

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16107

研究課題名（和文）ホモシステイン代謝異常がCOPD発症に関わる機序の検討

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism by which abnormal metabolism of homocysteine is involved in the development of COPD.

研究代表者

中野 寛之（Nakano, Hiroshi）

山形大学・医学部・医員

研究者番号：80637629

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：疫学研究では高島研究のデータを用いてメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（MTHFR）に関わる一塩基多形と呼吸機能検査所見の経年変化の関連について解析した。rs4846049, rs1476413, rs1994798, rs4846052において現喫煙者でメジャーホモ接合体を有する研究参加者ではマイナーホモ接合体やヘテロ接合体を有する研究参加者と比べて1秒量の経年低下率が有意に高かった。基礎研究ではCRISPR-Cas9を用いてMTHFR遺伝子ノックアウトマウスの作成した。繁殖にも成功し、喫煙曝露を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
世界的な死因となっている慢性閉塞性肺疾患の病因として喫煙感受性が存在する可能性が報告されているが、本研究結果はMTHFR遺伝子変異がその一因である可能性を示唆し、慢性閉塞性肺疾患の発症機序解明や治療と予防方法の開発の一助となり得る。

研究成果の概要（英文）：Epidemiological studies analyzed the association between single nucleotide polymorphisms involving methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and changes in respiratory function test findings over time using data from the Takahata study. In rs4846049, rs1476413, rs1994798, and rs4846052, study participants who were current smokers and major homozygotes had a significantly higher rate of decline in one second volume over time compared to study participants who were minor homozygotes or heterozygotes. In the basic study, MTHFR gene knockout mice were generated using CRISPR-Cas9. They were successfully bred and started smoking exposure.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 喫煙 呼吸機能 肺気腫 ホモシステイン 小胞体ストレス MTHFR アポトーシス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は喫煙が主たる原因であり、進行性の呼吸機能低下を特徴とする。病状の進行に伴い、呼吸不全と身体活動性の低下を来し死亡する。COPD は世界の死亡原因の上位を占めており、本邦においても社会的、経済的に大きな負荷となっている。COPD を発症するのは喫煙者の一部のみであり、その原因は解明されていない。当教室で行われた疫学研究で、男性の喫煙継続者において高ホモシステイン血症が経年的な呼吸機能低下に関与していることを報告した (Eur Respir J. 2013;42:18-27)。また、基礎研究において高ホモシステイン環境を誘導したところ、喫煙負荷による肺胞細胞の小胞体ストレスとアポトーシスを増加させること、実験動物において COPD の代表的な病理所見である肺気腫がより強く誘導されることを示した (Sci Rep. 2022;12:12968)。成人における高ホモシステイン血症の原因としては、ビタミン B6 や B12、葉酸の摂取といった食事の関与も指摘されているが、ホモシステイン代謝に関わる酵素の遺伝子変異による葉酸代謝異常が報告されている。中でもメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) 遺伝子変異による葉酸代謝異常の頻度は比較的高いことが知られている (Curr Med Chem. 2019;26:2948-2961)。MTHFR は、葉酸の活性化に関わる酵素であり、ホモシステインからメチオニンへの変換が促進する。MTHFR 遺伝子の塩基番号 677C T 変異があり、この C/T 多型における TT 型の血中ホモシステイン濃度は、C アレルのそれより高い。日本人における MTHFR 遺伝子 677C T 多型のマイナーアレル頻度は約 0.4 と報告されている (Jpn J Hum Genet. 1996;41:247-251)。このように食事や遺伝的関与によるホモシステインの代謝が、肺胞細胞における小胞体ストレスの誘導、それに伴う細胞のアポトーシスや、COPD の病態の主軸となる肺気腫の形成、呼吸機能の低下にどのように関わっているのかという検討はこれまでになされていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ホモシステイン代謝に関わる遺伝子の変異による血中ホモシステインの増加と喫煙曝露が小胞体ストレスを介して COPD 発症の原因となるかを検証することである。

### 3. 研究の方法

上記目的を達成するために疫学的研究と基礎的研究を行った。

疫学研究では一般住民を対象とした健康診断で呼吸機能検査や血液検体による遺伝子検査を行った山形 (高畠) 研究のデータを使用して、MTHFR 遺伝子変異による呼吸機能の経年変化との関連について検討を行う方針とし、以下の解析を計画した。

遺伝子データベースより MTHFR 遺伝子変異の C アレル、TT アレルの頻度を検討する。

同遺伝子変異と呼吸機能検査との相関性を検討する。

呼吸機能の経年変化率と MTHFR 遺伝子の C アレル、TT アレルとの関連性を検討する。

基礎研究では MTHFR 遺伝子をノックアウトしたマウスを作成して喫煙曝露を行い、MTHFR 遺伝子変異の有無と肺気腫形成の差異について評価を行う方針とした。マウスの MTHFR 遺伝子は第 4 染色体上の 12 の exon が同定されているため、本学遺伝子実験施設中島先生の協力を頂き、CRISPR-Cas9 と gRNA をハイスループットエレクトロポレーションを介して受精卵へ同時に注入してノックアウトマウスを作成する計画とした。ノックアウトマウス作成した後にその血中ホモシステイン濃度の測定し、喫煙曝露の短期効果と長期効果を観察する方針とした。喫煙曝露の短期効果を観察するために、喫煙曝露開始 2 日間、7 日間、30 日間、60 日間で以下の評価を行う計画とした。

