

200607022A

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療研究事業

アトピー性疾患の疾患感受性遺伝子同定に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 有波 忠雄

平成19（2007）年 4月

目 次

I. 総括研究報告書	
アトピー性疾患の疾患感受性遺伝子同定に関する研究	1
有波 忠雄	
II. 分担研究報告書	
1. アトピー性皮膚炎および花粉症のゲノム DNA 検体収集	7
大塚 藤男	
玉利真由美	
藤枝重治	
斎藤博久	
柴崎正修	
荒川浩一	
鈴木洋一	
2. 網羅的遺伝子発現解析によるアレルギー疾患関連遺伝子の同定	11
内田和彦	
野口恵美子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	15

厚生労働化学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

アトピー性疾患の疾患感受性遺伝子同定に関する研究

主任研究者 有波忠雄 筑波大学 大学院人間総合研究科

社会環境医学専攻遺伝医学分野 教授

研究要旨

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。本研究では日本人のアトピー性皮膚炎と花粉症の患者家系および症例対照サンプルを用いて、全ゲノム網羅的解析により疾患感受性遺伝子を同定することを目的とする。アトピー性皮膚炎についてはSNPによる全ゲノム連鎖解析により日本人アトピー性皮膚炎家系において1番および15番染色体に連鎖領域を見いだした。連鎖領域のデンスマッピングも終了しており8遺伝子11SNPにおいてアトピー性皮膚炎との関連が認められたため現在三次解析による関連解析が進行中である。また花粉症のゲノム解析については10万SNPによる一次解析および独立したサンプルにおける二次解析が終了し、7遺伝子について有意な関連が認められている ($P<0.01$)。網羅的遺伝子タンパク質発現解析については花粉暴露および舌下免疫療法関連遺伝子・タンパク質を同定している。

分担研究者

野口恵美子 筑波大学人間総合科学研究科
遺伝医学分野 講師

玉利真由美 理化学研究所アレルギー体質
関連遺伝子研究チーム チームリーダー

藤枝重治 福井大学医学部感覚運動医学講
座・耳鼻咽喉科頭頸部外科学 教授

内田和彦 筑波大学人間総合科学研究科生
化学分野 助教授

斎藤博久 国立成育医療センター研究所免
疫アレルギー研究部 部長

鈴木洋一 千葉大学大学院医学研究院環境
医学講座公衆衛生学 助教授

大塚藤男 筑波大学人間総合科学研究科皮
膚病態医学分野 教授

柴崎正修 筑波技術大学小児科 教授

荒川浩一 群馬大学小児生態防御学 講師

前仲勝実 九州大学生体防御医学研究所ワ
クチン開発構造生物学分野 助教授

A. 研究目的

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。本研究では日本人のアトピー性皮膚炎と花粉症の患者家系および症例対照サンプルを用いて、全ゲノム網羅的解析により疾患感受性遺伝子を同定することを目的とした。

B. 研究方法

日本人アトピー性皮膚炎患者および花粉症家系および症例対照サンプルを用いてSNPによる全ゲノム連鎖解析を行い、続いて、連鎖領域のデンスマッピングをおこない関連の認められたSNPsを検出する。

関連が見られたSNPsについては独立したケースコントロールサンプルを用いて、結果を追認する。さらに疾患特異的な組織を用いた網羅的発現解析を加え疾患発症のパスウェイを同定した。

(倫理面への配慮)

本研究の検体提供者にはすべて文書および口頭により説明し、書面によるインフォームドコンセントを得られた検体のみ解析に使用する。本研究は当該施設における倫理委員会の承認を得た上で行われている。

C. 研究結果

アトピー性皮膚炎：イルミナタイピングシステムを使用して77家系111罹患同胞対299人の全ゲノム連鎖解析が終了し、1番および15番染色体に連鎖領域を見いだした（論文投稿中）。連鎖領域のデンスマッピングを113家系384人について行い、8遺伝子11SNPにおいてアトピー性皮膚炎との関連が認められたため現在三次解析による関連解析（症例384：対照741）が進行中である。なお対照はアレルギー疾患のない健康成人である。

花粉症：スギ花粉症患者を対象に10万SNP（イルミナ社）を使用した一次解析（症例93：対照45）および独立したサンプルによる二次解析（症例235：対照149）が終了した。対照はアレルギー疾患および花粉症の症状がなく、かつ、スギおよびダニに対するIgE抗体が陰性である健康成人を対象とした。7遺伝子について有意な関連が認められている（ $P<0.01$ ）。現在は三次解析用サンプルの収集が進行している。

発現解析については血漿プロテオームにおいて花粉症暴露により変動する 2 タンパク質、舌下免疫療法により変動する 1 タンパク質を同定し、現在はウエスタンブロットおよび ELISA 法による確認を行っている。末梢血単核球における網羅的遺伝子発現解析では、花粉暴露により変動する遺伝子群および舌下免疫療法関連遺伝子を同定し、パスウェイの構築を行い、花粉暴露関連の hub gene として MAPK1, IFNG, 舌下免疫療法関連の hub gene として TNF が同定されている。

D. 考察

1) 達成度について

アトピー性皮膚炎については SNP による全ゲノム連鎖解析および二次解析（デンスマッピング）を終了したため、当初の目的を達成することができた。組織発現解析については対象とするサンプル収集が困難であり、予備実験の段階にとどまっている。

花粉症については、SNP による全ゲノム関連解析（一次）および二次解析については当初の予定通り終了した。三次解析についてはバイオバンクサンプルを使用する予定であったが、スギ花粉に対する IgE 値が不明であるためスギ花粉症に特化した今回の解析に使用するには適さない。そこで新たに三次解析用サンプルの収集を行い 2007 年 6 月には三次解析を終了する予定である。網羅的遺伝子タンパク質発現解析については当初の予定通り終了することができた。

構造解析（前仲分担）については、ターゲットとなる遺伝子は 19 年度に同定される予定なので平成 18 年度には行っていない。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

過去に白人家系を用いたアトピー性皮膚炎の全ゲノム解析が 4 つ報告されている

（Lee et al, 2000, Cookson et al, 2001, Bradly et al, 2002, Haagerup et al, 2004）が、これらの連鎖領域は一致していない。本邦においてはアトピー性皮膚炎と候補遺伝子の症例対照研究が散見されるのみで家系を用いた研究は申請者らの報告のみである。アジア人におけるアトピー性皮膚炎の全ゲノム解析は行われていないため、本研究の全ゲノム連鎖解析はアジア人初のものとなり、アジア人に頻度の高いアトピー性皮膚炎疾患感受性遺伝子が同定される可能性がある。

花粉症についてはスギ花粉症の特化した全ゲノム関連解析は行われておらず、複数の報告で追認されているものはない。本研究はアトピー性疾患遺伝研究について家系と症例対照研究を全遺伝子網羅的に行うことにより、日本人アトピー性疾患感受性遺伝子の同定を行い、またアトピー性喘息を含む 3 疾患の疾患感受性遺伝子の比較を行うことにより疾患特異的遺伝子およびアトピー素因に関連する遺伝子を同定するという点で独創的であると考えられる。

