

令和 6 年 5 月 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08330

研究課題名（和文）アレルギー性皮膚疾患の炎症と痒みにおける血小板活性化因子の役割の解明

研究課題名（英文）Investigation of the role of platelet-activating factor in inflammation and pruritus of allergic dermatitis

研究代表者

嶋岡 理沙（Mineoka, Risa）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：80464585

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：血小板活性化因子（PAF）は炎症における重要なケミカルメディエーターであるが、皮膚におけるその機能は不明である。我々はPAF産生に関する生合成酵素であるLPCAT2に注目し、アレルギー性および刺激性接触皮膚炎におけるPAFの役割を調べた。ハプテンあるいは刺激物質の塗布後の皮膚組織では、PAF量は炎症反応に伴い、増加していた。またLPCAT2欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、ハプテンおよび刺激物質塗布後の皮膚の炎症反応は減弱していた。これらの結果は、PAFがアレルギー性および非アレルギー性の皮膚の炎症反応に関与していることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー・炎症反応におけるPAFを介する炎症の機序が解明されれば、アトピー皮膚炎をはじめとするアレルギー性皮膚疾患の機構についての研究を大きく進展させ、生体が有する免疫・炎症機構の解明に新たな展開をもたらすことが期待できる。そしてこの基礎的研究の成果をもとに、PAFを活用した炎症性疾患の新たな発症予防法や治療法の開発を行うことで、PAFという概念を医療へ応用した斬新な治療法を確立することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Platelet-activating factor (PAF) is an important chemical mediator in inflammation, but its function in skin is unknown. We investigated the role of PAF in allergic and irritant contact dermatitis, focusing on LPCAT2, a biosynthetic enzyme involved in PAF production. In skin tissues after application of haptens or irritants, PAF levels increased in response to inflammation. In LPCAT2-deficient mice, the inflammatory response in the skin after application of haptens and irritants was attenuated compared to wild-type mice. These results indicate that PAF is involved in both allergic and non-allergic skin inflammatory responses.

研究分野：皮膚科学、アレルギー学

キーワード：血小板活性化因子 アレルギー性接触皮膚炎 刺激性接触皮膚炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究者は、これまでに血小板がアトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患の炎症・免疫に深く関与していることを明らかにしてきた。アトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患患者の血漿中において血小板活性化マーカーが健常者に比べて有意に上昇していることを明らかにし (Allergol Int 2008, Clin Immunol 2009, J Am Acad Dermatol 2010)、またアレルギー性皮膚炎モデルマウスを用いた研究により、活性化した血小板がアレルギー性皮膚炎の病態に関与していることを解明した (Am J Pathol 2007, J Allergy Clin Immunol 2009, Exp Dermatol 2019)。しかし、アレルギー性皮膚炎において血小板が活性化する機序は明らかにされていない。

(2) リン脂質メディエーターである PAF は、血小板・好酸球などの活性化を誘導するケミカルメディエーターであり、申請者はこれまでの研究成果により PAF が血小板活性化などを介してアレルギー性皮膚疾患の病態に深く関与している可能性を推察している。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、炎症性皮膚疾患における PAF の機能を調べることを目的とした。まず、アレルギー性皮膚炎および非アレルギー性皮膚炎の皮膚組織における PAF および PAF の前駆体である lyso-PAF のレベルを評価した。

(2) PAF 産生に關与する生合成酵素であるリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ 2 (LPCAT2、リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ 9、LPLAT9 とも呼ばれる) を欠損したマウスを用いて、PAF がアレルギー性接触皮膚炎 (ACD) および刺激性接触皮膚炎 (ICD) に影響を及ぼすかどうかを検討した。

(3) ACD においてどの細胞が PAF を産生するかを明らかにするために、LPCAT2 と好酸球を含むいくつかの種類の細胞の二重染色を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 雄の LPCAT2-KO マウスと野生型マウスを用いた。アセトン/オリーブ油 (4:1) 中の 1% (w/v) TNCB 25  $\mu$ l を剃毛した腹部の皮膚に塗布することにより、マウスを感作した。感作後 7 日目に、20  $\mu$ l (背側に 10  $\mu$ l、腹側に 10  $\mu$ l) の 1% TNCB を右耳に塗布した。コントロールとして、同量のアセトン/オリーブ油 (4:1) を左耳に塗布した。耳の厚さはダイヤル式厚さ計を用いて測定した。耳膨張反応は、誘発前および誘発後 24 時間における耳の厚さを測定することにより評価し、誘発後にみられた耳の厚さの差として定義した。誘発 24 時間後、マウスの耳を採取した。

(2) PAF の測定は、メタノールと内部標準物質を加え、4 で 1 時間回転させた。メタノール抽出物は、固相抽出 Oasis HLB カートリッジを用いて精製した。脂質メディエーターレベルは、トリプル四重極質量分析計を用いて測定した。

(3) 耳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で固定し、パラフィンに包埋した。マイクロトームを用いて切片を切り出し、一般的な組織学的評価にはヘマトキシリン・エオジン、肥満細胞染色にはトルイジンブルー、好酸球染色にはルナ液を用いた。免疫組織化学のために、マウスの耳を 4%パラホルムアルデヒド/PBS で 4、一晚固定し、OCT コンパウンドに包埋し、7  $\mu$ m の厚さで切開した。各種細胞マーカーの抗体を使用して、染色を行った。

### 4. 研究成果

(1) アレルギー性皮膚炎症において PAF が増加するかどうかを調べるため、ACD マウスの耳介組織における PAF と lyso-PAF の量を測定した。耳組織中の PAF 量は、WT マウスでは TNCB チャレンジ後に増加したが、LPCAT2-KO マウスではほとんど検出されなかった。LPCAT2 はリゾ PAF から PAF を生成する役割を担っている。LPCAT2-KO マウスでは、TNCB チャレンジ後、WT マウスと同レベルのリゾ PAF が産生された。これらの所見は、WT マウスでは PAF レベルの上昇がアレルギー性炎症を伴うが、LPCAT2-KO マウスでは伴わないことを示している。

(2) 非アレルギー性皮膚炎症で PAF が増加するかどうかを調べるため、ICD マウスの耳組織中の PAF と lyso-PAF の量を測定した。PAF の量は、統計学的に有意な差はなかったものの、刺激物塗布後に増加する傾向がみられた。ICD 実験では、ACD 実験と同様に、WT マウスの耳は LPCAT2-KO マウスの耳よりも有意に高い PAF レベルを示したが、WT マウスと LPCAT2-

KO マウスの中に lyso-PAF の有意差は認められなかった

(3) アレルギー性炎症における PAF の役割を探るため、ACD 反応に対する LPCAT2 欠損の影響を調べた。LPCAT2-KO マウスの耳膨疹の程度は、TNCB チャレンジ後 24 時間で、WT マウスにみられたものより有意に低かった。耳の皮膚の組織学的解析から、WT マウスの真皮への炎症細胞の浸潤が認められ、その結果、TNCB チャレンジ後 24 時間で皮膚の厚みが増加した。興味深いことに、LPCAT2 を欠損させると、このような皮膚の炎症が抑制された。さらに、LPCAT2 の欠損は、炎症を起こした皮膚に浸潤した白血球の数を有意に減少させた。

(4) さらに、LPCAT2 欠損が ACD マウスの炎症皮膚への個々の炎症細胞タイプの動員へ及ぼす影響を調べるため、いくつかの炎症細胞タイプの染色を行った。各タイプの浸潤炎症細胞(リンパ球、マクロファージ、好酸球、好中球、肥満細胞)の数は、LPCAT2-KO マウスよりも WT マウスの方が多かった。

(5) LPCAT2 欠損の影響がアレルギー反応に依存するかどうかを調べるため、LPCAT2-KO マウスと WT マウスで刺激性クロトン油塗布後の皮膚炎症を調べた。LPCAT2-KO マウスの耳膨疹の程度は、クロトン油塗布 6 時間後に WT マウスで見られたものより有意に低かった。耳の皮膚の組織学的検査では、クロトンオイル塗布 6 時間後に WT マウスの真皮に炎症細胞の浸潤が認められた。LPCAT2-KO マウスでは、WT マウスに比べて皮膚の炎症が抑制されていた。炎症細胞の数は、LPCAT2-KO マウスでは WT マウスよりも少なかった。これらの結果は、PAF が ACD だけでなく ICD にも関与していることを示唆している。

(6) PAF は、好酸球、肥満細胞、マクロファージ、好中球、内皮細胞など、さまざまなタイプの細胞によって産生される。好酸球、マスト細胞、マクロファージは、接触過敏反応の病態機序と密接に関連していると考えられている。ACD 組織における LPCAT2 の産生を担う細胞を確認するため、好酸球、マスト細胞、マクロファージの LPCAT2 二重染色を行った。ACD マウスでは、EMBP と LPCAT2 の強い共染色が観察された。さらに、c-Kit と LPCAT2 のわずかな共染色も見られた。さらに、マクロファージと LPCAT2 の共染色は観察されなかった。これらの所見から、ACD 組織では好酸球が主に PAF を産生することが示唆された

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kurioka T, Tamagawa-Mineoka R, et al.  |
| 2. 発表標題<br>Role of platelet-activating factor in the skin and spinal cord in the mechanisms of itch |
| 3. 学会等名<br>The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)     |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tamagawa-Mineoka R.  |
| 2. 発表標題<br>Role of platelet-activating factor in the mechanisms of itch |
| 3. 学会等名<br>International Symposium of Itch (招待講演) (国際学会)                |
| 4. 発表年<br>2023年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|