

原 著

IL-4 遺伝子プロモーター多型と1型糖尿病との関連

大久保 智子

A Novel Polymorphism in the Promoter Region of the Interleukin-4 Gene and Association with Type 1 Diabetes Mellitus

Tomoko Ohkubo (Fourth Department of Internal Medicine, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

Interleukin-4 (IL-4), one of the key regulators of the Th1-Th2 balance, promotes the differentiation of CD4⁺ helper lymphocytes into Th2 cells. It is assumed that the Th1 predominance over Th2 has an important role in the development organ-specific autoimmune diseases, such as type 1 diabetes and Hashimoto's thyroiditis. In the present study, therefore, we investigated the possible role of the IL-4 gene in type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease. First, we screened for variations in the promoter region (position -1,105 to +38; +1 = translation start site) and exons of the IL-4 gene in 24 patients by PCR direct sequencing, and detected five polymorphisms: C(-589)T, C(-144)T, C(-33)T, A363T and A8411C. Among them, A363T and A8411C are located in introns and were not further analyzed. Genotyping of other polymorphisms were performed by PCR-RFLP on 114 patients with type 1 diabetes, 92 patients with Graves' disease, 57 patients with Hashimoto's thyroiditis and 221 control subjects. C(-144)T is a novel and relatively rare polymorphism, and it was revealed that the distribution of the C(-144)T genotypes was significantly different between type 1 diabetic patients and control subjects ($p=0.0035$); the CT genotype was observed in six type 1 diabetic patients and one control subject, and the remainder were all CC genotype. The frequency of the CT genotype was also increased in patients with autoimmune thyroid disease compared to control subjects, but the difference was not significant. No significant difference was observed in the distribution of C(-589)T and C(-33)T genotypes between patients with type 1 diabetes or autoimmune thyroid disease and control subjects. Then, effects of the C(-144)T polymorphism on promoter activity of IL-4 gene were assessed by luciferase reporter gene assays. Transcriptional activity of the -144T allele, both stimulated and unstimulated, was significantly lower than that of the -144C allele. These data suggest that the C(-144)T polymorphism in the IL-4 gene reduces the IL-4 synthesis and contributes to the development of type 1 diabetes.

Keywords: type 1 diabetes, interleukin-4 (IL-4), promoter, polymorphism, association*J Saitama Med School* 2003; 30:29-36

(Received December 10, 2002)

緒 言

免疫応答に重要な役割を持つCD4陽性ヘルパーT細胞は、細胞性免疫に重要なTh1細胞と液性免疫に重要なTh2細胞とに分類される。Th1細胞とTh2細胞の誘導については、全てのサイトカインを産生しうるTh0細胞から、interleukin-12 (IL-12), interferon- γ (IFN- γ) の作用を受けるとTh1細胞に、IL-4の作用を受けるとTh2細胞に分化することが知られている。Th1細胞からはIL-2, IFN- γ , tumor necrosis

factor- β (TNF- β) が、Th2細胞からはIL-4, IL-10, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13が産生され、それらのサイトカインがお互いの細胞を抑制することがTh1-Th2バランスの維持に寄与しているものと考えられている^{1,2)}。

細胞性免疫は1型糖尿病を含めた臓器特異的自己免疫疾患の原因として重要であり、多くの臓器特異的自己免疫疾患において、自己成分に対するT細胞応答のTh1へのシフト(Th1バイアス)が観察される³⁾。一方、逆にTh1-Th2バランスがTh2優位となった場合には液性免疫による自己免疫疾患やアレルギー性疾患が発症しやすくなる可能性がある⁴⁾。1型糖尿病では、モデル動物であるNODマウスおよびヒトにおいて、Th1

バイアスを支持する成績が報告されている⁵⁻⁸⁾。一方、自己免疫性甲状腺疾患に関しては、橋本病では甲状腺組織の破壊が病因であるため1型糖尿病と同様にTh1優位であり、Graves病ではTSHレセプター抗体による甲状腺の過剰刺激が病因であるためTh2優位であると考えられていたが、Graves病についてはTh1とTh2の両方が関与しているとの報告もある⁹⁾。

