

201229018A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療)

免疫療法による花粉症予防と免疫療法の
ガイドライン作成に向けた研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡本 美孝

平成25(2013)年5月

目 次

I. 総括研究報告	
免疫療法による花粉症予防と免疫療法のガイドライン作成に向けた研究	
岡本 美孝	2
II. 分担研究報告	
1. 舌下免疫療法の奏功機序と発症予防についての検討	
岡本 美孝	12
2. アレルギー性鼻炎診療に対するアンケート調査と α -GalCer を利用した二次介入の検討	
櫻井 大樹	15
3. スギ花粉症発症に関する遺伝子の同定	
藤枝 重治	17
4. アレルギー性鼻炎診療に対するアンケート調査と 鼻汁中のスギ特異的IgE抗体の測定に関する研究	
竹内 万彦	20
5. スギ花粉症に対する舌下免疫療法の経年的効果に関する研究	
大久保 公裕	22
6. 小学生におけるアレルギー性鼻炎の実態に関する調査	
下条 直樹	25
7. 発症予防のためのスギ花粉症における最小持続炎症に関する検討	
岡野 光博	28
III. 研究成果の刊行に関する一覧	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	32

免疫療法による花粉症予防と免疫療法のガイドライン作成に向けた研究

研究代表者 岡本 美孝 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 教授

研究要旨

免疫療法による花粉症の発症の予防に対する有効性、ならびに免疫療法のガイドライン作成に向けて花粉症治療の実態調査から現状の治療の課題を明らかにすることを目的に、本年度は以下の検討を行った。

1、スギ花粉感作陽性でかつ未発症者を対象に、スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の発症予防効果を明らかにする介入試験を、プラセボエキス（溶剤）を対照として 2 重盲検試験により昨年が続いて実施した。（キーオープンは平成 25 年度）

2、アレルギー性鼻炎に対する現在行われている治療内容に関するアンケート調査を行なったところ、治療に対する満足度は、成人、小児患者ともに満足、やや満足を合わせてもその割合が 20%前後と低かった。効果が十分ではない、頻回な通院の必要性、副作用への危惧、費用が主な不満の理由であった。一方、抗原特異的免疫療法についての患者認知度は低値であった。

3、花粉症の発症の機序を明らかにするために、以下の検討を行った。

①Cystatin SN は鼻粘膜上皮に存在し、アレルギー反応の抑制に作用している可能性が認められたが、感作未発症者のうち皮内反応陽性者で陰性者より高く発現しており、感作から発症への関与が示唆された。

②抗原ディスク誘発試験を連日行なうことにより、日毎に陽性率が増加したが、無症状者でも有症者と差がなく鼻水中にトリプターゼの増加がみられ、アレルギー反応自体は生じている可能性が示唆された。

3、NKT 細胞免疫系を利用した舌下免疫療法の効果向上を目的に NKT 細胞のリガンドである α -galactosylceramide (α -GalCer) と抗原でパルスした樹状細胞を投与した鼻アレルギーモデルマウスでは症状の有意な改善、IgE, Th2 サイトカイン産生抑制、IFN- γ 、IL-21 発現の増加がみられた。抗 IL-21 抗体、抗 IFN- γ 抗体投与により、このような抗アレルギー反応は解除された。

4、舌下免疫療法の機序の解明を目的に、花粉飛散室での検討を行った。花粉飛散室内での 3 時間の花粉曝露により、全員に退室後にもくしゃみ、鼻漏、鼻閉症状が持続し、鼻汁中には Th2 サイトカイン、ECP, ロイコトリエン、さらにヒスタミン、トリプターゼの増加が遅発相に認められた。CD203 陽性細胞も高頻度に検出された。舌下免疫療法群ではプラセボ群に比較して特に遅発相での症状の改善傾向が認められた。

研究分担者

藤枝 重治 福井大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授
 竹内 万彦 三重大学大学院医学系研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科部門 教授
 大久保公裕 日本医科大学医学部 耳鼻咽喉科学 教授
 下条 直樹 千葉大学大学院医学研究院 小児病態学准教授
 岡野 光博 岡山大学大学院医歯総合研究科 耳鼻咽喉科学 准教授
 櫻井 大樹 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 講師

山本陸三朗 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 医員
 稲嶺 絢子 千葉大学大学院医学研究院 特任研究員
 櫻井 利興 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 医員
 大熊 雄介 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 大学院生
 坂下 雅之 福井大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 助教
 意元 義政 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 医員
 野山 和廉 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 医員
 森田 慶紀 千葉大学大学院医学研究院小児病態学 大学院生

研究協力者

黒野 裕一 鹿児島大学大学院医歯薬学総合研究科 耳鼻咽喉科頭頸部外科 教授
 増山 敬祐 山梨大学大学院医学工学総合研究部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授
 米倉 修一 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教

増田佐和子 国立病院機構三重大学 耳鼻咽喉科 医長
 坂井田 寛 三重大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 助教
 水谷 仁 三重大学大学院医学系研究科 皮膚科 教授
 山中 恵一 三重大学大学院医学系研究科 皮膚科 講師

A. 研究目的

スギ花粉症は一旦発症すると中高年者を除き自然改善は非常に少ない。花粉症を含めて、アレルギー疾患の自然経過を改善させる可能性を有するのは、現在のところは唯一抗原特異的免疫療法のみである。この抗原特異的免疫療法によって新規感作の予防も図れることが欧米で報告され、一定のエビデンスがあるものと考えられている。しかし、抗原特異的免疫療法が発症の予防効果を有するかどうかについての検討、報告はこれまでない。スギ花粉に感作陽性ながら非発症者は「発症予備軍」として捉えられ、感作陽性者のうち小学生で約 70%、青壮年では約 50%に達する。そこで、感作陽性者の発症予防の検討、すなわち花粉症発症に対する 2 次介入を、このような感作陽性ながら未発症者を対象に検討する。副作用発現の危険性など患者負担を考慮すると皮下免疫療法での検討は容易ではないが、これまでの検討から安全性を確認してきた舌下免疫療法を中心に 2 重盲検試験により有用性を明らかにし、かつこの試験で得られる試料の解析からスギ花粉症発症の免疫学的機序についても検討を行う。加えてアジュバントとして乳酸菌口内崩壊錠、さらに NKT 細胞の活性リガンド糖脂質の口腔内投与の有用性についても検討を行う。また、免疫療法の普及に向けて、現在の花粉症治療の実態調査を行う。

一方、これまでは医療機関での受診患者の調査やインターネットを利用した治療の調査報告が多いが、調査対象者に少なからずバイアスがかかり調査の信頼性が問題となる。インターネットによる調査対象者には一般の患者とは大きな乖離がみられることが、以前の代替医療の厚労科研班研究で明らかであった。そこで、住民検診、学校健診といった調査の参加者の中でアレルギー性鼻炎患者を調査対象にすることでバイアスを除き、調査結果から現在の花粉症を含むアレルギー性鼻炎の治療の問題点を明らかにする。近い将来広い普及が期待される免疫療法は患者の治療満足度が高いとされるが、その特徴を明らかにして免疫療法の確立に向けたガイドライン作成に取り組む。

B. 方法

(1) スギ花粉感作陽性でかつ未発症者を対象に、スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の発症予防についての介入試験を、プラセボエキス (溶剤) を対照とした 2 重盲検試験により開始した。対象者は、スギ花粉に感作され、スギ CAP-RAST スコアが 2 以上の 18 歳以上でこれまでスギ花粉症の発症がなく、かつスギ抗原ディスクを用いた鼻粘膜抗原誘発試験で陰性であることを確認され、試験参加の同意を得られた方とした。平成 23 年 12 月 5 日から連日トリイスギ花粉エキス®を増量期の後に維持量として 2000 JAU/ml を毎朝 1 日 1 回 1ml

の投与を開始した。投与は平成 24 年 4 月末まで行った。本試験計画は参加各施設の病院臨床試験部に申請し許可を得て開始された。未発症者は平成 24 年 12 月から再度同様の発症予防の 2 重盲検試験に参加している。

(2) 研究班にて作成したアレルギー性鼻炎治療に関して、内容、費用、効果などから問題点を問うアンケート用紙を用いて、学校健診、あるいは疫学調査など直接受療と関係なく医療機関を訪れたアレルギー性鼻炎患者に対して調査を行った。調査法、アンケート用紙の内容は千葉大学大学院医学研究院始め参加施設の倫理委員会の了解を得て行われた。本年度の調査では、小児は千葉市内の 10 カ所の小学校のアレルギー性鼻炎患児 1517 名、千葉大学付属幼稚園・小学校・中学校の患児 376 名、三重県津市内小中学校の 322 名の患児の保護者を対象に実施した。成人患者は 238 名が解析対象となった。

