

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15180

研究課題名（和文）好塩基球・M2マクロファージによるアレルギー炎症抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms how M2 macrophages induced by basophils dampen excess inflammation

研究代表者

三宅 健介（Miyake, Kensuke）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：90814533

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：慢性型のアレルギー炎症の病態の解明は喫緊の課題である。特にアレルギー炎症の終息機構については未知の部分が多く残されている。申請者の所属する研究グループでは、好塩基球が炎症抑制型のM2マクロファージを分化誘導することで慢性アレルギーにおける炎症終息に深く関与することを発表した。本研究では、好塩基球・M2マクロファージによる炎症抑制の分子メカニズムについて検討を行った。その結果、活性化した好塩基球によって誘導されたM2マクロファージでは死細胞の貪食能が高まっていることが解明した。これにより速やかに炎症局所の死細胞が除去され、死細胞の放出するIL-1による炎症悪化を妨げることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのアレルギー研究では、アレルギー炎症の誘導機構に重点が置かれ、発症に関与する分子がアレルギー疾患の治療標的とされてきた。しかしながらこの治療法では、すでに発症したアレルギー炎症の治療には有効ではない可能性が高い。アレルギー炎症の終息機構が解明できれば、アレルギーが発症している最中であっても炎症を終息させアレルギー症状を改善できる画期的な治療法の開発が期待される。本研究により、好塩基球やM2マクロファージによるアレルギー炎症の終息機構の一端が解明された。この研究を応用すれば、アレルギーの新規治療法開発につながると考えられ、社会的・学術的に大きな意義を持つ研究である。

研究成果の概要（英文）：Elucidation of the pathophysiology of chronic allergic inflammation is the urgent problem in developed countries. Especially, the mechanisms for the termination of allergic inflammation remains ill-defined. Our group previously identified that basophils contribute to the termination of allergic inflammation by inducing the differentiation of anti-inflammatory M2-like macrophages. In this study, we investigated the molecular mechanisms how basophils and anti-inflammatory M2 macrophages dampen excess allergic inflammation. We discovered that activated basophils release IL-4 and enhance the capacity of dead cell clearance in M2 macrophages, thus preventing the aggravation of allergic inflammation caused by dead cell-derived mediators, including IL-1.

研究分野：免疫学

キーワード：好塩基球 M2マクロファージ IL-4 死細胞 IL-1 炎症抑制 アレルギー 免疫学

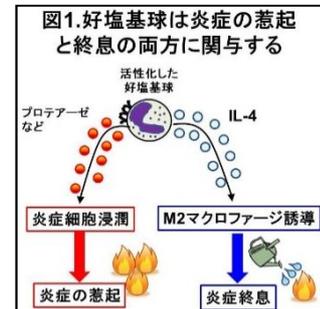
1. 研究開始当初の背景

我が国において、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、ぜんそくといったアレルギー疾患の罹患者はおよそ3人に1人存在しており、国民病といわれるほどである。なかでも慢性型のアレルギー疾患に関しては病態も不明の部分が多く残されており、根本的治療法の開発は喫緊の課題である。

好塩基球は、末梢血白血球中のわずか0.5%ほどしか存在しない希少な白血球集団である。好塩基球の機能については長らく謎のままであったが、ここ10-20年ほどで好塩基球除去抗体や好塩基球特異的欠損マウスなど好塩基球に関する研究ツールが次々に開発され、好塩基球の生理学的・病理学的機能に関する理解が格段に進んでいる。特に好塩基球は慢性アレルギー炎症の誘導に重要な役割を果たすことが分かかってきており、アレルギー疾患とのかわり近年注目されている (*Allergol Int* 2017)。

申請者らは以前、IgE依存性遅延発症型皮膚アレルギー炎症モデル(IgE-CAI: IgE-dependent chronic allergic inflammation)を樹立した。本モデルでは、まずマウスにハプテン特異的なIgE抗体を受動感作しておき、その翌日にアレルゲンを皮内投与する。その結果、アレルゲン投与後3-4日をピークとして1週間ほど続く非常に強い耳の腫れが観察され、炎症局所には好酸球を中心とする炎症細胞の浸潤が観察される。本モデルにおける炎症の様相が、慢性アレルギーの様相を呈していたため、本炎症をIgE依存性慢性アレルギー炎症と名付けた。この炎症を誘導する責任細胞を検索した結果、顆粒球の一種である好塩基球が慢性アレルギー炎症の誘導に重要な役割を果たしていることを解明した。(図1)さらなる解析から、本モデルでは好塩基球が炎症局所に浸潤して活性化し、プロテアーゼやサイトカインをはじめとする様々な炎症性物質が放出されることで炎症が惹起されることが明らかになっている。

一方、本モデルでは炎症誘導後1週間ほどで炎症は終焉する。この炎症終焉のメカニズムを検索したところ、好塩基球が自身の産生するIL-4によってM2マクロファージを誘導し、炎症を終息させることを明らかにした(図1)。(*Immunity* 2013) 炎症局所においてM2マクロファージが産生できないマウスでは、アレルギー炎症が持続し、炎症細胞の浸潤も増加してしまう。以上より好塩基球によって誘導されたM2マクロファージはアレルギー炎症の抑制に重要な役割を果たす。しかしながら、このM2マクロファージがどのようにして炎症抑制機能を果たしているのかはほとんどわかっていない。



2. 研究の目的

本研究では、好塩基球・M2マクロファージによるアレルギー炎症終息の仕組みを解明し、アレルギー症状の発症後であっても、アレルギー症状を改善する新規治療標的の発見につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

ケモカイン受容体の一つであるCCR2が欠損しているマウス(*Ccr2*^{-/-})では、炎症性単球が血中から皮膚炎症局所へと浸潤できないため、炎症抑制型マクロファージが産生できず、アレルギー炎症が遷延化し、炎症細胞浸潤が著明に増加することが明らかになっている(*Immunity* 2013)。本研究では炎症抑制型マクロファージが炎症局所に存在しないCCR2欠損マウスと野生型マウスを比較することで、炎症抑制型マクロファージの炎症抑制機構を検討した。さらに、炎症性単球は炎症局所へと浸潤するがIL-4を受けられないIL-4受容体欠損マウス(*Il4ra*^{-/-})と野生型マウスを比較してM2マクロファージの機能について評価した。

CCR2欠損マウス、IL-4受容体欠損マウスにおけるIgE-CAIの評価

野生型マウスおよびCCR2欠損マウス、IL-4受容体欠損マウスにハプテンTNP特異的IgE抗体を静脈投与することで受動感作しておき、その翌日にアレルゲンとしてハプテンTNP結合卵白アルブミン(TNP-OVA)を皮内投与することでIgE-CAIを誘導した。それぞれのマウスにおいて耳の腫れを5-7日間測定し炎症を評価した。さらにアレルゲン投与後1-5日後において、皮膚炎症局所をフローサイトメトリーや定量的PCR法、さらには組織学的な解析を行うことにより、多面的に評価した。さらに、炎症悪化におけるIL-1ファミリーサイトカインの役割を解析する目的で、炎症誘導前よりIL-1aまたはIL-1bに対する中和抗体あるいはコントロール抗体を投与し、耳の腫れや炎症細胞の浸潤を評価した。

炎症局所のマクロファージの遺伝子解析

さらに炎症抑制型マクロファージの機能を解析する目的で、マイクロアレイにより、炎症抑制型M2マクロファージに発現する遺伝子を網羅的に解析した。具体的には野生型マウス及びIL-4受容体欠損マウスにIgE-CAIを誘導し、5日目に炎症局所の皮膚よりマクロファージを単離して遺伝子解析した。コントロールとして、コントロール抗原(卵白アルブミン;OVA)を投与した皮膚におけるマクロファージの遺伝子も同時に解析した。

in vitro において誘導した M2 マクロファージの機能解析

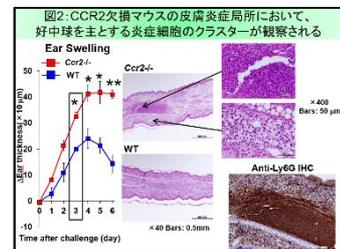
最後に炎症抑制型マクロファージの機能を *in vitro* にて解析した。特に、死細胞の貪食能を解析する目的で、pH-rodo にて蛍光ラベルした死細胞の貪食能を解析した。マウス骨髄より炎症性単球を単離し、単離した単球と活性化した好塩基球由来の上清を 2 日間共培養することで、M2 マクロファージを誘導した。誘導したマクロファージと蛍光ラベルした死細胞を 1 時間共培養して、フローサイトメトリーで解析することで、貪食能を検討した。

4. 研究成果

CCR2 欠損マウス、IL-4 受容体欠損マウスにおける IgE-CAI の評価

CCR2 欠損マウスにおいて IgE-CAI を誘導すると、以前の報告と同様に、野生型マウスと比較して耳の腫れが有意に悪化しさらに腫れが遷延することが明らかになった。さらに、浸潤してくる炎症細胞をフローサイトメトリーにて解析したところ、炎症細胞の浸潤が CCR2 欠損マウスにて有意に増加していることが分かった。炎症細胞中でも CCR2 欠損マウスでは好中球の浸潤が著明に増加しており野生型マウスと比較して 30-50 倍程度に浸潤数が増加していることが明らかになった。さらに、CCR2 欠損マウスに野生型の炎症性単球を移入したマウスで IgE-CAI を誘導した場合には、耳の腫れの悪化や、好中球を含む細胞浸潤の増加が抑えられることから、単球由来のマクロファージが、好中球の浸潤や耳の腫れの悪化を抑制する効果を持つことが示唆された。さらに IL-4 受容体欠損マウスに IgE-CAI を誘導した場合にも、好中球浸潤の増加や耳の腫れの悪化・遷延化が認められることから、炎症抑制型の M2 マクロファージは好中球の浸潤に抑制的に働いていることが示唆された。

このとき、炎症局所の皮膚の組織学的な解析を行ったところ、CCR2 欠損マウスの皮膚では、炎症細胞は一様に分布しているわけではなく、クラスターを形成していることが明らかになった。免疫細胞染色により、こちらのクラスターを染色したところ、クラスターの構成細胞はほとんどが Ly-6G 陽性の好中球であることが明らかになった(図 2)。さらに、TUNEL 染色により、死細胞を染色したところ、このクラスター内部に死細胞が集積していることが明らかになった。このことから、M2 マクロファージは好中球などの死細胞を含むクラスターの形成を抑制することで、炎症が過度に悪化しないようにしていると考えられた。



過去の研究から、好中球による膿瘍形成には IL-1R シグナルが重要であることが報告されている。このことから、次に CCR2 欠損マウスの IgE-CAI における IL-1R シグナルの重要性を検討する目的で、CCR2 欠損マウスに IL-1 α 、IL-1 β の中和抗体、またはコントロール抗体を投与し IgE-CAI を誘導した。その結果、IL-1 α の中和抗体を投与した場合には、有意に耳の腫れが減少し、好中球の浸潤も抑制される一方で、IL-1 β の中和抗体を投与した場合には耳の腫れの抑制はほとんど認められないことが明らかになった。IL-1 α は主に死細胞より放出されることから、CCR2 欠損マウスでは死細胞由来の IL-1 α により、好中球を中心とするクラスターが形成され、アレルギー炎症の悪化が認められるようになることが示唆された。

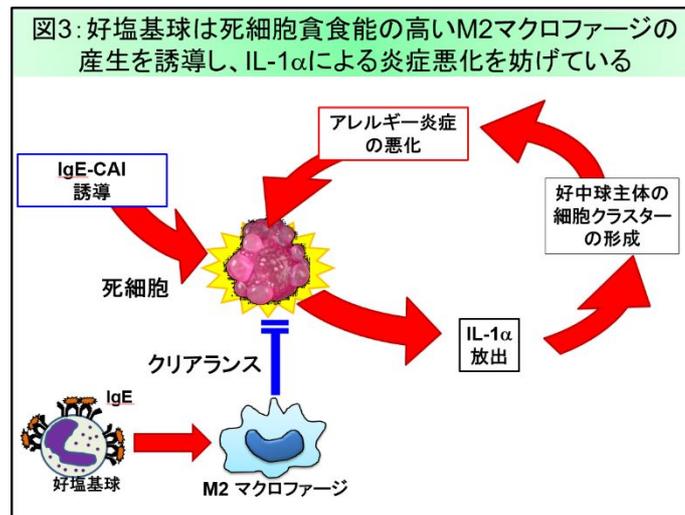
炎症局所のマクロファージの遺伝子解析

さらに、皮膚炎症局所に存在するマクロファージによる炎症抑制メカニズムを解析するために、野生型マウス、IL-4 受容体マウスに IgE-CAI を誘導し、それぞれの皮膚炎症局所よりマクロファージを単離した。単離したマクロファージをマイクロアレイにより解析し、網羅的に発現遺伝子を解析したところ、野生型マウスのマクロファージでは *Arg1*, *Fizz1*, *Chil3*, *Mrc1* といった M2 マクロファージに特徴的に発現する遺伝子の発現亢進が認められた。さらに、野生型マウスにおいて発現亢進が認められる遺伝子についてオントロジー解析をしたところ、エンドサイトーシスに関連する遺伝子において有意に発現亢進が認められた。この結果と合わせると、皮膚炎症局所の M2 マクロファージにおいては、死細胞を速やかに貪食することで、炎症の悪化を妨げていることが示唆された。

in vitro において誘導した M2 マクロファージの機能解析

最後に、実際に活性化した好塩基球により誘導された M2 マクロファージが死細胞貪食能の亢進が認められるのかどうかを *in vitro* にて解析した。その結果、炎症性単球と活性化した好塩基球由来の上清を共培養することで分化した M2 マクロファージは好塩基球と比べ優位に高い死細胞貪食能を有することが明らかになった。さらに、死細胞貪食能の亢進は、抗 IL-4 中和抗体を投与することにより有意に減弱することから、好塩基球由来の IL-4 が炎症性単球に働くことで、死細胞の貪食能を高める効果を持つことが示唆された。

以上の結果より、好塩基球は活性化することで IL-4 を放出し、それが炎症性単球に働くことで、死細胞貪食能の高い M2 マクロファージの分化に寄与することが明らかになった。CCR2 欠損マウスなどでこの経路が遮断されると、死細胞の適切なクリアランスが行われず、死細胞が IL-1a などの危険分子を放出することにより、好中球の浸潤が増加しアレルギー炎症が悪化してしまうことが示唆された(図 3)。本研究の結果から、好塩基球・M2 マクロファージによる炎症抑制機構の一端が明らかになった。この知見をさらに応用すれば、慢性アレルギー炎症の新規治療標的の発見につながると思われる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 0件）

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 Yang Yue, Nagai Shigenori, Kang Siwen, Xia Yulong, Kawano Yohei, Miyake Kensuke, Karasuyama Hajime, Azuma Miyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Tolerogenic properties of CD206+ macrophages appeared in the sublingual mucosa after repeated antigen-painting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International 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) 10.1093/intimm/dxaa014	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 三宅 健介, 烏山 一	4. 巻 49
2. 論文標題 好塩基球による、トロゴサイトーシスを介した新たな抗原提示メカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 感染・炎症・免疫	6. 最初と最後の頁 61-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 三宅 健介, 吉川 宗一郎, 柴田 翔, 山西 吉典, 烏山 一.	4. 巻 73
2. 論文標題 【アレルギーのエフェクター細胞研究の進展】好塩基球	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 6-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Tabakawa Yuya, Ohta Takuya, Yoshikawa Soichiro, Robinson Elisabeth J., Yamaji Kayoko, Ishiwata Kenji, Kawano Yohei, Miyake Kensuke, Yamanishi Yoshinori, Ohtsu Hiroshi, Adachi Takahiro, Watanabe Naohiro, Kanuka Hirotaka, Karasuyama Hajime	4. 巻 9
2. 論文標題 Histamine Released From Skin-Infiltrating Basophils but Not Mast Cells Is Crucial for Acquired Tick Resistance in Mice	5. 発行年 2018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) https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01540	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 Karasuyama Hajime, Miyake Kensuke, Yoshikawa Soichiro, Yamanishi Yoshinori	4. 巻 142
2. 論文標題 Multifaceted roles of basophils in health and disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 370 ~ 380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.10.042	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 Karasuyama Hajime, Miyake Kensuke, Yoshikawa Soichiro, Kawano Yohei, Yamanishi Yoshinori	4. 巻 30
2. 論文標題 How do basophils contribute to Th2 cell differentiation and allergic responses?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 391 ~ 396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1093/intimm/dxy026	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 Shibata Sho, Miyake Kensuke, Tateishi Tomoya, Yoshikawa Soichiro, Yamanishi Yoshinori, Miyazaki Yasunari, Inase Naohiko, Karasuyama Hajime	4. 巻 115
2. 論文標題 Basophils trigger emphysema development in a murine model of COPD through IL-4-mediated generation of MMP-12-producing macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 13057 ~ 13062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1073/pnas.1813927115	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 Nagao Toshihisa, Yamanishi Yoshinori, Miyake Kensuke, Teranishi Mio, Takahashi Saori, Yoshikawa Soichiro, Kawano Yohei, Karasuyama Hajime	4. 巻 31
2. 論文標題 Aggregation makes a protein allergenic at the challenge phase of basophil-mediated allergy in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 41 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1093/intimm/dxy062	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 三宅 健介	4. 巻 11
2. 論文標題 免疫学のABC(第8回) 顆粒球の作用と役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 分子リウマチ治療	6. 最初と最後の頁 148 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 三宅 健介、山西吉典、 烏山 一	4. 巻 70
2. 論文標題 トロゴサイトーシスを介した好塩基球による抗原提示機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 623 ~ 630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 三宅 健介、吉川 宗一郎、山西 吉典、烏山 一	4. 巻 71
2. 論文標題 Th2型免疫応答における好塩基球の役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 177 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 柴田 翔, 立石 知也, 小林 正嗣, 大久保 憲一, 明石 巧, 三宅 健介, 山西 吉典, 烏山 一, 宮崎 泰成
2. 発表標題 慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者の肺組織に好塩基球が浸潤している
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅 健介
2. 発表標題 好塩基球は炎症抑制型のM2マクロファージを誘導することで、アレルギー炎症の悪化を妨げる
3. 学会等名 2019年先端モデル動物支援若手技術支援講習会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyake K, Yoshikawa S, Yamanishi Y, Karasuyama H.
2. 発表標題 Basophils promote the differentiation of monocytes into M2-like macrophages which dampen IL-1 ⁻ mediated aggravation of allergic inflammation
3. 学会等名 17th IUIS 2019 (International Congress of Immunology) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshikawa S, Oh-hora M, Hashimoto R, Miyake K, Adachi T, Kawano Y, Yamanish Y, Kamiya A, Karasuyama H
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 IUIS 2019 (International Congress of Immunology) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyake K, Yoshikawa S, Yamanishi Y, Karasuyama H
2. 発表標題 Monocyte-derived M2-like macrophages induced by activated basophils dampen IL-1 β -mediated aggravation of allergic inflammation
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ito J, Miyake K, Shichino S, Yamanishi Y, Karasuyama H
2. 発表標題 Identification of immature-type basophils that are distinguishable from mature ones in terms of surface phenotype and activation property
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mogi K, Takahashi K, Miyake K, Yoshikawa S, Karasuyama H, Yamanishi Y
2. 発表標題 Basophil-derived IL-4 promotes disease progression in a hapten-elicited murine model of atopic dermatitis
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kensuke Miyake、 Ayako Fukui、 Soichiro Yoshikawa、 Yoshinori Yamanishi、 Hajime Karasuyama
2. 発表標題 Basophils promote monocyte differentiation to M2-like macrophages that display enhanced capacity of allergen clearance.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshihisa Nagao、Yoshinori Yamanishi、Kensuke Miyake、Mio Teranishi、Soichiro Yoshikawa、Yohei Kawano、Hajime Karasuyama
2. 発表標題 Aggregation makes a protein allergenic at the challenge phase of basophil-mediated allergy in mice.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Soichiro Yoshikawa、Yuya Tabakawa、Takuya Ohta、Kayoko Yamaji、Kenji Ishiwata、Yohei Kawano、Yoshinori Yamanishi、、Hiroshi Ohtsu、Takahiro Adachi、Naohiro Watanabe、Hirotaka Kanuka、Hajime Karasuyama
2. 発表標題 Histamine Released From Skin-Infiltrating Basophils but not mast cells is crucial for acquired tick resistance in mice.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔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