

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460097

研究課題名(和文)慢性蕁麻疹病態における好塩基球と血液凝固反応の役割解明

研究課題名(英文)The role of basophils and coagulation reactions for pathology of chronic spontaneous urticaria

研究代表者

柳瀬 雄輝 (Yanase, Yuhki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・助教

研究者番号：40452586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性蕁麻疹の病態と血液凝固異常の関係が指摘されているが、局所における血液凝固反応の亢進とそれに次ぐ膨疹形成機構は明らかでない。本研究では、血管内皮細胞が発現する組織因子(TF)に着目し、ヒスタミン、微生物由来成分(LPS)によるTF発現機構の解明と血管透過性への影響を検討した。その結果、血管内皮細胞であるHUVECをヒスタミン、LPSで同時に刺激すると、相乗的にTF発現が増加することを見出した。また、発現したTFは、外因系凝固反応を駆動し、活性化凝固因子を産生すること、さらに、産生された活性化凝固因子は、血管内皮細胞のPAR1受容体に作用し、血管透過性を亢進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chronic spontaneous urticaria (CSU) is a common skin disorder characterized by daily recurring wheal and flare with itch in association with mast cell degranulation. Although the involvement of the blood coagulation cascade and infections in CSU has been suggested, the trigger of the coagulation cascade and the relationship of infections to wheal formation induced by mast cell degranulation are unclear. We here investigated the effect of histamine and LPS on tissue factor (TF) expression on endothelial cells followed by activation of the coagulation pathway and intercellular gap formation. Histamine released from basophils and LPS synergistically induced TF expression on human endothelial cells (HUVEC) via the histamine H1 receptor and TLR-4. Moreover, the synergistically expressed TF on HUVECs induced contraction and intercellular gaps between HUVECs in the presence of plasma. These reactions were inhibited by an antagonist against protease activated receptor (PAR)-1.

研究分野：アレルギー学

キーワード：慢性蕁麻疹 組織因子 好塩基球 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性蕁麻疹は、明らかな誘因無く膨疹が毎日繰り返して出現する疾患であり、肥満細胞から遊離されるヒスタミンが血管内皮細胞に作用して膨疹が形成されると考えられている。肥満細胞の活性化機序として、一部の症例では肥満細胞膜上の高親和性 IgE 受容体や IgE 抗体に対する自己抗体が認められる。また、疲労・ストレスや感染症などが増悪因子となる症例もあるが、多くの慢性蕁麻疹の発症機序は依然不明であり、治療では抗ヒスタミン薬に抵抗する症例も多い。

近年、慢性蕁麻疹の病態に血液凝固系が関与していることが報告されており、患者血漿ではトロンビンの産生が増強し、フィブリンの分解により生じる D-dimer が上昇する。さらに、病変部皮膚の炎症細胞に、凝固系を開始する因子である組織因子 (tissue factor:TF) が発現しているという免疫組織学的報告もある。すなわち、TF 発現によって駆動された凝固反応の結果産生されたトロンビンにより、安定化フィブリンが生じ、フィブリンは線溶系により分解されて、D-dimer を生じると考えられる。これまで我々は、血漿中の凝固関連分子である、D-dimer と Fibrin degradation product (FDP) が、慢性蕁麻疹の重症度に相関して上昇し、さらに *in vitro* での凝固進行速度が病勢に並行して変動することを見出した。また、一部の慢性蕁麻疹ではヘパリン、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が示されている。また、細菌やウイルス感染が慢性蕁麻疹の増悪因子となることも知られている。これらの知見は蕁麻疹における膨疹形成に凝固反応と微生物感染が密接に関与していることを示唆している。

しかしながら、どのような刺激により、どのような細胞が TF を発現し、発現した TF により開始された凝固系がどのようにマスト細胞を活性化し、膨疹を誘発するのか、さらにはどのような抗凝固活性が蕁麻疹の治療標的として適しているかなど、なお不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

TF 発現細胞として最近我々が見出した血管内皮細胞と、末梢血好塩基球の働きに着目し、好塩基球活性化により始まる血管内での TF 発現メカニズムの解明と、TF 発現により駆動される血液凝固系が血管透過性の亢進、その後のマスト細胞を含む免疫細胞を活性化する仕組みを解明することで、難治性慢性蕁麻疹の機序解明と新しい薬物治療ターゲットの探索に繋げる。

