

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：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791761

研究課題名(和文) アレルギー性鼻炎における感作・発症に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of sensitization and onset of allergic rhinitis

研究代表者

意元 義政 (Imoto, Yoshimasa)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50418703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：当施設で調査した3453人の中で、スギ花粉に対する血清特異的IgE保有者は、57.5%であり、その中でスギ花粉症を発症していたのは72.2%であった。残りの27.8%は感作陽性未発症者であった。非アレルギー者、感作陽性未発症者、スギ花粉症患者の血清ケモカイン濃度を測定し、発症予測因子を検討した。また鼻粘膜上皮細胞における遺伝子発現解析を行い、感作から発症に関する遺伝子としてcystatin SN(CST1)を同定した。

研究成果の概要(英文)：We measured Japanese cedar (JC) specific IgE in serum about 3453 subjects and found that 57.5% of these subjects possess JC-specific IgE. Among them who have high-JC-specific IgE, 72.2% of these subjects show allergic rhinitis (AR) related symptoms during JC pollen, while the other subjects had not experienced any AR related symptoms. These subjects are only sensitized subjects. We studied the levels of chemokines related to AR among non-atopic subjects, sensitized subjects, and patients with seasonal allergic rhinitis by JC pollen in order to predict onset of AR. We also performed gene expression analysis and found that Cystatin SN (CST1) was a candidate gene that affect sensitization and onset of AR.

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：アレルギー性鼻炎

1. 研究開始当初の背景

スギ花粉症患者は増加傾向にあり、その社会的影響と経済的損出は大きく、日本における社会問題の一つとなっている。スギ花粉症がなぜ特定の個人のみが発症するのか、抗原特異的 IgE 抗体産生がどのように生じるかなど、依然としてスギ花粉症発症のメカニズムについて不明な点が多い。スギ花粉症には抗原特異的 IgE が関与するが、一方で血清スギ特異的 IgE が陽性でありながら、スギ花粉飛散時期に全く花粉症症状を示さない未発症者(感作陽性未発症者)が存在する。この感作陽性未発症者に関する報告は皆無であり、発症に対する予測は現時点で不可能である。これまで申請者は感作陽性未発症のメカニズム解明のため、スギ花粉症患者群、感作陽性未発症群、非アレルギー群(コントロール群)の3群間での網羅的遺伝子発現解析を行ってきた。解析は末梢血中を循環する CD4 陽性 T 細胞、CD14 陽性単球細胞、ならびに鼻上皮擦過細胞を使用した。これらの細胞から total RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析を行った。結果以下のことが判明した。

(1).末梢血 CD4 陽性 T 細胞に関しては、スギ花粉症患者と非アレルギー群で統計学的に 1.5 倍以上差を認めた遺伝子は *IL17RB* (interleukin17 receptor B)であり、スギ花粉症患者において有意に高く発現していた。定量的 real-time PCR にて同様の結果が得られ、*IL17RB* が、スギ花粉症発症に関与する遺伝子と考えられた。

(2).鼻上皮細胞の網羅的遺伝子発現解析についてはスギ花粉症患者群とコントロール群において、発現差が2倍以上かつ $p < 0.05$ の 32 遺伝子を同定した。その中で、コントロール群とスギ花粉症患者を比較して、特に高発現であった遺伝子を対象に、定量的 real-time PCR を行った。その結果、顕著に有意差の強く認められる *Intelectin 1* (*ITLN1*)と *Cystatin SN* (*CST1*)を見出した。スギ花粉飛散量が異なる 2009 年と 2010 年度の 2 つのスギ花粉シーズンでも、スギ花粉症患者では健常者と比較して有意に高発現していることが確認できた。

2. 研究の目的

これまで申請者は、スギ花粉症の感作、発症に関する遺伝子を検索するために、網羅的遺伝子解析を行ってきた。その結果、*IL17RB* (interleukin17 receptor B)、*ITLN1*(*intelectin1*)、*CST1*(*Cystatin Sn*)をはじめとする数個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子がどのような機能を有し、どの様に制御され、スギ花粉抗原感作から発症に至るかを明らかにすることは、スギ花粉症発症のメカニズムを解明する上で必須である。感

作陽性未発症者について全く研究がなされておらず、非アレルギー者、感作陽性未発症者、スギ花粉症患者における血清サイトカイン濃度を測定し、感作から発症における予測因子を検討した。また、鼻粘膜における *Intelectin 1* と *Cystatin SN* の機能解析を行い、感作から発症のメカニズムの解明を行う。

3. 研究の方法

(1).スギ花粉に対する感作率・発症率の検討
福井大学及び関連施設においてこれまでスギ花粉をはじめとする吸入抗原(スギ、コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、カモガヤ、ブタクサ、アスペルギルス、カンジダ)の血清特異的 IgE とアレルギー性鼻炎(通年性・季節性)の症状の有無についてのアンケート調査を行ってきた。この調査を継続した。

(2).スギ花粉症患者、スギ感作陽性未発症者、非アレルギー者における血清ケモカイン測定

スギ花粉症患者、スギ感作陽性未発症者、非アレルギー者を抽出し、スギ花粉飛散時期(3月中旬)に血清を採取し、Eotaxin、RANTES、MCP-1、MIP1- α 、MIP1- β を Human Chemokine Five-Plex Antibody Bead Kit (Invitrogen)を用いて測定した。

(3).*Intelectin 1* と *Cystatin SN* の機能解析
免疫組織化学

免疫組織化学は、*Intelectin 1* 及び、*Cystatin SN* に対するポリクローナル抗体と、ヒツジ IgG に対する 2 次抗体を使用した。染色に用いた組織は福井大学において手術時に採取されたアレルギー性鼻炎患者と非アレルギー患者の下甲介粘膜を用いた。

末梢血単核球に対する *Intelectin 1* と *Cystatin SN* の影響

スギ花粉症患者より末梢血 20ml を採取し、濃度勾配法を用いて末梢血単核球を分離した。これにスギ抗原である Cryj1 と recombinant *Intelectin1* 及び *Cystatin SN*(10mg/ml)を作用させ、作用後 24 時間後の Eotaxin、IFN- γ 、IL1- β 、IL-4、IL-5、IL-13、MCP-1、MCP-3、TNF- α 、RANTES の濃度を milliplex(Millipore)で測定した。

Intelectin 1 と *Cystatin SN* の鼻粘膜上皮細胞における誘導

鼻粘膜上皮細胞初代培養細胞株は、通年性アレルギー性鼻炎かつスギ花粉症患者から樹立した。RNA 用の鼻粘膜上皮細胞回収と同様に数回擦過し、すぐにペニシリン(100unit/ml)とのストレプトマイシン(100 μ g/ml)を含む培養液に回収した。培養した鼻粘膜上皮細胞を 37、5%CO₂ のインキュベーターにて培養し、LPS、IFN- γ 、TNF- α 、

ヒスタミン、IL-4、IL-13、IL-33、パパイ
ン、スギ花粉、Cryj-1、IL-25、TSLP を添加
し、刺激後 15 時間後に細胞を回収し、RNA を
抽出、その後 cDNA を合成し、定量 real-time
PCR にて mRNA の発現量を測定した。

4. 研究成果

(1).

3452 名に対し、スギ花粉に対する血清特異
的 IgE の測定と、スギ花粉症の症状の有無に
ついてのアンケート調査を行った。その結果
スギ花粉に対する感作率は 57.5%であり、以
前我々が報告したように、吸入抗原の中では
最も高い感作率を示した。その中で毎年花粉
症症状が出現しているには 72.2%で、残りの
27.8%はスギ花粉に対する血清特異的 IgE を
有しながら発症していないスギ感作陽性未
発症者であった。

(2).

血清中 RANTES は、スギ花粉症患者群にお
いて他の 2 群よりも有意に上昇していた。(非
アレルギー群：8551.96pg/ml、感作陽性未発
症群：7674.68pg/ml、スギ花粉症患者群：
1449.01pg/ml)。Eotaxin、MCP-1、MIP1- α 、
MIP1- β については、スギ花粉症患者群で高い
傾向があったが、有意な差はなかった。

(3).

通年性アレルギー性鼻炎患者の下鼻甲介
粘膜を用いた免疫組織化学では、Intelectin
1 と Cystatin SN は共に鼻粘膜上皮細胞に発
現していた。

末梢血単核球に対する Cryj1 と Intelectin
1 及び Cystatin SN の刺激において、
Intelectin 1 は MCP-1 及び MCP-3 を経度上昇
させる傾向があった。しかしながら Cystatin
SN については今回の検討では有意な変化を
与えなかった。

培養鼻粘膜細胞において、IL-4 及び IL-13
により Intelectin 1 の発現を誘導した。ま
た、パパイ、スギ花粉、IL-4 と IL-13、そ
して IL-25 と TSLP の共刺激により Cystatin
SN の発現が誘導された。

これまでアレルギー性鼻炎の感作率や発
症率に関する報告はあるが、我々が着目した
感作陽性未発症者についての報告はなく、貴
重な成果であると考えられる。今後どの個人
が発症するか追跡調査を行う予定である。ま
たどのような因子が感作あるいは発症のフ
ァクターとなるか、あるいは何がバイオマ
ーカーとなりうるかという点は重要である。現

在血清を用いた解析や好塩基球活性化試験
の解析を行っている。アレルギー性鼻炎は鼻
局所というでの型アレルギー反応であり、
鼻粘膜の炎症を direct に把握することが最
も有用であると考えられる。我々の今回の検
討では、鼻粘膜擦過細胞でスギ花粉症に関連
する多数の遺伝子を同定した。その中で
Intelectin 1 と Cystatin SN はスギ花粉症患
者において高発現していた。そして、
Intelectin 1 と Cystatin SN は、鼻粘膜上皮
細胞において IL-4 や IL-13 といった Th2 サ
イトカイン環境下において発現が誘導され
た。このことは局所におけるアレルギー炎症
を反映していると考えられる。Cystatin SN
は、非アレルギー感作陽性未発症者(皮内
反応陰性)感作陽性未発症者(皮内反応陽
性)スギ花粉症患者の順に発現が上昇して
いることをこれまで報告してきた。また、
Cystatin SN は IL-4 や IL-13 以外にも TSLP
や IL-25 といった上皮由来のサイトカインに
より誘導されたことより、Cystatin SN がよ
り局所のアレルギー炎症を反映する重要な
因子(感作から発症の予測因子)と考えられ
る。この点がさらに明確にできれば、アレル
ギー性鼻炎の新規治療戦略に貢献できると
考えられ、そのインパクトは非常に大きい。

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). Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H,
Kaneko Y, Yamada H, Iijima H, Naito T,
Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Imoto Y,
Tokunaga T, Fujieda S, Konno S, Nishimura
M, Hizawa N. : Genome-Wide Association
Study for Levels of Total Serum IgE
Identifies *HLA-C* in a Japanese Population.
PLoS One. 8(12):e80941,2013.
doi: 10.1371/journal.pone.0080941. 査読
有

(2). Nagai K, Tahara-Hanaoka S, Morishima
Y, Tokunaga T, Imoto Y, Noguchi E, Kanemaru
K, Imai M, Shibayama S, Hizawa N, Fujieda
S, Yamagata K, Shibuya A. : Expression and
Function of Allergin-1 on Human Primary
Mast Cells. PLoS One.7;8:e76160,2013.
doi: 10.1371/journal.pone.0076160. 査読
有

(3). Imoto Y, Tokunaga T, Matsumoto Y,
Hamada Y, Ono M, Yamada T, Ito Y, Arinami
T, Okano M, Noguchi E, Fujieda S. :
Cystatin SN Upregulation in Patients with
Seasonal Allergic Rhinitis.
PLoS One.12;8:e67057,2013.

doi: 10.1371/journal.pone.0067057. 査読有

(4). Haenuki Y, Matsushita K, Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T. : A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol. 130:184-94,2012.

doi: 10.1016/j.jaci.2012.02.013. 査読有

(5). Ono M , Hamada Y , Horiuchi Y , Matsuo-Takasaki M , Imoto Y , Satomi K , Arinami T , Hasegawa M , Fujioka T , Nakamura Y , Noguchi E.: Generation of induced pluripotent stem cells from human nasal epithelial cells using a sendai virus vector.

PLoS One.7(8):e42855,2012.

doi: 10.1371/journal.pone.0042855. 査読有

(6). Yamada T, Saito H, Kimura Y, Kubo S, Sakashita M, Susuki D, Ito Y, Ogi K, Imoto Y, Fujieda S.: CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced TSLP production in human laryngeal arytenoid fibroblasts. Cytokine. 57:245-50,2012.

doi: 10.1016/j.cyto.2011.10.012. 査読有

〔学会発表〕(計 14件)

(1). 意元義政、坂下雅文、徳永貴広、山田武千代、藤枝重治：アレルギー性鼻炎における鼻腔一酸化窒素(NO)の有用性. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会,2013.11.28 東京

(2). 意元義政、坂下雅文、徳永貴広、山田武千代、藤枝重治：鼻粘膜上皮細胞における Cystatin SN の役割. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会, 日本アレルギー学会秋季学術大会,2013.11.29 東京

(3). 意元義政、徳永貴広、藤枝重治：スギ花粉症圧勝に関する遺伝子解析. 第52回日本鼻科学会総会,2013.9.27 福井

(4). 意元義政、坂下雅文、徳永貴広、山本英之、加藤雄士、山田武千代、藤枝重治：アレルギー性鼻炎のバイオマーカー. 第25回日本アレルギー学会春季学術大会 2013.5.11 横浜

(5). 意元義政、坂下雅文、山田武千代、藤枝重治：スギ花粉症発症関連遺伝子の機能解析. 第32回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会,2013.2.6 倉敷

(6). Yoshimasa Imoto, Takahiro Tokunaga, Shigeharu Fujieda : Microarray analysis

related to seasonal allergic rhinitis caused by Japanese cedar pollen. 12th Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology Head and Neck Surgery, 2013.1.6 Taipei

(7). Yoshimasa Imoto, Masafumi Sakashita, Takahiro Tokunaga, Shigeharu Fujieda: Identification of genes that related to seasonal allergic rhinitis by microarray analysis. 2012 WAO International Scientific Conference,2012.12.6 Hyderabad

(8). 意元義政、須長 寛、藤枝重治:右総頸動脈から covered stent 挿入により救命できた気管腕頭動脈瘤の1例. 第64回日本気管食道科学会,2012.11.8 東京

(9). 意元義政、野口恵美子、徳永貴広、山田武千代、藤枝重治:鼻粘膜におけるスギ花粉症発症関連遺伝子の検討. 第62回日本アレルギー学会,2012.11.29 大阪

(10). 意元義政、藤枝重治:スギ花粉症の感作・発症に関する遺伝子解析. 第51回日本鼻科学会総会,2012.9.27 千葉

(11). 意元義政、坂下雅文、藤枝重治:アレルギー性鼻炎患者におけるBAT検査の有用性. 第24回日本アレルギー学会秋季学術大会,2012.5.12 大阪

(12). Imoto Y: Detection of genes related to seasonal allergic rhinitis caused by Japanese cedar pollen using microarray analysis: East Asia Allergy Symposium 2012,2012.5.25 Seoul

(13). Imoto Y, Fujieda S: Identification of genes that related to seasonal allergic rhinitis by Japanese cedar pollen. The 14th Japan-Korea joint meeting of Otorhinolaryngology Head & Neck Surgery,2012.4.12 Kyoto

(14). 意元義政、藤枝重治:スギ花粉症未発症者の検討. 第30回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会,2012.2.16 大津

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

意元 義政 (Imoto, Yoshimasa)
福井大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50418703

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：