

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790703  
 研究課題名（和文） 気管支喘息におけるロイコトリエン受容体拮抗薬の効果と遺伝子多型  
 研究課題名（英文） Genetic Influences on Response to  
 Leukotriene Receptor Antagonist(LTRA) in Asthma  
 研究代表者  
 広田 朝光(HIROTA TOMOMITSU)  
 独立行政法人理化学研究所・呼吸器疾患研究チーム・リサーチアソシエイト  
 研究者番号：50435674

## 研究成果の概要：

気管支喘息におけるロイコトリエン受容体拮抗薬(LTRA)の効果と遺伝子多型の関連について検討を行った。システニルロイコトリエン産生経路に関与する遺伝子についてスクリーニングを行った結果、LTC4S 遺伝子において LTRA 投与後の呼吸機能の改善率と有意な相関を示す SNP を遺伝子上流の領域に見出した。その遺伝子多型がどのように呼吸機能の改善率に関与しているかを解明するために機能的解析を行った。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	390,000	2,990,000

研究分野：生物系医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 膠原病・アレルギー内科学

キーワード：気管支喘息, ロイコトリエン受容体拮抗薬, 遺伝子多型, 個人差, 多様性

## 1. 研究開始当初の背景

気管支喘息の治療薬の1つであるロイコトリエン受容体拮抗薬はその多彩な抗喘息作用と安全性と経口薬であるなどの優れた特性を持ちながら効果のある患者の割合が低く、薬価が高いために費用対効果が劣るとされている。

## 2. 研究の目的

ロイコトリエン受容体拮抗薬に対して遺伝子多型を用いた薬理遺伝学的解析を行い、薬剤が有効である可能性の高い患者群の予

測に必要な遺伝子多型の情報を可能な限り数多く収集することを目的とした。複数の遺伝子多型の情報によって、より正確な薬剤の有効群の予測を行い、その群に積極的に投薬することでこの薬剤の優れた特性を効率よく活用することが可能となれば、基礎医学的のみならず、臨床医学的にもその意義は非常に大きい。

## 3. 研究の方法

(1)連鎖不平衡地図の作成及び代表的遺伝子

## 多型の選出

国際 HapMap の Data base より日本人の遺伝子多型の情報について、Haploview (Bioinformatics 2005 21:263)を用いて連鎖不平衡地図を作成し、Genotyping すべき代表的遺伝子多型を選出する。

### (2) Genotyping と相関解析

既収集の 172 検体に関して Genotyping を行う。TaqMan PCR法による Genotyping を第一選択とし、Primer&Probe setを設計できない場合は、PCR-RFLP法やPCR-Direct sequence 法などの手法を用いる。Genotype と FEV<sub>1</sub>改善率について相関解析を行い、薬剤の効果に与える遺伝子多型を探索する。

### (3) 詳細な遺伝子多型の抽出

Genotype と FEV<sub>1</sub>改善率について関連の得られた遺伝子多型を含む遺伝子に関して、詳細な遺伝子多型の抽出を行う。日本人 24 人のゲノムDNAを用いてシーケンシングを行い Data base上に登録されていない日本人に存在する遺伝子多型の情報を収集し、機能解析を行う遺伝子多型を絞り込む。

### (4) 遺伝子多型の機能解析

ロイコトリエン受容体拮抗薬 (LTRA) の呼吸機能の改善率と相関がえられた遺伝子多型に対して、その遺伝子多型を含む遺伝子の発現情報や、アレル間に遺伝子発現や転写因子の結合に関して差があるかを検討する。(Real time PCR, Luciferase assay, EMSA 等)

## 4. 研究成果

### (1) 候補遺伝子のスクリーニング

候補遺伝子としてシステニルロイコトリエン産生経路に関与する7遺伝子 (LTA4H, LTB4R1, LTC4S, ALOX5, ALOX5AP, GGTLA1, DOE01) を選び、これらに関してデータベース上の既知の29SNPについて Genotyping を行った。その結果、LTC4SにおいてLTRA投与後の呼吸機能の改善率と有意な相関を示すSNPを遺伝子上流の領域に見出した。

### (2) LTC4S 遺伝子からの遺伝子多型の抽出

有意な相関が認められたLTC4Sに関して、既知以外の遺伝子多型の有無を明らかにするため、24人の気管支喘息患者のゲノムDNAを用いて遺伝子多型の抽出を行った。その結果、11の遺伝子多型(新規の5SNPを含む)を見出した。(表1)

### (3) 連鎖不平衡地図の作製及び代表的遺伝子多型 (TagSNP) の選出

検出した11の遺伝子多型に関してアレル頻度を考慮して連鎖不平衡地図を作製し、 $r^2=0.8$ を閾値として3個のTagSNPを選出した。候補遺伝子のスクリーニングにて有

意差を認めたSNPは完全連鎖不平衡のSNPを5個(遺伝子上流2個, Intron2個, 遺伝子下流1個)持つ事が判明した。

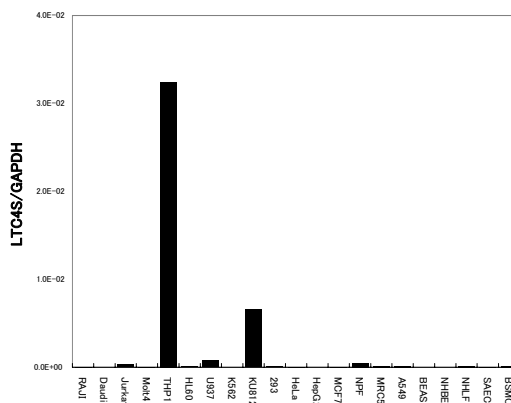
表 1. 日本人におけるLTC4S遺伝子の多型とその頻度

	Position	Location	Minor allele frequency (%)	NCBI dbSNP
1	-3302 C/G	5'-flanking region	33	rs10054477
2	-2721 C/T	5'-flanking region	17	-
3	-2525 G/A	5'-flanking region	33	rs6871140
4	-2240 G/A	5'-flanking region	17	-
5	-1072 G/A	5'-flanking region	17	rs3776944
6	-444 A/C	5'-flanking region	17	rs730012
7	10 G/A	exon1 (Glu4Lys)	4	-
8	1296 C/T	intron1	17	-
9	2157 T/C	intron4	17	rs2306795
10	2564 A/G	3'-flanking region	17	rs3756614
11	2765 A/T	3'-flanking region	2	-

### (4) LTC4S の発現プロファイル

浮遊細胞、接着細胞を含めた20の細胞株にてLTC4Sの発現情報を検討したところ、THP-1(単球系), KU812(好塩基球系)での特異的な高発現が認められた。(図1)

図1 種々の細胞株におけるLTC4S遺伝子G



### (5) LTC4S の遺伝子多型についての機能的解析

呼吸機能の改善率と相関をもつLTC4S 遺伝子の約 2kbp 上流に存在する 2SNP に対し、各アレルより遺伝子発現調節に差があるかを確認するために Luciferase assay を行った。

LTC4S 遺伝子を高発現している KU812(好塩基球)において、LTC4S の遺伝子上流約 2kbp と Luciferase 遺伝子を含むベクターを transfection する条件を Nucleofection (amaxa)にて設定した。さらに KU812 は TGFβ1 刺激にて LTC4S の遺伝子発現が上昇すること、また Luciferase assay においても TGFβ1 刺激により転写活性が上昇することを見出した。

(6)その他の遺伝子に関する詳細な遺伝子多型の抽出

システニルロイコトリエン産生経路に関与する遺伝子のうち LTA4H, LTB4R1, LTB4R2 に関して、12 人の気管支喘息患者のゲノム DNA を用いて Direct Sequence を用いて遺伝子多型の抽出を行い、Haploview を用いて連鎖不平衡マップの作製を行った。これらの遺伝子多型の中には、前年度に genotype を行っているものも含まれているが、これらとは連鎖の弱い、新たな tagSNP も多数含まれていた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

(1) Hatsushika K, Hirota T, Harada M et al (2 番目/15 人) [査読有り]

Transforming growth factor-β(2) polymorphisms are associated with childhood atopic asthma. Clin Exp Allergy 2007; 37(8): 1165-1174.

(2) Harada M, Nakashima K, Hirota T et al (3 番目/20 人) [査読有り]

Functional polymorphism in the suppressor of cytokine signaling 1 gene associated with adult asthma.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2007; 36(4): 491-6

(3) Kamada F, Mashimo Y, Hirota T et al (5 番目/24 人) [査読有り]

The GSTP1 gene is a susceptibility gene for childhood asthma and the GSTM1 gene is a modifier of the GSTP1 gene.

Int Arch Allergy Immunol 2007; 144(4): 275-286

(4) Hirota T, Harada M, Sakashita M et al (1 番目/13 人) [査読有り]

Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population.

J Allergy Clin Immunol. 2008;

121(3):769-70

(5) Harada M, Hirota T, Jodo AI et al (2 番目/16 人) [査読有り]

Functional analysis of the Thymic Stromal Lymphopoietin Variants in Human Bronchial Epithelial Cells.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2009; 40: 368-374

(6) Inoue H, Mashimo Y, Hirota T et al (6 番目/14 人) [査読有り]

Association study of the C3 gene with adult and childhood asthma.

J Hum Genet 2008; 53(8): 728-38.

(7) 広田朝光, 原田通成, 玉利真由美 (1 番目/3 人)

喘息と遺伝学 重症喘息について International Review of Asthma 2007; 9(4): 46-54

(8) 玉利真由美, 広田朝光, 原田通成, (2 番目/3 人)

特集 アレルギー疾患発症の胎内・胎外因子 アレルギー疾患発症における遺伝要因と感染の関与, アレルギー・免疫, 2008; 15(2): 134-140

(9) 坂下雅文, 広田朝光, 原田通成ら (2 番目/4 人)

特集: アレルギー疾患の遺伝 アレルギー性鼻炎, アレルギー・免疫, 2008; 15(7): 912-920

(10) 広田朝光, 原田通成, 玉利真由美ら (1 番目/5 人)

解説・基礎 日本人における気管支喘息関連遺伝子, 呼吸 (in press)

[学会発表] (計 5 件)

(1) Tomomitsu Hirota: Association between genetic variation in *Toll-like receptor 1 (TLR1)* gene and adult bronchial asthma.

The American Society of Human Genetics: 57th Annual Meeting, 2007 年 10 月 25 日 San Diego, California, USA

(2) 広田朝光:ORMDL3 の発現を調節する遺伝子多型と日本人小児気管支喘息の相関解析, 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2008 年 6 月 14 日, 横浜

(3) 広田朝光:ORMDL3 の発現を調節する遺伝子多型と日本人小児気管支喘息の相関解析, 第 53 回日本人類遺伝学会, 2008 年 9 月 30 日, 横浜

(4) 広田朝光:遺伝子多型の解析方法について, 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008 年 11 月 28 日, 東京

(5) Tomomitsu Hirota: Genetic association studies of *IL-13* gene in adult asthma and effects of IL-13 on the synthesis of chemokines by bronchial epithelial cells  
Keystone Symposia, Allergy and Asthma,  
2009年1月22日 Keystone, Colorado, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

広田 朝光 (HIROTA TOMOMITSU)  
独立行政法人理化学研究所・呼吸器疾患研究チーム・リサーチアソシエイト  
研究者番号：50435674