

アトピー性皮膚炎モデルを用いた好塩基球の機能解析研究

研究分担者 烏山 一

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 免疫アレルギー学分野 教授

研究要旨

好塩基球はアレルギー病態に関わることが知られているが、どのような好塩基球エフェクター分子がアレルギー炎症の誘導・制御に寄与しているのかはよくわかっていなかった。本研究では、アトピー性皮膚炎のマウスモデルである IgE 依存性皮膚慢性アレルギー炎症 (IgE-CAI) において、活性化好塩基球が分泌するプロテアーゼが炎症誘導に寄与していることを明らかにした。一方、好塩基球由来の IL-4 は、皮膚組織に浸潤した炎症性単球が作用することで、M2 マクロファージ生成を誘導して炎症を終焉に向かわせることが判明した。また、転写因子 GATA-1 が好塩基球の発生・機能に重要な役割を果たしており、好塩基球欠損マウスとして汎用されている  $\Delta$ dblGATA マウスでは好酸球だけでなく好塩基球の異常も存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

私たちは、これまでの研究で、生体内で好塩基球がマスト細胞とは明らかに異なる機能を担っていることを明らかにしてきた。しかし、その機能の違いが何に起因するのかは不明であった。そこで、本研究では、マスト細胞に比べて好塩基球に選択的に発現している分子として、セリン・プロテアーゼ mMCP-8 とサイトカイン IL-4 に注目して、アレルギー炎症反応における役割を解析した。また、好塩基球とマスト細胞の発生・分化の経路分岐に関わる分子として転写因子 GATA ファミリーに注目して、解析を進めた。

B. 研究方法

好塩基球からクローニングした mMCP-8 cDNA を発現ベクターに組み込んで昆虫細胞に発現させて、リコンビナント蛋白を精製した。それをマウス耳介皮内に投与し、皮膚の腫脹、血管透過性亢進、細胞浸潤などを解析した。

IgE-CAI 皮膚病変部に浸潤・集積している細胞の種類を Flow cytometry で解析した。ケモカイン受容体 CCR2 を欠損するマウスにおいて IgE-CAI を誘導し、炎症の程度、浸潤細胞の種類を調べた。CCR2 欠損マ

ウスに、野生型マウス由来の細胞を移入し、炎症の程度、浸潤細胞の変化を調べた。

$\Delta$ dblGATA マウスから骨髓、脾臓、末梢血を採取し、好塩基球・好塩基球前駆細胞の数ならびに機能を野生型マウスと比較検討した。

(倫理面への配慮) 動物実験はすべて東京医科歯科大学動物実験指針に則り、実験動物委員会の承認を得ておこなった。

C. 結果

mMCP-8 を皮内投与した予備実験では、明確な血管透過性亢進は認められなかったが、好中球を主とした細胞浸潤をともなう皮膚腫脹が観察された。

IgE-CAI 皮膚病変部において IgE とアレルギーによって活性化された好塩基球から分泌された IL-4 が、浸潤してきた炎症性単球に作用して M2 マクロファージへと分化誘導すること、この炎症性単球の M2 への分化が抗炎症作用発揮には必須であることが明らかとなった。

$\Delta$ dblGATA マウスを解析したところ、好酸球の欠損だけではなく好塩基球の減少がみとられ、*in vitro* での好塩基球生成も低下しており、IgE とアレルギーの刺

激によって誘導される好塩基球の脱顆粒ならびにサイトカイン産生も低下していた。

#### D. 考察

好塩基球に選択的に発現している mMCP-8 が炎症惹起分子として機能している可能性が強く示唆された。

炎症性単球が末梢組織に浸潤すると炎症性の1型マクロファージ(M1)に分化することは、これまでよく知られていたが、本研究では好塩基球由来のIL-4の作用によって炎症性単球がM2マクロファージに分化するという新事実が明らかとなった。

GATA-1が好塩基球の生成ならびに活性化に重要な役割を果たしていること、 $\Delta$ dblGATAマウスでは好塩基球の減少症ならびに機能低下が存在することが判明した。

#### E. 結論

好塩基球は、マスト細胞とは異なるエフェクター分子を使ってアレルギー炎症の誘導・制御に寄与していることが明らかとなった。これらの分子を標的とした新規アレルギー治療法開発が期待される。

#### F. 健康危険情報 該当せず。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sawaguchi, M., Tanaka, S., Nakatani, Y., Harada, Y., Mukai, K., Matsunaga, Y., Ishiwata, K., Oboki, K., Kambayashi, T., Watanabe, N., Karasuyama, H., Nakae, S., Inoue, H., and Kubo, M.: Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness. **J. Immunol.** 188:1809-1818, 2012.
2. Ogawa, H., Mukai, K., Kawano, Y., Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: Th2-inducing cytokines IL-4 and IL-33 synergistically elicit the expression of transmembrane TNF- $\alpha$  on macrophages through the autocrine action of IL-6. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 420: 114-118, 2012.
3. Etori, M., Yonekubo, K., Sato, E., Mizukami, K., Hirahara, K., Karasuyama, H., Maeda, H., Yamashita, M.: Melanocortin Receptors 1 and 5 might mediate inhibitory effects of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone on antigen-induced chronic allergic skin inflammation in IgE transgenic mice. **J. Invest. Dermatol.** 132: 1925-1927, 2012.
4. Mukai, K., BenBarak, M., Tachibana, M., Nishida, K., Karasuyama, H., Taniuchi, I., Galli, S.J.: Critical role of P1-Runx1 in mouse basophil development. **Blood** 120: 76-85, 2012.
5. Jin, G., Matsushita, T., Hamaguchi, Y., Le Huu, D., Ishii, T., Hasegawa, M., Obata, K., Karasuyama, H., Takehara, K., and Fujimoto, M.: Basophils and Mast Cells Play Critical Roles for Leukocyte Recruitment in IgE-Mediated Cutaneous Reverse Passive Arthus Reaction. **J. Dermatol. Sci.** 67: 181-189, 2012.
6. Kawano, Y., Ouchida, R., Wang, J-Y, Yoshikawa, S. Yamamoto, M., Kitamura, D., and Karasuyama, H.: A novel mechanism for the autonomous termination of pre-B cell receptor expression via induction of lysosomal-associated protein transmembrane 5. **Mol. Cell Biol.** 32: 4462-4471, 2012.
7. Shiraishi, Y., Jia, Y., Domenico, J., Joetham, A., Karasuyama, H., Takeda, K., and Gelfand, E.W.: Sequential engagement of Fc $\epsilon$ RI on mast cells and basophil histamine H4 receptor and Fc $\epsilon$ RI in allergic rhinitis. **J. Immunol.** 190: 539-548, 2013.
8. Egawa, M., Mukai, K., Yoshikawa, S., Iki, M., Mukaida, N., Kawano, Y., and Minegishi, Y., and Karasuyama, H.: Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4. **Immunity** 38: 570-580, 2013.

9. Ramadan, A., Pham, Van L., Machavoine, F., Dietrich, C., Alkan, M., Karasuyama, H., Schneider, E., Dy, M., Thieblemont, N.: Activation of basophils by the double-stranded RNA poly(A:U) exacerbates allergic inflammation. **Allergy** 68: 732-738, 2013.
10. Torrero, M.N., Morris, C.P., Mitre, B.K., Hübner, M.P., Mueller, E., Karasuyama, H., and Mitre, E.: Basophils help establish protective immunity induced by irradiated larval vaccination for filariasis. **Vaccine** 31: 3675-3682, 2013.
11. Reber, L.L., Marichal, T., Mukai, K., Roers, A., Hartmann, K., Karasuyama, H., Nadeau, K.C., Tsai, M., and Galli, S.J.: Selective ablation of mast cells or basophils reduces peanut-induced anaphylaxis in mice. **J. Allergy Clin. Immunol.** 132: 881-888, 2013.
12. Noti, M., Tait Wojno, E.D., Kim, B.S., Siracusa, M.C., Giacomini, P.R., Nair, M.G., Benitez, A.J., Ruymann, K.R., Muir, A.B., Hill, D.A., Chikwava, K.R., Moghaddam, A.E., Sattentau, Q.J., Alex, A., Zhou, C., Yearley, J.H., Menard-Katcher, P., Kubo, M., Obata-Ninomiya, K., Karasuyama, H., Comeau, M.R., Brown-Whitehorn, T., de Waal Malefyt, R., Sleiman, P.M., Hakonarson, H., Cianferoni, A., Falk, G.W., Wang, M-L., Spergel, J.M., and Artis, D.: TSLP-elicited basophil responses can mediate the pathogenesis of eosinophilic esophagitis. **Nat. Med.** 19: 1005-1013, 2013.
13. Anyan, W.K., Seki, T., Kumagai, T., Obata-Ninomiya, K., Furushima-Shimogawara, R., Kwansa-Bentum, B., Akao, N., Bosompem, K.M., Boakye, D.A., Wilson, M.D., Karasuyama, H., and Ohta, N.: Basophil depletion downregulates *Schistosoma mansoni* egg-induced granuloma formation. **Parasitol. Int.** 62: 508-513, 2013.
14. Obata-Ninomiya, K., Ishiwata, K., Tsutsui, H., Nei, Y., Yoshikawa, S., Kawano, Y., Minegishi, Y., Ohta, N., Watanabe, N., Kanuka, H., and Karasuyama, H.: The skin is an important bulwark of acquired immunity against intestinal helminths. **J. Exp. Med.** 210: 2583-2595, 2013.
15. Nei, Y., Obata-Ninomiya, K., Tsutsui, H., Ishiwata, K., Miyasaka, M., Matsumoto, K., Nakae, S., Kanuka, H., Inase, N., and Karasuyama, H.: GATA-1 regulates the generation and function of basophils. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 110: 18620-18625, 2013.
16. Leyva-Castillo, J.M., Hener, P., Michea, P., Karasuyama, H., Chan, S., Soumelis, V., and Li, M.: Skin TSLP initiates Th2 responses through an orchestrated immune cascade. **Nat. Commun.** 4:2847, 2013.
17. Bakocevic, N., Claser, C., Yoshikawa, S., Jones, L.A., Chew, S., Goh, C.C., Malleret, B., Larbi, A., Ginhoux, F., de Lafaille, M.C., Karasuyama, H., Renia, L., Ng, L.G.: CD41 is a reliable identification and activation marker for murine basophils in the steady-state and during helminth and malarial infections. **Eur. J. Immunol.** 44: 1823-1834, 2014.
18. Morshed, M., Hlushchuk, R., Simon, D., Walls, A.F., Obata-Ninomiya, K., Karasuyama, H., Djonov, V., Eggel, A., Kaufmann, T., Simon, H-U, and Yousefi, S.: NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils. **J. Immunol.** 192: 5314-5323, 2014.
19. Reber, L., Marichal, T., Sokolove, J., Starkl, P., Gaudenzio, N., Iwakura, Y., Karasuyama, H., Schwartz, L.B., Robinson, W.H., Tsai, M., and Galli, S.J.: Mast cell-derived IL-1 $\beta$  contributes to uric acid crystal-induced acute arthritis in mice. **Arthritis Rheum.** 66: 2881-2891, 2014.

20. Karasuyama, H., and Yamanishi, Y.: Basophils have emerged as a key player in immunity. ***Curr. Opin. Immunol.*** 31: 1-7, 2014.
  21. Tsai, S.H., Kinoshita, M., Kusu, T., Kayama, H., Okumura, R., Ikeda, K., Shimada Y., Takeda A., Yoshikawa, S., Obata-Ninomiya, K., Kurashima, Y., Sato, S., Umemoto, E., Kiyono, H., Karasuyama, H., and Takeda, K.: The ectoenzyme E-NPP3 negatively regulates ATP-dependent chronic allergic responses by basophils and mast cells. ***Immunity*** 42: 279-293, 2015.
  22. 江川真由美、烏山一：「好塩基球研究のアップデート」**実験医学** 30(6)：905-911, 2012
  23. 壺岐美紗子、烏山一：「好塩基球研究の進展」特集「自然免疫 Update-研究最前線」**医学のあゆみ** 243(1): 78-83, 2012
  24. 烏山一：「免疫系における好塩基球の重要性」**免疫学 Update -分子病態の解明と治療への展開** 南山堂 pp46-51, 2012
  25. 吉川 宗一郎、烏山一：「好塩基球とアレルギー」**アレルギー** 62(7)：797-804, 2013.
  26. 壺岐美紗子、烏山一：「好塩基球による慢性アレルギー炎症の誘導機構」**炎症と免疫** 21 (6): 78-82, 2013.
  27. 江川真由美、烏山一：「好塩基球とマクロファージによるアレルギー炎症の鎮静化」別冊 **BIO Clinica 慢性炎症と疾患** 2 (2): 63-68, 2013
  28. 烏山一：炎症の抑制・終焉機構「序」**炎症と免疫** 22 (2): 71, 2014
  29. 二宮(小畑)一茂、筒井英充、烏山一：消化管寄生虫感染防御免疫応答における好塩基球の新たな役割 **感染・炎症・免疫** 44(1): 30-39, 2014
  30. 烏山一：好塩基球の光と影「はじめに」**医学のあゆみ** 250(12): 1079, 2014
  31. 太田卓哉、吉川宗一郎、烏山一：マダニ感染防御と好塩基球 **医学のあゆみ** 250(12): 1114-1118, 2014
  32. 三宅健介、烏山一：最近明らかになってきた好塩基球の役割 **臨床免疫・アレルギー科** 63 (2): 164-169, 2015
2. 学会発表
    1. Karasuyama, H.: Emerging roles for basophils in immunity: a neglected minority gains new respect. The 2012 Spring Conference of the Korean Association of Immunologists, Seoul, Korea. 2012.04.13.
    2. Karasuyama, H.: Emerging roles for basophils in protective and pathological immune responses. Innovation Summit Tokyo 2012-Chronic Inflammation and Autoimmune Diseases. Tokyo, 2012.04.18.
    3. 烏山一：特別講演「アレルギーならびに生体防御における好塩基球の新たな役割～山椒は小粒でもぴりりと辛い」第24回アレルギー学会春季臨床大会 大阪 2012.05.12.
    4. Karasuyama, H.: The role of basophils revisited. EAACI Congress 2012. Geneva, Switzerland, 2011.06.17.
    5. 烏山一：「皮膚のアレルギー炎症ならびに寄生虫感染症における好塩基球の役割」第42回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 軽井沢 2012.07.14.
    6. 烏山一：「アレルギー疾患ならびに寄生虫感染症における好塩基球の役割～山椒は小粒でもぴりりと辛い」第51回日本鼻科学学会 幕張 2012.09.27.
    7. Karasuyama, H.: Critical roles for basophils in allergy and protective immunity as revealed by the basophil-engineered mice. 29<sup>th</sup> Symposium CIA. Jeju, Korea, 2012. 10.19.
    8. 烏山一：教育講演「アレルギー疾患ならびに生体防御における好塩基球の役割～日陰者が一気に檜舞台に」第74回日本血液学会学術集会. 2012. 10.21.
    9. 烏山一：特別講演「アレルギーならびに生体防御における好塩基球の新たな役割～日陰者が一気に檜舞台に」第76回小児アレルギー同好会 2012.11.10.

10. 烏山 一：教育講演「新たな脚光を浴びる好塩基球～山椒は小粒でもぴりりと辛い」第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012.11.30.
  11. Karasuyama, H.: Emerging roles for basophils in immunity: a neglected minority gains new respect. Centennial of Hashimoto Disease International Symposium. Fukuoka, 2012. 12.04.
  12. Karasuyama, H.: Non-redundant roles of basophils in immunity. EAACI-WAO Congress, Milan, Italy. 2013.06.23.
  13. 烏山 一：特別講演「アレルギーならびに生体防御における好塩基球の新たな役割～山椒は小粒でもぴりりと辛い」第34回ゲノム創薬フォーラム 東京 2013.07.25.
  14. Karasuyama, H.: Role of basophils in allergic responses and protective immunity. German-Japan Immunology Seminar. Shizuoka, Japan, 2013.12.08. Karasuyama, H.: Non-redundant roles of basophils in immunity-a neglected minority gains new respect. The 24<sup>th</sup> Congress of Interasma Japan/North Asia. Nagoya, 2014.07.19.
  15. Karasuyama, H.: Basophils have emerged as a key player in immunity. Cold Spring Harbor Asia Conference “Frontiers of Immunology in Health & Diseases” Suzhou, China, 2014.09.04
  16. Karasuyama, H.: Basophils have emerged as a key player in immunity. 第24回九州大学生体防御医学研究所国際シンポジウム 福岡 2014.11.08
  17. Karasuyama, H.: Emerging roles of basophils in allergy and protective immunity. Medical Research Institute 40<sup>th</sup> Anniversary Symposium. Tokyo 2014.11.28
  18. Karasuyama, H.: Non-redundant roles for basophils in allergy and protective immunity. British Society for Immunology Congress 2014. Briton, UK, 2014.11.02
  19. Karasuyama, H.: Non-redundant roles of basophils in Th2-type protective immunity and allergy. Cell Symposium “The multifaceted roles of type 2 immunity” Bruges, Belgium 2014.12.11.
  20. 烏山 一：教育講演「アレルギーに関連する新規の免疫細胞～ILC2 細胞と好塩基球を中心として～」第 26 回アレルギー学会春季臨床大会 京都 2014.05.10
  21. 烏山 一：アレルギーならびに生体防御における好塩基球の役割 第 79 回インターフェロン・サイトカイン学会 札幌 2014.06.19
  22. 烏山 一：アレルギー疾患ならびに生体防御における好塩基球の新たな役割 第 41 回本郷呼吸器研究会 東京 2014.06.24
  23. 烏山 一：教育講演「アレルギー発症における好塩基球の役割とその制御」第 42 回日本臨床免疫学会 東京 2014.09.25
  24. 烏山 一：アレルギーならびに生体防御における好塩基球の新たな役割 日本眼科アレルギー研究会 東京 2014.10.04
  25. 烏山 一：生体内での好塩基球の役割解明とアレルギー治療への応用 CREST「免疫機構」第三回公開シンポジウム 東京 2014.10.08
  26. 烏山 一：アレルギー発症における好塩基球の役割とその制御 第 74 回臨床アレルギー研究会 東京 2014.11.01
  27. 烏山 一：好塩基球研究のめざましい進展～日陰者がいっきに檜舞台に躍り出た！ 第 78 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 東京 2015.02.21
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)  
無し。