

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390108

研究課題名（和文） 炎症病態諸相における血小板ダイナミクスの解明

研究課題名（英文） Platelet function and dynamics in various phases of inflammation.

研究代表者 小野 栄夫 (ONO MASAO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 20302218

研究成果の概要：

血小板機能不全マウスを実験に利用して、様々なショック誘導や病態維持における血小板の機能を調べた。その結果、IgE 依存性アレルギーショックからの回復機能、エンドトキシンショックに対する促進効果、アドレナリンショックに対する促進効果が初めて明らかとなった。今後は各ショック関連の血小板由来因子、作用を明らかにし、血小板を標的とした新たなショック治療に繋げていく。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2008 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：血小板・炎症・自己免疫病・動物実験

1. 研究開始当初の背景

血管の破綻をきたす組織障害に対して凝集反応を起こし、止血、さらには様々な炎症性メディエーターを放出して障害部に炎症反応を惹起する、これは、最もよく知られている血小板の生理機能である。血小板は、遺伝子発現系を持たない細胞であるが、炎症メディエーター等の様々な生理活性因子を細胞内顆粒に蓄えており、これらが凝集反応に続いて障害部に放出されることによって、急性炎症反応から創傷治癒へ向けた一連の反応が開始される。一方、血栓形成や組織修復以外の観点からも、近年血小板機能は注目されつつある。それは自然免疫細胞としての役割であり、

獲得免疫系との連携にまで及ぶと考えられるようになった。

免疫異常を背景とする炎症性疾患の病態発生においても、血小板は何らかの役割を果たしていることは想定される。しかしながら、膠原病などのように、慢性かつ炎症の諸相が重なり合う病態経過の中で、血小板の病的役割を分離して明確に捉えることは困難であった。

2. 研究の目的

様々なショック病態における血小板の動態、炎症相別の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

ショック・炎症病態の誘導と評価

(1) 全身性即時型反応(systemic anaphylaxis, SA) と皮膚即時型反応(cutaneous anaphylaxis, CA)

野生型B6マウス(B6^{+/+})とカプチーノ変異型B6(B6^{cno/cno})に対して、抗TNP-IgEの受動感作後にTNP-OVAを投与して誘導する。CAは耳介部に誘導する。SAとCAの誘導に用いるIgEと抗原の投与量、投与法は定法に準じる¹。反応強度は、SAの場合は直腸温の低下で、CAの場合は耳介部厚やサイトカイン産生量(ELISA, RT-PCR)で評価する。

(2) エンドトキシンショック

B6^{+/+}とB6^{cno/cno}に対して、リポポリサッカライド(Klebsiella 03 strain LEN-1, S type)を投与して誘導する(Yamaguchi, et al, Biochim Biophys Acta 2006)。反応の強度は、既報に準じる(0, no symptoms of shock; 1, staggering; 2, crawling and prostration; 3, prostration and weak convulsions; 4, prostration and strong convulsions; 5, death)。遠藤らはエンドトキシンショック誘導系において、血小板が血中から速やかに消失し、末梢の組織において何らかの機能を果たしていることを示唆してきた(Yoshida, et al, Br J Pharmacol 2002)。B6^{cno/cno}において、何らかの異常が認められる可能性は高いと考えている。

(3) 関節炎モデル

野生型DBA/1マウス(DBA1^{+/+})とカプチーノ変異型DBA/1(DBA/1^{cno/cno})に対して、牛II型コラーゲンを2度免疫して誘導する。免疫法および関節炎の評価法は既報に準じる²。また、市販の関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテルキット(コンドレックス社, SA, USA)を用いて急性関節炎についても同様に検討する。

(4) 腎炎モデル

ウサギ抗基底膜抗体による誘発腎炎をB6^{+/+}とB6^{cno/cno}に誘導する。反応強度は、尿タンパクの定量と病理組織学的計測により行う。小野らのグループは、自然発症の急速進行性糸球体腎炎における半月体形成過程に、血小板機能が深く関わることをカプチーノマウスを用いて示した(Yoshida, et al, Arthritis Rheum 2006)。この実験腎炎は半月体形成を伴う腎炎モデルとして知られており、ここでもB6^{+/+}とB6^{cno/cno}の間に腎炎感受性の違いがあることは予想される。

