

バーにより測定した。チャンバーの下室に遊走活性を測定する気管支平滑筋細胞培養上清、上室に 1×10^6 cells/ml に調整した気管支平滑筋細胞の浮遊液を入れ、37 °C、5 %CO₂ 条件下で6時間インキュベートした。インキュベート終了後、遊走膜の下室側に遊走した細胞のみを Diff-Quik で染色した。この染色細胞を倍率400倍に設定した光学顕微鏡で10視野測定し、その合計数を遊走活性とした。

C. 結果

- 1) 気管支平滑筋細胞培養上清には127, 62, 57及び41kDaのメタロプロテアーゼが存在していた。(Fig.1, 2)
- 2) 気管支平滑筋細胞培養上清にはフィブロネクチン, MMP-1, 2及び3が存在していた。(Fig.3及び4)
- 3) 遊走実験に用いる気管支平滑筋細胞培養上清に抗フィブロネクチン抗体を添加することにより、本上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走が抑制された。(Fig.5)
- 4) 遊走実験に用いる気管支平滑筋細胞を抗 $\beta 1$ インテグリン抗体で前処理することにより、気管支平滑筋細胞培養上清に対する遊走が抑制された。(Fig.6)

D. 考察

平滑筋細胞には収縮型と合成型という異なる形質が存在することが知られている。合成型平滑筋細胞は収縮型に比べ、増殖能、遊走能及び細胞外マトリックス産生能を大きく亢進している。更に平滑筋細胞は通常収縮型の形質を取り、疾患に伴って合成型へと形質転換することが知られている。合成型平滑筋細胞の電子顕微鏡像における細胞内小器官の増加や細胞質フィラメントの配行などの特徴は、筋線維芽細胞に似ているとの報告がある (Gizycki MJ, et al, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1997)。喘息気道で確認される筋線維芽細胞は形質転換した気道平滑筋細胞かもしれない。

分担研究者は抗フィブロネクチン抗体を用いた気管支平滑筋細胞培養上清のウェスタンブロッティングにより、本上清にフィブロネクチンが含まれることを示した。更に遊走実験に用いる気管支平滑筋細胞培養上清に抗フィブロネクチン抗体を添加することで本上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走が抑制されたことから、本上清に含まれるフィブロネクチンが気管支平滑筋細胞遊走因子として作用する可能性を示した。血管平滑筋細胞においてもフィブロネクチンに対する遊走が報告

されており、これを介する受容体として $\beta 1$ 及び $\beta 3$ サブユニットを有するインテグリンが報告されている (Cyman RI, et al, *Exp. Cell Res.*, 1992)。そこで気管支平滑筋細胞においても、これらの β サブユニットを有するインテグリンがフィブロネクチンへの遊走に関与している可能性を考えた。遊走実験に用いる気管支平滑筋細胞を抗 $\beta 1$ インテグリン抗体で前処理したところ、本上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走は抑制された一方、抗 $\beta 3$ インテグリン抗体による細胞前処理は遊走活性に影響しなかった。このことは気管支平滑筋細胞が $\beta 1$ サブユニットを有するインテグリンを介して気管支平滑筋細胞培養上清中と遊走する可能性を示しており、本上清に含まれる気管支平滑筋細胞遊走因子がフィブロネクチンである可能性を支持するものである。本研究で用いた気管支平滑筋細胞では、 $\beta 3$ インテグリンの発現が低かったのかもしれない。

気管支平滑筋細胞培養上清のゼラチンザイモグラフィにより、ここに127, 62及び57及び41kDaのメタロプロテナーゼ活性が含まれることを確認した。更に抗MMP抗体を用いた本上清のウェスタンブロッティングにより、ここに抗MMP-1, 2及び3が含まれることを確認した。気管支平滑筋細胞同士の細胞間結合はカドヘリンを介している。血管平滑筋細胞では、N-カドヘリンを介する細胞間結合がMMP等のメタロプロテナーゼにより解離すると報告されている (Uglow EB, *Circ. Res.*, 2003)。気管支平滑筋細胞におけるMMP産生・放出は遊走経路を作製だけではなく、細胞間結合の解離にも寄与しているのかもしれない。

以上の知見により、喘息患者の気管支において平滑筋細胞が平滑筋から結合組織へと次々に遊走する可能性が示された。このことは気管支平滑筋細胞の遊走が気道リモデリングの新たな治療標的となり得る可能性を示している。喘息患者の気管支へのMMP-1, 2及び3阻害剤や $\beta 1$ インテグリン・アンタゴニストの投与は、気道リモデリングの治療に繋がるかもしれない。

E. 結論

喘息患者の気管支において、平滑筋細胞はMMP-1,2,3等のメタロプロテナーゼを産生・放出し平滑筋から結合組織へと遊走した後、ここでフィブロネクチンを産生・放出し近傍の平滑筋細胞を結合組織へと遊走させることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 気管支喘息の気道リモデリングにおける細胞外マトリックス及び気道平滑筋細胞の意義
北九州医工学会誌 p39~42 (2003年6月)
2. 学会発表
 - 1) Involvement of extracellular matrix components in chemotactic response of airway smooth muscle cells associated with airway wall remodeling
The 5th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium (2003年6月)
 - 2) 気管支喘息の気道リモデリングにおける細胞外マトリックス及び気道平滑筋細胞の意義
第27回 北九州医工学会誌 (2003年6月)
 - 3) Effect of extracellular matrix components on the migration of airway smooth muscle cells in asthma
第76回 日本生化学会大会 (2003年10月)
 - 4) 気管支喘息での気道リモデリングにおける細胞外基質因子の気管支平滑筋細胞遊走作用
第53回 日本アレルギー学会総会 (2003年10月)
 - 5) 気管支喘息での気道リモデリングにおけるオートクライン機序による気道平滑筋細胞遊走の意義
第7回 アレルギー・気道上皮細胞研究会 (2003年12月)

- 6) 気管支平滑筋細胞のオートクライン機序による遊走とフィブロネクチン及びMMP-2の関与
第25回日本炎症・再生医学会 (2004年7月)
- 7) Involvement of extracellular matrix components and matrix metalloproteinases in airway smooth muscle cell migration induced airway remodeling
第77回日本生化学会大会 (2004年10月)
- 8) 気管支喘息の気道リモデリング形成機序: 気管支平滑筋細胞遊走に対するフィブロネクチン及びマトリックスメタロプロテアーゼの関与
第37回日本結合組織学会 (2005年5月)
- 9) 気管支喘息の気道リモデリングへの気道平滑筋細胞の関与: フィブロネクチン産生及び遊走による病態形成機構
第55回日本アレルギー学会 (2005年10月)
- 10) 気管支喘息の気道リモデリング形成機構: 気道平滑筋細胞のオートクライン機序による遊走とフィブロネクチン及びマトリックスメタロプロテアーゼの関与
第9回アレルギー・気道上皮細胞研究会 (2005年12月)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

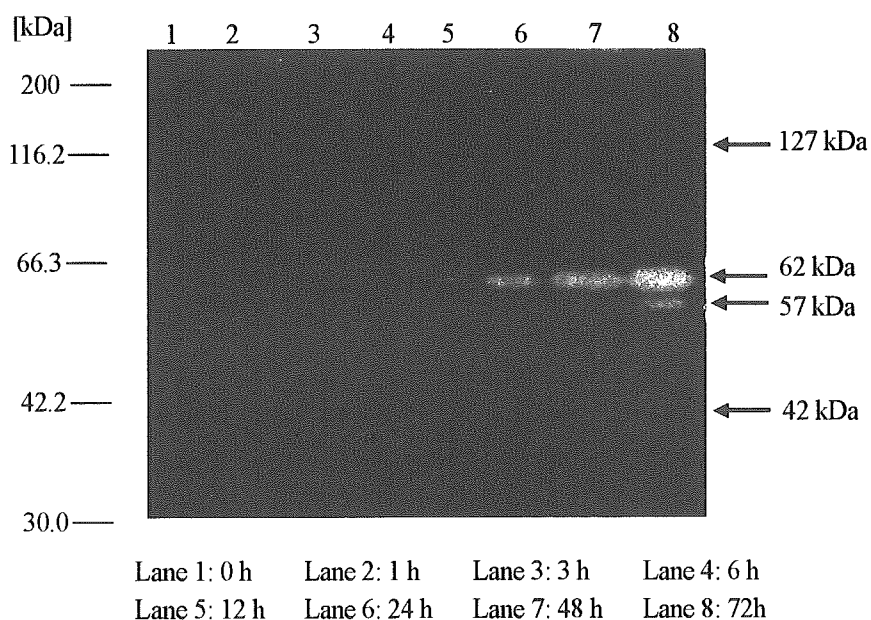
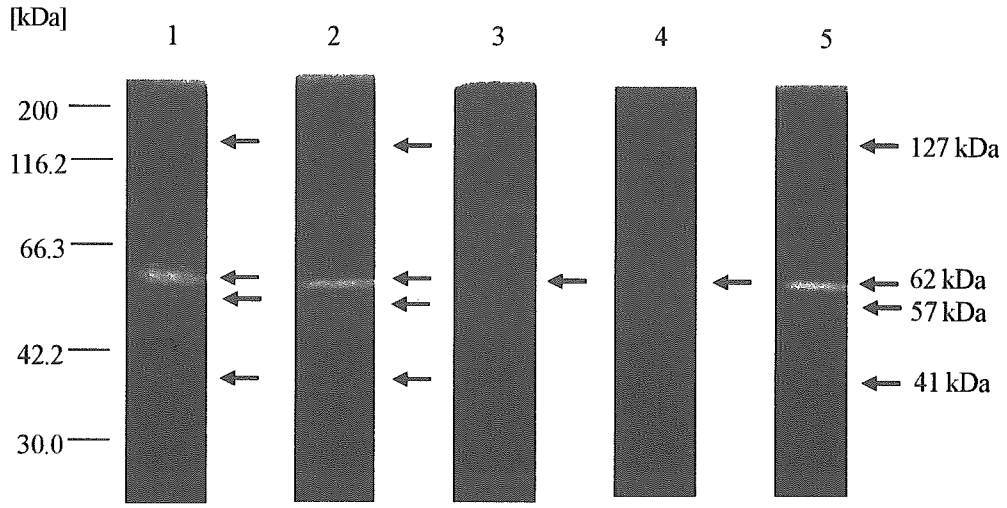
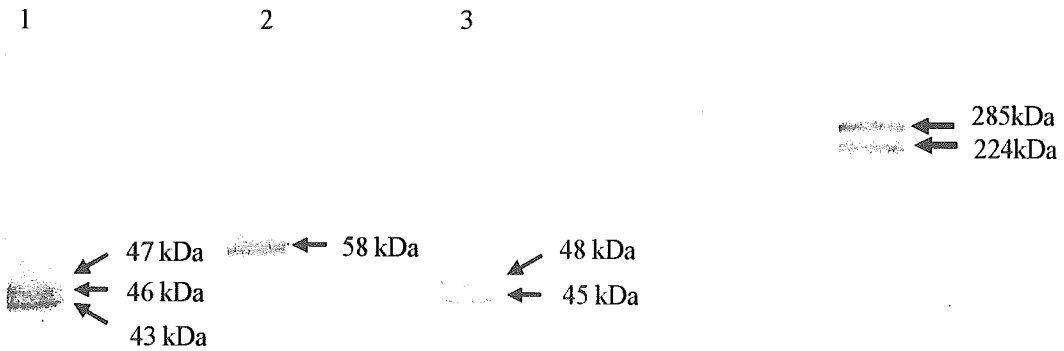


Fig.1 気管支平滑筋細胞培養上清のゼラチンザイモグラフィー



Lane 1: DEF 処理 Lane 2: PMSF 処理 Lane 3: EDTA 処理
 Lane 4: 1,10 - フェナントロリン Lane 5: 無処理 (Control)

Fig.2 セリン及びメタロプロテイナーゼ阻害剤を用いた気管支平滑筋細胞培養上清のゼラチンザイモグラフィー



Lane 1: 抗MMP-1 Lane 2: 抗MMP-2
 Lane 3: 抗MMP-3

Fig.3 マトリックスメタロプロテアーゼ抗体を用いた気管支平滑筋細胞培養上清のウエスタンブロットティング

Fig.4 抗フィブロネクチン抗体を用いた気管支平滑筋細胞培養上清のウエスタンブロットティング

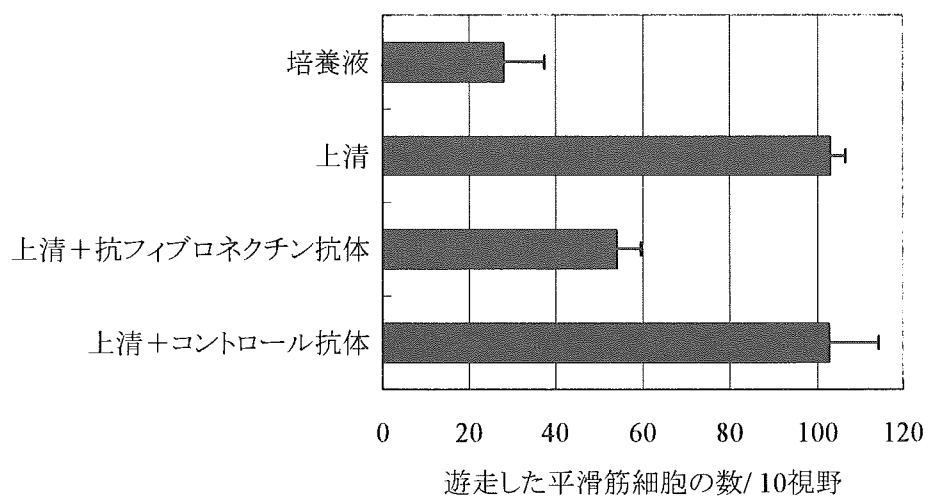


Fig.5 抗フィブロネクチン抗体を添加した気管支平滑筋細胞培養上清に対する気管支平滑筋細胞の遊走

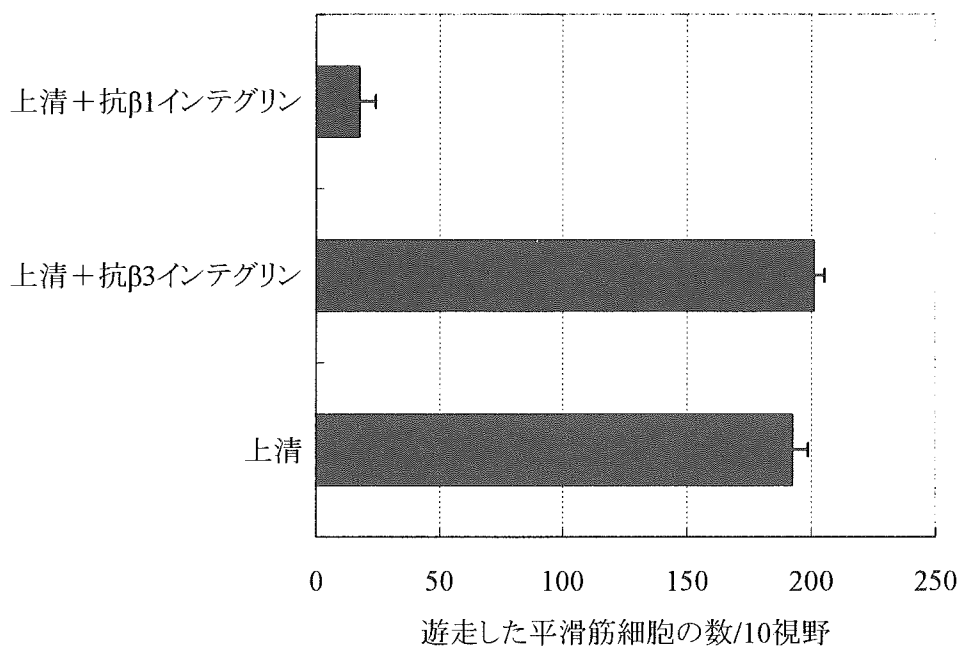


Fig.6 抗β1及びβ3インテグリン抗体で前処理した気管支平滑筋細胞に対する気管支平滑筋細胞培養上清の遊走活性

気道平滑筋細胞におけるメディエーター受容体の発現調節に関する研究

分担研究者 柳原行義

所属機関 国立病院機構相模原病院臨床研究センター遺伝子診断・治療研究室長

研究要旨：気管支喘息の主要な病態である気道過敏性の亢進にTh2サイトカインのIL-4/IL-13、ウイルス由来のdsRNA、活性化T細胞や好酸球に発現されるCD40Lが関与しているか否かについて、気道平滑筋細胞を用いて多角的に検討した。気道平滑筋細胞（IL-4R α ⁺, IL-13R α 1⁺, TLR3⁺, CD40⁺）をIL-4/IL-13で刺激すると、HR、CysLTR、MRのサブタイプのうち、CysLT1RとM3Rの発現が増強された。また、dsRNAの刺激によってはM2Rの発現低下とM3Rの発現増強が誘導された。PMA/Ionoで刺激したT細胞や好酸球を気道平滑筋細胞に添加すると、細胞接着は著しく促進された。この細胞接着は可溶性CD40や抗CD40L抗体によって強く抑制された。気道平滑筋細胞を抗CD40抗体で刺激すると、M3Rの発現が増強された。また、発現増強されたCysLT1RやM3Rが機能的であることについては、LTD₄やAChによる細胞内Ca²⁺濃度のさらなる増加作用からも確認できた。以上の結果から、Th2サイトカインのIL-4/IL-13はCysLT1RとM3Rの発現を増強することにより、ウイルス由来のdsRNAはM2Rの発現低下とM3Rの発現増強を誘導することにより、また活性化T細胞や好酸球に発現されるCD40LはM3Rの発現を増強することにより、気道過敏性の亢進に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

気管支喘息の主要な病態である気道過敏性の亢進には、T細胞や好酸球などの炎症細胞の浸潤による気道の慢性炎症と器質的変化が関与していると考えられている。また、喘息症状の増悪因子としては、ウイルス感染が関与している。

本研究では、気道平滑筋細胞におけるヒスタミン受容体（HR）、システニルロイコトリエン受容体（CysLTR）、ムスカリン受容体（MR）の各サブタイプの発現に対して、Th2サイトカインのIL-4/IL-13やウイルス由来のdouble-stranded RNA（dsRNA）が調節的に作用するか否かについて検討した。さらに、T細胞や好酸球とASM細胞とのCD40リガンド（CD40L）依存性の細胞接着について検討すると共に、抗CD40抗体によるHR、CysLTR、MRの各サブタイプの発現調節作用についても検討した。

B. 方法

気道平滑筋細胞は常法に従って培養した。HR、CysLTR、MRの各サブタイプのmRNA発現とToll様受容体（TLR）ファミリー分子のmRNA発現はRT-PCRやreal-time PCR、これらのタンパク発現はFACS、共焦点レーザー顕微鏡あるいはWestern blotで解析した。また、CD40、OX40L、LFA-3、ICAM-1、BLyS受容体などの発現はFACS、サイトカイン/ケモカイン産生はELISA、細胞内Ca²⁺濃度はFluoroskanでそれぞれ測定した。dsRNAの刺激によって発現誘導される遺伝子群については、GeneChipを用いて網羅的に解析した。尚、dsRNAとしてはpoly I : Cを用いた。また、インフォームドコンセントが得られた健常者の末梢血からnegative selectionによりT細胞と好酸球を分離した。これらの細胞におけるCD40LやOX40の発現はFACSで測定した。さらに、PMAとionomycin（PMA/Iono）で刺激したT細胞を³H-thymidineでパルスした後、

ASM細胞に添加してCD40L依存性の細胞接着を定量的に解析した。

初年度はIL-4/IL-13、次年度はdsRNA、最終年度は抗CD40抗体を用いて気道平滑筋細胞を刺激し、HR、CysLTR、MRの各サブタイプの発現調節について検討した。また、最終年度では、T細胞や好酸球と気道平滑筋細胞とのCD40L依存性の細胞接着についても併せて検討した。

C. 結果

気道平滑筋細胞にはIL-4R α 、IL-13R α 1、TLR3、CD40、OX40L、LFA-3、ICAM-1は発現されていたが、BLyS受容体は検出されなかった。また、H3Rを除いて、HR、CysLTR、MRのすべてのサブタイプが発現されていた。これらのサブタイプのうち、CysLT1Rの発現はIL-4/IL-13の刺激によって増強された。また、M3Rの発現はIL-4/IL-13のみならず、dsRNAや抗CD40抗体の刺激によっても増強されたが、M2Rの発現はdsRNAの刺激によって抑制された。IL-4/IL-13で刺激した気道平滑筋細胞では無刺激の細胞に比べてLTD₄やAChによる細胞内Ca²⁺濃度の上昇はさらに増加した。同様に、dsRNAや抗CD40抗体で刺激した細胞ではAChによる細胞内Ca²⁺濃度のさらなる増加が認められた。しかし、いずれの刺激細胞においてもヒスタミンによる細胞内Ca²⁺濃度の上昇には影響が認められなかった。また、IL-4/IL-13によって発現増強されたCysLT1RとM3R、dsRNAや抗CD40抗体によって発現増強されたM3Rのいずれの機能の特異性についてもCysLT1RアンタゴニストやM3Rアンタゴニストを用いて確認できた。

一方、dsRNAによるM2Rの発現低下とM3Rの発現増強はクロロキンの前処置によって完全に解除された。実際、TLR3は細胞表面ではなく、細胞内に発現されていた。また、dsRNAの刺激によって約650種類の遺伝子の発現が誘導され、特にMAPK系やNF- κ B系の遺伝子群が強く誘導された。さらに、IFN- β 、IL-6、IL-8の産生が誘導されたが、IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α などは検出されなかった。IL-6とIL-8に関しては、抗CD40抗体の刺激によっても産生されたが、IL-6とIL-8はM3Rの発現に

は影響を与えなかった。

T細胞や好酸球はPMA/Ionoの刺激によってCD40Lを発現し、またT細胞ではOX40の発現も誘導された。さらに、刺激したT細胞や好酸球を気道平滑筋細胞に添加すると、細胞接着は著しく促進された。また、刺激T細胞と気道平滑筋細胞との接着は、CD2、LFA-1、OX40などに対する抗体と同様、可溶性CD40や抗CD40L抗体の添加によって強く抑制された。一方、気道平滑筋細胞を抗OX40L抗体で刺激すると、抗CD40抗体とは異なり、M3Rの発現増強はされなかった。しかし、抗CD40抗体と抗OX40L抗体の共刺激ではM3Rの発現はさらに増強された。

D. 考察

本研究では、IL-4/IL-13、dsRNA、抗CD40抗体で刺激した気道平滑筋細胞を用いて各種のメディエーター受容体の発現調節作用を中心に検討した。その結果、HR、CysLTR、MRの各サブタイプのうち、CysLT1Rの発現はIL-4/IL-13によって増強され、またM3Rの発現はIL-4/IL-13のみならず、dsRNAや抗CD40抗体によっても増強されたが、M2Rの発現はdsRNAによって抑制された。発現増強されたCysLT1RやM3Rの機能と特異性に関しては、LTD₄やAChによる細胞内Ca²⁺濃度の上昇がさらに増加すること、ヒスタミンによる反応には影響がみられないこと、CysLT1RやM3Rに特異的なアンタゴニストによる抑制作用などからも確認できた。

一方、dsRNAによるM2Rの発現低下とM3Rの発現増強はクロロキンの前処置によって解除されたので、このような調節作用には細胞内に発現されているTLR3の活性化を介するエンドソームの酸性化が関与していると考えられた。また、dsRNA、IL-4/IL-13、抗CD40抗体の刺激に共通なM3Rの発現増強メカニズムについては、M3R遺伝子の発現調節に関与する共通の転写因子を同定する必要があるが、dsRNAの刺激によってはMAPK系やNF- κ B系の遺伝子が強く誘導されることが明らかとなった。

PMA/Ionoで刺激したT細胞や好酸球は気道平滑筋細胞に接着し、またこの細胞接着には

CD40Lも関与していた。実際、刺激T細胞と気道平滑筋細胞との接着は可溶性CD40や抗CD40抗体によって強く抑制された。したがって、気道の炎症局所に浸潤した活性化T細胞や好酸球はCD40Lの発現を介して気道平滑筋細胞に接着し、その結果CD40依存性にM3Rの発現が増強されると考えられた。CD40依存性のM3Rの発現増強は抗OX40L抗体によってさらに促進されるので、気道平滑筋細胞上のCD40とCD40Lの活性化はM3Rの発現増強に対して協調的に作用すると考えられた。また、炎症局所に浸潤したT細胞はIL-4/IL-13の産生を介して気道平滑筋細胞におけるCysLT1Rの発現増強にも関与していると考えられた。

本研究の結果から、Th2サイトカインのIL-4/IL-13はCysLT1RとM3Rの発現を増強することにより、ウイルス由来のdsRNAはM2Rの発現低下とM3Rの発現増強を誘導することにより、また活性化T細胞や好酸球に発現されるCD40LはM3Rの発現を増強することにより、気道過敏性の亢進に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

気道平滑筋細胞には、H3Rを除いて、HR、CysLTR、MRのすべてのサブタイプが発現されており、またIL-4/IL-13受容体、TLR3、CD40も発現されていた。Th2サイトカインのIL-4/IL-13はCysLT1RとM3Rの発現を増強することにより、ウイルス由来のdsRNAはM2Rの発現低下とM3Rの発現増強を誘導することにより、また活性化T細胞や好酸球はCD40L依存性の細胞接着を介してM3Rの発現を増強することにより、気道過敏性の亢進に関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto, H., Yanagihara, Y.: Genetic variants of chemical mediator receptors in relation to asthma. *Int. Rev. Asthma.*, 5, 60-66, 2003.
- 2) Yanagihara, Y.: Regulatory mechanisms of human IgE synthesis. *Allergol. Int.*, 52, 1-12, 2003.

- 3) Fujii-Maeda, S., Kajiwara, K., Ikizawa, K., Shinazawa, M., Yu, B., Koga, T., Furue, M., Yanagihara, Y.: Reciprocal regulation of thymus and activation-regulated chemokine/macrophage-derived chemokine production by interleukin (IL)-4/IL-13 and interferon- γ in HaCaT keratinocytes is mediated by alternations in E-cadherin distribution. *J. Invest. Dermatol.*, 122, 20-28, 2004.
- 4) Kajiwara K, Shinazawa M, Morishima H, Yanagihara Y.: Differential effect of IL-4 and IL-13 on the expression of recombination-activating genes in mature B cells from human peripheral blood. *Cell. Immunol.* 227, 121-128, 2004.
- 5) Tanaka G, Kanaji S, Hirano A, Arima K, Shinagawa A, Goda C, Yasunaga S, Ikizawa K, Yanagihara Y, Kubo M, Kuriyama-Fujii Y, Sugita Y, Inokuchi A, Izuhara K: Induction and activation of the aryl hydrocarbon receptor by IL-4 in B cells. *Int. Immunol.* 17: 797-805, 2005.
- 6) Yanagihara Y: Regulatory mechanisms of IgE synthesis by human B cells. *Clin. Exp. Allergy Rev.* in press.
- 7) 山本ひとみ、柳原行義: 喘息とリンパ球. *THE LUNG perspectives*, 11, 460-463, 2003.
- 8) 柳原行義: IgE産生の分子機構. *アレルギー・リウマチ・膠原病*, 19, 109-116, 2003.
- 9) 柳原行義: CD40に依存しない免疫グロブリンクラススイッチ. *臨床免疫*, 39, 623-628, 2003.
- 10) 柳原行義: IgE産生とアレルギー性炎症. *喘息*, 17, 2-6, 2004.
- 11) 梶原景一、柳原行義: IgE産生のメカニズム. *喘息*, 17, 21-25, 2004.
- 12) 柳原行義: IgE産生の調節機構. *分子呼吸器病* 8, 177-184, 2004.
- 13) 柳原行義: IgE産生の分子調節機構. *日本内科学雑誌* 93, 2649-2655, 2004.
- 14) 梶原景一、森嶋大貴、柳原行義: B_LySと免疫グロブリンのクラススイッチ. *臨床免疫* 41, 643-648, 2004.
- 15) 柳原行義: IgE抗体産生の調節. *総合アレルギー学* pp.81-87, 2004.

- 16) 梶原景一、羅 智靖、柳原行義: 可溶性FcεRIαと抗IgE抗体のIgE産生抑制機序. 臨床免疫 41, 219-222, 2004.
 - 17) 柳原行義: アレルギーと感染—hygiene hypothesisを含めて. 小児アレルギー学会誌 18, 14-18, 2004.
 - 18) 柳原行義: IgE抗体とB細胞. 小児科診療 68, 1415-1420, 2005.
 - 19) 柳原行義: サイトカイン環境とIgE産生機構. アレルギー科 20, 273-280, 2005.
 - 20) 梶原景一、柳原行義: BLYS/APRILとIgE産生誘導. 臨床免疫 44, 1-7, 2005.
 - 21) 梶原景一、柳原行義: IgEへのクラススイッチとAPRIL/BLYS. 臨床免疫 44, 450-454, 2005.
 - 22) 柳原行義: IgE産生の分子調節機構. アレルギー科 印刷中
 - 23) 柳原行義: IgE産生の分子機構. アレルギー 印刷中
2. 学会発表
- 1) Yanagihara Y. Regulatory mechanisms of IgE synthesis by human B cells. AR FORUM2005, 2005.
 - 2) 柳原行義. アレルギーと感染—hygiene hypothesisを含めて—. 第40回日本小児アレルギー学会, 2003.
 - 3) 柳原行義. 新規TNFスーパーファミリー分子によるIgE産生の誘導機序 第53回日本アレルギー学会総会, 2003.
 - 4) 山本ひとみ、梶原景一、品澤美樹、柳原行義. IL-4/IL-13による気道平滑筋細胞muscarinic M3Rの発現増強作用 第53回日本アレルギー学会総会, 2003.
 - 5) 山本ひとみ、梶原景一、品澤美樹、柳原行義. 気道平滑筋細胞における各種メディエーター受容体の発現に対するpoly I : Cの作用 第53回日本アレルギー学会総会, 2003.
 - 6) 梶原景一、品澤美樹、森嶋大貴、山本ひとみ、生澤公一、谷口正美、秋山一男、柳原行義. B lymphocyte stimulator (BLYS)とIgEクラススイッチ (1) 樹状細胞におけるBLYS発現とその機能解析 第53回日本アレルギー学会総会, 2003.
 - 7) 梶原景一、品澤美樹、森嶋大貴、山本ひとみ、生澤公一、柳原行義. B lymphocyte stimulator (BLYS)とIgEクラススイッチ (2) 可溶性BLYSを用いた検討 第53回日本アレルギー学会総会, 2003.
 - 8) 森嶋大貴、梶原景一、品澤美樹、山本ひとみ、釣木澤尚美、谷口正美、秋山一男、柳原行義. CpG ODNによるIgE産生の調節作用 (1) 末梢血単核細胞を用いた検討 第53回日本アレルギー学会総会, 2003.
 - 9) 品澤美樹、梶原景一、森嶋大貴、山本ひとみ、柳原行義. CpG ODNによるIgE産生の調節作用(2) B細胞を用いた検討 第53回日本アレルギー学会総会, 2003.
 - 10) 山本ひとみ、梶原景一、柳原行義. 気道平滑筋細胞における各種メディエーターレセプターの発現に対するIL-4/IL-13 とpoly I : Cの影響 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 2003.
 - 11) 梶原景一、山本ひとみ、生澤公一、柳原行義. 新規TNF様リガンドであるBLYSとAPRILによるIgEクラススイッチの誘導 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 2003.
 - 12) 釣木澤尚美、柳原行義、梶原景一、粒来崇博、西山晃好、豊田信明、森田園子、谷口正美、秋山一男. 家族内発症を呈したChurg-Strauss syndrome の2症例. 第16回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2004.
 - 13) 柳原行義. IgEの産生調節機構. 第54回日本アレルギー学会総会, 2004.
 - 14) 森嶋大貴、梶原景一、品澤美樹、稲葉奈緒美、大路バク、生澤公一、秋山一男、柳原行義. 成熟B細胞におけるRAG発現とその機能解析. 第54回日本アレルギー学会総会, 2004.
 - 15) 梶原景一、品澤美樹、森嶋大貴、生澤公一、稲葉奈緒美、大路バク、谷口正美、秋山一男、柳原行義. APRILによるIgEクラススイッチの誘導 (1) 樹状細胞を用いた検討. 第54回日本アレルギー学会総会, 2004.
 - 16) 梶原景一、品澤美樹、森嶋大貴、生澤公一、稲葉奈緒美、大路バク、谷口正美、秋山一男、柳原行義. APRILによるIgEク

ラススイッチの誘導 (2) 可溶性APRILを用いた検討. 第54回日本アレルギー学会総会, 2004.

- 17) 田中剛、金地佐知子、有馬和彦、合田千穂、安永晋一郎、生澤公一、柳原行義、久保允人、杉田雄二、出原賢治. IL-4によるB細胞におけるaryl hydrocarbon receptorの誘導 第34回日本免疫学会総会・学術集会, 2004.
- 18) 柳原行義. 感染とIgE産生. 第13回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会, 2005.
- 19) 梶原景一、森嶋大貴、大路バク、稲葉奈緒美、生澤公一、秋山一男、柳原行義. 気道平滑筋細胞におけるTLR3の機能解析. 第17回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2005.
- 20) 柳原行義. IgE産生の分子機構. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2005.
- 21) 梶原景一、生澤公一、森嶋大貴、品澤美樹、大路バク、秋山一男、柳原行義. BlyS依存性のIgEクラススイッチにおけるKu70/80の関与. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2005.
- 22) 森嶋大貴、梶原景一、稲葉奈緒美、大路バク、秋山一男、柳原行義. 気道平滑筋細胞におけるCD40の機能解析. 第55回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2005.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究協力者

梶原景一、森嶋大貴、大路バク、稲葉奈緒美、生澤公一 (国立病院機構相模原病院臨床研究センター)

気管支喘息の難治化機序の解明と予防・治療法の開発に関する研究班
－難治化に関連する遺伝因子の解析－

分担研究者:大田 健(帝京大学医学部内科教授)

気管支喘息の難治化に係わる機序を解明する目的で、気道炎症およびリモデリングに関連する因子について解析した。我々は以前マウスの喘息モデルにおいて、成長因子であるTGF- β およびIGF-Iがリモデリングに関与していることを明らかにした。本研究ではまずこれらの因子のヒト肺局所での局在を検討し、IGF-Iは喘息患者の気道上皮や浸潤炎症細胞に発現していることがわかった。また喘息患者でのIGF-I血漿レベルは、健常人に比較して有意に上昇していた。次に気道炎症・リモデリングに関わる遺伝子多型について検討した。IL-18 C-113GのSNPは、喘息群と難治性喘息群では、健常人に比し有意にSNPのアリル頻度が高かった($p < 0.01$)。しかしTGF- β 1 C-509TのSNPの頻度は、難治性喘息群で逆に低かった。ICOS G-1413Aは、小児喘息アウトグロウ群と比して喘息群($p = 0.045$)・難治性喘息群($p = 0.0054$)でその頻度が有意に低かった。これらの因子を更に解析することは、難治化の予防・治療法の開発に大きく貢献する可能性が示唆された。

研究協力者:足立哲也(帝京大学医学部内科講師) 長瀬洋之(帝京大学医学部内科助手) 中島幹夫(帝京大学医学部内科助手) 中野純一(帝京大学医学部内科非常勤講師) 山下直美(武蔵野大学薬学部教授)

1. 研究目的

吸入ステロイド薬の普及により喘息治療は格段の進歩を遂げたが、現在でも経口ステロイド薬を必要とする難治性喘息と言われる一群が存在する。難治化の病態には気道リモデリングが深く関わっており、ステロイド薬でも完全に治療することは困難である。我々はこれまでにマウス喘息モデルで、成長因子(PDGF, TGF- β , IGF-I)の中和抗体を投与することにより気道リモデリングを抑制できることを明らかにした。

本研究班では、難治化機序の解明と予防・治療法の開発を目的とし、以下の研究を行った。①喘息モデルマウスにおいて成長因子産生を明らかにする。②難治性喘息患者の血清中および気道局所でのこれら成長因子の発現分布を明らかにする。③難治性喘息患者における気道炎症およびリモデリングに関与する成長因子を含むサイトカインの遺伝子多型(SNPs)を解析する。

2. 研究方法

1) A/JマウスをOA + alumで免疫後、OA吸入を行った。マウス喘息モデルで成長因子のうちTGF- β , IGF-1の産生について、mRNAの発現をreal-time PCRで、蛋白をWestern blottingで発現検討した。

2) 喘息患者について、気道局所でのIGF-1の発現を免疫組織染色で検討した。血漿IGF-I値はELISA法により測定した。

3) 難治性喘息および健常人の末梢血単核球分画よりDNAを採取した。同時に背景として、総IgE、臨床経過(発作歴、治療歴)を検討した。気道炎症あるいは気道リモデリングに関連すると考えられるTGF- β 1, IL-18, ICOSのプロモーター領域のSNPsを日立のMassARRAY法で解析した。

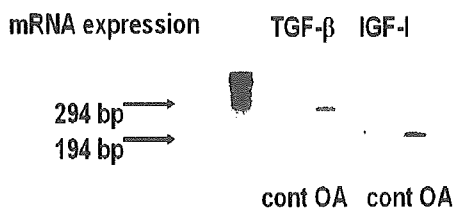
(倫理面への配慮)

喘息患者からのDNA採取にあたり、文書にて同意書の取得を行った。

3. 研究結果および考察

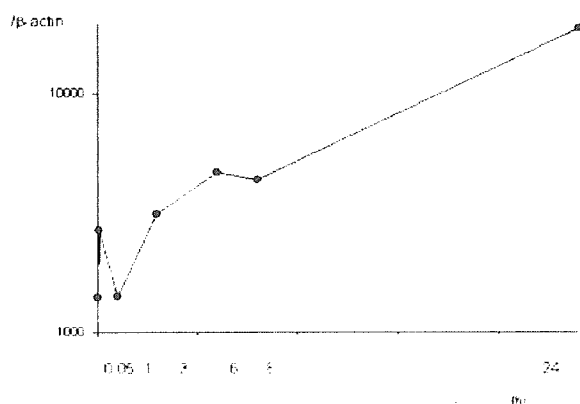
マウス喘息モデルで、OA吸入群ではIGF-IおよびTGF- β のmRNAの発現が特異抗原で刺激すると肺で増強した(図1)。

図1 mRNAの発現



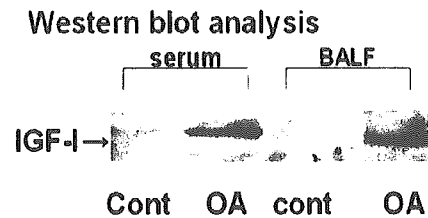
時間経過を検討するとOA吸入後1時間目より増加し始め24時間まで上昇し続けた(図2)。

図2 real-time PCRでの検討



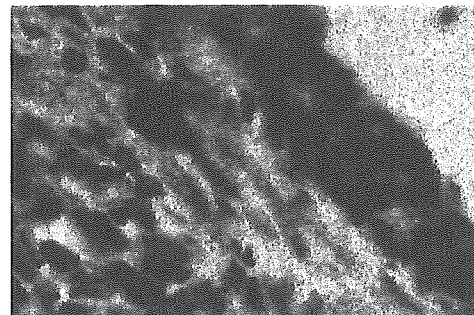
蛋白レベルをウエスタンブロットおよびOA吸入群で検出できることを明らかにした(図3)。

図3 IGF-I蛋白の発現



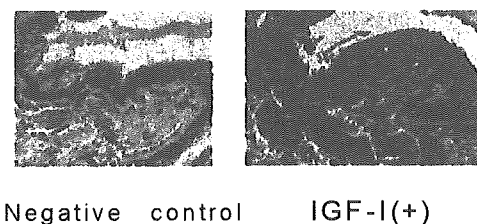
免疫組織染色で検討すると、IGF-Iは気道上皮細胞およびマクロファージより産生されていた(図4)。

図4 IGF-I免疫染色



次にヒトの喘息での発現を検討した。喘息死した患者の病理組織切片および、肺病変以外で死亡した患者について検討した。喘息死患者で、IGF-Iの蛋白発現を気道上皮細胞および浸潤細胞に認めた(図5)。

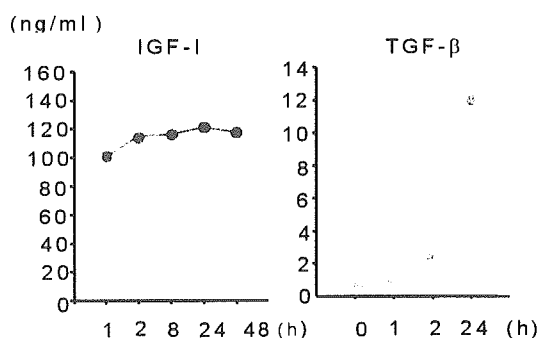
図5 IGF-I免疫組織染色



次に成長因子の蛋白濃度を検討した。

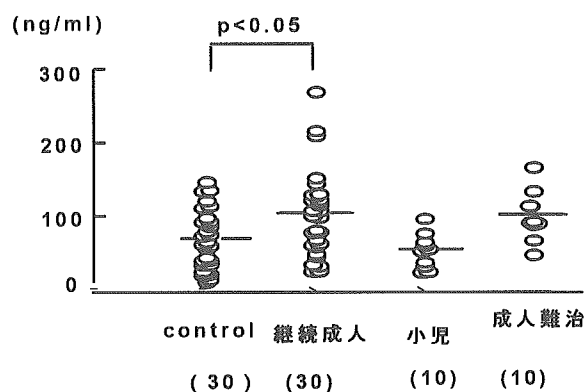
TGF- β についてはすでに報告しているように-509C/GSNPと血漿中蛋白濃度で相関を認めた。しかし、日本人で検討を進めると、図6に示すように採血後の時間経過で血漿中蛋白濃度の大幅な変化を示した。このことから、採血後の時間を指定できない、多施設で検討を行うのは難しい状況であった。同様にIGF-Iについても採血後の時間的経過を検討した(図6)。

図6 血漿中蛋白濃度の時間的経過



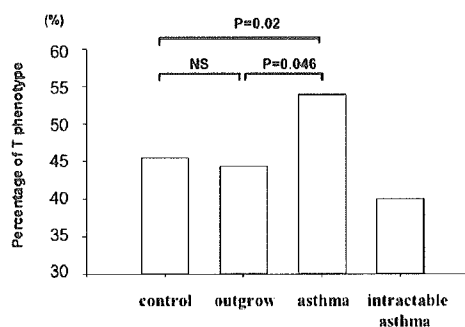
IGF-Iの血漿中蛋白濃度は24時間の経過でほぼ一定で変動を認めないことが明らかになった。そこで、今回の多施設での検体について検討した。その結果、IGF-Iの血漿中蛋白濃度は、コントロールと比較して喘息患者(継続成人)で有意に高い数値を示した。また、難治性喘息患者(成人難治)でも高い傾向を示した(図7)。

図7 IGF-I血漿中蛋白濃度



TGF- β 1 プロモーターの SNP である C-509T は既にプロモーター活性と関連する機能的な SNP であることが明らかになっている (AJRCCM 169:214,2004)。そこで我々は、アトピー型喘息患者で、健常人および小児喘息が寛解(アウトグロウ; outgrow)した群に比し、有意に T アリル (allele) の頻度が高く、喘息寛解の予測因子の一つとなりえることを見出した。しかし難治性喘息患者では TGF- β 1 C-509T の変異での T アリルの頻度は低く、健常人と有意差がなかった(図8)。TGF- β 1 の SNP の 1 つ C-509T は、喘息の難治化の予測因子ではなくむしろ寛解に関連すると考えられる。

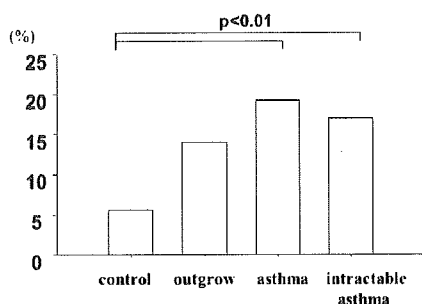
図8 TGF- β 1 C-509T での T アリル 頻度



IL-18 の C-113G は NF- κ B の結合領域にあり、血中 IgE レベルとの相関がオッズ比 3.96

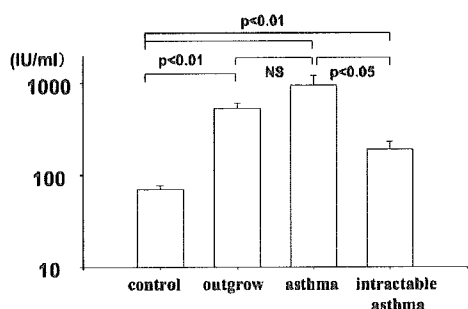
として、アレルゲン感作との相関がオッズ比4.12として報告されている(JACI 111: 117,2003)。今回の我々の検討結果では、喘息群では健常人に比し有意に変異の頻度が高かったが、難治性喘息患者群も同様に特異的な結果は得られなかった(図9)。

図9 IL-18 C-113GでのGアレル頻度



各群の血清総IgE値を図10に示す。アウトグロウ群および喘息群は健常人と比較して有意に血清総IgE値が高かった。難治性喘息では健常人との比較では有意に高かったが通常の喘息群よりは有意に低値を示した($p < 0.05$)。興味深いことに、難治性喘息はIgE値が却ってアウトグロウ群より低値を示したが、IL-18のSNPの頻度は高かった。

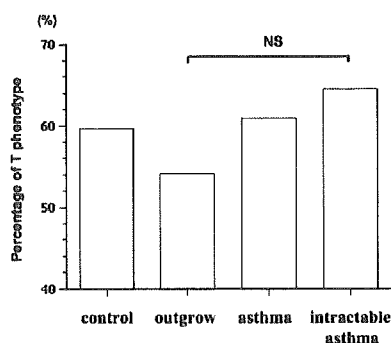
図10 血清総IgE値



Eotaxin-2の遺伝子多型に関しては、いくつか報告されている。例えばeotaxin-2

A1272Gの変異は、血漿中eotaxin-2の濃度と相関することが報告されている(J Hum Genet 50: 118-123, 2005)。またeotaxin-2 C275Tはオッズ比1.42で、喘息の発症と関連する遺伝子とされている(Biochem Biophys Res Commun 320: 131-7, 2004)。平成17年度の本研究では、喘息難治化におけるeotaxin-2 C275Tの関わりを検討した。Tアレルの頻度は、アウトグロウ群で最も低かった。その頻度は喘息群・難治性喘息群で高くなる傾向を認めたが、統計学的に有意ではなかった(図11)。

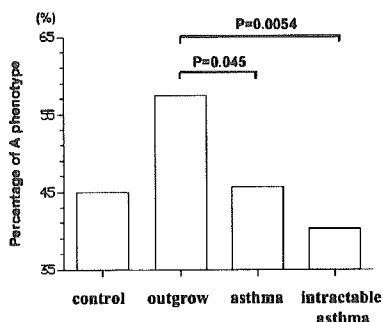
図11 eotaxin-2 C275TでのTアレル頻度



ICOSプロモーターのSNPであるG-1413Aは、アレルギーの抗原感作と血清総IgE濃度に関連する遺伝子として報告され、機能的にはNF- κ B結合能に影響するとされている(J Immunol 175: 2061-5, 2005)。我々はアウトグロウ群に比し喘息患者において、有意にAアレルの頻度が低いことを見出した。特に難治性喘息患者においては高い有意差をもってAアレルの頻度が低かった($p = 0.0054$)。健常人と喘息群との間では差を認めなかったため、喘息の発症に関与する遺伝子ではないと考えられる。一方喘息を発症した群では、アウトグロウ群で変異の頻度が高く、また難治性喘息群で最も低かったことから、ICOS G-1413Aの多型は喘

息の難治化の予測因子となることが推察された(図3)。

図12 ICOS G-1413AでのAアレル頻度



Schillingらによると、ICOS G-1413AのSNPは血清総IgE値と相関するとされている(J Immunol 175: 2061-5, 2005)。それゆえアウトグロ患者で多型の頻度が高いのは、ただ単にアウトグロ群では成人喘息群と比してアトピー型患者の割合が多いことを反映している可能性も考えられる。しかし我々の結果では、アウトグロ群と成人喘息群の間で血清総IgE値に差を認めなかった(図10)。今後更なる解析が必要である。

4. 結論

本研究において我々は、難治化に際してのリモデリングに関わる増殖因子としてIGF-Iの役割を明らかにし、また難治化の予測可能遺伝子としてICOSプロモーターのSNPであるG-1413Aを見いだした。今後の本研究の展望に関しては、難治化予測遺伝子としてのSNPsの情報をさらに蓄積し、難治化に関与する病態である気道の炎症、傷害、リモデリングなどを惹起する分子レベルでの発現機構の解明に応用することである。そこで当面の目標としては、IGF-IのSNPsを検索し、難治化予測遺伝子の有無を検討すること、そして難治化予測遺伝子の一つとなりうるプロモーター領域のSNPが

明らかになったICOSの喘息リモデリングにおける機能的役割を解析することが挙げられる。今後さらに解析を行うことは、喘息の難治化の予防・治療法の開発に大きく貢献する可能性を持つものと考えられる。

業績

1. Yamashita N, Tashimo H, Matsuo Y, Ishida H, Yoshiura K, Sato K, Yamashita N, Kakiuchi T, Ohta K. Role of CCL21 and in allergic inflammation in the OVA-specific murine asthmatic model. *J Allergy Clin Immunol* (in press).
2. Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, Matsuo Y, Tamauchi H, Terashima M, Yoshiwara I, Habu S, Ohta K. Involvement of GATA-3-dependent Th2 lymphocyte activation in airway hyperresponsiveness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (in press).
3. Adachi T, Hanaka S, Yano T, Yamamura K, Yoshihara H, Nagase H, Chihara J, Ohta K. The role of platelet-derived growth factor receptor in eotaxin signaling of eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* (in press).
4. Meng J, Thongngarm T, Nakajima M, Yamashita N, Ohta K, Bates CA, Grunwald GK, Rosenwasser LJ. Association of transforming growth factor- β 1 single nucleotide polymorphism C-509T with allergy and immunological activities. *Int Arch Allergy Immunol* 138: 151-60, 2005.
5. Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, Matsuo Y, Arai H, Nagase H, Adachi

- T, Ohta K. Role of insulin-like growth factor-I in allergen-induced airway inflammation and remodeling. *Cell Immunol* 235: 85-91, 2005.
6. Adachi T, Cui C-H, Kanda A, Kayaba H, Ohta K, Chihara J. Activation of epidermal growth factor receptor via CCR3 in bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 292-6, 2004.
7. Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol* 171: 3977-82, 2003.

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

気管支喘息症の重症度に関連する好酸球関連蛋白の機能とその遺伝子多型

分担研究者 烏帽子田 彰 広島大学大学院医歯薬総合研究科公衆衛生学教授

研究協力者 中村裕之（高知大学医学部環境医学教授）

研究要旨：気管支喘息の重症化に関与する遺伝子を見いだすために、好酸球関連蛋白である Interleukin 4 受容体 α 鎖(IL4RA)および遺伝子および CC chemokine receptor (CCR) family の遺伝子多型を調べた。罹患同胞対 52 対の CC ケモカイン遺伝子を調べた結果、CCR2 の Val64Ile、Asn260Asn (T860C)、CCR3 の Tyr17Tyr (T51C)の 3 つの多型は、アレルギー性疾患の中で、連鎖不均衡にあった。喘息単独、花粉症単独および喘息+花粉症の間での Zir score を調べたところ、喘息単独に対して喘息+花粉症においてこれらの多型における Zir score が高いことが示されたが、非難治化喘息症および健常人と比較した相関解析の結果では、重症化の遺伝子とは認められなかった。また、Interleukin 4 receptor A (IL4RA)についての相関解析では、I50 のアレル頻度は、対照群に比べ有意に高かったが、難治群と非難治群では有意な差は認められなかった。IL4RA におけるプロモーター領域である-3223T においても同様の結果であった。IL4RA の I50V の多型ごとに総 IgE 値の値を比較したとき、I/I、I/V、V/V の順に有意に低下していた。以上の結果から、IL4RA と CCR3 遺伝子はアレルギー共通遺伝子であり、特に、IL4RA は総 IgE 産生には深く関わっていると推定できた。しかしながら、これらの遺伝子は、気管支喘息症の難治性を決定するものではなく、環境アレルゲンに対する感作に影響を与えていると考えられた。また難治化においては、IgE 産生を含めたアレルギーの機序の中の Induction phase の役割は少ないと考えられた。さらに網羅的解析によって難治性喘息の遺伝子を探索する必要がある。

A. 研究目的

気管支喘息症の発症およびその重症度に関わる遺伝子を同定することで、喘息症を重篤化させない予防法および治療法の開発、特にテーラーメイド医療の実現の礎を築く。そのため、アレルギーの病理機序における共通の病態に関する遺伝子を探索し、次に、喘息症の分子病理機序の解明のため、スギ花粉症と喘息症における Interleukin 4 受容

体 α 鎖(IL4RA)遺伝子の関係の違いに着目する。さらには、難治性喘息症の患者の IL4RA および遺伝子および CC chemokine receptor (CCR) family の遺伝子多型を、非難治化喘息症および健常人と比較し、難治化の病態機序の解明をも目的とした。

B. 研究方法

東京都品川区五反田地区、山梨県山梨市牧丘町

地区および京都市、金沢市、富山市において以下の分子疫学を実施した。

- 1) アレルギー共通遺伝子の探索のためには、気管支喘息、花粉症のうちのいずれかの疾患を有する罹患者同胞対解析を実施し、52対を対象とした。
- 2) 気管支喘息症とスギ花粉症の分子疫学では、247人の患者（24人の喘息症、207人のスギ花粉症、16人の喘息症とスギ花粉症の合併）と、その対照250人を対象として、相関解析およびハプロタイプ相関解析を実施した。
- 3) 重症化喘息の感受性遺伝子の探索には、難治群としてJGL98で規定されたStep 4の最重症の8例（53.9±4.67歳、平均値±標準誤差）と、非難治群としてStep 1-2の軽・中等症の16例（48.8±2.85歳）、これらの対照として、健常人24例（50.8±2.56歳）を対象とした。

本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究が含まれている課題」に該当するため、人間の尊厳及び人権が尊重され、社会の理解と協力を得て、研究の適正な推進が図られることを目的とした「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って実施された。その際、金沢大学における「倫理審査委員会による事前の審査及び承認」を受け、さらに「事前の十分な説明と自由意思による同意（インフォームド・コンセント）」に基づいて行われた。

C. 研究結果

1) 多型が認められた遺伝子のうち、CCR2のVal64Ile、Asn260Asn (T860C)、CCR3のTyr17Tyr (T51C)の3つの多型は、アレルギー性疾患の中で、連鎖不均衡にあった。

喘息単独、花粉症単独および喘息+花粉症の間でのZir scoreを調べたところ、喘息単独に対して喘息+花粉症においてこれらの多型におけるZir scoreが高いことが示されたが、花粉症単独に際し

ても、喘息との合併ほど高い値ではないものの、比較的高い値を呈した（図1）。

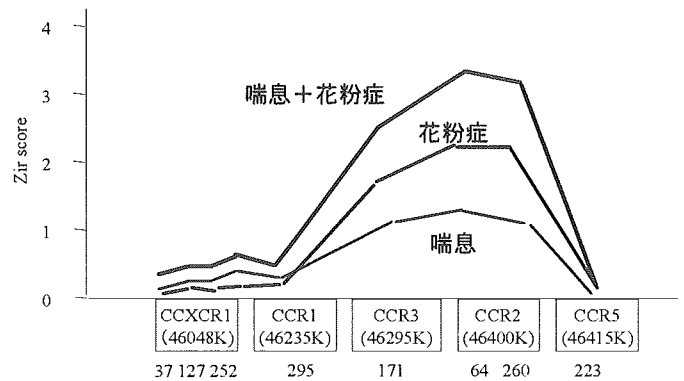


図1 喘息単独群、花粉症単独群、喘息+花粉症単独群におけるCCケモキンケモカインファミリーの遺伝子と連鎖不均衡を示すZir score

2) 気管支喘息症とスギ花粉症の分子疫学

相関解析の結果、Ile50と喘息症との関係は、スギ花粉症と同様、有意な関係であったが、プロモーター領域のいかなる領域との関係においても、喘息症はスギ花粉症同様に有意な相関は認められなかった。また、ハプロタイプ相関解析の結果からも、-3223T/Ile50と喘息症との関係、スギ花粉症と同様、Ile50以上のものではなかった。

3) IL4RA と CCR family 遺伝子多型と喘息症の相関解析

難治群の対照群に対するIL4RAの50Vの頻度におけるOdds ratio (OR, 95%信頼区間)は、0.36 (0.14-0.96)で、非難治群のそれは0.27 (0.12-0.64)であった。このように難治群および非難治群のIL4RAのI50のアレル頻度は、対照群に比べ有意に高かった。しかしながら、難治群と非難治群では有意な差は認められなかった。また、-3223TのORは、難治群では1.95 (0.20-19.2)、非難治群では1.64

(0.27-9.86)と、有意ではないものの比較的高い値を呈した(表1)。

CCR family 遺伝子多型と喘息症との間に有意な関連が認められたのは、CCR3 の T51C であり、非難治型の 51C の頻度が、対照群に比し有意な高値を示したが、難治群と非難治群の間には有意な差は認められなかった(表2)。

IL4RA の I50V の多型ごとに総 IgE 値の値を比較したとき、I/I、I/V、V/V の順に有意に低下していた。また、C-3223T についても同様の結果を示した(図2)。

D. 考察

アレルギー疾患が、花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎のように表現形は異なっても共通のメカニズムが存在することはよく知られた事実である(Barnes, 2000)。例えば、アトピー性疾患を有する一方の一卵性双生児が、他方の双生児において何らかのアレルギー性疾患を有するとする一致率は、二卵性におけるそれよりはるかに高い(Barnes, 1999)。したがって、アレルギーの病理機序における共通の病態に関する遺伝子と疾患(表現形)に特異的な遺伝子があることが窺い知れるが、この関係は病態の重症化と関係する可能性もあると考えられる。

難治群と非難治群における IL4RA の I50 および CCR3 の T51C のアレル頻度には有意な差は認められなかったことから、I50V および CCR3 の T51C は喘息症における感受性遺伝子座位であることが確認されたが、難治化との関係は少ないと考えられた。IL4RA は、膜貫通型蛋白質であり、細胞外領域に Ile50Val が存在している。その上流の C-3223T の多型は sIL4RA を減少させることが知られている(Hackstein et al., 2001)。したがって、IL4RA の I50V および C-3223T 多型ごとの総 IgE 値の値から、I50V と C-3223T の遺伝子座位間の相互作用の

結果、プロモーター領域の変異によって生じる IL4 可溶性蛋白の活性の低下が、IL4 受容体の活性の亢進をもたらすことによって、IgE の産生につながるという機序の存在が推測された。

CCR2 と CCR3 の多型については、これまで、CCR3 における Tyr17Tyr (T51C)と喘息との関連が報告されており、本研究においてもこの遺伝子座位との関連が認められたが、サイレント変異であることから、むしろアミノ酸置換を伴う CCR2 の Val64Ile によって機能異常が引き起こされていると想定される。この遺伝子座位と疾患座位の連鎖が、CCR2 と CCR3 遺伝子全体の連鎖不均衡を生じせしめていると考えられる。

以上、IL4RA および CCR 遺伝子は難治性を決定するものではなく、環境アレルゲンに対する感作に影響を与えていると考えられた。また難治化においては、IgE 産生を含めたアレルギーの機序の中の Induction phase の役割は少ないと考えられた。さらに網羅的解析によって難治性喘息の遺伝子を探索する必要がある。

E. 結論

重症化喘息症の感受性遺伝子を同定するために、まずは、喘息症の遺伝子を網羅的に解析し、さらには候補領域から遺伝子を特定した。その結果、IL4RA 遺伝子が喘息症をはじめとするアレルギー共通遺伝子であることが認められた。この遺伝子では、I50V と C-3223T の遺伝子座位間の相互作用が生じた結果、プロモーター領域の変異によって生じる IL4 可溶性蛋白の活性の低下が、IL4 受容体の活性の亢進をもたらすことによって、IgE の産生につながるという機序の存在が推測された。また、CCR2 および CCR3 遺伝子についても同様に感受性遺伝子であることが認められた。しかしながら、IL4RA および CCR2 あるいは CCR3 遺伝子は難治性を決定するものではなく、環境アレルゲンに対

する感作に影響を与えていると考えられた。また難治化においては、IgE産生を含めたアレルギーの機序の中の Induction phase の役割は少ないと考え

られた。さらに網羅的解析によって難治性喘息の遺伝子を探索する必要がある。

表2 難治性喘息群、非難治性喘息群、対照群におけるIL4RA遺伝子多型についての相関解析

Allele	Control (N=24)		Slight Asthma (N=16)		Severe Asthma (N=8)	
	Number	Frequency ¹⁾	Number	Frequency ¹⁾	Number	Frequency ¹⁾
				Odds ratio (CI)		Odds ratio (CI)
C-3223C	17	14.6	11	21.9	4	25
C-3223T	7		3	1.64	4	1.95
T-3223T	0		2	(0.27-9.86)	0	(0.20-19.2)
T-1914T	12	35.4	8	37.5	4	31.3
T-1914C	7		4	1.09	3	0.83
C-1914C	5		4	(0.02-44.9)	1	(0.45-1.52)
T-890T	23	2.08	15	3.13	8	0
T-890C	1		1	1.52	0	-
C-890C	0		0	(0.23-9.74)	0	-
I50I	5	62.5	9	31.3	4	37.5
I50V	8		4	0.27**	2	0.36*
V50V	11		3	(0.12-0.64)	2	(0.14-0.96)
E375E	22	4.17	15	3.13	8	0
E375A	2		1	0.74	0	-
A375A	0		0	(0.37-1.49)	0	-

¹⁾Frequency of minor allele (%), Statistical significance as compared to that in control, *p<0.05, **p<0.01

表3 難治性喘息群、非難治性喘息群、対照群におけるCCR遺伝子群多型についての相関解析

Gene	Allele	Control (N=24)		Slight Asthma (N=16)		Severe Asthma (N=8)	
		Number	Frequency ¹⁾	Number	Frequency ¹⁾	Number	Frequency ¹⁾
CCXCR1	A111A	23	2.08	16	0	8	0
	A111G	1		0		0	
	G111G	0		0		0	
CCXCR1	R127R	24	0	16	0	8	0
	R127C	0		0		0	
	C127C	0		0		0	
CCXCR1	R252R	24	0	16	0	8	0
	R252E	0		0		0	
	E252E	0		0		0	
CCR1	T947T	24	0	15	3.13	7	6.25
	T947C	0		1		1	
	C947C	0		0		0	
CCR2	V64V	17	18.8	6	34.4	4	25.0
	V64I	5		9		4	
	I64I	2		1		0	
CCR2	T860T	15	18.8	9	21.9	4	25.0
	T860C	9		7		4	
	C860C	0		0		0	
CCR3	T51T	24	0	12	12.5*	6	12.5
	T51C	0		4		2	
	C51C	0		0		0	
CCR5	R223R	22	4.17	13	9.38	7	6.25
	R223Q	2		3		1	
	Q223Q	0		0		0	

1) Frequency of minor allele (%), Statistical significance in odds ratio compared to that in control, *p<0.05.