

筑波大学

博士（医学）学位論文

ライノウイルス感染およびアレルギー感作への
遺伝的感受性が成人喘息に与える影響について

2018

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

金澤 潤

目次	
略語	4
第1章 序章	7
参考文献	10
第2章 喘息関連遺伝子が日本人集団に与える影響	
第1節 <i>CDHR3</i> 遺伝子多型が若年発症成人喘息に与える影響	12
参考文献	18
図表	22
第2節 日本人集団における <i>TYRO3</i> 遺伝子 eQTL とアレルギー疾患の関連解析	26
参考文献	33
表	35
第3章 アレルギー感作関連遺伝子が成人喘息に与える影響	39
参考文献	44
図表	46
第4章 <i>CDHR3</i> 遺伝子多型、 <i>TYRO3</i> 遺伝子多型およびアレルギー感作関連遺伝子の成人喘息、アトピーへの交互作用について	50
図	53
第5章 総括	58
図	60
謝辞	61
出典	62

略語

本論文においては以下の略語を使用した。

ADAD1	adenosine deaminase domain containing 1
Atopy-GRS	atopy genetic risk score
C11orf30	chromosome 11 open reading frame 30
CAMK4	calcium/calmodulin dependent protein kinase IV
CAP-FEIA	capsulated hydrophilic carrier polymer - fluorescent enzyme immunoassay
CART	classification and regression tree
CD4	cluster of differentiation 4
CDHR3	cadherin-related family member 3
CLEC16A	C-type lectin domain containing 16A
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
DNA	deoxyribonucleic acid
eQTL	expression quantitative trait locus
ETS1	ETS proto-oncogene 1, transcription factor
FEV ₁	forced expiratory volume in one second
FOXA1	forkhead box A1
FVC	forced vital capacity
GATA3	GATA binding protein 3
GSDMB	gasdermin B
GWAS	genomewide association study
ID2	inhibitor of DNA binding 2
Th1	type 1 helper T cells
Th2	type 2 helper T cells

HLA	human leukocyte antigen
IFN- α	interferon- α
IgE	immunoglobulin E
ILC2	group 2 innate lymphoid cell
IL	interleukin
IL1RL1	interleukin 1 receptor like 1
IL1RL2	interleukin 1 receptor like 2
IL4R	interleukin 4 receptor
IL18R1	interleukin 18 receptor 1
IL21R	interleukin 21 receptor
JPT	Japanese in Tokyo
LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma
LRRC32	leucine rich repeat containing 32
MHC class II	major histocompatibility complex class II
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A
mRNA	messenger ribonucleic acid
MYC	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
NFATC2	nuclear factor of activated T cells 2
OR	odds ratio
PARF	population attributable risk fraction
PCR	polymerase chain reaction
PEX14	peroxisomal biogenesis factor 14
PLCL1	phospholipase C like 1
PTGER4	prostaglandin E receptor 4

PVT1	Pvt1 oncogene
RAF	risk allele frequency
RANBP6	RAN binding protein 6
RPAP1	RNA Polymerase II Associated Protein 1
RS virus	respiratory syncytial virus
SLC25A46	solute carrier family 25 member 46
SMAD3	SMAD family member 3
SNP	single nucleotide polymorphism
STAT6	signal transducer and activator of transcription 6
TAM	Tyro3, Ax1, and Mer
TLR1	toll like receptor 1
TLR6	toll like receptor 6
TLR10	toll like receptor 10
TPD52	tumor protein D52
TTC6	tetratricopeptide repeat domain 6
TYRO3	TYRO3 protein tyrosine kinase
WDR36	WD repeat domain 36
ZBTB10	zinc finger and BTB domain containing 10

第1章 序章

喘息予防・管理ガイドライン 2018 において、喘息は「気道の慢性炎症を本態とし、変動性を持った気道狭窄(喘鳴、呼吸困難)や咳などの臨床症状で特徴付けられる疾患」と定義されている[1]。しかし、喘息の経過や治療への反応性は個々の患者により大きく異なり、そもそも単一の疾患ではなく、多様なフェノタイプから構成され、多くの個体要因と環境要因との複雑な交互作用によって発症や病態が規定される症候群と考えられている。個体要因としては、年齢、アトピー素因、肥満、遺伝的要因などが、環境要因としてはアレルゲン曝露、呼吸器感染症、喫煙、大気汚染などが知られている[1]。

その中でもウイルス感染は喘息の発症、治療において非常に重要な因子である。乳幼児期のライノウイルス感染、RS ウイルス感染がその後の反復する喘鳴、喘息、アレルゲン感作の重要な危険因子とされている。両親のどちらか一方が喘息の小児を 6 歳まで追跡した出生コホート研究では、3 歳でライノウイルスあるいは RS ウイルス感染による喘鳴エピソードがあると 6 歳時点での喘息発症のオッズ比が上昇し[2]、ウイルス感染と遺伝因子との相互作用の重要性が示唆されている。また、成人喘息においても増悪の原因としてウイルス感染が最多である[3]。さらに、ウイルス感染と個体要因であるアトピー素因との喘息発症への相互作用は、two-hit model として有名である。これは、1 歳時点でのウイルス感染の回数が多いほど、6 歳時点での喘息発症リスクが高くなり、さらにアレルギー感作が存在すると喘息発症のオッズ比が相乗的に増加することから提唱されたもので、出生後の肺の成長段階においてウイルスの下気道感染に伴う気道炎症とアレルギー感作による気道炎症の相乗作用により組織の分化が障害され肺機能異常を来し、喘息の発症につながるとする説である[4]。

本研究の目的は、遺伝的なライノウイルス易感染性とアレルゲン感作獲得体質が日本人集団においてどのような喘息フェノタイプに影響するのかを患者群と健常対照者群を用いた対立遺伝子頻度の比較により検討し、さらに両遺伝素因の交互作用を検討することである。遺伝的なライノウ

ルス易感染性とアレルギー感作獲得体質については、過去のゲノムワイド関連解析 (genomewide association study: GWAS) において特定の喘息フェノタイプとの関連が示されたライノウイルス感染 [5] およびアレルギー感作 [6] に関連する遺伝子多型を用いた。

第 2 章第 1 節で小児重症喘息の GWAS で特定されたライノウイルス感染、増殖に関連する cadherin-related family member 3 (*CDHR3*) 遺伝子の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) が日本人成人喘息に与える影響を検討した。その機能により特に若年発症、その中でもアレルギー感作陽性者に注目し、遺伝子多型の影響の違いについて検討した。第 2 節でアトピー性若年発症喘息の GWAS で関連が示された *TYRO3* 遺伝子の発現に関連する SNP (expression quantitative trait locus: eQTL) と喘息、アトピー素因、アレルギー性鼻炎との関連を検討した。

アトピー素因と喘息との関連については、吸入抗原に対するアレルギー感作が発症年齢に関わらず重要と考えられてきた。一方、アトピー性皮膚炎の遺伝学的検討によりフィラグリンなどのバリア蛋白の欠損によりアトピー性皮膚炎が発症することが示され、アレルギー感作がバリア機能障害に引き続く二次的な現象であることが示唆されている。近年、喘息の気道においても上皮バリア機能の異常が報告されており、喘息病態における重要性が示唆されている。第 2 章においてアレルギー感作に影響を与える遺伝的因子と成人喘息との関連が認められなかったことも踏まえ、喘息においてもアレルギー感作が気道バリア機能障害に引き続いて生じている可能性を検討するため、第 3 章では GWAS でアレルギー感作に関連することが報告された複数の SNP [7, 8] を用いてアレルギー感作獲得体質を定義する遺伝的リスクスコアを計算し、成人喘息発症に与える影響を検討した。

第 4 章では第 2 章、第 3 章で検討したライノウイルス感受性とアレルギー感作獲得体質の交互作用について検討した。

ヒトを用いた遺伝子解析は、出生時から存在する遺伝子変異が、特定の疾患発症にどのような影響を持つのかを検討するアプローチであり、疾患との強い関連が認められた遺伝子の機能を知

ることで、その疾患の成り立ちを分子レベルから理解することが可能になる。喘息が多様なフェノタイプから構成される不均一な疾患であることから、より均一な喘息フェノタイプを遺伝的関連解析に用いることで、新たな喘息の遺伝因子を特定し、個々の患者における生物学的機序もしくはエンドタイプの特特定から個別化治療につながる可能性がある。我々の研究結果が喘息発症の高リスク患者の拾い上げに役立ち、分子病態に基づいた疾患サブグループごとの治療の確立を目指す精密医療 (Precision Medicine) や個人に適応した予防的介入を疾患が発症する前に行う先制医療 (Preemptive Medicine) の実践につながることを期待される。

参考文献

1. 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 2018. 協和企画, 東京, 2018.
2. Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Roberg KA, Anderson EL, Pappas TE, et al. Wheezing rhinovirus illness in early life predict subsequent development in high-risk children. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:667-72.
3. Mallia P, Contoli M, Caramori G, Pandit A, Johnston SL, Papi A. Exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD): focus on virus induced exacerbations. *Curr Pharm Des* 2007;13:73–97.
4. Holt PG, Upham JW, Sly PD. Contemporaneous maturation of immunologic and respiratory functions during early childhood: implications for development of asthma prevention strategies. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:16–24.
5. Bonnelykke K, Sleiman P, Nielsen K, Kreiner-Moller E, Mercader JM, Belgrave D, 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.
6. Chan PY, Carrera Silva EA, Kouchkovsky D De, Joannas LD, Hao L, Hu D, et al. The TAM family receptor tyrosine kinase TYRO3 is a negative regulator of type 2 immunity. *Science* 2016;352:99–103.
7. Bonnelykke K, Matheson MC, Pers TH, Granell R, Strachan DP, Alves AC, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies ten loci influencing allergic sensitization. *Nat Genet* 2013;45:902-6.

8. Hinds DA, McMahon G, Kiefer AK, Do CB, Eriksson N, Evans DM, et al. A genome-wide association meta-analysis of self-reported allergy identifies shared and allergy-specific susceptibility loci. *Nat Genet* 2013;45:907-11.

第 2 章 喘息関連遺伝子が日本人集団に与える影響

第 1 節 *CDHR3* 遺伝子多型が若年発症成人喘息に与える影響

背景・目的

重症喘息発作により入院を繰り返す 2 歳から 6 歳の小児を対象にした GWAS がデンマークで行われ 2014 年に報告された。それまで行われた喘息の GWAS に比べて対象人数が少ないにも関わらず、新たに *CDHR3* 遺伝子領域の感受性座位が特定された。*CDHR3* はヒトの肺や気道上皮に多く発現しており[1、2]、細胞接着や上皮の極性や分化などの細胞プロセスに関与するカドヘリンファミリー膜貫通蛋白に属する[3]。*CDHR3* 遺伝子領域で小児喘息と最も強く関連したのは、非同義一塩基多型の rs6967330 であり、この多型により *CDHR3* 蛋白の 529 番目のシステインがチロシンに変換される[4]。rs6967330 のリスク変異を持つと、ヒトライノウイルス C の結合と増殖が非リスク多型の約 10 倍に増えることが示されており、*CDHR3* がライノウイルス C の受容体として働くことが示されている。この機能的多型によりライノウイルス C への感受性が高まることで、喘息発症のリスクが高くなると考えられている。

小児期のライノウイルス感染に伴う喘鳴はその後の喘息発症のリスクとなる[5]。また、ライノウイルス C は小児における重症喘息発作の原因ウイルスとして最も多く、他のウイルス下気道感染に比べて高い再入院率に関係する[6-8]。さらに、思春期、若年成人で喘息や吸入抗原に対する特異的 IgE がある者では、ヒトライノウイルスが気道に存在する割合が高い。ライノウイルスの存在は吸入ステロイド使用中においても全身性好酸球性炎症と関連する[9]。本研究の目的は、候補遺伝子症例対照研究により *CDHR3* 遺伝子多型が日本人成人喘息、特に若年発症喘息へ与える影響を調べ、ライノウイルス C への高感受性に関連した特異的な喘息フェノタイプを特定することである。

方法

対象

定期健康診断のためにつくば総合健診センターを受診した 967 人の健常者と、筑波大学病院および関連病院に通院中の喘息患者 814 名(筑波コホート)[10、11]、994 人の健常者と北海道大学病院および関連病院に通院中の喘息患者 591 名(北海道コホート)[11-13]の二つの日本人成人喘息コホートを対象とした。

喘息の診断は呼吸器専門医によって行われ、咳、喘鳴、呼吸困難のうち二つ以上の症状を繰り返し、気道可逆性もしくはメサコリンに対する気道過敏性を有する者とした[14]。喘息発症年齢は自己申告によるものとし、喘息発症年齢をより正確に決定するため小児期および思春期の咳、喘鳴、呼吸困難の有無を詳細に問診した。不明確な場合には、初めて呼吸器症状がみられたときを喘息発症とした[14]。健常者はこれまで一度も喘息や COPD などの呼吸器疾患と診断されていない者とした。吸入抗原 14 個(ダニ、花粉、ペット皮膚、カビ)に対する特異的 IgE 抗体の有無を検査し、少なくとも一つ以上の抗原に対して陽性の場合にアトピーと定義した[13]。

倫理関連

本研究計画は「炎症性閉塞性肺疾患の遺伝素因に関する研究(ヒトゲノム遺伝子解析研究)」として、筑波大学(IRB No.136-4)、筑波大学附属病院(IRB No.H29-294)、筑波メディカルセンター、理化学研究所および北海道大学の倫理委員会で承認された。それぞれ文書で説明、同意を得たうえで、三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って調査、解析を実施した。

遺伝子タイピング

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。筑波コホートの健常者 967 名と喘息患者 243 名では Illumina HumanHap 550v3/610-Quad BeadChip (Illumina、San Diego、CA、USA) を用いてゲノム網羅的な遺伝子タイ

ピングを行った[10]。それ以外の対象者では対立遺伝子特異的 PCR 法 (Applied Biosystem、Foster City, CA, USA) により rs6967330 のタイピングを行った[15]。

統計解析

CDHR3 蛋白の 529 番目のシステインがチロシンに変換される rs6967330 (G→A) の A アレルと喘息との遺伝的関連について、カイ二乗検定を用いて喘息発症年齢ごとにオッズ比を計算した。二つのコホートを合わせたメタ解析にはマンテル・ヘンツェル法を用いた。喘息についてのオッズ比が 1 を超えている場合に、片側検定で $P < 0.05$ を有意と判定した。

アレルギー感作とウイルス性気道感染は、以前より喘息の二大増悪因子と考えられており、アレルギー感作とウイルス感染の両方が存在すると、喘息増悪と増悪による入院のリスクがより高くなることが知られている[16]。そのため、特にアトピーがある若年発症喘息に対しての CDHR3 遺伝子多型が与える影響を検討した。またロジスティック回帰モデルを用いることでアトピーと CDHR3 遺伝子多型との交互作用を検討した。

喘息のように多様な分子病態を内包する症候群では、様々なフェノタイプを含む患者集団全体をまとめて解析を行うと、リスク因子を検出できない可能性があり、注意深くフェノタイプごとに分類して検討することが疫学研究において重要とされており、喘息の病因を理解するためにも重要な方法である。そこで、過去に我々がクラスター解析によって報告した喘息フェノタイプと CDHR3 ジェノタイプとの関連を多項ロジスティック回帰分析で検討した。我々のグループは先行研究において 880 人の日本人成人喘息患者を対象に二段階クラスター法で 6 つの喘息クラスターを同定した。クラスター解析には年齢、性別、喘息発症年齢、喫煙状況、総 IgE、%一秒量、一秒率、吸入抗原に対する特異的 IgE 陽性の有無の 8 つの変数を用いた[13]。それぞれのクラスターの特徴は以下の通りである。クラスター A: 中高年発症で気流閉塞が軽度、クラスター B: 小児発症で気流閉塞が軽度、クラスター C: 小児発症で罹病期間が最も長く、中等度から高度の気流閉塞がある、クラスター D: 中高年発症で、高度な気流閉塞がある、クラスター E: 中年発症で気流閉塞がない、クラスター

F: 中高年発症で軽度から中等度の気流閉塞がある。これらのクラスターを最も強く規定する因子は喘息発症年齢と%一秒量であった。CART (classification and regression tree) 法により、喘息発症年齢と%一秒量による決定木を作成し、決定木に従って分類したところ 80.8%の喘息患者が正しいクラスターに分類された[13]。今回の検討では%一秒量のデータが使用可能な喘息患者 1082 名 (筑波コホート 542 名、北海道コホート 540 名)を用いた。クラスター情報がないものについては CART 法による決定木に従いクラスターを決定した。1961 名の健常者 (筑波コホート 967 名、北海道コホート 994 名)を対照とした。統計解析には SPSS (Ver. 22)を使用した。

結果

筑波コホートと北海道コホートの対象者背景を Table 1 に示す。両コホートの健常者において rs6967330 のジェノタイプ頻度はハーディー・ワインベルグ平衡に従っていた ($P > 0.5$)。

筑波コホート、北海道コホートにおいて rs6967330 の A アリルは 10 歳以下で発症した喘息において頻度が高かった (それぞれオッズ比は 1.52、1.61、 P 値は 0.036、0.026)。二つのコホートを合わせた検討においても、A アリルは 10 歳以下で発症した喘息で有意に多かった ($OR = 1.56$ 、 $P = 0.0040$) (Table 2、Figure 1)。アトピー陽性者に限った検討ではより強い関連がみられた ($OR = 2.02$ [95%信頼区間 1.41-2.88]、 $P = 0.00015$)。また *CDHR3* ジェノタイプとアトピーとの間に交互作用が認められた (P for interaction = 0.027)。その一方でアトピー自体と rs6967330 の A アリルとの間には遺伝的な関連はなかった ($OR = 0.93$ [95%信頼区間 0.77-1.10]、 $P = 0.41$)。CDHR3 ジェノタイプと 6 つの喘息フェノタイプとの関連を多項ロジスティック回帰分析で検討したところ、クラスター C と有意な関連を認めた ($OR = 1.95$ 、 $P = 0.0037$) (Table 3)。このクラスターは小児発症で、罹病期間が最も長く、中等度から高度の気流閉塞をもつことが特徴であった。

考察

本研究では、二つの独立した日本人成人喘息集団を用いた解析により機能的 *CDHR3* 遺伝子

多型と若年発症喘息との遺伝的関連を認め、日本人、デンマーク人と人種を超えて同遺伝子の喘息発症における重要性が示された。最近のデンマークにおける小児喘息の GWAS で *CDHR3* 遺伝子の効果が再現されなかったことを考えると[17]、今回の日本人を対象とした研究結果は重要な知見である。*CDHR3* は気道上皮に存在するライノウイルス C の受容体であり、*CDHR3* 遺伝子多型は気道上皮への *CDHR3* 発現を高め、ライノウイルス C の結合、増殖を増やすことで[4]、喘息による入院リスクを増加させる[18]。本研究はライノウイルス/*CDHR3* 経路が、特に若年発症のアトピー性成人喘息の病態をドライブする分子機構、すなわち重要なエンドタイプの一つであることを明確に示した。

発症年齢と肺機能で規定されるクラスターとの関連では、*CDHR3* が小児発症でアトピーがあり気道閉塞を伴うことを特徴とする特定の喘息フェノタイプに関連することが示された。実際、ハイリスク出生コホートにおいて幼児外来患者のウイルス性喘鳴では、ライノウイルス感染に伴うものが8歳までの肺機能低下の最も有意なリスクであることが示されている。しかし、低肺機能がライノウイルス感染の原因であるのか結果であるのかは明らかではない[19]。ライノウイルスはウイルス感染による症状や喘息増悪のない喘息患者の喀痰や咽頭スワブからも検出され、低肺機能および頻回な喘息症状と関連することが示されている[20]。今回のコホートでは小児期の重症な喘鳴や喘息発作の有無に関するデータはないが、*CDHR3* 遺伝子多型によるライノウイルスに対する易感染性が重症な喘鳴や頻回の増悪と関連し、気道上皮傷害から慢性的な経過で肺機能を低下させた可能性がある。成人喘息集団を対象として得られた今回の知見と過去の小児集団を対象とした研究の結果を合わせて考えると、小児喘息から成人喘息への移行例に *CDHR3* 遺伝子多型が一定の役割を果たしている可能性がある。

次にアトピーがある患者で *CDHR3* 遺伝子多型のより強い影響が認められた。乳幼児期におけるライノウイルス感染とアトピーの存在が相乗的に喘息発症のリスクとなることが示されており[21]、いくつかのメカニズムが明らかにされている。ライノウイルスに感染したヒトの研究において、気管支肺胞洗浄液で IL-33 が増加し[22]、さらにライノウイルスを感染させた気道上皮細胞の上清におい

て T 細胞および ILC2 細胞から分泌される IL-5、IL-13 が増加する。ライノウイルスによって引き起こされる気道炎症は、Th1/IL-10 の障害と Th2 反応の増加により喘息発作を引き起こす[23]。繰り返す重症なライノウイルス感染が、このようなライノウイルス感染による 2 型炎症の活性化を介して、持続的に気道病変を悪化させ喘息病態にまで進行させていく可能性がある。加えて、喘息におけるアレルギー性気道炎症は上皮バリア機構を傷害する。in vitro の実験では分化した気道上皮細胞を傷害、剥離した時にライノウイルスの複製が高まることが示されている[24]。よって気道アレルギーをもつ患者において二次的にライノウイルス C が CDHR3 へ結合しやすくなる可能性も想定される。その結果、ライノウイルスはより多くの細胞に感染し、喘息をより重症にする[25]。最後に、IgE がライノウイルスに対する抗ウイルス免疫を障害し、喘息増悪の原因になっていることが示されている[26]。The Preventive Omalizumab or Step-up Therapy for Fall Exacerbations (PROSE) 研究において抗 IgE 抗体のオマリズマブ、吸入ステロイド増量、プラセボをライノウイルス流行期の前に都市部の小児、思春期患者に投与した研究でライノウイルスに対する IFN- α の反応がオマリズマブ投与群で増加することが示された。このことから IgE がライノウイルス感染からの喘息増悪に大きな役割を果たしていると考えられる。以上のようなメカニズムが CDHR3 遺伝子とアトピーとの間に認められた、若年発症喘息への交互作用の基礎になっている可能性がある。

結論

本研究では、CDHR3 の機能的遺伝子多型が、肺機能が低下した小児期発症のアトピー性成人喘息に関連することを示した。この研究を含む多くの研究結果から、重症喘息のエンドタイプとしてウイルスへの易感染性、細菌の定着の増加、肺の成長の障害、2 型炎症の亢進などが挙げられる[27]。このように重症喘息は不均一であり、喘息の病因としてライノウイルスの役割を理解することで、適切なバイオマーカーで規定されるエンドタイプや治療可能な形質を踏まえて患者にアプローチすることを可能にする。

参考文献

1. Yanai I, Benjamin H, Shmoish M, Chalifa-Caspi V, Shklar M, Ophir R, et al. Genome-wide midrange transcription profiles reveal expression level relationships in human tissue specification. *Bioinformatics* 2005;21:650-9.
2. Ross AJ, Dailey LA, Brighton LE, Devlin RB. Transcriptional profiling of mucociliary differentiation in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:169-85.
3. Hulpiau P, van Roy F. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:349-69.
4. Bochkov YA, Watters K, Ashraf S, Griggs TF, Devries MK, Jackson DJ, et al. Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:5485-90.
5. Jamieson KC, Warner SM, Leigh R, Proud D. Rhinovirus in the Pathogenesis and Clinical Course of Asthma. *Chest* 2015;148:1508-16.
6. Cox DW, Bizzintino J, Ferrari G, Khoo SK, Zhang G, Whelan S, et al. Human rhinovirus species C infection in young children with acute wheeze is associated with increased acute respiratory hospital admissions. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1358-64.
7. Bizzintino J, Lee WM, Laing IA, Vang F, Pappas T, Zhang G, et al. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *Eur Respir J* 2011;37:1037-42.
8. Miller EK, Khuri-Bulos N, Williams JV, Shehabi AA, Faouri S, Al Jundi I, et al. Human rhinovirus C associated with wheezing in hospitalised children in the Middle East. *J Clin Virol* 2009;46:85-

- 9.
9. Öhrmalm L, Malinowski A, Wong M, Levinson P, Janson C, Broliden K, et al. Presence of rhinovirus in the respiratory tract of adolescents and young adults with asthma without symptoms of infection. *Respir Med* 2016;115:1-6.
 10. Yatagai Y, Sakamoto T, Yamada H, Masuko H, Kaneko Y, Iijima H, 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.
 11. Masuko H, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, 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.
 12. Taniguchi N, Konno S, Hattori T, Isada A, Shimizu K, 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;111:376–81.
 13. Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, Yatagai Y, et al. Asthma phenotypes in Japanese adults - their associations with the *CCL5* and *ADRB2* genotypes. *Allergol Int* 2013;62:113-21.
 14. Hizawa N, Yamaguchi E, Konno S, Tanino Y, Jinushi E, Nishimura M. 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.
 15. Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, et al. Thymic stromal lymphopoietin gene promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial

- asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;44:787–93.
16. Rakes GP, Arruda E, Ingram JM, Hoover GE, Zambrano JC, Hayden FG, et al. Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care: IgE and eosinophil analyses. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:785–790.
 17. Nieuwenhuis MA, Siedlinski M, van den Berge M, Granell R, Li X, Niens M, et al. Combining genomewide association study and lung eQTL analysis provides evidence for novel genes associated with asthma. *Allergy* 2016;71:1712-20.
 18. Bonnelykke K, Sleiman P, Nielsen K, Kreiner-Moller E, Mercader JM, Belgrave D, 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.
 19. Guilbert TW, Singh AM, Danov Z, Evans MD, Jackson DJ, Burton R, et al. Decreased lung function after preschool wheezing rhinovirus illnesses in children at risk to develop asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:532-8.e1-10.
 20. Harju TH, Leinonen M, Nokso-Koivisto J, Korhonen T, Rätty R, He Q, et al. Pathogenic bacteria and viruses in induced sputum or pharyngeal secretions of adults with stable asthma. *Thorax* 2006;61:579-84.
 21. Gavala ML, Bertics PJ, Gern JE. Rhinoviruses, allergic inflammation, and asthma. *Immunol Rev* 2011;242:69–90.
 22. Jackson DJ, Makrinioti H, Rana BM, Shamji BW, Trujillo-Torralbo M-B, Footitt J, et al. IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:1373–1382.

23. Message SD, Laza-Stanca V, Mallia P, Parker HL, Zhu J, Kebabze T, et al. Rhinovirus-induced lower respiratory illness is increased in asthma and related to virus load and Th1/2 cytokine and IL-10 production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13562-7.
24. Jakiela B, Brockman-Schneider R, Amineva S, Lee WM, Gern JE. Basal cells of differentiated bronchial epithelium are more susceptible to rhinovirus infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 38:517–523.
25. Bochkov YA, Gern JE. Rhinoviruses and Their Receptors: Implications for Allergic Disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 2016;16:30.
26. Teach SJ, Gill MA, Togias A, Sorkness CA, Arbes SJ Jr, Calatroni A, et al. Preseasonal treatment with either omalizumab or an inhaled corticosteroid boost to prevent fall asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:1476-85.
27. Hizawa N. Clinical approaches towards asthma and chronic obstructive pulmonary disease based on the heterogeneity of disease pathogenesis. *Clin Exp Allergy* 2016;46:678-87.

Table 1. Characteristics of the study populations

	Tsukuba cohort		Hokkaido cohort	
	Healthy Control Subjects	Asthmatics	Healthy Control Subjects	Asthmatics
Number of subjects	967	814	994	591
Sex (female, %)	526 (54.4)	466(57.2)	447 (45.0)	342 (57.9)
Age, y (range)	50.0 (27-74)	56.9 (19-100)	45.0 (18-84)	52.0 (18-84)
Age of asthma onset (range)		40.7 (0-88)		37.2 (0-80)
Smoking pack-year (%)	0	607 (62.8)	356 (51.6)	325 (57.8)
	0-10	127 (13.1)	61 (8.8)	95 (16.9)
	>10	233 (24.1)	273 (39.6)	142 (25.3)
*Atopy (%)	541 (55.9)	397 (70.9)	517 (52.2)	320 (54.9)
FEV ₁ %pred. (% , SD)		85.6 (22.5)		88.7 (27.3)
FEV ₁ /FVC (% , SD)		71.2 (12.2)		68.4 (13.2)

*Atopy was defined as the presence of specific IgE Ab toward at least one of 14 common inhaled allergens.

Information on smoking and atopy was missing in 28 and 254 patients with asthma in the Tsukuba cohort, respectively.

Information on smoking and atopy was missing in 29 and 8 patients with asthma in the Hokkaido cohort, respectively.

Information on FEV₁ was missing in 229 and 47 patients with asthma in the Tsukuba and Hokkaido cohorts, respectively.

Information on smoking and atopy was missing in 643 and 3 controls in the Hokkaido cohort, respectively.

Table 2. Association of the *CDHR3* SNP (rs6967330) with early-onset asthma

rs6967330(CDHR3-C529Y)	Tsukuba cohort					Hokkaido cohort					Meta-analysis	
	A	G	Total	<i>P</i> value*	OR (95% CI)	A	G	Total	<i>P</i> value*	OR (95% CI)	<i>P</i> value*	OR (95% CI)
All participants												
Controls	144	1790	1934	0.036	1.52 (1.00-2.30)	180	1808	1988	0.026	1.61 (1.04-2.51)	0.0040	1.56 (1.15-2.11)
Patients with early-onset asthma (onset at ≤ 10 years)	30	246	276			26	162	188				
Total	174	2036	2210			206	1970	2176				
Atopic individuals												
Controls	68	1014	1082	0.044	1.66 (0.98-2.80)	83	951	1034	0.00026	2.64 (1.61-4.35)	0.00015	2.02 (1.41-2.88)
Patients with early-onset asthma (onset at ≤ 10 years)	20	180	200			24	104	128				
Total	88	1194	1282			107	1055	1162				

*One-sided *P* values of less than 0.05 were judged to be significant to test if the OR of the A allele for asthma is significantly greater than 1.

Table 3. Multinomial logistic regression between the *CDHR3* SNP (rs6967330) and the asthma clusters

Cluster	Phenotype	<i>CDHR3</i> genotype			<i>P</i> value	Odds ratio (95% CI)	Sex (Female, %)	Age (yrs, range)	Age of asthma onset (yrs, SD)	FEV ₁ %predicted (SD)	Atopy (N, %)
		AA/AG* (%)	GG (%)	Total							
Cluster A	Late-Onset	33	156	189	0.58	1.12 (0.75-1.66)	120 (63.5)	63.7 (31-84)	54.6 (12.0)	110.5 (14.7)	91 (48.1)
	Mild Less-Atopic	(17.5)	(82.5)								
Cluster B	Early-Onset	40	166	206	0.20	1.27 (0.88-1.84)	105 (51.0)	37.5 (18-83)	10.1 (8.4)	91.2 (16.0)	140 (74.5)
	Mild	(19.4)	(80.6)								
Cluster C	Early-Onset	28	76	104	3.7x10 ⁻³	1.95 (1.24-3.05)	41 (40.2)	43.1 (19-82)	14.9 (10.3)	55.9 (1.19)	78 (83.9)
	Moderate-to-Severe	(26.9)	(73.1)								
Cluster D	Late-Onset	25	88	113	0.084	1.50 (0.95-2.38)	63 (56.3)	64.8 (38-84)	50.3 (13.6)	48.7 (10.4)	60 (60.6)
	Severe	(22.1)	(77.9)								
Cluster E	Middle-Age Onset	28	182	210	0.33	0.81 (0.54-1.23)	136 (64.8)	52.5 (21-82)	41.1 (13.8)	105.9 (17.1)	109 (56.2)
	Female-Dominant	(13.3)	(86.7)								
Cluster F	Late-Onset	37	223	260	0.49	0.88 (0.61-1.27)	165 (63.7)	62.4 (36-88)	51.7 (11.6)	86.2 (25.0)	118 (55.1)
	Moderate Less Atopic	(14.2)	(85.8)								

*Owing to low frequency of the homozygote for the A allele, this group was combined with the heterozygote for these analyses.

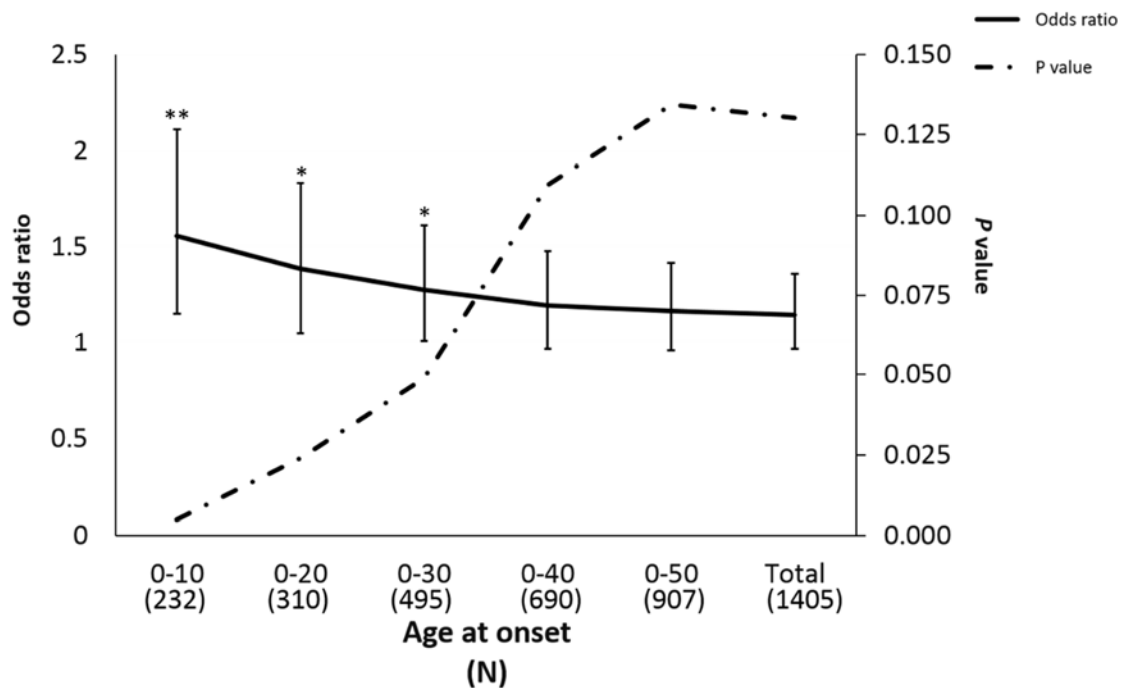


Figure 1. ORs for association between rs6967330 and age of onset–specific subsets of asthma. We studied 1405 asthma cases and 1961 controls from 2 independent Japanese populations who had accurate information on age of onset of asthma. The OR (95% CI) and its corresponding Mantel-Haenszel *P* values for association was plotted between rs6967330 and age of onset–specific subsets of asthma. The numbers of asthmatic patients who had the disease at the ages of 10 years or younger, 20 years or younger, 30 years or younger, 40 years or younger, and 50 years or younger were 232, 310, 495, 690, and 907, respectively. ORs significantly greater than 1 are highlighted (**P* < .05, ** *P* < .005).

第 2 節 日本人集団における *TYRO3* 遺伝子 eQTL とアレルギー疾患の関連解析

背景・目的

2 型免疫反応は CD4 陽性 Th2 細胞の分化と IL-4、IL-5、IL-9、IL-13 など 2 型サイトカインの産生に特徴づけられ、喘息やアレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患の病態生理において中心的な働きを有している。最近、アフリカ系アメリカ人、ラテンアメリカン人における喘息の GWAS で *TYRO3* 遺伝子が同定された[1]。*TYRO3* は TAM 受容体チロシンキナーゼファミリーに含まれ、樹状細胞に発現している。樹状細胞から抗原提示を受けた CD4 陽性 T 細胞からの刺激により *TYRO3* 発現が亢進すると、樹状細胞の活性化が抑制され、2 型炎症反応を抑制する[1]。本研究では、日本人における *TYRO3* 遺伝子の喘息、アトピー、アレルギー性鼻炎に対する影響を調べるため、候補遺伝子関連解析を 3 つの独立した日本人集団の 2403 名を対象に行った。そして、日本人集団における *TYRO3* の人口寄与危険割合を計算した。

方法

対象

血縁関係のない日本人成人からなる 3 つの集団を対象とした。対象者は茨城県において 2008 年 6 月から 2016 年 3 月の間にリクルートされた。一つ目の集団(筑波コホート 1)は 201 人の喘息患者と 967 人の健常者からなり、ゲノム網羅的な SNP タイピングが行われている[2]。二つ目の集団(筑波コホート 2)は 190 人の喘息患者と 514 人の健常者からなる[3、4]。この二つの集団においては、喘息患者は筑波大学附属病院および関連病院でリクルートされ、健常者はつくば健診センターにおける健診受診者からリクルートした。喘息の診断は呼吸器専門医によって行われ、咳、喘鳴、呼吸困難のうち二つ以上の症状を繰り返し、気道可逆性もしくはメサコリンに対する気道過敏性を有する者とした[5]。健常者はこれまで一度も喘息や COPD などの呼吸器疾患と診断されていない者とした。アトピーについては吸入抗原 14 個(ダニ、花粉、動物皮膚、カビ)に対する特異

的 IgE で評価した。14 抗原のうち少なくとも一つ以上に対する特異的 IgE 抗体陽性の場合にアトピーと定義した。アレルギー性鼻炎はアトピーがあり、さらにくしゃみ、鼻汁、鼻閉のうち一つ以上の症状があるものと定義した[6]。

3 つ目のコホート(筑波学生コホート)は 2013 年から 2015 年にリクルートした 531 人の筑波大学学生からなり、102 名の喘息患者を含む[7]。この集団では抗原特異的 IgE はスギ花粉とダニについてのみ CAP-FEIA 法で測定した(Phadia AB、Uppsala、Sweden)。アトピーはいずれかの抗原に対して特異的 IgE 陽性とし、アレルギー性鼻炎はアトピー陽性かつくしゃみ、鼻汁、鼻閉の症状が一つ以上あるものとした。この集団において喘息は喘息の治療歴があるか治療中であるとの自己申告があったものとした。喘息患者では、喘息を発症した結果としてアレルギー感作が成立している可能性もあり[8]、喘息の存在が遺伝子関連解析の結果に影響を与えると判断し、アトピーとアレルギー性鼻炎については喘息患者を除いて健常者のみで解析を行った。

倫理関連

本研究計画は「炎症性閉塞性肺疾患の遺伝素因に関する研究(ヒトゲノム遺伝子解析研究)」として、筑波大学(IRB No.136)、筑波大学附属病院(IRB No.H29-294)、筑波メディカルセンターおよび理化学研究所の倫理委員会で承認された。それぞれ文書で説明、同意を得たうえで、三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って調査、解析を実施した。

