

フェノタイプに基づく喘息の感受性遺伝子の同定

2 0 1 4

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

谷田貝洋平

目次

第 1 章	序章	4
第 2 章	喘息発症関連遺伝子の同定	
	1. 重喫煙の影響を除外した成人喘息集団における 喘息発症関連遺伝子の同定	7
	2. 中高年発症喘息集団における喘息発症遺伝子の同定	27
第 3 章	血清総 IgE 値に関連する遺伝子の同定	43
第 4 章	総括	74
略語		75
謝辞		76
参考論文		77

第1章 序章

我が国の喘息予防・管理ガイドラインの成人喘息の定義によると、「成人喘息は、気道の慢性炎症、可逆性のある種々の程度の気道狭窄と気道過敏性の亢進、そして臨床的には繰り返し起こる咳、喘鳴、呼吸困難で特徴づけられる閉塞性呼吸器疾患である。気道狭窄は、自然に、あるいは治療により可逆性を示す」と記されている¹⁾。つまり、喘息の病態では、可逆性のある種々の程度の気道狭窄と気道過敏性の亢進に加えて、慢性の気道炎症が重要な役割を担っている。

喘息の発症には外因性因子と内因性因子の相互作用が複雑に関与している。外因性因子としては、アレルゲン、喫煙、粉塵暴露、呼吸器感染症などがあり、内因性因子としては性別、年齢、アトピー素因、肥満、さらには複数の遺伝子変異などが考えられている。喘息の基本病態は慢性の気道炎症であるが、個々の症例においては発症時期、誘因、症状、経過、治療反応性などが様々である。したがって現在では、喘息は単一の疾患ではなく、可逆性の咳・喘鳴・呼吸困難を特徴とする症候群であると考えられている。従来、喘息はアトピーの有無や重症度によって分類されていたが、近年これらの多様な臨床的指標や呼吸機能などの病態生理学的指標に基づいて、恣意性なく類似のグループを同定するクラスター解析も試みられている。我々の研究室の解析では、日本人成人喘息は 6 つの異なるクラスターに分類されることを示した²⁾。各喘息クラスターにはそれぞれ異なった分子病態が関与している可能性がある。

分子病態解明へのアプローチとしては遺伝子解析が極めて有用である。喘息感受性遺伝子を同定する手法として、候補遺伝子多型関連解析がさかんに行われてきた。しかし、この解析法は、これまでの知識に基づいて選択される候補遺伝子についてのみ解析する手法で、未知の疾患感受性遺伝子を同定することは不可能である。それに対し、ゲノムワイド関連解析（Genome wide association study; GWAS）では、数十万～数百万の一塩基多型（single nucleotide polymorphism; SNP）をタイピングする。これにより、先入観なしに

全ゲノムを解析するため、既知の候補遺伝子のみならず、未知の疾患感受性遺伝子が同定される可能性がある。現在までに、喘息発症に対して 30 以上の大規模な GWAS が行われ、50 以上の遺伝子の関与が報告されている(Catalog of Published Genome-Wide Association Studies; <http://www.genome.gov/26525384>)。我々の研究室でも、理化学研究所ゲノム医学研究センターおよび筑波大学遺伝医学研究室と共同して、喘息発症に対する GWAS を行ってきた。その結果、成人喘息に対して *TSLP* 遺伝子など 5 つの遺伝子領域の重要性を示し³⁾、また小児喘息に対しては *HLA-DP* 遺伝子の関与を明らかにした⁴⁾。GWAS による網羅的な喘息関連遺伝子変異の解析が進むにつれ、喘息病態の分子レベルでの多様性も明らかになりつつある。

一方、これまでに報告された喘息感受性遺伝子の喘息発症に及ぼす寄与度は極めて小さく、これまでに報告されている喘息の遺伝率のわずかを説明できるのみである (Missing heritability)。従って、喘息発症に関与する、多くの遺伝的因子が依然、同定されていない可能性がある。

本研究の目的はより均一なフェノタイプを有する患者集団を対象とした解析を行うことで、喘息発症に関係する新規の遺伝的素因を明らかにすることである。喘息集団と正常健康人集団を用い、ケース・コントロール GWAS を行った。第 2 章では、重喫煙者を除外した喘息集団および 40 歳以上で初めて発症した喘息集団を対象として GWAS を行った。また第 3 章では、喘息と強く関係している血清総 IgE 値に対して GWAS を行った。

我々の検討によって、多様な分子病態からなる症候群としての喘息の発症メカニズムがより明らかにされ、新たな治療薬の開発にも結びつく可能性がある。また個々の症例に対して、それぞれの病態に基づいた最も効果的な個別化した治療を行うことができるようになることが期待される。

第 1 章の参考文献

1. 一般社団法人日本アレルギー学会喘息ガイドライン専門部会監修. 喘息予防・管理ガイドライン 2012. 協和企画. 2012.
2. Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, et al. Asthma phenotypes in Japanese adults - their associations with the CCL5 and ADRB2 genotypes. *Allergol Int.* 2013;62:113-21.
3. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, et al. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nat Genet.* 2011;43:893-6.
4. Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, et al. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Genet.* 2011;7(7):e1002170.

第2章 喘息発症関連遺伝子の同定

1. 重喫煙の影響を除外した成人喘息集団における喘息発症関連遺伝子の同定

背景・目的

候補遺伝子関連解析および GWAS により、現在までに 100 以上の喘息関連遺伝子が報告されている¹⁾。我々の研究室でも日本人成人喘息を対象とした GWAS を行い、5 つの関連遺伝子領域を報告した²⁾。これらの候補関連遺伝子は喘息の病態を解明する上で非常に有用であるが、これまでの報告はゲノム上でそれぞれの領域を代表する頻度の高い遺伝子多型をマーカーとした解析であり、同定された多型が喘息発症に与える影響は極めて小さい。実際には、このような common variant の解析では検出できない遺伝寄与 (missing heritability) が、疾患発症に対しては大きな割合を占める。Missing heritability が起こる理由の一つは、喘息のような多因子の相互作用によって発症する疾患では、様々な分子病態に基づいた多様なフェノタイプが存在するためである³⁾。GWAS のような大規模集団を扱う研究では、喘息の診断のもとに実際には多様なフェノタイプを持った集団を解析していることが多い。多様なフェノタイプを持つ症候群を対象として GWAS を行う場合には、フェノタイプをより均一にすることにより、たとえ最初の集団よりもサンプル数が少なくなろうとも、検出力が上がる可能性がある⁴⁾。このような考えの基に、アトピー性皮膚炎合併喘息集団や中高年発症喘息集団に限定した関連解析が行われ、喘息発症関連遺伝子多型が報告されている⁵⁻⁷⁾。

喫煙は喘息発症に対する重要な外因性危険因子である⁸⁾。喘息関連遺伝子多型が喘息発症に与える影響の程度は喫煙習慣の違いにより異なることが報告されている⁹⁻¹²⁾。さらに、ゲノムワイド連鎖解析により、喘息発症に関わる多くの遺伝子座の影響が、喫煙の有無により修飾されることが明らかにされている¹³⁾。2011 年に発表した我々の喘息に対する

GWAS では喫煙状態に対する検討がされていない¹⁾。そこで今回の研究では、喫煙の影響をなるべく少なくするため、10 pack-years 以上の重喫煙者を除外した喘息集団を対象として GWAS を行った。

方法

倫理声明

この研究は、筑波大学、筑波メディカルセンター、理化学研究所、北海道大学の倫理委員会において承認されており、各施設の倫理指針とヘルシンキ宣言を遵守し、すべての被験者からインフォームド・コンセントを取得した。

対象

筑波 GWAS コホートは、日本人成人健常者集団 734 名と日本人成人喘息患者集団 240 名、計 974 名からなる⁸⁾。健常者はつくば総合健診センターで定期健康診断を受診した一般集団からリクルートした。すべての対象者に対し、エントリー時に詳細な問診を行った。呼吸器症状の有無、病歴、生活習慣、そしてタバコ煙や各種アレルゲン、空気汚染への暴露について調査し、さらに胸部の聴診とレントゲン検査を行うことにより、喘息や COPD などの呼吸器疾患を持つ者を除外した⁹⁾。喘息患者集団は筑波大学およびその関連施設からリクルートされた¹⁾。喘息の診断は、呼吸器内科専門医が日本呼吸器学会の定める喘息診断基準に則り行われた¹⁰⁾。本研究では、喫煙歴が 10 pack years を超える重喫煙者を検討から外すことで、喫煙による影響を最小限に止めた。筑波 GWAS コホートでは 4 名が喫煙歴 10 pack years 以上であり除外された。両群ともに抗原特異的 IgE (MAST 法) が測定された (日立化成株式会社、東京)¹¹⁾。アトピー素因の判定指標には、14 種類の吸入抗原 (コナダニ、ハウスダスト II、ネコ上皮、イヌ上皮、オオアワガエリ、ハルガヤ、ブタクサ、ヨモギ、スギ、ペニシリウム、クラドスポリウム、カンジダ、アルテルナリア、アスペル

ギルス) に対する抗原特異的 IgE の反応性を使用した。つまり、上記 14 抗原のうち少なくとも 1 種類以上の抗原に対し陽性反応 (ルミカウント 4.40 以上) を示す場合、アトピー素因ありとした⁸⁾。すべての喘息患者はわれわれの 2011 年のオリジナル GWAS に含まれている¹⁾。

筑波 GWAS コホートで得られた結果の再現性を確認するために、別の独立した 2 つの日本人集団 (筑波 replication コホートと北海道 replication コホート) を用いた追試を行った。この両コホートとも我々のオリジナルの GWAS には含まれていない¹⁾。また、これら両コホートからも 10 pack years を超える重喫煙者は除外した。なお、筑波 replicaton コホートでは約 19% が重喫煙者、北海道 replication コホートでは約 18% が重喫煙者であった。筑波 replication コホートは 351 名の健常者と 277 名の喘息患者からなり、健常群はつくば総合健診センターの健診受診者からリクルートした⁹⁾。喘息患者は筑波大学附属病院の受診者からリクルートされた¹²⁾。北海道コホートは、北海道大学病院でリクルートされた 180 名の健常者と 141 名の成人喘息患者からなる⁸⁾。

Genotyping

ゲノム DNA は末梢血サンプルから自動 DNA 抽出システム (QuickGene-610L; Fujifilm, 東京) を用いて抽出した。筑波 GWAS コホートの genotyping では Illumina HumanHap550v3610-Quad BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いた⁸⁾。クオリティコントロールには PLINK version 1.07 を用いた¹³⁾。健常者、喘息患者ともすべての被験者において BeadChip 上の 98% 以上の SNP がタイピングされた。各 SNP については、missing genotype rate が 1% より大きく、minor allele frequency が 1% 未満、Hardy-Weinberg equilibrium P value が 1.0×10^{-6} 未満のものを除外した¹³⁾。

筑波 replication コホートと北海道 replication コホートにおいては、TaqMan® アレル特異的 PCR assay (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) により rs7846389 のタイプ

ングを行った。

遺伝子発現解析

Genevar database (GENe Expression VARiation) を利用し、遺伝子発現に影響を及ぼすゲノム領域を解析した¹⁴⁾。HapMap3 JPT (Japanese in Tokyo) のリンパ芽球様細胞株データベースを用いた¹⁵⁾。ヒアルロン酸合成酵素 2 (*HAS2*) 遺伝子の発現解析には、ILMN_1777562 (Illumina HumanWG 6 v3, Illumina) をプローブとして用いた。Rs7846389 の多型と *HAS2* mRNA の発現量の関連については線形回帰分析により解析した。

13 種のヒト組織で *HAS2* の発現について解析した。12 組織 (骨髄、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、気管、骨、脾臓、胸腺、小腸、末梢白血球) の RNA は Clontech (Mountain View, CA, USA) から、皮膚 RNA は Biochain (Newark, CA, USA) から購入した。cDNA は SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) により合成した。*HAS2* mRNA 発現量の定量は、SYBR® premix II Ex Taq™ (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いたリアルタイム PCR で行った。プライマーは、5'-CTCCGGGACCACACAGAC-3' (forward)、5'-TCAGGATACATAGAAACCTCTCACAA-3' (reverse) を用いた。*HAS2* の発現量はグリセルアルデヒド-3-リン酸の発現量で標準化した。

統計解析

筑波 GWAS コホートにおいては、喘息発症と SNPs との関連を PLINK version 1.07 を使用し、Cochran-Armitage trend test で解析した¹³⁾。この検定では diploid genotypes のみを解析するので、性染色体は含まれていない。オッズ比や 95%信頼区間は 4 分表から算出した。Genomic inflation factor や QQ プロットは PLINK で多次元尺度構成法

(multidimensional scaling method, MDS 法) を用いて算出した。筑波 replication コホートと北海道 replication コホートでも筑波 GWAS コホートと同様の解析を行った。両 replication コホートでは、リスクアレルの影響が筑波 GWAS コホートの結果と一致し、かつ $P < 0.05$ を満たしたとき、再現性ありとした。これら 3 つのコホートについて、Matel-Haenszel 法でメタ解析を行った。固定効果モデルでのメタ解析による P 値を計算した (test for heterogeneity: $X^2 = 3.5$, $P = 0.17$)。

結果

各コホートの特徴

各コホートの特徴を Table1 に記載した。呼吸機能は喘息群では健常群より悪く、血清総 IgE 値は喘息群で高値であった。

GWAS と replication study

クオリティコントロールではどの被験者も除外されず、480,098 個の SNP が関連解析の対象となった。QQ プロットを Figure1 に示す。Genomic inflation factor は 1.024 であり集団階層化はないと考えられた。Figure2 に GWAS のマンハッタンプロットを示す。第 8 染色体上に $P < 1.0 \times 10^{-6}$ を満たす SNP が一つのピークを形成していた。LocusZoom (<http://csg.sph.umich.edu/locuszoom/>)¹⁶⁾を用いてこの遺伝子領域 (染色体 8q24) を詳細に解析したところ、喘息と最も強い関連を示したのは *HAS2* 遺伝子の 5'末端より約 200 kb 上流に存在する rs7846389 であった (Figure3)。Rs7846389 の major allele である A allele が、喘息発症と有意に関連していた (オッズ比=1.74; 95%信頼区間: 1.41-2.15) (Table2)。

筑波 replication コホートと北海道 replication コホートでも、rs7846389 の A allele は喘息発症と有意に関連していた (それぞれ P 値は 0.0152、0.0478; オッズ比は 1.31、1.38; 95% 信頼区間は 1.05-1.65、1.01-1.90)。これら 3 集団のメタ解析では、rs7846389 はゲノムワ

イドレベルで有意に喘息と関連していた ($P = 7.92 \times 10^{-9}$ 、オッズ比 1.50、95%信頼区間 1.31-1.72)。この SNP について人口寄与危険度 (Population Attributable Risk) を算出したところ、筑波 GWAS コホートでは 5.4%、筑波 replication コホートでは 3.7%、北海道 replication コホートでは 4.5%であった。

HAS2 の発現解析

HapMap3 JPT のリンパ芽球様細胞株での mRNA 発現に関するデータベースを用いて、rs7846389 の *HAS2* 発現に対する影響を調べた。*HAS2* mRNA の発現は rs7846389 が C allele を持つと増強した ($r = 0.291$; $P = 0.0081$) (Figure4)。最も強く *HAS2* の mRNA の発現に関連していた SNP は rs279661 であったが ($P = 0.0074$) (Figure5)、この SNP は rs7846389 と強い連鎖不平衡の関係にあった ($r^2 = 0.965$)。これらの結果から、rs7846389 の C allele は *HAS2* の発現増加と相関があり、さらに一方では喘息発症のリスク減少と関連していた。また、13 種のヒト組織での *HAS2* の mRNA の発現を解析したところ、肺組織において最も強い *HAS2* の発現が確認された。

考察

重喫煙者を除外した日本人集団を解析することにより、*HAS2* 遺伝子が新たな成人喘息の感受性領域であることを同定した。今日までに様々な人種を対象として 30 の喘息に関する GWAS が行われ、50 以上の候補遺伝子が報告されている (Catalog of Published Genome-Wide Association Studies; <http://www.genome.gov/26525384>)。しかしながら、いずれの GWAS においても *HAS2* は候補遺伝子として同定されていない。なお、HapMap のデータでは、rs7846389 の minor allele frequency は、JPT で 0.45 (minor allele は C) であったのに対し、CEU で 0.37 (minor allele は C)、YRI で 0.36 (minor allele は A)、CHB で 0.35 (minor allele は A) と人種間を超えて common な SNP であった。喫煙者喘

息は独立したクラスターを形成することが報告されている¹⁷⁾。また、多くの遺伝子座において、その遺伝子座が喘息発症に与える影響が、喫煙の有無による修飾を受けることが報告されている¹⁸⁾。今回の研究では、多様な症候群である喘息の中から重喫煙者を除外することにより喫煙の影響を極力排除し、より均一な集団で解析を行った。これにより真の遺伝子多型を見つけ出す検出力が上がり、喘息関連遺伝子として *HAS2* を同定できたと考えられる。

HAS2 はヒアルロン酸 (HA) 合成酵素をコードする遺伝子ファミリーに属する。HA は細胞膜の細胞質側で *HAS1*, 2, 3 により合成され、細胞膜を通過し間質へ移動する¹⁹⁾。HA は線状の非硫酸化型のグリコサミノグリカン (GAG) で、細胞外に広く分布する成分である。HA には 100~600 kDa の高分子量型と 10~50 kDa の低分子量型がある。高分子量型 HA は *HAS1*, 2 によって合成され、低分子量型 HA は *HAS3* により合成される²⁰⁾。また高分子量型 HA がヒアルロン酸分解酵素により分解されることでも低分子量型 HA が生成される。HA の生物学的機能はその分子量により大きく異なっている。高分子量型 HA には組織修復²⁵⁾や関節潤滑²⁶⁾といった構造的な機能のみならず、抗炎症作用²¹⁻²³⁾、抗血管新生²⁴⁾のような様々な制御機能がある。低分子量型 HA はマクロファージ、T リンパ球、上皮細胞などの炎症反応を促進させ^{27),28)}、組織傷害部位で自然免疫を活性化させ、内因性の danger signal として作用する²⁹⁾。Klagas らの報告によると、喘息患者の気道平滑筋で作られる HA は健常人に比べ少ないことが分かっている³⁰⁾。喘息患者の気道平滑筋で HA 生成が減少するのは、*HAS1*, 2 の減少と HA 分解酵素 1 の増加による。一方、健常者の気道平滑筋から分離された HA は 700 kDa 以上の高分子量型であり、喘息患者から分離されたものは低分子量型である。さらに、高分子量型の HA はヒト気道平滑筋の増殖を抑制する³¹⁾。また、気管支上皮細胞の HA 分解酵素は健常者と比べ喘息患者で増加していることが報告されており³²⁾、HA の分解が喘息患者の炎症反応を引き起こしている可能性も示唆されている。以上のことから、喘息患者の肺組織では、高分子量型 HA の減少と低分子量型 HA