血小板の機能に関する実験

A. 以上の誘導病態に関して、マウス系統2群間で差が見られた場合、血小板の移入実験や、炎症細胞と血小板との共培養実験を行う。

4. 研究成果

(1) IgE依存性の全身性ショックでは、反応の遅発相でCnoマウスの回復の遅れが顕著であった(図1)。しかし、皮膚反応ではこの差が明らかではなかった。

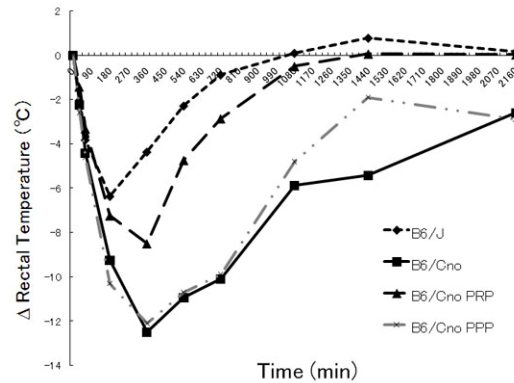


図1. IgEと抗原により誘導した全身ショック反応の時間経過。0時点で抗原(TNP化卵白アルブミン)を尾静脈より注入し、直腸温の低下(縦軸)でショック強度をモニタリングした。B6/Cno PRP: 野生型B6より得た血小板濃縮血漿(PRP)をカプチーノマウスに移入したマウス。B6/Cno PPP: 野生型B6より得た血小板除去血漿(PPP)をカプチーノマウスに移入したマウス。

全身反応の回復期において血小板機能の十分性を明らかにするため、血小板移入実験を行った。カプチーノマウスに見られた回復障害は、野生型マウス(B6)の血小板移入(PRP, platelet rich plasma)により、ほぼ完全に解消された。また、野生型の血漿成分輸液(PPP, platelet poor plasma)は無効であった(図1)。以上より、IgE依存性の全身ショックの回復には、血小板が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

次に、血小板が抗原刺激を直接受けるのか、あるいはマスト細胞などのIgEの活性型Fc受容体(FcεRI)を持つとされるアレルギー細胞の作用を間接的に受けているのか調べた。ヒトでは血小板の活性化に伴って細胞表面にFcεRIが表出することが分かっているが、マウスの血小板で、このようなことが起こるか否かは不明である。そこで、FcεRIの細胞膜表出が完全障害されているFcRγ鎖遺伝子欠損マウスの血小板を用いて、血小板移入実験を行った。このマウスの血小板はFcεRIが発現し得ないため、FcεRIを介した抗

原シグナルが血小板から直接導入されているか否かを厳密に評価できる。

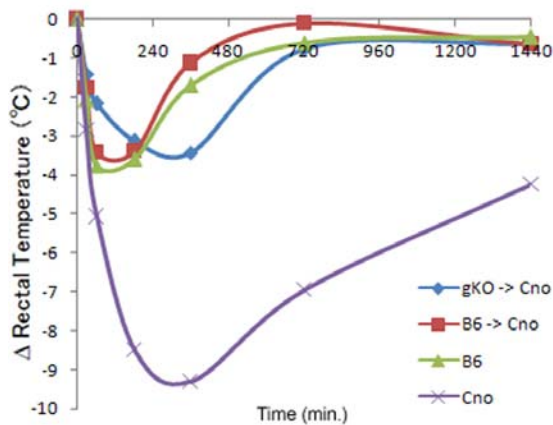


図2. IgEと抗原により誘導した全身ショック反応の時間経過。0時点で抗原(TNP化卵白アルブミン)を尾静脈より注入し、直腸温の低下(縦軸)でショック強度をモニタリングした。gKO->Cnoは、FcRγ欠損マウスより得た血小板濃縮血漿(PRP)をカプチャーノマウスに移入したもの。B6->Cnoは、野生型B6より得たPRPをカプチャーノマウスに移入したもの。

その結果、FcRγ鎖遺伝子欠損マウスの血小板は、野生型マウスの血小板と同様に、カプチャーノマウスのショック回復の遅れを解消することが判明した。すなわち、血小板はアレルギー抗原刺激を直接受け入れるのではなく、アレルギー抗原刺激に反応する他のアレルギー関連細胞に呼応して、ショック回復機能を果たしていることが明らかとなった。

現在、回復期における血小板活性化細胞、因子を検索中である。好塩基球とPAFが候補として挙げられている現状にある。

(2) エンドトキシンショックにおける血小板の役割について

カプチャーノマウスは、LPSショックに対して有意に抵抗性であった。詳細なメカニズムは検討中であるが、血小板が糖脂質のスカベンジャーの役割を果たしている可能性を考えている。

(3) 抗体誘導関節炎における血小板の役割について

血小板機能が、抗コラーゲン抗体誘導関節炎発症に対して促進的か抑制的かについては、一定したデータが得られなかった。ただし、2型コラーゲン免疫誘導関節炎に対しては、血小板は促進的に働くことが明らかであった。

現在のところ、関節において、血小板が炎

症反応を大きく修飾しているとは考えていない。

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(12)件

- ① Kuroishi T, Endo Y, Muramoto K, Sugawara S., Biotin deficiency up-regulates TNF- α production in murine macrophages., *J Leukoc Biol.* 83, 912-920, (2008) 有
- ② Kaneko I, Hishinuma T, Suzuki K, Owada Y, Kitanaka N, Kondo H, Goto J, Furukawa H, Ono M, Prostaglandin F(2 α) regulates cytokine responses of mast cells through the receptors for prostaglandin E., *Biochem Biophys Res Commun* 367, 590-596, (2008), 有
- ③ Mori S, Tanda N, Ito MR, Oishi H, Tsubaki T, Komori H, Zhang MC, Ono M, Nishimura M, Nose M., Novel recombinant congenic mouse strain developing arthritis with enthesopathy., *Pathol Int* 58, 407-414, (2008), 有
- ④ Chen S, Ndhlovu LC, Takahashi T, Takeda K, Ikarashi Y, Kikuchi T, Murata K, Pandolfi PP, Riccardi C, Ono M, Sugamura K, Ishii N. Co-inhibitory roles for glucocorticoid-induced TNF receptor in CD1d-dependent natural killer T cells., *Eur J Immunol*, 38, 2229-2240, (2008), 有
- ⑤ Zhang MC, Furukawa H, Tokunaka K, Saiga K, Date F, Owada Y, Nose M, Ono M, Mast cell hyperplasia in the skin of Dsg4-deficient hypotrichosis mice, which are long-living mutants of lupus-prone mice., *Immunogenetics*, 60, 599-607, (2008), 有
- ⑥ Yamamoto N, Kaneko I, Motohashi K, Sakagami H, Adachi Y, Tokuda N, Sawada T, Furukawa H, Ueyama Y, Fukunaga K, Ono M, Kondo H, Owada Y. Fatty acid-binding protein regulates LPS-induced TNF- α production in mast cells., *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 79, 21-26, (2008), 有
- ⑦ Tamai K, Toyoshima M, Tanaka N, Yamamoto N, Owada Y, Kiyonari H, Murata K, Ueno Y, Ono M, Shimosegawa T, Yaegashi N,

