

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10428

研究課題名(和文) IL-5を起点とした非IgE依存性アレルギー性鼻炎発症機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of non-IgE-dependent allergic rhinitis pathogenesis triggered by IL-5.

研究代表者

山崎 輝美(長井輝美)(Yamazaki-Nagai, Terumi)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・特任助教

研究者番号：20558134

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)：アレルギー性鼻炎においては、即時型反応に免疫グロブリンE(IgE)が関与しない経路が存在することが報告されているが、未解明である。本研究では、IL-5を起点とした非IgE依存性アレルギー性鼻炎の発症機序解明のため、マウスモデルおよび小児のコホート解析を行った。マウスモデルにおいて、経鼻投与されたパパインにより産生増大したIL-5が橋の神経活性化マーカーの発現に関与していることが示唆された。また、314名の6-7歳小児から採取した唾液において自然型アレルギーと関連すると考えられるIL-5を解析した。その結果、唾液IL-5はアレルギー性鼻炎および花粉症診断の有無とは関連が認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経原性炎症として知られるアレルギー性鼻炎において、IL-5が神経に作用することにより発症に関与しているという報告はなく、IL-5産生ILC2と三叉神経との相互作用は不明であった。本研究により、パパイン投与によってくしゃみをしているマウスの鼻粘膜で増加するIL-5産生ILC2と三叉神経との関連が示唆された。一方、ヒト小児の唾液においては、アレルギー性鼻炎の診断および症状の増悪とIL-5の関連はみとめられなかったが、IL-10の値が高いほど症状が軽い傾向がみられた。アレルギー性鼻炎においては、唾液中のIL-10産生を低下させないことが症状の緩和に重要な役割を果たす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In allergic rhinitis, it has been reported that pathways without immunoglobulin E (IgE) involvement in immediate-type reactions exist, but are not yet elucidated. In the present study, mouse models and paediatric cohort analyses were conducted to elucidate the pathogenesis of non-IgE-dependent allergic rhinitis initiated by IL-5. In the mouse model, increased IL-5 production by intranasally administered papain was implicated in the expression of neural activation markers in pons. We also analysed IL-5 that may be associated with spontaneous allergy in saliva collected from 314 children aged 6-7 years. Our results showed that salivary IL-5 was not associated with allergic rhinitis and hay fever diagnoses.

研究分野：免疫学、細胞生物学、疫学

キーワード：アレルギー性鼻炎 IL-5産生ILC2 唾液 唾液細菌叢 唾液中サイトカイン

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎は、ダニや花粉などのアレルゲン粒子に含まれるプロテアーゼが鼻粘膜のバリア機能を破壊して感作されることにより引き起こされる。その主症状である「くしゃみ、鼻漏、鼻閉」の発現には三叉神経系が関与し、主なメディエーターは、IgE 抗体による抗原の架橋に伴い肥満細胞などから放出されるヒスタミンやロイコトリエンとされてきた。しかし、エンドトキシンによる非 IgE 依存性のアレルギー性鼻炎発症経路の存在が指摘されている<sup>1</sup>。また、アレルゲンによりバリア機能が破壊された際には上皮組織から alarmin が放出され、IL-5 や IL-13 などの 2 型サイトカインを大量に産生する自然リンパ球 ILC2 が非 IgE 依存的に「自然型」のアレルギーを引き起こすことも明らかになっている<sup>2</sup>。故に、アレルギー性鼻炎の非 IgE 依存的発症機序には ILC2 が関与していることが考えられる。一方で我が国のアレルギー性鼻炎有病率は 5 歳以降に急速に増加する。また学童期ではアレルギー性鼻炎が無症状で進行することが報告されている<sup>3</sup>。発症予防を考える上では、小児の鼻粘膜環境の解析が鍵となるが、非 IgE 依存的経路を含め発症機序は明確ではない。

### 2. 研究の目的

本研究は、IL-5 を起点とした非 IgE 依存的アレルギー性鼻炎の発症機序解明を目指すものである。本研究では IL-5 産生 ILC2 と神経の相互作用を明らかにするために、非 IgE 依存的アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて解析を行う。さらに、アレルギー性鼻炎発症における IL-5 の関与を明らかにするため、エコチル調査参加者の小児コホートに対し新たな追加調査を行い、唾液試料を採取して微細環境因子を解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 非 IgE 依存的アレルギー性鼻炎における IL-5 産生 ILC2 と三叉神経との相互作用

抗原刺激の伝達に IL-5 が関与していることを明らかにするために、野生型マウス、および IL-5 欠損マウスの鼻腔にパパインを投与し、くしゃみを開始後のマウスから三叉神経節(TG)および橋を採取する。採取したサンプルから RNA を抽出し、神経活動の初期マーカー mRNA の発現量を解析する。

#### (2) 小児におけるアレルギー性鼻炎への IL-5 の関与についての疫学的解析

エコチル調査への参加小児に対し以下の前向きコホート研究(追加調査)を申請し、倫理審査を経て以下の通り実施した。

■リクルート：富山大学で追跡しているエコチル調査(全体調査)参加者のうち、現在 5 歳である平成 26 年生まれの小児 1,180 名から参加者 317 名をリクルートした。

■唾棄収集：スギ花粉の飛散時期である春(2021 年 3-5 月)に唾液を採取した。また、唾液採取時に診断および症状についてのアンケート調査を実施した。

■唾液サイトカイン解析：唾液上清中の IL-5 を含むサイトカイン濃度はフローサイトメトリー方により測定した。測定には、Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine kit (BD) を用い、そのプロトコールに従った。

■唾液細菌叢解析：-80°C で保存した唾液沈殿物から DNeasy Power Soil Kit (Qiagen) を使用して DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子の V1-V2 可変領域を MiSeq v2 500 cycle kit (Illumina) を用いてシーケンスを行った。シーケンスデータは、QIIME2 (ver. 2021.8) を使用して処理し、得られたペアエンド配列はマージされ、DADA2 を用いてノイズ除去を行った。分類学上の位置づけは、SILVA Greengenes 13\_8 データベースによる QIIME2 feature-classifier プラグインを

使用して実施した。その後、 $\alpha$  多様性、 $\beta$  多様性について解析した。

\*以上により、アレルギー性鼻炎の IL-5 による非 IgE 依存的経路について考察する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 非 IgE 依存的アレルギー性鼻炎における IL-5 産生 ILC2 と三叉神経との相互作用

IL-5 の産生を venus によって検出できる IL-5(+v) マウスにパパインを投与すると、直後から徐々に鼻粘膜の ILC2 から IL-5 の産生増大がみとめられる。また、野生型および IL-5 欠損マウスにパパインを投与すると、野生型に比べて IL-5 欠損マウスでは有意にくしゃみの回数が減少する ( $p < 0.01$ , 図 1)。パパインによるくしゃみ開始後の神経活性化マーカーの発現を解析した結果、野生型の TG および橋 (pons) では神経初期マーカーの発現が有意に上昇するのに対し ( $p < 0.05$ )、IL-5 欠損マウスではその発現量に有意な違いがないことが明らかになった(図 2)。以上から、パパイン投与によって産生された IL-5 産生 ILC2 の神経系への作用が示唆された。

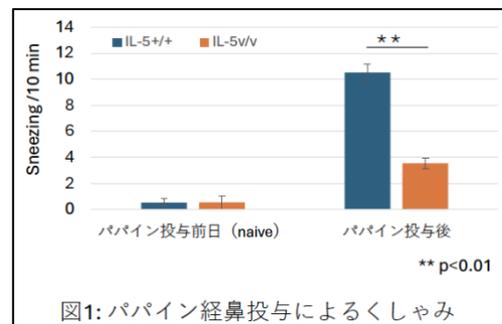


図1: パパイン経鼻投与によるくしゃみ

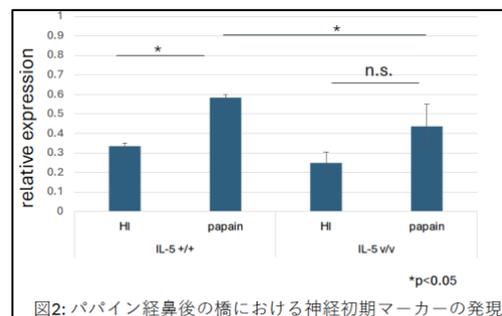


図2: パパイン経鼻後の橋における神経初期マーカーの発現

##### (2) 小児におけるアレルギー性鼻炎への IL-5 の関与についての疫学的解析

①参加集団：参加児のスギ花粉飛散前におけるアレルギー性鼻炎有病率は 33.3%で、うちスギ花粉症有病率は 28.0%であった。アレルギー性鼻炎有病率、スギ花粉症有病率においては、性差および年齢差をみとめなかった。

②参加児より採取した唾液サンプルの解析：2021 年度に唾液を回収できた 314 名の小児の唾液細菌叢およびサイトカインの解析を行い、質問票のデータを併せてアレルギー性鼻炎および花粉症の有無およびその症状との関連を明らかにした。その結果、花粉症有病者と無病者においては、 $\alpha$  多様性および  $\beta$  多様性について解析した結果、いずれも両群に違いはみとめられなかった。一方、アレルギー性鼻炎と唾液細菌叢においては、その症状により唾液細菌叢の  $\alpha$  多様性に違いがみられることが明らかになった。Chao-1 指数、Faith 指数、および菌数指数は、繰り返し鼻症状がありかつ、「中程度」に鼻症状が邪魔であると回答した群では、「少し(邪魔である)」または「まったく(邪魔ではない)」と回答した群と比較して有意に低下することが明らかになった。一方、weighted unifrac 距離、unweighted unifrac 距離による PCoA 解析ではいずれの群間でも有意差はみられなかった。次に、全検体の唾液においてアレルギーと関連すると考えられる IL-2, IL-4, および IL-10 を IL-5 に加えて解析した。「中程度」に鼻症状が邪魔な群は無病群に比べ有意に唾液中の IL-10 濃度が低いことが明らかになった。しかしながら、IL-2, IL-4, IL-5 の値については有意な違いが見られなかった。IL-10 は抑制性サイトカインとして知られている。アレルギー性鼻炎においては、唾液中の IL-10 産生を低下させないことが症状の緩和に重要な役割を果たす可能性がある。

<引用文献>

1. Iwasaki N, Matsushita K, Fukuoka A, et al. Allergen endotoxins induce T-cell-dependent and non-IgE-mediated nasal hypersensitivity in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(1):258-268. e10. doi:10.1016/j.jaci.2016.03.023

2. van Rijt L, von Richthofen H, van Ree R. Type 2 innate lymphoid cells: at the cross-roads in allergic asthma. *Semin Immunopathol.* 2016;38(4):483-496. doi:10.1007/s00281-016-0556-2
3. Suh MJ, Park JA, Chang SW, et al. Chronological changes in rhinitis symptoms present in school-aged children with allergic sensitization. *PLoS One.* 2019;14(1):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0210840

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 井上真理子、北瀬晶子、松村健太、田中朋美、山崎（長井）輝美、土田暁子、浜崎景、稲寺秀邦	4. 巻 30(1)
2. 論文標題 エコチル調査開始から10年を迎えてー富山ユニットセンターからの主な成果ー	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toyama Medical Journal	6. 最初と最後の頁 1-11
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎輝美、土田暁子
2. 発表標題 離乳期における乳製品の摂取が花粉症予防に關与するメカニズムの解明
3. 学会等名 ジャパンミルクコンgres2023（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北瀬晶子、畠山岳大、土田暁子、山崎輝美、田中朋美、松村健太、稲寺秀邦
2. 発表標題 エコチル調査学童期検査（小学2年生）受検者の質問票提出状況
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北瀬晶子、畠山岳大、井上真理子、山崎（長井）輝美、田中朋美、土田暁子、松村健太、浜崎景、足立雄一、稲寺秀邦
2. 発表標題 エコチル調査富山ユニットセンター10年の進捗
3. 学会等名 第56回富山県公衆衛生学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畠山岳大、北瀬晶子、井上真理子、山崎輝美、田中朋美、土田暁子、松村健太、両角良子、浜崎景、稲寺秀邦
2. 発表標題 エコチル調査富山ユニットセンターにおける成果発表の進捗状況とソーシャルキャピタルに関する知見
3. 学会等名 第56回富山県公衆衛生学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土田暁子、井上真理子、北瀬晶子、辻小夜可、山崎輝美、田中朋美、松村健太、浜崎景、足立雄一、稲寺秀邦
2. 発表標題 エコチル調査富山ユニットセンター 10年のあゆみ
3. 学会等名 第60回富山県小児保健学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松村健太、井上真理子、北瀬晶子、辻小夜可、山崎輝美、土田暁子、和田拓也、田中朋美、三澤恵、浜崎景、清水忠道、足立雄一、稲寺秀邦
2. 発表標題 エコチル調査富山ユニットセンター 10年のあゆみ
3. 学会等名 第60回富山県小児保健学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎輝美
2. 発表標題 富山ユニットセンターにおけるエコチル調査のフォローアップ戦略
3. 学会等名 第91回日本衛生学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021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	土田 暁子 (Tsuchida Akiko)  (00867674)	富山大学・学術研究部医学系・助教  (13201)	
研究分担者	柳橋 努 (Yanagibashi Tsutomu)  (60710887)	富山県薬事総合研究開発センター・その他部局等・主任研究員  (83206)	

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