

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860817

研究課題名(和文) 抗原特異的T細胞に注目したスギ舌下免疫療法の作用機序の解明

研究課題名(英文) Effect of Japanese cedar-specific subcutaneous immunotherapy on allergen-specific T cells

研究代表者

野村 孝泰 (NOMURA, Takayasu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50587334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー免疫療法はスギ花粉症の自然暦を変えうる現段階で唯一の治療法であるが、最近、従来の皮下免疫療法に比べて痛みによる苦痛が少ないスギ舌下免疫療法が開発された。その免疫学的作用機序は十分に明らかでなく、特異的T細胞がその中心的役割を担うと考えられるが、細胞数が少ないことが一因で技術的に解析が困難である。今回、活性化マーカーCD154とマルチカラーフローサイトメトリーを組み合わせた新しい解析手法を用いることで、舌下免疫療法におけるその関与を明らかにした。スギ花粉の自然暴露で血液中のスギ特異的IL-5産生細胞、IL-4産生細胞数が増加したが、舌下免疫療法はその増加を抑制した。

研究成果の概要(英文)：The contribution of antigen-specific TH cells in peripheral blood to immunologic mechanisms underlying sublingual immunotherapy (SLIT) remains unclear. To clarify the role of antigen-specific TH cells, we used a sensitive method analyzing activation marker CD154-positive TH cells with multicolor flow cytometry. We assessed antigen-specific TH cells in patients with Japanese cedar pollinosis receiving SLIT at baseline and during the first pollen season after the initiation of SLIT. A total of 18 patients were enrolled in the present study. Of these, 8 patients received SLIT (SLIT group) and 10 patients received symptomatic treatment only (control group). Although seasonal pollen exposure significantly increased the number of Japanese cedar-specific interleukin 5- and interleukin 4-producing TH cells in the control group, SLIT ameliorated this increase in the SLIT group. The present study indicates that peripheral allergen-specific TH2 cells are involved in mechanisms underlying SLIT.

研究分野：小児アレルギー

キーワード：舌下免疫療法 スギ花粉症 抗原特異的T細胞

1. 研究開始当初の背景

アレルギー免疫療法はスギ花粉症の自然暦を変えうる現段階で唯一の治療法である。最近になり、従来の皮下免疫療法に比べて痛みによる苦痛が少ないスギ舌下免疫療法が開発され、2014年10月から臨床応用が開始された。

一方で、舌下免疫療法の免疫学的機序は十分に明らかになっていない。特異的 IgE 値の一時的な上昇とその後の低下、特異的 IgG4 の上昇、エフェクター細胞の抑制、調節性 T 細胞の働き、などが報告されるが、末梢血中の特異的ヘルパー T (Th) 細胞の役割については評価が分かっている。特異的 Th 細胞は数が少なく(総 Th 細胞の $10^{-4} \sim 10^{-6}$)、解析が困難であることがその一因である。

皮下免疫療法における末梢血中の Th 細胞の関与はよくコントロールされた研究で否定的であったが、最近の新しい解析手法である MHC クラス II テトラマーや活性化マーカー CD154 を用いた解析手法で、その関与が明らかにされるようになった。我々も活性化マーカーとマルチカラーフローサイトメトリーを用いた解析手法で、スギ皮下免疫療法における特異的 Th 細胞の関与を明らかにした (Nomura T. Ann Allergy Asthma Immunol, 2013)。

2. 研究の目的

舌下免疫療法では末梢血中の Th 細胞の関与はより少ないと考えられてきたが、皮下免疫療法でその関与を明らかにした我々の解析手法を用いて、舌下免疫療法でもその関与を明らかにすべく本研究を行った。

3. 研究の方法

2014年11月から12月にかけて、スギ花粉症患者に対して本研究(名古屋市立大学倫理審査委員会承認、#961-2)の説明を行い、希望に応じてスギ舌下免疫療法を開始した(シダトレン、鳥居薬品)。免疫療法を行った SLIT 群と行わなかった Control 群に対して、花粉飛散前(Pre、11月から12月)と花粉飛散後(Post、3月から4月)に採血を行った。両群ともにシーズン中の花粉症症状に対しては、経口抗ヒスタミン剤、点鼻ステロイドなどの対症療法を行った(図1)。

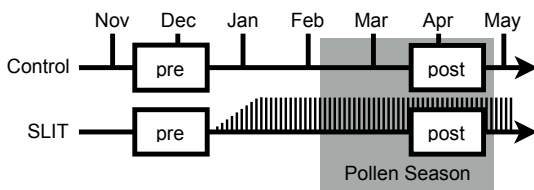


図1 研究概要

末梢血単核球を AIM-V medium で $5 \times 10^6 / \text{mL}$ ($400 \mu\text{L}$) の細胞浮遊液とし、ス

ギ抗原 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ で6時間の抗原刺激を行った。反応した細胞に対して EMA 染色(死細胞マーカー)、細胞膜固定、細胞膜透過、蛍光モノクローナル抗体付加(細胞表面マーカー CD4、細胞質内サイトカイン 5 種)を行った。使用した蛍光の種類はすべて異なるもので、マルチカラーフローサイトメトリー (FACSCanto II) で8種類の蛍光を同時に解析した。

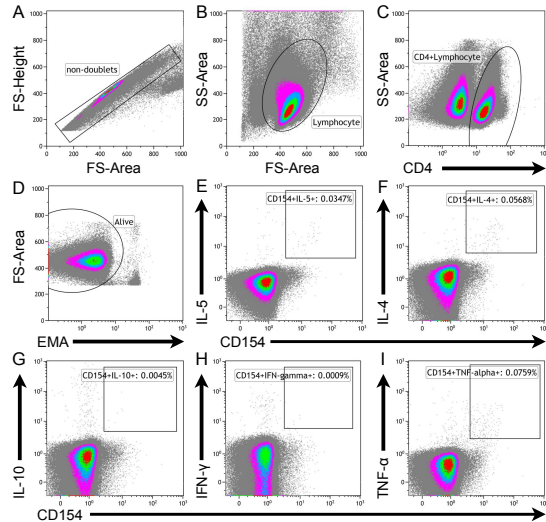


図2 抗原特異的 Th 細胞解析

CD4 陽性リンパ球をゲートしたうえで(図2A-D)、CD154 陽性サイトカイン陽性細胞の数を評価することで(図2E-I)、特異的(=活性化した)Th細胞の数と性質を決定した。スギ抗原刺激で発現した CD154 陽性サイトカイン陽性細胞数から無刺激コントロールで得られた細胞数を差し引き、値が0以下の時は0として扱った。

統計解析は2群の独立したデータに対して Fisher's exact test あるいは Mann Whitney U test を行った。対応のある2群のデータは Wilcoxon's matched-pairs signed-rank test を行った。統計解析には Prism 6.0g を使用した。

4. 研究成果

12歳から44歳の18名のスギ花粉症患者が本研究に参加した。SLIT群(8名)と Control 群(10名)で年齢、喘息の既往、スギ特異的 IgE 値、総 IgE 値に差を認めなかった。また、本研究中の花粉シーズンで経口抗ヒスタミン剤の使用、点鼻ステロイドの使用に差を認めなかった(表1)。

免疫グロブリンの解析では、SLIT 群でスギ特異的 IgE 値(図3A)、スギ特異的 IgG4 値(図3B)の増加を認めたが、Control 群では増加がみられなかった。特異的 Th 細胞の解析では、Control 群でスギ花粉の自然暴露により IL-5 産生細胞あるいは IL-4 産生細胞数が増加したのに対して、舌下免疫

療法はその増加を抑制した（図4）。

表1 患者背景

	SLIT group (n = 8)	Control group (n = 10)	P-value
Sex (female/male)	3/5	4/6	1.00
Age, median (quartile), y	24.5 (22.3-29)	36 (20.3-41)	0.24
Doctor diagnosed asthma	1	0	0.44
Japanese cedar-specific IgE, median (quartile), IU/mL	45.1 (6.1-110.4)	15.0 (6.0-48.6)	0.42
Total IgE, median (quartile), IU/mL	303.0 (127.3-777.3)	172.0 (99.3-339.0)	0.51
Oral antihistamine during the pollen season	4	4	1.00
Nasal corticosteroid during the pollen season	0	2	0.48

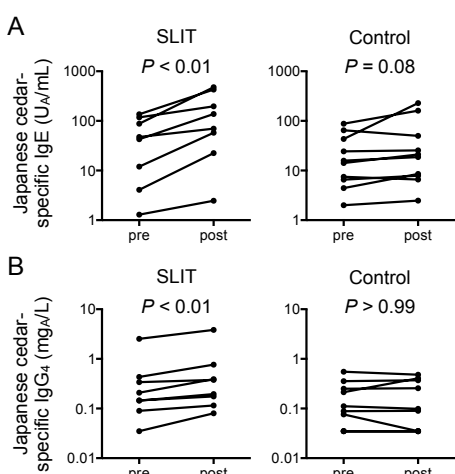


図3 抗原特異的免疫グロブリン値の変化

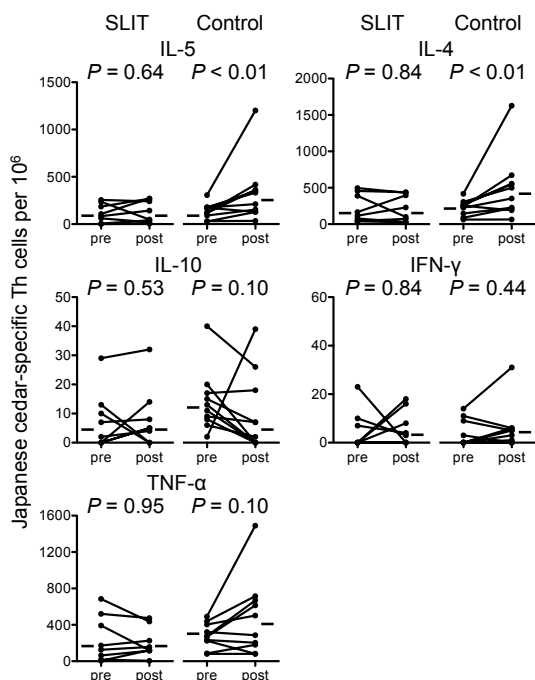


図4 抗原特異的サイトカイン産生 Th 細胞数の変化

本研究でアレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法の作用機序の一端を明らかにした。スギ花粉の自然暴露でスギ特異的 IL-5 産生細胞、IL-4 産生細胞数は増加し、舌下免疫

療法は開始 1 年目で、すでにその増加を抑制していた。

アレルギー免疫療法は 100 年以上の歴史があるにも関わらず、その作用機序が十分に解明されているとはいえない。末梢血中の抗原特異的 Th 細胞の決定的な解析手法は未確立で、免疫療法におけるその関与は長い間議論があった。しかし、最近の技術的に優れた解析手法により、皮下免疫療法ではその関与が明らかになっており、本研究では舌下免疫療法でもその関与を示すことができた。

本研究は研究期間が短期間に限られていること、臨床的有用性との比較がないことが欠点である。IL-4 あるいは IL-5 産生細胞への影響が明らかとなったが、長期的にはどのような影響がみられるのか、臨床効果とどのような関連があるのかは未解明である。

このような欠点があるものの、本研究は比較対象を用いて、舌下免疫療法が Th 細胞に影響をあたえることを示した初めての報告として重要である。本研究で用いた解析手法も、抗原特異的 Th 細胞の標準的な解析手法となりうる可能性を示すことができた。

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 1 件)

- ① Takayasu Nomura, Motohiko Suzuki, Makoto Yokota, Yoshihisa Nakamura, Kazuyoshi Ozeki, Yasuhiko Ito, Ikuya Tsuge, Shinji Saitoh. Effect of Japanese cedar-specific sublingual immunotherapy on allergen-specific T_H2 cell counts in blood. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2016;117:72-78. (査読有り)

DOI: 10.1016/j.anai.2016.04.003

[学会発表] (計 2 件)

- ① 野村孝泰, 鈴木元彦, 横田誠, 中村善久, 柘植郁哉, 齋藤伸治. スギ舌下免疫療法が抗原特異的 Th 細胞に与える影響. 第 42 回東海花粉症研究会, 2015 年 12 月 12 日, 名古屋ダイヤビルディング (愛知県・名古屋市)
- ② 横田誠, 野村孝泰, 鈴木元彦, 中村善久, 尾崎真也, 村上信五. スギ舌下免疫療法による抗原特異的 T 細胞動態の解析. 第 55 回日本鼻科学会総会, 2016 年 10 月 13 日~15 日, 栃木県総合文化センター (栃木県・宇都宮市)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

野村 孝泰 (NOMURA, Takayasu)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究
員
研究者番号：50587334

(2) 研究協力者

齋藤 伸治 (SAITOH, Shinji)
伊藤 康彦 (ITO, Yasuhiko)
尾関 和芳 (OZEKI, Kazuyoshi)
鈴木 元彦 (SUZUKI, Motohiko)
中村 善久 (NAKAMURA, Yoshihisa)
横田 誠 (YOKOTA, Makoto)
柘植 郁哉 (TSUGE, Ikuya)