

10030682

厚生労働科学研究補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

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 15 年度総括・分担研究報告書

主任研究者 浅野 浩一郎

平成 16 (2004) 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	プロスタグランシン D ₂ 受容体 DP 遺伝子多型と その機能解析 浅野 浩一郎	7
2	脂質メディエーター合成酵素の遺伝的多様性に基づいた アレルギー性鼻炎の治療についての研究 岡本 美孝	11
3	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 薬物動態と臨床効果 山口 佳寿博	13
4	日本人軽症喘息患者におけるロイコトリエン受容体 拮抗薬反応性規定因子の解析 石坂 彰敏	16
5	気管支喘息治療におけるプラナルカスト反応性と γグルタミルロイコトリエンナーゼ遺伝子多型の関連 小崎 健次郎	19
7	CysLT ₂ 受容体が抗炎症性シグナルを惹起する可能性 についての検討 石井 聡	21
8	小児気管支喘息におけるロイコトリエンの動向と 遺伝子多型に関する検討 松井 永子	26
III	研究成果の刊行に関する一覧表	30
IV	研究成果の刊行物・別刷	32

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防 治療研究事業）
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
分担研究者	岡本 美孝 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学 教授 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 小崎 健次郎 慶應義塾大学医学部小児科 助教授 石井 聡 東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 助手 松井 永子 岐阜大学医学部小児科 助手
研究協力者	小能 剛 埼玉社会保険病院 内科医長 白石良樹 財団法人日本予防医学協会 非常勤職員（リサーチレジデント） 花澤 豊行 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科学講師 大塚 雄一郎 千葉大学大学院医学研究院生 清水孝雄 東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 教授 吉川かおり 岐阜大学医学部大学院 金子英雄 岐阜大学医学部附属病院 小児科 講師 近藤直実 岐阜大学医学部 小児病態学 教授

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 15 年度の検討では七つの知見が得られた。①プロスタグランジン D₂ 受容体 DP 遺伝子プロモーター領域の 3 つの遺伝子多型がそれぞれ異なる転写因子の結合能に影響を及ぼすことにより、これらの遺伝子多型の組み合わせからなる 4 つのハプロタイプ間のプロモーター活性が異なる。②中等度以上の鼻閉を有する通年性アレルギー性鼻炎患者におけるロイコトリエン受容体拮抗薬（ランルカスト）反応性とロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 A (-444) C 多型との間に関連が認められた。③中等症～重症成人喘息患者におけるランルカスト反応性はサルブタモール反応性、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 A (-444) C 多型と相関し、ランルカスト血中濃度とは有意な関連を認めなかった。④軽症喘息患者において吸入ステロイドからロイコトリエン受容体拮抗薬（モンテルカスト）に変更後に症状、QOL スコア、朝のピークフロー値の悪化を認めた症例はロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 A (-444) C 多型陽性例に多い傾向が認められた。⑤中等症～重症成人喘息患者におけるランルカスト反応性はγグルタミルロイコトリエンナーゼ遺伝子多型ハプロタイプと関連した。⑥CysLT₂ 遺伝子のターゲティングヘクターを用いて作成した相同組換え ES 細胞が生殖系列に伝達されたキメラマウスからヘテロ遺伝子欠損マウスが得られた。⑦小児喘

息患者にロイコトリエン受容体拮抗薬（モンテルカスト）投与した際、LTC₄ 合成酵素遺伝子 C(-444)アレルを持つ症例全例で中等度以上の改善が得られた。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。

A 研究目的

ロイコトリエン、トロンホ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、問題点は薬剤の効果に個体差があり、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ことである。本研究は患者の遺伝子情報に基づいた適切な抗脂質メディエーター薬選択を可能とするために基礎的、臨床的検討を行うことを目的としている。

3年計画の3年目である本年度は昨年度までの基礎的・臨床的検討をもとに成人喘息（山口、石坂）、小児喘息（松井）、鼻アレルギー（岡本）も含めた広範囲の臨床応用の可能性についての検討を行った。さらに、個々の遺伝子多型だけでなくハプロタイプ解析に基づいた遺伝情報と薬剤反応性との関連の検討（小崎）を行った。基礎的な検討としては昨年度にみいだしたロイコトリエン受容体発現バランスとロイコトリエン感受性との関連について詳細な解析を行うために必要なノックアウトマウスの作成をすすめる（石井）とともに、今後アレルギー疾患の重要な治療ターゲットと考えられる DP 受容体の遺伝的機能差に関する検討を行った（浅野）。

B 研究方法

① プロスタグランシン D₂ 受容体 DP 遺伝子多型とその機能解析（浅野）

DP 遺伝子のアミノ酸標識領域およびプロモーター領域の遺伝子多型を SSCP 法で探索し、見いだされた複数の多型から構成されるハプロタイプを ARMS 法と PCR-RFLP 法により決定した。個々のハプロタイプ（プロモーター領域）の機能をルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイで検討した。

② 脂質メディエーター合成酵素の遺伝的多様性に基づいたアレルギー性鼻炎の治療についての研究（岡本）

中等度以上の鼻閉を有する通年性アレルギー性鼻

炎患者 86 名（男性 53 名、女性 33 名、平均年齢 24.1 歳）に対して、ロイコトリエン受容体拮抗薬 プランルカストの 4 週間内服投与を行った。アレルギー日記、鼻閉に対する visual analog scale (VAS) による評価、安静時ならびに鼻内抗原誘発後 10 分における鼻腔通気度から有効例、非有効例に分類し、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 A(-444)C 多型、γグルタミルロイコトリエナーゼ遺伝子 A989G 多型などとの関連について検討した。

③ 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薬物動態と臨床効果（山口）

日本人中等症-重症喘息患者 50 名（男性 30 名、年齢 26-75 歳）を対象に、プランルカスト（オノンカプセル）450 mg を 4 日間連用後のプランルカスト血中濃度を高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトリー法により測定した。これらの被験者のプランルカスト 4 週間投与前後の一秒量改善率をプランルカストの臨床効果の指標とし、平均プランルカスト血中濃度、サルブタモール反応性、ロイコトリエン合成酵素遺伝子多型などのパラメーターを用いて多変量解析を行った。

④ 日本人軽症喘息患者におけるロイコトリエン受容体拮抗薬反応性規定因子の解析（石坂）

ベクロメサゾン換算 400 μg/日以下の吸入ステロイド薬によりコントロール良好な日本人軽症喘息患者 49 名について、吸入ステロイド薬からモンテルカスト内服（10 mg/日、8 週間）への切り替えを行った際の臨床効果を一秒量、朝のピークフロー値、および QOL (AQLQ) スコアを用いて評価し、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 A(-444)C 多型との関連を検討した。

⑤ 気管支喘息治療におけるプランルカスト反応性とγグルタミルロイコトリエナーゼ遺伝子多型の関連（小崎） 日本人中等症喘息患者 72 名に 4 週間のプランルカスト投与試験を行った際の一秒量改善率（プランルカスト反応性）と PCR-RFLP 法により決定したγグルタミルロイコトリエナーゼの T459C 多型、イントロン 5 の

AT 置換多型、A989G 多型からなるハプロタイプとの関連を解析した。ハプロタイプ解析には Schaid らが開発した haplo score プログラムを使用した。

⑥ CysLT₂ 受容体が抗炎症性シグナルを惹起する可能性についての検討 (石井)

マウス CysLT₂ cDNA をプローブとして、129 マウスゲノム DNA と C57BL/6 マウスゲノム DNA の入ファージライブラリーをスクリーニングし、得られた陽性ファージを用いてターゲティングベクターを構築した。これをエレクトロポレーションによって ES 細胞へ導入し、得られたネオマイシン耐性クローンから相同組換え体のスクリーニングを行った。

⑦ 小児気管支喘息におけるロイコトリエンの動向と遺伝子多型に関する検討 (松井)

小児気管支喘息患者 20 名にモンテルカスト (5 mg/日、4 週間) を投与し、喘息症状点数・QOL 改善度、尿中 LTE₄ 排泄量の変化と、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 A(-444)C 多型との関連を検討した。

C 結果

① プロスタグランシン D₂ 受容体 DP 遺伝子多型とその機能解析 (浅野)

プロモーター領域に見いだされた 3 つの SNP (T-549C、C-441T、T-197C) から構成されるハプロタイプのうち、出現頻度の高い 4 つ (CCT、TTT、TCT、CCC) について検討したところ、ハプロタイプ CCC が最も高いプロモーター活性を示した。T-549C は転写因子 GATA3 結合能を低下、C-441T は C/EBPβ 結合能を上昇させた。DP プロモーター・ルシフェラーゼベクターとの共発現実験によりこれらの転写因子 (GATA3、C/EBPβ) が DP 遺伝子の転写調節に重要であることが確認された。

② 脂質メチエーター合成酵素の遺伝的多様性に基づいたアレルギー性鼻炎の治療についての研究 (岡本)

鼻腔通気度値は患者の症状変化と相関が認められなかったため、アレルギー日記及び VAS を用いた鼻閉症状の変化からブランルカストの有効性を判定し、86 名中 49 名が有効と判定された。ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 A (-444) C 多型

mutant 型で有効例は 31 名中 13 名 (41%)、wild 型で 54 名中 36 名 (67%) であった。γ グルタミルロイコトリナーゼ遺伝子 T459C 多型および A989G 多型、ジペプチダーゼ遺伝子 Dipep G1051C 多型に関しては pranlukast 有効例と無効例と各遺伝子多型との間に明らかな関連は認めなかった。

③ 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薬物動態と臨床効果 (山口)

全例で服薬 5-7 時間後の平均ブランルカスト血中濃度は有効濃度 (100 ng/ml) を上回ったが、101-2529 ng/ml と大きな個体差を示した。ブランルカスト反応性はサルブタモール反応性と γ グルタミルロイコトリエナーゼ遺伝子多型と関連を示したが、ブランルカスト血中濃度との相関は見られなかった。10% 以上の一秒量改善を示すブランルカストレスポンドーはサルブタモール反応性、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子多型と相関し、ブランルカスト血中濃度とは有意な関連を認めなかった。

④ 日本人軽症喘息患者におけるロイコトリエン受容体拮抗薬反応性規定因子の解析 (石坂)

解析可能 43 例中、症状、QOL スコア、朝のピークフロー値のいずれかの指標が増悪した症例 (ノンレスポンドー) が 10 例認められた。ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 C(-444)アレルを有する患者ではノンレスポンドーは 2 例 (15%) であり、A(-444)アレルのみを有する患者での 8 例 (27%) と比較して頻度が低い傾向を認めた。また C(-444)アレルを有する患者では QOL スコア改善、末梢血好酸球数減少が A(-444)アレルのみを有する患者よりも大きい傾向があった。

⑤ 気管支喘息治療におけるブランルカスト反応性と γ グルタミルロイコトリエナーゼ遺伝子多型の関連 (小崎) 年齢・性別・サルブタモール反応性で補正した Schaid らの Global score 値は 12.4 (p 値 = 0.029) であり、グルタミルロイコトリエナーゼ座位のハプロタイプとブランルカスト反応性に有意な関連を認めた。ハプロタイプ 1-1-2 (アレル頻度 17.6%) ではブランルカスト反応性が低く (ハプロタイプ特異的 p 値=0.038)、ハプロタイプ 2-2-1 (アレル頻度 4.8%) においてブランルカスト反応性は高値となる傾向 (ハプロタイプ特異的 p 値=0.003) を認めた。一秒量改善率が 10%

以上である患者群を「反応群」、10%未満である群を「非反応群」とした解析でもハプロタイプ 1-1-2 で非反応群が多く（ハプロタイプ特異的 p 値=0.0096）、ハプロタイプ 2-2-1 で反応群が多い傾向（ハプロタイプ特異的 p 値=0.039）を認めた。

⑥ CysLT₂ 受容体が抗炎症性シグナルを惹起する可能性についての検討（石井）

129 マウス由来のゲノム DNA で構築した CysLT₂ 遺伝子のターゲティングベクターでは相同組換え体は一つも得られなかったが、C57BL/6 マウス由来のゲノム DNA で構築したターゲティングベクターと C57BL/6 マウス由来の ES 細胞（RENKA 株、新潟大学脳研究所 崎村教授との共同研究）を用いることで相同組換え体を 1 個得た。現在までに、この相同組換え ES 細胞が生殖系列に伝達されたキメラマウスからヘテロ遺伝子欠損マウスが得られている。

⑦ 小児気管支喘息におけるロイコトリエンの動向と遺伝子多型に関する検討（松井）

モンテルカスト投与前後の症状改善度を喘息日誌の症状点数と QOL 調査表により評価したところ、LTC₄ 合成酵素遺伝子 C(-444)アレルを持つ症例全例で中等度以上の改善が得られた。

D 考察

昨年度に引き続きロイコトリエンとロイコトリエン受容体拮抗薬について薬物動態と薬力学の両面からの検討が行われた。今年度は対象疾患を従来の成人中等症～重症喘息から成人軽症喘息、小児喘息、鼻アレルギーまで拡げて検討を行った。薬物動態に関してはロイコトリエン受容体拮抗薬ブランドカストで臨床効果と比較した結果、薬剤反応性に大きな影響はないと結論した。アレルギー疾患治療薬はテオフィリンを除いては安全域の大きい薬剤が多いことから薬物動態の影響は少ないと予測される。薬力学に関しては成人中等症～重症喘息での検討から生体内ロイコトリエン量規定因子と考えられる LTA₄ を LTC₄ に変換するロイコトリエン C₄ 合成酵素と、LTC₄ を LTD₄ に変換する γ グルタミルロイコトリエンナーゼの遺伝子多型の重要性が示唆されていたが、成人軽症喘息、小児喘息についても同様の傾向が見いだされた。ただし、これらの疾患については検討症例数がまだ不

十分であり、有意差を見いだすまでにはいたらなかった。一方、鼻アレルギーについてもこれらの遺伝子多型との関連が認められたが、喘息の場合と異なるアレルがレスポンスに多い傾向がみられた。

一つの遺伝子に複数の多型が存在し、それらが連鎖不平衡にあるケースでは単独の遺伝子多型だけを検討することは誤った結論を導いてしまう可能性がある。複数の多型から構成されるハプロタイプを解析する意義について今回、γ グルタミルロイコトリエンナーゼ遺伝子、プロスタグランシン D₂ 受容体遺伝子をモデルとして行った。今後、他の遺伝子についても同様の検討を行う必要があると考えられる。

また CysLT₂ 受容体遺伝子ノックアウトマウスを作成中で、すでにヘテロ遺伝子欠損マウスが得られている。このモデルマウスが完成すればロイコトリエン受容体の発現や機能に影響しうるさまざまな遺伝的、環境的要因の検討が容易になると考えられる。

E 結論

ロイコトリエン受容体拮抗薬の臨床効果を遺伝的に規定する因子として薬物動態および薬力学関連因子について成人中等症～重症喘息、成人軽症喘息、小児喘息、鼻アレルギーを対象に総合的検討を行い、ロイコトリエン合成代謝酵素遺伝子多型の重要性を再確認した。また複数の多型から構成されるハプロタイプを解析する意義についても検討をおこなった。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

- 1 H Tatenno, H Nakamura, N Minematsu, T Nalkajima, S Takahashi, M Nakamura, K Fukunaga, K Asano, CM Lilly, and K Yamaguchi (2004) Plasma eotaxin level and severity of asthma treated with corticosteroid *Resp Med* (in press) 2004
- 2 K Naoki, K Asano, N Satoh, K Fukunaga, T Oguma, T Shiomi, Y Suzuki, T Nakajima, K Niimi, Y Shirashi, A Ishizaka, and K Yamaguchi

- PAF responsiveness in Japanese subjects with plasma PAF acetylhydrolase deficiency *Biochem Biophys Res Commun* (in press) 2004
- 3 Amakawa, K, Terashima, T, Matsuzaki, T, Matsumaru, A, Sagai, M and Yamaguchi, K Suppressive effects of diesel exhaust particles on cytokine release from human and murine macrophages *Exp Lung Res* 29(3) 149–164, 2003
 - 4 Takeshita, K, Suzuki, Y, Takeuchi, O, Nishio, K, Toda, K, Kudo, H, Miyao, N, Ishii, M, Sato, N, Naoki, K, Aoki, T, Suzuki, K, Hiraoka, R and Yamaguchi, K Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced nuclear factor- κ B activation *Am J Respir Cell Mol Biol* 29(1) 124–132, 2003
 - 5 Minematsu, M, Nakamura, H, Iwata, M, Tateno, H, Nakajima, T, Takahashi, S, Fujishima, S and Yamaguchi, K CYP2A6 deletion polymorphism is associated with smoking habit and development of pulmonary emphysema. *Thorax* 58(7) 623–628, 2003
 - 6 Tasaka, S, Ishizaka, A, Yamada, W, Shimizu, M, Koh, H, Hasegawa, N, Adachi, Y and Yamaguchi, K Effect of CD14 blockade on endotoxin-induced acute lung injury in mice *Am J Respir Cell Mol Biol* 29(2) 252–258, 2003
 - 7 Sakamaki, F, Ishizaka, A, Urano, T, Sayama, K, Nakamura, H, Terashima, T, Waki, Y, Soejima, K, Tasaka, S, Sawafuji, M, Kobayashi, K, Yamaguchi, K and Kanazawa, M Attenuation by intravenous 2-chloroadenosine of acute lung injury induced by live *Escherichia coli* or latex particles added to endotoxin in the neutropenic state *J Lab Clin Med* 142(2) 128–135, 2003
 - 8 K Yamazaki, S Ogura, A Ishizaka, T Oh-hara, M Nishimura Bronchoscopic microsampling method for measuring drug concentration. Watanabe, A Ishizaka, E Ikeda, A Ohashi, K Kobayashi Contributions of bronchoscopic microsampling in the diagnosis of peripheral lung carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2003, 76, 1668–72
 - 9 Ishizaka A, Matsuda T, Albertine KH, Koh H, Tasaka S, Hasegawa N, Kohno N, Kotani T, Monsaki H, Takeda J, Nakamura M, Martin TR, Matthay MA and Hashimoto S Clinical Outcome in Acute Lung Injury is Predicted by KL-6, a Lung Epithelial Cell Marker *Am J Physiology Lung Molecular Physiology* 2003, Sept 5 (Epub ahead of print)
 - 10 J S Park, D Svetkauskaite, Q He, J-Y Kim, D Strassheim, A Ishizaka and E Abraham Involvement of TLR 2 and TLR 4 in Cellular Activation by High Mobility Group Box 1 protein (HMGB1) *J Biol Chem* 2003, Dec 4 (Epub ahead of print)
 - 11 Vogensen, S B, Strömgaard, K, Shindou, H, Jaracz, S, Suehiro, M, Ishii, S, Shimizu, T, and Nakanishi, K (2003) Preparation of 7-substituted ginkgolide derivatives potent platelet activating factor (PAF) receptor antagonists *J Med Chem* 46, 601–608
 - 12 Nagase, T, Uozumi, N, Aoki-Nagase, T, Terawaki, K, Ishii, S, Tomita, T, Yamamoto, H, Hashizume, K, Ouchi, Y, and Shimizu, T (2003) A potent inhibitor of cytosolic phospholipase A₂, arachidonyl trifluoromethyl ketone, attenuates LPS-induced lung injury in mice *Am J Physiol* 284, L720–L726
 - 13 Noguchi, K, Ishii, S, and Shimizu, T (2003) Identification of p2y₉/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family *J Biol Chem* 278, 25600–25606
 - 14 Tokuoka, S M, Ishii, S, Kawamura, N, Satoh, M, Shimada, A, Sasaki, S, Hirotsune, S, Wynshaw-Boris, A, and Shimizu, T (2003) Involvement of platelet-activating factor and LIS1 in neuronal migration *Eur J Neurosci* 18, 563–570
 - 15 Talvani, A, Santana, G, Barcelos, L S, Ishii, S, Shimizu, T, Romanha, A J, Silva, J S, Soares, M B P, and Teixeira, M M (2003) Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in platelet-activating factor-deficient mice

- Microb Infect 5, 789-796
- 16 Souza, D G, Pinho, V, Soares, A C Shimizu, T, Ishii, S, and Teixeira, M M (2003) Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment Brit J Pharmacol 139, 733-740
- 17 Weijer, S, Leemans, J C, Florquin, S, Shimizu, T, Ishii, S, and van der Poll, T (2003) Host response of platelet-activating factor receptor-deficient mice during pulmonary tuberculosis Immunology, 109, 552-556
- 18 Rijneveld, A W, Weijer, S, Florquin, S, Speelman, P, Shimizu, T, Ishii, S, and van der Poll, T (2004) Platelet activating factor receptor deficient mice have an improved host defense against pneumococcal pneumonia. J Infect Dis 189, 711-716
- 19 Aoki, M, Matsui, E, Kaneko, H, Inoue, R, Fukao, T, Watanabe, M, Teramoto, T, Kato, Z, Suzuki, K, Suzuki, Y, Kasahara, K, Kondo, N A novel single-nucleotide substitution, Leu 467 Pro, in the interferon-gamma receptor 1 gene associated with allergic diseases Int J Mol Med 12, 185-191, 2003
- 20 Yoshikawa K, Matsui, E, Inoue R, Kaneko H, Teramoto T, Aoki M, Kasahara K, Shinoda S, Fukutomi O, Kondo N Urinary leukotriene E4 and 11-dehydro-thromboxane B2 excretion in children with bronchial asthma. Allergol Int (in press) 2003
- 21 浅野浩一郎 アレルギー疾患の薬理遺伝学の新展開 最新医学 58 (2)、245-250、2003
- 22 浅野浩一郎 遺伝子多型と抗喘息薬の有効性 分子呼吸器病 7 (2)、106-113、2003
- 23 浅野浩一郎 気管支喘息と遺伝子 呼吸 22 (8)、771-776、2003
- 24 浅野浩一郎 テーラーメイド医療 Medical Practice 20 (10)、1727-1729、2003
- 25 浅野浩一郎 呼吸器疾患と pharmacogenetics (気管支喘息を中心に) Asthma Frontier 2 (1)、54-64、2003
- H 知的財産権の出願・登録状況
- 1 特許取得 2件
- ①新規リゾフォスファチシン酸受容体
番号 特願 2003-007657
発明者 清水孝雄、石井聡、野口響子
出願人 科学技術振興事業団
出願日 平成 15 年 1 月 16 日
- ②アレルギー素因を規定する遺伝子の検出方法
申請中
- 2 実用新案登録 なし
- 3 その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

プロスタグランジン D₂ 受容体 DP 遺伝子多型とその機能解析

主任研究者氏名 浅野 浩一郎
慶應義塾大学医学部呼吸循環器内科 講師

プロスタグランジン D₂ の受容体には DP と CRTH2 の 2 種類が存在し、ともに喘息を含むアレルギー疾患の重要な治療ターゲットと考えられている。DP 遺伝子のアミノ酸標識領域およびプロモーター領域を解析したところ複数の遺伝子多型が検出されたが、なかでもプロモーター領域に 3 か所 (T-549C、C-441T、T-197C) の SNP について詳細な検討を行った。この 3 つの SNP から高頻度に形成されるハプロタイプは 4 つ (CCT、TTT、TCT、CCC) であったが、ハプロタイプ CCC が最も高いプロモーター活性を示し、CCT、TTT、TCT の順にプロモーター活性は低下した。T-549C 領域には GATA1-3 結合配列があるが、T-549C により転写因子 GATA3 の結合能が低下した。C-441T 領域には Sp-1 と C/EBPβ の結合配列があるが、C-441T により転写因子 C/EBPβ の結合能が低下した。T-197C によっても転写因子の結合能が変化することが示唆されたか、その転写因子は同定できなかった。さらに DP プロモーター・ルシフェラーゼベクターとこれらの転写因子 (GATA3、C/EBPβ) 発現ベクターとの共発現実験により、GATA3、C/EBPβ が DP 遺伝子の転写調節に重要であることが確認された。本検討において見いだした DP 遺伝子プロモーター領域ハプロタイプは DP 受容体拮抗薬反応性と関連する可能性があり、現在開発段階にある DP 受容体拮抗薬の臨床試験において遺伝子情報を併せて検討する意義があると考えられた。

研究協力者 小熊 剛（埼玉社会保険病院
内科医長）

A 研究目的

プロスタグランジン D₂ の受容体には DP と CRTH2 の 2 種類が存在する。DP 遺伝子ノックアウトマウスでは抗原感作・曝露によっても好酸球性気道炎症や気道過敏性亢進をきたさないこと、PGD₂ は気道上皮細胞のケモカイン MDC 産生誘導を介して Th2 リンパ球 好酸球性気道炎症を誘導していることが最近明らかとなり、DP 受容体は喘息を含むアレルギー疾患の重要な治療ターゲットと考えられている。実際、DP 拮抗薬は気管支喘息や鼻アレルギーの動物モデルで有効であることが証明され、CRTH2 拮抗薬とともに新たな抗脂質メチエーター薬として注目されている。そこでわれわれは DP 拮抗薬反応性と関連する遺伝素因が存在するかどうかの基礎的検討を行った。

B 研究方法

1) 遺伝子多型の検出

DP 遺伝子のアミノ酸標識領域およびプロモーター領域の一塩基置換多型 (single nucleotide polymorphism、以下 SNP) を SSCP 法と直接塩基配列決定法で検出した。日本人、白人、黒人、ヒスパニックの各集団において個々の SNP を PCR-RFLP 法によりタイピングし、さらにプロモーター領域の 3 つの SNP から構成されるハプロタイプを ARMS 法と PCR-RFLP 法を用い、直接同定した。

2) 遺伝子型による DP 遺伝子プロモーター活性への影響の検討

<DP 遺伝子プロモーター活性の測定>

ハプロタイプ間のプロモーター活性の違いを解析するために、それぞれのハプロタイプのプロモーター領域をルシフェラーゼベクターに組み込んだプラスミドを作成した。このプラスミドを肺上皮細胞 A549 に導入しルシフェラーゼアッセイを行

った。

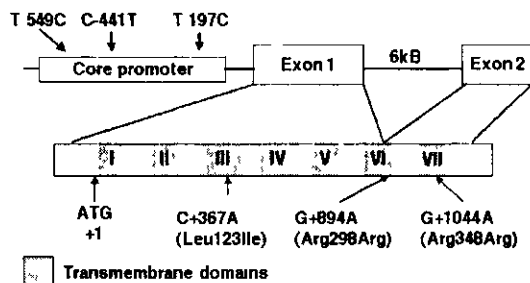
<遺伝子多型部位に結合する転写因子の同定>

各 SNP 周囲に結合する転写因子をコンピュータープログラムにより推測した。それらの転写因子が実際に SNP 領域に結合しているかどうか、さらに SNP により結合能がどのように変化するかをゲルシフトアッセイで検討した。さらに、転写因子発現ベクターとルシフェラーゼヘクターを共発現させることにより、各転写因子が実際に DP 遺伝子発現に重要であるかどうかを検討した。

C 結果

1) 遺伝子多型の検出

アミノ酸標識領域に3か所 (C+367A、G+894A、G+1044A)、プロモーター領域に3か所 (T-549C、C-441T、T-197C) の SNP が検出された。



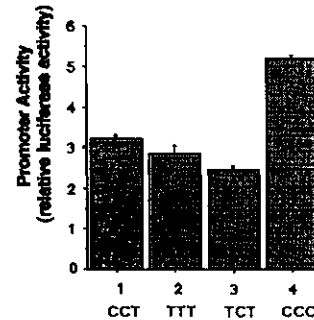
アミノ酸標識領域の SNP のうち、C+367A と G+894A は出現頻度が低く、G+1044A はサイレント変異であり、かつ T-197C とほぼ完全な連鎖不平衡状態にあった。そこでプロモーター域の3つの SNP についてさらに解析を行った。ハプロタイプ解析ではこの3つの SNP からは4つのハプロタイプ (CCT、TTT、TCT、CCC) が高頻度に認められた。

