

学位論文題名

(CCTTT)_n repeat polymorphism
in the NOS2 gene promoter is associated with atopy(NOS2 遺伝子プロモーター領域の
CCTTT 繰り返し多型とアトピーとの関連)

学位論文内容の要旨

研究目的

一酸化窒素 (NO) はアミノ酸を基質として NO 合成酵素 (NOS) より合成されるフリーラジカルである。NO は当初、内皮細胞由来の平滑筋弛緩因子 (EDRF) として脚光をあびたが、近年は種々の免疫病態への関与が報告されている。誘導型 NO 合成酵素 (NOS2、iNOS) は種々の細胞より、IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ などの炎症性サイトカインや LPS により誘導され、種々の感染症、炎症性疾患における NO の産生に関与している。

NOS2 遺伝子は 17 番染色体 q11.2 に存在し、この領域は C-CpG サイト遺伝子がクラスターを形成している。更にこの領域はアトピー、気管支喘息、また他の自己免疫性疾患との連鎖が報告されている。NOS2 遺伝子のプロモーター領域において、転写開始部位より 2.5kb 上流に (CCTTT)_n 繰り返し配列が報告されている。その中で繰り返し数が 14 のアリル [(CCTTT)₁₄] は IL-1 β による転写活性が最も高く、更に I 型糖尿病患者において網膜症、腎症といった微小血管障害の発症予防に寄与することが報告されている。

今回は (CCTTT)₁₄ の気管支喘息、アトピーの発症、また血清総 IgE 値への関与について検討した。

対象、方法

対象は健常者 243 人 (非アトピー -141 人、アトピー -102 人)、気管支喘息患者 254 人 (非アトピー -56 人、アトピー -198 人) からなる合計 497 人の日本人である。健常者は健康診断を希望したものから喘息を含めたアレルギー性疾患の既往のないものとした。気管支喘息患者は北海道大学医学部附属病院第一内科外来にて臨床症状、可逆性の閉塞性換気障害、メタコリンに対する気道過敏性検査をもとに気管支喘息と診断されている。アトピーは 10 種類の吸入性抗原に対する特異的 IgE が 1 つでも陽性 (IgE CAP RAST \geq 0.35 UA/ml) と定義した。(CCTTT)_n 繰り返し多型は ABI 310 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用い、電気泳動法により同定した。血清総 IgE 値の測定は radioimmunosorbent test (IgE RIST) を用いた。

尚、本研究は北海道大学医学部倫理委員会の承認に基づき、検体の採取に際しインフォームドコンセントを得られている。

結果

497 人において (CCTTT)_n 繰り返し多型は Hardy-Weinberg 均衡を満たしており、気管支喘息患者、健常人は同一集団から抽出されたことが示された。(CCTTT)_n 繰り返し数は 497 人、994 の染色体において 8 から 21 まで計 14 の多型を認めた。

全 994 染色体において、(CCTTT)₁₄ は非A7b°-群とA7b°-群でその頻度に差を認め ($\chi^2=7.48$, $p=0.0063$)、このアリルは非A7b°-群に高頻度であった。また全 497 人において (CCTTT)₁₄ 保有者は非A7b°-群に高頻度であった ($\chi^2=6.13$, $p=0.013$)。更に、性、年齢、喫煙で補正したロジスティック回帰分析では、(CCTTT)₁₄ についてA7b°-発症のオッズ比は 0.42 (95%CI [0.23-0.79]) であり、(CCTTT)₁₄ のA7b°-への影響はこれらとは独立した因子であると考えられた。更に気管支喘息の有無で補正を加えてもオッズ比は 0.36 (95%CI [0.18-0.71]) であり、気管支喘息と独立した因子であると考えられた。

一方このアリルは気管支喘息の発症、血清総 IgE 値への関与は認めなかった。

考察

今回の検討より、NOS2 遺伝子のプロモーター領域の(CCTTT)_n 繰り返し多型における(CCTTT)₁₄ のアリルは非A7b°-群に高頻度であることが示された。このアリルはリファレンスを用いた *in vitro* の検討で、IL-1 β による転写活性が最も高いことが報告されている。よって今回の結果から、NOS2 によって産生された NO がA7b°-の発症を抑制する可能性が示唆された。NO は近年種々の免疫病態への関与が報告されており、特に Th1、Th2 バランス制御への関与についての報告も散見されるが、一定の見解は得られていない。今回の我々の結果は、遺伝疫学的な側面から、生体内での NOS2、NO のA7b°-への関与を示唆する結果とも言える。近年種々の疫学的調査により、幼少時の感染がその後のアレルギー性疾患の発症を予防する可能性が報告されている。この事実は感染に伴い生体が Th1 に傾いた結果、その後の Th2 反応を抑制する為と推測されている。この事実を今回の結果にあてはめると、幼少時の種々の感染に伴い過剰に産生された NO が生体を Th1 に傾かせた可能性も考えられる。

また、(CCTTT)₁₄ のA7b°-発症への関与が、NO の過剰産生を介する効果以外の結果である可能性も否定はできない。このアリルが機能的に意味をもつ他の遺伝子多型との連鎖不平衡にある可能性もある。またこのアリルは I 型糖尿病における微小血管障害の発症予防に寄与していることも報告されており、我々の最近の知見では、このアリルはアレルギー性疾患における血清 ACE 活性上昇にも寄与することが示されている。気管支喘息、I 型糖尿病、SLE、関節炎などの種々の炎症性疾患の発症には共通の遺伝学的背景が存在する事も明らかにされており、(CCTTT)₁₄ はA7b°-、気管支喘息、I 型糖尿病、アレルギー性疾患といった種々の疾患の病態に影響する共通のアリルである可能性もある。

今回の結果では、(CCTTT)₁₄ は気管支喘息、血清総 IgE 値との関連は認められなかった。A7b°-は気管支喘息の発症に対し、気道炎症を惹起する最も強いリスクファクターと考えられているが、一方では、A7b°-の発症と気管支喘息発症に関する遺伝学的背景は異なっていることも報告されており、今回の我々の結果はこの事実を示唆する結果とも言える。

今後は *in vivo* における(CCTTT)₁₄ の機能的な検討、更には NOS2、NO のA7b°-をはじめとした種々の免疫病態への影響についての検討が望まれる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 野 重 昭

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 西 村 正 治

学 位 論 文 題 名

(CCTTT)_n repeat polymorphism in the *NOS2* gene promoter is associated with atopy

(*NOS2* 遺伝子プロモーター領域の
CCTTT 繰り返し多型とアトピーとの関連)

誘導型 NO 合成酵素 (*NOS2*) は種々の細胞より、IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ などの炎症性サイトカインや LPS により誘導され、種々の感染症、炎症性疾患における NO の産生に関与している。*NOS2* 遺伝子は 17 番染色体長腕に存在し、この領域は C-C 核カイン遺伝子がクラスターを形成している。更にこの領域は $\text{A}^{\text{b}}\text{b}^{\text{c}}$ 、気管支喘息との連鎖が報告されている。*NOS2* 遺伝子のプロモーター領域において、転写開始部位より 2.5kb 上流に (CCTTT)_n 繰り返し配列が報告されており、その中で繰り返し数が 14 回の対立遺伝子 (CCTTT)₁₄ は IL-1 β による転写活性が最も高く、更に I 型糖尿病患者において網膜症、腎症といった微小血管障害の発症予防に寄与することが報告されている。今回はこの (CCTTT)₁₄ の気管支喘息、 $\text{A}^{\text{b}}\text{b}^{\text{c}}$ の発症、血清総 IgE 値への関与について検討した。

対象は健常者 243 人 (非 $\text{A}^{\text{b}}\text{b}^{\text{c}}$ - 141 人、 $\text{A}^{\text{b}}\text{b}^{\text{c}}$ - 102 人)、気管支喘息患者 254 人 (非 $\text{A}^{\text{b}}\text{b}^{\text{c}}$ - 56 人、 $\text{A}^{\text{b}}\text{b}^{\text{c}}$ - 198 人) からなる合計 497 人の日本人である。健常者は健康診断を希望したもののから喘息を含めたアレルギー性疾患の既往のないものとした。気管支喘息患者は北海道大学医学部附属病院第一内科外来にて臨床症状、可逆性の閉塞性換気障害、メコリンに対する気道過敏性検査をもとに気管支喘息と診断されている。 $\text{A}^{\text{b}}\text{b}^{\text{c}}$ は 10 種類の吸入性抗原に対する特異的 IgE 抗体が 1 つでも陽性 (IgE CAP RAST \geq 0.35 UA/ml) と定義した。(CCTTT)_n 繰り返し多型は ABI 310 (PE Applied Biosystems) を用い、電気泳動法により同定した。尚、本研究は本学医学研究科 (医の倫理委員会) の承認に基づき、検体の採取に際しインフォームドコンセントを得られている。

検討した染色体 (n=994) において、(CCTTT)₁₄ は非 $\text{A}^{\text{b}}\text{b}^{\text{c}}$ - 群と $\text{A}^{\text{b}}\text{b}^{\text{c}}$ - 群でその頻度に差を認め ($\chi^2 = 7.48$, $p = 0.0063$)、この対立遺伝子は非 $\text{A}^{\text{b}}\text{b}^{\text{c}}$ - 群に高頻度であった。また、(CCTTT)₁₄ 保有者は非 $\text{A}^{\text{b}}\text{b}^{\text{c}}$ - 群に高頻度であった ($\chi^2 = 6.13$, $p = 0.013$)。更に、性、年齢、喫煙で補正したロジスティック回帰分析では、(CCTTT)₁₄ について $\text{A}^{\text{b}}\text{b}^{\text{c}}$ - 発症のオッズ比は 0.42 (95%CI [0.23-0.79]) であり、(CCTTT)₁₄ の $\text{A}^{\text{b}}\text{b}^{\text{c}}$ - への影響はこれらとは独立した因子であると考えられた。更に気管支喘息の有無で補正を加えてもオッズ比は 0.36 (95%CI [0.18-0.71]) であり、気管支喘息と独立した因子であると考えられた。一方この対立遺伝子は気管支喘息の発症、血清総 IgE 値への関与は認めなかった。

今回の検討より、*NOS2* 遺伝子のプロモーター領域の (CCTTT)_n 繰り返し多型における

(CCTTT)₁₄ は気管支喘息の発症とは独立した γHb° -発症に影響する因子であると考えられた。また、この対立遺伝子の機能的意義から考えると、NOS2によって産生されたNOが γHb° -の発症を抑制する可能性が示唆された。また、NOS2遺伝子の存在する17番染色体長腕は既に γHb° -との連鎖が報告されており、今回の結果は、これを支持する結果と考えられた。今後は、この対立遺伝子の生体内での機能的な意義と、NOS2、NOの γHb° -をはじめとした種々の免疫病態への影響についての更なる研究が期待される。

審査にあたり、副査上出教授より、1) γHb° -の定義について、2) NOのTh1、Th2バランス制御に関する報告、特に1つの疾患におけるTh1、Th2ステージに関するNOの関与について、3) 今回の結果は日本人に特異的なものか否かについての質問があり、副査西村教授より1) 繰り返し数14回の対立遺伝子のみが転写活性に影響を与える機序について、2) 更に多くの抗原特異的IgE抗体について検索した場合の予想される結果について、3) 今回の結果がTh1、Th2バランス制御以外の影響による可能性についての質問があった。主査大野教授からは、1) (CCTTT)_n全対立遺伝子頻度の人種差について、2) 他の近傍の遺伝子多型との連鎖不平衡の可能性について、3) NOS1、NOS3遺伝子多型に関する報告について、4) 正常人におけるIgEの役割についての質問があった。申請者はこれらの質問に対して、自験データと文献を引用して概ね適切な解答をおこなった。

審査員一同は本研究を、NOS2遺伝子多型と γHb° -との関連を初めて明らかにした研究として高く評価し、博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。