

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18322

研究課題名（和文）Bacteroides門口腔細菌の免疫制御活性の解明と舌下免疫療法への応用

研究課題名（英文）Investigation into the immune regulation by oral microbiome and application for sublingual immunotherapy

研究代表者

岡 愛子（OKA, Aiko）

国際医療福祉大学・医学部・助教

研究者番号：40865234

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）：日本人のスギ花粉症患者104人の唾液を採取、免疫系細胞に添加して培養し、免疫抑制性サイトカインであるIL-10産生量とマイクロバイオームの組成率を検討した。その結果、IL-10産生量が高い患者、舌下免疫療法（SLIT）の治療効果が高い患者で、唾液中のプレボテラ属の組成率が高いことが判明し、報告した。プレボテラ属の中でも組成率が高く、上記の結果でIL-10産生量とも相関のあった*P. melaninogenica*種を免疫系細胞に添加したところ、濃度依存的なIL-10産生が確認できた。これらの結果から、この細菌の菌体成分がSLITにおいてアレルギー反応を制御してい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

スギ花粉症患者は年々増加傾向にあり、労働生産性や睡眠の質の低下など社会的負荷となっている。舌下免疫療法はアレルギーの長期寛解が期待できる治療法であるが、治療期間の長さや効果不良の症例が存在するという課題がある。治療効果を高めるアジュバント開発が望まれており、本研究ではプレボテラ属細菌がその候補になることが示された。今後はプレボテラ属細菌の中でも組成率の高い*P. melaninogenica*を対象を絞り、IL-10産生誘導能を持つ成分の特定、治療薬開発へとつなげるために実験を継続予定である。

研究成果の概要（英文）：Saliva samples were collected from patients with Japanese cedar pollinosis and incubated with immune cells for 24 hours. The production of IL-10, a regulatory cytokine, was monitored by ELISA and patient response to sublingual immunotherapy (SLIT) was compared with the percent composition of the salivary microbiome. We found that patients with higher IL-10 production and better response to SLIT had a higher percent composition of *Prevotella* genus. In addition, we found that the IL-10 production depended on the percent composition of *P. melaninogenica* species, which was the main component of the *Prevotella* genus present in patient saliva samples. These results raise the possibility that IL-10 is involved in the regulation of allergic reaction by *P. melaninogenica* species in the context of the treatment with SLIT.

研究分野：アレルギー性鼻炎

キーワード：アレルギー性鼻炎 舌下免疫療法 プレボテラ属細菌 IL-10

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

舌下免疫療法(SLIT)は、アレルギー性鼻炎に対して、免疫寛容を誘導することで症状や QOL を改善するだけでなく、治療終了後も長期効果を示すなど通常の薬物療法ではみられない特長をもつ。一方、長期効果を期待するのであれば少なくとも3年間の治療が望ましいとされ、また治療効果には個人差があり効果が不良な症例も存在する。治療効果が治療前に予測できる因子が判明すれば、本治療法の適応を考慮する際の有力なツールとなる。

SLIT は口腔を利用した免疫療法であり、治療効果に影響する因子として口腔内の衛生環境、特に口腔内細菌が関与する可能性が考えられる。唾液を含む口腔内には約 1,000 種の細菌が検出され、大腸に次いで2番目に多様な細菌叢(マイクロバイーム)が形成されている。口腔細菌叢の乱れ、すなわち Dysbiosis は歯周病などの口腔疾患のみならず炎症性腸疾患や IgA 腎症など口腔外の疾患の病態にも関与する。

申請者らは先行研究で、唾液に含まれる細菌の有無で IL-10 誘導活性(ヒト単球性細胞である THP-1 細胞からの IL-10 産生量)が異なることを示すことを示し、唾液のマイクロバイームが免疫を調節する可能性があることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SLIT の効果と唾液マイクロバイームとの関連を解析し、“唾液に含まれる免疫制御活性をもつ特定の細菌種が SLIT の効果に関与する”という仮説を検証することである。特に以下の2点にしばって研究を行った。

舌下免疫療法の有効性に関わる唾液マイクロバイームの同定による治療効果予測法の開発
免疫制御活性を有する細菌株の分離・樹立による新規アジュバントの開発

3. 研究の方法

-1 前向きコホート研究の実施

スギ花粉症患者(約 100 例)を対象に舌下錠を用いた SLIT を3年間施行する。治療開始前に流涎法により唾液を採取する。治療効果は花粉飛散期の Visual analogue scale (VAS)、症状スコア、および薬物スコアを基に評価する。治療効果の判定は鼻アレルギー診療ガイドラインに準じて行い、治療開始前シーズンに比較して重症度が2段階以上改善したものを著明改善とする。

-2 唾液マイクロバイーム解析による治療効果関連細菌種の同定

唾液沈渣を材料に、次世代シーケンサー(NGS)を用いたメタ 16S 解析を行う。OTU (operational taxonomic units) 数から菌種組成を門 (Genus) から種 (Species) レベルまで解析する。SLIT 後に花粉症症状が著明改善例で組成率が有意に高い細菌種(治療効果関連細菌種)を同定する。

-1 唾液からの免疫制御活性の高い細菌株の樹立

流涎法により採取した唾液より細菌を分離し、株化する。細菌株添加による THP-1 細胞からの IL-10 産生量を指標に、免疫制御活性の高い細菌株を選択する。

-2 細菌株の制御性細胞誘導能の検討

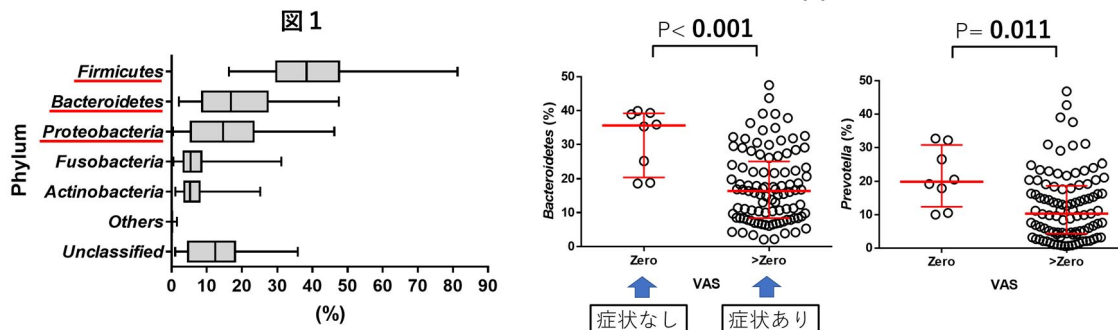
ヒト末梢血単核細胞(PBMC)に選択した細菌株を添加し、Foxp3+制御性T細胞の誘導がみられるか検討する。具体的にはPBMCからのIL-10産生量の変化を検討する。

4. 研究成果

-1 SLIT 著効例で Prevotella 属細菌の組成率が高い(治療効果関連細菌の可能性)

マイクロバイーム解析により、スギ花粉症の日本人における主要な口腔内細菌(門)は Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria であることがわかった(図1)。

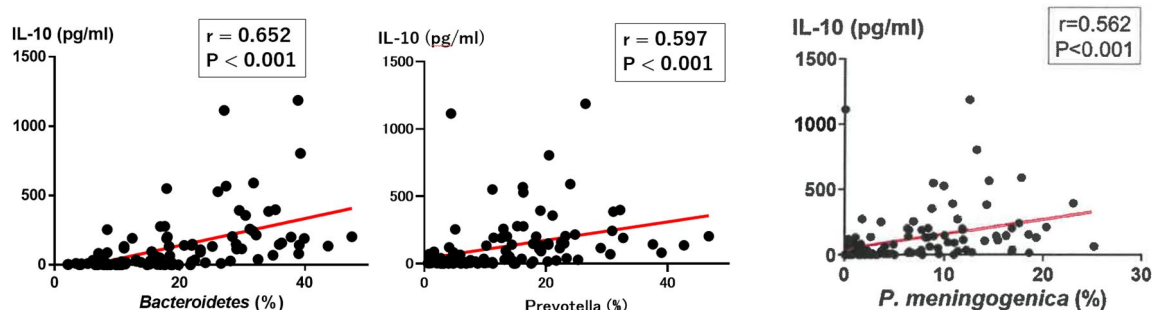
そこでこれら3種の細菌門の組成率と、SLIT 治療後の花粉症症状の有無を比較したところ、花粉症症状のない群、すなわち SLIT の著効例では Bacteroidetes 門、さらにその中でも Prevotella 属の組成率が高かった(図2)。



-2 *Prevotella* 属細菌の組成率と、IL-10 産生量が正の相関を示す

上記の3種の細菌門と、IL-10の産生量の関連を調べたところ、Bacteroidetes 門、その中でも *Prevotella* 属の組成率と IL-10 の産生量に正の相関を認めた(図3)。-1の結果とあわせると、*Prevotella* 属細菌が制御性サイトカインである IL-10 の産生を誘導し、SLIT の治療効果を高めている可能性が示唆された。この結果をまとめ、Allergy 誌に投稿し、受理された(引用文献)。私たちは *Prevotella* 属の中でも組成率が高く、単独でも IL-10 産生量と正の相関を示す *P. melaninogenica* (図3)に着目した。

図3



-1 *P. melaninogenica* 種の培養、樹立に成功

私たちは、まず *P. melaninogenica* 種を Microbiologics 社から入手し培養を試みた。嫌気性菌であるため、通常の培養方法では増殖を認めず、密閉パウチ内でガス濃度調整剤を用いて嫌気環境を作成して培養し、継代することに成功した(図4)。



図4

-2 *P. melaninogenica* 種による IL-10 産生誘導能の確認

上記で樹立した *P. melaninogenica* 種を添加して THP-1 細胞を培養したところ、細菌濃度依存的に IL-10 産生が起こることが確認できた(図5:未発表データ)。*P. melaninogenica* 種は嫌気性菌であることから、通常の培養環境では死滅していると考えられるが、濃度依存的な IL-10 産生が認められることから、細菌の成分が IL-10 産生を誘導していることが予想される。IL-10 産生を増強させる菌体成分が特定できれば、アジュバント開発につながる事が期待できる。現時点でその菌体成分の候補として *P. melaninogenica* 種の細胞壁構成成分であるリポポリサッカリド(LPS)、リポタンパク質などを想定し、LPS 阻害剤であるポリミキシン B、LPS の受容体である TLR4 の阻害剤、リポタンパク質の受容体である TLR2 の阻害剤などを用いて IL-10 産生増強を抑制できるかを確認する実験を行っており、結果が揃い次第論文化の予定である。

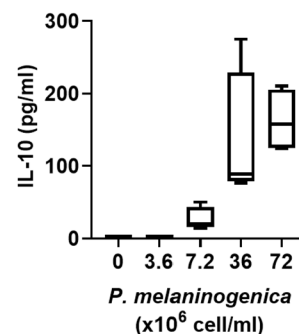


図5

引用文献: Oka A, Okano M, et al. Role of salivary microbiome in IL-10 production and efficacy of sublingual immunotherapy. Allergy. 2021 Aug;76(8):2617-2620.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Oka Aiko, Okano Mitsuhiro | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Relationship between Saliva and Sublingual Immunotherapy | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Pathogens | 6. 最初と最後の頁 1358 ~ 1358 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens10111358 | 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 Oka Aiko, Kidoguchi Masanori, Kariya Shin, Fujiwara Tazuko, Yuta Atsushi, Miyashita Hiromi, Higaki Takaya, Ogawa Yukiko, Kanai Kengo, Makihara Sei ichiro, Haruna Takenori, Kunisawa Jun, Adachi Naoto, Koyama Keisuke, Ii Rieko, Noguchi Emiko, Fujieda Shigeharu, Nishizaki Kazunori, Okano Mitsuhiro | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Role of salivary microbiome in IL 10 production and efficacy of sublingual immunotherapy | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Allergy | 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) 10.1111/all.14858 | 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 Oka Aiko, Akamatsu Maki, Kanai Kengo, Watanabe Yoshihiro, Imanishi Yoriyhisu, Noguchi Yoshihiro, Yano Harumi, Kiryu Shigeru, Shiomi Takayuki, Okano Mitsuhiro | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 A case of bacterial sphenoid sinusitis accompanied by a pituitary abscess | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Otolaryngology Case Reports | 6. 最初と最後の頁 100432 ~ 100432 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xocr.2022.100432 | 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 Oka Aiko, Akamatsu Maki, Kanai Kengo, Watanabe Yoshihiro, Okano Mitsuhiro | 4. 巻 61 |
| 2. 論文標題 Clinical and Laboratory Findings of Allergic Rhinitis Patients | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nihon Bika Gakkai Kaishi (Japanese Journal of Rhinology) | 6. 最初と最後の頁 284 ~ 291 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7248/jjrhi.61.284 | 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 Oka Aiko, Kanai Kengo, Okano Mitsuhiro | 4. 巻 116 |
| 2. 論文標題 Pathogenesis and Biomarkers of Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Practica Oto-Rhino-Laryngologica | 6. 最初と最後の頁 289 ~ 296 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5631/jibirin.116.289 | 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 - |

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡 愛子 |
| 2. 発表標題 舌下免疫療法の治療効果に関する唾液マイクロバイオームの同定 |
| 3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡 愛子 |
| 2. 発表標題 Role of salivary microbiome in IL-10 production and efficacy of sublingual immunotherapy in allergic rhinitis |
| 3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡 愛子 |
| 2. 発表標題 舌下免疫療法の治療効果に関する唾液マイクロバイオームの同定 |
| 3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 岡 愛子 |
| 2. 発表標題 アレルギー性鼻炎と口腔マイクロバイオーム |
| 3. 学会等名 第2回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 遠藤 朝彦、後藤 穰、岡 愛子、赤松 摩紀、金井 健吾、岡野 光博、細矢 慶、平野康次郎、飯村 慈朗、前田 陽平、識名 崇、浅香 大也、藤枝 重治、永倉 俊和、高橋英一郎、柳田 紀之、海老澤元宏、桐山 瑤子、安藤 智暁 | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 クリニコ出版 | 5. 総ページ数 128 |
| 3. 書名 アロスエルゴン Vol.1 No.2 アレルギー性鼻炎に対する外科的治療の可能性と限界 | |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|