

アトピー原因遺伝子の同定と
その機能解析に関する研究

目次

アレルギー部門

アトピー原因遺伝子の同定とその機能解析に関する研究	国立相模原病院臨床研究部 副部長	柳原 行義	(197)
IL-4受容体 α 鎖遺伝子多型とB細胞機能	国立相模原病院臨床研究部 副部長	柳原 行義	(200)
アトピーの病因遺伝子としてのIL-12レセプター $\beta 2$ 鎖遺伝子異常	岐阜大学医学部小児科 教授	近藤 直実	(203)
アトピー原因遺伝子の同定とその機能解析に関する研究	九州大学附属病院検査部 助手	出原 賢治	(206)
即時型アレルギー疾患の発症に関わる遺伝子の多型性の解析とその発症予防	大阪大学医学部分子病態内科 助手	田中 敏郎	(210)

アトピー原因遺伝子の同定とその機能解析に関する研究

主任研究者 柳原行義

国立相模原病院臨床研究部

研究要旨：多因子遺伝病であるアトピー性疾患の発症や病態形成に関わる多くの候補遺伝子のうち、今年度は約20種類の遺伝子の多型や異常を解析した。その結果、疾患との関連が認められたものはIL-4受容体 α 鎖、IL-13およびSTAT6の各遺伝子多型とIL-12受容体 β 2鎖の遺伝子異常であった。また、アトピー性喘息ではIL-4受容体 α 鎖と β 2アドレナリン受容体の各遺伝子多型の組み合わせにおいて増加しているパターンが存在した。一方、機能に関しては、IL-4受容体 α 鎖の遺伝子多型はIL-4シグナルの正の調節に、またIL-12受容体 β 2鎖の遺伝子異常はIL-12シグナルの負の調節にそれぞれ関与していた。

分担研究者

柳原行義 国立相模原病院臨床研究部副部長
近藤直美 岐阜大学医学部小児科教授
出原賢治 九州大学附属病院検査部助手
田中敏郎 大阪大学医学部分子病態内科助手

研究協力者

梶原景一 国立相模原病院臨床研究部
生澤公一 国立相模原病院臨床研究部
海老澤元宏 国立相模原病院臨床研究部室長
高橋一夫 国立相模原病院皮膚科医長
三田晴久 国立相模原病院臨床研究部室長
工藤 誠 国立相模原病院臨床研究部内科
森 晶夫 国立相模原病院臨床研究部室長
秋山一男 国立相模原病院臨床研究部部長
松井永子 岐阜大学医学部小児科
金子英雄 岐阜大学医学部小児科
渡辺みづほ 岐阜大学医学部小児科
伊上良輔 岐阜大学医学部小児科
深尾敏幸 岐阜大学医学部小児科
寺本貴英 岐阜大学医学部小児科
加藤善一郎 岐阜大学医学部小児科
寺田知新 岐阜大学医学部小児科
鹿野博明 岐阜大学医学部小児科
笠原貴美子 岐阜大学医学部小児科
坂口平馬 岐阜大学医学部小児科
森本直子 岐阜大学医学部小児科

A. 研究目的

アトピー性疾患は環境的要因と遺伝的要因の相互作用により発症する複雑な疾患であり、またこの遺伝的要因はアトピー素因と呼ばれている。本疾患の発症には家族集積性が認められること、また本疾患は多様な病態像を示すことから、アトピー素因には多くの遺伝子の多型や異常が関与していると考えられている。アトピー原因遺伝子としては、アレルギーの発症や病態形成に関わるIgE受容体、サイトカイン、サイトカイン受容体、シグナル伝達分子および転写調節因子などの多くの遺伝子とその候補に挙げられている。しかし、これらの候補遺伝子の機能解析が必ずしも十分でないために、機能的にも重要なアトピー原因遺伝子については不明な点が多いのが現状である。

本研究班においては、アトピーの原因となり得る主要な候補遺伝子群について、分子遺伝学的、遺伝子工学的および生化学的な手法を用いて多角的な解析を進めている。また、遺伝学的および機能的な両面で重要なアトピー原因遺伝子群の遺伝子診断法を確立することによって、アトピーの予知やアレルギーの発症予防に応用する。さらに、同定された原因遺伝子群の多型や機能異常に起因するシグナル伝達異常を特異的に制御するような低分子化合物や機能性食品についても併せて検索する。

B. 研究成果

1) IL-4受容体 α 鎖遺伝子多型とB細胞機能 (柳原行義)

IL-4受容体 α 鎖 (IL-4R α) は機能的なIL-4R複合体とIL-13R複合体の共通サブユニットであり、またその遺伝子にはアミノ酸置換を伴う遺伝的多型が7箇所存在する。これらの既知の多型に加えて、57番目と650番目のアミノ酸がそれぞれアラニン (Ala) からスレオニン (Thr) に、またプロリンからセリンに置換される2つの多型が存在することを新たに同定した。これらの新規多型のうち、アトピー性疾患との関連が認められたのは57Ala-Thr多型である。また、57Thr型はアトピー性喘息で頻度が高い50イソロイシン (Ile) 型と相関していたが、57Ala型はアトピー性皮膚炎で頻度が高い50バリン (Val) 型と相関していた。このようなIL-4R α 遺伝子多型によるリンパ球機能の調節作用について、50Ile型あるいは50Val型のB細胞を用いて検討した。IgE産生の誘導能に関しては、50Ile型では50Val型に比べて高かった。一方、RAG (recombination-activating gene) の発現能に関しては、50Ile型よりも50Val型の方が高かった。これらの結果から、IL-4R α 遺伝子の50Val-Ile多型は57Ala-Thr多型と相関しており、またこの2つの多型はアトピー性疾患と関連していることが明らかとなった。しかし、50Ile型-57Thr型と50Val型-57Ala型とでは疾患のタイプのみならず、B細胞機能の調節作用も異なっていると考えられた。

2) IL-13のアレルギー疾患発症への関与に関する研究 (原賢治)

IL-13遺伝子には110番目のアミノ酸がアルギニン (Arg) からグルタミン (Gln) に置換される遺伝的多型が存在することを同定した。気管支喘息患者および正常者のDNAにおけるこれらの遺伝的多型の出現頻度を解析した結果、日本人とイギリス人のいずれのグループにおいても、アトピー性、非アトピー性に関わらず、喘息患者においてはGlnの頻度が高くなっていた。また、血中IL-13値もArg型よりもGln型の方が高かった。IL-13の肺組織における標的細胞を同定するために、抗IL-13R α 1モノクローナル抗体を作製し免疫染色を行った結果、IL-13R α 1は気道上皮細胞と気管支平滑筋に高発現していた。さらに、B細胞株を用いてIL-13シグナル伝達経

路を解析した結果、IL-13刺激により転写因子であるSTAT3が、STAT6に加えて、活性化されることが判明した。コンピューターモデリングでは、Gln型とArg型ではIL-13R α 1との結合に差があるのではないかと予想された。また、IL-13は気道上皮細胞や気管支平滑筋に直接作用して、STAT3とSTAT6などを介して気管支喘息の発症に関わっていると考えられた。さらに、STAT6遺伝子の3'非翻訳領域における塩基置換がアトピー性喘息と関連していることも明らかとなった。

3) アトピーの病因遺伝子としてのIL-12受容体 β 2鎖遺伝子異常 (近藤直美)

IgE産生制御機構の破綻を来すIL-12受容体 β 2 (IL-12R β 2) 鎖遺伝子について解析した。IL-12やIL-18はその上位でIFN- γ を誘導するので、IgE高値のアレルギー患者の末梢血単核細胞をPHA、IL-12あるいはIL-18で刺激し、培養上清中のIFN- γ を測定すると、それぞれの間でIFN- γ 産生は正相関を示した。しかし、IL-12刺激によるIFN- γ 産生の選択的低下を示す症例が幾つか見出された。IL-12の刺激はIL-12R、次いでJAK2-STAT4情報伝達系を介しIFN- γ 遺伝子の発現を亢進させIFN- γ 産生を誘導する。IL-12刺激によるIFN- γ 産生不全の症例の中にIL-12R β 2鎖をコードする遺伝子の異常が幾つか見出された。さらに、このような症例では、STAT4のリン酸化が不十分であったことから、IL-12R β 2鎖遺伝子異常によりIFN- γ 産生不全がおり、その結果IgE産生の制御が不十分となり、IgE産生亢進を来すと考えられた。これはIgE産生亢進の原因の一つがその制御機構における遺伝子異常に基づくことを明らかにした最初の成績でもある。

4) 即時型アレルギー疾患の発症に関わる遺伝子の多型性の解析とフラボノイドによるその発症予防の試み (田中敏郎)

サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-6、IL-12、IL-13) 遺伝子の発現調節領域の多型の有無、既知の β 2アドレナリン受容体やIL-4受容体構造遺伝子の多型の頻度を解析した。IL-4遺伝子の転写開始点より上流の-525番目にC/Tの多型が存在すること、また β 2アドレナリン受容体のアミノ酸置換を伴う16と27番目の多型性は、IL-4受容

体構造遺伝子の50と576番目の多型性の存在が認められるも、それぞれの多型とアレルギー疾患の連鎖は認められなかった。各々の症例で、IL-4遺伝子調節領域、IL-4受容体構造遺伝子とβ2アドレナリン受容体の多型を解析し、その組み合わせがアトピー型喘息の発症と関与するのにかについては、さらに症例数を増やして検討を進めている。本年度の解析結果によれば、IL-4受容体遺伝子の50番目の多型とβ2アドレナリン受容体遺伝子の16番目の多型との組み合わせにおいて、アトピー性喘息患者で増加しているパターンが認められた。一方、遺伝子多型や血清マーカー等でアレルギー疾患の発症の予測が可能となった将来、その発症の予防法の開発が必要である。アトピー性皮膚炎に対するある種の民間療法の臨床効果の解析を出発点として、フラボノイドには好塩基球からのヒスタミン分泌やTh2サイトカインの発現を抑制する作用があることを見出した。また、自然発症のアトピー性皮膚炎モデルマウス (NC/Nga) に、発症前から柿葉抽出物やその主要フラボノイドを経口投与することで、皮膚炎の発症と共に血清IgEの上昇の抑制が観察された。

5) 成人喘息の諸病態 (寛解、軽症、難治性) および気道過敏性の免疫学的背景—T細胞サイトカイン産生から (森 晶夫)

活性化T細胞により産生されるIL-5は、好酸球活性化因子として、好酸球性炎症の成立に必須のサイトカインであり、またT細胞のIL-5産生亢進は好酸球性炎症疾患の免疫学的特徴である。喘息の遺伝的要因を解明するために、成人喘息の種々の病態 (寛解期、軽症、難治性等) における免疫学的特徴を解析し、特にIL-5産生能と気道過敏性との関連を検討した。成人喘息患者の末梢血単核細胞をPMAとionomycin、あるいはダニ抽出物で刺激後、上清中のIL-2、4、5濃度を特異的ELISA法で測定した。気道過敏性はアレルギー学会標準法に基づき測定した。軽症喘息のうち、Ach閾値の高い群では抗原特異的・非特異的IL-5が有意に低値を示すので、アレルギー応答性T細胞の産生するIL-5が気道過敏性の要因である可能性が示唆された。難治性 (経口PSL 10mg/日以上) の多数では、ステロイド投与にかかわらず、IL-5産生の高値持続を認めた。臨床上的寛解群 (薬物治療なしで3年以上

無症状) においては、約3分の2の症例でIL-5産生が低値であったが、残りではIL-5産生能が保持されていた。臨床的寛解は、免疫学的寛解に加えて、heterogeneousな寛解要因に基づくことが示唆される。以上の結果から、T細胞IL-5産生能が喘息形質および気道過敏性の獲得に密接な関連を有することが明らかとなった。さらに、IL-5も候補遺伝子の一つとして、喘息の遺伝的要因を解析することが重要であると考えられた。

6) LTC4合成酵素のプロモーター領域にみられる変異に関する検討 (三田晴久)

LTC4合成酵素 (LTCS) のプロモーター領域には転写因子の結合部位がいくつか同定されているが、スタートコドンから444ヌクレオチド上流のAがCに置換した変異によって転写因子結合部位が新たに生じ、LTCSの発現亢進とそれによるLTC4の産生増加が生じるという仮説が提示されている。そこで、この多型の出現頻度をPCR-RFLP法を用いて解析し、さらに尿中LTE4濃度と末梢血好酸球LTCS活性との関係についても検討した。A444CのCアレルの頻度はアトピー喘息群では0.123、非アトピー喘息群では0.150で両群間には有意差はなかったが、健常群 (頻度0.200) とアトピー喘息群との間には有意差傾向が認められた。尿中LTE4濃度はアトピー喘息群、非アトピー喘息群および健常群の3群間で差はみられず、また好酸球LTCS活性においても同様な結果が得られた。以上の結果から、A444CのCアレルの出現頻度はアトピー喘息患者では健常者に比べて低い傾向を示すことが明らかとなった。この意義については、現在解析を進めている。

C. 結論

本研究班の今年度の成果から、アトピー性疾患の発症や病態形成には複数の遺伝子の多型が関与していることが示された。また、発症の抑制に関わっている特定の遺伝子の異常も関与していることが明らかとなった。現在、さらなる原因遺伝子群を同定するために、各研究分担者および研究協力者がお互い近密なネットワークを組み合わせながら、遺伝学的アプローチのみならず、機能的アプローチも精力的に行っている。

IL-4受容体 α 鎖遺伝子多型とB細胞機能

分担研究者 柳原行義

所属機関 国立相模原病院臨床研究部

研究要旨：IL-4受容体 α 鎖(IL-4R α)はIgE産生の誘導活性を示すIL-4やIL-13に対する受容体複合体の共通サブユニットである。IL-4R α の構造遺伝子の全領域をシーケンスしてアミノ酸置換を伴う遺伝的な多型部位を解析した。その結果、既知の7箇所に加えて、細胞外部分の57番目がアラニンからスレオニンに、また細胞内部分の650番目がプロリンからセリンにそれぞれ置換される2つの新規多型を新たに同定した。このうち、57番目のスレオニン型はアトピー性喘息で頻度が高い50番目のイソロイシン型と相関していたが、57番目のアラニン型はアトピー性皮膚炎で頻度が高い50番目のバリン型と相関していた。このようなIL-4R α 遺伝子多型によるB細胞機能を多角的に解析したところ、50番目のイソロイシン型と57番目のスレオニン型はIgE産生の増強に関与しているのに対して、50番目のバリン型と57番目のアラニン型はRAG(recombination-activating gene)の発現増強に関与していた。したがって、IL-4R α 遺伝子の細胞外部分における2つの多型は、関連している疾患のタイプのみならず、B細胞における機能調節作用も異なっていると考えられた。

A. 研究目的

多因子遺伝病として考えられているアトピー性疾患の発症や病態形成には、サイトカイン、サイトカイン受容体、シグナル伝達分子および転写調節因子など多くの分子の機能異常が関与している。今回、IL-4とIL-13の共有受容体であるIL-4受容体 α 鎖(IL-4R α)の遺伝子多型によるB細胞機能の調節作用を中心に検討した。また、この多型とSrc homologous and collagen (Shc) やinsulin receptor substrate (IRS) などのアダプター分子との関係のみならず、recombination-activating gene (RAG)の発現との関係についても検討した。さらに、IL-4R α 遺伝子多型とI ϵ やC ϵ などの遺伝子多型との相関についても併せて解析した。

B. 方法

1) 研究対象者の採血に際しては、担当医師あるいは研究協力医師から研究の目的、必要性および有用性のみならず、不利益や危険性の排除についても十分に説明した後、同意が得ら

れた場合にのみ、採血と遺伝子解析を行った。尚、本研究は当院の倫理委員会からの承認を得ている。

- 2) インフォームドコンセントが得られた健常人とアトピー患者の末梢血単核細胞からDNAを抽出し、IL-4R α の遺伝子配列をdirect sequence法により解析した。また、I ϵ およびC ϵ の各遺伝子配列も併せて解析した。
- 3) B細胞におけるgermline C ϵ transcriptとmature C ϵ mRNAの発現はcompetitive PCRにより解析した。各転写物の発現量は1 μ gの総RNA当りのモル数で表わした。
- 4) B細胞におけるRAG mRNAの発現はPCR産物をSouthern hybridizationすることにより半定量化した。また、核内におけるRAGタンパク質の発現はEITCで標識した抗RAG抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡で解析した。
- 5) B細胞中のShc、IRSおよびJAK3は各特異抗体を用いて得られた免疫沈降物をSGS-PAGEで可溶化した後、Western blottingすることにより解析した。

C. 結果

IL-4R α の構造遺伝子にはアミノ酸置換を伴う遺伝的多型が細胞外部分に1箇所、細胞内部分に6箇所、計7箇所存在することが知られている。これらの既知の多型に加えて、細胞外部分の57番目がアラニン (Ala) からスレオニン (Thr) に、また細胞内部分の650番目がプロリンからセリンに置換される2つの多型を新たに同定した。このうち、57Thr型はアトピー性喘息で頻度が高い50番目のイソロイシン (Ile)型と相関していたが、57Ala型はアトピー性皮膚炎で頻度が高い50番目のバリン (Val)型と相関していた。また、IL-4と抗CD40抗体で刺激したB細胞の機能を調べてみると、germline C ϵ transcriptと mature C ϵ mRNAの誘導能は50Ile型の方が高かったが、RAGの発現能は逆に50Val型の方が高かった。RAGの発現はIL-7によって増強され、またJAK3の発現レベルは50Val型では50Ile型に比べて高値を示した。一方、50Ile-Val多型はIL-4R α のアダプター分子であるShc/IRSの変換には関与していなかった。また、C ϵ (C ϵ 1-C ϵ 4) 遺伝子にはアミノ酸置換を伴う複数の多型が検出され、このうちC ϵ 3遺伝子の新規多型として364番目がAlaからValに置換される多型を同定した。この多型は50Ile-Val多型とは相関せず、またIgE結合性分子によるIgE産生の調節作用にも関与していなかった。I ϵ 領域にも塩基置換を伴う多型が3箇所存在するが、50Ile-Val多型と相関する多型は検出されなかった。しかし、50Ile型ではI ϵ プロモーター領域のNF- κ B結合部位にGからTへと置換される例が認められた。

D. 考察

本研究では、アトピー原因遺伝子の主要な候補の一つであるIL-4R α 遺伝子には、アミノ酸置換を伴う新規多型が2箇所存在すること、また57Ala-Thr多型と相関する50Ile-Val多型がB細胞機能の異なった調節に関与していることを明らかにした。例えば、アトピー性喘息で頻度が高い50Ile型はIgE産生の増強に関与しているのに対して、アトピー性皮膚炎で頻度が高い50Val型はRAGの発現増強に関与していた。後者の結果は、50Val型ではIgE抗体の多様性が成熟B細胞のレベルでさらに獲得され易い可能性を示唆している。一方、C ϵ 遺伝子やI ϵ 領域に関して

は、アトピー性疾患に特徴的な多型は存在しないと推察される。

E. 結論

IL-4R α 遺伝子における細胞外領域の多型はアトピー性疾患と関連しているが、50Ile型-57Thr型と50Val型-57Ala型とでは疾患のタイプのみならず、B細胞機能の調節作用も異なっていると考えられた。

F. 論文発表

- 1) Yanagihara Y, Kajiwara K, Koshio T, Basaki Y, Ikizawa K, Mori M, Akiyama K, Kawamura N, Sakiyama Y : Production of IL-4 and expression of CD40 ligand by human CD8⁺ T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103: 405-411, 1999.
- 2) Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao X-Q, Gao P-S, Arinobu Y, Ihara K, Takabayashi A, Hara T, Enomoto T, Sasaki S, Kawai M, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM, Izuhara K : Dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor α -chain in IgE synthesis. *J. Immunol.* 162: 1227-1231, 1999.
- 3) Kanbe N, Kurosawa M, Yamashita T, Kurimoto F, Yanagihara Y, Miyachi Y : Cord-blood-derived human cultured mast cells produce interleukin 13 in the presence of stem cell factor. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 119: 138-142, 1999.
- 4) Yanagihara Y : Molecular regulation of human IgE synthesis. *Allergol. Int.* 48: 111-119, 1999.
- 5) Ikizawa K, Yanagihara Y : Possible involvement of Shc in IL-4-induced germline ϵ transcription in a human B cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268: 54-59, 2000.
- 6) Izuhara K, Yanagihara Y, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM : The correlation of a polymorphism of the interleukin-4 receptor α chain, Ile50Val, with atopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* in press.
- 7) Yanagihara Y, Kajiwara K, Basaki Y, Ikizawa K, Mori M, Akiyama K, Kawamura N, Sakiyama Y : Induction of IgE synthesis by genetically modified CD8⁺ T cells of a patient with adenosine deaminase deficiency. *Allergol. Int.*

in press.

- 8) 柳原行義：サイトカイン・IgEクラススイッチ 食物アレルギー 基礎と臨床のクロストーク (三河春樹、西間三馨、上野川修一編集) pp. 28-32, 1999.
- 9) 柳原行義：食品添加物と過敏性反応 別冊・医学のあゆみ「食物アレルギーの最前線」(名倉 宏 編集) pp. 90-94, 1999.
- 10) 光安廣倫、柳原行義、出原賢治：IL-4レセプター α 鎖の遺伝的多型とアトピー 臨床免疫 31: 506-512, 1999.
- 11) 柳原行義、出原賢治：IL-4レセプターの遺伝子多型 アレルギー科 8: 263-269, 1999.
- 12) 柳原行義：IgE産生調節に関する最近の知見 臨床医 25: 339-341, 1999.
- 13) 柳原行義：IgE抗体産生の誘導とその制御機構 IgE-Fc ϵ RI-マスト細胞枢軸とサイトカイン (羅 智靖 編集) pp. 64-76, 1999.
- 14) 生澤公一、柳原行義：Germline C ϵ transcript を発現させるシグナル Annual Review 免疫 2000 (矢田純一、奥村 康、佐藤昇志 編集) pp. 24-30, 1999.
- 15) 柳原行義：IgE抗体産生の調節機構 アレルギー科 9: 37-44, 2000.
- 16) 柳原行義、出原賢治：アレルギー疾患と遺伝子多型 医療 54: 67-72, 2000.
- 17) 柳原行義、羅 智靖：可溶化Fc ϵ RI α によるIgE産生抑制 医学のあゆみ 192: 1011-1015, 2000.

研究協力者

梶原景一 (国立相模原病院臨床研究部)

生澤公一 (国立相模原病院臨床研究部)

秋山一男 (国立相模原病院臨床研究部)

工藤 誠 (国立相模原病院臨床研究部・内科)

高橋一夫 (国立相模原病院臨床研究部・皮膚科)

海老澤元宏 (国立相模原病院臨床研究部・小児科)

課題名 アトピーの病因遺伝子としての IL-12 レセプターβ2 鎖遺伝子異常
 氏名 分担研究者 近藤 直実
 所属機関 岐阜大学医学部小児科・教授

研究要旨 アトピーの病因遺伝子を解明する一貫として、IgE 産生抑制系の遺伝子異常を検索した。選択的な IL-12 刺激による IFN-γ 産生不全の症例の 41.7% に IL-12 レセプターβ2 鎖をコードする遺伝子の異常が幾つか見出された (2496 del 91, R313G, H720R)。さらにそれらの症例では、Stat4 のリン酸化が不十分であった。健康人や IL-12 で IFN-γ が産生誘導される症例ではこれらの異常はみられなかった。以上の結果から IL-12 レセプターβ2 鎖遺伝子異常により IFN-γ 産生不全がおこり、ひいては IgE 産生の制御が不十分となり、IgE 産生亢進を来すと考えられた。これは IgE 産生亢進の原因の 1 つがその制御機構における遺伝子異常に基づくことを明らかにした世界で最初の成績である。

A. 研究目的

アレルギー疾患は、遺伝的要因と環境要因とが絡み合って発症・増悪する。アレルギー疾患の発症には遺伝的集積性が認められることから、何らかの遺伝子が関わっていると考えられるが、アレルギーの病態の多様性からアレルギー（アトピー）の病因となる遺伝子は多遺伝子群と考えられる。私共は、アレルギー反応のうち①HLA クラス II-ペプチド-T 細胞レセプターにおける抗原認識部位および②IgE 産生亢進の機序における B 細胞内と B 細胞外に関してアレルギーの病因となる遺伝子異常を検索してきた。このうち、IgE 産生制御機構の破綻を来す IL-12 レセプターβ2 (IL-12Rβ2) 鎖遺伝子異常を世界で初めて見出した。

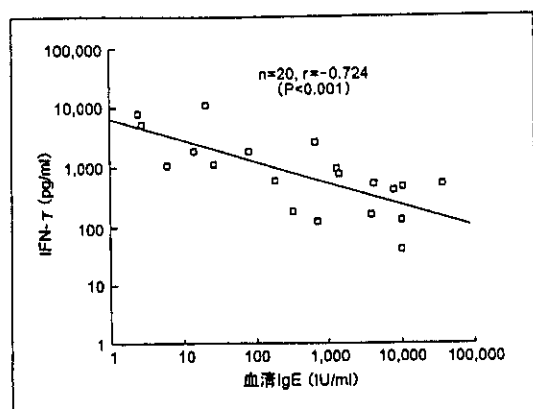


図1 培養上血清中IFN-γと血清IgE値

B. 研究方法

①血清 IgE 値または、特異 IgE 抗体高値の気管支喘息またはアトピー性皮膚炎などアレルギー疾患患者および健康人を対象とした。②ヘパリン加末梢血から末梢リンパ球単球分画 (PBMCs) を得、10%

胎児牛血清を含む RPMI1640 の培養液に 1×10^6 /ml の濃度に調整し、種々の条件で培養し培養上清中のサイトカイン、IgE を測定した。③さらに PBMCs を phytohemagglutinin (PHA) and/or interleukin 12 (IL-12, 5 IU/ml) あるいは IL-18 を添加し培養した。24 時間培養後の上清を採取し、enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) により interferon-γ (IFN-γ) を測定した。④24 時間培養後の PBMCs から得た RNA から IL-12Rβ2 cDNA を合成し、各フラグメントを PCR で増巾させ T ベクターにクローニングし、オートシクエンサーにより塩基配列を決定した。⑤15 分培養後の PBMCs を用いて stat4 のリン酸化の有無につき検討した。

(倫理面への配慮)

研究対象者には本研究の内容、方法および予想される結果を十分に説明し十分な理解 (インフォームド Consent) を得た上で採血が行われた。また倫理面でも、結果による不利益は全く生じないか、または配慮が充分になされることから問題がないと判断された。

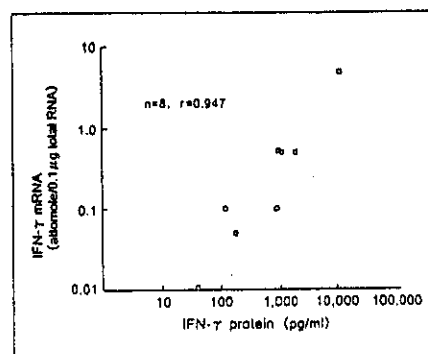


図2 フィトヘマグルチニン(PHA)刺激によるIFN-γ mRNA の発現量とIFN-γ蛋白質
 MIMIC法によりインターフェロン(IFN)-γのmRNAを定量したところ、IFN-γのmRNAは強い正の相関を示した。

C. 研究結果

IFN- γ は IL-4 により誘導される IgE 産生を抑制するが、その機序に関しては germline C ϵ transcript には影響せず、mature な C ϵ mRNA の発現を抑制することにより IgE 産生を抑制する。この効果は IL-4 と抗 CD40 抗体で誘導される IgE 産生系ではその効果を発揮せず、CD4+T 細胞 cognate の系でその効果が発揮される。

私共はまず、はマイトゲンや抗原刺激をうけた PBMCs からの IFN- γ と IL-4 と IgE の産生につき調べた。IgE 高値の患者では IgE 値は IL-4 と正相関を示すというよりはむしろ IFN- γ ときれいな負の相関を示した (図 1)。さらに卵に過敏性のある患者において、ovalbumin 刺激後の培養上清中の IL-4 と IgE は有意な ($p < 0.01$) 正相関を認め、IFN- γ と IgE は有意な ($p < 0.05$) 逆相関を認めた。さらに IL-4 と pokeweed mitogen で刺激された PBMCs からの IgE 産生は recombinant IFN- γ により抑制された。これらの結果は IFN- γ が IL-4 により誘導される IgE 産生を制御していること、また IFN- γ の産生が低下していると IgE 産生が亢進することを示している。MIMIC 法により IFN- γ の mRNA を定量したところ IFN- γ の産生量と IFN- γ mRNA は強い正の相関を示した (図 2)。すなわち IFN- γ の産生低下が IFN- γ の mRNA 発現低下によることが明らかになった。

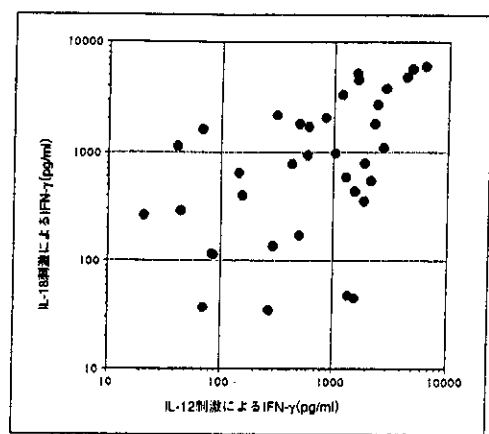


図3 末梢リンパ球のIL-12あるいはIL-18刺激によるIFN- γ 産生

アレルギーの IgE 産生過剰における IFN- γ 産生不全ともいうべき病態に関してさらに、上位で IFN- γ の産生誘導をする IL-12 と IL-18 および、それらのシグナル伝達系につき検討した。PBMCs を IL-12 で刺激した時の IFN- γ 量と IL-18 で刺激し

た時の IFN- γ 量とをプロットすると図 3 の如く正相関を示した。しかしながら、両者の刺激による IFN- γ 産生に解離のみられる症例が幾つか見出された。IL-12 刺激と PHA 刺激との間にも同様の結果が得られた (75 例中 24 例)。これらの症例につきそれぞれのレセプターを含む情報伝達系の異常につき検索した。IL-12 と IL-18 とはそれぞれのレセプター (前者では IL-12R β 1, β 2, 後者では IL-18R α , IL-18R β) を介して、さらに前者では Jak2-Stat4 の系を介し、後者では Traf-6, AP-1 を介して IFN- γ 遺伝子のプロモーター部分に作用して IFN- γ 遺伝子の発現を誘導する (図 4)。今回の検討で選択的な IL-12 刺激による IFN- γ 産生不全の症例 24 例の中に IL-12 レセプター β 2 鎖をコードする遺伝子の異常が 3 種類、10 例 (41.7%) に見出された (R313G, H720R, 2496 del 91) (図 5)。さらにそれらの症例では、Stat4 のリン酸化が不十分であった (図 6) ことから、IL-12 レセプター β 2 鎖遺伝子異常により IFN- γ 産生不全がおり、ひいては IgE 産生の制御が不十分となり、IgE 産生亢進を来すと考えられた。更に、その家系に同様の異常が確認されている。

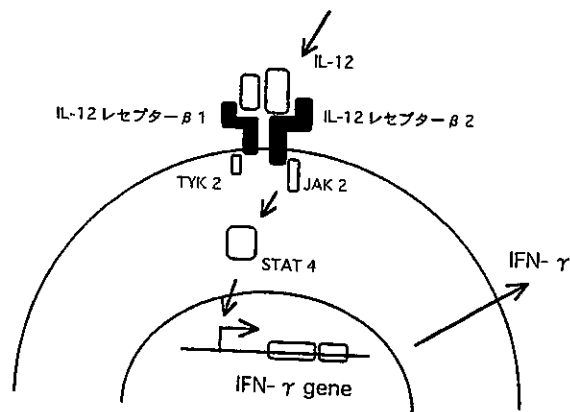


図4 IL-12 情報伝達系

D. 考察

IL-12 は p35 と p40 からなるタンパクである。IL-12 レセプターは β 1 鎖と β 2 鎖からなり、 β 2 鎖は細胞内ドメインに 3 ヶ所のチロシン残基を有する。IL-12 レセプターは IL-12 のシグナルカスケードの最初のステップである。IL-12R β 2 鎖遺伝子異常により IFN- γ 産生不全がおり、ひいては IgE 産生の制御が不十分となり、IgE 産生亢進を来すと考えられた。これは IgE 産生亢進の原因の 1 つがその

制御機構における遺伝子異常に基づくことを明らかにした最初の成績でもある。IL-12 レセプターβ 1 鎖遺伝子の異常によりマイコバクテリウムやサルモネラに易感染性を示す症例が報告されていることから、現在これらとの関係の解析を進めている。現在さらに IL-18 系についても検討をすすめている。まとめを図7に示す。

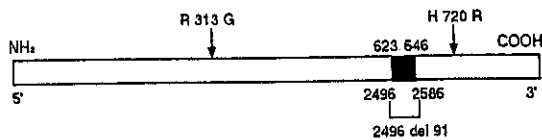


図5 IL-12 レセプターβ2 鎖遺伝子異常

E. 結論

選択的な IL-12 刺激による IFN-γ 産生不全の症例の 41.7% に IL-12 レセプターβ2 鎖をコードする遺伝子の異常が幾つか見出された (2496 del 91, R313G, H720R)。さらにそれらの症例では、Stat4 のリン酸化が不十分であった。健康人や IL-12 で IFN-γ が産生誘導される症例ではこれらの異常はみられなかった。以上の結果から IL-12 レセプターβ2 鎖遺伝子異常により IFN-γ 産生不全がおり、ひいては IgE 産生の制御が不十分となり、IgE 産生亢進を来すと考えられた。これは IgE 産生亢進の原因の 1 つがその制御機構における遺伝子異常に基づくことを明らかにした世界で最初の成績である。

Case	5	9	10
血清 IgE	94	126	21000
最高 RAST 値	3	4	6
IFN-γ (PHA)	1556	120	1000
IFN-γ (IL-12)	330	< 15.6	30
リン酸化 STAT4	▶	▶	▶
STAT4	▶	▶	▶

図6 リン酸化STAT4の検討(PHA+IL-12)

Case10 では STAT4 のリン酸化が低下している

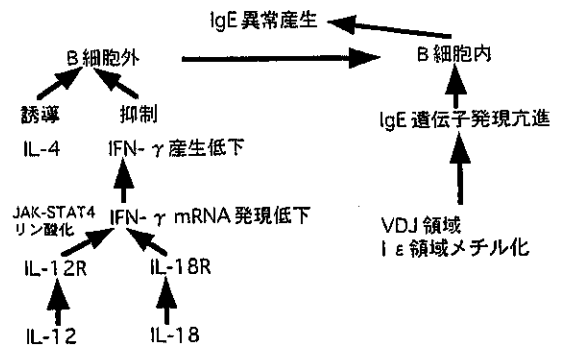


図7 アレルギーの病因に関わる種々の遺伝子のうち、IgE 産生過剰に関わる遺伝子の検討

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Matsui E. Kaneko H. Fukao T. Teramoto T. Inoue R. Watanabe M. Kasahara K. Kondo N. Mutations of the IL-12 receptor β2 chain gene in some atopic subjects. *Biochem Biophys Res Commun*, 266: 551-555 (1999)
- (2) 近藤直実：アレルギー予知の血中因子 —IL-12Rβ2 鎖遺伝子異常を含めて—。アレルギー科。(印刷中)
- (3) 近藤直実：IgE の産生制御と IL-12 と IL-12 レセプター。臨床免疫。科学評論社 (印刷中)

2. 学会発表

- (1) 松井永子、金子英雄、寺本貴英、伊上良輔、深尾敏幸、鹿野博明、渡辺みづほ、近藤直実：アレルギーの発症に関与する遺伝子異常—IL-12Rβ2 鎖遺伝子異常の発見—。日本小児科学会学術集会 (第 103 回) (2000 年 4 月 14~16 日, 和歌山)
- (2) 近藤直実：シンポジウム：気道アレルギーの発症要因：免疫学的機序。日本小児アレルギー学会 (第 36 回) (1999 年 10 月 14 日, 幕張)
- (3) 近藤直実：シンポジウム：アトピー性皮膚炎の発症・増悪に関与する遺伝子—IL-12Rβ2 鎖遺伝子異常の発見—。日本アレルギー学会総会・学術集会 (第 49 回) (1999 年 10 月 18~20 日, 広島)

課題名 アトピー原因遺伝子の同定とその機能解析に関する研究

氏名 分担研究者 出原 賢治

所属機関 九州大学医学部検査部助手

研究要旨 アレルギー疾患の発症における遺伝的素因を明らかにするために、インターロイキン(IL)-4、IL-13のシグナル伝達分子において気管支喘息の発症、病態に関与する遺伝子の同定を試みた。IL-13遺伝子とSTAT6遺伝子上における遺伝的多型を同定して、遺伝学的に気管支喘息の発症と相関する多型を同定した。IL-13レセプターは気道組織においては気道上皮細胞と気管支平滑筋に高発現しており、IL-13はこれらの細胞に直接作用することにより、気管支喘息の発症に関与しているのではないかと考えられた。STAT6遺伝子の遺伝的多型に関しては、両者の発現量に差は認められなかった。

A. 研究目的

アレルギー疾患は環境要因と遺伝要因の相互作用により発症する複雑な疾患であり、その遺伝要因は多因子であると考えられている。またその中にはIgEが高くなるアトピーや喘息、皮膚炎といった臓器特異的な原因遺伝子が存在すると考えられている。この研究では、アレルギーの遺伝的要因と成り得る候補遺伝子の中からインターロイキン(IL)-4、IL-13のシグナル伝達分子に焦点を絞り、それらの遺伝子上の多型についてアレルギー疾患との関連について解析することを目的とした。その事により、アレルギー疾患の遺伝子診断が可能になり、アレルギー疾患の予防につながると期待される。

B. 研究方法

今年度はIL-4、IL-13のシグナル伝達分子のうち、リガンドであるIL-13遺伝子とサイトカインのシグナル伝達分子であるSTAT6遺伝子の二つをアレルギーの原因遺伝子の候補として選び出した。そして、それらの遺伝子上における遺伝的多型の有無をSSCP法、シークエンス法で同定した。

次に、日本人とイギリス人という二つの人種において、症状の重症度あるいはアトピー性、非アトピー性にグループ別した気管支喘息患者、正常者のDNAにおけるこれらの遺伝的多型の出現頻度を解析

して、遺伝学的に有意に相関する多型が存在するかどうか解析した。

遺伝学的に気管支喘息と相関する同定された遺伝的多型についてはさらに機能的解析を進めた。第一に、正常型、アレルギー型の配列を持った蛋白質を作製して、その機能に差異があるか解析を行っている。第二に、正常型、アレルギー型の配列を持った個人由来の細胞を用いて、その機能に差異があるか解析を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析に関しては本人の意志を同意書を作製することにより確認するとともに、個人の遺伝情報が第三者に漏洩しないよう万全の配慮をつくした。

C. 研究結果

①IL-13遺伝子

SSCP法によりIL-13遺伝子上で成熟蛋白質の開始点より110番目のアミノ酸がアルギニンからグルタミンに置換される遺伝的多型が存在することを同定した。日本人、イギリス人のどちらのグループにおいてもアトピー性、非アトピー性に関わらず、喘息患者においてグルタミンの頻度がオッズ比で約2倍高くなっていた。また血中IL-13値も、グルタミン型においてアルギニン型に比べて高かった。これらの結果より、グルタミン型のIL-13遺伝子は遺伝学的に

喘息の原因遺伝子であると考えられた。

コンピューターモデリングにより両者の立体構造は異なり、レセプターとの結合に差を生ずるのではないかと予想された。

遺伝学的解析よりIL-13は直接肺組織に作用することにより、気管支喘息の発症に関与しているのではないかと考えられた。気道組織におけるIL-13の標的細胞を同定するために、IL-13レセプター α 鎖1(IL-13R α 1)に対するモノクローナル抗体を作製して、免疫染色を行った。その結果、IL-13Rの構成成分であるIL-13R α 1とIL-4レセプター α 鎖は、ともに気道組織においては気道上皮細胞と気管支平滑筋に高発現していることが判明した。

②STAT6遺伝子

SSCP法によりSTAT6遺伝子の3'非翻訳領域における2964番目の塩基がAからGへと置換する遺伝的多型を同定した。日本人のグループ内の軽中症の成人アトピー性喘息患者においてGのホモ接合型が多かった。しかしイギリス人においては相関は認められなかった。

この遺伝的多型がSTAT6蛋白質の発現調節に関与しているか解析するために、2964番目の塩基がAのホモ接合型、あるいはGのホモ接合型の正常者由来のB細胞、T細胞における刺激時、非刺激時のSTAT6の発現量を比較した。しかし、遺伝的多型によるSTAT6の発現量に差は認められなかった。

D. 考察

IL-13遺伝子に関しては、アルギニン型とグルタミン型の2つのタイプにおいて機能的な差があるのか、現在解析を進めているところである。もし差が認められれば、IL-13遺伝子は喘息遺伝子の一つであることが証明される。今後はまずこの遺伝的多型が機能的に差異があるかどうかを確定する必要があると考えられた。その上でこの遺伝的多型のアレルギー疾患の遺伝子診断への応用を考慮したいと考えている。

STAT6遺伝子の遺伝的多型に関しては、遺伝学的には喘息の発症と関連は認められたが、機能的には差異は認められなかった。今後は、今回見つけられた遺伝的多型と連鎖不均衡の関係にあるか、機能的

に違いを生ずるこれ以外の遺伝的多型の同定を行っていく必要があると考えられた。その上でどの遺伝的多型がアレルギー疾患の診断に有用であるか判断する必要があると考えられた。

E. 結論

1) IL-13遺伝子上で110番目のアミノ酸がアルギニンからグルタミンに置換される遺伝的多型が存在し、グルタミン型のIL-13遺伝子は遺伝学的に喘息と相関が認められた。IL-13Rの構成成分であるIL-13R α 1とIL-4R α は、ともに気道組織においては気道上皮細胞と気管支平滑筋に高発現しており、IL-13はこれらの細胞に作用することにより、気管支喘息の発症に関与しているのではないかと考えられた。

2) STAT6遺伝子の3'非翻訳領域における2964番目の塩基がAからGへと置換する遺伝的多型を同定し、日本人においてはGのホモ接合型とアトピー性喘息の間に相関を認めた。しかし、この遺伝的多型によるSTAT6の発現量に差は認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanai N, Yanai F, Hirose S, Nibu K, Izuhara K, Tani T, Kubota T, and Mitsudome A:
A "G" to "A" Transition at the Last Nucleotide Mutation of Exon 6 of the γ c Gene (868G \rightarrow A) May Result in Either a Splice or Missense Mutation in Patients with X-Linked Severe Combined Immunodeficiency.
Hum. Genet. 104, 36-42, 1999
- 2) Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao X-Q, Gao P-S, Arinobu Y, Ihara K, Takabayashi A, Hara T, Enomoto T, Sasaki S, Kawai M, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM, and Izuhara K:
Dominant Effect of Ile50Val Variant of the Human Interleukin-4 Receptor α Chain in IgE Synthesis.
J. Immunol. 162, 1227-1231, 1999
- 3) Arinobu Y, Atamas SP, Otsuka T, Niino H, Yamaoka K, Mitsuyasu H, Niho Y, Hamasaki N, White B, Izuhara K:
Antagonistic Effects of an Alternative Splice Variant of Human IL-4, IL-4 δ 2, on IL-4 Activities in Human Monocytes and B Cells.
Cell. Immunol. 191, 161-167, 1999
- 4) Izuhara K, Arinobu Y, Sumimoto H, Nunoi N, Takeya R, Higuchi K, Takeshige K, Hamasaki N, Harada N:
Association of the Interleukin-4 Receptor α Chain with p47^{phox}, an Activator of the Phagocyte NADPH Oxidase

- in B cells.
Mol. Immunol. 36, 45-52, 1999
- 5)Akaiwa M, Yae Y, Sugimoto R, Suzuki SO, Iwaki T, Izuhara K, and Hamasaki N:
Hakata Antigen, a New Member of the Ficolin/Opsonin p35 Family, Is a Novel Human Lectin Secreted into Bronchus/Alveolus and Bile.
J. Histochem. Cytochem. 47, 777-786, 1999
- 6)Yamaoka K, Otsuka T, Niino N, Nakashima H, Tanaka Y, Nagano S, Ogami E, Niho Y, Hamasaki N, Izuhara K:
Selective DNA-Binding Activity of IL-10-Stimulated STAT Molecules in Human Monocytes.
J. Interferon Cytokine Res. 19, 679-685, 1999
- 7)Nemoto Y, Otsuka T, Niino K, Izuhara K, Yamaoka H, Nakashima H, Niho Y:
Differential Effects of Interleukin-4 and Interleukin-10 on Nitric Oxide Production by Murine Macrophages.
Inflammation Research, 48, 643-650, 1999
- 8)Izuhara K, Hamasaki N, Adra CN, Shirakawa T, Hopkin JM:
Emerging Therapeutic Targets in Allergy: IL-4R α and Stat6.
Emerging therapeutic targets 3: 381-389, 1999
- 9)Heinzmann A, Mao X-Q, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao P-S, Ohshima K, Umeshita R, Abe Y, Braun S, Yamashita T, Roberts MH, Sugimoto R, Arima K, Arinobu Y, Yu B, Kruse S, Enomoto T, Dake Y, Kawai M, Shimazu S, Sasaki S, Adra CN, Kitaichi M, Inoue H, Yamauchi K, Tomichi N, Kurimoto F, Hamasaki N, Hopkin JM, Izuhara K, Shirakawa T, Deichmann KA:
Genetic Variants of IL-13 Signalling and Human Asthma and Atopy.
Hum. Mol. Genet. 9, 549-559, 2000
- 10)Shirakawa T, Deichman KA, Izuhara K, Mao X-Q, Adra CN, Hopkin JM:
Atopy and Asthma: Genetic Variants of IL-4 and IL-13 Signalling.
Immunol. Today 21: 60-64, 2000
- 11)Kojima M, Morisaki T, Izuhara K, Uchiyama A, Matsunari M, Katano M, Tanaka M:
Direct Effect of Lipopolysaccharide on Prostaglandin E2 Production by Colon Carcinoma through Nuclear Factor- κ B Activation and Cyclooxygenase-2 Induction.
Oncogene, in press
- 12)Takabayashi A, Ihara K, Sasaki Y, Izuhara K, Hamasaki N, Suzuki Y, Nishima S, and Hara T:
Association between Childhood Atopic Asthma and Polymorphisms of Three Candidate Genes: Interleukin-4 Receptor, Interleukin-4 Promoter and Fc ϵ Receptor Genes.
Exp. Clin. Immunogenet. in press
- 13)Gao P-S, Mao X-Q, Arinobu Y, Izuhara K, Roberts MH, Deichmann KA, Adra CN, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM:
Stat6 and atopic asthma.
J. Med. Genet. in press
- 14)Izuhara K, Umeshita R, Akaiwa M, Shirakawa T, Deichmann KA, Arima K, Yu B, Hamasaki N, Hopkin JM:
Recent advances in understanding how interleukin-13 signals are involved in the pathogenesis of bronchial asthma.
Arch. Immunol. Therap. Exp. in press
- 15)Izuhara K, Yanagihara Y, Mitsuyasu H, Arinobu Y, Hamasaki N, Shirakawa T, and Hopkin, JM:
Atopy and the Human Interleukin-4 Receptor α Chain.
J. Allergy Clin. Immunol. in press
- 16)出原賢治、柳原行義、光安廣倫、白川太郎、有信洋二郎、J.M.Hopkin、濱崎直孝:
IL-4レセプター α 鎖のIle50Val置換とアトピー性喘息との関連。
呼吸18: S26-S29, 1999
- 17)光安廣倫、柳原行義、出原賢治:
IL-4レセプター α 鎖の遺伝子多型とアトピー。
臨床免疫31: 506-512, 1999
- 18)出原賢治:
アトピーとインターロイキン4レセプター。
臨床病理47: 525-530, 1999
- 19)赤岩美奈、出原賢治:
IL-4レセプターの多型とアレルギー疾患の発症との関連。
現代医療31: 2210-2216, 1999
- 20)出原賢治:
アトピー原因遺伝子の同定に関する研究。
アレルギー28: 64-69, 1999
- 21)柳原行義、出原賢治:
IL-4レセプターの遺伝子多型。
アレルギー科8: 263-269, 1999
- 22)有馬和彦、出原賢治:
IL-4, IL-13シグナル伝達経路障害。
アレルギー科8: 335-341, 1999
- 23)山岡邦宏、大塚毅、出原賢治:
IFN- γ とIL-10によるヒト単球におけるSTAT分子の活性化ならびに不活性化機構。
臨床免疫32: 733-738, 1999
- 24)出原賢治、赤岩美奈、梅下律子、濱崎直孝、大島孝一、北市正則、富地信和、井上洋西、柳原行義:
IL-13レセプターの肺組織における発現分布とIL-13のシグナル伝達についての解析。
呼吸19: S47-S49, 2000
- 25)柳原行義、出原賢治:
アレルギー疾患と遺伝子多型。
医療54: 67-72, 2000
- 26)杉本理恵、出原賢治:
IL-4, IL-13シグナル伝達分子の遺伝的多型とアレルギーとの関連。
医学のあゆみ192: 943-947, 2000
- 27)梅下律子、出原賢治:
IL-13レセプター。
臨床免疫 印刷中
- 28)出原賢治:
アトピー性皮膚炎の原因遺伝子。

臨床免疫 印刷中

29)出原賢治:

IgE-FcεRIーマスト細胞枢軸とサイトカイン (アトピー素因とアレルギー炎症に関与するサイトカイン), 94-102, ファーマインターナショナル, 1999

G. 知的所有権の取得状況
特に記載すべき事なし

2. 学会発表

1) Izuhara K:

The Role of Interleukin-4 receptor in Atopy.
17th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 1999, Firenze, Italy
(Round Table)

2) 出原賢治、白川太郎、柳原行義:

アトピーの遺伝子レベルでの予知—IL-4レセプターを中心として—

第11回日本アレルギー学会春季臨床大会.

1999年, 大阪

(シンポジウム)

3) 出原賢治:

IL-13レセプターの発現調節機構とシグナル伝達.
第49回日本アレルギー学会. 1999年, 広島
(シンポジウム)

4) 赤岩美奈、大島孝一、梅下律子、北市正則、富地信和、井上洋西、杉本理恵、有信洋二郎、有馬和彦、于彬、Xiao-Quan Mao、濱崎直孝、Julian M Hopkin、白川太郎、出原賢治:

肺組織におけるIL-13レセプターα1とIL-4レセプターαの局在について.

第9回日本免疫学会. 1999年, 京都

(一般演題)

5) 関則靖、有馬和彦、林克彦、杉本理恵、出原賢治、久保允人:

ヒトIL-4レセプターα鎖トランスジェニックマウスを用いたT細胞機能分化決定機構の解析.

第9回日本免疫学会. 1999年, 京都

(一般演題)

6) 有信洋二郎、杉本理恵、赤岩美奈、有馬和彦、梅下律子、于彬、大塚毅、仁保喜之、濱崎直孝、出原賢治:

活性化B細胞、T細胞におけるStat6の発現増強について.

第9回日本免疫学会. 1999年, 京都

(一般演題)

7) 梅下律子、杉本理恵、有馬和彦、有信洋二郎、赤岩美奈、于彬、和田守正、桑野信彦、濱崎直孝、出原賢治:

IL-13、IL-4シグナル伝達におけるヒトIL-13受容体α1鎖細胞内領域の機能解析.

第9回日本免疫学会. 1999年, 京都

(一般演題)

8) 松田正、山本哲也、孫榮華、十二町明、吉村昭彦、出原賢治、川畑正博、宮園浩、平村口篤:

再構成系におけるJAK-STAT経路とTGF-βのシグナル伝達系のクロストーク.

第9回日本免疫学会. 1999年, 京都

(一般演題)

課題名 アトピー原因遺伝子の同定とその機能解析に関する研究
-即時型アレルギー疾患の発症に関わる遺伝子の多型性の解析とその発症予防

氏名 分担研究者 田中 敏郎

所属機関 大阪大学医学部分子病態内科助手

研究要旨 即時型アレルギー疾患の発症に関わる遺伝子として、サイトカイン (IL-5, IL-6, IL-12 β , IL-13)の遺伝子発現調節領域の多型性の有無をPCR-SSCP法にて解析したが、多型性は認められなかった。既知の遺伝子 (5'IL-4, β 2adrenoceptor, IL-4R)の多型性頻度を、アトピー患者と対照にて比較したが、それ単独では有意な差が得られなかった。これらの遺伝子多型性の組み合わせで解析した場合、症例数が少ないものの、対照と比してアトピー型喘息では β 2adrenoceptor16-GlyとIL-4R-Ileの重なりが増加する傾向が認められた。ある民間療法のアトピー性皮膚炎にたいする臨床効果の解析を出発点として、フラボノイドが好塩基球からのTh2サイトカインの分泌を抑制すること、またその経口投与によって、NC/Ngaマウスの皮膚炎やIgE上昇が著明に抑制されることがわかった。ヒトでの効果は今後の解析を要するが、この様な容易に生活習慣に組み入れることが可能な機能性食品は、即時型アレルギー疾患の発症を予防する一つ的手段と成り得よう。

A. 研究目的

即時型アレルギー疾患は、遺伝と環境要因が重なって発症するものと考えられている。遺伝要因として、種々の遺伝子の多型性が、即時型アレルギー疾患の発症、アトピー素因や臓器過敏性等に関与することが示されている。しかしながら、これまで示された報告をみると、いずれの多型性においてもそれ単一でアレルギー疾患の発症が決定されるわけではなく、また一つの多型性で発症予測することも困難であるのが現状であろう。アレルギー疾患の発症には、遺伝要因より環境要因の寄与が強いのか、他の主要な遺伝子の多型性が存在するのか、またそれぞれの多型性の”重なり”が発症に関与する等のことが考えられる。そこで、サイトカインを中心に遺伝子の多型性が存在するのか否か、また報告されている多型性の重なりで発症予測が可能か否かを検討した。また発症予測が可能となった場合どのようにアレルギー疾患の発症が予防できるのか、機能性食品の予防効果を動物モデルにて検討した。

B. 研究方法

1. アレルギー疾患を有する患者約200名、対照約110名のDNAを同意後採取した。遺伝子の多型性の存在の有無に関しては、PCR-SSCP法、direct sequencing法にて、サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 β , IL-13)遺伝子の発現調節領域を検討した。既知の β 2-adrenoceptor (β 2-ADR)やIL-4受容体(IL-4R)

構造遺伝子の多型性は、PCR法にて検討した。

2. 好塩基球からのヒスタミンやTh2サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13)分泌を抑制する柿葉抽出物やそれに含まれる主要フラボノイドであるアストラガリンを、自然発症アトピー性皮膚炎動物モデルであるNC/Ngaマウスに経口投与し、その予防効果を、皮膚症状と組織所見、IgE値および経皮水分喪失量にて検討した。種々のフラボノイドの好塩基球からのTh2サイトカインの分泌抑制は、PCR法やELISA法にて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたり、対象とするアレルギー患者及び対照から提供される検体には担当医師から研究の必要性及び有用性を十分に説明した後、同意が得られた場合にのみ、検体の解析を行なった。また実験動物を用いる場合、動物愛護に配慮し、その実験には倫理委員会の承認を得た上で遂行した。

C. 研究結果

1. 遺伝子の多型性の解析

(1) PCR-SSCP法、一部PCR-direct sequencing法にて、遺伝子の多型性が存在するか否かを検討したが、IL-4イントロン転写調節領域 (212bp) (特に肥満細胞や好塩基球で機能する調節領域)、IL-13 (-749bpまで)、IL-5 (-494bpまで)、IL-6 (-315bpまで)、IL-12 β (-718bpまで)遺伝子の5'転写調節領域には、アトピー患者及び健康人共に、遺伝子の多型性は

存在しなかった。

(2) IL-4の5' 転写調節領域(5'IL-4(-525)), IL-4受容体(IL-4R(50)とIL-4R(576)), β 2アドレナリン受容体(β 2-ADR(16)と β 2-ADR(27))構造遺伝子の多型性の解析では、アトピー患者と対照でその遺伝子頻度の差が認めず、これらの単独の多型性では、アトピーの発症予測には不十分であることが示唆された。それぞれの遺伝子頻度は、5'IL-4(-525) アトピー患者：C/C 9, C/T 37, T/T 52, 対照：C/C 5, C/T 28, T/T 31；IL-4R(50) アトピー患者：Val/Val 18, Val/Ile 12, Ile/Ile 26, 対照：Val/Val 19, Val/Ile 14, Ile/Ile 8；IL-4R(576) アトピー患者：Gln/Gln 65, Gln/Arg 20, Arg/Arg 0, 対照：Gln/Gln 43, Gln/Arg 12, Arg/Arg 0； β 2-ADR(16) アトピー患者：Arg/Arg 6, Arg/Gly 33, Gly/Gly 15, 対照：Arg/Arg 13, Arg/Gly 27, Gly/Gly 24； β 2-ADR(27) アトピー患者：Gln/Gln 96, Gln/Glu 14, Glu/Glu 0, 対照：Gln/Gln 69, Gln/Glu 12, Glu/Glu 0であった。

(3) β 2-ADR(16)と β 2-ADR(27)遺伝子の多型性は連鎖しており、 β 2-ADR(27)がGluである場合 β 2-ADR(16)としてGlyが用いられており(対立遺伝子特異的プライマーにより確認)、したがって日本人の β 2-ADR遺伝子は、調べた限り16Arg/27Gln, 16Gly/27Gln, 16Gly/27Gluの3つのパターンしか存在しなかった。一方IL-4R(50)とIL-4R(576)遺伝子の連鎖不均衡は認められなかった。

(4) アトピー型喘息、また非アトピー群に分類し、5'IL-4(-525)、IL-4R(50)、IL-4R(576)と β 2-ADR(16)の遺伝子の多型性を調べたところ、 β 2アドレナリン受容体構造遺伝子(Arg16Gly)とIL-4受容体遺伝子(Val50Ile)の多型性の組み合わせにおいて、アトピー型喘息患者で増加している組み合わせが存在していた。遺伝子頻度は、 β 2-ADR(16)-Arg/Gly or Gly/Gly + IL-4R(50)-Val/Ile or Ile/Ile アトピー型喘息 19, 対照 4；他の組み合わせ アトピー型喘息 18, 対照 22であった。

2. 発症予防の解析

(1) 低カロリー食、柿茶、緑食野菜飲料と温冷交互浴からなる民間療法がアトピー性皮膚炎に有効か否かを評価するために、成人重症アトピー性皮膚炎の患者20名の臨床症状、免疫動態を追跡した。2ヶ月の治療により、皮膚炎は

SCORAD指数にて半減化(45から23へ)し、同時に血清マーカーであるLDHと好酸球の減少を伴っていた。その免疫学的機序として、早期の好酸球の減少、単核球からの炎症惹起分子であるPGE2の産生低下が考えられた。一方IgEには変化を認めず、この療法によりT細胞からのIFN- γ 産生及び血清中のIFN- γ 値の低下が認められた。

(2) アブラナ科緑色野菜飲料摂取による健康人の生理機能の変化を検討したところ、赤血球膜のn3系の不飽和脂肪酸の増加(3週間で約1.7倍)が観察され、動物モデルでも同様な結果を得た。食習慣の悪化特にn6系の不飽和脂肪酸の過剰な摂取が、最近の即時型アレルギー疾患の有病率の増加の一つの原因であると示唆されているが、このジュースでn3系の不飽和脂肪酸が増加するとアレルギー炎症の重要な活性物質であるPG2系やLT4系の産生低下につながる可能性がある。

(3) 柿葉抽出物は、in vitroで好塩基球からのヒスタミン分泌とTh2タイプ(IL-4, IL-5, IL-13)のサイトカインの発現を抑制した。アトピー性皮膚炎モデルマウスNC/Ngaに発症前より経口投与で与えると、皮膚炎の発症が抑制され、引っ掻き回数が著明に減少し、また血清IgE値も減少した。HPLC解析では、フラボノイドであるアストラガリンが0.6%、柿葉抽出物に含まれることが明らかとなり、このアストラガリンも、in vitroで好塩基球からのヒスタミン分泌を抑制し、またそれ単独投与でNC/Ngaでの皮膚炎の発症を抑制した。さらに、20種類のフラボノイドの抗アレルギー作用(好塩基球からのIL-4, IL-5, IL-13分泌抑制)の検討の結果フィセチン、ルテオリン、アピゲニン、ケルセチン、ケンフェロール(アストラガリンの水酸化物)に強い作用が認められ、その作用のための基本骨格が明らかとなった。

D. 考察

本年度の研究においては、新たな遺伝子の多型性の有無を検索するために、IL-5, IL-6, IL-12 β , IL-13の遺伝子発現調節領域の多型性の有無をPCR-SSCP法にて解析したが、調べた限り多型性は認められなかった。IL-4のシグナルが過剰に伝達されると報告されているIL-4R(50)-Val/Ile or Ile/Ileと気道過敏性との関与が示唆されている β 2-ADR(16)-Arg/Gly or Gly/Gly

を組み合わせると、アトピー型喘息で増加している傾向が認められ、今後さらに症例数を増やしてその意義を検討する必要がある。アトピー性皮膚炎患者では血清IL-18が上昇しており、またアトピー性皮膚炎モデルマウスNC/Ngaにおいても発症前からの血清IL-18の増加が観察された。次年度は、IL-18やこのサイトカインを活性化するInterleukin-1 β converting enzyme (ICE)の遺伝子にも注目したい。

もし即時型アレルギー疾患の発症予知が可能になった場合、その発症を予防するための具体的な手段が必要となろう。最近米国でも、薬剤以外の食品や物理的療法がcomplementary and alternative medicineとして機能するのか、その評価機関としてNIHに Office of Alternative Medicineが設立されている。今年度明らかにしたフラボノイドや緑色野菜飲料がヒトでも抗アレルギー効果が認められるのか、その作用機序の解析ともに次年度検討したい。

E. 結論

(1) アトピー原因遺伝子の同定のため、サイトカイン (IL-5, IL-6, IL-12 β , IL-13)の遺伝子発現調節領域の多型性の有無をPCR-SSCP法にて解析したが、多型性は認められなかった。既知の遺伝子 (5"IL-4, β 2adrenoceptor, IL-4R)の多型性の組み合わせで解析した場合、症例数が少ないものの、対照と比してアトピー型喘息では β 2adrenoceptor16-Glyと IL-4R-Ileの重なりが増加する傾向が認められた。

(2) ある種のフラボノイドが好塩基球からのTh2サイトカインの分泌を抑制すること、またその経口投与によって、NC/Ngaマウスの皮膚炎やIgE上昇が著明に抑制されることがわかった。

F. 研究発表

A. 論文発表

1. Sasai M, Saeki Y, Ohshima K, Nishioka K, Mima T, Tanaka T, Katada Y, Yoshizaki K, Suemura M, and Kishimoto T. Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice. *Arth. Rheum.* 1999 42: 1635-1643.

2. Tanaka T, Katada Y, Higa S, Fujiwara H,

Wang W, Saeki Y, Ohshima S, Okuda Y, Suemura M, and Kishimoto T. Enhancement of T helper 2 response in the absence of interleukin (IL)-6; An inhibition of IL-4-mediated T helper 2 cell differentiation by IL-6. *Cytokine* in press.

3. Tanaka T, Tsutsui H, Yoshimoto T, Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, Wang W, Higa S, Kishimoto T, Nakanishi K, and Suemura M. Interleukin-18 is elevated in the sera from patients with atopic dermatitis and from atopic dermatitis-model mice, NC/Nga. *J. Allergy Clin. Immunol.* in press.

4. Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, Higa S, Wang W, Suemura M, Kishimoto T, and Tanaka T. Persimmon leaf extract and astragaloside inhibits development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga. *J. Allergy Clin. Immunol.* in press.

5. 小谷麻由美、藤田晃人、田中敏郎. ヒト好塩基球細胞及びマウスにおける柿の葉抽出物のアレルギー抑制効果 日本栄養、食糧学会誌 1999 52 (3) : 147-151.

6. 藤田晃人、橋本桂明、中原一彦、田中敏郎、奥田豊子、甲田光雄. 低カロリー玄米菜食療法による慢性関節リウマチ患者の病状と全身状態の変化 臨床病理 1999 47 : 554-560.

7. 田中敏郎、末村正樹. アレルギー 内科 1999 84 (6) : 1118-1124.

8. 田中敏郎、末村正樹. 新しいアレルギー治療の動向 IL-4作用拮抗化合物による治療 アレルギー科1999 8 (5) : 342-347.

9. 水道裕久、藤田晃人、田中敏郎、福原宏一、池田あこ、竹内明、清水俊彰、光岡知足. 緑食野菜果汁混合飲料摂取が健常成人の便性および糞便内菌叢に及ぼす影響 日本腸内細菌学会誌 2000 13 : 67-74.

10. 田部井利男、田中敏郎、水道裕久、福原宏一、小谷麻由美、竹内明、沖田美佐子、笠山宗正. 健常者の血清脂質値および赤血球膜リン脂

B. 学会発表

1. 田中敏郎、末村正樹. 喘息発症に関与する遺伝子の多型性 シンポジウム”アレルギー疾患の発症予知”第11回日本アレルギー学会春季大会 大阪 1999.4
2. 松本元伸、小谷麻由美、藤田晃人、田中敏郎. 柿葉抽出物及びその主要フラボノイド（アストラガリン）のNC/Ngaマウスの皮膚炎発症抑制作用 第49回日本アレルギー学会総会 広島 1999.11
3. 田中敏郎、松本元伸、小谷麻由美、藤田晃人、王薇、岸本忠三、末村正樹. アストラガリンによりNC/Ngaマウス皮膚炎発症抑制機序の解析 第49回日本アレルギー学会総会 広島 1999.11
4. 小谷麻由美、松本元伸、藤田晃人、田中敏郎. 柿葉抽出物のスギ花粉患者への影響 第49回日本アレルギー学会総会 広島 1999.11
5. Tanaka T, Suidou H, Takeuchi A, Tabei T, Ito T, Fukuhara K, Shimizu T, and Kasayama S. : A green vegetable juice product decreases the serum level of LDLcholesterol in hypercholesterolaemic patients. II International Conference on Food Factors. 京都 1999.12
6. Suidou H, Fujita A, Tanaka T, Fukuhara K, Ikeda A, Takeuchi A, Shimizu T, and Mitsuoka T. : Effects of a green vegetable juice product on defecation and fecal microflora in healthy human volunteers. II International Conference on Food Factors. 京都 1999.12