

アレルギーの臨牀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
臨牀大会、シンポジウム ゲノム解析の
臨牀応用)

[9] Hizawa N

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)

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 |

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）
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

分担研究者 棟方 充 福島県立医科大学 教授

研究要旨

【研究目的】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、平滑筋弛緩性受容体、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ならびに血清蛋白量を主体とする研究を計画した。主な標的分子は、①平滑筋弛緩性受容体として β 2-アドレナリン受容体(B2ADR)、②自然免疫関連分子として Mannose Binding Lectin (MBL)、③肺特異的蛋白として Uteroglogin Related Protein 1 (UGRP1)、④リモデリング関連蛋白として Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)とした。

【対象と方法】B2ADR については既存の DNA を用いた SNP s の網羅解析によるハプロタイプ解析をめざした。残り3分子については、学内倫理委員会での承認を得た後、書面でのインフォームドコンセントを得た患者について採血を行い、全国集積症例と合わせて検討を行った。MBL については G54D 多型と血清 MBL 値を測定した。UGRP1 については、遺伝子組み込みによりヒト UGRP1 蛋白を発現させ、この蛋白を基に単クローン抗体を作成し、血清 UGRP1 測定のための ELISA 法を確立した。さらに G-112A 遺伝子多型を解析した。EGFR についてはフラグメント解析により第一イントロン CA リピート多型の解析を行った。さらに、これらの結果と喘息発症ならびに病態との関連を検討した。

【結果と考察】全国施設からの症例集積により千例以上の症例が集積された。既存 DNA ならびに全国症例検体を用いて研究を行った。①既存検体を用いた B2ADR 遺伝子解析：本遺伝子のすべての SNP s を解析し、ハプロタイプの分布に著しい人種差が存在することを明らかにした。②MBL 遺伝子多型(G54D)は血清 MBL 値を規定していることを明らかにしたが、遺伝子型、血清 MBL 値とも喘息病態とは直接関連しないことが明らかになった。③UGRP1 遺伝子多型は家族歴の有る喘息と無い喘息でその分布がことなること、血清 UGRP1 値は G-112A 遺伝子型により影響を受け、A-allele を持つ者では血清 UGRP1 は低値であった。また、血清 UGRP1 値は重症喘息患者で低下が見られた。④EGFR 遺伝子多型では、CA リピート数は喘息患者で有意に少なく、喘息発症と関連している可能性が示唆された。

【結論】アレルギー疾患の発症及び悪化に影響する因子として、肺特異的抗炎症蛋白 UGRP1 と細胞増殖因子受容体 EGFR が重要である。

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、平滑筋弛緩性受容体、自然免疫関連蛋白、肺特異的蛋白、リモデリング関連蛋白などに注目した研究を計画した。主な標的

分子は、①平滑筋弛緩性受容体として β 2-アドレナリン受容体(B2ADR)、②自然免疫関連分子として Mannose Binding Lectin (MBL)、③肺特異的蛋白として Uteroglogin Related Protein 1 (UGRP1)、④リモデリング関連蛋白として Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)とした。①については既存 DNA を用いたハプロタイプ解析を、②~④については我々の施設を含めた全国施設から集積された検体を用いた解析を計画した。

研究対象

既存検体としては連結不可能匿名化された健常者 100 名、喘息患者 50 名の DNA を用いた。集積症例からの検体は、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。

B. 研究方法

①B2ADR 遺伝子 SNPs ハプロタイプ解析:

B2ADR 遺伝子には多数の SNPs の存在がするため、遺伝子のクローニングと直接シーケンス法を用いて、プロモーター領域、構造遺伝子領域の SNPs の全解析を行う伴に、ハプロタイプ解析を行った。

②MBL 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。

③UGRP1 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。h UGRP1 遺伝子プラスミドを用いて大腸菌に蛋白を発現させ、その蛋白を精製した。この蛋白を用いてハイブリドーマを作成し、複数の単クローン抗体を得た。この単クローン抗体の内、2 種類を用いて ELISA 系を確立し、血清 UGRP1 値の測定を行った。また、遺伝子型は PCR-RFLP 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比較検討した。

④EGFR 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。

(倫理面への配慮)

上記の研究経過は、福島県立医科大学倫理委員会で、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理規定ならびに倫理委員会規定に則り審査を受け承認された。また、当施設での参加者については全員から書面によるインフォームドコンセントを頂いた。

C. 結果

①B2ADR 遺伝子 SNPs ハプロタイプ解析:

健常者 100 名、喘息患者 50 名について 5'プロモーター領域 1.5kb, 構造遺伝子領域 1.3kb について全 SNP 解析を行った。5'プロモーター領域に 20 番目の新たな

SNP s (T-839C)を見出した。20SNP sのうち、日本人では15SNP sが確認された。両群間で各SNP sの頻度に有意な差は認めなかった。

ハプロタイプ解析では、15SNP sからなる42のハプロタイプを確認した。Drysdaleら(2000)の13SNP sによるハプロタイプでは21タイプを確認した。日本人ではDrysdaleらのハプロタイプ4と6に71.6%が属しており(欧米人ではハプロタイプ2と4に81.3%が属している)、ハプロタイプの分布には著しい人種差が認められた。また、 β 刺激薬定期吸入の副作用や効果に影響すると考えられるArg16Gly遺伝子型は、欧米人と日本人で全く異なるハプロタイプに属していた。

②MBL 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 ± 63.7 (SE) ng/ml, G/D 型では 355.4 ± 25.2 ng/ml, D/D 型では 9.4 ± 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。

③UGRP1 の遺伝子解析と血清蛋白定量：

UGRP1 遺伝子プラスミドを用いて蛋白を作成、これを基にハイブリドーマを作成し3種類の単クローン抗体を得た。このうち2種の抗体を用いて ELISA 系を確立した。

