

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293348

研究課題名(和文) 遺伝子多型関連分子と難治性上気道好酸球性病変局所の好塩基球に対する治療戦略

研究課題名(英文) Treatment strategy for intractable upper airway diseases concerning gene-polymorphism-related molecules and local basophils.

研究代表者

山田 武千代 (Takechiyo, Yamada)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：70283182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：難治性上気道好酸球性病変として、花粉症、好酸球性副鼻腔炎の難治例を研究対象とした。スギ舌下免疫療法で難治性を示すフェノタイプを同定した。スギ抗原刺激による好塩基球のCD203c発現レベル、好塩基球細胞株の実験では、遺伝子多型分子ORMDL3の発現の変化により抗原刺激によるIL-4産生が誘導された。真菌菌体成分カードラン刺激でもSykを介してIL-4が産生されることを証明した。鼻副鼻腔炎の組織では正常鉤状突起組織に比べるとXIII-A因子が有意に増加し、鼻茸のある鼻副鼻腔炎組織中では、鼻茸が認められない鼻副鼻腔炎に比べ、IL-5、IL-13、Eotaxin-2、MCP-1は有意に高値であった。

研究成果の概要(英文)：The intractable upper airway diseases including Japanese Cedar Pollinosis and eosinophilic chronic rhinosinusitis have been focused on. We have identified the phenotype of pollinosis refractory to sublingual immunotherapy. The antigen-induced expression level of CD203c on basophils from the patients with pollinosis was a more objective and reliable biomarker. The antigen-induced production of IL-4 increased in the basophilic cell line that was over-expressed by the gene-polymorphism-related molecules ORMDL3. Dectin-1 recognizes  $\beta$ -glucan, and dectin-1-mediated signaling stimulated gene expression of IL-4 through Syk in the basophilic cell line. Chronic rhinosinusitis without nasal polyps had increased levels of type 2 mediators, including IL-5, IL-13, eotaxin-2, and MCP-4. Aspirin-exacerbated respiratory disease had elevated protein levels of ECP, GM-CSF, and MCP-1, as well as decreased tissue plasminogen activator.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：好塩基球 花粉症 好酸球性副鼻腔炎 好酸球 肥満細胞 気管支喘息

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息やアトピー性皮膚炎患者の上気道病変は好酸球が著明に浸潤し易再発性で難治性であるため、更なる新規治療分子が求められる。難治性上気道好酸球性病変とアレルギー担当細胞である好塩基球に着目した。

## 2. 研究の目的

好酸球性病変局所の好塩基球の機能と発現分子の網羅的検索、アレルギー遺伝子多型関連分子と難治性上気道好酸球性病変と好塩基球に関連する標的分子を探る。

## 3. 研究の方法

(1) スギ花粉症患者好塩基球を用いて Cryj1 抗原刺激による CD203c 発現レベルを検討した。

(2) スギ抗原で刺激しヒト好塩基球からのサイトカイン産生と各種阻害剤の影響を検討した。

(3) 好塩基球細胞株 RBL の実験では、ORMDL3 を強制発現させ、抗原刺激で IL-4 の産生を検討した。真菌の菌体成分であるカードランで刺激しサイトカイン産生と細胞内シグナルを検討した。

(4) スギ花粉症患者における舌下免疫療法におけるバイオマーカーの存在について検討した。

(5) 花粉症マウスモデル実験では、TSLP 受容体欠損マウス、IL-33 欠損マウス、ST-2 欠損マウス、IL-33 欠損マウス/ST-2 欠損マウスでの病態について検討した。

(6) アスピリン過敏性患者組織、鼻茸のある鼻副鼻腔炎組織、鼻茸が認められない鼻副鼻腔炎組織、正常鉤状突起組織中の XIII-A 因子、IL-5、IL-13、Eotaxin-2、MCP-1、ECP、GM-CSF、MCP-1、プラスミノゲン活性化因子の発現を検討した。

## 4. 研究成果

(1) スギ花粉症患者の Cryj1 抗原刺激による好塩基球の CD203c 発現レベルは、非発症

者よりも有意に高く、抗原特異的 IgE を測定するよりも客観的で信頼性の高いマーカーであることを証明された。

(2) スギ抗原で刺激されたヒト好塩基球からは IL-4、IL-13、TNF、MCP-1 の産生が確認された。スギ花粉症患者の好塩基球を抗原刺激すると IL-4 を産生するが、Syk 阻害剤、ERK 阻害剤、NAC により抑制された。

(3) 好塩基球細胞株の実験では、アレルギー疾患関連遺伝子多型分子 ORMDL3 を強制発現させると、弱い抗原刺激、強い抗原刺激、とも IL-4 の産生を増強した。真菌の菌体成分であるカードランで Dectin-1 を刺激すると、Syk を介して IL-4、IL-13 が産生されることを証明した。

(4) 舌下免疫療法では長期成績が重要であり、長期療法におけるバイオマーカーの存在について検討してきた。Th2 サイトカインでは、血清 IL-4 レベルは 4 年目で、1 年目と比較して有意に減少したが、血清 IL-5、IL-13 は、1 年目と比較して有意な変化は認めなかった。血清 IL-17A レベルは 4 年目では、1 年目と比較して有意に減少したが、血清 IFN、TNF、は、1 年目と比較して有意な変化は認めなかった。舌下免疫療法 4 年目の血清 IL-17A レベルは舌下免疫療法 4 年目の症状薬物スコアと有意な相関が認められた (相関係数 = 0.57,  $p < 0.01$ )。

(5) 花粉症マウスモデル実験では、TSLP 受容体欠損マウスは野生型と比較して、くしゃみ症状が弱く、血清抗原特異的 IgE が定値であった。Th2 活性化と鼻粘膜局所の好酸球浸潤は変化が認められなかった。IL-33 欠損マウス、ST-2 欠損マウスでは、それぞれ、野生型と比較して、抗原暴露急性期の Th2 活性化と鼻粘膜局所の好酸球浸潤数は減少した。IL-33 欠損マウス/ST-2 欠損マウスでは慢性期の反応も減少した。

(6) 鼻副鼻腔炎の組織では正常鉤状突起組織に比べると XIII-A 因子が有意に増加して

いた。鼻茸のある鼻副鼻腔炎組織中では、鼻茸が認められない鼻副鼻腔炎に比べ、IL-5、IL-13、Eotaxin-2、MCP-1 は有意に高値であった。アスピリン過敏性患者の組織中では、ECP、GM-CSF、MCP-1 が高く、組織プラスミノゲン活性化因子の発現が減少していた。IgE 受容体を介する肥満細胞からの TGF- $\beta$ 1 産生は気道上皮細胞からの plasminogen activator inhibitor (PAI-1)の産生を亢進させた。

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 21 件)

1. Masuyama K, Goto M, Takeno S, Ohta N, Okano M, Kamiyo A, Suzuki M, Terada T, Sakurai D, Horiguchi S, Honda K, Matsune S, [Yamada T](#), [Sakashita M](#), Yuta A, Fuchiwaki T, Miyanohara I, Nakayama T, Okamoto Y, [Fujieda S](#). Guiding principles of sublingual immunotherapy for allergic rhinitis in Japanese patients. *Auris Nasus Larynx*. 43:1-9, 2016. 査読有
2. Ito Y, Narita N, Nomi N, Sugimoto C, [Takabayashi T](#), [Yamada T](#), Karaya K, Matsumoto H, [Fujieda S](#). Suppression of Poly(rC)-Binding Protein 4 (PCBP4) reduced cisplatin resistance in human maxillary cancer cells. *Sci Rep*. 5:12360, 2015. 査読有
3. Imoto Y, [Takabayashi T](#), [Sakashita M](#), Tokunaga T, Ninomiya T, Ito Y, Narita N, [Yamada T](#), [Fujieda S](#). Peripheral basophil reactivity, CD203c expression by Cryj1 stimulation, is useful for diagnosing seasonal allergic rhinitis by Japanese cedar pollen. *Immunity Inflammation and Disease*. 3:300-8, 2015. 査読有
4. [Sakashita M](#), [Yamada T](#), Imoto Y, Hirota T, Tamari M, Ito Y, Kubo S, Osawa Y, Takahashi N, [Fujieda S](#). Long-term sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis and the levels of IL-17A and complement components 3a and 5a. *Cytokine*. 75:181-5, 2015. 査読有
5. Imoto Y, [Yamada T](#), Tsukahara H, Kimura Y, Kato Y, [Sakashita M](#), [Fujieda S](#). Nitrite/nitrate in nasal lavage reflect nasal symptoms after single nasal allergen provocation in patients with seasonal allergic rhinitis. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 25:382-4, 2015. 査読有
6. Stevens WW, Ocampo CJ, Berdnikovs S, [Sakashita M](#), Mahdavinia M, Suh L, [Takabayashi T](#), Norton JE, Hulse KE, Conley DB, Chandra RK, Tan BK, Peters AT, Grammer LC 3rd, Kato A, Harris KE, Carter RG, [Fujieda S](#), Kern RC, Schleimer RP. Cytokines in Chronic Rhinosinusitis. Role in Eosinophilia and Aspirin-exacerbated Respiratory Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 192:682-94, 2015. 査読有
7. Tokunaga T, Ninomiya T, Osawa Y, Imoto Y, Ito Y, [Takabayashi T](#), Narita N, Kijima A, Murota H, Katayama I, [Fujieda S](#). Factors associated with the development and remission of allergic diseases in an epidemiological survey of high school students in Japan. *Am J Rhinol Allergy*. 29:94-9, 2015. 査読有
8. [Fujieda S](#), [Sakashita M](#), Tokunaga T, Okano M, Haruna Y, Yoshikawa M, Kou N, Asaka D, Haruna S, Nakayama T, Ishidoya J. Practice guideline for eosinophilic rhinosinusitis. *Nihon Jibiinkoka*

- Gakkai Kaiho. 118:728-35, 2015. 査読有
9. Fujieda S, Sakashita M, Tokunaga T, Okano M, Haruna T, Yoshikawa M, Ohtori N, Asaka D, Haruna S, Nakayama T, Ishitoya J, Sakuma Y, Hirakawa K, Takeno S, Himi T, Seki N, Iino Y, Yoshida N, Kobayashi M, Sakaida H, Kondo K, Yamasoba T, Miwa T, Yamada K, Kawata R, Terada T, Kawauchi H, Morikura I, Ikeda K, Murata J, Ikeda H, Noguchi E, Tamari M, Hirota T, Imoto Y, Takabayashi T, Tomita K, Ninomiya T, Morikawa T, Urashima M. Eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Arerugi*. 64:38-45, 2015. 査読有
  10. Ishii-Mizuno Y, Umeki Y, Takahashi Y, Kato Y, Takabayashi T, Fujieda S, Takakura Y, Nishikawa M. Nasal delivery of Japanese cedar pollen Cryj1 by using self-gelling immunostimulatory DNA for effective induction of immune responses in mice. *J Control Release*. 200:52-9, 2015. 査読有
  11. Ogi K, Takabayashi T, Sakashita M, Susuki D, Yamada T, Manabe Y, Fujieda S. Effect of Asian sand dust on Japanese cedar pollinosis. *Auris Nasus Larynx*. 41:518-22, 2014. 査読有
  12. Okamoto Y, Ohta N, Okano M, Kamiyo A, Gotoh M, Suzuki M, Takeno S, Terada T, Hanazawa T, Horiguchi S, Honda K, Matsune S, Yamada T, Yuta A, Nakayama T, Fujieda S. Guiding principles of subcutaneous immunotherapy for allergic rhinitis in Japan. *Auris Nasus Larynx*. 41:1-5, 2014. 査読有
  13. 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. 査読有
  14. Tanaka S, Hirota T, Kamiyo A, Ishii H, Hatsushika K, Fujieda S, Ishitoya J, Masuyama K, Tamari M. Lung functions of Japanese patients with chronic rhinosinusitis who underwent endoscopic sinus surgery. *Allergol Int*. 63:27-35, 2014. 査読有
  15. 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*. 8:e67057. 2013. 査読有
  16. Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Hizawa N, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy*. 68:92-100, 2013. 査読有
  17. 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:e80941, 2013. 査読有
  18. 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*. 8:e76160, 2013. 査読有

19. Tokunaga T, Ninomiya T, Kato Y, Ito Y, Takabayashi T, Tokuriki M, Sunaga H, Fujieda S. Long-term compliance with nasal continuous positive airway pressure therapy for sleep apnea syndrome in an otorhinolaryngological office. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 270:2267-73, 2013. 査読有
20. Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP. Increased expression of factor XIII-A in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 132:584-592, 2013. 査読有
21. Takabayashi T, Kato A, Peters AT, Hulse KE, Suh LA, Carter R, Norton J, Grammer LC, Cho SH, Tan BK, Chandra RK, Conley DB, Kern RC, Fujieda S, Schleimer RP. Excessive fibrin deposition in nasal polyps caused by fibrinolytic impairment through reduction of tissue plasminogen activator expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 187:49-57, 2013. 査読有
- 〔学会発表〕(計 26 件)
1. 山田武千代. アレルギー性鼻炎のフェノタイプと鼻噴霧用ステロイド薬の効果, 第 34 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2016, 鳥羽.
2. Yamada T, Sakashita M, Imoto Y, Ogi K, Kato Y, Saito K, Fujieda S. 54th Japanese Rhinology Society Meeting, Japan-Korea session, 2015, Hiroshima.
3. Yamada T, Sakashita M, Imoto Y, Ogi K, Okamoto M, Narita N, Saito T, Fujieda S. TSLP production in human endolymphatic sac fibroblasts. AAO-HNSF, 2015, Dallas.
4. Yamada T, Tokunaga T, Sakashita M, Fujieda S. Allergic rhinitis and paranasal rhinosinusitis in Japan. The 16th World Congress of Rhinology, 2015, Sao Paulo.
5. 山田武千代. アレルギー性鼻炎に対する薬物療法と舌下免疫療法. 第 53 回日耳鼻広島県地方部会東部耳鼻科医会講演会, 2015, 福山.
6. 山田武千代. アレルギー性鼻炎のフェノタイプと治療. 第 72 回関西耳鼻咽喉科アレルギー研究会, 2015, 大阪.
7. 山田武千代. どうして病気になるの? - 耳鼻咽喉科疾患 -. 平成 27 年度越前市味真野支部商工会講演会, 2015, 越前市.
8. 山田武千代. アレルギー性鼻炎最近の話題. -小児アレルギー性鼻炎治療の重要性-. 平成 27 年度京都府耳鼻咽喉科専門医会秋季研修会, 2015, 京都市.
9. Yamada T, Sakashita M, Imoto Y, Shigeharu Fujieda. Biomarkers and therapeutic effect predictors during long-term SLIT for Japanese seasonal allergic rhinitis. 2014 European Respiratory Society International Congress, 2014, Munich.
10. 山田武千代. アレルギー性鼻炎に対する配合剤の効果. 平成 26 年アレルギー性鼻炎研究会, 2014, 福井.
11. 山田武千代. アレルギー性鼻炎の薬物療法 -各薬剤の特徴と可能性・効果の予測 -. AR Forum 2014, 東京.
12. 山田武千代. スギ花粉症に対する早期介入. 平成 26 年東京耳鼻咽喉科医会講演会, 2014, 東京.
13. 山田武千代. アレルギー性鼻炎治療の基礎と臨床. H25 年度熊本 ENT 学術講演会, 2014, 熊本.
14. 山田武千代. アレルギー性鼻炎のトピック

- クス. 第2回 One Airway, One Disease Seminar, 2014, 東京.
15. 山田武千代. アレルギー性鼻炎の病態. 平成26年福井市学校保健研修会, 2014, 福井.
16. 山田武千代. 舌下免疫療法の基礎と実際. 第3回日本アレルギー学会舌下免疫療法講習会, 2014, 東京.
17. 山田武千代. アレルギー性鼻炎の診断と舌下免疫療法の適応. 第26回日本アレルギー学会春季臨床大会. 総合アレルギー-医育成コース1. 舌下免疫療法講習会, 2014, 京都.
18. 山田武千代. 舌下免疫療法の基礎と実際. 第1回総合アレルギー講習会舌下免疫療法講習会, 2014, 東京.
19. 山田武千代. 教育セミナー19. 鼻閉と咳嗽との関連. 26回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2014, 京都.
20. Yamada T, Sakashita M, Imoto Y, Fujieda S. Are there any biomarkers or therapeutic effect predictors during sublingual immunotherapy for Japanese seasonal allergic rhinitis? 16th Asian Research Symposium in Rhinology (ARSR), 2013, Tokyo.
21. 山田武千代. 舌下免疫療法とアレルギー性鼻炎の病態. 第14回栃木耳鼻咽喉科アレルギー・がんセミナー. 2013, 小山.
22. 山田武千代. 鼻噴霧用ステロイドの効果と舌下免疫療法. 平成25年MSD研究会, 2013, 東京.
23. 山田武千代. アレルギー性鼻炎と治療の重要性, 花粉治療2013. 名古屋.
24. 山田武千代. 上気道アレルギー疾患の病態と治療, 第17回 采・喘息アレルギーセミナー, 2013, さいたま.
25. 山田武千代. アレルギー性鼻炎の基礎と臨床, 平成25年岐阜県耳鼻咽喉科医会学術講演会, 2013, 岐阜.
26. 山田武千代. 花粉症の病態・治療とバイオマーカー, 第5回上越花粉症学術講演会, 2013, 上越.
- [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  
山田 武千代 (YAMADA, Takechiyo)  
福井大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70283182
- (2)研究分担者  
坂下 雅文 (SAKASHITA, Masafumi)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 40555455 (H27年度)
- 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 (H25-26年度)
- 富田 かおり (TOMITA, Kaori)  
福井大学・医学部・特別研究員  
研究者番号: 30444227 (H25-26年度)
- 高林 哲司 (TAKABAYASHI, Tetsuji)  
福井大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 70397272 (H26-27年度)
- 藤枝 重治 (FUJIEDA, Shigeharu)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号: 30238539
- (3)連携研究者  
なし