気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、総細胞数、細胞分画を測定

BAL 液 (BALF) 中の炎症性サイトカイン、ケモカインを ELISA 法により評価

肺組織を採取して、蛋白質、RNA を抽出し、Western blotting、rt-PCR により炎症性サイトカイン、ケモカインの蛋白濃度や RNA の発現量、小胞体ストレスマーカーを測定

喫煙曝露の長期効果については、喫煙曝露開始 6 か月後に上記項目に加え、以下の項目を評価する計画とした。

呼吸機能検査

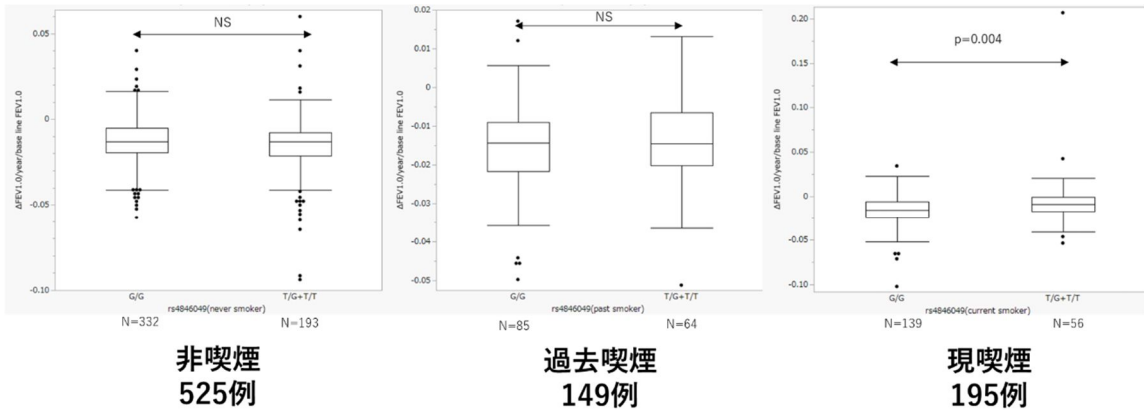
血中ホモシステイン濃度、ビタミン濃度の測定

肺組織における肺気腫の形成を平均肺胞間距離 (MLI) の測定により評価

さらに MTHFR 遺伝子ノックアウトマウスに対し、喫煙曝露下にビタミン B 群および葉酸を投与し、上記と同様の実験および評価を行うことで、喫煙によって誘導される肺気腫の形成にビタミン群の摂取が及ぼす影響を検討する計画とした。

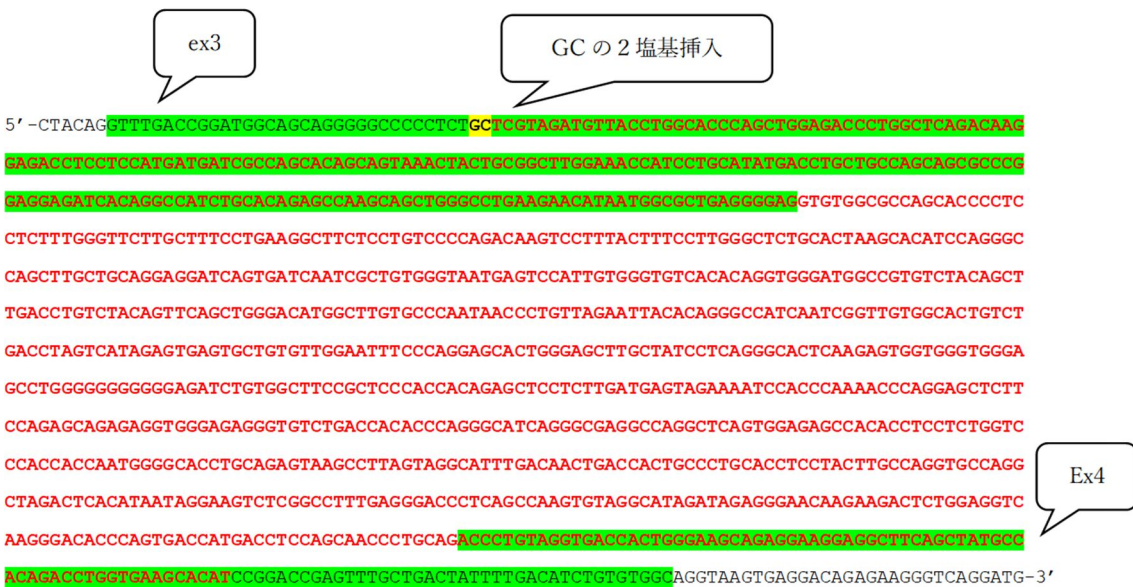
#### 4. 研究成果

疫学研究では山形（高島）研究の参加者から約 2700 人の遺伝子サンプルを収集することができた。MTHFR 遺伝子に関わる一塩基多形 (SNPs) は rs4846048, rs4846049, rs1476413, rs1994798, rs1801133, rs4846052, rs3753588 の 7 種類を検出できた。それらのアレル頻度は National library of medicine で公開されている東アジア人のアレル頻度とほぼ同じ傾向を示していた。したがって本研究の母集団については東アジア人の集団として妥当な集団であることが示された。これらの SNPs と呼吸機能検査データとの相関性を検討した。呼吸機能は初回測定後の 3-5 年後に再検査が行われており、呼吸機能の経年的な変化が追えた対象者は約 120 人であった。初回の肺活量、一秒量、一秒率といった呼吸機能検査値についてはいずれの SNPs との関連性を見出すことはできなかった。呼吸機能の変化量と SNPs との相関について検討を行ったところ、rs4846049, rs1476413, rs1994798, rs4846052 の 4 つの SNPs では、喫煙者でメジャーホモ接合体を有する研究参加者ではマイナーホモ接合体やヘテロ接合体を有する研究参加者と比べて 1 秒量の経年低下率が有意に高かった。



また、rs4846049, rs1476413, rs1994798 の 3 つの SNPs では、未喫煙でメジャーホモ接合体を有する研究参加者ではマイナーホモ接合体やヘテロ接合体を有する研究参加者と比べて 1 秒量の経年低下率が有意に小さかった。

基礎研究では C57BL/6 系統のマウスに CRISPR-Cas9 を用いて MTHFR 遺伝子変異を導入した。ジェノタイピングの結果、exon 2 に目的の遺伝子が挿入できていることが確認でき、MTHFR 遺伝子ノックアウトマウスの作成に成功した。



MTHFR 遺伝子ノックアウトマウスはワイルドタイプと比して外観に明らかな差はなかったが、HPLC 法で測定した血漿ホモシステイン値は高い傾向を示した。現在、6 か月間の予定とした喫煙曝露を行っており、その後に呼吸機能や肺気腫の差異について評価を行う予定としている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakano H, Inoue S, Minegishi Y, Igarashi A, Tokairin Y, Yamauchi K, Kimura T, Nishiwaki M, Nemoto T, Otaki Y, Sato M, Sato K, Machida H, Yang S, Murano H, Watanabe M, and Shibata Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of hyperhomocysteinemia on a murine model of smoke-induced pulmonary emphysema.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-16767-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Machida H, Inoue S, Igarashi A, Saitoh S, Yamauchi K, Nishiwaki M, Nemoto T, Otaki Y, Sato M, Sato K, Nakano H, Yang S, Furuyama K, Murano H, Ishibashi Y, Ota T, Nakayama T, Shibata Y, Watanabe M.	4. 巻 66
2. 論文標題 Role of CC Chemokine Ligand 17 in Mouse Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Respir Cell Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 428-438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1165/rcmb.2021-00690C.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Machida H, Inoue S, Igarashi A, Saitoh S, Yamauchi K, Nishiwaki M, Nemoto T, Otaki Y, Sato M, Sato K, Nakano H, Yang S, Furuyama K, Murano H, Ishibashi Y, Ota T, Nakayama T, Shibata Y, Watanabe M	4. 巻 66
2. 論文標題 Role of CC Chemokine Ligand 17 in Mouse Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Respir Cell Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 428-438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1165/rcmb.2021-00690C.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Machida H, Inoue S, Shibata Y, Kimura T, Ota T, Ishibashi Y, Murano H, Furuyama K, Yang S, Nakano H, Sato K, Sato M, Nemoto T, Nishiwaki M, Yamauchi K, Igarashi A, Watanabe M.	4. 巻 16
2. 論文標題 The Incidence and Risk Analysis of Lung Cancer Development in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Possible Effectiveness of Annual CT-Screening.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.	6. 最初と最後の頁 739-749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/COPD.S287492.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sato K, Inoue S, Ishibashi Y, Ota T, Murano H, Furuyama K, Yang S, Machida H, Nakano H, Sato M, Nemoto T, Nishiwaki M, Yamauchi K, Igarashi A, Watanabe M.	4. 巻 59
2. 論文標題 Association between low mean corpuscular hemoglobin and prognosis in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respir Investig.	6. 最初と最後の頁 498-504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2021.01.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 町田浩祥, 太田隆仁, 石橋 悠, 邨野浩義, 古山広大, 梁 秀鼎, 中野寛之, 佐藤建人, 根本貴子, 西脇道子, 山内啓子, 佐藤正道, 五十嵐朗, 井上純人, 渡辺昌文
2. 発表標題 Thymus and activation-regulated chemokine (TARC) KOマウスを用いたCOPDの病態についての検討 Examination of the pathophysiology of COPD using Thymus and activation-regulated chemokine (TARC) KO mouse
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 邨野浩義, 町田浩祥, 中野寛之, 佐藤建人, 佐藤正道, 五十嵐朗, 井上純人, 柴田陽光
2. 発表標題 肺気腫形成にホモシステインが及ぼす影響の検討 Effects of homocysteine on emphysema formation.
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------