

2. 学会発表

- 1) 釣木澤尚実、柳原行義、梶原景一、粒来崇博、西山晃好、豊田信明、森田園子、谷口正実、秋山一男. 家族内発症を呈したChurg-Strauss syndrome の2症例. 第16回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2004.
- 2) 山田一恵、中島陽一、河村牧子、各務美智子、松山温子、徳田玲子、近藤康人、柘植郁哉、宇理須厚雄、木村 守、柳原行義. 加熱脱オボムコイド卵白による経口減感作療法成功例の末梢血単核球からのTh1, Th2サイトカイン産生能の検討. 第16回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2004.
- 3) 柳原行義. IgEの産生調節機構. 第54回日本アレルギー学会総会, 2004.
- 4) 森嶋大貴、梶原景一、品澤美樹、稲葉奈緒美、大路バク、生澤公一、秋山一男、柳原行義. 成熟B細胞におけるRAG発現とその機能解析. 第54回日本アレルギー学会総会, 2004.
- 5) 梶原景一、品澤美樹、森嶋大貴、生澤公一、稲葉奈緒美、大路バク、谷口正実、秋山一男、柳原行義. APRILによるIgEクラススイッチの誘導 (1) 樹状細胞を用いた検討. 第54回日本アレルギー学会総会, 2004.
- 6) 梶原景一、品澤美樹、森嶋大貴、生澤公一、稲葉奈緒美、大路バク、谷口正実、秋山一男、柳原行義. APRILによるIgEクラススイッチの誘導 (2) 可溶性APRILを用いた検討. 第54回日本アレルギー学会総会, 2004.
- 7) 山田一恵、中島陽一、河村牧子、松山温子、各務美智子、徳田玲子、近藤康人、柘植郁哉、宇理須厚雄、木村 守、柳原行義、鳥居新平. 加熱脱オボムコイド卵白を用いた経口減感作療法による末梢血単核球のIL-4・INF- γ 産生能への影響 第41回日本小児アレルギー学会, 2004.
- 8) 田中剛、金地佐知子、有馬和彦、合田千穂、安永晋一郎、生澤公一、柳原行義、久保允人、杉田雄二、出原賢治. IL-4によるB細胞におけるaryl hydrocarbon receptorの誘導 第34回日本免疫学会総

会・学術集会, 2004.

- 9) 柳原行義. 感染とIgE産生. 第13回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会, 2005.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究協力者

梶原景一、森嶋大貴、大路バク、稲葉奈緒美、生澤公一 (国立病院機構相模原病院臨床研究センター)

気管支喘息の難治化機序の解明と予防・治療法の開発に関する研究班
— 難治化に関連する遺伝因子の解析 —

分担研究者：大田 健（帝京大学医学部内科教授）

気管支喘息の難治化に係わる遺伝子多型を解析する目的で気道炎症およびリモデリングに関連する因子としてIL-18およびTGF- β 1のプロモーター領域の遺伝子多型について検討した。IL-18の多型は喘息群と難治性喘息群で有意に健常人に比し多型のアリル頻度が高かった ($p < 0.01$)。TGF- β 1は機能的に気道リモデリングと関連していることが示されているが、多型の頻度は難治性喘息群で逆に低かった。今後、さらに気道リモデリングに関連する因子について検討を進める予定である。

分担研究者：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）

A研究目的 慢性喘息の本態が好酸球性炎症であることが解明され、吸入ステロイドを主とする抗炎症療法が普及しよりよい治療ができるようになってきている。しかし、経口ステロイド薬を常時必要とする重症喘息患者（いわゆる難治性喘息患者）は依然として存在している。これら、難治性喘息の特徴を浮き彫りにし、治療法を見出すことは重要な課題である。前年度のアンケート調査では治療開始早期より難治性喘息に移行する患者群が存在することが明らかになった。そこで、我々は、ステロイド依存性難治性喘息を対象に、気道炎症および気道リモデリングに関与する因子の遺伝子多型について解析を試みた。

