

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

アレルギー疾患の治療反応性予測因子の確立及び  
テーラーメイド治療法の確立に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 近藤直実

平成18年3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- アレルギー疾患の治療反応性予測因子の確立及びテーラーメイド治療法の  
確立に関する研究  
近藤直実…………… 1

## II. 分担研究報告

- 1 アレルギーの病因遺伝子・病態・治療反応性予測因子の解明とテーラー  
メイド治療法の確立および創薬の検討  
(分担研究者 近藤直実)…………… 5
- 2 成人喘息におけるロイコトリエン受容体拮抗薬と吸入ステロイド薬の  
治療反応性と中止可能予知因子の解明  
(分担研究者 秋山一男)…………… 9
- 3 吸入ステロイド薬の至適用量にもとづく臨床効果と遺伝子多型に関する研究  
(分担研究者 大田 健)…………… 15
- 4 小児喘息における吸入ステロイド薬の治療反応性に及ぼす生体因子・  
環境因子の解析に関する研究  
(分担研究者 赤澤 晃)…………… 21
- 5 気管支拡張薬の代謝、効果、および副作用に関する遺伝学的研究  
(分担研究者 山口悦郎)…………… 25
- 6 テーラーメイド治療開発のための発症予測データベース作成：  
アトピー性皮膚炎に関して  
(分担研究者 白川太郎)…………… 33
- 7 遺伝子情報の網羅的解析、および小児喘息におけるロイコトリエン  
受容体拮抗薬の治療反応性予測遺伝子因子とテーラーメイド治療開発  
(分担研究者 松井永子)…………… 37

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 41

## IV. 研究成果の刊行物・別冊…………… 45

# I. 総括研究報告

主任研究者 近藤直実 岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学 教授

**研究要旨** 近年、気管支喘息、アトピー性皮膚炎などアレルギー疾患の増加が大きな社会問題になっている。従ってこれらに対する適格な対策の確立が急務である。本研究の目的は、①アレルギー疾患の病因・病態および治療反応性予測因子を系統的に検出できる遺伝子診断キット及び DNA チップ（アレイ）を中心とする診断システムを開発すること。—このためには病因・病態・薬剤反応性解析の蓄積が重要である。②その診断をもとにして各病因・病態に合致したテーラーメイド治療法を確立すること。—このためには新たな創薬も必要である。本年度の研究成果から、次の点が確認できた。(1) アレルギーの病因・病態の系統的解析にもとづいてアレルギー（アトピー）を遺伝子学的に分類し、これに基づいて遺伝子検出キットをインベーターアッセイ法を利用し、確立できた。(2) 遺伝子発現変化を系統的に検出するための DNA チップ（アレイ）の開発を進めている。(3) アトピー性皮膚炎発症予測データベース作成のための病因遺伝子分析のための皮膚幹細胞の培養法が確立でき、さらにその DNA チップ作成を進めた。(4) 抗アレルギー薬、抗喘息薬について吸入ステロイド薬、テオフィリン製剤、ロイコトリエン受容体拮抗薬、Th2 サイトカイン抑制薬について、治療反応予測因子、中止予測因子について検討し、画期的成果が得られた。(5) テーラーメイド治療のための創薬がタンパク解析により可能である。

**分担研究者**

- 秋山一男 (独) 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター センター長
- 大田 健 帝京大学医学部内科学講座 教授
- 赤澤 晃 国立成育医療センター 総合診療部小児期診療科 医長
- 山口悦郎 愛知医科大学医学部 呼吸器・アレルギー内科 教授
- 白川太郎 京都大学大学院医学研究科 教授
- 松井永子 岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学 併任講師

良好・適格な治療効果が得られ、QOLの向上が得られ、社会問題の解決につながる。

本研究の目的は、

- ①アレルギー疾患の病因・病態および治療反応性予測因子を系統的に検出できる遺伝子診断キット及び DNA チップ（アレイ）を中心とする診断システムを開発すること。—このためには病因・病態・薬剤反応性解析の蓄積が重要である。
- ②その診断をもとにして各病因・病態に合致したテーラーメイド治療法を確立すること。—このためには新たな創薬も必要である。

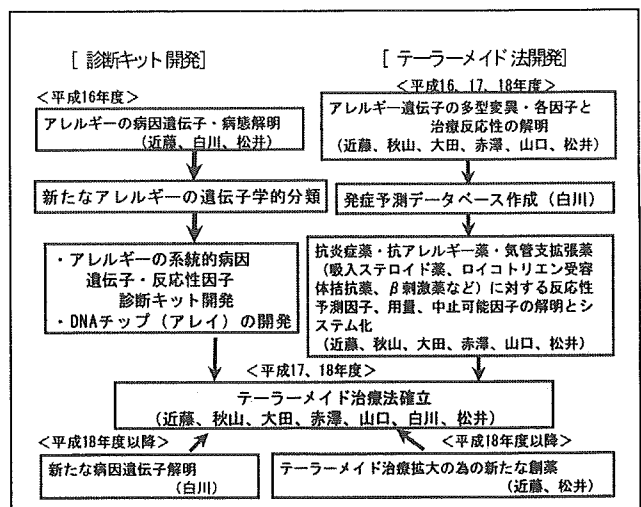
**A. 研究目的**

近年、気管支喘息、アトピー性皮膚炎などアレルギー疾患の増加が大きな社会問題になっている。従ってこれらに対する適格な対策の確立が急務である。アレルギー疾患は遺伝的要因と環境要因とが絡み合って発症する。その病因・病態は極めて多彩である。アレルギー疾患のガイドラインを基盤にして、さらに個々の患者における多彩な病因・病態に対応して、個々への対策の開発が急務である。すなわちテーラーメイド治療法（個別化治療法）の確立である。その為に必須なことは、個々の患者の病因・病態を適格に認識し、さらにこれをもとに治療反応性の予測法を確立することである。これなくしてテーラーメイド治療は成立しない。以上により

**B. 研究方法**

研究の流れを図1に示した。

図 1



(1) アレルギー（アトピー）の病因遺伝子群の系統的、多角的な解明に基づいて、アレルギーを新たに遺伝子学的に分類し、アレルギーの系統的遺伝子診断キットをインベーターアッセイ法を用いて開発した。(2) 加えてDNAチップ（アレイ）の開発にも着手した。これを気管支喘息を中心にアレルギー疾患に適用した。(3) アトピー性皮膚炎の発症予測データベースの開発とアトピー性皮膚炎用のDNAチップ作成を進めた。

(4) 個々の異常部位を系統的に診断あるいは予測できる遺伝子診断の情報および発症予測データベースをもとにして、その病因・病態に合致したテーラーメイド治療法を確立するため、まず、既存の薬剤の適格な使用方法について検討した。具体的には、主に個々の気管支喘息患者の発症病因、病態、成立機序の個々の部位に対する抗アレルギー薬・抗喘息薬のテーラーメイド治療法の確立のためのEBMを検討した。①抗アレルギー薬の中で、Th2 サイトカイン抑制薬投与前後における、末梢血単核球分画から産生されるIgE産生に関わるTh1、Th2 サイトカインおよび当該遺伝子多型等について検討した。②ロイコトリエン受容体拮抗薬投与前後における尿中アラキドン酸排泄量、当該遺伝子多型の検討、喘息日誌における症状改善度、QOL調査を行った。③吸入ステロイド薬の至適用量に基づく臨床効果・治療反応性・寛解予測因子・中止予知因子と当該遺伝子多型解析を行った。④気管支拡張薬（ $\beta_2$ 刺激薬とテオフェリン薬）の効果・副作用と遺伝子多型との解析を行った。(5) 次いで詳細な遺伝子情報をもとに、今後、どのような薬剤を開発すれば、医療効果が上昇し、患者の治癒軽快率の向上、さらにはQOLの向上が図れるかについて検討し、蛋白構造レベルでの創薬をすすめた。

(倫理面への配慮)

研究対象者には本研究の内容、方法および予想される結果を十分に説明し理解（インフォームドコンセント）を得た上で採血・採尿が行われた。また倫理面でも、結果による不利益は全く生じないか、または配慮が充分になされることから問題がないと判断された。

## C. 結果

(1) アレルギーの病因、病態の系統的解析にもとづいてアレルギー（アトピー）を遺伝子学的に分類し、これに基づいて遺伝子検出キットをインベーターアッセイ法を利用して構築した。

(2) 遺伝子発現変化を系統的に検出するためのDNAチップ（アレイ）の開発を進めている。

(3) アトピー性皮膚炎発症予測データベース作成のための病因遺伝子分析のための、皮膚幹細胞の培養法が確立でき、さらにそのDNAチップ作成を進めた。

(4) 抗アレルギー薬、抗喘息薬について、①Th2 サイトカイン抑制薬であるトシル酸スプラタスト投与により、症状の軽快が得られた症例では、IFN- $\gamma$ 産生量は、投与後に明らかに増加していた。さらに、症状の改善がみられた症例における遺伝子多型について検討したところ、IL-13 遺伝子多型に加えてLTC4S 遺伝子多型が症状改善度と関連している可能性が考えられた(表1,2)。これは、極めて画期的成果の一つである。

表1 Th2サイトカイン抑制薬（トシル酸スプラタスト）有効性とIL-13遺伝子多型 ( $\chi^2$ 二乗検定:p=0.043)

|     | GG | GAorAA | 合計 |
|-----|----|--------|----|
| 有効例 | 8  | 5      | 13 |
| 無効例 | 1  | 6      | 7  |

表2 Th2 サイトカイン抑制薬（トシル酸スプラタスト）有効性とLTC4S 遺伝子多型 ( $\chi^2$ 二乗検定:p=0.007)

|     | AA | AC | 合計 |
|-----|----|----|----|
| 有効例 | 10 | 3  | 13 |
| 無効例 | 1  | 6  | 7  |

②ロイコトリエン受容体拮抗薬により効果のみられた症例では、尿中LTE4排泄量が高く、好酸球上のLT1受容体発現が低下している症例が多いことが明らかになった(図2)。TxB2排泄量は投与4週後に減少傾向にあった。遺伝子多型との関連について検討中である。

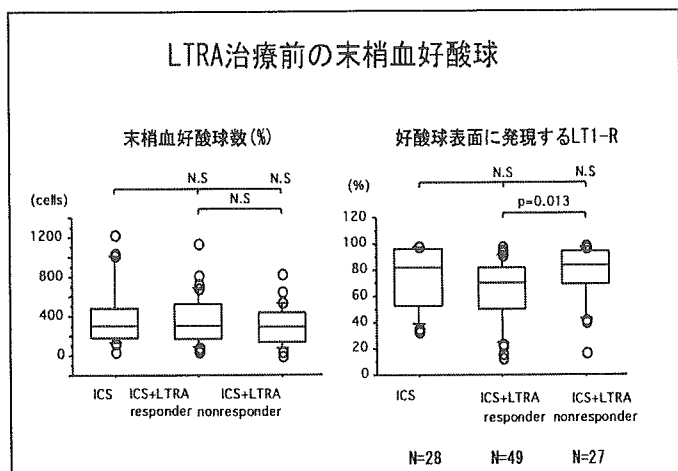


図2 LTRA治療前の末梢血好酸球数および好酸球表面に発現するLT1-R

③吸入ステロイド薬の使用量、臨床効果、治療反応性、寛解予測、中止予知のために気道過敏性の評価が重要であることが示された。このことがテーラーメイド治療に応用可能である。さらに TGF  $\beta_1$  の C-509T 多型に加えて MIF (ステロイドの抗炎症作用に拮抗する分子) の G-173C 多型がそれぞれ喘息寛解予測因子、ステロイド反応性予測因子になりうることが示された (表 3)。

表 3 吸入ステロイド薬の有効性と MIF G-173C 多型 (Spearman Rank Correlation 同順位補正後: p=0.0111)

|     | GG | GC | CC |
|-----|----|----|----|
| 有効例 | 28 | 26 | 5  |
| 無効例 | 42 | 14 | 3  |

④テオフィリン製剤など気管支拡張薬の血中濃度と CYP1A2 遺伝子多型等の関連の検討が進められている。

(4) HLA-peptide-TCR 複合体立体構造解析と HLA 遺伝子多型に基づく食物アレルギー治療薬の開発を進めている。βラクトグロブリンペプチドによるT細胞クローンをを用いた実験、患者由来血球を用いたヒスタミン遊離試験等を経て、実際のミルクアレルギー患者における皮膚試験を施行し、臨床応用の可能性が高いと考えられる結果を得た。一方、IL-18 リガンド：レセプター立体構造解析に基づいた薬剤開発をタンパクレベル、ペプチドレベル、低分子レベルで進めている。変

異体活性測定などに基づき新規機能蛋白分子の開発に成功したほか、低分子アンタゴニストのスクリーニングにより、阻害活性を持つ候補分子を検索することができた。

#### D. 考察

本年度の研究成果から、画期的成果が幾つか得られたと同時に次の点が確認できた。

- (1) アレルギーの病因・病態解析をもとにして、さらに遺伝子相互間作用と遺伝子・環境相互作用の検討も含めて新たにアレルギー (アトピー) の遺伝子学的分類が確立され、さらに個々の異常部位を系統的に診断あるいは予測できる遺伝子診断キットが確立できた。
- (2) DNA チップ (アレイ) の開発にも着手した。
- (3) 遺伝子診断・反応性予測因子診断キットおよび発症予測データベースをもとにして、その病因・病態に合致したテーラーメイド治療法を開発する基礎が確立できた。特に既存の薬剤の適格な使用方法 (中止時期決定因子の解明を含む) の確立が可能になった。
- (3) 近い将来、適格な診断・治療法の確立により医療効果が上昇し、患者の治癒軽快率の向上、QOL の向上、医療費の節減にもとづいて社会問題の解決が図れる。
- (4) テーラーメイド治療のための創薬がタンパク解析により可能である。

#### E. 結論

本年度の成果をもとにして、以下の点を中心に次年度の研究を推進する。

- (1) アレルギーのさらなる病因・病態の解析を基盤に、新たな病因の発見と、網羅的かつより系統的な診断範囲の拡大と確立を進める。
- (2) 本研究を通してアレルギーの既存外の新たな創薬の必要性と開拓がなされ、テーラーメイド治療法の開発をさらに拡大充実させる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

分担研究報告書参照

#### H. 知的所有権の取得状況

分担研究報告書参照

## II. 分担研究報告

分担課題名：アレルギーの病因遺伝子・病態・治療反応性予測因子の解明と  
テーラーメイド治療法の確立および創薬の検討

分担研究者 近藤直実 岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学 教授

**研究要旨** アレルギー疾患は、遺伝的要因と環境要因が相互に影響しあって発症すると考えられている。本研究の目的は、アレルギー疾患の病因・病態および治療反応性予測因子を系統的に分類し、病態を明らかにすること、および各病因・病態にもとづいたテーラーメイド治療法を確立することである。この確立のために新規創薬も目的とする。病因、病態解析にもとづいてアレルギー（アトピー）を遺伝子学的に分類することを試みた。テーラーメイド治療法を確立するため、まず、既存の薬剤の適格な使用方法について検討した。トシル酸スプラタスト投与により、症状の軽快が得られた症例では、IFN- $\gamma$  産生量は、投与後に明らかに増加していた。さらに、症状の改善がみられた症例における遺伝子多型について検討したところ、IL-13 遺伝子多型、LTC4S 遺伝子多型が症状改善度と関連している可能性が考えられた。既存の薬剤に対する有効性の予測が、遺伝子レベルでなされるために、さらに症例数を増やして検討したい。さらに、アレルギーの新たな創薬の開拓が、テーラーメイド治療法のさらなる拡大と充実のために必要である。

**研究協力者**

加藤善一郎 岐阜大学大学院医学系研究科  
小児病態学 講師  
寺本貴英 岐阜大学大学院医学系研究科  
小児病態学 助手

**A. 研究目的**

アレルギー疾患は、遺伝的要因と環境要因が相互に影響しあって発症すると考えられている。本研究の目的は、アレルギー疾患の病因・病態および治療反応性予測因子を系統的に分類し、病態を明らかにすること、および各病因・病態にもとづいたテーラーメイド治療法を確立することである。この確立のために新規創薬も目的とする。

**B. 研究方法**

(1) アレルギーの病因・病態解析をもとにして、さらに遺伝子相互作用と遺伝子・環境相互作用の検討も含めて新たにアレルギー（アトピー）を遺伝子学的に分類した。(2) 個々の異常部位を系統的に診断あるいは予測できる遺伝子診断の情報および発症予測データベースをもとにして、その病因・病態に合致したテーラーメイド治療法を確立するため、ま

Th2 サイトカイン抑制薬投与前後における、末梢血単核球分画から産生される IgE 産生に関わる Th1、Th2 サイトカイン等について検討した。同時に喘息日誌における症状改善度、QOL 票の記載による QOL の改善について検討を加えた。

