

平成30年6月13日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04827

研究課題名(和文) ゲノム情報に基づく難治性気道疾患のエンドタイプの解明に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Endotypes of severe airway diseases based on genomic information

研究代表者

檜澤 伸之 (Hizawa, Nobuyuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：00301896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：気道疾患の難治化を規定する遺伝因子の同定は分子病態の理解に基づいた精密医療の実現を可能にする。ライノウイルスCの受容体であるCDHR3遺伝子が、特に幼少期発症のアトピー型で呼吸機能が低下した成人喘息に一定の遺伝的役割を果たしていることを発見した。キチン結合蛋白であり、インフラマソームの制御因子でもあるYKL-40をコードするCHL13遺伝子が青壮年期以降に発症する喘息の発症に関連することを発見した。2型免疫応答の制御に重要な役割を有するTAM受容体チロシンキナーゼ(TYR03)遺伝子がアトピーと関連することを発見した。これらの因子が難治気道疾患のエンドタイプを形成することが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Identification of genetic factors associated with severe airway diseases allows us to understand the pathogenesis of diseases and to implement precision medicine based on endotypes. We found that the CDHR3 gene, which is the receptor for rhinovirus C, is associated with a specific phenotype of adult asthma characterized by early-onset, atopic and decreased FEV1. We also found that the CHL13L1 gene encoding YKL-40, which is a negative regulator of inflammasome, is associated with adult-onset non-smoking asthma. Furthermore, we found that the TAM family receptor tyrosine kinase TYR03, which is a negative regulator of type 2 immunity, is associated with allergic sensitization to common inhaled allergens or allergic rhinitis. These findings indicated the presence of endotypes each associated with increased susceptibility to viral infection, aberrant activation of inflammasome or increased susceptibility to allergic sensitization underlying asthma and COPD.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：Endotype Phenotype Asthma COPD Precision medicine CDHR3 YKL-40 Tyro3

### 1. 研究開始当初の背景

喘息やCOPDなどの難治性気道疾患は気道の慢性炎症、リモデリングや気流制限によって特徴づけられる多因子疾患であり、多様な表現型 (Phenotype) を呈する。気道疾患の難治化を規定する遺伝因子の同定は、その分子病態の多様性を明らかにし、病態の理解に基づいた個別化治療や一次予防の実現を可能にする。これまで研究代表者らは一貫して喘息やCOPDの発症や病態に關与する遺伝因子の探索を行ってきた。成人喘息では TSLP (Nat genet. 2011)、小児喘息では HLA-DP (PLoS Genet. 2011) を網羅的な遺伝子解析 (GWAS) によって同定した。さらに、中高年発症による遺伝因子の同定 (Am J Respir Crit Care Med. 2002)、喘息と COPD との共通の遺伝因子の同定 (Eur Respir J. 2008)、アトピークラスターと TSLP 遺伝子との関連 (Iijima et al. Allergol Int. 2013) などを報告してきた。また、880 名の喘息患者を対象にクラスター解析を実施し、CCL5 遺伝子や ADRB2 遺伝子と特定のクラスターとの遺伝的関連を報告した (Kaneko et al. Allergol Int. 2013)。これら一連の検討は、喘息や COPD の分子病態の多様性を明らかにするとともに、より明確な Phenotype を有する患者群を対象とした遺伝解析によって、新たな疾患感受性遺伝子を同定できる可能性を示した。

### 2. 研究の目的

本研究はこれまでの申請者の取り組みを発展的に継続していくものであり、その目的は、様々な Phenotype に着目することで新規に遺伝因子の難治性気道疾患の病態における役割をより明確にし、種々の Phenotype/Endotype の存在を明らかにすることである。我々の一連の研究において難治性気道疾患の種々の Phenotype の背景に存在する多様な分子病態 (Endotype) を明らかにし、将来的に Endotype に基づいた Precision Medicine (精密医療) や Preemptive Medicine (先制医療) が可能となるために必要な基盤データの創出を目的とする。

