

Th1 型の免疫応答が ITP 病態の発症を促進する

○桑名正隆 西本哲也 慶應義塾大学リウマチ内科

【背景・目的】 これまでに、人為的に制御性 T 細胞 (Treg) を欠損させたマウスの約 35% が ITP 病態を自然発症することを報告し、ITP の発症に Treg が重要な役割を果たしていることを示した。しかしながら、ITP 病態を発症しないマウスも存在しており、Treg 欠損マウスにおいて ITP 病態の発症を規定する因子は明らかではなかった。そこで、今年度は ITP モデルマウスにおけるヘルパー T 細胞 (Th) のサイトカイン産生プロファイルに着目し、ITP の発症を促進する自己免疫病態の解析をおこなった。

【方法】 BALB/c マウスの脾細胞から CD4⁺CD25⁻細胞を分離し、同系ヌードマウスに移入することで Treg 欠損マウスを作製した。細胞移入 4 週後に血小板数が $0.33 \times 10^6/u1$ 以下となったマウスを ITP マウスと定義し、血小板減少を呈さなかったマウスをコントロールとした。Treg 欠損マウスから回収した脾細胞を用いて、フローサイトメトリーの細胞内染色により IFN- γ (Th1)、IL-4 (Th2)、IL-17 (Th17) を産生する CD4⁺細胞を検出した。また、Treg 欠損マウスの脾細胞から磁気細胞分離により CD4⁺細胞を分離後、マイトジェン存在下で 4 日間培養し、培養上清中に産生されたサイトカイン (IFN- γ 、IL-4、IL-17) 濃度をフローサイトメトリーにより測定した。さらに、脾細胞の培養上清を正常マウス血小板と反応させ、血小板に結合した IgG のサブクラスをフローサイトメトリーで解析した。

【結果】 ITP マウス 16 例とコントロールマウス 10 例を対象とした。細胞内染色では、ITP マウスにおいて CD4⁺T 細胞中における Th1 細胞の割合が増加していた ($P < 0.05$)。さらに、Th1/Th2 比、Th1/Th17 比が上昇していた (ともに $P < 0.05$)。脾細胞の培養上清中では、ITP マウスにおいて IL-4 濃度が低下していた ($P < 0.05$)。また、IFN- γ /IL-4 比、IFN- γ /IL-17 比が上昇していた (ともに $P < 0.05$)。細胞内染色による Th1/Th2 比と培養上清中の IFN- γ /IL-4 比は強く相関していた ($r = 0.84$, $P < 0.01$)。ITP マウスの脾細胞培養上清中に存在する抗血小板抗体のサブクラスは主に IgG_{2a} であったが、IgG₁ または IgG_{2b} を主に産生するマウスの存在も認められた。

【考察】 ITP マウスにおけるサイトカイン産生プロファイルや抗血小板抗体のサブクラスはある程度の多様性を認めたが、ITP 患者と同様に Th1 優位の免疫応答を示した。Th1 型の免疫応答が Treg 欠損マウスにおける ITP 病態の発症を促進する可能性が示唆された。

血小板減少症の病態解明と新しい治療戦略開発を目指した基礎的研究：
巨核球分化・血小板産生機構の解明

研究協力者：松原 由美子

巨核球・血小板の細胞運命決定に重要な転写因子はこれまで不明であったが、最近その因子として p45NF-E2、その結合因子である Maf G と Maf K を見いだした。具体的には、これら遺伝子をヒト皮膚繊維芽細胞に導入し、巨核球・血小板分化誘導培地で培養すると巨核球サイズの細胞の約 99%は CD41 陽性を示し、DNA ploidy や形態観察、血小板の機能検討の結果、p45NF-E2/Maf G/Maf K 遺伝子導入のヒト皮膚繊維芽細胞は巨核球・血小板に分化しうることを認めた。これら遺伝子を導入しないヒト繊維芽細胞は巨核球・血小板分化を認めなかった。本研究では、この知見を発展させ p45NF-E2/Maf G/Maf K 遺伝子導入のヒト皮膚繊維芽細胞の micro RNA を解析し、巨核球分化・血小板産生の遺伝子制御ネットワークの解明を行い、血小板減少に対する新たな診断法・治療法の提案につなげたい。

今回、ヒト皮膚繊維芽細胞と p45NF-E2/Maf G/Maf K 遺伝子導入のヒト皮膚繊維芽細胞 (day 2) の RNA を抽出し、3D-Gene (東レ) chip を用いて各サンプルの micro RNA を網羅的に解析した。その結果、約 1,700 解析因子中、遺伝子導入の皮膚繊維芽細胞で 6 因子が有意に増加、325 因子が有意な減少を示した。これら有意差を示した因子の中で、ヒト造血幹細胞から MEP 分化過程で減少することが知られている miR-130a の減少が認められた。この因子の標的は Maf B が知られ、既報では、miR-130a の減少による Maf B の発現量増加は integrin・IIb、GATA1、SP1、ETS1 発現を enhance することが報告されている。また、c-mpl 発現を調節する miR708、miR151 の減少も認められた。実際に c-mpl 発現はヒト皮膚繊維芽細胞では認められないが、p45NF-E2/Maf G/Maf K 遺伝子導入のヒト皮膚繊維芽細胞では認められた。

今回の micro RNA 発現解析の結果、p45NF-E2/Maf G/Maf K 遺伝子導入のヒト皮膚繊維芽細胞は、造血幹細胞で報告されている巨核球分化に重要である因子の発現調節を介して巨核球・血小板分化を示すことが示唆された。造血幹細胞や多能性幹細胞を用いる場合に比し、他の血球分化に関与する micro RNA のコンタミネーションは低いと考え、巨核球・血小板分化に特異的な micro RNA の検出、疾患の血中バイオマーカー検出に発展させて行きたい。

