

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591290

研究課題名（和文） 喘息感受性の候補遺伝子 *TSLP* と SNPs による発現調節研究課題名（英文） Functional SNPs in *TSLP* gene is associated with susceptibility to asthma

研究代表者

原田 通成 (HARADA MICHISIHIGE)

独立行政法人理化学研究所・免疫制御研究グループ・研究員

研究者番号：20333487

研究成果の概要（和文）：

*TSLP* はアレルギー発症に重要なサイトカインであることが明らかになっている。本研究では、疾患-対照相関解析を用いて小児ならびに成人喘息の発症あるいは呼吸機能と *TSLP* 遺伝子領域に高い相関のある遺伝子多型を見いだした。すなわち、プロモーター領域には発症と相関する SNPs (rs3806933 および rs2289276) を同定した。感染疑似物質である poly(I:C) 刺激したヒト気道上皮細胞ではこれらの関連 SNPs によって、*TSLP* 発現誘導活性を有意に上昇されることを見いだした。また、イントロン2には、成人喘息での呼吸機能に関連する SNP (rs2289278) を見出した。以上のことから、*TSLP* 遺伝子多型には喘息との関連性があり、ウイルスの気道感染によって誘導される *TSLP* 産生の亢進に関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Thymic stromal lymphopoietin (*TSLP*) triggers dendritic cell-mediated T helper (Th) 2 inflammatory responses. We investigated whether *TSLP*-polymorphisms could affect the susceptibility to and clinical phenotypes of bronchial asthma. We selected three Tag SNPs and conducted association studies of the *TSLP* gene using two independent populations (639 childhood atopic asthma patients and 838 controls, and 641 adult asthma patients and 376 controls, respectively). We further examined effects of corticosteroids and a long-acting  $b_2$ -agonist (LABA) (salmeterol) on expression levels of the *TSLP* gene in response to poly(I:C) in NHBE. We found promoter polymorphisms, rs3806933 and rs2289276, significantly associated with disease susceptibility in both childhood atopic and adult asthma. The functional SNP rs3806933 was associated with asthma (meta-analysis,  $P = 0.000056$ ; odds ratio, 1.29; 95% confidence interval, 1.14-1.47). A genotype of rs2289278 was correlated with pulmonary function. We also found that the induction of *TSLP* mRNA and protein expression induced by poly(I:C) in NHBE was synergistically impaired by a corticosteroid and salmeterol. *TSLP* variants are significantly associated with bronchial asthma and pulmonary function. Thus, *TSLP* might be a therapeutic target molecule for combination therapy.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：TSLP, 遺伝子多型, ウイルス感染刺激, 気道上皮細胞, 薬理遺伝学, 呼吸機能

### 1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患は国内外を問わず増加の一途であり、一部は重症、難治化し社会生活に支障をきたすことから、その病態の科学的な解明が待たれている。気管支喘息は遺伝要因と環境要因が複雑に関与して引き起こされる多因子疾患であり、体質（個体間の遺伝子の多様性）の違いがウイルス感染や大気汚染等の環境要因と相互に作用し、発症、進展していくと考えられている。近年のゲノム解析技術の進歩は著しく、遺伝子多型を利用した関連解析や遺伝子多型の機能解析により、複数の多因子疾患でその病態が明らかになりつつある。

TSLPはIL-7 familyに属するサイトカインで、最近、マウス喘息モデルやヒトアトピー性皮膚炎において、TSLPのアレルギー炎症への関与と、そのメカニズムが詳細に解明され（Ziegler SF *et al.* Nat Immunol. 2006）、樹状細胞や単球細胞を介したアレルギー炎症の重要なイニシエーターの一つと考えられている。一方、気管支喘息患者の肺組織でTSLPの発現と喘息発症との関連が明らかにされたが、TSLP産生誘導機構の詳細は未解明であった（Ying S *et al.* J Immunol. 2005）。

気道感染症は古くから気管支喘息発症、

進展リスクを高める原因の一つとして注目されている（Gern J. E. *et al.* Nat Rev Immunol, 2002）。これまでに、当研究代表者らは、気管支喘息の炎症の現場である気道の構成細胞の気道上皮細胞が、病原体関連分子（poly(I:C)、ウイルス感染疑似物質）の刺激でTSLPを産生することを見いだした。また、TSLP遺伝子の転写調節領域に存在する一塩基多型（SNP）（rs3806933）によりAP-1結合配列がゲノム上に生じ、AP-1に対する結合能の違いが生じる事、その多型によりTSLPの転写活性が亢進することを報告してきた（Harada M *et al.* Am J Respir Cell Mol Biol. 40 368-374, 2009）。

