

機関番号：82612

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：20591196

研究課題名 (和文) 好酸球特異的な分子群の網羅的解析研究

研究課題名 (英文) Comprehensive analysis of eosinophil-specific mRNA expression profiles

研究代表者 松本 健治 (MATSUMOTO KENJI)

独立行政法人 国立成育医療研究センター・免疫アレルギー研究部・
アレルギー研究室・室長

研究者番号：60181765

研究成果の概要 (和文)：好酸球数は臨床的にアレルギー性炎症の最も良い指標とされているが、好酸球のアレルギー病態における役割については不明な点が多く残されている。私達はマイクロアレイを用いて好酸球特異的な機能の網羅的な探索を試みた。その結果、末梢血から純化した好酸球を *in vitro* で各種の刺激を加えたところ、定常状態の他の血液細胞には発現していない遺伝子群が見いだされた。それらの中には AREG や CCL23 などの他の細胞の活性化や遊走を惹起する因子が含まれていた。以上の結果から、好酸球は効果細胞としての脱顆粒などによる直接的な作用だけでなく、制御細胞としてもアレルギー性炎症反応に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The number of eosinophils is well known to be one of the best clinical markers for assessing the severity of allergic inflammation; however, the precise roles of eosinophils *in vivo* remain unclear. In the present study we comprehensively analyzed mRNA expression profiles of eosinophils after exposure to various cytokines, chemokines and immobilized immunoglobulins, and compared them with those of human blood cells. As a result, we identified a number of genes specifically expressed in human eosinophil. Those included cytokines and chemokines, suggesting that eosinophils may play important roles not only as effector cells but also as regulatory cells *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
22年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：アレルギー

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：好酸球、マイクロアレイ、網羅的遺伝子発現解析、Amphyregulin、CCL23

1. 研究開始当初の背景

好酸球はアレルギー性炎症反応において重要な役割を演じることが知られており、近年では特に気管支喘息における気道のリモデリングの形成に関与することが想定され

ている。しかし、好酸球の活性化状態での機能に関しては不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、好酸球のサイトカインによる

活性化時の全機能を網羅的に検索し、他の血球細胞と比較して好酸球に特異的な機能を特定することを目標とする。好酸球の全機能を把握することはアレルギー性炎症のネットワークを理解するために極めて重要な課題であり、将来的なリモデリングの抑制にも通じる可能性がある。

3. 研究の方法

ボランティア末梢血から純化した好酸球を *in vitro* で各種サイトカイン等で刺激し、誘導される遺伝子群をマイクロアレイを用いて網羅的に解析する。この解析結果と各種血球細胞の網羅的遺伝子発現解析結果を比較することにより、好酸球の活性化に伴って好酸球に特異的に発現亢進する分子群を抽出することが出来る。

マイクロアレイによってスクリーニングされた分子群の mRNA 発現を Real-time PCR で、蛋白の発現を Flow Cytometry や ELISA など確認し、スクリーニング結果の検証を行う。さらにこれらの分子群の機能について GeneOntology などのデータベースを用いて検討し、アレルギー性炎症病態形成のネットワークでの好酸球の役割について考察する。

4. 研究成果

末梢血から純化した好酸球を 100 ng/ml IFN- γ 、10 ng/ml IL-5 もしくは固相化した 100 μ g/ml secretory IgA (sIgA) 刺激 6 時間後に、vehicle 刺激と比較してそれぞれ 839、197 および 117 遺伝子の発現が 2 倍以上増強した。

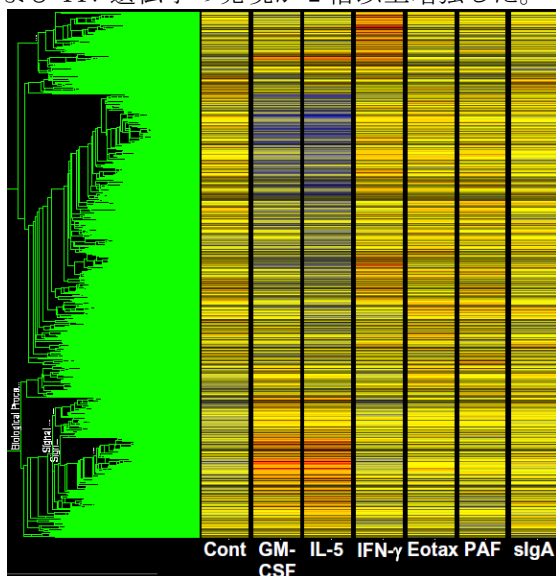


図1 好酸球を各種刺激時の遺伝子発現変化のパターンを示す。赤が発現上昇青が発現減弱を表す。

それらには
IFN- γ : CXCL10, CXCL11, FCGR1A, GBP3, TRAIL, STAT1, IFIT3, TLR8, IL-8, IDO,
IL-5 : AREG, FCGR2B, IL1RL1, HMOX1, TARP、

CCL23, MAFF, CLEC7A, M-CSF、
sIgA : HMOX1, MT1E, EPOR
などが含まれていた。これらの遺伝子のうち、49、111 および 8 遺伝子は他の血液細胞には constitutive には発現していない遺伝子であった。特にアレルギー性炎症病態やリモデリングに好酸球特異的に関与すると考えられる AREG、CCL23 に関してはすでに詳細な分泌制御を検討し、論文化した。M-CSF については、現在、臨床検体における発現上昇を確認している。

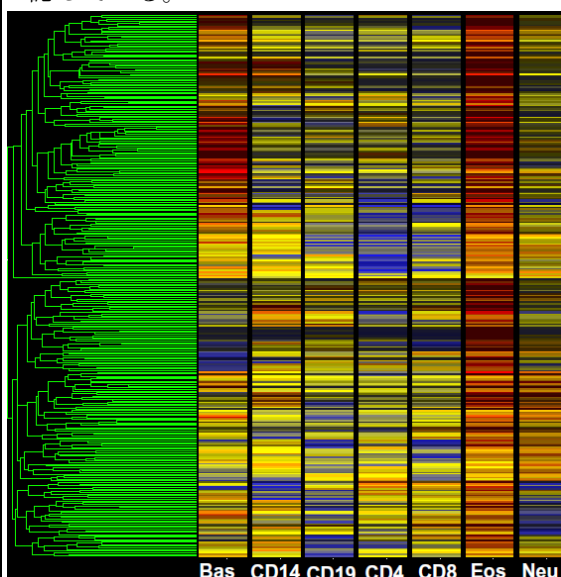


図2 好酸球を GM-CSF 刺激した際に誘導される遺伝子群の各種血球細胞で発現を示す

以上の結果から、好酸球は effector cell としてだけでなく regulatory cell としてもアレルギー性炎症反応に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 30 件)

1. Yamada Y, Nishi A, Ebara Y, Kato M, Yamamoto H, Morita H, Nomura I, Matsumoto K, Hirato J, Hatakeyama SI, Suzuki N, Hayashi Y. Eosinophilic gastrointestinal disorders in infants: a Japanese case series. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011; 155 Suppl 1:40-5.
2. Ohno T, Oboki K, Morita H, Kajiwara N, Arae K, Tanaka S, Ikeda M, Iikura M, Akiyama T, Inoue J, Matsumoto K, Sudo K, Azuma M, Okumura K, Kamradt T, Saito H, Nakae S. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation. *PLoS ONE.* 2011; 6:e18404.
3. Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H.