次いで詳細な遺伝子情報をもとに、今後、どのような薬剤を開発すれば、医療効果が上昇し、患者の治療軽快率の向上、さらには QOL の向上が図れるかについて検討し、蛋白構造レベルでの創薬をすすめた。

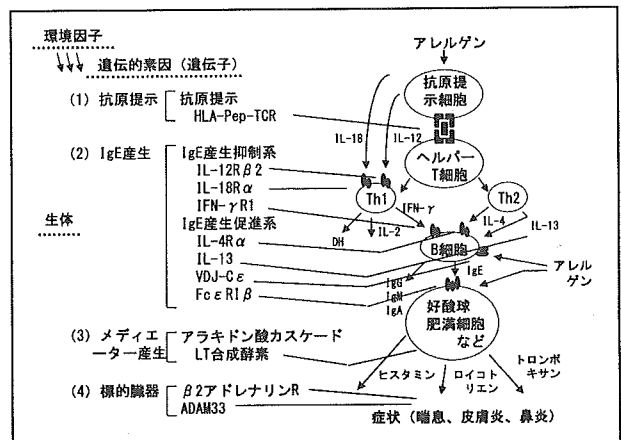


図1 新たなアトピーの遺伝子学的分類 (Kondo, N)

**C. 結果**

(1) 病因、病態解析にもとづいてアレルギー（ア



トピー) を遺伝子学的に分類することを試みた(図1)。(2) トシル酸プラタスト投与前後における末梢血単核球分画から産生されるサイトカイン(IL-4, IL-5, IL-12, IFN- $\gamma$ )を測定した。また、投与前後の末梢血中の好酸球数、IgEについても比較検討した。PHAで刺激した培養上清中のIL-4, IL-5は全体としては、明らかな変化はみられなかったが、トシル酸プラタスト投与により、症状の軽快が得られた症例では、IFN- $\gamma$ 産生量は、投与後に明らかに増加しており、その変化量は有意確率 0.0001であった(表1)。

表1 トシル酸プラタスト投薬前後のサイトカインの動向 Pearsonの相関係数

| 変数          | VS変数        | 相関     | 有意確率   |
|-------------|-------------|--------|--------|
| IFN-g (変化量) | response    | 0.843  | 0.0001 |
| IL-4 (変化量)  | IgE (変化量)   | 0.806  | 0.0049 |
| IL-4 (投与前)  | IgE (変化量)   | -0.800 | 0.0055 |
| IL-12 (変化量) | IL-12 (投与前) | -0.865 | 0.0055 |
| IL-12 (投与後) | IFN-g (投与後) | 0.839  | 0.0093 |
| IL-4 (投与前)  | IgE (投与前)   | 0.686  | 0.0197 |
| IgE (変化量)   | Eo (投与前)    | 0.879  | 0.0210 |
| IFN-g (投与後) | Eo (変化量)    | 0.978  | 0.0223 |
| IL-4 (変化量)  | IL-4 (投与後)  | 0.622  | 0.0307 |
| IgE (変化量)   | IgE (投与前)   | -0.671 | 0.0338 |
| IFN-g (変化量) | IFN-g (投与後) | 0.547  | 0.0347 |
| IL-5 (投与前)  | IL-4 (投与後)  | 0.604  | 0.0376 |
| IgE (投与後)   | Eo (変化量)    | -0.962 | 0.0378 |
| IL-4 (変化量)  | IL-4 (投与前)  | -0.591 | 0.0428 |

さらに、症状の改善がみられた症例における遺伝子多型について検討した(表2)。LTC4S A-444C多型の野生型はトシル酸プラタスト有効例が多く  $p=0.007$  で有意に症状改善度と関連していた。

表2 Th2サイトカイン抑制薬(トシル酸プラタスト)の有効性と遺伝子多型

| Gene    | SNP           | n  | Genotypes | Nonresponder | Responder | P value |
|---------|---------------|----|-----------|--------------|-----------|---------|
| IL12RB1 | IL-12RB1(365) | 20 | T/T       | 3 (43%)      | 4 (31%)   | 0.384   |
|         |               |    | T/C       | 4 (57%)      | 6 (46%)   |         |
|         |               |    | C/C       | 0 (0%)       | 3 (23%)   |         |
| IL12    | IL-12(3757)   | 20 | T/T       | 2 (29%)      | 4 (31%)   | 0.207   |
|         |               |    | T/C       | 5 (71%)      | 5 (38%)   |         |
|         |               |    | C/C       | 0 (0%)       | 4 (31%)   |         |
|         | IL-12(16078)  | 20 | C/C       | 6 (86%)      | 12 (92%)  | 0.299   |
|         |               |    | C/T       | 1 (14%)      | 0 (0%)    |         |
|         |               |    | T/T       | 0 (0%)       | 1 (8%)    |         |
| LTC4S   | LTC4S(-444)   | 20 | A/A       | 1 (14%)      | 10 (77%)  | 0.007   |
|         |               |    | A/C       | 6 (86%)      | 3 (23%)   |         |
|         |               |    | LTC4S(10) | 20           | G/G       |         |
| IL4RA   | IL-4RA        | 20 | G/A       | 0 (0%)       | 1 (8%)    |         |
|         |               |    | G/G       | 3 (43%)      | 4 (31%)   |         |
|         |               |    | G/A       | 4 (57%)      | 8 (62%)   |         |
| IL13    | IL-13         | 20 | A/A       | 0 (0%)       | 1 (8%)    | 0.690   |
|         |               |    | G/G       | 1 (14%)      | 8 (62%)   |         |
|         |               |    | G/A       | 5 (71%)      | 4 (31%)   |         |
|         |               |    | A/A       | 1 (14%)      | 1 (8%)    | 0.127   |

また、IL-13 遺伝子多型も  $p=0.127$  でトシル酸プラタスト有効性と関連する傾向を示していた。

(3) HLA-peptide-TCR複合体立体構造解析・HLA遺伝子多型に基づく食物アレルギー治療薬の開発を進めている。 $\beta$ ラクトグロブリンペプチドによるT細胞クローンを用いた実験、患者由来血球を用いたヒスタミン遊離試験などを経て、実際のミルクアレルギー患者における皮膚試験を施行し、臨床応用の可能性が高いと考えられる結果を得た。一方、IL-18 リガンド：レセプター立体構造解析に基づいた薬剤開発をタンパクレベル、ペプチドレベル、低分子レベルで進めている(図2)。

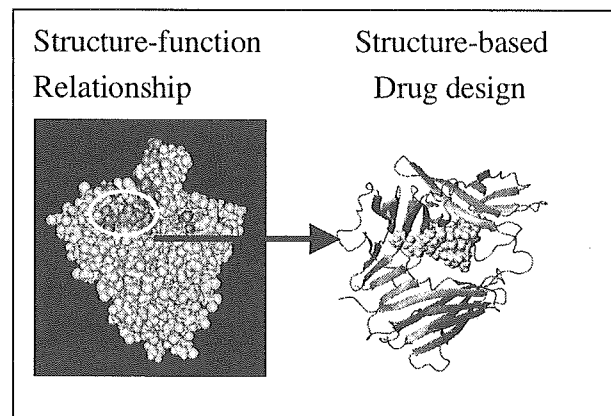


図2

#### D. 考察

以上の成績から、今後さらに遺伝子診断、発症予測に関する情報を集約し、得られたデータを検討することで、アレルギーのさらなる病因・病態の解析を基盤に新たな病因の発見と、網羅的かつより系統的な診断範囲の拡大と確立が可能である。また、既存の薬剤に対する有効性の予測が、遺伝子レベルでなされるために、さらに症例数を増やして検討したい。さらに、アレルギーの新たな創薬の開拓が、テーラーメイド治療法のさらなる拡大と充実のために必要である。

#### E. 結論

アレルギー疾患の病因、病態のデータベースをもとに、既存の薬剤を選択していくことは、患者のQOLの向上のみならず、医療経済学的にも非常に重要であると思われる。さらには、このことが今後どのような分子に注目して創薬をめざせばよいかについての貴重な情報を与えるものと

考える。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

<論文発表>

- 1) Kondo N, Kraft M, Kaminogawa S : Hygiene Hypothesis-Significance and Verification in Asthma/Allergy-, International Review of Asthma. 7: 8-25 (2005)
- 2) Tatebayashi K, Matsui E, Kaneko H, Fukao T, Kasahara K, Kondo N. IL-12B promoter polymorphism associated with asthma and IL-12B transcriptional activity. Allergology International. 54: 345-349 (2005)
- 3) Yoshikawa K, Matsui E, Kaneko H, Fukao T, Inoue R, Teramoto T, Shinoda S, Fukutomi O, Aoki M, Kasahara K, Kondo N. A novel single-nucleotide substitution, Glu 4 Lys, in the leukotriene C4 synthase gene associated with allergic diseases. Int J Mol Med. 16: 827-831 (2005)
- 4) Kondo M, Suzuki K, Inoue R, Sakaguchi H, Matsukuma E, Kato Z, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. Characterization of T-cell clones specific to ovomucoid from patients with egg-white allergy. J Investig Allergol Clin Immunol. 15 :107-111 (2005)
- 5) Matsukuma E, Kato Z, Omoya K, Hashimoto K, Li A, Yamamoto Y, Ohnishi H, Hiranuma H, Komine H, Kondo N. Development of fluorescence linked immunosorbent assay (FLISA) for high throughput screening (HTS) of interferon-gamma. Allergology International. in press.
- 6) Kawamoto N, Kaneko H, Takemura M, Seishima M, Sakurai S, Fukao T, Kasahara K, Iwasa S, Kondo N. Age-related changes in intracellular cytokine profiles and Th2 dominance in allergic children. Pediatric Allergy and Immunology. in press.
- 7) Kondo N, Kato Z, Kaneko H, Fukao T, Matsui E, Aoki M, Kawamoto N, Kondo M, Omoya K, Tatebayashi K, Matsukuma E, Kasahara K, Kuwabara M, Mabichi Y, Horikoshi H. Molecular

explanation of hygiene hypothesis. Allergology International. in press.

<学会発表>

- 1) Kondo N: 国際学会シンポジウム: Symposium 1 : The hygiene hypothesis: true or false? (衛生仮説). APAPARI KAPARD Joint Congress 2005 (2005年4月7日, 韓国)
- 2) Kawamoto N, Kondo N, Kasahara K, Takemura M, Kaneko H: Free Paper2-1: Age related changes in interacellular cytokine production of T cell . APAPARI KAPARD Joint Congress 2005(2005年4月8日, 韓国)
- 3) 近藤直実: 特別講演: 「アレルギーのテララーメイド医療とポストゲノム」. 岐阜免疫・アレルギー薬物療法研究会 (第19回) (2005年2月24日, 岐阜)
- 4) 近藤直実, 松井永子, 篠田紳司, 寺本貴英, 深尾敏幸, 金子英雄, 加藤善一郎, 川本典生, 平山耕一郎: イブニングシンポジウム2: 講演: 小児気管支喘息のQOLと評価. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第17回) (2005年6月2日, 岡山)
- 5) 近藤直実: ランチョンセミナー: 小児気管支喘息と治療-ガイドラインとテララーメイド医療の現在と将来-. 日本小児科医会セミナー (第16回) (2005年6月12日, 北海道)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

近藤直実, 松井永子, 金子英雄, 青木美奈子, 近藤應: 遺伝子多型を利用した抗アレルギー薬の感受性予測方法 (特許出願中): 平成17年度

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

分担課題名：成人喘息におけるロイコトリエン受容体拮抗薬と吸入ステロイド薬の  
治療反応性と中止可能予知因子の解明

分担研究者 秋山一男 国立病院機構相模原病院臨床研究センター センター長

研究要旨：成人喘息の治療はガイドラインにより吸入ステロイド(ICS)が長期管理薬として第1選択薬であるという位置づけが明確になってきた一方で、経口抗炎症薬として位置づけられているロイコトリエン受容体拮抗薬(LTRA)による治療が長期寛解または治癒に結びつくのかにどうかについては未だ明確な回答はなく、また LTRA 使用の適応基準についても十分な evidence は存在しない。本年度の研究では成人喘息患者で ICS を使用している症例を対象とし、第二選択薬として LTRA を併用し、治療前後で末梢血好酸球における LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub> のレセプターである CysLT<sub>1</sub> 受容体の発現頻度および尿中ロイコトリエン LTE<sub>4</sub> の測定を行い、これらのパラメーターが LTRA の治療反応性予測因子となりうるかどうかについて検討した。LTRA を使用した結果、自覚症状の改善、PEF の10%以上の増加、βMDIの使用回数の低下のいずれかひとつ以上を認めた症例を LTRA responder 群、いずれも認めない症例を LTRA nonresponder 群と定義し、各パラメーターを治療前後で比較した。結果、ICS+LTRA responder 群は ICS+LTRA nonresponder 群と比較して好酸球の LT<sub>1</sub> 受容体の発現頻度が低く (77.6% vs 65.2%, p=0.013)、LTRA 治療前の尿中 LTE<sub>4</sub> が高い (216.9 vs 80.0 pg/mgcre, p<0.01) ことが明らかとなった。以上より、LTRA 使用前の尿中 LTE<sub>4</sub>、好酸球の LT<sub>1</sub> 受容体発現頻度の測定は、治療反応性予測因子となる可能性があり、将来のテーラーメイド療法への応用へとつながるものと考えられた。

#### 研究協力者

釣木澤尚実 国立病院機構相模原病院臨床研究センター  
斉藤博士 国立病院機構相模原病院臨床研究センター  
三田晴久 国立病院機構相模原病院臨床研究センター  
粒来崇博 国立病院機構相模原病院臨床研究センター  
谷口正実 国立病院機構相模原病院臨床研究センター  
前田裕二 国立病院機構相模原病院臨床研究センター

#### A. 研究目的

成人喘息に治癒は存在するかあるいは少なくとも長期寛解があり得るかどうかについての明確な回答は得られていない。当センターにおけるこれまでの疫学調査では、成人喘息の一部に3年間以上無治療で無症状である臨床的寛解状態が得られる症例が存在すること、また昨年度の研究では吸入ステロイド(ICS)療法により臨床症状だけでなくアセチルコリン (Ach) 気道過敏性が正

常域 (すなわち AchPC<sub>20</sub>>20000μg/ml) まで改善する症例が増加していることが明らかとなった。このことから Ach 気道過敏性が正常化した症例を対象として治療薬 (ICS を含めたすべて) 中止後の経過を追跡した。結果、30ヶ月間以上観察できた症例では臨床症状および Ach 気道過敏性の悪化を認めなかった。このことから成人喘息においては Ach 気道過敏性正常化症例のうち治療薬中止後、長期間悪化を認めない治癒予備群が存在することが明らかとなった。しかし ICS 中止後、悪化症例と非悪化症例の喘息初診時の疫学背景では明らかな差は認めず、治癒予備群が存在するもののそれを初診時に予測することは困難であると考えられた。一方、Ach 気道過敏性が正常化しないが治療薬を中断した39症例について retrospective に調査を行った。結果、89.4%の症例が平均 7.63±0.9ヶ月で臨床症状の悪化を認めた。

このことから Ach 気道過敏性正常化は将来の治癒・寛解予備群に必要な条件であるといっても過言ではない。さらに昨年度の研究では、ICS 未使用群（テオフィリン、経口 $\beta$ 2 刺激薬、ロイコトリエン受容体拮抗薬など）は ICS 使用群と比較して Ach 気道過敏性の有意な改善を認めないことを報告した。Ach 気道過敏性が正常域まで改善するためには ICS を使用しない症例では改善しにくいことを示唆する結果である。成人喘息の治癒・寛解予備群に Ach 気道過敏性正常化は必要条件であるがそのためには治療内容が影響するのか、疫学背景因子が影響するのかは未だ明らかではない。

ガイドラインにより ICS が長期管理薬として第1選択薬であるという位置づけが明確になってきた一方で、経口抗炎症薬として位置づけられているロイコトリエン受容体拮抗薬 (LTRA) による治療が治癒または長期寛解に結びつくのかにどうかについては未だ明確な回答はなく、また LTRA 使用の適応基準についても十分な evidence は存在しない。

本研究班では成人喘息の治癒及び長期寛解導入の可能性をめざし、主要長期管理薬である吸入ステロイド薬と LTRA による治療反応性及び中止可能性の予知因子を解明するために本年度の研究では成人喘息患者で ICS を使用している症例を対象とし、第二選択薬として LTRA を併用し、治療前後において末梢血好酸球における LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub> のレセプターである CysLT<sub>1</sub> 受容体の発現頻度および尿中ロイコトリエン LTE<sub>4</sub> の測定を行い、これらのパラメーターが LTRA の治療反応性予測因子となりうるかどうかについて検討した。

## B. 研究方法

対象と方法：1・一般喘息 116 症例を GINA ガイドラインに基づき重症度別に分類し末梢血好酸球数 (%) と好酸球の CysLT<sub>1</sub> 受容体の発現について検討した。

2・当院成人喘息患者の 99 症例を対象とし、①ICS 単独 (FP, BUD) 群、28 症例、②ICS (FP, BUD)+ロイコトリエン受容体拮抗薬 (LTRA) (Montelukast 10mg/daily) 群: responder 群、44 症例、③ICS (FP, BUD)+ LTRA 群: nonresponder 群、27 症例の 3 群で比較検討した。

3・LTRA responder 群を①自覚症状 (咳嗽、喀痰、呼吸困難感、喘鳴の減少、消失) の改善、②PEF の 10%以上の増加、③ $\beta$ MDI の使用回数の低下のいずれかひとつ以上を認めた症例、LTRA nonresponder 群を上記のいずれも認めない症例と定義した。

4・上記 3 群について治療前、治療後 3 ヶ月後、6 ヶ月後、12 ヶ月後の CysLT<sub>1</sub> 受容体発現頻度と尿中 LTE<sub>4</sub> を経時的に測定した。

5・さらに著効群と有効群を以下のように分類し 3 群で比較した。A. 自覚症状 (咳嗽、喀痰、呼吸困難感、喘鳴の減少または消失): 各 1 点。B. PEF の 10%以上の増加 (1 点)、20%以上の増加 (2 点)。C.  $\beta$ MDI の使用回数の低下 (1 点)、消失 (2 点) とし、LTRA 著効群: A. B. C の合計点数 2 点以上、LTRA 有効群: A. B. C の合計点数 1 点、LTRA nonresponder 群: A. B. C の合計点数 0 点と定義した。

## CysLT<sub>1</sub> 受容体と尿中 LTE<sub>4</sub> の測定方法

1・末梢血好酸球の CysLT<sub>1</sub> 受容体の発現: 末梢血から Percoll 不連続比重勾配遠心法で好酸球を分離、フォルマリン固定後、細胞膜透過性を亢進し、抗 CysLT<sub>1</sub> receptor 抗体 (Cayman) と反応させ FACS を用いて陽性細胞比率を測定した。

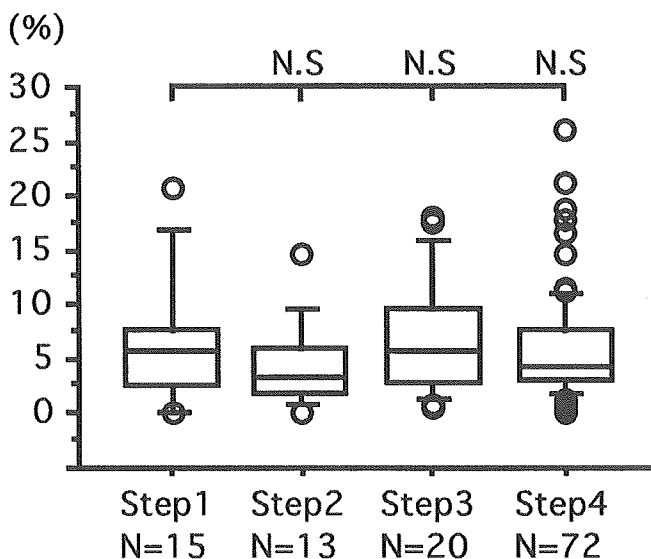
2・尿中ロイコトリエン LTE<sub>4</sub> の測定: 高速液体クロマトグラフィーで精製したのち EIA で測定した。

## C. 研究結果

1・喘息 116 症例の重症度別の末梢血好酸球数は有意差

を認めなかった(図1)が、末梢血好酸球上に発現するLT1受容体の発現頻度(%)は喘息重症度に負の相関を認めた( $P < 0.01$ ) (図2)。

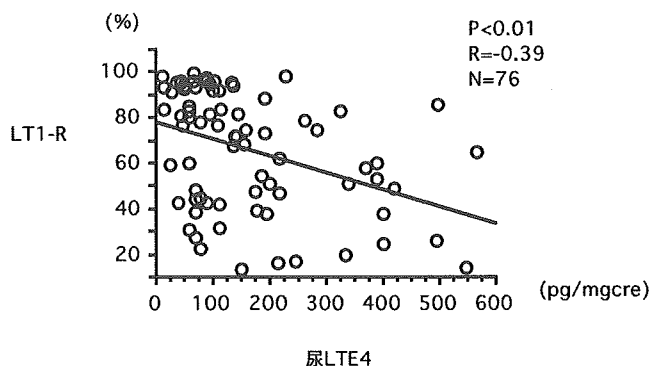
図1 末梢血好酸球数(%)



(BDP換算)はICS単独群:LTRA responder群:LTRA nonresponder群でそれぞれ平均 $1150 \pm 76$ 、 $1608 \pm 842$ 、 $1392 \pm 787$ ( $\mu\text{g}$ )とほとんどがStep4症例であり、3群間では有意差は認めなかった。またLTRAの平均使用期間はLTRA responder群( $4.9 \pm 3.2$ ヶ月)、LTRA nonresponder群( $3.2 \pm 1.6$ ヶ月)で有意差は認めなかった。

3・同一症例では好酸球上のLT1受容体の発現頻度と尿中LTE4は負の相関を認めた( $P < 0.01$ ,  $R = -0.39$ ) (図3)。

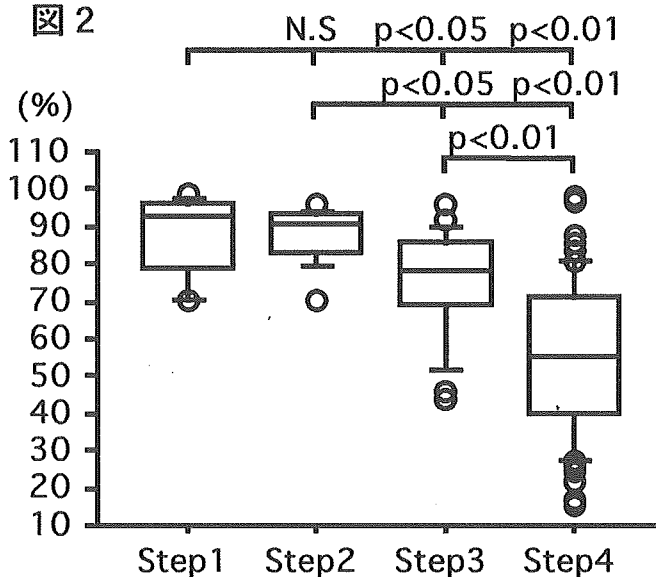
図3



4・ICS+LTRA responder群はICS+LTRA nonresponder群と比較してLT1受容体の発現頻度が低かった(77.6% vs 65.2%,  $p = 0.013$ ) (図4)。

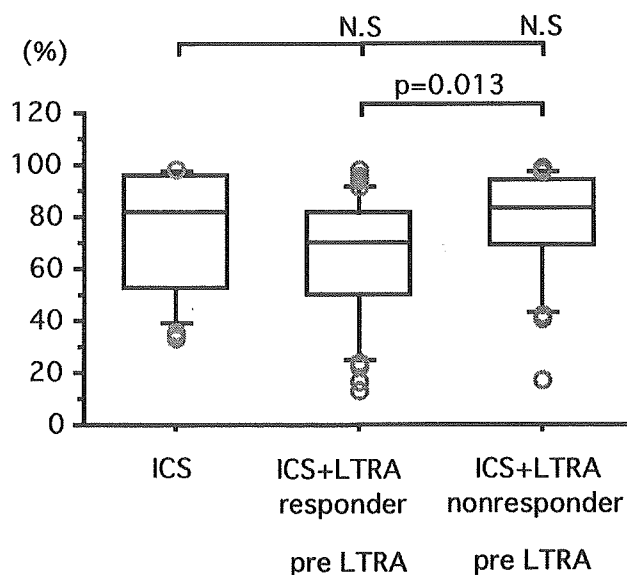
LT1受容体発現率

図2



2・ICS単独群:LTRA responder群:LTRA nonresponder群の現年齢、発症年齢、罹病期間、病型、血清IgE値、初診時%FEV1は有意差を認めなかった。ICS一日使用量

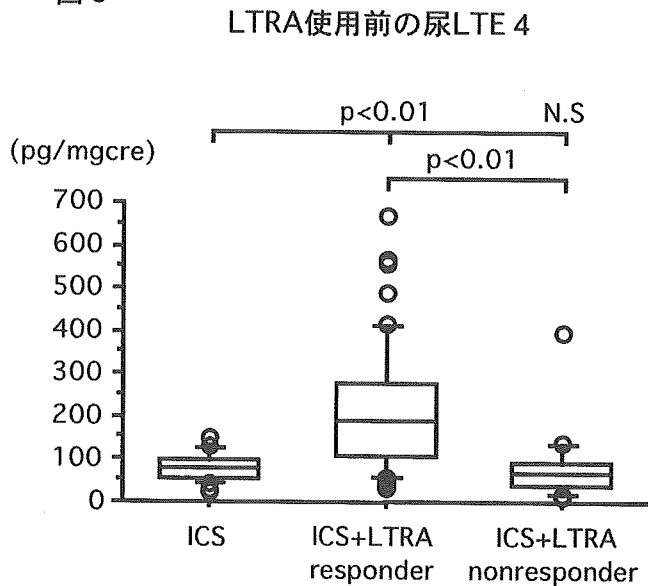
図4 LT1 R発現率(%)



5・LTRA治療前の尿中LTE4はICS+LTRA responder群

がICS群、ICS+LTRA nonresponder群と比較して高かった (216.9 vs 80.0 pg/mgcre,  $p < 0.01$ ) (図5)。

図5



6・LTRA 治療前後では好酸球上の LT1 受容体の発現頻度 (図6) および尿中 LTE4 (図7) は変化を認めなかった。

図6 治療前後のLT1受容体発現率%

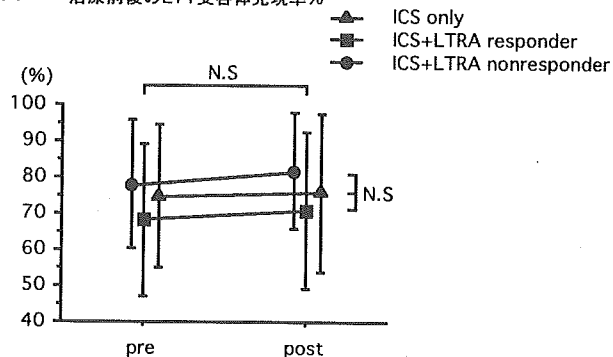
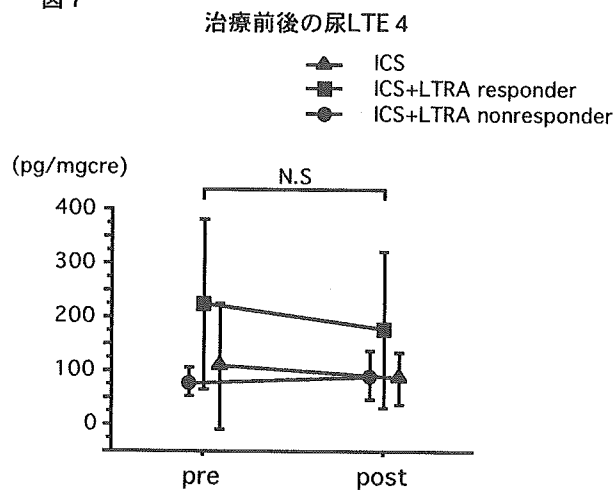


図7



7・LTRA responder 著効群、有効群、nonresponder 群症例はそれぞれ、25症例 (平均2.13点)、24症例、27症例であった。著効群vs有効群ではCysLT1受容体の発現頻度ではN.S (図8)、尿中LTE4では $p=0.077$  (図9) と有意な相関を認めなかった。

図8

著効、有効、無効例のLT1受容体発現率

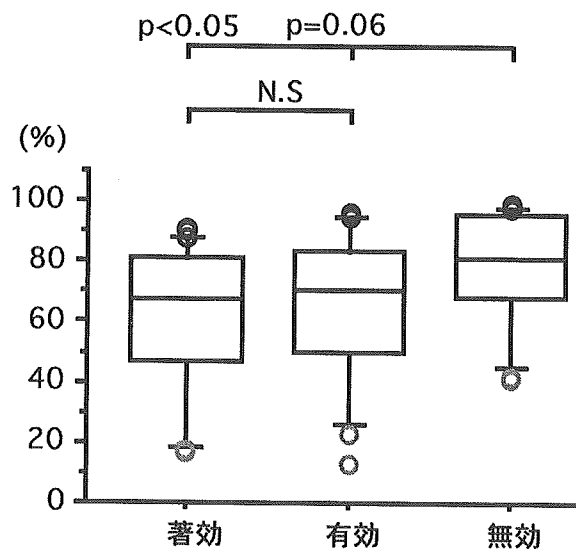
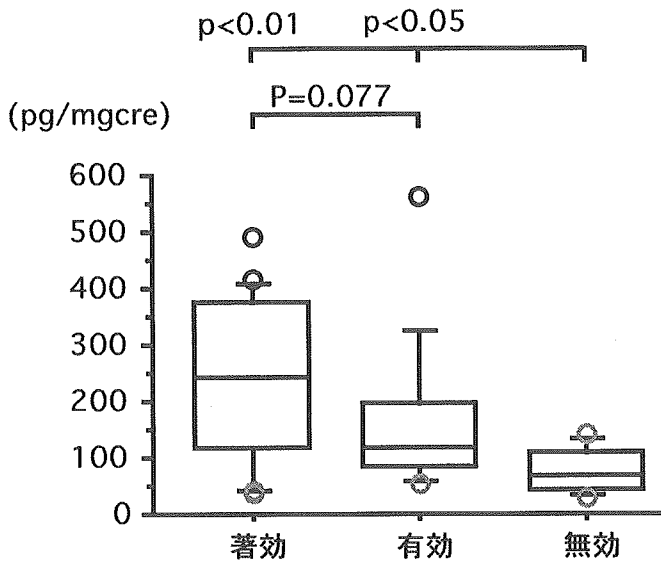
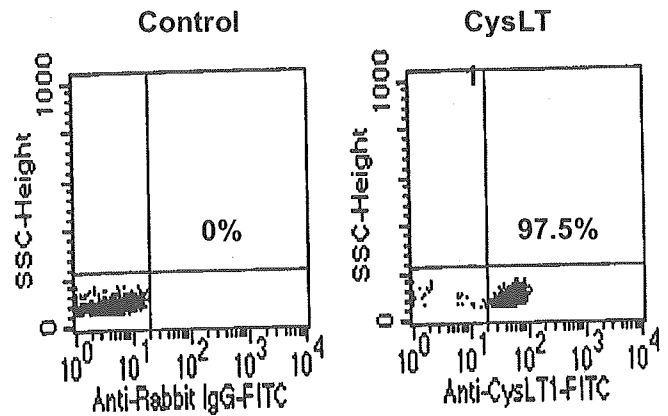


図9 著効、有効、無効例の尿中LTE4



FP800 $\mu$ g+LTRA、尿中LTE4: 87.9 pg/mgcre

LTRA使用開始後、約6ヶ月間使用したが自覚症状、PEFの改善を認めなかった。



尿中LTE4は87.9pg/mgcreと低く、LT1受容体の発現率は97.5%と高値である。

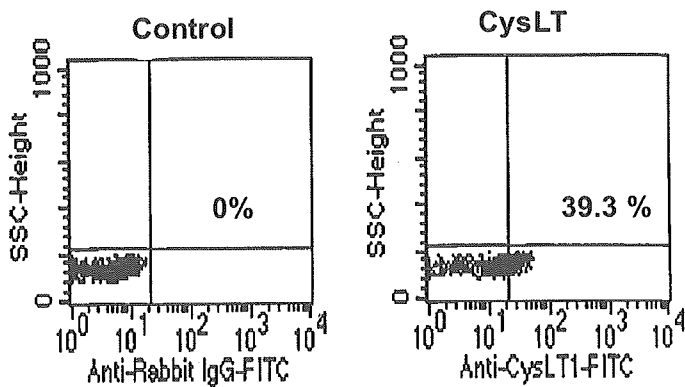
8・典型的な症例のCysLT1受容体の発現頻度

(A) LTRA responder症例

59才女性。39才発症、nonatopic type。

FP800 $\mu$ g+LTRA、尿中LTE4: 399.5 pg/mgcre

LTRA使用開始後、労作時呼吸困難感の消失、 $\beta$ -MDIの使用頻度が低下した。



尿中LTE4は399.5 pg/mgcreと高いが、LT1受容体の発現率は上記のFACSの結果のように39.3%と極めて低値である。

(B) LTRA nonresponder症例

26才男性。2才発症、atopic type。

D. 考察

臨床的経験からLTRAは約2/3の症例が有効であり、1/3の症例は効果が認められないと考えられている。近年、LTRAの治療反応性予測因子についてはSNPなどの研究が進んでいるが、蛋白レベルでの研究は少なく不明瞭な点が多い。今回の結果からLTRAのhigh responder症例は尿中LTE4高値、好酸球上のLT1受容体発現低下である症例に多いことが明らかとなった。尿中LTE4高値は血清中LT高値を反映していると考えられる。一般喘息では末梢血好酸球数は変化を認めないが、好酸球上のLT1受容体発現は重症度に応じて低下した。重症例におけるLT1受容体発現頻度の低下はCaymanのLT1受容体に対する抗体は細胞内のドメインを認識することを考えるとdown regulationによるエンドサイトーシスというより受容体数の低下が考えられる。また著効群と有効群の差については尿中LTE4もCysLT1受容体の発現頻度についても明らかな有意差は認められなかったが、LTRAは喘息治療の第2選択薬であり、ほとんどの症例

ではICSに追加する第2選択薬として使用し、ICSによる効果もあるため、著効群と有効群の明らかな有意差が出にくかったと考えられる。

#### E. 結論

成人喘息ではICSが抗炎症薬としての第一選択薬であり、LTRAは第2選択薬である。LTRAの治療反応性予測因子としては尿中LTE4高値、好酸球上のLT1受容体発現低下症例がLTRAのhigh responder症例であり、将来のテーラーメイド療法への応用へとつながるものと考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1. Prognosis of adult asthmatics after normalization of bronchial hyperresponsiveness (BHR) by inhaled corticosteroids (ICS) therapy. Naomi Tsurikisawa, Sonoko Morita, Takahiro Tsuburai, Kazuo Akiyama, et al. Am J Resp Crit Care Med 172: A923, 2005

2. 吸入ステロイド(ICS)療法により気道過敏性が正常化した成人喘息患者のICS減量・中止後悪化症例に対する再治療後の効果の検討。釣木澤尚実、粒来崇博、豊田信明、森田園子、谷口正実、宮崎恵理子、秋山一男 日呼学会誌 43:274, 2005

3. 成人喘息患者の発症年齢別の吸入ステロイド(ICS)療法に対する気道過敏性改善効果の差違。釣木澤尚実、粒来崇博、豊田信明、森田園子、谷口正実、秋山一男

アレルギー54: 399, 2005

4. 気道過敏性正常化した成人喘息患者の病理組織に対する検討。釣木澤尚実、押方智也子、粒来崇博、谷口正実、大友 守、前田裕二、三富弘之、秋山一男

アレルギー54: 1089, 2005

5. 気道過敏性が正常域まで改善する症例の疫学背景因子の検討。釣木澤尚実、押方智也子、粒来崇博、谷口正実、大友 守、前田裕二、秋山一男 アレルギー54: 1036, 2005

6. 気道過敏性のメカニズム—気道過敏性を指標とした治療効果の判定—シンポジウム。釣木澤尚実、粒来崇博、豊田信明、森田園子、谷口正実、三富弘之、森 吉臣、秋山一男 アレルギー54: 245, 2005

7. 成人喘息の予後—長期寛解・治癒の視点から—イブニングシンポジウム。釣木澤尚実、押方智也子、小野恵美子、粒来崇博、谷口正実、大友守、前田裕二、三富弘之、秋山一男 アレルギー54: 970, 2005

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 特になし

2. 実用新案登録 特になし

3. その他 特になし



分担課題名：吸入ステロイド薬の至適用量にもとづく臨床効果と遺伝子多型に関する研究

分担研究者 大田 健 帝京大学医学部 内科学講座 教授

研究要旨：気管支喘息ではアレルギー性気道炎症がその病態の中心にあると位置づけられている。気管支喘息治療薬として最も抗炎症作用が期待できる吸入ステロイド薬が普及した結果、入院患者数や喘息死患者数は減少傾向に転じ、治療体系は進歩したが、吸入ステロイドに対する治療反応性をあらかじめ予測する指標は乏しく、実際に治療抵抗症例も存在する。本研究班は、病因・病態および治療反応性予測因子を系統的に検出する遺伝子診断キットの開発をすることを目的としている。今回、吸入ステロイド薬の至適用量にもとづく臨床効果と遺伝子多型との関連を明らかにし、治療反応性予測因子を見出すことを目的とした。

平成 17 年度は 15 の遺伝子多型 (SNP) について解析した。喘息患者より遺伝子解析の同意を取得後 EDTA 採血し、血漿を採取、単核球分画より DNA を採取した。同時に臨床情報として、現在の治療薬、呼吸機能検査値を収集した。検体及び、臨床情報は平成 16 年度厚生労働科学研究事業「アレルギー疾患の発症および悪化に関連する因子の検討 (班長: 大田健)」で収集したものをを用いた。至適コントロールに必要な吸入ステロイド量が BDP 相当 400  $\mu\text{g}/\text{日}$  以下 ( $n = 69$ ) を低用量群、1600  $\mu\text{g}/\text{日}$  以上 ( $n = 157$ ) を高用量群とした。MIF G-173C 多型において、低用量群と高用量群で有意な SNP 頻度の差を認め ( $p = 0.0428$ )、低用量群で有意に C allele 頻度が多かった。さらに、吸入ステロイド単独投与 (BDP 相当 800  $\mu\text{g}/\text{日}$  以下) のみで一秒率が 70% 以上に達している反応良好群 ( $n = 59$ ) と、高用量吸入ステロイド (1600  $\mu\text{g}/\text{日}$  以上) + 併用薬を用いても一秒率が 70% 未満である反応不良群 ( $n = 59$ ) の 2 群に分けても有意な SNP 頻度の差を認め ( $p = 0.0111$ )、反応良好群で有意に C allele 頻度が多かった。MIF はステロイドの抗炎症作用に拮抗する分子であり、吸入ステロイド反応性予測において、MIF G-173C SNP の検討が有用である可能性が示唆された。

研究協力者:

長瀬洋之 帝京大学医学部内科学助手  
足立哲也 帝京大学医学部内科学講師  
山下直美 元帝京大学医学部内科学助教  
授 (現武蔵野大学薬学部教授)

イド薬が普及した結果、入院患者数や喘息死患者数は減少傾向に転じ、治療体系は進歩した。しかしながら、吸入ステロイドに対する治療反応性をあらかじめ予測する指標は乏しく、実際に治療抵抗症例も存在する。本研究班は、病因・病態および治療反応性予測因子を系統的に検出する遺伝子診断キットを開発することを目的としている。我々は、各種抗喘息治療薬の中で最も抗炎症作用が期待でき

## A. 研究目的

気管支喘息ではアレルギー性気道炎症がその病態の中心にあると位置づけられている。抗炎症治療薬として吸入ステロ

る吸入ステロイド薬をターゲットに、その至適用量にもとづく臨床効果と遺伝子多型との関連を明らかにし、治療反応性予測因子を見出すことを目的とした。

## B. 方法

喘息患者より遺伝子解析の同意を取得後 EDTA 採血し、血漿を採取、単核球分画より DNA を採取した。同時に臨床情報として、現在の治療薬、呼吸機能検査値を収集した。検体及び、臨床情報は平成 16 年度厚生労働科学研究事業「アレルギー疾患の発症および悪化に関連する因子の検討 (班長: 大田健)」で収集したものをを用いた。SNP 検出は、各施設の方法によったが、当施設では SNP 領域を特異的に増幅するプライマーを設定し、日立の Mass ARRAY 法で解析した。

平成 17 年度は 15 の遺伝子多型 (SNP) について解析した。

## C. 結果

我々は平成 16 年度に、TGF- $\beta$ 1 のプロモーター活性と関連する機能的な SNP: C-509T の解析を行い、成人まで持ち越したアトピー型喘息患者では、健常人および小児喘息寛解例に比し、有意に T allele の頻度が高く、同 SNP は喘息寛解の予測因子の一つとなりえることを見出した。

今回、TGF- $\beta$  C-509T の他に、IL-13 A110G、IL-18 C-113G、TARC C-431T、MBL G54A、UGRP1 G-112A、TLR5 392stop、RANTES C-28G、Fc $\epsilon$ R1 $\beta$  T-109C、MIF G-

173C、IL-17 T7489C、MUC5B A347G、MUC5B G452A、MUC5B G499A、MUC5B C583T の SNPs と吸入ステロイドの至適用量との関連を検討した。

至適コントロールに必要な吸入ステロイドは BDP 相当 400  $\mu$ g/日以下 ( $n = 69$ ) を低用量群、1600  $\mu$ g/日以上 ( $n = 157$ ) を高用量群とした。低用量群と高用量群では、年齢、血清総 IgE 値に有意差は無かったが、高用量群では、157 例中 28 例が経口ステロイド内服を行っており、有意に好中球分画 (%)が高く、リンパ球分画 (%)が低値であった (図 1)。SNP 解析では、低用量群と高用量群間で MIF G-173C において有意な SNP 頻度の差を認め (図 1,  $p = 0.0428$ )、低用量群で有意に C allele 頻度が多かった (図 1)。その他の多型に関しては、二群間で頻度に有意差を認めなかった (図 2)。

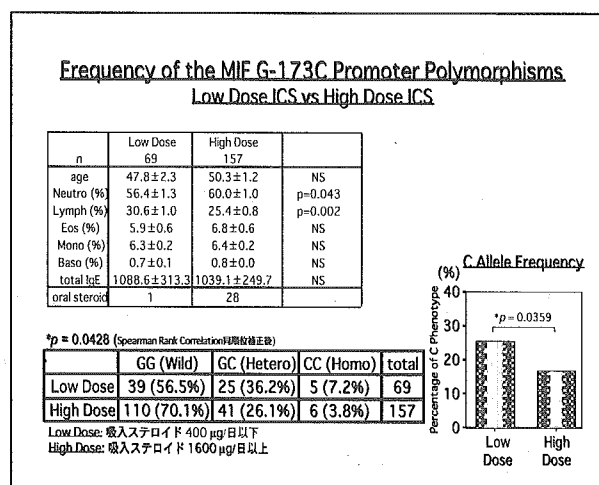


図 1 至適コントロールに要した吸入ステロイド用量と MIF G-173C 多型

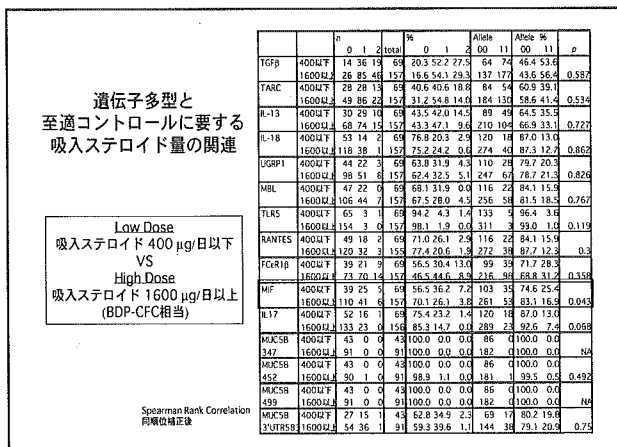


図2 至適コントロールに要した吸入ステロイド用量と遺伝子多型

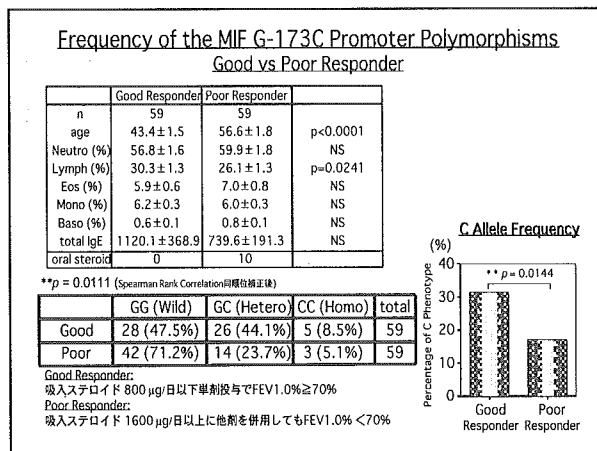


図3 吸入ステロイド反応性と MIF G-173C 多型

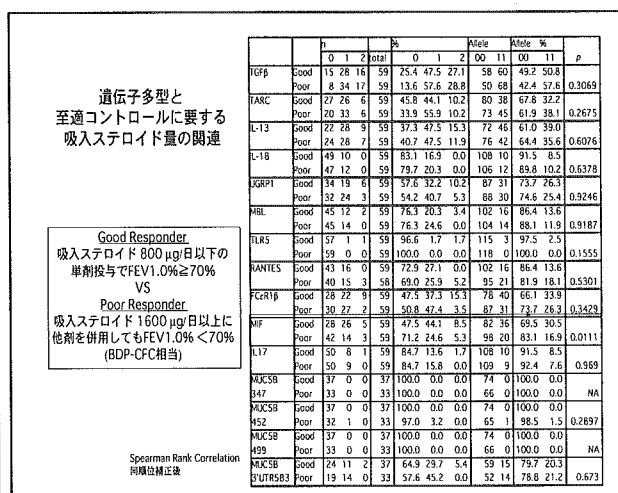


図4 吸入ステロイド反応性と遺伝子多型

さらに、吸入ステロイド単剤投与 (800 µg/日以下)のみで一秒率が 70%以上に達している反応良好群 (n = 59)と、高用量吸入ステロイド (1600 µg/日以上)に加えて併用薬を用いても一秒率が 70%未満である反応不良群 (n = 59)の 2 群に分けても有意な SNP 頻度の差を認め (p = 0.0111)、反応良好群で有意に C allele 頻度が多かった (図3)。その他の target に関しては、二群間で多型頻度に有意差を認めなかった (図4)。

#### D. 考察

MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor)は T リンパ球、単球、マクロファージ等の免疫担当細胞や 血管内皮細胞等の多彩な細胞で構築的 (constitutive)に発現している。向炎症性作用を持ち、TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IFN-γ等の炎症性サイトカイン、ケモカインの産生

を増強するほか、LPS 認識受容体である TLR4 発現を増強することも報告されている。また、MIF はグルココルチコイド(ステロイド)の抗炎症効果に拮抗する作用を持つ。すなわち、ステロイドは T リンパ球増殖、T リンパ球からの IL-2 分泌、LPS によるマクロファージからのサイトカイン産生等を抑制するが、MIF はこの抑制作用に拮抗する。疾患関連としては、炎症性腸疾患、乾癬、関節リウマチ、肝硬変、多発性硬化症、糸球体腎炎等の多岐にわたる炎症性疾患での高発現が報告されている。気管支喘息との関連については、有症状の喘息患者で血清中 MIF 濃度が高く、ステロイド依存性喘息でより高値であったこと、喘息患者の誘発喀痰で濃度上昇がみられたことが報告されている。また、近日 MIF ノックアウトマウスでは気管支喘息病態が減弱することも報告された。

今回検討した MIF プロモーター領域の G -173 C 多型は、CEM C7A 細胞において C allele でプロモーター活性が上昇すること、C allele を持つ健常人では、血清 MIF 蛋白濃度が高いことが報告されている。また、種々の疾患との関連が報告されており、ネフローゼ症候群、若年性関節リウマチ、サルコイドーシス発症、増悪との関連が報告されている。アレルギー性疾患では、G -173 C 多型と CATT repeat の組み合わせの検討で、-173 C/7-CATT のプロモーター活性は -173 G/5-CATT より低く、6, 7-CATT ではアトピー

素因をもつ頻度が高いことが報告されている。

今回の検討では、C allele を持つ喘息患者は吸入ステロイド感受性である可能性が示された。C allele では MIF 発現が亢進する可能性があること、炎症性疾患発症が多いこと、アトピー素因が多いことが報告されている。これらの表現型とステロイド感受性との関連は今後の検討課題である。今後の計画としては、吸入ステロイド単剤でコントロールされている群と高用量吸入ステロイドでもコントロール困難な群の症例数を増やすことや、可能であれば、血清、誘発喀痰、呼気濃縮液の MIF 濃度との関連を検討する等を考えている。

## E. 結論

MIF はステロイドの抗炎症作用に拮抗する分子であり、吸入ステロイド反応性予測には、MIF G-173C SNP の検討が有用である可能性が示唆された。

本研究で用いた検体、臨床情報の収集は、平成 16 年度厚生労働科学研究事業「アレルギー疾患の発症および悪化に関連する因子の検討(班長: 大田健)」における分担研究者: 西村正治(北海道大学大学院医学系研究科呼吸器内科学)、棟方充(福島県立医科大学呼吸器科)、山口正雄(東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学)、庄司俊輔(国立病院機構福岡病院)、塩原哲夫(杏林大学医学部