

特に医師から得た情報を信頼していると考えられ、患者の当 HP 利用促進のためには、まず医師に対

し当 HP の周知を図り、医師から患児の保護者に知らせることが必要であると考えられる。

アトピー性皮膚炎の痒みと炎症の機序の解析：脂質メディエーターとケモカインの役割

研究分担者 浜崎 雄平 佐賀大学医学部小児科教授
 研究協力者 市丸 智浩 佐賀県立病院好生館小児科部長
 研究協力者 山本 修一 佐賀大学医学部小児科講師

研究要旨

【研究目的】アラキドン酸代謝物、LTB₄, TXA₂, 12-HPETE, PGD₂ は、皮膚のかゆみに関与することが報告されている。そこで、皮膚ケラチノサイトがこれらを産生することが可能かについて、産生に関与する酵素の発現をヒト正常ケラチノサイト NHEK、ヒトケラチノサイト細胞株 KERTr において検討した。

【方法】NHEK および KERTr における cPLA₂, PHS-1, PHS-2, L-PGDS, H-PGDS, TXA₂S, cPGES, mPGES, 5LOX, FLAP, LTA4H, LTC₄S, 12LOX, 15LOX の mRNA 発現を定量的または半定量的 PCR にて検討した。TXA₂S 蛋白発現は Western 法にて、培養液中の TXA₂ 代謝物である TXB₂ を ELISA 法にて検討した。

【結果】NHEK および KERTr において、LT 産生の key enzyme である 5LOX mRNA 発現は不定であり、特殊な条件下で発現が誘導される可能性がある。PHS-2 は poly(IC) により発現が増強した。Th2 サイトカイン IL-13 は TXA₂S mRNA 発現を誘導した。Western 法にて TXA₂S 蛋白発現を確認したが、培養液中の TXB₂ 濃度には変化がなかった。しかし、基質であるアラキドン酸添加により増加する TXB₂ を IL-13 はさらに増強した。

【考察】5LOX の発現を規定する因子は現在のところ不明であるが、LTA4H の発現を認めることから、何らかの条件下でケラチノサイトはかゆみを惹起する LTB₄ を産生する可能性がある。IL-13 は TXA₂S mRNA 発現を誘導し、TXA₂S 蛋白発現も確認した。基質が十分な場合には IL-13 は TXA₂S 発現増強を介し TXA₂ 産生を増強すると思われる。かゆみを抑制するとされる PGD₂ 産生にかかわる酵素、L-PGDS mRNA 発現は Th2 サイトカインにより抑制される可能性がある。

【結論】ヒトケラチノサイトはアラキドン酸代謝に関わる酵素を発現し、LT, PG, TX 等のメディエーターを産生する能力があると考えられる。これらの酵素はサイトカインや感染等の刺激により発現が調節されていると考えられ、皮膚のかゆみと関連する可能性がある。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎におけるかゆみに関与する、ヒスタミン以外のメディエーターとして、アラキドン酸(AA)代謝物である LTB₄ (Andoh et al. *J Invest Dermatol.* 2001), TXA₂ (Andoh et al. *J Invest Dermatol.* 2007), 12-HPETE (Kim et al. *Eur J Pharmacol.* 2007), PGD₂ (Takaoka et al. *Exp Dermatol.* 2007) などが報告されている。LTB₄, TXA₂, 12-HPETE はマウスにおいてかゆみを惹起するとされる一方、PGD₂ はかゆみに対し抑制的に作用する可能性が示唆されている。アトピー性皮膚炎の皮膚局所に浸潤する種々の炎症細胞がこれらの物質を産生する可能性がある。一方、皮膚ケラチノサイトもいろいろなメディエーターを産生しむしろ積極的に皮膚での炎症に関与していることが我々の報告を含め明らかになってきた(4)。そこで本研究では皮膚ケラチノサイトがこれらのソースとなる可能性があるかどうかについて検討した。

B. 研究方法

ヒト正常表皮角化細胞 NHEK およびヒト角化細胞株 KERTr について検討した。未刺激の NHEK、IL-4、IL-13 (いずれも 50ng/ml)、二本鎖 RNA である poly(IC)、neuropeptide Substance P (Sub. P) とともに 24 時間培養した後 RNA を抽出し、特異的なプライマーを用い RT-PCR 法にて、AA 代謝経路にかかわる酵素群の mRNA 発現を半定量的および定量的に検討した。internal control として beta-actin を用いた。今回検討を行った酵素は以下のとおりである。cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂), 5-lipoxygenase (5LOX), 5-lipoxygenase activating protein (FLAP), leukotoriene A₄ hydrolase (LTA4H), leukotoriene C₄ synthase (LTC₄S), prostaglandin H synthase-1 (PHS-1), prostaglandin H synthase-2 (PHS-2), lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS), hematopoietic-type prostaglandin D synthase (H-PGDS), cytosolic prostaglandin E synthase (cPGES), membrane-bound prostaglandin E synthase (mPGES),

thromboxane A2 synthase (TXA2S). TXA2S 酵素発現は Western 法にて、培養上澄中の TXA2 代謝物である TXB2 濃度を ELISA 法にて検討した。TXB2 産生については、基質として AA(0.1-10 micro M)を加え検討した。

C. 結果：

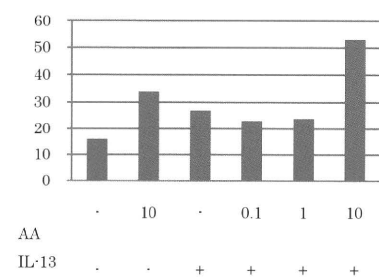
2 種の細胞における各酵素の mRNA 発現プロファイルを以下に示す。

NHEK	constitutive	Poly(IC)	IL-4	IL-13	Sub. P
5LOX	-	-	-	-	-
FLAP	-	-	-	-	-
LTA4H	+	+	+	+	+
PHS-1	+	+	+	+	+
PHS-2	+	++	+	+	+
l-PGDS	+	+	+-	+-	+
h-PGDS	-	-	-	-	-
TXA2S	-	-	-	++	+

KERTr	constitutive	Poly(IC)	IL-4	IL-13	Sub. P
5LOX	-	-	-	-	-
FLAP	-	-	-	-	-
LTA4H	+	+	+	+	+
PHS-1	+	+	+	+	+
PHS-2	+	++	+	+	+
l-PGDS	+	+	+-	+-	++
h-PGDS	-	-	-	-	-
TXA2S	+	-	+	++	+

いずれの細胞においても、LT 産生に必須である 5LOX および FLAP の恒常的発現はなかった。多くの場合誘導もされなかったが、時に何らかの条件下で発現が認められた。今回の検討では、その理由は不明であった。これに対し PG, TX 産生に関わる、PHS-1 および PHS-2 は恒常的な発現が認められた。さらに NHEK および KERTr を IL-13 とともに培養すると、TXA2S の

TXB2 (pg/ml)



発現は増強され、一方、L-PGDS の発現は抑制される傾向を認めた。定量的 PCR において IL-13 は TXA2S の mRNA 発現を 1.6 倍（有意差あり）に増加させ、Western 法にて TXA2S の蛋白発現を増強させた。TXA2 の基質 AA (10 micro M)は有意に TXB2 産生を増加させた。IL-13 単独では有意な TXB2 産生増強は認めなかったが、IL-13 は AA による TXB2 産生をさらに増強した。

D. 考察・結論：

今回の検討では、leukotoriene を産生するための key enzyme である 5LOX の発現は基本的には認められず、IL-13, substance P でも発現は誘導されなかった。しかしながら特殊な条件下、たとえばウイルス感染などにより 5LOX 発現誘導が起こる可能性があり、LTB4 産生の可能性は残るものと考えられる。Th2 サイトカイン IL-13 は TXA2S の mRNA 発現を増強した。IL-13 単独では TXA2 代謝物 TXB2 の産生は増強されなかった。基質である AA を添加することにより TXB2 産生は有意に増強し、さらに IL-13 添加により産生が増強した。これは今回の実験系では基質が不十分であることを示す。生体においては細胞外からの基質の供給が考えられること、状況においてはケラチノサイトにおける AA 産生が増強する可能性もあり、結果として IL-13 は TXA2S 合成増加を通じケラチノサイトにおける TXA2 産生を増強すると考えられる。アトピー性皮膚炎の皮膚局所では、抗原刺激により Th2 サイトカイン優位の状況が生じることが予想される。すなわち抗原刺激により生じるかゆみの一部に TXA2 が関与し、その機序に TXA2S の発現制御が含まれる可能性がある。本検討の結果はアレルギー性の皮膚炎症における TXA2 の関与を示唆すると考えられる。

L-PGDS については TXA2S と逆の反応が認められた。PGD2 はかゆみに対し抑制的に作用することが報告されている。皮膚での抗原刺激により産生される IL-13 は PGDS 発現減少を通じ PGD2 産生を減少させ、結果としてかゆみが増強する可能性がある。

このように、かゆみの原因として、皮膚ケラチノサイトをソースとする leukotoriene, thromboxane, prostaglandin が関与している可能性があり、特にかゆみ誘引物質である LTB4, TXA2 とかゆみ抑制物質である PGD2 のバランスがかゆみに関与している可能性がある。

以上の結果は、これらをターゲットにするかゆみの治療の可能性を示唆するものと考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

(論文発表)

1. 蕁麻疹・接触性皮膚炎・アトピー性皮膚炎・気管支喘息.:免疫学コア講義 南山堂 東京 pp247-258, 2005

2. Nishi N, Hamasaki Y et al. Squamous cell carcinoma-related antigen in children with acute asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 94: 391-397, 2005
3. Zaitu M, Hamasaki Y et al. Interleukin18 primes human basophilic KU812 cells for higher leukotriene synthesis. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids* 2006;74(1):61-6
4. Nishi N, Yamamoto S et al. Enhanced CCL26 production by IL-4 through IFN- γ -induced upregulation of type 1 IL-4 receptor in keratinocytes. *Biochem Biophys Research Commun.* 2008;376: 234-240
5. 蕁麻疹・接触性皮膚炎・アトピー性皮膚炎・気管支喘息. : 免疫学コア講義改訂 2 版 南山堂 東京 pp222-225 2007
6. 浜崎雄平 : 小児の食物アレルギー 今日の治療指針2008 医学書院 東京(pp1027-1029)

(学会発表)

浜崎雄平, 市丸智浩, 西奈津子, 宮崎倫子, 辻功介, 人見知洋, 在津正文, 山本修一, 室英理子, 小林育子, 稲田成安: 乳幼児のアトピー性皮膚炎(AD)の痒みに対する医師の認識と対処法についての調査 第18回日本アレルギー学会春期臨床大会 東京 2006.5.30-6.1 アレルギー55: 455, 2006

Yuhei Hamasaki : Genistein, a soybean derived isoflavonoid, inhibits leukotriene C4 synthesis in Rat Basophilic Leukemia-2H3 cells. *Asia Pacific Association and Clinical Immunology, Respiriology and Immunology* Jakarta 2006 April 21-23, (Abstract 61)

西奈津子、辻功介、宮崎倫子、人見知洋、在津正文、室英理子、稲田成安、小林育子、山本修一、市丸智浩、浜崎雄平 : KeratinocyteはCysLT1受容体を発現する。第56回日本アレルギー学会秋季学術大会 2006.11.2-11.4 (東京)

西奈津子, 辻功介, 宮崎倫子, 人見知洋, 在津正文, 室英理子, 小林育子, 稲田成安, 山本修一, 市丸智浩, 浜崎雄平, : 皮膚におけるIL-4のCysLT1受容体発現に対する効果 第19回日本アレルギー学会春期臨床大会 東京 2006.5.30-6.1 アレルギー56: 346, 2007, (横浜) 6.10-6.12

西奈津子、稲田由紀子、梁井啓輔、辻功介、宮崎倫子、人見知洋、在津正文、室英理子、稲田成安、小林育子、山本修一、市丸智浩、浜崎雄平 : 皮膚 KeratinocyteにおけるINF-gammaのIL-4受容体発現に対する効果第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 アレルギー56 : 1058 2007, (横浜) 11.1-11.3

食物アレルギー除去療法のEBMに関する研究

研究分担者 浜崎 雄平 佐賀大学小児科教授
研究協力者 市丸 智浩 佐賀県立病院好生館小児科部長
研究協力者 山本 修一 佐賀大学小児科講師

研究要旨

【研究目的】アトピー性皮膚炎の治療および発症予防に対する、食物アレルギー除去を含む食事療法のエビデンスを評価し、同療法の適正な施行を推進することである。

【方法】AD 治療における食物アレルギー除去を含む食事療法に関する文献を 2 個のデータベース「医学中央雑誌 Web」および「PubMed」において“2004 年 1 月 1 日から 2009 年 11 月 15 日までに収録された文献を対象とし検索した。

【結果】医学中央雑誌 Web 上で検索された論文 119 件はすべて症例検討または対照のない臨床研究であり、今回のエビデンスの評価の対象とはならないと考えられた。PubMed において検索された論文 167 件からタイトル、要旨から適当と思われる 31 件を抽出し、その中より RCT20 件を対象とした。これらの論文はさらにその内容から以下のように分類し検討した。①既存のアトピー性皮膚炎に対する食事療法： RCT 9 件。②アトピー性皮膚炎発症予防を目的とした食事療法： RCT 11 件。

【考察】①既存のアトピー性皮膚炎に対する食事療法：ミルクアレルギーと診断された乳児の皮膚症状に対するミルク除去、代替ミルクの有用性が示された。一方、食物アレルギーの診断のない AD 児におけるミルク除去、代替ミルクの使用は皮膚症状改善の効果がないことが示された。食物除去を行う場合、その食物に対するアレルギーの診断が必要であることを示唆している。AD の症状に対する probiotics の効果については、一定の結論を導くことはできない。成人 AD に対する DHA の効果は期待できるが今後の研究が必要である。②アトピー性皮膚炎発症予防を目的とした食事療法：アレルギー疾患発症ハイリスク児およびその母乳を与える母親における、牛乳、鶏卵を含む多数の食物の厳格な食物制限は、AD 発症を抑制する可能性は高い。probiotics の AD 発症予防効果については意見が分かれるものの、否定的な報告が多く見られた。

【結論】今回の検討において、既存の AD に対する除去食（代替食）療法の効果については多くがミルクアレルギー児を対象としたものであり、ミルクアレルギーの存在が証明された症例での有用性は認められる。probiotics の AD 治療に対する治療効果のエビデンスは、現時点では不十分である。成人 AD に対する DHA の効果は期待できる。アトピー性皮膚炎発症予防を目的とした、アレルギー疾患発症ハイリスク児に対する適切な除去食療法は推奨される。AD 発症に対する probiotics の効果は否定的である。

A. 研究目的

小児アトピー性皮膚炎（AD）は、報告によってはその罹患率が 30%以上にも及ぶ小児にとって重要な疾患であり、多くの医療資源が投入されている。小児 AD ではアレルギーの強い関与が示唆されており、特に乳児 AD の 70%に食物アレルギーを合併して

いると言われる。このように少なくとも乳児 AD における食物アレルギーの関与は明らかであるが、成人を含む幼児以上の年齢の AD における関与は明らかとは言えない。AD に対するアレルギー除去食による治療効果の評価は困難な場合が多いにもかかわらず一方では、乳児 AD の治療として経験的な

食物アレルギー除去療法が広く行われている。栄養学的な観点から小児に対する食物除去は慎重に行われるべきであり、食物アレルギー除去療法の AD 治療に対するエビデンスを十分に検討する必要があると考えられる。近年では、AD における免疫学的アンバランスの是正を目的に微生物製剤 (probitics) や様々な食品も用いられるようになったがそのエビデンスも依然不十分である。

本研究の目的は、食物アレルギー除去食療法を含む食事療法の、AD の治療および発症予防に対する効果のエビデンスを評価し、同療法の適正な施行を推進することである。

B. 研究方法

AD 治療における食物アレルギー除去食療法、または食事療法に関する文献を、和文は「医学中央雑誌 Web」、英文は「PubMed」の 2 個のデータベースについて、2004 年 1 月 1 日から 2009 年 11 月 15 日までに収録された文献を対象とした。

C. 研究結果

(医学中央雑誌 Web)

検索された論文数は 119 件でありすべて症例検討または対照のない臨床研究であった。今回のエビデンスの評価の対象とはならないと考えられた。

(PubMed)

抽出された論文は、その内容から以下のように分類し検討することが妥当であると考えられた。

1) 既存の AD に対する食事療法

検索された 116 件中、タイトル、要旨から適当と思われる 19 件を抽出した。その内 RCT 9 件を評価の対象とした。これら 9 件はさらに、①アレルギー除去の効果を検討したもの(3 件)、②probitics などの微生物製剤の効果を検討したもの(6 件)に大別された。

① 3 件中 2 件においてミルクアレルギー

を伴う AD 児における除去食の有用性が示された。一方、ミルクアレルギーの診断のない小児に対するミルク除去、アミノ酸乳の効果は示されなかった。

② AD 症状を持つ診断の確定したミルクアレルギー児に対する probiotics の効果を検討したものの内 3 件で効果なし、1 件で効果ありという結果であった。prebitics と synbitics の AD に対する効果は認められなかった。成人 AD に対する docosahexaenoic acid (DHA) は治療効果を認めた。

2) AD 発症予防を目的とした食事療法

検索された 51 件中、タイトル、要旨から適当と思われる 12 件が抽出された。このうち 11 件が RCT でありこれを評価の対象とした。これら 11 件は①アレルギー除去の効果を検討したもの(4 件)、②probitics などの微生物製剤の効果を検討したもの(7 件)に大別された。

① 4 件において、アレルギー疾患発症ハイリスク児における厳格な食物制限は AD 発症を抑制すると報告された。

② アレルギー疾患発症ハイリスクの新生児に対する probiotics、prebitics の AD 発症予防効果を検討したものが 7 件見られた。probitics を検討した 5 件では、1 件が予防効果あり、3 件で効果なし、1 件では菌種により効果を認めた。prebitics を検討した 2 件では相反する結果が報告された。

D. 考察

1) 既存の AD に対する食事療法

食物アレルギーの関与する乳児 AD の皮膚症状に対する食物アレルギー除去療法のエビデンスは、前回までの検討により、すでに確立していると考えられる。今回の検討はそれを補完するものであった。一方、食物アレルギーの診断のない AD 児におけるミルク除去、あるいはアミノ酸乳の使用は皮膚症状改善の効果がないことが示され、食物除去を行う場合、その食物に対するア

アレルギーの診断が必要であることを示唆していると考えられる。

今回の検討では、AD の症状に対する probiotics の効果については、一定の結論を導くことはできない。成人 AD に対する DHA の効果は期待できるが、いずれも今後の研究を待ちたい。

2) AD 発症予防を目的とした食事療法

アレルギー疾患発症ハイリスク児およびその母乳を与える母親における、牛乳、鶏卵を含む多数の食物の厳格な食物制限は、AD 発症を抑制する可能性は高い。しかしながら、現実にはこのように厳格な食物制限を実施するのは困難であると思われ、制限品目の削減などの検討が必要であると考えられる。

probiotics の AD 発症予防効果については意見が分かれるものの、否定的な報告が

多く見られた。prebiotics の効果についても、使用した prebiotics の違いもあり、現時点では結論を導くことはできない。

E. 結論

今回の検討において、既存の AD に対する除去食（代替食）療法の効果については多くがミルクアレルギー児を対象としたものであり、ミルクアレルギーの存在が証明された症例での有用性は認められる。probiotics の AD 治療に対する治療効果のエビデンスは、現時点では不十分である。AD 発症予防を目的とした、アレルギー疾患発症ハイリスク児に対する適切な除去食療法は推奨される。AD 発症に対する probiotics の効果は否定的である。

アトピー性皮膚炎のかゆみの解明と治療の標準化に関する研究、
EBM からみたアトピー性皮膚炎の民間療法の評価に関する研究

研究分担者 中村晃一郎（埼玉医科大学皮膚科教授）

研究協力者 滝口光次郎（埼玉医科大学皮膚科助教）

アトピー性皮膚炎(AD)では、治療中にさまざまな民間療法が行われていることが報告されているが、民間療法に関する評価は明らかではない。海外・国内における RCT 臨床研究を中心とした評価を行い、その評価について文献的に検討した。民間療法における報告の多くは症例報告、症例集積報告による臨床研究であった。RCT 臨床研究などで有効性を検討した報告は国内海外を含めて例が認められ、その内訳は 21 例であった。国内報告例の多くは対照群のない研究であった。民間療法における不適切治療の報告例は 74 例認められた。民間療法の有用性の評価に関しては、今後対照群を含めた RCT 検証が必要である。

A. 研究目的

1. アトピー性皮膚炎(AD)患者では、薬物療法やスキンケアをはじめとする標準治療が推奨される。いっぽうで経過中にその多くが民間療法を施行しているが、民間療法に関するエビデンスは明らかではない。EBMからみた民間療法の評価を行い、これまでの評価と比較する。

B. 研究方法

1. 医学中央雑誌、PubMed で RCT 臨床研究を中心とした論文の評価を行った。医学中央雑誌では、AD、代替療法、民間療法、副作用、成長障害を選択した。AD と代替療法 314 件、民間療法 37 件、副作用・治療 810 件、成長障害 54 件、温泉 113 件の民間療法が認められた。PubMed で AD と alternative therapy を検索した。JMEDICINE の文献 4,644,966 件をもとに民間療法で RCT 検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言を遵守して施行された。

C. 研究結果

1. Pub Med による報告では、シジュウム含有塗布剤、クリーム外用薬、入浴薬によるものなどが認められた。症例報告、症例集積報告による臨床研究が多く見られた。RCT 臨床研究を行った報告は国内海外を含めて 21 例であった。民間療法の臨床研究について追加検討したところ、本邦報告例では医学中央雑誌で 9 例の報告が認められ、この内訳は、外用薬、香料、厳格な食事療法、鍼治療、ドルフィン療法であった。エビデンスが低い報告例が多く認められた。民間療法においていわゆる不適切治療はこれまでの報告例と合わせて 74 例の報告となった。不適切治療の多くはステロイド外用薬使用を禁止しているものが多く、不適切治療による皮疹が悪化する症例が多く認められた。不適切治療による悪化事例に関しては、前回と同様に①ウイルス感染症（カポジ水痘様発疹症）や接触皮膚炎などの皮膚症状の合併症・悪化を生じたもの、②民間療法によって全身の機能異常を生じたもの（厳格な食事療法による栄養障害・成長不

全など)、③民間療法で使用した薬剤、あるいは混入した物質によって副作用を生じたもの(肝機能異常、腎機能異常など)が認められた。

D. 考案

1. 民間療法における有用性を RCT で評価した報告は少なく、症例報告や、コントロールを含まない報告などが多く認められた。また以前報告されたような不適切な治療方法が、多数報告された。十分な評価がなされていないものが多く、多施設などでの検索が必要である。いわゆる不適切治療に関しては現在も報告が多いため、今後も注意が必要である。

E. 結論

1. 民間療法の EBM からみた評価を確立するためには、さらに多施設での検討やコントロール・プラセボ群を含めた検討が有効であると考えられた。

また、標準治療から逸脱した不適切治療による健康被害が、現在も多く存在していることが把握された。これらの不適切治療に対しては再認識する必要があると考えられる。

参考文献

1. アトピー性皮膚炎不適切治療健康被害実態委員会：竹原和彦、飯塚一、伊藤雅章、玉置邦彦、川島眞、塩原哲夫、瀧川雅浩、ほか。アトピー性皮膚炎における不適切治療による健康被害の実態調査。日皮会誌 110：1095-1098, 2000.
2. 金子史男、中村晃一郎、古川裕利。よりよい治療のための EBM 集。10. 民間療法。編集：古江増隆。p58-61、p158-159、中山書店、2005

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 中村晃一郎. アトピー性皮膚炎のサイトカイン異常. サイトカインをターゲットとした治療の可能性. *Derma*. 169. 51-58, 2010.
- ② 中村晃一郎. 新しい分子標的薬のトピックス. 抗 IgE 抗体の話題. *Visual Dermatology*. 9(8), 848-9, 2010.
- ③ 中村晃一郎. 免疫異常からみたアトピー性皮膚炎のメカニズムと治療. *皮膚科の臨床*. 52(3), 345-50, 2010.
- ④ 中村晃一郎. アレルギー検査 TARC の読み方・検査値. 68 巻増刊号 6. 広範囲血液・尿化学検査・免疫学的検査(3), *日本臨床*. 41-45. 2010.

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

アトピー性皮膚炎患者における角層機能に関する遺伝子の解析

研究分担者 天谷雅行 慶應義塾大学医学部皮膚科学教授

研究要旨

現在までに日本人アトピー性皮膚炎(AD)患者から8種のフィラグリン(FLG)遺伝子変異が発見されている。我々は、石垣島コホート(0-6歳)でADと診断されていない594人(non-AD集団)とADと診断された127人(AD集団)合計721人に対し、すでに本班研究で行った4種のFLG遺伝子変異に加え、新たに4種のFLG遺伝子変異(R501X, S1695X, Q1701X, K4022X)の解析を行い、non-AD集団から新たに9人の変異保有者を同定した。この結果、石垣島コホートにおけるFLG変異保有者は全体で46/721人(6.4%)、non-AD集団に36/594人(6.1%)、AD集団に10/127人(7.9%:1名はS2554X/S2889X両方を有していた)となり、FLG遺伝子変異の有無とAD発症との有意な相関は認められなかった。石垣島の高温多湿な気候がFLG遺伝子変異による角層バリア機能の低下とADの発症を抑制しているのではないかと推測される。

研究協力者

海老原 全 慶應義塾大学医学部皮膚科学准教授

佐々木貴史 慶應義塾大学医学部皮膚科学

／総合医科学研究センター講師

工藤 純 慶應義塾大学医学部遺伝子医学教授

林 純 九州大学大学院感染環境医学分野教授

古江増隆 九州大学大学院医学研究院皮膚科学教授

玉利真由美 理化学研究所ゲノム医科学研究センター

チームリーダー

竹内 聡 九州大学大学院医学研究院皮膚科学助教

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(以下AD)は、かゆみを伴う湿疹病変である。現在までに欧州及びアジアのAD患者からフィラグリン(FLG)遺伝子の変異が発見されており、日本人AD患者では8種のFLG遺伝子変異が発見されている。これらの事からFLGなどの角層構成蛋白質の減少による皮膚バリア機能障害が、ADの発症の原因の一つであることが示された。今回、石垣島コホート(0-6歳)でADと診断されていない594人(non-AD集団)とADと診断された127人(AD集団)合計721人に対し、平成20年度の本班研究で行った4種のFLG遺伝子変異(3321delA, S2554X, S2889X, S3296X)に加え、4種のFLG遺伝子変異(R501X, S1695X, Q1701X, K4022X)の解析を行い、石垣島コホートにおけるFLG遺伝子変異とADの発症との相関について検討した。

B. 研究方法

日本人AD患者から同定されている8種のFLG変異のうち、3321delA, S2554X, S2889X, S3296Xの4種は、平成20年度の本班研究で解析済みである。そこで、石垣島コホート721人に対し残りの4種のFLG変異を以下の方法で解析した。

(1) S1695X:PCR 後 DNA シーケンサーにより DNA 配列同定(Q1701X と同時検出)

(2) Q1701X:PCR 後 DNA シーケンサーにより DNA 配列同定(S1695X と同時検出)

(3) K4022X: Taqman 法による変異検出

(4) R501X :Taqman 法による変異検出

(倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針及び疫学研究に関する倫理指針に従った計画書を慶應義塾大学医学部倫理委員会及び九州大学大学院医学研究院「ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査専門委員会」に提出し、承認を受けている。慶應義塾大学においては匿名化試料の解析を行った。

C. 研究結果

今年度のFLG変異解析結果を以下に示す。

R501X:non-AD 集団に 0 人(0%)、AD 集団に 0 人(0%)

S1695X:non-AD 集団に 0 人(0%)、AD 集団に 0 人(0%)

Q1701X:non-AD 集団に 1 人(0.2%)、AD 集団に 0 人(0%)

K4022X:non-AD 集団に 8 人(1.3%)、AD 集団に 0 人(0%)

平成 20 年度の解析の結果は、以下の通りであった。

3321delA:non-AD 集団に 0 人(0%)、AD 集団に 0 人(0%)

S2554X:non-AD 集団に 9 人(1.5%)、AD 集団に 6 人(4.7%)

S2889X:non-AD 集団に 16 人(2.7%)、AD 集団に 4 人(3.1%)

S3296X:non-AD 集団に 2 人(0.3%)、AD 集団に 1 人(0.8%)

今回の結果と併せると、FLG変異の保有者は全体で46/721人(6.4%)、non-AD集団に36/594人(6.1%)、AD集団に10/127人(7.9%:1名はS2554X/S2889X両方を有していた)となり、non-AD集団とAD集団の間でFLG変異の保有率に統計学的な有意差は見られなかった(Fisher exact test: $P = .174$) (表1)。

D. 考察

石垣島コホートに対し、日本人集団から同定されている FLG 遺伝子変異 8 種の解析を終了した。その結果、石垣島コホートにおいては、AD 集団(7.9%)と non-AD 集団(6.1%)の間で、FLG 変異の保有率に統計学的な有意差は見られないという結論に至った。この結果は、欧州で報告されている幼児集団を対象とした FLG 解析では、10 件すべてにおいて AD 集団と non-AD 集団における FLG 変異の保有率に有意差が見られたことが報告されていることから、全く予想外のことであった。この違いが生じた要因は様々な可能性があるが、我が国においても幼児とは限らないが、一般の AD 集団と non-AD 集団における FLG 変異の保有率に有意差が報告されていることから、欧州と日本人における遺伝的背景の違いにより AD 発症率の差が生じたとも考え難い。また、最近、日本人が SNP タイピングにより大きく Ryukyu(琉球)と Hondo(本土)クラスターの二つに分けられることが判明しており、今回の解析が、本土の AD 患者から発見された 8 種類の FLG 遺伝子変異のみに限られているため、石垣島においては、琉球クラスター独自の未知の FLG 遺伝子変異が存在する可能性もあり、石垣島コホートにおける実際の FLG 変異の保有率が多少高くなる可能性はあるが、何れにせよ FLG 変異の性質は似たようなものであり、AD 集団と non-AD 集団における FLG 変異の保有率に有意差が無いという傾向が大きく変わるとは考え難い。これらのことを考慮に入れた上で、国内外の他のコホート研究と比較した場合、石垣島コホートが他の先行研究と大きく異なる点として、石垣島の気候条件に大きな特徴があることに着目した。熱帯雨林気候区に位置する石垣島は 1 年を通じて高温多湿(温度:18.3-29.3℃、湿度:73-82%)で、皮膚バリア形成の阻害要因の一つである乾燥した環境になることがなく、FLG 変異による角層バリア能低下と AD の発症を抑制しているものと推測される。石垣島コホートでは、年毎の健診で AD と診断される率は 7-9%程度とやや低い傾向にあり、また比較的軽症例が多いことから、多因子疾患である AD においては、環境要因が AD の臨床症状に大きく影響している事が改めて想起される。この考えをさらに拡張すると、たとえ FLG 変異保有者であっても加湿やスキンケア等により、AD の発症と重症化を予防できる可能性を示唆しており、興味深い。石垣島コホートで健診時に non-AD と診断された集団については今後も AD 発症に関して追跡調査することにより、FLG 遺伝子変

