

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591472

研究課題名(和文)線溶系物質による樹状細胞機能の制御：炎症性疾患に向けた新たな治療コンセプトの提案

研究課題名(英文)Regulation of dendritic cell function by coagulation factors

研究代表者

伊藤 量基 (Ito, Tomoki)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70434826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：凝固因子である血液に多量に存在する血小板は、免疫システムの中心的存在である樹状細胞によるアレルギー性の炎症を増幅させることが*in vitro*の実験にて証明出来た。血小板は活性化によりRANKリガンドを発現し、DCによるTh2免疫応答を増強し、アレルギー性の炎症を増幅させることが判明した。凝固因子と免疫細胞のクロストークによる炎症病態の一つの機序の解明のみならず、抗血小板治療が、アレルギーにおける新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：There is an intimate link between the “immune-inflammatory response” and the “coagulation-fibrinolytic response”, which mutually interfere with each other. Platelets as coagulation factors are also potent immune cells that promote the inflammatory process through the expression of a wide variety of cytokines, chemokines, and TNF superfamilies. Platelets have the ability to enhance the DC-mediated Th2 response through RANK ligand expression and contribute to the allergic inflammation induced by DCs. Our study provides new insights in platelet functions and the possible mechanism of allergic responses that stem from DCs, and therefore, platelets would be a new therapeutic targets for the treatment of allergic disorders.

研究分野：血液免疫学

キーワード：樹状細胞 血小板 アレルギー CCL17 RANKリガンド

1. 研究開始当初の背景

外傷は生体バリアーの破綻であり、感染と出血を伴う。それゆえ生体にとっては、凝固止血系と感染防御が同時に稼働しなくてはならない。生体においては免疫系、凝固線溶系、神経内分泌系が連携を保ちつつその恒常性の維持に寄与しているが、外傷-感染-出血に際しては前二者の関与が大きく、生体の生存戦略として共に進化発達してきたと考えられる。凝固線溶系因子のうち、一般に凝固系物質は免疫システムを促進するペクトルに働き、向炎症反応を惹起する。組織損傷を伴う外傷や感染症・悪性腫瘍などをトリガーとして、組織修復レベルを上回るような血管内凝固反応が誘発されると、血栓形成による虚血性障害が惹起される。このような傷害によって遊離した内因性リガンドが免疫システムを活性化し、さらに感染に伴う外因性リガンドにより免疫応答が増強され、それらに呼応する形で凝固反応が促進するという悪循環が形成される。このように免疫炎症反応と凝固系反応が相互に干渉し合い暴走した病態が、播種性血管内凝固症候群 (DIC) あるいは全身性炎症反応症候群 (SIRS: 最近では DIC に関連する凝固障害を含めた広範な疾患概念を含む) である。一方、局所での凝固-炎症に対し、生体では打ち消すような力学がたえず働き恒常性を保とうとする。それが線溶系物質の存在である。なかでも血管内皮に存在するトロンボモジュリン (TM) は、血管内皮の炎症に伴う凝固・動脈硬化などに拮抗する抗炎症効果を有することが示唆されている。その観点から DIC 治療は「凝固」と「炎症」を併行して制御することに視点が置き換わっており、近年、遺伝子組み替え型 TM 製剤による治療は、従来のヘパリンによる抗凝固治療法を凌駕する成績を上げている。この治療効果は、TM の持つ抗炎症作用が重要なメカニズムと考えられているが、未だその詳細は不明である。

2. 研究の目的

この凝固止血-線溶系の持つ炎症-抗炎症効果を様々な免疫炎症病態に治療として何らかの形で応用することが出来ないか? そのために、本申請では、凝固線溶反応と免疫炎症反応の密接な関係に着目し、免疫炎症反応で中核の役割を果たす【樹状細胞】を標的とした実験モデルを構築し、その中で、凝固線溶系反応と免疫炎症反応の相互作用を明らかにするとともに、それを基盤として線溶系物質を用いた治療コンセプト確立のための基礎データの蓄積と新たな治療戦略を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本申請での研究計画の基本的な骨子は、以下の二つとする。免疫炎症反応系のマスター細胞【樹状細胞 (DC)】と凝固反応系の中心物質である【血小板】を対象とした研究手法を用いた。

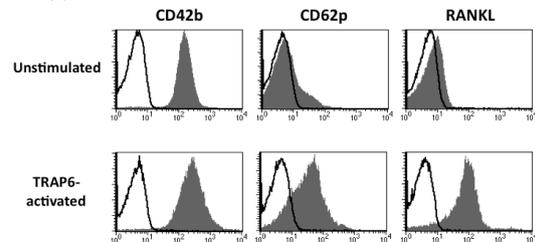
① *in vitro* における実験として、アレルギー

誘導サイトカインである胸線間質リンパ球増殖因子 (thymic stromal lymphopoietin: TSLP) を刺激物質として、ミエロイド系 DC サブセットを刺激し、活性化血小板との培養系を構築する。この実験系を用いて血小板とアレルギー誘導型樹状細胞との相互干渉メカニズムを解析する。解析手法として、血小板における TNF スーパーファミリー分子の発現と DC の成熟活性化度合いを CD40, CD80, CD86, CD83, の発現を指標としフローサイトメーターで解析する。また細胞上清における DC 由来 Th2 ケモカイン (CCL17) の量を ELISA 法を用いて明らかにする。

4. 研究成果

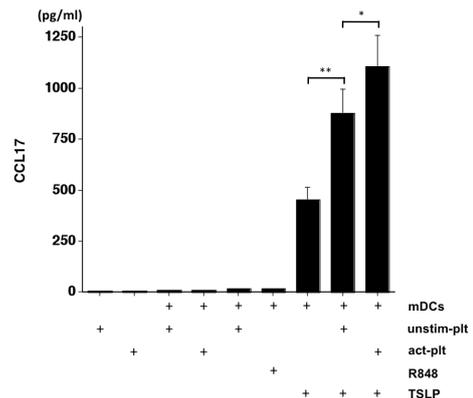
今回我々は新たに、活性化血小板が RANK リガンド (RANKL: Receptor Activator for Nuclear Factor B Ligand) を発現することを同定した (図 1)。RANKL は CD40 リガンドと同様に TNF スーパーファミリーの一つであり、活性化された T 細胞に発現し、DC の生存と成熟に寄与することが報告されている。

図1



この活性化血小板によって、DC の持つ CD40, CD83, CD86 は発現増強し、さらに TSLP と同時に活性化血小板を添加することによって、DC から産生される CCL17 は増加することも明らかにした (図 2)。

図2



また、RANKL 及び CD40L に対する中和抗体を用いることで、DC の持つ CD40, CD83, CD86 は発現増強が抑制され (図 3)、DC から産生される CCL17 は増加が抑制されることを確認した (図 4)。

したがって、血小板由来の RANKL は DC による Th2 免疫応答を増強し、アレルギー性の炎症を増幅させる可能性が示唆された。すなわち DC に由来する Th2 関連アレルギー応答に

において、血小板による新たな増幅機序の可能性が考えられた。血小板はそれ自身が止血凝固の維持に重要な役割を果たす細胞であると同時に、アレルギー性炎症の維持・増強にもかかわる因子とも言える。これらの知見から、凝固因子と免疫細胞のクロストークによる炎症病態の一つの機序の解明のみならず、抗血小板治療が、アレルギーにおける新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

図3

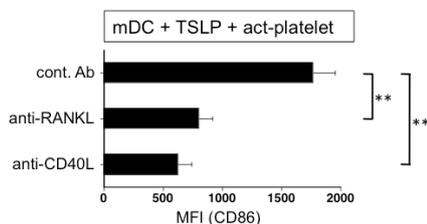
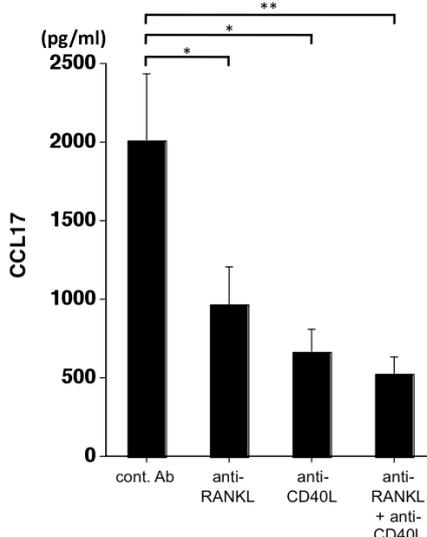


図4



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 3 件)

① Takahisa Nakanishi, Muneo Inaba, Noriko Inagaki-Katashiba, Akihiro Tanaka, Phan Thi Xuan Vien, Kayoko Kibata, Tomoki Ito, Shousaku Nomura

Platelet-derived RANK ligand enhances CCL17 secretion from dendritic cells mediated by thymic stromal lymphopietin.

Platelets. 27 :1-7. 2014. 査読有り
DOI: 10.3109/09537104.2014.920081

② Tomoki Ito

Anti-inflammatory effects of statins

=Novel investigation of the potent activity to human dendritic cell subsets as therapeutic cellular targets=

Cytometry Research, In Press. 査読有り

③ Tomoki Ito

血小板と樹状細胞の免疫クロストーク

Immune crosstalk between platelets and dendritic

cells

J. Japanese Society for Laboratory Hematology (日本検査血液学会雑誌)
13 :397-409. 2012. 査読無し

〔学会発表〕(計 6 件)

① 伊藤量基

スタチンの有する抗炎症効果

～ヒト樹状細胞サブセットを治療ターゲットとした新たな視点からの解析～(シンポジウム)

第 24 回日本サイトメトリー学会総会・関西医科大学(大阪・枚方市)・2014 年 6 月 28 日)

② 中西孝尚 伊藤量基 野村昌作
Platelet-derived RANK ligand enhances CCL17 secretion from dendritic cells mediated by thymic stromal lymphopietin

第 76 回日本血液学会総会・大阪国際会議場(大阪)・2014 年 10 月 31 日)

③ 中西孝尚 伊藤量基 野村昌作 血小板による新たな樹状細胞関連アレルギー性炎症の増幅機序

第 23 回日本樹状細胞研究会(京都国際会議場(京都)・2013 年 5 月 17 日)

④ Tomoki Ito, Shousaku Nomura

Platelets function as enhancers of the dendritic cell-mediated allergic response

XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis(オランダ・アムステルダム)・2013 年 7 月 1 日)

⑤ Takahisa Nakanishi, Tomoki Ito, Muneo Inaba, Shousaku Nomura

An intimate link between dendritic cells and platelets in the maintenance of allergic response.

XXVII Congress of the International Society for Advancement of Cytometry(ドイツ・ライプツィヒ)・2012 年 6 月 24 日)

⑥ 伊藤量基

血小板と樹状細胞の免疫クロストーク(招待講演)

第 13 回日本検査血液学会(大阪・高槻現代劇場)・2012 年 7 月 28 日)

〔図書〕(計 1 件)

伊藤量基

免疫応答における血小板と樹状細胞 先端医学社 2014 年 7 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

関西医科大学内科学第一講座 研究業績

<http://imed1.kmu-ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤量基 (ITO Tomoki)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70434826

(2) 研究分担者

野村昌作 (NOMURA Shosaku)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：20218358

(3) 連携研究者

()

研究者番号：