遺伝子タイピング

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。筑波コホート 1 の喘息患者 201 名、健常者 967 名では Illumina HumanHap 550k v3/610-Quad BeadChips (Illumina、San Diego、CA、USA) を用いてゲノム網羅的な遺伝子タイピングを行った。筑波コホート 2、筑波学生コホートでは対立遺伝子特異的 PCR 法 (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA) により rs2297377 のタイピングを行った。

統計解析

TYRO3 周辺の SNP とアレルギー疾患との関連をロジスティック回帰分析で解析した。非日本人における GWAS で喘息と最も強く関連したのは rs1200341 であったが[1]、マイナー対立遺伝子頻度が筑波コホート 1 で 0.8%と非常に低く、遺伝的関連を統計学的に検討するのは困難と判断した。GWAS における多因子疾患の基礎にある疾患感受性を推測する際に、遺伝子発現の違いが重要であることが示されている[10]。そこで我々は *TYRO3* 遺伝子の転写開始領域から上下流 1 Mb の範囲で *TYRO3* 遺伝子発現と関連する SNP (eQTL) を the GTEx Portal database (<https://gtexportal.org/home/>) を用いて抽出した。全部で 192 SNPs が肺での *TYRO3* 遺伝子発現レベルに関連した。そのうち肺における *TYRO3* mRNA 発現に強い関連を示し ($P < 5 \times 10^{-10}$)、マイナー対立遺伝子頻度が the HapMap-JPT (Japanese in Tokyo, Japan, Phase 3) で 10%以上の 8 つの SNP を関連解析に用いた。rs2297377 についての 3 集団を合わせた検討では集団で補正した。3 つのコホートの異質性は I^2 を PLINK で計算することで評価した。ハーディー・ワインバーグ平衡を 3 つの集団で確認した。

アトピーとアレルギー性鼻炎について人口寄与危険割合 (population attributable risk fraction: PARF) を次の式を用いて計算した。

$$\text{PARF} = P(E) (\text{OR}-1) / [1 + P(E) (\text{OR}-1)]$$

P(E) : リスクジェノタイプを持つ割合

OR : リスクジェノタイプの非リスクジェノタイプに対するアトピー、アレルギー性鼻炎についてのオッズ比

TYRO3 遺伝子多型の人口寄与危険割合の計算には、優性モデルと比較してより強い遺伝的影響が認められた劣性モデルを使用した。ロジスティック回帰分析、カイ二乗分析は SPSS (ver. 24) で行った。 $P < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。*TYRO3* 遺伝子はその機能からアレルギー疾患に関連すると予測され、また既にアレルギー性の小児喘息との関連も報告があるため、多重比較の補正は行わなかった。

結果

筑波コホート1、筑波コホート2、筑波学生コホートの対象者背景を Table 1 に示す。

筑波コホート1において rs2297377 はアトピー ($P = 0.043$) とアレルギー性鼻炎 ($P = 0.019$) に関連した。また rs1473781 はアレルギー性鼻炎 ($P = 0.033$) と関連した (Table 2)。8 つの SNP はいずれも喘息とは関連せず、アトピー性喘息に限っても関連はなかった (Table 2)。rs2297377 がアトピーとアレルギー性鼻炎に強く関連したため、筑波コホート2、筑波学生コホートでも関連を検討した。筑波コホート2では rs2297377 はアトピーとアレルギー性鼻炎に関連した (それぞれオッズ比は 1.44、1.46、 P 値は 0.0059、0.016)。筑波学生コホートにおいても rs2297377 のリスクアレル保有者では非保有者に比べ有意にアトピーが多かった ($OR = 2.13$ 、 $P = 0.026$)。3 つの集団のメタ解析では G アレルがアトピーとアレルギー性鼻炎に関連した (それぞれオッズ比は 1.29、1.31、 P 値は 0.00041、0.0010) (Table 3)。アトピー、アレルギー性鼻炎と関連した G アレルは肺における *TYRO3* mRNA の低発現に関連した。喘息、アトピー、アレルギー性鼻炎について $I^2 = 0$ で 3 集団の異質性は明らかではなかった。

樹状細胞は MHC class II 分子を介してペプチド抗原をナイーブ T 細胞に提示し、抗原特異的免疫応答を活性化する一方で、*TYRO3* は T 細胞が提示するプロテイン S と作用してネガティブフィードバックをかけ 2 型炎症を抑制する [11]。過去の報告では *HLA-DPBI* アレルがスギ感作に関連することが示されているが [7]、*TYRO3* ジェノタイプが *HLA-DPBI* アレルとスギ感作との関係に影響を与えるかどうかを筑波学生コホートを用いて検討した。その結果、rs2297377 ジェノタイプと *HLA-DPBI* アレルのスギ感作に対する交互作用は認められなかった (P for interaction term > 0.1) (Table 4)。

アトピーとアレルギー性鼻炎について日本人集団における rs2297377 の人口寄与危険割合はアトピーで 14%、アレルギー性鼻炎で 16% だった。

考察

本研究では、*TYRO3* 遺伝子の発現に関与する機能的遺伝子多型がアレルギー感作とアレルギー性鼻炎の病因として重要であることを示した。3つのコホートのメタ解析では *TYRO3* の rs2297377 がアレルギー感作とアトピー性鼻炎に関与していた。これらの遺伝的関連の正確な分子機構は明確ではないが、肺の樹状細胞における TAM ファミリー受容体チロシンキナーゼ *TYRO3* の発現減少が、2型 T 細胞の活性化を増強する可能性が示されており[1]、本研究の結果からも、mRNA の低発現と関連する *TYRO3* 遺伝子多型が 2 型炎症を強め、アレルギー感作とアレルギー性鼻炎への感受性を高める可能性が支持された。

rs2297377 は *RPAP1* (RNA Polymerase II Associated Protein 1) 遺伝子のイントロン領域に存在する SNP である。肺において *TYRO3*、*RPAP1* を含め 7 つの遺伝子発現に関連している。この SNP は皮膚など 4 つの組織でエンハンサー領域に存在し、ヒストン H3K4 のモノメチル化、トリメチル化、H3K27 のアセチル化といった転写を活性化するヒストン修飾も報告されている[12]。これらの機能により *TYRO3* を含む周辺の遺伝子の発現に関連している可能性がある。また、*RPAP1* の SNP rs1200345 ($r^2=0.75$) がアミノ酸置換により *RPAP1* タンパクの機能変化をきたし、肺での *TYRO3*、*RPAP1* を含む 6 つの遺伝子発現に影響を与えることが報告されている[13]。この 6 つの遺伝子は rs2297377 が発現に関連する遺伝子とも重複しており、rs2297377 と連鎖不平衡状態にある rs1200345 が *TYRO3* 発現に影響している可能性も示唆された。

マウスの骨髄由来の肥満細胞を IL-33 存在下で 4 週間培養し、マイクロアレイ解析を行った研究において、肥満細胞での *TYRO3* の発現亢進が認められている[14]。興味深いことに肥満細胞の慢性刺激はアレルギー性炎症に抑制的に作用することが知られており[14]、肥満細胞における *TYRO3* 発現亢進が 2 型炎症の抑制に関与している可能性がある。*TYRO3* 遺伝子多型によっては、2 型炎症を抑える *TYRO3* の発現亢進が弱く、結果として IL-33 による慢性刺激が肥満細胞の活性化抑制に繋がらないことが、今回の rs2297377 とアレルギー感作との遺伝的関連を少なくとも部分的には説明する可能性がある。

過去の GWAS メタ解析では *TYRO3* は喘息感受性遺伝子として特定された。しかし、我々の研究では喘息との関連は示されていない。この結果の不一致は喘息の不均一性で説明可能かもしれない。まず、過去の研究で対象となった喘息患者は若年発症のアトピー性喘息が大半であった[15、16]。一方、筑波コホート 1、筑波コホート 2 においては喘息発症年齢の中央値は 38 歳であり、アトピー陽性者の割合は約 72%と過去の研究に比して少なかった。*TYRO3* 遺伝子の影響により発症する小児期発症アトピー性喘息の多くが、成人するまでに症状が寛解し、本研究で対象とした成人喘息患者ではその遺伝的影響が確認できなかった可能性がある。加えて、TAM ファミリーはアポトーシスに陥った細胞の受容体として働くことで免疫反応をコントロールすることも知られているが、アポトーシス細胞の除去が特に非好酸球性喘息において障害されていることが知られている[17]。従って、*TYRO3* の発現低下によるアポトーシス細胞の認識障害が炎症反応を増幅させ、特定の喘息フェノタイプに関連している可能性がある。いずれにしても、*TYRO3* の喘息への影響はより多くの対象者で特定のフェノタイプに着目して検討する必要がある。

われわれの研究にはいくつかの限界がある。今回の結果は日本人を対象とした結果であり、他人種においても同様の結果が得られるかどうかは明らかではない。さらに、日本人のみを対象としている連鎖不平衡ブロックが大きくなり、真の責任 SNP の特定を困難にしている。加えて、今回得られた *TYRO3* 遺伝子のアレルギー感作、アレルギー性鼻炎への遺伝的影響は小さく、技術的なアーチファクト、対象集団の階層化、不適切な有意閾値の設定などによる擬陽性も完全には否定できない。しかしながらすべてのコホートが茨城県においてリクルートされた日本人であり集団階層化の可能性は低い。将来、より多数のより均一なフェノタイプを有する患者を対象とした研究によって、*TYRO3* のアレルギー性疾患への影響がより明らかになることが期待される。より多くの患者を対象とした検討によって、特定の遺伝子多型のアレルギー疾患への人口寄与危険割合をより正確に見積もることも期待できる。

結論

TYRO3 遺伝子のアレルギー疾患に対する関与を日本人集団で示した。人口寄与危険割合が10%を超えることから、*TYRO3* がスギ花粉症などのアレルギー疾患に対する薬物治療の魅力的なターゲットになるかもしれない。

参考文献

1. Chan PY, Carrera Silva EA, Kouchkovsky D De, Joannas LD, Hao L, Hu D, et al. The TAM family receptor tyrosine kinase TYRO3 is a negative regulator of type 2 immunity. *Science* 2016; 352:99–103.
2. Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, Kaneko Y, Yamada H, Iijima 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.
3. Masuko H, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, Naito T, Noguchi E, 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.
4. Yatagai Y, Sakamoto T, Yamada H, Masuko H, Kaneko Y, Iijima H, 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.
5. Ichinose M, Sugiura H, Nagase H, Yamaguchi M, Inoue H, Sagara H, et al. Japanese guidelines for adult asthma 2017. *Allergol Int* 2017;66:163–89.
6. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008. *Allergy* 2008;63(Suppl.86):8-160.
7. Morii W, Sakai A, Ninomiya T, Kidoguchi M, Sumazaki R, Fujieda S, et al. Association of Japanese cedar pollinosis and sensitization with *HLA-DPBI* in the Japanese adolescent. *Allergol Int* 2018;67:61-6.
8. Kanazawa J, Masuko H, Yamada H, Yatagai Y, Sakamoto T, Kitazawa H, et al. How important is allergic sensitization as a cause of atopic asthma? *Allergol Int* 2018;67:292-4.
9. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses.

- BMJ 2003;327:557–60.
10. Cookson W, Liang L, Abecasis G, Moffatt M, Lathrop M. Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nat Rev Genet* 2009;10:184-94.
 11. Kouchkovsky DA de, Ghosh S, Rothlin CV. Negative Regulation of Type 2 Immunity. *Trends Immunol* 2017;38:154–167.
 12. Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Res* 2012;40:D930–4.
 13. Jackson VE, Latourelle JC, Wain LV, Smith AV, Grove ML, Bartz TM, et al. Meta-analysis of exome array data identifies six novel genetic loci for lung function. *Wellcome Open Res* 2018;3:4.
 14. Jung MY, Smrž D, Desai A, Bandara G, Ito T, Iwaki S, et al. IL-33 induces a hyporesponsive phenotype in human and mouse mast cells. *J.Immunol* 2013;190:531-8.
 15. Burchard EG, Avila PC, Nazario S, Casal J, Torres A, Rodriguez-Santana JR, et al. Lower bronchodilator responsiveness in Puerto Rican than in Mexican subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:386-92.
 16. Galanter JM, Gignoux CR, Torgerson DG, Roth LA, Eng C, Oh SS, 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;134:295–305.
 17. Simpson JL, Gibson PG, Yang IA, Upham J, James A, Reynolds PN, et al. Impaired macrophage phagocytosis in noneosinophilic asthma. *Clin Exp Allergy* 2013;43:29–35.

Table 1. Characteristics of study population

	Tsukuba cohort 1		Tsukuba cohort 2		Tsukuba student cohort		
	Healthy Control Subjects	Asthmatics	Healthy Control Subjects	Asthmatics	Healthy Control Subjects	Asthmatics	
Number of subjects	967	201	514	190	429	102	
Sex (female, %)	526 (54.4)	118 (58.7)	263 (51.2)	117 (61.9)	257 (59.9)	60 (58.8)	
Age, y (range)	50.0 (27-74)	51.0 (20-72)	51.2 (22-81)	56.8 (18-84)	19.8 (18-38)	19.9 (19-29)	
Age of asthma onset (range)		36.9 (0-70)		39.1 (1-82)		NA	
Smoking (%)							
Pack-year	0	607 (62.8)	164 (82.0)	309 (60.1)	122 (64.2)	NA	NA
	0-10	127 (13.1)	33 (16.5)	64 (12.5)	21 (11.1)	NA	NA
	>10	233 (24.1)	3 (1.5)	141 (27.4)	46 (24.2)	NA	NA
Atopy (%)	541 (55.9)	143 (71.1)	328 (63.8)	137 (72.1)	334 (77.9)	94 (92.2)	
Allergic rhinitis (%)	358 (37.0)	69 (34.3)	207 (40.3)	36 (18.9)	163 (67.9)	60 (58.8)	
Serum IgE (log, SD)	1.73 (0.56)	2.23 (0.62)	1.93 (0.64)	2.26 (0.60)	2.15 (0.61)	2.47 (0.63)	

Information on asthma onset age and smoking was missing in 3 and 1 patients with asthma in the Tsukuba cohort 2, respectively.

Information on serum IgE was missing in 2 and 4 patients with asthma in the Tsukuba cohort 1 and 2, respectively.

Table 2. Association of eQTL SNPs of *TYRO3* with allergic diseases in Tsukuba cohort 1

SNP	<i>P</i> value	Minor allele	Minor allele frequency		<i>P</i> value		
			HapMap JPT	Tsukuba cohort 1 (Healthy Control Subjects +Asthmatics)	Asthma	Atopy	Allergic rhinitis
rs9944249	7.0 x 10 ⁻³⁴	T	0.15	0.14	0.39	0.52	0.44
rs721772	6.4 x 10 ⁻²⁴	A	0.44	0.39	0.92	0.89	0.51
rs2297381	1.3 x 10 ⁻²³	C	0.44	0.40	0.77	0.76	0.33
rs1200345	1.7 x 10 ⁻¹⁷	T	0.33	0.30	0.73	0.19	0.12
rs1473781	1.9 x 10 ⁻¹⁷	A	0.16	0.14	0.52	0.14	0.033
rs1200353	1.0 x 10 ⁻¹⁵	T	0.15	0.13	0.68	0.18	0.095
rs2297380	1.8 x 10 ⁻¹⁵	T	0.40	0.41	0.86	0.42	0.15
rs2297377	1.5 x 10 ⁻¹⁴	A	0.31	0.32	0.38	0.043	0.019

Significant differences are highlighted in bold ($P < 0.05$).

Table 3. Results of association analysis in 3 populations and meta-analysis (rs2297377)

	Tsukuba cohort 1				Tsukuba cohort 2				Tsukuba student cohort				Meta-analysis	
	n	RAF † (G)	OR (95% CI)	<i>P</i> value	n	RAF (G)	OR (95% CI)	<i>P</i> value	n	RAF (G)	OR (95% CI)	<i>P</i> value	OR (95% CI)	<i>P</i> value
Asthmatics	201	0.66	0.91	0.38	190	0.65	0.89	0.35	102	0.65	0.94	0.70	0.91	0.19
Healthy Control Subjects	967	0.68	(0.72-1.13)		514	0.68	(0.70-1.14)		429	0.66	(0.68-1.30)		(0.78-1.05)	
Atopy (-)	426	0.66	1.22	0.043	186	0.62	1.44	0.0059	95	0.62	1.27	0.17	1.29	0.00041
Atopy (+)	541	0.70	(1.01-1.47)		328	0.71	(1.11-1.87)		334	0.67	(0.90-1.81)		(1.12-1.48)	
Allergic rhinitis (-)	370	0.66	1.30	0.019	152	0.63	1.46	0.016	77	0.64	1.14	0.53	1.31	0.0010
Allergic rhinitis (+)	358	0.72	(1.04-1.61)		207	0.72	(1.07-1.99)		163	0.67	(0.76-1.70)		(1.12-1.55)	

†RAF: risk allele frequency

Significant differences are highlighted in bold ($P < 0.05$).

Table 4. The interaction of rs2297377 genotype with *HLA-DPBI* allele

rs2297377 genotype	JC sensitization (%)	<i>HLA-DPBI</i> *02					<i>HLA-DPBI</i> *05				
		Frequency (%)	Case Count (%)	Control Count (%)	<i>P</i> value	OR (95% CI)	Frequency (%)	Case Count (%)	Control Count (%)	<i>P</i> value	OR (95% CI)
Total (n=429)	308 (71.8)	24.9	134 (21.8)	80 (33.1)	0.00082	0.57 (0.41-0.79)	39.2	253 (41.1)	83 (34.3)	0.10	1.28 (0.95-1.73)
AA (n=42)	24 (57.1)	22.6	8 (16.7)	11 (30.6)	0.14	0.44 (0.15-1.31)	35.7	17 (35.4)	13 (36.1)	0.95	0.97 (0.39-2.43)
AG (n=207)	155 (74.9)	26.1	74 (23.9)	34 (32.7)	0.079	0.64 (0.39-1.05)	39.6	127 (41.0)	37 (35.6)	0.35	1.24 (0.79-1.94)
GG (n=180)	129 (71.7)	24.2	52 (20.2)	35 (34.3)	0.0077	0.50 (0.30-0.83)	37.8	109 (42.2)	33 (32.4)	0.10	1.47 (0.93-2.33)
					<i>P</i> for interaction = 0.42						<i>P</i> for interaction = 0.72

第3章 アレルギー感作関連遺伝子が成人喘息に与える影響

背景・目的

アトピーは一般的な環境アレルゲンに対する過剰な特異的 IgE 産生と定義されるが、発症年齢に関係なく喘息の重要な発症要因と考えられている。抗原暴露が感作につながり、持続的な曝露により気道炎症の悪化、気道過敏性の獲得や可逆性気道閉塞により臨床的な喘息の発症に繋がっていきとされる。しかしながら、IgE レベルを規定している遺伝子は喘息感受性遺伝子とほとんど一致しないことが報告されており、喘息患者におけるアトピーは喘息を発症した結果として起こるのであって、喘息の直接的な原因ではないとの主張もある[1]。アトピー性皮膚炎の小児での遺伝的研究においてフィラグリンなどのバリア蛋白の欠損によりアトピー性皮膚炎を発症することが示され、IgE の増加がバリア機能障害に引き続く二次的なものであることが示唆されている。同様に喘息患者の気道上皮の強度は、気道上皮細胞間接触の障害によりしばしば低下していることが示されている。最近特定されている多くの喘息感受性遺伝子が気道上皮に発現しており、気道上皮バリアの変化がアレルギー感作の中心的な役割を担っている可能性がある。本研究では、アトピーが原因で喘息を発症するのか、喘息の結果としてアトピーを生じるのかをメンデルランダム化法を用いて検討することを目的とした。

方法

メンデルランダム化法は、遺伝子多型を用いて特定の要因がある疾患の原因であるのか検討する手法である。要因に強く関連する遺伝子多型と疾患との関連を示すことで、要因と疾患の関連を証明する。遺伝子多型は要因を通じてのみ疾患に発症に関与し、遺伝子多型と疾患の両方に影響する因子が存在しないため、疾患が要因に影響を与える可能性や交絡因子を考慮する必要がない。遺伝子多型のアレルは減数分裂の際に環境要因の影響を受けずに、ランダムに受け継がれるため、観察研究においてランダム化比較試験のように未測定交絡因子を調整し、要因による

純粋な影響を評価できる手法である。メンデルランダム化法の適応条件として、遺伝子多型が強く要因と関連すること、遺伝子多型が要因および疾患に影響を与える他の因子に関連しないことが挙げられる[2]。また、GWAS から得られた複数の遺伝子多型を用いることでメンデルランダム化法の検出力を高めることが期待される[3]。

そこで我々はアトピーと強く関連するリスクスコア(Atopy genetic risk score: Atopy-GRS)を計算し、喘息との関連を検討することにした。定期健康診断のためにつくば総合健診センターを受診した967人の非喘息健常者(アトピー陽性541名)を対象としてアトピーについてGWASを行った[4、5]。対象者はすべて茨城県でリクルートした[4、5]。14個の吸入抗原に対する特異的IgE抗体が少なくとも一つ以上の抗原に対して陽性の場合をアトピーと定義した。まず始めに、非日本人の二つのGWAS[6、7]においてアトピーとの関連($P < 5.0 \times 10^{-8}$)が示された25の遺伝子領域に着目した。各遺伝子領域の上下流100 kbの範囲で最も関連の強いSNPを探索し、アトピーと有意な関連($P < 0.05$)があるSNPをさらなる検討に用いた。

ゲノム網羅的なタイピングを行った健常者967名と喘息患者216名に加えて、533名の健常者と325名の喘息患者において、我々のGWASでアトピーとの関連があったSNPについて対立遺伝子特異的PCR法(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)でタイピングを行った。個々のタイピング結果を用いて健常者1500名(アトピー883名)、喘息患者541名(アトピー391名)でAtopy-GRSを計算した。Atopy-GRSは複数のSNPの影響をひとつの変数として表現するものであり、個々のSNPについてそれぞれのORで重み付けした下記の式で計算した。

$$\text{Atopy-GRS}_i = \sum_{k=1}^n \text{OR}_k^{\text{RA}_k}$$

n: 我々のGWASでアトピーと関連したSNPの個数

Atopy-GRS_i: 個人iにおけるAtopy-GRS

OR_k: アトピーについてのGWASで得られたSNP_kのOR

RA_k: SNP_kにおけるリスクアレル数(k = 0, 1, 2)

Atopy-GRSがアトピーと関連することを確認した上で、健常者と喘息患者でAtopy-GRSに差が

あるかを検討した。次に、健常者と喘息患者をそれぞれアトピーの有無で 2 群に分け Atopy-GRS を比較した。一方、アトピー性喘息に対する Atopy-GRS の効果を検討するため、アトピーがない健常者とアトピー性喘息患者を Atopy-GRS によって 5 等分し、Atopy-GRS が最も低い 5 分位と各 5 分位のアトピー性喘息についてのオッズ比をカイ二乗検定で求めた。さらに、アレルギー感作の人口寄与危険割合 (PARF) を次の式で計算した。

$$\text{PARF} = P(E) (\text{OR}-1) / [1 + P(E) (\text{OR}-1)]$$

P(E) : GRS 最高 5 分位に属する割合 (0.2)

OR : 最高 5 分位をそれ以外と比較した際の喘息に対する OR

結果

対象は背景を Table 1 に示す。25 遺伝子領域のうち 20 個の SNP が我々の GWAS でアトピーと関連した ($P < 0.05$) (Table 2)。PVT1-MYC 遺伝子領域の rs6470586 については対立遺伝子特異的 PCR 法で十分な遺伝子増幅を得ることが出来ず、残りの 19SNP を用いて、Atopy-GRS を計算した。

対象集団において、アトピーは喘息患者で有意に頻度が高かった (健常者 58.9%、喘息患者 72.3%、OR = 1.82、 $P = 3.40 \times 10^{-8}$)。非喘息健常者において、アトピー陽性者はアトピー陰性者に比べ Atopy-GRS が有意に高値であった (アトピー陽性 883 名 : GRS [SD] 26.9 [1.1]、アトピー陰性 617 名 : 26.4 [1.1]、 $P = 2.64 \times 10^{-16}$)。一方、Atopy-GRS とアトピーとに強い関連が認められたにも関わらず、Atopy-GRS は喘息とは全く関連していなかった (健常者 : 26.7 [1.1]、喘息患者 : 26.6 [1.1]、 $P = 0.31$)。さらにアトピーと喘息との強い関連は Atopy-GRS で補正しても変わらなかった (OR = 1.89、 $P = 1.07 \times 10^{-8}$)。アトピー性喘息患者の Atopy-GRS は、非アトピー性喘息患者の Atopy-GRS と差がなく、アトピーがある非喘息健常者よりも有意に低かった (Figure 1)。

一方、アトピー性喘息患者 391 名の Atopy-GRS がアトピー陰性健常者 617 名の Atopy-GRS に比べ有意に高値であり (Figure 1)、Atopy-GRS を 5 等分して検討したところ、Atopy-GRS 最大の群

では最小の群と比較し、有意にアトピー喘息患者の割合が多かった ($OR = 2.36, P = 2.9 \times 10^{-5}$) (Figure 2)。少なくとも一部のアトピー喘息患者ではアレルギー感作が喘息発症の原因として病態をドライブしている可能性が考えられ、アトピー性喘息に対する Atopy-GRS の PARF は 16.6%と推計された。

考察

アトピーと喘息とに強い関連があるにも関わらず、健常者と喘息患者との間で、Atopy-GRS に差が認められなかった。アトピー性喘息における Atopy-GRS の PARF は 16.6%であったことから、アレルギーへの易感体質からの喘息発症は部分的であり、多くのアトピー喘息では、喘息を発症した結果としてアトピーを獲得している可能性が示された。

抗原特異的 IgE 反応性は複数のフェノタイプがあり、スギ花粉への感作は喘息との関連が小さいとされている[8]。本研究で計算した Atopy-GRS がスギ感作への遺伝的感受性も含んでいることから、アトピー陽性の定義からスギを除いて Atopy-GRS を再度計算した。その結果、新たに計算した Atopy-GRS もアトピーと強く関連 ($P = 3.7 \times 10^{-17}$)、一方で健常者と喘息患者との間に差はなかった ($P = 0.69$)。従って、健常者と喘息患者との間に Atopy-GRS に差がない原因が、スギ感作の影響を含むためではないと考えた。

われわれは第 2 章 1 において *CDHR3* 遺伝子多型が、ヒトライノウイルス C の侵入と増幅を促し、アトピー、若年発症、気流閉塞で特徴づけられる成人喘息と関連することを示した[9]。また日本人集団における GWAS で非日本人集団の GWAS と同様に 1 秒率低値と関連した 16 個の SNP を用いてリスクスコアを計算し、肺の成長障害と関連するリスクスコア高値群でアトピー、若年発症、気流閉塞で特徴づけられる喘息と強く関連することを示した[5, 10]。興味深いことに *CDHR3*、1 秒率低値の遺伝的リスクスコアはいずれもアトピー自体との関連がなかった。さらに、*HLA-C* 領域の SNP が血清総 IgE 値に強く関連することを発見したが、同 SNP と喘息との関連は認められなかった[4]。

これら一連の知見と今回の研究結果は、喘息におけるアレルギー感作は喘息の原因というよりも、喘息であることの結果として現れた二次的な現象であるとする考えを支持する。一方で、本研究はアトピー性喘息病態におけるアレルギー感作の重要性を否定するものではない。アレルギー感作の二次的な獲得は、気道のアレルギー炎症をさらに増悪させ疾患の慢性化や重症化に極めて重要な役割を果たしている。しかしアレルギー性喘息の原因が一律にアレルゲン感作であるという一般的に信じられている特定の理論のみを強調しすぎると、ウイルス感染や肺の成長障害といった、アレルギー感作以外の重要な喘息病態をドライブする因子を過小評価してしまう危険がある[11]。

結論

喘息発症の結果としてアトピーを獲得する可能性をメンデルランダム化法にて検証した。個々の喘息患者の背景に存在する多様な分子病態を理解したうえで、診断や治療を進めていくためには、ウイルス感染や肺の成長障害のようなアトピー以外に喘息病態のドライバーとなるエンドタイプの研究も重要である。

参考文献

1. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* 2010;363:1211-21.
2. Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JA, Timpson N, Davey Smith G. Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. *Stat Med* 2008;27:1133-63.
3. Freeman G, Schooling CM, Cowling BJ. Power and sample size calculations for Mendelian randomization studies using one genetic instrument. *Int J Epidemiol* 2013;42:1157-63.
4. Yatagai Y, Sakamoto T, Masuko H, Kaneko Y, Yamada H, Iijima 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.
5. Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, et al. Heritability of pulmonary function estimated from genome-wide SNPs in healthy Japanese adults. *Respir Investig* 2015;53:60-7.
6. Bønnelykke K, Matheson MC, Pers TH, Granell R, Strachan DP, Alves AC, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies ten loci influencing allergic sensitization. *Nat Genet* 2013;45:902-6.
7. Hinds DA, McMahon G, Kiefer AK, Do CB, Eriksson N, Evans DM, et al. A genome-wide association meta-analysis of self-reported allergy identifies shared and allergy-specific susceptibility loci. *Nat Genet* 2013;45:907-11.
8. Iijima H, Kaneko Y, Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Hizawa N, et al. A distinct sensitization pattern associated with asthma and the thymic stromal lymphoprotein (*TSLP*) genotype. *Allergol Int* 2013;62:123-30.

9. Kanazawa J, Masuko H, Yatagai Y, Sakamoto T, Yamada H, Kaneko Y, et al. Genetic association of the functional *CDHR3* genotype with early-onset adult asthma in Japanese populations. *Allergol Int* 2017;66:563-7.
10. Yamada H, Masuko H, Yatagai Y, Sakamoto T, Kaneko Y, Iijima H, et al. Role of lung function genes in the development of asthma. *PLoS One* 2016;11:e0145832.
11. Hizawa N. Clinical approaches towards asthma and chronic obstructive pulmonary disease based on the heterogeneity of disease pathogenesis. *Clin Exp Allergy* 2016;46:678-87.

Table 1. Characteristics of study population

	Tsukuba cohort 1		Tsukuba cohort 2	
	Healthy Control Subjects	Asthmatics	Healthy Control Subjects	Asthmatics
Number of subjects	967	216	533	325
Sex (female, %)	526 (54.4)	126(58.3)	274 (51.4)	204 (62.8)
Age, y (range)	50.0 (27-74)	50.7 (20-72)	51.3 (22-81)	57.7 (18-84)
Age of asthma onset (range)		37.1 (0-70)		40.1 (1-82)
Smoking pack-year (%)				
0	607 (62.8)	174 (80.6)	320 (60.0)	194 (59.7)
0-10	127 (13.1)	37 (17.1)	69 (12.9)	38 (11.7)
>10	233 (24.1)	5 (2.3)	144 (27.0)	85 (26.2)
Atopy (%)	541 (55.9)	156 (72.2)	342 (64.2)	235 (72.3)
<i>Dermatophagoides farinae</i> (%)	204 (21.1)	98 (46.4)	160 (30.0)	117 (40.8)
house dust (%)	81 (8.4)	73 (34.3)	99 (18.6)	121 (41.2)
Timothy grass (%)	151 (15.6)	39 (19.0)	119 (22.3)	33 (12.2)
sweet vernal grass (%)	135 (14.0)	43 (20.9)	104 (19.5)	34 (12.5)
ragweed mixture (%)	46 (4.8)	17 (8.3)	36 (6.8)	25 (9.1)
mugwort (%)	69 (7.1)	22 (10.7)	53 (9.9)	32 (11.6)
Japanese cedar (%)	474 (49.0)	125 (59.8)	291 (54.6)	140 (48.8)
cat dander (%)	46 (4.8)	59 (28.5)	64 (12.0)	46 (16.6)
dog dander (%)	42 (4.3)	42 (20.5)	46 (8.6)	31 (11.2)
<i>Penicillium notatum</i> (%)	15 (1.6)	10 (4.9)	14 (2.6)	21 (7.9)
<i>Cladosporium herbarum</i> (%)	17 (1.8)	4 (2.0)	10 (1.9)	7 (2.6)
<i>Candida albicans</i> (%)	17 (1.8)	13 (6.4)	23 (4.3)	34 (12.5)
<i>Alternaria tenuis</i> (%)	15 (1.6)	6 (2.9)	7 (1.3)	14 (5.1)
<i>Aspergillus fumigatus</i> (%)	16 (1.7)	12 (5.9)	15 (2.8)	19 (7.0)
Serum IgE (log, SD)	1.73 (0.56)	2.24 (0.62)	1.94 (0.64)	2.23 (0.62)
FEV ₁ %pred. (%), SD)	93.3 (12.1)	89.9 (19.8)	87.4 (14.3)	81.9 (24.2)
FEV ₁ /FVC (%), SD)	83.2 (5.19)	75.0 (10.6)	81.5 (7.2)	69.8 (12.8)

Information on asthma onset age and smoking was missing in 6 and 8 patients with asthma in the Tsukuba cohort 2, respectively.

Information on serum IgE was missing in 3 and 21 patients with asthma in the Tsukuba cohort 1 and 2, respectively.

Information on FEV₁ was missing in 6 and 36 patients with asthma in the Tsukuba cohort 1 and 2, respectively.

Table 2. Top SNPs with the strongest statistical evidence of association in each region extending ± 100 kb from each candidate gene for atopy

Gene	Chr	top SNP	Alleles	Risk allele frequency	OR	<i>P</i>
<i>PEX14</i>	1	rs2128416	T/C	0.49 (C)	1.28	0.009
<i>ID2</i>	2	rs2002685	G/T	0.13 (T)	1.50	0.006
<i>IL18R1-IL1RL1-IL1RL2</i>	2	rs1420094	G/A	0.19 (A)	1.33	0.017
<i>PLCL1</i>	2	rs12693837	T/G	0.04 (G)	1.67	0.046
<i>LPP</i>	3	rs4381925	T/C	0.44 (C)	1.25	0.022
<i>TLR1-TLR6-TLR10</i>	4	rs17582575	C/A	0.21 (A)	1.28	0.032
<i>ADAD1-IL2</i>	4	rs716501	A/G	0.52 (A)	1.28	0.010
<i>PTGER4</i>	5	rs6882903	C/A	0.89 (C)	1.33	0.056
<i>SLC25A46</i>	5	rs193436	C/T	0.45 (T)	1.18	0.081
<i>WDR36-CAMK4</i>	5	rs11466741	C/T	0.76 (C)	1.34	0.008
<i>HLA-C-HLA-B-MICA</i>	6	rs2524057	T/C	0.81 (T)	1.50	0.001
<i>HLA-DQA1-HLA-DQB1</i>	6	rs17211510	C/A	0.25 (A)	1.35	0.006
<i>TPD52-ZBTB10</i>	8	rs6473225	G/A	0.63 (G)	1.22	0.045
<i>RANBP6-IL33</i>	9	rs340934	A/C	0.97 (A)	1.79	0.057
<i>PVT1-MYC</i>	8	rs6470586	G/T	0.11 (T)	1.37	0.041
<i>GATA3</i>	10	rs2797290	C/T	0.98 (C)	2.09	0.014
<i>C11orf30-LRRC32</i>	11	rs7936562	T/C	0.47 (C)	1.23	0.022
<i>ETS1</i>	11	rs4362159	T/C	0.12 (T)	1.37	0.032
<i>STAT6</i>	12	rs841718	C/T	0.22 (T)	1.27	0.034
<i>FOXA1-TTC6</i>	14	rs17106785	A/G	0.71 (A)	1.19	0.091
<i>SMAD3</i>	15	rs427071	G/T	0.03 (T)	1.87	0.029
<i>CLEC16A</i>	16	rs8055893	C/T	0.06 (T)	1.83	0.004
<i>IL4R-IL21R</i>	16	rs982205	A/C	0.17 (C)	1.31	0.036
<i>GSDMB</i>	17	rs9635726	C/T	0.49 (T)	1.16	0.127
<i>NFATC2</i>	20	rs4811174	T/C	0.65 (T)	1.31	0.008

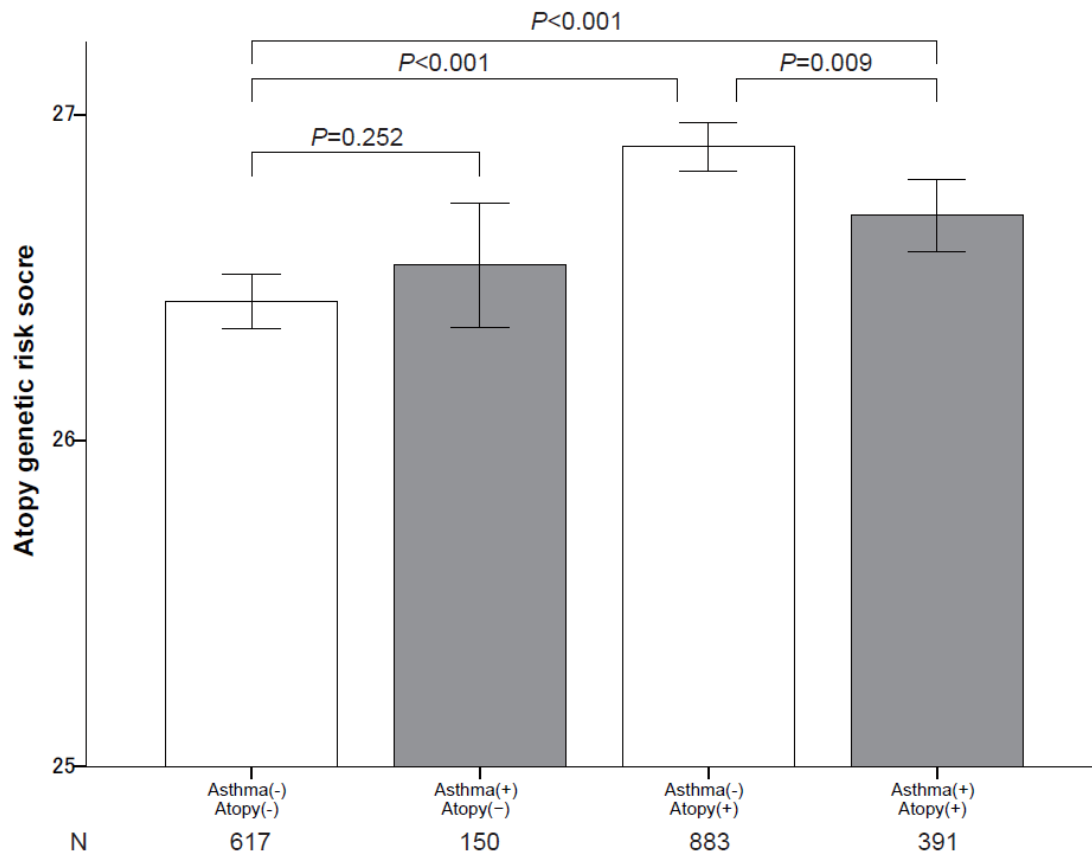


Figure 1. The Atopy-GRS levels according to the presence or absence of atopy and asthma. When we compared the levels of Atopy-GRS according to the 4 groups (atopic and non-atopic healthy adults, adults with atopic and non-atopic asthma), the highest levels of Atopy-GRS was found in atopic healthy adults. Error bars indicate 95% confidence intervals.

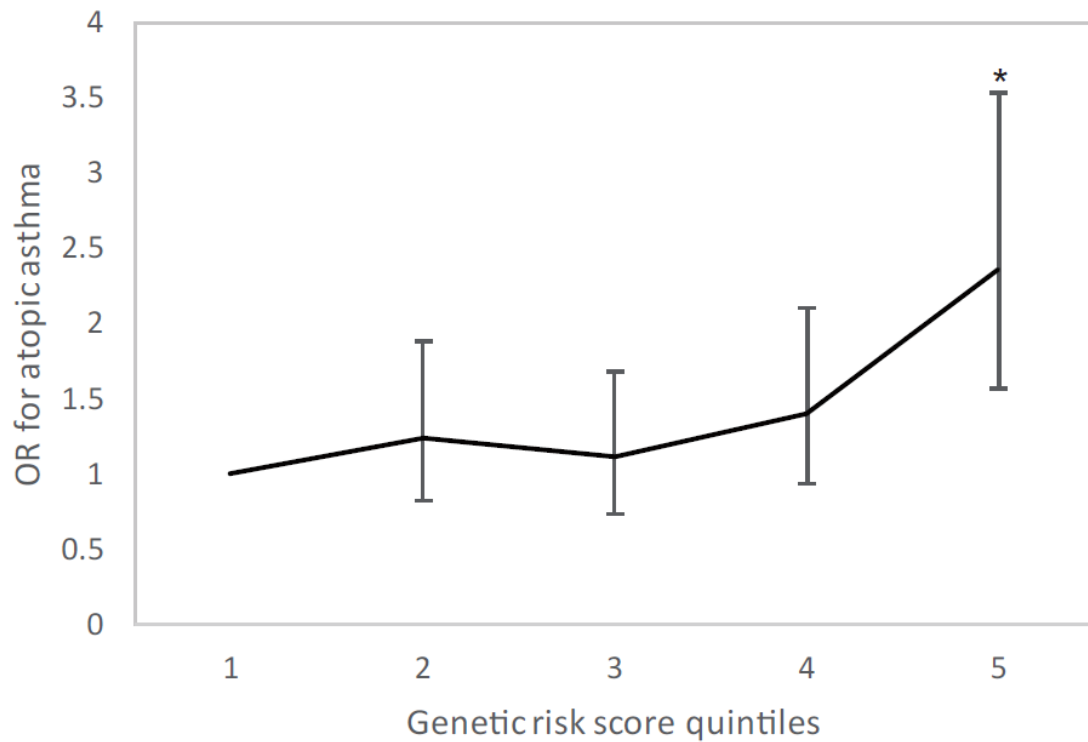


Figure 2. Odds ratios for association between the Atopy-GRS and atopic asthma across the Atopy-GRS quintiles. For each Atopy-GRS quintile, odds ratios for the development of atopic asthma were obtained using 391 patients with atopic asthma and 617 non-atopic non asthmatic healthy individuals. The odds ratio for comparison between the 5th and 1st quintiles was 2.36 (95%CI = 1.57-3.54, * $P = 2.9 \times 10^{-5}$). The odds ratio for comparison between the 5th and 1st to 4th quintiles was 1.99 (95%CI = 1.44-2.72, $P = 1.2 \times 10^{-5}$), which was used for the estimation of proportion of atopic asthma cases attributable to the Atopy-GRS.

第4章 *CDHR3* 遺伝子多型、*TYRO3* 遺伝子多型およびアレルギー感作関連遺伝子の成人喘息、アトピーへの交互作用について

背景・目的

第2章第1節において *CDHR3* 遺伝子多型 rs6967330 が若年発症喘息に関連し、アトピー陽性者においてより強い影響を有することを示した。第2節において *TYRO3* 遺伝子多型 rs2297377 がアレルギー感作に関連することを示した。また、第3章においては種々のアレルゲンに対する体質的な易感作性である Atopy genetic risk score を計算した。ウイルス感染とアトピー素因との喘息発症への相互作用についての two-hit model を前提に、本章ではアレルギー感作と関連する遺伝的リスクスコア (Atopy-GRS) および *TYRO3* が *CDHR3* の遺伝子効果に与える影響を検討した。さらに Atopy-GRS が *TYRO3* の効果に与える影響についても検討した。

方法

CDHR3 遺伝子多型と Atopy-GRS

CDHR3 遺伝子多型の検討で用いた10歳以下発症喘息と非喘息健常者のうち Atopy-GRS のデータが利用可能な喘息患者133名、非喘息健常者967名の合計1100名を対象とした。

Atopy-GRS は健常者において正規分布することから (Figure 1)、Atopy-GRS によって集団を3等分し、各群における *CDHR3* 遺伝子の喘息発症に対する効果をロジスティック回帰分析で検討した。さらにロジスティック回帰分析で交互作用項を用いることで Atopy-GRS と *CDHR3* ジェノタイプとの交互作用を検討した。

CDHR3 遺伝子多型と *TYRO3* 遺伝子多型

CDHR3 遺伝子多型と *TYRO3* 遺伝子多型がともにタイピングされている10歳以下発症喘息137名と非喘息健常者967名の合計1104名を対象とした。*TYRO3* 遺伝子多型 (rs2297377) のジェノ

タイプ(リスクアレル G)ごとに *CDHR3* 遺伝子が喘息に与える効果をロジスティック回帰分析で検討した。さらにロジスティック回帰分析で交互作用項を用いることで *CDHR3* 遺伝子と *TYRO3* 遺伝子との交互作用を検討した。

TYRO3 遺伝子多型と Atopy-GRS

TYRO3 遺伝子多型の検討で用いた対象者のうち Atopy-GRS のデータを利用可能な喘息患者 380 名、非喘息健常者 1476 名を対象とした。Atopy-GRS によって集団を 3 等分し、各群における *TYRO3* 遺伝子のアトピー及び喘息発症に対する効果をロジスティック回帰分析で検討した。さらにロジスティック回帰分析で交互作用項を用いることで Atopy-GRS と *TYRO3* ジェノタイプとの交互作用を検討した。アトピーについては非喘息健常者 967 名のみを対象とした。

結果

CDHR3 遺伝子多型と Atopy-GRS

CDHR3 は Atopy-GRS が最も高い群で、若年発症成人喘息と強い関連を示した(OR = 2.60、 $P = 0.0090$)。 *CDHR3* 遺伝子と Atopy-GRS 間に有意な交互作用を認めた($P = 0.042$) (Figure 2)。

CDHR3 遺伝子多型と *TYRO3* 遺伝子多型

アトピーのリスクジェノタイプである *TYRO3* GG において *CDHR3* の喘息に対するオッズ比の増加はなかった(P for interaction = 0.41) (Figure 3)。

TYRO3 遺伝子多型と Atopy-GRS

TYRO3 は Atopy-GRS が最も高い群で、アトピーと強い関連を示した(OR = 1.56、 $P = 0.0025$)。TYRO3 遺伝子と Atopy-GRS 間に交互作用を認めなかった($P = 0.42$) (Fig.4-1)。また、Atopy-GRS の値に寄らず、TYRO3 の喘息発症への遺伝的な影響は認められなかった (Fig.4-2)。

考察

CDHR3 遺伝子多型の喘息への影響、TYRO3 遺伝子多型のアトピーへの影響はいずれも、Atopy-GRS 高値の対象群で最も強かった。特に CDHR3 遺伝子多型と Atopy-GRS との間には有意な遺伝的交互作用が認められた。遺伝的にアレルギー感作を獲得しやすい人において CDHR3、TYRO3 の遺伝的影響がより強く認められることが示された。TYRO3 遺伝子多型によって、CDHR3 遺伝子多型の喘息への影響が変わらなかった理由として、TYRO3 遺伝子単独のアレルゲン感作への効果は、Atopy-GRS に比べ大きくないためと考えた。

結論

Atopy-GRS は CDHR3 遺伝子多型リスクアレルの喘息への効果、TYRO3 遺伝子多型リスクアレルのアレルゲン感作への効果を増強する。

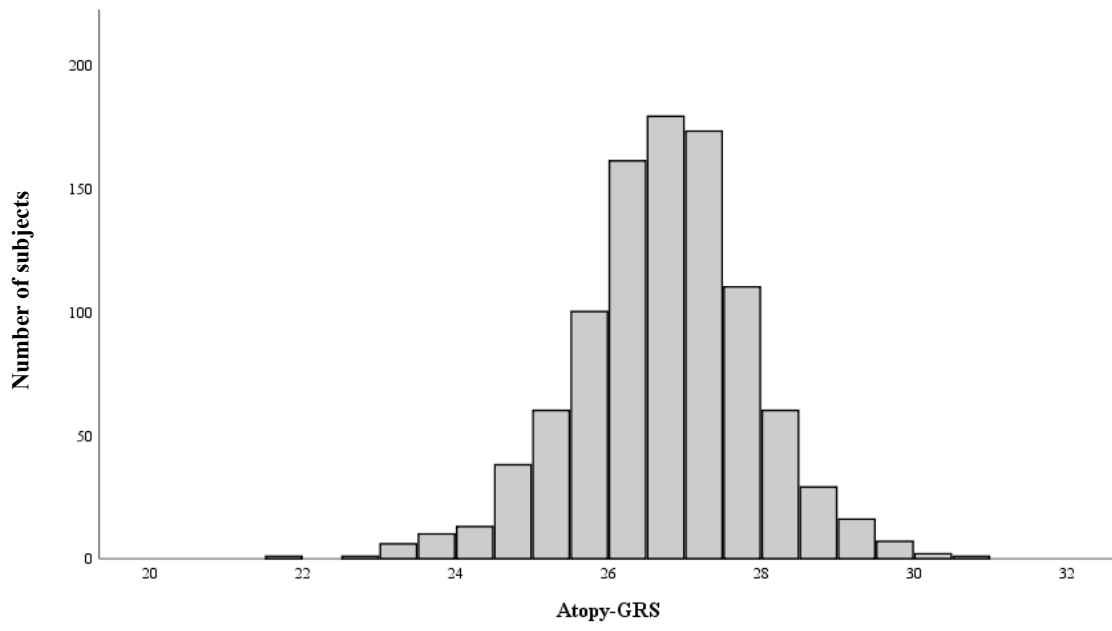


Figure 1. A histogram showing the distribution of Atopy-GRS of 967 healthy control subjects

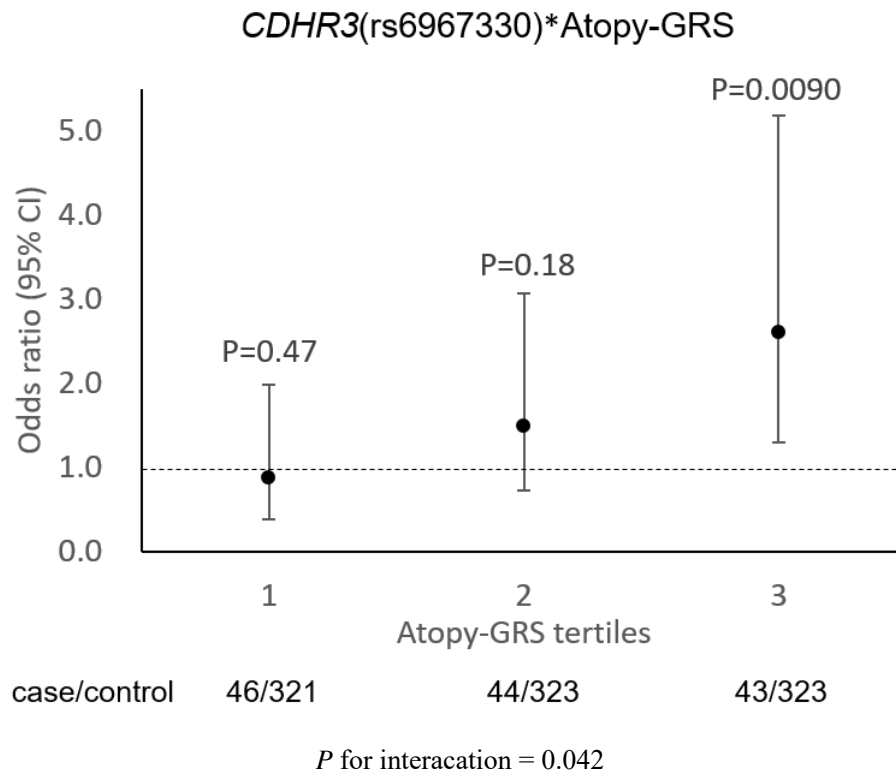


Figure 2. Odds ratios for association between *CDHR3* rs6967330 and asthma according to Atopy-GRS tertiles.

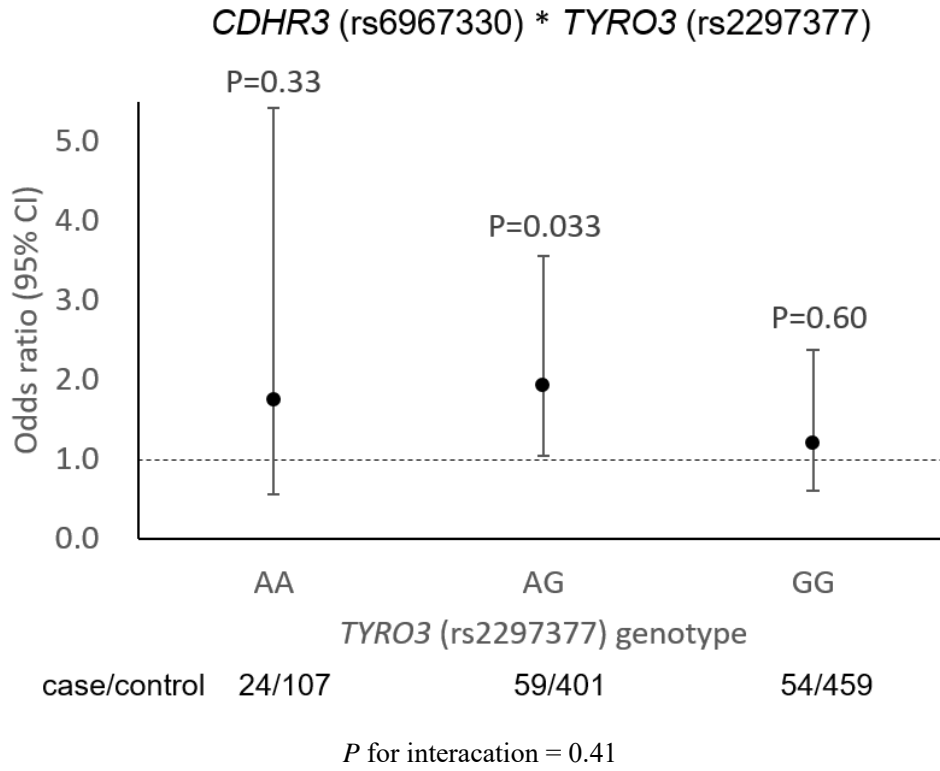


Figure 3. Odds ratios for association between *CDHR3* rs6967330 and asthma according to *TYRO3* rs2297377 genotype. The atopy risk allele at rs2297377 is the G allele.

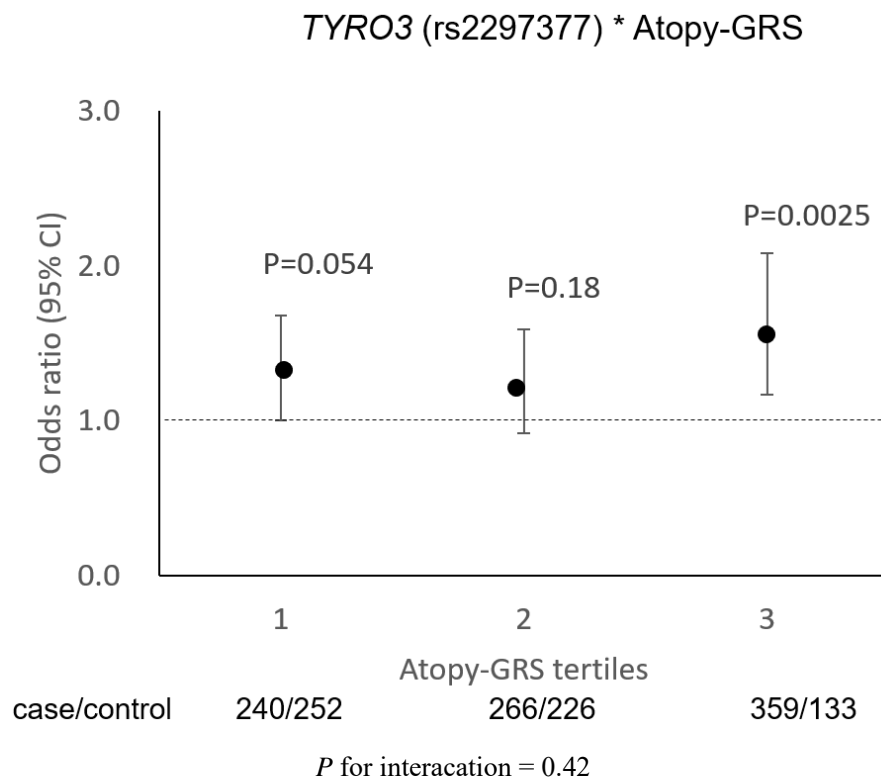


Figure 4-1. Odds ratios for association between *TYRO3* rs2297377 and atopy according to Atopy-GRS tertiles.

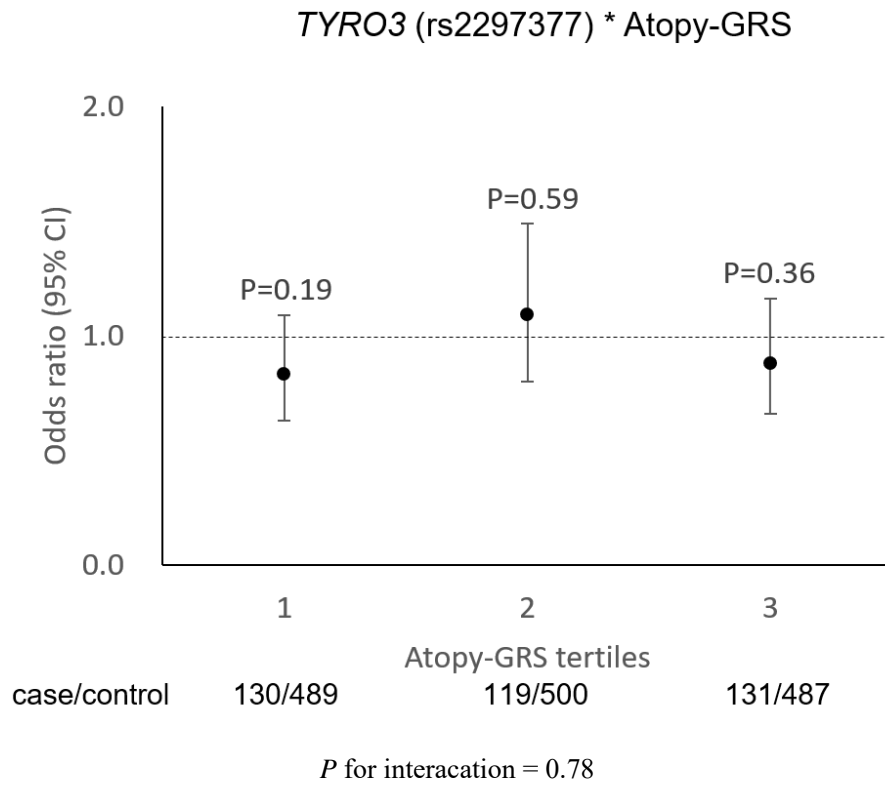


Figure 4-2. Odds ratios for association between *TYRO3* rs2297377 and asthma according to Atopy-GRS tertiles.

第5章 総括

遺伝的に規定されるウイルス易感染性とアレルゲンへの易感作性が成人喘息に与える影響を明らかにするために患者対照研究を行った。第2章第1節では *CDHR3* 遺伝子多型が有意に若年発症成人喘息に関連し、特にアトピーがある患者で強い影響があることを示した。小児期の重症な喘鳴や喘息発作の有無についてのデータはないものの、*CDHR3* 遺伝子に関連した重症な喘鳴や頻回の増悪が上皮傷害をきたし、慢性的に肺機能を低下させ成人喘息に移行していく可能性が示された。第2節では *TYRO3* 遺伝子の発現に関与する機能的遺伝子多型がアレルギー感作とアレルギー性鼻炎に関与する遺伝因子であることを示した。*TYRO3* は喘息の感受性遺伝子として同定されたものにも関わらず、我々の集団では喘息ではなくアレルギー感作とアレルギー性鼻炎と関連したことは、喘息の不均一性を示すと同時に、*TYRO3* 遺伝子の影響によって小児から青年期に発症したアトピー性喘息は、比較的軽症で成人に移行せず緩解してしまう割合が多いのかもしれない。第3章ではアレルギー感作に強く関連する Atopy-GRS を計算し、アトピーと強く関連する Atopy-GRS が喘息とは関連しないことから、少なくとも一部の患者において、アレルギー感作が喘息の原因ではなく、喘息を発症した結果としてアレルギー感作を獲得している可能性を示した。第4章では Atopy-GRS と *CDHR3* の喘息発症に対する交互作用とを示し、two-hit model を裏付ける結果を得た。

以上より、遺伝的に規定されるウイルス易感染性とアレルゲン易感作性がそれぞれに作用することで喘息発症のリスクを上昇させていることが考えられた (Figure 1)。それぞれの分子基盤を有する個人に対して、それぞれの病態における治療ターゲットの明確化、個々の分子病態をターゲットにした臨床試験の実施、診断や治療効果の判定に有用なバイオマーカーの開発などが期待され (精密医療)、*CDHR3* 遺伝子多型やアレルギー感作関連遺伝子のタイピングにより高リスク群の拾い上げを行い、ライノウイルスに対するワクチン接種、乳幼児期のアレルゲン曝露の回避を行うなどの

早期介入による喘息発症の予防や進行抑制の確立(先制医療)の実現に結び付けることを目標としたい。

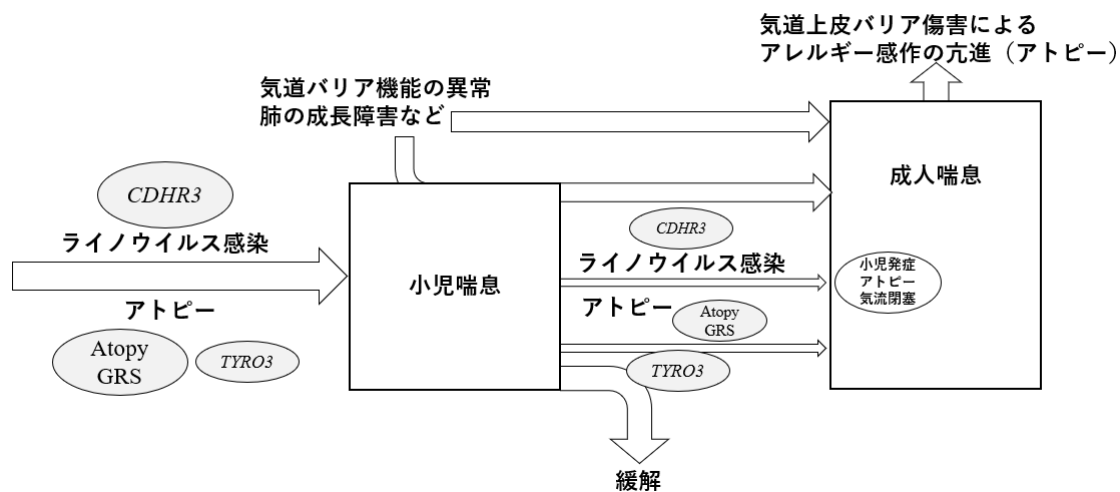


Figure 1. Genetic susceptibility to rhinovirus infection and allergic sensitization - Their impacts on the development of adult asthma

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いただきました筑波大学大学院呼吸器内科増子裕典講師に深く感謝いたします。

研究その他多方面にわたりご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、筑波大学附属病院土浦市地域臨床教育センター石井幸雄教授、筑波大学附属病院水戸地域医療教育センター佐藤浩昭教授、筑波大学附属病院神栖地域医療教育センター家城隆次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東京慈恵医科大学総合医科学研究センター基盤研究施設分子遺伝学玉利真由美教授、広田朝光講師に深謝いたします。

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。

貴重な検体をご提供いただきました北海道大学病院内科 I 西村正治教授、今野哲准教授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ご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、御教示をいただきました、坂本透病院教授、森島祐子准教授、松野洋輔講師、際本拓未講師、山本良子講師、増子裕典講師、中澤健介講師、塩澤利博病院講師、松山政史病院講師、川口未央医学博士、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、長南達也医学博士、金子美子医学博士、谷田貝洋平医学博士、山田英恵医学博士、林士元医学博士、角田義弥医学博士、櫻井啓文医学士、中嶋真之医学士、北沢晴奈医学士、吉田和史医学士、Mingma Sherpa 医学士、重政理恵医学士、兵頭健太郎医学士に深謝いたします。

出典

本学位論文では *Allergology International*. 66 (4) : 563-567, 2017
(doi.org/10.1016/j.alit.2017.02.012)、*Allergology International*. In press.
(doi.org/10.1016/j.alit.2018.07.004)、*Allergology International*. 68 (2) : 292-294, 2018
(doi.org/10.1016/j.alit.2017.10.005) に掲載された論文の内容を、the Japanese Society
of *Allergology* の規定に従って再利用している。