本研究では、そうしたTh1-Th2バランスに影響する因子の中でIL-4に注目した。既に述べたように、IL-4はTh2細胞への分化のkey regulatorであり、実際NODマウスにおいてIL-4の投与はTh2タイプの免疫反応を惹起し¹⁰⁾、糖尿病の発症を予防する^{10, 11)}ことが報告されている。また、最近ではnatural killer T (NKT)細胞の1型糖尿病を含む自己免疫疾患発症の抑制効果が注目されているが、その機構としてNKT細胞よりのIL-4産生低下が注目されている¹²⁾。NODマウスではNKT細胞の移入およびNKT細胞のリガンドである α GalCerの投与により1型糖尿病発症が抑制されたとの報告があり^{13, 14)}、またヒトにおいても1型糖尿病患者でNKT細胞からのIL-4分泌が認められないとの報告がある¹⁵⁾。

したがって、IL-4は自己免疫疾患およびアレルギー疾患の重要な候補遺伝子と思われるが、すでに遺伝学的な連鎖解析において、IL-4遺伝子を含む5番染色体の5q31-33領域と気管支喘息¹⁶⁻¹⁸⁾、Crohn病¹⁹⁾、1型糖尿病²⁰⁾、自己免疫性甲状腺疾患²¹⁾との連鎖が報告されている。さらに、これまでに多くの報告がIL-4遺伝子多型と疾患との関連を検討し、IL-4遺伝子のC(-589)T、C(-33)Tの2つの一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)について気管支喘息、IgEの高値、炎症性腸疾患との関連が報告されている²²⁻²⁵⁾。一方、1型糖尿病の発症に関連する遺伝子としてHLA class II遺伝子、インスリン遺伝子、CTLA-4遺伝子などが報告されているが^{27, 28)}、IL-4遺伝子については日本人1型糖尿病患者とC(-589)T多型との関連を認めないとの報告²⁴⁾があるのみである。また、自己免疫性甲状腺疾患についても、IL-4遺伝子多型との関連を検討した報告はあるが^{29, 30)}、コンセンサスは得られていない。

そこで本研究は、IL-4遺伝子多型が1型糖尿病の発症に与える影響についての手がかりを得ることを目的として、1) 1型糖尿病患者におけるIL-4遺伝子のプロモーター領域のallele頻度、および2) それらalleleがIL-4遺伝子の転写活性に与える影響について調べた。さらに、自己免疫性甲状腺疾患である橋本病及びGraves病についても、1) 1型糖尿病患者にしばしば合併症として発症すること、2) Th1-Th2バランスの違いが顕著であり、IL-4遺伝子との相関が疑われていることから、1型糖尿病の疾患モデルとして併せてallele頻度を調べ、考察を加えた。

対象および方法

対 象

対象は埼玉医科大学第4内科を受診した1型糖尿病114例(このうちGraves病合併例9例、橋本病合併例14例)、Graves病92例(1型糖尿病合併例なし)、橋本病57例(1型糖尿病合併例なし)、および対照者(コントロール)として埼玉県在住の間診により健常と思われるボランティア222例。1型糖尿病の診断は、islet cell antibody (ICA)、抗GAD抗体、血中及び尿中C-ペプチド、およびAmerican Diabetes Associationのガイドラインに従った³¹⁾。Graves病、橋本病の診断は甲状腺腫などの臨床像、甲状腺機能、甲状腺自己抗体(抗サイログロブリン抗体、抗マイクログロブリン抗体、抗TSHレセプター抗体)、超音波所見などにより行った。なお、本研究は、「糖尿病および糖尿病合併症の発症および進展に関与する遺伝子の研究」として本学倫理委員会の承認を受けている。

方 法

(1) ゲノム DNA

ゲノムDNAは対象者の血液よりWizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI)を用いて精製した。

(2) 多型の検索

1型糖尿病24例のIL-4遺伝子アミノ酸コード領域(exon 1-exon 4)とそのプロモーター領域について多型の検索のため塩基配列の決定を行った。プライマーとしてTable 1の1~7を用いて増幅されたPCR産物をdRhodamin Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems)を用いてDye Termination反応を行ったのち、ABI PRISM310 Genetic Analyzerを用いてDNA直接シーケンスを行った。PCRの反応条件は、95℃ 11分のhot startの後、94℃、1分、54℃、30秒、72℃、1分のサイクルを45回、72℃、7分とした。

(3) IL-4 遺伝子多型のタイピング

プロモーター領域に存在する多型について1型糖尿病114例、Graves病92例、橋本病57例、対象者221例を対象として、PCR-RFLP法を用いた関連解析を行った。一部の多型はそのままでは適切な制限酵素切断部位がないため、PCRにおいてmismatch primerを使用した(mismatch部は小文字で示す)。C(-589)TについてprimerとしてTAAACTTGGGAGAACATgGTおよびTGGGGAAAGATAGAGTAATAを用い、95℃、11分のhot startの後、94℃、1分、44℃、30秒、72℃、1分のサイクルを45回、72℃、7分でmismatch