の増加が気道炎症の一因となっていると考えられる。これらの報告は、我々が示した rs7846389 の A allele が *HAS2* 遺伝子の発現を低下させ、喘息リスクを増加させることと合致している。

この研究にはいくつかの解明すべき点が残されている。第一に、我々は先行研究で成人喘息患者 7,171 名と成人健常者 27,192 名での GWAS を行い、5 つの新規の感受性領域を同定した¹⁾。本研究の筑波 GWAS コホートの喘息患者は、先行研究に全例含まれているが、先行研究では rs7846389 と喘息には有意な関連が認められなかった。*HAS2* の遺伝的な作用はタバコ煙への暴露により規定されと考えられ、そのために結果が一致しなかったと思われる。今回の筑波 GWAS コホートでは正確な喫煙状況についての情報を取得していたため重喫煙者を除外でき、先行研究では同定できなかった *HAS2* 遺伝子と喘息の関連を同定できたと考えられる。第 2 に、rs7846389（あるいはこれと非常に強い連鎖不平衡にある rs279661）そのものが *HAS2* 遺伝子のプロモーター活性を持っている可能性はあるが、これらの SNP は *HAS2* 遺伝子の 200 kb 以上も上流にあるため、これらの SNP と連鎖不平衡の関係にある他の SNP が機能的な役割をはたしているかもしれない。

結論

日本人成人喘息に対する GWAS を行い、*HAS2* 遺伝子の近傍の遺伝子変異が喘息発症と関連することを見いだした。*HAS2* 遺伝子がどのようなメカニズムで喘息発症と関係しているかについては、遺伝子間相互作用、遺伝子環境間相互作用を踏まえてさらに検討する必要がある。HapMap データベースによると、rs7846389 の minor allele frequency は、JPT で 0.45 (minor allele は C)、CEU で 0.37 (minor allele は C)、YRI で 0.36 (minor allele は A)、CHB で 0.35 (minor allele は A) と様々な民族で変異が検出されている。³³⁾ Rs7846389 と喘息との関連について、日本人以外での人種での検証が必要である。

第2章 1.の参考文献

1. Kaneko Y, Yatagai Y, Yamada H, Iijima H, Masuko H, et al. The search for common pathways underlying asthma and COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2013;8: 65-78.
2. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, et al. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nat Genet* 2011;43: 893-6.
3. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS, A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest* 2008;118: 1590-605.
4. Bonnelykke K, Sleiman P, Nielsen K, Kreiner-Moller E, Mercader JM, et al. A genome-wide association study identifies CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations. *Nat Genet* 2014;46: 51-5.
5. Osawa R, Konno S, Akiyama M, Nemoto-Hasebe I, Nomura T, et al. Japanese-specific filaggrin gene mutations in Japanese patients suffering from atopic eczema and asthma. *J Invest Dermatol* 2010;130: 2834-6.
6. Isada A, Konno S, Hizawa N, Tamari M, Hirota T, et al. A functional polymorphism (-603A --> G) in the tissue factor gene promoter is associated with adult-onset asthma. *J Hum Genet* 2010;55: 167-74.
7. Hizawa N, Yamaguchi E, Konno S, Tanino Y, Jinushi E, et al. A functional polymorphism in the RANTES gene promoter is associated with the development of late-onset asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166: 686-90.
8. Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, Kaneko Y, Yamada H, et al. Genome-Wide Association Study for Levels of Total Serum IgE Identifies HLA-C in a Japanese Population. *PLoS One* 2013;8: e80941.

9. Masuko H, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, et al. Lower FEV1 in non-COPD, nonasthmatic subjects: association with smoking, annual decline in FEV1, total IgE levels, and TSLP genotypes. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2011;6: 181-9.
10. Harada M, Obara K, Hirota T, Yoshimoto T, Hitomi Y, et al. A functional polymorphism in IL-18 is associated with severity of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180: 1048-55.
11. Miller SP, Marinkovich VA, Riege DH, Sell WJ, Baker DL, et al. Application of the MAST Immunodiagnostic System to the determination of allergen-specific IgE. *Clin Chem* 1984;30: 1467-72.
12. Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, et al. Asthma phenotypes in Japanese adults - their associations with the CCL5 and ADRB2 genotypes. *Allergol Int* 2013;62: 113-21.
13. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81: 559-75.
14. Yang TP, Beazley C, Montgomery SB, Dimas AS, Gutierrez-Arcelus M, et al. Genevar: a database and Java application for the analysis and visualization of SNP-gene associations in eQTL studies. *Bioinformatics* 2010;26: 2474-6.
15. Stranger BE, Montgomery SB, Dimas AS, Parts L, Stegle O, et al. Patterns of cis regulatory variation in diverse human populations. *PLoS Genet* 2012;8: e1002639.
16. Pruim RJ, Welch RP, Sanna S, Teslovich TM, Chines PS, et al. LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. *Bioinformatics* 2010;26: 2336-7.

17. Pietinalho A, Pelkonen A, Ryttilä P, Linkage between smoking and asthma. *Allergy* 2009;64: 1722-7.
18. Meyers DA, Postma DS, Stine OC, Koppelman GH, Ampleford EJ, et al. Genome screen for asthma and bronchial hyperresponsiveness: interactions with passive smoke exposure. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115: 1169-75.
19. Philipson LH, Schwartz NB, Subcellular localization of hyaluronate synthetase in oligodendroglioma cells. *J Biol Chem* 1984;259: 5017-23.
20. Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, et al. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* 1999;274: 25085-92.
21. Campo GM, Avenoso A, Nastasi G, Micali A, Prestipino V, et al. Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812: 1170-81.
22. Bollyky PL, Lord JD, Masewicz SA, Evanko SP, Buckner JH, et al. Cutting edge: high molecular weight hyaluronan promotes the suppressive effects of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2007;179: 744-7.
23. Day AJ, de la Motte CA, Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol* 2005;26: 637-43.
24. Deed R, Rooney P, Kumar P, Norton JD, Smith J, et al. Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. *Int J Cancer* 1997;71: 251-6.
25. Noble PW, Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol* 2002;21: 25-9.

26. Wang M, Liu C, Thormann E, Dedinaite A, Hyaluronan and phospholipid association in biolubrication. *Biomacromolecules* 2013;14: 4198-206.
27. McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, et al. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest* 1996;98: 2403-13.
28. Boodoo S, Spannhake EW, Powell JD, Horton MR. Differential regulation of hyaluronan-induced IL-8 and IP-10 in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291: L479-86.
29. Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, et al. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* 2006;177: 1272-81.
30. Klagas I, Goulet S, Karakiulakis G, Zhong J, Baraket M, et al. Decreased hyaluronan in airway smooth muscle cells from patients with asthma and COPD. *Eur Respir J* 2009;34: 616-28.
31. Kanabar V, Hirst SJ, O'Connor BJ, Page CP. Some structural determinants of the antiproliferative effect of heparin-like molecules on human airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2005;146: 370-7.
32. Monzon ME, Manzanares D, Schmid N, Casalino-Matsuda SM, Forteza RM. Hyaluronidase expression and activity is regulated by pro-inflammatory cytokines in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;39: 289-95.
33. The International HapMap Project. *Nature* 2003;426: 789-96.
34. Yatagai Y, Sakamoto T, Yamada H, Masuko H, Kaneko Y, et al. Genomewide association study identifies HAS2 as a novel susceptibility gene for adult asthma in a Japanese population. *Clin Exp Allergy*. 2014;44: 1327-34

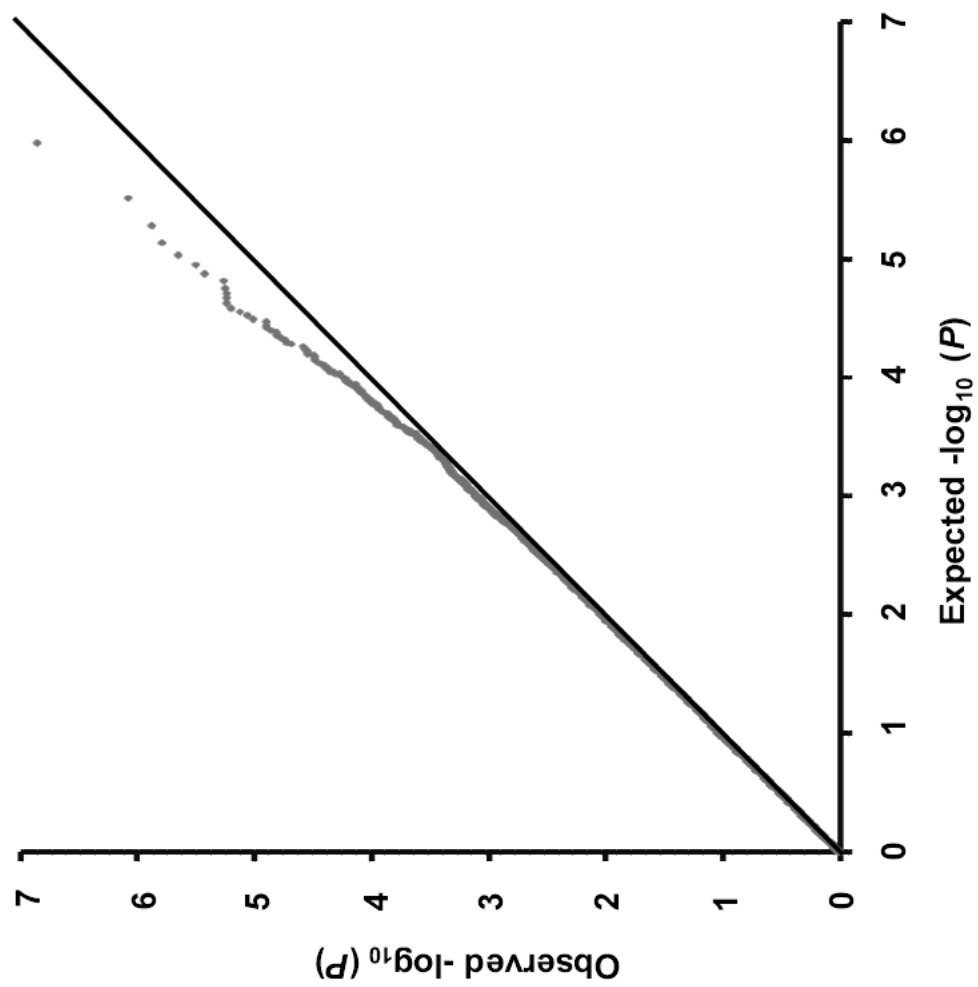


Figure 1. GWAS結果のQ-Qプロット
 直線が期待値を示し、灰色点が観測値を示す。
 (文献34 より引用)

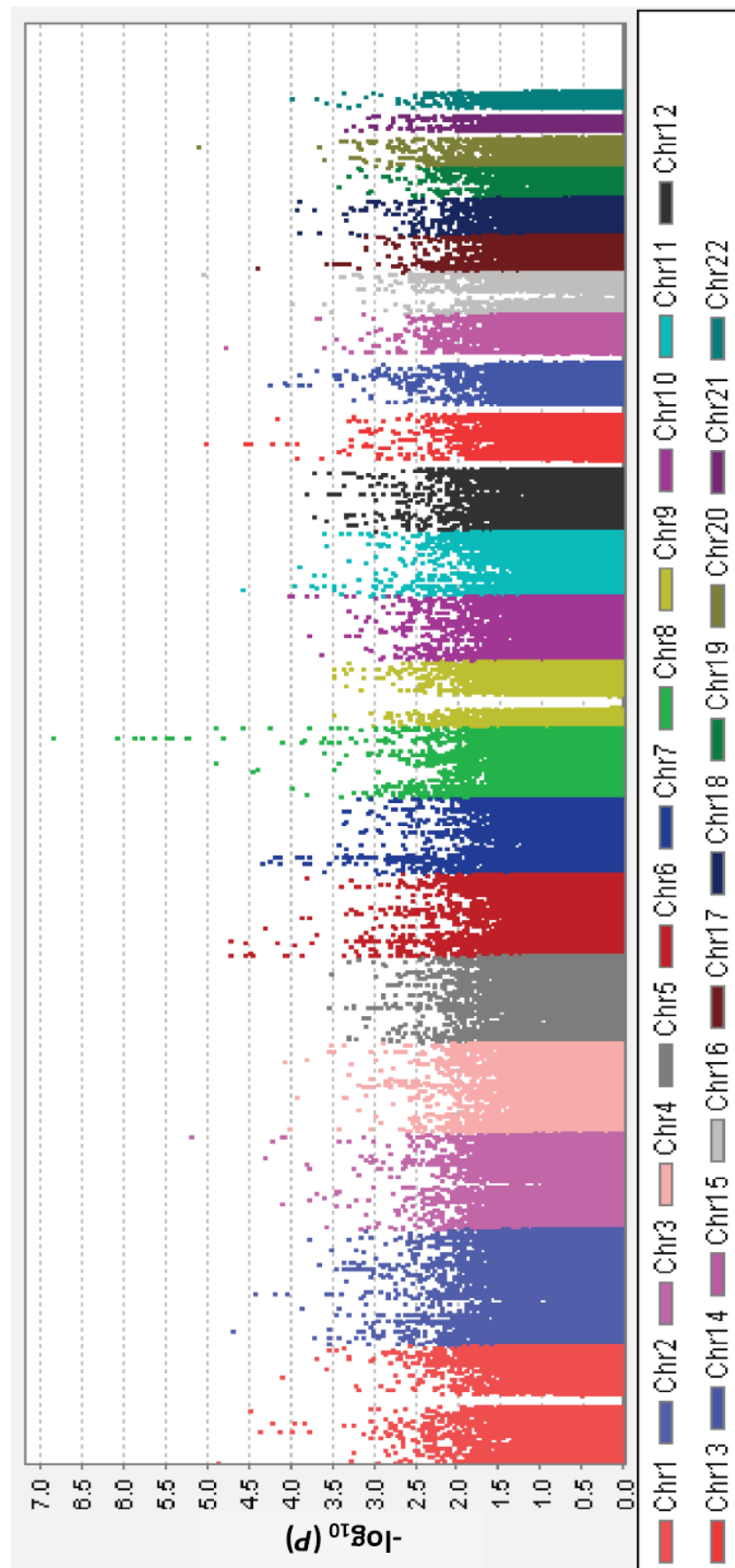


Figure 2. 喘息発症についてのGWAS (マンハッタンプロット)

(文献34 より引用)

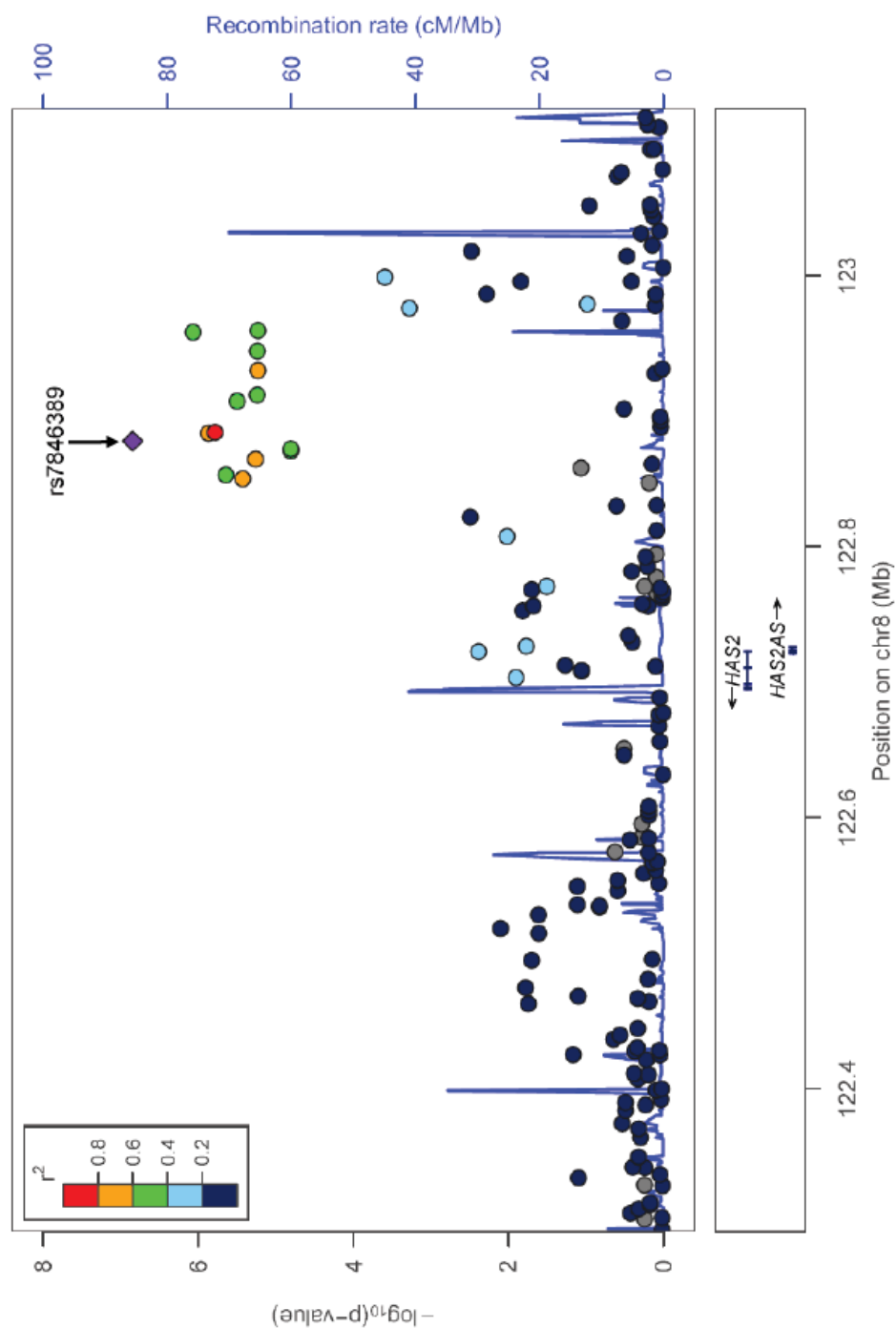


Figure 3. Chromosome 8q24 領域のfine-mapping
 Top SNP (rs7846389) はHAS2の5'末端の上流に存在する。 ($P = 1.43 \times 10^{-7}$).
 (文献34 より引用)

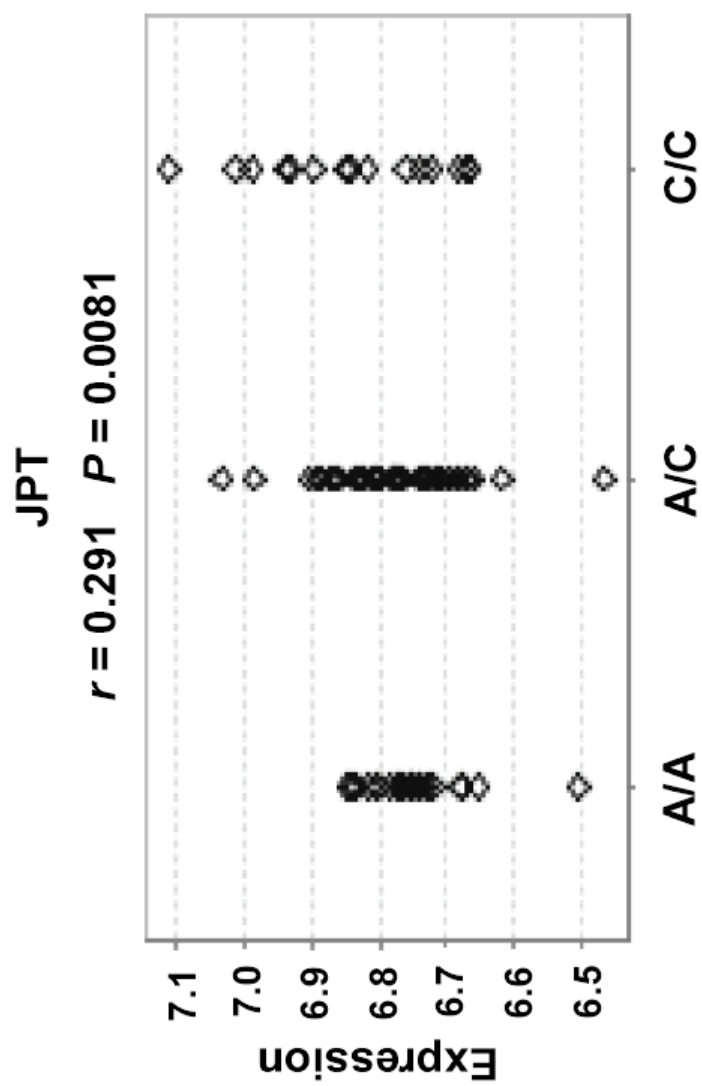


Figure 4. rs7846389 genotype と *HAS2* mRNA 発現の関係.

(文献34 より引用)

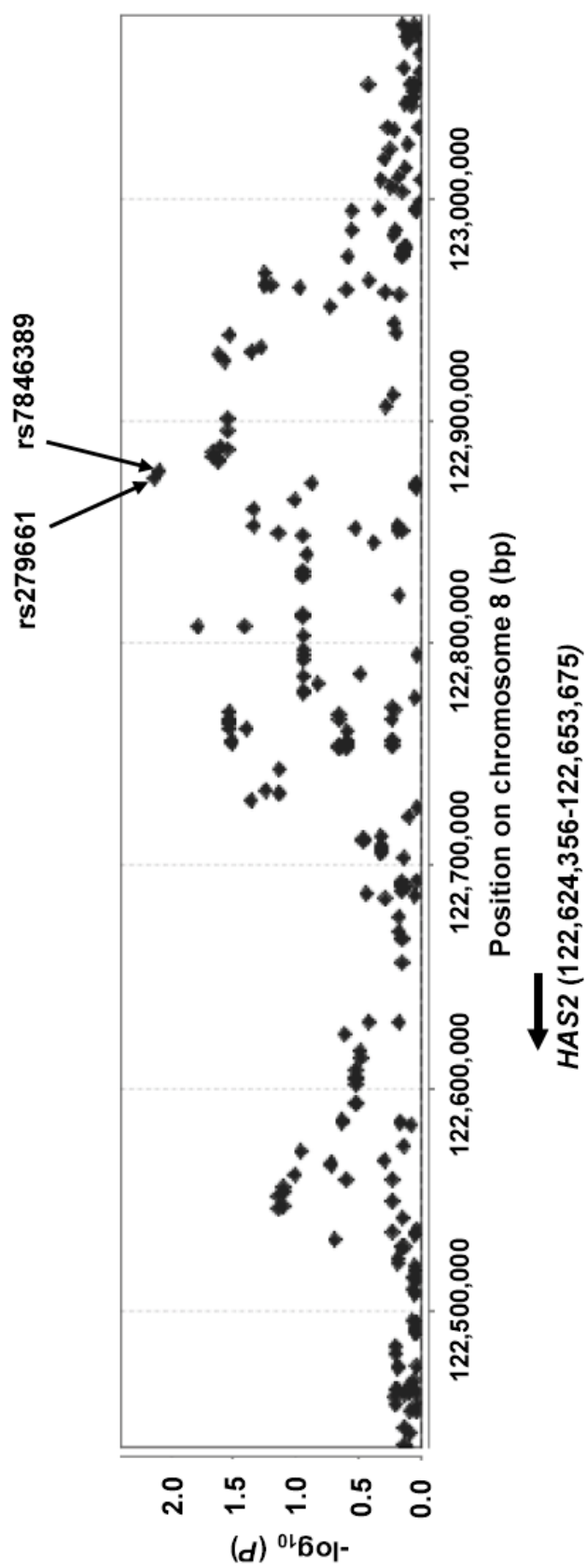


Figure 5. *HAS2*近傍のSNPと *HAS2* mRNA 発現の関係.

(文献34 より引用)

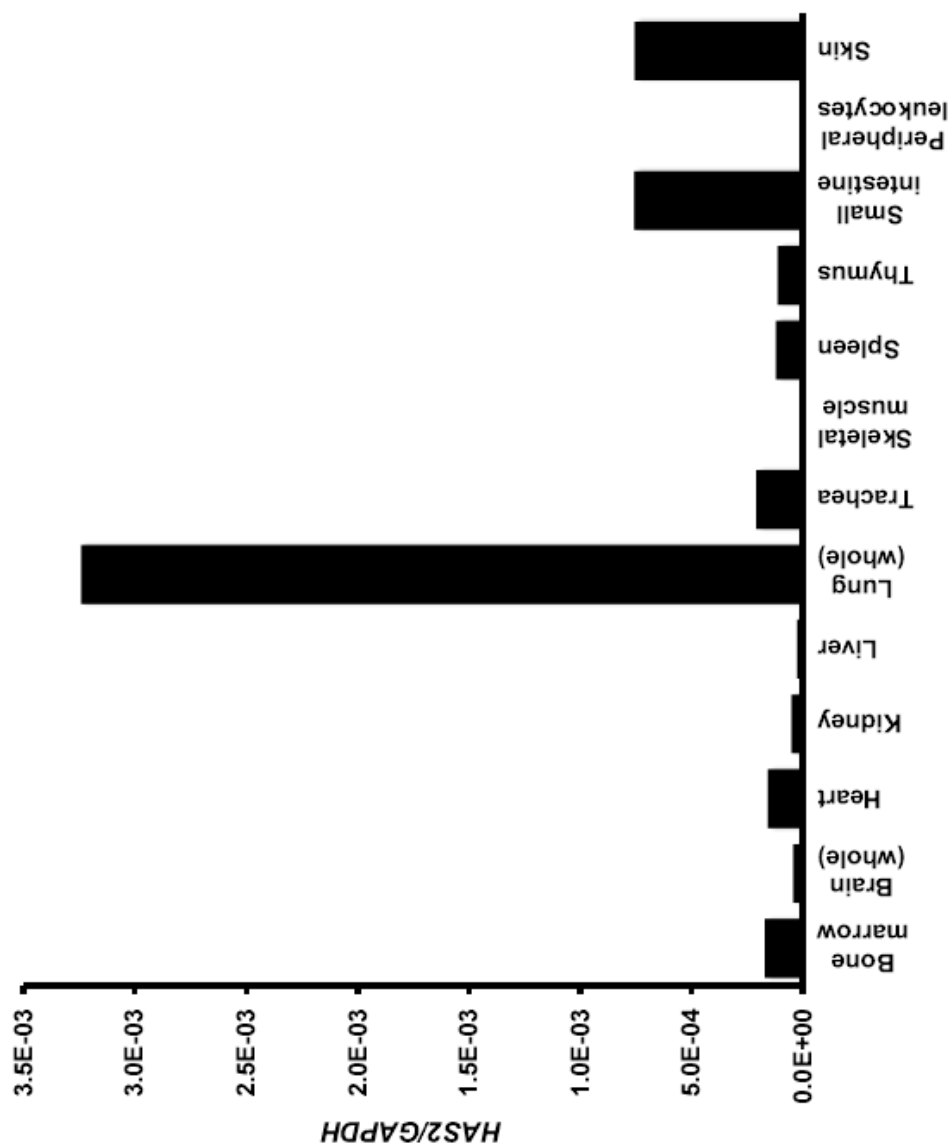


Figure 6. 13種のヒト組織で*HAS2* mRNAの発現
 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)で標準化.
 肺での発現が最も強かった。
 (文献34 より引用)

Table 1. 各コホートの特徴

	Asthma Cases	Controls
Tsukuba GWAS cohort (N = 974)		
Number of samples	240	734
Female sex	59.2%	68.0%
Age (mean \pm SD)	51.2 \pm 15.1 y	49.3 \pm 9.3 y
Smoking status		
Never-smoker	82.5%	82.7%
0 < pack-years \leq 10	17.5%	17.3%
FEV ₁ % predicted (mean \pm SD)	89.9 \pm 20.1%	94.6 \pm 12.3%
FEV ₁ /FVC	74.0 \pm 11.2%	83.7 \pm 5.3%
Atopy ^a	70.4%	56.1%
Serum IgE (Log) (mean \pm SD)	2.23 \pm 0.61 IU/mL	1.68 \pm 0.55 IU/mL
Tsukuba replication cohort (N = 628)		
Number of samples	277	351
Female sex	74.7%	65.0%
Age (mean \pm SD)	58.6 \pm 18.1 y	49.3 \pm 9.9 y
Smoking status		
Never-smoker	83.0%	82.6%
0 < pack-years \leq 10	17.0%	17.4%
FEV ₁ % predicted (mean \pm SD)	83.9 \pm 18.2%	91.4 \pm 12.5%
FEV ₁ /FVC (mean \pm SD)	70.6 \pm 11.1%	82.9 \pm 6.3%
Atopy ^a	73.0%	68.4%
Serum IgE (Log) (mean \pm SD)	2.16 \pm 0.65 IU/mL	1.92 \pm 0.62 IU/mL
Hokkaido replication cohort (N = 321)		
Number of samples	141	180
Female sex	78.7%	64.4%
Age (mean \pm SD)	58.6 \pm 15.0 y	48.8 \pm 8.7 y
Smoking status		
Never-smoker	68.8%	83.9%
0 < pack-years \leq 10	31.2%	16.1%
FEV ₁ % predicted (mean \pm SD)	104.5 \pm 21.7%	106.0 \pm 13.7%
FEV ₁ /FVC (mean \pm SD)	71.0 \pm 12.4%	83.9 \pm 6.5%
Atopy ^a	70.2%	53.3%
Serum IgE (Log) (mean \pm SD)	2.17 \pm 0.71	1.67 \pm 0.65

^aAtopy was defined as a specific positive IgE response (> 4.40 lumicount) to at least 1 of 14 common inhaled allergens with the multiple allergen simultaneous test (MAST)-26 chemiluminescent assay system ⁸⁾.

FEV₁, forced expiratory volume in 1 second; NS, not significant.

(文献34 より引用)

Table 2. GWASとreplication studyの結果

SNP	Allele (risk allele)	Sample	Asthma Cases		Controls		P value	OR (95% CI) ^b
			Total	RAF	Total	RAF		
rs7846389	A/C (A)	Tsukuba GWAS cohort	240	0.62	734	0.48	1.43E-07 ^a	1.74 (1.41 - 2.15)
		Tsukuba replication cohort	277	0.57	351	0.50	0.0152 ^a	1.31 (1.05 - 1.65)
		Hokkaido replication cohort	141	0.60	180	0.52	0.0478 ^a	1.38 (1.01 - 1.90)
		Combined	658	0.59	1265	0.49	7.92E-09	1.50 (1.31 - 1.72)

RAF, risk allele frequency; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

^aCochran-Armitage trend test.

^bORs and 95% CIs were calculated using the nonsusceptibility allele as the reference

(文献34 より引用)

2. 中高年発症喘息集団における喘息発症遺伝子の同定

背景・目的

我々は喘息病態とその多様性を明らかにするために、これまでに日本人において喘息対象とした GWAS を実施してきた^{1)・3)}。成人喘息では *TSLP* を含む 5 つの遺伝子領域が⁴⁾、小児喘息では *HLA-DP* 遺伝子領域が喘息発症に関連していることを報告した⁷⁾。さらに重喫煙者を除外した喘息集団を解析することにより、*HAS2* 遺伝子が喘息発症に関係していることを報告した。

我々はまた、*CCL5*、*ADRB2*、*TF*、*CC16* と中高年発症喘息との遺伝的関連を報告してきた^{8)・10)}。さらに我々の報告を含め複数のクラスター解析において、喘息の発症年齢が重要な層別化因子であることが報告されている^{5)・6)}。多様な分子病態を背景とする症候群としての喘息に対する遺伝子変異関連解析においては、フェノタイプをより均一にすることにより、検出力の上昇が期待される。

以上の理由から、今回の研究においては、対象を中高年発症の喘息患者に限定して GWAS を行った。

方法

倫理声明

この研究は、筑波大学、筑波メディカルセンター、理化学研究所、北海道大学、結核研究所複十字病院の各倫理委員会において承認されており、すべての対象者から各施設の倫理指針とヘルシンキ宣言を遵守し、インフォームド・コンセントを取得した。

対象

1st GWAS コホートは、日本人成人健常者 967 名と 40 歳以上で発症した日本人成人喘息患者 132 名の計 1,099 名から構成される¹⁾。健常者は、つくば総合健診センターで定期健

康診断を受診した一般集団からリクルートし、喘息や COPD などの呼吸器疾患を持つ者は除外した²⁾。喘息患者は筑波大学附属病院においてリクルートされた。2nd GWAS コホートは、日本人成人健常者 2,375 名と 40 歳以上で発症した日本人成人喘息患者 588 名、計 2,963 名からなる独立した集団である^{3),7)}。1st GWAS コホート、2nd GWAS コホートで得られた結果の再現性を確認するために、別の独立した日本人集団 (Replication コホート) で追試を行った。Replication コホートは、日本人成人健常者 701 名と日本人中高年発症喘息患者 169 名からなり、北海道大学病院とその関連病院においてリクルートされた。

Fukujuji コホートは、びまん性汎細気管支炎 (Diffuse panbronchiolitis; DPB) 患者 108 名と健常者 219 名からなる集団で、DPB の遺伝学的研究のためにリクルートされた集団である¹³⁾。

Genotyping

1st GWAS コホート、2nd GWAS コホートの genotyping は、Illumina HumanHap550v3 / 610-Quad BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA)を用いた。各 SNP については、missing genotype rate が 1%より大きく、minor allele frequency が 1%未満、Hardy-Weinberg equilibrium P value が 1.0×10^{-6} 未満のものを除外した。

Replication コホート

1st GWAS コホートで $P < 0.05$ であった SNP を選択し、さらに 2nd GWAS コホートでも $P < 0.05$ であった SNP について、両コホートでの結果をメタ解析した。その結果が $P < 1.0 \times 10^{-5}$ であった 10 個の SNP を選択し、Replication コホートにおいて追試を行った。遺伝子型の決定は TaqMan® アレル特異的 PCR assay によって行った。Fukujuji コホートの genotyping も同様の方法で行った。

さらに Replication コホートで再現性が確認された SNP は、DPB の感受性領域に属していた。この SNP については、Fukujuji コホートで DBP(108 人)と健常者(219 人)でタイピ

ングを行った¹³⁾。

遺伝子発現解析

Genevar database (GENe Expression VARIation) を利用し、遺伝子発現に影響を及ぼすゲノム領域を解析した¹⁴⁾。MuTHER project のリンパ芽球様細胞株を用いたデータベースを用いた。*Panbronchiolitis related mucin-like 2 (PBMUCL2)* 遺伝子の発現解析には、ILMN_1667229 (Illumina HumanWG 6 v3, Illumina) を用いた。Rs2523870 の多型と *PBMUCL2* mRNA の発現量の関連について、線形回帰分析により解析した。

挿入欠失多型分析

PBMUCL2 のオープンリーディングフレームには 4 塩基の挿入欠失多型(rs5875281、[-/CACT])が存在し、4 塩基の挿入によりフレームシフトを起こし、終止コドンを生じる。そのため翻訳される蛋白が短縮される¹³⁾。この多型と rs2523870 との連鎖不平衡を調べるために、健常人 90 名(rs2523870 の遺伝子型 メジャーホモ接合体、ヘテロ接合体、マイナーホモ接合体それぞれ 30 名)を選択し rs5875281 の genotyping を行った。プライマー5'-ACTGAGGACAATGTGACTGTG-3' (forward) と 5'-AAGGACTCCATCACTGCAGAC-3' (reverse) を用いて PCR-DNA 断片を作成、プライマー 5'-ACTGAGGACAATGTGACTGTG-3' によって多型部位をシーケンスすることによりタイピングを行った。

統計解析

1st GWAS コホート、2nd GWAS コホートでは、喘息発症について PLINK version 1.07 を用いて Cochran-Armitage 傾向検定と χ^2 乗検定を行った。1st GWAS コホート、2nd GWAS コホートと Replication コホートの結果から、Mantel Haenszel 法の固定効果モデルでのメタ解析による *P* 値を算出した。

結果

各コホートの特徴を Table 1 に示す。研究の流れを Figure 1 に示す。まず 1st GWAS では 967 名の健常者と 132 名の中高年発症喘息に対し、477,812 個の SNP について Cochran-Armitage 傾向検定を行った。その結果、23,759 個の SNP が $P < 0.05$ を満たした。これらの SNP について健常者 2,375 名、中高年発症喘息患者 588 名からなる 2nd GWAS で解析した。2nd GWAS においても $P < 0.05$ を満たす SNP は 1,491 個であった。この 1,491 個の SNP について、1st GWAS と 2nd GWAS の結果を Matel-Haenszel 法を用いて固定効果モデルでメタ解析を行った。その結果、10 個の SNP が $P < 1.0 \times 10^{-5}$ を満たしていた (Table 2)。この 10 個の SNP について再現性を確認するため、さらに独立した集団 (Replication コホート、健常者 701 名、中高年発症喘息 169 名) で追試を行った。その結果、rs2517548、rs2523870 でさらに結果が再現された (それぞれ $P = 0.035$ 、 0.038)。両 SNP とも喘息感受性アレルは C allele であった。これらの SNP について 2 つの GWAS の結果と Replication コホートでの結果をメタ解析したところ、それぞれ $P = 4.37 \times 10^{-7}$ 、 4.24×10^{-7} であった。ゲノムワイドレベルの有意差は認められなかったが、関連を示唆する結果であった。

Rs2517548、rs2523870 は染色体 6q21 上の *PBMUCL1* と *PBMUCL2* の間に存在する (Figure 2)。GENEVAR を用いて rs2517548、rs2523870 とこれら遺伝子の mRNA 発現について解析した。いずれの SNP も *PBMUCL1* とは有意な相関はなかったが、*PBMUCL2* の mRNA の発現は rs2517548、rs2523870 の喘息感受性アレルである C allele と正の相関が認められた (それぞれ $P = 3.23 \times 10^{-84}$ 、 8.54×10^{-87}) (Figure 3)。最も強く *PBMUCL2* の mRNA の発現に関連していた SNP は rs2517552 であったが ($P = 4.54 \times 10^{-87}$)、この SNP は rs2517548、rs2523870 と強い連鎖不平衡の関係にあった (それぞれ $r^2 = 1.000$ 、 0.998)。これらの結果から、rs2517548、rs2523870 の C allele は *PBMUCL2* の発現増加と相関があり、中高年発症喘息のリスク増大と関連していることが示された。

Rs2523870 と rs2517548 は強い連鎖不平衡にあり($r^2 = 0.998$)、以下では rs2523870 について検討した。*PBMUCL2* の蛋白翻訳に影響を及ぼす挿入欠失多型(rs5875281)と rs2523870 の連鎖不平衡について解析した。健常人から rs2523870 の各遺伝子型から 30 名ずつ抽出し、rs5875281 について genotyping を行った。連鎖不平衡係数 $r^2 = 0.0724$ であり、両者は連鎖不平衡がないと考えられた。

PBMUCL2 遺伝子領域は DPB 感受性遺伝子領域として知られている¹²⁾。そこで rs2523870 について DPB 患者と健常者でケース・コントロール関連解析を行った。その結果、中高年発症喘息の感受性アレルである C allele は DBP 発症とも有意に関連していた($P = 0.017$) (Table 3)。

考察

前章同様、フェノタイプにより絞り込まれた日本人喘息集団を使用し、*PBMUCL2* 遺伝子が新たな中高年発症喘息の感受性領域である可能性を示した。喘息は症候群であり、そのフェノタイプは一樣ではない。今回の研究では、中高年発症喘息に限定することにより集団をより均一化した。これにより検出力が上昇し、喘息関連遺伝子として *PBMUCL2* を同定できたと考えられる。

土方らは 6p21.3 の *HLA-A* 遺伝子座と *HLA-B* 遺伝子座の間に存在する DPB 疾患感受性領域に、セリンとスレオニンに富んだペプチドのタンデムリピート配列からなる 2 つの新規ムチン様遺伝子、*PBMUCL1* と *PBMUCL2* をクローニングした¹³⁾。この領域には、これら 2 つの遺伝子に加え *MUC21*、*DPCR1* が存在し、4 つのムチン・ムチン様遺伝子がクラスターを形成している。*PBMUCL2* は 4 つのエクソンと 1671 ヌクレオチドの cDNA からなる。推定されるアミノ酸配列は 251 アミノ酸で、22 アミノ酸からなるシグナルペプチドは N 末端に予測され、膜貫通領域は認められない。したがって、*PBMUCL2* 蛋白は分泌型と考えられる。3 番目のエクソンは、11 アミノ酸の 15 のタンデムリピートをコードしており、プロリン、セリン、スレオニンが豊富な蛋白である。15 種のヒト組織での *PBMUCL2*

の mRNA の発現が解析され、肺を含む 5 種の組織（肺、脳、脾臓、胸腺、前立腺）で発現が確認されている¹³⁾。

慢性炎症性肺疾患である DPB の病理学的特徴として、呼吸細気管支炎領域にリンパ球や形質細胞などの細胞浸潤と肺泡マクロファージの集簇がみられる。さらに多くの症例では上下気道に慢性の持続的気道感染が成立している。初期はインフルエンザ桿菌、肺炎球菌が主であるが、治療経過中に菌交代現象をきたし、ムコイド型緑膿菌となる¹⁵⁾。一方、慢性重症喘息患者 56 名の喀痰を検討した報告では 29 名において細菌の培養が陽性となり、特にインフルエンザ桿菌、緑膿菌やブドウ球菌が多く認められ、これら細菌の下気道への生着は喘息の罹病期間や過去の増悪と関連していた¹⁹⁾。さらに、新生児期に下咽頭への肺炎球菌やインフルエンザ桿菌の生着が、小児期の喘息発症のリスクとなることも報告されている¹⁶⁾。前述のとおり、DPB はインフルエンザ桿菌、肺炎球菌の感染を伴うことが多く、喘息と DPB には感染などに対する気道の一次防御機構の異常に関連した共通の病態が存在している可能性がある。

最近、ラテンアメリカ人の喘息を対象とした網羅的な解析（admixture mapping）で、*PBMUCL2* を含むムチン産生遺伝子クラスターが喘息感受性領域であったと報告されている¹⁷⁾。ムチンのような高分子のグリコシル化化合物は気道上皮に広く分布し、自然免疫における重要な役割を担う。また、ムチンの過剰産生は喘息を含めた、慢性気道疾患と関連していることも明らかであり¹⁸⁾、rs2523870 の変異が中高年発症喘息の感受性遺伝領域となりうることを示唆している。

さらに rs2523870 SNP の C allele は DPB において有意に発現頻度が高く（Table 3）、DPB と中高年発症喘息とは類似の病態が疾患発症に関与している可能性が考えられた。

結論

GWAS を含む 3 つの独立したコホートを用いて、*PBMUCL2* 遺伝子の近傍に中高年発症喘息の感受性領域と考えられる遺伝子変異を同定した。この遺伝子領域は DPB 感受性領域

でもあり、さらに同定された遺伝的変異は DPB 発症にも有意に関連していた。両疾患はその臨床像にも共通点があり、この遺伝子変異が両疾患に共通する病態に関係している可能性がある。

第2章 2.の参考文献

1. Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, Kaneko Y, Yamada H, et al. Genome-wide association study for levels of total serum IgE identifies HLA-C in a Japanese population. *PLoS One*. 2013 Dec 4;8(12):e80941.
2. Masuko H, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, et al.. Lower FEV1 in non-COPD, nonasthmatic subjects: association with smoking, annual decline in FEV1, total IgE levels, and TSLP genotypes. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2011;6:181-9.
3. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, et al. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nat Genet*. 2011 Jul 31;43(9):893-6.
4. Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, et al. Thymic stromal lymphopoietin gene promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Jun;44(6):787-93.
5. Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, et al. Asthma phenotypes in Japanese adults - their associations with the CCL5 and ADRB2 genotypes. *Allergol Int*. 2013 Mar;62(1):113-21.
6. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Feb 15;181(4):315-23.
7. Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, et al.. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Genet*. 2011 Jul;7(7):e1002170.
8. Hizawa N, Yamaguchi E, Konno S, Tanino Y, Jinushi E, et al. A functional polymorphism in the RANTES gene promoter is associated with the

- development of late-onset asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Sep 1;166(5):686-90
9. Isada A, Konno S, Hizawa N, Tamari M, Hirota T, et al. A functional polymorphism (-603A --> G) in the tissue factor gene promoter is associated with adult-onset asthma. *J Hum Genet*. 2010 Mar;55(3):167-74.
 10. Taniguchi N, Konno S, Hattori T, Isada A, Shimizu K, et al.. The CC16 A38G polymorphism is associated with asymptomatic airway hyper-responsiveness and development of late-onset asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013 Nov;111(5):376-381.e1.
 11. Bønnelykke K, Sleiman P, Nielsen K, Kreiner-Møller E, Mercader JM, et al. A genome-wide association study identifies CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations. *Nat Genet* 2014;46: 51-5.
 12. Keicho N, Ohashi J, Tamiya G, Nakata K, Taguchi Y, et al.. Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am J Hum Genet*. 2000 Feb;66(2):501-7.
 13. Hijikata M, Matsushita I, Tanaka G, Tsuchiya T, Ito H, et al. Molecular cloning of two novel mucin-like genes in the disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Hum Genet*. 2011 Feb;129(2):117-28.
 14. Yang TP, Beazley C, Montgomery SB, Dimas AS, Gutierrez-Arcelus M, et al.. Genevar: a database and Java application for the analysis and visualization of SNP-gene associations in eQTL studies. *Bioinformatics*. 2010 Oct 1;26(19):2474-6.
 15. Homma H, Yamanaka A, Tanimoto S, Tamura M, Chijimatsu Y, et al.. Diffuse panbronchiolitis. A disease of the transitional zone of the lung. *Chest*. 1983 Jan;83(1):63-9.

16. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, Loland L, Halkjaer LB, et al.. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N Engl J Med*. 2007 Oct 11;357(15):1487-95.
17. Galanter JM, Gignoux CR, Torgerson DG, Roth LA, Eng C, et al.. Genome-wide association study and admixture mapping identify different asthma-associated loci in Latinos: The Genes-environments & Admixture in Latino Americans study. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Aug;134(2):295-305.
18. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev*. 2006 Jan;86(1):245-78.21.
19. Zhang Q, Illing R, Hui CK, Downey K, Carr D, et al.. Bacteria in sputum of stable severe asthma and increased airway wall thickness. *Respiratory Research* 2012, 13:35

Table 1. 各コホートの特徴

	1 st GWAS コホート		2 nd GWAS コホート		Replication コホート	
	HV	LOA	HV	LOA	HV	LOA
No.	967	132	2375	588	701	169
Sex male/female	441/526	43/89		221/367	411/290	78/91
Age, yrs	50.00(9.13)	60.78(7.39)		61.3(8.5)	42.64(14.9)	58.94(8.9)
Current smoker	161(16.6%)	14(10.6%)			188(26.8%)	36(21.3%)
Ex-smoker	199(20.6%)	5(3.8%)			67(9.6%)	52(30.8%)
Serum IgE	118.60(176.69)	302.11(458.82)			190.33(352.40)	445.33(874.82)
FEV₁ / FVC	83.21(5.19)	73.80(11.41)				64.91(12.46)
Age at onset		53.86(8.13)				55.11(8.74)

HV: healthy volunteer, LOA: late-onset asthma

Table 2. 1st GWAS, 2nd GWAS, replication study の結果

SNP	Location	Genes	OR(1 st)	OR(2 nd)	P(1 st +2 nd)	OR(rep)	P(rep)	Meta(1 st +2 nd +rep)
rs1837253	5q22	TSLP	1.32	1.35	4.52E-06	1.04	0.75	6.17E-05
rs2517548	6p21.3	PBMUCL1/PBMUCL2	1.29	1.54	1.96E-06	1.11	0.035	4.37E-07
rs2523870	6p21.3	PBMUCL1/PBMUCL2	1.29	1.54	2.14E-06	1.25	0.038	4.24E-07
rs4714505	6p21.1		1.61	3.03	9.31E-06	1.14	0.53	2.30E-04
rs10241087	7p21	DGKB	2.00	2.04	3.31E-06	1.64	0.083	1.14E-06
rs1668157	10q22		1.35	1.33	3.96E-06	1.18	0.27	3.12E-06
rs7973745	12q23		1.82	1.64	2.45E-07	1.14	0.55	1.35E-06
rs1021891	17q11.2	ASIC2/CC	1.37	1.48	1.37E-06	1.26	0.068	4.73E-07
rs2834928	21q22		1.28	1.47	3.76E-06	1.13	0.32	3.98E-06
rs2898237	21q22		1.28	1.41	8.85E-06	1.15	0.25	6.52E-06

OR(1st), odds ratio in 1st GWAS cohort; OR(2nd), odds ratio in 2nd GWAS cohort; P(1st+2nd), P value in both 1st and 2nd GWAS cohorts;

OR(rep), odds ratio in Replication cohort; P(rep), P value in Replication cohort;

Meta(1st+2nd+rep), P value of meta-analysis in 1st GWAS, 2nd GWAS, and Replication cohorts.

Table 3. 複十字コホートの結果

rs2523870		DPB (n=108)	control (n=219)	
Allele	C	118	196	0.447
	T	98	242	0.553
DPB; diffuse panbronchiolitis				
				<i>P</i> = 0.017

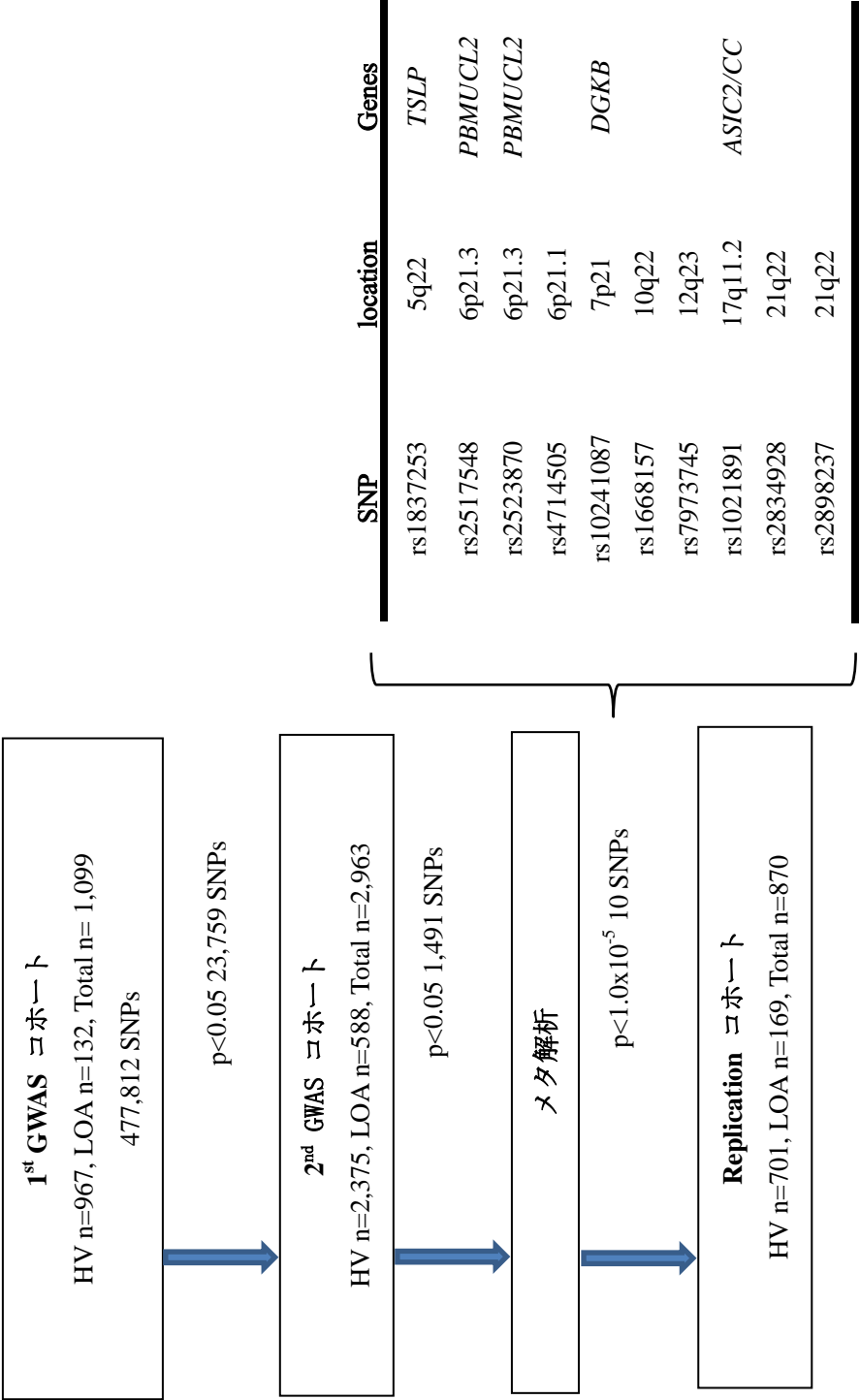


Figure 1. 研究の流れ
HV; healthy volunteer, LOA; late-onset asthma.

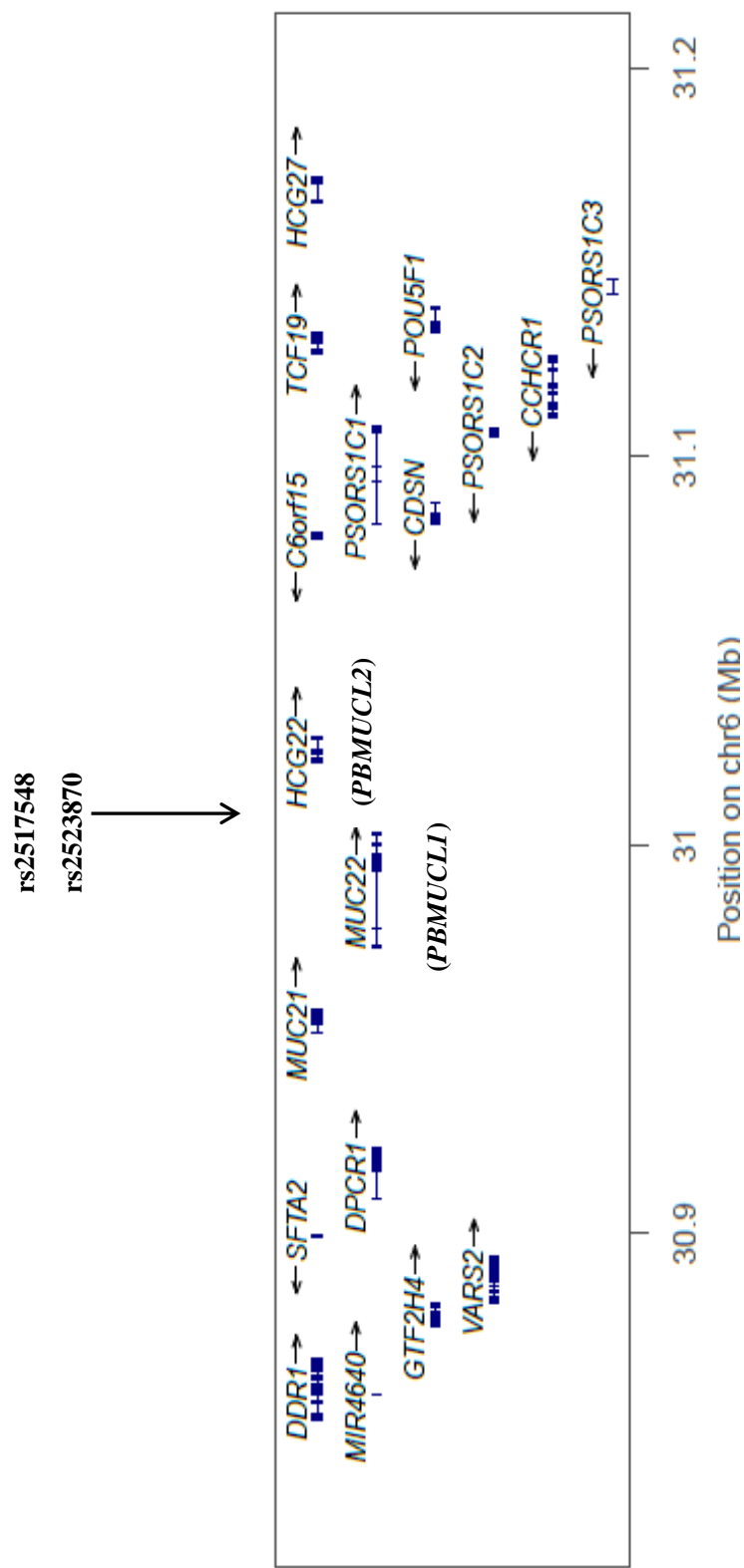


Figure 2. Rs2517548, rs2523870 周辺の遺伝子

Rs2517548、rs2523870 は *PBMUCL1* 遺伝子と *PBMUCL2* 遺伝子間に存在する。

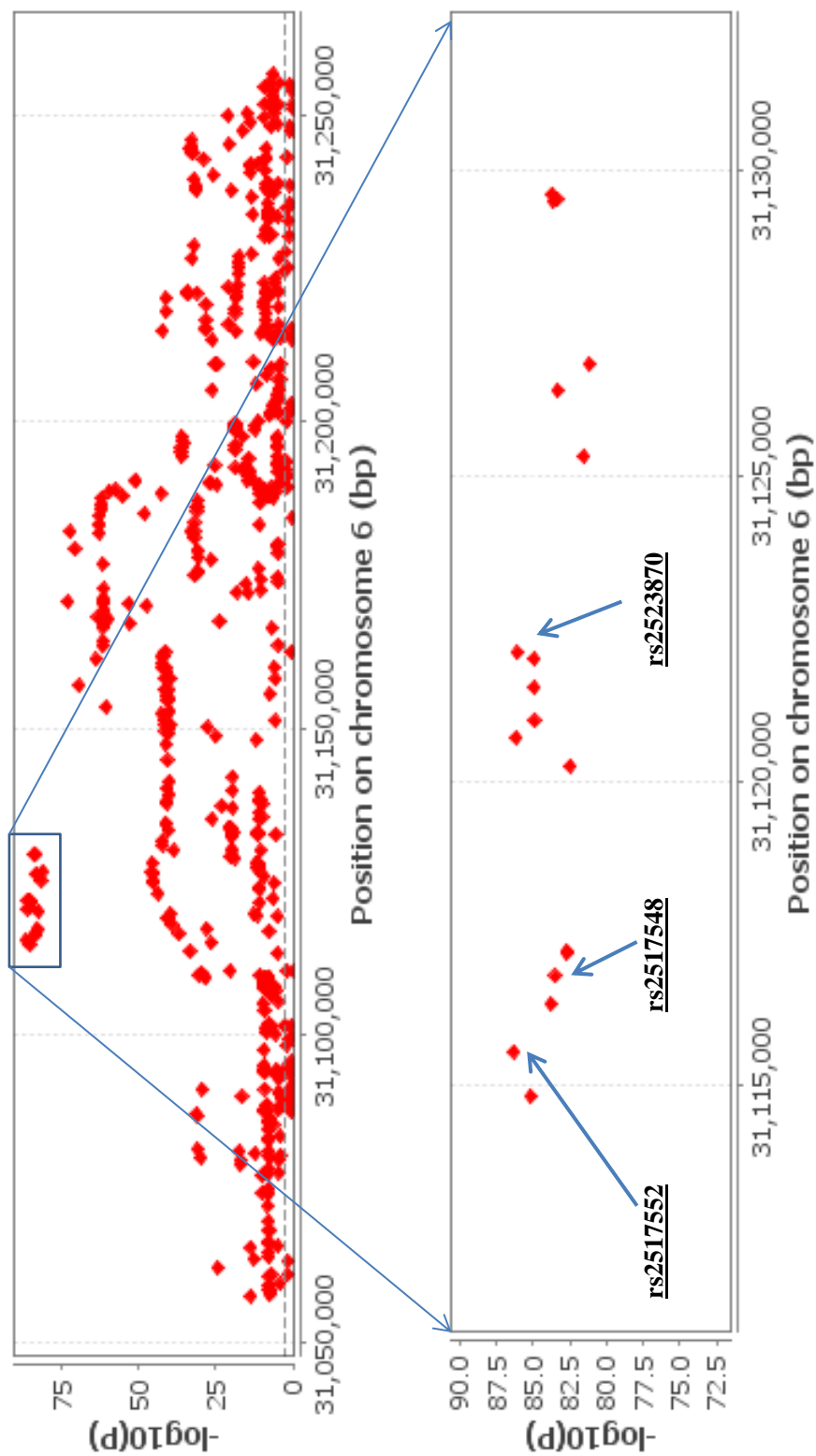


Figure 3. *PBMUCL2* 近傍の SNP と *PBMUCL2* mRNA 発現の関係
 Rs2517548、rs2517552 showed the strongest statistical significance ($P = 4.54 \times 10^{-87}$).
 This SNP was in tight linkage disequilibrium ($r^2 = 0.998$).

第3章 血清総 IgE 値に関連する遺伝子の同定

背景・目的

喘息と IgE との間に強い関連があり、従来より喘息はアトピー型、非アトピー型に分類されてきた。特にアトピー型ではアレルゲンや Th2 細胞を中心とした IgE 産生の亢進や肥満細胞および好酸球による気道炎症が喘息の本態と考えられてきた。また、近年のアレルゲン感作に関する研究により、アレルギー疾患の発症には自然免疫の重要性も明らかになってきた^{1), 2)}。

第2章では、より均一な患者集団を対象として喘息発症に関連する新規の感受性遺伝子を同定した。重喫煙者除外喘息では *HAS2* 遺伝子、中高年発症喘息では *PBMULC2* 遺伝子を感受性遺伝子として同定した。知りうる範囲では、これらの遺伝子の機能は喘息と強く関連しているとされる IgE とは関連が見いだせなかった。近年の大規模 GWAS の結果を見ても、IgE を規定する遺伝子と喘息感受性遺伝子にほとんど重複がみられなかった¹¹⁾。つまり、これらの結果を考えると喘息発症の起源として IgE をとらえることが困難になる。そこで我々は、IgE と喘息の関係を解明するために、まず血清総 IgE 値を規定する遺伝素因に注目した。

これまでの研究で、血清総 IgE 値には遺伝的素因が重要であり、その遺伝率は 36% から 78% と高いことがわかっている³⁾⁻⁵⁾。さらに血清総 IgE 値は、主として抗原特異的 IgE 値やアトピー素因とは独立した遺伝因子により決定づけられることが示されている^{4), 6), 7)}。また血清総 IgE 値と喘息罹患との関連性は、アトピー素因とは独立していることも分かっている^{8), 9)}。

現在までに多数の血清総 IgE 値に関する候補遺伝子関連解析が行われ、Th2 細胞経路に関係する遺伝領域において多くの遺伝子多型が同定されている。一方近年、血清総 IgE に関する 4 つの GWAS が行われ、*TBX18* 遺伝子や *SOBP* など Th2 経路とは無関係な新たな遺伝子領域が分かっている¹⁰⁾⁻¹³⁾。GWAS では研究者の先入観なく解析されるので、今までのよ

うな候補遺伝子検索では全く予想できなかった IgE 関連領域が明らかにされ、IgE 制御のメカニズムについてあらたな知見をもたらされる可能性がある。

4 つの血清総 IgE 値に関する GWAS のうち 3 つはヨーロッパ系住民を対象としたものであり、残りのひとはアフリカ系アメリカ人およびラテンアメリカ系住民を対象としたものである。一方、アジア人を対象として 2 つの GWAS が行われているが、統計学的に有意に関連する遺伝領域は同定されなかった^{14), 15)}。

そこで本研究では、日本人集団において血清総 IgE 値に関連する遺伝的素因を解明するため GWAS 解析を行った。得られた候補遺伝子変異について、別の独立した 2 つの集団で追試を行い、これら 3 集団での結果をメタ解析した。さらに、現在までに、欧米を中心として報告されている血清総 IgE 値関連遺伝子について、我々の GWAS において関連性の追認を行った。

方法

倫理声明

この研究は、筑波大学、筑波メディカルセンター、理化学研究所、北海道大学、福井大学の倫理委員会において承認されており、すべての対象者から各施設の倫理指針とヘルシンキ宣言を遵守し、インフォームド・コンセントを取得した。

対象

筑波 GWAS コホートは、日本人成人健常者 967 名と日本人成人喘息患者 213 名、計 1,180 名からなる。健常者はつくば総合健診センターで定期健康診断を受診した一般集団からリクルートし、喘息や COPD などの呼吸器疾患を持つ者は除外した⁴⁵⁾。すべての対象者に対し、エントリー時に詳細な問診を行い、呼吸器症状の有無、病歴、生活習慣、そしてタバコ煙や各種アレルゲン、空気汚染への暴露について調査し、胸部の聴診を行った。喘息患者は

筑波大学およびその関連施設からリクルートされた⁴⁶⁾。喘息の診断は、呼吸器内科専門医がアメリカ胸部疾患学会の定める喘息診断基準に則り施行された⁴⁷⁾。両群ともに抗原特異的 IgE (MAST 法) が測定された (日立化成株式会社、東京)⁴⁸⁾。アトピー素因の判定指標には、14 種類の吸入抗原 (コナダニ、ハウスダスト II、ネコ上皮、イヌ上皮、オオアワガエリ、ハルガヤ、ブタクサ、ヨモギ、スギ、ペニシリウム、クラドスポリウム、カンジダ、アルテルナリア、アスペルギルス) に対する抗原特異的 IgE の反応性を使用した。つまり、上記 14 抗原のうち少なくとも 1 種類以上の抗原に対し陽性反応 (ルミカウント 4.40 以上) を示す場合、アトピー素因を有するとした。

筑波コホートで得られた結果の再現性を確認するために、別の独立した 2 つの日本人集団 (北海道コホートと福井コホート) で追試を行った。北海道コホートは、日本人成人健常者 619 名と日本人成人喘息患者 419 名からなり、北海道大学病院とその関連病院においてリクルートされた⁴⁹⁾。抗原特異的 IgE はヒョウヒダニ、カビ、花粉、動物のフケについて RAST 法を用いて測定した。これらの抗原のうち少なくとも 1 種類以上の抗原に対し陽性 (0.70 UA/mL 以上) である場合、アトピー素因ありとした。福井コホートは、日本人成人健常者 1,275 名と日本人成人喘息患者 89 名からなり、福井大学の職員や学生からリクルートされた⁵⁰⁾。抗原特異的 IgE は、スギ、ハウスダスト、カモガヤ、ブタクサ、カンジダ、アスペルギルスについて RAST 法を用いて測定した。北海道コホート同様、これらの抗原のうち少なくとも 1 種類以上の抗原に対し陽性 (0.70 UA/mL 以上) である場合、アトピー素因ありとした。

Genotyping

全てのゲノム DNA は、自動 DNA 抽出システム (QuickGene-610L; Fujifilm, 東京) を使用し、末梢血サンプルから抽出した。筑波コホートの genotyping では、健常者については Illumina HumanHap550v3 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA)、喘息患者について

は HumanHap610-Quad BeadChip を用いた。なお、これら 2 つの BeadChip の一致率は、0.99998 であった⁴⁶⁾。一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNP) のクオリティコントロールには PLINK version 1.07 を用いた⁵¹⁾。健常者、喘息患者ともすべての被験者において、BeadChip 上の 98% 以上の SNP がタイピングされた。各 SNP については、missing genotype rate が 1% より大きく、minor allele frequency が 1% 未満、Hardy-Weinberg equilibrium P value が 1.0×10^{-6} 未満のものを除外した。抽出された 479,940 個の SNP について解析を行った。Genomic inflation factor は PLINK の多次元尺度構成法 (multidimensional scaling method, MDS 法) を用いて算出した⁵¹⁾。

X 染色体の解析については、クラスター化アルゴリズムが複雑であること、染色体異常の頻度が高いこと、喪失データが多いことが指摘され、X 染色体の genotyping の正確性は常染色体と比較し低いとされている⁵²⁾。したがって、本研究では X 染色体を解析から除外した。

候補領域の SNP を補完するために imputation を行った。血清総 IgE 値との関連が示唆された領域 ($P < 1.0 \times 10^{-5}$) について、MACH version 1.0 を使用し imputation を行った⁵³⁾。MACH はマルコフ連鎖のアルゴリズムに従い、相が特定されたハプロタイプを鋳型として genotype を補完する。我々は、1000 genome project のアジア人データ (JPT+CHB) を参照パネルとし、信頼性の高いデータを得るために 50 回のマルコフサンプリングを繰り返した。

GWAS で得られた結果の追試をするために、ready-made の TaqMan® SNP Genotyping assay でタイピングでき、以下の 2 つの基準を満たす SNP を選択した。(1) 候補領域において総 IgE 値と最も強く関連のある SNP と強い連鎖不平衡にある。(2) minor allele frequency が 0.15 より大きい。

既報の遺伝子と関連についての検証

2013 年 6 月 1 日時点での血清総 IgE 値関連遺伝子について、PubMed を使用し文献検索を

行った。キーワードとして、“IgE level” or “IgE concentration” or “serum IgE”)、 (“polymorphism” or “SNP” or “genetics”)、そして (“association” or “linkage”) にてそれぞれ検索し、これらを and で結び、さらに human study と英文論文に限定した。これらの文献を精読し、血清総 IgE 値に遺伝的関連を示す文献を選択した。抗原特異的 IgE についての報告は除外した。さらにこれらの文献から、独立した 3 つ以上の集団で報告されている遺伝子、あるいは GWAS により報告されている遺伝子を選び、血清総 IgE 値関連遺伝子として抽出した。

日本人と白色人種での連鎖不平衡は大きく異なる可能性があるため、我々の GWAS での総 IgE 値関連遺伝子の検証については、SNP レベルではなく遺伝子レベルでの追試を行った。文献検索で抽出された血清総 IgE 値関連遺伝子の ± 10 kb の範囲に存在する SNP について、我々の GWAS のデータで確認を行い、最も強い関連を認めた SNP についての有意性を確認した。有意水準については SNPSpD プログラムを用いて各遺伝子領域内における多重性の補正を行った¹⁶⁾。

統計解析

筑波コホートでは、SNP と常用対数変換した血清総 IgE 値について、PLINK を用いて多重線形回帰分析を行った。血清総 IgE 値は年齢、性別、喫煙状態、喘息罹患の有無に影響されるため^{8), 54)}、これらの変数で補正して解析した。Quantile-quantile プロットや genomic inflation factor は PLINK を用いて算出した。北海道コホートでの追試も同様の手法で解析した。福井コホートでは喫煙状態についての情報が得られなかったため、年齢、性別、喘息罹患の有無で補正した。再現性の検定は、 P 値が 0.05 未満で、血清総 IgE 値に対する影響の方向性が筑波コホートと同じ場合を再現性ありとした。筑波コホートと他の 2 つのコホートの追試の結果は、PLINK を使用しランダム効果モデルでのメタ解析を行った。SNP 間の連鎖不平衡を解析するには Haploview 4.2 program を使用した⁵⁵⁾。

結果

研究の流れ

研究のアウトラインを Figure 4 に示す。

各コホートの特徴

研究に用いた各コホートの特徴を Table 1 に示した。女性の割合は、筑波コホートや北海道コホートに比べ福井コホートで高かった。喘息患者の割合は、筑波コホートと北海道コホートで高く、福井コホートで低かった。年齢、性別、喘息罹患の有無、アトピー素因の有無、血清総 IgE 値については、コホート間で有意な差異は認めなかった。

GWAS および追試の結果

Figure1 に Q-Q プロットを示す。Genomic inflation factor は 1.018 であり、集団の階層化による偽陽性の可能性は低いと考えられる。Figure2 は GWAS の結果のマンハッタンプロットである。ゲノムワイド関連解析で有意とされる P 値 ($P < 5.0 \times 10^{-8}$) を満たす SNP は認められなかった。そこで、 $P < 1.0 \times 10^{-5}$ を満たす 4 つの染色体領域 (1q23、6p21、11q24、13q21) に注目した。これらの領域において imputation を行い、補完された SNP と血清総 IgE 値の関連についても解析した。染色体 6p21 領域には、MHC class I 領域、MHC class II 領域、*LEMD2* 遺伝子領域の 3 つのピークが認められ (Figure5)、合わせて候補遺伝領域として以下の 6 領域が確認された (Figure 3) : 染色体 1q23.1 上の *PYHIN1/IFI16* 領域 (chr1:176229979; $P = 3.19 \times 10^{-7}$)、染色体 6p21.3 上の MHC class I および II 領域 (rs9264567, $P = 2.33 \times 10^{-7}$ および rs9271682, $P = 1.55 \times 10^{-7}$)、染色体 6p21.31 上の *LEMD2* 領域 (rs12173787, $P = 7.03 \times 10^{-8}$)、染色体 11q24.1 上の *GRAMD1B* 領域 (rs2078158, $P = 6.57 \times 10^{-7}$)、染色体 13q21.31 上の chr13:60576338 の領域 (無遺伝子領域、rs1399315,

$P=6.40 \times 10^{-7}$)。それぞれの候補領域において、Figure3 で赤字で示した SNP について TaqMan SNP Genotyping assay を用いて追試を行った。Table2 に結果を示す。Rs3130941 (MHC class I 領域) は北海道コホートと福井コホートの両コホートで再現性が認められた。3 コホートでのメタ解析ではゲノムワイドレベルを満たしていた ($P=1.07 \times 10^{-10}$)。Rs28366296 (MHC class II 領域) は北海道コホートのみで、rs7939777 (*GRAMD1B* 領域) は福井コホートのみで再現性が確認された。Rs7939777 は、筑波コホートと福井コホートのメタ解析では P 値は 3.35×10^{-10} であった。

喘息患者を除いた健常者のみの解析や共変量としてアトピー素因の有無を追加した解析でも、rs3130941 と血清総 IgE 値との間にはゲノムワイドレベルの有意な関連が認められた (Table4、5)。

既報の血清総 IgE 値関連遺伝子の再現性の確認

PubMed での検索の結果、448 本の論文が抽出された。それらを精読し、156 本の論文を適格として選択した。またこれらの論文の参照論文の中から、さらに 33 本の論文を追加した。これら 189 本の論文から、血清総 IgE 値関連遺伝子として計 32 遺伝子を抽出した。25 遺伝子は3つ以上の独立した異なる集団で報告されており、7 遺伝子 (*DARC*, *HLA-A*, *HLA-DQA2*, *HLA-G*, *RAD50*, *SOBP*, and *TBX18*) は GWAS により報告されているものである。

これら 32 個の遺伝子領域内において、我々の GWAS で最も総 IgE 値と関連の強かった SNP を示す (Table 3)。32 遺伝子中、*HLA-C* 遺伝子を含む 17 遺伝子で P 値が 0.05 未満であった。SNPSpD¹⁶⁾を用いて各遺伝子領域内における多重検定の補正を行うと、9 遺伝子が有意であった。強い関連が認められたのは、染色体 6p21.3 上の MHC class I/II 領域であったが、ゲノムワイドレベルの有意差を持つ SNP は認められなかった。過去に血清総 IgE 値との関連が報告された多型を Table6 に示す。

考察

本研究は、アジア人を対象とした血清総 IgE 値に対する GWAS において有意な結果が得られた初めての報告である。メタ解析の結果、rs3130941 (MHC class I 領域) についてゲノムワイドレベルの有意な関連が認められた。さらに rs3130941 と総 IgE 値の関連は、喘息罹患やアトピー素因の有無とは独立していた。すなわち総 IgE 値関連 SNP rs3130941 は、喘息罹患やアトピー素因とは独立した因子と考えられる。

MHC class I 領域の rs3130941 は *HLA-C* 遺伝子と *HCG27* (*HLA-complex group 27*) の間に存在する (Figure6)。MHC class I 領域では、血清総 IgE 値関連遺伝子として、*HLA-A* 遺伝子 (rs2517754, rs2571391) と *HLA-G* 遺伝子 (rs2523809) の 2 遺伝子が報告されている^{12), 19)}。本研究の GWAS データを用いてこれら既報の SNP と rs3130941 との連鎖不平衡解析をしたところ、何れの SNP との連鎖不平衡も非常に弱いものであった (Table7、Figure6)。さらに、これらの既報 SNP の遺伝子型をそれぞれ共変量として rs3130941 と血清総 IgE 値の関連を解析したが、同様の結果が得られた。したがって、rs3130941 (*HLA-C* 遺伝子領域) は、*HLA-A*、*HLA-G* とは独立して血清総 IgE 値に関連していると考えられる。また、GENEVAR²³⁾を用いて eQTL 解析を行った結果、rs3130941 SNP と連鎖不平衡の関係にある rs3094609 ($r^2 = 0.566$) と rs3130931 ($r^2 = 0.324$) が、*HLA-C* 遺伝子の mRNA 発現に関係していることが明らかになった (それぞれ $P = 0.0495$, 0.00521)。以上のことから rs3130941 も *HLA-C* の発現に関係している可能性が示唆された。IgE 上昇に対する risk allele が増加すると *HLA-C* の発現が減少する関係にある。

MHC class II 領域の rs28366296 はメタ解析でゲノムワイドレベルには達しなかった。しかし、これまでに MHC class II 領域では、3 遺伝子 (*HLA-DQA2*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*) において血清総 IgE 値との関連が報告されている。我々の GWAS でもこれらの 3 遺伝子領域の SNP と血清総 IgE 値との関連が確認された (Table3)。MHC class I 領域と class II 領域はともに染色体 6p21.3 上で近接しているため、rs3130941 (MHC class I 領域) と

rs28366296 (MHC class II 領域) の関係を解析した。我々の GWAS では rs3130941 と rs28366296 はともに血清総 IgE 値と強い関連を認めたが、両 SNP 間の連鎖不平衡は弱かった (Table 7)。さらに、rs3130941 と血清総 IgE 値との関連解析を rs28366296 の遺伝子型で補正して行ったが有意な関連性は保たれていた。以上より、rs3130941 と血清総 IgE 値との関連は、MHC class II 領域の遺伝子による影響を見ているとは考えにくい。

ある種の感染は、Th1 や NK 細胞を強く活性化して Th2 免疫を低下させることによりアレルギー性疾患を抑制することが知られている。日本の学童での研究では、ツベルクリン反応陽性者は Th1 サイトカイン優位であり、喘息の発症が少なく、血清総 IgE 値が低いことが報告されている²⁵⁾。MHC class I 拘束性 CD8 T 細胞は CD4 Th1 細胞とともに Th1 型免疫を惹起し、その結果 CD4 Th2 細胞に対し抑制的に作用し、IgE の産生は低下する^{26), 27)}。また、HLA-C 分子は NK 細胞の働きを抑制的に調節する^{28), 29)}。したがって、HLA-C 分子の調節障害が存在すると、微生物に対する感染防御免疫が正常に機能せず、さらにアレルギーを引き起こして血清総 IgE 値が上昇する可能性が考えられる。

MHC 領域は幅広い範囲で強い連鎖不平衡の関係にあるため、この領域内の遺伝子が疾患発症に与える影響を、遺伝学的なアプローチのみで詳細に解析することは大変に困難である。しかしながら、免疫疾患や炎症性疾患の中には MHC 領域との遺伝的関連が明らかになっているものもある。*HLA-C* 遺伝子領域は特にベーチェット病、乾癬、サルコイドーシスとの関連が確認されている³⁰⁾⁻³²⁾。注目すべきは、IgE の調節異常がこれらの疾患で報告されていることである³³⁾⁻³⁵⁾。このことも *HLA-C* 遺伝子と血清総 IgE 値とは遺伝的に関連があることを示唆している。さらに興味深いことに、*HLA-C* 遺伝子の近傍にある rs9266772 SNP は、自己申告によるアレルギーを対象とした GWAS においてアレルギー感受性座位であることが報告されている³⁶⁾。

筑波コホートと福井コホートでの rs7939777 (*GRAMD1B*) のメタ解析では、*P* 値は 3.35×10^{-10} であった。*GRAMD1B* と血清 IgE 値の関連を示した報告はなかったが、*GRAMD1B* 近傍の SNP

が慢性リンパ球白血病（CLL）とゲノムワイドレベルに関連していると報告されている³⁷⁾。CLLは表面免疫グロブリンの発現が低下し、CD19とCD23が共発現しているという特徴をもつ³⁸⁾。CD23はFCER2（Fc fragment of IgE, low affinity II）としても知られているが、IgE低親和性受容体であり、血清IgEの制御に重要な役割をはたしている。さらに、血清総IgE値の上昇はCLL発症リスクと逆相関していると報告されている³⁹⁾。以上のことより、*GRAMD1B*の遺伝子多型は血清総IgE値の制御に関連しうると考えられる。

PYHINI/IFI16 遺伝子領域の SNP は筑波コホートの GWAS ではゲノムワイドレベルの有意な関連は認められなかったが ($P = 3.19 \times 10^{-7}$)、最近のアフリカ系アメリカ人を対象とした GWAS のメタ解析では *PYHINI* 上の SNP が喘息感受性変異であると報告されている⁴⁰⁾。近年、*PYHINI* と *IFI16* は微生物 DNA のセンサーであることが分かってきている⁴¹⁾。そして、自然免疫系の活動は、免疫細胞がパターン認識受容体を介して感染を識別する能力に依存している。また、さまざまな微生物に暴露される環境で子供が育つと、細菌や真菌への曝露量に比例して喘息やアトピー疾患に罹患しにくくなる⁴²⁾。*PYHINI* と *IFI16* は喘息やアトピーの候補遺伝子として注目すべきである。

既報の IgE 関連遺伝子についての再現性の検討では、32 個の遺伝子は主にヨーロッパ人での報告であったが、日本人集団においても多重性補正後でも 9 遺伝子 (28.1%) に再現性が認められた。このことは一部の遺伝子は人種を超えて血清総 IgE 値に関連していることを示している。異なる人種間においては、血清総 IgE 値に関連する遺伝因子は同一ではない可能性がある^{13), 43)}。一方で、我々の研究で再現性が認められなかった既報 SNP については、その SNP やその SNP と強い連鎖不平衡にある SNP が我々の解析には含まれていなかった可能性がある。あるいは、日本人においては、既報 SNP の minor allele frequency が低かったため、十分な検出力がなかった可能性も考えられる。さらに、GWAS で得られた結果を追試する際、各領域のうち 1 SNP のみの検証であったため、真に機能的に関連する遺伝子変異を見落としている可能性があることである。また、多重性の補正は各遺伝子領域内に

ついて行っているが、32 個の遺伝子領域間の多重性の補正は行っていない。

筑波コホートとその他 2 つの追試コホートでは、喘息罹患率や血清総 IgE 値など集団ごとの特徴に違いが認められた。特に血清総 IgE 値に影響を与える遺伝因子は非喘息健常人と喘息患者間で異なるため、喘息罹患率の違いが今回の結果に影響を及ぼした可能性はある⁴⁴⁾。しかしながら、今回の研究では、喘息患者を除外した健常者のみの解析でも *HLA-C* 遺伝子領域の rs3130941 SNP はゲノムワイドレベルで総 IgE 値に関連しており、今回の結果が喘息の影響を受けていないことを示唆していた。*HLA-C* 遺伝子領域が IgE に影響を及ぼすメカニズムは不明であるが、*HLA-C* 領域をさらに詳細に SNP 解析し、また *HLA-C* と IgE 産生調節の生物学的関連を解析することにより、そのメカニズムが明らかにされることが期待される。今回の研究では *HLA* アリル型タイピングは行われていないが、今後の課題として重要である。

結論

我々は日本人を対象とした血清総 IgE 値に関する GWAS を行い、アジア人において初めての有意な結果を得た。*HLA-C* 遺伝子領域の SNP と血清総 IgE 値との関連は、3,654 人を用いたメタ解析でゲノムワイドレベルの有意差を認めた。また、一部の既報の IgE 関連遺伝子は人種を超えて保存されていることが示された。

第3章の参考文献

1. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 2012;18: 673–683
2. Jacquet A. The role of innate immunity activation in house dust mite allergy. *Trends Mol Med* 2011;17: 604–611
3. Jacobsen HP, Herskind AM, Nielsen BW, Husby S. IgE in unselected like-sexed monozygotic and dizygotic twins at birth and at 6 to 9 years of age: high but dissimilar genetic influence on IgE levels. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107: 659–663
4. Lebowitz MD, Barbee R, Burrows B. Family concordance of IgE, atopy, and disease. *J Allergy Clin Immunol* 1984;73: 259–264
5. Meyers DA, Beaty TH, Freidhoff LR, Marsh DG. Inheritance of total serum IgE (basal levels) in man. *Am J Hum Genet* 1987;41: 51–62
6. Dizier MH, Hill M, James A, Faux J, Ryan G, et al. Detection of a recessive major gene for high IgE levels acting independently of specific response to allergens. *Genet Epidemiol* 1995;12: 93–105
7. Palmer LJ, Burton PR, Faux JA, James AL, Musk AW, et al. Independent inheritance of serum immunoglobulin E concentrations and airway responsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161: 1836–1843
8. Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbison GP, Hewitt CJ, et al. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N Engl J Med* 1991;325: 1067–1071
9. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989;320:

10. Weidinger S, Gieger C, Rodriguez E, Baurecht H, Mempel M, et al. Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies FCER1A as novel susceptibility locus. *PLoS Genet* 2008;4: e1000166.
11. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* 2010;363: 1211–1221
12. Granada M, Wilk JB, Tuzova M, Strachan DP, Weidinger S, et al. A genome-wide association study of plasma total IgE concentrations in the Framingham Heart Study. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129: 840–845 e821.
13. Levin AM, Mathias RA, Huang L, Roth LA, Daley D, et al. A meta-analysis of genome-wide association studies for serum total IgE in diverse study populations. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131: 1176–1184
14. Liao M, Shi D, Wang Y, Zhang K, Chen X, et al. Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies no common variants in a healthy Chinese male population. *Immunogenetics* 2013;65: 561–568
15. Kim JH, Cheong HS, Park JS, Jang AS, Uh ST, et al. A Genome-Wide Association Study of Total Serum and Mite-Specific IgEs in Asthma Patients. *PLoS One* 2013;8: e71958.
16. Nyholt DR. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* 2004;74: 765–769
17. Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Wang HJ, et al. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. *Hum Mol Genet* 2004;13:

18. Trabetti E, Patuzzo C, Malerba G, Galavotti R, Martinati LC, et al. Association of a lymphotoxin alpha gene polymorphism and atopy in Italian families. *J Med Genet* 1999;36: 323–325
19. Malerba G, Trabetti E, Patuzzo C, Lauciello MC, Galavotti R, et al. Candidate genes and a genome-wide search in Italian families with atopic asthmatic children. *Clin Exp Allergy* 1999;29 Suppl 427–30
20. Krasznai M, Szaniszló K, Kraxner H, Vargha E, Kovacs M, et al. Association of TLR-4 and TNF-alpha polymorphisms with clinical symptoms and cytokine levels in patients with allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011;268: 561–567
21. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Viola M, Tramoy D, Gaeta F, et al. Association of tumor necrosis factor-alpha -308G>A polymorphism with IgE-mediated allergy to betalactams in an Italian population. *Pharmacogenomics J* 2008;8: 162–168
22. Sharma S, Sharma A, Kumar S, Sharma SK, Ghosh B. Association of TNF haplotypes with asthma, serum IgE levels, and correlation with serum TNF-alpha levels. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35: 488–495
23. Yang TP, Beazley C, Montgomery SB, Dimas AS, Gutierrez-Arcelus M, et al. Genevar: a database and Java application for the analysis and visualization of SNP-gene associations in eQTL studies. *Bioinformatics* 2010;26: 2474–2476
24. Marsh DG, Meyers DA, Bias WB. The epidemiology and genetics of atopic allergy. *N Engl J Med* 1981;305: 1551–1559
25. Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997;275: 77–79
26. Thomas MJ, Noble A, Sawicka E, Askenase PW, Kemeny DM. CD8 T cells inhibit

- IgE via dendritic cell IL-12 induction that promotes Th1 T cell counter-regulation. *J Immunol* 2002;168: 216–223
27. Kalinski P, Moser M. Consensual immunity: success-driven development of T-helper-1 and T-helper-2 responses. *Nat Rev Immunol* 2005;5: 251–260
 28. Boyton RJ, Smith J, Ward R, Jones M, Ozerovitch L, et al. HLA-C and killer cell immunoglobulin-like receptor genes in idiopathic bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173: 327–333
 29. Das A, Long EO. Lytic granule polarization, rather than degranulation, is the preferred target of inhibitory receptors in NK cells. *J Immunol* 2010;185: 4698–4704
 30. Hughes T, Coit P, Adler A, Yilmaz V, Aksu K, et al. Identification of multiple independent susceptibility loci in the HLA region in Behcet's disease. *Nat Genet* 2013;45: 319–324
 31. Strange A, Capon F, Spencer CC, Knight J, Weale ME, et al. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat Genet* 2010;42: 985–990
 32. Adrianto I, Lin CP, Hale JJ, Levin AM, Datta I, et al. Genome-wide association study of African and European Americans implicates multiple shared and ethnic specific loci in sarcoidosis susceptibility. *PLoS One* 2012;7: e43907.
 33. Onat AM, Buyukhatipoglu H, Yilmaz M, Geyik R, Celik A, et al. Immunoglobulin E: a new diagnostic clue for Behcet's disease? IgE and Behcet's disease. *Clin Rheumatol* 2007;26: 81–83
 34. Ovcina-Kurtovic N, Kasumagic-Halilovic E. Serum levels of total immunoglobulin E in patients with psoriasis: relationship with clinical type of disease. *Med Arh* 2010;64: 28–29

35. Hattori T, Konno S, Shigemura M, Matsuno K, Shimizu C, et al. Total serum IgE levels and atopic status in patients with sarcoidosis. *Allergy Asthma Proc* 2012;33: 90–94
36. Hinds DA, McMahon G, Kiefer AK, Do CB, Eriksson N, et al. A genome-wide association meta-analysis of self-reported allergy identifies shared and allergy-specific susceptibility loci. *Nat Genet* 2013;45: 907–911
37. Di Bernardo MC, Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Webb E, Sellick G, et al. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2008;40: 1204–1210
38. Gaidano G, Foa R, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2012;122: 3432–3438
39. Ellison-Loschmann L, Benavente Y, Douwes J, Buendia E, Font R, et al. Immunoglobulin E levels and risk of lymphoma in a case-control study in Spain. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16: 1492–1498
40. Torgerson DG, Ampleford EJ, Chiu GY, Gauderman WJ, Gignoux CR, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat Genet* 2011;43: 887–892
41. Goubau D, Rehwinkel J, Reis e Sousa C. PYHIN proteins: center stage in DNA sensing. *Nat Immunol* 2010;11: 984–986
42. Rabinovitch N, Liu AH, Zhang L, Rodes CE, Foarde K, et al. Importance of the personal endotoxin cloud in school-age children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116: 1053–1057
43. Mathias RA, Freidhoff LR, Blumenthal MN, Meyers DA, Lester L, et al. Genome-wide linkage analyses of total serum IgE using variance components

- analysis in asthmatic families. *Genet Epidemiol* 2001;20: 340–355
44. Hizawa N, Yamaguchi E, Jinushi E, Kawakami Y. A common FCER1B gene promoter polymorphism influences total serum IgE levels in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161: 906–909
 45. Masuko H, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, et al. Lower FEV1 in non-COPD, nonasthmatic subjects: association with smoking, annual decline in FEV1, total IgE levels, and TSLP genotypes. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2011;6: 181–189
 46. Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, et al. Genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for adult asthma in the Japanese population. *Nat Genet* 2011;43: 893–896
 47. Harada M, Obara K, Hirota T, Yoshimoto T, Hitomi Y, et al. A functional polymorphism in IL-18 is associated with severity of bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180: 1048–1055
 48. Miller SP, Marinkovich VA, Riege DH, Sell WJ, Baker DL, et al. Application of the MAST Immunodiagnostic System to the determination of allergen-specific IgE. *Clin Chem* 1984;30: 1467–1472
 49. Isada A, Konno S, Hizawa N, Tamari M, Hirota T, et al. A functional polymorphism (–603A → G) in the tissue factor gene promoter is associated with adult-onset asthma. *J Hum Genet* 2010;55: 167–174
 50. Sakashita M, Hirota T, Harada M, Nakamichi R, Tsunoda T, et al. Prevalence of allergic rhinitis and sensitization to common aeroallergens in a Japanese population. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;151: 255–261
 51. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, et al. PLINK: a tool set

- for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81: 559–575
52. Wise AL, Gyi L, Manolio TA. eXclusion: toward integrating the X chromosome in genome-wide association analyses. *Am J Hum Genet* 2013;92: 643–647
53. Li Y, Willer C, Sanna S, Abecasis G. Genotype imputation. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009;10: 387–406
54. Wuthrich B, Schindler C, Medici TC, Zellweger JP, Leuenberger P. IgE levels, atopy markers and hay fever in relation to age, sex and smoking status in a normal adult Swiss population. SAPALDIA (Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults) Team. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;111: 396–402
55. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21: 263–265
56. Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, Kaneko Y, Yamada H, et al. Genome-wide association study for levels of total serum IgE identifies HLA-C in a Japanese population. *PLoS One*. 2013;4;8: e80941.

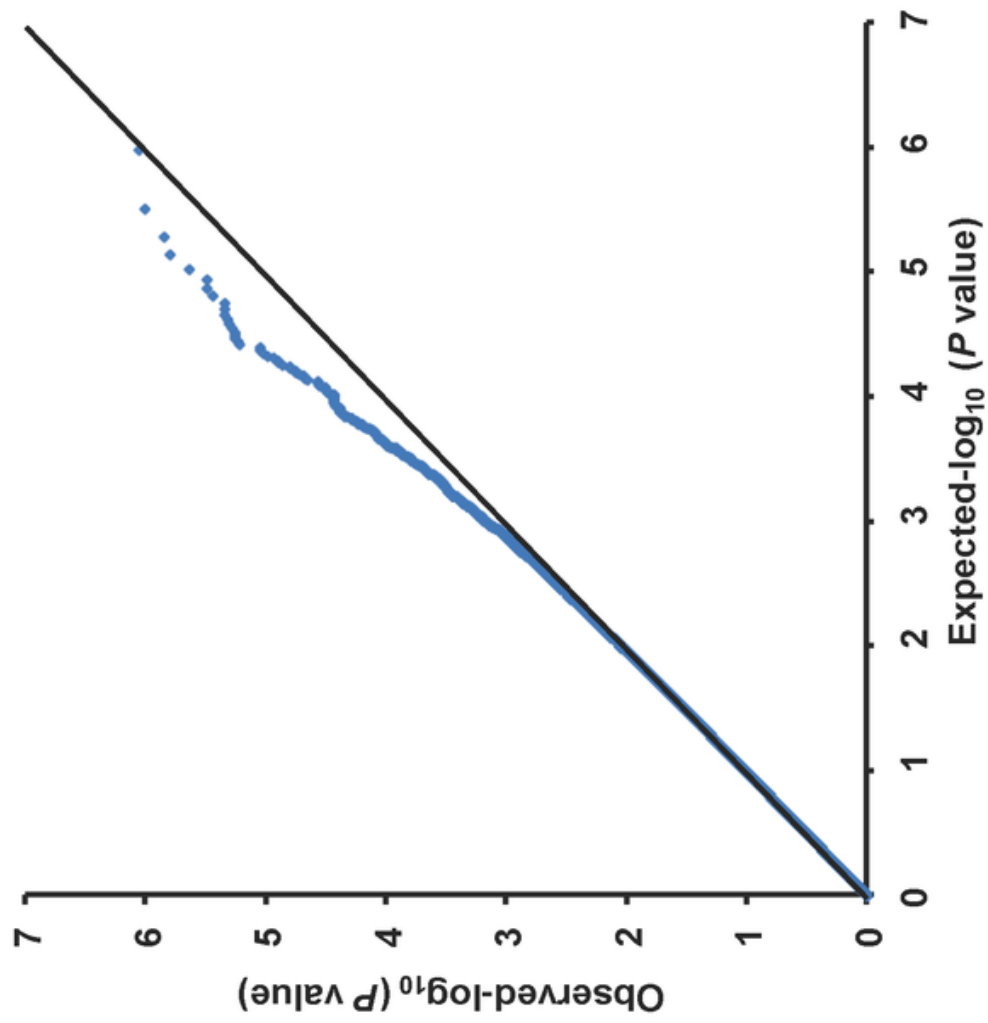


Figure 1. GWAS結果のQ-Qプロット
 直線が期待値を示し、青点が観測値を示す。
 (文献56 より引用)

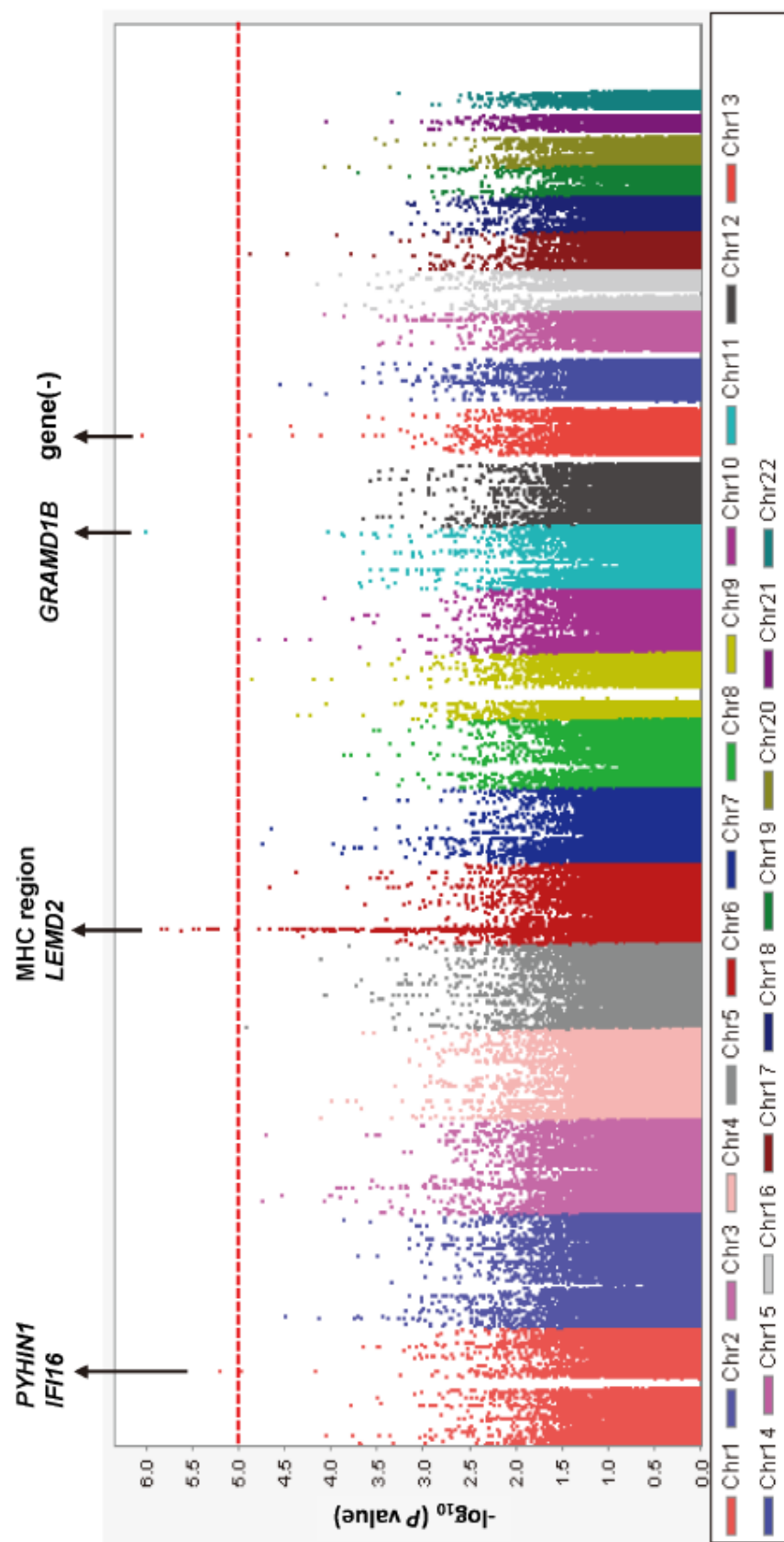


Figure 2. 血清総IgE値についてのGWAS (マンハッタンプロット)
 赤点線は $P=1.0 \times 10^{-5}$ を示す。 $P=1.0 \times 10^{-5}$ を満たす領域についてimputationを行った。
 (文献56 より引用)

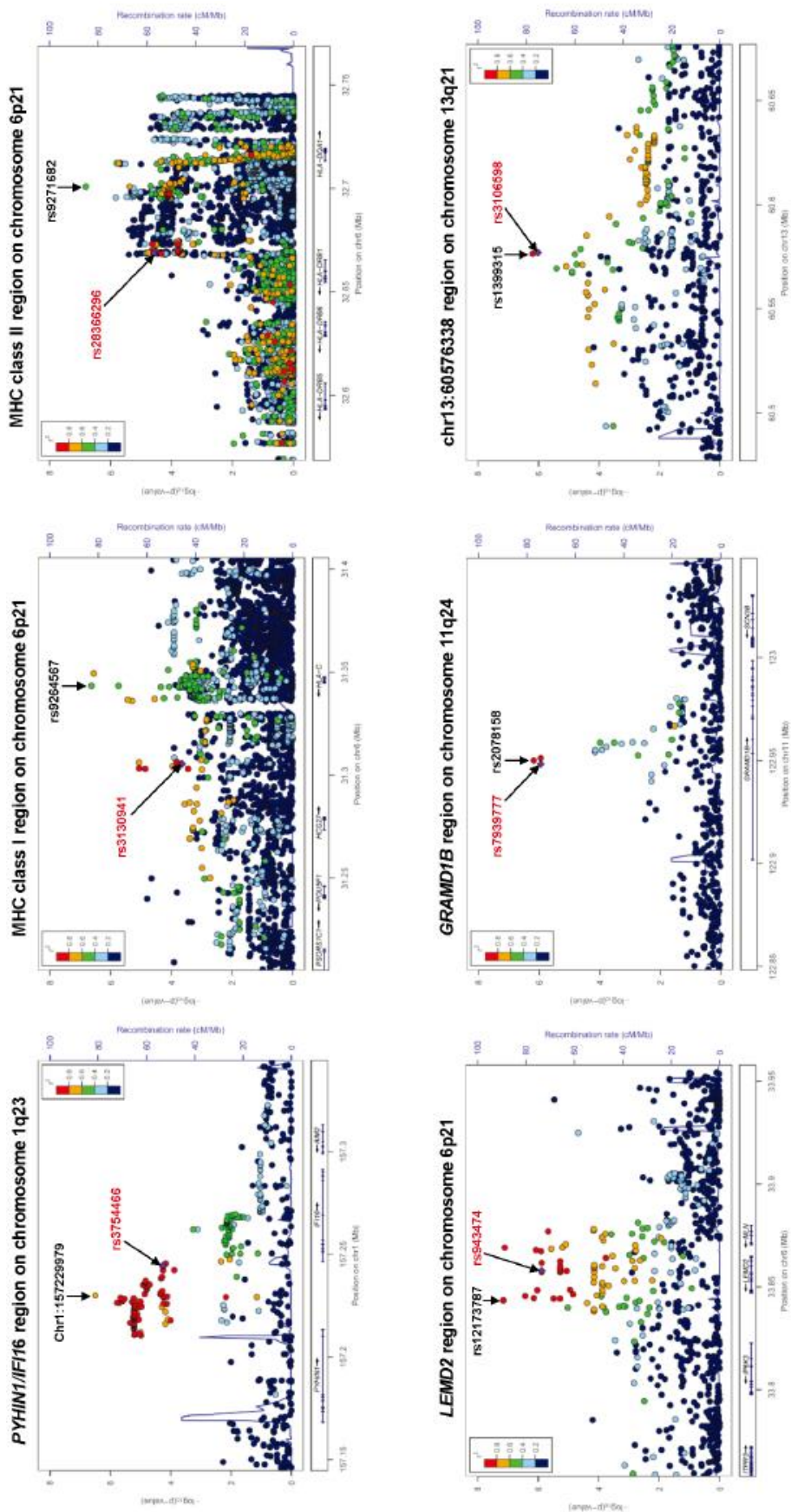


Figure 3. Fine-mappingにより明らかになった6つの候補領域。
 GWASで最も関連が強かったSNPを黒字で示し、replicationに用いたSNPを赤字で示す。
 それぞれの点の色は、replicationに用いたSNPとの連鎖不平衡係数に対応する。
 (文献56 より引用)

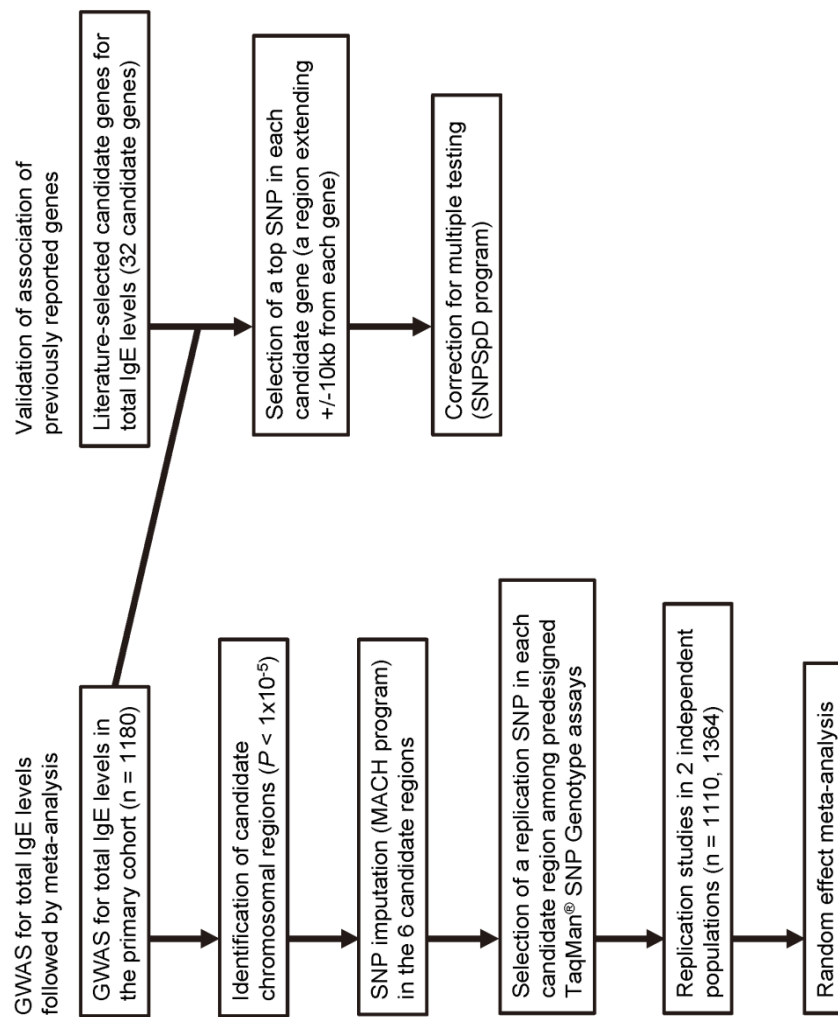


Figure 4. 研究の流れ

(文献56 より引用)

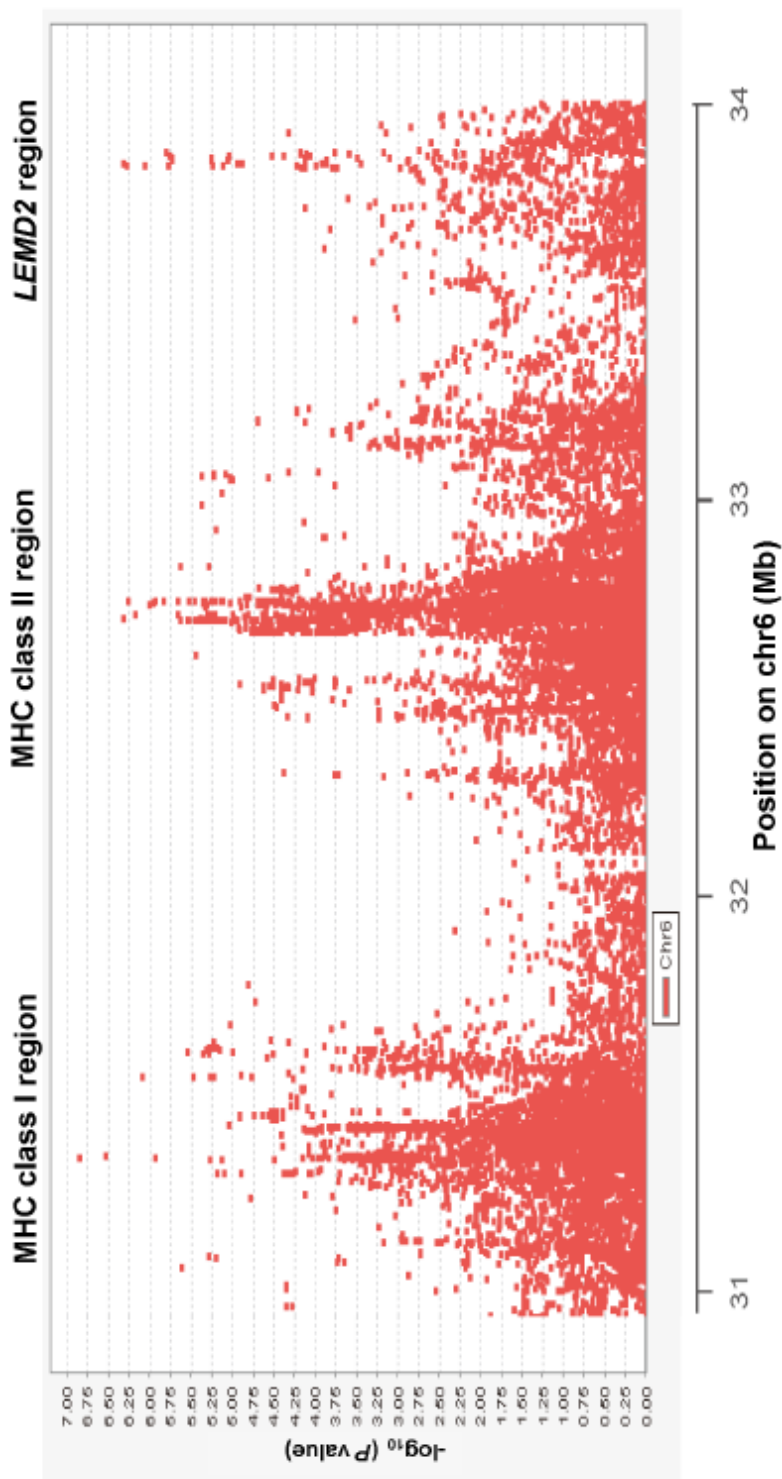


Figure 5. Chromosome 6p21についてのfine-mapping
fine-mappingにより3つのピークが明らかになった (MHC class I領域, MHC class II領域, *LEMD2*領域)
(文献56 より引用)

Table 1. 各コホートの特徴

	Tsukuba cohort (n = 1180)	Hokkaido cohort (n = 1110)	Fukui cohort (n = 1364)
Age, y (SD)	50.3(10.4)	44.6(16.0)	32.2(9.8)
Female sex	55.3%	49.3%	67.0%
Smoking status			
Current smoker	16.2%	26.1%	NA
Ex-smoker	17.5%	16.7%	NA
Never smoker	66.2%	57.2%	NA
Asthma	18.1%	44.2%	6.5%
Atopy			
Atopic	56.6%	53.7%	67.2%
Nonatopic	40.5%	29.5%	30.5%
Unknown	2.9%	16.8%	2.3%
Log ₁₀ [total serum IgE] (SD)	1.82(0.60)	2.08(0.69)	1.91(0.62)

NA = not applicable, SD = standard deviation
(文献56 より引用)

Table 2. replication studyとメタ解析の結果

Tsukuba cohort		Hokkaido cohort			Fukui Cohort			Meta-analysis		
Top SNP										
Chromosome	Gene	SNP for replication study	P value	LD with top SNP (r ²)	MAF	Minor allele	β	P value	P value	P value
1q23.1	PYHIN1/IFI16	chr1:157229979	3.19E-07	1	0.16	G	-0.168			
		rs3754466	5.65E-05	0.637	0.20	C	-0.119	0.244	0.222	0.378
6p21.3	MHC class I	rs9264567	2.33E-07	1	0.28	A	0.132			
		rs3130941	2.28E-04	0.549	0.25	C	0.098	5.03E-04	6.12E-05	1.07E-10
6p21.3	MHC class II	rs9271682	1.55E-07	1	0.48	A	0.127			
		rs28366296	2.67E-05	0.608	0.39	A	-0.098	4.15E-02	5.44E-02	2.17E-05
6p21.31	LEMD2	rs12173787	7.03E-08	1	0.17	G	0.161			
		rs943474	1.30E-06	0.786	0.16	G	0.157	5.56E-02	0.308	2.29E-02
11q24.1	GRAMD1B	rs2078158	6.57E-07	1	0.41	A	-0.118			
		rs7939777	1.13E-06	0.943	0.42	C	-0.114	7.63E-02*	7.58E-05	0.263
13q21.31	none	rs1399315	6.40E-07	1	0.48	C	0.114			
		rs3106598	9.51E-07	0.997	0.48	G	0.112	0.817	0.813	0.326

*筑波コホートの結果と逆の結果であった。
LD = linkage disequilibrium; MAF = minor allele frequency.
(文献56 より引用)

Table 3. 各遺伝子における血清総 IgE 値に対する Top SNP

Gene	Chromosome	Number of SNPs	SNP	Nominal <i>P</i> value	Corrected <i>P</i> value*
<i>ADAM33</i>	20	12	rs2853215	1.66E-02	0.150
<i>ADRB2</i>	5	17	rs17640574	7.27E-02	0.728
<i>CCL11</i>	17	7	rs6505403	0.225	0.898
<i>CD14</i>	5	8	rs3822356	0.719	1
<i>CMA1</i>	14	9	rs1956932	0.179	1
<i>CTLA4</i>	2	3	rs231726	1.21E-02	2.31E-02
<i>DARC</i>	1	3	rs863002	0.394	0.789
<i>FCER1A</i>	1	9	rs2427824	3.06E-02	0.184
<i>FLG</i>	1	3	rs3126085	0.288	0.577
<i>GSTP1</i>	11	3	rs614080	0.766	1
<i>HLA-A</i>	6	2	rs2734959	6.64E-03	1.33E-02
<i>HLA-C</i>	6	26	rs3132486	1.50E-04	1.88E-03
<i>HLA-DQA2</i>	6	24	rs17500468	7.94E-05	8.06E-04
<i>HLA-DQB1</i>	6	11	rs2647025	7.48E-05	3.74E-04
<i>HLA-DRB1</i>	6	66	rs35465556	8.51E-05	1.83E-03
<i>HLA-G</i>	6	21	rs1633053	7.58E-03	4.56E-02
<i>IFNG</i>	12	4	rs3181032	3.56E-02	0.104
<i>IL10</i>	1	8	rs1800896	0.110	0.660
<i>IL13</i>	5	4	rs1295686	7.41E-02	0.216
<i>IL4</i>	5	5	rs2243288	2.08E-03	8.34E-03
<i>IL4R</i>	16	23	rs4787948	0.219	1
<i>LTA</i>	6	12	rs2857709	4.24E-05	2.97E-04
<i>MS4A2</i>	11	4	rs574700	0.201	0.602
<i>NOD2</i>	16	6	rs7194886	0.156	0.468
<i>NOS1</i>	12	45	rs4767535	8.60E-03	0.235
<i>NPSR1</i>	7	66	rs323928	3.29E-02	0.867
<i>RAD50</i>	5	7	rs17772583	1.82E-02	7.29E-02
<i>SOBP</i>	6	41	rs3734747	5.43E-03	0.135
<i>STAT6</i>	12	7	rs841718	0.171	0.854
<i>TBX18</i>	6	5	rs2015519	3.71E-02	0.146
<i>TLR2</i>	4	4	rs7656411	0.328	0.983
<i>TNF</i>	6	11	rs2844484	7.96E-02	0.478

(文献 56 より引用)

Table 4.結果(喘息患者を除外)

Chromosome	Gene	Tsukuba cohort		Hokkaido cohort		Fukui cohort		Meta-analysis	
		SNP for replication study	Minor allele	<i>P</i> value	β	<i>P</i> value	(n = 1275)	(n = 2861)	<i>P</i> value
1q23.1	PYHIN1/IFI16	rs3754466	C	7.38E-05	-0.128	0.207	0.206	0.365	
6p21.3	MHC class I	rs3130941	C	9.80E-04	0.095	1.06E-04	2.19E-05	1.30E-10	
6p21.3	MHC class II	rs28366296	A	7.90E-05	-0.100	0.207	1.68E-02	7.73E-06	
6p21.31	LEMD2	rs943474	G	2.64E-05	0.146	4.29E-02	0.242	1.21E-02	
11q24.1	GRAMD1B	rs7939777	C	2.22E-06	-0.121	2.43E-02	2.94E-03	0.451	
13q21.31	none	rs3106598	G	5.26E-05	0.101	0.540	8.82E-01	0.354	

Table 5.結果(アトピー素因について補正)

Chromosome	Gene	Tsukuba cohort		Minor allele	Hokkaido cohort		Fukui cohort	Meta-analysis
		SNP for replication study	β		P value	P value	P value	
1q23.1	PYHIN1/IFI16	rs3754466	-0.094	C	5.71E-05	0.268	(n = 1275)	(n = 2861)
6p21.3	MHC class I	rs3130941	0.104	C	1.72E-05	2.36E-02		
6p21.3	MHC class II	rs28366296	-0.080	A	2.10E-04	0.106		
6p21.31	LEMD2	rs943474	0.125	G	2.39E-05	0.192		
11q24.1	GRAMD1B	rs7939777	-0.085	C	7.88E-05	0.282*		
13q21.31	none	rs3106598	0.093	G	9.91E-06	0.583		

(文献56 より引用)

Table 6. 血清総IgE値との関連が報告された多型

Gene	Polymorphism	P value previously reported	P value in our GWAS*	Reference
ADAM33	rs2280091	0.0033	NA	[1]
	rs597980	0.032	NA	[2]
	rs574174	0.01	NA	[3]
	rs528557	0.041	NA	[4]
ADRB2	rs1042714	<0.0001	0.846	[5]
	rs1042713	0.04	0.475	[6]
CCL11	rs16969415	0.0006	NA	[7]
	rs3744508	0.002	NA	[8]
	rs17809012	0.016	NA	[9]
CD14	rs2569190	0.0016	NA	[10]
	rs3138078	0.034	NA	[11]
	rs2563310	0.034	NA	[12]
CMA1	rs1800875	0.0004	NA	[13]
CTLA4	rs231775	0.0005	NA	[14]
	rs5472909	0.0047	NA	[15]
DARC	rs13962	2.21E-11	NA	[16]‡
	rs2814778	0.017	NA	[17]
FCER1A	rs2251746	1.85E-20	0.515	[18]‡
	rs4656784	1.68E-16	NA	[16]‡
	rs2427827	0.001	NA	[19]
	rs2427837	0.014	NA	[20]
FLG	2282del4	0.009	NA	[21]
	rs11584340	<0.05	NA	[22]
GSTP1	rs1695	0.02	0.911	[23]
HLA-A	rs2517754	3.61E-09	NA	[16]‡
HLA-C	rs3130941	1.07E-10	NA	Current study‡
HLA-DQA2	rs2858331	1.44E-08	0.000217	[16]‡
HLA-DQB1	DQB1*0301	0.008	NA	[24]
	rs1063355	0.01	0.000216	[25]
HLA-DRB1	rs9271300	8.30E-15	0.0813	[26]‡
	DRB1*07	<0.0001	NA	[27]
	DRB1*01	<0.004	NA	[28]
	DRB1*14	0.02	NA	[24]
HLA-G	rs2523809	4.34E-08	0.707	[16]‡
IFNG	(CA) _n intron 1	0.0001	NA	[29]
	rs2430561	<0.001	NA	[30]
IL4	rs2070874	0.0001	NA	[31]
	rs2243290	0.0005	0.00342†	[32]
	rs2243250	0.001	NA	[33]
IL4R	rs1805010	0.0021	NA	[34]
	rs1801275	0.02	0.948	[35]
IL10	rs1800872	<0.001	NA	[36]
IL13	rs20541	0.00002	0.0819	[37]
	rs1881457	0.00002	NA	[38]
	rs1295685	<0.0001	NA	[39]
	rs848	<0.0001	NA	[39]
	rs1295686	0.00022	0.0741	[40]
	rs1800925	0.0002	NA	[41]
	rs909253	0.0032	NA	[42]
	rs1441586	0.0004	NA	[43]
MS4A2	rs569108	<0.001	NA	[44]
	Rsa I-In2	0.04	NA	[24]
	rs2066845	0.006	NA	[45]
NOD2	rs5743293	0.009	NA	[46]
	rs2682826	<0.01	0.32	[47]
NOS1	(AAT) _n intron 20	0.015	NA	[48]
	rs323922	0.004	NA	[49]
	rs740347	0.001	NA	[50]
NPSR1	SNP546333	0.015	NA	[51]
	rs2040704	4.46E-08	NA	[18]‡
RAD50	rs7751374	3.68E-08	0.242	[52]‡
SOBP	rs1059513	1.99E-12	0.658	[16]‡
	rs12368672	1.52E-05	NA	[18]‡
	rs11172106	0.004	NA	[53]
	1570C/T	0.007	NA	[54]
	(GT) _n exon 1	<0.01	NA	[55]
	rs324011	0.015	NA	[56]
	rs324015	0.042	0.348	[57]
	rs10944017	3.88E-08	NA	[52]‡
TBX18	rs4696480	0.01	NA	[58]
	rs5743708	0.04	NA	[59]
TNF	rs1800630	0.0024	NA	[60]
	rs361525	<0.05	NA	[61]
	rs1800629	<0.05	NA	[61]

The most significant P value in each study is shown.

*Pvalue in our primary GWAS. †GWAS. ‡The direction of the effect was opposite.

NA = not applicable. (文献56 より引用)

Table 7. rs3130941 と MHC class I/II 領域の血清総IgE値関連遺伝子の連鎖不平衡と遺伝的影響

SNP	LD (r ²) with rs3130941	P value adjusted for each SNP*
rs2517754 (HLA-A)	0.008	3.34E-04
rs2571391 (HLA-A)	0.047	2.27E-03
rs2523809 (HLA-G)	0.02	3.79E-04
rs28366296 (MHC class II)	0.064	5.51E-03

NA = not applicable; LD = linkage disequilibrium

*P values given for the association between rs3130941 and total IgE levels in our primary cohort.

When none of these SNPs were included in the statistical model, the P value for rs3130941 was 2.28 x 10⁻⁴
(文献56 より引用)

第4章 総括

喘息の分子病態解明のために、GWASによる網羅的な遺伝子変異の解析を行った。喘息は多彩な臨床病態を含む症候群であり、検出力を高めるために対象とする集団をなるべく均一なフェノタイプを対象にする対策をとった。第2章 1.では重喫煙者を除外した喘息集団、第2章 2.では中高年発症喘息集団を対象としてGWASを行った。重喫煙者を除外した喘息での検討では、*HAS2* 遺伝子の近傍に日本人成人喘息の感受性領域と考えられる遺伝的変異を同定した。*HAS2* 遺伝子は、高分子量型ヒアルロン酸の生成に重要な役割を担っている。*HAS2* 遺伝子が肺組織で発現していることや高分子量型ヒアルロン酸が抗炎症作用を持つことなども我々の結果に合致している。中高年発症喘息の検討では、*PBMUCL2* 遺伝子の近傍に感受性遺伝領域を同定した。*PBMUCL2* 遺伝子はDPBの感受性遺伝子として同定されている。中高年発症喘息とDPBの間には、臨床像にも類似する点があり、共通の分子病態が存在する可能性が示唆された。

第3章では、アレルギー炎症の進展に重要な役割を果たしているIgEに焦点を当てた。第2章同様に、GWASを用いて血清総IgE値の感受性領域を検索した。*HLA-C* 遺伝子の近傍に、血清総IgE値を規定する遺伝領域を同定した。

慢性の気道炎症を起因とした可逆性の咳・喘鳴・呼吸困難からなる症候群である喘息を、喫煙状態や発症年齢により集団を均一化することで新規の喘息感受性領域を同定した。我々の先行研究を含め様々なクラスター分類が報告され、喘息を分類し、集団を均一化する際に重要な因子が明らかになってきている。分類されたクラスターごとに、それぞれ異なる分子病態が存在していると考えられる。本研究で扱った喫煙状態、発症年齢、アレルギー素因以外にも、肺機能、喀痰中の好酸球・好中球数、罹患期間、肥満、重症度などがクラスター分類における重要な因子とされている。今後はこれらの因子にも注目した遺伝的解析を行い、多様な分子病態からなる喘息の発症メカニズムを解明し、新たな治療薬・治療法の開発に結び付けることを目標としたい。

略語

本論文では、以下の略語を使用した。

ADRB2	adrenoceptor beta 2
CC16	secretoglobin, family 1A, member 1
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
CEU	Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection
CHB	Han Chinese in Beijing
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
DARC	atypical chemokine receptor 1 (Duffy blood group)
DNA	deoxyribonucleic acid
DPB	diffuse panbronchiolitis
DPCR1	diffuse panbronchiolitis critical region 1
FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II
GRAMD1B	GRAM domain containing 1B
GWAS	genome wide association study
HAS	hyaluronan synthase
HCG27	HLA-complex group 27
HLA	human leukocyte antigen
IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16
IgE	immunoglobulin E
JPT	Japanese in Tokyo
LEMD2	LEM domain containing 2
MAF	minor allele frequency
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid
PBMUCL	panbronchiolitis-related mucin-like protein 2
PCR	polymerase chain reaction
PYHIN1	pyrin and HIN domain family, member 1
RAD50	DNA repair protein RAD50
SNP	single nucleotide polymorphism
SOBP	sine oculis binding protein homolog
TBX18	T-box 18
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
YRI	Yoruba in Ibadan

謝 辞

本研究にあたり終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました筑波大学大学院呼吸器内科
檜澤伸之教授に深い謝意を表します。

適切な御指導と御示唆を頂きました筑波大学大学院呼吸器内科坂本透准教授に深く感謝
いたします。

研究その他多方面にわたり御指導いただきました筑波大学大学院遺伝医学野口恵美子教
授、筑波大学大学院呼吸器内科大塚盛男教授、筑波大学附属病院土浦市地域臨床教育ステ
ーション石井幸雄教授、水戸地域医療教育センター佐藤浩昭教授、ひたちなか社会連携教
育センター寺本信嗣教授に深く感謝いたします。

遺伝子解析で多大なる御協力、御指導をいただきました理化学研究所ゲノム医科学研究
センター玉利真由美チームリーダー、広田朝光研究員に深謝いたします。

日々の研究において御援助、御協力をいただきました、つくば総合健診センター内藤隆
志センター長をはじめつくば総合健診センターのスタッフの皆様に感謝いたします。

貴重な検体を御提供いただきました北海道大学病院第一内科西村正治教授、今野哲講師
に深く感謝いたします。

遺伝子タイピングをはじめ様々な実験手技を一から御指導いただきました中村貴子女史
に深く感謝いたします。

また、研究において様々な御協力、御教授をいただきました、森島祐子講師、川口未央
講師、本間晋介講師、松野洋輔講師、山本良子講師、長南達也医学博士、齋藤武文医学博
士、二宮浩樹医学博士、遠藤健夫医学博士、石川博一医学博士、飯島弘晃医学博士、野村
明広医学博士、金子美子医学博士、増子裕典医学博士、大塚茂男医学博士、松山政史医学
博士、太田恭子医学士、中澤健介医学士、山田英恵医学士に深謝いたします。

その他、多大なる御援助、御協力くださった方々に深く御礼申し上げます。

参 考 論 文