B方法 喘息患者（(1)小児喘息持ち越し(2)成人発症喘息 (3)小児喘息寛解 (4)難治性喘息）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、臨床経過（発作歴、治療歴）を検討した。気道リモデリングに関連するTGF- β 1および気道炎症に関連するIL-18のプロモーター領域のSNPsを日立のMassARRAY法で解析した。

C結果および考察

IL-18のプロモーター領域はいくつか報告されている。その中でC-113GはNF- κ Bの結合領域にあり、IgEレベルとの相関がオッズ比3.96で、アレルギー感作との相関がオッズ比4.12で報告されている(Kruse S, et al. J Allergy Clin Immunol. 2003;111:117)。今回検討した結果では、欧米でのホモのSNPの頻度は10%前後あるのに比し、日本人では多型の頻度は数%と低かった。しかし図1に示すように日本人でも同様のSNPsは存在した。さらに、喘息群では健常人に比し有意に変異の頻度が高かった(図1)。

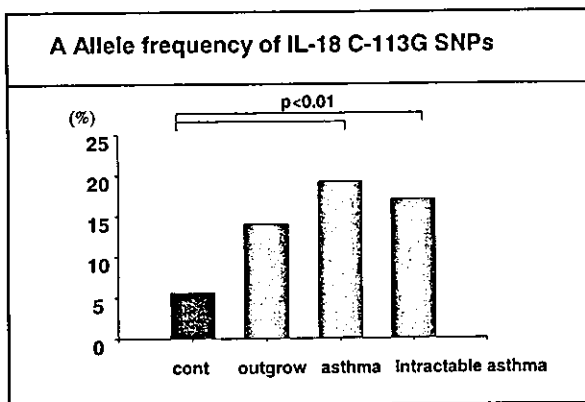
図1

| IL-18 C-113G promoter polymorphisms | | | | |
|-------------------------------------|--------------|--------------|-------------|----|
| | CC | CG | GG | |
| 喘息 | 61 (69.3) | 24 (27.2) | 3* (3.4) | 88 |
| 難治性喘息 | 34 (68) | 15 (30) | 1* (2) | 50 |
| アウトグロー | 53 (74.6) | 16 (22.5) | 2* (2.8) | 71 |
| 健常人 | 70 (88.6) | 9 (11.3) | 0 | 79 |

* p < 0.05

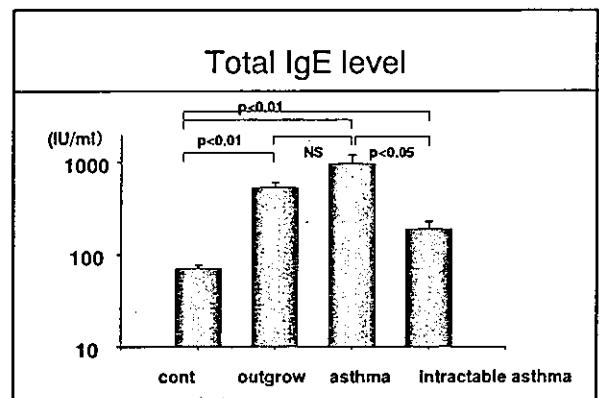
喘息症状が既に寛解したアウトグロー群でもこのSNPsの頻度は高く、寛解後もIgE値高値が続くこととの関連が示唆された。アレル頻度は喘息群および難治性喘息群で健常人と比較して有意にSNPsの頻度が高かった(図2)。

図2



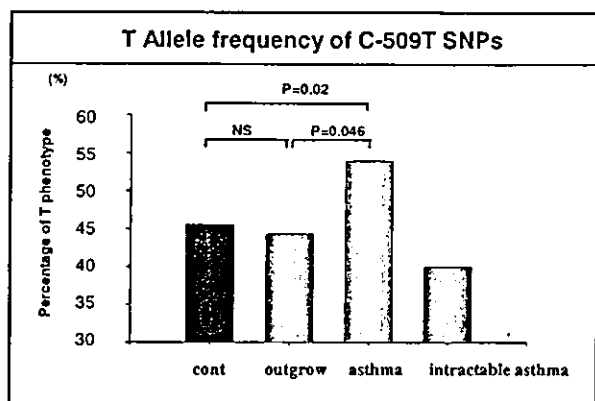
各群のIgEレベルを図3に示す。アウトグロー群および喘息群は健常人と比較して有意にIgEレベルが高かった。難治性喘息では健常人と比較しては有意に低値を示したが、通常の喘息群よりは有意に低値を示した(p < 0.05)。興味深いことに、難治性喘息はIgE値が返って他の喘息群より低い値を示したが、IL-18のSNPsの頻度は高かった。

図3



TGF-β1C-509TのSNPsは既知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)。我々はアトピー型喘息患者で、健常人および小児喘息がアウトグローした人に比し、有意にTアレルの頻度が高く、喘息寛解の予測因子の一つとなりえることを見出した。難治性喘息では、難治化に気道リモデリングの関与が想定されている。そこで今回がTGF-β1C-509Tの変異を検討した。しかし、TGF-β1C-509Tの変異でのTアレルの頻度は低く、健常人と有意差がなかった(図4)。TGF-β1の多型は喘息の難治化の予測因子とはならないことが示された。

図4



E結論

難治性喘息では通常の喘息と比較して、IL-18のプロモーター領域の多型の頻度は高く、TGF- β 1については正常人と同様であった。臨床的には、難治性喘息はこれまでの当班の検討により喘息発症数年でステロイド依存性に陥る群のあることが示されており、難治化する因子として遺伝的な因子も関与している可能性がある。今後さらに気道炎症およびリモデリングに関与した機能的に意味のある遺伝子多型について検討を進める必要がある。

業績

1. 論文発表

1. 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)

2. 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.

3. 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.

4. 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

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、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

気管支喘息症の重症度に関連する好酸球関連蛋白の機能とその遺伝子多型

分担研究者 烏帽子田 彰 広島大学大学院医歯薬総合研究科公衆衛生学教授

研究協力者 中村裕之（高知大学医学部医学科環境医学教授）

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、IL4RAの遺伝子、特に、IL4RAのexon 3と9およびプロモーター領域における多型と、気管支喘息（BA）、花粉症（JCP）、アトピー性皮膚炎（AD）との関係を、伝達不均衡試験（TDT）と相関解析により調べた。その結果、ADとJCPおよびADとJCPの合併をもった子供における5つの多型のTDTの結果から、Ile50のアレルはBonferroniの多重比較調整を行った後もJCPの子供に有意に伝達された。一方、相関解析の結果、Ile50とBAとの関係は、スギ花粉症と同様、有意な関係であったが、プロモーター領域のいかなる領域との関係においても、BAはスギ花粉症同様に有意な相関は認められなかった。以上の結果から、ADとJCPをIL4RAの遺伝子座位からみれば、ADの重症化として、IL4を中心としたTh2系の活性化が重要であると考えられるが、BAの重症化との関係では、Th2系の活性はADほど濃厚ではないと考えられた。

A 研究目的

気管支喘息症(BA)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病態に関して、アトピー性皮膚炎(AD)、スギ花粉症(JCP)と、Interleukin 4受容体 α 鎖(IL4RA)遺伝子の関係の違いに着目する。IL4RA遺伝子のexon 3とexon 9には、アミノ酸の置換を伴う10つの多型が知られており(Di Rienzo & Ober, 2001)、多くの研究者がアレルギー症の感受性遺伝子であると指摘するが(Ober et al., 2000)、異論も多い(Noguchi et al., 1999; Caggana et al., 1999)。本研究では、IL4RA遺伝子がアレルギーの病態の重症化に

関係するとする仮説を導くことを目的とした。

B 研究方法

東京都品川区五反田地区および京都市において以下の分子疫学を実施した。

1) アトピー性皮膚炎とスギ花粉症の分子疫学

75人の子供（15人のAD、30人のJCP、30人のADとJCPの合併）とその両親を対象とし、IL4RAのexon 3と9およびプロモーター領域をシーケンスし、伝達不均衡試験（TDT）、連鎖不均衡解析およびハプロタイプTDTを用い、疾患座位と遺伝子座位の連鎖を検討した。

2) 気管支喘息症とスギ花粉症の分子疫学

247人の患者（24人のBA、207人のJCP、16人のBA

とJCPの合併)と、その対照250人を対象として、同じ遺伝子座位について、相関解析およびハプロタイプ相関解析を実施した。

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

1) アトピー性皮膚炎とスギ花粉症の分子疫学

ADとJCPおよびADとJCPの合併をもった子供における5つの多型のTDTの結果から、Ile50のアレルはBonferroniの多重比較調整を行った後もJCPの子供に有意に伝達された ($p=0.048$) (表1)。また、-3223T/Ile50のハプロタイプがADおよびJCPの子供に有意に伝達した (表2)。

2) 気管支喘息症とスギ花粉症の分子疫学

相関解析の結果、Ile50とBAとの関係は、スギ花粉症と同様、有意な関係であったが、プロモーター領域のいかなる領域との関係においても、BAはスギ花粉症同様に有意な相関は認められなかった。また、ハプロタイプ相関解析の結果からも、-3223T/Ile50とBAとの関係、JCPと同様、Ile50以上のものではなかった。

D 考察

アレルギー疾患が、一部は、アトピー体質によって作られ、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎の表現形は異なっても共通のメカニズムが存在することはよく知られた事実である(Barnes,

2000)。例えば、アトピー性疾患を有する一方の一卵性双生児が、他方の双生児において何らかのアレルギー性疾患を有するとする一致率は、二卵性におけるそれよりはるかに高い(Barnes, 1999)。したがって、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と疾患(表現形)に特異的な遺伝子があることが窺い知れるが、この関係は病態の重症化と関係する可能性もあると考えられる。

アトピー性皮膚炎とスギ花粉症の分子疫学の結果から、Ile50がJCPにおける感受性遺伝子座位であることが確認されるとともに、ADでは、さらに-3223T/Ile50のときに発症するという遺伝子座位間の相互作用の存在が示唆された。IL4RAは、膜貫通型蛋白質であり、細胞外領域にIle50Valが存在している。その上流のC-3223Tの多型はsIL4RAを減少させることが知られている(Hackstein et al., 2001)。したがって、ADでは、細胞外領域を規定するIle50Valの遺伝子が、一方ではpromoter領域の機能亢進により、結果として受容体の機能亢進をもたらし、他方ではsIL4RAの減少を引き起こしていると推測される。この結果、スギ花粉症におけるIL4の活性以上の機能亢進が生じているという病理機序の存在が推察された。この推察は、AD患者はJCPを合併したときには、重症化しやすいこと(Kusunoki et al., 2002)や、犬の花粉症は皮膚炎を引き起こすこと(Sakaguchi et al., 2001)からも支持されると思われる。別の見方をすれば、Ile50を有する人がADを生じるかどうかは、-3223Tの多型を有するかどうかにかかっており、ADはJCPの重症型ともいえる。このような遺伝子座位間の相互作用の結果は、スギ花粉によって感作が生じれば、Ile50だけのときには鼻炎、-3223T/Ile50のときには、皮膚炎と鼻炎を合併するという関係を想定させた。また、ADの予防には環境アレルゲンの早期暴露を回避することが有効であるかもしれない。

気管支喘息症とスギ花粉症の分子疫学の結果か

ら、BAでは、重症化の病態としてのIL4RAの役割は認めがたく、他の病態の探索が必要であると考えられた。

の重症化として、IL4を中心としたTh2系の活性化が重要であると考えられるが、BAの重症化との関係では、Th2系の活性はADほど濃厚ではないと考えられた。

D 結論

ADとJCPをIL4RAの遺伝子座位からみれば、AD

Table 1 Transmission disequilibrium test (TDT) for IL4RA gene polymorphisms in 75 families including children with AD, JCP and combination of AD and JCP

| Allele | AD (15 family) | | JCP (30 family) | | Combination (30 family) | |
|--------|----------------|-----|-----------------|-----|-------------------------|-----|
| | Transmitted | Not | Transmitted | Not | Transmitted | Not |
| -3223T | 9 | 3 | 11 | 6 | 12 | 4 |
| -1914C | 7 | 2 | 11 | 5 | 11 | 3 |
| -890C | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Ile50 | 9 | 3 | 15* | 3* | 8 | 2 |
| Glu375 | 4 | 1 | 6 | 2 | 6 | 2 |

*p = 0.048 when corrected for multiple comparisons by Bonferroni adjustment

Table 2. Haplotype TDT in 45 families of children with AD and 60 with JCP

| Haplotype | Observed/Expected | |
|--------------|-------------------|--------|
| | AD | JCP |
| -3223T/Ile50 | 16/10** | 17/9** |
| -3223T/50Val | 3/6 | 4/7 |
| C-3223/Ile50 | 11/8 | 14/8** |
| C-3223/50Val | 4/6 | 4/6 |

**p < 0.01

G 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura H, Higashikawa F, Miyagawa K, Nobukuni Y, Endo T, Imai T, Ozasa K, Motohashi Y, Matsuzaki I, Sasahara S, Hatta K, Ogino K, Eboshida A.

Association of single nucleotide polymorphisms in the eosinophil peroxidase gene with Japanese cedar pollinosis.

Int Arch Allergy Immunol. 2004 Sep; **135(1)**:40-3

- 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 Nutr Immunol 2004, **14(1)** 25-32

- 3) 中村裕之、荻野景規、長瀬博文、大下喜子、松崎一葉、小川幸恵、烏帽子田彰

喫煙習慣に関連する心理社会的因子の評価と職場の禁煙プログラムの開発

産業医学ジャーナル, 2004, **27 (2)**, 67-71

2. 学会発表

- 1) 中村裕之、秋丸国広、遠藤朝彦、今井透、本橋豊、松崎一葉、笹原信一郎、荻野景規、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰

気管支喘息症の有症率と環境因子の関与についての地域間の相違

第17回日本アレルギー学会春季臨床大会、岡山 (発表予定)

- 2) 中村裕之、秋丸国広、遠藤朝彦、今井透、本橋豊、松崎一葉、笹原信一郎、荻野景規、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰

気管支喘息症における環境因子の関与についての年齢階級別解析

第75回日本衛生学会、新潟 (発表予定)

- 3) 中村裕之、田中武司、秋丸国広、田口徹也、山崎千春、東川史子、信国好俊、宮川清、本橋豊、松崎一葉、笹原信一郎、荻野景規、遠藤朝彦、今井透、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰

アトピー性皮膚炎におけるInterleukin 4受容体 α 鎖遺伝子の遺伝子座位間の相互作用

第4回分子予防環境医学研究会、東京、平成16年12月

- 4) 田中武司、中村裕之、秋丸国広、東川史子、信国好俊、宮川清、遠藤朝彦、今井透、本橋豊、松崎一葉、笹原信一郎、荻野景規、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰

アトピー性皮膚炎およびスギ花粉症におけるIL4RA遺伝子座位間の相互作用

第54回日本アレルギー学会総会、横浜、平成16年11月

- 5) 中村裕之、田中武司、秋丸国広、田口徹也、野村明日香、山崎千春、東川史子、信国好俊、宮川清、本橋豊、松崎一葉、笹原信一郎、荻野景規、遠藤朝彦、今井透、小笹晃太郎、八田耕太郎、烏帽子田彰

IL4RA遺伝子からみたアトピー性皮膚炎とスギ花粉症の病態

第49回日本人類遺伝学会、東京、平成16年10月

- 6) 前島早代、溝渕憲子、新納摩子、宮川貴弘、中村裕之、松崎一葉、笹原信一郎、小笹晃太郎、遠藤朝彦、今井透、八田耕太郎、井手武、本橋豊、福富有馬、烏帽子田彰

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季臨床大会、前橋、
平成16年5月

- 7) 金子善博、本橋豊、中村裕之、烏帽子田彰
スギ花粉症抗体陽性率増加の系統的評価
第74回日本衛生学会、東京、平成16年3月

