

令和 4 年 4 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07620

研究課題名(和文) マスト細胞と補体を中心とした抗マダニ免疫獲得メカニズムの解析

研究課題名(英文) Acquired anti-tick immunity involving mast cells and complement

研究代表者

吉川 宗一郎 (Yoshikawa, Soichiro)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：10549926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マダニは重篤な感染症を引き起こす病原体を媒介するベクターとして知られる。マダニに2回以上感染したことがある動物はマダニ吸血に対する免疫を獲得し、この病原体伝播も減少させることが知られている。これまでの解析により、マダニ(*Haemaphysalis longicornis*)に対する免疫獲得には好塩基球とマスト細胞が必須であると判明しているが、マスト細胞の役割は全く分かっていなかった。本研究の解析から、マスト細胞は補体C5aの活性化に関与することで、マダニ感染皮膚周辺に浸潤する好塩基球の動態をコントロールし、吸血局所に好塩基球を集積させる役割を持つ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、マダニ媒介性感染症はマダニ感染を防ぐことが最も効果的な対処方法であると考えられてきており、そのために殺ダニ剤などが多く用いられてきたが、薬剤耐性マダニの出現も大きな問題となっており、これに代わる手段としてワクチンを用いた手段が期待されている。本研究において、その分子メカニズムを明らかになったため、効果的な抗マダニワクチンの開発に繋がり、学術・社会的な意義も大きく、波及効果も高い。

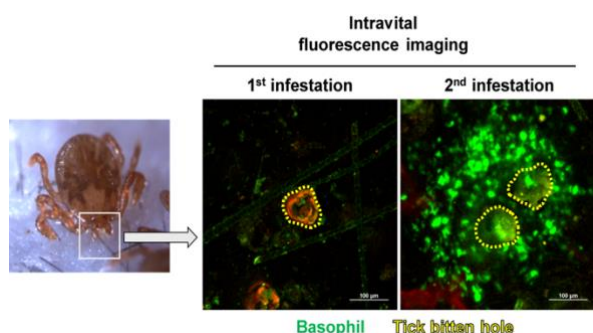
研究成果の概要(英文)：Ticks are blood-sucking ectoparasites that transmit several disease-causing pathogens to their host animals and humans. For certain combinations of animal and tick species, tick infestation elicits acquired tick immunity (ATR) in the host, which can decrease the ability of ticks to feed on blood and transmit pathogens in subsequent tick infestations. Determining the cellular and molecular mechanisms of ATR can advance the development of anti-tick vaccines that prevent tick infestation and tick-borne diseases. In mice infested with larval *H. longicornis* ticks, both mast cells and basophils reportedly play essential roles in ATR. The roles of basophils in ATR have been widely examined, however, the involvement of mast cells remains unclear. We found that mast cells converted C5 to C5a, affecting the mobilization and accumulation of basophils around tick-bite sites during re-infestation. Thus, mast cells may attract basophils around tick-bite sites via C5a/C5aR1 signaling to result in ATR.

研究分野：免疫学

キーワード：マスト細胞 好塩基球 補体 マダニ 獲得免疫

1. 研究開始当初の背景

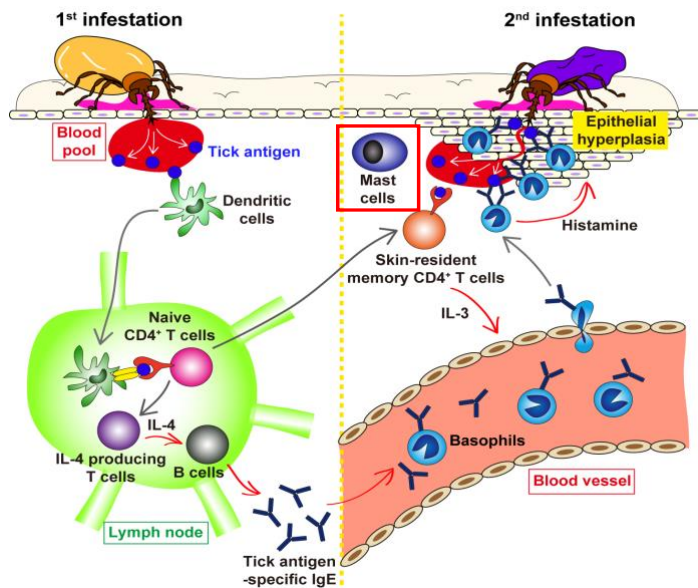
外部寄生虫の一種であるマダニは、ライム病やリケッチア症、重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) を媒介するベクターである。我が国において、マダニによって媒介される疾患患者の報告数は近年増加傾向にあり、特に SFTS 発症による死者が何人も報告されていることから、その対策が急務となっている。SFTS は有効な治療法もないため、マダニに刺咬されないことが最も効果的な防御策であり、従来から用いられてきた手段は殺ダニ剤を使った駆除対策である。しかし、近年では甚大な環境破壊懸念と薬剤耐性マダニの出現により、これに換わる方法が求められてきている。古くから、あらゆる動物において、マダニに刺された経験のある個体は再感染時に血を吸われにくくなること (マダニに対する免疫の獲得) が知られており、さらにはマダニ媒介性病原体の伝播も大幅に減少することが報告されている。したがって、抗マダニ免疫メカニズムを解明する事は、新たなマダニ媒介性感染症対策の開発につながることを期待され、現在大きな注目を集めている。



説明図 1: マダニ感染局所に集積する好塩基球の様子。右2つの写真は、マウス皮膚のマダニ吸血穴を水平面上から生体イメージング法で観察した図。穴の周りに集まる細胞が好塩基球。(好塩基球特異的 GFP 発現マウス Mpct8-GFP を使用。)

近年我々は、マダニ (*Haemaphysalis longicornis*) をマウスに 2 度感染させると、感染させた皮膚の局所で 1 度目の感染時には見られない好塩基球の浸潤が多数観察され (説明図 1 参照)、さらに、好塩基球やマスト細胞を欠損させるとマダニに対する抵抗性が消失したことから、好塩基球とマスト細胞が抗マダニ免疫に必須であることを明らかにした (Wada *et al.*, *J Clin Invest.* 2010)。また、最近の我々の研究より、好塩基球が 2 度目の感染時に浸潤するのは皮膚

常在性 CD4 メモリー T 細胞の IL-3 が関与していること (Ohta *et al.*, *Front Immunol.* 2017)、好塩基球の放出するヒスタミンがマダニ吸血を阻害していること (Tabakawa *et al.*, *Front Immunol.* 2018)、を明らかにし、好塩基球における抗マダニ免疫の分子メカニズムを解明してきた (説明図 2 参照、Yoshikawa *et al.*, *Parasit Immunol.* 2021)。一方で、マスト細胞がどのようにマダニ吸血耐性に関与しているのかは、今に至るまで全く分かっていない。



説明図 2: これまでに判明した抗マダニ免疫メカニズムの概略図。1 度目の感染でマダニ抗原特異的 T 細胞が局所リンパ節で作られ、マダニ抗原特異的 IgE が産生される。同時に、IL-3 産生能を有した皮膚常在性 CD4 メモリー T 細胞 (TRM) が出現し、全身の皮膚に常在するようになる。2 度目の感染が起こると TRM が即座に IL-3 を放出し、好塩基球をマダニ感染局所へ浸潤させる。浸潤した好塩基球はマダニ抗原に対して IgE を介して活性化し、ヒスタミンを放出することで上皮細胞の肥厚を誘導し、マダニ吸血を阻害する。

2. 研究の目的

本研究は、マスト細胞の役割を解明することを目的とし、以下の点を重点的に解析した。

- ① 好塩基球がマダニ感染局所へ集積することにマスト細胞が関与するのか。
- ② 補体が好塩基球のマダニ感染局所集積にマスト細胞が関与するのか。
- ③ 補体の活性化にマスト細胞が関与しているのか。

3. 研究の方法

マウスは、マスト細胞欠損マウス (*Kit^{Wsh/Wsh}*)、補体 C5 欠損マウス (A/J)、好塩基球特異的 GFP 発現マウス (*Mcpt8^{eGFP}*)、コントロールとして野生型 C57BL/6J、BALB/c マウスを使用した。マダニの感染は、マウスの体側にプラスチックカプセルを接着し、その中でマダニを 40 匹感染させた。1 度目の感染はマウスの左側体側に、2 度目の感染は右側体側に行った。マダニ吸血量の測定は、飽血した全てのマダニの体重を電子天秤で計量し、(吸血量%) = (実験群の飽血したマダニの総重量) / (初感染マウスから回収した飽血したマダニの総重量) × 100 によって算出した。マダニ感染局所へ浸潤する好塩基球、マスト細胞はコラゲナーゼ処理により単離し、フローサイトメトリーで解析、数を測定した。マダニ感染皮膚の組織染色は、ホルマリンで固定したサンプルを用い、生体イメージングはイソフルランで麻酔したマウスを Nikon A1R 共焦点顕微鏡下で観察した。

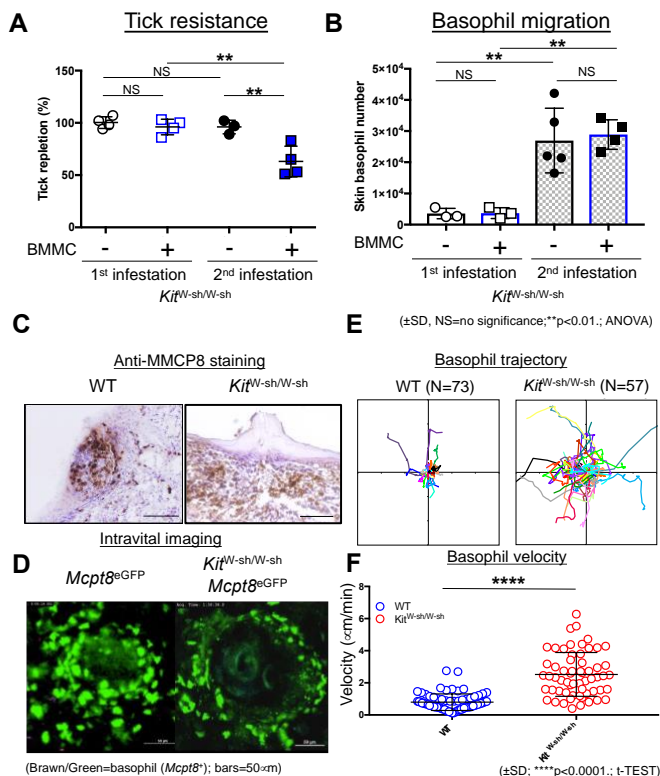


図 1: *Kit^{Wsh/Wsh}* マウスではマダニ感染局所の好塩基球動態が亢進している。二度目の感染における *Kit^{Wsh/Wsh}* マウスの (A) マダニ吸血量と (B) 皮膚への好塩基球浸潤数、(C) マダニ感染局所の免疫組織染色像 (anti-MMCP8 抗体で染色)。*Mcpt8^{eGFP}* マウス (コントロール)、または、*Kit^{Wsh/Wsh} Mcpt8^{eGFP}* マウスにマダニを二度感染し、二度目の感染から 1 日後の感染局所を生体イメージング法で好塩基球の動態を観察した。(D) 感染局所の好塩基球 (緑)、(E) 2 時間観察した際の好塩基球の動態軌跡と (F) その動態スピードを示す。

4. 研究成果

① 好塩基球がマダニ感染局所へ浸潤することにマスト細胞が関与するのか

マダニを二度感染させた *Kit^{Wsh/Wsh}* マウスでは、マダニを感染させた付近の皮膚への好塩基球浸潤は野生型マウスとほぼ変わらないことや (Wada *et al. J Clin Invest.* 2010)、この浸潤には組織常在性 CD4 メモリー T 細胞由来の IL-3 が関与することから (Ohta *et al. Front Immunol.* 2017)、好塩基球の皮膚浸潤はマスト細胞非依存的であることがわかっている (図 1 AB)。一方で、マダニ感染局所の好塩基球 (MMCP8 陽性細胞) を免疫組織化学染色で検出すると、*Kit^{Wsh/Wsh}* マウスでは好塩基球の集積が野生型と比べてまばらになっていることが判明した (図 1 C)。よって、より詳細な好塩基球の動態を解析するため、*Mcpt8^{eGFP}* マウスを *Kit^{Wsh/Wsh}* マウス

と交配させ、マスト細胞欠損状態での好塩基球の動態を生体イメージングによって解析したところ、野生型マウスの好塩基球はまさに感染局所に集積すると密に集まってほとんど動かないのに対し、マスト細胞欠損マウスの好塩基球は集積にまとまりがなく、動き回っていることがわかった (図 1 D-F)。以上の結果から、マスト細胞はまさに感染局所に集積する好塩基球の動態をコントロールし、感染局所に留める役割を担っていることが示唆された。

②補体が好塩基球のマダニ感染局所への浸潤にマスト細胞が関与するのか。

マダニを感染させると、感染回数に関係なく、血清中の補体 C5a 量が上昇することがわかった (図 2A)。一方で、*Kit^{Wsh/Wsh}* マウスと補体 C5 欠損マウス (A/J) ではその C5a がほとんど上昇しなかった (図 2A)。過去の報告では、マダニ感染局所では補体が沈着していることが発見されており、ヒトにおいては補体が好塩基球の走化性活性を上昇させることが報告されていることから、*Kit^{Wsh/Wsh}* マウスの好塩基球動態が異常となっている原因は、マダニ感染時に活性化した C5a が欠損しているためではないかと考えた。実際、マウスの好塩基球も補体 C5a の受容体の一つである C5aR1 を発現しており (図 2B)、この受容体を介して走化性が上昇することも、*in vitro* のトランスマイグレーションアッセイの実験により判明した (図 2C-D)。

③補体の活性化にマスト細胞が関与しているのか。

補体が好塩基球の動態や、マダニ吸血に対する免疫獲得に関与しているかを解析するため、補体 C5 欠損マウス (A/J マウス) を用いてマダニ感染をおこなったところ、二度目の感染で

みられるマダニ吸血耐性が欠損していることがわかった (図 3A)。さらに、二度目の感染時に C5 を投与すると欠損していたマダニ吸血耐性が付与されたことから (図 3B)、C5 はマダニ吸血耐性獲得に必須であることがわかった。興味深いことに、A/J マウスではマダニを感染させた皮膚に浸潤する好塩基球の数はコントロールと比べて変化がないが (図 3C)、免疫組織染色や生体イメージング法でマダニ感染局所における好塩基球の集積を観察したところ、*Kit^{Wsh/Wsh}* マウスと同様に、この集積がみられなかった (図 3D-E)。A/J マウスに C5 を投与すると好塩基球の集積が観察されるようになり (図 3D-E)、さらには、マダニ感染局所で動き回っていた好塩基球の動態が低下し、感染局所で動かなくなったことから (図 3F-G)、マダニ感染局所に沈着した補体 C5a が好塩基球の動態を低下させ、集積させる役割を持っている可能性が示唆された。

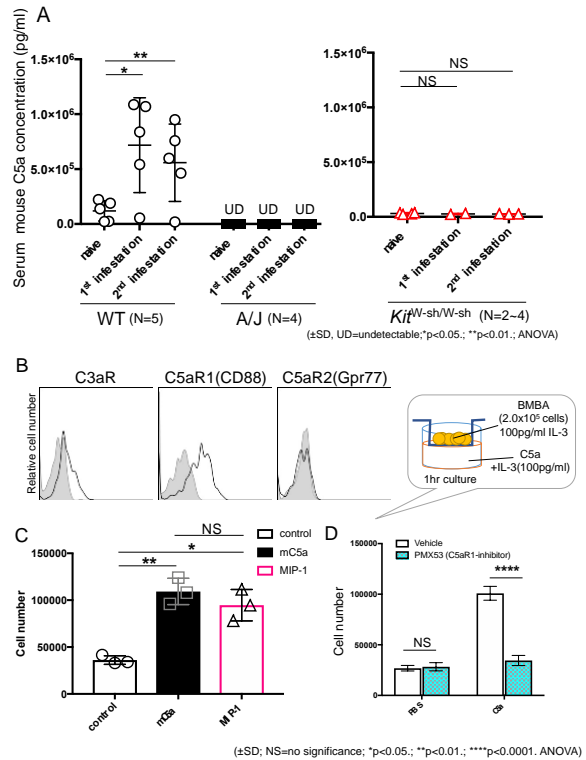


図 2：補体 C5a は C5aR1 を介して好塩基球の走化性を上昇させる。二度目の感染における野生型マウス (WT)、補体 C5 欠損マウス (A/J)、*Kit^{Wsh/Wsh}* マウスの (A) 血清中 C5a 量を ELISA で定量した。 (B) 脾臓好塩基球の C3aR, C5aR1, C5aR2 の発現をフローサイトメトリーで解析し、ヒストグラムで表した。骨髓由来好塩基球 (BMBA) を Transwell で培養し、(C) C5a の走化性活性と (D) C5aR1 阻害剤を用いた時の走化性能の変化を示す

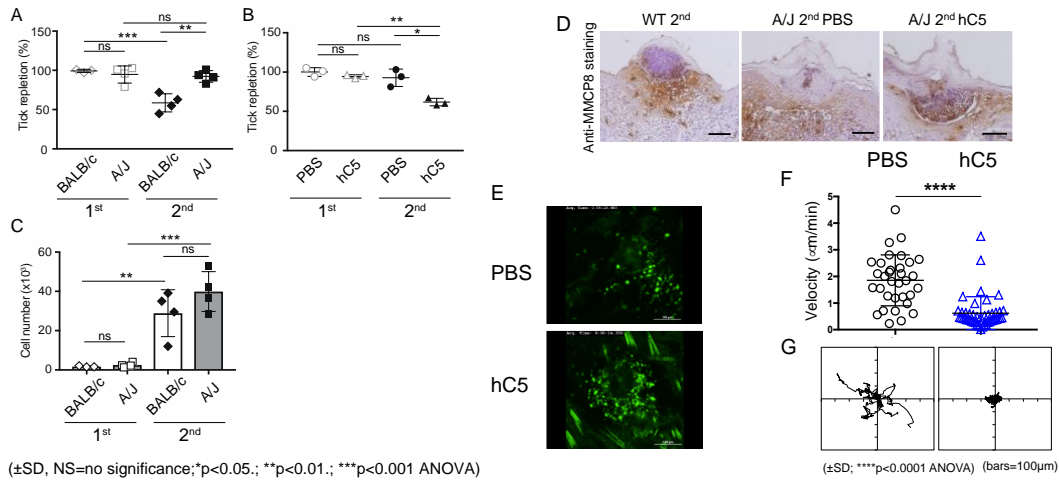


図3：A/J マウスはマダニに対する免疫が獲得できず、好塩基球の動態も異常である。(A)二度目の感染における野生型マウス(WT)と補体 C5 欠損マウス (A/J) のマダニの吸血量。(B)A/J マウスにマダニを感染させて同時に C5 を投与すると、マダニに対する免疫獲得が回復した。(C) 皮膚への好塩基球浸潤数 (D) MMCP8 抗体を用いたマダニ感染局所の免疫組織染色像。マダニを二度感染させた A/J *Mcpt8*^{GFP} マウスに、PBS もしくは C5 を投与したときの (E) 生体イメージング像と (F) 動態速度、および (G) 動態軌

マダニも感染時に Tick venom と呼ばれる物質を吸血時に注入し、免疫機能を低下させたり、補体活性や血液凝固因子を阻害することが知られている(A Cavezas-Cruz *et al. Front Zool.* 2014)。マスト細胞は蜂やヘビ、トカゲなどの毒素を中和することが知られており(SJ Galli *et al. Allergol Int.* 2016)、この毒素中和にはマスト細胞由来のプロテアーゼが関与している。よって、補体は好塩基球をマダニ吸血局所に集積させるが、マダニ由来の毒素が補体活性を阻害してしまうため、この毒素を中和するためにマスト細胞の放出するプロテアーゼが関与しているのではないかと考えた。

これまでに報告されている生物毒を中和する酵素として、*Mcpt4* や *CPA3* が知られている。これらの遺伝子をマスト細胞でノックダウンさせ、*Kit*^{Wsh/Wsh} マウスに移植する方法で検討した。骨髓由来マスト細胞 (BMDC) にレンチウイルスで各種遺伝子をノックダウンさせ、これを *Kit*^{Wsh/Wsh} マウスに移植し、マダニを二度感染させた。その結果、コントロール(Mock)を移植すると *Kit*^{Wsh/Wsh} マウスでもマダニ吸血耐性がみられるようになるが、*Mcpt4* や *CPA3* をノックダウンさせてもその耐性獲得には変化がみられなかったため(図4 A-B)、これらのプロテアーゼは毒素中和に関与していない可能性が考えられた。今後、更なる解析が必要である。

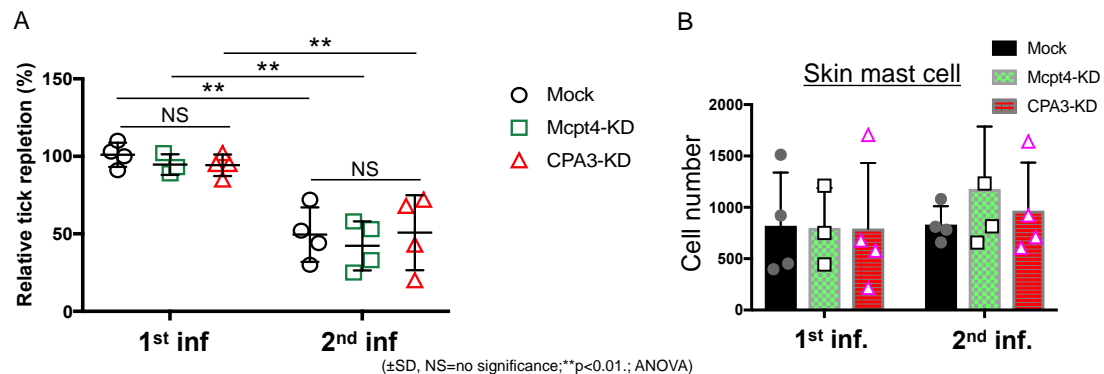


図4：マスト細胞由来 MMCP4 や CPA3 はマダニ耐性獲得に関与しない。*Mock*、*Mcpt4* 特異的 shRNA、*CPA* 特異的 shRNA を発現するレンチウイルスベクターを骨髓由来マスト細胞 (BMDC) に感染させ、遺伝子をノックダウンした BMDC のみを二度マダニを感染させた *Kit*^{Wsh/Wsh} マウスに移植した。(A)各種 BMDC を移植したマウスのマダニ吸血耐性を評価したもの、(B)BMDC マスト細胞の生着数を表す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshikawa Soichiro, Miyake Kensuke, Kamiya Atsunori, Karasuyama Hajime	4. 巻 -
2. 論文標題 The role of basophils in acquired protective immunity to tick infestation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasite Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pim.12804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyake Kensuke, Shibata Sho, Yoshikawa Soichiro, Karasuyama Hajime	4. 巻 -
2. 論文標題 Basophils and their effector molecules in allergic disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura Yuya, Fukuda Yota, Okonogi Toya, Yoshikawa Soichiro, Karasuyama Hajime, Osakabe Naomi, Ikegaya Yuji, Sasaki Takuya, Adachi Takahiro	4. 巻 524
2. 論文標題 Dual real-time in vivo monitoring system of the brain-gut axis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 340 ~ 345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Karasuyama Hajime, Miyake Kensuke, Yoshikawa Soichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Immunobiology of Acquired Resistance to Ticks	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.601504	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamanishi Yoshinori, Mogi Kotone, Takahashi Kazufusa, Miyake Kensuke, Yoshikawa Soichiro, Karasuyama Hajime	4. 巻 75
2. 論文標題 Skin infiltrating basophils promote atopic dermatitis like inflammation via IL 4 production in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 2613 ~ 2622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshikawa Soichiro, Oh-hora Masatsugu, Hashimoto Ryota, Nagao Toshihisa, Peters Louis, Egawa Mayumi, Ohta Takuya, Miyake Kensuke, Adachi Takahiro, Kawano Yohei, Yamanishi Yoshinori, Karasuyama Hajime	4. 巻 12
2. 論文標題 Pivotal role of STIM2, but not STIM1, in IL-4 production by IL-3 stimulated murine basophils	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaav2060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aav2060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 ADACHI Takahiro, YOSHIKAWA Soichiro, TEZUKA Hiroyuki, TSUJI Noriko M., OHTEKI Toshiaki, KARASUYAMA Hajime, KUMAZAWA Toshihiko	4. 巻 38
2. 論文標題 Propolis induces Ca2+ signaling in immune cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience of Microbiota, Food and Health	6. 最初と最後の頁 141 ~ 149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12938/bmfh.19-011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Lin Yu-Hsien, Tahara-Hanaoka Satoko, Nagai Kei, Yoshikawa Soichiro, Kubo Masato, Shibayama Shiro, Karasuyama Hajime, Shibuya Akira	4. 巻 32
2. 論文標題 Selective suppression of oral allergen-induced anaphylaxis by Allergin-1 on basophils in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 213 ~ 219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz075	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Huang Rongsheng, Fujimura Atsushi, Nakata Eiji, Takihiro Shota, Inoue Hirofumi, Yoshikawa Soichiro, Hiyama Takeshi, Ozaki Toshifumi, Kamiya Atsunori	4. 巻 557
2. 論文標題 Adrenergic signaling promotes the expansion of cancer stem-like cells of malignant peripheral nerve sheath tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 199 ~ 205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Karasuyama Hajime, Shibata Sho, Yoshikawa Soichiro, Miyake Kensuke	4. 巻 33
2. 論文標題 Basophils, a neglected minority in the immune system, have come into the limelight at last	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 809 ~ 813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagaishi Takashi, Watabe Taro, Kotake Kunihiko, Kumazawa Toshihiko, Aida Tomomi, Tanaka Kohichi, Ono Ryuichi, Ishino Fumitoshi, Usami Takako, Miura Takamasu, Hirakata Satomi, Kawasaki Hiroko, Tsugawa Naoya, Yamada Daiki, Hirayama Kazuhiro, Yoshikawa Soichiro, Karasuyama Hajime et al.	4. 巻 71
2. 論文標題 Immunoglobulin A?specific deficiency induces spontaneous inflammation specifically in the ileum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 487 ~ 496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2020-322873	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Soichiro Yoshikawa, Masatsugu Oh-hora, Ryota Hashimoto, Kensuke Miyake, Takahiro Adachi, Yohei Kawano, Yoshinori Yamanishi, Atsunori Kamiya, Hajime Karasuyama
2. 発表標題 Pivotal role of STIM2, but not STIM1, in IL-4 production by IL-3 stimulated basophils
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

好塩基球におけるアレルギー関連サイトカインIL-4の産生メカニズムを解明
<http://www.tmd.ac.jp/mri/press/press36/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------