- IL-33 and Airway Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011; 3:81-8.
4. Nomura I, Morita H, Hosokawa S, Hoshina H, Fukuie T, Watanabe M, Ohtsuka Y, Shoda T, Terada A, Takamasu T, Arai K, Ito Y, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Four distinct subtypes of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in neonates and infants, distinguished by their initial symptoms. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 127:685-8.
 5. Matsumoto K, Fukuda S, Hashimoto N, Saito H. Human eosinophils produce and release a novel chemokine, CCL23, in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011; 155 Suppl 1:34-9.
 6. Iikura K, Katsunuma T, Saika S, Saito S, Ichinohe S, Ida H, Saito H, Matsumoto K. Peripheral blood mononuclear cells from patients with bronchial asthma show impaired innate immune responses to rhinovirus in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011; 155 Suppl 1:27-33.
 7. Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, Miyagawa T, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Suzuki Y, Yoshihara S, Adachi M, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakajima T, Mathias RA, Rafaels N, Barnes KC, Himes BE, Duan QL, Tantisira KG, Weiss ST, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. Thymic stromal lymphopoietin gene promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011; 44:787-93.
 8. Yamada Y, Matsumoto K, Hashimoto N, Saikusa M, Homma T, Yoshihara S, Saito H. Effect of Th1/Th2 Cytokine Pretreatment on RSV-Induced Gene Expression in Airway Epithelial Cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010; 154:185-94.
 9. Yagami A, Orihara K, Morita H, Futamura K, Hashimoto N, Matsumoto K, Saito H, Matsuda A. IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells. *J Immunol.* 2010; 185:5743-50.
 10. Tsubota A, Matsumoto K, Mogushi K, Nariiai K, Namiki Y, Hoshina S, Hano H, Tanaka H, Saito H, Tada N. IQGAP1 and vimentin are key regulator genes in naturally occurring hepatotumorigenesis induced by oxidative stress. *Carcinogenesis.* 2010; 31:504-11.
 11. Toyoda M, Hamatani T, Okada H, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Defining cell identity by comprehensive gene expression profiling. *Curr Med Chem.* 2010; 17:3245-52.
 12. Takeichi T, Sugiura K, Muro Y, Matsumoto K, Ogawa Y, Futamura K, Kaminuma O, Hashimoto N, Shimoyama Y, Saito H, Tomita Y. Overexpression of LEDGF/DFS70 induces IL-6 via p38 activation in HaCaT cells, similar to that seen in the psoriatic condition. *J Invest Dermatol.* 2010; 130:2760-7.
 13. Oboki K, Ohno T, Kajiwarra N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:18581-6.
 14. Miyamoto T, Muneta T, Tabuchi T, Matsumoto K, Saito H, Tsuji K, Sekiya I. Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc degeneration through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:R206.
 15. Matsumoto K, Terakawa M, Fukuda S, Saito H. Analysis of signal transduction pathways involved in anti-CD30 mAb-induced human eosinophil apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010; 152 Suppl 1:2-8.
 16. Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, Matsumoto K, Saito H, Ohta H, Saito K, Umezawa A. Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the Mdx model of duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol.* 2010; 223:695-702.
 17. Futamura K, Orihara K, Hashimoto N, Morita H, Fukuda S, Sagara H, Matsumoto K, Tomita Y, Saito H, Matsuda A. beta(2)-adrenoceptor agonists enhance cytokine-induced release of thymic stromal lymphopoietin by lung tissue cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010; 152:353-61.
 18. Fukuie T, Nomura I, Horimukai K, Manki A, Masuko I, Futamura M, Narita M, Ohzeki T, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y. Proactive treatment appears to decrease serum immunoglobulin-E levels in patients with severe atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2010; 163:1127-9.
 19. Ebihara T, Azuma M, Oshiumi H, Kasamatsu J, Iwabuchi K, Matsumoto K, Saito H, Taniguchi T, Matsumoto M, Seya T. Identification of a polyI:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J Exp Med.* 2010; 207:2675-87.
 20. Toki S, Kagaya S, Shinohara M, Wakiguchi H, Matsumoto T, Takahata Y, Morimatsu F, Saito H, Matsumoto K. *Lactobacillus*

- rhamnosus GG and *Lactobacillus casei* suppress *Escherichia coli*-Induced chemokine expression in intestinal epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009; 148:45-58.
21. Takahashi N, Matsumoto K, Saito H, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, Azuma M, Lee SK, Mizutani S, Morio T. Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients. *J Immunol.* 2009; 182:5515-27.
22. Sugiura K, Muro Y, Futamura K, Matsumoto K, Hashimoto N, Nishizawa Y, Nagasaka T, Saito H, Tomita Y, Usukura J. The unfolded protein response is activated in differentiating epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2009; 129:2126-35.
23. Orihara K, Morita H, Yagami A, Kajiwara N, Nakae S, Matsumoto K, Nagasaki H, Saito Y, Saito H, Matsuda A. TH2 cytokines potently induce an appetite-stimulating peptide, melanin-concentrating hormone, in human vascular endothelial cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 124:612-4, 4 e1-2.
24. Morisawa Y, Kitamura A, Ujihara T, Zushi N, Kuzume K, Shimanouchi Y, Tamura S, Wakiguchi H, Saito H, Matsumoto K. Effect of heat treatment and enzymatic digestion on the B cell epitopes of cow's milk proteins. *Clin Exp Allergy.* 2009; 39:918-25.
25. Matsumoto K, Fukuda S, Nakamura Y, Saito H. Amphiregulin production by human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009; 149 Suppl 1:39-44.
26. Kato A, Chustz RT, Ogasawara T, Kulka M, Saito H, Schleimer RP, Matsumoto K. Dexamethasone and FK506 inhibit expression of distinct subsets of chemokines in human mast cells. *J Immunol.* 2009; 182:7233-43.
27. Imada Y, Fujimoto M, Hirata K, Hirota T, Suzuki Y, Saito H, Matsumoto K, Akazawa A, Katsunuma T, Yoshihara S, Ebisawa M, Shibasaki M, Arinami T, Tamari M, Noguchi E. Large scale genotyping study for asthma in the Japanese population. *BMC Res Notes.* 2009; 2:54.
28. Harada M, Hirota T, Jodo AI, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Yoshihara S, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. Functional analysis of the thymic stromal lymphopoietin variants in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009; 40:368-74.
29. Boyce JA, Broide D, Matsumoto K, Bochner BS. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2008. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 123:569-74.
30. Shinohara M, Wakiguchi H, Saito H, Matsumoto K. Presence of eosinophils in nasal secretion during acute respiratory tract infection in young children predicts subsequent wheezing within two months. *Allergol Int.* 2008; 57:359-65.
- [学会発表] (計 8 件)
1. 松本健治. 「好酸球特異的な機能の網羅的探索」第 60 回日本アレルギー学会総会. 2010 年 11 月 25-27 日、東京
2. Matsumoto K, Fukuda S, Saito H. “CCL23 production by human eosinophils” 28th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum April 25-30, 2010, Ischia, Italy
3. Matsumoto K, Terakawa M, Fukuda S, Saito H. Analysis of signal transduction pathways involved in anti-CD30 mAb-induced human eosinophil apoptosis” 66th Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, Feb 26-Mar 2, 2010, New Orleans, USA
4. Matsumoto K. “Induction of apoptosis in human eosinophils” 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 International symposium、2009 年 10 月 29-31 日、秋田
5. Matsumoto K, Fukuda S, Saito H. “Production of amphiregulin by human eosinophils” 65th Annual Meeting of American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, Mar 13-17, 2009, Washington DC, USA
6. 松本健治. 「アレルギー性炎症における好酸球—集積機序と病的意義の再考」第 58 回日本アレルギー学会総会. 2008 年 11 月 27 日～29 日、東京
7. 松本健治、齋藤博久. 「ヒト好酸球の amphiregulin 産生に関する研究」第 20 回日本アレルギー学会春期臨床大会. 2008 年 6 月 12～14 日、東京
8. 松本健治、齋藤博久. 「好酸球の Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) 産生に関する研究」第 111 回日本小児科学会総会. 2008 年 4 月 25～27 日、東京
- [図書] (計 1 件)
- Matsumoto K, Bochner BS. Eosinophils in Health and Disease. Chapter VIII. Eosinophil Trafficking Section B. Adhesion molecules:

interactions between cells and with the extracellular matrix. 2011 International Eosinophil Society. In Press

[その他]

ホームページ等

国立成育医療研究センター研究所免疫アレルギー研究部のホームページ

<http://111.89.135.117/imal/default.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 健治 (MATSUMOTO KENJI)

独立行政法人 国立成育医療研究センター・
免疫アレルギー研究部・室長

研究者番号 : 60181765

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

斎藤 博久 (SAITO HIROHISA)

独立行政法人 国立成育医療研究センター・
免疫アレルギー研究部・部長

研究者番号 : 40130166