

# アレルギー性鼻炎患者におけるバイオマーカーの検討

|       |                                                                                                                                       |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | <p>言語: jpn</p> <p>出版者:</p> <p>公開日: 2013-01-15</p> <p>キーワード (Ja):</p> <p>キーワード (En):</p> <p>作成者: 意元, 義政</p> <p>メールアドレス:</p> <p>所属:</p> |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/10098/7080">http://hdl.handle.net/10098/7080</a>                                                       |

福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センター平成23年度公募採択型研究費  
「学内共同研究等」

## アレルギー性鼻炎患者におけるバイオマーカーの検討

研究代表者： 意元 義政（医学部・医員）

| 概 要     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|         | スギ花粉症発症に関連する遺伝子の同定のために、スギ花粉飛散期に鼻上皮細胞を搾過し、これらの mRNA のプロファイル、スギ花粉症発症者およびスギ特異的 IgE 陽性未発症者（感作陽性未発症者）、および非アレルギー者（コントロール群）において比較検討をした。抽出した RNA サンプルを用いて Illumina 500GX システム（イルミナ）を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。鼻上皮細胞で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4倍以上かつ $P < 0.05$ の18遺伝子を同定した。その中の1つである <i>intelectin 1</i> に関して定量的 PCR で追認を行い、スギ花粉症患者が感作陽性未発症者及びコントロール群と比べ有意に高く発現していることを確認した。免疫組織化学的染色では <i>intelectin 1</i> は鼻下甲粘膜上皮細胞に存在し、IL-4 と IL-13 によりその発現が認められることが判明した。 |
| 関連キーワード | スギ花粉症、マクロアレイ、鼻粘膜上皮細胞、 <i>intelectin 1</i> 、Th2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

### 研究の背景および目的

ここ10年でスギ花粉症の罹患率は10%増加したことを申請者らは報告してきた。スギ花粉症患者の増加によりその社会的影響、経済的損失は大きくなっている。花粉症のアレルギー反応がどのように起こるかについてはある程度説明されているが、なぜ特定の個人のみが花粉症を発症するのか、花粉特異 IgE 抗体産生のメカニズムなど、依然として不明な点が多い。これまで申請者が所属する耳鼻咽喉科頭頸部外科では、理化学研究所と筑波大学と共同研究を行ってきた。解析手法として、全遺伝子による遺伝子多型解析（GWAS）、舌下免

疫療法におけるプロテオーム解析、末梢血細胞と鼻粘膜細胞のマクロアレイ解析を行ってきた。その結果スギ花粉症の病態に関連する複数の遺伝子を同定した。しかしながら、それらの遺伝子がどのようにスギ花粉症の急激な増加に関与しているのか、それらの遺伝子の制御がどのようになされているのか、依然として不明な点が多い。本研究では、スギ抗原感作から発症にいたる過程で、どのような遺伝子が関与し、症状を増悪あるいは抑制されるのか同定し、それらの遺伝子を制御する因子を同定することを目的とする。

### 研究の内容および成果

福井大学アレルギーデータベースからスギ花粉症患者群（血清スギ特異的 IgE が CAP スコアで2以上かつ毎年スギ花粉飛散時期にスギ花粉症の症状を認め、スギ花粉症と診断がされている）、感作陽性未発症者群（血清スギ特異的 IgE が CAP スコアで2以上であるが、今まで全く花粉症の症状がない）、非アレルギー群（7項目の吸入アレルギーに対する血清特異的 IgE が全て陰性であり鼻炎の症状を認めていない）であるコントロール群を抽出した。CAP スコアの測定はスギ、ヤケヒョウヒダニ、コナヒョウヒダニ、カモガヤ、ブタクサ、アスペルギルス、カンジダの7項目が測定されて

いる。さらにスギ花粉症の症状の有無、気管支喘息やアトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどの既往も調べられている。スギ花粉症患者群及び感作陽性未発症者群とも、血清スギ特異的 IgE のみ CAP スコアで2以上であり、測定した他の6項目の血清特異的 IgE は陰性である人を選んだ。さらに3群とも気管支喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーの既往は認めていない人を選んだ。対象者とは本研究の内容を書面と口頭にて説明し、文書で同意を得て行っている。本研究は福井大学医学部倫理委員会における承認を得て行った。

本研究において解析の対象とした細胞は、鼻上皮細胞である。鼻粘膜上皮細胞は 2009 年度および 2010 年度とも、スギ花粉飛散時期（3 月中旬）に施行した。採取は下甲介粘膜を、細胞診用ブラシで数回擦過し、鼻粘膜上皮細胞を採取した。これから total RNA を抽出し網羅的遺伝子発現解析を行った。鼻粘膜上皮細胞より合成した cRNA を用いたマイクロアレイは、HumanRef-8 ver3 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) によって行い、アレイの蛍光強度を BeadsStation 500X 遺伝子発現解析システム (Illumina) により検出した。網羅的遺伝子発現解析は、BeadStudio ソフトウェア (version3.1, Illumina) を用い、検出した蛍光強度をシグナル値として出力した。シグナル値とともに出力される Detection  $p$ -value は検出結果の信頼性の指標であり、 $p < 0.01$  であればシグナル値の信頼性があるとされる。よってこれらの値を基に結果の信頼性について検討した。また、Detection  $p$ -value を基に Flag を付加し、 $p < 0.01$  を Present、 $p > 0.05$  を Absent とした。Present と Absent の中間である  $0.01 < \text{Detection } p\text{-value} < 0.05$  は Marginal とした。BeadStudio ソフトウェアにより出力された各サンプルのシグナル値より、バックグラウンドを引いた値の解析は、GeneSpring GX Software Version 10.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) によって行った。シグナルの最小値は 5 とし、それ以上の値をシグナル値として採用した。チップ間のノーマライズは、シグナル値からバックグラウンドを引いた値の 75% タイルに合わせて補正する Median Shift 補正を行った。また Baseline 補正は Baseline to median of all samples により行った。スギ花粉症患者群とコントロール群の遺伝子発現量が 4 倍以上の増加あるいは減少があった遺伝子を抽出した。発現量の比較について Mann-Whitney 検定を行い、多重比較補正は

Benjamini Hochberg false discovery rate (FDR) を行い、 $p\text{-value} < 0.05$  を統計学的な有意水準とした。

鼻上皮細胞のマイクロアレイについては、スギ花粉症患者群とコントロール群において、発現差が 4 倍以上かつ  $p < 0.05$  の 18 遺伝子を同定した。そのうち、スギ花粉症患者が非アレルギー群と比べて、有意に増加している遺伝子は 13 遺伝子であった。また好酸球に強く発現しているものは 5 遺伝子であり、それらを除いた 13 遺伝子のうち、コントロール群とスギ花粉症患者において、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た *intelectin1* (*ITLN1*) については、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。*ITLN1* はスギ花粉症患者群では、感作陽性未発症者群と非アレルギー群と比べ有意に発現が上昇していたが、感作陽性未発症者群と非アレルギー群間では差は認めなかった。福井大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科において、手術時に採取された通年性アレルギー性鼻炎患者の下甲介粘膜で免疫組織化学的染色を行ったところ、*intelectin1* は下甲介粘膜の上皮部分に存在していることが判明した。鼻粘膜上皮細胞の初代培養細胞では、IL-4 と IL-13 の刺激で *intelectin 1* の発現が認められた。

IL-4 と IL-13 は代表的な Th2 サイトカインであり、*intelectin1* がアレルギー性炎症により誘導されること、スギ花粉症発症者に高く *intelectin1* が発現していることから、*intelectin1* がアレルギー性鼻炎の発症に関連する遺伝子であることが示唆された。

### 本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

Matsumoto Y, Noguchi E, Imoto Y, Nanatsue K, Takeshita K, Shibasaki M, Arinami T, Fujieda S : Upregulation of IL17RB during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis. Allergol Int. 60:87-92,2011

意元義政、藤枝重治

スギ花粉症に関する鼻上皮細胞の網羅的遺伝子解析 耳鼻免疫アレルギー 29(3):201-207,2011

意元義政、藤枝重治

網羅的遺伝子解析によるスギ花粉症発症に関する遺伝子解析 臨床免疫・アレルギー科 57: 39-44, 2012