

関する解析をアレルギー性腸炎モデルマウスの消化管組織を用いて行っている。

D. 考察

air-interface 法培養によるヒト初代気管支上皮細胞を用いることにより、すでに報告した (Cytokine, vol. 19, 287-296, 2002) liquid-culture 法 (液体培養法) とは異なる発現変動遺伝子のプロファイルを得た。さらに、卵白誘発喘息モデルマウスを用いることによりマウス遺伝子と共通で、かつ気管支喘息病変部位にて発現が変動している遺伝子を同定した。15-lipoxygenase はアラキドン酸代謝に関与するが、IL-4, IL-13 のシグナル伝達との関係について不明な点が多い。また、ADAM8 の生理的あるいは病理的意義もよくわかっていないが、類似のメタルプロテアーゼである ADAM33 が遺伝学的に気管支喘息と相関することが最近示されており (Nature, vol. 418, 426-430, 2002), その病理的意義については興味深いところである。今後、アレルギー性腸炎モデルマウスの病変部位での発現解析、さらに共通して発現が変動する遺伝子の機能解析により、アレルギー性腸炎における IL-4, IL-13 の役割が明らかになることが期待される。

E. 結論

気管支上皮細胞において IL-4, IL-13 により発現が変動し、同様に卵白誘発喘息モデルマウスの肺組織でも発現が変動している遺伝子を同定した。これらの遺伝子とアレルギー性腸炎との関連を解析することは、食物アレルギーの病因の解明につながると期待される。

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) 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.

- 7) 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.

- 8) 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.

- 9) 出原賢治

アレルギー疾患の病因と診断.

Medical Academy NEWS. 841 : 9-9, 2002.

- 10) 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.

- 11) 出原賢治

IL-13 研究の新展開.

最新医学 58(2) : 240-244, 2002.

- 12) 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.
- 13) 有馬和彦
IL-13の遺伝子多型.
臨床免疫 38(2):157-163. 2002.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 有馬和彦、出原賢治
アトピー候補遺伝子.
Allergy Update 14(2):7-7, 2002.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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 Izuhara, 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 Izuhara
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) Izuhara 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, 1040, 2002
- 11) 西奈津子、辻功介、宮崎倫子、人見知洋、在津正文、
室英理子、山本修一、稲田成安、小林育子、市丸智
浩、濱崎雄平、南雲文夫、出原賢治、湯山則子
小児喘息患児における血中SCCA値.

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、永井博弐、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.

3. 知的所有権の取得状況

特に記載すべき事なし

リウマチアレルギー疾患の早期診断に関する研究

EPEC(腸管病原性大腸菌)を用いた腸内フローラの経口免疫寛容成立における
役割の検討

分担研究者 古賀 泰裕 東海大学医学部感染症学教授

研究要旨

宿主の腸内フローラを構成する腸内細菌の、腸管上皮細胞への侵襲性の有無が、宿主が経口免疫寛容を獲得できるか否かにどのように関わるかについてノットバイオームマウスを用いて検討した。宿主マウスに OVA を腹腔内免疫して血中抗 OVA 抗体価を上昇させる系に、OVA をあらかじめ経口投与して血中抗 OVA 抗体価を測定することで、経口免疫寛容成立の有無を調べた。無菌マウスではすでに我々が報告したように IgG1, IgE などの Th2 系抗体が経口免疫寛容に抵抗性であり、一方通常の腸内フローラを持つ SPF マウスでは経口免疫寛容が容易に成立した。さらに、腸管上皮細胞への内在化 (internalization) 能を持つ EPEC(腸管病原性大腸菌)で腸内フローラを再建したノットバイオームマウスでは SPF マウスと同様に経口免疫寛容が成立したが、内在化に関与する遺伝子 *tir* を欠損した Tir 欠損 EPEC で再建したノットバイオームマウスでは無菌マウスと同様、経口免疫寛容に抵抗性であった。

A. 研究目的

アレルギー発症の環境要因として、感染症を引き起こす病原微生物と並んで、腸内フローラを構成する腸内常在細菌もアレルギー発症に関わる重要因子であることが強く示唆されている。腸内フローラを持たない無菌マウスでは GALT (gut-associated lymphoid tissue) が未発達で、Hygiene Hypothesis を裏付けるように Th2 免疫反応が過剰で、経口免疫寛容が成立し難い。我々はどのような腸内フローラが GALT 成熟を促し経口免疫寛容を誘導するのかを明らかにすることを目的としている。その一つの試みとして、腸内細菌の腸管上皮細胞への侵襲性の有無について注目し検討を行なった。

B. 研究方法

EPEC はヒト小児に下痢を引き起こす病原菌で腸管上皮に接着する際、Ⅲ型分泌系と称される一連の菌由来産物を用いる。その一つ

が Tir (translocated intimin receptor) と呼ばれる EPEC 由来分子で、接着に際して EPEC から分泌された Tir が腸管上皮に打ち込まれ細胞表面に発現する。次に EPEC 表面に分布した intimin と呼ばれる構造物が Tir と特異的に結合することで EPEC は腸管上皮細胞に強く接着する。その結果、EPEC は internalization により細胞内へ侵入する。Wild type EPEC 株 (WT) の、Tir 遺伝子を欠損させた EPEC 株 (Δ Tir) はこのような internalization による細胞内侵入ができなくなり、通常の非病原性大腸菌と同様のいわゆる “commensal bacteria” となる。我々は無菌マウスに WT あるいは Δ Tir を生下直後に経口接種して、腸内フローラをこれらの単一菌種で再建したマウスを作り実験に用いた。WT 再建マウスでは EPEC に対する血清抗体価が上昇し、 Δ Tir 再建マウスではそれが生じないことは前回の報告で述べた。OVA に対する経口免疫寛容を誘導するために 5 週

令の WT-あるいは Δ Tir 再建マウスに 1 日 1 回 5mg の OVA を 4 回連続経口投与した。寛容成立の有無を調べるために OVA 1 μ g in Alum 0.1mg をその後 2 週間おきに 4 回腹腔内免疫し最後の免疫から 1 週間後に採血し OVA に対する血中抗体価を測定した。経口投与を行わず OVA 1 μ g in Alum 0.1mg 腹腔内免疫のみを行なった群の血清を標準血清としその血清抗体価を 100unit/ml とした。

C. 研究結果

OVA-specific IgG1 抗体価は SPF マウス、 0.1 ± 0.0 unit/ml (n=10) に対し GF マウス、 9.8 ± 5.6 unit/ml (n=10) と、高値を示し、GF ではすでに報告したように OVA に対する経口免疫寛容が成立していなかった。一方、WT 再建マウスでは 0.8 ± 0.2 unit/ml (n=10) と、十分な経口免疫寛容成立が認められたのに対し、 Δ Tir 再建マウスでは 10.2 ± 5.1 unit/ml (n=10) と GF と同様に寛容成立が困難であった。次に腸管内容物に含まれる OVA-specific secretory IgA を測定したところ、SPF, WT 再建、GF, Δ Tir 再建では、それぞれ 141 ± 9.6 , 105 ± 9.9 , 96 ± 6.1 , 86 ± 4.6 といずれも経口免疫による寛容は成立していなかった。これらの 4 群のマウスについてパイエル板の総細胞数、T 細胞数、CD69⁺ 細胞数、PNA⁺細胞数を測定したところ、いずれも SPF > WT 再建 > Δ Tir 再建 > GF の順であった。

D. 考察

腸管上皮細胞に internalization と呼ばれる侵襲性を持つ wild type EPEC で、無菌マウスの腸内フローラを再建した WT 再建マウスでは、SPF マウスと同様に経口で投与した抗原 (OVA) に対して経口免疫寛容が成立した。一方、EPEC の Tir 遺伝子を欠損させ

た Δ Tir で再建した Δ Tir 再建マウスでは経口免疫寛容の導入に対して抵抗性であった。経口免疫寛容は消化管アレルギー発症の阻止に大きく関与していることを考えると、消化管免疫系の成熟を促し経口免疫寛容能を獲得させて消化管および全身性のアレルギー反応を阻止するに足る腸内フローラには、EPEC の様な侵襲性を持つ細菌が必要であると考えられる。

E. 結論

アレルギー発症予防に働く腸内フローラ構成細菌の持つべき特性として、侵襲性の有無が重要であると示唆された。

G. 研究発表

(論文発表)

1. Saitoh, S., Noda, S., Aiba, Y., Takagi, A., Sakamoto, M., Benno, Y., and Koga, Y. 2002. *Bacteroides ovatus* as the predominant commensal intestinal microbe causing a systemic antibody response in inflammatory bowel disease. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9 : 54-59.
2. Sasaki, M., Miyazaki, K., Koga, Y., Kimura, G., Nomoto, K., and Yoshida, H. 2002. Calcineurin - dependent mitochondrial disturbances in calcium - induced apoptosis of human immunodeficiency virus gp160 - expressing CD4⁺ cells. J. Virology. 76(1) : 416-420.
3. Sudo, N., Yu, X-N., Aiba, Y., Oyama, N., Sonoda, J., Koga, Y., and Kubo, C. 2002 . An oral introduction of intestinal bacteria prevents the development of a long -term Th2-skewed immunological memory induced by neonatal antibiotic treatment in mice. Clin. Exp. Allergy. 32: 1112-1116.

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働省免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

乳幼児における腸内細菌叢とアレルギー発症の相関関係の解析

分担研究者 園元謙二（九州大学大学院農学研究院教授）
中山二郎（九州大学大学院農学研究院助教授）

研究要旨

新生児における免疫系の発達は、腸内細菌に大きく影響を受けると考えられている。しかし、アトピーなどの生後一年以内に発症する乳幼児のアレルギーと腸内細菌叢との関連性は明らかではない。本研究は、細菌叢とアレルギー発症の関連性を疫学的に調査し、解明することを最終目的としている。まず、糞便およびさい帯血のサンプリングに協力可能な新生児ボランティア36名を登録した。糞便は生後0日から5日目までの毎日と、1ヶ月後、2ヶ月後にサンプリングした。さい帯血はIgEの測定に用いた。糞便中の総細菌数はフローサイトメトリー法により測定した。また糞便から全細菌のDNAを抽出し、PCRにより16S rDNAを増幅し、大腸菌にてクローンライブラリーを作製し、ランダムにシーケンスを行い、約40種の細菌に相当するシーケンスを得た。また増幅された16S rDNAをT-RFLP法により解析し、細菌叢の解析を行った。多くのボランティアにおいて、生後3日目に総細菌数が激増し、細菌叢も大きく変化するという共通の変動パターンを示した。その後は、総細菌数および細菌叢の変動はボランティアごとに異なり共通のパターンは見られなかった。今後、これらの方法を用いて、多検体の乳児糞便の細菌叢を解析し、それとアレルギー発症の関連性を統計的に処理することにより、日本人幼児のアレルギー発症のマーカーとなる特定細菌種の同定、あるいはアレルギー発症に高リスクを示す細菌叢の変動パターンを見つけ出すことができると期待される。

A. 研究目的

乳児期の免疫系は主として消化管において形成されると考えられ、腸管内の細菌が個人の免疫系に大きな影響を与えていると予想される。したがって、腸内細菌叢と免疫能がアレルギー疾患発症幼児と健康幼児でどのように異なるかを明らかにすることはアレルギーの発症機序を明らかにし、その予防対策を構築する上で必要である。本研究では、近年目まぐるしい進歩を遂げている分子生物学的手法を用い、多数のボランティアの細菌叢を網羅的に解析し、日本人幼児のアレルギー発症のマーカーとなる細菌種をできるだけ多く見つけ出すことを目的とする。

B. 方法・計画

(1) 幼児腸内細菌の16S rDNA配列データ

ベースの構築

乳幼児糞便より細菌のDNAを抽出し、PCR法により細菌の16S rDNAを増幅する。16S rDNAは細菌種特異的な配列をもっており、逆にこの配列情報から細菌種の同定あるいは推測が可能である。増幅された16S rDNAを一分子ずつ大腸菌へクローニングし、それぞれを配列解析することによりボランティアの腸管内におよそどの種の細菌が存在するか網羅的に把握することができる。さまざまな環境下(さい帯血中のIgE値の高低、抗生物質の投与の有無、母乳か人工乳かなど)で生育している複数名の乳幼児ボランティアにおいてこの16S rDNAのクローニング・配列解析を網羅的に行い、日本人乳幼児腸管内に存在し得る細菌種の16S rDNAの配列データベースを構築する。

(2) 乳幼児腸内細菌叢の迅速解析法の構

築

多検体の乳幼児腸管内の細菌叢を迅速かつ簡便かつ低コストで検出する方法を確立する。1) T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法、2) フローサイトメトリー法、3) 定量的 PCR 法、4) DNA マイクロアレイ法の4種の分子生物学的方法を検討する。

(3) 乳幼児腸内細菌叢のデータ収集およびアレルギー発症と腸内細菌叢の相関関係の解析

福岡市内産婦人科井植病院において新生児ボランティアを募集する。各ボランティアより生後0日目から5日目までと、1ヶ月後、2ヵ月後の糞便サンプルを採取し、細菌叢解析を上記(2)の方法により行う。また、各ボランティアのさい帯血 IgE 値を測定する。さらに、アンケート調査等により、抗生物質の使用状況、授乳状況、その他アレルギーに関する情報の追跡調査を行う。最終的に、以上すべての情報を統計的に解析し、腸内細菌叢とアレルギー発症の関連性を解析する。

(倫理面への配慮)

上記研究における幼児ボランティアは、妊娠8ヶ月～9ヶ月目の母親学級にて病院長を通じて協力要請の説明文章を出し、参加承諾の同意を得たもののみを対象として行った。得られたサンプルはすべて匿名で扱い、得られたデータは外部には漏れぬよう厳重に保管している。以上の研究計画は京都大学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

36名のボランティアから、さい帯血中の IgE 値の高低、抗生物質の投与の有無、母乳か人工乳か、の生育条件がなるべく異なるボランティア6名を選出し、B(1)の16S rDNA 配列の収集を行った。まず、各ボランティアの生後0日、5日、1ヶ月、2ヶ月の糞便サンプルから増幅された16S rDNA のクローンライブラリーより、それぞれ約10クローン、計262クローンを配列解析した。その結果、グラム陰性菌19種、グラム陽性菌20種に高い相同性を示す配列を得た。またB(2)の細菌叢迅速解析

法の検討においては、T-RFLP 法により B(1)の研究で得られた細菌種の大部分が半定量的に検出できた。

また、フローサイトメトリー法、T-RFLP 法および DGGE 法を用いて、数名のボランティアにおける生後2ヶ月間の腸内細菌叢の変動をモニタリングした。多くのボランティアにおいて、生後3日目に総細菌数が激増し、細菌叢も大きく変化するという共通の変動パターンを示した。その後は、総細菌数および細菌叢の変動はボランティアごとに異なり共通のパターンは見られなかった。

D. 考察

本研究にて作成した幼児腸内細菌の16S rDNA 配列データベースは日本人乳幼児の腸内細菌叢の大部分を網羅していると考えられる。また T-RFLP 法を用いた糞便細菌叢解析が今後の乳幼児腸内細菌叢の疫学解析にもっとも適した方法であると判断される。

E. 結論

今後、この16S rDNA をターゲットとした T-RFLP 法を中心に用い、多人数の乳児ボランティアの糞便細菌総解析を行うことにより、乳幼児の腸内細菌叢とアレルギー発症の関連性が明らかになるものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nakayama, J., R. Kariyama, and H. Kumon, "Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotypes of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine" *Appl. Environ. Microb.* **68**(6), 3152-3155 (2002).
- (2) Nakayama, J., A. D. L. Akkermans, and W. M. de Vos, "High-Throughput PCR Screening of Genes for Three-component Regulatory System Putatively Involved in Quorum Sensing from Low-G+C Gram-positive

Bacteria“ *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press (2003).

2. 学会発表

黒木佑美子, 中山二郎, Prapa Sonjinda, 田中重光, 福田早苗, 清原千香子, 白川太郎, 園元謙二 “乳幼児における腸内細菌叢とア

レルギー発症の相関関係の解析” 2002年日本生物工学会九州支部大会

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

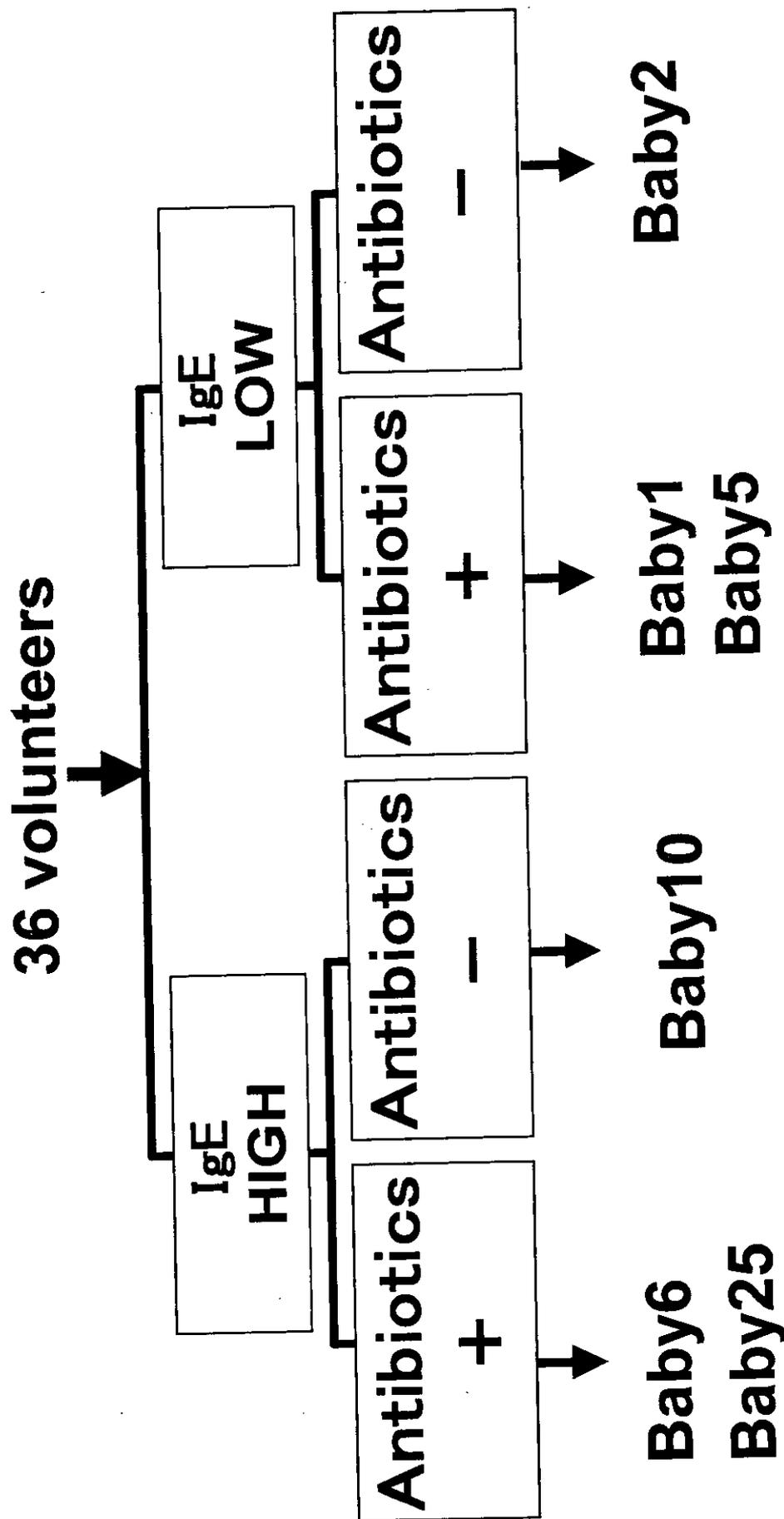


Fig3-1: 16S rDNAクローンライブラリー作成の
ためのボランティア選抜

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）
リウマチアレルギー疾患の早期診断に関する研究

アレルギー疾患関連遺伝子解析研究

分担研究者 小泉昭夫
(京都大学大学院医学研究科環境衛生学教授)

研究協力者

長谷川耕一（東京大学医科学研究所研究生） 玉利真由美（理化学研究所研究員）
土居悟（大阪府立羽曳野病院小児科医長） 宮武明彦（宮武内科院長）
福田早苗（京都大学大学院医学研究科研究生） 程雷（京都大学大学院医学研究科院生）
宇都宮真木（京都大学大学院医学研究科院生） 毛暁全（京都大学大学院医学研究科研究生）
井上佳代子（京都大学大学院医学研究科院生） 大津暁子（京都大学大学院医学研究科助手）
白川太郎（京都大学大学院医学研究科教授）

研究要旨

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。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解析を行なった。9万 SNP の解析結果から37個の候補 SNP が抽出され、候補遺伝子解析とあわせて、いくつかの自然免疫関連分子内の候補 SNP が抽出された。これらと腸内細菌の辛味の解析が今後必要である。

A. 研究目的

アレルギー疾患は遺伝素因が認められており、その素因の解析は発症リスク解析の基本である。アレルギー疾患の発症年齢は症例により異なっており、異なる遺伝子変異：SNP(single nucleotide polymorphism)が発症に関わっていると考えられている。そこで本研究では小児期3歳未満発症例と20歳以降に発症した成人喘息症例を比較して2群間で異なる頻度を示す SNP を同定し、粘膜免疫との関連を検討することを目的とした。

B. 研究方法

対象者は、小児期発症喘息 284 名と成人期発症喘息 384 名、正常対象 287 名を用いた。前者は羽曳野病院小児科から、後者は宮武内科よりの症例である。これらの患者または家族より同意を確認した上で、理研にて DNA を抽出し、前者を全ゲノム分析にかける。得られた結果について後者と比較し、有意差の見られたものはさらに症例数を増やして京大と理研で関連研究を行った。

C. 研究結果

全ゲノムで約 90,000SNP のスクリーニングが終了し、その中で 312 個の SNP で発症における有意差を認めた。2 次スクリーニングでは 37 個に絞り込まれた。この 37 個のうちで腸内細菌との関連が認められる自然免疫系の遺伝子 SNP がいくつか同定された。

D. 考察

アレルギーの発症には複数の遺伝子における SNP が複雑に関連していると考えられるが今回全ゲノムで約 10% の SNP を検討することでこの仮説が明らかとなった。また自然免疫系関連分子が小児期の早い段階でアレルギー発症に関連する可能性が示唆された。

E. 結論

理研において全ゲノムの SNP 解析の全ゲノム解析を 9 万 SNP s について行なった。その結果 37 個の候補 SNP s が抽出された。腸内細菌との結合に関連すると思われる自然免疫系の分子内の SNP s も発見され、今後の解析の焦点となると予想される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(論文発表)

1. Yamada S, Utsunomiya M, Inoue K, Nozaki K, Miyamoto S, Hashimoto N, Takanaka K, Yoshinaga T, Koizumi A: Absence of linkage of familial intracranial aneurysms to 7q.11 in highly aggregated Japanese Families. *Stroke* (in press).

2. Inoue S, Inoue K, Utsunomiya M, Nozaki J, Yamada Y, Toshio Iwasa T, Mori E, Yoshinaga T, Koizumi A: Mutation Analysis of *PKDI* in Japanese Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) patients. *Human Mutation*, 19: 622-628, 2002.
3. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Shizuo A, Araki E, Mori M: Targeted disruption of The CHOP gene protects mice against ER stress-induced diabetes. *J Clin Invest*, 109: 525-532, 2002.
4. Dakeishi M, Shioya T, Wada Y, Shindo T, Otaka K, Manabe M, Nozaki J, Inoue S, Koizumi A: Genetic epidemiology of hereditary hemorrhagic telangiectasia in a local community in the northern part of Japan. *Human Mut*, 19: 140-148, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Kiyono, H., Yamamoto, H. and Ishikawa, H.	Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine	J. Immunol	168	57-64	2002
Kweon, M-N., Takahashi, I., Yamamoto, M., Jang, M-H., Suenobu, N. and Kiyono, H.	Development of antigen-induced enterocolitis in SCID mice reconstituted with spleen-derived memory type CD4 ⁺ CD45RB ⁺ T cells	Gut	50	299-306	2002
Takahashi, I., Matsuda, J., Gapin, L., DeWinter, H., Kai, Y., Tamagawa, H., Kronenberg, M. and Kiyono, H.	Colitis-related public T cells are selected in the colonic lamina propria of IL-10 deficient mice.	Clin. Immunol.	102 (3)	237-248	2002
Kunisawa, J., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Hiroi, T.,	Lack of antigen-specific immune responses in anti-IL-7 α antibody-treated Peyer's patch-null	Eur. J. Immunol	32	2347-2345	2002

Nakagawa, S., Kiyono, H. and Mayumi, T.	mice following intestinal immunization with microencapsulated antigen.					
Ueta, M., Kweon, M-N., Sano, Y., Sotozono, C., Yamada, J., Koizumi, N., Kiyono, H. and Kinoshita, S.	Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction	Clin. Exp. Immunol.	129	464-470	2002	
Ohta, N., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kinoshita, N., Jang, M-H., Miyazaki, J. and Kiyono, H.	IL-15 induced CD8 α β ⁺ NK1.1 ⁺ T cells in the development of small itestinal inflammation in T3b-IL-15 Tg mice.	J.Immunol	169	460-468	2002	
Suenobu, N., Kweon, M-N. and Kiyono, H.	Nasal vaccination induces the ability to eliminate Candida colonization without influencing the pre-existing antigen-specific IgE Abs: a possibility for the control of Candida-related atopic dermatitis.	Vaccine	20	2972-2980	2002	
Fukuyama, S., Hiroi, T., Yokota, Y., Rennert, P.D., Yanagita, M., Kinoshita, N., Terawaki, S., Shikina, T., Yamamoto, M., Kuroono, Y. and Kiyono, H.	NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LT α 1 β 2/LT β R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3- CD4 ⁺ CD45 ⁺ cells.	Immunity	17	31-40	2002	
Watanabe, I., Hagiwara, Y., Kadowaki, S., Yoshikawa, T., Komase, K., Aizawa, C., Kiyono,	Characterization of protective immune responses induced by nasal influenza vaccine containing mutant	Vaccine	20	3443-3455	2002	

H., Takeda, Y., McGhee, J.R., Chiba, J., Sata, T., Kurata, T. and Tammura, S.	cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K).					
Yanagita, M., Shimabukuro, Y., Nozaki, T., Yoshimura, N., Watanabe, J., Koide, H., Terakura, M., Saho, T., Takedachi, M., Jang, M-H., Kiyono, H. and Murakami, S.	IL-15 up-regulates iNOS expression and NO production by gingival epithelial cells.	297	329-334	2002	Biochem. Biophysical Res. Commun	
Kweon, M-N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., F.W, van Ginkel, Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., J.R. McGhee. and Kiyono, H.	A non-toxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE Ab.	186	1261-69	2002	J. Infect. Dis.	
Kinoshita, N., Hiroi, T., Ohta, N., Fukuyama, S., E. J. Park. and Kiyono, H.	Autocrine IL-15 mediates intestinal epithelial cell death via the activation of neighboring intraepithelial NK cells	169	6187-6192	2002	J. Immunol	
Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J. and Kiyono, H.	HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160 encapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and	170	495-502	2002	J. Immunol.	

	neutralizing antibody responses				
Kweon, M-N. and Kiyono, H	CD40L in autoimmunity and mucosally induced tolerance	J. Clin. Invest.	109	171-173	2002
Kawahara, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Hiroi, T., Kiyono, H., Matsumoto, S., Yamada, T., Yamamoto, N. and Honda, M.	Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen.	Vaccine	21	158-166	2002
Okuda, Y., Takahashi, I., Kim, J-K., Ohta, N., Iwatani, K., Kai, Y., Tamagawa, H., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kawano, S., Sasaki, Y., Hori, M., Takeda, K., Akira, S. and Kiyono, H.	Development of colitis in STAT6-deficient TCR α ^{-/-} mice : A potential of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4 ⁺ β β T cells.	Am. J. Pathol	162	263-271	2003
Boyaka, P.N., Ohmura, M., Fujihashi, K., Koga, T., Yamamoto, M., Kweon, M-N., Takeda, Y., Jackson, R.J., Kiyono, H., Yuki, Y. and McGhee, J.R.	Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvant activity and direct Th cell subsets via their B subunit.	J. Immunol.	170	454-462	2003
Hagiwara, Y., McGhee, J.R., Fujihashi, K., Kobayashi, R., Yoshino, N., Kataoka, K., Etani, Y.,	Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4 ⁺ T cells in	J. Immunol.	15	1754-1762	2003

Kweon, M-N., Tamura, S., Kurata, T., Takeda, Y., Kiyono, H. and Fujihashi, K.	nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue.						
Yamada S, Utsunomiya M, Inoue K, Nozaki K, Miyamoto S, Hashimoto N, Takanaka K, Yoshinaga T, Koizumi A	Absence of linkage of familial intracranial aneurysms to 7q.11 in highly aggregated Japanese Families.	Stroke					In press
Inoue S, Inoue K, Utsunomiya M, Nozaki J, Yamada Y, Toshio Iwasa T, Mori E, Yoshinaga T, Koizumi A	Mutation Analysis of PKD1 in Japanese Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) patients.	Human Mutation	19			622-628	2002
Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Shizuo A, Araki E, Mori M	Targeted disruption of The CHOP gene protects mice against ER stress-induced diabetes.	J Clin Invest,	109			525-532	2002
Kiyahara C, Otsu A, Shirakawa T, Fukuda S, Hopkin JM	Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility	Lung Cancer	37			241-256	2002
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	75suppl72			10-12	2002
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, Shitakawa T, Izuhara K	Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma	J Allergy Clin Immunol	109			980-987	2002

Botini N, Borgiani P, Otsu A, Saccucci P, Stefanini L, Greco E, Fontana L, Hopkin J, Mao XQ, Shirakawa T.	L-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.	61	288-292	2002
Donato JL, Ko J, Kutok JL, Cheng T, Shirakawa T, Mao XQ, Beach D, Scadden DT, Sayegh MH, Adra CN	Human HTm4 is a hematopoietic cell cycle regulator	J Clin Invest.	109	51-58	2002
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
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. J Devel. Bioch.	3	33-40	2002
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)	980-87	2002
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

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)	287-96	2002
Saitoh, S., Noda, S., Aiba, Y., Takagi, A., Sakamoto, M., Benno, Y., and <u>Koga, Y.</u>	<i>Bacteroides ovatus</i> as the predominant commensal intestinal microbe causing a systemic antibody response in inflammatory bowel disease.	Clin. Diagn. Lab. Immunol	9	54-59	2002
Sasaki, M., Miyazaki, K., <u>Koga, Y.</u> , Kimura, G., Nomoto, K., and Yoshida, H.	Calcineurin - dependent mitochondrial disturbances in calcium - induced apoptosis of human immunodeficiency virus gp160 - expressing CD4 ⁺ cells.	J. Virology.	76 (1)	416-420	2002
Sudo, N., Yu. X-N., Aiba. Y., Oyama. N., Sonoda. J., <u>Koga. Y.</u> , and Kubo, C	An oral introduction of intestinal bacteria prevents the development of a long -term Th2-skewed immunological memory induced by neonatal antibiotic treatment in mice.	Clin. Exp. Allergy.	32	1112-1116	2002
<u>Nakayama, J.</u> , R. Kariyama, and	Description of a 23.9-kilobase	Appl. Environ.	68 (6)	3152-3155	2002

H. Kumon	chromosomal deletion containing a region encoding <i>fsr</i> genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotypes of clinical isolates of <i>Enterococcus faecalis</i> in urine	<i>Microb.</i>				
Nakayama, J., A. D. L. Akkermans, and W. M. de Vos,	High-Throughput PCR Screening of Genes for Three-component Regulatory System Putatively Involved in Quorum Sensing from Low-G+C Gram-positive Bacteria	<i>Biosci. Biotechnol. Biochem</i>	In press	In press	2003	
和文						
玉利真由美, 長谷川耕一, 白川太郎	SNP s を用いた気管支喘息遺伝子の解明	日本小児アレルギー学会誌	16	62-66	2002	
白川太郎	アレルギー疾患における SNP を用いた関連研究の現状と今後の展望	日本臨床免疫学会誌	25 (1)	33-36	2002	
中島加珠子, 大津暁子, 程雷, 白川太郎	多因子疾患としてのアトピー-アトピー・喘息発症のメカニズムと治療戦略	医学のあゆみ	202 (10)	810-814	2002	
福田早苗, 白川太郎	プロバイオティクスによるアレルギー予防の試み	最新医学	58 (2)	88-92	2003	
程雷, 榎本雅夫, Hopkin JM, 白川太郎	Th1 誘導物質を用いたアレルギー治療と予防の試み	最新医学	58 (2)	82-87	2003	
程雷, 福田早苗, 大津暁子, 白川太郎	花粉症の遺伝要因	医学のあゆみ	200 (5)	391-395	2002	

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
出原賢治	アレルギー疾患の病因と診断	Medical Academy NEWS	841	9	2002
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
出原賢治	IL-13 研究の新展開	最新医学	58 (2)	240-244	2002
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
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	9 (10)	78-83	2002
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)	380-87	2002
有馬和彦、出原賢治	アトピー候補遺伝子	Allergy Update	14 (2)	7	2002
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
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
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