

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08301

研究課題名(和文)慢性蕁麻疹の病態における血液凝固系・補体系の役割解明と診断・治療標的の探索

研究課題名(英文)The role of coagulation and complement systems in the pathogenesis of CSU

研究代表者

柳瀬 雄輝 (Yanase, Yuhki)

広島大学・医系科学研究科(薬)・准教授

研究者番号：40452586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性蕁麻疹は明らかな誘因無く、6週間以上ほぼ毎日膨疹が繰り返し出現する疾患であり、何らかの刺激を受けた皮膚マスト細胞・好塩基球から放出されるヒスタミン等が、皮膚微小血管に作用して血管透過性を亢進し、膨疹を形成すると考えられているが、その発症機序は依然不明である。本研究では、慢性蕁麻疹の病態に、外因系血液凝固反応開始因子である組織因子(TF)が重要であること、さらに、その発現機序の詳細を明らかにした。また、慢性蕁麻疹の病態において、活性化補体、特にC5aが重要である可能性を示した。さらに、血管内皮細胞由来マイクロパーティクル(MP)が慢性蕁麻疹の診断に応用できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、慢性蕁麻疹の病態と、血液凝固反応・補体系の関係の一部を解明し、また、血液内物質が慢性蕁麻疹の診断に応用できる可能性を示した。本成果は、難治性慢性蕁麻疹の新しい治療薬の開発と診断法の開発につながるものと期待する。

研究成果の概要(英文)：Chronic spontaneous urticaria (CSU) is characterized by daily or almost daily recurring wheal and flare with itch for more than 6 weeks. The extrinsic coagulation system has been shown to be activated in correlation with CSU severity. However, detailed relationship between the pathogenesis of CSU and coagulation system has not been clear. We here clarified that tissue factor (TF), a trigger of the extrinsic coagulation cascade, expressed on vascular endothelial cells plays critical roles in CSU and activated complement, C5a, are also important for basophils and mast cells activation in CSU. Moreover, we demonstrated that micro particles (MP) released from vascular endothelial cells have important roles in the pathogenesis of CSU.

研究分野：アレルギー

キーワード：慢性蕁麻疹 血液凝固 補体 マイクロパーティクル

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性蕁麻疹は明らかな誘因無く、6週間以上ほぼ毎日膨疹が繰り返し出没する疾患であり、何らかの刺激を受けた皮膚マスト細胞・好塩基球から放出されるヒスタミン等が、皮膚微小血管に作用して血管透過性を亢進し、膨疹を形成すると考えられている。皮膚マスト細胞・好塩基球の活性化機序として、一部の患者ではマスト細胞・好塩基球膜上の高親和性 IgE 受容体や IgE 抗体に対する自己抗体が認められる。また、ストレスや感染症が増悪因子となる症例もあるが、慢性蕁麻疹の発症機序は依然不明である。近年、慢性蕁麻疹の病態に血液凝固系が関与することが報告されている。例えば、患者血漿では外因系凝固反応を介したトロンビン (IIa) 産生能が亢進していること、また、慢性蕁麻疹患者では、凝固産物であるフィブリンの分解により生じる D-dimer と FDP が上昇することが報告されている。また、ヘパリン、ワーファリン等の抗凝固剤により症状が抑制されることも報告されている。これらの知見は慢性蕁麻疹における膨疹形成に血液凝固系が関与することを示している。最近我々は、健康人に比べ、慢性蕁麻疹患者の末梢血単球に、外因系凝固反応の開始因子となる組織因子 (tissue factor: TF) が高発現していることを発見した。また、*in vitro* で、ヒト血管内皮細胞を、慢性蕁麻疹の増悪因子である lipopolysaccharide (LPS)、ヒスタミン、vascular endothelial growth factor (VEGF)、IL-33、tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 等を組み合わせて刺激すると、それぞれの単独刺激に比べ、相乗的に TF 発現が上昇することを見出した。また、これらの TF 発現細胞は、TF を発現するマイクロパーティクル (MP) を放出することも発見した。さらに、血管内皮細胞上に高発現した TF は、局所的に外因系凝固反応を駆動し、活性化凝固因子 (Xa、IIa 等) を産生すること、また、Xa、IIa は血管内皮細胞上の protease-activated receptor-1 (PAR-1) を介して、血管透過性を亢進することを突き止めた。さらに最近、TF を引き金として産生された Xa、IIa は、血漿中の補体成分である C5 を分解して C5a を産生し、皮膚マスト細胞・末梢血好塩基球の C5a 受容体 (C5aR) を介してヒスタミン遊離を引き起こす事を発見した。

