

令和元年8月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09535

研究課題名（和文）Geno-endo-phenotype解析による重症喘息病型形成・増悪の機序解明

研究課題名（英文）Understanding of pathogenesis of severe asthma and its exacerbation through
geno-endo-phenotyping

研究代表者

松本 久子（Matsumoto, Hisako）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60359809

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：近年2型炎症喘息群のgeno-endo-phenotypeの解析は進んできたが、非2型炎症群についての知見は乏しい。本研究ではIL4RA、POSTNの遺伝子多型の一定の組み合わせにおいては、血清ペリオスチンが低値となること、そこにORMDL3のリスク遺伝子多型が加わることで、喘息増悪リスクがあがることを示した。増悪リスクのある非2型炎症群のgeno-endo-phenotypeを反映すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、非2型炎症を呈しながら喘息増悪リスクを有する可能性のある遺伝子多型の組み合わせが確認され、一定のgeno-endo-phenotypeが示された。組み合わせに入った遺伝子の一つは、ライノウイルス感染への感受性に関わる可能性のある遺伝子であり、何らかのウイルス感染との関係が示唆される。本結果は非2型炎症型喘息の病態解明の端緒になり、有意義な結果が得られたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study showed that specific combination of gene polymorphisms of IL4RA and POSTN was associated with low serum periostin levels. When a specific genotype of ORMDL3 was added to this combination, risks of asthma exacerbation were increased. These associations may reflect the presence of geno-endo-phenotype of non-type 2 inflammation with asthma exacerbations.

研究分野：喘息

キーワード：IL-18 ORMDL3

1. 研究開始当初の背景

治療学の進歩に伴い喘息の疾患コントロールは良くなったが、依然 5-10%には治療に難渋する例が存在し、その病態、特に遺伝子レベルの知見は乏しい。ゲノムワイド関連解析 (GWAS) により数々の遺伝子多型と喘息発症との関連が解明されてきたが、喘息の重症化、増悪を説明するには未だ十分ではない。多様な喘息の重症化、増悪を解明するには、詳細な臨床情報から、核となる endo-phenotype を抽出し、endo-phenotype 別に責任遺伝子を同定するアプローチが必要である。申請者は吸入ステロイド治療下非喫煙喘息例 (KiHAC 多施設共同研究登録例) を中心にクラスター解析による phenotype 分類を行い、他人種と共通した endo-phenotype、すなわち 1) 乏炎症群、2) 大多数を占める若齢発症・アトピー型喘息群、3) 高齢発症・遷延性好酸球性炎症群、4) 比較的若齢発症・アトピー型混合性炎症・コントロール不良・閉塞群を同定している (Nagasaki, Matsumoto, et al. *JACI* 2014)。これらの endo-phenotype は、従来の仮説に基づいた分類とも共通しており、喘息“症候群”において重要な endo-phenotype である。これらの endo-phenotype を解析することにより増悪・重症化に関与する遺伝子を明らかにできる可能性がある。

本邦の成人喘息例の検討で *IL18* 遺伝子の転写活性を亢進する多型 (rs5744247 GG) と重症喘息との関連が示されている (Hirota, et al. *AJRCCM* 2009)。喘息死での剖検肺において *IL-18* の発現が亢進しており (Oda, et al. *AAAI* 2014)。*IL-18* は *IL-13* 発現依存性に好酸球を増加する (Sawada, et al. *PLOS one* 2013) ことなどから、個体に Th2 炎症の素地があると *IL-18* 刺激で Th2 炎症が増強すると推察されるが、これまで喘息患者を Th2 素因の有無で層別化し、*IL-18* の喘息病態への関与を解析した報告はない。また *IL-18* が Th1/*IL-13* 炎症/アトピー素因のいずれの病態を修飾して重症化させるかについても明らかにされていない。

2. 研究の目的

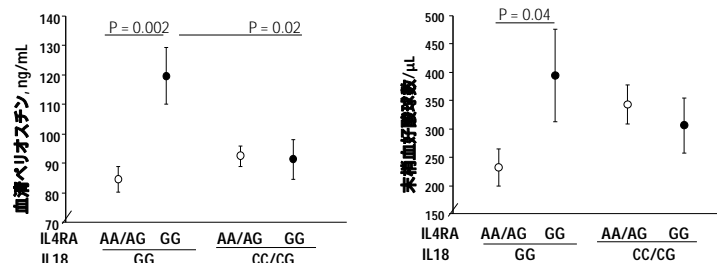
重症喘息に関与し、IFN- γ 産生などの Th1 応答をするとともに Th2 炎症を惹起しうる *IL-18* と、Th2 炎症の軸である *IL-13* あるいはアトピー素因に関連する遺伝子多型の組み合わせに着目し、遺伝子多型の組み合わせが、重症喘息の中核をなす 2 つの endo-phenotype (高齢発症好酸球性炎症群と若齢発症アトピー型混合性炎症コントロール不良群) に集積することを検証する。2 つの geno-endo-phenotype の病型形成において、環境応答の一つである inflammasome の関与を明らかにする。本研究の目的は上記 2 つの仮説を検証することである。

3. 研究の方法

KiHAC 登録者 (Discovery cohort)、非登録者 (Validation cohort) から得た DNA を解析し、Th2 (*IL-13*) 関連遺伝子多型またはアトピー関連遺伝子多型群、*IL18* の機能的多型 (rs5744247 GG) の各々を組み合わせる。その組み合わせと重症喘息の中核をなす 2 つの endo-phenotype (高齢発症好酸球性炎症群と若齢発症アトピー型混合性炎症コントロール不良群) との関係性を明らかにする。inflammasome は、高齢発症・遷延性好酸球性炎症群、比較的若齢発症・アトピー型混合性炎症・コントロール不良・閉塞群の 2 つの endo-phenotype で増加し、これらの程度が、各群の重症度、臨床経過と関連することを重症喘息例の喀痰上清や血清値などを用いて解析する。

4. 研究成果

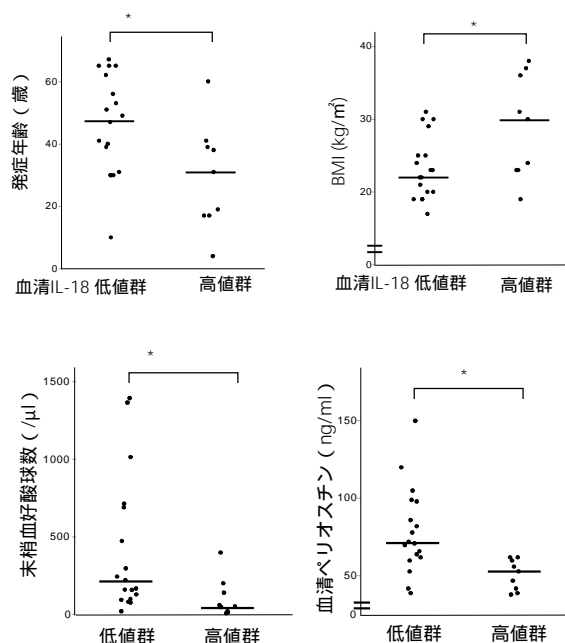
初めに仮説を検証すべく、Th2 (*IL-13*) 関連遺伝子多型またはアトピー関連遺伝子多型として、*IL4RA* rs8832 GG と *IL18* の機能的多型 (rs5744247 GG) の多型の組み合わせに着目して解析を行った。Discovery cohort では、*IL18GG_IL4RA* GG 群は *IL18GG_IL4RA* AA/AG 群に比し、血清ペリオスチン値、末梢血好酸球数、喘息発症年齢、副鼻腔炎頻度、スーパー抗原である黄色ブドウ球菌エンテロトキシンに対する特異 IgE 値がいずれも有意に高く、高齢発症 Th2・好酸球性炎症群の特徴を有することが示された。一方若齢発症アトピー型喘息で *IL18G* をもつと、一秒量が有意に低く、*IL18GG* 群では喘息コントロールが不良で、副鼻腔炎既往が多く、最高治療ステップを要する例が多い傾向があった。



しかし、この結果は replication cohort では確認されず、今後の検討課題とした。

アトピー型重症喘息における *IL-18* の役割について、次に血清値での検討を行った。即ちアトピー型重症喘息 27 名を対象とし、血清 *IL-18* (結合タンパク量での補正後) 高値群の特徴を検討した。血清 *IL-18* 高値群は、血清 *IL-18* の上位 1/3 群とした。血清 *IL-18* 高値群は、低値

群に比し、有意に発症年齢が若く、肥満例が多く、末梢血好酸球数、血清ペリオスチン値が低かった(図, * p<0.05)。さらに血清ペリオスチン値と血清IL-18値は有意な負の相関を認めた。また xolair®導入後2年間の血清総IgE、ペリオスチン、IL-18値の推移について解析したところ、血清IL-18高値群では、血清総IgE値の有意な低下が認められ、血清IL-18の変化値と血清ペリオスチンの変化値は有意な負の相関を認めた(論文投稿中)。血清IL-18値と2型炎症マーカーである血清ペリオスチンとの負の相関から、アトピー型重症喘息において血清IL-18高値はTh1系炎症、遺伝的背景が関与する可能性もあるが、生活習慣、特に肥満を中心とした炎症を反映することが示唆された。

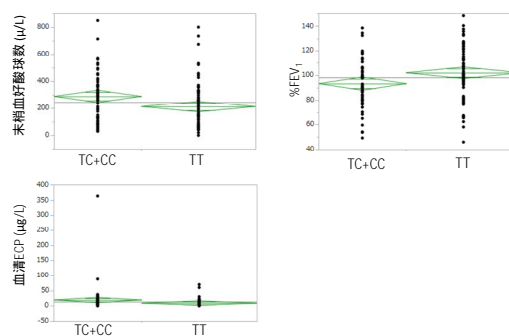


IL4RA rs8832 非GGかつPOSTN rs3829365 非GG群におけるORMDL3 rs7216389 TT遺伝子型と喘息増悪の関係

	増悪ありTT	増悪あり非TT	p値
ディスカバリー	39%	19%	<0.05
レプリケーション	28%	12%	<0.1
統合	34%	16%	<0.01

次に *IL4RA* rs8832 非GGと *POSTN* rs3829365 の非GG群の増悪頻度に着目した。この genotype を共に持つ群では、血清ペリオスチンが低値であることを我々は既に示しており、非2型炎症の集団と想定し、この集団における *ORMDL3* のリスク多型 rs7216389 TT との関連について解析を行った。尚、*ORMDL3* は小児において rhinovirus C の感染との関係が示唆されている。結果、*ORMDL3* のリスク多型 rs7216389 TT が増悪のリスク上昇と関係することを認めた。即ち Discovery cohort では、*IL4RA_POSTN* 非GG群は血清ペリオスチン低値(<80 ng/mL)に相当し、*IL4RA_POSTN* 非GG群において *ORMDL3* のリスク多型 rs7216389 TT と非TT群の比較では、有意に前者で増悪頻度が多いことが示された(増悪頻度 39% vs 19%, p < 0.05)。さらに Replication study においても、*IL4RA_POSTN* 非GG群において *ORMDL3* rs7216389 TT では増悪が 28%、非TTでは 12%と前者で多い傾向が認められた(p < 0.1)。Discovery と Replication study を合わせるとTT群で非TT群よりも有意に多く増悪を経験していた(表、p<0.01)。また *ORMDL3* の rs7216389 と連鎖不均衡の関係にある rs4065275 のリスク多型は、PHA 刺激を受けたヒト単核球において IL-13 産生亢進に関わると報告されているが、我々の検討ではむしろ末梢血好酸球数に関与した(図、2群間いずれも p<0.01)。他に *CDHR3* rs6967330 や *IL18* の多型も検討したが非2型炎症群の増悪頻度との関係はみられなかった(投稿準備中)。

非2型喘息群における *ORMDL3* rs7216389 TC+CC vs TT



以上から、genotype から非2型炎症群の endophenotype、増悪リスクを推察することが可能となり、本研究の主たる目的は達成できたと考える。近年2型炎症群の geno-endo-phenotype の解析は進んできたが、非2型炎症(低好酸球)群についての知見は乏しく、本結果は非2型(低好酸球)炎症型喘息病態解明の端緒になると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12件)

1. Izuwara K, Conway SJ, Moore BB, Matsumoto H (equally contributed), et al. Roles of Periostin in Respiratory Disorders. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193:949-956.

2. Inoue H, Ito I, Niimi A, 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. 2016:1-8.

3. Tajiri T, Matsumoto H, Gon Y, et al. Utility of serum periostin and free IgE levels in evaluating responsiveness to omalizumab in patients with severe asthma. Allergy. 2016;71:1472-1479.
 4. Hamada S, Tatsumi S, Kobayashi Y, Matsumoto H, Yasuba H. Radiographic Evidence of Sinonasal Inflammation in Asthma-Chronic Obstructive Pulmonary Disease Overlap Syndrome: An Underrecognized Association. J Allergy Clin Immunol Pract. 2017;5:1657-1662.
 5. Matsumoto H, Kanemitsu Y, Nagasaki T, et al. Staphylococcus aureus enterotoxin sensitization involvement and its association with the CysLTR1 variant in different asthma phenotypes. Ann Allergy Asthma Immunol. 2017;118:197-203.
 6. Sunadome H, Matsumoto H, Petrova G, et al. IL4Ralpha and ADAM33 as genetic markers in asthma exacerbations and type-2 inflammatory endotype. Clin Exp Allergy. 2017;47:998-1006.
 7. 長崎忠雄、松本久子: 成人喘息のバイオマーカー (好酸球・ペリオスチン). アレルギ-の臨床. 2017年12月臨時増刊号
 8. Matsumoto H. [Type 2 Biomarkers in Adults Asthma]. Arerugi. 2018;67:891-900. 和誌
 9. Suzukawa M, Matsumoto H, Ohshima N, Matsumoto H, et al. Baseline serum CXCL10 and IL-12 levels may predict severe asthmatics' responsiveness to omalizumab. Respir Med. 2018;134:95-102.
 10. Nagasaki T, Sato K, Kume H, Matsumoto H, et al. The prevalence and disease burden of severe eosinophilic asthma in Japan. J Asthma. 2019. in press
 11. Sunadome H, Matsumoto H, et al. Correlation between eosinophil count, its genetic background and body mass index: The Nagahama Study. Allergol Int 2019 in press
 12. Matsumoto H. Our obligation to find treatable and untreatable traits in patients with chronic airway diseases. Respir Invest 2019 in press
- [学会発表](計 15件)
1. 石山祐美、松本久子 ほか: 非2型喘息における増悪因子の検討。第57回日本呼吸器学会学術講演会 2017.4.21 東京
 2. Sunadome H, Matsumoto H, et al. Associations between blood eosinophil count and body mass index, lung function and genetic polymorphisms in the general population: The Nagahama Study. American Thoracic Society 2017. 5 Washington DC, USA
 3. 森本千絵、松本久子ほか:Xolair 導入後も増悪が残る重症喘息例の検討。第66回日本アレルギー学会学術大会 2017.6.16.東京
 4. 砂留広伸、松本久子ほか: 一般人口における末梢血好酸球数と BMI、遺伝子多型との関係-ながはま疫学研究 第66回日本アレルギー学会学術大会 2017.6 東京
 5. Ishiyama Y, Matsumoto H, et al. Risks for asthma exacerbations in patients with type 2-low endotype. European Respiratory Society 2017 Milano, Italy
 6. 松本久子. 重症難治性喘息への挑戦 ~病態解析から得られたもの、そうでないもの~. 第79回日本呼吸器学会九州支部秋季学術講演会 2017.9.23 大分
 7. Matsumoto H: Different response patterns to omalizumab in severe allergic asthma in Symposium "Update on molecular-targeted therapy in severe asthma" 第58回日本呼吸器学会学術講演会 2018.4.29.大阪
 8. 松本久子. Type 2炎症としての喘息と併存症. 第58回日本呼吸器学会学術講演会 2018.4 大阪

9. 松本久子. 生物学的製剤. 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会 2018.4 大阪
10. Morimoto C, Matsumoto H, et al. Elevated serum free IL-18 levels may indicate partial resistance to omalizumab. American Thoracic Society 2018.5 San Diego, USA
11. 森本千絵、松本久子ほか:Xolair 導入後の血清総 IgE などの推移 第 67 回日本アレルギー学会学術大会 2018.6.22.東京
12. 松本久子:難治性重症喘息への挑戦. 第 91 回日本呼吸器学会近畿地方会 2018.7 月神戸(誌上発表)
13. 松本久子:喘息フェノタイプと 2 型炎症: シンポジウム喘息フェノタイプと関連因子 国際喘息学会日本・北アジア部会 2018.10.4.東京
14. Matsumoto H: Management of severe asthma using biologics with greater precision. Asian Pacific Society of Respiriology. 2018.11.29.台北
15. Matsumoto H: Establishment of precision medicine for asthma using its endotypes. European Academy of Allergy and Clinical Immunology. 2019.6.4 Lisbon, Portugal

〔図書〕(計 3 件)

1. 松本久子:難治性喘息の病態・フェノタイプ、バイオマーカー; 診断と治療の ABC, 新実彰男企画 最新医学. 2018 年
2. Chapter 15: Matsumoto H. Roles of periostin in asthma. In: Kudo A, editor: Periostin, Springer 2019
3. Chapter 13: Matsumoto H. Treatment with Anti IgE monoclonal antibody and free IgE. How effective is the treatment with anti IgE antibody for asthma? In: Yokoyama A, editor: Advances in Asthma-pathophysiology, diagnosis and treatment, Springer 2018

〔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:
 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:
 国内外の別:

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 小熊毅

ローマ字氏名: Tsuyoshi Oguma

所属研究機関名: 京都大学医学部附属病院

部局名: 呼吸器内科

職名：特定助教

研究者番号（8桁）：50601324

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。