

平成21年4月2日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390110
 研究課題名（和文） 好塩基球の生体内における存在意義・役割の解明

研究課題名（英文） Study on *in vivo* roles of basophils

研究代表者

烏山 一 (KARASUYAMA HAJIME)
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：60195013

研究成果の概要：

好塩基球は末梢血白血球のわずか 0.5% を占めるに過ぎない最少血球細胞であり、またマスト細胞と類似性があるために、その存在意義が疑問視されていた。私たちは本研究において、好塩基球が IgE 依存性慢性アレルギー炎症ならびに IgG 依存性全身性アナフィラキシーの責任細胞であることを世界に先駆けて明らかにした。本研究により、生体内において好塩基球とマスト細胞が明らかに異なる役割を果たしていることが証明された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症、好塩基球、アレルギー、アナフィラキシー

1. 研究開始当初の背景

顆粒球のひとつである好塩基球は、1879年に Ehlich によって初めて記載されたが、その後 130 年近く経た現在でも、その全容とりわけ機能の解明は遅々として進んでいない。好塩基球は末梢血白血球のわずか 0.5% を占めるに過ぎない最少血球細胞であり、また IgE 受容体の発現やヒスタミンを含むケミカルメディエーターの分泌などマスト細胞との共通点が多いことから、「血中循環型マスト細胞」と揶揄されるなど、マスト細胞の陰に

隠れた脇役として無視され続けてきたといっても過言ではない。これまで、病理組織学的解析からアレルギー炎症部位において、しばしば好塩基球の浸潤が見られること、また寄生虫感染症において好塩基球増多・浸潤が観察されることなどから、好塩基球とアレルギー疾患や寄生虫感染との関連が示唆されていたが、これらの病態において好塩基球が決定的な役割を果たしているという明確な証拠は示されなかった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでほとんど体系的な機能解析が進んでいなかった好塩基球にスポットをあて、感染防御など自然免疫における役割、Th2 サイトカイン分泌細胞としての獲得免疫調節における役割ならびに慢性アレルギー疾患などの免疫病発症における役割を解明する。これまで好塩基球に関する研究が遅々として進まなかった原因は、好塩基球特異抗体、好塩基球欠損動物といった研究の基盤となるリソースがまったくといっていいほど欠如していることにある。そこで本研究では、好塩基球特異的モノクローナル抗体を作製して、生体内での好塩基球の検出ならびに除去に応用する。また、発生工学的手法により好塩基球のみを欠損するマウスならびに好塩基球のみに GFP を発現するマウスを樹立する。本研究では、このように樹立した *in vivo* ならびに *in vitro* のシステムを用いて、好塩基球の生体内での役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) 好塩基球特異的モノクローナル抗体の作製：マウス骨髄から好塩基球を調整し、それを過免疫したラットのリンパ節からハイブリドーマを樹立した。

(2) 好塩基球特異的 GFP マウスの作製：BAC engineering を応用して、好塩基球特異的遺伝子を GFP で置き換えたトランスジェニックマウスを作製した。

(3) 好塩基球欠損マウスの作製：好塩基球特異的遺伝子を細菌毒素遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウスならびに細菌毒素受容体に置き換えたノックインマウスを作製した。

(4) 慢性アレルギー炎症の誘導：マウスを IgE で受動感作したのち、耳介に抗原を皮下投与した。

(5) 全身性アナフィラキシーの誘導：マウスを IgG あるいは IgE で受動感作したのち、抗原を静脈注射した。

4. 研究成果

(1) 好塩基球除去抗体の樹立

マウス好塩基球をラットに免疫して作製したモノクローナル抗体のひとつ Ba103 をマウスに投与すると、好塩基球が生体内から除去されることが判明した。一方、マスト細胞の数、機能には影響が認められなかった。このような抗体は未だかつて作製されたこと

はなく、Ba103 が世界初の好塩基球除去抗体であり、生体内での好塩基球の機能解析のための強力な武器が完成したことになる (Obata et al. *Blood*, 2007)。

(2) 好塩基球は IgE 依存性慢性アレルギー炎症のイニシエーターである。

マウスに Ba103 を前投与しておくとも IgE 依存性の皮膚慢性アレルギー炎症の発症が阻止されたことから、好塩基球が慢性アレルギー炎症の責任細胞であることが証明された。アレルギー炎症がすでにはじまってから Ba103 を投与すると、皮膚腫脹が緩解し、皮膚に浸潤している好酸球と好中球が好塩基球とともに激減することがわかった。すなわち、好塩基球は炎症のエフェクターではなくイニシエーターとして、他の炎症性細胞の浸潤誘導に関わっていると考えられた (Obata et al. *Blood*, 2007)。

(3) 好塩基球は IgG を介する全身性アナフィラキシーの責任細胞である

従来より知られていた「IgE・マスト細胞・ヒスタミンを介する全身性アナフィラキシー」とは全く異なる「IgG・好塩基球・血小板活性化因子」を介する新たなアナフィラキシー誘導機構があることを明らかにした (Tsujiura et al. *Immunity*, 2008)。すなわち、血中をめぐる IgG がアレルゲンと結合して免疫複合体が形成されると、好塩基球は IgG 受容体を介して複合体を捕捉し、活性化される。活性化好塩基球は強力な生理活性を有する血小板活性化因子を分泌してアナフィラキシーを誘導することがわかった。これは臨床医学的にも重要な発見である。

(4) 抗体非依存的な好塩基球活性化機構

本研究で樹立に成功した好塩基球認識抗体 (Ba91 と Ba103) の標的分子が CD200 受容体様分子のひとつ CD200R3 であることを明らかにした (Kojima et al. *J. Immunol*, 2007)。CD200R3 がアダプター分子 DAP12 と会合して細胞表面に表出し、活性型受容体として好塩基球に活性化シグナルを伝達することが判明した。すなわち、これまで知られていた抗体 (IgE や IgG) を介する経路とは異なる抗体非依存性の好塩基球活性化経路が存在することが明らかとなった。

(5) 好塩基球によるマクロファージの活性化制御

IgE 依存性慢性アレルギー炎症の系において、活性化された好塩基球が産生・分泌する

Th2 サイトカインがマクロファージの非古典的活性化に寄与していることを示唆する実験結果を得た。現在、その分子機構ならびに生理学的・病理学的意義を解析している。

(6) 好塩基球特異的 GFP マウスならびに好塩基球欠損マウスの樹立

BAC engineering を応用して、好塩基球のみが GFP を発現するマウスの樹立に成功した。現在このマウスを使って、アレルギー炎症や寄生虫感染時の好塩基球の動態を解析している。好塩基球特異的遺伝子を細菌毒素受容体に置き換えたノックインマウスに関しては、現在その発現特異性を確認している。

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 34 件)

1. Karasuyama, H., Mukai, K., Tsujimura, Y. and Obata, K.: Newly-discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 9-13, 2009. (査読有り)
2. Hida, S., Yamasaki, S., Sakamoto, Y., Takamoto, M., Obata, K., Takai, T., Karasuyama, H., Sugane, K., Saito, T. and Taki, S.: Fc receptor γ -chain, a constitutive component of the interleukin 3 receptor is required for interleukin 3-induced interleukin 4. *Nat. Immunol.* 10: 214-222, 2009. (査読有り)
3. Yoshikawa, S., Kawano, Y., Minegishi, Y. and Karasuyama, H.: The skewed heavy-chain repertoire in peritoneal B-1 cells is predetermined by the selection via pre-B cell receptor during B cell ontogeny in the fetal liver. *Int. Immunol.* 21: 43-52, 2009. (査読有り)
4. Mukai, K., Obata, K., Tsujimura, Y. and Karasuyama, H.: New insights into the roles for basophils in acute and chronic allergy. *Allergol. Int.* 58: 11-19, 2009. (査読有り)
5. Minegishi, Y. and Karasuyama, H.: Defects in Jak-STAT-mediated cytokine signals cause hyper-IgE syndrome: lessons from a primary human immunodeficiency. *Int. Immunol.* 21: 105-112, 2009. (査読有り)
6. Khodoun, M., Strait, R., Orekov, T., Hogan, S., Karasuyama, H., Herbert, D. R., Köhl, J. and Finkelman, F. D.: Peanuts can contribute to anaphylactic shock by activating complement. *J. Allergy Clin. Immunol.* 58: 11-19, 2009. (査読有り)
7. Belkina N. V., Lie, Y., Hao J-J., Karasuyama, H. and Shaw, S.: LOK is a major ERM kinase in resting lymphocytes and regulates cytoskeletal rearrangement through ERM phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 4707-4712, 2009. (査読有り)
8. 鳥山 一: 「免疫アレルギー研究の表舞台に躍り出た好塩基球」アレルギー・免疫 16(3): 9-10, 2009 (査読無し)
9. 小島利之、小畑一茂、鳥山 一: 「CD200R3 を介した好塩基球とマスト細胞の活性化」アレルギー・免疫 16(3): 44-51, 2009 (査読無し)
10. 辻村祐佑、小畑一茂、鳥山 一: 「好塩基球による IgG 型アナフィラキシーの誘導」アレルギー・免疫 16(3): 62-71, 2009 (査読無し)
11. 向井香織、鳥山 一: 「好塩基球が主役を演じる慢性アレルギー炎症」アレルギー・免疫 16(3): 72-77, 2009 (査読無し)
12. Tsujimura, Y., Obata, K., Mukai, K., Shindou, H., Yoshida, M., Nishikado, H., Kawano, Y., Minegishi, Y., Shimizu, T. and Karasuyama, H.: Basophils play a pivotal role in immunoglobulin G- but not immunoglobulin E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity* 28: 581-589, 2008. (査読有り)
13. Yasuda, T., Sanjo, H., Pagès, G., Kawano, Y., Karasuyama, H., Pouysségur, J., Ogata, M. and Kurosaki, T. Erk kinases link pre-B cell receptor signaling to transcriptional events required for early B cell expansion. *Immunity* 28: 499-508, 2008. (査読有り)
14. Minegishi, Y. and Karasuyama, H.: Genetic origins of hyper-IgE syndrome. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 8(5): 386-91, 2008. (査読有り)
15. Watanabe, M., Satoh, T., Yamamoto, Y., Kanai, Y., Karasuyama, H. and Yokozeki, H.: Overproduction of IgE induces macrophage-derived chemokine (CCL22) secretion from basophils. *J. Immunol.* 181: 5653-5659, 2008. (査読有り)
16. Takada, T., Shitara, H., Matsuoka, K., Kojima, E., Ishii, R., Kikkawa, Y.,

- Karasuyama, H., Kohno, K. and Yonekawa, H.: A novel hairless mouse model on an atopic dermatitis-prone genetic background generated by receptor-mediated transgenesis. *Transgenic Res.* 17(6): 1155-1162, 2008. (査読有り)
17. 横関博雄、鳥山 一、佐藤貴浩:「皮膚アレルギーと好塩基球」皮膚アレルギーフロンティア 6 (2): 118-125, 2008 (査読無し)
18. 辻村祐佑、小畑一茂、向井香織、鳥山 一:「好塩基球の21世紀ルネサンスー生体内における好塩基球のユニークな役割が次々と明らかにー」臨床血液 49 (7): 489-497, 2008 (査読無し)
19. 鳥山 一:「アナフィラキシー・ショックを引き起こす新たな仕組み - 好塩基球の知られざる役割が明らかに」Dental Diamond 33: 66-70, 2008 (査読無し)
20. 辻村祐佑、鳥山 一:「アナフィラキシー・ショックを引き起こす新たなメカニズム - 好塩基球・IgG・血小板活性化因子を介した即時型アレルギー」細胞工学 27 (10): 1030-1031, 2008 (査読無し)
21. 鳥山 一:「アナフィラキシーショック発症の新たなメカニズム」日本医事新報 4402: 45-48, 2008 (査読無し)
22. 鳥山 一:「危険なアレルギー反応の新たな仕組みが明らかに」科学 (岩波書店) 78(11): 1246-1251, 2008 (査読無し)
23. 鳥山 一:「慢性アレルギー炎症ならびにアナフィラキシーにおける好塩基球のあらたな役割」医学のあゆみ 227 (5): 361-366, 2008 (査読無し)
24. 小畑一茂、小島利之、辻村祐佑、向井香織、鳥山 一:「好塩基球とマスト細胞に発現する CD200R3」臨床免疫・アレルギー科 50 (5): 595-602, 2008 (査読無し)
25. Obata, K., Mukai, K., Tsujimura, Y., Ishiwata, K., Kawano, Y., Minegishi, Y., Watanabe, N., and Karasuyama, H.: Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood* 110: 913-920, 2007. (査読有り)
26. Minegishi, Y., Saito, M., Tsuchiya, S., Tsuge, I., Takada, H., Hara T., Kawamura, N., Ariga, T., Pasic, S., Stojkovic, O., Metin, A., and Karasuyama, H.: Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 448: 1058-1062, 2007. (査読有り)
27. Kojima, T., Obata, K., Mukai, K., Sato, S., Takai, T., Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: Mast cells and basophils are selectively activated *in vitro* and *in vivo* through CD200R3 in an IgE-independent manner. *J. Immunol.* 179: 7093-7100, 2007. (査読有り)
28. Minegishi, Y. and Karasuyama, H.: Hyperimmunoglobulin E syndrome and tyrosine kinases 2 deficiency. *Curr. Opin. Allergy Clin Immunol.* 7: 506-509, 2007. (査読有り)
29. 向井香織、鳥山 一:「好塩基球によるIgE依存性慢性アレルギー炎症」アレルギー・免疫 (医薬ジャーナル) 14(2): 40-45, 2007 (査読無し)
30. 向井香織、鳥山 一:「慢性アレルギー炎症における好塩基球の役割」皮膚アレルギーフロンティア (メディカルレビュー社) 5 (1): 25-29, 2007 (査読無し)
31. 鳥山 一:「好塩基球と慢性アレルギー炎症」医学のあゆみ 220 (12): 949-952, 2007 (査読無し)
32. 鳥山 一:「好塩基球が主役を演じる慢性アレルギー炎症」メディカル・サイエンス・ダイジェスト (ニューサイエンス社) 33 (7): 26-29, 2007 (査読無し)
33. 鳥山 一:「慢性アレルギー炎症における好塩基球の新たな役割」生化学 79 (8): 761-767, 2007 (査読無し)
34. 鳥山 一:「アレルギーと好塩基球」Medical Tribune, Vol. 40, No. 45: 43, 2007 (査読無し)
- [学会発表] (計35件)
1. Karasuyama, H.: Basophils regulate macrophage functions through Th2 cytokines in allergic inflammation. Keystone Symposia 'Allergy and Asthma'. 2009.01.20-25, Keystone, USA.
2. Karasuyama H.: Basophils play a pivotal role in IgG- but not IgE-mediated systemic anaphylaxis in contrast to mast cells. LIAI Allergy Symposium. 2008.4.4. La Jolla, USA.
3. Karasuyama H., Tsujimura Y, Obata K, Mukai K, Shindo H, Shimizu T, Minegishi Y: Basophils and mast cells play distinct roles in