UGRP 1 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($p < 0.05$)、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($P < 0.05$)。

④EGFR 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以上を LL 群、どちらか2本が16以下を SL 群、2本とも16以下を SS 群として解析した。喘息群では SL+SS が 42.2%、健常群では 34.4%と、喘息群で SL+SS が有意に多かった($p < 0.05$)。

D. 考察

B2ADR 遺伝子は喘息発症や重症度に関連すると報告されてきた。今回、すべての SNP s を解析するとともに、ハプロタイプ解析をおこい、著しい人種差の存在が明らかになった。また、Pharmacogenetics で注目されている Arg16Gly 遺伝子型は、日本人と欧米人で全く異なるハプロタイプに属しており、両国で臨床試験結果の矛盾を説明可能かもしれない。

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をもたれていた。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に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

B2ADR 遺伝子多型のハプロタイプには著しい人種差が存在し、薬理遺伝学的検討の際には十分注意が必要である。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. 研究発表

1. 発表論文

1) Kamachi A, et al. Dissociation between responsiveness to methacholine and responsiveness to antigen. *Eur Respir J*, 19:76-83, 2002.

2) Niimi T, et al. A polymorphism in the human UGRP1 gene promoter that regulates transcription is associated with an increased risk of asthma. *Am J Human Genetics*, 70: 718-25, 2002.

3) Takahashi T, et al. Expression and alteration of ras and p53 proteins in idiopathic pulmonary fibrosis with lung cancer. *Cancer*. 95: 624-33, 2002.

4) Takahashi T, et al. Occurrence of farmer's lung disease is relevant to meteorological conditions: A 20-year follow-up survey analysis. *Am J Ind Med*, 46: 506-13, 2002.

5) 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.

6) Inoue K, et al. A Kendo player with haemoptysis. *Lancet* 364: 814, 2004.

7) 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) 石田 卓、関根聡子、菅原 綾、吉川素子、金沢賢也、斎藤純平、大塚義紀、鈴木利光、木村芝生子、棟方 充. 健常肺と喘息患者肺における uteroglobin-related protein-1 (URGP1)発現の検討. 第100回日本内科学会講演会(福岡市)、日本内科学会雑誌、92 (Suppl): 191, 2003.

2) 吉川素子、石田 卓、井上恵一、菅原 綾、渡辺香奈、斎藤純平、大塚義紀、鈴木利光、木村芝生子、棟方 充. 原発性肺癌における uteroglobin-related protein-1 (URGP1)発現の免疫組織化学的検討. 第100回日本内科学会講演会(福岡市)、日本内科学会雑誌、92 (Suppl): 248, 2003.

3) 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.

4) 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.

5) Saito J, et al., Dose serum mannose binding lectin (MBL) influence allergic disorders? Annual Meeting of European Respiratory Society, Scotland, 2004.

6) 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.

7) Inoue K, et al., Clinical significance of sputum eosinophilia in patients with chronic cough and airway hyperresponsiveness. Asian Pacific Congress for Allergy and Clinical Immunology, 2004. 10, Tokyo, Japan.

8) Wang S, et al. Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms and the development of coal workers' pneumoconiosis (CWP). American Thoracic Society (ATS) 2005, 5. San Diego, USA.

9) Inoue K, et al. Serum uteroglobin-related protein 1 (UGRP1) and respiratory symptoms in schoolchildren. American Thoracic Society (ATS) 2005, 5. San Diego, USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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)患者では自然免疫担当細胞であるNK、 $\gamma\delta$ T細胞が健常人コントロールと比べ、末梢血中の頻度だけでなく、そのサイトカイン(INF- γ , TNF- α)産生も著明に低下していることが明らかとなった。このようなサイトカイン産生の低下は自然免疫担当細胞に特異的に認められ、活性化された単球の存在下のみで生じた。このサイトカイン産生の低下には、単球からのIL-10は重油ではなく、単球存在下でこれらの細胞に誘導されるアポトーシスが重要な役割を果たしていることが明らかになった。

NSAIDsはNK細胞や $\gamma\delta$ T細胞からのINF- γ , TNF- α 産生を単球を介することなく直接抑制するが、その抑制はcyclooxygenase非依存性であり、アポトーシスは関与していなかった。この抑制作用はbufexamac、indomethacinが強くaspirinやmeloxicamでは認めなかった。

A. 研究目的

先進諸国におけるアトピー性皮膚炎(AD)の増加の原因として、小児期の感染機会の減少や様々な薬剤の過剰使用により自然免疫機能の発達が阻害される可能性を明らかにしようと考えた。その目的のため、AD患者の自然免疫担当細胞の数・機能を検討するとともに、近年小児に対する使用頻度の増加が著しいNSAIDsが自然免疫担当細胞に及ぼす影響につき明らかにしようと考えた。

B. 研究方法

1. AD患者及び、健常人コントロールより末梢血単核球(PBMC)を分離し、フローサイトメトリーにて各リンパ球分画の頻度を測定するとともに、PMA+ionomycinにて刺激後、様々な時間(2, 4, 6-24時間)後に細胞を回収し、自然免疫担当細胞(NK, $\gamma\delta$)、獲得免疫担当細胞($\alpha\beta$, CD4, CD8)分画に経時的に発現してくるサイトカイン(TNF- α , INF- γ , IL-4)の陽性細胞頻度、及びその発現レベル(MFI)をフローサイトメトリーにて測定する。

- 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てannexin V bindingを測定する。
- CD14⁺単球の関与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⁺単球を除き、この細胞分画を上記と同様PMA+ionomycinにて刺激する。様々な培養時間後に回収された各細胞分画に発現してくるサイトカインと、annexin V bindingをフローサイトメトリーを用いて測定する。
- 自然免疫担当細胞からのサイトカイン産生の低下に、単球から産生されるIL-10が関与している可能性を検討するために、上記サイトカイン産生系に抗IL-10R抗体を添加することにより、サイトカイン産生が回復するかを検討する。
- NSAIDsが健常人PBMCからのサイトカイン産生にどんな影響を与えるかをみるため、bufexamac (0.1-50ug/ml)、indomethacin (0.1-50ug/ml)、aspirin (0.1-50ug/ml)、meloxicam (2-100ug/ml)を各々上記サイ

トカイン産生系に加え、2, 4, 6 時間後に回収し、サイトカイン産生 (TNF- α , IFN- γ , IL-4) をフローサイトメトリーにて測定する。

6. 単球除去後、NSAIDs を加えた後 ionomycin+PMA で刺激し、各分画に発現してくるサイトカインをフローサイトメトリーにて測定する。
7. 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. 健常人と比較し、AD 患者 PBMC 中の頻度は $\alpha\beta$, CD4, CD8 T細胞では有意差を認めなかったが、 $\gamma\delta$ T細胞、NK 細胞は著明に低下しており、反対に B細胞では有意な増加を認めた。
2. AD 患者では NK 細胞、 $\gamma\delta$ T細胞からのサイトカイン (IFN- γ , TNF- α) 産生を産生細胞頻度でみた場合、培養時間が長くなるにつれ (2-4, 4-6 時間) 著明に低下するのに対し、IL-4 産生は逆に軽度増加していた。それに比べ $\alpha\beta$ T細胞からのサイトカイン産生は IL-4 産生の増加を認める他、健常人と差を認めなかった。それに対し、産生されたサイトカインのレベル (MFI) でみた場合には差を認めなかった。
3. AD の自然免疫担当細胞分画には、刺激後 annexin V binding により測定されるアポトーシスが選択的に誘導されることが分かった。それに対し、健常人自然免疫担当細胞や AD の獲得免疫細胞分画にはこのようなアポトーシスは誘導されなかった。
4. CD14⁺単球除去後、PMA+ionomycin 刺激による $\gamma\delta$ T細胞、NK 細胞からのサイトカイン産生を検討したところ、AD 患者の IFN- γ , TNF- α 産生の著明な低下は認められず、健常人なみに回復した。同時に CD14⁺単球除去により、刺激後 AD 患者自然免疫担当細胞

分画に選択的に誘導されるアポトーシスは著明に減少した。一方、獲得免疫担当細胞のサイトカイン産生やアポトーシスは CD14⁺単球の除去によっても影響を受けなかった。

5. AD 患者自然免疫担当細胞からの IFN- γ , TNF- α 産生は、抗 IL-10R 抗体によりごく軽度の回復を認めたのみで、単球除去の効果には全く及ばなかった。
6. NSAIDs は健常人 PBMC 中の自然免疫担当細胞 ($\gamma\delta$ T細胞, NK 細胞) からの IFN- γ , TNF- α 産生を量依存性に低下させたが、獲得免疫担当細胞からの産生は低下せず、IL-4 産生はむしろ亢進させた。この抑制作用は bufexamac が最も強力で、 $\gamma\delta$ T細胞, NK 細胞からのサイトカインを抑制したのに対し、indomethacin は $\gamma\delta$ T細胞にのみ抑制した。それに対し、aspirin や meloxicam は殆ど抑制効果を示さなかった。
7. NSAIDs による自然免疫担当細胞からのサイトカイン抑制は単球除去によっても影響を受けず、直接作用と考えられた。またアポトーシスの誘導とも無関係であった。

D. 考察

AD における様々な症状は Th2 細胞の活性化を反映していると考えられているが、Th2 細胞の活性化は本症の原因というより結果と考えた方が良さそうである。自然免疫は獲得免疫に先行して活性化され、後に続く獲得免疫の方向性を決定していることを考えれば、獲得免疫における Th2 細胞の活性化は自然免疫の以上の結果と考えることも出来る。つまり AD で認められる様々な免疫異常は自然免疫の異常を反映している可能性があり、本研究はその仮説を証明すべく 2つの方向からアプローチを行った。一つは、既に AD の病態が確立した患者において自然免疫の異常が認められるか否か、といういわば出口の方からのアプローチであるのに対し、もう一つは健常人に対し何かの処置をすることにより AD 様病態が誘導出来るかという、いわば入口からのアプローチである。本研究に

において AD 患者では自然免疫担当細胞としての NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞は PBMC 中の頻度のみならず機能においても低下していることが明らかになった。

AD における NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞からのサイトカイン産生の低下は、IFN- γ 、TNF- α に認められ、IL-4 はむしろ亢進していた。とくにこのサイトカイン産生の低下は培養開始直後には認められず、その数時間後に著明となり、しかも個々の産生細胞のレベルは低下していることから、これらのサイトカインを産生する細胞に選択的にアポトーシスが誘導される可能性が考えられた。実際、単球の存在下においてのみこれらの細胞にはアポトーシスが誘導されることが分かった。しかも単球を除去することでこれらの細胞からのサイトカインは健常人と同レベルまで回復することから、AD におけるこの自然免疫担当細胞の機能低下は単球の異常を反映しているものとも考えることも出来る。実際、AD 患者の単球は IL-15 産生が低下していることが示されており、NK、 $\gamma\delta$ T 細胞の増殖、生存は IL-15 に依存していることを考えると、単球の IL-15 産生の低下こそ、根源的な異常と考えられた。しかし近年、これらの自然免疫担当細胞相互の関係は決して一方向ではなく、相互が制御しあう reciprocal なものであることが明らかにされつつある。NK や $\gamma\delta$ T 細胞から IFN- γ や TNF- α 産生の低下は、単球からのサイトカイン産生 (e. g. IL-15) を低下させ、それがまた NK、 $\gamma\delta$ T 細胞から IFN- γ 産生を低下させるという相互作用があると考えられている。つまり AD ではこの単球/NK、 $\gamma\delta$ T 細胞の相互作用に primary な異常があると考えられる。

そこで第二のアプローチとして、どのような agent が健常人の NK、 $\gamma\delta$ T 細胞からの IFN- γ 、TNF- α 産生を抑制し AD 患者において観察されるような異常をもたらさうるかを明らかにしようと考えた。その際、まず考えたのは近年非常に投与量が増加している NSAIDs である。つまり小児の頃から NSAIDs を頻用していることが、NK、 $\gamma\delta$ T 細胞からのサイトカイン産生

を特異的に抑制するのではないかとの作業仮説に基づいて検討をすすめた。結果はまさに予想通り、bufexamac, indomethacin などに強力な自然免疫抑制作用が認められ、これらの NSAIDs の繰り返し使用が、AD 様病態の発症を容易にさせている可能性が考えられた。しかし aspirin や meloxicam にはこのような作用がなく、NSAIDs の中でも著明な差違が認められた。近年のアスピリンの使用量の減少(逆に言えば作用のより強力な NSAIDs の使用の増加)が、間接的に AD 等のアレルギー性疾患の増加に貢献しているとの報告もなされており、本研究の結果と一致しており興味深い。今後これ以上、AD を増加させないためには、小児における NSAIDs 使用ことにウイルス感染時に用いる場合には極力自然免疫抑制作用のない aspirin や meloxicam が望ましく、外用剤としての bufexamac の使用を制限することが必要と思われる。

E. 結論

AD 素因を持つ乳幼児においては、自然免疫の発達を阻害しないよう抗生剤や NSAIDs の投与は極力行わないことが望ましい。とくに自然免疫が重要な役割を果たす感染症においては、使用する NSAIDs は極力自然免疫抑制作用のないものを選択していく必要がある。また AD 病態が完成した成人患者においては、既に自然免疫が低下していることを考慮し、自然免疫細胞間の相互作用を損なわないような治療が望まれる。

F. 研究発表

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.
11. Takahashi R, Mizukawa Y, Yamazaki Y, Hayakawa K, Hayakawa J, Kudo A, Shiohara T: In vitro differentiation from naive to mature E-selectin binding CD4 T cells: acquisition of skin-homing properties occurs independently of cutaneous lymphocyte antigen expression. *J Immunol* 171:5769-5777, 2003.
12. Nori M, Iwata S, Munakata Y, Kobayashi H, Kobayashi S, Umezawa Y, Hosono O, Kawasaki H, Dang NH, Tanaka H, Shiohara T, Morimoto C: Ebastin inhibits T cell migration, production of Th2-type cytokines and proinflammatory cytokines. *Clin Exp Allergy* 33:1544-1554, 2003.
13. Hayakawa K, Shiohara T: Two cases of Henoch-Schonlein purpura with transient myocardial ischaemia. *Acta Derm Venereol* 83:393-394, 2003.
14. Teraki Y, Shiohara T: IFN- γ -producing effector CD8⁺ T cells and IL-10-producing regulatory CD4⁺ T cells in fixed drug eruption. *J Allergy Clin Immunol* 112:609-615, 2003.
15. Shiohara T, Mizukawa Y: Recall phenomenon: some skin-resident cells remember previous insults. *Dermatology* 207:127-129, 2003.
16. Inoue Y, Isobe M, Shiohara T, Hayashi H: Inhibitory activity of CX-659S, a novel diaminouracil derivative, against the rebound phenomenon following withdrawal of corticosteroid therapy for chronic contact hypersensitivity responses. *Int Arch Allergy Immunol* 131:143-152, 2003.
17. Teraki Y, Shiohara T: Preferential

- expression of $\alpha_E\beta_7$ integrin (CD103) on CD8⁺ T cells in the psoriatic epidermis: regulation by interleukins 4 and 12 and transforming growth factor- β . *Br J Dermatol* 147:1118-1126, 2002.
18. Mizukawa Y, Yamazaki Y, Teraki Y, Hayakawa J, Hayakawa K, Nuriya H, Kohara M, Shiohara T: Direct evidence for IFN- γ production by effector-memory-type intraepidermal T cells residing at an effector site of immunopathology in fixed drug eruption. *Am J Pathol* 161:1337-1147, 2002.
 19. Inoue Y, Isobe M, Shiohara T, Goto Y, Hayashi H: Protective and curative effects of topically applied CS-659S, a novel diaminouracil derivative, on chronic picryl chloride-induced contact hypersensitivity responses. *Br J Dermatol* 147:675-682, 2002.
 20. Mizukawa Y, Shiohara T: Trauma-localized fixed drug eruption: involvement of burn scars, insect bites and venipuncture sites. *Dermatology* 205:159-161, 2002.
 21. Shiohara T, Mizukawa Y: Fixed drug eruption: easily overlooked but needing new respect. *Dermatology* 205:103-104, 2002.
 22. Shiohara T, Mizukawa Y, Teraki Y: Pathophysiology of fixed drug eruption: the role of skin-resident T cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2:317-323, 2002.
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 $\gamma\delta^+$ T cells upon contact with monocytes in atopic dermatitis. The 29th Annual Meeting of the Japanese Society Investigative Dermatology, Kyoto, Apr. 14th, 2004.
 8. 塩原哲夫: イブニングセミナー アトピー性皮膚炎白書へ社会的インパクトからの考察へ. 第55回日本皮膚科学会西部支部学術大会, 愛媛, 2003年10月25日.
 9. 塩原哲夫: 教育セミナー アトピー性皮膚炎の発症メカニズムと治療の問題点. 第53回日本アレルギー学会総会, 岐阜, 2003年10月24日.

10. Teraki Y, Shiohara T: Decreased number of IL-12- producing C711c⁺ dendritic cells drive a shift from type 1 to type 2 cytokines in the chronic contact hypersensitivity. 8th International Workshop on Langerhans cells, Tokyo, Sep. 5th, 2003.
 11. 勝田倫江, 稲岡峰幸, 塩原哲夫 : シンポジウム アレルギー性皮膚疾患の治療戦略 アトピー性皮膚炎における自然免疫低下に対する治療戦略. 第 33 回日本皮膚アレルギー学会総会, 東京, 2003 年 7 月 6 日.
 12. Katsuta M, Inaoka M, Takigawa Y & Shiohara T : Selective and sustained impairment of $\gamma\delta$ T cells and NK cells in patients with atopic dermatitis is driven by monocytes. The 4th Joint Meeting of the International Investigative Dermatology, Florida, May 3rd, 2003.
 13. 塩原哲夫 : イブニングセミナー ディベート 混合の是非-これからの外用療法を考える- 2. これでも、まだ混合調剤を続けますか? 第 19 回日本臨床皮膚科医学会総会, 京都, 2003 年 4 月 19 日.
 14. 勝田倫江, 稲岡峰幸, 滝川幸生, 塩原哲夫 : アトピー性皮膚炎患者における自然免疫担当細胞. 日本皮膚科学会第 778 回東京地方会(研究地方会), 東京, 2002 年 12 月 21 日.
 15. Katsuta M, Inaoka M, Takigawa Y, Shiohara T: Defective type 1 innate immune response in atopic dermatitis. 第 27 回日本研究皮膚科学会総会, 京都, 2002 年 8 月 2-3 日.
 16. Mizukawa Y, Takahashi R¹, Shiohara T('Division of Flow Cytometry) : AD is a disorder of abnormal trafficking of Th2 cells. 第 27 回日本研究皮膚科学会総会, 京都, 2002 年 8 月 3 日.
 17. Inaoka M, Takahashi R¹, Shiohara T ('Division of Flow Cytometry) : Selective inhibition of the innate immune system by NSAIDs. 第 27 回日本研究皮膚科学会総会, 京都, 2002 年 8 月 3 日.
 18. Takahashi R¹, Mizukawa Y, Shiohara T ('Division of Flow Cytometry) : Skin-homing Th1 cells use FucT-VII-dependent and/or independent pathways to bind E-selectin, depending on a cytokine milieu. 第 27 回日本研究皮膚科学会総会, 京都, 2002 年 8 月 2 日.
 19. 塩原哲夫 : DEBATE : アトピー性皮膚炎はアトピー疾患か アトピー性皮膚炎はアトピー疾患と考えてよい. 東京, 2002 年 7 月 27 日.
 20. Shiohara T: Workshop "Mechanisms of allergic contact dermatitis". On the mechanisms for a shift to type 2 responses upon repeated elicitation of contact hypersensitivity. 20th World Congress of Dermatology, Paris, July 2nd, 2002.
 21. Shiohara T: Symposium "Topical immunomodulators (TIMs)-new concepts in atopic dermatitis treatment". Effect of tacrolimus ointment on a hapten-induced mouse model. 20th World Congress of Dermatology, Paris, June 30th, 2002.
 22. 塩原哲夫: 臨床からみたアトピー性皮膚炎の動物モデル. アレルギーモデル研究会, 大阪, 2002 年 6 月 15 日.
3. 書籍
1. Shiohara T, Kano Y: Dermatology. Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, eds. London, Mosby, 2003. p.175-198.
- 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
総合研究報告書

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喘息及び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した。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。ヒト二倍体肺線維芽細胞株（HFL-1）は、フィブロネクチン、ラミニン、I及びIV型コラーゲンに対して遊走し、III型コラーゲンには遊走しないという結果が得られた。さらに、正常ヒト肺線維芽細胞（NHFLF）に対する遊走実験では、PDGF、VEGF、bFGF、GM-CSF、HGF及びTGF- β 1が遊走活性を有することを確認した。さらに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。

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）
岸川 禮子（同 アレルギー科）
寺尾 浩（同 皮膚科）
山内 絵理（同 臨床研究部）
荒木 由希子（同 臨床研究部）
西原 麻千子（同 臨床研究部 外部研究員）
岡元 孝二（九州工業大学大学院 生命体工学研究科 教授）

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、解析施設である帝京大学に送付するサンプルとして、喘息及びアトピー性皮膚炎患者本人から同意を取得後、血液の採取を行った。

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。ヒト二倍体肺線維芽細胞株（HFL-1）を用いて、細

胞外基質（ECM）蛋白であるフィブロネクチン、ラミニン及びI、III、IV型コラーゲンに対する遊走活性を検討した。また、正常ヒト肺線維芽細胞（NHFLF）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。さらに、PDGFについては、抗PDGF抗体による遊走抑制実験を試みた。

B. 研究方法

まず、遺伝子解析に供する血液の採取に

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、国立病院機構福岡病院の外来診療において、協力を得られる喘息及びアトピー性皮膚炎患者に研究の概要を説明し、さらに治験コーディネーター（CRC）により詳細な説明を受けた後で同意を取得後、血液サンプルを採取し、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、ヒト二倍体肺線維芽細胞株（HFL-1：米国クロネティクス社）及び正常ヒト肺線維芽細胞（NHFLF：同）を用いた。これら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測定する遊走因子を、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。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。

C. 研究結果

喘息及びアトピー性皮膚炎の病態形成因子の遺伝子情報収集のため、解析サンプル

として用いる喘息及びアトピー性皮膚炎患者の採血を行った。検体は即日帝京大学に送付され、遺伝子解析が実施された。

細胞遊走実験では、ヒト二倍体肺線維芽細胞株（HFL-1）を用いて、細胞外基質（ECM）蛋白であるフィブロネクチン、ラミニン及びI、III、IV型コラーゲンに対する遊走活性を検討した。その結果、HFL-1は、フィブロネクチン、ラミニン、I及びIV型コラーゲンに対して遊走し、III型コラーゲンには遊走しなかった（Fig.1）。

また、正常ヒト肺線維芽細胞（NHFLF）に対する遊走実験では、PDGF、VEGF、bFGF、GM-CSF、HGF及びTGF- β 1がNHFLFに対する遊走活性を有することを確認した（Fig.2~7）。さらに、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.8）。

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、また細胞外基質（ECM）蛋白も遊走因子として作用し、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。本研究では、HFL-1は、フィブロネクチン、ラミニン、I及びIV型コラーゲンに対して遊走し、III型コラーゲンには遊走しないという結果を得た。この結果は、細胞外基質（ECM）蛋白のうち、フィブロネクチン、

ラミニン、I及びIV型コラーゲンは、細胞遊走を惹起して修復への進行を促進するが、III型コラーゲンの増加した環境では、この修復過程が抑制される可能性を示唆している。

また、NHLF に対する遊走実験では、PDGF、VEGF、bFGF、GM-CSF、HGF 及び TGF- β 1 が NHLF に対する遊走活性を有することを確認した。さらに、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。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、NHLF 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

細胞遊走実験では、HFL-1 が、フィブロネクチン、ラミニン、I及びIV型コラーゲンに対して遊走し、III型コラーゲンには遊走しないという結果が得られた。また、PDGF、VEGF、bFGF、GM-CSF、HGF 及び TGF- β 1 が NHLF 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 NHLF の遊走は抗 PDGF 抗体により抑制された。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行う予定である。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

Fig.1 ヒト二倍体肺線維芽細胞株(HFL-1)の遊走

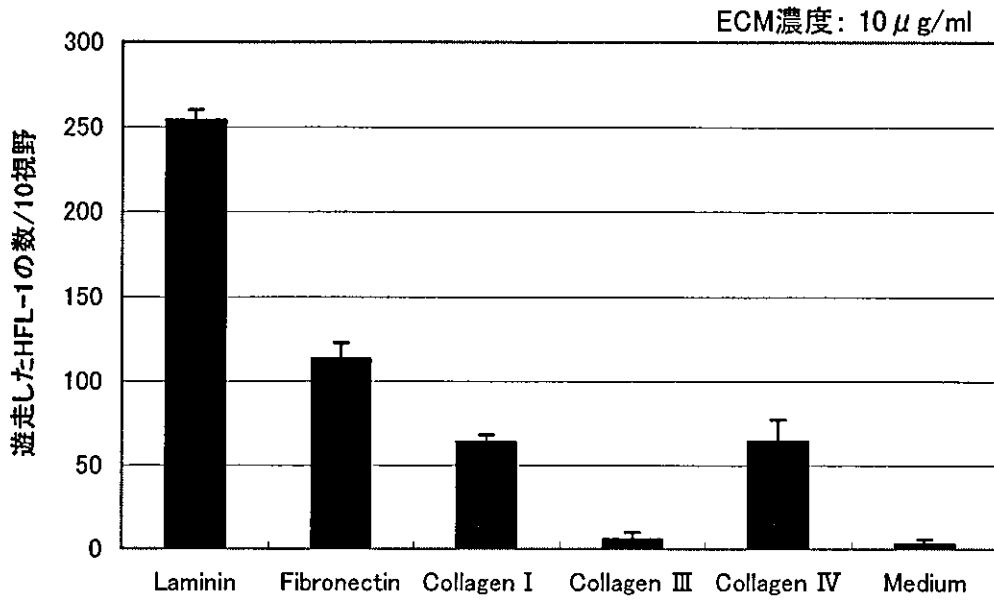


Fig.2 線維芽細胞に対するPDGFの遊走活性

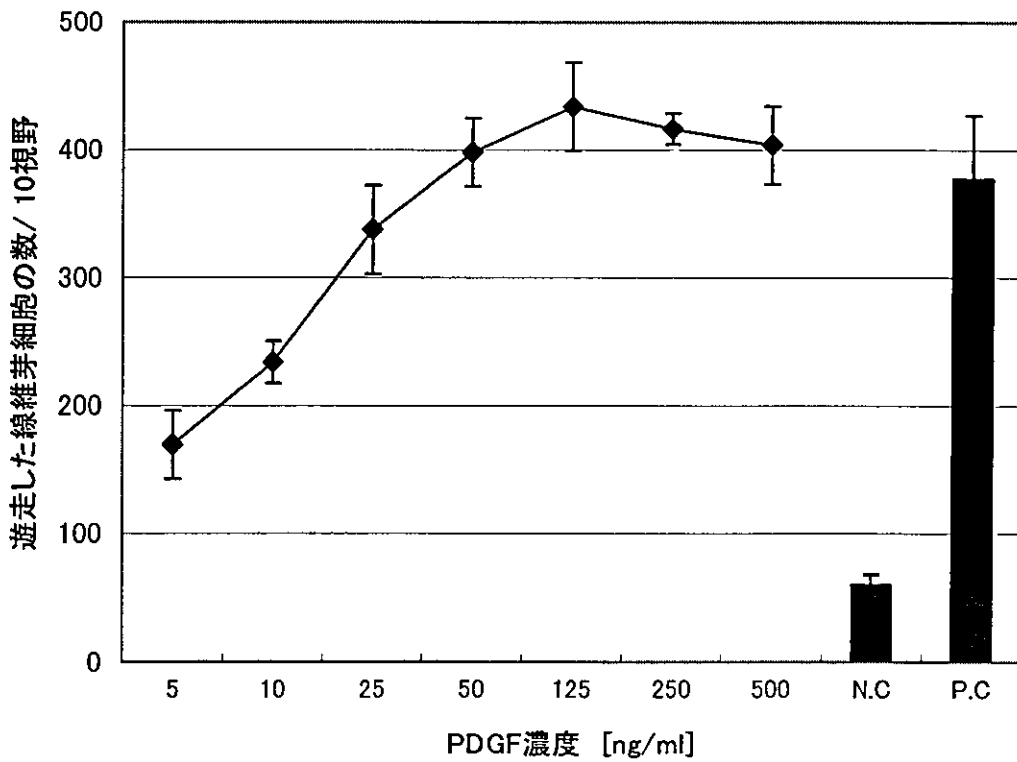


Fig.3 線維芽細胞に対するVEGFの遊走活性

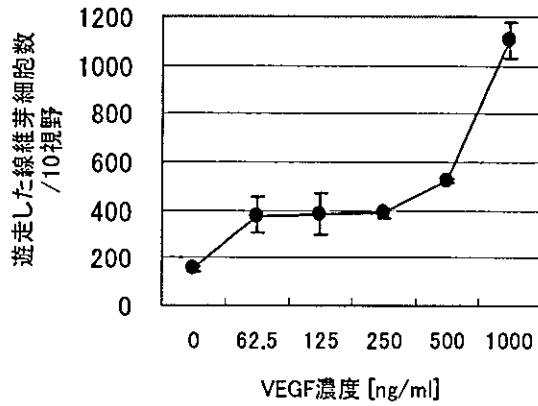


Fig.4 線維芽細胞に対するbFGFの遊走活性

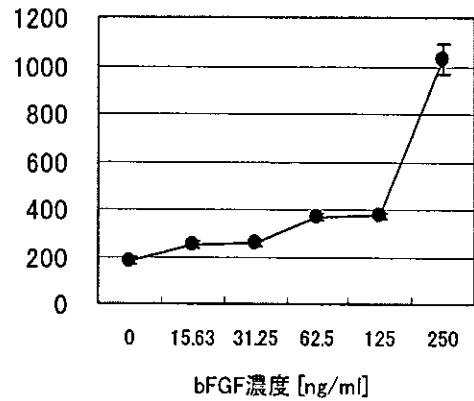


Fig.5 線維芽細胞に対するGM-CSFの遊走活性

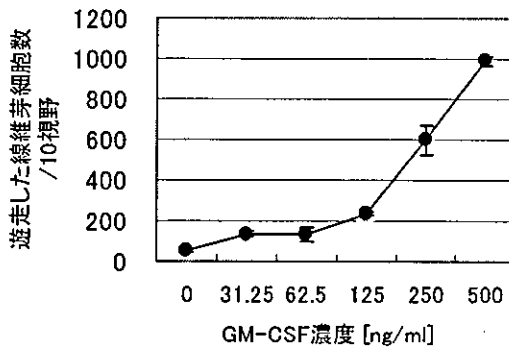


Fig.6 線維芽細胞に対するHGFの遊走活性

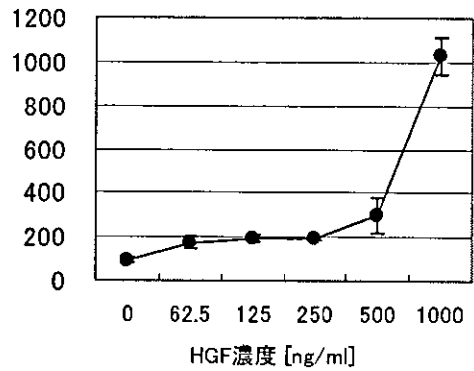


Fig.7 線維芽細胞に対するTGF-β1の遊走活性

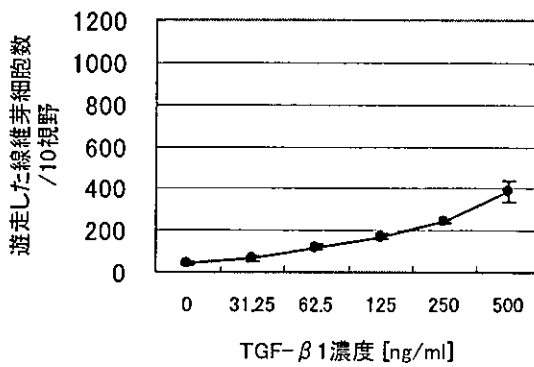
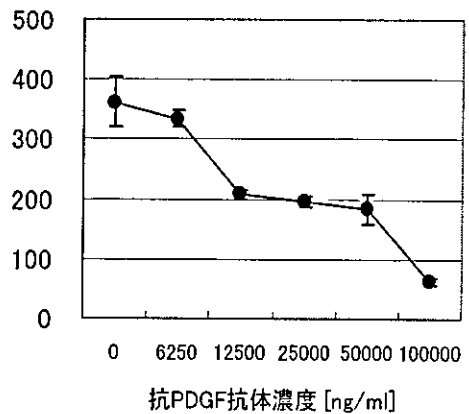


Fig.8 抗PDGF抗体による線維芽細胞遊走の抑制



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）

総合研究報告書

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・好塩基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これら細胞の集積に関わるケモカインに注目している。そこで我々は好酸球・好塩基球に多く発現している CCR(CC chemokine receptor)3 およびそのリガンドの一つである eotaxin/CCL11, また Th2 に発現している CCR4 およびその特異的リガンドである TARC/CCL17, MDC/CCL22、および同様に Th2 に特異的に発現している CCR8 およびその特異的リガンドである I-309 に着目し、その動態および遺伝子多型を解析した。まず喘息患者の血清および誘発喀痰において eotaxin のみならず TARC 濃度も上昇していること、気道粘膜組織において eotaxin だけでなく eotaxin-2, -3 も増加していることを見いだした。次いで SNP についてスクリーニングを行い有望であった TARC, MDC の SNP に関して健常人、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解析した。しかし TARC, MDC のいずれも疾患群と健常群との間に SNP 頻度の有意差は認められなかった。しかしながら、臨床パラメーターとの比較においては TARC SNP はロイコトリエンの内服と、アトピー性皮膚炎においては、発症年齢と相関することを見いだした。以上の知見はケモカインとその受容体がアレルギー疾患の病態に関与することを示唆していると考えられた。

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、臨床検体を用いて遺伝子解析および構造解析を進めるとともに、アレルギー疾患の発症および病態との比較解析

を行った。

B. 研究方法

研究班が収集した血液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、喘息アウトグロウ群に分類した。そしてこれら患者群や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。また我々が既に喘息における気道粘膜局所でのタンパク増加を証明している TARC については SNP の機能解析も行った。

（倫理面への配慮）

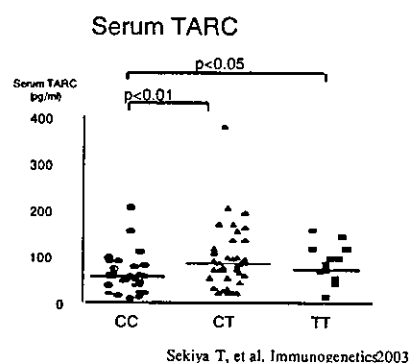
本研究にあたり各医療施設の倫理委員会で承認された方法に基づきプロトコールを作成し、各医療施設の倫理委員会の許可を得た。具体的には採血と同時に氏名、カルテ番号を記録し、方法に記載したような臨床情報を研究班共通のフォーマットに記録した。血液は東京大学生体防御機能学で連結匿名化、記号化（東大-1 など）し、個人が特定される情報を除いた臨床情報とともに帝京大学に送付された。帝京大学では、各施設の試料とともに、シャッフルして再度、連結匿名化（大田-1 など）した。DNA を分離し、他施設由来の DNA と一緒に東大に送付した。これらの DNA を東大で解析し、その結

果は帝京大に返送した。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

好酸球、好塩基球に関連する CCR3、eotaxin、および Th2 関連の CCR4, CCR8 と TARC, MDC, I-309 に関して検討した。eotaxin のみならず eotaxin-2, -3 のいずれも喘息の気道粘膜生検標本を用いて気道上皮細胞におけるタンパク量が増加していることを免疫染色で確認した。一方、CCR3 SNP に関しては気管支喘息ともアトピー性皮膚炎とも発症と関連あるデータは見いだせなかった（Tsunemi et al. J. Dermatol. Sci. 2003）。また CCR8, I-309 も有意な関連は見いだせなかった。

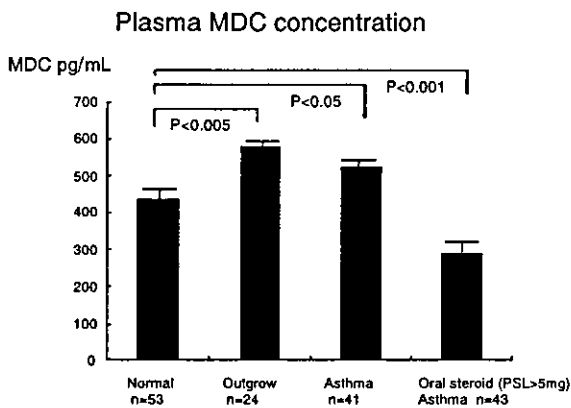
CCR4 および TARC, MDC については、我々が既に喘息の気道粘膜での TARC タンパク増加を認めているとおり、ケモカイン側の発現制御機構が病態と関連あると予測された。まず、我々は TARC 遺伝子解析を行い、新たな SNP (-431C>T) を見いだした。そして genotype により TARC の血中濃度が異なることを実際の臨床検体で示した。（Sekiya et al. Immunogenetics 2003）



また MDC の SNP は幾つかすでに報告されている

が、そのなかでも頻度が多くかつアミノ酸変異を伴い有望だと考えられた SNP は 5C>A の多型で

あった。まず血漿検体中の MDC 濃度を測定したところ、喘息および喘息アウトグロウ群で上昇、ステロイド内服中の喘息患者群で減少と、いずれも健常群との間では有意差があった (Airway Club 2004)。



その一方で、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、疾患群間に有意差はみられなかった。全喘息患者と健常コントロールとで比較したが、これも有意差は認めなかった。(アレルギー学会総会 2004)。

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

さらに MDC SNP をと同様に分類し解析したが有意なものはない。各群間および全喘息患

者と健常人との比較もしてみたが、SNP 頻度に関し、有意な差は存在しなかった。

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

次いで TARC SNP (-431C>T) が血中 TARC 濃度と関連があるメカニズムを追求する目的で、mutation vector を用いた luciferase assay により解析し、TT type が wild type である CC 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. 2004)。

臨床パラメーターとの比較においては TARC SNP において気管支喘息群が呼吸機能一秒率と弱い相関があり (p=0.0562)、意味づけは難しいがロイコトリエン拮抗薬内服との相関も見られた (p=0.0135)。アトピー性皮膚炎においては、発症年齢と TARC SNP との相関があり (p=0.0399)、TT type の方が wild type よりも発症年齢が低くなることが示唆された。

D. 考察 および E. 結論

我々はアレルギー疾患での CCR3, CCR4, CCR8 およびそのリガンド eotaxin, TARC, MDC, I-309 に関して包括的な検討を行った。特に TARC, MDC については多数の臨床検体を用いて SNP 解析を進めた。TARC SNP (-431C>T) につい