

厚生科学研究費補助金

感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業

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

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 柳原 行義

平成13(2001)年3月

厚生労働省

目 次

I. 総括研究報告書

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	—————	1
柳原行義		

II. 分担研究報告書

1. 成熟B細胞におけるRAG発現とアトピー性疾患との関連について	—————	4
柳原行義		
2. IL-13の遺伝的多型 (R110Q) の機能的影響に関する検討	—————	7
出原賢治		
3. 即時型アレルギーとIL-18：遺伝子多型の解析	—————	12
田中敏郎		
4. アトピーの病因遺伝子としてのIL-18レセプター α 鎖遺伝子異常	—————	16
近藤直実		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表（報告書参照）

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センター室長

研究要旨：アトピー性疾患の発症や病態形成に関わる原因遺伝子について、今年度はIL-4レセプターα鎖 (IL-4Rα)、IL-13、IL-18およびIL-18レセプターα鎖 (IL-18Rα)などの遺伝子を中心に解析した。その結果、IL-4Rαの遺伝子多型はIL-4シグナルの正の調節を介してIgE抗体の多様性の獲得に、一方IL-18Rαの遺伝子異常はIL-18シグナルの負の調節を介してIFN-γ産生の不全にそれぞれ関与していた。また、IL-13の遺伝子多型をコードするリコンビナント蛋白質の作成に成功したので、その機能解析が可能になった。さらに、IL-18は病態形成に対して二面性の作用を有していることを明らかにすると共に、その遺伝子の新規多型も同定した。

分担研究者

出原賢治 佐賀医科大学医学部生化学教授
田中敏郎 大阪大学医学部分子病態内科助手

近藤直実 岐阜大学医学部小児科教授

研究協力者

森 晶夫 国立相模原病院臨床研究センター室長
海老澤元宏 国立相模原病院小児科医長
谷口正実 国立相模原病院内科医長
長谷川眞紀 国立相模原病院診療部長
秋山一男 国立相模原病院臨床研究センター部長
高橋一夫 横浜市立大学医学部皮膚科講師
梶原景一 国立相模原病院臨床研究センター
生澤公一 国立相模原病院臨床研究センター
品澤美樹 国立相模原病院臨床研究センター
前田尚子 国立相模原病院臨床研究センター
森嶋大貴 国立相模原病院臨床研究センター
山本尚美 国立相模原病院臨床研究センター

松井永子 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
大西秀典 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
鹿野博明 岐阜大学医学部小児科
坂口平馬 岐阜大学医学部小児科
金子英雄 岐阜大学医学部小児科
伊上良輔 岐阜大学医学部小児科
青木美奈子 岐阜大学医学部小児科
田中洋子 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
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多因子疾患であり、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変異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、IgE受容体、サイトカイン、サイトカイン受容体およびシグナル伝達分子な

ど多くの遺伝子がある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。本研究班では、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手法を用いて多角的な解析を進めている。最終的には、遺伝学的のみならず、機能的にも重要なアトピー原因遺伝子群の多型や変異を組み合わせた簡便な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。

B. 研究概要

昨年度は、アレルギーの発症や病態形成に関与する候補遺伝子について、 $I\epsilon$ 、 $C\epsilon$ 、STAT6、IL-4レセプター α 鎖 (IL-4R α)、IL-12レセプター β 2鎖 (IL-12R β 2)、IL-13およびLTC4合成酵素などの遺伝子の多型や変異と機能を解析した。これらのうち、STAT6遺伝子3'非翻訳領域における2964番目の塩基のA-G多型、IL-4R α 遺伝子における50番目のアミノ酸のIle-Val多型およびIL-12R β 2遺伝子における複数の変異 (2496 del 91、Arg313Gly、His720Arg) がアトピー患者またはIFN- γ 産生不全症例と関連しており、またIL-13遺伝子における110番目のアミノ酸のArg-Gln多型が喘息形質と関連していることを明らかにした。さらに、IL-4R α の50Ile-Val多型と連鎖不均衡している57Thr-Ala多型を新規に同定した。また、機能的には、IL-4R α の50Ile型はIL-4によるSTAT6の活性化の増強に、一方IL-12R β 2の遺伝子変異はIL-12によるSTAT4の不十分なリン酸化に、それぞれ関与していた。今年度は、IL-4R α の50Ile-Val多型とrecombination-activating gene (RAG) 発現との関係、IL-13の110Arg型とGln型の各リコンビナント蛋白質の作成、IL-13レセプター α 1鎖 (IL-13R α 1) とIL-13R α 2の機能、即時型アレルギーにおけるIL-18の役割、IL-18遺伝子の多型およびIL-18レセプター α 鎖 (IL-18R α) 遺伝子の変異などについて、多角的な解析を行った。

C. 研究成果

1) 成熟B細胞におけるRAG発現とアトピー性疾患との関連について (柳原行義)

成熟B細胞上のタイプIあるいはタイプII IL-4RとCD40が活性化されると、抗原レセプターの可変部配列を変えることなく、IgMからIgEへのクラススイッチが誘導される。抗体遺伝子の抗原特異性はB細胞の初期の分化段階で発現されるRAGによるV(D)J組換えを介して獲得されている。しかし、成熟B細胞をIL-4と抗CD40抗体で刺激すると、IgEクラススイッチングの前にRAGが発現されると共に、一部の膜型IgE陽性B細胞にはVJ組換えが誘導されることが明らかとなった。このようなRAG発現はIL-13と抗CD40抗体の刺激では誘導されないため、RAG

によるVJ組換えにはタイプI IL-4RとCD40の活性化が重要な役割を果たしている。これらのレセプター分子のうち、IL-4R α のみにアミノ酸置換を生じる遺伝的多型が存在し、また成熟B細胞におけるRAG発現はIL-4R α の50Ile-Val多型によって調節を受けることも判明した。実際、50Val型では50Ile型に比べて、RAG発現のみならず、VJ組換えも強く誘導された。一方、IgEクラススイッチの誘導能は50Ile型の方が50Val型よりも高かった。さらに、50Ile-Val多型とアトピーとの関連を調べたところ、アトピー性皮膚炎では、アトピー性喘息では50Ile型の頻度が高いのに対して、50Val型の頻度が高かった。これらの結果から、多くのアレルゲンに感作されているアトピー性皮膚炎患者で頻度が高い50Val型は、成熟B細胞でのRAG発現による抗原レセプターのeditingを介してIgE抗体の多様性の獲得に関与していると考えられた。

2) IL-13の遺伝的多型 (R110Q) の機能的影響に関する検討 (出原賢治)

IL-13遺伝子には、110番目のアミノ酸がArgからGlnに置換される遺伝的多型 (R110Q) が存在すること、アトピー型と非アトピー型の両喘息患者においてはGln型の頻度が高いことおよびR110Qと連鎖不均衡している多型が複数存在することを明らかにした。また、血中IL-13値もGln型ではArg型に比べて高いことを示すと共に、コンピューターモデリングではArg型とGln型ではIL-13Rとの結合に差がある可能性も示唆した。IL-13のR110Qの機能的影響を解析する目的で、Arg型とGln型の各リコンビナント蛋白質を大腸菌に発現させることを試み、その発現と精製に成功した。精製したIL-13は、自然型IL-13と同様、分子内ジスルフィド結合のみを作っていることを確認した。さらに、IL-13の結合やシグナルを解析するために、IL-13R α 1とIL-13R α 2の強制発現B細胞株も作製した。強制発現したIL-13R α 1はIL-4R α とヘテロダイマーを形成することにより機能的なIL-13レセプターを構成し、STAT6やSTAT3の活性化などのIL-13シグナルを伝達することを明らかにした。一方、IL-13R α 2はIL-13のシグナルを抑制するので、デコイ(おとり)レセプターとして機能していると考えられた。このような強制発現細胞株を用いることによって、IL-13のR110Q

の機能的解析が可能になった。

3) 即時型アレルギーとIL-18: 遺伝子多型性の解析 (田中敏郎)

IL-18はIL-12共存下ではTh1細胞への分化を促進し、またIgE産生細胞への分化を抑制する。一方、IL-18は単独ではTh2細胞への分化や好塩基球からのTh2タイプサイトカイン産生を誘導するので、まず即時型アレルギーの発症におけるIL-18の機能について検討した。ヒト活性化好酸球はIL-18レセプターを発現しており、IL-18刺激によりIL-8の産生が増強された。また、NC/Ngaマウスでは皮膚炎発症前より血清IL-18レベルが上昇しており、発症後においてもその上昇は持続していた。同様に、アトピー性皮膚炎患者の血清IL-18レベルも対照と比較して増加していた。NC/Ngaマウスに発症前から抗IL-18中和抗体を投与したところ、抗体投与により皮膚炎の増悪が認められた。この結果は、IL-18が皮膚炎の病態形成において2面性の作用を有することを示している。次に、IL-18とその活性化型変換酵素であるcaspase-1の各構造遺伝子の多型の有無を解析した結果、ヒトにおいてはIL-18遺伝子の105A/Cの多型性が認められることが明らかになった。アトピー患者におけるこの多型の頻度と意義については、現在検討中である。

3) アトピーの病因遺伝子としてのIL-18R α 遺伝子異常 (近藤直実)

IFN- γ の産生不全を示すアトピー患者におけるIgE過剰産生の原因となる遺伝子を同定するために、昨年度はIL-12シグナリングの異常としてIL-12R β 2の遺伝子変異を明らかにしたので、今年度はIL-18シグナリングを媒介するIL-18R α を取り上げた。血中IgEが高値を示すアトピー患者の末梢血単核細胞をIL-12やIL-18で刺激すると、IFN- γ の産生量は正相関を示した。しかし、IL-12刺激ではIFN- γ は十分産生されるものの、IL-18刺激ではその産生が極めて低下しているような解離を示す症例がみられた。このようなIFN- γ 産生の不全症例では、IL-18シグナリングに異常が存在すると考えられたので、IL-18R α の遺伝子変異について検索した結果、del CAGの異常が同定できた。また、del CAGをもつ症例では、もたない症例に比べて、IL-18

によるIFN- γ 産生は有意に低下していることが明らかになった。このdel CAGはゲノムDNAを用いた解析では検出されないことから、alternative splicingに起因する異常と考えられた。

5) 成人喘息における好酸球性炎症および気道過敏性獲得の免疫学的背景—IL-5産生T細胞の意義 (森 晶夫)

成人喘息の免疫学的特徴を解析するために、末梢血T細胞のIL-5産生能と好酸球性炎症や気道過敏性との関連について検討した。PMA + ionomycinで刺激した末梢血単核細胞培養上清中のIL-5値と血清ECP値との間には、弱いながら正の相関が認められた ($p=0.03$)。気管支粘膜の好酸球浸潤には、気道局所におけるT細胞の数、活性化指標およびIL-5発現のみならず、末梢血T細胞の活性化指標も関連していることが示されているので、今回の結果は末梢T細胞のIL-5産生能が生体内における好酸球の活性化に関与していることを示唆している。また、Ach PC20が20,000 γ 以上の群では、20,000 γ 以下の群に比べて、PMA + ionomycin応答性のIL-5産生が有意に低かった。ダニアレルゲン感受性のアトピー型喘息においては、Ach PC20が20,000 γ 以下の群ではアレルゲン応答性のIL-5産生は亢進していたが、20,000 γ 以上の群では有意なIL-5産生を認めなかった。気道過敏性の成立には、先天性、後天性(炎症、好酸球等)の諸因子が指摘されているが、アレルゲン応答性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る。以上の知見は、T細胞IL-5産生能が喘息形質(好酸球性炎症)および気道過敏性の獲得に密接な関連を有することを示しており、またIL-5産生に関わる遺伝子の多型解析が重要であることを支持している。

D. 結論

今年度の研究成果から、アトピー性疾患の発症や病態形成には、昨年度同定した遺伝子に加えて、さらに複数の遺伝子が関与していることが明らかになった。本研究班が独自に同定したアトピー原因遺伝子の多型や変異を組み合わせた簡便な遺伝子診断法の系を確立するために、現在各分担研究者が近密なネットワークを組みながら、条件設定を行っている。

成熟B細胞におけるRAG発現とアトピー性疾患との関連について

主任研究者 柳原行義

所属機関 国立相模原病院臨床研究センター室長

研究要旨：アトピー性疾患の発症には、アレルゲン特異的なIgEが免疫抗体として重要な役割を果たしている。抗体の多様性と特異性は、B細胞の初期の分化段階で発現されるRAG (recombination-activating gene) 産物による可変部遺伝子の再構成を介して獲得されるが、最近では成熟B細胞も適当な刺激でRAGを発現することによって新たな抗原特異性を獲得する可能性が示唆されている。本研究では、アトピー候補遺伝子の一つであるIL-4受容体α鎖 (IL-4Rα) の多型による成熟B細胞の機能調節作用について、RAGの発現能とIgEクラススイッチの誘導能を中心に検討した。その結果、RAGの発現はIL-4Rαの50Valin (Val) 型で増強されるが、IgEクラススイッチの誘導は50Isoleucine (Ile) 型で増強された。また、多くの吸入アレルゲンと食物アレルゲンに感作されているアトピー性皮膚炎では50Val型の頻度が高いのに対して、主にダニアレルゲンに感作されているアトピー性喘息では50Ile型の頻度が高かった。さらに、50Val型のB細胞では50Ile型のB細胞に比べてRAG依存的な可変部遺伝子の再構成が数倍強く促進された。以上の知見から、IL-4Rαの50Val型は、50Ile型がIgE産生の増強に関与しているのとは異なり、IgE抗体の多様性の獲得に関与していると考えられた。

A. 研究目的

成熟B細胞の抗原レセプター (BCR) である膜型IgMの抗原特異性は、プロ、プレB細胞の初期の分化段階で発現されるRAG (recombination-activating gene) 産物によるIgMH鎖 (μ) とL鎖 (κ , λ) の可変部遺伝子の再構成、すなわちV(D)J組換えを介して獲得されている。また、成熟B細胞はIgMからIgG、IgA、IgEなどへクラススイッチされるが、最近では成熟B細胞もIgEクラススイッチを誘導するような刺激でRAGを再発現し、そしてBCRがさらにV(D)J組換えされる可能性が示唆されている。今回、成熟B細胞におけるRAGの発現がBCRのV(D)J組換えを介してIgE抗体の多様性の獲得に関与しているか否かについて検討すると共に、アトピー性疾患との関連についても併せて解析した。

B. 方法

1) 被験者の採血に際しては、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) 正常者、アトピー性喘息患者およびアトピー性皮膚炎患者の末梢血単核細胞からB細胞を分離した後、CD34⁺細胞を除去して成熟B細胞を得た。 κ ⁺細胞は λ ⁺細胞を除去することにより98%以上に精製し、またIgE⁺細胞 (ϵ ⁺細胞)、 ϵ ⁺ κ ⁺細胞および ϵ ⁺ λ ⁺細胞はFACSで解析した。タイプIやタイプIIのIL-4レセプター (IL-4R) を発現している細胞も同様にFACSで解析した。germline C ϵ とmature C ϵ の各mRNAの発現はRT-PCRにより、RAG mRNAの発現はRT-PCRやSouthern hybridizationにより、またRAGタンパク質の核内発現は共焦点レーザー顕微鏡により、それぞれ解析した。IL-4Rα鎖 (IL-4Rα) 構造遺伝子の多型は特異プライマーで増幅した

PCR産物をdirect sequence法で解析した。

C. 結果

正常者の成熟B細胞をIL-4やIL-13と抗CD40抗体で刺激すると、いずれの場合にもmature C ϵ mRNAの発現を介して ϵ^+ 細胞は誘導されたが、RAG mRNAとタンパク質の発現はIL-4と抗CD40抗体の刺激に特異的であった。RAG mRNAの発現は一過性であり、またその発現はmature C ϵ mRNAの発現が誘導される前にすでに終了していた。一方、IL-4と抗CD40抗体で刺激した κ^+ 細胞中の一部の ϵ^+ 細胞はBCR L鎖のVJ組換えを介して κ 鎖から λ 鎖へ変換された。この変換はIL-4R α の50番目のイソロイシン(Ile)-バリン(Val)多型の影響を受け、50Val型では50Ile型に比べて $\epsilon^+\lambda^+$ 細胞が約4倍多く誘導された。しかし、 ϵ^+ 細胞の誘導能は50Ile型の方が50Val型よりも約2倍強かった。さらに、IL-4R α の50Ile-Val多型とアトピー性疾患との関連について連鎖解析したところ、主にダニアレルゲンに感作されているアトピー性喘息患者では50Ile型の出現頻度が高いのに対して、多くの吸入アレルゲンと食物アレルゲンに感作されているアトピー性皮膚炎患者では50Val型の出現頻度が高かった。また、50Val型の成熟B細胞におけるRAGの発現能は50Ile型のそれよりも有意に高値を示した。RAGの発現はIL-7の添加によって増強され、またIL-7はIL-4刺激したケラチノサイトから産生された。

D. 考察

本研究では、成熟B細胞におけるRAGの発現はタイプI IL-4R $^+$ 細胞に特異的であること、RAG mRNAの発現はIgEクラススイッチが誘導される前に終了していること、またIgMからIgEへクラススイッチした一部の ϵ^+ 細胞はRAGの発現を介してBCRのL鎖にVJ組換えを誘導することを明らかにした。興味あることに、 ϵ^+ 細胞の誘導はアトピー性喘息で出現頻度が高いIL-4R α の50Ile型で増強されるのに対して、RAGの発現はアトピー性皮膚炎で出現頻度が高い50Val型で増強された。さらに、RAGの発現は、ケラチノサイトから産生されるIL-7によって、タイプI IL-4R α のサブユニットであるIL-2R γ の活性化を介して増強された。これらの結果から、多

くのアレルゲンに感作されているアトピー性皮膚炎患者におけるIgE抗体の多様性の獲得には、50Val型のIL-4R α とIL-2R γ との相互作用に依存して発現増強されたRAGが成熟B細胞でのBCRのV(D)J組換えの促進に関与していると考えられた。

E. 結論

IL-4R α の50Ile型と50Val型とではアトピー性疾患の病型における出現頻度のみならず、成熟B細胞における機能調節作用も異なっていることが明らかになった。また、アトピー性皮膚炎で頻度が高い50Val型は、アトピー性喘息で頻度が高いIle型がIgE産生の増強に関与しているのに対して、RAG依存的なBCRのV(D)J組換えの促進を介してIgE抗体の多様性の獲得に関与している可能性が強く示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Izuhara K, Yanagihara Y, Hamasaki N, Shirakawa, Hopkin JM : Atopy and the human IL-4 receptor α chain. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106: S65-71, 2000.
- 2) 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.
- 3) 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.* 49: 195-204, 2000.
- 4) Koshio T, Kajiwara K, Ikizawa K, Nakagami K, Yanagihara Y : Blocking the CD154-CD40 interaction with anti-CD154 antibody differentially regulates IL-4 synthesis in T cells and IgE production in B cells. *Allergol. Int.* in press.
- 5) 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: S47-49, 2000.
- 6) 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.
- 7) 柳原行義、出原賢治: アトピー性疾患とIL-4レセプター α 鎖遺伝子多型. アレルギー・免疫 7: 800-805, 2000.
 - 8) 生澤公一、柳原行義: IL-4レセプターシグナルの多様性. 臨床免疫 33: 664-668, 2000.
 - 9) 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 pp. 24-30, 2000.
 - 10) 梶原景一、柳原行義: CD23. 臨床免疫 35: 127-131, 2000.
 - 11) 柳原行義: IgE産生の制御に関する最近の知見. Outlook for asthma treatment pp31-49, 2000.
 - 12) 柳原行義: 抗体産生とその調節. コンパクト臨床アレルギー学 pp6-13, 2000.
 - 13) 柳原行義、羅 智靖: 可溶性Fc ϵ RI α によるIgE産生抑制. 医学のあゆみ 192: 1011-1015, 2000.
 - 14) 柳原行義、羅 智靖: ヒト可溶性Fc ϵ RI α によるIgE産生の抑制機序. アレルギー科 9: 441-446, 2000.
 - 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: IgE産生誘導とその制御. Progress in medicine 20: 2598-2604, 2000.
 - 17) 梶原景一、柳原行義: 気管支喘息におけるTh2細胞と転写因子. 臨床免疫 35: 127-131, 2001.
 - 18) 梶原景一、柳原行義: 好酸球によるIgE産生誘導. 臨床免疫 35: 161-167, 2001.
 - 19) 前田尚子、柳原行義: 抗アレルギー薬の作用域. 治療学 印刷中
 - 20) 前田尚子、柳原行義: 炎症性サイトカイン. 日本臨牀 印刷中
 - 21) 柳原行義: IgE免疫応答を標的としたアレルギー性疾患制御の方策. アレルギー・免疫 印刷中
 - 22) 柳原行義: IgE産生機構に関わる最近の話題. アレルギー科 印刷中
 - 23) 柳原行義: IgE・IgE抗体とその産生制御. 臨床アレルギー学 印刷中
- 構. 第50回日本アレルギー学会総会, 2000.
- 2) 生澤公一、柳原行義. IgE産生をめぐる最近の話題. 第50回日本アレルギー学会総会, 2000.
 - 3) 岩田淳一、梶原景一、生澤公一、秋山一男、柳原行義. 正常者末梢血B細胞におけるRAG発現能の解析. 第50回日本アレルギー学会総会, 2000.
 - 4) 梶原景一、生澤公一、海老澤元宏、高橋一夫、秋山一男、柳原行義. アトピー性皮膚炎におけるIL-4受容体 α 鎖遺伝子多型. 第50回日本アレルギー学会総会, 2000.
 - 5) 品澤美樹、梶原景一、生澤公一、海老澤元宏、工藤 誠、高橋一夫、柳原行義. IL-4受容体 α 鎖遺伝子の新規多型. 第50回日本アレルギー学会総会, 2000.
 - 6) 森嶋大貴、梶原景一、生澤公一、秋山一男、柳原行義. I ϵ 遺伝子とC ϵ 3遺伝子の多型解析. 第50回日本アレルギー学会総会, 2000.
 - 7) 梶原景一、生澤公一、海老澤元宏、高橋一夫、柳原行義. IL-4受容体 α 鎖遺伝子多型によるB細胞機能の調節作用. 第30回日本免疫学会総会, 2000.

研究協力者

梶原景一、生澤公一、品澤美樹、前田尚子、森嶋大貴、海老澤元宏、森 晶夫、山本尚美、谷口正実、長谷川真紀、秋山一男（国立相模原病院臨床研究センター）、高橋一夫（横浜市立大学医学部皮膚科）

2. 学会発表

- 1) 柳原行義. IgE産生細胞の活性化と制御機

厚生科学研究費補助金（厚生労働省感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）
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班
分担研究報告書

インターロイキン 13 (IL-13) の遺伝的多型 (R110Q) の機能的影響に関する検討

分担研究者 出原賢治 佐賀医科大学医学部生化学講座教授

研究要旨 インターロイキン 4(IL-4)、IL-13 はアレルギー疾患の発症に重要であり、それらのシグナル伝達分子はアレルギーあるいはアトピー原因遺伝子の候補であると考えられる。昨年我々は IL-13 遺伝子上に存在する 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 (R110Q) が、日本人、イギリス人のどちらのグループの喘息患者においても気管支喘息と関連することを見出した。今回アルギニン、グルタミンの両方の型の IL-13 を発現、精製するとともに、IL-13 レセプター α 1 鎖 (IL-13R α 1)、IL-13R α 2 を B 細胞株に安定して発現させることに成功した。IL-13R α 2 の発現により IL-13R α 1 依存的な IL-13 シグナル伝達が抑制され、IL-13R α 2 は IL-13 シグナルに対し抑制的に働いているレセプターだと考えられた。これらの材料を用いて R110Q の多型の機能的な影響について検討することが可能となった。

A. 研究目的

本研究においてはいくつかのアレルギー原因遺伝子の候補遺伝子上に存在する遺伝的多型の中から、アレルギー疾患の発症、病態形成に関与するものを同定し、その機能を解析することによりアレルギー疾患の発症機序を解明することを目指している。昨年、我々はアレルギー疾患の遺伝因子の候補であるインターロイキン 13 (IL-13) 遺伝子上において 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 (R110Q) が存在することを同定し、日本人、イギリス人のどちらのグループにおいても喘息患者においてグルタミンの頻度が高くなっており、この遺伝的多型が遺伝学的に気管支喘息と関連することを見出した。今回、我々はこの遺伝的多型の機能的影響について検討するための準備を行った。

B. 研究方法

アルギニン型とグルタミン型の両者の機能的影響を解析するために、両方のリコンビナント蛋白質を大腸菌に発現、精製することを試みた。さらに、IL-13 のレセプターとの結合、あるいはレセプターを介するシグナルへを解析するために、IL-13 レセプター発現株の作製を試みた。IL-13 のレセプターとしては IL-13 レセプター α 1 鎖 (IL-13R α 1) と IL-13R α 2 の 2 種類が存在するため、両方の B 細胞株への強制発現株の作製を試みた。

(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

リコンビナント蛋白質はマルトース結合蛋白質 (MBP) との融合蛋白質として発現し、酵素処理により MBP を切断して、リフォールディングにより立体構造を正常化した後精製を行った。これにより得られた IL-13 は蛋白質染色で判断すると、95%以上の純度で精製されていた。また、精製された IL-13 は還元下、非還元下でも SDS-PAGE 上で同じ移動度を示すことから、自然型 IL-13 と同じように分子内ジスルフィド結合のみを作っていることが確認された。

IL-13R α 1 と IL-13R α 2 の B 細胞株への安定した強制発現株を作製することに成功した。自然型 IL-13 は IL-13R α 1 とは Kd が 164pM、IL-13R α 2 とは Kd が 244pMであることを示し、IL-13R α 2 が IL-13R α 1 と同等の親和性を持つことを示した。E β プロモーター領域をレポーター遺伝子に結合させて IL-13 による反応を解析したところ、IL-13R α 1 発現株は IL-13 に反応するが、IL-13R α 2 発現株は IL-13 に反応しなかった。また、IL-13R α 1 発現株にさらに IL-13R α 2 を発現させると IL-13 への反応が阻害された。これらの結果から、IL-13R α 1 は IL-4R α とともに機能的な IL-13 レセプターを構成しているが、IL-13R α 2 は“おとりレセプター”として IL-13 シグナルに対して阻害するように働いていると考えられる (図 1)。

これらの材料を用いて現在、IL-13R α 1 との結合、IL-13R α 2 との結合、蛋白質の安定性の 3 点についてアルギニン型とグルタミン型の両者において差異があるかを現在検討を行っている。

D. 考察

IL-13 遺伝子の遺伝的多型に関しては、コンピューターモデリングでは、レセプターとの結合に差があるのではないかと予想された。現在、アルギニン型、グルタミン型の両方の IL-13 を発現、精製して、その機能に差があるか解析を行っている。もし差があれば、IL-13 遺伝子は喘息遺伝子の一つであることが確定される。しかし、IL-13 の機能を解析するために、上記のような系だけで充分かどうかは不明である。特に IL-13R α 1 は気道上皮細胞、気管支平滑筋に高発現していることから、これらの細胞への作用についても検討を行う必要がある。さらに、R110Q 以外に IL-13 遺伝子上には6個の遺伝的多型が存在し、この内4個は R110Q と連鎖不均衡にあることが判明した。これらの遺伝的多型の機能的影響についても解析を行う必要がある。

E. 結論

アルギニン型とグルタミン型の IL-13 のリコンビナント蛋白質を精製することに成功した。さらに、IL-13 のレセプターである IL-13R α 1 と IL-13R α 2 の B 細胞株への強制発現株の作製にも成功した。これにより、気管支喘息と遺伝学的な相関が認められた IL-13 遺伝子における遺伝的多型である R110Q の機能的解析が可能になった。

F. 健康危険情報

特に記載すべき事なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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

3) 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, 19, 1225-1231, 2000

4) Gao P-S, Mao X-Q, Roberts MH, Arinobu Y, Akaiwa M, Enomoto T, Dake Y, Kawai M, Sasaki S, Hamasaki N, Izuhara K, Shirakawa T, Hopkin JM:

Variants of STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) in atopic asthma.

J. Med. Genet., 37, 380-382, 2000

5) Arinobu Y, Sugimoto R, Akaiwa M, Arima K, Otsuka T, Hamasaki N, Izuhara K:

Augmentation of signal transducer and activation of transcription (STAT)6 and STAT3 Expression in Stimulated B and T Cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 277, 317-324, 2000

6) 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., 17, 63-70, 2000

7) Izuhara K, Umeshita-Suyama R, Akaiwa M, Shirakawa T, Deichmann KA, Arima K, Hamasaki N, Hopkin JM:

Recent advances in understanding how interleukin-13 signals are involved in the pathogenesis of bronchial asthma.

Arch. Immunol. Therap. Exp. 48, 505-512, 2000

8) Umeshita-Suyama R, Sugimoto R, Akaiwa M, Arima K, Yu B, Wada M, Kuwano M, Nakajima K, Hamasaki N, Izuhara K:

Characterization of IL-4 and IL-13 signals dependent on the human IL-13 receptor α chain 1: redundancy of requirement of tyrosine residue for STAT3 activation.

Int. Immunol. 12, 1499-1509, 2000

9) Akaiwa M, Yu B, Umeshita R, Terada N, Suto H, Koga T, Arima K, Matsushita S, Saito H, Ogawa H, Furue M, Hamasaki N, Ohshima K, Izuhara K:

- Localization of Human Interleukin-13 Receptor in Non-Hematopoietic Cells. Cytokine 13, 75-84, 2001
- 10) Izuhara K, Sugimoto R, Akaiwa M, Umeshita R, Arima K, Yu B, Hamasaki N: Molecular Target for Hematological Malignancies and Cancer(Signal Transduction of IL-4 and IL-13: Its Correlation with the Pathogenesis of Allergic Diseases.) 95-102, Kyushu University Press, 2000
- 11) 出原賢治, Bioscience 用語ライブラリー (免疫IL-4/IL-4R), 177-178, 羊土社, 2000
- 12) 出原賢治, 花粉症診療の質を高めるー内科医への20の診療ナビゲーション(なぜ花粉症(アレルギー)が増加したのかー21世紀の夢の治療に向けて), 142-148, 医学書院, 2000
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 柳原行義, 出原賢治: アトピー性疾患とIL-4レセプター α 鎖遺伝子多型. アレルギー・免疫 7: 62-67, 2000
- 17) 出原賢治: アトピー性皮膚炎の原因遺伝子. 臨床免疫 33: 443-447, 2000
- 18) 有馬和彦, 出原賢治: アレルギーとIL-13, IL-13レセプター. 組織培養工学 26: 353-357, 2000
- 19) 梅下律子, 出原賢治: IL-13レセプター. 臨床免疫 34: 608-612, 2000
- 20) 出原賢治: アレルギー疾患とサイトカイン. 実験医学 18: 197-202, 2000
- 21) 出原賢治: IL-13シグナリングとアレルギー疾患. 細胞工学 19: 1522-1527, 2000
- 22) 赤岩美奈, 出原賢治: IL-13レセプター発現調節とシグナル伝達. 喘息 13: 83-88, 2000
- 23) 有馬和彦, 出原賢治: IL-13の遺伝的多型と喘息との関連. アレルギー科 10: 323-327, 2000
- 24) 出原賢治: アトピーとIL-4レセプター. 検査と技術 28: 1563-1566, 2000
- 25) 赤岩美奈, 出原賢治: アレルギー原因遺伝子の同定.ーインターロイキン4, 13のシグナル伝達分子を中心としてー 臨床免疫 34: 804-811, 2000
- 26) 杉本理恵, 出原賢治: IL-13レセプターの発現とアレルギー疾患との関連. アレルギー科 10: 50-55, 2000
- 27) 出原賢治: 喘息に関する細胞の分子医学. リンパ球現代医療 33: 66-70, 2001
- 28) 出原賢治: IL-13. 分子呼吸器病 5: 11-11-17, 2001
2. 学会発表
- 1) 有馬和彦, 白川太郎, Deichmann Klaus A., 阿部義人, 赤岩美奈, 于杉, 濱崎直孝, Hopkin Julian M., 出原賢治: IL-13の遺伝的多型と気管支喘息との関連. 第30回日本免疫学会総会. 2000. 11. 14. 日免疫総会誌 30: 37.
- 2) 有馬和彦, 白川太郎, Klaus A. Deichmann, 阿部義人, 山下哲次, 榎本雅夫, 嶽良博, 佐々木聖, 赤岩美奈, 于杉, 濱崎直孝, Julian M. Hopkin, 出原賢治: IL-13の遺伝的多型と気管支喘息との関連. 第50回日本アレルギー学会総会. 2000. 11. 30. アレルギー 49: 938.
- 3) 出原賢治: 気道上皮とTh2サイトカイン. 第50回日本アレルギー学会総会. 2000. 11. 30. アレルギー 49: 812 (シンポジウム).
- 4) 出原賢治, 有馬和彦, 白川太郎: アレルギー疾患の発症とIL-13遺伝子多型.

第 50 回日本 アレルギー学会総会. 2000. 11. 30.

アレルギー 49 : 800 (シンポジウム)

5) 出原賢治、濱崎直孝 :

インターロイキン 4, 13 とアレルギー疾患の発症.

第 47 回日本臨床病理学会. 2000. 11. 2. 臨床病理 48 :

52 (シンポジウム) .

6) Izuhara K., Shirakawa T., Deichmann K.A.,
Hopkin J.M.:

Genetic Variants of IL-4 and IL-13 Signalling
Correlated with Atopy and Allergy.

5th World Congress on Advances in Oncology and
3rd International Symposium on Molecular
Medicine. 2000. 10. 20. (workshop)

7) 松井慶子、赤岩美奈、湯山則子、吉田寧、有馬和彦、
于杉、濱崎直孝、杉田雄二、出原賢治 :

ヒト気道上皮細胞と気管支平滑筋細胞における IL-4、
IL-13 による発現変動遺伝子の同定.

第 30 回日本免疫学会総会. 2000. 11. 14. 日免疫総
会誌 30 : 31

8) 関則靖、林克彦、出原賢治、久保允人 :

Th2 細胞初期分化を制御する転写因子の核内発現と
IL-4 シグナル伝達系.

第 30 回日本免疫学会総会. 2000. 11. 16. 日免疫総
会誌 30 : 237.

9) Shirakawa T., Izuhara K. , Mao X-Q., Deichmann
K.A., Hopkin J.M.:

Genetic Variants of IL-13 Signalling and Human
Asthma and Atopy.

Keystone Symposia. 2000. 4. 11. Cytokines and
Disease : 77 (workshop)

10) 湯山則子、赤岩美奈、松井慶子、吉田寧、有馬和彦、
于杉、濱崎直孝、杉田雄二、出原賢治 :

ヒト気道上皮細胞と気管支平滑筋細胞における IL-4、
IL-13 による発現変動遺伝子の同定.

第 50 回日本アレルギー学会総会. 2000. 11. 30. ア
レルギー 49 : 940.

II. 知的所有権の取得状況

特に記載すべき事なし

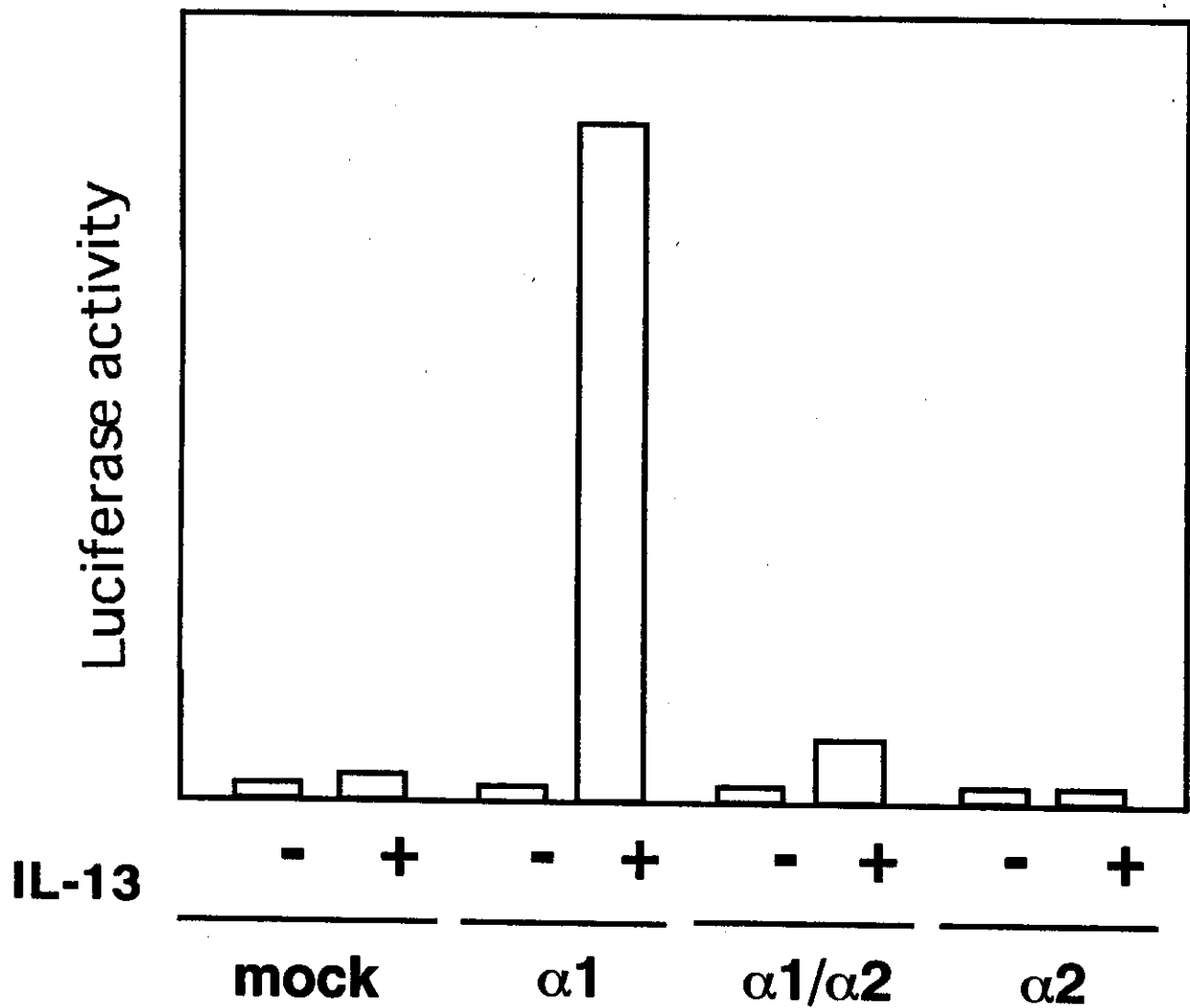
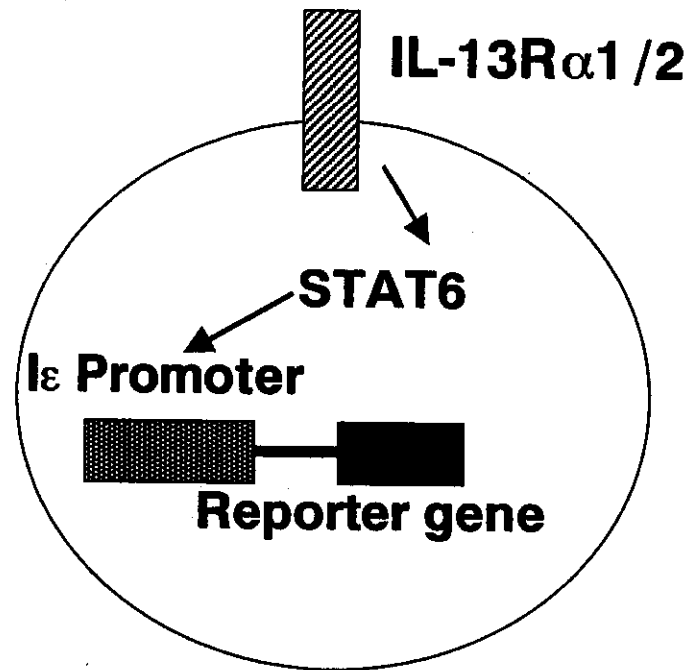


図 1 IL-13R α 1/2 によるIL-13シグナル

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
-即時型アレルギーとIL-18：遺伝子多型の解析

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 IL-18は、T細胞のTh1やTh2分化またIgE産生等のアレルギー反応誘導相に参与するサイトカインであることが示されているが、アレルギー反応の炎症相にも参与するのか、特に好酸球に対する作用を検討した。ヒト好酸球は、IL-18受容体を発現しており、また活性型好酸球では、IL-18の刺激によりIL-8の産生が増強することが示された。即時型アレルギー疾患の発症病態におけるIL-18の役割を検討するために、アトピー性皮膚炎患者とアトピー性皮膚炎マウスNC/Ngaにおける血清IL-18値をELISA法にて測定したところ、対照に比して、IL-18の上昇が観察された。特にNC/Ngaマウスでは、皮膚炎発症前より、IL-18の過剰発現が認められた。このマウスにおいて、IL-18の皮膚炎発症に及ぼす影響を検索する目的で、皮膚炎発症前より抗IL-18中和抗体を投与したところ、この抗体は、皮膚炎の発症を阻止し得ず、むしろ皮膚炎や引っ掻き行動の増悪を認めた。以上のことは、IL-18は、即時型アレルギー発症病態において、2面性の作用を有することを示唆する。次にIL-18とIL-18の活性化酵素であるInterleukin-1 β converting enzyme (ICE)構造遺伝子のSNPの有無を、RT-PCR-SSCP、PCR-sequencing法にて検討したところ、ヒトICE遺伝子にはSNPは同定されず、ヒトIL-18遺伝子においては、IL-18の翻訳開始点より105番目に、アミノ酸の変異を伴わないSNP (A/C) が認められた。その遺伝子頻度は、A:C=159:15であり、即時型アレルギー疾患との連鎖不均衡に関しては、現在検討中である。

A. 研究目的

昨年、IL-4受容体の2つのSNP(IL-4R-50Val/Ile、576Gln/Arg)、 β 2アドレナリン受容体の2つのSNP(β 2ADR-16Arg/Gly、27Gln/Glu)とIL-4転写領域(-525C/T)のSNPの遺伝子頻度を、即時型アレルギー患者と対照とで比較し、それぞれ単独のSNPの検討では、IL-4R-50Val/Ileがオッズ比2.3と示し、またアトピー型喘息と対照を、SNPの組み合わせ(IL-4R-50Val/Ile、 β 2ADR-16Arg/Gly)で検討すると、オッズ比が5.8に上昇することを報告した。しかしながら、SNP解析で期待されるアレルギーの発症予知や発症病態に応じた治療の開発となると、これらの結果は不十分であろうと考えられた。

IL-18は、アレルギー疾患の発症病態において、2面性の作用を有することが示されている。すなわちIL-18が、プライミング時にナイーブT細胞に作用すると、Th2細胞への分化を誘導し、また好塩基球に働くと、ヒスタミ

ン、IL-4やIL-13の分泌を惹起することが示されている。一方、IL-18がIL-12共存下でT細胞やB細胞に作用すると、それぞれTh1細胞への分化を促進し、またIgE産生を抑制することが明らかとなっている。そこで本年度では、即時型アレルギー疾患の発症病態にIL-18がどのような役割を果たすのか、またIL-18構造遺伝子にSNPが存在するのか、この2点を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 遺伝子の多型性の解析 即時型アレルギー疾患患者(アトピー性皮膚炎か喘息を発症している3-73才、環境アレルゲン陽性)もしくは過去に即時型アレルギー疾患の発症をみない非アトピー対照群から、研究の目的とその内容を説明し同意(インフォームドコンセント)を得た後、末梢白血球からDNAを、単核球よりRNAを採取した。

2. サイトカインは、ELISA法にて測定し

た。

3. アトピー性皮膚炎モデルマウスNC/Ngaにおける抗IL-18中和抗体の皮膚炎に対する作用 皮膚炎発症前生後5週より、毎週100 μ gの抗IL-18中和抗体もしくはコントロール抗体を腹腔内に投与し、non-SPFの環境下で13週まで飼育し、経時的に皮膚炎の重症度、引っ掻き行動また血清IgEを指標として、抗体の効果を検討した。

4. 好酸球におけるIL-18の作用 ヒト正常好酸球は、buffy coatより、好酸球増多症候群患者由来好酸球は、末梢血より、Percoll gradient遠沈法とCD16抗体を用いるnegative selection法により精製した。ヒト好酸球株として、EoL-1、YY-1細胞株を用いた。IL-18受容体の発現は、RT-PCR法とFACSにて解析した。好酸球におけるIL-18の作用の検討して、cell survival、サイトカインの発現をRT-PCR、ELISA法にて解析した。

5. ヒト及びマウスのIL-18、ICE (Interleukin-1 β converting enzyme: caspase-1)構造遺伝子のSNPの検索 マウス脾臓細胞 (NC/Nga、C57/BL6、BALB/c、C3H/He)とヒト末梢単核球より抽出したRNAから、構造遺伝子をRT-PCR法により増幅し、制限酵素にて切断後、SSCP法にて、SNPの有無をスクリーニングした。SNPの存在確認後、PCR productを鋳型として塩基配列を決定し、さらにそのSNPをDNAより検索する方法を確立した。

(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のみ、検体の解析を行った。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. アトピー性皮膚炎とIL-18

成人アトピー性皮膚炎患者では、対照に比して血清IL-18値が増加していた(437pg/ml+292 vs 146+74, p<0.05)。血

清IL-18は、皮膚炎の重症度との関与は示さず、血清IgE値とは、逆相関の傾向を示した($r=-0.43$)。自然発症のアトピー性皮膚炎マウスであるNC/Ngaにおいても、対照のマウス(BALB/c、C57/BL6)と比較して、血清IL-18が上昇していた(471pg/ml vs <50)。またこの上昇は、皮膚炎発症前より認められ、発症後も持続していた。そこで、皮膚炎に及ぼすIL-18の役割を明らかにするため、抗IL-18抗体を発症前より投与したところ、皮膚炎の発症を阻止し得ず、むしろ皮膚炎と引っ掻き行動の増悪を認めた。

2. 好酸球におけるIL-18の作用

精製好酸球またヒト好酸球細胞株YY-1やEoL-1において、IL-18受容体-mRNAの発現が観察され、またYY-1細胞では、FACS解析においても、IL-18受容体の細胞表面での発現が確認された。酪酸で処理したYY-1細胞は、成熟活性化するが、この処理に伴いIL-18受容体の発現も増強された。活性化好酸球(酪酸で処理したYY-1や好酸球増多症候群患者由来好酸球)をIL-18で刺激すると、IL-8の産生が増強された。

3. ヒト及びマウスIL-18、ICE構造遺伝子のSNPの検索

以上の事より、IL-18とproIL-18のactive IL-18に転換するICE遺伝子に注目し、これらの構造遺伝子にSNPが存在するのか、RT-PCR-SSCP法にて検討した。マウスでは、NC/Nga、C57BL/6、BALB/cとC3H/Heを用いた。ヒトでの検討は、30サンプルをスクリーニングした。マウスの両構造遺伝子には、NC/Ngaを含めて、SNPが検出されず、またヒトにおいても、ICE遺伝子では、SSCPにて泳動パターンが異なる遺伝子断片は認められなかった。ヒトIL-18遺伝子のSSCPでは、SNPの存在を示唆する泳動結果が得られ、RT-PCR productを鋳型として、塩基配列を決定したところ、翻訳開始点より105番目の塩基にA/CのSNPが存在することが明らかとなった。ICEにより切断される部位の近傍であったが、このSNPは、アミノ酸変異を伴わない遺伝子多型であった。現在までの解析では、このSNPの遺伝子頻度はA:C=159:15(Cが8.6%)であった。

D. 考察

本年度の研究においては、IL-18が活性化好酸球に作用し、IL-8の産生を増強すること、アトピー性皮膚炎の患者では、IL-18の過剰発現が認められることが明らかとなった。またアトピー性皮膚炎マウスであるNC/Ngaでは、肉眼的に観察される皮膚炎発症前より、血清IL-18が増加しており、この結果は、IL-18のTh2分化また好塩基球の活性化作用を考えると、皮膚炎の発症やTh2へのプライミングに作用している可能性が考えられた。この事を明らかにするため、中和実験をマウスにて遂行したが、抗IL-18抗体は、皮膚炎の発症とIgEの過剰産生を阻止できなかった。今後、IL-18のアトピー性皮膚炎に対する作用を明らかにするため、IL-18発現臓器（細胞）の同定、発現時期またIL-12も同時に過剰発現されているのか等の解析を行いたい。

ヒトIL-18構造遺伝子には、105A/CのSNPが認められたが、アミノ酸変異を伴わなかった。このSNPが、即時型アレルギー疾患に関与するのか、特にアトピー性皮膚炎において、その意義を確かめたい。

E. 結論

1. アトピー性皮膚炎では、血清IL-18が増加している。
2. IL-18は、活性型好酸球に作用し、IL-8の産生を増強する。
3. ヒトIL-18構造遺伝子には、105A/CのSNPが存在する。

F. 研究発表

A. 論文発表

1. Kotani M., M. Matsumoto, A. Fujita, S. Higa, W. Wang, M. Suemura, T. Kishimoto, and T. Tanaka. Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000 106:159-166.
2. Kouda K., T. Tanaka, M. Kouda, H. Takeuchi, A. Takechi, H. Nakamura, and M. Takigawa. Low-energy diet in atopic

dermatitis patients: clinical findings and DNA damage. *J. Physiol. Anthropol.* 2000 19:225-228.

3. Tanaka T., Y. Katada, S. Higa, H. Fujiwara, W. Wang, Y. Saeki, S. Ohshima, Y. Okuda, M. Suemura, and T. Kishimoto. 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* 2001 13:193-201.

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

Int. Arch. Allergy and Immunol. in press

5. Wang W., T. Tanaka, H. Okamura, M. Sugita, S. Higa, T. Kishimoto, and M. Suemura. Interleukin-18 enhances the production of interleukin-8 by eosinophils. *Eur. J. Immunol.* in press

6. 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. 緑食野菜、果物混合飲料の血清脂質値および赤血球膜リン脂質組成への影響 *日本医事新報* 2000 3985 : 46-49.

7. 水道裕久、藤田晃人、田中敏郎、福原宏一、清水俊彰、池田あこ、竹内明、光岡知足. 緑食野菜、果物混合飲料摂取が健常成人の便性および糞便菌叢に及ぼす影響 *腸内細菌学雑誌* 2000 13 : 67-74.

8. 小谷麻由美、藤田晃人、田中敏郎. スギ花粉症患者に対する柿葉抽出物の効果 *アレルギーの臨床* 2000 261 : 66-69.

9. 水道裕久、田部井利男、田中敏郎、小林民代、佐藤雄彦、竹内明、牧野武利、笠山宗正、辻啓介、東野一翁. ブロッコリー、キャベツを配合した緑色野菜飲料による軽度高コレステロール血症者への影響 *健康食品栄養研究* 2001 3 : 1-10.

10. 松本元伸、小谷麻由美、藤田晃人、田中敏郎. 柿葉抽出物のNC/Ngaマウスにおける

アトピー性皮膚炎抑制作用 日本栄養、食糧
学会誌 2001 15 : 3-7.

B. 学会発表

1. 比嘉慎二、田中敏郎、末村正樹、小谷麻
由美、松本元伸、藤田晃人. フラボノイドの
好塩基球からのTh2型サイトカイン(IL-4、
IL-5、IL-13)産生抑制作用

第12回日本アレルギー学会春季臨床大会
2000、4、福岡

2. Katada Y., T. Tanaka, M. Suemura, K.
Maeda, and T. Igarashi. Polymorphism of
b2-adrenoceptor in Japan.

XVII the International Congress of
Allergology and Clinical Immunology

2000、11、Sydney

3. Tanaka T., M. Kotani, M. Matsumoto,
A. Fujita, S. Higa, and M. Suemura.
Persimmon leaf extract and its major
flavonoid, astragaloside inhibit development
of dermatitis and IgE elevation in an atopic
dermatitis-model mouse.

XVII the International Congress of
Allergology and Clinical Immunology

2000、11、Sydney

4. Higa S., M. Kotani, M. Matsumoto, A.
Fujita, T. Igarashi, M. Suemura, and T.
Tanaka. Fisetin, a flavonol inhibits Th2
type cytokine expression by basophils.

XVII the International Congress of
Allergology and Clinical Immunology

2000、11、Sydney

5. 立花輝夫、田中敏郎、中西憲司.
サルコイドーシスの病態と血中サイトカイン

第50回日本アレルギー学会総会
2000、11、横浜

課題名 アトピーの病因遺伝子としてのIL-18レセプター α 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-18刺激によるIFN- γ 産生不全の症例の中にIL-18レセプター α 鎖をコードする遺伝子の異常が見出された(del CAG)。さらにそれらの症例では、IL-18によるIgE産生制御がみられなかった。以上の結果からIL-18レセプター α 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つがその制御機構の1つであるIL-18シグナリング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。このうち昨年度は、IgE産生制御機構の破綻を来すIL-12レセプター $\beta 2$ (IL-12R $\beta 2$)鎖遺伝子異常を世界で初めて見出した。今年度は引き続き、IgE産生制御機構のIL-18シグナリングの破綻をきたす遺伝子異常を世界で初めて明らかにした。

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-18R α 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。一方でPCR産物をアクリルアミドゲルで電気泳動した。⑤IgE産生系におけるIL-18の効果につき検討した。

(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(インフォームドコンセント)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。

C. 研究結果

IFN- γ はIL-4により誘導されるIgE産生を制御している。またIFN- γ の産生が低下しているとIgE産生が亢進する。

アレルギーのIgE産生過剰におけるIFN- γ 産生不全ともいべき病態に関して、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1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-18刺激とPHA刺激との間にも同様の結果が得られた。これらの症例につきIL-18レセプターを含む情報伝達系の異常につき検索した。IL-18はレセ

プター (IL-18R α , IL-18R β) を介して、さらに 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 2)。今回の検討で選択的な IL-18 刺激による IFN- γ 産生不全の症例の中に IL-18 レセプター α 鎖をコードする遺伝子の異常が見出された (del CAG) (図 3)。さらにそれらの症例では、IL-18 による IgE 産生制御がみられなかった (図 4) ことから、IL-18 レセプター α 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。del CAG をもつ症例と、もたない症例について IL-18 刺激による IFN- γ 産生を比べると、del CAG をもつ症例では有意に低下しており (図 5)、さらに表 1 のようにアレルギー患者と健康人とで比較すると del CAG はアレルギー患者で有意であった。

D. 考察

IL-18 レセプターは IL-18 のシグナルカスケードの最初のステップである。IL-18R α 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 つがその制御機構の IL-18 シグナリング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。しかし、これらの患者のゲノム DNA を用いた検索ではこの del CAG は認められなかったことから、alternative splicing により、発現してくる異常と考えている。

E. 結論

選択的な IL-18 刺激による IFN- γ 産生不全の症例の中に IL-18 レセプター α 鎖をコードする遺伝子の異常が見出された (del CAG)。さらにそれらの症例では、IL-18 による IgE 産生制御がみられなかった。以上の結果から IL-18 レセプター β 2 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 つがその制御機構の 1 つである IL-18 シグナリング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。

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 β 2 chain gene in some atopic subjects. *Biochem Biophys Res Commun*, 266: 551-555 (1999)
- (2) Kondo N, Matsui E, Kaneko H, Kato Z, Fukao T, Teramoto T, Inoue R, Watanabe M, Sakaguchi H, Kasahara K, Morimoto N: Role of IL-12 receptor β 2 mutations in development of atopy. *Proceedings. Allergy & Clinical Immunology International Supple 1*: 92-94. Hogrefe & Huber Publishers, Germany (2000)
- (3) Kondo N, Matsui E, Kaneko H, Fukao T, Teramoto T, Inoue R, Watanabe M, Aoki M, Kasahara K, Morimoto N: Atopy and mutations of IL-12 receptor β 2 chain gene. *Clin Exp Allergy* (in press)

2. 学会発表

- (1) 近藤直実: シンポジウム: アトピーと IL-12 受容体 β 2 鎖遺伝子異常. 日本アレルギー学会総会 (第 50 回) (2000 年 11 月 30~12 月 2 日, 横浜)
- (2) 加藤善一郎: IL-18 蛋白 3 次元立体構造と構造機能相関-Structural Rational Design of the Mutants-. 日本アレルギー学会総会 (第 50 回) (2000 年 11 月 30~12 月 2 日, 横浜)
- (3) 渡辺みづほ: アレルギー患者における IL-18 receptor の polymorphism 特に del CAG について. 日本アレルギー学会総会 (第 50 回) (2000 年 11 月 30~12 月 2 日, 横浜)

図1 IL-12,IL-18 刺激によるIFN- γ 産生量

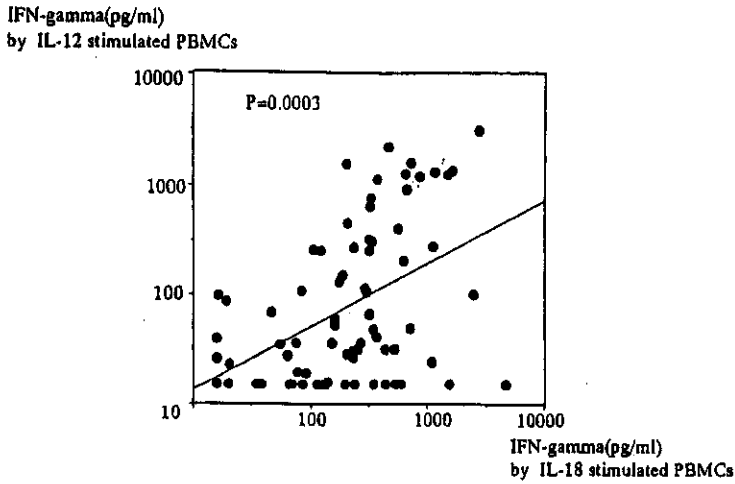


図2 IL-18 シグナリング

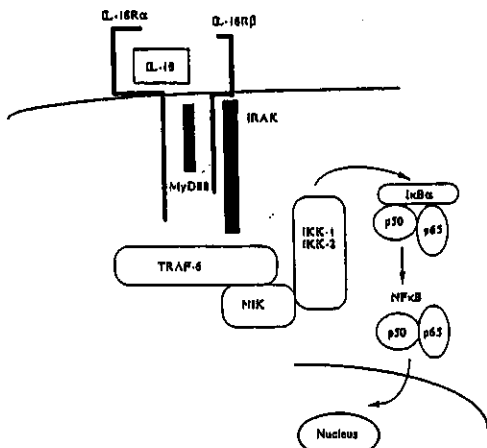


図3 IL-18R α 遺伝子のdel CAG

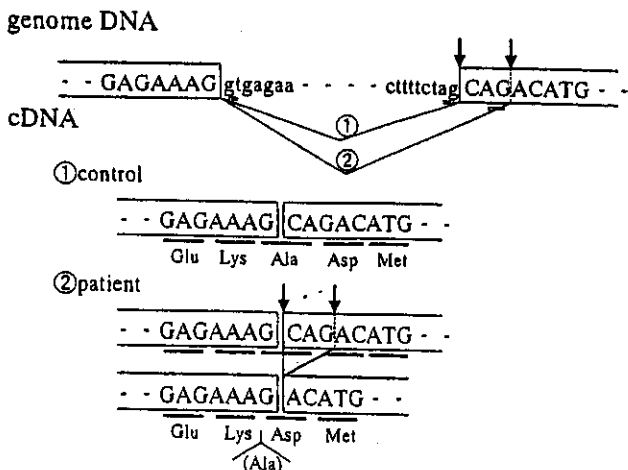


図4 IgE産生に及ぼすIL-18の影響

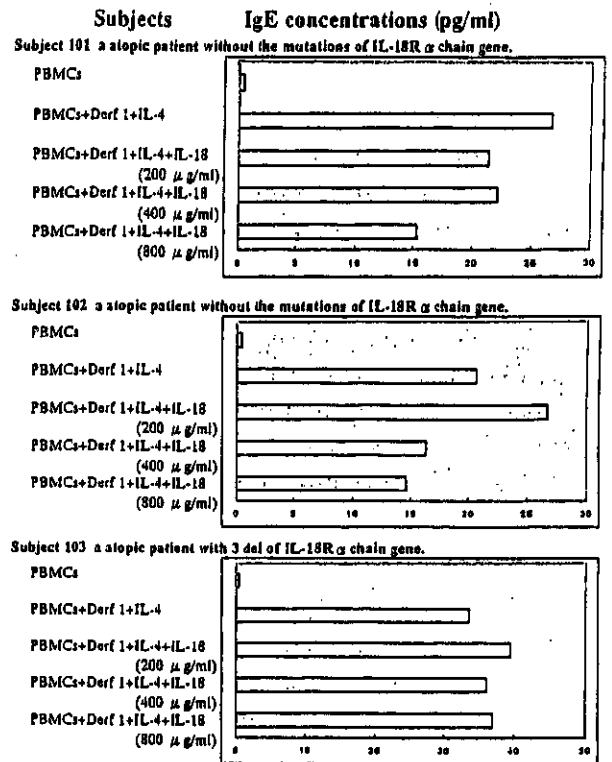


図5 del CAGの発現パターンとIL-18刺激のIFN- γ 産生

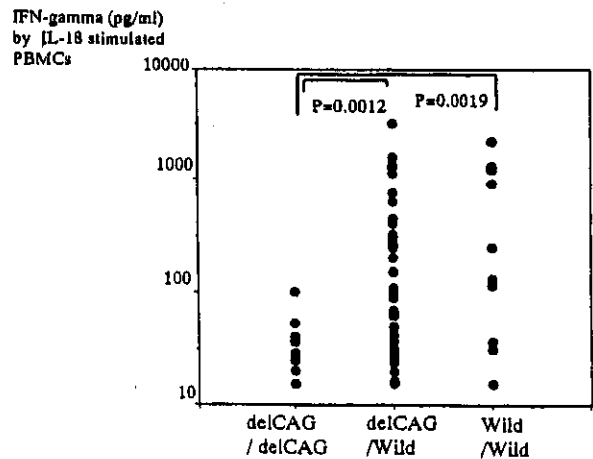


表1 del CAGの発現パターンとアレルギー患者との関係

	del CAG/ del CAG	del CAG/Wild	Wild/Wild	total
control	2	30	9	41
allergy	9	26	4	39
	11	56	13	80

chi-square test for independence
p=0.0366