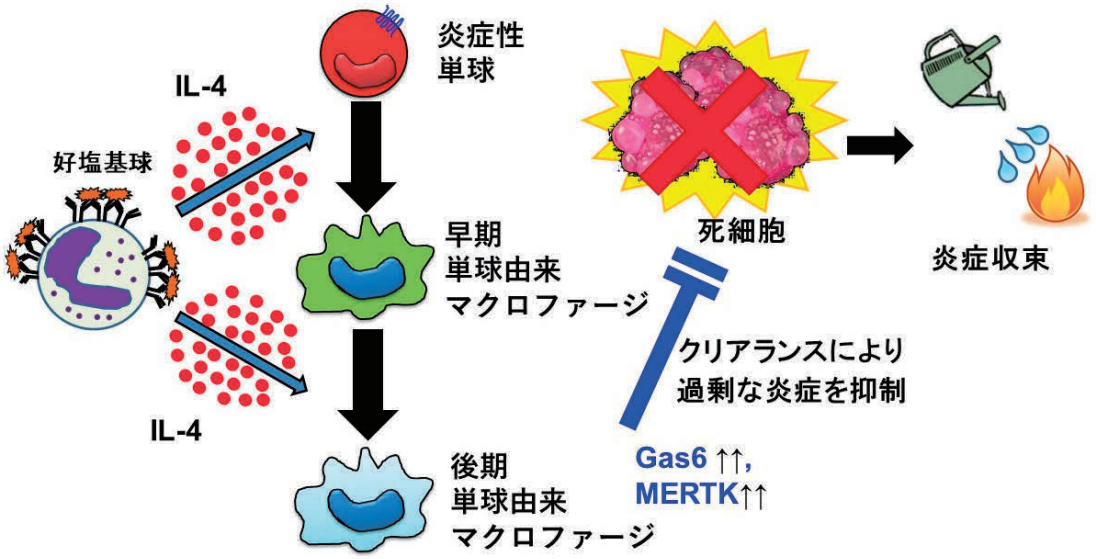
149　炎症後期M2マクロファージの皮膚アレルギー抑制機構	三宅　健介

【目的】我が国において、アレルギー疾患の罹患者はおよそ 3 人に 1 人と数多く、根本的治療法の開発は喫緊の課題である。本課題の解決のため筆者らは以前、IgE 依存性慢性皮膚アレルギー炎症モデル（IgE-dependent chronic allergic inflammation : IgE-CAI）を樹立した。この皮膚アレルギー炎症を誘導する責任細胞を検索した結果、希少な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。本モデルでは、誘導後 3 日ほどで著明な皮膚腫脹と炎症細胞浸潤をきたすが、誘導後 1 週間ほど経過すると皮膚の腫脹や炎症細胞浸潤は収束する。このアレルギー炎症収束のメカニズムを検索したところ、好塩基球由来の IL-4 が炎症性単球に作用することで炎症抑制型の 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（Immunity 2013）。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。炎症性単球の皮膚への浸潤が障害されている CCR2 欠損マウスでは、M2 マクロファージが誘導できず、IgE-CAI が悪化することが明らかになっている。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かった。そこで本研究では、1 細胞 RNA シーケンス解析を活用することで解明し、好塩基球ーM2 マクロファージのネットワークによるアレルギー炎症収束機構を解明することを目的とする。

【方法】本研究では、野生型マウスと CCR2 欠損マウスそれぞれに IgE-CAI を誘導し、炎症ピーク時（3 日目）と炎症収束時（5 日目）の皮膚炎症局所を 1 細胞 RNA シーケンス解析に供した。さらに、得られたトランスクリプトームデータから、単球ーマクロファージ系列の細胞クラスターを詳細に解析し、RNA 速度解析や擬似時間軸解析を行った。さらに、野生型マウスに IgE-CAI を誘導し、経時的にフローサイトメトリー解析を行った。

【結果】炎症性単球が皮膚に浸潤できない CCR2 欠損マウスでは、耳介皮膚炎症の増悪・遷延化が認められたが、野生型マウス由来単球を移入すると炎症が改善した。このことから単球由来マクロファージが皮膚炎症抑制に重要であると考えられた。1 細胞解析やフローサイトメトリー解析の結果から、単球由来マクロファージには炎症ピーク時に存在する早期 M2 と炎症収束時に存在する後期 M2 が存在し、炎症性単球は早期 M2 を経て後期 M2 へと分化することが明らかになった。さらに後期 M2 は、早期 M2 と比較して GAS6 や MERTK を高発現し、高い死細胞貪食能を持っていた。MERTK 阻害薬の投与により IgE-CAI は増悪することから、炎症性単球から早期 M2 を経て後期 M2 へと分化し、後期 M2 が速やかに死細胞をクリアランスすることで IgE-CAI を収束に導くことが示唆された。

炎症性単球は死細胞貪食能の高い後期 M2 マクロファージへと段階的に分化し、アレルギー炎症を抑制する



149. 炎症後期 M2 マクロファージの皮膚アレルギー抑制機構

三宅　健介

東京医科歯科大学 統合研究機構

Key words：好塩基球，単球由来マクロファージ，エフェロサイトーシス，分化経路

緒　言

我が国において、アレルギー疾患の罹患者はおよそ 3 人に 1 人と数多く、根本的治療法の開発は喫緊の課題である。本課題の解決のため筆者らは以前、IgE 依存性慢性皮膚アレルギー炎症モデル（IgE-dependent chronic allergic inflammation：IgE-CAI）を樹立した。本モデルでは、まずマウスにハプテ 2,4,6-トリニトロフェノール（trinitrophenol：TNP）特異的 IgE 抗体を静脈投与することで受動感作を行い、その翌日に耳介皮膚にアレルゲン（TNP 結合卵白アルブミン：TNP-OVA）を皮内投与することで誘導する。アレルゲン投与の直後にはマスト細胞依存的な二相性の耳介腫脹（即時相と遅延相）が認められるが、さらに観察を続けると、大量の炎症細胞浸潤を伴い 1 週間ほど持続する大きな耳介腫脹が観察される。この三相目の耳介腫脹は慢性アレルギー炎症の病理像を示していたことから、本皮膚アレルギー炎症を IgE 依存性慢性皮膚アレルギー炎症（IgE-CAI）と名付けた。

この IgE-CAI はマスト細胞や T 細胞・B 細胞が存在しないマウスでも誘導されることから、マスト細胞や獲得免疫に依存しないアレルギー炎症であると考えられた。そこで誘導する責任細胞を検索した結果、希少な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。実際に、本炎症は好塩基球除去抗体や好塩基球特異的除去マウスを用いて事前に好塩基球を除去するとほとんど耳介腫脹が誘導されないことが明らかになっている。さらに、IgE-CAI 誘導後に好塩基球を除去した場合でも、除去後数日で耳介腫脹や細胞浸潤が速やかに減弱することから、好塩基球は IgE-CAI において炎症誘導の火付け役を担っていることが示唆された［1］。

一方本モデルでは、誘導後 1 週間ほど経過すると皮膚の腫脹や炎症細胞浸潤は収束する。このアレルギー炎症収束のメカニズムを検索したところ、好塩基球由来の IL-4 が炎症性単球に作用することで炎症抑制型の 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［2］。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。炎症性単球の皮膚への浸潤が障害されている CCR2 欠損マウスでは、M2 マクロファージが誘導できず、IgE-CAI が悪化することが明らかになっている。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かった。そこで本研究では、1 細胞 RNA シーケンス解析やフローサイトメトリー解析にて野生型マウスの単球由来マクロファージを解析した。その結果、IgE-CAI 炎症局所の単球由来マクロファージには炎症ピーク時に認められる早期単球由来マクロファージと炎症収束時に認められる後期単球由来マクロファージが存在し、両者で遺伝子発現プロファイルが異なることが明らかになった。皮膚へと浸潤した炎症性単球はまず早期単球由来マクロファージへと分化することで、抗炎症性分子の遺伝子発現が高まり、さらに後期単球由来マクロファージへと分化することで、細胞内代謝の変化が起こり、死細胞貪食能が高まることが明らかになった。本研究の結果、炎症性単球からの単球由来マクロファージへと段階的な分化が起こることで、速やかに死細胞が貪食されアレルギー炎症収束が導かれることが明らかになった。本研究成果は現在論文投稿中であり、プレプリント誌として公開している［3］。

