

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591358

研究課題名（和文） アレルギー発症の遺伝環境相互関係の分子遺伝学的蛋白構造学的解明と臨床展開

研究課題名（英文） Molecular genetics and proteomics for gene-environmental relationship in allergy

研究代表者

近藤 直実（KONDO NAOMI）

岐阜大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50124714

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は(1)アレルギー発症の遺伝・環境の直接的相互関係の遺伝子分子レベルでの解明と(2)アレルギーの画期的予防・治療法の確立（テーラーメイド医療を含む）である。研究の結果、アレルギー発症に関わる遺伝子分子の解明とそれに基づいて、アレルギーの系統的遺伝子学的分類を確立した。さらに、これらの成果をもとにアレルギーのテーラーメイド治療法の開発を進め、新規分子の開発およびアレルギー薬の個別治療のためのマーカーについて明らかにし、一定の成果を収めた。

研究成果の概要（英文）：

The purposes of this study are (1) a analysis of molecular interaction between gene-environment for development of allergic disorders and (2) establishment of personalized medicine for allergic disorders. As results, several related genes for development of allergic disorders were analyzed, a new genetic classification for allergy was established, and personalized medicine for allergic disorders was established based on genetic and molecular analyses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：アレルギー，分子遺伝学，タンパク構造学，遺伝因子，環境因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、世界的に幾つかの重要なアレルギー（アトピー）候補遺伝子（FcεRIβ，IL-4Rα，IL-13，ADAM33 など-Hopkin JMら Lancet, 10:1292. 1989 から はじまり Nature, 19:119, 1998, J Allergy Clin

Immunol 2008 に至る、など多数）が報告されてきたが、系統的なものや、環境・生態との直接的関わりの研究は皆無に等しい。近年、遺伝子の働きを抑制するという RNA 干渉効果(siRNA)が発見（2006 ノーベル医学生理学賞のファイアーら）

- (RNAi-mediated gene silencing Nature, 441:111, 2006)され、ガンなどの治療開発に応用されている。一方で、アレルギー領域においては、RNA 干渉の解析、RNA プロセッシングや構造プロテオミクスの解析と、それを応用した治療開発は皆無に等しい。
- (2) 申請者らは、従来よりアレルギー発症に関わる遺伝子につき、世界に先駆け明らかにし、またプロテオミクス解析も行い、多くの関心を得てきた。(申請者らによる、IL-12Rβ2 遺伝子、IL-18R 遺伝子、IL-18 構造、Nature Struct Biol 10: 966-971 2003、ProNAS 2008、朝日新聞報道、をはじめ多数)。さらには RNA プロセッシングの alternative splicing や RNA editing など世界で申請者らのみが、アレルギーで検討しているのみである (Kondo N. Clin Exp Allergy 34:363-368, 2004 など)。
- (3) 以上より、アレルギー疾患の遺伝・環境要因の関わりを真に解明し、その成果を臨床に応用するためには、その直接的関わりを分子遺伝子レベルで明らかにすることが必須であるという画期的・独創的着想に至った。

2. 研究の目的

近年、気管支喘息などアレルギー性疾患患者の急増が大きな社会問題になっている。遺伝的因子に加えて、日常環境と CO2 蓄積、温暖化、酸性雨など地球規模的環境の劣悪化の関与が推測される。従って、生態系の視野に立脚し、遺伝・環境相互の直接的関係の分子レベルでの解明に基づく適格な対策の確立が急務である。

本研究の全体構想と目的は、21 世紀型ポストゲノムを駆使し、次の如く極めてユニークで明解である。

- (1) アレルギー発症の遺伝・環境の直接的相互関係の遺伝子分子レベルでの解明
アレルギー発症機構を真に明らかにするため、アレルギー疾患は、遺伝要因と環境要因によって発症するという原点に立脚して、画期的な戦略を用いて、遺伝子・環境(日常環境と地球規模的環境)相互関係の直接的な現象(gene-environment interaction)を分子遺伝子レベルで独創的に解明する。このために、ゲノムに加えて遺伝子発現、トランスクリプトーム、プロテオームの戦略を駆使する。
- (2) アレルギーの画期的予防・治療法の確立(テラーメイド医療を含む)

以上の成果を、アレルギーの独創的かつ先駆的な予防・治療法(テラーメイド医療を含む)の確立開発に応用・展開し、広く社会に貢献する。

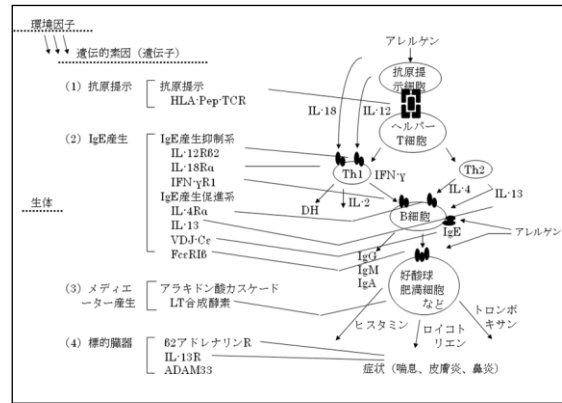


図1 新たなアトピーの遺伝子学的分類

3. 研究の方法

- (1) アレルギー(アトピー)の病因遺伝子群を以下の方法で系統的、大局的に解明し、新規にアレルギーの系統的遺伝子学的分類を確立する。
- (2) アレルギー病因遺伝子群分子群と環境因子・地球規模的環境因子との直接的関連の解明-遺伝子発現と抑制(RNA干渉など)およびエピジェネティクス(遺伝子・分子・生態医学)
- (3) 解明されたアレルギーの病因遺伝子群の環境・地球規模的環境下における構造的生物学解明(構造プロテオミクス)と機能異常との関連を解明し(構造機能相関)、治療予防法を開発する。
- (4) 環境下における遺伝子発現とエピジェネティクス及びコードされるタンパクの異常をもとにして多様な病因・病態に対応した系統的な環境を加味したテラーメイド治療を含む治療・予防法を確立する。

4. 研究成果

- (1) アレルギー(アトピー)の病因遺伝子群を以下の方法で系統的、大局的に解明し、新規にアレルギーの系統的遺伝子学的分類を確立した。
- ① アレルゲン侵入からアレルギー症状出現までの全免疫アレルギー反応系を新たに遺伝子学的に分類した。すなわち 1. 抗原提示 2. 過剰な IgE 産生 3. メディエーター産生 4. 標的臓器の 4 つに、まず、大きく分類した。
 - ② IgE の過剰産生に関わる遺伝子とその発現異常の解明。アレルギーの最も基盤となり、かつ異常なタンパクである IgE 抗体の産生過剰を B 細胞内部と外部(T 細胞など)の両面から系統的に分子遺伝的に解析する。Th1 細胞からの IFN-γ の産生低下、IFN-γ 産生を誘導する IL-12、IL-18 およびそれらのレセプターなどに着目し、IgE 産生抑制系のシグナル伝達などを中心にその異常を遺伝子学的に解明

- した。
- ③上記の結果を中心として世界的報告を基盤にしてアトピー（アレルギー）を系統的に遺伝子学的に分類した（図1）。
- (2) アレルギー病因遺伝子群分子群と環境因子・地球規模的環境因子との直接的関連の解明-遺伝子発現と抑制（RNA干渉など）およびエピジェネティクス-（遺伝子・分子・生態医学）
- ①遺伝子・分子に及ぼす環境因子の直接的関与を検討するため、明らかになったアレルギー（アトピー）病因遺伝子の変異と発現と抑制（siRNAなど）について、*in vitro*で環境因子・地球規模的環境因子であるpH、CO₂、温度、化学物質、ウイルス分子など種々の条件で刺激し、リンパ球（10⁶/mlの濃度）を培養し、種々のサイトカイン（IFN- γ 、IL-4、IL-12、IL-18、IL-10、TGF- β ）の産生、当該遺伝子及びレセプター遺伝子の変異と発現の異常を明らかにする。さらに、調節性T細胞（CD4、CD25）をFACSで検索をする。加えてTLR（Toll-like receptor）群遺伝子の解析を行った。
- ②以上の結果をふまえて、各アレルギーの遺伝子について、環境刺激下においてプロモーター領域のメチル化（クロマチン状態）を解析し（エピジェネティクス）、さらにプロモーター領域に関わる分子（転写因子AP-1/NFK-Bなど）を検索し、さらに翻訳領域での塩基の変化（alternative splicing及びC to TなどRNA editing）やRNA干渉などの遺伝子発現異常を解明した。
- (3) 解明されたアレルギーの病因遺伝子群の環境・地球規模的環境下における構造生物学的解明（構造プロテオミクス）と機能異常との関連を解明し（構造機能相関）、治療予防法を開発した。
明らかになった多病因遺伝子群のコードするタンパクとその機能を分析した。
明らかになった病因遺伝子がコードするタンパクを構造生物学的に解析し、その成果を治療・予防へ応用した。
- ①抗原特異的T細胞クローンの樹立と構造生物学（構造プロテオミクス）と創薬：
Derf1あるいは β ラクトグロブリンに過敏性のある患者からT細胞クローンを樹立し、DR抗原を中心にHLA抗原と抗原ペプチドとの結合を核磁気共鳴NMRなどを用いて構造生物学的に解析する。またmutation experimentにより、核となるアミノ酸と塩基配列を決定し、アナログペプチド群を作成し、種々の環境下での変化を検索し、臨床適用可能なものを選択した。
- ②抗原提示細胞からのIL-12およびIL-18

遺伝子の発現とRNA干渉および環境下での変化：

IL-12遺伝子の調節領域およびcoding領域の塩基配列を決定し、その異常を分子遺伝学的及びNMRを用いて構造生物学的に明らかにした。さらにIL-18、IL-18レセプターの構造と完全な結合様式とそのシグナル伝達系を決定し、遺伝子異常によりこの結合が不十分なアレルギー患者に対するテラーメイド創薬を開発する基盤が形成された。

- (4) 解明されたアレルギーの病因遺伝子群の環境・地球規模的環境下における構造生物学的解明（構造プロテオミクス）と機能異常との関連を解明（構造機能相関）をもとにして、テラーメイド治療予防法の開発を進めた。

①テラーメイド治療のための創薬への基盤形成を進めた。

1. IL-18、IL-18レセプターの構造と完全な結合様式とそのシグナル伝達系を決定し、遺伝子異常によりこの結合が不十分なアレルギー患者に対する低分子のテラーメイド創薬の開発を進めた。
2. 自然免疫系のMyD88との結合分子を明らかにして、その結合調節分子の開発を進めた。

②テラーメイド治療法を開発した。

すなわち、アレルギー患者個々に対して免疫寛容を誘導するためにT細胞エピートープを温存し、IgEエピートープを破壊した、乳タンパクペプチドを作成し、臨床応用を進めた。また、喘息治療薬の個々の患者への効果予測をするために、遺伝子、タンパクの測定により各薬剤の有効性を評価し、テラーメイド治療開発を進め、一定の成果を得た。すなわち、IL-13遺伝子、LTC4S遺伝子などの多型が薬剤の使い分けに有用であることなどが示された。さらにIFN- γ やロイコトリエン量などが同様に有用であることも示された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計52件）

- ① Ozeki M, Fukao T, Kondo N, Propranolol for intractable diffuse lymphangiomatosis, *N Engl J Med*, 査読有、364、2011、1380-1382
- ② Kondo N, Matsui E, Nishimura A, Kaneko H, Pharmacogenetics of asthma in children, *Allergy Asthma Immunol Res*, 査読有、2、2010、14-19
- ③ Kondo N, Nishimuta T, Nishima S, Morikawa A, Aihara Y, Akasaka T, Akasawa

A, Adachi Y, Arakawa H, Ikarashi T, Ikebe T, Inoue T, Iwata T, Urisu A, Ebisawa M, Ohya Y, Okada K, Odajima H, Katsunuma T, Kameda M, Kurihara K, Kohno Y, Sakamoto T, Shimojo N, Suehiro Y, Tokuyama K, Nambu M, Hamasaki Y, Fujisawa T, Matsui T, Matsubara T, Mayumi M, Mukoyama T, Mochizuki H, Yamaguchi K, Yoshihara S、Japanese pediatric guidelines for the treatment and management of bronchial asthma 2008、Pediatr Int、査読有、52、2010、319-326

[学会発表] (計 25 件)

1. 近藤直実、免疫療法その機序と効果－免疫療法の基礎的背景－、第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会、平成 23 年 11 月 12 日、東京
2. 近藤直実、アレルギーの患者と地球に優しい医療とその開発、第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会、平成 21 年 6 月 5 日、岐阜

[図書] (計 12 件)

- ① 近藤直実、診断と治療社、こどものアレルギー診療のポイント、2011、135

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 直実 (KONDO NAOMI)
岐阜大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50124714

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：