

日本人の肺気腫発症におけるヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子多型性の関与

山谷 睦雄*

はじめに

喫煙は肺気腫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% 前後のみに肺気腫を含めた 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、肺気腫の発症機序として提唱されている二つの仮説のうち、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肺気腫発症との関係は不明であった。また、欧米で報告されている α 1-アンチトリプシン欠損症は日本人に少ないため、日本人における肺気腫を含めた慢性閉塞性肺疾患の喫煙および発症感受性遺伝子は不明であった。ヘムオキシゲナーゼ (HO) 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¹⁾。誘導型ヘムオキシゲナーゼ (以下 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作用を持つ¹⁾。HO-1 の誘導は HO 遺伝子の 5' 上流域に位置する 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報告された。これらの知見から、私たちは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、GT 反復配列の遺伝子多型性と肺気腫発症との関係を研究してきた (図-1)。本稿に、これまでの研究成果をまとめることにする。

肺気腫発症とヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子多型性の関係

50 歳以下で発症する若年性肺気腫 20 例 (平均年齢 54 歳)、50 歳以上で発症した肺気腫 101 例 (平均年齢 67 歳)、非肺気腫 100 例 (平均年齢 67 歳) の末梢血から DNA を抽出し、HO-1 遺伝子 5' 上流域の GT 反復配列数を解析した²⁾。PCR 産物のシークエンスの結果、各々の個体は長さの異なる 2 種類の GT 反復配列を有した。肺気腫群、非肺気腫群全体をまとめると GT 反復配列の長さは 3 つのピークを持って分布し、26 回以下、27-32 回、33 回以上の 3 クラスに分けられた。33 回以上の長い GT 反復配列を持つクラス L のアレルの割合は若年性肺気腫において 9 アレル (22.5%) で、老年者肺気腫 202 アレル中 42 アレル (21%) と同等の割合を示し、非肺気腫喫煙男性 200 アレル中 20 アレル (10%) に比べて明らかに大きい値を示した ($p < 0.05$)。また、GT 反復配列数 33 回以上の長い反復回数を持つクラス L の遺伝子型を持つ割合は若年性肺気腫 20 例において 8 例 (40%) で、通常肺気腫 101 例中 38 例 (38%) (表-1)²⁾ と同等の割合を示し、非慢性肺気腫喫煙男性 100 例中 20 例 (20%) に比べて大きい値を示した ($p = 0.05$)。

さらに、肺機能上で閉塞性障害が存在するにもかかわらず、胸部 CT 像で低吸収領域の著明でない (25% 未満) 58 名 (平均年齢 63 歳) を解析の対象として末梢血から DNA を抽出し、HO-1 遺伝子 5' 上流域の GT 反復配列数を解析した。その結果、33 回以上の長い GT 反復配列を持つ L

* 東北大学病院老年科

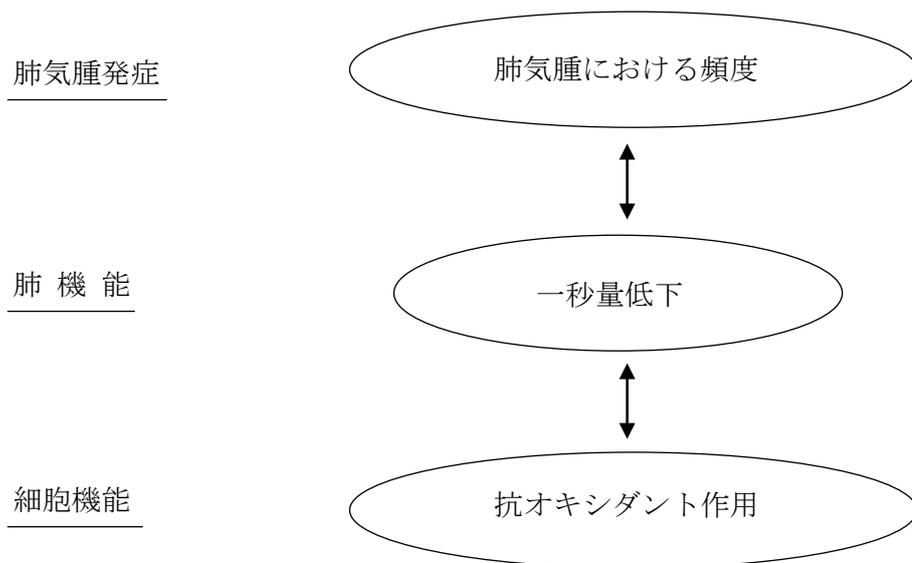


図-1 日本人の肺気腫におけるヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子多型性関与の研究

目的として、ヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子の細胞レベルでの抗酸化作用、肺機能変化との関連および肺気腫発症の関連について研究する。これによって細胞レベルから肺気腫発症までの一連の関係が明らかになる。

アリルの割合は胸部 CT 写真で低吸収領域の著明でない COPD で 116 アリル中 13 アリル (11%) と、非肺気腫喫煙男性における 200 アリル中 20 アリル (10%) に比べて差を認めなかった ($p = 0.7$)。また、L アリルの遺伝子型を持つ割合は低吸収領域の著明でない COPD 58 例において 13 例 (22%) で、非肺気腫喫煙男性 100 例中 20 例 (20%) に比べて差を認めなかった ($p = 0.7$)。

ヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子と肺機能経年変化

H0-1 の遺伝子多型性は更に、2 型糖尿病における冠状動脈疾患が報告され、私たちも健康長寿から早期に脱落するリスク、日本人喫煙男性における肺腺がんのリスク等を報告してきた³⁾⁴⁾。一方、人種による COPD の遺伝子的リスクに違いがあることも報告されており、H0-1 の遺伝子多型と白人における肺機能減衰は有意な関連は認められなかったとの報告がなされた⁵⁾。しかし、邦人における、H0-1 の遺伝子多型性と肺機能減衰の関係は未だ検討されていない。今回私たちは、既喫煙日本人男性の肺機能の変化(減衰)と H0-1 遺伝子多型性について検討し

た。

H0-1 遺伝子多型性と肺機能変化の関係を調べるために、101 名の既喫煙者 (46-85 歳) をインフォームドコンセントを得た上で登録した (2001 年 1 月から 12 月)。参加者は全員既喫煙者 (現喫煙者は除く) の日本人男性であり、禁煙後 6 ヶ月以上は経過している。活動期の肺炎や喘息、悪性疾患の患者は除外した。一方、高血圧、糖尿病や高脂血症等コントロール良好の慢性疾患患者は含むこととした。登録の時点で、末梢血採血により参加者全員の H0-1 遺伝子多型性を診断し、またスパイロメトリーによる肺機能検査を施行した。H0-1 遺伝子多型性に関しては、染色体 DNA を抽出後、GT 反復配列を含む断片を PCR で増幅し、DNA sequencer にてその反復回数を解析した。GT 反復の頻度は大きく 3 峰性の度数分布を示し、3 つの class に分類される。今回は、特に反復回数 33 以上のアリルを class L アリルとして、L アリル保持者と L アリル非保持者に関して肺機能の変化に対するリスクを評価した。肺機能検査に関しては、初回以降毎年 1 回行い 3 年以上フォローした。この際、検査前に気管支拡張薬の吸入を行なった。肺機

表-1 肺気腫におけるヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子多型性

Genotype subgroup	No. (%) of patients		Odds Ratio (95% CI)
	Without CPE (n=100)	With CPE (n=101)	
L-allele carrier	20 (20)	38 (38)	2.4 (1.3-5.7)*
Non-L-allele carrier	80 (80)	63 (62)	

*p < 0.008

Genotype: 遺伝子型、CPE: 肺気腫、Odds Ratio: オッズ比、L-allele carrier: Lアリル保持者

能の変化としては一秒量の予測値に対する %、FEV 1% predicted (pred) の年当たりの変化を指標とした。特に、年当たり FEV 1% pred が 3.0 以上減衰する場合を、肺機能急速減衰者 (rapid decliner) とした。それ以外は肺機能非急速減衰者 (non-rapid decliner) とした。

HO-1 遺伝子多型性解析の結果、Lアリル保持者は 28 名、Lアリル非保持者は 73 名であった。両者間において、登録時の年齢・性別・喫煙状態・肺機能・基礎疾患に有意な違いは認められなかった。Lアリル保持者の年当たり肺機能変化 (change in FEV 1% pred per year) は、Lアリル非保持者のそれに比して、有意に増悪傾向であった [2.74% (6.45) の減少に対し 0.57% (7.57) の増加、p = 0.044]。また、肺機能急速減衰者の割合も、Lアリル保持者では 12 名 (42.9%) であり、Lアリル非保持者の 13 名

(17.8%) に比して、有意に高頻度であった (p = 0.009) (表-2)⁶⁾。

さらに肺機能急速減衰に対するリスク群の多変量解析を行なった。年齢、喫煙状況 (pack year)、初期 FEV 1.0% pred、および Lアリルの保持をリスクとして、肺機能急速減衰に関するロジスティック解析を行なった。今回は全員男性であるので、性別はリスク解析には含めなかった。その結果、年齢、喫煙状況 (pack year)、初期 FEV 1.0% pred は有意なリスクとは評価されなかった。一方、Lアリルの保持は有意な危険因子であり (p = 0.008)、相対危険度は 3.9 (95% 信頼区間: 1.4-10.8) であった。

ヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子と細胞傷害性の関係の解析

HO-1 遺伝子多型性が肺気腫発症に関与する

表-2 肺機能低下とヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子の関係

Variables	L-allele carrier	Non-L-allele carrier	P value
	(n = 24)	(n = 48)	
Decrease in FEV 1% pred (% per year)	2.74 ± 1.22	-0.57 ± 0.89	0.044*
The number of rapid decliners [†]	12 (42.9%)	13 (17.8%)	0.009**

Data are presented as mean ± SE.

[†]Subjects with the mean annual decrease in FEV 1% pred ≥ 3

*Unpaired t-test, **Chi-square test

FEV 1%: 一秒率、rapid decliners: 肺機能急速減衰者、L-allele carrier: Lアリル保持者

ことが一連の研究で示唆されたが、*H0-1* 遺伝子多型性が喫煙による細胞傷害性に関連する研究はなされていなかった。そこで、末梢血白血球に Epstein-Barr ウイルスを感染させて lymphoblastoid cell line (LCL 細胞) を作成し、細胞に過酸化水素を作用させ、TUNEL 法で染色してアポトーシスに陥った細胞の割合を計算した。

過酸化水素 (300, 600, 900 μ M, 8 時間) 曝露による LCL 細胞の障害性を調べたところ、長い GT 反復配列を持つ細胞の viability は濃度依存性に低下したのに対して、短い GT 反復配列を持つ細胞の viability は低下し難いことが明らかになった⁷⁾。すなわち、GT 反復配列の長い遺伝子を持つ細胞は過酸化水素による細胞傷害性を受けやすいことが明らかになった。

肺気腫におけるヘムオキシゲナーゼ-1 単塩基遺伝子多型性の解析

H0-1 遺伝子の複数の単塩基遺伝子多型 (SNP) の中で、コード配列 413 番目の塩基 T が塩基 A に置き換わる SNP、SNP A [A (-413) T] が存在する。さらに、コード配列 19 番目の塩基 G が塩基 C に置き換わる SNP 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。*H0-1* 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 *H0-1* の活性を変化させる可能性がある。

そこで、コード配列 413 番目の塩基 T が塩基 A に置き換わる SNP、SNP A [A (-413) T] と、コード配列 19 番目の塩基 G が塩基 C に置き換わる SNP、SNP B [C (-19) G] を解析した。年齢 50 歳以上の肺気腫患者 84 名 (平均年齢 65 歳)、非肺気腫喫煙男性 96 名 (平均年齢 65 歳) を比較の対象とした。

その結果、SNP A におけるアレル AA の頻度は非肺気腫喫煙男性に比較して肺気腫患者で増加傾向 (22% 対 29%) にあったが、有意差は認められなかった ($p = 0.23$)。また、SNP B におけるアレル GG の頻度は肺気腫患者で減少傾向 (83% 対 77%) にあったが、有意差は認められな

かった ($p = 0.31$)。このように、今回調査した 2 種類の単塩基遺伝子多型性は日本人の肺気腫発症と関係を認めなかった。

考 察

従来、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 活性が肺気腫で低下する遺伝子多型性を報告した⁸⁾。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 *H0-1* の発現が慢性肺気腫で低下しているという仮説をたて、高齢で発症する慢性肺気腫において 33 回以上の長い GT 反復配列をもつ喫煙者において、*H0-1* の誘導が抑制され、肺気腫が発症するリスクが大きいことを報告してきた²⁾。さらに、本研究において、若年性肺気腫においても長い GT 反復配列を有する割合が上昇する結果が得られ、*H0-1* 遺伝子の GT 反復配列多型性と若年性肺気腫との関連が示唆された。他方で、胸部 CT 像の低吸収領域 (LAA) の軽いあるいは LAA の認められない COPD においては長い GT 反復配列の頻度は COPD のない喫煙男性と差を認めず、これらの COPD の発症と関係のないことが示唆された。

LCL 細胞を用いた実験において、GT 反復配列が長いと過酸化水素による細胞傷害性が強く発現することが明らかとなった。長い GT 反復配列がオキシダントによる *H0-1* 遺伝子発現を抑制し、細胞傷害に対する防御機能を低下させることを示唆している⁷⁾。

近年白人種を対象とした研究において、*H0-1* の遺伝子多型性と白人における肺機能減衰は有意な関連は認められなかったとの報告がなされた⁵⁾。今回私たちが、日本人男性の *H0-1* の遺伝子多型性と肺機能減衰との関係を検討した結果、L アレルの保持は肺機能急速減衰に対して約 4 倍のリスクを持つことが示された。この結果の

差異は、人種の違いによることが考えられる。例えば、Hegab ら⁹⁾は IL-1 β ハプロタイプが、エジプト人においては COPD の発症リスクとして関与するが、日本人の場合は無関係であり、人種による遺伝的リスクファクターの関与の違いがあることを報告している。HO-1 自体に関しても、He ら⁵⁾の解析では、白人と黒人における L アリルの頻度は 7% と 35% であり、一方、我々²⁾や Chen YH ら¹⁰⁾の解析による日本人、台湾人等アジア人では 10-12% の出現頻度である。日本人男性においては、HO-1 遺伝子多型性 (class L アリル) は重要であると考えられる。

その一方で、HO-1 遺伝子の複数の単塩基遺伝子多型 SNP の中で、HO-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 HO-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¹¹⁾。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、この多型は HO-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肺気腫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、日本人の肺気腫と HO-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。

おわりに

これまでの研究で、GT 反復配列の長い HO-1 の遺伝子多型性が日本人肺気腫患者で頻度が高いことが判明した。この遺伝子多型性は若年発症肺気腫の発症や肺機能の経年変化とも関連し、さらに、オキシダントによる細胞傷害性の感受性を促進した。このように、細胞レベルから肺気腫発症までの一連の過程が明らかにされた。これまでに日本人の肺気腫発症関連遺伝子が報告されてきたが¹²⁾、HO-1 の遺伝子多型性もその候補になると示唆される。

文 献

- 1) Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 517-54.
- 2) Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S, Sasaki H. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 187-95.
- 3) 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 normal Japanese population. *J Med Genet* 2003; 40: 146-8.
- 4) 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* 2005; 116: 354-60.
- 5) He JQ, Ruan J, Connett JE, Anthonisen NR, Pare PD, Sandford AJ. Antioxidant gene polymorphisms and susceptibility to a rapid decline in lung function in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 323-8.
- 6) Nakayama K, Kikuchi A, Yasuda H, Ebihara S, Sasaki T, Ebihara T, Yamaya M. Heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism and decline in lung function in Japanese men. *Thorax* 2006; 61: 921.
- 7) 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 lymphoblastoid cell lines. *Blood* 2003; 102: 1619-21.
- 8) Smith CA, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997; 350: 630-3.
- 9) Hegab AE, Sakamoto T, Saitoh W, Nomura A, Ishii Y, Morishima Y, Iizuka T, Kiwamoto T, Matsuno Y, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, Sekizawa K. Polymorphisms of TNF- α , IL-1 β , and IL1RN genes in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 1246-52.
- 10) Chen YH, Lin SJ, Lin MW, Tsai HL, Kuo SS, Chen JW, Charng MJ, Wu TC, Chen LC, Ding YA, Pan WH, Jou YS, Chau LY. Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients.

Hum Genet 2002; 111: 1-8.

- 11) Ono K, Goto Y, Takagi S, Baba S, Tago N, Nonogi H, Iwai N. A promoter variant of the heme oxygenase-1 gene may reduce the incidence of ischemic heart disease in Japanese. *Atherosclerosis* 2004; 173: 315-9.
- 12) 危険因子. COPD (慢性閉塞性肺疾患) 診断と治療のためのガイドライン. 第2版. 日本呼吸器学会 COPD ガイドライン第2版作成委員会. 2004; 6-13.