

皮膚科)、小林信之 (国立国際医療センター呼吸器科)の諸先生方の御協力に基づくものである。MIF G-173C の SNP 解析は檜澤伸之、西村正治先生によって、北海道大学大学院医学系研究科呼吸器内科学教室で行われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Meng J, Thongngarm T, Nakajima M, Yamashita N, Ohta K, Bates CA, Grunwald GK, Rosenwasser LJ. Association of transforming growth factor-beta1 single nucleotide polymorphism C-509T with allergy and immunological activities. Int Arch Allergy Immunol. 2005;138(2):151-60.

2. 学会発表

1. 中島幹夫, 長瀬洋之, 足立哲也, 中野純一, 山下直美, 関谷剛, 山本寿子, 松尾由起子, 木原令夫, 平井浩一, 大田健. ミニシンポジウム 6 呼吸器疾患と遺伝子多型 2 気管支喘息の寛解と TGF- β 1 の遺伝子多型 第 45 回日本呼吸器学会学術講演会 幕張 2005 年 4 月

2. Nakajima M, Yamamoto T, Yamashita N, Kuwabara M, Nagase H, Adachi T, Ishii A, Uehara Y, Rosenwasser LJ, Ohta K. Outgrow of Asthma May Relate to the Genotype for TGF- β Promotor, -509 C/T American

Thoracic Society (ATS) International Conference, San Diego, USA, May, 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 |

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療等研究事業）

分担研究報告書

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

分担課題名：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 国立成育医療センター 総合診療部小児期診療科 医長

研究要旨：吸入ステロイド薬(ICS)によって治療され一定期間無症状となった喘息患者での治療ステップダウンの基準は明確ではない。本研究では気道過敏性、環境因子、遺伝因子等を検討することにより症状および気道過敏性に及ぼす影響を検討する。2年度までの対象にした患者は、6～26歳の計96名。気道過敏性改善群が73名、過敏群が23名で、改善群はICSを中止した。さらに3ヶ月後に再度検討した54名に関して分析した。3ヶ月後の検討では7例で症状の再発があった。気道過敏性の改善に影響する因子を分析しているが、これまでのところ気道過敏性の悪化とICS使用年数に相関があることがわかった。

研究協力者

青田明子（同第1専門診療部アレルギー科）
明石真幸（同第1専門診療部アレルギー科）
石井徹仁（同総合診療部小児期診療科）
大矢幸弘（同第1専門診療部アレルギー科医長）
斎藤暁美（同第1専門診療部アレルギー科）
斎藤博久（同免疫アレルギー研究部長）
須田友子（同第1専門診療部アレルギー科医員）
成田雅美（同第1専門診療部アレルギー科）
野村伊知郎（同第1専門診療部アレルギー科医員）
二村昌樹（同第1専門診療部アレルギー科）
井上徳浩（同第1専門診療部アレルギー科）

の暴露、非特異的刺激性物質への暴露、治療内容によって異なるものと考えられている。吸入ステロイド薬(ICS)は、多くの気管支喘息患者の気道過敏性を改善させる作用があり現在の喘息治療の中心的薬剤である。その効果は、気道過敏性に関わる多くの因子によって変化してくることが予想される。さらに小児喘息治療ガイドラインにおいても早期からICSを導入するようになったが、臨床的に症状が無くなった場合の治療ステップダウンの明確な指標がない。この研究では、ICSを導入し、一定期間臨床的に発作が無い状態が続いた場合にICSのステップダウンが可能かどうかを気道過敏性、肺機能をはじめ遺伝的要因も含めて様々な危険因子との関係を分析し、ステップダウンの条件を見いだすことを目的としている。

A. 研究目的

小児気管支喘息は、多因子性疾患であり発症・増悪因子は多岐にわたる。気管支喘息の病態である気管支粘膜とその周囲組織の慢性炎症によっておこる気道過敏性は、遺伝的要因とその後の感染症、アレルゲンと

B. 研究方法

6歳以上の肺機能検査のできる喘息患者で、吸入ステロイド薬(ICS)を使用して治療を行い、ICS単独で最近3ヶ月以上発作が無く、1秒率が80%以上の場合に、

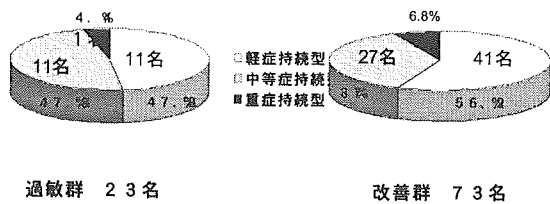
ATS法によるメサコリン吸入気道過敏性試験(MCT)を実施し、気道過敏性改善群(PC20 0.5mg/ml以上)と過敏群にわけ、改善群はICSを中止する。ICS中止3ヶ月後(2回目)とその6ヶ月後(3回目)、更に1年後(4回目)に症状、気道過敏性、危険因子について調査をおこない再発率、気道過敏性の変化を観察し危険因子との関連性を検討した。

対象患者は、今年度 6~26 歳(平均年齢 11.4±4.3 歳)の計 96 名(男 62 名、女 34 名)が上記条件を満たした。96 名に MCT を実施したところ、改善群が 73 名、過敏群が 23 名であり、改善群は、ICS を中止した。その後 3ヶ月間で 54 名中発作のなかった者は 47 名で、MCT 2回目で過敏性が改善を維持していたのは 38 名で、過敏性を再び獲得したのは、16 名であった。さらに1年以上経過した 29 名についても検討した。

C. 研究結果

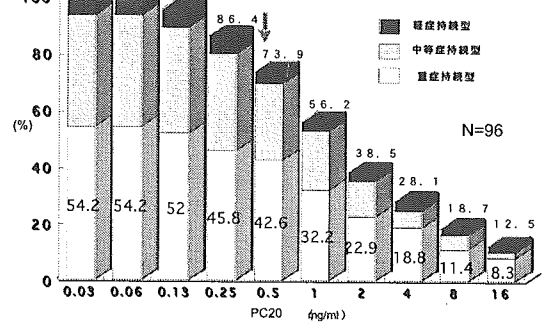
対象患者の重症度を、最も症状の悪かった時期の重症度で分類すると、過敏群では、軽症持続型 47.8%、中等症持続型 47.8%、重症持続型 4.4%、改善群では、それぞれ、56.2%、37%、6.8%であった(図1)。

図1 最も悪かった時の重症度分類



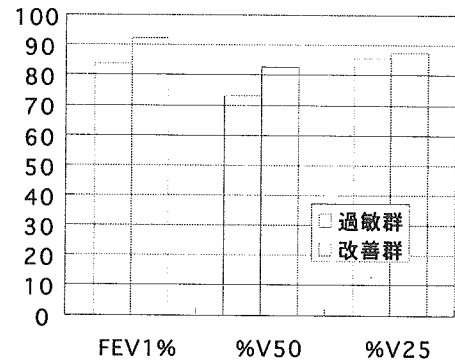
MCTの各ステージごとの人数を累積し、重症度別に示すと、PC20が高くなる(過敏性が低い)ほど軽症患者の割合が増加している(図2)。

図2 メサコリン吸入負荷試験で各ステージをクリアした割合(累積度数で表示)



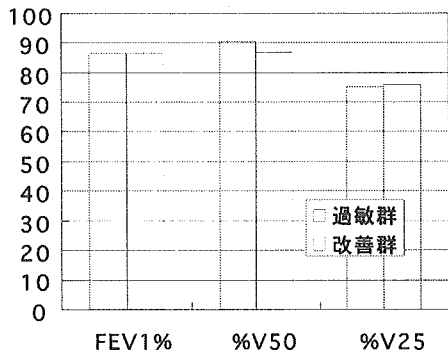
MCTでの改善群と過敏群での肺機能検査結果では、1秒率、%V50、%V25 いずれも有意差はなかった。末梢気道閉塞を示す、V50は過敏群でやや低い傾向にあった(図3)。

図3 1回目のメサコリン吸入負荷試験時の肺機能検査

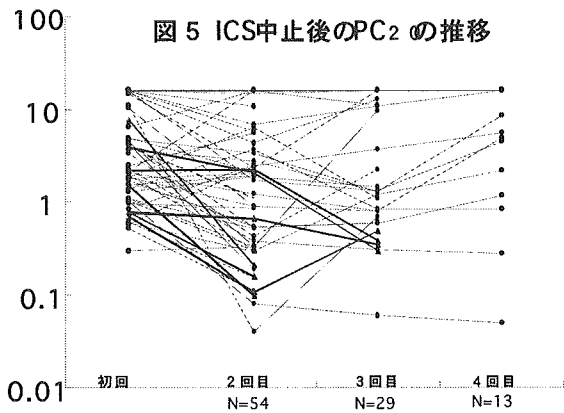


気道過敏性改善群は、約3ヶ月間経過を観察し、54名中7名で喘息発作を再発した。呼吸機能では、一秒率、%V50、%V25に差がなかった(図4)。

図4 2回目のメサコリン吸入負荷試験時の肺機能検査

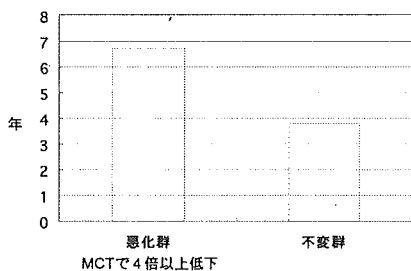


ICS中止後の、MCTでのPC20の推移を図5に示した。実線は、症状再発者を示している。



PC₂₀が、ICS中止後4倍以上低下してしまった11例とそれ以下の変化群では、前者のICS使用年数が有意に長かった(図6)。

図6 気道過敏性の変化とICS使用年数



上記以外でこれまでのところ、重症度、罹患期間、

発症年齢、薬剤の使用状況、環境要因と気道過敏性、ICS中止後の経過を検討しているが有意な結果は得られていない。

D. 考察

気管支喘息における気道過敏性に関わる因子は、遺伝因子、環境因子、感染、治療的介入の時期、治療薬などさまざまである。現在の喘息治療管理ガイドラインに沿った治療を行い、吸入ステロイド薬など気道炎症を改善する薬剤を使用した場合には、ほとんどの患者で発作を起こさない状態にコントロールすることができる。吸入ステロイド薬によって気道炎症がどこまで沈静化できるのか、気道炎症が沈静化したあとに気道過敏性は改善するのか、気道過敏性が改善されれば抗炎症薬は不要になるのかという問題がある。

この研究で対象となる患者は、吸入ステロイド薬だけの使用になって3ヶ月間以上発作がない患者を対象としている。これは、喘息治療管理ガイドラインに沿った治療をした場合に症状を観察する期間として3~6ヶ月が適当と考えられるからである。しかし、96名中23名では気道過敏性は改善していないことがわかった。改善したと判断した73名においても吸入ステロイド薬を中止して3ヶ月後に7名で症状が再発している。現在までのところ改善群と過敏群での環境因子、治療内容等を検討しているが吸入ステロイド使用年数で有意差がみられている。

環境因子の定量化、既知の遺伝子多型、介入の状況を検討し気道過敏性の改善、吸入ステロイドの効果に影響する因子を検討する必要がある。

E. 結論

多因子性疾患である気管支喘息の治療には、環境因子のコントロール、吸入ステロイド薬が使用されている。これらの効果について予測できる因子の定量

化をおこなうことが必要である。

遺伝因子に関しては、次年度研究で、アレルギーに関連する SNP について分析をする予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

気管支喘息児における吸入ステロイド薬減量・中止の検討。 須田友子、赤司賢一、明石真幸 二村昌樹、斎藤暁美、青田明子、成田雅美、野村伊知郎、大矢幸弘、赤澤 晃 日本アレルギー学会 横浜 2004

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：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 愛知医科大学医学部 呼吸器・アレルギー内科 教授

研究要旨：成人喘息治療において、気管支拡張薬であるテオフィリンを使用する機会は今日でも多い。本薬は一般的には安全かつ高い有効性が見込まれるが、低い確率で副作用が出現し、効果の程度には明らかな個体差が存在する。特に小児科では催けいれん性を危惧するあまり、使用を制限する機運さえ存在する。そこで治療効果や副作用の予測を薬剤使用前に予知することが重要な課題のひとつである。効果や特に副作用は血中濃度と相関すると考えられる。我々は昨年度の研究においてテオフィリンの代謝に関与するCYP1A2の遺伝子多型と、喘息患者血中テオフィリン濃度との関連を検討し、他の研究者による既報の内容と符合する結果を得た。そこで今年度は、さらに精度を高めて検証すべく他の薬物の影響を受けず被験者が比較的均一な非喫煙学生健常者18名を対象とする検討を行った。その結果、CYP1A2遺伝子3'非翻訳領域に位置する一塩基多型である+5521 (A/G)は、テオフィリン血清濃度のAUC(血漿薬物濃度曲線下面積)およびクリアランス値と有意な相関を示した。一方+5347 (C/T)は血清カリウムイオン濃度の変動と有意な相関を示した。今回の検討ではテオフィリン代謝の個体差の一部は、確かにCYP1A2の影響下にあることが示唆された。今後検討例数を増やして確認を行う予定である。

A. 研究目的

成人喘息治療は、近年吸入ステロイドの普及や各種の新薬の上市により、中等症までの治療はほぼ完成の水準にある。しかし、それらの患者においても発作時には、あるいは重症患者においては、気管支拡張薬であるテオフィリンや β_2 刺激薬を頻回使用する。両薬は使用に際してよく知られている注意点を遵守すれば、安全かつ高い有効率が見込まれるが、テオフィリンについては依然として一定の確率で悪心、動悸、痙攣などの副作用が出現し、また効果の程度には個体差が存在する。今日喘息治療は、より完成度の高い方法の確立が望まれており、その意味で治療効果と副作用の予測を薬剤使用前に予知することが重要な課題のひとつである。そこで今年度は、テオフィリンの代謝に関与する肝臓チトクローム

P450 酵素群のひとつであるCYP1A2 遺伝子多型とテオフィリン血中濃度。

B. 研究方法

対象：20歳以上の非喫煙健常者（学生ボランティア18名、男12名、女6名、年齢中央値22歳[21-24]）。

投与薬剤：テオフィリン（テオドリップ®、200mg/200 ml 生食）を3 mg/kg 体重の用量で、但し上限量を200mg として、30分かけて点滴静注した。

検査項目：静注直前と終了後は経時的（30分、60分、120分、240分）に血中テオフィリン濃度を測定し、PK Solutions®を用いて各種薬物代謝指標を計算した。テオフィリンの濃度は、ELISA法により測定した。また同じ時間間隔で血清カリウム値を測定

した。さらに全経過を通して動悸や胃腸症状などの副作用の有無を記録した。遺伝子多型:肝チトクロームP450 分子種の中でテオフィリンは主としてCYP1A2 により代謝・分解される。2005 年にSoyama らにより日本人におけるほぼすべての遺伝子多型が同定された。今回はそれらのうち比較的頻度の高い8 つについて検討した(表1)。各多型は、ゲノムDNA を用いて一塩基多型(SNP)の各アリルに特異的なプライマーを用いたPCR 増幅を行い、増幅過程をリアルタイムPCR法にてモニターし、増幅効率の差異から判定した。

(倫理面への配慮)

本研究は3 省庁による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき研究計画を立て、本学の倫理委員会の承認を得た。その際に作成した説明書を用いて被験者の同意を文書で得た。

C. 研究結果

テオフィリン点滴静注後の血清テオフィリン濃度は、直後が約11 µg/ml、30 分後約6 µg/ml、60 分後約5.5 µg/ml、120 分後約5 µg/ml、240 分後約4.5 µg/ml と推移した(図1)。

血清テオフィリン濃度の半減期($T_{1/2}$)と各SNPとの間には、有意な相関を認めなかった(表2)。

一方、AUC(血漿薬物濃度曲線下面積)と+5521 (A/G)との間には、遺伝子型頻度およびアリル頻度ともに有意な相関を認めた(表3)。その遺伝子型による3 群間の比較でも、全体としてAUC は有意な差異を示した(図2)。

+5521 (A/G)のアリル頻度は、クリアランス値と有意な相関を示し、遺伝子型頻度はその傾向を示した(表4)。

血清のカリウムイオン濃度は、テオフィリン静注後に上昇するが、前値と最大値との差を求め、今回の被験者の中央値を求め

た。次にその値を境にそれ以上の被験者とそれ以下の被験者の2 群に分けた。次いでこの群別と各SNP 遺伝子型頻度およびアリル頻度との相関を検討したところ、5347 (C/T) の遺伝子型と有意な相関を認めた(表5)。実際に同多型の二つの遺伝子型間で最大カリウムイオン濃度上昇値は有意差を示した(図3)。

テオフィリンによると考えられる副作用は、今回の検討では1 例も出現しなかった。

D. 考察

1999 年にNakajima らは、テオフィリンと同様な構造を有し代謝過程が類似しているカフェインの分解が、CYP1A2 の一つのSNP により影響を受けることを喫煙者について報告した(Nakajima M, et al., J Biochem (Tokyo)1999, 125(4):803-8)。その後Obase らにより実際に同じ多型が喘息患者の推定テオフィリン血中濃度と相関することが報告された(Obase Y, et al., Clin Pharmacol Ther 2003, 73(5):468-74)。我々は昨年報告で、少数の自験喘息患者を対象に、Obase らの報告を大筋において追認できる結果を得た。本年の検討ではさらに詳細に検討すべく、非喫煙学生ボランティアを対象に、かつカフェイン含有物の摂取を12 時間以上絶った状態でのテオフィリン代謝を解析した。テオフィリン投与量はほぼ正確に体重当たり同量年、また消化管からの吸収効率の影響を除外するために、点滴静注法によった。

その結果、CYP1A2 遺伝子3' 非翻訳領域に位置する+5521 (A/G)は、テオフィリン血清濃度のAUC およびクリアランス値と有意な相関を示した。これまで同多型がテオフィリン代謝を規定するとの報告はなく、既報のSNPとの連鎖不平衡を含めて興味を持たれる。次年度研究を踏まえて結論を出したい。

E. 結論

今年度の研究において、テオフィリンの薬物代謝指標とCYP1A2遺伝子の多型が相関を示唆する知見を得た。次年度は50例を目標に。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

<論文>

1. Role of macrophage migration inhibitory factor in ovalbumin-induced asthma in rats.
Kobayashi M, Nasuhara Y,
Kamachi A, Tanino Y, Betsuyaku T,
Yamaguchi E, Nishihira J,
Nishimura M
Eur Respir J 27 (1): 1-9, 2006.

<学会発表>

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 なし
2. 実用新案 なし
3. その他 なし

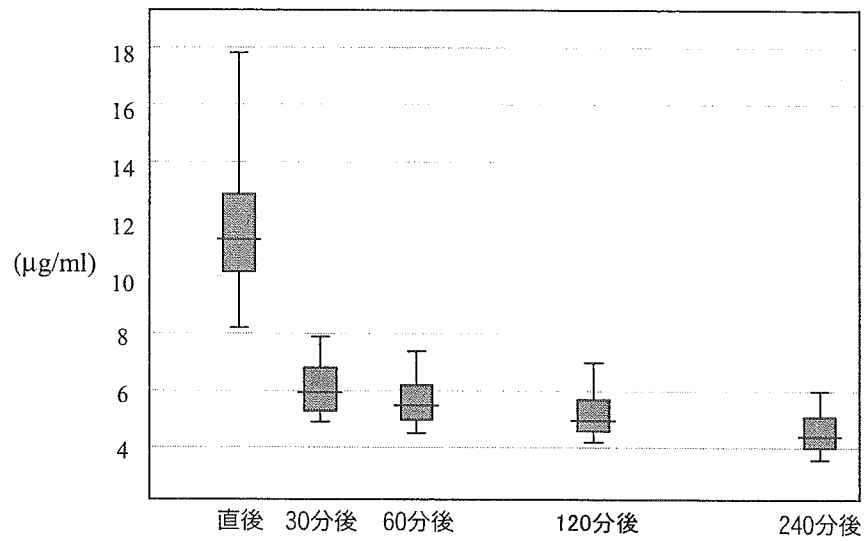


図1. 血清テオフィリン濃度推移

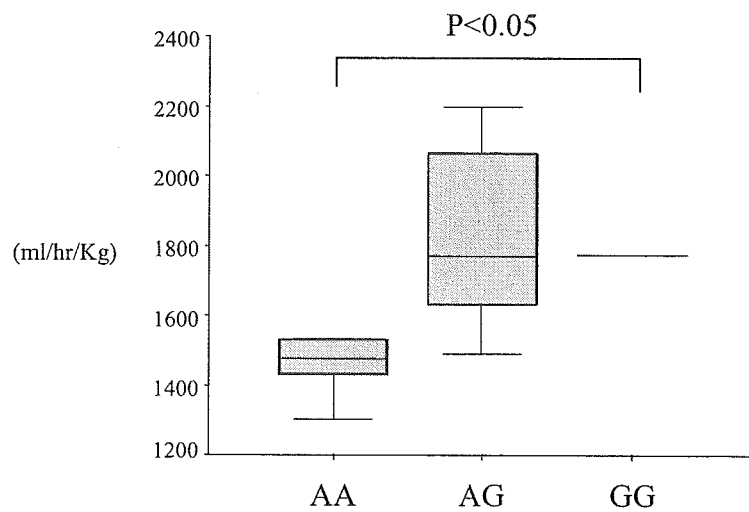


図2. CYP1A2 +5521 (A/G)とテオフィリン血中濃度 AUCとの相関

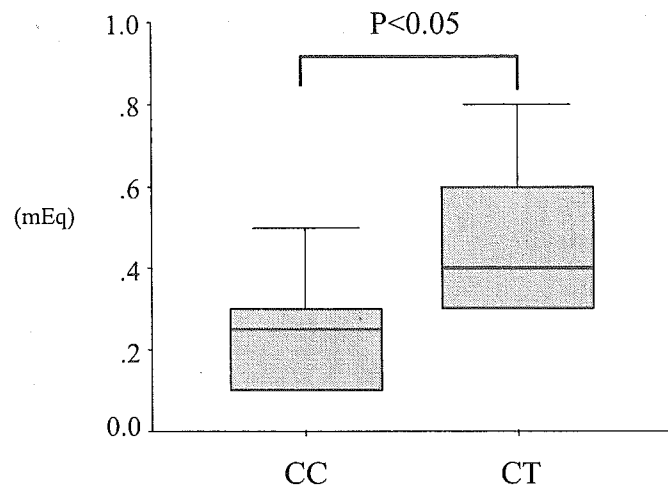


図3. CYP1A2 +5347 (C/T)と血清K⁺濃度上昇との相関

表1. 今回解析の対象としたCYP1A2のSNP

CYP Allele	SNP	Location	from the nearest exon	Allele	Freq.
-3860	G/A	Enhancer	-3860	CYP1A2*1C	0.236
-3594	T/G	Enhancer	-3594		0.170
-2467	T/-	Enhancer	-2467		0.438
-163	C/A	Intron 1	-163	CYP1A2*1F	0.628
2159	G/A	Intron 4	IVS4 +43		0.194
2321	G/C	Intron 4	IVS4 -65		0.170
5347	C/T	Exon 7	1548	CYP1A2*1B	0.192
5521	A/G	3'-UTR	1722		0.192

表2. CYP1A2のSNPとテオフィリン $T_{1/2}$ との相関

	Genotype				Allele			
	AIC(IM-DM)	χ^2	Df	p-value	AIC(IM-DM)	χ^2	Df	p-value
-3860(AG)	-3.7216	0.2769	1	0.5987	-1.7664	0.2323	1	0.6299
-3594(GT)	-3.5935	0.4000	1	0.5271	-1.6299	0.3636	1	0.5465
-2467(T-)	-2.5548	1.0588	1	0.3035	-0.5851	1.0286	1	0.3105
-163(GT)	-0.0647	3.1429	2	0.2077	-1.8795	0.1204	1	0.7286
2159(AG)	-3.7656	0.2338	1	0.6287	-1.8222	0.1773	1	0.6737
2321(CG)	-2.0676	1.5429	2	0.4624	-0.6466	1.3333	1	0.2482
5347(CT)	-2.9855	1.0000	1	0.3173	-1.187	0.8000	1	0.3711
5521(AG)	-1.089	2.5000	2	0.2865	0.2635	2.2154	1	0.1366

表3. CYP1A2のSNPとテオフィリン血中濃度のAUCとの相関

	Genotype				Allele			
	AIC(IM-DM)	χ^2	Df	p-value	AIC(IM-DM)	χ^2	Df	p-value
-3860(AG)	-1.374	2.4923	1	0.1144	0.2182	2.0903	1	0.1482
-3594(GT)	0.7629	3.6000	1	0.0578	2.432	3.2727	1	0.0704
-2467(T-)	-2.5548	1.0588	1	0.3035	-0.5851	1.0286	1	0.3105
-163(GT)	0.2122	3.3968	2	0.1830	1.0692	3.01	1	0.0828
2159(AG)	-1.8431	2.1039	1	0.1469	-0.3608	1.5961	1	0.2065
2321(CG)	-0.8827	2.6857	2	0.2611	-1.8516	0.1481	1	0.7003
5347(CT)	-2.9855	1.0000	1	0.3173	-1.187	0.8	1	0.3711
5521(AG)	8.646	10.9444	2	0.0042	7.8632	8.8615	1	0.0029

表4. CYP1A2のSNPとテオフィリン血中濃度の
クリアランス値との相関

	Genotype				Allele			
	AIC(IM-DM)	χ^2	Df	p-value	AIC(IM-DM)	χ^2	Df	p-value
-3860(AG)	-1.374	2.4923	1	0.1144	0.2182	2.0903	1	0.1482
-3594(GT)	-3.5935	0.4000	1	0.5271	-1.6299	0.3636	1	0.5465
-2467(T-)	-2.5548	1.0588	1	0.3035	-0.5851	1.0286	1	0.3105
-163(GT)	-0.0647	3.1429	2	0.2077	-1.8795	0.1204	1	0.7286
2159(AG)	-3.7656	0.2338	1	0.6287	-1.8222	0.1773	1	0.6737
2321(CG)	-0.8827	2.6857	2	0.2611	-1.8516	0.1481	1	0.7003
5347(CT)	-2.9855	1.0000	1	0.3173	-1.187	0.8000	1	0.3711
5521(AG)	2.4212	5.7778	2	0.0556	3.2521	4.9846	1	0.0256

表5. CYP1A2のSNPと血清K⁺濃度上昇との相関

	Genotype				Allele			
	AIC(IM-DM)	χ^2	Df	p-value	AIC(IM-DM)	χ^2	Df	p-value
-3860(AG)	-3.4128	0.5538	1	0.4568	-1.4992	0.4645	1	0.4955
-3594(GT)	-2.3020	1.8000	1	0.1797	-0.4751	1.6364	1	0.2008
-2467(T-)	-3.1599	0.5294	1	0.4669	-1.1749	0.5143	1	0.4733
-163(GT)	0.8076	4.1429	2	0.1260	-1.7614	0.2408	1	0.6236
2159(AG)	-3.8819	0.1169	1	0.7324	-1.9095	0.0887	1	0.7659
2321(CG)	-2.9215	0.7714	2	0.6800	-1.2999	0.6667	1	0.4142
5347(CT)	0.4629	4.5000	1	0.0339	1.3959	3.6000	1	0.0578
5521(AG)	-1.2052	2.5625	2	0.2777	-0.3235	1.7308	1	0.1883

分担課題名：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 京都大学大学院医学研究科 健康増進行動学 教授

研究要旨：毛髪のパルジ細胞からケラチノサイトを培養し、それを用いて、アトピー性皮膚炎の診断を行う方法論を確立することにした。そのためにまず、マイクロアレイ法により、候補遺伝子を絞り込む作業を行い、36個の遺伝子を同定した。この中から、6個のサイトカイン遺伝子群をまず選定し、皮膚培養細胞に発現している遺伝子群を絞り込む作業を行った。

研究協力者

山崎 暁子	京都大学大学院医学研究科健康増進行動学
中島加珠子	京都大学大学院医学研究科健康増進行動学
松田 彰	京都府立医科大学眼科
玉置 知子	京都府立医科大学眼科
喜多野征夫	京都府立医科大学眼科
笹原 祐介	兵庫医科大学
吉川 良恵	宝バイオ KK

ラスを使用することが可能であり、ノイズを減らした解析が可能である。今回このシステムを使用し、我々が検索を行った36個の候補遺伝子についてチップの作成を試みることにした。まず、刺激前後での患者培養細胞からのマイクロアレイ法の適応で、発現が変化する遺伝子群を同定する作業を行った。

A. 研究目的

本研究の目的は、皮膚幹細胞の培養法の確立によりアトピー性皮膚炎患者の組織及び培養皮膚組織モデルを確立し、組織学的、遺伝学的検討を行うことによって、アトピー性皮膚炎における病態(組織の剥落、バリア機能の阻害、サイトカイン等)の制御、そして制御に働く候補遺伝子を明らかにすることである。本年度はその培養系を用いて宝バイオ社と組んで DNA チップによるスクリーニング方の開発を開始した。

B. 研究方法

宝バイオの開発した新しい DNA チップ方式は、1本鎖 cDNA を基本とする新規のチップであり、その構造から、共通性が低い設計を取り入れること、反応性の低いガ

C. 結果

現在、宝バイオと共同で、アトピー性皮膚炎に関する36個の候補遺伝子につき、適当なチップを作成する作業を行っており、今年度中には、第一次の遺伝子6個として関連が認められたサイトカイン遺伝子系から選定し (IL-13, IL-1R1, IL-1R2, IL-18, IL-18R, IL-12R β 2)、皮膚細胞についての発現解析の条件を決定した。

D. 考察

アトピー性皮膚炎に関連したサイトカイン関連遺伝子について DNA チップによるスクリーニングが可能となると予想される。毛髪からの皮膚細胞培養について新生児に適応すれば、非常に早期にアトピー性皮膚炎の診断が可能となり、予防的な介入実験が可能になると考えられる。今後これらの

6種の遺伝子における遺伝子型の組み合わせからいくつかのパターン化が可能かを検討する必要がある。

E. 結論

アトピー性皮膚炎における DNA チップ診断への第一歩が開かれた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nakashima K, Hirota T, Obara K, Shimizu M, Jodo A, Kameda M, Doi S, Fujita K, Shirakawa T, Enomoto T, Kishi F, Yoshihara S, Matsumoto K, Saito H, Suzuki H, Nakamura Y, Tamari M. An association study of asthma and related phenotypes with polymorphisms in negative regulator molecules of the TLR signaling pathway. *J Hum Genet.* 2006, Jan 24.

(2) Nakashima K, Takeuchi T, Shirakawa T: Differentiation, distribution, and chemical state of intracellular trace elements in LAD2 mast cell clone. *Bio Trace Elem Res.* 2005;108(1-3):105-14.

(3) Kutok JL, Yang X, Folkert RD, Imitola J, Raddassi K, Yano Y, Salahuddin S, Lawitts J, Imboden H, Chinami M, Shirakawa T, Turner H, Khoury S, Sayegh MH, Scadden D, Adra C:

The cell cycle association protein, HTm4, is expressed in differentiating cells of the hematopoietic central nervous system in mice. *J Mol Histol.* 2005; 36(1-2):77-87.

(4) Songjinda P, Nakayama J, Kuroki Y, Tanaka S, Fukuda S, Kiyohara C, Yamamoto T, Izuchi K, Shirakawa T, Sonomoto K: Molecular monitoring of the developmental bacterial community in the gastrointestinal tract of Japanese infants. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005;69(3):638-41.

(5) Akahashi M, Obara K, Hirota T, Matsuda A, Hasegawa K, Takahashi N, Shimizu M, Nakashima K, Cheng L, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Higashi N, Taniguchi M, Enomoto T, Mao XQ, Nakashima H, Adra CN, Nakamura Y, Tamari M, Shirakawa T: Functional promoter polymorphism in the TBX21 gene associated with aspirin-induced asthma. *Hum Genet.* 2005; 117(1):16-26.

(6) Madden JA, Plummer SF, Tang J, Garaiova I, Plummer NT, Herbison M, Hunter JO, Shimada T, Cheng L, Shirakawa T: Effect of probiotics on preventing disruption of the intestinal microflora following antibiotic therapy: A double-blind, placebo-controlled pilot study. *Int Immunopharmacol.* 2005;5(6):159-64.

(7) Noguchi E, Yokouchi Y, Zhang J, Shibuya K, Shibuya A, Bannai M, Tokunaga K, Doi H, Tamari M, Shimizu M, Shirakawa T, Shibasaki M, Ichikawa K, Arinami T: Positional identification of an asthma susceptibility gene on human chromosome 5q33. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172(2):183-8.

(8) Hirota T, Suzuki Y, Hasegawa K, Obara K, Matsuda A, Akahoshi M, Nakashima K, Cheng L, Takahashi N, Shimizu M, Doi S, Fujita K, Enomoto T, Ebisawa M, Yoshihara S, Nakamura Y, Kishi F, Shirakawa T, Tamari M: Functional haplotypes of IL-12B are associated with childhood atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 116(4):789-95.

(9) Cheng L, Hirota T, Enomoto T, Tamari M, Akahoshi M, Matsuda A, Shimizu M, Takahashi N, Enomoto K, Yamasaki A, Mao XQ, Hopkin JM, Shirakawa T: Lack of association between the IL 13 variant Arg110Gln and susceptibility to cedar pollinosis in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;139(1):25-30.

(10) Takahashi N, Akahoshi M, Matsuda A, Ebe K, Inomata N, Obara K, Hirota T,

Nakashima K, Shimizu M, Tamari M, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nakashima H, Ikezawa Z, Shirakawa T: Association of the IL 12 RB1 promoter polymorphisms with increased risk of atopic dermatitis and other allergic phenotypes. *Hum Mol Genet.* 2005; 14(21): 3149-59.

(11) Shimizu M, Matsuda A, Yanagisawa K, Hirota T, Akahoshi M, Inomata N, Ebe K, Tanaka K, Sugiura H, Nakashima K, Tamari M, Takahashi N, Obara K, Enomoto T, Okayama Y, Gao PS, Huang SK, Tominaga S, Ikezawa Z, Shirakawa T: Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis. *Hum Mol Genet.* 2005;14(19):2919-27.

(12) Matsuda A, Hirota T, Akahoshi M, Shimizu M, Tamari M, Miyatake A, Takahashi A, Nakashima K, Takahashi N, Obara K, Yuyama N, Doi S, Kamogawa Y, Enomoto T, Ohshima K, Tsunoda T, Miyatake S, Fujita K, Kusakabe M, Izuhara K, Nakamura Y, Hopkin J, Shirakawa T: Coding SNP in tenascin-C Fn-III-D domain associates with adult asthma. *Hum Mol Genet.* 2005; 14(19):2779-86.

2. 学会発表

1. 白川太郎: アレルギー疾患の遺伝子解析—過去・現在・未来, 特別講演, 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会, ホテルグランビア岡山, 6.2-4.2005.
2. 嶋田貴志, 白川太郎: 新規乳酸菌株 *Enterococcus casseliflavus* Shirakawa 株の死菌体(NP-04)のアレルギー予防効果について, 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会, ホテルグランビア岡山, 6.2-4.2005.
3. 三邊武幸, 三好彰, 程 雷, 白川太郎, 稲川俊太郎, 中山明峰, 稲福繁, 佐橋紀男: 中国産杉・柳杉により発症する日本人杉花粉症の一例, 第 17 回日本アレルギー学会春季臨床大会, ホテルグランビア岡山, 6.2-4.2005.
4. 白川太郎: アレルギー疾患予防への新展開, 特別講演, 第 8 回日本臨床腸内微生物学会, 北里大学薬学部, 9.10.2005.
5. 国村伸祐, 白川太郎, 竹内亨: 好中球様に分化させた培養細胞を用いた酸化的 DNA 損傷誘発と鉄の関連, 第 29 回日本鉄バイオサイエンス学会, 鹿児島県民交流センター, 9.10-11.2005.
6. 白川太郎: アレルギー疾患の遺伝子学的研究—その現状と将来展望—, 招待講演, 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 盛岡市民ホール他, 10.20-22.2005.
7. 鎌田文顕, 新堀哲也, 邵 晨深, 青木洋子, 吳繁夫, 松原洋一, 鈴木洋一, 玉利真由美, 長谷川耕一, 広田朝見光, 清水麻貴子, 高橋尚美, 土居悟, 藤原寛, 宮武昭彦, 藤田きみゑ, 榎本雅夫, 河合 満, 佐々木聖, 森川利夫, 森川みき, 千葉 靖, 田村 弦, 白川太郎: GSTP1 遺伝子多型と気管支喘息との関連, 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 盛岡市民ホール他, 10.20-22.2005.
8. 三邊武幸, 寺尾 元, 三好 彰, 程 雷, 殷 敏, 時 海波, 白川太郎, 稲川俊太郎, 中山名峰, 稲福 繁, 佐橋紀男: チベットにおけるスギ花粉陽性例の存在とヒノキ植生の確認, 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 盛岡市民ホール他, 10.20-22.2005.
9. 坪内美樹, 時 海波, 程 雷, 三好 彰, 榎本雅夫, 嶋田貴志, 白川太郎: プロバイオティクスによる成人鼻アレルギー予防試験—熊本県小国町研究—, 第 55 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 盛岡市民ホール他, 10.20-22.2005.
10. 白川太郎: アレルギー予防と乳酸菌, 第 12 回未病システム学会学術総会, KKR HOTEL OSAKA, 1.27-28,2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

分担課題名：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ラーメイド治療開発

分担研究者 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

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。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検出できる遺伝子診断キットを中心とする診断システムを開発することおよび、その診断をもとにして各病因・病態に合致したテラーメイド治療法を確立することである。多数報告のみられるアレルギー関連遺伝子多型情報を、臨床レベルで活用するためには、多くのサンプルを迅速に処理する必要がある。これを実現するために、今回試みた遺伝子検出キットは、非常に有用であると考えられた。今後、実際の臨床応用にむけて詳細な解析を行いたい。また、さらに、治療への応用として、得られた遺伝子情報を活用し、より適切な治療薬を選択していきたいと考える。

研究協力者

金子英雄 岐阜大学医学部附属病院 小児科 講師

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。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検出できる遺伝子診断キットを中心とする診断システムを開発することおよび、その診断をもとにして各病因・病態に応じたテラーメイド治療法を確立することである。このことにより、良好・適格な治療効果が得られることが期待され、さらには、患者およびその家族のQOLの向上につながると考えられる。

B.研究方法

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、アレルギーの系統的遺伝子診断キットをインバーダーアッセイ法を用いて開

発した。

- ② 遺伝子検索キットには、IgE産生抑制系のシグナル伝達系に存在するサイトカイン、およびその受容体、メディエーター産生段階としてアラキドン酸カスケードに存在する酵素の遺伝子などの多型を組み合わせた。
- ③ アレルギーの系統的遺伝子診断キットによる解明をもとに、抗アレルギー薬の中で、ロイコトリエン受容体拮抗薬投薬前後における尿中アラキドン酸排泄量の検討、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。

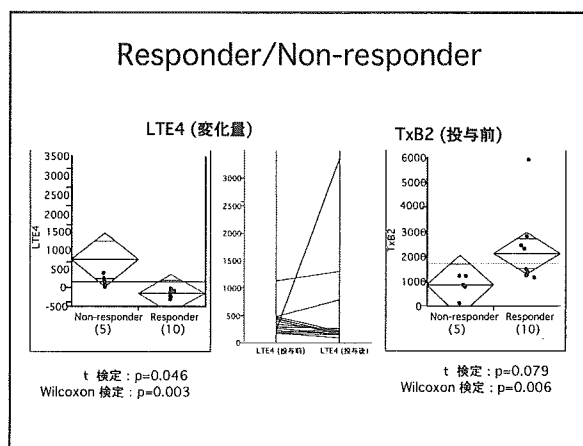
（倫理面への配慮）

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について十分に説明し十分な理解（インフォームドコンセント）を得た上で採血が行なわれた。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.研究結果

- ① 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 ロイコトリエン受容体拮抗薬のうち、モンテルカスト投薬前後における尿中アラキドン酸代謝産物の変化について検討した。対象は、6歳以上の気管支喘息患者とした。尿中のLTE4排泄量をモンテルカスト投与前後で検討したところ、効果のみられた症例では、モンテルカスト内服4週後にLTE4排泄量が減少しておりLTE4排泄量の変化量は有効例と無効例の間に有意差を認めた(図1)。また、さらに、有効例では、無効例に比較して投与前の尿中TxB2の排泄量が低下していることがわかった(図1)。

図1



- ③ 遺伝子多型とモンテルカストの有効性との関連を検討した(表1)。

表1

Gene	SNP	n	Genotypes	Non-responder	Responder	P value
IFN-GR1	IFN-GR1	21	A/A	7 (100%)	13 (93%)	0.469
			A/G	0 (0%)	1 (7%)	
			T/T	4 (57%)	6 (43%)	
IL12RB1	IL12RB1 (365)	21	T/C	3 (43%)	6 (43%)	0.549
			C/C	0 (0%)	2 (14%)	
			T/T	3 (43%)	4 (29%)	
IL12	IL-12(3757)	21	T/C	4 (57%)	8 (57%)	0.526
			C/C	0 (0%)	2 (14%)	
			C/C	0 (0%)	2 (14%)	
LTC4S	LTC4S(-444)	20	C/C	6 (86%)	12 (86%)	1.000
			C/T	1 (14%)	2 (14%)	
			A/A	4 (67%)	10 (71%)	
IL4RA	IL-4RA	20	A/C	1 (17%)	4 (29%)	0.275
			C/C	1 (17%)	0 (0%)	
			G/G	2 (33%)	8 (57%)	
IL13	IL-13	21	G/A	3 (50%)	5 (36%)	0.585
			A/A	1 (17%)	1 (7%)	
			G/G	2 (29%)	5 (36%)	
			A/A	3 (43%)	8 (57%)	0.416
			A/A	2 (29%)	1 (7%)	

TXB2 排泄量はモンテルカスト内服4週後

表1に示すように今回遺伝子検出キットを用いて解析したSNPsと有効性との間に有意差を認めたSNPsは見られなかった。そこで、比較的p値が低いLTC4S(-444)多型とIL-13多型を変異アリルを持つか否かで効果予測ができるか否かについて検討した(表2)。

表2

	LTC4S(-444)		合計
	AA	AC or CC	
Nonresponder	4	2	6
Responder	10	4	14
合計	14	6	20
	IL-13		合計
	GG	GA or AA	
Nonresponder	2	5	7
Responder	5	9	14
合計	7	14	21
	LTC4S(-444)		合計
	AA	AC or CC	
Nonresponder	4	2	6
Responder	10	4	14
合計	14	6	20
	IL-13		合計
	GG or GA	AA	
Nonresponder	5	2	7
Responder	13	1	14
合計	18	3	21

現在の症例数では、いずれも有意差を認めることはなかったが、今後も症例数を増やして検討を行なう予定である。

D.考察

増加を続けるアレルギー疾患患者の個々の病態を遺伝子レベルで整理し、分類することは、テーラーメイド医療を考える上で、非常に重要なことであると考えられる。多数報告のみられるアレルギー関連遺伝子多型情報を、臨床レベルで活用するためには、多くのサンプルを迅速に処理する必要があり、これを実現するために、遺伝子検出キットは、非常に有用であると考えられた。今後、どの目的のためには、どの遺伝子をどのように組み合わせるべきかについてさらに検討を加え、実用化に向けて検討を続けたい。また、さらに、治療への応用として、得られた遺伝子情報を活用し、より適切な治療薬を選択していきたいと考える。

E. 結論

アレルギー疾患の遺伝子診断キットを開発した。臨床へ応用するため、さらに、今後、診断、治療に着目した感受性、特異性の向上、薬理遺伝学的見地からの検討が必要である。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

論文発表

<論文発表>

1. Tatebayasi 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)

2. 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)

<学会発表>

1. 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: (回) (2005年6月2日, 岡山)

2. 松井永子, 青木美奈子, 近藤應, 金子英雄, 寺本貴英, 篠田紳司, 近藤直実: トシル酸スプラタストによるサイトカインの動向とオーダーメイド医療への応用.

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 日本小児アレルギー学会 (第 42 回) (2005 年 11 月 19 日, 福井)

3. 松井永子 寺本貴英 金子英雄 深尾敏幸 加藤善一郎 近藤直実: 薬物療法の pin point 化, 小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会 (第 13 回) (2005 年 2 月 19 日, 群馬)

4. 松井永子 寺本貴英 金子英雄 深尾敏幸 加藤善一郎 近藤直実: トランスレーショナルリサーチに基づくアレルギー診療 診断への応用, 小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会 (第 14 回) (2005 年 12 月 11 日, 岐阜)

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（平成17年度）

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsukuma E, Kato Z, Omoya K, Hashimoto K, Li A, Yamamoto Y, Ohnishi H, Hiranuma H, Komine H, <u>Kondo N</u>	Development of fluorescence linked immunosorbent assay (FLISA) for high throughput screening (HTS) of interferon- γ .	Allergol Int	55	49-54	2006
Kobayashi M, Nasuhara Y, Kamachi A, Tanino Y, Betsuyaku T, <u>Yamaguchi E</u> , Nishihira J, Nishimura M	Role of macrophage migration inhibitory factor in ovalbumin-induced asthma in rats.	Eur Respir J	27 (1)	1-9	2006
<u>Kondo N</u> , Kraft M, Kaminogawa S	Hygiene Hypothesis -Significance and Verification in Asthma/Allergy-	International Review of Asthma	7	8-25	2005
Tatebayasi K, <u>Matsui E</u> , Kaneko H, Fukao T, Kasahara K, <u>Kondo N</u>	<i>IL-12B</i> promoter polymorphism associated with asthma and <i>IL-12B</i> transcriptional activity.	Allergol Int	54	451-459	2005
Yoshikawa K, <u>Matsui E</u> , Kaneko H, Fukao T, Inoue R, Teramoto T, Shinoda S, Fukutomi O, Aoki M, Kasahara K, <u>Kondo N</u>	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
Kondo M, Suzuki K, Inoue R, Sakaguchi H, Matsukuma E, Kato Z, Kaneko H, Fukao T, <u>Kondo N</u>	Characterization of T-cell clones specific to ovomucoid from patients with egg-white allergy.	J Invest Allergol Clin Immunol	15	107-111	2005
Kutok JL, Yang X, Folkert RD, Imitola J, Raddassi K, Yano Y, Salahuddin S, Lawitts J, Imboden H, Chinami M, <u>Shirakawa T</u> , Turner H, Khoury S, Sayegh MH, Scadden D, Adra C	The cell cycle associated protein, HTm4, is expressed in differentiating cells of the hematopoietic and central nervous system in mice.	J Mol Histol	36(1-2)	77-87	2005
Songjiinda P, Nakayama J, Kuroki Y, Tanaka S, Fukuda S, Kiyohara C, Yamamoto T, Izuchi K, <u>Shirakawa T</u> , Sonomoto K	Molecular monitoring of the developmental bacterial community in the gastrointestinal tract of Japanese infants.	Biosci Biotechnol Biochem	69(3)	638-41	2005