### 3. 研究の方法

非喘息非COPD健常人1600名、喘息1500名、COPD 600名を対象とする。尚、2008年から約1400名の健常成人について毎年一回の問診、呼吸機能検査、胸部写真にて喘息やCOPDの発症について前向きに追跡している。これらの検体を用いて下記の3つの遺伝因子と患者 Phenotype との統計学的な関連を検討する。さらに複数の臨床的因子 (呼吸機能、発症年齢、IgE 反応性、喫煙行動など) から構築した疾患クラスター群や健常成人の前向きコホートを用いた新規の喘息やCOPDの発症との関連も検討する。

遺伝子タイピング: イルミナ HumanHap 550K v3 のプラットフォームを使用して健常成人

967 人と喘息患者 244 名において common SNP (1%以上) をゲノム網羅的にタイピングした。以下の条件に該当する対象と SNP とを除外した上で関連解析に使用した。常染色体 SNP について (1) コールレート < 98% (2) マイナー対立遺伝子頻度 < 1% (3) ハーディ・ワインベルグ平衡試験 <  $1 \times 10^{-6}$  (4) タイピング率 < 99%。

それ以外の対象 (899 名の喘息患者、562 名の COPD 患者、および 1395 名の健常者) では、TaqMan 対立遺伝子特異的増幅法 (Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスターシティ、米国) を使用して SNP ごとにタイピングを行った。

**CDHR3 遺伝子**: 増悪を繰り返す小児喘息患者のみを対象としたフェノタイプ特異的な GWAS では、これまでに報告されてきた複数の遺伝子に加え、新規に CDHR3 遺伝子が同定された (Nat Genet 2014; 46: 51-5.)。その後の検討から CDHR3 は、ライノウイルス C の受容体である可能性が報告された (Proc Natl Acad Sci USA 2015; 112: 5485-90)。

**CHI3L1 遺伝子**: 喘息患者の血清および肺での YKL-40 量の増加が認められ、またその発現と喘息の重症度の関連についても報告されている (N Engl J Med. 2008; 358(16): 1682-91)。YKL-40 をコードする CHI3L1 遺伝子における eQTL も喘息と関連することが報告されている (N Engl J Med 2007; 357(20): 2016-27)。YKL-40 は肺炎でも増加するが、特に喘息や COPD における好中球性炎症を特徴とするフェノタイプと関連することが報告されている。機能的には種々の要因で活性化したインフラマソームを抑制的に制御する可能性が示されている (J Biomed Mater Res A. 2015; 103(8): 2778-85)。

**Tyro3 遺伝子**: TAM 受容体チロシンキナーゼ (Tyro3) が 2 型免疫応答のネガティブレギュレーターとして機能することが報告され、さらに Tyro3 遺伝子の転写因子結合部位の一塩基多型 (SNP) が喘息と関連することが報告された (Science 2016; 352(6281): 99-103)。

これらの遺伝子多型と喘息や COPD との遺伝的関連を検討した。その際に、それぞれが特定の疾患フェノタイプに影響するかどうかを検討した。その際、我々が過去に報告した喘息クラスターにも着目した (Kaneko Y, et al. Allergol Int. 2013 Mar; 62(1): 113-21)。

CHI3L1 や TYRO3 遺伝子については GTEx Portal (<https://www.gtexportal.org/home/>) を使ってヒトの各組織での量的形質座位 (eQTL) を調べた。

#### 4. 研究成果

日本人成人喘息を対象とした我々の検討においても、特に10歳までに発症した成人喘息ではCDHR3遺伝子の有意な影響が認められた(OR = 1.56; Mantel-Haenszel p = 0.0040, Kanazawa et al. Allergol Int, 2017)。これらの知見からは、非喫煙喘息や小児期発症のアトピー型喘息患者ではウイルス感染への易感染性が疾患発症の分子基盤(Endotype)となっている可能性がある。

