

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08421

研究課題名(和文)好酸球のM-CSF産生に関する研究

研究課題名(英文)Production of M-CSF by human eosinophils

研究代表者

松本 健治(Matsumoro, Kenji)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・免疫アレルギー・感染研究部・部長

研究者番号：60181765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：不可逆的な呼吸機能低下に關与する気道リモデリングの全貌解明と、その阻止方法の開発が気管支喘息治療の最大のunmet needsである。ヒト末梢血から分離した好酸球は固相化したsecretory IgA刺激で上清中にM-CSFの産生放出が、IL-5やGM-CSF刺激で細胞破碎物中のM-CSF濃度の上昇が認められた。また、気管支喘息患者および対照疾患患者の気管支肺胞洗浄液中のM-CSF濃度と好酸球顆粒タンパクであるEDN濃度の間には有意な相関が認められた。以上からヒト好酸球は気管支喘息のリモデリングに關与するマクロファージの分化に必須のサイトカインであるM-CSFを産生することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好酸球はアレルギー疾患や寄生虫感染時の免疫応答に中心的な役割を演じる白血球である。今回、好酸球が気管支喘息の病態を模した刺激によって、肺の線維化などの重篤な長期合併症である気道リモデリングに重要な役割を演じるマクロファージという別の白血球の分化を促進する蛋白(M-CSF)を産生することを新たに見いだした。また、実際に気管支喘息や他の肺疾患の患者さんの肺の洗浄液からこのM-CSFが好酸球の活性化指標と相関することを確認した。

研究成果の概要(英文)：The most important unmet need in the treatment of bronchial asthma is to elucidate the whole mechanisms of airway remodeling that induce irreversible respiratory function decline and to develop methods to prevent it. Eosinophils isolated from human peripheral blood showed a production and release of M-CSF in the supernatant upon exposure to immobilized secretory IgA, and an increase in M-CSF concentration in cell lysates upon IL-5 or GM-CSF stimulation. In addition, there was a significant correlation between the concentration of M-CSF and EDN, an eosinophil granule protein, in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchial asthma and control disease. These results indicate that human eosinophils produce M-CSF, a cytokine essential for the differentiation of macrophages involved in the remodeling of bronchial asthma.

研究分野：免疫アレルギー学

キーワード：好酸球 サイトカイン 気管支喘息 マクロファージ リモデリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息の本態は、好酸球を中心とする複数の炎症細胞によって惹起される慢性の 2 型炎症 (好酸球性炎症) である。2 型炎症の形成には、各種炎症細胞と組織構成細胞の interaction が関与すると考えられている。吸入ステロイドによってこの 2 型炎症のコントロールは可能となりつつある一方、たとえ喘息の症状がコントロールできても、約半数の症例で肺の成長が低下し、またそれとは独立に約半数で呼吸機能が早期に低下することが明らかとなっており、このような不可逆的な呼吸機能低下に関与するとされる気道のリモデリングの全貌解明と、その阻止方法の開発が気管支喘息治療の最大の unmet needs である。

気道のリモデリングには、杯細胞過形成、上皮基底膜肥厚、線維化、気道平滑筋の過形成、血管新生など多くの因子と多種類の細胞が関与することが知られている。中でも、マクロファージは M2a 型と呼ばれる特殊なサブタイプに分化し、CCL8、CCL13、CCL17 等を産生して 2 型炎症の惹起相で関与するだけでなく、組織のリモデリングに直接関与する蛋白分解酵素 (MMP-9、MMP14) や Arginase-1 を大量に産生し、組織の線維化に関与するとされている。こうしたマクロファージの M2a 型への分化には IL-4 や IL-13、IL-33 だけでなく、M-CSF が重要な役割を演じることが知られているが、その M-CSF の産生細胞は明らかになっていない。

今回私達は、好酸球が M-CSF の mRNA を恒常的に発現し、GM-CSF の刺激によってその発現が数倍に増強することを網羅的な遺伝子発現解析から見いだした。このことは、好酸球は顆粒タンパクによる組織障害だけでなく、マクロファージの分化、活性化誘導を介してリモデリングに関与することを示唆する重要な所見と考えられる。

2. 研究の目的

従来、M-CSF を産生する細胞は線維芽細胞とされていた。しかし、今回、好酸球が直接 M-CSF を産生して肺局所で M2a マクロファージを分化誘導、活性化する可能性が示唆されている。本研究では、好酸球を各種の因子 (IL-5、GM-CSF、IFN- γ 、固相化 secretory IgA) で in vitro で活性化した際の M-CSF 産生誘導 (mRNA とタンパク) を検討するだけでなく、ステロイドなどの阻害剤を用いてシグナル伝達についても検討する。さらに、呼吸器疾患患者の臨床検体を用いた解析によって肺局所での M-CSF 産生も確認する。M2a マクロファージに重要な M-CSF の産生機序はこれまでに不明であっただけでなく、好酸球の新規の機能の解析は独自のものであるだけでなく、臨床検体による肺局所での確認は極めて独創性が高いといえる。

3. 研究の方法

本研究では、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析の結果を受けて、

(1) 好酸球がどのような刺激によって M-CSF の mRNA を発現するかを、RT-PCR で検証する。特に M-CSF には 4 種類の splicing variant が知られており、そのうち membrane-bound の分子と soluble form で cytokine として産生放出される分子はほとんど同等の機能を持つことが報告されている。ことから、どの分子量の mRNA が産生されるのかも検証する (2018-19 年度)。

(2) 非刺激状態および活性化した好酸球が産生する M-CSF が細胞表面に membrane-bound の分子として発現するのか、あるいは細胞質内に pre-form されるのかを検討する。具体的には、末梢血から純化した好酸球を固定後、細胞膜にサポニンによる透過処理を行う場合と行わない場合とで、抗 M-CSF 抗体および二次抗体で蛍光免疫染色後に、Confocal 蛍光顕微鏡を用いて解析し、M-CSF 分子の細胞内局在を明らかにする (2018-19 年度)。

(3) 各種刺激後の培養上清中に放出される M-CSF 濃度と、細胞破砕液中の M-CSF 濃度を ELISA によって測定する (2018-19 年度)。

(4) 各種呼吸器疾患患者由来の気管支肺泡洗浄液中の M-CSF 濃度と、好酸球特異的顆粒タンパクである eosinophil-derived neurotoxin (EDN) の濃度とを測定し、両者の相関を検討する (2019-20 年度)。

4. 研究成果

(1) ヒト末梢血から比重遠沈法で好酸球分画を採取し、混入している好中球を抗 CD16 抗体付着ビーズと磁気分離装置で除去し、純度 97% 以上の好酸球を得た (n = 11)。分離した好酸球は membrane-bound isoform と secretion isoform の M-CSF の mRNA を恒常的に発現しており、GM-CSF や IL-5、固相化した secretory IgA (sIgA) の刺激によって mRNA の発現は有意に増強された。一方、platelet-activation factor や eotaxin 1 の刺激では mRNA の発現は変化しなかった。

(2) 好酸球刺激後の上清中には sIgA 刺激で M-CSF の産生放出が確認された。一方、IL-5 や GM-CSF 刺激では上清には M-CSF の放出は認められず、細胞の破砕物中の M-CSF 濃度が上昇した。

(3) Flow cytometry と Confocal microscope を用いて、細胞内の M-CSF の局在について検討したところ、非刺激時には細胞膜を透過処理していない好酸球では M-CSF は染まらなかった。細胞を固定し、細胞膜を透過処理すると染色され、その局在は顆粒に一致していた。また、GM-CSF 刺激 48 時間後（脱顆粒によって細胞膜と顆粒膜が癒合していると考えられる）には、細胞膜透過処理していない細胞表面に M-CSF が検出され、細胞膜透過処理をしても蛍光強度は変化しなかった。また、Confocal microscope で顆粒膜に一致した部位に M-CSF が染色された。このことから、GM-CSF 刺激刺激では membrane-bound isoform の顆粒膜への発現が強く誘導され、脱顆粒によって顆粒膜が細胞膜と癒合して細胞表面に発現すると考えられた。

(4) 気管支喘息患者および対照疾患患者の気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の M-CSF 濃度と好酸球顆粒タンパクである EDN 濃度を測定したところ、気管支喘息患者由来の BALF 中には、対象患者由来の BALF に比して有意に高濃度の M-CSF と EDN が検出された。また、M-CSF 濃度と EDN 濃度の間には有意な正相関が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	寺川 真紀 (TERAKAWA Maki)		
研究協力者	外山 扇雅 (TOYAMA Sumika)		
研究協力者	福田 修平 (FUKUDA Shuhei)		
研究協力者	相良 博典 (SAGARA Hironori)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------