

Table 5. Genotype frequencies and case-control analysis of the *IL12RB1* -111 SNP in AD patient subgroups and childhood asthma

	-111 genotype			Genotype AA + AT versus TT		
	AA (%)	AT (%)	TT (%)	OR (95%CI)	$\chi^2$	P
AD (Total)	221 (59.7)	113 (30.5)	36 (9.7)	2.46 (1.47-4.13)	12.4	0.00044
IgE $\leq$ 250 IU/ml	27 (64.3)	11 (26.2)	4 (9.5)	2.41 (0.80-7.23)	2.6	0.11
IgE > 250 IU/ml	194 (59.1)	102 (31.1)	32 (9.8)	2.47 (1.45-4.20)	11.8	0.00059
IgE > 400 IU/ml	183 (58.8)	97 (31.2)	31 (10.0)	2.53 (1.48-4.32)	12.3	0.00046
IgE > 1800 IU/ml	128 (57.1)	71 (31.7)	25 (11.2)	2.87 (1.63-5.06)	14.3	0.00015
Blood eosinophil count > 500/ $\mu$ l	85 (52.8)	56 (34.8)	20 (12.4)	3.24 (1.77-5.94)	15.9	0.000068
Early age of disease onset $\leq$ 3year	115 (56.9)	62 (30.7)	25 (12.4)	3.23 (1.83-5.70)	17.9	0.000024
History of asthma in childhood	53 (54.6)	31 (32.0)	13 (13.4)	3.54 (1.76-7.12)	14.0	0.00018
History of allergic rhinitis	123 (64.4)	49 (25.7)	19 (9.9)	2.52 (1.37-4.65)	9.4	0.0022
Childhood asthma (n = 304)	162 (53.3)	114 (37.5)	28 (9.2)	2.32 (1.34-4.01)	9.5	0.0020

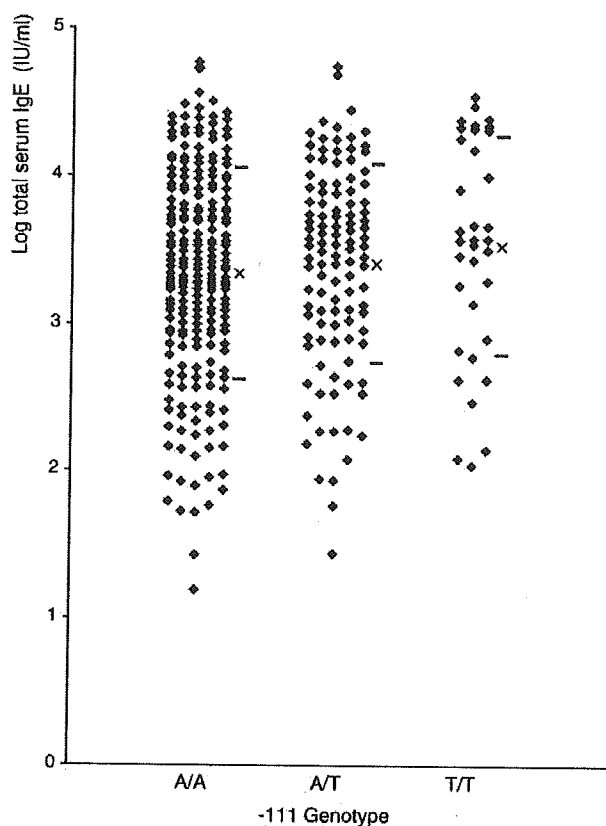


Figure 2. Relationship of *IL12RB1* -111 promoter genotype with total serum IgE levels in AD patients. Log-transformed individual IgE values are plotted, with the mean (x) and SD (bar) shown for each genotype group.

in the majority of affected patients, giving rise to the so-called 'atopic march', which suggests that AD is an initial step or entry point for subsequent allergic diseases (3,28). Therefore, early intervention in AD-susceptible individuals may be an effective strategy in preventing the atopic march. For this reason, *IL12RB1* genotype may be an important genetic marker.

The lymphocytes infiltrating unaffected skin or acute skin lesions in AD patients tend to be Th2-type T cells that produce IL-4, IL-5 and IL-13, whereas expression of IL-12

and the Th1 cytokine IFN- $\gamma$  are increased in chronic eczematous AD skin lesions (8,29). In addition, AD is known to be associated with a high prevalence of skin infections, particularly involving *Staphylococcus aureus*. Recent studies have shown that at both the mRNA and protein levels, antibacterial peptides such as  $\beta$ -defensins and cathelicidin are decreased or deficient in skin lesions from AD patients when compared with those from psoriasis patients and that the combination of IL-4 and IL-13 inhibited the production of these antimicrobial peptides from keratinocytes (30,31). Although the exact mechanisms by which IL-12R $\beta$ 1 regulates these pathophysiological disease features remain unknown, one possibility is that excess Th2 cytokines block a pathway of innate immune activation, leading to an increased susceptibility to skin infections. This in turn facilitates the continued activation of the adaptive immune system, including the recruitment and activation of atopic Th2 cells and perpetuation of the lesions (32). Therefore, our findings suggest that *IL12RB1* SNPs or haplotypes, which appear to affect protein expression or function, may predispose an individual toward the initiation or development of Th2-mediated immune responses in the skin. Further biological and population studies will be required to confirm the role of *IL12RB1* SNPs.

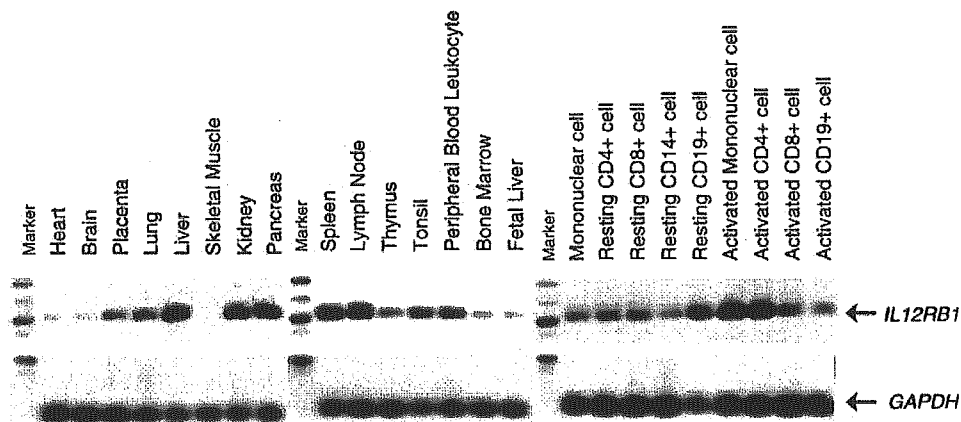
In contrast to AD, the immune response in psoriasis is Th1-mediated and is associated with local neutrophil infiltration. Recent data have indicated that expression of IL-23 and the IL-23-promoting cytokine IL-17 is increased in lesional skin samples of patients with psoriasis vulgaris. As IL-23 utilizes IL-12R $\beta$ 1 as part of its receptor, it is reasonable to speculate that the same promoter SNPs in *IL12RB1* that cause susceptibility to AD might be involved in psoriasis vulgaris as well. Our findings were in accordance with a recent study in Morocco that found an association of pulmonary tuberculosis (TB) with two promoter *IL12RB1* SNPs at -111 and -2 (24). Moreover, an association between heterozygous mutations of the *IL12RB2* gene and reduced IFN- $\gamma$  production by PBMC following stimulation by IL-12 in some Japanese atopic subjects has also been reported (33) and *IL12B* has been identified as a susceptibility gene in patients with AD (18), asthma (34) and type 1 diabetes (35). These studies along with our present data suggest that functionally relevant SNPs in the IL-12/IL-12R and IL-23/IL-23R systems may be associated with the genetic susceptibility to a variety of diseases, including AD and TB.

**Table 6.** Structure and frequencies of two-locus haplotype in *IL12RB1*

Haplotypes (-111; -2)	-111	-2	AD (n = 382)	Childhood asthma (n = 304)	Controls (n = 658)	<i>P</i> <sup>a</sup>	<i>P</i> <sup>b</sup>
1	A	C	0.742	0.717	0.787	0.021	0.00081
2	T	T	0.227	0.238	0.188	0.035	0.011
3	T	C	0.027	0.043	0.025	0.741	0.028
4	A	T	0.004	0.002	0.001	0.095	0.57

<sup>a</sup>AD versus controls (global *P* = 0.06).

<sup>b</sup>Childhood asthma versus controls (global *P* = 0.005).



**Figure 3.** Expression of *IL12RB1* mRNA in multiple tissue cDNA panels. PCR amplification between *IL12RB1* exons 10 and 13 is shown in the upper panel. The *GAPDH* control is shown in the lower panel.

The human *IL12RB1* gene is located on chromosome 19p13.1. Although this region has not been previously implicated by AD linkage studies, a recent study suggested that chromosome 19p13 might harbor a genetic determinant of IgE-related traits (36). Another report showed modest evidence of linkage for atopic phenotypes on chromosome 19p13.3 in an Italian population (37), and a genome-wide scan of a large cohort of German families revealed significant evidence for a psoriasis-susceptibility locus on 19p13 (38). Thus, chromosome 19p13 may indeed contain immunoregulatory genes that influence inflammatory skin diseases such as AD and/or atopy-related phenotypes. In addition, the *IL12RB1* gene is a novel and attractive candidate susceptibility gene for skin inflammatory diseases such as AD, on the basis of its location as well as its function. However, further genetic analyses and biological studies will be required to address whether other atopic disease-related genes or SNPs are also present on 19p13.

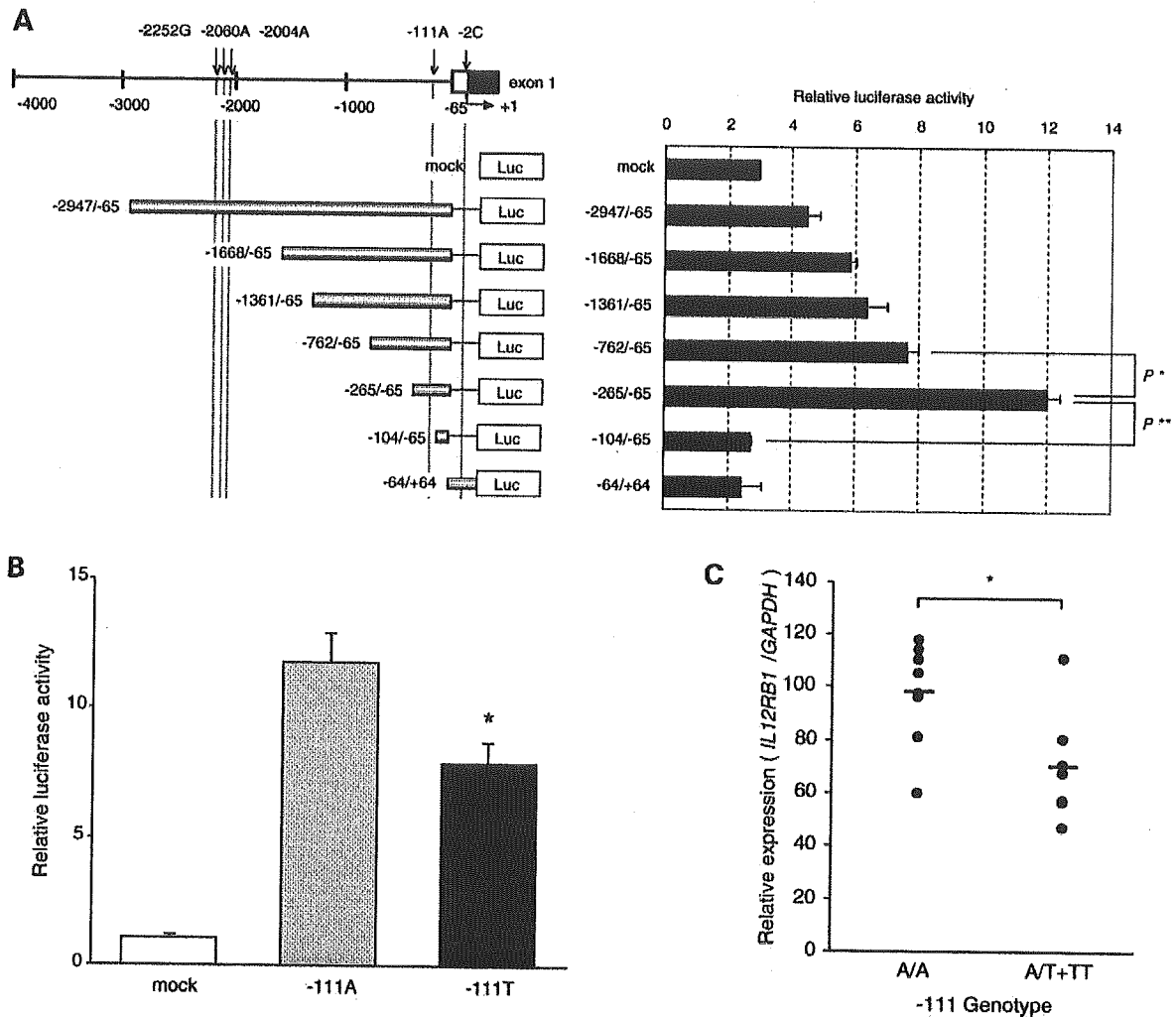
In conclusion, we have identified 48 variants (10 novel) of the human *IL12RB1* gene. Our studies demonstrated that the -111T/T *IL12RB1* genotype was associated with high total serum IgE levels and AD susceptibility in a Japanese population. Furthermore, we showed that the -111A/T polymorphism affected the *IL12RB1* gene transcriptional activity and may contribute to low IL-12Rβ1 expression levels. In individuals with the -111T/T genotype, reduced IL-12Rβ1 expression may lead to increased Th2 cytokine

production in the skin and contribute to the development of AD and other subsequent allergic diseases. Our findings also highlighted the importance of the IL-12-IFN-γ and/or IL-23-IL-17 pathway in the pathogenesis of AD and regulation of IgE. Although the exact functional role of IL-12Rβ1 in AD remains to be elucidated, the identification of SNPs in *IL12RB1* as a risk factor for AD may provide a strategy to prevent disease onset in susceptible individuals and to represent an attractive target for future therapies for this disorder.

## MATERIALS AND METHODS

### Study subjects

A total of 382 AD patients (mean age 30.2 years, range 16–65 years; 193 females and 189 males; mean total serum IgE level 2815 IU/ml) were recruited from Yokohama City University Hospital and Kyoto Takao Hospital. All patients with AD were diagnosed by dermatologists according to the criteria of Hanifin and Rajka (39). Controls for the SNP association study were 658 unrelated healthy individuals with an age range of 18–83 years, were from the same geographical areas as the AD patients and had no symptoms or personal and family histories of AD, asthma or allergic rhinitis. We also recruited 304 patients with childhood asthma with an age range of 4–15 years, who have been included in a previous study (40). All subjects in this study were ethnically



**Figure 4.** Identification of regulatory elements in the *IL12RB1* promoter, transcriptional effect of the  $-111A/T$  SNP and association of the  $-111$  genotype with *IL12RB1* mRNA expression. (A) The indicated *IL12RB1* gene promoter fragments derived from wild-type allele sequence ( $-2252G/-2060A/-2004A/-111A/-2C$ ) were cloned into the pGL3-basic vector and transiently cotransfected with pRL-TK vector as internal control. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.001$ . (B) Relative luciferase activities of constructs containing the human *IL12RB1* gene fragments (from  $-265$  to  $-65$  bp), with  $-111A$  or  $-111T$ , were compared in transient transfection assays using Jurkat cells. The relative luciferase activity of the *IL12RB1* reporter constructs is represented as the ratio of firefly luciferase activity to that of *Renilla*. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate. \* $P < 0.01$ . (C) Quantitative *IL12RB1* mRNA expression in stimulated PBMCs from healthy volunteers (A/A,  $n = 8$ ; A/T,  $n = 6$ ; T/T,  $n = 1$ ). *IL12RB1* mRNA levels in cells from *IL12RB1*<sup>-111A/A</sup>, *IL12RB1*<sup>-111A/T</sup> and *IL12RB1*<sup>-111T/T</sup> individuals following anti-CD3 stimulation are shown. Relative mRNA levels were defined as the net intensity of *IL12RB1* and *GAPDH* (*IL12RB1/GAPDH*). \* $P$  (A/A versus A/T+ T/T) = 0.019.

Japanese and gave written informed consent to participate in the study, according to the process approved by the Ethics Committee at the SNP Research Center, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN).

#### Screening for polymorphisms and genotyping

To identify genetic variants of the human *IL12RB1* gene, we sequenced all 17 exons, adjacent intronic sequence, 4.0 kb 5' flanking region and 1.5 kb 3'-flanking region in 24 individuals from our study cohort. On the basis of *IL12RB1* genomic and mRNA sequences from the GenBank database (accession nos AC020904 and U03187, respectively), 25 primer sets were

designed (Supplementary Material). All PCR products were sequenced using BigDye terminator v3.1 and an ABI Prism 3700 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequences were analyzed and polymorphisms identified using the SEQUENCHER program (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA). On the basis of information available from the public JSNP database (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp>), eight selected SNPs were genotyped by one of two methods: the Invader assay (41) (for  $-111A/T$ :IMS-JST063138,  $-2C/T$ :IMS-JST063137, 4443C/T:IMS-JST063136, 17183T/C:IMS-JST063134 and 27637T/A:IMS-JST097711) and the TaqMan assay (for 5970G/C, 17369C/T and 25748T/C) on an ABI PRISM 7700 Sequence

Detector Systems (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Probe sets for the Invader assay were designed and synthesized by Third Wave Technologies, and those for the TaqMan assay were obtained from Applied Biosystems.

### Tissue expression

We assessed *IL12RB1* expression in a panel of cDNA tissue samples (Human Multiple Tissue, Human Immune System and Human Blood Fractions Multiple Tissues cDNA Panels, Clontech) by PCR amplification of target sequences and Southern blotting. The primer sets were 5'-CAGTGGCTC TGAATATCAGC-3' and 5'-TGCACCGTGTAGGCTACACC-3' for *IL12RB1* and 5'-CCCATGTTTCGTCATGGGT-3' and 5'-GTGATGGCATGGACTGTGG-3' for *GAPDH*. Southern blotting was performed with a non-radioactive nucleic acid labeling and detection kit (Roche Diagnostic, Basal, Switzerland), according to the manufacturer's instructions. The probes for *IL12RB1* and *GAPDH* were 5'-TGGCAACC TACAGCTGGAGT-3' and 5'-CCATGAGAAGTATGACAA CAG-3', respectively.

### Luciferase assay

After restriction enzyme digestion with *KpnI* and *XhoI*, luciferase reporter constructs were generated by cloning the different promoter fragments of the *IL12RB1* gene into the pGL3-basic vector (Promega, Madison, WI, USA) between unique *KpnI* and *XhoI* sites. Forward primers used were: -2947/-65, 5'-CCACTTGGGCCTCAGTTTCC-3'; -1668/-65, 5'-CTGACATTTAGAGGCTTTGCC-3'; -1361/-65, 5'-CAAACCTCTGACCTCGTGATC-3'; -762/-65, 5'-CCG TGATTGCACCACTGCAC-3'; -265/-65, 5'-ACCCTGA CTTGCTCCAAAGTC-3'; -104/-65, 5'-TCTCCTTGCTC AGCTTC-3', with 5'-CCGTCCCCACTCCGGAACAC-3' used as a common reverse primer. Using plasmid DNA as template, -111T constructs were created using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, USA), forward primer (5'-CTTTTTTCTTTTTTCTGTCTTTTCTCCTTG CTCAGCTTC-3'), complementary reverse primer and the various pGL3-basic clones. The orientation and integrity of the inserts for each construct were confirmed by DNA sequencing. Jurkat cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Subconfluent cells cultured in 12-well plates were transiently cotransfected with 2 µg pG L3-basic vector DNA or each reporter construct and 40 ng pRL-TK vector DNA (Promega) as an internal control for transfection efficiency, using DMRIE-C transfection reagent (Invitrogen, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. After 24 h, cells were harvested, and firefly and *Renilla* luciferase activities measured as previously described (40). Data are presented as relative luciferase activity of firefly/*Renilla* luciferase activity.

### PBMC preparation

To analyze *IL12RB1* mRNA expression, PBMCs from 16 randomly selected healthy individuals were isolated by Ficoll

density gradient centrifugation, after which  $1 \times 10^6$  cells/ml PBMC were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% HEPES buffer, 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids and 1% penicillin-streptomycin solution. PBMCs were stimulated with 100 µg/ml PHA or 100 µg/ml anti-CD3 antibody for 72 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### Real-time quantitative PCR

Total RNA was isolated from cultured PBMC using the NucleoSpin 96 RNA kit (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany), according to the manufacturer's instructions. cDNA was then synthesized using the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Real-time quantitative PCR was performed on the ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) using an Assay-on-Demand TaqMan probe and primers (Hs00234651\_ml for *IL12RB1*), according to the manufacturer's instructions. Relative expression levels of *IL12RB1* mRNA were normalized according to *GAPDH* expression, using a standard curve method as described by the manufacturer.

### Statistical analysis

We calculated allele frequencies and tested agreement with Hardy-Weinberg equilibrium using a  $\chi^2$  goodness-of-fit test at each locus. We also compared differences in allele frequencies and genotype distribution of each polymorphism between case and control subjects, using a  $2 \times 2$  contingency  $\chi^2$  test with one degree of freedom or Fisher's exact test. All *P*-values are unadjusted for multiple comparisons unless specifically indicated. We calculated LD coefficients (*D'* and *r*<sup>2</sup>) using the SNP Alyze statistical package (Dynacom, Chiba, Japan), as described elsewhere (42). We estimated haplotype frequencies using the expectation-maximization algorithm. We calculated ODs with 95% confidence intervals (95%CI) using logistic regression. Comparisons in reporter assays as well as quantitative PCR experiments were performed using Student's *t*-test. Association between log-transformed total serum IgE levels in AD patients and individual genotypes was calculated by the Mann-Whitney *U*-test or the Kruskal-Wallis test. A *P*-value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at HMG Online.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Miki Kokubo, Aya Jodo and Hiroshi Sekiguchi for their technical assistance. This work was supported by grants-in-aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, the Japan Science and Technology Corporation and the Japanese Millennium Project.

*Conflict of Interest statement.* None declared.

## REFERENCES

- Rudikoff, D. and Leibold, M. (1998) Atopic dermatitis. *Lancet*, **351**, 1715–1721.
- Williams, H., Robertson, C., Stewart, A., Ait-Khalid, N., Anabwani, G., Anderson, R., Asher, I., Beasley, R., Björkstén, B., Burr, M. *et al.* (1999) Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 125–138.
- Leung, D.Y., Boguniewicz, M., Howell, M.D., Nomura, I. and Hamid, Q.A. (2004) New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.*, **113**, 651–657.
- Larsen, F.S., Holm, N.V. and Henningsen, K. (1986) Atopic dermatitis. A genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **15**, 487–494.
- Schultz Larsen, F. (1993) Atopic dermatitis: a genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **28**, 719–723.
- Novak, N., Bieber, T. and Leung, D.Y. (2003) Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **112**, S128–S139.
- Hamid, Q., Boguniewicz, M. and Leung, D.Y. (1994) Differential *in situ* cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.*, **94**, 870–876.
- Hamid, Q., Naseer, T., Minshall, E.M., Song, Y.L., Boguniewicz, M. and Leung, D.Y. (1996) *In vivo* expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **98**, 225–231.
- Chan, L.S., Robinson, N. and Xu, L. (2001) Expression of interleukin-4 in the epidermis of transgenic mice results in a pruritic inflammatory skin disease: an experimental animal model to study atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 977–983.
- Watford, W.T., Moriguchi, M., Morinobu, A. and O'Shea, J.J. (2003) The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **14**, 361–368.
- Abbas, A.K., Murphy, K.M. and Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, **383**, 787–793.
- Presky, D.H., Yang, H., Minetti, L.J., Chua, A.O., Nabavi, N., Wu, C.Y., Gately, M.K. and Gubler, U. (1996) A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two  $\beta$ -type cytokine receptor subunits. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 14002–14007.
- Wu, C., Ferrante, J., Gately, M.K. and Magram, J. (1997) Characterization of IL-12 receptor  $\beta$ 1 chain (IL-12R $\beta$ 1)-deficient mice: IL-12R $\beta$ 1 is an essential component of the functional mouse IL-12 receptor. *J. Immunol.*, **159**, 1658–1665.
- Wu, C., Wang, X., Gadina, M., O'Shea, J.J., Presky, D.H. and Magram, J. (2000) IL-12 receptor  $\beta$ 2 (IL-12R $\beta$ 2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites. *J. Immunol.*, **165**, 6221–6228.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K. *et al.* (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, **13**, 715–725.
- Leung, D.Y. and Bieber, T. (2003) Atopic dermatitis. *Lancet*, **361**, 151–160.
- Rafatpanah, H., Bennett, E., Pravica, V., McCoy, M.J., David, T.J., Hutchinson, I.V. and Arkwright, P.D. (2003) Association between novel GM-CSF gene polymorphisms and the frequency and severity of atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **112**, 593–598.
- Tsunemi, Y., Saeki, H., Nakamura, K., Sekiya, T., Hirai, K., Fujita, H., Asano, N., Kishimoto, M., Tanida, Y., Kakinuma, T. *et al.* (2002) Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3'-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J. Dermatol. Sci.*, **30**, 161–166.
- Olesen, A.B., Juul, S., Birkebaek, N. and Thestrup-Pedersen, K. (2001) Association between atopic dermatitis and insulin-dependent diabetes mellitus: a case-control study. *Lancet*, **357**, 1749–1752.
- Shirakawa, T., Enomoto, T., Shimazu, S. and Hopkin, J.M. (1997) The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science*, **275**, 77–79.
- Sakai, T., Matsuoka, M., Aoki, M., Nosaka, K. and Mitsuya, H. (2001) Missense mutation of the interleukin-12 receptor  $\beta$ 1 chain-encoding gene is associated with impaired immunity against *Mycobacterium avium* complex infection. *Blood*, **97**, 2688–2694.
- Akahoshi, M., Nakashima, H., Miyake, K., Inoue, Y., Shimizu, S., Tanaka, Y., Okada, K., Otsuka, T. and Harada, M. (2003) Influence of interleukin-12 receptor  $\beta$ 1 polymorphisms on tuberculosis. *Hum. Genet.*, **112**, 237–243.
- van de Vosse, E., Lichtenauer-Kaligis, E.G., van Dissel, J.T. and Ottenhoff, T.H. (2003) Genetic variations in the interleukin-12/interleukin-23 receptor ( $\beta$ 1) chain, and implications for IL-12 and IL-23 receptor structure and function. *Immunogenetics*, **54**, 817–829.
- Remus, N., El Baghdadi, J., Fieschi, C., Feinberg, J., Quintin, T., Chentouf, M., Schurr, E., Benslimane, A., Casanova, J.L. and Abel, L. (2004) Association of *IL12RB1* polymorphisms with pulmonary tuberculosis in adults in Morocco. *J. Infect. Dis.*, **190**, 580–587.
- Desai, B.B., Quinn, P.M., Wolitzky, A.G., Mongini, P.K., Chizzonite, R. and Gately, M.K. (1992) IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. *J. Immunol.*, **148**, 3125–3132.
- Grohmann, U., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Orabona, C., Ayroldi, E., Fioretti, M.C. and Puccetti, P. (1998) IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF- $\kappa$ B and primes DC for IL-12 production. *Immunity*, **9**, 315–323.
- Wu, C.Y., Warrier, R.R., Carvajal, D.M., Chua, A.O., Minetti, L.J., Chizzonite, R., Mongini, P.K., Stern, A.S., Gubler, U., Presky, D.H. *et al.* (1996) Biological function and distribution of human interleukin-12 receptor  $\beta$  chain. *Eur. J. Immunol.*, **26**, 345–350.
- Spergel, J.M. and Paller, A.S. (2003) Atopic dermatitis and the atopic march. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **112**, S118–S127.
- Grewe, M., Gyuftko, K., Schopf, E. and Krutmann, J. (1994) Lesional expression of interferon- $\gamma$  in atopic eczema. *Lancet*, **343**, 25–26.
- Nomura, I., Goleva, E., Howell, M.D., Hamid, Q.A., Ong, P.Y., Hall, C.F., Darst, M.A., Gao, B., Boguniewicz, M., Travers, J.B. *et al.* (2003) Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J. Immunol.*, **171**, 3262–3269.
- Ong, P.Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., Gallo, R.L. and Leung, D.Y. (2002) Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.*, **347**, 1151–1160.
- Kupper, T.S. and Fuhlbrigge, R.C. (2004) Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 211–222.
- Matsui, E., Kaneko, H., Fukao, T., Teramoto, T., Inoue, R., Watanabe, M., Kasahara, K. and Kondo, N. (1999) Mutations of the IL-12 receptor  $\beta$ 2 chain gene in atopic subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **266**, 551–555.
- Morahan, G., Huang, D., Wu, M., Holt, B.J., White, G.P., Kendall, G.E., Sly, P.D. and Holt, P.G. (2002) Association of *IL12B* promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children. *Lancet*, **360**, 455–459.
- Morahan, G., Huang, D., Ymer, S.I., Cancilla, M.R., Stephen, K., Dabadhghao, P., Werther, G., Tait, B.D., Harrison, L.C. and Colman, P.G. (2001) Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory *IL12B* allele. *Nat. Genet.*, **27**, 218–221.
- Laitinen, T., Ollikainen, V., Lazaro, C., Kauppi, P., de Cid, R., Anto, J.M., Estivill, X., Lokki, H., Mannila, H., Laitinen, L.A. *et al.* (2000) Association study of the chromosomal region containing the *FCER2* gene suggests it has a regulatory role in atopic disorders. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **161**, 700–706.
- Venanzi, S., Malerba, G., Galavotti, R., Lauciello, M.C., Trabetti, E., Zanoni, G., Pescolliderung, L., Martinati, L.C., Boner, A.L. and Pignatti, P.F. (2001) Linkage to atopy on chromosome 19 in north-eastern Italian families with allergic asthma. *Clin. Exp. Allergy*, **31**, 1220–1224.
- Lee, Y.A., Ruschendorf, F., Windemuth, C., Schmitt-Egenolf, M., Stadelmann, A., Nurnberg, G., Stander, M., Wienker, T.F., Reis, A. and Traupe, H. (2000) Genomewide scan in German families reveals evidence for a novel psoriasis-susceptibility locus on chromosome 19p13. *Am. J. Hum. Genet.*, **67**, 1020–1024.
- Hanifin, J.M. and Rajka, G. (1980) Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.*, **92**(suppl.), 44–47.
- Akahoshi, M., Obara, K., Hirota, T., Matsuda, A., Hasegawa, K., Takahashi, N., Shimizu, M., Nakashima, K., Cheng, L., Doi, S. *et al.* (2005) Functional promoter polymorphism in the *TBX21* gene associated with aspirin-induced asthma. *Hum. Genet.*, **117**, 16–26.
- Ohnishi, Y., Tanaka, T., Ozaki, K., Yamada, R., Suzuki, H. and Nakamura, Y. (2001) A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. *J. Hum. Genet.*, **46**, 471–477.
- Nakajima, T., Jorde, L.B., Ishigami, T., Umemura, S., Emi, M., Lalouel, J.M. and Inoue, I. (2002) Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations. *Am. J. Hum. Genet.*, **70**, 108–123.

# 花粉症の遺伝的背景

野口恵美子<sup>1)</sup>

**[SUMMARY]** 花粉症は環境要因と遺伝要因が深くかかわって発症する多因子疾患である。多因子疾患の疾患感受性遺伝子同定のためには症例対照研究と家系を用いた連鎖解析が広く用いられている。本稿では現在までに行われている花粉症・アレルギー性鼻炎の全ゲノム連鎖解析の報告と候補遺伝子の症例対照研究について詳述した。〔臨床検査 50:139-144, 2006〕

**[KEYWORDS]** 全ゲノム連鎖解析, 症例対照研究, SNP

## ▶ アトピーの遺伝的背景

21世紀の国民病といわれるアトピー性疾患は罹患者も多く(喘息5~10%, アトピー性皮膚炎20%, 花粉症30%), その対策は急務である。花粉症における医療経済損失は2,860億円(2000年)と試算され、これはさらに増加傾向にある。

アレルギー(アトピー)は、普遍的な抗原(室内塵、動物の毛や花粉など)に対してIgE抗体を作りやすい体質と定義され、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、結膜炎などがアトピー性疾患の代表である。人間には、内部に侵入しようとするものを排除する機構(免疫機能)が備わっている。具体的には、細菌・ウイルスなどから身体を守るためのシステムであり、われわれが健康に暮らしていくために必要不可欠のものである。しかし、アレルギー疾患の患者では、本来は無害であるはずのダニや花粉(これらはヒトに対

する感染性がない)に対して、免疫システムが過剰反応(または過敏反応)し、「アレルギー反応」を引き起こす。これらの疾患の共通点として、①IgEが上昇することが多い、②組織(喘息では気道、花粉症では鼻粘膜、アトピー性皮膚炎では皮膚)に好酸球やTリンパ球、肥満細胞などの浸潤が認められる、などが挙げられる。

アトピーはもともと遺伝する傾向にあることから提唱された概念であるが、これは家系調査、双生児研究などでも証明されている。アトピーの遺伝に関する初めての大規模な研究は、1916年、1924年にCookeらによって行われた<sup>1)</sup>。彼らは喘息と花粉症患者(アトピー群)とアレルギーのない正常コントロール(非アトピー群)を比較し、アトピー群では家族歴のあるものは48%、非アトピー群では7%、オッズ比は19であることを報告した。アレルギー疾患の家系調査による報告はその後多数なされているが、いずれも決定的なものではなく、その遺伝形式は単純なメンデル遺伝では説明がつかない<sup>2)</sup>。

疾患に関連する遺伝子変異頻度が数世代で急激に変わることはないため、近年のアレルギー疾患の増加は遺伝では説明がつかない。アレルギー疾患はその発症に環境(抗原暴露と感染症)も深くかかわっている。Hygiene Hypothesisは、アレルギーに関与するTh-2タイプヘルパーT細胞産生が感染症により、Th-1タイプのヘルパーT細胞にシフトすることによりアレルギー疾患が抑えられるという仮説である。この仮説に対して多くの研究がなされており、現在までにトキソプラズ

1) NOGUCHI Emiko 筑波大学人間総合科学研究科社会環境医学専攻 遺伝医学分野・講師

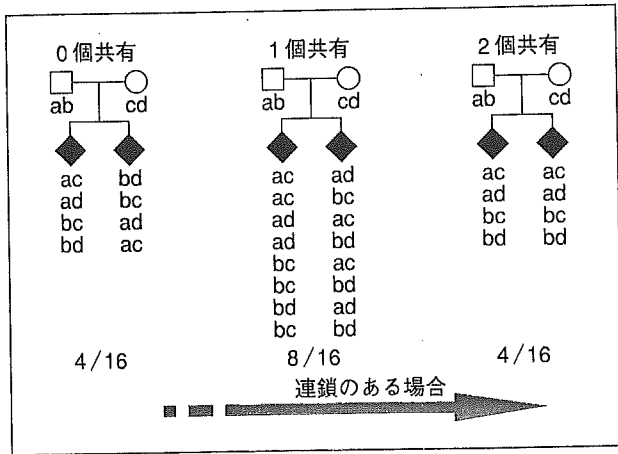


図1 罹患同胞対法(affected sib-pair method)の原理  
 両親の遺伝子型をそれぞれ ab, cd とすると, 2 人の子供の遺伝子型の組み合わせは上図の 16 通りが可能である。対立遺伝子を共有する組み合わせが, 2 個, 1 個, 0 個の組み合わせは無作為分配の場合, それぞれ 4/16(25%), 8/16(50%), 4/16(25%) となる。もし, ある対立遺伝子がある疾患に連鎖しているのなら, ともに疾患を発症している同胞は無作為分配に比べて対立遺伝子の共有頻度が高くなる, つまり, 2 個共有の同胞が増えて 0 個共有の同胞が減る。

マ<sup>3,4)</sup>, ヘリコバクターピロリ<sup>3,4)</sup>, A 型肝炎ウイルス<sup>3,4)</sup>, ツベルクリン反応性など<sup>5)</sup>とアトピーとの関連が示唆されている。現在までの一致する意見としては, アレルギー疾患は単一遺伝子疾患(1つの遺伝子が疾患の発症に十分である)ではなく, 複数の遺伝子と環境暴露による偶然の因子が重なった結果, 発症する多因子性疾患であると考えられている。

### 遺伝子多型

遺伝子多型(または単に多型とも呼ばれる)とは遺伝子を構成している DNA の配列の個体差であり, 集団の 1%以上の頻度であるものと定義される。遺伝子多型のなかで最も高頻度に観察されるものが SNP(single nucleotide polymorphism, 一塩基置換多型)である。SNP とは, DNA 塩基配列が 1 塩基だけ置換されており, 例えば CD 14-159 C/T の場合, CD 14 遺伝子のある塩基が C のものと T のものが集団内に存在するというを示す。

## ▶ 疾患感受性遺伝子の同定法

疾患遺伝子を同定する研究方法としては連鎖解析と候補遺伝子解析が挙げられる。連鎖解析は, その疾患を発症している構成員を含む家系を対象として, 発症に強い影響を与える遺伝子座位を染色体上に位置づけることを目的としており, 罹患同胞対法(図1)が広く用いられている。連鎖解析の利点としては, 全ゲノムにわたって解析を行うことにより, 全く新規の疾患感受性遺伝子を同定することが可能であることである。連鎖解析により同定された遺伝子としては, アルツハイマーの APOE 遺伝子, 乳癌の BRCA 1, BRCA 2 などが挙げられる。

連鎖から疾患感受性遺伝子同定に至る道筋を図2に示す。連鎖領域(図上, ピークのある部分)をさらにマーカーを加えて解析することにより, 連鎖領域を絞り込む(デンスマッピング)。デンスマッピングにより絞り込みを行っても, その領域には依然多くの遺伝子(ほとんどの場合では 20~50 個, またはそれ以上)が存在し, 連鎖解析による絞り込みには限界がある。そこで家系を用いた関連解析を行い, 原因となる遺伝子を特定する。ほとんどの場合には数百以上の SNP をタイピングする必要があり, かなりの労力を必要としていたが, 近年のテクノロジーの進歩により大量のタイピングを低コスト, 少ない労力で行うことが可能となってきている。

関連解析はその遺伝子多型が対照群と比較して多いかどうかを統計学的に検定し, その遺伝子変異が疾患発症に与える影響を検討する方法で, 症例対照研究が最も多く用いられている。この場合はまず疾患と関連している, または疾患と関連する可能性がある遺伝子が既に知られていることが必要である。これらの遺伝子に存在する多型をタイピングし, 図3に示すような方法で疾患との関連を検討する。この方法は疾患感受性多型を同定するためにはとても効率的であるが, 一方, 症例集団と対照集団の遺伝的背景が異なったり, 集団の構造化が存在すると実際には関連がないのに関連があることになる場合がある。このような各集団の不一致や集団の構造化を回避するために, 家

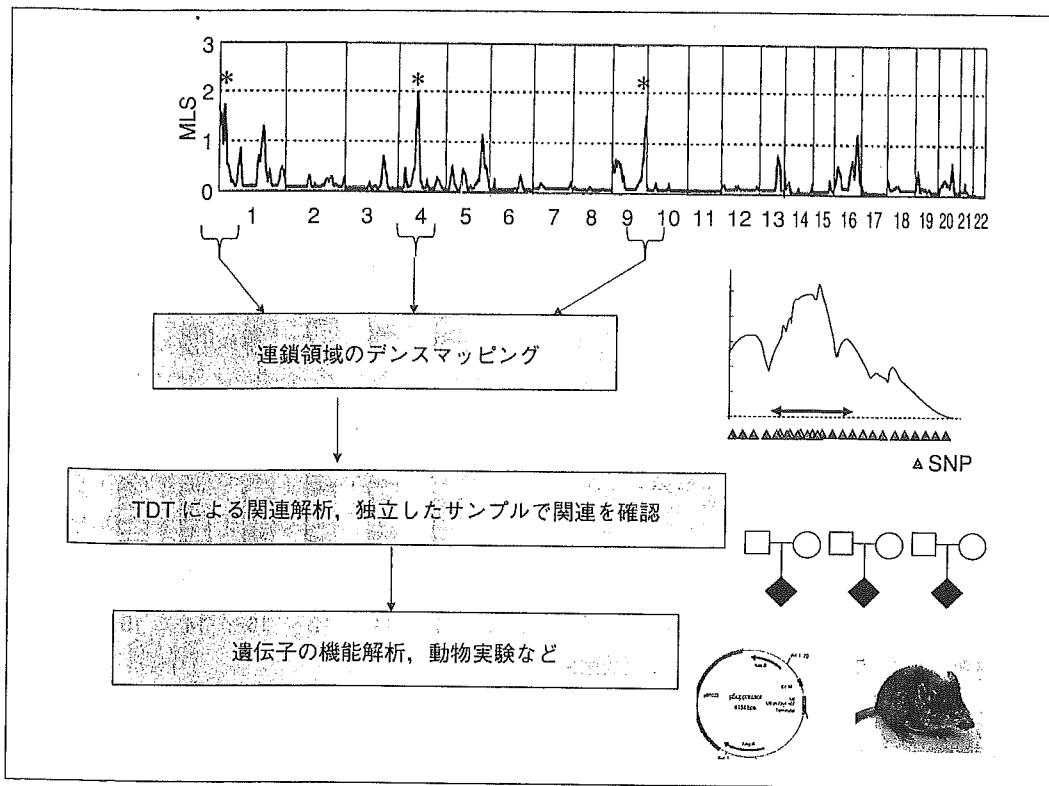


図2 全ゲノム連鎖解析

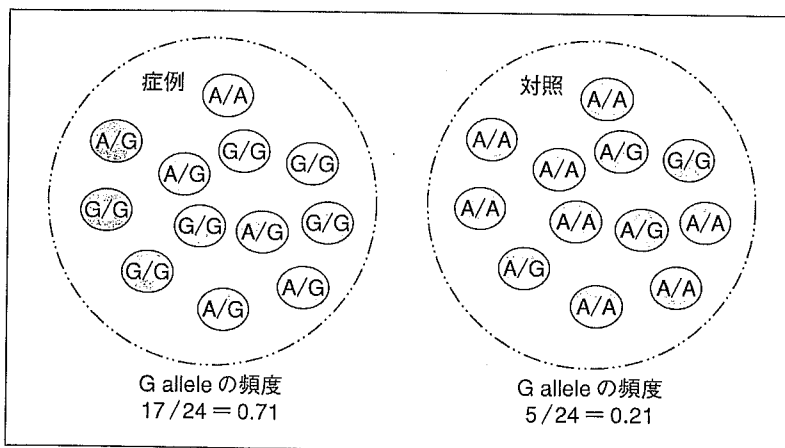


図3 症例対照研究

症例と対照群でアレル頻度に差があるかを検定する。例の場合  $p=0.04$  で、 $p<0.05$  を有意水準とすると有意差ありとなる。

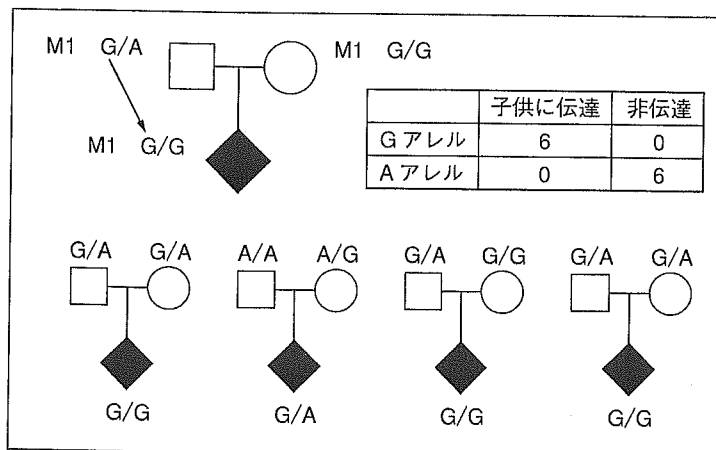


図4 TDT



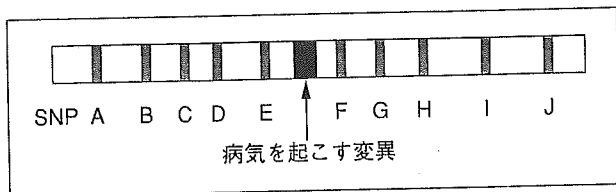


図5 連鎖不平衡

ある1人の祖先の遺伝子に疾患を起こす変異が起こったとする。それが子孫に受け継がれ集団にひろまった場合、世代を経るにつれて遠くにあるSNP(この場合A, B, I, J)は組み換えが起こることにより、病気を起こす変異との関連が徐々に失われていく。病気の変異のごく近傍にあるSNP(この場合E, F)は変異との連鎖を保ち疾患と関連する。このようなSNP間での連鎖を連鎖不平衡と呼び、連鎖不平衡が保たれている領域に複数のSNPがある場合、その領域内の代表するSNPをタイピングすればよいことになる。

系を用いた関連解析(伝達不平衡テスト, transmission disequilibrium test; TDT)<sup>9)</sup>がある。TDTの原理を図4に示す。マーカー対立遺伝子M1が疾患と関連しているかどうかを検定するためには、M1についてヘテロ接合体である親をえらぶ(図4上)。次にaをヘテロ接合体の親が患児に伝達した数とし、bを別の対立遺伝子が伝達されている数とする。TDT検定では $(a-b)^2 / (a+b)$ を計算する。例では検討したアレル数が6と少ないが、これは数が十分に大きければ自由度1の $\chi^2$ 分布をとることを用いて、統計学的に有意かどうかを検定する。図4下の4家系の場合、 $(6-0)^2 / (6+0) = 6$ で、 $p < 0.05$ となり統計学的に有意であり、このマーカーMIそのものかMIと連鎖不平衡(図5)にある遺伝子変異と疾患発症に関連があるという結論となる。

以上をまとめると、まず家系による連鎖解析→連鎖領域の絞込み→関連解析による疾患感受性遺伝子の同定という手順をとることになる。さらに独立したサンプルで関連を確認することが望ましい。

