

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：

スギ花粉症研究には、大きく2つの疑問が未解決である。1つは、発症に関する責任遺伝子の同定であり、もう1つは血清スギ特異的 IgE を有していながら発症しない機序解明である。この解決のため、スギ花粉飛散期に末梢血 CD4 陽性 T 細胞、CD14 陽性単核球細胞、鼻上皮細胞を採取し、これらの mRNA のプロファイルを、マイクロアレイを用いて、スギ花粉症発症者およびスギ特異的 IgE 陽性未発症者、および非アレルギー者（スーパーコントロール群）において比較検討をした。その結果、CD4 陽性 T 細胞は、スギ花粉症発症者において有意に IL17RB (Interleukin 17 receptor B) の発現が増大していた。鼻上皮細胞について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遺伝子を同定した。そのうちの Intelectin-1 と Cystatin SN (CST-1) がスギ花粉症患者において高発現であった。Intelectin-1 は、発症者で有意に高値を示した。一方 CST-1 は、感作未発症者でも皮内テスト陽性者において高値を示していた。免疫組織化学では Intelectin-1 は鼻粘膜上皮細胞に、CST-1 は鼻粘膜上皮細胞と線維芽細胞に発現していた。Intelectin-1 は IL-4 と IL-13 の刺激により、CST-1 はパピリンとスギ花粉、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。以上からまだ解明は行えていないが、解析対象にする遺伝子は同定でき、細胞接着分子とプロテアーゼインヒビターの関与が示唆された。

A．研究目的

我々が、2006年から2008年に福井県で行った約3300人のスギ花粉症大規模疫学調査では、約60%の人がスギ特異的 IgE を持っており、全体の35%がスギ花粉症を発症していた。すなわち全体の25%の人は、スギ花粉に対する感作が成立しているが、何らかの機序が働き、まだスギ花粉症を発症しておらず、将来的には発症の可能性が高いことになる。この、スギ花粉発症者、感作陽性未発症者、非アレルギー健康人の3群の免疫状態、炎症状態などを検討することで、抗原感作は予防できないが、発症は阻止できることになる。この戦略こそが、最近の著しく且つ低年齢化の吸入抗原の感作率上昇の現状において、スギ花粉症治療の有力な候補になりえると考えられる。そこで本研究においては、以下の3点について検討した。

1. スギ花粉症の発症に関連する遺伝子を網羅的に解析し、責任遺伝子を同定する。
2. 関連遺伝子がどのような発現パターンを示し、感作から発症においてどのように関連するかを同定する。

3. 見つけた関連遺伝子がどのような機能を有するのかを解析する。

B．研究方法

【対象】

福井大学アレルギーデータベースからスギ花粉症患者群(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(スギ花粉症群)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)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項目である。同時に、気管支喘息やアトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどの既往も調べ、2群とも気管支喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーの既往がない対象者を選んだ。スギ花粉症群では、血清スギ特異的 IgE 陽性であり、他の6項目は陰性である者を選択した。さらにスギ特異的 IgE 陽性未発症者群も抽出した。

【方法】

1. 遺伝子発現解析

対象者より末梢血 100ml を採取し、末梢血単核球を分離した。その後 CD4 MicroBeads (Miltenyi Biotec) 及び CD14 MicroBeads にて標識し、AutoMACS™ Separator (Miltenyi Biotec) により CD4 陽性 T 細胞ならびに CD14 陽性単球細胞を分離した。鼻粘膜上皮細胞は下甲介粘膜を、細胞診用ブラシで数回擦過し、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) を使い、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、Intelectin-1 と CST-1 に対するポリクローナル抗体と、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及び線維芽細胞培養

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。鼻粘膜線維芽細胞は手術時に採取された通年性アレルギー性鼻炎患者の下甲介粘膜より分離し、10% FCS を含む RPMI にて培養した。回収した鼻粘膜上皮細胞及び線維芽細胞を 37、5%CO₂ のインキュベーターにて培養し、LPS (100ng/ml)、IFN-γ (20ng/ml)、TNF-α (10ng/ml)、ヒスタミン (1x10⁻⁴M/ml)、IL-4 (10ng/ml)、IL-13 (10ng/ml)、IL-33 (10ng/ml)、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。そして real time PCR で変化量を数値化した。

(倫理面への配慮)

「アレルギー性鼻炎を中心としたアレルギー疾患の遺伝子解析と蛋白質解析に関する研究」にて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。ヒト末梢血及び鼻粘膜擦過細胞の採取は、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

スギ花粉飛散時期の末梢血 CD4 陽性 T 細胞におけるスギ花粉症群と非アレルギー群との間で 1.5 倍以上有意な発現変化を認めた遺伝子は、AT rich interactive domain 4B (*ARID4B*)、serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1)、Interleukin 17 receptor B (*IL17RB*) の 3 遺伝子であった。しかしこれら 3 遺伝子の mRNA を定量 real-time PCR にて検討すると、再現性が示された遺伝子は *IL17RB* のみであった。一方、CD14 陽性単球細胞ではスギ花粉症群と非アレルギー群で有意な発現変化を示す遺伝子はなかった。

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。そのうちスギ花粉症群において 13 遺伝子は非アレルギー群と比較して発現が有意に上昇していた。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 遺伝子あった。その一つである

Intelectin-1 (*ITLN1*) は非アレルギー群と比較して 17.6 倍、CST-1 は 151.4 倍発現が上昇していた。Intelectin-1 と CST-1 とともに定量的 PCR 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上昇していた ($p < 0.0001$)。また、感作陽性未発症群の中で、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での比較では、Intelectin-1 の発現には差がなかった。一方で CST-1 は皮内反応陽性者が陰性者に比べ有意に発現上昇していた。

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て Intelectin-1、CST-1 の免疫組織化学を行った。Intelectin-1 は鼻粘膜上皮細胞に発現していた。また 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

鼻粘膜上皮細胞の採取直後は Intelectin-1 の発現は確認できたが、初代培養した鼻粘膜上皮細胞では Intelectin-1 の発現がなかった。LPS、IFN- γ 、TNF- α 、ヒスタミン、IL-4、IL-13、IL-33 で 15 時間刺激をすると、IL-4 と IL-13 の刺激で Intelectin-1 の発現が認められた。

鼻粘膜上皮細胞の初代培養細胞を用いてどのような刺激が 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、パピイン、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ピイン、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 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、スギ花粉とさらに 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

CD4 陽性 T 細胞は、Th2 type のアレルギー反応を担う代表的な細胞である。IL-17RB は IL-17 receptor family の一つである。IL17RB のリガンドは IL-17B、IL-17E (IL-25) であり、IL-25 がより高い親和性をもつとされ、気道上皮細胞などで産生された IL-25 が IL-17RB に結合することにより、アレルギー反応が増強すると考えられている。CD4 陽性 IL-17RB 陽性 natural killer (NK) T 細胞に、IL-25 による刺激を加えると IL-4 や IL-13 の産生が亢進するとともに、IL-17RB 抗体によって気道でのアレルギー炎症を抑制することが報告されている。我々の行ったマイクロアレイの結果においても、スギ花粉症群の CD4 陽性 T 細胞における IL17RB が上昇していたことは、アレルギー炎症において IL17RB が重要な役割を担っている可能性を裏付ける結果であると考えられる。以上のことより IL17RB はアレルギー性気道炎症を増悪させる分子であることが推測される。

末梢血細胞と比較して、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。この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。その構成に関わる細胞の多様性の結果だと推測される。鼻は常に様々な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、あるいは排除する機能を有している。そのため、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と考えられる。Intelectin は、ヒトとマウスにおいて Intelectin-1 と Intelectin-2 の 2 つのタイプが同定されている。Intelectin-1 は Omentin、小腸における Lactoferrin receptor と呼ばれ、鉄の吸収やインスリン刺激による糖代謝や脂肪代謝に関連する。また Intelectin は arabinogalactan を認識し結合する。この arabinogalactan は細菌や真菌、原虫に存在するが、ヒトでは存在しないため、Intelectin が細菌や真菌などに結合し、生体の防御機構に関与している可能性があると考えている。マウスの気道上皮細胞では Intelectin-1 が IL-13 により誘導されることが報告されており、我々も鼻粘膜上皮培養細胞において、IL-4 及び

IL-13 で *Intelectin-1* の発現が誘導されることを確認した。また、ヒト喘息患者での気管支上皮では、*Intelectin-1* の発現が上昇していること、遺伝子解析では *Intelectin-1* の遺伝子多型と喘息との関連が報告されている。以上から *Intelectin-1* は喘息やアレルギー性鼻炎など、気道のアレルギー炎症において重要な分子である可能性が示唆される。

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、アレルギー性鼻炎に関連する遺伝子、*IL-17RB*、*Intelectin-1*、*CST-1* が同定できた。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。IL-17RB と *Intelectin-1* は発症に関する遺伝子であることが判明した。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。

今後、目的で述べた3点のことを確実に解決できたならば、スギ花粉に対する感作を防ぐことはできないが、発症は予防できる可能性があると考えている。更なる検討を有する。

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

Yamada T, Saito H, Fujieda S: Present state of Japanese cedar pollinosis: The national affliction. *J Allergy Clin Immunol.* 133(3):632-639.e5, 2014.

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*, 8:e80941, 2013.

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.* 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.* 8:e67057, 2013.

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.* 130(1):184-94.e1, 2012.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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, 2012.1.

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, 2011.9.

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

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

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

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

Imoto Y, Fujieda S : Upregulation of Intelectin 1 in nasal epithelial cells during natural allergen exposure in patients with

seasonal allergic rhinitis. Infection and Allergy of the Nose 2011.9. Tokyo, Japan

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-Laryngology Amicitiae Sacrum 2011.9. Bruges, Belgium

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

意元義政、野口恵美子、有波忠雄、藤枝重治：鼻副鼻腔炎におけるアレルギー性鼻炎関連遺伝子との関連 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011.11

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

1. 特許取得

藤枝重治、高橋昇、大澤陽子、窪誠太、有波忠雄、野口恵美子、牧野友香、内田和彦、大久保公裕：アレルギー疾患の治療薬且つ治療効果のマーカー（特許第 5176229 号）（特願 2008-053768）登録日：平成 25 年 1 月 18 日

野口恵美子、三浦謙治、藤枝重治、伊藤有未、意元義政：活性化型リコンビナント花粉アレルギーの作製方法（特願 2011-178391）

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし