

第32回 日本登山医学会 学術集会

The 32nd Annual Scientific Meeting of Japanese Society of Mountain Medicine

テーマ「登山医学を登山者に還元する」

プログラム・抄録集

会期 ▶ 2012年6月16日(土)～17日(日)

会場 ▶ エルガーラホール(福岡市)

高地肺水腫の分子遺伝学的検討

小林信光1)2) 花岡正幸1) 太田正穂2) 雲登卓瑪1)
伊東理子1) 勝山善彦3) 小林俊夫4) 久保惠嗣1)

- 1) 信州大学医学部内科学第一講座
- 2) 信州大学医学部法医学講座
- 3) 信州大学医学部附属病院薬剤部
- 4) 鹿教湯三才山リハビリテーションセンター鹿教湯病院

- 高地肺水腫(HAPE)は、急速に高地に到達することにより発症する非心原性肺水腫である。
- その発症機序は十分に解明されておらず、遺伝的素因が関与する可能性も指摘されている。

- これまで、HAPE発症について検討されている遺伝子
 - 有意差あり
 - NOS3 (*Japanese, Indian*)、ACE (*Indian, Han Chinese*)、AGTR1 (*Japanese*)、EDN1 (*Indian*)、SFTPA1,2 (*Indian*)、HSP1A,1B (*Han Chinese*)、CYP11B2 (*Han Chinese*)、ADRB2 (*Indian*)
 - 有意差なし
 - NOS3 (*Caucasian*)、ACE (*Japanese, European, Indian*)、AGTR1 (*Indian*)

- 当施設よりの報告

- NOS3, AGTR-1,

- 両群間での有意差を認めた。

- Droma, Hanaoka, et al. Circulation 106: 826-830, 2002

- Hotta J., Hanaoka M., et al., Chest. 126:825-830 2004

- ACE, VEGFの遺伝子多型

- 両群間では有意差を認めなかった。

- Hotta J., Hanaoka M., et al., Chest. 126:825-830 2004

- Hanaoka M., Kubo K., et al., Respirology. 14:46-52 2009

- HLA解析

- HLA-DR6、HLA-DQ4で有意差を認めた

- Hanaoka M, Kubo K, et al, Circulation. 97:1124-1128

- これまで報告されている研究では、我々の研究も含めて、
 - 単一遺伝子での報告が多い。
 - そもそも、均一な集団が多数高地に行くことが少ないため、どうしてもそれぞれの研究でのサンプル数は少ない

などの問題もあり、明確にHAPEの遺伝的素因を明らかにした報告はない

- HAPE既往者と非発症者において、マイクロサテライトマーカーを用いた網羅的遺伝子解析を行った。
- 両群間で有意差を認めたマイクロサテライトマーカー付近の遺伝子のうち、さらにHAPEの発症に関係していると推定される遺伝子につき、単塩基多型(SNPs)の解析を行った。

方法-1 マイクロサテライトマーカーによる全網羅的遺伝子解析

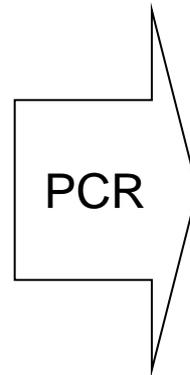
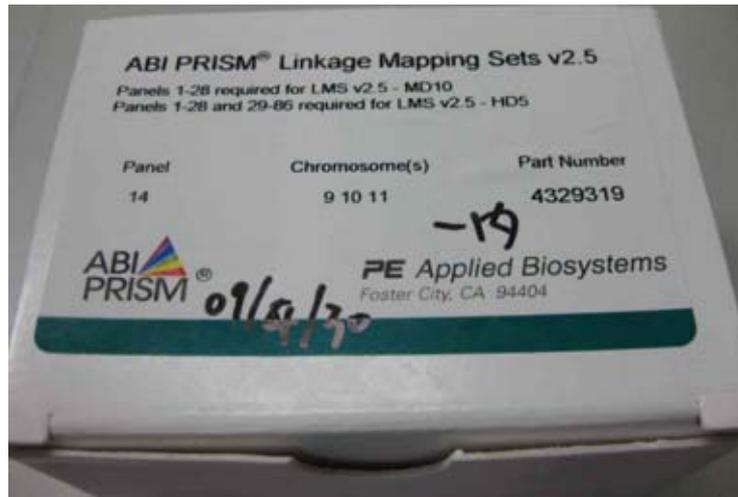
- HAPE既往者53名と、健常登山家67名を対象とした。
- 両群対象者から、静脈血を採取・保存し、そこから抽出したDNAを用いて、400個のマイクロサテライトマーカー (ABI PRISM® Linkage Mapping Set v2.5 MD10 -)を用いてPCR法で遺伝子を増幅した。
- シーケンサー (ABI PRISM® 3130ジェネティックアナライザ) でシーケンス解析を行った。

方法-1

	HAPE-s	HAPE-r
Age(years, mean,range)	34.2 (15-75)	37.6 (18-65)
Sex		
Male(%)	46 (86.8%)	57 (85.1%)
Female(%)	7 (13.2%)	10 (14.9%)
Total	53	67

•HAPE-s:患者群、HAPE-r:非発症群

方法-1



ABI PRISM®

Linkage Mapping Set v2.5

ABI PRISM® 3130

ジェネティックアナライザ

・マイクロサテライトマーカーによる全ゲノム解析の結果

Microsatellite markers	Chromosome	Odds ratio	χ^2 test	P	Pc
Susceptibility					
D1S2697	1p36.13	7.64	9.1190	0.0025	0.012
D1S468	1p36.32	3.32	8.9417	0.0028	0.025
D1S2785	1q43	3.13	8.1333	0.0044	0.039
D4S405	4p14	3.36	8.5390	0.0035	0.031
D5S424	5q13.3	2.17	7.9878	0.0047	0.032
D6S257	6p12.1	3.03	9.5599	0.0012	0.030
D12S368	6q13.13	2.83	7.4379	0.0064	0.045
D16S3103	13p12.3	29.27	13.191	0.0028	0.003
D21S263	21q22.11	20.28	9.1149	0.0025	0.035
Resistance					
D1S230	1p36.3	0.39	9.1073	0.0026	0.020
D14S283	14q11.2	0.44	8.4109	0.0037	0.045
D22S280	22q12.13	0.30	9.5209	0.0020	0.020

- 有意差のあったマイクロサテライトマーカーの±200kbps付近の遺伝子(一部)

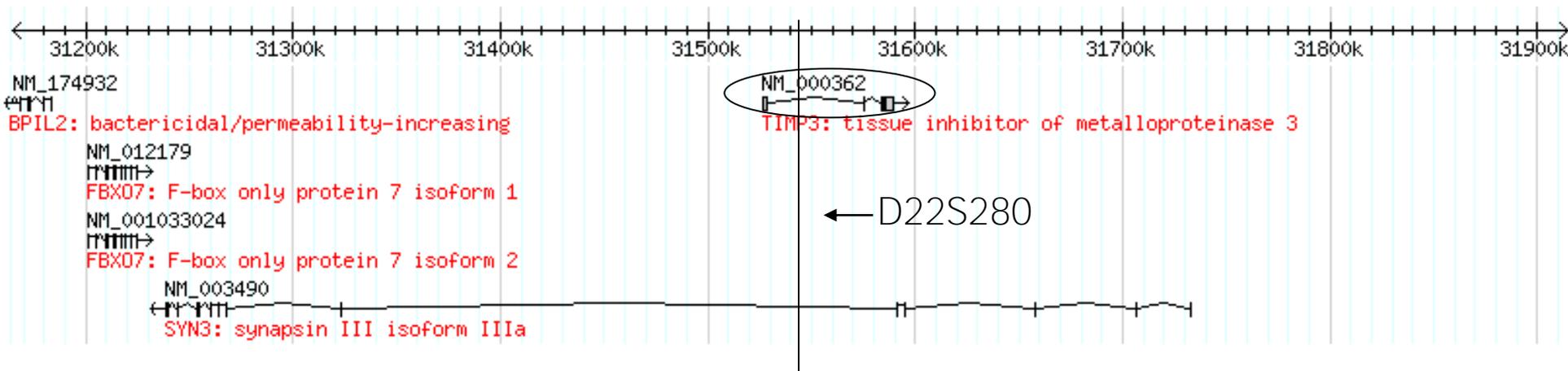
	Some genes near the microsatellite markers
Susceptible	TP73, CHRNA9, S100Z, KRT7, XYLT1,
Resistance	INADL, TRA(T-cell alpha chain), TIMP 3

