

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790399

研究課題名（和文） 肺気腫の疾病関連遺伝子の同定と遺伝子診断への応用

研究課題名（英文） Identification of pulmonary emphysema-susceptibility genes and its application to DNA-based diagnosis

研究代表者

中富 克己 (NAKATOMI KATSUMI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90457531

研究成果の概要（和文）：

糖転移酵素遺伝子や TGF- β 受容体を介した細胞内シグナル伝達系遺伝子、喫煙誘導による血管新生およびストレス関連遺伝子を候補遺伝子として、71 名の肺気腫患者群と 72 名の健常者群間で、候補遺伝子多型の出現頻度を有意差検定する（相関解析研究）で、肺気腫の発症に關与する疾患感受性遺伝子の同定を試みた。

21 個の候補遺伝子に対して 52 個の一塩基多型を単変量解析した結果、肺気腫の疾患感受性遺伝子として *FUT6*, *Smad2*, *PIGH* および *MFT1* を同定した。次に多変量解析を行い、*FUT6*, *PIGH* および *MFT1* の 3 つの遺伝子多型がお互いに独立して肺気腫発症の危険因子であった。今後、肺気腫発症を予測できるバイオマーカーに応用できるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：

Pulmonary emphysema (PE) is a multifactorial disorder characterized by destruction of alveolar septa, loss of lung elasticity, and enlargement of alveolar airspaces. Although the precise etiology of PE remains unknown, both several environmental factors such as cigarette smoking and multiple genetic factors may contribute to the pathogenesis of PE. In order to identify unknown genetic factors, I focused on the fucosyltransferase family, intracellular molecules in the signaling pathway of TGF- β and its receptors, and cigarette smoking-induced angiogenesis and anti-stress enzymes. Thus, I examined an association between polymorphisms of 52 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 21 candidate genes and susceptibility to PE using 72 Japanese PE patients and 72 age- and gender-matched healthy control subjects. All participants were former or current smokers.

Univariate logistic regression analysis revealed that *FUT6*, *Smad2*, *PIGH*, and *MFT1* appeared to be PE-susceptibility genes. However, subsequent multivariate logistic regression analysis indicated that *FUT6*, *PIGH*, and *MFT1* are genetic determinants of PE in the Japanese population. Furthermore, the polymorphism of these genes identified in this study may be useful as a DNA-based diagnostic biomarker for identifying Japanese individuals at high-risk for PE.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ファーマコゲノミクス

1. 研究開始当初の背景

肺気腫(pulmonary emphysema: PE)は、肺胞の破壊、肺弾性の低下、肺泡領域の拡張による呼吸困難を特徴とする慢性閉塞性肺疾患(chronic obstructive pulmonary disease: COPD)の一つである。本症の正確な病因は明らかではなく、喫煙に代表される環境因子と遺伝因子が相互に関与して発症する多因子疾患である。喫煙者の約15-20%しか発症せず、また家族集積性も報告されていることから、環境因子のみならず遺伝因子の関与も示唆されている。しかし、日本人に特有の疾患感受性遺伝子は同定されていない。

PEの病因論として、喫煙によるプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡説が有力である。ヒトの肺胞壁は、エラスチン・コラーゲンなどの蛋白質(弾性線維)で構成されており、マクロファージや好中球などの顆粒中に含まれるエラスターゼなどの蛋白質分解酵素(プロテアーゼ)によって分解される。他方、肝臓ではプロテアーゼに拮抗するアンチプロテアーゼを産生し、プロテアーゼを不活性化することで両者のバランスが保たれている。PEではプロテアーゼ優位の病態となっている。

プロテアーゼの一つである細胞外マトリックス分解酵素(matrix metalloproteases: MMPs)の発現がPE患者の肺組織で亢進している。このMMPsの発現は、interleukin 1 (IL-1)やinterferon- γ (IFN- γ)などの炎症性サイトカインによって、細胞内伝達物質であるSTATファミリーを介して正に調節されている。一方、transforming growth factor β (TGF- β)は、その受容体を介して細胞内シグナル伝達物質であるSmadファミリーによってMMPsの発現を負に調節している。したがって、プロテアーゼ優位の病態の原因の一つとして、MMPsの発現の亢進が示唆されている。

糖鎖付加に関与している α -1,6-フコース転移酵素(α -1,6-fucosyltransferase: FUT8)をノックアウトさせたマウスで肺気腫が発症した。また、肺組織ではTGF- β が亢進していることから、FUT8の不活性化によりTGF- β 受容体に糖鎖が付加されず、TGF- β 受容体蛋白が成熟されないために、TGF- β 受容体とその下流のシグナル伝達系が減弱あるいは遮断されて、MMPsの発現が亢進し、肺組織の破壊が引き起こされ肺気腫を発症したと考えら

