

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14202  
 研究種目：基盤研究(B) (一般)  
 研究期間：2019～2021  
 課題番号：19H03802  
 研究課題名(和文) ヒノキ花粉症の根治を目指すスギ花粉舌下免疫療法の分子機序解明のための総合的研究  
 研究課題名(英文) A mechanism of sublingual immunotherapy with Japanese cedar extract for the treatment of patients with Japanese cedar and cypress pollinosis  
 研究代表者  
 清水 猛史 (SHIMIZU, TAKESHI)  
 滋賀医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：00206202  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：スギ花粉舌下免疫療法後1, 2, 3年で採取した同一患者の血清と末梢血単核球を利用し、臨床症状と比較しながら、舌下免疫療法の有効例・無効例における作用機序を検討し、  
 1) スギ花粉舌下免疫療法後には制御性T・B細胞が誘導され、抗原特異的にIL-10, IL-35などが産生されること、  
 2) ヒノキ花粉症に対しては交差抗原性による反応と非特異的な免疫抑制作用によって症状が抑制されること、  
 3) 抗原特異的なIgA, IgG1, IgG4抗体産生が誘導されること、  
 4) 抗原親和性が低下した特異的IgE抗体産生が誘導されること、  
 5) 制御性B細胞を介してメモリーT細胞のアポトーシスが誘導されること、などを明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、まだ十分に解明されていないスギ花粉舌下免疫療法の作用機序を、スギ花粉とヒノキ花粉の交差抗原性の影響や、ヒノキ花粉症に対する非特異的な免疫学的効果、特異的IgA, IgG1, IgG4抗体の産生、特異的IgE抗体抗原親和性の変化や、末梢血単核球サブセットの機能面から解析し、その分子機序を明らかにしたものである。  
 治療開始前には判断できない無効例を見つけるバイオマーカーの発見や、抗原間の交差反応性の影響、免疫系全体に及ぼす非特異的な抑制作用など、その作用機序の解明は、舌下免疫療法の発展や有効利用に役立ち、成果は免疫学の基礎研究の発展にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Immunological effects of sublingual immunotherapy (SLIT) with Japanese cedar (JC) pollen extract in patients with JC pollinosis were examined using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and serum obtained at 1, 2, 3, years after the beginning of SLIT. We revealed that SLIT induced (1) the antigen-specific production of anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-35, (2) the production of antigen-specific IgA, IgG1, and IgG4 antibodies, (3) the production of antigen-specific (low avidity) IgE antibody, (4) the proliferation of regulatory T and regulatory B cells, (5) the apoptosis of memory CD4+T cells induced by regulatory B cells, and that (6) SLIT suppressed the non-specific production of IL-5 and IL-17 from PBMC. Clinical efficacy of SLIT was associated with (1) the serum level of IL-35, and (2) the antigen-specific IgG4 antibody in serum, and antigen-induced production ratio of IL-10/IL-5 from PBMC.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：アレルギー性鼻炎 スギ・ヒノキ花粉症 舌下免疫療法 制御性B細胞 制御性T細胞 IL-35 メモリーT細胞 抗原特異的IgE抗体

## 1. 研究開始当初の背景

1) 舌下免疫療法は2014年にスギ花粉、2015年にダニが保険適応になり、2018年に小児にも適応が拡大され、近年急速に普及した。しかしながらその作用機序については不明な点が多く十分に解明されていない。スギ花粉の主要抗原であるCry j 1とCry j 2はヒノキ花粉のCha o 1、Cha o 2とアミノ酸配列で高い相同性がある。抗原特異的IgE抗体にも強い交差反応性が認められ、スギ花粉症患者の70-80%はヒノキ花粉症にも罹患している。しかしながら、我々の検討ではスギ花粉舌下免疫療法のヒノキ花粉症に対する有効性は約40%程度に過ぎない(湯田厚司、日耳鼻2017)。その一因として、2016年に新たに同定されたヒノキ抗原Cha o 3が注目され、Cha o 3と相同性を有するスギ花粉コンポーネントのCry j 4はスギ花粉における含有率が少ない。舌下免疫療法は、抗原の交差反応性による作用や非特異的な免疫抑制反応によって、他抗原に対するアレルギー炎症も抑制できる可能性があるが、他抗原に対する免疫学的効果はこれまで検討されていない。

2) 舌下免疫療法後には、血清中の抗原特異的IgG4、IgA抗体とともに特異的IgE抗体も一旦上昇する。長期的には徐々に減少するが、我々の予備検討では抗原特異的IgE抗体が上昇している治療後1年の時期でも臨床症状が改善する。その理由として、抗原親和性が低下した特異的IgE抗体が産生されている可能性がある。近年、DCP(densely carboxylated protein)マイクロアレイを利用して、特異的IgE抗体の抗原親和性を測定する研究手法が開発され、食物アレルギーに対する経口免疫療法後の免疫寛容に、低親和性抗原特異的IgE抗体が関わっていることが報告された(Kamemura N, J Allergy Clin Immunol 2014)が、アレルギー性鼻炎や舌下免疫療法において、これまで抗原親和性の検討は行われていない。

3) 舌下免疫療法の作用機序についてはまだ不明な点が多い。その解明には、①同一患者から舌下免疫療法後3年間にわたって毎年血液を採取し血清とともに、末梢血単核球を用いた検討を行う必要がある。しかし、末梢血単核球は、その採取や処理の煩雑さから、これまで患者血清を利用した検討は行われても、末梢血単核球とそのサブセットを対象にした研究はほとんど行われていない。我々は、我が国で最も多い1800例以上の舌下免疫療法の臨床経験を有する共同研究者、三重県津市湯田クリニックの湯田厚司先生と連携して、舌下免疫療法患者の末梢血単核球を採取直後に処理するシステムを確立し、現時点で1000件以上の検体を得て、治療後3年にわたる同一患者の血液検体を詳細な臨床症状とともに100例以上保有している。

## 2. 研究の目的

スギ花粉舌下免疫療法の治療前と治療後1, 2, 3年時の患者血清と末梢血単核球を利用して、臨床症状と比較しながら、舌下免疫療法の作用機序を明らかにする。特に、スギ花粉舌下免疫療法のヒノキ花粉症に対する免疫学的効果や、抗原特異的IgE抗体の抗原親和性(Avidity)の変化、制御性T・B細胞の誘導や抑制系サイトカインIL-10, IL-35の役割、免疫記憶に関わるメモリーT細胞の機能変化、などについて検討した。

## 3. 研究の方法

スギ花粉舌下免疫療法の治療前と治療後1, 2, 3年の患者血清と末梢血単核球を用いて、臨床症状の改善度と比較しながら、以下の内容について、フローサイトメトリーやELISA法、RT-PCR法などを利用して検討した。

- 1) 血清中の抗原特異的(スギ・ダニ・ヒノキ粗抗原、Cry j 1, Cry j 2, Cha o 1, Cha o 3) IgE, IgG1, IgG4, IgA抗体量の測定
- 2) それぞれの抗原刺激による末梢血単核球からのサイトカイン(IL-5, IL-17, IL-10など)産生とその変化
- 3) 抗原特異的IgE抗体の抗原親和性とその変化
- 4) 末梢血単核球における、各種サブセット(Th1, Th2, Th17細胞、濾胞性T細胞、メモリーT細胞、制御性T細胞、制御性B細胞など)変化とその機能解析
- 5) 血清中の抑制系サイトカイン(IL-35, IL-10)の変化とその機能解析
- 6) メモリーCD4+T細胞のアポトーシスと制御性B細胞を介したその機序について

## 4. 研究成果

### 1) スギ花粉舌下免疫療法のヒノキ花粉症に対する免疫学的効果

- ①それぞれの抗原刺激による末梢血単核球からのサイトカイン(IL-5, IL-17, IL-10)産生

スギ・ヒノキ花粉症患者では正常人に比べて、抗原刺激（スギ粗抗原、Cry j 1, Cry j 2、ヒノキ粗抗原、Cha o 1, Cha o 3）刺激によって末梢血単核球から IL-5 が産生される。スギ花粉舌下免疫療法 1 年後には、こうしたすべての抗原刺激に対する IL-5 産生が抑制された。さらにすべての抗原刺激に対する IL-17 産生も抑制された（図 1）。

一方、抑制系サイトカインである IL-10 の産生は Cry j 1 の抗原特異的に亢進し、ヒノキ粗抗原や Cha o 1, Cha o 3 刺激によって IL-10 産生はむしろ抑制された。さらに IL-10/IL-5 の値はスギ花粉飛散期の臨床症状と負の相関があり、ヒノキ飛散期の臨床症状との相関は認めなかった（図 2）。

以上の結果、舌下免疫療法後には末梢血単核球からのサイトカイン産生が非特異的に抑制されるが、抑制系サイトカインの IL-10 産生は抗原特異的に生じること、こうした変化がスギ花粉症の臨床症状改善に関わっていることが明らかになった。

### 血清の抗原特異的 IgE、IgG4 抗体量

スギ・ヒノキ花粉症患者では、血清中の Cry j 1 や Cha o 1, Cha o 3 に対する抗原特異的 IgE 抗体が上昇する。スギ花粉舌下免疫療法 1 年後には、Cry j 1 特異的 IgE 抗体のみ上昇し、ヒノキ抗原に対する特異的 IgE 抗体は上昇しない。さらに Cry j 1 特異的 IgG4 抗体のみ上昇し、これはスギ花粉飛散期の臨床症状と負の相関を認めた（図 3）。

以上の結果、舌下免疫療法では抗原特異的 IgG4 抗体の産生が臨床的有効性に関わっていること、Cha o 1, Cha o 3 との交差反応性が認められないことが明らかになった。

以上をまとめると、「スギ花粉舌下免疫療法は、ヒノキ花粉症に対して非特異的に末梢血単核球の機能を抑制する機序と、スギ抗原特異的に作用する機序があり、ヒノキ花粉症に対する効果が不十分になる原因と考えられた。」

## 2) IL-35 の役割と制御性 T 細胞、制御性 B 細胞の誘導

### ①スギ花粉舌下免疫療法と血清 IL-35 量の変化

スギ花粉舌下免疫療法 1 年後には、血清中の IL-35 値が有意に上昇し、IL-35 を発現する制御性 T 細胞と制御性 B 細胞がともに増加した。また、血清 IL-35 値とスギ花粉飛散期の臨床症状に負の相関が認められた。

さらに、舌下免疫療法後には、花粉非飛散期の血清 IL-35 値は有意に減少するが、花粉飛散期には有意に上昇し、舌下免疫療法後には抗原刺激によって IL-35 産生が生じ、これが臨床症状の改善に作用していることが明らかになった（図 4）。

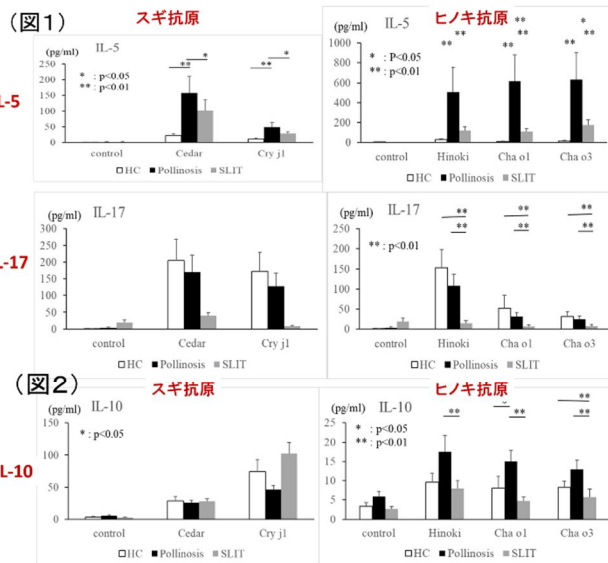


図 1 Cry j 1 特異的 IL-10/IL-5 産生はスギ花粉飛散期の臨床症状と負の相関があるが、ヒノキ花粉飛散期の症状とは相関しない。

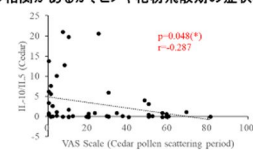


図 2

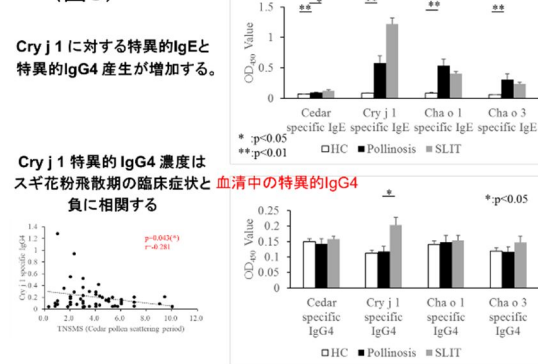
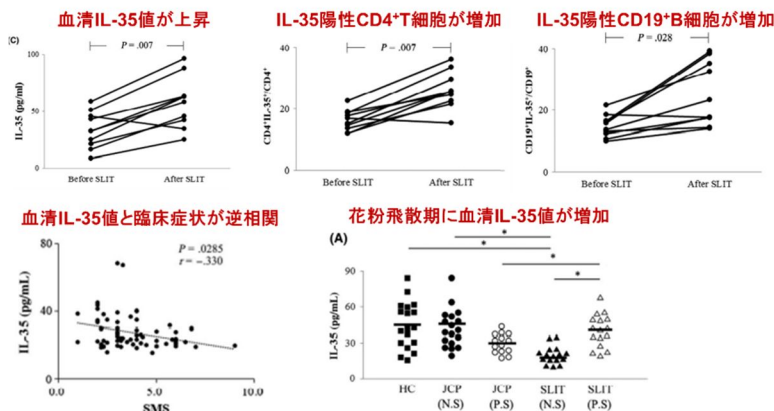


図 4: スギ花粉舌下免疫療法に伴う IL-35 の動態



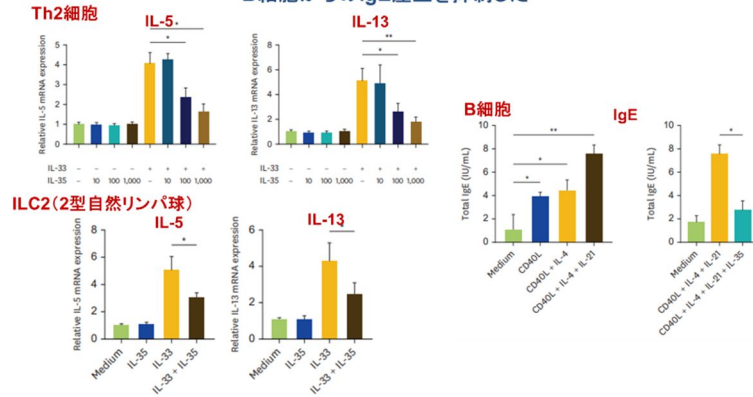
## 2型炎症に対する IL-35 の抑制作用

スギ花粉症患者の末梢血単核球からフローサイトメトリーで Th2 細胞と 2 型自然リンパ球 (ILC2) を分離し、IL-33 刺激に対する IL-5、IL-13 産生に対する IL-35 の作用を検討した。さらに、B 細胞を分離し、CD40L、IL-4、IL-21 刺激による IgE 産生に対する IL-35 の作用を検討した (図 5)。

その結果、IL-35 は Th2 細胞や ILC2 からの IL-5、IL-13 産生を抑制し、B 細胞からの IgE 抗体産生を抑制した。

以上をまとめると「舌下免疫療法後には、制御性 T 細胞や制御性 B 細胞が誘導され、これらから抗原刺激によって産生される IL-35 が、Th2 細胞や ILC2 からの 2 型サイトカイン産生や、B 細胞からの IgE 抗体産生を抑制して、臨床的有効性に関わる」と考えられる。

図 5: IL-35 は Th2 細胞や ILC2 からの IL-5、IL-13 産生を抑制し、B 細胞からの IgE 産生を抑制した



## 3) 抗原特異的 IgE, IgG1, IgG4, IgA 抗体の産生と抗原親和性 (Avidity) の変化

### ① 抗原特異的 IgE, IgG1, IgG4, IgA 抗体の産生

同一患者から舌下免疫療法後の前と 1, 2, 3 年後に血液を採取し、血清中のスギ粗抗原特異的免疫グロブリンを測定したところ、特異的 IgA, IgG1, IgG4 抗体は 1, 2, 3 年後には徐々に増加した。一方、スギ粗抗原特異的 IgE 抗体は、1 年後に一旦上昇するが、2, 3 年後には減少した (図 6)。臨床症状は抗原特異的 IgE 抗体が上昇している 1 年後でも改善するため、「新たに産生された抗原特異的 IgE 抗体は抗原親和性が低下し、肥満細胞からの脱顆粒を生じにくい」との仮説をもとに、抗原親和性の検討を行った。

### 抗原特異的 IgE 抗体の抗原親和性の検討

抗原親和性 (Avidity) については、血清中の特異的 IgE 抗体を測定する際に、血清に抗原を加えてその反応を 50% 阻害できる抗原量で表した。つまり、少量の抗原で阻害できる場合は、抗原と抗体の親和性が高いと考えられ、加えた抗原量が多くなるほど親和性が低下したことになる。

スギ花粉の Cry j 1, Cry j 2 に対する特異的 IgE 抗体も、舌下免疫療法 1 年後には一旦上昇して、2, 3 年後に低下した。一方、Cry j 1, Cry j 2 に対する抗原親和性については、1 年後にすでに低下し、2, 3 年後に徐々に低下した (図 7)。つまり、1 年後には抗原親和性の低下した IgE 抗体が産生されることが、臨床症状の改善につながったと考えられる。

### 濾胞性ヘルパー T (Tfh) 細胞サブセット変化

抗原との親和性が高い高親和性 IgE 抗体の産生には、IL-4 と IL-13 を産生する Tfh13 細胞が、低親和性 IgE 抗体の産生には IL-4 を産生する Tfh2 細胞が関与すると考えられている (Xie MM, Trends Pharmacol Sci 2019)。そこで、それぞれのサブセットの変化を確認したところ、Tfh2 細胞には変化が認められなかったが、舌下免疫療法の 2 年後には Tfh13 細胞が減少していた。

以上、「舌下免疫療法後には Tfh13 細胞が減少し、抗原親和性が低下した特異的 IgE 抗体が産生されて、架橋反応による肥満細胞からの脱顆粒が抑制される可能性」が考えられる。

図 6: 舌下免疫療法後 1, 2, 3 年のスギ粗抗原に対する特異的免疫グロブリンの変動

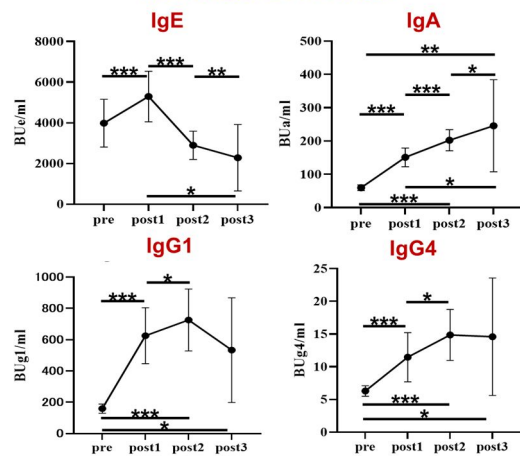
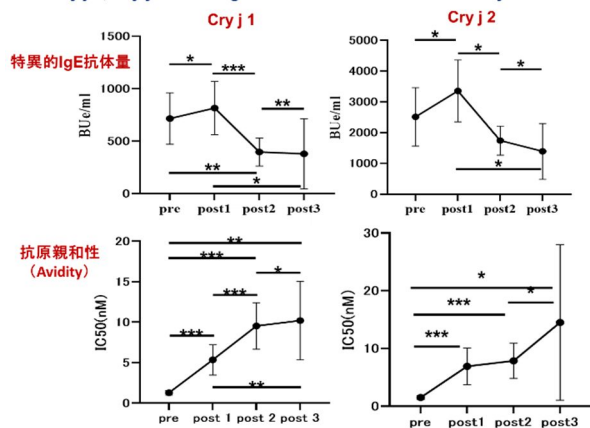


図 7: Cry j 1, Cry j 2 特異的 IgE 抗体量とその抗原親和性 (Avidity) の変化

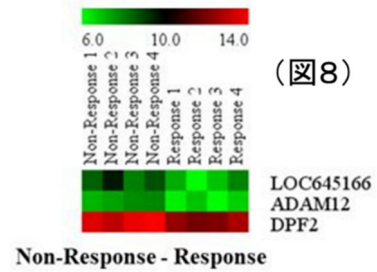




#### 4) メモリーT細胞のアポトーシス誘導について

##### ①RNA マイクロアレイによるメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞の遺伝子発現

舌下免疫療法は、アレルギー性鼻炎に対して、長期寛解や治癒が望める唯一の治療法であり、我々は、免疫記憶に関わるメモリーT細胞が重要であると考えた。そこで、メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞の機能に注目し、スギ花粉舌下免疫療法が有効であった症例(図8右)と無効であった症例(図8左)の末梢血単核球から、フローサイトメトリーでメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞を分離し、RNA マイクロアレイによる網羅的検索を行ったところ、スギ花粉舌下免疫療法有効例では無治療例や無効例に比べて、メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞におけるアポトーシス抑制遺伝子(DPF2)の発現が低下していることを見出した。



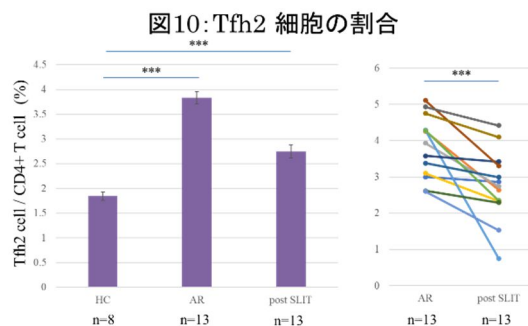
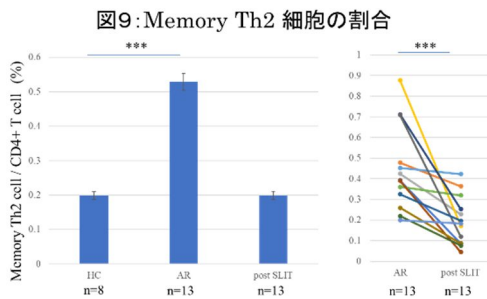
##### メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞におけるアポトーシス関連遺伝子発現

分離したメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞におけるアポトーシス関連遺伝子の発現をRT-PCR法で検討したところ、アポトーシス促進に関わる caspase 3 と Fas の発現には変化を認めなかったが、舌下免疫療法後1年でアポトーシス抑制に関わる遺伝子群の DPF2 と NF-κB p100 の発現が低下し、アポトーシスが誘導されていると考えられた。

##### メモリーTh2細胞とTfh2細胞の変化

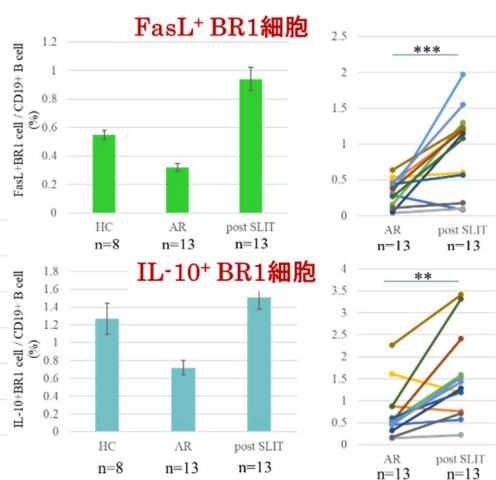
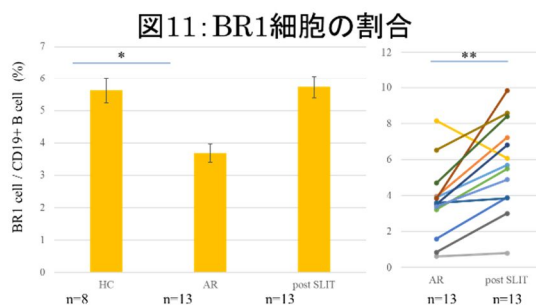
舌下免疫療法の1年後に、実際にメモリーTh2細胞やTfh細胞が減少するのか、フローサイトメトリーを利用して、末梢血単核球のうちCD4<sup>+</sup>T細胞に占めるそれぞれの細胞の割合を検討した。

スギ花粉症患者ではメモリーTh2細胞やTfh細胞が有意に増加しているが、同一患者の検討で、スギ花粉舌下免疫療法1年後はいずれの細胞も有意に減少していた(図9, 10)。



##### BR1細胞とFasL-Fasを介したメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞のアポトーシス誘導

BR1細胞(CD19+CD25+CD71+CD73-)についてフローサイトメトリーで検討した(図11)



スギ花粉症患者では、制御性B細胞のひとつであるBR1細胞が減少しているが、舌下免疫療法1年後には増加し、特にFasLやIL-10を発現したBR1細胞が増えていた。さらに、FasLはメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞のアポトーシスを誘導した。

以上の結果、「舌下免疫療法後には、制御性B(BR1)細胞が誘導され、FasL-Fasを介して、メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞のアポトーシスが生じ、長期寛解につながる」と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kikuoka Hiroataka, Kouzaki Hideaki, Matsumoto Koji, Arai Hiroyuki, Yamamoto Sayuri, Tojima Ichiro, Shimizu Shino, Miyashita Hiromi, Ogawa Yukiko, Osada Toshihiro, Okano Mitsuhiro, Yuta Atsushi, Shimizu Takeshi	4. 巻 210
2. 論文標題 Immunological effects of sublingual immunotherapy with Japanese cedar pollen extract in patients with combined Japanese cedar and Japanese cypress pollinosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 108310 ~ 108310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2019.108310	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 Kouzaki Hideaki, Arikata Masahiko, Koji Matsumoto, Arai Hiroyuki, Yamamoto Sayuri, Kikuoka Hiroataka, Fujimoto Noriki, Ogawa Yukiko, Yuta Atsushi, Shimizu Takeshi	4. 巻 0
2. 論文標題 Dynamic change of anti-inflammatory cytokine IL-35 in allergen immune therapy for Japanese cedar pollinosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.14124	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 Kouzaki Hideaki, Arai Yukihiro, Nakamura Keigo, Murao Takuya, Tojima Ichiro, Shimizu Shino, Yuta Atsushi, Shimizu Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Anti-inflammatory roles of interleukin-35 in the pathogenesis of Japanese cedar pollinosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Asia Pacific Allergy	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) 10.5415/apallergy.2021.11.e34	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroyuki Arai, Hideaki Kouzaki, Atsushi Yuta, Takeshi Shimizu
2. 発表標題 Sublingual immunotherapy with Japanese cedar pollen extract induces apoptosis of memory CD4+ T cells
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新井宏幸、神前英明、中村圭吾、村尾拓哉、湯田厚司、清水猛史
2. 発表標題 スギ花粉舌下免疫療法によるMemory CD4+T細胞のアポトーシス誘導
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井宏幸、神前英明、湯田厚司、清水猛史
2. 発表標題 スギ花粉舌下免疫療法におけるメモリーCD4+T細胞のアポトーシス
3. 学会等名 第38回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神前英明、湯田厚司、清水猛史
2. 発表標題 アレルギー免疫療法の進歩
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Shimizu
2. 発表標題 Future prediction of Japanese cedar (JC) and Japanese cypress pollen scattering and the immunological effects of sublingual immunotherapy with JC pollen extracts for the treatment of combined JC and Japanese cypress pollinosis
3. 学会等名 5th Rhinology Research Forum in Asia（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊岡弘高、神前英明、松本晃治、戸嶋一郎、清水志乃、長田年弘、岡野光博、湯田厚司、清水猛史
2. 発表標題 スギ・ヒノキ花粉症患者におけるスギ花粉症舌下免疫療法でのヒノキ花粉症に対する免疫学的作用
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 菊岡弘高、神前英明、松本晃治、戸嶋一郎、清水志乃、長田年弘、岡野光博、湯田厚司、清水猛史
2. 発表標題 スギ・ヒノキ花粉症患者におけるスギ花粉症舌下免疫療法でのヒノキ花粉症に対する免疫学的作用
3. 学会等名 第1回日本アレルギー学会地方会近畿支部学術講演会
4. 発表年 2019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	神前 英明  (KOUZAKI HIDEAKI)  (10402710)	滋賀医科大学・医学部・講師   (14202)	
研究分担者	山本 小百合  (YAMAMOTO SAYURI)  (10828114)	滋賀医科大学・医学部・医員   (14202)	
研究分担者	新井 宏幸  (ARAI HIROYUKI)  (60816627)	滋賀医科大学・医学部・助教   (14202)	



6. 研究組織（つづき）

	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	湯田 厚司  (YUTA ATSUSHI)  (80293778)	滋賀医科大学・医学部・客員教授    (14202)	
研究分担者	戸嶋 一郎  (TOJIMA ICHIROU)  (80567347)	滋賀医科大学・医学部・講師    (14202)	
研究分担者	中多 祐介  (NAKATA YUSUKE)  (80794958)	滋賀医科大学・医学部・客員助教    (14202)	

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