

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390397

研究課題名(和文) 網羅的解析を組み合わせたスギ花粉症に対する遺伝子多型からの発症予防と治療戦略

研究課題名(英文) Prevent and therapeutic strategy by combination of microarray and proteomics for seasonal allergic rhinitis caused by Japanese cedar pollen.

研究代表者

藤枝 重治 (Fujieda, Shigeharu)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：30238539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：本邦において全成人の60%がスギ抗原に対してIgEを持っており、40%がスギ花粉症を発症している。本研究では、どのような遺伝子を持つ人が、もしくはどのような蛋白を発現している人がスギ花粉症を発症しているのか、網羅的に解析した。その結果ORMDL-3、CST-1、IL-33、Allergin-1、Apolipoprotein A4が機能的に関与しており、さらに幾つかの候補遺伝子を見出した。

研究成果の概要(英文)：Sixty percent of adult in Japan have Japanese cedar pollen (JCP)-specific IgE. Prevalence of allergic rhinitis (AR) caused by JCP (AR-JCP) in Japanese adults is 40%. In this study we investigated AR-JCP-related gene by genome wide associated study, and gene expression by microarray and proteome analysis. We found that ORMDL-3, CST-1, IL-33, Allergin-1, and Apolipoprotein A4 are associated with onset of AR-JCP. Several SNP are also found to be associated with AR-JCP.

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：スギ花粉症 アレルギー性鼻炎 網羅的解析 遺伝子多型 ORMDL-3 Intelectin-1 Apolipoprotein A4 C3a

1. 研究開始当初の背景

- (1) 成人約2200名からなる吸入抗原特異的IgEを含むデータベースを作成したところ、スギ花粉感作率は60%、発症率は40%であり、7種抗原すべて陰性者は30%にしかすぎなかった。遺伝子多型(SNP)解析の結果からORMDL3、Intelectin-1の遺伝子がスギ花粉症に関連していることを見出した。ORMDL3:TT型は危険塩基ホモでスギ花粉症が有意に多く、かつORMDL3のRNA発現が亢進していた。特に鼻粘膜上皮で多くのORMDL3の発現を認めた。ORMDL3が肥満細胞の脱顆粒に関連するスフィンゴ脂質代謝を制御することが報告された。スギ花粉症患者鼻粘膜でのIntelectin-1は、有意な発現亢進を認めたが、未発症者では、Intelectin-1発現は低値であった。
- (2) 舌下免疫療法を行い効果が認められたスギ花粉症患者の網羅的蛋白解析では血清中に有意に高いApolipoprotein A4 (ApoA4)を認め、症状薬物スコアと有意な逆相関を示した。リコンビナントApoA4を作成し、好塩基球によるスギ抗原刺激ヒスタミン遊離試験に添加すると、有意にヒスタミンの遊離を抑制した。
- (3) 鼻粘膜のマイクロアレーの結果、スギ花粉症患者において健常人に比べ、CST-1の発現が鼻粘膜において有意に高いことを見出した。またスギ花粉感作陰性者では、鼻粘膜中CST-1は低値を示し、未発症者でも感作陽性で皮内テスト陽性者では、高値を示した。
- (4) IL-33ノックアウトマウスの研究からアレルギー性鼻炎発症には、IL-33とが必須であることが判明した。
- (5) IgE依存性のアナフィラキシーを抑制するAllergin-1がマウスで見つかった。

2. 研究の目的

- (1) 上述した遺伝子多型における特徴的蛋白発現、遺伝子発現制御因子の同定、相互の関係、補体不活性化の影響を調べることにより、スギ花粉症発症原因、予防、新しい分子標的治療因子を明らかにする。

- (2) ORMDL3、Apo A4、DAF、補体C3もしくはC3a、Intelectin-1、CST-1の機能を解析する。
- (3) ヒトにおけるスギ花粉症患者鼻粘膜でのIL-33、Allergin-1の発現状態を解明する。

3. 研究の方法

- (1) ORMDL3 遺伝子におけるrs7216389 部位の遺伝子多型TT型群、TA型群、AA型群で採血し、MACSを使用してCD4+T細胞を分離後、IL-17産生をELISAで測定した。またCD4+T細胞をpolyI:Cで刺激しその上清中、およびその患者血清中スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)を測定した。不活化B細胞株のアレル別にORMDL3の発現をRT-PCRで調べた。鼻粘膜線維芽細胞、肥満細胞において各種刺激でORMDL3発現に変化がないかRT-PCRで調べた。
- (2) ApoA-IV knockoutマウス(n=5)およびwild typeマウス(n=10)にOVAによるアレルギー性鼻炎を誘導し、くしゃみと鼻掻き回数の測定を行った。また血清サンプル中の総IgE、OVA特異的IgEをELISAで測定した。脾臓細胞中のIL5、IL13、IFN γ をELISAにより測定を行った。脾臓細胞および頸部リンパ節におけるIL13、IFN α の発現をリアルタイムPCRにて調べた。鼻組織をHE染色し、浸潤好酸球を比較した。
- (3) 抗CST-1抗体、抗intelectin-1抗体を用いてスギ花粉症患者、健常人での免疫組織化学を行った。鼻粘膜上皮細胞をスギ花粉飛散中に、下甲介粘膜を細胞診用ブラシで数回擦過し採取した。鼻粘膜上皮に対してプロテアーゼや抗原で刺激し、CST-1、細胞間接着因子の発現に変化がないかRT-PCRで調べた。
- (4) IgE関連遺伝子を検討すべくGenome-wide association study (GWAS)を行った。次に候補遺伝子アプローチによるSNP解析を行った。
- (5) ヒト肺のプライマリ肥満細胞、鼻粘膜内の肥満細胞においてAllergin-1が発現しているのか、フローサイトメトリを用いて細胞を分離後、RT-PCRにて確認した。
- (6) アレルギー性鼻炎患者、健常人の鼻粘膜擦過細胞をともに採取して次世代シーケン

サーにて解析を行った。

4. 研究成果

(1) ORMDL3 遺伝子におけるrs7216389 部位のリスクアレル型: TT型のスギ花粉症患者CD4陽性細胞からは、有意に高いIL-17が産生された。血清中S1Pは差を認めなかったが、CD4+T細胞をpolyI:Cで刺激するとTT型の人においてS1Pは有意に産生された。さらに不活化B細胞株では、TT発現株でORMDL3のmRNA発現が有意に高値であった。また鼻粘膜由来線維芽細胞においてLPS/MALP-2刺激では変動しないが、polyI:C刺激にてORMDL3の発現が亢進した。肥満細胞株においてもpolyI:C刺激でORMDL3の発現が亢進した。

(2) くしゃみは鼻投与後 15 分からの比較でApoA-IV knockout マウスにおいて有意に症状が多かった。また、鼻搔き回数は鼻投与後 10 分からの比較で ApoA-IV knockout マウスにおいて有意に症状が多かった。しかし、総 IgE、OVA 特異的 IgE 値、IL5、IL13、IFN γ の産生・発現、好酸球浸潤に差はなかった。

(3) 鼻粘膜において CST-1 の発現が認められた。CST-1 は protease inhibitor であり、パイン刺激によって産生が亢進した。その際上皮組織の tight junction の一つである ZO-1 の発現が低下した。さらに Occludin と claudin の発現も低下した。また、E-cadherin の発現も低下させた。鼻粘膜上皮に IL-4、IL-13 刺激をすると Intelectin-1 の mRNA は発現した。アレルギー性鼻炎患者下鼻甲介粘膜では、上皮、CD14 陽性単球が ntelection-1 陽性であった。

(4) GWAS では、PYHIN1/IFI16、MHC Class I と II、LEMD2、GRAMD1B、chr13:60576338 の 6 つの遺伝子が高 IgE と関連していた。また HLA-C 領域の rs313094 が血清中総 IgE 値と有意に相関していた。

(5) Allergin-1 のスプライシング isoform である Allergin-1S1 はヒト肺由来肥満細胞や鼻粘膜で優勢に発現しており、マウスの

Allergin-1 と同様の作用をしていることを証明した。

(6) 次世代シーケンサーの解析では、正常人に比較してアレルギー性鼻炎患者鼻粘膜で 2 倍以上の発現を認めている 13 遺伝子と半分以下の発現しか認めない 8 遺伝子を同定できた。

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 27 件)

(1) Yamada T, Saito H, Fujieda S. Present state of Japanese cedar pollinosis: the national affliction. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Mar;133(3):632-9. e5. doi: 10.1016/j.jaci.2013.11.002. 査読(有)

(2) Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, et al. Genome-wide association study for levels of total serum IgE identifies HLA-C in a Japanese population. *PLoS One*. 2013 Dec 4;8(12):e80941. doi: 10.1371/journal.pone.0080941. eCollection 2013. 査読(有)

(3) Okamoto Y, Ohta N, Okano M, et al. Guiding principles of subcutaneous immunotherapy for allergic rhinitis in Japan. *Auris Nasus Larynx*. 2014 Feb;41(1):1-5. doi: 10.1016/j.anl.2013.06.003. 査読(有)

(4) Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Morishima Y, et al. Expression and function of Allergin-1 on human primary mast cells. *PLoS One*. 2013 Oct 7;8(10):e76160. doi: 10.1371/journal.pone.0076160. 査読(有)

(5) Imoto Y, Tokunaga T, Matsumoto Y, et al. Cystatin SN upregulation in patients with seasonal allergic rhinitis. *PLoS One*. 2013

Aug 12;8(8):e67057. doi: 10.1371/journal.pone.0067057. 査読 (有)

(6) Tomita K, Sakashita M, Hirota T, et al. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy*. 2013 Jan;68(1):92-100. doi: 10.1111/all.12066. 査読 (有)

(7) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Sep;132(3): 584-592.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2013.02.003. 査読 (有)

(8) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Jan 1;187(1):49-57. doi: 10.1164/rccm.201207-12920C. 査読 (有)

(9) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, et al. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet*. 2012 Nov;44(11):1222-6. doi: 10.1038/ng.2438. 査読 (有)

(10) Kubo S, Yamada T, Osawa Y, et al. Cytosine-phosphate-guanosine-DNA induces CD274 expression in human B cells and suppresses T helper type 2 cytokine production in pollen antigen-stimulated CD4-positive cells. *Clin Exp Immunol*. 2012 Jul;169(1):1-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04585.x. 査読 (有)

(11) Takabayashi T, Kato A, Peters AT, et al. Glandular mast cells with distinct phenotype are highly elevated in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Aug;130(2):410-20.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2012.02.046. 査読 (有)

(12) Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, et al. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jul;130(1):184-94.e11. doi: 10.1016/j.jaci.2012.02.013. 査読 (有)

(13) Fujieda S, Kurono Y, Okubo K, et al. Examination, diagnosis and classification for Japanese allergic rhinitis: Japanese guideline. *Auris Nasus Larynx*. 2012 Dec;39(6):553-6. doi: 10.1016/j.anl.2011.12.006. 査読 (有)

(14) Yamamoto H, Yamada T, Sakashita M, et al. Efficacy of prophylactic treatment with montelukast and montelukast plus add-on loratadine for seasonal allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc*. 2012 Mar-Apr;33(2): e17-22. doi: 10.2500/aap.2012.33.3514. 査読 (有)

(15) Yamada T, Yamamoto H, Kubo S, et al. Efficacy of mometasone furoate nasal spray for nasal symptoms, quality of life, rhinitis-disturbed sleep, and nasal nitric oxide in patients with perennial allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc*. 2012 Mar-Apr;33(2):e9-16. doi: 10.2500/aap.2012.33.3509. 査読 (有)

- (16) Chang WC, Lee CH, Hirota T, et al. ORA11 genetic polymorphisms associated with the susceptibility of atopic dermatitis in Japanese and Taiwanese populations. *PLoS One*. 2012;7(1):e29387. doi: 10.1371/journal.pone.0029387. 査読 (有)
- (17) Osawa Y, Suzuki D, Ito Y, et al. Prevalence of inhaled antigen sensitization and nasal eosinophils in Japanese children under two years old. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012 Feb;76(2):189-93. doi: 10.1016/j.ijporl.2011.10.024. 査読 (有)
- (18) Hirota T, Saeki H, Tomita K, et al. Variants of C-C motif chemokine 22 (CCL22) are associated with susceptibility to atopic dermatitis: case-control studies. *PLoS One*. 2011;6(11):e26987. doi: 10.1371/journal.pone.0026987. 査読 (有)
- (19) Yamada T, Saito Y, Kimura Y, et al. CpG-DNA suppress poly (I:C)-induced TSLP production in human laryngeal arytenoids fibroblasts. *Cytokine*. 2012 Feb;57(2):245-50. doi: 10.1016/j.cyto.2011.10.012. 査読 (有)
- (20) Yamada T, Jiang X, Kubo S, et al. B type CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced BLYS expression and production in human tonsillar fibroblasts. *Clin Immunol*. 2011 Dec;141(3):365-71. doi: 10.1016/j.clim.2011.09.012. 査読 (有)
- (21) Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, et al. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Genet*. 2011 Jul;7(7):e1002170. doi: 10.1371/journal.pgen.1002171. 査読 (有)
- (22) Ogi K, Nakashima K, Chihara K, et al. Enhancement of B-cell receptor signaling by a point mutation of adaptor protein 3BP2 identified in human inherited disease cherubism. *Genes Cells*. 2011 Sep;16(9):951-60. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01539.x. 査読 (有)
- (23) Okubo K, Kurono Y, Fujieda S, et al. Japanese guideline for allergic rhinitis. *Allergol Int*. 2011 Mar;60(2):171-89. doi: 10.2332/allergolint.11-RAI-0334. 査読 (有)
- (24) Higashino M, Takabayashi T, Takahashi N, et al. Interleukin-19 Downregulates Interleukin-4-Induced Eotaxin Production in Human Nasal Fibroblasts. *Allergol Int*. 2011 Dec;60(4):449-57. doi: 10.2332/allergolint.10-0A-0262. 査読 (有)
- (25) Yamamoto H, Yamada T, Takabayashi T, et al. Platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase enhanced human IgE production. *Allergol Int*. 2011 Mar;60(1):79-85. doi: 10.2332/allergolint.10-0A-0220. 査読 (有)
- (26) Matsumoto Y, Noguchi E, Imoto Y, et al. Upregulation of IL17RB during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergol Int*. 2011 Mar;60(1):87-92. doi: 10.2332/allergolint.10-0A-0230. 査読 (有)
- (27) Yonekura S, Okamoto Y, Yamasaki K, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of ten-cha (*Rubus*

suavissimus) on house dust mite allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx*. 2011 Oct;38(5):600-7. doi: 10.1016/j.anl.2010.11.017. 査読 (有)

〔学会発表〕(計8件)

(1) Fujieda S, Sakashita M, Imoto Y, et al. Sublingual immunotherapy for seasonal allergic rhinitis caused by Japanese cedar. 16th Asian research symposium in rhinology. 2013.8.29. Tokyo

(2) 藤枝重治. アレルギー性鼻炎の診断と治療, 第38回日耳鼻夏期講習会, 2012.07, 軽井沢

(3) 坂下雅文, 藤枝重治. アレルギー性鼻炎治療効果に相関するバイオマーカーの探索, 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2012.05.12, 大阪

(4) Fujieda S. New strategy of the monitoring and the treatment for allergic rhinitis, 2012 KAAACI annual international congress and east asia allergy symposium, 2012.05.25, Seoul (Korea)

(5) 藤枝重治: 難治性アレルギー性鼻炎とは?, 第23回日本アレルギー学会春季臨床大会 教育セミナー3, 2011.05.14, 幕張

(6) Fujieda S. New therapeutic strategy for allergic rhinitis, 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2011.12.08, Kobe

(7) Fujieda S, Sakasita M, Hirota T, et al. Association between genetic variant of interleukin-33 and seasonal allergic rhinitis in the Japanese population, *Collegium Oro-Rhino-Laryngologygicum Amicitiae Sacrum*, 2011.09.05, Bruges (Belgium)

(8) Fujieda S. New clinical marker for allergic rhinitis, 14th International

Rhinology Society & 30th International Symposium on Infection and Allergy of the Nose, 2011.09.20, Tokyo

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称: 活性化型リコンビナント花粉アレルギーの作製方法

発明者: 野口恵美子、三浦謙治、藤枝重治、伊藤有未、意元義政

権利者: 筑波大学、福井大学

種類: ライフサイエンス分野

番号: 特願 2011-178391

出願年月日: 平成23年8月17日

国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称: アレルギー疾患の治療薬且つ治療効果のマーカー

発明者: 藤枝重治、高橋昇、大澤陽子、窪誠太、有波忠雄、野口恵美子、牧野友香、内田和彦、大久保公裕

権利者: 福井大学、筑波大学

種類: ライフサイエンス分野

番号: 特許第5176229号

取得年月日: 平成25年1月18日

国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤枝重治 (FUJIEDA Shigeharu)

福井大学・医学部・教授

研究者番号: 30238539

(2) 研究分担者

野口恵美子 (NOGUCHI Emiko)

筑波大学・医学(系)研究科(研究院)・
准教授

研究者番号: 40344882

坂下雅文 (SHAKASHITA Masafumi)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 40555455

(3) 連携研究者

なし