れている。

よって本研究の目的は、FUT8を含めたFUTsやTGF- β 受容体を介した細胞内シグナル伝達系、喫煙誘導による血管新生およびストレス関連遺伝子がヒトの肺気腫の発症に関与しているかを、肺気腫患者と健常者を対象とした症例-対照研究により、肺気腫感受性遺伝子の同定を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、候補遺伝子アプローチ法により候補遺伝子を絞り込み、症例-対照研究による相関解析の手法を用いて、肺気腫の疾患感受性遺伝子を同定した。

3. 研究の方法

(1) 長崎大学病院呼吸器内科とその関連病院において、肺気腫と診断され、遺伝子解析に同意されたPE患者71名を疾患群(PE)、健常者72名を対照群(NC)とした。文書によるインフォームド・コンセントを行い、各被験者から同意を得て試料(血液)を採取した。本研究はヒトゲノム・遺伝子解析倫理委員会の承認を得ている。

(2) 肺気腫の診断に関しては、国際的ガイドラインに従い、胸部X線写真や胸部CTによる画像診断所見と、呼吸機能検査で1秒率が<70%、1秒量が<80%と閉塞性換気障害を認めた場合に肺気腫と診断した。

(3) 情報管理者により匿名化された血液を、QuickGene DNA Whole Blood Kit S (Fujifilm, Tokyo, Japan)で処理し、QuickGene-800 (Fujifilm)を用いてゲノムDNAを抽出した。

(4) International HapMapのデータベースから候補遺伝子内に存在するすべての一塩基多型(single nucleotide polymorphisms: SNPs)の多型情報を入手した。

着目した候補遺伝子を以下の群に分類した。①糖転移酵素遺伝子群(FUT1, FUT2, FUT3, FUT5, FUT6, FUT7, FUT8), ②TGF- β 受容体の細胞内シグナル伝達系遺伝子群(Smad2, Smad4, Smad7), ③血管新生関連遺伝子群(PIGF, HIF1A, MTF1, CEBPA), ④抗酸化酵

素遺伝子群(*SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *SRXNI*), ⑤小胞体ストレス関連遺伝子群(*CHOP*, *XBPI*, *EIF2A*)の5群21個の遺伝子を候補遺伝子として解析対象とした。

(5) 候補遺伝子内に存在するすべての SNPs から, Haploview あるいは iHap ソフトウェアを用いて, 本研究で多型解析を行った 52 個の tag SNPs を選出した。次に, 各 tag SNP の多型情報から, それぞれの多型領域を挟むように PCR 用の primer pairs を作製した。

(6) PCR 産物を制限酵素で切断し, 切断の有無で多型の有無を判断する PCR-制限酵素断片長多型法か, PCR 産物の塩基配列を直接決定する PCR-DNA シークエンス法で tag SNPs の多型を決定した。

(7) PE 群と NC 群間で SNP 多型あるいは SNP 多型を組み合わせたハプロタイプ多型の出現頻度を有意差検定 (χ 二乗検定法とロジスティック回帰分析) することで, 肺気腫の疾患感受性遺伝子を同定した。

(8) 有意差を認めた候補遺伝子多型が複数ある場合は, 多変量解析 (ロジスティック回帰分析) を用いて, それぞれの遺伝子多型がお互いに独立して肺気腫の発症に関与していることを検証した。

4. 研究成果

(1) PE 患者と健常者の臨床情報とその比較

71 名の PE 患者が本研究に登録された。平均年齢は 72.6 ± 6.7 歳で, 男性 65 名 (91.5%), 女性 6 名 (8.5%) で, 全員喫煙者であった。一方, 72 名の健常者が登録され, 平均年齢は 71.9 ± 5.7 歳で, 男性 70 名 (97.2%), 女性 2 名 (2.8%) で, 全員喫煙者であった。

PE 群と NC 群間で臨床情報を比較した結果, 平均年齢でも男女比でも有意差を認めなかった (それぞれ $P = 0.170$ と $P = 0.166$)。

(2) 糖転移酵素遺伝子群の多型解析

FUT1, *FUT2*, *FUT3*, *FUT5*, *FUT6*, *FUT7* および *FUT8* の 7 個の候補遺伝子に対して, allele, genotype, haplotype および diplotype の出現頻度を, PE 群と NC 群間で有意差検定を行った結果, 以下の所見を得た。

- ① *FUT1* の rs2071699 SNP で, C allele をもつヒトは PE 群に有意に少なかった。 ($P = 0.018$)
- ② *FUT1* の rs2071699 SNP で, C/C genotype のヒトは PE 群に有意に少なく ($P = 0.032$), odds ratio (OR) = 0.449 であることから, この genotype を持たないヒトと比べて約 2.2 倍肺気腫に罹りにくい, 疾患抵抗性を

示した。

- ③ *FUT1* 内の 3 つの tag SNPs (rs4015, rs4021, rs2071699) を組み合わせさせて haplotypes を構築し, その多型の出現頻度を比較した結果, Hap 1 haplotype (rs4015 で G allele, rs4021 で T allele, rs2071699 で T allele) を持つヒトは PE 群に有意に多く ($P = 0.013$), OR = 1.815 であることから, この haplotype を持たないヒトと比べて約 1.8 倍肺気腫に罹患しやすく, 疾患感受性を示した。
- ④ *FUT1* の diplotype 解析で, 有意差を認めた Hap 1 haplotype のホモ接合体である Hap 1/Hap 1 diplotype のヒトは肺気腫に罹患しやすい傾向を示したが, 統計学的有意差はなかった ($P = 0.059$)。解析する症例数を増やせば, 統計学的有意差を認めると推察される。
- ⑤ *FUT6* の rs8101385 SNP で, C allele をもつヒトは PE 群に有意に多かった。 ($P = 0.010$)
- ⑥ *FUT6* の rs8101385 SNP で, C/C genotype のヒトは PE 群に有意に多く ($P = 0.002$), OR = 2.954 であることから, 肺気腫に約 3 倍罹患しやすく, 疾患感受性を示した。
- ⑦ *FUT6* 内の 3 つの tag SNPs (rs778805, rs8101385, rs3760775) で haplotypes を構築し, その多型の出現頻度を比較した結果, 統計学的有意差はなかった。
- ⑧ *FUT6* の diplotype 解析で, Hap 1 haplotype (rs778805 で C allele, rs8101385 で C allele, rs3760775 で C allele) のホモ接合体である Hap 1/Hap 1 diplotype のヒトは肺気腫に約 3.2 倍罹患しやすかった。 ($P = 0.003$, OR = 3.234)
- ⑨ 他の *FUT2*/*FUT3*/*FUT5*/*FUT7*/*FUT8* 内の tag SNPs で, allele および genotype の出現頻度に有意差を認めなかった。また, haplotype および diplotype の出現頻度も有意差はなかった。

(3) TGF- β 受容体の細胞内シグナル伝達系遺伝子群の多型解析

Smad2, *Smad4* および *Smad7* の 3 個の候補遺伝子に対して, allele, genotype, haplotype および diplotype の出現頻度を, PE 群と NC 群間で有意差検定を行った結果, 以下の所見を得た。

- ① *Smad2*/*Smad4*/*Smad7* 内の tag SNPs で, allele および genotype の出現頻度に有意差を認めなかった。
- ② *Smad2* 内に存在する 2 つの連鎖不平衡ブロック (LD block) のうち, 5' 上流側の LD block 内の 3 つの SNPs (rs1792666, rs8086227, rs1792689) で haplotypes を構築し, その多型の出現頻度を比較した結果, Hap 3 haplotype (rs1792666 で A allele,

- rs8086227 で G allele, rs1792689 で T allele)を持つヒトは肺気腫に約 2 倍罹患しやすかった。(P = 0.036, OR = 2.001)
- ③ *Smad2* の diplotype 解析で, 有意差を認められた Hap 3 haplotype と Hap 2 haplotype (rs1792666 で T allele, rs8086227 で A allele, rs1792689 で C allele) のヘテロ接合体である Hap 2/Hap 3 diplotype のヒトは肺気腫に約 9 倍罹患しやすかった。(P = 0.041, OR = 9.016)
- ④ 他の *Smad4* および *Smad7* で, haplotype および diplotype の出現頻度に有意差はなかった。

(4) 血管新生関連遺伝子群の多型解析

PIGF, *HIF1A*, *MTF1* および *CEBPA* の 4 個の候補遺伝子に対して, allele, genotype, haplotype および diplotype の出現頻度を, PE 群と NC 群間で有意差検定を行った結果, 以下の所見を得た。

- ① *PIGF* の rs8185 SNP で, A allele をもつヒトは PE 群に有意に多かった。(P = 0.024)
- ② *PIGF* の rs8185 SNP で, A/A genotype のヒトは PE 群に有意に多く (P = 0.010), OR = 2.599 であることから, 肺気腫に約 2.6 倍罹患しやすく, 疾患感受性を示した。
- ③ *MTF1* の rs473279 SNP で, A allele をもつヒトは PE 群に有意に多かった。(P = 0.029)
- ④ *MTF1* の rs473279 SNP で, A/A genotype のヒトは PE 群に有意に多く (P = 0.028), OR = 5.738 であることから, 肺気腫に約 5.7 倍罹患しやすく, 疾患感受性を示した。
- ⑤ 他の *HIF1A* および *CEBP* の tag SNPs で, allele および genotype の出現頻度に有意差はなかった。
- ⑥ haplotype および diplotype の出現頻度に有意差はなかった。

(5) 抗酸化酵素遺伝子群の多型解析

SOD1, *SOD2*, *SOD3* および *SRXN1* の 4 個の候補遺伝子に対して, allele, genotype, haplotype および diplotype の出現頻度を, PE 群と NC 群間で有意差検定を行った結果, 以下の所見を得た。

- ① *SOD1/SOD2/SOD3/SRXN1* 内の tag SNPs で, allele および genotype の出現頻度に有意差を認めなかった。
- ② haplotype および diplotype の出現頻度においても有意差はなかった。

(6) 小胞体ストレス関連遺伝子群の多型解析

CHOP, *XBPI* および *EIF2A* の 3 個の候補遺伝子に対して, allele, genotype, haplotype および diplotype の出現頻度を, PE 群と NC 群間で有意差検定を行った結果, 以下の所見

を得た。

- ① *CHOP/XBPI/EIF2A* 内の tag SNPs で, allele および genotype の出現頻度に有意差を認めなかった。
- ② haplotype および diplotype の出現頻度においても有意差はなかった。

以上の単変量解析の結果から, 肺気腫の疾患感受性遺伝子として *FUT6* の rs8101385 SNP で C/C genotype, *Smad2* の Hap 2/Hap 3 diplotype, *PIGH* の rs8185 SNP で A/A genotype, および *MFT1* の rs473279 SNP で A/A genotype は, 肺気腫の発症に関与している可能性が示唆された。

(7) 候補遺伝子多型の独立性の評価

単変量解析で有意差を認めた *FUT6*, *Smad2*, *PIGH* および *MFT1* の 4 個の候補遺伝子多型に対して, 多変量解析 (ロジスティック回帰分析) を行って, 各多型の独立性の検証を実施した結果, 以下の所見を得た。

- ① *FUT6* の rs8101385 SNP で C/C genotype は独立して肺気腫発症の危険因子であった。(P = 0.005, OR = 2.834)
- ② *PIGH* の rs8185 SNP で A/A genotype は独立して肺気腫発症の危険因子であった。(P = 0.005, OR = 2.834)
- ③ *MFT1* の rs473279 SNP で A/A genotype は独立して肺気腫発症の危険因子であった。(P = 0.043, OR = 5.599)
- ④ *Smad2* の Hap 2/Hap 3 diplotype は肺気腫発症の危険因子でなかった。(P = 0.121)

以上の所見から, 肺気腫の疾患感受性遺伝子として *FUT6*, *PIGH* および *MFT1* を同定した。この 3 つの感受性遺伝子はお互いに独立して肺気腫の発症の危険因子であった。今後は, 同定した危険因子 (遺伝子多型) をバイオマーカーとして用いた遺伝子診断法に臨床応用していきたい。そして, 結果のすべてを英語論文にまとめて, 英語雑誌や当研究室のホームページで公表する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 上村理紗, 谷口磨美, 近藤新二, 中富克己, 河野 茂, 塚元和弘. *FUT1* 遺伝子は肺気腫の疾患感受性遺伝子である. 日本薬学会第 129 年会 2009, 3/26-28 (京都)
- ② Uemura R, Taniguchi M, Naka Y, Inamine T, Kondo S, Nakatomi K, Kohno S,

Tsukamoto K. A haplotype polymorphism of *FUT1* is associated with susceptibility to pulmonary emphysema in the Japanese population. 59th American Society of Human Genetics Annual Meeting 2009, 10/20-24 (in Honolulu, USA).

- ③ 上村理紗, 中 友里, 稲嶺達夫, 近藤新二, 中富克己, 河野 茂, 塚元和弘. *PIGF*は肺気腫の疾患感受性遺伝子である. 第30回日本臨床薬理学会年会 2009, 12/3-5 (横浜)
- ④ 上村理紗, 中 友里, 稲嶺達夫, 近藤新二, 中富克己, 河野 茂, 塚元和弘. *PIGF*遺伝子は肺気腫の発症を予測できるバイオマーカーである. 第26回日本薬学会九州支部総会 2009, 12/12-13 (福岡)

[その他] (計 1 件)

- ① 研究成果を当研究室のホームページに公開している。
<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/intmed-2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中富 克己 (NAKATOMI KATSUMI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 90457531

(2) 研究協力者

河野 茂 (KOHNO SHIGERU)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 80136647

塚元 和弘 (TSUKAMOTO KAZUHIRO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 30253305

上村 理紗 (UEMURA RISA)
谷口 磨美 (TANIGUCHI MAROMI)
中 友里 (NAKA TOMOSATO)