

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 18 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590845

研究課題名（和文）喫煙関連呼吸器疾患へのニコチン受容体遺伝子多型の関与の検討

研究課題名（英文）The association between genetic variations of the neuronal nicotinic cholinergic receptors and smoking-related lung diseases

研究代表者

木田 厚瑞（Kida Kozui）

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：90142645

研究成果の概要（和文）：

CHRNA4-CHRNA3-CHRNA5 の遺伝子多型(SNP)の遺伝子型を約 360 例の COPD 及び対照症例にて決定、複数の SNP が肺気腫の程度（CT で定量的評価）と有意に関連、別の SNP は喫煙歴と関連のある傾向が見られた。公的データベースによる解析で、同 SNP は CHRNA3, 5 の発現量と関連していた。肺気腫症例において CHRNA3 は気管支上皮・肺胞壁・肺胞内マクロファージに発現が確認された。

研究成果の概要（英文）：

The study population comprised 366 current or ex-smokers including 247 COPD patients. Two of the SNPs, rs3743078 and rs660652, in CHRNA4-CHRNA3-CHRNA5 showed an association with %LAA in the upper region of the lungs ($p = 0.0050$ and 0.0038 , respectively) and were also associated with the mRNA expression of CHRNA3 and CHRNA5. CHRNA3 was expressed also in the lung, confirmed pathologically.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：閉塞性肺疾患・喫煙・肺気腫・ニコチン受容体・遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患（Chronic obstructive pulmonary disease: 以下 COPD と略）は、喫煙を主な環境因子とし、咳、痰、労作性息切れを主な症状とし不可逆的な気道閉塞により定義された慢性呼吸器疾患である。病態の進行に伴い Quality of life、予後共に悪化、急性増悪での入院を中心に医療費の急速な増加が推測され（木田、他。日本呼吸器学会誌，2006。GOLD ガイドライン，2006。）、

本邦 COPD 患者は急増、全人口の 8.6% と推測されている（Fukuchi Y, et al. *Respirology*. 2004; 9: 458-465）。

多くの慢性疾患と同様に COPD も、環境因子及び複数の遺伝子が病態に関与と推測されている。プロテアーゼ・アンチプロテアーゼ仮説、オキシダント・アンチオキシダント仮説などを中心として、case-control study による COPD 関連遺伝子の探索がなされてきた（Ishii T and Sandford AJ, 2007）。

2009 年になり、白人において大規模なゲノム

ワイドでの遺伝子相関解析が COPD について行われ、ニコチン受容体の CHRNA3/5 のクラスター近傍の SNP との強い相関が示された (Pillai SG, et al. Plosgenetics, 2009; 5: e1000421)。同領域は肺癌についても 3 つのゲノムワイド遺伝子相関解析で相関が指摘されている (Thorgerirsson TE, et al. Nature, 2008; 452: 638-642. など)。本邦においては、ニコチン受容体と COPD との関連を検討した報告はなく、上記遺伝子クラスターについても関連性の検討はなされていない。

2. 研究の目的

本邦における慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 及びその他の喫煙関連呼吸器疾患 (肺癌、肺線維症など) について、明瞭な臨床データを伴った母集団として日本医科大学呼吸ケアクリニック、および東京都健康長寿医療センター 剖検病理科における連続病理解剖症例からの DNA サンプルを用いて、東京医科歯科大学 分子疫学とも協力し遺伝子多型解析により原因遺伝子を探索する。白人において喫煙感受性との関連の既報告が多く且つ COPD との関連がゲノムワイドでの解析で示されているニコチン受容体群 (CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4) に的を絞って、喫煙行動、COPD について肺の気腫化や気道病変の悪化、及び肺癌、肺線維症の合併との関連の検討を行う。

3. 研究の方法

- (1) サンプルの登録: COPD 群及び対象群の当研究への登録の継続・データ入力 (臨床及び病理情報)・DNA の抽出を、日本医科大学呼吸ケアクリニック及び東京都健康長寿医療センターのサンプルにて行う。
- (2) 遺伝子型決定を行う遺伝子多型 (TagSNPs) の選別: これらのサンプルについてニコチン受容体群 (CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4) に属する Tag SNP の遺伝子型決定を日本医科大学及び東京医科歯科大学分子疫学教室にて行う。CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 の約 100kb の領域から 15 個の Tag SNPs を選択 (図 1)。haploview ソフトウェア (<http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>) での計算から、 $MAF > 0.10$, $R^2 > 0.80$ の条件で Tag SNP を選定した。
- (3) ゲノム DNA 抽出: 日本医科大学 (木田、石井) においては、採血にて得られた血液サンプルを用い、日本医科大学生命科

学研究センターの呼吸器内科研究室において、QIAamp blood mini kit (Qiagen 社) によりゲノム DNA の抽出を行う。一方、東京都老人医療センター (当時、沢辺) 同センターにおいて、新規の日本人高齢者連続病理解剖症例について、病理解剖により採取した凍結腎組織からフェノール・クロロホルム法により genomic DNA を抽出した。

- (4) 遺伝子型決定: 7500Fast Real-time PCR System (日本医科大学) あるいは自動分注装置 biomek2000 を使用して 384well-plate へ DNA を分注後、リアルタイム PCR 装置 LightCycler480 (東京医科歯科大学 分子疫学) にて realtime PCR master mix および primer and probe を用い、主に TaqMan SNP Genotyping Assay システムを用いて遺伝子型決定を行った。
- (5) TagSNPs と疾患との関連解析: ニコチン受容体の遺伝子型と喫煙行動、COPD における肺の気腫化や気道病変の悪化、及び肺癌、肺線維症の合併との関連を、自治医科大学情報センター及び日本医科大学にて解析する。たとえば、肺気腫などについては、上記にて選択した TagSNPs と、肺気腫を反映する胸部 CT の low attenuation area (LAA)%, 呼吸機能検査での閉塞性障害を示す予測一秒率、喫煙量 (pack-years) との関連を分析した。肺気腫については、日本医科大学のサンプルについて 19 個の Tag SNP の genotyping をすべて行い、COPD のフェノタイプと有意相関があった SNP について健康長寿医療センターサンプルにて再現性の検討を行った。
- (6) 肺気腫との関連 SNP 及び遺伝子についての機能解析: COPD フェノタイプと関連を示した SNP と同遺伝子発現量との関連を、Corriell sample の既報告データをもとに、in silico で検討。Corriell sample は、Hapmap project (全ゲノムにわたる遺伝子多型を複数人種について網羅的に調査、データベース化したプロジェクト) に用いられたゲノム DNA およびその lymphoblastoid cell。同サンプルの遺伝子型は hapmap のサイト (<http://www.hapmap.org>) より、同サンプルにおける mRNA 発現量のデータは既報告 (Spielman RS, et al. Nat genet. 2007. 39 (2) 226-231) されたものを NCBI の Gene Expression Omnibus のサイトからダウンロードした (accession num. は

GSE5859)。そのうえで、Corrielの lymphoblastoid cells における CHRN3 の遺伝子型とその遺伝子発現との関係を in silico に検討した。CHRN3 の発現が、アポトーシスの抑制に A549 細胞にて寄与しているか否か検討。即ち、CHRN3 の発現を siRNA の transfection で低下させ、肺由来細胞 A549 細胞におけるアポトーシスの頻度を検討した。siRNA transfected A549 細胞において MMPs の発現に変化があるか realtime PCR により検討した。

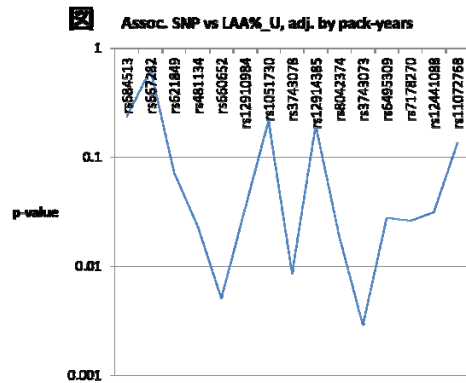
- (7) ニコチン受容体遺伝子の肺における発現状態の病理組織学的検討：ニコチン受容体の遺伝子型と肺気腫の程度が喫煙歴と独立に関連していることから、同遺伝子の機能を調べるべく肺における発現を病理学的に検討した（担当：沢辺）。

4. 研究成果

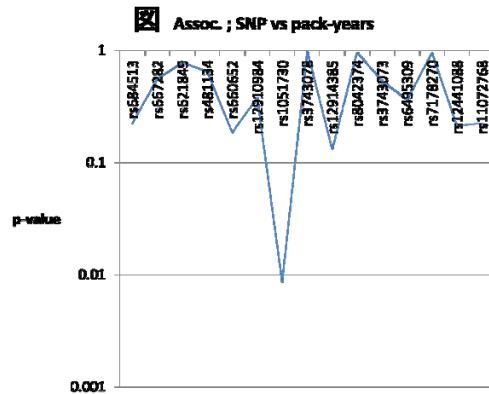
- (1) COPD 群及び対象群の当研究への登録及びゲノムDNA抽出：

日本医科大学（担当：木田、石井）においては、COPD 及び対照群で当初360例、最終年度には600例弱の症例のデータ収集及び血清サンプルの収集、またゲノムDNAの抽出が行われた。また、東京都健康長寿医療センター（担当：沢辺）においても、新規の病理解剖症例について臨床情報、病理情報のデータベースへの登録、及びゲノムDNAを抽出した。肺気腫150例強を含む、既喫煙者700例強の症例について by 法理学的データがありゲノムDNAを有する症例を確保することができた。

