

皮膚の炎症反応・炎症後組織修復における血小板の役割の解明と 血小板機能制御による治療法の開発

京都府立医科大学大学院医学研究科皮膚科学

加藤 則人、峠岡 理沙

Accumulated evidences have suggested that platelets play versatile roles in variety of inflammatory reactions, but involvement of platelets in the homeostasis of dendritic cell re-distribution in cutaneous tissue after inflammation. Bone marrow-derived dendritic cells were conjugated with fluorescent and injected intravenously after 6 hours from elicitation of contact dermatitis in mice, with or without platelet depletion. The number of dendritic cells re-distributed in the cutaneous tissue was significantly reduced in platelet-depleted mice, which was recovered by intravenous restoration of platelet. However, intravenous restoration of platelet from P-selectin-deficient mice did not show this effect. These results suggest that platelets play important roles in re-distribution of dendritic cells after cutaneous inflammation and homeostasis.

1 緒言

古くから血小板は止血に必須の細胞であることが知られていたが、最近になって血小板はCD40リガンド、P-selectinなどの接着分子、ケモカイン受容体、Toll様受容体を細胞の表面に発現するほか、成長因子、サイトカイン、ケモカイン、セロトニンやマイクロパーティクルなど様々な活性物質を遊離することによって、炎症反応に関わっていることが次第に知られるようになってきた¹⁾。しかし、皮膚を反応の場とするアレルギー炎症における血小板の役割については、これまでほとんど検討されておらず、アレルギー性皮膚疾患の病態と血小板の関わりは不明であった。私たちは、これまでに活性化血小板が遊離するセロトニンがアトピー性皮膚炎患者で増加していること²⁾や、セロトニンが単球を活性化させて抗原提示能を増強させるとともにアポトーシスを抑制することで慢性炎症に関与していること²⁾、あるいはセロトニンによって免疫制御作用を有する樹状細胞への分化が誘導できること³⁾、さらには血小板減少マウスを用いた実験により、ハプテン繰り返し塗布によるアトピー性皮膚炎モデルマウスの炎症の成立に血小板が重要な役割を果たしていること^{4,5)}など、皮膚の炎症反応と制御における血小板の役割に関する研究結果を報告してきた⁶⁾。

皮膚のホメオスターシスの維持には、皮膚の抗原提示細胞である真皮樹状細胞やランゲルハンス細胞が重要な働きをしていることが知られている。皮膚炎に伴って皮膚の樹状細胞はリンパ管に遊走し、その後減少した樹状細胞を皮

膚組織に補うため末梢血から皮膚組織へ樹状細胞が供給されることが知られている。この現象にも末梢血中での樹状細胞と血小板との複合体の形成が重要な役割を果たしている可能性が推測されるが、この樹状細胞の皮膚組織への供給におよぼす血小板の役割はまだ検討されていない。そこで、蛍光で標識したマウス骨髄由来の樹状細胞を末梢血の血小板を著しく減少させたマウスに静脈注射して皮膚への樹状細胞の遊走動態を解析することにより、皮膚炎組織への樹状細胞の供給におよぼす血小板の役割を検討するとともに、血小板P-セレクチンの関与についても検討した。

2 実験

2.1 血小板減少マウスの作成

BALB/cマウスに抗血小板抗体を2日ごとに腹腔内投与することで、末梢血中の血小板を1000個/ μ l程度に減少させた。

2.2 接触過敏反応

BALB/cマウスの耳介に1% trinitrochlorobenzene (TNCB)を塗布して感作させ、7日後にマウスの耳介に1% TNCBを塗布することにより接触過敏反応を惹起させた。

2.3 マウス骨髄由来樹状細胞の調製と注射

BALB/cマウスの骨髄を採取し、骨髄細胞をGM-CSF存在下で培養し、樹状細胞を分化誘導させた³⁾。そして、培養して得られた樹状細胞(5×10^6)を5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA)で標識し、TNCB塗布24時間後のマウスに静脈注射した。

2.4 血小板補充

樹状細胞の静脈注射20分前にマウス血小板($7.5-8.0 \times 10^8$)を投与し、P-セレクチンを欠損した血小板の静脈注射は抗P-セレクチン抗体で処理した血小板またはP-セレクチンノックアウトマウス由来の血小板を用いた。



Role of platelets in cutaneous inflammation and tissue remodeling: therapeutic approach for allergic skin diseases via blocking platelet activity

Norito Katoh, Risa Mineoka

Department of Dermatology, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

2.5 皮膚組織採取

樹状細胞を静脈注射して、その6時間後に耳介皮膚を採取し⁴⁾、4%パラホルムアルデヒドで固定した。そして、OCTコンパウンドで包埋した後、凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡 (Biozero, Keyence) を用いて観察した。

3 結果

3.1 樹状細胞の皮膚への分布におよぼす血小板減少の影響

CMFDAで標識した樹状細胞を静脈注射して、その6時間後に耳介皮膚を採取し、蛍光顕微鏡を用いて皮膚組織でのCMFDA陽性細胞を観察した。血小板減少マウスでは、血小板数が正常なマウスに比べて、皮膚組織でのCMFDA陽性細胞数は有意に低下していた (図1)。

3.2 樹状細胞の皮膚への分布におよぼす血小板補充の影響

CMFDAで標識した樹状細胞を静脈注射する20分前に、血小板または溶媒である生食のみを血小板減少マウスに静脈注射すると、血小板を補充したマウスでは皮膚組織へ分布する樹状細胞数の増加を認めた (図2)。

3.3 樹状細胞の皮膚への分布におよぼす血小板 P-セレクトインの影響

P-selectinノックアウトマウスから得た血小板を投与した場合や、正常マウスから得た血小板を抗P-selectin抗体で処理してから投与した場合には、遅発相反応の回復

はみられなかった (図3) ことから、血小板上に発現したP-selectinが即時型過敏反応の遅発相において重要な役割を果たしていることが示唆された。

4 考察

血中の樹状細胞は、血管内皮細胞のP-セレクトインを介して循環血中から皮膚組織へ遊走することがこれまでに報告されていたが、今回の我々の研究結果より、血中での血小板上のP-セレクトインを介した樹状細胞との複合体の形成が、血中から皮膚組織への樹状細胞の遊走動態において重要な役割を果たしていることが示唆された。

我々は、ヒトのアトピー性皮膚炎⁷⁾やマウスを用いた抗原刺激による皮膚炎^{4,5)}において、末梢血中の血小板が活性化していることを既に明らかにしており、アレルギー性皮膚疾患において血中の活性化血小板が樹状細胞の遊走能に大きく影響している可能性が考えられる。

今後、樹状細胞の機能における血小板の役割を明らかにしていくことにより、血小板の活性制御が、接触皮膚炎やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性皮膚疾患の有用な治療法になることが期待できる。

(引用文献)

- 1) von Hundelshausen P, Weber C: Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ. Res.*, 100, 27-40, 2007.
- 2) Soga F, Katoh N, Inoue T, et al: Serotonin activates human monocytes and prevents apoptosis. *J. Invest.*

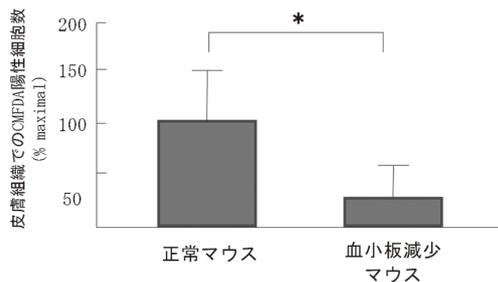


図1

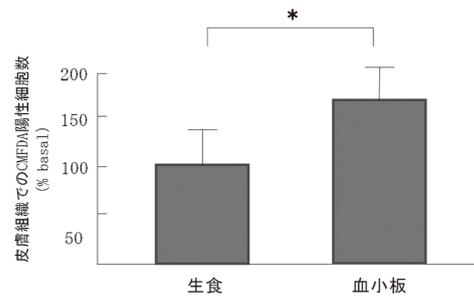


図2

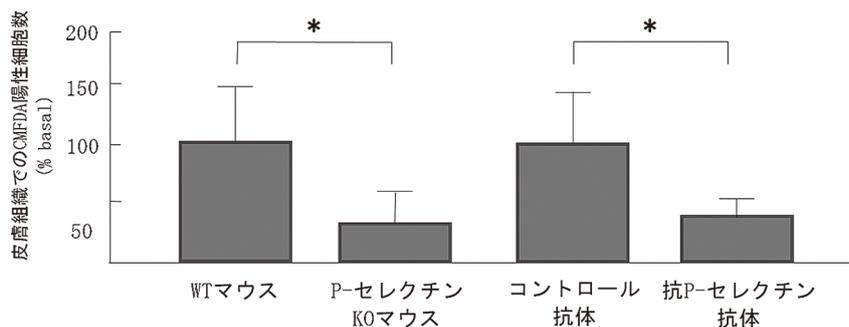


図3

- Dermatol, 127, 1947-55, 2007.
- 3) Katoh N, Soga F, Nara T, et al: Effect of serotonin on the differentiation of human monocytes into dendritic cells. Clin. Exp. Immunol., 146, 354-361, 2006.
 - 4) Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Ueda E, et al: The role of platelets in leukocyte recruitment in chronic contact hypersensitivity induced by repeated elicitation. Am. J. Pathol., 170, 2019-29, 2007.
 - 5) Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Kishimoto S: Platelets play important roles in the late phase of the immediate hypersensitivity reaction. J. Allergy Clin. Immunol., 123:581-7,2009.
 - 6) Katoh N: Platelets as versatile regulators of cutaneous inflammation. J. Dermatol. Sci., 53: 89-95, 2009 .
 - 7) Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Ueda E, et al: Platelet-derived microparticles and soluble P-selectin as platelet activation markers in patients with atopic dermatitis. Clin. Immunol., 131: 495-500, 2009.