3. 研究の方法

TF 発現にはヒト臍帯血由来血管内皮細胞 (HUVEC)、ヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC) を使用した。血管内皮細胞に発現した TF は RT-PCR により mRNA レベルの発現、フローサ

イトメトリ法により細胞膜タンパクレベルの発現を確認した。細胞表面に発現した TF の外因系凝固反応駆動能は、外因系凝固因子 FVII、FX の活性化を比色法に検出可能な Actochrome TF activity assay kit を利用して測定した。血管内皮細胞同士の結合状態と血管透過性は免疫蛍光法と *in vitro* でリアルタイムに血管透過性亢進をモニタリング可能なインピーダンス法により評価した。

4. 研究成果

血管内皮細胞である HUVEC、HMVEC をヒスタミン、細菌由来成分である LPS (Lipopolysaccharide) でそれぞれ刺激すると、濃度依存的に TF の発現が増加することを見出した。さらに、HUVEC、HMVEC 細胞に対してヒスタミン、LPS の同時刺激を行うと、それぞれの刺激による発現量を足し合わせたよりもはるかに大きな TF 発現 (mRNA、膜タンパクレベル) の増加が認められた (相乗的 TF 発現増加)。

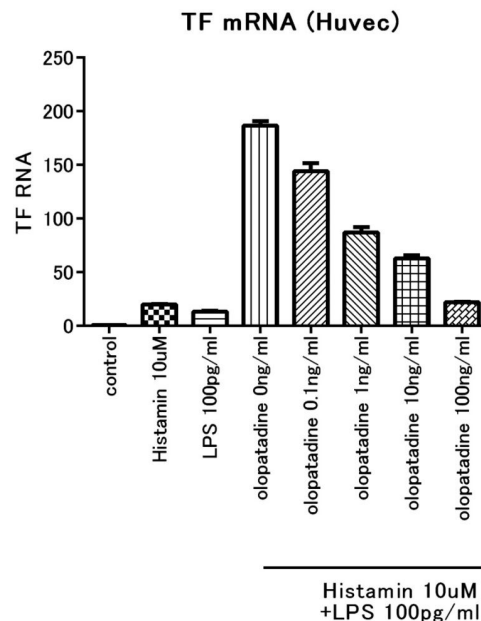


図1 TF 発現 (mRNA レベル)

血管内皮細胞に発現する TF は、ヒスタミン刺激、LPS 刺激単独でも発現するが、同時刺激によって有意に増強される。また、その発現はヒスタミン受容体遮断薬により抑制される。

さらにこの相乗的 TF 発現の増加は、H1 受容体拮抗薬であるオロパタジン、TLR4 シグナル伝達阻害薬である TAK-242 処理により、抑制されることを見出した。さらに、ヒト末梢血から分離した好塩基球と血管内皮細胞を共培養した状態で、好塩基球を活性化する刺激を与えると、血管内皮細胞の TF 発現が増加すること、またこの TF 発現は H1 受容体拮抗薬の処理により抑制されること、さらに LPS 存在下で相乗的に増強されることを明ら

かにした。以上の結果から、好塩基球から放出されるヒスタミンとLPS刺激は、それぞれ血管内皮細胞のH1受容体、TLR4受容体に作用し、顕著なTF産生を引き起こすことが示された。

次に、細胞上に相乗的に発現したTFが血液中で外因系凝固反応駆動し得るか検討した。Actochrome TF activity assay kitによりTF活性を解析した結果、血管内皮細胞をLPS、ヒスタミン単独で刺激場合に比べ、同時に刺激を行った場合、より大きな外因系凝固反応の駆動能があることが示された。以上の結果により、ヒスタミンとLPSの同時刺激を受けた血管内皮細胞は、相乗的にTFを発現し、その結果血液中で外因系凝固反応が駆動され、活性化凝固因子であるFVIIa、FXa、FIIa(トロンビン)を産生することが明らかとなった。

