

20030666

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 出原 賢治

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 ダニアレルゲンに対する生体防御機構に関する検討	-----	9
---------------------------	-------	---

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	-----	13
--------------------------------	-------	----

白川 太郎

3 樹状細胞による IgE 産生の誘導	-----	16
---------------------	-------	----

柳原 行義

4 アレルギー発症における遺伝と環境 - 特に RNA プロセッシングの関与-	-----	19
---	-------	----

近藤 直実

5 アレルギー疾患発症遺伝要因としての IL-18 遺伝子多型および環境要因としての	-----	
--	-------	--

フラボノイドの作用	-----	22
-----------	-------	----

田中 敏郎

6 ダニ抗原が TGF- β の活性化に及ぼす作用についての研究, ----- 25

中尾 篤人

III 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 27

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）
総括研究報告書

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

主任研究者 出原賢治 佐賀大学医学部分子生命科学講座教授

研究要旨 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 豊富なゲノム情報により多くのアレルギー疾患の遺伝要因候補が同定され、その一方で、感染症の減少などいくつかの要因が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、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は限界があり、また、個人間における環境要因の感受性の違いについてもほとんど解明されていない このため、本研究で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て、両方の要因の相互作用について解明を進めることを目指している 本年度は、遺伝要因の解析については、網羅的な遺伝子解析において 15 万 SNP の中で気管支喘息に関連する SNP を 17 個に絞り込んだ また、IL-12R β 2 鎖の RNA には RNA 編集が起こっており、これが IFN- γ 産生の低下を介してアレルギー疾患の発症あるいは増悪と関与していることを示した 環境要因の解析については、ダニアレルゲンは最も重要なアレルゲンの一つであるが、それに対する生体側の防御反応あるいは気道リモデリングあるいは皮膚の苔癬化との関連性を明らかにした また、アレルギー疾患の発症や増悪に対するウイルス感染の影響に関して、樹状突起細胞における BlyS 発現が重要であることを明らかにした さらに、昨年度食物成分であるフラボノイドが抗アレルギー効果を持つことを報告したが、その作用機序と構造的特徴について解析を進めた これらのことを統合して、最終的には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、また、アレルギー疾患に対するより効果的な創薬開発の標的を明らかにすることを目指す

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 山梨大学大学院医学工学総合研究部免疫学講座教授

研究協力者

有馬和彦 佐賀大学医学部分子生命科学講座助手
金地佐千子 佐賀大学医学部分子生命科学講座助手
増本清成 佐賀大学医学部分子生命科学講座助手
金地泰典 佐賀大学医学部分子生命科学講座助手
高井敏朗 順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター助手
梶原景一 国立相模原病院臨床研究センター
品澤美樹 国立相模原病院臨床研究センター
森嶋大貴 国立相模原病院臨床研究センター
山本ひとみ 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

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
比嘉慎二 大阪大学大学院分子病態内科学講座
平野亨 大阪大学大学院分子病態内科学講座
有光潤介 大阪大学大学院分子病態内科学講座
岡本篤司 山梨大学大学院医学工学総合研究部耳鼻咽喉科学講座

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て、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測できるようになり、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遺伝要因に関する解析

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は、候補遺伝子解析法と連鎖解析法があげられる。前者は、アレルギー疾患の発症機序に重要だと考えられる遺伝子内に存在する SNP とアレルギー疾患の発症あるいは病態との関連を解析する方法である。本年度は IL-18, $\beta 2$ アドレナリン受容体, SOCS3, IL-12p40, TLR3 の各遺伝子について解析を行った。後者は網羅的に数多くの SNP とアレルギー疾患の発症あるいは病態との関連を解析する方法である。本研究では、理研 SRC で開発された high through-put assay を用いてリストアップした 15 万 SNP の情報をもとに遺伝子解析を進めている。今年度は正常対象を集め直し、数を 760 例に増やして昨年度抽出された 37 個の SNP について解析を行った。また、ゲノム自体に変異が存在するのではなく、産生された RNA に塩基置換を生じる RNA 編集 (RNA editing) についても検討を行っている。本年度は IL-12R $\beta 2$ 鎖の RNA に生じている RNA 編集を同定し、アレルギー疾患との関連、IFN- γ 産生能との関連について解析を行った。

②環境要因に関する解析

アレルゲンは生体にアレルギー反応を引き起こす外来性異物であり、最も重要な環境要因である。アレルゲンの中でダニ抽出物は最も重要なものの一つであり、気管支喘息やアトピー性皮膚炎の発症への関与が指摘されている。本年度はダニアレルゲンの中で最も患者の IgE 陽性率が高く、システインプロテアーゼ活性を持つグループ I アレルゲンを取り上げ、これに対する生体側の防御反応あるいは気道リモデリングあるいは皮膚の苔癬化との関連について検討を行った。また、ウイルス感染はアレルギー疾患の発症や増

悪に関与していることが知られている。本年度はウイルス由来の二本鎖 DNA アナログとしての poly IC を用いて樹状突起細胞の活性化機能について検討を行った。また、食物の中にはアレルギー反応を誘発する物質とともに抑制する物質も含まれていることが知られている。本研究では、フラボノイドを取り上げ、これが抗アレルギー反応を示すことを昨年度に報告したが、本年度はさらに各種フラボノイドの抗アレルギー反応効果について解析を進めた。

C. 結果

①遺伝要因に関する解析

- (1) 昨年度 15 万 SNP の中からアレルギー疾患と非常に強い相関 ($p < 0.0001$) を認めた 37 個の SNP について、再度検討を行った結果、17 個についてはより強い相関が認められたが、残りの 20 個については同程度か、やや弱い相関しか得られなかった (白川)
- (2) 昨年度 IL-18 遺伝子上の 105A/C という SNP が気管支喘息の発症と関連する ($p = 0.006$, OR = 1.83) ことを報告したが、この SNP と他の SNP (SOCS3-514Phe/Leu, IL-12p40-1188A/T, $\beta 2$ ADR-16Arg/Gly, $\beta 2$ ADR-27Gln/Glu) と相互作用するか検討を行ったが、有意な組み合わせは認められなかった (田中)
- (3) ウイルス由来の二本鎖 DNA を認識する TLR3 遺伝子上に、Leu412Phe という新規の SNP を同定したが、アレルギー疾患との相関は認められなかった (柳原)
- (4) IL-12R $\beta 2$ 鎖の cDNA 上において、2451 番目の塩基が C から U に置換する RNA 編集が存在すること明らかにした。この RNA 編集により 604 番目のアミノ酸が Ala から Val へと変化する。この RNA 編集は非アレルギー患者 (3.8%) に比べてアレルギー患者 (20.6%) で頻度が高く、IL-12 刺激による IFN- γ 産生が有意に低下していた (近藤)

②環境要因に関する解析

- (1) Th2 型サイトカインである IL-4 あるいは IL-13 は気道上皮細胞を刺激して SCCA 分子の産生を誘導し、産生された SCCA 分子がグループ I のダニアレルゲンの生物活性に対して阻害するという新規の生体防御機構が存在することが明らかとなった。また、野生型 SCCA2 よりダニアレルゲンに対して強力な阻害効果を持つ変異型 SCCA 分子を作製し、新規の抗ダニアレルギー疾患治療薬の開発につながることを示された (出原)
- (2) グループ I のダニアレルゲンが持つシステインプロテアーゼ活性により、潜在型 TGF- β が生物活性を持つ活性化型

に変換されることが明らかとなり、ダニアレルゲンが気道リモデリングや皮膚の苔癬化に関与している可能性が示された (中尾)

- (3) ウイルス二本鎖 DNA アナログである poly I C により樹状突起細胞を活性化すると、IFN- α や IFN- γ のオートクリン産生を介して BlyS の発現が増強され、IL-4 存在下で B 細胞に IgE クラススイッチを誘導することが明らかとなった (柳原)
- (4) 代表的な 18 種のフラボノイドの中で luteolin, apigenin と fisetin が好塩基球からの IL-4 と IL-13 産生に対して強い抑制活性を持つことが明らかとなり (IC₅₀=2.4-5.7 μ M), 抑制活性に必要な基本骨格が明らかとなった (田中)

D. 考察

白川らの網羅的な遺伝子解析では、15 万 SNP の中で気管支喘息に関連する SNP を 17 個に絞り込み、これで遺伝要因の約 90%を予測することが可能になることが示された。来年度には、この中から環境要因の感受性に関与する遺伝子を取り上げ、その機能解析を行うことが予定している。また、IL-12R β 2 鎖の RNA には RNA 編集が起こっており、これが IFN- γ 産生の低下を介してアレルギー疾患の発症あるいは増悪と関与していることが示された。今後の遺伝要因に関する解析として、ゲノム上における SNP 解析のみではなく、このような遺伝子転写後の変異についても検討が必要であることと考えられた。

ダニアレルゲンは最も重要なアレルゲンの一つであるが、それに対する生体側の防御反応あるいは気道リモデリングあるいは皮膚の苔癬化との関連性が明らかとなった。また、アレルギー疾患の発症や増悪に対するウイルス感染の影響に関して、樹状突起細胞における BlyS 発現が重要であることが明らかとなった。これらの解析をさらに進めると同時に関連遺伝子の SNP との組み合わせを行うことにより、ダニアレルゲンやウイルス感染に対する生体感受性の環境的影響あるいは遺伝的影響が明らかになると期待された。また、昨年度食物成分であるフラボノイドが抗アレルギー効果を持つことを報告したが、その作用機序と構造的特徴について解析が進み、さらに効果的な創薬へ結びつくことが期待された。

E. 結論

遺伝要因に関しては、網羅的にアレルギー疾患に関連する SNP を絞り込むとともに、IL-12R β 2 鎖の RNA 上にアレルギー疾患と関連する RNA 編集を同定した。また、環境要因に関しては、ダニアレルゲンに対する生体側の防御

反応あるいは気道リモデリングあるいは皮膚の苔癬化との関連性を明らかにするとともに、ウイルス感染によるアレルギー疾患発症あるいは増悪機序について検討した。さらに、抗アレルギー効果を持つ食物成分であるフラボノイドについて解析を進めた。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1) **Izuhara K.**
The Role of interleukin-4 and interleukin-13 in the non-immunologic aspects of asthma pathogenesis
Clin Chem Lab Med · 2003 · 41 · 860-864
- 2) Yasunaga S, Yuyama N, Anma 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
- 3) Masumoto K, Sakata Y, Anma K, Nakao I, **Izuhara K.**
Inhibitory mechanism of a cross-class serpin, the squamous cell carcinoma antigen 1
J Biol Chem · 2003 · 278 · 45296-45304
- 4) Wongpiyabovorn J, Suto H, Ushio H, **Izuhara K.**, Mitsunishi K, Ikeda S, Nakao A, Okumura K, Ogawa H.
Up-regulation of interleukin-13 receptor α 1 on human keratinocytes in the skin of psoriasis and atopic dermatitis
J Dermatol Sci · 2003 · 33 · 31-40
- 5) Yokoi F, Hirashi H, **Izuhara K.**
Molecular cloning of a cDNA for the human phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase
J Biochem · 2003 · 133 · 607-614
- 6) Sakata Y, Anma K, Takai T, Sakurai W, Masumoto K, Yuyama N, Suminami Y, Kishi F, Yamashita T, Kato T, Ogawa H, Fujimoto K, Matsuo Y, Sugita Y, **Izuhara K.**
The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p 1
J Biol Chem · 2004 · 279 · 5081-5087
- 7) **Izuhara K.**, Anma K
Signal transduction of IL-13 and its role in the pathogenesis of bronchial asthma.
Drug News & Perspectives in press
- 8) **Izuhara K.**, Anma K, Masumoto K, Kanaji S, Kanaji T
IL-4 and IL-13 Their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies-Update
Medical Chemistry Reviews - online in press

- 9) Tanaka K, Roberts MH, Yamamoto N, Sugura H, Uehara M, Mao X-Q, Shirakawa T, Hopkin JM Heterogeneity of atopic eczema, a genetic variant of RANTES and high IgE level *Clin Exp Allergy* (in press)
- 10) Hasegawa K, Hirota T, Obara K, Akahoshi M, Cheng L, Takahashi Shimizu M, Sekiguchi H, Kokubo M, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Mao X-Q, Tamari M, Shirakawa T Association between genetic variation in the gene for ADAM33 and clinical severity of childhood asthma in the Japanese population *Hum Genet* (in press)
- 11) Nakajima T, Iikura M, Okayama I, Matsumoto K, Uchiyama C, Shirakawa T, Yang X, Adra CN, Hirai K, Saito H Identification of granulocyte subtype-selective receptors and channels by high-density oligonucleotide probe array *J Allergy Clin Immunol* 2004,113(3) 528-535
- 12) Fukuda S, Ishikawa H, Koga Y, Yaiba Y, Nakashima K, Cheng L, Shirakawa T Allergy and serum antibodies against bacterial species of predominant commensal intestinal microflora in schoolchildren *J Adoles Health* 2004,34 未定
- 13) Peisong G, Mao X-Q, Enomoto T, Feng Z, Glona-Bottini F, Bottini E, Shirakawa T, Sin D, Hopkin JM An asthma-associated genetic variant of STAT6 predicts low burden of ascaris worm infestation *Genes Immunity* 2004,5 58-62
- 14) Shimada T, Cheng L, Ide M, Fukeda S, Enomoto T, Shirakawa T Effect of lysed enterococcus faecalis FK-23 (LFK) on allergen-induced peritoneal accumulation of eosinophils in mice *Clin Exp Allergy* 2003,33 684-7
- 15) Bottini N, Mao XQ, Borgiani P, Saccucci P, Stefanini L, Greco E, Fontana L, Hopkin JM, Shirakawa T. Genetic control of serum IgE level, a study of lowmolecular weight protein tyrosine phosphatase *Clin Genet* 2003,63 228-231
- 16) Ouchi K, Suzuki Y, Shirakawa T, Kishi F Polymorphism of SLC11A1(formerly NRAMP1) gene confers susceptibility to Kawasaki disease *J Infect Dis* 2003,187.326-9
- 17) Yanagihara, Y Regulatory mechanisms of human IgE synthesis *Allergol Int* , 52, 1-12, 2003
- 18) Yamamoto, H, Yanagihara, Y Genetic variants of chemical mediator receptors in relation to asthma *Int Rev Asthma* , 5, 60-66, 2003
- 19) Fujii-Maeda, S, Kajiwara, K, Ikizawa, K, Shinazawa, M, Yu, B, Koga, T, Furue, M, Yanagihara, Y Reciprocal regulation of thymus and activation-regulated chemokine/macrophage-derived chemokine production by interleukin (IL)-4/IL-13 and interferon- γ in HaCaT keratinocytes is mediated by alternations in E-cadherin distribution *J Invest Dermatol* , 122, 20-28, 2004
- 20) Kajiwara, K, Shinazawa, M, Morishima, H, Yanagihara, Y Differential effect of IL-4 and IL-13 on the expression of recombination-activating genes in mature B cells from human peripheral blood *Cell Immunol* , in press
- 21) Kondo, N, Matsui, E, Kaneko, H, Aoki, M, Kato, Z, Fukao, T, Kasahara, K, Morimoto, N RNA editing of interleukin-12 receptor $\beta 2$, 2451 C-to-U (Ala 604 Val) conversion, associated with atopy *Clin Exp Allergy* (in press) (2003)
- 22) 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)
- 23) 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)
- 24) 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)
- 25) Higa S, M Kotani, M Matsumoto, A Fujita, T Hirano, M Suemura, I Kawase and T Tanaka 2003 Administration of anti-interleukin-18 antibody fails

- to inhibit development of dermatitis in atopic dermatitis-model mice NC/Nga *Br J Dermatol* 149 39-45
- 26) Tanaka T, S Higa, T Hirano, M Kotani, M Matsumoto, A Fujita, and I Kawase 2003 Flavonoids as potential anti-allergic substances *Curr Med Chem-Anti-Inflammatory & anti-allergy agents* 2 57-65
- 27) Higa S, T Hirano, M Mayumi, M Hiraoka, Y Ohshima, M Nambu, E Yamaguchi, N Hizzawa, N Kondo, E Matsui, Y Katada, A Miyatake, I Kawase, and T. Tanaka 2003 Association between IL-18 gene polymorphism 105A/C and asthma *Clin Exp Allergy* 33 1097-1102
- 28) Higa S, T Hirano, M Kotani, M Matsumoto, A Fujita, M Suemura, I Kawase, and T. Tanaka 2003 Fisetin, a flavonol, inhibits TH2-type cytokine production by activated human basophils *J Allergy Clin Immunol* 111 1299-1306
- 29) Iwashige K., K. Kouda, M Kouda, K. Horuchi, M Takahashi, A. Nagano, T. Tanaka, H and Takeuchi 2004 Calorie restricted diet and urinary pentosidine in patients with rheumatoid arthritis *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 23 19-24
- 30) Tanaka T, S Higa, T Hirano, J Arimitsu, and I Kawase 2004 The cytokine network in allergic disorders *Curr Drug Targets-Inflammatory & Allergy* in press
- 31) Hirano T, S Higa, J Arimitsu, T Naka, Y Shima, S Ohshima, M Fujimoto, T Yamadori, I Kawase, and T. Tanaka 2004 Flavonoids such as luteolin, fisetin and apigenin are inhibitors of IL-4 and IL-13 production by activated human B cells *Int Arch Allergy Immunol* in press
- 32) Inazaki K, Kanamaru Y, Kojima Y, Sueyoshi N, Okumura K, Kaneko K, Yamashiro Y, Ogawa H, Nakao A. Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction *Kidney Int* (in press)
- 33) Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, Okumura K, Ogawa H Exogenous Smad3 accelerates wound healing in a rabbit dermal ulcer model *J Invest Dermatol* (in press)
- 34) Higashi K, Inagaki Y, Fujimori K, Nakao A, Kaneko H, Nakatsuka I IFN- γ interferes with transforming growth factor- β signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3 *J Biol Chem* 278 43470-43479, 2003
- 35) Inagaki Y, Nemoto T, Kushida M, Sheng Y, Higashi K, Ikeda K, Kawada N, Shirasaki F, Takehara K, Sugiyama K, Fujii M, Yamauchi H, Nakao A, De Crombrughe B, Watanabe T, Okazaki I Interferon- α down-regulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis in mice *Hepatology* 38 890-899, 2003
- 36) Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, Okumura K, Tsuboi R, Ogawa H Smads regulate collagen gel contraction by human dermal fibroblasts *Br J Dermatol* 149 464-70, 2003

2 学会発表

- 1) Yuyama N, Yasunaga S, Anna K, Tanaka H, Toda S, Maeda M, Matsui K, Goda C, Yang Q, Sugita Y, Naga H, Izuhara K. The Negative-Feedback System of the IL-13 Signal by IL-13 Receptor $\alpha 2$ Chain in Bronchial Epithelial Cells 2003KEYSTONESYMPOSIA, 2003 43, KEYSTONE(USA)
- 2) 有馬和彦, 坂田資尚, 増本清成, 出原賢治, 高井敏朗 プロテアーゼ/プロテアーゼインヒビター相互作用を基盤としたアレルギー疾患治療戦略 第15回日本アレルギー学会春季期臨床大会, 2003 5 14, (シンポジウム)
- 3) 出原賢治 リンパ球機能に対する遺伝要因と環境要因の影響 第43回日本リンパ網内系学会総会, 2003 6 5, (シンポジウム)
- 4) 本庄栄二郎, 重松秀樹, 黒沢敬子, 黒木良太, 有馬和彦, 出原賢治 野生型及び R110Q 変異体ヒトインターロイキン-13 の大腸菌での発現調製及びその性質 日本農芸化学会 2003 年度大会 2003 4 2
- 5) Sakata Yasuhisa, Anna Kazuhiko, Masumoto Kiyonari, Taka Toshiro, Sakurai Wataru, Yuyama Noriko, Matuo Yo, Izuhara Kenji Squamous cell carcinoma antigen(SCCA)2, a member of the ovalbumin-serpin family, inhibits the enzymatic activity of the house dust mite allergen, *Der p1* 第76回日本生化学会大会, 2003 10 18 (口頭発表, ポス

- ター)
- 6) Kiyonan Masumoto, Yasuhisa Sakata, Kazuhiko Arima, Yoshinori Suminami, Fumio Kishi, Kengo Izuhara
Inhibitory mechanism of a cross-class serpin,squamous cell carcinoma antigen 1
第76回日本生化学会大会, 2003 10 18 (ポスター)
- 7) 出原賢治
Th2 型サイトカインを標的としたアレルギー疾患に対する分子標的治療の現状と展望
第 53 回日本アレルギー学会総会, 2003 10 24 (教育セミナー)
- 8) 有馬和彦, 出原賢治
創薬応用をめざしたIL-13/IL-13 受容体相互作用の解析
第 53 回日本アレルギー学会総会, 2003 10 25 (シンポジウム)
- 9) 加藤武, 高井敏朗, 坂田資尚, 安枝浩, 出原賢治, 奥村康, 小川秀興
組換えダニ主要アレルゲン Der p1,Der f1 のプロテアーゼ活性の解析
第 53 回日本アレルギー学会総会, 2003 10 23 (口頭発表)
- 10) 出原賢治
アレルギー疾患の遺伝要因同定に関する研究
第 50 回日本臨床検査医学会総会, 2003 10 30 (臨床検査医学会学会賞 (学術賞) 受賞講演)
- 11) 有馬和彦, 出原賢治, 白川太郎, 山下哲次, 寺田透, 松尾洋
IL-13 遺伝子上に存在する一塩基多型の気管支喘息における診断的意義とその機能ならびに構造解析
第 50 回日本臨床検査医学会総会, 2003 10 30 (ポスター)
- 12) 出原賢治, 坂田資尚, 有馬和彦, 西奈津子, 濱崎雄平, 湯山則子, 杉田雄二, 南雲文夫, 山下哲次
新しい気管支喘息の病態マーカーとしての SCCA(扁平上皮細胞癌抗原)の意義
第 50 回日本臨床検査医学会総会, 2003 10 29 (ポスター)
- 13) 坂田資尚, 有馬和彦, 高井敏朗, 増本清成, 出原賢治
IL-4/IL-13 による主要ダニ抗原 Der p1 に対する防御機構
第 33 回日本免疫学会総会・学術集会, 2003 12 8-10 (口頭発表)
- 14) 福田早苗, 白川太郎, 石川裕樹, 相場勇志, 古賀泰裕
アレルギー疾患と腸内細菌透過性に関する研究,第 13 回日本疫学会,福岡, 2003 1
- 15) 白川太郎 アレルギーの予防を考える(学術講演), 第 26 回日本医学会総会,福岡 シークホテル,2003 4 4-6
- 16) 玉利真由美,白川太郎 気管支喘息関連遺伝子への患者一対象研究を中心に (シンポジウム),第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会,パシフィコ横浜,2003 5 12-14
- 17) 井手昌洋, 嶋田貴志, 榎本雅夫, 白川太郎, 安枝 浩
スギ花粉抗原の 1 型アレルギーモデルに対する乳酸菌 F K-23 菌抽出物 (L F K) の効果, 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会,パシフィコ横浜,2003 5 12-14
- 18) 三邊武幸, 三好 彰, 程 雷, 殷 敏, 時 海波, 白川太郎 アレルギー性鼻炎と大気汚染, 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会,パシフィコ横浜,2003 5 12-14
- 19) 福田早苗, 白川太郎 プロハイオティクスを用いたアレルギー予防試験に関する取り組み—熊本県小国町研究一, 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会,パシフィコ横浜,2003 5 12-14
- 20) 白川太郎 新しい食の科学、フードバイオロジ— 機能性食品によるアレルギー予防をモデルに— (特別講演),第 49 回日本生理人類学会,九州大学百周年記念講堂,2003 5 16-17
- 21) 白川太郎 職業 環境によるアレルギー疾患の遺伝的背景 (特別講演),第 34 回日本職業 環境アレルギー学会,栃木県総合文化センター,2003 6 27-78
- 21) 白川太郎 遺伝要因と環境要因の相互作用 アレルギー疾患をモデルに (特別講演),第 10 回日本免疫毒性学会,相模原市民文化会館,2003 9 25-26
- 22) 柳原行義 アレルギーと感染— hygiene hypothesis を含めて— 第40回日本小児アレルギー学会, 2003
- 23) 柳原行義 新規TNFスーパーファミリー分子によるIgE産生の誘導機序 第53回日本アレルギー学会総会, 2003
- 24) 山本ひとみ, 梶原景一, 品澤美樹, 柳原行義 IL-4/IL-13 による気道平滑筋細胞 muscarinic M3Rの発現増強作用 第53回日本アレルギー学会総会, 2003
- 25) 山本ひとみ, 梶原景一, 品澤美樹, 柳原行義 気道平滑筋細胞における各種メディエーター受容体の発現に対するpoly I Cの作用 第53回日本アレルギー学会総会, 2003
- 26) 梶原景一, 品澤美樹, 森嶋大貴, 山本ひとみ, 生澤公一, 谷口正美, 秋山一男, 柳原行義 B lymphocyte stimulator (BLyS)とIgEクラススイッチ (1) 樹状細胞におけるBLyS発現とその機能解析 第53回日本アレルギー学会総会, 2003

- 27) 梶原景一、品澤美樹、森嶋大貴、山本ひとみ、生澤公一、柳原行義 B lymphocyte stimulator (BLyS)とIgEクラススイッチ (2) 可溶性BLySを用いた検討 第53回日本アレルギー学会総会, 2003
- 28) 森嶋大貴、梶原景一、品澤美樹、山本ひとみ、釣木澤尚美、谷口正美、秋山一男、柳原行義 CpG ODNによるIgE産生の調節作用 (1) 末梢血単核細胞を用いた検討 第53回日本アレルギー学会総会, 2003
- 29) 品澤美樹、梶原景一、森嶋大貴、山本ひとみ、柳原行義 CpG ODNによるIgE産生の調節作用(2) B細胞を用いた検討 第53回日本アレルギー学会総会, 2003
- 30) 山本ひとみ、梶原景一、柳原行義 気道平滑筋細胞における各種メディエーターレセプターの発現に対するIL-4/IL-13 とpoly I Cの影響 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 2003
- 31) 梶原景一、山本ひとみ、生澤公一、柳原行義 新規TNF様リガンドであるBLySとAPRILによるIgEクラススイッチの誘導 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 2003
- 32) 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)
- 32) 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, 篠田神司, 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, 船戸道徳, 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)
- 34) 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)
- 35) 藤田きみえ、藤田麻里、中野直子、長坂行雄、比嘉慎二、渡邊大、田中敏郎、宮武明彦 プデソニド タービュヘイラー(BUD)の吸入コンプライアンスの検討 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会 2003, 5, 横浜
- 36) 加藤元一、平田一人、東田有智、井上義一、岩崎吉伸、紙森隆雄、田中敏郎、寺川和彦、西村善博、藤田悦夫、前田恵治、南方良章、関庚火華、吉川雅則、五十嵐敏 近畿喘息 閉塞性肺疾患研究グループ 成人喘息の長期管理薬物療法の検討 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会 2003, 5, 横浜
- 37) 石井優、筒井広美、東直人、大河原知治、酒谷邦康、田中敏郎、佐伯行彦、片田圭宣 特発性門脈圧亢進症(IPH)をきたした強皮症の一例 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会 2003, 5, 横浜
- 38) 渡邊大、江副幸子、藤本穰、立花功、松村到、田中敏郎、金倉譲、川瀬一郎、岸本忠三、仲哲治 血球系腫瘍細胞におけるSOCS-1のsilencing 第100回日本内科学会総会 2003
- 39) Tanaka T, S Higa, T Hirano, and I Kawase Role of interleukin-18 in the development of dermatitis in atopic dermatitis-model mice NC/Nga. World Allergy Organization Congress-XVIII ICACI Vancouver, Canada Sep 2003
- 40) Hirano T, S Higa, Y Katada, A Miyatake, I Kawase, and T Tanaka Association between IL-18 gene polymorphism 105A/C and asthma World Allergy Organization Congress-XVIII ICACI Vancouver, Canada Sep 2003
- 41) Higa S, T Hirano, I Kawase, and T Tanaka Flavonoids as potential anti-allergic substances World Allergy Organization Congress-XVIII ICACI Vancouver, Canada Sep 2003
- 42) Takai M, H Sudo, T Tanaka, M Kotani, A Fujita, A Takeuchi, T Makino, K. Sumikawa, and M Nakashima. LDL-cholesterol-lowering effects of a mixed green vegetable and fruit beverage containing broccoli and cabbage in hypercholesterolemic subjects XIII International Symposium on Atherosclerosis Kyoto, Sep 2003
- 43) Sudo H, A. Takeuchi, T Makino, and T Tanaka Serum cholesterol-lowering effects of broccoli and cabbage mixture in rats XIII International Symposium on Atherosclerosis Kyoto, Sep 2003
- 44) 藤田きみえ、藤田麻里、渡邊大、田中敏郎、比嘉慎二、中野直子、長坂行雄、宮武明彦 Budesonide turbuhalerの安全性について 第53回日本アレルギー学会総会 2003, 10, 岐阜
- G 知的所有権の出願 取得状況**
- 1 特許取得
- 1 名称 プロテアーゼ阻害剤
国際予備審査請求中
国際出願番号 PCT/JP03/09998
- 2 毛包幹細胞の培養によるアトピー性皮膚炎の診断

3 遺伝子(TLR3,T-bet)とアレルギー性喘息の関連
(出願中)

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

アレルギー疾患の遺伝的要因と環境要因の相互作用に関する研究
—ダニアレルゲンに対する生体防御機構に関する検討—

分担研究者 出原賢治 佐賀大学医学部分子生命科学講座教授

研究協力者 有馬和彦、金地佐千子、増本清成、金地泰典
（佐賀大学医学部分子生命科学講座助手）
高井敏朗（順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター助手）

研究要旨 ダニアレルゲンは気管支喘息などアレルギー疾患発症に関わる重要な環境要因である。ダニアレルゲンが生体内へ侵入すると Th2 型免疫反応を引き起こし、IL-4、IL-5、IL-13 などの Th2 型サイトカインを産生する。IL-4 あるいは IL-13 がダニアレルゲンに対してどのような生体側の反応を引き起こすのかについては不明な点が多い。我々は以前、気道上皮細胞を IL-4 あるいは IL-13 で刺激した際に誘導される遺伝子を DNA マイクロアレイ法にて同定したが、今回その中に含まれる扁平上皮細胞癌抗原（SCCA）1 と SCCA2 という二つの分子の機能解析を行った。SCCA1 と SCCA2 のリコンビナントタンパク質を発現、精製し、ヤケヒョウヒダニグループ 1 アレルゲン（Der p 1）の持つシステインプロテアーゼ活性に対する阻害効果を解析したところ、SCCA2 は低濃度で Der p 1 のシステインプロテアーゼ活性を阻害したが、SCCA1 には阻害活性は見られなかった。さらに、複数の変異型 SCCA 分子を作製し、それらの阻害効果を解析した結果、353、356、357 番目のアミノ酸をグリシン、プロリン、トレオニンに置換した 3 アミノ酸変異型の SCCA は野生型の SCCA2 より強力な阻害効果を示した。このことは、プロテアーゼインヒビターである SCCA 分子を介した IL-4 あるいは IL-13 のダニアレルゲンに対する新規の生体防御機構が存在することを示唆していた。また、SCCA 分子の構造解析を行うことが、新規の抗ダニアレルギー疾患治療薬の開発につながることを示唆していた。

A. 目的

ダニアレルゲンは気管支喘息などアレルギー疾患発症に関わる重要な環境要因であり、近年のアレルギー疾患増加の理由の一つとして、住宅環境の変化によるダニアレルゲンへの曝露の増加が考えられている。現在のダニアレルゲンによるアレルギー疾患に対する対策は、ダニアレルゲンへの曝露の減少が主であり、他にダニアレルゲン投与による免疫寛容の誘導があげられる。ダニアレルゲンの生体内への侵入、あるいは侵入したダニアレルゲンの作用を直接阻害する有効な治療法の開発は今後の大きな課題となっている。ダニアレルゲンの生体内への侵入により Th2 型免疫反応が引き起こされ、Th2 型サイトカインである IL-4、IL-5、IL-13 などが産生される。IL-4 あるいは IL-13 は B 細胞に作用して IgE 産生を引き起こし、アレルギー疾患の病態形成に関与している。しかし、それ以外の作用、特に上皮細胞などの非免疫系細胞への作用については不明な点が多い。我々は以前、気道上皮細胞を IL-4 あるいは IL-13 で刺激した際に誘導される遺伝子を DNA マイクロアレイ法にて同定した。今回、誘導遺伝子の内、扁平上皮細胞癌抗原（SCCA）1 と SCCA2 という二つの分子に注目してそれらの機能解析を行った。

B. 方法

ヤケヒョウヒダニグループ 1 アレルゲン（Der p 1）、SCCA1、SCCA2 のリコンビナントタンパク質を発現、精製し、Der p 1 の持つシステインプロテアーゼ活性に対する阻害効果を解析した。基質としては、合成ペプチドと Jurkat 細胞表面上の CD25 を用いた。さらに、変異型 SCCA 分子を作製し、阻害活性に必要なアミノ酸の同定を試みた。

C. 結果

SCCA2 は低濃度で Der p 1 のシステインプロテアーゼ活性を基質として阻害したが、SCCA1 にはそのような作用は見られなかった。さらに、複数の変異型 SCCA 分子を作製し、それらの阻害効果を解析した結果、353 番目のグルタミン酸をクリシンに、356 番目のセリンをプロリンに、357 番目のプロリンをトレオニンに置換した 3 アミノ酸変異型の SCCA は野生型の SCCA2 より強力な阻害効果を示した。

D. 考察

本研究は、Th2 型サイトカインである IL-4 あるいは IL-13 が気道上皮細胞を刺激して SCCA 分子の産生を誘導し、産生された SCCA 分子がダニアレルゲンの生物活性に対し

て阻害することを示したものである。これは IL-4 あるいは IL-13 の外来性アレルゲンに対する新規の生体防御機構が存在することを示唆していた。また、本研究は、変異型 SCCA が野生型 SCCA2 より Der p 1 に対する強力な阻害効果を持つことも示しており、これらの SCCA 分子の構造解析が、新規の抗ダニアレルギー疾患治療薬の開発につながることを示唆していた。今後、さらに (1) ダニアレルゲンの生体内への侵入機序、(2) ダニアレルゲンの生体におけるアレルギー反応発症機序、(3) SCCA を含めた生体のダニアレルゲンに対する防御機構を明らかにする必要があると考えられた。そして、これらの機序に関与している遺伝子における SNP 解析が必要であると考えられた。

E. 結論

Th2 型サイトカインである IL-4 あるいは IL-13 は気道上皮細胞を刺激して SCCA 分子の産生を誘導し、産生された SCCA 分子がダニアレルゲンの生物活性に対して阻害するという新規の生体防御機構が存在することを示した。また、野生型 SCCA2 よりダニアレルゲンに対して強力な阻害効果を持つ変異型 SCCA 分子を作製し、新規の抗ダニアレルギー疾患治療薬の開発につながることを示した。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1) Izuhara K.
The Role of interleukin-4 and interleukin-13 in the non-immunologic aspects of asthma pathogenesis.
Clin Chem Lab Med · 2003 · 41 · 860-864
- 2) Yasunaga S, Yuyama N, Anma 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 $\alpha 2$ chain in bronchial epithelial cells
Cytokine 2003 24 293-303
- 3) Masumoto K, Sakata Y, Anma K, Nakao I, Izuhara K
Inhibitory mechanism of a cross-class serpin, the squamous cell carcinoma antigen 1
J Biol Chem · 2003 278 · 45296-45304
- 4) Wongpiyabovorn J, Suto H, Ushio H, Izuhara K, Mitsuishi K, Ikeda S, Nakao A, Okumura K, Ogawa H
Up-regulation of interleukin-13 receptor $\alpha 1$ on human keratinocytes in the skin of psoriasis and atopic dermatitis
J Dermatol Sci 2003 · 33 31-40
- 5) Yokoi F, Hiraishi H, Izuhara K.
Molecular cloning of a cDNA for the human phospholysine

phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase
J Biochem 2003 133 607-614

- 6) Sakata Y, Anma K, Takai T, Sakurai W, Masumoto K, Yuyama N, Summami Y, Kishi F, Yamashita T, Kato T, Ogawa H, Fujimoto K, Matsuo Y, Sugita Y, Izuhara K.
The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p 1
J Biol Chem 2004 279 · 5081-5087
- 7) Izuhara K, Anma K.
Signal transduction of IL-13 and its role in the pathogenesis of bronchial asthma.
Drug News & Perspectives in press.
- 8) Izuhara K, Anma K, Masumoto K, Kanaji S, Kanaji T
IL-4 and IL-13 Their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies-Update
Medical Chemistry Reviews—online in press.
- 9) 出原賢治
インターロイキン4、インターロイキン4レセプター、インターロイキン13
分子生物学 免疫学キーワード辞典第2版、永田和宏、宮坂昌之、宮坂信之、山本一彦編集、医学書院、2003、p105-107, p112-113
- 10) 出原賢治、有馬和彦
IL-13 サイトカイン・ケモカインのすべて—基礎から最新情報まで—
笠倉新平、松島綱治編集、日本医学館、印刷中
- 11) 出原賢治
アレルギー疾患の病因とその診断。
臨床化学・2003 32(1) 15-17
- 12) 有馬和彦、出原賢治
ヒト IL-4 受容体と気管支喘息。
International Review of Asthma
2003・5(3) 72-79
- 13) 出原賢治
サイトカインを標的とした治療法
医学のあゆみ 2003 207(8) 570-573
- 14) 有馬和彦、坂田資尚、出原賢治
プロテアーゼインヒビターによるアレルギー治療戦略
アレルギー科 2003 16(4) 351-356
- 15) 出原賢治
われらが Molecular Research
分子呼吸器病 2003 7(4) 373-374
- 16) 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 2003 23(1) 23-28

17) 出原賢治

IL-13 研究の新展開

最新医学 2003・58(2) 240-244

18) 出原賢治

分子標的治療の現状と将来

Asthma Frontier 2003・2003 2(1) 47-53

19) 有馬和彦、出原賢治

IgE 産生と遺伝因子

喘息・2004 17(1) 27-32

20) 坂田資尚、有馬和彦、高井敏朗、櫻井済、増本清成、松

尾洋、出原賢治

IL-4/IL-13 が誘導するタンパク質分解酵素阻害物質による主要ダニ抗原 *Der p1* の阻害。

呼吸 2004 23(2) S26-S28

2 学会発表

1) Yuyama N, Yasunaga S, Anma K, Tanaka H, Toda S, Maeda M, Matsui K, Goda C, Yang Q, Sugita Y, Nagai H, Izuhara K.

The Negative-Feedback System of the IL-13 Signal by IL-13 Receptor $\alpha 2$ Chain in Bronchial Epithelial Cells

2003KEYSTONESYMPOSIA, 2003 4.3,

KEYSTONE(USA)

2) 有馬和彦、坂田資尚、増本清成、出原賢治、高井敏朗

プロテアーゼ/プロテアーゼインヒビター相互作用を基盤としたアレルギー疾患治療戦略

第 15 回日本アレルギー学会春季期臨床大会, 2003.5.14,

(シンポジウム)

3) 出原賢治

リンパ球機能に対する遺伝要因と環境要因の影響。

第 43 回日本リンパ網内系学会総会, 2003 6.5, (シンポジウム)

4) 本庄栄二郎、重松秀樹、黒沢敬子、黒木良太、有馬和彦、

出原賢治

野生型及び R110Q 変異体ヒトインターロイキン-13 の大腸菌での発現調製及びその性質

日本農芸化学会 2003 年度大会 2003 4.2

5) Sakata Yasuhisa, Anma Kazuhiko, Masumoto Kiyonari, Taka Toshuro, Sakurai Wataru, Yuyama Noriko, Matuo Yo, Izuhara Kenji

Squamous cell carcinoma antigen(SCCA)2, a member of the ovalbumin-serpin family, inhibits the enzymatic activity of the house dust mite allergen, *Der p1*

第 76 回日本生化学会大会, 2003 10 18 (口頭発表、ポスター)

6) Kiyonari Masumoto, Yasuhisa Sakata, Kazuhiko Anma, Yoshinori Suminami, Fumio Kishi, Kenji Izuhara.

Inhibitory mechanism of a cross-class serpin, squamous cell carcinoma antigen 1

第 76 回日本生化学会大会, 2003 10 18 (ポスター)

7) 出原賢治

Th2 型サイトカインを標的としたアレルギー疾患に対する分子標的治療の現状と展望。

第 53 回日本アレルギー学会総会, 2003 10 24 (教育セミナー)

8) 有馬和彦、出原賢治

創薬応用をめざした IL-13/IL-13 受容体相互作用の解析。

第 53 回日本アレルギー学会総会, 2003 10.25 (シンポジウム)

9) 加藤武、高井敏朗、坂田資尚、安枝浩、出原賢治、奥村康、小川秀興

組換えダニ主要アレルゲン *Der p1*, *Der f1* のプロテアーゼ活性の解析

第 53 回日本アレルギー学会総会, 2003 10.23 (口頭発表)

10) 出原賢治

アレルギー疾患の遺伝要因同定に関する研究。

第 50 回日本臨床検査医学会総会, 2003 10.30 (臨床検査医学会学会賞 (学術賞) 受賞講演)

11) 有馬和彦、出原賢治、白川太郎、山下哲次、寺田透、松尾洋

IL-13 遺伝子上に存在する一塩基多型の気管支喘息における診断的意義とその機能ならびに構造解析

第 50 回日本臨床検査医学会総会, 2003 10.30 (ポスター)

12) 出原賢治、坂田資尚、有馬和彦、西奈津子、濱崎雄平、

湯山則子、杉田雄二、南雲文夫、山下哲次

新しい気管支喘息の病態マーカーとしての SCCA(扁平上皮細胞癌抗原)の意義。

第 50 回日本臨床検査医学会総会, 2003 10.29 (ポスター)

13) 坂田資尚、有馬和彦、高井敏朗、増本清成、出原賢治

IL-4/IL-13 による主要ダニ抗原 *Der p1* に対する防御機構

第 33 回日本免疫学会総会 学術集会, 2003 12 8-10 (口頭発表)

G. 知的所有権の出願・取得状況

1 特許取得

名称 プロテアーゼ阻害剤

国際予備審査請求中

国際出願番号 PCT/JP03/09998

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

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
—全ゲノム SNP 解析によるアレルギー疾患関連遺伝子解析 (II) —

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 アレルギー疾患は多因子疾患であり、その遺伝子解析には多数のサンプルが必要であると同時に、妥当性を検討する必要がある。そのためには、異なる集団、異なる人種での検討が必要であるとされている。本研究では、この点を考慮し、理化学研究所での 1 次スクリーニングで得られた 37 個の候補 SNP に対して、再度異なる対照集団で、さらに数を増やして検討を行なった。その結果 17 個の SNP が最終候補として同定され、一部は結果が異なるものの、大部分は結果が一致した。以上の結果から、ここに得られた 17 個の SNP は日本人における最終的な喘息の候補 SNP であると考えられる。

A. 目的

アレルギー疾患は多遺伝子疾患であり、その原因遺伝子探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前年度では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い、37 個 SNP が抽出された。しかし、この際の正常対照は人数的に少なく、抽出の 1 次スクリーニングは、他の疾患のケースを用いているためバイアスがかかっている可能性がある。そこで今回は正常対照をきちんと集めこれを用いて再度 37 個の SNP について検討を行い、結果を解析することにした。

B. 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 760 例、小児喘息 378 例、成人喘息 487 例を用いた。これらのサンプルについては理研の倫理委員会ですでに承認されている。

C. 結果

2 次スクリーニングを行なった結果 37 個の SNP が非常に強い関連を示した ($p < 0.0001$)。そこでさらに小児喘息、成人喘息のサンプル数を 400 例まで上げて 2 次スクリー

ニングを行なうと同時に、正常対照者を一般集団から

700 以上集めて 1 回目のスクリーニングで得られた 37 個の SNP について再度検討を行った。その結果、これらのうちの 17 個は 1 回目のスクリーニングより p 値が減少し、さらに強い相関を示すことが判明した。残り 20 個については同じ程度の相関か、やや弱い相関しか得られなかった。

D. 考察

前回の結果から約 40 個程度の SNP が喘息の最終候補遺伝子変異として抽出され、さらに今回別の完全正常集団を用いた検討で、17 個が抽出された。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。また、正常対照をどのようにとるかで結果が異なることは予測されていたが、今回の結果は、それをはっきりと示す結果となった。

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探索は極めて有用な解析法であるが、正常対照のとり方で予想されたように結果が異なることが示された。ただし、半数の SNP では強い相関が認められており、非常に有力な最終の候補と考えられる。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1 Tanaka K, Roberts MH, Yamamoto N, Sugiyama H, Uehara M, Mao X-Q, Shurakawa T, Hopkin JM. Heterogeneity of atopic eczema, a genetic variant of RANTES and high IgE level *Chn. Exp. Allergy* (in press)

- 2 Hasegawa K, Hirota T, Obara K, Akahoshi M, Cheng L, Takahashi Shimizu M, Sekiguchi H, Kokubo M, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Mao X-Q, Tamari M, Shirakawa T Association between genetic variation in the gene for ADAM33 and clinical severity of childhood asthma in the Japanese population *Hum Genet* (in press)
- 3 Nakajima T, Ikura M, Okayama I, Matsumoto K, Uchiyama C, Shirakawa T, Yang X, Adra CN, Hirai K, Saito H Identification of granulocyte subtype-selective receptors and channels by high-density oligonucleotide probe array *J Allergy Clin Immunol* 2004,113(3) 528-535
- 4 Fukuda S, Ishikawa H, Koga Y, Yaiba Y, Nakashima K, Cheng L, Shirakawa T Allergy and serum antibodies against bacterial species of predominant commensal intestinal microflora in schoolchildren *J Adolesc. Health.* 2004,34 未定
- 5 Peisong G, Mao X-Q, Enomoto T, Feng Z, Gloria-Bottini F, Bottini E, Shirakawa T, Sm D, Hopkin JM An asthma-associated genetic variant of STAT6 predicts low burden of ascaris worm infestation *Genes Immunity* 2004,5 58-62
- 6 Shimada T, Cheng L, Ide M, Fukuda S, Enomoto T, Shirakawa T Effect of lysed enterococcus faecalis FK-23 (LFK) on allergen-induced peritoneal accumulation of eosinophils in mice *Clin Exp Allergy.* 2003,33 684-7
- 7 Bottini N, Mao XQ, Borgiani P, Saccucci P, Stefanini L, Greco E, Fontana L, Hopkin JM, Shirakawa T Genetic control of serum IgE level, a study of low molecular weight protein tyrosine phosphatase *Clin Genet* 2003,63 228-231
- 8 Ouchi K, Suzuki Y, Shirakawa T, Kishi F Polymorphism of SLC11A1(formerly NRAMP1) gene confers susceptibility to Kawasaki disease *J Infect Dis* 2003,187 326-9
- 9 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 2003, 58(2) 88-92
- 10 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 2003, 58(2) 82-87
- 11 中島加珠子, 井手亜里, 白川太郎 微量元素の動態から見たアレルギー 最新医学 2003, 58(2) 77-81
- 12 赤星光輝, 玉利真由美, 白川太郎 アレルギー疾患における最近の話題 -オーバービュー- 最新医学 2003, 58(2) 7-14
- 13 程雷, 笹原祐介, 三好彰, 白川太郎 アレルギーはなぜ増えているのか 日本小児難治喘息アレルギー疾患学会誌 2003, 1(1) 7-14
- 14 赤星光輝, 玉利真由美, 清水麻貴子, 高橋尚美, 広田朝光, 小原和彦, 福田早苗, 中島加珠子, 笹原祐介, 程雷, 白川太郎 アレルギー疾患でのポストゲノム(テーラーメイド医療) アレルギーの臨床 2003, 23(1) 82-86
- 2 学会発表
- 1 福田早苗, 白川太郎, 石川裕樹, 相場勇志, 古賀泰裕 アレルギー疾患と腸内細菌透過性に関する研究, 第 13 回日本疫学会, 福岡, 2003 1
- 2 白川太郎 アレルギーの予防を考える(学術講演), 第 26 回日本医学会総会, 福岡 シークホテル, 2003 4 4-6
- 3 玉利真由美, 白川太郎 気管支喘息関連遺伝子への患者一対象研究を中心に (シンポジウム), 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会, パシフィコ横浜, 2003 5 12-14
- 4 井手昌洋, 嶋田貴志, 榎本雅夫, 白川太郎, 安枝 浩 スギ花粉抗原の 1 型アレルギーモデルに対する乳酸菌 F K-23 菌抽出物 (L F K) の効果, 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会, パシフィコ横浜, 2003 5 12-14
- 5 三邊武幸, 三好 彰, 程 雷, 殷 敏, 時 海波, 白川太郎 アレルギー性鼻炎と大気汚染, 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会, パシフィコ横浜, 2003 5 12-14
- 6 福田早苗, 白川太郎 プロバイオティクスを用いたアレルギー予防試験に関する取り組み-熊本県小国町研究-, 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会, パシフィコ横浜, 2003 5 12-14
- 7 白川太郎 新しい食の科学、フードバイオロジー -機能性食品によるアレルギー予防をモデルに- (特別講演), 第 49 回日本生理人類学会, 九州大学百周年記念講堂, 2003 5 16-17
- 8 白川太郎 職業 環境によるアレルギー疾患の遺伝的背景 (特別講演), 第 34 回日本職業・環境アレルギー学会, 栃木県総合文化センター, 2003 6 27-78
- 9 白川太郎 遺伝要因と環境要因の相互作用 アレルギー疾患をモデルに (特別講演), 第 10 回日本免疫毒性学会, 相模原市民文化会館, 2003 9 25-26

G. 知的所有権の出願・取得状況

1 特許取得

- 1) 毛包幹細胞の培養によるアトピー性皮膚炎の診断
- 2) 遺伝子(TLR3, T-bet)とアレルギー性喘息の関連
(出願中)

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

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
—樹状細胞による IgE 産生の誘導—

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

研究協力者 梶原景一、品澤美樹、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)

研究要旨 アレルギー疾患の発症や増悪には病原微生物の感染が環境要因として関与している。本研究では、ウイルス感染と IgE 産生との関係を明らかにするために、ウイルス由来の dsRNA を認識する TLR3 の活性化が樹状細胞における BLyS の発現調節に関与しているか否かについて検討すると共に、BLyS 依存性の IgE クラススイッチの誘導活性についても検討した。dsRNA アナログの poly I : C を用いて樹状細胞を刺激すると、IFN- α や IFN- γ のオートクリン産生を介して BLyS の発現は著しく増強された。また、poly I : C 刺激した樹状細胞を IL-4 存在下で B 細胞と共培養すると、germline C ϵ 、AID および mature C ϵ のいずれの転写物の発現も誘導されたが、培養上清中には IgE はほとんど検出されなかった。同様な結果は可溶性 BLyS と IL-4 で刺激した B 細胞を用いた場合にも得られた。しかし、さらに抗 IgM 抗体を共存させると、細胞増殖の増強を伴って IgE 産生細胞への分化が誘導された。一方、BLyS の発現増強に関わる TLR3 には Leu412Phe 多型が同定されたが、この多型とアレルギー疾患との関連は認められなかった。以上の結果から、TLR3 を介して活性化された樹状細胞は BLyS の発現を増強することによって T 細胞非依存性抗原に対する IgE 産生の誘導に関与していると考えられた。

A. 目的

アレルギー疾患の発症や増悪には外来微生物の感染が環境要因として関与している。多様な病原微生物成分のパターン認識には Toll 様受容体 (TLR) ファミリーが重要な役割を果たしており、例えば TLR3 はウイルス由来の dsRNA を認識する。また、樹状細胞は自然免疫に加えて、T 細胞への抗原提示を介して適応免疫の誘導にも関与している。さらに、樹状細胞は TNF スーパーファミリーの新規メンバーである B lymphocyte stimulator (BLyS) を発現するので、BLyS 受容体を恒常発現している B 細胞とも接触する。最近、BLyS は T 細胞が発現する CD40 リガンド (CD40L) とは異なった様式で免疫グロブリンのクラススイッチを誘導することが明らかにされている。

本研究では、ウイルス感染と IgE 産生との関係を明らかにするために、dsRNA アナログの poly I : C で刺激した樹状細胞を用いて BLyS の発現を解析すると共に、BLyS 依存性の activation-induced cytidine deaminase (AID) 発現、IgE クラススイッチおよび IgE 産生の誘導活性についても検討した。

B. 方法

インフォームドコンセントが得られた健常者とア

レルギー患者の末梢血単核細胞から単球と B 細胞を分離した。さらに、単球を IL-4 と GM-CSF で刺激してミエロイド系の樹状細胞を誘導した。TLR ファミリー、BLyS および AID の mRNA 発現は real-time PCR により、BLyS のタンパク発現や膜型の IgE 発現は FACS により、germline C ϵ と mature C ϵ の mRNA 発現は RT-PCR や competitive PCR により、また TLR3 構造遺伝子の多型は TaqMan PCR によりそれぞれ解析した。また、細胞増殖は ^3H -TdR uptake、各種サイトカインは ELISA、IgE は RIA で測定した。尚、TLR3 遺伝子の多型解析は当院の倫理委員会の承認を得て行った。

C. 結果

樹状細胞を dsRNA アナログの poly I : C で刺激すると、BLyS の発現は著しく増強されたが、ssRNA アナログの poly C には増強活性は認められなかった。また、poly I : C による BLyS の発現増強は IFN- α 、IFN- γ あるいは IL-12 に対する中和抗体によって抑制された。実際、IFN- α や IFN- γ で樹状細胞を刺激すると、BLyS の発現は増強された。

また、poly I : C で刺激した樹状細胞を固定化した

後、IL-4存在下でB細胞と共培養すると、BLyS依存的にAIDとmature Ceの両mRNAの発現が誘導されたが、培養上清中にはIgEはほとんど検出されなかった。同様な結果は可溶性BLySとIL-4で刺激したB細胞を用いても得られた。しかし、抗IgM抗体を共存させると、B細胞の増殖はさらに増強されると共に、膜型IgEの発現とIgE産生細胞への分化も誘導された。これに対して、可溶性CD40LとIL-4の刺激では抗IgM抗体を必要としないでB細胞の増殖、膜型IgEの発現およびIgE産生細胞への分化のいずれの反応も誘導された。

一方、BLySの発現増強に関わるTLR3にアミノ酸置換を生じる遺伝的多型部位が存在するか否かについて解析したところ、Leu412Phe多型が同定できた。しかし、この多型の出現頻度は約5%であり、またアレルギー疾患との関連は認められなかった。

D. 考察

本研究では、ウイルス感染とIgE産生との関係を明らかにするために、poly I : Cで刺激したミエロイド系樹状細胞を用いてBLySの発現を解析すると共に、BLyS依存性のIgEクラススイッチの誘導活性についても検討した。樹状細胞のTLR3をpoly I : Cで活性化すると、IFN- α やIFN- γ のオートクリン産生を介してBLySの発現が増強されることが明らかとなった。また、BLySはIL-4存在下ではB細胞にAIDの発現を介してIgEクラススイッチとmature Ce転写を誘導するが、CD40Lとは異なり、IgE産生細胞への増殖分化にはさらに抗原受容体の架橋を必要とした。したがって、自然免疫を介して樹状細胞に発現されるBLySは、適応免疫を介してTh2細胞に発現されるCD40Lとは異なり、T細胞非依存性抗原に対するIgE産生の誘導に関与していると考えられた。

一方、TLR3にはLeu412Phe多型が同定されたが、この多型とアレルギー疾患との関連は認められなかった。プロモーター領域とイントロンにおける多型については、現在解析中である。

E. 結論

ウイルス由来のdsRNAはミエロイド系樹状細胞にBLySの発現を増強するので、樹状細胞はBLySの発現を介してT細胞非依存性抗原に対するIgE産生の誘導に関与していると考えられた。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1) Yanagihara, Y. Regulatory mechanisms of human IgE synthesis Allergol Int, 52, 1-12, 2003
- 2) Yamamoto, H, Yanagihara, Y. Genetic variants of chemical mediator receptors in relation to asthma Int Rev Asthma, 5, 60-66, 2003
- 3) Fujii-Maeda, S, Kajiwara, K, Ikizawa, K, Shinazawa, M, Yu, B, Koga, T, Furue, M, Yanagihara, Y. Reciprocal regulation of thymus and activation-regulated chemokine/macrophage-derived chemokine production by interleukin (IL)-4/IL-13 and interferon- γ in HaCaT keratinocytes is mediated by alternations in E-cadherin distribution J Invest Dermatol, 122, 20-28, 2004
- 4) Kajiwara, K, Shinazawa, M, Morishima, H, Yanagihara, Y. Differential effect of IL-4 and IL-13 on the expression of recombination-activating genes in mature B cells from human peripheral blood Cell Immunol, in press
- 5) 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, 39, 623-628, 2003
- 6) 柳原行義 IgE産生の分子機構 アレルギーリウマチ 膠原病, 19, 109-116, 2003
- 7) 山本ひとみ, 柳原行義 喘息とリンパ球 THE LUNG perspectives, 11, 460-463, 2003
- 8) 柳原行義 IgE産生とアレルギー性炎症 喘息, 17, 2-6, 2004
- 9) 梶原景一, 柳原行義 IgE産生のメカニズム 喘息, 17, 21-25, 2004
- 10) 柳原行義 IgE抗体産生の調節 総合アレルギー学, pp 81-87, 2004
- 11) 柳原行義 アレルギーと感染 - hygiene hypothesisを含めて 小児アレルギー学会誌, 18, 14-18, 2004
- 12) 梶原景一, 羅 智靖, 柳原行義 可溶性Fc ϵ R1 α と抗IgE抗体のIgE産生抑制機序 臨床免疫, 41, 219-222, 2004
- 13) 梶原景一, 森嶋大貴, 柳原行義 BLySと免疫グロブリンのクラススイッチ 臨床免疫 印刷中
- 14) 柳原行義 IgE産生の調節機構 分子呼吸器病 印刷中
- 15) 柳原行義 IgE産生の分子調節機構 日本内科学雑誌 印刷中