(3) スギ花粉症患者群、感作陽性未発症者群、コントロール群である非アレルギー群を抽出しスギ花粉飛散時期に鼻粘膜を擦過し、抽出した RNA サンプルを用いた網羅的遺伝子発現解析を昨年に続いて進めた。得られた候補遺伝子を、アレルギー性鼻炎患者由来の下鼻甲介粘膜を用いて発現部位を確認し、同時に培養した鼻粘膜上皮細胞と線維芽細胞において同定した候補遺伝子がどのような刺激により誘導されるかを確認し、機能解析を行った。

(4) アレルギー性鼻炎モデルマウスを用い、誘導した樹状細胞を α -galactosylceramide (α -GalCer) および抗原でパルスし、感作後のマウスの口腔底粘膜下に投与した。抗原点鼻による症状誘発を行った後、鼻症状・免疫学的パラメーターの解析、症状抑制機序の検討を進めた。さらに α -GalCer および抗原を包み込むリン脂質二重層で形成されるナノカプセルのリポソームを用いた舌下投与の検討を開始した。

(5) スギ花粉症患者 15 名を対象に千葉大学亥鼻キャンパスの花粉飛散室でスギ花粉の曝露試験を行い、詳細な症状解析と花粉飛散室入室前、退室時、退室 6 時間後に、鼻腔 NO 値、鼻呼吸抵抗、鼻腔有効断面積を測定した。また、鼻汁を採取して各種炎症メディエーター、サイトカインを解析した。舌下免疫療法の 2 重盲検試験参加者に花粉飛散室での試験曝露を行い、即時相、遅発相での効果、メディエーターについて解析を進めた。

(6) スギ花粉の非飛散期に、通年性鼻炎を有さないスギ花粉症患者 (n=20) を対象に、対照ディスクと低用量スギ花粉エキス付着ディスクによる鼻粘膜誘発試験を 3 日間連続して行い、誘発 5 分後の症状および局所

所見を観察し、陽性（症状発現あり）と陰性（症状発現なし）の判定を行った。ディスクに付着した鼻汁を回収し、抽出液中のECP、トリプターゼおよびTh2 サイトカイン濃度を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究を遂行するにあたり、アンケート調査対象患者、検診対象者には十分な説明を行い了解を得て行われた。小児では保護者から了解を得て行われた。舌下免疫療法を用いた臨床試験の実施にあたっては、厚生労働省の臨床研究に関する指針を遵守して、学内倫理委員会の許可を得た後に十分な説明をして、文書による同意を得た方を対象に実施した。同意の取得にあたっては不参加でも不利益は全く受けないこと、同意後も撤回は可能であることを説明した。使用したスギ花粉エキスについては非常に高額になるため、公正取引委員会へ申請し、許可が得られた後に製造企業より提供を受けた。

C. 結果

（1） 参加7大学、協力2大学の体勢で、舌下免疫療法の介入によるスギ花粉症発症予防の有効性を検討する2重盲検試験が平成24年4月末まで行われ計152名が完遂した。スギ花粉飛散期に花粉症症状出現の有無から評価し、さらに5月に鼻粘膜抗原誘発試験により発症の有無を確認した。その結果、23名に新規発症を認めた。試験終了後も盲検性を保ったまま非発症者には平成24年12月から再度2重盲検試験に参加して戴いた。また、平成24年12月からは新たな参加者も含め、延べ300名の感作陽性未発症者を対象に試験が進んでいる。

（2） アレルギー性鼻炎の治療内容に関するアンケート調査を昨年に続いて対象患者を増やして行った（2215名）。成人患者が最近受けた治療は、花粉症では病院での治療が60%以上であったが、通年性では病院治療が40%程度で無治療患者も約45%と多かった。治療に対する満足度は、通年性・花粉症とも満足、やや満足を合わせてもその割合が20%台にとどまった。治療に対する不満の理由は効果不十分が約半数と最も多く、眠気などの副作用も40%程度あった。今後希望する治療としては病院治療が花粉症でも40%程度と低かった。小児患者では通年性アレルギー性鼻炎患者の無治療者は少なかったが、治療に対する保護者の満足度はやや満足以上で20%前後と成人患者に比べてもさらに低値であった。一方、抗原特異的免疫療法への期待度は20%程度であったが、無回答者が半数以上であり認知度が低いことを示唆していた。

（3） マイクロアレイ解析で、コントロール群と比較してスギ花粉症患者で最も高発現であったCystatin SN (CST-1)の発現はコントロール群と感作陽性未発症者

との間には有意な変化は認めなかった。3群間でのスギ抗原に対する皮内反応陽性者では陰性者よりCystatin SNが有意に高発現していた。感作陽性未発症者の皮内反応陽性者と陰性者との間では、Cystatin SNは陽性者が有意に高かった。Cystatin SNは鼻粘膜上皮に存在していることが免疫染色で確認され、培養鼻粘膜上皮細胞では、Cystatin SNはスギ花粉（粗抗原）とprotease活性を有するpapainにより誘導された。鼻粘膜の刺激試験を行うと、スギ花粉のみの刺激では鼻粘膜のZ0-1のmRNAが減少したが、花粉を前もってCystatin SNと培養したものでは発現減少が抑制された。

（4） 鼻アレルギーモデルマウスの検討から、 α -GalCerと抗原でパルスした樹状細胞投与群では症状の有意な改善を認め、特異的IgE値の低下、リンパ節T細胞からのTh2型サイトカインの産生抑制、IFN- γ 産生増加を認めた。また頸部リンパ節においてIgEクラススイッチの抑制作用のあるIL-21の遺伝子発現が有意に上昇していたが、抗IL-21抗体、抗IFN- γ 抗体の腹腔投与により、認められた症状抑制やIgE値の低下は解除されることを確認した。 α -GalCerと抗原を包んだリポソームの口腔底粘膜下投与は有意な症状改善を誘導した。

（5） 花粉飛散室内での3時間の花粉曝露により、全員に鼻症状が発現したが退室後にもくしゃみ、鼻漏、鼻閉症状が持続した。鼻汁中にはIL-5、IL-13などのTh2サイトカイン、ECP、ロイコトリエンの有意な増加が花粉飛散室退室後に認められたが、興味深いことに退室6時間後の鼻汁中にヒスタミンの増加が見られ、トリプターゼも高濃度に検出された。鼻汁細胞診ではCD203陽性細胞が多数確認された。舌下免疫療法群ではプラセボ群に比較して特に遅発相での症状の改善傾向が認められた。

（6） 抗原ディスク誘発試験により、日毎に陽性率が増加し、3日目には68%が陽性であった。鼻汁抽出液中にIL-5、IL-13、IL-31は検出されなかった。ECPは誘発1日目には検出されなかったが、2日目の対照ディスクで有意に検出された。トリプターゼは誘発1日目より対照ディスクに比較して花粉ディスクから有意に検出された。ECP、トリプターゼは抗原刺激により誘発症状陰性者でも徐々に増加が見られ、誘発陽性者と必ずしも差が認められなかった。

D. 考察

スギ花粉感作陽性ながら未発症者を対象に、スギ花粉エキスを用いた舌下免疫療法による介入が発症抑制に作用するかどうかを明らかにするべく、プラセボ投与を対照にした2重盲検試験が7大学において延べ300名以上の参加で進んでいる。平成25年の花粉シーズン後にキーオープンされるが、その結果が注目される。

昨年度からスギ花粉症の感作・発症に関連するマーカーを検討しているが、今回その候補遺伝子として、protease inhibitor である Cystatin SN が同定された。Cystatin SN はスギ花粉症患者だけでなく、抗原に対する皮内反応が陽性になる過程で誘導される遺伝子であることが明らかになった。papain やスギ花粉は protease 活性を有しており、Cystatin SN は、上皮における protease に対する” protector” として関与し発症関連マーカーの一つとして考えられる。これまでの検討で候補と考えられたマーカーについては進行中の予防試験の中で検証を行うべく準備が進んでおり、その結果が期待される。

新たな免疫療法のアジュバントならびにデリバリー法として本年度は NKT 細胞免疫系の活用、リポソーム封入体の利用を検討した。マウスでの検討から α -GalCer をパルスした樹状細胞の口腔粘膜下投与は、抗原と同時に投与することで抗アレルギー作用を有効に発現させることが可能で、局所リンパ節における Th1/Th2 バランスの改善や、抗原特異的 IgE 産生の低下が認められた。この結果を基にさらに抗原のデリバリーの向上を目的に抗原封入リポソームを用いた解析に進んでいる。GMP 規格のリポソームが準備され臨床検討も始まる。