YKL-40の遺伝子発現量と関連するCHI3L1遺伝子におけるSNPs(eQTLs)が特に成人発症喘息と関連することを確認した(OR=1.24; Mantel-Haenszel p = 0.006)。さらに、中高年発症、非アトピーで呼吸機能が比較的保たれたクラスターと有意に関連していた(OR=1.294; p = 0.027)。喘息及びCOPD患者群では肺でのキチナーゼ様蛋白質YKL-40量の増加が認められ、特に喘息やCOPDにおける好中球性炎症と関連することが報告されており、Endotypeとしてインフラマソームが活性化し好中球性気道炎症を特徴とする分子病態と関連する可能性がある。

Tyro3の遺伝子発現と関連するeQTLsがアレルギー感作(OR=1.29; P=0.0004)やアレルギー性鼻炎(OR=1.31; P=0.001)と有意に関連していた。Tyro3は過剰な2型免疫応答に対してブレーキとしての役割を有するが、Tyro3の遺伝子発現低下と関連する対立遺伝子がアトピーと有意に関連していた。EndotypeとしてのType-2炎症の背景に存在する遺伝子と考えられた。

これらの結果、臨床的には個々の患者さんに特有の環境因子(特にアレルゲンやウイルス感染、喫煙や肥満)遺伝子に基づいた予防(先制医療)診断、治療(個別化医療)への蓋然性が高まる。さらに難治性喘息とCOPDとの分子機構の相同性が明らかになり、単なる臨床病名ではなく個々の分子病態に応じた診断や治療が可能となることが期待される。

#### 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18件)

1. Nakajima M, Kawaguchi M, Matsuyama M, Ota K, Fujita J, Matsukura S, Huang SK, Morishima Y, Ishii Y, Satoh H, Sakamoto T, Hizawa N: Transcription Elongation Factor P-TEFb Is Involved in IL-17F Signaling in Airway Smooth Muscle Cells. Int Arch Allergy Immunol. 2018 Apr 12. doi: 10.1159/000488154.

2. Barnes N, Ishii T, Hizawa N, Midwinter D, James M, Hilton E, Jones PW: The distribution of

blood eosinophil levels in a Japanese COPD clinical trial database and in the rest of the world. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2018; 13: 433-440. doi: 10.2147/COPD.S144108.

3. Kanazawa J, Masuko H, Yamada H, Yatagai Y, Sakamoto T, Kitazawa H, Iijima H, Naito T, Hirota T, Tamari M, Hizawa N: How important is allergic sensitization as a cause of atopic asthma? Allergol Int. 2018; 67(2): 292-294. doi: 10.1016/j.alit.2017.10.005.

4. Hirata J, Hirota T, Ozeki T, Kanai M, Sudo T, Tanaka T, Hizawa N, Nakagawa H, Sato S, Mushihiroda T, Saeki H, Tamari M, Okada Y: Variants at HLA-A, HLA-C, and HLA-DQB1 confer risk of psoriasis vulgaris in Japanese. Journal of Investigative Dermatology 2017 Oct 12. pii: S0022-202X(17) 33037-3. doi: 10.1016/j.jid.2017.10.001.

5. Hirota T, Nakayama T, Sato S, Yanagida N, Matsui T, Sugiura S, Takaoka Y, Hizawa N, Fujieda S, Miyatake A, Sasaki T, Amagai M, Doi S, Ito K, Ebisawa M, Tamari M: Association study of childhood food allergy with genome-wide association studies-discovered loci of atopic dermatitis and eosinophilic esophagitis. J Allergy Clin Immunol. 2017 pii: S0091-6749(17) 30991-0. doi: 10.1016/j.jaci.2017.05.034.

6. Kuroda A, Hegab AE, Jingtao G, Yamashita S, Hizawa N, Sakamoto T, Yamada H, Suzuki S, Ishii M, Namkoong H, Asakura T, Ozaki M, Yasuda H, Hamamoto J, Kagawa S, Soejima K, Betsuyaku T: Effects of the common polymorphism in the human aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) gene on the lung. Respir Res. 2017; 18(1): 69. doi: 10.1186/s12931-017-0554-5.

7. Kanazawa J, Masuko H, Yatagai Y, Sakamoto T, Yamada H, Kaneko Y, Kitazawa H, Iijima H, Naito T, Saito T, Noguchi E, Konno S, Nishimura M, Hirota T, Tamari M, Hizawa N: Genetic association of the functional CDHR3 genotype with early-onset adult asthma in Japanese populations. Allergol Int. 2017 pii: S1323-8930(17)30016-3. doi: 10.1016/j.alit.2017.02.012.

8. Nakajima M, Kawaguchi M, Ota K, Fujita J, Matsukura S, Huang SK, Morishima Y, Ishii Y, Satoh H, Sakamoto T, Hizawa N: IL-17F induces IL-6 via TAK1-NFkB pathway in airway smooth muscle cells. Immun Inflamm Dis. 2017; 5(2): 124-131. doi: 10.1002/iid3.149.

9. 檜澤伸之. 専門医のためのアレルギー学講

座 アレルギー疾患のフェノタイプ 病態に基づいた分類と治療 フェノタイプに基づくアレルギー疾患の遺伝子解析. アレルギー 2017; 66(2): 71-75. doi: 10.15036/arerugi.66.71.

10. Hizawa N. Clinical approaches towards asthma and chronic obstructive pulmonary disease based on the heterogeneity of disease pathogenesis. Clin Exp Allergy. 2016; 46(5): 678-87. doi: 10.1111/cea.12731.

11. Yatagai Y, Hirota T, Sakamoto T, Yamada H, Masuko H, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Tamari M, Kubo M, Takahashi A, Konno S, Makita H, Nishimura M, Hijikata M, Keicho N, Homma S, Taguchi Y, Azuma A, Kudoh S, Hizawa N: Variants near the HLA complex group 22 gene (HCG22) confer increased susceptibility to late-onset asthma in Japanese populations. J Allergy Clin Immunol. 2016; 138: 281. doi: 10.1016/j.jaci.2015.11.023.

12. Yamada H, Masuko H, Yatagai Y, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Konno S, Nishimura M, Hirota T, Tamari M, Hizawa N: Role of Lung Function Genes in the Development of Asthma. PLoS One. 2016; 11(1): e0145832. doi: 10.1371/journal.pone.0145832.

13. Watanabe T, Tsujino I, Konno S, Ito YM, Takashina C, Sato T, Isada A, Ohira H, Ohtsuka Y, Fukutomi Y, Nakamura H, Kawagishi Y, Okada C, Hizawa N, Taniguchi M, Akasawa A, Nishimura M. Association between Smoking Status and Obesity in a Nationwide Survey of Japanese Adults. PLoS One. 2016 Mar 23;11(3):e0148926. doi: 10.1371/journal.pone.0148926.

14. 山田英恵、増子裕典、乾年 秀、金澤潤、谷田貝洋平、坂本 透、飯島弘晃、今野 哲、清水薫子、牧田比呂仁、西村正治、國分二三男、斎藤武文、遠藤健夫、二宮浩樹、金子教宏、檜澤伸之 . 喘息患者におけるサルメテロールとモンテルカストの有効性の差に影響するロイコトリエン関連遺伝子の検討. アレルギー 2016; 65(9):1201-1208  
<https://doi.org/10.15036/arerugi.65.1201>

15. 檜澤伸之 . アレルギー用語解説シリーズ Asthma-COPD Overlap Syndrome アレルギー 2016; 65(3): 210.  
<https://doi.org/10.15036/arerugi.65.210>

16. Hales BJ, Hizawa N, Jenmalm M, Sverremark-Ekström E, Wardlaw AJ. Developments in the field of allergy in 2014 through the eyes of Clinical and Experimental Allergy. Clin Exp Allergy 45:1723-45, 2015. doi: 10.1111/cea.12663.

17. Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T,

Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Hizawa N. Heritability of pulmonary function estimated from genome-wide SNPs in healthy Japanese adults. Respir Investig. 2015; 53(2): 60-7. doi: 10.1016/j.resinv.2014.

18. Yatagai Y, Sakamoto T, Yamada H, Masuko H, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Hizawa N: Genomewide association study identifies HAS2 as a novel susceptibility gene for adult asthma in a Japanese population. Clin Exp Allergy. 2014; 44(11):1327-34. doi: 10.1111/cea.12415.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Kanazawa J, Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Hizawa N. TYRO3: A Gene for Allergic Rhinitis? American Thoracic Society 2018 International Conference (San Diego), 5月, 2018 .

2. Yatagai Y, Sakamoto T, Yamada H, Masuko H, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Hirota T, Tamari M, Hizawa N. How Important Is Allergic Sensitization As A Cause Of Atopic Asthma? American Thoracic Society 2018 International Conference (San Diego), 5月, 2018 .

3. Mochizuki F, Iijima H, Fujiwara K, Shimada T, Watanabe A, Shiigai M, Ishikawa H, Kanazawa J, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T, Oguma T, Sato S, Muro S, Hizawa N. Abnormality in Flow Volume Loop of Obstructive Index Reflects the Extent of Emphysema and Disease Severity in Obstructive Lung Diseases American Thoracic Society 2018 International Conference (San Diego), 5月, 2018 .

4. 檜澤伸之. 重症喘息病態における IgE の役割. 日本アレルギー学会第 4 回総合アレルギー講習会. イブニングシンポジウム 5 IgE 制御による疾病マネジメント up-to-date 2017 年 12 月 (東京)

5. 増子裕典, 檜澤伸之. 遺伝子から解くウイルス感染による気道アレルギー 第 66 回日本アレルギー学会学術大会 シンポジウム 4 遺伝子から解くアレルギーの謎 2017 年 6 月 (東京)

6. Kanazawa J, Masuko H, Yatagai Y, Sakamoto T, Yamada H, Kaneko Y, Kitazawa H, Iijima H, Naito T, Saito T, Noguchi E, Konno S, Nishimura M, Hirota T, Tamari M, Hizawa N. Role of the CDHR3 Variant (Cys529 Tyr) in Early-Onset Adult Asthma in Japanese Populations, American Thoracic Society 2017 International Conference (Washington DC), 5月, 2017

7. 檜澤伸之. 好中球性炎症のエンドタイプ

第 65 回日本アレルギー学会学術大会・シンポジウム 6 好中球性気道炎症 2016 年 6 月 (東京)

8. Hizawa N: JOINT ATS/ERS/JRS SYMPOSIUM ON SEVERE ASTHMA: A GLOBAL PERSPECTIVE, Pathogenesis of Severe Asthma: A Clue from the Common Genes Underlying Asthma and COPD, American Thoracic Society 2016 International Conference (San Francisco, CA), May, 2016

9. 檜澤伸之. 喘息と COPD における遺伝子解析; データの読み方から臨床的意義まで 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、2016 年 4 月 (東京)

10. Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Kaneko Y, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Konno S, Nishimura M, Hirota T, Tamari M, Hizawa N. The role of pulmonary function genes in the pathogenesis of asthma. American Thoracic Society 2015 International Conference (Denver), 5 月, 2015 .

11. Yatagai Y, Sakamoto T, Yamada H, Masuko H, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, Hirota T, Tamari M, Makita H, Konno S, Nishimura M, Hizawa N. Genome-wide association study for late-onset asthma demonstrates possible association with a gene related to diffuse panbronchiolitis. American Thoracic Society 2015 International Conference (Denver), May, 2015 .

12. 檜澤伸之. フェノタイプに基づくアレルギー疾患の遺伝子解析. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会 (東京) 5 月、2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

檜澤 伸之 (HIZAWA Nobuyuki)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：00301896

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

野口 恵美子 (NOGUCHI Emiko)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：40344882

玉利 真由美 (TAMARI Mayumi)  
東京慈恵会医科大学・総合医科学研究センター・教授  
研究者番号：00217184