

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791158

研究課題名(和文)慢性蕁麻疹の病態における組織因子の発現機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of expression mechanism of Tissue Factor in pathophysiology of chronic urticaria

研究代表者

森桶 聡 (Morioka, Satoshi)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：40536679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：慢性蕁麻疹患者の血漿では、Tissue Factor (TF)、またはPhosphatidyl serineの添加で産生されるトロンビン量が増加しており、その病態に外因系凝固能の亢進が関与していることが示された。また、ヒト臍帯血静脈血管内皮細胞では、ヒスタミン、Lipopolysaccharideによる刺激でTF発現がみられた。ヒスタミンでのTF発現はヒスタミンH1受容体拮抗薬で抑制された。

研究成果の概要(英文)：In the plasma of patients of chronic urticaria, the amount of thrombin produced by adding tissue factor (TF) or phosphatidyl serine was increased. It suggested the fact that the enhancement of extrinsic coagulation was associated with the pathophysiology of chronic urticaria. Also, TF was expressed when human umbilical vein endothelial cells were stimulated by histamine or lipopolysaccharide. The TF expression induced by histamine was suppressed by adding histamine H1 receptor antagonist.

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：蕁麻疹 血液凝固 Tissue Factor

1. 研究開始当初の背景

蕁麻疹は膨疹や浮腫性紅斑が出没するありふれた皮膚疾患であり、そのうち特に誘因なく皮疹が1ヶ月以上にわたって出没するものを慢性蕁麻疹と呼ぶ。その病態は、皮膚に存在する肥満細胞が何らかの機序で脱顆粒し、種々のケミカルメディエーターが真皮の血管や神経に作用して痒痒を伴う皮疹を生じさせることによる。蕁麻疹での肥満細胞の活性化機序としては、典型的なI型アレルギーとして肥満細胞膜上の高親和性IgE受容体やIgE抗体に対する自己抗体が証明されることもあるが、これらの抗体が検出される例は少数に留まり、慢性蕁麻疹での肥満細胞活性化の機序の詳細については不明な点が多い。

これまでに我々は、D-dimer と Fibrin degradation product (FDP)が慢性蕁麻疹の重症度に相関し、病勢に並行して変動することを報告した。また、海外の報告では慢性蕁麻疹患者の血漿ではトロンピン産生が亢進し、フィブリン分解により生じる D-dimerが増加し、皮疹部の炎症細胞に凝固開始因子である Tissue Factor (TF)が発現するとされる。TFは何らかの原因で血管が破綻した際に血中の第VII因子と結合して凝固反応を開始させ、慢性蕁麻疹の病態形成にも何らかの重要な役割を担っていることが示唆されている。我々は、予備的検討で一部の健康人の末梢血単核球を抗IgE抗体で刺激すると一過性にTFのmRNA発現が誘導されることを見出した。TF発現細胞の候補としては好酸球の可能性はあるが、これを否定する見解もある。白血球分画においてTFを発現する細胞、およびその発現が誘導される条件や機序については不明の点が多く、特に慢性蕁麻疹の増悪因子として知られる感染症やアスピリン投与がTF発現に及ぼす影響についてはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

健康人白血球分画を種々の条件下で抗IgE抗体または抗原で刺激し、mRNAレベル、蛋白レベルでTFの発現を検討する。抗IgE抗体または抗原は濃度と反応時間を種々に設定し、TF発現に必要な条件を検討する。白血球分画でTFの発現が確認できた場合は、感染症罹患時に上昇する炎症性サイトカインや、慢性蕁麻疹において増悪因子となるアスピリンで白血球分画を処理し、TF発現への影響を検討する。次に、抗ヒスタミン薬、ステロイド、抗ロイコトリエン薬などの蕁麻疹治療薬をin vitroで添加し、これらの反応に与える影響を観察する。また、慢性蕁麻疹患者の白血球分画を用いて健康人白血球分画と比較してTF発現とサイトカイン、Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)への感受性等に相違がみられるかを検討する。次に、刺激後の細胞を免疫染色

したり、白血球分画を構成する細胞を種々組み合わせて抗IgE抗体または抗原で刺激して、TF発現細胞を同定する。また、好塩基球由来のメディエーターのリコンビナント蛋白を用いてTF発現を確認し、TF発現に必要なメディエーターを特定する。in vivoの検討として、抗IgE抗体または抗原やそれまでの実験で特定した好塩基球由来のメディエーターをマウスの皮内に投与し、皮膚組織でのTF発現を観察する。これらによって、ヒト白血球分画におけるTF発現誘導因子とその機序を検討し、持続性の蕁麻疹における膨疹出現の直接的トリガーを同定することを目指す。

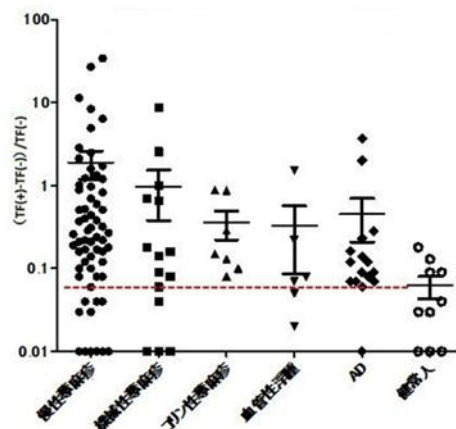
3. 研究の方法

慢性蕁麻疹、その他の蕁麻疹(機械性蕁麻疹、コリン性蕁麻疹、血管性浮腫)、アトピー性皮膚炎、健康人からそれぞれ採血し、末梢血単核球を分離した。それを用いてフローサイトメトリー(FACS解析)を行い、細胞表面のTissue Factor (TF)発現を解析した。

次に、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)を用いて、ヒスタミン、Lipopolysaccharide (LPS)のいずれか、あるいは両者を加えて刺激し、Tissue FactorのmRNAをリアルタイムPCR法で検出した。次に、ヒスタミンH1受容体拮抗薬(オロパタジン)、あるいはヒスタミンH2受容体拮抗薬(ファモチジン)で処理を行い、これらTissue Factorの発現が抑制されるかどうかを検討した。

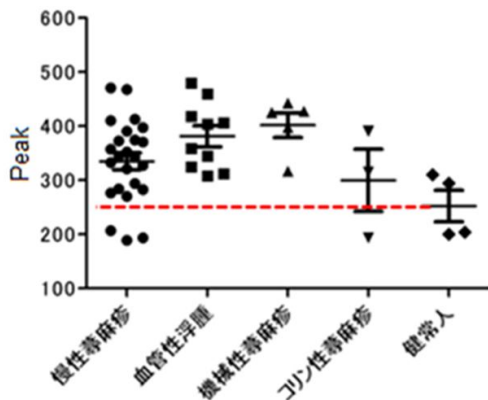
4. 研究成果

慢性蕁麻疹患者の末梢血単核球の表面を解析すると、多くの患者で健康人と比較してTissue Factor (TF)の発現が亢進していることがわかった(図1)



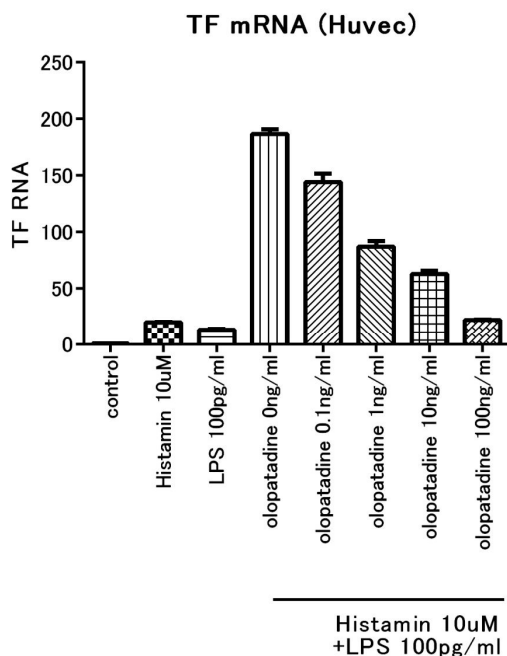
(図1)単球におけるTissue Factorの発現

慢性蕁麻疹の病態において、外因系の血液凝固能が亢進しているか否かを確認するため、トロンビン生成試験 (Calibrated automated thrombography, CAT) を行った。その結果、慢性蕁麻疹患者の血漿では、健康人にくらべ、Tissue Factor (TF)、Phosphatidyl serine (PS) の添加によって産生されるトロンビンの量が著しく増加していることが明らかになった(図 2)。この結果は、慢性蕁麻疹の病態では、外因系の血液凝固能が明らかに亢進していることを意味している。



(図 2) TF, PS 添加によるトロンビン生成

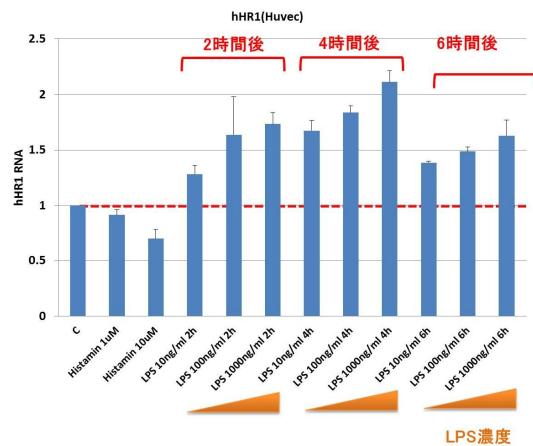
また、TF の発現細胞の候補としては、血管内皮細胞に着目した。血管内皮細胞において TF が発現するメカニズムについてはこれまでよく知られていなかったため、検討を行った。その結果、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Huvec) では、ヒスタミン、Lipopolysaccharide (LPS) による刺激によ



(図 3) ヒスタミン、LPS の刺激による TF 発現と抗ヒスタミン薬の影響

て TF の発現が認められること、またヒスタミン、LPS 両者による同時刺激によって相乗的に TF の発現が起こることを見出した(図 3)。さらに、この相乗的な TF の発現は、ヒスタミン H1 受容体拮抗薬での処理によって抑制されることがわかった(図 3)。一方で、ヒスタミン H2 受容体拮抗薬では抑制されないことも示唆された。これらのことから、ヒスタミン H1 受容体を介した反応であることが明らかとなった。

次に、Lipopolysaccharide による刺激後の血管内皮細胞におけるヒスタミン受容体の mRNA を検討した。その結果、刺激によりヒスタミン受容体の発現が亢進することがわかった(図 4)。



(図 4) LPS 刺激後の血管内皮細胞におけるヒスタミン受容体の発現

このことから、Lipopolysaccharide は血管内皮細胞のヒスタミンに対する感受性を増強させる可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 森桶 聡：慢性蕁麻疹におけるトロンビン生成ポテンシャルの検討. 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 金沢市. 2013 年 11 月 29 日

2. 森桶 聡：慢性蕁麻疹の病態と血液凝固の関わり. 第 65 回日本皮膚科学会西部支部総会学術大会. 鹿児島市. 2013 年 11 月 10 日

3.森桶 聡：蕁麻疹、血管性浮腫と凝固能異常．第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会．横浜市．2013 年 5 月 12 日

4.森桶 聡：単球における Tissue factor の発現亢進がみられた遺伝性血管性浮腫の 1 例．第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会．大阪市．2012 年 12 月 1 日

6．研究組織

(1)研究代表者

森桶 聡 (MORIOKE SATOSHI)
広島大学・病院(医)・病院助教
研究者番号：40536679