

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07190

研究課題名(和文) CD4+T細胞や抑制性T細胞に発現する苦味レセプターが舌下免疫療法に与える影響

研究課題名(英文) Effects of bitter taste receptors expressed in CD4+ T cells and regulatory T cells on sublingual immunotherapy

研究代表者

廣井 隆親 (HIROI, Takachika)

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・室長

研究者番号：80228824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、舌下免疫療法の奏功機序の解明において抗原特異的ヘルパーT細胞上に発現する苦味受容体(TAS2R)が重要な働きをすることを突き止めた。舌下免疫療法の効果が認められた患者の末梢血におけるCD4+T細胞上に発現するTAS2Rは、TAS2R43が優位に発現していることを認めた。さらに初年度に効果が認められなかった患者において治療を継続して観察すると、2年後ならびに3年後にTAS2R43の発現が年々増加していることが認められた。これらの知見は今後のスギ花粉症における病態把握や効果的な治療法の開発などに大きく役立つ結果であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スギ花粉症に代表されるアレルギー疾患は、発症原因が明らかにされていない。またこの疾患は年々増加の一途を辿っており、既に国民の半数近くの罹患者が認められている。根本的治療法として免疫療法が推奨されているが、その作用メカニズムも明らかではない。本研究は、舌下免疫療法の作用機序の一端を解明した。この結果は、アレルギー免疫療法における今後の治療効率や薬剤開発の大きな助けになると思われる。さらにアレルギー疾患の発症機序の解明に有効である結果である。さらに、苦味受容体43を治療効果のバイオマーカーとすれば治療効果を表す具体的な指標になると思われる。

研究成果の概要(英文)：This study found that the bitter taste receptor (TAS2R) plays an important role in the elucidation of the mechanism of response to sublingual immunotherapy expressed on antigen-specific helper T cells. TAS2R expressed on CD4+ T cells in the peripheral blood of patients with observed sublingual immunotherapy was observed to be predominantly expressed TAS2R43. Furthermore, when treatment was continued in patients who were not effective in the first year, it was observed that the expression of TAS2R43 increased year by year after 2 and 3 years. These findings were considered to be of great use in understanding the pathology of cedar hay fever in the future and developing effective treatment methods.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー スギ花粉症 舌下免疫療法 粘膜免疫 苦味受容体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

国内外での舌下免疫療法研究において症状スコアのみならず、客観的に治療効果を判定できるバイオマーカーの研究は重要な課題の1つである。簡易に測定できるものとして末梢血の血清に注目して、スギ花粉症に対する舌下免疫療法のバイオマーカーに関する研究報告がある。疾患感受性に関する遺伝子多型解析では、HLA (DP5)、IL-4 と IL-4R $\alpha$ 、Fc $\epsilon$ RI などの遺伝子変異の関与が報告されている。また、スギ花粉症に対する長期舌下免疫療法4年目で、血清中の補体 3a と C5a、サイトカイン IL-4 と IL-17A、thymic TSLP は、有意な減少が認められたことを報告している。しかしながら現時点でこれらの結果は、客観的に治療効果を判定できるバイオマーカーとして確立されていないため、客観的な治療効果化の診断ができていないのが現状であることを解明する必要性が認められた。

研究代表者は、経粘膜ワクチン開発を含めた粘膜免疫学のフィールドで長い間研鑽を重ねてきた経験により、スギ花粉症舌下免疫療法のバイオマーカーに関する研究を開始した。一方でスギ花粉症に関わる「食べるワクチン」の研究開発を農林水産省と共同で行ってきた経緯がある。現在スギ花粉症に対するコメをベースとした治療米は、臨床試験でその効果の検証が進んでいる。また、アトピー性皮膚炎、喘息や食物アレルギーなど幅広く疾患を捉えて、遺伝子組換え技術を踏まえた疾患モデルマスの開発や病態の解析を行ってきた。現在もヒトのサンプルや動物を用いた研究より、アレルギー疾患の効果的な治療法の開発や診断評価など様々な研究を展開していることにより本研究の課題の発想に至った。

### 2. 研究の目的

スギ花粉症舌下免疫療法は、成功すればアレルギーの根本治療法であると考えられている。その一方で、2年以上の長期治療に関わらず約3～4割の患者に症状の改善が認められないうえ、治療効果における診断基準も存在しない。代表者は先の臨床研究で CD4<sup>+</sup>T 細胞に発現している苦味受容体 (TAS2R)の一部が舌下免疫療法の治療効果に強く相関していることを、遺伝子多型解析と mRNA 発現解析より見出した。本研究目的は、環境(外的・後天的)因子に影響を受けた各種 TAS2R を免疫学的な個性を司る因子として捉えた研究を展開することにより、個々の患者における舌下免疫療法の作用機序を解明することである。これにより、生活環境(習慣)と治療効果が関連した TAS2R プロファイル(バイオマーカーの組み合わせ)を確立し、リスク分類に基づく層別化医療(オーダーメイド)の推進に寄与する可能性を検討することを目標とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)ヒト末梢血 CD4<sup>+</sup>T 細胞での TAS2R 遺伝子発現プロファイルの解析

健常者(100人)、花粉症患者(100人)およびこれまでに舌下免疫療法を行った患者の保存 CD4<sup>+</sup>T 細胞や新規開始患者(有効100人、無効100人)の末梢血より CD4<sup>+</sup>T 細胞を採取し、total RNA を抽出する。抽出した RNA を DNase で処理後に逆転写し、cDNA を調整する。本研究では、cDNA をテンプレートとして TAS2R 発現量をリアルタイム PCR にて測定する。TAS2R は exon が一つであるため、逆転写なしのサンプルについても測定し、genomic DNA の混入がないことを確認する。また葉状乳頭付近の舌を擦過することにより、味覚受容体が発現している細胞を採取することが可能であることが報告されていることから、本法にて細胞を採取し、ポジティブコントロールとして用いる。

#### (2)ヒト末梢血 CD4<sup>+</sup>T 細胞の各種 TAS2R リガンドに対する増殖反応測定

分離した CD4<sup>+</sup>T 細胞は、各種既知リガンドを単独で暴露する、あるいは CD3 と CD28 に対する

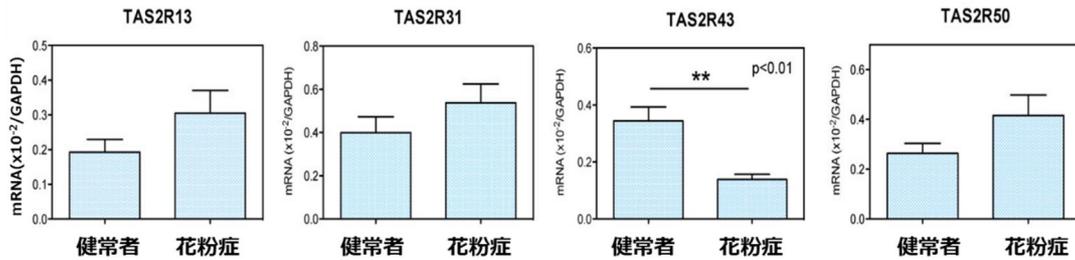
モノクローナル抗体を用いて生体内での抗原提示細胞から T 細胞活性化を模倣した状態などの条件下で増殖反応測定や上清のサイトカインの定量解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### (3) スギ花粉症患者における末梢血 CD4<sup>+</sup>T 細胞上の各種 TAS2R mRNA 発現解析

先行研究において、アレルギー免疫療法の効果に伴う末梢血中のコピー数変異の解析を行った結果 TAS2R の発現に差異があったことから<sup>1)</sup>、新規 100 人の患者の末梢血 CD4<sup>+</sup>T 細胞における TAS2R 発現を定量 mRNA 解析を再度調査した。その結果、図1に示すように各健常者と比較して患者群は、種 TAS2R の中でも TAS2R43 が優位に減少していることが認められた。

図1. スギ花粉症患者における末梢血 CD4<sup>+</sup>T 細胞上の各種 TAS2R mRNA 発現解析

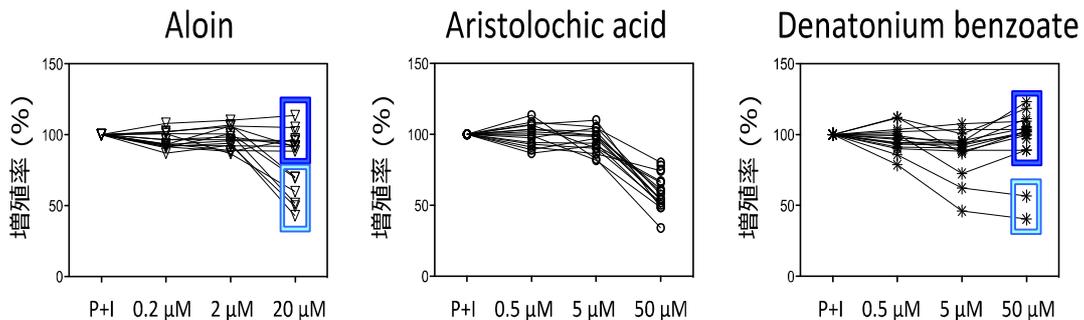


この結果より、TAS2R43 が免疫学的に重要な働きをしている可能性が認められたので分子レベルでの機能解析を行った。

##### (2) ヒト CD4<sup>+</sup>T 細胞における TAS2R43 における agonist の反応性

花粉症患者の末梢血を採取して CD4<sup>+</sup>T 細胞に分離後、抗原特異的細胞増殖試験により TAS2R の反応性を検討した。TAS2R43 に対するリガンド3種類(Aloin, Aristolochic acid, Denatonium benzoate)を培養液中に添加した結果、それぞれ濃度依存的にスギ花粉抗原依存的に増殖抑制を認めた(図2)。

図2. ヒト CD4<sup>+</sup>T 細胞における TAS2R agonist の反応性

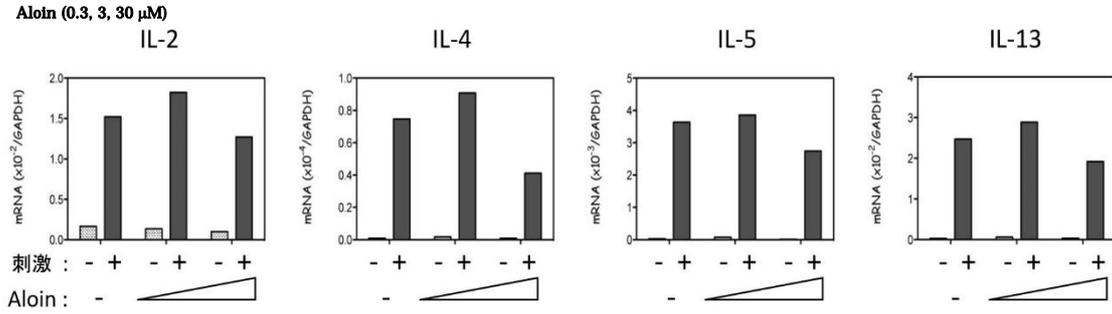


しかしながら、それぞれのリガンドを添加した培養系において、すべての患者に対して反応が抑制されなかった。その後、舌下免疫療法を3年間行った結果を踏まえると、抑制が認められなかった患者は、治療に対して難治性の傾向を示し治療期間が長期に渡ることが明らかとなった(データ未発表)。

##### (4) TAS2R43 における免疫抑制によるサイトカイン産生解析

図2の抗原特異的増殖試験の結果において、培養上清のサイトカイン産生量を解析した。図3に示すようにアレルギーに関連する各種サイトカインの産生は、増殖抑制に伴い添加した Aloin の濃度依存的に産生抑制が認められた。

図 3. Aloiin-TAS2R43 における細胞増殖抑制によるサイトカイン産生能解析

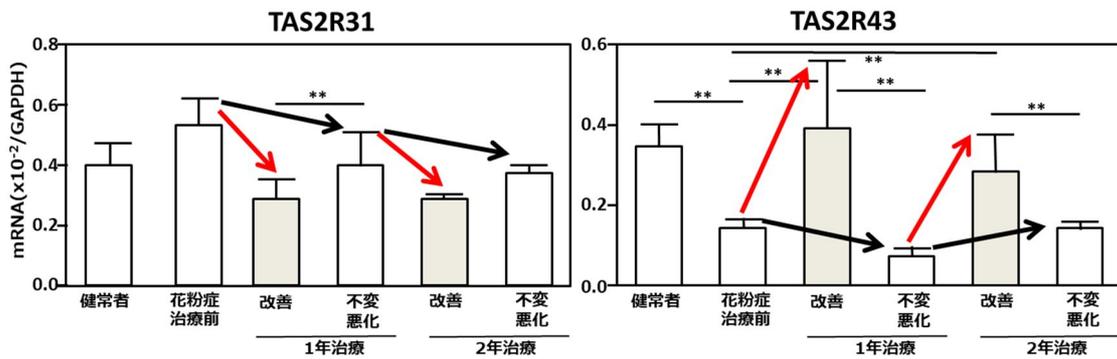


これらの結果から、アレルギー炎症に關与するサイトカインの抑制は CD4<sup>+</sup>T 細胞における Aloiin-TAS2R43 反応に關与することが大きく示唆された。

(5)治療効果における経時的苦味受容体リガンドの発現解析

初年度で治療効果が認められなかった患者に対して末梢血の TAS2R の発現を経時的に解析を行った結果、次年度で効果が表れた患者は TAS2R43 の発現が末梢血 CD4<sup>+</sup>T 細胞において上昇していることが明らかとなった(図4)。

図4. 舌下免疫療法の治療効果における経時的苦味受容体リガンドの発現解析



舌下免疫療法の治療効果は、ヘルパーT 細胞(CD4<sup>+</sup>)上に発現する苦味受容体(TAS2R)が重要な働きをすることを突き止めた。舌下免疫療法は3年以上の投与が推奨されており、その治療期間は長く効果がある患者は約6割程であった。効果が認められた患者の末梢血における CD4<sup>+</sup>T 細胞上に発現する TAS2R は、TAS2R43 が優位に発現していることを認めた。さらに初年度に効果が認められなかった患者において治療を継続して観察すると、2年後ならびに3年後に TAS2R43 の発現が年々増加していることが認められた。最終的に3年間以上の治療期間では約8割の患者に治療効果が認められた。舌下免疫療法において TAS2R43 の発現が上昇するメカニズムは不明ではあるが、薬剤の長期投与によってこのレセプターの発現が上昇して体液中のリガンドによる免疫抑制によることが、舌下免疫療法の奏功機序の一端であることが示唆された。

<引用論文>

1. 東京都花粉症実態調査 東京都福祉保健局, 2015.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 9件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Ito D, Miura K, Saeki M, Yamasaki N, Ogata S, Koyama T, Hiroi T, Mori A, Endou H, Hayashi K, Kaminuma O	4. 巻 11
2. 論文標題 L-type amino acid transporter 1 inhibitor suppresses murine Th2 cell-mediated bronchial hyperresponsiveness independently of eosinophil accumulation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Asia Pac Allergy.	6. 最初と最後の頁 e33
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 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 該当する

1. 著者名 Koyama T, Miura K, Yamasaki N, Ogata S, Ito D, Saeki M, Hiroi T, Mori A, Kaminuma O	4. 巻 11
2. 論文標題 Suppressive effect of dexamethasone on murine Th9 cell-mediated nasal eosinophilic inflammation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Asia Pac Allergy.	6. 最初と最後の頁 e25
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 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 該当する

1. 著者名 Ito D, Miura K, Saeki M, Yamasaki N, Ogata S, Koyama T, Hiroi T, Mori A, Endou H, Hayashi K, Kaminuma O	4. 巻 11
2. 論文標題 L-type amino acid transporter 1 inhibitor suppresses murine Th2 cell-mediated bronchial hyperresponsiveness independently of eosinophil accumulation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Asia Pac Allergy.	6. 最初と最後の頁 e33
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 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 Koyama T, Miura K, Yamasaki N, Ogata S, Ito D, Saeki M, Hiroi T, Mori A, Kaminuma O	4. 巻 11
2. 論文標題 Suppressive effect of dexamethasone on murine Th9 cell-mediated nasal eosinophilic inflammation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Asia Pac Allergy.	6. 最初と最後の頁 e25
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 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 Saeki M, Kaminuma O, Hiroi T.	4. 巻 155
2. 論文標題 A new mechanism of bronchial hyperresponsiveness revealed by murine Th9 cell-transferred asthma model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 375-380
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 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 Kaminuma O, Nishimura T, Saeki M, Mori A, Hiroi T.	4. 巻 43
2. 論文標題 T cell-mediated nasal hyperresponsiveness in allergic rhinitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 36-40
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 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 Morinaga M, Nakajima-Adachi H, Hiraide E, Kitamura N, Kaminuma O, Hiroi T, Ohashi-Doi K, Hachimura S.	4. 巻 69
2. 論文標題 Epicutaneous allergen administration without antigen delivery device induces local T cell response and alleviates food allergic enteropathy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 622-625
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 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 Takaiwa F, Yang L, Takagi H, Maruyama N, Wakasa Y, Ozawa K, Hiroi T.	4. 巻 67
2. 論文標題 Development of Rice-Seed-Based Oral Allergy Vaccines Containing Hypoallergenic Japanese Cedar Pollen Allergen Derivatives for Immunotherapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Agric Food Chem.	6. 最初と最後の頁 13127-13138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.9b05421.	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 該当する

1. 著者名 Tachibana M, Watanabe N, Koda Y, Oya Y, Kaminuma O, Katayama K, Fan Z, Sakurai F, Kawabata K, Hiroi T and Mizuguchi H	4. 巻 32
2. 論文標題 Ablation of IL-17A leads to severe colitis in IL-10-deficient mice: implications of myeloid-derived suppressor cells and NO production.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 187-201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz076.	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 該当する

1. 著者名 Kaminuma O, Gotoh M, Okubo K, Nakaya A, Hiroi T.	4. 巻 154
2. 論文標題 Mechanisms of allergen immunotherapy elucidated through integrated comparative analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nihon Yakurigaku Zasshi.	6. 最初と最後の頁 23-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.154.23.	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 該当する

1. 著者名 Saeki M, Nishimura T, Kitamura N, Hiroi T, Mori A, Kaminuma O.	4. 巻 20
2. 論文標題 Potential Mechanisms of T Cell-Mediated and Eosinophil-Independent Bronchial Hyperresponsiveness.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2980-2981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20122980.	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 該当する

1. 著者名 Kaminuma O, Kitamura N, Gotoh M, Shindo M, Watanabe N, Saeki M, Nishimura T, Mori A, Nemoto S, Tatsumi H, Okubo K, Hiroi T.	4. 巻 68S
2. 論文標題 Thrombospondin 1-mediated suppression of mast cell degranulation is involved in the efficacy of sublingual immunotherapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergol Int.	6. 最初と最後の頁 S9-S10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2019.03.007.	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 該当する

1. 著者名 Kenichi Shimada, Minoru Gotoh, Kimihiro Okubo, Takachika Hiroi, Osamu Kaminuma, Akihiro Nakaya	4. 巻 85
2. 論文標題 Serum interactions are implicated in the mechanism of action of sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Nippon Med Sch	6. 最初と最後の頁 250 ~ 258
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 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 該当する

1. 著者名 Gotoh Minoru, Kaminuma Osamu, Nakaya Akihiro, Katayama Kazufumi, Akihiro Nakaya, Watanabe Nobumasa, Saeki Mayumi, Nishimura Tomoe, Kitamura Noriko, Okubo Kimihiro, Hiroi Takachika	4. 巻 67
2. 論文標題 Involvement of taste receptor in the effectiveness of sublingual immunotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergy international	6. 最初と最後の頁 421 ~ 424
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 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 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 神沼修, 北村紀子, 宮武昌一郎, 森晶夫, 廣井隆親.
2. 発表標題 Calcineurin / NFATシグナルのダイバーシティを生む分子メカニズム.
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北村紀子, 佐伯真弓, 神沼修, 廣井隆親, 後藤穰.
2. 発表標題 花粉症患者CD4陽性T細胞におけるカフェインの効果について.
3. 学会等名 第4回アレルギー学会関東地方会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐伯真弓、西村友枝、神沼 修、高木英典、森 晶夫、高岩文雄、廣井隆親.
2. 発表標題 経口免疫療法用デバイスとしての米蛋白顆粒の有用性.
3. 学会等名 アレルギー・好酸球研究会2019.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神沼 修、後藤 穰、中谷明弘、北村紀子、西村友枝、佐伯真弓、廣井隆親、森 晶夫、大久保公裕.
2. 発表標題 アレルギー免疫療法の効果発現に関わる好塩基球およびマスト細胞関連メディエーター
3. 学会等名 アレルギー・好酸球研究会2019.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐伯真弓、西村友枝、神沼 修、高木英典、森 晶夫、高岩文雄、廣井隆親.
2. 発表標題 アレルギー発現米による制御性T細胞の誘導を介さない免疫寛容誘導.
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 Kaminuma O, Saeki M, Nishimura T, Kitamura N, Mori A, Hiroi T.
2. 発表標題 Differential mechanisms of Th2- and Th9-mediated bronchial hyperresponsiveness in mice.
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会.(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐伯真弓、後藤 穰、大久保公裕、中谷明弘、北村紀子、西村友枝、神沼 修、廣井隆親.
2. 発表標題 舌下免疫療法における味覚受容体を介した奏功メカニズム.
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 北村紀子、後藤 穰、湯田厚司、佐伯真弓、神沼 修、廣井隆親.
2. 発表標題 花粉症舌下免疫療法の効果発現機序の探索.
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 廣井隆親
2. 発表標題 スギ花粉症舌下免疫療法の個別化医療を目指した基礎研究
3. 学会等名 東京都福祉保健医療学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京都医学総合研究所における花粉症研究  
<http://www.igakuken.or.jp/>  
 東京都医学総合研究所における花粉症研究  
<http://www.igakuken.or.jp/>

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