- Watanabe M, Sugamura K., Loss of hrs in the central nervous system causes accumulation of ubiquitinated proteins and neurodegeneration. *Am J Pathol*,173, 1806-1817, (2008),有
- ⑧Furukawa H, Kitazawa H, Kaneko I, Matsubara M, Nose M, Ono M., Role of 2B4-mediated signals in the pathogenesis of a murine hepatitis model independent of Fas and Valpha 14 NKT cells., *Immunology* 17, 1-8, (2008), 有
- ⑨Kuroishi T, Endo Y, Muramoto K, Sugawara S. Biotin deficiency up-regulates TNF-alpha production in murine macrophages., *J Leukoc Biol.* 83:912-920. (2008), 有
- ⑩Sato N, Kinbara M, Kuroishi T, Kimura K, Iwakura Y, Ohtsu H, Sugawara S, Endo Y. Lipopolysaccharide promotes and augments metal allergies in mice, dependent on innate immunity and histidine decarboxylase., *Clin Exp Allergy*.;37:743-751. (2007), 有
- ⑪Deng X, Wu X, Yu Z, Arai I, Sasano T, Sugawara S, Endo Y. Inductions of histidine decarboxylase in mouse tissues following systemic antigen challenge: contributions made by mast cells, non-mast cells and IL-1., *Int Arch Allergy Immunol.*;144:69-78.(2007), 有
- ⑫Yoshida A, Deng X, Sasano T, Takada H, Sugawara S, Endo Y. Oral bacterial lipopolysaccharide acts in mice to promote sensitisation to ovalbumin and to augment anaphylaxis via platelets., *Arch Oral Biol.*;52(10):990-994.(2007), 有
- [学会発表] (計 20 件)
- ①小野栄夫、即時型アレルギーの諸相を制御するメカニズム、第 97 回日本病理学会総会、2008 年 5 月 15-17 日、石川
- ②山下雅大 (小野栄夫)、Collagen代謝による特発性肺線維症病期分類の検討、第 97 回日本病理学会総会、2008 年 5 月 15-17 日、石川
- ③伊達文子 (小野栄夫)、褥初期に出現する CD34 強陽性細胞に関する免疫組織化学的検討、第 97 回日本病理学会総会、2008 年 5 月 15-17 日、石川
- ④神 幸希、小野栄夫 (笹野公伸)、肺非小細胞における女性ステロイドホルモンの受容体の発現、第 97 回日本病理学会総会、2008 年 5 月 15-17 日、石川
- ⑤T.Takahashi, M. Ono et al (R. Yoshida), Possible Involvement of Eosinophils in the Tumor Rejection from Mice by Specific Elimination of Tumor-associated Macrophages, 第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 20-22 日、東京
- ⑥金原正敬 (遠藤康男)、マウスにおけるニッケルアレルギー：交差反応および LPS のニッケル濃度におよぼす効果、第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 20-22 日、東京
- ⑦高橋春江 (遠藤康男)、マウスにおけるニッケルアレルギー：感作過程における各種微生物成分および炎症性物質の効果、第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 20-22 日、東京
- ⑧北沢博 (小野栄夫) 全身性受動的アナフィラキシー反応の感受性を規定する遺伝的要因の解析、第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 20-22 日、東京
- ⑨T.Kuroishi, Y. Endo (S. Sugawara), Modulation of IL-1 β production. 第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 20-22 日、東京
- ⑩四釜洋介 (遠藤康男)、Muramyl-dipeptide によるマウス組織における IL-1 β の産生：エンドトキシンショック増強ショックとの関連性、第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 20-22 日、東京
- ⑪X. Deng, Y. Endo (Y. Kiyoura), Alendronate augments the production of IL-1 β but not TNF α by macrophages stimulated by *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*. 第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 20-22 日、東京
- ⑫大泉丈史 (遠藤康男)、骨吸収抑制薬 bisphosphonates (BP) の壊死作用：窒素含有 BP (NBP) と窒素非含有 BP (non-NBP) の作用の違い、第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 20-22 日、東京
- ⑬愈志前、(遠藤康男)、Concanavalin A 肝炎の LPS 前投与による抑制：血小板とマクロファージの関与、第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 20-22 日、東京
- ⑭佐藤隆太郎、遠藤康男他 (菅原俊二)、ヒスタミン刺激によるヒト単球様細胞表面 NKG2D リガンド発現の抑制、第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 20-22 日、東京
- ⑮H. Furukawa (M. Ono), Fas-FasL axis-dependent syngeneic tumor rejection in MRL mice, 第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 20-22 日、東京
- ⑯M. Ono, (H. Furukawa), Genetic characterization of Concanavalin A-induced hepatitis in mice, 第 37 回

日本免疫学会総会、2007年11月20-22日、東京

- ⑰ R. Moloud (M. Ono), A spontaneous model for pulmonary arterial hypertension associated with OX40 ligand overexpression and genetic background in mice, 第37回日本免疫学会総会、2007年11月20-22日、東京
- ⑱ 北沢博 (小野栄夫)、マウス Concanavalin A 誘導肝炎の重症化を規定する遺伝要因の全ゲノム解析、第51回日本リウマチ学会総会、第16回国際リウマチシンポジウム (以下、リウマチ学会 2007)、2007年4月26-29日、横浜
- ⑲ 古川宏 (小野栄夫)、抗原の繰り返し投与による自己抗体産生と腎炎発症におけるT細胞の関与、リウマチ学会 2007、2007年4月26-29日、横浜
- ⑳ 丹田奈緒子、小野栄夫他 (能勢真人)、耳下腺炎を自然発症するリコンビナントコンジュニクマウスの検討、リウマチ学会 2007、2007年4月26-29日、横浜

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 栄夫 (ONO MASAO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 20302218

(2) 研究分担者

遠藤 康男 (ENDO YASUO)
東北大学・大学院歯学系研究科・非常勤講師
研究者番号 50005039

(3) 連携研究者

能勢 真人 (NOSE MASATO)
愛媛大学・医学部・教授
研究者番号 70030913