

supported, in part, by a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) from the Ministry Education, Science, Sports and Culture of Japan.

## REFERENCES

- Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 1994; **265**: 1701–6.
- Takeda K, Tanaka T, Shi W *et al.* Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 1996; **380**: 627–30.
- Malabarba MG, Rui H, Deutsch HH *et al.* Interleukin-13 is a potent activator of JAK3 and STAT6 in cells expressing interleukin-2 receptor  $\gamma$  and interleukin-4 receptor  $\alpha$ . *Biochem. J.* 1996; **319**: 865–72.
- Izuhara K, Shirakawa T. Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. *Int. J. Mol. Med.* 1999; **3**: 3–10.
- Akimoto T, Numata F, Tamura M *et al.* Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airway hyper-reactivity in signal transducers and activators of transcription (STAT) 6-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1998; **187**: 1537–42.
- Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the  $\alpha$  subunit of the interleukin-4 receptor. *N. Engl. J. Med.* 1997; **337**: 1720–5.
- Kawashima T, Noguchi E, Arinami T *et al.* Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J. Med. Genet.* 1998; **35**: 502–4.
- Barnes KC, Freidhoff LR, Nickel R *et al.* Dense mapping of chromosome 12q13.12-q23.3 and linkage to asthma and atopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; **104**: 485–91.
- Tamura K, Arakawa H, Suzuki M *et al.* Novel dinucleotide repeat polymorphism in the first exon of the STAT-6 gene is associated with allergic diseases. *Clin. Exp. Allergy* 2001; **31**: 1509–14.
- Tamura K, Suzuki M, Arakawa H, Tokuyama K, Morikawa A. Linkage and association studies of Stat6 gene polymorphisms and allergic diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003; **131**: 33–8.
- Gao PS, Mao XQ, Roberts MH *et al.* Variants of STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) in atopic asthma. *J. Med. Genet.* 2000; **37**: 380–2.
- Duetsch G, Illig T, Loesgen S *et al.* STAT6 as an asthma candidate gene: Polymorphism-screening, association and haplotype analysis in a Caucasian sib-pair study. *Hum. Mol. Genet.* 2002; **11**: 613–21.
- Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ *et al.* Dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor  $\alpha$ -chain in IgE synthesis. *J. Immunol.* 1999; **162**: 1227–31.
- National Heart Lung Blood Institute National Institutes of Health. *Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma*. Washington DC: Government Printing Office. 1995.
- Hanifin J, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol. Suppl.* 1980; **92**: 44–7.
- Patel BK, Keck CL, O'Leary RS, Popescu NC, LaRochelle WJ. Localization of the human Stat6 gene to chromosome 12q13.3-q14.1, a region implicated in multiple solid tumors. *Genomics* 1998; **52**: 192–200.
- Gabellini N. A polymorphic GT repeat from the human cardiac Na<sup>+</sup>Ca<sup>2+</sup> exchanger intron 2 activates splicing. *Eur. J. Biochem.* 2001; **268**: 1076–83.
- Buenger H, Gebhardt F, Schmidt H *et al.* Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of egfr is related to cytogenetic alterations and epithelial growth factor receptor expression. *Cancer Res.* 2000; **60**: 854–7.
- Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T *et al.* No association between atopy/asthma and the Ile50Val polymorphism of IL-4 receptor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; **160**: 342–5.

## Original Articles

# Signal transducers and activators of transcription 6 (Stat6) variants in childhood and adult asthma

Michiko Suzuki,<sup>1</sup> Hirokazu Arakawa,<sup>1</sup> Yasuko Kobayashi,<sup>1</sup> Kazushi Tamura,<sup>1</sup> Hiroyuki Mochizuki,<sup>1</sup> Kenichi Tokuyama,<sup>1</sup> Mayumi Tamari,<sup>2</sup> X-Q Mao,<sup>2,3</sup> Taro Shirakawa,<sup>2,3</sup> Kenji Izuhara<sup>4</sup> and Akihiro Morikawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics and Developmental Medicine Gunma University Graduate School, Maebashi, Gunma, <sup>2</sup>RIKEN SRC, Yokohama, <sup>3</sup>Department of Health Promotion and Human Behavior, Kyoto University Graduate School of Public Health, Kyoto and <sup>4</sup>Department of Biochemistry, Saga Medical School, Saga, Japan

### ABSTRACT

**Background:** Signal transducers and activators of transcription 6 (Stat6) is a key transcription factor involved in interleukin (IL)-4 and IL-13-mediated biological responses. Recently, we reported the association between the dinucleotide (GT) repeat polymorphism in the first exon of Stat6 and allergic subjects in a Japanese population. The aim of the present study was to evaluate whether this GT repeat polymorphism is associated with bronchial asthma, including childhood asthma and atopic and non-atopic adult asthma.

**Methods:** Stat6 gene polymorphisms were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) fragment length polymorphism analysis.

**Results:** In the first exon of Stat6, polymorphic PCR products were classified into six alleles (12–17 GT repeats). A significant difference was found in the genotypic frequency of the GT repeat polymorphism between controls and child asthmatics ( $P = 0.015$ ), but not atopic or non-atopic adult asthma. The frequency of the 15 repeat allele (wild type) was lower in child asthmatics than in controls ( $P = 0.0047$ ; odds ratio (OR) 1.6, 95% confidence interval (CI) 1.16–2.23), whereas shorter repeat alleles (12, 13

and 14 GT repeat) were higher in child asthmatics than in controls ( $P = 0.0064$ ; OR (95%CI) 1.66 (1.15–2.39)).

**Conclusion:** Genetic variations in the Stat6 gene may be associated with a predisposition for childhood asthma.

**Key words:** atopy, dinucleotide repeat polymorphism, interleukin-13, interleukin-4, signal transducers and activators of transcription 6 (Stat6).

### INTRODUCTION

Allergic diseases may be based on an inflammatory mechanism involving Th2 cytokines, such as interleukin (IL)-4 and IL-13.<sup>1,2</sup> When IL-4 or IL-13 engages its receptor complex, the phosphorylation, dimerization and nuclear localization of the signal transducer and activator of transcription 6 (Stat6) results in the transcription of several IL-4-inducible genes<sup>3–5</sup> that play a central role in IgE synthesis and the development of bronchial hyper-responsiveness.<sup>2,6,7</sup>

Recently, various genetic studies have shown that polymorphisms in genetic variations of Th2 cytokines are associated with atopic disorders in Western or Japanese populations.<sup>8–11</sup> Recently, we reported the association between the dinucleotide repeat polymorphism of the Stat6 exon 1 and allergic subjects in a Japanese population.<sup>12</sup> However, other groups have not replicated this finding; it was demonstrated that the GT repeat did not show a linkage/association to asthma in a Caucasian sib-pair study.<sup>13</sup>

Correspondence: Dr Hirokazu Arakawa, Department of Pediatrics and Developmental Medicine, Gunma University Graduate School, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan.

Email: harakawa@showa.gunma-u.ac.jp

Received 4 December 2003. Accepted for publication 12 February 2004.

The aim of the present study was to test whether the GT repeat polymorphism of the *Stat6* exon 1 relates to bronchial asthma, including childhood asthma and atopic or non-atopic adult asthma, in a Japanese population.

## METHODS

### Bronchial asthma and control subjects

Bronchial asthma and control subjects were collected in accordance with methods described previously.<sup>10,11</sup> Briefly, adult and child asthmatic subjects in a Japanese population were diagnosed by physicians specializing in asthma, as having: (i) recurrent breathlessness and chest tightness requiring continuing treatment; (ii) physician-documented wheeze; and (iii) documented labile airflow obstruction with variability in serial peak expiratory flow rates > 30%. Because wheezing is often associated with viral respiratory infection in young children, children older than 3 years of age were evaluated for childhood asthma. Specific IgE was detected by MAST (Hitachi, Tokyo, Japan) or CAP-RAST (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Atopy was diagnosed as the presence of a high concentration of total serum IgE (> 250 IU/mL), a positive specific IgE titer (> 4.41 LC in MAST and > 0.70 UA/mL in CAP-RAST) against one or more of 15 highly purified aeroallergens or a combination of these two features. Control subjects were 166 individuals with no history of major atopic disease. Informed consent was obtained from all subjects or their parents. This study was approved by the Committee of Ethics at the Department of Pediatrics, The University of Gunma.

### Molecular methods

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. Polymerase chain reaction (PCR) primer sequences in the first exon of the *Stat6* gene and the PCR conditions used were as described previously.<sup>12</sup> Briefly, PCR reactions were performed in a volume of 25 µL containing 50 ng genomic DNA, each dNTP at 125 µmol/L, 2 U *Taq* polymerase, *Taq* buffer and 10 pmol forward and reverse primer. 6-Carboxy fluorescein (6-FAM)-labeled forward primer was used for *Stat6* exon 1. Cycle conditions were 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 66°C for 30 s and 72°C for 30 s, with a final extension step of 7 min at 72°C in a GeneAmp 2400 thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, CA, USA). After PCR, a 1 µL aliquot of the products plus 0.5 µL Genescan 400HD molecular weight standard (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA) were denatured in 12 µL formamide, separated in an Applied Biosystems Prism Genetic Analyzer (ABI PRISM™310) with performance optimized polymer 6 (POP6) polymer and fragment lengths determined.

### Statistical analysis

Data were analyzed by the Chi-squared test.  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

Children or adults with bronchial asthma and controls were genotyped in terms of the GT repeat polymorphism in the first exon of the *Stat6* gene. The allelic and genotypic distributions of the GT repeat polymorphism are shown in Tables 1,2. In the first exon of *Stat6*, polymorphic PCR products were classified into six alleles (12–17 GT repeats; Table 1). The frequency of the 15 GT repeat allele was significantly lower in child asthmatics compared with controls (odds ratio (OR) 1.6; 95% confidence interval (CI) 1.16–2.23;  $P = 0.0047$ ), whereas the frequency of shorter repeat alleles (12, 13 and 14 repeats) were significantly higher in child asthmatics than in controls (OR (95%CI) 1.66 (1.15–2.39);  $P = 0.0064$ ). However, there was no significant difference between atopic or non-atopic adult asthmatics and controls.

We designated an individual homozygous for the most commonly occurring allele (the 15 GT repeat allele) as a wild type, an individual without a shorter repeat allele as a mutant 1 type and an individual having one or two shorter repeat alleles as a mutant 2 type (Table 2). There was a significant difference in the GT repeat polymorphism in genotype frequencies between controls and

**Table 1** Allele frequency of GT repeat polymorphisms in *Stat6* exon 1

No. GT repeats	Controls		Asthmatics	
	Children	Adults	Atopic adults	Non-atopic adults
12	0	1	0	0
13	69	79	29	42
14	1	6	0	0
15	222	156**	78	134
16	40	37	11	21
17	0	1	0	1
Total	332	280	118	198

\*\* $P < 0.01$  compared with controls.

