

機関番号：24402
研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2008～2010
課題番号：20590902
研究課題名 (和文) 喘息予備軍の発症要因に関する細胞内シグナルクロストークに基づいた多遺伝子同時解析
研究課題名 (英文) Co-analysis of multi-gene polymorphisms related to future development of asthma
研究代表者
吉川 貴仁 (YOSHIKAWA TAKAHIRO)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号 10381998

研究成果の概要 (和文)：

気管支喘息の発病には、気道過敏性亢進（刺激に容易に気道が細くなる性質）が伴う。アレルギー体質を有し呼吸器症状のない若年成人にも亢進者が存在し、小児期に喘鳴症状を有したが成人期に無症状である者と同様に、将来成人喘息を発病する危険群が潜む。この未病危険群の発症要因を新しい遺伝統計学手法で調べた結果、上皮増殖因子受容体とプロテアーゼ活性化受容体-1 の遺伝子型の違いが危険群と非危険群の間で認められた。

研究成果の概要 (英文)：

Airway hyperresponsiveness (AHR) is a hallmark of bronchial asthma. Some of young atopic adults without respiratory symptoms exhibit AHR, and they as well as those with a remission of childhood asthma constitute a possible risk group for adult-onset asthma. The present study raised the possibility that gene polymorphism of epidermal growth factor receptor (EGFR) and protease activated receptor (PAR)-1 might be associated with the formation of these risk groups.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：喘息予備軍、多遺伝子同時解析、気道過敏性

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は世界中で増加している呼吸器疾患で、WHO の報告 (2005 年) では全世界で約 3 億人が罹患している。その発症に関わる遺伝的要因を解明する試みが大規模になされてきたが、結果が研究間で一貫しない。

2. 研究の目的

そこで、喘息発症の遺伝的要因の解明をより進めるためには、今回我々は新たな研究デザインを考案した。

(1) 対象者の基準をより単純化する

喘息患者には、種々の特徴（形質：phenotype）は認められるが、明確な診断基準が存在しない。多くの遺伝子研究では、数百人を超える対象患者を多数の医師が別々に診断するため、患者を選ぶための喘息の定義や基準は個々の臨床家の主観的な判断に依存し医師間で不均一になる。その点、気道過敏性（Airway hyperresponsiveness：AHR）は喘息患者に普遍的で最も重要な phenotype で、ヒスタミンやメサコリンのような気道収縮を誘発する吸入物質に対して容易に収縮する性質と定義され、その測定は客観的であるため、遺伝子研究に適していると思われる。

（2）早期の病態を有する対象（予備軍）

AHR は主に 2 つの起源から生ずる：①気道平滑筋の反応性の亢進（一次性 AHR）と、②気道の炎症や組織構造の変化等の複雑な気道病態に基づくもの（二次性 AHR）であり、②は有症状喘息患者に認められる。一方、呼吸器症状はないがアトピー素因を有する若年成人のうち AHR を有する群（無症候性気道過敏性（Asymptomatic AHR：A-AHR）の気道分泌物には炎症成分を殆ど認めず（Nomura N and Yoshikawa T. *Respirology.* 2007；12：516-22.）、①に近い状態である。また医師から過去に小児喘息の診断を受けた者（小児喘息既往群：past-asthmatics：PA 群）や未診断でも小児期に喘鳴症状があった者（未診断喘鳴既往群：past-wheezers：PW 群）で、現在は無症候である若年成人も、気道病態は有症状患者ほど進行していない。これらの群は将来の成人喘息発症への前段階と考えられており（Hopp RJ. *Am Rev Respir Dis.* 1990；141：2-8. など）、喘息発症の源流の機序を調べる上で重要な群である。

（3）生来から気道の構造・機能に変化をもたらす可能性のある分子

（有症状）成人喘息患者の気道上皮には、

病的損傷と修復に関わる Epidermal growth factor receptor（EGFR）の発現増加が認められ AHR の一因と考えられる。一方、Protease activated receptor-1（PAR-1）は気道を含め様々な組織に発現し、主にトロンビンがリガンドとして作用し、平滑筋など組織の構造・機能変化などを起こす（McNamara CA. *J Clin Invest* 1993；91：94-8.）。（有症状）成人喘息患者の気道分泌物中ではトロンビン活性が亢進しており（Kanazawa H and Yoshikawa T. *Chest.* 2007；132：1169-74.）、トロンビン-PAR-1 系が（有症状）喘息気道の病態に役割を果たす。しかし、EGFR と PAR-1 の上記予備軍における役割は未だ検討されていない。加えて、両受容体が AHR の成立に果たす役割に関して、各レセプターで個別に議論されているに過ぎないが、最近の細胞生理学の研究では PAR-1 の細胞内シグナル経路は EGFR のそれと共有する部分が存在すると報告されている（Dery O. *Am J Physiol.* 1998；274：C1429-52.）（transactivation または細胞内シグナル・クロストーク）。

（4）複数分子の遺伝子の複合的な効果を同時に検討する研究へ（細胞内シグナル・クロストークを踏まえて）

従来の遺伝子研究では、単一遺伝子座の対立遺伝子（アレル）の多型（一塩基多型（SNP）：A/G など）や複数遺伝子座のアレルの並び順（haplotype：GGC/CGC など）を疾患群と対照群の間で比較してきた（Umeda A and Yoshikawa T. *Respirology* 2008；13：346-52.）。一方、最近では haplotype block という概念が応用されつつある（Daly MJ. *Nature Genet.* 2001；29：229-32.）。Hardy-Weinberg 平衡の理論によれば、各 SNP 座のアレルの頻度は他の SNP 座のアレルとは独立している。しかし、haplotype block では block 内に含まれる複数の SNP 遺伝子座の多型パターンが、block

外の遺伝子座に比べて連動する（独立していない）形で認められるもので、これは歴史的にこれらの遺伝子領域が一塊 (block) で遺伝子組み換え現象を起こしてきた結果と考えられている。block は複数分子の遺伝子領域にまたがり、この概念を利用し幅広い遺伝子領域のなかの block の境界線を見つけることで、複数の分子を同時に解析できる。

以上 (1) ~ (4) を踏まえて、気管支喘息の成立に関係しかつ細胞内シグナルを共有している 2 つの受容体 (EGFR と PAR-1) 遺伝子の haplotype block 内のアレルパターンの違いが上記 A-AHR 群を含め、喘息予備軍と関連するかを中心に、アトピー素因を有する無症状若年成人群で検討した。

3. 研究の方法

(1) 被験者

大阪市立大学の在校生の中から現在呼吸器症状のない健康被験者を抽出し、説明と同意の上で、①問診（アレルギー性疾患・小児喘息の診断や小児期の喘鳴症状の有無）の他、②血液：好酸球数やアレルギー特異的な免疫グロブリン E 抗体量、③呼吸機能：1 秒量など、④メサコリン吸入に対する AHR 閾値 (PC₂₀) を測定した。

(2) EGFR・PAR-1 遺伝子の SNP タイピング及び haplotype block の同定

各被験者の DNA を白血球から抽出したのち、EGFR・PAR-1 両遺伝子上の SNP 座のタイピングを行った。SNP 座は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) website のデータベースに記載された既知の SNP 座からマイナーアレル頻度が 5%以上のものを選んだ (EGFR 上に 12 個、PAR-1 上に 7 個、次ページの表を参照)。次にこれら各候補 SNP 周囲の DNA 配列データを元に PCR 法を用いて、各被験者の DNA の候補 SNP 座の核酸を増幅さ

せて、各人のアレルのタイピングを行った。次に、そのデータをもとに、Hardy-Weinberg 平衡の理論を応用した最尤法アルゴリズムを用いて、EGFR・PAR-1 両遺伝子領域内で変異パターンが連動している haplotype block を同定した。(DNA 抽出やタイピング法、最尤法については、Yoshikawa T. *Med Sci Monit* 2010; 16: CR163-71. を参照)。

(3) A-AHR の有無別にみた 2 群間の各 block の出現頻度の違い

各 block 内で見られる haplotype (たとえば C-T-T 等) の出現頻度を A-AHR の有無の群別に計算して、両群に頻度差が有意に存在するかをピアソンの χ^2 乗検定と Fisher の正確テストを用いて検討した。

(4) 小児喘息の既往や喘鳴症状の既往別に見た検討 (A-AHR 以外の視点で)

