

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15992

研究課題名（和文）外来抗原情報によるマスト細胞・単球の相互作用とアレルギー炎症の制御機構

研究課題名（英文）The role of mast cell and monocyte/macrophage interaction in the regulation of allergic responses

研究代表者

長田 夕佳 (Nagata, Yuka)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：80802016

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）：マスト細胞は、アレルゲン（抗原）に応じて多様な初動応答を担う。多くの細胞と協調して炎症反応調節に寄与するが、単球・マクロファージとの関わりについてはまだ不明な点が多い。本研究により、マスト細胞が抗原情報（親和性）に応じて異なる応答を示すことで、単球からマクロファージへの細胞分化を調節することが明らかとなった。低親和性抗原に反応したマスト細胞は、遅発性にケモカイン分泌を亢進させ、炎症性単球の遊走を促進した。さらに炎症性サイトカイン産生の多いマクロファージへと細胞分化を誘導した。これらの知見は、マスト細胞による単球・マクロファージを介した遅発性炎症反応の調節を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー疾患の有病率は依然として高く、多様化するアレルゲン（抗原）によって病態の複雑化が懸念されている。本研究により、低親和性抗原刺激を受けたマスト細胞が遅発性にケモカイン分泌を亢進させ、炎症性単球の遊走を促進し、炎症性サイトカイン産生の多いマクロファージへの分化を誘導することが分かった。マスト細胞は即時型炎症を惹起するのみならず、単球・マクロファージを介して遅発型炎症にも関与すると考えられる。この知見を発展させることで、慢性で難治性のアレルギー炎症応答のメカニズムを解明することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Mast cells exhibit diverse responses to various antigens, and the affinity of IgE and antigen is the initiating factor for these responses. Although some interactions between mast cells and other immune cells have been suggested in response to antigens, information on the interactions between mast cells and monocytes/macrophages remains limited. This study has investigated that IgE/antigen-induced mast cell allergic responses regulate the differentiation of monocytes into macrophages. Mast cells stimulated by low-affinity antigen promoted the secretion of chemokines, leading to the migration of inflammatory monocytes that eventually differentiate into TNF-alpha or IL-1beta producing macrophages. These observations conclusively suggest that the antigen-specific heterogeneous responses of mast cells influence macrophage differentiation and the prolonged duration of allergic inflammation.

研究分野：アレルギー・免疫学

キーワード：マスト細胞 単球 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー炎症組織ではマスト細胞と単球・マクロファージが近接する様子が観られるが、詳細なメカニズムや意義は不明であった。マスト細胞はI型アレルギーの主要な細胞として、様々なアレルゲン(抗原)に対して初動応答を担っている。単球は、炎症が起こると血中から組織に移行し、炎症組織に動員される。炎症組織で単球から分化した炎症性(M1マクロファージ)や抗炎症性(M2マクロファージ)マクロファージが、微細な環境変化で数や割合を変化させ、炎症・抗炎症バランスを制御している「M1/M2マクロファージ」のコンセプトは多くの疾患でその重要性が証明されている。アレルギー疾患においても、慢性皮膚炎モデルにおけるM2マクロファージによる炎症抑制(Egawa M et al. *Immunity*. 2013)など、その重要性が示唆される。しかし、これらマクロファージのM1/M2分化調節因子については、その全貌はまだ明らかでない。炎症環境に依存して起こる単球からM1/M2マクロファージへの分化は、アレルギー炎症下では、抗原刺激に依存して分泌反応等を調節するマスト細胞がそれを司る可能性があるが、まだ究明されていない。本研究では、マスト細胞と単球・マクロファージによるアレルギー炎症調節機構の解明を試みた。

