

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06636

研究課題名(和文) スギ花粉多糖成分によるアジュバント活性の解析

研究課題名(英文) Elucidation of adjuvant activity by polysaccharides in Japanese cedar pollen

研究代表者

大野 尚仁 (Ohno, Naohito)

東京薬科大学・薬学部・名誉教授

研究者番号：80152213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：花粉症などの1型アレルギーの発症に必要なアレルゲン特異的IgEの誘導にはアレルゲンの感作に加えて何らかのアジュバント(免疫賦活化)物質の寄与が必要であると考えられている。我々はスギ花粉の花粉壁外壁に含まれるβ-グルカン(BG)が鼻汁などとの接触によりスギ花粉が破裂することで初めて露出し、露出したBGがBG受容体であるDectin-1を介して炎症性サイトカインの産生誘導等の自然免疫に対する賦活化作用を示し、BGにより賦活化された自然免疫が獲得免疫を活性化することでアレルゲン特異的な抗体が産生されることで花粉アレルギーに対するアレルギーの誘発因子の一つとなっていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花粉症は罹患者の多いアレルギー疾患で特に日本ではスギ花粉症の罹患率は大変高いが治療満足度は低い。花粉症発症には様々な物質の寄与が報告されているが今までメカニズム解明には至っていなかった。本研究成果により、花粉に含まれるβ-グルカンがアレルゲン特異的免疫を誘導する因子である事が明らかになったことから発症メカニズムの全容解明及び新たな機序の新規治療法の創成に寄与すると考えられ、国民病とも呼ばれる花粉症の治療・予防に新たな道が開けたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Type 1 allergic diseases such as pollinosis requires allergen specific IgE. It is known that both of the allergen sensitization and contribution of adjuvant substance need to induction of allergen specific IgE. In this study we clarified that beta-glucan in Japanese cedar pollen is one of an induction factor of allergen specific immunity. The beta-glucan in Japanese cedar pollen is exposed by rupture. The exposed pollen beta-glucan stimulates innate immune cells via Dectin-1, a beta-glucan receptor. Then the stimulated innate immune cells induce activation of acquired immunity. Finally, enhanced immune response by pollen beta-glucan is linked to allergen-specific immunoglobulins.

研究分野：免疫学

キーワード：スギ花粉 自然免疫 獲得免疫 糖鎖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

スギ花粉症は本邦において有病率 26.5%にのぼる最も患者数の多いアレルギー疾患である。花粉症が未だに増加傾向にある要因には、高度経済成長期に大量に植樹されたスギが花粉を放出する樹齢に達し、飛散量が増加していることがあげられる。一般的に、花粉症の発症には大量の花粉尘露に伴うアレルゲン(アレルギーの原因となる抗原)感作と何らかのアジュバント(免疫を活性化する物質)が必要であると考えられるが、スギ花粉のアレルゲンタンパク質以外の成分が免疫系へどのような影響を及ぼすかは明確ではない。

マツ科やヒノキ科の花粉では、潜在する未知のアレルゲンタンパク質以外の成分がアジュバント作用を示すことや、自己免疫疾患発症と関連するなどの報告がある。花粉自身のアジュバント作用は、花粉症患者増加をもたらすだけでなく、そのアジュバント作用の影響によって様々な免疫系疾患が誘導される可能性が危惧されるが、あまり着目されていない。

スギ花粉の持つアジュバント成分とその免疫活性の解明は、未だ明確になっていない花粉症並びに関連疾患の発症機序解明と新規治療の開発に資すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではスギ花粉とその分画物のもつ病原体関連分子パターン物質 (PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns) の 1 種である多糖の β -1,3-グルカン(BG)が持つ生理活性を評価し、スギ花粉成分中のアジュバント活性とその活性化機序を明らかにすることを主な目的とする。

3. 研究の方法

1) スギ花粉からの BG 抽出および分画、精製法の検討

スギ花粉を密度勾配遠心分離により分画し、各々の画分から BG を抽出し含量の定量を行った。また水溶性画分については昆虫由来 BG 特異的たんぱく質(BGRP)を用いたアフィニティカラムにより精製した。

2) スギ花粉とその抽出物の in vitro における免疫誘導の解析

野生型及び BG 受容体の Dectin-1 欠損マウスの骨髄から誘導した樹状細胞(BMDC)にスギ花粉分画物及びそのBG分解酵素処理物を作用させ、サイトカイン産生量をELISA法によって定量した。また Dectin-1 依存的な活性を持つ花粉分画刺激による mRNA 発現量変化について網羅的解析を行った。

3) スギ花粉とその抽出物の免疫応答に対する作用の解析

野生型及び Dectin-1 欠損マウスに対してスギ花粉を経鼻的に投与し、くしゃみ症状、単離した脾細胞を花粉で刺激することにより産生されるサイトカイン及び血中のアレルゲン特異的抗体価について検討した。陽性対照としてアルミニウムゲルアジュバント(Alum)と花粉を腹腔投与して事前に感作させたマウス、陰性対照として花粉の代わりに生理食塩水を投与したマウスを利用した。

4) スギ花粉とその抽出物の抗体産生に対するアジュバント作用の解析

野生型及び Dectin-1 欠損マウスに対して卵白アレルゲン(OVA)とスギ花粉分画物を同時に投与し、脾細胞に対する OVA2 次刺激によるサイトカイン及び血中の OVA 特異的抗体価について検討した。

4. 研究成果

1) スギ花粉からの BG 抽出および分画、精製法の検討

スギ花粉は水に触れて破裂するとアレルゲンなどの水溶性成分が漏出し、花粉は花粉壁外壁と花粉壁内壁に包まれた生殖細胞と花粉管細胞からなる破裂内容物の 2 種類の粒子に分離する。これらの粒子は比重の違いにより分離可能であり、それぞれ分離した画分(Pp:外壁画分、Pc:破裂内容物画分、Ps:水溶性画分)を BG 含量の局在解明や細胞の刺激、アジュバント活性の評価等に利用した。可溶性 Dectin-1 で局在を検討したところスギ花粉に含まれる BG は破裂とともに放出される水溶性の BG と花粉壁外壁のネキシン層及び生殖細胞や花粉管細胞の細胞壁に含まれる不溶性の BG が存在していた。(図.1 左)そのうち外壁に含まれる BG は花粉の破裂とともに表出する一方で破裂内容物に含まれる BG はそのままの状態では吸水によって膨潤した花粉壁内壁によって包まれ、表出しなかった。

それぞれの画分から BG を抽出し、BGRP によって定量すると大部分の BG は Pc に含まれており、Ps 及び Pp に含まれる BG はそれぞれ全体の 15% ずつ程度であった。(図.1 右)

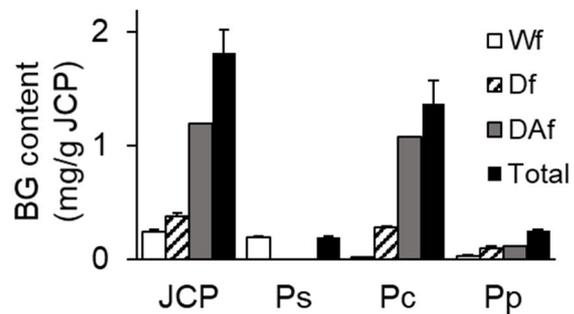
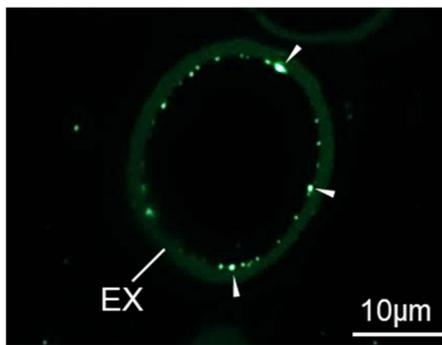


図. 1 スギ花粉中の BG の局在 (EX:花粉壁外壁, Wf:水抽出, Df:DMSO 抽出, DAf:DMSO 熱抽出) (Allergol Int 2021 より引用)

また、Ps に含まれる BG についてはさらに性状解析を行った。スギに限らず様々な花粉には真菌 BG の一般的な測定法であるリムルス G テスト反応性分子が含まれていることが報告されていたが、リムルス G テストはセルロース(-1,4-グルカン)等に対する交差性が示唆されており、花粉抽出物中の BG の定量には影響を与える可能性がある。スギ花粉全粒子をリムルス G テストで BG 定量すると BGRP による含量に比べて含量が大幅に高く算出された。一方 Ps に含まれる BG を BGRP アフィニティカラムによって濃縮し、その性質を複数種の BG 特異的なプローブで解析したところプローブ間の反応性に大きな差がなかった。以上より水溶性成分中に含まれるリムルス G テスト反応性分子は主に BG であると推察された。

2) スギ花粉とその抽出物の in vitro における免疫誘導の解析

BMDC をスギ花粉及び花粉分画物と共培養すると、スギ花粉及び Pp との共培養ではサンプル濃度依存的に炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-6)が産生誘導された。一方で Pc 及び Ps との共培養では炎症性サイトカイン産生は誘導されなかった。スギ花粉及び Pp による炎症性サイトカイン産生誘導は Dectin-1 欠損マウス骨髄由来 BMDC では抑制されており、また Pp を BG 分解酵素処理することで炎症性サイトカイン産生は抑制された。(図.2) 以上より BMDC に対するスギ花粉刺激による炎症性サイトカイン産生活性は BG 由来であることが明らかになった。

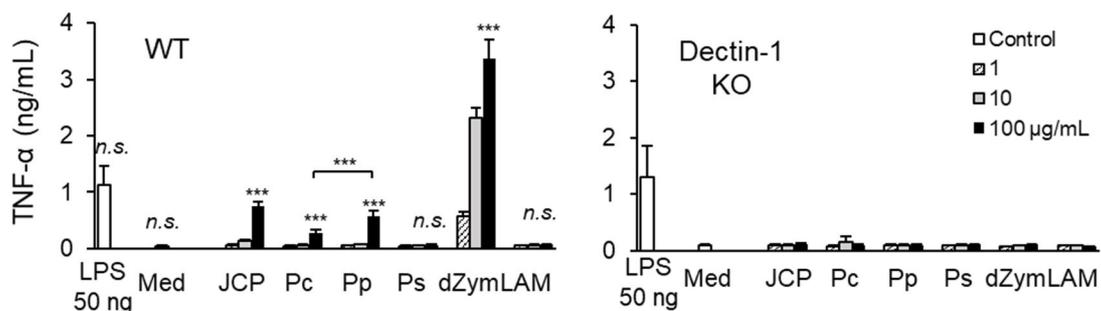


図. 2 マウス骨髄由来樹状細胞に対する花粉画分の TNF- α 産生誘導活性 (Med:培養液, JCP:花粉全粒子, dZym:酵母由来不溶性 BG 粒子 LAM:藻類由来可溶性 BG) (Allergol Int 2021 より引用)

また Pp による刺激の網羅的解析により Th 細胞誘導に関わる補助刺激分子 (CD80, CD86, OX40 ligand など) の mRNA 発現レベルが Dectin-1 依存的に上がっており、Pp 刺激により Th 細胞の分化誘導が促進されると考えられる。

3) スギ花粉とその抽出物の免疫応答に対する作用の解析

スギ花粉のみを野生型マウスに経鼻投与することにより Alum 前投与群と同等にくしゃみ症状や脾細胞に対する花粉での二次刺激による IL-13 産生、血中のアレルギー特異的抗体価などの免疫学的パラメータの上昇がみられるが、Dectin-1 欠損マウスではこれらの免疫学的パラメータの上昇は Alum 前投与群と比較し有意に抑制された。両マウス系統とも Alum 前投与群間及び生理食塩水投与群間には有意な差は見られなかったが花粉のみ投与群同士で比較すると野生型に対して Dectin-1 欠損マウスでは有意にパラメータ上昇の抑制がみられた。(図.3)これらの結果からスギ花粉 BG による Dectin-1 を介した自然免疫の活性化がスギアレルギー特異的な獲得免疫の誘導に寄与していることが明らかになった。

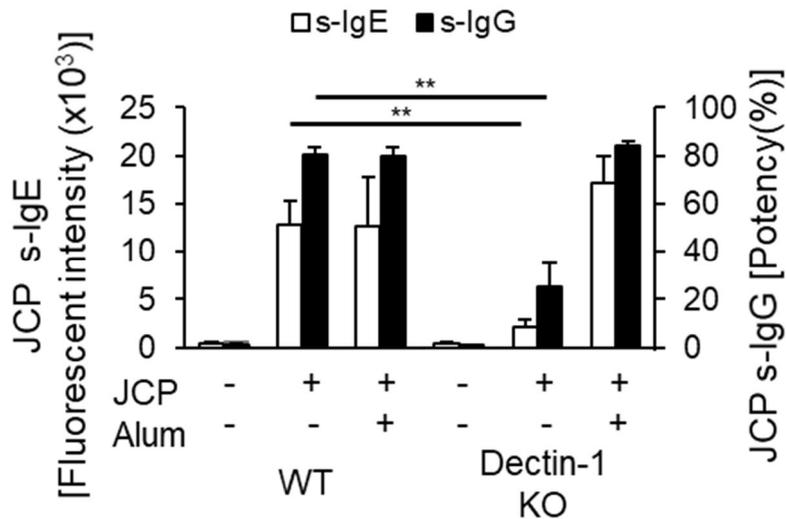


図. 3 スギ花粉(JCP)投与による血中アレルギー特異的抗体価 (Allergol Int 2021 より改変引用)

4) スギ花粉とその抽出物の抗体産生に対するアジュバント作用の解析

スギ花粉と OVA の皮下投与および腹腔投与による抗体価の上昇を検討したところ、可溶性成分の Ps 投与群では弱く特異的抗体価の上昇がみられたものの花粉全粒子及び Pc, Pp の誘導活性はマウス系統間の比較が難しいレベルの変化であった。スギ花粉は粒子サイズが大きく、かつ BG が露出しているのが外壁の内側であること及び In vitro での検討で上皮細胞系のセルラインの HEK 細胞は花粉に対する反応性に乏しかったことから組織に局在する細胞種により花粉粒子の BG による免疫活性には違いがあり、全身の免疫機構を利用した一般的な評価は難しいことが考えられ、鼻腔局所的なアジュバントとしての機能を持つ可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kanno Takashi, Adachi Yoshiyuki, Ishibashi Ken-ichi, Yamanaka Daisuke, Ohno Naohito	4. 巻 22 (3)
2. 論文標題 Quantification of β -Glucan from Culinary-Medicinal Mushrooms Using Novel Artificial β -Glucan Recognition Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Medicinal Mushrooms	6. 最初と最後の頁 269 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1615/IntJMedMushrooms.2020034003	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 安達 禎之、菅野 峻史、平塚 理恵、大野 尚仁	4. 巻 40 (2)
2. 論文標題 スギ花粉に内在する β -グルカンの自然免疫活性化作用と抗体産生促進作用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 58 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Adachi Yoshiyuki, Ishii Masaki, Kanno Takashi, Tetsui Junko, Ishibashi Ken-ichi, Yamanaka Daisuke, Miura Noriko, Ohno Naohito	4. 巻 20 (14)
2. 論文標題 N-Terminal (1-3)- β -d-Glucan Recognition Proteins from Insects Recognize the Difference in Ultra-Structures of (1-3)- β -d-Glucan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3498 ~ 3498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20143498	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 Adachi Yoshiyuki, Kanno Takashi, Ishibashi Ken-ichi, Yamanaka Daisuke, Motoi Akitomo, Motoi Masuro, Ohno Naohito	4. 巻 23
2. 論文標題 Binding Specificity of a New Artificial β -Glucan Recognition Protein and Its Application to β -Glucan Detection in Mushroom Extracts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Medicinal Mushrooms	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1615/IntJMedMushrooms.2021038074	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 Kanno Takashi, Kim Changmin, Yamanaka Daisuke, Ishibashi Ken-ichi, Tanaka Hiroshi, Ohno Naohito, Adachi Yoshiyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Possibility of Japanese Cedar Pollen Causing False Positives in the Deep Mycosis Test	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2135 ~ 2135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22042135	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 Kanno Takashi, Adachi Yoshiyuki, Ohashi-Doi Katsuyo, Matsuhara Hiroki, Hiratsuka Rie, Ishibashi Ken-ichi, Yamanaka Daisuke, Ohno Naohito	4. 巻 70
2. 論文標題 Latent 1,3- β -D-glucan acts as an adjuvant for allergen-specific IgE production induced by Japanese cedar pollen exposure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 105 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2020.08.004	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 安達 禎之・菅野 峻史・平塚 理恵・大野 尚仁	4. 巻 41
2. 論文標題 スギ花粉内在性 β -グルカンによる樹状細胞活性化と花粉アレルギー特異的抗体産生の促進作用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 75-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Adachi Yoshiyuki, Nakata Hidetaka, Tanabe Tetsuya, Yamanaka Daisuke, Kanno Takashi, Ishibashi Ken-ichi, Ohno Naohito	4. 巻 22
2. 論文標題 Development of a Highly Sensitive β -Glucan Detection System Using Scanning Single-Molecule Counting Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5977 ~ 5977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115977	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 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 菅野峻史、安達禎之、平塚理恵、岩倉洋一郎、大野尚仁
2. 発表標題 スギ花粉中の α -1,3-glucan局在と自然免疫賦活化作用
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅野 峻史、安達 禎之、土井 雅津代、松原 弘季、平塚 理恵、岩倉 洋一郎、山中 大輔、石橋 健一、大野 尚仁
2. 発表標題 スギ花粉中1,3- β -glucanによる抗原特異的免疫グロブリン産生誘導作用
3. 学会等名 第31回日本比較免疫学会学術集会 - 第30回日本生体防御学会学術総会の合同集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金 昌ミン、菅野 峻史、安達 禎之、山中 大輔、石橋 健一、岩倉 洋一郎、大野 尚仁
2. 発表標題 スギ花粉によるDectin-1を介した樹状細胞成熟化への影響の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Adachi, T. Kanno, K. Ohashi-doi, H. Matsuhara, R. Hiratsuka, K. Ishibashi, D. Yamanaka, N. Ohno
2. 発表標題 1,3- β -glucan in the Japanese cedar pollen activates innate immune response via dectin-1
3. 学会等名 EAACI Annual Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Kanno, Yoshiyuki Adachi, Katsuyo Ohashi-Doi, Hiroki Matsuhara, Rie Hiratsuka, Yoichiro Iwakura, Daisuke Yamanaka, Ken-Ichi Ishibashi, Naohito Ohno
2. 発表標題 Latent 1,3-β-D-glucan in Japanese cedar pollen facilitated allergen-specific IgE production
3. 学会等名 EAACI Annual Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Kanno, Yoshiyuki Adachi, Katsuyo Ohashi-Doi, Hiroki Matsuhara, Rie Hiratsuka, Ken-ichi Ishibashi, Daisuke Yamanaka, and Naohito Ohno
2. 発表標題 Latent 1,3-β-D-glucan acts as an adjuvant for allergen-specific IgE production induced by Japanese cedar pollen exposure
3. 学会等名 JSA/WAO XXVII World Allergy Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅野峻史、山中大輔、安達禎之
2. 発表標題 スギ花粉によるリムルスGテストへの影響の検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 -1,3-1,6-グルカンの測定方法	発明者 中田秀孝, 安達禎之, 石橋健一, 山中大輔, 大野尚仁	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-209679	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 -グルカン結合タンパク質、-グルカン検出キット、人工DNAおよび細菌	発明者 安達禎之, 大野尚仁, 元井益郎, 元井章智	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-107248	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	安達 禎之 (Adachi Yoshiyuki) (60222634)	東京薬科大学・薬学部・教授 (32659)	

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