

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461174

研究課題名(和文) Marfan型COPDの遺伝子レベルから見たECMの動態と革新的治療に向けた研究

研究課題名(英文) Investigation on pathogenesis and therapy of COPD with phenotypes of Marfan syndrome, especially on its relation to ECM malformation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：胸部動脈瘤合併型COPDは、Marfan症候群と類似し、細胞外基質蛋白(ECM)を介した経路の病態への関与が推定された。ECM関連遺伝子の一塩基多型(SNP)とヒト肺気腫との関連を母集団A(574名の喫煙者[352名のCOPDを含む])、母集団B(329名の喫煙者[258名のCOPDを含む])にて検討、LTBP4のcoding SNPsの一つrs1051303のGアレルの数が増加すると、母集団Aでは上肺野における肺気腫(CTで評価)が重度、母集団Bも同様( $p = 0.029$ 、及び $p = 0.038$ )。LTBP4が既報のマウスだけでなくヒト肺気腫の病態形成への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：COPD with thoracic aneurysm is similar to Marfan syndrome from the clinical point of view, and both diseases could have a common pathogenesis through extracellular (ECM) malformation. Thus, we hypothesized that ECM-related genes have critical roles in pathogenesis of emphysema and their genetic variations (single nucleotide polymorphisms (SNPs)) are associated with emphysema severity in human. Two populations were studied: population A comprised 574 smokers including 352 COPD, and population B comprised 329 smokers including 258 COPD. In population A, a G allele at SNP rs1051303 (one of the coding SNPs of LTBP4) was positively correlated with the low-attenuation area (LAA%) in the upper lung ( $p = 0.029$ ) in population A, and this relationship was validated in population B in one-sided test ( $p = 0.038$ ). LTBP4 might have a critical role in pathogenesis of emphysema in human. The pathogenetic mechanism related to LTBP4 remains to be elucidated.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 遺伝子多型 ECM マルファン症候群

1. 研究開始当初の背景

COPD(慢性閉塞性肺疾患: chronic obstructive pulmonary disease)は喫煙を主因とし、呼吸機能検査で非可逆性の閉塞性障害をきたす疾患である。肺気腫型、末梢気道病変型、易増悪型、併存症(動脈硬化症、骨粗鬆症、うつ病など)の合併の有無など数多くのフェノタイプの集まった症候群と考えられる。QOLや予後の悪いサブグループの抽出、遺伝子を含む原因特定、特化した治療の探索は急務である。COPDの死因の30%は心血管系に起因し、本研究グループの新井の検討においてもCOPDと大動脈瘤の関連に関し1189例の剖検例の解析では、肺気腫(+)群では大動脈瘤の併存率は13.3%(32/240)に対し、肺気腫(-)群では7.3%(69/949)(この大動脈瘤は腹部も含む)有意に肺気腫(+)群で動脈瘤との関連が認められた(東京都健康長寿医療センターのデータより: unpublished data)。よって、動脈瘤合併型COPDの病態解析と特化した治療探索が急務である。腹部大動脈瘤は加齢の影響が大きい、胸部大動脈瘤は遺伝的背景が強いとされ(Lindsay ME. Nature 2011)。特に胸部大動脈瘤合併型COPDの病態は遺伝子解析により明らかにできる可能性が高い。

TGF- $\beta$  は、細胞外基質蛋白 fibrillin や TGF- $\beta$  受容体の遺伝子変異のもと、線維化に参与する SMAD 以外の ERK などの細胞内情報伝達経路を介し、先天性遺伝子疾患 Marfan 症候群の動脈瘤、肺気腫形成に参与する事が示された(Holm TM.Science. 2011)。申請者は、collagen, elastin, fibrillin の cross-linkage に関わる lysyl oxidase (LOX) の選択的阻害剤により幼若ラットに肺気腫を形成(Kida K. Am J Pathol 1981), 成熟後も改善せず(Kida K. Am Rev Respir Dis 1980)、大動脈瘤も高率に発症、しばしば破裂し急死することを確認している。これは、Marfan 症候群と病態が類似、fibrillin-TGF- $\beta$  経路の病態への関与が疑わしい。

COPD への自己免疫の関与が示唆され(Rinaldi M. Thorax. 2012)、elatin, collagen だけでなく抗 fibrillin 抗体関与の可能性もある。fibrillin-TGF- $\beta$  経路にクロスリンクするアンギオテンシン(ANG)経路の AT1 受容体拮抗薬は動脈瘤合併型 COPD の進行を抑制する(Habashi JP. Science. 2011)。

TGF- $\beta$  経路と COPD の関連については、マウスで TGF- $\beta$  受容体の糖鎖修飾から TGF- $\beta$  経路の制御を変化させる蛋白 FUT8 の遺伝子とヒト肺気腫や COPD の進行の関連を報告(Kida K. J Hum Genet 2012; Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012) TGF- $\beta$  の血清濃度と COPD の重症度との関連を見出している(Kida K. Geriat.

