

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08163

研究課題名(和文) 気道に発現するムチン、MUC4は好中球性炎症の重症化を抑制する

研究課題名(英文) Mucin 4, expressed in the airways, suppresses neutrophilic inflammation

研究代表者

太田 洋充(Ohta, Hiromitsu)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本人は重症肺障害の有病率が高く、これまでの研究で気道上皮細胞に発現するムチン(Mucin4)が原因遺伝子として同定した。次世代シーケンサーを用いて解析し、MUC4遺伝子には5つの主要な対立遺伝子型があり、ほぼすべての患者がリスク対立遺伝子を持っていることを明らかにした。さらに、MUC4遺伝子をクローニングし、気道上皮細胞にトランスフェクトして発現させたが、MUC4発現細胞自体には増殖能や薬剤耐性に差は認められなかった。MUC4の糖鎖部分を回収して好中球に添加したところ、正常対照のムチン4では細胞死(ネトーシス)の抑制が観察されましたが、リスク対立遺伝子では細胞死の抑制が弱い傾向を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で重症肺障害のリスクとなるMucin4の遺伝子型が明らかになった。また、Mucin4の遺伝子型が好中球性炎症の重症化と関係することを示唆する結果が得られた。今回の研究は、重症肺障害の発症リスクをあらかじめ推定することに役立つものであり、また、日本人に多い重症肺障害の発症機序を解明するための一助になるものである。

研究成果の概要(英文)：Japanese people exhibit a high prevalence of severe lung injury, and previous studies have identified mucin (Mucin4), which is expressed in airway epithelial cells, as the causative gene. Utilizing next-generation sequencing, we demonstrated that there are five principal allele types of the MUC4 gene and that nearly all patients possess the risk allele. Furthermore, the MUC4 gene was cloned and transfected into airway epithelial cells for expression. No difference in proliferative capacity or drug resistance was observed in the MUC4-expressing cells themselves. When the sugar chain portion of MUC4 was recovered and added to neutrophils, inhibition of cell death (netosis) was observed in normal control Mucin 4. However, the inhibition of cell death was weaker in the risk allele.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：びまん性肺胞障害 肺障害 Mucin 4 好中球性炎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

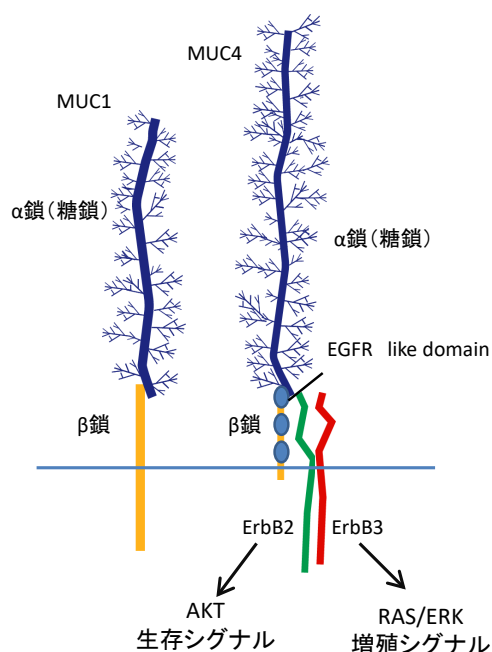
1. 研究開始当初の背景

MUC4 は日本人の薬剤性肺障害の原因遺伝子である。

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, *AM J RespirCrti Care Med*, 2008、Kudoh, S, *AM J RespirCrti 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。日本人の患者群とデータベース上のコーカソイド、中国人、日本人のシーケンズと比較し関連解析を行ったが、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 MUC4 のみであった。以上より肺で発現するムチン、MUC4 を日本人に多い、びまん性肺胞障害 (DAD) の原因遺伝子として同定した。

ムチンは主に上皮細胞に発現する高糖タンパクであり、ヒトでは 18 のサブタイプが知られている。MUC1 と MUC4 の構造と分布は類似し、気管から細気管支まで気道細胞上皮細胞に発現している。(Albercht, H, *Cancer Biother Radiopharm*, 2011) MUC1/MUC4 は 16 アミノ酸・48 塩基の配列が数十～数百連続する (VNTR) 構造を持つ糖鎖タンパクを含む α 鎖と細胞内領域を含む β 鎖から構成される。MUC1/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。しかし、MUC4 の遺伝子多型がびまん性肺胞障害と関係する具体的な機序は解明できていない。本研究グループのこれまでの検討の結果、正常道上皮細胞に好中球エラスターゼを添加すると MUC4 の発現が用量依存性に誘導された。米国で嚢胞性線維症の患者に対してゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行い、嚢胞性線維症の重症化に MUC4 が関係することが報告された (Harriet C, *nature communications*, 2015)。これらの事実は、重篤な好中球性炎症であるびまん性肺胞障害の発症に MUC4 が関与することを支持する所見と考えられる。

図 1



MUC4 は β 鎖に EGF-like domain が存在し、EGFR (上皮細胞成長因子受容体) ファミリーである ERBB2、ERBB3 に結合し増殖シグナル (RAS/ERK) や生存シグナル (AKT) を伝達することが報告されている。(図 1) MUC4 が同じ膜上の ERBB2, ERBB3 を介して上皮細胞の生存に有利に働いている可能性がある。

また、ムチンは細胞表面上の Siglec を介して好中球性炎症を制御していると推測される。

Siglec はシアル酸結合性の膜貫通型レクチンであり、ヒトで 14 種、マウスで 8 種同定されている。CD33 (Siglec-3) 関連 Siglec は抑制性シグナルモチーフ (ITIM) を持ち、マクロファージ、好中球、リンパ球、好酸球といった免疫細胞の細胞表面に発現し、免疫細胞による炎症を制御する。ヒトの好酸球には Siglec-8、マウスには機能的に

相同な Siglec-F が発現しているが、遊離した MUC4 と MUC5B は、Siglec-8/Siglec-F を介して好酸球と結合し、好酸球にアポトーシスを誘導、過剰な好酸球性炎症を抑制することが示された (Kiwamoto T, *J Allergy Clin. Immunol.* 2015)。好中球・NK 細胞・樹状細胞などには Siglec-9 が発現しており、抗 Siglec-9 抗体による Siglec-9 の架橋結合が好中球の活性化を抑制し細胞死を誘導すること、また、Siglec-9 の生体内での ligand は同定されていないものの、MUC4 を含む気道上皮細胞のムチンが Siglec-9 と結合していることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、“日本人には薬剤肺障害、間質性肺炎急性増悪など致死的な肺障害が多い”という臨床的な疑問から始まっており、以下を目的とする。

- (1) 致死的な重症肺障害、びまん性肺泡障害の原因遺伝子を同定し、肺手術や化学療法の前にリスク評価を行うことを可能とする。
- (2) MUC4の遺伝子変異によりびまん性肺泡障害が発症する機序を解明する。さらに、びまん性肺泡障害の発症予防、治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) びまん性肺障害の原因となる MUC4 の遺伝子配列の特定

本研究グループは、日本人のびまん性肺泡障害の原因遺伝子の候補として同定した MUC4 の遺伝子配列を次世代シーケンス (PaBiosci-シーケンシングシステム) を使用し解析した。

(2) MUC4 発現細胞を利用した MUC4 の機能解析

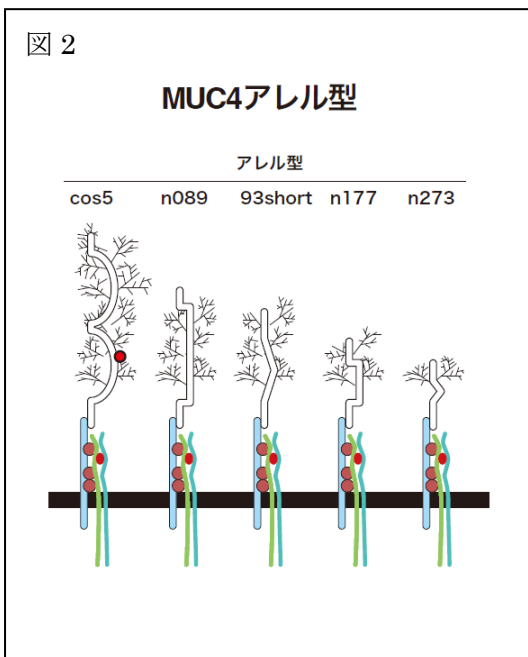
日本人の患者よりリスクアレルに相当する考えられる MUC4COS5、MUC4R5 と正常コントロールと考えられる MUC4W3、MUC4R6 をクローニングし、気道上皮細胞の培養細胞である BEAS-2B に導入し、MUC4 発現細胞を作成した。これらの細胞を利用し、細胞増殖や細胞障害実験を行い MUC4 の機能を検討した。

4. 研究成果

(1) びまん性肺障害の原因となる MUC4 の遺伝子配列の特定

MUC4 がびまん性肺泡障害の責任遺伝子か確認するために、「EGFR 遺伝子変異陽性肺癌患者における MUC4 遺伝子多型と EGFR-TKI によるILD発症との相関性を検証するためのコホート内ケースコントロールスタディ-NEJ022A」(以下 NEJ022A) を計画し実施した。

同遺伝子の塩基配列は高度な反復配列のため解析は難航したが、MUC4 の遺伝子が主として5つ



のアレル型 (COS5, N089, 93short, N177, N273) からなることを発見した。NEJ022A 試験でのコホート研究では、EGFR 阻害薬によって肺障害を起こしたすべての患者で COS5 アレル型を持っていた。(図 2) そのため、COS5 アレルはリスクアレルと推測される。ただし、対照とした健常群にもILD発症した患者の全てがリスクアレルであるCOS5を有していたが、コントロール群としての健常人にも広くリスクアレルが存在した。その結果、リスクアレルCOS5とEGFR-TKIとの相関に有意差は認められなかった。この結果は、MUC4の遺伝子多型がびまん性肺障害を起こすとの仮説に矛盾するものであった。そのため、稀な薬剤性障害や放射線、間質性肺炎における上皮障害が起きたときに、重症の肺障害に進行することをMUC4が抑制している

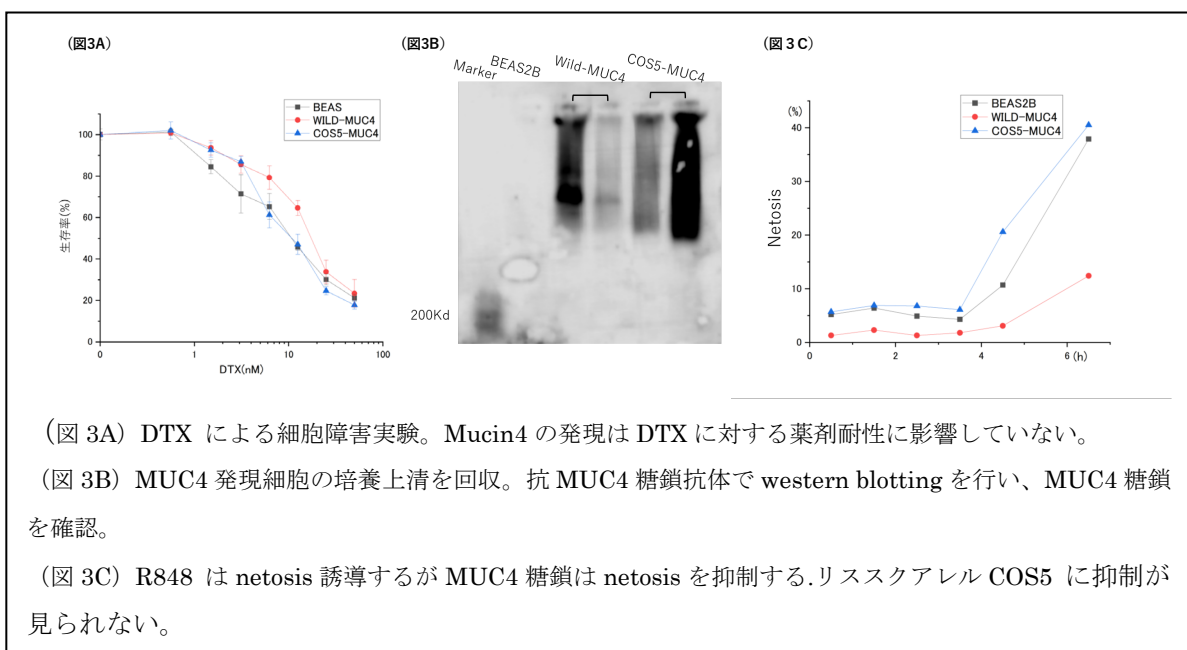
と仮説を修正した。

(2) MUC4 発現細胞を利用した MUC4 の機能解析

前述のように患者 (MUC4 リスクアレル、COS5、R5) と正常コントロールと考えられる健常人 (MUC4 一般アレル、W3、R6) から、MUC4 の VNTR 領域をクローニングし発現ベクターを作成し、気道上皮細胞の培養細胞である BEAS-2B に MUC4 を発現させた細胞を作成した。

