

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461155

研究課題名(和文)慢性炎症性気道疾患における過去喫煙の影響；エピゲノム変化を介した機序の解明

研究課題名(英文) Effects of ex-smoking on chronic inflammatory airway diseases: analysis through epigenomic changes

研究代表者

松本 久子 (Matsumoto, Hisako)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60359809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙喘息例の特徴である好酸球・2型炎症/好中球性炎症を惹起しうる因子に着目し、ブドウ球菌由来スーパー抗原(SE)への感作と禁煙後の炎症遅延との関係を臨床検体で明らかにした。一方SE刺激下気道平滑筋細胞でのサイトカイン発現に有意な変化はなく、この系でのエピゲノム解析候補サイトカイン同定は困難であった。次に2型炎症喘息例において、IL4R とADAM33 の多型が各々独立して高いodds比で増悪に寄与することが示された。特に後者は喫煙喘息に特徴的な混合性炎症と関連することが示された。臨床的寄与度の高いゲノム変化部位を同定し、効率的なエピゲノム解析の基盤形成に寄与したと言える。

研究成果の概要(英文)：Here we aimed to clarify genomic/epigenomic changes in smoking-associated airway inflammation, which is characterized with mixed type inflammation of eosinophilic/type 2 and neutrophilic inflammations in asthma. In clinical samples, we found that sensitization to staphylococcus aureus enterotoxins (SE) was associated with smoking status. However, stimulation with SE to cultured airway smooth muscle cells did not show any significant changes in several cytokines that were candidate for epigenomic analysis. We then focused on genotyping of eosinophilic/type 2 asthmatics, which lead to identification of SNPs of IL4R and ADAM33 as important genome markers of asthma exacerbations. More importantly, a SNP of ADAM33 was associated with mixed type inflammation, which is a typical endotype of smoker asthma. These findings may be a clue to understand smoking-associated airway inflammation and efficient analysis of the epigenetic changes, which is closely associated with genomic changes.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：喫煙喘息

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、喫煙喘息例では好中球性炎症に加え好酸球性・2型炎症が遷延し、アトピー素因が強調されることを示してきた。現喫煙例のみならず、過去喫煙例でも同様の事象がみられており、COPDと同様、喫煙喘息においても禁煙後気道炎症が遷延することが推察される。その背景機序の一つとして環境変化を感知して記憶する後天的遺伝子修飾であるエピジェネティクスの関与があげられ、結果として免疫学的変化が生じている可能性が推察されるが、未解明な点が多い。

### 2. 研究の目的

禁煙後の遷延性気道炎症の背景の一つに、エピゲノム変化とその結果として免疫学的変化が生じている可能性がある。本研究ではエピゲノム-フェノタイプ解析により、これらの可能性について検証し、喫煙関連炎症が遷延する機序解明をめざした。

### 3. 研究の方法

喫煙喘息例の一つの特徴である好酸球性・2型炎症/混合性炎症を惹起しうる因子に着目し、それらの因子の探索からエピゲノム解析への展開を計画した。即ち喫煙と好酸球性・2型炎症に共通する因子として、初めにブドウ球菌由来スーパー抗原(SE)を候補とした。SEには複数の亜型が存在するが、SE-Bは初期に感作される抗原とされる。疫学研究では喫煙例でのSE-B感作の増加が報告され、SE-B、SE-Aとも高齢発症好酸球性喘息、喘息重症化、好酸球性副鼻腔炎との関連が示唆されている。

喫煙とSEへの曝露・感作との関連について初めに臨床検体での検討を行った。さらに喫煙による気道上皮の脆弱化に伴い、気道平滑筋細胞(ASM)がSEに曝露されやすくなると考えASMを用いた系で検討し、エピゲノム解析で必要となる候補サイトカインの絞り込みを狙った。最終年度では好酸球性・2型炎症で鍵となるゲノム解析から候補サイトカインの絞り込みを狙った。

当初候補サイトカインについて、網羅的エピゲノム解析を計画していたが、研究期間中に、1)エピゲノム変化部位はゲノム変化部位と密に関連する可能性が示されてきたこと、2)喘息罹患やアトピー素因への寄与遺伝子探索と異なり、疾患内病型への寄与遺伝子探索には、網羅的解析よりもフェノタイプ\_エンドタイプ別解析において、より臨床的寄与度の高い結果が得られる可能性が示されてきたため、本研究でも好酸球性・2型炎症の病態に深く関与するゲノム変化部位の同定を最優先とした。

### 4. 研究成果

臨床検体での検討:本検討では、SE-B、Aに対する感作は、好酸球性下気道炎症、重症度などと関連し(Kanemitsu, Matsumoto, et

al. Eur Respir Society 2014 で発表)、喫煙例で高く、現喫煙、過去喫煙、非喫煙喘息の順に強く感作されていた(図1,2)。さらに過去喫煙例において、禁煙期間とSE-B特異IgE値が負の相関をとり、ROC曲線にて、2年の禁煙期間がSE-B感作の有無に関する最適閾値であることが示された(Nagasaki, Matsumoto, et al. paper in preparation)。現・過去喫煙例の誘発喀痰上清では、非喫煙に比し有意にTSLPの発現は高かったが、SE-B感作の有無との関連はなかった。

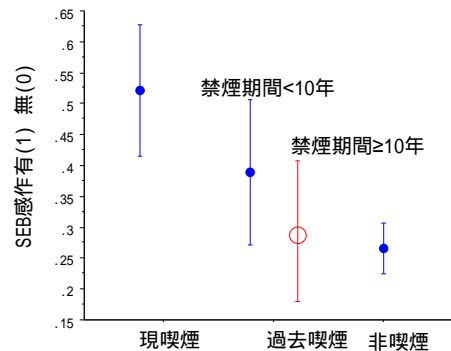


図1

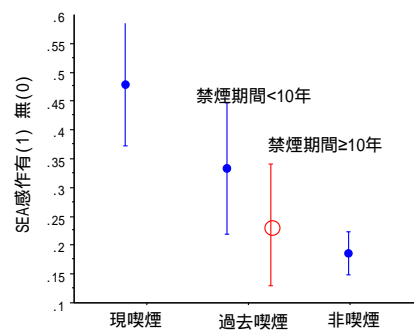


図2

ASMでの検討:上記結果から、SE-B曝露が喫煙・禁煙時のエピゲノム変化に関与する可能性が推察されたため、ASMにSE-B曝露を行い、エピゲノム解析に賦する候補サイトカイン発現について検討した。しかし各種候補サイトカインの発現は、SE-B曝露により有意な差は認めず、この系からエピゲノム解析の候補サイトカインの絞り込みに至らなかった。

2型炎症例において、経口ステロイドを要する喘息増悪にIL4Rの多型[Odds比4.01(1.47, 11.1)]とADAM33の多型[Odds比2.81(1.05, 7.67)]が各々独立して寄与することを明らかにした。また前者は2型炎症の血清マーカーであるペリオスチンの高値と、後者はペリオスチン高値または末梢血好酸球数高値例での末梢血好中球高値に寄与した(Sunadome H, Matsumoto H, et al. paper in submission)。ADAM33と混合性炎症との関係

は、2つの独立した喘息患者集団で確認できている(図3)。混合性炎症は、喫煙喘息に特徴的な炎症パターンであること、ADAM33はCOPD病態にも関与する遺伝子であることから、禁煙後の遷延性気道炎症へのADAM33のゲノム、エピゲノム変化の関与が強く示唆される。フェノタイプ\_エンドタイプ別解析により、臨床的に寄与度が高いと想定されるゲノム変化部位が同定でき、効率的なエピゲノム解析の基盤に至ったと言える。

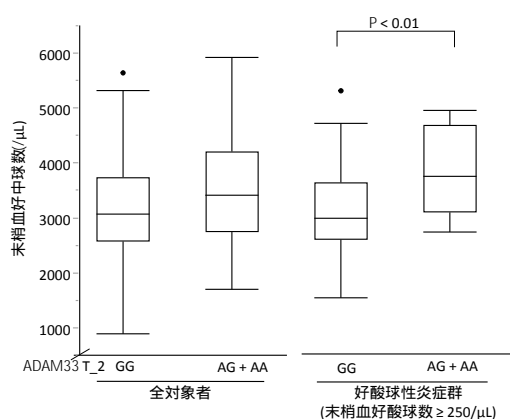


図3

### 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)

1. Tajiri T, Matsumoto H, et al. Utility of serum periostin and free IgE levels in evaluating responsiveness to omalizumab in patients with severe asthma. *Allergy*, in press
2. Izuhara Y, Matsumoto H, et al. Mouth breathing, another risk factor for Asthma: the Nagahama Study. *Allergy* 2016, Epub ahead of print.
3. Hira D, Komase Y, Koshiyama S, Oguma T, Hiramatsu T, Shiraki A, Nishikawa M, Nakanishi M, Tsuji T, Matsumoto H, et al. Problems of elderly patients on inhalation therapy: difference in problem recognition between patients and medical professionals. *Allergol Int*, Epub ahead of print.
4. Inoue H, Ito I, Matsumoto H, et al. CT-assessed large airway involvement and lung function decline in eosinophilic asthma: the association between induced sputum eosinophil differential counts and airway remodeling. *J Asthma*, in press
5. Kanemitsu Y, Niimi A, Matsumoto H, et al. Gastroesophageal dysmotility is associated with the impairment of cough-specific quality of life in patients with cough variant asthma. *Allergol Int* 2016 Epub ahead of print.

6. Muro S, Tabara S, Matsumoto H, et al. Relationship among Chlamydia and Mycoplasma pneumoniae seropositivity, IKZF1 genotype, and chronic obstructive pulmonary disease in a general Japanese population: the Nagahama study. *Medicine (Baltimore)* 2016 Epub ahead of print.
7. Izuhara K, Conway SJ, Matsumoto H, et al. Roles of periostin in respiratory disorders. *Am J Respir Crit Care Med* 2016 Epub ahead of print.
8. Izuhara K, Matsumoto H, et al. Recent developments regarding periostin in bronchial asthma. *Allergol Int* **64** Suppl:S3-10, 2015.
9. Hamada S, Matsumoto H, et al. Nasal exhalation of inhaled beclomethasone HFA to treat chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol Practice*, Epub ahead of print
10. Oguma T, Matsumoto H, et al. Longitudinal shape irregularity of airway lumen assessed by CT in patients with bronchial asthma and COPD. *Thorax*, **70**, 719-24, 2015
11. Oguma T, Matsumoto H et al. Assessment of small airways with computed tomography: mosaic attenuation or lung density? *Respiration* **89**,539-49, 2015
12. Iwata T, Ito I, Matsumoto H, et al. Mechanical Stimulation by Postnasal Drip Evokes Cough. *PLoS One* 2015
13. Nagasaki T, Matsumoto H, et al. Using exhaled nitric oxide and serum periostin as a composite marker to identify severe/steroid-insensitive asthma *Am J Respir Crit Care Med* **190**,1449-152, 2014
14. Kanemitsu Y, Matsumoto H, et al. Factors contributing to an accelerated decline in pulmonary function in asthma. *Allergol Int* **63**,181-188, 2014
15. Matsumoto H. Serum periostin: a novel biomarker for asthma management. *Allergol Int* **63**,153-160, 2014
16. Inoue H, Niimi A, Matsumoto H, et al. Pathophysiological characteristics of asthma in the elderly: a comprehensive study *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, **113**, 527-533, 2014
17. Tajiri T, Niimi A, Matsumoto H, et al. Prevalence and clinical relevance of allergic rhinitis in patients with classic asthma and cough variant asthma. *Respiration*, **87**, 211-218, 2014
18. Nagasaki T, Matsumoto H, et al. Integrating longitudinal information on pulmonary function and inflammation using asthma phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* **133**,1474-1477 e2, 2014

19. Kanemitsu Y, Ito I, Matsumoto H, et al. Osteopontin and periostin associates with a 20-year decline of pulmonary function in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* **190**, 472-474, 2014
20. Izuhara Y, Matsumoto H, et al. *GLCCII* variant accelerates pulmonary function decline in patients with asthma receiving inhaled corticosteroids. *Allergy*, **69**, 668-673, 2014
21. Tajiri T, Niimi A, Matsumoto H, et al. Comprehensive efficacy of omalizumab for severe refractory asthma: a time-series observational study. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, **113**, 470-475, 2014
21. Kinose D, Muro S, et al. Association of COPD exacerbation frequency with gene expression of pattern recognition receptors in inflammatory cells in induced sputum. *Clin Respir J*. 2014
22. Marumo S, Hoshino Y, Sato A, Muro S, et al. p38 mitogen-activated protein kinase determines the susceptibility of cigarette smoke-induced emphysema in mice. *BMC Pulm Med*. **14**, 79, 2014

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 松本久子. 慢性炎症性気道疾患における過去喫煙の影響. アレルギーの臨床 2015. 8 (北隆館)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Kanemitsu Y, Matsumoto H, et al. Associations between sensitization to *Staphylococcus aureus* enterotoxins and Th2/eosinophilic inflammation and uncontrolled asthma. ERS 2014
2. Sunadome H, Matsumoto H, et al. Polymorphisms of *IL4RA* and *ADAM33*, risk variants in patients with asthma exacerbations with type 2-predominant condition. ATS 2016
3. Nagasaki T, Matsumoto H, et al. Smoking and *Staphylococcus aureus* enterotoxin sensitization in adults with asthma. 第 65 回日本アレルギー学会学術講演会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本久子 (MATSUMOTO HISAKO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号： 60359809

### (2) 研究分担者

室繁郎 (MURO SHIGEO)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号： 60344454

佐藤篤靖 (SATO ATSUYASU)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号： 30706677