一方、花粉飛散室を用いることで花粉症にみられる即時相、遅発相を分けての詳細な検討が可能となった。これまでは、遅発相は鼻閉が中心で患者の約半数でみられると考えられていた。このような従来の鼻粘膜抗原ディスクを用いての鼻粘膜誘発試験の解析と異なり、花粉飛散室で一定時間花粉の曝露を受けることで、退室後に見られる遅発相は全症例で確認され、鼻閉のみならずくしゃみや鼻漏も強く即時相の症状より強い発現も見られた。実際の花粉症の治療では遅発相への対応が非常に重要と考えられたが、発現機序の検討と共に抗原特異的免疫療法の効果を明らかにする必要がある。また、花粉非飛散期の連続鼻粘膜抗原誘発試験の結果からは、スギ花粉症の発症前には主に肥満細胞と好酸球を介した最小持続炎症を認めることが示唆された。発症への T 細胞への関与も示唆される結果であり、さらに発症の機序解明に向けた詳細な検討を進めている。

検診を利用したアレルギー性鼻炎患者に対する治療内容に関するアンケート調査からは、これまで報告されている医療機関での受診患者を対象にした調査、あるいはインターネットを利用した調査結果に比較して、現在の治療に対して満足度が非常に低いことが示されている。広く実施されている欧米では抗原特異的免疫療法は患者満足度が高いことが報告されているが、わが国でも検証していく必要がある。一方で、免疫療法そのものについての患者の認知度は低く、実際の免疫療法の実施に当たっては内容、メリット、デメリットについて十分な情報提供が必要である。

E. 結論

舌下免疫療法によるスギ花粉症発症に対する 2 次介入試験が進んでいる。スギ花粉症の感作・発症におけるマーカーの検討も進み、現在進行中の介入試験でその検証が行われ有力なマーカーが明らかになるものと期待される。一方、従来の治療に対する患者の満足度は低く免疫療法の普及が期待されるが、患者への正しい情報提供が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Inoue H, Mashimo Y, Funamizu M, Yonekura S, Shigtoshi H, Shimojo N, Kohno Y, Okamoto Y, Hata A, Suzuki Y. Association of the MMP9 gene with childhood cedar pollen sensitization and pollinosis. *J Hum Genet on line publication* 1-8, 2012.
2. Uekusa Y, Inamine A, Yonekura S, Horiguchi S, Fujimura T, Sakurai D, Yamamoto H, Hanazawa T, Okamoto Y. Immunological parameters with the development of allergic rhinitis: A preliminary prospective study. *American Journal of Rhinology and Allergy* 26: 92-96, 2012.
3. Inamine A, Sakurai D, Horiguchi S, Yonekura S, Hanazawa T, Hosokawa H, Matuura-Suzuki A, Nakayama T, Okamoto Y. Sublingual administration of *Lactobacillus paracasei* KW3110 inhibits Th2-dependent allergic responses via upregulation of PD-L2 on dendritic cells. *Clinical Immunology* 143: 170-179, 2012.
4. Yonekura S, Okamoto Y, Horiguchi S, Sakurai D, Chazono H, Hanazawa T, Okawa T, Aoki S, Konno A. Effects of aging on the natural history of seasonal allergic rhinitis in middle-aged subjects in South chiba, Japan. *Int Arch Allergy Immunol* 157: 73-80, 2012.
5. Yamamoto H, Yonekura S, Sakurai D, Inamine A, Sakurai T, Iinuma T, Horiguchi S, Okamoto Y. Comparison of nasal steroid with anti-histamine in prophylactic treatment against pollinosis using an environmental challenge chamber. *Allergy and Asthma Proceeding* 33: 397-403, 2012.
6. Yonekura S, Okamoto Y, Shimojo N, Yamamoto H, Sakurai D, Horiguchi S, Hanazawa T, Inoue Y, Arima T, Tomiita M, Kohno Y. The onset of allergic rhinitis in Japanese atopic children: A preliminary prospective

- study. *Acta Otolaryngol* 132: 981-987, 2012.
7. Ono M, Hamada Y, Horiuchi Y, Matsuo-Takasaki M, Imoto Y, Satomi K, Arinami T, Hasegawa M, Fujioka T, Nakamura Y, Noguchi E: Generation of induced pluripotent stem cells from human nasal epithelial cells using a sendai virus vector. *PLoS One*.2012 ; 7(8): e42855.
 8. Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T: A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jul;130(1):184-94.e11.
 9. Yamada T, Saito H, Kimura Y, Kubo S, Sakashita M, Susuki D, Ito Y, Ogi K, Imoto Y, Fujieda S: CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced TSLP production in human laryngeal arytenoid fibroblasts. *Cytokine*. 2012 Feb;57(2):245-50.
 10. Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, saito H, Matsumoto K : Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Geget*. 7:e1002170,2011
 11. Matsumoto Y, Noguchi E, Imoto Y, Nanatsue K, Takeshita K, Shibasaki M, Arinami T, Fujieda S : Upregulation of IL17RB during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergol Int*. 60:87-92,2011
 12. Ishida A, Ohta K, Suzuki Y, Kakehata S, Okubo K, Ikeda H, Shiraiishi H, Izuhara K. Expression of pendrin and periostin in allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis. *AllergologyInt* 61: 589-595, 2012.
 13. Wakabayashi K, Hashiguchi K, Kanzaki S, Fujioka M, Tanaka N, Kawashima K, Suematsu K, Yamamotoya H, Iwasaki M, Gotoh M, Horibe S, Naito K, Okubo K. Puranlukast dry syrup inhibits symptoms of Japanese cedar pollinosis in children using OHIO chamber. *Allergy Asthma Proc* 33: 102-109, 2012.
 14. Higaki T, Okano M, Fujiwara T, Makihara S, Kariya S, Noda Y, Haruna T, Nishizaki K. COX/PGE₂ axis critically regulates effects of LPS on eosinophilia-associated cytokine production in nasal polyps. *Clinical and Experimental Allergy* 42: 1217-1226, 2012.
 15. Ohta N, Makihara S, Okano M, Kurakami K, Ishida A, Furukawa T, Suzuki Y, Watanabe T, Kakehata S, Aoyagi M. Roles of IL-17, Th1, and Tc1 cells in patients with IgG4-related sclerosing sialadenitis. *Laryngoscope* 122: 2169-2174, 2012.
 16. Okano M, Fujiwara T, Makihara S, Fujiwara R, Higaki T, Kariya S, Noda Y, Haruna T, Nishizaki K. Characterization of IL-18 expression and release in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis. *International Archives of Allergy and Immunology* 160: 275-286, 2012.
 17. 意元義政、藤枝重治
 18. スギ花粉症に関する鼻上皮細胞の網羅的遺伝子解析 耳鼻免疫アレルギー 29(3):201-207, 2011
 19. 意元義政、藤枝重治
 20. 網羅的遺伝子解析によるスギ花粉症発症に関する遺伝子解析 臨床免疫・アレルギー科 57: 39-44, 2011
 21. 岡野光博. こどものアレルギー性鼻炎. 耳鼻咽喉・頭頸部外科 84: 23-28, 2012.
 22. 岡野光博. 序～真菌とアレルギー・炎症～. アレルギー・免疫 19: 1041-1042, 2012.
 23. 岡野光博. アレルギー性鼻炎における治験の問題点. アレルギー・免疫 19: 1693-1700, 2012.
 24. 岡野光博. スギ・ヒノキ花粉症に対する免疫療法. 臨床免疫・アレルギー科 58: 689-696, 2012.
2. 学会発表
 1. 櫻井利興、稲嶺絢子、飯沼智久、米倉修二、櫻井大樹、石井保之、中山俊憲、岡本美孝. α -GalCer-AG DCの口腔粘膜下投与におけるアレルギー性鼻炎炎症の抑制機序の解明. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012年. 大阪市.
 2. 櫻井利興、稲嶺絢子、舩越うらら、米倉修二、櫻井大樹、岡本美孝. α -GalCerパルスDCの口腔粘膜投与におけるアレルギー性鼻炎炎症の抑制機序の解明. 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2013年. 倉敷市.
 3. 森田慶紀他. 千葉市内中学生を対象とするアレルギー性鼻炎の治療法とその効果に関するアンケート調査. 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012年. 大阪市.
 4. 竹内万彦、坂井田 寛、増田佐和子、岡本美孝. 小中学生を対象としたアレルギー性鼻炎に対する治療の実態と治療に対する満足度調査. 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2013年. 倉敷市.
 5. 坂井田 寛、増田佐和子、竹内万彦. 鼻汁中のスギ特異的IgE抗体測定を試み. 第31回日本耳鼻咽喉科免疫

アレルギー学会. 2013年. 倉敷市.

