

- 3 小児気管支ぜん息の発症・変動因子に関する研究

代表者：眞弓光文

1 研究従事者

- 眞弓光文（福井医科大学小児科） 山口悦郎（北海道大学大学院医学研究科呼吸器病態内科学）
- 近藤直実（岐阜大学医学部小児科） 田中敏郎（大阪大学大学院医学研究科分子病態内科学）
- 鈴木定彦（大阪府立公衆衛生研究所） 南部光彦（天理よろず相談所病院小児科）
- 平岡政弘（福井医科大学小児科） 大嶋勇成（福井医科大学小児科）

2 平成 13 年度の研究目的

近年、世界各国で有症率が増加している気管支ぜん息に対しては、患者に対する効果的な治療法の開発が重要であると共に、より根本的な対策として、気管支ぜん息の発症を予防することにより患者数を減少させることが強く求められている。

気管支ぜん息は発症しやすい遺伝的素因を有する人が一定の環境下に置かれたときに発症しやすいと考えられる。我が国における小児気管支ぜん息有症率の増加は、日本人集団の遺伝因子が変化するには不十分な短期間で起きていることから、環境要因の関与が主であると考えられ、環境要因に対する対策により気管支ぜん息の発症をかなり予防できることが期待される。しかしながら、気管支ぜん息が豊かで快適な社会の到来に一致して増加してきたことを考えると、気管支ぜん息の発症予防のための環境要因対策とは、この豊かで快適な生活を一部であれ放棄する必要性があるとも考えられる。したがって、気管支ぜん息の発症を予防するための対策は小児全体に対して一律に行うのではなく、気管支ぜん息の発症を規定する個々人の遺伝的素因の強弱に応じて行われるほうがより効率的である。

一方、気管支ぜん息の発症や病態に係る遺伝因子として、これまでに多くの遺伝子多型が世界各国の研究者から報告されている。これらの遺伝子多型はいずれも気管支ぜん息の発症や病態形成に有意な影響を与えることが明らかにされたが、気管支ぜん息の発症を高い精度で予知するという観点からは未だ不十分である。また、外国で報告された遺伝子多型をそのまま日本人に適用できるかどうかに対しても疑問が多い。

このような認識の下に、本研究は、日本における小児気管支ぜん息の発症・変動に関わる因子を解明して、発症予知に基づく発症予防の可能性を明らかにすることを目的として行う。

3 平成 13 年度の研究の対象および方法

3 年計画で、気管支ぜん息患者500名と対照者100名を調査研究対象者として末梢血を採取して白血球を分離し、そこからDNAを分離精製する。本研究が遺伝子解析を主とする研究であることに鑑み、DNAの収集は、平成12年度の研究開始前に倫理委員会で承認された手順に基づいて十分な説明を行い、同意を得て行う。

このDNAを用いて、IL-4レセプター α 鎖遺伝子多型（Ile50ValとArg551Gln）、γ-インターフェロンレセプター 2 遺伝子多型（Arg64Gln）、γ-インターフェロンレセプター 1 遺伝子多型、β2 アドレナリンレセプター遺伝子多型（Arg16GlnとGln27Glu）、IL-4遺伝子多型（+33C/T）、IL-18 遺伝子多型（-105A/C）、IgEレセプター 1 β 鎖遺伝子多型（-109）、CD14遺伝子多型（-159T/C）、

PAF acetylhydrolase遺伝子多型（Glu192Arg）、methylenetetrahydrofolate reductase遺伝子多型（677C/T）の、10遺伝子12部位の遺伝子多型を解析する。一部の症例ではムスカリン受容体遺伝子、RANTES遺伝子の多型性も解析する。

次に、これらの遺伝子多型が気管支ぜん息に関与するかどうかを、その組み合わせを含めて、統計学的に解析する。この解析にあたって、気管支ぜん息の多様性に基づいて層別解析が行えるように、年齢、性別、気管支ぜん息発症年齢、気管支ぜん息の型（アトピー型、非アトピー型）、気管支ぜん息の重症度（発症時、現在）、気管支ぜん息治療歴、他のアトピー性疾患の有無、アトピー性疾患家族歴、血清IgE値、ダニ特異的IgE値、他の抗原特異IgEなどの患者情報を収集し、ケースカードを作成する。一部の症例では、IL-12、IL-18、PHA刺激下でのγインターフェロン産生を測定し、遺伝子多型との関連性を検討する。

採取したDNAおよび個人情報、被験者の氏名など個人の特定につながる情報をすべて暗号化し、個人の特定ができないようにしてから、監督官の監督の下に保管する。DNAを他の研究に利用して良いとの承諾が得られた検体については、DNAバンクとして保管し、後の研究に資する。

また、遺伝子を用いた検査が臍帯血を用いた血清学的検査で代用できる可能性を考慮し、過去に公健協会森永班により集められた気管支ぜん息発症の有無や各種の情報が6歳時点まで追跡できた児1,300名の臍帯血清を保管し、この可能性に対応する。

4 平成13年度の研究成果

1) 全体研究

(1) 調査研究対象サンプルの収集

本年度は、昨年度と合わせて計487名の気管支ぜん息患者および83名の対照者から、説明に基づく承諾を得た後に末梢血を採取し、得られた白血球からDNAを分離精製した。同時に、問診と血液検査により、上記の個人情報を収集した。収集されたDNAおよび情報は、個人の特定ができない形にして、監督官の監督の下に保管した。また、情報のコンピューター入力を行い、統計解析が可能になるように準備した。

3年計画の2年目として、平成13年度のDNAと個人情報の収集は計画通り順調に推移し、気管支ぜん息患者では3年間の目標数の約95%、対照者では約80%を本年度中に収集できた。

(2) 遺伝子多型の有無とその気管支ぜん息への関与に関する研究

個々の班員は上記の調査研究対象である10遺伝子12部位の遺伝子多型のなかでそれぞれが担当する遺伝子多型の解析を実施した。これまでに、集められたDNAの約80%の解析を終了し、その結果をコンピューターに入力した。

得られた結果は全ての解析が終了する平成14年度に個人情報とあわせてまとめて解析し、当該遺伝子多型と気管支ぜん息の発症や病態との関連性および発症予測因子としての位置づけを明らかにする予定である。

(3) 集められたDNAの内、バンクとして保管することへの同意が得られたDNAはバンクとして保管し、今後、世界各国の研究者から気管支ぜん息に関係する新たな遺伝子多型の発見の報告が出た場合に迅速に対応できるよう、態勢を整えた。

(4) 臍帯血清サンプルの保存

過去に公健協会森永班により集められた気管支ぜん息発症の有無や各種の情報が6歳時点まで追跡できた児1,300名の臍帯血清を冷凍し、収集された情報と共に保存することにより、今後の臍帯血清による気管支ぜん息発症予測に関する新たな研究の進展に対応できるようにした。

2) 各個研究

全体研究以外に、各班員は分担する遺伝子多型と気管支ぜん息の発症および病態・病像との関連性について調査研究すると共に、新たにムスカリン受容体遺伝子とRANTES遺伝子における遺伝子多型の有無を調査し、認めた遺伝子多型についてはそのぜん息発症との関連性について解析し、以下の成果を得た。

(1) IL-18遺伝子多型に関する研究

IL-18遺伝子の転写開始点より105番目に存在するA/C多型を解析するための簡易な検出法を開発し、気管支ぜん息患者と対照者における多型頻度を明らかにした。また、対象者の血清IL-18値とIgE値を測定し、この遺伝子多型と血清IL-18値やIgE値との相関を解析した。これまでに調査した検体においては、有意な相関を認めていない。

(2) IL-4受容体 α 鎖 (IL-4R α) 遺伝子多型に関する研究

IL-4R α 鎖のIle50Valの遺伝子多型の解析により、気管支ぜん息患者では対照者に比して有意に50Ile型が多く、この遺伝子多型がぜん息発症に関係する遺伝因子のひとつである可能性を示した。

(3) IFN- γ 受容体 (IFN- γ R) 遺伝子多型に関する研究

IFN- γ R2遺伝子のArg64Gln多型は気管支ぜん息発症との相関を認めなかったが、IFN- γ R1遺伝子のintron2部にアレルギー発症と相関する遺伝子多型の存在を確認した。今後、この遺伝子多型の詳細を同定し、さらに詳しく解析する予定である。

(4) CD14遺伝子多型に関する研究

CD14-158 SNPsはこれまでのところ単独では気管支ぜん息の発症や病像と関係しているとの結果は得られなかった。

(5) ムスカリン遺伝子多型に関する研究

M1ムスカリン受容体遺伝子とその近傍に3つの、また、M2ムスカリン受容体遺伝子に3つのSNPsが存在することを明らかにし、また、これらの遺伝子多型はそれぞれ別個に気管支ぜん息発症と関連していることを明らかにした。M3ムスカリン受容体遺伝子にはSNPsを同定できなかった。

(6) RANTES遺伝子多型に関する研究

RANTES遺伝子の-28(C/G)多型と高年発症の気管支ぜん息との間に有意な相関を認めた。小児気管支ぜん息の発症に関しては、当該遺伝子多型との間に相関を認めなかった。

(7) メチレンテトラヒドロフォレート (MTHFR) 遺伝子多型に関する研究

MTHFR遺伝子の677C/Tの遺伝子多型(TT型)は気管支ぜん息全体の発症とは相関を認めなかったが、アトピー型ぜん息の発症との間に有意な相関を認めた。

(8) PAF acetylhydrolase (PAF-AH) 遺伝子多型に関する研究

PAF-AHの遺伝子多型は気管支ぜん息群で対照群に比して頻度が高い傾向を認めた。

5 考察

小児における気管支ぜん息の有症率の増加をうけて、気管支ぜん息の発症を減少させることが益々重要になっている。本研究は気管支ぜん息の発症・変動に関わる因子を解明し、気管支ぜん息の発症予測に基づく発症予防を展望する研究である。

これまでに世界各国の研究者から気管支ぜん息に関与すると報告された遺伝子多型は、それを有する人では気管支ぜん息発症の危険性が2～3倍程度高いというものである。しかしながら、気管支ぜん息の発症を精度良く予測するという観点からは、これらの遺伝子多型による予測は未だその精度が不十分である。遺伝子多型によるぜん息発症予測精度の低さの原因として、(1)気管支ぜん息の発症に関与する遺伝的素因は複数の遺伝子多型により規定されており、したがって、単一の遺伝子多型による予測は困難である、(2)気管支ぜん息の発症に関与する真の遺伝子多型が未だ明らかにされていない、ことが考えられる。本調査研究は、この(1)、(2)のいずれの可能性に対しても対応できるように設定された。即ち、もし(1)が該当するのであれば、複数の遺伝子多型を同時に解析し、それを組み合わせることにより、気管支ぜん息の発症をより高い精度で予測できる可能性があり、この方法を今回の調査研究に取り入れた。もし(2)が該当するのであれば、今後、世界の研究者から真に気管支ぜん息の発症に関与する遺伝子の報告がなされるまで、遺伝子多型による気管支ぜん息発症予測の有用性について正確なことはわからないと言わざるを得ないが、今回の調査研究では、得られたDNAをバンク的に保管することにより、この可能性にも迅速に対処できるようにした。

同一サンプルを用いて同時に多数の遺伝子多型を検討し、遺伝子多型によるぜん息発症予測の精度を複数の遺伝子多型の組み合わせによる場合も含めて検討しようとする研究は、世界で初めてのものである。さらに本研究は、遺伝子多型によるぜん息発症予測精度を気管支ぜん息患者の病態の特徴に応じて層別解析することも含んでおり、解析対象数および解析方法のいずれにおいても、これまでに世界で類を見ないものである。

遺伝子多型による気管支ぜん息発症予測の精度をできるだけ正確に明らかにすることは、とりまなおさず、気管支ぜん息の発症に環境要因がどれだけ関与するかを明らかにすることにもつながると期待され、本研究はこの意味からも重要であると考えられる。

6 今後の課題

本研究の成果は気管支ぜん息の発症予測に基づく発症予防につながることを期待されるが、そのためには、今年度までの調査研究の実績を踏まえて、3年計画の最終年度である平成14年度に、計画した数の気管支ぜん息患者および対照者のDNAと情報を収集して遺伝子多型の解析を終了させ、さらに、その結果を気管支ぜん息の多様性に関するパラメーターに基づいて層別解析することにより、気管支ぜん息の発症・変動に遺伝子多型がどの程度関与するのか、また、遺伝子多型による気管支ぜん息の発症予測がどの程度正確に行えるかを明らかにする必要がある。これまでに平成12、13年度の2年間実施された調査研究の成果は、平成14年度に全ての結果が示されたときに明らかになるものである。

また、広く内外の医学情報を収集し、気管支ぜん息の発症や病態に関係すると考えられる新たな遺伝子多型の発見が報告された際には、バンクに保管されたDNAを有効活用して迅速に対応

し、本調査研究の更なる充実を目指すことも重要である。特に、現在進行中の我が国のミレニアムプロジェクトの成り行きが注目されるが、本研究班により、その成果をすばやく公健協会の調査事業に取り入れることができる態勢ができあがったので、今後もこの態勢を維持しておく必要がある。

さらに、過去に公健協会森永班により集められた気管支ぜん息発症の有無や各種の情報が6歳時点まで追跡できた児 1,300 名の臍帯血清の冷凍保存を今後も継続し、収集された情報と共に保存することにより、今後の臍帯血清による気管支ぜん息発症予測に関する新たな研究の進展に対応できるようにしておく必要がある。

7 社会的貢献

小児の気管支ぜん息罹病率は依然として高い水準にある。気管支ぜん息は一旦発症すると長年にわたる治療が必要な疾患であり、重症化すれば長期入院が必要となったり、時には死亡する事態も起こりうる。したがって、小児における気管支ぜん息の発症を予防して患者数を減少させることは、少子高齢化社会の進行により医療制度の見直しが迫られている現在、重要な社会的要請である。この気管支ぜん息の発症を予防するための保健指導を効率的・効果的に実施するためには、個々の対象者における気管支ぜん息発症の危険性の程度を同定することが重要である。

本研究はこれらの社会的要請に答えるべく、小児気管支ぜん息の発症・変動に関与する因子とその寄与度を明らかにし、あわせて、遺伝子による気管支ぜん息発症予測がどの程度の精度で可能であるかを明らかにするものである。この研究の成果は気管支ぜん息の発症予測に基づいたきめ細かい発症予防対策の実施が可能となることにつながると期待されるものであり、小児気管支ぜん息患者を減少させるという社会的要請に対する貢献は大である。

本研究の成果はまた、既に気管支ぜん息を発症した患者の治療において、個々の患者に最適な治療法を選択できることにもつながる可能性を有しており、この面からの貢献も期待される。

【まとめ】

気管支ぜん息の発症は複数の遺伝因子と多数の環境要因により規定されると考えられる。本研究は気管支ぜん息の発症・変動に関する因子を明らかにすることを目的として、IL-4 レセプター α 鎖遺伝子多型 (Ile50Val と Arg551Gln)、 γ -インターフェロンレセプター 2 遺伝子多型 (Arg64Gln)、 γ -インターフェロンレセプター 1 遺伝子多型、 β 2 アドレナリンレセプター遺伝子多型 (Arg16Gln と Gln27Glu)、IL-4 遺伝子多型 (+33C/T)、IL-18 遺伝子多型 (-105A/C)、IgE レセプター 1 β 鎖遺伝子多型 (-109)、CD14 遺伝子多型 (-159T/C)、PAF acetylhydrolase 遺伝子多型 (Glu192Arg)、methylenetetrahydrofolate reductase 遺伝子多型 (677C/T) の、10 遺伝子 12 部位の多型を 500 名の気管支ぜん息患者と 100 名の対照者という多数の、かつ、同一のサンプルを用いて解析し、得られた遺伝子多型のデータをその組み合わせを含めて、気管支ぜん息の多様性に関するパラメーターに基づいて層別解析する調査研究である。このような研究はその質・量の両面で、これまで世界的にも類をみない研究であり、本調査研究により、気管支ぜん息の発症・変動に遺伝因子がどれだけ関与するのか、遺伝子多型による気管支ぜん息発症予測がどの程度の精度を持って可能であるかが、これまで以上に明らかになると期待される。また、気管支ぜん息の発症・変動に遺伝子多型がどれだけ関与しているかを明らかにすることは、とりもな

おさず、気管支ぜん息の発症・変動に環境要因がどれだけ関与しているかを、逆の意味から明らかにすることにもつながるものであり、このことは、気管支ぜん息の発症予防のための環境対策の意義を明らかにすることにもつながるものである。

さらに、本調査研究は集めたDNAや患者情報をバンクとして保管することや、昨年度までに公健協会研究班が採取した、気管支ぜん息発症の有無や各種の情報が6歳時点まで追跡できた児1,300名の臍帯血清を冷凍保管することも含んでいる。前者は、今後の遺伝子研究分野の進歩により気管支ぜん息の発症・変動に関係する新たな遺伝子多型が明らかにされた場合に、日本人集団におけるその意義を直ちに解析できるように意図されたものであり、後者は、より簡便な検査法でぜん息の発症を予測するという観点から、血清を用いた検査で遺伝子多型の検査結果を外挿できる可能性を考慮して計画されたものである。これらは、本研究班で実施される遺伝子多型の調査結果の如何に関わらず、気管支ぜん息の発症・変動に関する因子を明らかにするという研究目的に資するものであり、有意義なものであると考えられる。

本調査研究の目標に添った結果は、本研究が3年計画であり、本年はその2年目であることから、すべてのデータが揃う平成14年度に明らかになるものであるが、今年度の調査研究は3年計画の2年目として計画通りに進行した。また、各個研究として、気管支ぜん息の発症・変動に関係すると考えられるIFN- γ R2遺伝子、ムスカリン受容体遺伝子、RANTES遺伝子など、新たな遺伝子多型の存在とその意義を示すことができた。来年度も本研究は順調に進展し、計画通りの成果が得られると期待される。

本研究により気管支ぜん息の発症・変動に関する因子が明らかとなり、また、遺伝子多型による気管支ぜん息の発症予測がどの程度正確に行えるかが明らかになれば、気管支ぜん息の発症予測に基づく発症予防により気管支ぜん息患者の減少につながると期待されると共に、既に気管支ぜん息を発症した患者の治療においても、個々の患者に最適な治療法を選択できることにつながる可能性を有しており、この面からの貢献も期待される。