

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

NSAIDs 過敏喘息の難治性、難治化因子に関する研究

研究代表者	谷口正実	国立病院機構相模原病院 外来部長 (アレルギー科医長・臨床研究センター気管支喘息研究室長併任)
研究協力者	福富友馬	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 研究員
	関谷潔史	国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
	谷本英則	国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
	三井千尋	国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師
	三田晴久	国立病院機構相模原病院臨床研究センター分子生物学研究室 研究員
	梶原景一	国立病院機構相模原病院臨床研究センター分子生物学研究室 研究員
	東憲孝	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 特別研究員
	小野恵美子	ハーバード大学 研究員
	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
	粒来崇博	国立病院機構相模原病院アレルギー科 医師

研究要旨：

喘息型 NSAIDs 不耐症（いわゆるアスピリン喘息（以下 AIA）は 臨床的に半数以上が重症難治性喘息であることが報告されている。この傾向に人種差はなく、欧州米国本邦いずれも同様の傾向であるが、成人喘息全体からみた AIA の位置づけは明らかでなく、どの程度重症化に関与しているかも不明であった。今回は①AIA が成人喘息の難治化因子や臨床的なりモデリング指標とされる気管支拡張薬吸入後の肺機能低下にどの程度関わっているかを、多数例の成人喘息の背景因子から統計学的手法を用いて証明した。また②AIA における重症化因子を多変量解析で証明した。その結果、1. 成人喘息の難治化因子として、喫煙、長期の罹病期間、女性の肥満と並んで、AIA は強い難治化因子であることが日本人でも確認された 2. その重症化に関与する因子として好酸球性炎症と U-LTE4 が有意因子と判明した。これらの成績は国際的にも初めてであり、非常に価値が有ると考える。また AIA が重症である機序の本質にせまる今後の研究の一助となる。

A. 研究目的

喘息型 NSAIDs 不耐症（いわゆるアスピリン喘息（以下 AIA）は 臨床的に半数以上が重症難治性喘息であることが報告されている。この傾向に人種差はなく、欧州米国本邦いずれも同様の傾向であるが、成人喘息全体からみた AIA の位置づけは明らかでなく、どの程度重症化に関与しているかも不明である。今回は①AIA が成人喘息の難治化因子や臨床的なりモデリング指標とされる気管支拡張薬吸入後の肺機能

低下にどの程度関わっているかを、多数例の成人喘息の背景因子から統計学的手法を用いて検討する。また②AIA における重症化因子を多変量解析で証明する。

B. 研究方法

1. 対象：

国立病院機構相模原病院にて通院中の 2112 例の成人喘息間患者のうち JGL による重症度分

類が判明している 2012 例を対象とした。

2. 方法：

①難治化因子：step4 の治療をしても週に 1 回以上の喘息症状が持続する症例を難治性喘息と定義。難治性喘息とそれ以外の喘息症例の背景因子を比較する。

②AIA 7 2 例を用いてその背景と判事か因子を検討した。多重ロジスティック回帰分析で検討し、多因子の関与を検討した。

(倫理面への配慮)

- ・倫理委員会の審査了解を得るのはもちろん、十分な倫理的配慮と個人情報の保護に努める。
- ・患者へは十分な説明をした上で、文書同意を得る。

C. 研究結果

1. 成人喘息の難治化因子として、喫煙、長期の罹病期間、女性の肥満と並んで、AIA は強い難治化因子であることが日本人でも確認された (図 1)。

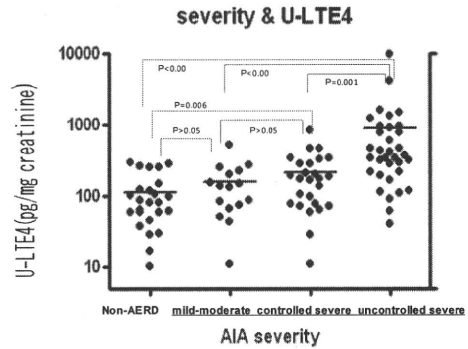
性別・年齢階級別の喘息難治化因子 (adjusted odds ratio [95% CIs])

	男性			女性		
	若壮年期 15-44歳 N=140	中年期 45-64歳 N=136	高年期 65歳- N=140	若壮年期 15-44歳 N=216	中年期 45-64歳 N=234	高年期 65歳- N=106
罹病年数 (10年ごと)	3.08 (1.33-7.13)	1.85 (1.20-2.27)	1.41 (1.12-1.76)	1.81 (1.17-2.81)	1.72 (1.29-2.30)	1.42 (1.12-1.80)
AIA	3.48 (0.79-15.40)	4.88 (1.02-23.67)	5.03 (1.02-23.67)	6.14 (1.55-24.44)	5.14 (1.55-24.44)	3.54 (0.93-14.24)
BMI						
-18.5	4.36 (0.48-39.91)	1.48 (0.13-16.40)	0.46 (0.08-2.76)	0.50 (0.06-4.26)	0.88 (0.10-8.06)	3.75 (1.18-11.91)
18.5-25	1	1	1	1	1	1
25-30	0.18 (0.01-2.41)	1.91 (0.71-5.14)	0.57 (0.21-1.55)	0.37 (0.04-3.17)	0.38 (0.07-1.88)	3.64 (1.50-8.84)
30-	1.19 (0.09-15.27)	0.40 (0.04-4.18)	0.01 (0.00-10 ¹²)	2.40 (0.40-14.36)	3.58 (0.75-16.89)	4.43 (0.98-22.80)
Smoking						
Nonsmoker	1	1	1	1	1	1
Past smoker	2.61 (0.42-16.26)	3.05 (0.86-10.83)	1.48 (0.63-3.51)	3.50 (1.01-12.11)	0.82 (0.21-3.24)	0.92 (0.27-3.08)
Current smoker	0.23 (0.02-2.22)	4.20 (1.01-17.51)	1.90 (0.57-6.33)	2.22 (0.62-7.99)	1.98 (0.55-7.21)	1.19 (0.27-5.22)

赤字・・・P<0.05 太字・・・P<0.10 Multivariate logistic regression

- 図 1 -

2. その重症化に関与する因子として好酸球性炎症と U-LTE4 が有意因子と判明した (図 2、図 3)。



- 図 2 -

Eos. count and U-LTE4 were strong predictors of uncontrolled severe asthma in AERD, independently. (by multiple regression analysis)

	OR (95% CI)
Log [Eos (/μl)]	8.4 (1.1-65.0)
Log [U-LTE4 (pg/mg creatinine)]	7.3 (1.5-37.2)

- 図 3 -

D. 考察

成人喘息の難治化因子として、喫煙、長期の罹病期間、女性の肥満と並んで、AIA は強い難治化因子であることが初めて日本人でも確認された (国際誌投稿中)。さらに AIA では好酸球性炎症と CysLTs 過剰産生がその難治化に関与することが証明された。いずれもはじめての成

績であり、非常に価値が高いと考える。今後は、この機序を明らかにする必要がある。また Cys-LTs 過剰産生の制御が本症の安定化に必須と考えられた。

3. その他
なし

E. 結論

成人喘息の難治化因子として、喫煙、長期の罹病期間、女性の肥満と並んで、AIA は強い難治化因子であることが初めて日本人でも確認された（国際誌投稿中）。さらに AIA では好酸球性炎症と CysLTs 過剰産生がその難治化に関与することが証明された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

「総括研究報告書」

G. 研究発表 1. 論文発表 参照のこと

2. 学会発表

「総括研究報告書」

G. 研究発表 2. 学会発表 参照のこと

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

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

アスピリン喘息の気道過敏性：Adenosine 5'-monophosphate (AMP) 吸入の有用性

研究分担者	榑原博樹	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科 I	教授
研究協力者	齊藤雄二	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科 I	准教授
	磯谷澄都	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科 I	講師
	三重野ゆうき	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科 I	助教
	岡本拓也	藤田保健衛生大学医学部	呼吸器内科 I	助手

研究要旨：

Adenosine 5'-monophosphate (AMP) の吸入は気管支喘息患者に対して比較的特異的に気道収縮を誘発する。AMP 自体には気道平滑筋収縮作用がなく、体内で加水分解されて生成されたアデノシンが肥満細胞からヒスタミンなどの気道収縮性メディエータの遊離を惹起するための気道反応と推定されている。アスピリン喘息 (AIA) の気道反応には肥満細胞が関与している証拠がある。そこで、AMP およびメサコリン吸入に対する気道反応を AIA と非アスピリン喘息 (非 AIA) で比較し、気道反応の感度から両者の鑑別が可能か否かを検討した。その結果、AMP およびメサコリン吸入に対する気道反応は、AIA と非 AIA の間に有意差がなかった。しかし、メサコリン吸入閾値に対する AMP 吸入閾値の比 (PC20-AMP/PC20-Mch) は AIA で有意に低く、AIA は AMP 吸入に対して過敏な喘息群であり、その病態に肥満細胞の関与が推定された。ただし、両群の差は有意であってもわずかであり、AIA の診断に応用できるほど特異性は高くなかった。

A. 研究目的

Adenosine 5'-monophosphate (AMP) の吸入は気管支喘息患者に対して比較的特異的に気道収縮を誘発する^{1, 2)}。AMP は直接的な平滑筋収縮作用を持たないが、吸入された気道局所で直ちに加水分解されてアデノシンとなり^{3, 4)}、気道粘膜に存在する肥満細胞上のアデノシン受容体に結合してヒスタミンやロイコトリエンの遊離を惹起する^{5, 6)}。AMP による気道収縮は肥満細胞の脱顆粒を介する間接的な反応と考えられている。すでに筆者らは、AMP 吸入試験に関する基礎的な検討を行い、気道反応 (気道収縮と回復) の時間経過や安全性の確認を行い、気管支喘息の診断に関してメサコリン吸入試験と同等の感度と特異度を有することを示

した⁷⁾。アスピリン喘息 (AIA) の症状発現には肥満細胞の活性化が関与していると推定されている⁸⁾。そこで、AMP 気道過敏性を非アスピリン喘息 (非 AIA) と比較し、AIA に特異な反応がみられるか否かを検討し、さらに AIA の診断に応用できるかどうかについても検討した。

B. 研究方法

対象とする喘息患者は FEV1.0% が 70% 以上あり、メサコリン気道過敏性閾値と性、および年齢をあらかじめマッチさせた AIA 群 (9 例: 男性 2 名, 女性 7 名) と非 AIA 群 (14 例: 男性 3 名, 女性 11 名) である。非ステロイド性抗

炎症薬 (NSAID) による喘息発作誘発歴, スルピリン吸入試験, トルメチン吸入試験, その他の NSAID 負荷試験の4項目のうち2項目以上満たす者を AIA とした。AMP 吸入液の濃度は 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400mg/ml とした。メサコリン吸入試験はアレルギー学会の標準法に従った。FEV1 が 20%低下する薬剤濃度をそれぞれ PC20-AMP, PC20-Mch と表した。

(倫理面への配慮)

各種の負荷試験は検査の目的や方法, 意義に関して説明した上で, 保険診療で認められる範囲内で行われた。

C. 研究結果

AIA 患者は平均年齢 37.3 歳, アトピー陽性 6 名, 血清 IgE 値 282 ± 286 U/ml, 喫煙群 2 名, Smoking Index (pack-years) は 4.4 ± 10.1 であった。非 AIA 患者は平均年齢 41.5 歳, アトピー陽性 10 名, 血清 IgE 値 431 ± 433 U/ml, 喫煙群 4 名, 非喫煙群 10 名, Smoking Index (pack-years) は 1.1 ± 2.0 であった (表 1)。PC20-AMP と PC20-Mch に関しては AIA 群と非 AIA 群で有意差は認めなかった (図 1, 2)。しかし, PC20-Mch に対する PC20-AMP の比, すなわち $\log(PC20-AMP/PC20-Mch)$ に関しては, 非 AIA 群に比べ AIA 群で有意に低下していた ($P < 0.01$) (図 3)。更に $\log PC20-Mch$ に対する $\log PC20-AMP$ の回帰直線の傾きに関しても, AIA 群では非 AIA 群に比べて有意に低値であった (図 4)。

表 1 研究対象者の背景

	AIA	ATA
N	9	14
Sex (M/F)	2/7	3/11
Atopy (+/-)	6/3	10/4
Serum IgE (u/ml)	282 ± 286	431 ± 433
Smoking (+/-)	2/7	4/10
Smoking index (Pack-years)	4.4 ± 10.1	1.1 ± 2.0
% Eosinphils (%)	6.8 ± 1.7	6.4 ± 1.6
FVC (ml)	3120 ± 620	3120 ± 770
FEV1 (ml)	2620 ± 490	2480 ± 600
%FEV1 (%)	93.0 ± 15.2	89.2 ± 10.5
FEV1/FVC (%)	84.1 ± 8.5	79.6 ± 4.6

AIA: aspirin intorelant asthma, ATA: aspirin torelant asthma.