### 2. 研究の目的

慢性蕁麻疹の病態において、皮膚マスト細胞や末梢血好塩基球を活性化される機構は未だ明らかでない。また、慢性蕁麻疹の程度を客観的に評価するマーカーもほとんど確立されていない。そこで本研究では、慢性蕁麻疹の病態における血液凝固系・補体系の役割に着目し、血液凝固系を指標とした慢性蕁麻疹の新しい評価法の探索と、血液凝固因子と補体が皮膚マスト細胞・好塩基球を活性化して膨疹を形成する機序を解明することを目的とした。慢性蕁麻疹の病態における血液凝固系と補体系の詳細な役割を解明できれば、血液凝固反応が関与する慢性蕁麻疹の程度を客観的に評価できる新しい診断法と、既存の治療薬とは異なる作用機序を持つ、新しい慢性蕁麻疹治療薬の開発に繋がると期待できる。

### 3. 研究の方法

本研究では、特に以下の3点について重点的に研究を行った。

- ①血管内皮細胞の相乗的 TF 発現における刺激時間解析
- ②慢性蕁麻疹患者好塩基球の C5a に対する応答解析
- ③血管内皮細胞由来マイクロパーティクルの TF 発現と凝固活性化能解析

血管内皮細胞として、ヒト臍帯血管内皮細胞 (HUVEC) を使用した。TF の mRNA、細胞内タンパクと細胞膜タンパク発現はそれぞれ、qPCR、ウェスタンブロット、フローサイトメトリ法で解析した。ヒト好塩基球の解析は採取後 24 時間以内の末梢血を使用した。凝固活性化能は ACTICHROME® TF (BIOMEDICA) を使って測定した。血管透過性の評価はインピーダンスセンサ (iCELLigence、スクラム社製) を使用した。マイクロパーティクルは遠心分離法により単離した。

### 4. 研究成果

- ①血管内皮細胞の相乗的 TF 発現における時間解析

これまでに申請者らは、慢性蕁麻疹の増悪因子である LPS、ヒスタミン、vascular VEGF、IL-33、TNF $\alpha$  等を組み合わせて同時に刺激すると、それぞれの単独刺激に比べ、相乗的に TF 発現が上昇することを見出してきた。しかしながら、実際の慢性蕁麻疹病態においては、これらの物質による刺激は同時に行なわれず、それぞれの刺激には時間差があると予想される。そこで本研究では、一回目の刺激を行った後、時間をおいて 2 回目目の刺激 (それぞれ別の刺激) を行った場合でも TF 発現の相乗効果が得られるのか検討した。また、この際の 1 回目目の刺激による準備状態をプライミング状態と呼ぶこととした。その結果、1 回目目の刺激後 20 時間程度は、徐々に弱まっていくもののプライミング状態が維持され、2 段階目の刺激に暴露された際に相乗的 TF の発現 (mRNA、タンパクレベル) が引き起こされることが明らかとなった。また、このように細胞膜上に発現した TF も、血液凝固反応の亢進とその後の血管透過性亢進を引き起こすことを明らかにした。これらの結果は、様々な時間かつ異なる箇所に出没を繰り返す慢性蕁麻疹の病態を良く反映したものであり、実際の病態においても重要なメカニズムであると考えられる。

本成果は *International Journal of Molecular Sciences* 誌 (2023;24(15):12388) に掲載された。

## ②慢性蕁麻疹患者好塩基球の C5a に対する応答解析

慢性蕁麻疹患者の好塩基球は IgE 受容体を介した刺激に応答しないノンレスポンダーの割合が健常人や他のアレルギー疾患よりも高い事が知られている。しかしながら、実際の慢性蕁麻疹病態においては、好塩基球の活性が重要であると考えられているにも関わらず、ノンレスポンダーの好塩基球がどのように活性化されているのかは不明であった。申請者らのこれまでの研究から、血液凝固反応の活性化に伴い産生される C5a が慢性蕁麻疹において重要である可能性が示されてきた。そこで本研究では、ノンレスポンダーの好塩基球に対する活性化補体 C5a 刺激の影響について検討を行った。その結果、IgE 受容体を介する刺激に応答しないノンレスポンダーの好塩基球であっても、C5a に対する反応性は維持されていることが明らかとなった。本成果は、ノンレスポンダーである慢性蕁麻疹患者においては、IgE 受容体を介した刺激よりも、C5a とその受容体である C5aR による刺激の方が重要であり、C5a 受容体を阻害する物質が慢性蕁麻疹の治療薬となり得る可能性を示唆している。本成果は *Frontiers in Immunology* 誌 (2022;13:994823) に掲載された。

## ③血管内皮細胞由来マイクロパーティクルの TF 発現について

これまでの研究から、慢性蕁麻疹の病態において血管内皮細胞が発現する TF が重要である可能性を示してきた。血管内皮細胞からは細胞外小胞であるマイクロパーティクル (MP) が恒常的に放出されていることが報告されている。そこで本研究では、HUVEC 細胞に TF 発現刺激を加えた際に、TF を発現する MP が放出されるか、また、それらは凝固反応を誘導し得るか検討した。その結果、TF 発現を誘導する刺激を加えた HUVEC からは TF を高発現する MP が放出されることを明らかにした。さらに単離した MP は、血液凝固反応とそれに次ぐ血管透過性亢進を起こし得ることを明らかにした。以上の結果から、TF 発現 MP も血液凝固反応や血管透過性亢進に関与しているため、慢性蕁麻疹の病態解明と血清由来 MP が診断に応用できる可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yanase Yuhki, Matsubara Daiki, Takahagi Shunsuke, Tanaka Akio, Ozawa Koichiro, Hide Michihiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Basophil Characteristics as a Marker of the Pathogenesis of Chronic Spontaneous Urticaria in Relation to the Coagulation and Complement Systems	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10320 ~ 10320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241210320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsubara Daiki, Kunieda Takuma, Yanase Yuhki, Takahagi Shunsuke, Uchida Kazue, Kawaguchi Tomoko, Ishii Kaori, Tanaka Akio, Ozawa Koichiro, Hide Michihiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Time Course of Priming Effect of TF Inducers on Synergistic TF Expression and Intra-Cellular Gap Formation of Human Vascular Endothelial Cells via the Extrinsic Coagulation Cascade	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12388 ~ 12388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241512388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Numata Tomofumi, Takahagi Shunsuke, Ishii Kaori, Morioke Satoshi, Kan Takanobu, Mizuno Hayato, Yanase Yuhki, Kawaguchi Tomoko, Tanaka Akio, Hide Michihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Immunological Changes of Basophil Hyperreactivity to Sweat in Patients With Well-Controlled Atopic Dermatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 883605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.883605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsubara Daiki, Yanase Yuhki, Ishii Kaori, Takahagi Shunsuke, Tanaka Akio, Ozawa Koichiro, Hide Michihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Basophils activation of patients with chronic spontaneous urticaria in response to C5a despite failure to respond to IgE-mediated stimuli	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 994823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.994823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Preninka Arini Isnani, Kuriya Karen, Yazawa Kyosuke, Yoshii Michiko, Yanase Yuhki, Jockers Ralf, Dam Julie, Hosoi Toru, Ozawa Koichiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Homocysteine causes neuronal leptin resistance and endoplasmic reticulum stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0278965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0278965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yanase Y, Hide M.	4. 巻 1
2. 論文標題 Living-cell analysis by surface plasmon resonance and its medical application.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Engineering.	6. 最初と最後の頁 Chapter7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Gimenez-Arnau Ana M., de Montjoye Laurence, Asero Riccardo, Cugno Massimo, Kulthanan Kanokvalai, Yanase Yuhki, Hide Michihiro, Kaplan Allen P.	4. 巻 9
2. 論文標題 The Pathogenesis of Chronic Spontaneous Urticaria: The Role of Infiltrating Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice	6. 最初と最後の頁 2195 ~ 2208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaip.2021.03.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yanase Yuhki, Takahagi Shunsuke, Ozawa Koichiro, Hide Michihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 The Role of Coagulation and Complement Factors for Mast Cell Activation in the Pathogenesis of Chronic Spontaneous Urticaria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1759 ~ 1759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10071759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柳瀬雄輝
2. 発表標題 慢性蕁麻疹における組織因子発現細胞・マイクロパーティクルの機能解明と診断への応用
3. 学会等名 第72回日本アレルギー学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳瀬雄輝
2. 発表標題 慢性特発性蕁麻疹の病態における凝・補体系の役割
3. 学会等名 第87回日本皮膚科学会東京支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 國枝 拓真、柳瀬 雄輝、松原 大樹、高萩 俊輔、小澤 光一郎、秀 道広
2. 発表標題 ヒト血管内皮細胞における相乗的組織因子発現に対する組織因子誘発物質の時間解析
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳瀬雄輝
2. 発表標題 慢性特発性蕁麻疹における血液凝固系と補体系の関係
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳瀬雄輝
2. 発表標題 基礎・臨床研究から解明する慢性特発性蕁麻疹の病態
3. 学会等名 第52回日本皮膚免疫アレルギー学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuhki Yanase, Yoshimi Matsuo, Tomoko Kawaguchi, Kaori Ishii, Koichiro Ozawa, Shunske Takahagi, Michihiro Hide.
2. 発表標題 Complement component 5 produced by coagulation factors induces histamine release from human skin mast cells and peripheral basophils
3. 学会等名 GA2LEN UCARE Urticaria Conference 2021（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------	---------