

令和 4 年 8 月 30 日現在

機関番号：82609
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2021
課題番号：18K06713
研究課題名（和文）苦味受容体の免疫学的役割に関する研究

研究課題名（英文）The role of taste receptors in immunology

研究代表者

佐伯 真弓（SAEKI, Mayumi）

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・主席研究員

研究者番号：00462771

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）：以前の臨床研究において、我々は、舌下免疫療法の奏功に苦味受容体が関与する可能性を報告した。今回の研究では、T細胞における苦味受容体の役割について検討した。苦味受容体を発現させたT細胞の活性化に対する苦味リガンドの効果を検討したところ、抗原刺激によるT細胞のサイトカイン発現上昇が抑制された。以上より、苦味受容体やそのリガンドはT細胞の活性化を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前の臨床研究において、我々は、舌下免疫療法の奏功に苦味受容体が関与する可能性を報告したが、本研究で、はじめて、苦味受容体が実際T細胞の活性化に影響を与えることを示した。今後、更に研究を進めることにより、舌下免疫療法の奏功機序の解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Our previous study has reported that the involvement of taste receptors in the efficacy of sublingual immunotherapy. In the present study, we investigated that the role of taste receptor in T cells. Cytokine expression by T cell activation signal was suppressed in taste receptor expressing cells, compared to wild type cells. Taste receptor and their ligands may inhibit the activation of T cells.

研究分野：アレルギー学

キーワード：免疫 T細胞 味覚受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎はくしゃみ、鼻汁分泌亢進、および鼻閉を三主徴とするアレルギー性疾患である。現在では、わが国の3人に1人が罹患していると推定され、今後も患者数は増加するものと予測されている。アレルギー性鼻炎そのものが致命的な予後をもたらすことはないが、日常生活において集中力や就労の作業効率を低下させるなど、大きな影響を与える。

スギ花粉症に対する治療法として、2014年10月にスギ花粉エキスを舌下に投与する舌下免疫療法が保険適用となり、根本的な治療法として注目されているものの、その詳しい奏功メカニズムは、今なおわかっていない。また、明確な治療効果のみられない患者もいる。

申請者らは、スギ花粉症の舌下免疫療法における臨床研究を行い、花粉症患者に2年間、実薬投与してその臨床効果を調査し、約6割の患者で有意な治療効果が認められることを示した。しかし、これは裏を返すと長期間、治療を行っても、約4割の患者では効果が認められないということであり、憂慮すべき問題である。この研究中に治療効果を予測するバイオマーカーを見出すことを目的とし、種々の解析を行った結果、CD4陽性T細胞における苦味受容体が奏功と強く関連していることを見出した。

味覚は食物に含まれる化学物質の一部を口腔内で感知する機構であり、口腔内にある味覚受容細胞によって知覚され、甘味、塩味、酸味、苦味、旨味に分類されている。苦味受容体はヒトでは26種類の分子種が報告されており、一つの物質が複数の受容体に反応することも多い。人種や地域での生活環境に応じた多数の遺伝子多型があり、個体の嗜好性を大きく左右する。各地域での生存に貢献してきたと考えられており、苦味受容体に関する研究は、嗜好性や生活環境、リガンドに関する研究が大部分であった。しかし、近年、苦味受容体が、鼻粘膜、肺などの舌以外の部位でも発現していることが明らかとなり、味覚以外でも機能を担うことを示す研究が報告されている。例えば、副鼻腔で苦味受容体が発現している役割は長年不明であったが、緑膿菌などが産生する化学物質がリガンドとなり、繊毛運動の亢進や抗菌ペプチドの放出を介して菌を排除すること、リガンドに感受性の高い遺伝子型を有する人は慢性副鼻腔炎患者が少ないことが報告された。

2. 研究の目的

申請者らは、以前に、CD4陽性T細胞における苦味受容体発現と奏効率に相関があることを明らかにした。各種免疫細胞で苦味受容体が発現していることが既に報告されていることから、CD4陽性T細胞における苦味受容体の機能を明らかにすることを目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

1) ヒト細胞培養株を用いた苦味受容体の解析

ヒトT細胞株であるJurkat細胞における苦味受容体の発現を確認した。苦味受容体を発現するJurkat細胞の樹立を行った。苦味受容体の発現を、real-time PCR、Western blotting、蛍光顕微鏡などにより確認した。樹立したJurkat細胞を用いて、T細胞の刺激に対する苦味リガンドの効果を測定した。

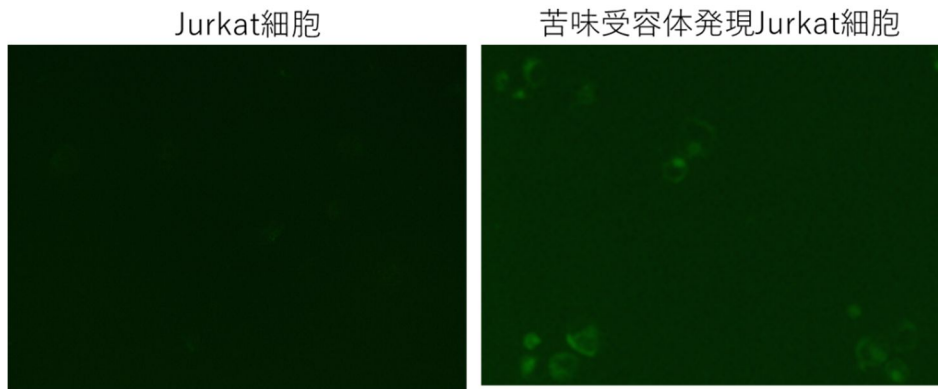
2) ヒトPBMCを用いた苦味受容体の解析

インフォームドコンセントの得られた花粉症患者および健常ボランティアより採血を行って単核球(PBMC)を採取し、CD4陽性T細胞を分離した。分離したCD4陽性T細胞の刺激に対する苦味リガンドの効果を測定した。

4. 研究成果

1) ヒト細胞培養株を用いた苦味受容体の解析

免疫細胞における苦味受容体の発現は低いことが報告されている。ヒトT細胞株であるJurkat細胞における苦味受容体の発現を調べると、その発現は非常に低かった。そこで、より明確にその役割を検討するため、Jurkat細胞を用いて、苦味受容体の強制発現系を構築した。ヒトcDNAライブラリーから苦味受容体のcDNAをクローニングし、苦味受容体タンパクを強制的に発現させた。構築当初、T細胞膜上への発現は困難であったが、コンストラクトのN末、C末部分に種々の改変を加えることで、安定して発現させることが可能となった。また、実験開始当初は、遺伝子の導入効率に優れたJurkat細胞株を用いて発現系の構築を行っていたが、本細胞株において



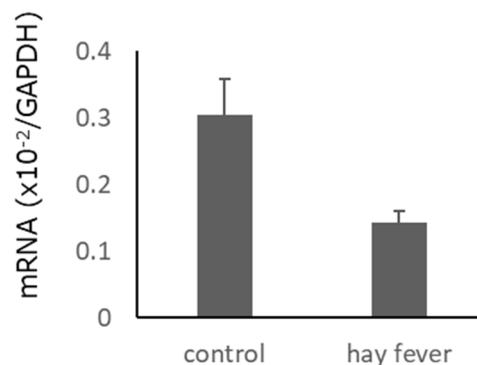
(図 1)

は CD28 の発現が非常に低いことが明らかとなった。CD28 は T 細胞の活性化に不可欠な因子である為、この細胞株で機能解析を行うことは不適であると考え、他のサブクローンを手入して、再度、遺伝子発現を行った。しかしながら、そのクローンにおける発現も非常に低いものであり、安定した実験結果が得られにくかったことから、苦味受容体の恒常発現細胞株の樹立を試みた。構築したプラスミドを Jurkat 細胞にトランスフェクションし、その後、遺伝子導入細胞の薬剤選択を行ったところ、安定的に苦味受容体を発現する株を得ることができた (図 1)。

そこで、本細胞株を用いて、Jurkat 細胞を T 細胞活性化シグナルの存在下で各種苦味受容体リガンドを作用させ、サイトカインなどの遺伝子発現を real-time PCR で解析した。苦味成分により、細胞の活性化が抑制されることが明らかになった。

2) ヒト PBMC を用いた苦味受容体の解析

苦味受容体を強制発現させた Jurkat 細胞に苦味成分を作用させると、細胞の活性化が抑制されたことから、次に、ヒト末梢血から PBMC を分離し、CD4 陽性 T 細胞における様々なリガンドに対する反応性を解析した。健常者と花粉症患者の苦味受容体の発現を比較すると、花粉症患者の T 細胞における苦味受容体の発現は健常コントロールに比較して有意に低かった (図 2)。また、CD4 陽性 T 細胞を刺激すると、苦味受容体の発現が down regulation されたが、花粉症患者ではその割合が低かった。



(図 2)

3) 苦味受容体コンディショナルトランスジェニックマウスの作出

免疫応答は全身性の反応であることから、マウスを用いて、生体内での免疫応答における苦味

受容体の機能を解析することにした。マウスは36種類の苦味受容体を発現しているが、ヒトの間には感受する苦味に差があること、マウスの系統間においても、苦味に対する感受性が大きく異なることが明らかにされていることから、ヒトと相同する苦味受容体を明らかにするために、複数の系統のマウスに当該苦味成分を飲水させ、分子種のスクリーニングを行った。しかし、苦味成分を加えた水の飲水量に、系統差はみられなかった。そこで、ヒト苦味受容体のコンディショナルトランスジェニックマウスの作出に取り組んだ。今後、本マウスを樹立し、解析することで、免疫細胞に発現する苦味受容体の生物学的意義に関する基礎的な知見と分子機構の探索を展開していくことができるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Gotoh Minoru, Kaminuma Osamu, Nakaya Akihiro, Saeki Mayumi, Nishimura Tomoe, Kitamura Noriko, Hiroi Takachika, Okubo Kimihiro	4. 巻 87
2. 論文標題 Association of Basophil-Expressing Genes with Effectiveness of Sublingual Immunotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 49～52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1272/jnms.JNMS.2020_87-104	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 Saeki M, Kaminuma O, Nishimura T, Kitamura N, Mori A, Hiroi T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Potential mechanisms of T cell-mediated and eosinophil-independent bronchial hyperresponsiveness.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20122980.	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐伯 真弓、北村 紀子、神沼 修、廣井 隆親、湯田 厚司、後藤 穰
2. 発表標題 スギ花粉症舌下免疫療法の効果発現機序の探索
3. 学会等名 第70回 日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神沼 修、後藤 穰、中谷明弘、北村紀子、西村友枝、佐伯真弓、廣井隆親、森 晶夫、大久保公裕.
2. 発表標題 アレルギー免疫療法の効果発現に関わる好塩基球およびマスト細胞関連メディエーター.
3. 学会等名 アレルギー・好酸球研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐伯 真弓, 後藤 穰, 大久保 公裕, 中谷 明弘, 北村 紀子, 西村 友枝, 神沼 修, 廣井 隆親
2. 発表標題 舌下免疫療法における味覚受容体を介した奏功メカニズム
3. 学会等名 第1回日本アレルギー学会関東地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神沼 修, 後藤 穰, 大久保 公裕, 中谷 明弘, 森 晶夫, 北村 紀子, 西村 友枝, 佐伯 真弓, 廣井 隆親.
2. 発表標題 著効/無効患者間の比較に基づくアレルギー免疫療法における効果発現機構の解析
3. 学会等名 アレルギー・好酸球研究会2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人 東京都医学総合研究所 花粉症研究室ホームページ https://www.igakuken.or.jp/allergy/

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