- acute and chronic allergic reactions. 27th Symposium of the Collegium International Allergologicum. 2008.5.1-6. Curacao, USA.
4. Karasuyama H: Chronic cutaneous allergic inflammation – responsible cells and causative genes. International Investigative Dermatology 2008. 2008.5.14-17. Kyoto.
 5. Karasuyama H: Roles of mast cells and basophils in the development of allergic diseases. Frontiers in Allergy and Autoimmunity. 2008.5.30-31. Mainz, Germany.
 6. Karasuyama H: Basophils and mast cells play distinct roles in acute and chronic allergic responses. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2008. 2008.6.5-9. Boston, USA.
 7. Karasuyama H: The role for basophils in the protection against external parasites. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2008.9.9-10. Awaji.
 8. 鳥山 一: 生体防御ならびにアレルギー疾患における好塩基球のユニークな役割. 第32回阿蘇シンポジウム. 2008.8.1-2. 熊本
 9. 鳥山 一: 皮膚慢性アレルギー: 責任細胞と原因遺伝子. 第29回近畿アトピー性皮膚炎懇話会. 2008.10.4. 大阪
 10. 鳥山 一: 見逃されていた好塩基球の重要性. 第36回日本臨床免疫学会. 2008.10.18. 東京
 11. 鳥山 一: 特別講演「好塩基球の21世紀ルネサンスー急性ならびに慢性アレルギーにおける好塩基球の新たな役割」第58回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2008.11.27-29. 東京
 12. 向井香織、鳥山 一: 好塩基球由来 Th2 サイトカインによる alternative activated macrophage の誘導: 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008.11.27-29 東京
 13. Karasuyama H: Basophils regulate macrophage functions through Th2 cytokines : The 38th JSI annual meeting. 2008.12.1-3, Kyoto.
 14. Mukai K, Minegishi Y, and Karasuyama H: Basophils induce alternative activation of macrophages through Th2 cytokine release. : The 38th JSI annual meeting. 2008.12.1-3, Kyoto.
 15. Ugajin T, Kojima T, Obata K, Mukai K, Kawano Y, Minegishi Y, Yokozeki H, and Karasuyama H: Novel tools for immunohistochemical identification of mouse basophils in immune and allergic responses: mAbs specific to basophil granular enzymes mMCP-8 and mMCP-11. : The 38th JSI annual meeting. 2008.12.1-3, Kyoto.
 16. Obata K, Ishiwata K, Wada T, Kawano Y, Minegishi Y, Watanabe N, and Karasuyama H: Basophils play a protective role against *Nippostrongylus brasiliensis*. : The 38th JSI annual meeting. 2008.12.1-3, Kyoto.
 17. Wada T, Obata K, Ishiwata K, Minegishi Y, Watanabe N, and Karasuyama H: The role for basophils in the protection against external parasites. : The 38th JSI annual meeting. 2008.12.1-3, Kyoto.
 18. Karasuyama H, Mukai K, Obata K, Ishiwata K, Watanabe N, Kawano Y, Minegishi Y: Basophils function as initiators rather than effectors in IgE-mediated chronic allergic inflammation, independently of T cells and mast cells. The 94th annual meeting of the American Association of Immunologists. 2007.5.18-22. Miami.
 19. Karasuyama H: The traffic of basophils in allergic responses. The 28th Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. 2007.6.9-13. Goteborg.
 20. Karasuyama H: Basophils functions as initiators rather than effectors in a novel type of chronic allergic inflammation. The 13th International Congress of Immunology. 2007.8.21-25. Rio de Janeiro.
 21. Karasuyama H: Novel mechanism of chronic allergic inflammation; pivotal role of basophils. World Allergy Congress 2007. 2007.12.1-6. Bangkok.
 22. 鳥山 一: 慢性アレルギー性炎症における好塩基球の役割. 第17回国際喘息学会日本北アジア部会 2007.7.6-7. 東京.
 23. 鳥山 一: 即時型ならびに慢性アレルギー反応における好塩基球の新たな役割. 生体機能と創薬シンポジウム 2007 2007.9.13-14 金沢.
 24. Karasuyama H, Mukai K, Obata K, Tsujimura Y, Kawano Y, Ishiwata K, Watanabe N, and

