

20020801

# 厚生労働科学研究研究費補助金

厚生省感覚器障害および免疫アレルギー等研究事業

アレルギー疾患の発症および悪化に影響する因子の解析 (14210601)

平成 14 年度 総括研究報告書

主研究者 大田 健

平成 15 (2003) 年 4 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

研究課題名：アレルギー疾患の発症および悪化に影響する因子の解析-----	1
大田 健	

### II. 分担研究報告

1、アレルギー疾患の発症および悪化に影響する因子の解析に関する研究-----	4
-リモデリングに関連する増殖因子の遺伝子多型の解析-	
大田 健（帝京大学医学部内科教授）	
2、アレルギー疾患の発症及び悪化に影響する因子の解析に関する研究-----	7
平井 浩一（東京大学大学院医学系研究科生体防御機能学客員助教授）	
3、アレルギー疾患の発症及び悪化に影響する因子の解析に関する研究-----	9
西村 正治（北海道大学大学院医学研究科分子病制御学教授）	
4、アレルギー疾患の発症及び悪化に影響する因子の解析に関する研究-----	13
棟方 充（福島県立医科大学呼吸器科教授）	
5、アトピー性皮膚炎における自然免疫反応の低下とその誘因に関する研究-----	16
塩原 哲夫（杏林大学医学部皮膚科学教授）	
6、アレルギー疾患の発症及び悪化に影響する因子の解析に関する研究-----	19
庄司 俊輔（国立医療所南福岡病院副院長）	
7、成人喘息における早期治療介入の有効性を規定する因子に関する研究-----	23
小林 信之（国立国際医療センター呼吸器科部長）	
8、アレルギー疾患の発症及び悪化に影響する因子の解析に関する研究-----	25
橋本 修（日本大学講師）	
9、アレルギー疾患の発症及び悪化に影響する因子の解析に関する研究-----	26
玉利 真由美（理化学研究所 遺伝子多型研究センター研究員）	
土居 悟（大阪府立羽曳野病院アレルギー小児科部長）	

Ⅲ. 研究の刊行に関する一覧表----- 27

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷----- 29

## アレルギー疾患の発症および悪化に関する因子の解析

主任研究者：大田 健（帝京大学医学部内科教授）

喘息およびアトピー性皮膚炎は今なお増加する高い有病率を示すアレルギー性疾患である。本研究は喘息・アトピー性皮膚炎の発症および悪化に影響を及ぼす因子を明らかにすることにより、これらの発症、増悪を予測し、最終的に有効な治療戦略の開発につなげることを目的とした。今年度は基礎的検討として、アレルギー病態形成の重要な過程であるIgE依存性反応、炎症機転、修復（リモデリング関連分子）についてSNPを同定でき、IgE受容体β鎖、CTLA4、ケモカイン（Eotaxin, TARC）、クララ細胞分泌関連蛋白UGRP-1、β2-アドレナリン受容体）、TGF-βで機能と結びついていることが示唆された。平成15年度より、アトピー型と非アトピー型の喘息、および喘息合併・非合併群のアトピー性皮膚炎に焦点を絞り同一のサンプルを用いて各SNPの検討を行う。

分担研究者：平井浩一（東京大学大学院医学系研究科生体防御機能学客員助教授）、西村正治（北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学教授）、棟方 充（福島県立医科大学呼吸器科教授）、塩原哲夫（杏林大学医学部皮膚科学教授）、庄司俊輔（国立療養所南福岡病院副院長）、小林信之（国立国際医療センター呼吸器科部長）

研究協力者：羅 智靖（日本大学医学部先進医学総合研究センター教授）、向山徳子（同愛記念病院小児科部長）、佐野靖之（同愛記念病院アレルギー呼吸器科部長）、橋本 修（日本大学医学部第一内科講師）、太田康男（東京大学医学部付属病院感染内科助手）、上原誉志夫（東京大学保健管理センター助教授）、石井彰（東京大学医学部付属病院呼吸器内科助手）、玉利真由美（理化学研究所 遺伝子多型

研究センター）、土居 悟（大阪府羽曳野病院アレルギー小児科部長）

山下直美（帝京大学医学部内科助教授）

中島幹夫（帝京大学医学部内科助手）

山本寿子（帝京大学医学部内科研究生）

### A. 目的

喘息およびアトピー性皮膚炎は今なお増加する高い有病率を示すアレルギー性疾患である。本研究は喘息・アトピー性皮膚炎の発症および悪化に影響を及ぼす因子を明らかにすることにより、これらの発症、増悪を予測し、最終的に有効な治療戦略の開発につなげることを目的とする。喘息・アトピー性皮膚炎の病態には慢性の炎症とリモデリングが重要な役割を演じている。炎症やリモデリングに関連する細胞や液性因子についての機能的な研究が進められており、関与する細胞群や液性因子が明らかにされてきている。例えば、炎症には好酸球、マスト細

胞、Th2細胞、樹状細胞などの細胞群とIL-4、IL-5、IL-13などのTh2タイプやGM-CSFのサイトカインなどが重要であり、リモデリングには線維芽細胞、上皮/ケラチノ細胞、マクロファージ、樹状細胞などの細胞群とPDGF、TGF- $\beta$ 、IGF-Iなどの成長因子などが機能的に関与している。さらに細胞遊走活性をもつ各種ケモカインについてもその関与が示唆されている。そこでアレルギー病態形成の重要な過程であるIgE依存性反応、炎症機転、修復（リモデリング関連分子）を遺伝子レベル、蛋白レベルで解析し、発症および悪化に影響を及ぼす因子を明らかにする。さらに最近注目されている自然免疫と獲得免疫の相互作用という観点から、自然免疫に関連する因子についても解析を進める。

アトピー型と非アトピー型の喘息、および喘息合併・非合併群のアトピー性皮膚炎に焦点を絞り検討する。臨床的、基礎的知見の少ない喘息とアトピー性皮膚炎の合併例も含め検討するのが本研究の特徴の一つである。

## B. 方法

三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿い、各施設で共通のフォーマットで倫理委員会に提出し、承認を得る。検体は各施設と帝京大学で二重に匿名化する。

対象は1. アトピー型喘息症例 2. 非アトピー型喘息症例 3. アトピー性皮膚炎症例 4. 喘息アトピー性皮膚炎合併例 5. 健常人の五群であり、各群100例収集する。検体はEDTA採血し、血漿および、単核球分画よりDNAを採取する。同時に各群の患者について病歴、治療歴、検査所見を統一したフォーマットに入力する。背景として、総IgE、IgE

RAST（吸入系：ハウスダスト、ダニ、ブタクサ、ネコ毛）、好酸球数を検討する。喘息については呼吸機能検査、気道過敏性のデータを採取する。

解析因子としては、IgE受容体 $\beta$ 鎖、CTLA4、サイトカイン（IL-4、IL-13、IL-18）、ケモカイン（eotaxin, TARC, MDC, I-309）、クララ細胞分泌関連蛋白UGRP-1、 $\beta$ 2-アドレナリン受容体）、TGF- $\beta$ 、PDGF、IGF-I、MUC1, 2, 4, 5AC, 5B, 7、TLR4、MAP kinaseを遺伝子レベル、蛋白レベルで検討する。

治療による介入とその効果との関連を解析する目的で、早期治療介入症例についても解析を進める。

## C. 結果

倫理委員会の承認：各共同研究施設で、倫理委員会に提出し、14年末までに承認を得た。平成15年2月より検体の収集を開始する。サンプルは各施設で匿名化し、血漿およびDNAを採取した後、全てのサンプルを一度帝京大学に集め、再度匿名化する。個人情報情報は匿名化した形を帝京大学で集積する。各施設では各施設の症例についての情報を連結可能匿名化の状態での保存する。全ての匿名化は個人情報管理者が行なう。

各施設でそれぞれ平成15年度解析予定の遺伝子多型について、既存のサンプルを用いて、基礎的検討をおこなった。

1) Fc $\epsilon$ RI $\beta$ の-109C/T およびCTLA4-318C/Tの遺伝子変異が血清IgE値に遺伝的影響を与えていることが示された。この影響は気管支喘息患者では認められるが、アトピー性皮膚炎患者や健常人では認められなかった。

2) Eotaxin およびTARCのプロモーター領域にSNPを同定した。TARC遺伝子のプロモーター領域の-431C/TのSNPはTTのホモタイプおよびCTのヘテロタイプがCCのホモタイプと比較して血漿TARCの濃度が高かった。喘息重症例では血漿中のTARCの濃度が上昇していた。

3) 喘息患者ではUGRP1の陽性細胞が対照群と比較して有意に増加していた。さらに遺伝子解析では-112bpにG/Aの多型が存在した。 $\beta$ 2-アドレナリン受容体遺伝子の3'側に14個に新規のSNPを同定した。

4) MUC遺伝子のプロモーター領域にSNPを同定した。

5) TGF- $\beta$ 1 遺伝子のプロモーター領域-509C/TのSNPの頻度を検討した。この変異は成人喘息患者で、正常人や喘息寛解者と比較して有意に高かった。この変異は米国デンバーで検討した条件では血漿TGF- $\beta$ 1値と関連を示し、TTのホモタイプが有意に高いTGF- $\beta$ 1値を示した。

6) アトピー性皮膚炎患者ではフローサイトメトリーによる検討で $\gamma\delta$ 細胞およびNK細胞の数が低下していた。さらに機能としてIFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ の産生能の低下を認めた。

NSAIDsは $\gamma\delta$ 細胞およびNK細胞の機能を抑制した。

7) 発症2年以内の成人喘息患者に経口ステロイド薬（プレドニソロン0.5mg/kg）を2週間投与後フルチカゾンによる吸入療法を行なった。治療早期介入による有効群を規定する因子は喘息有病期間と治療前の気流制限の度合いであった。

8) ゲノムワイドに約80,000SNPsを用いたケースコントロールスタディー（喘息vs. コントロール）を行い、この中でア

トピー性皮膚炎合併喘息患者を用いてアトピー性皮膚炎の発症に関連する遺伝子同定を試みた。その結果、 $p < 0.01$ を満たす4つのSNPが同定された。

#### D. 結論

アレルギー病態形成の重要な過程であるIgE依存性反応、炎症機転、修復（リモデリング関連分子）についてSNPを同定でき、機能と結びついていることが示唆された。解析SNPについてはさらに自然免疫に関連してTLR、気道炎症に関連して気道上皮特異的な転写因子、リモデリングに関連して増殖因子のプロモーター領域の多型についても解析を進めている。平成15年度から同一のサンプルで各因子について多型および蛋白レベルでの発現の検討を展開していく。これら基礎研究で得られた知見をEBMの確立に十分な数の症例で検証することは極めて重要であり、共通の診断基準に基づいたサンプルの多数例の収集に集中する。一方、ゲノムワイドに検索された候補SNPについても同一サンプルで検討を進める。この検討により①アトピーという共通の基盤に関連する因子、②喘息においてアトピーにより規定される因子、③疾患の重症度に関連する因子が解明されることが期待される。

また、治療早期介入症例についても個別に検討を進め、有効性と気道リモデリングに関連する因子との解析も考慮する。

## アレルギー疾患の発症および悪化に関与する因子の解析

### ーリモデリングに関連する増殖因子の遺伝子多型の解析ー

分担研究者：大田 健 （帝京大学医学部内科教授）

気管支喘息のリモデリングの形成に重要であるTGF- $\beta$ 1のプロモーター領域およびIGF-I受容体のプロモーター領域のSNPを検討した。ダイレクトシーケンス法で、TGF- $\beta$ 1のプロモーター領域-509C/TのSNPを同定した。TTはCCタイプと比較して、血漿中のTGF- $\beta$ 1レベルが高いという知見をデンバー住人51名の検討より得た。しかし、日本の住人では、ベースとなる血漿レベルはデンバー住人と比較して有意に高く、多型のタイプと血漿レベルとの相関は認められなかった。TGF- $\beta$ 1の多型と血漿レベルの関連については人種差と環境要因が関与する可能性が考えられさらに検討を進めている。IGF-I受容体のプロモーター領域にもSNPを同定し、機能との関連の検索を進めている。

研究協力者：山下直美（帝京大学医学部内科助教授）、中野純一（帝京大学医学部内科講師）、金子富志人（帝京大学医学部助手）中島幹夫（帝京大学医学部助手）、山本寿子（帝京大学医学部）

#### A. 目的

気管支喘息およびアトピー性皮膚炎の病態には慢性の炎症とリモデリングが重要な役割を演じている。リモデリングに関与する液性因子としてPDGF、TGF- $\beta$ 、IGF-Iが機能的に関与していることを我々は示してきた。今回これらの因子の遺伝子多型および病態別に血漿中蛋白レベルを測定することにより、発症および悪化に関与する因子を明らかにすることを目的とした。対象患者としてはアトピー型と非アトピー型の喘息、および喘息合併・非合併群のアトピー性皮膚炎に焦点を絞り検討する。臨床的、基礎的知見の少ない喘息とアトピー性皮膚炎の合併例も

含め検討するのが本研究の特徴の一つである。

#### B. 方法

1. 喘息症例（アトピー型） 2. アトピー性皮膚炎 3. アトピー型皮膚炎と喘息の合併 4. 健常人を対象にEDTA採血し、血漿を採取、単核球分画よりDNAを採取した。同時に各群の患者について発作歴を聴取する。背景として、総IgE、IgE RAST（吸入系：ハウスダスト、ダニ、ブタクサ、ネコ毛、ゴキブリ）、好酸球数、臨床経過（発作歴、治療歴）を検討する。

TGF- $\beta$ 1のプロモーター領域を特異的に増幅するプライマーを設定した。PCR-RFLP法でSNPを解析した。血漿中のTGF- $\beta$ 1量はELISAで測定した。

#### C. 結果

遺伝子解析を目的とする採血を行なうための説明文書および同意書を作成し、

倫理委員会の承認を得た。平成15年より、外来および入院患者で採血可能である。平成15年度に解析する成長因子および受容体の多型について基礎的検討を行なった。

背景となる知見として、マウスの喘息モデルを用いて気道のリモデリングを評価する系（DEP暴露による気道過敏性の亢進および、基底膜下組織の肥厚の観察）を確立し、このモデルでは抗TGF- $\beta$ 中和抗体の投与により上記変化の改善を示した。つまりTGF- $\beta$ 気道リモデリング形成に直接関連している知見を得ている。そこで、TGF- $\beta$ 1のプロモーター領域SNPを検出した。ダイレクトシーケンス法で、-509C/TのSNPを同定した（図1）。さらにRFLPで簡易的に検出することを試み、図2に示すように3タイプに分類できた。TGF- $\beta$ 1のプロモーター領域-509C/TのSNPのalleleの頻度はデンバーと東京で差異はなかった。成人喘息患者ではOutgrow患者に対し、ITのホモタイプの頻度が高い傾向を示した（図3）。

ITはCCタイプと比較して、血漿中のTGF- $\beta$ 1レベルが高いという知見をデンバー住人51名の検討より得た。一方同様の検討を東京都の住人についても施行した。ベースとなる血漿レベルはデンバー住人と比較して有意に高く、多型のタイプと血漿レベルとの相関は認められなかった。

同様に気道のリモデリングに重要である、IGF-Iの受容体のプロモーター領域にプライマーを設定し、多型についてdirect sequence法で検討し、SNPを同定した。

#### D. 結論

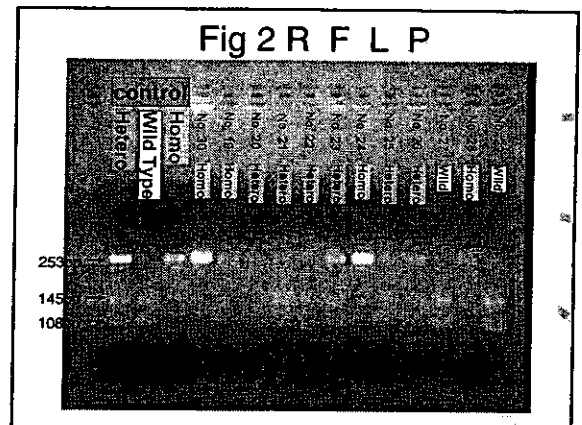
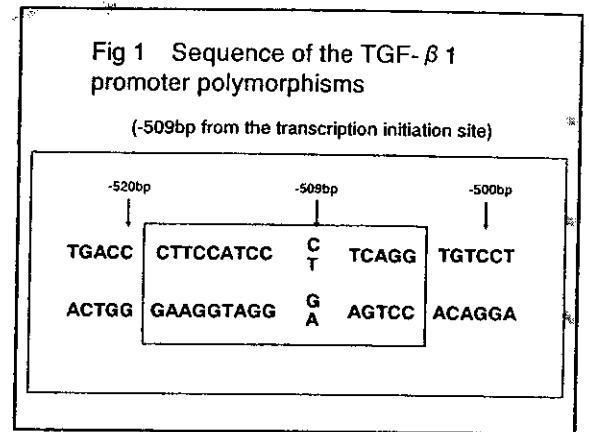
TGF- $\beta$ 1のプロモーター領域-509C/TのSNPのalleleの頻度はデンバーと東京で差異はなかった。しかし血漿中のTGF- $\beta$ 1レベルは日本の患者では多型と相関なかった。Outgrow患者では成人喘息患者と比較してITのホモタイプの頻度が高い傾向を示した。TGF- $\beta$ 1の多型と血漿レベルの関連については人種差と環境要因が関与する可能性が考えられた。次年度の本格的検討では地方の患者さんからの検体を得ることができるので、人種差と環境要因の関与の度合いについて知見を得られるものと期待できる。

#### E. 業績

1. Sekiya, T., Tsunemi, Y., Miyamasu, M., Ohta, K., Morita, A., Saeki, H., Matsushima, K., Yoshie, O., Tsuchiya, N., Yamaguchi, M., Yamamoto, K., Tamaki, K., and Hirai, K. (2003) *Immunogenetics* 54, 742-745.
2. Komiya, A., Hirai, K., Iikura, M., Nagase, H., Yamada, H., Miyamasu, M., Ohta, K., Morita, Y., Ra, C., Yamamoto, K., and Yamaguchi, M. (2003) *Int Arch Allergy Immunol* 130, 40-50.
3. Yamashita, N., Tashimo, H., Ishida, H., Kaneko, F., Nakano, J., Kato, H., Hirai, K., Horiuchi, T., and Ohta, K. (2002) *Cell Immunol* 219, 92-97.
4. Yamamoto, T., Yamashita, N., Kuwabara, M., Nakano, J., Sugimoto, H., Akiyama, K., Hirai, K., Ishii, A., Uehara, Y., and Ohta, K. (2002) *Ann Genet* 45, 109-113.



5. Nagase, H., Kudo, K., Izumi, S., Ohta, K., Kobayashi, N., Yamaguchi, M., Matsushima, K., Morita, Y., Yamamoto, K., and Hirai, K. (2001) *J Allergy Clin Immunol* 108, 563-569.



**Fig 3 Frequency of the TGF-β 1 promoter polymorphisms**

	Wild	Hetero	Homo	Total
喘息者	52 (28)	89 (49)	42 (23)	183
Outgrow	25 (40)	28 (45)	9 *(15)	62
健常者	27 (23)	66 (56)	25 (21)	118

括弧の単位: パーセント その他: 人

\*p<0.05 Outgrowは健常者に比べ、ワイルドタイプが多くホモタイプが少なかった。

アレルギー疾患の発症及び悪化に影響する因子の解析に関する研究

分担研究者 平井 浩一 東京大学大学院医学系研究科生体防御機能学客員助教授

研究要旨

アレルギー炎症には、好酸球がエフェクターとして、また Th2 がレギュレーターとして関わっている。Th2 に特異的な CCR4 のリガンドである TARC の誘発痰中、血中濃度を喘息患者、正常人と比較したところ、喘息患者では有意に増加していた。さらに、TARC 遺伝子の構造解析を行い、新規に C>T の SNP を見出した。この SNP は機能的であると考えられたが喘息、アトピー性皮膚炎とは関連は見い出せなかった。好酸球特異的 CCR3 のリガンドであるエオタキシン-2、-3 を検討したところ、喘息患者の気道上皮では、エオタキシン-1 のみならず、エオタキシン-2、-3 の発現が亢進していた。エオタキシン-2、-3 および、TARC がアレルギー疾患の病態に関わっている可能性が考えられた。

研究協力者：山田浩和、佐野 靖（同愛記念病院）、常深祐一郎、佐伯秀久、玉置邦彦（東京大学医学部皮膚科）、山口正雄、関谷剛、小宮明子、山本一彦（東京大学医学部アレルギーリウマチ内科）

A. 研究目的

アレルギー疾患の根底には炎症機転が存在し、好酸球、好塩基球が主たるエフェクターとして、また Th2 がレギュレーターとして、その成立に関わっている。ケモカインは、細胞走化性を持つサイトカインであり、種々の炎症病態に関わっていることが知られている。アレルギー疾患においてもある種のケモカインは、好酸球、好塩基球、Th2 の組織集積を通じてアレルギー炎症の病態の形成に関わっている可能性が強い。我々は、好酸球、好塩基球、Th2 に発現するケモカイン受容体に注目し、受容体及びリガンドについてそのアレルギー疾患での発現、産生統御、遺伝子構造解析を行ってきた。具体的には、好酸球、好塩基球に構築的かつ特異的に発現する CCR3 とその特異的リガンドであるエオタキシン-1/CCL11、-2/CCL24、-3/CCL26 について、また、Th2 に特異的に発現される CCR4 とその特異的リガンドである TARC/CCL17、MDC/CCL22 および CCR8 とその特異的

リガンドである I-309/CCL1 について検討してきた。現在までに CCR3 のリガンドであるエオタキシン-1 について、モノクローナル抗体を樹立し、その発現解析を通じて、エオタキシン-1 の発現がアレルギー疾患で亢進していることを示している。また、CCR4 の特異的リガンドである TARC が、喘息の重要なケモカイン産生細胞である気道上皮細胞から大量に産生されることを示している。本年度はエオタキシン-1 とともに CCR3 の特異的リガンドであるエオタキシン-2、-3 の喘息における発現と産生制御を検討した。また、CCR4 の特異的リガンドである TARC の臨床意義を明らかにする目的で喘息患者の誘発痰、血中 TARC 濃度を正常人と比較した。さらに、TARC 遺伝子の構造解析を行うとともに喘息、アトピー性皮膚炎表現型との関連を検討した。

B. 方法

- ①古谷安希子博士（協和発酵）より抗エオタキシン-3 のモノクローナル抗体の供与を受け、ELISA システムを樹立した。エオタキシン-2 の ELISA システムは市販の抗体を用いて樹立した。
- ②エオタキシンの免疫染色は、同愛記念病院にて生検した健常人、喘息患者の気道粘膜組織にて行った。

③TARCのELISAシステムは、森田 敦博士(シオノギ)より供与された。

④誘発痰・血清は、同愛記念病院、帝京大内科通院中の喘息患者より informed consent を得た後に採取した。

⑤gDNAは、帝京大内科通院中の気管支喘息患者より採取した。TARCのSNPはSSCP法によりスクリーニングを行い、同定されたSNPはRFLP法により検出した。

#### (倫理面への配慮)

遺伝子の収集、解析に当たっては、三省庁合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した。本プロジェクトに関しては、帝京大学遺伝子研究倫理委員会、東京大学医学部附属病院ゲノム遺伝子解析研究審査委員会にて承認済みである。正常人、喘息患者の気道粘膜生検については、同愛記念病院倫理委員会の承認を受け、informed consent を得た後に施行した。

#### C. 結果

①喘息患者の誘発痰(30例)のTARC濃度は $111.7 \pm 139.9$  pg/mlであり、健常人(6例)の $31.8 \pm 39.1$  pg/mlに比べ有意に増加していた。また喘息患者(46例)の血中のTARC濃度は $192.0 \pm 143.6$  pg/mlであり、健常人(26例) $88.8 \pm 58.2$  pg/mlに比べ有意に増加していた。一方血中MDC濃度については両群間に有意な差を認めなかった。

②TARCのSNP(-431C>T)を新規に見出した。CCアリル保有者の血中TARC濃度は $61.3 \pm 7.1$  pg/ml(32例)であり、CTアリル保有者 $97.3 \pm 10.3$  pg/ml(41例)、TTアリル保有者 $84.0 \pm 10.8$  pg/ml(13例)に比べ有意に低値を示した。

-431C>Tは血清のTARC濃度と相関し、機能的であると考えられたが喘息(105例)、アトピー性皮膚炎(148例)と健常人(158例)のアリル頻度に有意差は認めなかった。

③喘息患者の気道上皮では、エオタキシン-1のみならず、エオタキシン-2、-3の発現も亢進していた。エオタキシン-1と同様、エオタキシン-2、-3の発現もTh2サイトカインであるIL-4により誘

導され、Th1サイトカインであるIFN- $\gamma$ にて抑制された。

#### D. 考察

今回の結果は、エオタキシン-1のみならず、エオタキシン-2、-3もアレルギー性気道疾患の病態に関わっている可能性を示している。TARCのSNPは機能的であったが、疾患との関連は認めなかったが、重症度等で細かく層別化して検討すると関連が出ると考えている。現在、MDC、エオタキシン-2、-3についてプロモーター、遺伝子構造を解析中である。またTh2に特異的に発現するCCR8とその特異的リガンドであるI-309についても、疾患での発現、産生統御機構、プロモーター、遺伝子構造を解析している。

#### E. 結論

好酸球特異的ケモカインであるエオタキシン-2、-3および、Th2特異的ケモカインであるTARCがアレルギー疾患の病態にケモカインとして関わっている可能性を見出した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sekiya, T., Y. Tsunemi, M. Miyamasu, K. Ohta, A. Morita, H. Saeki, K. Matsushima, O. Yoshie, N. Tsuchiya, M. Yamaguchi, K. Yamamoto, K. Tamaki, and K. Hirai. 2003. Variations in the human Th2-specific chemokine TARC gene. *Immunogenetics* 54:742-745.
2. Yoshimura-Uchiyama, C., M. Yamaguchi, H. Nagase, T. Fujisawa, C. Ra, K. Matsushima, T. Iwata, T. Igarashi, K. Yamamoto, and K. Hirai. 2003. Comparative effects of basophil-directed growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 302:201-206.
3. Fukagawa, K., N. Okada, H. Fujishima, T. Nakajima, K. Tsubota, Y. Takano, H. Kawasaki, H. Saito, and K. Hirai. 2002. CC-chemokine receptor 3: a possible target in treatment of allergy-related corneal ulcer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:58-62.
4. Katayama, H., A. Yokoyama, N. Kohno, K. Sakai, K. Hiwada, H. Yamada, and K. Hirai.

アレルギー疾患の発症及び悪化に影響する因子の解析

分担研究者名 西村正治(北海道大学)、檜澤伸之(北海道大学)

研究要旨

本研究では、我々が新たに発見した高親和性 IgE 受容体β鎖遺伝子(FCER1B、11q13)のプロモーター領域の点突然変異(-109C/T)が気管支喘息やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の発症や総 IgE 値の多寡に及ぼす影響を症例対照研究により検討した。また CTLA4 遺伝子プロモーター領域(2q33)の点突然変異(-318C/T)とFCER1B 遺伝子との遺伝的交互作用の有無を検討し、それぞれの遺伝子に存在する点突然変異がアレルギー疾患の発症及び悪化に影響する因子である可能性について検討した。気管支喘息患者(339 名)、アトピー性皮膚炎患者(120 名)、健康人(306 名)を対象とした。FCER1B 遺伝子の-109C/T 多型は喘息患者における血清総 IgE 値に遺伝的な影響を与えていた。血清 IgE 値に対する同様の影響が CTLA4 遺伝子-318C/T 多型にも認められた。さらに FCER1B 遺伝子と CTLA4 遺伝子との間には有意な遺伝子間交互作用が認められた。FCER1B 遺伝子と CTLA4 遺伝子の影響が喘息患者だけに認められたことや、両遺伝子間に相互作用が存在することは、これまでに各施設で行われた遺伝子解析の結果が一致しないことを説明するかもしれない。さらに今回の結果はアトピー性皮膚炎と気管支喘息とにおいて血清 IgE の上昇する病態、機序が異なる可能性を示唆している。

A.研究目的

現在、気管支喘息の罹患率は年々増加しているが、喘息は生活の質(quality of life)を障害するのみならず、ときに突然死の原因にもなる。気管支喘息の発症には環境因子のほかに複数の遺伝因子が強く関与していることが多くの疫学データや、家系や双子を用いた遺伝解析から明かにされている。1989 年にオックスフォード大学の Cookson と Hopkin が第 11 番染色体長腕 11q13 領域と気管支喘息やアレルギー性鼻炎の発症の基盤となる高 IgE 反応性(アトピー素因)との遺伝的連鎖を報告した。

我々はこれまでに日本人集団で 11q13 領域の多型マーカーと血清総 IgE 値との関連を報告してきた。その後、高親和性 IgE 受容体β鎖をコードする遺伝子が 11q13 遺伝子座に存在することが判明した。これまでに他のグループからいくつかのβ鎖遺伝子の変異が報告されているが、我々が検討した日本人集団にはこれらの既知の変異は存在せず、β鎖遺伝子やその調節領域に未知の変異が存在する可能性が強く示唆された。そこで、アトピー性気管支喘息と診断された 20 名を選びだし、各人でβ鎖遺伝子の 7 つのエクソン及びプロモーター領域の

塩基配列をすべて決定した。その結果、新たにプロモーター領域(転写開始部位から109bp 上流)の点突然変異(C→T)を発見した。この新しい変異の遺伝子頻度は健常日本人(226名)においてCアリルが30.3%、Tアリルが69.7%と共に高い値を示した。一方7つのエクソン部分にはこれまでに報告された変異を含め、いかなる遺伝子変異も認めなかった。従って、少なくとも我々が検討している日本人集団ではこのプロモーターの変異が喘息の発症、病態や総IgE値の多寡に影響を与えている可能性があると考えられた。今回我々はCTLA4分子にも着目した。CTLA4はco-stimulatory molecule(B7)のT細胞上の受容体で、T細胞の活性化、Th1/Th2バランスさらにはTh3の調節などに関与する分子である。CTLA4遺伝子プロモーター領域の多型(-318C/T)は糖尿病や多発性硬化症、自己免疫性肝炎や橋本病などの多くの免疫炎症性疾患と遺伝的に関連している。喘息のgenomewideでの解析でも同遺伝子が存在する2q33に有意なピークを認めている。従ってアトピーや喘息の重要な候補遺伝子の一つと考えられている。高親和性IgE受容体β鎖遺伝子のプロモーター領域の変異(-109C/T多型)とCTLA4遺伝子プロモーター領域の変異(-318C/T多型)はこれまでに報告された他のいかなる変異に比較しても一般集団における頻度が極めて高く、喘息やアトピーなどの罹患頻度が非常に高い疾患における遺伝的意義が高いことが予測される。本研究では、我々が新たに発見した高親和性IgE受容体β鎖遺伝子(FCER1B、11q13)のプロモーター領域の点突然変異(-109C/T)が気管支喘息や

アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の発症や総IgE値の多寡に及ぼす影響を症例対照研究により検討する。さらに高親和性IgE受容体β鎖遺伝子プロモーターの多型とCTLA4遺伝子プロモーターの多型との交互作用に注目し、気管支喘息の病態におけるこれらの遺伝子多型の意義を検討する。

## B.研究方法

高親和性IgE受容体β鎖及びCTLA4遺伝子のプロモーター領域の多型によって喘息患者における血清総IgE値、抗原特異的IgE抗体の有無や陽性抗原の種類、数に違いがあるかどうかを検討する(内因型、外因型分類に対する遺伝的影響)。また気管支喘息の発症年齢(幼若年期と成人以降)や家族歴の有無との関連についても検討する(疾患異質性の検討)。気管支喘息患者、健常者の臨床情報と末梢血からの遺伝子DNAの収集、血清総IgE値と抗原特異的IgE抗体の測定を行う。喘息患者は北海道大学医学部附属病院第一内科喘息外来を受診した喘息患者、健常者は問診で気管支喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患に罹患していない者とする。それぞれの遺伝子の喘息発症への寄与度を1.5-3.0と推定し総計500人程度の人数を検定することで有意差 $p<0.01$ のレベルで遺伝子の効果を同定する。さらにアトピー性皮膚炎患者(120名)を対象とし、各群でのFCER1B遺伝子プロモーター領域の-109C/T変異の頻度を検討し、疾患発症における意義を検討する。一方、喘息群での総IgE値や抗原特異的IgE抗体の有無とCTLA4遺伝子の変異(-318C/T)との

遺伝的関連を検討する。FCER1B 遺伝子と CTLA4 遺伝子の各プロモーター領域の多型間での遺伝子/遺伝子相互作用の有無については、年齢、性別、喫煙歴を考慮した多変量解析を用いて検討する。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトの遺伝子解析を主要課題として実施される。資料の提供者、その家族と血縁者、その他関係者の人権及び利益保護のために、三省合同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき、説明書と同意書を作成した。北海道大学「医の倫理委員会」に「炎症性肺疾患の遺伝素因に関する研究」として審査を申請し、既に承認されている。

#### C. 研究結果

いずれの遺伝子変異も喘息やアトピー性皮膚炎の発症には遺伝的な寄与を認めなかった。FCER1B 遺伝子の-109C/T 多型は喘息患者における血清総 IgE 値に遺伝的な影響を与えていた( $p=0.0004$ )。すなわち T をホモで有する喘息患者(127名)の平均 IgE 値は C を有する喘息患者(212名)に比べ有意に IgE が高値であった。この遺伝的な影響はアトピー性皮膚炎や健常人では認められなかった。血清 IgE 値に対する同様の影響が CTLA4 遺伝子-318C/T 多型にも認められた( $p=0.0047$ )。さらに FCER1B 遺伝子と CTLA4 遺伝子との間には有意な遺伝子間交互作用が認められた( $p=0.014$  for interaction)。

#### D. 考察

FCER1B 遺伝子の変異は肥満細胞や好塩基球の膜表面に発現した高親和性 IgE

受容体β鎖の発現量やその後のシグナル伝達の強度に影響を与えることで、また CTLA4 遺伝子の変異は T 細胞が抗原提示細胞から抗原の情報を受け取る時に、その情報の質的、量的な変化をもたらすことで、それぞれ血清総 IgE 値の多寡に遺伝的な影響を与えることが考えられる。FCER1B 遺伝子と CTLA4 遺伝子の影響が喘息患者だけに認められたことや、両遺伝子間に相互作用が存在することは、これまでに各施設で行われた遺伝子解析の結果が一致しないことを説明するかもしれない。FCER1B や CTLA4 の遺伝的影響は喘息患者にのみ認められ、喘息に特有な他の遺伝因子や環境因子との相互作用がその遺伝効果発現のために重要と考えられた。またドイツの研究グループは幼少時のダニや猫アレルギーへの暴露とその後の喘息発症との間に明らかな関連がないことを報告し、喘息患者に認められる血清総 IgE 値や抗原特異的 IgE の高値は、喘息に特有な気道病態の結果として全身の IgE 反応性が増強してくることを反映していると考えた。我々が観察した FCER1B や CTLA4 が喘息患者のみで IgE に対して強い遺伝的影響を示した結果は、この仮説に合致するものと考えられる。FCER1B 遺伝子がアトピー性皮膚炎の発症に及ぼす影響は明らかではない。アトピー性皮膚炎に認められる総 IgE の上昇には気管支喘息におけるそれとは異なった機序の存在が考えられた。これらの一連の研究結果は、アトピーや気管支喘息が非常に多くの遺伝因子と環境因子との複雑な交互作用の結果として発症してくることを示唆している。

## E. 結論

今回の検討では CTLA4 と FCER1B 遺伝子の血清総 IgE 値に対する影響が認められた。我々が発見した高親和性 IgE 受容体 β鎖遺伝子や CTLA4 の遺伝子多型を含め、これまでに 10 を超える遺伝子変異に気管支喘息発症との間の遺伝的な関連が報告されている。いずれの変異もひとつひとつの遺伝子が疾患の発症に与える影響は非常に小さいが、それらの遺伝子多型が疾患の病態、病型や重症度に何らかの影響を与えている可能性がある。これらの遺伝子多型が持つ意義を遺伝疫学的に明らかにすることは喘息の疾患異質性の存在や明確な病態の理解を可能にし、それらの知見に基づいた正確な疾患分類、有効な予防や治療の開発などへの発展が期待される。一つ一つの遺伝子が少しずつ疾患発症のリスクを上昇させる。その総和が全体として疾患の発症をもたらすといった比較的単純なモデルでは喘息やアレルギーなどの Complex disease を解明することは困難である。今回示したような、より多様な遺伝子型と表現型との関連を考慮していく必要がある。多様な相互作用が徐々に解明されてくることで、遺伝子の疫学研究や機能的な研究においてより再現性の高いデータが得られることが期待される。

F.健康危険情報           なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hizawa N, Yamaguchi E, Ohe M, Itoh A, Furuya K, Ohnuma N, Kawakami Y. Lack of linkage between atopy and locus 11q13. Clin Exp Allergy. 1992, 22: 1065-69.

Hizawa N, Yamaguchi E, Furuya K, Ohnuma N, Kodama N, Kojima J, Ohe M, Kawakami Y. Association between high serum total IgE levels and D11S97 on chromosome 11q13 in Japanese subjects. J Med Genet, 32 (5): 363-369, 1995.

Hizawa N, Yamaguchi E, Jinushi E, Kawakami Y. A common FCER1B gene promoter polymorphism influences total serum IgE levels in a Japanese population. Am J Respir Crit Care Med. 2000 Mar;161(3 Pt 1):906-9.

Hizawa N, Yamaguchi E, Jinushi E, Konno S, Kawakami Y, Nishimura M. Increased total serum IgE levels in patients with asthma and promoter polymorphisms at CTLA4 and FCER1B. J Allergy Clin Immunol 2001 Jul; 108(1 Pt 1):74-9

## 2. 学会発表

May 2000 96<sup>th</sup> ATS, Toronto, Canada

“The -109C/T polymorphism at the promoter region of the FCER1B gene and IgE phenotypes in subjects with bronchial asthma”

May 2001 97<sup>th</sup> ATS San Francisco, USA

“The CTLA-4 and the FCER1B promoter polymorphism interact to increase total serum IgE levels”

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得           なし

2. 実用新案登録   なし

3. その他           なし

厚生労働研究補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

（分担）研究報告書

アレルギー疾患の発症及び悪化に影響する因子の解析に関する研究

（分担） 研究者 棟方 充 福島県立医科大学 教授

#### 研究要旨

本年度は研究計画の倫理委員会での承認を得、検体収集を開始した。また、既存の検体を用いて、平成15年度からの解析に向けた準備的研究を行なった。Uteroglobin-related protein-1 (UGRP1)に関しては、簡便な遺伝子多型検出方法を確立するとともに、喘息患者での蛋白発現が健常者と異なることを明らかにした。また、 $\beta$ アドレナリン受容体遺伝子(ADRB2)に関してはこれまで未検討であった3'側の遺伝子多型を解析し新たな SNPs を発見した。

#### 研究協力者

大塚義紀・福島県立医科大学講師

石田 卓・福島県立医科大学助手

斎藤純平・福島県立医科大学助手

吉川素子・福島県立医科大学研究生

#### A.研究目的

我々は、代表的アレルギー性疾患である気管支喘息に注目し、その発症及び難治化に影響する因子の解析を目標としている。本年度の主要な研究目標は以下の2つである。

1.検体収集：学内倫理委員会に研究計画を提出し、研究実施許可をうける。次に、気管支喘息患者の病態解析を行うとともに、インフォームドコンセントを得た上で、血液サンプルを採取し、DNA抽出をおこなう。

2.遺伝子解析：気道リモデリング関連分子の検討としてクララ細胞分泌蛋白(CCSP; Uteroglobin)関連蛋白(Uteroglobin Related Protein-1; UGRP1)ならびにその遺伝子と $\beta$ アドレナリン受容体遺伝子について、今後の

解析に向けての基礎的検討を開始する。これまでに収集した連結不可能匿名化されたDNAならびに剖検肺と手術肺を用いて(いずれも倫理委員会での許可済)、以下の検討をおこなう。

#### B.研究方法

1.免疫染色による喘息肺ならびに非喘息肺でのUGRP1蛋白の発現に関する検討

2.UGRP1 遺伝子多型の検出方法の確立(これまでの我々の検討は、直接シーケンスによるものであったが、より簡便な PCR-RFLP を用いた SNP 検出方法を確立する)

3. $\beta$ 2 アドレナリン受容体遺伝子の新規 SNP の解析 (特に、3'側における SNPs の検索)



#### (倫理面への配慮)

新たな検体収集に関しては、学内倫理委員会に研究計画を提出し許可を受けた後に検体収集を開始する。特に、遺伝子解析に関しては、福島県立医科大学ヒトゲノム、遺伝子解析研究規定に則るものである。また、既存の連結不可能匿名化された DNA ならびに剖検・手術肺に関しては、既に学内倫理委員会での許可が得られている。

#### C. 研究結果

##### 1. 検体の収集:

本研究班の研究計画を本学倫理委員会に提出し許可が得られた。現在、検体採取を開始した所である。

##### 2. 既存 DNA、肺組織を用いた検討結果:

1) 喘息肺ならびに非喘息肺での UGRP1 蛋白の発現: UGRP1 蛋白に対する polyclonal 抗体を用い免疫染色を行なった。健常肺では UGRP1 は健常肺では II 型肺胞上皮細胞, クララ細胞, 線毛上皮細胞に発現がみられた。また気管支腺, マクロファージなどにも発現していた。細気管支上皮における染色陽性細胞の出現率を検討したところ陽性細胞出現率は喘息群において  $39.9 \pm 23.4SD\%$  であり, 対照群では  $15.5 \pm 5.6\%$  で, 前者において有意に発現が増加していた ( $p < 0.05$ )。

2) PCR-RFLP を用いた UGRP1 遺伝子 SNP 検出方法: UGRP1 遺伝子には -112bp の位置に G/A 多型が存在し, これが遺伝子発現に影響することが明らかにされている。この多型を検出するため, -210~+7 までの 217bp を PCR により増幅, さらに PCR product を制限酵素(Hph I)で digest する検出系を開発し

た。既に直接シーケンス法により genotype が判明している検体を用い, 検出精度を確認した所, 各 genotype で以下の長さの band が検出された(A/A: 147bp, 70bp, A/G: 147bp, 110bp, 70bp, 37bp, G/G: 110bp, 70bp, 37bp)。この結果から, 本 PCR-RFLP 法により簡便に遺伝子型が検出可能になった。

3)  $\beta 2$  アドレナリン受容体遺伝子(ADRB2)3'側の新規 SNP の解析: 健常人 25 名, 喘息患者 25 名を用い, ADRB2 遺伝子+6200bp までの SNPs の解析を行った。その結果, 14 個の SNPs の存在を確認した。

#### D. 考察

本年度は倫理委員会での承認に多少時間がかかったものの, 許可が得られ, 検体収集を開始した。また, この間, 既存の検体を用いて, 平成 15 年度からの解析に向けた準備的研究を行なった。UGRP1 に関しては, 簡便な多型検出方法を確立し, また, 喘息患者での蛋白発現が健常者と異なることを明らかにした。また, ADRB2 遺伝子に関してはこれまで未検討であった 3'側の遺伝子多型を解析し新たな SNPs を発見した。これらの情報を基に来年度の解析を進める予定である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kamachi A, Nasuhara Y, Nishimura M, Takahashi T, Homma Y, Ohtsuka Y and Munakata M, Dissociation between responsiveness to methacholine and responsiveness to antigen. Eur Respir J, 2002, 19:76-83.
- 2) Niimi T, Munakata M, Keck-Waggoner CL, Popescu NC, Levitt RC, Hisada M and Kimura S, A polymorphism in the human UGRP1 gene

promoter that regulates transcription is associated with an increased risk of asthma. *Am J Human Genetics*, 2002, 70:718-725.

3) Takahashi T, Munakata M, Ohtsuka Y, Nishihara H, Nasuhara Y, Kamachi A, Akita H, Homma Y and Kawakami Y, Expression and alteration of ras and p53 proteins in idiopathic pulmonary fibrosis with lung cancer. *Cancer*. 2002, 95: 624-633.

4) Takahashi T, Ohtsuka Y, Munakata M, Nasuhara Y, Kamachi A, Homma Y and Kawakami Y. Occurrence of farmer's lung disease is relevant to meteorological conditions; A 20-year follow-up survey analysis. *Am J Ind Med*, 2002, 46: 506-513.

## 2. 学会発表

1) 石田 卓、関根聡子、菅原 綾、吉川素子、金沢賢也、斎藤純平、大塚義紀、鈴木利光、木村芝生子、棟方 充. 健常肺と喘息患者肺における uteroglobin-related protein-1 (URGP1)発現の検討. 第100回日本内科学会講演会(福岡市)、日本内科学会雑誌、92 (Suppl): 191, 2003.

2) 吉川素子、石田 卓、井上恵一、菅原 綾、渡辺香奈、斎藤純平、大塚義紀、鈴木利光、木村芝生子、棟方 充. 原発性肺癌における uteroglobin-related protein-1 (URGP1)発現の免疫組織化学的検討. 第100回日本内科学会講演会(福岡市)、日本内科学会雑誌、92 (Suppl): 248, 2003.

アトピー性皮膚炎における自然免疫反応の低下とその誘因に関する研究

分担研究者 塩原哲夫 杏林大学医学部皮膚科教授

**研究要旨** アトピー性皮膚炎(AD)患者では、自然免疫担当細胞である $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞が、正常人コントロールと比べ末梢血中で著明に減少しているだけでなく、その産生するサイトカイン(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )も著明に減少していることが明らかになった。このような減少は獲得免疫細胞(CD4, CD8 T細胞)では著明ではなく、自然免疫担当細胞に特異的に認められた。

近年、使用頻度の増加している NSAID はこのような $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞からのサイトカイン(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )産生を単球を介することなく直接的に抑制した。小児期の NSAID の頻用は自然免疫能の低下を招き、ADを増加させている可能性が示された。

**A. 研究目的**

アトピー性皮膚炎(AD)では様々なウイルス、細菌感染が起りやすいことが知られている。この原因は必ずしも明らかではないが、医療レベルの高いとされる先進諸国における近年のADの著明な増加をあわせて考えると、過剰治療による自然免疫の低下が感染に対する抵抗性の減弱をもたらし、ひいてはAD発症に繋がっていることが推測される。そこで本研究ではADにおける自然免疫担当細胞(NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞)の機能を明らかにするとともに、使用頻度の増加が著しい NSAIDs の自然免疫担当細胞に対する影響を検討したいと考えている。

**B. 研究方法**

1. AD患者及び正常人コントロールより末梢血単核球(PBMC)を分離し、フローサイトメトリーにより獲得免疫担当細胞、及び自然免疫担当細胞の頻度を調べる。獲得免疫担当細胞として TCR- $\alpha\beta$ , CD4, CD8, CD19 陽性分画を、自然免疫担当細胞としては TCR- $\gamma\delta$ , CD56(NK)陽性細部分画の PBMC 中の頻度を測定する。
2. これらの細胞分画における早期活性化マーカーとしての CD69 発現と、皮膚へのホーミング・レセプターである CLA 発現を測定

する。

3. これらの細胞分画の機能を明らかにするため、PMA + ionomycin にて様々な時間(~6h)刺激し、その細胞分画に発現してくるサイトカイン(TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4)をフローサイトメトリーにて測定する。
4. 正常人 PBMC の様々な分画からのサイトカイン産生に対する NSAIDs の影響を調べるため、NSAIDs 添加群と非添加群における PMA + ionomycin 刺激により各分画に発現されるサイトカイン(TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ )を比較検討する。
5. NSAIDs のサイトカイン産生に対する作用が直接、自然免疫担当細胞に向けられているかを明らかにするため、PBMC 中から CD14<sup>+</sup>単球を除去し、#4 と同様の検討を行う。さらに $\gamma\delta$ T細胞のみを単離し同様の検討を行う。
6. 本研究の実施にあたっては、試料提供者に危害を加える可能性は皆無であり、検体の採取にあたっては研究の目的を十分に説明し、同意を得た上で試料を収集するなど、倫理面でも十分配慮をした。

**C. 研究成果**

1. 正常人と比較し、AD患者PBMCでは TCR- $\alpha\beta$ , CD4, CD8 細胞では有意差を認めなかつ

たが、 $\gamma\delta$ T細胞、CD56<sup>+</sup>NK細胞数は著明に低下し、CD19<sup>+</sup>B細胞は有意に増加していた。

- AD患者の $\alpha\beta$ , CD4, CD8細胞分画におけるCD69, CLA発現は正常人に比べ有意な差を認めなかったが、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞におけるCD69発現は有意に上昇し、CLA発現は有意に低下していた。
- PMA + ionomycin刺激の時間の長さにかかわらず、AD細胞の $\alpha\beta$ , CD4, CD8細胞分画からのIFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 産生は、正常人と比べ有意な変化は認められなかった。それに対し、 $\gamma\delta$ T細胞やNK細胞からのIFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 産生は培養時間が長くなる程(2~4h, 4~6h)、正常人に比べ低下することが明らかになった。一方、IL-4産生はAD患者のCD4T細胞分画で亢進していたが、NK細胞や $\gamma\delta$ T細胞では正常人と比べ有意差は認められなかった。
- NSAIDs (プフェキサマック、インドメタシン)は正常人PBMC中の $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞からのTNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 産生を量依存的に著明に抑制した。
- NSAIDsの $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞からのサイトカイン産生の抑制は、CD14<sup>+</sup>単球分画除去後も変わらず認められた。単離した $\gamma\delta$ T細胞分画からのTNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 産生に対してもNSAIDsは著明に抑制した。

#### D. 考察

AD患者では、感染に対する初期免疫として重要な役割をする自然免疫担当細胞の $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞の数、機能がともに著明に低下していることが明らかになった。獲得免疫担当細胞ではこのような低下が認められないことより、これらの低下は自然免疫担当細胞に選択的であると考えられた。これらの低下は、 $\gamma\delta$ T細胞やNK細胞がその後続く獲得免疫の方向性をも認めていることを考えると、この自然免疫能の低下こそがAD患者におけるウイルスや細菌感染に対する抵抗性の低下をもたらす最大の原因ではないかと考えられた。 $\gamma\delta$ T細胞やNK細胞からのIL-4産生は低下しておらず、TNF- $\alpha$ やIFN- $\gamma$ のみが低下していることから考えると、それは

相対的に自然免疫反応におけるタイプ2反応の亢進を招き、後に続く獲得免疫反応におけるタイプ2反応への偏位をもたらしている可能性も考えられる。

NSAIDsが広く用いられるようになって久しいが、NSAIDsが自然免疫担当細胞に対して選択的な抑制作用を有することはこれまで全く明らかにされていなかった。NSAIDsが自然免疫担当細胞が最も活躍しなければならないウイルス感染や細菌感染時に頻用されていることを考えると、この選択的な抑制作用は極めて危険なことと言える。小児における近年のNSAIDsの乱用を考えると、小児期の乱用が先進諸国におけるADの増加の一因となっていることを示すものと考えている。

#### E. 結論

ADにおけるウイルスや細菌に対する易感染性は、これらに対する初期免疫反応として重要な $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞の数的、機能的低下により説明出来る。とくにこれらの細胞の産生するタイプ1サイトカインの著明な低下は、相対的にタイプ2反応を増加させ、後に続く獲得免疫反応をタイプ2反応へと偏位させると考えられる。小児期より感染時に頻用されるNSAIDsが選択的に $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞からのタイプ1サイトカイン産生を抑制させ、ADの発症を増加させている可能性がある。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究成果

##### 1. 論文発表

- Takahashi R, Mizukawa Y, Yamazaki Y, Hayakawa K, Hayakawa J, Kudo A, Shiohara T: In vitro differentiation from naïve to mature skin-homing CD4 T cells: acquisition of skin-homing properties occurs independently of CLA expression. J. Exp. Med. in press
- Shiohara T, Kano Y: Lichen planus and lichenoid dermatoses. In: Bologna J, Jorizzo JL,