

令和 2 年 4 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16874

研究課題名(和文) スギ花粉症の発症を、感作未発症という段階とT細胞の機能から捉える

研究課題名(英文) Investigation of the onset of Japanese cedar pollen induced allergic rhinitis from the point of the Asymptomatic sensitization stage and the T cell function

研究代表者

飯沼 智久 (Inuma, Tomohisa)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：00748361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：スギ花粉症発症者と感作未発症者を選別し、PBMCsを分離した。スギ花粉抗原で刺激し培養、抗原刺激で分裂した細胞を単離した。両群のスギ特異的CD4 T細胞に対してRNA-seqを行い、機能や性質の差異となりうる候補遺伝子を探索した。感作未発症と発症者では遺伝子発現のパターンに一定の差があった。発症者で亢進していた遺伝子、859遺伝子に対してGene Ontology解析を行った。免疫反応の活性化に関わる遺伝子群の関与を認めた。GO解析で免疫反応に関わるとして抽出された遺伝子に対してreal-time PCRを行った。発症者のスギ特異的CD4T細胞に発現亢進している遺伝子を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はスギ花粉症の病態を健康人と発症者ではなく、その病態の進展を原因細胞の分化・機能獲得から捉えられないかとしているのが特徴である。結果で得られた遺伝子を解析していくことにより、メモリーTh2細胞のなかでも、さらに細分化された機能が重要であることが証明される。その標的分子を治療ターゲットとすることができる可能性もある。さらには増加の一途をたどるアレルギー性鼻炎・花粉症の発症の予防・予知が可能である。応用次第では本研究の成果はスギ花粉症のみならず気管支喘息などの他の気道アレルギー疾患の治療・予防にも貢献できる可能性があり、アレルギー疾患全体に福音となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：PBMCs were separated from patients with Japanese cedar pollinosis and patients with asymptomatic sensitization. The cells were stimulated with Japanese cedar pollen antigen and cultured, and cells divided by the antigen stimulation were isolated. RNA-seq was performed on cedar-specific CD4 T cells in both groups to search for candidate genes that could have differences in function and properties. There was a certain difference in the pattern of gene expression between asymptomatic and affected individuals. Gene Ontology analysis was performed on 859 genes, which were upregulated in affected individuals. Genes involved in the activation of the immune response were involved. Real-time PCR was performed on the genes extracted by GO analysis as being involved in the immune response. Genes whose expression was upregulated in cedar-specific CD4 T cells of affected individuals were identified.

研究分野：アレルギー

キーワード：花粉症 アレルギー性鼻炎 T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎と花粉症は、今や日本国民の約4割近くが罹患していると言われている。2月などのスギ花粉症シーズンにはテレビのニュースで花粉天気予報が流れ、花粉症対策の眼鏡やマスクをした人々が町にあふれるなど国民病となっている。

花粉症は上気道におけるI型アレルギーの代表疾患である。I型アレルギーの病態に対して以前より用いられる機序は、肥満細胞上に結合した抗原特異的なIgEに特異抗原が付着・架橋されることにより各種ケミカルメディエーターが放出され炎症が惹起されるというものである。しかし、特異的IgEも特異抗原も肥満細胞も存在するにもかかわらず、症状を呈さない患者が存在し、感作未発症と呼ばれている。

I型アレルギー疾患は特異的IgEの存在と症状の有無により、3つの段階を経ることが以前より知られている。すなわち、抗原に未感作な状態(特異的IgEも症状も存在しない)、感作されているが発症していない状態(特異的IgEは検出されるが症状が無い;感作未発症)そして発症している状態(特異的IgEも症状も存在する)である。例えばスギ花粉に対して感作未発症に分類される対象では、鼻内に肥満細胞が存在し血中でスギ特異的IgEを検出されるにもかかわらず、スギ花粉飛散期に症状を呈さない。

この感作未発症という病態の存在は古くから知られているものの、海外を含めて3群における詳細な解析は成されていない。理由の一つとしてアレルギー性鼻炎では発症が小児期になり検討が難しいことが挙げられる。しかし、日本に存在するスギ花粉症は発症が20-30歳台に多く、感作未発症の病態をとらえやすく検討対象として適している。感作するメカニズム、また感作未発症者が発症するメカニズムを解明すれば、病態の進展や慢性化の原因解明につながり、さらに予防法の検討に結びつくのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

本研究はスギ花粉症の病態を健常人と発症者ではなく、その病態の進展を原因細胞の分化・機能獲得から捉えられないかとしているのが特徴である。特に申請者は好酸球炎症の原因となり得るPathogenic Th2細胞を解析しているため、本研究でもT細胞に焦点を当てる。メモリーTh2細胞のなかでも、さらに細分化された機能が重要であることが証明されれば、その標的分子を治療ターゲットとすることができる。

3. 研究の方法

スギ花粉飛散期の症状の有無、鼻粘膜誘発テスト、血清スギ特異的IgEの有無によってスギ花粉症発症者と感作未発症者を選別した。

両群の対象者からスギ花粉飛散期に末梢血を採取し、PBMCsを分離した。

採取したPBMCsをスギ花粉抗原で刺激し培養。CTV (cell trace violet) を使用して抗原刺激で分裂した細胞(スギ特異的CD4 T細胞)を選別し、Flow cytometer と cell sorter を用い採取した。両群のスギ特異的CD4 T細胞に対して、RNA-seqを行い、機能や性質の差異となりうる候補遺伝子を探索した。

4 . 研究成果

- スギ特異的 CD4T 細胞採取のための Flow cytometry の手順を図 1 に示す。
- スギ花粉症発症者 (n = 5) と感作未発症者 (n = 4) を選び、単離採取したスギ特異的 CD4 T 細胞の RNA-seq を行った。図 2 に RNA-seq の結果を Heat map と Volcano plot で示す。
- 発現亢進されていた遺伝子群に対し Gene Ontology 解析を行った (図 2)。
- その結果、もっとも活性化された遺伝子群は免疫反応に関わる活性化因子であり、95 の遺伝子が抽出された。発症者と感作未発症者のスギ特異的 CD4 T 細胞を特徴づける因子として、いくつかの遺伝子に対して real time PCR で発症者での発現亢進を確認した (図 3)。
- 引き続き、特定された遺伝子の機能などを再検していく予定である。

図 1 ; Flow cytometry の手順

リンパ球ゲートをかけ、死細胞を除き、CD4T 細胞にゲートをかけている。

CTV は CFSE と同様の機序によって、刺激によって細胞分裂を起こした刺激特異的な細胞がわかる。未感作者ではスギ抗原刺激でほとんど分裂を起こさず、感作未発症者と発症者では CD4T 細胞が分裂していることがわかる。

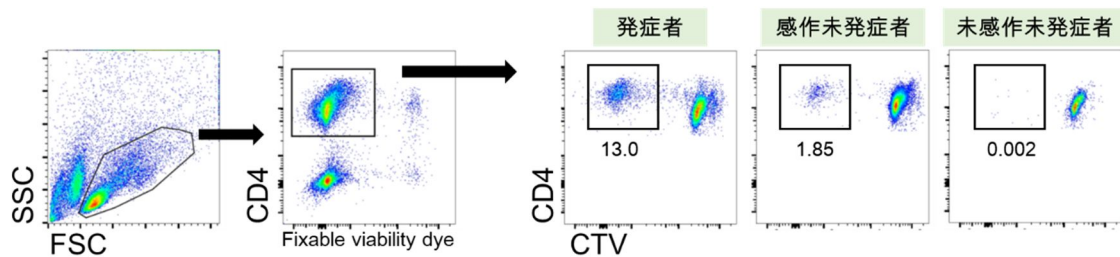


図 2 ; RNA-seq

患者 2 群のスギ特異的 T 細胞に対して RNA-seq を行った。クラスタリングを行うとヒートマップ (黄色が発現亢進) で示すように、確かに感作未発症と発症者では遺伝子発現のパターンに一定の差があるように思われた。ボルケーノプロット (発症者で有意差 .05 で 4 倍以上亢進していた遺伝子が赤い点) で示すように、発症者に発現亢進する遺伝子を多く認めた。そこで、その発現亢進している 859 遺伝子に対して Gene Ontology 解析を行った。その結果、有意差をもって免疫反応の活性化に関わる遺伝子群の関与を認めた。

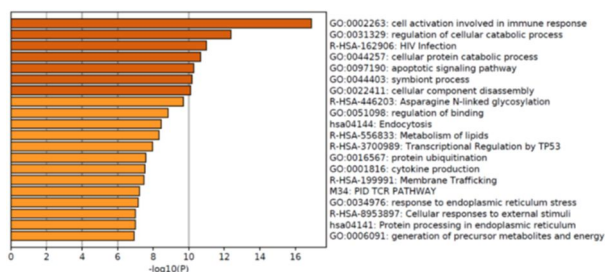
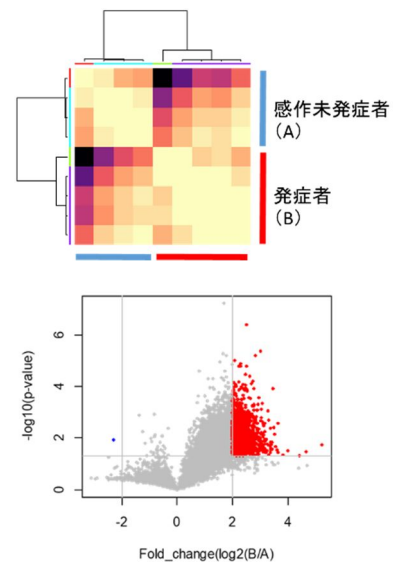
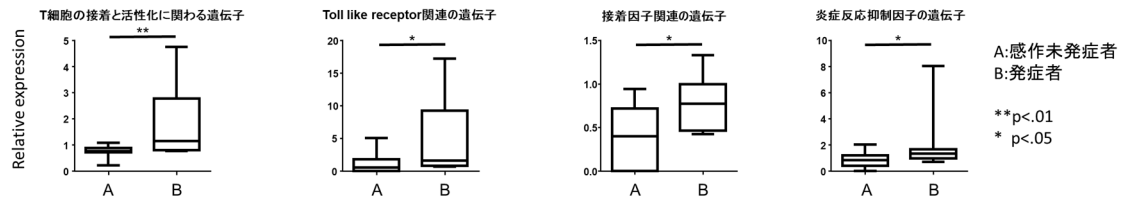


図 3 ; real-time PCR

G0 解析で免疫反応に関わるとして抽出された遺伝子に対して real-time PCR を行った。有意差をもって発症者のスギ特異的 CD4T 細胞に発現亢進している遺伝子が分かった。以下にいくつかの遺伝子の PCR 結果を示す。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tomohisa Iinuma	4. 巻 Undecided
2. 論文標題 Investigating Japanese cedar pollen-induced allergic rhinitis and related terms using Google Trends	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 Undecided
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2020.03.006	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 飯沼智久
2. 発表標題 スギ花粉症発症者と感作未発症者における特異的T細胞の差異の探索
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohisa Iinuma
2. 発表標題 The pathogenicity of memory Th2 cell is involved in the onset of allergic rhinitis and changed by immunotherapy
3. 学会等名 The Joint Congress of the Asia Pacific Association of Allergy, Asthma and Clinical Immunology & the Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiriology and Immunology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohisa Iinuma
2. 発表標題 Pathogenic Th2 cells develop the symptoms of allergic rhinitis
3. 学会等名 2019 KAAACI-KAPARD-WPAS-INTERASMA Joint Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----