

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591660

研究課題名(和文)血小板により誘導される炎症の制御機構の解明とそれに基づく新規治療法の開発

研究課題名(英文)The role of platelets in the induction of immune tolerance to contact allergens

研究代表者

峠岡 理沙 (Mineoka, Risa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80464585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は低濃度アレルゲン反復塗布による免疫寛容モデルマウスを用いて、抗血小板抗体を投与して血小板数を減少させたマウスと血小板数が正常なマウスにおける免疫寛容の誘導について比較し、炎症制御機構における血小板の役割を検討した。血小板を減少した状態にすると、接触過敏反応における免疫寛容の誘導が抑制された。また低濃度アレルゲン反復塗布を行ったマウスの血中の血小板は活性化し、血小板から遊離される代表的な制御性サイトカインであるTGF- β が上昇していた。その一方で血小板減少マウスではそのTGF- β は低下していた。以上の結果より、血小板はTGF- β 遊離を介して免疫寛容の誘導に深く関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of platelets in induction of specific tolerance to contact allergens, using a mouse model of low zone tolerance (LZT), in which repeated epicutaneous applications of low doses of contact allergens prevent contact hypersensitivity (CHS). Low doses of hapten were repeatedly applied to murine skin, with or without platelet depletion by administering antiplatelet antibody, followed by sensitization and elicitation procedures. Under conditions at normal platelet count, the CHS response was decreased in mice with LZT compared with those in mice without LZT. Interestingly, platelet depletion reversed inhibition of CHS in mice with LZT. Furthermore, repeated low-dose skin exposure induced platelet activation and increased serum levels of TGF- β . Platelet depletion reduced serum TGF- β levels in mice with LZT. These results suggest that platelets are important for induction of Treg cells and immune tolerance via TGF- β release.

研究分野：皮膚科学、アレルギー学

キーワード：血小板 皮膚 アレルギー 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

血小板は多くの生理活性物質を有し、止血だけでなく炎症を含むさまざまな生体反応に深くかかわっている。血小板は膜表面に P-セレクチンなどの接着分子を発現して白血球や内皮細胞と接着し、また内部顆粒からさまざまな生理活性物質を遊離することによって白血球などを活性化し、炎症反応に深く関与している。申請者はこれまでに血小板が皮膚の炎症部位への白血球遊走において深く関与していることを初めて見出しており、血小板は血中での血小板表面の P-セレクチンを介した血小板白血球複合体形成と血管への接着、炎症局所での血小板からのケモカインなどの可溶性物質の遊離を介して即時型アレルギーの遅発相および慢性接触皮膚炎の白血球遊走に重要な役割を果たしていることなどを明らかにした (Tamagawa-Mineoka R et al, *J Allergy Clin Immunol*, 2009. Tamagawa-Mineoka R et al, *Am J Pathol*, 2007.)。

近年、血小板第 4 因子や TGF- β などのサイトカイン・ケモカインが制御性 T 細胞 (regulatory T cells: Treg) の分化・増殖が誘導することが報告されており (Liu CY et al, *J Immunol*, 2005;174:2680. Semple JW et al, *Nat Rev Immunol*, 2011;11:264) また血小板由来マイクロパーティクルがマクロファージの機能に対して抑制的に働くことが報告されている (Sadallah S et al, *J Immunol*, 2011;186:6543)。これらの物質は血小板から放出されるが、血小板により誘導される炎症の制御機構の研究について詳細にはまったく行われていない。

申請者は、代表的な炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎および乾癬患者の血漿中において、これらの血小板第 4 因子や血小板由来マイクロパーティクルが健常者に比べて有意に上昇しており、その値が疾患の病勢と相関関係を示すことを明らかにしている

(Tamagawa-Mineoka R et al, *Clin Immunol*, 2009. Tamagawa-Mineoka R et al, *J Am Acad Dermatol*, 2009. Tamagawa-Mineoka R et al, *Allegol Int*, 2008.)。したがって、アトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患では血小板から放出される血小板第 4 因子や TGF- β 、血小板由来マイクロパーティクルにより、Treg および制御性マクロファージなどによる炎症の制御機構が誘導されている可能性がおいに示唆される。しかし、免疫・炎症反応の制御機構における血小板の役割に関する研究報告はこれまでにほとんどみられていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、血小板により誘導される炎症制御機構について解明することである。

3. 研究の方法

(1) マウス : 6-8 週、オス。

(2) トレランス誘導 : トレランス誘導群では、マウスの腹部に、4.5 μg (低濃度) トリニトロクロロベンゼン (TNCB) / 15 μL アセトン・オリーブ油 (4:1) を隔日に 10 回塗布した。また、対照群では、マウスの腹部に 15 μL アセトン・オリーブ油 (4:1) を隔日に 10 回塗布した。

(3) 感作と接触過敏反応の惹起 : Day 20 (低濃度 TNCB 塗布開始を Day 0 とする) に、マウスの腹部に 450 μg TNCB / 15 μL アセトン・オリーブ油 (4:1) を塗布した。Day 25 に、マウスの耳介に 45 μg TNCB / 15 μL / 15 μL アセトン・オリーブ油 (4:1) を塗布した。また、対照群では、溶媒である 15 μL アセトン・オリーブ油 (4:1) を塗布した。

(4) 血小板除去 : 血小板減少群では、低濃度 TNCB 反復塗布の期間に、抗血小板抗体 (3 $\mu\text{g}/\text{g}$ bodyweight; ラット抗マウス CD42b 抗体, Emfret Analytics, Germany) を静脈注射することにより、血中の血小板を減少させた。対照

群にはコントロール抗体 (3 µg/g bodyweight; ラット IgG) を静脈注射した。

(5) 組織学的検討：ヘマトキシリン・エオジン染色、免疫染色 (ラット抗マウス Foxp3 抗体 (clone: FJK-16s, eBioscience)、ビオチン標識ウサギ抗ラット IgG 抗体、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアジピン、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride にて発色) を行い、皮膚組織に浸潤した白血球数、Treg 数を計測した。

(6) フローサイトメトリー：鼠径リンパ節からリンパ節細胞を採取し、得られた細胞における Treg の細胞表面および細胞内マーカー (CD4、CD25、FoxP3) の発現を検討するために、蛍光標識された各マーカーに対する抗体で染色を行い、フローサイトメトリーを用いて解析した。

(7) 統計学的解析：データは平均値 ± SD で示した。統計学的解析は、one-way analysis of variance followed by a Tukey multiple comparison test, paired Student *t*-test を用いて行った。P 値は 0.05 以下のときに有意と考えた。

4. 研究成果

(1) 血中の血小板数と白血球数

	血中血小板数 (/mL)	血中白血球数 (/mL)
抗血小板抗体投与前	9.32 ± 0.69 × 10 ⁸	6.21 ± 0.52 × 10 ⁶
抗血小板抗体投与後	1.08 ± 0.28 × 10 ⁸	6.03 ± 0.56 × 10 ⁶

低濃度のトリニトロクロロベンゼン反復塗布の期間に、抗血小板抗体を静脈注射することにより、上記のように、血中の血小板数は著しく低下した。血中白血球数は変化を認めなかった。

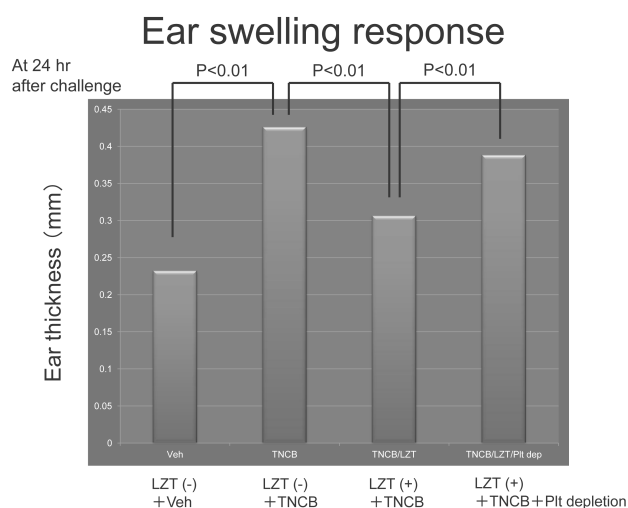
	血中血小板数 (/mL)	血中白血球数 (/mL)
感作時	9.05 ± 0.55 × 10 ⁸	6.59 ± 0.50 × 10 ⁶
惹起時	9.28 ± 0.41 × 10 ⁸	6.24 ± 0.62 × 10 ⁶

上記のように、感作時と接触過敏反応の惹起時には血小板数は低下せず、正常範囲内であった。血中白血球数は変化を認めなかった。

(2) 接触過敏反応の評価

TNCB 塗布による接触過敏反応を検討するために、TNCB 塗布 24 時間後の耳介の腫脹の変化について検討した。低濃度 TNCB 反復塗布 (Low-zone tolerance: LZT) を行うと、接触過敏反応は有意に減少した。

また、低濃度 TNCB 反復塗布 (LZT) の期間に抗血小板抗体を投与することにより、血中血小板を著しく減少させると、血中血小板数が正常のマウス群に比べて、接触過敏反応は有意に増強した。



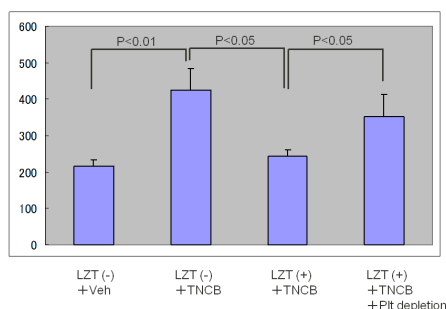
(3) 皮膚炎部位の白血球浸潤

TNCB 塗布による皮膚炎部位への白血球浸潤を検討するために、HE 染色標本を用いて、TNCB 塗布 24 時間後の耳介皮膚へ浸潤した白血球数を計測した。低濃度 TNCB 反復塗布 (Low-zone tolerance: LZT) を行うと、耳介の腫脹の変化と同様に、皮膚炎組織へ浸潤した

白血球数は有意に減少した。

また、低濃度 TNCB 反復塗布 (LZT) の期間に抗血小板抗体を投与することにより、血中血小板を著しく減少させると、血中血小板数が正常のマウス群に比べて、耳介の腫脹の変化と同様に、皮膚炎組織へ浸潤した白血球数は有意に増強した。

Number of cells infiltrating to skin



(4) 皮膚炎部位の Treg の割合

低濃度 TNCB 反復塗布 (LZT) の期間に抗血小板抗体を投与することにより、血中血小板を著しく減少させると、血中血小板数が正常のマウス群に比べて、皮膚炎組織での Treg 数は有意に減少した。

(5) 所属リンパ節での Treg の割合 (感作後)

低濃度 TNCB 反復塗布により誘導される所属リンパ節での Treg の割合を調べるために、鼠径リンパ節のリンパ節細胞における Treg の細胞表面および細胞内マーカー (CD4、CD25、FoxP3) の発現を調べた。結果は、上記のように、低濃度ハプテン反復塗布により所属リンパ節での Treg の割合は有意に増加していたが、低濃度ハプテン反復塗布期間に血中の血小板を著しく減少させると、Treg の割合は有意に低下していた。

(6) リコンビナント TGF-β投与

低濃度 TNCB 反復塗布 (LZT) および抗血小板抗体投与期間に、血小板から遊離される代表的な制御性サイトカインである TGF-βを投

与すると、対照の溶媒投与群に比べて、接触過敏反応は減弱視、免疫寛容の誘導が認められた。

(7) 研究結果のまとめ

今回の研究結果より、

過去の報告の通り、低濃度のハプテン反復塗布により抗原特異的な免疫寛容が導かれる。

トレランス誘導期間である低濃度ハプテン反復塗布期間に、血中の血小板を著しく減少させておくと、炎症制御機構が誘導されにくくなる。

その機序として、血中の血小板を著しく減少させることにより、皮膚炎組織への Treg 数が減少することが考えられる。

血中の血小板を減少している期間に、血小板から遊離される代表的な制御性サイトカインである TGF-βを投与すると、トレランスが誘導される。

上記について考えられ、血小板が炎症制御機構における Treg の誘導において重要な役割を果たしており、その機序として血小板から遊離される TGF-βが深く関与していると考えられる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Tamagawa-Mineoka R. Important roles of platelets as immune cells in the skin. J Dermatol Sci 77;93-101, 2015.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.10.003>

[学会発表](計1件)

Tamagawa-Mineoka R, Hiromi Mizutani, Risa Yasuike, Naomi Nakamura, Katoh N. Important role of platelets in the induction of low zone tolerance to contact allergens. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society

for Investigative Dermatology. Suita, Osaka.
December 12-24, 2014.

〔図書〕(計1件)

Tamagawa-Mineoka R, Katoh N. Platelets.
In: Kabashima K, editor. Immunology of the
skin, Tokyo: Springer Japan; in press. 査読有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

峠岡 理沙 (MINEOKA, Risa)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：80464585