

アスピリン喘息の遺伝的背景(遺伝子多型の検索)

研究分担者 玉利真由美 理化学研究所 統合生命医科学研究センター
呼吸器・アレルギー疾患研究チーム チームリーダー
研究協力者 広田朝光 理化学研究所 統合生命医科学研究センター
呼吸器・アレルギー疾患研究チーム 研究員

研究要旨:

アスピリン喘息はしばしば重症喘息および難治再発性の好酸球性副鼻腔炎を合併し、社会生活に影響をおよぼすことからその科学的な病態解明および新たな治療法や予防法の開発が待たれている。今回、我々はゲノムワイド関連解析の手法を用いてアスピリン喘息の発症に関連するゲノム領域の同定を行った。ゲノムワイド水準 ($P < 5 \times 10^{-8}$) を満たす SNP はなかったが、HLA 領域 ($P = 4.8 \times 10^{-6}$)、2q21 ($P = 1.9 \times 10^{-5}$) の2つの領域で強い関連を認めた。空中環境真菌であるアルテルナリアは好酸球性副鼻腔炎への関与が示唆されている。マイクロアレイにより気道上皮細胞において、アルテルナリア刺激により IL-8, CXCL3, EDN1 の発現が 1.9~2.5 倍増加することが明らかとなった。またマイクロアレイによりアスピリン喘息合併鼻ポリープとアスピリン喘息非合併好酸球性副鼻腔炎ポリープ、および非好酸球性副鼻腔炎ポリープとの mRNA の発現量の比較検討を行った。アスピリン喘息合併鼻ポリープで 2 倍以上の mRNA の発現上昇を認める 2,764 個(うち 273 個がケモカイン・サイトカイン関連)の遺伝子群が同定された。

A. 研究目的

アスピリン喘息はしばしば重症喘息および難治再発性の好酸球性副鼻腔炎を合併し、社会生活に影響をおよぼすことからその科学的な病態解明および新たな治療法や予防法の開発が待たれている。一方、アスピリン喘息に合併することが多い好酸球性副鼻腔炎に伴う鼻ポリープは重症喘息の病態を反映する組織として注目されている。本研究はGWAS、およびマイクロアレイの手法を用いて、アスピリン喘息の病態に関連する遺伝子群を同定し、疾患発症の機序を科学的に解明し、新しい治療法の開発へ向けてエビデンスを提示していくことを目的とする。

B. 研究方法

153例のアスピリン喘息症例と3,304例のコントロールについて Illumina HumanHap 610 - Quad ChipによりGWASを行いアスピリ

ン喘息との関連領域について探索を行なった。アスピリン喘息の診断は少なくとも2つの異なる非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)により喘息発作が出現した既往をもつ症例、またはアスピリン負荷試験陽性例とした。Quality controlを行い、433,543個のSNPsについて Cochrane-Armitage trend testにより関連解析を行なった。GWASの結果、 $P < 1 \times 10^{-4}$ を示した75個のTagSNPs ($r^2 \geq 0.8$)を選出し、本研究班で3年間に収集したアスピリン喘息178例、コントロール24,608例を用いて validation studyを行い、メタ解析を行った。マイクロアレイ解析(PrimeView Human Gene Expression Array)を行った。ヒト正常気管支上皮細胞をアルテルナリア(50 μ g/ml)で4時間および10時間刺激し、発現量の比較を行った。また、好酸球性副鼻腔炎のポリープ(アスピリン喘息合併例および非合併例)、非好酸球性鼻ポリープを採取し発現量の比較検討を

行った。cDNAの合成には3'IVT Express kitを用いた。

(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

GWASの結果、 $\lambda_{GC}=1.016$ であり、population stratificationにより偽陽性の結果が得られる確率は低いと考えられた。メタ解析の結果、ゲノムワイド水準 ($P < 5 \times 10^{-8}$) を満たすSNPは認めなかったが、8個のSNPが $P < 1 \times 10^{-4}$ の強さの関連を示した。その内7個はHLA領域内のSNPであり、1個は2q21に存在していた。最も関連が強かったのはHLA領域に存在するSNP (rs2281389, $P=4.8 \times 10^{-6}$) であった。

