

アスピリン不耐症喘息患者における難治性鼻茸の網羅的蛋白解析と
次世代シーケンサーを用いた Whole Transcriptome 解析(RNA-Seq)による解析

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
鈴木 弟 福井大学耳鼻咽喉科頭頸部外科学 医員
田 中 幸 枝 福井大学医学部分子生命化学 助教
高 林 哲 司 福井大学耳鼻咽喉科頭頸部外科学 助教
春 名 眞 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：

アスピリン不耐症喘息患者には鼻茸の合併が多く、かつ難治性である。われわれはアスピリン不耐症患者(AIA)と慢性副鼻腔炎患者のそれぞれの鼻茸について、プロテオーム解析を行い、AIA鼻茸においてL-plastinの発現がアスピリン耐性喘息(ATA)鼻茸に比べ増加し、その発現は主に好酸球であることを見出した。機能としては好酸球の遊走に関与していることが判明した。これまでのアスピリン負荷試験などリスクを伴う診断法以外の方法として、L-plastinが有用である可能性が示唆された。

一方で鼻茸中のWhole transcriptome(RNA-seq)を、次世代シーケンサー(NGS)を用いて解析し、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(ECRS)が注目されている。そのような副鼻腔炎では、アスピリン不耐症(AIA)、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。

AIA患者における鼻茸の解明のために、我々はこれまで網羅的蛋白解析(プロテオーム解析)を行ってきた。その結果、AIA群で有意に発現が2倍以上亢進している61スポットと、発現が0.5倍以下に減少している33スポットを同定した。そのうち、AIA群において有意に発現亢進している蛋白としてL-plastinを同定した。本研究では、まずL-plastinの機能

解析を行った。

また一方で、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。

そこで更なる基礎的件研究としてAIA患者の鼻茸におけるWhole transcriptome(RNA-seq)をNGSを用いて解析した。

B．研究方法

1) L-plastinの発現誘導：

好酸球におけるL-plastin機能解析を行うために、apicidinで好酸球に分化誘導した好酸球様細胞株EoL-1を用いて実験を行った。好酸球の活性化・生存・浸潤に重要であるサイトカイン・ケモカイン(IL-4, IL-5, IL-13, RANTES, Eotaxin, TNF α), LTB₄, LTD₄にて刺激し、

L-plastin の発現変化を real time polymerase chain reaction (PCR)法で検討した。

2) Lipopolysaccharide (LPS)とアスピリンの好酸球に及ぼす影響：

EoL-1 細胞株を使用し、LPS、アスピリンそれぞれの存在下、もしくは L-plastin に対する siRNA 遺伝子導入後、EoL-1 細胞株における L-plastin と CysLT1R の mRNA 発現変化を real time PCR 法にて測定した。

3) 好酸球細胞株 EoL-1 細胞の生存率測定：

EoL-1 細胞に L-plastin と negative control に対する siRNA を各々トランスフェクションした。トランスフェクション 1 日目、2 日目、3 日目でトリパンブルー染色し各々の生存率を計測した。細胞数計測には、Countess™ Automated Cell Counter を使用した。

4) 好酸球細胞株 EoL-1 細胞の遊走能測定：

CytoSelect™ 24-well Cell Migration (3 μm), Fluorometric を用いて、L-plastin と negative control の siRNA をトランスフェクションした各々の EoL-1 細胞の細胞遊走能を検討した。さらに GM-CSF1000ng/ml で刺激した。

5) 好酸球細胞株 EoL-1 細胞における CysLT1R の発現：

EoL-1 細胞に L-plastin 及び negative control の siRNA を各々トランスフェクションし、リアルタイム PCR を用いてシステニルロイコトリエン 1 受容体 (CysLT1R) mRNA の発現変化を測定した。

6) Whole transcriptome (RNA-seq)：トランスクリプトーム解析

アスピリン喘息合併を含む好酸球性副鼻腔炎 (E CRS) と非好酸球性副鼻腔炎 (non-E CRS)

とに分類した。E CRS 群の鼻茸 5 例、non-E CRS 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、Lifescopy™ 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、E CRS と non-E CRS 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)

「慢性好酸球性炎症疾患の網羅的遺伝子解析と網羅的蛋白に関する研究」、「慢性副鼻腔炎に関する疫学的調査と遺伝子解析研究」の題名で福井大学医学部倫理委員会の承認を受け、本研究を行った。また、データシート作成は、個人を同定できる情報を削り、代わりに符号をつけて区別管理した。

C . 研究結果

1) 分化誘導した EoL-1 細胞株を IL-4、IL-5、IL-13、RANTES、Eotaxin、TNFα、LTB4、LTD4 で刺激しても、L-plastin の mRNA 発現変化は認められなかった。

2) LPS で刺激することにより、CysLT1R は発現が有意に増加し、L-plastin の発現も増加傾向がみられた。またアスピリンの処理によって LTC4mRNA の発現は上昇した。次に

L-plastin の siRNA を導入すると LPS 刺激による CysLT1R mRNA の上昇は解除された。

3) L-plastin に対する siRNA をトランスフェクションした EoL-1 細胞は、negative control の siRNA 導入した細胞群より、導入 2 日目で生存率が低かった。

4) L-plastin の siRNA 導入により、EoL-1 細胞の GM-CSF 刺激による遊走能は低下した。しかし、GM-CSF1000ng/ml の高濃度刺激では遊走能に差が認められなかった。

5) L-plastin の siRNA 導入により、EoL-1 細胞における CysLT1R mRNA の発現が低下した。

6) 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 遺伝子のうち、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

好酸球様細胞株 EoL-1 を LPS で刺激することにより、CysLT1R 及び L-plastin の発現が増加した。CysLT1R は AIA で発現が亢進しており、AIA 発症に重要な因子の一つである。このことは EoL-1 細胞における LPS 刺激が AIA の in vitro モデルになる可能性が見出された。さらに、L-plastin の発現は CysLT1R 発現に関連しており、L-plastin がアスピリン不耐症に重要な役割を担っていることが示唆された

好酸球細胞株 EoL-1 細胞において L-plastin の発現低下とともに、好酸球細胞株の生存率及び遊走能も低下した。このことは、AIA においては、L-plastin の発現が亢進していることで、好酸球の局所への遊走及び生存を促し、好酸球炎症を惹起していると考えられる。これに加え、L-plastin と好酸球 CysLT1R の発現も関連あることが示された。これまでの報告で、CysLT1R は AIA と深く関連が示されており、L-plastin はこの点からも AIA にとって重要な役割を担っていると考えられる。また、前回の検討で、好酸球細胞株にアスピリンで刺激すると LTC₄ の発現が亢進することがわかった。AIA においては、L-plastin 発現亢進することによって、生存延長し、CysLT1R の発現が亢進した好酸球が局所へ遊走され、自身がアスピリン刺激により産生したロイコトリエンで負の循環に陥っていることが、AIA 発症や AIA 鼻茸が難治性である原因の一つではないかと考えられた。これらより、L-plastin は AIA の診断と治療にも結び付く可能性が示唆された。

トランスクリプトーム解析で同定された 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

好酸球における L-plastin の発現亢進は、好酸球の生存・遊走に重要な役割を担い、なおかつ CysLT1R の発現を亢進させることにより、AIA 発症及び AIA 鼻茸の生成・難治性に関与している可能性を見出した。

また Whole transcriptome 解析を行い、疾患関連遺伝子の候補を同定した。今後その機能について検討していく。

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]

4) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP.: Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Aug ;130(2):410-20.e5.

5) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M.:

- Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2012 Oct 7;44(11):1222-6.
- 6) Yamada T, Yamamoto H, Kubo S, Sakashita M, Tokunaga T, Susuki D, Narita N, Ogi K, Kanno M, Yamashita S, Terasawa Y, Kayano Y, Masada M, Fujieda S: Efficacy of mometasone furoate nasal spray for nasal symptoms, quality of life, rhinitis-disturbed sleep, and nasal nitric oxide in patients with perennial allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc.* 2012 Mar-Apr;33(2):e9-16.
- 7) Fujieda S, Kurono Y, Okubo K, Ichimura K, Enomoto T, Kawauchi H, Masuyama K, Goto M, Suzaki H, Okamoto Y, Takenaka H: Examination, diagnosis and classification for Japanese allergic rhinitis: Japanese guideline. *Auris Nasus Larynx.* 2012 Dec;39(6):553-6. Epub 2012 Mar 7.
- 8) 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.* 57(2):245-50, 2012.2.
- 9) Chang WC, Lee CH, Hirota T, Wang LF, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Ebe K, Saeki H, Takeuchi S, Furue M, Chen WC, Chiu YC, Chang WP, Hong CH, Hsi E, Juo SH, Yu HS, Nakamura Y, Tamari M: ORA11 genetic polymorphisms associated with the susceptibility of atopic dermatitis in Japanese and Taiwanese populations. *PLoS One.* 7(1):e29387. 2012.1.
- 10) Yamada T, Jiang X, Kubo S, Sakashita M, Narita N, Yamamoto H, Sunaga H, Fujieda S: B type CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced BlyS expression and production in human tonsillar fibroblasts. *Clin Immunol.* 141:365-71, 2011.12.
- 11) Yoshimura K, Kawata R, Haruna S, Moriyama H, Hirakawa K, Fujieda S, Masuyama K, Takenaka H: Clinical epidemiological study of 553 patients with chronic rhinosinusitis in Japan. *Allergol Int.* 60(4):491-6, 2011.12
- 12) Higashino M, Takabayashi T, Takahashi N, Okamoto M, Narita N, Kojima A, Hyo S, Kawata R, Takenaka H, Fujieda S: Interleukin-19 downregulates interleukin-4-induced eotaxin production in human nasal fibroblasts. *Allergol Int.* 60(4):449-57, 2011.12.
- 13) Hirota T, Saeki H, Tomita K, Tanaka S, Ebe K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Esaki H, Takeuchi S, Furue M, Noguchi E, Kamatani N, Nakamura Y, Kubo M, Tamari M: Variants of C-C motif chemokine 22 (CCL22) are associated with susceptibility to atopic dermatitis: case-control studies. *PLoS One.* 6(11):e26987. 2011.11
- 14) 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 Genet.* 7(7):e1002170. 2011.7.

15) Okubo K, Kurono Y, Fujieda S, Ogino S, Uchio E, Odajima H, Takenaka H, Baba K: Japanese Society of Allergology: Japanese guideline for allergic rhinitis. *Allergol Int.* 60(2):171-89, 2011.3.

16) Yamamoto H, Yamada T, Takabayashi T, Sunaga H, Oh M, Narita N, Kojima A, Fujieda S: Platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase enhanced human IgE production. *Allergol Int.* 60(1):79-85, 2011.3.

17) 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(1):87-92, 2011.3.

18) Imoto Y, Kojima A, Osawa Y, Sunaga H, Fujieda S: Cough reflex induced by capsaicin inhalation in patients with dysphagia. *Acta Otolaryngol.* 131(1):96-100, 2011.1.

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) 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

8) 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

9) 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

10) 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

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

12) 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

13) 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

14) Susuki D, Tanaka Y, Ito Y, Yamada T, Nomi N, Kodama S, Suzuki M, Tsukidate T, Haruna S, Fujieda S. Proteomics analysis of nasal polyps in aspirin intolerant asthma (AIA) and chronic rhinosinusitis (CRS). The 14th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, April, 13, 2012, Kyoto.

15) Fujieda S, Susuki D, Tanaka Y, Tsukidate T, Haruna S, Yamada T. Proteomics analysis of nasal polyps from patients with aspirin intolerant asthma (AIA). Collegium oto-rhino-laryngologicum micitiae sacrum. August 27, 2012, Roma.

16) 鈴木弟、田中幸枝、月舘利治、伊藤有未、能美希、児玉悟、鈴木正志、山田武千代、

出原賢治、春名眞一、藤枝重治: 鼻茸組織におけるアスピリン不耐症特異的蛋白の検索.

アスピリン不耐症・難治性喘息研究会 2011.11. 東京

17) 鈴木弟、田中幸枝、月舘利治、伊藤有未、能美希、児玉悟、鈴木正志、山田武千代、出原賢治、春名眞一、藤枝重治: アスピリン不耐症と慢性副鼻腔炎における鼻茸の相違 第50回日本鼻科学会学術講演会 2011. 12. 岡山

18) Fujieda S, Sakashita M, Hirota T, Osawa Y, Harada M, Yoshimoto T, Tamari M: Association between genetic variant of interleukin-33 and seasonal allergic rhinitis in the Japanese population. Collegium Oro-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum 2011.9. Bruges, Belgium

19) Fujieda S: New clinical marker for allergic rhinitis. 14th International Rhinology Society & 30th International Symposium on Infection and Allergy of the Nose 2011.9. Tokyo, Japan

20) Fujieda S: New therapeutic strategy for allergic rhinitis. 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery 2011.12. Kobe, Japan

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