## 2. 研究の目的

抗原刺激を受けたマスト細胞が単球・マクロファージに及ぼす影響を明らかにし、マスト細胞-単球・マクロファージによるアレルギー炎症調節機構を解明する。

## 3. 研究の方法

### 3-1 抗原の作製

多くのアレルゲン(抗原)は、タンパク質などの高分子化合物(キャリア)に低分子化合物(ハプテン)が結合した複合体を形成している。本研究では、キャリアとハプテンを独自に結合し、さらに、IgEとの親和性が異なるハプテンを用いることで、抗原性(高親和性、低親和性)の異なる抗原を作製した。

### 3-2 マスト細胞と単球・マクロファージの共培養

マウス骨髄由来初代培養マスト細胞とマウス骨髄から細胞磁気分離により単離した骨髄単球を各種培養条件で共培養した(図1)。抗原情報(高親和性、低親和性)を受容したマスト細胞の活性化に伴う単球・マクロファージの変化(細胞遊走、分化、活性化等)をトランスウェル遊走解析やフローサイトメトリー等で評価した。単球・マクロファージのフェノタイプは細胞免疫染色や定量的RT-PCR等で同定した。

### 3-3 アレルギー炎症組織のホールマウント免疫染色

マウスに受動皮膚アナフィラキシー応答を誘導し、アレルギー炎症組織を採取し、炎症反応の評価およびマスト細胞と単球・マクロファージの局在変化やフェノタイプ同定について、ホールマウント免疫染色、組織染色、定量的RT-PCR等で解析した。

### 3-4 単球・マクロファージ欠損によるマスト細胞応答変化の解析

単球・マクロファージ枯渇作用を有するクロドロン酸を内包するリポソームをマウスに投与し、単球・マクロファージの枯渇を確認した後、受動皮膚アナフィラキシー応答を誘導した。ホールマウント免疫染色、定量的RT-PCR等により、単球・マクロファージ枯渇に伴うマスト細胞応答およびアレルギー応答変化を解析した。

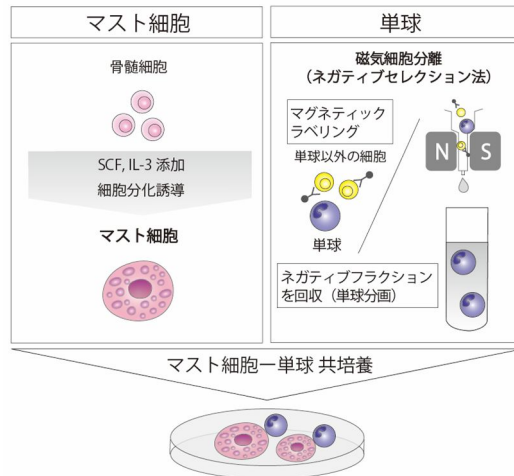


図1 マウス骨髄マスト細胞と骨髄単球の共培養システムの作製

#### 4. 研究成果

マウス骨髄由来初代培養マスト細胞と骨髄単球を共培養することによって、単球からマクロファージへの細胞分化が亢進した。これは、マスト細胞の培養培地（成長因子を含む）のみでは観察されず、また、マスト細胞非刺激下よりも抗原刺激下の方が顕著に亢進することがわかった。このように、少なくとも *in vitro* 条件下において、抗原刺激を受けたマスト細胞は単球に影響を及ぼし、単球からマクロファージへの細胞分化を誘導することが明らかとなった（図2）。

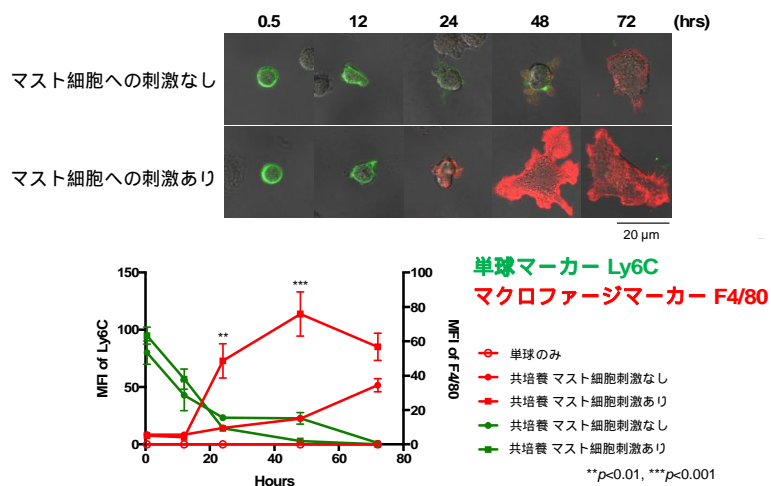


図2 活性化マスト細胞による単球からマクロファージへの分化誘導

マスト細胞の抗原刺激応答は極めて複雑であり、IgE と抗原の親和性によって大きく異なる (Suzuki R et al. Science. 2014)。低親和性抗原刺激を受けたマスト細胞は遅発性にケモカインの分泌が亢進する。親和性（高親和性、低親和性）の異なる抗原を用いて、マスト細胞がマクロファージへ分化に及ぼす影響を解析したところ、いずれの抗原でも同様に単球からマクロファージへの分化が観られた。しかし、分化したマクロファージのフェノタイプは、抗原（高親和性、低親和性）によって異なっていた。高親和性刺激マスト細胞によって誘導されたマクロファージは、抗炎症（M2）マクロファージマーカー分子を高発現した。一方、低親和性抗原刺激マスト細胞によって誘導されたマクロファージは高和性抗原刺激の場合とは異なるマーカーを発現する細胞に分化していた。このような異なるマクロファージへの分化は、細胞免疫染色およびフローサイトメトリーで同様に確認された。さらに、マクロファージからのサイ

トカイン分泌について解析したところ、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の分泌は、低親和性抗原刺激マスト細胞によって有意に亢進した。これらのことから、マスト細胞の抗原刺激応答により、単球からマクロファージへの細胞分化が調節されることが明らかとなった。

