

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06634

研究課題名(和文) スギ花粉 -グルカンの免疫学的緒活性とアレルギー疾患との関連性に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the relationship between immunological activity of cedar pollen beta-glucan and allergic reaction

研究代表者

安達 禎之 (Adachi, Yoshiyuki)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60222634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：スギ花粉アレルギー以外のアジュバント候補物質1,3-β-グルカン(BG)の物性及び免疫系への影響を解析した。さらにBGの受容体であるDectin-1に競合するアンタゴニストの探索を行い、低分子化合物、可溶性BGおよびDectin-1の中和抗体の影響を検討した。スギ花粉外壁の不溶性BGはDectin-1陽性樹状細胞のTNF、IL-6等のサイトカイン産生に関わり、Dectin-1アンタゴニストも活性を有意に抑制し、スギ花粉症マウスモデルでも症状を軽減させたが、IgE抗体産生には影響しなかった。Dectin-1を標的とした治療には、さらに効果的な競合物質を探索するなどの新たな課題が見いだされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スギ花粉症は日本国内において最も患者数の多い花粉症であり有病率は約40%と増加傾向にあり、国民病とも言える社会的問題となっている。また、花粉症から食物アレルギーへ移行する花粉食物アレルギー症候群(PFAS)も危惧され、国民のQuality of Life改善においても解決すべき課題となっている。本研究は、スギ花粉の成分のうち、アジュバントとして機能する1,3-β-グルカンに注目し、その免疫活性を自然免疫の観点から緒活性段階の影響を明らかにした。現在の治療法は抗ヒスタミン薬やステロイド製剤などの対症療法、舌下免疫療法など限られているが、本研究結果から新たな治療法開発に展開する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The physical properties of 1,3-β-glucan (BG), a candidate adjuvant other than cedar pollen allergens, and its effects on the immune system were analyzed. We also searched for antagonists that compete with Dectin-1, the receptor for BG, and examined the effects of low molecular weight compounds, soluble BG, and neutralizing antibodies for Dectin-1. Insoluble BG in the cedar pollen outer wall is involved in the production of cytokines such as TNF and IL-6 by Dectin-1 positive dendritic cells, and Dectin-1 antagonists also significantly suppressed activity and reduced symptoms in a cedar pollinosis mouse model, but did not affect IgE antibody production. New challenges for Dectin-1-targeted therapy, such as the search for more effective competitors, have been identified.

研究分野：免疫学

キーワード：スギ花粉症 1,3-β-グルカン デクチン-1 自然免疫 獲得免疫 アジュバント

1. 研究開始当初の背景

スギ花粉症は日本国内において最も患者数の多い花粉症であり有病率は約 40%と増加傾向にある。スギ花粉には、タンパク質アレルゲン Cryj1 などに加えて 1,3-β-D-グルカンが花粉壁に存在し、アレルゲンに対する免疫応答を促進させ、花粉症発症に関わる可能性がこれまでの研究で示された。一方、花粉症発症には、公衆衛生環境の向上による患者体内のヘルパーT 細胞 (Th) バランスの変化や、ディーゼル排気ガス中に含まれる微粒子 (DEP) や黄砂などがアジュバントとして働き、患者増の原因となっているという報告もある。しかし、それらの要因は花粉に直結したのではなく、曖昧である。申請者らは免疫反応に影響する花粉自身の成分としてアレルゲンタンパク質以外に 1,3-β-D-グルカンが関わる可能性を見出したが、免疫応答にどのような影響をもたらすのか? など、花粉症の発症機序をめぐって学術的に解明すべき問題は多々残されている。花粉には、微生物多糖と構造類似の多糖成分が含まれることが先行研究により示されているが、その免疫学的活性については明らかになっていない。これらを足掛かりに自然免疫系を活性化する花粉の 1,3-β-D-グルカン成分に注目して研究を行った。

2. 研究の目的

スギ花粉に含まれる病原体関連分子パターン物質 (PAMPs: pathogen-associated molecular patterns) として 1,3-β-D-グルカンに着目し、その物性、自然免疫系細胞の活性化機構を明らかにすることを当初の目的とした。高等植物に含まれる微生物類似物質による免疫系疾患の観点で研究が行われている例は少ないため、新知見が得られると期待された。また、植物 PAMPs の働きが明確になることで、対症療法的でなく、免疫学的機序に基づいた花粉症の根本的治療を確実にすることにもつながると期待される。そこでスギ花粉に含まれる多糖成分、特に (1-3)-D-グルカン (以下 BG と称する) およびその受容体 Dectin-1 への影響について、以下に上げた視点から解析した。

スギ花粉 BG の性状解析、スギ花粉の Dectin-1 反応性の解析、BG の自然免疫系細胞活性化作用の検討、スギ花粉 BG の樹状細胞活性化における Dectin-1 アンタゴニスト及び中和抗体の影響、スギ花粉症マウスモデルにおける免疫パラメーターの解析

3. 研究の方法

スギ花粉 BG 性状解析

スギ花粉成分を水溶性及び不溶性画分に分画し、水溶性画分から可溶性 BG を β-D-グルカン結合タンパク質 (BGRP) 固相化アフィニティーカラムにより分離した。得られた可溶性 BG 分画物の糖鎖構造を検討する目的で、各種レクチンとの反応性を ELISA で検討した。不溶性画分においても BG が検出され、花粉粒外壁の BG に対しては蛍光標識 BGRP 及びレクチンの反応性を検討した。

スギ花粉 BG の Dectin-1 反応性の解析

スギ花粉の不溶性 BG に対して、可溶性 Dectin-1-Fc 分子を作用させ、Dectin-1 の局在及び結合量を蛍光顕微鏡および ELISA にて解析した。Dectin-1 反応性が BG 依存性であるか検討する目的で、藻類由来の水溶性 BG (Laminarin) を反応液中に共存させ、結合阻害の有無を検討した。

スギ花粉 BG の自然免疫系細胞活性化作用の検討

スギ花粉 BG への免疫応答における Dectin-1 の影響をマウス系統の違いによる Dectin-1 発現差に着目し、異なる系統のマウス C57BL/6、DBA/2、BALB/c マウスの骨髄細胞由来樹状細胞 (BMDC) で検討した。BMDC の活性化をサイトカイン産生量及び BMDC の成熟化作用 (CD86 及び MHC-II 発現) により評価した。BMDC 成熟化作用の検討では、BALB/c マウス及びその Dectin-1KO マウスを用いて Dectin-1 依存性を検討した。

スギ花粉 BG の樹状細胞活性化における Dectin-1 アンタゴニスト及び中和抗体の影響

マウス Dectin-1 のアンタゴニストとして、水溶性 BG の Laminarin、およびモノクローナル抗体 (mAb) クローン名 2F3、3H8 を用いて、可溶性 Dectin-1 と BG との相互作用に対する抑制効果を ELISA で、Dectin-1 発現樹状細胞の活性化をサイトカイン産生で検討した。

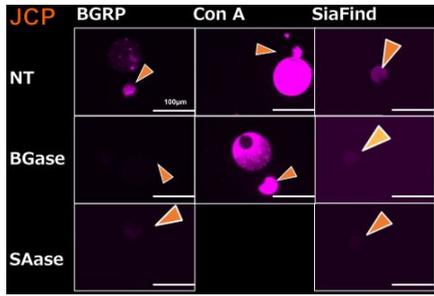
スギ花粉症マウスモデルにおける免疫パラメーターの解析

BALB/c マウスにスギ花粉を 42 日間経鼻投与する動物実験を行い、花粉症症状の誘導やスギ花粉に対する抗体産生における Dectin-1 アンタゴニスト (水溶性 BG や中和抗体) の影響を検討した。

4. 研究成果

スギ花粉粒子は蛍光標識 BGRP により染色され、その染色像は 1,3-β-D-グルカナーゼ処理で消失した。また、シアリダーゼ処理によっても BGRP 染色性が低下したことから BG とシアリ酸が複合糖鎖を形成している可能性が示された。(図 1) ところで、スギ花粉 BG を抽出し、BGRP アフィニティーカラムにて分画した水溶性 BG を ELISA で

各種レクチン反応性を解析したところ、シアル酸結合性レクチン WGA 及び SiaFind との反応性が認められ、スギ花粉 BG にシアル酸が結合していることが初めて明らかになった。



スギ花粉 (JCP) 粒子の BG を 1,3-β-グルコナーゼで前処理すると BGRP 反応性が消失しただけでなく、SiaFind 染色も低下したことから、スギ花粉の BG 糖鎖はシアル酸による修飾を受けていることが明らかになった。(図1)

図1 スギ花粉の BGRP 染色及びレクチン染色による蛍光顕微鏡観察

スギ花粉の水溶性 BG のレクチン反応性を検討したところ WGA(小麦胚芽レクチン) に反応性が認められた。WGA は、N-アセチル-D-グルコサミンおよびシアル酸に高い親和性を示すレクチンであることが知られており、SiaFind との反応性も認められたことから、スギ花粉 (JCP) の BG にシアル酸が付加することが示唆された。(表1)

表1 スギ花粉 BG のレクチン反応性

Lectins	BGRP	ConA	DBA	PNA	UEA1	WGA	PHA-E	SiaFind(Pan)
Reactivity	+++	+	-	-	-	++	-	+

スギ花粉 BG の Dectin-1 反応性の解析：可溶性 Dectin-1-Fc タンパク質による免疫染色とスギ花粉の BG に対する Dectin-1 結合率を ELISA により測定した。Dectin-1-Fc はスギ花粉外壁の内側面をスポット状に染色し、その反応は水溶性 β-1, 3-D-glucan である Laminarin の添加によって抑制された(図2)。これらの結果からスギ花粉の BG は Laminarin と共通の構造を有しており、Dectin-1 と相互作用することが明らかとなった。

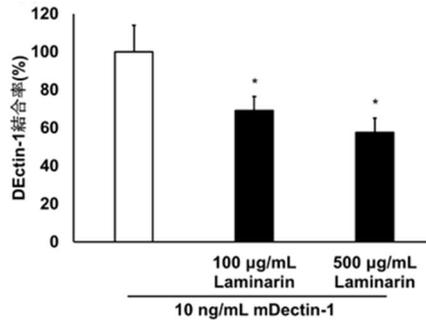
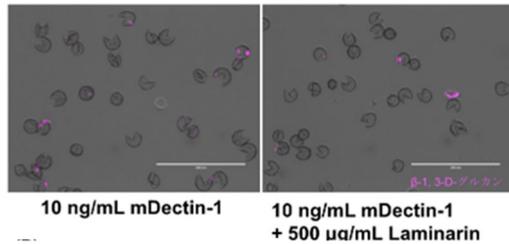


図2 スギ花粉 BG の Dectin-1 反応性
左：可溶性 Dectin-1-Fc によるスギ花粉粒子の染色像
右：スギ花粉粒子への Dectin-1-Fc 結合における Laminarin の阻害活性

スギ花粉 BG の自然免疫系細胞活性化作用の検討：

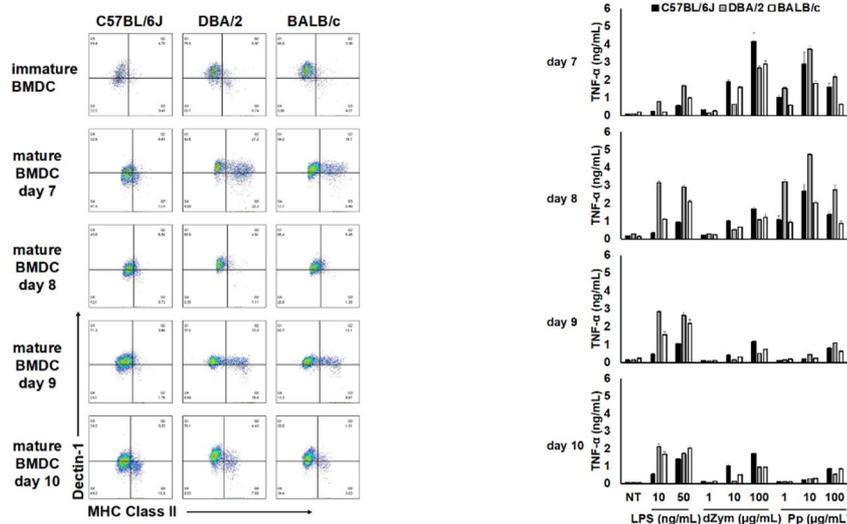


図3 マウス BMDC の Dectin-1 発現とサイトカイン産生能
花粉成分への免疫応答における Dectin-1 の影響を検討するために、マウス系統の違いによる

Dectin-1 発現の差に着目した。骨髓由来樹状細胞の Dectin-1 及び MHC クラス 発現の比較では DBA/2、および BALB/c マウスで Dectin-1 と MHC クラス 発現が高いことが明らかとなった。また、各 BMDC の LPS (TLR4 リガンド)、dZym (Dectin-1 リガンド)、およびスギ花粉粒子 (Pp) で刺激した時のサイトカイン (TNF- α) 産生は系統ごとに異なり、特に DBA/2 や BALB/c マウスの BMDC が比較的未熟な分化段階で dZym やスギ花粉 (Pp) に高い反応性を示した。(図 3)

さらに、BALB/c 野生型マウスと Dectin-1KO マウスの樹状細胞成熟化誘導効果を検討した。

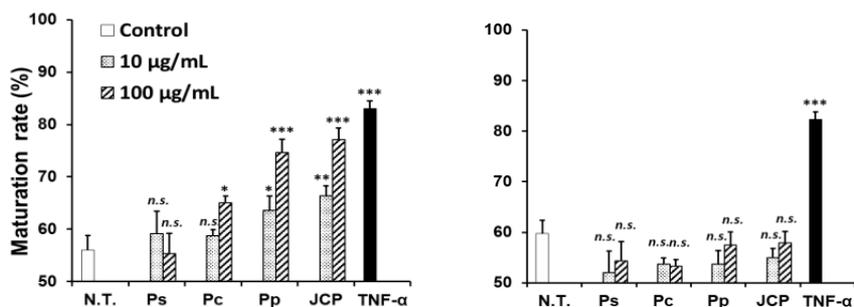


図 4 BALB/c マウス BMDC の成熟化 (CD86、MHC クラス 発現) に及ぼすスギ花粉粒子の影響
左: BALB/c WT、右: Dectin-1KO マウス (BALB/c バックグラウンド)
JCP: スギ花粉粒子、Pp: スギ花粉不溶性画分、PC: スギ花粉細胞成分、Ps: 水溶性画分

その結果、Dectin-KO では、スギ花粉による樹状細胞成熟化が WT に比べ顕著に低下していた。これらのことから、花粉の BG が BMDC の Dectin-1 に作用し、BMDC の成熟化やサイトカイン産生を促進することが明らかになった。(図 4)

スギ花粉 BG の樹状細胞活性化における Dectin-1 アンタゴニスト及び中和抗体の影響

スギ花粉症における抗体産生やサイトカイン産生には Dectin-1 が強く関与することが示唆されていることから、Dectin-1 と花粉 BG との相互作用を抑制することで発症を予防できるか検討した。Dectin-1 と BG との結合を阻害するアンタゴニストの検索を BIND の低分子ライブラリーや中分子ライブラリーについて一通り行ったが、再現良く抑制する化合物を見出すことが出来なかった (データ示さず)。そこで、マウス Dectin-1 のアンタゴニストとして、水溶性 BG の Laminarin、Dectin-1 中和活性を有するモノクローナル抗体 (mAb) 2 種 2F3 及び 3H8 を樹立し、アンタゴニストと Dectin-1 中和抗体の影響を検討した。

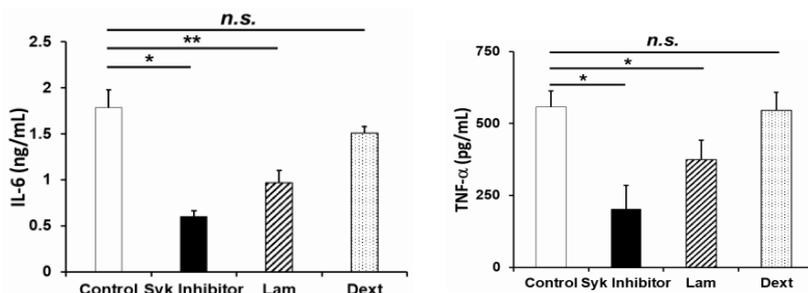


図 5 スギ花粉 BG によるマウス BMDC のサイトカイン産生における Laminarin の影響

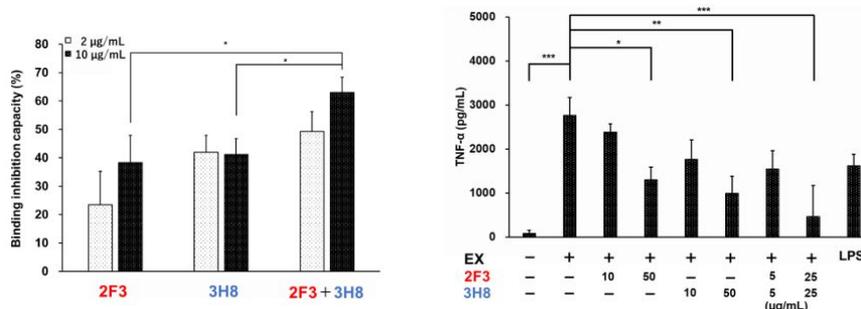


図 6 Dectin-1 中和抗体のスギ花粉と Dectin-1 相互作用への影響

左: スギ花粉外壁への Dectin-1-Fc タンパク質の結合における Dectin-1mAb の抑制効果

右: スギ花粉外壁 (EX) と BMDC との共培養で誘導される TNF- α における Dectin-1mAb の効果

その結果、Laminarin は、スギ花粉による BMDC 刺激を有意に低下させることが明らかになっ

た。グルカンの Dextran では、阻害活性が認められず BG に特異的であることが示唆された。(図 5) また、スギ花粉外壁成分と BMDC との共培養で誘導される TNF- α 産生は抗体添加により有意に減少した。(図 6)

これらの結果から Dectin-1 アンタゴニストとして可溶性 BG の Laminarin や Dectin-1 中和抗体は *in vitro* において有意にスギ花粉の刺激活性を低下させることが明らかとなった。

スギ花粉症マウスモデルにおける免疫パラメーターの解析

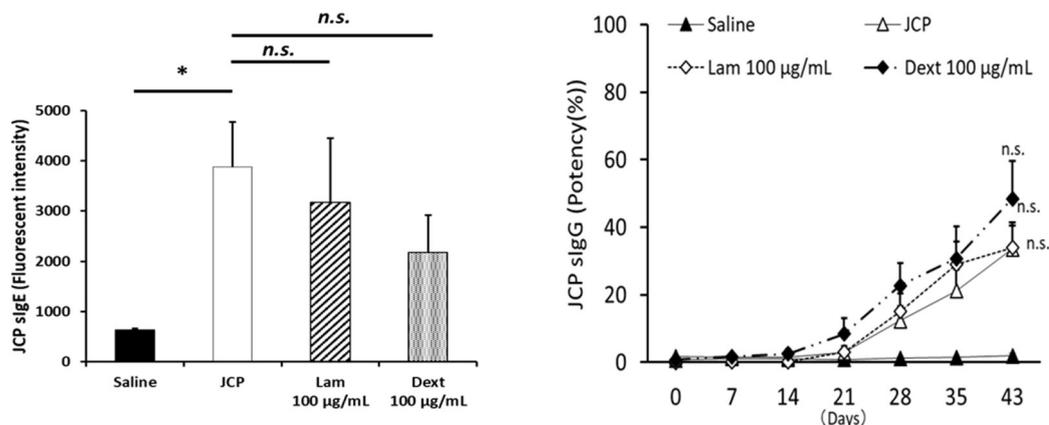


図 7 スギ花粉症マウスモデルにおける水溶性 BG 経鼻接種の影響

左：スギ花粉特異的 IgE 抗体誘導における Laminarin の影響

右：スギ花粉特異的 IgG 抗体誘導における Laminarin の影響

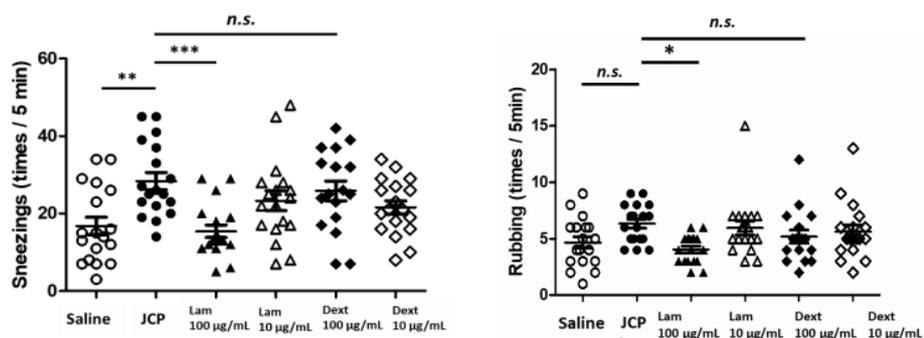


図 8 スギ花粉経鼻接種マウスのアレルギー行動における水溶性 BG の影響

左：くしゃみ回数、右：鼻こすり

スギ花粉接種によるマウス花粉症モデルにおいてスギ抗原特異的な IgE や IgG 産生への影響は Laminarin 経鼻接種では有意な差が認められなかったが(図 7) 投与開始 43 日目における花粉接種直後のくしゃみや鼻こすり行動において、Laminarin 接種群は有意な低下を認めた。(図 8) スギ花粉接種で誘導される反応が、Laminarin で抑制可能であることが明らかとなった。そのため、*in vivo* においてもスギ花粉刺激前の Laminarin 処理はその刺激を緩和させる可能性が示された。一方、Dectin-1 中和抗体では Laminarin のような効果は認められなかった。(結果示さず)

5. 総括

スギ花粉には水溶性 BG と花粉外壁に固定された不溶性 BG が存在し、いずれも、マンノースやシアル酸と結合した複合糖鎖であることが示された。スギ花粉外壁の BG は自然免疫系受容体である Dectin-1 によって認識され、樹状細胞のサイトカイン産生や成熟化を促進させるのに関わることが明らかとなった。水溶性 BG は、スギ花粉による樹状細胞の活性化に対して抑制的に作用し、アンタゴニストとして機能することが示唆された。さらに実験動物の花粉症モデルにおいて花粉感作前に水溶性 BG を経鼻接種すると、スギ花粉症の症状を緩和することが明らかとなったが、アレルゲン特異的な IgE 産生を有意に低下させることはなかった。これらの結果から、Dectin-1 を標的としたスギ花粉症の治療には、さらに効果的な競合物質を探索するなどの新たな課題が見いだされた。

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 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ishibashi Ken-ichi, Onaka Nobuteru, Nishida Norihisa, Takahashi Madoka, Adachi Yoshiyuki, Ohno Naohito	4. 巻 45
2. 論文標題 Dectin-1 Reactivity to Paramylon Derived from <i>Euglena gracilis</i> E0D-1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1394 ~ 1397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00247	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 Sumiya Kazuki, Izumi Hiroto, Adachi Yoshiyuki, Mochizuki Shinichi, Sakurai Kazuo	4. 巻 523
2. 論文標題 Binding assay of human Dectin-1 variants for DNA/ β -glucan complex for active-targeting delivery of antisense DNA: Part II	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 108731 ~ 108731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carres.2022.108731	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, Momose Fumiyasu, Momose Hiromi, Tada Rui, Ohno Naohito	4. 巻 25
2. 論文標題 Potentiation of Antitumor Activity by Antibody Drugs and Mushroom-Derived β -Glucans in Natural Killer Cell-Mediated Tumoricidal Activities against Non-Hodgkin's B-Cell Lymphoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Medicinal Mushrooms	6. 最初と最後の頁 1 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1615/intjmedmushrooms.2022047219	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 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 該当する

1. 著者名 Tamura Hiroshi、Adachi Yoshiyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Diagnostic Challenge and Therapeutic Approaches in Human Sepsis Based on the Appearance of Endotoxemia and Beta-d-Glucanemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12900 ~ 12900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312900	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 該当する

[学会発表] 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 蛭谷 美鈴、菅野 峻史、田中 愛美、岡野 笑帆、山中 大輔、安達 禎之
2. 発表標題 スギ・ヒノキにおける花粉 グルカンの構造比較
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 健斗、山中 大輔、安達 禎之
2. 発表標題 機能改変型ヒトキトリオンダーゼを用いたELISA様試験による生体内キチンの検出
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島崎 錬、山中 大輔、安達 禎之
2. 発表標題 機能改変型キチナーゼを用いたキチン検出法による血清中真菌キチンの構造変化の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山中 大輔、安達 禎之
2. 発表標題 真菌細胞壁多糖の高感度検出を目的とした糖質加水分解酵素の機能改変
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅野 峻史、安達 禎之
2. 発表標題 スギ花粉 -グルカンの自然免疫賦活化作用とその抑制
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅野 峻史、山口 明莉、平塚 理恵、岩倉 洋一郎、山中 大輔、安達 禎之
2. 発表標題 カモガヤ花粉 -1,3-D-glucanの局在と免疫活性に関する研究
3. 学会等名 第71回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2022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 スギ花粉中 -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 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 -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 安達 禎之, 山中 大輔, 菅野 峻史, 石橋 健一, 大野 尚仁
2. 発表標題 一分子蛍光検出法による高感度な真菌多糖検出システムに関する検討
3. 学会等名 第65回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2021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
4. 発表年 2021年

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 スギ花粉による樹状細胞刺激活性に対する藻類由来 -glucan の抑制効果
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京薬科大学薬学部免疫学教室ホームページ
<https://www.ps.toyaku.ac.jp/menekigaku/>

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