

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

発生工学を用いたアスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明

研究分担者 長瀬 隆 英 東京大学大学院医学系研究科呼吸器内科学 教授
研究協力者 石井 聡 東京大学大学院医学系研究科 准教授

研究要旨：

NSAIDs 不耐症の一型であるアスピリン喘息は、発症頻度や緊急性・重篤性において極めて重大な疾患であり社会的にも注目されている。気管支喘息、特にアスピリン喘息の発症機序については未解明の部分が多く、その解明には関連遺伝子の探索を含めた研究が必須と考えられる。また、アスピリン喘息については、世界的にも動物モデルが報告されていない。近年、遺伝子改変マウスが次々と開発されており、疾患関連遺伝子の解明に有用であることが報告されている。気管支喘息の発症分子機序の解明についても、実験動物としての遺伝子改変マウスを用いた研究が重要であることが考えられる。本研究では、炎症メディエーターに関する遺伝子改変マウスを作成し、喘息モデルを用いてアスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明を目指す。今後、遺伝子改変マウスを活用することにより、さらに各々の遺伝子・蛋白系の病態生理学的意義・重要性が解明され、気管支喘息・アスピリン喘息治療への貢献が期待される。

A. 研究目的

NSAIDs 不耐症の一型であるアスピリン喘息は、発症頻度や緊急性・重篤性において極めて重大な疾患であり社会的にも注目されている。気管支喘息の病態的・生理学的特徴として、慢性的な気道炎症・気道過敏性・可逆的な気流制限が挙げられる。気道過敏性の機序はこれまで不明の部分が多かったが、喘息特有の気道炎症に起因していることが明らかになってきた。気道炎症の機序は、炎症細胞と気道構成細胞が放出する炎症メディエーター・サイトカインなどの生理活性物質が相互反応を繰り返す炎症カスケードであると考えられている。しかしながら、気管支喘息、特にアスピリン喘息の発症機序については未解明の部分が多く、その解明には関連遺伝子の探索を含めた研究が必須と考えられる。また、アスピリン喘息については、世界的にも動物モデルが報告されていない。近年、遺伝子改変マウスが次々と開発されており、疾患関連遺伝子の解明に有用であることが報告されている。気管支喘息の発症分子機

序の解明についても、実験動物としての遺伝子改変マウスを用いた研究が重要であることが考えられる。本研究では、炎症メディエーターに関する遺伝子改変マウスを作成し、アスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明を目指す。

B. 研究方法

本研究では、本研究者が独自に開発した遺伝子改変マウスを使用する。LTC₄/D₄/E₄ など cysteinyl LT は、気管支喘息における主要な炎症メディエーターであり、アスピリン喘息発症に大きく関わるものが想定される。cysteinyl LT の受容体 (CysLT1-R, CysLT2-R) は肺・気管支に豊富に存在し、気管支喘息を含めた呼吸器疾患発症への関与が示唆される。特に、CysLT2-R は大きく注目されているが、その機能は未だに解明されていない。本研究では、この CysLT2-R を標的としたノックアウトマウスの新規作成に着手する。このような遺伝子改変マウスを用いて、脂質性メディエー

ターと気管支喘息(特にアスピリン喘息)との関連について評価・検討を加える。

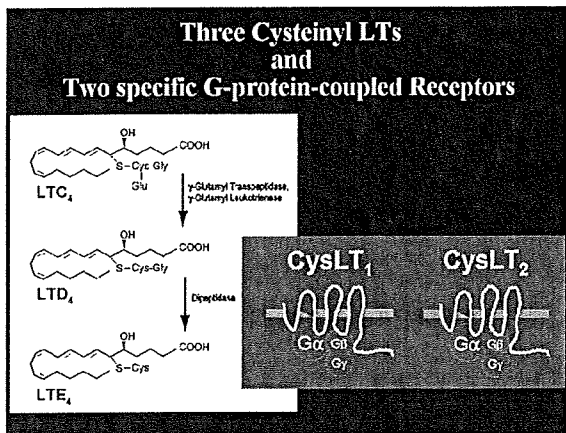


図1 CysLTs と CysLT 受容体の模式図

倫理面への配慮

本研究では、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究における危険の排除、説明と理解(インフォームドコンセント)について、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に基づき、研究を進める。

本研究で行う予定の遺伝子組換え実験は、平成16年9月10日の東京大学医学部組換えDNA実験安全委員会において承認を受けた生化学分子生物学・細胞情報学講座「脂質メディエーター受容体、合成酵素遺伝子欠損マウスならびにタンパク質過剰発現細胞を用いた脂質メディエーター機能の解明、セマフォリン遺伝子欠損マウスを用いた嗅覚系神経回路形成機構の解明」に含まれており、適切な拡散防止措置がとられる。

C. 研究結果

発生工学的的手法により CysLT2-R ノックアウトマウスが作成された。

Targeted Disruption of Mouse CysLT₂ Gene in C57BL/6 ES Cells

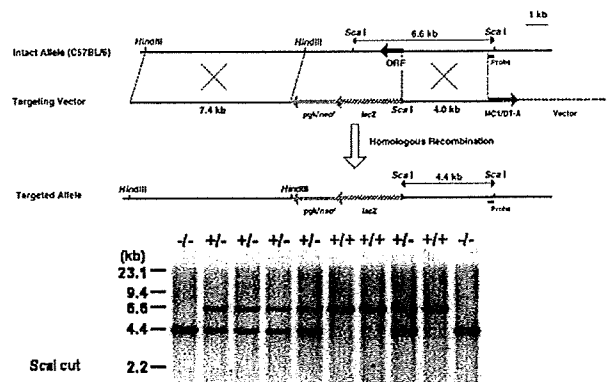


図2 CysLT2 受容体ノックアウトマウスの作成

CysLT2-R ノックアウトマウスでは胎生致死が認められず、ホモ接合体の生存個体が得られた。また、外表所見上の著明な異常は認められず、発育・成長・生殖も正常と考えられた。また、遺伝的純化を行うためバッククロスを重ね遺伝的純化を行った。

次に、アレルギー性気管支喘息モデルを作成した。

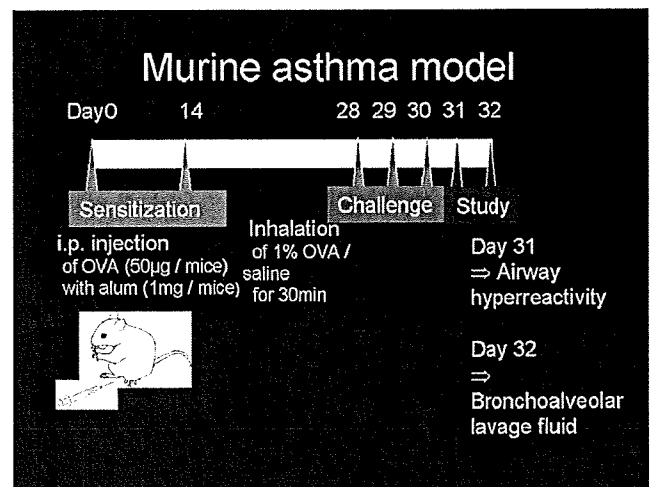


図3 アレルギー性気管支喘息モデルの作成

今後、生理学的、生化学的、免疫組織化学的、分子生物学的検討により、CysLT2-R 遺伝子発現と炎症性肺疾患の関係について評価・検討を加える。

D. 考察

気管支喘息は、気道炎症を病態の特徴としており、その発症には多数の生理活性物質の関与が想定される。特に CysLT2 受容体は、肺・気管支に多量に存在することが示唆されているが、その機能はほとんど解明がなされていない。今回 CysLT2-R ノックアウトマウスのはモ接合体が得られたことにより、気管支喘息(特にアスピリン喘息)における気道過敏性・末梢気道炎症への関与を検証することが可能となった。気管支喘息・アスピリン喘息に関わる候補物質・遺伝子を評価する手段として、分子生物学・発生工学を駆使したトランスレーショナル・リサーチによる研究アプローチが有用と思われる。今後、さらに各々の遺伝子・蛋白質の生理的意義・重要性が解明されることにより、気管支喘息・アスピリン喘息に対する有効な治療法・管理法の開発および実用化が期待される。

E. 結論

発生工学的手法により CysLT2-R ノックアウトマウスが作成された。CysLT2-R ノックアウトマウスののはモ接合体生存個体が得られたことにより、CysLT2 とアスピリン喘息との関連について評価・検討を行うことが可能となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Mitani A, Nagase T, Fukuchi K, Aburatani H, Makita R, Kurihara H. Transcriptional coactivator

with PDZ-binding motif is essential for normal alveolarization in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 326-338.

2) Saito RA, Watabe T, Horiguchi K, Kohyama T, Saitoh M, Nagase T, Miyazono K. Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2009; 69:2783-91.

3) Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Kamitani S, Kawasaki S, Nagase T. Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol Cell Biochem* 2009 in press.

4) Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Itakura S, Kamitani S, Desaki M, Kawasaki S, Nagase T. Procaterol inhibits lung fibroblast migration. *Inflammation* 2009 in press.

5) Ishii S, Noguchi K, Yanagida K. Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009; 89: 57-65.

6) Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, Taguchi R, Shimizu T, Ishii, S. Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA₆. *J Biol Chem.* 2009; 284: 17731-17741.

7) Mogi C, Tobo M, Tomura H, Murata N, He X-d, Sato K, Kimura T, Ishizuka T, Sasaki T, Sato T, Kihara Y, Ishii S, Harada A Okajima F. Involvement

of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of pro-inflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. J Immunol. 2009; 182: 3243-3251.

2. 学会発表

1) Respiratory research using genetically-engineered mice. The 14th APSR Meeting, Seoul. (発表者:長瀬隆英、招待講演), 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

(出願準備中 1件)

発明者:栗原裕基、大内尉義、長瀬隆英、山口泰弘

発明の名称: 筋ジストロフィー症の病態モデル
哺乳動物、及びその製造方法

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等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

好酸球性副鼻腔炎手術後の経過不良例の臨床的および組織学的検討
—長期経過での評価—

研究分担者 春名 眞一 獨協医科大学耳鼻咽喉科 教授
研究協力者 月舘 利治 獨協医科大学耳鼻咽喉科 講師
吉川 衛 東京慈恵会医科大学耳鼻咽喉科 講師
相良 博典 獨協医科大学越谷病院呼吸器科 教授

研究要旨：

AIA 合併副鼻腔炎とATA 合併副鼻腔炎の術後長期経過時の臨床的評価とともに、経過不良因子として *Staphylococcus aureus* の enterotoxin によるスーパー抗原の関与と喘息における予後不良に認められる Amphiregulin の組織学的検討を行った。対象は術後3年以上経過した AIAsinusitis18例、ATA sinusitis43例と sinusitis38歳とした。CT,内視鏡所見から ESS は局所治療効果を高め自覚症状の改善につながると考えられた。しかし、やはり再燃の割合が高く、特に篩骨洞病変に來しやすく、嗅覚障害の改善維持には至っていない。副鼻腔培養で *Staphylococcus aureus* は AIAsinusitis に有意に高く検出されていなかった。しかし、肥満細胞の増加、組織中 IgE 値の増加、Amphiregulin の増加が認められ、何らかの関与が示唆された。

A. 研究目的

アスピリン喘息(AIA)と非アスピリン喘息(ATA)を比較するとAIAの方が高率に好酸球性副鼻腔炎1)を伴い、アスピリン喘息合併副鼻腔炎(AIASinusitis)の副鼻腔病変は重症例が多く、保存的治療に抵抗性で内視鏡下鼻内副鼻腔手術(ESS)の適応となることが多い。術後治療は、短期間の経口ステロイド薬とその後の点鼻ステロイド薬と抗LT薬と自宅での鼻洗浄が一般的である。喘息同様にAIAsinusitisでは、好中球優位な慢性副鼻腔炎に比べ、副鼻腔組織におけるLT濃度が有意に高く、かつPG濃度の低下を認め2)、かつ手術をすることで術前にくらべ優位に減少するとされ3)、上気道においてもLT過剰産生されていると考えられる。したがって、上気道においても抗LT薬と点鼻ステロイド薬の効果が期待される。特に、ESS後には、各副鼻腔は大きく単洞化されており、局所ステロイド薬が副鼻腔まで到達しや

すくなる。しかし、術後経過で感冒後を契機に経過不良に転じる場合が多く、その後の点鼻ステロイド薬の効果が減じ、AIAsinusitisで経過不良例の割合は高い。好酸球性副鼻腔炎の術後経過で長期的な臨床的評価は少なく、かつその病態の検討は世界的なトピックとなっている。

最近、*Staphylococcus aureus* の enterotoxin がスーパー抗原となり Th2 リンパ球を刺激して IgE 抗体産生を増強していると報告された4)。またステロイド抵抗因子として喘息の重症例で肥満細胞に存在する Amphiregulin の増加は、杯細胞の増加を促し粘稠性分泌物を増加させている5)。本研究では、AIAsinusitis と ATAsinusitis の術後長期経過時の臨床的評価とともに、*Staphylococcus aureus* と Amphiregulin の組織学的検討を行った。

B. 研究方法

AIAsinusitis、ATA sinusitis と喘息合併なし副鼻腔炎(sinusitis)の3群に分類し、後治療として、約1ヶ月間経口ステロイド薬をセレスタミン®2T/日から漸減して投与する。その後、生理食塩水と鼻洗浄を2回/日と鼻洗浄後の点鼻ステロイド(リンデロン®、リノコート®)と抗LT薬を用いた。ただし、感染などで術後不良化した場合には、経口ステロイド薬の投与となる。術後3年以上の症例の臨床的評価した。術前後の内視鏡下鼻内所見、CT画像、自覚症状(鼻閉、鼻漏、嗅覚障害)で確認する。これらの評価を Haruna ら分類を利用する4)。すなわち、内視鏡所見は中鼻道にポリープなし(N0)、単発性ポリープあり(N1)、中鼻道・嗅裂に多発性ポリープあり(N2)、鼻腔充満ポリープ(N3)で表し、CT画像所見は片側の上顎洞、篩骨洞、前頭洞、蝶形骨洞の各副鼻腔陰影を0-3点の4段階でスコア化して、片側副鼻腔陰影の合計点で重症度を評価する。自覚症状は、鼻閉、鼻漏、嗅覚障害それぞれ4段階にスコア化し、術前後で2段階以上改善した場合には著明改善、1段階を改善、不変、悪化に分類した。

手術時に採取した鼻ポリープ中の好酸球、肥満細胞数をカウントし、副鼻腔鼻汁中の細菌培養を行う。3群の中での手術不良例と良好例との間で組織中でのIgEおよびAmphiregulin発現と、副鼻腔鼻汁中でのIgEを免疫染色し、比較する。術後長期経過で良好例と不良でも同様な検討を行う。鼻ポリープの採取および研究は、獨協医大倫理委員会の許可(No.1917)のもと患者の承諾を得た。

C. 研究結果

術後3年以降で、AIAsinusitis18例(21-47歳、

平均31.3歳)、ATA sinusitis43例(26-66歳、平均33.9歳)と sinusitis38歳(24-44歳、平均30.9歳)を対象とした。

術前の内視鏡所見は、N0 0例、N1 21例(AIAsinusitis:0, ATA sinusitis:6, sinusitis:15)、N2 40例(AIAsinusitis:5, ATA sinusitis:17, sinusitis:18)、N3 48例(AIAsinusitis:13, ATA sinusitis:20, sinusitis:15)を示した。CT画像では AIAsinusitis 6-12(平均7.9)、ATA sinusitis 5.8-12(平均7.5)、sinusitis 5.4-11.3(平均7.3)であった。AIAsinusitis では鼻閉3.8、ATA sinusitis 鼻漏4.6、嗅覚障害4.9、ATA sinusitis では鼻閉4.9、ATA sinusitis 鼻漏4.3、嗅覚障害4.5、sinusitis では鼻閉3.6、ATA sinusitis 鼻漏4.3、嗅覚障害3.9であった。内視鏡所見、CTでは3群とも高度副鼻腔炎を呈していた。自覚症状では鼻閉、鼻漏は3群とも高度であったが、嗅覚障害では ATA sinusitis と AIAsinusitis では高度だが、sinusitis では中等度領域に属していた。

術後3年での内視鏡所見は、N0 52例(AIAsinusitis:0, ATA sinusitis:24, sinusitis:28)、N1 31例(AIAsinusitis:5, ATA sinusitis:9, sinusitis:17)、N2 16例(AIAsinusitis:8, ATA sinusitis:5, sinusitis:3)、N3 10例(AIAsinusitis:5, ATA sinusitis:5, sinusitis:0)を示した。N1以上の術後経過不良例の割合(図1)は、AIAsinusitis が77.2%(13/18)、ATA sinusitis が44.1%(19/43)、sinusitis が26.3%(10/38)となり、AIAsinusitis が最も悪かった。術後CT画像では AIAsinusitis 3.9-10.1(平均6.9)、ATA sinusitis 3.4-9.1(平均5.5)、sinusitis 2.1-6.3(平均2.3)であった。術前後のCT画像の改善度で、AIAsinusitis と ATA sinusitis では有意差が認められなかった。自覚症状の中で改善以上の割合は鼻閉で AIAsinusitis77.8%(14/18)、ATA

sinusitis61.0%(22/43) 、 sinusitis73.6%(28/38) 、 sinusitisが26.3%(10/38)、鼻漏でそれぞれ55.6%、53.4%、76.3%と良好な改善効果が維持されていた。一方、嗅覚障害の改善以上は、それぞれ27.8%、30.2%、68.4%と喘息合併例では、有意に悪化が認められた。

手術で採取した鼻ポリープ中の好酸球数はAIAsinusitis>ATAsinusitis>>sinusitisの順に多かった。一方、3者とも肥満細胞数は正常に比べ増加していた(図2)。鼻ポリープでのIgEおよびAmphiregulinの発現は認められたが、術後不良例で発現した細胞数は有意に高くなかった。副鼻腔鼻汁中の細菌培養ではStaphylococcus aureusの検出率(図3)は全体の約1/4程度に認められた。しかし、術後不良時での副鼻腔細菌培養で有意にStaphylococcus aureusの検出率は高くなかった。

D. 考察

組織中好酸球数が増加すると慢性副鼻腔炎の粘膜調整作用を有するマクロライド療法の効果が不良になる⁶⁾。今回の検討でもAIAsinusitis群で組織中好酸球が最も多く、術後長期経過でもAIAsinusitis群が最も不良例が多く認められ、好酸球数は臨床的な良い指標となることが再確認された。長期経過においても3群ともに鼻閉、鼻漏などの自覚症状の改善効果は維持されてきた。しかし、嗅覚障害の改善はAIAsinusitisとATAsinusitisとともに有意に不良であり、好酸球性副鼻腔炎では容易に嗅覚障害が出現しやすく、術後経過の良悪の指標になると考えられた⁷⁾。不良化する原因としてStaphylococcus aureusのenterotoxinがスーパー抗原の関与を検討した。手術時および長期経過時の培養検査を施行した

(図3)が、手術時培養検査で3群ともに差が認められなかつた、さらに長期経過時においても有意にAIAsinusitis群に多い傾向は認められなかつた。しかし、好酸球性副鼻腔炎粘膜では好酸球増加のみでなく肥満細胞や組織中のIgE値の増加がみられ(図2)、好酸球増多に伴う経過不良をおこす因子であることが想定された。さらに肥満細胞に存在するAmphiregulin発現も確認され、AIAsinusitis群では多く認められ、喘息同様に副鼻腔炎においても予後不良の一因と予想された。

E. 結論

難治性副鼻腔炎であるAIAsinusitisに対するESSは、術後長期間において、局所治療効果を高め自覚症状の改善につながると考えられた。しかし、やはり経過不良の割合が高く、篩骨洞病変の再燃を来しやすく、嗅覚障害の改善には至っていない。その原因としてスーパー抗原の関与を検討したが、明確な結果は得られなかつた。しかし、肥満細胞の増加、組織中IgE値の増加、Amphiregulinの増加などの関与が示唆された。

<参考文献>

- 1) 春名眞一、鴻信義、柳清、森山寛:好酸球性副鼻腔炎(Eosinophilic sinusitis). 耳展44(3):195-201,2001.
- 2) Yoshimura T, Yoshikawa M, Otori N, Haruna S, Moriyama H. Correlation between the prostaglandin D(2)/E(2) ratio in nasal polyps and the recalcitrant pathophysiology of chronic rhinosinusitis associated with bronchial asthma. Allergol Int 57:429-36,2008.

3) Higashi H, et al. Clinical features of asthmatic patients with increased urinary leukotriene E4 excretion: Involvement of chronic hyperplastic rhinosinusitis with nasal polyposis. J Allergy Clin Immunol 2004;113:1277-83.

4) van Zele T, Gevaert P, Watelet JB, Claeys G, Holtappels G, Claeys C, vanCauwenberge P, Bachert C. Staphylococcus aureus colonization and IgE antibody formation to enterotoxin is increased in nasal polyposis. van J Allergy Clin Immunol 114:981-3,2004.

5) Okumura S, et al. Fc ε RI-mediated amphiregulin production by human mast cells increases mucin gene expression in epithelial cells. J Allergy Clin Immunol 115:272-279,2005.

6) Haruna S, et al. A study of poor responders for long-term, low-dose macrolide administration for chronic sinusitis. Rhinology 47:66-71,2009.

7) Haruna S, Otori N, Moriyama H, Nakanishi M. Olfactory dysfunction in sinusitis with infiltration of numerous activated eosinophils. ANL33:23-30,2006.

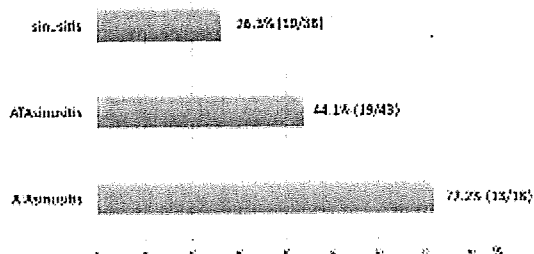


図1 好酸球性副鼻腔炎の術後不良例の割合—術後3年以降での再発—

	AIA sinusitis (n=13)	ATA sinusitis (n=16)	sinusitis (n=10)	total
手術時培養	23.0% (3/13)	25.0% (4/16)	30.0% (3/10)	26.2%
経過不良時培養	15.4% (2/13)	31.5% (5/16)	20% (2/10)	19.2%

図3 術後経過不良例でのStaphylococcus aureusの検出率

	AIA sinusitis (n=7)	ATA sinusitis (n=8)	Sinusitis (n=8)
血中好酸球数(%)	8.43	8.29	8.45
組織中好酸球数 (x400)	355	121	170
血清総IgE値	354	770	135
AAI (x100)	49	62	88
Amphiregulin (x100)	2.56	1.2	1.5
組織IgE (x100)	32	40	44

図2 各群における組織学的検討

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 春名眞一.慢性副鼻腔炎再手術例に対する内視鏡下鼻内副鼻腔手術.耳展52(2):64-72,2009.
- 2) 春名眞一.好酸球性副鼻腔炎とは 鼻内視鏡手術に照らして.ENTONI 106:1-5,2009.
- 3) 春名眞一.好酸球性副鼻腔炎の臨床.小児科50(9):1423-1429,2009.

2. 学会発表

- 1) Haruna S. Revision Surgery for Eosinophilic sinusitis and postoperative course. Rhinology World in Philadelphia, 2009 Apr, Philadelphia.

Haruna S. Surgical management of frontal sinus disease.10th Taiwan-Japan otolaryngology Head & Neck Conference.2009 Dec,Taiwan

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

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

アスピリン喘息患者における難治性鼻茸の網羅的蛋白解析

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 教授
研究協力者 鈴木 弟 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 医員
坂下 雅文 福井大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 医員
田中 幸枝 福井大学医学部分子生命化学 助手
春名 真一 獨協医科大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授

研究要旨：

アスピリン喘息の特徴に、鼻茸がある。その合併率は 70%を超え、一般的な慢性副鼻腔炎に比較して、形態学的には何ら違いは認められないが、手術治療後の再発率、ステロイド内服に対する感受性にかなりの違いが認められる。しかし、どのような分子レベル、蛋白レベルでの違いがあるのか検討された報告は、皆無である。本研究では、一度の大量の情報が得られ、かつ予想もつかない因子を見つけることができる網羅的蛋白解析法を用いて、アスピリン喘息の鼻茸と慢性副鼻腔炎の鼻茸を比較検討した。

その結果、アスピリン喘息症例で慢性副鼻腔炎に比べ 2 倍以上発現が亢進したのは 61 スポット（うち 5 倍以上は 9 スポット、10 倍以上は 3 スポット）認めた。逆に、アスピリン喘息症例で 0.5 倍以下に発現が低下していたのは 33 スポット（うち 0.2 以下は 5 スポット、0.1 以下は 2 スポット）認められた。現在、蛋白を同定中であり、その発現部位同定、機能解析を行う予定である。これにより、新規の蛋白制御による、アスピリン喘息に伴う難治性鼻茸の治療法開発ができる可能性が高まった。

A. 研究目的

アスピリン喘息患者の 71.9%が鼻茸を合併しており、鼻手術による治療後も再発する割合が高い。また、日常診療でよく遭遇する副鼻腔炎の 0.9%、アレルギー性鼻炎の 1.1%、鼻茸の 4.4%がアスピリン喘息であるという臨床統計がある。このように、日常臨床で比較的遭遇する可能性が高く、易再発難治性であり、アスピリンや非ステロイド系解熱鎮痛薬使用により数時間以内に喘息死する可能性があるアスピリン喘息に伴う鼻茸は、耳鼻咽喉科医にとっては非常に興味深いものである。

これまでの組織学的検討からは、アスピリン喘息症例の鼻茸の方が副鼻腔炎症例の鼻茸組織より好酸球浸潤が有意に増加しており、好酸球が重要な役割を担っていることが示唆されている。しかし、アスピリン喘息症例における鼻茸の成因や

再発しやすい原因は全くわかっていない。

原因探索の効果的な手段として、遺伝子多型、遺伝子発現、蛋白などいくつかの対象を一気に大量に検討できる網羅的解析がある。その中でも網羅的蛋白解析では、全蛋白の変化を比較検討することにより、予想もしえない遺伝子や蛋白が機能していることを見出すことができる画期的な方法である。本研究では、アスピリン喘息に伴う鼻茸と一般的な慢性副鼻腔炎に伴う鼻茸において、網羅的蛋白解析を用いて、比較検討した。

B. 研究方法

アスピリン喘息症例の鼻茸 8 例（平均年齢 52.75 歳、男 3 例、女 5 例）とアスピリン耐性かつ慢性副鼻腔炎患者鼻茸 8 例（平均年齢 41.62 歳、

男5例、女3例)を研究対象とした。いずれの症例も手術2週間前からステロイドの服用はなされていない。手術中に鼻茸組織を採取し、すぐに液体窒素中で凍結保存した。RIPA バッファーで蛋白を抽出し、IgG除去キットを用いて蛋白精製を行った。蛋白濃度を一定に揃えた後、DIGE用のバッファーへバッファー変換を行った。Ettan DIGE システムにより、8cmのゲルを用い、pHレンジを4-7の範囲で、2-DIGE電気泳動を行った。Decyderにより各スポットの発現強度をGeneSpringにより解析した。統計的有意な変化を示しているスポットについて質量分析(mass spectrometry)を行った。ゲルを銀染色し、目的のスポットをEttan Spot Pickerにより切り出した後、MALDI-TOFMS: AXIMA-CFR plusを用いて解析、得られたPeptide mass fingerprintをMascotデータベースにより解析した。Mascotで得られた結果とSwiss-2DPAGEのデータが一致した、または複数回のMALDI-TOFMS→Mascot解析により結果が再現された場合に同定したと判定した。

C. 研究結果

予備実験として、7cmゲルを用いpHレンジを3-11と設定して、2-DIGE電気泳動を行った。その結果、鼻茸サンプル中にはIgGを中心に免疫グロブリンが多く、これらの蛋白付近では分離が非常に悪く、有効なスポット解析が難しい状況だった。そのため、ゲルを18cmと大きくし、なおかつpHレンジを4-7と狭くした。さらにカラムによるIgG除去を行うことによって、蛋白スポットの分離改善を認めることができた。この条件で電気泳動及びプロテオーム解析を行った結果、アスピリン喘息症例で2倍以上発現が亢進したのは61スポット(うち5倍以上は9スポット、10倍以上は3スポッ

ト)同定できた。逆に、アスピリン喘息症例で0.5倍以下に発現が低下していたのは33スポット(うち0.2以下は5スポット、0.1以下は2スポット)みられた。このように、アスピリン喘息症例の鼻茸と慢性副鼻腔炎患者鼻茸においては、蛋白レベルでの発現に有意差を認めた。

D. 考察

これまでアスピリン喘息の発症機序としてアラキドン酸経路異常があり、アスピリン喘息症例における鼻茸中にも、アラキドンサン経路に働く15-HETE(15-hydroxy eicosatetraenoic)の過剰、HSP70(heat shock protein 70)の発現亢進などが報告されている。しかし、今回我々の解析では、pH4-7のレンジ幅でさえ、61スポットの発現亢進と33スポットの発現低下という、総数94スポットの多数の蛋白発現変化が関与していることが示唆された。このことは、アスピリン喘息の発症機序、鼻茸の易再発に関与する遺伝子、蛋白は多数あることが考えられる。現在このスポットの蛋白同定中であり、その同定により、アスピリン喘息鼻茸の形成機序解明と新しい治療戦略の構築を目指していく予定である。

E. 結論

アスピリン喘息症例と慢性副鼻腔炎症例(アスピリン耐性)の鼻茸成因機序解明のために、蛋白レベルでの網羅的解析ができるプロテオーム解析を行ったところ非常に有用であった。総数94スポットの蛋白は、これまでアスピリン喘息や慢性副鼻腔炎において、想像しえない蛋白の関与などが候補因子になりうる可能性がある。しかし今回の解析で、IgGなど鼻茸に多く含まれる蛋白を除

去すること、pH 範囲をしぼること、ゲルを大きくすることなどの工夫が必要であることが判明し、この工夫が蛋白分離にとっても大切であった。

今回の結果をもとに、スポット解析で蛋白同定、その発現部位同定、作用、他の pH レンジでの検討を行っていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Imoto Y, Enomoto H, Fujieda S, Okamoto M, Sakashita M, Susuki D, Okada M, Hirota T, Tamari M, Ebe K, Arinami T, Noguchi E: S2554X mutation in the filaggrin gene is associated with allergen sensitization in the Japanese population. *J Allergy Clin Immunol* 2010, in press.

2) Yamada T, Lizhong S, Takahashi N, Kubo S, Narita N, Suzuki D, Takabayashi T, Kimura Y, Fujieda S: Poly(I:C) induces BLYS-expression of airway fibroblasts through phosphatidylinositol 3-kinase. *Cytokine*. 2010, in press

3) Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Suzuki Y, Shimojo N, Kohno Y, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Nakamura Y, Tamari M.: Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*.

124(4): 779-85, 2009.

4) Kimura Y, Sugimoto C, Takabayashi T, Tanaka T, Kojima A, Narita N, Fujieda S.: Bax-gene transfer enhances apoptosis by steroid treatment in human nasal fibroblasts. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 267:61-66, 2010.

5) Harada M, Obara K, Hirota T, Yoshimoto T, Hitomi Y, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Fukutomi Y, Nakanishi K, Nakamura Y, Tamari M.: A functional polymorphism in IL-18 is associated with severity of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 180(11) 1048-1055, 2009

6) Takabayashi T, Takahashi N, Okamoto M, Yagi H, Sato M, Fujieda S.: Lipopolysaccharides increase the amount of CXCR4, and modulate the morphology and invasive activity of oral cancer cells in a CXCL12-dependent manner. *Oral Oncol*. 45:968-973, 2009.

7) Oh M, Tanaka T, Kobayashi M, Furukawa T, Mori T, Kudo T, Fujieda S, Fujibayashi Y.: Radio-copper-labeled Cu-ATSM: an indicator of quiescent but clonogenic cells under mild hypoxia in a Lewis lung carcinoma model. *Nucl Med Biol*. 36:419-426, 2009.

8) 大澤陽子、高橋昇、窪誠太、山田武千代、大久保公裕、藤枝重治: 網羅的蛋白解析の結果から考える免疫療法の作用機序, 耳鼻免疫アレルギー 27(3):249-251, 2009.

9) 藤枝重治、坂下雅文: アレルギー性鼻炎, 小児科 50:7:994-1001, 2009.

10) 広田朝光, 原田通成, 人見祐基, 坂下雅文, 玉利真由美: 日本人における気管支喘息関連遺伝子, 呼吸 28(6): 603-608, 2009.

2. 学会発表

1) 大澤陽子、藤枝重治: 網羅的蛋白の結果から考える免疫療法の作用機序, 第 27 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2009.2

2) 山田武千代、山本英之、窪 誠太、藤枝重治、春名眞一、増山敬祐、池田勝久、竹中 洋、平川勝洋、森山 寛: 慢性副鼻腔炎と気管支喘息に対する疫学調査-上気道と下気道病態との関連・呼吸機能を中心に, 第 110 回日本耳鼻咽喉科学会総会 2009.5.

3) 新実彰男、陣内牧子、藤村政樹、西村善博、石原享介、安場広高、有田真知子、郷間 巖、吉村千恵、鈴木雄二郎、田口善夫、松本久子、藤枝重治、三嶋理晃、東田有智: 頻回の増悪をきたす重症難治性喘息の臨床像と病態に関する多施設共同研究, 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2009.6.

4) 松元佑莉、意元義政、有波忠雄、野口恵美子、藤枝重治: 網羅的遺伝子発現解析による花粉症発症関連遺伝子の同定と機能解析, 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009.10.

5) 藤枝重治: アレルギー疾患の最新治療 鼻アレルギー, 第 23 回日本耳鼻咽喉科専門医講習会 2009.11.

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

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

アスピリン喘息と NSAID s 蕁麻疹/血管浮腫における遺伝的背景（遺伝子多型の検索）

研究分担者 玉利真由美 理化学研究所ゲノム医科学研究センター チームリーダー
研究協力者 広田朝光 理化学研究所ゲノム医科学研究センター リサーチアソシエイト
人見祐基 理化学研究所ゲノム医科学研究センター 特別研究員

研究要旨：

アスピリン喘息および食物アナフィラキシーは経口摂取した抗原に対し全身症状を引き起こす疾患である。NLRP3 遺伝子はウイルス感染やシリカなどの Danger signals を認識し、Inflammasome を介して炎症性サイトカインの産生を促進する。我々はこの遺伝子多型と食物アナフィラキシー発症との強い関連を見いだした。それらの多型について成人アスピリン喘息(AIA)79 例においても検討を行なったところ、rs4612666 と AIA との関連を見いだした。リスクアレルは NLRP3 遺伝子の mRNA の転写活性を増強する方向に作用していた。

A. 研究目的

アスピリン喘息は NSAID の投与に起因する全身性の急性アレルギー症状の一つである。NLR (nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing) family の一つである NLR family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) (=NALP3, CIAS1, PYPAF1, cryopyrin)はウイルス感染やシリカなどの Danger signals を認識し、Inflammasome と呼ばれる複合体を形成し、炎症性サイトカインである IL-1 β や IL-18 の成熟および産生を促す。本研究では、NLRP3 遺伝子多型とアスピリン喘息発症との関連を検討した。

B. 研究方法

アスピリン喘息症例は少なくとも 2 回以上の非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) による喘息発作の既往のある 79 例を疾患群 (AIA+BA) とし、コントロールは NSAID による喘息発作の既往のない 470 例の気管支喘息患者 (AIA-BA)、および気管支喘息、アトピー性皮膚炎などアレルギー疾患の既往のない 730 人 (control) をコントロールとした。遺伝

子型タイピングは、日本人集団の HapMap database より抽出した NLRP3 遺伝子の 15 個の Tag SNP を対象に TaqMan 法を用いて実施した。有意な関連を示した SNP については周辺の新規 SNP の探索後、発症への影響が予想される SNP の機能解析を併せて実施した。

C. 研究結果

NLRP3 遺伝子の intron 7 に存在する SNP rs4612666 とアスピリン喘息発症との間に有意な関連が認められた (P=0.018, OR=1.55, 95%CI 1.08-2.24, AIA+BA vs. AIA-BA; P=0.0096, OR=1.60, 95%CI 1.12-2.29, AIA+BA vs. control)。NLRP3 遺伝子周辺のゲノム領域に rs4612666 遺伝子多型と強い連鎖不平衡にある SNP ($r^2 > 0.8$) はなく、rs4612666 について機能解析を行なった。ヒト単球系細胞である THP-1 を用いた Luciferase assay の結果、関連を示した rs4612666 のリスクアレルは NLRP3 遺伝子の mRNA の転写活性を増強する方向に作用していた (Gain of function)。EMSA (Electrophoretic mobility shift assays) にお

いてリスクアレルを含む領域に何らかの核タンパクの結合が認められた。

D. 考察

NLRP3 遺伝子多型はその発現量に影響を与え、より強い inflammasome の活性化を通してアスピリン喘息発症に関与する可能性が示唆された。さらにこの遺伝子多型は食物アナフィラキシーの発症とも強い相関を認めており(リスクアレルも一致)、NLRP3 inflammasome の活性化はこれら重篤な即時型全身性アレルギー反応に関与する可能性が考えられた。

E. 結論

NLRP3 の遺伝子多型 rs4612666 とアスピリン喘息発症との間に強い相関を認めた。(JACI 2009;124(4):779-85)。

今後、NLRP3 inflammasome の構成分子多型についてさらなる検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Imada Y, Fujimoto M, Hirata K, Hirota T, Suzuki Y, Saito H, Matsumoto K, Akazawa A, Katsunuma T, Yoshihara S, Ebisawa M, Shibasaki M, Arinami T, Tamari M, Noguchi E. Large scale genotyping study for asthma in the Japanese population. BMC Res Notes. 2009 Mar 31;2:54.

2) Tamari M, Harada M, Hirota T, Nakamura Y. Host defense molecular mechanisms against *Chlamydomydia pneumoniae* and genetic studies of immune-response-related genes in asthma. Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery 2009;3:17-35

3) Harada M, Hirota T, Jodo AI, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Yoshihara S, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. Functional analysis of the polymorphisms of the TSLP gene in human bronchial epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2009;40:368-74

4) Shimokawa N, Nishiyama C, Hirota T, Tamari M, Hara M, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Functional analysis of a polymorphism in the promoter region of the IL-12/23p40 gene. Clin Exp Allergy 2009;39:228-235

5) Otsuka K, Takeshita S, Enomoto H, Takahashi T, Hirota T, Tamari M, Ebe K, Otsuka F, Shibasaki M, Arinami T, Noguchi E. SMAD3 as an atopic dermatitis susceptibility gene in the Japanese population. J Dermatol Sci. 2009 Sep;55(3):200-2.

6) Kawai T, Takeshita S, Imoto Y, Matsumoto Y, Sakashita M, Suzuki D, Shibasaki M, Tamari M, Hirota T, Arinami T, Fujieda S, Noguchi E. Associations between decay-accelerating factor polymorphisms and allergic respiratory diseases. Clin Exp Allergy. 2009 Oct;39(10):1508-14.

- 7) Sakashita M, Hirota T, Harada M, Nakamichia R, Tsunoda T, Osawa Y, Kojima A, Okamoto M, Suzuki D, Kubo S, Imoto Y, Nakamura Y, Tamari M, Fujieda S. Prevalence of Allergic Rhinitis and Sensitization to Common Aeroallergens in a Japanese Population *Int Arch Allergy Immunol*. 2009 Sep 29;151(3):255-261
- 8) Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Suzuki Y, Shimojo N, Kohno Y, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Nakamura Y, Tamari M. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Oct 124(4):779-85.
- 9) Harada M, Obara K, Hirota T, Yoshimoto T, Hitomi Y, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Fukutomi Y, Nakanishi K, Nakamura Y, Tamari M. A functional polymorphism in IL-18 is associated with severity of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Dec 1;180(11):1048-55.
- 10) 玉利真由美、原田通成、広田朝光、人見祐基: アレルギー疾患関連遺伝子の全ゲノム解析. *最新医学*, 64:894-898, 2009
- 11) 人見祐基、原田通成、広田朝光、玉利真由美: 成人喘息の関連遺伝子. *アレルギーの臨床*, 29:216-220, 2009
- 12) 原田通成、広田朝光、人見祐基、玉利真由美: 遺伝とアレルギー. *小児科診療*, 72:123-1243, 2009
- 13) 広田朝光、原田通成、人見祐基、坂下雅文、玉利真由美: 日本人における気管支喘息関連遺伝子. *呼吸*, 28:603-608, 2009
- 14) 広田朝光、原田通成、人見祐基、玉利真由美: 小児呼吸器疾患とゲノム解析 *小児科*, 50:861-866, 2009
- 15) 玉利真由美、原田通成、広田朝光、人見祐基、気管支喘息の病態と自然免疫関連遺伝子アレルギー. 58:766-771, 2009
- 16) 増山敬祐、玉利真由美、藤枝重治: アレルギー疾患の遺伝子多型、鼻アレルギーフロンティア. 9:7-14, 2009
- 17) 原田通成、広田朝光、人見祐基、玉利真由美 小児気管支喘息と遺伝子多型 *喘息*. 22:154-158, 2009
- 18) 原田通成、広田朝光、人見祐基、玉利真由美 アレルギーの遺伝要因 *実験医学* 羊土社 (2009年 増刊 27巻 20号 3360-3371)
- 19) 原田通成、広田朝光、玉利真由美 気管支喘息と自然免疫関連遺伝子 *感染炎症免疫* (2009年 in press)
2. 学会発表
- 1) 第 8 回 Kinki Hokuriku Airway disease Conference (KIHAC) 2009年4月 リーガロイヤルホテル大阪

上気道・下気道リレーショナルシップ わかりやすい遺伝子研究の最先端 感染とアレルギーの謎に迫る 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基

2) 独立行政法人理化学研究所「ゲノム医科学研究センター」/文部科学省「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」SNP から疾患遺伝子解明へ 2009年4月 品川インターシティーホール
遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基

3) 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会 2009年6月岐阜都ホテル

(1) シンポジウム7 アレルギー免疫における分子生物学

分子遺伝学の臨床応用 Translational Research TSLP とアレルギー疾患 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基

(2) 一般演題 花粉症 2 142 アレルギー性鼻炎とIL-33との関連について 坂下雅文、広田朝光、大澤陽子、人見祐基、原田通成、善本知広、中西憲司、玉利真由美、藤枝重治

4) 第8回愛知免疫アレルギーを語る会 2009年7月 ホテルキャッスルプラザ

特別講演 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基

5) 第54回大分耳鼻咽喉科臨床研究会 2009年9月 大分東洋ホテル

特別講演 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基

6) 日本人類遺伝学会第54回大会 2009年9月 高輪プリンスホテル

(1) 一般演題 口演 12 免疫遺伝学 OC102 IL-13 遺伝子多型と成人気管支喘息発症との関連解析 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基

(2) 一般演題 口演 12 免疫遺伝学 C115 Inflammasome 形成に関与する NLR family 遺伝子多型と食物アナフィラキシーとの関連解析 人見祐基、海老澤元宏、広田朝光、原田通成、鈴木洋一、中村祐輔、玉利真由美

(3) ポスター発表 PA148 MMP-13 遺伝子と喘息発症との相関 真下陽一、佐藤正子、下条直樹、広田朝光、土居悟、宮武明彦、岡本美孝、河野陽一、玉利真由美、羽田明、鈴木洋一

(4) ポスター発表 PA055 17q21 locus の遺伝子多型とスギ花粉症の相関解析 広田朝光、原田通成、人見祐基、玉利真由美、坂下雅文、藤枝重治

7) 水戸地区耳鼻科医会 2009年10月 ホテルテラス ザガーデン水戸

特別講演 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基

8) The 59th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics 2009年10月 The Hawaii Convention Center,

(1) Poster Board #512 Genetic association studies of IL-13 gene in adult asthma in Japanese populations

Mayumi Tamari, Tomomitsu Hirota, Michishige Harada, Yuki Hitomi, Akihiko Miyatake, Yoichi Suzuki, and Yusuke Nakamura.

(2) Poster Board #518 Associations of functional polymorphisms in NLR genes with susceptibility to food-induced anaphylaxis Yuki Hitomi, Motohiro Ebisawa, Tomomitsu Hirota, Michishige Harada, Yoichi Suzuki, Yusuke Nakamura, Mayumi Tamari

9) 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会
2009 年 10 月秋田ビューホテル

(1) Poster 教育セミナー10 ウイルス感染による喘息増悪の機序と SFC の作用 遺伝子研究の立場から 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基

(2) Poster ワークショップ 12 アレルギー病態解析のジェノミクスとサイトミクス

W12-2 ジェノミクス 各論-遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の解析 原田通成 広田朝光 人見祐基 玉利真由美

(3) Poster MS-4-12 初診の咳喘息患者および気管支喘息患者の背景因子の比較検討 藤田きみゑ、宮武明彦、中野直子、大月道夫、笠山宗正、玉利真由美

(4) Poster MS-10-7 IL-13 遺伝子多型と気管支喘息との関連解析 城道絢、広田朝光、原田通成、人見祐基、宮武明彦、土居悟、中村豊、井上洋西、玉利真由美

(5) MS-10-9 MMP13 遺伝子の気管支喘息との相関と気道上皮における役割
鈴木洋一、真下陽一、佐藤正子、下条直樹、広田朝光、土居悟、宮武明彦、岡本美孝、河野陽一、玉利真由美、羽田明

(6) MS-21-16 日本人集団におけるアトピー性皮膚炎と乾癬の GWAS の検証
広田朝光、原田通成、人見祐基、玉利真由美、江部康二、土居悟、宮武明彦、佐伯秀久、常深祐一郎、古江増隆

(7) MS31-8 気管支喘息患者における IL-13 遺伝子多型と気道リモデリング

長島広相、中村豊、鹿内俊樹、佐々木信人、佐藤温子、似内郊雄、菅野祐幸、澤井高志、玉利真由美、広田朝光、出原賢治、山内広平、井上洋西

(8) MS39-#5 NLR family 遺伝子多型と食物アナフィラキシーとの関連解析 人見祐基、海老澤元宏、富川盛光、今井孝成、小俣貴嗣、広田朝光、原田通成、鈴木洋一、下条直樹、河野陽一、玉利真由美

10) 第 54 回山口アレルギー疾患研究会 2009 年 11 月 宇部全日空ホテル

特別講演 1 気管支喘息と COPD の病因病態について 疾患遺伝子の観点より 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基

11) アスピリン不耐症・難治性喘息研究会 2009 年 11 月ベルサール西新宿

II. シンポジウム:喘息の難治化機序を考える 2) 喘息難治化に関与する遺伝子 玉利真由美 原田通成 広田朝光 人見祐基

12) アレルギー・気道上皮細胞研究会 第 13 回学術大会 2009 年 12 月 シェーンバツハ・サボー
特別講演 気管支喘息の遺伝子解析-SNP 解析と発現解析、気道上皮細胞を中心に 玉利真由美 原田通成 広田朝光

13) The 17th Symposium of Asthma in Tokyo
2009 年 12 月 千代田放送会館 2 階ホール
プレナリーシンポジウム「喘息サブタイプ」 1.喘息サブタイプと遺伝子多型 玉利真由美 原田通成 広田朝光

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

NLRP3 遺伝子の多型に基づくアレルギー疾患劇
症化の検査方法

玉利真由美、中村祐輔、人見祐基、広田朝光

2009-173252(平成 21 年 7 月 24 日出願)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表