

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）
分担研究報告書

気管支喘息の難治化の病態機序の解明と難治化の予防・治療法開発に関する研究
—マウス気道過敏性発症に関与する責任遺伝子の同定に関する研究—

分担研究者 永井 博弼（岐阜薬科大学 薬理学教室 教授）

研究要旨 本研究では、マウス気道過敏性モデルを用いて、抗原曝露により生ずる気道過敏性発症に関与する責任遺伝子の同定を目的とし、網羅的遺伝子解析を行った。すなわち、能動的に感作したマウスに抗原を2回吸入させ、その4および24時間後に気管・気管支および肺実質を採取し、得られたcDNAをサンプルとした。また、感作生理食塩水吸入群ならびにステロイド投与群を対照群として比較検討した。その結果、4時間後では気道過敏性が認められたが、顕著な気道炎症は観察されなかった。一方、24時間後では、気道内好酸球増多ならびに気道過敏性が観察された。この際、4時間後において対照2群に比し抗原曝露群で2倍以上の発現変動の認められた遺伝子数は646、24時間後では661であった。今後、種々の遺伝子改変動物ならびに中和抗体を用いて、これらの遺伝子群のスクリーニングを行う予定である。

研究協力者

稲垣直樹（岐阜薬科大学薬理学教室・助教授）

田中宏幸（岐阜薬科大学薬理学教室・助手）

A. 研究目的

気管支喘息は、呼気性呼吸困難、気道内好酸球を中心とする気道炎症ならびに気道反応性亢進、すなわち気道過敏性を特徴とする慢性閉塞性呼吸器疾患である。本疾患の発症機序に関しては、これまでの多くの基礎および臨床研究により、主としてヘルパーT細胞のうち、特にIL-4、IL-5、IL-9、IL-13などのいわゆるTh2サイトカインを産生するTh2細胞、肥満細胞、好酸球ならびに気道上皮、気道平滑筋が種々の機能分子を介し病態形成に関与することが明らかにされているが、気道過敏性発症に関与する遺伝子ならびにその遺伝子産物に関しては不明な点が多い。

これまでに教室では、マウス抗原反復曝露により生ずる気道過敏性モデルを作成し、種々の検討を行ってきた。本モデルでは、抗原反復曝露により、気道内好酸球増多、血清中抗原特異的IgE値の上昇、アセチルコリンに対する気道過敏性などが認められ、これらのパラメーターの変化がいずれもステロイドにより抑制されることから、臨床のアトピー型気管支喘息のモデルとして有用であると思われる。

そこで本研究では、気道過敏性発症に関与する遺伝子群の同定を目的とし、DNAマイクロアレイを用いて、まず、抗原曝露により変動し、かつ、ステロイドによりその変動が抑制されている遺伝子を網羅的に解析した。

B. 方法

実験は、当教室のマウス気道過敏性モデルのプロトコールに従って行った。すなわち、雄性BALB/cマウスを、抗原として卵白アルブミンおよび水酸化アルミニウムゲルを用いて2回免疫し、その後、抗原を2回反復吸入し反応を惹起した。最終抗原曝露4時間および24時間後に、アセチルコリンによる気道収縮反応を測定し、その直後に気管支肺胞洗浄(BAL)を行った。遠心後、BAL液中の炎症性細胞数はDiff-Quik染色液により染色後、各分面ごとにカウントした。また、血清中の免疫グロブリン量はELISAにより定量した。一方、上述の時間に気管・気管支および肺実質を含むサンプルを採取し、DNAマイクロアレイにより、抗原曝露による変動遺伝子ならびにステロイド投与による変動遺伝子群を解析した。

C. 結果

生理食塩水吸入群に比しOA吸入群では、最終抗原曝露4時間後において、アセチルコリンに対

する気道反応性亢進、すなわち気道過敏性が認められたが、BALF中の炎症性細胞数の増加は顕著ではなかった。一方、24時間後では、気道内好酸球増多ならびに気道過敏性が観察された。これに対し、ステロイドは、いずれの場合においても気道過敏性を有意に抑制した。

4時間後のサンプルでは、生理食塩水吸入群に比しOA吸入群において2倍以上変動し、かつ、ステロイドにより2倍以上変動した遺伝子数は646であった(図2)。また、24時間後では、661遺伝子が同定された(図3)。

D. 考察

本研究では、抗原曝露2回目の4および24時間後の変動遺伝子を解析した結果、アレルギー反応によって生じる気道過敏性の発症に関与すると思われる遺伝子群を検索した。このうち、4時間後では、気道炎症に比較的依存していないと思われる遺伝子群が、24時間後では気道炎症に依存する遺伝子群が含まれていることが推察されることから、今後、種々の遺伝子改変動物あるいは中和抗体を用いて、さらに気道過敏性発症に関与する遺伝子群のスクリーニングを行う予定である。

E. 結論

マウス喘息モデルを用いた気道過敏性発症に関与する遺伝子群をスクリーニングした結果、抗原曝露4時間後ならびに24時間後において、それぞれ646ならびに661遺伝子が同定された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文

1) Komai M, Tanaka H, Masuda T, Nagao K, Ishizaki M, Sawada M, Nagai H. Role of Th2 responses in the development of allergen-induced airway remodeling in a murine model of allergic asthma. *Br. J. Pharmacol.* 2003; 138: 912-920.

2) Masuda T, Tanaka H, Komai M, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwara D, Nagai H. Mast cells play a partial role in allergen-induced subepithelial fibrosis in a murine model of allergic asthma. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33:

705-713.

3) Nagao K, Tanaka H, Komai M, Masuda T, Narumiya S, Nagai H. Role of PGI2 in airway remodeling induced by repeated allergen challenge in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003; 29: 314-320.

4) Yasunaga S, Yuyama N, Arima K, Tanaka H, Toda S, Maeda M, Matsui K, Goda C, Yang Q, Sugita Y, Nagai H, Izuhara K. The negative-feedback regulation of the IL-13 signal by the IL-13 receptor α 2 chain in bronchial epithelial cells. *Cytokine* 2003; 24: 293-303.

2. 学会発表

1) 田中宏幸, 永井博式: 気管支喘息とプロスタノイド. 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会 シンポジウム6 (2003年5月、横浜)

2) 稲垣直樹, 田中宏幸, 永井博式: 低分子メチコクニールを標的としたアレルギー治療薬. 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会 シンポジウム7 (2003年5月、横浜)

3) 永井博式: アレルギー性炎症の機序解明と免疫薬理学的アプローチ. 第53回日本アレルギー学会総会 会長講演 (2003年10月、岐阜)

4) 田中宏幸, 永井博式: 気道過敏性と気道リモデリング発症の分子メカニズム—マウスモデルを用いた検討—. 第53回日本アレルギー学会総会 シンポジウム1 (2003年10月、岐阜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

図 1

マイクロアレイ解析の手順

各マウスの気管、気管支および肺実質をRNA later (QIAGEN社) にて保存し、その後、RNeasy (QIAGEN社) を用いてtotal RNAを抽出した。

抽出したtRNAのうち、電気泳動で18S・28Sが確認でき、かつ吸光度測定にてOD260/OD280が1.7以上であったサンプルを等量ずつ混合し、各群のサンプルとした。

Amino A llyl Message AMP aRNA kit (Ambion社) を用いてアミノアルイルラベルaRNAを調製した。

得られたaRNAにCyDye (Cy3, Cy5) をカップリングさせ、フラグメント化を行った。今回は、Saline吸入群およびPrednisolone投与群をCy3、OA吸入群をCy5にて標識した。

Ace Gene Mouse O ligo Chip 30K (日立) 上に標識化されたターゲット溶液を載せ、ハイブリダイゼーションを行った。

洗浄後、CRBD Ilc (日立) を用いてスキャンし、DNASIS Array (日立) にて解析した。

図 2

最終抗原吸入 4 時間後測定群

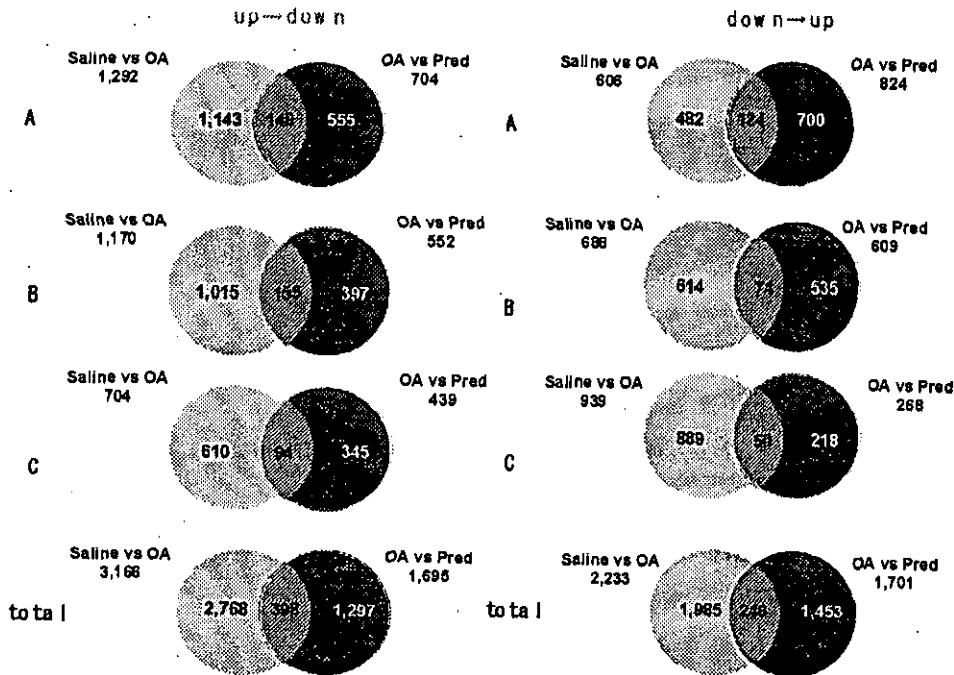
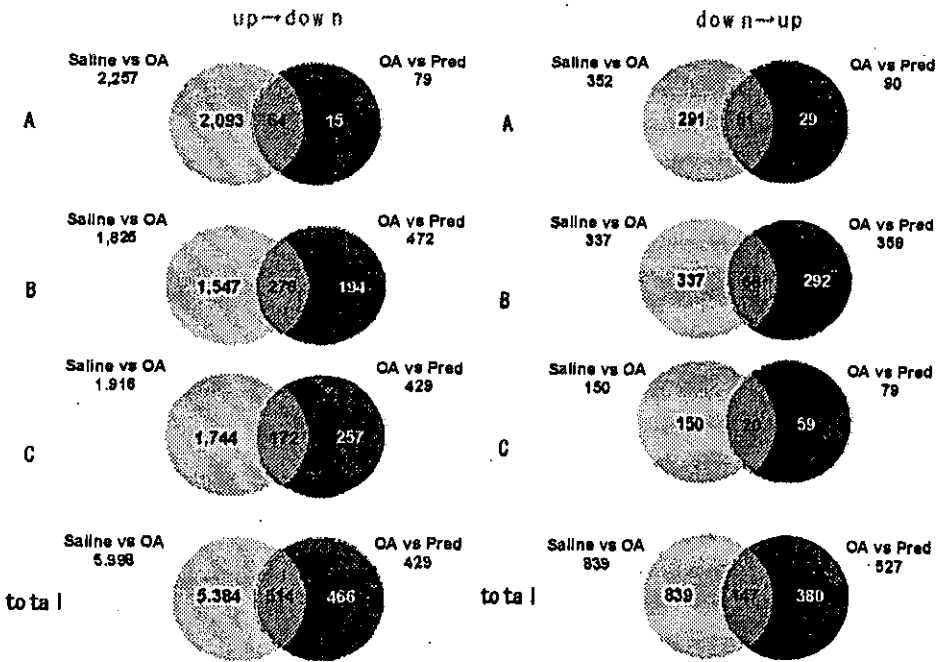


図 3

最終抗原吸入 24 時間後測定群



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）

分担研究報告書

分担研究者 鳥帽子田 彰 広島大学大学院医歯薬総合研究科公衆衛生学教授

研究要旨：気管支喘息の重症化に関与する遺伝子を見いだすために、好酸球関連蛋白である CCR2 や CCR3 をはじめとする CC ケモカインに着目し、気管支喘息、花粉症のうちのいずれかの疾患を有する罹患同胞対 52 対の CC ケモカイン遺伝子を調べた。その結果、CCR2 の Val64Ile、Asn260Asn (T860C)、CCR3 の Tyr17Tyr (T51C) の 3 つの多型は、アレルギー性疾患の中で、連鎖不均衡にあった。喘息単独、花粉症単独および喘息+花粉症の間での Zir score を調べたところ、喘息単独に対して喘息+花粉症においてこれらの多型における Zir score が高いことが示された。したがって、CCR2 の遺伝子の多型を有す人は、花粉症の合併によって喘息の発症を促す、あるいは重症化を引き起こす可能性が示唆された。

A 研究目的

気管支喘息の発症およびその重症度に関わる遺伝子を同定することで、喘息症を重篤化させない予防法および治療法の開発、特に Tailor-made 医療の実現の礎を築く。本年度は、アレルギーの病理機序における共通の病態に関する遺伝子を探索し、その遺伝子が重症化に関係するとする仮説を導くことを目的とした。

特異的な好酸球遊走活性を示す CC ケモカイン Eotaxin やその特異的受容体 CCR2 と CCR3 は、アレルギー性炎症への関与が注目されている。CCR2 や CCR3 は、CCR1、CCR5、CCXCR1 とともにその遺伝子を染色体 3p21.3 に有し、相互が極めて近接する CCR ケモカインファミリーを形成している（図 1）。CCR2 と CCR3 は主に好酸球、好塩基球に発現するとともに Th2 リンパ球にも発現しており、CCR2 や CCR3 をはじめとする CC ケモカインのアレルギーにおける更なる病態生理学的役割解明が期待されている。

B 研究方法

東京都品川区五反田地区および牧丘地区において分子疫学を実施した。その対象は、気管支喘息、花粉症のうちのいずれかの疾患を有する罹患同胞対 52 対である。候補感受性遺伝子は、遺伝子を染色体 3p21.3 に有し、相互が極めて近接する CCR ケモカインファミリーである CCR1、CCR2、CCR3、CCR5 および CCXCR1 である。この遺伝子と調べた一塩基多型を図 1 に示した。

本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究が含まれている課題」に該当するため、人間の尊厳及び人権が尊重され、社会の理解と協力を得て、研究の適正な推進が図られることを目的とした「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って実施された。その際、金沢大学における「倫理審査委員会による事前の審査及び承認」を受け、さらに「事前の十分な説明と自由意思による同意（インフォームド・コンセント）」に基づいて行われ

た。

C 研究結果

多型が認められた遺伝子のうち、CCR2のVal64Ile、Asn260Asn (T860C)、CCR3のTyr17Tyr (T51C)の3つの多型は、アレルギー性疾患の中で、連鎖不均衡にあった。

喘息単独、花粉症単独および喘息+花粉症の間でのZir scoreを調べたところ、喘息単独に対して喘息+花粉症においてこれらの多型におけるZir scoreが高いことが示されたが、花粉症単独に際しても、喘息との合併ほど高い値ではないものの、比較的高い値を呈した。

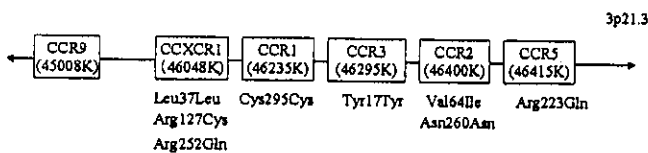


図1 CCRケモカインファミリーの遺伝子と本研究で調べた一塩基多型

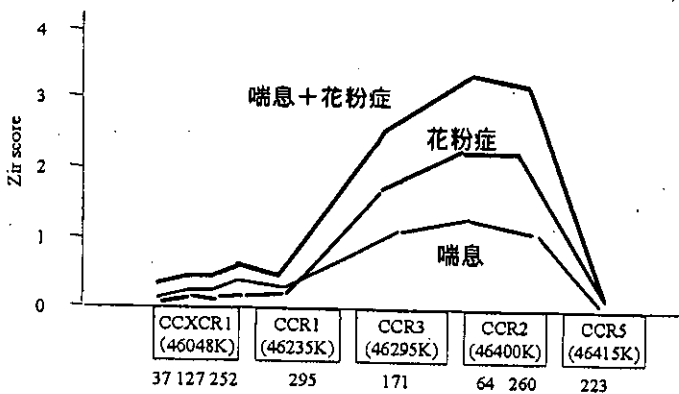


図2 喘息単独群、花粉症単独群、喘息+花粉症単独群におけるCCケモキケモカインファミリーの遺伝子と連鎖不均衡を示すZir score

D 考察

これまで、CCR3におけるTyr17Tyr (T51C)と喘息との関連が報告されており、本研究においてもこの遺伝子座位との関連が認められたが、サイレント変異であることから、むしろアミノ酸置換を伴うCCR2のVal64Ileによって機能異常が引き起こされていると想定される。この遺伝子座位と疾患座位の連鎖が、CCR2とCCR3遺伝子全体の連鎖不均衡を生じせしめていると考えられる。また、喘息症との関連で調べたところ、CCR2の遺伝子の多型を有す人は、花粉症の合併によって喘息の発症を促す、あるいは重症化を引き起こす可能性があることがわかった。さらに症例を増やし、発症時期との関係、重症度との関係を調べる必要があると考えられた。

E 結論

CCR2の遺伝子多型である64Ileを有す人は、花粉症の合併によって喘息の発症を促す、あるいは重症化を引き起こす可能性が示唆された。

F 健康危険情報

花粉症は、マスクの着用の徹底などによって予防可能である。本研究の結果から、喘息を重症化させないためにも、花粉症の予防におけるセルフケアの重要性が提唱された。

G 研究発表

1. 論文発表

1) Sasahara S, Matsuzaki I, Nakamura H, Ozasa K, Endo T, Imai T, Honda Y, Hatta K, Ide T, Motohashi Y, Eboshida A: Environmental factors and lifestyles as risk factors for Japanese cedar

pollinosis in recent urban areas. Arch Complex Environ Studies (in print)

2) Nakamura H, Matsuzaki I, Sasahara S, Hatta K, Endo T, Imai T, Ozasa K, Motohashi Y, Ogino K, Eboshida A: Higher sense of coherence as a

psychological factor responsible for elevated natural killer cell activity in patients with cedar pollinosis. J Phys Fit Nutri Immunol (in print)

3) Nakamura H, Miyagawa K, Ogino K, Endo T, Imai T, Ozasa K, Motohashi Y, Matsuzaki I, Sasahara S, Hatta K, Eboshida A: High contribution contrast between the genes of eosinophil peroxidase and interleukin 4 receptor α chain in Japanese cedar pollinosis: J Allergy Clin Immunol 112(6):1127-31, 2003.

4) 小笹晃太郎、藤田麻里、奈倉淳子、林恭平、渡邊能行、出島健司、竹中洋、中村裕之、鳥帽子田彰：スギ花粉症QOL指標作成の試み、厚生指標、50(7)、1-7, 2003

5) 鳥帽子田 彰、中村裕之：大気汚染はアレルギー疾患の発症に関与するか、Progress in

Medicine 23 (12), 3217-3222, 2003.

6) .鳥帽子田 彰、中村裕之：スギ花粉症は今後
も増えるのか、臨床と薬物治療 23(1), 2-5,
2004

2. 学会発表

1) 福富友馬、松崎一葉、笹原信一郎、中村裕之、小笹晃太郎、遠藤朝彦、今井透、八田耕太郎、本橋豊、鳥帽子田彰：マスク着用行動による花粉症症状の防止効果が認知機能に与える影響、第15回アレルギー学会春季臨床大会、横浜、2003年5月

2) 中村裕之、荻野景規、鳥帽子田彰：スギ花粉症における環境と遺伝の相互作用—IL4RA 遺伝子を中心として、第3回分子予防環境医学研究会、東京、2003年12月

3) 前島早代、中村裕之、鳥帽子田彰：スギ花粉症における生活環境因子の親子関係、第16回日本アレルギー学会春期臨床大会、前橋市、2004年5月（予定）