

## 【研究内容】

### -3 小児気管支ぜん息の発症・変動因子に関する研究

#### 1. 研究従事者

眞弓 光文（福井医科大学小児科）	山口 悦郎（北海道大学医学部内科）
近藤 直実（岐阜大学医学部小児科）	田中 敏郎（大阪大学医学部内科）
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 12 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への対策として、既にぜん息を発症した患者に対する効果的な治療法の開発が重要であることは言うまでもないが、根本的な対策として、気管支ぜん息の発症予知に基づく発症予防により、患者数を減少させることが求められている。

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すると考えられる。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出来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があると考えられる。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方がより効率的である。

気管支ぜん息の発症に関与する遺伝的素因を規定する因子として、多くの遺伝子多型が世界各国の研究者から現在までに報告されている。これらの遺伝子多型はいずれも気管支ぜん息の発症に影響を与えることが示されたが、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。

このような認識の下に、本研究は、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する。

#### 3. 平成 12 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名を調査研究対象とする。

調査研究対象者の末梢白血球を採取し、白血球を分離して、そこからDNAを分離精製する。このDNAを用いて、IL-4レセプター 鎖遺伝子 (Ile50ValとArg551Gln)、 インターフェロンレセプター 2 遺伝子 (Arg64Gln)、 インターフェロンレセプター 1 遺伝子 (イントロン部分)、<sub>2</sub> アドレナリンレセプター 遺伝子 (Arg16GlnとGln27Glu)、IL-4遺伝子 (+33 C/T)、IgEレセプター 1 鎖遺伝子 (-109とGlu237Gly)、CD14 遺伝子 (-159 T/C)、PAF acetylhydrolase 遺伝子 (Glu192Arg)、methylene tetrahydrofolate reductase 遺伝子 (677 C/T) の、9遺伝子12部位の遺伝子多型の有無とその種類を解析する。一部の症例ではCD18遺伝子の多型も解析する。

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。

本研究が遺伝子解析を主とする研究であることを鑑み、国の遺伝子解析に関する指針に従って気管支ぜん息患者ならびに対照者に対する説明文書を作成し、班員の所属する福井医科大学、北海道大学、岐阜大学、大阪大学、天理よろず相談所病院の各倫理委員会に置いて審査を受け、研究実施の許可を得る。患者および対照者からのDNAの採取や情報の収集は、この説明文書に基づいて十分な説明を行い、同意を得た後に行う。

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、個人の特定が出来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。

臍帯血を用いた血清学的検査が遺伝子解析結果に外挿出来る可能性を考慮し、昨年度まで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 12 年度の研究成果

##### (1)調査研究の倫理性の確認

調査研究対象とすべき遺伝子多型および個人情報の項目を選定後、国の遺伝子解析に関する指針に従って気管支ぜん息患者ならびに対照者に対する説明文書および調査票を作成し、班員の所属する福井医科大学、北海道大学、岐阜大学、大阪大学、天理よろず相談所病院の各倫理委員会に置いて審査を受け、研究実施の許可を得た。

##### (2)調査研究対象サンプルの収集

倫理委員会で承認された研究説明書に則り、気管支ぜん息患者および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、上記個人情報を収集した。

平成12年度は気管支ぜん息患者および対照者あわせて220名からDNAの分離精製と個人情報の収集を行った。この数は、本年度の予定数200名を若干上回るものであった。これらのDNAおよび情報は、氏名などの個人が特定できる情報をすべて暗号化し、個人の特定が出来ない形にして、監督官の監督の下に保管した。

##### (3)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9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方法を開発または改良し、集めた220検体のDNAについて遺伝子多型の有無を解析した。

また、各個研究として、それぞれの担当する遺伝子多型の有無と気管支ぜん息との関連や、サイトカイン産生能などの他のマーカーとの関連について検討し、

(a) IgEレセプター 1 鎖遺伝子のプロモーター領域に存在する遺伝子多型が、気管支ぜん息患者の血清総IgEの高値に関与する

- (b) IL-4プロモーター領域のC+33T多型は血清IgEの高値に關与する
- (c) 気管支喘息患者では、対照者に比して、IL-4R Ile50ValのIle/Ileのhomozygousが有意に高く、IL-4R Arg551Gln、IFN- R2Arg64Glnでは有意差は認めない
- (d) 血清IgE値とIL-4R Ile50Valの変異との關連については、Val/ValがIle/Valより有意に高かった。Ile/IleとIle/Valでは有意差を認めない。血清IgE値とIL-4R Arg551Glnの変異との關連については、Arg/Gln、Gln/Gln、Arg/Argの間に有意差は認めない
- (e) IL-18刺激下におけるIFN- 産生量とIL-4R Arg551Glnの変異との關連については、Gln/GlnがArg/Glnに比べ有意に低い
- (f) 血清IgE値とIFN- R2Arg/Glnの変異との關連性では、Arg/Glnの変異がGln/Glnに比べて有意に高い
- (g) IL-18刺激下のIFN- 産生量とIL-4R Arg551Glnの変異との關連性では、Gln/Glnが、Arg/Glnに比べ有意に低い。IL-18刺激下のIFN- 産生量とIFN- R2Arg64Glnの変異については、有意差を認めない

などの結果を得た。

気管支ぜん息の発症・変動との観点から見たこれらの遺伝子多型の意義については、予定数のサンプルの遺伝子多型の解析がすべて終了する平成14年度に、まとめて解析する予定である。

#### (4)血清サンプルの保存

これまでに採取された、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保管した。

## 5. 考察

小児における気管支ぜん息の罹病率の増加を受けて、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きている。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關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その精度が未だ不十分である。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關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關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良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關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、この可能性にも対処出来るようにした。

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た研究は、世界で初めてのものである。本研

究はさらに、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いる。本研究は、解析対象数および解析方法の両面において、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出来るだけ正確に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、この意味からも重要であると考えられる。

## 6．今後の課題

今年度の調査研究の進展を受けて、来年度以降の2年間で、予定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、予定した遺伝子多型を解析し、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実施できるかを明らかにすることが、今後の課題である。本研究の成果が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。

## 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期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、少子高齢化社会が進行し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的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 鎖遺伝子 (Ile50Val と Arg551Gln)、インターフェロンレセプター2 遺伝子 (Arg64Gln)、インターフェロンレセプター1 遺伝子 (イントロン部分)、 $\beta_2$  アドレナリンレセプター遺伝子 (Arg16Gln と Gln27Glu)、IL-4 遺伝子 (+33 C/T)、IgE レセプター1 鎖遺伝子 (-109 と Glu237Gly)、CD14 遺伝子 (-159 T/C)、PAF acetylhydrolase 遺伝子 (Glu192Arg)、methylenetetrahydrofolate reductase 遺伝子 (677 C/T) の、9 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見ない研究であり、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。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、本調査研究の内容には、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が含まれる。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出来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標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 1 年目であることから、すべてのデータが揃う予定である平成 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 1 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、IgE レセプター 1 鎖遺伝子のプロモーター領域、IL-4 プロモーター領域、IFN- R2 遺伝子など、新たな遺伝子多型とその意義を示すことが出来た。来年度以降、本研究が順調に進展し、計画通りの成果が得られることが期待される。

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実施でき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ことを期待されると共に、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。