

令和元年6月10日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10780

研究課題名(和文) アレルギー性鼻炎における新たなエピジェネティクスの探索

研究課題名(英文) The research for new epigenetics in allergic rhinitis

研究代表者

松岡 伴和 (MATSUOKA, Tomokazu)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：30313810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アレルゲン免疫療法におけるバイオマーカーの探索として、スギ花粉症患者の末梢血を用いて、ELIFABの測定系を樹立した。スギ花粉症に対してアレルゲン免疫療法(皮下免疫療法)を行っている患者では、ELIFABは有意に抑制されることが明らかとなった。研究の本題である、スギ花粉症患者と健常者およびアレルゲン免疫療法を受けている患者の末梢血単核球のIL-27産生を検討したが、再現性の乏しいデータとなった。IL-27のプロモーター解析も思うような結果が得られなかった。試薬や細胞を保存していたフリーザーが故障したことが原因と考えられた。研究の期間は終了したが、現在も研究を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルゲン免疫療法におけるバイオマーカーの探索として、皮下免疫療法においてELIFABが有効なバイオマーカーとなる可能性を示した。現在、IgG4やIgEとの関連や、舌下免疫療法においても、同様にバイオマーカーとして用いることができるか、可能性も検討している。これらの検討は、現在広まりつつある舌下免疫療法を受けている患者様にとって、事情に有益になると考えられる。一方、アレルギー性鼻炎におけるエピジェネティクスとして注目したIL-27のプロモーター解析は、十分な結果を示すことができなかった。しかし、可能性を否定するデータも得られていないので、今後さらに研究を継続し、結果を社会に還元したい。

研究成果の概要(英文)：As a search for biomarkers in allergen immunotherapy, peripheral blood of cedar pollinosis patients was used to establish a measurement system of ELIFAB. ELIFAB was found to be significantly suppressed in patients undergoing allergen immunotherapy (subcutaneous immunotherapy) for Japanese cedar pollinosis.

We examined IL-27 production of peripheral blood mononuclear cells in patients with cedar pollinosis, normal subjects and patients who are received allergen immunotherapy. However, the data were poorly reproducible. Also, the promoter analysis of IL-27 did not give the desired results. It was thought that the cause was failure of the freezer that was storing reagents and cells. The research period has ended, but the research is still ongoing.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：アレルギー 免疫療法 バイオマーカー 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IL-27 は IL-12 サイトカインファミリーに属するサイトカインであり、近年、その免疫抑制・免疫調整作用が注目され、自己免疫疾患における臨床応用が期待されている。イネ科花粉症患者を対象とした先行研究では、IL-27 はアレルギー性炎症に対しても抑制的に働き、健常人と比較しアレルギー性鼻炎患者では、末梢血樹状細胞からの IL-27 産生が低下し、さらに、アレルギー免疫療法を受けている患者では IL-27 産生が亢進することが明らかとなっていた。そこで、IL-27 のアレルギー性鼻炎における役割を明らかにするべく、エピジェネティクスを検討しようと考えた。

2. 研究の目的

アレルギー性鼻炎患者における末梢血樹状細胞の IL-27 産生は、感作・発症、さらにアレルギー免疫療法の作用機序に深く関与している可能性が示唆されている。さらに、アレルギー性鼻炎の病態に重要な自然免疫系の細胞である ILC2 と、IL-27 産生が深く関与していることも、マウスの実験で報告されている。そこで、本研究では、末梢血樹状細胞からの IL-27 産生調節機構を解明し、アレルギー性鼻炎の感作・発症およびアレルギー免疫療法の作用機序における樹状細胞の新たな役割を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

スギ花粉症患者ボランティアと健常者ボランティア、皮下免疫療法を受けている患者ボランティアの募集を行う。ボランティアより末梢血を 200ml 採血し、末梢血単核球を比重遠心法にて分離する。分離した末梢血単核球は凍結後にディープフリーザーにて凍結保存した。凍結保存した末梢血単核球は、LPS およびスギ抗原 Cryj1 にて刺激し、さらに PMA、イオノマイシンにて刺激し、IL-27 産生細胞である樹状細胞を、サブユニットである p28 と EB13 の細胞内 2 重染色し、フローサイトメトリーにてダブルポジティブな IL-27 産生細胞を測定した。次に、IL-27 のプロモーター領域のメチル化について検討を行う。アレルギー性鼻炎患者末梢血中からの IL-27 産生は、健常者比較して有意に低下していることが予測される。よって、アレルギー性鼻炎患者では IL-27 のプロモーター領域でメチル化が起きていることにより IL-27 産生が低下している可能性が考えられる。よって、マグネットビーズ法を用いて樹状細胞を IL-27 のプロモーター領域の Real Time PCR を行い、IL-27 のプロモーター領域のメチル化について解析をおこなった。

また、各患者から得られた血清を用い、アレルギー免疫療法のバイオマーカーとなりうる、IgE、IgG4 について、Immuno-CAP にて測定を行った。さらに、ELIFAB についても検討を行った。以前より、B 細胞の抗原提示能に着目し、患者血清を用い、血清中の IgE と抗原の免疫複合体と B 細胞表面の低親和性 IgE 受容体 (CD23) との結合を測定する Facilitated Antigen Binding はヨーロッパを中心に行われてきた。同方法は、EB ウイルス感染の B 細胞セルラインを用いるが、sCD23 をコートしたプレートを用いた ELIFAB (Enzyme-Linked Immunosorbent Facilitated Antigen Binding) 法は、セルラインを用いない新たな検出法として近年報告された。そこで、スギ花粉抗原を用いた ELIFAB 法を確立し、測定を行った。

4. 研究成果

アレルギー免疫療法におけるバイオマーカーの探索として、健常者、スギ花粉症患者、皮下免疫療法を受けているスギ花粉症患者の末梢血を用いて、ELIFAB の測定系を樹立した。同時に、IgE と IgG4 も測定を行い、スギ花粉症に対して皮下免疫療法を行っている患者では、行ってない患者に対して IgG4 が有意に増加し、ELIFAB では有意に抑制されることが明らかとなった。そこで、ハウスダスト・ダニアレルギー性鼻炎患者に対しても同様の結果が得られるか検討を行ったが、用いた抗原が原因なのか、同様の条件で結果は得られていない。新たな条件設定が必要であると考えられた。

また、舌下免疫療法を行った患者についても検討すべく、スギ花粉およびダニの併用舌下免疫療法を行った患者についても、投与初期の IgE と IgG4 を測定し、舌下免疫療法でスギ花粉およびダニに対する特異的 IgE および IgG4 が増加することが明らかとなった。ELIFAB については現在検討中である。

研究の本題である、アレルギー性鼻炎におけるエピジェネティクスの探索について、IL-27 を中心に検討してきた。スギ花粉症患者、健常者、皮下免疫療法を受けている患者の末梢血単核球の IL-27 産生について、フローサイトメトリーを用いて検討を行った。IL-27 産生は健常者や皮下免疫療法を受けている患者では高く、スギ花粉症患者では低い傾向があると考えていたが、得られたデータについて FlowJo 解析ソフトウェアを用いて結果を解析すると、再現性に乏しい結果となっていた。IL-27 のプロモーター解析についても思うような結果が得られなかった。現在、実験の条件設定や試薬の見直しを行っている。

本研究では、先行研究で用いた抗体と同じ抗体を使用することができなかった。また、試薬を保存していた冷蔵庫や、細胞を保存していたディープフリーザーも、研究期間中に不具合を起こしてしまったので、それらも原因と考えられる。本研究の期間は終了してしまったが、現在も研究を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- 1) Matsuoka T, Igarashi S, Kuroda Y, Fukano C, Natsui K, Doi-Ohashi K, Masuyama K. Dual sublingual immunotherapy with Japanese Cedar Pollen droplets and House Dust Mite tablets. Allergol Int. 2019 In Press. doi: 10.1016/j.alit.2019.03.005. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1323893019300450?via%3Dihub>)
- 2) Du W, Fukano C, Yonemoto M, Matsuoka T, Masuyama K, Ohashi-Doi K. Comparison of the Allergenic Potency of House Dust Extract and House Dust Mite Allergen Extract for Subcutaneous Allergen Immunotherapy. Biol Pharm Bull. 2019;42(4):601-606. doi: 10.1248/bpb.b18-00710. (https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/42/4/42_b18-00710/article)
- 3) Masuyama K, Matsuoka T, Kamijo A. Current status of sublingual immunotherapy for allergic rhinitis in Japan. Allergol Int. 2018 Jul;67(3):320-325. doi: 10.1016/j.alit.2018.04.011. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1323893018300546?via%3Dihub>)

〔学会発表〕(計3件)

- 1) 松岡伴和、増山敬祐．舌下免疫2剤併用療法の実態とその効果．第1回日本アレルギー学会関東地方会 教育セミナー（招待講演）2019年
- 2) 松岡伴和、秦宏興、土井雅津代、増山敬祐．アレルギー免疫療法におけるアレルギー患者血清中抗体価非(t-IgE/s-IgE)の有用性．第37回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会2018年
- 3) Matsuoka T., Kuroda Y., Igarashi S., Fukano C., Natsui K., Doi-Ohashi K., Masuyama K. The safety trial of sequential sublingual immunotherapy with japanese cedar droplet and house dust mite tablet. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2018 (国際学会)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。