Table 1. PCR primers

Sequence		
1	Up Down	CACTGACTAGGAGGGCTGATTTGT CTTGGCAAGGTAGGTCTATTCTGA
2	Up Down	ATTTACAGCCTGGGTGACAGAGTGA TGGCTTTTTGCTTTGCATAGAAGG
3	Up Down	ACTCTATCTTTCCCAAGGAGGACT GTGAGGCAATTAGTTTATCAGGAG
4	Up Down	TAGAGATATCTTTGTCAGCATTGC CAGAGTCTTGGTCCAGGCAGAAAT
5	Up Down	GCTGCTCATCAAGGACTTCTCTGT CCCGCTCGTTTTCCATTAGACAAG
6	Up Down	CCATTTGTCCTCCTGGAAAGAAGA TGTTAGAAAGTGAGGCTGCTGTCC
7	Up Down	TGGTTTTATAAGTGTTTCAGGTGAC GTCAAGTAAACATAGCCAATACAT

PCRを行った。制限酵素 Ava II を用いて、37℃で24時間PCR産物の消化を行った後、3%アガロースゲルにて泳動、SNPの判定を行った。C(-144)TについてはprimerとしてCAAGTGACTGACAATCTGGgtTAAおよびCTTACGATGCAATGCTGACAを用い、95℃、11分のhot startの後、94℃、1分、42℃、30秒、72℃、1分のサイクルを45回、72℃、7分でmismatch PCRを行った。制限酵素 Hpa I を用いて、37℃で24時間PCR産物の消化を行った後、C(-589)Tと同様に判定した。C(-33)TについてはprimerとしてTAGAGATATCTTTGTCAGCATTGCおよびGGGGGAAGCAGTTGGGAGGTGAGAを用い、95℃、11分のhot startの後、94℃、1分、46℃、30秒、72℃、1分のサイクルを45回、72℃、7分でPCRを行い、制限酵素 Mnl I を用いて、37℃で24時間PCR産物の消化を行った後、アガロースゲルにて泳動、SNPの判定を行った。

(4) 臨床像の比較

C(-144)T多型においてT alleleを保有する症例と保有しない症例について、1型糖尿病の臨床像(発症年齢、GAD抗体、IA-2抗体、糖尿病家族歴、自己免疫性甲状腺疾患の合併の有無)について比較した。

(5) Luciferase reporter vector の作成

C(-144)T多型を含む-203~-50領域を5'-GGG GTA CCT GGA AGA GAG GTG CTG ATT G-3'及び5'-AAA AGC TTA CGA TGC AAT GCT GAC AAA GAT-3'を用いてPCRで増幅した。これらにはそれぞれKpnI、

HindIIIサイトを導入してある(下線部)。この151bpのフラグメントをpT7-Blue Vector (Novagen)にサブクローニングした。その後、プラスミドDNAのPCR産物に由来する挿入配列部分の塩基配列の決定をdRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)により行った。塩基配列が確認されたプラスミドの挿入配列部分をKpn IとHind IIIで切り出し、pGL3-Basic vectorのホタルルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチプルクローニングサイトにサブクローニングした。

(6) Dual-Luciferase Reporter Assay による多型の機能解析

Jurkat T細胞はRPMI 1640 medium (SIGMA, St Louis, MO)に10% FBS (JRH Biosciences), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0.292 ng/ml L-Glutamine (Life Technologies, Rockville, MD)を混合した培養液を用いて培養した。Jurkat T細胞を上記の培養液で24時間培養後、RPMI 1640 mediumで洗浄、懸濁し、約 4×10^5 個の細胞に24穴プレートにて、(5)で作成したIL-4プロモーター領域をpGL3-BasicプラスミドDNAにサブクローニングしたluciferase reporter vectorを1.9 µg、内部対象としてウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を含むpRL-Tk vectorを0.095 µgの両者をコトランスフェクトした。トランスフェクション試薬としてはX-tremeGENE Q2 Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)を用いた。DNA、トランスフェクション試薬、培地の混合液にて4時間培養し、トランスフェクション反応を行った。血清含有培地を加えさらに37℃5% CO₂で24時間培養し、増殖刺激として10 ng/ml PMA及び1 µM Ionomycin (SIGMA, St Louis, MO)を用いてさらに16~18時間培養した。その後細胞を回収しホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼ活性をDual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI)とGene-Light 55 Luminometer (マイクロテックニチオン)を用いて測定した。

統計解析

多型(allele, genotype)の頻度の検定については、Fisherの直接検定(2×2)あるいは χ^2 検定で行った。連鎖不平衡についてはt値でその有無を検定した³²⁾。臨床データの比較においては、パラメトリカルデータは対応の無いt検定、非パラメトリカルデータはFisherの直接検定(2×2)で行った。Dual-Luciferase Reporter Assayの結果は反復測定分散分析(repeated measures ANOVA)により検定した。統計計算はStatView J 5.0 (SAS Institute)で行った。有意差レベルは $p < 0.05$ とした。

成績

(1) IL-4 遺伝子多型のスクリーニング

1 型糖尿病 24 例に対し、IL-4 遺伝子及び 5' 上流領域について遺伝子多型の検索を行ったところ、5' 上流領域に C(-589)T, C(-144)T, C(-33)T, 第 2 エクソン上流のイントロン部に A363T, 第 4 エクソン上流のイントロン部に A8411C の合計 5 つの SNP を認めた (Fig. 1).

(2) IL-4 遺伝子多型と 1 型糖尿病および自己免疫性甲状腺疾患 (Graves 病, 橋本病) との関連の検討

IL-4 遺伝子 5' 上流領域に存在する 3 つの多型について PCR-RFLP を行い, genotype および allele の頻度を疾患群とコントロール群の間で比較した. これら 3 つの多型について, C(-33)T 多型と C(-589)T 多型との間に強い連鎖不平衡を認めたが, C(-144)T 多型は他の 2 つの多型とは有意な連鎖不平衡は認めなかった (Table 2). まず, 1 型糖尿病とコントロールの間で, C(-589)T 多型の頻度 (genotype および allele) に有意差は認めなかった. また, Graves 病, 橋本病についてもコントロールと比較して多型の頻度に有意差は認めなかった (Table 3). 次に, C(-144)T 多型については, T allele はコントロールでは 221 例中 1 例のみに認めたのに対して 1 型糖尿病では 114 例中 6 例に認め, genotype においては CT genotype が 1 型糖尿病で有意に増加し ($p=0.0074$), allele においては T allele が 1 型糖尿病で有意に増加していた ($p=0.0037$). Graves 病および橋本病においても T allele の頻度はコントロールと比べて増加していたが, 有意差は認めなかった (Table 4). C(-33)T 多型では C(-589)T 多型と同様に, 1 型糖尿病とコントロールの間で多型の頻度 (genotype および allele) に有意差を認めなかった (Table 5). なお, Graves 病, 橋本病については, C(-33)T 多型と C(-589)T 多型との強い連鎖不平衡のため, 有意な関連がないことが予想されたため, C(-33)T 多型の解析は行わなかった.

(3) 臨床像の比較

C(-144)T 多型の T allele を保有する患者 6 例と保有しない患者 108 例との間で臨床像を比較した. 発症年齢, GAD 抗体および IA-2 抗体の有無, 糖尿病家族歴の有無, 自己免疫性甲状腺疾患合併の有無において, 2 群間に有意差は認められなかった (Table 6).

(4) C(-144)T による転写活性の変化の検討

C(-144)T 多型の転写活性に及ぼす影響を検討するため, IL-4 遺伝子 5' 上流領域の -203 ~ -50 の配列を luciferase reporter vector である pGL3-Basic に組み込み dual-luciferase assay system で luciferase 活性を測定した. T 細胞由来のヒト細胞株である Jurkat 細胞において, -144 部位が T である pIL-4-144T は -144 部位が C である pIL-4-144C に比べて, 転写活性が刺激前 ($p=0.0189$) と刺激後 ($p=0.0434$) とともに有意に低下していた (Fig. 2).

考察

緒言で述べたように, 1 型糖尿病の成因において免疫担当細胞であるヘルパー T 細胞の Th1-Th2 バランスが重要と考えられており, 1 型糖尿病の発症過程では膵 β 細胞に対する T 細胞応答の Th1 バイアスが観察される. 今回, 我々は Th1-Th2 バランスに関与する遺伝子の中で IL-4 遺伝子に注目し, プロモーター領域及び exon 部分について DNA シーケンスによる多型のスクリーニングを行った. その結果, 5 つの SNP を認めたが, その中の 2 つは IL-4 遺伝子の発現に関与する可能性の低い intron 部分に存在しており, 残りの 3 つの SNP について検討を行った.

3 つの多型のうち, C(-589)T 多型と C(-33)T 多型については, 疾患との関連を含めてこれまでに多くの報告がある. まず, これら 2 つの多型は強い連鎖不平衡の関係にあり 589T/-33T および -589C/-33C の 2 つのハプロタイプがあることが報告されていたが^{33, 34)}, 今回の我々の検討においても同様の結果

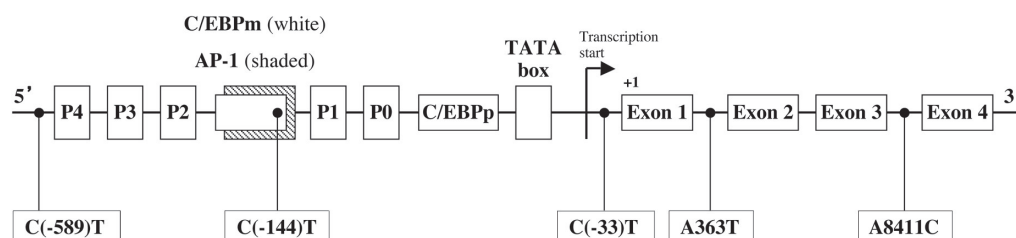


Fig. 1. Schematic representation of the human IL-4 gene and its promoter. Transcriptional factor binding sites and exons are shown as rectangles, and positions of the five polymorphic nucleotides are shown as dots. Transcriptional factor binding sites, C/EBPm(white) and AP-1(shaded), overlap and include the C(-144)T polymorphism.

が示された。疾患との関連については、血清 IgE の高値²²⁾、気管支喘息^{25, 26)}、アトピー性皮膚炎³⁵⁾との関連が報告され、さらに疾患と関連する-589T 配列が luciferase 活性で測定した転写活性を-589C 配列より

も促進するという成績²²⁾がある。このことは、アレルギー疾患における Th1-Th2 バランスの Th2 への偏倚に対する IL-4 の重要性⁴⁾に合致するものである。さらに、アレルギー疾患のゲノムワイドの連鎖解析によって、IL-4 遺伝子を含む染色体 5q31-33 は人種を超えて疾患感受性遺伝子の候補領域としてマッピングされた。しかしながら、IL-4 遺伝子と喘息、アトピー性皮膚炎との関連については、否定的な報告^{34, 36, 37)}、IL-4 遺伝子に隣接する IL-13 遺伝子領域の多型の関与を示唆する報告²⁴⁾もあり、いまだコンセンサスは得られていない。1 型糖尿病および自己免疫性甲状腺疾患については、日本人 1 型糖尿病において IL-4 遺伝子 C(-589)T 多型との関連を認めないという報告があり³⁸⁾、英国白人における自己免疫性甲状腺疾患患者で-589T allele が有意に少ないと報告されたが²⁹⁾、その後の多数例の検討では否定されている³⁰⁾。今回の我々の検討でも、C(-589)T 多型および C(-33)T 多

Table 2. Linkage disequilibrium of the IL-4 gene polymorphisms

Polymorphism	C(-589)T	C(-144)T	C(-33)T
C(-589)T	-	-	-
C(-144)T	-0.15	-	-
C(-33)T	24.83	-0.64	-

t-value was calculated by the method of Mittal. When the t-value was more than 2.0, the linkage disequilibrium was considered statistically significant.

Table 3. Genotype and allele distribution of C(-589)T polymorphism of the IL-4 gene

	Type 1 diabetes n=113	Graves' disease n=89	Hashimoto's thyroiditis n=57	Control n=207
Genotype				
CC	9 (8.0%)	14 (15.7%)	3 (5.6%)	24 (11.6%)
TC	53 (46.9%)	43 (48.3%)	32 (56.1%)	105 (50.7%)
TT	51 (45.1%)	32 (36.0%)	22 (38.6%)	78 (37.7%)
p value	0.3401	0.6213	0.3653	
Allele				
C	71 (31.4%)	71 (39.9%)	38 (33.3%)	153 (37.0%)
T	155 (68.6%)	107 (60.1%)	76 (66.7%)	261 (63.0%)
p value	0.1601	0.5001	0.4759	

Data are n(frequency) or p.

Table 4. Genotype and allele distribution of C(-144)T polymorphism of the IL-4 gene

	Type 1 diabetes n=114	Graves' disease n=92	Hashimoto's thyroiditis n=57	Control n=221
Genotype				
CC	108 (94.7%)	90 (97.8%)	56 (98.2%)	220 (99.5%)
CT	6 (5.3%)	2 (2.2%)	1 (1.8%)	1 (0.5%)
TT	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
p value	0.0035	0.1544	0.2998	
Allele				
C	222 (97.4%)	182 (98.9%)	113 (99.1%)	441 (99.8%)
T	6 (2.6%)	2 (1.1%)	1 (0.9%)	1 (0.2%)
p value	0.0037	0.1554	0.3006	

Data are n(frequency) or p.

Table 5. Genotype and allele distribution of C(-33)T polymorphism of the IL-4 gene

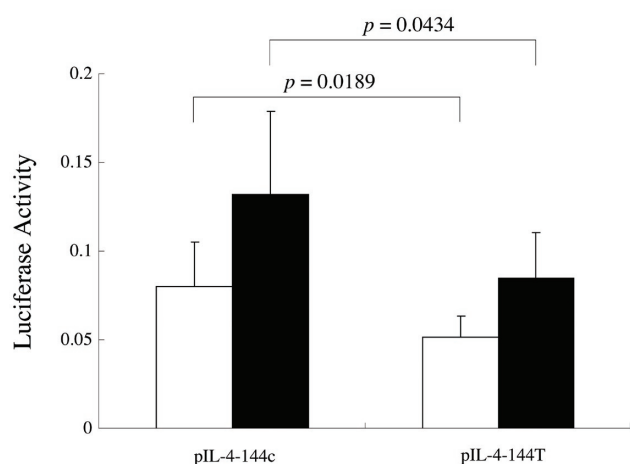
	Type 1 diabetes n=114	Control n=221
Genotype		
CC	9 (8.0%)	19 (8.6%)
TC	50 (44.2%)	106 (47.7%)
TT	54 (47.8%)	97 (43.7%)
<i>p</i> value	0.7761	
Allele		
C	68 (30.1%)	144 (32.4%)
T	158 (69.9%)	300 (67.6%)
<i>p</i> value	0.5373	

Data are n(frequency) or *p*.

Table 6. C(-144)T genotypes and clinical characteristics in Type 1 diabetes patients

	CT genotype n=6	CC genotype n=108
Age at onset (year)	36.5±14.1	35.6±16.6
GAD antibody positive	66.6%	65.7%
IA-2 antibody positive	50.0%	22.2%
Family history of diabetes	16.6%	38.0%
Associated autoimmune thyroid disease	33.3%	20.8%

Data are mean±SD, frequency.

**Fig. 2.** Effects of the C(-144)T polymorphism on promoter activity of IL-4 gene. The 5'-flanking region of the IL-4 gene from position -203 to -50 containing either -144C or -144T was subcloned into the pGL3-Basic vector (pIL-4-144C and pIL-4-144T, respectively). Transcriptional promoter activity in Jurkat cells was compared by dual-luciferase assay system. The experiments were performed eight times. The activity of the -144T allele, both stimulated and unstimulated, was significantly lower than that of the -144C allele.

型と1型糖尿病および自己免疫性甲状腺疾患（Graves病，橋本病）との関連は認めず，これらの多型は1型糖尿病，自己免疫性甲状腺疾患の発症に関与している可能性は低いと考えられた。

本研究で行った IL-4 遺伝子多型のスクリーニングにより，すでに報告されている C(-589)T 多型，C(-33)T 多型に加え，プロモーター領域にこれまでに報告のない新たな多型である C(-144)T を見出した．この多型の -144T allele はコントロール 221 例中 1 例にしか認められない稀なものであったが，1 型糖尿病では 114 例中 6 例に認め，genotype, allele とも有意に高率であった．Graves 病，橋本病においても -144T allele は増加していたが，有意ではなかった．C(-144)T は C/EBP μ および AP-1 という 2 つの転写因子結合部位が重なった配列の末端に当たり³⁹⁾ (Fig. 1), C/EBP β , NFAT, NF-Y, HMGI/Y などが結合することが知られている⁴⁰⁾. C(-144)T の転写活性を検討するために IL-4 遺伝子 5' 上流領域の -203 ~ -50 の部位を pGL3 -Basic vector の luciferase 遺伝子上流に組み込み，dual-luciferase assay による検討を行った．1 型糖尿病に有意に高頻度に認められた C(-144)T 多型の T allele の配列を組み込んだ plasmid では C allele の配列を組み込んだ plasmid に比較して転写活性が有意に低いことが示された．したがって，C(-144)T 多型の T allele では IL-4 の転写活性が低下し Th1-Th2 バランスが Th1 優位へ傾くことが考えられ，そのことが 1 型糖尿病との関連の理由である可能性が示唆された．

本研究では，1 型糖尿病との合併頻度が高く，やはり臓器特異的自己免疫疾患である自己免疫性甲状腺疾患と C(-144)T 多型との関連も検討したが，T allele の頻度は自己免疫性甲状腺疾患患者で増加していたが有意ではなかった．また，1 型糖尿病症例において C(-144)T 多型の T allele の保有者と非保有者の臨床像を比較したが，発症年齢，自己抗体陽性率，糖尿病家族歴，自己免疫性甲状腺疾患合併の有無などに有意差は認めなかった．このことは，C(-144)T 多型単独の影響は多因子疾患である 1 型糖尿病および自己免疫性甲状腺疾患においてあまり大きいものではないことを意味しているのかもしれない．しかし，C(-144)T は比較的稀な多型ではあるが IL-4 の転写活性の低下に関連し，1 型糖尿病患者の中で 1 つの亜集団を形成して疾患感受性マーカーとなりうる可能性がある．この多型の臨床的特徴に及ぼす影響，疾患感受性遺伝子としての意義などを明確にするためには，今後さらに多数例の検討が必要であると思われる．

結 論

今回我々が発見した IL-4 プロモーター多型 C(-144)T は比較的稀な多型であるが，IL-4 遺伝子の転写

活性を低下させ、1型糖尿病の疾患感受性に影響する可能性がある。すなわち、1型糖尿病患者の中に IL-4 遺伝子プロモーター領域において転写活性を低下させる多型を有する患者亜集団が存在する可能性があり、それが感受性マーカーとなりうる事が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導御校閲いただきました埼玉医科大学第四内科片山茂裕教授および直接御指導いただきました栗田卓也助教授に深謝いたします。また、御協力いただきました第四内科の諸先生方と研究室の諸氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Fitch FW, McKisic MD, Lancki DW, Gajewski TF. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu Rev Immunol* 1993;11:29-48.
- 2) Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994;12:635-73.
- 3) Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4+T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 1995;16:34-8.
- 4) Ricci M, Matucci A, Rossi O. IL-4 as a key factor influencing the development of allergen-specific Th2-like cells in atopic individuals. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1997;7:144-50.
- 5) Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 1994;43:613-21.
- 6) Cameron MJ, Arreaza GA, Zucker P, Chensue SW, Strieter RM, Chakrabarti S, et al. IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J Immunol* 1997;159:4686-92.
- 7) Foulis AK, McGill M, Farquharson MA. Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man -macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *J Pathol* 1991;165:97-103.
- 8) Huang X, Yuang J, Goddard A, Foulis A, James RF, Lernmark A, et al. Interferon expression in the pancreases of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 1995;44:658-64.
- 9) 日高洋, 網野信行. 血中サイトカイン測定の臨床的意義 臓器特異的自己免疫疾患とサイトカイン. *臨床病理* 1999;47:335-9.
- 10) Cameron MJ, Strathdee CA, Holmes KD, Arreaza GA, Dekaban GA, Delovitch TL. Biologic-mediated interleukin 4 gene transfer prevents the onset of type 1 diabetes. *Hum Gene Ther* 2000;11:1647-56.
- 11) Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, et al. Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1993;178:87-99.
- 12) Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Delovitch TL. Regulatory natural killer T cells protect against spontaneous and recurrent type 1 diabetes. *Ann NY acad* 2002;958:77-88.
- 13) Baxter AG, Kinder SJ, Hammond KJ, Scollay R, Godfrey DI. Association between $\alpha\beta$ TCR+CD4-CD8-T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 1997;46:572-82.
- 14) Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, et al. The natural killer T-cell ligand α -Galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 2001;7:1052-6.
- 15) Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, et al. Extreme Th1 bias of invariant V α 24J α Q T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998;391:177-81.
- 16) Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Maki T, Miyamoto T, et al. Evidence for linkage between asthma/atopy in childhood and chromosome 5q31-q33 in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1390-3.
- 17) Yokouchi Y, Nukaga Y, Shibasaki M, Noguchi E, Kimura K, Ito S, et al. Significant evidence for linkage of mite-sensitive childhood asthma to chromosome 5q31-q33 near the interleukin 12B locus by a genome-wide search in Japanese families. *Genomics* 2000;66:152-60.
- 18) Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ. A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am J Hum Genet* 2000;67:1154-62.
- 19) Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, Lindblad K, Steinhart H, Cohen Z, et al. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 2001;29:223-8.
- 20) Morahan G, Huang D, Ymer SI, Cancilla MR, Stephen K, Dabadghao P, et al. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. *Nat Genet* 2001;27:218-21.
- 21) Sakai K, Shirasawa S, Ishikawa N, Tamai H, Kuma K, Akamizu T, et al. Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-q33 and

- Hashimoto's thyroiditis to 8q23-q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japanese. *Hum Mol Genet* 2001;10:1379-86.
- 22) Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK, Inamura H, Mascali JJ, Klennert M, et al. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 1995;25(suppl 2): 74-8.
 - 23) Aithal GP, Day CP, Leathart J, Daly AK, Hudson M. Association of single nucleotide polymorphisms in the interleukin-4 gene and interleukin-4 receptor gene with Crohn's disease in a British population. *Genes Immun* 2001;2:44-7.
 - 24) Noguchi E, Nukaga-Nishio Y, Jian Z, Yokouchi Y, Kamioka M, Yamakawa-Kobayashi K, et al. Haplotypes of the 5' region of the IL-4 gene and SNPs in the intergene sequence between the IL-4 and IL-13 genes are associated with atopic asthma. *Hum Immunol* 2001;62:1251-7.
 - 25) Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kawashima T, et al. Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 1998;28:449-53.
 - 26) Burchard EG, Silverman EK, Rosenwasser LJ, Borish L, Yandava C, Pillari A, et al. Association between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV1 in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:919-22.
 - 27) 栗田卓也. 1型糖尿病疾患感受性遺伝子. *内科* 2001;87:1558-61.
 - 28) She JX, Marron MP. Genetic susceptibility factors in type 1 diabetes-linkage, disequilibrium and functional analyses-. *Curr Opin Immunol* 1998;10:682-9.
 - 29) Hunt PJ, Marshall SE, Weetman AP, Bell JI, Wass JA, Welsh KI. Cytokine gene polymorphisms in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1984-8.
 - 30) Heward JM, Nithiyananthan R, Allahabadia A, Gibson S, Franklyn JA, Gough SC. No association of an Interleukin 4 gene promoter polymorphism with Graves' disease in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3861-3.
 - 31) American Diabetes Association: clinical practice recommendations 1997. *Diabetes Care* 1997;20(Suppl 1):S1-70.
 - 32) Mittal KK. The HLA polymorphism and susceptibility to disease. *Vox Sang* 1976;31:161-73.
 - 33) Takabayashi A, Ihara K, Sasaki Y, Kusuhaara K, Nishima S, Hara T. Novel polymorphism in the 5'-untranslated region of the interleukin-4 gene. *J Hum Genet* 1999;44:352-3.
 - 34) Elliott K, Fitzpatrick E, Hill D, Brown J, Adams S, Chee P, et al. The -590C/T and -34C/T interleukin-4 promoter polymorphisms are not associated with atopic eczema in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:285-7.
 - 35) Kawashima T, Noguchi E, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K, Nakagawa H, Otsuka F, et al. Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J Med Genet*. 1998;35: 502-4.
 - 36) Hijazi Z, Haider MZ. Interleukin-4 gene promoter polymorphism [C590T] and asthma in Kuwaiti Arabs. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122:190-4
 - 37) Walley AJ, Cookson WO. Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy. *J Med Genet* 1996;33:689-92.
 - 38) Kanemitsu S, Takabayashi A, Sasaki Y, Kuromaru R, Ihara K, Kaku Y, et al. Association of interleukin-4 receptor and interleukin-4 promoter gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42:1298-300.
 - 39) Li-Weber M, Salgame P, Hu C, Davydov IV, Laur O, Klevenz S, et al. Th2-specific protein/DNA interactions at the proximal nuclear factor-AT site contribute to the functional activity of the human IL-4 promoter. *J Immunol* 1998;161:1380-9.
 - 40) Davydov IV, Krammer PH, Li-Weber M. Nuclear factor-IL6 activates the human IL-4 promoter in T cells. *J Immunol* 1995;155:5273-9.