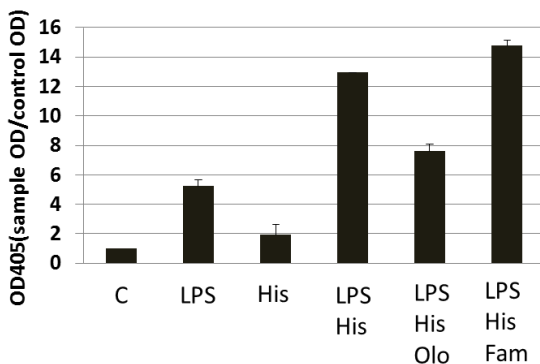


図2 膜発現TF活性(Actochrome法)
ヒスタミン、LPSで刺激した際に血管内皮細胞に発現するTFは、外因系凝固反応を駆動することができる。さらに、ヒスタミン(His)・LPS同時刺激により、その活性は増強される。また、その増強は、ヒスタミンH1受容体遮断薬(Olo; olopatadin)によって抑制されるが、H2受容体遮断薬(Fam; Famotidin)では抑制されない。

次に、血管内で産生された活性化凝固因子が血管透過性亢進を誘導し得るか検討した。その結果、外因系活性化凝固因子の内、FVIIaではなく、FXaとFIIaが血管内皮細胞の収縮と、細胞間結合の解離を誘導することが明らかとなった。また、この反応はProtease activated receptor(PAR)-1の拮抗薬(SCH79797)処理によって抑制されることを見出した。最後に、TFを相乗的に発現する血管内皮細胞にヒト血漿(凝固因子を含む)を加えた際に、細胞上に発現するTFが引き金となり、血漿中の凝固因子による凝固カスケードが駆動され、その結果産生された活性化凝固因子により血管透過性の亢進(血管内皮細胞の収縮と細胞間結合の解離)が認められるか検討した。その結果、TF発現細胞にヒト血漿(最終濃度1%)を加えると血管透過性が

亢進すること、また、加える血漿が外因系凝固反応に必要なXを欠損している場合、その反応は起こらないことを明らかにした。また、上記反応は凝固反応阻害薬であるヘパリンやPAR-1受容体の拮抗薬によって抑制されることを明らかにした。

以上の結果は、細胞上に大量のTFが発現すると、血液中で外因系凝固反応が駆動され、その結果生じた活性化血液凝固因子(FXa、FIIa)が血管内皮細胞上のPAR-1を介して血管透過性の亢進を誘導している可能性が示唆された。

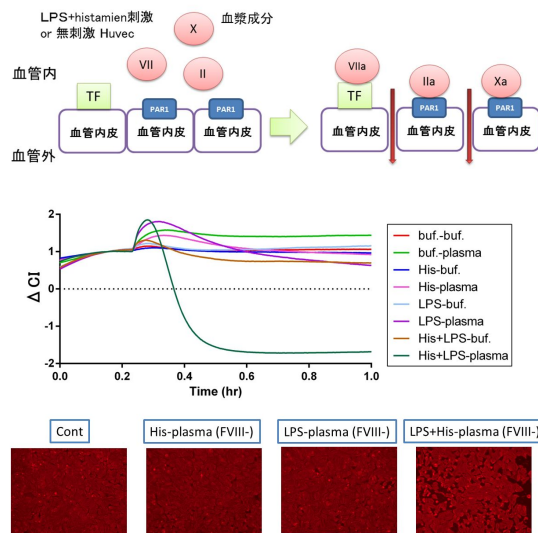


図3 血管透過性評価(蛍光観察法、インビードン法)
ヒスタミンとLPSの同時刺激により相乗的にTFを発現した血管内皮細胞は、ヒト血漿(上図中plasma)存在下で外因系活性化凝固因子を産生し、血管透過性を亢進させる。

