

サイトカイン産生系に加え、2, 4, 6 時間後に回収し、回収された PBMC 中の各分画に発現してくるサイトカイン (TNF- α , IFN- γ , IL-4) をフローサイトメトリーにて測定する。

6. 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。

C. 研究成果

1. 本年度はさらに患者数を増やし検討を行ったが、AD 患者では NK、 $\gamma\delta$ T 細胞からの IFN- γ , TNF- α 産生は培養時間が 2-4, 4-6 時間と長くなるにつれて、コントロールと比べ低値となった。それには活性化された単球 $\gamma\delta$ 存在下で、AD 患者自然免疫担当細胞 (NK、T 細胞) に選択的に誘導されたアポトーシスが関与していることが Annexin V binding により確認された。このような自然免疫担当細胞に特異的なアポトーシスの誘導は正常人では認められず、AD 患者にのみ認められることが確認された。
2. 培養時間の経過とともに、AD 患者 PBMC 中の NK、 $\gamma\delta$ T 細胞特異的に TNF- α , IFN- γ 産生の抑制が起こる原因として単球からの IL-10 が関与する可能性を明らかにするため、抗 IL-10R 抗体添加の影響を検討した。結果は、抗 IL-10 抗体により AD 患者 NK、 $\gamma\delta$ T 細胞からの IFN- γ 産生はある程度回復したものの、TNF- α 産生は全く回復せず単球除去による効果とは全く異なった結果となった。
3. 様々な NSAIDs を正常人 PBMC に添加し、そのサイトカイン産生に及ぼす影響について検討したが、bufexamac が最も強力に NK、 $\gamma\delta$ T 細胞からの TNF- α , IFN- γ 産生を著明に抑制した。Indomethacin は $\gamma\delta$ T 細胞からの TNF- α , IFN- γ は抑制したが、NK 細胞に対しては全く影響を与えなかった。

それに対して COX-1, -2 抑制活性を殆ど持たない acetaminophen も NK、 $\gamma\delta$ T 細胞からの IFN- γ 産生は抑制するものの、TNF- α 産生には全く影響を与えなかった。一方、aspirin や COX-2 選択的阻害剤である meloxicam は殆ど抑制効果を示さなかった。

4. Bufexamac による自然免疫担当細胞からのサイトカイン産生の抑制は、annexin V binding の増加を伴わないことから、アポトーシスの誘導は関与しないと考えられた。

D. 考察

NSAIDs が自然免疫担当細胞特異的に TNF- α , IFN- γ 産生を抑制することが示されたが、COX-1, -2 阻害作用を殆ど持たない acetaminophen においても確認されたこと、COX-1, -2 阻害に関係なく、様々な抑制パターンを示すことなどから、COX 阻害に関係ない機序によりもたらされたものと考えられた。しかもこれらの NSAIDs により annexin V binding の増強がみられなかったことから、単球を介したアポトーシスの誘導によるものでもないことが明らかになった。興味深いのは、各々の NSAIDs がそれぞれ異なった抑制パターンを示したことであり、aspirin や meloxicam には全く抑制作用が認められなかった。Indomethacin は低濃度 (1 μ g/ml) では逆に $\gamma\delta$, NK 細胞からのサイトカイン産生を軽度ながら増強することも明らかになった。また bufexamac は NK 細胞からの IL-4 産生を増強する作用もあり、このような作用が後に続く獲得免疫反応を Th2 パターンに偏位させるのに大きな役割をしていると考えられた。このような NSAIDs による自然免疫反応の抑制は感染の際に生ずる様々な臨床症状 (発熱など) を軽快させる一方で、感染に対する抵抗性を低下させることにより感染を遷延化し、後に続く獲得免疫の代償性の活性化をもたらす可能性がある。NSAIDs の自然免疫抑制作用は様々であり、重症のウイルス感染時には極力自然免疫に対する抑制効果の少ない aspirin や meloxicam などを選択すべき

であると考えられた。

AD における自然免疫の選択的機能低下は、活性化された単球存在下で NK, $\gamma\delta$ T細胞に選択的に誘導されるアポトーシスのためと考えられた。これらの細胞が IL-15 依存性であり、AD では単球からの IL-15 産生が低下していることを考えると、AD の NK, $\gamma\delta$ T細胞は単球由来の増殖シグナル(IL-15)の低下により相対的に抑制シグナル(e.g. reactive oxygen species)が増加する結果として、選択的にアポトーシスが誘導された可能性が考えられた。本研究の結果からは AD における自然免疫反応の低下は単球依存性であり、二次的なものと考えられた。

E. 結論

AD 素因を持つ乳幼児に対し、感染の際に NSAIDs を頻用することにより NK, $\gamma\delta$ T細胞からの TNF- α , IFN- γ 産生の低下を招き、それが感染に対する抵抗性を減弱させるのみならず、後に続く獲得免疫反応を Th2 に偏位させ、さらにそれを代償性に過度に活性化させる可能性が示された。しかし NSAIDs の中にも自然免疫抑制作用の少ないものがあり、感染の際にはこのようなものを優先的に用いる必要があると考えられた。実際、上気道感染症に対し、indomethacin などの強力な作用を有する NSAIDs を避け aspirin を使用することにより、それに続く喘息の発症が防がれる可能性がある。

F. 研究成果

1. 論文発表

1. Shiohara T: T-cell dynamics of inflammatory skin diseases. *Expert Review of Clinical Immunology* in press
2. Shiohara T, Mizukawa Y: The immunological basis of lichenoid tissue reaction. *Autoimmunity Review* in press
3. Shiohara T, Kano Y: Are viral infections responsible for the development of drug-induced hypersensitivity syndrome as well as graft-versus-host diseases? *Dermatology* in press
4. Teraki Y, Miyake A, Takebayashi R, Shiohara T: Homing receptor and chemokine receptor on intraepidermal T cells in psoriasis vulgaris. *Clin Exp Dermatol* 29:658-663, 2004.
5. Teraki Y, Miyake A, Takebayashi R, Shiohara T: In vivo evidence for close association of CLA expression and E-selectin binding by T cells in the inflamed skin. *J Dermatol Sci* 36:63-65, 2004.
6. Shiohara T, Hayakawa J, Mizukawa Y: Animal models for atopic dermatitis: are they relevant to human disease? *J Dermatol Sci* 36:1-9, 2004.
7. Teraki Y, Shiohara T: Successful desensitization on fixed drug eruption: the presence of CD25⁺CD4⁺ T cells in the epidermis of fixed drug eruption lesions may be involved in the induction of desensitization. *Dermatology* 209:29-32, 2004.
8. Mizukawa Y, Shiohara T: Which term should be used to describe drug eruptions confined to sites of previous herpes zoster lesions, 'isotopic response' or 'recall phenomenon'? *Clin Exp Dermatol* 29:323-324, 2004.
9. Kano Y, Inaoka M, Shiohara T: Association between anticonvulsant hypersensitivity syndrome and human herpesvirus 6 reactivation and hypogammaglobulinemia. *Arch Dermatol* 140:183-188, 2004.
10. Teraki Y, Shiohara T: Spontaneous tolerance to terbinafine-induced lichenoid drug eruption. *Dermatology*

208:81-82, 2004.

2. 学会発表

1. 塩原哲夫: 非ステロイド外用剤について. 第20回日本臨床皮膚科医会三支部合同学術集会, 東京, 2004年11月23日.
2. 塩原哲夫: ハプテン反復塗布皮膚炎モデルの解析と薬効の評価. 第54回日本アレルギー学会総会, 横浜, 2004年11月5日.
3. 塩原哲夫: EBM シリーズ 2. 非ステロイド外用薬は、アトピー性皮膚炎を増加させる? 第103回日本皮膚科学会総会, 京都, 2004年4月17日.
4. 塩原哲夫: イブニングセミナー アトピー性皮膚炎の予防は可能か? 自然免疫からみた hygiene hypothesis に基づくアトピー性皮膚炎の予防. 第103回日本皮膚科学会総会, 京都, 2004年4月16日.
5. Takahashi R¹, Mizukawa Y, Shiohara T (Division of Flow Cytometry): Selective recruitment of human TH1/TH2 cells to the skin is determined by the combinatorial expression of E-selectin ligands and CCR4. The 29th Annual Meeting of the Japanese Society Investigative Dermatology, Kyoto, Apr. 14th, 2004.
6. Mizukawa Y, Shiohara T: Scratching acts as an important positive regulator of IgE dependent mast cell degranulation. The 29th Annual Meeting of the Japanese Society Investigative Dermatology, Kyoto, Apr. 14th, 2004.
7. Katsuta M, Takigawa Y, Shiohara T: Preferential apoptosis of NK cells and . . + T cells upon contact with monocytes in atopic dermatitis. The 29th Annual Meeting of the Japanese Society Investigative Dermatology, Kyoto, Apr. 14th, 2004.

G. 知的財産権の出版・登録状況
特になし。

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）
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
分担研究報告書

リモデリングの臨床的評価に関する研究

分担研究者 庄司 俊輔（国立病院機構 福岡病院 副院長）

研究要旨 本研究の第一の目的は、喘息及びアトピー性皮膚炎の病態形成に関与する因子を遺伝子レベルで解析することである。分担研究者は、このサンプルとしてアトピー性皮膚炎の患者より採血を行い、解析施設である帝京大学に送付する。第二の目的は、気道リモデリングの形成機序を明らかにすることである。分担研究者は正常ヒト肺線維芽細胞（NHLF）に対する各種サイトカイン・増殖因子の遊走活性を検討した。その結果、VEGF、bFGF、GM-CSF、HGF 及び TGF- β 1 が線維芽細胞に対する遊走活性を有することが確認された。

研究協力者 下田 照文（国立病院機構 福岡病院 臨床研究部長）
加藤 真理子（同 皮膚科）
山内 絵理（同 臨床研究部）
西原 麻千子（同 臨床研究部 外部研究員）

A. 研究目的

本研究の第一の目的は、喘息及びアトピー性皮膚炎の病態形成に関与する因子を遺伝子レベルで解析することである。分担研究者は、このサンプルとしてアトピー性皮膚炎患者の血液を本人の同意を得た後に採取し、解析施設である帝京大学に送付する。

第二の目的は昨年度に引き続き、気道リモデリングの形成機序を明らかにすることである。本年度は正常ヒト肺線維芽細胞（NHLF）を用い、気道リモデリングに関与すると考えられる各種サイトカイン・増殖因子に対する遊走活性を検討した。

B. 研究方法

まず、遺伝子解析に供する血液の採取については、患者サンプルを使用する遺伝子

関連研究であるため、国立病院機構福岡病院倫理委員会に申請を行った。この際に、主任研究施設や他の分担研究施設との間で、患者への説明文書や研究プロトコールについて十分に討議し、施設間で共通性を失うことのないように留意した。その後プロトコールに基づいて患者サンプル（血液）の収集を開始した。この時、研究協力者である加藤の外来診療において、協力を得られるアトピー性皮膚炎患者に研究の概要を説明し、さらに CRC により詳細な説明を受けた後で同意書に署名の上、サンプルを採取し、即日帝京大学に送付した。

次に細胞遊走実験については、標的細胞として正常ヒト肺線維芽細胞（NHLF：米国クロネティクス社）を用いた。この細胞をサブコンフルエントになるまで培養した

後、トリプシン処理により回収した。遊走活性の測定には改良型 48 穴ボイデンチャンバーを使用した。チャンバーの下室に遊走活性を測定するサイトカイン・増殖因子を、上室に 1×10^6 cells/ml に調整した細胞浮遊液を入れた後、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で 6 時間培養した。この時チャンバーの下室と上室との間は孔径 $8 \mu\text{m}$ の遊走膜により隔てられている。遊走活性を測定したサイトカイン・増殖因子は VEGF、bFGF、GM-CSF、HGF 及び TGF- β 1 の 5 種類である。培養終了後、遊走膜の下室側に遊走した細胞をディフクイックで染色し、400 倍に設定した光学顕微鏡で 10 視野測定し、その合計数を遊走活性とした。さらに、昨年度肺線維芽細胞に対する遊走活性が認められた PDGF については、抗 PDGF 抗体による遊走抑制実験を試みた。

C. 研究結果

最終年度である本年度は、遺伝子解析サンプルはアトピー性皮膚炎患者を中心に採取した。検体は即日帝京大学に送付され解析中である。

細胞遊走実験では、VEGF、bFGF、GM-CSF、HGF 及び TGF- β 1 が肺線維芽細胞に対する遊走活性を有することを確認した(Fig. 1-5)。また、昨年度の実験で線維芽細胞に対する遊走活性が確認された PDGF については、遊走活性測定の際に抗 PDGF 抗体を添加したところ、抗体の濃度依存的に遊走活性が低下した(Fig. 6)。

D. 考察

気道組織が喘息その他何らかの原因で傷害を被ると、気道構成細胞である線維芽細

胞、上皮細胞などから様々な遊走因子が産生され、線維芽細胞や上皮細胞の遊走・増殖さらに分化を促進する。この気道修復機構、いわゆるリモデリングにおいて、気道結合織の肥厚が特徴とされるが、これらの遊走因子によって惹起される細胞遊走が重要な役割を担うと考えられている。

今回の実験では、VEGF、bFGF、GM-CSF、HGF 及び TGF- β 1 が線維芽細胞に対する遊走活性を有することを確認した。また、PDGF による線維芽細胞遊走が抗 PDGF 抗体により濃度依存的に抑制された。このことから、気道傷害部位において、これらの各種サイトカイン及び増殖因子が遊走因子として作用し、線維芽細胞の遊走を促すことにより、気道修復を促進するものと推察される。今後さらにこれらのサイトカイン及び増殖因子における細胞遊走活性について検討を加え、気道リモデリングの機序の解明を試みていきたいと考えている。

E. 結論

細胞遊走実験において、VEGF、bFGF、GM-CSF、HGF 及び TGF- β 1 が線維芽細胞に対する遊走活性を有することが確認された。また、PDGF による線維芽細胞遊走は抗 PDGF 抗体により抑制されたことから、今後は細胞上清など未知の因子による遊走活性を抗体により同定する実験を開始する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

Fig. 1 抗PDGF抗体による線維芽細胞遊走の抑制

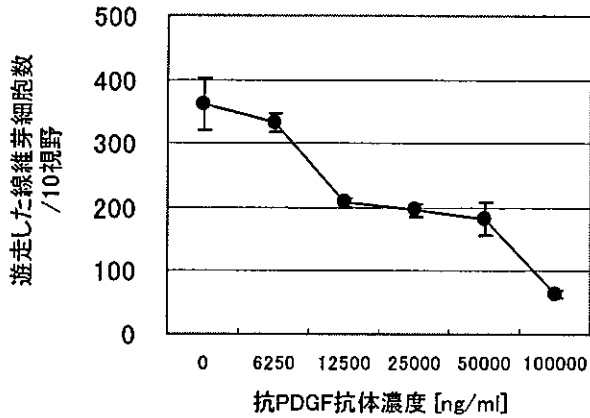


Fig.2 線維芽細胞に対するVEGFの遊走活性

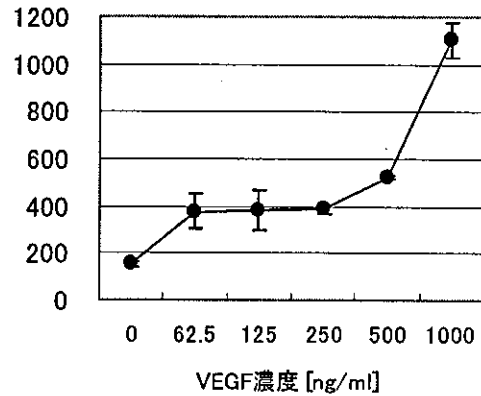


Fig.3 線維芽細胞に対するbFGFの遊走活性

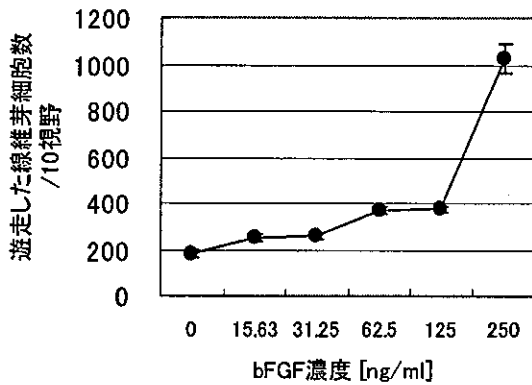


Fig.4 線維芽細胞に対するHGFの遊走活性

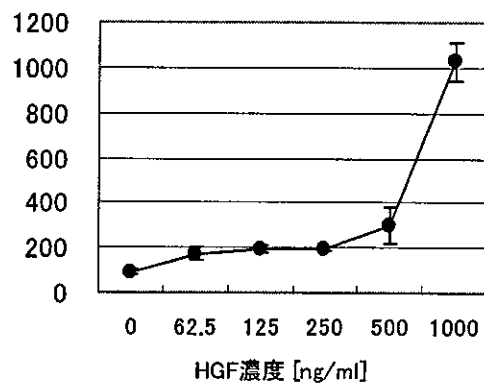


Fig.5 線維芽細胞に対するGM-CSFの遊走活性

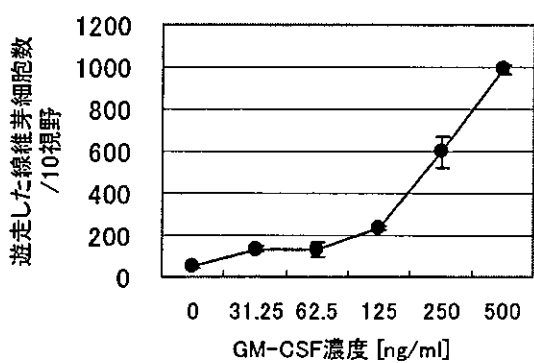
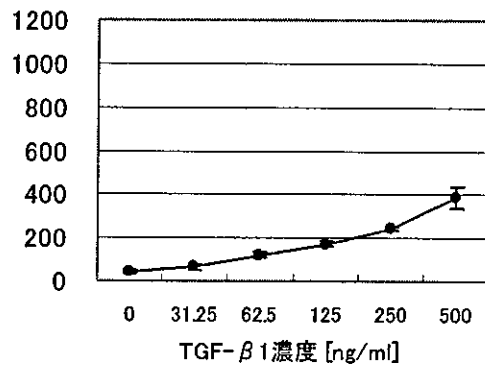


Fig.6 線維芽細胞に対するTGF-β1の遊走活性



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および悪化に影響する
ケモカイン・ケモカイン受容体の検討に関する研究

分担研究者：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）

共同研究者：関谷 剛（東京大学大学院医学系研究科

生体防御機能学・日本予防医学協会リサーチレジデント）

研究要旨

アレルギー性炎症には、好酸球がエフェクターとして、また Th2 細胞がレギュレーターとして関わっている。我々はアレルギー疾患の病態の中で特に、好酸球、Th2 集積に関わるケモカインに注目している。なかでも Th2 に特異的に発現されている CCR4 (CC chemokine receptor 4) の特異的リガンドである TARC/CCL17 はアレルギー疾患の病態形成に重要と考えられており、我々は昨年度までに TARC SNP (-431C>T) が TARC の産生調節に関わっていることを報告してきた。平成 16 年度は、健常人、アトピー型喘息、非アトピー型喘息、喘息+アトピー性皮膚炎、アトピー性皮膚炎に分類し、TARC および MDC の SNP 頻度を解析したところ有意差は得られなかったが、臨床パラメーターとの解析および今までの血中濃度データを踏まえることにより病態において TARC が何らかしらの役割をはたしていることが推察される。

A. 研究目的

アレルギー性炎症では、好酸球、好塩基球が主たるエフェクターとして、また Th2 がレギュレーターとして、その成立に関わっている。ケモカインはこれら細胞を一方向性に遊走させるサイトカインの一種であり、近年の研究により、発生や炎症や感染防御等の様々な分野においてケモカインが重要な働きをしていることが報告されている。我々はこれらケモカインおよびその受容体について、遺伝子解析および構造解析を行ってきた。本年度は最終年度であることから、アレルギー

疾患に関連しかつ現在まで解析してきたケモカイン・ケモカイン受容体に対して包括的な検討を行った。

B. 研究方法

研究班が収集した検体を用いた。それら検体を健常人コントロール、アトピー型喘息、非アトピー型喘息、喘息+アトピー性皮膚炎合併、アトピー性皮膚炎、喘息アウトグロ群に分類した。そしてこれら患者および健常人コントロールより genomic DNA を抽出し、ケモカイン・ケモカイン受容体の遺伝子に特異的なプライマーをもちい

た PCR-SSCP 法および direct sequencing にて全 exon 領域、および上流域をスクリーニングし、その後有望な領域をさらに PCR-RFLP 法をもちいてタイピングした。そしてこれらのデータを統計解析した。また IgE, IgE RAST, 好酸球数、臨床経過 (発作歴、治療歴) との関連を検討した。また TARC SNP の機能解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究にあたり各医療施設の倫理委員会で承認された方法に基づきプロトコールを作成し、各医療施設の倫理委員会の許可を得た。具体的には採血と同時に氏名、カルテ番号を記録し、方法に記載したような臨床情報を研究班共通のフォーマットに記録した。当院にて採血された血液は生体防御機能学で連結匿名化し、記号化 (東大-1 など) し、個人が特定される情報を除いた臨床情報とともに帝京大学に送付された。帝京大学では、各施設の試料とともに、シャッフルして再度、連結匿名化 (大田-1 など) した後、DNA と血漿を分離し、他施設由来の DNA と血漿を一緒に東大に送付した。これらの他施設の検体を含めた検体全体を東大で解析した。疾患や臨床データは参照できるが、帝京大と東大の匿名化した原本を照合しない限り、個人の特定は不可能であるように配慮した。

C. 研究結果

各疾患群において TARC SNP (-431C>T) 遺伝子多型を解析したところ、健常コントロールに比較して、有意差は認めなかった。全喘息患者と比較したが、これも有意差は存在しなかった。また他の組み合わせ、例えばアトピー型喘息と非アトピー型喘息や、喘息とアトピー性皮膚炎などの種々の組み合

わせも解析したが、いずれも有意なものはない (アレルギー学会総会 2004)。更に TARC SNP に関して *in vitro* で機能解析を行った。TARC SNP は mutation vector を用いた luciferase assay により解析し、TT type が wild type である CC

Genotype frequencies of TARC SNP

TARC SNP	CC	CT	TT	χ^2 (2x3)
Control (n=231)	79	113	39	
Atopic Asthma	147	215	46	N.S.
Non-Atopic Asthma	53	70	20	N.S.
Asthma+Atopic Dermatitis	25	45	17	N.S.
All Asthma (n=638)	225	330	83	N.S.
Atopic Dermatitis (n=166)	58	81	27	N.S.
Outgrow (Asthma)	5	9	2	N.S.
Outgrow (Asthma)+AD	13	18	5	N.S.

N.S. : not significant

type よりも有意に活性が高く、機能的な SNP であることを証明し報告した (Tsunemi et al. *Exp Dermatol.* 13 (11):715-9, 2004)。

MDC の SNP は幾つかすでに報告されているが、我々の基礎検討では MDC SNP のなかでも頻度が多かつ機能的で有望だと考えられた SNP は 5C>A の多型であった。この ATG より 5 番目の変異はアミノ酸変異を伴っている。しかしこの MDC SNP を TARC SNP の時と同様に分類し解析したが、有意なものはない。各群間の比較でも有意なものはない。

Genotype frequencies of MDC SNP

MDC SNP (5C>A)	CC	CA	AA	χ^2 (2x3)
Control (n=113)	83	30	0	
Atopic Asthma	201	53	2	N.S.
Non-Atopic Asthma	69	26	4	N.S.
Asthma+Atopic Dermatitis	31	7	0	N.S.
All Asthma (n=393)	301	86	6	N.S.
Atopic Dermatitis	54	20	0	N.S.
Outgrow (Asthma)	10	4	1	N.S.
Outgrow (Asthma)+AD	9	1	0	N.S.

N.S. : not significant

D. 考察 および E. 結論

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との間では、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。これら SNP は今回検討したアレルギー疾患の発症とは直接の関連を認めないと考えられる。今後、これらケモカイン SNP がアレルギー疾患を発症している患者群の中で、病態や重症度などに対してどのような役割を担っているのか、臨床パラメーターとどのように関連しているのかの解析が特に重要と考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsunemi Y, Sekiya T, Saeki H, Hirai K, Ohta K, Nakamura K, Kaminuma T, Fujita H, Kagami S, Asano N, Tanida Y, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K.

Lack of association of CCR4 single nucleotide polymorphism with atopic dermatitis in Japanese patients.

Acta Derm Venereol. 84(3):187-190, 2004.

2) Tsunemi Y, Komine M, Sekiya T, Saeki H,

Nakamura K, Hirai K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Asano N, Tanida Y, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K.

The -431C>T polymorphism of thymus and activation-regulated chemokine increases the promoter activity but is not associated with susceptibility to atopic dermatitis in Japanese patients.

Exp Dermatol. 13(11):715-719, 2004 .

3) Yoshimura-Uchiyama C, Iikura M, Yamaguchi M, Nagase H, Ishii A, Matsushima K, Yamamoto K, Shichijo M, Bacon KB, Hirai K.

Differential modulation of human basophil functions through PGD2 receptors DP and CRTH2/DP2.

Clin Exp Allergy 34:1283-1290, 2004.

4) Iikura M, Ebisawa M, Yamaguchi M, Tachimoto H, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K.

Transendothelial migration of human basophils.

J Immunol 173:5189-5195, 2004.

3) 関谷剛, 平井浩一

TARC 遺伝子と SNPs

アレルギー科 17(6):572-578, 2004.

2. 学会発表

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。アレルギー学会総会 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 CCL22 (MDC:macrophage-derived chemokine)の遺伝子多型。アレルギー学会春期臨床大会 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および悪化に影響する因子の解析に関する研究

研究協力者 玉利 真由美 理化学研究所遺伝子多型研究センター

研究要旨

候補遺伝子として、リモデリングへの関与が示唆されている、MMP9 遺伝子について詳細に SNP を検索し、症例対照相関解析を行い、小児喘息発症への関与を見いだした。

研究協力者 土居 悟

大阪府立呼吸器アレルギー医療センター
小児アレルギー科部長

A. 研究目的

人口の1%以上の頻度で存在する遺伝暗号の違いは遺伝子多型と定義され、それらが病気へのかかりやすさ、重症度、薬剤の副作用の出やすさ等に関与していると考えられている。SNP (Single Nucleotide Polymorphism) と呼ばれる一塩基多型は、近年、高速に大量に低コストでタイピングする技術が確立され、喘息においてもその手法を用いてその病態の解明が進んでいる。喘息の発症や進展に関連する遺伝子多型が同定できれば、早期診断、早期予防に役立てることができる。またその遺伝子機能低下や機能促進によって喘息の病態にどのように関連するのか、機能解析を行うことにより、新たな治療薬の開発に貢献できる可能性がある。本研究では高速大量遺伝子多型解析システムを用いて、喘息の発症や関連する病態と相関する遺伝子を同定することを目的とする。平成16年度は候補遺伝子解析として、近年、そのノックアウトマウス解析、および気管支喘息症例での気道内分泌物、気管支組織、血清の検討において、喘息の病態との相関が報告されている MMP9 について詳細に SNP を同定し、それを用いて症例対照相関解析を行った。

B. 研究方法

SNPs の同定についてはゲノム配列より Repeat masker にて反復配列部位を同定し、その部分を避けてプライマーを設計し、PCR-direct sequence 法を用い、小児喘息12例、成人喘息12例の genome DNA の塩基配列を決定し、コンピューターソフト Sequencher を用いて、遺伝子多型の同定を行った。

遺伝子多型については TaqMan 法にてプライマープローブを設計し genotypig を行った。用いたサンプルは、複数の医療機関より収集した下記のサンプルである。

小児喘息=470 例

成人喘息=470 例

アトピー性皮膚炎=376 例

コントロール=564 例

これらの症例は臨床における疾患重症度、発症年齢、血清 IgE 値、好酸球数等、詳細な臨床情報とともに収集されており、気管支喘息、アトピー性皮膚炎の発症に加え、これらのアレルギーの関連病態と遺伝子多型との相関についても検討を行った。Genotyping 後、コントロール群における Hardy-Weinberg 平衡を確認し、優性モデルおよび劣性モデル、さらにアレル頻度について χ^2 乗検定にて有意差検定を行った。

（倫理面への配慮）

本研究のヒトの遺伝子解析研究はすべてヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日)に準拠して行われ、理化学研究所倫理委員会の承認のもと、行われている。

C. 研究結果

MMP9 遺伝子内に日本人集団において15例の SNPs を同定した。白人集団とは分布、頻度がかなり異なっていた。これらを用いて、連鎖不平衡マップの作製を行った。この連鎖不平衡を鑑み、3つの SNPs のタイピングを行った。

日本人集団と白人集団とはその遺伝子多型の存在部位も頻度もかなり異なっていた。チェコスロバキアで気管支喘息との相関について報告のあった遺伝子多型は今回の検索では日本人集団に存在しなかった。

症例対照相関解析においては、アミノ酸の置換を伴う SNP において、小児喘息発症との相関 $p < 0.01$ 、ダニ特異抗体陽性小児喘息との相関 $p < 0.01$ 、および発症年齢が 3 才以上の喘息との相関 $p < 0.01$ を認めた。さらにタイピングを行った 3 つの SNPs についてハプロタイプ解析を行ったが、ハプロタイプにおいても小児喘息発症との相関を認めた。

成人喘息、アトピー性皮膚炎との相関は認めなかった。

マイクロアレイでの発現の変動を確認したところ、MMP9 遺伝子はヒト気道上皮細胞にウイルス感染疑似物質である polyI:C (dsRNA) で刺激を加えたときに、その発現が刺激前の 32 倍と強く誘導されていた。

D. 考察

MMP9 は細胞外マトリックス分解作用、そしてサイトカイン、ケモカイン、成長因子のタンパク分解を介した活性化や不活性化に関与すると言われ、炎症反応を修飾すると考えられている。喘息との相関解析についてはこれまでにプロモーターに存在する SNP 一個がチェコスロバキアの集団において、相関が認められないとする報告のみであった。しかし MMP9 の喘息の病態との相関に対する知見は、ノックアウトマウスを使った実験やヒト気管支喘息症例のサンプルを用いた検討により、積み重ねられてきている。MMP9 ノックアウトマウスにおいては樹状細胞の気道内への遊走阻害、樹状細胞由来 RANTES、MIP-3a 等のケモカイン産生阻害等を認め、アレルギー性気道炎症が抑制されることが示されている。また、気管支喘息患者においては気道内分泌物、気管支組織、血液において MMP9 の上昇が報告されている。これらのことから、MMP9 遺伝子内の多型が気管支喘息の発症や関連病態に関与するかどうかを検討することは重要であると考えられた。

現在、様々な細胞を用いて、そのアミノ酸の変化する SNP と連鎖不平衡にあるイントロンの SNP でレポータージーンアッセイを行っている。これまでの結果では、喘息感受性アレルで転写活性の増強が認められた。

また、その領域について *in silico* で転写因子の結合を検索したところ、RUNX1 との結合配列を含むことが判明した。現在、EMSA および Supershift assay にて確認中である。

さらにマイクロアレイのデータから MMP9 はウイルス感染疑似物質である polyI:C (dsRNA) で刺激を加えたときに、その発現が刺激前の 32 倍と強く誘導されることから、ウイルス感染において重要な役割を果たす可能性が考えられた。特に近年の報告では小児喘息発作にウイルス感染が強く関与していることが報告され、特に 4 才以上の学童期の喘息ではライノウイルスの関与が指摘されている。本研究においては喘息感受性アレルで転写が促進される傾向にあり、ウイルス感染下での気道における MMP9 の役割は検討する必要があると考えられた。

E. 結論

候補遺伝子解析として MMP9 遺伝子について検討を行い、日本人において 15 個の SNPs を同定した。小児喘息発症との相関 $p < 0.01$ 、ダニ特異抗体陽性小児喘息との相関 $p < 0.01$ 、および発症年齢が 3 才以上の喘息との相関 $p < 0.01$ を認めた。さらに気道上皮細胞において MMP9 はウイルス疑似物質 polyI:C (dsRNA) 刺激において強く誘導がかかることが判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

ADAM33 をめぐって 分子呼吸器病
2004. 8;3 p97-99

SNPs を用いた気管支喘息関連遺伝子の解明
日本小児アレルギー学会誌 18;2
164-167 2004

SNP (一塩基多型) アレルギーの臨床 ⇨ 陸館 アレルギーの臨床 24;643-647 2004

遺伝子多型と喘息 Asthma Frontier 3; 29-37
2004

ロコドリエン遺伝子多型 アレルギー・免疫 11; 16-23
2004

日本人喘息患者におけるADAM33,TGFβ遺伝子多型を含む最近の研究結果 アレルギー科 17:364-373 2004

遺伝子多型と喘息遺伝子 -喘息の個別化医療をめぐって International Review of Asthma 7:54-63 2005

Onouchi Y, Onoue S, Tamari M, Wakui K, Fukushima Y, Yashiro M, Nakamura Y, Yanagawa H, Kishi F, Ouchi K, Terai M, Hamamoto K, Kudo F, Aotsuka H, Sato Y, Nariai A, Kaburagi Y, Miura M, Saji T, Kawasaki T, Nakamura Y, Hata A.:CD40 ligand gene and Kawasaki disease. Eur J Hum Genet. 12:1062-1068 (2004)

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, Taamura G, Shirakawa T, Matsubara Y:Association of the hCLCA1 gene with childhood and adult asthma. Genes Immun. 7:540-547 (2004)

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 to bronchial asthma. Hum Genet. 115:295-301 (2004)

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.34:1192-201 (2004)

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. 49 :370-375 (2004)

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. 49:115-22, (2004)

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.114:503 (2004)

Akahoshi M, Obara K, Hirota T, Matsuda A, Hasegawa K, Takahashi N, Shimizu M, Nakashima K, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Higashi N, Taniguchi M, Enomoto T, Mao XQ, Nakashima H, N. Adra CN, Nakamura Y, Tamari M, Shirakawa T. A functional promoter polymorphism in the *TBX21* gene is associated with aspirin-induced asthma Hum Genet.in press (2005)

2. 学会発表

2004

第16回日本アレルギー学会 春期臨床大会 群馬県民会館
シンポジウム2 ゲノム解析の臨床応用
特別講演2 環境と遺伝の相互作用、粘膜免疫をめぐって

第54回日本アレルギー学会総会 パシフィコ横浜 (横浜市西区みなとみらい)
シンポジウム5 アレルギー関連遺伝子2. アレルギー関連遺伝子- 本邦の状況

Annual Meeting The American Society of Human Genetics 2004. Toronto, Canada.

A large-scale case control study for bronchial asthma

The 13th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience Genome Analysis and Medicine Hotel Okura Tokyo, Tokyo, Japan

A large-scale case control study for bronchial asthma

2005

第3回 気道アレルギー疾患シンポジウム 江陽グランドホテル 気管支喘息の遺伝要因

The 8th Guest Symposium on Asthma and Allergy 阪急電鉄本社「エコルテ・ホール」
感染とアレルギー、自然免疫とリモデリング
自然免疫関連遺伝子の遺伝子多型

第7回多摩アレルギー懇話会 吉祥寺第一ホテル 遺伝子多型を利用した気管支喘息へのアプローチ

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 未定
2. 実用新案登録 未定
3. その他 特になし

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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	98(10)	1016-24	2004
Iikura M, Ebisawa M, Yamaguchi, Tachimoto H, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K.	Transendothelial Migration of Human Basophil.	J Immunol	15;173(8)	5189-95	2004
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	23;320(2)	292-6	2004
慶長直人, 土方美奈子	びまん性汎気管支炎と多因子疾患に関連する遺伝子研究の進歩	呼吸	23(5)	359-364	2004
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 single-strand conformation polymorphism and their statistical estimation.	Genomics	84(3)	613-22	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
N <u>Hizawa</u> , E Yamaguchi, D Takabashi, J Nishihira, and M <u>Nishimura</u> .	Functional Polymorphisms in the Promoter Region of Macrophage Migration Inhibitory Factor and Atopy.	Am. J. Respir. Crit. Care Med.	169	1014-1018	2004
Y Zhou, E Yamaguchi, N <u>Hizawa</u> , M <u>Nishimura</u>	Roles of functional polymorphisms in the interleukin-18 gene promoter in Sarcoidosis.	Sarcoidosis Vasculitis Diffuse Lung Diseases	(in press)		2005
T Shimizu, N <u>Hizawa</u> , A Honda, Y Zhao, R Abe, H Watanabe, J Nishihira, M <u>Nishimura</u> , and H Shimizu.	Promoter Region Polymorphism of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is Strong Risk Factor for Young Onset of Extensive Alopecia Areata.	Genes and Immunity	(in press)		2005
福居嘉信, 山口悦郎, 檀澤伸之, 前田由起子, 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 檀澤伸之	気管支喘息患者と若年成人無症候者にお けるア ストグラフ法による気道過敏性の 検討	アレルギー	53 (6)	565-574	2004
檀澤伸之	気管支喘息とサイトカイン	医学のあゆみ	210(10)	879-882	2004
高橋大輔, 檀澤伸之, 前田由起子, 福居嘉信, 西村正治	日本人喘息患者と非喘息健常者における 抗原特異的 IgE 反 応 の比較検討	アレルギー	53 (10)	1071-1078	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
榎澤伸之	アレルギーの臨床におけるゲノム解析の意義	アレルギー科	(in press)		2005
榎澤伸之	サイトカイン関連遺伝子による喘息分類の可能性	カレントセラピー	(in press)		2005
Saito J, Inoue K, Sugawara A, Yoshikawa M, Watanabe K, Ishida T, Ohtsuka Y, <u>Munakata M</u>	Exhaled nitric oxide as a marker of airway inflammation for an epidemiologic study in school children.	J Allergy Clin Immunol	114	512-6	2004
Inoue K, Saito J, Miyazaki M, Ejiri S, <u>Munakata M</u>	A Kendo player with haemoptysis.	Lancet	364	814	2004
Takahashi K, Ishida T, Ogura G, Ishii T, Ohshima K, Sato S, Muroi M, Kanazawa K, Saito J, Otsuka Y, Watanabe K, Handa M, <u>Munakata M</u>	Diagnostic usefulness of bronchoalveolar lavage in Hermansky-Pudlak syndrome: A case with double lung cancers.	Int Med	43	972-6	2004
Shiohara T	T-cell dynamics of inflammatory skin diseases.	Expert Review of Clinical Immunology		in press	
Shiohara T, Mizukawa Y	The immunological basis of lichenoid tissue reaction.	Autoimmunity Review		in press	
Shiohara T, Kano Y	Are viral infections responsible for the development of drug-induced hypersensitivity syndrome as well as graft-versus-host diseases ?	Dermatology		in press	

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yoshimura-Uchiyama C, Iikura M, Yamaguchi M, Nagase H, Ishii A, Matsushima K, Yamamoto K, Shichijo M, Bacon KB, Hirai K.	Differential modulation of human basophil functions through PGD2 receptors DP and CRTH2/DP2.	Clin Exp Allergy	34	1283-1290	2004
Iikura M, Ebisawa M, Yamaguchi M, Tachimoto H, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K.	Transendothelial migration of human basophils.	J Immunol	173	5189-5195	2004
Tsunemi Y, Sekiya T, Saeki H, Hirai K, Ohta K, Nakamura K, Kaminuma T, Fujita H, Kagami S, Asano N, Tanida Y, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K.	Lack of association of CCR4 single nucleotide polymorphism with atopic dermatitis in Japanese patients.	Acta Derm Venereol	84	187-190	2004
Tsunemi Y, Komine M, Sekiya T, Saeki H, Nakamura K, Hirai K, Kakinuma T, Kagami S, Fujita H, Asano N, Tanida Y, Wakugawa M, Torii H, Tamaki K.	The -431C>T polymorphism of thymus and activation-regulated chemokine increases the promoter activity but is not associated with susceptibility to atopic dermatitis in Japanese patients.	Exp Dermatol	13	715-719	2004
関谷剛, 平井浩一	TARC 遺伝子と SNPs	アレルギー科	17(6)	572-578	2004
玉利 真由美	遺伝子多型と喘息	Asthma Frontier	3	p29-37	2004
玉利 真由美	SNP (一塩基多型) アレルギーの臨床 北陸館	アレルギーの臨床	24	p643-647	2004
玉利真由美 白川太郎	SNPs を用いた気管支喘息関連遺伝子の解明	日本小児アレルギー学会誌	18	p164-167	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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 ceda pollen.	Clin Exp Allergy	34	p1192-201	2004
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	49	p370-375	2004
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	49	p115-22	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Akahoshi M, Obara K, Hirota T, Matsuda A, Hasegawa K, Takahashi N, Shimizu M, Nakashima K, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Higashi N, Taniguchi M, Enomoto T, Mao XQ, Nakashima H, N. Adra CN, Nakamura Y, Tamari M, Shirakawa T	A functional promoter polymorphism in the <i>TBX21</i> gene is associated with aspirin-induced asthma	Hum Genet		In press	2005