

# 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及び悪化に影響する因子の解析に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大田 健

平成17（2005）年4月

# 目 次

I. 総括研究報告	
アレルギ－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	1
大田 健	
II. 分担研究報告	
1. アレルギ－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	6
大田 健 (帝京大学医学部内科教授)	
2. 気道上皮の傷害と修復に関わる遺伝子変異解析研究	9
小林 信之 (国立国際医療センター呼吸器科医長)	
3. アレルギ－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	11
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)	
4. アレルギ－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	15
棟方 充 (福島県立医科大学呼吸器科教授)	
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	18
塩原 哲夫 (杏林大学医学部皮膚科教授)	
6. リモデリングの臨床的評価に関する研究	22
庄司 俊輔 (国立病院機構福岡病院副院長)	
7. ケモカイン・ケモカイン受容体の検討に関する研究	25
山口 正雄 (東京大学大学院医学系研究科アレルギー・リウマチ学助手)	
8. アレルギ－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	29
玉利 真由美 (理化学研究所遺伝子多型研究センター)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	32

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

主任研究者：大田 健（帝京大学医学部内科教授）

気管支喘息およびアトピー性皮膚炎を対象に発症および悪化に影響する因子を解析した。予想どおり1遺伝子多型で発症を規定できる因子は存在しなかった。発症に影響する因子としてMIF、EGFR、TGF- $\beta$ 1、FCER1BとPAI1の組み合わせ、UGRP1、IL-13、IL-18が有望であった。悪化に関連する因子としてはTARC、MDC、TGF- $\beta$ 1、IL-18の関与が示唆された。

分担研究者：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）山口正雄（東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科助手）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（東京大学医学部附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（東京大学医学部附属呼吸器内科助手）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（大阪府立呼吸器アレルギー医療センター小児科部長）山下直美（帝京大学医学部内科助教授）

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疾患である。アレルギーの原因遺伝

子に関する研究は、広く莫大な予算の元になされてきたが、まだ原因遺伝子として広く認められたものは少ない。アレルギー疾患が多因子疾患であることより、その研究をより困難なものとしている。つまりアレルギーの原因遺伝子は特定の部分には存在せず広く分散していることが考えられる。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した。特に特徴的なことは共通の検体を多施設で、多面的な解析を行うことを基本とした点である。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- $\beta$ 、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ことを試みた。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た。

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した。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」に沿い、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二重に匿名化する。

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. 健常人の五群を収集した。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、PAI-1 MIF、IL-17（西村）、サイトカイン（IL-13、IL-18）（大田）ケモカイン（TARC、MDC、I-309）（山口）、クララ細胞分泌関連蛋白UGRP-1、 $\beta$ 2-アドレナリン受容体、MBL（棟方）、TGF- $\beta$ （大田）、MUC1, 2, 4, 5AC, 5B, 7（小林）、TLR4, 5（太田）を遺伝子レベルで検討した。

## 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。個人情報情報は匿名化した形で帝京大学に集積した。アトピー型喘息413例、非アトピー型喘息148例、アトピー性皮膚炎174例、喘息とアトピー性皮膚炎合併例 95例 健常人242例のDNAおよび血漿の収集を終了した。検体の匿名化は個人情報管理者が行った。

アトピーを規定する遺伝因子として高親和性IgE受容体・鎖遺伝子（FCER1B）を、気道リモデリングに影響を与える遺伝因子としてプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター遺伝子（PAI1）を検討した。いずれの多型も単独では気管支喘息との間に有意な関連が認められなかった。しかし、FCER1Bがある特定の遺伝子型を持つ場合にはPAI1遺伝子5G5G型が4G型を有する遺伝子型（4G4G or 4G5G）に比べ有意に喘息発症のリスクが小さかった。抗原特異的なIgE抗体刺激に引き続く肥満細胞からのPAI1産生系において、FCER1BとPAI1遺伝子多型によってもたらされるプラスミン/プラスミンインヒビターの微妙なバランスの変化が、気道

の炎症やリモデリングに影響を与える可能性が推定された。

MBL遺伝子多型はG54Dの多型でDD型が有意に血清MBL値が高かったが、多型の頻度は喘息と健常人と差異がなく、喘息病態とは直接関連しなかった。UGRP1遺伝子には-112G/A多型が認められ、G/G型が63%、G/A型が32%、A/A型が5%程度の頻度であった。喘息と健常人間で遺伝子頻度に差は認めなかった。喘息患者群では、家族歴のない喘息患者群でA/A型が5.1%と家族歴のある喘息患者群(0%)よりも有意に高頻度だった。血清UGRP1は重症喘息で低下が見られることが明らかになった。EGFR遺伝子多型解析では、日本人ではCAリピート数9~24であり、欧米人より多様性に富んでいた。リピート数が2本とも17以上群をLL、少なくとも一本が16以下群をSL+SS群、喘息群ではSL+SS型が42.2%、健常群では34.4%と、喘息群でSL+SS群が有意に多かった( $p < 0.05$ )。

HNF-3B (FOXA2)には、3'非翻訳領域にcommon SNP (rs1055080)が認められ、健常人におけるアリル頻度は、C: 0.80 T: 0.20であったが、アトピー型喘息、非アトピー型喘息、健常人間で頻度差を認めなかった(データ省略)。同領域には、比較的まれな新規SNP T/C見られ、この多型とアトピー性皮膚炎との関連が見られた(表1; Fisher's exact testにより、アリル頻度差は、 $p = 0.0148$ )。

また、MUC5B遺伝子のプロモーター部位の2塩基の挿入欠失変異(rs17235353)のアリル頻度は、Ins: 0.75 Del: 0.25であり、アトピー型喘息と健常人との間に有意差が認められた(表2; アリル頻度差は、 $p = 0.0177$ )。

我々は本年度、気管支喘息におけるCCR4リガンドTARC, MDCのSNPを検討し

た。TARC SNP (-431C>T)で機能的なSNPであることを証明し、このSNPによるTARCの産生制御が病態に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。しかし今までの検討で喘息の重症度との関連が示唆されたものの、今回は喘息患者やアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患群と健常コントロールの間では、有意なものは存在しなかった。MDC SNPも同様に、アレルギー疾患と健常コントロールの間には有意差は認められなかった。

TGF- $\beta$ のSNPは既にプロモーター活性と関連しホモの変異型は有意に血漿中のTGF- $\beta$ レベルが高いことが欧米で報告されている。さらに我々の検討で、日本人において欧米人と同様にTGF- $\beta$ のプロモーター領域のSNPが存在することが明らかとなった。さらにこの変異を群間で検討したところ、アトピー型喘息で健常人に比し有意にホモの変異型が多かった。さらに軽症喘息患者と中等症喘息患者でSNP発現頻度に有意差があり、喘息の重症度と相関していることが示唆された。一方喘息とうフェノタイプでも非アトピー型喘息ではSNPの頻度が低かった。以前このSNPはIgE値と相関していることが報告されているが、アトピー性皮膚炎ではSNPの頻度が正常人と差異がなく、IgEだけとの関連ではなく、アトピー型喘息とリンクしていることが示唆された。アトピー疾患の病態のさまざまな発症機序を網羅し、喘息とアトピー性皮膚炎の差異を浮き彫りにするため、炎症性サイトカインとして病態形成に促進面で働くIL-13および抑制面で働くIL-18も解析対象として加えた。IL-13については Arimaらがすでにアミノ酸変異を伴い機能的なSNPとして報告しているArg110Glnを対象とした。(J Allergy Clin Immunol. 2002 ;109:980-7). IL-18もプロモー

ター領域でIgEやアレルゲン感作との関連が報告されているC-113G (J Allergy Clin Immunol. 2003 ;111:117) を解析した。IL-13はアトピー促進に働き、IL-18はアトピーの促進と重症度に関連することが明らかになった。

## E. 結論

アレルギー性疾患の発症または悪化に関連する因子について多型の解析を行った。遺伝子多型と機能が結びついている遺伝子としてMBL、IL-13、TARC、TGF- $\beta$  1の多型をターゲットとした。予想どおり1遺伝子多型で発症を規定できる因子は存在しなかった。発症に影響する因子としてMIF、EGFR、TGF- $\beta$  1、FCER1BとPAI1の組み合わせ、UGRP1、IL-13、IL-18が有望であった。悪化に関連する因子としてはTARC、MDC、TGF- $\beta$  1、IL-18の関与が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 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 25<sup>th</sup> 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CCL2

(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

#### 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

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

主任研究者：大田 健（帝京大学医学部内科教授）

アトピー性疾患の発症および悪化に関連する遺伝子多型を解析する目的として、喘息およびアトピー性皮膚炎を対象に解析した。TGF- $\beta$  1のプロモーター領域の遺伝子多型はアトピー型喘息の発症に関連するとともに、寛解を規定する因子として有望であった。さらに既に報告されているIL-13およびIL-18の遺伝子多型を解析し、今回の研究班で収集したサンプルでアトピー促進および重症度と関連するという知見を得た。今後さらに被験者のフォローアップにより、重要な知見が得られると期待できる。

分担研究者：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講師）中島幹夫（帝京大学医学部内科助手）長瀬洋之（帝京大学医学部内科助手）中野純一（帝京大学医学部内科講師）、木原令夫（木原病院院長）冲山智子（東京大学保健センター）上原誉志夫（東京大学保健センター助教授）

#### 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した。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- $\beta$ 、IGF-Iが機能的に関与していることを我々は示してきた。さらに気道炎症に関連する

IL-13およびIL-18についても既に喘息やアトピー体質との関連が報告されている因子について解析を進めた。今回これらの因子の遺伝子多型を病態別に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

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、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二重に匿名化する。

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. 健常人の五群を収集した。検体はEDTA採血し、血漿および、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病歴、治療歴、検査所見を統一したフォーマットに入力した。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。遺伝子多型は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。

### 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。個人情報匿名化した形で帝京大学にて集積した。アトピー型喘息413例、非アトピー型喘息148例、アトピー性皮膚炎174例、喘息とアトピー性皮膚炎の合併例95例 健康人242例のDNAおよび血漿の収集を終了した。

TGF- $\beta$ のSNPは既にプロモーター活性と関連しホモの変異型は有意に血漿中のTGF- $\beta$ レベルがたかいことが欧米で報告されている。さらに我々の検討で、日本人において欧米人と同様にTGF- $\beta$ のプロモーター領域のSNPが存在することが明らかとなった。さらにこの変異を5群間で検討したところ、アトピー型喘息で健康人に比し有意にホモの変異型が多かった。さらに軽症喘息患者と中等症喘息患者でSNP発現頻度に有意差があり、喘息の重症度と相関していることが示唆された。一方喘息というフェノタイプでも非アトピー型喘息ではSNPの頻度が低かった。以前このSNPはIgE値と相関していることが報告されているが、アトピー性皮膚炎ではSNPの頻度が正常人と差異がなく、IgEだけとの関連ではなく、アトピー型喘息とリンクしていることが示唆された。

アトピー疾患の病態のさまざまな発症機序を網羅し、喘息とアトピー性皮膚炎の差異を浮き彫りにするため、炎症性サイトカインとして病態形成に促進面

で働くIL-13および抑制面で働くIL-18も解析対象として加えた。IL-13については Arimaらがすでにアミノ酸変異を伴い機能的なSNPとして報告しているArg110Glnを対象とした。(J Allergy Clin Immunol. 2002 ;109:980-7)。IL-18もプロモーター領域でIgEやアレルギー感作との関連が報告されているC-113G (J Allergy Clin Immunol. 2003 ;111:117)を解析した。IL-13はアトピー促進に働き、IL-18はアトピーの促進と重症度に関連することが明らかになった。

### E. 結論

アトピー性疾患の発症および悪化に関連する遺伝子多型を解析する目的として、喘息およびアトピー性皮膚炎を対象に解析した。TGF- $\beta$  1のプロモーター領域の遺伝子多型はアトピー型喘息の発症に関連するとともに、寛解を規定する因子として有望であった。さらに既に報告されているIL-13およびIL-18の遺伝子多型を解析し、今回の研究班で収集したサンプルでアトピー促進および重症度と関連するという知見を得た。今後さらに被験者のフォローアップにより、重要な知見が得られると期待できる。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 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 25<sup>th</sup> 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  
ローチー、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  
川真穂、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 CCL2

(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

## 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

### 気道上皮の傷害と修復に関わる遺伝子変異解析研究

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

気管支喘息における気道炎症は、気道上皮の傷害と修復、炎症性パラメーターの放出を伴うため、気道上皮細胞特異的に発現する遺伝子群や、それらにより制御されるエフェクター分子が、病態に密接に関係するものと推測される。我々は、候補遺伝子となる HNF-3B と MUC5B について、症例、対照研究を行った。HNF-3B (FOXA2) には、3'非翻訳領域に common SNP (rs1055080) が認められ、健常人におけるアリル頻度は、C: 0.80 T: 0.20 であった。アトピー型喘息、非アトピー型喘息、健常人間で有意差を認めなかった。さらに我々は、MUC5B 遺伝子の転写開始点より、-657 bp 上流に 2 塩基の挿入欠失変異を同定 (rs17235353 にて登録) し、この変異の機能的意義をすでに報告した。このアリル頻度は、Ins: 0.75 Del: 0.25 であり、喘息との関連を示した。さらに HNF-3B の近傍の新規遺伝子変異の頻度の偏りも見られた。気道上皮の発生・分化に関わる転写因子は、GC-rich で、これまで遺伝子変異については十分に解析されていなかったが、我々の検討により、多くの新規遺伝子多型が同定された。その結果、気道過分泌に関連すると推定される変異と喘息との弱い関連が示された。