方法2

- マイクロサテライトマーカーによる解析で有意差を認め、HAPEの発症に関与すると考えられた遺伝子群のうち、TIMP3(tissue inhibitor of metalloproteinase 3)遺伝子が発症に関係すると考え、リアルタイムPCR法でSNPs解析を行った。

	Some genes near the microsatellite markers
Susceptible	TP73, CHRNA9, S100Z, KRT7, XYLT1,
Resistance	INADL, TRA(T-cell alpha chain), TIMP 3

TIMP3



- Tissue inhibitor of metalloproteinase 3
- 22番染色体短腕に存在し、マイクロサテライトマーカー (D22S280) はこの遺伝子内に存在する
- Matrix metalloproteinase (MMP) と拮抗する働きを持つ。
- 肺においてはMMPとTIMPのバランスが肺の恒常性維持に重要であると報告されている
 - Mocchegiani E. et al, Curr Opin Pulm Med. 2011 Dec;17 S11-19.

- TIMP3の中の6個のSNPsについて解析を行い、うち1個のSNP(rs130293)につき、両群間で有意差を認めた。

Marker	Position(bp)	Alleles (1/2)	Major allele frequency		O.R.	x2	P
			HAPE(%)	Control(%)			
rs130287	31,546,760	A/G	73.6	77.6	0.8	0.52	0.469262
rs130293	31,551,939	T/C	94.3	78.4	4.6	12.13	0.000495
rs715572	31,564,931	G/A	70.8	74.6	0.9	0.19	0.663119
rs2071947	31,576,032	C/T	57.7	62.7	0.8	0.61	0.434345
rs9862	31,583,280	C/T	66.0	62.7	1.2	0.29	0.590820
rs738992	38,540,005	C/T	46.3	51.5	0.9	0.27	0.601161

1, Major allele; 2, Minor allele; O.R., Odds ratio;

- 今回のマイクロサテライトマーカー解析では9個の感受性マーカーと3つの抵抗性マーカーを認めた。
- 複数のマイクロサテライトマーカーに有意差を認めたことから、HAPEの発症には種々の遺伝子が関与する可能性が示唆される。
- また、これまで解析されていない新たな遺伝子がHAPEの発症に関与している可能性が示唆される。

- TIMP3遺伝子はこれまでの報告で肺の構造や恒常性維持に関係する可能性が報告されている。
- 今回の研究でTIMP3のSNPsで有意差を認めたことから、HAPEの発症に関与することが示唆される。
- 今後、病態との関係を調べていくことで、HAPEの発症メカニズムの解明につながる可能性が期待される。

シェルパ族の高地適応メカニズムにおける *EPAS 1* 遺伝子の関与

木野田文也¹⁾ 花岡正幸¹⁾ 雲登卓瑪¹⁾ Buddha Banyat²⁾
伊東理子¹⁾ 小林信光¹⁾ 久保恵嗣¹⁾ 太田正穂³⁾

1)信州大学内科学第一講座

2)Mountain Medicine Society of Nepal

3)信州大学医学部法医学講座

背景

チベット族であるシェルパ族は主にネパール東部やヒマラヤ南麓に住みヒマラヤ登山において案内人や荷運びに従事している。その高地での身体能力は高く、現在のヒマラヤ登山で重要な役割をはたしている。

また近年 *endothelial PAS domain protein (EPAS1)* 遺伝子 (別名 *HIF-2* 遺伝子) のチベット族における変異が高地適応における重要な役割をはたしている事が解明されている。

低酸素状態



低酸素誘導性因子 (*hypoxia-inducible factor HIF*) 活性化



HIF-2 遺伝子の関与 ↓

解糖系酵素

血管内皮増殖因子

エリスロポイエチン



細胞代謝維持

血管新生、血管拡張

造血亢進

低酸素下では以上の反応によりHbの上昇が起こり、血液の粘性があがる（慢性高山病）

一方チベット族は、高地低酸素でもHbの上昇をおこさない。

目的

ネパールのヒマラヤ地域に居住するシェルパ族はチベット族を祖先としているが、シェルパ族における*EPAS1*遺伝子の変異は未解明である。そこでシェルパ族における*EPAS1*遺伝子多型を調査し、非シェルパ族との比較をした。

材料と方法

1 : シェルパ族

海拔3440mのネパールナムチェ村に居住するシェルパ族 105名

2 : 非シェルパ族のネパール人

カトマンズ(海拔1330m)に居住する非シェルパ族のネパール人 111人

3 : 日本人

高地低酸素に感受性の高い日本人高地肺水腫既往者(J-HAPE-s) 54名

エリート登山家 日本人高地肺水腫非発症者(J-HAPE-r) 66名

4 : 既報の文献から得たチベット族の遺伝情報

5 : HapMapから得た4つの人種

JPET東京の日本人 CHB北京の漢民族

CHU祖先が西北ヨーロッパのユタ州住民 YRIナイジェリアの Yoruba 人

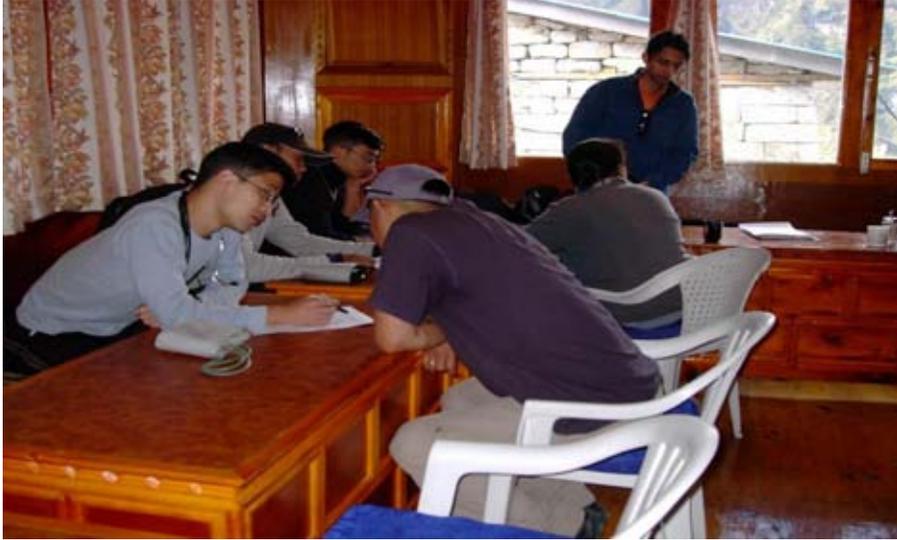
On the way to Namche village



**Namche Bazaar, 3,440 meters above sea level,
located in a narrow, horseshoe-shaped high
valley**



Fieldwork



遺伝子タイピング

全血よりDNAを抽出し、*EPAS1*遺伝子の3つの一塩基多型 (SNPs)

rs13419896 (G/A ancestral allele G)

rs4953354 (A/G ancestral allele A)

rs495388 (G/A ancestral allele G)

をTaqMan法でタイピングした。

SNP	Sherpas	Tibetan [†]	Nepalese	HAPE-s	HAPE-r	JPT	CHB	CEU	YRI
rs13419896 (Position: 46556345; Function: intron in <i>EPAS1</i> gene)									
Genotype (G/A= ancestral allele/derived allele according to NCBI dbSNP database)									
G/G	0.068	-	0.618	0.611	0.545	0.460	0.467	0.982	0.476
G/A	0.320	-	0.291	0.370	0.379	0.407	0.460	0.018	0.463
A/A	0.612	-	0.091	0.019	0.076	0.133	0.073	0	0.061
Allele									
G	0.228	0.210 [†]	0.764	0.796	0.735	0.664	0.697	0.991	0.707
A	0.772	0.790	0.236	0.204	0.265	0.336	0.303	0.009	0.293

[†] Xu S, Li S, Yang Y, Tan J, Lou H, Jin W, Yang L, Pan X, Wang J, Shen Y, Wu B, Wang H and Jin L.

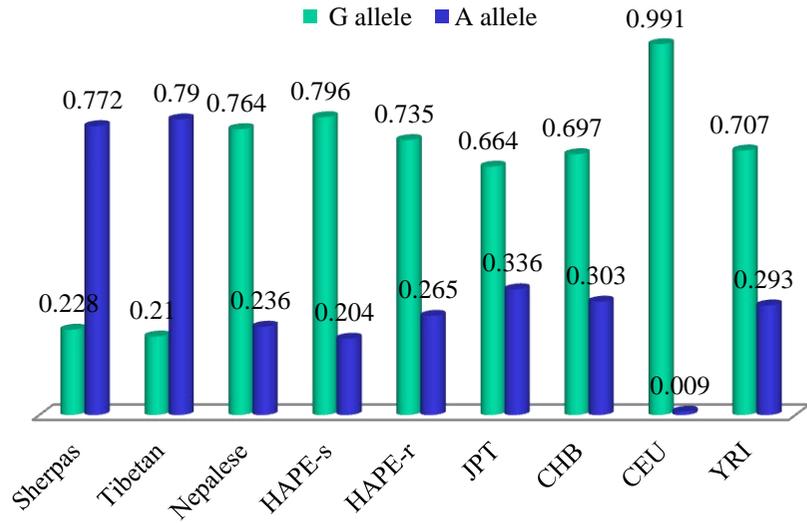
A genome-wide search for signals of high-altitude adaptation in Tibetans. *Mol Biol Evol* 28: 1003-1011, 2010

SNP	Sherpas	Tibetan [†]	Nepalese	HAPE-s	HSPE-r	JPT	CHB	CHU	YRI
rs4953354 (Position: 46575388; Function: intron in <i>EPAS1</i> gene)									
Genotype (A/G)									
A/A	0.058	-	0.440	0.778	0.750	0.756	0.733	0.692	0.603
A/G	0.250	-	0.413	0.222	0.250	0.244	0.267	0.215	0.365
G/G	0.692	-	0.147	0	0	0	0	0.092	0.032
Allele									
A	0.183	0.200 [†]	0.647	0.889	0.875	0.878	0.867	0.800	0.786
G	0.817	0.800	0.353	0.111	0.125	0.122	0.133	0.200	0.214

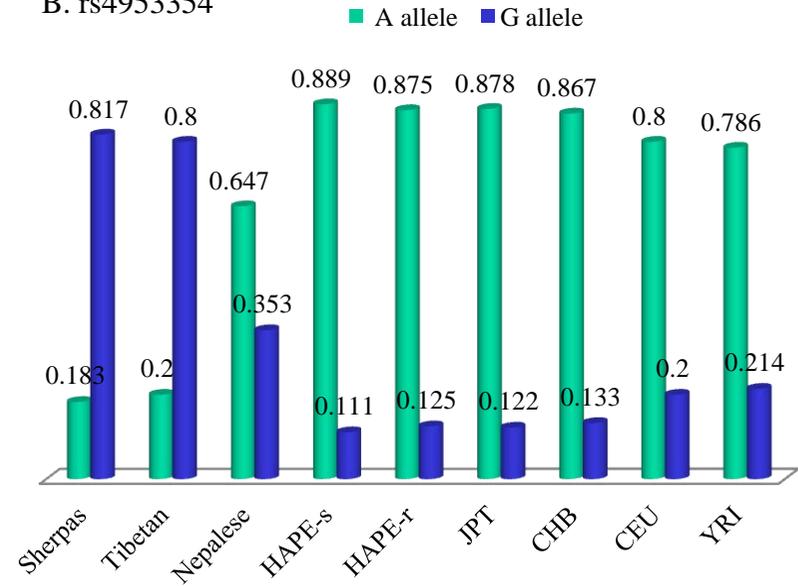
SNP	Sherpas	Tibetan‡	Nepalese	HAPE-s	HAPE-s	JPT	CHB	CEU	YRI
rs4953388 (Position: 46713201; Function: unknown gene downstream of <i>EPAS1</i> gene)									
Genotype (G/A)									
G/G	0.085	-	0.536	0.926	0.937	0.823	0.876	0.496	0.939
G/A	0.429	-	0.418	0.074	0.063	0.177	0.124	0.363	0.061
A/A	0.486	-	0.046	0	0	0	0	0.142	0
Allele									
G	0.300	0.272‡	0.745	0.963	0.968	0.912	0.938	0.677	0.969
A	0.700	0.728	0.255	0.037	0.032	0.088	0.062	0.323	0.031

‡Peng Y, Yang Z, Zhang H, Cui C, Qi X, Luo X, Tao X, Wu T, Ouzhuluobu, Basang, Ciwangsangbu, Danzengduojie, Chen H, Shi H and Su B. Genetic variations in Tibetan populations and high-altitude adaptation at the Himalayas. *Mol Biol Evol* 28: 1075-1081

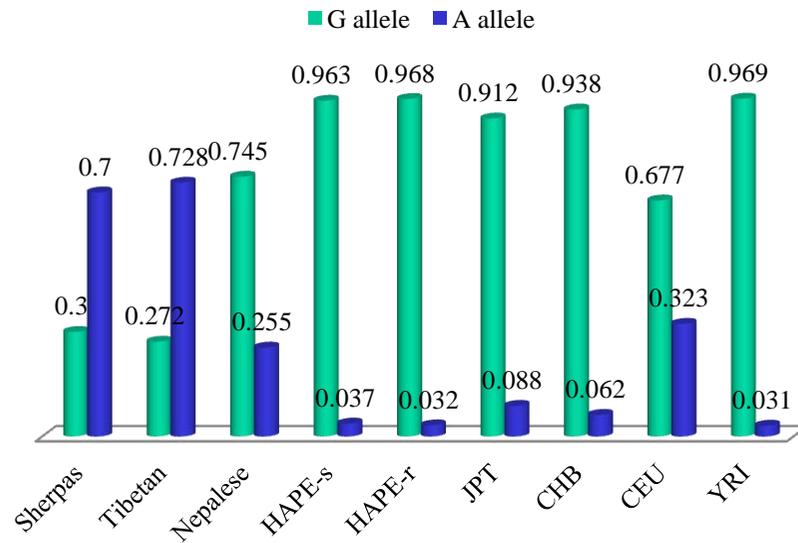
A. rs13419896



B. rs4953354



C. rs4953388



The genetic distance (F_{ST}) in each SNPs

SNPs	Sherpas-Nepalese	Sherpas-HAPE-r	Nepalese-HAPE-r
rs13419896	0.287	0.257	0.001
rs4953354	0.222	0.481	0.072
rs4953388	0.198	0.481	0.101

Haplotype structures			Populations			
rs13419896	rs4953354	rs4953388	Sherpas	Nepalese	HAPE-s	HAPE-r
G/A*	A/G*	G/A*		(P value†)	(P value†)	(P value†)
A	G	A	0.684	0.048 (1.85x10 ⁻²²)	0 (2.26x10 ⁻¹⁶)	0 (1.12x10 ⁻¹⁸)
G	A	G	0.128	0.381 (2.16x10 ⁻⁵)	0.713 (9.43x10 ⁻¹⁴)	0.660 (6.75x10 ⁻¹²)
G	G	G	0.079	0.181 (0.0265)	0.046 (0.4331)	0.045 (0.3829)
A	A	G	0.048	0.118 (0.0637)	0.139 (0.0438)	0.196 (0.0021)
A	G	G	0.040	0.068 (0.3644)	0.065 (0.48709)	0.067 (0.4321)
G	G	A	0.011	0.057 (0.0646)	0 (0.4392)	0 (0.3926)
G	A	A	0	0.142 (6.06x10 ⁻⁵)	0.037 (0.04739)	0.024 (0.1107)

結論

*EPAS1*遺伝子のSNPs対立遺伝子パターンは、シェルパ族とチベット族で一致し、その他の人種とでは異なったパターンを示した。

すなわち、他の人種と比較して高地適応能力の高いシェルパ族においても、チベット族と同様に*EPAS1*遺伝子が関与する可能性が示唆された。

ご静聴ありがとうございました