2) 遺伝子型による DP 遺伝子プロモーター活性への影響の検討

a. DP 遺伝子プロモーター活性の測定

4つのハプロタイプ (CCT、TTT、TCT、CCC) についてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、ハプロタイプ CCC が最も高いプロモーター活性を示し、CCT、TTT、TCT の順にプロモーター活

性は低下した。



b 遺伝子多型部位に結合する転写因子の同定

T-549C は GATA1-3 結合配列、C-441T は Sp-1 と C/EBPβ の結合配列、T-197C は Sp-1 の結合配列と一致した。実際にゲルシフトアッセイによりこれらの領域に上記の転写因子が結合することを確認した。T-549C により転写因子 GATA3 の結合能が低下、C-441T により転写因子 C/EBPβ の結合能が低下することが明らかになった。さらに DP プロモーター・ルシフェラーゼヘクターとこれらの転写因子 (GATA3、C/EBPβ) 発現ヘクターとの共発現実験により、GATA3、C/EBPβ が DP 遺伝子の転写調節に重要であることが確認された。ゲルシフトアッセイにより T-197C によっても転写因子の結合能が変化することか示唆されたが、その転写因子は同定できなかった。

D 考察

DP 受容体 mRNA はヒトにおいては好塩基球、好酸球などで発現しているが、抗ヒト DP 受容体抗体がまだないために、喘息気道における発現調節についてはまたよく分かっていない。健常マウス肺に DP 受容体はわずかししか発現していないが、抗原感作・曝露により気道炎症をきたすと気道上皮細胞において DP 受容体が強力に発現誘導される。この気道上皮細胞の DP 受容体と PGD₂ との相互作用によってケモカイン MDC 産生誘導を介して Th2 リンパ球・好酸球性気道炎症が生じると考えられている。本検討において見いだした DP 遺伝子発現に影響するハプロタイプは DP 受容体

拮抗薬反応性と関連する可能性が十分にある。DP受容体拮抗薬は現在抗アレルギー薬として開発段階にあるが、その臨床試験において今回見いだした遺伝子情報を併せて検討する意義があると考えられた。

E. 結論

プロスタグランシン D₂ 受容体 DP 遺伝子のプロモーター領域には3つの遺伝子多型が存在しており、個々の遺伝子多型がプロモーター活性、転写因子結合能に影響するが、実際の DP 遺伝子の発現は遺伝子多型の組み合わせであるハプロタイプによって決定されている。

F. 健康危険情報

なし

G 研究発表

論文発表

- 1 H Tateno, H Nakamura, N Minematsu, T Nakajima, S Takahashi, M Nakamura, K Fukunaga, K Asano, C M Lilly, and K Yamaguchi (2004) Plasma eotaxin level and severity of asthma treated with corticosteroid *Resp Med* (in press) 2004
- 2 K Naoki, K Asano, N Satoh, K Fukunaga, T Oguma, T Shiomi, Y Suzuki, T Nakajima, K Niimi, Y Shiraishi, A Ishizaka, and K Yamaguchi PAF responsiveness in Japanese subjects with plasma PAF acetylhydrolase deficiency *Biochem Biophys Res Commun* (in press) 2004
- 3 浅野浩一郎 アレルギー疾患の薬理遺伝学の新展開 *最新医学* 58 (2)、245-250、2003
- 4 浅野浩一郎 遺伝子多型と抗喘息薬の有効性 *分子呼吸器病* 7 (2)、106-113、2003
- 5 浅野浩一郎 気管支喘息と遺伝子 *呼吸* 22 (8)、771-776、2003
- 6 浅野浩一郎 テーラーメイド医療 *Medical Practice* 20 (10)、1727-1729、2003
- 7 浅野浩一郎 呼吸器疾患と pharmacogenetics (気管支喘息を中心に) *Asthma Frontier* 2 (1)、54-64、2003

学会発表

- 1 T Oguma, E Birben, O Kalayci, LA Sonna, K Asano and C M Lilly Functional analysis of haplotypic variants in the prostanoid DP receptor ATS 99th International Conference 2003 5
- 2 K Asano, Y Suzuki, T Shiomi, T Nakajima, H Kudoh, T Matsuzaki, W Yamada, R Hiraoka, K Yamaguchi, A Nagabukuro, Y Harada Airway Responsiveness to β -agonist and β_2 -adrenoceptor Gene Polymorphisms 60th AAAAI Annual Meeting, 2003 3
- 3 Asano, K, Nakajima, T, Suzuki, Y, Shiomi, T, Yamaguchi, K Clinical and genetic factors that determine the urinary leukotriene E₄ (LTE₄) excretion rate in patients with moderate asthma. ATS 99th International Conference 2003 5
- 4 Asano, K, Shiomi, T, Suzuki, Y, Nakajima, T, Kudoh, H, Matsuzaki, T, Nakajima, T, Yamada, W, Hiraoka, R, Nagabukuro, A, Harada, Y and Yamaguchi, K Clinical and genetic factors that determine the bronchodilatory response to inhaled anticholinergic agents in patients with asthma. ATS 99th International Conference 2003 5
- 5 Suzuki, Y, Asano, K, Nakajima, T, Shiomi, T, Fukunaga, K and Yamaguchi, K Effects of thromboxane A₂ mimetic on proliferation of human bronchial smooth muscle cells ATS 99th International Conference 2003 5
- 6 Nakajima, T, Asano, K, Fukunaga, K, Shiomi, T, Suzuki, Y and Yamaguchi, K Influence of platelet-activating factor (PAF) receptor gene polymorphism upon human neutrophil function ATS 99th International Conference 2003 5
- 7 浅野浩一郎 β_2 アドレナリン受容体遺伝子多型と β 刺激薬 第15回日本アレルギー学会春期臨床大会イブニングシンポジウム (β_2 アドレナリン受容体刺激薬 100年の歩み) 2003 5

- | | | | | | | | |
|--|--|--------|----|----------|----|-------|----|
| <p>8 浅野浩一郎 ロイコトリエンと遺伝子
第1回西日本メディエーター研究会 2003 7</p> <p>9 浅野浩一郎</p> <p>10 浅野浩一郎 Pharmacogenetics of asthma
4th Pneumo Colloquium 2003 10</p> <p>11 浅野浩一郎 遺伝子情報の応用 ロイコトリ
エン受容体拮抗薬 第53回日本アレルギー
学会総会シンポジウム(アレルギー疾患のゲ
ノム解析の現状) 2003 10</p> <p>12 小熊 剛、浅野浩一郎、C M Lilly、山口佳寿博</p> | <p>気管支喘息発症と Prostanoid DP 受容体(DP)
遺伝子多型の関連 第8回プロスタノイド研究
会 2003 11</p> <p>H 知的財産権の出願・登録状況</p> <table border="0"> <tr> <td style="padding-left: 20px;">1 特許取得</td> <td style="padding-left: 20px;">なし</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">2 実用新案登録</td> <td style="padding-left: 20px;">なし</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">3 その他</td> <td style="padding-left: 20px;">なし</td> </tr> </table> | 1 特許取得 | なし | 2 実用新案登録 | なし | 3 その他 | なし |
| 1 特許取得 | なし | | | | | | |
| 2 実用新案登録 | なし | | | | | | |
| 3 その他 | なし | | | | | | |

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

脂質メディエーター合成酵素の遺伝的多様性に基づいたアレルギー性鼻炎の治療についての研究

分担研究者 岡本美孝 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科学教授

研究要旨

アレルギー性鼻炎患者でみられるロイコトリエン合成酵素、あるいは代謝酵素の遺伝子多型とロイコトリエン受容体拮抗薬に対する効果を検討するため、中等度以上の鼻閉を有する通年性アレルギー性鼻炎患者に、4週間のロイコトリエン受容体拮抗薬の内服投与を行ない、その鼻閉に対する効果と患者の遺伝子多型についての関連を検討した。ロイコトリエンC₄合成酵素遺伝子 LTC4SA (-AAA)Cの wild 型を持つ患者では mutant 型の患者に比べ有効率が高かった。

A 研究目的

アレルギー性鼻炎は全国民の約 20%が罹患し、さらにその増加が問題となっている。アレルギー性鼻炎の症状の発現には、鼻粘膜の過敏性の存在と種々のメディエーターの関与がある。ロイコトリエンなどの脂質メディエーターは、鼻粘膜血管に直接作用して鼻閉の形成に作用する以外にも、好酸球はじめ種々の炎症細胞の浸潤・活性化に関与しアレルギー性炎症の形成に働くことが明らかになっている。現在、アレルギー性鼻炎の治療の中心は薬物治療であり、種々の作用機序を持った薬剤が多数開発されているが、一方でアレルギー性鼻炎患者の治療に対する満足度は低く、この原因の一つには、薬物治療に対する個々の患者の反応性が大きく異なっていることが挙げられる。特に、脂質メディエーターの合成や代謝に遺伝的固体系差が存在することが明らかにされているが、これら遺伝子多型と、アレルギー性鼻炎の症状の内容や重症度、治療薬に対する反応性、副作用の発現には関連が存在することが推測される。アレルギー性鼻炎患者でみられるロイコトリエン合成酵素（5-リポキシゲナーゼ、およびロイコトリエンC₄合成酵素）遺伝子の遺伝子多型と臨床症状との関連、ロイコトリエン受容体拮抗薬に対する効果との関連を検討することで、患者の遺伝的背景に応じたテーラーメイド医療を可能とすることを目的とする。

B 研究方法

研究の同意を得た中等度以上の鼻閉を有する通年性アレルギー性鼻炎患者 86 名（男性 53 名、女性 33 名、平均年齢 24.1 歳）に対して、ロイコトリエン受容体拮抗薬である pranlukast の 4 週間内服投与を行った。アレルギー日記、4 週間の内服前後の鼻閉に対する visual analog scale (VAS) による評価、安静時ならびに鼻内抗原誘発後 10 分における鼻腔通気度について検討し、pranlukast に対する効果から、有効例、非有効例に分類した。また、採血により患者末梢血から DNA を抽出し、ロイコトリエン合成酵素（ γ -グルタミルロイコトエナーゼ、ロイコトリエンC₄合成酵素）遺伝子の遺伝子型を PCR-SSLP 法、あるいは PCR-RELP 法により決定し、pranlukast の臨床効果との関連について検討した。
(倫理面への配慮) 学内生命倫理委員会の許可を得て患者のサンプルの匿名化を行なった。また、全ての患者より同意書を得た。

C 研究結果

鼻閉症状の変化を、患者のアレルギー日記及び VAS を用いた評価から pranlukast の有効性について判定した。鼻腔通気度値は、患者の症状変化と相関が認められなかった。53 名のうち、36 名が、pranlukast 内服が鼻閉に対して有効と判定された。これを遺伝子型別に検討してみると、ロイコトリエンC₄合成酵素遺伝子 LTC4SA (-AAA)C の検討

において、mutant 型は 32 名であり、このうち pranlukast 有効例は 13 名 (40.6%)、無効例は 19 名 (59.4%) であった。一方、wild 型は 54 名であり、このうち 36 名 (66.7%) が pranlukast に対して有効性が認められ、18 名 (33.3%) には無効であり、有意に wild 型に有効者が多かった。また、γ グルタミルロイコトリナーゼ遺伝子 GG trel T459C および GG trel A989G、シペプチダーゼ遺伝子 Dipep G1051C に関しては wild 型はそれぞれ 59.4%、58.5%、53.8%、mutant 型は、それぞれ 50.0%、54.5%、59.6% であったが、pranlukast 有効例と無効例と各遺伝子多型との間に明らかな関連は認められなかった。

D 考察

86 名の通年性アレルギー性鼻炎患者のロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子、代謝遺伝子の遺伝子多型と抗ロイコトリエン薬の有効性についての検討の結果、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子多型との間に関連がみられ、wild 型で薬の有効性が高かった。しかし、この結果は喘息患者での同様な検討結果と違いが認められた。この理由は明らかで

はないが、ロイコトリエンのアレルギー性鼻炎と喘息での作用、意義の違いがあることを示している可能性もある。ロイコトリエンは下気道では気道平滑筋を収縮させ、気道収縮を引き起こすが、鼻では鼻粘膜血管平滑筋を弛緩させ、鼻腔抵抗が増大し鼻閉が引き起こされる。今後、喘息合併したアレルギー性鼻炎患者での検討を進めたい。

E 結論

アレルギー性鼻炎患者でみられるロイコトリエン合成酵素の遺伝子多型と抗ロイコトリエン薬の有効性に関連が認められた。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

今後発表予定

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防 治療研究事業）
分担研究報告書

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薬物動態と臨床効果

分担研究者氏名 山口 佳寿博
慶應義塾大学医学部 呼吸循環器内科 助教授

薬理作用規定因子のひとつである薬物動態（pharmacokinetics）の個体差が薬剤反応性に及ぼす影響を検討するために、日本人中等症-重症喘息患者 50 名にロイコトリエン受容体拮抗薬 プランルカストを投与した際の薬物動態と肺機能改善効果を検討した。AUC と関連する服薬 5-7 時間後の平均プランルカスト血中濃度は 50 例全例で有効濃度（100 ng/ml）を上回ったが、101-2529 ng/ml と大きな個体差を示した。しかしプランルカストにより 10%以上の一秒量改善効果を示したレスポンドー（n=16）の平均プランルカスト血中濃度（382 ng/ml）とノンレスポンドー（n=33）の平均プランルカスト血中濃度（603 ng/ml）には有意差が認められず、多変量解析の結果ではレスポンドー規定因子はサルブタモール反応性、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 C(-444)アレルであり、平均プランルカスト血中濃度の関与は認めなかった。

研究協力者

白石良樹

財団法人日本予防医学協会非常勤職員（リサーチアシスタント）

体差、ロイコトリエン合成 代謝酵素遺伝子多型などの複数のパラメーターと薬剤反応性との関連を検討した。

A 研究目的

薬理作用は大きく分けて 2 つの因子によって規定される。ひとつは、一定量の薬物の投与により血中（組織中）濃度がどのレベルに達するか（薬物動態、pharmacokinetics）であり、もうひとつは一定の血中濃度の薬物に対して生体がいかに反応するか（薬力学、pharmacodynamics）である。薬物動態には吸収、分布、代謝、排泄の各相で様々な因子が関与するが、その中でも薬物代謝酵素の遺伝子は非常に多型性に富んでいる。プランルカストの代謝は主にチトクローム P450 に属する CYP3A 群の酵素によって肝臓で行われる。CYP3A 群の中で最も活性の高い CYP3A4 の遺伝子には酵素活性を変化させる多型は認められない。しかしほぼ同じ基質選択性をもつ CYP3A5 には酵素活性を変化させる多型があることが最近報告された。平成 14 年度の研究においてわれわれは健常人 8 名及び中等症～重症喘息患者 37 名においてプランルカストの薬物代謝の個体差がどの程度存在するかを検討した。それにより薬物代謝の個体差がかなり大きいことが示唆されたため、本年度はさらに症例数を 50 症例まで増やすとともに、薬物代謝の個

B 研究方法

(1) 対象

日本人中等症-重症喘息患者 50 名（男 30 名、女 20 名、年齢 26-75 歳）を対象とした。被験者に対して慶應義塾大学医学部治験審査委員会の承諾を得た説明同意文書を用いて説明を行い、書面での同意を得た。

(2) プランルカスト投与試験

1 4 日間連続投与試験

プランルカスト（オノンカプセル）225 mg を一日 2 回、3 日間服薬させたのち、4 日目の朝食 30 分後にプランルカスト 225 mg を服用させた。4 時間後に昼食を摂取させた後、服薬 5、7 時間後に採血を行った。

3 4 週間連続投与試験

プランルカスト（450 mg/day）を 4 週間投与した際の投与前後で一秒量を測定し、その改善率をプランルカストの臨床効果の指標として検討した。またサルブタモール（200 µg/ml）吸入前後での一秒量改善率も併せて測定した。同意の得られた 48 名の患者では DNA を採取し、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 A(-444)C 多型および γ グルタミルロイコトリエンナーゼ遺伝子の T459C 多型のタイピングを行った。

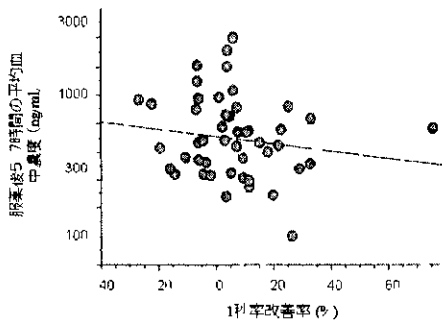
(3) プランルカスト血中濃度の測定

日本医学臨床検査研究所に委託し、高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトリー法により測定を行った。

(4) 統計解析

結果は平均値±標準誤差で表した。レスポナーとノンレスポナーの血中濃度は Students t 検定により行った。

図1 プランルカスト血中濃度と臨床効果



C 結果

50 例全例で服薬 5-7 時間後の平均プランルカスト血中濃度は有効濃度 (100 ng/ml) を上回ったが、101-2529 ng/ml と大きな個体差を示した。プランルカストの 4 週間服薬で 10% 以上の一秒量改善を示したレスポナー (n=16) の服薬 5-7 時間後の平均プランルカスト血中濃度 382 ng/ml (相乗平均) と比較して、ノンレスポナー (n=33) の平均プランルカスト血中濃度は 603 ng/ml とかえって高い傾向にあった。

年齢、性別、サルブタモール反応性、平均プランルカスト血中濃度、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 A(-444)C 多型、γグルタミルロイコト

析ではプランルカスト反応性はサルブタモール反応性とγグルタミルロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 C459 アレルと相関し、プランルカスト血中濃度とは有意な相関は見られなかった。プランルカストレスポナー規定因子を決定するために行った多変量ロジスティック解析ではプランルカストレスポナーはサルブタモール反応性、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 C(-444)アレルと相関し、プランルカスト血中濃度とは相関を示さなかった。

D 考察

今回の検討では健常者を対象とした検討で AUC と良好な相関を示すことが報告されている服薬 5-7 時間後の平均プランルカスト血中濃度を用いて薬物動態を評価した。今まで日本人中等症-重症喘息患者で行われた検討と同様にプランルカスト反応性はサルブタモール反応性、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子多型、γグルタミルロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子多型と有意な関連を認めた。しかし、平均プランルカスト血中濃度はプランルカスト反応性と関連しないか、かえってレスポナーで低い傾向が認められた。これは安全域の大きいプランルカストのような薬剤では比較的投与量を多めに設定してあるためと考えられる。他のアレルギー疾患治療薬についても、テオフィリンを除いては中毒域と安全域の違いが大きいものが多く、薬物動態の個体差はそれほど薬剤の効果に影響を与えないと考えて良いと思われる。

E 結論

プランルカスト血中濃度には大きな個体差があるが、臨床効果との間には関連は認められなかった。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

- Amakawa, K, Terashima, T, Matsuzaki, T, Matsumaru, A, Sagai, M and Yamaguchi, K Suppressive effects of diesel exhaust particles on cytokine release from human and murine macrophages *Exp Lung Res* 29(3) 149-164, 2003

表1 プランルカスト反応性規定因子の多変量ロジスティック解析

	標準回帰係数	p
年齢	0.70	ns
性別	0.70	ns
気道可逆性	2.65	<0.01
LTC ₄ S C(-444)	2.25	<0.05
平均血中濃度	-1.91	ns

リエナーゼ遺伝子 T459C 多型を用いた多変量解

- 2 Takeshita, K, Suzuki, Y, Takeuchi, O, Nishio, K, Toda, K, Kudo, H, Miyao, N, Ishii, M, Sato, N, Naoki, K, Aoki, T, Suzuki, K, Hiraoka, R and Yamaguchi, K Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced nuclear factor- κ B activation Am J Respir Cell Mol Biol 29(1) 124-132, 2003
- 3 Minematsu, M, Nakamura, H, Iwata, M, Tateno, H, Nakajima, T, Takahashi, S, Fujishima, S and Yamaguchi, K CYP2A6 deletion polymorphism is associated with smoking habit and development of pulmonary emphysema Thorax 58(7) 623-628, 2003
- 4 Tasaka, S, Ishizaka, A, Yamada, W, Shimizu, M, Koh, H, Hasegawa, N, Adachi, Y and Yamaguchi, K Effect of CD14 blockade on endotoxin-induced acute lung injury in mice Am J Respir Cell Mol Biol 29(2) 252-258, 2003
- 5 Sakamaki, F, Ishizaka, A, Urano, T, Sayama, K, Nakamura, H, Terashima, T, Waki, Y, Soejima, K, Tasaka, S, Sawafuji, M, Kobayashi, K, Yamaguchi, K and Kanazawa, M Attenuation by intravenous 2-chloroadenosine of acute lung injury induced by live *Escherichia coli* or latex particles added to endotoxin in the neutropenic state J Lab Clin Med 142(2) 128-135, 2003

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 |

日本人軽症喘息患者におけるロイコトリエン受容体拮抗薬反応性規定因子の解析

分担研究者氏名 石坂彰敏
東京電力病院 検査科 科長

研究要旨

ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 A(-444)C 多型は中等症～重症喘息患者におけるロイコトリエン受容体拮抗薬反応性と関連することが報告されている。そこで、この遺伝子多型が軽症喘息患者においてもロイコトリエン受容体拮抗薬反応性と関連するかどうかを検討した。ベクロメサゾン換算 400 μg/日以下の吸入ステロイド薬によりコントロール良好な日本人軽症喘息患者 49 名に対し、吸入ステロイド薬からモンテルカスト内服（10 mg/日、8 週間）への切り替えを行い、症状、QOL スコア、朝のピークフロー値のいずれかの指標が増悪した症例をモンテルカストノンレスポnderとして解析した。解析可能 43 例中、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 C(-444)アレルを有する患者は 13 例であった。C(-444)アレル陽性者ではノンレスポnderは 2 例（15%）であり、A(-444)アレルのみを有する症例での 8 例（27%）と比較してノンレスポnderの頻度が低い傾向を認めた。また C(-444)アレルを有する症例では QOL スコア改善量、末梢血好酸球数減少量が大きい傾向があった。

A 研究目的

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、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とが報告されている遺伝子多型である。イギリスの Sampson のグループは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 cystLT₁ 拮抗薬 Zafirlukast を投与した際、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 C(-444)アレルを持たない患者では一秒量が 12%悪化したのに対し、C(-444)アレルを持っている患者では 9%改善したと報告している。平成 13 年度研究においてわれわれは中等量以上の吸入ステロイド薬を使用中の日本人中等症～重症喘息患者を対象に同様の検討を行った。ロイコトリエン受容体拮抗薬（プラナルカスト）を投与した際の一秒量改善率はロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 C(-444)アレルを持っている患者で 14%、持たない患者では 3%であり、C(-444)アレルを持っている患者には一秒量が 10%以上改善したレスポnderの比率が有意に高かった。これらの結果はロイコトリエン量が多い喘息患者ほどロイコトリエン受容体拮抗薬が奏功しやすい、という仮説を支持している。このような関連が軽症喘息患者にお

いても当てはまるかどうかを検討するために今回の検討を行った。

B 研究方法

ベクロメサゾン換算 400 μg/日以下の吸入ステロイド薬によりコントロール良好な日本人軽症喘息患者 49 名（男性 29 名、平均年齢 55±15 歳）に対し、吸入ステロイド薬からモンテルカスト内服（10 mg/日、8 週間）への切り替えを行った。臨床効果の指標として一秒量、朝のピークフロー値、および QOL (AQLQ) スコアを用いた。また末梢血より DNA を抽出し、ロイコトリエン C₄ 合成酵素遺伝子 A(-444)C 多型を PCR-RFLP 法により決定した。

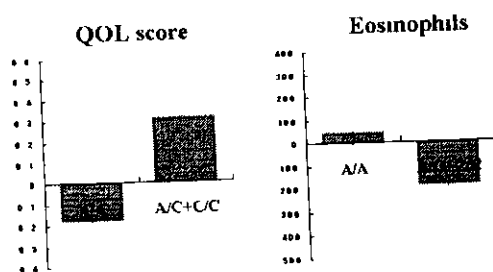
C 結果

QOL スコアの変化と朝のピークフロー値変化率と相関したが、一秒量変化率は他の指標との相関を認めなかったため、臨床効果の指標としては QOL スコアと朝のピークフロー値変化率を使用した。

副作用のため 2 例が脱落、4 例では遺伝子解析についての同意が得られなかった。解析が可能であった 43 例のうち、6 例は症状増悪のためモンテルカストから吸入ステロイドに再変更を要し、

7例では朝のピークフロー値が5%以上増悪、4例ではQOLスコアが0.5ポイント以上低下した。症状、QOLスコア、朝のピークフロー値のいずれかの指標が増悪したモンテルカストノンレスポナーは10例であり、うち9例はベクロメサゾン換算400 μ g/日の吸入ステロイドからの変更例で、ヘクロメサゾン換算200 μ g/日の吸入ステロイドから変更した17例中で増悪例は1例のみであった。

43症例のうち、ロイコトリエンC₄合成酵素遺伝子C(-444)アレルを有する患者は13例であった。C(-444)アレルを有する患者ではノンレスポナーは2例(15%)であり、A(-444)アレルのみを有する患者での8例(27%)と比較して頻度が低い傾向を認めた。またC(-444)アレルを有する患者ではQOLスコ



ア変化量、末梢血好酸球数減少量がA(-444)アレルのみを有する患者よりも大きい傾向があった(図)。

D 考察

今回の研究では吸入ステロイド薬からロイコトリエン受容体拮抗薬への切り替えという試験デザインを選択したため、喘息コントロールが悪化した被験者をロイコトリエン受容体拮抗薬に対するノンレスポナーとして評価した。軽症患者を対象としているために一秒量は必ずしも良い指標とならないと考え、朝のピークフロー値とQOLスコアを併せて評価したが、やはりQOLスコアと一秒量改善率との間には相関が認められず、朝のピークフロー値が良い指標となった。ロイコトリエンC₄合成酵素遺伝子C(-444)アレルを有する中等症～重症喘息患者でプラナルカスト反応性が良好であったが、軽症喘息患

者においてもC(-444)アレルを有する患者でモンテルカスト不応例が少ない傾向が認められた。モンテルカスト不応例の比率が少ないこともあり、統計学的な有意差が認められなかったため、今後症例を増やして検討する必要があると考えられた。

E. 結論

中等症～重症喘息患者ではプラナルカスト反応性とロイコトリエンC₄合成酵素遺伝子C(-444)アレルと関連が認められたが、軽症喘息患者におけるモンテルカスト反応性においても同じ遺伝子多型との関連が示唆された。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

論文発表

- 1 Tasaka S, Ishizaka A, Hasegawa N, Koh H, Yamada W, Shimizu M, Adachi Y, Yamaguchi K CD14 Blockade Attenuates Endotoxin-Induced Lung Injury by Suppressing Macrophage Function in Mice *Am J Respir Mol Cell Biol* 29 252-258, 2003
- 2 K Yamazaki, S Ogura, A Ishizaka, T Oh-hara, M Nishimura Bronchoscopic microsampling method for measuring drug concent³ M Watanabe, A Ishizaka, E Ikeda, A Ohashi, K Kobayashi Contributions of bronchoscopic microsampling in the diagnosis of peripheral lung carcinoma *Ann Thorac Surg* 2003, 76, 1668-72
- 4 Ishizaka A, Matsuda T, Albertine KH, Koh H, Tasaka S, Hasegawa N, Kohno N, Kotani T, Morisaki H, Takeda J, Nakamura M, Martin TR, Matthay MA and Hashimoto S Clinical Outcome in Acute Lung Injury is Predicted by KL-6, a Lung Epithelial Cell Marker *Am J Physiology Lung Molecular Physiology* 2003, Sept 5 (Epub ahead of print)
- 7 J S Park, D Svetkauskaite, Q He, J-Y Kim, D Strassheim, A Ishizaka and E Abraham Involvement of TLR 2 and TLR 4 in Cellular Activation by High Mobility Group Box 1 protein (HMGB1) *J Biol Chem* 2003, Dec 4 (Epub ahead of print)

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