



Expression of Toll-like receptors on human platelets

白木, 里織

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3434

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003434>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 3 0 】

氏 名・（本 籍） 白木 里織 （ 愛知県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1683号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年3月31日

【 学位論文題目 】

Expression of Toll-like receptors on human platelets
（ヒト血小板におけるトールライク受容体の発現）

審 査 委 員

主 査 教 授 堀田 博
教 授 上野 易弘
教 授 横野 浩一

[背景]

動脈硬化症は慢性炎症性疾患である。炎症は酸化ストレスやずり応力、感染症などによる血管障害に対する反応であり、近年、肺炎クラミジアなどの慢性感染症との関連が示唆されている。1992年、動脈硬化巣に肺炎クラミジアの菌体が顕微鏡的に検出されて以来その研究は盛んになり、近年 Sasu らにより、肺炎クラミジア熱ショック蛋白(heat shock protein, HSP)60による血管平滑筋の増殖には、トールライク受容体(Toll-like receptors, TLRs)を介していることが報告され、TLRsと動脈硬化性疾患との関連に注目が集まっている。

TLRsは自然免疫機構において最前線で活躍する抗原認識機構である。ヒトではTLR1からTLR10までの10種類が同定されている。これまでに、TLR1,2,4がヒトの動脈硬化血管に多く発現し、マクロファージ上のTLR4は酸化LDLにより発現が誘導される等の報告があり、TLRsと動脈硬化性疾患との強い関連がうかがわれる。

インターフェロンガンマ(interferon-gamma, IFN- γ)は、動脈硬化性疾患では末梢血単球・マクロファージの活性化や血管平滑筋細胞を増殖させ炎症反応を促進するサイトカインとして知られている。不安定プラーク内のCD4陽性Tリンパ球はIFN- γ を産生し、それにより活性化されたマクロファージは種々の蛋白分解酵素を産生し、それらはプラークの線維性被膜を菲薄化し、その結果プラーク破綻の原因となると推察されている。よって、急性冠症候群においてIFN- γ は重要と考えられている。

血小板は急性冠症候群における動脈内血栓症において中心的役割を果たしている。これまでの報告で、活性化した血小板はCD40 ligandを介して血管内皮上で炎症反応を引き起こすことが知られている。

これらの背景から、今回我々はヒト血小板上にTLRsが発現しているかどうかを検討し、認められたものについてIFN- γ がその発現に与える影響を検討した。

[方法]

培養細胞はTHP-1細胞(human monocytic leukemia cell line)とMeg-01細胞(megakaryoblastic cell line)を使用した。THP-1細胞をマクロファージに分化させる際には12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)を用いて100 ng/mlの濃度で24時間刺激した。

Meg-01細胞はIFN- γ を用いて0, 4, 40, 400 ng/mlの濃度で6時間刺激とIFN- γ 40ng/mlで0, 1, 6, 12, 24時間刺激を行い、そのTLRs mRNA発現量の変化を検討した。

血小板は駆血帯を外した状態で末梢静脈より採血し、acid-citrate dextrose buffer (ACD buffer: 85mM trisodium citrate, 71mM citric acid, and 111mM dextrose)と9:1で混和後、150g×20分間(室温)遠心し、白血球の混和を防ぐため、得られた多血小板血清(platelet rich plasma, PRP)の上半分のみを使用し、血小板を遠心分離した。末梢血単核球はLymphoprep®を使用し比重遠心法にて分離した。

冠動脈内血栓は急性冠症候群の治療をした患者より経カテーテル的に吸引し直ちにホルマリン固定を行った。

mRNA量の比較にはReverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法を用いた。

蛋白量の比較にはWestern blot法を用いた。Meg-01細胞表面のTLRs発現量評価にはFlow Cytometryを用いた。また、冠動脈内血栓上のTLRs発現の評価には蛍光免疫組織化学染色法を用いた。

[結果]

RT-PCR法にて血小板とMeg-01細胞におけるTLRs発現を評価したところ、TLR1とTLR6の発現を認めた。他のTLRsは認められなかった。IFN- γ は、これまでの単球についての報告と同様に、Meg-01細胞においても濃度・時間依存性にTLR1とTLR6のmRNA量を増加させた。Western blotによりTLR1とTLR6は蛋白レベルでも血小板、Meg-01細胞に発現が認められ、その発現量は血小板の方がMeg-01細胞より高値であった。Flow CytometryにてMeg-01細胞表面でのTLR1とTLR6の発現が認められた。その上、急性冠症候群患者の冠動脈内血栓の血小板上にTLR1とTLR6が発現していることが免疫組織化学染色法で示された。

[考察]

これまでに慢性感染症により動脈硬化性疾患が増悪するという報告が多数なされており、近年それらがTLRsを介することがわかってきた。動脈硬化病変でのTLRs発現報告はマクロファージや血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などであり、血小板での報告は今回が初めてである。動脈硬化病変の進展のみならず急性冠症候群へのTLRsの関与を示唆するものである。しかし、これまでの報告はTLR2,TLR4に関するものが大半であり、今回のTLR1,TLR6に関する報告は少ない。TLR1,TLR6に対する単独のligandや作用機序には不明な点が多く、その機能的な解析が今後必要と考えられる。

[結論]

今回我々は、ヒト血小板とMeg-01細胞にTLRsが発現していることを初めて証明した。これは、血小板自体がTLRsを介した抗原認識機構をもち、感染性の炎症と動脈硬化性疾患・急性冠症候群との関連に新しい機序の可能性を示したものである。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1684 号	氏 名	白木 里織
論文題目	Expression of Toll-like receptors on human platelets ヒト血小板におけるトールライク受容体の発現		
審査委員	主 査 堀田 博 副 査 上野 易弘 副 査 横野 浩一		
審査終了日	平成 17 年 5 月 18 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

動脈硬化症は慢性炎症性疾患である。炎症は酸化ストレスやずり応力、感染症などによる血管障害に対する反応であり、とりわけ近年、慢性感染症との関連が示唆されている。1992年、動脈硬化巣に肺炎クラミジアの菌体が顕微鏡的に検出されて以来その研究は盛んになり、その機序の一つとしてToll-like receptors (TLRs)の関与の可能性が報告されている。

TLRsは自然免疫機構において最前線で活躍する病原体認識機構である。ヒトではTLR1からTLR11までの11種類が同定されている。これまでに、TLR1, 2, 4がヒトの動脈硬化血管に多く発現し、TLRsと動脈硬化性疾患との強い関連が伺われ注目されている。

インターフェロンガンマ (IFN- γ)は、動脈硬化性疾患では末梢血単球・マクロファージを活性化し、血管平滑筋細胞を増殖させて、炎症反応を促進するサイトカインとして知られている。不安定プラーク内で産生されたIFN- γ により活性化されたマクロファージは種々の蛋白分解酵素を産生し、プラークの線維性被膜を菲薄化し、その結果プラーク破綻させると推測されている。従って、急性冠症候群においてIFN- γ は重要であると考えられている。加えて、血小板は急性冠症候群における動脈内血栓症において中心的な役割を果たしている。

このような背景から、本学位申請者は、ヒト血小板上にTLRsが発現しているか否かについて検討し、発現が認められたTLRsについてIFN- γ が及ぼす影響について解析した。

その結果、以下の事が明らかとなった。まず、Reverse Transcription-PCR法を用いて、ヒト末梢血由来血小板とヒト巨核芽球由来株細胞であるMeg-01細胞におけるTLRsの発現を調べたところ、TLR1とTLR6が発現していることがわかった。他のTLRsの発現は認められなかった。Meg-01細胞をIFN- γ で処理すると、単球についての報告と同様に、IFN- γ 濃度と処理時間依存性にTLR1とTLR6のmRNA量が増加した。Western blot法により、TLR1とTLR6は蛋白レベルでも血小板とMeg-01細胞に発現する事が認められ、その発現量は血小板の方がMeg-01細胞より高値であった。Flow Cytometryを用いた解析でもMeg-01細胞表面でのTLR1とTLR6の発現が認められた。さらに、免疫組織化学染色法を用いて、急性冠症候群患者の冠動脈内血栓の血小板上にTLR1とTLR6が発現していることを明らかにした。

これまでに慢性感染症により動脈硬化性疾患が増悪するという報告が多数なされており、近年、それらが TLRs を介することがわかってきた。動脈硬化病変で TLRs が発現する事が報告されているが、それらはすべてマクロファージや血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などについて解析したものであり、血小板において TLRs が発現していることを見いだしたのは、今回の本申請者の研究が初めてである。この研究成果は、動脈硬化病変の進展のみならず急性冠症候群への TLRs の関与を示唆するものである。これまでの TLRs の研究では TLR2, TLR4 に関するものが大半であり、本申請者が解析した TLR1, TLR6 に関する報告は少ない。TLR1, TLR6 に対する単独の ligand や作用機序には不明な点が多く、その機能的な解析が今後必要と考えられる。

以上、本研究は、ヒト血小板と巨核芽球由来の Meg-01 細胞に TLR1 と TLR6 が発現していることを初めて証明し、それらの発現が IFN- γ により亢進することを明らかにしたものである。このことは、血小板自体が TLRs を介した病原体関連分子パターン認識機構を有しており、感染性の炎症と動脈硬化性疾患・急性冠症候群との関連を合理的に説明する新しい分子機序の可能性を提唱したものであり、価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。