

論文審査結果の要旨

小耳症に対する耳介形成術では、1960年代に開発された肋軟骨をドナーとする術式が標準術式となっている。この手術では、自己の肋軟骨を3本使用して、耳介形状フレームワークに加工し、次に耳介部の皮膚を挙上した後、耳介形状フレームワークを移植する。この利点として、移植する軟骨が自己組織であるため拒絶反応がないことが上げられる。一方、フレームワーク作製とその移植には、長時間の手術と高い習熟度が要求されること、肋軟骨を多量に使用するため胸部変形を来たしやすきことなど数多くの欠点が指摘されている。

近年、組織工学によるヒト耳介形状軟骨の再生誘導法が注目を集めている。この方法では、軟骨細胞を増殖・分化する目的で子牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) が必須であることが知られている。しかし、FBSには重篤な感染症 (例えば、狂牛病) を引き起こす可能性が強く指摘されており、臨床応用の大きな障害となっている。これまで、代用血清や無血清培地に種々なサイトカインを補充する方法などが検討されてきたが、それらの効果は十分得られていない。

本研究では、血小板内に含まれる細胞増殖因子を血清内に大量に放出する調整自家血清採取法を開発した。さらに、このシステムを軟骨細胞の培養に応用してヒト耳介形状軟骨の再生誘導を試みた。その結果、調整自家血清採取法によってPDGF およびTGF- β を高濃度に含む自家血清の作製が可能となった。また、調整自家血清にb-FGFを添加することにより、ヒト耳介形状軟骨の再生誘導過程を促進化することが可能となった。

本研究は、軟骨細胞をする際に仔牛胎児血清の代用となりえる自家血清採取法を開発した点で画期的である。再生医療を臨床応用する上で、本培技術を導入した細胞培養は、不可欠な基盤技術と考えられ、学位論文に値する。

氏名	森 富美子
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医 第 9 2 2 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	気管支喘息と好中球 : IL-8, ENA-78, IL-18 遺伝子プロモーター多型と気管支喘息との関連
論文審査委員 (主査)	教授 東 田 有 智
	(副主査) 教授 川 田 暁
	(副主査) 教授 義 江 修

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

気管支喘息は、その発症に複数の遺伝要因と環境要因とが関わっている多因子疾患と考えられている。気管支喘息の基本病態は、好酸球を中心とした炎症細胞浸潤による慢性気道炎症と気道過敏性亢進であるが、最近、好中球による慢性気道炎症と気道過敏性亢進の機序が注目されている。今回、我々は好中球の気道局所への浸潤を引き起こす CXC ケモカインである IL-8 と ENA-78、さらに好中球主体の気道過敏性亢進に関与する IL-18 のプロモーター領域遺伝子多型と喘息との関連性に注目し、一塩基多型から見た喘息と好中球との関連性を明らかにする目的で研究を行った。

【方法】

当院外来通院中の気管支喘息患者 139 例、健常者 132 例を対象とした。末梢血を採取し、ゲノム DNA の抽出、血球算定、総 IgE 値、抗原特異的 IgE 抗体、喘息患者は安定期に呼吸機能検査を測定した。IL-8 遺伝子のプロモーター領域 (-251A/T)、ENA-78 のプロモーター領域 (-156G/C)、IL-18 のプロモーター領域 (-607C/A、-656G/T) の PCR 反応を施行した。その後、IL-8 遺伝子のプロモーター領域 (-251A/T) 多型は、制限断片長多型 (restriction fragment length polymorphism: RFLP) を用いて判定した。ENA-78 遺伝子と IL-18 遺伝子のプロモーター領域多型の遺伝子型は、DNA シークエンサーを用いて決定した。

【結果】

IL-8 (-251A/T) において、アトピー型喘息と非アトピー型喘息との間に、genotype (dominant model) の有意な頻度差が認められた ($p_{adjusted} = 0.00255 \times 8 = 0.0204$)。ENA-78 (-156G/C) では、血清総 IgE 値の検討で、C allele 群のほうが G allele 群より有意に高値であった (C allele: 1899 kU/L, G allele: 535 kU/L, $p = 0.039$)。IL-8 (-607C/A、-656G/T) の両者においては、アトピー型喘息と非アトピー型喘息でそれらの頻度に有意な差は認められなかった。

【考察】

IL-8 遺伝子プロモーター多型はアトピー型・非アトピー型の決定に関与すると考えられた。また、ENA-78 遺伝子プロモーター多型は血清総 IgE の産生調節に関与すると考えられた。これらの結果より、IL-8 遺伝子プロモーター多型と ENA-78 遺伝子プロモーター多型は、喘息のなかでも好中球が大きな役割を果たす場合の病態に関わっている可能性が考えられた。今後、症例数を増やして検討を行うことで、好中球が深く関わる場合の喘息発症メカニズム解明の糸口になることが期待される。

【結論】

IL-8、ENA-78 の遺伝子プロモーター領域多型は、アトピー体質の獲得や IgE の産生調節に関連していることが示された。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	平成 18 年 月 日 公表予定	出版物名 近畿大学医学会雑誌 第 31 巻 第 4 号
	公 表 内 容	平成 18 年 月 日 発行予定
	全 文	

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

気管支喘息をはじめとするアレルギー疾患は、その発症に複数の遺伝要因と環境要因とが関わっている多因子疾患と考えられている。気管支喘息の基本病態は、慢性気道炎症と気道過敏性亢進である。この気道炎症は、好酸球・Th2 細胞・マスト細胞などの炎症細胞と気道上皮細胞などが関与しているアレルギー性炎症である。好酸球性気道炎症に対しては、吸入ステロイド薬が有効であり、近年吸入ステロイド薬の普及により喘息のコントロールは格段に向上した。しかしながら、高用量の吸入ステロイド薬を使用しているにも関わらず依然としてコントロール不良の重症患者も存在し、このような重症喘息患者では、その病態に好中球が関わっていると考えられる。本研究では、重症喘息の病態を解明する目的で好中球に注目し、好中球の気道局所への浸潤を引き起こす CXC ケモカインである IL-8 と ENA-78、さらに好中球主体の気道過敏性亢進に関与するとされている IL-18 のプロモーター領域遺伝子多型と喘息との関係について、一塩基多型から見た喘息と好中球との関連性を明らかにする目的で研究を行った。

方法:

近畿大学医学部附属病院呼吸器・アレルギー内科外来通院中の喘息患者および健常人ボランティアを対象とした。喘息患者をアトピー型喘息患者と非アトピー型喘息患者に分類した。

末梢血より DNA の抽出を行った。その後、IL-8 遺伝子のプロモーター領域(-251A/T)・ENA-78 のプロモーター領域(-156G/C)・IL-18 のプロモーター領域の遺伝子多型 (-607C/A, -656G/T) をそれぞれのプライマーを用いて PCR で増幅した。

IL-8 遺伝子のプロモーター領域(-251A/T)多型は、制限断片長多型 (RFLP) を用いて判定した。ENA-78 遺伝子と IL-18 遺伝子のプロモーター領域多型の遺伝子型は、DNA シーケンサーを用いて決定した。

結果:

1. IL-8 プロモーター多型

喘息群と健常人群との間では、genotype や allele の頻度には差が認められなかった ($p=0.92$)。

アトピー型喘息群と非アトピー型喘息群を比較すると、dominant model においては genotype との間で有意な相関が認められた ($p=0.00255$)。喘

息群において、末梢血好酸球数・好中球数・血清総 IgE 値・抗原特異的 IgE 抗体濃度・呼吸機能の各パラメーター・eNO・重症度と genotype や allele の頻度との間に相関は認められなかった。

2. ENA-78 プロモーター多型

今回の結果では、喘息群・コントロール群において genotype, allele の頻度に差は認められなかった ($p = 0.15$)。血清総 IgE 値の検討では、C allele 群のほうが G allele 群より有意に高値であった ($p = 0.039$)。また、喘息患者においては、末梢血中好酸球数・好中球数・抗原特異的 IgE 抗体・呼吸機能の各パラメーター・eNO・重症度と genotype や allele の頻度との間に関連は認められなかった。

3. IL-18 プロモーター多型

いずれの多型も、喘息群・コントロール群において genotype, allele の頻度には有意差がなかった ($-607G/T$; $p = 0.31$, $-607G/T$; $p = 0.31$)。また、喘息患者においては、末梢血好酸球数・好中球数・血清総 IgE 値・特異的 IgE 抗体濃度・呼吸機能の各パラメーター・eNO・重症度と genotype や allele の頻度との間に相関は認められなかった。

考察:

IL-8 (-251A/T) の検討では、アトピー型喘息と非アトピー型喘息を比較すると、dominant modelにおいて非アトピー型喘息群で Wild type である AA が有意に多く認められた。非アトピー型喘息は、その病態より好中球炎症が中心の喘息である。Wild type (AA) では IL-8 の産生が抑制されず、非アトピー型喘息はアトピー型喘息と比べて、IL-8 の産生が抑制されないために、好中球の関与する喘息と関連があると考えられた。

ENA-78 (-156G/C) の検討では、血清総 IgE 値の比較において、Wild type である G allele で血清総 IgE 値が有意に低値であった。G allele は IgE 非依存性であり、好中球の関与する喘息と関連があると考えられた。

本研究では、IL-8, ENA-78 遺伝子多型と好中球の関与する喘息との間で関連を認めた。これらの知見より、今後好中球が関与すると考えられる難治性喘息の病態および発症のメカニズム解明の糸口になることが期待され、学位論文として価値ある研究と判断した。