

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16917

研究課題名(和文) 舌下免疫療法におけるセマフォリン4Aを介した Th1/Th2制御の解明

研究課題名(英文) Analysis of Th1/ Th2 control via Sema4A in sublingual immunotherapy

研究代表者

端山 昌樹 (Hayama, Masaki)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70756048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性鼻炎における舌下免疫療法はTh1/Th2バランスを改善することにより治療につながる。セマフォリン4Aはそのメカニズムに関連のある物質と予想されたが、有意な結果は得られなかった。しかし好酸球におけるセマフォリン4Aの発現が明らかとなった。またアレルギー性鼻炎患者の血清中のセマフォリン4Dは健常者と比較して有意に発現が増加しており、今後もセマフォリンとアレルギー性炎症に関する研究を継続する方針となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法(以下、SLIT)は、そのメカニズムは十分に解明されていない。またSLITの治療効果が得られない症例も多く、また効果が不十分なことも多い。さらに治療期間は複数年と長い。これらはSLITの限界である。しかしSLITはアレルギー性鼻炎の根治的治療で副作用が少ないという強みがある。そこで我々はSLITの治療メカニズムについて、セマフォリン4Aに着目してTh1/Th2の制御メカニズムを解明し、さらに治療効果を増強させることで、治療期間の短縮や、効果の増大を目指した。SLITの治療効果の改善、治療期間の短縮は患者QOLの改善のみならず、医療費の抑制にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：Sublingual immunotherapy in allergic rhinitis leads to treatment by improving Th1/Th2 balance. Semaphorin 4A was expected to be relevant to the mechanism, but no significant results were obtained. However, the expression of semaphorin 4A in the eosinophil was clarified. The expression of semaphorin 4D in the serum of patients with allergic rhinitis was significantly increased compared with that of healthy subjects, and it was decided to continue research on semaphorin and allergic inflammation.

研究分野：鼻科学

キーワード：アレルギー性鼻炎

1. 研究開始当初の背景

(1) アレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法の問題点

A. 舌下免疫療法の問題点

アレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法 (SLIT) は安全性が高く、根治的治療になりうることから患者の期待は高く、また有病率の増加に対する医療費の抑制も期待されている。しかし治療期間は 2-3 年と長く、治療効果の予測が困難なこと、治療効果を反映するバイオマーカーが存在しないこと、治療効果に個人差があり 3 割程度の方は治療が無効であることなどの問題点がある。バイオマーカーにより治療効果を客観的に評価することや、治療効果を予測すること、さらに有効率を高めることが SLIT の普及や患者のアドヒアランスの向上のために求められている。

B. 舌下免疫療法の作用機序に関する問題点

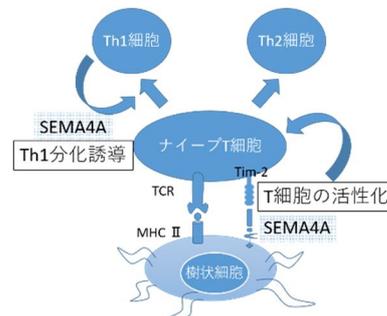
SLIT の作用機序は十分には解明されていないが、マウス SLIT モデルでの実験から、自然曝露より多量の抗原が体内に取り込まれると、まず口腔底の樹状細胞へ作用することが報告されている。その結果、制御性 T 細胞 (Treg) の誘導及び Th1 細胞の増加、Th2 細胞増加の抑制、抗原特異的 IgG4 の増加等により、アレルギーを抑制すると推測されている (Y.Tanaka et al. *Mucosal Immunol.* 2016)。アレルギー性鼻炎では Th1/Th2 バランスが Th2 優位となっているが、SLIT は Th1/Th2 バランスを改善することにより治療につながる。そのため根治的な治療になり得るとされているが、その分子メカニズムは詳細には解明されていない。SLIT のメカニズムを促進あるいは抑制する因子は同定されておらず、そのためなぜ効果に個人差が大きいのかは不明である。

(2) Th1/Th2 制御とセマフォリン 4A

A. セマフォリン 4A (SEMA4A) について

我々のグループでは免疫セマフォリンの一つであるセマフォリン 4A (SEMA4A) に着目してきた。セマフォリンは神経ガイダンス因子として同定されたが、神経誘導以外にも様々な機能を有することが明らかとなった。その中でも免疫制御に関わる分子群を免疫セマフォリンと呼ぶ。我々のグループは SEMA 4A が T 細胞や樹状細胞に強く発現し、T 細胞活性化の促進、Th1/Th2 分化の制御、特に Th1 への分化誘導に関与していることを明らかにした (Fig. 1)。

Fig.1 Th1/Th2制御におけるSEMA4Aの役割



さらに SEMA4A ノックアウト (KO) マウスでは Th2 優位な免疫状態となり、アレルギー性鼻炎や喘息誘発試験を行うと野生型 (WT) マウスと比較して重症化するということが報告した。また SEMA4A KO マウスを用いた誘発喘息モデルにおいてリコンビナント SEMA4A を全身投与することにより病状の軽減が見られ、SEMA4A の治療薬としての可能性を示唆した (A. Kumanogoh, T. Shikina et al. *Immunity.* 2005, Morihana T et al. *J Clin Immunol.* 2012)。

2. 研究の目的

舌下免疫療法における効果発現のメカニズムの解析、特に SEMA4A の機能解析を通じた Th1/Th2 分化の制御についての検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

マウスに関してはまずは SLIT モデルマウスを作成している。OVA を麻酔下に舌下投与を行い、その後にマウス口腔底組織を採取し、誘導されてくる樹状細胞を分離し、SEMA4A の発現を確認する実験を行っている。しかしながらマウス口腔底組織から樹状細胞を分離する方法は手技が難しいため、手技が安定するように複数の条件設定を行った。その樹状細胞を分離し、SEMA4A の発現を確認する実験を試みた。しかしながら樹状細胞の分離がテクニカルに難しく、実験に必要な細胞数を確保することに難航した。

ヒトに関してはスギ舌下免疫療法のため当院に通院している患者の血清を用いた検討を行った。2014 年 11 月から 2015 年 5 月に阪大病院においてスギに対する舌下免疫療法を開始し、治療開始後 2 年間のフォローを行ったスギ花粉症患者の内血液検査に同意を得た 7 例を対象とした。花粉飛散前 (12 月前後) 飛散後 (6 月前後) に血清総 IgE 値、スギ抗原特異的 IgE 値・IgG4 値、ヒノキ抗原特異的 IgE 値・IgG4 値を測定した。

血清抗体価はシーメンス社のアラスタット 3g を用いて測定した。これらの症例に対して症状スコア等を用いた治療効果判定を行い、血清抗体価との相関を検討すると同時にスギ花粉と抗原の相関性が高いヒノキ花粉に対する抗体価の推移についてもあわせて検討を行った。また血清中のセマフォリン、血清抗体価について ELISA にて測定を行った。また患者症状に関して症状スコア、薬物スコア、症状薬物スコア、自覚評価などについてデータを回収し、患者背景についても調査を行った。

4. 研究成果

マウスの実験においてアレルギー性鼻炎モデルマウスとして、アスペルギルス抗原であるプロテアーゼとOVAを腹腔内投与し、感作させた。鼻腔粘膜のHE染色にて好酸球の浸潤を認め、アレルギー性鼻炎モデルマウスとして機能していることを確認した(Fig. 2)。しかし口腔底組織から樹状細胞を分離する実験が難航し、マウス SLIT モデルを用いた実験は機能しなかった。

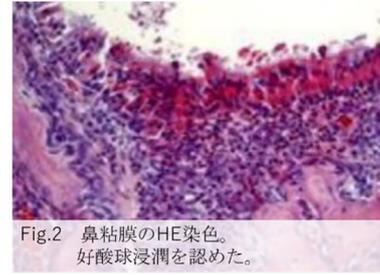


Fig.2 鼻粘膜のHE染色。好酸球浸潤を認めた。

ヒト SLIT 症例を用いた研究では7例を対象として解析を行った。5/7例が Responder であった。自覚的な治療効果は症状スコアと一致する結果であった(Fig.3)。自覚的な治療効果に関わらず、スギ特異的 IgE は一度上昇した後、低下する傾向は共通であった。一方でスギ特異的 IgG4 は Responder であっても必ずしも上昇はしていなかった(Fig.4)。このことから SLIT での IgE と IgG4 の推移と自覚症状との関連は指摘できなかった。症状スコア・薬物症状スコアは、以前からの報告の通り、スギの時期で改善傾向にあってもヒノキの時期に悪化する症例を認めた。ヒノキの時期にも効果を認めた症例は症例4のみであり、一部の症例では有効である可能性が示唆された。またヒノキ特異的 IgE、IgG4 ともに変動がある症例があることから、長期的な観察は今後の検討課題であると考えられた(Fig.4)。

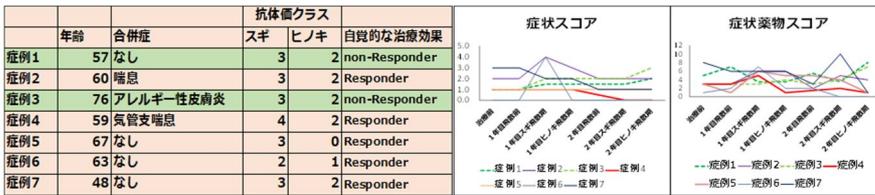


Fig.3 SLIT症例の症状および症状薬物スコアの変移

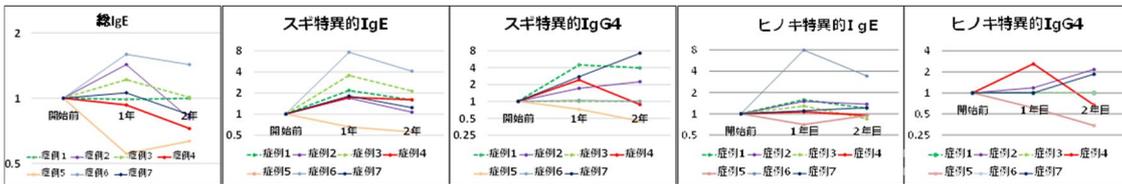


Fig.4 SLIT症例の総IgEおよびスギ・ヒノキ特異的抗体価の変移

アレルギー性鼻炎症例の血清中セマフォリンファミリーについて測定を行ったところ、SEMA4A、SEMA7A においてはコントロールと変化なかった。SEMA4D については有意に上昇しており、アレルギー性鼻炎のバイオマーカーとなる可能性が示唆された(Fig. 5)。

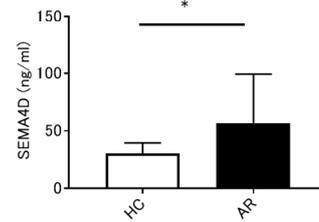


Fig.5 アレルギー性鼻炎患者の血清中SEMA4D
* P<0.05 (Mann-whitney U test)

またその過程で好酸球における SEMA4A の発現を確認することができた。また SEMA4A のノックアウトマウスにおいて、骨髄由来の好酸球の生存がコントロールと比較して有意に短くなることを見出した。従来、SEMA4A は T 細胞の研究から Th1/Th2 分化の制御、特に Th1 への分化誘導に参与するという知見が得られていたが、好酸球上の発現では従来と異なる結果で controversial であった。

(Maeda Y, ...Hayama M, et al. SEMA4A promotes eosinophil survival and contributes to eosinophil-mediated allergic diseases. *Allergol Int.* 2019) T細胞と好酸球を介した異なるカスケードでアレルギーをコントロールしている可能性もあり今後の検討を要する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Eguchi Hirotaka, Hayama Masaki, Maeda Youhei, Takeda Kazuya, Tsuda Takeshi, Inohara Hidenori	4. 巻 121
2. 論文標題 Sinonasal Malignant Tumor Diagnosis Following Endoscopic Sinus Surgery:15 Case Studies and Survey of Preoperative MRI and Biopsy for Unilateral Sinus Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho	6. 最初と最後の頁 899 ~ 904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3950/jibiinkoka.121.899	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 Obata Sho, Hayama Masaki, Maeda Yohei, Takeda Kazuya, Tsuda Takeshi, Yokoi Kei, Inohara Hidenori	4. 巻 57
2. 論文標題 Two Cases of Foreign Body Frontal Sinusitis due to Filling with Bone Wax after Craniotomy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nihon Bika Gakkai Kaishi (Japanese Journal of Rhinology)	6. 最初と最後の頁 616 ~ 622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.7248/jjrhi.57.616	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masaki Hayama, Sho Obata, Yohei Maeda, et al.
2. 発表標題 Refractory frontal sinusitis due to bone wax: removal by endoscopic modified Lothrop procedure and identification by GC/MS
3. 学会等名 27th Congress of European Rhinology Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥野未佳、端山昌樹、前田陽平、川島佳代子、識名崇、武田和也、津田武、猪原秀典
2. 発表標題 スギ舌下免疫療法による治療効果と抗体価の推移
3. 学会等名 耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----