

学位論文題名

気管支喘息の発症及び治療反応性における 遺伝的背景に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景】

気管支喘息は好酸球を主体とした慢性気道炎症により、可逆性の気道狭窄と気道過敏性が生じる疾患である。過去の検討より、気管支喘息の発症や治療薬の反応性に関して、環境要因、遺伝的要因が関与していることが知られている。

気管支喘息患者の喀痰中ではトロンビンが増加しており、気道内で凝固系が活性化していることが報告されている。トロンビンの増加には組織因子 (Tissue factor: TF) の発現と外因系凝固経路を活性化が重要な役割を果たしており、TF は喘息患者の喀痰でも増加していることから、TF は喘息の発症、病態に関与していることが推測される。TF 遺伝子のプロモーター領域には、いくつかの遺伝子多型が存在し、特に-603 部分に存在する A→G 多型では、G アレルは、血清 TF 濃度の上昇を介し、心血管系疾患発症のリスク因子であることが報告されている。本研究では、TF と喘息発症との関連を検討する目的で、TF 遺伝子多型における患者対照研究を施行した。

また、気管支喘息の治療に用いられる β_2 刺激薬は、この受容体遺伝子をコードする β_2 アドレナリン受容体 (*ADRB2*) 遺伝子の多型性が、治療の反応性に影響を及ぼすことが報告されている。*ADRB2* 遺伝子多型のうち、16 番のアミノ酸におけるグリシン (Gly) からアルギニン (Arg) への多型 (Arg16Gly) に関する検討が最も多く、短期間作動性 β_2 刺激薬 (SABA) や長期間作動性 β_2 刺激薬 (LABA) の連用により、Arg/Arg 型においてピークフローの経時的な増悪が認められることが、欧米人を対象に報告されている。*ADRB2* 遺伝子多型は人種により異なることが知られているが、これまで日本人を対象とした検討の報告はない。今回我々は日本人喘息患者を対象に *ADRB2* 遺伝子多型 (Arg16Gly) と β_2 刺激薬の長期連用による呼吸機能の変化との関連を後ろ向きに検討した。

【目的】

研究 1: 気管支喘息発症における Tissue factor 遺伝子-603A→G 多型の影響

研究 2: *ADRB2* 遺伝子 Arg16Gly 多型が気管支喘息患者の β_2 刺激薬長期連用に与える影響

【対象と方法】

研究 1: 対象は当科通院中の喘息患者 437 人及び健常者 389 人を対象とした検討 (Primary 群) と理化学研究所の協力により健常者 745 人と喘息患者 343 人 (Replicate 群) の両群で患者対照研究を行なった。また、多型のプロモーター活性を解析するためにルシフェラーゼアッセイと、転写に関与する核蛋白同定のためにゲルシフトアッセイを行なった。

研究 2: 対象は当科通院中で 6 ヶ月以上 β_2 刺激薬を連用した喘息患者 (全例吸入ステロイドを定期的に使用中、Arg/Arg 型 86 人、Gly/Gly 型 83 人)。当科初診時および治療経過中の呼吸機能検査を両群で比較した。

【結果】

研究 1: 健常者 389 人及び喘息患者 437 人を対象とした検討 (Primary 群) で、遺伝子型 GG と 21 歳以上の喘息発症 (成人発症喘息) との関連が認められた (OR=2.89, $p=0.023$)。健常者 722 人と喘息患者 932 人 (Replicate 群) を用いた追試でも同様の傾向を認め (OR=1.60, $p=0.064$)、全体の解析では GG 型は成人発症喘息と明らかな関連を認めた ($n=2480$, OR=1.736, $p=0.0117$)。また、ルシフェラーゼアッセイにより G アレルでは A アレルと比較し約 30% の転写活性の亢進 ($p<0.05$) を認めたが、転写に関与する核蛋白の同定はできなかった。

