
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

免疫アレルギー疾患に係わる
胎内・胎外因子の同定に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 森川 昭廣

平成16(2004)年3月

厚生労働省

目 次

I 総括研究報告書

アレルギー疾患に係わる胎内・胎外因子の同定に関する研究 主任研究者 群馬大学医学部小児生体防御学教授 森川 昭廣	1
--	---

II 分担研究報告書

1) アレルギー疾患におけるサイトカイン遺伝座のDNAメチル化修飾 分担研究者 群馬大学医学部小児生体防御学教授 森川 昭廣.....	6
2) ウイルス感染がアレルギー発症に及ぼす影響 分担研究者 岐阜大学医学部小児病態学教授 近藤 直実	10
3) サイトカインと胎外因子 分担研究者 帝京大学医学部内科教授 大田 健	13
4) 気管支喘息の胎外因子としてのウイルス感染 分担研究者 昭和大学第一内科教授 足立 満	18
5) 自然免疫による病原体の認識機構とアレルギー疾患の発症に関する研究 分担研究者 千葉大学医学部小児病態学教授 河野 陽一	23
6) アレルギー疾患の発症に関する疫学的検討 分担研究者 国立療養所南福岡病院診療部長 小田嶋 博	26
7) アレルギー気道炎症・リモデリング形成に果たす胎内胎外因子の役割 分担研究者 群馬大学医学部小児生体防御学助教授 徳山 研一	31
8) ヒト気道上皮細胞におけるRSV感染による遺伝子発現の網羅的解析 分担研究者 獨協医科大学小児科講師 吉原 重美	36
9) エオタキシン発現制御機構と胎内・胎外因子 IFN- γ やオゾンによるTh1活性化の影響 分担研究者 群馬大学医学部小児生体防御学講師 荒川 浩一	40

III 研究成果の刊行に関する一覧表.....	45
-------------------------	----

IV 研究成果の刊行物・別冊.....	46
---------------------	----

厚生労働科学研究補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

総括研究報告書

アレルギー疾患に係わる胎内・胎外因子の同定に関する研究

研究主任者 森川昭廣 群馬大学大学院小児生体防御学教授

研究要旨

アレルギー疾患は、遺伝的要因と環境的要因（胎内・胎外因子）が複雑に絡み合って発症していくと考えられている。近年、日本を含む世界各国においてアレルギー疾患患者の増加が報告され、胎内・胎外因子が変化してきたことか疑われる。本年度は、遺伝的要因とウイルス感染など環境要因との直接的な関わりを明らかにするために、ウイルス感染症と自然免疫との関連、遺伝子発現との相互作用を検討し気管支喘息の発症および増悪の機序を中心に研究をすすめる。本年度は以下の結果を得た。

1) 胎内因子

アレルギー疾患発症に関わる胎内因子として、疫学的調査にて、妊娠中の母親のアレルギー症状や感染が発症背景因子に寄与していた（小田嶋）。また、母親の妊娠中における種々の要因が児のアレルギー疾患発症と関連するかを前方視的に検討するプロジェクトが進行中で、さらに、臍帯血のサイトカインやケモカイン、増殖因子と、その後のアレルギー疾患発症の有無を検討する予定である（荒川）。自然免疫の受容体でRSウイルスと関連の深いToll様受容体4（TRL-4）の遺伝子多型と喘息との関連およびその機能的な面が検討された（河野）。Th1/Th2バランスを規定する因子としてIL-12が関与か想定されるか、そのプロモーター領域のDNAメチル化によりIL-12の発現が制御されている可能性が示唆された（森川）。

2) 胎外因子

RSウイルス感染時にIL-12やIL-18受容体遺伝子発現においてRNA修飾現象やspl1c1ng現象がみられ、アレルギー疾患との関連が示唆された（近藤）。気道上皮細胞株へのRSウイルス感染では、GeneChipを用いた検討で、サイトカインやケモカイン産生が著明に増加し、その発現順序や時期等に関して現在検討している（吉原）。ウイルス感染モデルであるdsRNA刺激により、TLR-3を介して気道上皮からエオタキシンの発現が増強した（足立）。INF- γ は転写レベルでエオタキシンの発現を抑制する可能性が示唆された（荒川）。アレルギーの反復曝露による気道過敏性と気道リモデリングは年齢により変化する可能性を示した（徳山）。マウスのタバコ曝露モデルにおいて、長期曝露は気道炎症を増悪し、喘息に影響を及ぼすことか示唆された（大田）。本研究は、アレルギー疾患である気管支喘息の発症要因を多方面より検討し、アレルギー疾患の原因解明および治療にもつなかる意義深いものに発展することか期待される。

研究分担者

足立 満（昭和大学医学部第一内科教授）

荒川浩一（群馬大学医学部小児科講師）

大田 健（帝京大学医学部内科教授）

小田嶋博（国立療養所南福岡病院 診療部長）

河野陽一（千葉大学医学部小児科教授）

近藤直美（岐阜大学医学部小児病態学教授）

徳山研一（群馬大学医学部小児科助教授）

吉原重美（獨協医科大学小児科講師）

（アイウエオ順）

A 研究目的

アレルギー疾患は、遺伝的要因（胎内因子）

と環境的要因（胎外因子）が複雑に絡み合って発症していくと考えられている。遺伝的要因とウイルス感染など環境要因との直接的な関わりを明らかにするために、ウイルス感染症と自然免疫との関連、遺伝子発現との相互作用を検討し気管支喘息の発症および増悪の機序を明らかにすることを目的とした。これら因子を解明することにより、アレルギー疾患発症増加の制御に役立て、それが国民の健康増進に大きく貢献するものと考えられる。

B 研究の方法およびC 結果

胎内因子

近年の小児アレルギー疾患の急激な増加の原因を明らかにするために、疫学的調査による諸因子の解明は重要である。今回、生後1歳でのアレルギー疾患、特に喘息発症に影響する因子を解明するため、九州・関東・東北地区で調査した。その結果、出生時体重が大きく、在胎週数が少ないほどアレルギー疾患発症が多かった。母親および家族のアレルギー歴と関連し、感染では、生後初めての疾患が気道感染で、かつその数が多いほど喘鳴の発症が多かった。(小田嶋)。

疫学的調査に加え、母親の妊娠中における種々の要因が児のアレルギー疾患発症と関連するかを前方視的に検討するプロジェクトが進行中で、それに加えて、臍帯血のサイトカインやケモカイン、増殖因子などを測定し、その後のアレルギー疾患発現の有無を検討する予定である(荒川)。

アレルギー疾患増加の原因として、胎内を含め乳児期の感染の減少によるTh1/Th2バランスの成熟かなされないという hygiene hypothesis がある。Th1/Th2 バランスを規定するものとしてTh1へ傾けるIL-12の発現量の違いが関与する可能性が想定されるか、そのプロモーター領域にDNAメチル化が存在し、発現が制御されている可能性が示唆された。これは、すでにプロクラムされているものであるか、あるいは感染など胎外因子によるかは今後の検討が必要である(森川・滝沢)。

胎外因子

喘息発症に関与する胎外因子として重要と考えられる気道感染、特にRSウイルスにつき検

討した。

まず、RS感染の受容体である toll-like 受容体-4 (TRL-4) は自然免疫の受容体として注目されている。そこで、アレルギー疾患発症に、TRL-4受容体 (TRL-4, CD14) の遺伝的差異が影響しないかを検討した。その結果、CD14については-159C/Tの多型を確認し、機能的に、CD14T1型はCC型と比較しIL-12の発現が少なかった。IL-12の減少はTh2へのバランスに傾けるためアレルギー疾患との関係が示唆される(河野・下条)。

実際にRS感染が起こったときの生体反応について検討した。アレルギー患者の末梢血単核球を用い、ウイルス感染によりどのようなサイトカイン産生が見られ、IgE産生に影響が見られるかを検討した。その結果、ウイルス感染後に、IL-4産生には大きな変動はなかったがIFN- γ は大きな変動を示し、さらに回復期にはアレルギー疾患児ではIL-12やIL-18が有意に増加していた。その機序として、IL-12やIL-18受容体の editing 現象や Alternative splicing が関連している可能性が示唆された(近藤)。

また、in vitro の系として、ヒト肺胞上皮細胞にRSウイルスを感染させ、GeneChipを用いて遺伝子発現量を定量的に測定した。その結果、約12,000の遺伝子のうち、対照と比較して約50~200種類の遺伝子が強く発現誘導され、I型IFN誘導遺伝子群(IFIT1、ISG15など)、炎症性サイトカイン群(IL-6、IL-1 β など)、CCおよびCXCケモカイン群(RANTES、MCP-1、IL-8など)が含まれていた(吉原・山田)。

次に、ウイルス感染による分子レベルでの細胞反応性の検討をおこなった。すなわち、気道上皮培養細胞にウイルス感染モデルである dsRNA 刺激を行った結果、IL-8、RANTES、IP-10濃度

は dsRNA 刺激後、有意に産生増加が認められた。また、この刺激は TLR-3 を介し、転写因子として NF- κ B や IRF-3 が関与する可能性が示唆された。また、喘息治療薬であるフルチカゾンで抑制が見られた（足立・国分）。

さらに、肺線維芽細胞を用いて、エオタキシン産生と感染時に発現が増強する IFN- γ との関連を検討した結果、IL-4 は濃度依存的にエオタキシンのプロモーターを活性化し、IFN- γ の前処理にて、IL-4 誘導性のエオタキシン産生は、RT-PCR、プロモーターアッセイとともに抑制された。また、大気汚染と関連するオゾン曝露では、エオタキシン発現を誘導し、IL-4 と相加作用を示した（荒川）。

最後に、最終的に喘息発症と直接関連すると考えられる気道過敏性の獲得および持続における年齢的な因子とウイルス感染と同様に重要である受動喫煙について検討した。新生仔および成熟 BALB/C マウスに、卵白アルブミン(OA)で感作し、チャレンジ開始後に penh を用いた気道過敏性の経時的変化について検討した。その結果、気道感受性は成熟マウスにおいては8週まで持続したか、気道反応性については幼若マウスでは4週で消失していた。すなわち、幼若マウスでは成熟マウスに比べて気道過敏性は早期に収束することか予想された（徳山）。BALB/C マウスを用い、喫煙曝露、卵白アルブミン感作につき検討した。その結果、短期喫煙曝露では、BALF 中細胞数および気道過敏性は抑制傾向であったか、長期曝露ではマクロファージおよび好中球の増加を認め、TNF- α および MIP-2 の増加を認めた。長期喫煙曝露は、気道炎症を増悪し、喘息に影響を及ぼすことが示唆された。（大田）。

D 考察および結論

本年度の結果は、胎内因子として、母親のアレルギー疾患、感染を含めた要因が重要であることが示され、さらに、遺伝的な要因として自然免疫の遺伝子多型や IL-12 のプロモーター活性などが関与している可能性が示唆された。一方、胎外因子としてウイルス感染により、その受容体を介した刺激による IL-12 産生あるいは INF の産生調節により、Th2 ハランスに傾き、IgE 産生が促進されアレルギー疾患発症に向かう可能性が示唆される。さらに、ウイルス感染によるケモカイン発現により、好酸球、好中球などが動員され、気道炎症を導く過程も示唆された。

胎外因子としての環境要因として重要な喫煙曝露は、アレルゲン感作と平行して行った場合直接の気道過敏性増強効果は認めなかったか、好中球エラストラーゼ惹起の炎症については相乗効果を認めた。幼若マウスを用いた慢性アレルギー性気道炎症モデルにより、幼若マウスでは成熟マウスに比べて気道過敏性が早期に収束することから、アレルギー性気道炎症の消退に年齢的な因子が関与する可能性が示唆された。本研究は、アレルギー疾患である気管支喘息およびアトピー性皮膚炎の発症要因を多方面より検討し、アレルギー疾患の原因解明および治療にもつなかる意義深いものに発展することか期待される。

研究協力者

足立哲也	(帝京大学医学部内科講師)
阿部利夫	(獨協医科大学助手)
大木康史	(群馬大学小児科教務員)
大柴晃洋	(東京医科歯科大学小児科)
川口未央	(昭和大学医学部)

川野 豊 (横浜赤十字病院小児科部長)	中野純一 (帝京大学医学部内科講師)
國分二三男 (昭和大学医学部助教授)	野間 剛 (北里大学小児科講師)
斎藤博久 (国立成育医療センター 免疫アレルギー研究部部長)	本村知華子 (国立療養所南福岡病院小児科)
佐伯敏秋 (北里大学小児科)	松倉 聡 (昭和大学医学部)
七種美和子 (横浜市衛生研究所 ウイルス研究室)	松本健治 (国立成育医療センター研究所免疫 アレルギー研究部アレルギー研究室室長)
下条直樹 (千葉大学医学部小児科講師)	篁 博雄 (群馬県立小児医療センター)
滝沢琢己 (群馬大学大学院小児生体防御学)	森川みき (J R 仙台病院小児科医長)
堤 裕幸 (札幌医科大学小児科教授)	山下直美 (帝京大学医学部内科助教授)
手塚純一郎 (国立療養所南福岡病院小児科)	山田裕美 (獨協医科大学小児科助手)
長瀬洋之 (帝京大学医学部内科助手)	渡辺美砂 (東邦大学医学部小児科)
	(あいうえお順)

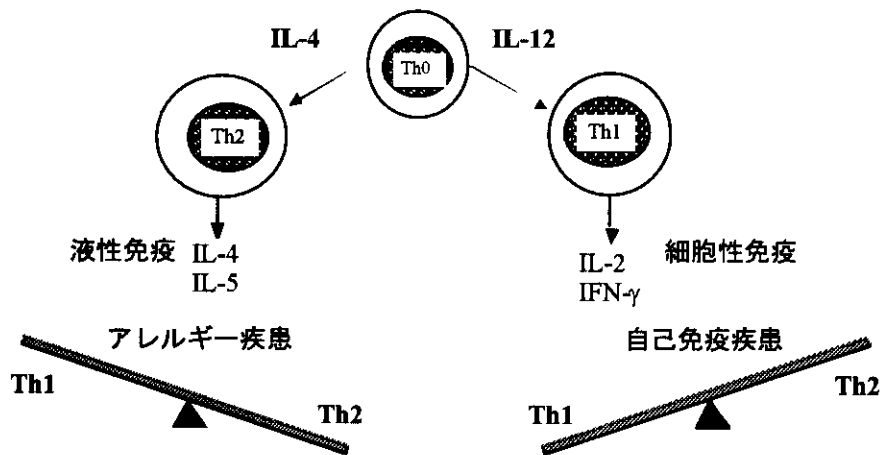


図1 ヘルパーT細胞のTh1/Th2バランス制御機構の破綻と疾患

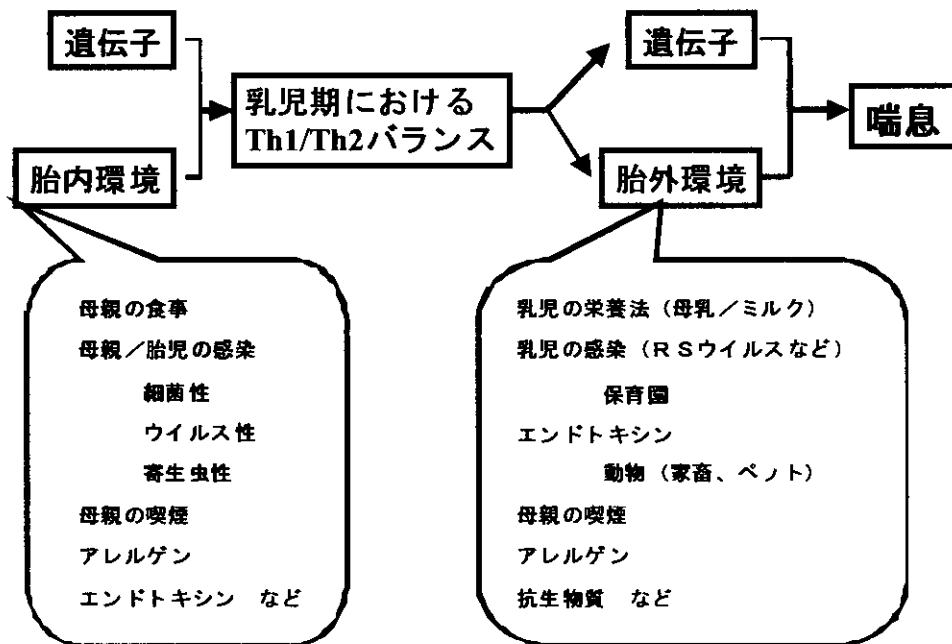


図2 喘息発症における遺伝因子と胎内・胎外環境因子

厚生省科学研究補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）

研究課題名 アレルギー疾患に係わる胎内、胎外因子同定に関する研究

分担課題名 遺伝と胎内因子

アレルギー疾患におけるサイトカイン遺伝子座の DNA メチル化修飾

分担研究者 森川昭廣 群馬大学小児科・教授

研究要旨 気管支喘息などのアレルギー疾患の病態には T ヘルパー (Th) 細胞の Th2 タイプへの偏向が深く関与している。Th 細胞の Th1/Th2 分化は、樹状細胞によるナイーブ CD4 陽性 T 細胞への抗原提示の際に抗原提示細胞から産生されるサイトカイン interleukin (IL)-12 と IL-4 のバランスが重要であることが知られている。すなわち樹状細胞から IL-12 が優位に産生されると Th1 へと分化する。一方、同一個体内でも Th1/Th2 バランスは、乳児期までは Th2 優位であり以後徐々に Th1 優位へと変化することが知られている。実際、新生児期の樹状細胞からの IL-12 産生は、成人由来のものに比し非常に低下している。このことは Th1/Th2 バランスがサイトカイン遺伝子座の多型や変異などの遺伝的因子 (シエネティクス) のみで決定されるのではなく、後天的な因子によって決定されていることを示唆している。我々は、樹状細胞からのサイトカイン産生制御にサイトカイン遺伝子座のゲノム DNA の後天的な修飾 (エピシエネティクス) が関与しているのではないかと仮定し、なかでも、DNA の CpG 配列のシトシンにメチル基が付与される DNA メチル化修飾に着目し解析に着手した。

滝沢琢己 群馬大学小児生体防御学
日本学術振興会特別研究員

ゲノム DNA のメチル化、あるいはヒストンのアセチル化、メチル化、リン酸化などのエピシエネティック修飾が遺伝子発現を制御していることがわかってきた。なかでも、

A 研究目的

近年、単一のゲノムをもった受精卵から多種多様な組織や細胞を作り出すメカニズムとして、ゲノム DNA の後天的な修飾 (エピシエネティクス) が注目されている。ゲ

DNA の CpG 配列のシトシンにメチル基が付与される DNA メチル化修飾は、遺伝子発現抑制に関与しており、X 染色体不活性化、ゲノムインプリンティング、発癌および細

胞特異的な遺伝子発現制御など広汎な生命現象に重要な役割を果たしている。実際、われわれは、中枢神経発生におけるグリア細胞の分化制御において、発生が進むにつれて特定の遺伝子のゲノム DNA のメチル化修飾の変化が必須であることを見いたしている (Developmental Cell 2001)。樹状細胞においても IL-12 の発現か、DNA メチル化により制御されている可能性が想定される。すなわち、DNA メチル化が可変的であるため、加齢や病態に伴い IL-12 遺伝子の DNA メチル化が変化することによりその発現が変化し、結果としてアレルギー反応の年齢による変化に至ると考えられる。

本研究においては、臍帯血およびアレルギー患者あるいは健常コントロールの末梢血から、樹状細胞を分離し、IL-12 産生能を ELISA 法にて検討し、IL-12 p 35 プロモーターの DNA メチル化を bisulphite 法にて検討し、アレルギー疾患および小児期免疫発達における DNA のエピジェネティック修飾の関与を解明したい。

B 研究方法

アレルギー患者または健常コントロールへパリン化末梢血、または臍帯血から比重遠心法にて単核球分画を採取、さらに磁気細胞分離システム (MACS[®]) にて CD14 陽性

単球を分離する。同細胞を LPS にて刺激し、培養上清および mRNA を回収。一方で、LPS 未刺激の CD14 陽性単球よりゲノム DNA を採取し制限酵素 SacI で切断後、メチル化されていないシトシンをウラシルへと変化させる化学処理法である bisulphite 法にて処理した。DNA をカラム処理し精製したのち IL-12p35 のプロモーター領域の 5 カ所を PCR にて増幅し、シーケンスにて配列を決定した。bisulphite 処理にてメチル化されていないシトシンはウラシルに変化するため、シーケンス決定後処理前の配列と比較することによりメチル化修飾の有無調へることかてきる。

C 研究結果

本年度は、健常コントロールの末梢血から CD14 陽性単球を分離し、ゲノム DNA を回収し、bisulphite 法による処理を行いシーケンスを行った。

IL-12 は p40 と p35 の 2 量体からなり、二者のうち p35 の発現量が IL-12 としての発現量を規定していることが知られている。その IL-12 p35 遺伝子プロモーター領域約 1300 塩基の範囲に存在する DNA メチル化の標的配列である CpG 配列のシトシン 19 個に対して DNA のメチル化を検討した。IL-12 p35 プロモーター領域を 5 カ所に分けて

bisulphite 処理した DNA を PCR で増幅後、PCR 産物を直接シーケンス決定した。bisulphite 処理後の PCR は非常に反応がかかりにくく、PCR 産物が十分回収できたのは、転写開始点上流-285 から-377 塩基の範囲のみであった。

同領域に存在する CpG 配列 5 カ所につき、メチル化の有無をシーケンスにて確認した。

この 5 カ所の CpG 配列中、下流に存在する三つの CpG 配列のシトシンは bisulphite 処理後すべてウラシルへと変換されておりメチル化されていないと考えられた。一方、上流の二つの CpG 配列のシトシンはウラシルへと変換されずシトシンのままであったものと変換されているものが混在しており、メチル化されているアレルとされていないアレルが混在していることが分かった。

D 考察

アレルギー疾患発症には遺伝因子と種々の環境因子が複雑に関与していると考えられている。近年、アトピー候補遺伝子に関する研究が精力的になされ、特に IL-4、IL-4 受容体、IL-13 など Th2 サイトカインやそのレセプター遺伝子の多型が報告されている。一方で、とりわけ小児においてはアレルギーが自然に寛緩あるいは治癒する

アウトグローが知られている。このアウトグローという現象は、Th2 サイトカインの発現もしくは Th1/Th2 バランスが可変的な機構により制御されている可能性を示唆している。

今回、健常コントロールの末梢血単球を用い IL-12 p35 のプロモーターの DNA メチル化を検討した。プロモーターの-285 から-377 の範囲に存在する 5 つの DNA メチル化の標的配列である CpG 配列中 2 つにおいてメチル化されているアレルとされていないアレルがあることがわかった。

今後はこの 2 カ所を含む IL-12p35 遺伝子プロモーターの CpG 配列について、臍帯血、アレルギー患者、健常コントロール由来の単球を用いて調べることで、IL-12 p35 遺伝子プロモーターの DNA メチル化が 1) 成長に伴って変化するかどうか、2) アレルギーの発症に関与しているかどうか、を検討したい。特に、臍帯血を用いた検討を行うことで、IL-12 p35 プロモーターの DNA メチル化が胎内、胎外の因子の影響を受けているか、また受けていた場合それがアレルギー疾患の発症に関与しているかどうかという点についても検討できると考えられる。

E 結論

アレルギー疾患と樹状細胞の前駆細胞であ

<p>る CD14 陽性単球の IL-12 p35 遺伝子の DNA メチル化について検討を開始した。今後、 臍帯血、アレルギー罹患児末梢血由来の単 球で検討することで、アレルギー発症に関 与する胎内、胎外因子の解明に迫りうると 考えられる。</p>	<p>F 健康危険情報 特になし。</p> <p>G 研究発表 なし</p>
---	--

図1 単球ゲノム DNA の IL-12 p35 遺伝子プロモーターの bisulphite 法によるシーケ
ンスの結果

(-377) -tttagtgtggcaatgccccagggtcctgttctcctgggtgtcctgcacctgggtgcaa (C^m/C) Gt (C^m/
C) GgcctggcatctagtgagccatctaaaggaaCGatgatgagtgaatgattgcctacccttccagtactagget
ggaggtCGtggttaggcccatacctaCGcaggacatgcaaagtgggaggcactcctctctc-(-285)

C^m メチル化シトシン、C 非メチル化シトシン、下線は PCR プライマー配列

IL-12 p35 遺伝子プロモーターの転写開始点上流-377 から-285 の範囲に存在する 5 つの
CpG 配列のうち上流の二つにおいて、シトシンのメチル化がモザイクになっており、同
部位のメチル化は細胞により異なっている可能性が考えられた。

研究課題名：免疫アレルギー疾患に係わる胎内・胎外因子の同定に関する研究

分担課題名・ウイルス感染がアレルギー発症に及ぼす影響

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 気管支喘息などアレルギー疾患は、遺伝的要因と環境要因とが絡み合って発症する。環境要因の重要な1つにウイルス感染がある。今回はIgE産生抑制系とIgE産生系の分子と遺伝子の発現に及ぼすウイルス感染の影響につき検討した。ウイルス感染前後に、IL-4の産生には大きな変動がなかったのに対しIFN- γ は大きな変動を示した。ウイルス感染時に産生誘導されるIFN- α とIFN- β がgermline C ϵ transcriptの発現に及ぼす効果につき検討した。その結果、IFN- α とIFN- β はgermline C ϵ transcriptの発現を明らかに増加させた。ひいてはVDJ-C ϵ へのクラススイッチを促進させることが考えられた。以上よりある種のウイルス感染によりIgE産生亢進に向かうことが示された。

研究協力者

松井永子	岐阜大学医学部	小児病態学	助手
金子英雄	岐阜大学医学部	小児病態学	講師
寺本貴英	岐阜大学医学部	小児病態学	助手
青木美奈子	岐阜大学医学部	小児病態学	医員
服部里美	岐阜大学医学部	小児病態学	医員
浅野勉	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	

A 研究目的

気管支喘息などアレルギー疾患は、遺伝的要因と環境要因とが絡み合って発症する。遺伝的要因について、私共はアレルギーの病因となる遺伝子およびその発現の異常を解析してきた。このうち、IgE産生制御機構の破綻を来すIL-12 R β 2 鎖遺伝子異常を、さらにごく最近、IL-18 R α 鎖遺伝子異常をそれぞれ世界で初めて見出した。

一方、環境要因の重要な1つにウイルス感染がある。日常診療でRSVなどのウイルス感染に引き続いて、気管支喘息発作が誘導されることはしばしば経験する。私共は、遺伝的要因とウイルス感染など環境要因との直接的な関わりを明らかにするため、遺伝子生態医学 (genetic ecological medicine Kondo N, による) とでもいべき分野を新たに開拓して、環境要因が遺伝子分子およびその発現に直接的に与える影響を検討している。このうちIgE産生抑制系とIgE産生系の分子と遺伝子の発現に及ぼすウイルス感染の影響につき、幾つかのevidenceを得たので報告する。

B 研究方法

アレルギー患者および非アレルギー患者の末梢血リンパ球、単球分画を用いて検討した。検討項目はRSあるいはインフルエンザウイルス感染時、非感染時のサイトカイン産生量を測定した。MIMIC法によりPCRを用いてIFN- γ のmRNAを定量した。IgE産生に及ぼす感染、インターフェロンの影響として、IFN- α とIFN- β がgermline C ϵ transcriptの発現に及ぼす効果につきPCRを用いて検討した。

C 研究結果

ウイルス感染前後に、特にアトピー群ではIL-4の産生には大きな変動がなかったのに対しIFN- γ は大きな変動を示した(図1)。またIFN- γ を産生誘導するIL-12にも一部に変動がみられた。さらに、この変動につき、MIMIC法によりPCRを用いてIFN- γ のmRNAを定量したところIFN- γ のタンパク量に相当してIFN- γ のmRNAの発現量が増減を示した(図2)。すなわちウイルス感染によるIFN- γ のタンパク量の変動はmRNAの発現によって規定されていることが明らかになった。

次に、ウイルス感染時に産生誘導されるIFN- α とIFN- β がgermline C ϵ transcriptの発現に及ぼす効果につきPCRを用いて検討した。このtranscriptはIgEへのクラススイッチに重要である(図3)。その結果、IFN- α とIFN- β はgermline C ϵ transcriptの発現を明らかに増加させた(図4)。このことからウイルス感

染による IFN- α や IFN- β の産生が germline C ϵ transcript の発現を増加させ、ひいては VDJ-C ϵ へのクラススイッチを促進させることが考えられた。

D 考察・結論

IFN- γ は IgE 産生抑制系の重要な分子である。ウイルス感染による IFN- γ の変動は Th1 と Th2 のアンバランスを来とし、また IFN- γ の減少は Th2 を優位にし、ひいては IgE 産生の抑制がきかずに、その量に変化を来たすものと考えられた。さらにウイルス感染による IFN- α や IFN- β の産生が germline C ϵ transcript の発現を増加させ、ひいては VDJ-C ϵ へのクラススイッチを促進させることが考えられた。

以上よりある種のウイルス感染により IgE 産生亢進に向かうことが示された。

F 研究発表

<論文発表>

- (1) Kondo, N., Matsui, E., Kaneko, H., Aoki, M., Kato, Z., Fukao, T., Kasahara, K., Morimoto, N. RNA editing of interleukin-12 receptor β 2, 2451 C-to-U (Ala 604 Val) conversion, associated with atopy *Clin Exp Allergy* (in press) (2003)
- (2) Kato, Z., Jee, J., Shikano, H., Mishima, M., Ohki, I., Ohnishi, H., Li, A., Hashimoto, K., Matsukuma, E., Omoya, K., Yamamoto, Y., Yoneda, T., Hara, T., Kondo, N., Shirakawa, M. Structure of interleukin-18 and the binding mode *Nature Struct Biol* 10, 966-971 (2003)
- (3) Ohnishi, H., Kato, Z., Watanabe, M., Fukutomi, O., Ito, R., Teramoto, T., Kondo, N. Interleukin-18 is associated with the severity of atopic dermatitis *Allergology International* 52,123-130 (2003)

- (4) Aoki, M., Matsui, E., Kaneko, H., Inoue, R., Fukao, T., Watanabe, M., Teramoto, T., Kato, Z., Suzuki, K., Suzuki, Y., Kasahara, K., Kondo, N. A novel single-nucleotide substitution, Leu 467 Pro, in the interferon-gamma receptor 1 gene associated with allergic diseases *Int J Mol Med* 12,185-191 (2003)

<学会発表>

- (1) 近藤直実 会長講演 アレルギーのオーダーメイド治療と 21 世紀型ポストゲノム 日本小児アレルギー学会 (第 40 回) (2003 年 10 月 3 日, 岐阜)
- (2) 近藤直実, 松井永子, 加藤善一郎, 金子英雄, 深尾敏幸, 伊上良輔, 寺本貴英, 福富悌, 篠田紳司, 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, 船戸道德, 松隈英治 シンポジウム IgE 産生抑制系の遺伝子解析とその応用 日本アレルギー学会総会 (第 53 回) (2003 年 10 月 25 日, 岐阜)
- (3) 近藤直実 シンポジウム 司会 司会の言葉 アレルギーのゲノム解析とその臨床応用 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第 15 回) (2003 年 5 月 12 日, 横浜)
- (4) 松井永子, 加藤善一郎, 浅野勉, 寺本貴英, 伊藤玲子, 青木美奈子, 長尾みづほ, 笠原貴美子, 近藤直実 シンポジウム ウイルス感染におけるアレルギー病態の分子メカニズム 日本アレルギー学会総会 (第 53 回) (2003 年 10 月 25 日, 岐阜)

図1 RSV感染者

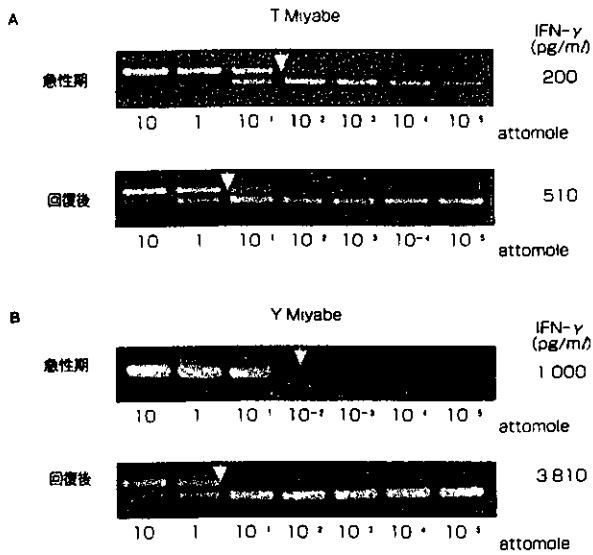
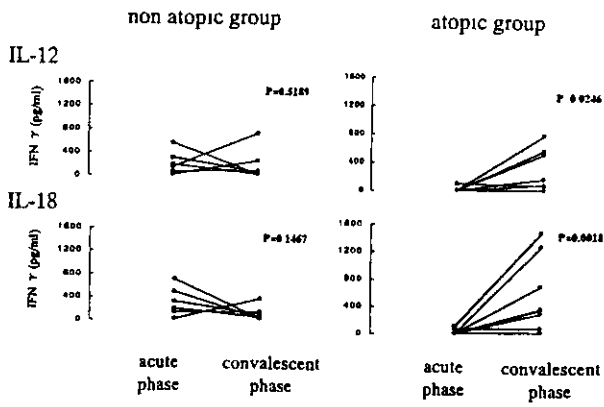


図2 ウイルス感染後のMIMIC法によりPCRを用いたIFN-γのmRNAの定量 (著者らによる)

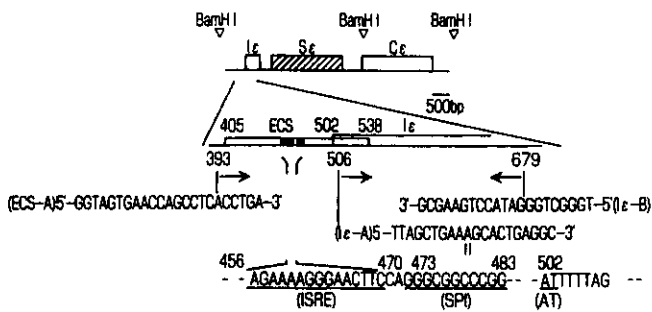


図3 Iε領域の5'上流

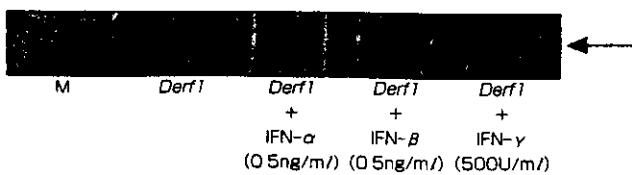


図4 IFN-α, βまたはγによるgermline Cε transcriptの発現増加

免疫アレルギー疾患に係わる胎内、胎因子の同定に関する研究 —サイトカインと胎外因子—

分担研究者 大田 健 (帝京大学医学部内科教授)

気道過敏性は気管支喘息の病態形成の重要な因子であり、その獲得には遺伝的因子と後天的因子として胎内、胎外因子、サイトカイン、増殖因子が関与している。平成11年度から13年度の研究で我々は増殖因子の気道過敏性に及ぼす影響を明らかにしてきた。さらに体外因子として大気汚染物質のディーゼル排気微粒子(DEP)およびエンドトキシンの関与について検討を進めてきた。今年度は胎外の環境因子として、喫煙暴露について検討した。喫煙暴露は単独で気道過敏性を惹起する方向には働かないこと、および長期暴露により、好中球を中心とする気道炎症を惹起し、気道炎症悪化にはTNF- α およびMIP-2関与していることが示唆された。本結果は喫煙が気道過敏性惹起に直接働かないことを示したもののたが、喘息患者に喫煙を許可するとう形に解釈されるものではなく、同様に扱われている非特異的な刺激物質の気道への作用機序が異なることを示唆する所見である。次年度、喫煙暴露やディーゼル排気微粒子と自然免疫との相互作用についても明らかにする。

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)、足立哲也 (帝京大学医学部内科講師)、長瀬洋之 (帝京大学医学部助手)

A 目的 喘息の増加に関与している胎内胎外因子を明らかにし、アレルギー性疾患の予知予防に役立てることか、当該研究班の主題である。我々は、その中で喘息の発症に関連する非アレルギー的側面である臓器過敏性の気道過敏性に焦点を絞って研究を進めてきた。気道過敏性は気管支喘息の病態形成の重要な因子であり、その獲得には遺伝的因子と後天的因子として胎内、胎外因子 サイトカイン、増殖因子が関与している。平成11年度から13年度の研究で我々は増殖因子の気道過敏性に及ぼす影

響を明らかにしてきた。さらに体外因子として大気汚染物質のディーゼル排気微粒子(DEP)およびエンドトキシンの関与について検討を進めてきた。胎外の環境因子として、喫煙暴露について検討した。一方では、innate immunityの喘息発症における役割について明らかにすることを目標とした。

B 方法

balb/cマウスで、1)無処置、2)喫煙暴露のみ、卵白アルブミン(OA)+alumで免疫後3)無処置 4)喫煙暴露 5)OA吸入 6)OA吸入+喫煙暴露 6群に分け検討に用いた。暴露期間は、実験①のOA+アラム免疫後 OA吸入と同時に2週間喫煙暴露をする場合と、実験②のOA+ALUM免疫開始時から17週間暴露を検討した。最終暴露24時間後、気道過敏性測定、血清 肺胞洗浄液、病理組織を採取した。

喫煙暴露はマウス用隔離型全身曝露装置(M I・P・S社製)、煙草はhi-liteを使用した。喫煙曝露システム煙草主流煙発生装置の曝露吸引回数・間欠曝露回数を設定し、週に6日間・1日1回の条件で行った。暴露量は、尿中コチニンを測定し、ヒトの喫煙での最高レベル15000 (ng/ml)相当になるように設定した。

気道過敏性の測定ではAchを25mg/ml、50mg/mlと低濃度より3分間ずつ順次吸入させ、body plethysmograph覚醒下でenhanced pause (Penh)を測定し、吸入前値(100% Penh)に対する%値を% Penhとして評価した。

C. 結果

最初にIgE産生に及ぼす影響を検討した。総IgEはOA 単独吸入群と比較して、煙草暴露とOA吸入を併用してもIgE抗体価に軽度減少を認めた(図1)。

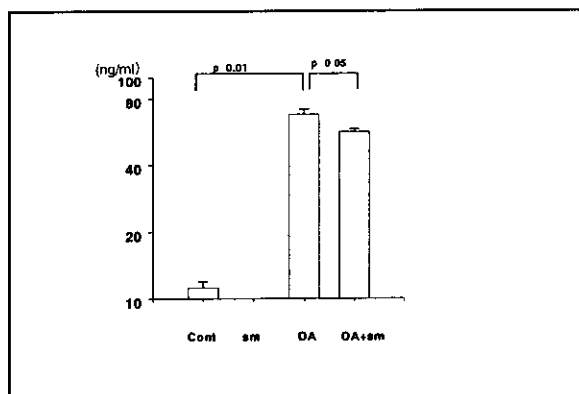


図1 喫煙暴露のIgE抗体価に及ぼす影響

次にBALF細胞について検討した。喫煙暴露により短期間の暴露では総細胞数の有意な減少を示した(図2)。この減少は好酸球数の減少によるものであった。気道過敏性について検討すると同様に抑制傾向を示した(図2)。

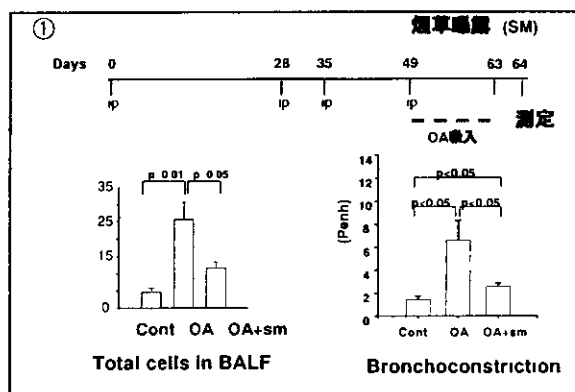


図2 喫煙短期暴露の気道炎症および過敏性への影響

各群5匹のマウスより得られた結果のmean ± SEMを示す。

一方、7週間暴露ではBALF細胞の総数はOA+喫煙群でOA単独暴露群と差異がなかった(図3)。細胞分画では喫煙群に好中球の有意な上昇を認めた(図4)。喫煙単独露群ではコントロールと比較して有意な細胞数の増加があり、特に好中球およびマクロファージの上昇が認められた(図4)。気道過敏性について検討すると、OA 単独暴露群と喫煙併用群比較して、有意差を認めなかった。また喫煙単独でも気道過敏性の誘導は認められなかった(図3)。

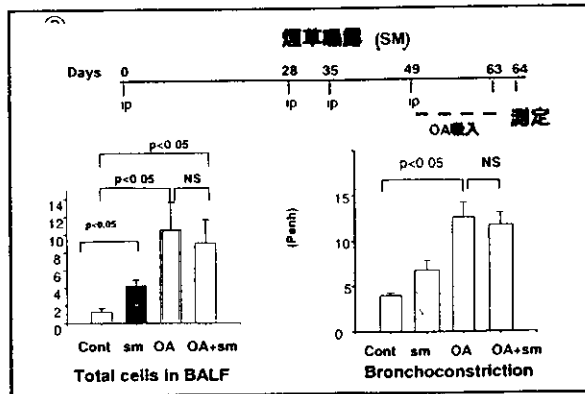


図3喫煙長期暴露の影響

各群5匹のマウスより得られた結果の mean ± SEMを示す。

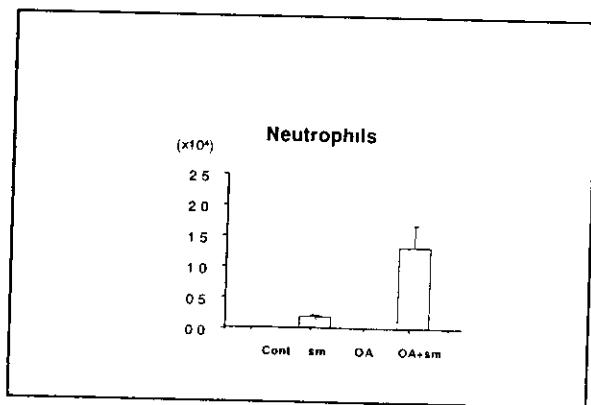


図4細胞分画の検討

サイトスピン標本をデフクイックで染色した。400倍で200個の細胞を算定し、細胞分画を算出した。総細胞数から好中球数を算定した。各群5匹のマウスより得られた mean ± SEMを示す。

さらにmRNAの発現について検討すると好中球の活性化および浸潤に関連するTNF- α およびMIP-2の有意な上昇が喫煙暴露群で認められた(図5)。

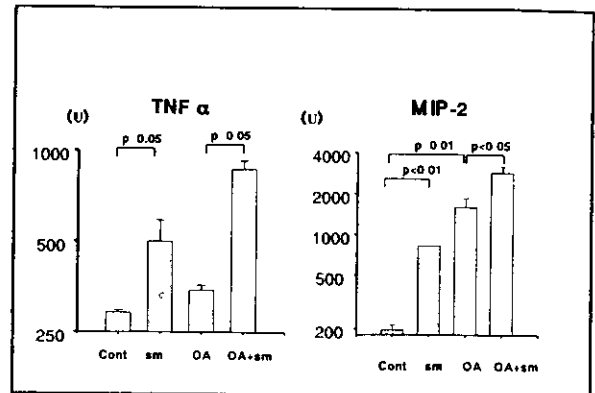


図5喫煙のサイトカインmRNA発現に及ぼす影響

肺からmRNAを抽出し、cDNAを合成、real-time PCRにてmRNAの発現を定量化した。各群3匹のマウスより得られたmRNAの mean ± SEMを示す。

D. 考察

喘息の発症に関与する因子として遺伝、アレルギーなど重要であるか、胎外因子として環境因子も大きく関わっている。喫煙が喘息へあたえる影響として、既に喫煙は直接気道収縮を引き起こす刺激として作用するのみならず、気道に炎症を起こし喘息の状態そのものを悪化させる因子としての報告も存在する。喫煙は喘息の悪化因子のひとつとして挙げられている。しかしエビデンスとしては母体の喫煙が喘息の発症頻度を増加させることが示されているが、その他の関与については喫煙の関与は疫学調査で賛否両論がある。基礎的検討では母体の喫煙が子マウスの気道過敏性に影響を及ぼすか、出産後子マウスへの暴露は影響ないと報告され

ている。そこで、今回、煙草暴露が気道炎症および気道過敏性にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とし検討を進めた。まず本実験では喫煙曝露量をモニターして行った。種々の喫煙モデルが存在するが喫煙曝露量をモニターして行った報告はない。モニターにはコチニンを使用した。コチニンはニコチンの代謝物として血中および尿中に検出できる物質であり、代謝時間が半減期12時間と長く、安定して検出できるものである。今回の実験では本曝露により、喫煙群Level 6, 15000 (ng/ml)、非喫煙群Level 0, 0 (ng/ml)と有意な差を生じたことから喫煙曝露が正確に行われたかの裏付けがされた。この曝露量をヒトの喫煙量モニターの最高レベルに相当するものである。

本実験では短期間の曝露では抑制傾向があった。この原因はさらに検討の必要があるか、短期の曝露ではTh1サイトカインが誘導されることにより、アレルギー炎症により惹起される気道過敏性が低下したことが想定された。長期曝露では、TNF- α およびMIP-2など、好中球遊走および活性化に関連するサイトカインやケモカインの上昇を認めこれらが、気道炎症悪化に関与していることが示唆された。

我々は既にディーゼル排気微粒子(DEP)が単独投与で気道過敏性を惹起することを報告した。喫煙曝露は単独で気道過敏性を惹起する作用は認めなかった。

今回は示さないが、喫煙曝露単独を長期に作用させることにより、肺の気腫化を促進した。しかし、この時点でも気道過敏性という指標については変化を認めなかった。

本結果は喫煙が気道過敏性惹起に直接働かないことを示したもののたが、喘息患者に喫煙を許可するという形に解釈されるものではなく、同様に扱われている非特異的な刺

激物質(DEPなど)と喫煙の気道への作用機序が異なることを示唆する所見である。

排気微粒子の一部はTLRを介して、マクロファージ等を刺激することが報告されている。また喫煙曝露もマクロファージや好中球に影響を及ぼすことが考えられ自然免疫への影響が想定される。そこで、次年度はTLRは発現への影響を含め解析を行う。

B 結論

喫煙曝露は長期曝露により気道炎症の悪化に働いたが、気道過敏性を悪化させる直接作用は認めなかった。

D. 業績

- ¹⁻⁶ Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, et al Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils activation by Toll-like receptor 7 ligand J Immunol 2003, 171 3977-82
- Komiyama A, Nagase H, Yamada H, Sekiya T, Yamaguchi M, Sano Y, et al Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells Cell Immunol 2003, 225 91-100
- Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, Kaneko F, Nakano J, Kato H, et al Attenuation of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model by neutralization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) Cell Immunol 2002, 219 92-7

- 4 Tsunemi Y, Sekiya T, Saeki H, Hirai K, Ohta K, Nakamura K, et al Lack of association of CCR3 single nucleotide polymorphism with atopic dermatitis in Japanese population J Dermatol Sci 2003, 33 130-3
- 5 Sekiya T, Tsunemi Y, Miyamasu M, Ohta K, Morita A, Saeki H, et al Variations in the human Th2-specific chemokine TARC gene Immunogenetics 2003, 54 742-5
- 6 Komiya A, Hirai K, Iikura M, Nagase H, Yamada H, Miyamasu M, et al Induction of basophil desensitization in physiological medium enhancement after IgE-dependent upregulation of surface IgE binding on basophils Int Arch Allergy Immunol 2003, 130 40-50

厚生労働科学研究補助金(免疫アレルギー疾患予防、治療研究事業)

アレルギー疾患に係わる胎内、胎外因子の同定に関する研究

(主任研究者 森川昭廣)

気管支喘息の胎外因子としてのウイルス感染

研究要旨

近年のアレルギー疾患罹患率増加は著しく気管支喘息患者数も増加を辿っている。感染は喘息のみならず全ての疾患においてその病態を修飾し大きな影響を及ぼす。当科における喘息の発症および増悪因子に関するアンケート調査では感冒(ウイルス性上気道炎)は発症時の誘因として43.4%(第一位)、増悪因子として64%(第一位)を占めその重要性は明らかである。しかしながら現時点ではウイルス感染に対し根治療法がないことも事実である。

ウイルス感染による喘息増悪の機序を解明する目的で気道組織構成細胞の一つである気道上皮に着目し研究を実施した。気道内腔表面に存在する気道上皮は外界とのバリアー機能やその線毛運動などによる異物排除機能が研究の対象とされてきたが、近年気道上皮細胞へ種々の刺激を加えることによりサイトカイン、ケモカインなどの生理活性物質の産生放出やICAM-1などの接着分子の発現が観察されることか判明した。このことは気道上皮細胞が気道炎症形成にあたり積極的に何らかの役割を演じていることを想定させる。今回我々は *in vitro* における気道上皮細胞培養系を確立し、これに対し炎症性サイトカイン刺激やウイルス感染モデルである dsRNA 刺激を行い新たな生理活性物質の産生などにつき検討を加えた。*in vitro* 気道上皮細胞培養系における検討は、近年注目されつつある分野であり現在までに気道上皮は IL-6,8,GM-CSF,RANTES などの生理活性物質を産生し気道炎症特にアレルギー性炎症の形成に関与することか明らかとなっている。これらの結果より抗体産生の亢進や好酸球好中球などの炎症細胞浸潤や活性化が誘導され炎症が増悪することか推定され、本実験系を用いた気道炎症機序解明は極めて有用な方法であることか確認された。

研究者 昭和大学第一内科 足立満(教授)

研究協力者 國分二三男(助教授) 松倉聡 川口未央

研究目的

influenza, parainfluenza, RSV, rhinovirus などのウイルスが気道感染の原因ウイルスとしては重要とされている。感冒症状を有する喘息発作患者においては喘息症状悪化とライノウイルス感染とに有意の関係を認めている。現在までウイルス感染と気管支喘息特に気道過敏性との関連については

ウイルス特異的 IgE 産生やケミカルメディエーターである LTC₄, ヒスタミン、プロスタグランジンなどの関与が報告されている。またウイルス感染において防御機構の中心的役割を担うウイルス特異的 CD8T 細胞が IL-4 刺激によって IL-5 産生を行い好酸球浸潤に関与しウイルス感染時の喘息悪化、