

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 柳原 行義

平成14(2002)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<br>柳原行義                                | 1  |
| II. 分担研究報告書  |    |
| 1. AID遺伝子多型とアトピー性疾患との関連について<br>柳原行義                              | 4  |
| 2. インターロイキン13 (IL-13) の遺伝的多型 (R110Q) の機能的<br>影響に関する検討<br>出原賢治    | 7  |
| 3. 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<br>－即時型アレルギーとIL-18：遺伝子多型の解析<br>田中敏郎 | 10 |
| 4. アトピー原因遺伝子の同定とその機能解析－特にその構造<br>生物学的、遺伝子生態学的検討－<br>近藤直実         | 13 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表<br>(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基礎免疫研究部長

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AID遺伝子多型、IL-13の110Arg型とGln型の各リコンビナント蛋白質の機能、IL-18遺伝子多型、IL-18Rα遺伝子異常およびIFN-γR1遺伝子異常などを中心に検討すると共に、アレルギ関連遺伝子の相互作用を推定する解析モデルについても作成を試みた。AID構造遺伝子にはアトピー喘息と関連している465C/T多型が存在することを新規に同定した。喘息患者で頻度が高いIL-13のGln型は、Arg型に比べて、おとり受容体であるIL-13Rα2に対する親和性やIL-13Rα2を介する取り込み能が低値を示すので、Gln型は生体内におけるIL-13濃度の上昇に寄与していることが明らかとなった。IL-18構造遺伝子における105A/C多型はアトピー性皮膚炎との連鎖傾向が認められたが、皮膚炎モデルマウスであるNC/NgaマウスにはIL-18遺伝子の多型は検出されなかった。一方、IgEの過剰産生にはIL-18Rα cDNAにおける950 del CAGが関与しており、またこの発現調節には温度変化が関与していること、またIL-18Rαの下流に位置するIFN-γR1構造遺伝子にはアトピー患者に極めてユニークなミスセンス変異が存在することも判明した。さらに、今までに同定されたアレルギ関連遺伝子の変異間の相互作用を推定する解析モデルも作成した。

### 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

白川太郎 京都大学大学院医学研究科健康増進行動学分野教授、理化学研究所遺伝子多型センター遺伝子多型機能相関チームリーダー  
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  
青木美奈子 岐阜大学医学部小児科  
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  
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  
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

釣木澤尚美 国立相模原病院臨床研究センター  
谷口正実 国立相模原病院臨床研究センター室長  
森 晶夫 国立相模原病院臨床研究センター部長  
海老澤元宏 国立相模原病院臨床研究センター部長  
長谷川真紀 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副センター長  
高橋一夫 横浜市立大学医学部皮膚科講師  
寺本貴英 岐阜大学医学部小児科  
田中洋子 岐阜大学医学部小児科  
大西秀典 岐阜大学医学部小児科  
橋本和幸 岐阜大学医学部小児科  
李 愛蓮 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の多くの遺伝子は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

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、今までに、Iε、Cε、STAT6、IL-4レセプターα鎖 (IL-4Rα)、IL-12レセプターβ2鎖 (IL-12Rβ2)、IL-18レセプターα鎖 (IL-18Rα)、IL-13、IL-18およびLTC4合成酵素などの遺伝子の多型や変異を解析した。これらのうち、STAT6遺伝子3'非翻訳領域における2964 A/G多型、IL-4Rα遺伝子における50Ile-Val多型およびIL-12Rβ2遺伝子における2496 del 91およびIL-18Rα遺伝子における950 del CAGがアトピー患者と関連しており、またIL-13遺伝子における110Arg-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-4Rα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-4Rα50Ile型はIL-4によるSTAT6の活性化の増強に、IL-4Rα50Val型はrecombination-activating gene (RAG) の発現増強に、またIL-12Rβ2遺伝子異常は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、activation-induced cytidine deaminase (AID) 遺伝子多型、IL-13の110Arg型とGln型の各リコンビナント蛋白質の機能、即時型アレルギーにおけるIL-18の役割、IL-18遺伝子多型、IL-18Rα遺伝子異常およびIFN-γレセプター1 (IFN-γR1) 遺伝子異常などについて、多角的な検討を行った。さらに、全ゲノムに存在するsingle nucleotide polymorphism (SNP) を対象にしてアレルギー関連遺伝子を検索すると共に、遺

伝子相互作用を推定する解析モデルについても作成を試みた。

## C. 研究成果

### 1) AID遺伝子多型とアトピー性疾患との関連について (柳原行義)

B細胞特異的な発現を示すAIDは、クラススイッチに重要な働きをしているRNA編集酵素である。正常者B細胞を用いてAID発現とIgEクラススイッチとの関係を調べてみると、IL-4またはIL-13と抗CD40抗体の共刺激により、AID mRNAの発現に続いて、IgEクラススイッチが誘導された。また、AID mRNAの発現はIL-4とIL-13の共有受容体であるIL-4Rαの50Ile-Val多型の影響を受け、50Ile型では50Val型に比べて有意に増強されることが明らかとなった。AID構造遺伝子の多型については、エクソン4にのみ465C/T多型が存在することを新規に同定した。このTアリル頻度はアトピー喘息患者では正常者に比べて高い値を示したが、アトピー性皮膚炎患者では差は認められなかった。IL-4Rαの50Ile-Val多型は抗体可変部のV(D)J組換えに関わるRAGの発現にも調節的に作用し、またこのRAG発現は皮膚炎患者で頻度が高い50Val型によって増強され、その結果IgE抗体の多様性が獲得されることについては、昨年報告した。一方、喘息患者で頻度が高い50Ile型はAIDの発現を増強し、またAID構造遺伝子の465Tアリル頻度も高いので、このTアリルはアトピー型喘息における高IgE血症と関連していると考えられた。

### 2) IL-13の110Arg-Gln多型の機能的影響に関する検討 (出原賢治)

IL-13は喘息の重要なエフェクター分子の1つであり、またIL-13の110Arg-Gln多型におけるGln型は喘息患者で頻度が高い遺伝型である。IL-13の110Arg-Gln多型の機能を解析するために、Arg型とGln型の各リコンビナント蛋白質を作成して、まずIL-13Rα1やIL-13Rα2発現細胞を用いて結合実験を行った。IL-13Rα1に関してはArg型とGln型の間には親和性に差異は認められなかったが、おとり受容体として考えられているIL-13Rα2に対する親和性はArg型>Gln型であった。また、IL-13Rα2を介するIL-13の取り込み能もGln型ではArg型に比べて低値を示した。次に、ヒト血漿中での安定性について検討したところ、Gln型ではArg型に比べて半減期の延長が認められた。同様な結果はArg型とGln型の

IL-13を投与したマウスを用いても得られた。また、喘息患者における血中IL-13レベルはGln型の方が高値を示したので、生体内においてもGln型はArg型よりも安定型で存在することは明らかである。以上の知見は、Gln型のIL-13ではIL-13R $\alpha$ 2との相対的低親和性が生体内でのIL-13濃度の上昇に寄与していることを示しており、またIL-13の110Arg-Gln多型は喘息の遺伝因子として機能していると考えられた。

### 3) 即時型アレルギーとIL-18: 遺伝子多型の解析 (田中敏郎)

IL-18はIL-12共存下ではTh1細胞の分化を促進するが、単独ではTh2細胞の分化を促進すると共に、マスト細胞/好塩基球からのヒスタミン遊離やIL-4/IL-13産生および好酸球からのIL-8産生なども誘導する。また、アトピー型喘息患者やアトピー性皮膚炎患者では血中IL-18の増加が認められるので、IL-18は病態形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。そこで、まず昨年同定したIL-18構造遺伝子105A/C多型の連鎖解析を行った。この多型のCアリル頻度は正常者では13.3%、喘息患者では18.5%、皮膚炎患者では21.2%であり、疾患では高い傾向を示したが、有意な連鎖は認められなかった。次に、皮膚炎モデルマウスであるNC/Ngaマウスを用いて、血中IL-18の推移を検討したところ、皮膚炎発症前においてもそのレベルは著しく上昇していた。このマウスに発症前からフラボノイドを投与すると、皮膚炎症状や経皮水分喪失量などが強く抑制された。フラボノイドの作用機序としては、カルモジュリン依存性のカルシニューリンやNFATの活性化抑制が関与していることが明らかになった。NC/Ngaマウスでは、ヒトとは異なり、IL-18遺伝子の多型は検出されなかった。

### 4) アトピー原因遺伝子の構造生物学的、遺伝子生態学的検討 (近藤直実)

IgEの過剰産生にはIL-12R $\beta$ 2やIL-18R $\alpha$ などの抑制系の遺伝子異常が関与しており、実際これらの遺伝子異常はIFN- $\gamma$ 産生不全の症例と関連していた。しかし、IL-12とIL-18との間にはIFN- $\gamma$ 産生調節に解離を示す症例が認められ、このような症例ではalternative splicingによるIL-18R $\alpha$  cDNAの異常 (950 del CAG) が同定できた。このdel CAGの頻度はアトピー患者では正常者に比べて有意に高く、またdel CAGをもつ症例ではIL-18によるIFN- $\gamma$ 産生は有意に

低下していた。さらに、del CAGの発現は37°Cの細胞培養では誘導されるが、30°Cでは一部解除されることも判明した。このことはdel CAGの発現調節に温度変化が関与していることを示している。一方、IL-18とIL-18R $\alpha$ との結合様式を解析すると、ミスセンス変異によるアミノ酸荷電の変化により結合力を消失することが明らかになった。また、IL-12R $\beta$ 2やIL-18R $\alpha$ の下流に位置するIFN- $\gamma$ R1の構造遺伝子には、アトピー患者に極めてユニークなミスセンス変異が同定された。以上の知見から、IgE産生の抑制系の破綻には、IL-12R $\beta$ 2、IL-18R $\alpha$ およびIFN- $\gamma$ R1などの遺伝子異常の相互作用が密接に関わっていると考えられた。

### 5) 全ゲノムSNPスクリーニングによるアレルギー遺伝子の解析 (白川太郎)

全ゲノムに存在するSNPとアレルギー疾患との関連については、今までにマイクロサテライトマーカーを用いた家系解析が行われてきた。しかし、このような連鎖解析の手法ではマーカーや家系の選定などに問題があり、実際この手法ではアレルギー関連遺伝子はまだ1つも同定されていないのが現状である。一方、最近では連鎖不平衡の原理を用いたSNPのcase-control studyが注目されているので、この手法を用いて関連遺伝子の解析を試みた。小児喘息患者における全ゲノムの20万SNPを対象にして、今までにゲノムスクリーニングで報告された候補遺伝子座を中心に、既知遺伝子のみならず、未知遺伝子の検索も行った。また、アレルギーは多因子疾患であるので、今までに同定された遺伝子内の変異がどのように相互作用しているのかという点を明らかにするために、遺伝子相互作用を推定する解析モデルを作成した。

### D. 結論

多因子疾患であるアレルギーの発症や病態形成には、少なくともIL-4R $\alpha$ 、AID、IL-13、IL-12R $\beta$ 2、IL-18R $\alpha$ およびIFN- $\gamma$ R1などの遺伝子の多型や異常が関与していることが明らかになった。現在、全ゲノムの20万SNPを対象にして未知の関連遺伝子についても検索を行っているので、さらに多くの関連遺伝子が同定されると期待される。また、遺伝子相互作用を推定する解析モデルはアレルギー疾患の複雑な病態形成の解明に大きく寄与すると考えられた。

## AID遺伝子多型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基礎免疫研究部長

研究要旨：AID (activation-induced cytidine deaminase) は免疫グロブリンのクラススイッチに重要な働きをしているRNA編集酵素である。今回、AIDとIgEクラススイッチとの関係を検討すると共に、AID構造遺伝子の多型とアトピー性疾患との関連についても検討した。IL-4やIL-13応答性のB細胞は抗CD40抗体の存在下でAID mRNAの発現を伴ってmature C $\epsilon$  mRNAを発現した。AID mRNAの発現誘導はIL-4R $\alpha$  50Ile-Val多型の影響を受け、50Ile型では50Val型に比べて有意に増強された。また、AID構造遺伝子には155Hisのサイレント変異である465C/T多型が存在することを新規に同定した。この多型のTアリル頻度は、アトピー性疾患のうち、IL-4R $\alpha$  50Ile型の頻度が高い喘息患者において高値を示した。したがって、IL-4R $\alpha$  50Ile型によるIgE産生の増強には、既知のSTAT6の活性化増強に加えて、AIDの発現増強が関与していると考えられた。以上の結果から、AID構造遺伝子の465Tアリルはアトピー型喘息における高IgE血症と関連している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

AID (activation-induced cytidine deaminase) はB細胞に特異的に発現されるRNA編集酵素であり、また免疫グロブリンのクラススイッチに重要な働きをしていることが示されている。実際、AID構造遺伝子(第12染色体p13)の変異は常染色体劣性高IgM症候群の原因となっていることが明らかにされている。今回、AIDの発現誘導とIgEクラススイッチとの関係について検討を行うと共に、AID構造遺伝子の多型の有無のみならず、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、アトピー型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(PBMC)か

らnegative selectionによりB細胞を分離した。IL-4R $\alpha$ やIL-13R $\alpha$ 1発現細胞およびIL-4やIL-13結合性細胞はFACSで解析した。AID、germline C $\epsilon$ およびmature C $\epsilon$ の各mRNAの発現はRT-PCRで解析した。また、PBMCからDNAを抽出した後、AID構造遺伝子の各エクソンに特異的なプライマーを用いてPCRを行い、direct sequence法により塩基配列を解析した。

### C. 結果

正常者B細胞におけるIL-4R $\alpha$ 発現細胞は約95%、IL-13R $\alpha$ 1発現細胞約10%であり、またIL-4やIL-13との結合実験においても同様な結果が得られた。IL-4やIL-13応答性のいずれの細胞も抗CD40抗体との共刺激によってgermline C $\epsilon$ 、AIDおよびmature C $\epsilon$ の順にmRNAを発現した。しかし、IL-4、IL-13あるいは抗CD40抗体の単独刺激ではAID mRNAのみならず、mature C $\epsilon$  mRNAも発現されなかった。一方、IL-4と抗CD40抗体によるAID mRNAの発現はアトピー候補遺伝子の1つであるIL-4R $\alpha$ の50Ile-Val多型の影響を受け、50Ile型では50Val型に比べ

て有意な増強が認められた。AID構造遺伝子の多型については、エクソン1~5のうち、エクソン4にのみ465C/T多型が存在したが、これは155Hisのサイレント変異であった。このTアレル頻度はアトピー型喘息患者では正常者に比べて高い値を示したが、アトピー性皮膚炎と正常者との間には差は認められなかった。

#### D. 考察

本研究では、IgEクラススイッチにおけるAIDの役割を検討すると共に、AID構造遺伝子の多型とアトピー性疾患との関連についても検討した。その結果、AIDはgermline C $\epsilon$ 転写とIgEクラススイッチの中間段階で発現されること、AIDの発現はIL-4R $\alpha$  50Ile-Val多型によって調節されること、またAID構造遺伝子には155Hisのサイレント変異である465C/T多型が存在することが明らかとなった。この465C/T多型のTアレル頻度は、アトピー性疾患のうち、喘息患者においては正常者に比べて高い値を示したが、皮膚炎患者と正常者との間には有意な相違は認められなかった。興味あることに、喘息患者で頻度が高いIL-4R $\alpha$ の50Ile型は皮膚炎患者で頻度が高い50Val型に比べてAIDの発現を有意に増強した。すでに報告したように、50Ile型はgermline C $\epsilon$ 転写とIgEクラススイッチの増強に関与しているのに対して、50Val型は抗体可変部遺伝子のV(D)J組換えを媒介するRAGの発現増強に関与している。

以上の結果から、AID構造遺伝子の465Tアレルはアトピー型喘息における高IgE血症と関連している可能性が示唆された。

#### E. 結論

AID構造遺伝子にはアトピー型喘息と関連している465C/T多型が存在することを新規に同定した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ikizawa K, Kajiwara K, Izuhara K, Yanagihara Y : PKC $\delta$  and  $\zeta$  mediate IL-4/IL-13-induced germline  $\epsilon$  transcription in human B cells: a putative regulation via PU.1 phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 34-41,

2001.

- 2) Koshio T, Kajiwara K, Ikizawa K, Nakagami K, Yanagihara Y : Blocking the CD154-CD40 interaction with anti-CD154 antibody differentially regulates interleukin-4 synthesis in T cells and IgE production in B cells. *Allergol. Int.* 50: 35-41, 2001.
- 3) Kajiwara K, Ra C, Yanagihara Y : Recombinant soluble form of the high-affinity IgE receptor  $\alpha$  subunit and anti-IgE antibody inhibit IgE synthesis by IgE-expressing B cells through distinct pathways. *Allergol. Int.* in press.
- 4) 柳原行義 : サイトカイン阻害薬. アレルギーマニゲーター pp. 166-167, 2001.
- 5) 柳原行義 : IgE. アトピー疾患用語ハンドブック p. 184, 2001.
- 6) 柳原行義 : アトピー性皮膚炎患者の成熟B細胞におけるRAG発現. *臨床免疫* 36: 541-546, 2001.
- 7) 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* 8: 762-767, 2001.
- 8) 柳原行義 : IgE産生機構に関する最近の話題. *アレルギー科* 12: 92-99, 2001.
- 9) 柳原行義 : IgE産生誘導とその制御. *Progress in Medicine* 20: 2598-2607, 2001.
- 10) 柳原行義 : IgE抗体研究の進展. *新世紀のアレルギー* 8: 7-9, 2001.
- 11) 前田尚子, 柳原行義 : T細胞. *治療学* 35: 487-490, 2001.
- 12) 前田尚子, 柳原行義 : 炎症性サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-13). *日本臨床* 59: 1894-1899, 2001.
- 13) 柳原行義, 羅 智靖 : 可溶性Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ によるIgE産生抑制. 別冊・医学のあゆみ-アレルギーの分子医学的究 pp. 71-75, 2002.
- 14) 柳原行義 : アトピー体質と遺伝. *アレルギー・免疫* 9: 74-80, 2002.
- 15) 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
- 16) 柳原行義 : アトピー遺伝子の同定とその機能解析. *アレルギー・免疫* 印刷中

##### 2. 学会発表

- 1) Ikizawa K, Izuhara K, Yanagihara Y. PKC $\delta$  and

- ζ mediate STAT6-independent signaling of IL-4/IL-13 in human B cells. 11th International Congress of Immunology, 2001.
- 2) 柳原行義. 抗アレルギー剤の基礎と分類. 第10回小児臨床薬理・アレルギー免疫研究会, 2001.
  - 3) 生澤公一、梶原景一、出原賢治、柳原行義. IL-4/IL-13によるgermline Cε transcriptの発現誘導におけるPKCδおよびζの役割. 第31回日本免疫学会, 2001.
  - 4) 梶原景一、生澤公一、出原賢治、柳原行義. 成熟B細胞におけるIL-4応答性細胞とIL-13応答性細胞の機能解析. 第31回日本免疫学会総会学術集会, 2001.
  - 5) 前田尚子、梶原景一、品澤美樹、秋山一男、柳原行義. HaCaT細胞におけるTARC産生に対するTh1, Th2サイトカインの影響. 第51回日本アレルギー学会総会, 2001.
  - 6) 生澤公一、梶原景一、品澤美樹、柳原行義、出原賢治. IL-4/IL-13によるgermline Cε mRNAとCD23b mRNAの発現誘導におけるPKC依存性の差異. 第51回日本アレルギー学会総会, 2001.
  - 7) 梶原景一、生澤公一、品澤美樹、柳原行義、出原賢治. IL-4反応性B細胞とIL-13反応性B細胞における機能発現の比較検討. 第51回日本アレルギー学会総会, 2001.
  - 8) 柳原行義、梶原景一、品澤美樹、森嶋大貴、生澤公一、前田尚子、釣木澤尚美、森 晶夫、谷口正実、秋山一男. B細胞にCD40リガンド(CD40L)の発現が認められた高IgE血症の1例. 第51回日本アレルギー学会総会, 2001.
  - 9) 品澤美樹、梶原景一、生澤公一、秋山一男、柳原行義、海老澤元宏、高橋一夫. Activation-induced cytidine deaminase (AID) 遺伝子の多型解析. 第51回日本アレルギー学会総会, 2001.
  - 10) 森嶋大貴、梶原景一、森 晶夫、釣木澤尚美、谷口正実、長谷川眞紀、秋山一男、柳原行義. 気管支喘息患者におけるIL-13産生とIL-13プロモーター領域遺伝子多型. 第51回日本アレルギー学会総会, 2001.
  - 11) 山田一恵、宇理須厚雄、各務美智子、森田豊、寺西映子、近藤康人、柘植郁哉、柳原行義、鳥居新平. 鶏卵アレルギー寛解群と非寛解群との間での末梢血単核球のIL-4とIFN-γ産生能の比較. 第51回日本アレルギー学会総会, 2001.
  - 12) 柳原行義. IgE産生とアレルギー性炎症におけるサイトカインの役割. 第20回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2002.
  - 13) 柳原行義. IgE制御の基礎と臨床. 第14回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2002.
  - 14) 釣木澤尚美、柳原行義、梶原景一、橋本直方、関根健太郎、森 晶夫、大友 守、谷口正実、前田裕二、長谷川眞紀、秋山一男. 著明な高IgE血症を示した一例. 第14回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2002.
  - 15) 于 彬、古賀哲也、占部和敬、師井洋一、前田尚子、柳原行義、古江増隆. ケラチノサイトと線維芽細胞のTARC産生に及ぼすIL-4、IL-13、TNF-α、IFN-γの影響. 第14回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2002.
  - 16) 山田一恵、宇理須厚雄、各務美智子、森田豊、寺西映子、近藤康人、柘植郁哉、柳原行義、鳥居新平. 鶏卵アレルギー非寛解児末梢血単核球からのPepsin処理Ovomucoidによるサイトカイン産生. 第14回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2002.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし
- 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、長谷川眞紀、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）



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。一昨年我々は 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。昨年よりアルギニン、グルタミンの両方の型の IL-13 を発現、精製して解析を進めた結果、グルタミン型の IL-13 はアルギニン型の IL-13 に比べて、生体内での IL-13 レベルを高くすると考えられた。このことから、IL-13 遺伝子上の遺伝的多型 (R110Q) は機能的な遺伝因子であると考えられた。

### A. 研究目的

本研究においては、アレルギー疾患の発症、病態形成に関与する遺伝的多型を同定し、その機能を解析して、アレルギー疾患に対する罹患の予防、あるいは治療の開発に役立てることを目指している。一昨年、我々はアレルギー疾患の発症に重要な役割を持つインターロイキン 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た。遺伝学的解析により、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型の頻度が高くなっており、この遺伝的多型が気管支喘息と関連することを見出した。さらに昨年より、この遺伝的多型の機能的影響について検討を行っていた。

### B. 研究方法

アルギニン型とグルタミン型の両方のリコンビナントタンパク質を大腸菌に発現させ、精製した。これらを用いて、2種類の IL-13 レセプターである IL-13 レセプター $\alpha$ 鎖 1 (IL-13R $\alpha$ 1) と IL-13R $\alpha$ 2 との結合能を解析するとともに、リコンビナントタンパク質自身の安定性についても解析を行った。さらに、遺伝型と血中 IL-13 レベルについても解析を行った。

### C. 研究結果

IL-13R $\alpha$ 1 と IL-4 レセプター $\alpha$ 鎖より成るレセプターに対しては、アルギニン型とグルタミン型はほぼ同じ解離定数 (K<sub>d</sub>) を示し、親和性に差異は認められなかった。しかし、IL-13R $\alpha$ 2 に対しては、グルタミン型の K<sub>d</sub> はアルギニン型の K<sub>d</sub> の約 1.5 倍で、グルタミン型はアルギニン型に比べて IL-13R $\alpha$ 2 との親和性が低いことを示していた。

IL-13R $\alpha$ 2 は細胞内部分が短いシグナルを伝えない“おとりレセプター”であると考えられている。実際に、IL-13R $\alpha$ 1 と IL-13R $\alpha$ 2 の両方を細胞表面上に発現させると、IL-13R $\alpha$ 1 を介する IL-13 シグナルの伝達が阻害された。生体内での IL-13R $\alpha$ 2 の役割として、局所 IL-13 のクリアランス機能が考えられるため、IL-13R $\alpha$ 2 発現細胞と IL-13 を混合して IL-13 を結合させた後、残存している IL-13 レベルを解析した。その結果、IL-13R $\alpha$ 2 により IL-13 はクリアランスされ、この際にグルタミン型はアルギニン型よりクリアランスされにくいことが半明した。

次にアルギニン型とグルタミン型のタンパク質としての安定性を検討するために、まずヒト血漿中における IL-13 活性を *in vitro* で解析した。ヒト血漿中では IL-13 活性は時間とともに低下していくが、グルタミン型の半減期はアルギニン型の半減期は約 1.5 倍に延長していた。またマウスに IL-13 を投与してマウスの血中における IL-13 レベルを解析したところ、投与 1 時間後の IL-13 レベルが、アルギニン型に比べてグルタミン型は約 1.5 倍の高値を示した。

さらに、遺伝型と血中 IL-13 レベルとの関連を解析したところ、特に気管支喘息患者において、グルタミン型の方はアルギニンの方に比べて血中 IL-13 レベルが高くなる傾向を示した。

### D. 考察

グルタミン型の IL-13 は、プレーキ役の IL-13R $\alpha$ 2 との結合が弱くなることにより、生体内ではグルタミン型の方がアルギニン型に比べて局所の IL-13 濃度が高くなると考えられた。またタンパク質の安定性においてもグルタミン型の方がアルギニン型に比べて高くなっており、全身的な IL-13 濃度が高くなると考えられた。実際にグルタミン型

の遺伝型の方はアルギニン型の方に比べて血中の IL-13 レベルが高くなっていた。これらの事より、グルタミン型の IL-13 は生体内における IL-13 濃度を高めるというユニークな機序を持っていると考えられた。さまざまな原因により IL-13 が産生された場合、グルタミン型の方は IL-13 レベルが高くなって気管支喘息に罹患しやすくなるか、あるいは気管支喘息が重症化しやすくなると考えられた。

## E. 結論

グルタミン型の IL-13 はアルギニン型の IL-13 に比べて、生体内での IL-13 レベルを高くすると考えられた。このことから、IL-13 遺伝子上の遺伝的多型 (R110Q) は機能的な遺伝因子であると考えられた。これは、個人のアレルギー疾患の遺伝素因を考える上で重要な発見だと思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 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(2), 75-84, 2001

2) Ohshima K, Akaiwa M, Umeshita R, Suzumiya J, Izuhara K, Kikuchi M:

Interleukin-13 and interleukin-13 receptor in Hodgkin's disease: Possible autocrine mechanism and involvement in fibrosis.

Histopathology 38(4), 368-375, 2001

3) Ikizawa K, Kajiwara K, Izuhara K, Yanagihara Y:

PKC $\delta$  and  $\zeta$  mediate IL-4/IL-13-induced germline  $\epsilon$  transcription in human B cells: a putative regulation via PU.1 phosphorylation.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 288(1), 34-41, 2001

4) Izuhara K, Arima K, Yasunaga S, Yokoi F, Sakata Y, Tanaka T, Yang Q:

The importance of interleukin-13 in the pathogenesis of bronchial asthma.

Recent Research Development, in press

5) 出原賢治:

輸血医学における分子生物学 (サイトカイン情報伝達経路における遺伝子多型とアレルギー疾患),

220-228, エフ・コピント・富士書院, 2001

6) 出原賢治:

分子生物学・免疫学キーワード辞典 第2版 (インターロイキン4, インターロイキン4レセプター, インターロイキン13),

医学書院, 印刷中

7) 出原賢治:

Annual Review 呼吸器 2002 (IL-13 をめぐって), 27-31, 中外医学社, 2002

8) 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(2):66-70, 2001

9) 出原賢治:

IL-13.

分子呼吸器病 5(2):11-17, 2001

10) 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, 于彬, 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相関.

呼吸 20(2):S18-S20, 2001

11) 湯山則子, 赤岩美奈, 松井慶子, 吉田寧, 前田都, 有馬和彦, 于彬, 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における IL-4, IL-13 による発現変動遺伝子の同定.

呼吸 20(2):S34-S35, 2001

12) 出原賢治:

インターロイキン4, 13 とアレルギー疾患の発症.

臨床病理 49(4):360-364, 2001

13) 出原賢治:

気道上皮細胞と Th2 サイトカイン.

アレルギー科 11(4):366-373, 2001

14) 出原賢治:

アレルギー疾患と遺伝子変異.

Molecular Medicine 38(5):490-495, 2001

15) 出原賢治:

IL-4, IL-13 シグナリングとアトピー遺伝子.

Pharma Medica 19(Suppl.):65-71, 2001

16) 出原賢治:

マイクロアレイを用いた気管支喘息関連遺伝子検索の試み.

アレルギー・免疫 8(10):60-64, 2001

17) 有馬和彦, 出原賢治:

気管支喘息と IL-13 遺伝子多型.

アレルギーの臨床 22(1):33-38, 2002

18)安永晋一郎、出原賢治：

アレルギーの病態における遺伝子発現変化。

臨床検査 46(2)：205-207, 2002

## 2.学会発表

1)出原賢治、有馬和彦、白川太郎：

喘息と IL-13 遺伝子多型

第51回日本アレルギー学会。2001. 10. 30.

アレルギー 50：852.

2)中尾篤人、金丸裕、鈴木龍洋、奥村康、小川秀興、

羅智靖、松倉聡、出原賢治：

TGF- $\beta$ 1 による気道上皮細胞における IL-13 誘導性  
エオタキシン発現の調節

第51回日本アレルギー学会。2001. 10. 29.

アレルギー 50：899.

3)湯山則子、赤岩美奈、松井慶子、濱崎雄平、住浪  
義則、前田都、有馬和彦、岸文雄、加藤紘、只野壽  
太郎、杉田雄二、出原賢治：

ヒト気管支上皮細胞における IL-4、IL-13 刺激によ  
る SCCA 発現の解析

第51回日本アレルギー学会。2001. 10. 30.

アレルギー 50：962.

4)生澤公一、梶原景一、品澤美樹、柳原行義、出原  
賢治：

IL-4/IL-13 による germline C $\epsilon$  mRNA と CD23 $\beta$   
mRNA の発現誘導における PKC 依存性の差異

第51回日本アレルギー学会。2001. 10. 30.

アレルギー 50：982.

5)梶原景一、生澤公一、品澤美樹、柳原行義、出原  
賢治：

IL-4 反応性 B 細胞と IL-13 反応性 B 細胞における  
機能発現の比較検討

第51回日本アレルギー学会。2001. 10. 30.

アレルギー 50：982.

6)生澤公一、梶原景一、出原賢治、柳原行義：

IL-4/IL-13 による germline C $\epsilon$  transcript の発現  
誘導における PKC $\delta$ および $\epsilon$ の役割

第31回日本免疫学会。2001. 12. 11.

日免疫総会誌 31：25.

7)梶原景一、生澤公一、出原賢治、柳原行義：

成熟 B 細胞における IL-4 応答性細胞と IL-13 応答  
性細胞の機能解析

第31回日本免疫学会。2001. 12. 11.

日免疫総会誌 31：25.

8)有馬和彦、坂田資尚、HOPKIN Julian M、PURI Raj

K、白川太郎、出原賢治：

IL-13 の遺伝的多型 R110Q の機能的解析

第31回日本免疫学会。2001. 12. 11.

日免疫総会誌 31：25.

9)中尾篤人、松倉聡、出原賢治、奥村康、小川秀興、  
羅智靖：

気道上皮細胞におけるインターロイキン 13 誘導性エ  
オタキシン産生のトランスフォーミング成長因子ベ  
ータによる調節機序の解析

第31回日本免疫学会。2001. 12. 11.

日免疫総会誌 31：31.

10)関則靖、鈴木渉、林克彦、出原賢治、久保允人：

IL-4 シングル依存性 GATA-3 発現によるクロマチ  
ンモデリングと Th2 細胞初期分化制御

第31回日本免疫学会。2001. 12. 11.

日免疫総会誌 31：52

11)Kenji Izuvara, Noriko Yuyama, Donna E.  
Davies, Keiko Matsui, Miyako Maeda, Ning Lu  
Yoshida, Yuji Sugita, Stephen T. Holgate：

Analysis of Novel Disease-Related Genes in  
Bronchial Asthma

Keystone symposia. 2002. 2. 11.

Keystone symposia. Rethinking of asthma：62

12)Kazuhiko Arima, Taro Shirakawa, Kenji  
Izuvara

Up-regulation of IL-13 concentration *in vivo* by  
the IL-13 variant associated with bronchial  
asthma

Keystone symposia. 2002. 2. 11.

Keystone symposia. Rethinking of asthma：56

## G. 知的所有権の取得状況

特に記載すべき事なし

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關与するサイトカインであることが示されている。喘息や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マウス NC/Nga においても、皮膚炎発症前より血清 IL-18 の上昇が観察された。Caspase1 遺伝子を過剰発現させた（結果として IL-18 の過剰発現が認められる）マウスでのアトピー性皮膚炎の発症や、NC/Nga の責任遺伝子が IL-18 の近傍に存在するという最近の報告により、ヒトと NC/Nga マウス IL-18 遺伝子の多型性や変異の検索をおこなった。マウスでは、IL-18 構造遺伝子と転写調節領域で、ヒトでは構造遺伝子の SNP の有無を、PCR-SSCP、PCR-sequencing 法にて検討したところ、マウス IL-18 遺伝子には NC/Nga 特異的変異は同定されず、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。IL-18-105A/C 遺伝子頻度は、A/A:A/C:C/C=対照で、26 : 4 : 0、喘息で、123 : 26 : 2、アトピー性皮膚炎で、26 : 6 : 1 であった。また A/A に比べて A/C もしくは C/C である場合、血清 IL-18 や IgE 値が高い傾向が観察されるも、統計学的には有意差は認められなかった。

#### A. 研究目的

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。

昨年、アトピー性皮膚炎モデルマウス NC/Nga において、発症前からの、血清 IL-18 の上昇が認められること、ヒト IL-18 構造遺伝子には、転写開始点より 105 番目の塩基に A/C の SNP が存在することを報告した。最近トランスジェニックマウスや多型性マーカーを用いた解析により、少なくともマウスでは、IL-18 がアトピー性皮膚炎の発症に必須な分子であることが示された。そこで、

本年度では NC/Nga マウスの IL-18 遺伝子には変異があるのか、またヒトの 105A/C の SNP の意義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 3-80 才、環境アレルギー陽性）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の対照から、研究の目的とその内容を説明し同意（インフォームド Consent）を得た後、末梢白血球から DNA を採取した。

##### 2. 血清 IL-18 の測定

喘息、アトピー性皮膚炎患者または対照の血清 IL-18 値を、Human IL-18 ELISA kit (MBL 社)を用いて測定した。

##### 3. ヒト及びマウスの IL-18 遺伝子の変異、

## 多型の検索

マウスでは、構造遺伝子と転写調節領域を、直接 PCR-sequencing 法にて、変異の有無をスクリーニングした。ヒトの IL-18-105A/C の SNP は、遺伝子断片を増幅後、制限酵素による切断パターンにて検討した。

(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、喘息と IL-18

成人アトピー性皮膚炎患者、喘息患者では、対照に比して血清 IL-18 値が増加していた (444pg/ml+435 n=17, 236+170 n=40, 129+64 n=31, p<0.01)。

### 2. IL-18-105A/C の遺伝子頻度と血清 IL-18、IgE との関与

IL-18-105A/C の遺伝子頻度を各群で調べたところ、A/A:A/C:C/C= 対照で 26: 4: 0、喘息で 123:26: 2、アトピー性皮膚炎で 26: 6: 1 であった。各遺伝子多型と血清 IgE 値との比較では、C/C で血清 IgE 値が高い傾向が認められた。また喘息患者を対象に、IL-18-105A/C の遺伝子頻度と血清 IL-18 値を比べると、A/C(266+118pg/ml n=8)の群では、A/A(235+169 n=42)の群に比して血清 IL-18 が高い傾向を示すも、統計学的には有意ではなかった。

### 3. NC/Nga マウスでの IL-18 遺伝子変異の検索

7つのエキソンと2つの遺伝子調節領域をPCRにて増幅後、塩基配列を検討したところ、NC/Nga に特異的な変異、多型は認められなかった。

## D. 考察

IL-18 がマウスの動物モデルにおいて、アトピー性皮膚炎の発症に関与するサイトカイ

ンであることが示されている。確かにヒトでもアトピー性皮膚炎や喘息患者でも、血清 IL-18 の上昇が認められた。IL-18 がヒトの即時型アレルギーの過剰な Th 2 分化に直接関与しているのか、発症病態における IL-18 の役割に関して、今後の検討が必須である。

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、さらに症例数を増やして、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. 喘息やアトピー性皮膚炎では、血清 IL-18 が増加している。
2. 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. Tanaka T., Y. Katada, S. Higa, H. Fujiwara, W. Wang, Y. Saeki, S. Ohshima, Y. Okuda, M. Suemura, and T. Kishimoto. 2001. 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* 13: 193-201.
2. Tanaka T., H. Tsutsui, T. Yoshimoto, M. Kotani, M. Matsumoto, A. Fujita, W. Wang, S. Higa, T. Kishimoto, K. Nakanishi, and M. Suemura. 2001. Interleukin-18 is elevated in the sera from patients with atopic dermatitis and from atopic dermatitis-model mice, NC/Nga. *Int Arch Allergy Immunol* 152: 236-240.
3. Wang W., T. Tanaka, H. Okamura, M. Sugita, S. Higa, T. Kishimoto, and M. Suemura. 2001. Interleukin-18 enhances the production of interleukin-8 by eosinophils. *Eur J Immunol* 31: 1010-1016.
4. Yokota A., M. Narazaki, Y. Shima, N. Murata, T. Tanaka, M. Suemura, K. Yoshizaki, H. Fujiwara, I. Tsuyuguchi, and T. Kishimoto. 2001.

- Preferential and persistent activation of the STAT1 pathway in rheumatoid synovial fluid cells. *J Rheumatol* 28: 1952-1959.
5. Tanaka T., K. Kouda, M. Kotani, A. Takeuchi, T. Tabei, Y. Masamoto, H. Nakamura, M. Takigawa, M. Suemura, H. Takeuchi, and M. Kouda. 2001. Vegetarian diet ameliorates symptoms of atopic dermatitis through reduction of the number of peripheral eosinophils and of PGE2 synthesis by monocytes. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 20: 353-361.
6. Yamaguchi T, S. Ohshima, T. Tanaka, S. Tsukada, M. Matsushita, S. Kohmo, T. Kanzaki, and Y. Saeki. 2001. Renal crisis due to intimal hyperplasia in a patient with mixed connective tissue disease (MCTD) accompanied by pulmonary hypertension. *Internal Med* 40: 1250-1253.
7. Matsumoto M., M. Kotani, A. Fujita, S. Higa, T. Kishimoto, M. Suemura, and T. Tanaka. 2002. Oral administration of persimmon leaf extract ameliorates skin symptoms and transepidermal water loss in atopic dermatitis-model mice, NC/Nga. *Br J Dermatol* in press
8. Higa S., H. Hirata, S. Minami, S. Hashimoto, M. Suemura, Y. Saeki, and T. Tanaka. 2002. A case of autoimmune acquired form of angioedema that responded to danazol therapy. *Internal Med* in press
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 2001. 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* 3 ; 1-10.
10. 松本元伸、小谷麻由美、藤田晃人、田中敏郎 2001. 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* 15 ; 3-7.
11. 比嘉慎二、小谷麻由美、松本元伸、藤田晃人、田中敏郎 2001. アトピー性皮膚炎と IL-18 遺伝子の多型性 *臨床免疫* 36 ; 529-534.
12. 比嘉慎二、小谷麻由美、松本元伸、藤田晃人、田中敏郎 2001. フラボノイドによる好塩基球活性化の抑制 *臨床免疫* 36 ; 910-916.

#### B. 学会発表

1. 比嘉慎二、田中敏郎、小谷麻由美、松本元伸、藤田晃人、末村正樹. フラボノイドの抗アレルギー作用 ワークショップ 第13回アレルギー学会春季臨床大会 2001、5、横浜
2. 小谷麻由美、森脇真一、藤田晃人、笹川貴代、沖田美佐子、田中敏郎、古川福実、瀧川雅浩. アトピー性皮膚炎に対する緑色野菜飲料の臨床効果 第54回日本栄養食糧学会大会 2001、5、京都
3. 平田陽彦、比嘉慎二、佐伯行彦、田中敏郎. 自己免疫性 C1 esterase inhibitor (C1INH)欠損症の1例 第51回日本アレルギー学会総会 2001、10、福岡

## アトピー原因遺伝子の同定とその機能解析—特にその構造生物学的、遺伝子生態学的検討—

分担研究者 近藤直実 岐阜大学医学部小児科・教授

研究協力者 青木美奈子 岐阜大学医学部小児科 寺本貴英 岐阜大学医学部小児科  
松井永子 岐阜大学医学部小児科 田中洋子 岐阜大学医学部小児科  
金子英雄 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 橋本和幸 岐阜大学医学部小児科  
鹿野博明 岐阜大学医学部小児科 李愛蓮 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 笠原貴美子 岐阜大学医学部小児科  
伊上良輔 岐阜大学医学部小児科 森本直子 岐阜大学医学部小児科

**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構造生物学的、遺伝子生態学的に検索した。IgE 産生調節の抑制系において IL-18 R $\alpha$  鎖 cDNA の異常は alternative splicing により発現してくること、およびその異常は温度という環境の変化により解除されることが初めて明らかになった。また、IL-18 と IL-18 R $\alpha$  との結合様式とその異常を構造生物学的に解明した。さらに IFN- $\gamma$  R1 エクソン7内に、アレルギーに極めてユニークな変異を世界で初めて見いだした。

### A. 研究目的

アレルギー疾患は、遺伝的要因と環境要因が絡み合って発症・増悪する。私共はその遺伝的要因として IgE 産生抑制系である IL-12—IFN- $\gamma$  シグナル伝達系および IL-18—IFN- $\gamma$  シグナル伝達系における遺伝子異常、特に IL-12 レセプター (R)  $\beta$  2 鎖遺伝子異常および IL-18 レセプター (R)  $\alpha$  鎖遺伝子異常を世界に先駆け明らかにしてきた (図1)。本年度はさらにこれらの異常の構造生物学的解析、ならびに環境の変化が直接的にどのように生体の遺伝子発現に影響を及ぼすか、すなわち遺伝子生態学的異常を明らかにした。さらにこれらシグナル伝達系の終末である IFN- $\gamma$  レセプター (R) 1 における新たな遺伝子異常を明らかにした。

### 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 100 万/ml

の濃度に調整し PHA、IL-12 あるいは IL-18 を添加し培養した。③24 時間培養後の上清を採取し、enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) により interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を測定した。④ゲノム DNA から IgE 産生抑制系の分子の塩基配列を検討した。⑤24 時間培養後の PBMCs から得た RNA から 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、オートシーケンサーにより塩基配列を決定した。⑥種々の環境変化がこれらの遺伝子発現に及ぼす影響を解析した。⑦さらに構造生物学的解析を行った。

(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。

### C. 研究結果

(1) 選択的な IL-18 刺激による IFN- $\gamma$  産生不全の

症例の中に IL-18R $\alpha$  鎖をコードする遺伝子の異常が見出された (del CAG) (図 2)。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。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- $\gamma$  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、さら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。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 (図 3)。さらにその発現は 37℃ の培養系では出現するが、30℃ では一部で解除されることが明らかになった (図 4)。

(2) IL-18 と IL-18 R $\alpha$  との結合様式とその異常を構造生物学的に解析した結果、ミスセンス変異により 1 つのアミノ酸の荷電が変化することにより、結合力を失うことが証明された。

(3) IFN- $\gamma$  R1 遺伝子エクソン 7 内にアレルギーに極めてユニークなミスセンス変異を見いだした。

#### D. 考察

以上から IgE 産生抑制系の遺伝子異常を構造生物学的、遺伝子生態学的に検索した。IgE 産生調節の抑制系において IL-18 R $\alpha$  鎖 cDNA の異常は alternative splicing により発現してくること、およびその異常は温度という環境の変化により解除されることが初めて明らかになった。また、IL-18 と IL-18 R $\alpha$  との結合様式とその異常を構造生物学的に解明した。さらに IFN- $\gamma$  R1 エクソン 7 内に、アレルギーに極めてユニークな変異を世界で初めて見いだした。

#### E. 結論

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構造生物学的、遺伝子生態学的に検索した。IgE 産生調節の抑制系において IL-18 R $\alpha$  鎖 cDNA の異常は alternative splicing により発現してくること、およびその異常は温度という環境の変化により解除されることが初めて明らかになった。また、IL-18 と IL-18 R $\alpha$  との結合様式とその異常を構造生物学的に解明した。

#### 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  $\beta$  2 chain gene in some atopic subjects. *Biochem Biophys Res Commun*, 266: 551-555 (1999)
- (2) 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  $\beta$  2 chain gene. *Clin Exp Allergy* 31,1189-1193 (2001)
- (3) Watanabe, M., Kaneko, H., Shikano, H., Aoki, M., Sakaguchi, H., Matsui, E., Inoue, R., Kato, Z., Kasahara, K., Fukutomi, O., Kondo, T., Kondo, N. Predominant expression of 950delCAG of IL-18R alpha chain cDNA is associated with reduced IFN-gamma production and high serum IgE level in atopic Japanese children. *J Allergy Clin Immunol* (in press)

##### 2. 学会発表

- (1) Kondo N : 国際学会シンポジウム : Clinical and genetic research of food allergy in childhood. The 9th Korea-Japan Joint Allergy Symposium (2001 November 2-3, Jeju Island, Korea)
- (2) 近藤直実 : シンポジウム : アレルギーの成立機構. 日本農芸化学会 (2001 年度) (2001 年 3 月 25 日, 京都)
- (3) 近藤直実, 松井永子, 金子英雄, 伊上良輔, 加藤善一郎, 青木美奈子, 渡辺みづほ, 坂口平馬, 鈴木清高, 田中洋子, 吉川かおり, 笠原貴美子 : シンポジウム : 喘息発症における遺伝因子と環境・感染との関わり (遺伝子生態医学). 日本アレルギー学会総会 (第 51 回) (2001 年 10 月 30 日, 福岡)



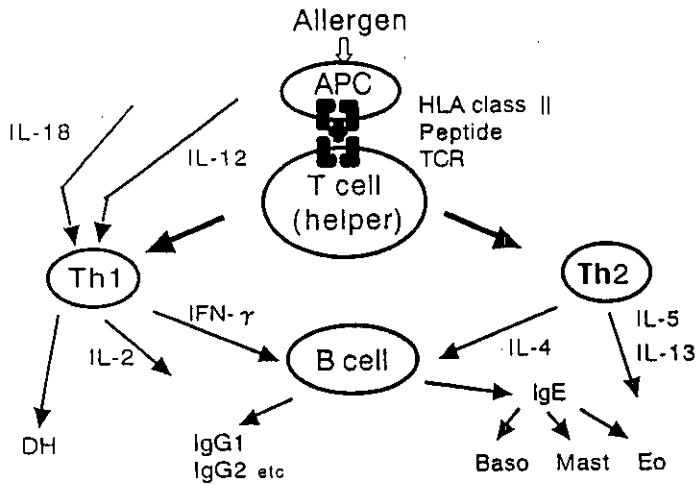


図 1

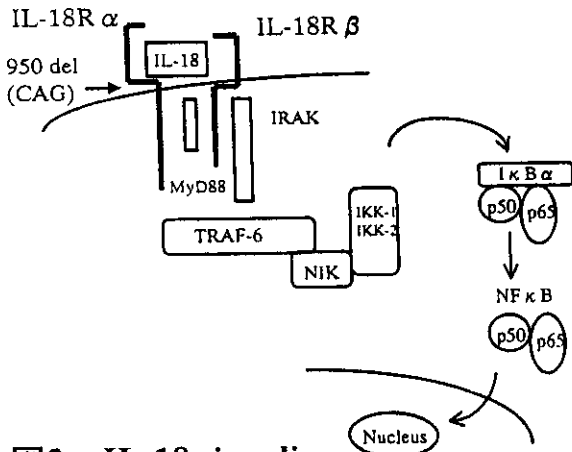


図 2 IL-18 signaling

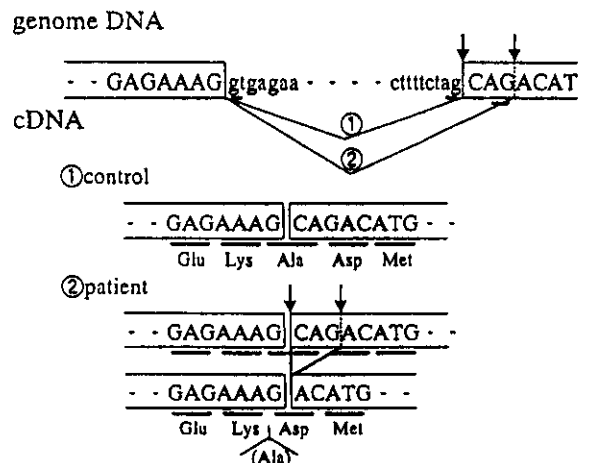


図 3 IL-18Rα の 950 del CAG

|      | Type 1                         | Type 2                     | コントロール                 |
|------|--------------------------------|----------------------------|------------------------|
| 37°C | [ 950 del CAG<br>950 del CAG ] | [ 950 CAG<br>950 del CAG ] | [ 950 CAG<br>950 CAG ] |
| ↓    |                                |                            |                        |
| 30°C | [ 950 CAG<br>950 CAG ]         | [ 950 CAG<br>950 CAG ]     | [ 950 CAG<br>950 CAG ] |
| or   |                                |                            |                        |
|      | [ 950 CAG<br>950 del CAG ]     |                            |                        |

図 4 IL-18Rα 鎖 cDNA の 950 del CAG の 培養温度による変化