

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19417

研究課題名(和文) 高地肺水腫における内皮型一酸化窒素合成酵素遺伝子のシーケンス解析による病態解明

研究課題名(英文) The sequence analysis of the endothelium nitric oxide synthase gene in a high altitude pulmonary edema in Japanese population.

研究代表者

小林 信光 (Kobayashi, Nobumitsu)

信州大学・医学部附属病院・助教(診療)

研究者番号：50447752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高地肺水腫の既往者と健常者について内皮型一酸化窒素合成酵素遺伝子(NOS3遺伝子)の解析を行い、高地肺水腫の発症の機序の解明を目指した。患者群と、非発症者群のそれぞれ4検体につき、NOS3遺伝子のエクソン解析を行った。その結果、missense mutationがある3つの単塩基多型(SNPs)(rs143324164、rs1799983、rs79467411)のうち、rs1799983、rs79467411の患者群でのみヘテロ接合体を認めた。よってこれらのSNPs変異が高地肺水腫発症に関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed genetic analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene (NOS3) to reveal mechanism of development of high altitude pulmonary edema (HAPE). We carried out whole exon analysis in NOS3 gene of four HAPE susceptible subjects (HAPE-s) and four HAPE resistant subjects (HAPE-r). There were 3 single nucleotide polymorphism (SNPs) (rs143324164, rs1799983, rs79467411) which cause missense mutation. In four HAPE-s subjects, two subjects of had heterozygous in each two SNPs, rs1799983 and rs79467411, neither in HAPE-r subjects. This result suggests that polymorphism of rs1799983 and rs79467411 might correlate with development of HAPE.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：高地肺水腫 内皮型一酸化窒素合成酵素 NOS3

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 社会的背景

近年中高年の登山者、ハイカーが増加しているが、その一方でそういった人々による遭難事故も増えている。遭難の原因は滑落や転倒などによるものが多いが、なかには全身疲労や急性高山病、重症例である高地肺水腫により救助される例も報告されている。

急性高山病は、登山などにより急激に標高が上がり低酸素環境にさらされることにより、頭痛や嘔吐などの症状を来す疾患であるが、さらに進行すると高地肺水腫 (HAPE) を発症し、安静時呼吸困難、咳、虚脱感または運動能力低下、胸部圧迫感などの自覚症状を伴い、死亡例も報告されている。高地肺水腫は日本では大部分が登山者において発症し、全体の約2割に再発が見られている。発症頻度は年間数例程度であるが、海外の高地へ観光などで訪れて高地肺水腫による事故も報告されており、その原因究明や新たな予防法・治療法の開発が必要な疾患である。

(2) 高地肺水腫の遺伝学的検討の問題

高地肺水腫の発症機序は未だ不明であるが、高地肺水腫既往者は低酸素負荷に対し、特異的な換気応答・肺循環応答を示すとの報告がある他、再発例もあることが示されており、遺伝学的な素因の可能性も考えられており、これまで多くの遺伝学的な研究の報告がされている。

しかし、これまで報告されている遺伝学的解析は、ほとんどが単塩基多型 (SNPs) を用いた解析であり、かつ多くがイントロン領域の解析であるため、実際に報告された遺伝子が分子生理学的にどのように高地肺水腫の発症に寄与しているかはほとんど解明されていない。

血管拡張因子である内皮型一酸化窒素 (NO) の低換気に対する応答が健常者と高地肺水腫既往者で差異があるとの報告も有り、その発症には内皮型 NO に関する遺伝学的な素因の関与も指摘されてきた。

| | | | |
|---------|--|------------------------|--------|
| •NOS | Exon7 | glu298asp | 有意差(+) |
| | <small>Droma, Hanaoka, et al. Circulation 106: 826-830, 2002</small> | | |
| •AGTR-1 | Intron G | (1517)T;3'UTR | 有意差(+) |
| | <small>Hotta J, Hanaoka M, et al. Chest. 126:825-830 2004</small> | | |
| •HLA | HLA-DR6, | HLA-DQ4 | 有意差(+) |
| | <small>Hanaoka M, Kubo K, et al. Circulation. 97:1124-1128</small> | | |
| •TIMP3 | Intron 1 | | 有意差(+) |
| | <small>Kobayashishi N, Ota M, et al PLoS ONE 8: e71993</small> | | |
| •ACE | Intorn 16 | Alu Insertion/deletion | 有意差(-) |
| | <small>Hotta J, Hanaoka M, et al. Chest. 126:825-830 2004</small> | | |
| •VEGF | promtor | C(-2578) | 有意差(-) |
| | <small>Hanaoka M, Kubo K, et al. Respirology. 14:46-52 2009</small> | | |

表 1. 当教室でこれまで報告してきた遺伝子の解析結果

これまでの当教室からもいくつかの遺伝子について報告しているが、中でも血管拡張因子である内皮型一酸化窒素の合成酵素 (eNOS) に関する遺伝子 (NOS3) でエクソン(exon)に遺伝学的な差異があることにより、高地肺水腫の発症に寄与する可能性が高いことを報告している¹⁾。(表1)

2. 研究の目的

本研究では高地肺水腫発症に内皮型一酸化窒素合成酵素遺伝子 (NOS3) がどのように関与しているかを解析するために、患者群および非発症群にそれぞれについて遺伝子のエクソン解析を行い、従来の手法では解析不能であった、高地肺水腫発症の機序や原因をより明らかにし、臨床での検査所見との比較も行う事で、臨床に還元することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子抽出

高地肺水腫の既往者および非発症者から同意を得た上で血液検体を採取し、まだ遺伝子抽出を終えていない検体については、遺伝子抽出に QuickGene-800 (富士フイルム) を用いて、遺伝子抽出を行い、同機による抽出が困難な場合はフェノール法で抽出を行った。

(2) 遺伝子解析

抽出した遺伝子検体のうち、臨床情報が比較的そろっている、患者群の4検体、非発症群の4検体につき、NOS3 遺伝子のエクソン解析を行った。

4. 研究成果

エクソン解析を行った結果、NOS3 遺伝子で3つの missense mutation の SNPs (rs143324164, rs1799983, rs79467411) を認めた。(表2、図1)

| SNPs | Chr | Gene | position | missense mutation | 1/2* | ratio of ancestral |
|-------------|-----|------|-----------|-------------------|------|--------------------|
| rs143324164 | 7 | NOS3 | 150693603 | Arg Trp | C/T | 1.000 |
| rs1799983 | 7 | NOS3 | 150696111 | Asp Glu | G/T | 0.870 |
| rs79467411 | 7 | NOS3 | 150700291 | Cys Tyr | G/A | 0.908 |

* 1: ancestral allele, 2: derived allele

表 2.

3つの missense mutation を起こす SNPs.

- Missense mutation はそれぞれ ancestral allele から derived allele に変異が起きた時のアミノ酸の変化。
- Ancestral allele の ratio は東アジア民族における割合²⁾



図 1 .
rs143324164・rs1799983・rs79467411
の NOS3 遺伝子上の位置

これらの3つのSNPsについて、患者群 (HAPE-s) 4 検体、非発症群 (HAPE-r) 4 検体を用いた。

その結果、rs143324164 では非発症群で1例のみヘテロ接合体を認めただが、他の検体ではすべて ancestral のホモ接合体であった。

また、rs1799983、rs79467411 では非発症群において ancestral allele のホモ接合体のみであったが、患者群においてはそれぞれ2検体でヘテロ接合体を認めた。また、rs1799983、rs79467411 において、それぞれヘモ接合体を認めた検体は、同一でない場合もあり、それぞれが連鎖不平衡を起こしていない可能性が示唆された。(表3,4)

| SNPs | Subjects | | | | | | | |
|-------------|----------|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|
| | HAPE-r | | | | HAPE-s | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| rs143324164 | C/C | C/C | C/T | C/C | C/C | C/C | C/C | C/C |
| rs1799983 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/T | G/G | G/T | G/G |
| rs79467411 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/A | G/A | G/G | G/G |

表 3 .
各検体における、3つのSNPsの解析結果。
HAPE-r : 非発症者群、HAPE-s : 患者群

| SNPs | 1/2* | Genotype distributions | | | | | |
|-------------|------|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1/1 | | 1/2 | | 2/2 | |
| | | HAPE-r | HAPE-s | HAPE-r | HAPE-s | HAPE-r | HAPE-s |
| rs143324164 | C/T | 0.75 | 1.00 | 0.25 | 1.00 | 0 | 0 |
| rs1799983 | G/T | 1.00 | 0.50 | 0 | 0.50 | 0 | 0 |
| rs79467411 | G/A | 1.00 | 0.50 | 0 | 0.50 | 0 | 0 |

表 4 .
非発症者群 (HAPE-r) と患者群 (HAPE-s)
における遺伝子頻度。

考察

当科では2002年にDromaらがNOS3遺伝子のrs1799983 (Glu298Asp)に関する研究を行い、HAPEの患者群と非発症者との間でその遺伝子頻度に有意差をもって差異を認め、この変異がHAPEの発症に關与する可能性を報告している。

今回の研究では、rs1799983とrs79467411のSNPsではそれぞれ非発症者群ではいずれもancestral alleleのホモ接合体のみを認めたが、患者群では半分の検体でヘテロ接合体を認めた

これら2つのSNPsの解析については4検体のみでの検討ではあるが、いずれのSNPsのancestral alleleの割合は9割程度であることから、有意に患者群でヘテロ接合体が多い可能性が考えられる。また、両SNPsは1kb以上離れている他(図1)、今回の解析結果でもrs1799983、rs79467411において、それぞれヘモ接合体を認めた検体は、同一でない場合もあり、連鎖不平衡を起こしていない可能性が示唆された。これらの結果は既に当科から報告しているrs1799983だけでなくrs79467411によるmissense mutationがそれぞれ独立してeNOSの機能になんらかの影響を及ぼした結果、高地肺水腫の発症に關与している可能性が考えられ、今後さらに検討が必要である。

他方、rs143324164もHAPEの発症と關連している可能性は否定できないが非発症群4検体中の1検体のみヘテロ接合体を認めただけであり、また、患者群では変異を認めなかった。これらの結果からは偶然非発症群にヘテロ接合体の検体が存在した可能性が考えられ、今後も慎重な検討が必要である。

本研究では患者群、非発症群それぞれ4検体ずつのみの解析であり、統計学的な検討は行わなかった。しかし、今回認められた単塩基多型がこれまでの報告と併せてHAPEの発症に何らかの關与をしている可能性はあり、今後さらに検体数を増やして検討を行う必要がある。

また、今回NOS3遺伝子以外にも解析を行っており、これらについてもさらに検討を行い、HAPEの発症機序の解明を進めていく予定である。

参考文献

1) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
2) Droma Y, Hanaoka M, Ota M, Katsuyama Y, Kubo K, et al. Positive association of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with high-altitude pulmonary edema. Circulation 106: 826-830. 2002.

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者
には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

Genetic Evidence for high-altitude
pulmonary hypertension in Japanese
climbers

2017.6.3 4th Congress of Asia-Pacific
Society for Mountain Medicine

Genetic Variants in PPARA contribute
to adaptation to High-Altitude Hypoxia
in Sherpas

2017.6.3 4th Congress of Asia-Pacific
Society for Mountain Medicine

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 信光 (Kobayashi Nobumitsu)

信州大学・医学部内科学第一教室

・助教(診療)

研究者番号: 50447752

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

花岡 正幸 (Hanaoka Masayuki)

信州大学・医学部内科学第一教室

・教授

研究者番号: 20334899

太田 正穂 (Ota Masao)

信州大学・医学部内科学第二教室

・特任教授

研究者番号: 50115333

木野 田文也 (Kinota Fumiya)

信州大学・医学部内科学第一教室

・医員

研究者番号: 90647257