

図9

治療後AchPC20>20000 γ 以上に改善した後
吸入ステロイド（ICS）を中止した54名の背景因子

悪化した群と悪化しない群の比較

	悪化なし群 27名	悪化あり群 27名	p value
M/F	5 / 22	6 / 21	N.S
A/NA	12 / 15	13 / 14	N.S
発症年齢	42.8 \pm 15.5	41.3 \pm 15.8	N.S
ICS導入までの期間（年）	2.1 \pm 4.9	3.1 \pm 4.1	N.S
初診時FEV1(%)	77.5 \pm 13.0	76.7 \pm 9.8	N.S
初診時末梢血Eo(%)	4.8 \pm 3.7	5.7 \pm 4.3	N.S
初診時喀痰Eo(score)	1.2 \pm 1.1	2.4 \pm 1.6	P<0.01
初診時AchPC20(γ)	13803.8	10351.4	N.S
初診時HistPC20(γ)	6095.4	3819.4	N.S
ICS(μ g)(BDP換算)	622.2	785.2	P=0.073

分担課題名：吸入ステロイド薬の至適用量にもとづく臨床効果と遺伝子多型解析

分担研究者：大田 健（帝京大学医学部内科教授）

アレルギー疾患の治療反応性予測因子を解析する目的で、治療に必要な吸入ステロイド量により患者群を分別し、遺伝的背景を検討することとした。対象遺伝子多型としては初めに、機能が明らかになり、気道リモデリングとの関連が示唆されるTGF- β 1のプロモーター領域について検討した。まず、喘息の自然寛解について検討したが、小児喘息アウトグロウ群では喘息群と比較して有意にTGF- β 1の多型の頻度が低かった。しかし、吸入ステロイドの用量ではTGF- β 1の多型の頻度には差異を認めなかった。今後、吸入ステロイドの至適用量の評価について、呼吸機能の評価も加え検討する。一方、解析対象多型についてはステロイドへの反応性に関連する細胞側の因子についても解析を進める。

研究協力者

長瀬洋之（帝京大学医学部内科助手）
中島幹夫（帝京大学医学部内科助手）
足立哲也（帝京大学医学部内科講師）
中野純一（帝京大学医学部内科講師）
山下直美（帝京大学医学部内科助教授）
関谷 剛（東京大学生体防御機構）

A 研究目的

気管支喘息治療は、長期管理が重視され、抗炎症治療薬として吸入ステロイド薬が普及し、著しい進歩を遂げた。しかし、治療反応性をあらかじめ予測する指標は乏しい。そこで、本研究班は、病因・病態および治療反応性予測因子を系統的に検出する遺伝子診断キットの開発しようとするものである。各種抗喘息治療薬の中で、我々は、もっとも抗炎症作用が期待できる吸入ステロイド薬をターゲットに、その至適用量にもとづく臨床効果を検討し、遺伝子多型との関連を明らかにし、予測因子を見出すことを目的とした。平成16年度はまず、遺伝子多型として、気道リモデリングとの関連

が示唆されるTGF- β 1のプロモーター領域C-509TのSNPについて解析した。

B 方法

喘息患者および健常人より遺伝子解析の同意取得後EDTA採血し、血漿を採取、単核球分画よりDNAを採取した。同時に背景として、総IgE（FRIA法により測定）、臨床経過（発作歴、治療歴）を検討した。TGF- β 1のプロモーター領域を特異的に増幅するプライマーを設定し、日立のMassARRAY法でSNPsを解析した。喘息をコントロールするために必要とされている吸入ステロイド薬の量を至適用量とし、少用量群と高用量群の差異を検討した。血漿中のTGF- β 1蛋白量はBiosource社のELISAキットを用いて測定した。統計解析はstatview統計ソフトを用いた。（倫理面への配慮）三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿い、倫理委員会に提出し、承認を得た。患者より遺伝子解析の文書同意を得た後、採血し、検体は匿名化し解析に用いた。

C結果および考察

まず、アウトグローと多型の関連について解析した対象患者を表1に示す。喘息群は小児期から喘息があり、成人喘息に持ち越したアトピー喘息165名、アウトグロー群は小児期に喘息がありその後寛解し、16歳以降全く発作のない18歳以上の成人、コントロールは喘息、アレルギー性鼻炎アトピー性皮膚炎の既往症のない健常人で血清IgE値が250未満とした。吸入ステロイド至適用量解析のためにはコントロールに使用している吸入ステロイド量を調査した成人喘息患者(アトピー型および非アトピー型を含む)199人を対象とした。

表1 対象患者

Profile of subjects (Japanese)				
	Age(mean)	M	F	Total
Asthma	34.0	89	76	165
Outgrow	20.8	62	17	79
Control	27.5	107	106	213

C-509TのSNPsは既にTGF-β1のプロモーター活性と関連する機能的なSNPsであることが明らかになっている(Eric S. et al Am J Respir Crit Care Med. 2004;169:214-9)。つまりTTのホモタイプを有するとプロモーター活性がCCのホモタイプと比較して高くなる。我々の予備検討で蛋白レベルでも血漿中のTGF-β1のレベルが高値になることが明らかになった(図1)。図1に示すサンプルはすべて採血直後に血漿の遠心分離をおこなった。多数の外来喘息患者を対象に検討することを視野にいれ

TGF-β1の血漿レベルの採血後の時間経過を検討した。図2は採血後遠心までの時間を横軸に示す。採血後時間が経過するに従い、時間依存性にTGF-βが急激に上昇することがわかった。このことより多数の患者サンプルの解析にはTGF-β1の血漿レベルを適応することは困難と考えた。

