

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18248

研究課題名(和文) アレルギー性鼻炎とその免疫寛容におけるB7/CD28ファミリーの機能を解明する

研究課題名(英文) Elucidating the function of the B7/CD28 family in allergic rhinitis and its immune tolerance

研究代表者

五十嵐 賢 (Igarashi, Satoshi)

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：10597016

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)：アレルギー性鼻炎の治療である舌下免疫療法が免疫抑制マーカーにどのような影響をあたえるのかを調べるため、ダニアレルギー性鼻炎患者のダニアレルゲン舌下免疫治療前および治療半年後に末梢血単核球を採取し、抗原特異的T細胞を誘導した後シングルセルRNAseqおよびTCRシーケンスを行った。SLIT治療によるPDCD1<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>Th2細胞の遺伝子プロファイルの変化を解析したところSLIT治療により60遺伝子が発現低下、20遺伝子が発現増加していることがわかり、SLIT治療によるPD-1<sup>high</sup> Th2へ及ぼす影響について明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B7/CD28ファミリーとアレルギー疾患に関する報告は、アレルギー性鼻炎に関しては少ない。本研究はこれまでに明らかになっていないアレルギー性鼻炎のT細胞のB7/CD28ファミリーシグナルを解明する研究であり独創的である。本研究で得られる知識は他のアレルギー疾患の研究分野にも応用可能と考えられ、新たな免疫応答メカニズムの情報を提供し、治療法の展開へと期待でき創造的である。特に免疫療法については治療効果を判定するバイオマーカーがまだないため、本研究により免疫寛容の一側面を明らかにすることで新規バイオマーカーの開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate the impact of sublingual immunotherapy, a treatment for allergic rhinitis, on immunosuppressive markers, peripheral blood mononuclear cells were measured before and six months after mite allergen sublingual immunotherapy in patients with mite allergic rhinitis. Following the induction of antigen-specific T cells, single-cell RNAseq and TCR sequencing were performed. Upon analyzing CD4<sup>+</sup>GATA3<sup>+</sup>Th2 cells in the mite allergen-stimulated group, distinct fractions of PDCD1<sup>high</sup> and PDCD1<sup>low</sup> cells could be clustered. Analysis of changes in the gene profile of PDCD1<sup>high</sup>CD4<sup>+</sup>Th2 cells following SLIT treatment revealed down-regulation of 60 genes and up-regulation of 20 genes, demonstrating the effect of SLIT treatment on PD-1<sup>high</sup> Th2 cells.

研究分野：アレルギー

キーワード：アレルギー性鼻炎 免疫療法 B7/CD28ファミリー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

スギ花粉症をはじめとするアレルギー性鼻炎の患者数は近年増加を続けており、2008年の国の統計によると、その有病率は39.4%で、スギ花粉症においては26.5%と報告されており、1998年の調査より約10%も増加し、現在日本のスギ花粉症の患者数は3000万人とも推定されている。スギ花粉症は低年齢化が進んでいる一方で、一旦発症すると中高年まで自然寛解はほとんど期待できない。従って長期にわたって医療的介入を必要とする患者が多い。アレルギー性鼻炎に対し様々な薬物療法が開発され、副作用の軽減・症状の改善効果は進んでいるが、一般の薬物療法は長期の使用によっても根本的な改善にはつながらないと考えられている。アレルゲン免疫療法が現在唯一の根本的治療法であるが、長期の治療期間が必要であること、有効性は高いが寛解症例は一部であった課題もある。アレルギー性鼻炎は未だその発症に至る機序は十分に解明されていないため、根本的な治療法の開発と確立が望まれる。

Th2細胞はアレルギー疾患に重要な役割を持つと考えられている。樹状細胞によるアレルゲンペプチドと主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラス IIをT細胞受容体が認識することで免疫応答に特異性が付与される。アレルゲンの提示を受けたCD4陽性T細胞はTh2細胞へと分化・増殖し、2型アレルギーの病態形成に重要なIL-4、IL-5、IL-13など2型サイトカインを産生する。

T細胞が完全に効果を発揮するには上記の特異的なシグナルの他、非特異的な共刺激シグナルが必要である。PD-1とそのリガンドであるPD-L1とPD-L2はT細胞の活性化・寛容に関わるシグナル伝達系で、自己免疫疾患の調節、感染症における免疫調節機能、腫瘍免疫、組織移植でも主要な役割を果たすことが報告されている。PD-1およびPD-L1とPD-L2はB7/CD28ファミリーに属する。PD-L1は多種多様な腫瘍で発現しており、高レベルのPD-L1発現はいくつかの癌の予後不良と強く相関していることが十分に確立されており、抗PD-1抗体は免疫チェックポイント阻害剤として広く臨床利用されている。PD-L1はB細胞、T細胞、マクロファージ、樹状細胞にも発現し、様々な刺激で発現がさらに増強されることが知られている。一方でPD-L2はB細胞やT細胞にはあまり発現せず、マクロファージや樹状細胞といった抗原提示細胞に発現している。IL-4は抗原提示細胞のマクロファージや樹状細胞上にPD-L2を強く誘導し、逆にIFN $\gamma$ はPD-L1を強く誘導することが知られており、Th1およびTh2応答がPD-L1およびPD-L2を特異的に誘導することが示唆されている。したがって、PD-1とリガンドであるPD-L1とPD-L2は、癌だけでなくアレルギー疾患でもT細胞の恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられる(Allergy 2011;66:155-162)。

アレルギー疾患であるアレルギー性鼻炎において、PD-1とリガンドであるPD-L1とPD-L2はどのような役割を担っているのだろうか。他に報告されているB7ファミリー(CD80、CD86、ICOS-L)、CD28ファミリー(CD28、CTLA-4、ICOS)との関連はあるのだろうか。また、免疫寛容が誘導されるとそれらはどのような動態をみせるのだろうか。本研究ではこれらの問いに挑み、アレルギー性鼻炎の発症と寛容のメカニズムを解明し、新たな診断法、根本治療の開発への展開を目指す。

### 2. 研究の目的

スギ花粉症を代表とするアレルギー性鼻炎の病態と、免疫療法による修飾が加わった後の病態において、T細胞、樹状細胞などに発現するB7ファミリー(PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、ICOS-L)、CD28ファミリー(PD-1、CD28、CTLA-4、ICOS)が与える影響を探究し、それぞれの病態を解明することが本研究の目的である。アレルギー性鼻炎発症には、一塩基多型、エピゲノム、アレルゲン暴露によるTh2細胞応答、粘膜バリアー障害など、遺伝的要因と環境的要因があると考えられている。B7/CD28ファミリーとアレルギー疾患に関する報告は、アレルギー性鼻炎に関しては少ない。本研究はこれまでに明らかになっていないアレルギー性鼻炎のT細胞のB7/CD28ファミリーシグナルを解明する研究であり独創的である。本研究で得られる知識は他のアレルギー疾患の研究分野にも応用可能と考えられ、新たな免疫応答メカニズムの情報を提供し、治療法の展開へと期待でき創造的である。特に免疫療法については治療効果を判定するバイオマーカーがいまだないため、本研究により免疫寛容の一側面を明らかにすることで新規バイオマーカーの開発につながることを期待される。

### 3. 研究の方法

アレルギー性鼻炎患者から末梢血を採取し、CD4<sup>+</sup>Th細胞のRNAseqデータを用い、Th2遺伝子プロファイルを解析した。

ダニアレルゲン舌下免疫療法前および治療半年後で末梢血単核球分画を採取し、抗原特異的T細胞を誘導した後シングルセルRNAseqおよびTCRシークエンスを行い、治療前後の遺伝子プロファイルを解析した。

#### 4. 研究成果

まず健常人と比較して、アレルギー性鼻炎患者における末梢血 Th2 細胞の遺伝子プロファイルの違いを明らかにするため健常人 15 人とアレルギー性鼻炎患者 25 人から採取した CD4 Th2 細胞の RNAseq データ (GSE75011) を用いて解析を行った。健常人と比較しアレルギー患者由来の CD4 +Th 細胞で有意に増加していた 318 遺伝子、有意に低下していた 191 遺伝子をそれぞれ同定できた (図 1)。

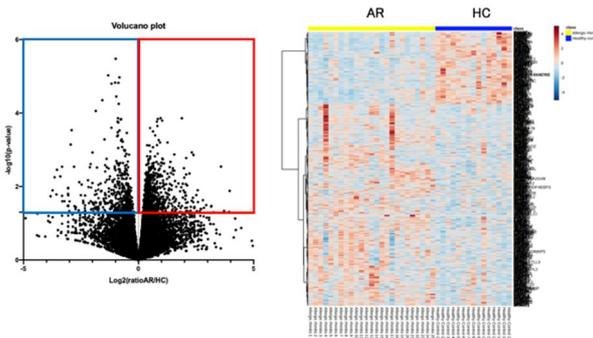


図 1

同定できた遺伝子の中で T 細胞の免疫抑制マーカーについて調べたところ PDCD1 遺伝子と LAG3 遺伝子がアレルギー性鼻炎患者で有意に低下していた (図 2)。

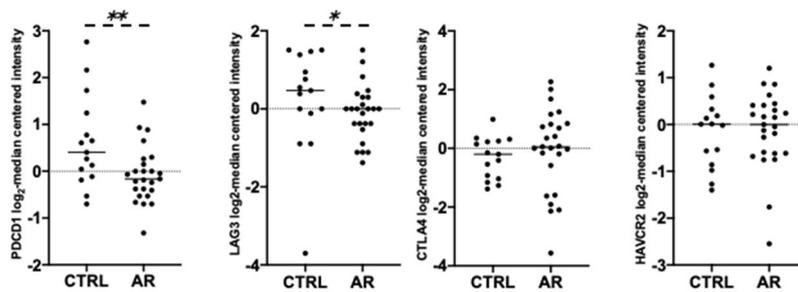


図 2

続いてアレルギー性鼻炎で非常に重要な治療である舌下免疫療法が免疫抑制マーカーにどのような影響を及ぼすのかを調べるため、ダニアレルギー性鼻炎患者のダニアレルゲン舌下免疫療法 (ミティキュア) 前および治療半年後で末梢血単核球分画 (PBMCs) を採取し抗原特異的 T 細胞を誘導した後シングルセル RNAseq および TCR シークエンスを行った。

採取された PBMCs は rIL-2 (100 IU/mL) とダニアレルゲン (6.5 ug/mL) を添加した RPMI1640 培地で 5 日間培養したあと浮遊細胞を採取し CD3 マグネティックビーズを用いて CD3+T 細胞をエンリッチメントした。SLIT 治療前抗原刺激 (-) CD3 T 細胞、SLIT 治療前抗原刺激 (+) CD3 T 細胞、SLIT 治療後抗原刺激 (-) CD3 T 細胞、SLIT 治療後抗原刺激 (+) CD3 T 細胞の 4 群それぞれ 10,000 細胞について解析を行った。

ダニアレルゲン刺激により CD4+GATA3+Th2 細胞で PD-1 発現細胞が増加していたが、SLIT 前後で PD-1 発現量に変化はなかった (図 3)。

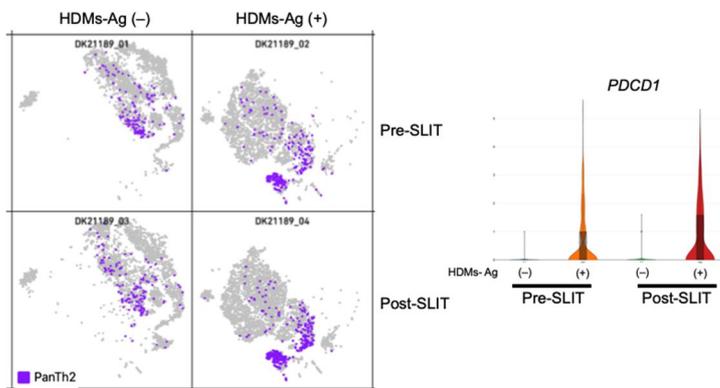


図 3

さらにダニアレルゲン刺激群の CD4+GATA3+Th2 細胞を解析したところ図 4 のように PDCD1high 分画と PDCD1low 分画をクラスタリングできた。SLIT 治療による PDCD1high CD4 Th2 細胞の遺伝子プロファイルの変化を解析したところ SLIT1 治療により 60 遺伝子が発現低下、20 遺伝子が発現増加していることがわかり、SLIT 治療による PD-1high Th2 へ及ぼす影響について明らかにできた (図 4)。

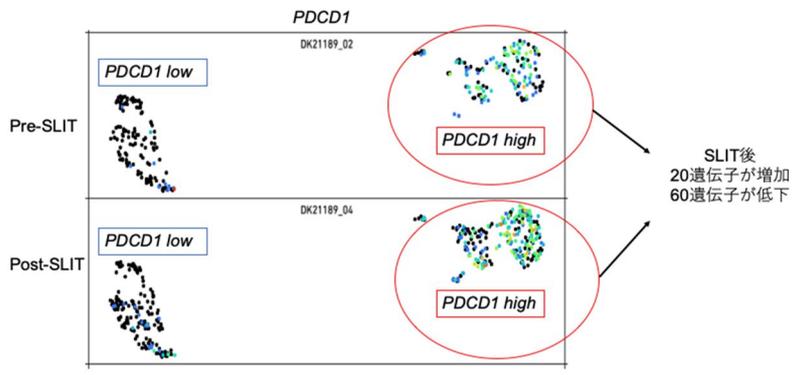


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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