### 2. 研究の目的

背景で記述したように、感染時の気道上皮細胞のTSLP産生は、遺伝子多型により発現誘導が亢進する可能性があり、その産生亢進が気管支喘息の発症に関連する可能性が示唆された。

本研究では、気管支喘息発症とTSLP遺伝子多型の関連、およびメカニズムを明らかにする目的で以下の3点に焦点を絞って、研究を推進した。

#### 1) 気管支喘息発症と *TSLP* 遺伝子多型

成人および小児気管支喘息の発症と *TSLP* 遺伝子多型の関連性を評価するため、患者-対照相関解析を行った。

#### 2) 気管支喘息関連形質と *TSLP* 遺伝子多型

気管支喘息関連形質に対する *TSLP* の遺伝的要因を評価した。さらに *TSLP* 多型の遺伝薬理学的アプローチとして、気管支喘息治療薬（グルココルチコイド、長時間作用型  $\beta$  刺激薬の合剤）による喘息患者の呼吸機能の改善効果と *TSLP* 遺伝的要因を調査し、治療効果の予測に有用か否か調査した。

#### 3) *TSLP* 多型の遺伝薬理学的作用機序の解明

気道上皮細胞での感染刺激の誘導系を用いて、*TSLP* 多型間の発現誘導の違いと fluticasone/salmeterol による相乗的な *TSLP* の発現抑制効果について検討した。

### 3. 研究の方法

目的で記述した各 3 点の項目について、下記の通り行った。

#### 1) 気管支喘息-対照相関解析

すでに同定済みの *TSLP* 遺伝子領域の全 SNPs と、*TSLP* 遺伝子領域の詳細な連鎖不平衡マップから (Harada M et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2009)、マーカー SNPs を選択して *TSLP* 遺伝子多型と小児および成人気管支喘息の発症について  $\chi^2$  乗検定、Cochran. Armitage 検定を用いて相関解析を行った。

#### 2) 関連形質-対照相関解析

気管支喘息患者サンプルとそれぞれの関連形質の臨床データ (60 名分) を用いて、被検者サンプルの血中 IgE 濃度、好酸球数、重症度等の臨床データを用いて多型の関連性についてトレンド解析を行った。

被検者サンプルの呼吸機能については、合剤 (fluticasone / salmeterol) を使用した際の呼吸機能の改善率 ( $\Delta$ FEV1.0%; (post

FEV1.0-preFEV1.0) /preFEV1.0) と *TSLP* 遺伝子多型の関連を、Spearman's correlation coefficient rank test, multiple regression analysis を用いて検討した。

#### 3) ヒト気道上皮細胞株を用いた機能解析

気道上皮細胞を用いて遺伝子多型間の *TSLP* 発現誘導の差異を評価するために 2 つの方法を用いた。一つ目は、多型間のプロモーター活性の比較するため、レポーターアッセイを用いた。二点目は、異なる *TSLP* 遺伝子型を持つヒト気道上皮細胞を収集して、遺伝子型ごとに比較検討した。すなわち、*TSLP* 遺伝子の感受性アレル・ホモ、非感受性アレル・ホモおよびヘテロ遺伝子型について、それぞれ 2 人に由来する気道上皮培養細胞で評価した。*TSLP* 発現誘導には poly(I:C) を用いた。また、喘息薬として fluticasone/salmeterol での産生抑制能に比較検討を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) 気管支喘息の発症と関連する *TSLP* 多型

*TSLP* 遺伝子領域に小児喘息 (639 検体 vs コントロール 838 検体) ならびに成人喘息 (641 検体 vs コントロール 376 検体) の発症と高い相関のある遺伝子多型 (rs3806933 および rs2289276) を見いだした (meta-analysis,  $P = 0.000056$ ; odds ratio, 1.29; 95% confidence interval, 1.14-1.47)。この両方の SNPs は *TSLP* 遺伝子の転写制御領域に位置する。これらの多型はウイルス感染疑似物質である poly(I:C) 刺激したヒト気道上皮細胞で *TSLP* 発現誘導活性の上昇を促進し、特に SNP (rs3806933) が転写因子 AP-1 と結合し、*TSLP* の産生亢進に働く機能があることを、すでに我々が解明したものである (Harada M et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007)。気道 (上皮細胞) へのウイルス感染では、関連多型による高い *TSLP* 発現が誘導

