

氏名(本籍)	あおき たけし 青木 健(茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博乙第2450号		
学位授与年月日	平成21年8月31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>Expression profiling of genes related to asthma exacerbations</b> (喘息発作に関連して発現する遺伝子の同定)		
主査	筑波大学教授	博士(医学)	檜澤伸之
副査	筑波大学教授	博士(医学)	土屋尚之
副査	筑波大学准教授	医学博士	嶋田知博
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	和田哲郎
副査	筑波大学講師	博士(医学)	栗島浩一

## 論文の内容の要旨

### (目的)

気管支喘息は近年増加傾向にあり、その原因究明と予防法の確立は急務の課題である。気管支喘息の基本病態は慢性気道炎症であり、様々な外的、内的要因によって気道狭窄が誘発され発作にいたるが、その詳細な分子生物学的機序は十分に解明されていない。喘息発作にはさまざまな遺伝子の関与が推察されるが、近年の分子生物学的手法の進展により細胞内に発現する遺伝子を網羅的に解析することが可能となってきた。そこで本研究では小児気管支喘息患者の発作時と非発作時における遺伝子発現レベルの変動をマイクロアレイ法により網羅的に解析することを目的とした。

### (対象と方法)

3歳から14歳の小児アレルギー喘息患者23人及び非アレルギー疾患対照小児11人を対象として末梢静脈血を採取した。喘息患者は発作群(n=12)と非発作群(n=11)に、対照者は気道感染群(n=6)と非感染群(n=5)に分類した。静脈血から末梢血単核球を分離後、RNAを抽出した。逆転写酵素によりcDNAを合成し、インビトロ転写反応を行いビオチン標識した転写産物をマイクロアレイCHIPにハイブリダイズして遺伝子解析を施行、結果をGeneSpringソフトウェアを用いてWelch's t-testによる統計処理を行った。各群間で変動の確認された遺伝子を定量的RT-PCRで検証し、更にIPAソフトウェアを用いてパスウェイ解析を施行した。

### (結果)

喘息患者と非アレルギー疾患対照者を合わせた34検体をイルミナ社製のHuman Ref8 Bead Chipを用いてマイクロアレイ解析を行った。34検体中20検体で発現した12073遺伝子のうち、喘息発作時に2倍以上、かつq-value 0.05未満で変動した遺伝子が153同定された。このうち62遺伝子が気道感染でも有意に変動しており、それらを除外した残り91遺伝子を気道感染の影響を受けずに喘息発作のみによって変動した遺伝子と同定した。変動した遺伝子の機能を解析したところ、喘息発作時に変動した153遺伝子では防御、創傷、

炎症、外的刺激への反応、免疫反応などに関連していたが、気道感染でも変動した遺伝子を除くとそれらの関連性が殆ど失われた。

発作で変動した遺伝子に対し定量的 RT-PCR による検証を行い、遺伝子の有意な変動が確認された。そのうち Growth arrest-specific 6 (GAS6)、S100 calcium binding protein A9 (S100A9) は喘息発作でも気道感染でも変動が認められたのに対し、CD200 antigen (CD200) と Retinol binding protein 7 (RBP7) は感染による有意な変動はなく、喘息発作のみで変動が認められた。気道感染の影響を受けなかった 91 遺伝子についてパスウェイ解析を行ったところ、4つの遺伝子ネットワークが構築された。

#### (考察)

Johnston らは学童期に喘息を呈した患者の 80% 以上にウイルス感染の関与を認め、また、喘息発作の重症度とウイルス感染の関連も報告している。また、Wark らは喘息患者においてライノウイルスに対する抗ウイルス活性を持つ IFN $\beta$ 1 の気道上皮における発現が低いことを証明し、下気道におけるウイルス感染の遷延化と気道炎症の増悪が喘息発作の重要な誘因となっている可能性を示唆している。本検討から喘息発作時に変動する遺伝子のうち、その多くを気道感染に関連した遺伝子が占め、発作で変動した遺伝子の機能は気道感染時に生じる変動と高い共通性を持つことが分かった。喘息発作には気道感染が重要な誘因であり、その病態には気道感染と共通したメカニズムが存在する可能性が推察された。

定量的 RT-PCR で確認された発作時変動遺伝子のうち、CD200 などは感染による有意な変動がみられなかった。CD200 は調節性 T 細胞の誘導など免疫反応に関する遺伝子として知られており、炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制するとの報告もある。本検討では CD200 の発現は発作時に減少しており、それによる炎症性サイトカイン産生抑制効果の阻害が気道炎症の増悪に関与している可能性が考えられた。

発作時のみで変動した遺伝子によるパスウェイ解析では Tumor necrosis factor (TNF)、Transforming growth factor, beta (TGF $\beta$ )、Histone h3 (His3)、Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (NF $\kappa$ B)、Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) など喘息と関連性の高い遺伝子を中心とするネットワークが構築された。本検討ではパスウェイの hub となる遺伝子は同定されなかったが、これらの hub 遺伝子は気道上皮細胞やマスト細胞で発現している可能性がある。本検討で用いた検体は末梢血単核球であり、直接気道上皮で生じている変化を観察できたわけではない。しかし気道炎症を間接的に反映する末梢血単核球を介して観察することで発作時の病態の全体像を捉えられるかもしれない。

#### (結論)

小児喘息発作で変動した遺伝子の多くは気道感染によっても変動し、その病態への強い関与が示唆された。気道感染に影響されない発作時変動遺伝子の機能は多くが不明であったが、これらの遺伝子特性を解明することで喘息発作の分子生物学機序を解明する一助になることが解明された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

「喘息発作に関連して発現する遺伝子の同定」と題した本研究では、喘息発作に関連する遺伝子を比較的新しい手法であるマイクロアレイ法により検討している。喘息は気道の慢性的炎症性疾患であるが、実際に気道細胞の発現解析を行うことは特に小児では困難であり、それに代わる方策として末梢血単核球を使用し、パスウェイ解析などにより疾患パスウェイの構築を行っている。

本研究によって、入院を必要とする喘息発作では、臨床的に感染を疑わせる兆候がなくても、感染症または感染症と共通する遺伝子群が発現していることが示された。さらに、感染症と関連しないと考えられる遺伝子群も同定されており、これらの遺伝子やパスウェイが疾患にどのような影響を与えているのかについては大変興味深く、今後の研究課題となるであろう。

本論文はすでに Clinical and Experimental Allergy 誌に掲載されており、今回の審査においても研究内容に対する評価は高いものであった。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。