

氏名(本籍)	ひらのくによし 平野国美(茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2946号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	慢性閉塞性肺疾患(COPD)における遺伝子多型解析の検討
主査	筑波大学教授 医学博士 長澤俊郎
副査	筑波大学助教授 医学博士 有波忠雄
副査	筑波大学助教授 医学博士 柴崎正修
副査	筑波大学講師 博士(医学) 石川成美

論文の内容の要旨

(目的)

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、外因性の喫煙や粉塵の吸入と、内因性の遺伝子要素が関係する多因子疾患と考えられている。COPD発症の重要な危険因子は喫煙であるが、喫煙者の約15%しかCOPDを発症せず、さらに異なった人種間では喫煙者におけるCOPDの発症率が異なるといった個人差、人種差などの遺伝的要因の関与が示唆される。本症の発症には、プロテアーゼ/アンチプロテアーゼバランスが提唱されており、肺のマトリックス構造が、喫煙による刺激で誘導されるプロテアーゼと、その阻害物質であるアンチプロテアーゼとの不均衡によって不安定になることによりCOPDが発症するという仮説が提唱されている。最近では、肺組織攻撃因子としてのmatrix metalloproteinase(MMP)と防御因子としてのtissue inhibitor of metalloproteinases(TIMP)の相互作用に関する報告が目ざされている。本研究ではCOPD発症のプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡説に基づき、候補遺伝子をプロテアーゼとしてMMP-2、アンチプロテアーゼとしてTIMP-2を選び、その遺伝子多型について解析を行い当疾患との関与を検討した。

(対象と方法)

対象 日本人の喫煙感受性COPD発症患者88人(男性85人、女性3人)と喫煙非感受性正常対照群40人(すべて男性)について解析を加えた。COPDの診断は次の(1)から(3)の基準を満たすこととした。(1)スパイロメトリーにてFEV1.0/FVCが70%未満かつFEV1.0が予備値の70%未満であること、(2)胸部単純レントゲン写真において肺野透過性の亢進、肺野の過膨張、横隔膜の平底化が認められること、(3)気管支喘息、気管支拡張症、陈旧性肺結核あるいは他の重篤な呼吸器疾患の除外ができること。全ての患者及び対照例に対しては、筑波大学医の倫理特別委員会によって承認されたインフォームド・コンセントを得た。

方法 症例及び対照より全血よりDNAを精製抽出した。遺伝子変異のスクリーニングとして蛍光標識プライマーを用いたSSCP(Single strand conformational polymorphism)法を使用した。TIMP-2遺伝子とMMP-2遺伝子に対して、エクソン領域とプロモーター領域をカバーするDNA断片を増幅するプライマーを作製した。この際、SSCP解析のためにDNA断片の長さは約250塩基対となるようにした。TIMP-2に対しては11組22個、MMP-2に対しては15組30個の5'末端FITCプライマーを作製し各部位にPCR反応を行なった。確認されたPCR断片を使用

し ALF II DNA シークエンサーを用いて SSCP 解析を行なった。SSCP の結果で異なる泳動パターンが認められた DNA 断片については、ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定した。確認された 2 群間でのゲノタイプ表現型とアレルの分布に関しては Fisher 法を、相対危険度はオッズ比を用いて統計解析した。

(結果)

TIMP-2 遺伝子に関しては 2 つの遺伝子多型を認めた。一つはエクソン 3 部位に位置する + 853G/A である。この変異は、サイレント変異であるが、統計学的に有意に、ゲノタイプ G/G とアレル G が患者群に多く見られた。もう一方の - 418G/C はプロモーター領域 SP1 結合部位内の変異であった。当変異は、統計学的解析では、アレル発現頻度及びオッズ比において、患者群にアレル C を保持する傾向が認められた。なお、+ 853G/A 変異と - 418G/C 変異の間には統計学的に有意な連鎖不平衡は認められなかった。

MMP-2 遺伝子においてはエクソン 5 領域内の + 1463C/G 変異とエクソン 9 領域内の + 2245A/G 変異の 2 ヶ所の変異が確認された。両者共にサイレント変異であった。統計学的解析においては、両変異において、ゲノタイプ表現型とアレル頻度の何れでも、患者群と対照群の間には有意な差は認められなかった。

(考察)

今回の COPD における遺伝子多型解析結果では TIMP-2 においては、疾患との感受性が考えられる 2 つの遺伝子多型が見い出された。+ 853G/A の遺伝子多型の意義に関しては、一つはこの遺伝子において重要な役割をする、いわば真の変異が他にありこの多型がそれと連鎖不平衡の関係にある可能性が考えられた。また、この変異によって mRNA の安定性の低下、または転写、翻訳活性の低下をきたし、TIMP-2 蛋白発現の低下によって COPD の発症の低下をきたすという可能性が考えられた。また、- 418G/C は、SP1 結合部位の変異であり、これによって、同蛋白の転写活性の低下を引き起こし発症する機序を想定した。MMP-2 に関しては、今回解析したエクソン領域とプロモーター領域には COPD 罹患感受性遺伝子変異は認められなかった。これは、SSCP 法の感受性の問題、または、まだ、確認していないイントロン領域や、プロモーター部位に変異が存在する可能性もあると思われた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、COPD 発症のプロテアーゼ・アンチプロテアーゼ不均衡説に基づき、候補遺伝子をプロテアーゼでは MMP-2 遺伝子、アンチプロテアーゼでは TIMP-2 遺伝子を選び、その遺伝子多型について検討した。その結果、TIMP-2 遺伝子においては 2 つの疾患感受性を示す遺伝子多型を特定した。MMP-2 遺伝子ではエクソン 5 領域内の + 1463C/G 変異とエクソン 9 領域内の + 2245A/G 変異の 2 ヶ所の変異が確認されたが、疾患感受性は認めなかった。本研究では TIMP-2 遺伝子、MMP-2 遺伝子多型と COPD の発症との間の直接的因果関係は証明されていないが、本研究は COPD の発症の一端を明らかにした研究であり、今後の研究にも指針を与える研究と評価した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。