異保有者における発症率の低さが、単に発症の遅延に留まるのか、その後も引き続き、発症が抑制されるのかが明らかになるであろう。さらに石垣島の成人層における AD 集団と non-AD 集団を対象とした FLG 遺伝子変異を行うことにより、環境要因の寄与がより明確になると考えられ、大変興味深い。

E. 結論

石垣島コホートにおいては、AD 集団(7.9%)と non-AD 集団(6.1%)で、FLG 変異保有率に統計学的な有意差は見られなかった。すなわち、石垣島では、たとえ FLG 変異を持っていても、少なくとも幼児期における AD の発症率には、ほとんど影響を及ぼさないということが示唆された。この要因の一つとして、石垣島の高温多湿な環境が肌の乾燥を防ぎ、このことが FLG 変異による角層バリア能低下と AD 発症を抑制していることが推測された。この結果から、FLG 遺伝子解析からも従来提唱されている AD 発症には遺伝要因と環境要因の両方が深く影響している事が示唆されると共に、加湿やスキンケア等により、AD の発症を予防できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 石垣島コホートの FLG 変異解析

Genotypes *	R501X		3321delA		S1695X		Q1701X		S2554X		S2889X		S3296X		K4022X		Combined	
	AD	non-AD	AD	non-AD	AD	non-AD	AD	non-AD	AD	non-AD	AD	non-AD	AD	non-AD	AD	non-AD	AD	non-AD
AA	127	594	127	594	127	594	127	593	121	585	123	578	126	592	127	586	117	558
Aa	0	0	0	0	0	0	0	1	6	9	4	16	1	2	0	8	9	36
aa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Total	127	594	127	594	127	594	127	594	127	594	127	594	127	594	127	594	127	594
Fisher exact test	NA		NA		NA		$P = .643$		$P = .033$		$P = .766$		$P = .441$		$P = .188$		$P = .174$	
OR** (95% CI)	NA		NA		NA		NA		3.2 (1.1-9.2)		1.2 (0.3-3.6)		2.4 (0.2-26.0)		NA		1.3 (0.6-2.7)	

* A: wild type, a: mutant

** Odds Ratio

アトピー性皮膚炎の疾患感受性遺伝子解析

研究分担者 玉利 真由美 理化学研究所ゲノム医科学研究センター チームリーダー
研究協力者 広田 朝光 理化学研究所ゲノム医科学研究センター リサーチアソシエイト

研究要旨:

本研究は遺伝子多型解析を用いてアトピー性皮膚炎関連遺伝子群を同定し、病態の科学的な解明を通してより良い予防法、治療法を確立することを目的とする。今回、我々は従来、アトピー性皮膚炎患者の血清で上昇し、皮膚病変部で発現の高いCCL22に着目し、その遺伝子多型と発症との関連を検討した。その結果、エクソン1に存在するSNP (C/A)において、2つの独立に収集した集団で強い関連を認めた($P = 8.9 \times 10^{-6}$)。リスクアレルはCCL22遺伝子の発現量に影響を与え(Gain of function)としてアトピー性皮膚炎発症に関与することが示された。

A. 研究目的

近年、ゲノム情報の基盤整備が進み、SNPsを用いた関連解析により様々な疾患において遺伝要因の解明が急速に進んでいる。本研究は症例対照関連解析の手法を用い、アトピー性皮膚炎の病態に関連のある遺伝子群を同定し、痒みとアレルギー炎症の機序を科学的に解明し、新しい治療法の開発へ向けてエビデンスを提示していくことを目的とする。CCL22 (MDC)はTh2型のサイトカインであり、近年アトピー性皮膚炎患者の血清中のCCL22レベルが上昇していること、皮膚炎局所にてCCL22の発現が亢進していることが報告されている。また、アトピー性皮膚炎局所にてCCL22受容体であるCCR4を発現したTh2細胞が多く浸潤していることも明らかとなっている。我々はCCL22を疾患候補遺伝子と考え、遺伝子多型を用い関連解析を行なった。

B. 研究方法

第1集団としてアトピー性皮膚炎患者919名(昨年度561名、当班研究にて収集したサンプル358名が本年度追加された)、非アトピー性皮膚炎患者1032名について検討を行なった。さらに独立に収集した第2集団(アトピー性皮膚炎患者1034名、非アトピー性皮膚炎患者1004名)について関連の検証(replication study)を行なった。遺伝子型タイピングは、日本人集団のHapMap databaseより抽出したCCL22遺伝子のTag SNPを対象にTaqMan法を用いて実施した。有意な関連を示したSNPについては周辺の連鎖不平衡の強いSNPsの関連解析を行い、最も関連の強いSNPを同定し、機能解析を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行い、当該実施機関の倫理委員会の承認を受けたうえで研究を行っている。

C. 研究結果

CCL22遺伝子領域よりHaploviewを用いて7個のTag SNPsを選出した。このうち第1集団において2つのSNPsとアトピー性皮膚炎発症との間に有意な関連を認めた

め、第2集団において関連の検証を行なったところ、エクソン1に存在するSNP (C/A)で、第2集団においても強い関連を認めた($P = 8.9 \times 10^{-6}$, Mantel-Haenszel検定)。リスクアレルはMajor alleleであり、関連の方向性も2つの集団で一致していた。日本人EB virus不活化B細胞、合計21株を用いて、アレル特異的mRNA定量解析(Alele-specific transcript quantification; ASTQ)を行なったところ、リスクアレルで発現増加の傾向($P = 6.3 \times 10^{-6}$, Mann-Whitney's U test)を認めた。また、このSNPと完全連鎖不平衡にあるintron 2にある遺伝子多型+3970G/Aについて、Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSAを行なったところ、リスクアレルにおいて核タンパクとより強い結合を認めた。

D. 考察

CCL22の遺伝子多型がアトピー性皮膚炎の発症しやすさに関連することを見いだした。CCL22はTh2 type chemokineであり、マクロファージ、樹状細胞、リンパ球、ケラチノサイトにて産生されることが知られている。近年、IgEが大量に存在すると好塩基球が活性化し、特異抗原が無くてもCCL22が分泌されることも報告されている。アトピー性皮膚炎(特に重症例)では高IgE血症を示す症例が多く、この遺伝子多型を通じてCCL22の過剰産生が生じ、Th2炎症の増強につながる可能性が考えられた。

E. 結論

アトピー性皮膚炎感受性に関連するCCL22の遺伝子多型を同定した。この関連は独立に収集された2つのサンプル集団において検証された。アレル特異的発現解析により、リスクアレルはCCL22遺伝子の発現量に影響を与え(Gain of function)、アトピー性皮膚炎発症に関与する可能性が示唆された。

これら一連の解析について、現在、投稿準備中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sakashita M, Hirota T, Harada M, Nakamichia R, Tsunoda T, Osawa Y, Kojima A, Okamoto M, Suzuki D, Kubo S, Imoto Y, Nakamura Y, Tamari M, Fujieda S. Prevalence of Allergic Rhinitis and Sensitization to Common Aeroallergens in a Japanese Population *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;151(3):255-261

Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Suzuki Y, Shimojo N, Kohno Y, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Nakamura Y, Tamari M. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Oct 124(4):779-85.

Harada M, Obara K, Hirota T, Yoshimoto T, Hitomi Y, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Fukutomi Y, Nakanishi K, Nakamura Y, Tamari M. A functional polymorphism in IL-18 is associated with severity of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Dec 1;180(11):1048-55.

Isada A, Konno S, Hizawa N, Tamari M, Hirota T, Harada M, Maeda Y, Hattori T, Takahashi A, Nishimura M. A functional polymorphism (-603A --> G) in the tissue factor gene promoter is associated with adult-onset asthma. *J Hum Genet.* 2010 Mar;55(3):167-74..

Imoto Y, Enomoto H, Fujieda S, Okamoto M, Sakashita M, Susuki D, Okada M, Hirota T, Tamari M, Ebe K, Arinami T, Noguchi E. S2554X mutation in the filaggrin gene is associated with allergen sensitization in the Japanese population. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2):498-500.

Undarmaa S, Mashimo Y, Hattori S, Shimojo N, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Kohno Y, Okamoto Y, Hirota T, Tamari M, Hata A, Suzuki Y. Replication of genetic association studies in asthma and related phenotypes. *J Hum Genet.* 2010 Jun;55(6):342-9.

Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, Miyagawa T, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Suzuki Y, Yoshihara S, Adachi M, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakajima T,

Mathias RA, Rafaels N, Barnes KC, Himes BE, Duan QL, Tantisira KG, Weiss ST, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. TSLP promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010 in press.

日本語総説

原田通成、広田朝光、人見祐基、玉利真由美 遺伝子多型とアレルギー疾患 アレルギーの臨床 30:164-167, 2010

玉利 真由美、広田 朝光 基礎医学とのダイアログ、SNP解析を用いた稀少疾患の解明 THE LUNG perspectives 18:164-168, 2010

玉利 真由美、広田 朝光 Topic/Science、慢性好酸球性肺炎の病態研究の現況 ヒューマンサイエンス誌 31:18-21, 2010

玉利 真由美、広田 朝光 呼吸器疾患感受性-遺伝的背景- 気管支喘息、日本胸部臨床 69:687-694, 2010

広田 朝光、富田かおり、玉利 真由美 特集:アレルギー疾患に対するオーダーメイド医療、I. アレルギー疾患の遺伝子と遺伝学、アレルギー・免疫 17:1652-1660, 2010

玉利 真由美、富田かおり、広田 朝光 III. 診断の進歩、ゲノムワイド関連解析と呼吸器多因子疾患、Annual Review 呼吸器 2011 140-146

広田 朝光、富田かおり、玉利 真由美 特集:小児アレルギー疾患の治療・管理の新しい展開、I. 基礎研究の進歩 2.アレルギー疾患と遺伝子多型、小児科臨床 第63:2409-2415, 2010

2. 学会発表

口頭発表

愛媛県ENT臨床セミナー 2010年1月松山全日空ホテル 特別講演 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析 玉利真由美、広田朝光

第42回北陸呼吸器シンポジウム(FITs) 2010年2月 金沢都ホテル

特別講演 遺伝子解析を用いた気管支喘息およびCOPDの病態の解明 玉利真由美、広田朝光

第28回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2010年2月 福井AOSSA

ランチョンセミナーI アレルギー疾患と遺伝子 遺伝子多型と機能解析 玉利真由美、広田朝光

第1回 新都心呼吸器セミナー 2010年4月 新宿ハイア
ットリージェンシー
アレルギー疾患の病態解析 遺伝子解析を中心に 玉
利真由美、広田朝光

第62回 関西耳鼻咽喉科アレルギー研究会 2010年4
月 大阪薬業年金会館
アレルギー疾患の環境と遺伝のトピックス 玉利真由美、
広田朝光

第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 2010年5月
国立京都国際会館
シンポジウム「アレルギー疾患のオーダーメイド治療」
研究者からの発信 玉利真由美、広田朝光

第20回 日本耳科学会総会 学術講演会 2010年10月
松山 ひめぎんホール
ランチョンセミナー 遺伝子多型を用いたアレルギー疾
患の病態解析 玉利真由美、広田朝光、富田かおり

日本人類遺伝学会第55回大会 2010年10月 大宮ソニ
ックシティー

一般演題(口演)4 関連解析・多因子遺伝1(小児疾患)
・「小児期発症喘息患者の重症度と呼吸機能に関連す
る遺伝子多型」竹内和秀、真下陽一、服部聡、下條直
樹、富坂美奈子、有馬孝恭、森田慶紀、広田朝光、佐
藤一樹、鈴木修一、西牟田敏之、渡辺博子、星岡明、
山出晶子、渡邊美砂、土居悟、宮武明彦、玉利真由美、
羽田明、鈴木洋一
・「CCL22遺伝子多型とアトピー性皮膚炎の関連解析」
広田朝光、玉利真由美、佐伯秀久、常深祐一郎、中村
祐輔、鎌谷直之

第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11
月 東京国際フォーラム

(1)シンポジウム11 食物アレルギーをめぐる新たな進展
・「食物アレルギーの遺伝子多型解析」玉利真由美、広
田朝光、富田かおり

(2)ミニワークショップMW3 サイトカイン・ケモカイン
・MW3-5「小児期発症喘息患者の重症度と呼吸機能に
関連する遺伝子多型」竹内和秀、真下陽一、服部聡、

下條直樹、富坂美奈子、有馬孝恭、森田慶紀、広田朝
光、佐藤一樹、鈴木修一、西牟田敏之、渡辺博子、星
岡明、山出晶子、渡邊美砂、土居悟、宮武明彦、玉利
真由美、羽田明、鈴木洋一

(3)ミニワークショップMW6 アトピー性皮膚炎 up date
・MW6-3「CCL22遺伝子多型とアトピー性皮膚炎の関連
解析」広田朝光、佐伯秀久、玉利真由美

(4)一般演題 「気管支喘息患者のIL-13遺伝子多型と
気道リモデリング関連分子」中村豊、長島広相、佐藤
温子、佐々木信人、似内郊雄、中舘俊英、小林仁、宮
本孝行、菅野祐幸、澤井高志、出原賢治、玉利真由美、
広田朝光、井上洋西、山内広平

(5)一般演題 「小児気管支喘息関連領域17q21のSNPs
とアレルギー性鼻炎との関連解析」坂下雅文、広田朝
光、富田かおり、扇和弘、伊藤有未、岡本昌之、大澤陽
子、山田武千代、玉利真由美、藤枝重治

(6)一般演題 「健常成人の呼吸機能におけるTSLP遺伝
子多型の検討」増子裕典、金子美子、飯島弘晃、内藤
隆志、坂本透、広田朝光、玉利真由美、檜澤伸之

(7)一般演題 「血清総IgE値、吸入抗原特異的IgE抗体
(MAST)を用いた感作パターンの解析」飯島弘晃、増子
裕典、金子美子、坂本透、内藤隆志、広田朝光、玉利
真由美、檜澤伸之

第40回日本皮膚アレルギー・接触性皮膚炎学会総会・
学術大会 2010年12月 広島国際会議場
2010/12/11

シンポジウム3 皮膚アレルギー学の未来
アレルギー疾患の遺伝子多型解析の現況 玉利真由
美、広田朝光、富田かおり

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

アトピー性皮膚炎の痒みと炎症の機序の解明と新しい治療法の開発の模索

研究分担者 野口恵美子 筑波大学

研究要旨

本研究室でアトピー性皮膚炎(以下AD)の疾患感受性遺伝子として同定されたSMAD3がどのようにADの発症に関与しているかについてはマウスモデルを含めた詳細な解析が必要となる。ヒトサンプルにおける解析ではSMAD3の発症が低下することによりAD発症に抵抗性を持つことが推察されている。Smad3のノックアウトマウスのバックグラウンドはC57BL/6であり、もともとAD抵抗性をもつため、よりADに対する易罹患性をもつNc/Ngaにバックグラウンドを変更する必要がある。そこで本研究ではSmad3ノックアウトマウス解析の前段階として、C57BL/6系統をNc/Ngaにバックグラウンドを変更するためのスピードコンジェニック法を確立した。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(以下AD)の罹患率は5-10%であり、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。分担研究者らが家系解析によりADの疾患感受性遺伝子として同定したSMAD3(Enomoto et al., BMC Dermatol, 2007, Otsuka et al., J Dermatol Sci 2009)がどのようにADの発症に関与しているかについてはマウスモデルを含めた詳細な解析が必要となる。ヒトサンプルにおける解析ではSMAD3の発症が低下することによりAD発症に抵抗性を持つことが推察されている。SMAD3のノックアウトマウスのバックグラウンドはC57BL/6であり、もともとAD抵抗性をもつため、よりADに対する易罹患性をもつNc/Ngaにバックグラウンドを変更する必要がある。バックグラウンド変更には通常10世代2-3年が必要となるが、マーカーによって選抜するスピードコンジェニック法により5世代でバックグラウンドの変更が可能となる。Nc/Nga系統のスピードコンジェニックについては現在までに確立されておらず、新たにマイクロサテライトマーカーの選定とバリデーションが必要となる。

そこで本研究ではSMAD3ノックアウトマウス解析の前段階として、C57BL/6系統をNc/Ngaにバックグラウンドを変更するためのスピードコンジェニック法の確立を目的とする。

B. 研究方法

マウス全染色体をカバーし、C57BL/6とNC/Ngaにおいてアレルの差があるマイクロサテライトマーカーを設定する。データベースは Mouse Microsatellite Data Base of

Japan

(<http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/mmdbj/top.jsp>) を使用する。各ローカスについてPCR法により増幅をおこない、PCR プロダクトのサイズの差により C57BL/6 と NC/Nga 系統の区別が可能かについて判定した。

(倫理面への配慮)

マウス研究については筑波大学動物実験センターの承認を得て、動物実験の適正な実施に向けたガイドラインに沿って行った。

C. 研究結果

第三世代のSmad3ノックアウトアレルヘテロ接合体の雄11匹において、Nc/Ngaバックグラウンドに置き換わっている割合としては80-90%であった。予想より置き換わる頻度が低い理由としては、第二世代における選抜時に今回使用したマイクロサテライトマーカーの四分の一がPCR条件設定が困難であったためタイピングできなかったこと、選抜した3マウスのうち1マウスのみがNc/Nga雌マウスを妊娠させることが可能であったことにより十分な選抜ができなかったことも一つの原因と考えられる。現在、89%のゲノムが置き換わった雄マウスを使用して第4世代のマウスの作出を行っている。

D. 考察

ノックアウトマウスの解析は近年の疾患病態解明において重要な役割を果たしているが、しばしばバックグラウンドの変更が必要となる。通常のバッククロスでは10世代

3-5年の期間が必要となるが、5世代以内の戻し交配だけで10世代分の戻し交配に相当するスピードコンジェニック系統の作製が注目されている。Nc/Ngaマウスはアトピー性皮膚炎のモデルマウスとして有用であるが、スピードコンジェニックのためのマイクロサテライトマーカーについての情報はほとんどない。SMAD3は近年行われた1万人規模のヨーロッパ集団の喘息全ゲノム関連解析においても疾患感受性遺伝子として同定されており(Moffatt et al, NEJM, 2010)、アトピー性疾患共通の疾患感受性遺伝子である可能性もあり、その分子病態の解明が必要である。今回設定されたスピードコンジェニック用のマイクロサテライトマーカーを用いて近日中にNC/Nga バックグラウンドのSmad3ノックアウトマウスによるアトピー性皮膚炎モデルマウス研究を行う予定である。

F. 結論

C57BL/6系統をNc/Ngaにバックグラウンドを変更するためのスピードコンジェニック法を確立した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Matsumoto Y, Noguchi E, Imoto Y, Nanatsue K, Takeshita K, Shibasaki M, Arinami T, Fujieda S. Upregulation of IL17RB during natural allergen exposure in patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergol Int* 2010.
2. Makino Y, Noguchi E, Takahashi N, Matsumoto Y, Kubo S, Yamada T, Imoto Y, Ito Y, Osawa Y, Shibasaki M, Uchida K, Meno K, Suzuki H, Okubo K, Arinami T, Fujieda S. Apolipoprotein A-IV is a candidate target molecule for the treatment of seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010.
3. Imoto Y, Enomoto H, Fujieda S, Okamoto M, Sakashita M, Susuki D, Okada M, Hirota T, Tamari M, Ebe K, Arinami T, Noguchi E. S2554X mutation in the filaggrin gene is associated with allergen sensitization in the Japanese population. *J Allergy Clin Immunol*

2010;125(2):498-500 e2.

4. Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, Miyagawa T, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Suzuki Y, Yoshihara S, Adachi M, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakajima T, Mathias RA, Rafaels N, Barnes KC, Himes BE, Duan QL, Tantisira KG, Weiss ST, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. TSLP Promoter Polymorphisms are Associated with Susceptibility to Bronchial Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010.

学会発表

1. Emiko Noguchi: Proteomics and Transcriptome in Allergic diseases 第60回日本アレルギー学会 シンポジウム2 11月 東京 2010.
2. Emiko Noguchi: Genome wide association study for pediatric asthma in Asian population 第60回日本アレルギー学会 シンポジウム3 11月 東京 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

アトピー性皮膚炎のかゆみの解明と治療の標準化に関する研究

研究分担者 古庄憲浩 九州大学大学院感染環境医学 准教授

研究要旨

アトピー性皮膚炎の有病率は上昇しており、現在、社会問題化している。一般住民において、アトピー性皮膚炎の調査を行い、遺伝子アトピー疾患関連遺伝子の解明を進めるべくこのコホート群における遺伝子解析を行うため、血液サンプルの採取を行った。沖縄県石垣市一般住民3892例（男性1590例、女性2302例）の協力を得て、遺伝子検体採取と問診によりアレルギー性疾患（アトピー性皮膚炎、気管支喘息、薬剤性皮膚炎、花粉症など）保有者 117例と非保有者3775例を判別できた。非アレルギー性疾患3775例は、20才から96才までの集団であり、アトピー性皮膚炎患者と性・年齢などをマッチさせて抽出し、遺伝子解析を行う必要がある。今後、さらに解析を行い、アトピー関連遺伝子の探索を行う。

研究協力者:

林 純 九州大学大学院感染環境医学
 澤山泰典 九州大学病院 総合診療科
 村田昌之 九州大学病院 総合診療科
 貝沼茂三郎 九州大学大学院 感染環境医学
 岡田享子 九州大学病院 総合診療科
 谷合啓明 九州大学病院 総合診療科
 大西八郎 九州大学大学院 感染環境医学
 海野麻美 九州大学大学院 感染環境医学
 永楽訓三 九州大学大学院 感染環境医学
 居原 毅 九州大学大学院 感染環境医学
 池崎裕昭 九州大学大学院 感染環境医学
 林 武生 九州大学大学院 感染環境医学

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(AD)の有病率は上昇しており、現在、社会問題化している。本疾患の解明は未だ進んでおらず、分子生物学的アプローチを含めた、幅広い視点に立った病因の解明と新規治療薬の開発が切望されている。より正確な候補遺伝子の探索のためには、ある地域に生活する集団を全体として解析するコホート解析を用いる必要がある。

我々はこれまでに、平成 13 年度から沖縄県石垣市の乳幼児の集団検診と採血による血液データの解析を開始しているが、初年度は 0-6 歳 (平均 3.1 歳) の乳幼児 565 例の AD の頻度と採血による IgE 値を測定し、種々のアンケートを行ってきた。この検診は毎年継続されており、石垣市の乳幼児コホートの前向き調査を可能としている。平成 15-16 年にかけては AD の重症度マーカー、TARC の血清値がアトピー患児での発症、持続、消退などの自然経過と強く関連することを見いだした。さらにアトピー疾患関連遺伝子の解明を進めるべくこのコホート群における遺伝子解析を行うため、血液サンプルの採取を行っている。

最近、日本人が SNP タイピングにより大きく Ryukyu

(琉球)-と Hondo (本土) クラスターの 2 つに分けられることが判明した。従って、石垣島のコホート群における追跡調査、血液検査、遺伝子研究などで得られた成果が日本人に広く応用可能であるかどうかについては、同様の採血検査、遺伝子調査を本邦の他地域においても実施し、妥当性・有意性を検証する必要がある。これまでに得られている石垣島のサンプルに加え、Hondo クラスターの健常対照群として、これまで解析していた福岡市糟屋郡などで得られる非 AD、非喘息 (現症、既往除く) の健常対象者からの血液サンプル 1000 人分の採取をめざす。

今年度の研究テーマについては下記の通りである。近年、AD と様々な慢性感染症の関連が報告されているが、ヘリコバクター・ピロリ (HP) 感染もその一つである。同感染が AD に関わるという報告と関わらないという報告もあり、結論はでていない。今回、沖縄県石垣市保育園児において、AD と HP 感染との関連について調査した。

B. 研究方法

九州大学病院総合診療科(感染環境医学)、同皮膚科、慶応義塾大学病院皮膚科、東京大学にて AD 患者、健常者各 1000 人を目標に血液検体、アンケート調査票、ゲノムタイピングの結果を用いて解析する。2009 年 6 月から同年 8 月の沖縄県石垣市の住民健診において遺伝子研究への参加を募り、同意を得ることができた一般住民の血液遺伝子採取と問診によるアレルギー性疾患調査を行った。

今回の沖縄県石垣市保育園児において、AD と HP 感染との関連についての調査対象は、2003 年から 2009 年同市内の保育園児 2329 例(男児 1239 例、女児 1090 例、1-6 歳、中央値 3 歳)において、皮膚科専門医が診察にて AD 診断を行い、血清 HP 抗体(ELISA 法)、血清 IgE 値を測定した。

(倫理面への配慮)

すでに九州大学病院倫理委員会の審査許可を得ている (承認番号162番)。

C. 研究結果

AD 児は 254 例、10.9%で、そのうち男児は 127 例、女児は 127 例で、AD に性差は認められなかった。HP 抗体陽性率は、107 例、4.6%で、そのうち男児は 63 例、女児は 44 例で性差を認めなかった。AD 児における HP 抗体陽性率 3.5% (9 例)は、非 AD 児における 4.7% (98 例)と比べ有意差を認めなかった。AD 児の平均血清 IgE 値 889.8 IU/mL は、非 AD 児の 81.2 IU/mL と比べ有意に高値であった。HP 抗体陽性児の平均血清 IgE 値 192.1 IU/mL は、HP 抗体陰性児の 168.3 IU/mL と比べ有意差を認めなかった。AD 児における、HP 抗体陽性児の血清 IgE 値 913.0 IU/mL は HP 抗体陰性児の 889.0 IU/mL と比べ有意差を認めず、同様に、非 AD 児における HP 抗体陽性児の IgE 値 125.9 IU/mL は HP 抗体陰性児の 78.9 IU/mL と比べ有意差を認めなかった。

D. 考察

HP 感染の頻度が多い本邦において、乳幼児を対象とした大規模な疫学調査を行うことにより、今まで不明確であった、AD と HP 感染の関連がないことを確認することができ、臨床的に意義のある研究である。

E. 結論

大規模疫学調査において、1-6歳でのHP感染とADの関連は認めなかった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashida S, **Furusyo N**, Uchi H, Miyazaki S, Eiraku K, Gondo C, Tsuji G, Hachisuka J, Fukagawa S, Kido M, Nakahara T, Moroi Y, Hayashi J, Hagihara A, Furue M. Are lifetime prevalence of impetigo, molluscum and herpes infection really increased in children having atopic dermatitis? J Dermatol Sci. 2010; 60: 173-178.
- 2) Kainuma M, **Furusyo N**, Kajiwaru E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Shimono J, Shimoda S, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study Group. Pegylated interferon 2b plus ribavirin for older patients with chronic hepatitis C. World J Gastroenterol. 2010; 16 : 4400-4409.
- 3) Hayashi J, Murata M, **Furusyo N**, Hoshina T,

Shimono N. Measures taken by a university hospital for the prevention and control of the 2009 H1N1 influenza. Nippon Rinsho. 2010; 68: 1707-1712.

- 4) Hayashi J, **Furusyo N**. Epidemiological and clinical study for hepatitis C virus infection. Fukuoka Igaku Zasshi. 2010; 101: 46-52.
- 5) Ohnishi H, Sawayama Y, **Furusyo N**, Maeda S, Tokunaga S, Hayashi J. Risk factors for and the prevalence of peripheral arterial disease and its relationship to carotid atherosclerosis: the Kyushu and Okinawa Population Study (KOPS). J Atheroscler Thromb. 2010 30; 17: 751-758.
- 6) Ogawa E, **Furusyo N**, Toyoda K, Taniyai H, Otaguro S, Kainuma M, Murata M, Sawayama Y, Hayashi J. Excellent superiority and specificity of COBAS TaqMan HCV assay in an early viral kinetic change during pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin treatment. BMC Gastroenterol. 2010; 10: 38.

2. 学会発表

- 1) 豊田一弘、**古庄憲浩**、村田昌之、武岡宏明、大西八郎、澤山泰典、林 純. 沖縄県石垣市一般住民におけるヘリコバクター・ピロリ感染の血清ペプシノゲンと上部消化器官病変の検討 第1回日本病院総合診療医学会学術総会 福岡 2010年2月
- 2) 大西八郎、澤山泰典、**古庄憲浩**、前田晋至、林 純. 末梢動脈閉塞症の危険因子と有病率および頸動脈硬化症との関連:九州・沖縄疫学研究(KOPS) 第1回日本病院総合診療医学会学術総会 福岡 2010年2月
- 3) 澤山泰典、大西八郎、古賀恒久、**古庄憲浩**、林 純. エゼチミブは高コレステロール血症だけでなく、食後高脂血症も改善する 第107回日本内科学会講演会 東京 2010年4月
- 4) 居原 毅、**古庄憲浩**、古賀恒久、大西八郎、迎はる、海野麻美、永樂訓三、貝沼茂三郎、村田昌之、澤山泰典、林純. 沖縄県石垣市一般検診におけるパルボウイルスB19感染症の疫学調査 第84回日本感染症学会総会 京都 2010年4月
- 5) 澤山泰典、大西八郎、古賀恒久、**古庄憲浩**. 睡眠時無呼吸症候群と Helicobacter pylori 感染との関連 第84回日本感染症学会総会 京都 2010年4月
- 6) **古庄憲浩**、林 純. 一般住民検診における生活習慣病の現状 福岡市内科医会学術講演会 福岡 2010年5月
- 7) Okada K, **Furusyo N**, Sawayama Y, Kanamoto Y, Murata M, Hayashi J. Prevalence and risk factors for diabetes: A ten-year follow-up study of the Yaeyama district of Okinawa 78th European atherosclerosis

- society congress, Hamburg, Germany. 2010 年 6 月
- 8) Sawayama Y, **Furusyo N**, Hayashi J. The Effectiveness of Ezetimibe plus Pravastatin for Hypercholesteromic Patients with Postprandial hyperlipidemia 78th European atherosclerosis society congress, Hamburg, Germany. 2010 年 6 月
- 9) Okada K, **Furusyo N**, Sawayama Y, Murata M, Kainuma M, Hayashi J. A hypertriglyceridemic state increases the high-sensitivity C-reactive protein of men with normal glucose tolerance 第 42 回日本動脈硬化学会総会. 2010 年 7 月
- 10) Unno M, **Furusyo N**, Ihara T, Koga T, Ohnishi H, Sawayama Y, Hayashi J. An association of visceral fat area by bioelectrical impedance analysis (BIA) with metabolic syndrome(MetS) :Kyushu and Okinawa Population Study (KOPS) 第 42 回日本動脈硬化学会総会 2010 年 7 月
- 11) Eiraku K, **Furusyo N**, Ihara T, Ikezaki H, Mukae H, Hayashi T, Koga T, Toyoda K, Murata M, Hayashi J. Chronic infection of Helicobacter pylori among pre-school age children: AProject of the Kyushu and Okinawa Population Study (KOPS) 第 48 回米国感染症学会 IDSA カナダ バンクーバー 2010 年 10 月
- 12) **古庄憲浩**、永樂順三、豊田一弘、小川栄一、池崎裕昭、居原毅、林 武生、貝沼茂三郎、村田昌之、林 純. C 型慢性肝炎(CH-C)におけるヘリコバクター・ピロリ(HP)感染と除菌療法の功績 第 80 回日本感染症学会西日本地方会学術集会 松山市 2010 年 11 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。