MUC4 を導入した細胞と MUC4 を導入していない細胞ではむしろ MUC4 を導入していない細胞では細胞の増殖速度が速く、MUC4 による気道上皮細胞の増殖は認めなかった。この結果は肺癌細胞株に糖鎖の短縮した MUC4 を導入した過去の報告と一致するものであった (Majhi P, *J Thorac Oncol.* 2013)。さらに、これらの細胞を使用し細胞障害実験を行い、MUC4 の発現により薬剤耐性が向上しているか検討した。BEAS-2B (コントロール)、BEAS-2B/MUC4W3 (健常人アレル)、BEAS-2B/MUC4COS5 (リスクアレル) を使用したが、まず、上皮成長因子受容体阻害剤 (EGFR-TKI)、ゲフィチニブで細胞障害を行ったが、48h 経過しても細胞死が観察されなかった。そのため、細胞障害性抗癌剤であるドセタキセル (DTX) により細胞障害実験を行った。(図 3A)

BEAS-2B (コントロール)、BEAS-2B/MUC4W3 (健常人アレル)、BEAS-2B/MUC4COS5 (リスクアレル) で DTX の薬剤耐性に差は認められなかった。(図 3A) NEJ022A の試験の結果と併せて考え MUC4 がびまん性肺障害、つまり重症の好中球性炎症を抑制すると推測した。そのため、MUC5B が好酸球の活性を抑制するように、MUC4 も好中球の活性化を抑制するのではないかと考え次の実験を行った。BEAS-2B (コントロール)、BEAS-2B/MUC4W3 (健常人アレル)、BEAS-2B/MUC4COS5 (リスクアレル) を 10dish にコンフルエントになるまで培養し、トリプシン処理し上清を回収した。MUC4 糖鎖に対する抗体を使用し western blotting を行い、MUC4 の糖鎖の回収を確認した(図 3B)。ヒト全血から好中球を分離し、Toll-like receptor7/8 のアゴニストである、Resiquimod (R848) で Netosis を誘導すると、健常人アレル MUC4W3 では Netosis を抑制したが、リスクアレルである MUC4COS5 及びコントロールである BEAS-2B より回収した上清では、Netosis がよく姿勢されなかった(図 4C)。BEAS-2B (MUC4) 培養上清であり精製したものではなく、また、回収された MUC4 糖鎖の量は一定でないなどの問題点はあるが、今回の実験結果は MUC4 の糖鎖が好中球機能を抑制する可能性があること、リスクアレル COS5 はその機能が喪失していることを示唆する。



今回の研究により、MUC4 の遺伝子アレルが主として 5 つのアレル型 (COS5, N089, 93short, N177, N273) となり、COS5 は患者に必ず存在しリスクアレルであると考えられた。さらに、当初の予想と異なり、MUC4 が重症好中球性炎症で抑制的に作用することが推測された。さらに、MUC4 の糖鎖に好中球性炎症を抑制する機能があると考えられた。今後は、MUC4 の糖鎖部分の制糖と Mucin 糖鎖部分の受容体として機能すると予想される抑制系 lectin との相互作用に注目して実験を進める方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 野村基子 太田洋充 椎原淳 前田悠希 長井良昭 萩原弘一 山口泰弘
2. 発表標題 正常気管支上皮細胞におけるMUC4の発現調節
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 萩原弘一
2. 発表標題 MUC4遺伝子多型とEGFR-TKIによるILD発症との相関性を検証するためのコホート内ケースコントロールスタディ-NEJ022A-結果報告
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野村基子 太田洋充 前田悠希 椎原淳 山口泰弘
2. 発表標題 Thre regulation mechanism of membrane-bound mucins in normal human epithelial cells
3. 学会等名 アメリカ胸部疾患学会（国際学会）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 太田洋充、萩原弘一	4. 発行年 2025年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 150
3. 書名 間質性肺炎合併肺癌に関するステートメント2025（改訂第2版）	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Mucin4は間質性肺炎、重症肺障害の診断に有用である	発明者 太田洋充	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、23-14号	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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)	
研究分担者	椎原 淳 (Shiihara Jun) (20737241)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------