全ゲノム関連解析は、対象とする多型数が膨大(10万SNP以上)であることから非現実的と考えられてきたが、近年のタイピング技術の向上により可能となってきている。日本のミレニアムプロジェクトによる10万SNPの全ゲノム関連解析では、現在までに心筋梗塞、リウマチなどの疾患感受性遺伝子が同定されている<sup>7,8)</sup>。このような研究を可能とするために、10万~25万、さらに

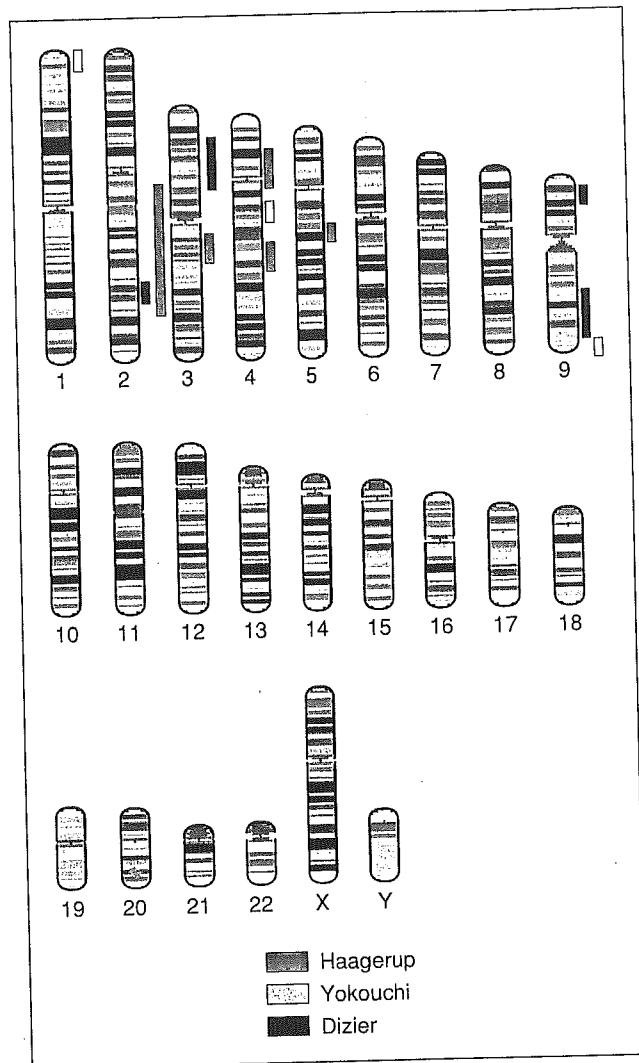


図6 花粉症・鼻炎の全ゲノム連鎖解析

は50万SNP(1人当たり)タイピング用のアレイなどが販売中または発売予定となっている(<http://www.affymetrix.co.jp/>, <http://www.illumina.com/index.shtml>)。

同定された遺伝子について関連の認められた多型の機能解析、遺伝子がどのように疾患発症にかかわっているかについて、動物実験などを行うことによって疾患との関連を検証する。以下に、現在までに報告されている花粉症およびアレルギー性鼻炎の研究について解説する。

## ▶ 全ゲノム連鎖解析

アレルギー性鼻炎、花粉症の全ゲノム解析の全ゲノム連鎖解析は現在まで3つ報告されている<sup>9-11)</sup>。図6に示すとおりすべての報告で共通している領域はなく、2つの報告で共通している領域も1つのみ(2q32)である。この理由として人

種差, 対象とする疾患の定義の違いなどが考えられる。われわれは, カモガヤ花粉症家系 48 家系 188 人の臨床データおよび DNA サンプルを収集し, 全ゲノム連鎖解析を行った。カモガヤ花粉症発症と 1p36.2, 4q13.3, 9q34.3 上のマーカーに連鎖が認められた ( $p < 0.001$ )<sup>11)</sup>。そのなかで 4 番染色体長腕の連鎖領域に位置する SDA 1 domain containing 1, chemokine, CXC motif, ligand (CXCL)-9; CXCL 10 および CXCL 11 の SNP と花粉症との関連を認めた<sup>12)</sup>。これらの SNP は強い連鎖不平衡にあり, どの遺伝子が実際に花粉症発症にかかわっているかについては現在検討を行っている。

## ▶ 候補遺伝子解析

花粉症・アレルギー性鼻炎の候補遺伝子としては, インターロイキンおよびそのレセプター, ケモカインなどが挙げられ, 現在までにいくつかの遺伝子多型との関連が報告されている(表 1)<sup>13~29)</sup>。関連解析の対象とされているものは, 主に免疫関連遺伝子, または喘息など, ほかのアレルギー疾患で関連が報告されているものである。ADAM 33 は 2002 年に連鎖解析から同定された最初の喘息疾患感受性遺伝子であるが, Cheng らは日本人スギ花粉症患者と正常コントロールを対象として, 22 の ADAM 33 遺伝子多型の遺伝子型を決定し, そのうちの 6 つの多型がスギ花粉症発症と関連していることを報告した<sup>29)</sup>。また Nakamura らは日本人スギ花粉症家系を用いて TDT を行い, eosinophil peroxidase (EPO) の A 660 A/G および Pro 358 Leu 多型が花粉症発症と関連していることを報告した<sup>18)</sup>。

## ▶ おわりに

花粉症克服のために, ゲノム解析が今後どのような役割を果たすことが可能であろうか? アレルギー疾患の頻度は高く, 環境も疾患発症の重要なファクターである。この困難な課題を克服するためには, ①サンプルサイズを増やす(メタアナリシスなど), ②環境要因を含んだ解析, ③前向き調査(Prospective study), ④花粉症関連遺伝

表 1 花粉症・鼻炎と遺伝子多型との関連解析

発表年度	著者	遺伝子	サンプル	関連
2005	Takeuchi	CD 14-159 C/T	Japanese	なし
2005	Candelaria	CC 16 A 38 G	Dane	なし
2005	Melen	GPR 154	European	あり
2005	Chae	TIM 3	Korean	あり
2005	Chae	CCL 24, CCL 26	Korean	あり
2005	Nakamura	EPO	Japanese	あり
2005	Cheng	ADAM 33	Japanese	あり
2004	Kim	ACE	Korean	なし
2004	Kim	RANTES	Korean	あり
2004	Eder	TLR 2	European	あり
2004	Nieters	IL 2, IL 6	European	あり
2004	Yang	CTLA-4	Chinese	あり
2004	Yang	IL 4-590 C/T	Chinese	なし
2003	Joki-Erkkila	IL 1 gene complex	Finnish	あり
2003	Wang	IL 13	Chinese	なし
2003	Kabesch	CARD 15	German	あり
2003	Sengler	CD 14-159 C/T	German	なし
2003	Kruse	IL 18	German	あり

子ネットワークの構築, ⑤複数の遺伝子多型を総合的に解析する新しいアプローチ (artificial neural network)<sup>30)</sup> など, 従来の遺伝子型タイピングを中心とした手法をさらに一歩進めていくような解析やアプローチが必要であろう。花粉症克服は困難ではあるが, 問題をひとつひとつ克服していくことにより, 遺伝子同定につながることを期待している。

## 文 献

- 1) Cooke RA, Van DV : A Human sensitization. J Immunol 16 : 201-205, 1916
- 2) Genes for asthma? An analysis of the European Community Respiratory Health Survey. Am J Respir Crit Care Med 156 : 1773-1780, 1997
- 3) Matricardi PM, Rosmini F, Panetta V, et al : Hay fever and asthma in relation to markers of infection in the United States. J Allergy Clin Immunol 110 : 381-387, 2002
- 4) Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, et al : Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma : epidemiological study. Bmj 320 : 412-417, 2000
- 5) Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, et al : The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. Science 275 : 77-79, 1997
- 6) Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ : Transmission test for linkage disequilibrium ; the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). Am J Hum Genet 52 : 506-516, 1993
- 7) Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, et al : Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are

- associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet* 32 : 650-654, 2002
- 8) Suzuki A, Yamada R, Chang X, et al : Functional haplotypes of PADI 4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 34 : 395-402, 2003
  - 9) Haagerup A, Bjerke T, Schoitz PO, et al : Allergic rhinitis—a total genome-scan for susceptibility genes suggests a locus on chromosome 4 q 24-q 27. *Eur J Hum Genet* 9 : 945-952, 2001
  - 10) Dizier MH, Besse-Schmittler C, Guilloud-Bataille M, et al : Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study. *Am J Respir Crit Care Med* 162 : 1812-1818, 2000
  - 11) Yokouchi Y, Shibasaki M, Noguchi E, et al : A genome-wide linkage analysis of orchard grass-sensitive childhood seasonal allergic rhinitis in Japanese families. *Genes Immun* 3 : 9-13, 2002
  - 12) Zhang J, Noguchi E, Migita O, et al : Association of a haplotype block spanning SDAD 1 gene and CXC chemokine genes with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 115 : 548-554, 2005
  - 13) Takeuchi K, Suzuki S, Yagawa M, et al : A CD 14 gene polymorphism is associated with the IgE level for *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Acta Otolaryngol* 125 : 966-971, 2005
  - 14) Candelaria PV, Backer V, Laing IA, et al : Association between asthma-related phenotypes and the CC 16 A 38 G polymorphism in an unselected population of young adult Danes. *Immunogenetics* 57 : 25-32, 2005
  - 15) Melen E, Bruce S, Doekes G, et al : Haplotypes of G protein-coupled receptor 154 are associated with childhood allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 171 : 1089-1095, 2005
  - 16) Chae SC, Park YR, Lee YC, et al : The association of TIM-3 gene polymorphism with atopic disease in Korean population. *Hum Immunol* 65 : 1427-1431, 2004
  - 17) Chae SC, Park YR, Oh GJ, et al : The suggestive association of eotaxin-2 and eotaxin-3 gene polymorphisms in Korean population with allergic rhinitis. *Immunogenetics* 56 : 760-764, 2005
  - 18) Nakamura H, Higashikawa F, Miyagawa K, et al : Association of single nucleotide polymorphisms in the eosinophil peroxidase gene with Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol* 135 : 40-43, 2004
  - 19) Kim JJ, Kim HJ, Lee IK, et al : Association between polymorphisms of the angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen genes and allergic rhinitis in a Korean population. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 113 : 297-302, 2004
  - 20) Kim JJ, Lee JH, Jang CH, et al : Chemokine RANTES promoter polymorphisms in allergic rhinitis. *Laryngoscope* 114 : 666-669, 2004
  - 21) Eder W, Klimecki W, Yu L, et al : Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 113 : 482-488, 2004
  - 22) Nieters A, Linseisen J, Becker N : Association of polymorphisms in Th 1, Th 2 cytokine genes with hayfever and atopy in a subsample of EPIC-Heidelberg. *Clin Exp Allergy* 34 : 346-353, 2004
  - 23) Yang KD, Liu CA, Chang JC, et al : Polymorphism of the immune-braking gene CTLA-4(+49) involved in gender discrepancy of serum total IgE levels and allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 34 : 32-37, 2004
  - 24) Joki-Erkkila VP, Karjalainen J, Hulkkonen J, et al : Allergic rhinitis and polymorphisms of the interleukin 1 gene complex. *Ann Allergy Asthma Immunol* 91 : 275-279, 2003
  - 25) Wang M, Xing ZM, Lu C, et al : A common IL-13 Arg 130 Gln single nucleotide polymorphism among Chinese atopy patients with allergic rhinitis. *Hum Genet* 113 : 387-390, 2003
  - 26) Kabesch M, Peters W, Carr D, et al : Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *J Allergy Clin Immunol* 111 : 813-817, 2003
  - 27) Sengler C, Haider A, Sommerfeld C, et al : Evaluation of the CD 14 C-159 T polymorphism in the German Multicenter Allergy Study cohort. *Clin Exp Allergy* 33 : 166-169, 2003
  - 28) Kruse S, Kuehr J, Moseler M, et al : Polymorphisms in the IL 18 gene are associated with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 111 : 117-122, 2003
  - 29) Cheng L, Enomoto T, Hirota T, et al : Polymorphisms in ADAM 33 are associated with allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen. *Clin Exp Allergy* 34 : 1192-1201, 2004
  - 30) Tomida S, Hanai T, Koma N, et al : Artificial neural network predictive model for allergic disease using single nucleotide polymorphism data. *J Biosci Bioeng* 93 : 470-478, 2002

## 総説

特集：遺伝子チップを用いた臨床免疫研究の最前線

## アレルギー疾患への応用

斎藤 博久

## Application to Allergic Diseases

Hirohisa SAITO

Department of Allergy &amp; Immunology, National Research Institute for Child Health &amp; Development

(Received February 7, 2005)

## summary

The increasing prevalence of allergic diseases in developed countries is considered to be caused, at least in part, by rapid improvement of human hygiene. In human beings, the immune system developed as an ingenious device for defending against frequent attacks by microbes. Therefore, our immune system seems to have become deranged in our recent, unprecedentedly hygienic environment. It is now necessary to understand the total functional elements comprising the immune system, not just a single molecule present in an immunocyte working in our immune system. Microarray analysis is now becoming capable of detecting the whole transcripts present in a cell. It is anticipated that we can understand the deranged human immunity using the system biology. It is also expected to predict previously unexpected drug-related adverse events caused by interaction of a drug with responsible molecules present in vital organs.

**Key words**—allergy; microarray; systems biology

## 抄録

ゲノム科学の成果を基盤に、コンピュータサイエンスなどの手段を利用・開発し、システムレベルでの生命の原理を研究すると共に、創薬などに応用しようという研究分野である「システム・バイオロジー」が急速に発展している。人類の進化の過程において細菌やウィルスの侵入など日常的な擾乱に対して発達した免疫システムは、想定していない擾乱、すなわち抗生物質による無菌状態下における大量の花粉飛散などの状態に対して極めて脆弱である。したがって、増加し続けるアレルギー疾患病態を理解し、適切な予防治療方法を開発するためには、システムとしての理解が求められている。また、システムを理解することにより、今までは予期できなかった薬剤の副作用をあらかじめ予測できるようになる等の画期的なメリットが期待されている。本稿では、アレルギー炎症細胞特異的に発現し、副作用が少ないと予想される創薬標的遺伝子の発見を含めて遺伝子チップ（マイクロアレイ）をもちいたアレルギー疾患病態システム解析のいくつかの試みについて概説する。

## 1. はじめに

ヒトをはじめ各生物において、全ゲノム配列の解読が次々と終了している。これらのゲノム科学の成果を基盤に、コンピュータサイエンスなどの手段を利用・開発し、システムレベルでの生命の原理を研究すると共に、創薬などに応用しようという研究分野と定義されたシステム・バイオロジーが急速に発展している<sup>1)</sup>。20世紀後半より急速に増えたアレルギー疾患罹患率は、今は先進工業諸国において30%を超え、ありふれたアレルゲンに反応してIgE

抗体を産生しやすいアトピー素因の保有者は我が国の青年では9割に達している。アトピー素因はヘルパーT細胞ではTh2細胞が優位な状態と理解される。この原因としては、細菌由来のエンドトキシンレベルが高い環境で乳児期を過ごした場合、衛生的な環境で育った場合と比較して統計学的にアレルギー発症率が低いという衛生環境仮説が想定されている。そのメカニズムとして、乳児期において頻回にエンドトキシンなどの微生物由来の分子と遭遇しない限り過剰なアレルギー反応を抑制するTh1細胞や抑制性T細胞は発達することができないためであるといわれている<sup>2)</sup>。人類の進化の過程において細菌やウィルスの侵入など日常的な擾乱に対して

発達した免疫システムは、想定していない擾乱、すなわち抗生物質による無菌状態下における大量の花粉飛散などの状態に対して極めて脆弱である。したがって、増加し続けるアレルギー疾患病態を理解し、適切な予防治療方法を開発するためには、システムとしての理解が求められている。本稿では、アレルギー炎症細胞特異的に発現し、副作用が少ないと予想される創薬標的遺伝子の発見を含めて遺伝子チップ（マイクロアレイ）をもちいたアレルギー疾患病態システム解析のいくつかの試みについて概説する。

## 2. uA オリゴヌクレオチド・マイクロアレイと cDNA マイクロアレイ

マイクロアレイは DNA チップや遺伝子チップとも呼ばれ、主に多種類の遺伝子 mRNA の発現を同時に測定する装置のことである。そして、様々な遺伝子の全長 cDNA をスライドガラス上に貼り付けた cDNA マイクロアレイ<sup>3)</sup>とシリコンチップ上にオリゴヌクレオチドを合成して作成したオリゴヌクレオチド・マイクロアレイ（Affymetrix 社の GeneChip など）の 2 種類に大別される。

特許の対象となるような未知遺伝子・分子を探索する場合、未知の遺伝子配列を含む全長 cDNA をプローブとして使用した cDNA マイクロアレイの方が既知の配列を合成した GeneChip よりも有用であるといわれていた。しかし、ヒトゲノム配列解析が終了し、ヒトの遺伝子が 2~3 万程度であると推察されるに至った現在、有限であるヒトゲノムのほとんどすべての遺伝子は既に GeneChip などオリゴヌクレオチド・マイクロアレイのプローブ上に存在するようになった。また、以前はマイクロアレイ研究の利点は、ハイスループット、つまり少量のサンプルを用いて一度に複数の遺伝子の発現が解析できるという便利さであった。しかし、ほとんどすべての遺伝子発現が定量できるようになった現在、状況は一変した。すなわち、「すべての遺伝子について解析してしまった、つまり他にはもう可能性が残っていない」ということ自体に意味がでてきたのである。通常の候補遺伝子の検索では、誘導されなかった遺伝子は注目されないが、網羅的な解析では膨大な遺伝子群が「誘導されないこと」まで同時に確認できる。発現全遺伝子の構造から機能を類推することにより、細胞全体の機能を評価することも不可能ではなくなった。ただし、現時点でのマイクロアレイ

による網羅的な遺伝子発現解析法は感度の低さなどの問題もあり、重要な発見に関しては蛋白質の発現も含めて他の方法を組みあわせて確認することが必要である。

## 3. ハイスループットな利点を生かしたマイクロアレイ研究

国立小児病院とジェノックス創薬研究所を中心として 1996 から 2003 年に行われた共同研究において、喘息やアトピー性皮膚炎等、アレルギー患者由来の細胞で発現変動する多くの新規遺伝子や今まで機能よく知られていなかった遺伝子が発見されている。その中には重症アトピー性皮膚炎、気管支喘息患者における Th1 サイトカイン遺伝子発現を抑制するシグナル伝達分子である SOCS3 遺伝子発現の発増加の発見などがある<sup>4)</sup>。その他にも、重症アレルギー疾患患者由来の T 細胞や単球で著しく発現変動する既知遺伝子として、ケモカイン受容体 CC や Toll 様受容体 2, 4, 6 (以上増加)、IL-12, インターフェロン $\gamma$  (以上減少) が確認されている<sup>5,6)</sup>。

このような試みは世界各国で行われていて NIH は Gene Expression Omnibus (GEO) と名付けたサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) で喘息患者由来細胞を使ったマイクロアレイ解析の全データを公開している。GDS266 という database で 15 名の重症気管支喘息患者、15 名の軽症気管支喘息患者および 6 名の非アトピー対照者から採取した梢血 CD4 陽性 T 細胞における遺伝子の発現 Affymetrix GeneChip U133A を用いて網羅的に解析している。このデータを全て自分のコンピュータにダウンロードして解析することも可能である。念ながら、このデータの質はあまり高くなく、(陽性細胞であるはずなのに、明らかに単球由来の遺伝子の発現が高いものもあり、各グループ間の再現性に疑問がある。

患者由来のサンプルを使用した実験に比較すると、条件を厳密に設定することのできるマウスモデルをもちいたマイクロアレイ解析は有利であり、実際、権威ある国際雑誌に成果が発表されることが多い。例えば、2 種類の気管支喘息モデル arginase I と arginase II が共通に発現上昇していることを見だし、それが IL-4 や IL-13 によって誘導されることを示し、最終的に気管支喘息患者に誘導していることを確認した論文などである<sup>7)</sup>。

#### 4. システム・バイオロジーをもちいたアレルギー疾患発症予防戦略

人類は微生物に対する防御を目的として、非常に巧妙なシステムとしての免疫系を発達させてきた。しかしながら、われわれの免疫システムは微生物の脅威に対応して発達してきたため、現代社会の様な衛生的環境と、それに引き続く花粉などのアレルゲンの曝露に対しては極めて脆弱であると思われる。衛生的環境下における免疫細胞の反応性をシステムとして解析し理解することが必要であると思われる。このようなシステム・バイオロジーの概念は、その必要性が以前から認識されていたが、ゲノム配列解析終了とマイクロアレイ技術の発展に伴い急速に浸透しつつある。

乳幼児における微生物に誘発される免疫反応の変化としては自然免疫系が重要である。自然免疫系は微生物に特有な構造を認識する Toll 様受容体 (TLR) を介して感染防止に関与しているのみならず、宿主の免疫をアレルギー性免疫反応 (Th2) から非アレルギー性免疫反応 (Th1) へとシフトさせる。現在までに、10 種類のヒト TLR が同定されている<sup>9)</sup>。したがって、乳幼児期において将来のアレルギー疾患発症を予防するためには、TLR リガンド、すなわち微生物成分を刺激することが十分に期待される。しかし、エンドトキシン等の TLR リガンドの中には、激しい組織炎症を誘発するため臓器障害を生じるものもある。TLR を活性化し、アレ

ルギー疾患治療薬として実用段階に入っている CpG モチーフ、あるいはエンドトキシンをもちい、ヒト末梢血単核細胞を刺激しマイクロアレイ解析を行うと、CpG は Th1 細胞関連分子を強く誘導するが、炎症関連分子や調節性 T 細胞関連分子の誘導は弱く、エンドトキシンでは炎症関連分子誘導能が非常に強いことがわかった<sup>9)</sup>。この様に TLR リガンドなどの薬効を、抗アレルギー効果とともに、生体に好ましくない副作用をも含めて総合的に理解することも可能になってきた。

#### 5. システム・バイオロジーをもちいた創薬研究

好中球、好酸球、好塩基球の3種類の顆粒球とマスト細胞は炎症刺激により顆粒内のメディエーター等を放出し、感染防御に作用する。その中で、好中球以外の3種類の細胞は、寄生虫感染防御やアレルギー反応に重要な役割を演じている。したがって、これらの細胞のみを特異的に標的とした薬剤開発は副作用回避という面で重要である。脱顆粒反応に関わる分子としては G 蛋白質結合受容体 (GPCR) やカルシウムチャンネルなどのイオンチャンネルが最も重要である。現在使用されている全ての薬剤の標的となっている遺伝子はわずか 500 種類である。これらは受容体などの開発しやすいものがほとんどである。これらの創薬標的となりうる遺伝子の数は、多く見積もっても全ゲノムの中の 5% 程度、つまり 2,000 程度であろうと推定されている<sup>10)</sup>。Nakajima ら<sup>11)</sup>は、各血球分画の全遺伝子発現レベ

	マスト細胞	好酸球	好塩基球	好中球	リンパ球	肺組織	脳神経	心臓
遺伝子A								
遺伝子B								
遺伝子C								

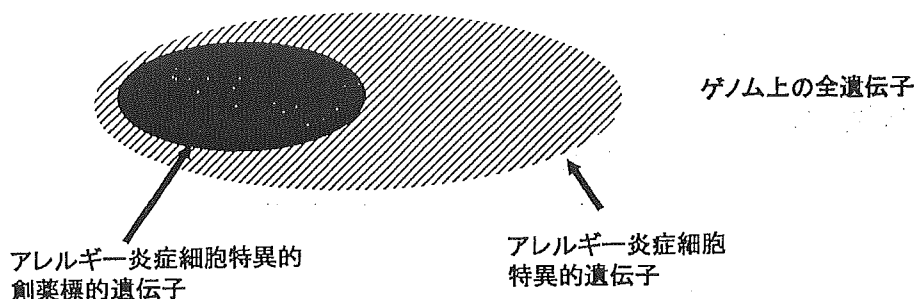


図1 アレルギー炎症細胞特異的創薬標的遺伝子の絞り込み

各種血球・臓器網羅的遺伝子発現データベースよりマスト細胞、好酸球、好塩基球にのみ発現するものを絞り込んだ(上図、遺伝子Cが相当)。そして、さらに、これらの遺伝子を GPCR などの創薬標的遺伝子の情報にて絞り込むことに成功した(下図)

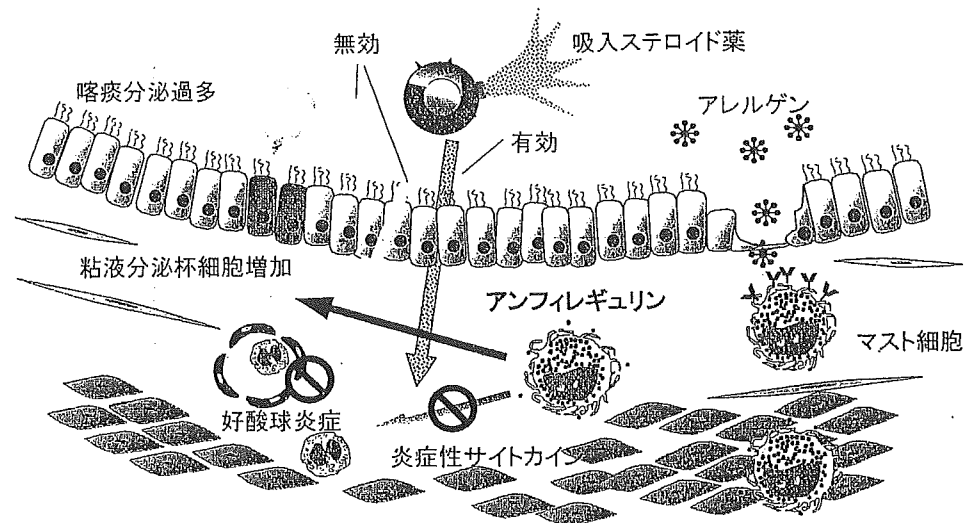


図2 システム解析によるマスト細胞特異的ステロイド薬抵抗性サイトカインの発見  
マスト細胞をIgE抗体を介した刺激で活性化すると数時間後にはIL-13などのサイトカインが分泌される。それらのほとんど入事前のステロイド薬処理で抑制されるが、アンフィレギュリンの産生は抑制されない(本文参照)。

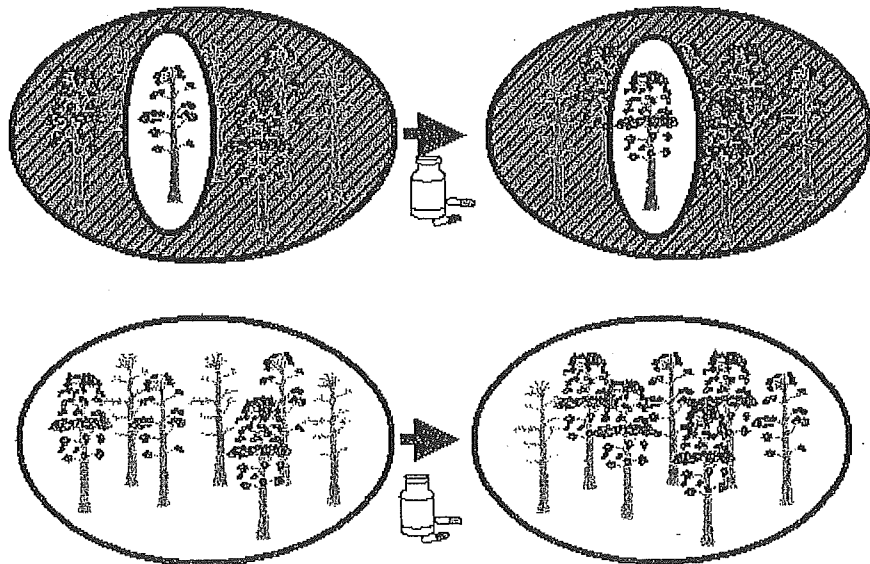


図3 網羅的遺伝子・分子発現解析による副作用の予知  
従来の検査法では、一部の情報により、全体の大まかな評価が行われていた(上図)。しかし、網羅的解析を行うことにより来予期し得なかった副作用を検知することが可能になると期待される(下図、薬剤投与により左の木が枯れていることに注)

ルを測定し、これら創薬標的遺伝子の中で、アレルギー炎症に関与する好酸球、好塩基球、マスト細胞のみに発現し、感染防御等に関与する好中球やリンパ球あるいは心臓や脳などの重要臓器に発現していない遺伝子を同定している(図1)。これらの分子に対する薬剤はアレルギー炎症のみを選択的に抑制し、他の生理的機能を抑制しないと予想されるので、副作用のない薬剤開発が期待される。この様に、ゲノム配列情報により、網羅的遺伝子発現解析が可能になり、それらの情報を用いた効率的な薬剤開発が可能になっている。

喘息治療の第一選択薬は吸入ステロイド薬で、今後の創薬標的としてはステロイド薬による治療されにくい組織リモデリング(病的再構築)喀痰排出過多などの病態に対する責任分子が重なる。マスト細胞は即時型アレルギー反応、好性炎症反応の惹起以外に組織リモデリングに重働きを演じていることが判明している。そこOkumuraら<sup>12)</sup>は、活性化マスト細胞特異的にしている遺伝子の中で、ステロイド薬処理により抑制されず、リモデリングを惹起すると想定されるものをマイクロアレイ・データより探索した結果

ンフィレギュリン (AREG) を見いだした。実際、正常気道上皮と比して喘息患者由来気道上皮では AREG 陽性マスト細胞が著しく増加していること、AREG 処理した気道上皮細胞では過剰な喀痰排出に関わる MUC5A 遺伝子の発現が誘導されることも確認されている (図 2)。

マウスとヒトのマスト細胞の配列相同性 (オルソログ) 遺伝子の発現パターンの異同を総合的に探索することも行われている。マウス実験喘息モデルにおいては、好酸球を標的とした抗 IL-5 療法が有効であったが、ヒトでは著効を示さなかった。マウスは、古くからヒト疾患モデルとして使用され、医学の発展に大いに貢献してきた。マウスで有効であったアレルギー治療薬剤がヒトで無効である例は後を絶たない。このような状況において、ヒトとマウスの共通点と相違点を整理することは急務であると思われる。そこで、Nakajima ら<sup>13)</sup>は、ヒトおよびマウスのマスト細胞を IgE で感作後、抗 IgE 抗体あるいは抗原で刺激し、遺伝子発現の変動を網羅的に検討した。その結果は、IgE 抗体を介した刺激によりマスト細胞はケミカル・メディエーターやサイトカインのみならず CC ケモカインを産生し、アレルギーの炎症部位へ種々の免疫細胞を集積させる機構は、マウスとヒトにおいて非常によく保存されていることが判明したが、多くの遺伝子がヒトあるいはマウスのいずれか一方のマスト細胞のみに発現していた。なお、MBP はマウスのマスト細胞には存在しなかった。

ヒトとマウスのオルソログ遺伝子比較発現解析研究に関しては、ヒト疾患組織等を探索して発見された創薬標的遺伝子の機能解析を、マウス疾患モデルを用いた実験により確認できるかどうか予測するというような応用が可能である。また、これらの情報を利用することにより、将来的に動物実験による病態関連分子の動態をヒトのオルソログ遺伝子の発現パターンにあわせて補正し、ヒトの病態のシミュレーション・データベースに登録することも将来的に可能になると期待される。

## 6. おわりに

システム・バイオロジーに基づく創薬研究では、一つの分子や反応経路を同定することが目的ではなく、全ての反応経路や分子の働きを理解することが目標である。そのことにより、今までは予期できなかった副作用をあらかじめ予測できるようになる等の

メリットが期待される。測定対象物が 1 から 1 万になるということは単なる量的な変化に過ぎないが、100%の情報を定量できるとなると、これは全く意味が違う。臨床試験の有効性と安全性の評価は数千人の対象者について臨床情報と数十種類の蛋白質等の検査に基づいて判定される。しかし、実際に市場に出て、さらに多くの対象者に使用されると予期しない副作用が出現する<sup>14)</sup>。100%の情報を把握することとは、従来予測不可能であったこれらの副作用も予測できる (図 3) ということを意味する。このようなシステム解析手法は、今後、加速度的に発展し、臨床にも応用されていくことであろう。事実、一つ一つの分子を探求する時代は終わりに近づき、21 世紀はシステム・バイオロジーの時代であるといわれている。システム解析成果が蓄積していくことにより、将来的にはコンピューター内 (in silico) に細胞を構築することが可能になる。さらに臓器内のシステム解析、生体内のシステム解析と発展することにより数十年後には、実際に薬剤を投与することなく、個人の遺伝子多型情報を “in silico ヒトモデル” に入力することによりその有効性と安全性が確認できるようになるであろう。

## 文 献

- 1) Kitano H. : Systems biology : a brief overview. *Science*. 295 : 1662-1664, 2002.
- 2) Holla AD, Roy SR, Liu AH. : Endotoxin, atopy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2 : 141, 2002.
- 3) Seki Y, Inoue H, Nagata N, et al. : Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) regulates onset and maintenance of type 2 helper T cell mediated allergic responses. *Nat Med*. 9 : 1047, 2003.
- 4) Heishi M, Kagaya S, Katsunuma T, Nakajima T, Yuki K, Akasawa A, Maeda M, Gunji S, Sugita Y, Tsujimoto G, Saito H. : High-density oligonucleotide array analysis of mRNA transcripts in severe atopic dermatitis patients' peripheral blood cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 129 : 57-66, 2002.
- 5) Nagata N, Oshida T, NL, Yuyama-Ohtani N, Sugita Y, Tsujimoto G, Katsunuma T, Akasawa A, Saito H. : Analysis of highly expressed genes in monocytes from atopic dermatitis patients. *Int Arch Allergy Immunol*. 132 : 156-167, 2003.



- 6) Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM, Muntel EE, Witte DP, Pegg AA, Foster PS, Hamid Q, Rothenberg ME. : Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest.* **111** : 1863-1874, 2003.
- 7) Takeda K, Kaisho T, Akira S. : Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* **21** : 335-376, 2003.
- 8) Kato A, Ogasawara T, Homma T, Saito H, Matsumoto K. : lipopolysaccharide-binding protein critically regulates lipopolysaccharide-induced IFN- $\alpha/\beta$  signaling pathway in human monocytes. *J Immunol.* **172** : 6185-6194, 2004.
- 9) Hopkins AL, Groom CR. : The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov.* **1** : 727-730, 2002.
- 10) Zimmermann N, King NE, Laporte J, Yang M, Mishra A, Pope SM, Muntel EE, Witte DP, Pegg AA, Foster PS, Hamid Q, Rothenberg ME. : Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J Clin Invest.* **111** : 1863-1874, 2003.
- 11) Okumura S, Sagara H, Fukuda T, Saito Okayama Y. : Fc $\epsilon$ RI-mediated amphireg production by human mast cells increases  $\alpha$ 1-antitrypsin gene expression in epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol.* **115** : 272-279, 2005.
- 12) Nakajima T, Inagaki N, Tanaka H, Tanaka Yoshikawa M, Tamari M, Hasegawa K, Matsumoto K, Tachimoto H, Ebisawa M, Tsujimoto G, Matsuda H, Nagai H, Saito H. : Mast cell increase in CC chemokine gene expression both human and mouse mast cell transcriptomes following Fc $\epsilon$ receptor I cross-linking. An interspecies comparison. *Blood* **100** : 3868-3874, 2002.
- 3) Trontell A. : Expecting the unexpected—drug safety, pharmacovigilance, and the prepared mind. *N Engl J Med.* **351** : 1385-1387, 2004.

## 特集

## 多因子疾患としてのアレルギー性皮膚炎の予防戦略

## 小児アトピー性皮膚炎\*

村松 礼子\*\*  
 荒川 浩一\*\*\*  
 森川 昭廣\*\*\*

Key Words: gene, environment, cytokine, skin care, TEWL

## はじめに

アトピー性皮膚炎は、遺伝的要因と環境的要因(胎内・胎外因子)が複雑に絡み合って発症していく多因子疾患と考えられている。遺伝的要因としては、アトピー素因とドライスキンの素因が重要と考えられ、さらに、環境的因子であるアレルギー的あるいは非アレルギー的な要因が加わって、アトピー性皮膚炎が発症していくと想定される。このような、多因子疾患への予防戦略は多岐にわたるため、一筋縄ではいかないものである。本稿では、われわれのデータを紹介しつつ、小児アトピー性皮膚炎に対する予防戦略についての考察を行う。

## アトピー性皮膚炎の定義・診断

日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎治療ガイドライン2004<sup>1)</sup>の定義、診断基準によると、「アトピー性皮膚炎は、増悪・寛解を繰返す、そう痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因を持つ」とされている(表1)。アトピー素因とは、①家族歴・既往歴(気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎のうちいずれか、あるいは複数の疾患)、ま

たは、②IgE抗体を産生しやすい素因である。日常診療では、家族歴や合併症を参考に、汗疹、接触皮膚炎、魚鱗癬、脂漏性皮膚炎、皮脂欠乏性湿疹、単純性痒疹、疥癬、手湿疹などの除外診断に注意を払う必要がある。

## 多因子疾患であるアトピー性皮膚炎の発症機序

アトピー性皮膚炎は、遺伝的要因と環境的要因(胎内・胎外因子)が複雑に絡み合って発症していく多因子疾患と考えられている。遺伝的要因では、前述のアトピー素因以外に、皮膚乾燥により皮膚過敏性を呈するドライスキン素因も重要である。さらに、環境的因子として、アレルギー的あるいは非アレルギー的な要因が加わることで、アトピー性皮膚炎が発症していくと想定されている。

アレルギー的機序としては、アレルギー反応における即時型・遅発型と遅延型反応が複合的に病態に介在すると考えられている。ただし、これらによってすべての病理組織所見や病態像を完璧に説明できないとの意見が多い。アレルギー性炎症にかかわる細胞として、抗原提示細胞、T細胞、肥満細胞、好酸球などが深く関与している。とくに、遅発型アレルギー反応において真皮での好酸球性炎症により浮腫性紅斑が生じ、また、表皮の海綿状態を形成するのにcuta-

\* Atopic dermatitis in children.

\*\* Reiko MURAMATSU, M.D.: 独立行政法人国立病院機構高崎病院小児科(〒370-0829 高崎市高松町36); Department of Pediatrics, Takasaki National Hospital, Takasaki 370-0829, JAPAN

\*\*\* Hirokazu ARAKAWA, M.D. & Akhiro MORIKAWA, M.D.: 群馬大学大学院医学系研究科小児生体防御学分野

表1 日本皮膚科学会「アトピー性皮膚炎の定義・診断基準」

<p>アトピー性皮膚炎の定義(概念)                  「アトピー性皮膚炎は、増悪-寛解を繰り返す、そう痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因を持つ」                  アトピー素因：①家族歴・既往歴(気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎のうちいずれか、あるいは複数の疾患)、または、②IgE抗体を産生し易い素因。</p>
<p>アトピー性皮膚炎の診断基準</p>
<p>1. そう痒</p>
<p>2. 特徴的皮疹と分布</p>
<p>①皮疹は湿疹病変</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>・急性病変：紅斑、浸潤性紅斑、丘疹、漿液性丘疹、鱗屑、痂皮</li> <li>・慢性病変：浸潤性紅斑・苔癬化病変、痒疹、鱗屑、痂皮</li> </ul>
<p>②分布</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>●左右対側性</li> <li>好発部位：前額、眼囲、口囲・口唇、耳介周囲、頸部、四肢関節部、体幹</li> <li>●参考となる年齢による特徴</li> <li>乳児期：頭、顔にはじまりしばしば体幹、四肢に下降。</li> <li>幼小児期：頸部、四肢屈曲部の病変。</li> <li>思春期・成人期：上半身(顔、頸、胸、背)に皮疹が強い傾向。</li> </ul>
<p>3. 慢性・反復性経過(しばしば新旧の皮疹が混在する)</p>
<p>乳児では2か月以上、その他では6か月以上を慢性とする。</p>
<p>上記1,2,および3の項目を満たすものを、症状の軽重を問わずアトピー性皮膚炎と診断する。そのほかは急性あるいは慢性の湿疹とし、経過を参考にして診断する。</p>
<p>除外すべき診断</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>・汗疹・接触皮膚炎・魚鱗癬・脂漏性皮膚炎・皮脂欠乏性湿疹・単純性痒疹・疥癬・手湿疹(アトピー性皮膚炎以外の手湿疹を除外するため)</li> </ul>
<p>診断の参考項目</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>・家族歴(気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎)</li> <li>・合併症(気管支喘息、アレルギー性鼻炎・結膜炎)</li> <li>・毛孔一致性丘疹による鳥肌様皮膚</li> <li>・血清IgE値の上昇</li> </ul>

(文献より引用)

is lymphocyte associated antigen (CLA) を発した T 細胞が関与すると考えられている。さらに、肥満細胞や T 細胞から産生されるサイトンや化学伝達物質が病態形成の一翼を担っている。

アレルギー的機序として、表皮細胞間脂質るセラミドの減少により皮膚保湿能が低下さらに、角層水分量が減少して乾燥肌(ドラキン)が惹起される。これにより、皮膚バリア能の破綻を招来し、アレルゲンや微生物な侵入を容易にし、アレルギー反応や非特異刺激に由来する皮膚過敏性を惹起することる。さらに、バリア機能障害をきたした皮は黄色ブドウ球菌が増殖し、それがADの増延化を促すことが示唆されている。また、ような部位ではケラチノサイトによる nerve

growth factor (NGF) 産生が亢進し、それによる神経線維の表皮への伸長と痒みの増強およびそれに伴う搔破がADを悪化させる可能性が考えられている。

### 予防戦略の概略

このように、遺伝的要因に加え、環境要因など多岐にわたる要因が複合的に関連して、アトピー性皮膚炎の発症あるいは増悪が起こっている。このような要因に対し、一方向的なアプローチでは、発症あるいは増悪を阻止するような予防戦略を見出すのは困難と思われる。

気管支喘息においては、喘息発症や重症化を防ぐ目的でearly intervention(早期介入)という概念が注目されている。実際、小児気管支喘息治療・管理ガイドライン2002では、「小児喘息治療

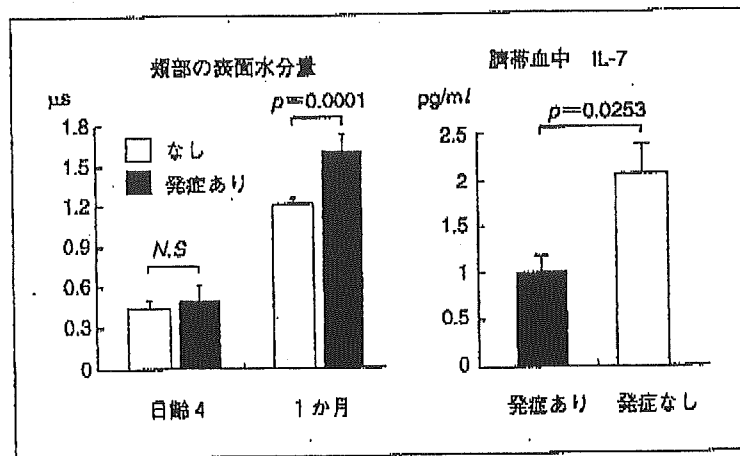


図1 皮膚生理機能、臍帯血中サイトカインとアトピー性皮膚炎発症の関係  
(皮膚生理機能検査は、早期新生児期と1か月健診時に測定)

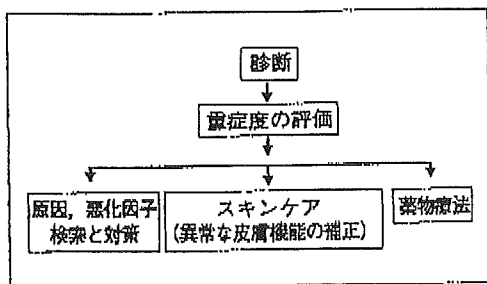


図2 治療ガイドラインの概要

のearly intervention(早期介入)として、発症の危険性が高いと考えられる小児に対する発症予防(一次予防)と、既に発症してしまった小児に対する発症早期からの重症化・難治化予防(二次予防)が考えられる」と述べている。

この戦略をアトピー性皮膚炎に当てはめると、一次予防は、アトピー性皮膚炎へ向かう免疫学的反応(Th2型免疫反応)を回避するような免疫応答の発達を促進すること、異常な角層生理機能を元に戻すスキンケアを行っていくことなどが考えられる。一方、二次予防としては、アレルギー的な増悪因子(食物、花粉、動物、ハウスダスト、チリダニ、真菌など)の検索および回避、さらには、非アレルギー的側面である乾燥・発汗、ストレス、細菌・真菌、物理・化学的刺激因子による皮膚過敏性亢進からの回避、適切な軟膏療法を発症早期から行い、疾患の重症化を防ぐことが目的となろう。気管支喘息において

難治化の原因と考えられている気道リモデリングは、アトピー性皮膚炎では慢性湿疹病変(浸潤性紅斑・苔癬化病変、痒疹など)が相当すると考えられる。

われわれは、乳児アトピー性皮膚炎発症における一次予防の可能性として、臍帯血中のサイトカインの測定と新生児期の皮膚生理機能を角質膜厚・水分計(ASA-M1<sup>®</sup>, アサヒバイオメッド社)で評価し、1歳時までのアトピー性皮膚炎発症に関して前方視的検討を行った。その結果、アトピー性皮膚炎患者において臍帯血中のIL-7、生後1か月の皮膚角質水分量や角質膜厚が非発症群と比較し有意差が認められ(図1)、発症予知因子となる可能性が示唆された(投稿中)。病態への関与については現在、検討中である。

### 増悪因子の検索および治療

日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎治療ガイドライン2004では、治療は図2のような3本柱の概要になっている。

#### 1. 原因, 悪化因子検索と対策

アトピー性皮膚炎の原因, 悪化因子は多種にわたり、年齢層によっても相違がある。

乳幼児では、食物の関与が特徴的であるが、発汗や細菌感染症などにより悪化することも多い。年長児では、環境因子としてダニ、ハウスダスト、真菌、スギを含めた花粉などの接触アレルゲン、発汗や感染などによるものが重要と