マイクロアレイにより発現を検討した。気道上皮細胞において、アルテルナリア刺激によりIL8, CXCL3, EDN1の発現が1.9~2.5倍増加することが明らかとなった。アスピリン喘息非合併好酸球性副鼻腔炎ポリープと非好酸球性副鼻腔炎ポリープ間で発現量の差が2倍以内、かつアスピリン喘息合併好酸球性副鼻腔炎のポリープで2倍以上のmRNAの発現上昇を認める2,764個(うち273個がケモカイン・サイトカイン関連)の遺伝子群が同定された。

D. 考察

2013年に韓国のグループよりアスピリン喘息のGWASが報告された(Human genetics 2013;132:313-321)。この報告では、HLA-DPB1のrs1042151で $P=5.11 \times 10^{-7}$ の最も強い関連が報告されている。日本人の集団で最も関連が強かったSNP(rs2281389)はHLA領域に存在し、韓国のグループから報告されたHLA-DPB1領域のrs1042151の近傍(約

785kb)に存在していた。今後、これらの結果については、独立に収集したサンプルでの検証が必要である。

アルテルナリアは空中環境真菌の代表であり、近年好酸球性副鼻腔炎への関与が示唆されている。IL8およびCXCL3はグルココルチコイド治療抵抗性(難治性)気管支喘息における気管支肺胞洗浄液(BAL)中の細胞におけるマイクロアレイ解析で3倍以上の発現増加が報告されている(JACI,120:130,2007)。近年、好中球が気管支喘息の重症化に関与しているというエビデンスが増えつつある。アルテルナリアによるIL8の誘導は1つの要因である可能性が考えられた。またEDN1はLaser Microdissection(LMD)法により、ステロイド抵抗性喘息患者の気道上皮細胞においてmRNAおよび蛋白の発現増加が報告されている(JACI,120:130,2007)。これまで、難治性喘息の気道上皮細胞においてEDN1、IL8が増加し、EDN1の発現と平滑筋および線維過形成の程度は比例しているという報告がある。これらの原因については不明だが、避けがたい空中環境真菌であるアルテルナリアへの長期暴露はそのひとつの要因となる可能性が示唆された。

好酸球性副鼻腔炎の鼻ポリープは重症喘息のsurrogate tissueとして注目されている。今後も解析症例数を増やし結果の検証を行っていく。

E. 結論

計331例のアスピリン喘息と計27,912例のコントロール例においてゲノムワイド関連解析を行なった。本年度は37症例を追加し、Validation studyを行った。韓国のグループが行ったGWASで最も強い関連を示したSNPの近傍(785kb)に日本人でも $P=4.8 \times 10^{-6}$ の関連を示すSNP(rs2281389)が、存在していた。

マイクロアレイにより気道上皮細胞におい

て、アルテルナリア刺激によりIL8, CXCL3, EDN1の発現が1.9~2.5倍増加していた。アスピリン喘息合併好酸球性副鼻腔炎の鼻ポリープでmRNAの発現上昇を認める2,764個(うち273個がケモカイン・サイトカイン関連)の遺伝子群が同定された。

F . 健康危険情報
なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

1) Park HW, Dahlin A, Tse S, Duan QL, Schuemann B, Martinez FD, Peters SP, Szeffler SJ, Lima JJ, Kubo M, Tamari M, Tantisira KG. Genetic predictors associated with improvement of asthma symptoms in response to inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*. 2014. In press

2) Wu AC, Himes BE, Lasky-Su J, Litonjua A, Peters SP, Lima J, Kubo M, Tamari M, Nakamura Y, Qiu W, Weiss ST, Tantisira K. Inhaled corticosteroid treatment modulates ZNF432 gene variant's effect on bronchodilator response in asthmatics. *J Allergy Clin Immunol*. 2013: in press.

3) Tanaka S, Hirota T, Kamiyo A, Ishii H, Hatsushika K, Fujieda S, Ishitoya J, Masuyama K, Tamari M. Lung Functions of Japanese Patients with Chronic Rhinosinusitis Who Underwent Endoscopic Sinus Surgery. *Allergol Int*. 2013 Nov 25 in press.

4) Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, Kuwabara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, Nakano

Y, Oguma T, Hozawa S, Nagasaki T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Iwata T, Izuhara Y, Ono J, Ohta S, Tamari M, Hirota T, Yokoyama T, Niimi A, Mishima M. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:305-12.

5) Ellinghaus D, Baurecht H, Esparza - Gordillo J, Rodríguez E, Matanovic A, Marenholz I, Hübner N, Schaarschmidt H, Novak N, Michel S, Maintz L, Werfel T, Meyer-Hoffert U, Hotze M, Prokisch H, Heim K, Herder C, Hirota T, Tamari M, Kubo M, Takahashi A, Nakamura Y, Tsoi LC, Stuart P, Elder JT, Sun L, Zuo X, Yang S, Zhang X, Hoffmann P, Nöthen MM, Fölster-Holst R, Winkelmann J, Illig T, Boehm BO, Duerr RH, Büning C, Brand S, Glas J, McAleer MA, Fahy CM, Kabesch M, Brown S, McLean WH, Irvine AD, Schreiber S, Lee YA, Franke A, Weidinger S. High-density genotyping study identifies four new susceptibility loci for atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2013;45:808-12.

6) Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Hizawa N, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M. Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population. *Allergy*. 2013;68:92-100.

7) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi

- E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2012;44:1222-6.
- 8) Kinose D, Ogawa E, Hirota T, Ito I, Kudo M, Haruna A, Marumo S, Hoshino Y, Muro S, Hirai T, Sakai H, Date H, Tamari M, Mishima M. A NOD2 gene polymorphism is associated with the prevalence and severity of chronic obstructive pulmonary disease in a Japanese population. *Respirology.* 2012;17:164-71.
- 9) Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Doi S, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Miyagawa T, Adachi M, Tanaka H, Niimi A, Matsumoto H, Ito I, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Taniguchi M, Lima JJ, C. G. Irvin, S. P. Peters, B. E. Himes, Litonjua AA, Tantisira KG, Weiss ST, Kamatani N, Nakamura Y, Tamari M. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nature Genetics,* 2011;43:893-6.
- 10) Tantisira KG, Lasky-Su J, Harada M, Murphy A, Litonjua AA, Himes BE, Lange C, Lazarus R, Sylvia J, Klanderman B, Duan QL, Qiu W, Hirota T, Martinez FD, Mauger D, Sorkness C, Szeffler S, Lazarus SC, Lemanske RF, Peters SP, Lima JJ, Nakamura Y, Tamari M, Weiss ST. Genome-Wide Association of GLCCI1 with Asthma Steroid Treatment Response. *N Engl J Med* 2011;365:1173-1183.
- 11) 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.* 2011;44:787-93.
- 12) Tamari M, Tomita K, Hirota T. Genome - Wide Association Studies of Asthma. *Allergol Int.* 2011; 60(3):247-52. 英文総説
- 13) Tamari M, Tanaka S, Hirota T. Genome - wide association studies of allergic diseases. *Allergol Int.* 2013;62;21-28. 英文総説
- 14) 玉利真由美, 広田朝光: ゲノムワイド関連解析と呼吸器疾患 別冊 医学のあゆみ 呼吸器疾患, 61-63, 2013. 日本語総説
- 15) 広田朝光, 田中翔太, 玉利真由美: アレルギー疾患発症関連遺伝子のトピックス 喘息, 26(1), 13-16, 2013. 日本語総説
- 16) 広田朝光, 玉利真由美: 疾患概念と病因論: ゲノム解析 最新医学(最新医学社) 68(6), 1072-1078, 2013. 日本語総説
- 17) 広田朝光, 玉利真由美: 喘息の全ゲノム関連解析 GWASの解説 -日本の報告と世界の報告- 呼吸器疾患最新の治療 2013-2015(南江堂) 32-38, 2013. 日本語総説
- 18) 玉利真由美, 田中翔太, 角大治朗, 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 呼吸, 32(3), 274 -284, 2013. 日本語総説

