

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09314

研究課題名（和文）アレルギー性鼻炎の発症・寛解を制御する末梢血免疫細胞のエピゲノム解析研究

研究課題名（英文）The study of epigenetic regulation in peripheral immune cells associated with onset and remission of allergic rhinitis.

研究代表者

櫻井 大樹（SAKURAI, DAIJU）

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：10375636

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）：本研究において、アレルギー性鼻炎の寛解におけるリンパ球の遺伝子制御およびエピゲノム制御機構について検討を行った。舌下免疫療法の臨床試験に参加した症例の末梢血を用いて治療効果に関連し治療後発現が変動したリンパ球の遺伝子を探索し、5つの候補遺伝子を同定した。実臨床のサンプルにて検証実験を行うと、前回の結果を再現する1つの遺伝子を同定した。この遺伝子のコードタンパクは補体関連の酵素分子であった。また舌下免疫療法施行例の末梢血リンパ球を抗原で刺激したのち、CD4陽性T細胞を回収しATAC-seqとRNA-seqによる解析を行った。治療効果と関連がある遺伝子を複数確認し寛解機序との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国内においてアレルギー性鼻炎の罹患率の高さと生活の質への影響は大きな問題である。アレルギー性鼻炎の病態形成にはTh2細胞を中心としたリンパ球の免疫応答が重要な役割を持つと考えられるが、アレルギー免疫療法により誘導される寛解機序におけるリンパ球の役割とその制御機構は十分には解明されていない。本研究において、舌下免疫療法の寛解におけるリンパ球の遺伝子制御およびエピゲノム制御の検討を行い、いくつかの候補遺伝子を同定した。これらは寛解機序に関連する可能性が示唆された。アレルギー性鼻炎の寛解機序の解明は、予防治療や新たな根治治療の開発への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：The changes in gene expressions and in epigenetic regulations of lymphocytes in the remission of allergic rhinitis were examined in this study. The peripheral blood lymphocytes before and after the treatment were obtained from the subjects participated in a clinical study of sublingual immunotherapy (SLIT) for the patients with allergic rhinitis. The genes that have changed in their expressions in lymphocytes after SLIT in association with the therapeutic efficacy were explored, and five candidate genes were identified. Next, the gene expressions were validated in the blood lymphocytes obtained from the patients with SLIT in clinical practice, and one gene exhibited the same behavior in the former experiment. This gene encoded an enzymatic molecule linked to complement. Furthermore, the epigenomic regulations in peripheral T cells by SLIT were examined with ATAC-seq and RNA-seq. As a result, it was suggested that a number of gene regulations were associated with the mechanism of SLIT.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：アレルギー性鼻炎 遺伝子 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎の患者数は近年急速な増加が報告されており、特に日本国内においてアレルギー性鼻炎の中でもスギ花粉症の罹患率の高さと生活の質への影響は大きな問題である。しかし、いまだ有効な予防治療法は確立されていない。アレルギー性鼻炎の発症のしやすさには遺伝的要因が関与するとされるが、遺伝的要因だけで急速な増加を説明するのは難しい。近年、環境因子は遺伝子発現調節に影響し疾患発症への関与が示唆されている。DNAの配列を変化させず後天的に遺伝子発現を調節する機構はエピゲノム制御と呼ばれ、近年急速にその制御機構が明らかになっている。しかしアレルギー性鼻炎の発症や病態形成におけるエピゲノム制御の詳細は良く分かっていない。

アレルギー性鼻炎の病態形成には Th2 細胞を中心とした免疫応答が重要な役割を持つと考えられるが、アレルギー性鼻炎の発症に至る過程やアレルゲン免疫療法により誘導される寛解機序において Th2 細胞を含む末梢免疫細胞の役割や制御機構はよく分かっていない。特に Th2 細胞の変化において、内因性や外因性のエピゲノム制御が大きな役割を持つ可能性が示唆される。しかし、これまでアレルギー性鼻炎患者におけるエピゲノム解析の報告は少なく、特にスギ花粉症患者における解析の報告はほとんどない。アレルギー性鼻炎の発症や寛解の機序を解明することは、予防治療や新たな根治治療法の開発に発展できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、アレルギー性鼻炎に対しアレルゲン免疫療法が誘導する寛解において、T細胞を含む免疫細胞に引き起こされる遺伝子制御およびエピゲノム制御機構を解明することを目的とした。これらの解明は新規治療や予防治療への発展も期待される。

3. 研究の方法

(1) スギ花粉症に対する舌下免疫療法の臨床試験に参加した症例から治療開始前後にて採取した末梢血検体を用いた。末梢血は比重遠心法によりリンパ球を含む単核球分画を分離回収した。末梢血リンパ球の遺伝子発現を次世代シーケンサーにて解析した。症例の症状日記からアレルギー性鼻炎の症状スコアを算定し、治療前後での変動の程度から舌下免疫療法の効果を有効と無効に判定した。治療前後で発現が変動し、特に治療効果と関連のみられる末梢血リンパ球の遺伝子を探索した。

(2) 次に、上記の臨床試験サンプルにおいて遺伝子発現に変動があった候補遺伝子について、実臨床で舌下免疫療法を希望され同意された症例から研究への登録を行い、治療前後で採血を行い保存した。上記臨床試験の症例の血液サンプルの解析より候補となった遺伝子の発現をそれぞれ PCR 法にて検証した。

(3) 検証実験により再現性のみられた遺伝子について、コードするタンパクを同定し、コードタンパクの血清中の発現を ELISA 法にて解析した。舌下免疫療法の開始後に症状改善が見られた

有効群と、明らかな改善がみられなかった無効群とにグループを分け、コードタンパクの発現量と治療効果との関連を解析した。

(4) また、スギ花粉症に対するスギ花粉舌下免疫療法の施行によって変化する末梢血 T 細胞のエピゲノム制御について解析を行った。舌下免疫療法施行例に対し治療開始前後で末梢血を採取した。末梢血は、比重遠心法によりリンパ球を含む単核球分画を分離回収し、スギ抗原で刺激したのち、磁気ビーズを用いて CD4 陽性 T 細胞を分離回収し、ATAC シーケンスと RNA シーケンスによる解析を行った。治療前後に ATAC シーケンスにて変動が同定され発現量に差のある遺伝子を探索した。症例の症状日記からアレルギー性鼻炎の症状スコアを算定し、治療前後での変動の程度から舌下免疫療法の効果を有効と無効に判定した。治療効果と遺伝子解析データと比較し関連を解析した。

4 . 研究成果

(1) 舌下免疫療法の臨床試験に参加した症例の末梢血を用いて治療効果に関連し治療後発現が変動したリンパ球の遺伝子を探索したところ、5 つの候補遺伝子を同定した。

(2) さらに、これらの候補遺伝子について、実臨床で舌下免疫療法の治療を受けた症例の末梢血サンプルにて検証実験行くと、前回の結果を再現する遺伝子を 1 つ同定した。

(3) この遺伝子のコードタンパクは補体関連の酵素分子であった。血清中のタンパク発現について ELISA 法を用いて確認したところ、タンパクレベルでは効果との関連は明らかでなかった。この結果より、コードタンパクは酵素であるため発現量だけでなく酵素活性や 2 次代謝物の検討が必要であると考えられた。

(4) 舌下免疫療法施行例から採取した末梢血リンパ球をスギ抗原で刺激したのち、CD4 陽性 T 細胞を回収し ATAC-seq と RNA-seq による解析を行ったところ、治療効果と関連する遺伝子を複数確認し寛解機序との関連が示唆された。

今後、本研究の結果をもとにさらなる解析を進め、治療効果判定や治療予測マーカーとしての有用性について検証研究を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Arai T, Sakurai D, Iinuma T, Nakagawa T, Yonekura S, Okamoto Y.	4. 巻 120
2. 論文標題 Basophils from allergic rhinitis patients show allergen-specific upregulation of thymic stromal lymphopoietin receptor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Allergy Asthma Immunol.	6. 最初と最後の頁 155-163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anai.2017.12.005.	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 Ihara F, Sakurai D, Yonekura S, Iinuma T, Yagi R, Sakurai T, Ito T, Matsuura A, Morimoto Y, Arai T, Suzuki S, Katayama K, Nakayama T, Okamoto Y.	4. 巻 73
2. 論文標題 Identification of specifically reduced Th2 cell subsets in allergic rhinitis patients after sublingual immunotherapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 1823-1832
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/all.13436.	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 櫻井大樹
2. 発表標題 アレルギー性鼻炎に対する免疫療法と感作の関係 作用機序とマーカー
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 櫻井大樹
2. 発表標題 舌下免疫療法のメカニズムと最新知見
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 櫻井大樹
2. 発表標題 スギ舌下免疫療法におけるスギ反応性Th2細胞の解析
3. 学会等名 第37回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井大樹
2. 発表標題 千葉大学の取り組み 臨床と基礎のteam-up
3. 学会等名 第67回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻井大樹
2. 発表標題 スギ花粉症の特徴をふまえた今後の治療戦略
3. 学会等名 第67回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻井大樹
2. 発表標題 Immunological parameters observed in sublingual immunotherapy
3. 学会等名 第67回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻井大樹
2. 発表標題 アレルギー性鼻炎の症状と病態から考える治療戦略
3. 学会等名 第49回日本職業・環境アレルギー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 櫻井大樹
2. 発表標題 スギ舌下免疫療法におけるスギ反応性Th2細胞の解析
3. 学会等名 第37回 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井大樹
2. 発表標題 臨床効果、奏効機序とバイオマーカーUp-to-date
3. 学会等名 第1回 日本アレルギー学会関東地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井大樹
2. 発表標題 ダニ舌下免疫療法の長期寛解への期待・寛解機序と最新の知見
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020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
研究 分担者	金田 篤志 (KANEDA ATSUSHI) (10313024)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究 分担者	石井 裕貴 (ISHII HIROKI) (40568250)	山梨大学・大学院総合研究部・講師 (13501)	

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