

次世代シーケンサーを用いた Whole Transcriptome 解析(RNA-Seq)による
アスピリン喘息患者鼻茸の解析

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 徳 永 貴 広 福井大学耳鼻咽喉科頭頸部外科学 医員
高 林 哲 司 福井大学耳鼻咽喉科頭頸部外科学 助教

研究要旨：

アスピリン喘息に合併する慢性副鼻腔炎は、易再発性かつ難治性である好酸球性副鼻腔炎の代表として注目されている。好酸球性副鼻腔炎についての遺伝子発現解析は、病態の解明や新たな診断・治療の確立に重要な役割を果たすが、本疾患においては未だ十分な解析がなされていない。我々は 15 の共同研究施設及び協力機関において術後の再発性についての疫学的解析を行い、好酸球性副鼻腔炎の診断基準を作成した。その結果を基に、好酸球性副鼻腔炎を定義し、その鼻茸における Whole transcriptome (RNA-seq) を、次世代シーケンサー(NGS)を用いて行い、新規トランスクリプトを同定した。その結果、アスピリン喘息を合併する好酸球性副鼻腔炎群において特異的に発現量が多く、かつ有意差のあった遺伝子が 112 個同定された。NGS によって、好酸球性副鼻腔炎に関与する遺伝子を検索することができた。

A．研究目的

マクロライド療法や内視鏡下副鼻腔手術 (ESS) の発達に伴い、慢性副鼻腔炎に対する治療成績は、近年向上した。しかし、それらの治療によっても治癒しえない易再発性・難治性の慢性副鼻腔炎として、好酸球性副鼻腔炎が注目されている。

我々は厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業: H23-難治-一般-080)により、15の共同研究施設及び協力機関において後向きの疫学的解析を行い、好酸球性副鼻腔炎の難治性を術前に評価する診断基準作成を試みた。

その結果、再発性・難治性の因子として、アスピリンアレルギー、NSAIDsアレルギー、気管支喘息の合併が有意に関与していることがわかった。好酸球性副鼻腔炎の難治性と、遺伝子発現との関連を解析することは、病態の解明や新たな診断・治療の確立に重要な役割を果たすが、本疾患においては未だ十分な解析がなされていない。

近年実用化された次世代シーケンサー(NGS)は、大量の塩基配列を一度に解析できる高性能シーケンサーであり、未知の配列も含めた網羅的な解析が可能である。

本研究では、好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸における Whole transcriptome (RNA-seq) を NGSを用いて行い、新規トランスクリプトを同定することを目的とした。

B．研究方法

対象は当科で手術を行った症例で、前述の診断基準を用いて、アスピリン喘息合併を含む好酸球性副鼻腔炎(ECRS)と非好酸球性副鼻腔炎(non-ECRS)とに分類した。ECRS 群の鼻茸 5 例、non-ECRS 群の鼻茸 5 例と、健常者鼻粘膜擦過細胞(Control) 5 例を検討した。

鼻茸および擦過細胞から total RNA を抽出し、rRNA を除去し、断片化した cDNA ライブラリーを作成し、SOLiD™ 5500x1 (LifeTechnologies 社)を用いてシーケンスを

行い、Lifescape™ Genomic Analysis Software (LifeTechnologies 社)を用いてゲノムマッピングを行い、Avadis® NGS software (Strand Scientific Intelligence 社)を用いて発現解析を行った。

発現差解析は、マッピングされた全トランスクリプトームから、全てのサンプルで低発現のものを除去し、ECRS と non-ECRS とで発現差が5倍以上のものを抽出し、t 検定および Benjamini-Hochberg FDR 補正を行って有意であるものを抽出した。

(倫理面への配慮)

本研究は福井大学倫理委員会の承認を得て、被験者への説明・同意は文書で実施した。

C . 研究結果

ECRS 群対 non-ECRS 群の発現差解析において、有意差のある遺伝子を 12 個同定した。ECRS 群で高発現のものは3個、反対に non-ECRS 群で高発現のものが9個同定された。ECRS 群で高発現の3遺伝子の内、過去の報告で末梢血好酸球に発現がない遺伝子が1個同定された。これら12個の遺伝子のうち既知の遺伝子は10遺伝子、新規は2遺伝子であった。

また、Control 群を加えた3群間の発現差解析では、ECRS 群に有意に高く発現しているが、末梢血好酸球には発現していない遺伝子が112個同定された。また non-ECRS 群の中に遺伝子発現プロファイルが異なる2群が存在することも示され、Gene ontology 解析にて2群間で線毛関連遺伝子17個に有意な発現差がみられることがわかった。

しかし、この2群間で、症状や再発性・難治性、診断基準スコアに有意な違いは認められなかった。

D . 考察

今回同定された112個の遺伝子は、ECRS で特異的に発現しており、鼻茸に浸潤している好酸球と正常末梢血好酸球との発現の違いを反映しているか、あるいは鼻茸中の好酸球以外の組織での発現を反映していると考えられる。NGS は網羅性や新規配列の発見には優れているが、配列読み取りにバイアスがあるなどの問題点も指摘されており、マイクロアレイなど他の解析法での結果もあわせて検討し、最終的には real-time PCR での追認が必要である。

また、診断基準で non-ECRS と分類された中に、線毛関連遺伝子の発現プロファイルが異なる2群が存在することがわかった。線毛機能の障害が副鼻腔炎発症の一因となっていることは以前から知られているが、non-ECRS の中に線毛機能障害の程度や性質が異なるものが存在し、それらが発症機序や病態に関与することが示されれば、遺伝学的な治療へのアプローチができるようになるかもしれない。

本研究で同定された遺伝子発現の違いが、ECRS の難治性・再発性に関与しているか否かについて、さらなる遺伝子機能解析が必要である。

E . 結論

難治性の好酸球性副鼻腔炎に対して、Whole transcriptome 解析を行い、疾患関連遺伝子の候補を同定した。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer

LC, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP: Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Sep;132(3): 584-592.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2013.02.003. Epub 2013 Mar 28.

2) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Cho SH, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP: Excessive Fibrin Deposition in Nasal Polyps Caused by Fibrinolytic Impairment through Reduction of t-PA Expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Jan 1;187(1): 49-57. doi: 10.1164/rccm.201207-1292OC. Epub 2012 Nov 15

3) Tanaka S, Hirota T, Kamijo A, Ishii H, Hatsushika K, Fujieda S, Ishitoya J, Masuyama K, Tamari M.: Lung Functions of Japanese Patients with Chronic Rhinosinusitis Who Underwent Endoscopic Sinus Surgery. *Allergol Int.* 2013 Nov 25. [Epub ahead of print]

2 . 学会発表

1) 徳永貴広、意元義政、坂下雅文、藤枝重治. 次世代シーケンサーを用いた Whole transcriptome 解析 (RNA-seq)による好酸球性副鼻腔炎関連遺伝子の同定. 第 32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2014.2. 徳島

2) Fujieda S: Diagnosis for eosinophilic chronic rhinosinusitis. The 12th Taiwan-Japan conference on otolaryngology-head and neck surgery. Symposium 2013.12. Taipei

3) 高林哲司、加藤 厚、藤枝重治、Schleimer RP: 肥満細胞の多様性と好酸球性副鼻腔炎に関する検討. 第 63 回日本アレルギー学会 シンポジウム 2013.11. 東京

4) 高林哲司、加藤 厚、藤枝重治、Schleimer RP: 好酸球性副鼻腔炎の病態形成メカニズム. 第 63 回日本アレルギー学会 シンポジウム 2013.11. 東京

5) Tokunaga T, Ninomiya T, Imoto Y, Sakashita M, Takabayashi T, Noguchi E, Arinami T, Fujieda S. Whole Transcriptome using next-generation sequencer (RNA-seq) identifies genes associated with eosinophilic chronic rhinosinusitis. 7th International symposium on recent advances in rhinosinusitis and nasal polyposis. 2013.10. Matsue.

6) 藤枝重治. 好酸球性副鼻腔炎診断ガイドライン -好酸球性副鼻腔炎の診断基準-. 第 52 回日本鼻科学会総会・学術講演会. 2013.9. 福井

7) 藤枝重治: 好酸球性副鼻腔炎診断の診断基準. 第 52 回日本鼻科学会 シンポジウム 2013.9. 福井

8) 富田かおり、鈴木弟、藤枝重治: アスピリン不耐性喘息関連タンパクの機能解析. 第 52 回日本鼻科学会 2013.9. 福井

9) 高林哲司、藤枝重治: 線溶系制御異常による慢性副鼻腔炎の病態形成メカニズムに関する検討 第 52 回日本鼻科学会 基礎アップデートセミナー 2013.9. 福井

10) 高林哲司、加藤 厚、藤枝重治、Schleimer RP: 好酸球性副鼻腔炎の病態形成における肥

満細胞の役割 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会 シンポジウム 2013.5. 横浜

11) 藤枝重治：好酸球性副鼻腔炎の取り扱い.
第114回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 ランチョンセミナー2013.5. 札幌

12) Fujieda S: Eosinophilic chronic rhino-sinusitis. The 45th annual meeting of Koeran Rhinology Society. 2013.3. Seoul

13) 富田かおり、鈴木弟、藤枝重治：アスピリン不耐性喘息関連タンパクの機能解析. 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2013.2. 倉敷

14) 徳永貴広、意元義政、坂下雅文、藤枝重治.
次世代シーケンサーを用いた Whole transcriptome 解析 (RNA-seq)による好酸球性副鼻腔炎関連遺伝子の同定. 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2013.2. 倉敷

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