19) 玉利真由美, 広田朝光 遺伝子解析から考えるアレルギー疾患の治療戦略-アレルギー疾患は克服できるか? 日本医事新報 4592 : 81-85, 2012. 日本語総説

20) 玉利真由美, 田中翔太, 広田朝光: 呼吸器疾患のゲノムワイド関連解析 BioClinica, 27(11), 1044-8, 2012. 日本語総説

21) 広田朝光, 玉利真由美: 日本人成人気管支喘息のゲノムワイド関連解析 医学のあゆみ, 240(6), 535-7, 2012. 日本語総説

22) 広田朝光, 田中翔太, 玉利真由美: GWASによる疾患遺伝子の解明 呼吸, 31(7), 605 -611, 2012. 日本語総説

23) 玉利真由美, 富田かおり, 広田朝光: アレルギー疾患の発症や重症化への遺伝子多型の関与 日本耳鼻咽喉科学会会報, 114(5), 477-84, 2011. 日本語総説

24) 玉利真由美, 富田かおり, 広田朝光: 気管支喘息包囲網 - 喘息死ゼロへ向けた最後の10年へ、トピックス: 自然免疫と気管支喘息 内科, 108(3), 485-8, 2011. 日本語総説

2. 学会発表

1) アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析-アトピー関連領域と成人喘息関連領域-, 第53回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム閉塞性肺疾患の多様性とフェノタイプ 2013, 有楽町 東京. 玉利真由美

2) Genetic Study of Allergic Diseases, Taiwan-Japan Joint Symposium on BioBank and Genomic Medicine in Academia Sinica

2013, 台北 台湾. Mayumi Tamari

3) ゲノムワイド関連解析によるアトピー性皮膚炎関連遺伝子の同定, 第112回日本皮膚科学会総会 教育講演23 アトピー性皮膚炎: バリア障害による表皮と免疫のクロストーク 2013, 横浜 神奈川. 玉利真由美

4) Genomics in Allergic Disease, Symposium 24 World Allergy Forum, Omics in Allergic Disease, European Academy of Allergy and Clinical Immunology & World Allergy Organization World Allergy & Asthma Congress 2013, ミラノ イタリア. Mayumi Tamari

5) アレルギー疾患のゲノムワイド関連解析, 第34回日本炎症・再生医学会 シンポジウム4 炎症性疾患の再生のゲノム・エピゲノム解析の現状と展望 2013, 宝ヶ池 京都. 玉利真由美

6) アトピー性皮膚炎のゲノム解析の現状, 特別講演 九州大学皮膚科学教室 かゆみ研究会 2013, 博多 福岡. 玉利真由美

7) Genome-Wide Association Study of Allergic Diseases, 8th RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2013, Interface between Immune System and Environment 2013, 横浜 神奈川. Mayumi Tamari

8) アレルギー疾患の遺伝的要因 ゲノムワイド関連解析を中心に, 第64回東海小児アレルギー-談話会 特別講演 2013, 名古屋 愛知. 玉利真由美

9) Genome-Wide Association Study of Allergic Diseases, Plenary Lecture 1 第50

回日本小児アレルギー学会 2013, 横浜 神奈川. 玉利真由美

10) アレルギー疾患関連遺伝子・ゲノムワイド関連解析を中心に. 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 教育講演9 2012, 品川. 玉利真由美

11) ゲノムワイド関連解析(GWAS)によるアレルギー関連遺伝子の同定と好塩基球. 第42回日本皮膚アレルギー・接触性皮膚炎学会総会学術大会, 2012, 長野. 玉利真由美

12) Genetic and Environmental Factors in Allergic Disorders Genome-wide association study of aspirin-intolerant asthma in the Japanese population. 29th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, 2012, 韓国濟州島. Mayumi Tamari

13) Mayumi Tamari Genetic analysis of bronchial asthma. India-Japan Symposium on Global Challenges in Health and Environment, 2011, Indian Embassy Auditorium. Mayumi Tamari

H .知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1 . 特許取得

一塩基多型に基づくアトピー性皮膚炎の検査方法(アトピー性皮膚炎の罹患リスク検査方法) 2012.8.31

玉利真由美、広田朝光、久保充明

理化学研究所 特願2012-192247

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし