

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293368

研究課題名(和文) アレルギー性鼻炎発症における肥満細胞脱顆粒の多面的研究

研究課題名(英文) Degranulation from mast cell in the onset of allergic rhinitis

研究代表者

藤枝 重治 (Fujieda, Shigeharu)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：30238539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：スギ花粉症においてDPB1\*05:01はスギ花粉症発症の責任遺伝子であり、HLA-DPB1\*02:01とHLA-DPB1\*02:02はスギ花粉症に防御的に働く遺伝子であった。舌下免疫療法で誘導されるApoA-4は、くしゃみ、鼻掻き、鼻腔の開存度において影響を及ぼす因子であった。肥満細胞においてDectin-1はチロシンリン酸化を起こす重要な因子であった。TSLPとIL-33はIgE産生に重要であるが、肥満細胞からのヒスタミン放出にはあまり関係がなかった。血清中C3a、C5a、IL-17Aが症状との相関を認め、舌下免疫療法を行うといずれも経年的に値が有意に低下した。

研究成果の概要(英文)：HLA-DPB1\*02:01 and HLA-DPB1\*02:02 had a protective tendency and DPB1\*05:01 had a susceptible tendency for sensitization of Japanese cedar pollen. Apo A4, which is induced by sublingual immunotherapy, inhibited sneezing, nasal itching and nasal obstruction. Dectin-1 is a critical factor in the tyrosine phosphorylation in mast cells. TSLP and IL-33 are important factors in production of IgE, but not release histamine from mast cells. Serum levels of C3a, C5a and IL-17A were associated with symptom scores and increased by sublingual immunotherapy.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：スギ花粉症 HLA-DR Apolipoprotein A4 Dectin-1 TSLP IL-33 C3a C5a

### 1. 研究開始当初の背景

我々が、本邦の成人におけるアレルギー性鼻炎の有病率、吸入抗原に対する感作率を調査したところ、スギ花粉症に限定すれば、20歳台で35%、40歳台で40%の有病率であった。しかしスギ特異的IgE陽性(感作陽性)ながら未発症の人が20歳台で25%、40歳台でも14%存在することが判明した。またダニに関しては、1歳6ヵ月児ですでに約10%が感作陽性であり、6歳になると38%を占めていた。この事実を考えると感作や症状を抑制する新しい治療開発はもちろん重要であるが、感作は防げずとも発症を防ぐ治療の開発も、重要な課題である。その解決には少なくとも感作陽性・未発症者のメカニズムを解明することが必須である。

これまでの研究で、感作と発症に関する網羅的RNA発現解析(マイクロアレー)にて、Intelectin-1とCST1が感作・発症に関与することを見出した。スギ抗原感作陽性・未発症者では、花粉飛散期に血清中のIntelectin-1が低く、症状発現すると上昇した。CST1はスギ抗原感作陽性・未発症群のスギ皮内テスト陰性群では低値を示し、皮内反応陽性群では発症群と同様に有意に高値となった。

またスギ花粉症に対する舌下免疫療法施行患者血清の網羅的蛋白解析にてApolipoprotein A4 (Apo A4)を見つけ、血清中におけるApo A4誘導と症状薬物スコアとは有意な逆相関を示した。リコンビナントApo A4を作成し、好塩基球による

Dectin-1は、樹状細胞やマクロファージにおいてβ-グルカンを認識してSykを活

性化させることによって抗真菌に対する免疫反応を起こす重要な因子であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒスタミン遊離にIntelectin-1、CST1、Dectin-1、Apo A4が関与するかどうかを検討した。またスギ花粉症の責任遺伝子について検討した。舌下免疫療法は、最終的にヒスタミン遊離抑制をin vivoで行う有用な治療法である。どのような因子が働き、ヒスタミン遊離を抑制するのか明確にすることを目的に研究を行った。

### 3. 研究の方法

舌下免疫療法において誘導されるApolipoprotein A4 (ApoA4)のノックアウトマウスとスギ花粉症のサルを用いて研究した。肥満細胞株：RBL-2H3に対し、Dectin-1のアゴニスト処理、Dectin-1を介した刺激を行い、発現亢進している遺伝子をマイクロアレーおよびreal time PCRにて探索した。スギ花粉症患者、健常人の3群で、スギ抗原Cry j1刺激下での末梢好塩基球におけるCD203c発現をフローサイトメトリーにて調べた。

### 4. 研究成果

最初、Black 6マウスを使用してApoA4ノックアウトマウスを作り、OVA感作によるアレルギーモデル作成を試みたが、全くアレルギー反応を示さなかった。そこでBALB/cマウスにバッククロスして、同じくOVA感作モデルを作成した。野生マウスに比べてApoA4ノックアウトマウスでは、くしゃみ回数と鼻掻き回数の減少を認めた。抗原特異的IgE産生、総IgE産生、IL-4、IL-13、IFN $\gamma$ の産生、好酸球浸潤は