近年、皮膚組織内のマスト細胞はPAR-2を発現し、そのリガンドにより活性化されヒスタミン等を放出することが報告されている。さらに、血液凝固因子であるFVIIa、FIIa、FIIaはPAR-2のリガンドとなることが知られている。そのため、本研究により明らかになった、血管内皮細胞上のTFが引き金となり誘発される血管透過性亢進により、皮膚組織に滲出した活性化凝固因子が皮膚組織内のマスト細胞のPAR-2を活性化し、さらに大量のヒスタミン遊離と大きな膨疹形成を誘導する可能性も十分に考えられる。本研究により得られた成果から以下のような慢性蕁麻疹発症仮説を立てることができる。慢性蕁麻疹病態において、末梢好塩基球の活性化(±細菌感染)() 好塩基球からの(少量の)ヒスタミン遊離() 血管内皮細胞のTF発現増強() 血液凝固系の駆動 活性化凝固因子FVIIa、FXa、FIIa(Thrombin)の産生() 活性化凝固因子の血管外漏出() 活性化凝固因子によるマスト細胞の活性

化と大量のヒスタミン遊離() 蕁麻疹の誘発()という、好塩基球活性化から始まる蕁麻疹誘発の新しい経路が明らかとなった。

これまでの研究では、血液凝固反応とアレルギー反応は切り離して考えられることが多かったが、本研究を通して血液凝固異常とアレルギー反応の密接な関係を証明することで、これまで解明されていなかった慢性蕁麻疹の発症・増悪サイクルの一端を明らかとなり、難治性アレルギー疾患である慢性蕁麻疹の病態解明、さらには効果的な新規薬物治療ターゲットの探索に繋がると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 10件)

Yuhki Yanase, Satoshi Morioke, Kazumasa Iwamoto, Takaaki Hiragun, Kazue Uchida, Tomoko, Kawaguchi, Kaori Ishii, Michihiro Hide Synergistic expression of tissue factor on vascular endothelial cells by histamine and LPS triggers the extrinsic coagulation pathway followed by vascular hyperpermeability The 19th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience 武田薬品研修所(大阪府吹田市) 2017年1月21日発表

柳瀬雄輝、入福令子、川口智子、内田一恵、秀道広 *In vitro*リアルタイム血管透過性評価法の開発 第20回日本ヒスタミン学会 倉敷市美術館(岡山県倉敷市) 2016年11月24日発表

柳瀬雄輝、内田一恵、川口智子、秀道広 慢性蕁麻疹の病態と外因系血液凝固反応の関係解明 第17回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 帝京大学(東京都板橋区) 2016年9月3日発表

柳瀬雄輝、川口智子、宇野重康、秀道広 インピーダンスセンサを利用した無標識・リアルタイム血管透過性評価法の開発 第77回応用物理学会秋季学術講演会 朱鷺メッセ(新潟県新潟市) 2016年9月15日発表

柳瀬雄輝、森桶聡、岩本和真、平郡隆明、内田一恵、秀道広 血管内皮細胞の組織因子発現に対する感染とヒスタミンの影響 第129回日本薬理学会近畿部会 広島県医師会館(広島県広島市) 2016年6月24日発表

柳瀬雄輝、中谷絵里子、厚味巖一、内田一恵、秀道広 血管内皮細胞と血管内皮細胞由来マイクロパーティクルの組織因子発現に対するLPSとヒスタミンの影響 日本薬学会第136年会 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016年3月28日発表

柳瀬雄輝 慢性蕁麻疹の病態における血液凝固反応の役割とオロパタジンの影響 第66回広島県皮膚科講習会 ホテルグランヴィア(広島県広島市) 2015年10月24日発表

柳瀬雄輝、森桶聡、岩本和真、平郡隆明、内田一恵、秀道広 慢性蕁麻疹病態と血液凝固反応の関係解明 第16回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 日本薬学会会長井記念ホール(東京都渋谷区) 2015年6月13日発表

柳瀬雄輝、森桶聡、岩本和真、平郡隆明、内田一恵、秀道広 血管内皮細胞の組織因子発現に対するヒスタミンの影響 第64回日本アレルギー学会学術大会 グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区) 2015年5月26日発表

柳瀬雄輝、森桶聡、岩本和真、平郡隆明、内田一恵、秀道広 血管内皮細胞組織因子発現に対するヒスタミンの影響 第18回日本ヒスタミン学会 都ホテルニューアルカイク(兵庫県尼崎市) 2014年10月10日発表

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://yyanase.hiroshima-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳瀬 雄輝 (YANASE, Yuhki)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：40452586