

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461169

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患の感受性遺伝子の網羅的同定と機能解析

研究課題名(英文)Elucidation of smoking-sensitive genes in chronic obstructive pulmonary disease with genomic analysis

研究代表者

青木 琢也 (AOKI, Takuya)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：70255438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)に対する全ゲノム相関解析が開発され、COPDと関連した遺伝子が報告されている。それら遺伝子を次世代シーケンサーにより解析し、塩基配列上の差を明らかにすることを目的とした。倫理委員会の承認後、約90症例の検体を収集し、DNAを抽出した。また、患者の臨床情報を調査した。報告されているINTS12, GSTCD, NPNT, AGER, ADAM19, BICD1, SERPINA1, CHRNA3/5等の領域の塩基配列を解析した。その結果、Japanese populationにおいてもVariantを認めた。今後、これら領域のCOPD発症への有効性を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide association studies for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) have been developed, and COPD-associated genes have been reported. We aimed to explore these genes by using 2nd generation sequencer, and elucidate the differences of sequences between COPD patients and the control subjects in Japanese population. After approval of IRB, DNAs were collected from 90 COPD patients. Clinical information of each patient was also collected. Sequences of previously reported COPD-associated genes such as INTS12, GSTCD, NPNT, AGER, ADAM19, BICD1, SERPINA1, CHRNA3/5 were analyzed. There were variants in these genes in Japanese population. Our future plans are to examine the significance of these variances in the pathogenesis of COPD.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 喫煙感受性遺伝子 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

(1) COPD と喫煙

慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) は、完全には可逆的でない気流閉塞に特徴づけられる疾患であり (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease : GOLD; <http://www.goldcopd.org/>)、2020 年までには全世界で死亡原因の第 3 位になると予想されている (Murray CJ and Lopez AD, Lancet. 1997;349:1498-1504)。喫煙は、COPD の主な原因と考えられている。全ての喫煙者が COPD を発症するわけではなく、喫煙に対する感受性遺伝子の存在が考えられている。すなわち、喫煙によって COPD を発症する症例と喫煙をしても COPD を発症しない健常人がいる (Fletcher C and Peto R, Br Med J. 1977;25:1645-1648)。証明されている遺伝的因子として循環血中のセリンプロテアーゼの主な阻害物質である α -1 アンチトリプシンの遺伝子欠損がある (Stoller JK, et al. Lancet 2005;365:2225-2236)。重症の α -1 アンチトリプシン欠損症では、喫煙者と非喫煙者の両方で早発性および加速性の汎小葉性肺気腫が発症して肺機能が低下するが、喫煙は明らかにこのリスクを高める。しかしながら、それ以外の COPD 感受性遺伝子に関しては 20 年以上にわたる研究によっても、未だ明確にされていない。

(2) COPD 感受性遺伝子の研究

COPD 感受性遺伝子の研究は、炎症、プロテアーゼ アンチプロテアーゼ不均衡、アンチオキシダントの 3 つの経路に関わる因子に集約される (Smolonska J, et al. Am J Respir Crit Care Med. 2009;180:618-631)。炎症性の因子として Tumor necrosis factor- α 、Transforming growth factor- β 1、Interleukins、プロテアーゼ アンチプロテアーゼ不均衡の因子として neutrophil elastase、matrix metalloproteinases (MMPs)、cathepsin、MMP を阻害する tissue inhibitors of MMPs (TIMP) 等があり、アンチオキシダントの因子として microsomal epoxide hydrolase、glutathione S-transferase (GST) subunits P1、T1、M1 等がある。これら因子は全て COPD 発症に関連すると考えられてきた因子であるが、遺伝子研究では、報告によって差が大きく、一貫性はない。

(3) COPD 研究における GWAS 研究

近年、ゲノム全体の解析により多因子疾患の原因を推定する方法として全ゲノム相関解析 (genome-wide association study: GWAS) が開発された (Hardy J and Singleton A, N

Engl J Med. 2009;360:1759-1768)。肺機能検査上の一秒率および一秒量に関して GWAS による二つの大規模なメタアナリシスとして CHARGE (Hancock DB, et al. Nat Genet. 2010;42:45-52) および SpiroMeta consortia (Repapi E, et al. Nat Genet. 2010;42:36-44) が行われた。GWAS による一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) として検出された遺伝子として染色体 4q24 上の INTS12/GSTCD/NPNT/FLJ20184、6p21 上の AGER、5q33 上の ADAM19 がある。INTS12 は、3' end processing of small nuclear RNA に関わり (Baillat D, et al. Cell 2005;123:265-276)、GSTCD は exogenous compounds の detoxification に関与し (Hayes JD, et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2005;45:51-88)、NPNT は organ development (Brandenberger R, et al. J Cell Biol. 2001;154:447-458) および細胞分化 (Kahai S, et al. PLoS One 2009;4:e7535) との関連を指摘されている。FLJ20184 の機能は不明であり、AGER は特発性肺線維症との関連、ADAM19 は disintegrin および MMP と関連する。しかしながら、喫煙による COPD の発症例と喫煙非発症例との差を説明することはできず、また、GWAS によって検出された SNP は、従来報告されてきた発症機序との直接的な関連はない。

(4) 研究開始当初時の大規模 GWAS 研究

COPD 中の肺気腫症例での GWAS による最も規模の大きい解析が行われた。これは白人を対象とした 3 つの異なるコホート研究からの 2542 症例の分析であり、*BICD1* [bicaudal D homolog 1 (Drosophila)] 遺伝子との関連が示唆された (Kong X, et al. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183:43-49)。*BICD1* は telomere の長さを調節することが示唆されており、喫煙による老化促進との関連が考えられる。また、3 万人以上の GWAS が報告されているが (Wilk JB, et al. Am J Respir Crit Care Med. 2012;186:622-632)、喫煙関連の COPD 感受性遺伝子は同定されていない。更に COPD の発症メカニズムを説明する段階には至っていない。

(5) COPD とレドックス機構

COPD 発症において酸化ストレスは特に重要なメカニズムの一つと考えられてきた。酸化ストレスは、炎症性遺伝子の活性化、アンチプロテアーゼの不活化、粘液分泌の刺激、血漿滲出物増加など、肺において様々な悪影響を引き起こす。喫煙によって発生するパーオキシナイトライト等の活性酸素は転写因子である NF- κ B (nuclear factor- κ B) を介する炎症性因子の転写を促進する (Shapiro

SD. N Engl J Med. 2005;352:2016-2019)。今まで我々は、酸化ストレスのモデルとして高濃度酸素曝露を用い *in vivo* および *in vitro* で検討してきた。正常な肺では比較的高濃度酸素曝露時において線維化とコラゲナーゼ活性が均衡を保つことが示唆された(Aoki T, et al. *Respir Res*. 2008;26:9:37)。肺での好中球集積に重要な役割を果たす intercellular adhesion molecule-1(Aoki T, et al. *Am J Physiol*. 1997;273:H2361-H2371)の発現においてレドックス(酸化還元反応)機構が関与することを報告した(Aoki T, et al. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;15:319-327)。これら研究を通して、炎症性疾患と考えられている COPD の発生機序において、レドックス制御機構の破綻が重要であると考えられるに至った。

2. 研究の目的

従来の GWAS 研究の問題点として、喫煙をしているが COPD を発症しないヒトをコントロールとしていないため、本来 COPD を発症する遺伝子を持っているが非喫煙者であるため、COPD を発症しないヒトが含まれる可能性がある。また、COPD には多くの病型があり(Celli BR, et al. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:461-465) 一様に比較できない。更に一般的な GWAS では各集団中で頻度が高い SNP を採用するが、検出される各感受性 SNP が疾患に及ぼす効果は多くの場合非常に低く、疾患の遺伝性の一部しか説明できない。本研究では、喫煙非発症例をコントロールとし、報告されている感受性領域候補遺伝子を次世代シーケンサーでシーケンシングし COPD 症例と喫煙非発症例の間で塩基配列に差がある喫煙感受性遺伝子の候補を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 患者の選択

喫煙歴を有し、スパイロメトリー検査にて気管支拡張剤吸入後の一秒率が 70%未達の気流制限が証明されている患者で、呼吸器内科専門医により COPD として診断されている患者 100 例を対象とする。喫煙歴 20 pack-year 以上を有しスパイロメトリー検査にて気流制限がなく、胸部高分解能 CT (high-resolution CT: HRCT)上、気腫性病変のない 45 歳以上の症例 50 例をコントロールとする。一般的には喫煙歴 20 pack-year 以上、年齢 45 歳以上で COPD を発症してくると考えられている(Barnes PJ. *Managing Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. London, England: Science Press Ltd; 1999)。他の呼吸器疾患の合併例であっても、COPD が

除外される場合はコントロールとする。鑑別が必要な疾患として、喘息、うっ血性心不全、気管支拡張症等があるが、喘息、肺線維症および気管支拡張症の合併例は、喫煙による気腫性病変が明らかな場合は対象とする。当施設においては、月約 2700 人の呼吸器患者の外来受診があり、COPD のみでも 170 症例以上が現在外来受診中であることから、目標症例数に到達すると考えられる。

(2) 同意の取得

倫理委員会における承認を得る。その後、本研究の開始に先立ち、被験者に対して、説明文書を用いて説明し、被験者になることの本人の自由意志に基づいた同意を文書で得る。説明文書には以下の事項を記載する。遺伝子の分析を行うこと、研究目的、遺伝子解析に必要な材料、遺伝子解析の費用、研究計画書等の開示、個人情報保護、遺伝子解析を受ける人の権利、解析結果の報告、研究に協力することによる利益と不利益、提供者の代わりに試料などの提供に同意する場合の特例、研究から生じる知的財産権の帰属、遺伝子解析研究終了後の試料等の取扱いの方針である。

(3) 患者の評価

患者の年齢、体重、身長、喫煙歴、喫煙量、喫煙期間および COPD 発症年齢を含めた臨床経過、合併症を含む既往歴、身体所見、検査データ(炎症反応、間質性肺炎の活動性、腫瘍マーカー、喘息を示唆するマーカー; CRP, KL-6, SP-D, CEA, IgE)、呼吸機能検査(換気機能、拡散機能、残気量)、胸部画像検査(胸部レントゲン、HRCT)等の臨床情報を評価する。COPD の重症度も評価する。

(4) 採血

インフォームドコンセントの承諾を得た後、血液を採取する。血液約 5cc を EDTA2Na 加スピッツに採取する。血液は 4℃ 冷蔵保存する。

(5) 感受性領域候補のシーケンシング解析

報告されている感受性遺伝子候補約 200 遺伝子のエクソン領域を次世代シーケンサーによりシーケンシングする。感受性遺伝子候補として GWAS によって報告された COPD 関連遺伝子群、転写因子を含めレドックス制御に関連する遺伝子群(NF- κ B, IK- κ B, mitogen-activated protein kinase superfamily 等)が挙げられる。各感受性候補遺伝子領域(500-1Mbp)をイルミナ社及びロシュ社製の次世代シーケンサーによりシーケンシングし、塩基配列を決定する。最終的に検出された喫煙 COPD 発症例と喫煙 COPD 非発症例で塩基配列上の差がある遺伝

子を COPD 感受性遺伝子候補と考へて、全個体を対象に調査する。

4 . 研究成果

(1) 患者および健常者の遺伝子を扱うことから倫理的な側面の解決

本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づく倫理的原則、「臨床研究に関する倫理指針」「ヒト遺伝子検査受託に関する倫理指針」「遺伝子解析に付随する倫理問題等に対応するための指針」「東海大学医学部附属病院群臨床研究実施規則・細則」を遵守して実施されなければならない。本研究の実施に際しては、東海大学医学部附属病院に設置された倫理委員会における承認を必要とする。倫理委員会への申請が受理され、本研究を行うことが可能となった。

(2) 対象からの同意の取得と検体の収集

東海大学医学部附属病院において、「喫煙歴を有し COPD を発症している患者」および「喫煙歴があり、咳、呼吸困難、肺機能異常等より COPD が疑われた症例あるいは健診等での胸部異常陰影より肺がんが疑われた症例で、COPD の合併が否定された症例」から、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき、十分なインフォームドコンセントを行なったうえ、採血を行った。今までに約 90 症例の検体を収集した。これら採血検体より DNA を抽出した。

(3) シークエンシング

COPD との関連が報告されている下記の領域の塩基配列を解析中である。その結果、文献で一部報告されているように Japanese population においても Variant を認めた。現在、これらの Variant の COPD 発症への有効性を解析中である。

INTS12, GSTCD, NPNT, AGER, ADAM19, BICD1, SLC7A1, INO80, AXIN1, EREG, MAP3K10, TACC2, MYO1E, NPLOC4, FUT2, PEX26, PLCH2, KIAA1919, MRPS34, EPPK1, NAT10, DNAH8, ALCAM, RARS, GBF1, CCDC38, SERPINA1, CHRNA3/5, FAM13A, HHIP

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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

青木 琢也 (AOKI, Takuya)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：70255438

(2) 研究分担者

岡 晃 (OKA, Akira)
東海大学・総合医学研究所・講師
研究者番号：80384866

後藤 信哉 (GOTOU, Shinya)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：50225653