

- Conference. 2001.5.
13. Fujishima, S., Inoue, T., Aiso, S., Okubo, Y., Yogo, Y., Ikeda, E., Shigematsu, N., Tsukamoto, N., Hori, S., Aikawa, N. and Yamaguchi, K.: Various chemokines gene expression in a murine model of radiation pneumonitis/fibrosis. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
 14. 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.
 15. Fukunaga, K., Asano, K., Ishi, 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.

16. Miyao, N., Takeshita, K., Suzuki, Y., Aoki, T., Nishio, K., Sato, N., Naoki, K., Kudo, H., Ishii, M., Tsumura, H. and Yamaguchi, K.: Impaired leukocyte kinetics in pulmonary microvessels of ventilator-induced lung injury. International Congress of European Respiratory Society, 2001.9

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 |

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

分担研究者 石坂彰敏
東京電力病院 検査科 科長

研究要旨

尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量は体内でのシステイニルロイコトリエン産生量の指標として用いられる。日本人中等症喘息患者 50 名での尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量は 326 pg/mg クレアチニン（相乗平均）であった。ロイコトリエン合成酵素（5 リポキシゲナーゼ、ロイコトリエン C₄ 合成酵素）遺伝子の転写活性を変化させる遺伝子多型が報告されているが、尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量とは関連しなかった。ロイコトリエン C₄ からロイコトリエン D₄ への代謝に関与する γ グルタミルロイコトリエンナーゼ、ロイコトリエン D₄ からロイコトリエン E₄ への代謝に関与するジペプチダーゼの遺伝子についても同様の検討を行うために新規遺伝子多型の検出を行い、ミスセンス変異を含む 10 個の遺伝子多型を見いだした。

A. 研究目的

体内でのシステイニルロイコトリエン（ロイコトリエン C₄、ロイコトリエン D₄、ロイコトリエン E₄）産生量の指標として一般的に用いられる尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量には大きな個体差が存在する。健常人と比較して喘息患者では高い傾向があり、アスピリン喘息患者では非アスピリン喘息患者より高値を示すことが知られているが、それ以外に尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量を規定しているものが何であるかは不明である。システイニルロイコトリエン産生量の多い喘息患者ではロイコトリエン合成阻害薬（5 リポキシゲナーゼ阻害薬）やロイコトリエン受容体拮抗薬の有効性が高いことが予測されることから、今回の研究では尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量とロイコトリエン合成酵素（5 リポキシゲナーゼ、ロイコトリエン C₄ 合成酵素）遺伝子多型との関連を検討した。

またロイコトリエン C₄、D₄、E₄ は一括してシステイニルロイコトリエンと総称されるが、ロイコトリエン E₄ はロイコトリエン C₄ やロイコトリエン D₄ と比較して気管支収縮作用は弱い。またロイコトリエン C₄ は cysLT₂ 受容体を介した作用も強いのにに対してロイコトリエン D₄ は主に cysLT₁ 受容体を介して作用を発揮するなどその生物活性は微妙に異なる。 γ グルタミルロイコトリエンナーゼはロイコトリエン C₄ からロイコトリエン D₄ への代謝、ジペプチダーゼはロイコトリエン D₄ からロイコトリエン E₄ への代謝に関与する酵素である。これらの代謝酵素の活性によっては気道において同量のシステイニルロイコトリエンが産生されたとしてもロイコトリエン C₄/D₄/E₄ の相対量に変化し、それによって病態

も修飾される可能性がある。そこで、これらのロイコトリエン分解酵素の遺伝子について新たな遺伝子多型の検出を試みた。

B. 研究方法

(1) 対象

中等量の吸入ステロイド薬（BDP 400-800 μ g）および経口、吸入気管支拡張薬の運用により 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）からスポット尿と血液を採取した。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) 尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量の測定

10 ml の尿に ³H 標識ロイコトリエン E₄ を加えた上で逆相固相カラム（Sep-Pak C₁₈）を通し、精製水と 40%エタノールで洗浄した後に 80%エタノールで抽出した。風乾後に逆相高速液体クロマトグラフィーでロイコトリエン E₄ 分画を分離抽出した。再度風乾後に ELISA 法によりロイコトリエン E₄ 濃度を測定した。尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量は添加した ³H 標識ロイコトリエン E₄ の回収率と尿中クレアチニン濃度で補正した。

(3) ロイコトリエン合成酵素遺伝子多型タイプニング

末梢血から DNA を抽出し、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プングを行った。5 リポキシゲナーゼ遺伝子は 5'上流領域の GGGCGG 配列繰り返し領域の欠失・挿入変異を PCR-SSLP 法により解析した。ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子は 5'上流領域の A(-444)C 多型を制限酵素 MstI を用いた PCR-RFLP 法により決定した。

(4) ロイコトリエン代謝酵素遺伝子多型の検出
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 cDNA 塩基配列をもとにヒトゲノムドラフトシーケンスを BLAST 解析し、エクソン・イントロン構造を決定した。尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量の最も多い 6 名と最も少ない 6 名の患者の末梢血から DNA を抽出し PCR 増幅した上で、それぞれ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。

C. 研究結果

喘息患者 50 名の尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量は 326 pg/mg クレアチニン (相乗平均) であった。これは健常者における尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量と比較して有意に多かった。尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量は 5 リポキシゲナーゼ遺伝子 5'上流領域の GGGCGG 配列繰り返し領域の欠失・挿入変異、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 A(-444)C 多型のいずれとも有意な関連を認めなかった。

ロイコトリエン代謝酵素遺伝子多型を検討した 12 名の被験者のうち、尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量の最も多い 6 名での平均値は 1460 pg/mg クレアチニン、最も少ない 6 名の患者での平均値は 114 pg/mg クレアチニンであった。BLAST 解析によりγグルタミルロイコトリエナーゼは 13 個、ジペプチダーゼは 10 個のエクソンからなる遺伝子であることが明らかとなった。現在までにγグルタミルロイコトリエナーゼ遺伝子 5'上流領域に 3 つ、ジペプチダーゼ遺伝子 5'上流領域に 5 つ、アミノ酸標識領域に 2 つの遺伝子多型を見出した。ジペプチダーゼ遺伝子アミノ酸標識領域の多型のうちひとつはグルタミン酸 (酸性) からグルタミン (中性) へのアミノ酸置換を伴うミスセンス変異であった。

D. 考察

今回の検討では 5 リポキシゲナーゼ、あるいはロイコトリエン C₄ 合成酵素の遺伝子多型と体内でのロイコトリエン産生量の指標である尿中ロイコトリエン E₄ 排泄速度には全く関連がなかった。ひとつの仮説として、この現象はロイコトリエン産生細胞であるマスト細胞や好酸球の活

性化状態によりロイコトリエン産生のボトルネック (律速段階) が移動するためではないかと考えている。つまり喘息症状の安定した被験者で測定された尿中ロイコトリエン E₄ 排泄速度は基質であるアラキドン酸の供給量で規定されており、遺伝的に規定された 5 リポキシゲナーゼやロイコトリエン C₄ 合成酵素の活性の多寡は影響を及ぼさないのではないかと考えられる。しかし実際に喘息気道局所で十分量の基質が供給されている場合には 5 リポキシゲナーゼやロイコトリエン C₄ 合成酵素の酵素量がボトルネックになりうると考えられ、今後、抗原吸入などにより刺激したときの尿中ロイコトリエン E₄ 排泄速度が 5 リポキシゲナーゼやロイコトリエン C₄ 合成酵素の遺伝子多型と関連しうるかを検討する予定である。

またロイコトリエン C₄、D₄、E₄ は一括してシステニルロイコトリエンと総称されるが、ロイコトリエン C₄/D₄/E₄ の気道における作用は微妙に異なる。γグルタミルロイコトリエナーゼはロイコトリエン C₄ からロイコトリエン D₄ への代謝、ジペプチダーゼはロイコトリエン D₄ からロイコトリエン E₄ への代謝に関与する酵素である。これらの代謝酵素の活性の遺伝的な違いは気道におけるロイコトリエンの作用を修飾する可能性がある。特に電荷の変化をもたらすジペプチダーゼのグルタミン酸 (酸性) からグルタミン (中性) へのアミノ酸置換が酵素活性にどのような影響を与えるか興味深い。今後、変異型酵素蛋白の機能解析を進めると同時に、喘息の病態、尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量、抗ロイコトリエン薬反応性などとの関連解析を進める予定である。

E. 結論

尿中ロイコトリエン E₄ 排泄量は既知のロイコトリエン合成酵素 (5 リポキシゲナーゼ、ロイコトリエン C₄ 合成酵素) 遺伝子多型とは関連しなかった。ロイコトリエン C₄ からロイコトリエン D₄ への代謝に関与するγグルタミルロイコトリエナーゼ、ロイコトリエン D₄ からロイコトリエン E₄ への代謝に関与するジペプチダーゼの遺伝子にミスセンス変異を含む 10 個の遺伝子多型を見いだした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 論文発表

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* 29: 896–898, 2001.
 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* 119:1455–1460, 2001.
 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*, 50; 625–630, 2001.
 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
- 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. 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.
 3. Ishizaka, A., Hasegawa, N., Hashimoto, S., Matsuda, T., Koh, H., Kotani, T., Kotake, Y., Morisaki, H., Fujishima, S., Takeda, J. and Yamaguchi, K.: Pulmonary KL-6 concentration correlates with alveolar septal permeability in early acute respiratory distress syndrome. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
 4. Sawafuji, M., Ishizaka, A., Kohno, M., Shimada, H., Yamaguchi, K. and Kobayashi, K.: Contribution of neutrophils to change in epithelial permeability of the re-expanded lung after prolonged atelectasis in rabbits. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
 5. Kohno, M., Ishizaka, A., Koh, H., Sawafuji, M., Hirayama, Y., Yamaguchi, K. and Kobayashi, K.: Hyperoxia and endotoxemia have opposite effects on lung collagen metabolism in late-phase hyperoxia and continuous endotoxin infusion-induced lung injury. 2001 ALA/ATS International Conference. 2001.5.
 6. 石井芳樹、渡邊直人、福田健、石坂彰敏: 気道上皮被覆液マイクロサンプリングと気管支肺胞洗浄液 第 50 回日本アレルギー学会総会、横浜、2000、11
 7. 石坂彰敏、黄英文、橋本悟、松田知之、小谷透、長谷川直樹、藤島清太郎、山口佳寿博、武田純三、相川直樹 急性呼吸促迫症候群(ARDS)における血管内皮障害の経時的評価と血管増殖因子(VEGF)の肺血管内皮障害への影響 第 16 回日本 Shock 学会総会、広島、2001、56
 8. 石坂彰敏: マイクロサンプリングプローベの有用性 第 24 回日本気管支学会総会、千葉、2001、6
 9. 石坂彰敏、橋本悟、松田知之、黄英文 マイクロサンプリング法を用いた急性肺障害症例における肺上皮被覆液中生化学物質の経時的観察 第 23 回日本呼吸療法医学会・第 11 回日本呼吸管理学会合同学術集会 大阪、2001、8

- | | | |
|--|-----------|----|
| 10. 石坂彰敏: マイクロサンプリング法を用いた
各種肺疾患の気道上皮被覆液中液性因子の
検討、呼吸生理フォーラム 東京、2002、1 | 1. 特許取得 | なし |
| | 2. 実用新案登録 | なし |
| | 3. その他 | なし |

H. 知的財産権の出願・登録状況

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K. Fukunaga, S. Ishii, K. Asano, et al.	Single nucleotide polymorphism of human platelet-activating factor receptor impairs G-protein activation.	J Biol Chem	276	43025-43030	2001
T. Oguma, K. Asano, et al.	Cyclooxygenase-2 expression during allergic inflammation in guinea pig lungs.	Am. J. Respir. Crit Care Med.	165	382-386	2002
K. Asano, M. Nakamura, et al.	Differential expression of CCR3 ligand mRNA in guinea pig lungs during allergen-induced inflammation.	Inflam Res	50	625-630	2001
K. Fukunaga, K. Asano, et al.	Genetic polymorphisms of CC chemokine receptor 3 in Japanese and British asthmatics.	Eur Respir J	17	59-63	2001
A. Ishizaka, K. Asano, Yamaguchi, et al.	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	896-898	2001
K. Nishio, Yamaguchi, et al.	Differential effects of hypercapnia and hypocapnia on intracellular calcium mobilization in human pulmonary artery endothelial cells.	J. Appl. Physiol	90	2094-2100	2001
A. Ishizaka, K. Yamaguchi, et al.	Usefulness of pulmonary vascular leakiness assessment in interstitial pneumonitis.	Chest	119	1455-1460	2001
T. Terashima, K. Yamaguchi, et al.	Bronchoalveolar lavage induces an increase in peripheral blood neutrophils and cytokine levels in healthy volunteers and patients with pneumonia.	Chest	119	1724-1729	2001
H. Tateno, K. Yamaguchi, et al.	Eotaxin and monocyte chemoattractant protein-1 in chronic eosinophilic pneumonia.	Eur. Respir. J	17	962-968	2001
H. Nakamura, K. Yamaguchi, et al.	IL-4 differentially regulates eotaxin and MCP-4 in lung epithelium and circulating mononuclear cells.	Am. J. Physiol	281	L1288-L1302	2001
N. Minematsu, K. Yamaguchi, et al.	Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema.	Biochem. Biophys. Res. Commun	289	116-119	2001

K. Yamaguchi, K. Soejima, et al.	Inhaling gas with different CT densities allows detection of abnormalities in the lung periphery of patients with smoking-induced COPD.	Chest	120	1907-1916	2001
Y. Itoh, , K. Yamaguchi, et al.	Morphological analysis of developmental changes in pontine noradrenergic neuronal groups in the neonatal rat.	Brain Res.	925	107-109	2002
T. Koshika, A. Ishizaka, et al.	Pretreatment with FK506 improves survival and gas exchange in canine acute lung injury.	Am J Respi Crit Care Med	163	79-84	2001
K. Albertine, A. Ishizaka, et al.	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	2002
K. Asano.	Asthma and pharmacogenetics.	International Review of Asthma	3	64-73	2001
浅野浩一郎	気道過敏性の遺伝的素因	アレルギー科	11	520-525	2001
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	2228-2232	2001
浅野浩一郎	遺伝子からみた喘息薬物治療	呼吸	20	842-851	2001
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	700-704	2001
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	44-49	2002
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	157-163	2002

20010797

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。