- (2) 遺伝子型の決定及び臨床データ（肺気腫を中心に）との相関解析：日本医科大学（担当：木田、石井）の COPD 247名を含む366名の喫煙者について検討。CHRN3-CHRNA3-CHRNA5に属する15個の Tag SNP の遺伝子型を決定。上肺野のLAA%とrs3743073は有意に関連（ $p = 0.0029$ ）、多重検定補正後も有意。



喫煙量（pack-years）と有意に関連する SNP は見出されなかった（既報告の rs1051730 と関連する傾向があった）。



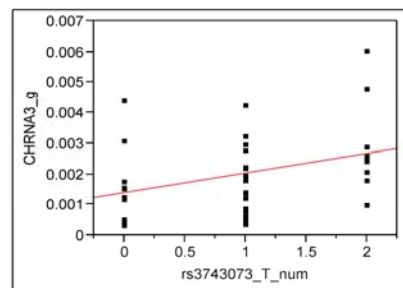
以上を、2011年5月に行われたアメリカ胸部疾患学会（ATS）にて発表。

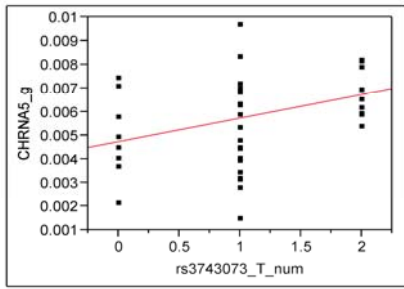
日本医科大学のサンプルにおいて肺気腫と関連が見られたCHRNA3遺伝子の2種類の多型について健康長寿医療センターの1536症例において呼吸器疾患との関連があるか検討した（担当：村松）。選択したSNPは、既にいくつかの論文で喫煙関連の肺がん遺伝子として同定され、中国人集団で特に非小細胞性肺がんに関連が強くみられ、本研究でも日本医大の母集団で肺気腫と関連の見られたCHRNA3遺伝子上にあるrs3743073（in intron4）多型と、韓国人集団では残念ながらCOPD（慢性閉塞性肺疾患）や肺気腫との優位な関連がみられなかったが、DLCOとは強い関連がみられたCHRNA3遺伝子の3'-UTR上に位置するrs660652多型の2種類である。まず肺疾患とこの2種類の多型の関連解析を行った。各SNPをgenotyping判定した結果、rs3743073多型はHardy-Weinberg平衡が保持（ $P = 0.063$ ）されていたが、

rs660652多型の判定結果は平衡が崩れていた(P = 0.014)。rs660652多型の判定結果では、各genotyping結果のなかでも minor allele homo genotyping群の頻度がHapMapの日本人集団の頻度と大きく異なっていたことから、タイピングエラーも考えられ、再験の必要があるだろう。Hardy-Weinberg平衡が保たれていたrs3743073多型のタイピング結果のみを解析に使用する事とし、臨床疾患情報、病情報、死亡時年齢、性別、喫煙歴、飲酒習慣等の情報と統合して、統計解析用のデータセットを作成した。この際、DNAが無いサンプルやTaqMan SNP Genotyping Assayが巧く行かなかったサンプルは除外対象とした。タイピング結果がある1353検体の解析用データセットは、統計解析用ソフトウェアSAS for Windows ver.9.2とSPSSを用いて、疾患との関連解析を行った。各解析結果は、死亡時年齢、性別、喫煙歴の有無で調整後のロジスティック回帰分析結果のP値が0.05未満の時に、統計学的に有意な結果が得られたと判断した。これまで発表された論文で関連が強く出ているCOPDとは、日本人高齢者連続剖検例の集団では統計学的に有意な結果が得られなかった[COPD: CC;CA vs. AA(reference), P = 0.255]。我々の集団は剖検例の集団であり、COPDの診断は生前のカルテ情報からの引用であり、正確なCOPDの診断がなされていなかったと考えられる。また、日本人高齢者集団ということで、死亡時平均年齢が約80歳と長寿であることも、日本医科大学のクリニック集団での結果を再現できなかった要因のひとつではないかと考えている。さらに、肺気腫とも統計学的に優位な関連はみられなかった[肺気腫: CC;CA vs. AA(reference), P = 0.252]。肺気腫においては、病学的診断にから、より正確な肺気腫の診断がおこなわれており、これがクリニック集団での結果を再現できなかった要因ではないかと考える。さらには、剖検例集団ということから、LAA%やCTのデータを持っていない為に、肺気腫の程度との関連を再現できなかったことが非常に残念であった。その一方で肺疾患以外の疾患と多型との関連をみても、病学的診断によるパーキンソン病とrs3743073多型に強い関連がみられた[CC vs.

