

気管支喘息の改善・自然寛解に関する
分子生物学的機序の解明と
その制御に関する研究

目次

アレルギー部門

気管支喘息の改善・自然寛解に関する分子生物学的機序の解明とその制御に関する研究	帝京大学医学部内科 教授	大田 健	(85)
患者背景の検討とムスカリンおよびヒスタミン受容体多型の解析	帝京大学医学部内科 教授	大田 健	(88)
気管支喘息の発症および寛解と遺伝子マーカーD7S684多型の関連に関する研究	東京大学大学院医学系研究科内科学専攻・呼吸器内科学 助教授	森田 寛	(91)
気管支喘息の発症および寛解とケモカイン/ケモカイン受容体に関する研究	東京大学大学院医学系研究科生体防御機能学 客員助教授	平井 浩一	(94)
マスト細胞の感受性を決めるFcεRIβ鎖遺伝子の多型	順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター 助教授	羅 智靖	(97)
ヒト・培養マスト細胞機能に対する遺伝子型の影響	国立小児病院小児医療研究センター・免疫アレルギー研究部 部長	斎藤 博久	(101)

研究課題名：気管支喘息の改善・自然寛解に関する分子生物学的機序の解明とその制御に関する研究

(主任研究者) 大田 健
(所属施設名および職名) 帝京大学医学部内科教授

分担研究者：森田 寛 (東京大学医学部附属病院呼吸器内科助教授)
平井浩一 (東京大学医学部大学院医学系研究科生体防御機能学客員助教授)
羅 智靖 (順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター助教授)
斉藤博久 (国立小児医療研究センター免疫アレルギー研究部長)
研究協力者：太田康男 (東京大学医学部附属病院感染内科助手)
山下直美 (帝京大学医学部内科助教授)
上原誉志夫 (東京大学保健管理センター助教授)
石井 彰 (東京大学医学部附属病院呼吸器内科助手)
秋山一男 (国立相模原病院臨床研究部部長)
土屋尚之 (東京大学医学部大学院医学系研究科人類遺伝学助教授)
越野 健 (東京大学医学部附属病院呼吸器内科助手)
杉本日出雄 (国立東埼玉病院小児科医長)

研究の要旨

小児喘息の70%が成人へ成長する段階で寛解するという現象に注目して、遺伝子多型を検討した。FcεRI 鎖遺伝子、トロンボキサン合成酵素の遺伝子多型については、非寛解例で正常と比較して特異な多型が存在するのに対し、寛解例では正常と同等の多型を示す傾向を認めた。また、CCR4 遺伝子の多型は正常人に変異が存在していたが喘息には認められなかった。今後さらに症例数を増やし検討するとともに、機能との関連について明らかにしていく予定である。

A. 研究目的

小児喘息の約70%が成人へと成長する段階で寛解 (outgrow) するという現象に着目し、寛解を規定する因子や治療歴などを明らかにすることで、根本的治療につながる標的とその制御方を確立することを最終的な目標とした。そのため、喘息の基本病態の3つの要素、アレルギー反応、気道炎症、気道過敏性から構成されると考え、それぞれの事象において現時点で重要な項目を検討することとした。アレルギー反応の面ではFcεRI 鎖遺伝子の多型、気道炎症の側面ではトロンボキサ

ン合成酵素遺伝子の多型、ケモカイン受容体として好酸球のCCR3 およびTh2細胞のCCR4各遺伝子の多型、アレルギー性炎症で重要なサイトカインであるエオタキシンの産生、気道過敏性の面からムスカリンおよびヒスタミン受容体の多型を検討することとした。

B. 方法

成人喘息患者例 (小児喘息より継続型、小児喘息非寛解)、成人小児喘息寛解例、正常健康人より上記の目的で遺伝子検索することについてインホームドコンセントを得て文書で同意を得た。病歴治療歴を採取後、末

梢白血球数分画、総 IgE、IgERAST (吸入系：ハウスダスト、ダニ、スギ、ブタクサ、ネコ毛) の検討、EDTA 採血し、血漿および単核球層を分離した。一部の患者ではメサコリンおよびヒスタミンをもちいて気道過敏性試験を行なった。単核球層から DNA はアルカリ-SDS 法で分離した。血漿をもちいてエオタキシンの測定を DNA をもちいて各遺伝子の多型を検討した。

C. 結果および考察

FcεRIβ鎖遺伝子の多型性：FcεRIβ鎖遺伝子の0エクソン1-7の遺伝子多型を解析するとコドン237の野生型はGluであるがGlyに変異しているタイプが存在した。健常人32例では、Glu/Glu(wild homo) 27例、Glu/Gly(hetero) 4例、Gly/Gly(mutanat homo) 1例であり、多型頻度は15.6%であった。非寛解例では、Glu/Glu(wild homo) 30例、Glu/Gly(hetero) 12例、Gly/Gly(mutanat homo) 1例であり、多型頻度は30.2%であった。寛解例ではGlu/Glu(wild homo) 11例、Glu/Gly(hetero) 2例、Gly/Gly(mutanat homo) 0例であり、多型頻度は15.4%であった。すなわち、寛解例では非寛解例に比し多型頻度が低く、健常人と同等であった。FcεRIβ鎖遺伝子は、アレルゲンがマスト細胞上でIgE抗体と結合することによって惹起されるFcεRIを介した細胞活性化シグナルの増強に大きく関与しており、いわゆるアトピー遺伝子の一つである。したがって、FcεRIβ鎖の多型頻度から、寛解例ではFcεRIβ鎖が機能的にも健常者に近く、非寛解例では健常者と異なり機能的に亢進する方向に変異している可能性が示唆される。小児喘息の患児でFcεRIβ鎖の多型性をスクリーニングし、機能亢進を示唆する表現

型を示す場合には、マスト細胞を標的とする治療により寛解することが期待されることになる。

ケモカイン受容体の遺伝子の多型：CCR3とCCR4の変異について検討したところ、Th2細胞に特異的に発現しているCCR4について、Y338Y1014(C-T)の変異が正常人および寛解例において認められ、喘息非寛解患者では全く認められなかった。Y338Y1014(C-T)の変異が喘息にprotectiveに働く可能性があることが考えられた。CCR3については全例変異を認めなかった。

トロンボキサンA2合成酵素(TXAS)遺伝子の多型性：TXASの多型性については、TXAS遺伝子の存在する遺伝子の近傍に存在するD7S684遺伝子をマーカーにした遺伝子解析を行なった。そして、CA repeatsの異なった6種類のホモ多型(CA18, 19, 22, 23, 24, 25)を認め、非寛解例ではCA24ホモ多型が多く寛解例では少なかった。トロンボキサンA2は、喘息に関与する重要な炎症性メディエーターの1つといわれているが、TXASの多型が喘息の発症さらには継続と関連する可能性が示された。

エオタキシンの産生の検討：血清エオタキシンレベルは喘息非寛解患者例、喘息寛解例、正常人で差異を認めなかった。

ムスカリン受容体およびヒスタミン受容体の遺伝子多型：ムスカリン受容体M2およびヒスタミン受容体H1について全長を各8,9,6の領域に分割しプライマーを設定しPCR-SSCPをおこなった結果、多型は認められなかった。現在ダイレクトシーケンス法で検討継続中である。

マスト細胞機能についての検討：臍帯血マスト細胞前駆細胞数はアトピー疾患患者と正

常人で差異を認めなかった。さらにB細胞のIL-4感受性を既定するIL-4受容体 α 鎖50番目の変異について検討したが、マスト細胞ではこの変異はIL-4産生と関連なかった。

E：結論

気管支喘息寛解症例と非寛解症例の間には、アレルギー性炎症に関連するFcεRI β 鎖遺伝子の多型性、トロンボキサンA2合成酵素(TXAS)遺伝子の多型性およびCCR4遺伝子多型に差異があることを発見した。これらの多型と機能との関連性を明らかにし、喘息の根本治療の確立へと結びつけるためには、今後さらに検討が必要である。

研究課題名：気管支喘息の改善・自然寛解に関する分子生物学的機序の解明とその制御に関する研究（患者背景の検討とムスカリンおよびヒスタミン受容体多型の解析）

（主任研究者） 大田 健
（所属施設名および職名） 帝京大学医学部内科教授

研究協力者： 太田康男（東京大学医学部附属病院感染内科助手）
山下直美（帝京大学医学部内科助教授）
上原誉志夫（東京大学保健管理センター助教授）
石井 彰（東京大学医学部附属病院呼吸器内科助手）
秋山一男（国立相模原病院臨床研究部部長）
中野純一（帝京大学医学部内科講師） 有岡 仁（帝京大学医学部内科助手）
山田和人（帝京大学医学部内科） 沖山智子（東京大学保健管理センター）
山本寿子（帝京大学医学部内科） 宮崎美千子（東京大学保健管理センター）

研究の要旨

気道過敏性の側面からムスカリンとヒスタミン受容体の多型について、喘息寛解および非寛解例で検討した。ダイレクトシーケンス法によりムスカリン受容体 M2 の 1050 番に点変異を喘息非寛解例で認めた。今後さらにダイレクトシーケンス法で変異について検討を進めていく。

A. 研究目的

小児喘息の約 70%が成人へと成長する段階で寛解 (outgrow)するという現象に着目し、寛解を規定する因子や治療歴などを明らかにすることで、根本的治療につながる標的とその制御方を確立することを最終的な目標とした。寛解を既定する気道過敏性の側面からのアプローチとして、ムスカリンとヒスタミン受容体の多型について検討した。

B. 方法

成人喘息患者例（小児喘息より継続型、小児喘息非寛解）、成人小児喘息寛解例、正常健康人を対象とした。病歴特に治療歴を問診し、末梢血白血球数分画、総 IgE、IgERAST（吸入系：ハウスダスト、ダニ、スギ、ブタクサ、ネコ毛）の検討、EDTA 採血し、血漿および単核球層を分離した。一部の患者ではメサコリンおよびヒスタミンをもちて気道過

敏性試験を行なった。単核球層から DNA はアルカリ-SDS 法で分離した。ムスカリン受容体 M2 およびヒスタミン受容体 H1 について全長を各 8,9,6 の領域に分割し各フラグメントが 250bp 前後になるようにプライマーを設定し、PCR-SSCP を行なった。一部ではダイレクトシーケンスを行なった。

C. 結果および考察

患者背景：前年度採取が難しかった喘息寛解症例は東大保健センターの協力を得て教養の学生からも採取した。沖山らが進入生検診時に問診にて検討した結果では、3425 人の新入生のうち喘息症例 59 例 小児喘息寛解症例 224 例を認めた。成人喘息患者例（小児喘息より継続型、小児喘息非寛解）28 例は 10 歳以下で発症した喘息症例で、全員 IgE 高値を示すアトピー型症例であった。成人小児喘

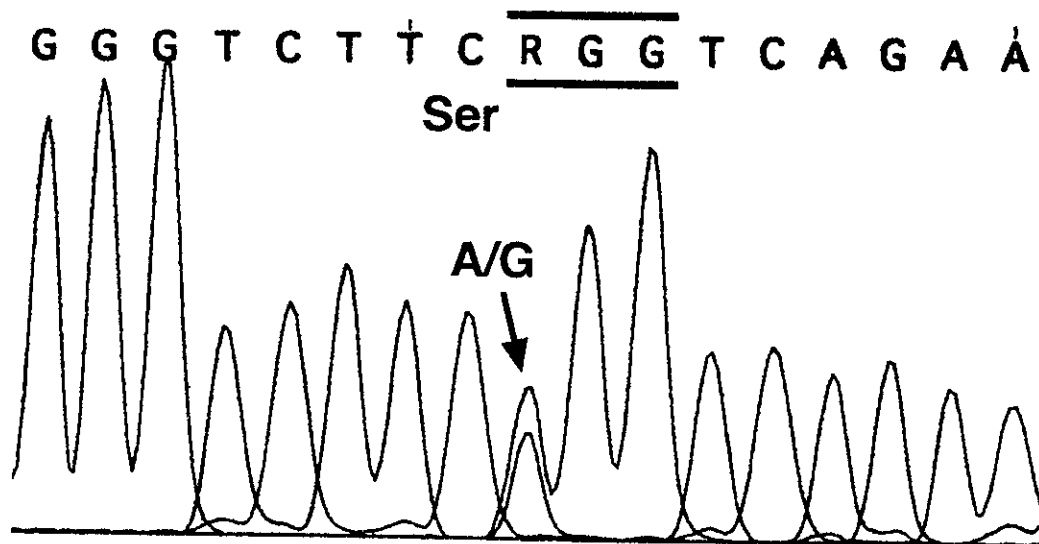
息寛解例 21 例は 15 歳以降喘息発作が全くない症例で 5 年以上発作のエピソードを有さない症例であった。寛解症例も軽度血清 IgE、ダニ RAST 陽性が継続していたが、喘息非寛解症例と比較すると有意に低値を示した。

ムスカリン受容体およびヒスタミン受容体の遺伝子多型：気道過敏性の negative feedback に関連するムスカリン受容体 M2 について非寛解 21 例、寛解例 16 例、健常人 6 例について PCR-SSCP で検討した。全例について全く変異を認めなかった。小児 5 例、成人非寛解例 4 例、成人寛解例 1 例、健常人 1 名についてダイレクトシーケンスを行ない、喘息非寛解例で 1050 番目の塩基が A から G

への置換を認めた (図 1)。しかし、両者ともアミノ酸は Ser であり、機能異常と結びつく可能性は少ない。ヒスタミン受容体についても同様に PCR-SSCP にて検討したが、変異を認めず、ダイレクトシーケンスを非寛解 5 例、寛解例 5 例、健常人 5 例について行なったが、現在のところすべてのシーケンスが一致している。

気道過敏性の重要な遺伝因子であると考えられるムスカリンおよびヒスタミン受容体における変異の発現頻度は高くないことが今までの検討で示されたが、さらの現在、ウェーブをもちいることより、ひろく多数の症例について現在検討を進めている。

図 1. 遺伝子変異の検出 (点変異)



1. Ohta K: Apoptosis and its induction in eosinophils activated with IL-5. Allergy Clin. Immunol. Int. In press. 2000.
2. Nagase H, Yamaguchi M, Jibiki S, Yamada H, Ohta K, Kawasaki H, Yoshie O, Yamamoto K, Morita Y, Hirai K: A rapid and simple photometric assay for quantification of eosinophil chemotaxis. Int. Arch. Allergy Immunol. In press. 2000.
- 3.○ Ohta K, Yamashita N, Tajima M, Miyasaka T, Nakano J, Nakajima M, Ishii A, Horiuchi T, Mano K, Miyamoto T: Diesel exhaust particulate induces airway hyperresponsiveness in murine model: Essential role of GM-CSF. J Allergy Clin. Immunol. 104: 1024-1030, 1999.
4. Ohta K, Yamashita N: Apoptosis of eosinophils and lymphocytes in allergic inflammation. J. Allergy Clin. Immunol.104: 14-21, 1999.
5. Nagase H, Yamaguchi M, Jibiki S, Yamada H, Ohta K, Kawasaki H, Yoshie O, Yamamoto K, Morita Y, Hirai K: Eosinophil chemotaxis by chemokines: a study by a simple photometric assay. Allergy. 54: 944-950, 1999.
6. Yamashita N, Koizumi H, Murata M, Mano K, Ohta K: Nuclear factor kappa B mediates interleukin-8 production in eosinophils. Int. Arch. Allergy Immunol. 120: 230-236, 1999.

課題名 気管支喘息の発症および寛解と遺伝子マーカー D7S684 多型の関連に
関する研究

氏名 分担研究者 森田 寛

所属機関 東京大学大学院医学系研究科内科学専攻・呼吸器内科学 助教授

研究要旨

Thromboxane A₂ (TXA₂) は強い気道平滑筋収縮作用、血管平滑筋収縮作用および血小板凝集作用を有する。Thromboxane A₂ Synthase (TXAS) 遺伝子は、7 番染色体 q34-35 に位置していることが知られているが、遺伝子マーカー D7S684 も 7 番染色体 q35 近傍に位置していることから、D7S684 遺伝子多型性と気管支喘息の発症、寛解との関連性について検討した。

喘息患者 72 例、健常人 50 例および小児喘息寛解例 20 例の末梢血白血球より DNA を抽出し、ABI model 310 を用いて D7S684 マーカーの Gene Scan を行った。

喘息患者および健常人において CA repeats 数の違った 6 種 homo 多型(CA18, 19, 22, 23, 24, 25) が認められた。CA24 allele(+)は喘息患者では 72 例中 26 例(36.1%)にみられ、健常人では 50 例中 8 例(16.0%)にみられ、CA24 allele(+)は喘息患者に多いことが判明した(odds ratio 2.97)。

一方、寛解群では 20 例中 5 例(25.0%)に CA24 repeats が認められたが、健常人群と比べて頻度に有意差は認められなかった。したがって CA24 repeats の存在は喘息を発症、さらには継続させる可能性が考えられる。また、CA24 repeats の欠除は喘息の寛解と関連すると考えられる。

現時点では寛解例が 20 例と少ないので寛解症例を更に集めて D7S684 多型が気管支喘息の寛解のマーカーになりうるかどうかを今後検討していきたい。

A. 研究目的

Thromboxane A₂ (TXA₂) は強い気道平滑筋収縮作用、血管平滑筋収縮作用および血小板凝集作用を有する。また Thromboxane A₂ Synthase (TXAS) は、Prostaglandin H₂ から TXA₂ を合成する酵素であり、我々のこれまでの研究では気管支喘息患者の末梢血白血球の TXAS mRNA の発現量と喘息患者の気道過敏性には負の相関がみられることがわかっている。TXAS 遺伝子は、7 番染色体 q34-35 に位置していることが知られているが、遺伝子マーカー D7S684 も 7 番染色体 q35 近傍に位置していることから、D7S684 遺伝子多型性と気管支喘息

の発症、寛解との関連性について検討した。

B. 研究方法

喘息患者 72 例、健常人 50 例および小児喘息寛解例 20 例の末梢血白血球より DNA を抽出し、ABI model 310 を用いて D7S684 マーカーの Gene Scan を行った。

① TXA mRNA 半定量法

1. 白血球の分離
- デキストラン法
2. Total RNA の分離
- RNAeasy Total RNA Kit (QIAGEN)
3. RT

- AMV Reverse Transcriptase XL
- 4. cDNA の純化
 - High Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer Mannheim GmbH)
- 5. PCR
 - denaturation : 94°C, 1分 (45秒)
 - annealing : 60°C, 2分 (45秒)
 - extension : 72°C, 2分 (1分)
 - TXAS : 30 サイクル、β-アクチン : 24 サイクル
- 6. アガロースゲル電気泳動と ethidium bromide による染色
- 7. デンシトメトリーによる半定量

② D7S684 多型検出法

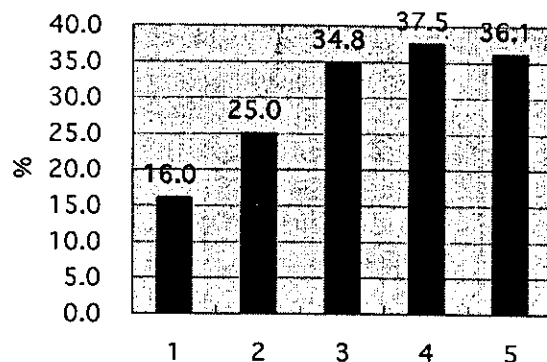
1. ゲノム DNA の抽出
 - QIAamp Blood Kit (QIAGEN)
2. PCR
 - プライマー : D7S684 primer mixture
3. PCR 産物サイズの分析
 - Genetic Analyzer (model ABI 310, PE Applied Biosystems)
4. DNA シークエンシング
 - Genetic Analyzer (model ABI 310)

C. 結果

1. 喘息患者で TXAS mRNA の発現の増強が認められた。
2. TXAS mRNA の発現量と気道過敏性の間に相関が認められた。
3. 喘息患者および健常人において CA repeats 数の違った 6 種の homo 多型(CA18, 19, 22, 23, 24, 25)が認められた。
4. CA24 repeats は喘息患者群では 72 例中 26 例(36.1%)にみられ、健常者群では 50 例中 8 例(16.0%)にみられ、CA24 repeats の頻度は喘息患者群に多いことが判明した(odds ratio 2.97)。
5. 寛解群では 20 例中 5 例(25.0%)に CA24

repeats が認められたが、健常者群と比べて頻度に有意差は認められなかった。

図 1 喘息患者における CA24 repeats の頻度



- 1)コントロール (n=50)
- 2)Out grow例 (n=20)
- 3)成人継続喘息例 (n=23)
- 4)成人寛解例 (n=8)
- 5)喘息 (n=72)

Fisher's exact test

- 1)vs2) p=0.498 NS
- 1)vs3) p=0.125 NS
- 1)vs4) p=0.167 NS
- 1)vs5) p=0.023 p<0.05

D. 考察

CA24 repeats の存在は喘息を発症、さらには継続させる可能性が考えられる。また、CA24 repeats の欠除は喘息の寛解と関連すると考えられる。

E. 結論

1. D7S684 遺伝子多型と喘息発症と関連が示唆された。
2. D7S684 遺伝子多型が喘息の寛解のマーカーになりうるかどうかを確定するには寛解症例を更に集めて検討する必要がある。

研究協力者 越野 健

(東京大学医学部附属病院呼吸器内科)

1. Yamada H, Yamaguchi M, Yamamoto K, Nakajima T, Hirai K, Morita Y, Sano Y, Yamada H: Eotaxin in induced sputum of asthmatics: relationship with eosinophils and eosinophil cationic protein in sputum. *Allergy*. 55:1-16, 2000.
2. Nagase H, Yamaguchi M, Jibiki S, Yamada H, Ohta K, Kawasaki H, Yoshie O, Yamamoto K, Morita Y, Hirai K: Eosinophil chemotaxis by chemokines: a study by a simple photometric assay. *Allergy*. 54: 944-950, 1999.
3. Honda Z, Suzuki T, Yamoto K, Morita Y, Yamoto T, Ra C: Sequential requirements of N-terminalpalmitoylation site and SH2 domain of Src family kinases in the initiation and the progression of FcεRI signaling. *Mol. Cell. Biol.* In press, 1999.
4. Iikura M, Yamaguchi M, Miyamasu M, Morita Y, Iwase T, Mori I, Yamamoto K, Hirai K: Secretory IgA-mediated basophil activation II: Roles of GTP-binding regulatory proteins and phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264: 575-579, 1999.
5. Miyamasu M, Nakajima T, Misaki Y, Izumi S, Tsuno N, Kasahara T, Morita Y, Yamamoto K, Morita Y, Hirai K: Dermal fibroblasts represent a potent major source of human eotaxin: In vitro production and cytokine-mediated regulation. *Cytokine* 11: 751-758, 1999.
- 6.○ Koshino T, Takano S, Kitani S, Ohshima N, Sano Y, Takaishi T, Hirai K, Yamamoto K, Morita Y: Novel polymorphism of the 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) promoter gene associated with asthma. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 2: 32-35, 1999.
- 7.○ Miyamasu M, Yamaguchi M, Nakajima T, Misaki Y, Morita Y, Matsushima K, Yamamoto K, Hirai K: Th1-derived cytokine IFN-γ is a potent inhibitor of eotaxin synthesis in vitro. *Int. Immunol.* 11: 1001-1004, 1999.

課題名 気管支喘息の発症および寛解とケモカイン/ケモカイン受容体に関する研究

氏名 分担研究者 平井 浩¹⁾
研究協力者 土屋 尚之²⁾

所属機関 1) 東京大学大学院医学系研究科生体防御機能学講座 客員助教授
2) 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学講座 助教授

研究要旨 喘息の特徴である好酸球集積には、ケモカイン系として CCR3/エオタキシンが、また Th2 集積には、CCR4/MDC、TARC が関わっていると考えられる。これらの喘息における意義を明らかにするとともに、喘息の改善・自然寛解に関わっているかを CCR3、CCR4 の多型を中心に検討した。誘発痰中のエオタキシン濃度は気管支喘息において、有意に健常人より高値を示したが、血中エオタキシンについては研究班症例の正常例、継続例、寛解例について有意な差は認めなかった。正常例、継続例、寛解例について CCR3 の変異は全例で認められなかった。CCR4 については、Y338Y1014 (C→T) の変異が正常例 16 中 3 例、寛解群 16 中 2 例に認められ、継続群 17 検体中には認められなかった。喘息群、健常人群とのあいだに有意差は認められなかったが、自験例を合わせると有意差を認めた。正常例、寛解例において CCR4 の変異がみられ、継続例においてみられない、という結果は、この変異を持つ個体が喘息という疾病に protective な個体である可能性を示唆し、寛解の予知に有用である可能性を強く示した。

A. 研究目的

喘息をはじめとするアレルギー疾患の病態には、炎症局所に集積した好酸球が関与している。好酸球由来の顆粒蛋白などのメディエーターの強い組織傷害性は、喘息における気道上皮の剥離やリモデリングに関わっている。好酸球性炎症の成立には、ある種のケモカインが関与していることが判明してきている。CCR3 は、好酸球以外では好塩基球にのみ発現されており、その特異的リガンドであるエオタキシンは、強力に好酸球を遊走させる。喘息の特徴である好酸球組織集積には、ケモカイン系として CCR3/エオタキシンが関わっていると考えられる。また Th1/Th2 パラダイムからみると、アレルギー疾患は、Th2 優位反応であり、炎症局所に集積するリンパ球は Th2 フェノタイプを示す。従来、Th1/Th2 はその産生するサイトカインのパターンより区別されてきたが、最近、Th1/Th2 それぞれに特定のケモカイン受容体が発現していることが明らかになった。Th1 には、CCR5、CXCR3 が、また Th2 には CCR4 が選択的に発現している。CCR4 の特異的リガンドである MDC (Macrophage-Derived Chemokine)、TARC (Thymus- and Activation-Regulated Chemokine) は強力に Th2 を遊走させ、喘息における Th2 組

織集積には、ケモカイン系として CCR4/MDC、TARC が関わっていると考えられる。

CCR3/エオタキシン、CCR4/MDC、TARC の喘息における意義を明らかにするとともに、これらが喘息の改善・自然寛解に関わっているかを検討した。具体的には (1) 喘息におけるエオタキシンの発現、(2) 喘息における TARC、MDC の発現の検討を行った。また我々は、CCR3 第 5 脱異通部における非同義置換を、CCR4 に関しては 4 種の新しい多型を日本人で見出している⁽¹⁾。最後にこれら多型が喘息の改善・自然寛解に関連するか検討した。

B. 方法

同意を得た気管支喘息患者および健常者から Pin らの方法により、高張食塩水を吸入させ誘発痰を採取した。エオタキシン濃度は、我々の樹立したモノクローナル抗体 (Nakajima, T et al. FEBS Lett. 434:226,1998) を用い、既報 (Morita, A et al. J. Immunol. Methods. 226:1) の如く行った。ECP 濃度は、Pharmacia ECP RIA kit で測定した。血清エオタキシン測定も同様に行った。

正常人、喘息患者の気道粘膜生検組織を免疫組織染色し、TARC、MDC 蛋白の発現を検討した。

気道上皮細胞株 (A549, BEAS-2B) 培養上清の TARC, MDC 蛋白は house-made の ELISA (感度 30 pg/ml) にて定量した。

既報の CCR3, CCR4 蛋白翻訳領域の多型を PCR-SSCP 法を用いて、研究班症例 59 例 (正常例 16 例、寛解例 16 例、継続例 17 例) について検討した。CCR3 については、5TM 部の変異 C218S 及び変異の可能性のある 5' 末端領域 (5' UTR から TM1) について検討した。CCR4 については、3TM 部の変異 L130V, 4TM 部の変異 V166V, 2nd EC loop 部の変異 C178S 及び C 末端部の変異 Y338Y について検討した。

C. 研究結果

<喘息におけるエオタキシンの発現>

誘発痰中のエオタキシン濃度は気管支喘息において、有意に健常人より高値を示し (353.6 ± 582.6 vs 14.3 ± 19.8 pg/ml)、ECP と有意の相関を示した⁽²⁾。また、経口ステロイド治療されていない例では、エオタキシン濃度と誘発痰中の好酸球数の間に有意な相関を認めた⁽²⁾。血中エオタキシンについては研究班症例の正常例 (68.0 ± 27.98 pg/ml, n=15)、継続例 (48.9 ± 29.6 pg/ml, n=20) 寛解例 (43.7 ± 9.9 pg/ml, n=13) であり、各群に有意差は認めなかった。

<好酸球のケモカイン受容体発現>

好酸球は強い CCR3 mRNA と CCR1, CXCR2 mRNA を弱く発現していた⁽³⁾。CXCR4 mRNA も CCR3 と同程度に発現されていた。流血中の好酸球は表面に CXCR4 蛋白を発現していなかったが、培養することにより発現が認められた⁽³⁾。分離直後の好酸球は CCR3 リガンドにのみ強い遊走を示し、抗 CCR3 抗体により阻害された^(4,5)。CXCR4 のリガンドである SDF-1 は、培養後の好酸球に

エオタキシンと同程度の強力な遊走を誘発した。好酸球の CXCR4 発現は、Th2 サイトカインである IL-4, IL-5 により完全に抑制され、Th1 サイトカインである IFN-γ により増強された。

<気道における CCR4 リガンドの発現>

喘息患者気道上皮は正常に比べ、強い TARC 蛋白を発現していた。MDC も正常に比し増加していたが弱い発現にとどまっていた。気道上皮細胞株 A549, BEAS-2B は、TNF/IL-4, TNF/IFN-γ の共刺激により TARC mRNA を発現し、TNF/IL-4/IFN-γ の三者刺激にて最大の TARC mRNA が認められた。MDC mRNA の発現はほとんど認められなかった。蛋白レベルの結果も同様であり、A549, BEAS-2B とも ng/ml オーダーの TARC を TNF/IL-4/IFN-γ 刺激により産生したが、MDC 産生はほとんど認めなかった。dexamethasone は濃度依存的に TARC 産生を蛋白レベル、mRNA レベルで完全に抑制した (ID₅₀: 10⁻⁹~10⁻⁸M)。

<CCR3, CCR4 の多型解析 (図 1)>

正常例、継続例、寛解例について CCR3 の変異は全例で認められなかった。CCR4 については、Y338Y1014 (C→T) の変異が正常例 16 中 3 例、寛解群 16 中 2 例に認められ、継続群 17 検体中には認められなかった。健常人 604 例中にこの variant は、7.2% の頻度で出現し⁽¹⁾、当科の喘息例 24 例にもこの variant は検出されなかった。研究班例では喘息群、健常人群とのあいだに有意差は認められなかったが、東大例を合わせると Fisher's test による検討にて有意差を認めた。

D. 考察および結論

好酸球遊走は CCR3, CXCR4 の二つのケモカイン受容体により統御されている。CXCR4 に関しては Th2 優位状況下で発現が抑制されるため⁽³⁾、

	NUCLEOTIDE	AMINO ACID	POSITION	正常 (班)	寛解 (班)	継続 (班)	継続 (東大)	正常 (東大)
CCR3	unknown	unknown	N tail	0	0	0	0	0
	652(C→G)	C218S	5TM	0	0	0	0	0
CCR4	388(C→G)	L130V	3TM	0	0	0	0	0
	498(G→C)	V166V	4TM	0	0	0	0	1
	533(G→C)	C178S	2nd EC loop	0	0	0	0	1
	1014(C→T)	Y338Y	C tail	3	2	0	0	22
Total				16	16	17	24	304

図 1. CCR3, CCR4 の多型解析

炎症局所での集積には関わらず、逆に negative に作用している可能性が考えられた。喘息における組織の好酸球集積には CXCR4 でなく、CCR3 が関与していると考えられた。CCR3 のリガンドのうちエオタキシンは Th2 優位状況下で発現が誘導されるため⁽⁶⁻⁹⁾、エオタキシンが重要であると考えられた。研究班症例では有意差を認めなかったが、今後例数を増やし更に検討する予定である。

喘息において、気道上皮細胞は TARC の重要な産生細胞である。気道上皮細胞は、吸入ステロイドの主たる作用標的であり、同様の喘息での有効性の機序の一つとして、TARC 産生抑制が考えられた。

正常例、寛解例において CCR4 Y338Y 1014 (C→T) の変異がみられ、継続例においてみられない、という結果は、この変異を持つ個体が喘息という疾病に protective な個体である可能性を示唆し、寛解の予知に有用である可能性を強く示した。CCR4 Y338Y 1014 (C→T) の変異はアミノ酸変化を伴わない同義置換 (synonymous substitution) であるため、直接 CCR4 の立体構造やシグナル伝達異常などには結びつかない。がしかし、CCR4 近傍にこれとハプロタイプを強く組むような対立遺伝子と連鎖不平衡 (linkage disequilibrium) を生じている可能性があるため、CCR4 プロモーター領域や 3' UTR もしくは近隣遺伝子の変異の有無をさらに検討する予定である。

E. 本研究に関わる業績 (平成十一年度分)

1. Kato, H., T. N., M. Matsusita, S. Izumi, M. Miyamasu, T. Nakajima, H. Kawasaki, K. Hirai, and K. Tokunaga. 1999. New variants of CC chemokine receptors CCR3 and CCR4. *Genes and Immunity* 1:97-104.
2. Yamada, H., M. Yamaguchi, T. Nakajima, Y. Morita, K. Yamamoto, Y. Sano, and K. Hirai. 2000. Eotaxin in induced sputum of asthmatics: relationship with eosinophils and eosinophil cationic protein in sputum. *Allergy* 55:1-6.
3. Nagase, H., M. Miyamasu, M. Yamaguchi, T. Fujisawa, K. Yamamoto, Y. Morita, and K. Hirai. 2000. Expression of CXCR4 in eosinophils: functional analyses and cytokine-mediated regulation. *J. Immunol.* in press.
4. Nagase, H., M. Yamaguchi, S. Jibiki, H. Yamada, K. Ohta, H. Kawasaki, O. Yoshie, K. Yamamoto, Y. Morita, and K. Hirai. 2000. A rapid and simple photometric assay for quantification of eosinophil chemotaxis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* in press.
5. Nagase, H., M. Yamaguchi, S. Jibiki, H. Yamada, K. Ohta, H. Kawasaki, O. Yoshie, K. Yamamoto, Y. Morita, and K. Hirai. 1999. Eosinophil chemotaxis by chemokines: a study by a simple photometric assay. *Allergy* 54:944-50.
6. Miyamasu, M., Y. Misaki, M. Yamaguchi, K. Yamamoto, Y. Morita, K. Matsushima, T. Nakajima, and K. Hirai. 2000. Regulation of human eotaxin generation by Th1-/Th2-derived cytokines. *Int. Arch. Allergy Immunol.* in press.
7. Fujisawa, T., Y. Kato, J. Atsuta, A. Terada, K. Iguchi, H. Kamiya, H. Yamada, T. Nakajima, M. Miyamasu, and K. Hirai. 2000. Chemokine production from the BEAS-2B human bronchial epithelial cells: Differential regulation of eotaxin and IL-8 by TH2 cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:126-33.
8. Miyamasu, M., T. Nakajima, Y. Misaki, S. Izumi, N. Tsuno, T. Kasahara, K. Yamamoto, Y. Morita, and K. Hirai. 1999. Dermal fibroblasts represent a potent major source of human eotaxin: in vitro production and cytokine-mediated regulation. *Cytokine* 11:751-8.
9. Miyamasu, M., M. Yamaguchi, T. Nakajima, Y. Misaki, Y. Morita, K. Matsushima, K. Yamamoto, and K. Hirai. 1999. Th1-derived cytokine interferon-gamma is a potent inhibitor of human eotaxin synthesis in vitro. *Int. Immunol.* 11:1001-4.

課題名 マスト細胞の感受性を決める FcεRIβ鎖遺伝子多型に関する研究
氏名 分担研究者 羅 智靖
所属機関 順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター 助教授

研究要旨

アレルギーにおいて中心的な役割を演じるマスト細胞は、高親和性 IgE レセプター (FcεRI) を介して活性化される。FcεRI は、α、β、γ 2 サブユニットによって構成されるが、ヒトβ鎖遺伝子に多型が見つかっており、その多型頻度がアレルギー疾患に相関するという報告がある。β鎖はシグナル伝達分子として働き、アレルギー性炎症の現場でマスト細胞の感受性を決めている可能性があり、アレルギー素因を規定する遺伝子の一つの候補に挙げられている。本研究においては、この多型が、成人アレルギー性喘息の原因遺伝子の一つとして、特に out grow に相関があるか検討した。未だ例数が少ないので統計的有意差の検定はできないものの、out grow 型においてはこの変異が少ない可能性があり、更に例数を増やして検討する価値が大きいと思われる。

A. 研究目的

アレルギーの遺伝的素因の一つとして、マスト細胞の感受性を挙げることができる。高親和性 IgE レセプター (FcεRI) β鎖に遺伝子多型が知られており、その多型頻度が喘息患者において高いことが報告されている。PCR-SSCP の系で喘息患者の多型頻度を解析すると同時に、in vitro, in vivo でこの多型がアレルギー反応に及ぼす影響を検討する。特に out grow 型の成人アレルギー性喘息との関係を解析することが一つの目的である。

B. 研究方法

1. 喘息患者 FcεRIβ鎖遺伝子の多型解析

FcεRIβ鎖遺伝子のエキソン 1~7 の遺伝子多型 (変異) を解析するため、高感度、高速の PCR-SSCP の系を樹立し、能率よくスクリーニングを行った。

2. FcεRIβ鎖欠失マウスの作製と変異β鎖の機能解析

アレルギー素因における FcεRIβ鎖の役割を in vivo で明らかにする目的で、定法に従ってβ鎖ノックアウトマウスを作製し解析した。さらにレトロウイルスベクターを用いて、種々の変異β鎖を導入する系を確立し、この系を用いてβ鎖の機能を細胞レベルで調べた。

C. 研究結果

1. FcεRIβ鎖の遺伝子多型と喘息

β鎖は N 末、C 末ともに細胞内に存在するが、C 末側の細胞内領域にシグナル伝達に必須の ITAM のモチーフがある。このモチーフの直下に変異の存在が知られており、シグナル伝達に影響する可能性が高い。即ちコドン 237 の野生型は Glu であるが、Gly に変異しているタイプがある。アレルギー性喘息の成人継続型 43 例と out grow 型 8 例について

この変異の有無を検索した。正常コントロール 44 例中、Glu/Glu(wild homo)34 例、Glu/Gly(hetero)9 例、Gly/Gly (mutant homo) 1 例であり、多型頻度は 22.7%であった。Shirakawa らの検索では正常群の多型頻度は 6%であった。成人継続型では Glu/Glu(30/43)、Glu/Gly(12/43)、Gly/Glu(1/43)で、多型頻度は 30.2%であった。Out grow 型では、Glu/Glu(7/8)、Glu/Gly(1/8)、(Gly/Gly(0/8)で、多型頻度は 12.5%であった。例数を増やしてさらに有意差を検定するが、この変異が素因を規定している要素の一つである可能性は高い。

2. FcεRIβ鎖欠失マウスの作製とβ鎖の機能解析

FcεRIβ鎖ノックアウトマウスでは、β鎖の発現が全く欠失しているため FcεRI の細胞膜への発現はなく、IgE によるアナフィラキシーは惹起されない。このマウスの骨髓細胞から、IL-3 によってマスト細胞を誘導し、レトロウイルスベクターを用いて変異β鎖を導入した。β鎖 ITAM の Tyr を Phe に置換すると、FcεRI を介した Ca²⁺ Influx や脱顆粒が正常型の 1/2 以下に低下した。

D. 考察並びに結論

アレルギー性喘息における FcεRIβ鎖の多型頻度の解析を、β鎖遺伝子エキソン 7 に位置するコドン 237 について行った。本解析においては、多型頻度は成人継続型 13/43 (30.2%)、寛解成人型 3/8 (37.5%)、out grow 型 1/8 (12.5%) で、特に out grow 型において Glu237Gly の変異の頻度が低い傾向にあり注目される。正常コントロールの多型頻度は 10/44 (22.7%) であったが、いずれもまだサンプル数が少なく、統計学的な検定はできないので、今後サンプルを増やして解析する。コ

するシグナルの増強あるいは、 α 鎖や γ 鎖への会合に影響が及べば、マスト細胞の感受性に変化の生じる可能性があり、 β 鎖遺伝子はマスト細胞レベルでのアレルギー素因を規定する遺伝子の一つであり得る。多型頻度は他の日本人喘息患者 200 例、アトピー性皮膚炎患者 120 例でも 31~32%で、また正常コントロール 100 例では 16%であった。さらに変異 β 鎖の機能を *in vitro*, *in vivo* で検討する目的で β 鎖ノックアウトマウスを作製した。特に β 鎖 ITAM の Tyr を Phe に置換した変異体において、シグナルが 1/2 以下に低下することが明らかになり、現在実際のヒトで観察されたコドン 237 の変異に対応する変異 β 鎖の導入実験を行うところであり、トランスジェニックマウスの作成とあわせて、今後の展開が大いに期待される。

- 1.○ Honda Z, Suzuki T, Kono H, Okada M, Yamamoto T, Ra C, Morita Y, Yamamoto K: Sequential requirements of N- terminal palmitoylation site and SH2 domain of Src family kinases in the initiation and progression of FcεRI signaling. *Mol. Cellular Biol.* 20:1759-1771, 2000.
2. Aioi A, Tonogaito H, Sato H, Hamada K, Ra C, Ogawa H, Maibach H, Matsuda H: Defective skin barrier function in NC/Nga mice. *J. Invest. Dermatol.* In press. 2000.
3. Wada T, Toma T, Shimura S, Kudo M, Kasahara Y, Koizumi S, Ra C, Seki H, Yachie A: Age-Dependent increase of IgE-binding and FcεRI expression on circulating basophils in children. *Pediatr. Res.* 46: 603-307, 1999.
- 4.○ Matsuoka K, Taya C, Kubo S, Toyama Sorimachi N, Kitamura F, Ra C, Yonekawa H, Karasuyama H: Establishment of antigen-specific IgE transgenic mice to study pathological and Immunobiological roles of IgE in vivo. *Int. Immunol.* 11: 987-994, 1999.
- 5.○ Hasegawa S, Pawankar R, Suzuki K, Nakahata T, Furukawa S, Okumura K, Ra C: Functional expression of the high affinity receptor for IgE (FcεRI) in human platelets and megakaryocytes. *Blood* 93: 2543-2551, 1999.
6. Matsumoto M, Ra C, Kawamoto K, Sato H, Itakura A, Sawada J, Ushio H, Suto H, Hikasa Y, Matsuda H: IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis. *J. Immunol.* 162: 1056-1063, 1999.
7. Suto H, Matsuda H, Mitsuishi K, Uchida T, Unno T, Ogawa H, Ra C: NC/Nga Mice: A mouse model for atopic dermatitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 120: 70-75, 1999.
- 8.○ Atuta R, Akiyama K, Shirasawa T, Okumura K, Fukuchi Y, Ra C: Atopic asthma is dominant in elderly onset asthmatics: possibility for an alteration of mast cell function by aging through Fc receptor expression. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 120: 76-81, 1999.
9. Suzuki Y, Ra C, Saito K, Horikoshi S, Hasegawa S, Tsuge T, Okumura K, Tomino Y: Expression and physical association of Rα receptor and Fc receptor chain in human mesangial cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14: 1117-1123, 1999.
10. Ono M, Yuasa T, Ra C, Takai T: Stimulatory function of paired immunoglobulin-like receptor-A in mastcell line by associating with subunits common to Fc receptors. *J. Biol. Chem.* 274: 30288-30296, 1999.
- 11.○ Yamamoto J, Watanabe S, Hirose M, Osada T, Ra C, Sato N: Role of mast cells as a trigger of

inflammation in helicobacter pylori infection. *J. Phys. Pharmacol.* 50: 17-23, 1999.

12.○ Nishiyama C, Yokota T, Okumura K, Ra C: The transcription factors Elf-1 and GATA-1 bind to cell specific-enhancer elements of human high-affinity IgE receptor α -chain. *J. Immunol.* 163: 623-630, 1999.

13. Yamaguchi M, Sayama K, Yano K, Lantz C.S, Noben-Trauth N, Ra C, Costa J J, Galli S J: IgE enhances Fc ϵ receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: Synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fc ϵ receptor I expression and mediator release. *J. Immunol.* 162: 5455-5465, 1999.

14.○ Goitsuka R, Hayashi N, Nagase M, Sasaki N, Ra C, Tsujimoto H, Hasegawa A: Molecular cloning of cDNAs encoding canine high-affinity IgE receptor α , β and γ -chain. *Immunogenetics.* 49: 580-582, 1999.

15.○ Hiraoka S, Furumoto Y, Koseki H, Takagaki Y, Taniguchi M, Okumura K, Ra C: The Fc receptor β subunit is required for full activation of mast cells through Fc receptor engagement. *Int. Immunol.* 11: 199-207, 1999.

16. Hayashi S, Okumura K, Ra C: Mouse Langerhans cells do not express the high affinity receptor for IgE
Arch. Dermatol. Res. 291: 241-243, 1999.

17. Ohtsuka Y, Naito K, Yamashiro Y, Yabuta K, Okumura K, Ra C: Induction of anaphylaxis in mouse intestine by orally administered antigen and its prevention with soluble high affinity receptor for IgE. *Ped. Res.* 45: 300-305, 1999.

18. Hasegawa S, Pawankar R, Suzuki K, Nakahara T, Furukawa S, Okumura K, Ra C: Functional Expression of the high affinity receptor for IgE (Fc ϵ RI) in human platelets and megakaryocytes. *Blood.* 93: 2543-2551, 1999.

19. Matsumoto M, Ra C, Kawamoto K, Sato H, Itakura A, Sawada J, Ushio H, Suto H, Hikasa Y, Matsuda H: IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis. *J. Immunol.* 162: 1056-1063, 1999.

気管支喘息の改善・自然寛解に関与する分子生物学的機序の解明とその制御
(ヒト・培養マスト細胞機能に対する遺伝子型の影響)

分担研究者 齋藤博久

国立小児病院小児医療研究センター・免疫アレルギー研究部・部長

要旨

好塩基球・好酸球前駆細胞数は高IgE血症のアトピー疾患患者群で有意に増加していたが、マスト細胞前駆細胞数は正常対照群と変化なかった。マスト細胞コロニー数、コロニーあたりの細胞数と種々の因子について検討を行った結果、唯一、有意差のみられたものは、年齢とマスト細胞コロニーあたりの細胞数が逆相関している点であった。臍帯血マスト細胞前駆細胞は成人マスト細胞前駆細胞に比べ、20倍の増殖能を有していた。高親和性IgE受容体数、ヒスタミン遊離能、サイトカイン産生能についてマスト細胞の機能的検討を行った結果、アトピー疾患群と正常対照群ともにマスト細胞をIL-4で48時間反応させた場合、大きく機能が増強されたが、アトピー疾患と正常対照群の間には有意差は認めなかった。B細胞のIL-4反応性に影響することに報告されているIL-4受容体 α 鎖50番目のアミノ酸置換について臍帯血マスト細胞よりのサイトカイン産生により検討したがイソロイシン置換6例、バリン置換5例、ヘテロ接合体5例において、培養されたマスト細胞のサイトカイン産生能に有意差を認めなかった。

A. 研究目的

遺伝子多型の細胞機能に与える影響を研究する場合、疾病により細胞機能が修飾を受けていることが問題になる。つまり、アレルギーを発症するリスクの高い遺伝子多型をもっている個体が対立遺伝子多型をもつ個体に比べ、好塩基球からのヒスタミン遊離能が亢進しているかどうかという研究の場合、アレルギー疾患に罹患した個体では好塩基球は炎症性サイトカインによってすでにプライミングを受けていることが多い。したがって、アレルギー疾患を発症しやすい遺伝子多型をもった好塩基球が対立遺伝子多型をもつ好塩基球に比べ機能に差が見られたとしても、その遺伝子は好塩基球の機能に直接関与するのかどうかは断定できない。したがって、遺伝子多型の細胞機能に対する影響をみるには、同一環境で長期間培養し、プライミングの影響を除くなどの処置が必要である。

気管支喘息末梢血中においては好塩基球、好酸球および、発作時にはその前駆細胞が増加しているとの報告がある。しかし、末梢血中には成熟細胞が存在していないマスト細胞については不明であった。昨年度の本分担研究において、われわれは末梢血中に存在するマスト細胞前駆細胞を定量することに成功した。この方法は通

常の液体培養法よりも多くのマスト細胞を得ることが可能であることも判明した。これらの培養細胞を回収し、アトピー疾患患者におけるマスト細胞の機能を測定することも可能になった。本年度の研究ではマスト細胞前駆細胞がアトピー疾患患者末梢血で増加しているのか、機能的に増強されているのかどうか検討した。

B. 方法

(1) 血清高IgE値(IgE > 5,000 U/ml)がみられるアトピー疾患患者17名、および血清IgE値が400 U/ml以下の正常対照者12名より末梢血を採取した。シリカ処理を行い、比重遠沈法で、非貪食性単核細胞を採取した。この細胞をCD4, CD8, CD11b, CD14, CD19に対する抗体と反応させ、磁気細胞分離装置MACSにて、negative selectionを行い造血幹細胞を含む細胞を取り出した(通常20 ml血液より、 10^6 の細胞を得られた)。この細胞を100 ng/mlのstem cell factor(SCF)、50 ng/mlのIL-6、1 ng/mlのIL-3を含む0.9%メチルセルロース含無血清Iscove's DMEMに浮遊させた。14日目ごとに、細胞を含まない100 ng/ml SCF、50 ng/ml IL-6を含むメチルセルロースを重層し、合計6週間培養すると、マスト細胞のみよりなるコロニー形成が観察された。

機能解析のためには細胞をさらに 6 週間 100 ng/ml SCF, 50 ng/ml IL-6 を含む液体培地に浮遊させ培養した。なお、培養 3 週目の段階では好酸球+好塩基球コロニーを算定することができた。

(2)倫理委員会規定に基づいて同意書のもと採取され、臨床情報を記号化した状態で送られた臍帯血より CD34 陽性細胞を MACS にて、positive selection を行い分離した。100 ng/ml の stem cell factor (SCF)、50 ng/ml の IL-6, 1 ng/ml の IL-3 を含む 0.9%メチルセルロース含無血清 Iscove's DMEM に浮遊させ、同様に 14 日目ごとに、細胞を含まない 100 ng/ml SCF, 50 ng/ml IL-6 を含むメチルセルロースを重層し、合計 6 週間培養した。そして機能解析のためにさらに液体培地で 6 週間培養した。CD34 陰性細胞は臍帯血採取日時などをさらに記号化し、九州大学大学院医学系研究科臨床分子医学教室出原賢治博士に送付し、PCR-SSCP 法による IL-4 受容体 α 鎖 50 番目のアミノ酸の多型(イソロイシンとバリン=アデニンとグアニンの一塩基多型)の検討を依頼した。培養マスト細胞は IL-4 と IgE の存在下で 2 日間反応させ、機能を活性化した後、IgE 受容体数、ヒスタミン遊離能、サイトカイン(GM-CSF, IL-5 および IL-13)産生能を測定した。

C. 結果

(1)好塩基球・好酸球コロニー数は高 IgE 血症のアトピー疾患患者群で有意に増加していたが、マスト細胞コロニー数は正常対照群と変化なかった。マスト細胞コロニー数、コロニーあたりの細胞数と種々の因子について検討を行った結果、唯一、有意差のみられたものは、年齢とマスト細胞コロニーあたりの細胞数が逆相関している点であった。臍帯血マスト細胞前駆細胞は成人マスト細胞前駆細胞に比べ、20 倍の増殖能が認められた。高親和性 IgE 受容体数、ヒスタミン遊離能、サイトカイン産生能についてマスト細胞の機能的検討を行った結果、アトピー疾患群と正常対照群ともにマスト細胞を IL-4 で 48 時間反応させた場合、大きく機能が增强されたが、アトピー疾患と正常対照群の間には有意差は認めなかった。

(2) B 細胞の IL-4 反応性に影響することに報告されている IL-4 受容体 α 鎖 50 番目のアミノ

酸置換について臍帯血マスト細胞よりのサイトカイン産生により検討した。イソロイシン置換 6 例、バリン置換 5 例、ヘテロ接合体 5 例において、培養されたマスト細胞のサイトカイン産生能に有意差を認めなかった。

D. 考察

アレルギーを発症するリスクの高い遺伝子多型をもっている個体が対立遺伝子多型をもつ個体に比べ、好塩基球からのヒスタミン遊離能が亢進しているかどうかという研究の場合、アレルギー疾患に罹患した個体では好塩基球は炎症性サイトカインによってすでにプライミングを受けていることが多い。したがって、アレルギー疾患を発症しやすい遺伝子多型をもった好塩基球が対立遺伝子多型をもつ好塩基球に比べ機能に差が見られたとしても、その遺伝子は好塩基球の機能に直接関与するのかどうかは断定できない。したがって、遺伝子多型の細胞機能に対する影響をみるには、同一環境で長期間培養し、プライミングの影響を除くなどの処置が必要である。

本研究では、末梢血 20ml より機能的解析を行うに十分な量のマスト細胞を培養する方法を確立した。今回の結果は、全てネガティブな結果となったが、純粋な genotype の影響をみるためには、有用な方法であり、より多くの事例において検討されるべき方法である。

いずれにしても、今回の結果から、少なくともマスト細胞に関する限り、サイトカインなど環境により大きく機能的な影響を受けるのに対し、遺伝子多型などの genotype による影響は少ないことが予想される。

E. 結論

(1)マスト細胞の機能は genotype よりも環境による影響の方が強いことが推測された。

(2) B 細胞からの IgE 抗体産生に対する IL-4 感受性とはことなり、マスト細胞のサイトカイン産生能に対する IL-4 感受性は α 鎖 50 番目のアミノ酸置換の影響を受けなかった。