

令和7年度 厚生労働科学研究費
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)

呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索

分担研究報告書

研究分担者	大坪和明	熊本大学	研究協力者	橋本弘司	熊本大学
研究分担者	首藤 剛	熊本大学	研究協力者	河野圭亮	熊本大学
研究分担者	黒澤 一	東北大学			
研究分担者	緒方裕光	女子栄養大学			
研究代表者	大森久光	熊本大学			

研究要旨

本研究は、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的とした。本研究は、先行研究での受動喫煙の評価方法に加えて、曝露指標（尿中ニコチン代謝物）、臨床指標（炎症、呼吸機能）および肺への影響指標を分析し、加熱式たばこの使用によって影響の生じるバイオマーカーの抽出および選定を目指すことに特色がある。加熱式たばこによる受動喫煙が人の健康に及ぼす影響をバイオマーカーから予測し、評価することを最終目的とする。

本研究は、「項目1：加熱式たばこ使用による受動喫煙曝露の実態調査（長期間の臨床指標への影響の評価）」および「項目2：呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索」で構成されている。本分担研究は項目2を担当する。

令和7年（2025年）度は、リクルートした研究対象者の余剰血清より、エクソソーム（細胞外小胞）miRNAを次世代シーケンサーで解析し、そのプロファイルの取得を行った。主成分分析では、肺気腫の有無でクラスターが分かれること、つまり肺病変によってmiRNAプロファイルが変化することを見出し、さらに、肺障害関連miRNAの解析、たばこの種類の比較や、病態に繋がるバイオマーカーの探索を行った。

血清miRNAのレベルを肺気腫の有無でプロットすると、肺気腫で減少するmiRNAや、肺気腫で増加するmiRNA、さらには肺気腫のみで出現するmiRNAを捉えることができた。この増減するmiRNAをボルケーノプロットで解析し、統計学的に有意に上昇、低下するmiRNAを割り出した。

それらmiRNAのgene ontology解析を行った結果、慢性炎症や、脂質代謝、骨格筋の萎縮、細胞老化、血管内皮の障害、酸化ストレス応答、上皮細胞のアポトーシス、細胞マトリックスの破壊といった、肺疾患に特徴的な表現系（COPDの併存疾患）がエンリッチ（指し示め）された。このように、血清中miRNAは肺疾患の良いバイオマーカーとなることが判明した。

さらに、リアルPCRによるmiRNAの精密定量系を組み立てた。例えば、肺気腫で有意

に増加していた **miR-766-3p** を喫煙の種類別ごとに定量すると、この miRNA が、喫煙により誘導されること、特に、加熱式タバコで、統計学的に有意に増加することが明らかとなった。miR-766-3p は、非小細胞がんを促進させる因子として知られており、これらの結果は、加熱式タバコは紙巻きタバコと比較して肺気腫患者への肺がん発症リスクをより高める可能性があることを示唆する。

次世代シーケンサーにより miRNA のプロファイルを解析し、加熱式タバコによる能動喫煙および受動喫煙者で有意に変動する miRNA を決定し、リアルタイム PCR で検証を行い、一般の医療機関での解析可能な miRNA バイオマーカーの創出が可能となった。

これら取得データに基づいて曝露指標（尿中ニコチン代謝物）、臨床指標（特に呼吸機能）の経年変化および炎症指標（高感度 C 反応性蛋白、白血球）との関連について分析中である。とりわけ、肺胞破壊や COPD の病態マーカーである Fibulin-3 及び SP-D との相関性を解析し、その結果及び健康診断の結果と miRNA を指標とした解析結果との相関性を解析することで、呼吸器疾患につながり得るバイオマーカーを見出し、その評価方法を開発する。

開発した方法を用いて、順次、加熱式タバコの使用および受動喫煙の評価を行う。さらに、国内で主に使用されている複数のメーカーの加熱式タバコについての解析を行う。

A. 研究目的

加熱式タバコによる受動喫煙の健康影響について明らかにすることが目的である。

これまで、紙巻タバコについては受動喫煙による健康影響が明らかになっているが、加熱式タバコについては主流煙にニコチンや発がん性物質が含まれていることは明らかであるものの、現時点では受動喫煙による長期的な健康影響を予測することは難しい状況である。このような状況を踏まえ、健康増進法の改正において、加熱式タバコによる受動喫煙が人の健康に影響を及ぼす調査研究を一層推進し、可能な限り早期に結論を得よう附帯決議がなされた。

申請者らは、日本医療研究開発機構（AMED）（2018-19 年）および厚生労働科学研究費補助金（2019-22 年）の助成を受け、父親が加熱式タバコを使用している非喫煙

家族（配偶者と子供）の尿中ニコチン代謝物は、非喫煙・非使用家族に対して有意に高値を示し、受動喫煙による曝露の実態を明らかにした。（Onoue A, Omori H. et al. *Int J Environ Res Pub Health*. 2022, 19, 6275.）

本研究では、曝露指標に加えて、影響指標を用いた評価方法の開発を行い、加熱式タバコによる受動喫煙が人の健康に及ぼす影響をバイオマーカーから予測し、評価することを最終目的として、以下の 4 点について検討した。

- ① 呼吸機能、炎症、尿中のニコチン代謝物など、加熱式タバコの使用によって影響の生じるバイオマーカーの抽出・選定

- ② 疾患につながり得るバイオマーカーを用いた、加熱式たばこの喫煙及び受動喫煙の評価方法の開発
- ③ 開発した方法に基づいて実施する加熱式たばこの喫煙及び受動喫煙の評価
- ④ 国内で主に使用されている複数のメーカーの加熱式たばこについての解析

B. 研究方法

項目 2：呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索

(首藤班員、河野研究協力者、大坪班員、橋本弘司研究協力者、黒澤班員、緒方班員、大森代表者)

【曝露指標の分析】

図 1 にニコチンの代謝経路を示す。

・尿中ニコチン代謝物: コチニン、3-ハイドロキシコチニン (3-OHCot)

依存性化学物質。過去 2-3 日間のニコチン曝露量を反映。

・尿中たばこ特異的ニトロソアミン類: NNAL: 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone

たばこ製品由来の発がん性物質。中期的な曝露マーカー (半減期 15-45 日)

・トリプル四重極型(QQQ)LC-MS (liquid chromatography [LC] / mass spectrometry [MS]) を確立しその手法を用いて測定する。

【対象者】

現在までに、令和 5 年 (初年度) および 6 年 (2 年目) にリクルートした以下の対象者について分析した。

【CT 肺気腫 118 名】紙巻 30 名、加熱式 23 名、併用 2 名、電子 1 名、過去喫煙 53 名、非喫煙 7 名

【CT 肺気腫なし (呼吸機能正常) 34 名】

受動喫煙あり 25 名、受動喫煙なし 9 名 (Control)

【呼吸器疾患につながり得る影響指標の分析】

図 2 に概念図、図 3 に本研究における曝露指標と生体機能の変化 (影響マーカー) を示す。

・ **SP-D** : 肺の II 型肺胞上皮細胞より産生・分泌される**肺特異的糖タンパク質**である。SP-D 遺伝子の SNPs(Rs721917, Met11Thr) が血清中の SP-D レベルの低下を招く、COPD、肺気腫と相関、血清 SP-D が喫煙者で高値、COPD 患者で高値などが報告されており、**COPD の病態バイオマーカー (肺障害を反映)** である。

・ 令和 5 年度および 6 年度収集サンプルより、CT 肺気腫あり 121 名、CT 肺気腫なし 34 名の血清 50 mL から Human SP-D Quantitation ELISA kit(R&D systems, Inc)により Serum SP-D レベルを測定した。

・ **Fibulin-3** : 生体を構成する殆ど全ての細胞が分泌する**エクソソーム (細胞外小胞)** が、細胞機能の制御や疾患の進展に大きく寄与することが報告され、現在、血液や尿等

の体液を利用した疾患診断（リキッドバイオプシー）として、世界的に注目されている。

慢性閉塞性肺疾患（COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease）患者血清のプロテオミクス解析により、エラスチン繊維の変性・破壊を反映する。

細胞外小胞タンパク質として同定された肺胞破壊（肺気腫）関連バイオマーカーである。

(Koba T, ERJ open research, 2020)

・次世代シーケンシング（NGS：Next Generation Sequencing）による miRNA の発現プロファイル解析による病態モニタリング

微量な余剰血清よりエクソソーム（細胞外小胞）に含まれる miRNA を抽出し、次世代シーケンシング（NGS：Next Generation Sequencing）による miRNA の発現プロファイル解析法およびクラスター分析（主成分分析）法を確立した。

【miRNA の発現プロファイル解析】

【令和 6（2024）年収集サンプルの解析】

・CT 肺気腫なし (NEP)：23 検体

・CT 肺気腫あり (EP)：25 検体

[喫煙無 10、喫煙 15（紙巻たばこ 9、加熱式たばこ 5、電子たばこ 1）]

・平均年齢：NEP53 才、EP63 才

・年齢による miRNA プロファイルの変化がないことを検証・確認済み

・令和 5（2023）年収集サンプル（miRNA ライブラリー DNA 少ない）に比べて、血清サンプルの凍結融解を避け、採取サンプル

は 1 回融解後、迅速に miRNA の精製を行ったことにより、令和 6（2024）年収集サンプルでは、存在比の小さな miRNA の検出力が向上した。（令和 5 年度報告書）

C. 結果

項目 2：呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索

（首藤班員、河野研究協力者、大坪班員、橋本弘司研究協力者、黒澤班員、緒方班員、尾上協力者、大森代表者）

【曝露指標の分析】

尿中バイオマーカーとしてニコチン代謝物（TNM）、たばこ特異的ニトロソアミン代謝物（NNAL：4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol)

・トリプル四重極型 (QQQ) LC-MS にて、測定対象であるニコチン、コチニン、3-OH コチニン、NNAL が実際に測定可能かどうか、またその測定可能な濃度域の検討を行った。

・上記 4 種類の化合物の標準物質、安定同位体である d3-コチニン、13C6 NNAL を濃度別に流し、検量線の作製に成功した。

・検量線の範囲をもとに、尿を前処理する段階で添加する標準物質の濃度を検討し、成功したので、実サンプルでの測定を開始した。なお、本測定系では、1 サンプルおよそ 10-15 分で測定可能であり、無人状態でも継続して測定が可能であるため、理論上は、1 日（24 時間）でおよそ 96 サンプルの測定が可能となった。

喫煙者・受動喫煙者の生体試料(尿)に含まれているたばこ由来のニコチン代謝物と尿中たばこ特異的ニトロソアミン (NNAL) の曝露影響マーカーに対するトリプル四重極型 (QQQ) LC-MS による受動喫煙レベルでの高感度分析方法を確立した。

- ・ニコチン代謝物は、CT 肺気腫なしの群で、受動喫煙「なし」に対して「あり」の群で有意に高値を示した。(p<0.05)

(図 4－8)

図 4：尿中 Nicotine

図 5：尿中 Cotinine

図 6：尿中 3OHCotinine

図 7：尿中 Cotinine+ 3 OHCotinine

図 8：尿中 Nicotine +Cotinine
+3OHCotinine

・尿中 NNAL

- ・CT 肺気腫なしの群で受動喫煙「なし」に対して「あり」の群で高値の傾向を示したが有意な差は認めなかった。研究期間中の全サンプルを検討している。

図 9：尿中 NNAL

【呼吸器疾患につながり得る影響指標の分析】

【血清 SP-D レベル (CT 肺気腫有無別)】

- ・CT 肺気腫なし (34 検体) の測定値：
平均値±SD：5.18±3.18
- ・CT 肺気腫あり (121 検体) の測定値：
平均値±SD：7.23±6.87

肺気腫あり群 (7.23±6.87) が肺気腫なし群 (5.18±3.18) と比較して SP-D レベルが

高い傾向を示した (P=0.095)。

全体では有意差を認めなかったものの、CT 肺気腫ありの群で高値を示す者がおり、さらなる詳細な検討中である。

図 10：血清 SP-D レベル (CT 肺気腫有無別)

【血清 SP-D レベル (CT 肺気腫有無別+受動喫煙有無別+タバコの種類別)】

SP-D の値は、紙巻たばこ (CC) と加熱式たばこの間で差を認めなかった。同様の影響を及ぼす可能性があると考えられた。

図 11：血清 SP-D レベル

(CT 肺気腫有無別+受動喫煙有無別+タバコの種類別)

【血清 Fibrin-3】

血清 Fibrin-3 レベルに関しては、肺気腫ありで高い発現を示す検体が多く見られたが、統計学的有意差は見られなかった (図 12)。

今後、解析検体数を増やすことで解析の信頼性を向上させる。

図 12：血清 Fibrin 3 (CT 肺気腫有無別)

図 13：血清 Fibrin 3

(CT 肺気腫有無別+受動喫煙有無別+たばこの種類別)

【次世代シーケンサーによる miRNA プロファイリング】

微量血清サンプルからの miRNA プロファイリングの実験条件の設定のための検討を行った。

微量血清サンプルからの miRNA プロファ

イリングの実験条件の設定のため、異なる被検者 12 名から取得した血清サンプル (200 μ l $\sim$ 1ml) から miRNA 抽出を行った。

その結果、健診の残余検体で得られる検体量から本解析に必要な miRNA を分解することなく十分量取得できることが確認された。次に、取得した miRNA サンプルから次世代シーケンサー解析用のライブラリーを作成し、そのサイズ分布及び定量解析から解析に適したライブラリーを作成できることを確認した。次世代シーケンサーによる 12 サンプルの解析から、各血清サンプル中の miRNA プロファイルの取得に成功した。

表 1. NGS による miRNA の発現プロファイル (その他：参照)

より信頼あるデータを取得するために昨年の解析から改善を試み、存在比の小さな miRNA の検出力が向上した。

図 14 : miRNA プロファイリング

この手法を用いて、胸部 CT 検診受診者 24 名 (肺気腫なし 6 名、肺気腫あり 18 名) を対象として NGS による miRNA の発現プロファイル解析を実施した (表 1)。

表 1. NGS による miRNA の発現プロファイル (その他：参照)

この解析から、発現上位 50 位までの miRNA において肺気腫あり検体で発現が低下している傾向が見られた。また、肺気腫あり検体のみで検出される miRNA が、発現上位 221 位以降に数多く検出されており、これらが肺気腫の病態や肺機能と関連するバイオマーカーとなる可能性がある。

また、取得した miRNA プロファイル結果

についてクラスター分析 (主成分分析) を行った結果、第 1 主成分が強力な因子であることが示された。

図 15 : 血清 miRNA の主成分分析における因子解析

第 1 主成分および第 2 主成分でのプロットにより、精度は劣るものの肺気腫あり、なしの検体がある程度分類しうることが示された。

図 16 : miRNA の主成分分析による検体のクラスタリング

さらには、主成分分析から発現上位 50 位までの miRNA において、機能的に関連あるものがクラスタリングされる傾向が見られた。

図 17 : 検出された主要 miRNA Top50 の主成分分析

微量な余剰血清よりエクソソーム (細胞外小胞) に含まれる miRNA を抽出し、次世代シーケンシング (NGS: Next Generation Sequencing) による miRNA の発現プロファイル解析法およびクラスター分析 (主成分分析) 法を確立した。

今後、加熱式使用群、紙巻喫煙群、非喫煙群について、次世代シーケンサーによる miRNA プロファイリングを行う。取得した結果についてクラスター分析を行い、各群を分類しうるマーカー miRNA を見出す。

リクルートした研究対象者の余剰血清より、エクソソーム (細胞外小胞) miRNA を次世代シーケンサーで解析し、そのプロファイルの取得を行った。主成分分析では、肺気腫の有無でクラスターが分かれること、つ

まり肺病変によって miRNA プルファイルが変化することを見出し (図 18)、さらに、肺障害関連 miRNA の解析、たばこの種類の比較や、病態に繋がるバイオマーカーの探索を行った。

図 18: CT 肺気腫有無における血清 miRNA の主成分分析

血清 miRNA のレベルを肺気腫の有無でプロットすると、肺気腫で減少する miRNA や、肺気腫で増加する miRNA、さらには肺気腫のみで出現する miRNA を捉えることができた。(図 19、20)。

図 19: 肺気腫の有無における miRNA の発現レベルの比較

図 20: 肺気腫ありのみで検出された miRNA

この増減する miRNA をボルケーノプロットで解析すると統計学的に有意に上昇、低下する miRNA を割り出すことができた。

図 21: 肺気腫の有無により発現レベルが変動する miRNA (ボルケーノプロット)

その miRNA の gene ontology 解析を行った結果、慢性炎症や、脂質代謝、骨格筋の萎縮、細胞老化、血管内皮の障害、酸化ストレス応答、上皮細胞のアポトーシス、細胞マトリックスの破壊といった、肺疾患に特徴的な表現系 (COPD の併存疾患) がエンリッチ (指し示め) された。このように、血清中 miRNA は肺疾患の良いバイオマーカーとなることが判明した。

図 22: 肺気腫の有無により発現レベルが変動する miRNA の Gene Ontology 解析結果

通常、鎖長が短い miRNA は PCR による検

出が困難であるとされるが、Loop-PCR 法を応用することで、リアル PCR による miRNA の精密定量系を組み立てた。

例えば、肺気腫で増加した miR-766-3p を定量すると、この miRNA が、喫煙により誘導されること、特に、加熱式タバコで、統計学的に有意に増加することが明らかとなった。

図 23: リアルタイム PCR による血清中 Has-miR-766-3p の精密定量

miR-766-3p は、非小細胞がんを促進させる因子として知られており、これらの結果は、加熱式タバコは紙巻きタバコと比較して肺気腫患者への肺がん発症リスクをより高める可能性があることを示唆する。

図 23: リアルタイム PCR による血清中 Has-miR-766-3p の精密定量

次世代シーケンサーにより miRNA のプロファイルを解析し、加熱式タバコによる能動喫煙および受動喫煙者で有意に変動する miRNA を決定し、リアルタイム PCR で検証を行い、一般の医療機関での解析可能な miRNA バイオマーカーの創出が可能となった。

図 24: 血清中細胞外小胞 miRNA の解析によるバイオマーカー創出戦略

臨床指標 (特に呼吸機能) の経年変化および炎症指標 (高感度 C 反応性蛋白、白血球) との関連について分析中である。

肺泡破壊や COPD の病態マーカーである Fibulin-3 及び SP-D の解析結果及び健康診断の結果と miRNA を指標とした解析結果との相関性を解析することで、呼吸器疾患に

つながり得るバイオマーカーを見出し、その評価方法を開発する。

開発した方法を用いて、順次、加熱式たばこの使用および受動喫煙の評価を行う（目的③）。さらに、国内で主に使用されている複数のメーカーの加熱式たばこについての解析を行う（目的④）。（全班員）

研究成果は順次、学会発表、論文を作成し公表する。

E. 結語

影響指標の分析として、微量な余剰血清よりエクソソーム（細胞外小胞）に含まれる miRNA を抽出し、次世代シーケンシングによる miRNA の発現プロファイル解析法およびクラスター分析（主成分分析）法を確立した。

リクルートした研究対象者の余剰血清より、エクソソーム（細胞外小胞）miRNA を次世代シーケンサーで解析し、そのプロファイルの取得を行った。その結果、肺気腫の有無、つまり肺病変によって血清 miRNA プロファイルが変化することを見出した。

血清 miRNA のレベルを肺気腫の有無で比較解析すると、肺気腫で増減少する miRNA や、さらには肺気腫のみで出現する miRNA を捉えることができた。

これら増減する miRNA をボルケーノプロットで解析することで、統計学的に有意に変動する miRNA を割り出した。その miRNA の gene ontology 解析を行った結果、慢性炎症や、脂質代謝、骨格筋の萎縮、細胞老化、血管内皮の障害、酸化ストレス応答、上皮細胞のアポトーシス、細胞マトリックスの破壊といった、肺疾患に特徴的な表現

系（COPD の併存疾患）がエンリッチされた。このように、血清中 miRNA は肺疾患の良いバイオマーカーとなることが判明した。

通常、鎖長が短い miRNA は PCR による検出が困難であるとされるが、Loop-PCR 法を応用することで、リアル PCR による miRNA の精密定量系を組み立てた。この手法を用いることで、例えば、肺気腫で増加した miR-766-3p を定量すると、この miRNA が、喫煙により誘導されること、特に、加熱式タバコで、統計学的に有意に増加することが明らかとなった。miR-766-3p は、非小細胞がんを促進させる因子として知られており、これらの結果は、加熱式タバコは紙巻きタバコと比較して肺気腫患者への肺がん発症リスクをより高める可能性があることを示唆する。

次世代シーケンサーにより miRNA のプロファイルを解析し、加熱式タバコによる能動喫煙および受動喫煙者で有意に変動する miRNA を決定し、リアルタイム PCR で検証を行い、一般の医療機関での解析可能な miRNA バイオマーカーの創出が可能となった。

開発した方法を用いて、順次、加熱式たばこの使用およびその受動喫煙の評価を行っている（目的③）。さらに、国内で主に使用されている複数のメーカーの加熱式たばこについての解析を行う。

また、肺胞破壊や COPD の病態マーカーである Fibulin-3 及び SP-D の解析を実施し、肺気腫あり検体で高くなることを示す結果を得た。

今後、臨床指標（特に呼吸機能）の経年変

化および炎症指標（高感度 C 反応性蛋白、白血球）との関連について分析する。また、Fibulin-3 及び SP-D の解析結果及び健康診断の結果と miRNA を指標とした解析結果との相関性を解析することで、呼吸器疾患につながり得るバイオマーカーを見出し、その評価方法を開発する。

開発した方法を用いて、順次、加熱式たばこの使用および受動喫煙の評価を行っている（目的③）。さらに、国内で主に使用されている複数のメーカーの加熱式たばこについての解析を行う

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表（本研究に関連するもの）
なし。

2. 学会発表

1) 大森久光、尾上あゆみ、北川拓弥、佐藤祐樹、首藤剛、大坪和明、窪田健一、東憲孝、吉田稔、井上博雅、黒澤一、緒方裕光、稲葉洋平、大和浩。「特別報告」加熱式たばこの健康影響に関する疫学調査。第 66 回日本呼吸器学会学術講演会。2026 年 4 月 19 日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

この研究において、知的財産権に該当するものはなかった。

【参考】

図1：ニコチンの代謝経路

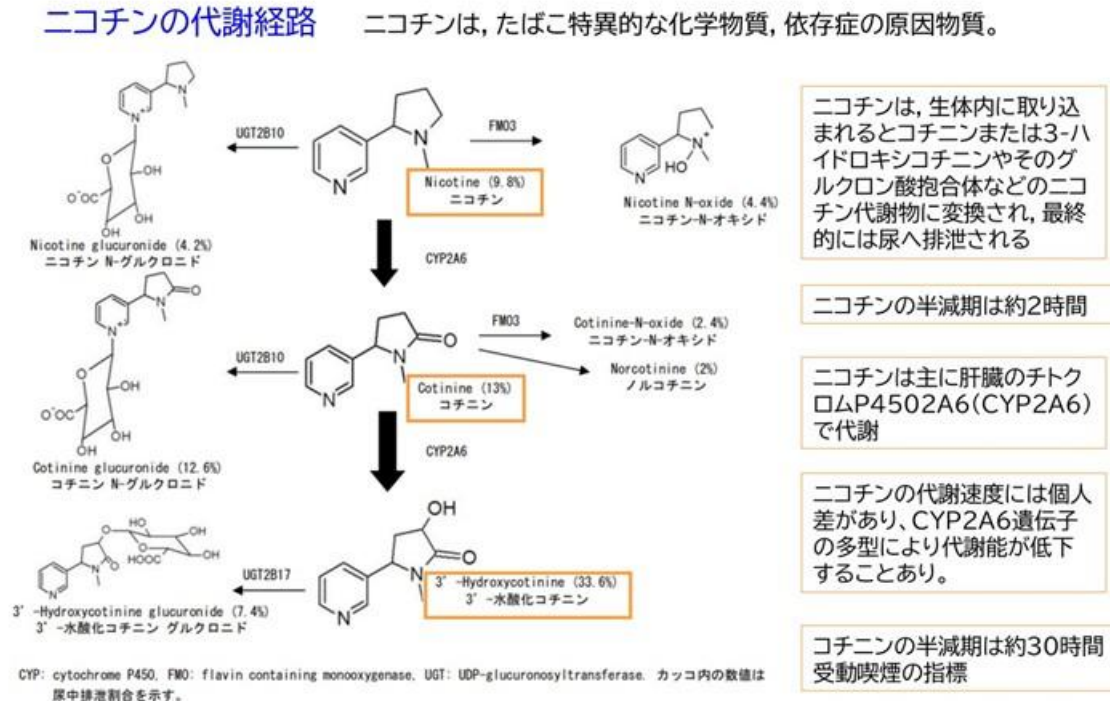


図6. ニコチンの代謝経路（出典：N. L. Benowitz, et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 268 (1994) 296. より改変）

厚生労働省「喫煙と健康 喫煙の健康影響に関する検討会報告書」平成28年

図2：呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索（概念図）

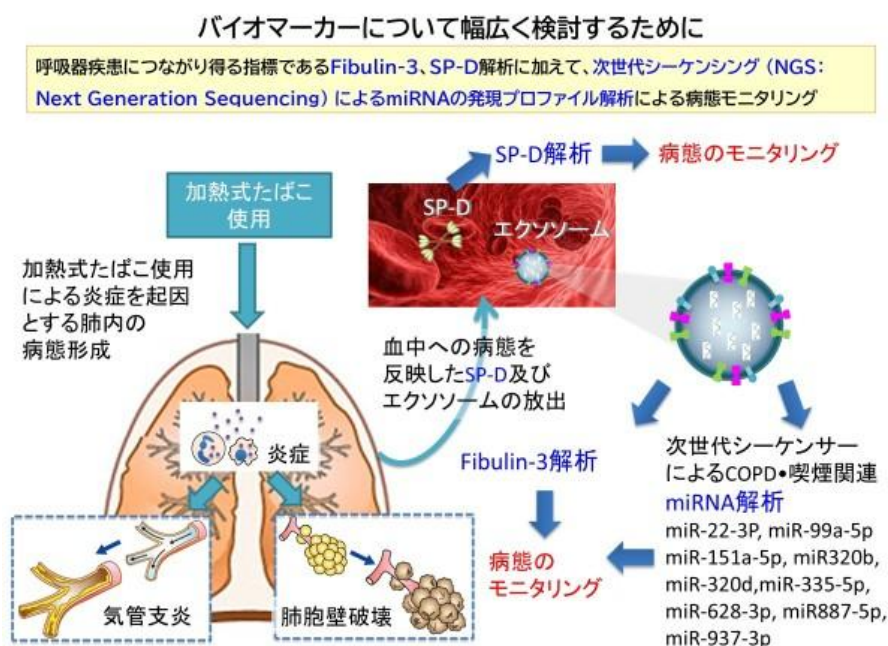
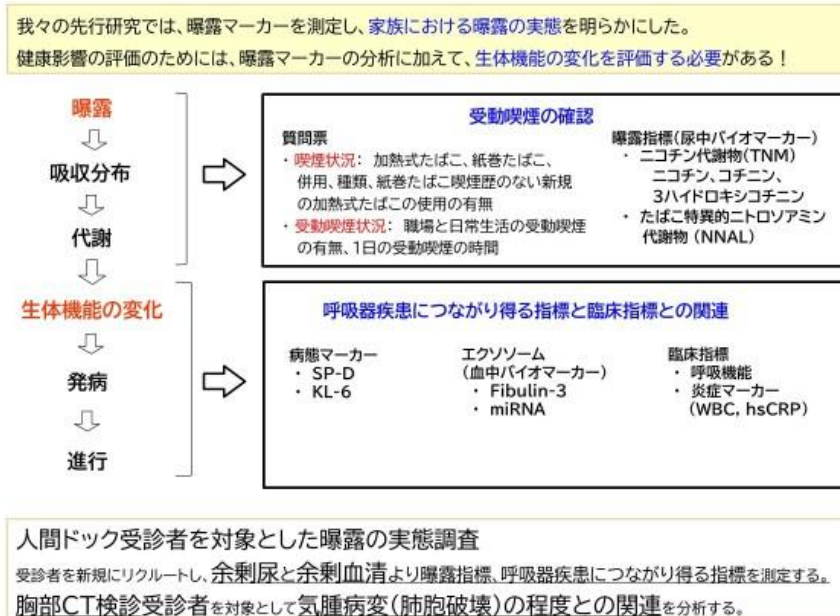


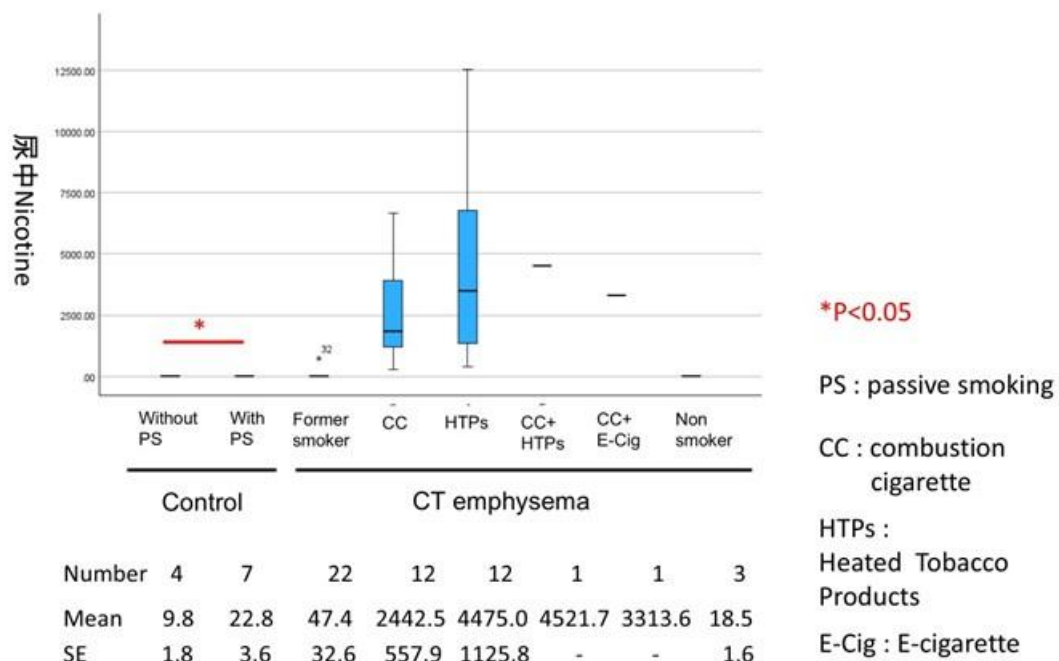
図3：本研究における曝露指標と生体機能の変化（影響マーカー）



【曝露指標の分析】

図 4：尿中 Nicotine

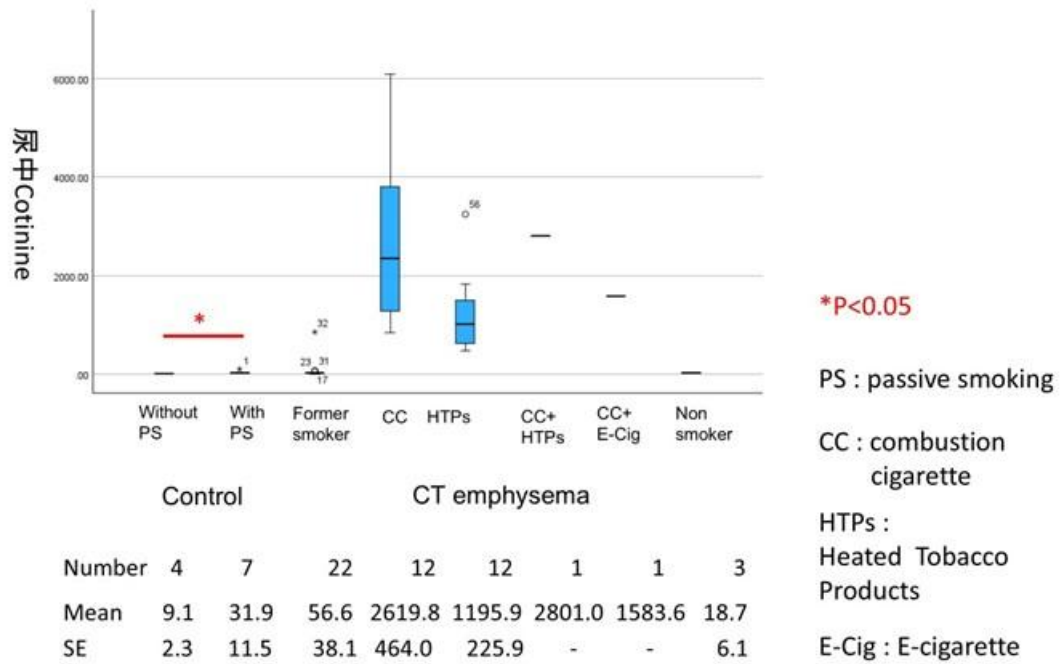
➤ 曝露指標の分析（尿中Nicotine）



・ニコチン代謝物（尿中 Nicotine）は、CT 肺気腫なしの群で、受動喫煙「なし」に対して「あり」の群で有意に高値を示した。（ $p<0.05$ ）

図 5：尿中 Cotinine

➤ 曝露指標の分析（尿中Cotinine）



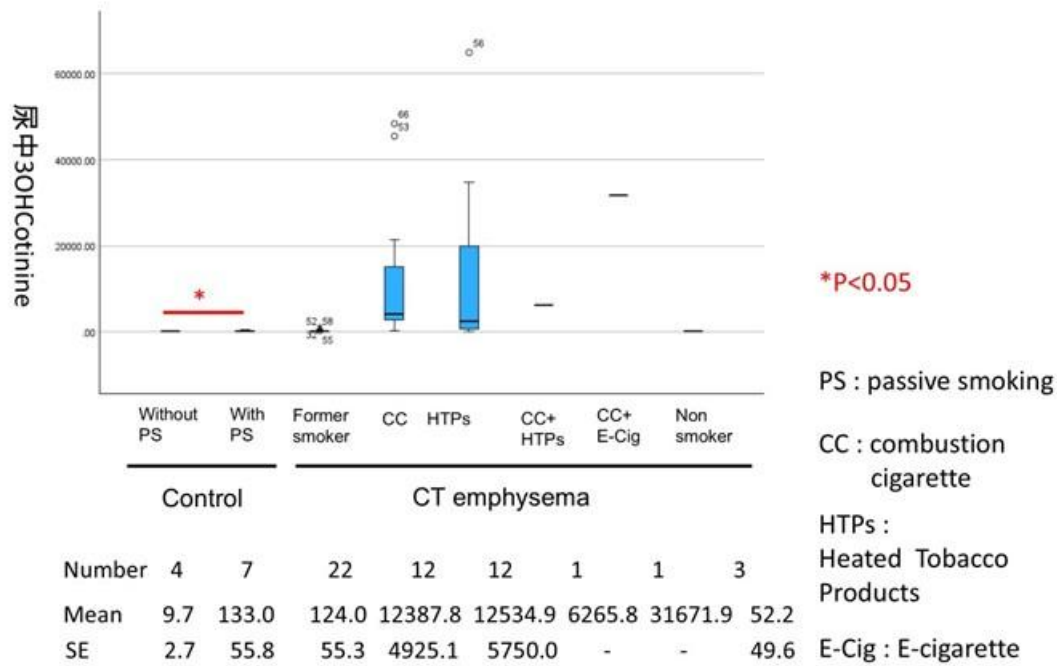
・ニコチン代謝物（尿中 Cotinine）は、CT 肺気腫なしの群で、受動喫煙「なし」に対して「あり」の群で有意に高値を示した。（ $p < 0.05$ ）

・CT 肺気腫ありの群で、紙巻たばこ（CC）喫煙者および加熱式たばこ（HTPs）使用者で高値であった。

期間中全サンプルで解析中である。

図 6：尿中 3OHCotinine

➤ 曝露指標の分析（尿中3OHCotinine）



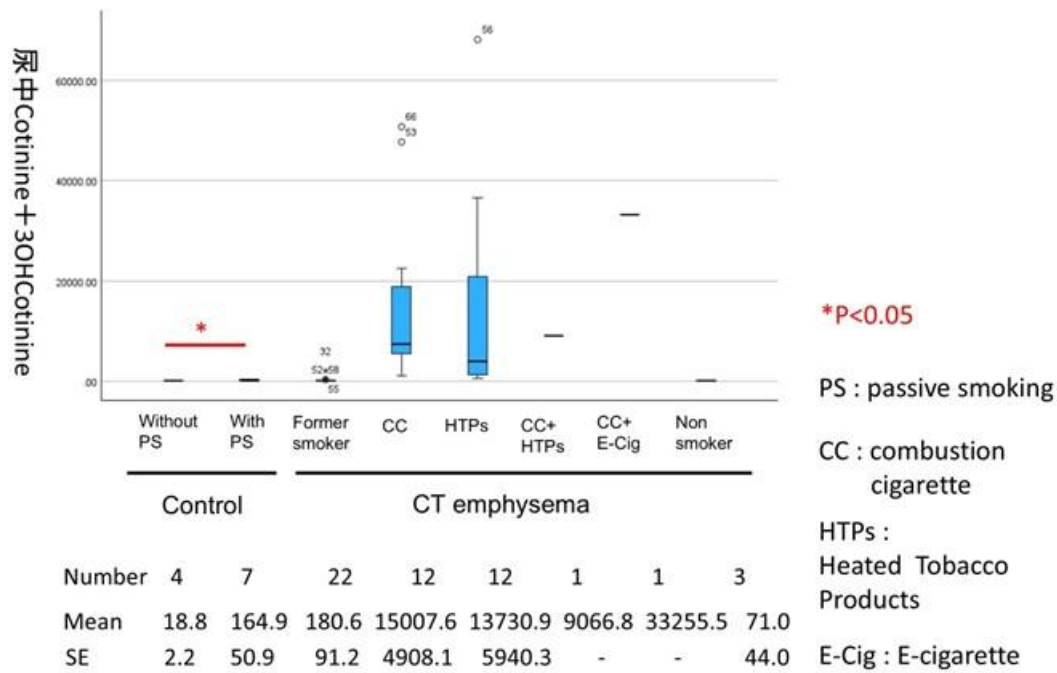
・ニコチン代謝物（尿中 3OHCotinine）は、CT 肺気腫なしの群で、受動喫煙「なし」に対して「あり」の群で有意に高値を示した。（ $p < 0.05$ ）

・CT 肺気腫ありの群で、紙巻たばこ（CC）喫煙者および加熱式たばこ（HTPs）使用者で高値であった。

期間中全サンプルで解析中である。

図 7 : 尿中 Cotinine+3 OHcotinine

➤ 曝露指標の分析 (尿中Cotinine + 3OHCotinine)



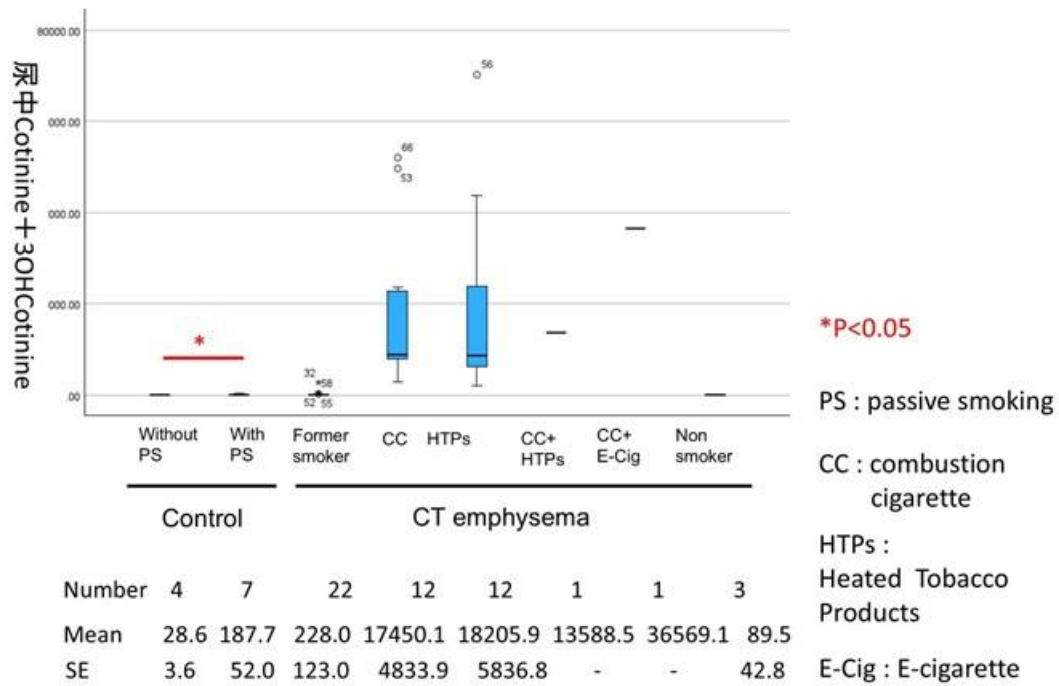
・ニコチン代謝物（尿中 Cotinine+尿中 3OHCotinine）は、CT 肺気腫なしの群で、受動喫煙「なし」に対して「あり」の群で有意に高値を示した。（ $p<0.05$ ）

・CT 肺気腫ありの群で、紙巻たばこ（CC）喫煙者および加熱式たばこ（HTPs）使用者で高値であった。

期間中全サンプルで解析中である。

図 8：尿中 Nicotine+Cotinine+3OHCotinine

➤ 曝露指標の分析（尿中Nicotine+Cotinine+3OHCotinine）



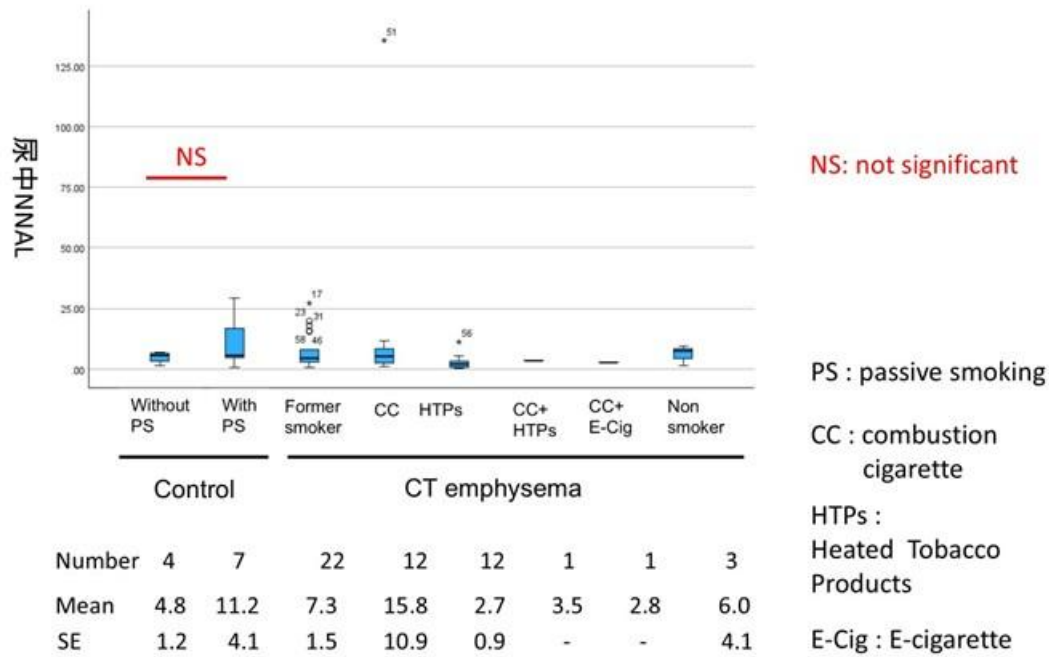
・ニコチン代謝物（尿 Nicotine+Cotinine+3OHCotinine）は、CT 肺気腫なしの群で、受動喫煙「なし」に対して「あり」の群で有意に高値を示した。（ $p<0.05$ ）

・CT 肺気腫ありの群で、紙巻たばこ（CC）喫煙者および加熱式たばこ（HTPs）使用者で高値であった。

期間中全サンプルで解析中である。

図 9：尿中 NNAL

➤ 曝露指標の分析（尿中NNAL）



・CT 肺気腫なしの群で受動喫煙「なし」に対して「あり」の群で**高値の傾向**を示したが有意な差は認めなかった。研究期間中の全サンプルを検討中である。

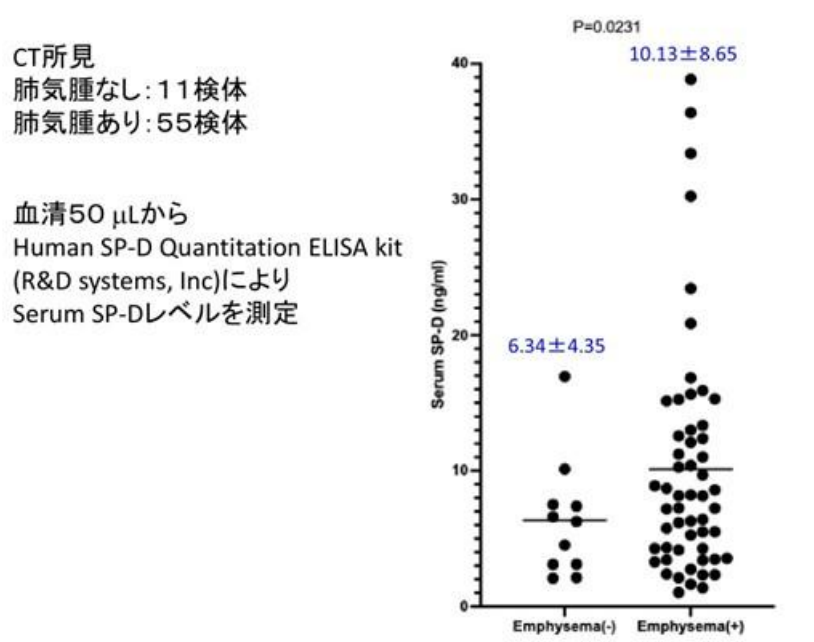
・CT 肺気腫ありの群で、紙巻たばこ（CC）喫煙者および加熱式たばこ（HTPs）使用者で高値傾向であった。

期間中全サンプルで解析中である。

【影響指標の分析】

図 10：血清 SP-D レベル（CT 肺気腫有無別）

図10 健診受診者検体を用いたSP-Dレベルの解析



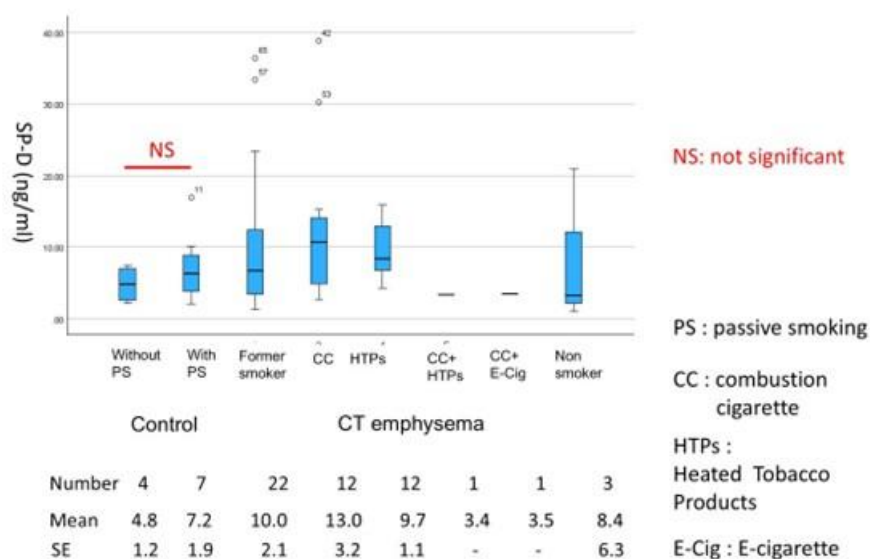
・肺気腫あり群 (7.23 ± 6.87) が肺気腫なし群 (5.18 ± 3.18) と比較して SP-D レベルが高い傾向を示した ($P=0.095$)。

全体では有意差を認めなかったものの、CT 肺気腫ありの群で高値を示す者がおり、さらなる詳細な検討中である。

図 11：血清 SP-D レベル

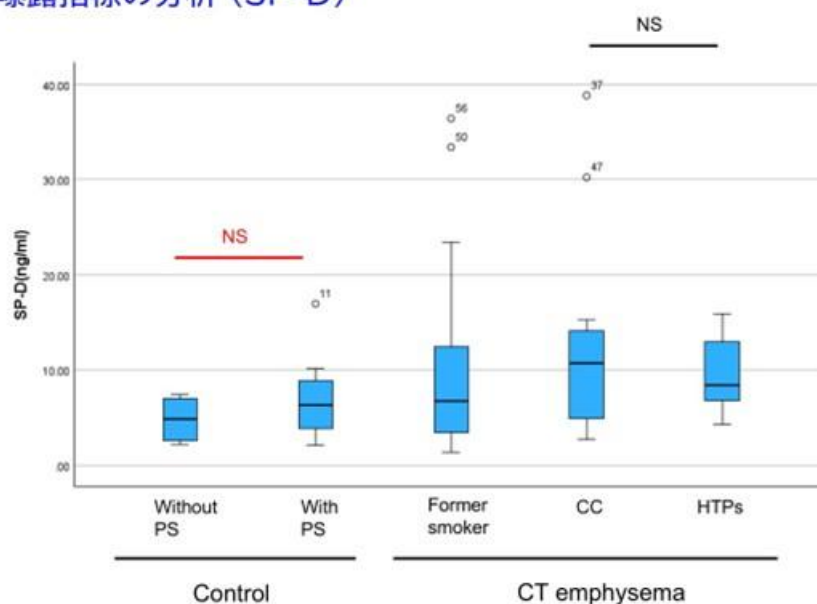
(CT 肺気腫有無別 + 受動喫煙有無別 + タバコの種類別)

➤ 曝露指標の分析 (SP-D)



上図より、併用、電子たばこ使用、その他を除外して作図した。

➤ 曝露指標の分析 (SP-D)



・ SP-D の値は、紙巻たばこ (CC) と加熱式たばこの間で差を認めなかった。
同様の影響を及ぼす可能性があると考えられた。

図 12：血清 Fibrin 3 （CT 肺気腫有無別）

図12 健診受診者検体を用いたFibulin-3レベルの解析

CT所見
肺気腫なし: 11検体
肺気腫あり: 54検体

血清250 μ Lから
Exo Quickを用いて
エクソソームを精製

ウエスタンブロットにより
Fibulin-3のバンド強度を
測定

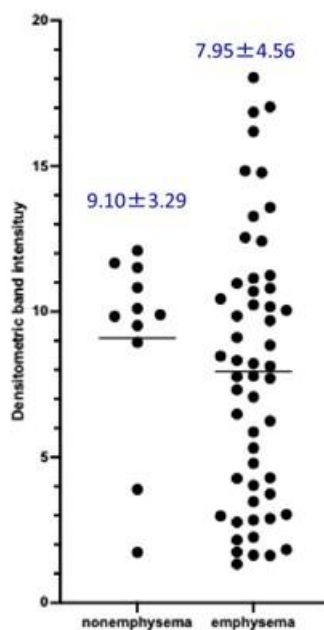
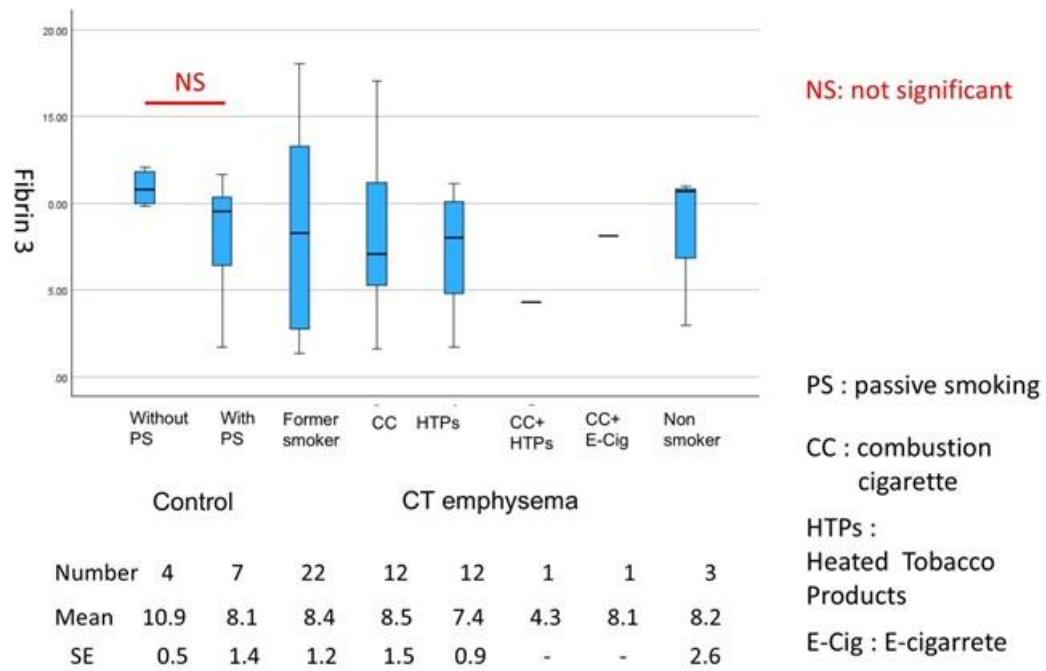


図 13：血清 Fibrin 3（CT 肺気腫有無別＋受動喫煙有無別＋タバコの種類別）

➤ 曝露指標の分析（Fibrin 3）



・これまでのサンプルではサンプル数が少ないこともあり有意な差を認めなかった。期間中の全サンプルで検討中である。

図 14：miRNA プロファイリング

より信頼あるデータを取得するために昨年の解析から改善を試み、存在比の小さな miRNA の検出力が向上した。

【2024 年収集サンプルの解析】

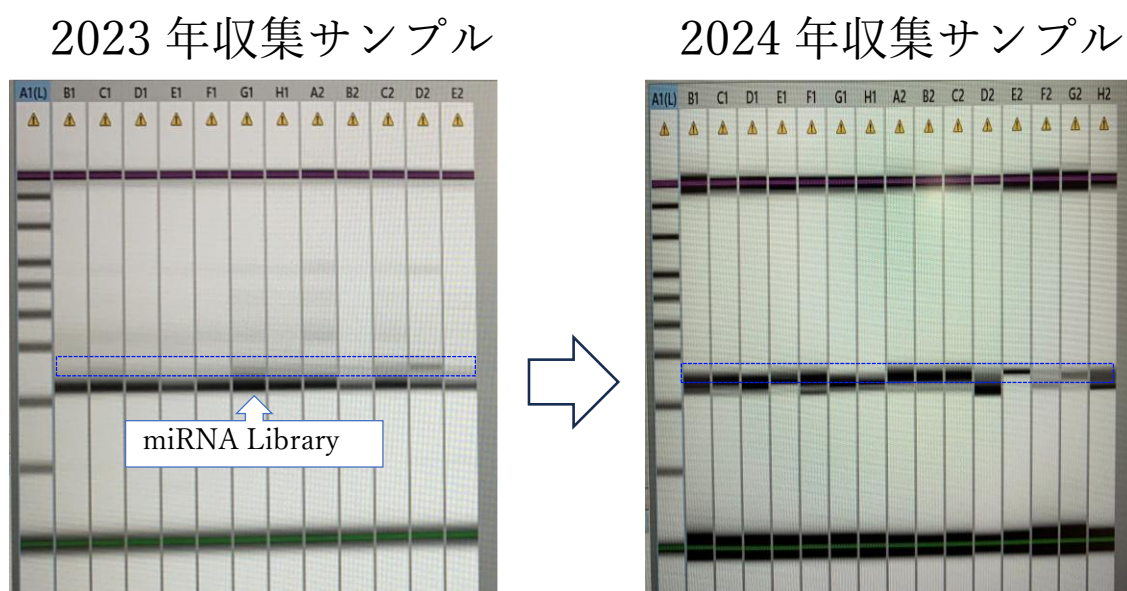
・肺気腫なし (NEP)：23 検体

・肺気腫あり (EP)：25 検体

(喫煙無 10、喫煙 15 (紙巻 9、加熱 5、電子 1))

平均年齢：NEP53 才、EP63 才

・年齢による miRNA プロファイルの変化がないことを検証・確認済み



miRNA ライブラリー DNA が少ない。→存在比の小さな miRNA の検出力が向上。

・血清サンプルの凍結融解を避け、採取サンプルは 1 回融解後、迅速に miRNA の精製を行ったことにより、存在比の小さな miRNA の検出力が向上した。

図 15：血清 miRNA の主成分分析における因子解析

図15 主成分分析における各成分の因子得点

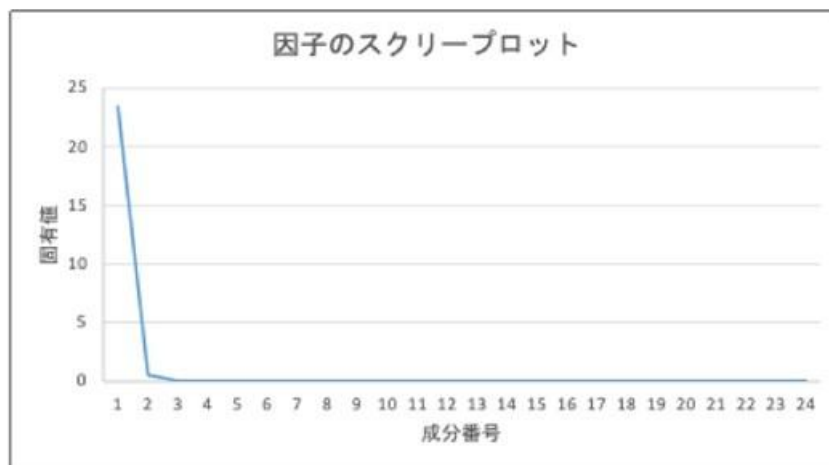
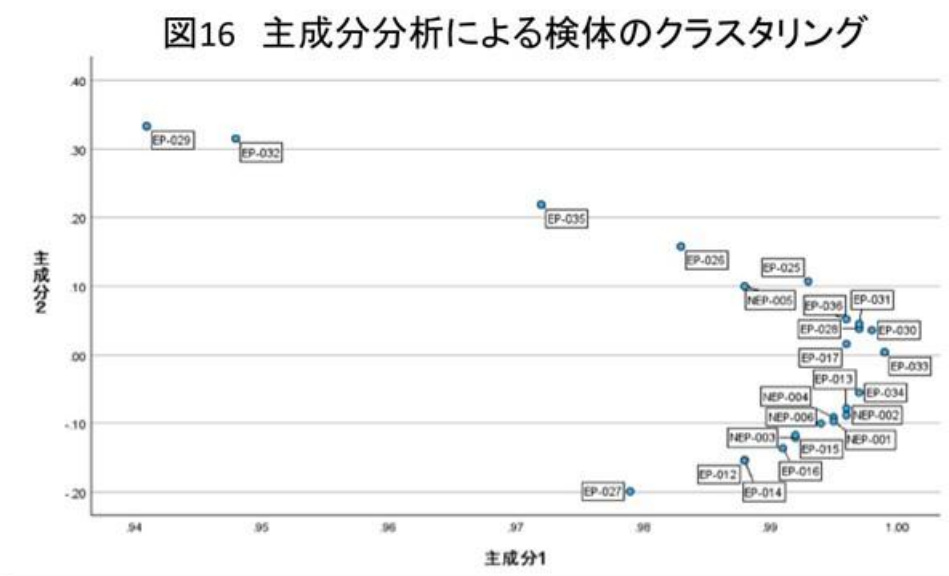


図 16：miRNA の主成分分析による検体のクラスタリング



NP:肺気腫あり NEP:肺気腫なし

図 17：検出された主要 miRNA Top50 の主成分分析

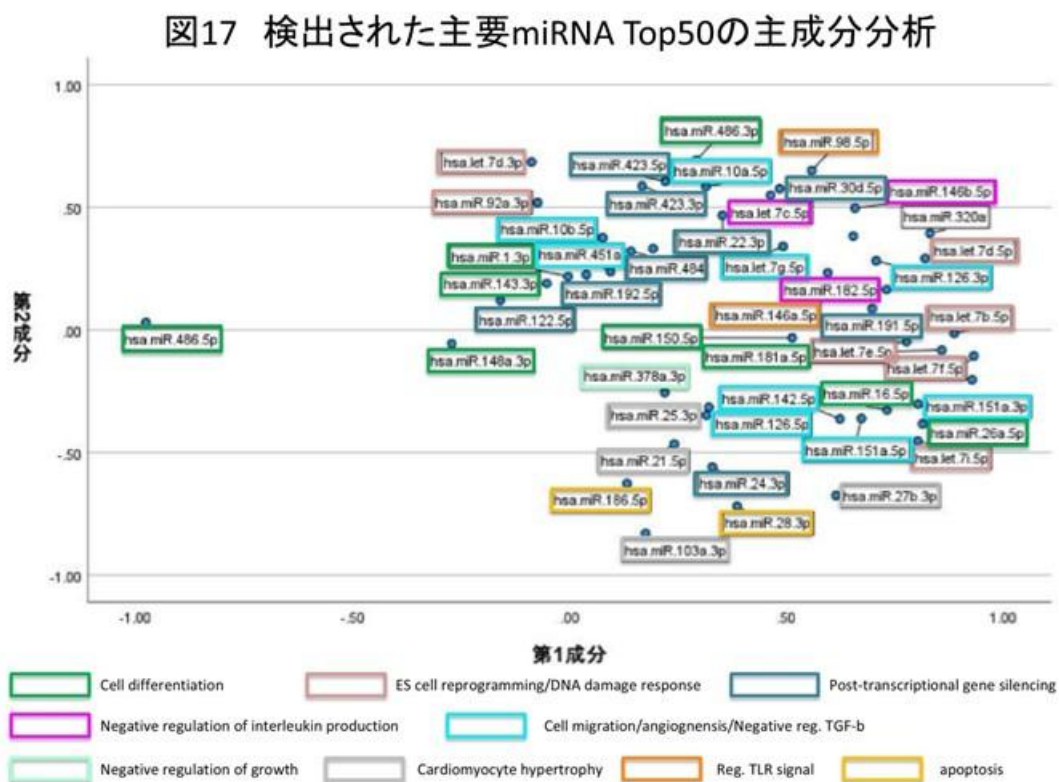
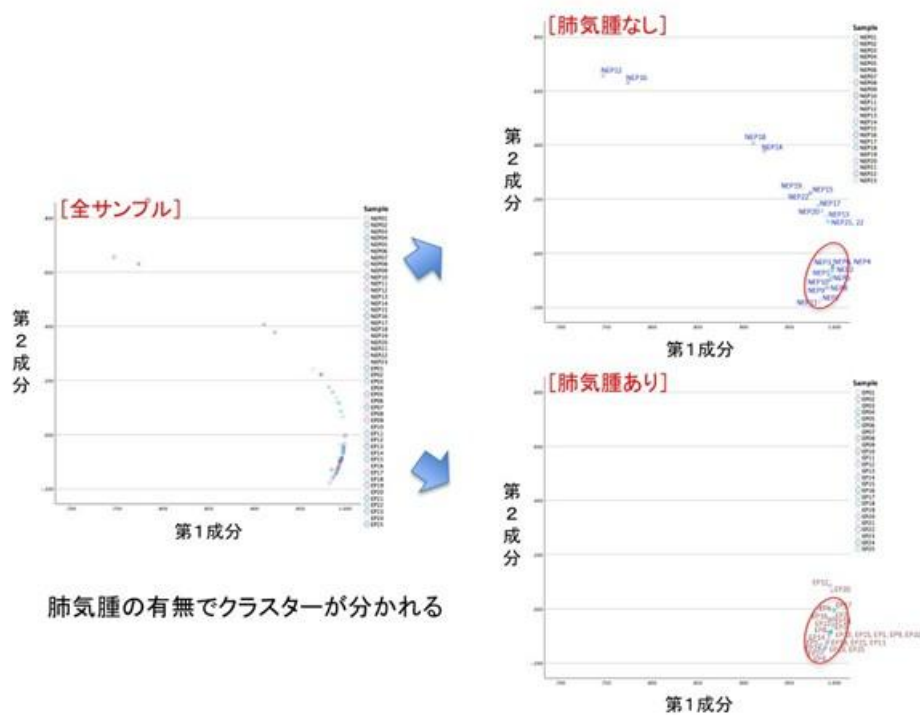


図 18：CT 肺気腫有無における血清 miRNA の主成分分析

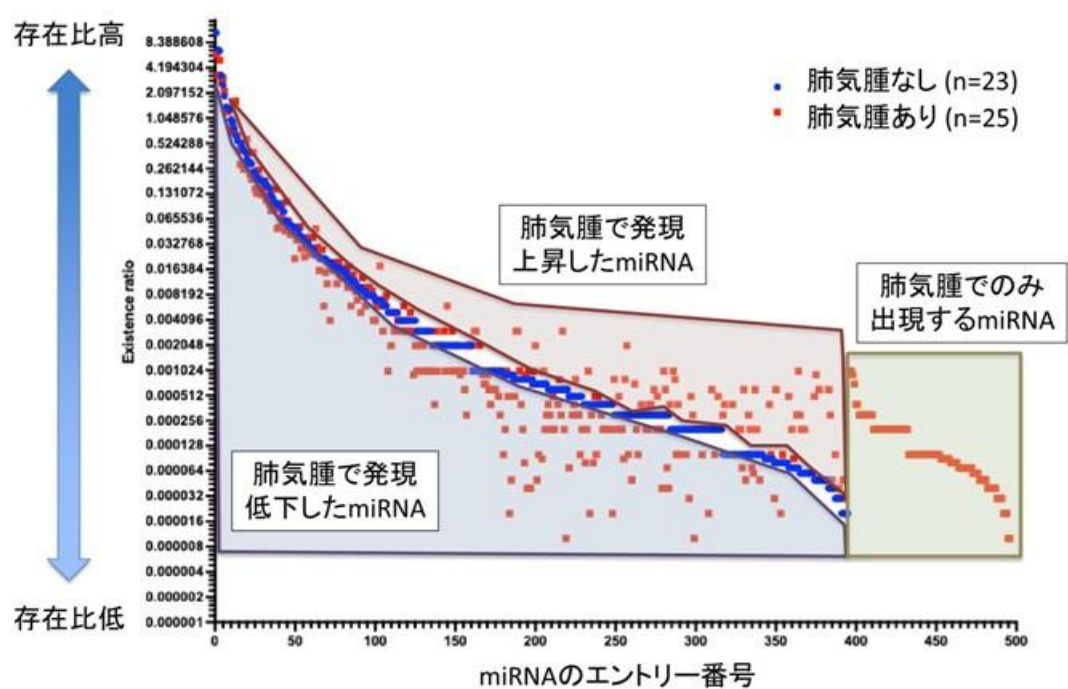
図18 CT肺気腫の有無における血清miRNAの主成分分析



- 肺気腫の有無でクラスターが分かれた。
- 肺気腫ありの中で、喫煙の種類（紙巻たばこ、加熱式たばこ）に差はなかった。

図 19：肺気腫の有無における miRNA の発現レベルの比較

図19 肺気腫の有無におけるmiRNAの発現レベルの比較



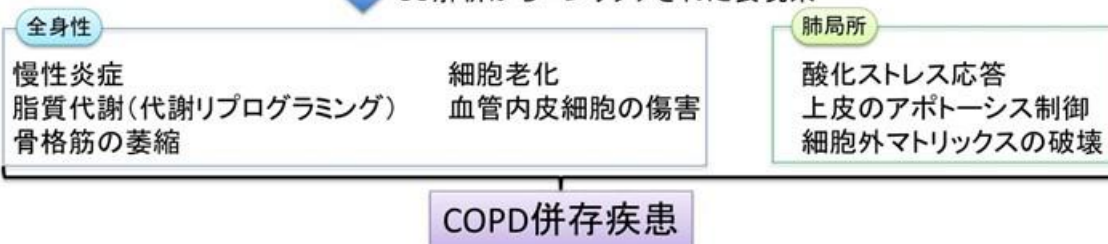
- ・紙巻たばこと加熱式たばこに大きな差は見られなかった。

図 22：肺気腫の有無により発現レベルが変動する miRNA の Gene Ontology 解析結果

図22肺気腫の有無により発現レベルが変動するmiRNAのGO解析結果

miRNA	Log2(AveNEP/AveEP)	-LOG10P	miRNAの機能	発現プロファイルの意義
hsa-miR-766-3p	4.21	2.46	NR3C2抑制。	がんの進行を促進
hsa-miR-7849-3p	4.1	1.78	機能不明	
hsa-miR-1307-3p	3.93	1.69	がん抑制遺伝子等を標的とする。	様々ながんの増殖や血管新生、転移に関与
hsa-miR-100-5p	2.84	1.34	mTOR抑制、オートファジー関連	異常な脂肪でのリモデリング
hsa-miR-34a-5p	2.83	2.05	p53関連、細胞老化、アポトーシス促進	肺胞上皮細胞のアポトーシス、老化促進。肺気腫で増加の報告あり
hsa-miR-132-3p	1.9	2.43	炎症性サイトカイン誘導、ZO-1,E-cadherin低下	炎症促進作用、内皮細胞のバリア機能低下
hsa-miR-4677-3p	1.85	1.83	増殖、運動、EMTの抑制	がんの進行を抑制
hsa-miR-206	1.4	1.82	筋分化、筋萎縮マーカー	骨格筋減少(COPD合併症?)
hsa-miR-122-5p	1.37	2.03	脂質代謝抑制、肝臓由来	主に肝臓由来。全身性代謝異常(COPD合併の脂質代謝異常?)
hsa-miR-421	1.06	1.58	ATM抑制	DNA損傷応答の低下
hsa-miR-375	1.05	1.7	PI3K/AKT/mTORを抑制	がん細胞の増殖抑制
hsa-let-7f-5p	-1.01	3.93	炎症抑制、細胞老化抑制、IL-6経路抑制	慢性炎症亢進→老化促進→SASP増強
hsa-miR-134-5p	-1.03	1.84	血管新生	血管系機能の低下
hsa-miR-28-5p	-1.03	1.87	GAGE12I, YWHAZ抑制。増殖、運動、転移抑制。アポトーシス誘導	がんの進行を促進
hsa-miR-379-5p	-1.07	1.81	UBE2E3, IGF1抑制。がんの悪性化を抑制	がんの進行を促進
hsa-miR-204-5p	-1.07	1.39	血管内皮保護、酸化ストレス応答抑制	血管内皮障害→肺毛細血管減少
hsa-miR-144-5p	-1.22	2.74	IFN- γ , TNF- α , IL-10の発現抑制	炎症促進
hsa-miR-370-3p	-1.25	1.37	CYP2D6 (シタクロムP450) 発現抑制 前立腺がんでは低下が報告	がん細胞の増殖に関連
hsa-miR-454-3p	-2.09	2.96	PTEN	がん細胞の増殖、生存、転移が促進。
hsa-miR-23b-3p	-2.32	2.02	NF- κ B抑制、炎症抑制	慢性炎症(炎症の持続)
hsa-miR-1255b-5p	-2.36	1.49	がん抑制性miRNA	がんの進行を促進
hsa-miR-5187-5p	-2.5	1.84	がん抑制性miRNA	がんの進行を促進
hsa-miR-3613-5p	-4.21	1.39	がん抑制性miRNA	がんの進行を促進

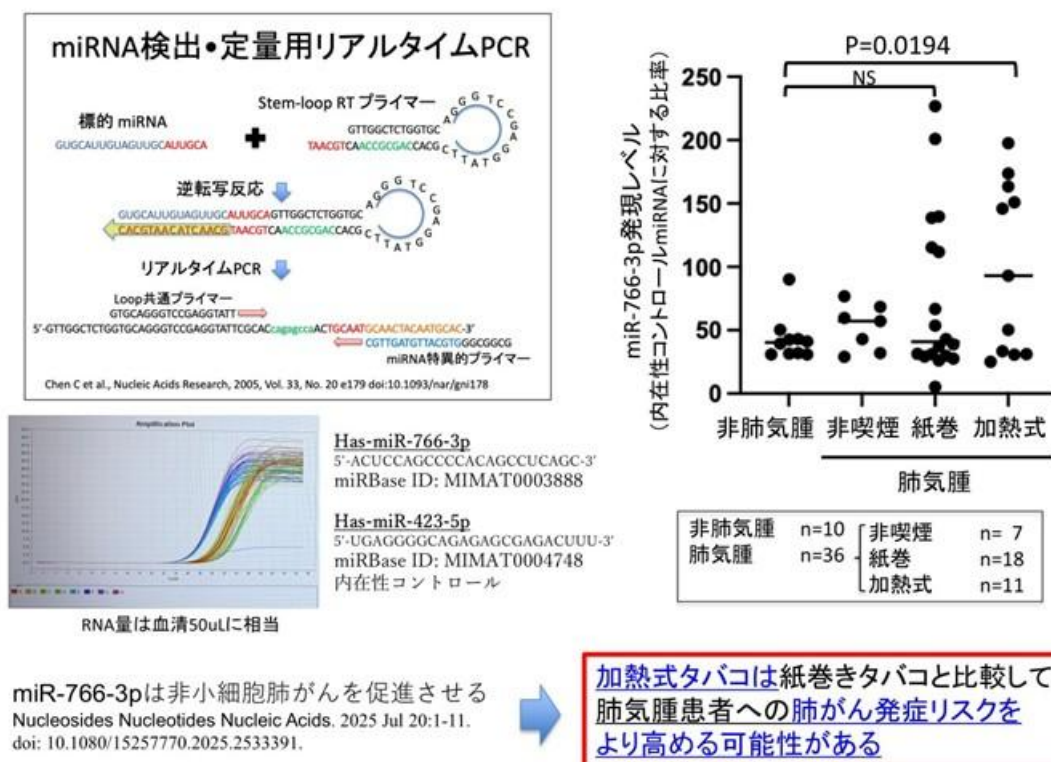
GO解析からエンリッチされた表現系



その miRNA の gene ontology 解析を行うと、慢性炎症や、脂質代謝、骨格筋の萎縮、細胞老化、血管内皮の障害、酸化ストレス応答、上皮細胞のアポトーシス、細胞マトリックスの破壊といった、肺疾患（COPD の併存疾患）に特徴的な表現系がエンリッチされてきた。このように、血清中 miRNA は肺疾患の良いバイオマーカーとなることが分かった。

図 23：リアルタイム PCR による血清中 Has-miR-766-3p の精密定量

図23 リアルタイムPCRによる血清中Has-miR-766-3pの精密定量



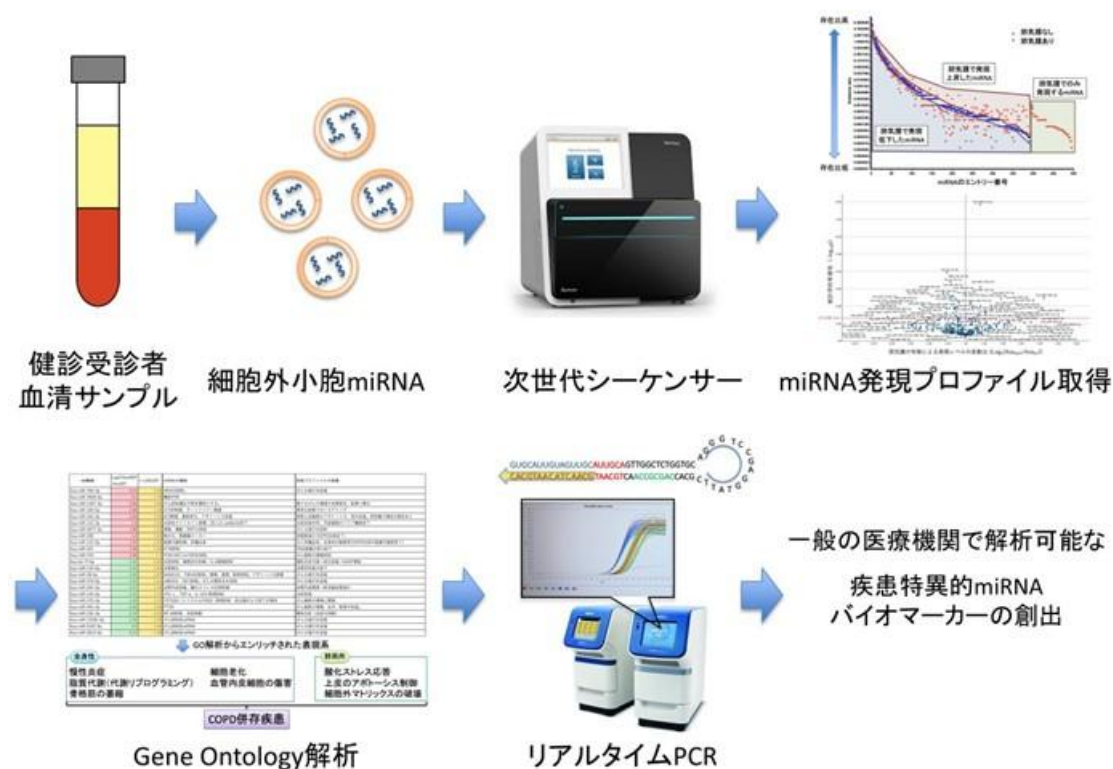
さらに、リアルPCRによるmiRNAの精密定量系を組み立てた。

例えば、肺気腫で増加した、**miR-766-3p**を定量すると、このmiRNAが、喫煙により誘導され、特に、加熱式タバコで、統計学的に有意に増加することが分かった。

このmiRNAは非小細胞肺癌を促進することから、**加熱式タバコは肺気腫患者への肺がんリスクを有意に高める可能性があることが分かった。**

図 24：血清中細胞外小胞 miRNA の解析によるバイオマーカー創出戦略

図24 血清中細胞外小胞miRNAの解析によるバイオマーカー創出戦略



次世代シーケンサーにより miRNA のプロファイルを解析し、加熱式タバコと関連する miRNA を決定し、リアルタイム PCR で検証を行う。

さらに、健診情報や GO 解析の結果から、喫煙と肺疾患の関連や潜在リスクを解析することが可能となった。

これにより、医療機関で広く普及しているリアルタイム PCR 装置を用いて、簡便に迅速に診断が可能になる未来に繋がれると考える。