

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17692

研究課題名(和文)血小板による2型自然リンパ球依存的好酸球性気道炎症の制御メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of control mechanism of Group 2 innate lymphoid cells-dependent eosinophil airway inflammation by platelets

研究代表者

折茂 圭介(Keisuke, Orimo)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・研究員

研究者番号：50794369

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)：マウスを用いた実験で、血小板は、本来の止血作用にとどまらず、2型自然リンパ球(ILC2)に付着することで、ILC2が活性化して起こる好酸球を伴うアレルギー性気道炎症を増悪させる可能性があることが示唆された。また健康人においても、末梢血、鼻組織において血小板が付着するILC2が存在したことから、ヒトにおいても同様の現象が起きていることが強く示唆される結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喘息は、ステロイド吸入治療の浸透により、従来に比べてコントロールが容易になっている患者が増えている。その一方で、一部のステロイド不応性の重症喘息患者の治療に関しては、現在も注目が集まっており、抗体医薬などの新薬や新しい治療が模索されている。今回の研究により、喘息の病態形成に深く関わると考えられている2型自然リンパ球の活性化を血小板が付着によりサポートする可能性が示唆され、このメカニズムが喘息の重症化に関与する可能性もあることから、将来的な喘息治療の標的の一つになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In mice, platelets not only have hemostatic effects but may also exacerbate eosinophilic allergic airway inflammation caused by activation of group 2 innate lymphocytes (ILC2) by attaching to ILC2. In addition, the presence of ILC2 to which platelets adhered in peripheral blood and nasal tissue also in healthy subjects strongly suggested that the same phenomenon occurred in humans.

研究分野：呼吸器・免疫・アレルギー

キーワード：ILC2 platelet 2型自然リンパ球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血小板は、止血という生体に不可欠な作用の他に、免疫系に作用し、多くの炎症性疾患の病態に影響を与えていると考えられている。気道における慢性の好酸球性炎症(2型炎症)が主病態である喘息もその疾患の一つである。

好酸球の気道への浸潤、杯細胞の過形成、平滑筋の肥大などの喘息の病態の形成には IL-5 や IL-13 などの 2 型サイトカインが深く関与している。2 型サイトカインの産生源としては、従来は、抗原特異的に活性化する Th2 細胞が中心的役割を果たすと考えられてきた。しかし近年になり、気道上皮細胞から放出される IL-33 や、プロスタグランジンなどの脂質によって抗原非特異的に活性化する、自然リンパ球の 1 種である 2 型自然リンパ球(Group 2 innate lymphoid cells: ILC2)も大量に 2 型サイトカインを産生し、喘息の病態形成に深く関わっていると考えられるようになった。

血小板による気道の好酸球性炎症の制御について、「血小板は ILC2 の機能に影響を与えるのか、与えているならばどのように作用しているのか」は明らかになっておらず、本研究はここに焦点を絞り行った。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、血小板による ILC2 を介した気道の好酸球性炎症への作用メカニズムの解明である。

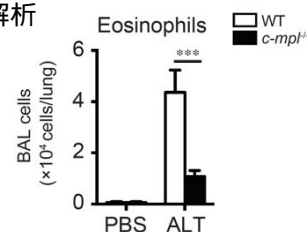
3. 研究の方法

トロンボポエチン受容体である MPL のノックアウトマウスでは血小板と巨核球が正常の 15% 程度まで減少している一方、他の免疫細胞には影響を及ぼさないとされていることから、このマウスを野生型マウスと比較し、空中浮遊真菌であるアルテルナリアを吸入したマウスモデルにおける血小板の影響について解析した。またマウスの肺において血小板の表面マーカーである CD41 が陽性となる ILC2 が存在するかを、フローサイトメトリーを用いて解析した。さらにマウス肺から CD41 が陽性あるいは陰性の ILC2 を細胞分離し、*ex vivo*での培養で活性化の違いなどを解析した。さらに RNA-seq を用いて、表現型の違いについても解析した。またヒト健康人における末梢血、鼻組織中の ILC2 についても CD41 発現の有無についてフローサイトメトリーと免疫染色を用いて解析した。

4. 研究成果

1) MPL ノックアウトマウスにおける好酸球性気道炎症の減弱

アルテルナリアを 4 日間吸入した後、気管支肺胞洗浄液を回収し解析したところ、好酸球数は MPL ノックアウトマウスで有意に減少していた(右図)。また組織学的にも気道周囲の炎症も減弱していた。さらに q-PCR や気管支肺胞洗浄液の ELISA でも、MPL ノックアウトマウスでは 2 型炎症が減弱していた。

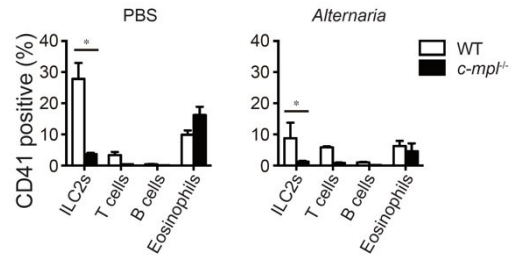


2) 血小板は ILC2 に付着する

マウス肺を細胞分離し、血小板の表面マーカーである

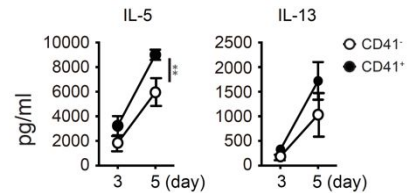
CD41 陽性の割合をフローサイトメーターを用いて解析したところ、ILC2 は他の免疫細胞と比較して高い割合で

CD41 陽性であった(右図)。またマウス肺の免疫染色を行うと、CD41 陽性の ILC2 と思われる細胞が存在し、これらの結果から血小板は ILC2 に付着していることが示唆された。



3) 血小板が付着した ILC2 は活性化しやすい傾向にある

マウス肺から分離した CD41 陽性 ILC2 は、陰性の ILC2 と比較して IL-2 と IL-33 の存在下で培養した場合、2 型サイトカインを多量に産生した(右図)。また細胞増殖についても CD41 陽性の ILC2 の方が活性化していることから、血小板の付着による ILC2 活性化のサポート効果が示唆された。

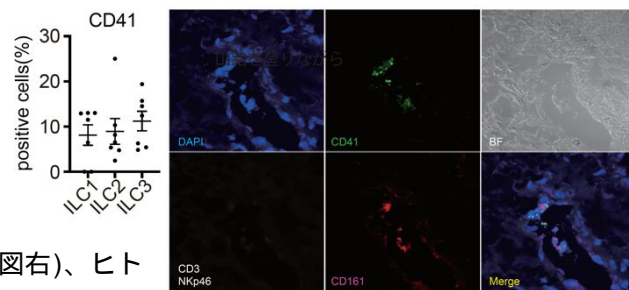


4) CD41 陽性、陰性の ILC2 は異なる表現型を示す

マウス肺から分離した CD41 陽性、陰性の ILC2 を用いて RNA-seq を行った。解析の結果、CD41 陽性、陰性で ILC2 は異なる表現型を示しており、上流のパスウェイ解析では ESR1 が有意な遺伝子として導かれたことから、エストロゲンの関与が示唆された。in vivoでのエストロゲンによる刺激では明らかな ILC2 の活性化の効果は検出できなかった。

5) ヒト組織でも CD41 陽性の ILC が存在する

健常人の末梢血中の PBMC において、CD41 陽性の ILC2 が存在することがフローサイトメトリーによって明らかになった(右図左)。また鼻組織の免疫染色において、CD41 陽性の ILC2 と思われる細胞が存在することから(右図右)、ヒトにおいても血小板が ILC2 に付着する現象は起こることがわかった。



上記の結果から、血小板が ILC2 に付着することで、ILC2 の活性化をサポートしていることは明らかになったが、その詳細なメカニズムについては、今回はまだはっきりとは明らかにできなかったため、今後研究を継続していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 折茂圭介
2. 発表標題 血小板はILC2に付着し、ILC2の活性化を介して好酸球性気道炎症の増悪に寄与する
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------