

【平成 25 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：

スギ花粉症をはじめとするアレルギー性鼻炎患者が増加していることは、日本における公衆衛生的な大きな問題である。しかしながらなぜ患者数が増加しているか、発症のメカニズムに関しては十分に解明されていない。アレルギー性鼻炎の発症には抗原特異的 IgE が産生される“感作”が必須である。どのように感作され、その後感作から発症に至るかを明確にすることは、今後のアレルギー性鼻炎の新規治療のみならず、アレルギー性鼻炎の予防という観点からも貢献できる可能性が高い。本研究ではスギ花粉症の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とし、3 群間で比較検討をした。その結果鼻上皮細胞ではスギ花粉症患者群とコントロール群間において、発現差が 2 倍以上かつ $p < 0.05$ の 32 遺伝子を同定した。その中でスギ花粉症患者で高発現していた Cystatin SN (CST-1) に注目した。CST-1 はスギ花粉症患者のみならず、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高発現しており、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 は鼻粘膜上皮細胞に発現していることを確認できたが、非アレルギー者の鼻粘膜では 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 はパインとスギ花粉、IL-4 と IL-13、そして IL-25 と TSLP の共刺激により発現が誘導された。また、鼻粘膜上皮細胞にスギ花粉を作用させると、ZO-1 と claudin-1 の mRNA の低下が認められたが、recombinant CST-1 の前処理により、ZO-1 と claudin-1 の mRNA の低下が抑制された。

A．研究目的

スギ花粉症患者は増加傾向を示しており、ここ 10 年間で罹患者数が約 10%増加した。また患者の低年齢化も進んでおり、今後より一層の患者数の増加が危惧されている。これまで福井県における一般集団約 3300 人の調査では、約 60%がスギ花粉に対する血清特異的 IgE を有し、他の吸入系アレルギーと比較して最も感作率が高いことが判明した。一方その中で、約 25%が血清スギ特異的 IgE を有しながら発症していない“感作陽性未発症者”であった。感作された人がどのようにして発症するか、そのメカニズムについては現時点で全く解明されていない。これまで末梢血 CD4 陽性 T 細胞を用いた網羅的遺伝子解析により、スギ花粉症患者において Interleukin 17 receptor B (IL17RB) が有意に増加していることを報告してきた。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）における鼻粘膜擦過細胞の遺伝子を網羅的に解析し、発症に関連する遺伝子を同定し、その機能解析を行うことを目的とした。

B．研究方法

【対象】

対象者は、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群（7 項目吸入アレルギー特異的 IgE 陰性、無症状者）とした。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対象とした。これらの 3 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がない者を対象者とした。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 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 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 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と非アレルギー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 (100unit/ml)とのストレプトマイシン (100µg/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、IL-25、TSLP 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 2 倍以上有意な発現変化を認めた遺伝子は 32 遺伝子であった。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。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 は鼻粘膜上皮細胞に発現していた。

3. 鼻粘膜上皮細胞培養

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)、IL-25、TSLP で 15 時間刺激をするとパパイン、スギ花粉、IL-4 と IL-13、そして IL-25 と TSLP の共刺激により 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 後、鼻粘膜上皮細胞に刺激を行い、鼻粘膜上皮細胞の ZO-1 と claudin-1 発現への影響を調べた。その結果スギ花粉による刺激では、鼻粘膜の ZO-1 と claudin-1 の mRNA が減少したのに対し、スギ花粉と recombinant CST-1 で前処理すると、ZO-1 と claudin-1 の mRNA の発現が非刺激の状態に戻る事が判明した。

D . 考察

鼻粘膜擦過細胞における多数の遺伝子変化は、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内で起こっていることを反映している結果と推測される。鼻は気道の first line として存在しており、容易に抗原が入らないような、もしくは排除するようなバリア機能を有している。

本研究では、スギ花粉症発症関連遺伝子の同定のために、非アレルギー者とスギ花粉症患者のみならず、感作陽性未発症者についても遺伝子発現変化を調べた。その結果、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) 発症の順に上昇しており、CST-1 が発症に関連する遺伝子であることが示唆された。CST-1 は cystatin ファミリーに属する protease inhibitor の一つであり、細菌や寄生虫、ウイルス感染などに関係するという報告がある。CST-1 の誘導には、パパインやスギ花粉といった protease による刺激と、IL-4、IL-13、IL-25 と TSLP といった Th2 サイトカインが必要であった。これらは抗原 (protease) とそれに伴う上皮や炎症細胞から放出されるサイトカインであり、CST-1 は抗原の持つ protease による上皮への刺激を緩衝するために働き、Th2 環境を利用して、気道上皮の恒常性を維持しているかもしれない。

E . 結論

以上の研究成果より、アレルギー性鼻炎の発症に関連する遺伝子として CST-1 が同定できた。CST-1 は発症に関連する遺伝子であり、抗原の protease 活性に対し、防御因子として生体から誘導され、抗原に対する上皮のバリア機能を維持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

Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, Kaneko Y, Yamada H, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Imoto Y, Tokunaga T, Fujieda S, Konno S, Nishimura M, Hizawa N. : Genome-Wide Association Study for Levels of Total Serum IgE Identifies *HLA-C* in a Japanese Population. PLoS One,2013 in press

Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Morishima Y, Tokunaga T, Imoto Y, Noguchi E, Kanemaru K, Imai M, Shibayama S, Hizawa N, Fujieda S, Yamagata K, Shibuya A. : Expression and Function of Allergin-1 on Human Primary Mast Cells. PLoS One. 7;8:e76160,2013

Imoto Y, Tokunaga T, Matsumoto Y, Hamada Y, Ono M, Yamada T, Ito Y, Arinami T, Okano M, Noguchi E, Fujieda S. : Cystatin SN Upregulation in Patients with Seasonal Allergic Rhinitis. PLoS One. 12;8:e67057,2013

Haenuki Y, Matsushita K, 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. 130:184-94,2012

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.

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 ;57:245-50.

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

2 . 学会発表

意元義政、坂下雅文、山田武千代、藤枝重治: スギ花粉症発症関連遺伝子の機能解析.第 32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会,2013.2

意元義政、坂下雅文、徳永貴広、山本英之、加藤雄士、山田武千代、藤枝重治:アレルギー性鼻炎のバイオマーカー,第 25 回日本アレルギー学会春季学術大会 2013.5

意元義政、徳永貴広、藤枝重治:スギ花粉症圧勝に関する遺伝子解析.第 52 回日本鼻科学会総会,2013.9

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