

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790926

研究課題名(和文)

免疫性血小板減少性紫斑病の新規マウスモデル作製とそれを用いた免疫病態評価

研究課題名(英文)

CD4+CD25+ regulatory T-cell deficient mice as a novel mouse model for immune thrombocytopenia

研究代表者

西本 哲也 (NISHIMOTO TETSUYA)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：90528316

研究成果の概要(和文):

本研究は、免疫性血小板減少症 (ITP) の新規マウスモデルを作製し、それを用いて免疫病態を評価することで ITP の病態メカニズムに基づいた新規治療法を確立することを目的とした。獲得免疫を制御する制御性 T 細胞 (Treg) を欠損したマウスを作製し、その血小板動態を検討した。その結果、ITP の病態形成における Treg の重要性が示され、それらを標的とした治療が ITP に対する新たな治療法となりえることが考えられた。

研究成果の概要(英文):

Purposes in this study are to investigate the role of Tregs in the induction phase of immune thrombocytopenia (ITP) in vivo using a novel mouse model and to develop a fundamental treatment based on the pathophysiology of ITP. We have found that a group of Treg deficient mice develop autoantibody-mediated thrombocytopenia. Our results together indicate that CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs play a critical role in preventing the development of murine autoantibody-mediated thrombocytopenia, in part, through CTLA4 engagement.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：免疫性血小板減少症、制御性 T 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

免疫性血小板減少症 (ITP) は、抗血小板抗体により血小板破壊が亢進し、血小板減少を呈する後天性自己免疫疾患である。日本における発症数は年間 3000 人、人口 10 万人当たりの有病率は 15～20 人程度である。予後は比較的良好だが、既存の治療に反応しない約 10% の症例では死亡率が 5～10% と高く、難治性疾患のひとつである。主な血小板破壊機序として、血小板膜表面に発現する糖蛋白 (glycoprotein: GP) である GPIb/IX や

GPIIb/IIIa を認識する抗血小板抗体が結合してオプソニン化された血小板が、網内系で Fcγ 受容体を介してマクロファージに補足・貪食される病態が考えられている。しかしながら、ITP の発症機転や病態については依然不明な点が多い。

現在までに、ITP に類似した病態を呈するマウスモデルがいくつか報告されている。自己免疫疾患モデルである雄性 (NZW/BXSB) F1 マウスは、4 ヶ月齢以降に抗血小板抗体の産生がみられ、血小板減少を自然発症する

(Oyaizu N・J Exp Med・1988)。このモデルは多彩な自己免疫現象の一つとして ITP 様の病態を認めるが、元来、全身性エリテマトーデスのモデルであり、発症に Y 染色体自己免疫促進遺伝子が関連することから、遺伝素因が少ないとされる ITP とは大きく異なる (Ida A・Eur J Immunol・1998)。ほかに、ラット血小板を特定系統のマウスに免疫することで、抗血小板自己抗体の産生と血小板減少を誘導できることが報告されているが (Musaji A・Exp Hematol・2004)、これは ITP というより輸血後血小板減少症のモデルと考えられている。

最近、ITP 患者では健常人と比較して CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞(regulatory T cell: Treg)の減少や獲得免疫の抑制能が低下していること (Yu J・Blood・2008)、治療により寛解の得られた ITP 患者では Treg の数が健常人と同等まで回復することが報告された (Stasi R・Blood・2008)。これらの報告から、ITP の病態に対する Treg の関与が推測されている。

## 2. 研究の目的

従来、ITP の病態解析に関する報告は主に患者検体を用いた *in vitro* の研究により得られてきた。しかしながら、患者検体を用いた解析では遺伝的背景の多様性や繰り返しの検体採取が困難であることなどの数々の制約があるため、ITP の発症機序や病態については依然として多くのことが未解明である。さらに、適切な疾患モデルがないため、*in vivo* での免疫病態評価ができず、新規治療法の開発に対する大きな障害となっている。そこで本研究では、これまで ITP 患者検体を用いた *in vitro* での解析により集積されてきた知見に基づいて、ITP の病態を的確に反映する新規マウスモデルの作製を試みる。さらに、確立した新規 ITP マウスモデルを用いて、*in vivo* における自己免疫応答の動的な解析や薬効検定を行い、新たな治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) Treg 欠損マウスの作製

BALB/c マウス(雌、8~11 週齢、日本チャールス・リバー)の末梢血、脾臓より比重遠心法で採取した単核球から、磁気細胞分離により CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞を回収した。その後、BALB/c nu/nu ノードマウス(雌、6~8 週齢、日本チャールス・リバー)の尾静脈から  $5 \times 10^6$  個または  $2 \times 10^7$  個の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞を移入し、Treg 欠損マウスを作製した。磁気細胞分離により回収した CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞の純度は 95%以上であった。作製したマウスは細胞移入後 8 週まで毎週、ITP 病態の評価を行った。