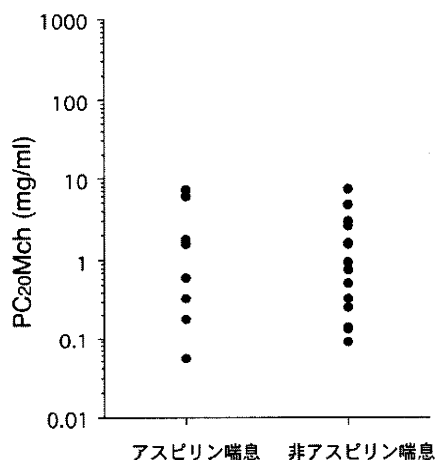


図 1 アスピリン喘息の気道過敏性 (PC20Mch) メサコリン気道過敏性 (PC20Mch) を比較した。両群に差はなかった。

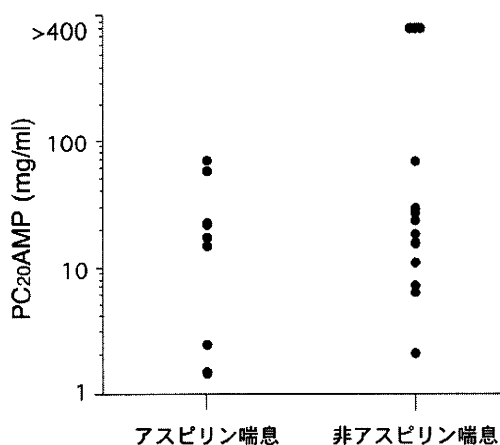


図 2 アスピリン喘息の気道過敏性 (PC20AMP) AMP過敏性 (PC20AMP) を比較した。両群に差はなかった。

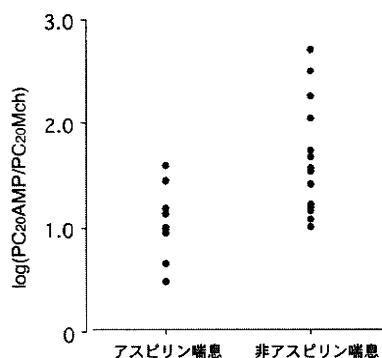


図3 アスピリン喘息の気道過敏性
メサコリン過敏性 (PC20Mch) で標準化したAMP過敏性 (PC20AMP)
(log(PC20AMP/PC20Mch)) をアスピリン喘息と非アスピリン喘息で比較した。

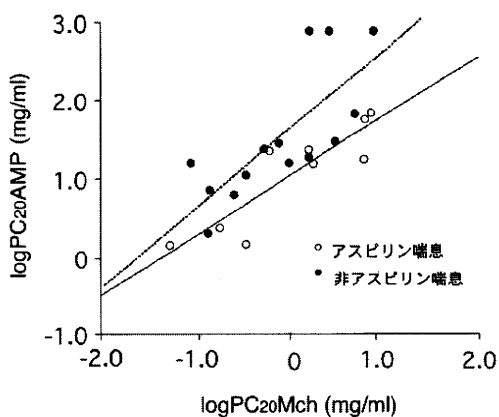


図4 病型別にみたAMP過敏性とメサコリン過敏性の関係

D. 考察

すでに筆者らは、AMP 吸入負荷試験はメサコリン吸入負荷試験と同様に気道過敏性を評価する上で有用であることを示した⁷⁾。しかし、メサコリン気道過敏性との臨床的な意義の差異に関しては明らかでなかった。今回、AIA がアデノシンに対してより過敏な喘息群である可能性が示唆され、AIA の病態における肥満細胞の重要性を示している可能性がある。しかし、AIA 群と非 AIA 群の AMP 吸入閾値の差はわずかであり、両群を鑑別できるほどの特異性はみられなかった。今後、AMP 吸入閾値に及ぼす重症度、性別、年齢、アトピーなどの影響を明らかにすることで、AIA における AMP 気道過敏性の

臨床的な意義を明らかにすることはできるであろう。

E. 結論

AIA は AMP に対してより過敏な喘息群であり、AIA の病態における肥満細胞の関与を示唆している。しかし、AIA と非 AIA を鑑別できるほどには特異性が高くなかった。

引用文献

- 1) Cushley MJ, Tattersfield AE, Holgate ST: Adenosine-induced bronchoconstriction in asthma. *Am Rev Respir Dis* 129:380-384, 1984.
- 2) Church MK, Fetherstone RL, Cushley MJ, et al: Relationship between adenosine, cyclic nucleotides, and xantines in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 78:670-675, 1986.
- 3) Church MK, Featherstone RL, Cshley JM, et al: Relationships between adenosine, cyclic nucleotides, and xanthines in asthma. *J Allergy Clin immunol* 78:670-675, 1986.
- 4) Collis MG, Hourani SMO: Adenosine reseptor subtypes. *Trends Pharmacol* 14:360-366, 1993.
- 5) Cushley MJ, Church MK, Pao GK, et al: Adenosine-induced bronchoconstriction is not caused by enhance immunological release of mast cell mediators. *Clin Pharmacol* 14: 607-611, 1982.

6) Phillips GD, Rafferty P, Beasley R, et al: Effect of oral terfenadine on the bronchoconstrictor response to inhaled histamine and adenosine 5'-monophosphate in non-atopic asthma. *Thorax* 42:939-945, 1987.

7) 松井 潔, 齊藤雄二, 榊原博樹, ほか: 成人健常人および気管支喘息患者におけるアデノシン気道過敏性の検討. 第 49 回日本アレルギー学会総会, 広島, 1999.

8) O'Sullivan S et al: Increased urinary excretion of the prostaglandin D2 metabolite 9 α , 11 β -prostaglandin F2 after aspirin challenge supports mast cell activation in aspirin-induced airway obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 97:318;1996.

F. 健康危険情報

AMP 吸入に対する気道反応の程度は, 広く実施されているメサコリン吸入試験と同程度であり, 本研究の方法で示したように, 気道反応を注意深く観察しながら吸入 AMP 濃度を漸増する限り, 危険な反応はみられなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 榊原博樹: NSAIDs 不耐症の機序と対応. 内科 105: 599-602, 2010.

本研究内容の詳細に関しては, 適当な学会誌に発表予定。

2. 学会発表

1) 加藤 敦, 岡村拓哉, 小橋保夫, 他: 当院におけるアスピリン内服負荷試験の検討. 第 60 回日本アレルギー学会秋期学術大会, 東京, 2010 年 11 月.

2) 磯谷澄都, 榊原博樹: アスピリン喘息と難治性喘息の関わり. アスピリン不耐症・難治性喘息研究会 2011, 東京, 2010 年 11 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

発生工学を用いたアスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明

研究分担者 長瀬 隆 英 東京大学大学院医学系研究科呼吸器内科学 教授

研究協力者 石井 聡 秋田大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：

NSAIDs 不耐症の一型であるアスピリン喘息は、発症頻度や緊急性・重篤性において極めて重大な疾患であり社会的にも注目されている。気管支喘息、特にアスピリン喘息の発症機序については未解明の部分が多く、その解明には関連遺伝子の探索を含めた研究が必須と考えられる。また、アスピリン喘息については、国内外において動物モデルが報告されていない。近年、遺伝子改変マウスが次々と開発されており、疾患関連遺伝子の解明に有用であることが報告されているが、気管支喘息の発症分子機序の解明についても実験動物としての遺伝子改変マウスを用いた研究が重要であることが考えられる。本研究では、炎症メディエーターに関する遺伝子改変マウスを作成し、喘息モデルを用いてアスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明を目指した。今後、遺伝子改変マウスを活用することにより、さらに各々の遺伝子・蛋白系の病態生理学的意義・重要性が解明され、NSAIDs 不耐症・気管支喘息・アスピリン喘息治療への貢献が期待される。

A. 研究目的

気管支喘息は極めて多数の因子から病像が形成されており、その発症機序については未だ解明されていないことも多い。なかでも、NSAIDs 不耐症の一型であるアスピリン喘息は、発症頻度や緊急性・重篤性において極めて重大な疾患であり社会的にも注目されている。気管支喘息の病態的・生理学的特徴として、慢性的な気道炎症・気道過敏性・可逆的な気流制限が挙げられる。気道過敏性の機序はこれまで不明の部分が多かったが、喘息特有の気道炎症に起因していることが明らかになってきた。気道炎症の機序は、炎症細胞と気道構成細胞が放出する炎症メディエーター・サイトカインなどの生理活性物質が相互反応を繰り返す炎症カスケードであると考えられている。しかしながら、気管支喘息、特にアス

ピリン喘息の発症機序については未解明の部分が多く、その解明には関連遺伝子の探索を含めた研究が必須と考えられる。また、アスピリン喘息については、世界的にも動物モデルが報告されていない。近年、遺伝子改変マウスが次々と開発されており、疾患関連遺伝子の解明に有用であることが報告されている。気管支喘息の発症分子機序の解明についても、実験動物としての遺伝子改変マウスを用いた研究が重要であることが考えられる。本研究では、炎症メディエーターに関する遺伝子改変マウスを作成し、アスピリン喘息発症機序に関する基礎的研究と病態解明を目指す。

B. 研究方法

本研究では、本研究者らが独自に開発した遺伝子改変マウスを使用する。LTC₄/D₄/E₄ など cysteinyl LT は、気管支喘息における主要な炎症メディエーターであり、アスピリン喘息発症に大きく関与することが想定される。cysteinyl LT の受容体(CysLT1-R, CysLT2-R) は肺・気管支に豊富に存在し、気管支喘息を含めた呼吸器疾患発症への関与が示唆される。特に、CysLT2-R は大きく注目されているが、その機能は未だに解明されていない。本研究では、この CysLT2-R を標的としたノックアウトマウスの新規作成に着手する。このような遺伝子改変マウスを用いて、脂質性メディエーターと気管支喘息（特にアスピリン喘息）との関連について評価・検討を加える。

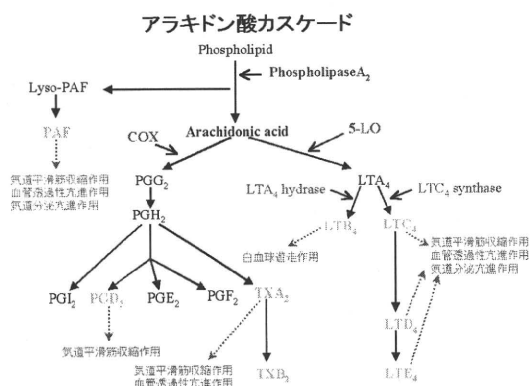


図1 アラキドン酸カスケードの模式図

(倫理面への配慮)

本研究では、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究における危険の排除、説明と理解 (インフォームドコンセント) について、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号) に基づき、研究を進める。

本研究で行う予定の遺伝子組換え実験は、平成16年9月10日の東京大学医学部組換えDNA

実験安全委員会において承認を受けた生化学分子生物学・細胞情報学講座「脂質メディエーター受容体、合成酵素遺伝子欠損マウスならびにタンパク質過剰発現細胞を用いた脂質メディエーター機能の解明、セマフォリン遺伝子欠損マウスを用いた嗅覚系神経回路形成機構の解明」に含まれており、適切な拡散防止措置がとられる。

C. 研究結果

発生工学的手法により CysLT2-R ノックアウトマウスが作成された。

Targeted Disruption of Mouse CysLT₂ Gene in C57BL/6 ES Cells

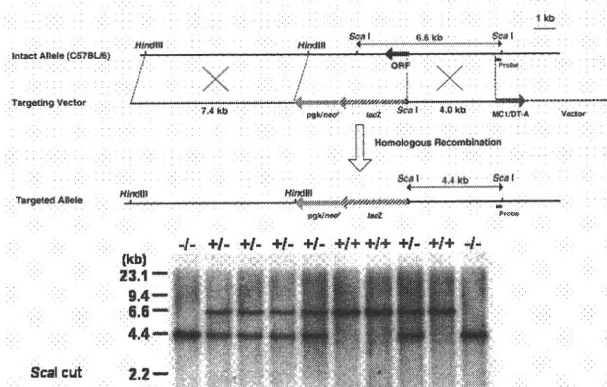


図2 CysLT2 受容体ノックアウトマウスの作成

発生工学的手法により CysLT2-R ノックアウトマウスが作成された。CysLT2-R ノックアウトマウスでは胎生致死が認められず、ホモ接合体の生存個体が得られた。また、外表所見上の著明な異常は認められず、発育・成長・生殖も正常と考えられた。また、アレルギー性気管支喘息モデルを用いた解析により、LTB₄ 受容体と cysteinyl LT 受容体は、異なる生理活性を示すことが示唆された。

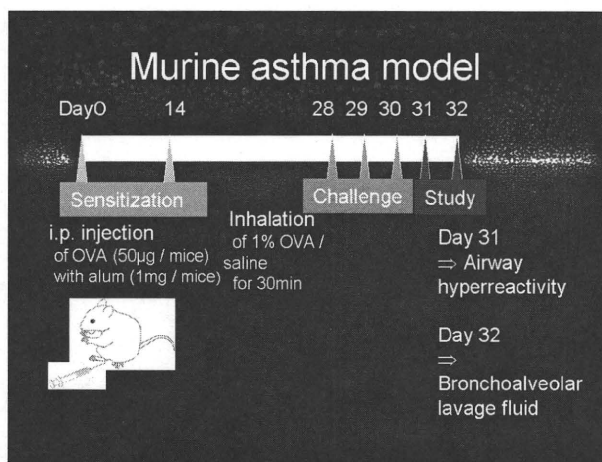


図3 アレルギー性気管支喘息モデルの作成

D. 考察

気管支喘息は、気道炎症を病態の特徴としており、その発症には多数の生理活性物質の関与が想定される。特に CysLT₂ 受容体は、肺・気管支に多量に存在することが示唆されているが、その機能はほとんど解明がなされていない。今回 CysLT₂-R ノックアウトマウスのホモ接合体が得られたことにより、気管支喘息（特にアスピリン喘息）における気道過敏性・末梢気道炎症への関与を検証することが可能となった。気管支喘息・アスピリン喘息に関わる候補物質・遺伝子を評価する手段として、分子生物学・発生工学を駆使したトランスレーショナル・リサーチによる研究アプローチが有用と思われる。今後、さらに各々の遺伝子・蛋白系の生理的意義・重要性が解明されることにより、気管支喘息・アスピリン喘息に対する有効な治療法・管理法の開発および実用化が期待される。

E. 結論

発生工学的手法により CysLT₂-R ノックアウトマウスが作成され、CysLT₂ とアスピリン喘

息との関連について評価・検討を行うことが可能となった。また、アレルギー性気管支喘息モデルを用いた解析により、LTB₄ 受容体と cysteinyl LT 受容体は、異なる生理活性を示すことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Kamitani S, Kawasaki S, Nagase T. Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol Cell Biochem* 2010; 337: 77-81.

2) Yamauchi Y, Kohyama T, Takizawa H, Kamitani S, Desaki M, Takami K, Kawasaki S, Kato J, Nagase T. Tumor necrosis factor-alpha enhances both epithelial-mesenchymal transition and cell contraction induced in A549 human alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1. *Exp Lung Res* 2010; 36: 12-24.

3) Narumoto O, Horiguchi K, Horiguchi S, Moriwaki Y, Takano-Ohmuro H, Shoji S, Misawa H, Yamashita N, Nagase T, Kawashima K, Yamashita N. Down-regulation of secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1 (slurp-1), an endogenous allosteric alpha7 nicotinic acetylcholine

receptor modulator, in murine and human asthmatic conditions. Biochem Biophys Res Commun 2010; 398: 713-8.

4) Ihara Y, Kihara Y, Hamano F, Yanagida K, Morishita Y, Kunita A, Yamori T, Fukayama M, Aburatani H, Shimizu T, Ishii S. The G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 TDAG8 facilitates tumor development by serving as an extracellular pH sensor. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107: 17309-14.

5) Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, Hamano F, Sato S, Tamaki K, Morishita Y, Kano M R, Iwata C, Miyazono K, Sakimura K, Shimizu T, Ishii S. LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. Blood 2010 in press.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

発明者：栗原裕基、大内尉義、長瀬隆英、
山口泰弘

発明の名称：筋ジストロフィー症の病態モデル
哺乳動物、及びその製造方法

(出願準備中)

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等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

アスピリン喘息とNSAIDs蕁麻疹/血管浮腫における遺伝的背景（遺伝子多型の検索）

研究分担者 玉利真由美 理化学研究所ゲノム医科学研究センター チームリーダー
研究協力者 広田朝光 理化学研究所ゲノム医科学研究センター リサーチアソシエイト

研究要旨：

本研究は遺伝子多型解析を用いてアスピリン喘息と NSAID s 蕁麻疹/血管浮腫関連遺伝子群を同定し、病態の科学的な解明を通してより良い予防法、治療法を確立することを目的とする。今回、我々は成人気管支喘息 1500 症例を用いた GWAS のサブ解析として、アスピリン喘息の有無についての検討を行なった。1 次解析（GWAS）において P value<0.0001 を満たす 72SNPs を同定した。最も強い関連を示した SNP は Protein arginine N-methyltransferase 6 (PRMT6) 遺伝子上に存在していた。現在、独立に収集されたアスピリン喘息 91 例と非アスピリン喘息 1109 例について 2 次解析を行っている。

A. 研究目的

アスピリン喘息は NSAID の投与に起因する全身性の急性アレルギー症状の一つである。遺伝子多型の情報基盤の整備や高速大量タイピング法の確立など近年のゲノム解析技術の進歩は目覚ましく、ゲノムワイド関連解析（GWAS; Genome-wide association study）により様々な疾患において遺伝要因の解明が急速に進んでいる。我々は成人気管支喘息 1500 症例を用いた GWAS を行なっているが、そのサブ解析として、アスピリン喘息の有無についての検討を行なった。本研究では、アスピリン喘息とアスピリン過敏のない喘息の症例を用いて、ゲノムワイド関連解析を行ない、アスピリン喘息の遺伝要因の探索を試みた。

B. 研究方法

アスピリン喘息症例は少なくとも2回以上の非

ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）による喘息発作の既往のある153例を疾患群（AIA+BA）とし、コントロールはNSAIDによる喘息発作の既往のない940例の気管支喘息患者（AIA-BA）、および気管支喘息、アトピー性皮膚炎などアレルギー疾患の既往のない730人（control）をコントロールとした。遺伝子型タイピングは、Illumina HumanHap610K_Quad（=約60万SNPsを解析）を用いて実施した。集団の構造化についての検討（PCA解析）を行い、2例のoutlierを除去し、GWASを行なった。

（倫理面への配慮）

本研究は三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行い、当該実施機関の倫理委員会の承認を受けたうえで研究を行っている。

C. 研究結果

Cochrane-Armitage trend testを行い、P value<0.0001のSNP、72個を抽出した。このSNPsは互いに連鎖不平衡にあるものもあり、52個の遺伝子上に存在していた。この1次解析 (GWAS) において最も強い関連を示したSNPはProtein arginine N-methyltransferase 6 (PRMT6) 遺伝子上にある rs9887893 であった (P=2.53x10⁻⁸)。これらの52遺伝子中にはウイルス感染防御に関連する2', 5' oligoadenylate synthase familyのOAS3やcAMP応答エレメントに結合するタンパクCyclic AMP-responsive element-binding protein 5CREB5などが含まれていた。

現在、独立に収集されたアスピリン喘息91例と非アスピリン喘息1109例について2次解析を行なっている。

D. 考察

さらにアスピリン喘息の症例数を増やし、検討していく必要がある。また、同じアジア人の独立に収集された他集団での検証も必要と思われるが、韓国においてアスピリン喘息症例が多数収集されており、それらを用いて関連解析 (replication study) を行なっていく。

E. 結論

GWASを用いてアスピリン喘息の関連解析を行なった。1次解析は終了し、現在、日本人の第2集団において2次解析が進行中であるが、解析対象人数が少なく (AIA 91例)、さらなる症例収集は必須である。今後、は他の人種 (アジ

ア人、韓国を予定) においてもAIA喘息集団による関連の検証を進めていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sakashita M, Hirota T, Harada M, Nakamichia R, Tsunoda T, Osawa Y, Kojima A, Okamoto M, Suzuki D, Kubo S, Imoto Y, Nakamura Y, Tamari M, Fujieda S. Prevalence of Allergic Rhinitis and Sensitization to Common Aeroallergens in a Japanese Population *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;151(3):255-261

2) Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Suzuki Y, Shimojo N, Kohno Y, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Nakamura Y, Tamari M. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Oct 124(4):779-85.

3) Harada M, Obara K, Hirota T, Yoshimoto T, Hitomi Y, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Fukutomi Y, Nakanishi K, Nakamura Y,

- Tamari M. A functional polymorphism in IL-18 is associated with severity of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Dec 1;180(11):1048-55.
- 4) Isada A, Konno S, Hizawa N, Tamari M, Hirota T, Harada M, Maeda Y, Hattori T, Takahashi A, Nishimura M. A functional polymorphism (-603A --> G) in the tissue factor gene promoter is associated with adult-onset asthma. *J Hum Genet.* 2010 Mar;55(3):167-74..
- 5) Imoto Y, Enomoto H, Fujieda S, Okamoto M, Sakashita M, Susuki D, Okada M, Hirota T, Tamari M, Ebe K, Arinami T, Noguchi E. S2554X mutation in the filaggrin gene is associated with allergen sensitization in the Japanese population. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2):498-500.
- 6) Undarmaa S, Mashimo Y, Hattori S, Shimojo N, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Kohno Y, Okamoto Y, Hirota T, Tamari M, Hata A, Suzuki Y. Replication of genetic association studies in asthma and related phenotypes. *J Hum Genet.* 2010 Jun;55(6):342-9.
- 7) Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, Miyagawa T, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Suzuki Y, Yoshihara S, Adachi M, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakajima T, Mathias RA, Rafaels N, Barnes KC, Himes BE, Duan QL, Tantisira KG, Weiss ST, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. TSLP promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010 in press.
- 日本語総説
- 8) 原田通成、広田朝光、人見祐基、玉利真由美: 遺伝子多型とアレルギー疾患 アレルギーの臨床 30:164-167, 2010
- 9) 玉利 真由美、広田朝光: 基礎医学とのダイアログ、SNP解析を用いた稀少疾患の解明 THE LUNG perspectives 18:164-168, 2010
- 10) 玉利 真由美、広田朝光: Topic/Science、慢性好酸球性肺炎の病態研究の現況 ヒューマンサイエンス誌 31:18-21, 2010
- 11) 玉利 真由美、広田朝光: 呼吸器疾患感受性-遺伝的背景- 気管支喘息、日本胸部臨床 69:687-694, 2010
- 12) 広田朝光、富田かおり、玉利 真由美: 特集:アレルギー疾患に対するオーダーメイド医療、I. アレルギー疾患の遺伝子と遺伝学、アレルギー・免疫 17:1652-1660, 2010
- 13) 玉利 真由美、富田かおり、広田 朝光 III. 診断の進歩、ゲノムワイド関連解析と呼吸器多因子疾患、Annual Review 呼吸器 2011 140-146
- 14) 広田 朝光、富田かおり、玉利 真由美: 特集:小児アレルギー疾患の治療・管理の新しい

展開、I. 基礎研究の進歩 2. アレルギー疾患と遺伝子多型、小児科臨床 第63:2409-2415, 2010

2. 学会発表

1) 玉利真由美、広田朝光：特別講演 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析。愛媛県ENT臨床セミナー 2010年1月松山全日空ホテル

2) 玉利真由美、広田朝光：特別講演 遺伝子解析を用いた気管支喘息およびCOPDの病態の解明。第42回北陸呼吸器シンポジウム (FITs) 2010年2月 金沢都ホテル

3) 玉利真由美、広田朝光：ランチョンセミナーI アレルギー疾患と遺伝子 遺伝子多型と機能解析。第28回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2010年2月 福井AOSSA

4) 玉利真由美、広田朝光：アレルギー疾患の病態解析 遺伝子解析を中心に。第1回 新都心呼吸器セミナー 2010年4月 新宿ハイアットリージェンシー

5) 玉利真由美、広田朝光：アレルギー疾患の環境と遺伝のトピックス。第62回 関西耳鼻咽喉科アレルギー研究会 2010年4月 大阪薬業年金会館

6) 玉利真由美、広田朝光：シンポジウム「アレルギー疾患のオーダーメイド治療」研究者からの発信。第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 2010年5月 国立京都国際会館

7) 玉利真由美、広田朝光、富田かおり：ランチョンセミナー 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の病態解析。第20回 日本耳科学会総会 学術講演会 2010年10月 松山ひめぎんホール

8) 竹内和秀、真下陽一、服部聡、下條直樹、富坂美奈子、有馬孝恭、森田慶紀、広田朝光、佐藤一樹、鈴木修一、西牟田敏之、渡辺博子、星岡明、山出晶子、渡邊美砂、土居悟、宮武明彦、玉利真由美、羽田明、鈴木洋一：一般演題（口演）4 関連解析・多因子遺伝1（小児疾患）・「小児期発症喘息患者の重症度と呼吸機能に関連する遺伝子多型」。日本人類遺伝学会第55回大会 2010年10月 大宮ソニックシティー

9) 広田朝光、玉利真由美、佐伯秀久、常深祐一郎、中村祐輔、鎌谷直之：一般演題（口演）4 関連解析・多因子遺伝1（小児疾患）。・「CCL22遺伝子多型とアトピー性皮膚炎の関連解析」。日本人類遺伝学会第55回大会 2010年10月 大宮ソニックシティー

10) 玉利真由美、広田朝光、富田かおり：（1）シンポジウム11 食物アレルギーをめぐる新たな進展 ・「食物アレルギーの遺伝子多型解析」第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

11) 竹内和秀、真下陽一、服部聡、下條直樹、富坂美奈子、有馬孝恭、森田慶紀、広田朝光、佐藤一樹、鈴木修一、西牟田敏之、渡辺博子、星岡明、山出晶子、渡邊美砂、土居悟、宮武明彦、玉利真由美、羽田明、鈴木洋一：（2）ミニワークショップMW3 サイトカイン・ケモカイン

・MW3-5「小児期発症喘息患者の重症度と呼吸機能に関連する遺伝子多型. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

12) 広田朝光、佐伯秀久、玉利真由美: (3) ミニワークショップMW6 アトピー性皮膚炎 update ・MW6-3「CCL22遺伝子多型とアトピー性皮膚炎の関連解析」. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

13) 中村豊、長島広相、佐藤温子、佐々木信人、似内郊雄、中舘俊英、小林仁、宮本孝行、菅野祐幸、澤井高志、出原賢治、玉利真由美、広田朝光、井上洋西、山内広平: (4) 一般演題 「気管支喘息患者のIL-13遺伝子多型と気道リモデリング関連分子」. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

14) 坂下雅文、広田朝光、冨田かおり、扇和弘、伊藤有未、岡本昌之、大澤陽子、山田武千代、玉利真由美、藤枝重治: (5) 一般演題 「小児気管支喘息関連領域17q21のSNPsとアレルギー性鼻炎との関連解析. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

15) 増子裕典、金子美子、飯島弘晃、内藤隆志、坂本透、広田朝光、玉利真由美、檜澤伸之: (6) 一般演題 「健常成人の呼吸機能におけるTSLP遺伝子多型の検討. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

16) 飯島弘晃、増子裕典、金子美子、坂本透、内藤隆志、広田朝光、玉利真由美、檜澤伸之: (7) 一般演題 「血清総IgE値, 吸入抗原特異的IgE抗体(MAST)を用いた感作パターンの解析. 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010年11月 東京国際フォーラム

17) 玉利真由美、広田朝光、冨田かおり: シンポジウム3 皮膚アレルギー学の未来 アレルギー疾患の遺伝子多型解析の現況. 第40回日本皮膚アレルギー・接触性皮膚炎学会総会・学術大会 2010年12月 広島国際会議場 2010/12/11

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

玉利真由美、中村祐輔、人見祐基、広田朝光
NLRP3遺伝子の多型に基づくアレルギー疾患
劇症化の検査方法 2009-173252
(平成21年7月24日出願)

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等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

NSAIDs 不耐喘息では抗炎症性メディエーター産生低下が必須病態である

研究代表者 谷口正実 国立病院機構相模原病院 外来部長
(アレルギー科医長・臨床研究センター気管支喘息研究室長併任)
研究協力者 山口裕礼 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院呼吸器内科 医師
三田晴久 国立病院機構相模原病院臨床研究センター分子生物学研究室
研究員
梶原景一 国立病院機構相模原病院臨床研究センター分子生物学研究室
研究員
東 憲孝 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 特別研究員
小野恵美子 ハーバード大学 研究員

研究要旨：

アスピリン喘息の特徴は Cys-LTs の過剰産生病態に有る。しかし我々はアスピリン喘息以外にも Cys-LTs 過剰産生病態が生じること、にもかかわらず喘息病態が生じないことを見出した (Ono et al ERJ 2009, CEA2009, その他投稿中)。そこで Cys-LTs 以外にも重要な病態がアスピリン喘息にも隠されている可能性を想定し、今回の検討を行った。その結果、AIA においては 炎症メディエーター (LT) と抗炎症メディエーター (LX/15epi-LX) の imbalance が アスピリン過敏体質に大きく関わっている可能性が示唆された。これらの成績は国際的にも初めてであり、非常に価値が有ると考える。また AIA が重症である機序の本質にせまる今後の研究の一助となる。

A. 研究目的

アスピリン喘息の特徴は Cys-LTs の過剰産生病態に有る。しかし我々はアスピリン喘息以外にも Cys-LTs 過剰産生病態が生じること、にもかかわらず喘息病態が生じないことを見出した (Ono et al ERJ 2009, CEA2009, その他投稿中)。そこで Cys-LTs 以外にも重要な病態がアスピリン喘息にも隠されている可能性を想定し、今回の検討を行った。

アラキドン酸カスケード内で産生される脂質メディエーターの 1 つ Lipoxin / 15-epi-Lipoxin (LX/15-epi-LX) は、1) 炎症細胞の局所への浸潤を抑制する、2) LT 受容体に対して拮抗作用を示す、ことから、抗炎症性脂質メディエーターとして注目されつつある。さらに、近年、生体内における LX

産生能が低いことが重症喘息と密接にかかわることが、喀痰・気管支肺胞洗浄液を用いた検討により報告されている。初年度、喘息型 NSAIDs 不耐症 (いわゆるアスピリン喘息 (以下 AIA) 群は、有意な LX 合成能の低下が示唆された。今回、さらに症例を増やし、検討を行った。

B. 研究方法

1) 国立病院機構 相模原病院アレルギー科受診患者のうち、アスピリン負荷試験にて陽性であった AIA15 名 (12 例、重症持続型) を対象とした。対照群として 非 AIA (ATA) 患者 16 名 (うち重症持続型は 8 名) Healthy control (HC) 群 10 名も追加検討した。

2) サンプルは 午前中に採取した随時尿とし、すべて HPLC による精製・抽出後に測定した。

測定項目	マーカーの意義	Methods
LTE4	CysLTs の主要な代謝産物	Empore C18 >HPLC > EIA (Gayman chemical)
LX	腎臓由来	Empore C18 >HPLC > ELIA (NeogenI)

(倫理面への配慮)

- ・ 倫理委員会の審査了解を得るのはもちろん、十分な倫理的配慮と個人情報の保護に努める。
- ・ 患者へは十分な説明をした上で、文書同意を得る。

C. 研究結果

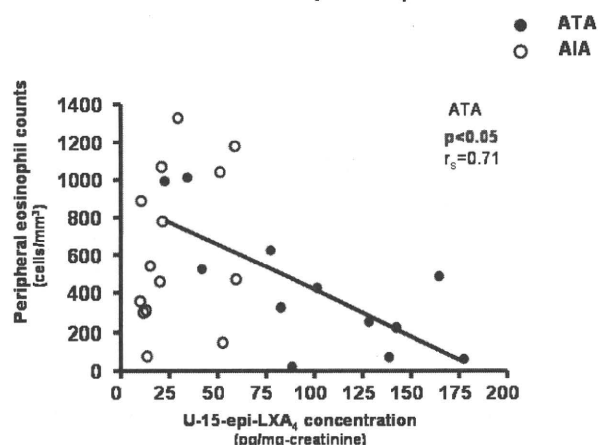
1) 尿中 LX 濃度は尿中 15-epi-LXA4 と正の相関が見られるが、腎臓での 15-PGDH の代謝を受け有意に低値で 15-epi-LX の方が、感度の面で尿のバイオマーカーとして有用である。

2) 尿中 15-epi-LX 濃度は、末梢血好酸球数と有意に負の相関を示した ($p=0.03$, $r_s = 0.45$)

3) 尿中 15-epi-LX 濃度は、AIA 群は非 AIA 群と比較して有意に低値 (median, 21.5 pg/mg-cre vs 95.3 pg/mg-cre, $p<0.05$), LTE4/15epi-LX 比は有意に高値であった (14.5 vs 1.9, $p<0.01$)。

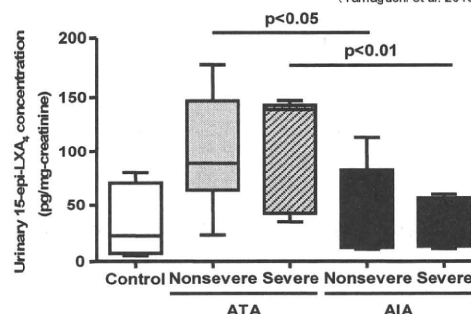
4) 重症持続型の 2 群比較においても尿中 15-epi-LX 濃度は AIA 群で有意に低値であった。(26.7 pg/mg-cre vs. 100.7pg/mg-cre, $p<0.05$)

【末梢血好酸球数と尿中15-epi-LXA₄濃度の相関】



AERD patients show a significant decrease in 15-epi-LXA4 concentration in urine in comparison with ATA patients.

(Yamaguchi et al. 2010 unpublished data)



D. 考察

AIA においては 炎症メディエーター (LT) と抗炎症メディエーター (LX/15epi-LX) の imbalance が アスピリン過敏体質に大きく関わっている可能性が示唆された。LX/15epi-LX は従来報告のとおり、気管支喘息の好酸球性炎症に対して抗炎症作用を示す可能性が本研究でも示された。また本症例は高用量の吸入ステロイド±全身性ステロイドを使用しながらも難治性の喘息患者群であり、ステロイド抵抗性喘息の病態の1つの側面を表している可能性がある。(投稿中)

E. 結論

アスピリン喘息では LXs が低下していることが初めて証明できた。今後 LX アナログが アスピリン喘息をはじめとする重症喘息群の治療薬となりうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

「総括研究報告書」

G. 研究発表 1. 論文発表 参照のこと

2. 学会発表

「総括研究報告書」

G. 研究発表 2. 学会発表 参照のこと

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

NSAIDs 過敏喘息における内因性 PGE2 低下に関する研究

研究代表者 谷口正実 国立病院機構相模原病院 外来部長
(アレルギー科医長・臨床研究センター気管支喘息研究室長併任)
研究協力者 東 憲 孝 国立病院機構相模原病院臨床研究センター 特別研究員
三田晴久 国立病院機構相模原病院臨床研究センター分子生物学研究室
研究員
梶原景一 国立病院機構相模原病院臨床研究センター分子生物学研究室
研究員

研究要旨：

喘息型 NSAIDs 不耐症（いわゆるアスピリン喘息（以下 AIA）は COX-1 阻害を有するすべての NSAIDs 投与により、気道収縮反応を誘発する。しかし、意外にも全身の PGE2 低下については明らかでない。我々は、アスピリン喘息のアスピリン負荷前と負荷後の PGE2 と PGF2 の推移を明らかにすることを目的とした。その結果、安定期において、アスピリン喘息では顕著に PGE2 産生が低下していることが判明した（JACI 2010 掲載）。これらの成績は国際的にも初めてであり、非常に価値が有ると考える。また AIA 機序の本質にせまる今後の研究の一助となる。

A. 研究目的

喘息型 NSAIDs 不耐症（いわゆるアスピリン喘息（以下 AIA）は COX-1 阻害を有するすべての NSAIDs 投与により、気道収縮反応を誘発する。しかし、意外にも全身の PGE2 低下については明らかでない。我々は、アスピリン喘息のアスピリン負荷前と負荷後の PGE2 と PGF2 の推移を明らかにすることを目的とした。

2) 負荷試験前後の尿を用いて、すべて HPLC による精製・抽出後 PGE2, PGF2・・・ent-PGF2・について EIA にて測定した。

（倫理面への配慮）

・倫理委員会の審査了解を得るのはもちろん、十分な倫理的配慮と個人情報の保護に努める。
・患者へは十分な説明をした上で、文書同意を得る。

B. 研究方法

1) 国立病院機構相模原病院アレルギー科受診患者のうち、病歴から AIA が疑われた 18 名を対象に、診断目的で行われたアスピリン負荷試験を行った。負荷試験の結果、AIA10 名と非 AIA8 名であった。アナフィラキシー（AN）発作群 8 名も同様に検討した

C. 研究結果

すでに JACI2010 に掲載されたとおり、アスピリン喘息では ATA やアナフィラキシー患者の案的期の状態より、有意に PGE2 産生が低下していた。