

## 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24年5月31日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791583

研究課題名（和文） 酸化ストレス代謝酵素CYP1A1のSNPがアレルギー性鼻炎発症に及ぼす影響

研究課題名（英文） Influence between genetic variant of oxidative stress relating gene CYP1A1 and allergic rhinitis

研究代表者

坂下 雅文（SAKASHITA MASAFUMI）

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40555455

研究成果の概要（和文）：

アレルギー疾患の発症、増悪に深く関係する酸化ストレスを受けた場合、CYP1A1が働きストレス解消に働くのではないかとというのが今回の研究の着想である。これまでに申請者は、CYP1A1遺伝子のイントロンにおける遺伝子多型（SNP）が、アレルギー性鼻炎発症と有意な相関を示していることを見いだしている。

本研究では、CYP1A1を高発現する細胞株 HepG2 において、プロモーター領域におけるSNPsが転写調節に及ぼす影響の解析を行なった。イントロン1のSNPでのリスクアレルAを挿入したベクターにおいて、低い転写活性を認めたことから、酸化ストレスに対してストレス解消の活性が低いことがアレルギー性鼻炎の発症に関与しているのではないかと考えた。そして、そのメカニズムがSNPによって決定されている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

Oxidative stress is one of a key components of inflammation for upper airway diseases. Diesel exhaust particles (DEP) and asian sand dust increase oxidative stress and influence upper airway disorder including allergic rhinitis. Cytochrom 1A1(CYP1A1) is one of the Cytochrome P450 enzymes, catalyze the biotransformation of a wide variety of xenobiotic compounds such as DEP and asian sand dust. We screened single-nucleotide polymorphisms (SNPs) at the CYP1A1 locus and performed an association study in the Japanese population. (619 patients with allergic rhinitis, 311 controls) Functional analysis of the SNP using transient transfection reporter gene assay was conducted. We identified 9SNPs at this locus and found this region consisted of one linkage disequilibrium block represented by three SNPs (tag SNPs). The association between the intron 1 polymorphism in the CYP1A1 gene and adult allergic rhinitis was significant. ( $p = 0.002$ , OR = 1.51, 95% C.I. = 1.1-1.7) Risk allele containing construct showed significantly lower induction of CYP1A1 promoter activity in reporter gene assay. ( $p < 0.01$ ) Our results support a role for CYP1A1 in the pathogenesis of allergic rhinitis in the Japanese population.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学  
科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学  
キーワード：鼻科学、鼻アレルギー

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎の罹患率は近年増加、若年化の一途をたどっている。我々が、2006-7年に福井大学職員および学生 1540 人を調査した結果、有病率は 44.2%と高い数値であった (Int Arch Allergy Immunol. 2009 Sep 29;151(3):255-261)。全国的にも、医療費の増加や患者の Quality of Life (QOL)の低下は社会的に非常に大きな問題であり、病態の解明および発症の予防は急務とされている。

アレルギー性鼻炎の真の原因をひとつにしぼることは困難であるが、産業の発展や社会環境の変化とともに増加してきたことは疫学的にも示されており、ディーゼル排出粒子(diesel exhaust particles: DEPs)や内分泌攪乱物質による、酸化ストレスとアレルギー性鼻炎の発症は以前から注目されている。

これまで当教室では、DEPs とカモガヤ花粉を経鼻投与すると、ヒト鼻汁中において、炎症細胞数の増加、炎症性サイトカインや特異的 IgE 値が上昇すること (Fujieda S et.al Am J Respir Cell Mol Biol. 1998 Sep;19(3):507-12.)、DEPs 刺激をしたヒト気道上皮細胞からのエオタキシン産生が上昇するというのを見いだしている。

酸化ストレスは生体内での活性酸素(reactive oxygen species: ROS)産生とそれらの抑制系のバランスが乱れ ROS が過剰になる状態であり、それらが免疫抑制細胞のアポトーシスや炎症性サイトカイン産生を誘導する。

DEPs は炭素物質に多種の化合物 PAHs (多環式芳香族化合物)や Quinons (キノン)から構成されるものである。この化合物にマクロファージや気道・鼻上皮細胞が曝露を受けると解毒機構として CYP1A1 が働く。CYP1A1 の発現や機能が異なれば受けたストレスの影響も自ずと違ってくる。

これまでに申請者は、CYP1A1 遺伝子のイントロンにおける遺伝子多型 (SNP) が、アレルギー性鼻炎発症と有意な相関を示しているのを見いだしている。アレルギー性鼻炎 619 例対健常人 311 例の結果、SNP rs4646421 において、 $p=0.002$ , odds ratio=1.4, 95%C.I.=1.1-1.7 であった。すなわち、酸化ストレスによる反応の違いが SNP によって決定されている可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、遺伝子多型の手法を用いて酸化ストレス代謝酵素 CYP1A1 の多型とアレルギー性鼻炎の発症について検討すると

ともに、CYP1A1 遺伝子多型の機能解析を行なった。

### 3. 研究の方法

(1) CYP1A1 を高発現する細胞株を選出するために、23 種 (RAJI, THP1, HL60, U937, Jurkat, Molt4, Daudi, Molt3, K562, KU812, LAD2, MRC5, MCF7, HEK293, HeLa, A549, BEAS2B, HepG2, MRC5, NHBE, NHLF, SAEC, BSMC) から CYP1A1 発現をスクリーニングした。

(2) イントロン SNP のアレルによる違いがプロモーターとして CYP1A1 遺伝子発現に及ぼす影響を解析するため、イントロン SNP における 25 塩基の配列をプラスミドベクターに挿入し、上記にて選出した細胞株をもちいてルシフェラーゼアッセイ (レポータージーンアッセイ) を行った。

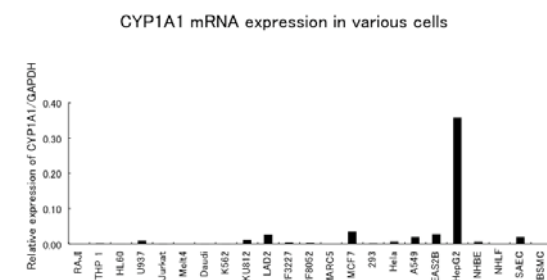
(3) 組織中の発現を確認するために、bone marrow, brain(whole), heart, kidney, liver, lung(whole), trachea, skeletal muscle, spleen, thymus, small intestine, peripheral leukocyte, skin, nasal tissue の 15 種の組織においてメッセンジャーRNA の発現をスクリーニングした。

### (4) タンパク発現解析

ウエスタンブロッティングにより CYP1A1 タンパク発現を確認した。選出した HepG2 細胞株に Pifithrin- $\alpha$  (CYP1A1 の誘導に関わる AhR (aryl hydrocarbon receptor) の agonist) を用いて刺激を行ないポジティブコントロールとした。

### 4. 研究成果

(1) 23 種の細胞株 (から CYP1A1 遺伝子発現をスクリーニングした結果、HepG2 で高発現を認めたため、CYP1A1 を高発現する細胞株として HepG2 を選出した。



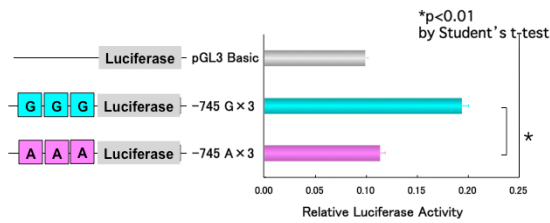
機能解析に使用できる細胞としてHepG2、BEAS2Bが考えられる

(2) 転写活性の解析

イントロン 1 の SNP でのリスクアレル A を挿入したベクターにおいて、低い転写活性を認めた。

レポーター遺伝子アッセイ

HepG2

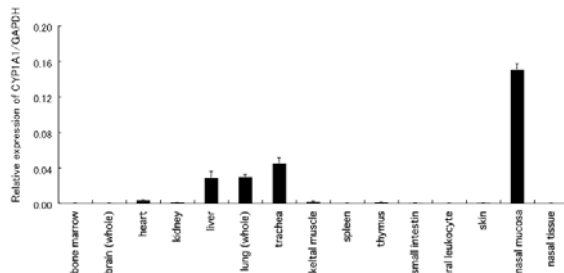


リスクアレルの-745Aにおいて低い転写活性を認めた

(3) 組織中の CYP1A1 mRNA 発現解析

肝臓、肺、気管と鼻粘膜において高い発現が見られた。

CYP1A1 mRNA expression in various cells

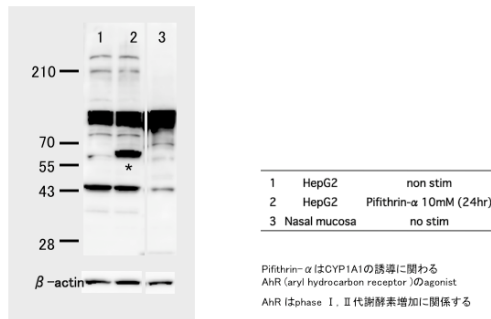


肝臓、肺、気管と鼻粘膜において高い発現がみられた  
鼻組織では発現は低かった

(4) タンパク発現の解析

健常者の無刺激下甲介粘膜では CYP1A1 は発現しなかった。一方、アレルギー性鼻炎のない健常人の鼻粘膜上皮細胞を用いてウエスタンブロッティングを行ったが、健常人の鼻粘膜上皮細胞では CYP1A1 タンパクの発現は認めなかった。

Western blotting analysis of CYP1A1 in nasal mucosa



2レーンにおける(\*)がCYP1A1(56kDa)と思われる

Nasal mucosaにおいてCYP1A1タンパクは検出できなかった 3

まとめ

DEPs および酸化ストレス代謝に関連する CYP1A1 遺伝子多型とスギ花粉症発症の関連を認めた。Intron 1 の-745G/A 近傍の配列はアレルの違いにより転写活性に影響を与える可能性がある。

同部位の SNP においてリスクアレル A を持つ個体では、CYP1A1 の転写活性が低いために、代謝過程において残存した細胞障害物質による炎症状態が生じ、スギ花粉曝露が加わることでアレルギー炎症が惹起される可能性がある。

タンパク発現解析実験では、健常人の鼻粘膜上皮細胞において CYP1A1 の発現は見られなかった。今後、健常人およびアレルギー性鼻炎の鼻粘膜上皮細胞を用いて誘発刺激に対するタンパク発現解析を、イントロン 1 の SNP のアレル別の集団において解析する必要がある。

アレルギー性鼻炎における、遺伝子多型解析の報告は気管支喘息やアトピー生皮膚炎に比べて少なく、機能解析を行なっている報告も少ないところに今回の研究の重要性がある。

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 6 件)

① 坂下雅文、藤枝重治

V. アレルギー性鼻炎のゲノム解析の現況  
アレルギー・免疫

Vol. 18, No. 9, 38-46, 2011、査読無

② 坂下雅文、藤枝重治

花粉症の遺伝～子供に花粉症は遺伝するのか?～チャイルドヘルス

Vol. 15, No. 2, 8-12, 2011、査読無

③ 藤枝重治、坂下雅文、窪誠太、大澤陽子

免疫療法の作用メカニズム  
喘息 24(1): 2-7, 2011、査読無

④ Hirota T, Sakashita M (25 人中 6 番目), Yamada T, Fujieda S, 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, 査読有  
DOI:10.1371/journal.pone.0026987

⑤ Yamada T, Jiang X, Kubo S, Sakashita M

(8 人中 4 番目), 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(3):365-71. 2011, 査読有  
DOI:10.1016/j.clim.2011.09.012

⑥Noguchi E, Hirota T, Sakashita M (34人中6番目), Fujieda S. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. PLoS Genet. 7(7):e1002170. 2011 査読有  
DOI:10.1371/journal.pgen.1002170

[学会発表] (計4件)

①Association between genetic variant of interleukin (IL)-33 and allergic rhinitis in the Japanese population  
Masafumi Sakashitaほか6名  
XIVIRS-XXXISIAN  
2011年9月20-23日、東京

②The impact of Asian sand Dust on allergic rhinitis  
Masafumi Sakashitaほか8名  
第42回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会  
2011年6月3-4日、愛知

③スギ花粉症患者の症状への黄砂の影響  
坂下雅文ほか6名  
第23回日本アレルギー学会春季臨床大会  
一般講演 (ポスター)  
2011年5月14から5日、千葉

④スギ特異的舌下免疫療法の治療効果に相関するマーカー分子の検討 (2)  
坂下雅文ほか6名  
第29回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会  
2011年2月10-12日、大分

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂下雅文 (SAKASHITA MASAFUMI)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 40555455

(2) 研究分担者 なし

### (3) 研究協力者

藤枝重治 (FUJIEDA SHIGEHARU)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号: 30238539