

## (見本) この Form (A 3 で 1 枚、2 つ折)、ワープロで作製

(A 3 判)

### 論文内容の要旨

論文提出者氏名 堀田 恵理

### 論文題目

Platelets are important for the development of immune tolerance: possible involvement of TGF- $\beta$  in the mechanism

### 論文内容の要旨

血小板は、止血機能に加えて、CD40 リガンド、P-セレクトリンなどの接着分子、ケモカイン受容体、Toll 様受容体を細胞の表面に発現する他、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り、炎症反応に関わっていることが知られている。また制御性T細胞は、胸腺または末梢で分化し、自己免疫応答や非自己に対する免疫応答の抑制に関与している。末梢組織では、CD4<sup>+</sup>T細胞が TGF- $\beta$  や T 細胞受容体刺激などを受けることで、Foxp3 陽性制御性T細胞に分化することが報告されている。TGF- $\beta$  は血小板に最も多く含まれているサイトカインであり、TGF- $\beta$  が制御性T細胞の分化・増殖を誘導することが報告されているが、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は、これまでにほとんど行われていない。

今回我々は、血小板およびそれ由来の TGF- $\beta$  により誘導される炎症制御機構について説明することを研究の目的とした。低濃度のアレルゲンを反復塗布することにより、皮膚免疫寛容が誘導される (low zone tolerance: LZT) ことが知られており、その機序として CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞が関与していることが報告されている。

まず初めに、既報告の接触過敏反応での免疫寛容を誘導するプロトコールにしたがって、マウスの腹部に低濃度のハプテン (2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene: TNCB) を実験 0 日目から 14 日目まで隔日に 8 回塗布し、16 日目に感作、21 日目に耳介に惹起を行い、その 24 時間後に接触過敏反応を検討した。コントロール群ではアセトン・オリーブオイルを塗布した。接触過敏反応における免疫寛容が誘導されたかどうかを調べるために、耳介の厚さ、皮膚組織検査 (HE 染色、免疫染色)、所属リンパ節のフローサイトメトリーを行った。低濃度 TNCB を反復塗布することで、接触過敏反応は減弱し、皮膚炎組織への白血球浸潤数が減少し、皮膚炎組織および所属リンパ節中の制御性T細胞の割合が増加し、皮膚免疫寛容が誘導された。

次に、免疫寛容誘導における血小板の役割を検討するために、低濃度 TNCB 反復塗布の期間に、抗血小板抗体またはアイソタイプ抗体を 3 日に 1 回、0 日目から 12 日目まで合計 5 回投与した。抗血小板抗体の最終投与から 24 時間後に採血を行ったところ、抗血小板抗体を投与した群では、循環血液中の血小板数は投与開始前と比べ約 83% 減少しており、免疫寛容を誘導する期間中に循環血液中の血小板数が減少していることを確認した。この期

間中に抗血小板抗体を投与した群で、接触過敏反応は増強し、皮膚炎組織へ浸潤した白血球数が増加し、また皮膚炎組織および所属リンパ節中の制御性T細胞の割合が減少した。

次に、血漿中の TGF- $\beta$  の濃度について検討した。免疫寛容を誘導することで、コントロール群 (免疫寛容を誘導しない群) と比較し、血漿中 TGF- $\beta$  の濃度は増加したが、免疫寛容誘導の期間に抗血小板抗体を投与することで、血漿中 TGF- $\beta$  は有意に減少した。

さらに、免疫寛容誘導の期間における TGF- $\beta$  の影響を検討するために、低濃度ハプテンの反復塗布期間に、抗血小板抗体およびリコンビナント TGF- $\beta$ 1 をともに投与したところ、接触過敏反応は減弱し、皮膚炎組織への白血球浸潤数が減少し、制御性T細胞の割合が増加した。また、免疫寛容誘導の期間に抗 TGF- $\beta$  抗体を投与することで、接触過敏反応は増強し、皮膚炎組織への白血球浸潤が増加し、制御性T細胞の割合が減少した。

過去の報告では、特発性血小板減少性紫斑病の患者において、血漿中の TGF- $\beta$  濃度と制御性T細胞の抑制機能は、健康人よりも低下していたが、これらは治療後に改善した。また、慢性アレルギー接触皮膚炎モデルマウスにおいて、惹起時にリコンビナント TGF- $\beta$  を皮膚に投与した群では、皮膚炎組織における Foxp3 の数が増加し、抗 TGF- $\beta$  抗体を皮膚に投与した群では、皮膚炎組織における Foxp3 の数が減少していた。近年、血小板第 4 因子が、制御性T細胞の分化・増殖を誘導すること、血小板由来のプロスタグランジン E2 や IL-10 が、炎症を抑制することが報告されており、血小板由来の TGF- $\beta$  以外の因子が、炎症制御機構に関与した可能性もあるかもしれない。過去の報告および、今回の実験結果からは、血小板が炎症制御機構における制御性T細胞の誘導において、重要な役割を果たしており、その機序の一つとして、血小板由来の TGF- $\beta$  が深く関与していることが示唆された。