

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06723

研究課題名(和文) スギ花粉内在性免疫アジュバントの解析

研究課題名(英文) Analysis of endogenous immune adjuvant in Japanese cedar pollen

研究代表者

安達 禎之 (Adachi, Yoshiyuki)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60222634

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)：スギ花粉粒子内に(1-3)- β -D-グルカンが潜在することを示し、花粉BG含量および構造的特徴を解析した。花粉中のBGIは、真菌細胞壁BGとは異なり(1-6)-分岐構造は僅かであり、直鎖状(1-3)- β -D-グルカンの存在が示唆された。花粉 β -グルカンは自然免疫系受容体タンパク質に結合し、哺乳動物のDectin-1にも作用し樹状細胞やDectin-1遺伝子導入細胞株を活性化することが明らかとなった。このDectin-1反応性が花粉症の発症原因であるアレルゲン特異的IgE産生に関わることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スギ花粉症は、我が国において国民病とも言われるほど有病率の高い免疫疾患である。本研究では、スギ花粉に含まれる糖鎖成分が糖鎖受容体Dectin-1に作用して花粉症を発症させることを示した。この発見は、花粉の自然免疫活性化物質を明確にした点で学術的な独自性が高いものと考えられる。花粉糖鎖とその受容体との相互作用をコントロールする新たな花粉症治療法開発への展開も期待され、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The applicant showed the potential of (1-3)- β -D-glucan in cedar pollen particles and analyzed the pollen BG content and structural characteristics. Unlike fungal cell wall BGs, the BGs in pollen had only a few (1-6)-branched structures, suggesting the presence of linear (1-3)- β -D-glucan. Pollen β -glucan binds to innate immune system receptor proteins and also acts on mammalian Dectin-1 to activate dendritic cells and Dectin-1-transduced cell lines. This Dectin-1 reactivity was also found to be involved in the production of allergen-specific IgE, the cause of pollinosis.

研究分野：免疫学

キーワード：スギ花粉症 (1-3)- β -D-グルカン デクチン-1 自然免疫 アレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

スギ花粉症は日本国内において最も患者数の多い花粉症であり有病率は 26.5% にのぼる。その発症要因は日本国内に大量に植樹されたスギから放出される花粉に含まれるタンパク質性アレルゲンによる感作である。さらに、公衆衛生環境の向上による患者体内のヘルパー T 細胞 (Th) バランスの変化や、ディーゼル排気ガスに含まれる微粒子 (DEP) や黄砂などがアジュバントとして働き、患者増の原因となっているという報告もある。しかし、それらの要因は花粉に直結したものではなく、曖昧である。免疫反応に影響する花粉自身の成分はアレルゲンタンパク質以外に何があるのか？それは、免疫応答にどのような影響をもたらすのか？など、花粉症の発症機序をめぐって学術的に解明すべき問題は多々残されている。一方、植物花粉には、微生物多糖と構造類似の多糖成分が含まれることが先行研究により示されているが、その免疫学的活性については明らかになっていない。花粉の多糖類に着目して自然免疫系を活性化させる花粉成分について研究を行った。

2. 研究の目的

スギ花粉に含まれる病原体関連分子パターン物質 (PAMPs: pathogen-associated molecular patterns) を単離し、その構造や物性、自然免疫系細胞の活性化機構を明らかにすることを主な目的とした。本来、PAMPs とは、リポ多糖などのエンドトシキシンやペプチドグリカン、非メチル化 CpG DNA、ウイルス RNA など病原微生物 (病原体) に関連した分子を指すが、申請者は高等植物にも同様な分子が潜在し、免疫系に影響を及ぼす可能性があると考え、本研究を計画した。高等植物に含まれる微生物類似物質による免疫系疾患の観点で研究が行われている例は少ないため、新知見が得られると期待された。また、植物 PAMPs の働きが明確になることで、対症療法的でなく、免疫学的機序に基づいた花粉症の根本的治療を確実にすることにもつながると期待される。そこでスギ花粉に含まれる多糖成分、特に (1-3)- β -D-グルカン (以下 BG と称する) について、以下に上げた視点から解析した。

スギ花粉 グルカン抽出及び精製法の検討、 スギ花粉 BG の検出及び定量法の解析、スギ花粉由来 BG の構造解析、 スギ花粉 BG の細胞活性化作用の検討

3. 研究の方法

スギ花粉からの糖鎖成分抽出及び精製法の検討

スギ花粉症患者の粘膜分泌液の液性に着目し、花粉粉末を弱アルカリ性の緩衝液に浸漬して花粉粒破裂を誘導した。破裂後の花粉成分を水溶性及び不溶性画分に分画し、分画物の顕微鏡観察、水溶性成分の成分分析を行った。

スギ花粉 BG の検出及び定量法の解析

糖鎖結合性の糖鎖認識タンパク質 (BGRP) の組換え型タンパク質の発現系を構築し、得られた BGRP を用いて、スギ花粉から抽出された糖鎖成分の検出に応用可能か検討した。また BGRP の結合活性を応用して定量的 ELISA 法を構築した。

スギ花粉由来 BG の構造解析

花粉抽出物中の BG の構造解析を目的として、分岐構造 (1 次構造) やらせん構造 (高次構造) の BG に対して反応特異性の異なる BG 結合タンパク質を組換えタンパク質として 6 種作製し、それらの組合せ反応性により、花粉分画中の BG 構造を推定した。

スギ花粉 BG の細胞活性化作用の検討

BG に対する哺乳動物の自然免疫系受容体として知られる Dectin-1 に着目して、花粉成分と可溶性 Dectin-1-Fc タンパク質との結合性を検討した。さらに Dectin-1 発現細胞株や各種 Toll 様受容体 (TLR) 発現細胞の活性化能、Dectin-1 アンタゴニスト存在下での花粉成分への免疫細胞反応性を NF- κ B レポーターアッセイ及びサイトカイン産生能により検討した。

4. 研究成果

不溶性画分には花粉の生殖細胞を含む細胞成分と殻成分が含まれ、密度勾配遠心分離法を採用し、生殖細胞と外殻に分画できることが分かった。(図 1)

BGRP を用いて、スギ花粉から抽出された糖鎖成分の検出に応用可能か検討し、完成させた。また BGRP 固相化カラムにより、花粉抽出物から糖鎖成分を分離精製できることが明らかとなった。BGRP を応用した ELISA 法により糖鎖成分の含量を求め、mg 単位の糖鎖画分が 1g の乾燥スギ花粉から分取可能であることが明らかとなった。

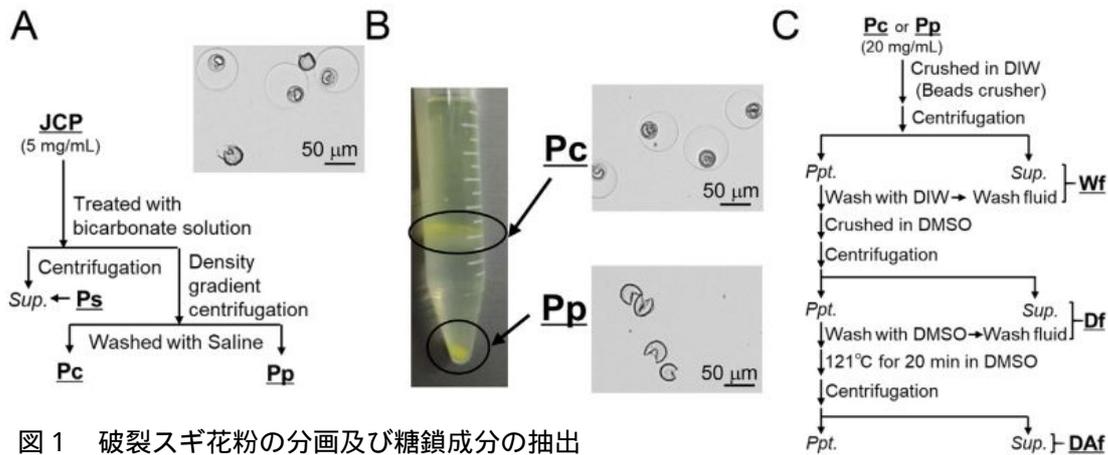


図1 破裂スギ花粉の分画及び糖鎖成分の抽出
 Pp:外殻、Pc:生殖細胞
 (Allergol Int. 70,105-113,2021 より引用)

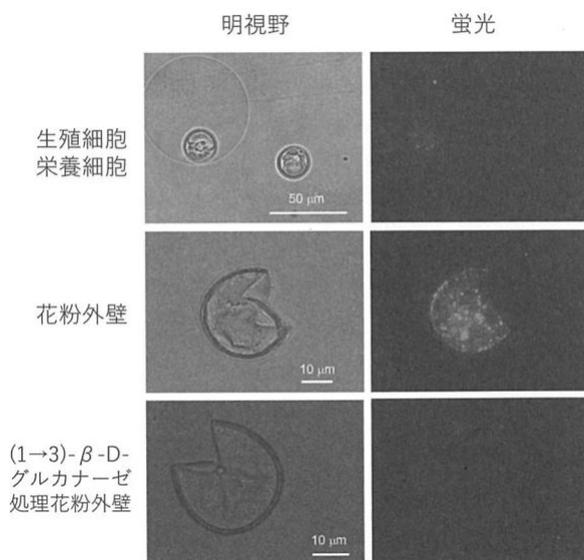


図2 -グルカン認識タンパク質(BGRP)によるスギ花粉の免疫蛍光染色 (アレルギーの臨床 41, 75-79, 2021 より引用)

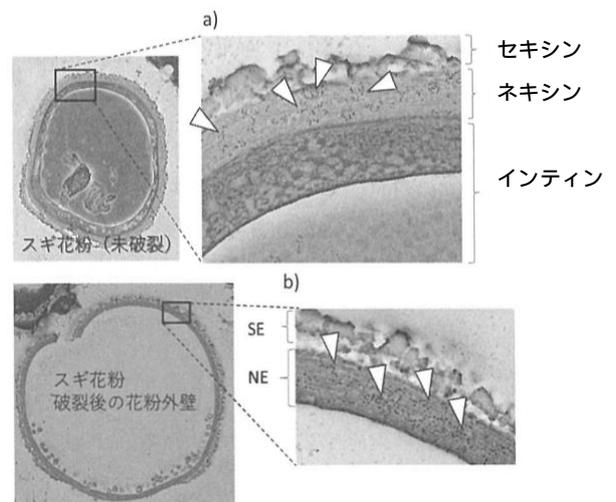


図3 -グルカン認識タンパク質で免疫染色したスギ花粉の電顕画像
 金コロイド粒子の局在例を矢印で示す
 (アレルギーの臨床 41, 75-79, 2021 より引用)

組換え型 BGRP タンパク質作製を用いて、花粉中の糖鎖局在を顕微鏡で検討したところ、外壁の内側表面及び生殖細胞境界部(インティン)に対象物が集積していることが明らかとなった。(図2, 3)(1 3)-β-D-グルカンに結合性を有する BGRP を用いた一分子蛍光測定 BG 検出法に対して、(1 6)-β-D-グルカン結合タンパク質(16BGP)と BGRP との組合せによる一分子蛍光測定 BG 検出法では花粉糖鎖成分の反応性が約 5,000,000 倍低下したことから、スギ花粉の BG は真菌の(1 3)-β-D-グルカンとは異なり、(1 6)-分岐構造は殆どないことが推測された(図4)。(Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(11), 5977)

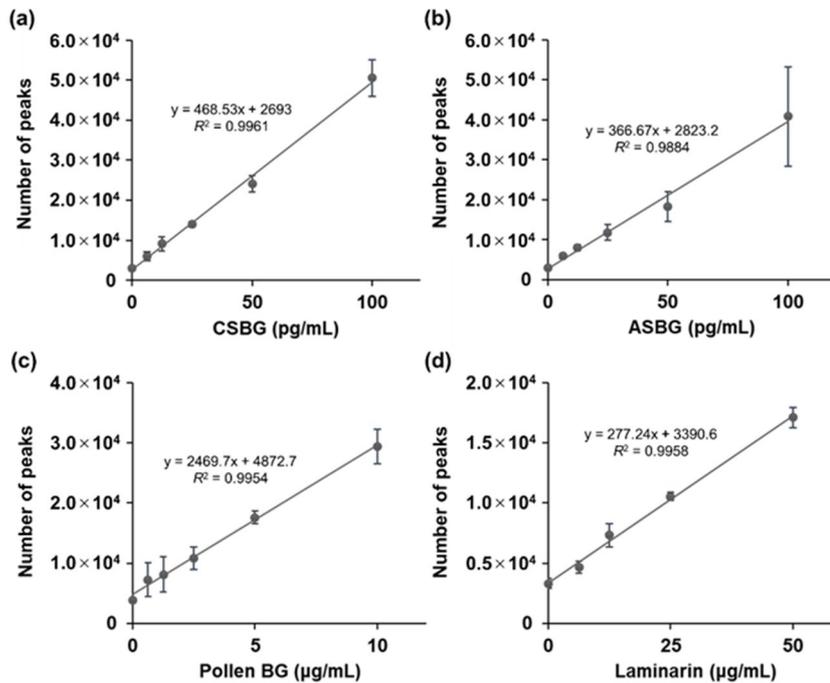


図 4 BGRP 及び 16BGP を用いた一分子蛍光測定法による真菌 BG 及び花粉 BG の反応性比較
 カンジダ真菌 BG; CSBG (a), アスペルギルス BG; ASBG (b), スギ花粉 BG; Pollen BG (c), 海藻 BG; laminarin (d)
 (*Int. J. Mol. Sci.* 2021, **22**(11), 5977 より引用)

Dectin-1 アンタゴニストとしての、低分子 β -グルカン (Laminarin) 及び水溶性 β -グルカン (ソニフィラン、SPG) を用いて、スギ花粉成分とマウス樹状細胞との共培養時に各種アンタゴニストを用いたところ、樹状細胞からの IL-6 産生が有意に低下した。また Dectin-1 欠損マウスの樹状細胞においてもスギ花粉成分による IL-6 産生が消失した (図 5)。以上より、スギ花粉による樹状細胞の活性化において Dectin-1 が主な活性化受容体であり、アンタゴニストにより樹状細胞の活性化を抑制できることが明らかになった。

スギ花粉に潜在する (1-3)- β -D-グルカンを β -グルカナーゼ処理により消化し、TLR などの自然免疫受容体発現細胞の活性化能を検討したところ、TLR2 及び TLR4 発現細胞において NF- κ B の活性化が観察された。 β -グルカナーゼ未処理ではその活性が殆ど認められないことから、 β -グルカン除去処理により TLR 反応性が新たに出現した可能性が示された。本研究によりスギ花粉には自然免疫を活性化する β -グルカンが含まれることが明らかになり、花粉アジュバント活性の主成分は β -グルカンである可能性が強く示された。

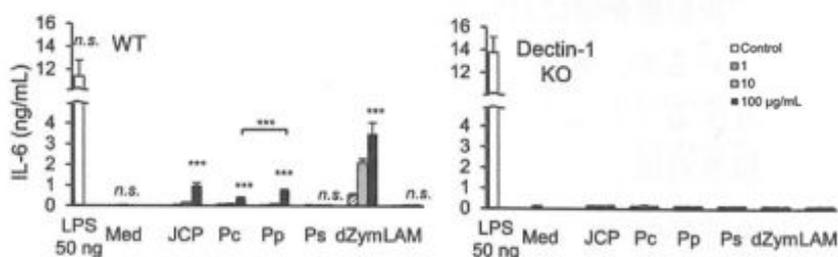


図 5 樹状細胞のサイトカイン産生におけるスギ花粉画分の影響
 (*Allergol Int.* **70**, 105-113, 2021 より引用)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshiyuki Adachi, Masaki Ishii, Takashi Kanno, Junko Tetsui, Ken-Ichi Ishibashi, Daisuke Yamanaka, Noriko Miura, Naohito Ohno	4. 巻 20
2. 論文標題 N-Terminal (1-3)- β -D-Glucan Recognition Proteins from Insects Recognize the Difference in Ultra-Structures of (1-3)- β -D-Glucan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	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) 10.3390/ijms20143498	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 安達禎之、菅野峻史、平塚理恵、大野尚仁	4. 巻 40
2. 論文標題 スギ花粉に内在する β -グルカンの 自然免疫活性化作用と抗体産生促進作用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 53-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Adachi Yoshiyuki, Nakata Hidetaka, Tanabe Tetsuya, Yamanaka Daisuke, Kanno Takashi, Ishibashi Ken-ichi, Ohno Naohito	4. 巻 22
2. 論文標題 Development of a Highly Sensitive β -Glucan Detection System Using Scanning Single-Molecule Counting Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5977 ~ 5977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115977	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 Kanno Takashi, Kim Changmin, Yamanaka Daisuke, Ishibashi Ken-ichi, Tanaka Hiroshi, Ohno Naohito, Adachi Yoshiyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Possibility of Japanese Cedar Pollen Causing False Positives in the Deep Mycosis Test	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2135 ~ 2135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22042135	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 Adachi Yoshiyuki, Kanno Takashi, Ishibashi Ken-ichi, Yamanaka Daisuke, Motoi Akitomo, Motoi Masuro, Ohno Naohito	4. 巻 23
2. 論文標題 Binding Specificity of a New Artificial α -Glucan Recognition Protein and Its Application to α -Glucan Detection in Mushroom Extracts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Medicinal Mushrooms	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1615/IntJMedMushrooms.2021038074	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 Kanno Takashi, Adachi Yoshiyuki, Ohashi-Doi Katsuyo, Matsuhara Hiroki, Hiratsuka Rie, Ishibashi Ken-ichi, Yamanaka Daisuke, Ohno Naohito	4. 巻 70
2. 論文標題 Latent 1,3- β -D-glucan acts as an adjuvant for allergen-specific IgE production induced by Japanese cedar pollen exposure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 105~113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.08.004	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 安達 禎之・菅野 峻史・平塚 理恵・大野 尚仁	4. 巻 41
2. 論文標題 スギ花粉内在性 α -グルカンによる樹状細胞活性化と花粉アレルギー特異的抗体産生の促進作用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 75-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 菅野 峻史, 安達 禎之, 平塚 理恵, 岩倉 洋一郎, 大野 尚仁
2. 発表標題 スギ花粉中の α -1,3-glucan局在と自然免疫賦活化作用
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 菅野 峻史, 安達 禎之, 平塚 理恵, 岩倉 洋一郎, 大野 尚仁
2. 発表標題 スギ花粉中1,3-β-D-glucanによる抗原特異的免疫グロブリン産生誘導作用
3. 学会等名 第30回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達 禎之
2. 発表標題 (1-3)-β-D-グルカンの免疫賦活作用におけるデクチン-1の影響
3. 学会等名 第92回日本生化学学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金 チャンミン, 菅野 峻史, 安達 禎之, 山中 大輔, 石橋 健一, 岩倉 洋一郎, 大野 尚仁
2. 発表標題 スギ花粉によるDect in-1を介した樹状細胞成熟化への影響の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅野峻史、安達禎之、平塚理恵、岩倉洋一郎、大野尚仁
2. 発表標題 スギ花粉中のβ-1,3-glucan局在と自然免疫賦活化作用
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 菅野峻史、山中大輔、安達禎之
2. 発表標題 スギ花粉によるリムルスGテストへの影響の検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Kanno, Yoshiyuki Adachi, Katsuyo Ohashi-Doi, Hiroki Matsuhara, Rie Hiratsuka, Yoichiro Iwakura, Daisuke Yamanaka, Ken-Ichi Ishibashi, Naohito Ohno
2. 発表標題 Latent 1,3-β-D-glucan in Japanese cedar pollen facilitated allergen-specific IgE production
3. 学会等名 EAACI Annual Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Kanno, Yoshiyuki Adachi, Katsuyo Ohashi-Doi, Hiroki Matsuhara, Rie Hiratsuka, Yoichiro Iwakura, Daisuke Yamanaka, Ken-Ichi Ishibashi, Naohito Ohno
2. 発表標題 Latent 1,3-β-D-glucan acts as an adjuvant for allergen-specific IgE production induced by Japanese cedar pollen exposure
3. 学会等名 JSA/WAO XXVII World Allergy Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiyuki Adachi, Takashi Kanno, Katsuyo Ohashi-Doi, Hiroki Matsuhara, Rie Hiratsuka, Yoichiro Iwakura, Daisuke Yamanaka, Ken-Ichi Ishibashi, Naohito Ohno
2. 発表標題 1,3-β-D-glucan in Japanese cedar pollen activates innate immune response via dectin-1
3. 学会等名 EAACI Annual Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 -1,6-分岐 -1,3-グルカンまたは -1,3-グルカンの検出・定量方法および検出・定量 キット	発明者 山中大輔, 安達禎之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-149797	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 -1,3-1,6-グルカンの測定方法	発明者 中田秀孝, 安達禎之, 石橋健一, 山中大輔, 大野尚仁	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-209679	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 -グルカン結合タンパク質、 -グルカン検出キット、人工DNAおよび細菌	発明者 安達禎之, 大野尚仁, 元井益郎, 元井章智	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-107248	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------