

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：12103

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591151

研究課題名（和文） ウイルス感染によって誘発される喘息発作時の遺伝子発現プロファイリング

研究課題名（英文） Gene expression profile induced by viral infection during asthma exacerbation

研究代表者

柴崎 正修（SHIBASAKI MASANAO）

筑波技術大学・保険科学部・教授

研究者番号：30049233

研究成果の概要（和文）：小児気管支ぜんそく発作は呼吸器ウイルス感染により誘発されることがよく知られている。本研究ではウイルス感染によって誘発される喘息発作時の遺伝子発現を検討することにより喘息発作に関連する分子メカニズムを解明することを目的とした。喘息発作により入院を必要とした小児アトピー性喘息患者（n=16）を対象として発作時および非発作時の採血を行い、分離したリンパ球を用いてマイクロアレイ解析を行った。発作時発現上昇が認められた 65 遺伝子、低下していた 5 の遺伝子を喘息発作によって変動した遺伝子として同定した。それらの遺伝子群を Gene Ontology analysis で解析した結果、21 遺伝子が免疫反応に関連し、16 が感染に対する反応、21 が感染防御反応、7 がインターフェロン誘導に関連が認められた。

研究成果の概要（英文）：It is well known that asthma exacerbation in pediatric patients is often induced by respiratory viral infection. In the present study, we examined gene expression profile induced by viral infection during asthma exacerbation. Pediatric patients (n=16) who admitted to the hospital due to asthma exacerbation were enrolled in the study. Blood was taken twice from each patient, once during asthma exacerbation and once during a stable period. Total RNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells and subjected to microarray analysis. Sixty-five/5 genes were significantly up/down-regulated during asthma exacerbation by microarray analysis. Gene ontology analysis revealed that 21 genes were related to immune reaction, 16 genes for immune reaction against pathogens, 21 genes for defense responses against pathogens, and 7 genes for interferon reactions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
総計	4,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：喘息、ウイルス感染、マイクロアレイ

### 1. 研究開始当初の背景

小児気管支喘息は「発作性の呼吸困難、喘鳴、咳などの気道閉塞による症状の繰り返す病態であり、その背景として多くは、気道の過敏性を伴う環境アレルゲンによる慢性のアレルギー性炎症が存在する」と定義される。喘息における慢性気道炎症の存在が明らかになって以来、その治療法は気管支を拡張するβ刺激剤から炎症をおさえるステロイド吸入薬が主流となり、発作のコントロール、患者のQOLは飛躍的に改善した。しかし、現在でも、入院の原因として、喘息発作が占める割合は依然として高く、小児における重要な疾患のひとつである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子発現プロファイルで気管支喘息発作時のウイルス血症の有無、正常コントロールとの比較、臨床症状の違い、気道炎症の程度の違い等により検討することにより、喘息発作に関連する分子メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

#### ライノウイルス血症の同定

気管支喘息患者では呼吸器ウイルス、特にライノウイルスによる感染により発作が増悪することが知られている。喘息発作時にライノウイルスによるものかについての診断を目的として発作時に来院した患者を対象として末梢血単核球の採取を行った。またライノウイルスはウイルス血症を起こすことが報告されている (Xatzipsalti et al, Am J Respir Crit Care Med, 2005) ことから血液中のライノウイルスのRT-PCRを行った。血漿からのRNA抽出にはQIAamp Viral RNA Mini Kit (キアゲン) を使用した。

#### マイクロアレイ解析

喘息発作により入院を必要とする小児アトピー性喘息患者を対象として、書面及び口頭により研究に対する説明を行い、書面によりインフォームドコンセントの得られた患者から発作時および非発作時の採血を行った。採取した静脈血からフィコールを用いてリンパ球を分離後、キアゲン社のRNeasyによりRNAを抽出し、得られたRNAを使用してマイクロアレイ解析 (illumina社のチップを使用) を行った。アレイの発現解析にはGeneSpring (Agilent) を使用した。

### 4. 研究成果

#### ライノウイルス血症の同定

発作で入院した21名の患者のうち、ライノウイルスのウイルス血症がRT-PCRにより確認されたのは1名のみであった。ほか3名にピコルナウイルスが血漿中から喘息同定された。

#### マイクロアレイ解析

発現上昇が認められた65遺伝子、低下していた5の遺伝子を喘息発作によって変動した遺伝子として同定した。それらの遺伝子群をGene Ontology analysisで解析した結果、21遺伝子が免疫反応に関連し、16が感染に対する反応、21が感染防御反応、7がインターフェロン誘導に関連が認められた。また、Chenらの報告 (Am J Respir Cell Mol Biol, 2006) したライノウイルス感染時に気道上皮細胞で誘導された遺伝子と、Lilyらの報告 (Am J Respir Crit Care Med, 2005) したアレルギー誘発試験によって誘導された遺伝子との共通性を検討したところ、ライノウイルス感染時に誘導された遺伝子との高い共通性が認められた。以上から入院を必要とする喘息発作の場合にはその遺伝子発現プロファイルから、アレルゲン暴露より気道感染症の影響が強いことが示唆された。

また、研究代表者および研究分担者はアレルギー疾患の関連遺伝子を同定する目的で、以下の実験を、本研究と同時進行的に遂行し、興味ある結果を得たので、ここに結果を追加して報告する。

#### 研究課題

マイクロアレイ解析から得られた新規花粉症関連遺伝子の機能解析

#### 研究の目的

花粉症を含むアレルギー性鼻炎は働き盛りである20歳から50歳までの罹患率が40%に達し、日本における国民病と位置付けられているが、その治療のほとんどは抗ヒスタミン薬などの対症療法にとどまり日常生活に大きな支障をきたしており、効率的な治療法の開発が急務の課題になっている。スギに対する季節性鼻アレルギー (スギ花粉症) は鼻粘膜を侵襲するI型アレルギーである。しかし、本症の分子生物学的なメカニズムはほとんど明らかにされていない。本研究の目的は、マイクロアレイ法により、花粉飛散期のスギ花粉症の発症に関連する新たな遺伝子を同定することである。

#### 研究の方法

対象は32例のスギ花粉症患者と25例の対照者である。RNAは末梢血単核球から精製されたCD4陽性細胞から抽出され、Illumina Human Ref8 BeadChip arrayによりマイクロアレイ解析された。遺伝子の発現はMann-Whitney testにより比較された。結果はQuantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)により確認された。

#### 研究成果

花粉飛散時期には3つの遺伝子で両群間に有意な差が認められた。3遺伝子の中でも、interleukin 17 receptor beta (IL17RB)の発現は、花粉症患者でアレルギーのない正常対照者に比較して増加していた。real-time RT-PCRによるIL17RBの発現倍率は3.9倍(P = 0.003)であった。これらのことから、スギ花粉症患者では、花粉飛翔時期にIL17RBの遺伝子発現が増加することが明らかとなった。この結果は、今後の花粉症の分子メカニズムの解明に貢献するものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, Yatagai Y, Yamada H, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N. Asthma Phenotypes in Japanese Adults - Their Associations with the CCL5 and ADRB2 Genotypes. 査読あり. Allergol Int. Epub Dec 25 2012.
- ② Iijima H, Kaneko Y, Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T, Naito T, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N. A Distinct Sensitization Pattern Associated with Asthma and the Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) Genotype. 査読あり. Allergol Int. Epub Dec 5 2012.
- ③ 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. 査読あり. PLoS Genet 7:e1002170, 2011.

- ④ 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. 査読あり. Allergol Int 60:87-92, 2011.
- ⑤ 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. 査読あり. PLoS One 6:e26987, 2011.
- ⑥ Makino Y, Noguchi E, Takahashi N, Matsumoto Y, Kubo S, Yamada T, Imoto Y, Ito Y, Osawa Y, Shibasaki M, Uchida K, Meno K, Suzuki H, Okubo K, Arinami T, Fujieda S. Apolipoprotein A-IV is a candidate target molecule for the treatment of seasonal allergic rhinitis. 査読あり. J Allergy Clin Immunol 126:1163-9, 2010.
- ⑦ Imoto Y, Enomoto H, Fujieda S, Okamoto M, Sakashita M, Susuki D, Okada M, Hirota T, Tamari M, Ebe K, Arinami T, Noguchi E. S2554X mutation in the filaggrin gene is associated with allergen sensitization in the Japanese population. 査読あり. J Allergy Clin Immunol 125:498-500. 2010.
- ⑧ 野口恵美子 アレルギー疾患のトランスクリプトーム解析とプロテオミクス. 査読なし, 小児科 52:823-832, 2011.
- ⑨ 野口恵美子 アレルギー疾患発症とIgE産生能にかかわる遺伝要因. 査読なし, アレルギーの臨床 415:392-396 2011.

[学会発表] (計6件)

- ① 徳永貴広, 意元義政, 野口恵美子, 有波忠雄, 藤枝重治 次世代シーケンサーを用いたWhole Transcriptome解析によるスギ花粉症関連遺伝子の同定. 第62回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012年11月30日 大阪.
- ② 野口恵美子 次世代シーケンサーのアレルギー疾患研究への応用. 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会 2012年5

月 12 日 大阪.

- ③ 意元義政, 野口恵美子, 藤枝重治 鼻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 年 11 月 10 日 東京.
- ④ 野口恵美子 遺伝子の情報をどのように臨床にむすびつけていくか? ゲノム解析とトランスクリプトーム解析. 第 11 回愛知免疫アレルギーを語る会 2011 年 4 月 23 日 名古屋.
- ⑤ 野口恵美子 ゲノム解析によるアレルギー疾患の疾患感受性遺伝子の同定. 関東アレルギークラブ 2011 年 2 月 12 日 東京.
- ⑥ 意元義政, 野口恵美子, 有波忠雄, 藤枝重治 副鼻腔炎重治 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の同定. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010 年 11 月 26 日 東京.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴崎 正修 (SHIBASAKI MASANAO)  
筑波技術大学・保健科学部・教授  
研究者番号: 30049233

### (2) 研究分担者

有波 忠雄 (ARINAMI TADAO)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号: 10212648  
野口 恵美子 (NOGUCHI EMIKO)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号: 40344882