次に、アトピー素因を有するが現在呼吸器症状のない健康若年成人において、PA 群や PW 群にも注目し、そういった既往のない群 (never-wheezers : NW 群) との間に呼吸機能・アレルギー感作の面でどのような差異や類似点があるかを検討するとともに、上記と同様の EGFR・PAR-1 に関する遺伝子学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) A-AHR の頻度

アトピー素因を有するが現在呼吸器症状のない健康若年成人の中で、何らかのアトピー素因を有しかつ DNA サンプルを得られた 189 例のうち、アメリカ胸部疾患学会公認の PC₂₀ 基準値である 8.0mg/ml を下回る者 (AHR 有りの者) は 72 例 (38%) であった。

(2) EGFR・PAR-1 遺伝子の SNP タイピング及び haplotype block の同定の結果

候補 SNP 座 (計 19 個) における各アレル頻度を被験者の DNA サンプルから計算し、そ

のデータを元に、両分子をコードした遺伝子領域の範囲内でいくつかの区別できる haplotype block が同定できた。これらの遺伝子のアレルの多型パターンの違いが AHR の有無に影響するかに関して、case (A-AHR 例 72 例)・control (非 A-AHR 例 117 例) の比較研究を行った。PAR-1 遺伝子に関しては case・control 間で有意な差をもつ部位は存在しなかったが、EGFR 遺伝子上ではイントロン上の *rs4947972* と *rs12718945*、エクソン上の *rs2072454*、*rs2227983*、*rs2293347* から構成される haplotype block において、そのアレル多型パターンが case 対 control の間で有意な差を認めた(下表)。

	SNP loci	(1)	(2)	(3)
EGFR	<i>rs 12668421</i> A/T			
	<i>rs 4947488</i> T/A			
	<i>rs 11766798</i> G/A			
	<i>rs 723527</i> G/A			
	<i>rs 9642564</i> A/G			
	<i>rs 4947972</i> C/G	●	●	●
	<i>rs 12718945</i> G/T	●	●	●
	<i>rs 13247687</i> A/G			
	<i>rs 2072454</i> T/C	●		
	<i>rs 2227983</i> G/A		●	
	<i>rs 1050171</i> G/A			
	<i>rs 2293347</i> A/G			●
	<i>rs 27135</i> A/G			
	<i>rs 2227750</i> A/G			
PAR-1	<i>rs 37243</i> A/G			
	<i>rs 37244</i> A/G			
	<i>rs 253072</i> A/G			
	<i>rs 153311</i> A/G			
	<i>rs 5893</i> A/G			

P value by Fisher's exact test **0.0171 0.0109 0.0333**
in 2 x *k* contingency table
(*k*: the number of haplotypes for cases and controls)

以上より、A-AHR の有無に関して EGFR と PAR-1 の 2 遺伝子間の相互作用は認められなかったが、EGFR 単独でも、今回注目したアレルギー性素因と A-AHR の有無を決定する要因となることを見出した。(Yoshikawa T. *Med Sci Monit* 2010; 16: CR163-71.)

(3) 小児喘息の既往や喘鳴症状の既往別に見た検討 (A-AHR 以外の視点で)

PA 群 25 名、PW 群 50 名 (AHR あり群 21 名、

なし群 29 名)、NW 群 60 名 (AHR なし) の合計 135 名で下記の点を検討した。

①呼吸機能: PA や PW (なかでも AHR を有する群) は、1 秒量 (%FEV₁: 体格・性別から予測される正常基準 FEV₁ 値との比率) や最大中間呼気流量 (%FEF₂₅₋₇₅; 正常基準 FEF₂₅₋₇₅ 値との比率) が、NW や AHR のない PW の値よりも低かった。②アレルギー感作: PA や PW (なかでも AHR を有する群) は、血液好酸球や血清 IgE、とくにハウスダストに対する IgE 抗体量が、NW や AHR のない PW の値に比べて高かった。

(Yoshikawa T. *Respir Med* 2011;105:24-30.)

(Yoshikawa T. *Allergol Int* accepted 2011.)