変化がなかった。抗原刺激による *in vitro* ヒスタミン遊離試験においては、ApoA4 ノックアウトマウスにおいてヒスタミン遊離の有意な減少を認めたスギ花粉症のニホンサルにおいて、麻酔下でスギ抗原刺激を行うとアコースティックライノメーターにて鼻腔容積の著しい低下をきたす。そこでリコンビナント ApoA4 ( 50 mg/mL、1 日 1 回 100  $\mu$ L/片鼻 ) を反復点鼻群とサル血漿を点鼻した control 群で比較検討すると、Control 群の平均鼻腔開存率に比べ、rhApoA4 群の平均鼻腔開存率は、即時相及び遅発相ともに抑制し、有意な治療効果を認めた。

肥満細胞株( RBL-2H3 )に対し、Dectin-1 のアゴニストで処理すると IgE 高親和性受容体に非依存的にチロシンリン酸化を起こすことが判明した。さらにマイクロアレーおよび real time PCR にて Dectin-1 を介した刺激は、MCP-1、IL-3、IL-4、IL-13、TNF alpha といったサイトカインや Nfkbiz 転写因子の遺伝子発現を亢進させることが判明した。そしてそれらは、Syk の阻害薬 R406 にて消失した。これらのことから Dectin-1 が肥満細胞刺激において重要な因子であることが判明した。

アレルギー性鼻炎の発症メカニズムにおいて、好塩基球の役割はまだ十分わかっていない。そこでスギ感作陽性未発症者、スギ花粉症患者、健常人の 3 群で、スギ抗原 Cry j1 刺激下での末梢好塩基球における CD203c 発現を調べた。すると、スギ花粉症患者群では、スギ感作陽性未発症者群および健常人群に比較して、有意に CD203c 発現が亢進していた。またスギ感作陽性未発症者群において、スギ皮下テスト陽性群と陰性群を比較すると皮下テスト陽性群では、陰性群に比較して有意に CD203c 発現が亢進していた。以上のことは、CD203c 発現は、感作・発症の状態を確実に反映し

ていることが判明した。

同時にサイトカイン分泌や作用状況は、Th2 に傾くこともアレルギー性鼻炎発症には重要である。TSLP 受容体欠損マウスと IL-33/ST-2 欠損マウスの実験から、急性期の抗原曝露では、IL-33/ST-2 が Th2 環境誘導の中心として働き、慢性の抗原曝露では TSLP 受容体と ST-2 がともに Th2 環境誘導の中心として働くことがわかった。すなわち TSLP と IL-33 は IgE 産生に重要であり、肥満細胞からのヒスタミン放出など下流の発症機序にはあまり関係がないのかもしれない。

アレルギー性鼻炎の症状を反映する臨床マーカーの検索としては、血清中 C3a と C5a の補体レベル、IL-17A が症状との相関を認め、舌下免疫療法を行うと、いずれも経年的に値が有意に低下した。C3a は肥満細胞を直接刺激し、ヒスタミン放出を促す物質であり、この制御がアレルギー性鼻炎治療の目標になりえることを見出した。

アレルゲンを取り込んだ抗原提示細胞が HLA class II 上に抗原ペプチドを提示することにより、T 細胞が認識でき、B 細胞に情報が伝えられて IgE が産生されるとアレルゲンの感作が成立する。スギ花粉症において親がスギ花粉症であれば、ほぼ確実に子供はスギ花粉症を発症する。この二つに関連する可能性がある遺伝子としては、HLA class II である *HLA-DR*、*HLA-DQ*、*HLA-DP* が挙げられる。そこで、544 人の学生において、スギ抗原特異的 IgE、スギ花粉飛散時期の鼻症状、*HLA* のタイピングを行い、その関連性を調べた。その結果、*DPB1\*05:01* はスギ発症の責任遺伝子であり、*HLA-DPB1\*02:01* と *HLA-DPB1\*02:02* はスギ花粉症に防御的に働く遺伝子であった。さらに *HLA-DPB1* の遺伝子多型解析を行うと、69 番 Glu、84-87 番

Gly-Gly-Pro-Met、170番 Thr、205番 Val  
の場合、スギ花粉症発症に防御的であった。

ApoA4は舌下免疫療法で誘導される因子であるが、ヒト誘導型肥満細胞においてもカルシウム放出ヒスタミン遊離を抑えることができるかどうか検討した。その結果、この系では、ApoA4はヒスタミン遊離を認めなかった。同様にスギ花粉症患者での網羅的解析で見出したCST-1、Intelection-1についても検討したが、明確なヒスタミン遊離抑制作用を証明することはできなかった。

舌下免疫療法においては、口腔粘膜の樹状細胞が重要な役割を果たす。この樹状細胞を刺激すべく短鎖CpG-DNAから6本のCpG-DNAを組み合わせた多脚構造様核酸:Hexapodna (hexa polypod-like structured nucleic acid)とスギ抗原 (Cryj1)を組み合わせたものを作成した。マウスに注入すると組織に長時間貯留し、リンパ節への移行と貯留も有意に高いことが判明した。またこのHexapodnaは、通常の抗原刺激 (Cryj1) で起こるヒスタミン遊離を抑えることが判明した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計20件)

1) Morii W, Sakai A, Ninomiya T, Kidoguchi M, Sumazaki R, Fujieda S, Noguchi E.

Association of Japanese cedar pollinosis and sensitization with HLA-DPB1 in the Japanese adolescent. *Allergol Int.* 2017 Apr 28. [Epub ahead of print] 査読あり

2) Okubo K, Kurono Y, Ichimura K, Enomoto T, Okamoto Y, Kawauchi H, Suzaki H, Fujieda S, Masuyama K; Japanese Society of Allergology. Japanese guidelines for allergic

rhinitis 2017. *Allergol Int.* 2017 Apr;66(2):205-219. 査読あり

3) Okamoto Y, Fujieda S, Okano M, Yoshida Y, Kakudo S, Masuyama K. House dust mite sublingual tablet is effective and safe in patients with allergic rhinitis. *Allergy.* 2017 Mar;72(3):435-443. 査読あり

4) Yonekura S, Okamoto Y, Sakurai D, Sakurai T, Iinuma T, Yamamoto H, Hanazawa T, Horiguchi S, Kurono Y, Honda K, Majima Y, Masuyama K, Takeda N, Fujieda S, Okano M, Ogino S, Okubo. Complementary and alternative medicine for allergic rhinitis in Japan. *Allergol Int.* 2016 Nov 21. [Epub ahead of print] 査読あり

5) Yamada T, Ogi K, Sakashita M, Kanno M, Kubo S, Ito Y, Imoto Y, Tokunaga T, Okamoto M, Narita N, Fujieda S. Toll-like receptor ligands induce cytokine and chemokine production in human inner ear endolymphatic sac fibroblasts. *Auris Nasus Larynx.* 2016 Nov 21. [Epub ahead of print] 査読あり

6) Masuyama K, Goto M, Takeno S, Ohta N, Okano M, Kamijo A, Suzuki M, Terada T, Sakurai D, Horiguchi S, Honda K, Matsune S, Yamada T, Sakashita M, Yuta A, Fuchiwaki T, Miyanojima I, Nakayama T, Okamoto Y, Fujieda S. Guiding principles of sublingual immunotherapy for allergic rhinitis in Japanese patients. *Auris Nasus Larynx.* 2016 Feb;43(1):1-9. 査読あり

7) Akasaki S, Matsushita K, Kato Y, Fukuoka A, Iwasaki N, Nakahira M, Fujieda S, Yasuda K, Yoshimoto T. Murine allergic rhinitis and nasal Th2 activation are mediated via TSLP-

and IL-33-signaling pathways. *Int Immunol*. 2016 Feb;28(2):65-7. 査読あり

8) Imoto Y, Yamada T, Tsukahara H, Kimura Y, Kato Y, Sakashita M, [Fujieda S](#). Nitrite /Nitrate in Nasal Lavage Fluid Reflects Nasal Symptoms After a Single Nasal Allergen Provocation in Patients With Seasonal Allergic Rhinitis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015;25(5):382-4. 査読あり

9) Imoto Y, [Takabayashi T](#), Sakashita M, [Tokunaga T](#), Ninomiya T, Ito Y, Narita N, Yamada T, [Fujieda S](#). Peripheral basophil reactivity, CD203c expression by Cryj1 stimulation, is useful for diagnosing seasonal allergic rhinitis by Japanese cedar pollen. *Immun Inflamm Dis*. 2015 Sep;3(3):300-8. 査読あり

10) Sakashita M, Yamada T, Imoto Y, Hirota T, Tamari M, Ito Y, Kubo S, Osawa Y, Takahashi N, [Fujieda S](#). Long-term sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis and the levels of IL-17A and complement components 3a and 5a. *Cytokine*. 2015 Apr 28. pii: S1043-4666 (15) 00136-2. 査読あり

11) Tanaka S, Tamari M, Nakayama T, Ishii H, Hatsushika K, Hayashi A, Watanabe H, Kanai M, Osano M, Yonaga T, Tomita K, [Fujieda S](#), Sakuma Y, Shiono O, Ishitoya J, Masuyama K, Hirota T. Synergistic suppression of Poly(I:C)-induced CCL3 by a corticosteroid and a long acting  $\beta$ 2 agonist in nasal epithelial cells. *Allergol Int*. 2015 Apr;64(2):196-9. 査読あり

12) Okano M, Kariya S, Ohta N, Imoto Y, [Fujieda S](#), Nishizaki K. Association and management of eosinophilic inflammation in

upper and lower airways. *Allergol Int*. 2015 Apr;64(2):131-138. 査読あり

13) [Fujieda S](#), Izuhara K. Regulation of upper airway inflammation facilitates comfortable breathing. *Allergol Int*. 2015 Apr;64(2):119-20. 査読あり

14) [Tokunaga T](#), Ninomiya T, Osawa Y, Imoto Y, Ito Y, [Takabayashi T](#), Narita N, Kijima A, Murota H, Katayama I, [Fujieda S](#). Factors associated with the development and remission of allergic diseases in an epidemiological survey of high school students in Japan. *Am J Rhinol Allergy*. 2015 Mar-Apr; 29(2):94-9. 査読あり

15) Ishii-Mizuno Y, Umeki Y, Takahashi Y, Kato Y, Takabayashi T, [Fujieda S](#), Takakura Y, Nishikawa M. Nasal delivery of Japanese cedar pollen Cryj1 by using self-gelling immunostimulatory DNA for effective induction of immune responses in mice. *J Control Release*. 2015 Feb 28;200:52-9. 査読あり

16) Ogi K, [Takabayashi T](#), Sakashita M, Susuki D, Yamada T, Manabe Y, [Fujieda S](#). Effect of Asian sand dust on Japanese cedar pollinosis. *Auris Nasus Larynx*. 2014 Dec;41 (6):518-22. 査読あり

17) Kimura Y, Chihara K, Honjoh C, Takeuchi K, Yamauchi S, Yoshiki H, [Fujieda S](#), Sada K. Dectin-1-mediated signaling leads to characteristic gene expressions and cytokine secretion via spleen tyrosine kinase (Syk) in rat mast cells. *J Biol Chem*. 2014 Nov 7;289(45): 31565-75. 査読あり

18) Kato Y, Akasaki S, Muto-Haenuki Y, Fujieda S, Matsushita K, Yoshimoto T.

Nasal sensitization with ragweed pollen induces local-allergic-rhinitis-like symptoms in mice. PLoS One. 2014 Aug 13;9(8):e103540.

査読あり

19) Yamada T, Saito H, Fujieda S. Present state of Japanese cedar pollinosis: the national affliction. J Allergy Clin Immunol. 2014 Mar;133(3):632-9.e5. 査読あり

20) Okamoto Y, Ohta N, Okano M, Kamijo A, Gotoh M, Suzuki M, Takeno S, Terada T, Hanazawa T, Horiguchi S, Honda K, Matsune S, Yamada T, Yuta A, Nakayama T, Fujieda S. Guiding principles of subcutaneous immunotherapy for allergic rhinitis in Japan. Auris Nasus Larynx. 2014 Feb;41(1):1-5. 査読あり

〔学会発表〕(計7件)

1) 藤枝重治 : アレルギー性鼻炎の発症因子と先制医療. 第3回総合アレルギー講習会 2016.12.18 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

2) 藤枝重治 : アレルゲン免疫療法. 第47回日本職業・環境アレルギー学会総会 2016.07.09 近畿大学(大阪府東大阪市)

3) 坂下雅文、藤枝重治 : アレルギー性鼻炎治療効果に相関するバイオマーカー. 第65回日本アレルギー学会 2016.06.18 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

4) 藤枝重治 : アレルゲン免疫療法の期待と課題. 第65回日本アレルギー学会 2016.06.17 東京国際フォーラム(東京都

千代田区)

5) 藤枝重治 : 喘息の合併症を考える ~ One Airway, One Disease の治療戦略 ~ 耳鼻咽喉科の立場から. 第64回日本アレルギー学会学術集会 2015.5.27 グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)

6) 藤枝重治 : 舌下免疫療法の実際と対応. 第116回日本耳鼻咽喉科学会総会 2015.5.22 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

7) 木村幸弘、藤枝重治 : C型レクチン Dectin-1 を介するマスト細胞の活性化機構. 第116回日本耳鼻咽喉科学会総会 2015.5.21 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤枝 重治 (Fujieda Shigeharu)  
福井大学・学術研究院医学系部門・教授  
研究者番号: 30238539

(2) 研究分担者

徳永 貴広 (Tokunaga Takahiro)  
福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教  
研究者番号: 10464075

野口 恵美子 (Noguchi Emiko)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号: 40344882

高林 哲司 (Takabayashi Tetsuji)  
福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師  
研究者番号: 70397272