**Table 2** Association between genotypic distribution of GT repeat polymorphisms in *Stat6* exon 1 and asthma

Phenotype	No. cases	Genotype of GT repeat			P	P <sup>†</sup>	OR <sup>†</sup> (95%CI)
		No. wild type (%)	No. mutant 1 (%)	No. mutant 2 (%)			
Control	166	76 (45.8)	30 (18.1)	60 (36.1)			
Asthmatics							
Children	140	42 (30)	26 (18.6)	72 (51.4)	0.011	0.0072	1.87 (1.18–2.96)
Atopic adults	59	23 (39.0)	8 (13.6)	28 (47.5)	0.300	0.126	
Non-atopic adults	99	45 (45.5)	15 (15.2)	39 (39.4)	0.783	0.597	

<sup>†</sup>Wild type + mutant 1 compared with mutant 2.

Wild type, wild/wild homozygosity; mutant 1, longer/longer, longer/wild; mutant 2, shorter/shorter, shorter/wild, shorter/longer. (Wild: 15 GT repeats; shorter: 12, 13 and 14 GT repeats; longer: 16 and 17 GT repeats.) OR, odds ratio; CI, confidence interval.

child asthmatics ( $P = 0.011$ ), but not atopic and non-atopic adult asthmatics (Table 2). Furthermore, a significant difference was observed between child asthmatics and non-atopic adult asthmatics ( $P = 0.049$ ). The frequency of an individual with a mutant 2 type was significantly higher in child asthmatics than in controls (OR (95%CI) 1.87 (1.18–2.96);  $P = 0.0072$ ). In contrast, no significant difference was observed between atopic or non-atopic adult asthmatics and controls.

## DISCUSSION

We found that the GT repeat polymorphism in the first exon of *Stat6* was significantly associated with childhood asthma, but not with atopic or non-atopic adult asthma. The frequency of a shorter repeat allele in child asthmatics was significantly different from those of controls. Our data suggest that the GT repeat polymorphism in the *Stat6* gene may play an important role in the development of childhood asthma in the Japanese population.

Despite intensive efforts and advances in molecular biology and genetics, no gene has been identified with any certainty as being involved in the heritability of asthma. However, the results of several studies have provided an indication that multiple genes may be involved in its pathogenesis. Recently, we found a novel dinucleotide repeat polymorphism in the first exon sequences of the *Stat6* gene and identified a strong association between the 13/15 allele heterozygote and allergic diseases.<sup>12</sup> The present study further evaluated whether this GT repeat polymorphism is associated with bronchial asthma and we have found a significant difference in allelic and genotypic frequencies in the GT repeat polymorphism between child asthmatics and controls, when considered as a wild or mutant type, suggesting that the GT repeat variant of the *Stat6* exon 1 is associated with

childhood asthma. Duetsch *et al.*<sup>13</sup> found that there was a significant association of the 16 repeats allele with an increase in the eosinophil cell count. However, they found that there was no linkage of any of the GT repeat alleles with the asthmatic phenotype.<sup>13</sup> The discrepancy between the results of Duetsch *et al.*<sup>13</sup> and the present study may be explained by the different allelic distributions between different ethnic groups and different phenotypes of asthmatic patients. In fact, the frequency of 13 GT repeat allele was shown to be 40.14% in a Caucasian population,<sup>13</sup> whereas it was 20.8 and 28.2% in controls and child asthmatics, respectively, in the Japanese population in the present study. Furthermore, we evaluated patients divided by age and the level of IgE, whereas Duetsch *et al.*<sup>13</sup> used sib-pair analysis.

In the present study, we found that the frequency of shorter repeat alleles of the *Stat6* exon 1 were significantly higher in child asthmatics than in controls. In addition, the genotypic frequency of an individual with a mutant 2 type was significantly higher in child asthmatics than controls. The GT repeat polymorphism of *Stat6* may, directly or indirectly, modulate *Stat6* gene expression. Perhaps the repeat number may be an important factor for this modulation (e.g. a shorter repeat allele than a wild type enhances the function, whereas the longer repeats do not, and vice versa).

Interestingly, in the present study we could not identify a linkage with either atopic or non-atopic adult asthma. In Japanese people, less than 20% of adult asthma is a type developed during childhood. There seems to be some difference in the pathogenesis (especially genetic background) between adult asthma developed during childhood and adult-onset asthma, although no conclusion has been reached. We need to extend the association studies further to ascertain any differences in pathogenesis between these two types of asthma. More

than 90% of childhood asthma is of the atopic type, whereas two-thirds of adult asthma consists of infectious or mixed types. Moreover, childhood asthma contributes anti-IgE antibodies to environmental allergens, such as house dust mites and animal dander. Thus, there are some features that make adult-onset asthma different to that seen in younger patients. Our results suggest that the relative contribution of genetic and environmental factors in the pathogenesis of asthma may vary according to age. It has been reported, with respect to the Ile50Val variant in the IL-4 receptor  $\alpha$ , that Ile50 was associated with atopic asthma but not with non-atopic subjects and that this association was especially strong in children.<sup>10</sup> These results seem to be somewhat consistent with those of the present study showing that the *Stat6* gene variant was significantly associated with childhood asthma, although we could not identify a linkage with atopic adult asthma. We previously found that IgE production was not associated with the *Stat6* gene.<sup>12</sup> Furthermore, because Duetsch *et al.*<sup>13</sup> failed to demonstrate a relationship between the level of serum IgE and *Stat6* gene variants in Caucasian asthma patients,<sup>13</sup> it is unlikely that the *Stat6* gene variants promote the dysregulation of IgE synthesis.

Our findings suggest that the polymorphic microsatellite at the *Stat6* locus may be a useful marker for predicting future childhood asthma and, thus, allow for early therapeutic intervention in cases of high-risk infants. Because asthma is a multifactorial disease, characterized by high genetic heterogeneity between different ethnic groups, it is possible that the influence of *Stat6* on asthma differs according to the population. Additional genetic and epidemiological studies, as well as functional analysis of *Stat6*, are required to fully elucidate the role of this interesting gene in the development of asthma.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mrs Tomoko Endo and Mrs Chinori Iijima for their technical assistance.

#### REFERENCES

- 1 Takeda K, Kishimoto T, Akira S. STAT6: Its role in interleukin 4-mediated biological functions. *J. Mol. Med.* 1997; **75**: 317–26.
- 2 Izuhara K, Shirakawa T. Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. *Int. J. Mol. Med.* 1999; **3**: 3–10.
- 3 Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Bousseau M, McKnight SL. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 1994; **265**: 1701–6.
- 4 Takeda K, Tanaka T, Shi W *et al.* Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 1996; **380**: 627–30.
- 5 Malabarba MG, Rui H, Deutsch HH *et al.* Interleukin-13 is a potent activator of JAK3 and STAT6 in cells expressing interleukin-2 receptor  $\gamma$  and interleukin-4 receptor  $\alpha$ . *Biochem. J.* 1996; **319**: 865–72.
- 6 Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X *et al.* Interleukin-13: Central mediator of allergic asthma. *Science* 1998; **282**: 2258–61.
- 7 Akimoto T, Numata F, Tamura M *et al.* Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airway hyper-reactivity in signal transducers and activators of transcription (STAT) 6-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1998; **187**: 1537–42.
- 8 Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the  $\alpha$  subunit of the interleukin-4 receptor. *N. Engl. J. Med.* 1997; **337**: 1720–5.
- 9 Kawashima T, Noguchi E, Arinami T *et al.* Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J. Med. Genet.* 1998; **35**: 502–4.
- 10 Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ *et al.* Cutting edge: Dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor  $\alpha$ -chain in IgE synthesis. *J. Immunol.* 1999; **162**: 1227–31.
- 11 Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M *et al.* Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum. Mol. Genet.* 2000; **9**: 549–59.
- 12 Tamura K, Arakawa H, Suzuki M *et al.* Novel dinucleotide repeat polymorphism in the first exon of the *Stat6* gene is associated with allergic disease. *Clin. Exp. Allergy* 2001; **31**: 1509–14.
- 13 Duetsch G, Illig T, Loesgen S *et al.* STAT6 as an asthma candidate gene: Polymorphism-screening, association and haplotype analysis in a Caucasian sib-pair study. *Hum. Mol. Genet.* 2002; **11**: 613–21.

## The genetics of pollinosis

H. Arakawa and A. Morikawa

*Department of Pediatrics and Developmental Medicine, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi, Japan*

### Summary

Japanese cedar pollinosis is an allergic disease characterized by sneezing and itchy and watery eyes in persons with a specific immunoglobulin (Ig)E antibody to this allergen. Since 1960, the prevalence of Japanese cedar pollinosis has greatly increased in Japan. Both environmental and host factors contribute strongly to the pathogenesis of allergic disorders such as allergic rhinitis. The best-established risk factor for nasal allergy is family history of allergy, especially nasal allergy. Susceptibility genes are genes in which only a few mutational changes may lead to sensitivity to certain diseases. Japanese cedar or orchard grass pollinosis may be diseases of this type, related to the haplotype of human leukocyte antigen. Recent studies of susceptibility genes of allergic diseases have focused on the IgE receptor gene, which is closely related to the pathogenesis of allergic diseases, interleukin (IL)-4, IL-4 receptor and interferon genes, which are concerned with the Th2- and Th1-immune responses. However, these susceptibility genes exhibit different behaviours in different ethnic populations and their contribution to conferring disease is not yet established. In addition, allergic rhinitis, especially pollinosis, may be strongly influenced by environmental factors.

**Keywords** environment, genetic, HLA, IL-4, Japanese cedar, pollinosis, Stat 6, risk factors

### Introduction

Pollinosis is an allergic disease characterized by sneezing, itchy and watery eyes, runny nose and burning sensation in the palate and throat. In Japanese cedar pollinosis, exposure to Japanese cedar pollen induces nasal and eye symptoms in individuals who express specific IgE antibody to this allergen. Since 1960 we have seen a remarkable increase in the number of patients with Japanese cedar pollinosis in Japan. Recent epidemiological investigations by Baba [1] and Okuda [2] have shown that about 17–20 million people have Japanese cedar pollinosis. Orchard grass, ragweed and Japanese cedar in Europe, the United States and Japan, respectively, are estimated to be the three major pollinosis allergens in the world, in terms of both severity of symptoms and numbers of patients affected.

Risk factors for allergic rhinitis may be classified as host factors that predispose individuals to the disease and environmental factors that influence susceptibility to developing allergic rhinitis in those who are thus predisposed. Known host factors include genetic predisposition to developing allergic rhinitis or allergic sensitization, sensitivity of the

nasal mucous membrane, gender and race. Environmental factors include duration of breast feeding, maternal age, heating with wood or coal and exposure to diesel exhaust fumes, tobacco smoke, air pollution, respiratory (viral) infections, diet, socioeconomic status and family size [3]. In this paper, we focus on risk factors for allergic rhinitis, in particular Japanese cedar pollinosis and genetic factors.

### Environmental risk factors for allergic rhinitis

Japanese cedar pollen belongs to the anemophilous (wind-borne) class. This pollen is smaller (grain size about 30 µm diameter) and lighter than most other anemophilous pollens, and emitted in large quantities; it travels long distances and consequently can affect sensitized individuals who reside far from the pollen source. The duration of the pollinating period of Japanese cedar is relatively long at 2–3 months, because this species grows from low to high areas above sea level. Furthermore, large-scale afforestation was advanced by the expansion project to recover woods after World War II to meet the lumber demands of economic development. As a result, the current area covered by artificial Japanese cedar is three times greater compared with that before the war. Thus the dramatic increase in numbers of Japanese cedar pollinosis patients

Correspondence: Dr H. Arakawa, Department of Pediatrics and Developmental Medicine, Gunma University Graduate School of Medicine, 3-39-15 Showamachi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan. E-mail: harakawa@showa.gunma-u.ac.jp

may be explained by higher levels of airborne Japanese cedar pollen.

One epidemiology study [4] of Japanese cedar pollinosis in otolaryngologists and their families throughout Japan indicated that the prevalence of this disease in both Yamanashi and Nagano prefectures was >25%, while in Okinawa, Hokkaido and Kagoshima prevalence was only 0.6%, 2.9% and 4.7%, respectively (Fig. 1). By contrast, very little difference was observed in the prevalence of perennial allergic rhinitis among the same prefectures: Yamanashi 14.2%; Nagano 12.6%; Okinawa 18.5%; Hokkaido 22.4%; and Kagoshima 30.8%. These data suggest that even in the presence of host factors such as susceptibility genes, no exposure to Japanese cedar pollen may prevent onset of pollinosis.

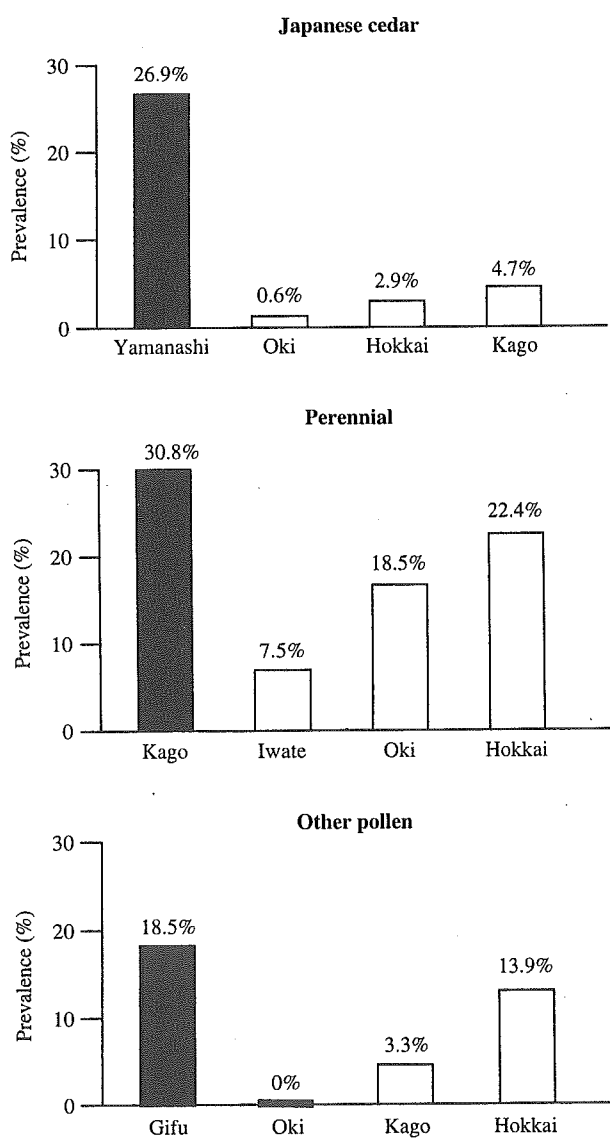


Fig. 1. Allergic rhinitis epidemiology in Japan using prefecture-based prevalence. Data from Nakamura et al. [4]. Oki, Okinawa; Hokkai, Hokkaido; Kago, Kagoshima.

## Host risk factors for allergic rhinitis

It is generally accepted that the best-established risk factor for developing nasal allergy is family history of allergy, especially nasal allergy [5]. Numerous studies of twins have demonstrated that concordance rates for asthma, eczema and allergic rhinitis are all substantially higher in monozygotic than dizygotic twins, suggesting a strong genetic contribution [6]. In population-based studies of twins, the estimated effect of genetic factors is about 35–70% depending on the population and design of the study [7, 8].

Recently, Kulig et al. [9] investigated annual longitudinal data on seasonal allergic symptoms and sensitization in 587 children from birth to their 7th birthday (Fig. 2). Both incidence and prevalence of symptoms and sensitization increased steadily with age. Up to 7 years of age, seasonal allergic rhinitis (SAR) developed in 15% of the children. They found that risk factors assessed by multiple logistic regression analysis were atopic mothers and fathers having allergic rhinitis, strongly confirming previous studies.

## Genetics of allergic rhinitis

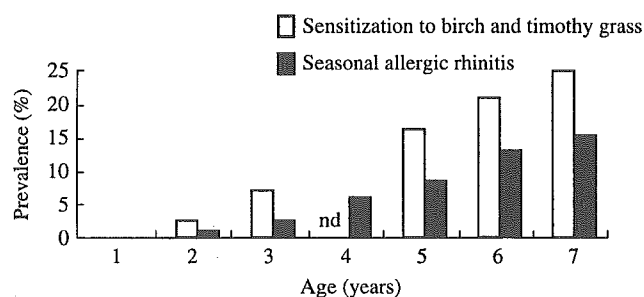
The search for pollinosis susceptibility genes centres on two major techniques: linkage mapping and the candidate gene approach. Linkage mapping, also called positional cloning, is the process of systematically scanning the entire DNA contents of various members of families affected by pollinosis using genetic markers. The candidate gene approach involves assessing the association between a particular allele of a gene that may be involved in the disease and presence of the disease [3].

The genetic factors of rhinitis have not been studied as much as those of asthma and atopy. One of the principal reasons for this is the difficulty in making a precise and discriminating characterization of allergic rhinitis phenotype in the general population and families. Moreover, numerous rhinologic disorders can exhibit the same symptoms [3].

### Linkage mapping

The linkage mapping approach has demonstrated associations between certain phenotypes (bronchial hyperreactivity, total serum IgE, eosinophilia, positive allergy skin tests, asthma and atopy) and markers on chromosomes 4, 6, 7, 11, 13 and 16 [10].

Haagerup et al. [11] performed a total genome scan on 100 affected Danish sib-pair families to identify candidate regions holding genes conferring susceptibility to allergic rhinitis and revealed one major candidate region on chromosome 4q24–q27 (LOD = 2.83). Furthermore, Yokouchi et al. [12] conducted genome-wide linkage screening of 48 Japanese families of children with orchard grass (OG)-sensitive SAR in a farming community in



**Fig. 2.** Lifetime prevalence of sensitization to birch and timothy grass and seasonal allergic rhinitis (SAR) in children up to 7 years of age. nd, not determined (no blood examined). Reprinted from Kulig M, Klettke U, Wahn V, Forster J, Bauer CP, Wahn U; the MAS Study Group. Development of seasonal allergic rhinitis during the first 7 years of life. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:832-9; with permission from The American Academy of Allergy, Asthma and Immunology.

central Japan. Genotyping data revealed linkage of SAR to chromosomes 1p36.2, 4q13.3 and 9q34.3 and linkage of OG-RAST IgE levels to 4p16.1, 11q14.3 and 16p12.3. It is possible that only a few specific genes to allergic rhinitis may exist, although most loci linked to allergic rhinitis are probably common to asthma.

#### Candidate heredity analysis

Some of the genes that possibly predispose individuals to allergic rhinitis are involved in the specific immune response [human leukocyte antigen D (HLAD), T cell receptor (TCR)]; others are genes of the (total) IgE response [IL-4, IL-4R, interferon (IFN)- $\gamma$ , Fc $\epsilon$ RI $\beta$ ] or genes involved in the inflammatory process [tumour necrosis factor (TNF- $\alpha$ )]. IL-4-related gene polymorphisms are shown in Fig. 3 [13-22].

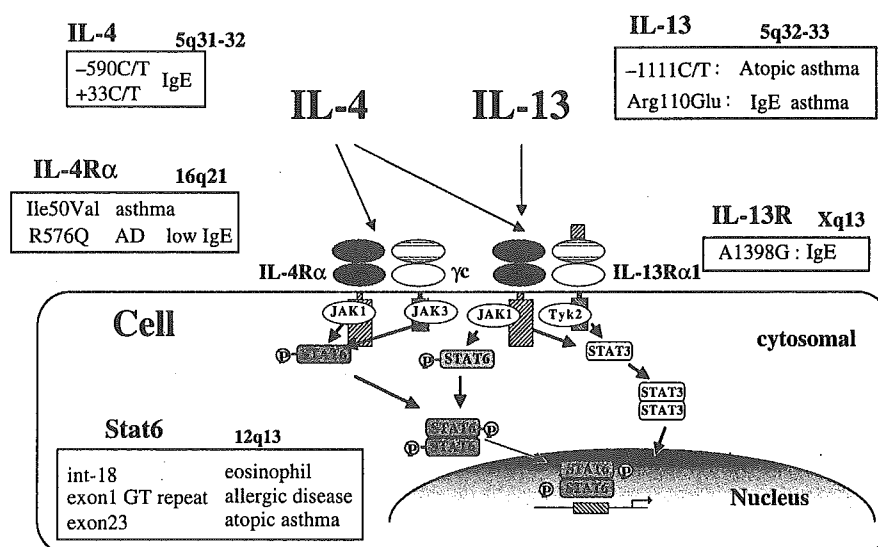
#### Genes related to HLA

Many genes conferring susceptibility to numerous disorders (e.g. psoriasis, rheumatoid arthritis and diabetes) have been localized in the HLA region. In subjects with pollinosis, linkage disequilibrium has been observed

between particular HLA haplotypes and sensitization to purified allergen. The IgE response to Amb a5 antigen of ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) and to Cry j1/2 antigen of Japanese cedar pollen is strongly associated with haplotype HLA-D2/Dw2 [23] and HLA-DP/DR [24-26], respectively. Furthermore, that of rye grass (*Lolium perenne*) pollen or *Dermatophagoides pteronyssinus* is strongly associated with haplotype HLA-DR3 [23].

#### Non-HLA candidate genes

A genetic association has been found between T cell receptor-alpha (TCR- $\alpha$ )-chain and sensitization to Amb a5, Fel d1 (major allergen of cat), and grass pollen allergens [27]. The gene for the beta-chain of the high-affinity receptor for IgE (Fc $\epsilon$ RI $\beta$ ) has been proposed as a candidate gene for atopy and asthma [28-30]. Nagata et al. [31] found a significant association between the Gly237 variant of Fc $\epsilon$ RI $\beta$  and nasal allergy, perennial nasal allergy, Japanese cedar pollinosis and allergy to multiple allergens. Among patients positive for a specific IgE, Gly237 was significantly associated with high IgE for house dust mite and Japanese cedar pollen. It has been suggested that the Fc $\epsilon$ RI $\beta$  gene variant is involved in the development of nasal allergy through IgE antibody production. In our preliminary study, we evaluated the possible role of the Stat6 gene, a key transcription factor involved in both IL-4- and IL-13-mediated biological responses, in modulating allergic rhinitis in the Japanese population. A significant difference was found in the genotypic frequency of the GT repeat polymorphism between cases and controls (Fig. 4), as was the case in those with allergic diseases in our previous study [21]. The frequency of the 15-repeats allele was lower in those with allergic rhinitis than in controls, suggesting that genetic variations in the Stat6 gene might be associated with predisposition to allergic rhinitis. A more recent study has demonstrated high contribution contrast between the genes for eosinophil peroxidase and IL-4 receptor alpha-chain in Japanese cedar pollinosis [32].



**Fig. 3.** IL-4-related gene polymorphisms.



Number of GT repeats	Allergic rhinitis		Control		P value (OR)
	Subjects	Frequency	Subjects	Frequency	
13	33	0.311	24	0.182	0.02 (2.03)
14	0	0	1	0.008	
15	61	0.575	87	0.659	0.186
16	12	0.113	20	0.152	0.389
Total	106	1	132	1	

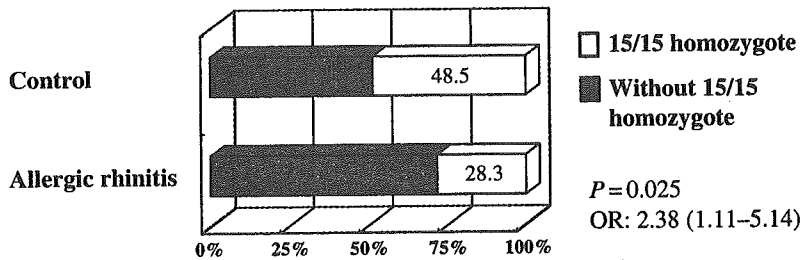


Fig. 4. GT repeat polymorphisms in the Stat6 exon1 and allergic rhinitis.

## Conclusion

Over recent years, the prevalence of Japanese people who exhibit Japan cedar-specific IgE antibody has gradually increased annually, and is currently about 30–50%. In some areas, prevalence are reported to exceed 50% [33]. However, it is unclear whether this surprisingly high prevalence is due to increased numbers of individuals predisposed to allergic rhinitis. It is most probably related to an interaction of environmental factors with genetic susceptibility, as the genetic background of the population is believed to have not changed significantly over the period. There are also alternative interpretations. Until three decades ago, atopic children had increased mortality from infectious diseases including measles due to the gamma interferon secretory defect associated with atopy [34, 35]. Vaccination and antibiotics may have decreased mortality in these patients over this period, and hence atopic genes subsequently may have been increasingly transferred.

Environmental factors are also likely to play a contributory role as pollinosis is infrequent, e.g. in Okinawa where airborne Japanese cedar pollen levels are low. By contrast, massive antigen insult in other areas may be responsible for producing the high prevalence of sensitization to allergen, as has been noted in animal models of allergy and occupational allergies. Further work is needed to clarify how genetic susceptibility interacts with the timing of pollen exposure that stimulates the immune system to cause or predispose individuals to allergic rhinitis.

## References

- Baba K. Pollinosis. *Nippon Rinsho* 2002; 60 (Suppl. 1):643–51.
- Okuda M. Epidemiology of Japanese cedar-pollinosis throughout Japan. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 91:288–96.
- Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108 (Suppl. 5):S147–334.
- Nakamura A, Asai T, Yoshida K, Baba K, Nakae K. Allergic rhinitis epidemiology in Japan. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 2002; 105:215–24 [in Japanese].
- Bahna SL. Factors determining development of allergy in infants. *Allergy Proc* 1992; 13:21–5.
- Edfors-Lubs M. Allergy in 7,000 twin pairs. *Acta Allergol* 1971; 26:249–85.
- Holloway JW, Beghe B, Holgate ST. The genetic basis of atopic asthma. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:1023–32.
- Wiesch DG, Meyers DA, Bleecker ER. Genetics of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:895–901.
- Kulig M, Klettke U, Wahn V, Forster J, Bauer CP, Wahn U; the MAS Study Group. Development of seasonal allergic rhinitis during the first 7 years of life. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:832–9.
- Daniels SE, Bhattacharya S, James A et al. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 1996; 383:247–50.
- Haagerup A, Bjerke T, Schoitz PO, Binderup HG, Dahl R, Kruse TA. Allergic rhinitis – a total genome-scan for susceptibility genes suggests a locus on chromosome 4q24–q27. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:945–52.
- 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* 2002; 3:9–13.
- Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR et al. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994; 264:1152–6.
- Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T et al. Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:449–53.
- Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, Mao I, Adra CN, Hopkin JM. Atopy and asthma. Genetic variants of IL-4 and IL-13 signaling. *Immunol Today* 2000; 21:60–4.
- Graves PE, Kabesch M, Halonen M et al. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:506–13.
- Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M et al. Genetic variants of IL-13 signaling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet* 2000; 9:549–59.

- 18 Hershley GK, Friedrich MF, Esswein LA. The association of atopy with a gain-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Eng J Med* 1997; **337**:1720–5.
- 19 Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ et al. Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis. *J Immunol* 1999; **162**:1227–31.
- 20 Risma KA, Wang N, Andrews RP et al. V75R576IL-4 receptor  $\alpha$  is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function. *J Immunol* 2002; **169**:1604–10.
- 21 Tamura K, Arakawa H, Suzuki M et al. Novel dinucleotide repeat polymorphism in the first exon of the STAT-6 gene is associated with allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 2001; **31**:1509–14.
- 22 Duetsch G, Illig T, Loesgen S et al. STAT6 as an asthma candidate gene: polymorphism-screening, association and haplotype analysis in a Caucasian sib-pair study. *Hum Mol Genet* 2002; **11**:613–21.
- 23 Marsh DG, Meyers DA, Freidhoff LR et al. HLA-Dw2: a genetic marker for human immune response to short ragweed pollen allergen Ra5. II. Response after ragweed immunotherapy. *J Exp Med* 1982; **155**:1452–63.
- 24 Sasazuki T, Nishimura Y, Muto M, Ohta N. HLA-linked genes controlling immune response and disease susceptibility. *Immunol Rev* 1983; **70**:51–75.
- 25 Kitao Y, Sadanaga Y, Uno M, On N, Masuyama K, Ishikawa T. Investigation of the genetics in allergic rhinitis. The 3rd report – HLA class I and II specificities of Japanese cedar pollinosis. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 1988; **91**:509–15.
- 26 Hori T, Kamikawaji N, Kimura A et al. Japanese cedar pollinosis and HLA-DP5. *Tissue Antigens* 1996; **47**:485–91.
- 27 Huang SK, Yi M, Palmer E, Marsh DG. A dominant T cell receptor beta-chain in response to a short ragweed allergen, Amb a5. *J Immunol* 1995; **154**:6157–62.
- 28 Sandford AJ, Shirakawa T, Moffatt MF et al. Localisation of atopy and beta subunit of high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on chromosome 11q. *Lancet* 1993; **341**:332–4.
- 29 Shirakawa T, Li A, Dubowitz M et al. Association between atopy and variants of the beta subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nat Genet* 1994; **7**:125–9.
- 30 Hill MR, James AL, Faux JA et al. Fc epsilon RI-beta polymorphism and risk of atopy in a general population sample. *BMJ* 1995; **311**:776–9.
- 31 Nagata H, Mutoh H, Kumahara K et al. Association between nasal allergy and a coding variant of the Fc epsilon RI beta gene Glu237Gly in a Japanese population. *Hum Genet* 2001; **109**:262–6.
- 32 Nakamura H, Miyagawa K, Ogino K et al. High contribution contrast between the genes of eosinophil peroxidase and IL-4 receptor alpha-chain in Japanese cedar pollinosis. *J Allergy Clin Immunol* 2003; **112**:1127–31.
- 33 Shima M, Adachi M. Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among school children and its influencing factors. *Chiba Univ Environ Sci Report* 2002; **27**:9–14 [in Japanese].
- 34 Campbell DE, Kemp AS. Measles and atopy in African children. *Lancet* 1996; **348**:825.
- 35 Kemp A, Bjorksten B. Immune deviation and the hygiene hypothesis: a review of the epidemiological evidence. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; **14**:74–80.

## 会長講演

# アレルギーのオーダーメイド治療と21世紀型ポストゲノム

近藤直実

岐阜大学医学部小児病態学

### I はじめに

このような機会を頂きまして会員の皆様に厚く御礼申し上げます。

日常診療の中で学ぶこと、疑問に思うことは実に多い。アレルギー診療も例外ではない。個体特異性（外来抗原に対して、なぜ過剰反応する人とならない人が存在するのか）、抗原特異性（なぜある特定のアレルギーンに対してのみ症状を呈するのか）や病態の異質性の存在等々。近年のアレルギー疾患患者の増加が、個々の患者のQOLや日常生活を大いに妨げ、更には大きな社会問題になっている。このような現況を踏まえて、日々の診療で得られた多くの疑問を1つ1つ着実に解決し、その成果を臨床に還元し、QOLの向上、ひいては社会問題の解決に役立てたい。このような立場から、著者らは臨床からの問題や疑問を整理し、その解決のために研究し—その研究は極めて基礎的（ゲノム、21世紀型ポストゲノムの）な研究にも至る—その成果を再び真に臨床に応用し画期的かつユニークな診断法・

治療法・予防法、特にオーダーメイド治療・予防法の開発を目指して今日に至っている（図1）。

本講演ではこのような視点から、著者らが取り組んできたゲノム、さらにゲノムを越えた21世紀型ポストゲノムの研究内容と臨床への応用、特にアレルギーのオーダーメイド治療開発を紹介する。小児気管支喘息治療・管理ガイドラインにおいても序文で古庄先生、西間先生が、「…画一化をめざすものではなく、あくまで個々に対応した医療が重要である」ことを強調されている。そこでまず現時点におけるオーダーメイド治療について述べ、次にゲノム・21世紀型ポストゲノムに基づいたオーダーメイド治療・予防法開発について述べる。

### II 現時点におけるアレルギーのオーダーメイド治療

気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患の発症要因のうち環境要因には、アレルギーン、ウイルスなどの感染、ストレス、気象の変化、運動などがあり、生体側の要因にはアレルギー免疫反応、気道過敏性亢進、

#### 日常診療での疑問

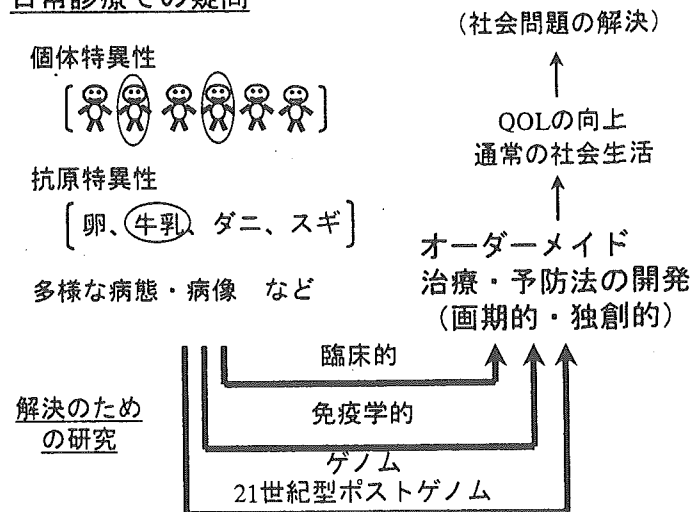


図1 日常診療での疑問からオーダーメイド治療・予防法の開発へ

自律神経系などがある。個々の患者において、これらの要因のどれが優位になっているかを明らかにして、それぞれに対応する。

図2に気管支喘息などアレルギー疾患の成立機序を示す。このうちどこかが断ち切られれば成立しないことになる。個々の患者さんに対して、それぞれにどの経路を断ち切るかを考えることがオーダーメイド治療・予防のスタートになる。アレルギー素因がなければその後の反応は進まない。素因があって反応が進むにしても、種々のアレルギーや誘因のうち個々の患者さんに特徴的なアレルギーや誘因を明らかにして、それに対する対策をとることがオーダーメイド治療・予防になる。

#### 免疫アレルギー反応に対するオーダーメイド診療

種々の要因のうちアレルギー反応も種々であり、それに対する抗アレルギー薬も種々ある。その中でどのように使い分けていくかが、オーダーメイド治療として極めて重要である。すなわち個々の患者さんの病態を明らかにして、それに対応する薬剤を選択することが必要である。

喘息発作が起こる機序は図3のように整理できる。アレルギー侵入後、肥満細胞などから、ヒスタミンなどのケミカルメディエーターが産生遊離され、気管支平滑筋収縮、分泌亢進、浮腫が生じ起こるような発作は、いわゆる即時型喘息発作であり、これに種々の炎症性細胞が大いに関与して気道のアレルギー性炎症が中心になって起こるような発作は、主として遅発型喘息発作で、より重く難治になりやすい。この場合には

アラキドン酸カスケードなども大いに関わり、ロイコトリエンも大いに作用する。同じく喘息発作といってもこれらのどちらが主体か、あるいは両者がともに関わっているかを見抜いて、抗喘息薬を使い分ける必要がある。気道収縮の直接的な解除には $\beta_2$ 刺激薬やキサンチン誘導体を中心になる。即時型喘息発作が中心の場合には、DSCG (インターール®)、フマル酸ケトチフェン (サジテン®) を、IgE 産生制御やTh2 サイトカイン制御にはトシル酸スプラタスト (アイピーディー®) を考慮する。ロイコトリエンなどアラキドン酸カスケードの関与を中心にしたアレルギー性炎症が主体の場合には、モンテルカストナトリウム (シングレア®, キプレス®)、プラナルカスト水和物 (オノン®) などロイコトリエン受容体拮抗薬が威力を発揮する。アレルギー性炎症の全体的な制御には現在のところ吸入ステロイドが必要であり、現在成人はもちろん、小児でも中等症以上では中心的な位置を占める方向にある。最近、キサンチン誘導体の少量持続投与に抗アレルギー性炎症作用が言われている。

著者らは喘息発作を起こした患者の種々のパラメーターを測定し、個々の患者でその病態が多様であることを明らかにした。IgE系が優位、好酸球系が優位、ロイコトリエンなどアラキドン酸系が優位など様々である。今後はこれらの病態解析をもとにしてオーダーメイド治療がなされることが必要である。

#### ストレス、感染などに対するオーダーメイド診療

さらにストレスやウイルス感染それぞれが優位になって喘息発作が起きる患者さんも存在する。ストレ

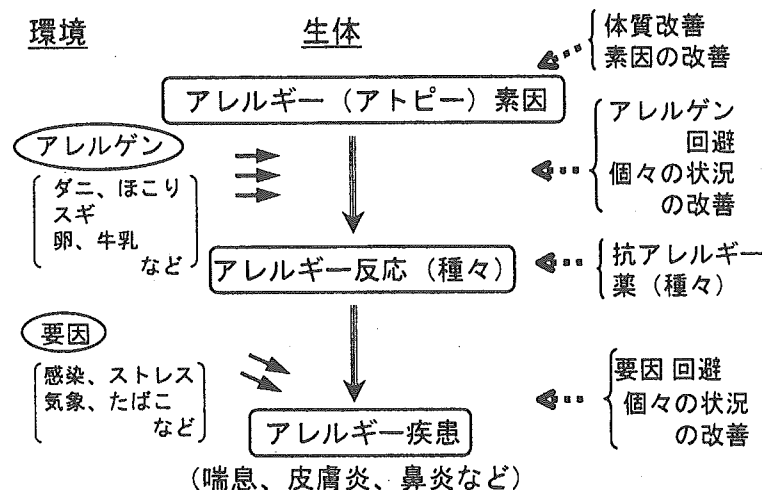


図2 アレルギー疾患の成立

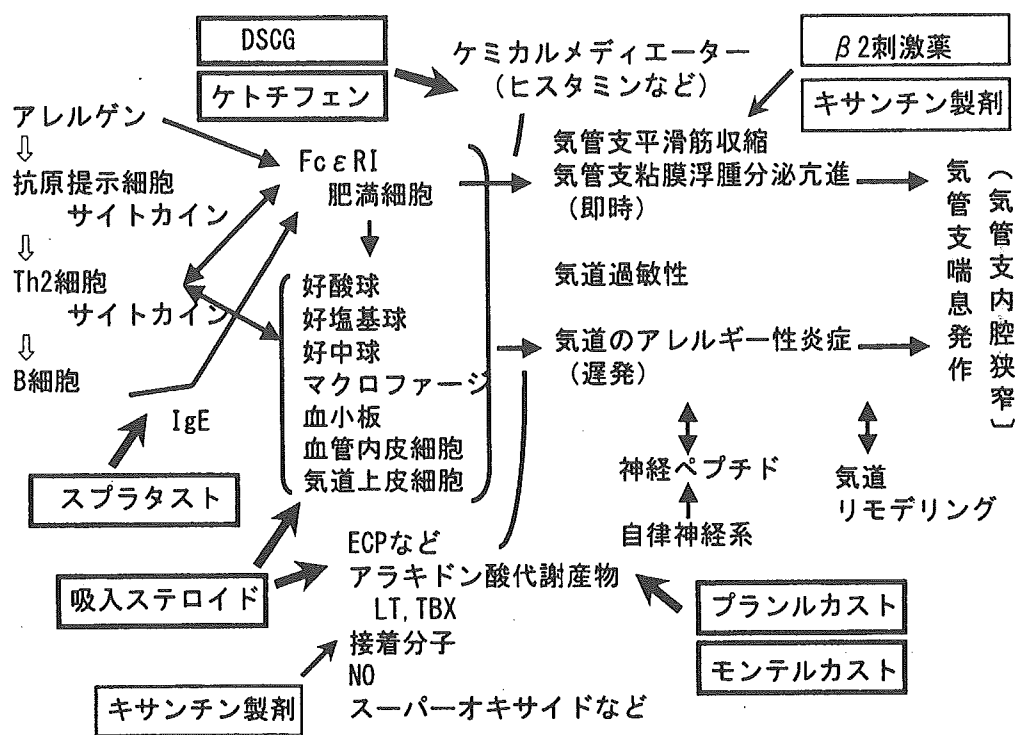


図3 気管支喘息発作の発症機序と薬剤の作用部位

スにより症状がしやすい素因について著者らは大脳辺縁系に多く分布する分子であるドーパミンD<sub>4</sub>レセプターの遺伝子につき興味ある成績を得つつある。いずれにしてもこのような患者さんでは鍛錬療法が重視される。さらにRSウイルスやインフルエンザウイルス感染により喘息発作が誘導されやすい患者さんが存在する。このような人ではウイルスの感染によりアレルギーのブレーキ役、つまり抑制系の重要な物質であるインターフェロンγ (IFN-γ) の産生が一時的に低下することが明らかになった。今後このような患者さんへのさらなる抗ウイルス対策 (アレルゲン回避, ワクチン, 抗体, 治療薬など) の検討が必要である。

### Ⅲ ゲノム・21世紀型ポストゲノムに基づくアレルギーのオーダーメイド治療予防法開発

次にゲノム・21世紀型ポストゲノムに基づく開発につき著者らの成績を中心に述べる。それは1つには遺伝子と、これらの遺伝子がコードしているタンパクとその異常についてタンパクの機能異常を3次元立体構造の異常から理解し、治療・予防など医療へ応用すること。いわば構造生物学 (structure biological medicine—近藤らによる) とでも言うべき学問体系を

導入し、治療開発をすすめている。もう1つはアレルギーにおける遺伝的要因と環境要因の直接的な関連につき、生体の遺伝子や分子への環境の直接的な関与を検討している、すなわち遺伝子分子生態医学 (genetic molecular ecological medicine—近藤らによる) とでもいうべき分野である。

#### (1) アレルギーの遺伝子解明とタンパク立体構造 (構造生物学) の解明に基づくオーダーメイド治療予防開発

著者らは以前に岐阜市と沖縄の糸満市において約4,000例を対象にアンケート調査を行いアレルギー発症に関わる因子を多重ロジスティック解析で分析した。結果は家族歴が最も high score を示した。このような成績は以前より数多く報告されており、これらのことからアレルギーの発症には遺伝的集積性、あるいは家族集積性があることから、何らかの遺伝子がかかっていることが示される。しかもアレルギー反応は多様であることから、これらの遺伝子も多様であると考えられる。これらの遺伝子が明らかになれば、診断、治療、予防法に画期的な改革が進むと考えられる。

ある疾患の病因遺伝子を明らかにする方法には、大きくポジショナルクローニングとファンクショナルク

ローニングがある。この両方法を用いて、著者らも含めて世界的に現在までに多くのアレルギー(アトピー)あるいは喘息の遺伝子が解明されてきている。このうち重要なものもいくつか示されている。ここでは著者らの研究成果を中心に述べる。図4のアレルギー反応系のうち著者らは、抗原認識部位と過剰なIgE産生の部位について遺伝子学的かつ構造生物医学的に解析をすすめている。そこでこの2点について述べる。

①抗原認識部位

抗原を認識し、アレルギー反応が進むかどうか、さらにアレルギー反応や症状の型の方向を決定するポイントになる部位は図4の抗原認識部位、すなわち抗原提示細胞のHLAclassII分子、抗原ペプチド、そして

ヘルパー T細胞のT細胞レセプターの3つの分子の結合部位と考える。

著者らは1987年以来、食物アレルギーには臨床的に食物摂取後、直ちに症状が発現する即時型食物アレルギー(immediate)のほかに、食物摂取後少し時間を経てから症状が発現する症例があることを報告し、これを臨床的に非即時型食物アレルギー(non immediate)と名づけて報告した(図5)1-4)。そこで著者らは、これらの型の症状を示す牛乳あるいは卵アレルギー患者から、各々の食物抗原に特異的に反応するT細胞クローンをいくつか樹立して検討した。ここでは牛乳アレルギー患者由来のβラクトグロブリンに特異的に反応するT細胞クローンをういた成績につき示す。βラクトグロブリンのオーバーラッピングペプ

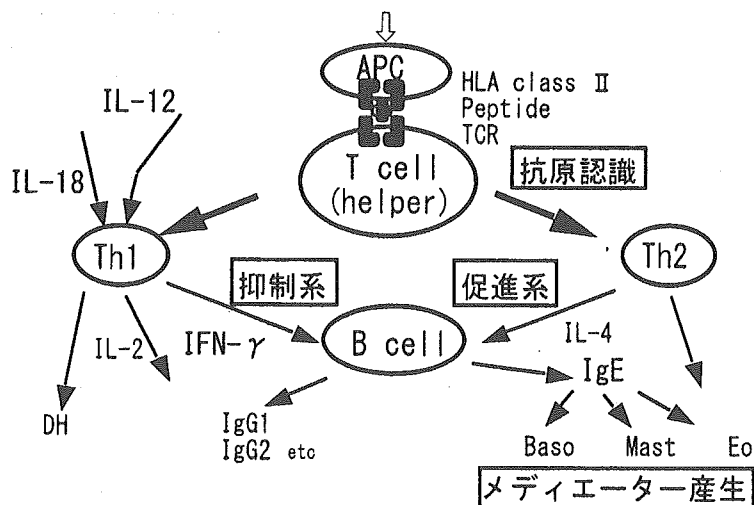


図4 抗原認識とIgE産生調節系

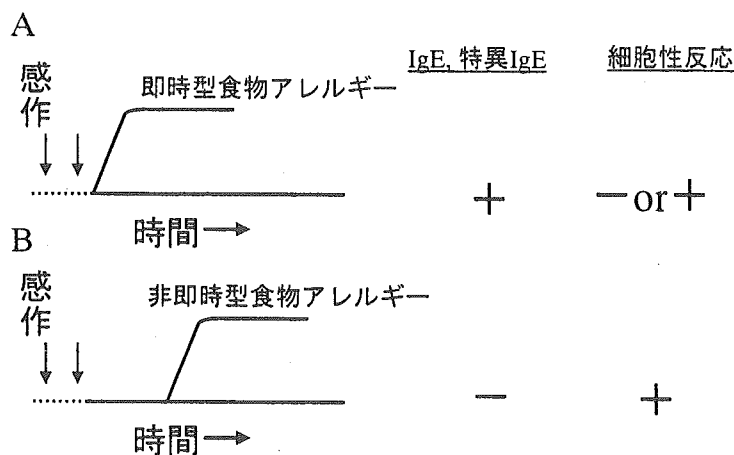


図5 食物アレルギーの症状発現時間による分類

(Kondo N. による Acta Paediatr Jpn 1987, 小児科臨床 1987, J Allergy Clin Immunol 1990, 1993)

タイドを作成し、クローンで調べるとP97-117に反応するクローンがいくつかみられた。このコアとなるアミノ酸配列を調べて決定し、さらにT細胞レセプターの可変部領域を調べたところ、CDR3領域といわれる超可変部領域が重要であることが示された。

以上の成績から、図6のようなタンパク立体構造的な結合様式が考えられた。すなわち、CDR3領域のK<sup>+</sup>（リジン）とβラクトグロブリンペプチド側のE<sup>-</sup>（グルタミン酸）とが正負の荷電で引き合い、その周囲に疎水性部分が存在した。そこでこの性質を利用して、この反応が低下するようなアナログペプチドや酵素処理ミルクを作成し、治療ミルクを共同開発中である。

## ② IgE 産生抑制系の破綻<sup>5-9)</sup>

図4に示すように、過剰なIgE産生はTh2系の促進系の異常により更に促進する一方で、Th1系の抑制系の破綻により過剰なIgE産生にブレーキがかからなくなり、アレルギー発症に向かうことが考えられる。そこで著者らはこの抑制系に注目し遺伝子学的検索を行ってきた。IFN-γはその上位でインターロイキン12 (IL-12) とインターロイキン18 (IL-18) の刺激により産生誘導される。そこで、IL-12とIL-18でそれぞれ刺激した時の末梢リンパ球からのIFN-γの産生量をプロットすると図7のようになった。全体としては正相関を示したが、よくみると discrepancy (解離) を示す症例がいくつも存在した。すなわちIL-18の刺激では十分な

IFN-γが産生されるが、IL-12の刺激ではIFN-γの産生がよくない症例やその逆の症例である。著者はこのような症例が極めて興味深く、かつ重要と考えそれについて追求していった。

まずIL-12-IFN-γ系について、IL-12はIL-12レセプター (R) β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub>鎖のヘテロダイマーに結合し、細胞内へ情報が入る。すなわちJAK2, Stat4を介してIFN-γ遺伝子を発現させ、IFN-γタンパクが産生され、これが過剰なIgE産生を抑制調節する。前述のIL-12にのみ反応の悪い症例では、この情報伝達系に何らかの異常が存在すると考えられたので、そのうち特に重要であるIL-12R β<sub>2</sub>鎖をコードする遺伝子の変異の有無につき検討した。その結果極めて興味深いことに、3種の遺伝子変異を同定した(図8)。これらは91塩基が欠損 (deletion) するもの、1塩基置換によりアミノ酸が変わる missense mutation であった。さらにこれらの変異をもつ患者のリンパ球でのStat4のリン酸化は明らかに低下していたことから図8のように、IL-12R β<sub>2</sub>鎖の遺伝子変異によりJAK2-Stat4の情報伝達系が進まず、従ってIFN-γ遺伝子発現がわるく、IFN-γタンパク産生が不十分で、その結果、過剰なIgE産生を抑制することができないというストーリーが成立した。これはIgE産生の抑制系の遺伝子異常の存在を示した世界で初めての成績である。

次にIL-18-IFN-γについて、著者らはIL-18をGST融合タンパクを用いて精製した。この精製ヒトIL-18をもとにNMRを用いて、約7年がかりで著者らの教室で、

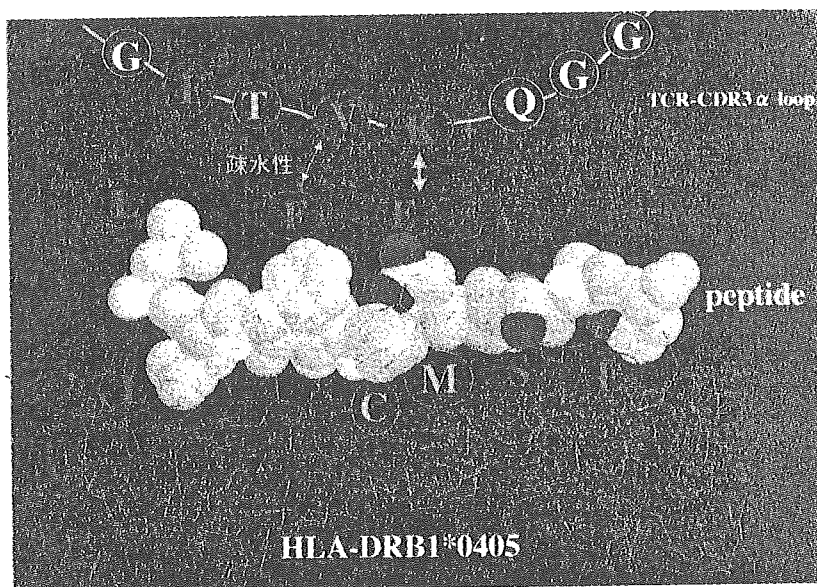


図6 BLGペプチド-HLA複合体とT細胞レセプターとの相互関係

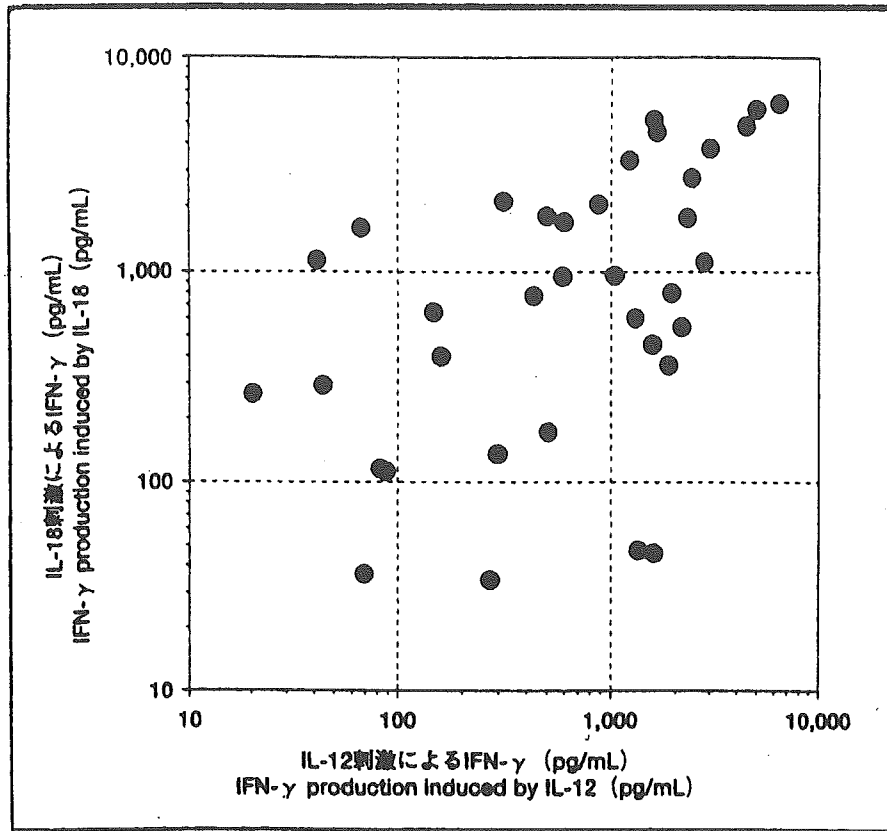


図7 末梢リンパ球のIL-12あるいはIL-18刺激によるIFN- $\gamma$ 産生

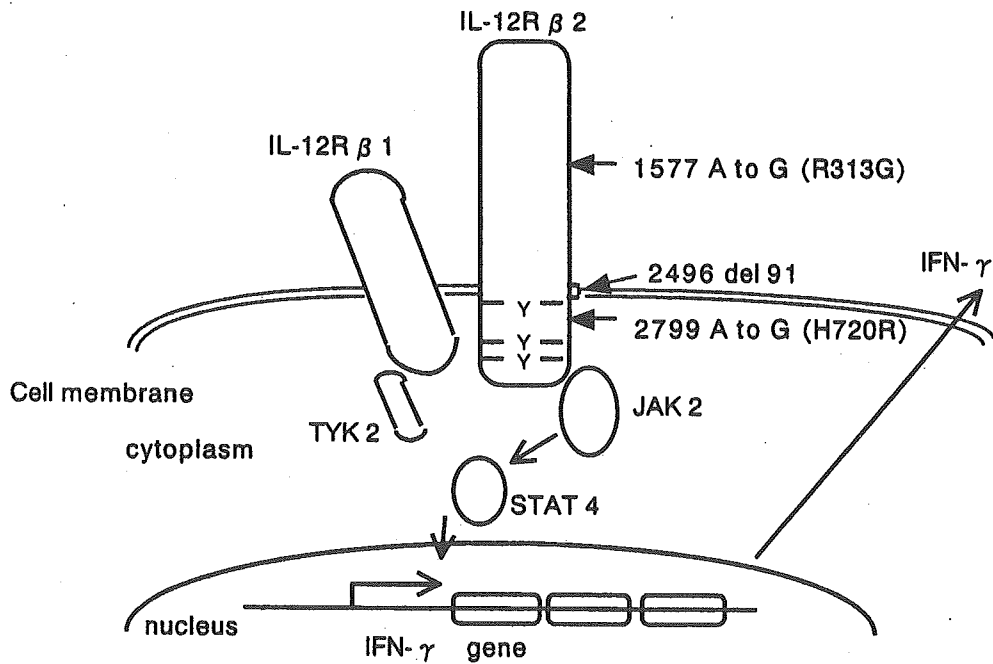


図8 IL-12カスケードとIL-12R $\beta_2$ 鎖の遺伝子変異



そのタンパク立体構造とレセプターへの結合様式が明らかにされた(構造生物学)(図9)。

さらに、このIL-18を用いて種々検討した結果、IL-18R $\alpha$ 鎖に遺伝子変異(950 del CAG)を示す症例が存在すること、またこの変化はcDNA上に存在し、RNAプロセッシングの段階でalternative splicingによりおこっていることが明らかになった。この変化をhomoでもつ患者では確かにIL-18刺激によるIFN- $\gamma$ の産生が他群に比し明らかに低下していた。図10に示すように、この変化によりレセプターの茎の部分のアミノ酸が1つ欠失する。これにより安定性の低下、あるいは情報伝達の低下が生来するものと考えられた。また、IL-18とIL-18Rとの結合様式についてはアミノ酸の正負荷電が重要であり、これらのことを利用したポストゲノムの創薬がオーダーメイド治療開発の一貫として著者らにより進められている。

### ③構造生物学について

主としてタンパクの3次元の立体構造を解明、理解する学問体系が構造生物学である。

構造生物学は従来は主として理学系で扱われ今日に至っている。著者らは1995年からこの学問体系を医学に導入し、タンパクである物質の構造と機能との相関を理解し、それに立脚し、疾病におけるタンパクの機能異常を3次元立体構造の異常から理解し、さらに治療・予防など医療へ応用することを目指してきている。いわば構造生物学とでも言うべき学問体系を目指している。

生体においてタンパクが適切な機能を発揮するにあ

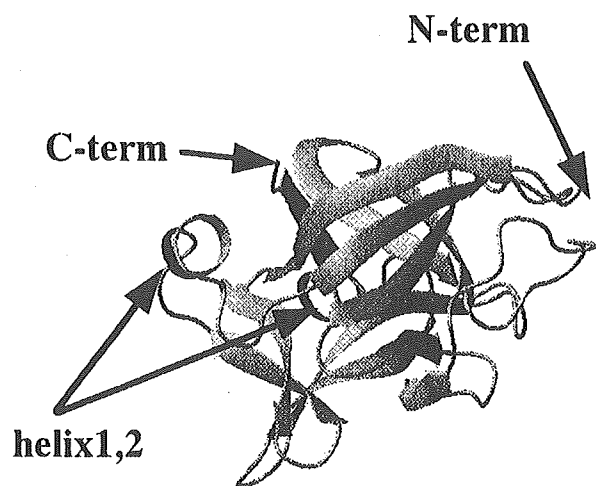


図9 ヒトIL-18の立体構造 (Kato Z. et al. Nature Struct Biol 10:966-971, 2003)

たり重要なことがある。タンパクである酵素が機能を発揮するには何よりもまず当該の基質に結合することが必要である。リガンドである種々のサイトカインが情報伝達効果を発揮するためには、まずそのレセプターに結合する必要がある。ウイルスも生体のウイルスレセプターに結合して初めて生体への侵入が可能になる。このようにタンパク同志の結合が適切に行われるためにはそれぞれのタンパクの3次元立体構造が正しく構築されていなければ成し遂げられない。さらに、それぞれのタンパクが本来の機能を発揮する際にもその構造が重要である。

ある疾病の原因として、その病因となる遺伝子に異常があり、その遺伝子がコードするタンパクの機能の異常により疾病が発症することが明らかになったとしても、どのような機構でタンパクが機能出来ないのかは不明である。遺伝子異常により停止コドンが入り、短いタンパクしか作られないこともあるし、アミノ酸が置換することもあるし、フレームシフトにより全く異なったタンパクが出来ることもある。このようなタンパクが本当に適切な機能を発揮出来なくなることを証明するためには、作られたタンパクの3次元立体構造の分析により、正常な場合とどこがどのように違うのかを明らかにする必要がある。構造生物学を医学に導入する理由の1つはここにある。さらに、構造生物

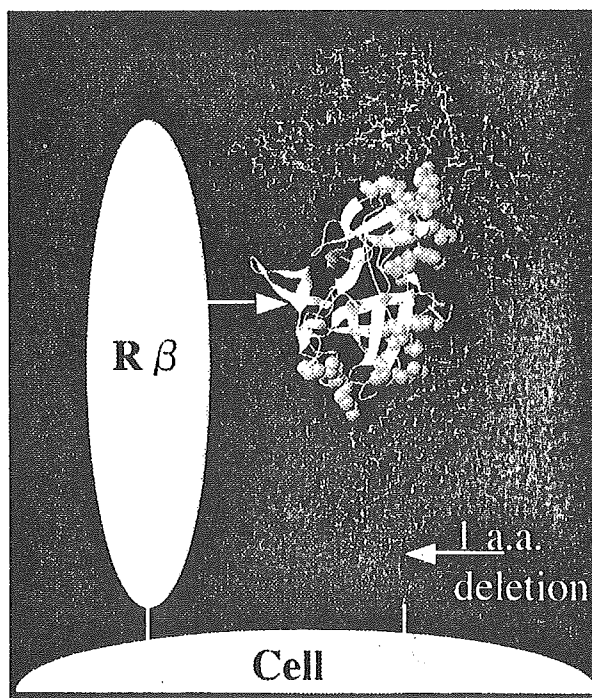


図10 IL-18レセプター $\beta$ 、IL-18、IL-18レセプター $\alpha$ の三元複合体モデル

学的知見をもとにして、新たに構造生物学的治療法を目指すことがもう1つの理由である。すなわち、遺伝子異常から疾病が発現するまでのblack boxを構造生物学的に明らかにすることにより、その異常個所を治す知識と技術の開発が可能になる(図11)。

コップを作る時の平面の設計図を図12(a)に示す。(b)はそれにより作ったコップの立体図である。(a)でAとBは同じような異常であるがAではこのコップから水は殆どこぼれないが、同じような異常であってもBでは完全に水がこぼれコップとしての機能を全く失う。このことを(a)のみでは説明がつきにくい。ところが(b)の如くコップの立体図をみればBで機能を失うことは明白となる。これと同様にタンパクの1次構造のみでは説明のつかない機能異常とそれらの差異も立体構造を明らかにすることにより説明が可能になる。さらにBを補修する治療法を開発することが可能になる。

今後はこのような解明を通して、従来からの薬剤の使い分けや、創薬の開発を通して適格なオーダーメイド治療予防がすすむであろう。

#### ④アレルギー(アトピー)の遺伝子学的分類の試みとオーダーメイド治療開発への応用<sup>5-13)</sup>

以上述べてきた著者らの成績と現在までに世界で報告されている成績をもとに、図13のようにアレルギー

(アトピー)を新たに遺伝子学的に分類することを試みた。(1)抗原提示(2)過剰なIgE産生(3)メディエーター産生(4)標的臓器の4つに大きく分類した。このうち著者らは、抗原提示段階や、IgE産生抑制系の遺伝子変異を報告してきた。このうち後者についてはIL-12、IL-18-IFN- $\gamma$ シグナルにおける、特にレセプター(R)についてIL-12R $\beta_2$ 鎖遺伝子変異、IL-12R $\beta_1$ 鎖遺伝子変異、IL-18R $\alpha$ 鎖遺伝子異常、IFN- $\gamma$ R1遺伝子変異などである。さらにロイコトリエン合成酵素(LTC<sub>4</sub>合成酵素など)の遺伝子変異を明らかにしてきた。

著者らは、上記のアレルギーの遺伝子学的分類に基づいて、個々の患者での異常部位を明らかにして、それぞれに対応したオーダーメイド治療の開発を進めている。その為に、インバーダー法を用いたアレルギー遺伝子診断キットを共同で開発した。先の抑制系の変異がアレルギー患者の約1/3で検出された。さらに促進系のIL-4R $\alpha$ 鎖遺伝子変異などを入れれば、約2/3がカバーされると考えている。

#### (2) 遺伝子分子生態医学に基づくオーダーメイド治療・予防開発

遺伝子・タンパク構造について述べてきた。さらに、著者が最近重要と考えていることに触れて講演を終わる。さらにQOLの向上を目指す為には、原点に戻って

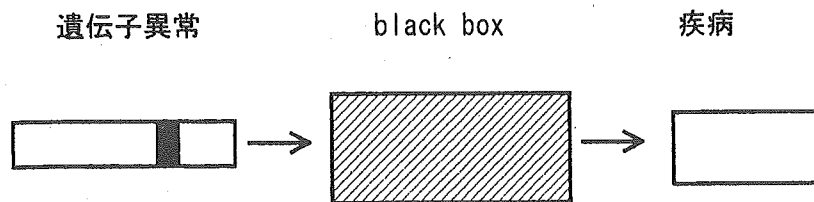


図11 遺伝子異常から疾病の発現

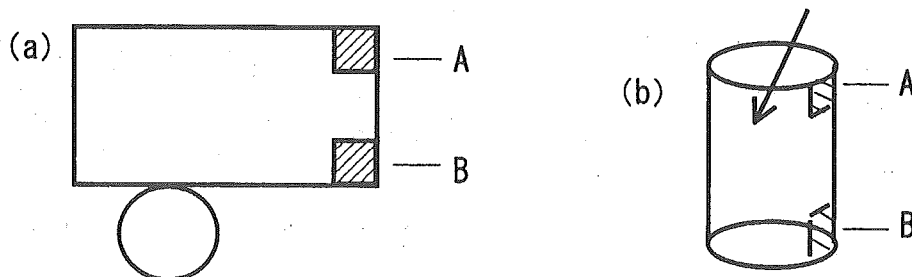


図12 コップの平面図と立体構造

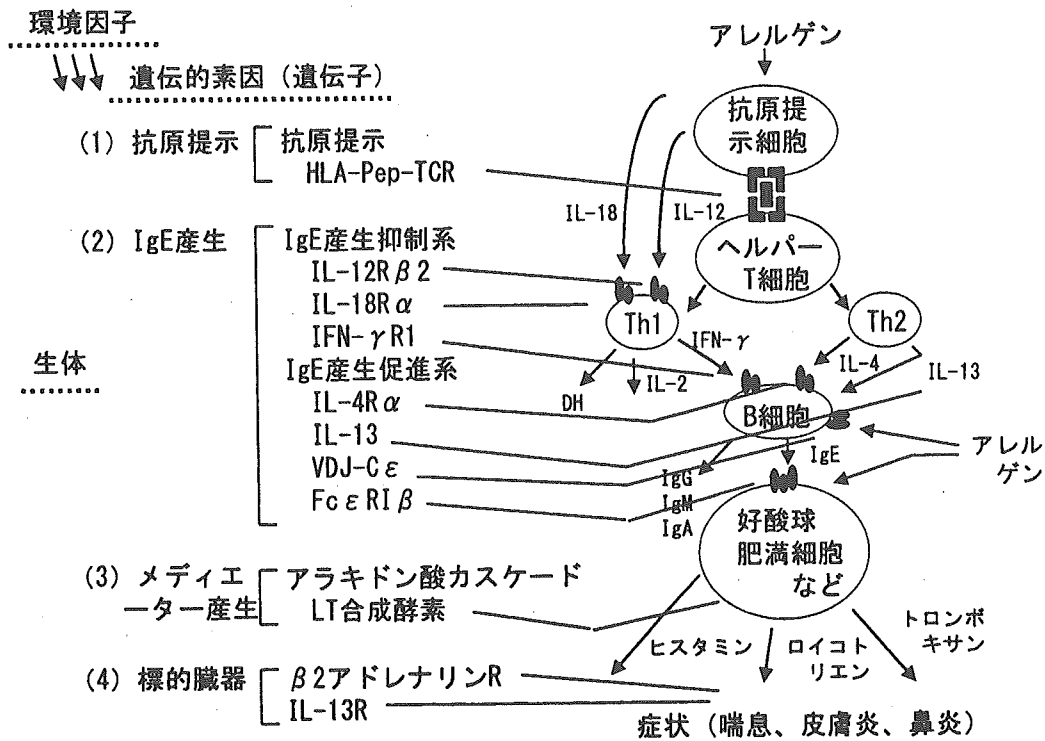


図13 アレルギーの遺伝子学的分類 (Kondo, N 2001)

アレルギー疾患は遺伝的要因と環境要因が絡み合って発症するという考え直してみる必要がある。それは両者の直接的な関わりである。

ヒトは出生後、約3ヶ月間は原始反射により哺乳し栄養をとり、生後3ヶ月で顎定、1才になると1人で立ち歩行するようになる。極めて画期的なことである。このようなことは遺伝子が生体をプログラムしていることによる。さらに驚くことに、サバンナの動物達は出生後数分以内に立ち上り、歩行どころか走行することが可能である。これも遺伝子が彼らの生体をそのようにプログラムしていることによる。では、一体同じくこの地球に生をうけた生物であるヒトと動物のこの差は何によっているのであろうか。長い進化の過程で、その種の生存をかけて、おかれた環境の中で子孫を残して生き残ってきた。動物達はそのように進化しなければ、捕食動物によって捕食されることにより、子孫を残すことができないのである。すなわち、環境の中で多大な影響をうけて、遺伝子およびその発現がそのようにコントロールされて進化したのである。つまりヒトの成長・発達も遺伝子によりタンパクとその発現をとおして、プログラムされているが、このプログラムは環境によって支配されているのである。しかも長い進化の過程を経て、著者は最近までそのように考え

てきた。しかし最近さらに新たな点に注目している。それは雷鳥は夏から冬にかけ保護色が変わる。これは極めて短い時間の間に環境の影響を受けて、遺伝子・分子がその発現を含めて変化しうること示している。このような視点から、著者らはアレルギーにおける遺伝的要因と環境要因の直接的な関連につき、生体の遺伝子や分子への環境の直接的な関与を検討している(遺伝子・分子生態医学—著者による)。その一部を紹介する。

アレルギーの重要なタンパクであるIgEの産生過剰に関しては、図4のように促進系と抑制系のバランスがとれている場合には何事もおきないが、抑制系(ブレーキ)に異常が存在するとブレーキが効かず促進系が亢進し過剰なIgE産生、従ってアレルギー発症に傾く。この抑制系の中心になる分子がIFN-γである。著者らは遺伝的要因としてIgE産生抑制系であるIL-12—IFN-γシグナル伝達系およびIL-18—IFN-γシグナル伝達系における遺伝子異常、特にIL-12Rβ2鎖遺伝子異常(2496 del 91など)およびIL-18Rα鎖遺伝子異常(950 del CAG)を世界に先駆け明らかにした。これらの遺伝的に規定された遺伝子異常はIFN-γの産生低下を来たし、ブレーキがかからなくなる。では、このような遺伝的要因であるIFN-γ分子の産生低下が、環

境要因によって直接的にどのような影響をうけるかについて種々の角度から検討した。その結果、ウイルス感染によりIFN- $\gamma$ 産生が一過性に低下すること、しかもそれは少なくともmRNAレベルで発現していること、pHが低下することによりIFN- $\gamma$ 産生が低下すること、さらに温度が低下することによりIL-18R $\alpha$ 鎖950 del CAGが解除されることが明らかになった。さらに環境の変化により、RNA editing現象が起こっていることも初めて明らかにされた。

このようにもともと生体に惹起された遺伝子異常により引き起こされる生体分子の異常が、環境要因によっても引き起こされることが証明され、遺伝的要因と環境要因とのかかわりを直接、分子や遺伝子のレベルで捉えることができた(図14)。さらにストレスという環境による疾病の発症も遺伝的に規定されている証拠も上がりつつある。

考えてみると、ヒトなど生物は地球-太陽系、そして宇宙の中で多くの元素を得て発生し、現在存在している。従ってヒトの成長発達、恒常性維持、さらには病気を理解し対策を講じる時、このような視点から捉える必要がある。すなわち日常診療の中で、地球規模的環境の改善を充分考慮に入れて、個々の患者への対応、すなわちオーダーメイド対応を講じるべきである。

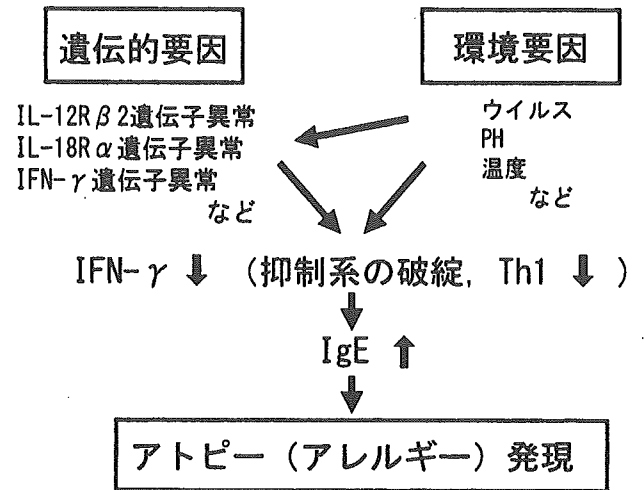


図14 遺伝子分子生態医学

IV おわりに

以上の点を含めて、著者なりに現在と今後のオーダーメイド治療の方向を表1にまとめた。最近提案されている衛生仮説(図15)が示唆するものは、改めて不潔な環境に逆戻りすることを推奨するものではなく、人間が生を受けた本来の原点に戻って、良好な地球規模的自然環境の中で生きることの重要性を示唆しているものと著者は強調したい。

21世紀、ポストゲノムの最も重要なものとして、著

表1 気管支喘息などアレルギー治療における今後の展望(オーダーメイド治療)

A. 現存する治療法、治療薬の病態に即した使用法の再検討

- (1) 個々の患者にとっての原因・誘因の回避
- (2) 発作の程度、重症度による使用法
- (3) 病態に即した治療法、治療薬の適用
  - 1. 即時型、遅発型に対応して
  - 2. IgE主体、リンパ球主体、アラキドン酸主体、自律神経主体、精神的主体、感染主体などに対応して

B. 新しい治療薬、治療法の開発

- (1) アナログペプチド、CpGDNA
- (2) Th1細胞の誘導、経口免疫寛容
- (3) クリーンルームの一時的使用

C. ゲノム・21世紀型ポストゲノムに基づく治療・予防法開発

- (1) アトピー遺伝子およびタンパク立体構造に基づく治療予防法の開発
  - (遺伝子診断による予知と予防、ゲノム創薬 など)
- (2) 遺伝子分子生態医学の解明に基づく対策の開発
  - (生体の分子・遺伝子に及ぼす環境因子の直接的な作用)