### (2) ITP 病態の評価

#### 血小板数

マウス眼窩静脈より採血した末梢血を FITC 標識ラット抗マウス CD41 モノクローナル抗体(clone MWReg30: Becton Dickinson)と反応させた後、FLOW-COUNT<sup>®</sup> Fluorospheres (Beckman Coulter)を加え、フローサイトメトリーを用いて、CD41<sup>+</sup>細胞と FLOW-COUNT<sup>®</sup> Fluorospheres との比により血小板数を測定した。

#### 網状血小板比率

末梢血を Retic-COUNT<sup>™</sup> Reagent (Becton Dickinson)と反応させた後、フローサイトメトリーを用いて、スキャッターで血小板領域に含まれる染色細胞の割合を網状血小板比率として測定した。

#### 血小板関連 IgG (platelet associated IgG: PAIgG)

末梢血を Alexa Fluor<sup>®</sup>488 ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体(Invitrogen)と反応させた後、フローサイトメトリーによりスキャッターで血小板領域に含まれる細胞の蛍光強度を MFI(mean fluorescence intensity)として測定した。コントロールには Alexa Fluor<sup>®</sup>488 ヤギ抗ヒト IgG ポリクローナル抗体(Invitrogen)を反応させた血小板を用いた。

#### 血小板減少マウスの定義

血小板数が正常値の 30%以下、網状血小板比率が 9%以上、PAIgG の MFI が 3 以上のとき、それぞれ血小板減少、網状血小板比率の増加、PAIgG の増加と定義した。

### (3) 脾細胞培養上清中における抗血小板自己抗体の検出

Treg 欠損マウスから比重遠心法で採取した脾細胞 ( $5 \times 10^6$  個/mL)を無刺激条件下で 4 日間培養し、その培養上清を回収した。その後、脾細胞の培養上清を正常 BALB/c マウス、GPIIb 欠損マウス(雌、8~11 週齢、トロント大学(Dr. Heyu Ni)より供与)、GPIIIa 欠損マウス(雌、8~11 週齢、Jackson Laboratory)から採取した血小板と反応させ、さらに Alexa Fluor<sup>®</sup>488 ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体を反応させた後にフローサイトメトリーで血小板の蛍光強度を測定した。

### (4) Treg 同時移植による ITP 病態の発症抑制効果の検討

Treg 欠損マウスの作製時に CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞 ( $2.5 \times 10^6$  個)を同時に移植する群としない群を作成し、細胞移植後 8 週まで ITP 病態の評価を行なった。磁気細胞分離により回収した CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞の純度は 85%以上であった。

一部の実験では、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞と CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞を同時に移入したマウスに対して、抗 CTLA 4 抗体(clone UC10-4F10-11: Bio X

cell)を細胞移入後 0、3、7、11 日に 250ug ずつ投与した。対照群には同量の isotype をマッチさせたコントロールの抗体 (Bio X cell) を投与した。抗体を投与したマウスは細胞移入後 8 週まで毎週、ITP 病態の評価を行った。

#### (5) Treg 移植による ITP 病態の治療効果の検討

Treg 欠損マウスの作製から 6 週後、血小板減少を認めたマウスに CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞 (2.5 × 10<sup>6</sup> 個) を移植し、さらに 6 週後まで隔週で ITP 病態の評価を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) Treg 欠損マウスにおける ITP 病態の評価

Treg 欠損マウスの作製後 3~4 週目に血小板減少を自然に発症するマウスが 69 例中 25 例 (36%) でみられた (図 1)。これらマウスでは網状血小板比率と PAIgG の増加を伴っていた。血小板減少は 1 ヶ月以上持続することを確認した。さらに、一部の血小板減少マウスは紫斑を呈した。これらのことから、Treg の欠損により ITP 病態が誘導されることが確認された。

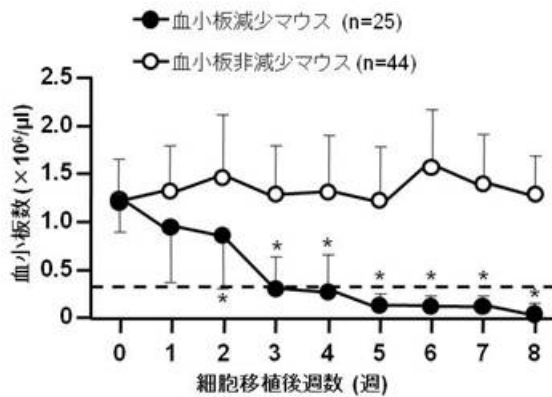


図 1 Treg 欠損マウスの ITP 病態評価  
Treg 欠損マウスの血小板数を経時的に観察した。それぞれの数値は平均 ± 標準偏差で表した。破線は血小板減少の定義を示す。\* = p < 0.01

#### (2) 抗血小板抗体の検出

血小板に結合する活性をもつ抗体を検出するため、脾細胞の培養上清を用いた検討を行った。血小板に結合したマウス IgG 量を MFI を用いて測定したところ、血小板減少マウスで有意な増加がみられた (MFI = 6.3 ± 8.2 vs 1.0 ± 0.1) (図 2)。これにより、Treg 欠損マウスの脾細胞の培養上清から native な血小板に結合できる抗血小板抗体の存在を確認した。このとき血小板非減少マウスの脾細胞培養上清中からは 1 例も検出されなかった。GPIb 欠損マウス血小板を抗原として用いたとき、大部分の培養上清では IgG の結合能が消失した (10 例 / 12 例)。また、GPIIIa 欠損マ

ウス血小板を抗原として用いたとき、10 例中 1 例のみに抗体の結合能の減弱を認めた。これらのことから、Treg 欠損マウスでみられる抗血小板抗体の主な対応抗原は GPIb であることが明らかとなった。また、ポリクローナルな抗体産生が起きていることが示された。

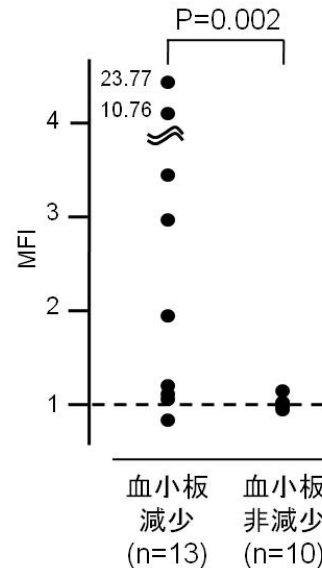


図 2 培養上清中に存在する抗血小板抗体の検出

正常マウス血小板を Treg 欠損マウスから採取した脾細胞の培養上清と反応させた後、血小板に結合したマウス IgG の量をフローサイトメトリーで検出し、MFI により定量化して比較検討した。

#### (3) Treg 欠損マウスにおける血小板減少の発症率規定因子

5 × 10<sup>6</sup> 個または 2 × 10<sup>7</sup> 個の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞を移入して作製した Treg 欠損マウスの血小板減少の発症率はそれぞれ 8% (2 例 / 24 例) または 36% (25 例 / 69 例) であり、移入細胞数に依存して血小板減少の発症率が有意に増加した。ITP 患者においては血小板に対する自己反応性 T 細胞が病態形成に重要な役割を果たしていることから、Treg 欠損マウスにおいても移入細胞中の血小板に対する自己反応性 T 細胞が血小板減少の発症率を規定していると考えられた。

#### (4) Treg 同時移植による CTLA-4 を介した ITP 病態の発症抑制効果

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞移植時に CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞同時移植の ITP 病態に与える影響を調べた。その結果、Treg 同時移植マウス (n=17) では血小板減少を認めなかった。一方、対照の Treg 欠損マウス (n=19) において血小板減少の発症を 6 匹 (32%) で認めた。血小板減少の発症頻度は 2 群間で有意に異なっていた。したがって、Treg は自己血小板反応性 T 細胞の抑制に寄与しており、ITP の発症抑制に重要な役割

を持つことが示唆された。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞と CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞を同時に移植したマウスに対して、抗 CTLA-4 抗体を投与したところ、19%(3例/16例)で血小板減少の発症を認めた。このとき、コントロール抗体を投与した群では血小板減少の発症を1例も認めなかった(0例/20例) (表1)。このことから、TregはCTLA-4を介してITP病態の発症を抑制していることが明らかとなった。

表1 抗CTLA-4抗体投与によるTregのITP病態発症抑制作用の阻害効果

(5)Treg移植によるITP病態の治療効果  
血小板減少を呈したTreg欠損マウスに

移植細胞	投与した抗体	血小板減少
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 細胞	抗CTLA-4抗体	3/16(19%)
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 細胞		
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 細胞	isotype control	0/20(0%)
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> 細胞		

\* P<0.05

Tregを移植し、6週間ITP病態を評価したところ、全例で血小板数の改善は認めなかった(0例/5例)。このことから、Tregの移植のみではITPの治療には不十分であ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3件)

1. Tetsuya Nishimoto. A critical role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in prevention of murine autoantibody mediated thrombocytopenia. The 52nd Annual Meeting of American Society of Hematology. Dec 6, 2010. Orlando, FL.

2. Tetsuya Nishimoto. A critical role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in murine autoantibody mediated thrombocytopenia. The 14th International Congress of Immunology. Aug 26, 2010. Kobe.

3. Tetsuya Nishimoto. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control murine autoantibody mediated thrombocytopenia. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Dec 2, 2009. Osaka.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

西本 哲也 (NISHIMOTO TETSUYA)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：90528316

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし