

20030667

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

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

平成 15 年度 総括研究報告書

主任研究者 大田 健

平成 16 (2004) 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 大田 健	1
---	---

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 —気道リモデリングに関連する因子の解析— 大田 健（帝京大学医学部内科教授）	5
2、気道上皮の傷害と修復に関わる遺伝子の多型検索 小林 信之（国立国際医療センター呼吸器科医長）	8
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 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）	11
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 棟方 充（福島県立医科大学呼吸器科教授）	15
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 塩原 哲夫（杏林大学医学部皮膚科教授）	17
6、リモデリングの臨床的評価に関する研究 庄司 俊輔（国立療養所南福岡病院副院長）	20
7、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 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）	23

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

主任研究者 大田 健 (帝京大学医学部内科教授)

アレルギー疾患の発症および悪化に影響する因子を解析する目的で、アトピー型喘息、非アトピー型喘息、アトピー性皮膚炎を対象に候補遺伝子の遺伝子多型の解析を行った。アレルギーの発症に重要な過程、すなわち、IgE依存性反応、炎症病態、リモデリングを規定している因子に分けて候補遺伝子を想定した。平成15年度はサンプルの収集を集中して行った。平成16年度にサンプルの解析を多施設で行い、ハプロタイプ解析し、影響する因子を明らかにしていく予定である。

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)、木原令夫(木原病院院長)、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)、足立哲也(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- α 、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」に依り、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2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300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・鎖、CTLA4(西村)、サイトカイン(IL-4、IL-13、IL-18)ケモカイン(Eotaxin, TARC, MDC, I-309)(平井)、クララ細胞分泌関連蛋白UGRP-1、-2-アトレナリン受容体(棟方)、TGF- β 、PDGF、IGF-I(大田)、MUC1, 2,

4, 5AC, 5B, 7(小林)、TLR4(太田)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した。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、再度匿名化した。個人情報 は匿名化した形で帝京大学で集積した。アトピー型喘息300例、非アトピー型喘息200例、アトピー性皮膚炎150例、健常人200例のDNAおよび血漿の収集を終了した。

1) Fc γ RI の -109C>T、CTLA4-318C>T、血清IgE値と相関することか明らかになった。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。MIFはTLR4の発現を増強させ自然免疫に関与するかそのSNPsについて解析した。-173G>CのSNPsはアトピーの有無と相関した。MIF-794CATTのリピートについても検討し、転写活性と相関することを見出した(西村)。

2) 気道リモデリングに関連する因子としてmannose binding lectin (MBL)のSNPsの解析の条件を整えた。現在まで、喘息患者でSNPsの頻度の高い傾向を認めている。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おり、血清レベルでの検討を進め

ている。さらにUGRP1の遺伝子解析では-112bpにG>Aの多型が存在した。
・2-アトレナリン受容体遺伝子についてハプロタイプ解析を行ったか、喘息群と健常人で群間に差認めなかった。(棟方)

- 3) 気道上皮細胞に関連する転写因子であるTTF-1, HNF-3A, HNF-3B, HFH-4, HFH-8, GATA6のプロモーター部位のSNP、を検出した。現在までGC-richで解析の進んでいない変異であり、新たな知見が得られると期待できる(小林)。
- 4) 増殖因子としてはIGF-Iのプロモーター領域の変異、IGF-IRのSNPsについて解析の条件を整えた。血漿中の蛋白レベルではIGF-Iが喘息患者で健常人より高値である傾向を認めており、変異との相関が期待できる。IGF-Iの活性の発現に関連するIGF-BP3についても検討し、血漿レベルについて高値であることを見出した。またIGF-BP3の-202A>GのSNPsについて検討を進めた(大田)。
- 5) ゲノムワイドに理研における解析によりIL-1Rの変異について喘息との相関が示唆された(王利、土居)。SNPsの解析については異なる母集団で再現性を見ることか非常に重要であり、平成16年度に研究班で集積されたサンプルで検討する(大田)。
- 6) Eotaxin、TARC、MDCのプロモーター領域にSNPsを同定した。これらは蛋白レベルがアトピー性皮膚炎や喘息疾患活動性に関連していることが報告されており、本研究班で採取したサンプルについても検討を進めている。SNPsは

TARC-431C>TもMDC 5C>Aも疾患群との有意差は低いものの、血清中ケモカイン蛋白との関連において、これらSNPsが重要な働きをしていることを証明した。すなわちTARCもMDCも変異により蛋白血中濃度が高く、かつ疾患関連性が高いことが示唆された(平井)。

- 7) 炎症に関連する因子として自然免疫に関連するTLRのSNPsについて解析の条件を整えた(太田)。機能的に影響を及ぼすことが報告されているTLR4の299Asp>GlyのSNPについては日本人の検体では全く変異を認めなかった(太田)。
- 8) アトピー性皮膚炎患者の細胞の機能を検討し、アポトーシスに陥りやすい条件や自然免疫が機能的に低下している可能性を見出した(塩原)。
- 9) 気道リモテリングに参与する線維芽細胞の遊走という機能についても解析を進めた(庄司)。機能的に樹状細胞について検討する条件を整えた(向山)。またFcεRI・鎖やTLRの遺伝子多型とマスト細胞の機能解析の条件を整えた(羅)。

D. 考察

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(リモテリング関連分子)についてSNPsを同定でき、機能と結びついていることか示唆された。特に血漿レベルと相関するマーカーを見出すことができ、来年度、多数のサンプルで検討することにより、EBMを確立するために寄与できると考えられる。さらにSNPsと機能との関連を詳細に明らかにするため、気道上皮細胞、線維芽細胞、マスト細胞、樹状細胞、

$\gamma\delta$ 細胞の機能解析を併行しておこなった。

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総合的に検証することは、アレルギー疾患に対する新たな治療戦略の開発に極めて重要であると考えられる。海外では気道リモデリングに関連し、喘息の発症を既定する遺伝子としてADAM33が報告されたが、日本人を対象としては有意な結果が出ていない。このようにSNPsの解析は人種によって全く異なる結果が得られるので、日本人での検討が必須である。国家のプロジェクトとして大規模にゲノムワイドな解析が行われているか、対象サンプルの違いでスクリーニングを重ねると候補遺伝子が消去されていく場合もあることが報告されている。平成16年度は集積されたサンプルについて一斉に多施設で検討し、臨床的背景とともに多変量解析を行う。

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 —気道リモデリングに関連する因子の解析—

主任研究者 大田 健 (帝京大学医学部内科教授)

アレルギー疾患の発症および悪化に影響する因子を解析する目的で、アトピー型喘息、非アトピー型喘息、アトピー性皮膚炎を対象に気道リモデリングを規定している因子について候補遺伝子を想定した。リモデリングへの関与が基礎的臨床的に想定されるGM-CSF、IGF-I、IGF-IR、IGF-BP3についてSNPsの同定を行った。IGF-BP3プロモーター領域についてはすでに癌に関連して、外国で報告されている。このSNPが日本人にも存在し、血漿IGF-BP3のレベルと相関することが明らかになった。アトピー性皮膚炎で有意差を持って頻度の高いGM-CSF3928C/TのSNPについては、今回のアトピー性皮膚炎患者と正常人では差異を認めなかった。

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)、山本寿子(帝京大学医学部内科研究生)、木原令夫(木原病院院長)、中島幹夫(帝京大学医学部内科助手)

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GM-CSF、PDGF、TGF- β 、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。

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。

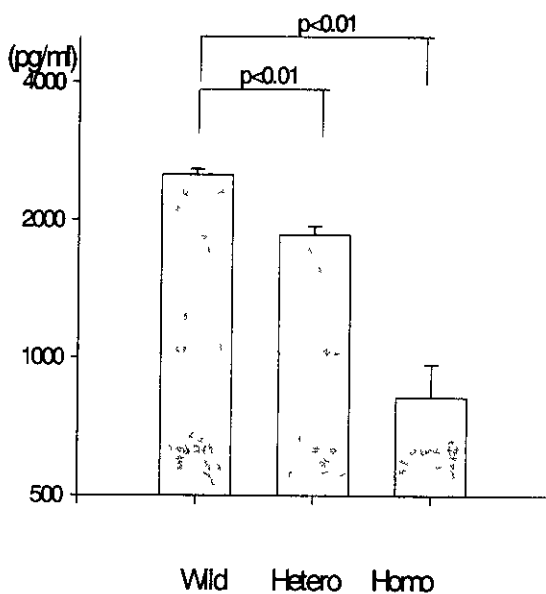
同時に各群の患者について発作歴を聴取する。背景として、総IgE、IgE RAST(吸入系 ハウスダスト、ダニ、ブタクサ、ネコ毛、ゴキブリ)、好酸球数、臨床経過(発作歴、治療歴)を検討する。GM-CSF、IGF-I、IGF-IR、IGF-BP3のSNPを検討するため、プライマーを設定し、ダイレクトシーケンス法にて検討した。血漿中のIGF-IおよびIGF-BP3の蛋白量はELISAで測定した。

C 結果および考察

気道のリモデリングに関与するIGF-Iおよびその受容体であるIGF-BP3の血漿レベルについてまず検討した。両者とも健常人と比較して、喘息群で有意な高値を認めた。IGF-BP3のSNP3については、癌患者でSNPと血症レベルの相関があることが報告されている。そこで、まず、IGF-BP3についてはSNPと血漿レベルが相関するとの報告がなされている。まず日本人でもこの変異が存在するかについて検討した。日本人ではプロモーター領域の-202のA/Cの変異を認めた。血漿レベルをELISAキットを用いて測定すると、homoの変異のグループの中

にIGF-BP3が血漿中に存在しないトナーが存在した。
全体として、SNPと血漿レベルを検討した結果を図1に示す。

図1 IGF-BP3の血漿レベルとSNPの関連

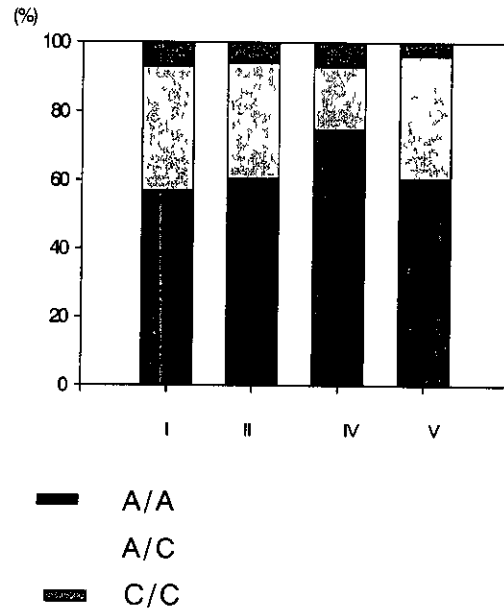


Wild typeのA/Aに対しCの変異が加わることにより、血漿レベルが有意差を持って低下することが示された。

次にこの-202A/CのSNPの疾患群ごとの変異頻度を検討した。アトピー型喘息(I)、非アトピー型喘息患者(II)、アトピー性皮膚炎患者(IV) 健常人(V)、でSNPの頻度を検討した。

図2に示すようにhomoの変異はアトピー型喘息患者およびアトピー性皮膚炎患者で多い傾向を示すが、有意差はなく症例数を増やして検討を続ける予定である。

図2 IGF-BP3-202A/C変異の頻度

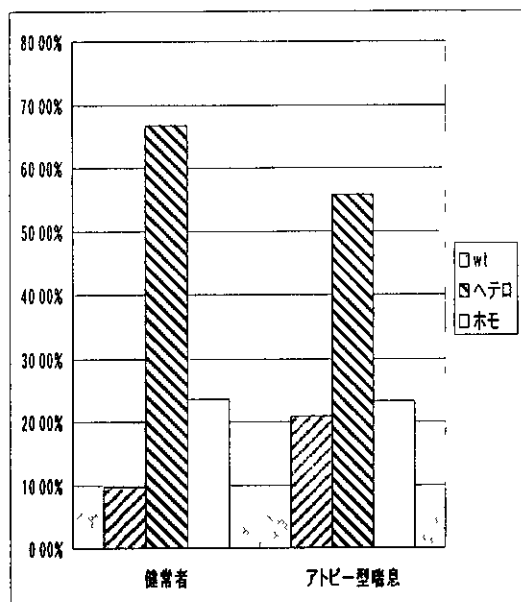


IGF-Iのプロモーター領域については、プライマーを設定し、ダイレクトシーケンスを行いSNPの存在を検討した。その結果-603T/Aの変異が存在することか明らかになった。変異の頻度は患者と健常人で差異がなかった。血漿IGF-Iレベルは健常人に対し患者群が有意差を持って高いが、この変異と血漿レベルとも相関を認めなかった。IGF-Iの血漿レベルとの相関は存在しなかった。またIGF-IRについても同様に検討を進めている。

GM-CSFのSNPsについては、海外の文献でアトピーとの関連が示唆されている3928T/CのSNPsについて検討した。アトピー群ではCアレルの頻度が高くなる。アトピー型喘息群では0.34に対し健常人では0.17であり有意な差(p=0.0063)をもつことが報告されている。このSNPはアミノ酸の変異を伴い、Ile117Thrとなる。しかし、日本

人では欧米とことなり、変異示す方の頻度が高かった。欧米の健常人ではTTが66.2% CCが0.6%でCアレルの頻度が0.17であるのに対し、日本人ではTTが9.8% CCが23.53%でCアレルの頻度が0.56とCアレルの頻度が高く、T/Cのヘテロ群の頻度が最も高かった。図3にアトピー型喘息と健常人で比較した結果を示す。Cアレルの頻度は両群で差異を認めなかった。つまり、アトピーとの関連は全く認めなかった。

図3 GM-CSF3928T/Cの頻度



D 考察

アレルギー病態形成の重要な修復過程(リモデリング関連分子)に関連する増殖因子についてSNPを検討した。増殖因子は数数の関与が想定されているが、今回特に我々が喘息のモデル動物を用いた検討で関与を証明している因子に焦点を絞って検討した。IGF-1RについてはGCrichでプライマーの設定が難しいか さらに検討を進めていく予定である。

E 業績

- 1-61 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
- 2 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
- 3 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
- 4 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

気道上皮の傷害と修復に関わる遺伝子の多型検索

分担研究者 小林信之（国立国際医療センター呼吸器科医長）
研究協力者 慶長直人（国立国際医療センター呼吸器疾患研究部部长）
工藤宏一郎（国立国際医療センター副院長）

研究要旨

気管支喘息においては、種々の外的刺激により気道粘膜が傷害を受ける。気管支上皮の修復が不十分であると、気管支壁の線維化に伴う不可逆的な気流制限、すなわち気道リモデリングが生じる。このような機序は、喘息の重症化 難治化の一因として注目される。剥離した上皮を埋めるように、未分化な上皮細胞が増殖 分化し気道粘膜が修復される際には、上皮分化増殖因子の刺激に反応して、本来胎生期に働く組織特異的転写因子が再発現すると考えられる。本研究では、気道上皮傷害の修復過程に関わると予想される、気道粘膜に関連した転写因子の遺伝子多型性について系統的な検討を行った。これらの転写因子の遺伝子変異は、塩基配列が GC-rich のために解析が難しく、従来の遺伝子変異探索プロジェクトでは十分に同定されていなかった。今回の検討により、エクソン領域だけでも 10 個以上の新規多型が同定され、その中にはプロモーター多型や非同義置換など、転写因子の機能に直接影響を及ぼす可能性のある変異が複数認められた。今後、これらの遺伝子変異の機能的解析、気管支喘息の重症度との関連について検討する予定である。

A 研究目的

動物モデルによる知見から、胎生期の気管支・肺の上皮細胞は、分化増殖因子による刺激に対し、その発生段階に応じた転写因子の発現を通じ、増殖・分化し機能的に成熟した気管支・肺上皮組織を構築することが明らかになっている。このような気管支・肺に発現する転写因子が欠損すると、その発生・分化に深刻な影響を与えることも知られている。

気管支喘息においては、気道に抗原等が吸入され、好酸球性気道炎症が生じ、気道上皮粘膜が傷害を受ける。剥離した上皮を埋めるように、未分化な上皮細胞が増殖 分化して気道上皮は修復されるが、このような気道上皮の傷害と修復の機転にも、発生段階で見られる組織特異的転写因子が働くことが予測される。傷害された気道上皮は、何らかの機序で十分に復元されないと、気道のリモデリング、気道の不可逆的な気流制限をきたし、喘息の重症化 難治化の一因になるものと考えられる。

気管支喘息の病態に影響を及ぼす遺伝子群として、好酸球性気道炎症の主因となる Th2

応答に関わるサイトカイン、サイトカイン遺伝子についてはすでに多くの報告があるため、我々の分担研究では、気道上皮の傷害と修復に焦点を当てて候補遺伝子を選定した。

B 方法

はじめに、ヒト気管支上皮の初代培養細胞を培養し、発生期に見られる転写因子の遺伝子発現が成人の成熟気管支上皮細胞にも認められるかどうかを RT-PCR 法で確認した。

次に、日本人健常対照 8 名の末梢血液中のゲノム DNA より、PCR 法により、TTF1、HNF-3A、HNF-3B、HFH-4、HFH-8、GATA6 の全エクソンおよびプロモーター領域を増幅し、塩基配列を決定し、塩基配列のアラインメントを行い、各遺伝子変異を同定して dbSNP データベースと比較照合した（表 1）。

Gene	TTF1	HNF-3A	HNF-3B	HFH-4	HFH-8	GATA6
Locus	TITF1	FOX A1	FOX A2	FOX J1	FOX F1	GATA A6
Genbank	NM_0033	NM_0044	NM_0217	NM_0014	NM_0014	NM_0052

	17	96	84	54	51	57
--	----	----	----	----	----	----

表 1 気管支上皮関連転写因子のゲノム情報

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子解析に関しては、三省合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した当施設の遺伝子解析に係わる倫理委員会の承認を受けている。

C 結果

1) ヒト気管支上皮の初代継代細胞を各種条件下で培養し、その気管支上皮関連転写遺伝子発現を RT-PCR 法で検討した。TTF1、HNF-3A、HFH-4、GATA6 は、培養条件により、成人の気管支上皮細胞にも発現することが確認された (図 1)。HFH-8 は間葉系細胞に発現する転写因子であり、気管支上皮細胞では発現がみられない。

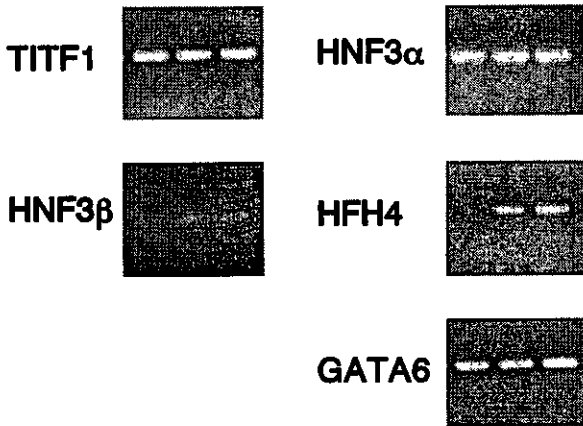


図 1 ヒト成人気管支上皮細胞における各種気管支関連転写因子の遺伝子発現 (RT-PCR 法)

2) TTF-1、HNF-3A、HNF-3B、HFH-4、HFH-8 の各転写因子に同定された遺伝子変異を図示する (図 2 から図 6 の▽印)。dbSNP データベースに既に登録されている既知の SNP と新規の SNP が同程度見いだされた。一連の検討により、エクソン領域だけでも、今回、10 個以上の新規多型が同定された。この中で、コード領域にありアミノ酸置換を伴う、いわゆる非同義置換は、HNF3A、HFH4、HFH8、GATA6 遺伝子にそれぞれ確認された。これらは、いずれも、dbSNP データベース上に登録されていない新規 SNP であった。

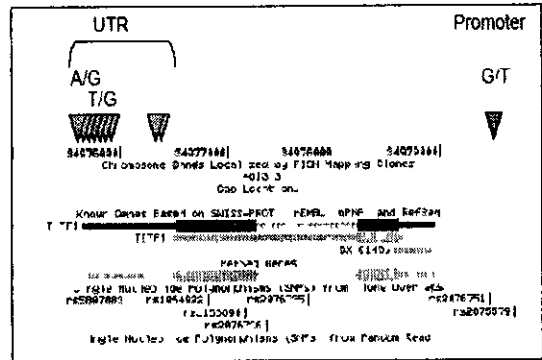


図 2 TTF1 のゲノム構造と遺伝子変異

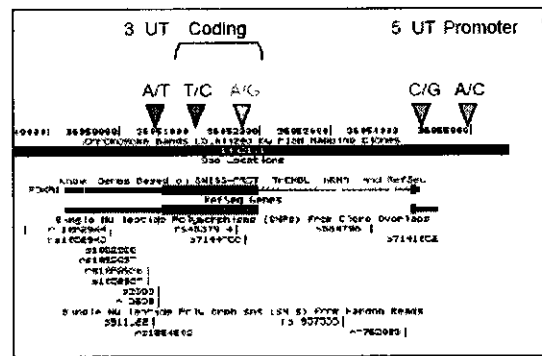


図 3 HNF3A のゲノム構造と遺伝子変異

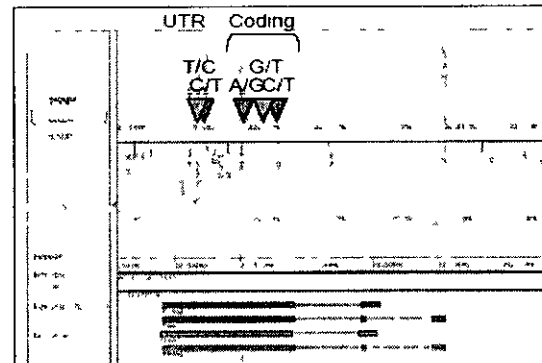


図 4 HNF3B のゲノム構造と遺伝子変異

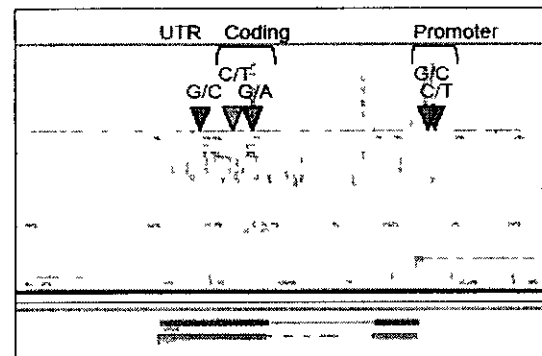


図 5 HFH4 のゲノム構造と遺伝子変異

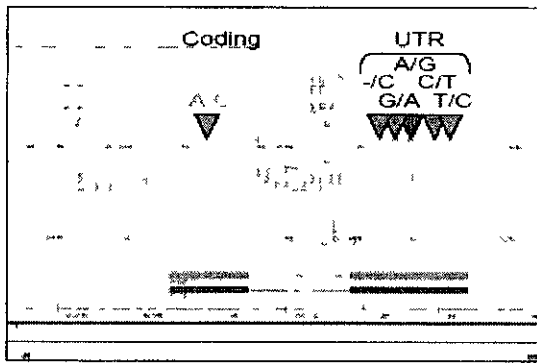


図6 HFH8 のゲノム構造と遺伝子変異

D 考察

ヒト気道上皮細胞の発生・分化に関わる転写因子は、培養条件により、胎児期のみならず、ヒト成熟気管支上皮にも発現していた。気管支喘息における気道粘膜傷害の修復過程に関係し、気道のリモデリングに影響を与えられられるこれらの転写因子には、日本人においても遺伝的多型性が認められることが明らかになった。その中には、各遺伝子の機能に影響を及ぼす可能性のある非同義置換も複数同定された。これらの転写因子の遺伝子配列は、部分的に著しく GC-rich であり、従来、解析が難しく、JSNP のような網羅的遺伝子変異検索プロジェクトでも十分に検討されていなかった。今回同定された遺伝子多型は、転写因子機能の完全欠損ではなく、むしろ、気道粘膜の修復が遅延するとか、過剰な炎症応答を生じるなど、部分的な機能変化をもたらす可能性があるため、今後、これらの遺伝子変異の機能的解析、気管支喘息の重症度との関連について検討したい。

E. 結論

気管支上皮関連転写遺伝子 (TTF1、HNF-3A、HFH-4、GATA6) は、成人の気管支上皮細胞にも発現することを確認した。これらの転写因子には新たな遺伝子多型が同定され、その中には各遺伝子の機能に影響を及ぼす可能性のある非同義置換も複数認められた。これらの遺伝子変異が気管支喘息における気道修復過程、気道リモデリングに関与している可能性を考慮に入れ、今後検討を進めたい。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

Kamio K, Matsushita I, Tanaka G, Hijikata M, Nakata K, Tokunaga K, Azuma A, Kudoh S, Keicho N Direct determination of MUC5B promoter haplotypes based on the method of single-strand conformation polymorphism and their statistical estimation Genomics in press

2 学会発表

慶長直人 ひまん性肺疾患の疾患感受性遺伝子の探求 第26回日本医学会総会, 4月4-6日, 福岡, 2003

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

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、マクロファージ遊走阻止因子（Macrophage migration inhibitory factor, MIF）遺伝子のプロモーター領域の 2 箇所の機能的な多型が気管支喘息やアトピーの発症に及ぼす遺伝的な影響を症例対照研究により検討した。MIF はリンパ球やマクロファージから産生される多様な機能を有するサイトカインであるが、特に近年では自然免疫能における重要な役割が注目されている。MIF 遺伝子は染色体 22q11 に位置するが、最近のゲノムワイドな遺伝子解析はこの領域にアトピーとの強い関連を報告している。MIF 遺伝子のプロモーター領域には-173 の G/C 一塩基多型と-794 の[CATT]からなる 4 塩基の繰り返し多型が報告されており、それぞれの多型はプロモーター活性に影響を与えることが既に他施設の検討から判明している。気管支喘息患者（277 名）、健常人（307 名）を対象として施行した症例対照研究にて、いずれの多型もアトピーと有意に相関した（遺伝子型解析、ハプロタイプ解析）。一方、気管支喘息との間には有意な関連は認められなかった。さらに両者の多型から構成されるハプロタイプのうち最頻の 3 つのタイプにつきルシフェラーゼアッセイを用いた機能解析にて、ハプロタイプの違いによる転写活性の違いが認められた。これらの結果から、特にプロモーター活性が低下する遺伝子型を有する人ではアトピー素因を有する人が高頻度に認められ、MIF 遺伝子はアトピー感受性遺伝因子の一つと考えられた。

A 研究目的

現在、アトピーや気管支喘息に代表されるアレルギー疾患の罹患率は年々増加している。近年のアトピーや喘息の増加の一因として、我々を取り巻く環境の変化、特に感染症の減少が指摘されている（いわゆる環境仮説）。特に最近の疫学的検討からは出生後早期のエンドトキシンへの曝露はアトピーや喘息の発症を抑制する可能性が指摘されている。このメカニズムとしてエンドトキシンなどの刺激が Th1 タイプの免疫応答の成熟を促進する働きがあることが

推測されている。

トルライク受容体-4（Toll-like receptor 4）はエンドトキシンに対する受容体であるが、MIF はこの TLR4 の細胞表面への発現を調節することで生体のエンドトキシンへの応答性を規定している可能性がある。MIF 遺伝子は染色体 22q11 に存在する。最近のアトピー形質を表現型として行われた全ゲノムレベルでの連鎖解析の結果では、同領域に有意な遺伝的連鎖が報告されている。MIF 遺伝子プロモーター領域には *in vitro* の検討からメッセージの発現に影響

を与える機能的な 2 つの多型が知られている (-173 番目の G から C への一塩基多型と-794 番目から始まる CATT の繰り返しからなる多型)。さらにそれらの 2 つの多型は関節リウマチやサルコイドーシスといったいくつかの免疫炎症性疾患の発症との有意な関連も報告されている。

本研究ではこれらの機能的な多型がアトピーや喘息の発症にどのような遺伝的影響をもたらしているのかを検討する。

B 研究方法

(1)対象

277 名の喘息患者と 307 名の健常人ボランティアを対象とした。喘息の診断は臨床症状（繰り返す咳嗽、喘鳴、呼吸困難）の有無、気管支拡張薬投与または自然に軽快する気流障害の存在、メサコリンに対する非特異的気道過敏性の存在、さらには COPD、間質性肺炎などの他の肺疾患が除外される、などの条件によって行った。すべての対象者において血清総 IgE 値、抗原特異的 IgE 抗体価（ダニ、草木、動物、真菌など）の測定を行った。これらの中で少なくとも一つの抗原に対して特異的 IgE 抗体が陽性的場合にアトピーありと判定した。

(2)遺伝子タイピング

-173G/C 多型については G 及び C、それぞれの対立遺伝子に特異的なプライマーを作成し、SYBR green 色素存在下に定量的 PCR を行った。増幅効率の違いから GG ホモ、CC ホモ、GC ヘテロの遺伝子型を決定した。-794 繰り返し多型については、FAM 色素で蛍光標識した Forward プライマーを用いて繰り返し配列を含む部分を PCR

増幅した。標識された PCR 産物を電気泳動することで、GeneScan プログラムにてそのサイズを決定し繰り返し回数を決定した。

(3)統計解析

それぞれの遺伝子型が有するアトピーや喘息発症への影響をロジスティック解析にて検討した。性別、年齢、喫煙の有無で補正したオッズ比にて遺伝子の影響の有無を判定した。両者の多型からなるハプロタイプの影響は "Haplo Score" プログラムを用いて各ハプロタイプがもつ疾患へのリスクの程度を検討した。

(4)レポーターアッセイ

2 箇所のプロモーター多型からなるハプロタイプが MIF の転写活性に与える影響を検討するため、我々の検討した集団で高頻度に認められた 3 つのハプロタイプにおいて、それぞれの変異に特異的なプロモーター配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミドを作成した。気道上皮細胞である A549 細胞を用いて特に刺激のないレベルでのメッセージ発現を比較した。

(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「アレルギー疾患の発症及び悪化に影響する因子の解析」として審査を申請し、既に承認されて

いる。

C 研究結果

アトピーのない集団において両遺伝子多型とも Hardy-Weinberg 平衡に矛盾しない遺伝子分布を示した。-173G/C 多型においては対立遺伝子 G のホモに比へ、対立遺伝子 C のホモではオッズ比 3.67(95%CI 1.43-9.46, $p < 0.01$)とアトピーへのリスクが有意に高かった。-794 の繰り返し多型では 5 回繰り返しのホモに比へて、5 回繰り返しの対立遺伝子をヘテロで有する人はオッズ比 2.22(1.20-4.11, $p < 0.05$)、さらに 5 回繰り返し配列を持たない人ではオッズ比 3.51(1.82-6.78, $p < 0.005$)と有意にアトピー発症へのリスクが高かった。一方、両多型とも喘息発症のリスクではなかった。ハプロタイプ解析では-173G/-794[5-CATT]からなるハプロタイプがアトピー発症に対して防御的(Haplotype-specific score = -3.54, $p < 0.0001$)な影響を持ち、一方で-173C/-794[7-CATT]からなるハプロタイプがアトピー発症のリスク(Haplotype-specific score = 2.89, $p = 0.0036$)となっていた。

D 考察

我々の今回の結果から転写活性が弱くなる遺伝子型を有する人では、よりアトピーの頻度が多いことが推察された。このような人では LPS に対する生体の反応が弱いことが予測され、LPS 刺激にてもたらされる免疫系の成熟や十分な Th1 免疫応答が起こりづらく、結果として Th2 型の免疫応答が強くなってしまふ可能性が考えられた。

さらに、以前より IgE 調節機構における抑制性のサイトカインとして知られていた Glycosylation inhibiting factor(GIF)は、近年 MIF と同一の遺伝子によってコードされていることが判明した。従って、MIF/GIF の産生が低下するような遺伝子型では、IgE の産生に抑制性の調節がかからず、結果として増強したアトピー反応が生じる可能性もある。

E 結論

今回の検討では MIF 遺伝子のアトピー発症に対する影響を示した。近年の疫学的な検討から、出生後早期の感染、エンドトキシンへの暴露が喘息や他のアレルギー疾患発症に予防的であることが報告されている。遺伝的な見地からもエンドトキシン刺激に対する生体の応答を規定する CD14 や CARD15 遺伝子の変異がアレルギーの発症に強く影響を与えることが報告されている。本研究の結果もこれらの事実を支持し、エンドトキシン暴露が、その後のアレルギー疾患発症へ強い影響を与えていることが示唆される。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

N Hizawa, E Yamaguchi, D Takahashi, J Nishihira, and M Nishimura
Functional Polymorphisms in the Promoter Region of Macrophage Migration Inhibitory Factor and Atopy
Am J Respir Crit Care Med 2004 Feb 12

[Epub ahead of print]

mechanisms underlying asthma and atopy

Hizawa N

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

2 学会発表

(1) 2002年11月28日 第52回アレルギー学会総会 横浜

MIF/GIF プロモーター領域の遺伝子多型が抗原特異的 IgE 応答に及ぼす遺伝的影響
檜澤伸之、高橋大輔、山口悦郎、地主英世、谷野洋子、福居嘉信、周 艶秋、和田由紀子、西村正治

(2) 2003年3月 第43回日本呼吸器学会総会 福岡

ミニシンポジウム 呼吸器疾患と遺伝的素因
気管支喘息感受性遺伝子の探索 ―遺伝疫学による遺伝的多様性の解析―
檜澤伸之、山口悦郎

(3) 2003年5月 第99回アメリカ胸部疾患学会 シアトル

The -173G/C promoter polymorphism of the MIF/GIF gene and atopy
Hizawa N, Yamaguchi E, Takahashi D, Nishihira J, Nishimura M

(4) 2003年8月 国際アレルギーシンポジウム 東京

Genetic Background of Allergic Disorders
From functional polymorphisms to common pathophysiological

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）

（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

本年度は検体収集を続けるとともに、既存の検体に加え、各施設から集積された検体を用いて、①UGRP1 蛋白測定へ向けての検討、②ADRB2 遺伝子ハプロタイプ解析、③MBL 遺伝子多型の検討、の3つの研究を行った

研究協力者

大塚義紀・福島県立医科大学講師

石田 卓、斎藤純平 福島県立医科大学助手

井上恵一・福島県立医科大学大学院生

吉川素子、王 新濤・福島県立医科大学大学院研究生

A 研究目的

アレルギー性気道疾患である気管支喘息の発症及び難治化に影響する因子の解析を目標として、以下の3つの分子に注目し、研究を行った

①クララ細胞分泌蛋白関連蛋白(UGRP1)に関する検討 昨年度は、UGRP1 遺伝子多型を検討し、喘息群と対象群で allele 頻度に有意な差を認めた UGRP1 の機能が今だ不明なため、本年度は、蛋白の精製ならびに、UGRP1 測定系の確立を目的とした研究を行った

②βアドレナリン受容体遺伝子(ADRB2)に関する検討 昨年度に引き続き構造遺伝子ならびにその上流の SNP について検討し、ハプロタイプ解析を行った

③自然免疫関連分子 mannose binding lectin(MBL)に関する検討 近年、自然免疫関連分子とアレルギーならびに喘息との関連に

注目が集まっている このため、本年度は MBL 遺伝子多型に関する検討を行った

B 研究方法

1 クララ細胞分泌蛋白関連蛋白(UGRP1)に関する検討

UGRP1 機能解析と蛋白測定のため、UGRP1 遺伝子プラスミドを用いて大腸菌に蛋白を発現させ、その精製を行う 精製された蛋白を用いて、ハイブリドーマを作成し、複数の単クローン抗体を得る この単クローン抗体を用いて ELISA 系を確立し、血清および BALF での UGRP1 濃度を測定する

2 βアドレナリン受容体遺伝子(ADRB2)に関する検討 喘息患者 46 名、健常者 100 名より DNA を採取 PCR にて目的部位の DNA を増幅 これを大腸菌に組み込み、単一コロニーからの DNA を直接シークエンス

した 個体ごとにハプロタイプを決定し、両群間での比較、ならびに欧米白人のハプロタイプと比較した

3 MBL に関する検討 血清 MBL 値に直接影響を及ぼす Exon1、codon54G/A 多型を、PCR-FRLP 法を用いて検討した 健常者 268 名、喘息患者 582 名を対象とした

C 研究結果

1 クララ細胞分泌蛋白関連蛋白(UGRP1)に関する検討 UGRP1 蛋白を精製し、ハイブリドーマを作成、5 種の単クローン抗体を作成した そのうち 2 種の抗体を用いて ELISA 系を作成した 血清中 UGRP1 測定を試みたが、血清中に阻害物質が存在し、十分な測定が出来なかった このため、現在、抗体の種類などを変え、再検討を行っている

2 β アトレンリン受容体遺伝子(ADRB2)に関する検討 日本人では、20SNP s のうち新規 SNP(-839)を含めた 15SNP s が確認され、42 のハプロタイプ、54 のディプロタイプが確認された 両群間にハプロタイプ、ディプロタイプ頻度の差は認めなかった これらの頻度は、欧米白人の頻度と大きく異なっていた

MBL に関する検討 G/G, G/A, A/A の遺伝子型は、喘息患者はそれぞれ 402(69.1%), 160(27.5%), 20(3.4%)、健常者では 203(75.7%), 62(23.1%), 3(1.1%)であり、喘息群で A allele 頻度が有意に高かった(P<0.05)

D 考察

UGRP1 に関する解析では、血清中阻害物質の存在により、測定系の確立まではいかなかった 来年度に測定系を確立し、血清ならびに BALF での UGRP1 測定ならびに喘息重症度との関連を検討する予定である

ADRB2 遺伝子については、ハプロタイプ頻度が欧米白人と大きく異なることが判明した ハプロタイプは薬剤反応性と関連することが報告されており、今後、喘息治療戦略構築の再人種差を考慮することの重要性を示唆しているものと考えている

MBL 遺伝子解析では、喘息患者で血清 MBL の低下する A allele 頻度が高いことが 8 名した 次年度には喘息重症度などとの関連も同時に解析する予定としている

E 研究発表

1 論文発表

1) Harada Y, Munakata M, et al, Molecular-based haplotype analysis of the β 2-adrenergic receptor gene (ADRB2) in Japanese asthmatics and non-asthmatic subjects (投稿中)

2 学会発表

1) Saito J, et al, ENO as a noninvasive assessment of recurrent wheezers in school children Eur Respir J, 22 569s, 2004

2) Yoshikawa M, et al, Immuno-histo-chemical study on uterogloin-related protein 1 (UGRP1) expression in pulmonary carcinoma Lung Cancer, 41 S255, 2003

3) 斉藤純平、他 学童期のアレルギー性気道炎症の疫学的評価における呼気中 NO 値の検討 アレルギー, 52 918, 2003

4) 渡辺香奈、他 受動喫煙 母乳栄養は学童アレルギー発現のリスクファクターか? アレルギー, 52 919, 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、健常人コントロールと比べ数だけでなく機能も減少している。とくにこれらの細胞からの Th1 型サイトカインの産生は、時間とともに急速に低下する。その機序として、単球の存在下、これらの細胞には優先的にアポトーシスが誘導されることが明らかになった。単球を除去することにより、これらの細胞からの Th1 型サイトカインの産生は健常人と同レベルまで回復した。

NSAID は、AD 患者において低下している NK、 $\gamma\delta$ T細胞からの Th1 サイトカイン産生を、さらに特異的に抑制することが明らかとなった。AD における NSAID の頻回の使用は、Th2 型反応へのシフトをさらに促進する可能性が示された。

A. 研究目的

先進諸国におけるアトピー性皮膚炎(AD)患者の増加を、小児期の感染機会の減少に求める hygiene hypothesis が近年注目を集めている。しかし、何故感染機会の減少がアトピー性疾患の発症に結びつくのかは明らかではない。我々は感染に対して早期に反応する自然免疫能の未発達が、その原因ではないかとの仮説を証明すべく、AD における自然免疫担当細胞について検討を加え、その数的、機能的低下が認められることを見出した。今年度の研究では、AD において自然免疫担当細胞が機能的に低下をきたす機序を明らかにしたいと考えた。さらに、小児期の AD の治療に広く用いられてきた外用剤(NSAID)が、その機能低下にどのような影響を示すのかについての検討もあわせて行うこととした。

B 研究方法

1 前年度に引き続いて、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、PMA+ ionomycin にて刺激後 2, 4, 6 時間後に回収する。回収された PBMC 中の獲得免疫担当細胞($\alpha\beta$, CD4, CD8)、自然免疫担当細胞(NK, $\gamma\delta$)分画に、経時的に発現してくるサイトカイン(TNF- α , IFN- γ , IL-4)を、陽性細胞頻度及びその発現レベルに関してフローサイトメトリーを用いて測定する。

2 このサイトカイン測定と平行して、各々の

分画に誘導されるアポトーシスを検討するため、フローサイトメトリーを用いた Annexin V binding を測定する。

3 CD14⁺単球が、自然免疫担当細胞のアポトーシス誘導に関与している可能性を明らかにするため、抗体でコートした magnetic beads を用いて PBMC より CD14⁺単球を除く。この細胞を上記と同様に PMA + ionomycin にて刺激し、様々な時間後に回収された細胞中の各分画に誘導されるサイトカインと、Annexin V binding をフローサイトメトリーを用いて測定する。

4 前年度の研究で、NSAID が正常人の自然免疫担当細胞(NK, $\gamma\delta$)に対してサイトカイン(TNF- α , IFN- γ)産生を抑制することを示した。そこで今年度は、AD 患者 PBMC を用いて NSAID がサイトカイン産生に及ぼす影響について検討を行う。NSAID としてはプフェキサマク、インダシム、アスピリンなどを使用する。

5 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。