

20020094A

厚生科学研究研究費補助金  
長寿科学総合研究事業

肺癌および慢性肺気腫原因遺伝子の研究

平成 14 年度 総括研究報告書

主任研究者 山谷 睦雄

平成 15(2003)年 3 月

# 目 次

I. 総括研究報告		
肺癌および慢性肺気腫原因遺伝子の研究	-----	1
山谷 睦雄		
II. 分担研究報告書		
肺癌および慢性肺気腫原因遺伝子の研究	-----	6
関沢 清久		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	8
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	別添

肺癌および慢性肺気腫原因遺伝子の研究

主任研究者 山谷 睦雄 東北大学医学部附属病院老人科助教授

(1) 抗酸化作用を持つ酵素ヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) 遺伝子多型と肺癌の関係について解析した。HO-1 遺伝子発現を制御する GT 反復配列数は肺腺癌患者において、対照者と比較して、頻度が多かった。(2) 抗酸化作用を持つ酵素グルタチオン-S トランスフェラーゼ (GST) の遺伝子多型 GSTM1 と GSTT1 の欠損について解析した。GSTM1 および GSTT1 いずれの欠損の割合も肺気腫において、非肺気腫喫煙者に比較して有意の変化を認めなかった。(3) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) の遺伝子多型と肺気腫発症の関連を検討したところ、TIMP-2 遺伝子の 2 個所に遺伝子多型が検出された。2 個所の遺伝子多型ともに肺気腫発症との関連が示され、蛋白融解酵素阻害活性の低下が肺気腫発症の原因と考えられた。

分担研究者：関沢清久・筑波大学臨床医学系  
呼吸器内科教授

A. 研究目的

(1) 肺癌の発症は喫煙が最大の原因である。喫煙中にはタールやニトロサミンなどの発癌物質がふくまれている。喫煙はさらに、DNA 傷害を生ずるオキシダントが含まれ、肺癌発症に関与すると示唆されている。肺腺癌は非喫煙者や女性に多く発症するが、最近になって喫煙量増加によって患者が増加すると報告されている。抗酸化酵素グルタチオン-S トランスフェラーゼ遺伝子欠損が発癌物質の活性化を起こすとの報告があるが、抗酸化酵素活性低下と肺癌発症との関係は明らかになっていない。ヘムオキシゲナーゼはヘムを

ビリベルジンと鉄に代謝し、一酸化炭素やビリルビン、フェリチンを産生する酵素である。誘導型ヘムオキシゲナーゼはオキシダントや高酸素による細胞破壊を防御する抗オキシダント作用を持ち、生体におけるオキシダント物質とのバランスを保つ働きをしていると考えられている。さらに、ヘムオキシゲナーゼは発癌物質ベンゾピレンの活性に対する予防効果が報告されている。ヘムオキシゲナーゼの誘導はヘムオキシゲナーゼ遺伝子上流に位置する GT 反復配列で制御され、長い GT 反復配列ほど抑制作用が強いことが最近報告された。これらの知見から、私たちは慢性肺気腫では喫煙中のオキシダントに対する防御能力が弱いのではないかと考え、慢性肺気腫における長い GT 反復配列の遺伝子多型性を報告してきた。本研究において、私たち

は肺癌においても、喫煙中のオキシダントに対する防御能力が弱いのではないかと考え、肺癌患者において、GT 反復配列数を解析した。

(2) 慢性肺気腫に代表される慢性閉塞性肺疾患 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease; COPD) は世界における主要死亡原因の 1 つであり罹患率・死亡率ともに増加している。喫煙は COPD 発症の最大の危険因子として認められているが、一方で喫煙者の 10%前後のみに COPD が発症するとの報告があり、喫煙に対する感受性を含め、COPD の発症因子・発症機序は不明である。現在、慢性肺気腫の発症機序として 2 つの仮説、プロテアーゼ・抗プロテアーゼ説およびオキシダント・抗オキシダント説が提唱されている。オキシダント・抗オキシダント説はオキシダントの直接傷害および抗プロテアーゼ抑制作用による肺組織破壊が慢性肺気腫を惹起すると説明しているが、喫煙者の抗オキシダント産生機能と慢性肺気腫発症との関係は不明であった。誘導型ヘムオキシゲナーゼはオキシダントや高酸素による細胞破壊を防御する抗オキシダント作用を持ち、ヘムオキシゲナーゼの誘導はヘムオキシゲナーゼ遺伝子上流に位置する GT 反復配列で制御され、長い GT 反復配列ほど抑制作用が強いため、私たちは慢性肺気腫では喫煙中のオキシダントに対する防御能力が弱いのではないかと考え、慢性肺気腫における長い GT 反復配列の遺伝子多型性を報告してきた。しかし、慢性肺気腫においても GT 反復配列の長くない、HO-1 遺伝子多型性に該当しない患者も多い。今年度は慢性肺気腫の発症素因をさらに検討するため、別の抗酸化作用を持つ酵素グルタチオン-S 転スフェラーゼ (GST) の遺伝子多型 GSTM1 と GSTT1 の欠損について、肺気腫患者および非肺気腫喫煙男性を対象に解析した。

(3) 肺気腫発症の大半は喫煙によるが、喫煙に

よる肺気腫発症機序として、蛋白融解酵素とその不活性化機構のアンバランスも重要と考えられている。蛋白融解酵素の内因性阻害物質である TIMP-2 遺伝子の遺伝子多型と慢性肺気腫の関連性を検討した。

(倫理面への配慮)

肺癌および慢性肺気腫の遺伝子解析については東北大学医学部倫理委員会の承認と患者の同意を得て行なった。また、筑波大学医学部倫理委員会および患者の承諾を得て慢性肺気腫の遺伝子解析を行った。

#### A. 研究方法

(1) 肺腺癌患者 151 名 (平均年齢 62.8 歳、喫煙者 73 名、女性 71 名)、対照者 153 名 (平均年齢 62.9 歳、喫煙者 68 名、女性 71 名) を対象に、末梢血液から DNA を抽出して、ヘムオキシゲナーゼ-1 の遺伝子発現を制御する GT 反復配列数を解析した。二種のプライマー P1-s と P1-as は誘導型ヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子上流域をはさむ位置とした。PCR 産物は 15%ポリアクリルアミドゲルの電気泳動を行ない、GT 反復配列の長さを比較した。

(2) 慢性肺気腫患者 101 名 (平均年齢 66.8 歳、平均 Brinkman' s index 1006)、非慢性肺気腫 100 名 (平均年齢 67.1 歳、平均 Brinkman' s index 938) の喫煙男性を対象にグルタチオン-S 転スフェラーゼ (GST) の遺伝子多型 GSTM1 と GSTT1 の欠損について、解析した。慢性肺気腫の診断は原則的に、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息の診断と治療指針 (日本胸部疾患学会 1995 年) に従い、理学的所見、呼吸機能所見、胸部画像所見などを参考にした。以上の対象から血液を採取し DNA を抽出した。これを鋳型として PCR を行った。PCR は Arand らの方法を一部修正しておこなった。

(3)喫煙指数が同じ88名の肺気腫患者と44名の健常者を対象として、末梢血白血球よりDNAを抽出し、TIMP-2遺伝子の遺伝子多型を調べた。その後、検出された遺伝子多型と肺気腫の関連を統計学的手法で検討した。

### C. 研究結果

(1)肺腺癌151名のうち、GT反復配列が33回以上のL型に所属するアリの割合は19%であった。この割合は対照者の割合13%に比べて有意に増加していた( $P < 0.03$ )。また、L型の遺伝子型を有する肺腺癌患者の割合は36%で対照者の24%に比べて有意に増加していた( $P < 0.02$ )。喫煙肺腺癌患者73名において、L型のアリの割合(21%)および遺伝子型を有する割合(41%)は対照者69名におけるL型アリの割合(11%)および遺伝子型を有する割合(22%)に比較して、有意に増加していた( $P < 0.02$  および  $P < 0.02$ )。これに対して、非喫煙肺腺癌患者78名において、L型のアリの割合(17%)および遺伝子型を有する割合(31%)は対照者84名におけるL型アリの割合(14%)および遺伝子型を有する割合(25%)に比較して、有意差を認めなかった( $P = 0.5$  および  $P = 0.4$ )。

(2)グルタチオン-Sトランスフェラーゼ(GST)の遺伝子多型解析はまだ途中にあり、慢性肺気腫50名(平均年齢66歳)、非肺気腫喫煙男性50名(平均年齢64歳)で行われた。グルタチオン-Sトランスフェラーゼ(GST)の遺伝子多型のうち、GSTM1欠損の割合は慢性肺気腫54%、非肺気腫喫煙男性72%と、慢性肺気腫においてGSTM1欠損の頻度は有意差がなかった。GSTT1欠損の割合は慢性肺気腫32%、非肺気腫喫煙男性54%と、慢性肺気腫においてGSTT1欠損の頻度も有意差がなかった。

(3)TIMP-2遺伝子中エクソン3の+853にG/Aの1塩基置換、プロモーター領域にG/Cの1塩基

置換が検出された。+853の変異では遺伝子型G/G、アリルGが、プロモーター領域の変異では遺伝子型G/G、アリルGが肺気腫患者で健常者に比べ有意に頻度が高かった。

### D. 考察

(1)本研究において、HO-1遺伝子発現を制御するGT反復配列の長いアリルおよび遺伝子型が肺腺癌患者全体および喫煙肺腺癌患者において、対照者に比較して割合が高いことを明らかにした。しかし、非喫煙肺腺癌患者において、対照者に比較してGT反復配列の長いアリルおよび遺伝子型の割合に有意差を認めなかった。喫煙肺腺癌患者の80%以上が男性であり、非喫煙肺腺癌患者の80%以上が女性であった。これらの所見より、HO-1の遺伝子多型性は日本人の喫煙男性における肺腺癌発症に関与することが示唆された。HO-1の5'上流域に存在するGT反復配列は個人によって長さの異なる多型性を有している。HO-1遺伝子発現はGT反復配列によって制御され、長いGT反復配列は活性酸素によるHO-1発現を抑制する。私たちは以前にGTの長さとオキシダントによるHO-1遺伝子発現の関係について、継代細胞を用いて調べた。その結果、S型に所属する短いGT反復配列を遺伝子導入した細胞においてのみ、オキシダントによるHO-1誘導が認められた。他方で、HO-1遺伝子の欠損した症例から継代した線維芽細胞は過酸化水素に対して抵抗力が弱く、細胞傷害が強いという報告もある。L型に所属する長いGT反復配列から継代したリンパ球は過酸化水素処理によって生存率が低下する。これらの所見はGT反復配列の短い遺伝子型を持つ肺はGT反復配列の長い肺に比べてHO-1の抗酸化活性を利用しやすいと思われる。活性酸素やベンゾピレンなどを含有する喫煙は肺癌の最大の危険因子である。ベンゾピレンやニト

ロサミン、活性酸素は DNA 傷害を生ずる。DNA 傷害は p53 などの癌抑制遺伝子の欠損した個体において異常な細胞増殖を引き起こし、肺癌発症に関係すると考えられている。HO-1 は抗酸化作用を有し、また、活性酸素や発癌物質から細胞を防御する働きを持つ。したがって、高い HO-1 活性は活性酸素やベンゾピレンによる細胞傷害を防ぐのみでなく、喫煙による DNA 傷害を防ぐ効果も持っていると考えられる。さらに、HO-1 はアポトーシス抑制を介して発癌を防止する示唆される。肺腺癌の発症危険因子は喫煙のみならず、職業における粉塵曝露、食品、家族歴などがある。女性は喫煙に対する感受性が高いとされているが、喫煙以外の危険因子も肺腺癌発症に関与すると考えられる。肺腺癌の発症因子は多種多様であるが、私たちは本研究において日本人の喫煙者における肺腺癌と HO-1 遺伝子多型性の関係を世界で初めて明らかにした。

(2) 従来、慢性肺気腫の発症原因としてプロテアーゼ・抗プロテアーゼの不均衡が提唱され、発症遺伝子として $\alpha$ 1-アンチトリプシン欠損症が明らかにされてきた。最近、これに加えて、オキシダント・抗オキシダントの不均衡が指摘されている。Smith らは抗オキシダント酵素である microsomal epoxide hydrolase 活性が慢性肺気腫で低下する遺伝子多型性を報告した。これまで、私たちは抗オキシダント作用を有する酵素である HO-1 の発現が慢性肺気腫で低下しているという仮説をたて、HO-1 遺伝子 GT 反復配列多型性と慢性肺気腫との関連について検討してきた。結果、高齢で発症する慢性肺気腫において 33 回以上の長い GT 反復配列を有する割合が有意に上昇した。また、反復回数 33 回以上の遺伝子を有する喫煙者が慢性肺気腫に罹患するリスクは 29 回以下の GT 反復配列を有する喫煙者の 2.4 倍であった。この結果、長い GT 反復配列をもつ喫煙

者において、抗オキシダント作用を持つヘムオキシゲナーゼの誘導が抑制され、慢性肺気腫が発症するリスクが大きいと結論された。若年性肺気腫においても同様の結果が得られ、発症年齢に関係なく HO-1 遺伝子多型性が肺気腫発症に関係することが示唆された。しかし、肺気腫患者においても約 6 割において GT 反復配列は長くなく、このような個々の患者に関して考えると、発症素因が不明の状態にある。別の抗酸化作用を持つ酵素グルタチオン-S トランスフェラーゼ (GST) の遺伝子多型 GSTM1 欠損が慢性肺気腫あるいは COPD 発症に関連するとの報告が Harrison によってなされている。しかし、本研究において、日本人肺気腫患者において GSTM1 遺伝子欠損の頻度が非肺気腫に比べて有意差がないことが示唆された。また、GSTT1 欠損の頻度も日本人の肺気腫において、非肺気腫に比べて有意差がないことが示唆された。したがって、GSTM1 および GSTT1 遺伝子欠損は日本人の肺気腫患者における発症素因でない可能性が考えられる。

(3) 細胞外マトリックスの分解系として MMP-2/TIMP-2 が重要と考えられている。本研究では生体内蛋白融解酵素阻害物質である TIMP-2 に遺伝子多型が存在することが示された。TIMP-2 遺伝子における遺伝子多型性と蛋白融解酵素阻害活性との関係は不明であるが、+853 にみられる変異は大動脈瘤との関連も示唆されており、組織の脆弱性に関連する変異と考えられる。また、プロモーター領域の変異は蛋白量と関係する可能性があり、今後の検討を必要とする。

## E. 結論

GT 反復配列の長い HO-1 遺伝子多型性は日本人喫煙者における肺腺癌発症に関与する可能性が高い。GST 遺伝子多型性は日本人の慢性肺気腫発症

に関与していない可能性がある。TIMP-2 遺伝子の遺伝子多型は肺気腫発症と関連する可能性が高い。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, Hosoda M, Yamada N, Ishizuka S, Yoshino A, Yasuda H, Takahashi H, Nishimura H, Sasaki H: Erythromycin inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 1113-1118, 2002.

Hosoda H, Yamaya M, Suzuki T, Yamada N, Kamanaka M, Sekizawa K, Butterfield JH, Watanabe T, Nishimura H, Sasaki H: Effects of rhinovirus infection on histamine and cytokine production by cell lines from human mast cells and basophils. *J Immunol* 169: 1482-1491, 2002.

Yasuda H, Yamaya M, Yanai M, Ohrui T, Sasaki H: Increased blood carboxyhaemoglobin concentrations in inflammatory pulmonary diseases. *Thorax* 57: 779-783, 2002.

Yamaya M: Pathogenesis and management of virus infection-induced exacerbation of senile bronchial asthma and chronic pulmonary emphysema. *Tohoku J Exp Med* 197: 67-80, 2002.

Yamaya M, Hosoda M, Suzuki T, Yamada N, Sasaki

H. Human airway epithelial cell culture. *Methods in Molecular Biology* 9-26, 2002.

Nakayama K, Jia YX, Hirai H, Shinkawa M, Yamaya M, Sekizawa K, Sasaki H: Acid stimulation reduces bactericidal activity of surface liquid in cultured human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26: 105-113, 2002.

Hirano K, Sakamoto T, Uchida Y, Morishita Y, Masuyama K, Ishii Y, Nomura A, Ohtsuka M, Sekizawa K: Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 18: 748-752, 2001.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請中

発明の名称：へムオキシゲナーゼ-1 遺伝子解析による肺癌発症遺伝子の同定

発明者：山谷陸雄、久保裕司、鈴木聡、佐々木英忠

肺癌および慢性肺気腫原因遺伝子の研究

分担研究者 関沢 清久 筑波大学臨床医学系呼吸器内科教授

Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) の遺伝子多型と肺気腫発症の関連を検討したところ、TIMP-2 遺伝子の 2 個所に遺伝子多型が検出された。2 個所の遺伝子多型ともに肺気腫発症との関連が示され、蛋白融解酵素阻害活性の低下が肺気腫発症の原因と考えられた。

A. 研究目的

肺気腫発症の大半は喫煙によるが、喫煙による肺気腫発症機序として、活性酸素とその消去機構、蛋白融解酵素とその不活化機構のアンバランスが重要と考えられている。しかし、喫煙者中肺気腫が発症する割合は 10% くらいであるため、肺気腫発症に遺伝的素因が関与するとされる。本研究は、蛋白融解酵素の内因性阻害物質である、TIMP-2 遺伝子の遺伝子多型と肺気腫発症の関連性を検討することを目的とする。

B. 研究方法

喫煙指数が同じ 88 名の肺気腫患者と 44 名の健常者を対象として、末梢血白血球より DNA を抽出し、TIMP-2 遺伝子の遺伝子多型を調べた。その後、検出された遺伝子多型と肺気腫の関連を統計学的手法で検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は学内医の倫理委員会の承諾を得ており、また、事前に被験者に検査内容を詳しく説

明し承諾を得ている。

C. 研究結果

TIMP-2 遺伝子中エクソン 3 の +853 に G/A の 1 塩基置換、プロモーター領域に G/C の 1 塩基置換が検出された。+853 の変異では遺伝子型 G/G、アレル G が、プロモーター領域の変異では遺伝子型 G/G、アレル G が肺気腫患者で健常者に比べ有意に頻度が高かった。

D. 考案

細胞外マトリックスの分解系として MMP-2/TIMP-2 が重要と考えられている。本研究では、生体内蛋白融解酵素阻害物質である TIMP-2 に遺伝子多型が存在することが示された。TIMP-2 遺伝子多型と蛋白融解酵素阻害活性との関係は不明であるが、+853 にみられる変異は大動脈瘤との関連も示唆されており、組織の脆弱性に関連する変異と考えられる。また、プロモーター領域の変異は蛋白量と関係する可能性があり、今後の検討を必要とする。



## E. 結論

TIMP-2 遺伝子の遺伝子多型は肺気腫発症と関連する可能性が高い。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Hirano K, Sakamoto T, Uchida Y, Morishita Y, Masuyama K, Ishii Y, Nomura A, Ohtsuka M, Sekizawa K: Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 18: 748-752, 2001.

研究成果の刊行に関する一覧表-1

Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K, Hosoda M, Yamada N, Ishizuka S, Yoshino A, Yasuda H, Takahashi H, Nishimura H, Sasaki H.	Erythromycin inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells.	Am J Respir Crit Care Med 165: 1113-1118, 2002.
Hosoda M, Yamaya M, Suzuki T, Yamada N, Kamanaka M, Sekizawa K, Butterfield JH, Watanabe T, Nishimura H, Sasaki H.	Effects of rhinovirus infection on histamine and cytokine production by cell lines from human mast cells and basophils.	J Immunol 169: 1482-1491, 2002.
Yasuda H, Yamaya M, Yanai M, Ohrui T, Sasaki H.	Increased blood carboxyhaemoglobin concentrations in inflammatory pulmonary diseases.	Thorax 57: 779-783, 2002.
Yamaya M.	Pathogenesis and management of virus infection-induced exacerbation of senile bronchial asthma and chronic pulmonary emphysema.	Tohoku J Exp Med 197: 67-80, 2002.
Yamaya M, Hosoda M, Suzuki T, Yamada N, Sasaki H.	Human airway epithelial cell culture.	Methods in Molecular Biology 9-26, 2002.
Nakayama K, Jia YX, Hirai H, Shinkawa M, Yamaya M, Sekizawa K, Sasaki H.	Acid stimulation reduces bactericidal activity of surface liquid in cultured human airway epithelial cells.	Am J Respir Cell Mol Biol 26: 105-113, 2002.
Wang HD, Yamaya M, Okinaga S, Jia YX, Kamanaka M, Takahashi H, Guo LY, Ohrui T, Sasaki H.	Bilirubin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats.	Am J Respir Crit care Med 165: 406-411, 2002.
Ohrui T, Namima T, Yamaya M, Sato T, Matsui T, Sasaki H.	Risk of prostate cancer in the Japanese elderly asthmatics.	J Am Geriatr Soc 57: 561, 2002.
Matsui T, Yamaya M, Ohrui T, Arai H, Sasaki H.	Sitting position prevent aspiration in bed-bound patients.	Gerontology 48: 194-195, 2002.
Nakamura M, Matsui T, Ohrui T, Kida K, Yamaya M, Sasaki H.	Gender crossover of lung function.	Geriatr Gerontol Internat 2: 115-118, 2002.

研究成果の刊行に関する一覧表-2

Yamaya M, Ohrui T, Kubo H, Ebihara S, Arai H, Sasaki H.	Prevention of respiratory infections in the elderly.	Geriatr Gerontol Internat 2: 115-121, 2002.
Sasaki H, Yamaya M, Ohrui T, Kubo H, Ebihara S, Arai H.	Characteristics of respiratory diseases in older people.	JMAJ 45: 231-236, 2002.
Hirano K, Sakamoto T, Uchida Y, Morishita Y, Masuyama K, Ishii Y, Nomura A, Ohtsuka M, Sekizawa K.	Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease	Eur Respir J 18: 748-752, 2001.