6. 坂井田 寛、岩田賢治、山崎皓亮、増田佐和子、竹内万彦. スギ花粉症未発症者におけるスギ花粉の感作に及ぼす因子の検討. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012年. 大阪市.
7. 岡野光博. スギ・ヒノキ花粉症に対する免疫療法. 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会. 大阪. 2012年(シンポジウム).
- 8.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1、特許取得

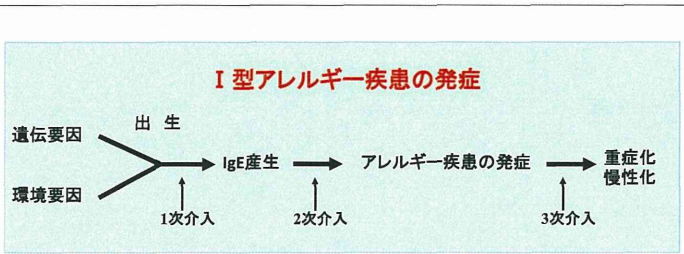
なし

2、実用新案登録

なし

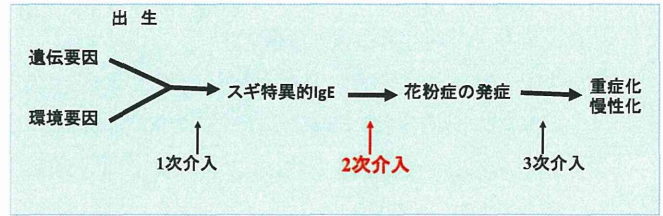
3、その他

なし



研究目的

- ・花粉症の発症予防に向けた研究を行う。
- ・現在の花粉症治療の課題を明らかにする。
- ・免疫療法の展開とガイドライン作成を目指す。



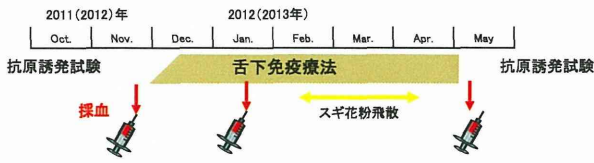
**・抗原特異的免疫治療(舌下免疫療法)による2次介入の検討:
舌下免疫ワクチン**

多施設共同2重盲検試験;

- ・主要評価項目: スギ花粉飛散後のスギ抗原誘発試験による発症の有無の確認
- ・副次的評価項目: パラメーターの変動

スギトリイエキス®2000JAU: 季節前連日投与 2011年~

参加者: スギ花粉感作陽性だが、これまで未発症、スギ抗原誘発陰性者(抗原誘発試験で確認)
 ランダム化: 中央登録 = 1:1 の配分、割付け因子は年齢、スギ花粉特異的IgE値
 介入: 実薬群・標準化アレルギー治療エキス「トリイ」スギ花粉による舌下免疫治療
 偽薬群・偽薬(基剤)による舌下免疫治療
 投与方法: Sublingual Spit.連日
 維持量: 2000JAU /回、60,000JAU /月
 期間: 2011年12月~2012年4月の5ヶ月間、2012年12月~2013年4月の5ヶ月間
 スギ花粉飛散前後に採血を行い、血清とPBMOを凍結保存。



各年に参加同意者約400名の血清抗体価、皮膚テスト、鼻粘膜抗原誘発テスト

2011年12月~2012年4月;154名参加:23名がスギ花粉症を発症

2012年12月~2013年4月;160名参加試験中:

2013年6月にキーオープン

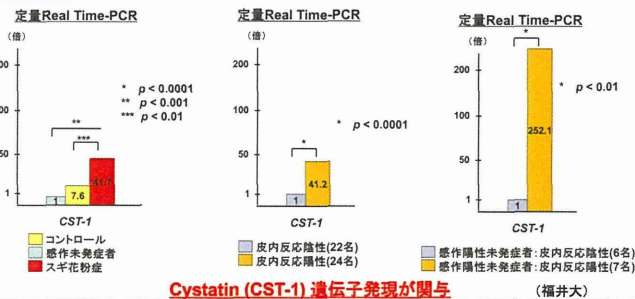
- ・主要評価項目: 花粉飛散後のスギ抗原誘発試験による発症の有無の確認
舌下免疫による早期介入で発症が抑制できるか。
- ・副次的評価項目: パラメーターの変動
プラセボ群での発症/非発症者の比較検討から
実薬群での発症/非発症者の比較検討から
実薬群とプラセボ群での違い

スギ花粉の感作・発症に関連遺伝子の同定

【対象】
 スギ花粉症患者
 スギ特異的IgE陽性、スギ花粉飛散時期に花粉症症状あり
 感作陽性未発症者
 スギ特異的IgE陽性、スギ花粉飛散時期に花粉症症状なし
 コントロール
 吸入抗原7項目に対して特異的IgE陰性、花粉症症状なし
 スギ花粉飛散期に鼻粘膜上皮細胞を擦過し、網羅的に遺伝子発現解析

マイクロアレイ結果(鼻粘膜擦過細胞): 2009年
 コントロールに対するスギ花粉症患者の遺伝子発現倍率

gene	fold change	q-value	gene	fold change	q-value
CYP11B1	-7.1	0.030	CD69	4.3	0.033
BDN	-4.7	0.024	TMEM100	4.3	0.026
DOXA2	-4.3	0.038	MUC2	5.5	0.024
FBXW7	-4.3	0.038	GPA3	6.3	0.030
STES14	-4.0	0.023	CCL26	6.5	0.024
NOS2A	4.0	0.026	GSTT1	13.6	0.026
RPS9	4.0	0.024	CLC	16.7	0.024
PINCK	4.1	0.023	ITIH1	17.6	0.024
CDH26	4.1	0.024	CS71	191.4	0.024

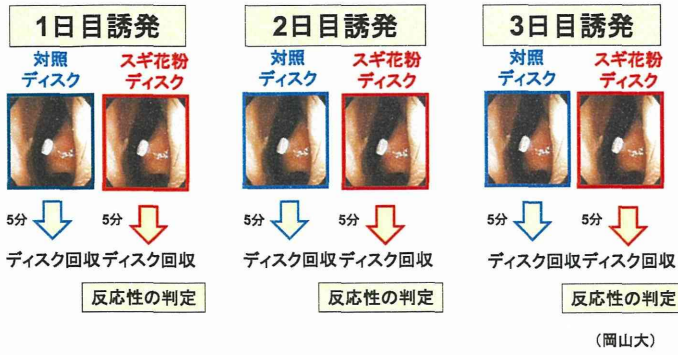


Cystatin (CST-1) 遺伝子発現が関与 (福井大)

発症のパラメーター

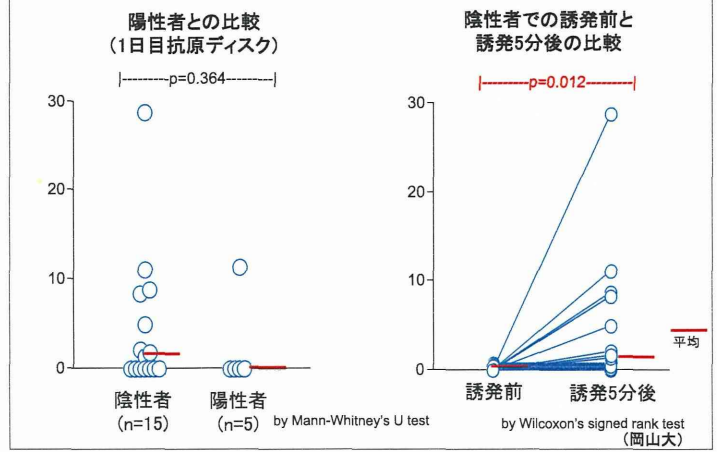
- ・花粉飛散前後での **血清 sIgE/tIgE ratio** の変動(全参加施設)
- ・ **Cry j** 特異的Th2細胞の変動(千葉大)
- ・鼻粘膜上皮細胞の **Cystatin-1, Intelectin-1** の発現(福井大)
- ・ **Cry j** 特異的制御性 T 細胞の変動(三重大、千葉大)
- ・舌下免疫有効例で治療後早期に増加するPBMCの **CCL2** などの発現(千葉大)

花粉非飛散期にスギ花粉ディスクによる鼻粘膜抗原誘発試験
—3日間連続実施—



7

鼻汁中トリプターゼ濃度の検討



8

アレルギー性鼻炎治療に対する実態調査

調査対象やバイアスを防ぐため検診参加者を対象

- ・医療機関でその機関の受診患者を対象としない
- ・インターネットを利用した調査は一般患者と乖離がある

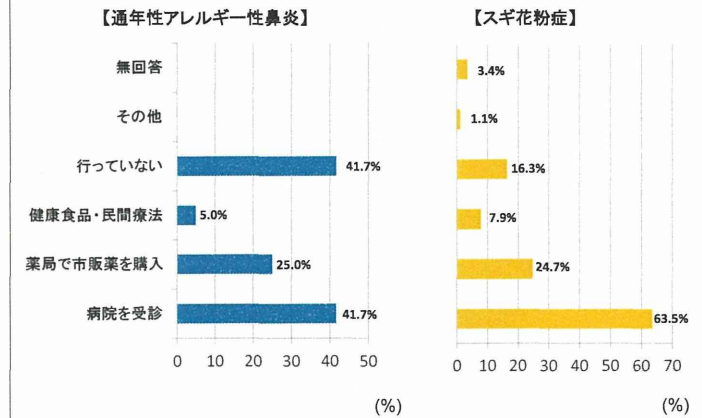
【方法】 質問紙形式調査

- | | |
|--------------|-------------|
| 1,年齢、発症時期 | 6,治療の費用 |
| 2,原因抗原 | 7,治療の満足度 |
| 3,最近1年間の治療内容 | 8,治療への不満の理由 |
| 4,病院での治療の効果 | 9,今後希望する治療 |
| 5,OTCの治療の効果 | |

これまで3080名のアレルギー性鼻炎患者を対象に調査を実施(千葉大、三重大)

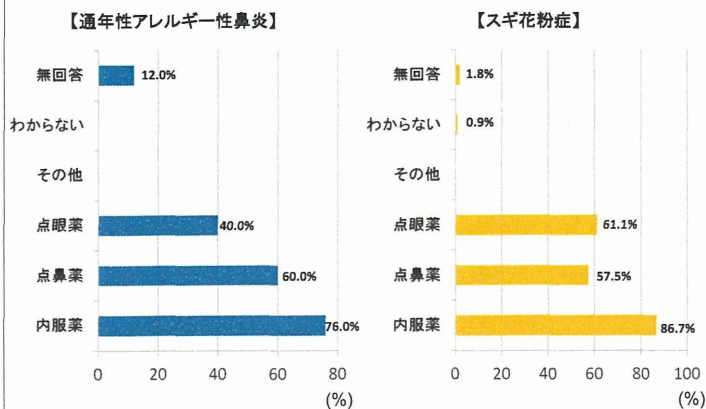
9

【成人】最近一年間の治療(複数回答可)



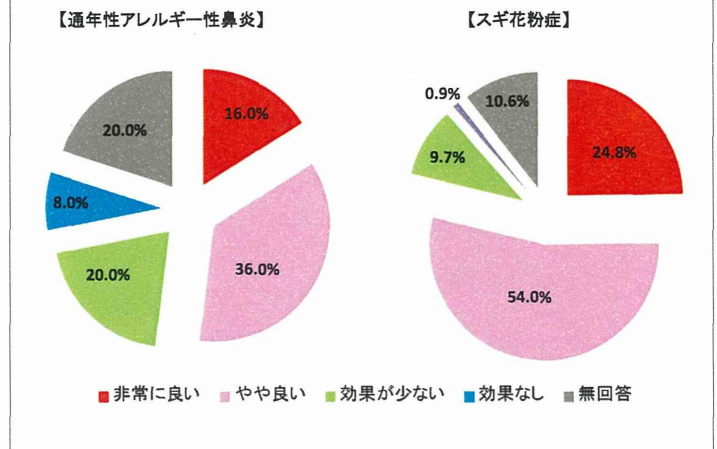
10

【成人】病院での治療の詳細(複数回答可)



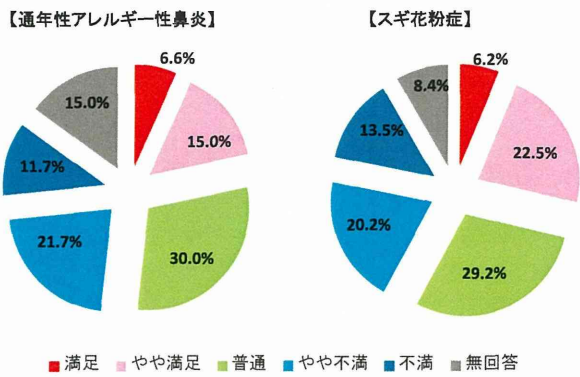
11

【成人】病院治療の効果



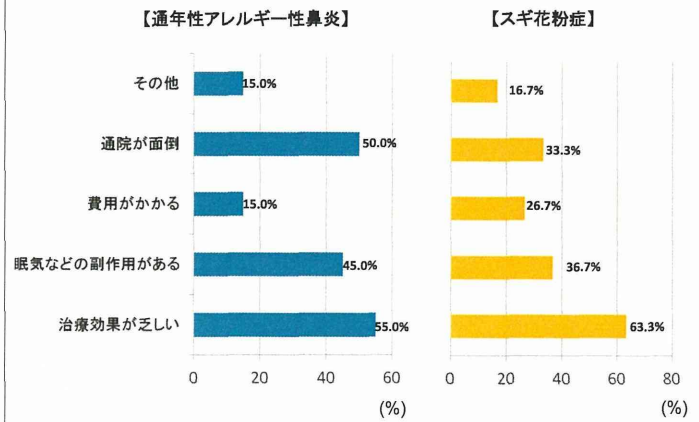
12

【成人】患者の満足度



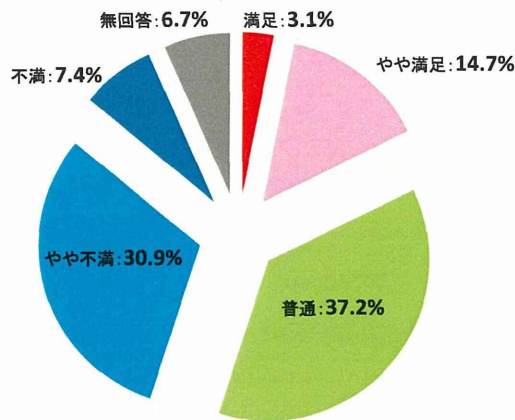
13

【成人】不満の理由(複数回答可)



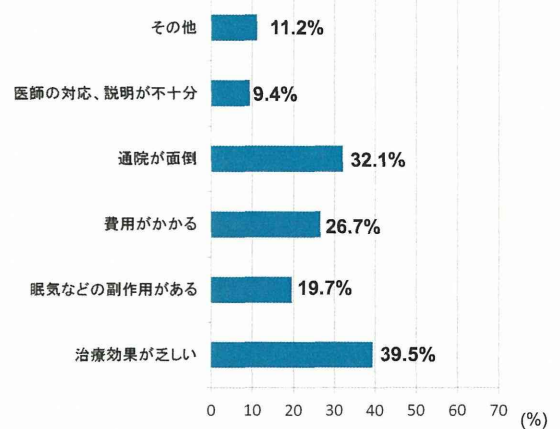
14

【小児】患者(保護者)の満足度



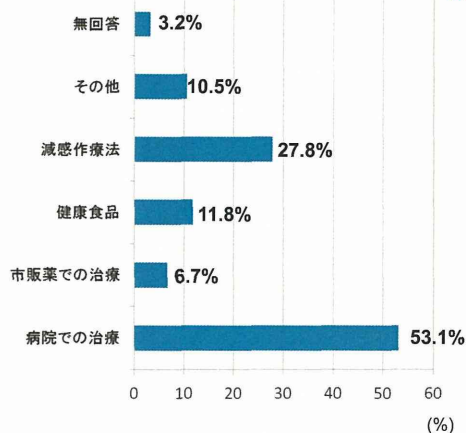
15

【小児】不満の理由(複数回答可)



16

【小児】今後どのような治療を受けてみたいか (複数回答可)



17

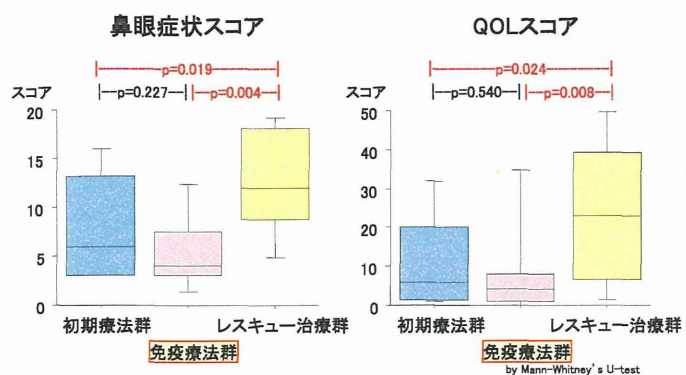
現状のアレルギー性鼻炎に対する治療満足度は低い

- ・治療効果への不満
- ・頻回な通院への不満
- ・副作用の不安
- ・費用

免疫療法は期待できる治療法。

18

患者のQOL評価 -スギ花粉最大飛散期-



免疫療法は単独治療でも薬物療法以上の高いQOLの維持を示す
薬物使用量 (Mediationスコア) を減少させる (岡山大)

舌下免疫療法の奏功機序と発症予防についての検討

研究分担者 岡本 美孝 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 教授
研究協力者 米倉 修二 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 助教
稲嶺 絢子 千葉大学グローバル COE 特任研究員
山本 陸三朗 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 医員
大熊 雄介 千葉大学大学院医学研究院院生

研究要旨

1、免疫療法による花粉症の発症の予防に対する有効性を明らかにするため、スギ花粉感作陽性でかつ未発症者を対象に、スギ花粉エキスをを用いた舌下免疫療法の発症予防効果を明らかにする介入試験を、プラセボエキス（溶剤）を対照として2重盲検試験により実施した。参加41名中13名に新規の発症が確認された。未発症者は盲検性を保ったまま本年度12月から試験を再度継続した。また新規参加者も含めて試験を行った。（キーオープンは平成25年度）

2、舌下免疫療法の機序の解明を目的に、花粉飛散室での検討を行った。花粉飛散室内での3時間の花粉曝露により、全員に退室後にもくしゃみ、鼻漏、鼻閉症状が持続し、鼻汁中にはTh2サイトカイン、ECP、ロイコトリエン、さらにヒスタミン、トリプターゼの増加が遅発相に認められた。CD203陽性細胞も高頻度に検出された。舌下免疫療法群ではプラセボ群に比較して特に遅発相での症状の改善傾向が認められた。

A. 研究目的

スギ花粉症患者の増加が認められるが、一方で感作陽性ながら未発症者も多い。本研究班の目的は、発症の機序、バイオマーカーを明らかにし、さらに免疫治療による介入によって発症の予防が可能かどうかを検討することであるが、感作陽性未発症者をエントリーして翌年度の花粉尘散期で発症への予防効果、発症の機序に関する検討を進める。また、花粉飛散室を用いることで花粉症の即時相、遅発相を分けて評価することが可能であるが、花粉症の症状、病態、さらに舌下免疫療法が及ぼす影響を飛散室を使用した臨床試験で明らかにする。

B. 方法

(1) スギ花粉に感作陽性ながらこれまで発症したことが無い成人を対象に検討を行った。2011年12月からトリイスギ花粉エキス2000JAU連日舌下投与をプラセボ投与対照に2重盲検試験として2012年4月末まで実施した。スギ花粉飛散期の自覚症状、ならびに誘発試験にて発症の有無を確認した。13名の発症が確認された。スギ花粉シーズ

ン前の12月とシーズン後の5月採血を行い、CAP-RAST以外に総IgE値、Cry j-1特異的Th2細胞数、Cry j-1特異的制御性T細胞数、末梢血細胞の遺伝子発現解析を進めた。

(2) スギ花粉症患者15名を対象に千葉大学亥鼻の花粉尘散室でスギ花粉の曝露試験を行い、詳細な症状解析と花粉飛散入室前、退室時、退室6時間後に、鼻腔NO値、鼻呼吸抵抗、鼻腔有効断面積を測定した。また、鼻汁を採取して各種炎症メディエーター、サイトカインを解析した。舌下免疫療法の2重盲検試験参加者に花粉飛散室での試験曝露を行い、即時相、遅発相での効果、メディエーターについて解析を行った。

C. 結果

(1) 予防試験参加者は41名で平均年齢は34.4歳、RAST平均値は2.90であった。このうち13名が新規発症したが、その平均年齢は32.7歳で平均RAST値は2.77だった。キーオープンはせずに盲検性を保ったまま2012年12月からの再度舌下免疫療法を開始した。さらに

2012年からは新規に30名が参加した。2013年5月にキーオープンの予定である。

(2) 花粉飛散室内での3時間の花粉曝露により、全員で鼻症状が発現したが退室後にもくしゃみ、鼻漏、鼻閉症状が持続した。鼻汁中にはIL-5, IL-13などのTh2サイトカイン、ECP, ロイコトリエンの有意な増加が花粉飛散室退室後に認められたが、興味深いことに退室6時間後の鼻汁中にヒスタミンの増加が見られ、トリプターゼも高濃度に検出された。鼻汁細胞診ではCD203陽性細胞が多数確認された。舌下免疫療法受療者では、プラセボ群と比較して特に遅発相での改善傾向が目立った。

D. 考察

千葉県では2012年の花粉飛散は平年よりやや少なかったが、新規の発症が約30%に認められた。試験はキーオープンせずに継続しており、さらに新規参加も加わって行われている。花粉症では一定の花粉曝露を浴びると鼻閉のみならず、くしゃみや鼻漏も含めた遅発相が全員に出現し、ヒスタミンの関与も大きい。舌下免疫の作用機序についての解析に有用である。

E. 結論

スギ花粉症発症予防試験が進んでおり、来春のキーオープンが待たれる。血液サンプルの解析から予防効果のみならず発症機序の解析も進むと期待される。花粉飛散室を用いた即時相、遅発相への免疫療法の作用機序についても明らかになると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Inoue H, Mashimo Y, Funamizu M, Yonekura S, Shigtoshi H, Shimojo N, Kohno Y, Okamoto Y, Hata A, Suzuki Y. Association of the MMP9 gene with childhood cedar pollen sensitization and pollinosis. *J Hum Genet on line publication* 1-8, 2012.
2. Uekusa Y, Inamine A, Yonekura S, Horiguchi S, Fujimura T, Sakurai D, Yamamoto H, Hanazawa T, Okamoto Y. Immunological

parameters with the development of allergic rhinitis: A preliminary prospective study. *American Journal of Rhinology and Allergy* 26: 92-96, 2012.

3. Inamine A, Sakurai D, Horiguchi S, Yonekura S, Hanazawa T, Hosokawa H, Matuura-Suzuki A, Nakayama T, Okamoto Y. Sublingual administration of *Lactobacillus paracasei* KW3110 inhibits Th2-dependent allergic responses via upregulation of PD-L2 on dendritic cells. *Clinical Immunology* 143: 170-179, 2012.
4. Yonekura S, Okamoto Y, Horiguchi S, Sakurai D, Chazono H, Hanazawa T, Okawa T, Aoki S, Konno A. Effects of aging on the natural history of seasonal allergic rhinitis in middle-aged subjects in South chiba, Japan. *Int Arch Allergy Immunol* 157: 73-80, 2012.
5. Yamamoto H, Yonekura S, Sakurai D, Inamine A, Sakurai T, Inuma T, Horiguchi S, Okamoto Y. Comparison of nasal steroid with anti-histamine in prophylactic treatment against pollinosis using an environmental challenge chamber. *Allergy and Asthma Proceeding* 33: 397-403, 2012.
6. Yonekura S, Okamoto Y, Shimojo N, Yamamoto H, Sakurai D, Horiguchi S, Hanazawa T, Inoue Y, Arima T, Tomiita M, Kohno Y. The onset of allergic rhinitis in Japanese atopic children: A preliminary prospective study. *Acta Otolaryngol* 132: 981-987, 2012.

2. 学会発表

1. 櫻井利興、稲嶺絢子、飯沼智久、米倉修二、櫻井大樹、石井保之、中山俊憲、岡本美孝. α -GalCer-Ag DCの口腔粘膜下投与におけるアレルギー性鼻炎炎症の抑制機序の解明. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012年. 大阪市.
2. 櫻井利興、稲嶺絢子、船越うらら、米倉修二、櫻井大樹、岡本美孝. α -GalCerパルスDCの口腔粘膜投与におけるアレルギー性鼻炎炎症の抑制機序の解明. 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2013年. 倉敷市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1、特許取得

なし

2、実用新案登録

なし

3、その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究年度終了報告書

アレルギー性鼻炎診療に対するアンケート調査と α -GalCer を利用した二次介入の検討

研究分担者 櫻井 大樹 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 講師
研究協力者 米倉 修二 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 助教
稲嶺 絢子 千葉大学特任研究員 (G-COE)
櫻井 利興 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉・頭頸部腫瘍学 医員

研究要旨

アレルギー性鼻炎の患者数は増加しており、患者の治療動向や、効果・満足度の把握は今後の治療を考える上で重要である。今回のアレルギー性鼻炎診療に対するアンケートから、現治療で十分に満足のおく効果が得られていない実態と、根治的な治療法となりうる特異的免疫治療への期待が高いことが明らかとなってきた。この実態からも予防治療の確立は課題であり、NKT細胞免疫系を利用した新たな治療法の可能性について検討を行った。 α -GalCer と抗原をパルスした樹状細胞やliposomeを用いた口腔粘膜下投与は、抗アレルギー作用を有効に発現させることが可能であることが示された。これらの症状変化は、局所リンパ節におけるTh1/Th2バランスの改善や、抗原特異的IgE産生の低下に起因する可能性が示唆された。この作用により舌下免疫療法の治療効果を増強することで有効な二次介入となる可能性が示唆された。

A. アレルギー性鼻炎の患者数は近年増加し、患者の治療動向・効果・満足度の実態把握は今後の治療を考える上で重要である。薬剤治療は近年治療効果が向上しているが、対症療法にとどまっている。特異的免疫療法は、アレルギー性鼻炎に対し唯一自然経過を改善しうる治療法であり、舌下免疫療法は従来の副作用などの問題を大きく軽減する方法として期待されている。しかし良好な治療効果を得るには複数年の投与が必要である。一方、NKT細胞は高い免疫調節能を持ち、糖脂質の α -Galactosylceramide (α -GalCer)によって活性化する。NKT細胞免疫系を利用して、花粉症に対し早期に高い治療効果を発揮し、有効な二次介入となりうる新たな治療法の可能性について検討した。

B. 研究方法

1) 病院外において一般のアレルギー性鼻炎患者を対象に、これまでの治療内容、効果、費用、満足度、不満の理由、今後希望する治療についてアンケートによる調査を継続して行った。

2) アレルギー性鼻炎モデルマウスを用い、誘導した樹状細胞を α -GalCer および抗原でパルスし、感作後のマウスの口腔底粘膜下に投与した。抗原点鼻による症状誘発を行った後、鼻症状・免疫学的パラメーターの解析、症状抑制機序の検討を行った。さらに α -GalCer および抗原を包み込むリン脂質二重層で形成されるナノカプセルの liposome を用いた舌下投与の検討を開始した。

(倫理面への配慮)

アレルギー性鼻炎に対するアンケート調査にあつ

ては、参加者に十分な説明を行い、同意を得て行われた。調査の内容や実施法については千葉大学内の倫理委員会に申請し、許可を得て行われた。動物実験にあたっては、動物実験に対して動物愛護の面からの配慮を最大限払って行い、学内の実験動物実施規定を遵守し、委員会の許可を得て行われた。

C. 研究結果

1) 患者背景は10歳未満から70歳代と幅広い年齢層に渡り、通年性319名、スギ花粉症295名より回答を得た。小児は通年性、成人は花粉症が大多数を占めていた。小児では80%程度が、成人では40-60%程度が病院を受診していた。成人の通年性アレルギー性鼻炎で無治療の割合が高かった。治療に対する満足度は、通年性・花粉症ともやや満足以上の割合は30%に及ばず、不満の割合は両者とも30%を超えていた。不満の理由として、小児・成人ともに効果不十分の割合が最も高く、治療効果はある程度認められるものの、患者はさらに高い効果を望んでいる可能性が示唆された。今後の治療に関して、小児では27-31%が、成人では15-25%が免疫治療に期待していた。

2) α -GalCer と抗原でパルスした樹状細胞投与群では症状の有意な改善を認め、特異的IgE値の低下、リンパ節T細胞からのTh2型サイトカインの産生抑制、IFN- γ 産生増加を認めた。また頸部リンパ節においてIgEクラススイッチ抑制作用のあるIL-21の遺伝子発現が有意に上昇していたが、抗IL-21抗体、抗IFN- γ 抗体の腹腔投与により、認められた症状抑制やIgE値の低下は解除されることを確認した。 α -GalCer と抗原を包んだ liposome の口腔底粘

膜下投与は有意な症状改善を誘導した。

D. 考察

アレルギー性鼻炎の罹患年数は 10 年以上と長い患者が多かったが、通年性では無治療の患者も多く、長期にわたる通院の困難さが示唆される。現治療に対する効果や副作用に対する不満も多い一方、今後希望する治療として根治的な治療法となりうる減感作療法への期待が高いことも明らかとなった。また α -GalCer と抗原をパルスした樹状細胞や liposome を用いた口腔粘膜下投与は、抗アレルギー作用を有効に発現させることが可能であった。これらの症状変化は、局所リンパ節における Th1/Th2 バランスの改善や、抗原特異的 IgE 産生の低下に起因する可能性が示唆された。

E. 結論

アレルギー性鼻炎診療に対するアンケート調査から、小児・成人とも現治療では十分に満足のおく効果が得られていない実態と、根治的な治療法となりうる減感作療法への期待が高いことが明らかとなった。この実態からも予防治療の確立は大きな課題であり、抗原と α -GalCer の舌下投与による NKT 細胞免疫系を利用した新たな免疫療法は、有効な二次介

入になる可能性が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 櫻井利興、稲嶺絢子、飯沼智久、米倉修二、櫻井大樹、石井保之、中山俊憲、岡本美孝. α -GalCer- Ag DC の口腔粘膜下投与におけるアレルギー性鼻炎炎症の抑制機序の解明. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2012. 大阪市.

2) 櫻井利興、稲嶺絢子、船越うらら、米倉修二、櫻井大樹、岡本美孝. α -GalCer パルス DC の口腔粘膜投与におけるアレルギー性鼻炎炎症の抑制機序の解明. 第 31 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2013 年. 倉敷市.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【平成 24 年度報告書】

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

スギ花粉症発症に関する遺伝子の同定

研究分担者 藤 枝 重 治 福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授
研究協力者 坂 下 雅 文 福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 助教
意 元 義 政 福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 助教

研究要旨：

スギ花粉症患者がなぜ現代において急激に増加しているか未だに解明されていない。一方で、血清スギ特異的 IgE を有していながら発症していない感作陽性未発症者も存在していることが知られている。しかし、この感作陽性未発症者に関する研究はほとんどされておらず、どのような変化が生体に生じたのちにスギ花粉症が発症するか、あるいはなぜ発症しないのか詳しいメカニズムは解明されていない。スギ花粉症発症に関連する遺伝子を同定するために、スギ花粉飛散期に鼻上皮細胞を擦過、採取し、これらの mRNA について網羅的遺伝子解析を行った。対象はスギ花粉症発症者、スギ特異的 IgE 陽性未発症者、および非アレルギー者の 3 群間で比較検討をした。鼻上皮細胞ではスギ花粉症患者群とコントロール群において、発現差が 4 倍以上かつ $p < 0.05$ の 18 遺伝子を同定し、そのうちの一つである Cystatin SN (CST-1) がスギ花粉症患者において高発現していた。また、感作陽性未発症者のうちスギ抗原に対する皮内反応が陽性である対象者も CST-1 の発現が高く、感作から発症における重要な因子である可能性が示唆された。アレルギー性鼻炎患者の下甲介粘膜の免疫組織化学では、CST-1 は鼻粘膜上皮細胞と線維芽細胞に発現していることを確認できたが、正常粘膜においては CST-1 の発現は認めなかった。鼻粘膜上皮培養細胞では、CST-1 はパパインとスギ花粉により発現が誘導された。

A. 研究目的

スギ花粉症患者が年々増加し、患者の低年齢化が進んでいることは、日本における社会問題の一つとなっている。これまで福井における一般集団約 3300 人の調査で、約 60% がスギ花粉に対する血清特異的 IgE を有し、他の吸入系アレルゲンと比較して最も感作率が高いということが判明した。そのうちの 27.8% は血清スギ特異的 IgE を有しながら、これまで全くスギ花粉症の症状を認めてなく、この感作陽性未発症者がどのように発症に至るかは未だに解明されていない。本研究では、スギ花粉症発症者と非発症者（感作陽性未発症者と非アレルギー者）における鼻粘膜細胞の遺伝子を網羅的に解析し、発症に至るまでの過程で候補遺伝子が発現誘導されるかを確認すること、またその発現部位と発現様式を同定し、鼻粘膜上皮細胞において、関連遺伝子がどの刺激により誘導され、アレルギー炎症に関与するかを解明することを目的とする。

B. 研究方法

【対象】

スギ花粉症患者群（血清スギ特異的 IgE、Immuno-CAP スコア 2 以上、2 年以上スギ花粉飛散時期での有症者）とコントロール群である非アレルギー一群（7 項目吸入アレルゲン特異的 IgE 陰性、無症

状者）を抽出した。特異的 IgE はスギ、ヤケヒョウヒダニ、コナヒョウヒダニ、カモガヤ、ブタクサ、アスペルギルス、カンジダの 7 項目を測定した。同時に、血清スギ特異的 IgE が陽性でありながら、これまで全くスギ花粉症の症状を認めていない感作陽性未発症者も抽出した。これらの群は、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーの既往は認めていない対象者を選んだ。スギ花粉症患者群と感作陽性未発症者群では、血清スギ特異的 IgE のみ陽性であり、他の 6 項目は陰性である者を選択した。

【方法】

1. 遺伝子発現解析

鼻粘膜上皮細胞はスギ花粉飛散中である 3 月中旬に、下甲介粘膜を細胞診用ブラシで数回擦過し採取した。スギ花粉飛散が毎年異なるため、2009 年と 2010 年の 2 年に分けてサンプルを採取した。採取した細胞をすぐに TRIzol (Invitrogen, Leek, the Netherlands) に溶解し、 -80°C で保存した。Total RNA の抽出には、miRNeasy Mini キット (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いた。Total RNA (100–500ng) から、Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) により、ビオチンラベル化した cRNA を合成し、HumanRef-8 ver3 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) によってマイクロアレイの解析を行った。アレイの蛍光強度は BeadsStation 500X 遺伝子発現解析システム (Illumina) により検討した。抽出し

た total RNA から cDNA を合成し、定量的 PCR を行った。遺伝子の内在性コントロールとして Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) で定量的 PCR を行った。PCR 反応におけるプロトコールは、95°C 10 分後 PCR による増幅サンプルが指数関数的に起こる領域で、一定の増幅産物になるサイクル数 (Threshold Cycle; Ct) を検出し、各遺伝子発現量は GAPDH の発現量に対する比を $\Delta\Delta Ct$ 法で算出した。

2. 免疫組織化学

免疫組織化学は、CST-1 に対するポリクローナル抗体 (Abnova) と、ヒツジ IgG に対する 2 次抗体 (R&D) を使用した。染色に用いた組織は福井大学において手術時に採取されたアレルギー性鼻炎患者の下甲介粘膜を用いた。

3. 鼻粘膜上皮細胞培養

鼻粘膜上皮細胞初代培養細胞株は、通年性アレルギー性鼻炎かつスギ花粉症患者から樹立した。RNA 用の鼻粘膜上皮細胞回収と同様に数回擦過し、すぐにペニシリン (100 unit/ml) とのストレプトマイシン (100 μ g/ml) を含む培養液に回収した。培養した鼻粘膜上皮細胞を 37°C、5%CO₂ のインキュベーターにて培養し、LPS、IFN- γ 、TNF- α 、ヒスタミン、IL-4、IL-13、IL-33、パパイン、スギ花粉、Cryj-1 を添加し、刺激後 15 時間後に細胞を回収し、RNA 抽出した。

(倫理面への配慮)

本研究は福井大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。鼻粘膜細胞の採取は、福井大学規程に則り、患者もしくはボランティアから文書での研究材料使用承諾書を取り、行った。

C. 研究結果

1. 遺伝子発現解析

2009 年度の鼻粘膜上皮擦過細胞におけるマイクロアレイの解析では、スギ花粉症群とコントロール群との間で 4 倍以上有意な発現変化を認めた遺伝子は 18 遺伝子であった。18 遺伝子のうち 5 遺伝子は好酸球に高く発現している遺伝子であった。スギ花粉症群で 10 倍以上遺伝子発現上昇が認められた遺伝子は 4 遺伝子であり、その一つである CST-1 は 151.4 倍発現が上昇していた。定量的 PCR の結果でも、スギ花粉症群が非アレルギー群と比較して有意に高い ($p < 0.0001$) ことを再確認できた。2010 年度のサンプルにおいてもスギ花粉症患者では感作陽性未発症者とコントロール群と比較して、CST-1 の発現が有意に高いことを定量的 PCR で確認した。次に感作陽性未発症者のうちスギ抗原に対する皮内反応で陽性を示す群と陰性を示す群を比較すると、皮内反応陽性者では CST-1 の発現が有意に上昇

していた。

2. 免疫組織化学

通年性アレルギー性鼻炎患者の下鼻甲介粘膜を用いた免疫組織化学では、CST-1 は鼻粘膜上皮細胞と線維芽細胞に発現していた。

3. 鼻粘膜上皮細胞培養及び線維芽細胞培養

鼻粘膜上皮細胞の初代培養細胞を用いてどの刺激が CST-1 を誘導するかを調べた。LPS、IFN- γ 、TNF- α 、ヒスタミン、IL-4、IL-13、IL-33、パパイン、スギ花粉、Cryj-1 (スギ精製抗原) で 15 時間刺激をするとパパインとスギ花粉の刺激により CST-1 は発現誘導された。他の刺激では CST-1 の発現は認めなかった。次に recombinant CST-1 をスギ花粉と 37°C で 30 分間 incubation し、スギ花粉のみの刺激とを鼻粘膜における ZO-1 への影響を調べた。その結果スギ花粉刺激では、鼻粘膜の ZO-1 の mRNA が減少したのに対し、CST-1 と共培養を行ったものでは ZO-1 の mRNA の発現が減少せず、非刺激の状態に保たれる事が判明した。

D. 考察

鼻粘膜擦過細胞においては多数の遺伝子変化が認められた。これは鼻粘膜擦過細胞には鼻粘膜上皮細胞をはじめアレルギー炎症に関する様々な血球成分、鼻粘膜を構築する細胞が含まれている結果と推測される。鼻は常に様々な病原体や抗原にさらされているため、容易に生体に抗原が入らないように、あるいは排除するバリア機能を有している。スギ花粉飛散時期における鼻粘膜擦過細胞のマイクロアレイの結果はアレルギー炎症のみならず、鼻粘膜のバリア機構を明確に反映している結果と考えられる。

CST-1 の発現に関連する因子としては、生体において、スギ抗原に対し皮内反応が陽性になることが一つの要因として考えられる。つまり CST-1 の発現は非感作→感作陽性未発症 (皮内反応陰性)→感作陽性未発症 (皮内反応陽性)→発症の順に上昇すると考えられる。抗原に対する皮内反応には好塩基球や肥満細胞が抗原と反応しヒスタミンが遊離される。この反応が生体内で生じる過程で CST-1 は発現誘導がおきる。CST-1 は protease inhibitor の一つである。スギ花粉などの抗原はさまざまな protease を有しており、これらが上皮に作用すると PAR-2 (protease associated receptor-2) を介し IL-33 や TSLP が放出され、アレルギー炎症を誘導すると近年報告されている。CST-1 は抗原の protease 活性に対し、防御因子として生体から誘導され、上皮におけるバリア機能をより安定化するために重要な役割を担っている可能性があると考えられる。

E. 結論

以上の研究成果より、アレルギー性鼻炎に関連する遺伝子を同定できた。それぞれの遺伝子は異なった発現パターンを示し、発症にいたる様々な過程で誘導されることが判明した。CST-1 は感作から発症に関連する遺伝子であり、抗原に対する上皮のバリア機能を安定させることが推測された。

F. 健康危険情報

本研究における健康有害状況は認めなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ono M, Hamada Y, Horiuchi Y, Matsuo-Takasaki M, Imoto Y, Satomi K, Arinami T, Hasegawa M, Fujioka T, Nakamura Y, Noguchi E.: Generation of induced pluripotent stem cells from human nasal epithelial cells using a sendai virus vector. PLoS One.2012 ; 7(8):e42855.

Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T.: A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol. 2012 Jul;130(1):184-94.e11.

Yamada T, Saito H, Kimura Y, Kubo S, Sakashita M, Susuki D, Ito Y, Ogi K, Imoto Y, Fujieda S.: CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced TSLP production in human laryngeal arytenoid fibroblasts. Cytokine. 2012 Feb;57(2):245-50.

Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, saito H, Matsumoto K : Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. PLoS Geget. 7:e1002170,2011

Matsumoto Y, Noguchi E, Imoto Y, Nanatsue K, Takeshita K, Shibasaki M, Arinami T, Fujieda S : Upregulation of IL17RB during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis. Allergol Int. 60:87-92,2011

意元義政、藤枝重治

スギ花粉症に関する鼻上皮細胞の網羅的遺伝子解析 耳鼻免疫アレルギー 29(3):201-207,2011

意元義政、藤枝重治

網羅的遺伝子解析によるスギ花粉症発症に関する

遺伝子解析 臨床免疫・アレルギー科 57: 39-44,2011

2. 学会発表

意元義政、藤枝重治: スギ花粉症未発症者の検討. 第30回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会,2012.2

Imoto Y, Fujieda S: Identification of genes that related to seasonal allergic rhinitis by Japanese cedar pollen. The 14th Japan-Korea joint meeting of Otorhinolaryngology Head & Neck Surgery,2012.4

Imoto Y: Detection of genes related to seasonal allergic rhinitis caused by Japanese cedar pollen using microarray analysis: East Asia Allergy Symposium 2012,2012.5

意元義政、坂下雅文、藤枝重治: アレルギー性鼻炎患者におけるBAT検査の有用性. 第24回日本アレルギー学会秋季学術大会,2012.5

意元義政、藤枝重治: スギ花粉症の感作・発症に関する遺伝子解析. 第51回日本鼻科学会総会,2012.9

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし