

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 6 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590853

研究課題名（和文） 高地肺水腫の全ゲノムアソシエーションスタディ

研究課題名（英文） Whole genome association study in high-altitude pulmonary edema

研究代表者

花岡 正幸 (HANAOKA MASAYUKI)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：20334899

研究成果の概要（和文）：高地肺水腫既往者と健常登山家において、400 個のマイクロサテライトマーカーによる遺伝子解析と、tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3) 遺伝子の単塩基多型 (SNPs) 解析を行った。その結果、マイクロサテライト解析では、12 個のマーカーに統計学的な有意差を認め、このうち 9 マーカーは疾患感受性を、3 つは疾患抵抗性を示した。また、TIMP3 遺伝子の 6 個の SNPs 解析では、1 個の SNP (*rs130293*) に両群間で強い有意差を認めた ($P < 0.0005$)。高地肺水腫の発症には種々の遺伝子が関与する可能性が示唆され、特に TIMP3 遺伝子の変異が危険因子になると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is attempt to identify the candidate human genes those might associate with the development of high-altitude pulmonary edema (HAPE). A case-control association study was performed using 400 polymorphic microsatellite markers by PCR and sequenced by Gene Scan software in HAPE susceptible subjects and HAPE resistant subjects. Nine markers showed statistically significant associations with the susceptibility to HAPE, and three markers showed significant associations with the resistance to HAPE. We also evaluated the association of HAPE with six single nucleotide polymorphisms (SNPs) in tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3) gene, and found that one SNP (*rs130293*) was significantly associated with the HAPE susceptibility ($P < 0.0005$). This study provides the first evidence that the development of HAPE may be determined by the interaction of multiply genes and TIMP3 may influence the risk for HAPE.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	400,000	120,000	520,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：呼吸器内科学

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：高地肺水腫、遺伝子、マイクロサテライトマーカー、TIMP3、単塩基多型

1. 研究開始当初の背景

(1) 高地肺水腫の体質的素因

高地肺水腫は若年男性に多く、再発例が散見されるため、従来から体質的素因の存在が

指摘されていた。近年の我々の検討により、

- ① 高地肺水腫既往者は、低酸素、低圧および運動負荷により、健常者に比し有意な肺高血圧を呈する (Kawashima A, et al. *J Appl Physiol* 67: 1982-9, 1989)。
- ② 肺血流シンチグラムで、低酸素負荷により肺底部の血流が肺尖部に再分布する現象を認める (Hanaoka M, et al. *Circulation* 101: 1418-22, 2000)。
- ③ 心エコー検査で、右室の Tei index (心機能の客観的な指標で、高値になるほど心機能の低下を示す) が有意に増加する (Hanaoka M, et al. *Intern Med* 50: 2967-73, 2011)。

などの事実が証明され、低酸素は高地肺水腫既往者により高度な肺血管収縮と、それに伴う肺高血圧を引き起こすことが分かった。

(2) 高地肺水腫の分子遺伝学的検討

我々は高地肺水腫既往者の血液サンプルを用い、様々な分子遺伝学的検討を行ってきた。現在までに解析した遺伝子を以下に列挙する。

- ① Human leukocyte antigen (HLA) (Hanaoka M, et al. *Circulation* 97: 1124-1128, 1998)
- ② Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 遺伝子 (Droma Y, Hanaoka M, et al. *Circulation* 106: 826-30, 2002)
- ③ Tyrosine hydroxylase (TH) 遺伝子 (Hanaoka M, et al. *Chest* 123: 54-8, 2003)
- ④ Coagulation factor V (FV) 遺伝子 (Droma Y, Hanaoka M, et al. *High Alt Med Biol* 4: 497-498, 2003)
- ⑤ Renin-angiotensin system (RAS) 遺伝子 (Hotta J, Hanaoka M, et al. *Chest* 126: 825-30, 2004)
- ⑥ Vascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子 (Hanaoka M, et al. *Respirology* 14: 46-52, 2009)

この検討から、高地肺水腫の発症に遺伝的背景が存在する可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

高地肺水腫には体質的素因が存在するため、eNOS のような単一遺伝子が関与する可能性がある一方、低圧低酸素により惹起されるプロトタイプの肺水腫であるため、複合的な遺伝的要因が関与する可能性も指摘されている。本研究では全ゲノムの単塩基多型 (SNPs) 解析を行い、健常登山家と比較することで、高地肺水腫の候補遺伝子を絞り込む。さらに、候補遺伝子の SNPs 解析を行い、高地肺水腫との関連を確認する。また、高地肺水腫の病因や病態生理における役割を検討する。

