

気管支喘息におけるエオタキシンプロモーターおよびエオタキシン受容体の遺伝子多型

●平井 浩一¹⁾ ◆山口 正男²⁾

1) 東京大学大学院医学系研究科 2) 東京大学医学部附属病院

研究の目的と進め方

気管支喘息における好酸球集積には、ケモカイン受容体である CCR3 が関わっており、その特異的リガンドであるエオタキシンは強力な好酸球遊走活性を持っている。また、気管支喘息の炎症局所に集積するリンパ球は Th2 phenotype であるが、TARC, MDC をリガンドとする CCR4 は Th2 に選択的に発現されていることが示されている。

エオタキシン / CCR3 また TARC, MDC / CCR4 遺伝子の「発現解析」は多くの科学的成果を提供し続けているが、「構造解析」すなわちこれら遺伝子の変異解析が十分になされ、かつ変異の有無が「気管支喘息」という表現型に病的影響を与えているか否かについては、いまだ十分な検討はなされていない。我々はこれらの遺伝子構造を遺伝子多型を中心に健康人/喘息患者間で比較検討し、更に機能解析、統計学的解析を通じて両群間での遺伝子構造上の差異が疾患関連性を生ずるかを追求し、これら分子の遺伝子が喘息の発症、増悪に関わる原因遺伝子の一つであることを明らかにする。

2001 年度の研究の当初計画

① genotyping と機能解析

TARC, MDC, CCR4 遺伝子の蛋白翻訳領域の多型解析を完了させる。多型の存在が確認し塩基配列を決定し、変異の存在を確認する。その場合、リコンビナント突然変異体を作製し、機能の解析を行う。

TARC, MDC 遺伝子のプロモーター領域について多型の有無を検討する。変異の存在が確認された場合は、遺伝子工学的手法を用いて変異プロモーターを細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイにて転写制御を検討する。

変異を健康人/喘息患者間で比較検討し、統計学的解析を通じて疾患関連性を有するかを検討する。

② gDNA 収集と phenotyping

健康人、気管支喘息患者の genomic DNA 収集を継続する。

以上については東京大学医学系研究科・医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認済み (No. 442) である。

2001 年度の成果

① eotaxin 遺伝子の蛋白翻訳領域に、A23T, S4S の 2 多型、プロモーター領域に -426C > T, -384A > G の 2 SNP を見出し、初めて報告した。しかしながら、健康人 60 例/喘息患者 72 例間で有意な相関は認めなかった (Genes and Immunity 2 : 461, 2001)。

② TARC, MDC, CCR4 遺伝子については健康人 16 例、喘息患者 16 例の解析を完了した。これらの蛋白翻訳領域に新たな 3' 領域に多型は認めなかったが、TARC のプロモーター領域に 1SNP (-431C > T), 2variation (2134

C > T, 2034G > A) を初めて見出した。現在までの検討では、TARC SNP である (-431 C > T) については喘息との関連は見出せなかった ($\chi^2=0.240, p=0.625$) が、アトピー性皮膚炎では、解析症例数は少ないが、相関を認めている。

③ MDC のプロモーター領域に、既報の 2 カ所の SNP (JSNP: 既登録) を確認するとともに、新規の SNP (-357C > T) を見出した。

④ 新たにエオタキシン-2, エオタキシン-3, I-309, CCR8 の解析を開始した。

国内外での成果の位置づけ

ケモカイン、ケモカイン受容体の多型解析はアレルギー疾患ではあまり行われていなかったが、徐々に報告が認められるようになってきている。単一遺伝子の異常のみでは common disease である喘息の発症は規定できないと考えているが、ケモカイン、ケモカイン受容体の多型を多変量解析することで喘息の発症リスクについて、ある程度の予測がつくのではないかと考えている。

達成できなかったこと、予想外の困難、その理由

01 年 4 月の三省庁の通達後、再審査が必要となり gDNA の収集に一時的な遅滞が生じたが、それ以外は予定通りに進行している。

今後の課題

エオタキシン-1, -2, -3, TARC, MDC, I-309, CCR3, CCR4, CCR8 は喘息の病態に重要な働きをしている。これらすべての解析を行い、多数試料について多変量解析を行う。

成果公表リスト

1. Fukagawa, K., N. Okada, H. Fujishima, T. Nakajima, K. Tsubota, Y. Takano, H. Kawasaki, H. Saito, and K. Hirai. 2002. CC-chemokine receptor 3 : a possible target in treatment of allergy-related corneal ulcer. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43 : 58-62.
2. Terada, N., N. Hamano, W. J. Kim, K. Hirai, T. Nakajima, H. Yamada, H. Kawasaki, T. Yamashita, H. Kishi, T. Nomura, T. Numata, O. Yoshie, and A. Konno. 2001. The kinetics of allergen-induced eotaxin level in nasal lavage fluid. Its key role in eosinophil recruitment in nasal mucosa. Am J Respir Crit Care Med 164 : 575-579.
3. Nagase, H., K. Kudo, S. Izumi, K. Ohta, N. Kobayashi, M. Yamaguchi, K. Matsushima, Y. Morita, K. Yamamoto, and K. Hirai. 2001. Chemokine receptor expression profile of eosinophils at inflamed tissue sites : decreased CCR3 and increased CXCR4 expression by lung eosinophils. J. Allergy Clin. Immunol. 108 : 563-569.
4. Miyamasu, M., T. Sekiya, K. Ohta, C. Ra, O. Yoshie, K. Yamamoto, N. Tsuchiya, K. Tokunaga, and K. Hirai. 2001. Variations in human CC chemokine eotaxin gene. Genes and Immunity 2 : 461-463.
5. Iikura, M., M. Miyamasu, M. Yamaguchi, H. Kawasaki, K. Matsushima, M. Kitaura, Y. Morita, O. Yoshie, K. Yamamoto, and K. Hirai. 2001. Chemokine receptors in human basophils : inducible expression of functional CXCR4. J Leukoc Biol 70 : 113-120.