	SNP loci	(1)	(2)
EGFR	<i>rs 12668421</i> A/T	●	●
	<i>rs 4947488</i> T/A	●	●
	<i>rs 11766798</i> G/A		
	<i>rs 723527</i> G/A		
	<i>rs 9642564</i> A/G		
	<i>rs 4947972</i> C/G		
	<i>rs 12718945</i> G/T		
	<i>rs 13247687</i> A/G		
	<i>rs 2072454</i> T/C		
	<i>rs 2227983</i> G/A		
	<i>rs 1050171</i> G/A		
	<i>rs 2293347</i> A/G		
	<i>rs 27135</i> A/G		
	<i>rs 2227750</i> A/G		
PAR-1	<i>rs 37243</i> A/G	●	
	<i>rs 37244</i> A/G		
	<i>rs 253072</i> A/G		
	<i>rs 153311</i> A/G		●
	<i>rs 5893</i> A/G		

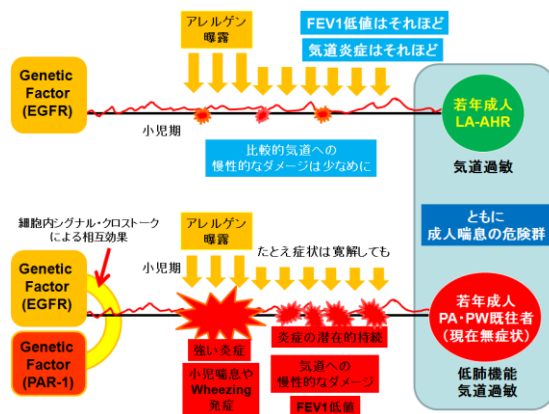
P value by Fisher's exact test **0.0127 0.0374**
in 2 x *k* contingency table
(*k*: the number of haplotypes for cases and controls)

③ 遺伝子学的検討: PA と PW を合わせた群 (case: 75 名) では、NW 群 (control) との間に、EGFR のイントロン上の *rs12668421* と *rs4947488* と PAR-1 のイントロン上の *rs37243* と *rs153311* から構成される haplotype block において、そのアレル多型パターンが case 対 control の間で有意な差を認めた (上表)。即ち、PA と PW は NW とは

異なる遺伝子的背景を EGFR と PAR-1 上に同時に有している可能性が示唆された。

まとめ

本研究の結果から、現在呼吸器症状のないアトピー素因を有する若年成人の AHR (A-AHR) の有無を決定する要因として、EGFR 遺伝子の関与が認められた。一方、PA や PW (いずれも喘息症状を生じる気道病態にまで過去に一過性に至ったことが考えられる) 群の遺伝子学的な検討から、小児期の症状の有無を決定した要因には、EGFR+PAR-1 遺伝子領域を block に含むような複数の遺伝子にまたがるものが考えられた。また、呼吸機能的・血清学的な面からみた結果から、過去に喘鳴症状を有した群 (PA や PW 群) では成人になって呼吸器症状は寛解して一見正常に見えても、呼吸機能の潜在的な低下やアレルギー感作の亢進が認められ、将来の成人気管支喘息の発症の温床になる可能性が示唆された。



今回の研究では、異なる受容体の下流にある細胞内シグナル・クロストークを考慮した上で、複数の遺伝子 (多型) が形質に及ぼす相乗効果を調べる試みを行った。従来、大規模な被験者数と人種で行われてきた網羅的な遺伝子研究 (Genome-wide association study : GWAS) からは多くの貴重な情報がもたらされたが、研究間で結果が一貫していな

い (Moffatt MF. *NEJM* 2010;363:1211-21.)。今回の試みは従来の遺伝子学的手法に新しい方向性を提示するものと考えられる。

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 3 件)

Yoshikawa T, Kanazawa H. Phenotypic differences between asymptomatic airway hyperresponsiveness and remission of asthma. *Respir Med.* 査読有 2011; 105: 24-30.

Yoshikawa T, Kanazawa H. Characteristics of young atopic adults with self-reported past wheeze and airway hyperresponsiveness. *Allergol Int.* 査読有 accepted 2011.

Yoshikawa T, Kanazawa H, Tanaka J, Fujimoto S, Yamamoto T. Gene polymorphism of epidermal growth factor receptor and airway hyperresponsiveness in young allergic subjects without respiratory symptoms. *Med Sci Monit* 査読有 2010; 16: CR163-71.

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/sportsmed/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 貴仁 (YOSHIKAWA TAKAHIRO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号 : 10381998

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし