

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 年～2010 年

課題番号：20590327

研究課題名（和文）

気道アレルギーの病態解明を目的とした花粉症の発現プロファイリング

研究課題名（英文）

Gene expression profiling to identify molecular network for seasonal allergic rhinitis

研究代表者

野口 恵美子 (NOGUCHI EMIKO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：40344882

研究成果の概要（和文）：

スギ花粉症発症および治療効果に関連する遺伝子タンパク質を同定する目的でマイクロアレイおよびプロテオミクスを用いて網羅的な遺伝子発現タンパク質解析を行った。マイクロアレイ解析では IL17RB が花粉暴露時に花粉症患者で高発現となっていることを見出した。またスギ花粉症舌下免疫療法により特異的に増加するタンパク質としてアポリポプロテイン A4 を同定した。

研究成果の概要（英文）：

We performed microarray analysis and proteomics to identify genes/proteins related to seasonal allergic rhinitis (SAR). We found that IL17RB was significantly up-regulated during natural exposure against Japanese cedar pollens in patients with SAR. Also, we identified that apolipoprotein A4 was significantly up-regulated in SAR patients treated by sublingual immunotherapy compared with those treated with placebo.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2009 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：遺伝医学 アレルギー学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：花粉症 マイクロアレイ プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

花粉症は花粉に対する I 型アレルギーであり、その花粉に対してアレルギーをおこしやすい人が花粉に暴露すると IgE 免疫応答性がおこり、くしゃみや鼻汁、目のかゆみなどが誘発される。花粉症の罹患者は国民の 10-20%、医療費や労働効率の低下による経済的損失は年間に約 2860 億円といわれており、21 世紀の国民病と称されている。

花粉症は喘息などのアレルギー疾患や他の common diseases と同様に発症に遺伝と環境が関与する多因子疾患であると考えられている。花粉、たとえばスギに対する IgE 抗体が血中に存在していても必ずしも花粉症を発症するわけではなく、様々な要因が花粉症発症にかかわっていると考えられる。

2. 研究の目的

(1)花粉暴露時の遺伝子・タンパク質発現を全遺伝子的に比較することにより、花粉暴露より変化する遺伝子群を同定し、疾患パスウェイを構築する

(2)鼻粘膜から得られた花粉症、正常コントロール由来の鼻上皮細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析をおこない、花粉症患者に有意に高い（または低い）発現を示す遺伝子群を同定する。

3. 研究の方法

スギ特異的 IgE 陽性かつスギ花粉症有症状グループ 32 名、スギ特異的 IgE 陽性かつスギ花粉症無症状グループ 25 名、スギ特異的 IgE 陰性かつ無症状グループ 25 名を対象とした。書面及び口頭により研究に対する説明を行い、書面によりインフォームドコンセントの得られた患者からスギ離散前（11~12 月）、スギ離散中（3 月）の採血を行った。末梢血からフィコール法により末梢血単核球を分離する。さらに磁気ビーズ法により CD4 陽性 T 細胞および CD14 陽性モノサイトを分離した。また一部の対象者から鼻上皮細胞を擦過法により採取した。それぞれの細胞から RNA を抽出し、それらの RNA を使用してイルミナ発現解析システムによるマイクロアレイ解析を行った。発現に差の認められた遺伝子については定量的リアルタイム PCR で確認をおこなった。

タンパク質発現解析については花粉暴露時と非暴露時に採取された血液から得られた血漿を用いた。対象者は全てスギ花粉症患者でプラセボ群と舌下免疫療法治療群である。蛍光標識された血漿を Ettan DIGE システム (GE healthcare) を用いて、二次元電気泳動を行った。非暴露時と比較して暴露時に 1.1 倍以上の変化が認められるものを変化ありと定義した。統計的有意 ($P < 0.05$) な変

化を示しているスポットについては質量分析 (mass spectrometry, MS) を行った。

4. 研究成果

遺伝子発現解析

花粉飛散時期の CD4 陽性 T 細胞において、スギ特異的 IgE 陰性かつ無症状 (スーパーコントロール) グループとスギ特異的 IgE 陽性かつ有症状 (花粉症発症) グループにおいて発現量が統計的有意差を持って 1.5 倍以上変化する遺伝子が 3 遺伝子同定され、そのうち花粉症患者における IL17RB の発現上昇が定量 Real-time PCR 法においても確認された (Matsumoto et al., Allergol Int, 2011)。

さらに同時期に対象者の一部から鼻粘膜上皮細胞を擦過法により採取し、同様にマイクロアレイを行った。網羅的遺伝子発現解析の結果を検証するために有意な発現変化を示した 5 遺伝子について定量 Real-time PCR 法を用いて発現量の定量を行った。鼻粘膜上皮細胞では非アレルギー者において全く発現しないが、花粉症患者において強く発現する 2 遺伝子を同定した。これらの遺伝子はコントロールではほとんど発現していないが、花粉症患者では強く発現しており、さらに、スギ特異的 IgE 陽性症状なし群では強く発現している人と全く発現していない人に分けることが可能であり発症予測に使用できる可能性がある。これらの結果は 2010 年に採取した鼻上皮細胞の発現解析によっても再現性が認められている。さらにリコンビナントタンパク質を使用した細胞実験では、ヒト線維芽細胞やヒト単核球における炎症性サイトカイン発現の上昇が認められた。

タンパク質発現解析

スギ花粉症舌下免疫療法により特異的に増加するタンパク質を蛍光二次元電気泳動および TOF-MAS 法により解析し、舌下免疫療法により特異的に変動するタンパク質としてアポリポrotein A4 (ApoA-IV) を同定した (Makino et al, J Allergy Clin Immunol, 2010)。ApoA-IV の血清中の濃度は臨床症状と逆相関し、ヒト好塩基球からのヒスタミン遊離を濃度依存的に抑制することが実験により確かめられ、有力なアレルギー治療候補および新規の免疫療法作用機序である可能性が示された (特願 2008-053768)。

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 24 件)

1. Nakayama J, Iwasaki N, Shin K, Sato H, Kamo M, Ohyama M, Noguchi E, Arinami T. A Japanese case of ichthyosis follicularis with atrichia and photophobia syndrome with an MBTPS2 mutation. *J Hum Genet* 2011, 56:250-252. 査読有
2. 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* 2011, 60:87-92. 査読有
3. Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, Miyagawa T, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Suzuki Y, Yoshihara S, Adachi M, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakajima T, Mathias RA, Rafaels N, Barnes KC, Himes BE, Duan QL, Tantisira KG, Weiss ST, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. TSLP Promoter Polymorphisms are Associated with Susceptibility to Bronchial Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011, 44:787-93. 査読有
4. Ono M, Tsuda J, Mouri Y, Arai J, Arinami T, Noguchi E. Contiguous Xp11.4 gene deletion leading to ornithine transcarbamylase deficiency detected by high-density single-nucleotide array. *Clin Pediatr Endocrinol* 2010, 19:25-30.
5. Makino Y, Noguchi E, Takahashi N, Matsumoto Y, Kubo S, Yamada T, Imoto Y, Ito Y, Osawa Y, Shibasaki M, Uchida K, Meno K, Suzuki H, Okubo K, Arinami T, Fujieda S. Apolipoprotein A-IV is a candidate target molecule for the treatment of seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010, 126:1163-9. 査読有
6. Ishiguro H, Koga M, Horiuchi Y, Noguchi E, Morikawa M, Suzuki Y, Arai M, Niizato K, Iritani S, Itokawa M, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Ujike H, Kunugi H, Sasaki T, Takahashi M, Watanabe Y, Someya T, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T. Supportive evidence for reduced expression of GNB1L in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2010, 36:756-765. 査読有
7. Imoto Y, Enomoto H, Fujieda S, Okamoto M, Sakashita M, Suzuki D, Okada M, Hirota T, Tamari M, Ebe K, Arinami T, Noguchi E. S2554X mutation in the filaggrin gene is associated with allergen sensitization in the Japanese population. *J Allergy Clin Immunol* 2010, 125:498-500 e492. 査読有
8. 野口恵美子. アレルギー疾患のゲノム解析 —その理論と方法. アレルギーの臨床 2009, 129:23-29. 査読無
9. Otsuka K, Takeshita S, Enomoto H, Takahashi T, Hirota T, Tamari M, Ebe K, Otsuka F, Shibasaki M, Arinami T, Noguchi E. SMAD3 as an atopic dermatitis susceptibility gene in the Japanese population. *J Dermatol Sci* 2009, 55:200-202. 査読有
10. Kawai T, Takeshita S, Imoto Y, Matsumoto Y, Sakashita M, Suzuki D, Shibasaki M, Tamari M, Hirota T, Arinami T, Fujieda S, Noguchi E. Associations between decay-accelerating factor polymorphisms and allergic respiratory diseases. *Clin Exp Allergy* 2009, 39:1508-14. 査読有
11. Imada Y, Fujimoto M, Hirata K, Hirota T, Suzuki Y, Saito H, Matsumoto K, Akazawa A, Katsunuma T, Yoshihara S, Ebisawa M, Shibasaki M, Arinami T, Tamari M, Noguchi E. Large scale genotyping study for asthma in the Japanese population. *BMC Res Notes* 2009, 2:54. 査読有
12. Harada M, Hirota T, Jodo AI, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Yoshihara S, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. Functional analysis of the thymic stromal lymphopoietin variants in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009, 40:368-374. 査読有
13. Aoki T, Matsumoto Y, Hirata K, Ochiai K, Okada M, Ichikawa K, Shibasaki M, Arinami T, Sumazaki R, Noguchi E. Expression profiling of genes related to asthma exacerbations. *Clin Exp Allergy* 2009, 39:213-221. 査読有
14. 野口恵美子. アレルギー疾患. 小児内科 2008, 40:1328-1329. 査読無
15. 野口恵美子. 花粉症発症のメカニズムと遺伝子. 日本医師会雑誌 2008, 136:1965-1969. 査読無
16. 野口恵美子. アレルギー疾患の遺伝要因について. アレルギー・免疫 2008, 15:12-18. 査読無
17. 牧野有香, 野口恵美子. アレルギー疾患のプロテオミクス. アレルギー・免疫 2008, 15:76-84. 査読無
18. 榎本久子, 大塚藤男, 有波忠雄, 野口恵美子. アトピー性皮膚炎. アレルギー・免疫 2008, 15:34-39. 査読無
19. Nishioka T, Uchida K, Meno K, Ishii T, Aoki T, Imada Y, Makino Y, Hirata K, Matsumoto Y, Arinami T, Noguchi E.

Alpha-1-antitrypsin and complement component C7 are involved in asthma exacerbation. *Proteomics Clin Appl* 2008, 2:46-54. 査読有

20. Nagasaki A, Nishie W, Sato K, Oba I, Noguchi E, Akitsu H, Sawamura D, Shimizu H. Clinical and genetic analysis of Fabry disease: Report of six cases including three heterozygous females. *J Dermatol Sci* 2008, 52:61-64. 査読有

21. Ishiguro H, Koga M, Horiuchi Y, Noguchi E, Morikawa M, Suzuki Y, Arai M, Niizato K, Iritani S, Itokawa M, Inada T, Iwata N, Ozaki N, Ujike H, Kunugi H, Sasaki T, Takahashi M, Watanabe Y, Someya T, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T. Supportive evidence for reduced expression of GNBIL in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2008. 査読有

22. Hirota T, Harada M, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Ebisawa M, Yoshihara S, Noguchi E, Saito H, Nakamura Y, Tamari M. Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population. *J Allergy Clin Immunol* 2008, 121:769-770. 査読有

23. Fujimoto M, Imai K, Hirata K, Kashiwagi R, Morinishi Y, Kitazawa K, Sasaki S, Arinami T, Nonoyama S, Noguchi E. Immunological profile in a family with nephrogenic diabetes insipidus with a novel 11 kb deletion in AVPR2 and ARHGAP4 genes. *BMC Med Genet* 2008, 9:42. 査読有

24. Enomoto H, Hirata K, Otsuka K, Kawai T, Takahashi T, Hirota T, Suzuki Y, Tamari M, Otsuka F, Fujieda S, Arinami T, Noguchi E. Filaggrin null mutations are associated with atopic dermatitis and elevated levels of IgE in the Japanese population, family and case-control study. *J Hum Genet* 2008, 57:615-621. 査読有

[学会発表] (計 18 件)

1. 野口恵美子. ゲノム解析によるアレルギー疾患の疾患感受性遺伝子の同定. 第 19 回関東アレルギークラブ 2011 年 2 月 12 日、東京.

2. 意元義政, 野口恵美子, 有波忠雄, 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の同定. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010 年 11 月 25 日~27 日 東京.

3. Noguchi E. Proteomics and Transcriptome in Allergic diseases. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010 年

11 月 25 日~27 日 東京.

4. Noguchi E. Genome wide association study for pediatric asthma in Asian population. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010 年 11 月 25 日~27 日 東京.

5. 落合香保里, 野口恵美子, 有波忠雄, 松本健治, 斎藤博久. 全ゲノム関連解析による疾患感受性遺伝子の同定. 第 55 回日本人類遺伝学会 2010 年 10 月 28 日~30 日 埼玉県大宮 2010.

6. Noguchi E. Genetic approach to identify susceptibility genes for allergic diseases. World Allergy Congress, Buenos Aires, Argentina December 8, 2009.

7. 野口恵美子. 遺伝子とアレルギー疾患の性差. シンポジウム 2 第 46 回日本小児アレルギー学会 2009 年 12 月 5 日~6 日 福岡シンポジウム 2

8. 松元佑莉, 意元義政, 有波忠雄, 野口恵美子, 藤枝重治. 網羅的遺伝子発現解析による花粉症発症関連遺伝子の同定と機能解析 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009 年 10 月 29 日~31 日 秋田.

9. 意元義政, 野口恵美子, 松元佑莉, 有波忠雄, 藤枝重治. スギ花粉症未発症者における末梢血白血球分画の動向. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009 年 10 月 29 日~31 日 秋田

10. 落合香保里, 野口恵美子, 松本健治, 斎藤博久, 有波忠雄. 全ゲノム関連解析を用いた喘息関連 SNP の解析. 第 54 回日本人類遺伝学会 2009 年 9 月 23 日~26 日 東京.

11. 小野美都穂, 落合香保里, 野口恵美子, 有波忠雄. 高密度 DNA アレイを用いたオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症における遺伝子欠損領域の同定. 第 54 回日本人類遺伝学会 2009 年 9 月 23 日~26 日 東京.

12. 青木健, 市川邦男, 松元佑莉, 落合香保里, 有波忠雄, 柴崎正修, 野口恵美子. 網羅的遺伝子発現解析による喘息発作関連遺伝子の同定. 第 45 回日本小児アレルギー学会 2008 年 12 月 14 日 横浜.

13. 野口恵美子, 浅野浩一郎. ミニシンポジウム 基調講演 遺伝子. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008 年 11 月 27 日~29 日 東京.

14. 野口恵美子. ワークショップ 5 アレルギー疾患のゲノム解析の最近の話題 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008 年 11 月 27 日~29 日 東京.

15. 大塚健太, 榎本久子, 広田朝光, 玉利真由美, 有波忠雄, 野口恵美子. 全ゲノム連鎖解析によるアトピー性皮膚炎疾患感受性遺伝子の機能解析 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008 年 11 月 27 日~29 日 東京.

ギー学会秋季学術大会 2008年11月27日～29日 東京.

16. 松元佑莉, 意元義政, 有波忠雄, 野口恵美子, 藤枝重治. スギ花粉症の網羅的遺伝子発現解析 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008年11月27日～29日 東京.

17. 榎本久子, 大塚健太, 河合利春, 広田朝光, 鈴木洋一, 玉利真由美, 藤枝重治, 有波忠雄, 野口恵美子. 日本人アトピー性皮膚炎とフィラグリン遺伝子変異との関連. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008年11月27日～29日 東京.

18. 意元義政, 野口恵美子, 有波忠雄, 坂下雅文, 広田朝光, 玉利真由美, 藤枝重治. フィラグリン機能喪失変異とスギ花粉症発症の関連解析 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008年11月27日～29日 東京.

〔産業財産権〕

○出願状況 (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

発明者: 藤枝重治、野口恵美子ら

権利者: 国立大学法人福井大学、国立大学法人筑波大学

種類: 特許出願

番号: 特願 2008-053768

出願年月日: 2008年3月4日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 恵美子 (EMIKO NOGUCHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号: 40344882

(2) 研究分担者

内田 和彦 (KAZUHIKO UCHIDA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号: 90211078

(3) 連携研究者

なし

