

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09664

研究課題名(和文) 気道上皮に発現するムチン(MUC4)の遺伝子多型は好中球性炎症の重篤化と関係する

研究課題名(英文) Genetic polymorphism of MUC4 is related to the severity of neutrophilic inflammation in the lung

研究代表者

太田 洋充(Hiromitsu, Ohta)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：40451562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：日本人は重篤な薬剤性肺障害や間質性肺炎の急性増悪など“びまん性肺胞障害”を発症する頻度が世界でも高い。そのため、“びまん性肺胞障害”、つまり重篤な好中球性炎症を起こす原因遺伝子が日本人の集団の中に存在すると考えた。本研究グループでは関連解析を行い、MUC4の反復配列に原因となる遺伝子変異があることを同定した。次世代シーケンスを使用しMUC4の遺伝子配列を解析し、MUC4の反復配列が保存領域と3つの多型部位にわかれることを明らかにした。また、代表的な遺伝子多型毎にMUC4発現ベクターを作成、安定にMUC4を発現する細胞を作成した。今後、これらの細胞を使用しMUC4の機能解析を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は日本人に多い重篤な肺障害の原因遺伝子を同定し、発症予測や予防法、治療法を開発することを目的に行われている。これまでの研究で原因となる遺伝子変異がMucin 4(MUC4)の反復配列領域にあることを明らかにしてきたが次世代シーケンスを使用し、同領域の構造を解明した。また、MUC 4は巨大分子であり培養細胞で解析することが難しかったが、今回、MUC4を完全長で安定に発現する細胞を作成することに成功し、MUC 4の機能解析を培養細胞で行うことを可能にした。

研究成果の概要(英文)：The frequency of "diffuse alveolar disorders," such as severe drug-induced lung injury and acute exacerbation of interstitial pneumonia, is the highest in Japan in the world. Therefore, it was considered that the Japanese population could have a genetic mutation that caused "diffuse alveolar disorder," that is, severe neutrophilic inflammation in the lung. In this research group, we performed association analysis and identified the causative genetic mutation should exist in the variable tandem repeat region of Mucin 4 (MUC4). Next-generation sequences were used to analyze the variable tandem repeat region of MUC4, revealing that the area was divided into conserved parts and three polymorphic sites. Besides, the MUC4 expression vector was prepared for each representative gene polymorphism, and cells stably expressing MUC4 were also made. In the future, we plan to proceed with the functional analysis of MUC4 using these cells.

研究分野：内科学

キーワード：ムチン びまん性肺胞障害 薬剤性肺障害 間質性肺炎急性増悪 遺伝子多型 次世代シーケンス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、イレッサなどの分子標的薬で薬剤性肺障害が社会的な問題となったが、重篤なびまん性肺胞障害 (Diffuse Alveolar Damage : DAD) は欧米人とだけでなく、同じ東アジアの民族と比較しても日本人に多い。病理像が同じ DAD で臨床経過もよく類似する、特発性間質性肺炎の急性増悪や皮膚筋炎の一部に認める、DAD 型の急性間質性肺炎の頻度も日本人で多いことが知られている。(Azuma, A et.al. *AM J Respir Crit Care Med*, 2008, Kudoh, S et.al. *AM J Respir Crit Care Med*, 2008) これらの事実は、日本人の集団の中でびまん性肺胞障害に関係する遺伝子変異が起こり、集団内に伝播したと考えれば説明しやすい。

本研究グループは厚生労働省難治性疾患克服研究事業として「特発性肺線維症急性増悪及び薬剤性肺障害に関与する日本人特異的遺伝素因に関する研究」を行った。日本人の患者群で全遺伝子コード領域シーケンス解析を行い、データベース上のコーカシアン、中国人、日本人のシーケンスと比較した。日本人の 1 名以上で検出された変異のうち、アミノ酸変化を生じる変異が全ゲノムで 180215 カ所存在した。その全てで、イレッサ + タルセバ肺障害患者合計 36 名と一般人 70 名で関連解析を行った。統計的に有意な遺伝子変異のうち、疫学データに合致し、肺で発現し、間質性肺疾患と関連のある機能を有する遺伝子は肺では発現する MUC4 のみであった。肺で発現する MUC4 の遺伝子多型が日本人に多い、DAD の原因遺伝子と推定された。MUC4 は上皮細胞の表面を物理的な障害から保護する以外にも細胞の再生、分化、接着などに関与することが知られているが、MUC4 が好中球性炎症であるびまん性肺胞障害を軽減する具体的な機序については解明されていない。また、MUC4 は巨大分子であり、48 塩基の反復配列が長いもので 300 回以上繰り返す。エクソーム関連解析の結果は、DAD の原因となる遺伝子多型は繰り返し配列領域 (VNTR) にあることを示唆しているが、具体的には特定できていない。

## 2. 研究の目的

日本人は抗癌剤や手術などの侵襲により重篤な肺障害、びまん性肺胞障害をきたしやすい。近年、癌に対する治療として、上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤 (ゲフィチニブ、エルロチニブなど) などが多く使用されるようになってきていることもあり、びまん性肺障害が実際の臨床問題となっている。本研究は、重篤な薬剤性肺障害の予防・回避のため、MUC4 の原因となる遺伝子多型を特定し、また、検出方法を確立することを目的とする。

びまん性肺胞障害 (DAD) は、重篤な好中球性炎症であり、MUC4 が好中球性炎症による障害を軽減する機能を持つと推測される。そのため、MUC4 を気道上皮細胞に導入し、MUC4 がびまん性肺障害を軽減する分子生物学的な機序を解析、重篤な肺障害であるびまん性肺胞障害の新たな予防方法と治療方法を開発することを目標とする。

## 3. 研究の方法

### MUC4 遺伝子多型判定システムの構築

これまで検討した実験結果に基づき、びまん性肺胞障害を来す遺伝子多型が確定させ、その検査システムを設計する。商業的に利用可能なゲノムを用いた予備実験では、有力候補である VNTR 領域の 3 塩基の挿入は日本人のゲノムでは 20-30%程度認められた。薬剤性肺障害は 5%程度であり、遺伝子多型をホモ接合型で持つ場合にのみ、びまん性肺胞障害は起きるのかも知れない。対象領域の次世代シーケンスを利用したシステムを検討した。

## MUC4 発現ベクターによる検討

本研究グループでは、正常人のリンパ球由来のMUC4 (wild 型) とびまん性肺障害を来した患者のリンパ球右から MCU4 遺伝子をクローニングした、これらの遺伝子を利用し、正常人由来の MCU4 発現ベクターとの患者由来の発現ベクター (mutant 型) を作成した。これまでの報告では、ERBB2, ERBB3 に結合し生存シグナルや増殖シグナルを伝達することが報告されているため、ERBB2 と ERBB3 についても発現ベクターを作成した。これらの発現ベクターを培養上皮細胞に導入、WILD 型の MUC4 と ERBB2, ERBB3 の相互作用を観察し、また、wild 型の MUC4 と mutant 型の MUC4 で ERBB2、ERBB3 との相互作用に違いがあるか検討を行う。

## 4. 研究成果

### MUC4 遺伝子シーケンスを解析

本研究グループは、正常人リンパ球とびまん性肺障害を来した患者からのリンパ球から MUC4 遺伝子相同組み換えを利用しクローニングを行った。VNTR 領域は約 20000 塩基に及ぶが、約 1000 塩基程度に断片化しシーケンスを行った。その後、再度、得られた塩基配列を組合し MUC4 の VNTR 領域の全長の配列を決定した。びまん性肺障害を来した患者の塩基配列では、共通して 3 塩基の挿入を認めた。そのため、当初はこの 3 塩基挿入が DAD の発症に関係する遺伝子変異と考えた。挿入 3 塩基を同定するシステムを開発し、スクリーニングを開始し、健常日本人 96 名の MUC4 反復配列長の決定と、3 塩基配列の検索を行った。比較のために欧米人の DNA の検索を始めたところ、欧米人にも 3 塩基挿入を認める配列が 6 名中少なくとも 2 名の患者に存在した。そのため、日本人肺障害患者、日本人健康人、欧米人、中国人の MUC4 の VNTR 領域の遺伝子配列をより包括的に比較する必要が生じた。通常のシーケンス方法ではコスト、労力とも多大であり、次世代シーケンスをもちいた方法を検討した。

以下の方法で解析を行った。

MUC4VNTR 領域を含む、long PCR。\* 非特異的反応を抑制されるように反応系を作成。

PCR product を断片化し断片長により選択。

MCU4 反復配列特異的ライブラリ調整反応

次世代シーケンサーMiSeq による 25-300bp の塩基配列の決定。

MUC4 反復配列専用のアセンブラによる塩基配列の決定。

図 1 にアライメントの 1 例を示す。MUC4 の反復配列にはパターンがあり、それぞれ ID (番号) をつけ、番号をアライメントするようにしてある。

現時点での解析結果では全ての患者で一塩基の違いも無い保存領域と、患者により異なる多型部位が存在することが判明した。3 つの多型部位に肺障害責任配列が存在する可能性が高い。当初、責任配列と考えた、3 塩基挿入は 4 番目の保存領域に存在し、やはり DAD の責任配列ではないと考えられる。

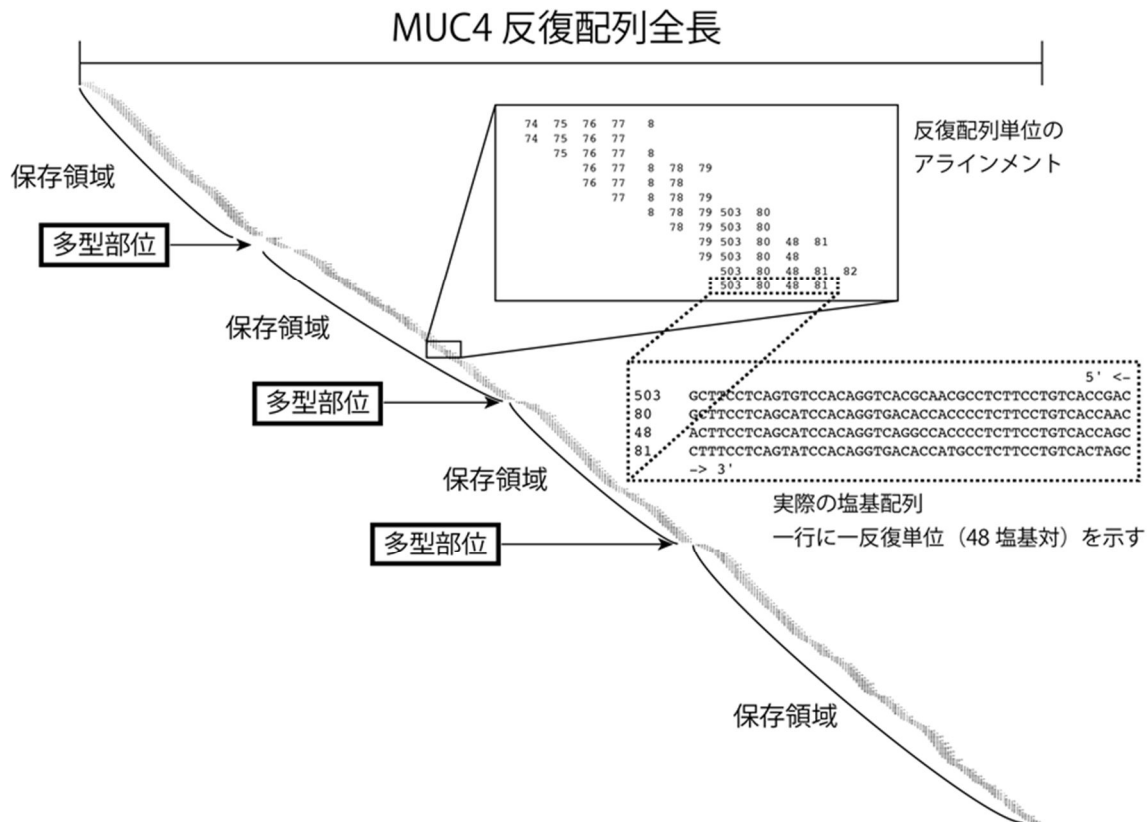


図1 MUC4 反復配列のアラインメント. 全てタンパクコード領域である. MUC4 遺伝子は, 個人間で塩基配列の完全に一致する保存領域 4 箇所と, 個人間で異なる多型領域 3 箇所からなることが分かってきた. 異なる塩基配列を持つ反復配列には異なる ID を付し, 次世代シーケンサーで得られた断片を ID に変換, ID の数列としてアセンブルする.

### MUC4 発現ベクターによる検討

Southern Blotting の解析から VNTR 領域の 4 つの代表的な 4 つの遺伝子多型を特定(図2)、クローニングを行った。クローニングした VNTR 領域を利用し発現ベクターを作成したがベクターは 200000 塩基を超える巨大なベクターであり培養細胞への導入効率は極めて不良であった。

そのため、episomal 型の発現ベクターであり pEB ベクターにより再度作成し培養細胞へ導入したが、それでも長期には安定に発現を認めなかった。そのため、さらにトランスポゾンによる cDNA の宿主細胞のゲノムへの挿入が可能な PiggyBAC Transposon Vevtor を利用し再度発現ベクターを再構築する必要があり、時間を要した。これらの vector を利用し、ヒトの気道上皮細胞由来の培養細胞である、BEADS-2B 細胞に遺伝子型ごとの MUC4 を導入した。

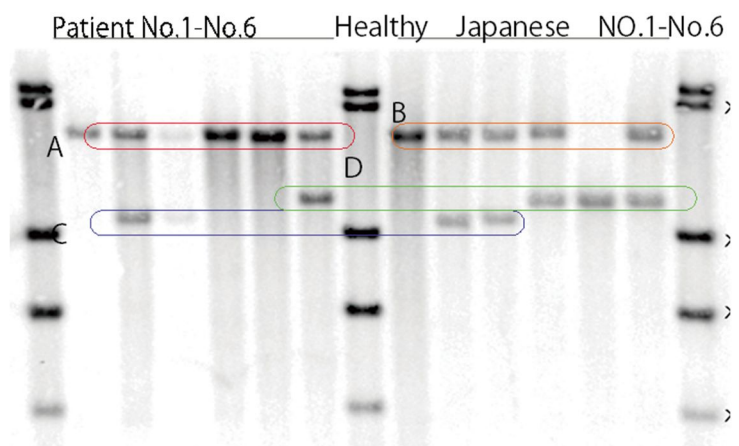


図2 MUC4 の VNTR 領域の Southern Blotting 代表的な 4 つの遺伝子型についてクローニングを行った。

導入した細胞での MUC4 の発現を確認した。MUC4 の糖鎖を抗原とする抗体により MUC4 を染色し、培養細胞での発現を確認した(図 3A)。抗 MUC4 抗体により MUC4 発現細胞を無固定で染色可能であり、MUC4 の糖鎖が細胞外に存在していることを確認した(図 3B)。また、同じ抗体を用いてフローサイトメトリーを行い、ほとんどの細胞で MUC4 が発現していることを確認した(図 4)。

研究の途中で MUC4 の VNTR の領域が発現ベクターにおいて短縮していることが判明し、MUC4 の発現ベクターを作成しなおす必要があった。そのため、この MUC4 発現細胞の作成に想定以上の時間を要した。今後、これらの細胞を使用し、MUC4 の機能について解析を進めることを予定している。

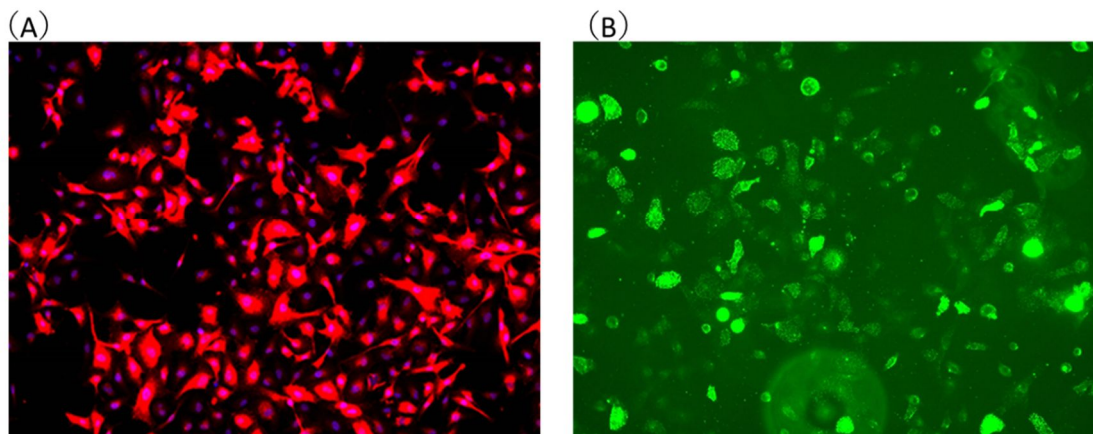
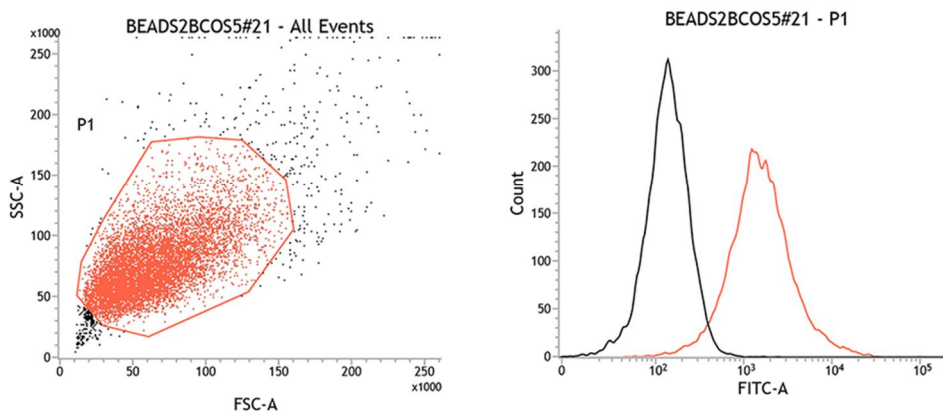


図 3 MUC4 安定発現細胞株の染色

MUC4-FLAG 安定発現細胞株 (BEADS2B) を染色した。

(A) 細胞を 1%ホルマリンで固定後、界面活性剤 (TX-100) で処理後、FLAG で染色した。

(B) 細胞を固定せず、生細胞を抗 MUC4 抗体で染色した。抗 MUC4 抗体は MUC4 糖鎖に対する抗体であり、糖鎖が細胞外にあることが示唆される。



MUC4 図 4 MUC4 安定発現細胞株のフローサイトメトリー

MUC4 発現細胞を抗 MUC4 抗体で染色し、フローサイトメトリーで MUC4 の発現を確認した。

MUC4 導入していない細胞を対照とした。大多数の細胞に MUC4 が発現している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inoue Y, Shiihara J, Miyazawa H, Ohta H, Higo M, Nagai Y, Kobayashi K, Saijo Y, Tsuchida M, Nakayama M, Hagiwara K	4. 巻 12
2. 論文標題 A highly specific and sensitive massive parallel sequencer-based test for somatic mutations in non-small cell lung cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS one	6. 最初と最後の頁 1371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 S. Shiihara, H. Ohta, K. Kudo, K. Mizushima, T. Miwa, H. Ohyanagi, S. Koyama, K. Hagiwara
2. 発表標題 MUC4 Variable Number Tandem Repeat Polymorphisms and severe lung injury
3. 学会等名 Congress OF Asian Pacific Society of Respirology 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 太田洋充、萩原弘一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 380
3. 書名 「上皮細胞生死の分子生物学的機構と間質性肺炎」 間質性肺炎・肺線維症と類縁疾患 第4巻	

1. 著者名 太田洋充、萩原弘一	4. 発行年 2017年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 分子呼吸器病 2017年3月号 ムチンと気道上皮防御機構	

〔産業財産権〕

[ その他 ]

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	萩原 弘一  (Hagiwara Koichi)  (00240705)	自治医科大学・医学部・教授    (32202)	
研究 分担者	海老名 雅仁  (Ebina Masahito)  (10280885)	東北医科薬科大学・医学部・教授    (31305)	