

厚生科学研究費補助金
感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業

遺伝子情報に基づいた
抗脂質メディエーター薬適正投与の検討

平成 13 年度総括・分担研究報告書

主任研究者 浅野 浩一郎

平成 14 (2002) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告	1
遺伝子情報に基づいた抗脂質メディエーター薬適正投与の検討 浅野 浩一郎	
II. 分担研究報告	
1. 日本人における変異型 PAF 受容体遺伝子の同定と 機能解析 浅野 浩一郎	6
2. 日本人喘息患者におけるロイコトリエン産生酵素 遺伝子多型と cysLT ₁ 拮抗薬の臨床効果 山口 佳寿博	14
3. ロイコトリエン産生・代謝酵素の個体差に関する 基礎的検討 石坂彰敏	20
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	24
IV. 研究成果の刊行物・別刷	26

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）
総括研究報告書

遺伝子情報に基づいた抗脂質メディエーター薬適正投与の検討

主任研究者 浅野 浩一郎
慶應義塾大学医学部 呼吸循環器内科 講師

研究要旨

ロイコトリエン、トロンボキサンなどの脂質メディエーターの作用を抑制する薬剤（抗脂質メディエーター薬）は強力かつ安全な喘息治療薬であるが薬剤の効果に比較的大きい個体差があり、しかもどの薬剤がどの患者に奏功するのかを事前に予測する有効な手段が存在しない。本研究では患者の脂質メディエーターの産生・代謝酵素、受容体などの遺伝子情報に基づいて、適切な抗脂質メディエーター薬の選択を行うことが可能かどうかの基礎的、臨床的検討を行った。平成 13 年度の検討では三つの知見が得られた。① 血小板活性化因子受容体細胞内第 3 ループのアラニン-アスパラギン酸置換変異を日本人の約 15%に見出した。変異型受容体の細胞内情報伝達機構は障害されており、この変異を持つ患者では血小板活性化因子受容体拮抗薬が奏功しにくい可能性が示唆された。② ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子の C(-444)アレルの有無がロイコトリエン受容体拮抗薬プラナルカストの肺機能改善効果の予測因子となりうることを見いだした。③ ロイコトリエン代謝酵素（γグルタミルロイコトリエンナーゼ、ジペプチダーゼ）遺伝子のアミノ酸標識領域および 5'上流領域に 10 個の遺伝子多型を見出した。これらの知見が抗脂質メディエーター薬の選択に応用できる可能性について今後検討を続けていく。

分担研究者

山口佳寿博 慶應義塾大学医学部 呼吸循環器
内科 助教授
石坂彰敏 東京電力病院 検査科 科長

ロイコトリエン、トロンボキサンなどの脂質メディエーター合成阻害薬あるいは受容体拮抗薬は現在の喘息治療のガイドラインではステロイド薬と並ぶコントローラーとして位置づけられている。これら抗脂質メディエーター薬は、

（1）従来の抗アレルギー薬と比較して有効性が高い、（2）吸入ステロイド薬単独で治療効果が不十分な症例に相加効果が期待できる、（3）経口薬であるため服薬コンプライアンスが良い、などの利点を有しており、軽症例から重症例までの喘息治療において有用であるとされている。しかし、これらの薬剤は吸入ステロイド薬と異なり必ずしもすべての患者に奏功しない（奏効率 50-60%）ため、無効な患者に投与されると不必要な副作用をきたしたり無駄な医療費がかかることになる。かといって有効な抗脂質メディエーター薬が試みられなければ、喘息のコントロールが不十分となったり、ステロイド薬投与量が必要以上に多くなる場合もありうる。しかし現時点では事前に抗脂質メディエーター薬の効果を予測する有効な手段が存在せず、いずれの抗脂質メディエーター薬も実際に長期間投与してみなければその効果がわからない。

A. 研究目的

脂質メディエーターとは、刺激により主要膜構成成分であるリン脂質やコレステロールから産生される生理活性物質であり、免疫系の調整、炎症・抗炎症作用、平滑筋の収縮弛緩など様々な作用を発揮する。以前から知られていたプロスタグランジン、ロイコトリエン、血小板活性化因子（PAF）などに加えて、最近ではリゾフォスファチジン酸、スフィンゴシン1リン酸など新しい脂質メディエーターも重要な生理活性を持つことが明らかになりつつある。脂質メディエーターの中でもロイコトリエン、血小板活性化因子、トロンボキサンは気管支平滑筋の収縮作用、好酸球などの炎症細胞遊走作用等を介して喘息の病態を修飾しており、その合成阻害薬あるいは受容体拮抗薬のなかには喘息における治療薬としての有効性が確立しているものも多い。

抗脂質メディエーター薬を含む全ての薬物において、薬効の個体差には年齢、性別、体格、人種など患者側の様々な要因が関与している。しかしそれらの要因を一致させてもなお説明できない個体差が存在する。個体差に併せた治療を行うためには一部の薬剤では直接、血中濃度を迅速測定することが有用な場合がある。しかし、すべての薬剤で血中濃度を測定していたのでは多大な時間、コストと労力が必要になってしまうし、たとえ血中濃度が同じでも、同じ治療効果、副作用を生じるとは限らない。そこで個体差を考慮した、より合理的な薬物治療を行うために“遺伝子情報”を利用する薬理遺伝学的アプローチが注目されている。

本研究では患者の遺伝子情報を利用することで科学的根拠に基づいた、より適切な抗脂質メディエーター薬の選択を可能とすることを目的として基礎的ならびに薬理遺伝学的検討を行なう。抗脂質メディエーター薬の場合には(1)生体内での脂質メディエーター産生・代謝速度、(2)脂質メディエーターに対する生体感受性の個体差、の二つが薬剤感受性を規定する重要な因子となっていると考えられる。本研究ではこれらの因子を個別に評価し、特に後者(脂質メディエーター感受性)については健常者(非喘息患者)あるいは健常動物の中から脂質メディエーター高感受性個体と低感受性個体を見つけだして検討する方法を一つのアプローチとして用いた。平成13年度に関してはロイコトリエン産生酵素・代謝酵素および血小板活性化因子(PAF)受容体遺伝子の個体差に関する検討を行った。

B. 研究方法

血小板活性化因子受容体遺伝子に関する検討として、日本人健常者30名の遺伝子をスクリーニングして新規の変異型PAF受容体遺伝子を検出した。この変異型PAF受容体発現細胞を用いて変異型PAF受容体のリガンド親和性、受容体発現量、PAFに対する反応性(細胞内カルシウム応答、イノシトールリン酸産生、cAMP産生抑制、細胞遊走能)を検討した。

ロイコトリエン産生酵素遺伝子に関する検討として、日本人中等量喘息患者50名の末梢血からDNAを抽出し、ロイコトリエン産生酵素(5リポキシゲナーゼ、ロイコトリエンC₄合成酵素)遺伝子のジェノタイプングを行った。これらの

患者にcysLT₁拮抗薬ブランルカスト(450mg/day)を4週間投与し、投与前後での一秒量改善率をブランルカストの臨床効果の指標として検討した。ロイコトリエン産生酵素遺伝子型とブランルカストの臨床効果との関連を単変量解析および多変量解析により検討した。

ロイコトリエン代謝酵素遺伝子に関する検討として、呼吸器症状の安定している日本人中等量喘息患者50名の尿中ロイコトリエンE₄排泄量をHPLC-ELISA法により測定し、同時にロイコトリエン代謝酵素(γグルタミルロイコトリエンナーゼ、ジペプチダーゼ)遺伝子のアミノ酸標識領域および5'上流領域の塩基配列を直接塩基配列決定法により検討した。

DNA採取・解析に関してはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に基づき、慶應義塾大学医学部倫理審査委員会の承諾を得た説明書を用いて被験者の書面での同意を得た上で行った。サンプルはID化して保管し、被験者のプライバシーには特に留意した。

C. 結果

① PAF受容体遺伝子変異の検出と変異型PAF受容体の機能解析

細胞内第3ループに位置する224番目のアミノ酸をアラニンからアスパラギン酸に置換(A224D)するミスセンス変異を日本人の約15%に見出した。変異型受容体のリガンド結合能ならびに発現量については野生型PAF受容体と差がなかったが細胞内情報伝達機構が障害されており、さらにPAFに対する最大遊走能は変異型受容体発現細胞では野生型受容体発現細胞に比べ65.5±7.9%減弱していた。

② ロイコトリエン産生酵素遺伝子型とロイコトリエン受容体拮抗薬の臨床効果との関連

ロイコトリエンC₄合成酵素遺伝子のC(-444)アレルをもつ患者ともたない患者ではβ刺激薬サルブタモールによる気管支拡張効果には差がなかった(一秒量改善率17.5±2.1%対18.7±2.2%)のに対し、ロイコトリエン受容体拮抗薬ブランルカストに対する反応には明らかな違いが認められた(一秒量改善率14.3±5.3%対3.1±2.4%、p<0.01)。10%以上の一秒量改善を示したのはC(-444)アレルをもつ患者14名中9名(64%)であったのに対し、C(-444)アレルを

持たない患者では 34 名中 7 名 (21%) のみであった。

③ ロイコトリエン代謝酵素遺伝子多型の検出
日本人中等量喘息患者 50 名の相乗平均尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量は 326 pg/mg クレアチニンであった。尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量の最も多い 6 名 (平均 1460 pg/mg クレアチニン) と最も少ない 6 名の患者 (平均 114 pg/mg クレアチニン) のロイコトリエン代謝酵素 (γ グルタミルロイコトリエナーゼ、ジペプチダーゼ) 遺伝子のアミノ酸標識領域および 5' 上流領域に 10 個の遺伝子多型を見出した。

D. 考察

薬剤反応性を規定する遺伝子を見出す方法として、反応性の高い患者と低い患者の遺伝子についてゲノム上に数百万個あるといわれる 1 塩基多型 (SNP) を網羅的に検討する方法が考えられるが、現状のテクノロジーでは莫大な費用と時間がかかる。われわれは抗脂質メディエーター感受性規定遺伝子として脂質メディエーターの産生酵素、代謝酵素、受容体の遺伝子に注目して対象遺伝子内の SNP の検出、生物学的意義の解明、臨床的意義の解明という順序で解析するアプローチを選択した。JSNP などの公開 SNP データベースは今回の解析には十分でなく、今回見出した PAF 受容体遺伝子多型、ロイコトリエン代謝酵素遺伝子多型はいずれも JSNP には登録されていなかった。血小板活性化因子受容体の A224D 変異は受容体と G 蛋白との共役に重要な細胞内第 3 ループ内の電荷を変化させることから受容体機能に影響すると予測されたが、今回の詳細な解析により細胞内情報伝達機構を障害することが明らかとなった。日本人の 15% はこの変異型アレルを持っており、今後、PAF 受容体拮抗薬の臨床効果を検討する際にはこの PAF 受容体遺伝子型を検討することで反応性の低い患者をあらかじめ同定し、除外できる可能性がある。ロイコトリエン代謝酵素遺伝子の検討でも電荷を変化させるミスセンス変異が検出されており、今後の変異型酵素の機能解析の結果が待たれる。ロイコトリエン産生酵素遺伝子の多型については今回日本人において初めて検討し、ロイコトリエン受容体拮抗薬の臨床効果との関連解析を行った。その結果、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子のタイプによりロイコトリエン受容体拮抗薬の臨床効果を予測できる可

能性が示唆された。しかし臨床的な薬理作用には薬物動態の個体差も関与している可能性があり、薬物動態についても今後さらに検討する必要があると考えられる。

E. 結論

PAF 受容体、ロイコトリエン代謝酵素遺伝子に新たな遺伝子多型を見出した。PAF 受容体の遺伝子多型は受容体機能を減弱させることから、PAF 受容体拮抗薬の作用にも影響することが示唆された。また既に報告されていたロイコトリエン合成酵素遺伝子の多型が日本人喘息患者におけるロイコトリエン受容体拮抗薬の臨床効果と関連することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

(主任研究者 浅野 浩一郎)

1. K. Fukunaga, S. Ishii, K. Asano, T. Yokomizo, T. Shiomi, T. Shimizu, and K. Yamaguchi. Single nucleotide polymorphism of human platelet-activating factor receptor impairs G-protein activation. *J Biol Chem* 276 (46), 43025-43030, 2001.
2. T. Oguma, K. Asano, T. Shiomi, K. Fukunaga, Y. Suzuki, M. Nakamura, H. Matsubara, H. Sheldon, K. Haley, C. M. Lilly, J. M. Drazen, and K. Yamaguchi. Cyclooxygenase-2 expression during allergic inflammation in guinea pig lungs. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 165 (3): 382-386, 2002.
3. K. Asano, M. Nakamura, T. Oguma, K. Fukunaga, H. Matsubara, T. Shiomi, A. Ishizaka, K. Yamaguchi, and M. Kanazawa. Differential expression of CCR3 ligand mRNA in guinea pig lungs during allergen-induced inflammation. *Inflam Res* 50 (12) 625-630, 2001.
4. K. Fukunaga, K. Asano, X.-Q. Mao, P.-S. Gao, M.H. Roberts, T. Oguma, T. Shiomi, M. Kanazawa, C.N. Adra, T. Shirakawa, J.M. Hopkin and K. Yamaguchi. Genetic polymorphisms of CC chemokine receptor 3 in Japanese and British asthmatics. *Eur Respir J* 17 (1): 59-63, 2001.
5. K. Asano. Asthma and pharmacogenetics.

International Review of Asthma 3 (1): 64-73, 2001.

6. 浅野浩一郎 気道過敏性の遺伝的素因 アレルギー科 11 (6)、520-525、2001.
7. 浅野浩一郎 喘息治療の新しい動向 テーラーメイド医療 診断と臨床 89 (12)、2228-2232、2001.
8. 浅野浩一郎 遺伝子からみた喘息薬物治療呼吸 20 (9)、842-851、2001
9. 浅野浩一郎 脂質メディエーターと喘息 その遺伝的多様性 埼玉県医学会雑誌 35 (6)、700-704、2001.
10. 浅野浩一郎 気管支喘息と脂質メディエーター遺伝子 アレルギーの臨床 22 (1)、44-49、2002.
11. 浅野浩一郎 アラキドン酸代謝酵素遺伝子多型と喘息治療薬の効果 炎症と免疫 10 (2)、157-163、2002.

(分担研究者 山口 佳寿博)

1. Fukunaga, K., Asano, K., Mao, X.-Q., Gao, P.S., Roberts, M.H., Oguma, T., Shiomi, T., Kanazawa, M., Adra, C.N., Shirakawa, T., Hopkin, J.M. and Yamaguchi, K.: Genetic polymorphisms of CC chemokine receptor 3 in Japanese and British Asthmatics. *Eur. Respir. J.* 17(1):59-63, 2001.
2. Ishizaka, A., Watanabe, N., Yamashita, T., Ogawa, Y., Koh, H., Hasegawa, N., Nakamura, H., Asano, K., Yamaguchi, K., Kotani, M., Kotani, T., Morisaki, H., Takeda, J., Kobayashi, K. and Ogawa, S.: A new bronchoscopic microsample probe to measure the biological constituents in epithelial lining fluid of patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 29(4):896-898, 2001.
3. Nishio, K., Suzuki, Y., Takeshita, K., Aoki, T., Kudo, H., Sato, N., Naoki, K., Miyao, N., Ishii, M. and Yamaguchi, K.: Differential effects of hypercapnia and hypocapnia on intracellular calcium mobilization in human pulmonary artery endothelial cells. *J. Appl. Physiol.* 90(6):2094-2100, 2001.
4. Ishizaka, A., Hasegawa, N., Nakamura, K., Takagi, Y., Takano, M., Takada, Y., Yamaguchi, K. and Kubo, K.: Usefulness of pulmonary vascular leakiness assessment in interstitial pneumonitis. *Chest* 119(5):1455-1460, 2001.
5. Terashima, T., Amakawa, K., Matsumaru, A., Eeden, S., Hogg, J. and Yamaguchi, K.: Bronchoalveolar lavage induces an increase in peripheral blood neutrophils and cytokine levels in healthy volunteers and patients with pneumonia. *Chest* 119(6):1724-1729, 2001.
6. Tateno, H., Nakamura, H., Minematsu, N., Ohkubo, Y., Amakawa, K., Terashima, T., Fujishima, S., Luster, A.D., Lilly, C.M. and Yamaguchi, K.: Eotaxin and monocyte chemoattractant protein-1 in chronic eosinophilic pneumonia. *Eur. Respir. J.* 17(5):962-968, 2001.
7. Fukunaga, K., Ishii S., Asano, K., Yokomizo, T., Shiomi, T., Shimizu, T. and Yamaguchi, K.: Single nucleotide polymorphism of human platelet-activating factor receptor impairs G-protein activation. *J. Biol. Chem.* 276(46):43025-43030, 2001.
8. Nakamura, H. Luster, A.D., Jedrzkiewicz, S., Tamura, G., Haley, K.J., Garcia-Zepeda, E.A. Yamaguchi, K. and Lilly, C.M.: IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells. *Am. J. Physiol. (Lung Cellular and Molecular Physiology)* 281(5):L1288-L1302, 2001.
9. Minematsu, N., Nakamura, H., Tateno, H., Nakajima, T. and Yamaguchi, K.: Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. *Biochem. Biophys. Res. Commun. (BBRC)* 289(1):116-119, 2001.
10. Yamaguchi, K., Soejima, K., Koda, E. and Sugiyama, N.: Inhaling gas with different CT densities allows detection of abnormalities in the lung periphery of patients with smoking-induced COPD. *Chest* 120(6):1907-1916, 2001.
11. Asano, K., Nakamura, M., Oguma, T., Fukunaga, K., Matsubara, M., Shiomi, T., Ishizaka, A., M. Kanazawa and Yamaguchi, K.: Differential expression of CCR3 ligands mRNA in guinea pig lungs during allergen-induced inflammation. *Inflamm. Res.* 50(12):625-630, 2001.
12. Itoh, Y., Oyamada, Y., Hakuno, H. and Yamaguchi, K.: Morphological analysis of developmental changes in pontine noradrenergic neuronal groups in the neonatal rat. *Brain Res.* 925(1):107-109, 2002.
13. Oguma, T., Asano, K., Shiomi, T., Fukunaga,

K., Nakamura, M., Matsubara, H., Lilly, C.M., Drazen, J.M. and Yamaguchi, K.: Cyclooxygenase-2 expression during allergic inflammation in guinea pig lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165(3):382-386, 2002.

14. Hasegawa, N., Miura, T., Ishii, K., Yamaguchi, K., Lindner, TH., Merritt S., Matthews, JD. and Siddiqi, SH.: A new simple and rapid test for culture confirmation of *M. tuberculosis* - A multi-center study. *J. Clin. Microbiol.* 40(3):908-912, 2002.

(分担研究者 石坂 彰敏)

1. Koshika T, Ishizaka A, Nagatomi I, Sudo Y, Hasegawa N.: Pretreatment with FK506 improves survival and gas exchange in canine acute lung injury. *Am J Respi Crit Care Med* 163, 79-84, 2001
2. Ishizaka A, Watanabe N, Yamashita T, Ogawa Y, Koh H, Hasegawa N, Nakamura H, Asano K, Yamaguchi, Kotani M, Kotani T, Morisaki H, Takeda J, Kobayashi K, Ogawa S.: A New bronchoscopic microsample probe to measure the biochemical constituents in epithelial lining fluid of patients with ARDS. *Critical Care Medicine* 2001 ; 29: 896-898
3. Ishizaka A, Hasegawa N, Nakamura K, Takagi Y, Takano M, Yamaguchi K, A Kubo.: Usefulness of pulmonary vascular leakiness assessment in interstitial pneumonitis. *Chest* 2001; 119:1455-1460.
4. Asano K, Nakamura M, Oguma T,

Fukunaga K, Matsubara H, Shiomi T, Ishizaka A, Yamaguchi K and Kanazawa M. Differential expression of CCR3 ligand mRNA in guinea pig lungs during allergen-induced inflammation. *Inflammation Research*, 2001, 50; 625-630

5. Albertine K, Soulier M, Wang Z, Ishizaka A, Hashimoto S, Zimmerman W, Matthay M, Ware L. Fas and Fas Ligand are Upregulated in Pulmonary Edema Fluid and Lung Tissue of Patients with Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome *Am J Pathol* (in press)
6. N Hasegawa, T Miura, Ishizaka A, K Yamaguchi, K Ishii. Detection of Mycobacteria from Patients with Pulmonary Tuberculosis Undergoing Chemotherapy Using MGIT and Egg-based Solid Media Culture Systems. *Int J Tuberc Lung Dis* (in press)
7. 石坂彰敏、渡辺真純: 気管支鏡下マイクロサンプリング法と肺癌診断 *総合臨床* 50, 2242-2244, 2001
8. 永井厚志、石坂彰敏、宮下明: ベストサポートをめざした呼吸管理 *臨床医* 27 ; 2048-2060, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

日本人における変異型 PAF 受容体遺伝子の同定と機能解析

主任研究者 浅野 浩一郎

慶應義塾大学医学部 呼吸循環器内科 講師

研究要旨

血小板活性化因子（PAF）は喘息の病態に重要な役割を持つと考えられている脂質メディエーターであるが、この PAF に対する感受性の個体差は非常に大きい。われわれは PAF 受容体遺伝子に注目し、PAF 反応性を変化させているような遺伝子変異の検出を試みた。日本人健常者 30 名の遺伝子をスクリーニングしたところ、細胞内第 3 ループに位置する 224 番目のアラニンをアスパラギン酸に置換するミスセンス変異を見出した。この変異は日本人の約 15% に認められた。変異型受容体を HEK293 細胞あるいは CHO 細胞に一過性あるいは安定発現させ検討したところ、変異型 PAF 受容体の PAF に対する細胞内情報伝達機構（細胞内カルシウム応答、イノシトールリン酸産生、cAMP 産生抑制）は障害されていた。さらに PAF に対する最大遊走能は野生型受容体発現細胞に比べ 65.5 ± 7.9 % 減弱していた。

A. 研究目的

血小板活性化因子（PAF）は喘息の病態に重要な役割を持つと考えられている脂質メディエーターである。好塩基球を活性化させる物質として発見されたが、それ以外にも好酸球の強力な遊走・活性化因子でもあり、またモルモット気管支平滑筋に対しては PAF 自体が直接の収縮作用を有している。ヒト気管支平滑筋に対しては直接の収縮作用はないもののトロンボキサンやロイコトリエンを介した気管支収縮作用を発揮する。PAF の様々な生理活性は 7 回膜貫通型 G 蛋白共役受容体である PAF 受容体を介して発揮される。PAF 受容体遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは PAF のみならずメサコリンに対する気道反応性も亢進する。逆に PAF 受容体遺伝子を発現しないノックアウトマウスでは、抗原反復吸入によって生じるアレルギー性気道炎症が抑制される。この 2 種類のマウスでの実験データは PAF とその受容体が喘息に関与することをさらに裏付けるデータである。いままでに喘息治療薬として様々な PAF 受容体拮抗薬が開発されてきた。モルモットやラットなどの動物実験レベルで有効性が確認された PAF 受容体拮抗薬はいくつかあり、その中で毒性の少ない化合物についてはヒト喘息患者での臨床試験も行われた。しかしながらヒトにおける臨床試験ではその有効性が必ずしも顕著ではなく、現時点で臨床応用されている PAF 受容体

拮抗薬はないのが現状である。

PAF 受容体拮抗薬の効果がヒトでの臨床試験で一定しなかった原因のひとつには PAF に対する感受性の個体差が考えられる。PAF に対する反応性の高い個体では PAF 受容体拮抗薬の効果は高いと予測されるが、PAF に対してもともと反応性の低い個体では PAF 以外の分子が喘息の病態に主に関与していると考えられ、PAF 受容体拮抗薬の効果はあまり期待できないと予測される。

実際に PAF 吸入試験における反応の個体差の大きさは非常に大きい。ヒトに PAF を吸入させた場合には、血管拡張作用としての顔面紅潮・動悸や、気管支収縮作用、気道過敏性亢進作用などが認められる。また、PAF 吸入後には一過性の好中球減少症とガス交換障害（ $AaDO_2$ の開大）が生じている。ところが、われわれ自身の検討を含む過去のいずれの報告においても、個々のデータをよくみると PAF に対する反応性は個体間で大きな差があり、きわめて高濃度の PAF を吸入しても全く反応しない被験者もいる。環境因子を均一にして遺伝的背景のみが異なる純系マウスでも PAF 反応性の系統差が認められることが報告されており、何らかの遺伝素因が関与していると考えられる。PAF 投与後にメサコリン反応性が亢進する現象を利用して検討した結果では PAF 反応性は常染色体劣性遺伝している可能性が示唆されている。

この PAF 感受性の違いは個体レベルのみに限らない。PAF 受容体は Gq 蛋白に共役しているので、これを介してイノシトールリン酸産生をきたし、それが細胞内カルシウムを上昇させるが、PAF に対する不活化 B リンパ球の細胞内カルシウム濃度の変化には著しい個体差が存在し、やはり殆ど PAF に反応しないような個体も存在していることが報告されている。われわれは PAF 受容体遺伝子に注目し、その機能を変化させているような遺伝子変異の検出を試みた。

B. 研究方法

(1) 対象

平成 8 年 12 月から平成 9 年 5 月までに慶應義塾大学病院呼吸器内科外来を受診した発作寛解期にある喘息患者 279 名を対象とした。治療内容、血液検査所見 (IgE RIST, IgE RAST など) に加え質問表方式により発症年齢、既往歴、家族歴、喘息発作の頻度・程度を確認し、それらの結果に基づいて病型および重症度を確定した。アトピー型は IgE 値の上昇、あるいは特異的 IgE 抗原 (ダニ、ネコ、真菌) が 1 個以上陽性のものとした。重症度は NIH ガイドラインの判定基準によった。対照群として喘息を有さない健康人 116 名を選択した。

DNA 採取・解析に関してはヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) に基づき、慶應義塾大学医学部倫理審査委員会の承諾を得た説明書を用いて被験者の書面での同意を得た上で行った。サンプルは ID 化して保管し、被験者のプライバシーには特に留意した。

(2) ヒト PAF 受容体遺伝子変異の検出

6 人の日本人健康者から抽出した DNA を用いて直接塩基配列法により遺伝子変異を検出した。イントロンを持たない 1029 bp からなるヒト PAF 受容体遺伝子を既に報告されている塩基配列をもとに PCR (polymerase chain reaction) を用いて増幅した。Taq DNA polymerase (AmpliTaq Gold, Perkin-Elmer, Foster City, CA) を用いて反応液を調整し、95°C 9 分間加熱、活性化した後速やかに PCR を施行した。PCR 産物は自動シーケンサー (ABI 373S, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) を用いて塩基配列を決定した。さらに喘息患者を含む 30 名の日本人から抽出した DNA を用いて PCR-single

nucleotide conformation polymorphism (SSCP) 法によるスクリーニングを行った。

(3) PAF 受容体 A224D タイピング

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法により PAF 受容体 A224D 遺伝子多型を検出した。センスプライマー (5'-CCACAGCGCCCGGCGCTTGACTGCA-3') とアンチセンスプライマー (5'-ATCGTGTTGAGCTTCTTCCTGGTCT-3') を用いて増幅した PCR 産物を制限酵素 Pst I (New England Biolab, Beverly, MA) とともに 37°C、2 時間加熱し、3% アガロースゲル (NuSieve 3:1 agarose, FMC, Rockland, ME) 上で電気泳動を施行した。このとき、野生型アレルは 105 bp と 24 bp の断片として、変異型アレルは制限酵素により切断されず 129 bp の産物として泳動された。

(4) PAF 変異受容体発現細胞の作製

ヒト PAF 受容体 cDNA を鋳型として Quick Change Site-Directed Mutagenesis キット (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて変異型ヒト PAF 受容体 cDNA を作製した。作製した変異型 cDNA は直接塩基配列法でその配列を確認した。野生型、変異型 PAF 受容体 cDNA を pcDNA3.1 ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) にサブクローニングした。次に Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に野生型あるいは変異型 PAF 受容体 cDNA をリポフェクション法を用いて安定に発現させた。CHO 細胞を培養したディッシュに Transfectum (BioSeptra, Inc., Marlborough, MA) とそれぞれの cDNA を混合した溶液を入れ 48 時間インキュベーションした。これらの CHO 細胞において Geneticin (1.0 mg/ml), (Wako, Osaka, Japan) 耐性クローンを選別し、限外希釈法でいくつかの単一クローンを得た。さらにこれらのクローンから [³H]-PAF (NEN Life Science Products, Inc.) を用いて PAF 受容体高発現クローンを獲得した。以上の方法により 3 つの野生型受容体発現細胞株と 3 つの変異型受容体発現細胞株を確立し、0.3 mg/ml Geneticin、10% ウシ血清、および 100 μg/ml streptomycin と 100 IU/ml penicillin を含んだ Ham's F-12 培地 (Sigma, St Louis, MO) で細胞を維持した。また、一過性発現のためにリポフェクション法を用いて HEK293 細胞に野生型、変異型受容体をそれぞれ発現させた。それぞれの cDNA と LipofectAMINE PLUS (Invitrogen) を混合した溶液を HEK293 細胞にトランスフェクションし、72

時間後にこれらの細胞を採取して実験に用いた。

(5) 結合能実験

野生型、変異型受容体を発現させた CHO 細胞ならびに HEK293 細胞から細胞膜分画を採取して、アゴニスト (PAF) またはアンタゴニスト (WEB2086) に対する結合能実験を行った。プロテアーゼ阻害剤 (Complete; Roche, Mannheim, Germany) を含む HEPES-sucrose 緩衝液 (25 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 0.25 M sucrose, 10 mM MgCl₂) 中で超音波処理 (100 watts, 30 s × 3 回) によって細胞を粉砕し、900 × g、15 分間の遠心処理を行った。さらにこの上清を 10 万 × g で 1 時間超遠心処理を行い、受容体を含む細胞膜分画を採取した。細胞膜分画に [³H]-PAF あるいは [³H]-WEB2086 (370 GBq/mmol)(Du Pont/NEN, Tokyo, Japan)、ならびに各々の競合物質 (非アイソトープ標識の PAF あるいは WEB2086) を加え HEPES-sucrose-bovine serum albumin (BSA, 0.1%; fatty acid-free) 緩衝液で総量 200 μl になるように調整し結合実験をおこなった。この反応液を氷上で 1 時間放置し、GF/C glass-fiber フィルター (Packard, Meriden, CT) に吸着させ、50°C で 3 時間乾燥させた。その後 Top-count microplate scintillation counter (Packard) でプレート上に残った放射活性を測定した。この結果から Scatchard plot を用いてリガンド親和性 (K_d) および受容体発現量 (B_{max}) を求めた。

(6) 細胞内カルシウム濃度変化

野生型あるいは変異型受容体を発現させた CHO 細胞を 2mM EDTA を用いてシャーレからはがして遠心し、HEPES-Tyrode 緩衝液 (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 5.6 mM D-glucose, 0.49 mM MgCl₂, 0.37 mM NaH₂PO₄, 25 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 0.1% BSA) で懸濁した。これに Fura 2-AM (3 μM, Dojin, Kumamoto, Japan) を加え 5% CO₂ 下で 1 時間放置した。その後細胞を遠心して回収し、最終細胞濃度が 2 × 10⁶ cells/ml になるように 1 mM CaCl₂ を含む HEPES-Tyrode 緩衝液に懸濁した。細胞懸濁液 0.5 ml をキュベットにとり、0.01-100 nM PAF およびコントロールとしてトロンピン (10 U/ml) を用いて刺激した。細胞内カルシウム濃度を CAF110 system (Jasco, Tokyo, Japan) を用いて検出し、既に報告されている計算式を用いて濃度に変換した。

(7) イノシトールリン酸産生

野生型あるいは変異型受容体を安定に発現させた CHO 細胞を 5 μCi/ml myo-[³H] inositol (Amersham, Buckinghamshire, UK) とともにイノシトールリン酸を含まない DMEM 培地で 24 時間培養した。その後、細胞をリン酸塩緩衝食液 (PBS) で洗浄し、30 分間培養した後、20 mM LiCl を加えさらに 30 分間培養した。次いで PBS で細胞を洗浄し 0.1-100 nM の PAF、10 U/ml トロンピンでおのおの 10 分間刺激を加え Martinらの方法でイノシトールリン酸を抽出した。刺激後の反応液を回収し、AG1-X8 columns (BioRad, Hercules, CA) に移し、0.1 M formic acid と 1 M formate の溶液を加え、総イノシトールリン酸の抽出を行った。

(8) cAMP 測定

野生型あるいは変異型 PAF 受容体を安定に発現させた CHO 細胞を HEPES-Tyrode 液で 2 回洗浄し 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine を含んだ HEPES-Tyrode 液中で 37°C 10 分間インキュベーションした。その後細胞を 0.1 mM フォルスコリンのみまたは 0.1 mM フォルスコリン + 100 nM PAF で 30 分間刺激した。10% trichloroacetic acid で反応を終了し得られた反応液中の cAMP を radioimmunoassay kit (Amersham) で測定した。

(9) Chemotaxis

PAF 受容体を安定に発現させた CHO 細胞において Chemotaxis を測定した。8 μm pore の polycarbonate フィルター (Neuroprobe, Gaithersburg, MD) を 10 μg/ml fibronectin (Wako, Tokyo, Japan) で覆い、96-well の chemotaxis chamber (Neuroprobe) に充填した。チャンバーの下段には種々の濃度の PAF 溶液 (0-625 nM) を添加した。上段には 2.0 × 10⁵ cells/ml の濃度になるように細胞を調整した。4 時間 37°C でインキュベーションを行った後、フィルターをはがし、Diff-Quick staining kit (International Reagents Corp., Kobe, Japan) で染色した。スペクトロフォトメーターを用いて 595 nm での吸光度を測定しフィルターに移動・接着した細胞数を定量化した。チャンバー下段の PAF 濃度がゼロの時の 595nm で測定したフィルター吸光度に対する各 PAF 濃度における吸光度の比を "Chemotaxis index" と定義し細胞遊走能の定量的指標として用いた。

(10) 統計処理

χ² 検定を用いて各群の遺伝子変異頻度の比較あ

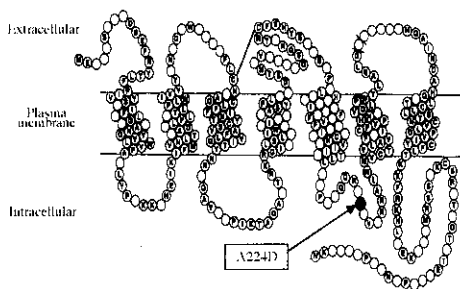
るいは Hardy-Weinberg equilibrium から予測される頻度分布の差を検討した。生化学実験における結果は Student's t-test あるいは post-hoc Scheffe's test を用いた two-way analysis of variance (ANOVA) で統計学的有意差を検討した。結果は平均値 ± 標準偏差で表し、p 値が 0.05 以下の場合に有意差ありと判定した。

C. 研究結果

(1) PAF 受容体遺伝子多型の検索

30 人の日本人健康者をスクリーニングした結果、2 名において未知の PAF 受容体遺伝子変異を見出した。この変異は 671 番目の塩基 C (シトシン) を A (アデニン) に置換し、その結果として細胞内第 3 ループに位置する 224 番目のアラニンをアスパラギン酸に変換する (A224D) ミスセンス変異であった (図 1)。

図1 PAF受容体A224D変異



ヒトPAF受容体細胞内第3ループにA224Dミスセンス変異が存在する。

(2) 結合能実験

この変異 (A224D) によってリガンド結合能ならびに受容体発現量がどのように変化するかを検討した。アゴニストとして放射線標識されたアルキル化 PAF、アンタゴニストとして放射線標識された WEB2086 を用いて野生型、A224D 変異型受容体の K_d 値を受容体安定発現型ならびに一過性発現型細胞を用いて検討した。野生型あるいは変異型受容体を安定発現させた CHO 細胞における PAF あるいは WEB2086 に対する K_d 値はほぼ同等であった。一過性にそれぞれの受容体を発現させた HEK293 細胞における

WEB2086 に対する K_d 値にも明らかな差を認めなかった。さらに一過性に受容体を発現させた HEK293 細胞を用いて受容体発現量の違いを検討したが野生型、変異型細胞間の B_{max} に差を認めなかった。

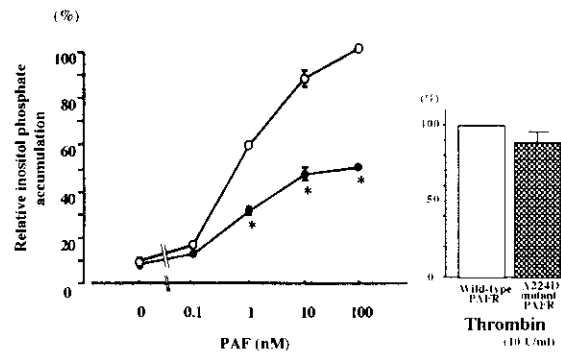
(3) 細胞内カルシウム濃度変化

受容体発現量の差によって細胞内情報伝達機構に差が生じることを避けるために野生型と変異型の受容体発現量がほぼ同等の CHO 細胞を用いて解析した。野生型 PAF 受容体発現細胞 (B_{max} 2.56 ± 0.22 pmol/mg protein)、変異型 PAF 受容体発現細胞 (B_{max} 3.41 ± 0.68 pmol/mg protein) の両者において PAF 濃度に依存して細胞内遊離カルシウム濃度の上昇を認めた。PAF 濃度が 10 nM 以上になると両細胞における細胞内遊離カルシウム濃度はほぼプラトーに達した。100 nM の刺激による細胞内カルシウム濃度は変異型 PAF 受容体発現細胞では野生型 PAF 受容体発現細胞よりも 27.1 ± 3.0 % 低値を示した ($n = 3$, $p < 0.01$)。対照として用いたトロンピンに対する細胞内カルシウム応答は両者間で差を認めなかった。

(4) イノシトールリン酸産生

0.1-100 nM の PAF 刺激に対するイノシトールリン酸産生は野生型、変異型発現細胞で用量依存的に上昇したものの、変異型受容体発現細胞において産生量は有意に減少していた (図 2)。

図2 PAF受容体安定発現CHO細胞におけるイノシトールリン酸産生



イノシトールリン酸産生を野生型 PAF 受容体を発現した CHO 細胞 (○)、変異型 PAF 受容体を発現した CHO 細胞 (●) を用いて 0-100 nM PAF または 10 U/ml トロンピンで 10 分間刺激した。野生型 PAF 受容体細胞での PAF あるいは トロンピンに対する最大反応量を 100% として表した。変異型受容体発現 CHO 細胞では PAF によるイノシトール産生の減弱を認めた。一方でトロンピンに対する反応には差を認めなかった。1 回の実験を duplicate で独立して 3 回の実験を行った。平均値 ± 標準偏差。* $p < 0.001$ (野生型と比較して)。

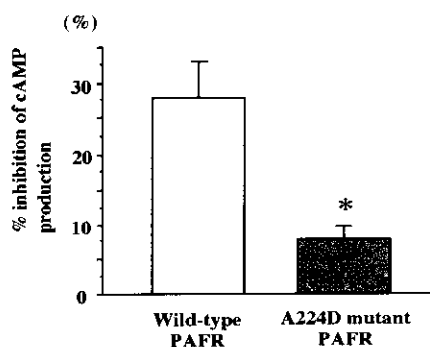
100 nM PAF 刺激によって産生されたイノシトールリン酸は野生型 PAF 受容体発現細胞に比べ変異型では 49.7 ± 1.0 %の減少を認めた ($n=3$, $P < 0.001$)。

さらに変異型 PAF 受容体発現細胞においていかなる G 蛋白経路が抑制されたかを検討する目的で各細胞を百日咳毒素 (PTX) で処理し 100 nM の PAF で刺激した。野生型、変異型 PAF 受容体発現細胞の両者において PTX 処理によってイノシトールリン酸の産生は有意に抑制された。PTX 処理の有無によるイノシトールリン酸産生量より G 蛋白を PTX 感受性 (Gi/Go) と PTX 非感受性 (Gq/11) に分画し各々の G 蛋白経路の関与を検討した。その結果、変異型 PAF 受容体発現細胞では、PTX 感受性、PTX 非感受性の G 蛋白経路がともに有意に抑制されていた。

(5) cAMP 産生能

Gi/Go 蛋白質はアデニルシクラーゼを抑制し cAMP 産生を抑制することから、PAF 受容体を介した cAMP 産生能に対する A224D 変異体の影響について検討した。フォルスコリンのみで刺激した時の cAMP 量を 100%としてフォルスコリン + 100 nM PAF で刺激した場合の cAMP 量をパーセントで表し PAF 刺激による cAMP 産生能を算出した。その結果 cAMP 産生抑制率は野生型発現細胞で 18.6 ± 5.2 %であったのに対し変異型発現細胞では 7.8 ± 2.0 %と有意に低下していた ($n = 4$, $p = 0.01$, 図 3)。

図3 PAF受容体安定発現 CHO細胞における cAMP 産生抑制

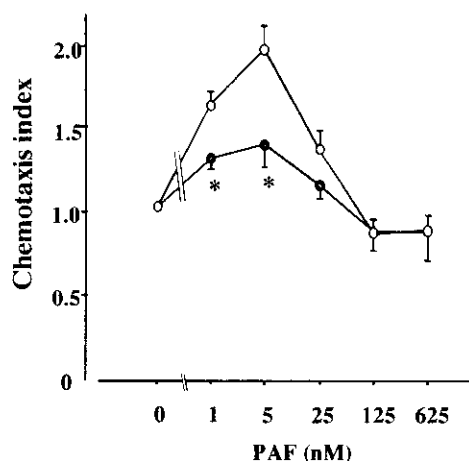


野生型PAF受容体 (open column) あるいは変異型PAF受容体 (shaded column) をフォルスコリンのみあるいはフォルスコリン + 100 nM PAF で刺激した。フォルスコリンのみで刺激した時の cAMP 量を 100%として結果を示した。1回の実験を triplicate で独立して4回の実験を行った。値は平均値 ± 標準誤差で示した。
* : $p < 0.01$ (野生型に比較して)

(6) 細胞遊走能

A224D 変異 PAF 受容体の生物学的意義を検討するために野生型、変異型それぞれの受容体を安定発現させた CHO 細胞を用いて PAF に対する細胞遊走能を測定した。野生型、変異型ともに PAF に対する用量-反応曲線はベル型を示し、5 nM で最大の遊走能を示した。しかしながら、野生型 PAF 受容体発現細胞に比べ変異型 PAF 受容体発現細胞では 65.5 ± 7.9 %の遊走能の減弱を認めた ($n=5$, $P = 0.02$, 図 4)。

図4 PAF受容体安定発現 CHO細胞における細胞遊走能



野生型PAF受容体を発現した CHO細胞 (○)、変異型PAF受容体を発現した CHO細胞 (●) における刺激 PAF 濃度による細胞遊走能の変化を示した。チャンパー下段の PAF 濃度がゼロの時の 595 nm で測定したフィルター吸光度に対する各 PAF 濃度における吸光度の比を "Chemotaxis index" と定義した。変異型 PAF 受容体を発現した細胞では細胞遊走能が減弱していた。1回の実験を triplicate で独立して5回の実験を行った。平均値 ± 標準誤差。* : $p = 0.02$ (野生型に比較して)

(7) 気管支喘息との関連

対照群 116 人、気管支喘息患者群 279 人において PAF 受容体遺伝子多型をスクリーニングした。A224D 変異のアレル頻度は対照群で 8%、気管支喘息患者群では 11%であり、アレル頻度、遺伝子型ともに両群間で有意差を認めなかった。得られた遺伝子型の分布は Hardy-Weinberg equilibrium から予想されるホモ接合体、ヘテロ接合体の頻度とよく一致した。気管支喘息患者群をさらに重症度別、病型別に分けて検討したが、いずれの場合にも遺伝子型頻度に差を認めなかった。

D. 考察

PAF 受容体はそのアゴニストである PAF と結合し、複数の GTP 結合タンパクを介して異なったエフェクターに共役することで、多彩な生物

学的反応を引き起こすと考えられている。われわれはこの PAF に対する反応に個人差が存在する原因として遺伝的素因があると予測し、その中でも PAF 受容体に着目しその遺伝子多型について検討した。

これまで PAF 受容体の遺伝子多型に関する報告は存在しない。われわれはヒト PAF 受容体の細胞内第 3 ループにアミノ酸変異をともなう自然発症のミスセンス変異、A224D を検出した。この遺伝子多型のアレル頻度は日本人対照群で 8%、喘息患者群で 11%であった。全ゲノムスキャン解析ではヒト PAF 受容体遺伝子の位置する第 1 染色体上の領域がアトピー反応に関連する主たる候補領域とは考えられておらず、われわれの検討でもこの変異は気管支喘息の発症、重症度、病型とは無関係であった。このことから PAF 受容体遺伝子変異は喘息発症を発症させる主たる原因ではないと思われる。しかしながら、この変異によって細胞内カルシウム応答、イノシトールリン脂質産生、そしてアデニル酸シクラーゼの阻害作用が有意に減弱することが判明した。さらに、この変異受容体を発現させた細胞では細胞遊走能が有意に抑制された。以上の結果より、PAF 受容体遺伝子変異は気管支喘息の発症自体とは無関係であったが PAF 受容体拮抗薬の臨床効果を修飾する可能性が十分であると推測される。

細胞内第 3 ループは 7 回膜貫通型受容体において G 蛋白との共役を誘起する重要な部位と考えられている。PAF 受容体も Gq/11 や Gi/Go など複数の G 蛋白を介して異なったエフェクターと共役し多彩な生物反応を引き起こすが、その際に細胞内第 3 ループが重要な役割を果たす。特に細胞内第 3 ループ N 末端側に位置する 209 番から 220 番アミノ酸からなる α -ヘリックス構造領域と細胞内第 3 ループ C 末端側に位置する 230 番アラニン、231 番ロイシンについては人為的変異導入により G 蛋白との共役、細胞内情報伝達機構に重要な領域であることが確認されている。今回われわれが日本人で検出した A224D 変異は α -ヘリックス構造領域と C 末端部位との間に位置している。224 番目のアラニンはヒト、マウス、モルモットで保存され、ラットにおいてもこの部位のアミノ酸はアラニンと同様に電荷を帯びないプロリンで占められていることから、陰性電荷を有するアスパラギン酸への置換は受容体機能に何らかの変化をもたらすことが

予測された。今回の検討により、この変異が百日咳毒素感受性 G 蛋白 (Gq/11) と非感受性 G 蛋白 (Gi/Go) の両者を介する作用を減弱させることが示唆された。また、細胞遊走がおこる際には G 蛋白三量体構造から G $\beta\gamma$ の解離が必須であると報告されているので、A224D 変異によって G α と G $\beta\gamma$ の解離が不十分になり、変異型 PAF 受容体発現細胞の遊走能が低下したのと考えられた。

気管支喘息の病態に関与するメディエーターは多数存在する。それらの中で PAF が果たす役割はいまだ明らかではない。PAF 受容体拮抗薬の薬効が期待されたほどではないことから PAF 自体があまり喘息に関与していないのではないかとする研究者もいるが、PAF のように生体の反応性自体に大きな個体差が存在するメディエーターではその阻害薬の薬効にも大きな個体差が生じることは想像に難くない。その個体差を規定する可能性のある遺伝的素因としては今回検討した PAF 受容体遺伝子以外にも PAF 代謝酵素である血漿型 PAF アセチル水解酵素遺伝子があげられる。この遺伝子内のミスセンス変異により日本人の 4% で酵素活性が完全欠損しており、不完全欠損を含めれば 30% で酵素活性に異常がある。今まで有効性が不高いと判定された PAF 受容体拮抗薬もこのような遺伝的因子をあらかじめ調べておき、より薬効の高い患者に選択的に使用すれば新たな喘息治療の modality として有用である可能性は十分であると考えられる。

E. 結論

血小板活性化因子受容体細胞内第 3 ループに位置する 224 番目のアラニンをアスパラギン酸に置換するミスセンス変異を見出した。この変異は日本人の約 15% に認められ、PAF に対する細胞内情報伝達機構 (細胞内カルシウム応答、イノシトールリン酸産生、cAMP 産生抑制)、細胞遊走能を障害していた。喘息の発症との関連はないが、血小板活性化因子受容体拮抗薬の効果と関連する可能性がある。

研究協力者

福永興彦	慶應義塾大学医学部内科	助手
石井聡	東京大学大学院 医学系研究科	生化学 分子生物学講座 (細胞情報部門) 助手
横溝岳志	同	助教授
清水孝雄	同	教授

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. K. Fukunaga, S. Ishii, K. Asano, T. Yokomizo, T. Shiomi, T. Shimizu, and K. Yamaguchi. Single nucleotide polymorphism of human platelet-activating factor receptor impairs G-protein activation. *J Biol Chem* 276 (46), 43025-43030, 2001.
2. T. Oguma, K. Asano, T. Shiomi, K. Fukunaga, Y. Suzuki, M. Nakamura, H. Matsubara, H. Sheldon, K. Haley, C. M. Lilly, J. M. Drazen, and K. Yamaguchi. Cyclooxygenase-2 expression during allergic inflammation in guinea pig lungs. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 165 (3): 382-386, 2002.
3. K. Asano, M. Nakamura, T. Oguma, K. Fukunaga, H. Matsubara, T. Shiomi, A. Ishizaka, K. Yamaguchi, and M. Kanazawa. Differential expression of CCR3 ligand mRNA in guinea pig lungs during allergen-induced inflammation. *Inflam Res* 50 (12) 625-630, 2001.
4. K. Fukunaga, K. Asano, X.-Q. Mao, P.-S. Gao, M.H. Roberts, T. Oguma, T. Shiomi, M. Kanazawa, C.N. Adra, T. Shirakawa, J.M. Hopkin and K. Yamaguchi. Genetic polymorphisms of CC chemokine receptor 3 in Japanese and British asthmatics. *Eur Respir J* 17 (1): 59-63, 2001.
5. K. Asano. Asthma and pharmacogenetics. *International Review of Asthma* 3 (1): 64-73, 2001.
6. 浅野浩一郎 気道過敏性の遺伝的素因 アレルギー科 11 (6)、520-525、2001.
7. 浅野浩一郎 喘息治療の新しい動向 テーラーメイド医療 診断と臨床 89 (12)、2228-2232、2001.
8. 浅野浩一郎 遺伝子からみた喘息薬物治療 呼吸 20 (9)、842-851、2001
9. 浅野浩一郎 脂質メディエーターと喘息 その遺伝的多様性 埼玉県医学会雑誌 35 (6)、700-704、2001.
10. 浅野浩一郎 気管支喘息と脂質メディエーター遺伝子 アレルギーの臨床 22 (1)、44-49、2002.
11. 浅野浩一郎 アラキドン酸代謝酵素遺伝子多型と喘息治療薬の効果 炎症と免疫 10

(2), 157-163, 2002.

学会発表

1. K. Fukunaga, K. Asano, S. Ishii, T. Yokomizo, T. Shiomi, T. Shimizu, Y. Suzuki, and K. Yamaguchi. Functional analysis of naturally-occurring mutant human platelet-activating factor receptor 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
2. K. Fukunaga, K. Asano, S. Ishii, T. Yokomizo, T. Shiomi, T. Shimizu, Y. Suzuki, and K. Yamaguchi. Functional analysis of naturally-occurring mutant human platelet-activating factor receptor The 3rd Triennial World Asthma Meeting. 2001.6
3. Shiomi, T., Asano, K., Oguma, T., Fukunaga, K., Suzuki, Y. and Yamaguchi, K.: Gene expression of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) in guinea pig and murine lungs. The 3rd Triennial World Asthma Meeting. 2001.6.
4. Fukunaga, K., Asano, K., Ishii, S., Yokomizo, T., Shiomi, T., Suzuki, Y., Shimizu, T. and Yamaguchi, K.: Functional analysis of naturally-occurring mutant human platelet-activating factor receptor. The 3rd Triennial World Asthma Meeting. 2001.6.
5. H. Isioka, A. Sonoda, K. Asano, K. Fukunaga, K. Yamaguchi, E. Takeshita, D. Ito, N. Tanahashi, Y. Fukuuchi, I. Saito, T. Yoshida, M. Murata, Y. Ikeda, and K. Watanabe. A polymorphism in the cytoplasmic domain of platelet-activating factor receptor (PAF-R) ²²⁴Ala/Asp, affects PAF-induced signaling and may cause inter-individual variation of platelet responsiveness to PAF. International Meeting of American Society of Hematology 2001.12
6. 浅野浩一郎 遺伝子からみた喘息薬物治療 第14回日本アレルギー協会東北支部秋田分会学術講演会 2001.7
7. 浅野浩一郎 気管支喘息のテーラーメイド治療 市川浦安喘息セミナー 2001.9
8. 浅野浩一郎 ロイコトリエンと遺伝子—その臨床的重要性— 第3回東京ロイコトリエン研究会 2001.11
9. 浅野浩一郎 ロイコトリエンと遺伝子 第51回日本アレルギー学会総会イブニングセミナー (ロイコトリエンの基礎と臨床) 2001.12

10. 浅野浩一郎 喘息治療における5リポキシゲナーゼおよびロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子多型の意義 第14回日本アレルギー学会総会サテライトシンポジウム（気道アレルギーにおける抗ロイコトリエン療法の基礎と臨床） 2002.3
11. 浅野浩一郎 これからの喘息薬物治療—喘息治療ガイドラインからテーラーメイド医

療へ— 第4回奈良喘息フォーラム 2002.3.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

日本人喘息患者におけるロイコトリエン産生酵素遺伝子多型と cysLT₁ 拮抗薬の臨床効果

分担研究者 山口 佳寿博
慶應義塾大学医学部 呼吸循環器内科 助教授

研究要旨

ロイコトリエン合成酵素阻害薬、受容体拮抗薬は副腎皮質ステロイドと並ぶ喘息のコントローラーとしての有効性が確立しているが、30-40%の喘息患者では無効であることがその使用上の制約になっている。2つのロイコトリエン合成系酵素（5 リポキシゲナーゼ、ロイコトリエン C₄ 合成酵素）の遺伝子多型を用いて日本人喘息患者におけるロイコトリエン受容体拮抗薬（プラナルカスト）の効果を予測できないかどうかを検討した。日本人中等症喘息患者 50 名に CysLT₁ 拮抗薬プラナルカスト（225 mg bid）を 4 週間投与した前後で一秒量を測定し、一秒量改善率をプラナルカストの臨床効果の指標とした。ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子の C(-444)アレルの有無と β 刺激薬サルブタモールによる気管支拡張効果には関連がなかった（一秒量改善率 17.5±2.1% 対 18.7±2.2%）が、プラナルカストに対する反応には明らかな違いが認められた（一秒量改善率 14.3±5.3% 対 3.1±2.4%、p < 0.01）。これはロイコトリエン C₄ 合成酵素の遺伝子型が cysLT₁ 拮抗薬の効果の予測因子となる可能性を示唆している。

A. 研究目的

フォスホリパーゼにより細胞膜から遊離したアラキドン酸は核膜上の FLAP と結合した状態で、活性化した 5 リポキシゲナーゼと反応しロイコトリエン A₄ となる。マスト細胞、好酸球、好塩基球においてロイコトリエン A₄ はロイコトリエン C₄ 合成酵素によりグルタチオンと結合しロイコトリエン C₄ に変換される。ロイコトリエン C₄ は細胞膜トランスポーター（MRP-2 など）を介して細胞外に放出され、γ グルタミルペプチダーゼ、ジペプチダーゼの作用によりロイコトリエン D₄、ロイコトリエン E₄ に変化する。ロイコトリエン C₄、ロイコトリエン D₄（一部ロイコトリエン E₄）は主に気管支平滑筋、好酸球、マクロファージなどに発現している cysLT₁ 受容体に作用して気管支平滑筋収縮、好酸球遊走・活性化などの生物活性を発揮し、喘息の病態に関与する。ロイコトリエンの喘息の病態に占める重要性から、喘息の治療薬としてロイコトリエン合成酵素阻害薬（Zileuton、本邦では未承認）、ロイコトリエン受容体（cysLT₁）拮抗薬（Pranlukast、Zafirlukast、Montelukast）が開発され、副腎皮質ステロイドと並ぶ喘息のコントローラーとしての有効性が確立している。しかしこれらのロイコトリエン合成酵素阻害薬、受容体拮抗薬は喘息患者の 10%に著効し 50-60%程度に有効であるものの、残りの 30-40%の患

者では無効であることがその使用上の制約になっている。有効な薬剤を投与されないことが患者にとっての不利益になるだけでなく、無効な薬剤を投与されることも不必要な副作用をきたす危険性があり、また医療経済上の大きなデメリットとなる。そこで薬剤に対するレスポンス、ノンレスポンスをロイコトリエン合成酵素の遺伝子多型のタイプにより予測しようという試みがハーバード大学の Drazen らにより報告された。今回の検討では 2 つのロイコトリエン合成系酵素（5 リポキシゲナーゼ、ロイコトリエン C₄ 合成酵素）の遺伝子多型を用いて日本人中等症喘息患者におけるロイコトリエン受容体拮抗薬（プラナルカスト）の効果を予測できないかどうかを検討した。

B. 研究方法

(1) 対象

日本人におけるロイコトリエン合成系酵素（5 リポキシゲナーゼ、ロイコトリエン C₄ 合成酵素）の遺伝子多型の頻度を調べるために、東京近郊在住の健常人 182 名（男性 93 名、女性 89 名）から血液を採取し、DNA を抽出した。

これとは別に、中等量の吸入ステロイド薬（BDP 400-800μg）および経口、吸入気管支拡張薬の連用により 12 週間以上呼吸器症状が安定した状態にある日本人喘息患者 50 名（男性 31 名、女

性 19 名、年齢 26-75 歳)からも血液を採取し、DNA を抽出した。さらにこの 50 名の喘息患者を対象として、4 週間のプラナルカスト投与試験を行った。

DNA 採取・解析に関してはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 13 年 3 月 29 日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)に基づき、慶應義塾大学医学部倫理審査委員会の承諾を得た説明書を用いて被験者の書面での同意を得た上で行った。サンプルは ID 化して保管し、被験者のプライバシーには特に留意した。

(2) プラナルカスト投与試験

プラナルカスト投与開始前に肺機能検査を行った。気管支拡張薬を 12 時間以上(徐放性テオフィリン薬は 24 時間以上)中止した上で、午前 8 時 30 分に一秒量を測定し、さらに β 刺激薬サルブタモール (200 μ g) を吸入 15 分後に再度一秒量を測定することで気道可逆性を測定した。同時に血液検査を行い、末梢血好酸球数、血清 IgE 値、RAST score を測定した。CysLT₁拮抗薬プラナルカスト (225 mg bid) を 4 週間投与した後に再度一秒量を測定し、一秒量改善率をプラナルカストの臨床効果の指標とした。

5 リポキシゲナーゼ遺伝子とロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子のジェノタイピングを行うために末梢血 10ml を採取した。

(3) 5 リポキシゲナーゼ遺伝子多型

5 リポキシゲナーゼ遺伝子の 5'上流領域翻訳開始点より 179 bp から 56 bp の領域に存在する転写因子 Sp-1 結合モチーフ (GGGCGG) 繰り返し領域は転写活性に重要であるが、この繰り返し回数が異なる数種類の対立遺伝子(アレル) -繰り返し回数が 3-4 回の 6-12 塩基欠失変異、繰り返し回数が 5 回の野生型、繰り返し回数が 6-7 回の 6-12 塩基挿入変異- が存在し、プロモーター活性に影響する。これを PCR-SSLP 法により解析した。

(4) ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子多型

ロイコトリエン C₄ 合成酵素の 5'上流領域に一塩基置換変異(翻訳開始部位の 444 塩基上流のアデニンがシトシンに置換)が存在する。この変異により新たな転写因子 H4TF2 の結合モチーフが生じるが、この H4TF2 がロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子の転写を正に制御している。この A(-444)C 多型を制限酵素 Mst I を用いた PCR-RFLP 法により解析した。

(5) 統計解析

結果は平均値±標準誤差で表した。血清 IgE 値については相乗平均値と 95%信頼区間であらわした。吸入ステロイド使用量(ベクロメサゾン 800 μ g はフルチカゾン 400 μ g に相当するとして計算した)、肺機能データ、遺伝子型頻度は Mann-Whitney 検定、Kruskal-Wallis 検定、 χ^2 検定により解析した。またサルブタモール気道可逆性とロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子型との独立した関与を確認するため、重回帰分析および多重ロジスティック回帰分析を行った。

C. 研究結果

エントリーした 50 名の喘息患者のうちアトピー型喘息患者は 23 名であった。5 名が喫煙者であり、11 名に喫煙の既往があった。1 名は既往からアスピリン過敏性が疑われた。2 名はプラナルカストの副作用がうたがわれる軽微な症状(頭痛、皮疹)のため投薬を中止した。服薬中止後にはこれらの症状は速やかに消失した。1 名は投与期間中に喘息症状が悪化し経口ステロイド薬投与が必要となったが、この症例はプラナルカストに対するノンレスポonderと判定した。

健常者 (n = 182) においては 5 リポキシゲナーゼ遺伝子 5'上流領域の GGGCGG 配列繰り返し領域に関して 12 塩基欠失変異が 0.8%、6 塩基欠失変異が 23.1%、6 塩基挿入変異が 11.5%に認められた。一方、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 A(-444)C 多型については C(-444)アレルが 20.8%に認められた。喘息患者 (n = 50) においては 5 リポキシゲナーゼ遺伝子 6 塩基欠失変異が 25.0%、6 塩基挿入変異が 8.0%に認められ、12 塩基欠失変異は認めなかった。ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 C(-444)アレル頻度は 19.0%であった。健常者と喘息患者の間には 5 リポキシゲナーゼ遺伝子、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子とも遺伝子多型の頻度に有意差を認めなかった。

5 リポキシゲナーゼ遺伝子多型とプラナルカストの効果には関連を認めなかった。ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子の C(-444)アレルの有無で β 刺激薬サルブタモールによる気管支拡張効果には差がなかった(一秒量改善率 17.5±2.1%対 18.7±2.2%) が、プラナルカストに対する反応には明らかな違いが認められた(一秒量改善率 14.3±5.3%対 3.1±2.4%、p < 0.01)。

4 週間のプラナルカスト投与後に 10%以上の-

秒量改善を示した症例をレスポナーとした場合、C(-444)アレルをもつ患者 14 名中 9 名 (64%) がレスポナーであったのに対し、C(-444)アレルを持たない患者 34 名中 10%以上の一秒量改善を示したのは 7 名 (21%) のみであった。レスポナーとノンレスポナーとの比較をしたところ、年齢、性別、末梢血好酸球数、血清 IgE 値、RAST score、吸入ステロイド使用量には有意な差は認めなかった。レスポナーはノンレスポナーと比較して治療前の%一秒量が低く (%一秒量 $54.8 \pm 4.0\%$ 対 $70.1 \pm 2.6\%$ 、 $p < 0.01$)、サルブタモールに対する気道可逆性が高かった (一秒量改善率 $26.9 \pm 3.6\%$ 対 $14.3 \pm 1.4\%$ 、 $p < 0.01$)。

治療前の%一秒量とサルブタモールに対する気道可逆性はよく相関したが C(-444)アレルの有無とは相関に乏しいことから、さらに重回帰分析および多重ロジスティック回帰分析によりサルブタモール気道可逆性とロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子型との関与が独立しているかどうかを検討した。一秒量改善率、改善量、あるいは 10%以上の一秒量改善の有無を指標として解析したが、いずれの指標についてもサルブタモール気道可逆性とロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子型とは独立に寄与していることが明らかとなった ($p < 0.01 \sim 0.05$)。

D. 考察

5 リポキシゲナーゼ遺伝子の 5'上流領域の Sp-1 結合モチーフ (GGGCGG) 欠失変異では転写因子の結合能とプロモーター活性が低下する。欧米での検討でこの遺伝子多型が 5 リポキシゲナーゼ阻害薬あるいは cysLT₁ 拮抗薬の治療に対する抵抗性と関連することが報告されている。Drazen らはアボット社が開発した 5 リポキシゲナーゼ阻害薬 Zileuton の関連化合物 ABT-761 の臨床試験に参加した軽症喘息患者 114 症例について 5 リポキシゲナーゼ遺伝子型を検討した。論文内には患者の人種的背景に関する記載はないがアレル分布 (欠失型変異アレルが 21%、挿入型変異アレルが 2%以下) からおそらく多くは白人種であったと考えられる。ABT-761 による治療が行われた 114 例の喘息患者のうち、64 例は野生型遺伝子のみを有するホモ接合体、40 例は野生型遺伝子と変異遺伝子を一つずつ有するヘテロ接合体、10 例は野生型遺伝子を持たない変異遺伝子ホモ接合体であった。治療開始 12 週

後には一秒率が野生型遺伝子のホモ接合体で $18.8 \pm 3.6\%$ 、ヘテロ接合体では $23.3 \pm 6.0\%$ 改善したのに対し、変異遺伝子ホモ接合体では逆に $1.2 \pm 2.9\%$ 悪化した。さらに野生型遺伝子を少なくとも一つ以上もつ症例の 52%が responder (12%以上の一秒量改善) であったのに対し、変異遺伝子しか持たない 10 例ではこの基準を越えた症例は 1 例も認めなかった。同じ GGGCGG 配列の反復回数の多型についてグラクソウェルカム社のグループは 2000 年の European Respiratory Society 総会で cysLT₁ 拮抗薬である Zafirlukast の効果との関連を報告している。Zafirlukast 投与により、一秒率が野生型遺伝子のホモ接合体 ($9.1 \pm 2.9\%$)、ヘテロ接合体 ($12.8 \pm 6.5\%$) で改善したのに対し、変異遺伝子ホモ接合体では $2.3 \pm 4.8\%$ 悪化した。この結果は 5 リポキシゲナーゼ遺伝子多型の影響が合成酵素阻害薬、受容体拮抗薬のいずれでもみられることを示唆する点で重要である。同じグラクソウェルカム社のグループは 2001 年の American Thoracic Society の総会で 5 リポキシゲナーゼ遺伝子の第 13 エクソンにある 1728 番目のアデニンがチミンに代わる変異と cysLT₁ 拮抗薬 Montelukast あるいは Zafirlukast に対する効果の関連についても報告している。彼らの検討では変異のない個体では Montelukast と Zafirlukast による一秒量の改善が $6.8 \pm 1.7\%$ 、 $9.4 \pm 1.3\%$ であったのに対して、変異のあった個体では $-1.9 \pm 2.9\%$ 、 $2.1 \pm 3.2\%$ と有意に少なかったとしている。この A1728T 変異はアミノ酸変異を伴わず、さらに 5'上流領域の Sp-1/Egr-1 結合部位の遺伝子多型とも連鎖不平衡にはないことから、何らかの未知の変異と連鎖不平衡にある可能性がある。今回のわれわれの検討では明らかな関連が見出せなかったが、その理由のひとつとして日本人と欧米人でこの遺伝子多型のアレル頻度の差が関与する可能性が考えられた。欧米人では挿入変異がまれであるのに対し、日本人では挿入変異の頻度が比較的高い。今後症例数を増やして検討する必要があると考えられた。

ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 5'上流領域の一塩基置換 A(-444)C は新たな転写因子 H4TF2 の結合モチーフを生じさせ、5 リポキシゲナーゼ遺伝子変異とは逆に変異型遺伝子の方がロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子の転写を亢進させる。この多型はアスピリン喘息との関連が示唆されており、特に中等症以上のアスピリン喘息との

関連があるとされる。イギリスの Sampson のグループは 23 人の重症喘息患者に吸入ステロイド薬以外の抗喘息薬を中止した上で cysLT₁ 拮抗薬 Zafirlukast を投与した。この時、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子の A(-444)C 変異を持たない患者では一秒量が 12%悪化したのに対し、変異を持っている患者では 9%改善したと報告している。彼らの検討は症例数が少なく有意差にまでは達していない (p < 0.1) が、ロイコトリエン C₄ 合成酵素の遺伝子型が cysLT₁ 拮抗薬の効果と関連する可能性を示唆している。われわれの日本人における検討でも cysLT₁ 拮抗薬の治療反応性との関連が示唆されており、薬剤選択の上で有用な情報をもたらす可能性がある。今後、C(-444)アレルをもつにもかかわらずプラナルカストに反応しなかった患者で十分な血中濃度が得られていたかなど、薬物動態からの検討も必要と考えられる。

E. 結論

2 つのロイコトリエン合成系酵素 (5 リポキシゲナーゼ、ロイコトリエン C₄ 合成酵素) の遺伝子多型を用いて日本人中等症喘息患者におけるロイコトリエン受容体拮抗薬 (プラナルカスト) の効果を予測できないかどうかを検討した結果、ロイコトリエン C₄ 合成酵素の遺伝子型が cysLT₁ 拮抗薬の効果の予測因子となる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Fukunaga, K., Asano, K., Mao, X.-Q., Gao, P.S., Roberts, M.H., Oguma, T., Shiomi, T., Kanazawa, M., Adra, C.N., Shirakawa, T., Hopkin, J.M. and Yamaguchi, K.: Genetic polymorphisms of CC chemokine receptor 3 in Japanese and British Asthmatics. *Eur. Respir. J.* 17(1):59-63, 2001.
2. Ishizaka, A., Watanabe, N., Yamashita, T., Ogawa, Y., Koh, H., Hasegawa, N., Nakamura, H., Asano, K., Yamaguchi, K., Kotani, M., Kotani, T., Morisaki, H., Takeda, J., Kobayashi, K. and Ogawa, S.: A new bronchoscopic microsample probe to measure the biological constituents in epithelial lining fluid of patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 29(4):896-898, 2001.
3. Nishio, K., Suzuki, Y., Takeshita, K., Aoki, T., Kudo, H., Sato, N., Naoki, K., Miyao, N., Ishii, M. and Yamaguchi, K.: Differential effects of hypercapnia and hypocapnia on intracellular calcium mobilization in human pulmonary artery endothelial cells. *J. Appl. Physiol.* 90(6):2094-2100, 2001.
4. Ishizaka, A., Hasegawa, N., Nakamura, K., Takagi, Y., Takano, M., Takada, Y., Yamaguchi, K. and Kubo, K.: Usefulness of pulmonary vascular leakiness assessment in interstitial pneumonitis. *Chest* 119(5):1455-1460, 2001.
5. Terashima, T., Amakawa, K., Matsumaru, A., Eeden, S., Hogg, J. and Yamaguchi, K.: Bronchoalveolar lavage induces an increase in peripheral blood neutrophils and cytokine levels in healthy volunteers and patients with pneumonia. *Chest* 119(6):1724-1729, 2001.
6. Tateno, H., Nakamura, H., Minematsu, N., Ohkubo, Y., Amakawa, K., Terashima, T., Fujishima, S., Luster, A.D., Lilly, C.M. and Yamaguchi, K.: Eotaxin and monocyte chemoattractant protein-1 in chronic eosinophilic pneumonia. *Eur. Respir. J.* 17(5):962-968, 2001.
7. Fukunaga, K., Ishii S., Asano, K., Yokomizo, T., Shiomi, T., Shimizu, T. and Yamaguchi, K.: Single nucleotide polymorphism of human platelet-activating factor receptor impairs G-protein activation. *J. Biol. Chem.* 276(46):43025-43030, 2001.
8. Nakamura, H., Luster, A.D., Jedrzkiewicz, S., Tamura, G., Haley, K.J., Garcia-Zepeda, E.A., Yamaguchi, K. and Lilly, C.M.: IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells. *Am. J. Physiol. (Lung Cellular and Molecular Physiology)* 281(5):L1288-L1302, 2001.
9. Minematsu, N., Nakamura, H., Tateno, H., Nakajima, T. and Yamaguchi, K.: Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. *Biochem. Biophys. Res. Commun. (BBRC)* 289(1):116-119, 2001.
10. Yamaguchi, K., Soejima, K., Koda, E. and Sugiyama, N.: Inhaling gas with different CT densities allows detection of

abnormalities in the lung periphery of patients with smoking-induced COPD. *Chest* 120(6):1907-1916, 2001.

11. Asano, K., Nakamura, M., Oguma, T., Fukunaga, K., Matsubara, M., Shiomi, T., Ishizaka, A., M. Kanazawa and Yamaguchi, K.: Differential expression of CCR3 ligands mRNA in guinea pig lungs during allergen-induced inflammation. *Inflamm. Res.* 50(12):625-630, 2001.
12. Itoh, Y., Oyamada, Y., Hakuno, H. and Yamaguchi, K.: Morphological analysis of developmental changes in pontine noradrenergic neuronal groups in the neonatal rat. *Brain Res.* 925(1):107-109, 2002.
13. Oguma, T., Asano, K., Shiomi, T., Fukunaga, K., Nakamura, M., Matsubara, H., Lilly, C.M., Drazen, J.M. and Yamaguchi, K.: Cyclooxygenase-2 expression during allergic inflammation in guinea pig lungs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165(3):382-386, 2002.
14. Hasegawa, N., Miura, T., Ishii, K., Yamaguchi, K., Lindner, TH., Merritt S., Matthews, JD. and Siddiqi, SH.: A new simple and rapid test for culture confirmation of *M. tuberculosis* - A multi-center study. *J. Clin. Microbiol.* 40(3):908-912, 2002.

学会発表

1. Tasaka, S., Ishizaka, A., Koh, H., Hasegawa, N. and Yamaguchi, K.: Gene expression of toll-like receptors during hyperoxia in mice. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
2. Fukunaga, K., Asano, K., Ishi, S., Yokomizo, T., Shimizu, T. and Yamaguchi, K.: Functional analysis of naturally-occurring mutant human platelet-activating factor receptor. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
3. Asano, K., Fukunaga, K., Shiomi, T., Suzuki, Y. and Yamaguchi, K.: Genetic polymorphisms of toll-like receptors 3 in Japanese population. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
4. Tateno, H., Nakamura, H., Minematsu, N., Nakajima, T., Takeshita, K., Oyamada, Y., Asano, K., Luster, A.D., Lilly, C.M. and Yamaguchi, K.: Effect of suplatast tosilate

on eosinophil-related inflammation in asthmatics. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.

5. Nakamura, H., Minematsu, N., Iwata, M., Tateno, H., Nakajima, T., Fujishima, S. and Yamaguchi, K.: CYP2A6 del allele is associated with smoking habit and protective against development of pulmonary emphysema. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
6. Ishii, M., Suzuki, Y., Takeshita, K., Nishio, K., Miyao, N., Kudo, H., Naoki, K., Sato, N., Aoki, T. and Yamaguchi, K.: Hyperglycemia modulates nuclear factor-kappa B activation in human pulmonary endothelial cells. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
7. Matsuzaki, T., Terashima, Amakawa, K., T., Matsumani, A. and Yamaguchi, K.: Effect of diesel exhaust particles on the apoptosis in alveolar macrophages. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
8. Suzuki, Y., Shiomi, T., Asano, K., Fukunaga, K. and Yamaguchi, K.: Expression of various prostanoid receptors in A549 cells. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
9. Shiomi, T., Asano, K., Oguma, T., Fukunaga, K., Suzuki, Y. and Yamaguchi, K.: Differential gene expression of heparin-binding EGF-like growth factor between guinea pigs and mice under inflammatory conditions. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
10. Yogo, Y., Fujishima, S., Inoue, T., Okubo, Y., Minematsu, N., Tateno, H., Nakamura, H., Aiso, S. and Yamaguchi, K.: MCP-1 gene polymorphism in Japanese patients with pulmonary fibrosis. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
11. Nakajima, T., Nakamura, H., Tateno, H., Minematsu, N., Terashima, T., Asano, K., Fujishima, S., Ishizaka, A., Fukui, H. and Yamaguchi, K.: Elevation of cystatin C concentrations in epithelial lining fluid in patients with interstitial lung diseases. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
12. Terashima, T., Matsumaru, A. and Yamaguchi, K.: Predictive factors of clinical responses to leukotriene receptor antagonist. 2001 ALA/ATS International