

2009003208

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14年度-16年度 総合研究報告書

主任研究者 山谷 睦雄

平成17(2005)年3月

## 目 次

I. 総合研究報告 肺癆および慢性肺気腫原因遺伝子の研究 山谷 睦雄	-----	1
II. 分担総合研究報告書 肺癆および慢性肺気腫原因遺伝子の研究 関沢 清久	-----	11
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	15
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 東北大学病院老年・呼吸器内科助教授

(1) 肺腺癌および肺扁平上皮癌発症とヘムオキシゲナーゼ-1の遺伝子発現を制御するGT反復配列数の関係を解析した。肺腺癌とりわけ喫煙肺腺癌において、GT反復配列が33回以上のL型に所属するアリルおよび遺伝子型の割合は対照者に比べて有意に増加していた。肺扁平上皮癌において、GT反復配列が33回以上のL型に所属するアリルおよび遺伝子型の割合は対照者の割合に比べて有意差を認めなかった。発見時病期の進行期(病期IIIBおよび病期IV)の肺扁平上皮癌におけるL型アリルの割合および遺伝子型を有する割合は早期扁平上皮患者(病期0-病期IIIA)におけるL型のアリルの割合および遺伝子型を有する割合に比較して、有意に増加していた。(2) 慢性肺気腫を主体とする慢性閉塞性肺疾患(COPD)の発症と以下の遺伝子多型性との関係を解析した: グルタチオン-Sトランスフェラーゼ(GST)遺伝子欠損、TIMP-2、CLCA1、ヘムオキシゲナーゼ-1の単塩基遺伝子多型性、およびIL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-13およびADRB2。慢性肺気腫および慢性閉塞性肺疾患(COPD)発症とTIMP-2、CLCA1、IL-1 $\beta$ 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。グルタチオン-Sトランスフェラーゼ(GST)欠損、および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。CLCA1、IL-4およびADRB2の単塩基遺伝子多型性における人種差が明らかとなった。

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) 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(GST)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(HO)はヘムをビリ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(HO-1)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、次の通りの計画で GT 反復配列数を解析した：平成 14 年度；肺腺癌、平成 15 年度；肺扁平上皮癌。(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。本研究において、慢性肺気腫あるいは慢性肺気腫を主体とする慢性閉塞性肺疾患(COPD)の発症と以下の遺伝子多型性について検討した。1) 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(平成 14 年度)、2) 蛋白融解酵素の内因性阻害物質である TIMP 遺伝子の遺伝子多型性について(平成 14 年度)、3) 気道分泌と関係の深い CLCA1 遺伝子の多型性について(平成 15 年度)、4) ヘムオキシゲナーゼ遺伝子の単塩基遺伝子多型性について(平成 16 年度)、5) IL-1 $\beta$ 、および 6) IL4、IL13 などの炎症性サイトカインおよび気道平滑筋拡張に関与する  $\beta$ 2-adrenoceptor(ADRB2) 遺伝子多型性について(平成 16 年度)。

(倫理面への配慮)

肺癌および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

(1-1)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。

(1-2)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。

(2-1) 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)を対象にグルタチオン-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。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。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。

(2-2) 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。

(2-3) 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、CLCA 1 遺伝子を解析した。

(2-4) 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。

(2-5) 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 $\beta$ -511 T/C および IL-1 $\beta$ -31 T/C の単塩基遺伝子多型性を調べた。

(2-6) 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

(1-1) 肺腺癌 151 名のうち、GT 反復配列が 33 回以上の L 型に所属するアリルの割合は 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 型のアリルの割合 (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 型アリルの割合 (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 型のアリルの割合 (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 型アレルの割合(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  $P=0.4$ )。

(1-2) 肺扁平上皮癌 100 名のうち、GT 反復配列が 33 回以上の L 型に所属するアレル(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 型アレルの割合(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 型のアレルの割合(13%)および遺伝子型を有する割合(23%)に比較して、有意に増加していた( $P<0.05$  および  $P<0.05$ )。

(2-1) 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。

(2-2) 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。

(2-3) CLCA 1 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。CLCA 1 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。

(2-4) HO-1-413T/A におけるアレル 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 におけるアレル 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。

(2-5) IL-1 $\beta$ -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 $\beta$ -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。

(2-6) 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

(1-1) (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。喫煙肺癌患者の 80%以上が男性であり、非喫煙肺癌患者の 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。

(1-2) 肺腺癌の結果と異なり、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ル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ル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。

(2-1) 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 $\alpha$ 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 転スフェラーゼ (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。

(2-2) 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。

(2-3) CLCA 1 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。CLCA 1 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。CLCA 1 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。

(2-4) GT 反復配列の他にもヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子発現を制御する単塩基遺伝子多型 (SNP) が報告されている。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。

(2-5) 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 $\beta$ -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 $\beta$ 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。

(2-6) 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

肺腺癌発症および肺扁平上皮癌の進展性とヘムオキシゲナーゼ-1 の遺伝子多型性の関係が明らかとなった。慢性肺気腫および慢性閉塞性肺疾患(COPD)発症と TIMP-2、CLCA 1、IL-1 $\beta$  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。グルタチオン-S トランスフェラーゼ(GST)遺伝子欠損、および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。CLCA 1、IL-4 および ADRB2 の単塩基遺伝子多型性における人種差が明らかとなった。

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

山谷睦雄関連

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, Ohru 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.
- Yamaya M, Sasaki H: Rhinovirus and asthma. J Med Genet 40: 146-148, 2003.
- 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, 2003.

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.

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.

関沢清久関連

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.

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.

## 2. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請中

発明の名称：ヘムオキシゲナーゼ-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内科学教授

（1）Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)の遺伝子多型性と肺気腫発症の関連を検討したところ、TIMP-2 遺伝子の2個所に遺伝子多型性が検出された。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。（2）慢性肺気腫を主体とする慢性閉塞性肺疾患(COPD)の発症と気道分泌と関係の深い CLCA 1 遺伝子との関係を調べた。CLCA 1 遺伝子に 22 の新規遺伝子多型性が検出され、エジプト人では+5080 T/C genotype の頻度が COPD 患者で対照群に比べて低い結果が得られた。日本人では+13924 T/A allele 頻度が COPD 患者で対照群に比べて高い結果が得られた。CLCA 1 遺伝子の遺伝子多型性は 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。（3）IL4、IL13 などの炎症性サイトカインおよび気道平滑筋拡張に関与する  $\beta$ 2-adrenoceptor(ADRB2) 遺伝子多型性と COPD との関係を調べた。エジプト人では、ADRB2 +79 C/G genotype に CC が COPD に少なく、GG が COPD に多く、COPD と対照群に有意差があった。ADRB2 遺伝子多型性と COPD 発症の間には人種による違いが認められた。

A.研究目的

（1）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10-15%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、COPD および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、日本人の COPD 発症関連遺伝子は不明である。平成14年度から16年度において以下の研究を行なった。（1）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。平成14年度において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性と慢性肺気腫の関連性を検討した。（2）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。CLCA 1 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。COPD の発症

素因をさらに検討するため、平成 15 年度は気道分泌と関係の深い CLCA 1 遺伝子の多型性を検討した。(3) 平成 16 年度は気道過敏性と関連が深い IL-4, IL-13, ADR B2 遺伝子多型性と異なる 2 人種の COPD 発症との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

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および COPD の遺伝子解析を行った。

#### A. 研究方法

(1) 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性と肺気腫の関連を統計学的手法で検討した。

(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)の末梢血白血球より DNA を抽出し、CLCA 1 遺伝子を解析した。

(3) 日本人 COPD 88 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 COPD 106 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。

慢性閉塞性肺疾患(COPD)および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)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。

#### C. 研究結果

(1) 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。

(2) CLCA 1 遺伝子に 22 の新規遺伝子多型性が検出され、エジプト人では+5080 T/C genotype が 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。CLCA 1 遺伝子の遺伝子多型は COPD 発症と関連があること、関連遺伝子多型性は人種間で異なることが明らかとなった。

(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。遺伝子多型性と COPD 発症の間には人種による違いが認められた。

#### D. 考察

(1) 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 に遺伝子多型性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間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。

(2) CLCA 1 遺伝子に 22 の新規遺伝子多型性が検出され、エジプト人では +5080 T/C genotype、日本人では +13924 T/A allele 頻度が 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。CLCA 1 遺伝子のうち、+5080 C 遺伝子は +5080T 遺伝子に比べて COPD 発症において防衛的役割を有していると示唆された。CLCA 1 遺伝子の遺伝子多型性は COPD 発症と関連があること、関連遺伝子多型性は人種間で異なることが明らかとなった。

(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性が 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

TIMP-2 遺伝子の遺伝子多型性は肺気腫発症と

関連する可能性が高い。気道分泌も発症に関与するといわれている CLCA 1 遺伝子の遺伝子多型性は 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。ADRB2 遺伝子の遺伝子多型性が COPD 発症と関連すること、そして遺伝子多型性と COPD 発症の関係は人種間で異なることが示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 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.

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.

H.知的所有権の取得状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表-1

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.
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, Ohruai 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, Ohruai T, Sasaki H.	Bilirubin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats.	Am J Respir Crit care Med 165: 406-411, 2002.
Ohruai 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, Ohruai T, Arai H, Sasaki H.	Sitting position prevent aspiration in bed-bound patients.	Gerontology 48: 194-195, 2002.
Nakamura M, Matsui T, Ohruai 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, Ebiyara 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, Ebiyara S, Arai H.	Characteristics of respiratory diseases in older people.	JMAJ 45: 231-236, 2002.
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.
Yamaya M, Sasaki H.	Rhinovirus and asthma.	Viral Immunol 16: 99-109, 2003.
Yamaya M, Nakayama K, Ebiyara 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.
Ohrui 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.
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.

研究成果の刊行に関する一覧表 -3

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.
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, 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.