

1. 論文発表

藤枝重治、他：鼻線維芽細胞におけるケモカイン産生と増殖シグナルについて. 日鼻誌 42(1): 1-7, 2003.

藤枝重治、他：線維芽細胞における炎症性サイトカインシグナル. 第2回鎌倉カンファレンス記録集 87-100, 2002

2. 学会発表

高橋昇、藤枝重治、他：Ras 変異株導入による鼻線維芽細胞における RANTES 産生および増殖の検討, 第52回日本アレルギー学会総会, 2002. 11. 横浜

藤枝重治、他：鼻線維芽細胞におけるケモカイン産生と増殖シグナルの制御をめざして, 第38回鼻科学基礎問題研究会, 2002. 9. 広島

藤枝重治：鼻茸線維芽細胞のシグナル伝達について-, 第10回細胞シグナル伝達研究会 2002. 6. 大阪

藤枝重治：線維芽細胞における炎症性サイトカインシグナル, 第2回鎌倉カンファレンス, 2002. 4. 大磯

藤枝重治：細胞内シグナルからみた好酸球の検討, ラウンドテーブル「近畿北陸 鼻アレルギー」, 2002. 2. 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)

研究報告書

花粉症の QOL による治療法の評価と新しい治療法の基礎的研究

免疫療法と鼻粘膜 T リンパ球の研究

分担研究者 岡本美孝 千葉大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学教授

研究要旨

花粉症の新しい治療法開発の基礎的研究として自然寛解および減感作療法による寛解症例の血中 IgE 抗体の変動と有症者の鼻粘膜局所でのサイトカイン産生リンパ球について検討した。

寛解には、IgE 値の低下は必要ないこと、また有症者でも鼻粘膜局所の Th1 サイトカイン産生細胞の減少は認められず、Th1, Th2 サイトカインと臨床症状の間には単純な相関はみられなかった。

A. 研究目的

代表的 I 型アレルギー疾患とされる花粉症の増加が問題となっているが、アレルギー疾患の病態の根底には Th1 サイトカイン/Th2 サイトカインの産生の dysregulation が存在することが指摘されている。このサイトカイン産生の dysregulation の是正は、花粉症の根本治療の柱となることが期待される。本年度は以下の点について検討を行った。

①スギ花粉症に対する減感作療法での特異的 IgE 値の変動について ②スギ花粉症の自然寛解症例の検討と IgE 値の変動について ③ヒト鼻粘膜における T 細胞の検討とし、アレルギーの有無による Th1, Th2 細胞の違い ④実験鼻アレルギーモデルマウスを用いての、IFN- γ 、並びに抗 IFN- γ 投与の影響

B. 研究方法

- (1) 千葉大学耳鼻咽喉科外来で、精製スギ花粉抗原（プルラン）による 1 年半の減感作療法を受けたスギ花粉症症例について、継続的な IgE 抗体の変動と臨床効果の関連を検討した。
- (2) 千葉県下の住民検診において、3 年以上スギ花粉症症状が出現していない、いわゆる「自然寛解」とされる症例について、継続的な IgE 抗体の変動も含め、種々のパラメーターについて検討した。
- (3) 手術により採取したヒト鼻粘膜よりリンパ球を分離し、CD4 抗体、CXC-R3 抗体、CDR4 抗体を用いて 3 重染色を行いフローサイトメトリーにより検討した。

アレルギーの有無により比較した。

- (4) 卵白アルブミン (OVA) を抗原とし、アラムをアジュバントとして用いて、腹腔内感作、点鼻感作を繰り返して、実験的鼻アレルギーモデルマウスを作製した。この感作マウスに、IFN- γ 、あるいは抗 IFN- γ 中和抗体を投与し、その後の OVA による誘発試験による鼻症状、好酸球浸潤について検討した。

倫理面への配慮として、患者、検診者には説明のうえ同意を得て行い、得られた情報は千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科にて保管し、プライバシーの保護を行った。

C. 結果

- (1) スギ花粉抗原を用いた減感作治療について薬物投与が不要となった著効症例と、症状の改善が認められなかった無効例と、減感作治療終了後の IgE 値の変動に差は認められなかった。
- (2) スギ花粉症の自然寛解は、40 歳代以降の中・高齢者では約 20% にみられた。自然寛解例の retrospective な検討で、特異的 IgE 値の減少は必ずしも認められなかった。
- (3) ヒト鼻粘膜中の CD4⁺陽性 CXC-R3 陽性細胞は、アレルギー性鼻炎および非アレルギー性鼻炎患者とでは差は認められなかった。一方 CD4⁺陽性 CCR4 陽性細胞は、アレルギー性鼻炎症例で有意に高値を示した。
- (4) OVA 感作マウスへの IFN- γ の投与は、誘発症状には、対照群と比較して影響は明かではなかった。鼻粘膜組織中の好酸球数は、IFN- γ 投与群で有意な増加がみられた。感作マウスへの抗 IFN- γ の投与は、誘発症状、鼻粘膜中の好酸球浸潤に影響は明かではなかった。

D. 考察

花粉症では、自然寛解を示すことが非常に少ないとされていたが、中・高年者では20%近くに自然寛解が認められた。しかし、特異的 IgE 値の減少を認めない症例も存在した。一方、治療による寛解として減感作治療による症例がみられるが、減感作治療著効例で、IgE 値あるいはその変動に差は認められなかった。減感作療法的作用機序に IgE 産生制御は必須ではなかった。他方、鼻アレルギー患者の鼻粘膜では、Th2 細胞と考えられる CCR4 陽性 CD4 細胞が、非アレルギー性鼻粘膜患者の鼻粘膜中と比較して増加がみられた。一方、Th1 細胞と考えられる CXCR3 陽性 CD4 陽性細胞は、アレルギーの有無による差は全く認められなかった。

E. 結語

- (1) 自然寛解、あるいは治療による寛解で、必ずしも血中 IgE の低下は認められず、寛解の機序については、鼻粘膜局所での詳細な検討が必要である。
- (2) アレルギー性鼻炎患者の局所鼻粘膜では Th1 細胞の減少はみられず、代表的な Th1 サイトカインである IFN- γ 投与によって症状、病態の改善は認められなかった。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：岡本美孝, アレルギー性鼻炎-最近の話題, 第52回日本アレルギー学会総会教育講演, 2002年10月
岡本美孝, 花粉症の発症から自然寛解まで, 第52回日本アレルギー学会総会シンポジウム

H. 知的財産権の出願・登録状況：なし

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業)

研究報告書

花粉症の GOL による治療法の評価と新しい治療法の基礎的研究

スギ花粉症に対する予防医学に関する研究

- IL-4R α Ile50Val および IL-4R α Arg551Gln と血清 IgE 値、発症年齢との関係 -

分担研究者 寺田修久 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科学講師

研究要旨 スギ花粉症患者を対象として、細胞外領域に存在する 50 番目のアミノ酸がバリンからイソロイシンに置換される遺伝子多型 (IL-4R α Ile50Val) および、細胞内領域に存在する 551 番目のアミノ酸がグルタミンからアルギニンに置換される遺伝子多型 (IL-4R α Arg551Gln) を解析したがいずれも健常人と比較して有意な差は認められなかった。しかし、50 番目のアミノ酸がイソロイシンホモ型を示すスギ花粉症患者は他の発現型を示す患者と比較して IgE 値が高値を示しており、また、発症年齢が低く 20 歳までに 74%が発症していた。次に遺伝子多型が 2 次発症に与える影響について検討するために 4 年前に CAPRAST でスギ花粉に対する抗体値がスコア 2 以上で未発症の症例を対象として、その後の発症の有無についてアンケート調査し、遺伝子多型との関係を調べた。4 年前に未発症であった 145 人中 38 人が発症していた。これらの症例の遺伝子多型別の発症率は、イソロイシンホモ型 47.8%、ヘテロ型 24.8%、バリンホモ型 23.2%とイソロイシンホモ型で高率に発症が認められた。以上の事実は、生後早期に IL-4R α の遺伝子多型を調べることにより将来の IgE 値の推移や発症をある程度予測できる可能性を示唆している。

A. 研究目的 アレルギー疾患の治療は対症療法から予防医学へと進化していく可能性がある。スギ花粉症は IgE を介した典型的な I 型アレルギー性疾患であり、病態成立は遺伝に立脚している。半面、抗体獲得や発症には多くの修飾因子が関与している。最近 50 年間でスギ花粉症が増加した背景には、スギ人工林の植林面積の増加や地球温暖化に起因する飛散数の増加に加えて環境汚染が大きく影響を及ぼしている。50 年程度の期間で遺伝子に変化が生じる可能性は低く、また、一卵性双生児のアレルギー疾患一致率がたかだか 50-70%であることを考慮すると、遺伝子要因よりも環境因子が最近のアレルギー疾患の増加にとって重要であると考えられる。しかし、IgE の産生が遺伝子により制御されていることは種々の報告から明らかであり、IgE 値を規定している遺伝子や遺伝子多型を研究することは新しい治療法の開発や予防医学の確立に貢献する。これまでの疫学調査の結果から、CAPRAST スコアが高くなるにつれてスギ花粉症発症率も増加すること、未発症患者のうち、RAST スコアが高値を示す症例は将来発症する確率が高いこと、などが明らかとなった。高親和性 IgE レセプタ

ー β 鎖 (Fc ϵ RI β) には遺伝子多型が存在し、細胞内ドメインの 237 番目のアミノ酸がグルタミンからグリシンに変異する SNP が気管支喘息患者で多いことが報告されている。Nagata ら (Nagata H et al. Association between nasal allergy and a coding variant of the Fc epsilon RI beta gene Glu237Gly in a Japanese population. Hum Genet 109:262-6, 2001.) は鼻アレルギーにもこの SNP が健常人よりも高率にみられることを明らかにした。健常人と鼻アレルギー全体比較した場合は 2.3%の危険率で、スギ花粉症患者との比較でも 1.3%の危険率で、グリシン型が多いことが明らかとなった。さらに CAPRAST スコアでもスコアが高い症例では抗原に関わらずグリシン型が多くみられた。一方、IL-4 受容体 α 鎖 (IL-4R α)もアトピー原因遺伝子の一つである可能性があり、喘息患者では遺伝子多型の比率が健常人と異なることが報告されている。我々はスギ花粉症患者を対象として、細胞外領域に存在する 50 番目のアミノ酸がバリンからイソロイシンに置換される遺伝子多型 (IL-4R α Ile50Val) および、細胞内領域に存在する 551 番目のアミノ酸がグルタミンからアルギニンに置換される遺伝子多型 (IL-4R α Arg551Gln) を解析した。

B. 対象および方法

1. スギ花粉患者を対象として末梢血を採取。末梢血単核球より DNA Zol で DNA を抽出したのち、PCR 法により各遺伝子を増幅し IL-4R α Ile50Val、IL-4R α Arg551Gln の多型を検討した。これらと血清 IgE 値、発症年齢との相関を検討した。

2. 二次発症と遺伝子多型との関係

4年前に CAPRAST でスギ花粉に対する抗体値がスコア 2 以上で未発症の症例を対象として、その後の発症の有無についてアンケート調査し、遺伝子多型との関係を調べた。

(倫理面への配慮) 本研究では全般にわたり、文部科学省、厚生労働省、経済産業省の三省による平成13年4月1日施行の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(以下、「倫理指針」と略す)を遵守した。また、本研究計画千葉大学倫理委員会の承認をすでに得ている。人権及び利益の保護の取扱いについて以下のごとく十分配慮する。

(1) 研究の対象となる個人の人権の擁護

本研究に参加するか否かは対象者の自由意志であり研究に参加しない場合でも不利益を受けることはないこと、一旦同意した場合でも不利益を受けることなくいつでもこれを撤回できることを明記し、対象者の人権擁護に配慮した。また、平成13年3月31日以前に千葉大学医学部附属病院およびその関連施設で受診する鼻過敏症患者および対照としての非鼻過敏症患者および健康人から採取された検体に関しては連結不可能匿名化したうえで研究に用いた。これらの検体に関しては、連結不可能匿名化して使用するため、対象者の人権擁護に配慮できる。また、本研究で得られた個人情報外部にもれることのないよう厳重に管理した。試料等は、個人識別情報管理者を設け、連結可能匿名化することにより、研究者に患者の特定ができないよう配慮した。

C. 結果 スギ花粉症患者を対象として、細胞外領域に存在する50番目のアミノ酸がバリンからイソロイシンに置換される遺伝子多型(IL-4R α Ile50Val) および、細胞内領域に存在する551番目のアミノ酸がグルタミンからアルギニンに置換される遺伝子多型(IL-4R α Arg551Gln)

を解析したがいずれも健康人と比較して有意な差は認められなかった。しかし、50番目のアミノ酸がイソロイシンホモ型を示すスギ花粉症患者は他の発現型を示す患者と比較して IgE 値が高値を示しており、また、発症年齢が低く 20 歳までに 74%が発症していた。次に遺伝子多型が2次発症に与える影響について検討するために4年前に CAPRAST でスギ花粉に対する抗体値がスコア 2 以上で未発症の症例を対象として、その後の発症の有無についてアンケート調査し、遺伝子多型との関係を調べた。4年前に未発症であった145人中38人が発症していた。これらの症例の遺伝子多型別の発症率は、イソロイシンホモ型47.8%、ヘテロ型24.8%、バリンホモ型23.2%とイソロイシンホモ型で高率に発症が認められた。

D. 考察 以上の事実は、生後早期に Fc γ RI β や IL-4R α の遺伝子多型を調べることにより将来の IgE 値の推移や発症をある程度予測できる可能性を示唆している。しかし、アレルギー性鼻炎は多因子疾患であり、1-2個の遺伝子多型をもとに予防医学の理論的根拠を構築するのには無理がある。今後、喘息など他のアトピー性疾患で注目されている CCR-3、CCR-4、IL-13、CRTH2 などの遺伝子多型とスギ花粉症との関係、発症時期との関係について検討し、感作・発症に関して重要な遺伝子多型を絞り込む必要がある。近未来ではハイリスク群に関しては CAPRAST 検査施行時に遺伝子多型検査も行い、高 IgE 値や早期発症が予想される場合には、スギ花粉からの徹底した回避の他、発症前の予防治療も視野に入れる必要がある。大橋ら(大橋淑宏、中井義紀、鷺尾有司 免疫療法によるスギ花粉症の発症予防 アレルギー科 11:185-192,2001.) は、無症候性スギ花粉症患者に対する予防的減感作療法がスギ花粉症の発症を有意に予防する事を報告している。今後免疫療法は従来の皮下あるいは皮内投与の減感作治療から、より侵襲や副作用が少ない舌下減感作治療、ペプチド治療、抗 IgE 抗体やサイトカイン抗体を用いた新規治療に発展して、予防医学の中心的存在となる可能性が高いと思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 学会発表

Terada N. New axis of the lymphocytes/eosinophils in allergic rhinitis - from basic research to therapy to clinical application. 5th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology and 7th West Pacific Allergy Symposium, Seoul, Korea, 2002/10.

寺田修久、牛来茂樹、今野昭義、出原賢治 IL-4 受容体遺伝子多型がスギ花粉症発症に与える影響 第 102 回日本耳鼻咽喉科学会総会 東京 2002/5.