図1

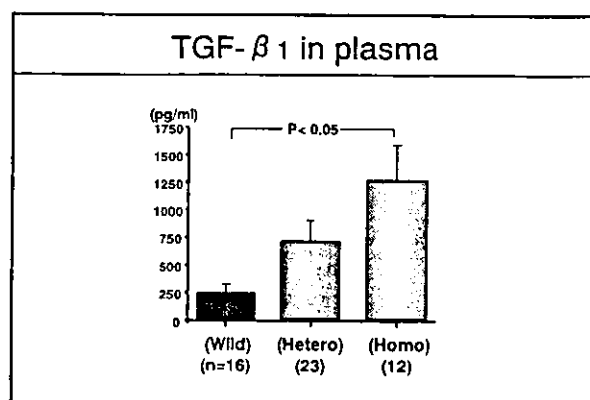
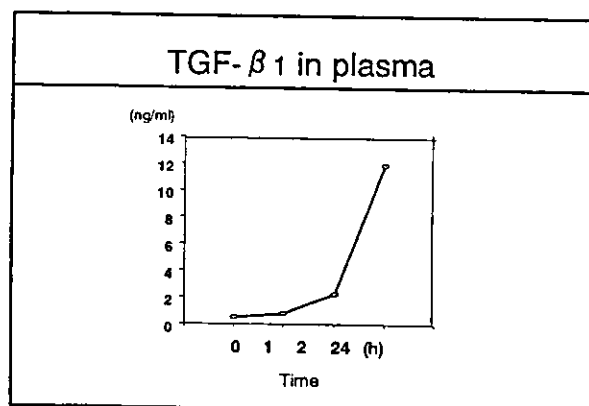


図2

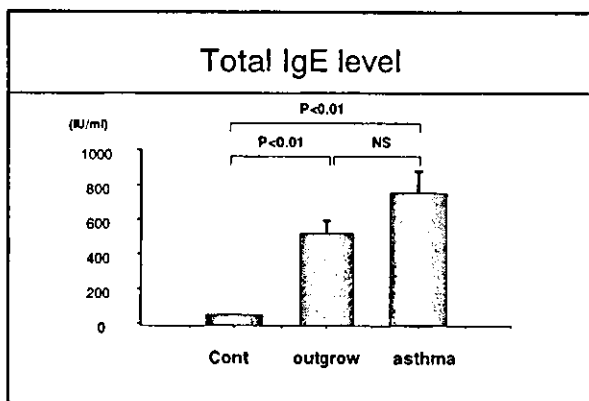


TGF-β1の遺伝子多型と機能が相関することより、日本人の多数のサンプルでTGF-β1のプロモーターの多型を検討する

ことを試みた。TGF-β1は線維化に関連する増殖因子であり、喘息の気道局所では発現が亢進し、気道リモデリングへの関与が示唆されている(Vignola AM et al: Am J Respir Crit Care Med 1997;156:591-9)。つまり、蛋白レベルと相関のあるTGF-β1のプロモーター領域の多型は喘息の疾患感受性遺伝子とともに治療反応性や寛解を反映する遺伝子としても有望と考えられる。そこで、我々は、日本人の健常人、アトピー型喘息患者および小児喘息がアウトグロースした人を対象にC-509TのSNPを解析した。

まず患者背景として血清中総IgEを測定した結果を図3に示す。コントロール群に比しアトピー型喘息群では有意にIgE値が高い。さらに、アウトグロース群のIgE値を検討すると、喘息症状がない群にも関わらずIgE値はコントロール群と比較して有意に高値を示し、アトピー型喘息群の差異を認めなかった。

図3



アトピー型喘息患者で、TTタイプが29.6%であり、健常人(18.7%)および小児喘息がアウトグロースした人(21.5%)に比し、有意にTTのホモタイプの頻度が高かった(図4)欧米人において喘息患者では健常人と比較して有

意にTTタイプが多いことが報告されているが(Eric S. et al Am J Respir Crit Care Med. 2004;169:214-9)、今回日本人についても適応できることが明らかになった。

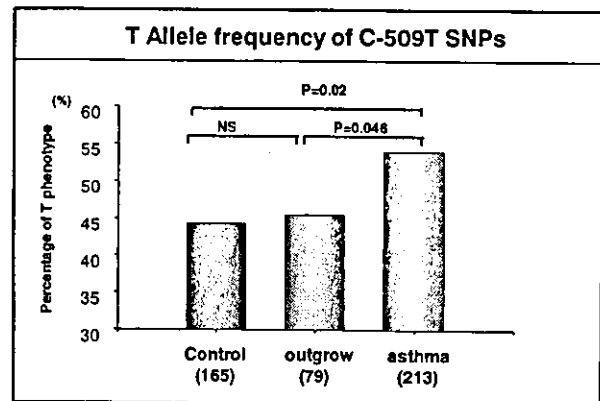
図4

	Wild(CC)	Hetero(CT)	Homo(TT)	Total
Asthma	36(21.8)	80(48.4)	49* (29.6)	165
Outgrow	26 (32.9)	36 (45.5)	17 (21.5)	79
Control	59 (27.6)	114 (53.5)	40 (18.7)	213

*p= 0.04 vs control (%)

アレル頻度を検討するとTアレルを有する頻度はアトピー型喘息群でアウトグロース群および健常人に比して有意に高かった(図5)。

図5



日本人においても欧米人と同様に喘息患者で有意にTアリの頻度の高いこと、つまり疾患感受性遺伝子の一つとなりえることが明らかになった。さらにアウトグロウ群でTアリの頻度の低いことはTアリが存在することが喘息の寛解しにくい予測因子の一つとなり得ることが考えられた。表1に示すように対象患者の年齢を以上よりTアリを有することは喘息が寛解しにくい予測因子の一つとなり得ることが考えられた。

次に治療反応性との関連を検討する目的で、吸入ステロイドの至適用量とTGF-β1C-509TのSNPとの関連を検討した。対象は成人喘息患者で、アトピー型および非アトピー型両者を含む形で解析した。至適コントロールに必要な吸入ステロイドはBDP400 μg/日以下(51人)を低用量群、1600 μg/日以上(148人)を高用量群とした。図2に示すように低用量群と高用量群で有意なSNPs頻度の差異は認めなかった。

図6

Frequency of the TGF-β1 C-509T promoter polymorphisms				
BDP	Wild(CC) (%)	Hetero(CT)	Homo(TT)	Total
400μg/day	8 (15.6)	29 (56.9)	14 (27.6)	51
>1600μg/day	26 (17.6)	80 (54.1)	42 (28.3)	148

今回大学病院受診患者で吸入ステロイド低用量群がすくなかったため、次年度以降、低用量群を収集し、さらに吸入ステロイドの至適用量を厳密に把握するため、呼吸機能との関連についても解析する準備を進めている。また、検索対象についても、アレルギー炎症に関連する因子、さらに直接ステロイド感受性に関連する因子についても検討を進める予定である。

E結論

TGF-β1のプロモーター領域の多型が喘息アウトグロウの予知因子の一つとなり得ることを明らかにした。吸入ステロイド至適用量との関連は見出せなかったが、さらに患者の背景について詳細な検討予定である。

G業績

1. 論文発表

Ohta K, Yamashita N, Arai H, Tashimo H, Kuramochi M, Ohbayashi O, Ishida H, Kawashima R, Nakano J, Ishii A, Hirai K, Horiuchi T, Miyamoto T.

Inhibition of airway remodeling, cell infiltration, and airway hyperresponsiveness. Allergy Clin Immunol Int (in press)

Ohta K, Fukuchi Y, Grouse L, Mizutani R, Rabe KF, Rennard SI, Zhong NS. A prospective clinical study of theophylline safety in 3,810 elderly with asthma or COPD. Respiratory Medicine 2004 Oct;98(10):1016-24.

Iikura M, Ebisawa M, Yamaguchi, Tachimoto H, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Transendothelial Migration of Human Basophil. J Immunol. 2004 Oct 15;173(8):5189-95.

Adachi T, Cui C-H, Kanda A, Kayaba

H, Ohta K, Chihara J. Activation of epidermal growth factor receptor via CCR3 in bronchial epithelial cells. *Biochem and Biophys Res Commun* 2004 Jul 23;320(2):292-6

2. 学会発表

大田 健 気道リモデリングと遺伝子多型
第 126 回 日本医学会シンポジウム 6/24
東京 2004

Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Matsushima K, Yamamoto K, Ohta K, Hirai K: Comparison of expression and function of toll-like receptors in eosinophils and neutrophils. *Collegium Internationale Allergologica 25th Symposium*, 8/27, デンマーク, 2004

山下直美、大田 健：気道リモデリング—
T細胞と組織細胞の相互作用
第 16 回日本アレルギー学会春季臨床大会、
5/12、群馬県前橋市、2004

山下直美、中島幹夫、山本寿子、大田 健：
気道のリモデリングの分子標的—マウスモデルを用いた検討を通じてのアプローチ—
第 54 回日本アレルギー学会総会、11/4、神奈川、2004

関谷 剛、小宮明子、飯倉元保、鈴木真穂、川上綾子、山口正雄、山下直美、山本一彦、大田 健、

平井浩一：

気管支喘息における CCL22 (MDC: Macrophage-derived chemokine) の遺伝子多型

第 16 回日本アレルギー学会春季臨床大会、
5/12~14、群馬県前橋市、2004 関谷 剛、
常深祐一郎、足立哲也、木原令夫、山口正雄、
佐伯秀久、中野純一、山下直美、小林信之、
塩原哲夫、庄司俊輔、西村正治、棟方 充、
玉置邦彦、山本一彦、大田 健、平井浩一：

アレルギー疾患における Th2 特異的ケモカイン TARC, MDC タンパクおよびその遺伝子多型
第 54 回日本アレルギー学会総会、11/4~6、神奈川、2004

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
アレルギー疾患の治療反応性予測因子の確立及びテーラーメイド治療法の確立に関する研究

分担課題名：小児喘息における吸入ステロイド薬の治療反応性に及ぼす
生体因子・環境因子の解析に関する研究

分担研究者 赤澤 晃 国立成育医療センター 総合診療部小児期診療科医長

研究要旨

吸入ステロイド薬によって治療され一定期間無症状となった喘息患者での治療ステップダウンの基準は明確ではない。本研究では気道過敏性、環境因子、遺伝因子等を検討することにより症状および気道過敏性に及ぼす影響を検討する。初年度対象にした患者は、6～24歳の計44名。気道過敏性改善群が34名、過敏群が10名で改善群は、ICSを中止した。さらに3ヶ月後に再度検討した25名に関して分析した。改善群と過敏群では日常生活での運動発作の出現、環境整備の程度で差がでた。3ヶ月後の検討では、3例で症状の再発があり、日常の運動発作、ピークフローの変動率との関連性が考えられた。

気道過敏性の改善に影響する因子を分析することで治療反応性を予測およびより高い治癒率を目指した患者指導の可能性があると考えられる。

研究協力者

青田明子（国立成育医療センター
第1専門診療部アレルギー科）
明石真幸（同第1専門診療部アレルギー科）
石井徹仁（同総合診療部小児期診療科）
大矢幸弘（同第1専門診療部アレルギー科医長）
河原秀俊（同総合診療部小児期診療科医員）
斎藤暁美（同第1専門診療部アレルギー科）
須田友子（同第1専門診療部アレルギー科医員）
成田雅美（同第1専門診療部アレルギー科）
野村伊知郎（同第1専門診療部アレルギー科医員）
二村昌樹（同第1専門診療部アレルギー科）

A. 研究目的

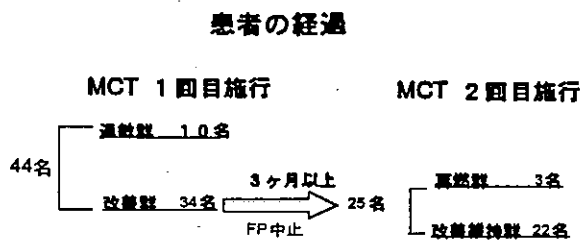
小児気管支喘息は、多因子性疾患であり発症・増悪因子は多岐にわたる。気管支喘息の病態である気管支粘膜とその周囲組織の慢性炎症によっておこる気道過敏性は、遺伝的要因とその後の感染症、アレルゲンとの暴露、

非特異的刺激性物質への暴露、治療内容によって異なるものと考えられている。吸入ステロイド薬（ICS）は、多くの気管支喘息患者の気道過敏性を改善させる作用があり現在の喘息治療の中心的薬剤である。その効果は、気道過敏性に関わる多くの因子によって変化してくることが予想される。さらに小児喘息治療ガイドラインにおいても早期からICSを導入するようになったが、臨床的に症状が無くなった場合の治療ステップダウンの明確な指標がない。この研究では、ICSを導入し、一定期間臨床的に発作が無い状態が続いた場合にICSのステップダウンが可能かどうかを気道過敏性、肺機能をはじめ遺伝的要因も含めて様々な危険因子との関係性を分析し、ステップダウンの条件を見いだすことを目的としている。

B. 研究方法

6歳以上の肺機能検査のできる喘息患者で、吸入ステロイド薬（ICS）を使用して治療を行い、ICS単独で最近3ヶ月以上発作が無く、1秒率が80%以上の場合に、ATS法によるメサコリン吸入気道過敏性試験（MCT）を実施し、気道過敏性改善群（PC20 0.5mg/ml以上）と過敏群にわけ、改善群はICSを中止する。ICS中止3ヶ月後に症状、気道過敏性、危険因子について調査をおこない再発率、気道過敏性の変化を観察し危険因子との関連性を検討した。

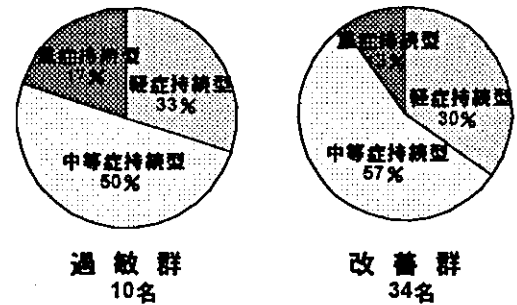
対象患者は、今年度6~24歳の計44名（男30名、女14名）が上記条件を満たした。44名にMCTを実施したところ、改善群が34名、過敏群が10名で改善群は、ICSを中止し現在までに3ヶ月後のMCTの2回目を実施できた25名に関して分析した。



C. 研究結果

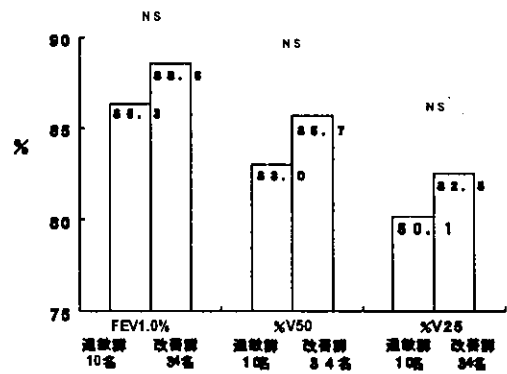
対象患者の重症度を、最も症状の悪かった時期の重症度で分類すると、過敏群では、軽症児族型33%、中等症持続型50%、重症持続型17%、改善群では、それぞれ、30%、57%、13%であった。

最も悪かった時の重症度分類



MCTでの改善群と過敏群での肺機能検査結果では、1秒量、%V50、%V25 いずれも有意差はなかった。末梢気道閉塞を示す、V25等も両群とも80%以上あった。しかし過敏群で低い傾向にあった。

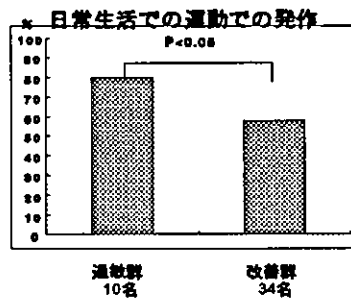
1回目のメサコリン吸入負荷試験時肺機能検査



肺機能以外の要因として、喘息罹患年数は、改善群が平均7.2年、過敏群が7.6年（有意差なし）、発症年齢は、改善群3.3歳、過敏群2.4歳で有意差なし。吸入ステロイド薬使用期間でも有意差はなかった。

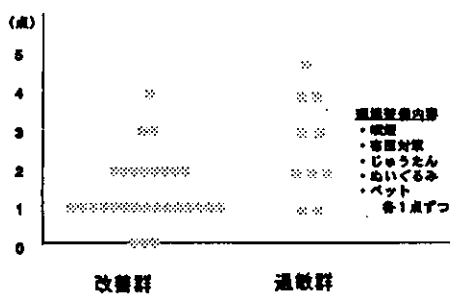
日常生活での運動による発作誘発は過敏群で発症が多かった。

1回目のメサコリン吸入負荷試験時の検1



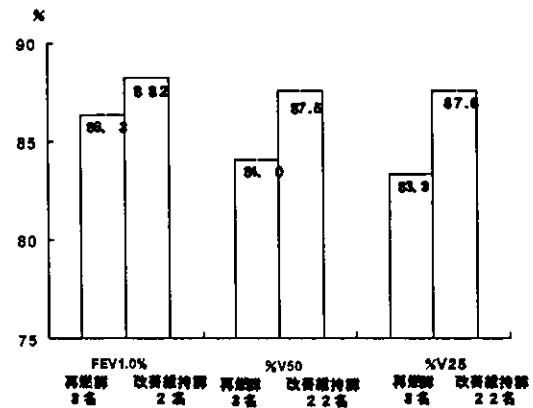
環境整備の実施に関しては、喫煙、布団、絨毯、ぬいぐるみ、ペットの問題があれば各1点として評価すると、過敏群では有意に点数が高かった。

1回目 環境整備の実施



気道過敏性改善群は、約3ヶ月間経過を観察し、25名中3名で喘息発作を再発した。呼吸機能では再発群では、一秒率、%V50、%V25が低い傾向にあり、運動による発作の出現率が高く、またピークフローの日内変動率も大きい傾向であった。

2回目のメサコリン負荷試験時肺機能検査



D. 考察

気管支喘息における気道過敏性に関わる因子は、遺伝因子、環境因子、感染、治療的介入の時期、治療薬などさまざまである。現在の喘息治療管理ガイドラインに沿った治療を行い、吸入ステロイド薬など気道炎症を改善する薬剤を使用した場合、ほとんどの患者で発作を起こさない状態にコントロールすることができる。吸入ステロイド薬によって気道炎症がどこまで沈静化できるのか、気道炎症が沈静化したあとに気道過敏性は改善するのか、気道過敏性が改善されれば抗炎症薬は不要になるのかというリサーチクエッションがある。

この研究で対象となる患者は、吸入ステロイド薬だけの使用になって3ヶ月間以上発作がない患者を対象としている。これは、喘息治療管理ガイドラインに沿った治療をした場合に症状を観察する期間として3~6ヶ月が適当と考えられるからである。しかし、44名中10名では気道過敏性は改善していないことがわかった。改善したと判断した44名においても吸入ステロイド薬を中止して3ヶ月後に3名で再発している。現在までのところ改善群と過敏群での環境因子、治療内容等を検討しているが環境因子で有意差がみられている。

環境因子の定量化、既知の遺伝子多型、介入の状況を検討し気道過敏性の改善、吸入ステロイドの効果に影響する因子を検討する必要がある。また、今回の基準としたメサコリン 0.5mg/m³も改善の基準として適切かどうかの検討も必要である。

E. 結論

多因子性疾患である気管支喘息の治療には、環境因子のコントロール、吸入ステロイド薬が使用されている。これらの効果について予測できる因子の定量化をおこなうことが必要である。

G. 研究発表

1. 学会発表

気管支喘息児における吸入ステロイド薬減量・中止の検討。 須田友子、赤司賢一、明石真幸、二村昌樹、斎藤暁美、青田明子、成田雅美、野村伊知郎、大矢幸弘、赤澤 晃 日本アレルギー学会 横浜 2004

分担課題名：気管支拡張薬の代謝、効果、および副作用に関する遺伝学的研究

分担研究者：山口悦郎 愛知医科大学医学部呼吸器・アレルギー内科 教授

研究要旨：成人喘息治療において、いわゆる気管支拡張薬であるテオフィリンや β_2 刺激薬を使用する機会は今日でも多い。両薬は一般的には安全かつ高い有効率が見込まれるが、一定の確率で副作用が出現し、効果の程度には明らかな個体差が存在するのは事実である。そこで治療効果と副作用の予測を薬剤使用前に予知することが重要な課題のひとつである。そのために、両薬剤の代謝に関与する分子の遺伝子や受容体遺伝子の多型と、血中薬物濃度や臨床像との関連を検討することが、有望な手法となる。今年度の研究において、 β_2 アドレナリン受容体のひとつの多型と喘息の重症度の指標との相関や、テオフィリンの主な代謝酵素である CYP1A2 の多型と喘息患者血清のテオフィリンピーク濃度との関連を見出した。しかし、より確度と精度の高い知見を得るために、健常者において制御された条件での薬物代謝速度や、副作用を含めた生理学的指標の変化と、遺伝子多型との関連を検討することが次年度の課題として残された。

研究協力者

馬場研二 愛知医科大学医学部呼吸器・アレルギー内科 助教授
若山英雄 愛知医科大学医学部呼吸器・アレルギー内科 非常勤医

究にあつては、378名の健常対照者と387名の成人喘息患者。CYP1A2 遺伝子多型研究にあつては、34名の成人喘息患者である。多型は、ゲノム DNA を用いて一塩基多型(SNP)部位の各塩基に特異的なプライマーを用いた PCR 増幅を行い、増幅過程をリアルタイムPCR 法にてモニターし、増幅のされやすさから同定した。血中テオフィリンのピーク濃度は、テオフィリン製剤内服後に採血し、その時点のテオフィリン濃度、内服量、内服後の時間からベイズ推定により推定値を計算した。

(倫理面への配慮)

本研究は 3 省庁による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき研究計画を立て、本学の倫理委員会の承認を得た。そこで作成した説明書を用いて患者の同意を文書で得た。

A. 研究目的

成人喘息治療は、近年吸入ステロイドの普及や各種の新薬の上市により、中等症までの患者には満足すべき効果が確実に期待できる。しかし、それらの患者においても発作時や重症患者においては、いわゆる気管支拡張薬であるテオフィリンや β_2 刺激薬を使用する機会が多い。両薬は使用に際してよく知られている注意点を遵守すれば、安全かつ高い有効率が見込まれるが、依然として一定の確率で副作用が出現し、効果の程度には明らかな個体差が存在するのは事実である。今日喘息治療は、より完成度の高い方法の確立が望まれており、その意味で治療効果と副作用の予測を薬剤使用前に予知することが重要な課題のひとつである。そこで今年度は、テオフィリンの代謝に関与する肝臓チトクローム P450 酵素群のひとつである CYP1A2 遺伝子多型とテオフィリン血中濃度や、 β_2 アドレナリン受容体遺伝子多型と成人喘息患者の臨床像との関連を検討した。

B. 研究方法

対象は β_2 アドレナリン受容体遺伝子多型研

C. 研究結果

β_2 アドレナリン受容体遺伝子の Arg16→Gly の変異をもたらす多型は、通常の χ^2 検定や、性、年齢、喫煙歴で補正したロジスティック回帰分析にても、発症との有意な相関を見出せず、発症因子としての役割は少ないと考えられた。一方初診時 1 秒率は、 β_2 刺激薬による受容体の発現低下と関連のある 16(グリシン)を有意する患者で有意に小さかった。

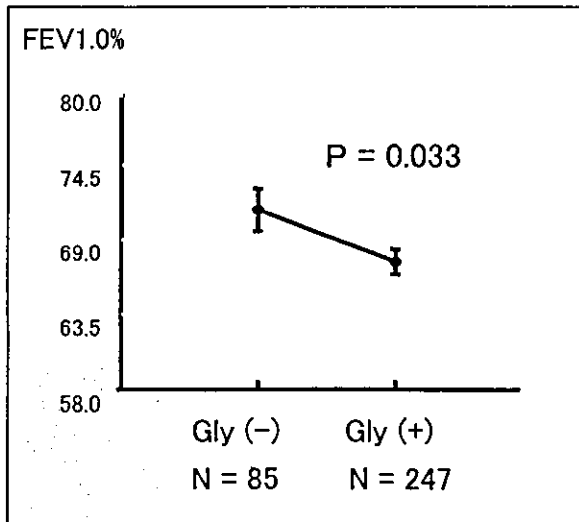


図1. 喘息患者における β_2 アドレナリン受容体遺伝子多型と初診時1秒率

次にテオフィリンと喘息の臨床像に関して、朝の最大呼気流量(PEF)値及びその日内変動は、テオフィリン濃度に依存しており、今回の検討対象ではあらためて血中テオフィリン濃度を一定以上に維持することが重要であることが判明した。テオフィリン製剤を1日400mg以上内服している患者の中に、十分な有効血中濃度に達しない症例が存在した。それに関してCYP1A2の遺伝子解析では、-3858における「G/G」、あるいは-2464における「T/del」の遺伝子型を有する個体が、ピーク血中濃度 $8\mu\text{g/ml}$ 未満の群に多く認められた。特にテオフィリン内服量と体重で補正した血中テオフィリン濃度のピーク値は、-3858(GG)ではそれ以外の遺伝子型個体に比して、有意に低かった。

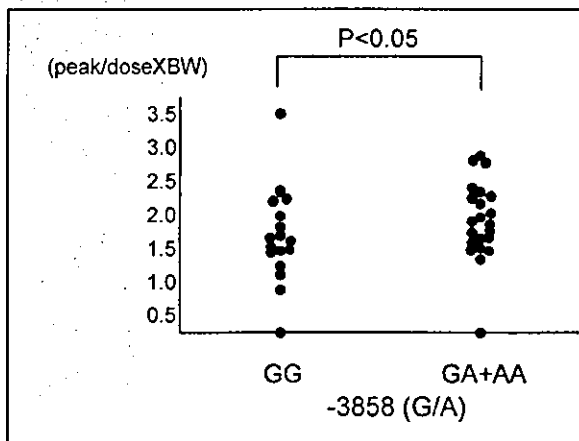


図2. 体重と投与量で補正したピーク血中テオフィリン濃度

D. 考察

これまで β_2 アドレナリン受容体遺伝子多型と喘息の諸指標との関連について、喘息全体の発症と相関するとの結果は少ない。むしろステロイド依存性夜間喘息など喘息の亜集団との相関に始まり、気道過敏性や β_2 刺激薬に対する反応性などと、何らかの有意な関連を示唆するものが多い。今回の我々の検討でも同様であり、喘息の発症との相関は認められず、初診時の1秒率との相関を認めた。しかし、それらの結果は、 β_2 刺激薬を初め様々な抗喘息薬の影響下での知見であり、正確に β_2 アドレナリン受容体遺伝子多型の役割を評価し得ていない可能性がある。次年度では健常者での検討を予定している。

テオフィリンの血中濃度とCYP1A2遺伝子多型の相関についても、ピーク血中濃度は推定値であり、自ずと一定の誤差がある。やはり健常者における実測値を基にした、より精密な検討が必要である。

E. 結論

今年度の研究においては、 β_2 アドレナリン受容体遺伝子とCYP1A2遺伝子の多型と、喘息の病態やテオフィリン血中濃度との相関を示唆する知見を得た。次年度は本研究の課題により即した成果を得るべく、健常者において基礎的検討を予定している。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

<論文>

1. Hizawa, N., Yamaguchi, E., Takahashi, D., Nishihira, N., Nishimura, M. Functional Polymorphisms in the Promoter Region of Macrophage Migration Inhibitory Factor and Atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 169:1014-1018 (2004)
2. Jiang, M., Tsukahara, H., Ohshima, Y., Zou, C., Ohta, N., Sato, S., Todoroki, Y., Hiraoka, M., Nambu, M., Tanaka, T., Yamaguchi, E., Kondo, N., Mayumi, M. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism in patients with bronchial asthma.

International Med J 11: 119-123
(2004)

3. 福居嘉信, 山口悦郎, 檜澤伸之, 前田由紀子, 高橋大輔, 今野 哲, 小林基子, 細川 剛, 地主英世, 高村 圭, 南須原康行, 西村正治 アレルギー 53: 565-574 (2004)
4. 山口悦郎 目でみるバイオサイエンス 気管支喘息の遺伝子多型 内科 93:965-967 (2004)
5. 山口悦郎, 周 艶秋 気管支喘息の遺伝素因 現代医学 52:263-269 (2005)

<学会発表>

1. 周 艶秋, 馬場研二, 松井聖子, 丹羽さやか, 松原綾子, 八木健郎, 小野江和之, 服部 努, 吉田和仁, 山口悦郎, 斉藤征夫: 喘息患者における TARC, MDC の意義 日本アレルギー学会総会(第 54 回)(2004 年 11 月 5 日、横浜)
2. Zhou, Y., Yamaguchi, E., Hizawa, N., Nishimura, M. The gene polymorphism of MDC and serum MDC levels. The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology (Oct 6th, 2004, Tokyo)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 なし
2. 実用新案 なし
3. その他 なし

分担課題名：テーラーメイド治療開発のための発症予測データベース作成：アトピー性皮膚炎に関して

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：アトピー性皮膚炎の遺伝子解析には、候補遺伝子の皮膚細胞における発現様式の解析が必須であるが、生検は危険性が高い。そこで、皮膚幹細胞の培養法の確立によりアトピー性皮膚炎患者の組織及び培養皮膚組織モデルを確立するため、本年度はその第一歩として、毛包の bulge 内の幹細胞を取り出し、ケラチノサイト培養法の変法を開発して皮膚培養細胞系の確立をおこなった

研究協力者

山崎暁子、毛暁全

（京都大学大学院医学研究科健康増進行動学）

玉利真由美、松田 彰、中島加珠子

（理化学研究所遺伝子多型センター）

玉置知子、喜多野征夫、笹原祐介

（兵庫医科大学）

成長を維持しており、bulge に存在する細胞が表皮、脂腺、毛包を形成している。bulge 内の幹細胞は生体内で膨大な増殖力を持ち、毛包の形態形成と再生を維持する多分化能幹細胞であると考えられる。そこで健常者のみならずアトピー性皮膚炎患者の毛包からの幹細胞に対して、ケラチノサイト培養法の変法を開発し、の樹立を行い、ケラチノサイト培養皮膚組織モデルを構築した。

C. 結果

毛包幹細胞に由来する表皮基底細胞の基本的な初代培養および継代培養の条件を検討した。その結果、コラーゲン培地を加えたケラチノサイト培養液を利用して、1本の毛包より6回の継代が可能で 2.6×10^7 細胞を得ることができた。この培養法ですでに20歳代以上の健常者、アトピー性皮膚炎患者からの毛髪培養が可能であることが示された。

D. 考察

毛髪より培養された細胞はケラチン5, 14を発現しており、基底膜層に存在するケラチノサイトと同様のパターンを示し、かつCa添加にて分化誘導がかかるので、ケラチノサイト幹細胞と考えられる。

E. 結論

アトピー性皮膚炎有無に関係なくケラチノサイト幹細胞を培養することが可能になった。

A. 研究目的

本研究の目的は、皮膚幹細胞の培養法の確立によりアトピー性皮膚炎患者の組織及び培養皮膚組織モデルを確立し、組織学的、遺伝学的検討を行うことによって、アトピー性皮膚炎における病態(組織の剥落、バリア機能の阻害、サイトカイン等)の制御、そして制御に働く候補遺伝子を明らかにすることである。本年度はその第一歩として、皮膚培養細胞系の確立をおこなうことを目的とした。

B. 研究方法

毛包は、皮膚付属器でありながら、上皮の幹細胞を有する。上皮化過程は、一部の毛包細胞の表皮角化細胞への転換現象と説明することができる。クローン分析により毛包内の幹細胞は bulge と呼ばれる外毛根鞘上部の膨大部に存在する事が解明されている。bulge から毛球に向けて幹細胞が遊走しており、毛の

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1)Tomita Y, Tomida S, Hasegawa Y, Suzuki Y, Shirakawa T, Kobayashi T, Honda H: Artificial neural network approach for selection of susceptible single nucleotide polymorphisms and construction of prediction model on childhood allergic asthma. *BMC Bioinformatics*.2004; 5(1):120.
- (2)Kamada F, Suzuki Y, Shao C, Tamari M, Hasegawa K, Hirota T, Shimizu M, Takahashi N, Mao XQ, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Chiba Y, Aoki Y, Kure S, Tamura G, Shirakawa T, Maysubara Y: Association of the hCLCA1 gene with childhood and adult asthma. *Genes Immun*. 2004; 5(7):540-7.
- (3)Cheng L, Enomoto T, Hirota T, Shimizu M, Takahashi N, Akahoshi M, Matsuda A, Dake Y, Doi S, Enomoto K, Yamasaki A, Fukuda S, Mao XQ, Hopkin JM, Tamari M, Shirakawa T: Polymorphisms in ADAM33 are associated with allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34(8):1192-201.
- (4)Hasegawa K, Tamari M, Shao C, Shimizu M, Takahashi N, Mao XQ, Yamasaki A, Kamada F, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Tamura G, Matsubara Y, Shirakawa T, Suzuki Y: Variations in the C3, C3a receptor, and C5 genes affect susceptibility bronchial asthma. *Hum Genet*.2004.
- (5)Fukuda S, Ishikawa H, Koga Y, Aiba Y, Nakashima K, Cheng L, Shirakawa T: Allergic symptoms and microflora in schoolchildren. *J Adolesc Health*. 2004;35(2):156-8.
- (6)Kiyohara C, Yoshimasu K, Shirakawa T, Hopkin JM: Genetic polymorphisms and environmental risk of lung cancer: a review. *Rev Environ Health*. 2004; 19(1):15-38.
- (7)Hirota T, Obara K, Matsuda A, Akahoshi M, Nakashima K, Hasegawa K, Takahashi N, Shimizu M, Sekiguchi H, Kokubo M, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Kishi F, Suzuki Y, Saito H, Nakamura Y, Shirakawa T, Tamari M: Association between genetic variation in the gene for death-associated protein-3(DAP3) and adult asthma. *J Hum Genet*. 2004; 49(7):370-5.
- (8)Shao C, Suzuki Y, Kamada F, Kanno K, Tamari M, Hasegawa K, Aoki Y, Kure S, Yang X, Endo H, Takayanagi R, Nakazawa C, Morikawa T, Morikawa M, Miyabayashi S, Chiba Y, Karahashi M, Saito S, Tamura G, Shirakawa T, Matsubara Y:Linkage and association of childhood asthma with the chromosome 12 genes. *J. Hum. Genet*. 2004; 49:115-22
- (9)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 probearray. *J.Allergy Clin .Immunol*.2004; 113:528-35.
- (10)Akahoshi M, Ishihara M, Remus N, Uno K, Miyake K, Hirota T, Nakashima K, Matsuda A, Kanda M, Enomoto T, Ohno S, Nakashima H, Casanova JL, Hopkin JM, Tamari M, Mao XQ, Shirakawa T:Association between IFNA genotype and the risk of sarcoidosis. *Hum Genet*. 2004; 114:503-9.
- (11)Peisong G, Mao XQ, Enomoto T, Feng Z, Gloria-Bottini F, Bottini E, Shirakawa T, Sun D, Hopkin JM: An asthma-associated genetic variant of STAT6 predicts low burden of ascaris worm infestation. *Genes Immun*.2004; 5:58-62.
- (12)Shimada T, Cheng L, Enomoto T, Yang X, Miyoshi A, Shirakawa T: Lysed enterococcus faecalis FK-23 oral administration reveals inverse association between tuberculin responses and clinical manifestations in perennial allergic rhinitis: a pilot study. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2004; 14(3):187-92.
- (13)Shimada T, Cheng L, Yamasaki A, Ide M,

Motonaga C, Yasueda H, Enomoto K, Enomoto T, Shirakawa T: Effects of lysed enterococcus faecalis FK-23 on allergen-induced serum antibody responses and active cutaneous anaphylaxis in mice. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34(11): 1784-8.

(14)Chinami M, Yano Y, Yang X, Salahuddin S, Turner H, Shirakawa T, Barford D, Adra CN: Binding of HTm4 to KAP/CDK2/Cyclin A complex enhances the phosphatase activity of KAP, dissociates cyclin A, and facilitates KAP dephosphorylation of CDK2. *J Bio Chem*. 2005; In Press

(15)Akamatsu R, Maeda Y, Hagihara A, Shirakawa T: Interpretations and attitudes toward healthy eating among Japanese workers. *Appetite*. 2005; 44(1):123-9.

2. 学会発表

国際学会

1. Taro Shirakawa: A whole genome SNP search for asthma in the Japanese population. 招待講演, The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology, Tokyo, 2004.10.4-7.
2. Lei Cheng, Tadao Enomoto, Tomomitsu Hirota, Makiko Shimizu, Mitsuteru Akahoshi, Akira Matsuda, Mayumi Tamari, Taro Shirakawa: TLR3 gene is associated with Japanese cedar pollinosis. The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology, Tokyo, 2004.10.4-7.
3. Lei Cheng, Tadao Enomoto, Tomomitsu Hirota, Akiko Yamasaki, Mitsuteru Akahoshi, Akira Matsuda, Mayumi Tamari, Taro Shirakawa: Association of the ADAM33 gene with Japanese cedar pollinosis. The 6th Asia Pacific Congress of Allergology and Clinical Immunology, Tokyo, 2004.10.4-7.
4. Kazuko Nakashima, Shinsuke Kunimura, Mina Tsubouchi, Lei Cheng, Taro Shirakawa: Comprehensive research of allergic disease: mechanism of action from gene and trace elements kinetics. CAARI 2004, University of North Texas, 2004.10.10-15.

国内学会

1. 白川太郎: 子供のアトピー, 基調講演, 第4回日本生理人類学会市民公開シンポジウム, 大阪朝日生命ホール, 1.24.2004.
2. 白川太郎: プロバイオティックスを用いたアレルギー予防の試み, 特別講演, 第8回腸内細菌学会, 東京大学弥生講堂, 6.3-4.2004.
3. 白川太郎: アレルギー・アトピー性疾患の疫学と遺伝子解析, シンポジウム, 第126回日本医学会シンポジウム, 日本医師会館, 6.24.2004.
4. 白川太郎: 遺伝子情報に基づく新しいアレルギー医療, 第21回日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会ランチョンセミナー, 栃木県総合文化センター, 6.20.2004.
5. 玉利真由美, 白川太郎: アレルギー関連遺伝子—本邦の状況, シンポジウム, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
6. 嶋田貴志, 程 雷, 元永知恵, 榎本雅夫, 白川太郎: マウスの系統差研究, シンポジウム, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
7. 程 雷, 榎本雅夫, 山崎暁子, 三好彰, 白川太郎: 疫学と遺伝学からみた hygiene hypothesis, シンポジウム, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
8. 三邊武幸, 三好彰, 程 雷, 殷 敏, 時海波, 白川太郎, 稲川俊太郎, 中山名峰, 稲福繁, 中村晋: アレルゲンの暴露とアレルギー性鼻炎, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
9. 上田哲也, 新実彰男, 松本久子, 竹村昌也, 山口将史, 松岡弘典, 水口正義, 白川太郎, 三嶋理晃: 健常者におけるカプサイシン咳感受性トACE遺伝子多型, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
10. 鎌田文頭, 鈴木洋一, 青木洋子, 誤繁夫, 松原洋一, 長谷川耕一, 玉利真由美, 白川太郎: 補体系 C3, C3AR1, C5 遺伝子の多型は喘息発症リスクに影響する, 第54回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.

- 1 1. 鈴木洋一, 鎌田文顕, Chao Chenchen, 玉利真由美, 白川太郎, 松原洋一: 喘息発症における遺伝子検査ノ有用性の検討, 第 54 回日本アレルギー学会, パシフィコ横浜, 11.4-6.2004.
- 1 2. 三辺武幸, 三好彰, 程 雷, 殷 敏, 時海波, 白川太郎, 稲川俊太郎, 中山明峰, 稲福繁, 中村晋, 松井猛彦: アレルゲンの暴露とアレルギー性鼻炎, 第 41 回日本小児アレルギー学会, 都市センターホテル, 11.27-28.2004.
- 1 3. 鎌田文顕, 鈴木洋一, 青木洋子, 誤繁夫, 松原洋一, 長谷川耕一, 玉利真由美, 白川太郎: 補体系 C3, C3AR1, C5 遺伝子の多型は喘息発症リスクに影響する, 第 41 回日本小児アレルギー学会, 都市センターホテル, 11.27-28.2004.
- 1 4. 白川太郎: 乳酸菌によるアレルギー予防の試み, 特別講演, 日本学術会議・日本乳酸菌学会シンポジウム, 九州大学視聴覚ホール, 12.17.2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 発明の名称: 培養皮膚細胞及びその用途と製造方法
出願番号: K4053H01