

厚生労働科学研究費補助金
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 16 年度 総括研究報告書

主任研究者 山谷 睦雄

平成 17 (2005) 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 山谷 睦雄 | ----- | 1 |
| 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 関沢 清久 | ----- | 6 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 7 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- | 別添 |

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

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 東北大学病院老年・呼吸器内科助教授

(1) 慢性肺気腫を主体とする慢性閉塞性肺疾患(COPD)の発症とヘムオキシゲナーゼ-1のHO-1-413T/AおよびHO-1-413G/Cの単塩基遺伝子多型性を解析した。HO-1-413T/AにおけるアリルAAの頻度はCOPD患者で増加傾向にあったが、有意差は認められなかった。また、HO-1-413G/CにおけるアリルGGの頻度はCOPD患者で減少傾向にあったが、有意差は認められなかった。(2) COPDの発症とIL-1 β -511 T/CおよびIL-1 β -31 T/Cの単塩基遺伝子多型性を調べた。IL-1 β -511 T/Cの単塩基遺伝子多型性においてTTの遺伝子型を有する頻度がCOPDで有意に低い結果となった。他方でIL-1 β -31 T/Cの単塩基遺伝子多型性において、COPDと非COPD対照者で違いを認めなかった。(3) 日本人とエジプト人のCOPDの発症とIL-4の単塩基遺伝子多型性589 C/Tおよび33 C/T、およびIL-4 VNTR、IL-13の単塩基遺伝子多型性1111 C/Tおよび+2044 G/A、ADRB2の単塩基遺伝子多型性+46 A/Gおよび+79 C/Gの単塩基遺伝子多型性を調べた。エジプト人では、ADRB2 +79 C/G genotypeにCCがCOPDに少なく、GGがCOPDに多い有意差があった。ハプロタイプ解析では、日本人では(IL-4 -589 C/T: IL4 VNTR; IL4 -33 C/T: IL4 VNTR)で、エジプト人では(IL-4 -589 C/T: ADRB2 +79 C/G; IL4 VNTR: ADRB2+79 C/G)でCOPDと対象群に有意差が見られた。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。

分担研究者：関沢清久・筑波大学大学院臨床
医学系内科学教授

A. 研究目的

(1) 喫煙習慣が原因で生ずる肺癌および慢性肺気腫を主体とする慢性閉塞性肺疾患(COPD)は罹患率・死亡率が増加しており、発症機序の解明、診断法・治療法・予防法の開発は緊急を要している。肺癌および慢性肺気腫発症に原因遺伝因子の関与が示唆されているが明らかでない。生体の抗酸化酵素は活性酸素や発癌物質を不活性化して喫煙によるDNA損傷を抑制するが、抗

酸化酵素活性と肺癌発症との関係を証明した研究は存在しない。私たちはヘムがヘムオキシゲナーゼで代謝されて産生される一酸化炭素が肺胞マクロファージのオキシダント発生を抑制することを明らかにした。また、ヘムオキシゲナーゼ-1誘導が過酸化水素による気道上皮細胞障害作用を抑制することを明らかにした。このように、私たちはヘムオキシゲナーゼが強力な抗酸化作用を持ち、呼吸器の恒常性維持に重要な働きを持つことを明らかにした。また、ヘムオキシゲナーゼによるヘム分解の結果発生する一酸化炭素が肺から排泄される現象に着目し、気管

支喘息等の炎症性呼吸器疾患における呼気一酸化炭素濃度の上昇を発表した。更に、抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼ遺伝子発現と肺気腫発症の関係を調べ、ヘムオキシゲナーゼ遺伝子発現がGT反復配列によって制御されること、および慢性肺気腫患者において長いGT反復配列を持つ割合が高い遺伝子多型性を世界で初めて明らかにした。また、慢性肺気腫における一酸化炭素ヘモグロビン濃度上昇を明らかにした。平成14年度および平成15年度研究において、喫煙者肺腺癌患者（平成14年度研究、Hum Genet 2005印刷中）および進行性肺扁平上皮癌患者（平成15年度研究）における長いGT反復配列を持つ割合が高い遺伝子多型性を世界で初めて明らかにした。また、グルタチオンS-トランスフェラーゼおよび腫瘍壊死因子(TNF)遺伝子多型性とヘムオキシゲナーゼ-1遺伝子多型性と日本人慢性の関連がないことが明らかになった（平成15年度研究）。これらの研究成果をもとに、本年度はGT反復配列以外のヘムオキシゲナーゼ-1遺伝子多型性と慢性肺気腫を主体とする慢性閉塞性肺疾患(COPD)との関連、炎症性サイトカイン遺伝子多型性および気道平滑筋拡張に参与する β 2-adrenoceptor(ADRB2)遺伝子多型性との関係とを調べ、日本人のCOPD発症遺伝子を検討した。

（倫理面への配慮）

慢性閉塞性肺疾患の遺伝子解析については東北大学医学部倫理委員会と筑波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。

A. 研究方法

慢性閉塞性肺疾患(COPD)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）およびCOPD（慢性閉塞性肺疾患）診断と治療のためのガイドラ

イン（日本呼吸器学会2004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。対象から血液を採取しDNAを抽出し、以下の研究を行なった。（1）COPD患者84名（平均年齢65歳、全て男性）、非COPD喫煙男性96名（平均年齢65歳、全て男性）を比較の対象に、末梢血からDNAを抽出して、ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)遺伝子の413番目の塩基Tが塩基Aに置換されるHO-1-413T/Aおよび、19番目の塩基Gが塩基Cに置換されるHO-1-413G/Cを解析した。（2）COPD85名（平均年齢66歳、男性82名、女性3名）と非COPD対照者68名（平均年齢66歳、男性66名、女性2名）を対象に、IL-1 β -511 T/CおよびIL-1 β -31 T/Cの単塩基遺伝子多型性を調べた。（3）日本人COPD88名（平均年齢67歳、男性85名、女性3名）と非COPD対照者61名（平均年齢68歳、男性60名、女性1名）、およびエジプト人のCOPD106名（平均年齢63歳、男性106名、女性0名）と非COPD対照者72名（平均年齢68歳、男性72名、女性0名）を対象に、IL-4の単塩基遺伝子多型性589 C/Tおよび33 C/T、およびIL-4 VNTR、IL-13の単塩基遺伝子多型性-1111 C/Tおよび+2044 G/A、ADRB2の単塩基遺伝子多型性+46 A/Gおよび+79 C/Gの単塩基遺伝子多型性を調べた。その後、検出された遺伝子多型とCOPDの関連を統計学的手法で検討した。

C. 研究結果

（1）HO-1-413T/AにおけるアリルAAの頻度はCOPD患者で増加傾向にあったが、有意差は認められなかった(P=0.23)。また、HO-1-413G/CにおけるアリルGGの頻度はCOPD患者で減少傾向にあったが、有意差は認められなかった(P=0.31)。HO-1-413T/AおよびHO-1-413G/C

の単塩基遺伝子多型性と COPD 肺疾患との関連は統計学的に有意差を見出せなかった。したがって、現時点において、日本人の COPD とヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子の関係では、単塩基遺伝子多型性よりもこれまでに報告してきた GT 反復配列の方がより強い関係があると示唆された。(2) IL-1 β -511 T/C の単塩基遺伝子多型性において TT の遺伝子型を有する頻度が日本人の COPD で 20%と非 COPD 対照者で 37%を比較した場合、COPD で有意に低い結果となった(P<0.05)。他方で IL-1 β -31 T/C の単塩基遺伝子多型性において、COPD と非 COPD 対照者で違いを認めなかった。(3) エジプト人では、ADRB2 +79 C/G genotype に CC が COPD に少なく(50%対 76%)、GG が COPD に多く(11%対 6%)、COPD と対照群に有意差があった(P<0.01)。ハプロタイプ解析では、日本人では(IL-4 -589 C/T: IL4 VNTR: IL4 -33 C/T: IL4 VNTR)で、エジプト人では (IL-4 -589 C/T: ADRB2 +79 C/G; IL4 VNTR: ADRB2+79 C/G)で COPD と対象群に有意差が見られた。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

(1) 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 α 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 30 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 32 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 32 回未満の 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、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。

その一方で、ヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子の複数の単塩基遺伝子多型(SNP)の中で、ヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子のコード配列 413 番目の塩基 T が塩基 A に置換される SNP(本研究における SNP A)はヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子発現の亢進を認め、さらに、虚血性心疾患抑制との関係が指摘されている。また、コード配列 19 番目の塩基 G が塩基 C に置き換わる SNP(本研究における SNP B)があり、これは 7 番目のアミノ酸においてアスパラギン酸がヒスチジンに置き換わる変異をもたらす。ヘムオキシゲナーゼ-1 のヘム結合リガンドがヒスチジン残基であるため、この多型はヘムオキシゲナーゼ-1 の活性を変化させる可能性がある。

本研究において、SNP A および SNP B の単塩基遺伝子多型性と慢性閉塞性肺疾患との関連は統計学的に有意差を見出せなかった。逆に、ヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子発現を亢進させる SNP A における AA ゲノタイプの頻度が慢性閉塞性肺疾患でむしろ多い傾向があった。また、SNP B における GG ゲノタイプの頻度が慢性閉塞性肺疾患で多い傾向があった。SNP B における GG ゲノタイプにおけるヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子発現が高いか低いかについては現在検討中である。症例数を増加させればいずれも有意差が出る性質であると予想される。その一方

で、ヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子の発現を制御する GT 反復配列の遺伝子多型性は、単塩基遺伝子多型性解析と同一の対象者を用いて再検討しても、GT 反復配列の長い伝子多型性と慢性閉塞性肺疾患との間に強い関係を認めた。したがって、現時点において、日本人の慢性閉塞性肺疾患とヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子の関係では、単塩基遺伝子多型性よりも GT 反復配列の方がより強い関係があると示唆された。

(2) 慢性閉塞性肺疾患の病態や急性増悪には種々の炎症性サイトカインの関与が指摘されている。これらの炎症性サイトカインは気道壁や肺胞壁に炎症性細胞を集積させ、肺胞破壊や気道狭窄をもたらす。今回の結果は IL-1 β -511 T/C の単塩基遺伝子多型性において TT の遺伝子型を有する頻度が日本人の COPD で 20%と非 COPD 対照者で 37%を比較した場合、COPD で有意に低い結果となった(P<0.05)。TT の遺伝子型は IL-1 β の発現亢進に作用することがこれまで報告されており、慢性閉塞性肺疾患の気道壁や肺胞壁の炎症に関係している可能性がある。

(3) 気管支喘息のみならず、COPD にも気道過敏性の存在が指摘されているが、本研究により、ADRB2 遺伝子の遺伝子多型が COPD 発症と関連すること、そして遺伝子多型と COPD 発症の関係は人種間で異なることが示された。COPD の気道過敏性の機序を考える上で重要な知見と考えられる。

E. 結論

慢性閉塞性肺疾患(COPD)発症と IL-1 β および ADRB2 の単塩基遺伝子多型性の関係が明らかとなった。また、ヘムオキシゲナーゼ-1 の単塩基遺伝子多型性と慢性閉塞性肺疾患発症との関係は見出せなかった。COPD に関連する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 airway allergy. *Allergology International* 53: 37-45, 2004.

Yasuda H, Yamaya M, Ebihara S, Sasaki T, Maruyama M, Ishizawa K, Kanda A, Sasaki H: Increased arteio-venous Hb-CO differences in inflammatory pulmonary diseases. *Chest* 125: 2160-2168, 2004.

Furukawa E, Ohru T, Yamaya M, Suzuki T, Nakasato H, Sasaki T, Kanda A, Yasuda H, Nishimura H, Sasaki H: Human airway submucosal glands augment eosinophil chemotaxis during rhinovirus infection. *Clin Exp Allergy* 34: 704-711, 2004.

Yasuda H, Ebihara S, Yamaya M, Mashito Y, Nakamura M, Sasaki H: Increased arterial carboxyhemoglobin concentrations in elderly patients with silicosis. *J Am Geriatr Soc* 52: 1403-1404, 2004.

Yasuda H, Yamaya M, Ebihara S, Sasaki T, Inoue D, Kubo H, Suzuki S, Sasaki H: Arterial carboxyhemoglobin concentrations in elderly patients with operable non-small cell lung cancer. *J Am Geriatr Soc* 52: 1592-1593, 2004.

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.

Hegab AE, Sakamoto T, Saitoh W, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, Sekizawa K: Polymorphisms of IL4, IL13, and ADRB2 genes in COPD. *Chest* 126: 1832-1839, 2004.

Hegab AE, Sakamoto T, Uchida Y, Nomura A, Ishii Y, Morishima Y, Mochizuki M, Kimura T, Saitoh W, Massoud HH, Massaud HM, Hassanein KM, Sekizawa K: CLCA1 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *J Med Genet* 41: e27, 2004.

Hegab AE, Sakamoto T, Uchida Y, Nomura A, Ishii Y, Morishima Y, Mochizuki M, Kimura T, Saitoh W, Kiwamoto T, Iizuka T, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, Sekizawa K: Association analysis of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 gene polymorphisms with COPD in Egyptians. *Respir Med* 99: 107-110, 2005.

Kikuchi A, Yamaya M, Suzuki S, Yasuda H, Kubo H, Nakayama K, Handa M, Sasaki T, Shibahara S, Sekizawa K, Sasaki H: Association of susceptibility to the development of lung adenocarcinoma with the heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism. *Hum Genet* 116: 354-360, 2005.

2. 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）
（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

（分担）研究者 関沢清久 筑波大学臨床医学系内科学教授

研究要旨 *IL4*, *IL13*, $\beta 2$ -adrenoceptor (*ADRB2*) 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。*ADRB2*+79C/G 遺伝子多型とハプロタイプは 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。本研究は気道過敏性と関連が深い *IL-4*, *IL-13*, *ADRB2* 遺伝子多型と異なる 2 人種の COPD 発症との関連を検討す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 COPD 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 *IL-4*, *IL-13*, *ADRB2* 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

エジプト人では、*ADRB2*+79 C/G genotype に COPD と対照群に有意差があった。

ハプロタイプ解析では、日本人では(*IL-4*-589 C/T, *IL4*-33 C/T; *IL4* VNTR) で、エジプト人では (*IL-4*-589 C/T; *ADRB2*+79 C/G; *IL4* VNTR: *ADRB2*+79 C/G)で COPD と対象群に有意差が見られた。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. 考案

気管支喘息のみならず、COPD にも気道過敏性の存在が指摘されているが、本研究により、*ADRB2* 遺伝子の遺伝子多型が COPD 発症と関連すること、そして遺伝子多型と COPD 発症の関係は人種間で異なることが示された。COPD の気道過敏性の機序を考える上で重要な知見と考えられる。

E. 結論

COPD に関連する遺伝子多型は人種間で異なる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hegab AE, Sakamoto T, Saitoh W, et al. Polymorphisms of *IL-4*, *IL-13*, and *ADRB2* genes in COPD. *Chest* 126: 1832-1839, 2004.

研究成果の刊行に関する一覧表・1

| | | |
|--|---|--|
| Yamaya M, Sasaki H. | Rhinovirus and airway allergy. | Allergology International 53: 37-45, 2004. |
| Yasuda H, Yamaya M, Ebihara S, Sasaki T, Maruyama M, Ishizawa K, Kanda A, Sasaki H. | Increased arteio-venous Hb CO differences in inflammatory pulmonary diseases. | Chest 125: 2160-2168, 2004. |
| Furukawa E, Ohru T, Yamaya M, Suzuki T, Nakasato H, Sasaki T, Kanda A, Yasuda H, Nishimura H, Sasaki H. | Human airway submucosal glands augment eosinophil chemotaxis during rhinovirus infection. | Clin Exp Allergy 34: 704-711, 2004. |
| Yasuda H, Ebihara S, Yamaya M, Mashito Y, Nakamura M, Sasaki H. | Increased arterial carboxyhemoglobin concentrations in elderly patients with silicosis. | J Am Geriatr Soc 52: 1403-1404, 2004. |
| Yasuda H, Yamaya M, Ebihara S, Sasaki T, Inoue D, Kubo H, Suzuki S, Sasaki H. | Arterial carboxyhemoglobin concentrations in elderly patients with operable non-small cell lung cancer. | J Am Geriatr Soc 52: 1592-1593, 2004. |
| Hegab AE, Sakamoto T, Uchida Y, Nomura A, Ishii Y, Morishima Y, Mochizuki M, Kimura T, Saitoh W, Massoud HH, Massaud HM, Hassanein KM, Sekizawa K. | CLCA1 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. | J Med Genet 41: E27, 2004. |
| Hegab AE, Sakamoto T, Saitoh W, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, Sekizawa K. | Polymorphisms of IL4, IL13, and ADRB2 genes in COPD. | Chest 126: 1832-1839, 2004. |
| Hegab AE, Sakamoto T, Uchida Y, Nomura A, Ishii Y, Morishima Y, Mochizuki M, Kimura T, Saitoh W, Kiwamoto T, Iizuka T, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, Sekizawa K. | Association analysis of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 gene polymorphisms with COPD in Egyptians. | Respir Med 99: 107-110, 2005. |
| Kikuchi A, Yamaya M, Suzuki S, Yasuda H, Kubo H, Nakayama K, Handa M, Sasaki T, Shibahara S, Sekizawa K, Sasaki H. | Association of susceptibility to the development of lung adenocarcinoma with the heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism. | Hum Genet 116: 354-360, 2005. |
| | | |