

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390258

研究課題名（和文）薬剤性肺障害・特発性肺線維症急性増悪の遺伝学的研究

研究課題名（英文）Genetic studies for the drug-induced interstitial lung disease and the acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

萩原 弘一（HAGIWARA KOICHI）

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：00240705

研究成果の概要（和文）：

本研究は、薬剤性肺障害および特発性肺線維症急性増悪に關与する遺伝因子の同定を目的としている。

現時点までに薬剤性肺障害、特発性肺線維症急性増悪を含む 400 例（かなりの部分がまだ臨床データ未収集で最終分類できていない）を超えるサンプルが収集できた。200 例以上の症例で SNP6.0 解析，60 例で exome 解析が終了した。Exome 解析を行った 18 例の gefitinib 肺障害症例で、症例に集積し、日本人に特異的に見られ、Tyrosine kinase pathway に存在する 2 つの遺伝子を同定した。今後この遺伝子の機能解析を行っていく予定である。

研究成果の概要（英文）：

The aim of the current study is to identify the genetic factor(s) involved in the drug-induced interstitial lung disease and the acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis.

Using the exome sequencing analysis performed on DNA from 18 patient with gefitinib-induced interstitial lung disease, we have identified 2 genes that bear alterations that are specific to Japanese. These 2 genes are located in the signal transduction pathway of tyrosine kinases, and may be responsible to the etiology of the disease. We are currently performing the functional analyses of these genetic alterations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	1,742,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：薬剤性肺障害，ゲノムワイド解析

1. 研究開始当初の背景

近年、日本人肺の脆弱性が指摘されている

（1）薬剤性肺障害が他国（西洋や他のアジア人）より高頻度で見られ、高率に致死的な

経過をたどること(Azuma and Kudo, JMAJ 50:1-7, 2007:表 1), (2) 肺線維症を有する患者で他国より高頻度に急性増悪が起こり, 高い致死率を示すと推定されること(Azuma et al. Am J Respir Crit Care Med. 177:1397, 2008) が典型例である。これ以外にも (3) 皮膚筋炎に伴うびまん性肺胞障害 (DAD) 型の急性間質性肺炎は海外では非常に少ない (Kameda et al. J Rheumatol 34:1719, 2005 及び亀田私信)。(4) 肺線維症合併肺手術後の肺線維症急性増悪は海外にはあまり見られない(工藤私信)などがある。日本人は, 特定の条件下で, びまん性肺胞障害 (DAD) を起こしやすいようだ。厚生労働省も久保恵嗣 (主任研究者)「薬剤性肺障害の発現状況の国際比較に関する研究」で実態調査に乗り出している。

病態に明確な民族差がある場合, 民族特異的な遺伝因子があると考えられる。好例は「下戸の遺伝子」(ALDH2 の変異遺伝子: アルコール代謝機能が低下する)である。「酒が飲めない人」は東洋人に限られる。「下戸の遺伝子」は中国で生じ, 地域で広がったものだからである (Goeddel et al. Hum Genet 88:344, 1992)。日本には弥生時代に渡来人がもたらした。日本に入って 2000 年程度という新しい遺伝子だが, 現日本人に高率に見いだされる (Shibuya et al. Am J Hum Genet 43:741, 1988)。特殊な状況(「下戸の遺伝子」ではアルコール摂取)のみで明確になる遺伝子は通常の生活では選択を受けないため, 集団内に広がりやすい。

薬剤性肺障害や特発性肺線維症急性増悪に関与する遺伝因子は多数あると想定されるが, その中でも特に強く関与する遺伝因子を 1 つ想定する(下戸における ALDH2 のように)と, 民族差を説明しやすい。その遺伝因子が過去の日本で生じたと仮定すると, 日本は島国であるため, 日本でのみ高率に見られる疾患が生じる。肺の防御力を弱める遺伝因子なら, 薬剤性肺障害や特発性肺線維症急性増悪等の共通の原因にもなりうるだろう。

現在施行されている疾患遺伝子解析の多くは, この仮説に基づいて開発された全ゲノム関連解析 (genome-wide association study: GWAS) を用いて行なわれている。呼吸器でも「ドイツのサルコイドーシスに関与する遺伝子 (Hoffman et al. Nat Genet 40:1103, 2008)」, 「ヨーロッパの肺癌に関与する異常ニコチン受容体遺伝子 (Thorgeirsson et al. Nature 452:638, 2008)」が見つかった。

研究代表者 (萩原) は, 肺胞微石症責任遺伝子の同定 (Huqun et al. Am J Respir Crit Care Med 175:263, 2007) 以来, 疾患遺伝子解析を行っている。その過程で, 効率的な疾患遺伝子解析手法であるホモ接合ハプロタイプ法を開発 (Miyazawa et al. Am J Hum Genet 80:1090, 2007) し, さらに発展型である「ホモ接合ハプロタイプ法を用いた全ゲノム関連解析」を開発した (文部科学省特定領域研究「ゲノム」合同班会議発表)。

「ホモ接合ハプロタイプ法を用いた全ゲノム関連解析」は, 通常の全ゲノム関連解析より少ない症例数で疾患遺伝子を同定できる。

2. 研究の目的

本研究は, 薬剤性肺障害および特発性肺線維症急性増悪に関与する遺伝因子の同定を目的としている。本研究では, (1) 薬剤性肺障害に関与する遺伝因子が 1 つ存在し, それが日本人に広がった, (2) 特発性肺線維症急性増悪に関与する遺伝因子も同様に日本人に広がった, という作業仮説のもと, 両者が同一である可能性, 異なる可能性を共に考慮に入れながら, 「ホモ接合ハプロタイプ法を用いた全ゲノム関連解析」を始めとする各種解析手法により, 両者の遺伝因子を特定する。両者の遺伝因子が同一か否か, 比較対照しながら平行して研究する。

本研究の特徴は薬剤性肺障害の遺伝因子を想定。その遺伝因子を人類遺伝学的に考察し, 研究代表者が考案した「ホモ接合ハプロタイプ法を用いた全ゲノム関連解析」を含む複数の手法により, 疾患遺伝子の同定を行う点である。本研究により, 日本人特異的な薬剤性肺障害, また特発性肺線維症急性増悪に関与する遺伝因子が解明できる。遺伝因子が判明した場合, 薬剤投与の適否を遺伝因子保有の有無で判定できる。また特発性肺線維症急性増悪の治療を確立する手がかりが得られる。

3. 研究の方法

以下の手順で施行する

(1) 検体収集

「薬剤性肺障害の発生状況の国際比較に関する研究」(主任研究者: 久保恵嗣), 厚生労働省「びまん性肺疾患に関する調査研究班」(主任研究者: 杉山幸比古) で収集している薬剤性肺障害, 特発性肺線維症急性増悪患者末梢血 DNA (全ゲノム SNP 解析の同意取得済み) を用いる。これらの DNA は, 両疾患の原因探索研究に供することを目的として収集されている (検体収集責任者: 萩原弘一)。薬剤性肺障害の収集が先に始まり, 現在 gefitinib, erlotinib 肺障害 10 例収集済み。特発性肺線維症急性増悪は 2008 年秋より開始している。全ゲノム SNP 解析の同意取得済みの健常者コントロールは埼玉医科大学で収集している。

(2) 生存シグナル伝達系個別遺伝子解析

サンプル収集の都度, 合計 20 例, 生存シ

グナル伝達系を構成する 10 遺伝子 AKT1, BAD, BCL2, BCL2L1, PIK3CA, PIK3CB, PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, PDPK1 の全コード領域を、PCR ダイレクトシーケンスにより解析する。

(3) 全ゲノム SNP タイピング

Affymetrix 社 SNP6.0 を用いて、本学附置研究所である埼玉医科大学ゲノム医学研究センター、または Denmark の AROS 社で全ゲノム SNP タイピングを行う。これにより一度に各被験者 100 万ヶ所の SNP 情報、200 万ヶ所の染色体コピー数情報を得ることができる。

(4) 染色体コピー数解析

染色体の多くの領域は各個人で 2 コピーだが、1 コピー、3 コピーの場合もあることが分かって来た (Redon R et al. Nature 444:444, 2006)。これらを見るために、SNP 6.0 アレイには、染色体コピー数解析プローブ (全ゲノムで 200 万ヶ所) が組み込まれている。コピー数異常の多くはタンパク非コード領域にあるが、まれにタンパクコード領域にあり、タンパク機能を全く喪失することがある。突然変異による欠失も、多型としての欠失も、ともに染色体コピー数解析で検討できる。全ゲノムで 200 万ヶ所のコピー数解析を行っても、欠失が疑われる箇所は数百程度である。我々は染色体コピー数解析で SLC34A2 欠失が判明し、肺胞微石症の原因が特定できた症例を報告した (Ishihara et al. Thorax 64:365-7, 2009)。この患者同様、欠失が薬剤性肺障害や特発性肺線維症急性増悪の原因となっている可能性も考え、患者に共通して見られる欠失領域の有無を検討する。

(5) ホモ接合ハプロタイプ法による全ゲノム関連解析

薬剤性肺障害、特発性肺線維症急性増悪患者合計 50 例の解析が終わった時点で、それぞれの病態を別々に、および同時に、ホモ接合ハプロタイプ法による全ゲノム関連解析にて解析。ピークを示す位置を疾患遺伝子の候補領域とする。

(6) 候補遺伝子の人種間頻度の検索

米国人の一般人口のゲノム DNA は NIH より、中国人の一般人口のゲノム DNA は内蒙古医学院と北京大学より供与を受けるか、または検索を依頼する予定である。検索は、我々が確立した PNA-LNA PCR clamp 法を用いれば、容易に施行できると考えられる。

(7) 疾患遺伝子候補の選定

生存シグナル解析の結果複数の患者で異常が見つかった遺伝子を疾患遺伝子の候補とする。また、染色体コピー数解析により複

数の患者で一倍体またはゼロ倍体である染色体領域が判明した場合、またはホモ接合ハプロタイプ法による全ゲノム関連解析で有意なピークが判明した場合、当該領域に存在する各遺伝子機能を考慮し、詳細な検討を加える疾患遺伝子候補を絞り込む。

(8) 候補遺伝子の機能検索

同定された遺伝因子が肺に及ぼす影響を検討する。手法は同定された遺伝子の機能に依存するため、ここでは具体的に記載できない。この結果をもとに、日本人に多い急性肺障害の病因を探り、診断法、治療法を考察する。

各年度の計画

平成 21 年度の計画

収集した検体を順次解析する。まず 10 例で生存シグナル構成分子の個別解析 (すでに 2 例終了している) を行い、生存シグナルの関与の有無を検討する (貞方: 大学院生)。薬剤性肺障害や特発性肺線維症急性増悪と誤診された症例が混ざっている可能性を考えても、10 例の検索で「日本人で見られる急性肺障害に生存シグナル伝達分子異常が関わっているか否か」という命題に関しては結論が出ると考えられる。

収集された検体を順次 SNP 6.0 アレイで全ゲノム SNP タイピングする。染色体コピー数解析にて患者に共通して見られる欠失がないか、逐次検討する (萩原, 貞方)。

平成 22 年度以降の計画

生存シグナル伝達分子異常検索結果、染色体コピー数データ検索結果が陽性なら、候補遺伝子の人種間頻度検索、候補遺伝子の機能検索を行う。

50 例を集積した時点から、ホモ接合ハプロタイプ法による全ゲノム関連解析を施行し、有意差が出る時点、または 100 例に達する時点まで繰り返す。ここで同定した遺伝子異常・多型に関して、候補遺伝子の人種間頻度検索を行う (萩原, 貞方)。

疾患遺伝子の存在頻度は日本人とアメリカ人、中国人との間で大きく異なっているはずであるから、それを手がかりに候補遺伝子を絞り込む。

候補遺伝子の遺伝子変異・多型が、遺伝子機能にどのような影響を与えるかを、通常の分子生物学的手法を用いて検討する (貞方)。このステップは、タンパク機能の比較検討であるので、候補遺伝子の機能がどのようなものであってもそれほど難しいものとはならないと考えている。これらの検討結果をもとに、薬剤性肺障害、特発性肺線維症急性増悪責任遺伝子を同定する。

研究が当初計画通り進まない場合の対処

本研究は、対象を生存シグナル伝達系に絞ったステップ、染色体コピー数解析、ホモ接合ハプロタイプ法による全ゲノム関連解析の3ステップから成っている。疾患遺伝子解析のために様々な手法を用意することは、一つの手法でうまく行かない場合の備えとなっている。

すでに検体収集は始まっており、各個遺伝子解析は2例終了、SNP 6.0解析も1例終了しており、技術的な問題はないことを確認している。本研究は問題なく進められると考えられる。

4. 研究成果

(1) サンプル採集

特発性肺線維症急性増悪および薬剤性肺障害が疑われる呼吸器疾患患者より、末梢血リンパ球を採取、DNAを分離するとともに、EBウイルスを感染させてB細胞を不死化し、再度のDNA調整に備えている。

収集症例数

IIPs + IPF 急性増悪 160 症例

薬剤性肺障害 149 症例

上記の症例を集積した。EB virus virus による不死化は、ほぼ5割の症例において成功している。EB virus による不死化は、通常のリンパ球ならば成功率が高いが、本研究においては高くない。これは、ステロイドパルス療法を行った患者、ステロイド投与を通常行われている患者からのサンプルがある程度の割合を占めるためである。それらの症例では、末梢血リンパ球数が少なく、EB virus 不死化率の低下につながっていると思われる。

(2) 臨床情報、画像情報収集

特発性肺線維症急性増悪および薬剤性肺障害で、本研究にてDNAを採集した患者の臨床情報、画像情報を収集し、特に予後不良と密接に結びつく临床上、画像上の特徴を明らかにするとともに、さまざまな画像上の特徴で症例を層別化し、解析効率を上げる。

臨床情報、画像情報収集症例数

IIPs + IPF 急性増悪 75 症例

薬剤性肺障害 89 症例

ここで収集した画像は、画像データベースとして集積している。これらの情報を、予後不良症例の臨床情報の特徴、画像情報の特徴として解析していく予定である。

(3) SNP 解析

全ゲノム SNP 情報を収集するために、Affymetrix社のSNP 6.0により順次解析を行っている。

SNP 解析症例数

IIPs + IPF 急性増悪 76 症例

薬剤性肺障害 85 症例

世界で広く使用されている SNP チップとしては、Illumina社の1MDuoとAffymetrix社のSNP 6.0が挙げられる。SNP 6.0を選択した理由は、日本人健常人のデータが約300例集積されており、それらをコントロールとして利用可能なこと、Illumina社と比べて情報やソフトウェアがオープンで、より容易に使用できることが挙げられる。DenmarkのAROS社では、安価な委託解析を行っており、一例4万円程度で全ゲノムSNPデータを収集できる。そのため、AROS社の委託解析を積極的に利用し、研究費を効率的に使用することとした。

(4) 少数例からのSNPデータ解析手法の開発

近年、遺伝的効果が極めて大きな遺伝子以外は、全ゲノム関連解析では解析力が不足し、極めて多数の症例を収集しなければならないことが明らかになってきている。本研究で想定している特発性肺線維症急性増悪遺伝子、薬剤性肺障害原因遺伝子は遺伝的効果の大きなものであるが、本研究で対象となる症例は重症の呼吸不全である場合が多く、検体収集は非常に困難である。そのため、少数例の患者データを効率的に解析する手法を使用する必要がある。

本研究では、少数例から効率的に疾患遺伝子を同定する手法を開発し、それをを用いて研究を行うことを一つの柱としている。

我々はホモ接合ハプロタイプ法を報告している。本法は優性遺伝子、劣性遺伝子双方に使用可能な手法であるが、それを多因子疾患であると想定されるCOPD(慢性閉塞性肺疾患)の疾患感受性遺伝子解析に応用した(本報告書「遺伝子解析研究手法開発」の項を参照)。この結果は、100例以下の症例でも解析が可能と言うものであった。

我々は、劣性遺伝子に強力な解析力を発揮するホモ接合マッピング法を、定量化により効率的に使用する手法も開発し(定量ホモ接合マッピング法:本報告書「遺伝子解析研究手法開発」の項を参照)、それを利用してOPTNの異常が筋萎縮性側索硬化症を引き起こすことを同定した。

さらに、ホモ接合マッピング法とホモ接合ハプロタイプ法を組み合わせることにより、100例以下の疾患集団より、その僅か10%のみを説明する疾患遺伝子を同定することを見いだした。これらの手法を効率的に使用し、本研究を進めていく予定である。

(5) コピー数多型解析

人の染色体のコピー数には染色体の部位により多型が存在する。全ゲノムで染色体コピー数を見ても、染色体の一部が欠失し

ている場合がある。このような欠失が薬剤性肺障害，特発性肺線維症急性増悪患者に存在するか否かは検索する必要のある事項である。

(6) Exome 解析

Gefitinib 薬剤性肺障害症例 18 例に対して，exome 解析を施行した。Exome データより，tyrosine kinase，その伝達経路，炎症関連シグナル伝達経路の以下の遺伝子に関して，患者で異常を示す遺伝子を検索した。

ここで検出された多型・変異を

- 1 日本人にのみ見られる
- 2 タンパクに顕著な構造変化をもたらす
- 3 Gefitinib による ILD 患者に高度に集積するの 3 点を基準として選択したところ，2 種類のタンパク質に該当する多型・変異が見られた。

今後，これらのタンパクの機能解析を施行していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 49 件。うち 13 を示す。英文は 6 以外全て査読あり)

1. Ishii, T., et al., Involvement of surfactant protein D in emphysema revealed by genetic association study. *Eur J Hum Genet*, 2012. 20(2): p. 230-5.

2. Brehm, J.M., et al., Identification of FGF7 as a novel susceptibility locus for chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 2011. 66(12): p. 1085-90.

3. Hagiwara, K., et al., Homozygosity mapping on homozygosity haplotype analysis to detect recessive disease-causing genes from a small number of unrelated, outbred patients. *PLoS ONE*, 2011. 6(9): p. e25059.

4. 吾妻安良太 and 萩原弘一，【分子標的薬剤・生物学的製剤と肺障害】薬剤性肺障害 日本人の特殊性。成人病と生活習慣病，2011. 41: p. 867-874.

5. 萩原弘一，呼吸器疾患の遺伝解析。日本内科学会雑誌，2011. 100(9): p. 2695-2701.

6. Hagiwara, K., T. Johkoh, and T. Tachibana, Pulmonary Alveolar Microlithiasis., in *Molecular Basis of Lung Disease, Insights from Rare Lung Disorders.*, R. Panos, B. Trapnell, and F. McCormack, Editors. 2010, Humana Press.

7. Huqun, et al., A quantitatively-modeled homozygosity mapping algorithm, qHomozygosityMapping, utilizing whole genome single nucleotide polymorphism genotyping data. *BMC*

Bioinformatics, 2010. 11 Suppl 7: p. S5.

8. Maemondo, M., et al., Gefitinib chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*, 2010. 362(25): p. 2380-8.

9. Tanaka, T., et al., Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes. *Int J Cancer*, 2010. 126(3): p. 651-5.

10. 萩原弘一，治療のピットフォール 薬剤性肺障害 日本人における特性。治療学，2010. 44(5): p. 591-593.

11. Inoue, A., et al., First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *J Clin Oncol*, 2009. 27(9): p. 1394-400.

12. Ishihara, Y., et al., A case of pulmonary alveolar microlithiasis with an intragenetic deletion in SLC34A2 detected by a genome-wide SNP study. *Thorax*, 2009. 64(4): p. 365-7.

13. 萩原弘一，【間質性肺炎の成因と病態】特発性肺線維症患者のゲノムワイド関連解析。炎症と免疫，2009. 17(6): p. 675-678.

〔学会発表〕(計 56 件。1 件のみ示す)

1. 萩原弘一，宮澤仁志，田中知明，鈴木朋子，上田哲也，森秀法，小暮啓人，片岡健介，今野哲，井上彰，永川博康，林龍二，原田敏之，沖永壮治，千葉弘文，前門戸任，吾妻安良太，有田真知子，小林国彦，田口善夫，小倉高志，岩崎博信，谷口博之，藤田結花，貫和敏博，杉山幸比古。特発性肺線維症急性増悪、薬剤性肺障害の遺伝学的検討。第 50 回日本呼吸器学会学術講演会。2010 年 4 月 26 日 京都。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称: HOMOLOGOUS HAPLOTYPE METHOD
発明者: Koichi Hagiwara
権利者: Koichi Hagiwara
種類: 特許
番号: PCT/JP2007/062368 米国移行 12/309994
出願年月日: 2009 年 2 月 6 日
国内外の別: 国外

〔その他〕
ホームページ
<http://www.hhanalysis.com>

6 . 研究組織
(1)研究代表者
萩原 弘一 (HAGIWARA KOICHI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：00240705