方　法

1. IgE 依存性慢性皮膚アレルギー炎症モデル（IgE-CAI）の誘導

動物実験は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認のもとに行った。野生型マウスおよび CCR2 欠損マウスにまず 300μg の TNP 特異的 IgE 抗体（ATCC で購入したハイブリドーマ IgE Lb4 より回収）を静脈投与し、その翌日にマウスの右耳に TNP-OVA を左耳に OVA を、それぞれ 10μg 皮内投与を行うことで IgE-CAI を誘導した。IgE-CAI 誘導後、耳介腫脹を経時的に計測した。単球移入実験では、野生型マウスの骨髄より CD115 陽性単球を磁器分離法により単離し、IgE-CAI を誘導した CCR2 欠損マウスに毎日 CD115 陽性単球を静脈投与した。

2. 耳介皮膚のフローサイトメトリーと 1 細胞 RNA シーケンス解析

野生型マウスまたは CCR2 欠損マウスに誘導後 3 日目または 5 日目に耳介皮膚を回収し、Liberase TM（Roche）にて処理することで、細胞分散を行った。酵素処理後の耳介皮膚由来細胞懸濁液を、フローサイトメトリー解析または 1 細胞 RNA シーケンス解析に供した。1 細胞 RNA シーケンス解析は BD Rhapsody システムを用いて行い、その後 TAS-Seq 法［4］を用いてライブラリ作成を行い、Illumina NovaSeq 6000 にてシーケンスした。その後、Bowtie2 を用いてマッピングを行い、遺伝子発現テーブルを作成した。Seurat パッケージを用い、標準化や主成分分析を行い、UMAP による次元削減と細胞クラスター解析を行った。擬似時間解析は slingshot パッケージを用いた。RNA 速度解析には scVelo を用いた。遺伝子セットエンリッチメント解析は clusterProfiler パッケージを用いて行った。

結果および考察

1. 炎症ピーク時と炎症収束時では単球由来マクロファージの遺伝子発現プロファイルが異なる

単球由来マクロファージによる皮膚アレルギー炎症抑制機構を解明するために、まず野生型マウスと CCR2 欠損マウスに IgE-CAI を誘導した。以前の報告の通り、CCR2 欠損マウスでは、炎症ピーク時の 3 日目以降、耳介腫脹が有意に悪化し、5 日目以降も耳介腫脹が収束せずに、皮膚炎症が遷延化することが明らかになった。さらに、炎症誘導後 5 日目の、浸潤細胞数についても CCR2 欠損マウスでは野生型マウスと比較して有意に増加していた。フローサイトメトリー解析の結果、CCR2 欠損マウスでは、炎症性単球の浸潤が障害されるために単球・マクロファージの細胞数が減少する一方で、好中球の浸潤数が野生型マウスと比較して 50 倍程度に増加することが明らかになった。CCR2 欠損マウスに野生型マウス由来の単球を移入すると、耳介腫脹や好中球の浸潤が有意に減弱することから、単球由来のマクロファージが耳介腫脹や好中球浸潤を抑制する役割を持つと考えられた。

そこで、単球由来マクロファージによるアレルギー炎症抑制機構を詳細に解析する目的で、野生型マウスと CCR2 欠損マウスに IgE-CAI を誘導し、炎症ピーク時と炎症収束時それぞれの皮膚炎症局所を 1 細胞 RNA シーケンスにより解析した。その結果、血球系細胞（T 細胞、B 細胞、単球、マクロファージ、マスト細胞、好酸球、好中球、好塩基球など）や非血球系細胞（線維芽細胞、内皮細胞、ケラチノサイトなど）を含む様々な細胞種を同定できた（図 1A）。フローサイトメトリーの解析結果と一致して、1 細胞解析においても、CCR2 欠損マウスでは好中球の割合が増加し、単球・マクロファージの割合が減少していた。

単球･マクロファージによる炎症抑制機構を解明する目的で、単球･マクロファージ系の細胞クラスターに着目した。単球･マクロファージ系の細胞クラスターをリクラスタリングにより解析したところ、5 つのクラスターが同定できた。そのうち 1 つのクラスターについては *H2-Ab1*、*Ciita*、*Cd74* といった遺伝子が高発現したため、樹状細胞のクラスターであると考えられた。一方、ほかの 4 つのクラスターは、*Ly6c1*^{hi}*Ly6c2*^{hi} の炎症性単球のクラスターが 1 つ、*Adgre1*（F4/80）^{hi}Ccr2^{lo} の常在性マクロファージのクラスターが 1 つ、そして *Adgre1*（F4/80）^{hi}Ccr2^{lo} の単球由来マクロファージのクラスターが 2 つ存在していた。実際、野生型マウスと CCR2 欠損マウスの 1 細胞解析結果を比較したところ、野生型マウスでは炎症性単球、2 つの単球由来マクロファージ、常在性マクロファージの 4 つのクラスターが存在していた一方で、CCR2 欠損マウスでは常在性マクロファージのみが存在し、ほかの 3 つのクラスターはほとんど存在

しなかった。さらに炎症ピーク時（3 日目）と炎症収束時（5 日目）の 1 細胞解析結果を比較したところ、2 つの単球由来マクロファージのクラスターの片方は炎症ピーク時に主に認められ、もう片方のクラスターは炎症収束時に主に認められることが明らかになった（図 1B）。このことから、炎症ピーク時にみられる単球由来マクロファージを早期単球由来マクロファージ、炎症収束時にみられる単球由来マクロファージを後期単球由来マクロファージと名付けた。