#### A. 研究目的

気管支喘息における気道炎症は、気道上皮の傷害と修復、炎症性パラメーターの放出を伴うため、気道上皮細胞特異的に発現する遺伝子群や、それらにより制御されるエフェクター分子が、病態に密接に関係するものと推測される。これまで我々が日本人集団において遺伝子変異を同定してきた 6 種の転写因子と 4 種のムチン遺伝子のうち、HNF-3B については、Cincinnati の Jeffrey Whitsett らのグループが、FOXA2 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスでは、ムチン過分泌状態がみられることを (Wan H et al., Development 131: 953, 2004)、また我々のグループは、MUC5B のプロモーター挿入・欠失変異が MUC5B の発現量を調節することをすでに報告した (Kamio K et al., AJRCCM in press)。そこで、これらを候補遺伝子として、症例、対照研究を行った。

#### B. 方法

転写因子 TTF-1, HNF-3A, HNF-3B, HFH-4, HFH-8, GATA6 および 気道関連ムチンである MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B の塩基配列を直接比較することにより、同定した遺伝子変異の中から、本年度は、前述の理由により、特に HNF-3B と MUC5B の遺伝子変異に注目して、関連解析を行った。

#### (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

HNF-3B (FOXA2) には、3'非翻訳領域に common SNP (rs1055080) が認められ、健常人におけるアリル頻度は、C: 0.80 T: 0.20 であったが、アトピー型喘息、非アトピー型喘息、健常人間で頻度差を認めなかった (データ省略)。同領域には、比較的まれな新規 SNP T/C 見られ、この多型とアトピー性皮膚炎との関連が見られた (表 1; Fisher's exact test により、アリル頻度差は、 $p = 0.0148$ )。

また、MUC5B 遺伝子のプロモーター部位の 2 塩基の挿入欠失変異 (rs17235353) のアリル頻度は、Ins: 0.75 Del: 0.25 であり、アトピー型喘息と健常人との間に有意差が認められた (表 2; アリル頻度差は、 $p = 0.0177$ )。

#### D. 考察

HNF3B も MUC5B も気管支喘息の気道過分泌との関連で候補遺伝子として検討したが、HNF3B の遺伝子多型のひとつが、気道過分泌と無関係のアトピー性皮膚炎と関連を示したのは、多重比較による偽陽性である可能性も考えられる。一方、MUC5B については、アトピー性喘息と関連し、非アトピー性喘息と関連が見られなかったが、この理由は、単に非アトピー性喘息の症例数が少ないことによる偽陰性かもしれない。喘息全体で解析しても、健常と喘息集団の遺伝子型の分布の違いは統計学的に有意であった (データ省略)。この遺伝子多型は、喘息以外の慢性気道炎症性疾患でも関連を示し、気道過分泌全般に関連する遺伝子変異である可能性が考えられた。

表 1

HNF3B new

(T/C)

## 1. genotype

区分		typing数	T/T	T/C	C/C
I	(アトピー型喘息)	411	398(96.8%)	13(3.2%)	0(0.0%)
II	(非アトピー型喘息)	146	142(97.3%)	3(2.1%)	1(0.7%)
III	(喘息+アトピー性皮膚炎)	74	72(97.3%)	2(2.7%)	0(0.0%)
IV	(アトピー性皮膚炎)	115	109(94.8%)	6(5.2%)	0(0.0%)
V	(健常人)	247	245(99.1%)	2(0.8%)	0(0.0%)

表 2

MUC5B

(CA)

## 1. genotype

区分		typing数	I/I	I/D	D/D	
I	(アトピー型喘息)	410	272(66.3%)	21(29.5%)	17(4.1%)	p=0.0231
II	(非アトピー型喘息)	145	90(62.1%)	47(32.4%)	8(5.5%)	p=0.4037
III	(喘息+アトピー性皮膚炎)	74	45(60.8%)	27(36.5%)	2(2.7%)	p=0.1442
IV	(アトピー性皮膚炎)	115	72(62.6%)	37(32.2%)	6(5.2%)	p=0.4124
V	(健常人)	248	150(60.5%)	75(30.2%)	23(9.3%)	

## E. 結論

気道過分泌に関連する変異と喘息との関連が示された。さらに、気道上皮の発生・分化に関わる転写因子には多くの多型が同定された。これらの転写因子は、気道上皮の傷害と修復に関わることが予想され、喘息等の気道リモデリングについて考える上で、重要な要素と思われる。

single-strand conformation polymorphism and their statistical estimation. *Genomics* 84 (3): 613-22, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

## 論文発表

Kamio K, Matsushita I, Hijikata M, Tanaka G, Nakata K, Ishida T, Tokunaga K, Kobashi Y, Taguchi Y, Homma S, Nakata K, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. Promoter analysis and aberrant expression of MUC5B gene in diffuse panbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*, in press.

Kamio K, Matsushita I, Tanaka G, Ohashi J, Hijikata M, Nakata K, Tokunaga K, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. Direct determination of MUC5B promoter haplotypes based on the method of

厚生労働省科学研究費補助金（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

分担研究者名 西村正治（北海道大学）、檜澤伸之（北海道大学）

#### 研究要旨

気管支喘息は複数の遺伝因子と環境因子との複雑な交互作用の結果として発症してくる。喘息病態の遺伝的背景には、種々のアレルゲンに対して特異的な IgE 反応を起こし易いこと（アトピー）、気道傷害に対する組織の易感受性、さらには傷害に対する修復反応の異常（気道リモデリング）などが挙げられる。本研究ではアトピーを規定する遺伝因子として高親和性 IgE 受容体・鎖遺伝子（FCER1B）を、気道リモデリングに影響を与える遺伝因子としてプラスミノージェンアクチベーターインヒビター遺伝子（PAI1）を検討した。特に両遺伝子の交互作用の有無に注目して、これらの遺伝因子が気管支喘息の発症に与える影響について検討した。気管支喘息患者（374 名）、健常人（374 名）を対象として施行した症例対照研究にて、いずれの多型も単独では気管支喘息との間に有意な関連が認められなかった。しかし、FCER1B がある特定の遺伝子型を持つ場合には PAI1 遺伝子 5G5G 型が 4G 型を有する遺伝子型（4G4G or 4G5G）に比べ有意に喘息発症のリスクが小さかった。抗原特異的な IgE 抗体刺激に引き続く肥満細胞からの PAI1 産生系において、FCER1B と PAI1 遺伝子多型によってもたらされるプラスミン/プラスミンインヒビターの微妙なバランスの変化が、気道の炎症やリモデリングに影響を与える可能性が推定された。喘息病態において肥満細胞は、いわゆるアトピーと気道のリモデリングとを結ぶ重要な役割を果たしている可能性がある。

#### A. 研究目的

気管支喘息の発症は単一の遺伝子異常によって規定されるものではなく、複数の遺伝子の交互作用と、さらには環境因子の影響を強く受け、それらの結果として発症してくる。気管支喘息の病態は複雑であるが、その背景には種々のアレルゲンに対して特異的な IgE 抗体を産生しやすい免疫学的な特異性（アトピー）と、その結果として起こってくる気道の炎症に対する気道組織の易感受性や修復過程の異常（気道リモデリング）の存在が考

えられる。これらの病態が交互に影響を与えることで慢性喘息の病態が形成される。本研究ではアトピーに関与する遺伝因子として高親和性 IgE 受容体・鎖（FCER1B）遺伝子、気道リモデリングに影響を与える遺伝因子としてプラスミノージェンアクチベーターインヒビター（PAI1）遺伝子に着目した。高親和性 IgE 受容体（FCER）は肥満細胞や好塩基球に発現し IgE 依存的な即時型および遅発型の免疫反応や喘息気道におけるアレルギー性炎症において重要な役割を果たして

いる。FCER1B 遺伝子は染色体 11q13 領域に存在し、これまでに多くの施設の検討で同遺伝子と種々のアトピー形質との間に遺伝的な関連が報告されている。我々は FCER1B 遺伝子のプロモーター領域に一塩基多型 (-109C/T SNP) を同定し、同部位の多型が喘息患者における血清総 IgE 値に遺伝的な影響を与えることを報告した。

一方、プラスミノゲン/プラスミノゲンインヒビターのバランスが組織のリモデリングにおいて重要な役割を果たすことが知られている。特に PAI1 は IgE/IgE 受容体の刺激を受けて肥満細胞から大量に産生される。また PAI1 遺伝子プロモーター領域には PAI1 遺伝子の転写に影響を与える多型 (4G/5G) が存在する。4G 型は 5G 型に比べて転写活性が高く、既に複数の施設からこの 4G 多型が喘息発症と遺伝的に関連することが報告されている。本研究ではこれらの遺伝子多型が日本人集団において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、特にこれらの遺伝子間相互作用にも着目し検討する。

## B. 研究方法

### (1) 対象

374 名の喘息患者と 374 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 抗体が陽性の場合にアトピーありと判定した。

### (2) 遺伝子タイピング

FCER1B-109T/C 多型及び PAI14G5G 多型について、それぞれの対立遺伝子に特異的な 4 種類の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それぞれの多型について野生型ホモ、変異型ホモ、ヘテロ型の遺伝子型を決定した。

### (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。交互作用については両者の遺伝子型によって 4 つの組み合わせ ([1] FCER1B TT + PAI1 4G4G or 4G5G, [2] FCER1B TT + PAI1 5G5G, [3] FCER1B CT or CC + PAI1 4G4G or 4G5G, [4] FCER1B CT or CC + PAI1 5G5G) に分類し、それぞれの群における喘息発症のリスクを検討した。さらに多変量解析にて両遺伝子の交互作用を組み込んだモデルを用いた検討も行った。

### (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

喘息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。それぞれの遺伝子は単独では喘息発症に有意な遺伝的影響を与えていなかった (FCER1B;  $\chi^2=1.37$ ,  $p=0.5$ , PAI1;  $\chi^2=1.14$ ,  $p=0.56$ )。一方、FCER1B 遺伝子多型は喘息患者の血清総 IgE 値に有意な影響を与えていた ( $p=0.0018$ )。さらに両遺伝子多型の組み合わせによる 4 群間での比較では FCER1B 遺伝子が TT 型の集団において PAI1 遺伝子が 5G5G 型は 4G4G or 4G5G 型に比べて有意に喘息発症のリスクが小さかった (OR=0.29,  $p=0.0020$ )。このような PAI1 遺伝子 5G5G 型の遺伝的影響は FCER1B 遺伝子が CT or CC 型の集団では認められなかった (OR=1.14,  $p=0.67$ )。両遺伝子の交互作用を組み込んだ回帰モデルによる検討でも両遺伝子間に有意な交互作用の存在が示唆された ( $p=0.00660$ )。

### D. 考察

我々の今回の結果からは、喘息気道におけるアレルギー性炎症において、抗原特異的な IgE の刺激によって肥満細胞から産生される PAI1 が、今回検討した FCER1B や PAI1 の遺伝子多型に影響を受

けることで、結果として気道炎症や気道リモデリングの程度に影響を与えることが推察された。PAI1 4G/5G 多型は白人系の集団では単独で喘息と関連することが報告されている。一方、我々の検討した集団では PAI1 単独では喘息発症に遺伝的な影響を認めなかった。検討する集団で遺伝子の影響が違うのは、今回認められたように、ある遺伝子の影響が他の遺伝因子の影響を受けて発現していることが一つの要因と考えられた。

### E. 結論

今回の検討では FCER1B 遺伝子と PAI1 遺伝子との交互作用が喘息発症に及ぼす遺伝的影響が示された。特異的 IgE 抗体刺激によって肥満細胞から PAI1 産生がもたらされる pathway が喘息病態において重要な役割を有し、特に肥満細胞がアトピー素因と気道のリモデリングの両者を結ぶ重要な働きを有している可能性がある。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

[1] 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 May 1;169(9):1014-8.

#### 2. 学会発表

[1] 檜澤伸之

喘息治療における遺伝子多型情報の臨床  
応用の可能性について

(2004年4月 札幌呼吸器講演会)

[3] 檜澤伸之

アレルギーの臨床におけるゲノム解析の  
意義

(2004年5月 日本アレルギー学会春季  
臨床大会、シンポジウム ゲノム解析の  
臨床応用)

[4] N Hizawa

Molecular Genetic Mechanism of Asthma  
WORKSHOP 16: Current Understanding &  
Therapy of Asthma

(2004年7月 The Society of Chinese  
Bioscientists in America International  
Symposium 2004)

#### 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 |



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

我々は、アレルギー疾患の発症及び悪化に影響する因子を解析するため、自然免疫関連蛋白、肺特異的蛋白、リモデリング関連蛋白に関する遺伝子解析を主体とする研究を計画した。本年度は各施設から集積された検体を用いて、①自然免疫関連分子として Mannose Binding Lectin (MBL)、②肺特異的蛋白として Uteroglogin Related Protein 1 (UGRP1)、③リモデリング関連蛋白として Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)、の3つの遺伝子について多型解析等を行い、喘息発症ならびに病態との関連を検討した。その結果、①MBL 遺伝子多型は血清 MBL 値を規定しているが、喘息病態とは直接関連しないこと、②UGRP1 遺伝子多型は家族歴の有ある喘息と無い喘息でその分布がことなること、血清 UGRP1 は重症喘息で低下が見られること、③EGFR 遺伝子多型は喘息発症や血清 IgE 値と関連すること、などが明らかになった。

#### A. 研究目的

アレルギー疾患の発症及び悪化には多数の因子が関与すると推定されるが、我々は、自然免疫関連蛋白、肺特異的蛋白、リモデリング関連蛋白に注目し、遺伝子解析ならびに血清蛋白定量などを主体とする研究を計画した。本年度は、①自然免疫関連分子である mannose binding protein (MBL)の遺伝子解析と血清蛋白量、②抗炎症作用を持つ気道特異的蛋白である Uteroglobin Related Protein 1 (UGRP1)の遺伝子解析と血清蛋白量、③気道リモデリング形成に重要な関与をする Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)遺伝子、についての検討を行った。

#### B. 方法

対象は気管支喘息患者 656 名、アトピー性皮膚炎 212 名、アウトグロウ小児喘息 18 名、健常対象 248 名の計 1134 名である。

##### ①MBL 遺伝子解析と血清蛋白定量：

MBL 遺伝子には複数の多型が存在するが、日本人では G54D 多型のみが知られ、血清 MBL 値に影響する。今回、遺伝子型は PCR-RFLP 法により、血清 MBL 値は ELISA 法により、検討した。遺伝子型と血清 MBL 値の関連、遺伝子型と喘息病態との関連などを解析した。

##### ②UGRP1 の遺伝子解析と血清蛋白定量：

UGRP1 遺伝子にはプロモーター領域に G-112A 多型が存在し、遺伝子発現量に影響を与えることが知られている。今回は、遺伝子型は PCR-RFLP 法により、血清蛋白量は

我々の開発した単クローン抗体を用いた ELISA 法により検討した。遺伝子型と血清蛋白量の関連、遺伝子型と喘息病態との関連などを検討した。

### ③EGFR 遺伝子：

EGFR 遺伝子には第一イントロンに CA リピート多型が存在し、CA リピート数により EGFR 発現に差が認められる。特に、CA リピートが 17 以上では遺伝子転写活性が低下すると報告されている。今回はこの CA リピート多型 ABI310 を用いた Fragment Analysis により検討し、喘息病態との関連性を検討した。

## C. 結果

### ①MBL 遺伝子解析と血清蛋白定量：

MBL 遺伝子と血清 MBL 値との関連では、G/G 型では血清 MBL 値は  $2277.1 \pm 63.7$  (SE) ng/ml, G/D 型では  $355.4 \pm 25.2$  ng/ml, D/D 型では  $9.4 \pm 7.5$  ng/ml と G54D 遺伝子型により完全に制御されていた。遺伝子型と喘息発症や病態に明らかな関連は認められなかった。

### ②UGRP1 の遺伝子解析と血清蛋白定量：

UGRP1 遺伝子には -112G/A 多型が認められ、G/G 型が 63%, G/A 型が 32%, A/A 型が 5% 程度の頻度であった。喘息と健常者間で遺伝子頻度に差は認めなかった。喘息患者群では、家族歴のない喘息患者群で A/A 型が 5.1% と家族歴のある喘息患者群 (0%) よりも有意に高頻度だった。血清 UGRP1 値の解析では、遺伝子型との関連では、A-allele を持つ者では血清 UGRP1 値が有意に低値であり、*in vitro* での結果と一致していた。また、喘息群と健常者群の比較では有意な差は認められなかった。喘息重症度を JGL

分類により分類したところ、血清 UGRP1 値は重症群で他群より有意に低値であり、これは健常者よりも有意に低値であった。

### ③EGFR 遺伝子：

EGFR 遺伝子多型解析では、日本人では CA リピート数 9~24 であり、欧米人より多様性に富んでいた。リピート数が 2 本とも 17 以上群を LL、少なくとも一本が 16 以下群を SL+SS 群。喘息群では SL+SS 型が 42.2%、健常群では 34.4% と、喘息群で SL+SS 群が有意に多かった ( $p < 0.05$ )。

## D. 考察

MBL は自然免疫関連蛋白であり、その血清値は遺伝子型に依存していた。血清 MBL 低値群では、結核などの感染症への感受性が高まることが知られており、Hygiene Hypothesis の観点からも喘息病態との関連性に興味もたれていた。しかし、今回の解析により、MBL 遺伝子型ならびに血清 MBL 値は喘息病態とは明瞭な関連性は有していなかった。

UGRP1 は、肺サーファクタント蛋白やクララ細胞分泌蛋白 (CC10) などの発現を調節している転写因子 TTF1 の下流蛋白である。肺に特異的に発現し、マウス喘息モデルでは気道においてその発現が減少しており、ステロイド投与により回復することが知られている。今回の検討では、遺伝子型については健常者と喘息患者間に差は認めなかったが、血清 UGRP1 値は重症喘息患者で低下しており、喘息重症化と関連している可能性が示唆された。

我々は既に、気管支喘息患者気道で EGF 受容体 (EGFR) の発現が増強していることを報告し (Amishima M, et al. AJRCCM, 1995)、

気道リモデリングとの関連性が推測されている。一方、遺伝子 CA リピート多型は遺伝子発現に影響を及ぼし、CA リピートが 16 回以下ではそれ以上のものより EGFR 発現が強いと考えられる。今回の解析では、喘息患者群で CA リピート 16 回以下を持つものが有意に多かった。したがって、喘息患者では EGFR 発現が増強し易い可能性がある。喘息の基本病態が慢性アレルギー性気道炎症であることを考えると、炎症に伴う EGFR 発現増強は、気道上皮の増殖や平滑筋増生などと関連する可能性が高く、非常に興味深い結果と考えられる。

#### E. 結論

MBL は G54/D 遺伝子多型によりその血清レベルが規定されているが、喘息病態との関連は明確でない。UGRP1 は G-112A 遺伝子多型によりその血清レベルが影響を受け、喘息重症度と関連している可能性がある。EGFR 遺伝子第一イントロン CA リピート数は EGFR 発現に影響を与え、喘息発症と関連している可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 発表論文

- 1) Saito J, et al., Exhaled nitric oxide as a marker of airway inflammation for an epidemiologic study in school children. *J Allergy Clin Immunol* 114:512-6, 2004.
- 2) Inoue K, et al., A kendo player with haemoptysis. *Lancet* 364:814, 2004.
- 3) Takahashi K, et al., Diagnostic

usefulness of broncho- alveolar lavage in Hermansky-Pudlak syndrome: A case with double lung cancers. *Int Med* 43:972-6, 2004.

##### 2. 学会発表

- 1) Watanabe K, et al., Environmental tobacco smoke (ETS) exposure and male gender are risk factors for atopy in school children. Annual Meeting of European Respiratory Society Scotland, 2004.
  - 2) Munakata M, et al., Development of new method for off-line measurement of exhaled NO (FENO) compatible to on-line method. Annual Meeting of European Respiratory Society, Scotland, 2004.
  - 3) Saito J, et al., Dose serum mannose binding lectin (MBL) influence allergic disorders? Annual Meeting of European Respiratory Society, Scotland, 2004.
  - 4) Saito J, et al., Exhaled nitric oxide (eNO) for an epidemiological study in school children. Asian Pacific Congress for Allergy and Clinical Immunology, 2004. 10, Tokyo, Japan.
  - 5) Inoue K, et al., Clinical significance of sputum eosinophilia in patients with chronic cough and airway hyper- responsiveness. Asian Pacific Congress for Allergy and Clinical Immunology, 2004. 10, Tokyo, Japan.
- #### H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

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)患者における自然免疫担当細胞(NK、 $\gamma\delta$ T細胞)からのサイトカイン(IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )産生の低下の機序としてはアポトーシスの誘導が主体であり、単球からのIL-10産生は重要な役割を果たしていないことが明らかになった。

Bufexamacによる自然免疫担当細胞からのIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 産生の抑制はannexin V bindingの増加を伴わず、apoptosisの誘導は関与していないと考えられた。このような作用はbufexamac、indomethacinだけでなく、COX-1、-2抑制活性を持たないacetaminophenにも認められたが、aspirinやmeloxicamでは認められなかった。

**A. 研究目的**

アトピー性皮膚炎(AD)における獲得免疫反応のTh2反応への偏位と、細菌やウイルスに対する易感染性をもたらす機序として、自然免疫の低下の可能性を明らかにするとともに、どのような因子がその低下に関与しているかを明らかにしようと考えた。これまでの研究においてAD患者では自然免疫担当細胞の数的・機能的な低下を認め、その低下には単球からの何らかの因子が関与することを明らかにしている。今年度の研究では低下をもたらす因子のさらなる解明を目指すとともに、NSAIDsがどのような機序により自然免疫能の低下をもたらすかについても明らかにしようと考えた。

**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- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4)を、陽性細胞頻度及びその発現レベル(MFI)を尺度にして、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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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. 自然免疫担当細胞からのサイトカイン産生の抑制における単球からのIL-10の関与を明らかにするため、上記サイトカイン産生系に抗IL-10R抗体を添加し、単球除去の効果と同様の増強効果が得られるかの検討を行った。
5. NSAIDsのサイトカイン産生に対する作用をみるため、bufexamac (0.1-50ug/ml)、indomethacin (0.1-50ug/ml)、aspirin (0.1-50ug/ml)、meloxicam (2-100ug/ml)、acetaminophen (1-10ug/ml)を各々上記