

厚生労働科学研究研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

アレルギー疾患の遺伝要因と環境要因の
相互作用に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 出原 賢治

平成15(2003)年3月

厚生労働省

目次

I. 総括研究報告	
アレルギー疾患の遺伝要因と環境要因の相互作用に関する研究	1
出原 賢治	
II. 分担研究報告	
1. アレルギー疾患とダイオキシンとの関連性に関する検討	4
出原 賢治	
2. 全ゲノム SNP 解析によるアレルギー疾患関連遺伝子解析	8
白川 太郎	
3. B 細胞における Toll-like receptor の発現とその機能解析	10
柳原 行義	
4. アレルギー発症に関わる遺伝子・分子とそれに及ぼす環境因子の影響	13
近藤 直実	
5. IL-18、 β 2 アドレナリン受容体、SOCS3 遺伝子の多型；アレルギー疾患発症における環境要因との相互作用に関する研究	16
田中 敏郎	
6. 環境要因が喘息の気道リモデリングに与える影響についての検討	19
中尾 篤人	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	21

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）

アレルギー疾患の遺伝要因と環境要因の相互作用に関する研究

総括研究報告書

主任研究者 出原 賢治

佐賀医科大学医学部分子生命科学講座教授

研究要旨 気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患は遺伝要因と環境要因とが複雑に組み合わさって生じると考えられている。近年両方の要因に関する解析が進んできたが、両者の相互作用については不明な点が多い。本研究の目的は、従来独立してなされていた遺伝要因と環境要因の解析を組み合わせることにより両方の要因の相互作用について解明を進めることである。本年度においては、遺伝要因の同定とそれらの機能解析に関しては理研 SRC で開発された high through-put assay を用いた網羅的遺伝子解析と IL-18、β2 アドレナリン受容体、IL-12 レセプターβ2 鎖、IL-18 レセプターα鎖遺伝子を対象とした候補遺伝子解析を進めた。遺伝学的解析に関しては全て患者からの同意を得た上で所轄の研究機関における倫理委員会で承認を受け施行している。環境要因の解析に関しては大気汚染物質としてダイオキシン、ディーゼル排気粒子を、アレルゲンとしてコナヒョウダニ由来プロテアーゼ (*Der f1*) を、微生物成分としてグラム陽性菌由来のペプチドグリカン (PGN)、CpG DNA、インフルエンザウイルス、RS ウイルスを、食物成分としてフラボノイドを取り上げて種々の細胞に対する影響について解析を進めた。その結果、遺伝要因の解析に関しては網羅的解析により 37 個の有力な候補遺伝子を絞り込むとともに、気管支喘息の発症と相関する IL-18、β2 アドレナリン受容体遺伝子上の一塩基多型 (SNP)、IL-12 レセプターβ2 鎖、IL-18 レセプターα鎖遺伝子の異常転写産物を同定した。環境要因に関しては IL-4/IL-13 によるダイオキシンに対する感受性の増強、ディーゼル排気粒子、*Der f1* による TGF-βを介する気道リモデリングの増強、Toll-like 受容体を介する IgE 産生の抑制、インフルエンザ、RS ウイルス感染症による IFN-γ産生抑制、フラボノイド類による Th2 型サイトカイン産生抑制などの研究結果を得ることができた。今後さらにそれぞれの要因、あるいは両者の間の相互作用について解析を進め、最終的には得られた研究結果を組み合わせることでより的確なアレルギー疾患発症の危険性の予知とアレルギー疾患に対するより効果的な創薬開発の標的の解明に結びつける予定である。

分担研究者

白川 太郎 京都大学大学院医学研究科教授
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
近藤 直実 岐阜大学医学部小児病態学教授
田中 敏郎 大阪大学大学院分子病態内科学講座助手
中尾 篤人 順天堂大学医学部アトピー疾患研究センタ
ー講師

山本ひとみ 国立相模原病院臨床研究センター
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
森嶋大貴 国立相模原病院臨床研究センター
高井敏郎 順天堂大学医学部アトピー疾患研究センタ
ー助手
藤巻秀和 国立環境研究所環境健康部

研究協力者

有馬和彦 佐賀医科大学医学部分子生命科学講座助手
安永晋一郎 佐賀医科大学医学部分子生命科学講座助手
増本清成 財団法人予防医学協会リサーチレジデント
梶原景一 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
品澤美樹 国立相模原病院臨床研究センター

A. 研究目的

気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患は遺伝要因と環境要因とが複雑に組み合わさって生じると考えられている。アレルギー疾患の遺伝要因は多因子であり、一塩基多型 (SNP) の中に遺伝要因が含まれていると考えられるようになった。ゲノムプロジェクト等に基づく豊富なゲノム情報により多くの遺伝要因候補が同定され、機能的に遺伝要因であることが証明された例も出てきた。しかし、近

年のアレルギー疾患罹患率の飛躍的な増大は環境要因の変化によると考えられ、遺伝要因単独でアレルギー疾患発症の予知を行うことに限界があることも明らかになってきた。一方で、感染症の減少、食生活の変化、大気汚染などが疫学的あるいは生理学的研究に基づいてアレルギー疾患の環境要因としてあげられている。しかし、これらの要因がアレルギー反応関連遺伝子とどのような相互作用を持っているか不明な点が多く、個人間におけるこれらの環境要因の感受性の違いについては全く解明されていない。このため、本研究の目的は、従来独立してなされていた遺伝要因と環境要因の解析を組み合わせ、両方の要因の相互作用について解明を進めることである。このことにより、従来の遺伝要因単独の組み合わせに比べて、よりの確にアレルギー疾患発症の危険性を予知できるようになり、アレルギー疾患に対するより効果的な創薬開発の標的が明らかになることが期待される。

B. 研究方法

①遺伝要因の同定とそれらの機能解析

アレルギー疾患の遺伝要因は多因子であり、SNP の中に存在すると考えられている。アレルギー疾患に関連する SNP を同定する方法として候補遺伝子解析法と連鎖解析法があげられるが、本研究ではこれら両方の方法により遺伝因子の同定を進めている。前者の候補遺伝子解析法として、本年度は IL-18、 $\beta 2$ アドレナリン受容体、SOCS3 の各遺伝子について解析を行った。後者の連鎖解析法としては、理研 SRC で開発された high through-put assay を用いて遺伝子解析を進めている。具体的には、理研がリストアップした 15 万 SNP に対して正常対象 287 例、小児喘息 331 例、成人喘息 409 例のサンプルを用いて multiplex PCR 法にて PCR を行った後 invader assay 法により遺伝子型の決定を進めている。また、アレルギー疾患の患者の中で、IL-12、IL-18 による末梢血単核球における IFN- γ の産生が低下する症例について IL-12 レセプター $\beta 2$ 鎖と IL-18 レセプター α 鎖の遺伝子配列に関して検討を加えた。遺伝学的解析に関しては全て患者からの同意を得た上で所轄の研究機関における倫理委員会で承認を受け施行している。同定された SNP あるいは遺伝子変異については、現在機能解析を行っている。

②環境要因の細胞あるいは個体への影響に関する解析

環境要因としては、本年度は大気汚染物質としてダイオキシン、ディーゼル排気粒子 (DEP) を、アレルゲンとしてコナヒョウダニ由来プロテアーゼ (*Der fl*) を、微生物成分としてグラム陽性菌由来のペプチドグリカン

(PGN)、CpG DNA、インフルエンザウイルス、RS ウイルスを、食物成分としてフラボノイドを取り上げ、これらの B 細胞、好塩基球、形質細胞様樹状細胞、末梢血単核球等の免疫・炎症系細胞、あるいは気管支上皮細胞、線維芽細胞等の非免疫・炎症系細胞に対する作用について *in vitro* で、あるいは患者からのサンプルを用いて解析を行った。

C. 研究結果

①遺伝要因の同定とそれらの機能解析

- (1) 理研がリストアップした 15 万 SNP のうち、9 万 SNP に対して一次スクリーニングを行い、約 2300 個の SNP において強い相関 ($p < 0.01$) を認めた。これらの SNP に対してさらに二次スクリーニングを行った結果、37 個の SNP において非常に強い相関 ($p < 0.0001$) を認めた。(白川)
- (2) IL-18 遺伝子上の SNP である 105A/C が気管支喘息の発症と ($p = 0.006$, OR=1.83)、 $\beta 2$ アドレナリン受容体遺伝子上の 16Arg/Gly が気管支喘息とアトピー性皮膚炎合併例における IgE 高値と相関が認められた。さらに、SOCS3 遺伝子上に新規の SNP を同定した。(田中)
- (3) IL-12、IL-18、PHA に対する末梢血単核球における IFN- γ 産生低下例の症例を解析した結果、IL-12 レセプター $\beta 2$ 鎖と IL-18 レセプター α 鎖に新規の遺伝子変異を持つ症例が存在することを明らかにした。この遺伝子変異は遺伝子の転写あるいはその後の段階で異常が生じていると考えられた。(近藤)

②環境要因の細胞あるいは個体への影響に関する解析

- (1) IL-4/IL-13 により B 細胞においてダイオキシン (四塩化ジベンゾパラジオキシン; 2,3,7,8-TCDD) の受容体であるアリルヒドロカーボン受容体 (AhR) の発現が増加し、ダイオキシンの生物活性が非常に増強されることが明らかとなった。また、気管支上皮細胞でも AhR の発現が軽度増強されることが明らかとなった。このことは IL-4/IL-13 産生が増加しているアレルギー疾患患者ではダイオキシンに対する感受性が増強していることを示している。(出原)
- (2) TGF- β は気道上皮細胞において気道リモデリングに関与するプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター 1 (PAI-1) の発現を誘導するが、可溶性 DEP はこの TGF- β による PAI-1 誘導を増強した。また *Der fl* は線維芽細胞から TGF- β の産生を誘導した。(中尾)
- (3) B 細胞上における Toll-like 受容体発現を解析したところ、アトピー患者では Toll-like 受容体 1, 4 の発現

が亢進していた。また Toll-like 受容体 9 のリガンドと考えられている CpG-B は IL-4/抗 CD40 抗体による B 細胞からの IgE 産生を抑制した。(柳原)

- (4) アレルギー患者の末梢血単核球ではインフルエンザウイルスと RS ウイルスの感染により喘鳴時に IFN- γ 産生の低下が見られ、症状の回復とともに IFN- γ 産生も回復した。さらに、ウイルス感染症により IL-12 レセプター β 2 鎖の変異型の産生が増強された。(近藤)
- (5) フィセチン等のフラボノイドの正常好塩基球に対する活性化抑制の作用機序について解析を行った結果、これらのフラボノイドはカルモジュリンと結合して NFAT1 の活性化を抑制し、その結果、IL-4/IL-13 産生を抑制していると考えられた。(田中)

D. 考察

気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患は遺伝要因と環境要因とが複雑に組み合わさって生じると考えられている。アレルギー疾患の遺伝要因は多因子であり、一塩基多型 (SNP) の中に遺伝要因が含まれていると考えられるようになった。本年度の研究結果により、新規の IL-18、 β 2 アドレナリン受容体遺伝子上における SNP、あるいは IL-12 レセプター β 2 鎖、IL-18 レセプター α 鎖遺伝子の異常転写産物が同定され、アレルギー疾患の診断あるいは創薬開発に役立つものと期待される。また、網羅的遺伝子解析も進んでおり、これが完了すれば 15 万 SNP の中で気管支喘息に関連する SNP を 40-50 個程度に絞り込み遺伝要因の約 90% を予測することが可能になり、日本人の気管支喘息における遺伝要因の評価の基準になると考えられる。

一方、環境要因に関する研究成果よりディーゼル排気粒子、Der f1、インフルエンザ、RS ウイルス感染症などの気管支喘息増悪因子としての作用、フラボノイド類のアレルギー疾患に対する治療効果などが明らかになり、アレルギー疾患の改善あるいは治療対策を講ずる上での重要な知見となった。また、IL-4/IL-13 によるダイオキシン類に対する感受性の増強が見出されたことは、今後アレルギー疾患患者におけるダイオキシン類の影響を観察していく必要があることを示唆する重要な知見だと考えられる。さらに、ウイルス感染症が IL-12 レセプター β 2 鎖遺伝子変異型の発現に影響を与えるという結果は、本研究の最終的な目的である環境要因と遺伝要因との相互作用を示す具体的な例であり、同遺伝子変異型の解析がウイルス感染症を契機とする気管支喘息の診断に有用であるとともに、治療戦略を立てる上でのヒントを与えてくれるものと期待される。

今後、これらの遺伝要因あるいは環境要因の機能的解析を進めていくことと同時に、これらの要因同士の相互作用

についても解析を進めていくことが重要であると考えている。

E. 結論

候補遺伝子解析法により新規の遺伝要因となる SNP あるいは異常転写産物を同定するとともに、網羅的遺伝子解析法により有力な遺伝要因の候補遺伝子を絞り込むことができた。また、ダイオキシン、ディーゼル排気粒子、Der f1、Toll-like 受容体シグナル、インフルエンザ、RS ウイルス感染症、フラボノイド類などの環境要因とアレルギー疾患との関連性について解析を進めることができた。今後さらにそれぞれの要因、あるいは両者の間の相互作用について解析を進めていくことにより、よりの確なアレルギー疾患発症の危険性の予知とアレルギー疾患に対するより効果的な創薬開発の標的の解明が可能になると期待される。

分担研究報告書

アレルギー疾患とダイオキシンの関連性に関する検討

分担研究者 出原賢治

佐賀医科大学医学部分子生命科学講座教授

研究要旨 気管支喘息やアレルギー性鼻炎の発症機序において Th2 サイトカインである IL-4、IL-13 が重要な役割を持っていることが知られている。一方、四塩化ジベンゾパラジオキシン (2,3,7,8-TCDD) を始めとするダイオキシン類は、主に物質の燃焼によって生成される毒性を持った化合物であり、近年その汚染が大きな社会問題となっている。本研究においては、B 細胞に対する IL-4、IL-13 の生物活性を解析する過程で、偶然ダイオキシンとの相互作用の存在に気づき、それについてさらなる詳細な解析を行った。B 細胞における IL-4、IL-13 による誘導遺伝子を同定するために、ヒト B 細胞株、DND39 細胞を IL-4、IL-13 で刺激して誘導遺伝子を DNA チップにて解析を行った結果、TCDD の受容体であるアリルヒドロカーボン受容体 (AhR) が含まれていた。さらにタンパク質レベルにおいても B 細胞、気管支上皮細胞において AhR の発現増強が認められた。このことは IL-4、IL-13 の産生が上昇しているアレルギー病態ではダイオキシンの作用が増強されることを示しており、今後 IL-4、IL-13 存在下での TCDD の生物活性についてさらに解析を進めることにより環境要因としてのダイオキシンとアレルギー疾患との関連が明らかになるものと期待される。

研究協力者

有馬和彦 佐賀医科大学医学部分子生命科学講座助手
安永晋一郎 佐賀医科大学医学部分子生命科学講座助手
増本清成 財団法人予防医学協会リサーチレジデント

も判っていない。

本研究では、B 細胞に対する IL-4、IL-13 の生物活性を解析する過程で、偶然ダイオキシンとの相互作用の存在に気づき、それについてさらなる詳細な解析を行った。

A. 研究目的

気管支喘息やアレルギー性鼻炎の発症機序において Th2 サイトカインである IL-4、IL-13 が重要な役割を持っていることが知られている。IL-4、IL-13 は B 細胞に対して IgE 産生を誘導すると同時に、上皮細胞、線維芽細胞などの非免疫系細胞に対してさまざまな作用を引き起こすことにより、アレルギー疾患の病態形成に関与している。

一方、四塩化ジベンゾパラジオキシン (2,3,7,8-TCDD) を始めとするダイオキシン類は、主に物質の燃焼によって生成される毒性を持った化合物である。近年、ダイオキシン類の生成量が増加して大気、土壌、河川などが汚染され、その結果、気道、食物による摂取、皮膚を介する経路により人体も汚染されていることが、大きな社会問題となっている。ダイオキシン類とアレルギー疾患との関連については、疾患の発症頻度に関する疫学的な調査や IgE 産生に対する影響に関する解析等において相反する報告があり、不明な点が多い。特に両者の分子レベルにおける相互作用についてはほとんど何

B. 研究方法

B 細胞における IL-4、IL-13 による誘導遺伝子を同定するために、ヒト B 細胞株、DND39 細胞を IL-4、IL-13 存在下で 24 時間培養し、Affymetrix 社の HuGeneFL Array シリーズの DNA チップにて解析を行った。発現誘導が強く認められた遺伝子の一つであり、TCDD の受容体であるアリルヒドロカーボン受容体 (AhR) の発現量について、Real-Time PCR 法とウエスタンブロッティングにて解析を行った。さらに、IL-4、IL-13 存在下にて TCDD の B 細胞における IgE 産生、CD23 発現、TCDD の誘導遺伝子である CYP1A1 発現に対する影響についても解析を行った。

C. 研究結果

DNA チップにおける解析により、AhR の発現が IL-4、IL-13 により増強されることが判明した。さらにタンパク質レベルにおいても B 細胞で非常に強く AhR の発現誘導が起こり、気管支上皮細胞においても軽度の増強が見られ

た。IL-4、IL-13 による IgE 産生、CD23 発現に対して TCDD は不変か、あるいは軽度の抑制効果を示した。また、IL-4、IL-13 処理後では CYP1A1 の発現が著明に増強されることも判明した。

D. 考察

これまでアレルギー疾患とダイオキシンとの分子レベルでの相互作用についてはほとんど判っていなかったが、本研究により、アレルギー疾患において産生が増強される IL-4、IL-13 が B 細胞、気管支上皮細胞において AhR の発現を誘導し、ダイオキシンの生物活性を増強させることが判明した。IL-4、IL-13 による IgE 産生や CD23 発現は TCDD により増強しないので、TCDD が IgE を介する機序によってアレルギー疾患の増悪因子とはならないと思われる。しかし、IL-4、IL-13 存在下で TCDD の作用が増強されることが、何らかのアレルギー疾患の病態形成に関与している可能性は考えられる。今後、IL-4、IL-13 存在下での TCDD の生物活性についてさらに解析を進めることが重要だと考えられた。

E. 結論

B 細胞、気管支上皮細胞において TCDD の受容体である AhR の発現が IL-4、IL-13 により誘導され、TCDD の生物活性が増強されることが判明した。これはアレルギー疾患とダイオキシンとの分子レベルでの関連性を示す重要な知見であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Izuhara K, Arima K, Yasunaga S.
IL-4 and IL-13 : Their Pathological Roles in Allergic Diseases and their Potential in Developing New Therapies.
Current Drug Targets-Inflammation & Allergy.
1(3) : 263-269, 2002.
- 2) Izuhara K, Arima K, Yasunaga S, Yokoi F, Sakata Y, Tanaka G, Yang Q
The importance of interleukin-13 in the pathogenesis of bronchial asthma.
Recent. Res. Devel. Bioch., 3:33-40, 2002.
- 3) Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y, Akaiwa M, Mao X-Q, Emonoto T, Dake Y, Shimazu S, Yamashita T, Sugawara N, Brodeur S, Geha R Puri RK, Sayegh MH, Adra CN, Hamasaki N, Hopkin JM, Shirakawa T, Izuhara K.
Upregulation of IL-13 concentration in vivo by

the IL13 variant associated with bronchial asthma.
J. Allergy Clin. Immunol., 109(6) : 980-987, 2002.

- 4) Matsui K, Yuyama N, Akaiwa M, Yoshida N, Maeda M, Sugita Y, Izuhara K.
Identification of an alternative splicing variant of cathepsin C/dipeptidyl-peptidase I.
Gene 293 (1): 1-7, 2002.
- 5) Yuyama N, Davies DE, Akaiwa M, Matsui K, Hamasaki Y, Suminami Y, Yoshida NL, Maeda M, Pandit A, Lordan JL, Kamogawa Y, Arima K, Nagumo F, Sugimachi M, Berger A, Richards I, Roberds SL, Yamashita T, Kishi F, Kato H, Arai KI, Ohshima K, Tadano J, Hamasaki N, Miyatake S, Sugita Y, Holgate ST, Izuhara K
Analysis of novel disease-related genes in bronchial asthma.
Cytokine. 19(6) : 287-296, 2002.
- 6) Izuhara K
Pathogenesis of Allergic Diseases in Human Patients.
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, in press
- 7) 出原賢治
IL-13 をめぐって.
工藤翔二、土屋了介、金沢実、大田健 編 : Annual Review 呼吸器 2002. 27-31, 中外医学社 東京 2002.
- 8) 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.
羅 智靖 編 : アレルギーの分子医学的究明と克服. 3-7, 医歯薬出版株式会社 東京 2002.
- 9) 出原賢治
アレルギー疾患治療薬としての試み 可溶性 IL-4 レセプターと可溶性 IL-13 レセプター.
Molecular Medicine. 39(5) : 586-590, 2002.
- 10) 出原賢治
アレルギー疾患の病因と診断.
Medical Academy NEWS. 841 : 9-9, 2002.
- 11) 出原賢治
サイトカイン遺伝子とアレルギーの病態.
Allergy 21st Century, 12 : 7-9, 2003.
- 12) 出原賢治
IL-13 研究の新展開.
最新医学 58(2) : 240-244, 2002.
- 13) 出原賢治、有馬和彦、安永晋一郎

アレルギー疾患における遺伝因子の機能的解析とその臨床応用—IL-13を中心に—

Inflammation and Regeneration. 23(1):23-28, 2003.

14) 有馬和彦

IL-13の遺伝子多型.

臨床免疫 38(2) : 157-163. 2002.

15) 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・免疫 (Allergology & Immunology) 9(10) : 78-83, 2002.

16) 有馬和彦、出原賢治

IL-13/IL-13Rの遺伝子多型とその機能.

アレルギー科 14(5) : 380-387, 2002.

17) 有馬和彦、出原賢治

アトピー候補遺伝子.

Allergy Update14(2) : 7-7, 2002.

18) 有馬和彦、出原賢治

IL-13 および受容体遺伝子.

喘息 15(3) : 43-47, 2002.

19) 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.

20) 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) 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(workshop)

2) 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(workshop)

3) 出原賢治

アレルギー疾患における遺伝因子の機能的解析とその臨床応用. 第23回日本炎症・再生医学会. 2002. 7. 2-3.

(シンポジウム).

4) 石崎雅之、梶原大輔、田中宏幸、出原賢治、Andrew N. J. McKenzie、永井博式

マウス抗原反復曝露による気道過敏性発症ならびに気道リモデリング形成におけるIL-13の意義

「Airway Club in Sendai」第11回研究会. 2002.9.20-21.

5) 安永晋一郎、湯山則子、有馬和彦、田中宏幸、戸田修二、合田千穂、前田都、杉田雄二、永井博式、出原賢治

IL-4, IL-13による気管支上皮細胞におけるIL-13シグナルの調節機構.

「Airway Club in Sendai」第11回研究会. 2002.9.20-21.

6) Izuvara K

Pathogenesis of allergic diseases based on human patients.

The 18th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine., 2002.10.22.

Clinical chemistry and laboratory medicine .40 : S31.

7) 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PU.1の関与.

第52回日本アレルギー学会, 2002.11.28. アレルギー 51 : 1035.

8) 石崎雅之、梶原大輔、田中宏幸、出原賢治、Mckenzie Andrew N. J, 永井博式

気道リモデリング形成におけるIL-13の意義.

第52回日本アレルギー学会, 2002.11.28. アレルギー 51 : 956.

9) 出原賢治

サイトカインをターゲットとした治療法.

第52回日本アレルギー学会, 2002.11.28. アレルギー 51:813. (シンポジウム)

10) 梶原大輔、石崎雅之、田中宏幸、出原賢治、Mckenzie Andrew NJ, 永井博式

アレルギー性気道炎症におけるIL-13の意義.

第52回日本アレルギー学会, 2002. 11.28. アレルギー 51 : 952.

12) 湯山則子、安永晋一郎、有馬和彦、田中宏幸、戸田修

二、合田千穂、平野愛弓、前田都、杉田雄二、永井博
式、出原賢治

IL-4, IL-13 による気管支上皮細胞における IL-13 シ
グナルの調整機構。

第32回日本免疫学会総会, 2002,12,5, 日免総会誌32 :
176.

13) Wongpiyabovorn J, Suto H, Izuhara K, Ushio H,
Okumura K, Ogawa H.

Modulation of interleukin 13 receptor $\alpha 1$ and $\alpha 2$
on human keratinocyte by interferon- γ .

第32回日本免疫学会総会, 2002.12.5. 日本免疫学
会総会・学術集会記録 32 : 179.

G. 知的所有権の取得状況

特に記載すべき事なし

分担研究報告書

全ゲノム SNP 解析によるアレルギー疾患関連遺伝子解析

分担研究者 白川太郎 京都大学大学院医学研究科教授

研究要旨 現在、SNP を用いて、理化学研究所遺伝子多型センターを中心に、喘息を対象とし全ゲノム領域における体系的関連解析が行われている。common disease の様な相対危険率（用語）の低い疾患では、原因遺伝子は複数存在し環境要因の影響もその発症に関わることから、一つの関連遺伝子の疾患に対する影響は小さいと考えられ、大規模なサンプル数で解析することが必要となる。従って、このような膨大な数の SNP をいかに①高速で、②正確に、③安価で、解析していくかが鍵となる。理研では一度にゲノム上の複数（実際には 96 カ所）領域を PCR で増幅する Multiplex PCR 法と Invader 法を組み合わせられた方法が開発され、わずか 0.05ng-0.1ng のゲノム DNA で SNP をタイピングすることが可能となった。インベダー法は①PCR 反応を行わず SNP のタイピングができる、②短時間でタイピングができる、③一度にタイピングできるサンプル数が多い、④蛍光色素が結合しているプローブ（フレットプローブ）は共通のものを利用するためコストが安い、というのが大きな特徴である。この方法を用いて解析を行ない、約 9 万 SNP のスクリーニングを終了し、37 個の候補 SNP が絞り込まれた。今後、これらの候補 SNP の機能解析が行なわれ、喘息との関連が明らかにされると期待される。

A. 研究目的

アレルギー疾患は多遺伝子疾患であり、その原因遺伝子検索には遺伝的多型を調べることが基本となっている。多型にはいくつかの種類があり、家系を用いたマイクロサテライトマーカーの利用は特定遺伝子座の決定には役立つものの、それ以降の原因遺伝子決定は困難を伴っている。そこで高密度に存在する、SNPs（一塩基多型）が遺伝子上のマーカーとして注目され、ヒトゲノム計画の終了で全ゲノム上で精度のよい SNPs マップが作成され、この SNP を用いた遺伝子解析が世界のトップを切ってわが国の理研 SRC で開始されている。このシステムを用いてアレルギー疾患に関する遺伝子を網羅的に解析することを目的とした。

B. 研究方法

理研 SRC において開発された high through-put assay を用いて解析を行なった。PCR は multiplex PCR 法を用いて行い、invader assay 法を用いて遺伝子型を決定した。DNA サンプルは正常対照 287 例、小児喘息 331 例、成人喘息 409 例を用いた。これらのサンプルについては利権の倫

理委員会ですでに承認されている。

C. 研究結果

理研がリストアップした 15 万 SNP のうちですでに 9 万 SNP の 1 次スクリーニングが終了した。この中で強い関連の認められた約 2300 個の SNP ($p < 0.01$) について 2 次スクリーニングを行なった。その結果 37 個の SNP が非常に強い関連を示した ($p < 0.0001$)。現在これらの 37 個の SNP について機能解析を行なっている。

D. 考察

15 万 SNP のスクリーニングにより $p < 0.01$ の関連を示した SNP は約 2% 内外で、偶然の閾値を越えるものではないことが判明した。このことから約 100 例程度の関連研究ではたとえ $p < 0.01$ の関連を認めても十分でないことがわかる。そこでさらにサンプル数を 300-400 まで上げて 2 次スクリーニングを行なうと、得られる SNP の数は極端に減少する。このことからサンプル数は多いほど正確な判定が可能になると考えられる。最終的には病気の感受性遺伝子 20 個程度が得られると予想されることか

ら15万 SNP すべての解析で40-50個程度の候補遺伝子に絞り込める可能性が示された。これは予想された数に比べて極めて少ないと考えられる。すなわち90%程度の発症予測をするには数十の SNP 情報で十分というデータが世界で初めて示されたことになる。

E. 結論

全ゲノム SNP 解析によるアレルギー疾患原因遺伝子検索は極めて有用な解析法であり、得られた候補 SNP の機能解析により、新規の遺伝子の発見とアレルギー疾患のメカニズムの解明に大きく寄与すると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kiyahara C, Otsu A, Shirakawa T, Fukuda S, Hopkin JM. Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility: a review. *Lung Cancer*. 2002;37:241-256.
- 2) Bottono N, Mao XQ, Borgiani P, Saccucci P, Stefanini L, Greco E, Fontana L, Shirakawa T, Hopkin JM. Low molecular weight PTP-IL-4RA interaction in atopy predisposition. *Allergy*. 2002;75:Suppl72:10-12.
- 3) Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y, Akaiwa M, Mao XQ, Enomoto T, Dake Y, Shimazu S, Yamashita T, Sugawara N, Brodeur S, Geha R, Puri RK, Sayegh MH, Adra CN, Hamasaki N, Hopkin JM, Shirakawa T, Izuhara K. Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:980-987.
- 4) Bottini N, Borgiani P, Otsu A, Saccucci P, Stefanini L, Greco E, Fontana L, Hopkin J, Mao XQ, Shirakawa T. IL-4 receptor alpha chain genetic polymorphism and total IgE levels in the English population: two-locus haplotypes are more informative than individual SNPs. *Clin Genet*. 2002;61:288-292.
- 5) Donato JL, Ko J, Kutok JL, Cheng T, Shirakawa T, Mao XQ, Beach D, Scadden DT, Sayegh MH, Adra CN. Human Hflm4 is a hematopoietic cell cycle regulator. *J Clin Invest*. 2002;109:51-8.
- 6) Tanaka K, Roberts MH, Yamamoto N, Sugiura H, Uefara M, Mao XQ, Shirakawa T, Hopkin JM. Genetic variants of the receptors for thromboxane A2 and IL-4 in atopic dermatitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;292:776-80.

2. 学会発表

- 1) 白川太郎：アレルギー疾患の遺伝学的研究（特別講演），第14回日本アレルギー学会春季臨床大会，2002.3.21-23，千葉幕張メッセ
- 2) 荒川浩一，鈴木道子，戸所誠，加藤政彦，望月博之，徳山研一，森川昭広，白川太郎，出原賢治：細胞内シグナル伝達物質 STAT6 遺伝子の exon1 における GT 繰り返し配列の多型と気管支喘息との関連，第14回日本アレルギー学会春季臨床大会，2002.3.21-23，千葉幕張メッセ
- 3) 幸野健，青木敏之，上田伸男，植田美津江，高岡正敏，程雷，白川太郎，三好彰：チベット自治区におけるアトピー性皮膚炎調査報告，第14回日本アレルギー学会春季臨床大会，2002.3.21-23，千葉幕張メッセ
- 4) 嶋田貴志，程雷，河合康雄，三好彰，榎本雅夫，白川太郎：乳酸菌 FK-3 菌抽出物（LFK）の通年性アレルギー性鼻炎に対する効果，第14回日本アレルギー学会春季臨床大会，2002.3.21-23，千葉幕張メッセ
- 5) 玉利真由美，長谷川耕一，白川太郎：機関紙関連遺伝子へのアプローチ，（シンポジウム）第39回日本小児アレルギー学会，2002.11.2-3，岩手県民会館
- 6) 鈴木洋一，邵晨深，鎌田文頭，松原洋一，田村弦，玉利真由美，長谷川耕一，白川太郎：多遺伝子間の関連をどのように明らかにするか（シンポジウム），第39回日本小児アレルギー学会，2002.11.2-3，岩手県民会館
- 7) 鎌田文頭，邵晨深，玉利真由美，長谷川耕一，遠藤宏子，高柳玲子，中澤千冬，森川利夫，森川みき，宮林重明，千葉靖，斎藤誠一，田村弦，白川太郎，鈴木洋一，松原洋一：hCLCA1 遺伝子多型と小児気管支喘息との相関，第39回日本小児アレルギー学会，2002.11.2-3，岩手県民会館

H. 特許

なし

分担研究報告書

B 細胞における Toll-like receptor の発現とその機能解析

分担研究者 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は、遺伝要因に加えて、環境要因も関与している。本研究では、病原体成分のパターン認識受容体として機能している TLR について、B 細胞における TLR ファミリーメンバーの発現を検討すると共に、TLR9 のリガンドである CpG ODN の IgE 産生に対する調節作用についても併せて検討した。B 細胞は TLR3 以外のメンバーを構成的に発現しており、またアトピー患者では正常者に比べて TLR1 と 4 の発現レベルは高い傾向を示した。このような TLR4 の発現増強は IL-4 刺激によって誘導された。一方、CpG ODN に関しては、CpG-A は IL-4 による PBMC からの IgE 産生を抑制するのに対して、CpG-B は IL-4 と抗 CD40 抗体による B 細胞からの IgE 産生を抑制した。また、B 細胞 TLR9 の活性化を介する遺伝子発現プロファイルは CpG-A と CpG-B とでは明らかに異なっていた。

A. 研究目的

Toll-like receptor (TLR) は微生物成分の受容体として機能しており、自然免疫に重要な役割を果たしている。TLRファミリーメンバーのうち、例えばTLR2はグラム陽性菌の pepti-doglycanを、TLR4はグラム陰性菌の lipopo-lysaccharideを、またTLR9は細菌に特異的な非メチル化CpG DNAをそれぞれ認識する。TLRは各種の細胞系列に発現されており、特に樹状細胞におけるTLRはT細胞分化の方向性の決定、すなわち獲得免疫の誘導にも関与していることはよく知られている。一方、B細胞におけるTLRの発現やその機能については、不明な点が多い。本研究では、正常者とアトピー患者のB細胞TLRファミリーメンバーの発現について比較検討すると共に、TLR9を介するIgE産生の調節作用についてもCpG ODNを用いて検討した。

B. 方法

1) インフォームドコンセントが得られた正常者とアトピー患者の末梢血単核細胞 (PBMC) から negative selectionによりB細胞を、また posi-tive selectionにより plasmacytoid樹状細胞 (PDC) をそれぞれ分離した。

2) TLR mRNAはreal-time PCR、細胞表面分子はFACS、サイトカインはELISA、またIgMとIgEはRIAによりそれぞれ測定した。TLRの

リガンドとしては、合成CpGタイプA (CpG-A, ODN 2216) と合成CpGタイプB (CpG-B, ODN 2006) を用いた。尚、非CpG ODNとしては、GpC-AとGpC-Bを用いた。これらのリガンド活性については、PDCからのサイトカイン産生能やB細胞の増殖能を指標に検討した。また、B細胞TLR9の活性化を介して誘導される各種遺伝子の発現については、Gene chipによる解析を行った。

C. 結果

1) CpG-AはPDCにIFN- α/β 産生を誘導するのに対して、CpG-BはB細胞に増殖とIgM産生を誘導した。

2) B細胞は、TLR3 mRNAを除いて、他のTLR mRNAを構成的に発現していた。また、アトピー患者では正常者に比べてTLR1, 4 mRNAの発現レベルは高い傾向を示した。

3) B細胞におけるTLR4 mRNAの発現はIL-4刺激によって増強された。

4) B細胞におけるCD86やHLA-DRなどの発現はCpG-Bによって強く増強された。

5) IL-4と抗CD40抗体の刺激によるB細胞からのIgE産生はCpG-Bでは抑制されたが、CpG-Aではほとんど影響が認められなかった。一方、IL-4刺激によるPBMCからのIgE産生はCpG-Aでは抑制されたが、CpG-Bでは増強された。いずれの場合にも、IgE産生とIgM産生

との間には逆相関が認められた。

6) CpG-AやCpG-Bの刺激によってB細胞に強く発現誘導される遺伝子は異なっており、例えばCpG-Aはジンクフィンガータンパクを強く誘導するのに対して、CpG-BはDNA依存性DNAポリメラーゼの発現を強く誘導した。

D. 考察

TLRは微生物成分をパターン認識することによって自然免疫における細胞応答を始動する重要な受容体である。また、TLRは単球、樹状細胞、上皮細胞およびマスト細胞など多くの細胞に発現されているが、B細胞におけるTLRの発現やその機能については、不明な点が多い。本研究では、まず正常者とアトピー患者におけるB細胞TLR1~10 mRNAの発現量を比較検討し、次いでCpG ODNによるTLR9依存的なIgE産生の調節作用について検討した。

B細胞はTLR3以外のメンバーのmRNAを構成的に発現しており、またこれらのうち、TLR1と4の発現レベルはTh2優位なアトピー患者では高い傾向が認められた。実際、TLR4の発現はIL-4刺激によって増強されるので、アトピー患者におけるTLR4の発現増強には内因性IL-4が関与していると考えられる。

CpG ODNには2つのプロトタイプがあり、CpG-AはPDCにI型IFN産生を、一方CpG-BはB細胞にCD86やHLA-DRなどの発現増強のみならず、増殖やIgM産生も誘導した。また、CpG-AによるIgE産生の抑制作用はPBMCを用いた培養系に特異的であるのに対して、CpG-BによるそれはB細胞を用いた培養系に特異的であった。したがって、B細胞TLR9を介するIgE産生の調節作用はCpG-AとCpG-Bとでは明らかに異なっている。さらに、CpG-AとCpG-Bによる遺伝子発現のプロファイルの違いを解析してみると、例えば誘導遺伝子に関しては、ジンクフィンガータンパクの発現はCpG-Aによって、一方DNA依存性DNAポリメラーゼの発現はCpG-Bによって強く誘導された。このような遺伝子発現の違いによるIgE産生の調節メカニズムについては、現在検討中である。

E. 結論

B細胞TLR9に対するCpG-AとCpG-Bの作用は異なっていることが明らかとなった。また、IgE産生の誘導はPDC、単球、T細胞あるいはNK細胞などの存在の有無によって異なる調節を受

けると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yu B, Koga T, Urabe K, Moroi Y, Maeda S, Yanagihara Y, Furue M : Differential regulation of thymus- and activation-regulated chemokine induced by IL-4, IL-13, TNF- α and IFN- γ in human keratinocyte and fibroblast. *J. Dermatol. Sci.* 30: 29-36, 2002.
- 1) Basaki Y, Ikizawa K, Kajiwara K, Yanagihara Y : CD40-mediated tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 signaling upregulates IL-4-induced germline C ϵ transcription in a human B cell line. *Arch. Biochem. Biophys.* 405: 199-204, 2002.
- 2) Kajiwara K, Ra C, Yanagihara Y : Recombinant soluble form of the high-affinity IgE receptor α subunit and anti-IgE antibody inhibit IgE synthesis by IgE-expressing B cells through distinct pathways. *Allergol. Int.* 51: 175-184, 2002.
- 3) Yanagihara Y : Regulatory mechanisms of human IgE synthesis. *Allergol. Int.* in press.
- 4) Yanagihara Y : Regulation of IgE synthesis. *Int. Proc.* in press.
- 5) 柳原行義、羅 智靖 : 可溶性Fc ϵ RI α 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研究 pp. 71-75, 2002.
- 6) 柳原行義 : アトピー体質と遺伝. *アレルギー・免疫* 9: 74-80, 2002.
- 7) 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. *耳鼻免疫アレルギー* 20: 29-36, 2002.
- 8) 山本ひとみ、品澤美樹、梶原景一、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* 9: 1174-1180, 2002.
- 9) 梶原景一、山本ひとみ、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. *アレルギー科* 14: 120-126, 2002.
- 10) 梶原景一、品澤美樹、山本ひとみ、柳原行義 : AIDの遺伝子多型とその機能. *アレルギー科* 14: 403-407, 2002.

- 11) 柳原行義 : IgE・IgE抗体とその産生制御. アレルギー病学 pp38-44, 2002.
- 12) 柳原行義 : IgE産生の分子調節機構. アレルギー・リウマチ・膠原病の最新医療 pp109-116, 2003.
- 13) 柳原行義 : IgE抗体産生の調節. 総合アレルギー学 印刷中
- 14) 柳原行義 : CD40に依存しない免疫グロブリンクラススイッチ. 臨床免疫 印刷中
2. 学会発表
- 1) Yanagihara Y. Regulation of human IgE synthesis. The 5th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology, 2002.
- 2) Yanagihara Y. Signal transduction mechanisms of IL-4 and IL-13. The 12th Congress of Interasma Japan/North Asia, 2002.
- 3) Maeda, S., Kajiwara, K., Ikizawa, K., Morishima, H., Shinazawa, M., Yamamoto, H., Furue, M., Yanagihara, Y. Reciprocal regulation of TARC and MDC production by IL-4 or IL-13 and IFN- γ in a human keratinocyte cell line. The 9th Meeting of the Trans-Pacific Allergy and Immunology, 2002.
- 4) 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.
- 5) 柳原行義. IgE産生の誘導とその制御機構. 第5回免疫薬理研究会, 2002.
- 6) 前田尚子、梶原景一、生澤公一、品澤美樹、森嶋大貴、山本ひとみ、秋山一男、柳原行義、于彬、古江増隆. ケラチノサイト株 HaCaT細胞からのTARC/MDC産生に対するIFN- γ とIL-4/IL-13の作用. 第52回日本アレルギー学会総会, 2002.
- 7) 山本ひとみ、梶原景一、森嶋大貴、品澤美樹、前田尚子、三田晴久、秋山一男、柳原行義. IL-4/IL-13による気道平滑筋細胞 cysteinyl LT1Rの発現増強作用 第52回日本アレルギー学会総会, 2002.
- 8) 田端祐一、楠幸博、枈丸博幸、渡辺徹、崎山幸雄、柳原行義. 肝機能障害を伴った好酸球増多症の1例 第52回日本アレルギー学会総会, 2002.
- 9) 山田一恵、宇理須厚雄、河村牧子、各務美智子、徳田玲子、近藤康人、柘植郁哉、柳原行義、鳥居新平 鶏卵アレルギーの寛解とPepsin処理Ovomucoidによる末梢血単核球のTh1・Th2サイトカイン産生能の関係 第52回日本アレルギー学会総会, 2002.
- 10) 品澤美樹、梶原景一、生澤公一、森嶋大貴、前田尚子、山本ひとみ、秋山一男、柳原行義 IL-4応答性成熟B細胞に発現されるRAGの機能解析 第52回日本アレルギー学会総会, 2002.
- 11) 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 ϵ transcriptの発現誘導におけるPU.1の関与 第52回日本アレルギー学会総会, 2002.
- 12) 梶原景一、生澤公一、柳原行義. 抗CD40抗体によるgermline C ϵ transcriptの発現増強におけるTRAF3の関与 第52回日本アレルギー学会総会, 2002.
- 13) Maeda, S., Kajiwara, K., Ikizawa, K., Furue, M., Yanagihara, Y. Reciprocal regulation of TARC/MDC production by IL-4/IL-13 and IFN- γ in a human keratinocyte cell line 第32回日本免疫学会総会・学術集会, 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、品澤美樹、山本ひとみ、森嶋大貴、釣木澤尚美、谷口正実、秋山一男（国立相模原病院臨床研究センター）

分担研究報告書

アレルギー発症に関わる遺伝子・分子とそれに及ぼす環境因子の影響

分担研究者 近藤直実 岐阜大学医学部小児病態学教授

研究要旨 アレルギーの病態、および病因遺伝子を解明し、さらにそれらに及ぼす環境因子の直接的関与を明らかにする目的でアレルギー患者における Th1 および Th2 系のサイトカインの動態を検討し、その結果より考えられる遺伝子レベルでの異常について検討し、さらに環境因子の影響につき解析した。対象者の末梢血単核球分画を IL-12、IL-18 あるいは PHA で刺激し誘導される IFN-gamma の産生量を比較したところ、いずれの刺激においてもコントロール群に比較しアレルギー群では IFN-gamma の産生量は低い傾向にあった。さらにアレルギー患者の中に、刺激の違いにより IFN-gamma の産生に解離がみられる症例が存在した。これらの症例の検索から、IL-12 レセプターβ2 鎖、あるいは IL-18 レセプターα鎖の遺伝子変異あるいは発現異常が明らかになった。さらに、インフルエンザウイルスや RS ウイルス感染直後には、IFN-gamma の産生が低下し、その変化が遺伝子発現レベルでおこっていることが明らかとなった。また、温度や pH によってサイトカイン産生に関わる分子・遺伝子の発現が変化することも明らかになった。

松井永子 岐阜大学医学部小児病態学助手
金子英雄 岐阜大学小児科講師
深尾敏幸 岐阜大学小児科講師
寺本貴英 岐阜大学小児科助手
浅野 勉 岐阜大学医学部小児病態学大学院
館林宏治 岐阜大学医学部小児病態学大学院
笠原貴美子 岐阜大学医学部小児病態学

（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。

A.研究目的

アレルギーの発症に関わるサイトカインの動態を明らかにし、その発症に関与するとおもわれる分子・遺伝子に及ぼすウイルスを含む環境因子の影響を検討し、臨床に応用する。

B.研究方法

アレルギー患者、および健常人の末梢血より末梢血単核球分画（以下PBMCs）を分離し1) 無刺激、IL-12、IL-18、PHAにて刺激し、24時間培養後、培養上清中のIFN-gammaをELISA法で測定した。2) IFN-gamma messenger RNA の発現量についてMIMIC法を用いて検討した。3)またそれらの症例についてゲノムDNAあるいはcDNAを用いて遺伝子変異の有無について検討した。4) さらにインフルエンザウイルス感染、RSウイルス感染、温度、pHの影響について検討を行った。

C.研究結果

血清IgEとPHA刺激したPBMCsのIFN-gamma産生量の関係について検討した。血清IgEとIFN-gamma産生量は負の相関を示し、IFN-gammaはIgEの産生に対して抑制的に働いていると考えられた。

IL-18 は IL-12 と共に Th1 の分化誘導および IFN-gamma 産生誘導の中心的役割を担い、IgE 産生抑制系に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで PBMCs を IL-12、IL-18 で刺激し、その IFN-gamma 産生について検討した。IL-12 刺激による IFN-gamma 産生量と IL-18 刺激による IFN-gamma 産生量は正の相関を示した。IL-12、IL-18 刺激による IFN-gamma 産生と PHA 刺激による IFN-gamma 産生とそれぞれ比較した。IL-12 刺激における IFN- γ 産生と PHA 刺激による IFN-gamma 産生は正の相関を示し、IL-18 刺激による

IFN-gamma 産生と PHA 刺激による IFN-gamma 産生も正の相関を示した。しかしながら、IL-12, IL-18, PHA の刺激による IFN-gamma の産生量に解離のみられる症例がみられ、IL-12 あるいは IL-18 に特異的に IFN-gamma の産生不全を示す症例を検索したところ、IL-12 レセプターβ2 鎖、あるいは IL-18 レセプターα鎖をコードする遺伝子の変異あるいは発現段階での異常を認めた (図1)。

PHA 刺激、IL-12 刺激、IL-18 刺激における IFN-gamma 産生量を比較したところ、PHA 刺激、IL-12 刺激における IFN-gamma の産生量はコントロール群に比較しアレルギー群で低い傾向を示した。

インフルエンザウイルス感染時において、喘鳴を認めた患児では、感染直後には IFN-gamma 産生が低下しており回復後にはその値は回復した (図2)。さらに、これは mRNA レベルで起こっていることが示された (図3)。さらに RS ウイルス感染時にも同様の傾向が認められた。さらに培養条件 (温度や pH) が先の IL-18 レセプターα鎖の遺伝子発現に影響を与えることを示唆する症例が認められた (図4)。

D. 考察および結論

アレルギーの病態、および病因遺伝子を解明し、さらにそれらに及ぼす環境因子の直接的関与を明らかにする目的でアレルギー患者における Th1 および Th2 系のサイトカインの動態を検討し、その結果より考えられる遺伝子レベルでの異常について検討し、さらに環境因子の影響につき解析した。アレルギー患者の中に、刺激の違いにより IFN-gamma の産生に解離がみられる症例が存在した。これらの症例の検索から、IL-12 レセプターβ2 鎖、あるいは IL-18 レセプターα鎖の遺伝子変異あるいは発現異常が明らかになった。さらに、インフルエンザウイルスや RS ウイルス感染直後には、IFN-gamma の産生が低下し、その変化が遺伝子発現レベルでおこなっていることが明らかとなった。また、温度や pH によってサイトカイン産生に関わる分子・遺伝子の発現が変化することも明らかになった。

さらに培養条件が先の IL-18 レセプターα鎖の遺伝子発現に影響を与えることを示唆する症例が認められた。

E. 研究発表

<論文発表>

(1) 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 levels in atopic Japanese children. *J Allergy Clin Immunol* 109, 669-675 (2002)

(2) Suzuki, K., Inoue, R., Sakaguchi, H., Aoki, M., Kato, Z., Kaneko, H., Matsushita, S., Kondo, N. The correlation between ovomucoid-derived peptides, human leucocyte antigen class II molecules and T cell receptor-complementarity determining region 3 compositions in patients with egg-white allergy. *Clin Exp Allergy* 32,1223-1230 (2002)

(3) 近藤直実：感染とアレルギー．先端医療シリーズ19 アレルギー・リウマチ・膠原病．アレルギー・リウマチ・膠原病の最新医療，117-124 先端医療技術研究所 (2003)

(4) Ohrnishi, H., Kato, Z., Watanabe, M., Fukutomi, O., Inoue, R., Teramoto, T., Kondo, N. IL-18 is associated with severity of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* (in press)

<学会発表>

(1) Kondo N, Kato Z : 国際学会シンポジウム : Symposium : Genomics and proteomics in allergic diseases : 4th APAPARI 2002 (Asian Pacific Association of Pediatrics Allergy, Respiriology and Immunology) , 9th TPAIS (9th Biennial Meeting of The Trans-Pacific Allergy and Immunology Society) , 11th PSCAI (The Pediatric Society for Clinical Pharmacology, Allergy and Immunology) (2002年9月20日, 東京)

(2) 近藤直実：シンポジウム：司会：アトピー性皮膚炎の難治化の病態とその対応．日本アレルギー学会春季臨床大会（第14回）（2002年3月21日, 幕張）

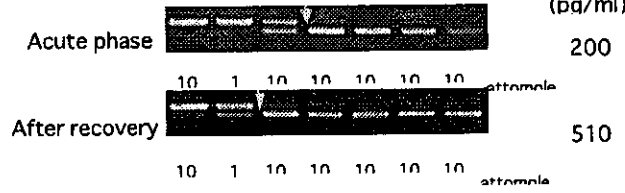
(3) 近藤直実, 加藤善一郎, 松井永子, 金子英雄, 深尾敏幸, 伊上良輔, 寺本貴英, 福富悌, 篠田紳司, 鈴木清高, 青木美奈子, 大西秀典, 笠原由貴子, 山本裕, 吉川かおり, 浅野勉, 長瀬朋子, 橋本和幸, 李愛蓮, 松尾直樹, 面家健太郎, 近藤應, 館林宏治,

船戸道徳, 松隈英治: シンポジウム: 原因遺伝子同定から機能的アミノ酸同定へ. 日本小児アレルギー学会 (第39回) (2002年11月1日, 盛岡)

(4) 近藤直実: 招待講演: 司会: 感染とアレルギー疾患. 日本アレルギー学会総会 (第52回) (2002年11月29日, 横浜)

T.Miyabe

IFN- γ
(pg/ml)



申3 Competitive PCR with PCR-MIMICs of IFN- γ mRNA on viral infection

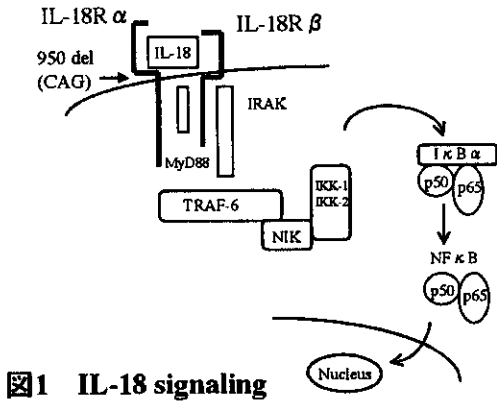
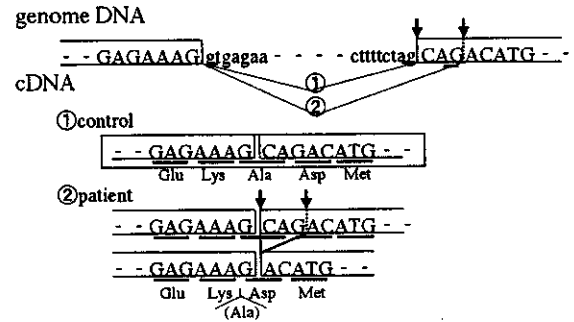
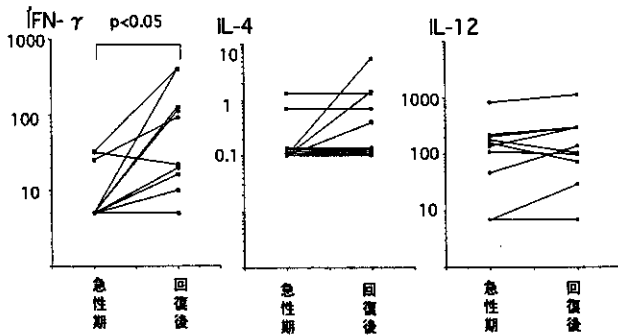


図1 IL-18 signaling

図2 インフルエンザ急性期と回復後のサイトカイン産生
Der f-1 刺激による検討 (n=10)



	Type 1	Type 2	コントロール
37°C	[950 del CAG 950 del CAG]	[950 CAG 950 del CAG]	[950 CAG 950 CAG]
↓			
30°C	[950 CAG 950 CAG]	[950 CAG 950 CAG]	[950 CAG 950 CAG]
or	[950 CAG 950 del CAG]		

図4 IL-18R α 類cDNAの950 del CAGの
培養温度による変化

分担研究報告書

IL-18、 $\beta 2$ アドレナリン受容体、SOCS3 遺伝子の多型；アレルギー疾患
発症における環境要因との相互作用に関する研究

分担研究者 田中 敏郎 大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座助手

研究協力者 比嘉 慎二 大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座
平野 亨 大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座

研究要旨 喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患は、アトピー素因などの遺伝要因と環境要因が相互作用することで発症するものと考えられている。遺伝要因として、昨年報告した新規な IL-18 構造遺伝子の多型 IL-18-105A/C、 $\beta 2$ アドレナリン受容体の 2 つの遺伝子多型 (16Arg/Gly、27Gln/Glu) の遺伝子頻度を、また新たな候補遺伝子として、SOCS3 構造遺伝子の多型の有無を検索した。IL-18-105A/C は、喘息群で有意に A の遺伝子頻度が上昇していた ($p=0.006$, $OR=1.83$)。 $\beta 2$ アドレナリン受容体の 16Arg/Gly、27Gln/Glu のハプロタイプ解析では、喘息とアトピー性皮膚炎合併症例で、16Gly である場合、血清 IgE が有意に上昇していた。SOCS3 構造遺伝子には、514Phe/Leu が存在し、現在その遺伝子頻度と機能に及ぼす影響を検討中である。環境要因として、特に食物に含まれる抗アレルギー作用機能物質の検索を行い、植物に含まれるフラボノイドに、正常好塩基球からの Th2 サイトカインの産生を抑制する作用が認められ、その活性のための基本骨格と作用機序 (NFAT の活性化抑制) を明らかとした。以前、アトピー性皮膚炎動物モデルへのフラボノイドの経口投与で、皮膚炎の発症予防が可能であることを示したが、今後ヒトでの解析をすすめたい。

A. 研究目的

アレルギー疾患は、遺伝要因と環境要因が相互作用することで発症してくるものと考えられており、この数十年間での急激な発症率の増加をみる現状では、その具体的な因子の同定とその相互作用の解明が急務の課題とされる。昨年まで、遺伝要因として、アレルギー疾患で過剰発現が認められる IL-18 の遺伝子に注目し、構造遺伝子の 105A/C の SNP の存在を報告した。また環境要因として、食物に含まれる抗アレルギー物質に注目し、フラボノイドが好塩基球細胞株からの Th2 タイプのサイトカインの産生を抑制し、アトピー性皮膚炎動物モデル (NC/Nga) の発症前からのフラボノイドの経口投与により、皮膚炎の発症が抑制されることを報告した。本年度は、遺伝要因として、IL-18-105A/C の意義を明らかとし、アレルギー疾患の発症と関与する遺伝子の新規な SNP の同定、さらにフラボノイドの作用機序、正常好塩基球に対する活性化抑制を検討した。

B. 研究方法

1. 遺伝子の多型性の解析は、倫理委員会での承認後、インフォームドコンセントにて協力が得られたアレルギー患者さん末梢血より DNA と RNA を抽出した。SNP の同定は PCR-direct sequence 法に

て、SNP の検討は PCR-RFLP 法にて解析した。

2. Buffy coat より正常好塩基球を精製後、アレルゲンや抗 IgE 抗体刺激時のフラボノイドのサイトカイン (IL-4、IL-13) 産生に対する抑制効果を ELISA、RT-PCR 法にて検討した。

3. フラボノイドの NFAT に対する作用は、好塩基球細胞株 KU812 の核蛋白を用いて、ゲルシフトアッセイにて検討した。

(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. IL-18-105A/C は、喘息群で有意に A の遺伝子頻度が上昇していた ($p=0.006$, $OR=1.83$)。しかしながら、喘息の重症度、血清 IgE や IL-18 との関与は認めなかった。

2. $\beta 2$ アドレナリン受容体の 16Arg/Gly、27Gln/Glu の haplotype 解析では、喘息とアトピー性皮膚炎合併症例において、16Gly である場合血

清 IgE の増加が有意に認められた。

3. SOCS3 遺伝子には、514Phe/Leu の遺伝子多型が存在した。

4. フィセチン等のフラボノイドは、カルモジュリンと結合することで、NFAT1 の活性化を抑制し、また正常好塩基球からの IL-4、IL-13 産生を抑制した (IC50=4.8-6.2 μ M)。

D. 考察

今回、IL-18-105A/C の喘息との関与、SOCS3-514Phe/Leu の新規な遺伝子多型を同定した。IL-18-105A/C はプロモーター領域の-137G/C と連鎖不均衡にあり、炎症惹起時の IL-18 の過剰発現に関与するものと推測される。SOCS3 は、IL-12 の応答性に関与する分子であり、この 514Phe/Leu 多型のアレルギー疾患発症との関与、機能への影響は今後の課題である。ある種のフラボノイドは低濃度でも、好塩基球からの IL-4、IL-13 産生を抑制し、アレルギー疾患発症の予防手段と成り得る可能性がある。今後同定した IL-18 や SOCS3 の遺伝子多型とフラボノイドの相互作用に関して検討する予定である。

E. 結論

1. IL-18-105A/C は、喘息の発症と関与する。
2. SOCS3 構造遺伝子には、514Phe/Leu の多型が存在する。
3. ある種のフラボノイドには、正常好塩基球からの Th2 サイトカインの産生を抑制する作用が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表
1. 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* 146:221-227.
2. Higa S., H. Hirata, S. Minami, S. Hashimoto, M. Suemura, Y. Saeki, I. Kawase, and T. Tanaka. 2002. Autoimmune acquired form of angioedema that responded to danazol therapy. *Internal Med* 41:398-402.
3. Suido H., T. Tanaka, T. Tabei, A. Takeuchi, M. Okita, T. Kishimoto, S. Kasayama, and T. Higashino. 2002. A mixed green vegetable and fruit beverage decreased the serum level of LDL in hypercholesteromic patients. *J Agric Food Chem* 50:3346-3350.
4. Kasayama S., T. Tanaka, K. Hashimoto, M. Koga, and I. Kawase. 2002. Efficacy of

glimepiride for the treatment of diabetes mellitus occurring during glucocorticoid therapy. *Diabetes Care* 25:2359-2360.

5. Higa S., M. Kotani, M. Matsumoto, A. Fujita, M. Suemura, I. Kawase and T. Tanaka. 2002. Administration of anti-interleukin-18 antibody fails to inhibit development of dermatitis in atopic dermatitis-model mice NC/Nga. *Br J Dermatol* In press

6. Tanaka T., S. Higa, T. Hirano, M. Kotani, M. Matsumoto, A. Fujita, and I. Kawase. Flavonoids as potential anti-allergic substances. *Current Medicinal Chemistry Anti-Inflammatory & anti-allergy agents*. In press

7. Higa S., T. Hirano, M. Mayumi, M. Hiraoka, Y. Ohshima, M. Nambu, E. Yamaguchi, N. Hizawa, N. Kondo, E. Matsui, Y. Katada, A. Miyatake, I. Kawase, and T. Tanaka. Association between IL-18 gene polymorphism 105A/C and asthma. *Clin Exp Allergy* In press

8. Higa S., M. Kotani, M. Matsumoto, A. Fujita, T. Hirano, M. Suemura, I. Kawase, and T. Tanaka. Fisetin, a flavonol, inhibits T helper 2 (Th2) type cytokine production by activated human basophils. *J Allergy Clin Immunol* In press

9. 小林民代、水道裕久、竹内明、牧野武利、田中敏郎、長岡利。ラットにおけるブロッコリーの血清コレステロール低減作用
日本栄養食糧学会誌 55; 275-280、2002.

10. 平野亨、比嘉慎二、田中敏郎。IL-18 遺伝子の多型性と機能 アレルギー科 14;400-402、2002.

2. 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。食物フラボノイドの抗アレルギー作用 第 14 回アレルギー学会春季臨床大会 2002、3、千葉
2. 宮武明彦、藤田麻里、藤田きみえ、比嘉慎二、渡邊大、田中敏郎、土居悟。気管支喘息患児に対する長期吸入ステロイド (ICS) 療法—特に身長発育について 第 52 回日本アレルギー学会総会 2002、11、横浜
3. 藤田きみえ、藤田麻里、比嘉慎二、渡邊大、田中敏郎、中野直子、長坂行雄、宮武明彦。成人気管支喘息患者に対するフルチカゾン、ディスクヘラー (FP) 吸入コンプライアンスの検討 第 52 回日本アレルギー学会総会 2002、11、横浜
4. 比嘉慎二、平野亨、田中敏郎、川瀬一郎、片田圭宣、宮武明彦。気管支喘息患者における IL-18 遺伝子多型の解析 第 52 回日本アレルギー学会総会 2002、11、横浜
5. 立花輝夫、田中敏郎、中西憲二。サルコイドーシスの経過と血清 IL-18 第 52 回日本アレルギー

学会総会 2002, 11, 横浜

6. 比嘉慎二、平野亨、田中敏郎、川瀬一郎. フラボ
ノイドによる好塩基球活性化抑制作用の検討 日本
免疫学会総会 2002, 12, 東京