

スギ花粉症の感作・発症と Cystatin SN の役割

意元 義政¹, 徳永 貴広¹, 藤枝 重治¹¹ 福井大学耳鼻咽喉科頭頸部外科学

スギ花粉症の感作から発症に至るプロセスは明確ではない。我々はこれまでスギ花粉症の発症メカニズムを解明すべく、スギ花粉症患者と非アレルギー者を対象に、鼻粘膜上皮における網羅的遺伝子解析を行ってきた。その結果 Cystatin SN (CST1) がスギ花粉症患者において高く発現していることを見出した。さらに、スギ花粉に対する特異的 IgE を有しながらスギ花粉症未発症である“感作陽性未発症者”においても CST1 は発現しており、感作から発症に関与する因子であると考えられた。CST1 は Cystatin family に属する protease inhibitor の一つである。花粉や細菌、真菌に含まれる外因性の protease に対する拮抗作用を有することとともに、cathepsin などの内因性 protease に対する protease 阻害作用も有する。つまり、CST1 は組織における炎症や修復反応、細胞増殖に関与している。本稿では、CST1 の鼻上皮粘膜およびアレルギー性鼻炎における役目を中心に概説する。

キーワード：アレルギー性鼻炎、感作、プロテアーゼインヒビター

はじめに

スギ花粉症は本邦における代表的な季節性アレルギー性鼻炎である。スギ花粉症患者は現在でも増加が継続されるとともに、発症の低年齢化も進み、今後さらに患者数増加が危惧されている^{1,2)}。アレルギー性鼻炎は学業や生産効率を低下させることが知られており³⁾、スギ花粉症は日本における大きな社会問題である⁴⁾。しかし、その感作・発症のメカニズムは依然として不明確な点が多い。2006 年～2008 年我々が成人対象に行った疫学調査では、スギ花粉に対する感作率は 53～59% と高率であった¹⁾。一方でスギ抗原に対する感作が成立しておりながら、スギ花粉症を発症していない個人も 13～25% 存在している。どの個人が発症するか、あるいは発症しないかを予測することは現時点で不可能である。どうして抗原に対する IgE が検出されながら発症しないのか、この現象を解明することは大変興味深い。

遺伝学的検討

アレルギー性鼻炎の増加は主に遺伝学的要因と環境因子

の 2 点が重要とされる。まず DNA レベルの解析として遺伝子多型が調べられている。アレルギー性鼻炎において相関が認められるのは、IL-33⁵⁾、ORMDL3 (Orosomucoid like 3)⁶⁾、フィラグリン (fillagrin)⁷⁾であった (表 1)。IL-33 は IL-1 ファミリーに属するサイトカインであり、上皮、血管内皮、線維芽細胞、気道の平滑筋細胞、ケラチノサイトなど様々な細胞に発現し、機械的な刺激やネクロシスが生じた場合には IL-33 が放出され、“alarmin”として周囲細胞に危険を知らせる作用がある^{8,9)}。IL-33 の受容体は ST2 であり、様々な細胞に ST2 は発現している¹⁰⁾。アルテルナリアやブタクサ花粉が気道上皮細胞からの IL-33 放出に関与していることも知られている^{11,12)}。IL-33 は好塩基球や肥満細胞に作用することで、IgE 非依存的に IL-6 や IL-13 の産生を行ったり、好酸球に作用することで、好酸球の走化やケモカイン産生にも関与することでアレルギー炎症を惹起させる¹³⁻¹⁶⁾。ORMDL3 は genome wide association study (GWAS) により気管支喘息との関連が認められた遺伝子である¹⁷⁾。ORMDL3 は小胞体の膜貫通蛋白であり、炎症関連蛋白である。これまでクローン病や潰瘍性大腸炎においても重要な遺伝子であると報告されてきた^{18,19)}。ORMDL3 はスフィンゴ脂質や細胞内 Ca²⁺ 代謝機能に関与しているが^{20,21)}、その機能は依然として不明な点も多い。フィラグリン (fillagrin) は皮膚の角質細胞の細胞質内にある主要な蛋白であり、皮膚の保湿やバリア機能に重要である。フィラグリン遺伝子変異はアトピー性皮膚炎や²²⁻²⁴⁾、食物アレルギーとの関連を示唆する報告があり²⁵⁾、抗原に対するバリア機能の観点からも重要な遺伝子である。さらに最近では GWAS が行

2014 年 8 月 7 日受稿, 2014 年 10 月 8 日受理
別冊請求先: 意元義政
〒910-1104 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月 23-3
福井大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学
TEL: 0776-61-8408, FAX: 0776-61-8118
E-mail: yimoto@u-fukui.ac.jp

表1 IL-33, ORMDL3, Fillagrin, Cystatin SN の発現と機能

	発現部位	機能
IL-33	上皮細胞, 内皮細胞, 脂肪細胞, 皮膚など	Th2 サイトカイン産生誘導など
ORMDL3	肝細胞, 気道上皮, リンパ球, 好酸球	細胞内小胞体 Ca 調節 リンパ球活性化
Fillagrin	皮膚	皮膚バリア機能, 保湿
Cystatin SN	気道上皮細胞, 涙腺, 顎下腺, 膀胱	細菌に対する殺菌作用

われるとともに, いくつかの GWAS の結果を組み合わせた meta 解析も行われるようになった。その結果 chromosome 11 open reading frame 30/leucine-rich repeat containing 32 (C11orf/LRRC32) と HLA 領域の遺伝子多型がアレルギー性鼻炎の感作や発症と関連していた²⁶⁾。

次に, スギ花粉症患者と非アレルギー者の遺伝子発現差を解析することで, アレルギー性鼻炎の発症に関連する遺伝子の同定を行った。対象者は, スギ花粉症患者 (血清スギ特異的 IgE が陽性で, 毎年スギ花粉症症状を認めている人) と非アレルギー者 (吸入抗原に対する血清特異的 IgE がすべて陰性で, 今までアレルギー性鼻炎症状を有していない人) とした。末梢血 CD4 陽性 T 細胞と鼻粘膜擦過細胞を用いて網羅的に遺伝子解析を行った。末梢血 CD4 陽性 T 細胞では, *IL-17RB* (*Interleukin 17 receptor B*) がスギ花粉症患者で有意に高いことを見出した²⁷⁾。IL-17RB のリガンドは IL-25 であり, CD4 陽性 T 細胞が IL-25 と結合することでアレルギー反応を助長することが報告されている²⁸⁾。鼻粘膜擦過細胞では, 多数の遺伝子を候補遺伝子として確認できたが, 最も発現差を認めた遺伝子は *Cystatin SN* (*CST1*) であった²⁹⁾。CST1 はスギ花粉症患者で非常に高発現しており, スギ花粉飛散量の違う年でも同様にスギ花粉症患者で高発現していた。またスギ抗原に対する特異的 IgE が陽性でありながらスギ花粉症未発症である“感作陽性未発症者”では抗原に対する皮内反応に対する陽性者と陰性者が存在していた。CST1 の発現は 1) 非アレルギー者 2) 感作陽性未発症者 (皮内反応陰性者) 3) 感作陽性未発症者 (皮内反応陽性者) 4) スギ花粉症患者の順に発現が順次上昇していた。感作陽性未発症者 (皮内反応陽性者) の中で, 43% が調査後 2 年以内にスギ花粉症を発症していた。

CST1 は Cystatin family に属する protease inhibitor であり, type I, type II, type III に分類される Cystatin family の中で type II に属する。CST1 は涙腺, 顎下腺, 膀胱などに発現している (表 1)³⁰⁾。今回の我々の研究で, CST1 が鼻粘膜上皮細胞にも存在していることが判明した (図 1)。CST1 の機能として, 細菌の protease に対する拮抗作用が報告されているのみである³¹⁾。抗原に存在する protease は, アレルギー発症に深く関与することが知られている。花粉やダニ, 真菌などに含まれる protease は, 気道上皮細胞の tight junction を減弱させ³²⁻³⁴⁾, 上皮から IL-33 などのサイトカ

インを放出させる^{12,16)}。放出された IL-33 によりアレルギー炎症が惹起される。生体には外因性 protease に対する防御機構を備えており, Cystatin はその一つとされる。ダニ抗原である Der f1 や Der p1 は, protease 活性により皮膚のバリア機能を破壊するが³⁵⁾, 一方で皮膚のケラチノサイトや汗腺で発現している Cystatin A は, Der f1 や Der p1 の protease 活性に拮抗することで, 皮膚のバリア機能保持部を担っている³⁶⁾。スギ花粉にも serine protease などの protease が含まれおり, 培養鼻粘膜上皮細胞にスギ花粉を作用させると, 上皮のバリア機能を担う ZO-1 (zonula occludens-1) や claudin-1 の mRNA が減少するが, CST1 でスギ花粉を前処理すると, この現象が有意に抑制される (未発表データ)。このことは CST1 の protease 阻害作用が, スギ花粉の protease 活性を抑制したことを示す。鼻粘膜上皮細胞では, Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) が産生され, TSLP が tight junction を構成する claudin-1, claudin-4, claudin-7, occuludin の発現を上昇させることで, 鼻粘膜のバリア機能を担っている³⁷⁾。我々は IL-4, IL-13, TSLP と IL-25 との共刺激により, CST1 が鼻粘膜上皮細胞で誘導されることを確認した (未発表データ)。鼻粘膜上皮細胞における CST1 は, 抗原による鼻粘膜への浸潤 (障害) があり, 鼻粘膜局所での Th2 環境が惹起される時に誘導が開始され, 鼻粘膜上皮のバリア機能の維持に貢献しているのではないかと考えている (図 2)。スギ花粉症患者で CST の

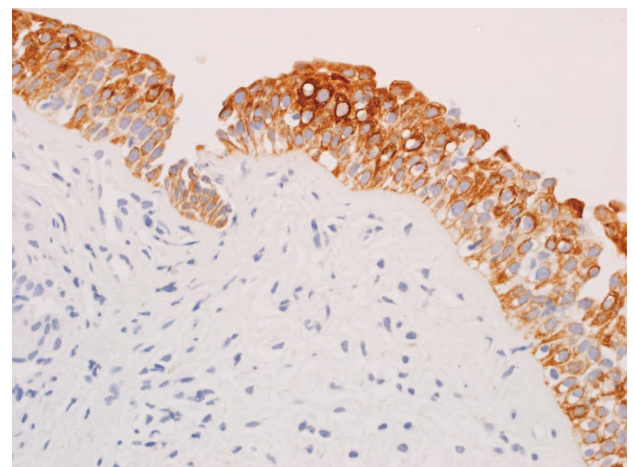


図1 鼻下甲介粘膜の CST1 染色。アレルギー性鼻炎患者の下甲介粘膜の上皮細胞に CST1 が発現している。

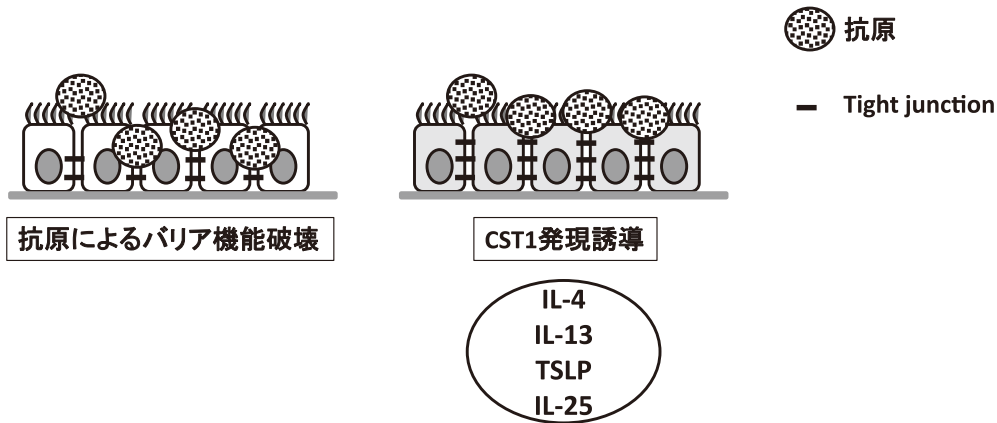


図2 CST1の鼻粘膜における発現誘導とバリア機能。CST1の誘導にはIL-4, IL-13, TSLPとIL-25の共刺激により生じ、抗原による鼻粘膜上皮のバリア障害を緩衝している。

発現が上昇しているのは、局所の炎症性サイトカインによるためと考えられる。

Cystatinは外因性proteaseだけでなく、cathepsinのような内因性のproteaseに対しても拮抗的に作用することで、炎症反応を示す³⁸⁾。cathepsinは免疫、骨や軟骨の代謝、神経伝達、ホルモン産生などに重要な役割を担っており³⁹⁾、生体はcathepsinのような内因性proteaseを過剰にならないように制御している。cathepsinはアトピー性皮膚炎、気管支喘息、動脈硬化症など様々な疾患の症状増悪に関与するため^{40,41)}、Cystatinによるcathepsinの抑制は重要である。さらにCystatinは組織障害による修復過程にも関与している。例えば、フリーラジカルによる心筋のダメージから産生されるCystatin Cは、cathepsin Bの活性を抑制することで、心筋の線維芽細胞からのコラーゲンやfibronectin産生を誘導し、組織修復を促す⁴²⁾。すでにCystatin Cは心筋障害や腎障害の一つのバイオマーカーとして使用されている。アレルギー性鼻炎においても、粘膜下のコラーゲン沈着は著明である。現在、気道におけるアレルギー炎症と線維化(組織修復)にCST1が関与しているかどうか研究を継続している。

CST1のもう一つの活用として、アレルギー性鼻炎の発症を予測する一つのバイオマーカーとして用いることができないか検討を行っている。これまでのアレルギー性鼻炎の症状(治療効果判定や重症化の目安)を明確に反映できるバイオマーカーは存在しておらず、渴望されているのが現状である。鼻粘膜上皮細胞は、耳鼻咽喉科医師が外来でも容易に採取可能であり、粘膜の状態や患者の症状と比較できる点で有用である。もし、CST1によるアレルギー性鼻炎の発症予測が可能であれば、特に小児に対する早期発見、早期介入が可能かもしれない。小児ではアレルギー性鼻炎の症状があっても症状を明確に訴えることができず、気管支喘息や他の疾患の受診の際にようやく診断されることも少なくない。気管支喘息ではアレルギー性鼻炎の合併していることも多く、“united airway”の観点からは、鼻粘

膜と気管支粘膜は必ずしも同一でないにしろ、鼻粘膜は末梢気道を含む気道炎症を示す指標であることが示唆されている⁴³⁻⁴⁵⁾。今後はCST1がアレルギー性鼻炎のみならず、気管支喘息や他の気道炎症のバイオマーカーとなりえないか検討を行っていく予定である。

本論文の要旨は第32回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(2014年2月、徳島)において、奨励賞応募演題として発表した。

本論文に関して、開示すべき利害相反状態は存在しない。

文 献

- 1) Sakashita M, Hirota T, et al. Prevalence of allergic rhinitis and sensitization to common aeroallergens in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010; 151(3): 255–61.
- 2) Okubo K, Kurono Y, et al. Japanese guideline for allergic rhinitis. *Allergol Int.* 2011; 60(2): 171–89.
- 3) Blanc PD, Trupin L, et al. The work impact of asthma and rhinitis: findings from a population-based survey. *J Clin Epidemiol.* 2001; 54(6): 610–8.
- 4) Yamada T, Saito H, et al. Present state of Japanese cedar pollinosis: the national affliction. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133(3): 632–9.e5.
- 5) Sakashita M, Yoshimoto T, et al. Association of serum interleukin-33 level and the interleukin-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38(12): 1875–81.
- 6) Tomita K, Sakashita M, et al. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy.* 2013; 68(1): 92–100.
- 7) Imoto Y, Enomoto H, et al. S2554X mutation in the filaggrin gene is associated with allergen sensitization in the Japanese population. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(2): 498–500.e2.
- 8) Moussion C, Ortega N, et al. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel “alarmin”? *PLoS One.* 2008; 3(10): e3331.

- 9) Liew FY, Pitman NI, et al. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(2): 103–10.
- 10) Schmitz J, Owyang A, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005; 23(5): 479–90.
- 11) Kouzaki H, Iijima K, et al. The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. *J Immunol.* 2011; 186(7): 4375–87.
- 12) Haenuki Y, Matsushita K, et al. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 130(1): 184–94.e11.
- 13) Ho LH, Ohno T, et al. IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcεRI signals. *J Leukoc Biol.* 2007; 82(6): 1481–90.
- 14) Iikura M, Suto H, et al. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest.* 2007; 87(10): 971–8.
- 15) Matsuba-Kitamura S, Yoshimoto T, et al. Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis. *Int Immunol.* 2010; 22(6): 479–89.
- 16) Yoshimoto T, Matsushita K. Innate-type and acquired-type allergy regulated by IL-33. *Allergol Int.* 2014; 63 Suppl 1: 3–11.
- 17) Moffatt MF, Kabesch M, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature.* 2007; 448(7152): 470–3.
- 18) McGovern DPB, Gardet A, et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010; 42(4): 332–7.
- 19) Li X, Ampleford EJ, et al. Genome-wide association studies of asthma indicate opposite immunopathogenesis direction from autoimmune diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 130(4): 861–8.e7.
- 20) Breslow DK, Collins SR, et al. Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature.* 2010; 463(7284): 1048–53.
- 21) Worgall TS, Veerappan A, et al. Impaired sphingolipid synthesis in the respiratory tract induces airway hyperreactivity. *Sci Transl Med.* 2013; 5(186): 186ra67.
- 22) Palmer CNA, Irvine AD, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 2006; 38(4): 441–6.
- 23) Rodríguez E, Baurecht H, et al. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 123(6): 1361–70.e7.
- 24) Nemoto-Hasebe I, Akiyama M, et al. FLG mutation p.Lys4021X in the C-terminal imperfect filaggrin repeat in Japanese patients with atopic eczema. *Br J Dermatol.* 2009; 161(6): 1387–90.
- 25) Brown SJ, Asai Y, et al. Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 127(3): 661–7.
- 26) Ramasamy A, Curjuric I, et al. A genome-wide meta-analysis of genetic variants associated with allergic rhinitis and grass sensitization and their interaction with birth order. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 128(5): 996–1005.
- 27) Matsumoto Y, Noguchi E, et al. Upregulation of IL17RB during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergol Int.* 2011; 60(1): 87–92.
- 28) Rickel EA, Siegel LA, et al. Identification of functional roles for both IL-17RB and IL-17RA in mediating IL-25-induced activities. *J Immunol.* 2008; 181(6): 4299–310.
- 29) Imoto Y, Tokunaga T, et al. Cystatin SN upregulation in patients with seasonal allergic rhinitis. *PLoS One.* 2013; 8(8): e67057.
- 30) Dickinson DP, Thiesse M, et al. Expression of type 2 cystatin genes CST1-CST5 in adult human tissues and the developing submandibular gland. *DNA Cell Biol.* 2002; 21(1): 47–65.
- 31) Romas LM, Hasselrot K, et al. A comparative proteomic analysis of the soluble immune factor environment of rectal and oral mucosa. *PLoS One.* 2014; 9(6): e100820.
- 32) Shin S-H, Lee Y-H. Airborne fungi induce nasal polyp epithelial cell activation and Toll-like receptor expression. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010; 153(1): 46–52.
- 33) Jacquet A. Interactions of airway epithelium with protease allergens in the allergic response. *Clin Exp Allergy.* 2011; 41(3): 305–11.
- 34) Vinas R, Cortes L, et al. Pollen proteases compromise the airway epithelial barrier through degradation of transmembrane adhesion proteins and lung bioactive peptides. *Allergy.* 2011; 66(8): 1088–98.
- 35) Thomas WR, Smith W-A, et al. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002; 129(1): 1–18.
- 36) Kato T, Takai T, et al. Cystatin A inhibits IL-8 production by keratinocytes stimulated with Der p 1 and Der f 1: biochemical skin barrier against mite cysteine proteases. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 116(1): 169–76.
- 37) Kamekura R, Kojima T, et al. Thymic stromal lymphopoietin enhances tight-junction barrier function of human nasal epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 2009; 338(2): 283–93.
- 38) Haves-Zburof D, Paperna T, et al. Cathepsins and their endogenous inhibitors cystatins: expression and modulation in multiple sclerosis. *J Cell Mol Med.* 2011; 15(11): 2421–9.
- 39) Deal C. Potential new drug targets for osteoporosis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2009; 5(1): 20–7.
- 40) Kim N, Bae KB, et al. Overexpression of cathepsin S induces chronic atopic dermatitis in mice. *J Invest Dermatol.* 2012; 132(4): 1169–76.
- 41) Faiz A, Tjin G, et al. The expression and activity of cathepsins D, H and K in asthmatic airways. *PLoS One.* 2013; 8(3): e57245.
- 42) Xie L, Terrand J, et al. Cystatin C increases in cardiac injury: a role in extracellular matrix protein modulation. *Cardiovasc Res.* 2010; 87(4): 628–35.
- 43) Lopez-Guisa JM, Powers C, et al. Airway epithelial cells from asthmatic children differentially express proremodeling factors. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 129(4): 990–7.e6.
- 44) Wagener AH, Zwinderman AH, et al. The impact of allergic rhinitis and asthma on human nasal and bronchial epithelial gene expression. *PLoS One.* 2013; 8(11): e80257.
- 45) Thavagnanam S, Parker JC, et al. Nasal epithelial cells can act as a physiological surrogate for paediatric asthma studies. *PLoS One.* 2014; 9(1): e85802.

A role of Cystatin SN for sensitization and onset of seasonal allergic rhinitis by Japanese cedar pollen

Yoshimasa Imoto¹, Takahiro Tokunaga¹, Shigeharu Fujieda¹

¹Department of Otorhinolaryngology, Head & Neck Surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui

ABSTRACT

The mechanisms of allergic rhinitis from sensitization to onset had not been well revealed. We had performed gene expression analysis of nasal epithelial cells by using microarray toward patients with seasonal allergic rhinitis by Japanese cedar pollen (SAR-JCP) and healthy, non-atopic subjects (control subjects). We found that Cystatin SN was up-regulated in SAR-JCP than control subjects. We also invited subjects who possess specific IgE against JCP in serum but had not experienced any SAR-JCP related symptoms “Sensitized subjects” and analyzed Cystatin SN expression. Because some showed higher expression pattern of Cystatin SN among sensitized subjects, it was suspected that Cystatin SN was one of the candidate genes that related the onset from sensitization phase. Cystatin SN belongs to Cystatin family and acts as protease inhibitor. Cystatins have anti-protease activity against not only exogenous protease such as pollen, bacteria, and fungi, but also endogenous protease such as cathepsin, which contribute to inflammation, tissue repair, and cell proliferation. This review summarize the functions of Cystatin SN in nasal epithelial cells and developing allergic rhinitis.

Key words: allergic rhinitis, sensitization, protease inhibitor