Gerontol. Int. in revision) COPD の病態形成に TGF- $\beta$  が関与している可能性が高く、新規治療開発のためにもメカニズムの解明が急務である。

2. 研究の目的

慢性閉塞性肺疾患 (COPD)は症候群であり、予後が悪いサブグループに特化した治療を行うべきである。COPD の死因の 30%は心血管系に起因し、両者の接点が極めて重要な課題である。胸部動脈瘤合併型 COPD はしばしばみられ(図1を参照) 病態は Marfan 症候群と類似し、細胞外基質蛋白 fibrillin、TGF- $\beta$  を介した経路の病態への関与が推定される。

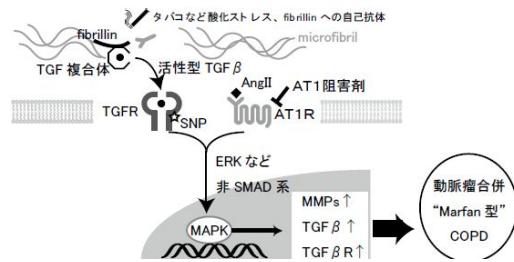


図1

COPD では自己免疫が関与する可能性から、抗 fibrillin 抗体の関与も想定される。fibrillin-TGF- $\beta$  経路にクロスリンクするアンギオテンシン(ANG)経路への AT1 受容体拮抗薬は動脈瘤合併型 COPD 進行を抑制する可能性がある。"Marfan 型 COPD" への fibrillin-TGF- $\beta$ -ANG 経路の関与と新規治療を検討する事が研究目的である。即ち、Marfan 型 COPD と、fibrillin・TGF- $\beta$  受容体・AT1 受容体の機能的遺伝子多型、血清 ANG 濃度との関連を検討する。

Marfan 型 COPD と抗 fibrillin 抗体及び fibrillin 反応性 T 細胞などとの関連を検討する。

連続剖検例の肺気腫、大動脈瘤合併症例について、免疫染色により病変部位における fibrillin-TGF- $\beta$ -ANG 経路の活性化の有無、fibrillin への自己免疫反応の有無を検討する。

3. 研究の方法

Marfan 型 COPD と、fibrillin・TGF- $\beta$  受容体・AT1 受容体の機能的遺伝子多型、血清 ANG 濃度などとの関連の検討: Fibrillin (FBN1), lysyl oxidase (LOX) 及び Latent TGF- $\beta$  binding protein-4、TGF- $\beta$  受容体 (TGFB1, TGFB2, TGFB3)、AT1 受容体 (AGTR1) の遺伝子多型の Marfan 型 COPD (胸部 CT 上、大動脈拡張が認められる COPD) への関連を検証する。遺伝子型を日本医科大学の COPD

350 症例 at risk 症例 250 例について決定、Marfan 型 COPD との関連を検証する。疾患との有意な関連の認められた遺伝子多型について随時、慶應義塾大学の COPD 350 症例 at risk 症例 250 例、また東京都健康長寿医療センターの連続剖検例 2200 例で遺伝子型決定。肺気腫及び動脈瘤の罹患との関連を検討、遺伝子型と疾患の関連の再現性をみる。血清 ANG および fibrillin fragment 濃度を決定するための ELISA の系の作成を進め、可能になった時点で日本医科大学及び慶應義塾大学にて、血清 ANG 濃度、血清 fibrillin fragment 濃度を測定し、肺気腫、大動脈瘤との関連の有無を調べる。

Marfan 型 COPD と抗 fibrillin 抗体及び fibrillin 反応性 T 細胞などとの関連の検討:抗 fibrillin 自己抗体を測定するための ELISA の系を作成。末梢血から T 細胞を磁気ビーズで抽出、fibrillin を添加し interferon などの産生を Enzyme-Linked ImmunoSpot で測定する系を作成。可能になった時点で、血清中の抗 fibrillin 自己抗体が、Marfan 型 COPD 患者で上昇しているか検討。末梢血由来 T 細胞の fibrillin 反応性が Marfan 型 COPD 患者で上昇しているか検討。

連続剖検例の肺気腫、大動脈瘤合併症例について、病変部位における fibrillin-TGF- $\beta$ 1-ANG 経路の活性化の確認、fibrillin への自己免疫反応の有無の検討:肺気腫の重症度は平均肺胞径 (mean linear intercept) など客観的指標により評価する。抗 fibrillin 抗体を用いて、fibrillin が肺気腫の部位で低下しているか調べる。LTBP4 も同様の検索を行う。抗 TGF- $\beta$ 1 抗体を用いて、肺気腫の部位で TGF- $\beta$ 1 の発現が増えていること、fibrillin や LTBP4 の発現と逆相関にあることを確認する。抗リン酸化 ERK 抗体にて、ERK の経路の活性化を確認。抗 TGF- $\beta$ 1 受容体抗体、また抗 ANG 受容体抗体を用い、同一細胞に共発現していることを確認する。また、Fibrillin, LOX などへの IgG 抗体の沈着、Fibrillin, LOX と自己抗体による複合体がみられるか検討する。

#### 4. 研究成果

LTBP4 遺伝子の一塩基多型 (SNP) とヒト肺気腫との関連を検討した。呼吸機能検査及び胸部 CT を行っている 2 つの母集団を用いた。母集団 A (日本医科大学呼吸ケアクリニック) は 574 名の喫煙者で、352 名の COPD 症例を含む。母集団 B (慶應義塾大学付属病院) は 329 名の喫煙者で、258 名の COPD 症例

を含む。LTBP4 の coding SNPs の遺伝子型と、胸部 CT から算出した low-attenuation area (LAA%) で示される肺気腫の重症度との関連を、年齢・性別・pack-years にて補正し、回帰分析にて検討した。

LTBP4 遺伝子の SNP rs1051303 の G アレルの数が増加すると、母集団 A では上肺野における LAA% が有意に高く (図 2 を参照)。

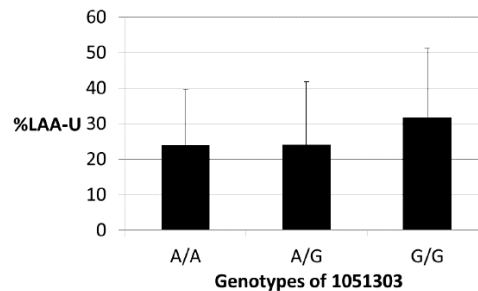


図 2

母集団 B の LAA% も G アレルが高いとする片側検定において有意であった (図 3 を参照)) ( $p = 0.029$ 、及び  $p = 0.038$ )。

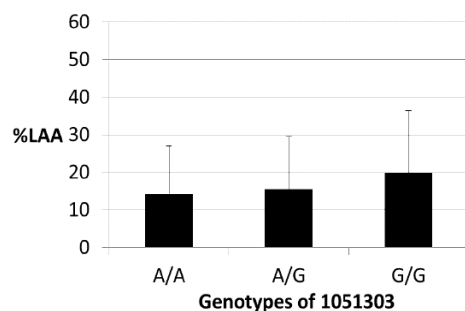


図 3

Latent TGF- $\beta$ -binding protein-4 (LTBP4) は、ノックアウトマウスは肺気腫を形成し、同遺伝子の変異で肺気腫合併例を含むヒトの皮膚弛緩症がみられる。しかし、ヒト肺気腫の病態と同遺伝子の関連は不明であった。LTBP4 がマウスだけでなくヒトの肺気腫の病態形成に関与することが示唆された。

本 SNP と細胞における LTBP4 遺伝子の発現量との関係を調べるため、hapmap database

(<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) で示されており且つゲノムワイドに遺伝子発現量が public database で提示されている (the data series of GSE5859 (based of the following ref; Spielman RS, et al. Nat Genet 2007 Feb; 39(2):226-31.) in Gene Expression Omnibus database

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> ) )  
lymphoblastoid cells について、LTBP4 の遺  
伝子型と遺伝子発現量の関連を in silico に  
検討したが、有意な関係を見出すことはでき  
なかった。肺由来細胞における遺伝子型  
と遺伝子発現との関連 遺伝子型が換わる  
ことになる淡白最終産物の効果の変化につ  
いての検討 LTBP4 蛋白についてTGFB 蛋白の  
キャリアーだけでなくエラスチンファイバ  
ーのアセンブリを整える役割がこの数年指  
摘されているが、その検討、などが今後のメ  
カニズム解明の方法として考えられる

末梢血液中における Ang,  
fibrillin 濃度の測定方法などの ELISA の系  
の確立は遅れている。TGF- の発現量を含む  
末梢肺におけるメカニズム解明のための免  
疫染色は、適宜進められている。

#### 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 2 件)

1. 石井 健男、中鉢 正太郎、佐々木 衛、  
別役 智子、新井 富生、弦間 昭彦、  
木田 厚瑞。弾性線維形成関連蛋白  
LTBP4 の遺伝子多型と肺気腫重症度と  
の関連. 第 56 回日本呼吸器学会学術講  
演会(2016 年 4 月 8 日、京都にて開催さ  
れた同学会にて発表)
2. Takeo Ishii, Shotaro Chubachi,  
Mamoru Sasaki, Tomio Arai, Tomoko  
Betsuyaku, Akihiko Gemma, Kozui  
Kida. The association between  
emphysema and genetic variations of  
LTBP4, a protein related to the  
formation of elastic fiber assembly.  
2016 ATS International Conference.  
(2016 年 5 月 16 日、サンフランシスコ  
(米国)で開催の同学会で発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 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

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

別役 智子 (Betsuyaku, Tomoko )  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授  
研究者番号：60333605

石井 健男 (Ishii, Takeo )  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号：90445750

##### (3)連携研究者

なし