3. 研究の方法

(1) 対象

高地肺水腫既往者 53 名 (男性 46 名/女性 7 名、平均年齢 34.2 歳) と、健常登山家 67 名 (男性 57 名/女性 10 名、平均年齢 37.6 歳) を対象とした。

(2) DNA の抽出

静脈血より QuickGene-800 (FUJIFILM) を用いて DNA を抽出し、匿名化ののち、冷凍保存した。QuickGene-800 で抽出が困難な場合はフェノール法を用いた。

(3) ゲノム網羅的遺伝子解析

得られた DNA を用い、400 個のマイクロサテライトマーカー (ABI PRISM® Linkage Mapping Set v2.5 MD10) による遺伝子解析を行った。各マーカーに対し、PCR 法で遺伝子を増幅した。さらに、シークエンサー (ABI PRISM® 3130 ジェネティックアナライザ) でシークエンス解析を行った。

(4) SNPs 解析

マイクロサテライトマーカーによる解析で高地肺水腫の発症に関与すると考えられた遺伝子に対して、HapMap project から日本人に有意な SNPs を選択し、TaqMan assay にて遺伝子タイピングを行った。

(5) 統計解析

統計解析には、 χ^2 乗検定を用いた。

4. 研究成果

(1) ゲノム網羅的遺伝子解析

マイクロサテライト解析では、12 個のマーカーに統計学的な有意差を認めた。このうち 9 マーカーは疾患感受性を、3 つは疾患抵抗性を示した (表 1)。

表 1 マイクロサテライトマーカーによる全ゲノム解析により有意差を認めたマーカー

Microsatellite markers	Chromosome	Odds ratio	χ^2 test	P	Pc
Susceptibility					
D1S2697	1p36.13	7.64	9.1190	0.0025	0.012
D1S468	1p36.32	3.32	8.9417	0.0028	0.025
D1S2785	1q43	3.13	8.1333	0.0044	0.039
D4S405	4p14	3.36	8.5390	0.0035	0.031
D5S424	5q13.3	2.17	7.9878	0.0047	0.032
D6S257	6p12.1	3.03	9.5599	0.0012	0.030
D12S368	6q13.13	2.83	7.4379	0.0064	0.045
D16S3103	13p12.3	29.27	13.191	0.0028	0.003
D21S263	21q22.11	20.28	9.1149	0.0025	0.035
Resistance					
D1S230	1p36.3	0.39	9.1073	0.0026	0.020
D14S283	14q11.2	0.44	8.4109	0.0037	0.045
D22S280	22q12.13	0.30	9.5209	0.0020	0.020

(2) 候補遺伝子の抽出

有意差が得られた 12 個のマイクロサテライトマーカーの前後 200 キロベースペアに存在する代表的な遺伝子を幾つかピックアップした (表 2)。

表 2 有意差を認めたマイクロサテライトマーカーの近傍に存在する遺伝子

Chromosome	locus	Symbols
1	D1S2697 D1S230	SPEN, ZBTB17, Ctorf64, HSPB7, CLCNKA, CLCNKB, FAM31C INADL
5	D5S424	F2R, F2RL1, S100Z, CHRBP
6	D6S257	COL21A1
12	D12S368	Keratin (KRT) genes
14	D14S283	T cell receptor alpha variable (TRAV) genes
16	D16S3103	XYLT1
21	D21S263	Keratin associated protein (KRTAP) genes
22	D22S280	TIMP3, SYN3

(3) 候補遺伝子の絞り込み

候補遺伝子のうち、高地肺水腫の発症に関連する可能性のある遺伝子として tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3) に注目した。TIMP3 遺伝子は、22 番染色体短腕に存在し、マイクロサテライトマーカー“D22S280”はこの遺伝子内に存在した。TIMP3 は、肺の構造や恒常性の維持への関与が報告されている。

(4) TIMP3 遺伝子の SNPs 解析

TIMP3 遺伝子の 6 か所の SNPs を解析したところ、1 個の SNP“rs130293”について、両群間で有意差を認めた (表 3)。

表 3 高地肺水腫と TIMP3 遺伝子多型との関連

SNP	Observed Allele (1/2)	Frequency Allele1		OR (95%CI) (1/2)	P value (1/2)
		HAPE-s	HAPE-r		
rs738992	C/T	0.481	0.515	0.87 (0.52-1.46)	0.60
rs130287	A/G	0.736	0.776	0.80 (0.44-1.45)	0.47
rs130293	C/T	0.057	0.216	0.22 (0.09-0.55)	0.00049
rs715572	G/A	0.721	0.746	0.88 (0.49-1.57)	0.66
rs2071947	C/T	0.577	0.627	0.81 (0.48-1.37)	0.43
rs9862	C/T	0.660	0.627	0.98 (0.57-1.68)	0.95