研究 2: 初診時の 1 秒量は Gly/Gly 型でより低値を示した ($p=0.022$)。6 ヶ月以上使用後の 1 秒量は Arg/Arg 型では $\beta 2$ 刺激薬連用群に比べ非連用群で治療による改善の程度が大きかった ($0.13\pm 0.067(L)$ vs. $0.049\pm 0.080(L)$, $p=0.44$)。一方、Gly/Gly 型では非連用群に比べ連用群で 1 秒量の改善が明らかに大きかった ($0.032\pm 0.12(L)$ vs. $0.42\pm 0.11(L)$ 、 $p=0.027$)。

【考察】

研究 1: 本研究により、TF 遺伝子プロモーター領域の -603A→G 多型と成人発症喘息との関連が認められ、GG 型は、成人発症喘息の危険因子であることが示された。さらに G アレルでは A アレルと比較し転写活性が亢進しており、GG 型は TF 遺伝子の発現を介し喘息発症に寄与することが示された。

21 歳以上で発症した成人発症喘息と心血管系疾患との関連を示す疫学研究が存在する。TF 遺伝子 -603G は心筋梗塞や静脈血栓との関連はすでに知られていることから、TF は喘息と心血管系疾患の発症にかかわる共通の遺伝子である可能性が推測された。GG 型では繰り返し外界からの刺激に曝されることにより、気道内で TF の発現が亢進し、凝固反応がより強く引き起こされた結果、成人喘息の発症に寄与する可能性が考えられた。また加齢により凝固能が亢進していくことが知られており、この事も GG 型が成人発症喘息においてのみ危険因子であった理由の一つであると考えられた。以上より TF 遺伝子が成人発症喘息に関与する候補遺伝子と考えられた。

研究 2: 我々の検討により、Gly/Gly 型では $\beta 2$ 刺激薬連用により呼吸機能の改善が認められたのに対し、Arg/Arg 型では $\beta 2$ 刺激薬連用の有無による呼吸機能の改善に差はなく、 $\beta 2$ 刺激薬連用の有用性は明らかではなかった。

Arg16Gly 遺伝子多型と $\beta 2$ 刺激薬連用による呼吸機能の変化については、Arg/Arg 型では Gly/Gly 型と比較し、 $\beta 2$ 刺激薬連用に伴い呼吸機能が低下するという欧米からの報告がある。最近の前向き研究では、この遺伝子多型と $\beta 2$ 刺激薬連用の治療効果には関連はないことが示されているが、興味深いことに、アフリカ系アメリカ人のみを対象とした検討では、Arg/Arg 型は LABA 使用により呼吸機能の改善を認めないことが報告されている。SMART 試験においても、アフリカ系アメリカ人においては、 $\beta 2$ 刺激薬の使用により喘息関連死が多いことも報告されており、 $\beta 2$ 刺激薬の効果には人種差がある可能性がある。実際、日本人における ADRB2 遺伝子多型頻度やハプロタイプ遺伝子型の分布は、アフリカ系アメリカ人により近いことが知られており、日本人における $\beta 2$ 刺激薬連用による影響はアフリカ系アメリカ人と同じ傾向である可能性がある。よって、今後日本人を対象にした大規模な前向き検討を実施することが重要な課題であると考えられた。

【結語】

TF 遺伝子及び ADRB2 遺伝子に存在する遺伝子多型と、気管支喘息の発症および治療反応性との関連を検討した。TF-603A→G 遺伝子多型では、GG 遺伝子型は TF 遺伝子の発現を亢進し、成人発症喘息に関与することが示された。また、ADRB2 遺伝子 Arg16Gly 多型では、Arg/Arg 型で $\beta 2$ 刺激薬連用による呼吸機能の改善を認めなかった。

今後、大規模かつ複数の人種での検討、及び治療反応性については前向きの検討により、TF および ADRB2 遺伝子が喘息の発症、治療反応性との関連がより明らかになることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 有 賀 正
副 査 教 授 筒 井 裕 之

学 位 論 文 題 名

気管支喘息の発症及び治療反応性における 遺伝的背景に関する研究

気管支喘息は好酸球を主体とした慢性気道炎症により、可逆性の気道狭窄と気道過敏性が生じる疾患である。気管支喘息の発症や治療薬の反応性に関して、環境要因、遺伝的要因が複雑に関与していることが知られている。

気管支喘息患者の気道内において、凝固系の活性が亢進している事が報告されている。凝固系の亢進は、炎症の結果のみならず、疾患の病態形成に関与する可能性が報告されている。組織因子(Tissue factor: TF)は、外因系凝固経路の初期因子として重要な役割を果たしており、TFは喘息の発症、病態に影響する可能性が推測される。

また、気管支喘息の治療に使用される β_2 刺激薬の反応性は、遺伝的影響を受けることが報告されている。中でも、 β_2 刺激薬の受容体をコードする β_2 アドレナリン受容体遺伝子(*ADRB2*)に存在する遺伝子多型のうち、16番アミノ酸におけるグリシン(Gly)からアルギニン(Arg)への変化と β_2 刺激薬の効果との関連についてこれまで数多くの検討が報告されている。しかし、日本人を対象とした検討はこれまでなく、今回は日本人喘息患者を対象に*ADRB2*遺伝子多型(Arg16Gly)と β_2 刺激薬の長期連用による呼吸機能の変化との関連を後ろ向きに検討した。

気管支喘息発症におけるTissue factor 遺伝子-603A→G多型の影響については、患者対照研究を行なった。健常者389人及び喘息患者437人を対象(Hokudai群)とした検討で、遺伝子型GGと21歳以上の喘息発症(成人発症喘息)との関連が認められた。健常者722人と喘息患者932人(RIKEN群)を用いた追試においても同様の傾向が確認された。また、ルシフェラーゼアッセイにより、GアレルではAアレルと比較し約30%の転写活性の亢進が認められた。本研究よりTF遺伝子プロモーター領域の-603A→G多型と成人発症喘息との関連が示され、TFは喘息の発症に寄与する要因の一つと考えられた。

また、*ADRB2*多型が気管支喘息患者の β_2 刺激薬長期連用に与える影響については、Arg/Arg遺伝子型群64人とGly/Gly遺伝子型群64人の喘息患者を対象とし、各遺伝子型で6ヶ月以上 β_2 刺激薬を連用した群と発作時のみ β_2 刺激薬を使用した非連用群とで一秒量の変化を比較し検討を行なった。Gly/Gly群では非連用群に比べ連用群で一秒量の改善が明らかであったが、Arg/Arg群では β_2 刺激薬連用群と非連用群とで治療による改善に差を認めなかった。つまり、 β_2 受容体遺伝子多型の違いが β_2 刺激薬連用による呼吸機能の改善に影響を及ぼす可能性が示唆された。人種差により β_2 刺激薬の効果に違いがある事が報告されているが、この影響には*ADRB2*遺伝子多型が関与している可能性も考えられる。今後、 β_2

刺激薬連用による喘息病態への影響について、日本人を対象とした大規模な前向き検討を実施することは重要な課題であると思われた。

今回日本人を対象に行なった検討により、*TF* 遺伝子は成人発症喘息の発症に関連し、また *ADRB2* 遺伝子は $\beta 2$ 刺激薬の治療効果に影響を与えることが示された。

審査にあたり副査の筒井教授より 1)喘息に関連する遺伝子として *TF* に注目した理由とその根拠、2)喘息と全身性の血栓症のとの関連、3) $\beta 2$ 刺激剤に対する治療効果が高い患者と低い患者の存在に関する質問があった。また、有賀教授からは 1)喀痰や気管支肺胞洗浄液における *TF* 濃度に対する遺伝子多型の影響、2)多型以外の *TF* 濃度上昇に関わる因子の有無、3)*ADRB2* 多型が $\beta 2$ 刺激薬長期連用に与える影響のメカニズムの質問があった。最後に主査の西村教授より 1)喘息を対象にした多型研究で成人と若年に発症を分けた検討の有無、2)遺伝子多型研究の方向性や今後の展望についての質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は自験データや過去の文献を引用し、概ね適切に回答した。質疑応答の時間は約 15 分であった。

この論文は、遺伝子多型を用いて気管支喘息の発症や薬剤の効果に影響を及ぼす遺伝的背景を示したものであり、今後のさらなる臨床応用への可能性が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。