

20030206

厚生労働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 15 年度 総括研究報告書

主任研究者 山谷 睦雄

平成 16(2004)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 陸雄 東北大学病院老年・呼吸器内科助教授

(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 反復配列数は肺扁平上皮癌患者において、非肺癌対照者と比較して、頻度に違いを認めなかった。ただし、発見時病期の早期患者（病期 0 - 病期 IIIA）患者に比べて進行期（病期 IIIB および病期 IV）の肺扁平上皮癌患者では GT 反復配列数の長い頻度が高い結果となった。(2) 慢性閉塞性肺疾患と気道分泌に関係の深い *CLCA1* 遺伝子との関係を調べた。*CLCA1* 遺伝子に 22 の新規遺伝子多型が検出され、エジプト人では +5080 T/C genotype、日本人では +13924 T/A allele 頻度が慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者と対照群で有意差があった。*CLCA1* 遺伝子の遺伝子多型は COPD 発症と関連があるが、関連遺伝子多型は人種間で異なる結果が得られた。

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の上流に位置する 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、H0-1遺伝子多型性に該当しない患者も多い。COPDの病型のうち気道狭窄が主に現れ、肺泡破壊が弱い症例もあり、気道分泌も発症に関与するといわれている。*CLCA1*遺伝子は気管支喘息の気道杯細胞に発現し、非喘息の気道上皮には発現しない。また、気道粘液合成における関与も報告されている。今年度はCOPDの発症素因をさらに検討するため、気道分泌と関係の深い*CLCA1*遺伝子の多型性を検討した。

(倫理面への配慮)

肺癌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) 肺扁平上皮癌患者100名(平均年齢68.1歳、男性95名、女性5名)、対照者100名(平均年齢68.8歳、男性93名、女性7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) 日本人のCOPD患者88名(平均年齢66.9歳、男性85名、女性3名)と対照者40名(平均年齢72.9歳、男性40名、女性0名)、およびエジプト人のCOPD患者106名(平均年齢62.5歳、男性106名、女性0名)と対照者72名(平均年齢59.0歳、男性72名、女性0名)の末梢白血球よりDNAを抽出し、*CLCA1*遺伝子を解析した。慢性閉塞性肺疾患の診断は原則的に、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。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) 肺扁平上皮癌100名のうち、GT反復配列が33回以上のL型に所属するアリル(allele)の割合は15%であった。この割合は対照者の割合14%に比べて有意差を認めなかった($P>0.30$)。また、L型の遺伝子型を有する肺扁平上皮癌患者の割

合は27%で対照者の26%に比べて有意差を認めなかった($P>0.30$)。発見時病期の進行期(病期 IIIB および病期 IV)の肺扁平上皮癌患者16名におけるL型アリの割合(28%)および遺伝子型を有する割合(50%)は早期扁平上皮癌患者(病期 0-病期 IIIA)84名におけるL型のアリの割合(13%)および遺伝子型を有する割合(23%)と比較して、有意に増加していた($P<0.05$ および $P<0.05$)。

(2) *CLCA1* 遺伝子に22の新規遺伝子多型が検出され、エジプト人では+5080 T/C genotype が慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者で11%と対照群20%に比べて低く、有意差があった。日本人では+13924 T/A allele 頻度が COPD 患者で48%と対照群の34%に比べて高く、有意差があった。*CLCA1* 遺伝子の遺伝子多型は COPD 発症と関連があること、関連遺伝子多型は人種間で異なることが明らかとなった。

D. 考察

(1)本研究において、肺扁平上皮癌患者において、対照者に比較してHO-1 遺伝子発現を制御するGT 反復配列の長いアリおよび遺伝子型の割合に有意差を認めなかった。しかし、GT 反復配列の長いアリおよび遺伝子型が診断時病期の進行した肺扁平上皮癌患者において、早期扁平上皮癌患者に比較して割合が高いことを明らかにした。HO-1 の遺伝子多型性は日本人の肺扁平上皮癌発症には関与しないが、肺扁平上皮癌の進展性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 の長さとおキシダントによる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。実際に、昨年報告したように、喫煙者における肺腺癌発症において、GT 反復配列の長いアリおよび遺伝子型の割合が高いことを報告した。しかし、本年度の研究において、肺扁平上皮癌患者では非肺癌対照者と比べても、GT 反復配列の長いアリおよび遺伝子型の割合は有意差を認めなかった。他の肺扁平上皮癌の発症因子の作用あるいは喫煙の作用そのものが強く働いて、HO-1 の遺伝子多型性の関与が及ばなかった可能性が考えられる。他方で、GT 反復配列の長いアリおよび遺伝子型が診断時病期の進行した肺扁平上皮癌患者において、早期扁平上皮癌患者に比較して割合が高いことを明らかにした。同様の悪性腫瘍の診断時病期と遺伝子多型性に関しては、皮

膚悪性黒色腫の病期と細胞増殖因子 EGF の遺伝子多型性の関係について、細胞増殖因子 EGF の強さと病期の関連が報告されている。HO-1 の遺伝子多型性と細胞増殖性に関して不明であるが、HO-1 を過剰発現した肺癌継代細胞の増殖が抑制した報告がある。したがって、GT 反復配列の長いアリルを持つ HO-1 の遺伝子多型性の肺扁平上皮癌患者においては、逆に HO-1 の発現発現抑制による細胞増殖促進作用がもたらす可能性がある。今後の研究が必要である。いずれにしても、日本人の喫煙者における肺扁平上皮癌の診断時病期と 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) *CLCA1* 遺伝子に 22 の新規遺伝子多型が検出され、エジプト人では+5080 T/C genotype、日本人では+13924 T/A allele 頻度が慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者と対照群で有意差があった。COPD の病型のうち気道狭窄が主に現れ、肺胞破壊が弱い症例もあり、気道分泌も発症に関与するといわれている。*CLCA1* 遺伝子のうち、+5080 C 遺伝子は+5080T 遺伝子に比べて COPD 発症において防御的役割を有していると示唆された。*CLCA1* 遺伝子の遺伝子多型は COPD 発症と関連があること、関連遺伝子多型は人種間で異なることが明らかとなった。

E. 結論

GT 反復配列の長い HO-1 遺伝子多型性の日本人喫煙者における肺扁平上皮癌発症への関与は認めなかった。ただし、進行性の早い肺扁平上皮癌と GT 反復配列の長い HO-1 遺伝子多型性の関係を認めた。気道分泌も発症に関与するといわれている *CLCA1* 遺伝子の遺伝子多型は COPD 発症と関連があること、関連遺伝子多型は人種間で異なることが明らかとなった。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamaya M, Sasaki H: Rhinovirus and asthma. *Viral Immunol* 16: 99-109, 2003.

Yamaya M, Nakayama K, Ebihara S, Hirai H, Higuchi S, Sasaki H: Relationship between microsatellite polymorphism in the haem oxygenase-1 gene promoter and longevity of the Japanese normal population. *J Med Genet* 40: 146-148, 2003.

Nakajoh M, Fukushima T, Suzuki T, Yamaya M, Nakayama K, Sekizawa K, Sasaki H: Retinoic acid inhibits elastase-induced injury in human lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 296-304, 2003.

Ohru T, Yasuda H, Yamaya M, Matsui T, Sasaki H: Transient relief of asthma symptoms during jaundice: a possible beneficial role of bilirubin. *Tohoku J Exp Med* 199: 193-196, 2003.

Hirai H, Kubo H, Yamaya M, Nakayama K, Numasaki M, Kobayashi S, Suzuki S, Shibahara S, Sasaki H: Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoid cell lines. *Blood* 102: 1619-1621, 2003.

Ishizuka S, Yamaya M, Suzuki T, Takahashi H, Ida S, Sasaki T, Inoue D, Sekizawa K, Nishimura H, Sasaki H: Effects of rhinovirus infection on the adherence of

Streptococcus pneumoniae to cultured human airway epithelial cells. J Infect Dis 188:1928-1939.

Hegab AE, Sakamoto T, Uchida Y, Nomura A, Ishii Y, Morishima Y, Mochizuki M, Kimura T, Saitoh W, Massoud HH, Masoud HM, Sekizawa K: CLCA1 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. J Med Genet 41: E27, 2004.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請中

発明の名称：肺癌の発症リスクを予測するためのデータの収集方法

出願番号：特願 2003-168012 号

発明者：山谷睦雄、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

研究要旨：CLCA1 遺伝子の遺伝子多型と慢性閉塞性肺疾患(COPD) の関連を異なる 2 人種である日本人とエジプト人で検討した。CLCA1 遺伝子に 22 の新規遺伝子多型が検出され、エジプト人では+5080 T/C genotypes、日本人では+13924 T/A allele 頻度が COPD 患者と対照群で有意差があった。CLCA1 遺伝子の遺伝子多型は COPD 発症と関連があるが、関連遺伝子多型は人種間で異なる。

A. 研究目的

COPD 発症の最大要因は喫煙であるが、COPD は喫煙者の約 15%にしか発症しないことより、COPD 発症に遺伝的要素があると考えられている。これまで約 20 の COPD 関連遺伝子が報告されているが、相反する結果が多い。この原因として、人種による違いが考えられているが、同一施で人種差を検討した報告はない。本研究は気道の過分泌と関連が深い CLCA1 遺伝子と COPD の関連を検討するとともに、異なる二つ人種の COPD 発症に及ぼす効果も調べることを目的とする。

B. 研究方法

年齢、喫煙指数が一致する 88 人の COPD 患者と 40 人の対照(日本人)と 106 人の PD 患者と 72 人の対照(エジプト人)末梢血白血球より DNA を抽出し CLCA1 遺伝子の 遺伝子多型を調べた。一秒率はいずれの対照群ともに正常で COPD 患者の平均一秒率は日本人で 47%、エジプト人で 30%でともに有意差があった。

(倫理面への配慮)

筑波大学およびカイロ大学の倫理委員会の許可を得、被検者から同意書を得ている従って、倫理面の配慮はなされていると考えている。

C. 研究結果

CLCA1 遺伝子に 22 の遺伝子多型が検出された。このうち、エジプト人では+5080 T/C genotypes、日本人では+13924 T/A allele 頻度に COPD と対照群で有意差がみられた。遺伝子多型と COPD 発症の間には人種による違いが認められた。

D. 考察

これまで、遺伝子多型と COPD の関連にかんする報告は欧米と日本で大きく異なる。本研究より、その違いが人種の違いで説明しうる可能性が示された。また、CLCA1 遺伝子の遺伝子多型と COPD の発症には両人種共に関連することが示された。

E. 結論

CLCA1 遺伝子は COPD 関連遺伝子の 1 つである。

F. 研究発表

Hegab AE, Sakamoto T, Uchida Y, Nomura A, Ishii Y, Sekizawa K, et al. *CLCA1* gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. J Med Genet 41: E27, 2004

研究成果の刊行に関する一覧表

Yamaya M, Sasaki H.	Rhinovirus and asthma.	Viral Immunol 16: 99-109, 2003.
Yamaya M, Nakayama K, Ebihara S, Hirai H, Higuchi S, Sasaki H.	Relationship between microsatellite polymorphism in the haem oxygenase-1 gene promoter and longevity of the Japanese normal population.	J Med Genet 40: 146-148, 2003.
Nakajoh M, Fukushima T, Suzuki T, Yamaya M, Nakayama K, Sekizawa K, Sasaki H.	Retinoic acid inhibits elastase-induced injury in human lung epithelial cells.	Am J Respir Cell Mol Biol 28: 296-304, 2003.
Ohnui T, Yasuda H, Yamaya M, Matsui T, Sasaki H.	Transient relief of asthma symptoms during jaundice: a possible beneficial role of bilirubin.	Tohoku J Exp Med 199: 193-196, 2003.
Hirai H, Kubo H, Yamaya M, Nakayama K, Numasaki M, Kobayashi S, Suzuki S, Shibahara S, Sasaki H.	Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoid cell lines.	Blood 102: 1619-1621, 2003.
Ishizuka S, Yamaya M, Suzuki T, Takahashi H, Ida S, Sasaki T, Inoue D, Sekizawa K, Nishimura H, Sasaki H.	Effects of rhinovirus infection on the adherence of Streptococcus pneumoniae to cultured human airway epithelial cells.	J Infect Dis 188: 1928-1939, 2003.
Ilegab AE, Sakamoto T, Uchida Y, Nomura A, Ishii Y, Sekizawa K, et al.	CLCA1 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease.	J Med Genet 41: E27, 2004.