95% CI: 95% confidence interval; OR: odds ratio.
P value was calculated by Chi-square test (2 × 2 contingency table) for each allele

(5) TIMP3 遺伝子のハプロタイプ解析

TIMP3 遺伝子の 4 つのハプロタイプを解析したところ、ハプロタイプ 3 (CAC) について両群間で有意差を認めた (表 4)。

表 4 4 つの主要なハプロタイプの頻度

Number of haplotype#	SNPs			Frequency		p*
	rs738992	rs130287	rs130293	HAPE-s	HAPE-r	
1	T	A	T	0.514	0.477	0.565
2	C	G	T	0.254	0.224	0.584
3	C	A	C	0.056	0.208	0.0008
4	C	A	T	0.165	0.083	0.0511

Abbreviations: HAPE-s= subjects susceptible to high-altitude pulmonary edema; HAPE-r= subjects resistant to high-altitude pulmonary edema; SNPs = single nucleotide polymorphisms; A = adenine; C = cytosine; G = guanine; T = thymine
Number of haplotype was defined in this study
*P values were calculated by Chi-square test

(6) 考察

今回の検討で、複数のマイクロサテライトマーカーに有意差を認めたことから、高地肺水腫の発症に種々の遺伝子が関与する可能性が示唆された。特に、TIMP3 遺伝子の SNP とハプロタイプに有意差を認めたことから、TIMP3 の異常が高地肺水腫の発症に関与す

ると考えられた。今後、高地肺水腫の病態における TIMP3 の役割を調べることで、本症の発症機序の解明が期待される。

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)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Nobumitsu Kobayashi, Masayuki Hanaoka, Masao Ota, Fumiya Kinota, Yunden Droma, Michiko Ito, Masanori Yasuo, Yoshihiko Katsuyama, Hideki Asamura, Keishi Kubo. A Genome Wide DNA Microsatellite Association Study and Association of TIMP3 gene Polymorphism in Japanese Patients with High Altitude Pulmonary Edema (HAPE). 5th World Symposium of Pulmonary Hypertension, 2013.2.27, Nice, France
- ② 小林信光、花岡正幸、太田正穂、雲登卓瑪、伊東理子、勝山喜彦、小林俊夫、久保恵嗣. 高地肺水腫の分子遺伝学的検討. 第 32 回日本登山医学会学術集会、2012.6.16、福岡市
- ③ 堀内俊道、花岡正幸、太田正穂、小林信光、雲登卓瑪、伊東理子、勝山喜彦、小林俊夫、久保恵嗣. 高地肺水腫の分子遺伝学的検討. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会、2012.4.22、神戸市
- ④ Nobumitsu Kobayashi, Masao Ota, Masayuki Hanaoka, Yunden Droma, Yoshihiko Katsuyama, Keishi Kubo. A Genome wide DNA Microsatellite Association Study of Japanese Patients with High altitude pulmonary edema (HAPE). European Respiratory Society Annual Congress, 2011.9.28, Amsterdam, Holland
- ⑤ Nobumitsu Kobayashi, Masayuki Hanaoka, Masao Ota, Yunden Droma, Michiko Ito, Yoshihiko Katsuyama, Toshio Kobayashi, Hideki Asamura, Keishi Kubo. Genome Wide DNA Microsatellite Association Study of Japanese Patients with High Altitude Pulmonary Edema (HAPE). 2nd Congress of Asia Pacific Society for Mountain Medicine, 2011.8.22, Xining, China
- ⑥ 小林信光、太田正穂、花岡正幸、雲登卓瑪、伊東理子、勝山喜彦、浅村英樹、久保恵嗣. マイクロサテライト解析法による、日本人の高地肺水腫患者の遺伝学的検討. 第 31 回日本登山医学会学術集会、2011.6.11、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花岡 正幸 (HANAOKA MASAYUKI)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：20334899

(2) 研究分担者

太田 正穂 (OTA MASAO)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：50115333

伊東 理子 (ITO MICHIKO)
信州大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：60569812