されアレルギー炎症が誘導されやすくなる  
ことが推察された。TSLP の遺伝要因では、感  
染という外的要因によって喘息発症を引き  
起こす可能性が高まることを示唆するもの  
と考えた。

## 2) 気管支喘息治療薬の効果と TSLP 多型

成人喘息での合剤 (fluticasone /  
salmeterol) の使用による呼吸機能の改善率  
( $\Delta$ FEV1.0%など) は TSLP 遺伝子のイントロ  
ン2に存在する SNP(rs2289278)と関連するこ  
とを見出した( $P = 0.0021$ )。一方、血中 IgE  
濃度、好酸球数、重症度等の臨床データと相  
関する TSLP 多型は認められなかった。

## 3) 喘息の発症の制御 SNP の作用機序の解明

感染刺激時の気道上皮細胞の TSLP 発現誘  
導の著しい上昇および感受性アレルの亢進  
効果に対して、気管支喘息治療薬であるグル  
ココルチコイドと $\beta$ 2遮断薬の併用で多型に  
関連なく TSLP 産生の強い抑制を引き起こし  
た。これはグルココルチコイド単体の抑制さ  
れた活性に対しても有意な抑制であった。気  
管支喘息治療薬の合剤効果の一端には、気道  
上皮細胞へ直接作用して TSLP 産生の抑制を  
介した気管支喘息の制御の可能性が示唆さ  
れた。

一方、異なる TSLP 遺伝子型を持つヒト気  
道上皮培養細胞での比較では、いずれの上皮  
細胞においても poly(I:C) 刺激による TSLP 発  
現誘導と喘息薬による抑制効果は示された  
が、その値のふれ幅は個体間差の影響が大き  
く、遺伝子型の傾向は見いだせなかった。こ  
れには、刺激経路や情報伝達経路に関わる他  
の遺伝子多型も複雑に関与する他の要因が  
考えられる。分析サンプル数が少ないために  
傾向が認められないものと推察された。

## 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 5 件)

1) Harada M, Hirota T, Jodo AI, Doi S,  
Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T,  
Noguchi E, Yoshihara S, Ebisawa M, Saito  
H, Matsumoto K, Nakamura Y, Ziegler SF,  
Tamari M. “TSLP Promoter Polymorphisms  
are Associated with Susceptibility to  
Bronchial Asthma.” Am J Respir Cell Mol  
Biol 44.787-793 (2011), 査読有

2) 原田 通成, 広田 朝光, 人見 祐基, 玉  
利 真由美. “アレルギーの遺伝要因: 自然免  
疫応答の関与” 実験医学 27.3360-3365  
(2010), 査読無

3) 原田 通成, 広田 朝光, 玉利 真由美.  
“気管支喘息と自然免疫関連遺伝子” 感  
染・炎症・免疫 39.364-366 (2010), 査読無

4) 原田 通成, 広田 朝光, 玉利 真由美, 人  
見 祐基.

“遺伝子多型とアレルギー疾患” アレルギ  
ーの臨床 30.164-167 (2010), 査読無

5) 原田 通成, 広田 朝光, 人見 祐基, 玉  
利 真由美.

“小児気管支喘息と遺伝子多型” 喘息  
22.154-158 (2009), 査読無

[学会発表] (計 2 件)

1) 原田 通成, 広田 朝光, 人見 祐基, 城  
道 絢, 玉利 真由美 “ジェノミクス 各論  
- 遺伝子多型を用いたアレルギー疾患の解  
析.” 第 59 回日本アレルギー学会秋期学術  
大会(秋田). 2009 年 10 月 29-31 日

2) 玉利 真由美, 原田 通成, 広田 朝光,  
人見 祐基 “TSLP とアレルギー疾患” 第  
21 回日本アレルギー学会春季臨床大会(岐  
阜). 2009 年 6 月 4-6 日

[その他]

ホームページ等

独立行政法人理化学研究所・免疫制御研究グ  
ループ

[http://web.rcai.riken.jp/en/labo/regula  
tion/index.html](http://web.rcai.riken.jp/en/labo/regulation/index.html)

独立行政法人理化学研究所・呼吸器疾患研究  
チーム

[http://www.src.riken.jp/group/resp/inde  
x.html](http://www.src.riken.jp/group/resp/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 通成 (HARADA MICHSHIGE)  
独立行政法人理化学研究所・免疫制御研究グループ・研究員  
研究者番号：20333487

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

玉利 真由美 (TAMARI MAYUMI)  
独立行政法人理化学研究所・呼吸器疾患研究チーム・チームリーダー  
研究者番号：00217184