

博士(医学) 大江真司

学位論文題名

Beta<sub>2</sub> adrenergic receptor gene restriction fragment length polymorphism and bronchial asthma

(β<sub>2</sub>アドレナリン受容体遺伝子制限酵素断片長多型と気管支喘息)

学位論文内容の要旨

I 目的

気管支喘息の発症には、遺伝的要因が関与するといわれている。気管支喘息の発症の一つの要因として推定されるβアドレナリン系の機能異常が遺伝的に規程されている可能性を考慮し、気管支喘息患者およびその家族を対象とし、近年報告された制限酵素Ban-Iによるβ<sub>2</sub>アドレナリン受容体遺伝子制限酵素断片長多型(Beta<sub>2</sub> adrenergic receptor gene restriction fragment length polymorphism, β<sub>2</sub>-ADR Ban-I RFLP)を検出し、アトピー素因・メサコリンやβ<sub>2</sub>刺激薬による気道反応性・気管支喘息の頻度などとの関連を検討した。

II 対象

4家系58名の気管支喘息患を対象とした。まず対象者にアメリカ胸部疾患学会質問表に則り呼吸器疾患・アレルギー性疾患に関する問診を行った。続いて以下の各種検査を行った。  
1)アトピー素因の検索:26種類の主要吸入抗原による皮膚プリックテスト、血清総IgE(RIST法)、16種類の吸入抗原に対する特異的IgE測定(MAST法)を施行し、プリックテスト陽性、血清総IgE>250U/ml、特異的IgE陽性のいずれかを満たす場合にアトピー陽性と定義した。  
2)メサコリンおよびβ<sub>2</sub>刺激剤(サルブタモール)に対する気道反応:アストグラフを用い、呼吸抵抗を持続的にモニターし、まずメサコリンを低濃度から1分ごとに順次濃度を上げながら吸入させ、呼吸抵抗が初期値の2倍に達した時点からサルブタモールを4分間吸入させた。メサコリンの気道反応性の指標として呼吸コンダクタンス(Grs:呼吸抵抗の逆数)を35%低下させる累積メサコリン濃度PD<sub>35</sub>を、サルブタモールに対する気道反応性の指標としてサルブタモール吸入後のGrs上昇線の傾き(β-SGr:ΔGrs/Δt)とGrs改善の絶対量値(abs-β-Grs)を用いた。健常人での平均値-2SD以下を異常とし、メサコリン気道反応性ではPD<sub>35</sub><1.39Uを気道過敏性陽性、β-SGr<0.02、abs-β-Grs<0.035をサルブタモール気道反応性低下とした。3)DNAの抽出とRFLPの検出:末梢血の白血球よりDNAを抽出、制限酵素Ban-Iで消化し、アガロースゲルで電気泳動後、ザザン法によりナイロン膜に転写し、放射性同位元素でラベルされたβ<sub>2</sub>-ADRプローブでハイブリダイズした。4)末梢血単核球cyclic AMP(c-AMP)反応:末梢血より比重勾配法により分離した単核球にβ<sub>2</sub>刺激剤(イソプロテレノール)を10<sup>-8</sup>から10<sup>-5</sup>の濃度で加え、產生されるc-AMP量をRIA法により測定した。c-AMPの検討は遺伝子型が判明している健常者で行った。データの解析:遺伝型の解析はDavieのシングルス法を、連鎖解析はLIPEDプログラムによるロッドスコア法を用いた。二つの遺伝子型別の気道反応およびc-AMP反応の検討にはStudentのunpaired t-testを、喘息や喘鳴の頻度の比較にはχ<sup>2</sup>検定を用い、p<0.05を有意とした。

### III 結 果

4家系はそれぞれ17, 12, 13, 16名より構成されていた。アトピーと診断されたのはそれぞれ12(70.6%), 8(75%), 8(61.5%), 14名(87.5%)、気道過敏性亢進者はそれぞれ6(35.3%), 7(58.3%), 4(30.8%), 7名(43.8%)であった。4家系合わせて12名(20.7%)の喘息患者が見いだされた。気道過敏性亢進者の遺伝形式は、常染色体優性遺伝に矛盾しない結果が得られた。アトピーと非アトピーでは気道過敏性亢進の有無に関して有意差はなかった。

$\beta_2$ -ADR Ban-I RFLPとして2つの型のallele2.1kb, 2.3kbが確認された(2.3kbのホモ型、2.3kb, 2.1kbのヘテロ型、2.1kbのホモ型)。 $\beta_2$ -ADR Ban-I RFLPと気道過敏性のロッドスコアは $\theta = 0.1$ で-3以下となり、連鎖は否定された。 $\beta_2$ -ADR Ban-I RFLPと $\beta$ 刺激剤に対する気道反応性のロッドスコアは、 $\theta = 0.1$ で0.4と正であったが、有意な連鎖とは言えなかった。allele2.3 kbに着目した気道過敏性の指標であるlog(PD<sub>35</sub>)の関係では、allele2.3 kbの有無とlog(PD<sub>35</sub>)には有意差はなかった。allele2.3 kbに着目した気道反応性の指標であるabs- $\beta$ -Grs,  $\beta$ -SGrs,  $\beta$ -SGrs/Grs. min. の関係では、allele 2.3 kb(-)群では(+)群に比べabs- $\beta$ -Grs,  $\beta$ -SGrs,  $\beta$ -SGrs/Grs. min. は有意に小さく、 $\beta$ 刺激薬によるGrsの改善が悪かった。喘息患者の頻度をallele2.3 kbに着目して相関をみると、allele2.3 kb(-)群では(+)群に比べ、有意に喘息の頻度が多かった( $\chi^2 = 6.89, p < 0.01$ )。喘鳴の症状の有無に関しても同様であった( $\chi^2 = 6.82, p < 0.01$ )。

末梢血単核球のイソプロテレノールに対する反応はallele2.3 kb(-)群では(+)群に比べ $10^{-5}$ の濃度においてc-AMPの産生量が低い傾向を呈した。

### IV 考 案

気管支喘息の発症には遺伝的素因があることは以前より知られている。気管支喘息の特徴である気道過敏性も遺伝的に規定されていることが指摘されている。これまで、気管支喘息患者の $\beta$ アドレナリン受容体機能低下に関して多数の研究があるが、この機能低下が遺伝的に規定されているか否かは不明であった。近年ヒト $\beta_2$ -ADR遺伝子DNAがクローニングされ、第5染色体長腕(5q31-32)に存在することが明らかになった。Lentesらは、白人について $\beta_2$ 受容体遺伝子の多型を報告した。本研究では、日本人においても2.1kb, 2.3kbの $\beta_2$ -ADR遺伝子Ban-I RFLPが存在することを確認した。さらに、気管支喘息患者家族での解析では、このRFLPとメサコリン気道反応性との関連は否定されたが、 $\beta_2$ 刺激薬による気道反応性との関連では、ロッドスコアが0.4と正の値をとり、否定も肯定もできない結果であった。しかしallele2.3 kb(-)群ではallele2.3 kb(+)群に比べ $\beta_2$ 刺激薬による気道反応性が有意に低下していた。また気管支喘息患者の頻度や喘鳴の頻度もallele2.3 kb(-)群で有意に多かった。さらに、allele2.3 kb(-)群では、末梢血単核球の $\beta$ 刺激薬に対するc-AMP反応が低下傾向を認めた。これらの結果から、Ban-I RFLPで検出される $\beta_2$ -ADR遺伝子多型が $\beta_2$ アドレナリン受容体機能や気管支喘息の発症と関連する可能性が示唆された。本研究では、Ban-I RFLPの原因となるDNAの変異が $\beta_2$ -ADR遺伝子のどの部位に存在するのか、その変異がどのような機序で気道反応や喘息の発症と関連しているかは明らかでない。また今回の検討は気管支喘息家系での検討であることから、 $\beta_2$ -ADR Ban-I RFLPと気管支喘息との関連を確定するには、変異部位の決定や血縁関係のない喘息患者での検討が必要である。

### V 結 論

- (1)  $\beta_2$ -ADR遺伝子Ban-I RFLPが日本人において存在することを確認した。
- (2) 多型に関して、allele2.3 kb(-)群ではallele2.3 kb(+)群に比べ $\beta_2$ 刺激薬による気道反応性が低下しており、気管支喘息患者の頻度や喘鳴の頻度も多く、Ban-I RFLPで検出される $\beta_2$ -ADR遺伝子多型が $\beta_2$ アドレナリン受容体機能や気管支喘息の発症と関連する可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主査教授 葛巻 遼  
副査教授 吉木 敬  
副査教授 川上 義和

## 学位論文題名

Beta<sub>2</sub> adrenergic receptor gene restriction fragment length polymorphism and bronchial asthma

(β<sub>2</sub>アドレナリン受容体遺伝子制限酵素断片長多型と気管支喘息)

気管支喘息の発症要因としてβアドレナリン系の機能異常があるとする“β adrenergic theory”が提唱されて以来、多くの検討により喘息患者ではβアドレナリン刺激薬に対する反応が低下していることが明らかにされている。近年β<sub>2</sub>アドレナリン受容体遺伝子がクローニングされ、その構造が明らかにされた。また制限酵素Ban-Iによるβ<sub>2</sub>アドレナリン受容体遺伝子制限酵素断片長多型(β<sub>2</sub> adrenergic receptor gene restriction fragment length polymorphism: β<sub>2</sub>-ADR遺伝子Ban-I RFLP)が報告された。本研究では喘息患者およびその家族を対象とし、β<sub>2</sub>-ADR遺伝子Ban-I RFLPを検出し、アトピー素因・メサコリンやβ<sub>2</sub>刺激薬による気道反応性・喘息の頻度などとの関連を検討した。

4家系58名の喘息患者家族を対象とし、皮膚アリックテスト、血清総IgE測定(RIST法)、特異的IgE測定(MAST法)を施行し、アトピーの有無を検索した。アストグラフを用い、メサコリン気道反応性(気道過敏性)およびサルブタモール気道反応性を検出した。末梢血白血球よりDNAを抽出、ザサン法によりBan-I RFLPを検出した。末梢血より分離した単核球にβ刺激剤(イソプロテレノール)を加え、産生されるcyclic AMP(cAMP)量をRIA法により測定した。

β<sub>2</sub>-ADR遺伝子Ban-I RFLPとしてallele 2.1kbと2.3kbが検出された。アトピー陽性およびメサコリン気道過敏性亢進の遺伝形式は常染色体優性遺伝に矛盾しない結果が得られた。RFLPとサルブタモール気道反応性のロッドスコアはθ=0で0.4と正であったが、有意な連鎖とは言えなかった。2.3kb陰性群では陽性群に比べサルブタモール気道反応性は悪かった。喘息患者の頻度および喘鳴の頻度も2.3kb陰性群では陽性群に比べ有意に多かった。末梢血単核球のイソプロテレノールに対する反応は2.3kb陰性群では陽性群に比べc-AMPの産生量が低い傾向を呈した。RFLPとメサコリン気道過敏性には関連はなかった。以上の結果よりβ<sub>2</sub>-ADR遺伝子Ban-I RFLPがβ<sub>2</sub>アドレナリン受容体機能や喘息の病態と関連する可能性が示唆された。

公開発表には約20名が参加した。審査に当たっては、主査葛巻より1. β<sub>2</sub>アドレナリン受容体遺伝子の多型の選別について、Ban-I多型を選択した理由、繰り返し配列について多量の検体を扱えるPCR法で検索できる多型がないかどうか。2. 実験群について、allele 2.3kb(+)群のホモとヘテロ間での、受容体機能や気管支喘息発症に差がなかったか、また末梢血核球cAMPの測定を気管支喘息の家系で行わなかった理由。3. 2.3kb(-)群でのβ<sub>2</sub>アドレナリン受容体遺伝子の機能不全が受容体の数の減少によるか発現低下によるか、また

ステロイドに対する反応性との関係について、4. 喘息の発症機構について、アゴニスト側の異常はないか、5. 検査結果について、他のグループより追試がなされているかなどに関して質問をおこなった。発表者はこれらの質問に対して適切な回答を行った。また副査吉木教授より、1. Reihnsaus等により報告された $\beta_2$ アドレナリン受容体遺伝子における9ヶ所の多型とBan-I多型との関係、および受容体機能やプロモーターとの関係、2. メサコリンに対する気道過敏性とサルブタモールに対する気道反応性間の相関、3. 単一優性遺伝が関与していることを断定するための条件、とくに検体数の問題について、4.  $\beta_2$ アドレナリン受容体遺伝子以外の因子、とくにアトピーの関与について、5. 喘息発症の動物モデルにおいて発現する遺伝子について、質問があった。発表者はこれらの質問に対しても的確な回答をおこなった。さらに副査川上教授より、1.  $\beta_2$ アドレナリン受容体遺伝子多型が喘息の原因と病態のいずれに関係するかについて、2. サルブタモールに対する気道反応性の低下の一般および夜間喘息発症への影響について、3. allele2.3kb(-)における $\beta_2$ アドレナリン受容体遺伝子機能不全の具体的機構、4.  $\beta_2$ アドレナリン受容体遺伝子機能不全とアトピー陽性の喘息発症への影響、についての質問があった。発表者はこれらいずれの質問に対しても適切な回答をおこなった。本研究は1968年に提唱された" $\beta$  adrenergic theory"を遺伝子レベルで検討し、 $\beta_2$ アドレナリン受容体遺伝子の機能と喘息の病態とが関連することを初めて示した。よって審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。