- Minegishi Y: Basophils function as an initiator of chronic allergic inflammation. The 20th Naito Conference. 2007.10.9-12. Kanagawa.
25. 向井香織、峯岸克行、鳥山 一；慢性アレルギー炎症におけるイニシエーターとしての好塩基球の役割: 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007.11.1-3 横浜.
26. 宇賀神つかさ、小島利之、小畑一茂、辻村祐佑、向井香織、河野洋平、峯岸克行、鳥山 一: 好塩基球に選択的に発現する顆粒酵素に対する特異抗体の樹立とその応用: 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007.11.1-3 横浜.
27. 辻村祐佑、河野洋平、峯岸克行、鳥山 一: 好塩基球が中心的な役割を果たす IgG 依存性全身性アナフィラキシー: 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007.11.1-3 横浜.
28. 小畑 一茂、小島 利之、辻村 祐佑、峯岸 克行、鳥山 一: CD200R3 は好塩基球・マスト細胞特異的な活性型受容体として機能する: 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007.11.1-3 横浜.
29. Karasuyama H, Tsujimura Y, Obata K, Mukai K, Kojima T, Nishikado H, Kawano Y, Minegishi Y: Basophils and mast cells play distinct roles in systemic anaphylaxis. The 37th JSI annual meeting. 2007.11.20-22, Tokyo.
30. Mukai K, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H: Basophils function as initiator rather than effectors in IgE-mediated chronic allergic inflammation: The 37th JSI annual meeting. 2007.11.20-23, Tokyo.
31. Kojima T, Obata K, Mukai K, Sato S, Minegishi Y, Karasuyama H: A CD200-like protein CD200R3 is selectively expressed on basophils and a subset of mast cells: The 37th JSI annual meeting. 2007.11.20-23, Tokyo.
32. Ugajin T, Kojima T, Obata K, Tsujimura Y, Mukai K, Kawano Y, Yokozeki H, Minegishi Y, Karasuyama H: Identification and characterization of murine basophil granular enzymes mMCP-8 and mMCP-11: The 37th JSI annual meeting. 2007.11.20-23, Tokyo.
33. Tsujimura Y, Kawano Y, Minegishi Y, and Karasuyama H: Basophils play a pivotal role in IgG-but not IgE-mediated systemic anaphylaxis. The 37th JSI annual meeting. 2007.11.20-22, Tokyo.
34. Obata K, Kojima T, Tsujimura Y, Kawano Y, Minegishi Y. and Karasuyama H: CD200R3 functions as an activating receptor expressed exclusively on basophils and a subset of a mast cells. The 37th JSI annual meeting. 2007.11.20-23, Tokyo.
35. Onuma N, Obata K, Ishiwata K, Watanabe N, Minegishi Y. and Karasuyama H: Possible functions of basophils in the protection against external parasite. The 37th JSI annual meeting. 2007.11.20-22, Tokyo.

〔図書〕 (計2件)

1. 鳥山 一: 「アレルギーにおける好塩基球の新たな役割」 Annual Review 2009 呼吸器 (中外医学社) pp44-51、2009 (査読無し)
2. 鳥山 一: 「アレルギー性炎症」 免疫応答と免疫病態の総合的分子理解 (南山堂) pp189-196、2007 (査読無し)

〔その他〕

ホームページ:

http://www.tmd.ac.jp/med/mbch/top_Japanese.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥山 一 (KARASUYAMA HAJIME)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 60195013

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し