

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590887

研究課題名（和文） 肺気腫の発症に関与する遺伝子の解明

研究課題名（英文） Study of genetic contribution to the development of emphysema

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：慢性閉塞性肺疾患（COPD）は人口の高齢化が進むにつれ増加し、2020年には全世界の死亡原因の第3位になると予想されている。COPDの発症機序はいまだ不明であるが、全喫煙者のうち約15%が発症するという事実は、本症における遺伝的素因の存在を示唆する。本研究ではCOPDの臨床病型のうち日本人に頻度が高い肺気腫に焦点をあて、transforming growth factor beta 1（TGF- β 1）遺伝子とToll-like receptor 4（TLR4）遺伝子の多型を解析した。その結果、これら遺伝子の幾つかの一塩基多型（single nucleotide polymorphisms；SNPs）が肺気腫と有意に関連することを見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：COPD、肺気腫、呼吸機能、遺伝子多型、PCR、TGF- β 1、Toll-like receptor 4

1. 研究開始当初の背景

COPDは現在世界の全死因中第6位を占めるが、2020年には第3位になると予想されており、今後患者の急増が見込まれている。さらに日本人の40歳以上の有病率は8.5%と報告されており、非常に高い頻度を示している。COPDが喫煙習慣と関連することは事実であるが、その発症機序はいまだ不明である。しかし、全喫煙者のうち一部が本症を発症するという事実は、COPDに対する疾患感受性個体の存在を示唆する。ある特定の遺伝的背景、

すなわち遺伝子異常を有する個体が、慢性の喫煙刺激によりCOPDへ移行する可能性が高い。

(1) 肺気腫と transforming growth factor beta 1（TGF- β 1）遺伝子多型との関連

TGF- β 1は、種々の細胞の増殖・分化、細胞外マトリックス産生、アポトーシス、さらに免疫機能に関与するサイトカインで、TGF- β 1の活性を制御する integrin subunit β 6の欠損マウスモデルでは、TGF- β 1活性化

の欠如、matrix metalloproteinase-12 (MMP-12)の産生増加、elastinの分解を認め、加齢に伴い気腫化が進行するが、integrin subunit B6を遺伝子導入するか、TGF- β 1遺伝子を活性化させると気腫化を認めず、TGF- β 1には肺の気腫化を防止する働きがあると考えられている。一方、interleukin-13の遺伝子導入マウスモデルでは、MMP-9依存性のTGF- β 1の活性化と末梢気道の線維化が認められ、TGF- β 1が気道のリモデリングに関与することが示唆されている。以上から、TGF- β 1は、肺実質における気腫性変化と、気道におけるリモデリングの双方に関与している可能性がある。

(2) 肺気腫と Toll-like receptor 4 (TLR4) 遺伝子多型との関連

TLR4 ノックアウトマウスモデルでは、NADPH酸化酵素の活性化によって活性酸素産生が増加し、エラスチン分解が促進することにより、加齢に伴う気腫性変化を来す。このマウスモデルをNADPH阻害薬等で治療すると、気腫性変化がおこらない。一方、気道細胞にTLR4を過剰発現させたマウスモデルでは、高濃度酸素刺激によるI型・II型肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージのアポトーシスが野生型と比較して有意に低下することが報告されており、TLR4が酸化ストレスから肺を防御し、気腫化を抑制する可能性が示唆されている。以上から、TLR4が肺気腫の発症・重症度に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

COPDの中で肺気腫に注目し、TGF- β 1遺伝子およびTLR4遺伝子に存在する複数のSNPsの遺伝子頻度について喫煙歴のある対照群と比較検討し、日本人における肺気腫と両遺伝子との関連を検討する。また、COPD群における呼吸機能検査データとSNPsとの関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) 肺気腫と transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) 遺伝子多型との関連

肺気腫群70例、対照群99例の血液サンプルより、QIA amp® DNA Blood Mini kit (QIAGEN, Tokyo)を用いてDNA抽出を行った。TGF- β 1の8つのSNPs(promoter region: *rs2241712*, *rs1982072*, *rs1800469*; exon1: *rs1982073*; intron2: *rs2241716*, *rs4803455*; 3' genomic region: *rs6957*, *rs2241718*)について、TaqManプローブとリアルタイムPCRシステム(ABI7500リアルタイムPCR)を用いて遺伝子タイピングを施行した。Mann-Whitney U testを用いて患者背景を

比較、Chi-square testを用いて各SNPsの遺伝子頻度を比較検討した。Logistic regressionを用いて肺気腫群、対照群の年齢・性別・喫煙歴を補正し、SNPsと肺気腫との関連を検討した。Pair-wise linkage disequilibrium (LD)に基づきハプロタイプ構造を解析し、肺気腫群と対照群でその頻度を比較検討した。さらに肺気腫群において、呼吸機能データとSNPsとの相関をlogistic regressionを用いて検討した。

(2) 肺気腫と Toll-like receptor 4 (TLR4) 遺伝子多型との関連

COPD群151例、対照群98例の血液サンプルより、QIA amp® DNA Blood Mini kit (QIAGEN, Tokyo)を用いてDNA抽出を行った。TLR4の4箇所のSNPs(promoter region: *rs10759930*, exon3: *amino acid 299*, 3' genomic region: *rs11536889*, *rs7037117*)について、TaqManプローブとリアルタイムPCRシステム(ABI7500リアルタイムPCR)を用いて遺伝子タイピングを施行した。Mann-Whitney U testを用いて患者背景を比較、Chi-square testを用いて各SNPsの遺伝子頻度を比較検討した。また、肺気腫群71例と対照群98例の遺伝子頻度について同様の比較を行った。COPD群、肺気腫群における呼吸機能データとSNPsの相関について、logistic regressionを用いて年齢・性別・喫煙歴を補正し、検討した。

4. 研究成果

(1) 肺気腫と transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) 遺伝子多型との関連

本研究の対照群は50歳以上で抽出したが、肺気腫群と比較し、低年齢で喫煙指数が低いという結果になった。各SNPsの遺伝子頻度は、Chi-square testでは肺気腫群と対照群で有意差を認めなかったが、年齢・性別・喫煙歴を補正すると、肺気腫と*rs6957*, *rs2241718*との間に相関を認めた (additive genetic model および dominant genetic model: $p < 0.05$)。また、promoter regionの*rs2241712*, *rs1982072*, *rs1800469*, exon1の*rs1982073*、intron2の*rs2241716*, *rs4803455*は相互に強いLDを示し、3' genomic regionの*rs6957*, *rs2241718*も相互に強いLDを示した。Common haplotypeの検討では、haplotype3の頻度について肺気腫群、対照群間で有意差を認めた ($p < 0.05$)。一方、肺気腫群における呼吸機能検査データの中で、気管支拡張薬吸入後の%FEV_{1.0}と*rs1800469*, *rs1982073*に相関を認めた ($p < 0.05$)。

今回の検討で、TGF- β 1遺伝子の3' genomic regionにおける2つのSNPs

(*rs6957*, *rs2241718*) と肺気腫、promoter region における *rs1800469* および exon1 における *rs1982073* と気管支拡張薬吸入後の%FEV_{1.0}との間に相関関係を認め、日本人における肺気腫の発症に TGF-β1 遺伝子多型が関与する可能性が示唆された。

白人種においては、Celodon らが Boston Early-Onset COPD 研究の家系調査で、%FEV_{1.0}と *rs2241712*, *rs6957*, *rs2241718*に相関を認め、National Emphysema Treatment Trial の症例対象研究では、*rs2241712*, *rs1800469*, *rs1982073*と肺気腫を有する重症 COPD に関連を認めたと報告されており、白人と日本人との間で関連する SNPs が異なるという結果であった。これは、主に人種による遺伝的異質性が影響していると考えられた。ハプロタイプ構造について、白人では *rs2241712*, *rs1800469* と *rs1982073*の間で中等度の LD を示したのに対し、日本人ではいずれも強い LD を示した。また common haplotype の頻度についても、日本人では haplotype1 : 0.25、haplotype2 : 0.48、白人では haplotype1 : 0.41、haplotype2 : 0.23 と両人種間で相違を認め、遺伝的異質性が示唆された。一方、日本人と人種的に近い韓国人においては、COPD と *rs2241712*, *rs1800469*, *rs1982073*に関連を認めなかったと報告されており、今回の検討と一致する結果であった。

