

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790729

研究課題名（和文） 突然死発症における喫煙の影響

研究課題名（英文） The effect of smoking on occurrence of sudden death

研究代表者

稲岡 斉彦（INAOKA YOSHIHIKO）

東海大学・医学部・助教

研究者番号：50564689

研究成果の概要（和文）：

乳幼児突然死症候群（SIDS）について主要なリスクファクターとして挙げられるのが喫煙である。このことから、我々は突然死にニコチンが影響していることを想定している。我々はニコチンを作用させた副腎髄質クロム親和細胞における遺伝子発現変化をDNAマイクロアレイにより解析し、約150程度の遺伝子において転写量の上昇または減少を確認し、現在これら遺伝子について解析中である。また、ニコチンの代謝に関わる遺伝子であるCYP2A6、CYP1A1、GSTT1の多型性の出現頻度について健常者群とSIDS群との間で比較した結果、表現型、遺伝子型ともに健常者群とSIDS群間で出現頻度に差は認められなかった。SIDS検体についてはニコチン受容体と低酸素関連遺伝子群についてもDNAシーケンシングにより変異検出を試みたが、タンパク質機能に異常をきたすような変異はみられなかった。今回の検討では日本人集団におけるニコチン代謝に関わる遺伝子群が、SIDS発症に関わる可能性は低いことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The exposure to tobacco smoke is the major risk factor for the occurrence of sudden infant death syndrome (SIDS). A variety of components are present in the smoke, but nicotine is of particular concern in relation to SIDS because of penetrance in the placenta and effects on fetal development. We performed microarray analysis of an adrenal chromaffin (AMC) cell lines treated with nicotine. As the results, 150 genes were differentially expressed in both the AMC and AMC cell lines treated with nicotine. We are analyzing about these genes. We performed an association study of CYP2A6, CYP1A1, and GSTT1 polymorphisms with SIDS. Moreover, Analysis of hypoxia-related genes and alpha-7 nicotinic receptor gene mutations were performed by direct sequence to the whole coding regions. In these genes, biologically significant mutations were not detected. Our results indicate that the genetic polymorphism of CYP2A6, alpha-7 nicotinic receptor, and hypoxia-related genes are not differ between SIDS victims and control subjects. Moreover, our analysis did not reveal an association between GSTT1 gene deletion or polymorphisms of CYP1A1 and SIDS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：SIDS、ニコチン、変異検出

1. 研究開始当初の背景

乳幼児突然死症候群 (SIDS: sudden infant death syndrome) は乳幼児に発生する原因不明の突然死であり、2004年のSan Diego会議で定義が厳格化され、Sudden unexpected death in infancy (SUDI)と呼ばれることも増えている。原因不明の突然死における診断では、肉眼的解剖所見加え、組織学的検査を行い、外因死でないことを確認し除外診断される。SIDSについては、これまでも様々な観点から研究がおこなわれているが、原因については判明しておらず、不明な点が多い。睡眠に伴う覚醒反応の低下を含む脳機能の異常、先天性代謝異常症の存在、感染症、さらに慢性の低酸素症の関与等について考えられているが、これらの直接的あるいは複合的な原因により引き起こされるものなのかは明らかになっていない。

これまでに原因不明の突然死には、家族内発生は少なく、遺伝傾向は低いとされてきたが最近の臨床遺伝学研究から、様々な疾患において減数分裂時の *de novo* 変異が原因となり発症するものが多数を占め、一般的に常染色体優性遺伝の形態をとっていることが明らかとなってきた。このことより、遺伝性は低いとされてきた孤発例においても遺伝的要因が大きく影響している可能性が高いと考えられる。

SIDSについての責任遺伝子を特定することは、病態発症のメカニズムの解明のみならず、新たな診断法の確立につながると期待される。近年、出生前のニコチン暴露がSIDSの発症リスク増大に関連することが報告された。加えて、ニコチン暴露を受けたラット新生児由来の副腎髄質クロム親和性細胞 (AMC) では、ニコチン受容体のひとつであるCHRNA7を介し、 K_{ATP} チャネルの増加に伴う低酸素誘導性 Ca^{2+} シグナルの低下を示し、ニコチンに起因する低酸素症とSIDSとの関連が示唆された。しかし、ニコチン受容体経路や、低酸素症に関与する K_{ATP} イオンチャネル経路の詳細なメカニズム、およびこれらに関わる遺伝子群の変異が、SIDSにおよぼす影響については不明である。

実際CHRNA7の変異体では、構造変化によりニコチン様作用を示す化合物に対する活性が異なること、 K_{ATP} チャネルのサブユニットであるKir6.2のノックアウトマウスを低酸素状態におくと全般発作を起こすことが確認されている。これらのことから、ニコチン暴露による低酸素誘導経路の詳細なメカニズム、およびそれら遺伝子群の変異を調べることの意義は大きく、学術的および法医学領域におけるSIDS症例との関連解明においても貢献できる研究であると考えられる。

2. 研究の目的

ニコチン暴露による低酸素誘導経路の詳細なメカニズムを解明すること、また、実際のSIDS検体から得られたDNAを用いて、それら遺伝子群の変異を調べニコチン暴露による低酸素誘導経路の関与を明らかにしたい。さらに、ニコチン代謝に関連する遺伝子変異を調べ、代謝経路異常との関わりを明らかにしたい。これらを解明することの意義は大きく、学術的および法医学領域におけるSIDS症例との関連解明においても貢献できる研究であると考えられることより、SIDSについての責任遺伝子を特定することを目的とした。

3. 研究の方法

ニコチンを作用させたAMCの遺伝子発現変化について、DNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析し、ニコチン暴露による細胞内応答の詳細なメカニズムを解明する。また、同時にニコチンにより誘導される低酸素応答因子の機能異常、ニコチン代謝関連遺伝子についても、実際のSIDS症例から得たDNAについて、主にプロモーター領域とエクソン領域を中心に網羅的に配列を検討し、挿入・欠失、ナンセンス変異、非同義置換などを検出し、原因不明とされるSIDSに遺伝的関与がないのかを検討する。さらに変異が確認された場合はタンパク質

機能に及ぼす影響や変異タンパク質の細胞内局在について、組み換えタンパク質発現実験を培養細胞を用いて実施する。転写因子の変異については標的遺伝子のプロモーター領域を組み込んだベクターを作成し、細胞内に変異体と共発現させることで、転写活性に及ぼす影響について検討する予定である。また、細胞内局在に関しては Green Fluorescent Protein (GFP) との融合タンパク質として発現させ、観察する。

4. 研究成果

ニコチンを作用させた副腎髄質クロム親和細胞における遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析し、ニコチンにより引き起こされる低酸素応答メカニズムの解明をおこなった。ニコチン刺激を与えていない細胞と比較し、約 150 程度の遺伝子において転写量の上昇または減少が確認された。現在はこれらの変動について有意なものを算出し、どのようなシグナリング経路との関連があるかについて絞りこみをおこなっている。

さらに SIDS と診断された検体より抽出した DNA を用いて、ニコチン受容体を含む低酸素関連遺伝子群のエクソン領域を中心に挿入・欠失、ナンセンス変異、非同義置換などについてダイレクトシーケンシングにより確認したところ、健常者にもみられる変異のみが確認され、タンパク質機能に異常をきたすような変異はこれまでのところ確認できてはいない。さらにニコチンの肝臓内での代謝に関わる遺伝子である CYP2A6、CYP1A1、GSTT1 の多型性の出現頻度について、健常者群と SIDS 群との間で比較した。その結果、表現型、遺伝子型ともに健常者群と SIDS 群間で出現頻度に差は認められなかった。このことから日本人集団におけるニコチン代謝に関わる遺伝子群が、SIDS 発症に関わる可能性は低いことが示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

- 1) 稲岡 齊彦、筒井健太、中西亜由美、坪井秋男、瀬戸良久、長谷川巖、佐藤文子、大澤資樹：ABO式血液型におけるDNA検査による遺伝子型判定法の比較. *DNA多型*. 20: 252-256, 2012. 査読あり
- 2) Yazawa T., Kawabe S., Inaoka Y., Okada R., Mizutani T., Imamichi Y., Ju Y., Yamazaki Y., Usami Y., Kuribayashi M., Umezawa A., Miyamoto K.: Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol Cell Endocrinol*. 336(1-2): 127-132, 2011. 査読あり
- 3) Tamura T, Osawa M, Inaoka Y., Tanaka S, Satoh F, Nakamura T.: Re-evaluation of the identical-by-state method in pairwise kinship inference. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series*. 3(1): e244-e245, 2011. 査読あり
- 4) Inaoka Y., Tajima A., Tamura T., Satoh F., Osawa M.: Kinship analysis based on SNP data from microarray assay. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series*. 3(1): e275-e276, 2011. 査読あり
- 5) Osawa M, Inaoka Y., Hasegawa I, Satoh F.: Postmortem molecular analysis to SIDS victims. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series*. 3(1): e263-e264, 2011. 査読あり
- 6) 稲岡 齊彦、佐藤文子、筒井健太、大澤資樹、田嶋敦、田村友紀、田中佐知、佐藤至：DNAチップを用いたSNP解析による二者間の血縁関係判定. *DNA多型*. 19:164-168, 2011. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Inaoka Y., Tajima A., Tamura T., Satoh F., Osawa M.: Kinship analysis based on SNP data from microarray assay. 24th World Congress of the International Society for Forensic Genetics. 2011, 9月2日、オーストリア、ウィーン
- 2) 稲岡 齊彦、筒井健太、中西亜由美、坪井秋

男, 瀬戸良久, 長谷川巖, 佐藤文子, 大澤資樹. : ABO式血液型におけるDNA検査による遺伝子型判定法の比較. 日本DNA多型第20回学術集会. 2011、12月2日、横浜

- 3) 稲岡齊彦、田中政之、田嶋敦、田村友紀、佐藤文子、長谷川巖、大澤資樹ゲノムワイドSNPデータから同定されたIBDセグメントによる二者間の血縁関係推定日本法医学会第81回学術関東地方会. 2012、10月20日、高崎
- 4) Inaoka Y., Nakatome M., Satoh M., Hasegawa I., Fujita M. Q., Osawa M. Association analysis of CYP2A6 polymorphism in SIDS. American Society of Human Genetics Annual Meeting. 2012、11月9日、サンフランシスコ、アメリカ

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲岡 齊彦 (INAOKA YOSHIHIKO)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：50564689