

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592004

研究課題名(和文) エピジェネティック解析に基づく慢性副鼻腔炎に対する新しい治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of New Treatment Strategies for Chronic Rhinosinusitis Based on Epigenetic Analysis

研究代表者

吉川 衛 (YOSHIKAWA MAMORU)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：50277092

研究成果の概要(和文)：慢性副鼻腔炎の難治症例の臨床的背景を検討した結果から、要因として鼻副鼻腔粘膜にウイルス感染に対する反応性の違いが存在するのではないかと考えた。本研究課題では、polyI:Cで刺激した線維芽細胞におけるIP-10やI-TACなどのIFN誘導性遺伝子の発現をDNAメチル基転換酵素阻害剤(脱メチル化剤)やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の処理前後で比較し、転写調節にDNAのメチル化状態やヒストンの修飾状態(アセチル化)が関与しているかを確認した。将来的には、難治性の慢性副鼻腔炎に対する有効な治療として、エピジェネティック制御化合物の創薬をめざすことを目標としている。

研究成果の概要(英文)：As a results of investigation of clinical background concerning intractable chronic rhinosinusitis, we thought that nasal sinus mucosa differences in reactivity against virus infection exists. We verified whether or not the expression of IFN-induced genes such as IP-10 and I-TAC, compares the before and after the incubation with DNA methyltransferase (DNMT) inhibitors and histone deacetylase (HDAC) inhibitors. We identified that histone acetylation is involved in transcriptional regulation. We targeted to drug discovery for epigenetic control as effective therapy for intractable chronic rhinosinusitis in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：インターフェロン誘導性遺伝子、ウイルス感染、エピジェネティック解析、気管支喘息、慢性副鼻腔炎

1. 研究開始当初の背景

慢性副鼻腔炎は、粘膿性鼻漏、鼻閉、嗅覚障害、頭重感などの生活に支障をきたす症状が長期にわたって持続し、かつ約3～4%と比較的高い有病率を示す疾患である。その治療に関しては、マクロライド療法が確立したこ

とにより保存的治療の治癒率が飛躍的に向上し、また1980年代より内視鏡手術(endoscopic sinus surgery: ESS)が導入され、術後にマクロライド療法を併用することによりさらに高い治癒率を得た。しかしある程度の治癒率を得ると、一部の慢性副鼻腔炎

患者において、このような治療を行ってもポリープの再発を繰り返す特徴的な難治症例が存在することが次第に明らかになってきた。

このような難治症例の臨床的な背景を検討したところ、アスピリン喘息(AIA)を含む非アトピー性気管支喘息を合併している症例が多く、末梢血中の好酸球増多や鼻粘膜、ポリープに著しい好酸球浸潤があること、ステロイドの内服が著効することなどがわかってきた。その上、このような難治症例の臨床経過において病態の増悪期に感冒様の症状を伴うことが多くみられ、既に慢性副鼻腔炎とウイルス感染の関連を示唆する報告もあることから、この難治化の要因として鼻副鼻腔粘膜にウイルス感染に対する反応性の違いが存在するのではないかと考えた。

そこで、種々の病態の局所に存在する細胞の性格について、病変部位と正常組織からの培養細胞で比較検討を行った *in vitro* の実験系の報告が既に数多くあることをふまえ (Park CC, et al: Mol Med Today 2000; 6: 324-329.) (Silzle T, et al: Eur J Immunol 2003; 33: 1311-1320.) (Silzle T, et al: Int J Cancer 2004; 108: 173-180.)、慢性副鼻腔炎患者のうち難治症例として非アトピー性気管支喘息合併例 (AIA を含む) と、対照として非合併例から手術時に採取した鼻組織由来の線維芽細胞を培養し、ウイルス由来二重鎖 RNA を認識するレセプターである Toll-like receptor (TLR)3 を介する応答性の違いについて、GeneChip (Affymetrix 社) を用いて包括的に遺伝子発現についてスクリーニングを行った。その結果、TLR3 のリガンドである polyI:C で刺激を行うと、難治症例由来の細胞では IP-10 や I-TAC を含むいくつかのインターフェロン (IFN) 誘導性遺伝子の発現が増強しており、各培養細胞に保存された遺伝子発現パターンの変化が慢性副鼻腔炎の難治化に関与している可能性を示唆した。TLR3 を介した IFN 誘導性遺伝子の発現についてはアダプター分子である TRIF または IPS-1 を介するシグナル伝達経路が知られている。そこで、難治症例の鼻副鼻腔粘膜に存在する線維芽細胞では、IFN 誘導性遺伝子の発現を調節しているこれらのシグナル伝達因子に何らかの変異が存在し、IFN 誘導性遺伝子の発現を増強させているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究課題は、これまで過去 4 年間継続して行ってきた慢性副鼻腔炎における予後不良因子の新規同定という課題をふまえて、再発を繰り返す難治症例由来の線維芽細胞で polyI:C 刺激時の IFN 誘導性遺伝子の発現が増強していたという研究成果をさらに追究し、原因となる因子の同定とその機序の解明

を目的とした。さらに慢性副鼻腔炎の病態におけるウイルス感染に対する反応性の違いに関する原因と、培養細胞レベルでの検討結果で見出された IFN 誘導性遺伝子の発現増強との関連性についても検討し、将来的な臨床応用に向けた基礎的研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

難治症例由来の線維芽細胞における polyI:C 刺激時の IFN 誘導性遺伝子の発現パターンの違いに関与する因子の同定として、(1)①慢性副鼻腔炎患者を、難治症例として②気管支喘息を合併する症例および③アスピリン喘息を合併する症例、その対照として④いかなる喘息も合併しない症例の 3 群に分類し、各群の患者より手術時に採取した鼻組織から線維芽細胞を培養する。(2)これらの線維芽細胞を polyI:C で刺激した後、IP-10 や I-TAC などの IFN 誘導性遺伝子を発現する過程で活性化されるシグナル伝達因子および転写調節因子について、①②③各群間で発現レベルや活性化状態に変化の見られる分子を Quantitative real-time PCR 法および Western blotting 法などを用いて解析する。(3)同時に polyI:C 刺激の際に、シグナル伝達に関わる酵素の阻害剤を用いて、IFN 誘導性遺伝子の発現の違いに関与する因子の関わるシグナルカスケードを絞り込む。(4)絞り込まれた因子について、さらに siRNA を利用した遺伝子の抑制系や、ウイルスベクターを使った遺伝子導入による強制発現系の検討方法を利用して機能解析を行い、IFN 誘導性遺伝子の発現パターンの違いに関与する因子を同定する。

この結果同定された因子の発現調節におけるクロマチン構造変化の関与についての検討として、(1)polyI:C で刺激した線維芽細胞を、DNA メチル基転換酵素阻害剤 (脱メチル化剤) である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である Trichostatin A (TSA) で処理する。(2)IP-10 や I-TAC などの IFN 誘導性遺伝子や、I で同定した因子の発現を処理前後で比較し、転写調節に DNA のメチル化状態やヒストンの修飾状態 (アセチル化) が関与しているかを確認する。

これらの因子のプロモーター領域でのクロマチン構造変化についての検討として、3 群の線維芽細胞について、これまでの検討で同定された因子のプロモーター領域を中心にクロマチン構造の変化を確認する。(1)ヒストン蛋白質の化学的修飾 (メチル化、アセチル化) の確認には、培養細胞上でヒストンと DNA をホルムアルデヒドで固定し、様々なヒストンの修飾状態に応じた抗体を用いて近傍の DNA 配列を得る、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を行う。使用する抗ヒストン抗体

としては、転写活性化領域の指標の代表としてアセチル化 H3K9 およびメチル化 H3K4、転写抑制領域の指標の代表としてメチル化 H3K27 を用いる。抗体ごとに各細胞より採取した DNA を用いて、同定された因子または IFN 誘導性遺伝子のプロモーター領域に設計されたプライマーにより PCR を行うことで、難治症例由来の線維芽細胞に特異的なヒストンの修飾状態を解析する。(2) また、同定された因子のプロモーター領域における DNA のメチル化を調べるために、各細胞から得られた DNA を bisulfite (亜硫酸水素塩) 処理し、メチル化されたシトシンをウラシルへと変換させる技術を用いて、プロモーターのメチル化推定領域に設計されたプライマーにより PCR を行うことで、難治症例由来の線維芽細胞に特異的な DNA のメチル化状態や部位を解析する。

4. 研究成果

慢性副鼻腔炎患者の①気管支喘息合併症例、②アスピリン喘息合併症例③非喘息合併症例由来の各組織から線維芽細胞を培養し、poly I:C で刺激した後、GeneChip (Affimetrix 社) を用いて遺伝子解析を行った。このデータを GeneSpring (Silicon Genetics 社) によりクラスタリング解析を行い、poly (I:C) 刺激によって発現の増強する遺伝子群のうち、アスピリン喘息合併症例由来の線維芽細胞において他の病態と比べて特に発現が増強している遺伝子群を抽出すると、その中にインターフェロン誘導性遺伝子であるケモカインの IP-10 と I-TAC が含まれていた。これらを Real-time PCR で再現性の確認を行ったところ、気管支喘息およびアスピリン喘息合併症例において、poly (I:C) 刺激による IP-10 と I-TAC の mRNA 発現増強が両者の合併のない例と比較して増強されていた。さらに同様の結果が ELISA での培養上清中のタンパク発現においても確認された。

Poly I:C などの double strand RNA (dsRNA) は TLR3 を介して細胞内にシグナルを伝えるが、その下流では Myd88 非依存的に Toll/IL-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor (TRIF) を介し、NFκB を活性化する経路と IRF-3 を活性化する経路との 2 つが存在することが知られている (Science, 2003)。そこで次に、NFκB と IRF がアスピリン合併症例由来の線維芽細胞における IP-10, I-TAC の発現増強にどのように関与しているかどうかを、TNF-α (NFκB 活性化系) および IFN-γ (IRF 活性化系) で刺激をすることで検討した。すると、TNF-α 刺激での IP-10 および I-TAC の遺伝子発現は非喘息合併例に比べ、気管支喘息合併例、アスピリン喘息合併例で有意に高いことがわかった。一方、IFN-γ 刺激ではア

スピリン喘息合併例において特に有意な発現増強が見られた。よって、喘息合併症例においては、poly (I:C) 刺激で NFκB 経路の過剰な活性化が惹起され、IP-10 や I-TAC の遺伝子発現増強に関与している。さらにアスピリン喘息合併例では NFκB に加え IRF の経路の過剰な活性化が惹起され、これらが相乗的に IP-10 や I-TAC の遺伝子発現増強に関与している可能性が示唆される。

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 2 件)

- 1) Yoshimura T, Yoshikawa M, Otori N, Haruna S, Moriyama H. Correlation between the prostaglandin D₂/E₂ ratio in nasal polyps and the recalcitrant pathophysiology of chronic rhinosinusitis associated with bronchial asthma. Allergol Int. 2008; 57(4): 429-36.
- 2) 吉村剛, 吉川衛, 鴻信義, 春名眞一, 森山寛. 喘息を合併する慢性副鼻腔炎におけるロイコトリエンの関与について. 耳展 2008; 51(1): 26-32.

[学会発表] (計 2 件)

- 1) Yoshikawa M, Yoshimura T, Otori N, Haruna S, Moriyama H. Correlation between the Prostaglandin D₂/E₂ Ratio in Nasal polyps and the Recalcitrant Pathophysiology of Chronic Rhinosinusitis Associated with Bronchial Asthma. 29th EAACI Annual Congress 2010; London.
- 2) 中山次久, 浅香大也, 大櫛哲史, 松脇由典, 吉川衛, 鴻信義, 森山寛. 好酸球性副鼻腔炎の診断基準に関する検討. 日本鼻科学会 2010; 札幌.

[図書] (計 1 件)

- 1) 吉川衛. DNAチップによる遺伝子発現解析. 森山 寛 他 編. 今日の耳鼻咽喉科頭頸部外科治療指針 第 3 版. 東京; 医学書院, 2008; 609-10.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 衛 (YOSHIKAWA MAMORU)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：50277092