

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591148

研究課題名(和文) 間質性肺炎の新たな血清マーカーの開発と治療戦略の確立

研究課題名(英文) Identification of novel disease-specific diagnostic markers and therapeutic targets for interstitial pneumonias

研究代表者

石川 暢久 (Ishikawa, Nobuhisa)

広島大学・医歯薬保健学研究院・講師

研究者番号：90423368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：特発性間質性肺炎は新たな診断法と治療法の開発は急務である。本研究では、特発性間質性肺炎と診断した12症例の肺生検組織を用いてマイクロアレイ解析を行い、健康人の肺組織と比較して特発性間質性肺炎症例の肺組織における発現レベルが発現上昇している新規血清バイオマーカーの候補分子を多数同定した。一方で、マイクロアレイ解析により正常肺と比較してIIPsの肺組織における発現レベルの変動している遺伝子群を抽出し、Ingenuity Pathway Analysisを用いた解析を行ったところ、IIPsのマイクロアレイ解析の発現プロフィールは、悪性腫瘍の発現プロフィールと非常に類似していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) are subtypes of idiopathic interstitial pneumonia (IIP), which is characterized by alveolar epithelial damage, activation of fibroblast proliferation, and loss of normal pulmonary architecture and function. Clinical differentiation between IPF and NSIP is difficult, and the molecular basis for IIP remains unclear. The study included 12 patients with IIP (IPF, n = 7; NSIP, n = 5). RNA extracted from lung specimens was profiled using Illumina Human WG-6 v3 BeadChips, and an Ingenuity Pathway Analysis was performed to identify altered functional and canonical signaling pathways. Genes and pathways related to cancer, cell death and survival, and cellular growth and proliferation were differentially expressed in IIP patients. These data provide valuable information on the possible mechanisms underlying pulmonary fibrosis, and reveal several potential biomarkers for IIP diagnosis and therapeutic targeting.

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：間質性肺炎 マイクロアレイ バイオマーカー 分子標的治療薬

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) マイクロアレイを用いた間質性肺炎の新たな血清マーカーと治療戦略の確立

間質性肺炎は、早期発見がいまだ困難であり、なおかつ有効な治療の選択肢が限られているために、新たな診断法と治療法の開発は急務である。私達は現在までにパイオインフォマティクス解析、組織アレイ、迅速血清診断システム、small interfering RNA (siRNA) を用いた発現阻害実験、などを駆使して、ゲノムワイドな網羅的遺伝子発現情報解析から効率的に血清マーカーをスクリーニングする探索戦略を確立し、臨床応用が可能な難治性呼吸器疾患（特に肺癌）の新規血清マーカーを多数同定してきた。さらに、近年では、特発性特発性肺線維症（IPF: idiopathic pulmonary fibrosis）や非特異性間質性肺炎（NSIP: Non-specific interstitial pneumonia）などの特発性間質性肺炎（IIPs: idiopathic interstitial pneumonias）の血清マーカーに関する研究も行っているが、治療薬への応用に関する検討が十分に行われていない、などの課題が残されていた。

### (2) 間質性肺炎の人種的な違い

私達はフィンランド（Helsinki大学）、ドイツ（Duisburg-Essen大学）と連携し、難治性呼吸器疾患の血清マーカーの開発に関する日欧国際臨床研究を継続的に実施してきた。その過程において、IIPsの臨床像・病型が、日本人と欧州人では明らかに異なることを経験してきた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、より完成度を高めた探索戦略をとることによって、IIPsの新たな血清マーカーを開発すること、ならびにIIPsの新たな治療法を臨床応用するための基盤研究を行うことである。同時に本研究を通じて、IIPsの病態ならびに人種的な違いの解明に近づくことを目指したい。

## 3. 研究の方法

### (1) マイクロアレイを起点とした間質性肺炎の新たな血清マーカーの開発

広島大学病院において2002年から2011年までに外科的肺生検が施行され、IIPsと診断

した12症例（IPF 7症例、NSIP 5症例）を対象とした。外科的肺生検組織から抽出したmRNAを用いてマイクロアレイによる網羅的発現解析を施行した。マイクロアレイ解析はIllumina Human WG-6 v3 BeadChipsを用いて行った。クラスター解析をM.EisenによるClusterおよびTreeViewのソフトを用いて行った（<http://rana.lbl.gov/eisen/>）。続いて、Cherry-picking approachを用いて、IIPs患者群で健常者群と比較して10倍以上の発現上昇が75%以上の症例で認める394遺伝子を選出し、さらにその翻訳後タンパク質が膜タンパク質あるいは分泌タンパク質であると推定される分子を血清バイオマーカー候補分子として抽出した。

これらの分子の中で市販の抗体が入手可能なものについては、マイクロアレイを用いた遺伝子発現情報を組織免疫染色によって確認した。さらに、市販のELISAキットが入手可能なものにしては血清中のタンパクレベルを測定した。

### (2) マイクロアレイを起点とした間質性肺炎の新たな治療戦略の確立

近年では1つの分子だけに注目した薬剤の開発ではなく、遺伝子同士の関係性を考慮した創薬の必要性が認識されるようになってきている。そこで、マイクロアレイ解析から包括的に発現変動している遺伝子群を抽出して解析するIngenuity Pathway Analysisを用いたSystems approachを用いることにより、IIPsの新規治療標的の候補を同定した。

### (3) 血清マーカー測定を通じた間質性肺炎の人種的な違いの解明

臨床情報の既に臨床情報がデータベース化されている国際的な大規模コホートを用いて、血清マーカー値の検討を行った。すでにわが国では間質性肺炎の血清マーカーとして臨床応用されているKL-6、SP-A、SP-Dの血清中のレベルならびにその遺伝子多型を測定し、血清マーカーの人種的な違いを明らかにした。さらに、IIPの臨床像・病型の人種的な違いについても検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 間質性肺炎の遺伝子発現プロファイル

患者背景では、IPF症例ではNSIP症例と比較して男性、喫煙者が多い傾向を認めた。IIPs 12症例の外科的肺生検組織から抽出したRNAを用いてマイクロアレイによる網羅的発現解析を施行した。クラスター解析では、IIPs 12症例は159遺伝子で3群に分かれる傾向を認めたが、IPFとNSIPを明確には分けることはできなかった。

## (2) 間質性肺炎の新たな血清マーカーの開発

健常人の肺組織と比較してIIPs症例の肺組織における発現レベルが発現上昇している分子を多数同定したが、これらの中にはすでに間質性肺炎のバイオマーカーとして有用性が報告されているKL-6/MUC1などが含まれていた。

組織免疫染色を用いて、肺組織における発現レベルの確認をおこなったところ、KL-6/MUC1はコントロールの肺組織と比較してIIPsの肺組織において発現の亢進を認めた。現在、他のバイオマーカー候補分子についても肺組織における発現を確認中である。また、IL18BPについては血清中のIL18BP値を測定したところ、IIPs症例においてコントロールと比較して有意に高値を示した。今後は症例数を増やした測定を行うことでIIPsの新規血清バイオマーカーとしての有用性を検討する予定である。

## (3) 間質性肺炎の新たな治療戦略の確立

治療標的分子の探索にはマイクロアレイ解析により正常肺と比較してIIPsの肺組織における発現レベルの変動している遺伝子群を抽出し、Ingenuity Pathway Analysisを用いた解析を行った。その結果、IIPsのマイクロアレイ解析の発現プロフィールは悪性腫瘍の発現プロフィールと非常に類似していることを見出した。さらに、私たちが治療の標的分子として抽出したいいくつかの分子は既存の分子標的治療薬により抑制されることが報告されているため、悪性腫瘍に対する分子標的治療薬がIIPsの治療薬としても有用であるという仮説を立てた。悪性腫瘍に対してすでに臨床応用されており、その有用性と安全性が確認されている新規の分子標的治療薬をIIPsに応用することは、新規に薬剤を開発する場合に比較して時間的にも経済的にも有用性が高いものと思われる。現在、プレオマイシン肺線維症モデルにおいて、既存の悪性腫瘍に対する分子標的治療薬を投与することにより、病態の進行を抑制しうるかを検討しているところである。

## (4) 血清マーカー測定を通じた間質性肺炎の人種的な違いの解明

血清中のKL-6値ならびにSP-D値は日本人と比較して欧米人で高かったが、SP-A値は人種差を認めなかった。これらの間質性肺炎の血清マーカー値において人種差を認めた原因としては遺伝子多型(MUC1, SFTPD)の違いが関与していると思われた。一方で、IPF急性増悪の頻度は、欧州人に比べ日本人に高頻度で、かつ発症までの期間も短く重症例も多いことを見出した。

## 5. 主な発表論文等

(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20件)

Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Tanaka S, Bonella F, Ohshimo S, Guzman J, Costabel U, Kohno N. Differences in serum SP-D levels between German and Japanese subjects are associated with SFTPD gene polymorphisms. *BMC Med Genet* 2014; 15(1): 4. (査読有)

石川暢久. 第41回箱根呼吸器討論会記録 呼吸器疾患の新規バイオマーカーの開発と臨床応用. *呼吸* 33; 179-188, 2014. (査読無)

Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Kawase S, Tanaka S, Yoshioka K, Yokoyama A, Kohno N, Bonella F, Guzman J, Ohshimo S, Costabel U. Different MUC1 gene polymorphisms in German and Japanese ethnicities affect serum KL-6 levels. *Respir Med* 106:1756-64, 2013. (査読有)

Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, Kohno N. Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. *Respiratory Investigation* 50: 3-13, 2012. (査読有)

Tanaka S, Hattori N, Ishikawa N, Shoda H, Takano A, Nishino R, Okada M, Arihiro K, Inai K, Hamada H, Yokoyama A, Kohno N. Krebs von den Lungen-6 (KL-6) is a prognostic biomarker in patients with surgically resected non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 130: 377-87, 2012. (査読有)

Tanaka S, Hattori N, Ishikawa N, Horimasu Y, Deguchi N, Takano A, Tomoda Y, Yoshioka K, Fujitaka K, Arihiro K, Okada M, Yokoyama A, Kohno N. Interferon (alpha, Beta and omega) receptor 2 is a prognostic biomarker for lung cancer. *Pathobiology* 79: 24-33, 2012. (査読有)

石川暢久, 河野修興. 間質性肺炎マーカーの予後も含めた臨床的意義. *日本胸部臨床* 72; S19-23, 2013. (査読無)

石川暢久, 河野修興. KL-6が異常高値を示す肺癌の頻度. *日本医事新報* 4613:50-51, 2012. (査読無)

石川暢久, 服部登. 呼吸器疾患にかかわるバイオマーカー. *呼吸* 31: 819-821, 2012. (査読無)

Nishino R, Takano A, Oshita H, Ishikawa N, Akiyama H, Ito H, Nakayama H, Miyagi Y, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y, Daigo Y. Identification of Epstein-Barr virus-induced gene 3 as a novel serum and tissue biomarker and a therapeutic target for lung cancer. *Clin Cancer Res* 17: 6272-86, 2011. (査読有)

Kawase S, Hattori N, Ishikawa N,

Horimasu Y, Fujitaka K, Furonaka O, Isobe T, Miyoshi S, Hamada H, Yamane T, Yokoyama A, Kohno N. Change in serum KL-6 level from baseline is useful for predicting life-threatening EGFR-TKIs induced interstitial lung disease. *Respir Res* 12:97, 2011. (査読有)

**Ishikawa N**, Mazur W, Toljamo T, Vuopala K, Rönty M, Horimasu Y, Kohno N, Kinnula VL. Ageing and long-term smoking affects KL-6 levels in the lung, induced sputum and plasma. *BMC Pulm Med* 11: 22, 2011. (査読有)

Illumets H, Mazur W, Toljamo T, Louhelainen N, Toljamo T, Nieminen P, Kobayashi H, **Ishikawa N**, Kinnula VL. Ageing and smoking contribute to plasma surfactant proteins and protease imbalance with correlations to airway obstruction. *BMC Pulm Med* 11:19, 2011. (査読有)

Kondo T, Hattori N, **Ishikawa N**, Murai H, Haruta Y, Hirohashi N, Tanigawa K, Kohno N. KL-6 Concentration in Pulmonary Epithelial Lining Fluid and Is a Useful Prognostic Indicator in Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Respiratory Research* 12:32, 2011. (査読有)

**Ishikawa N**, Hattori N, Tanaka S, Horimasu Y, Haruta Y, Yokoyama A, Kohno N, Kinnula VL. Surfactant protein A and KL-6 are elevated in the induced sputum of COPD; a sequential sputum analysis. *Respiration* 82:10-8, 2011. (査読有)

Nakashima T, Yokoyama A, Inata J, **Ishikawa N**, Haruta Y, Hattori N, Kohno N. Mucins carrying selectin ligands as predictive biomarkers of disseminated intravascular coagulation complication in acute respiratory distress syndrome. *Chest* 139(2):296-304, 2011. (査読有)

Ueda K, Saichi N, Takami S, Kang D, Toyama A, Daigo Y, **Ishikawa N**, Kohno N, Tamura K, Shuin T, Nakayama M, Sato TA, Nakamura Y, Nakagawa H. A comprehensive peptidome profiling technology for the identification of early detection biomarkers for lung adenocarcinoma. *PLoS One* 6: e18567, 2011. (査読有)

Toyama A, Nakagawa H, Matsuda K, **Ishikawa N**, Kohno N, Daigo Y, Sato TA, Nakamura Y, Ueda K. Deglycosylation and label-free quantitative LC-MALDI MS applied to efficient serum biomarker discovery of lung cancer. *Proteome Sci* 9:18, 2011. (査読有)

**石川暢久**, 河野修興. 【線維化による疾患】 特異性肺線維症. *BIO Clinica* 26: 1078-84, 2011. (査読無)

**石川暢久**, 河野修興. 【特異性間質性肺

炎 最近の進歩と展望】 間質性肺炎のマーカー KL-6, SP-A, SP-D. *最新医学* 6: 1140-5, 2011. (査読無)

〔学会発表〕(計6件)

**Ishikawa N**, Matsuda T, Nakashima T, Iwamoto H, Ohshimo S, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Hattori N, Kohno N. Comparison of KL-6, SP-A, SP-D, 8-isoprostane, MMP-9, and TIMP-1 as serum biomarkers for patients with combined pulmonary fibrosis and emphysema. **18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology** (2013.11.11-14, Yokohama)

**Ishikawa N**, Yoshioka K, Horimasu Y, Iwamoto H, Ohshimo S, Hattori N, Kohno N. KL-6, SP-D and MMP-7 as serum biomarkers for early detection of interstitial lung diseases. **European Respiratory Society Annual Congress** (2013.9.7-11, Barcelona, Spain)

**Ishikawa N**, Taniwaki M, Horimasu Y, Iwamoto H, Ohshimo S, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Hattori N, Kohno N. Gene expression profiles of chronic hypersensitivity pneumonitis: Molecular signatures of pulmonary fibrosis. **American Thoracic Society International Conference** (2013.5.17-22, Philadelphia, USA)

**石川暢久**, 松田智代, 出口奈穂子, 堀益靖, 大下慎一郎, 藤高一慶, 春田吉則, 村井博, 服部登, 河野修興. 気腫合併肺線維症におけるプロテアーゼ・アンチプロテアーゼの不均衡ならびに酸化ストレスの意義. **第53回日本呼吸器学会学術講演会** (2013.4.19-21, 東京)

**石川暢久**, 出口奈穂子, 岩本博志, 大下慎一郎, 藤高一慶, 春田吉則, 村井博, 服部登, 河野修興. 間質性肺炎の早期発見における血清バイオマーカーの有用性に関する検討. **第53回日本呼吸器学会学術講演会** (2013.4.19-21, 東京)

**Ishikawa N**, Hattori N, Taniwaki M, Horimasu Y, Matsuda T, Kohno N. Gene expression profiles of idiopathic interstitial pneumonias: Identification of disease-specific diagnostic markers and molecular therapeutic targets. **European Respiratory Society Annual Congress** (2012.9.1-5, Vienna, Austria).

〔図書〕(計4件)

**石川暢久**, 河野修興. KL-6. 間質性肺疾患診療マニュアル・改訂第2版 (南江堂): p143-145, 2014. (査読無)

**石川暢久**, 河野修興. 肺癌腫瘍マーカーの判読のポイント. **検査診断学への展望** (南江堂): p608-611, 2013. (査読無)

**石川暢久**, 河野修興. 薬剤性肺障害. **臨**

床病態学 1 卷 (ノーベルヒロカワ) 第 2  
版: p309-313, 2013. (査読無)  
石川暢久, 河野修興. 肺がん. がんの浸  
潤・転移 (南山堂): p20-27, 2011. (査読  
無)

〔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

石川 暢久 (Ishikawa Nobuhisa)  
広島大学・大学院医歯薬総合研究科・  
講師

研究者番号: 90423368

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし