

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22791

研究課題名（和文）花粉症発症に関わる花粉アジュバントの解明

研究課題名（英文）Elucidation of pollen adjuvants for pollinosis

研究代表者

菅野 峻史（Kanno, Takashi）

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00882135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では花粉症のなりやすさと花粉に含まれる免疫を活性化する物質の1種である、 β -グルカンとの関連について検討した。本研究で検討した花粉のうちスギ、ヒノキ、カモガヤについては β -グルカンが花粉症発症に影響を与えている可能性が高い。一方でブタクサ、シラカバについては別の物質によって免疫が活性化されることで花粉症発症に関わると考えられる。また、花粉症になりにくい花粉として検討したセイタカアワダチソウ、イチョウ、アカマツ、クロマツについては通常飛散している状態では β -グルカンは免疫の活性化に関与していないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国内には多くの人々が花粉症に罹患し、スギが最も多いもののそれだけでなく様々な花粉症を発症あるいは併発している。しかし現在のところ植物種による花粉症のなりやすさには明確な指標が存在しない。本研究では糖の1種である β -グルカンを指標として花粉症の発症への影響を比較した。 β -グルカンの受容体は個人差があることから植物種ごとの花粉症のなりやすさやその個人差に関連する可能性があり、今後さらに検討が進めば新たな治療法・予防法の確立につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the relationship between the susceptibility to pollinosis and β -glucan, which is one of the immune-activating substances contained in pollen. Among the pollens examined in this study, β -glucan is highly likely to affect the onset of pollinosis in Japanese cedar, Japanese cypress and orchard grass. On the other hand, in ragweed and birch β -glucan is not to affect the onset of pollinosis. Other immunostimulatory substances are thought to be affect onset of pollinosis. In addition, it was clarified that β -glucan is not involved in the activation of immunity in the pollens that are less likely to cause pollinosis, such as Canadian goldenrod, Ginkgo, Japanese red pine, and Japanese black pine which are in normally scattered condition.

研究分野：免疫学

キーワード：花粉症 自然免疫 獲得免疫 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

花粉症は本邦では国民病と呼ばれるほど認知度の高いアレルギー疾患である。特にスギ花粉症は有病率 26.5%(2008 年) と高い。スギに関しては舌下免疫療法の普及に伴い花粉症の症状の緩和が容易となった。その一方でヒノキなどの他の花粉に対する症状が顕在化している。

花粉は植物の配偶子であり、特に風媒花の花粉を単にアレルゲンの供与体として考えるならスギ以外の花粉症が広まっても疑問はない。しかし、スギやヒノキ、ブタクサ、シラカバ、カモガヤ等は有病者が多い一方で、マツやイチョウ、セイタカアワダチソウ等はあまり多くない。これらのことから花粉自体の免疫原性には植物種による違いがあると考えられるがその理由は明確でない。種々の花粉が持つアレルゲンタンパク質に関しては多くの研究がなされており、同定も進んでいる。一方で花粉のアレルゲン以外の物質による免疫への影響についての研究は少なく、2000 年代初めにはアジュバント物質候補としてプロテアーゼや NADPH オキシダーゼ、脂質等について積極的に研究がなされていたものの近年ではあまり注目されていない。

花粉の持つ免疫原性の違いは何に起因しているのかを明らかにすることは未だ明確になっていない花粉症、および口腔アレルギー症候群やラテックスフルーツ症候群などの関連疾患の発症機序解明と新規治療法、予防法の開発に資すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では種々の植物由来の花粉とその分画物を病原体関連分子パターン物質 (PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns) の生理活性の点から評価し、花粉の持つ免疫原性の起因物質(花粉アジュバント)を明らかにすることを主な目的とする。

花粉の研究において、アレルゲンタンパク質以外の成分による免疫学的研究は少なく、その中でもアレルゲン糖鎖以外の花粉多糖に関する免疫学的研究はほぼないことから学術的独自性は高いと考えられる。

また、花粉の持つ植物 PAMPs の働きを明確にすることで、免疫学的機序に基づいた花粉症およびその関連疾患の効果的な予防法や、新規治療法の開発につながると期待される。

本研究では複数種の植物花粉の免疫原性を PAMPs の 1 種である多糖の β -グルカン(BG)によるアジュバント活性から以下のように解析し、比較する。

1. 花粉の分画、多糖抽出、BG の定量及び局在解明
2. 花粉の免疫細胞活性化作用の *in vitro* における解析
3. マウスを用いた花粉に対する免疫応答の解析

3. 研究の方法

1. 花粉の分画、多糖抽出、BG の定量及び局在解明

9 種の花粉(ブタクサ(AAP)、セイタカアワダチソウ(SCP)、シラカンバ(BPjP)、カモガヤ(DGP)、ヒノキ(COP)、スギ(JCP)、イチョウ(GBP)、アカマツ(PDP)、クロマツ(PTP))について水中で破碎処理し、破碎上清(Wf)を回収した後、DMSO 中で破碎処理し上清(Df)を回収、最後に DMSO 中で 121 20 分処理し上清(DAf)を回収することで可能な限り多糖を抽出し、各画分の BG 含量を昆虫由来の β -glucan recognition protein(BGRP)を用いて定量した。また、各花粉懸濁液の lipopolysaccharides(LPS)含量はエンドスペシ-ES(生化学工業)を、タンパク質含量を Qubit Fluorometer(ThermoFisher)によって定量した。

各花粉の表出する BG を Dectin-1 と蛍光色素によって蛍光免疫染色し表在状態を検討した。DGP については表面染色ではバックグラウンドが高かったため、切片を BGRP と蛍光色素によって免疫染色し BG の局在を検討した。

2. 花粉の免疫細胞活性化作用の *in vitro* における解析

各花粉の *in vitro* での活性はマウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)を用いて検討した。

野生型(WT)及びBG受容体のDectin-1欠損(KO)のBALB/cマウスから骨髓細胞を回収し、GM-CSF及びIL-4存在下で5日間培養して樹状細胞に誘導した後エタノールで消毒した各花粉によって刺激した。24時間刺激後の培養上清を回収し、サイトカイン産生を検討した。

In vitroでBGによる活性がみられた花粉(COP, DGP)についてはJCPに関する既報と同様に花粉症発症のDectin-1依存性について検討した

3. マウスを用いた花粉に対する免疫応答の解析

WT/KO両マウスをAlum前投与群(Alum)、花粉投与群(DGP/COP)、生理食塩水投与群(Saline)の3群に分割し、Alum群にはエタノールで処理した花粉とAlumアジュバントを腹腔投与し残りの2群には生理食塩水を投与した。腹腔投与1週間後から週に1回採血及び週に2回、計13回麻酔下でAlum群とPollen群には花粉を経鼻投与し、Saline群には生理食塩水を経鼻投与した。

4. 研究成果

1. 花粉の分画、多糖抽出、BGの定量及び局在解明

COP, JCPはpH8.5の炭酸水素ナトリウム水溶液で容易に破裂し、粒子が分離したが、他の7種の花粉は破裂を起こさなかった。PTP, PDPについては未処理状態の花粉は水和せず、単純な懸濁だけでなく超音波処理を行っても溶液上に浮遊した。一方でアセトンやジエチルエーテルなどの有機溶媒による処理を行うと浸水可能となった。そのためマツ科花粉は自然状態ではBGの水和が起こらず受容体に認識されないと考えられ、BGを介した刺激には関与しない可能性がある。

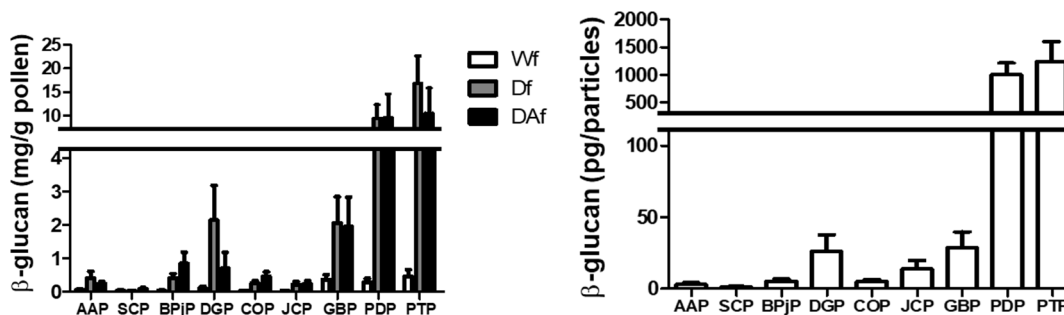


Fig. 1 花粉中β-glucanの含量

BGは検討した中では裸子植物全てで検出されており特にPTP, PDPの含量が高かった。一方被子植物ではDGPに多く含まれていたものの他の花粉では含量は高くなかった。(Fig. 1)

BGを可溶性Dectin-1で染色し表在状態を検討したところCOP, JCP, DGP, PDP, PTPでは多くの花粉粒にBGが表在しており、AAP, GBPでも一部表面にBGを持つ花粉粒が存在していた。(Fig. 2)

また、BG以外の免疫に影響を与える分子としてLPS及びタンパク質の含量についても検討した。AAPは極端に高くLPSを含有しており、SCP, DGPもLPS含量が高かった。LPS含量が高い花粉は草本で草丈は高くても数m程度であるが、LPS含有量の低い花粉は高木の花粉であった。そのため草本花粉は浮遊物や昆虫などによって外来成分が花粉に付着、混入しやすいことが示唆される。鼻腔環境を模したpHによって抽出される粒子あたりのタンパク質含量はGBPで極端に低く、粒子の大きいPDP, PTPでは含量が高かった。しかし花粉症のなりやすさと単純なタンパク質溶出量との関連は見いだせなかった。

2. 花粉の免疫細胞活性化作用のin vitroにおける解析

マウスBMDCを花粉で刺激したところAAP, DGP, COP, JCPでは有意な炎症性サイトカイン(TNF-α, IL-6)の産生がみられた、また、活性は低いもののGBPでも刺激濃度依存的なサイトカインの産生誘導が確認された。これらの花粉のうち、DGP, COP, JCP, GBPについてはDectin-1KOマウスでは炎症性サイトカインはほぼ産生誘導されなかった。AAPによる刺激ではWTと比較

して産生量の低下は見られたものの Dectin-1KO マウス由来の細胞でも炎症性サイトカインが産生された。以上より DGP, COP, JCP では BG による活性が自然免疫に対する刺激活性の主体であり、AAP では BG と他のアジュバント物質による活性の両者が自然免疫を活性化させると考えられる。

以上の結果から既報の有る JCP を除いて BG 依存的に活性の強い DGP, COP について In vivo で花粉症発症に与える花粉 BG の影響について検討した。

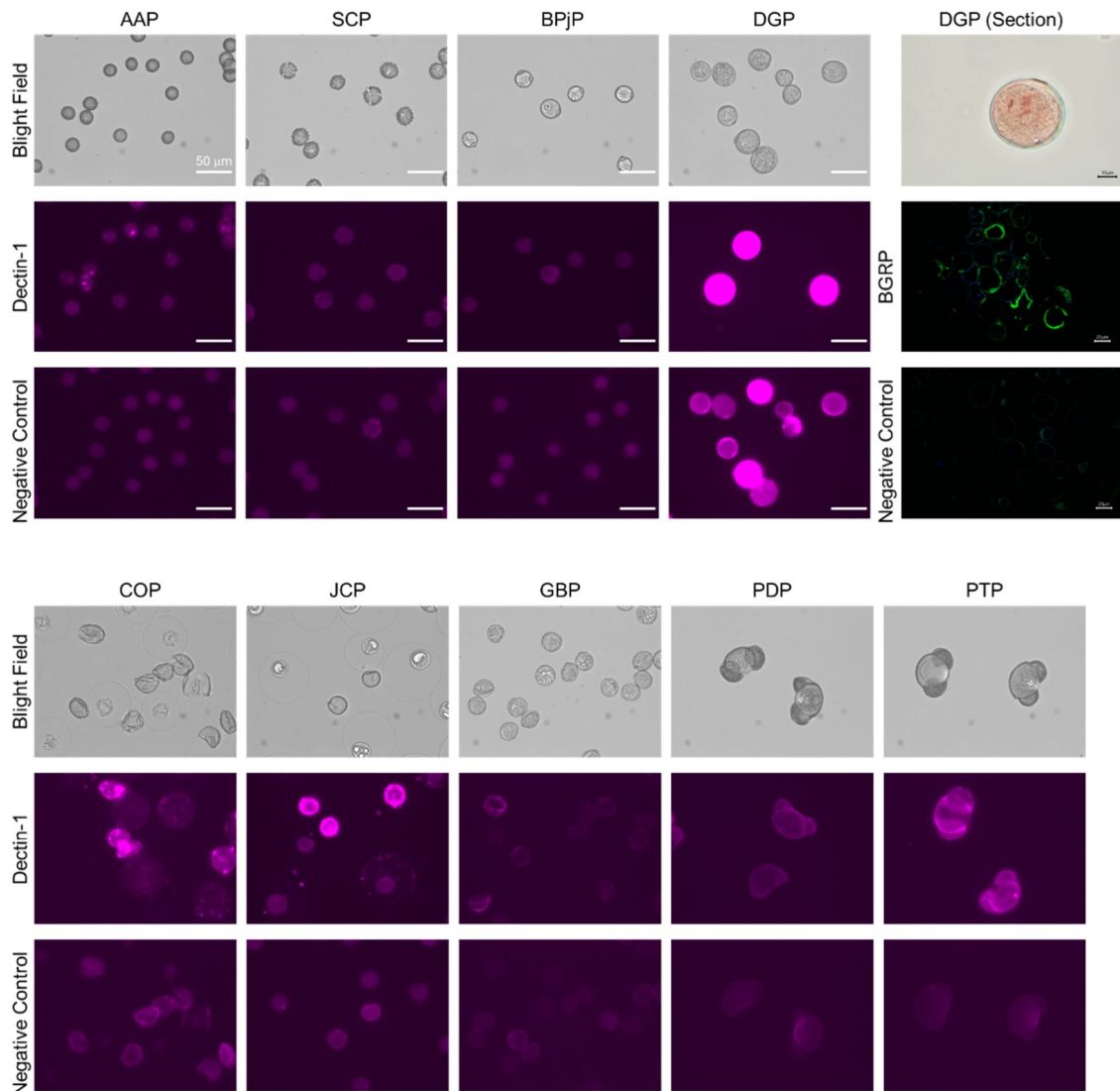


Fig. 2 花粉 BG の局在

3. マウスを用いた花粉に対する免疫応答の解析

DGP および COP はマウスに花粉を経鼻投与することで花粉症を発症させ、発症に対する花粉 BG の影響について Dectin-1KO マウスとの比較によって検討した。

血中抗体価を測定するとアレルゲン特異的 IgG は両マウスの Alum で前感作した群間に抗体価の差はなかったがアレルゲン特異的 IgE では Alum 前感作群間の抗体価に差が生まれた。(Fig.4) 脾細胞のサイトカイン産生に与える影響を検討したところ、アレルギーの指標となる Th2 サイトカインは WT では DGP 投与及び Alum による前投与で産生がみられたが Dectin-1KO では 3 群とも産生がみられなかった。(Fig. 4) 一方で、DGP と JCP の細胞増殖に対する影響を比較すると、DGP では Dectin-1 依存的に脾細胞に細胞毒性を呈するのに対して JCP は増殖に影響を与えなかった。以上より DGP は腹腔投与時には Dectin-1 依存的な細胞死の誘導によるアジュバント

活性を發揮していると考えられる。

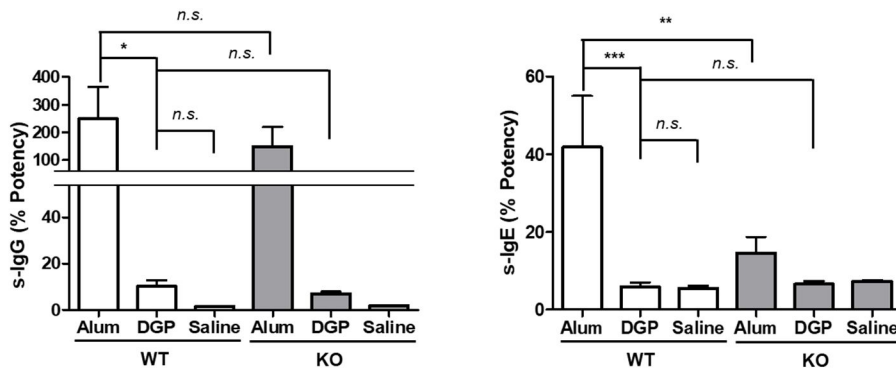


Fig. 3 Serum DGP specific Immunoglobulin titers of DGP administered mice

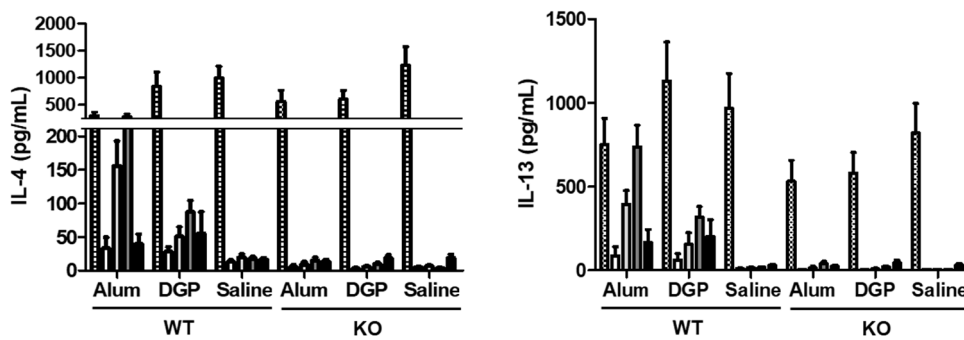


Fig. 4 Cytokine production of splenocyte isolated from DGP administered mice

また、COP も、DGP, JCP と同様の投与系で評価した。COP は Dectin-1 依存的な細胞毒性が DGP よりも強く、COP も DGP と同様に腹腔投与時に Dectin-1 依存的な感作作用が強いと考えられ、粒子そのものによる前感作を行うと粒子の持つ Dectin-1 依存的なアジュバント作用によって評価が難しくなってしまった。一方で経鼻投与のみを行った群を比較すると花粉二次刺激に対する Th2 サイトカインの産生量に差がみられていることから経鼻投与による感作強度には Dectin-1 依存性があると考えられる。

本研究では9種の花粉について花粉特異的免疫誘導に対するBGの影響を検討した。花粉症の報告の多い5種(スギ、ヒノキ、カモガヤ、ブタクサ、シラカバ)のうちスギ、ヒノキ、カモガヤの3種はBGが表面に露出しており、自然免疫活性化作用及び検証は限定的ではあるが獲得免疫の誘導に対してBGが影響していることが明らかになった。また、今回 *in vivo* での検討に至らなかったブタクサ花粉についてはBGによる活性化作用を持っていたが、LPSなどの外因性のアジュバント物質の混入があること及び花粉粒のうち一部だけにBGが確認されたことからBG自体も浮遊真菌など由来の外因性物質である可能性があり、ブタクサのアジュバント作用については今後検討の余地がある。シラカバ花粉については今回の検討では自然免疫の賦活化作用が確認されなかった。シラカバ花粉は粒子が小さく他の花粉よりも気道の奥まで入り込みやすい可能性があり免疫応答に關する細胞に違いがある可能性がある。また本検討ではエタノールによる処理を介しているため脂質成分の除去やタンパク質成分の失活などが考えられ、これらの影響が小さく評価された可能性があるが、シラカバ花粉症発症にはBGによる活性はほとんど影響していないと考えられる。

以上より花粉の免疫活性をBGの状態のみを指標に一律で行う事はできなかったが少なくとも裸子植物及びイネ科花粉についてはBGの影響は大きいと考えられ、これらのアレルギー性評価にはBGの活性評価は重要であると明らかになった。

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 2件）

1. 著者名 Kanno Takashi, Kim Changmin, Yamanaka Daisuke, Ishibashi Ken-ichi, Tanaka Hiroshi, Ohno Naohito, Adachi Yoshiyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Possibility of Japanese Cedar Pollen Causing False Positives in the Deep Mycosis Test	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2135 ~ 2135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22042135	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 Adachi Yoshiyuki, Nakata Hidetaka, Tanabe Tetsuya, Yamanaka Daisuke, Kanno Takashi, Ishibashi Ken-ichi, Ohno Naohito	4. 巻 22
2. 論文標題 Development of a Highly Sensitive β -Glucan Detection System Using Scanning Single-Molecule Counting Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5977 ~ 5977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115977	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅野峻史、金チャンミン、大野尚仁、岩倉洋一郎、安達禎之
2. 発表標題 スギ花粉の自然免疫刺激活性における藻類由来水溶性 β -1,3-D-glucanの抑制作用
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅野峻史、金チャンミン、岩倉洋一郎、大野尚仁、安達禎之
2. 発表標題 スギ花粉による樹状細胞刺激活性に対する藻類由来 β -glucanの抑制効果
3. 学会等名 第32回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 滝田峻也、菅野峻史、山中大輔、安達禎之
2. 発表標題 スギ花粉 -1,3-D-glucanによる炎症性サイトカイン産生におけるマウス系統差の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤航、菅野峻史、前田直樹、山中大輔、安達禎之
2. 発表標題 新規樹立されたマウスDect in-1に対する抗体の活性についての検討
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口明莉、菅野峻史、山中大輔、安達禎之
2. 発表標題 由来植物の違いによる花粉b-1,3-D-glucanの持つの違いについての検討
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中愛美、坂西みさと、菅野峻史、山中大輔、安達禎之
2. 発表標題 スギ花粉内在性b-1,3-D-glucanの精製法の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡野笑帆、渡辺大貴、菅野峻史、山中大輔、安達禎之
2. 発表標題 ヒノキ花粉 -1,3-D-glucanによる自然免疫賦活化作用の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅野峻史、山中大輔、石橋健一、大野尚仁、安達禎之
2. 発表標題 リムルスGテスト擬陽性反応におけるスギ花粉の影響
3. 学会等名 第65回日本医真菌学会総会・学術集会/真菌症フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅野峻史、山中大輔、安達禎之
2. 発表標題 スギ花粉によるリムルスGテストへの影響の検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
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
---------------------------	-----------------------	----

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