これらの結果をアレルギー炎症局所で検証するため、IgE 感作したマウスに各抗原（高親和性、低親和性）を投与し、ホルマウント免疫染色、定量的 RT-PCR 等により、細胞局在変化や炎症応答を解析した。その結果、抗原刺激から 3 日後には、抗原（高親和性、低親和性）によって異なるフェノタイプのマクロファージが誘導される傾向が観られた。さらに組織片の定量的 RT-PCR 解析により、低親和性抗原刺激では遅発性に IL-1 $\beta$  の発現が増加することが分かった。このとき、高親和性抗原刺激では炎症反応は未刺激と同程度まで回復していた。これらのことから、低親和性抗原刺激を受けたマスト細胞により、マクロファージからの炎症性サイトカイン分泌が遅発性に誘導され、炎症収束が遅延する可能性が示唆された。さらに、クロドロン酸リポソーム投与により単球・マクロファージを枯渇させることで高親和性抗原刺激後のマスト細胞活性化が持続する傾向が観られた。この結果は、高親和性抗原刺激下で M2 マクロファージが増加する結果を裏付けるものであった。アレルギー炎症組織におけるマクロファージの役割は、抗原情報を受容したマスト細胞の影響を受けて変化することが示唆された。低親和性抗原刺激下では、マスト細胞の活性化は抑えられるが、一方で単球・マクロファージを介して遅発性の炎症応答が誘導されている可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nagata Yuka, Suzuki Ryo	4. 巻 183
2. 論文標題 Fc RI Cluster Size Determines Effective Mast Cell Desensitization without Effector Responses in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Archives of Allergy and Immunology	6. 最初と最後の頁 453 ~ 461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000520132	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 Nagata Yuka, Suzuki Ryo	4. 巻 11
2. 論文標題 Fc RI: A Master Regulator of Mast Cell Functions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 622 ~ 622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11040622	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 Nagata Yuka, Ando Hirokazu, Sasaki Yohei, Suzuki Ryo	4. 巻 38
2. 論文標題 Ephedra Herb, Mao, Inhibits Antigen-Induced Mast Cell Degranulation by Induction of the Affinity Receptor for IgE Internalization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 569 ~ 581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-021-03020-0	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 Satomi Mishima, Marin Sakamoto, Hikaru Kioka, Yuka Nagata, Ryo Suzuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Multifunctional regulation of VAMP3 in exocytic and endocytic pathways of RBL-2H3 cells	5. 発行年 2022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.2022.885868	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 Sakura Fujisawa, Yuka Nagata, Ryo Suzuki	4. 巻 382
2. 論文標題 Leukotriene D4 accelerates antigen-mediated mast cell responses via the cysteinyl leukotriene 1 receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular 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) 10.1016/j.cellimm.2022.104632	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 Yuka Nagata, Yohei Sasaki, Ryo Suzuki	4. 巻 46
2. 論文標題 Ephedrine Alkaloid-Independent High-Affinity Immunoglobulin-E Receptor (Fc.R1) Internalization Results in CCL2 Production without Inducing Mast Cell Degranulat	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b23-00006	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 長田夕佳、鈴木亮
2. 発表標題 加熱・非加熱抗原を用いたマスト細胞in vitro脱感作機構の解析
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuka Nagata, Ryo Suzuki
2. 発表標題 Clarification of Fc RI-IgE cluster size in OVA desensitized mast cells
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuka Nagata, Ryo Suzuki
2. 発表標題 Clarification of Fc RI-IgE Cluster Formation in Desensitized Mast Cells
3. 学会等名 第8回 アジア・オセアニア免疫学会議 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuka Nagata, Ryo Suzuki
2. 発表標題 Immunoglobulin E receptor cluster size determines effective mast cell desensitization without effector responses in vitro
3. 学会等名 米国細胞生物学会議 Cell Bio Virtual 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nagata Yuka, Ando Hirokazu, Sasaki Yohei, Suzuki Ryo
2. 発表標題 Ephedra herb, Mao, inhibits allergen-induced mast cell degranulation by inducing IgE-Fc RI internalization
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nagata Yuka, Ando Hirokazu, Sasaki Yohei, Suzuki Ryo
2. 発表標題 Ephedra Herb, Mao, Inhibits Antigen-Induced Mast Cell Degranulation by the Induction of the Affinity Receptor for IgE Internalization
3. 学会等名 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI) Virtual Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長田 夕佳、安藤 広和、佐々木 陽平、鈴木 亮
2. 発表標題 麻黄によるIgE受容体internalizationを介したマスト細胞の脱顆粒抑制機構
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会（広島）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nagata Y, Fujisawa S, Suzuki R
2. 発表標題 Leukotriene D4 accelerates antigen-mediated mast cell responses via the cysteinyl leukotriene 1 receptor
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長田夕佳、藤沢咲良、鈴木亮
2. 発表標題 ロイコトリエン受容体を介したアレルギー応答におけるフィードバック調節機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉坪真千、中矢姫菜子、古川敦、長田夕佳、鈴木亮
2. 発表標題 親和性の異なる混合アレルギーを用いた IgE 受容体活性化調節機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部 第134回例会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 五十嵐杏実、長田夕佳、古川敦、鈴木亮
2. 発表標題 好中球由来タンパク質 Ly6G によるアレルギー応答制御機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部 第134回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原萌宏、古川敦、長田夕佳、鈴木亮
2. 発表標題 大気環境中微粒子による肺胞マクロファージへの毒性発現機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部 第134回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安間千智、長田夕佳、古川敦、瀬戸章文、鈴木亮
2. 発表標題 カーボンブラックナノ粒子による肺胞上皮細胞での毒性発現機構の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本 真凜、長田 夕佳、古川 敦、草田 智之、稲本 奨平、千田 知美、平嶋 尚英、鈴木 亮
2. 発表標題 マスト細胞の分泌顆粒の不均質性と分泌メカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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