

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18275

研究課題名(和文) 鼻上皮細胞のエピゲノム解析を用いたアレルギー性鼻炎の新規診断方法と予防方法

研究課題名(英文) Novel diagnostic and preventive methods for allergic rhinitis using epigenetic analysis of nasal epithelial cells

研究代表者

渡辺 浩介 (Watanabe, Hiroyuki)

山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員

研究者番号：20622434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：鼻アレルギーは高い有病率を持ち、スギ花粉症については国民病と揶揄されるほど身近な疾患である。治療法は重症度を参考とするが、重症度に関するバイオマーカーは存在しない。そこで私が注目したのはエピゲノムを用いたアレルギー性鼻炎の重症度の判定法である。70名の参加者より採取した鼻上皮細胞のエピゲノム解析を進めたところ、LPCAT2に関連する領域のメチル化傾向と重症度に有意な関連を認めた。なお、LPCAT2は鼻漏や鼻閉を増悪させる血小板活性化因子をコードする遺伝子である。鼻粘膜は容易に採取できる検体であり、鼻粘膜のLPCAT2のメチル化解析は、今後の鼻アレルギー診療の一助となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鼻アレルギーは高い有病率を持つ。治療法は重症度を参考とするが、重症度に関するバイオマーカーは存在しない。種々の疾患はバイオマーカーを参考にしながら対応しているが、鼻アレルギーに関しては専ら自覚症状をもとに治療を選択している。本研究では鼻アレルギーの重症度に関するバイオマーカーを見出すことである。私が注目したのはエピゲノムを用いたアレルギー性鼻炎の重症度の判定法であり、70名の参加者より採取した鼻上皮細胞のエピゲノム解析を進めたところ、LPCAT2に関連する領域のメチル化傾向と重症度に有意な関連を認めた。LPCAT2のメチル化解析は、今後の鼻アレルギー診療の一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Nasal allergy has a high prevalence, and cedar pollinosis is so common that it is ridiculed as a national disease. Treatment is based on the severity, but there is no biomarker for severity. I focused on an epigenomic method to determine the severity of allergic rhinitis using epigenome analysis of nasal epithelial cells collected from 70 participants, and found a significant association between methylation tendency of LPCAT2-related regions and severity. LPCAT2 is a gene encoding a platelet-activating factor that aggravates rhinorrhea and nasal obstruction. Since the nasal mucosa is an easily collected specimen, methylation analysis of LPCAT2 in the nasal mucosa may help in the future practice of rhinological allergy.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：アレルギー、遺伝子

キーワード：アレルギー性鼻炎 エピゲノム 遺伝子 スギ花粉症 LPCAT2 メチル化 バイオマーカー 重症度

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎は有病率が高く、近年では増加傾向で有効な予防方法もないため、アレルギー性鼻炎のメカニズム解明は喫緊の課題となっている。近年ではアレルギー疾患を含む慢性疾患に対しては、発症や病態にエピゲノムが関与することが報告されており、アレルギー性鼻炎においても同様に考えられる。遺伝子は生まれながらに配列が決まっており、その後生涯変わることがないが、エピゲノムは種々の環境曝露により後天的に DNA の修飾が行われることで遺伝子発現が制御される機構である。このエピゲノムとアレルギー性鼻炎の関連性を解析した研究報告はまだ少ない。

アレルギー性鼻炎に対する治療方法は、本邦では重症度を評価しながら決定される。アレルギー性鼻炎の重症度判定は、鼻漏と鼻閉とくしゃみの程度を患者自身の評価をもとに決定される。他覚的にアレルギー性鼻炎の重症度を評価のできるバイオマーカーはない。

## 2. 研究の目的

本邦の鼻アレルギーガイドラインでは、アレルギー性鼻炎は重症度ごとに治療方針が選択されているが、重症度は患者への詳細な問診でのみ判定される。現状では重症度に関連するバイオマーカーはない。本研究の目的は、季節性アレルギー性鼻炎であるスギ花粉症を対象に、末梢血単核細胞と鼻粘膜を解析し、アレルギー性鼻炎の重症度のバイオマーカーとなるエピゲノムを解析することである。本研究の解析対象遺伝子は、エピゲノムの先行研究で IgE 抗体やアレルギー性鼻炎との関連が示されている LPCAT2、IL4、ACOT7、MUC4、SLFN12 とした。

## 3. 研究の方法

### 【対象者】

2019年3月19日から4月30日の間(スギ花粉飛散時期)に、山梨大学医学部附属病院、頭頸部・耳鼻咽喉科の外来受付にてスギ花粉症症状の有無によらず参加者を募集した。参加者には書面を用いて説明し同意を得た。山梨大学医学部倫理委員会の承認を得ている。(No1963)

### 【解析対象】

対象者から末梢血と鼻粘膜の擦過細胞(nasal mucosa scraping cells, NMSCs)を採取した。日本の鼻アレルギー診療ガイドラインを参考にスギ花粉症の重症度を判定した。

### 【IgE抗体】

IgE抗体はFEIA法にて測定された。非特異的IgE抗体と4つの抗原特異的IgE抗体(スギ花粉、ハンノキ、カモガヤ、ダニ)の測定を行った。

### 【スギ花粉症の定義、無症状者の分類】

スギ花粉症の定義は以下の から をすべて満たすものとした。スギ花粉飛散時期にアレルギー性鼻炎症状(くしゃみ、鼻漏、鼻閉)を3年以上繰り返すこと、あるいは医師にスギ花粉症と診断されていること、 受付の時点でアレルギー性鼻炎症状があること、 スギ花粉特異的IgE抗体が0.7Ua/mL以上であること。なお本検討では抗原特異的IgE抗体が0.7Ua/mL以上(class2以上)のとき、該当抗原の感作陽性とした。また、症状のない者は、スギ花粉感作陰性の群をSen(-)Sym(-)群、スギ花粉感作陽性の群をSen(+)Sym(-)群とした。(スギ花粉症の群はCPとし、スギ花粉感作陽性で症状があるためSen(+)Sym(+))とも言い換えられる。)

### 【DNAの抽出、DNA methylation analysis(バイサルファイトシーケンス法)】

末梢血から分離した末梢血単核細胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)と、鼻粘膜の擦過で得られた鼻粘膜の擦過細胞(nasal mucosa scraping cells, NMSCs)からDNAの抽出を行った。各DNAはバイサルファイト変換を行ったのち、本研究のメチル化解析対象領域(LPCAT2、IL4、ACOT7、MUC4、SLFN12のそれぞれの領域)が含まれるようにPrimerを設計しPCRにて領域を増幅した。

その後のメチル化解析は次世代シーケンサーを用いた。この手法はバイサルファイトシーケンス法で、DNA上の領域を自由に指定して、その領域内の個々のCpG単位のメチル化レベルまで算出可能である。

### 【統計解析】

各遺伝子の平均メチル化レベルと非特異的IgE抗体、またスギ花粉特異的IgE抗体(CS IgE)と

の相関解析は Pearson correlation coefficient tests を行った。CP と Sen(+)*Sym*(-)と Sen(-)*Sym*(-)の 3 群の各遺伝子の平均メチル化レベルの比較には ANOVA を行い、その後 2 群ずつ Student's *t*-tests を行った。各遺伝子の平均メチル化率と重症度の傾向検定には、Jonckheere-Terpstra 検定を用いた。P<0.05 を統計学的に有意とした。解析ソフトは SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, N.C.)を用いた。

#### 4 . 研究成果

##### 【参加者】

参加者は合計 70 名で有症状 37 名 (そのうち CP は 32 名)、無症状 33 名 (Sen(+)*Sym*(-)13 名、Sen(-)*Sym*(-)19 名)であった。

##### 【非特異的・スギ花粉特異的 IgE 抗体、および DNA のメチル化】

70 名の参加者の非特異的およびスギ花粉特異的 IgE 抗体と PBMC および NMSC の各遺伝子の平均メチル化について解析した。

非特異的 IgE 抗体は PBMC の IL4 の平均メチル化と有意な相関を認めた ( $r=-0.46$ ,  $P<0.0001$ )。スギ花粉 IgE 抗体は PBMC の IL4、MUC4 の平均メチル化と有意な相関を認めた(それぞれ  $r=-0.31$ ,  $P=0.01$ 、 $r=-0.241$ ,  $P=0.046$ )。

##### 【症状の有無、スギ花粉感作の有無に関する DNA のメチル化】

Sen(-)*Sym*(-)群 19 名、Sen(-)*Sym*(+)群 13 名、CP 群 32 名について、PBMC および NMSC の各 DNA のメチル化レベルの差を解析した。PBMC における IL4 の平均 DNA メチル化レベルは、Sen(-)*Sym*(-)群では Sen(+)*Sym*(-)群および CP 群に比べて有意に高かった (それぞれ  $P=0.002$ 、 $P=0.014$ ) が、Sen(+)*Sym*(-)群と CP 群では有意な差は認められなかった。すなわち、PBMC の IL4 のメチル化レベルはスギ花粉感作の有無では有意な差を認めたが、症状の有無では有意な差は認められなかった。

##### 【重症度と DNA のメチル化】

CP 群 15 名のそれぞれの重症度 (軽症 3 名、中等症 7 名、重症/最重症 5 名)ごとに、メチル化レベルの傾向を検定すると、NMSC の LPCAT2 のメチル化レベルのみ重症度が増すに従い有意に低下する傾向を認めた。(  $P=0.027$ , Jonckheere-Terpstra test )

#### 考察

IL4 と MUC4 のメチル化レベルは IgE 抗体との関連を認めたものの、いずれも症状の有無や重症度とは統計学的に有意な関連は見いだせなかった。NMSC における LPCAT2 のメチル化は重症度と関連した。LPCAT2 は、PAF(Platelet-activating factor)の産生に関連しており、PAF は鼻汁の分泌や鼻粘膜の腫脹に関連するため、LPCAT2 と重症度との関連は理解しやすい。PBMC ではなく NMSC の LPCAT2 のメチル化レベルが重症度と有意な傾向を認めたが、鼻粘膜は外界の環境曝露を受けやすい組織であり、アレルギー炎症を起こしている直接的な組織であるためかもしれない。NMSC の LPCAT2 のメチル化により重症度が推定できる可能性が示唆されたことから、NMSC の LPCAT2 のメチル化は AR 診療の補助となる新規のバイオマーカーとなる可能性が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroyuki Watanabe, Kunio Miyake, Tomokazu Matsuoka, Reiji Kojima, Daiju Sakurai, Keisuke Masuyama, Zentaro Yamagata	4. 巻 35
2. 論文標題 LPCAT2 Methylation, a Novel Biomarker for the Severity of Cedar Pollen Allergic Rhinitis in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Rhinology & Allergy	6. 最初と最後の頁 631-639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1945892420983646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------