様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ４ 月 ２４ 日現在

機関番号：３２６６６
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：１９Ｋ０９９０１

研究課題名（和文）舌下免疫療法によるマスト細胞脱顆粒抑制機構

研究課題名（英文）Mechanism of suppression of mast cell degranulation by sublingual immunotherapy

研究代表者
後藤　穣（Gotoh, Minoru）

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：８０２８１４２６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：患者血清をIgE感作マスト細胞と共培養したのちに脱顆粒実験を行ったところ、著効群血清（HR）では有意な脱顆粒抑制効果が認められたが、無効群血清（NR）では抑制効果は見られなかった（図1）。この2群の各5人の治療前後の血清をiTRAQ解析し、治療後の著効群で発現が増強しかつ無効群との発現差の大きなタンパクを探索した結果、5種類の分子が候補にあがった。この中でThrombospondin-1は濃度依存的に脱顆粒を抑制した（図2）。以上の結果から、舌下免疫療法では治療後に増加したThrombospondin-1によるマスト細胞の脱顆粒抑制効果が奏功メカニズムのひとつであ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
アレルゲン免疫療法（舌下免疫療法を含む）は、喘息の発症を抑えたり、新規抗原感作を予防したりする効果が期待されている。対症療法である薬物療法にはない有益な有効性があることから舌下免疫療法は根治的治療法と位置づけられているが、効果発現が遅いことや数年間に及んで治療継続しても20%程度の症例には効果が乏しいというデメリットがある。
舌下免疫療法の効果を十分発揮させ、必要な患者に広く普及させるためには、治療効果予測や効果発現メカニズムのさらなる解明が課題である。Thrombospondin-1の効果をより詳細に検討することによって、花粉症が社会へ与える影響を最小限にすることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：When the patient's serum was co-cultured with IgE-sensitized mast cells and then a degranulation experiment was performed, a significant degranulation inhibitory effect was observed in the effective group serum (HR), but no effect was seen in the ineffective group serum (NR). (Fig. 1). Therefore, iTRAQ analysis was performed on the sera of 5 patients in each of these 2 groups before and after treatment, and as a result of searching for a protein whose expression was enhanced in the effective group after treatment and whose expression difference was large from that in the ineffective group, 5 types of molecules were found. Among them, Thrombospondin-1 was found to suppress degranulation in a concentration-dependent manner (Fig. 2). From the above results, it was suggested that the effect of thrombospondin-1 on sublingual immunotherapy, which was increased after treatment, to suppress mast cell degranulation may be one of the successful mechanisms.

研究分野：アレルギー性鼻炎・花粉症

キーワード：舌下免疫療法　マスト細胞　スギ花粉症　トロンボスポンジン1

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景
アレルゲン免疫療法（舌下免疫療法を含む）はアレルギー疾患の自然史を修飾する可能性があると言われている。具体的には喘息の発症を抑えたり、新規抗原感作を予防したりする効果が期待されている。対症療法である薬物療法にはない有益な有効性があることから、舌下免疫療法は根治的治療法と位置づけられているが、効果発現が遅いことや数年間に及んで治療継続しても20%程度の症例には効果が乏しいというデメリットがある。舌下免疫療法の効果を十分発揮させ、必要な患者に広く普及させるためには、治療効果予測や効果発現メカニズムのさらなる解明が課題である。今回我々は治療効果メカニズム解明のために舌下免疫療法の著効群と無効群の患者血清に着目し、アレルギー反応を制御する何らかの成分が血清中に存在する可能性について検討した。

２．研究の目的
花粉症はⅠ型アレルギー疾患の典型的病態を示す。アレルゲンがマスト細胞上の IgE 抗体に架橋することによってマスト細胞が活性化することが反応の第 1 段階である。もし何らかの機序によってマスト細胞の活性化をコントロールすることができれば、アレルギー反応を早い段階から制御できる可能性がある。本研究では治療効果の異なる患者血清成分がマスト細胞脱顆粒に影響を及ぼすかどうか検討し、血清中の何が脱顆粒に関与しているのか同定することを目的とした。

３．研究の方法
1)著効・無効の判定
2 年間の舌下免疫療法前後でアレルギー性鼻炎症状の重症度をスコア化し順位付けすることによって、顕著に改善した著効群と改善の認められなかった無効群に分類した。
2)血液採取
舌下免疫療法開始前および 2 年間の継続治療後に患者から血液を採取した。血液中の各種細胞分画の変化について確認するとともに、分離した血清を用いてアレルギー反応に重要な役割を果たす IgE の値なども同時に評価した。
3)マスト細胞脱顆粒試験
ヒト CD34 陽性細胞からマスト細胞を作製し、IgE を感作させたのち抗 IgE を作用させて hexosaminidase 遊離反応での脱顆粒試験を行った。この際、免疫グロブリンを含む多量タンパクを取り除いた患者血清をあらかじめマスト細胞と共培養することで脱顆粒に与える影響を確認し、著効・無効血清での違いを評価した。
4)マスト細胞脱顆粒抑制因子の探索
マスト細胞脱顆粒反応試験において脱顆粒抑制効果が認められた著効群と、抑制効果の見られなかった無効群の治療前後における血清を ProteoMiner タンパク質濃縮キットを用いてタンパク含量調整したのち、それぞれ 5 人分を混合して iTRAQ 解析を行った。著効群における治療前後および治療後において著効・無効群間で大きく発現変化したタンパクを同定した。
5)脱顆粒抑制因子の機能検証
4)で抽出された候補分子のリコンビナントタンパクや抗体を用いてヒトマスト細胞の脱顆粒に与える影響を検証した。

４．研究成果
アレルゲン免疫療法の奏功メカニズムとして IgE の減少や制御性 T 細胞の増加、Th1/Th2 バランスの正常化などが考えられている。しかしこれらの結果は報告者によっても大きく異なっており、未だ統一された見解や全容解明には至っていない。今回の我々の検討においても著効群・無効群間で IgE 抗体やアレルギー炎症に関わる免疫細胞分画、分布に有意な差は認められなかった。それにも関わらず舌下免疫療法の治療効果に明確な違いを認めたことから、メカニズムのひとつとして治療によっての著効群患者血清中にマスト細胞脱顆粒抑制因子が増加している可能性があると考えた。
血清をそのままマスト細胞に作用させると脱顆粒が促進されるため、本研究では免疫グロブリンを含む多量タンパクを取り除いた血清を準備した。この患者血清を IgE 感作マスト細胞と短時間共培養したのちに脱顆粒実験を行ったところ、著効群血清（HR）では有意な脱顆粒抑制効果が認められたが、無効群血清（NR）ではそのような効果はほとんど見られなかった（図 1）。そこでこの 2 群の各 5 人の治療前後における血清を iTRAQ 解析し、治療後の著効群で発現が増強し、かつ無効群との発現差の大きなタンパクを探索した結果、5 種類の分子が候補にあがった。これらのリコンビナントタンパクをマスト細胞脱顆粒実験で患者血清の代わりに作用させたところ、Thrombospondin-1 によって濃度依存的な脱顆粒抑制が認められ（図 2）、またこの抗体を作用させることでその抑制効果が打ち消されることが確認できた。以上の結果から、舌下免疫療法では治療後に増加した Thrombospondin-1 によるマスト細胞の脱顆粒抑制効果が奏功メカニズムのひ

とつである可能性が示唆された。

図1

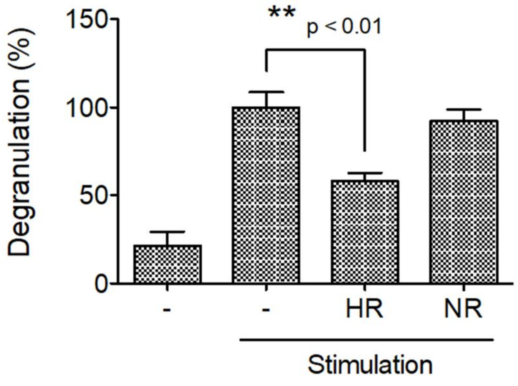
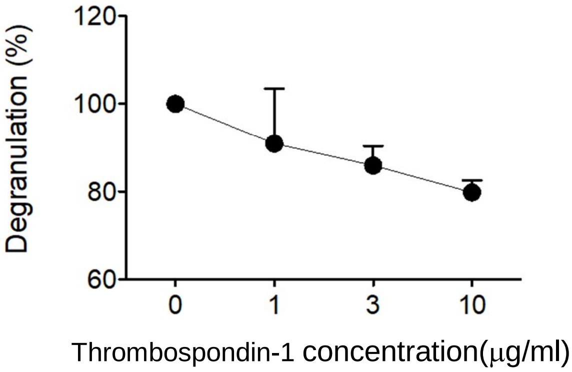


図2



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　4件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 Gotoh Minoru、Kaminuma Osamu	４．巻 10
２．論文標題 Sublingual Immunotherapy: How Sublingual Allergen Administration Heals Allergic Diseases; Current Perspective about the Mode of Action	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Pathogens	６．最初と最後の頁 147～147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens10020147	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 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Hamada Satoko、Kobayashi Yoshiki、Sakamoto Daiki、Shimamura Akihiro、Kuroda Kazumichi、Kawachi Risaki、Kanda Akira、Asako Mikiya、Gotoh Minoru、Okubo Kimihiro、Tomoda Koichi、Iwai Hiroshi	４．巻 －
２．論文標題 Long-term sublingual immunotherapy provides better effects for patients with Japanese cedar pollinosis	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Auris Nasus Larynx	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） 10.1016/j.anl.2021.01.003	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 Gotoh Minoru、Okubo Kimihiro、Yuta Atsushi、et al.	４．巻 69
２．論文標題 Safety profile and immunological response of dual sublingual immunotherapy with house dust mite tablet and Japanese cedar pollen tablet	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Allergology International	６．最初と最後の頁 104～110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2019.07.007	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 Kaminuma O, Kitamura N, Gotoh M, Shindo M, Watanabe N, Saeki M, Nishimura T, Mori A, Nemoto S, Tatsumi H, Okubo K, Hiroi T.	4．巻 68
2．論文標題 Thrombospondin 1-mediated suppression of mast cell degranulation is involved in the efficacy of sublingual immunotherapy.	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Allergol Int.	6．最初と最後の頁 s9-s10

掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2019.03.007	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 －

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

1．発表者名 Kaminuma O, Gotoh M, Nakaya A, Saeki M, Nishimura T, Kitamura N, Watanabe N, Okubo K, Hiroi T.
2．発表標題 Genome-wide transcriptome and copy number variation analysis for sublingual immunotherapy.
3．学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (Kyoto)（国際学会）
4．発表年 2020年

1．発表者名 Gotoh M
2．発表標題 New development of cedar pollinosis treatment with anti-IgE antibody
3．学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (Kyoto)（国際学会）
4．発表年 2020年

1．発表者名 後藤穣
2．発表標題 舌下免疫療法のup to date 長期効果、スギ花粉とダニSLIT併用を含めて
3．学会等名 耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4．発表年 2020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
研究分担者	神沼　修 (Kaminuma Osamu) (80342921)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授 (15401)	
研究分担者	北村　紀子 (Kitamura Noriko) (80415603)	公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員 (82609)	

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