3) 今後の展望について

アトピー性皮膚炎：平成19年度には一次から三次解析で疾患との関連が認められた遺伝子について機能解析を行う予定である。

花粉症：三次解析用サンプルの収集および二次解析の結果の追認を6月までに終了し、得られた疾患感受性遺伝子の機能解析をアトピー性皮膚炎と同様におこなう予定である。網羅的遺伝子タンパク質発現解析

で得られた舌下免疫療法関連タンパク質については発現ベクターなどもすでに得られているので花粉症モデル動物を用いた機能解析を行う予定である。

E. 結論

アトピー性皮膚炎についてはSNPによる全ゲノム連鎖解析により日本人アトピー性皮膚炎家系において1番および15番染色体に連鎖領域を見いだした。二次解析(デンスマッピング)では8遺伝子11SNPにおいてアトピー性皮膚炎との関連が認められた。

花粉症のゲノム解析については10万SNPによる一次解析および独立したサンプルにおける二次解析が終了し、7遺伝子について有意な関連が認められた ($P<0.01$)。網羅的遺伝子タンパク質発現解析については花粉暴露および舌下免疫療法関連遺伝子・タンパク質を同定した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ishizaki K, Yamada A, Yoh K, Nakano T, Shimohata H, Maeda A, Fujioka Y, Morito N, Kawachi Y, Shibuya K, Otsuka F, Shibuya A, Takahashi S: Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate responses in T-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis. *J Immunol* 2007; 178(1): 605-12.
- Harada M, Nakashima K, Hirota T, Shimizu M, Doi S, Fujita K, Shirakawa

T, Enomoto T, Yoshikawa M, Moriyama H, Matsumoto K, Saito H, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari M: Functional Polymorphism in the Suppressor of Cytokine Signaling 1 Gene Associated with Adult Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36(4): 491-496.

- Hamajima Y, Fujieda S, Sunaga H, Yamada T, Moribe K, Watanabe N, Murakami S: Expression of Syk is associated with nasal polyp in patients with allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx* 2007; 34(1): 49-56.
- Zhang J, Migita O, Koga M, Shibasaki M, Arinami T, Noguchi E: Determination of structure and transcriptional regulation of CYSLTR1 and an association study with asthma and rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; 17(4): 242-9.
- Thuwajit C, Thuwajit P, Uchida K, Daorueang D, Kaewkes S, Wongkham S, Miwa M: Gene expression profiling defined pathways correlated with fibroblast cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product. *World J Gastroenterol* 2006; 12(22): 3585-92.
- Osawa Y, Iho S, Takauji R, Takatsuka H, Yamamoto S, Takahashi T, Horiguchi S, Urasaki Y, Matsuki T, Fujieda S: Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*

- 2006; 177(7): 4841-52.
- Noguchi E, Ohtsuki Y, Tokunaga K, Yamaoka-Sageshima M, Ichikawa K, Aoki T, Shibasaki M, Arinami T: ADAM33 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in a Japanese population. Clin Exp Allergy 2006; 36(5): 602-8.
 - Nishimura F, Shibasaki M, Ichikawa K, Arinami T, Noguchi E: Failure to find an association between CD14-159C/T polymorphism and asthma: a family-based association test and meta-analysis. Allergol Int 2006; 55(1): 55-8.
 - Nakashima K, Hirota T, Obara K, Shimizu M, Jodo A, Kameda M, Doi S, Fujita K, Shirakawa T, Enomoto T, Kishi F, Yoshihara S, Matsumoto K, Saito H, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari M: An association study of asthma and related phenotypes with polymorphisms in negative regulator molecules of the TLR signaling pathway. J Hum Genet 2006; 51(4): 284-91.
 - Fukuda Y, Koga M, Arai M, Noguchi E, Ohtsuki T, Horiuchi Y, Ishiguro H, Niizato K, Iritani S, Itokawa M, Arinami T: Monoallelic and unequal allelic expression of the HTR2A gene in human brain and peripheral lymphocytes. Biol Psychiatry 2006; 60(12): 1331-5.
 - Cheng L, Hirota T, Enomoto T, Tamari M, Akahoshi M, Matsuda A, Shimizu M, Takahashi N, Enomoto K, Yamasaki A, Mao XQ, Hopkin JM, Shirakawa T: Lack of association between the IL13 variant Arg110Gln and susceptibility to cedar pollinosis in a Japanese population. Int Arch Allergy Immunol 2006; 139(1): 25-30.
 - Sugiyama M, Arakawa H, Ozawa K, Mizuno T, Mochizuki H, Tokuyama K, Morikawa A: Early-life risk factors for occurrence of atopic dermatitis during the first year. Pediatrics 2007; 119(3): e716-23.
 - 野口恵美子 花粉症の遺伝的背景臨床検査 臨床検査 2006 139-144
 - 野口恵美子 花粉症は遺伝するのか？ 花粉症と周辺アレルギー疾患 診断と治療社 2007 p151-153
- ## 2. 学会発表
- 野口恵美子: 花粉症と遺伝、東京都臨床医学総合研究所セミナー 東京
 - 野口恵美子: アレルギー疾患の遺伝、花粉症を中心に 花粉症研究シンポジウム 文部科学省・理化学研究所主催 東京
 - 野口恵美子: アレルギー疾患の遺伝要因 第43回日本小児アレルギー学会シンポジウム4 千葉
 - 牧野友香、高橋 昇、大澤陽子、小嶋章弘、山田武千代、目野浩二、鈴木英昭、内田和彦、有波忠雄、野口恵美子、藤枝重治 プロテオームによる花粉症関連物質の同定 第56回日本アレルギー学会秋季学術集会 東京
 - 玉利真由美 アレルギー疾患と遺伝要因 第57回臨床アレルギー研究会 臨

床アレルギー研究会 東京

- ・ 玉利真由美 アレルギー体質と感染症、
SNPs を使ったアプローチ 理化学研究
所遺伝子多型センターシンポジウム
東京
- ・ 荒川浩一、杉山幹雄、森川昭廣 シンポ
ジウム 4「アレルギー疾患発症に関与す
る遺伝因子・環境因子」胎内・胎外因子
-臍帯血サイトカインと皮膚生理機能、
第 43 回日本小児アレルギー学会シンポ
ジウム 4 千葉
- ・ 荒川浩一、杉山幹雄、森川昭廣、乳児期
におけるアレルギー性疾患発症予知、第
56 回日本アレルギー学会秋季学術大

会

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

TSLP 遺伝子の多型に基づく免疫疾患
の検査法

整理番号 P-C61134

国際特許分類 G01N 33/50

厚生労働化学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

アトピー性皮膚炎および花粉症のゲノム DNA 検体収集

分担研究者 大塚藤男 筑波大学人間総合科学研究科皮膚病態医学分野 教授

玉利真由美 理化学研究所アレルギー体質関連遺伝子研究チーム

チームリーダー

藤枝重治 福井大学医学部感覚運動医学講座・耳鼻咽喉科頭頸部外科学
教授

斎藤博久 国立成育医療センター研究所免疫アレルギー研究部

柴崎正修 筑波技術大学小児科 教授

荒川浩一 群馬大学小児生態防御学 講師

鈴木洋一 千葉大学大学院医学研究院環境医学講座公衆衛生学 助教授

研究要旨

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。本研究では日本人のアトピー性皮膚炎と花粉症のゲノム解析に必要なサンプル収集を目的とした。アトピー性皮膚炎については全ゲノム連鎖解析（77 家系 111 罹患者同胞対 299 人）、デンスマッピング（二次解析）用の TDT 家系 113 家系、三次解析（症例 384：対照 741）について検体収集が完了した。花粉症については 10 万 SNP による全ゲノム関連解析（症例 93：対照 45）および独立したサンプルによる二次解析（症例 235：対照 149）サンプルの収集が完了した。三次解析コントロールとして発現解析用の検体としては花粉症下鼻甲介由来線維芽細胞（症例 10：対照 7）、スギ花粉離散前後の末梢血単核球 RNA 44 ペア、スギ花粉離散前後の血漿 24 ペア、花粉暴露室における花粉暴露前後のペア血漿も 17 ペア採取している。

A. 研究目的

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。本研究では日本人のアトピー性皮膚炎と花粉症のゲノム解析に必要なサンプル収集を目的とする。

B. 研究方法

研究対象者は筑波大学皮膚科、福井大学耳鼻咽喉科、筑波技術大学小児科、千葉大学小児科、群馬大学小児科に通院中のアトピー性皮膚炎、花粉症患者、非アトピー性疾患コントロールで、口頭および文書によりインフォームドコンセントを取得した患者を対象とした。該当施設はその倫理審査機構における本研究の認可を受けてお

り、倫理委員会の指針に基づいて患者の臨床情報および検体採取を行った。採取された検体は当該施設、または筑波大学遺伝医学においてDNAが抽出され、研究遂行まで-20度で保管した。RNAおよび血漿サンプルについては研究遂行まで-80度で保管した。

C. 研究結果

アトピー性皮膚炎については全ゲノム連鎖解析(77家系111罹患同胞対299人)、デンスマッピング(二次解析)用のTDT家系113家系、三次解析(症例384:対照741)について検体収集が完了した。

花粉症については10万SNPによる全ゲノム関連解析(症例93:対照45)および独立したサンプルによる二次解析(症例235:対照149)サンプルの収集が完了した。花粉症は罹患者が多いため(20%程度)、より厳密な対照(アレルギー疾患および花粉症の症状がなく、かつ、スギおよびダニに対するIgE抗体が陰性である健康成人)を選定した。三次解析コントロールとして発現解析用の検体としては花粉症下鼻甲介由来線維芽細胞(症例10:対照7)、スギ花粉離散前後の末梢血単核球RNA44ペア、スギ花粉離散前後の血漿24ペア、花粉暴露室における花粉暴露前後のペア血漿も17ペア採取している。

D. 考察

1) 達成度について

DNAについては当初の目的通り収集を行うことができた。皮膚生検による遺伝子およびタンパク質発現解析用の検体採取については筑波大学倫理委員会の承認を得ており、患者様への検体提供協力について依

頼を継続している。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

過去に白人家系を用いたアトピー性皮膚炎の全ゲノム解析が3つ報告されている

(Lee et al, 2000, Cookson et al, 2001, Bradly et al, 2002)が、これらの連鎖領域は一致していない。本邦においてはアトピー性皮膚炎と候補遺伝子の症例対照研究が散見されるのみで家系を用いた研究は申請者らの報告のみである。アジア人におけるアトピー性皮膚炎の全ゲノム解析は行われていないため、本全ゲノム連鎖解析はアジア人初のものとなり、アジア人固有のアトピー性皮膚炎疾患感受性遺伝子が同定される可能性がある。

花粉症についてはスギ花粉症の特化した全ゲノム関連解析は行われておらず、複数の報告で追認されているものはない。本研究はアトピー性疾患遺伝研究について家系と症例対照研究を全遺伝子網羅的に行うことにより、日本人アトピー性疾患感受性遺伝子の同定を行い、またアトピー性喘息を含む3疾患の疾患感受性遺伝子の比較を行うことにより疾患特異的遺伝子およびアトピー素因に関連する遺伝子を同定するという点で独創的であると考えられる。

E・結論

アトピー性皮膚炎については三次解析までの検体収集が当初の予定通り完了した。

花粉症では平成18年度から研究組織に福井大学の藤枝重治教授を迎え、一次および二次解析のサンプル収集が完了した。花粉症の網羅的遺伝子タンパク質発現解析用の

サンプルはすでに収集がなされている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ishizaki K, Yamada A, Yoh K, Nakano T, Shimohata H, Maeda A, Fujioka Y, Morito N, Kawachi Y, Shibuya K, Otsuka F, Shibuya A, Takahashi S: Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate responses in T-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis. *J Immunol* 2007; 178(1): 605-12.
- Harada M, Nakashima K, Hirota T, Shimizu M, Doi S, Fujita K, Shirakawa T, Enomoto T, Yoshikawa M, Moriyama H, Matsumoto K, Saito H, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari M: Functional Polymorphism in the Suppressor of Cytokine Signaling 1 Gene Associated with Adult Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36(4): 491-496.
- Hamajima Y, Fujieda S, Sunaga H, Yamada T, Moribe K, Watanabe N, Murakami S: Expression of Syk is associated with nasal polyp in patients with allergic rhinitis. *Auris Nasus Larynx* 2007; 34(1): 49-56.
- Zhang J, Migita O, Koga M, Shibasaki M, Arinami T, Noguchi E: Determination of structure and transcriptional regulation of CYSLTR1 and an association study with asthma and rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; 17(4): 242-9.
- Thuwajit C, Thuwajit P, Uchida K, Daorueang D, Kaewkes S, Wongkham S, Miwa M: Gene expression profiling defined pathways correlated with fibroblast cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product. *World J Gastroenterol* 2006; 12(22): 3585-92.
- Osawa Y, Iho S, Takauji R, Takatsuka H, Yamamoto S, Takahashi T, Horiguchi S, Urasaki Y, Matsuki T, Fujieda S: Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2006; 177(7): 4841-52.
- Noguchi E, Ohtsuki Y, Tokunaga K, Yamaoka-Sageshima M, Ichikawa K, Aoki T, Shibasaki M, Arinami T: ADAM33 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in a Japanese population. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(5): 602-8.
- Nishimura F, Shibasaki M, Ichikawa K, Arinami T, Noguchi E: Failure to find an association between CD14-159C/T polymorphism and asthma: a family-based association test and meta-analysis. *Allergol Int* 2006; 55(1): 55-8.
- Nakashima K, Hirota T, Obara K, Shimizu M, Jodo A, Kameda M, Doi S, Fujita K, Shirakawa T, Enomoto T, Kishi F, Yoshihara S, Matsumoto K, Saito H, Suzuki Y, Nakamura Y, Tamari M: An association study of asthma and

- related phenotypes with polymorphisms in negative regulator molecules of the TLR signaling pathway. *J Hum Genet* 2006; 51(4): 284-91.
- Fukuda Y, Koga M, Arai M, Noguchi E, Ohtsuki T, Horiuchi Y, Ishiguro H, Niizato K, Iritani S, Itokawa M, Arinami T: Monoallelic and unequal allelic expression of the HTR2A gene in human brain and peripheral lymphocytes. *Biol Psychiatry* 2006; 60(12): 1331-5.
 - Cheng L, Hirota T, Enomoto T, Tamari M, Akahoshi M, Matsuda A, Shimizu M, Takahashi N, Enomoto K, Yamasaki A, Mao XQ, Hopkin JM, Shirakawa T: Lack of association between the IL13 variant Arg110Gln and susceptibility to cedar pollinosis in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 139(1): 25-30.
 - Sugiyama M, Arakawa H, Ozawa K, Mizuno T, Mochizuki H, Tokuyama K, Morikawa A: Early-life risk factors for occurrence of atopic dermatitis during the first year. *Pediatrics* 2007; 119(3): e716-23.
 - 野口恵美子 花粉症の遺伝的背景臨床検査 臨床検査 2006 139-144
 - 野口恵美子 花粉症は遺伝するのか？ 花粉症と周辺アレルギー疾患 診断と治療社 2007 p151-153
- ## 2. 学会発表
- 野口恵美子: 花粉症と遺伝、東京都臨床医学総合研究所セミナー 東京
 - 野口恵美子: アレルギー疾患の遺伝、花粉症を中心に 花粉症研究シンポジウム 文部科学省・理化学研究所主催 東京
 - 野口恵美子: アレルギー疾患の遺伝要因 第43回日本小児アレルギー学会シンポジウム4 千葉
 - 牧野友香、高橋 昇、大澤陽子、小嶋章弘、山田武千代、目野浩二、鈴木英昭、内田和彦、有波忠雄、野口恵美子、藤枝重治 プロテオームによる花粉症関連物質の同定 第56回日本アレルギー学会秋季学術集会 東京
 - 玉利真由美 アレルギー疾患と遺伝要因 第57回臨床アレルギー研究会 臨床アレルギー研究会 東京
 - 玉利真由美 アレルギー体質と感染症、SNPsを使ったアプローチ 理化学研究所遺伝子多型センターシンポジウム 東京
 - 荒川浩一、杉山幹雄、森川昭廣 シンポジウム4「アレルギー疾患発症に関与する遺伝因子・環境因子」胎内・胎外因子-臍帯血サイトカインと皮膚生理機能、第43回日本小児アレルギー学会シンポジウム4 千葉
 - 荒川浩一、杉山幹雄、森川昭廣、乳児期におけるアレルギー性疾患発症予知、第56回日本アレルギー学会秋季学術大会
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- (予定を含む)
- TSLP遺伝子の多型に基づく免疫疾患の検査法
 整理番号P-C61134
 国際特許分類G01N 33/50

網羅的遺伝子タンパク質発現解析によるアレルギー疾患関連遺伝子の同定

分担研究者 内田和彦 筑波大学人間総合科学研究科生化学分野 助教授

野口恵美子 筑波大学 大学院人間総合研究科遺伝医学分野 講師

研究要旨

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。網羅的タンパク質発現解析については血漿プロテオームにおいて花粉症暴露により変動する2タンパク質、舌下免疫療法により変動する1タンパク質を同定し、ウェスタンブロットおよびELISA法による確認が進行中である。末梢血単核球における網羅的遺伝子発現解析では、花粉暴露により変動する遺伝子群および舌下免疫療法関連遺伝子を同定し、パスウェイの構築を行い、花粉暴露関連の hub gene として MAPK1, IFNG, 舌下免疫療法関連の hub gene として TNF が同定された。

A. 研究目的

アトピー性疾患は罹患者も多く、その病態の解明と治療法の開発は医療および経済的に急務の課題である。本研究では網羅的遺伝子タンパク質発現解析によりアトピー関連遺伝子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

プロテオーム：スギ離散前後のペア血清（舌下免疫療法15例：プラセボ9例）および花粉暴露室における暴露前後の血漿（17ペア）を用いて蛍光二次元電気泳動と飛行時間型質量分析(TOF-MAS)を行い、花粉暴露および治療により変動するタンパク質を同定した。

トランスクリプトーム：スギ離散前後の末梢血単核球由来のペアRNA（舌下免疫療法11例：プラセボ10例）を用いて花粉暴露

および治療により変動する遺伝子をイルミナ発現解析システム（Human-6 Expression Chip, 48000遺伝子を網羅）により同定した。

C・研究結果

網羅的タンパク質発現解析については血漿プロテオームにおいて花粉症暴露により変動する2タンパク質、舌下免疫療法により変動する1タンパク質を同定し、ウェスタンブロットおよびELISA法による確認が進行中である。末梢血単核球における網羅的遺伝子発現解析では、花粉暴露により変動する遺伝子群および舌下免疫療法関連遺伝子を同定した。プラセボ群で発現が上昇、低下しているが、舌下免疫療法群で変化がみられない遺伝子として *NEATC3* および *CISH* が同定された。IPA4.0 (Ingenuity)ソフトウェアによるパスウェイ

解析では、花粉暴露関連の hub gene として MAPK1, IFNG, 舌下免疫療法関連の hub gene として TNF が同定された。

D. 考察

報告者は網羅的タンパク質遺伝子発現解析により、花粉暴露および舌下免疫療法関連タンパク質・遺伝子を同定した。さらに正常コントロール（スギおよびダニに対する RAST が陰性でありアレルギー症状のまったくない健康成人）由来のタンパク質遺伝子発現解析を平成19年度に加える予定であり、これらの発現データと、患者遺伝子多型情報をあわせることにより本研究課題に貢献できると考える。

E. 結論

網羅的タンパク質・遺伝子発現解析により花粉暴露関連および舌下免疫療法関連タンパク質・遺伝子を同定した。

研究発表

1. 論文発表

- ・ Thuwajit C, Thuwajit P, Uchida K, Daorueang D, Kaewkes S, Wongkham S, Miwa M: Gene expression profiling defined pathways correlated with fibroblast cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product. *World J Gastroenterol* 2006; 12(22): 3585-92.

2. 学会発表

- ・ 牧野友香、高橋 昇、大澤陽子、小嶋章弘、山田武千代、目野浩二、鈴木英昭、内田和彦、有波忠雄、野口恵美子、藤枝重治
プロテオームによる花粉症関連物質の同定
第56回日本アレルギー学会秋季学術集会
東京

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishizaki K, Yamada A, Yoh K, Nakano T, Shimohata H, Maeda A, Fujioka Y, Morito N, Kawachi Y, Shibuya K, <u>Otsuka F</u> , Shibuya A, Takahashi S:	Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate responses in T-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis. 2007; 178(1):.	J Immunol	178	605-12	2007
Harada M, Nakashima K, Hirota T, Shimizu M, Doi S, Fujita K, Shirakawa T, Enomoto T, Yoshikawa M, Moriyama H, Matsumoto K, <u>Saito H</u> , <u>Suzuki Y</u> , Nakamura Y, <u>Tamari M</u>	Functional Polymorphism in the Suppressor of Cytokine Signaling 1 Gene Associated with Adult Asthma.	Am J Respir Cell Mol Biol	36	491-496	2007
Hamajima Y, <u>Fujieda S</u> , Sunaga H, Yamada T, Moribe K, Watanabe N, Murakami S:	Expression of Syk is associated with nasal polyp in patients with allergic rhinitis.	Auris Nasus Larynx	116	49-56.	2007
Sugiyama M, <u>Arakawa H</u> , Ozawa K, Mizuno T, Mochizuki H, Tokuyama K, Morikawa A:	Early-life risk factors for occurrence of atopic dermatitis during the first year.	Pediatrics	119	716-23	2007
Zhang J, Migita O, Koga M, Shibasaki M, <u>Arinami T</u> , <u>Noguchi E</u> :	Determination of structure and transcriptional regulation of CYSLTR1 and an association study with asthma and rhinitis..	Pediatr Allergy Immunol	17	242-249	2006

Thuwajit C, Thuwajit P, <u>Uchida K</u> , Daorueang D, Kaewkes S, Wongkham S, Miwa M:.	Gene expression profiling defined pathways correlated with fibroblast cell proliferation induced by <i>Opisthorchis viverrini</i> excretory/secretory product.	World J Gastroenterol	12	3585-92	2006
Osawa Y, Iho S, Takauji R, Takatsuka H, Yamamoto S, Takahashi T, Horiguchi S, Urasaki Y, Matsuki T, <u>Fujieda S</u> : 2006; 177(7):	Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells.	J Immunol	177	4841-52.	2006
<u>Noguchi E</u> , Ohtsuki Y, Tokunaga K, Yamaoka-Sageshima M, Ichikawa K, Aoki T, Shibasaki M, <u>Arinami T</u> :	ADAM33 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in a Japanese population.	Clin Exp Allergy	36	602-608	2006
野口恵美子	花粉症の遺伝的背景	臨床検査	50	139-144	2006
野口恵美子	花粉症は遺伝するのか？ 花粉症と周辺アレルギー疾患	診断と治療社		151-153	2007

Th1 and Type 1 Cytotoxic T Cells Dominate Responses in T-bet Overexpression Transgenic Mice That Develop Contact Dermatitis¹

Kazusa Ishizaki,^{2*} Akiko Yamada,^{2*} Keigyou Yoh,[†] Takako Nakano,^{*} Homare Shimohata,^{*} Atsuko Maeda,^{*} Yuki Fujioka,^{*} Naoki Morito,^{*} Yasuhiro Kawachi,[§] Kazuko Shibuya,[†] Fujio Otsuka,[§] Akira Shibuya,[†] and Satoru Takahashi^{3*}

Contact dermatitis in humans and contact hypersensitivity (CHS) in animal models are delayed-type hypersensitivity reactions mediated by hapten-specific T cells. Recently, it has become clear that both CD4⁺ Th1 and CD8⁺ type 1 cytotoxic T (Tc1) cells can act as effectors in CHS reactions. T-bet has been demonstrated to play an important role in Th1 and Tc1 cell differentiation, but little is known about its contribution to CHS. In the present study, we used C57BL/6 mice transgenic (Tg) for T-bet to address this issue. These Tg mice, which overexpressed T-bet in their T lymphocytes, developed dermatitis characterized by swollen, flaky, and scaly skin in regions without body hair. Skin histology showed epidermal hyperkeratosis, neutrophil, and lymphocyte infiltration similar to that seen in contact dermatitis. T-bet overexpression in Tg mice led to elevated Th1 Ig (IgG2a) and decreased Th2 Ig (IgG1) production. Intracellular cytokine analyses demonstrated that IFN- γ was increased in both Th1 and Tc1 cells. Furthermore, Tg mice had hypersensitive responses to 2,4-dinitrofluorobenzene, which is used for CHS induction. These results suggest that the level of expression of T-bet might play an important role in the development of contact dermatitis and that these Tg mice should be a useful model for contact dermatitis. *The Journal of Immunology*, 2007, 178: 605–612.

The Th1/Th2 paradigm proposed by Mosmann et al. (1) holds that CD4⁺ T cells can be subdivided into two categories, namely Th1 and Th2 (2). These two polarized subsets can be identified on the basis of the cytokines they secrete (3). Th1 cells produce IL-2 and IFN- γ , whereas Th2 cells produce IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, and IL-13. More recently, a similar heterogeneity among CD8⁺ T cytotoxic (Tc)⁺ cells has also been recognized with the identification of Tc1 and Tc2 subpopulations (4, 5). IFN- γ is also one of the main cytokines produced by differentiated CD8⁺ effector T cells and has been shown to have a fundamental role in CD8⁺ T cell-mediated immunity (6). Lineage commitment of CD4⁺ and CD8⁺ T cells is transcriptionally regulated, often by the same factors that mediate T cell effector function.

T-bet is known as a Th1 lineage commitment transcription factor as a result of its transactivation of the Th1 cytokine IFN- γ (7). Recently, T-bet has also been shown to regulate cytolytic effector mechanisms of CD8⁺ T cells (8). T-bet expression is rapidly induced in CD8⁺ T cells by signaling through the TCR and the IFN- γ R, and it functions downstream of STAT1 (6, 9, 10). In the context of Ag-specific activation, T-bet is required for the differentiation of naive CD8⁺ T cells into effector CTLs.

Contact dermatitis is one of the most common skin diseases (11). Knowledge of the pathophysiology of contact dermatitis is derived chiefly from animal models in which the inflammation induced by hapten painting of the skin is referred to as contact hypersensitivity (CHS) (12). Contact dermatitis and CHS are delayed-type hypersensitivity reactions that are mediated by hapten-specific T cells (12). Skin sensitization resulting in contact dermatitis and CHS is dependent on the initiation of specific T lymphocyte responses (11, 13). Until recently it was believed that the most important cells in these responses were CD4⁺ T lymphocytes. IL-2 and IFN- γ produced by Th1 cells are thought to play a preeminent role in the evolution of CHS (14, 15). Some investigations in mice found CHS to be associated with CD4⁺ T lymphocyte function and to be compromised when such cells were deleted (15, 16). However, there is growing evidence that in many instances the predominant effector cell in CHS may be a CD8⁺ T lymphocyte (13, 17, 18). Wang et al. (17) clearly demonstrated that the deletion of CD8⁺ Tc1 cells had a more significant suppressive effect than the deletion of CD4⁺ Th1 cells in CHS responses to 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB). According to these results, both CD4⁺ Th1 and CD8⁺ Tc1 cells are key players in CHS.

Although T-bet plays an important role in Th1 and Tc1 cell induction, little is known about its contribution to CHS. In the present study we used T-bet overexpression in T cell transgenic (Tg) mice to address this issue.

*Department of Anatomy and Embryology, [†]Department of Immunobiology, Biomolecular, and Integrated Medical Sciences, [‡]Department of Pathophysiology of Renal Diseases, and [§]Department of Dermatology, Medical Sciences for Control of Pathological Processes, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan

Received for publication March 10, 2006. Accepted for publication October 12, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Grants-in-Aid for Young Scientists (B) and Scientific Research (C) from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture and a grant of the Genome Network Project from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

² K.I. and A.Y. contributed equally to this work.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. Satoru Takahashi, Department of Anatomy and Embryology, Biomolecular, and Integrated Medical Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575, Japan. E-mail address: satoruta@md.tsukuba.ac.jp

⁴ Abbreviations used in this paper: Tc, cytotoxic T; CHS, contact hypersensitivity; DNFB, 2,4-dinitrofluorobenzene; LNC, lymph node cell; Tg, transgenic; WT mice, wild-type transgene-negative littermates.

Copyright © 2006 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/06/\$2.00

Materials and Methods

Generation of T-bet Tg mice

A 2.5-kb, full-length cDNA encoding the murine T-bet protein was inserted into a VA CD2 transgene cassette containing the upstream gene regulatory region and locus control region of the human CD2 gene. The VA vector has been reported to direct expression of the inserted cDNA in all single-positive mature T lymphocytes of Tg mice, with expression being linearly proportional to the transgene copy number (19). This T-bet construct was injected into BDF1 fertilized eggs to generate Tg mice. T-bet Tg mice were inbred with C57BL/6 mice for four generations. Mice were maintained in specific pathogen-free conditions in a laboratory animal resource center. All experiments were performed according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals at the University of Tsukuba (Ibaraki, Japan), and the study was approved by the Institutional Review Board of the university.

Southern hybridization analysis of genomic DNA

Southern hybridization was performed by using the Gene Images random prime labeling module system (Amersham Biosciences). High m.w. DNA was prepared from the tail of each mouse, and 15 μ g of DNA was digested with *Apal* and then subjected to electrophoresis on 1.0% agarose gels. After electrophoresis, the DNA was transferred to a Hybond-N⁺ membrane. A fluorescence-labeled *Apal/KpnI* fragment (0.5 kb) of the *T-bet* cDNA was used as a probe. The transgene copy number was determined from the blot with a BAS 1500 Mac image analyzer.

RT-PCR for transgene expression analysis

Total RNA was prepared from the thymus of 10 wk-old Tg mice or their wild-type transgene-negative littermates (WT mice) using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Life Technologies). First-strand cDNA was synthesized at 42°C for 50 min using the SuperScript II RNase H2 reverse-transcriptase kit (Invitrogen Life Technologies), and 1 μ l of this 20 μ l reaction mixture was used for the PCR. Amplified products were analyzed on 2% agarose gels. PCR primer sequences were as follows: T-bet, 5'-CGGTACCAGAGCGGCAAGT-3' and 5'-AGCCCCCTTGTGTGTGGTG-3'; GATA-3, 5'-TCTCACTCTCGAGGCAGCATGA-3' and 5'-GGTACCATCTCGCGCCACAG-3'; GAPDH, 5'-CCCCTTCATTGACCTCAACTACATGG-3' and 5'-GCCTGCTTCAC CACCTTCTTGATGTC-3'.

Western blot analysis

Thymocyte nuclear extracts were prepared from 10 wk-old Tg mice or WT. The extracts were size-fractionated on a 10% SDS-polyacrylamide gel, transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (FluoroTrans), and reacted with primary and secondary Abs. For detection of the T-bet protein, a goat anti-mouse T-bet (N-19; Santa Cruz Biochemicals) was used as the primary Ab and peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG (Zymed Laboratories) was used as the secondary Ab. For normalization with respect to the amount of protein in each sample, anti-lamin B Ab (Santa Cruz Biochemicals) was used as a control.

Histopathological analysis

Organs were fixed with 10% formalin in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.2) and embedded in paraffin. Sections (3 μ m) were stained with H&E for histopathological examination by light microscopy.

Measurement of serum Ig

Total serum Ig was determined by ELISA as previously described (20). Briefly, Nunc immunoplates were coated with goat anti-mouse Ig (ICN Pharmaceuticals). The plates were kept at room temperature for 1 h and then washed with 0.1 M PBS. After washing, the plates were blocked with 0.5% BSA in PBS solution. Serial dilutions of test serum samples were applied and incubated at room temperature for 1 h. After washing with PBS, the plates were treated with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG, IgG1, or IgG2a (Sigma-Aldrich) at room temperature for 1 h. After additional washes, alkaline phosphatase substrate (Sigma-Aldrich) solution was added and allowed to develop. Absorption at 405 nm was measured with an immunoplate reader (BenchMark; Bio-Rad).

Culture medium, cytokines, and Abs

RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2-ME (0.05 mM), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), HEPES buffer (10 mM), and sodium pyruvate (1 mM) was used as culture medium. Recombinant mouse cytokines were IL-2 (Genzyme Techno),

IL-4 (BD Pharmingen), and IL-12 (BD Pharmingen). Purified rat anti-mouse IL-4 (1B11), IL-12 (C17.8), CD3e (145-2C11), and CD28 (37.51) mAb, PE-conjugated anti-mouse IL-5 (TRFK5), and FITC-conjugated anti-mouse IFN- γ (XMG1.2) were purchased from BD Pharmingen.

Preparation of T Cells

CD4⁺ and CD8⁺ T cells were prepared from each mouse spleen and lymph nodes. CD4⁺ and CD8⁺ T cells were enriched by positive selection using a MACS system with anti-CD4 and anti-CD8 mAb (Miltenyi Biotec). In the spleen cell transfer experiment the cells (3×10^6 cells) were transferred i.v.

Stimulation of Tg CD4⁺CD8⁺ T cells for cytokine production

Primary stimulations of CD4⁺/CD8⁺ T cells (2.5×10^5 cells/well) were performed with cross-linked anti-CD3e (1 μ g/ml) and anti-CD28 (10 μ g/ml) plus IL-2 (10 ng/ml) in a total volume of 2 ml in 24-well plates. In addition, some cultures received cytokines (10 ng/ml IL-4 or 10 ng/ml IL-12) or mAb to block endogenous cytokines (10 μ g/ml anti-IL-4 or 10 μ g/ml anti-IL-12). T cells were expanded and maintained under constant culture conditions for 1 wk.

Flow cytometric analysis of intracellular IL-5 and IFN- γ synthesis

Cells were resuspended at 10^6 to 10^8 cells/ml and stimulated with PMA (50 ng/ml) plus ionomycin (500 ng/ml). Two hours before cell harvesting, brefeldin A was added at 10 μ g/ml using a stock solution of 1 mg/ml in ethanol (100%). Cells were harvested, washed, and resuspended in PBS with brefeldin A before the addition of an equal volume of 4% formaldehyde fixative (final concentration, 2%). After fixation for 20 min at room temperature, cells were stained for cytokines. For intracellular staining, all reagents and washes contained 1% BSA and 0.5% saponin (Sigma-Aldrich), and all incubations were performed at room temperature. Cells were washed and preincubated for 10 min in PBS/BSA/saponin and then incubated with allophycocyanin-conjugated anti-mouse IL-5 (5 μ g/ml) and anti-mouse IFN- γ (5 μ g/ml) or isotype-matched control Abs (10 μ g/ml) for 30 min. After 20 min, cells were washed twice with PBS/BSA/saponin and then washed with PBS/BSA without saponin to allow membrane closure. Samples were analyzed with a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences). Results were analyzed by using CellQuest software.

Induction of CHS

Induction of CHS was conducted using the methods described previously (21). Briefly, mice were sensitized to DNFB by painting the shaved abdomen with 50 μ l of 0.5% DNFB in acetone/olive oil (4:1) and each footpad with 5 μ l of the mixture on days 0 and 1. On day 5, mice were challenged with 20 μ l of 0.3% DNFB on each side of the left ear. As a control, the right ear was painted with an identical amount of vehicle. The ear thickness was measured at 12, 24, 48, and 72 h after challenge at three locations. The ear swelling was calculated as [(T - T₀) left ear] - [(T - T₀) right ear], where T₀ and T represent the values of ear thickness before and after the challenge, respectively.

Results

Generation of Tg mouse lines overexpressing T-bet in T cells

To generate Tg mouse lines expressing high levels of T-bet specifically in T cells, the mouse *T-bet* cDNA was inserted into the VA vector (Fig. 1A). Genomic Southern blotting analysis was performed to confirm the integrity and copy number for each Tg mouse line. The length of the *Apal* fragment containing the *T-bet* transgene was 1.2 kb, whereas the corresponding fragment for the endogenous *T-bet* gene was 4.0 kb (Fig. 1A). The transgene was detected in mice of Tg lines 710, 725, and 731 (Fig. 1B). In densitometric analyses, line 710 seemed to contain more than 12 copies of the transgene, whereas lines 725 and 731 contained approximately 12 and 8 copies, respectively. However, line 710 could not transmit the genes to the next generation, but the transgenes in both line 725 and line 731 were stably transmitted to progeny.

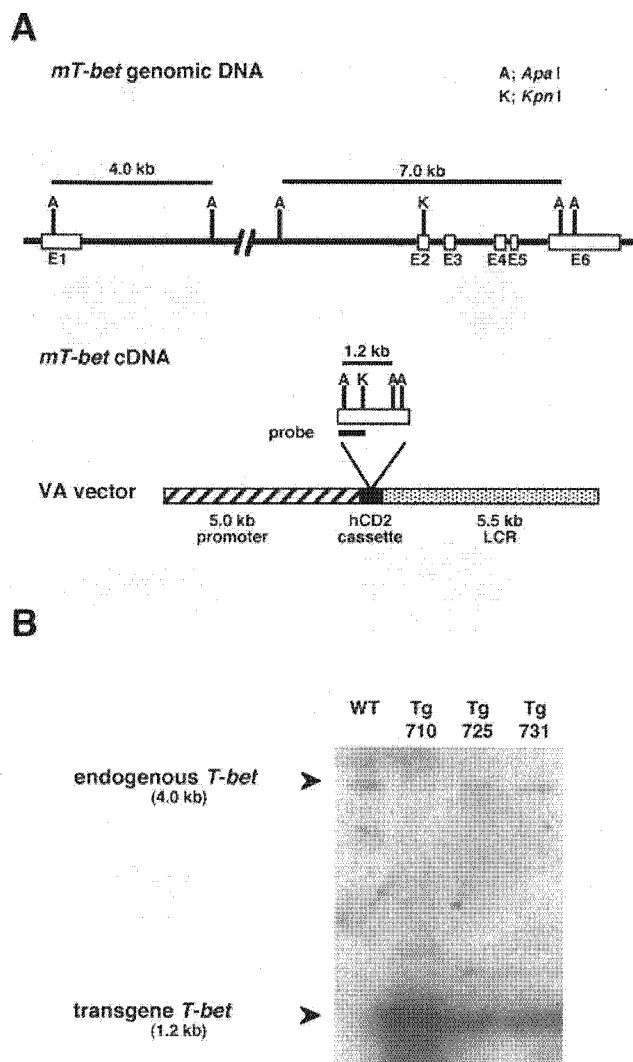


FIGURE 1. Generation of T-bet-overexpressing mice. *A*, Diagram showing the structures of the mouse *T-bet* (*mT-bet*) gene locus and the Tg construct. *T-bet* cDNA was inserted into a vector (VA vector) containing a human CD2 transgene cassette. The Southern blotting probe site, the restriction sites, and the predicted sizes of the endogenous gene and the transgene (with *Apa*I restriction sites) are indicated. E, Exon; LCR, locus control region. *B*, Southern blot analysis of the endogenous and Tg *T-bet* genes in Tg mice. The fragment with *Apa*I and *Kpn*I restriction sites in *mT-bet* cDNA in panel (*A*) was used as the probe. The 4.0-kb endogenous and 1.2-kb Tg genes are shown for Tg line 710 (Tg 710), Tg 725 (Tg 725), and Tg 731 (Tg 731) mice. The transgene copy numbers for Tg lines 710, 725, and 731 were over 12, 12, and 8 copies, respectively.

Overexpression of T-bet in Tg mice

To confirm expression of the transgene, RT-PCR and immunoblot analyses were performed to monitor T-bet mRNA and protein levels in thymocytes from the two Tg lines (Fig. 2, *A* and *B*). Overexpression of T-bet mRNA and protein was detected in all Tg mice tested. The amount of T-bet protein in Tg line 725 cells was slightly higher than the amount in Tg line 731, indicating that the expression level of the protein was copy number dependent. The T-bet protein was not detected in WT mice in this analysis.

Higher ratio between IgG2a and IgG1 in T-bet Tg mice

To determine cytokine levels we first analyzed serum by the ELISA method, but all samples were below the level of detec-

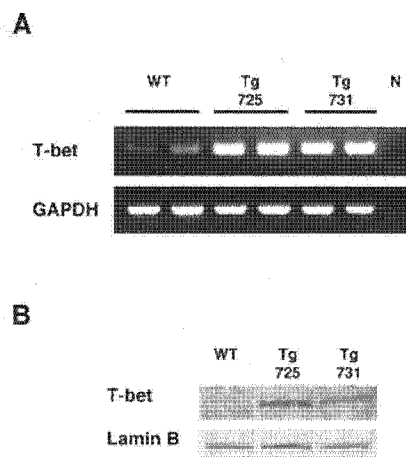


FIGURE 2. T-bet expression analysis by RT-PCR and Western blot in the thymus. *A*, RT-PCR analysis. In Tg line 725 (Tg 725) and Tg line 731 (Tg 731), T-bet gene expression was higher than that of WT. N, PCR without template as negative control. Two individual mice were used in each genotype. *B*, T-bet protein in nuclear extracts from thymocytes. T-bet protein was clearly identified by Western blotting in the extracts from Tg lines 725 and 731. In this analysis, however, the normal level of T-bet from WT thymocytes could not be detected.

tion (data not shown). Because Th1/Th2 cytokines contribute to control of Ig subtype production, we next analyzed serum IgG1 and IgG2a. Th1 cells support macrophage activation, delayed-typed hypersensitivity responses, and Ig isotype switching to IgG2a. In contrast, Th2 cells provide efficient help for B cell activation and class switching to IgG1 (22, 23). To confirm the Th1-dominant response in T-bet Tg mice, serum IgG levels were measured by ELISA (Table I). Tg line 731 mice had serum total IgG levels similar to those of WT mice (Tg line 731, 394.0 ± 37.6 mg/dl; WT, 340.3 ± 18.7 mg/dl), but Tg line 725 levels were significantly higher than those of WT mice (547.4 ± 108.9 mg/dl). Serum IgG1 levels of Tg mice (Tg line 731, 79.4 ± 7.4 mg/dl) tended to be lower than those of WT mice (174.0 ± 33.7 mg/dl) but, in contrast, IgG2a levels were higher (Tg line 725, 253.1 ± 77.9 mg/dl; WT, 90.7 ± 12.6 mg/dl). To confirm the promotion of the IgG2a class switch and repression of IgG1 Tg mice, IgG2a/IgG1 ratios were calculated. These were found to be significantly higher in Tg mice (Tg line 725, 2.93 ± 0.95 ; Tg line 731, 1.22 ± 0.13) than in WT mice (0.62 ± 0.08) ($p < 0.01$).

Increased synthesis of IFN- γ in T-bet Tg mice

From the above data, Tg line 725 mice had greater overexpression of T-bet than Tg line 731 mice and were therefore used in the following studies. To confirm the observed differences in

Table I. Serum immunoglobulins for 30-week-old mice^a

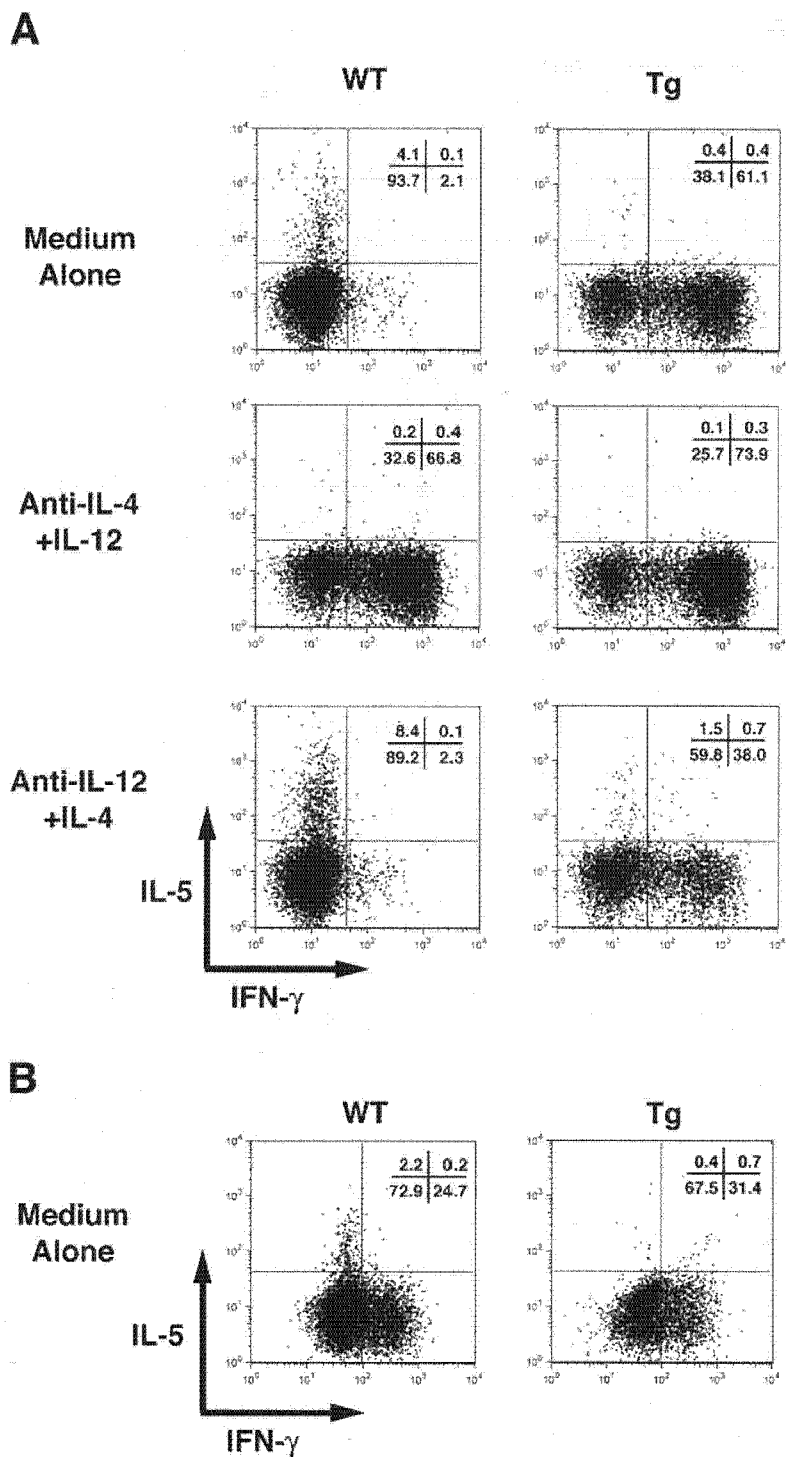
Measurement	WT (<i>n</i> = 12)	Tg Line 725 (<i>n</i> = 8)	Tg Line 731 (<i>n</i> = 10)
IgG (mg/dl)	340.3 ± 18.7	547.4 ± 108.9^b	394.0 ± 37.6
IgG1 (mg/dl)	174.0 ± 33.7	174.9 ± 89.0	79.4 ± 7.4^b
IgG2a (mg/dl)	90.7 ± 12.6	253.1 ± 77.9^b	97.1 ± 13.4
IgG2a/IgG1 ratio	0.62 ± 0.08	2.93 ± 0.95^c	1.22 ± 0.13^c

^a Data are expressed as mean \pm SEM.

^b $p < 0.05$ versus WT.

^c $p < 0.01$ versus WT.

FIGURE 3. Intracellular cytokine analysis of CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T cells from each group. A, CD4⁺ T cells from WT and Tg line 725 mice were cultured in the presence of medium alone, anti-IL-4 plus IL-12 (Th1 differentiation conditions), or anti-IL-12 plus IL-4 (Th2 differentiation conditions) and analyzed by flow cytometry for intracellular synthesis of IFN- γ and IL-5. The frequencies of IFN- γ -producing cells are shown on the x-axis and those of IL-5-producing cells on the y-axis. Intracellular synthesis of IFN- γ in Tg line 725 mice was increased under all conditions. B, CD8⁺ T cells from WT and Tg line 725 mice were cultured in the presence of medium alone and analyzed by flow cytometry for intracellular synthesis of IFN- γ and IL-5. Results are representative of three independent experiments.



cytokine production at the single-cell level, we studied their intracellular synthesis by flow cytometry. CD4⁺ T cells from Tg mice had higher levels of IFN- γ than WT mice either in medium alone or under conditions favoring Th1 differentiation (presence of anti-IL-4 Ab and IL-12) or Th2 differentiation (presence of anti-IL-12 Ab and IL-4) (Fig. 3A). Especially in the Th2 condition 38.0% of CD4⁺ T cells from Tg mice produced IFN- γ , but only 2.3% from WT did so. In contrast to IFN- γ , the production of IL-5 in cells from Tg mice showed lower levels in medium and the Th2 condition. IL-4 production

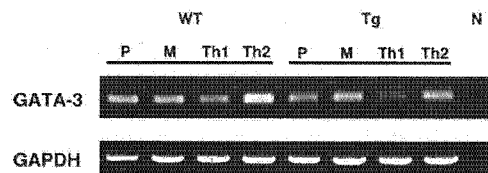


FIGURE 4. GATA-3 mRNA expression analysis by RT-PCR in intracellular cytokine production experiment. P, Prestimulation; M, medium-alone condition; Th1, Th1 differentiation conditions; Th2, Th2 differentiation conditions; N, PCR without template as negative control.