

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14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 大田 健

平成17（2005）年4月

目 次

I. 総合研究報告	
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 大田 健	1
II. 分担研究報告	
1. 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 大田 健 (帝京大学医学部内科教授)	6
2. 気道上皮の傷害と修復に関わる遺伝子の多型検索に関する研究 小林 信之 (国立国際医療センター呼吸器科医長)	10
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に関する研究 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)	13
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)	20
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)	25
6. リモデリングの臨床的評価に関する研究 庄司 俊輔 (国立病院機構福岡病院副院長)	31
7. ケモカイン・ケモカイン受容体の検討に関する研究 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)	36
8. 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 玉利 真由美 (理化学研究所遺伝子多型研究センター)	44
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	49

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）
総合研究報告書

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

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- β 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- β 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

性疾患である。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。アレルギー性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に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- β 、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、 β 2-アドレナリン受容体、MBL（棟方）、TGF- β （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。患者背景を表1, 2に示す。患者収集の手技的な問題で群間に年齢の有意差を生じた。特に健常人の中でその後喘息が発症する可能性も否定できず今後の経過観察が必要であるが、喘息の発症率から結果に大きな影響を及ぼすものではないと判断した。

表 1 臨床データ 1

臨床データ-1		
	年齢 (平均)	男:女
1. アトピー型喘息 (AA)	46.3	215:198
2. 非アトピー型喘息 (NAA)	60.1	68: 80
3. アトピー性皮膚炎 (AD)	27.7	110: 64
4. BA(AA+NAA)+AD	30.9	58: 37
5. 健常人 (normal)	25.5	104:138

若年者は将来的にアレルギー疾患を発症する危険性は否定できない

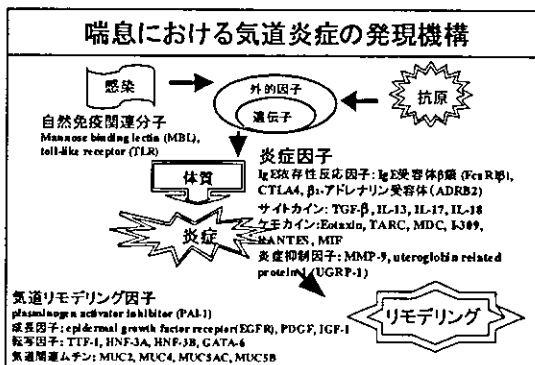
表 2 臨床データ 2

臨床データ-2					
	WBC	EosX	IgE (median)	FEV1.0 mL	FEV1.0%
1. AA	6643	6.28	378	2427	74.5
2. NAA	6776	5.54	69	1959	70.4
3. AD	6835	9.00	2215	N. T.	N. T.
4. BA+AD	7218	6.54	2560	2822	77.3
5. normal	6004	5.19	64	3106	86.8

表現型によく合致した結果であり各群の研究対象は妥当

解析対象を図 1 に示す。それぞれ喘息の病態の中で重要な因子であり、解析に値するものをターゲットとした。

図 1 解析因子



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- β 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- β 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- β 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- β 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- β 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- β 1, IL-18の関与が示唆された。

F. 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* 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

G. 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- β 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）沖山智子（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- 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。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、健常人242例のDNAおよび血漿の収集を終了した。

TGF- β 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- β 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- β 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。

気道のリモデリングに参与する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ドナーが存在した。しかし、多型について対象各群で検討した結果では発症および悪化因子としての関連はなかった。

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- β 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. 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* 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

G. 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の多型検索に関する研究

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長）
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。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群の遺伝子多型および、粘液分泌に関連したムチン遺伝子群の転写制御領域の遺伝子多型について、系統的な検討を行い、プロモーター多型や非同義置換などの多くの新規変異を同定した。我々は、この中で、気道過分泌との関連が報告されている 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、健常間で有意差を認めなかった。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。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 として登録) し、この変異の機能的意義をすでに報告したが、そのアリル頻度は、健常集団で Ins: 0.75 Del: 0.25 であり、喘息においては、Del アリルの頻度の低下を認めた。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、本研究において多くの新規多型が同定された。気道過分泌に関連すると推定される MUC5B の変異と喘息との関連が示唆された。

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、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。気道上皮が傷害された後、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・難治化の一因と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、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同定してきた、6 種の転写因子と 4 種のムチン遺

伝子の遺伝子多型のうち、HNF-3B については、Cincinnati の Jeffrey Whitsett らのグループにより、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が、また我々のグループにより、MUC5B のプロモーター遺伝子多型は MUC5B の発現量を調節することが、すでに報告されている。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

初めに、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、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、dbSNP データベースと比較照合した (表 1)。

表 1. 気管支上皮関連転写因子のゲノム情報

Gene	TTF1	HNF-3 A	HNF-3 B	HFH-4	HFH-8	GATA6
Locus	TITF1	FOXA1	FOXA2	FOXJ1	FOXF1	GATA6
Gen-b ank	NM_00 3317	NM_00 4496	NM_02 1784	NM_00 1454	NM_00 1451	NM_00 5257

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、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見られない。

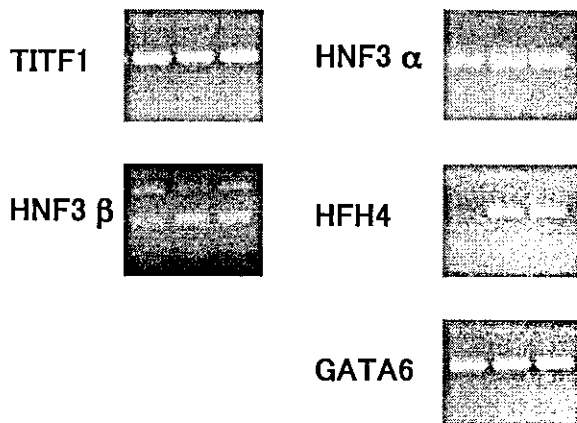


図1 ヒト成人気管支上皮細胞における各種気管支関連転写因子の遺伝子発現 (RT-PCR 法)

2) HNF-3B の各転写因子に同定された遺伝子変異を図示する (図2 の▽印)。TTF-1, HNF-3A, HFH-4, HFH-8 については年度報告書に記載した。結果として、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。

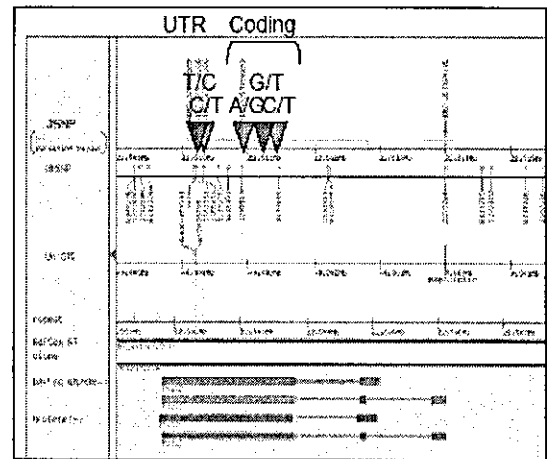


図2 HNF3B のゲノム構造と遺伝子変異

3) 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。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 (Fisher's exact test により、アリル頻度差は、 $p = 0.0148$)。また、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があることが我々のグループにより見いだされ、すでに rs17235353 として登録されている。このアリル頻度は、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

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ると考えられる、これら転写因子には、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。

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、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。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 2 MUC5B の遺伝子変異と喘息との関連

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	50(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。

F. 研究発表

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

2. 学会発表

慶長直人. び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.

Kamio K, Matsushita I, Tanaka G, Nakata K, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. A SNP haplotype in the promoter region of MUC5B gene may affect susceptibility to diffuse panbronchiolitis. May 16-21, Seattle, USA, 2003.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究要旨

気管支喘息は複数の遺伝子の効果に加え、ある特定の環境因子が引き金になることで発症する。本研究では、日本人において喘息発症に影響を与える遺伝因子を検討するために、喘息病態との関連が大きいと考えられるいくつかの候補遺伝子を選択し、特にそれらの遺伝子に存在する機能的な遺伝子変異の喘息発症における意義を検討した。個々の遺伝子の寄与度が大きくないことを踏まえ、検出力の高い患者対照研究を用いた。またそれぞれの候補分子の機能に基づいて生物学的に意義があると考えられた場合には遺伝子-遺伝子交互作用についても検討した。検討した遺伝子は高親和性 IgE 受容体・鎖遺伝子 (FCER1B、11q13)、CTLA4 遺伝子 (2q33)、マクロファージ遊走阻止因子遺伝子 (MIF、22q11) さらにはプラスミノゲンアクチベーターインヒビター (PAI1、7q21) 遺伝子である。気管支喘息患者 (約 400 名)、健常人 (約 400 名) を対象とした。FCER1B 遺伝子の-109C/T 多型は喘息患者における血清総 IgE 値に遺伝的な影響を与えていた。血清総 IgE 値に対する同様の影響が CTLA4 遺伝子-318C/T 多型にも認められた。さらに FCER1B 遺伝子と CTLA4 遺伝子との間には有意な遺伝子間交互作用が認められた。MIF 遺伝子多型はアトピーの有無と有意に相関した。一方、FCER1B 遺伝子と PAI1 遺伝子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が、FCER1B 遺伝子が TT 型の場合には 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。これらの一連の研究結果は、検討したそれぞれの分子の喘息病態における重要性を遺伝疫学的手法で確認したことに加え、FCER1B と CTLA4 遺伝子の交互作用や FCER1B と PAI1 との交互作用の存在からは、これらの分子を内包した共通の passway の存在と、それらの喘息病態における重要性を示したことに意義がある。

A. 研究目的

これまでの複数の検討からは喘息は単一の遺伝子異常によって規定される疾患ではなく、複数の遺伝子の作用に加え、環境因子が重要な役割を果たしている。本研究ではいくつかの遺伝子を喘息発症の候補遺伝子として選択し、それぞれ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検討する。

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。我々はこのアトピーの候補遺伝子である FCER1B 遺伝子に新たにプロモーター領域（転写開始部位から 109bp 上流）の点突然変異（C・T）を発見した。この新しい変異の遺伝子頻度は健常日本人（226 名）において C アリルが 30.3%、T アリルが 69.7% と共に高い値を示した。一方 7 つのエクソン部分にはこれまでに報告された変異を含め、いかなる遺伝子変異も認めなかった。

CTLA4 は co-stimulatory molecule (B7) の T 細胞上の受容体で、T 細胞の活性化、Th1/Th2 バランスさらには Th3 の調節などに関与する分子である。CTLA4 遺伝子プロモーター領域の多型（-318C/T）は糖尿病や多発性硬化症、自己免疫性肝炎や橋本病などの多くの免疫炎症性疾患と遺伝的に関連している。喘息の genomewide での解析でも同遺伝子が存在する 2q33 に有意なピークを認めている。従ってアトピーや喘息の重要な候補遺伝子の一つと考えられている。

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暴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、マクロファージ遊走阻止因子（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。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。

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）に加えて、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。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（PAI1）遺伝子に着目した。プラスミノーゲン/プラスミノー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。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。

これらの遺伝子が喘息、アトピーや総

IgE 値に及ぼす影響を検討した。特に FCER1B と CTLA4、FCER1B と PADI1 遺伝子についてはその遺伝子間相互作用についても検討した。

B. 研究方法

(1) 対象

約 400 名の喘息患者と約 400 名の健常人ボランティアを対象とした。喘息患者は北海道大学医学部附属病院第一内科喘息外来を受診した喘息患者、健常者は問診で気管支喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患に罹患していない者とした。それぞれの遺伝子の喘息発症への寄与度を 1.5-3.0 と推定し総計 800 人程度の人数を検定することで有意差 $p < 0.01$ のレベルで遺伝子の効果を同定できると判断した。

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臨床情報と末梢血からの遺伝子 DNA の収集、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

一塩基多型については野生型及び変異型、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野生型ホモ、変異型ホモ、ヘテロの遺伝子型を決定した。繰り返し配列の数の違いによる多型については、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はロジスティック解析にて検討した。血清総 IgE 値への影響については喘息群と健常群のそれぞれにおいて ANCOVA を用いて検討した。何れの解析においても性別、年齢、喫煙の有無で補正した上で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。遺伝子-遺伝子の交互作用については、2 つの遺伝子型の組み合わせによって得られる 4 群間で喘息発症のリスクや血清総 IgE 値の違いを比較検討した。さらに 2 つの遺伝子の交互作用をモデルとして組み込んだ多変量解析にて遺伝子遺伝子間の交互作用を検討した。

(4) レポーターアッセイ

MIF 遺伝子の 2 つの多型に関しては、そのハプロタイプが MIF の転写活性に与える影響を検討するため、ルシフェラーゼアッセイを行った。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「炎症性肺疾患の遺伝素因に関する研究」として審査を申請し、既に承認されている。

C. 研究結果

いずれの遺伝子多型も全集団において Hardy-Weinberg 平衡に矛盾しない遺伝子分布を示した。

<単一遺伝子の遺伝的影響>

FCER1B、CTLA4 遺伝子はそれぞれ喘息患者における血清総 IgE 値と有意な相関が認められた (FCER1B; $p=0.0004$, CTLA-4; $p=0.0047$)。FCER1B TT 型の喘息患者の平均 IgE 値は C を有する喘息患者に比べ有意に高値であった。この遺伝的影響は健常人では認められなかった。

MIF 遺伝子とアトピーとの有意な相関が認められた。すなわち、-173G/C 多型においては対立遺伝子 G のホモに比べ、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べて、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, $p<0.0005$) と有意にアトピー発症へのリスクが高かった。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。

ルシフェラーゼアッセイにおいては -173G/-794 [5-CATT] からなるハプロタイプが -173C/-794 [7-CATT] からなるハプロタイプに比べて有意に転写活性が高値であった。

FCER1B 及び PAI1 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; $\chi^2=1.14$, $p=0.56$)

<遺伝子-遺伝子交互作用>

FCER1B 遺伝子と CTLA4 遺伝子との間には総 IgE 値に対する影響において有意な遺伝子間交互作用が認められた ($p=0.014$ for interaction)。

FCER1B 及び PAI1 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 PAI 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 PAI 遺伝子 5G5G型の遺伝的な影響は 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

FCER1B 遺伝子の変異は肥満細胞や好塩基球の膜表面に発現した高親和性 IgE 受容体・鎖の発現量やその後のシグナル伝達の強度に影響を与えることで、また CTLA4 遺伝子の変異は T 細胞が抗原提示細胞から抗原の情報を受け取るときに、その情報の質的、量的な変化をもたらすことで、それぞれ血清総 IgE 値の多寡に遺伝的な影響を与えることが考えられる。FCER1B や CTLA4 の遺伝的影響は喘息患者にのみ認められ、喘息に特有な他の遺伝因子や環境因子との相互作用がその遺伝効果発現のために重要と考えられた。

MIF 遺伝子とアトピーとの関連については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 刺激による免疫系の成熟、特に十分な Th1 免疫応答、が起こりづらく結果として Th2 型の免疫応答が優位になってしまう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。

FCER1B と PAI1 遺伝子との交互作用の存在からは、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。

E. 結論

今回の検討では個々の遺伝子多型と喘息、アトピーや血清総 IgE 値との間に遺伝的な関連が認められた。しかしいずれの場合もそれぞれの遺伝子が持つ効果は非常に小さいと考えられた。

FCER1B 遺伝子と CTLA4 遺伝子の影響が喘息患者だけに認められたことや、両遺伝子間、さらには FCER1B 遺伝子と PAI1 遺伝子との間に相互作用が存在することは、ある遺伝子の影響が他の遺伝因子の影響を強く受けていることを示すものである。従って、一つ一つの遺伝子が単独で、少しずつ疾患発症のリスクを上昇させる。その総和が全体として疾患の発症をもたらすといった比較的単純なモデルでは喘息やアレルギーなどの Complex disease を解明することは困難である。より包括的な遺伝子型と表現型との関連を考慮していく必要がある。多様な遺伝子-

遺伝子、遺伝子-環境因子の相互作用が徐々に解明されてくることで、遺伝子の疫学研究や機能的な研究においてより再現性の高いデータが得られることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] Hizawa N, Yamaguchi E, Jinushi E, Kawakami Y. A common *FCER1B* gene promoter polymorphism influences total serum IgE levels in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Mar;161(3 Pt 1):906-9.

[2] Hizawa N, Yamaguchi E, Jinushi E, Konno S, Kawakami Y, Nishimura M. Increased total serum IgE levels in patients with asthma and promoter polymorphisms at CTLA4 and FCER1B. *J Allergy Clin Immunol* 2001 Jul; 108(1 Pt 1):74-9

[3] Hizawa N, 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] Hizawa N
The -109C/T polymorphism at the promoter region of the *FCER1B* gene and IgE phenotypes in subjects with bronchial asthma.
(2000年5月 アメリカ胸部疾患学会)

[2] Hizawa N
The CTLA-4 and the FCER1B promoter polymorphism interact to increase total serum IgE levels”

(2001年5月 アメリカ胸部疾患学会)

[3] 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

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

2002年11月 アレルギー学会総会

[4] 檜澤伸之、山口悦郎

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

(2003年3月 日本呼吸器学会総会)

[5] Hizawa N, Yamaguchi E, Takahashi D, Nishihira J, Nishimura M

The -173G/C promoter polymorphism of the MIF/GIF gene and atopy

(2003年5月 アメリカ胸部疾患学会)

[6] Hizawa N

Genetic Background of Allergic Disorders

From functional polymorphisms to common pathophysiological mechanisms underlying asthma and atopy

(2003年8月 国際アレルギーシンポジウム)

[7] 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)

[8] 檜澤伸之