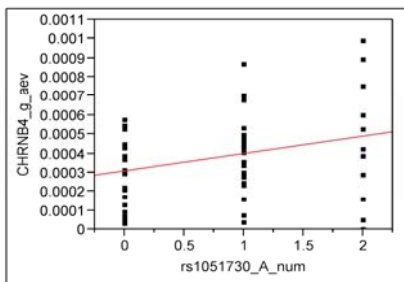
AA+AC(reference), OR=2.35, 95%CI;1.25-4.41, P=0.008]。パーキンソン病の約60%は喫煙がリスクだというメタアナリシスの報告がある。CHRNA3遺伝子を含むニコチン依存クラスター(CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4遺伝子)に変異を持つと喫煙常習となり1日の喫煙本数が多くなる事からパーキンソン病のリスクを上げるのではないかと考えられる。まとめると、日本医科大学のクリニックサンプル集団で、肺気腫と関連が認められたCHRNA3遺伝子のSNPのうちrs3743073多型とrs660652多型は、日本人の高齢者連続剖検例1536検体においては、COPDと肺気腫において、統計学的に有意な関連がみられなかった。

- (3) 遺伝子のハプロタイプと臨床データとの関連解析: 上記のすでに決定された遺伝子型をもとに、CHRNA4-CHRNA3-CHRNA5のクラスターにつきハプロタイプを決定、日本医科大学のサンプルでハプロタイプとCOPDとの関連を検討、統計的に有意な差みられず。ハプロタイプと肺気腫(LAA%)との関連もHaplotype Trend Regression (Zaykin et al., 2002)によって検討したが、いずれも有意差はみられなかった。(担当: 三重野)
- (4) 肺気腫との関連遺伝子についての機能解析: 日本医科大学のサンプルでLAA%と関連のあるSNPがCHRNA3, 5の発現量と関連があることをNCBIのデータベースを用いて検証したところ、In silicoでの検討では、Rs3743073のT alleleの数と、CHRNA3(上図), CHRNA5(下図)のmRNA発現量は日本人で、正の相関を認めた(p<0.05)





喫煙との関連が示唆されている
rs1051730は、白人ではCHRNA4のmRNA発現量との有意相関を認めた（下図）。



そこで、CHRNsの発現の肺由来細胞における機能解析を行った。CHRNの発現は、アポトーシスの抑制にA549細胞にて寄与、MMPsの発現に影響していなかった（realtime PCRによる検討）。（担当：木田、石井）

- (5) ニコチン受容体遺伝子の肺における発現
：ニコチン受容体の遺伝子型と肺気腫の程度が喫煙歴と独立に関連していることから、同遺伝子の機能を調べるべく肺における発現を病理学的に検討（担当：沢辺）。肺気腫症例において気管支上皮・肺胞壁・肺胞内マクロファージに発現を確認した。ニコチン受容体の遺伝子型と肺気腫の程度が喫煙歴と独立に関連していることから、同遺伝子の機能を調べるべく肺における発現を免疫病理学的に検討した（担当：沢辺）。肺気腫症例においてCHRNA3は気管支上皮・肺胞壁・肺胞内マクロファージに発現を確認した。気管支上皮では内腔側にリング状の特徴的な陽性所見を認めたため、免疫電顕を行ったところ、線毛の基底小体に強い陽性所見を認めた。なお扁平上皮化生部位では陽性所見を認めなかった。

以上より、CHRNA5及びCHRNA3の発現を変化させる機能的SNPは、pack-yearsと関連

はなく、肺気腫と有意に関連。ニコチンが喫煙量を介さず肺気腫形成に関与する可能性が示唆された。また、ニコチン受容体は脳だけでなく肺にも発現し、肺気腫形成に何らかの役割を担っている可能性も推測された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕（計 1 件）

Takeo Ishii, Kozui Kida他. Association between emphysema and genetic variations of CHRNA3. American Thoracic Society 2011 International Conference. 2011年5月, デンバー（アメリカ）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木田 厚瑞 (KIDA KOZUI)
日本医科大学・医学部・教授
研究者番号：90142645

(2) 研究分担者

石井 健男 (ISHII TAKEO)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：90445750

村松 正明 (MURAMATSU MASAOKI)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：50230008

沢辺 元司 (SAWABE MOTOJI)
東京医科歯科大学・その他の研究科・教授
研究者番号：30196331

三重野 牧子 (MIENO MAKIKO)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：60464707

(2) 連携研究者

新井 富生 (ARAI TOMIO)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・

研究員

研究者番号：20232019

池田 仁子 (IKEDA SHINOBU)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：20415508