

## 【平成 26 年度報告書】

厚生労働科学研究委託費(難治性疾患等実用化研究事業(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業(免疫アレルギー疾患実用化研究分野)))

### 委託業務成果報告(分担)

#### 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:

スギ花粉症の発症のメカニズム解明のために、網羅的遺伝子解析を行い、候補遺伝子をこれまで報告してきた。この中で Cystatin SN(CST1)がスギ花粉症患者で高発現していた。CST1 をスギ花粉症発症の関連遺伝子と考え、本研究では CST1 について発現機構と機能解析を行った。鼻粘膜上皮細胞において、CST1 の誘導には IL-4 と IL-13、そして tryptase が関与することを見出した。さらに tryptase は IL-4 と IL-13 による CST1 の誘導を増強させた。CST1 を鼻線維芽細胞に作用させると、fibronectin と type collagen の mRNA が増強した。本研究結果より、CST1 は Th2 環境下に誘導され、鼻粘膜における線維化に関与することで、抗原からの防御機構を担うことが示唆された。またこれらの反応には肥満細胞が関与することが考えられた。

#### A . 研究目的

肥満細胞はアレルギー性鼻炎において重要なエフェクター細胞である。肥満細胞が他の免疫細胞や上皮細胞に作用することで、アレルギー炎症を惹起させることが知られている。肥満細胞には様々なフェノタイプが存在しているが、アレルギー性鼻炎発症の段階で、どのようにフェノタイプが変化するか、そして他の免疫細胞や上皮細胞にどのような影響を与えるか、明確にされていない。このため、アレルギー性鼻炎の患者数の増加や低年齢化に歯止めがかからず、とりわけ先進国における問題の一つとなっている。アレルギー性鼻炎が発症するには、抗原に対する感作が必要である。感作は気道以外にも皮膚などで成立することが分かっている。抗原量の増加や大気汚染、食物摂取の変化、そして遺伝的素因が加わることにより感作が成立することが知られている。我々の行った疫学調査では、最も頻度が高い吸入抗原はスギ花粉であり、成人の 57.5%がスギ花粉に対する血清特異的 IgE を有していた。スギ花粉症は日本特有の季節性アレルギー性鼻炎であり、大量かつ広範囲に花粉が飛散するため重症化しやすい。一方で、血清スギ特異的 IgE が陽性でありながら、発症していない者が約 30%存在している。この感作陽性未発症者についてはこれまで報告がなく、今後どのようなメカニズムで発症するか、あるいは発症しないかという点については現時点で予測不可能である。

感作と発症を解明すべく、これまでスギ花粉症患者、スギ感作陽性未発症者、非アレルギー者を対象に、末梢血 CD4 陽性 T 細胞と鼻粘膜擦過細胞について、スギ花粉飛散時期に網羅的遺伝子解析を行

ってきた。その結果末梢血 CD4 陽性 T 細胞では Interleukin17 receptor B(IL17RB)がスギ花粉症患者で上昇していることを見出した。また鼻粘膜擦過細胞ではスギ花粉症患者と非アレルギー者の間で 2 倍以上の有意な差を認めた 32 遺伝子を同定した。このうち、Cystatin SN(CST1)は、スギ花粉症患者で高発現しており、非アレルギー者、スギ感作陽性未発症者、スギ花粉症患者の順に発現が増加していることがわかった。このため、CST1 は感作から発症に関連する遺伝子であることが示唆された。この CST1 についてはアレルギー性鼻炎に関する報告はなく、本研究では CST1 の機能解析を目的とした。

#### B . 研究方法

##### 1.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。下甲介粘膜をブラシで数回擦過し、37℃、5%CO<sub>2</sub>のインキュベーターにて 2 週間培養し、80%のコンフルエントになった段階で使用した。1 x 10<sup>6</sup>個/m の鼻粘膜上皮細胞に、LPS(10ng/ml)、IFN- $\gamma$ (20ng/ml)、IL-4 (100ng/ml)、IL-13 (100ng/ml)、tryptase (100 $\mu$ g/ml)を添加し、刺激後 12 時間、24 時間後に細胞を回収し、RNA 抽出した。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)を用いた。

##### 2.血清 C3a、C5a 測定

スギ花粉症患者、スギ感作陽性未発症者、非アレ

ルギー者のスギ花粉飛散時期の血清中の補体 (C3a, C5a) を ELISA (BD Biosciences, San Diego, US) にて測定した。

### 3. 下甲介粘膜線維芽細胞培養

鼻粘膜線維芽培養細胞株は、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。培養した線維芽細胞にリコンビナント CST1 (100ng/ml) を添加し、添加後 12 時間、24 時間後の fibronectin と type collagen の mRNA の発現量を比較した。

### 4. Picrosiriusred 染色

鼻粘膜における線維化の状態を把握するため、Picrosiriusred 染色を行った。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。

#### (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. CST1 の鼻粘膜上皮細胞における誘導

鼻粘膜上皮細胞において、非刺激の定常状態では CST1 の発現はごく低い発現レベルであった。しかし、IL-4、IL-13、tryptase により CST1 の発現が増加した。さらに tryptase は IL-4 と IL-13 による CST1 誘導をさらに増強させた。

### 2. 血清 C3a, C5a

スギ花粉飛散時期に採取した血清中に含まれる C3a と C5a の濃度を ELISA にて測定した。その結果スギ花粉症患者では、非アレルギー者と比べ C3a、C5a ともに有意に増加していた。一方、スギ感作陽性未発症者は非アレルギー者と比較しても有意な増加はなかった。

### 3. 鼻線維芽細胞における CST1 のコラーゲン産生への影響

培養鼻線維芽細胞にリコンビナント CST1 を添加すると、添加後に fibronectin と type collagen の mRNA が増強した。

### 4. Picrosiriusred 染色

手術で採取した重症アレルギー性鼻炎患者と非アレルギー性鼻炎患者における粘膜下の線維化を検討した。その結果重症アレルギー性鼻炎患者では、基底膜、間質における線維化が顕著に認められた。H-E 染色と比較すると、重症アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜には、好酸球をはじめとする多数の炎症細胞

の浸潤が認められた。

## D . 考察

本研究では CST1 を感作から発症に関連する候補遺伝子として鼻粘膜上皮細胞における誘導機構と機能解析について検討した。CST1 は Cystatin family に属する protease inhibitor である。CST1 の発現は唾液腺や涙腺、膀胱に恒常的に認められ、細菌などの外因性の protease に対する拮抗作用により生体の防御機構を担っている。本研究において、IL-4 と IL-13 といった Th2 サイトカインにより CST1 が誘導されることを見出した。これらの Th2 サイトカインはアレルギー性鼻炎において、肥満細胞や好塩基球、好酸球で産生され、アレルギー炎症を惹起・増強させる。この中心を担うのは肥満細胞である。肥満細胞が抗原特異的 IgE と FcεR とが架橋すると活性化され、ヒスタミンや tryptase を放出する。tryptase は局所の炎症をさらに増加する。CST1 の誘導に IL-4 と IL-13、そして tryptase が関与していることは、鼻粘膜上皮細胞における局所のアレルギー反応を鋭敏に反映していると考えられる。C3a と C5a は肥満細胞や好塩基球に作用し、IL-4 と IL-13 の産生を誘導する。血清 C3a と C5a が上昇することにより、CST1 の発現を増強しているかもしれない。

Cystatin は外因性の protease のみならず、内因性の protease にも作用することで、創傷治癒、免疫反応などに関与していることが知られている。アレルギー性鼻炎と気管支喘息では、粘膜におけるコラーゲン産生の増強、基底膜肥厚、腺組織の増加といった“リモデリング”が認められる。これらの変化は慢性のアレルギー炎症の結果である。本研究で CST1 が気道リモデリングに関与しているかを線維芽細胞で検討した。その結果 CST1 は線維芽細胞におけるコラーゲン産生を増強することを見出した。CST1 がどの内因性 protease に作用するか、あるいは腺組織の増加にどのように関連するかまだ解明されていないが、CST1 がアレルギー性鼻炎の重症化に関連していることが推測された。肥満細胞も、アレルギー炎症のみならず、創傷治癒、免疫において重要な役割を持っている。CST1 は肥満細胞を中心として誘導され、抗原 (=protease) に対し拮抗的に作用すること、気道粘膜のリモデリングに関連することから、鼻粘膜の肥満細胞による一連の炎症反応を鋭敏に反映していると考えられる。

## E . 結論

アレルギー性鼻炎の感作から発症に関連する候補遺伝子として CST-1 の機能解析を行った。CST1 は鼻粘膜における肥満細胞による炎症反応を反映し、リモデリングに関連する役割があることが示唆された。

## 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

意元義政、藤枝重治

スギ花粉症の感作・発症と Cystatin SN の役割：  
耳鼻免疫アレルギー . 32:211-215.2014

Kojima A, Imoto Y, Osawa Y, Fujieda S :  
Predictor of rehabilitation outcome for  
dysphagia. Auris Nasus Larynx. 41(3):294-8,  
2014

### 2 . 学会発表

意元義政、徳永貴広、山田武千代、藤枝重治: スギ  
花粉症発症の感作・発症と Cystatin SN の役割.第  
32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会,2014.2

意元義政、山田武千代、藤枝重治: 喉頭アレルギー  
患者における呼気 NO の検討 . 第 26 回喉頭科学会  
総会 2014.3

意元義政、徳永貴広、山田武千代、藤枝重治: スギ  
花粉症の感作・発症に関する遺伝子の機能解析,  
第 26 回日本アレルギー学会春季学術大会 2014.5

意元義政、徳永貴広、山田武千代、藤枝重治: アレ  
ルギー性鼻炎の感作・発症に関する因子の検討,  
第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会 2014.5

Yoshimasa Imoto, Tetsuji Takabayashi, Shigeharu  
Fujieda: The upregulation of Cystatin SN in nasal  
epithelial cells among patients with allergic rhinitis.  
25th Congress of the European Rhinologic  
Society,2014.6

意元義政、徳永貴広、藤枝重治: 疾患における鼻腔  
一酸化窒素(NO)の検討.第 53 回日本鼻科学会総  
会,2014.9

## 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