

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860882

研究課題名(和文)慢性蕁麻疹の病態における血液凝固系駆動機序の検討

研究課題名(英文)The analysis of the mechanism of blood coagulation system enhancement in chronic urticaria

研究代表者

森桶 聡 (Morioka, Satoshi)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：40536679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Lipopolysaccharide(LPS)は相乗的に血管内皮細胞のTissue Factor(TF)発現を増強した。この反応はヒスタミンH1受容体とtoll like receptor 4(TLR4)を介して生じた。単球や血管内皮細胞に発現したTFは外因系凝固反応を駆動し、それによって産生された活性化凝固因子が血管内皮細胞上のProtease activated receptor 1(PAR1)を介して血管透過性を亢進させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lipopolysaccharide(LPS) enhanced the expression of Tissue Factor(TF) on endothelial cells synergistically. This reaction occurred through histamine type 1 receptor and toll like receptor 4. TF expressed on monocytes or endothelial cells drove external coagulation system. We showed a possibility that the activated coagulation factors produced by external coagulation reaction enhanced vascular permeability through protease activated receptor 1(PAR1).

研究分野：医歯薬学

キーワード：蕁麻疹 血液凝固 Tissue Factor

1. 研究開始当初の背景

慢性蕁麻疹は膨疹や浮腫性紅斑が特に誘因なく1ヶ月以上にわたり出没する、実地臨床で遭遇する頻度の高い皮膚疾患である。膨疹を生じる機序としては、皮膚に存在する肥満細胞が何らかの刺激で脱顆粒し、ヒスタミンをはじめとする種々のケミカルメディエーターが真皮の血管や神経に作用することによる。

肥満細胞を活性化させる機序としては、肥満細胞膜上の高親和性 IgE 受容体または IgE 抗体に対する自己抗体が証明される症例もある。しかし、これらの抗体が関与しない症例も多く、すべてを 型アレルギーで説明することは困難で、慢性蕁麻疹における肥満細胞活性化の機序についてはいまだ不明な点が多い。

申請者らは、慢性蕁麻疹患者血漿ではその重症度に相関してフィブリンおよびその重合体の分解産物である Fibrin degradation product (FDP)および D-dimer が上昇し、その値は病勢に並行して変動すること、および研究協力者の櫻井らは、慢性蕁麻疹患者血漿では凝固の潜在力が亢進していること報告した。海外からは、慢性蕁麻疹患者血漿において D-dimer とともにトロンビン産生が亢進し、さらに皮疹部皮膚の炎症細胞には外因系凝固経路の開始因子である Tissue factor (TF) が発現していることなどが報告されている。TF は、本来組織中に発現していて何らかの原因で血管が傷害されると血液に暴露し、血液中の第 VII 因子と結合して凝固反応を開始する。しかし、そこにはさらに陰性荷電したリン脂質の会合が必要であり、血管の器質的障害を伴わない通常の慢性蕁麻疹の皮膚組織中の TF が、いかにして血漿中の VII 因子と反応するのか、また皮膚組織中で本当にさらなる凝固反応が進行するのかといった点については明らかにされていない。

申請者らは、慢性蕁麻疹患者の末梢単核球表面を解析し、多くの患者で健常人に比べて TF の発現が亢進していることを見出した。さらに、健常人末梢血から採取した単球を好塩基球と共培養して好塩基球を活性化すると、単球表面上の TF 発現量が増加することを見出した。また、臍帯血由来のヒト血管内皮細胞をヒスタミンで刺激した場合にも細胞膜上に TF が発現し、さらにその程度は微量の

lipopolysaccharide(LPS)存在下で相乗的に増加することを見出した(未発表データ)。これらの結果は、好塩基球の脱顆粒により遊離された微量のヒスタミンないしその他の活性物質の遊離と細菌感染が、相乗的に作用して血液凝固反応を駆動し、慢性蕁麻疹の病態を形成している可能性を示唆する。しかし、これらの一連の反応が皮膚肥満細胞を活性化するという直接的証明はなく、また、その分子機構も推測の域を出ていない。

本研究では血管内で血液凝固系を活性化する因子として血管内皮細胞と好塩基球に着目し、血液凝固系が駆動される機序について検討する。

2. 研究の目的

(1) 血液凝固反応に必要な細胞の同定：これまでの報告で、皮疹部組織内の好酸球、血管内皮細胞および末梢血単球が TF を発現すること、慢性蕁麻疹患者は血液凝固能が亢進し、実際少なからぬレベルのフィブリン形成が起きていることが明らかになったが、実際に凝固反応を駆動させる引き金となる TF はどの細胞により提供されるのか、またどの細胞の TF が凝固系カスケードを駆動することができるのかを検証する。

(2) ex vivo 凝固反応系の構築：上記の課題を解決するため、ヒト血漿または凝固に必要なすべての凝固因子を含む溶液と生細胞を混在させて凝固反応を起こす系を構築する。

(3) 血液凝固反応による肥満細胞の活性化機序の解明：上記 ex vivo の系を利用して凝固反応を起こし、肥満細胞が脱顆粒を起こす条件を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト皮膚血管内皮細胞をヒト好塩基球と共培養した状態で好塩基球活性化により血管内皮細胞表面に TF 発現が起こるか検討する。ヒト皮膚由来血管内皮細胞(DMEC)は ATCC 社より市販されているものを購入し、ヒト末梢血由来好塩基球は5人程度の健常人ボランティアより既報の方法により採取して抗 IgE

抗体および予め反応性を確認できたダニなどの抗原で活性化する。好塩基球を刺激後 15 分から 2 時間まで経時的に共培養系から好塩基球を吸引除去し、トリプシン処理により皮膚血管内皮細胞を回収して DMEC の TF 発現を検討する。TF 発現は定量 PCR、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリーにより確認する。

ヒスタミン、LPS で刺激を行い、どのようなシグナル伝達経路をへて TF 発現が起こるのかを各種受容体阻害薬を用いて検討する。LPS は、TLR4 がその受容体であることが知られている。阻害薬により関与が示唆された受容体ならびにその下流でシグナルを伝達する分子については RNAi の手法を利用して役割を確定する。さらに LPS による TF 発現における相乗効果のメカニズムについても解析する。

単球および血管内皮細胞に発現した TF が血漿成分の血管外漏出に寄与するかどうかを検討する。単球は lipopolysaccharide(LPS)等の Toll like receptor(TLR)リガンドにより TF の発現を増加され、また、血管内皮細胞は LPS とヒスタミンによって相乗的に TF の発現が増加される。これらの細胞に発現した TF が、外因系凝固反応を駆動し、その結果、血管透過性亢進が誘導されるかどうかを、血管内皮細胞の蛍光染色解析、及び細胞の接着状態を無標識、リアルタイムにモニタリングできるインピーダンス法によって評価する。

4 . 研究成果

まず好塩基球活性化によるヒト皮膚由来血管内皮細胞での TF 発現の検討を行った。その結果、mRNA、膜発現レベルにおいてヒスタミンと lipopolysaccharide(LPS)が相乗的に血管内皮細胞(Huvec)の TF 発現を増強していることがわかった。

また、ヒト正常皮膚微小血管内皮細胞 (DMEC) でも同様の結果が得られた。さらに、阻害薬を用いた検討ではこの反応がヒスタミン H1 受容体と toll like receptor 4(TLR4)受容体を介して生じ、各受容体の下流にあるプロテインキナーゼ C (PKC) と NFκB の作用が重要であることを見出した。また、ヒト末梢血由来好塩基球と血管内皮細胞を共培養して好塩基球を活性化させると、血管内皮細胞に TF 発現がみられた。

この TF 発現は、H1 受容体拮抗薬を加えると抑制された。なお、血管内皮細胞に発現した TF は血液凝固外因系を駆動し、活性化第

因子、および活性化トロンビンを生成することが明らかになった。単球および血管内皮細胞に発現した TF が血漿成分の血管外漏出に寄与するかどうかを検討した。単球は lipopolysaccharide(LPS) 等の Toll like receptor(TLR)リガンドにより TF の発現を増加され、また、血管内皮細胞は LPS とヒスタミンによって相乗的に TF の発現が増加される。これらの細胞に発現した TF が、外因系凝固反応を駆動し、その結果、血管透過性亢進が誘導されるかどうかを評価した。その結果、LPS、あるいはヒスタミン等の刺激により発現した単球・血管内皮細胞上の TF は、強く外因系血液凝固反応を駆動し、さらに、血液凝固反応によって産生された活性化血液凝固因子が血管内皮細胞上の Protease activated receptor 1(PAR1)を介して血管透過性を亢進させ、血漿成分の漏出、つまりは蕁麻疹の発現に寄与する可能性が示された。今後は、血管外に漏出した活性化凝固因子によるマスト細胞等の免疫担当細胞の活性化について検討を進めていき、さらなる機序の解明に取り組みたい。

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2件)

1.森桶 聡、秀 道広：蕁麻疹・血管性浮腫における血液凝固系の関わり. MB Derma、査読無、227 巻、2015、15-21

2.Iwamoto K, Morioke S, Yanase Y, Uchida K, Hide M: Tissue factor expression on the surface of monocytes from a patient with hereditary angioedema. J Dermatol、査読有、41 巻、2014、929-932、DOI 10.1111/1346-8138.12610.

[学会発表](計2件)

1.森桶 聡：凝固系と遺伝性血管性浮腫. 第 51 回補体シンポジウム. 2014 年 8 月 23 日. 神戸

2.森桶 聡：蕁麻疹の病態における凝固・線溶系のかかわり. 第 26 回日本アレルギー学会春

季臨床大会.2014年5月10日.京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

森桶 聡 (MORIOKE SATOSHI)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号：40536679