TGF-β1 遺伝子多型のうち、*rs1800469*, *rs1982073*は TGF-β1 産生に関与することが報告されているが、今回肺気腫と関連を認めた *rs6957*, *rs2241718*については、その機能が解明されておらず、今後の検討が必要と考えられた。

(2) 肺気腫と Toll-like receptor 4 (TLR4) 遺伝子多型との関連

本研究の対照群は 50 歳以上で抽出したが、肺気腫群と比較し、低年齢で喫煙指数が低いという結果になった。*Amino acid 299* における多型については、今回検討したすべてのサンプルで AA の homozygote であった。COPD 群と対照群で各 SNPs の遺伝子頻度に有意差を認めなかったが、肺気腫群でサブ解析を行うと、3' genomic region における *rs11536889* の遺伝子頻度に有意差を認めた。さらに、COPD 群、肺気腫群で%TLC(total lung capacity)と promoter region における *rs10759930* に相関 ($p = 0.043$ および $p = 0.015$) を認めた。また、有意差は認めなかったものの、COPD 群、肺気腫群で気流制限を示す各因子と *rs10759930*, *rs11536889* が相関する可能性が考えられた。

今回の検討で、3' genomic region における *rs11536889* と肺気腫、promoter region における *rs10759930* と%TLC との間に有意

な相関関係を認め、*rs10759930*, *rs11536889* と気流制限が相関する傾向を認めた。

今回解析した TLR4 の SNPs の中で、*amino acid 299* における多型では、アスパラギン酸 (Asp) からグリシン (Gly) へアミノ酸が変化することによって、TLR4 の細胞外ドメインの構造変化を来すことが知られている。*Gly* アリルの保持者は、LPS への反応性の低下や炎症性サイトカインの産生低下、重症感染症のリスク増加が報告されており、ドイツ人では COPD 群で *Gly* アリル保持者が少なかった。また、イギリスのグループは、喫煙者においてこの多型と 1 秒量との間に有意な相関を認めなかったと報告している。今回の解析では、すべての対象者において機能変化を伴う *Amino acid 299* に変異を認めなかった。その他の SNPs については、検索した範囲内では COPD との関連を解析した報告はなく、その機能についても不明で、どのような機序で COPD に関与しているのか今後の検討が必要と考えられた。

【本課題の成果における結論】

日本人における肺気腫の発症に、transforming growth factor beta 1 と Toll-like receptor 4 の遺伝子多型が関与する可能性がある。

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 2 2 件)

(1) Hanaoka M, Droma Y, Ota M, Ito M, Katsuyama Y, Kubo K. Polymorphisms of human vascular endothelial growth factor gene in high-altitude pulmonary edema susceptible subjects. *Respirology* 2009; 14: 46-52, 査読有

(2) Chen Y, Hanaoka M, Chen P, Droma Y, Voelkel NF, Kubo K. Protective effect of beraprost sodium, a stable prostacyclin analog, in the development of cigarette smoke extract-induced emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 296(4): L648-56, 査読有

(3) 花岡正幸、久保恵嗣. COPD の治療—増悪時. *臨床と研究* 第 86 巻第 2 号 第 19 頁～第 22 頁 2009 年 査読無

(4) Hanaoka M, Yu X, Urushihata K, Ota M, Fujimoto K, Kubo K. Leptin and leptin receptor gene polymorphisms in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*

2008; 133: 79-85, 査読有

(5) Ideura G, Agematsu K, Komatsu Y, Hatayama O, Yasuo M, Tsushima K, Hanaoka M, Koizumi T, Fujimoto K, Kubo K. Selective IgM deficiency accompanied with IgG4 deficiency, dermal complications and a bronchial polyp. *Allergol Int* 2008; 57: 99-105, 査読有

(6) Yasuo M, Ito M, Kobayashi Y, Tsushima K, Hanaoka M, Koizumi T, Kubo K. Primary tracheal adenoid cystic carcinoma with malignant pleural effusion. *Intern Med* 2008; 47: 475, 査読有

(7) Chen Y, Chen P, Hanaoka M, Huang X, Droma Y, Kubo K. Mechanical ventilation in patients with hypoxemia due to refractory heart failure. *Intern Med* 2008; 47: 367-73, 査読有

(8) Droma Y, Hanaoka M, Basnyat B, Arjyal A, Neupane P, Pandit A, Sharma D, Ito M, Miwa N, Katsuyama Y, Ota M, Kubo K. Adaptation to high altitude in sherpas: association with the insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene. *Wilderness Environ Med* 2008; 19: 22-9, 査読有

(9) Matsubara M, Yasuo M, Tanabe T, Tsushima K, Urushihata K, Yamamoto H, Hanaoka M, Koizumi T, Fujimoto K, Kubo K, Yamazaki Y, Uehara T. Pleomorphic adenoma with an endobronchial resection. *Intern Med* 2008; 47: 1117-20, 査読有

(10) Urushihata K, Koizumi T, Hanaoka M, Fujimoto K, Kubo K, Kobayashi T, Fujii T. Reduced lung uptake of Iodine-123 metaiodobenzylguanidine in high-altitude pulmonary oedema. *Respirology* 2008; 13: 897-902, 査読有

(11) Hanaoka M, Ideura G, Ito M, Urushihata K, Koizumi T, Fujimoto K, Kubo K. Pulmonary haemodynamic changes in patients with severe COPD. *Respirology* 2008; 13: 919-922, 査読有

(12) Ito M, Hanaoka M, Droma Y, Hatayama O, Sato E, Katsuyama Y, Fujimoto K, Ota M. The association of transforming growth factor beta 1 gene polymorphisms with the emphysema

phenotype of COPD in Japanese. *Intern Med* 2008; 47: 1387-94, 査読有

(13) Tanabe T, Yasuo M, Tsushima K, Urushihata K, Yamamoto H, Hanaoka M, Koizumi T, Fujimoto K, Yamazaki Y, Hirose Y, Hamano H, Sakurai A, Kubo K. Mediastinal seminoma in a patient with multiple endocrine neoplasia type 1. *Intern Med* 2008; 47: 1615-9, 査読有

(14) 伊東理子、花岡正幸、Yunden Droma、漆畑一寿、安尾将法、小松佳道、藤本圭作、久保恵嗣、太田正穂。COPD と Toll-like receptor 4 遺伝子多型との関連。厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 呼吸不全に関する調査研究 平成 19 年度研究報告書 第 29 頁～第 32 頁 2008 年 3 月 査読無

(15) 花岡正幸、浅川俊、西村良平、川崎洋一郎、漆畑一寿、久保恵嗣。長野県中学校集団登山における疾病発生状況。信州医学雑誌 第 56 巻第 3 号 第 133 頁～第 140 頁 2008 年 査読有

(16) 中川佐和子、吾妻俊彦、横山俊樹、牛木淳人、田名部毅、安尾将法、山本洋、花岡正幸、小泉知展、藤本圭作、久保恵嗣、権名隆之、近藤竜一、吉田和夫、浅野功治、山崎善隆。孤立性肺腫瘍陰影を呈し CA19-9 が高値を示した非結核性抗酸菌症の 1 例。信州医学雑誌 第 56 巻第 6 号 第 365 頁～第 370 頁 2008 年 査読有

(17) 花岡正幸。呼吸の生理 ⑧高地環境での呼吸生理。呼吸 第 27 巻第 12 号 第 1157 頁～第 1163 頁 2008 年 査読無

(18) Ideura G, Hanaoka M, Koizumi T, Fujimoto K, Shimojima Y, Ishii W, Matsuda M, Ikeda S. Interstitial lung disease associated with amyopathic dermatomyositis: Review of 18 cases. *Respir Med* 2007; 101: 1406-1411, 査読有

(19) Komatsu Y, Hanaoka M, Ito M, Yasuo M, Urushihata K, Koizumi T, Fujimoto K, Kubo K. Unilateral absence of the pulmonary artery incidentally found after an episode of hemoptysis. *Intern Med* 2007; 46: 1805-8, 査読有

(20) Droma Y, Hanaoka M, Ito M, Kubo K. Genetic contribution of the endothelial nitric oxide synthase gene to high-altitude adaptation in Sherpas. *Jpn J Mount Med*

2007; 27: 61-68, 査読有

(21) Hanaoka M, Droma Y, Koizumi T, Fujimoto K, Kobayashi T, Kubo K. Susceptibility to high-altitude pulmonary edema. Ge R, Hackett P (ed), Life on the Qinghai-Tibetan plateau. pp47-55, Peking University Medical Press, Beijing, 2007, 査読無

(22) 海老澤聡一朗、山崎誓一、安尾将法、漆畑一寿、津島健司、花岡正幸、小泉知展、藤本圭作、久保恵嗣。広範囲かつ多発性肝転移で発見された非セミノーマ型胚細胞性腫瘍の1例。日本呼吸器学会雑誌 第45巻第4号 第318頁～第323頁 2007年4月 査読有

〔学会発表〕(計10件)

(1) 花岡正幸、北口良晃、藤本圭作、久保恵嗣、Voelkel NF. 自己免疫性肺気腫モデルにおける耐性誘導。日本呼吸器学会学術講演会(2008年6月、神戸)

(2) 伊東理子、花岡正幸、安尾将法、田名部毅、吉川純子、小松佳道、藤本圭作、久保恵嗣。COPDとToll-like receptor 4遺伝子多型との関連。日本呼吸器学会学術講演会(2008年6月、神戸)

(3) 花岡正幸、于秀軍、小松佳道、漆畑一寿、太田正穂、藤本圭作、久保恵嗣。閉塞性睡眠時無呼吸症候群におけるレプチンおよびレプチン受容体の遺伝子多型の検討。日本呼吸ケア・リハビリテーション学会(2007年11月、東京)

(4) 塩谷美保、浅和照子、伊井亜佐美、荒井瞳、小松佳道、漆畑一寿、花岡正幸、藤本圭作、久保恵嗣。信州大学医学部附属病院受診者におけるCOPDの実態調査。日本呼吸ケア・リハビリテーション学会(2007年11月、東京)

(5) 雲登卓瑪、花岡正幸、伊東理子、太田正穂、久保恵嗣、小林俊夫。シェルパ族の高地適応における内皮型一酸化窒素合成酵素遺伝子の関与。日本登山医学会(2007年6月、宮城蔵王)

(6) 伊東理子、花岡正幸、藤本圭作、安尾将法、小松佳道、北口良晃、久保恵嗣。肺気腫の発症要因とTransforming growth factor beta 1遺伝子多型。日本呼吸器学会学術講演会(2007年5月、東京)

(7) Hanaoka M, Lee JH, Nicolls M, Kraskauskas D, Voelkel NF, Taraseviciene-Stewart L. Immune tolerance in autoimmune emphysema. American Thoracic Society International Conference, San Francisco, May 2007.

(8) Ito M, Hanaoka M, Droma Y, Katsuyama Y, Ota M, Fujimoto K, Kubo K. Association of transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) gene polymorphisms with chronic obstructive lung disease (COPD) and emphysema phenotype. American Thoracic Society International Conference, San Francisco, May 2007.

(9) Ito M, Hanaoka M, Droma Y, Yasuo M, Tanabe T, Komatsu T, Katsuyama Y, Ota M, Fujimoto K, Kubo K. Toll like receptor 4 gene polymorphisms and COPD in Japanese population. American Thoracic Society International Conference, Toronto, May 2007.

(10) Kitaguchi Y, Taraseviciene-Stewart L, Kraskauskas D, Hanaoka M, Burns N, Kraskauskas V, Voelkel NF. Mechanism of acrolein-induced emphysema. American Thoracic Society International Conference, Toronto, May 2007.

〔図書〕(計2件)

(1) 花岡正幸. 高地肺水腫. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.9 呼吸器症候群(第2版) II—その他の呼吸器疾患を含めて— 第225頁～第228頁 2009年

(2) 花岡正幸. 血胸. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.10 呼吸器症候群(第2版) III—その他の呼吸器疾患を含めて— 第374頁～第376頁 2009年

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

藤本 圭作 (FUJIMOTO KEISAKU)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：70242691

太田 正穂 (OTA MASAO)

信州大学・医学部・講師

研究者番号：50115333

漆畑 一寿 (URUSHIHATA KAZUHISA)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60362125

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

伊東 理子 (ITO MICHIKO)

信州大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号：なし