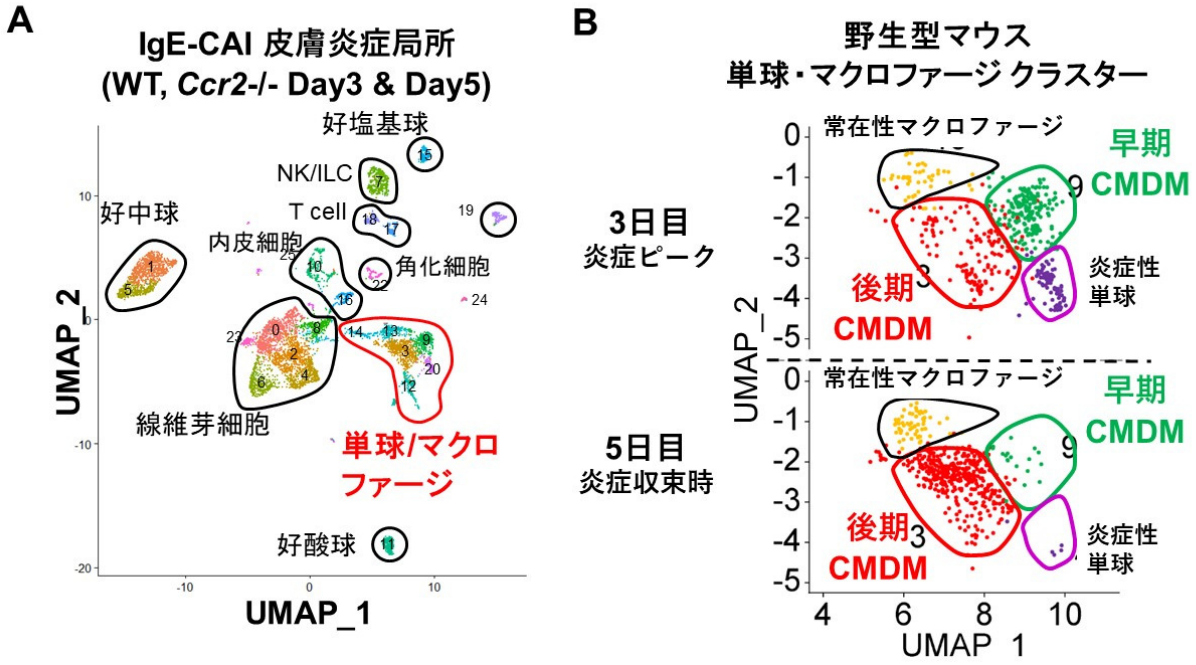


図 1. 1 細胞 RNA シーケンス解析による早期・後期単球由来マクロファージの検出

A) IgE-CAI 皮膚炎症局所のすべての細胞の UMAP プロットを示す。図は野生型マウスと CCR2 欠損マウス由来の 1 細胞 RNA シーケンスデータを統合したものを示す。

B) 野生型マウスの IgE-CAI 皮膚炎症局所の単球・マクロファージの UMAP プロットを示す。上のパネルは炎症ピーク時下のパネルは炎症収束時の UMAP プロットを示す。

2. 炎症性単球は早期単球由来マクロファージを経て後期単球由来マクロファージへと分化する

さらに炎症性単球から単球由来マクロファージへの分化経路を推定するために RNA 速度解析並びに擬似時間解析を行った。その結果、炎症性単球、早期単球由来マクロファージ、後期単球由来マクロファージ、常在性マクロファージの順番で分化が進むことが予測された。さらに、擬似時間軸に沿った遺伝子発現の変動を解析したところ、*Ly6c1* や *Ly6c2*（Ly6C）の発現は炎症性単球で最も高く、分化に従い発現が減少する一方で、*Adgre1*（F4/80）の発現は分化に伴って上昇することが明らかになった。さらに、*Pdcd1lg2*（PD-L2）の発現は炎症性単球が早期単球由来マクロファージに分化するに伴い上昇し、その後分化に伴い減少していくことも明らかになった。

さらに解析を進めるために、フローサイトメトリーでの炎症性単球、早期・後期単球由来マクロファージ、常在性マクロファージの同定を試みた。IgE-CAI 誘導後 5 日目の皮膚組織をフローサイトメトリーにて解析したところ、単球・マクロファージの中に Ly6C^{hi}PD-L2^{lo}、Ly6C^{hi}PD-L2^{hi}、Ly6C^{lo}PD-L2^{hi}、Ly6C^{lo}PD-L2^{lo} の 4 つの分画が存在することが明らかになった。1 細胞 RNA シーケンス解析における発現プロファイルとの比較により、以上の 4 分画はそれぞれ、炎症性単球、早期単球由来マクロファージ、後期単球由来マクロファージ、常在性マクロファージに相当すると考えられた。さらに筆者らは、炎症性単球から早期・後期単球由来マクロファージへの分化が皮膚炎症局所で起こるのかを検討した。CCR2 欠損マウスに IgE-CAI を誘導し、誘導後 1 日目に CD45.1^{+}の炎症性単球を移入すると、炎症誘導後 3 日目には Ly6C^{hi}PD-L2^{hi} の早期単球由来マクロファージへと分化し、さらに炎症誘導後 5 日目には Ly6C^{lo}PD-L2^{hi} の後

期単球由来マクロファージへと分化していた。以上から、炎症性単球は、早期単球由来マクロファージを経て後期単球由来マクロファージへと分化することが明らかになった。

3. 後期単球由来マクロファージは高い死細胞貪食能を持ち、アレルギー炎症を抑制する

次に単球由来マクロファージへの分化に伴う遺伝子発現プロファイルの変化を解析した。炎症性単球が早期単球由来マクロファージへと分化するに伴い、抗炎症性マクロファージの関連遺伝子（*Arg1*、*Mrc1*、*Cd163*、*Retnla*、*Il10* など）が発現上昇していた。一方、インターフェロン誘導遺伝子の発現は炎症性単球が早期単球由来マクロファージへの分化に伴い低下した。実際、炎症性単球と早期単球由来マクロファージ間で遺伝子セットエンリッチメント解析を行うと、炎症性単球では「インターフェロン応答」の関連遺伝子が発現していた一方で、早期単球由来マクロファージでは「酸化的リン酸化」などの抗炎症マクロファージの関連遺伝子が発現していた。以上から、炎症性単球は早期単球由来マクロファージへと分化することで「抗炎症性マクロファージ」への性質を獲得していると考えられた。

さらに早期単球由来マクロファージと後期単球由来マクロファージの間で、遺伝子セットエンリッチメント解析を行った結果、後期単球由来マクロファージでは脂質代謝に関連する遺伝子がエンリッチしていることが明らかになった。さらに、後期単球由来マクロファージではファゴサイトーシスに関連する遺伝子がエンリッチしており、*Mertk* などの死細胞貪食の関連受容体や *Gas6* などのフォスファチジルセリン架橋分子が高く発現していることが明らかになった。そこで、後期単球由来マクロファージの死細胞貪食能を解析するために、IgE-CAI 誘導後 5 日目の皮膚炎症局所に蛍光ラベルした死細胞を投与したところ、後期単球由来マクロファージでは、早期単球由来マクロファージや炎症性単球と比較して高い死細胞貪食能を持つことが明らかになった。以上から、IgE-CAI 炎症局所に存在する後期単球由来マクロファージが GAS6 や MERTK などを高発現することで、死細胞を速やかに貪食し、皮膚アレルギー炎症を抑制すると考えられた。そこでこの仮説を延焼するために、後期単球由来マクロファージで高く発現する TAM 受容体に対する阻害剤を投与し IgE-CAI を誘導した。その結果、TAM 受容体阻害剤を投与したマウスでは、IgE-CAI の耳介腫脹が増悪し、細胞浸潤数が増加することが明らかになった。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学高等研究院炎症・感染・免疫研究室の烏山一特別栄誉教授、東京医科歯科大学統合教育機構の中林潤教授、東京理科大学生命医科学研究所の七野成之助教である。

文　献

1） Miyake K, Ito J, Karasuyama H. Role of Basophils in a Broad Spectrum of Disorders. Front Immunol. 2022 May 27;13:902494. PMID: 35693800; DOI 10.3389/fimmu.2022.902494.

2） Egawa M, Mukai K, Yoshikawa S, Iki M, Mukaida N, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4. Immunity. 2013 Mar 21;38(3):570-80. Epub 2013 Feb 21. PMID: 23434060. DOI 10.1016/j.immuni.2012.11.014.

3） Miyake K, Ito J, Takahashi K, Nakabayashi J, Shichino S, Yoshikawa S, Karasuyama H. Single-cell transcriptomics identifies the differentiation trajectory from inflammatory monocytes to pro-resolving macrophages in skin allergy. Preprint at Research Square. 2023; DOI: 10.21203/rs.3.rs-2669348/v1

4） Shichino S, Ueha S, Hashimoto S, Ogawa T, Aoki H, Wu B, Chen CY, Kitabatake M, Ouji-Sageshima N, Sawabata N, Kawaguchi T, Okayama T, Sugihara E, Hontsu S, Ito T, Iwata Y, Wada T, Ikeo K, Sato TA, Matsushima K. TAS-Seq is a robust and sensitive amplification method for bead-based scRNA-seq. Commun Biol. 2022 Jun 27;5(1):602. PMID: 35760847; DOI: 10.1038/s42003-022-03536-0.