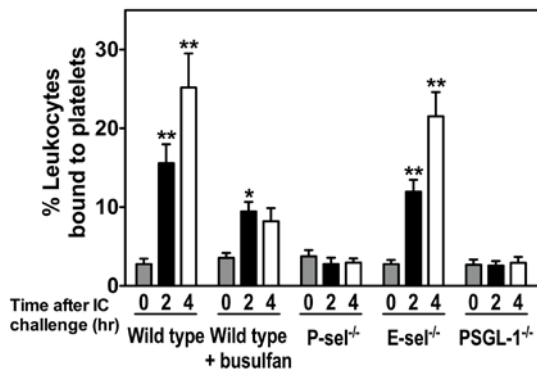


Fig. 4

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1件) 査読あり

Hara T, Shimizu K, Ogawa F, Yanaba K, Iwata Y, Muroi E, Takenaka M, Komura K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S: Platelets control leukocyte recruitment in a murine model of cutaneous arthus reaction. *Am J Pathol.* 2010 Jan; 176(1):259-69. Epub 2009 Dec 11

〔学会発表〕(計2件)

原 肇秀ら: 皮膚アルサス反応における炎症細胞浸潤のメディエータ細胞としての血小板の役割、日本臨床免疫学会(2009年11月6日、東京)

Hara T et al.: Platelets Control Leukocyte Recruitment in a Murine Model of Cutaneous Arthus Reaction, 日本研究皮膚科学(2009年12月4日、福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 肇秀 (HARA TOSHIHIDE)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 90380956