

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461196

研究課題名(和文)"MUC4"の遺伝子多型が薬剤性肺障害をおこす分子細胞生物学的機序の解明

研究課題名(英文)The molecular mechanism of drug-induced lung injury caused by the genetic polymorphism of MUC4

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：日本人は薬剤性肺障害、特発性間質性肺炎の急性増悪などの頻度が多い。これらの疾患の病理像はびまん性肺胞障害であり、共通の遺伝的要因が想定される。まず、日本人のびまん性肺胞障害をきたした患者を集積しエクソーム解析を行い、コーカシアン、中国人と比較することにびまん性肺障害の原因遺伝子として、MUC4を同定した。研究期間内に、患者と健常人のMUC4の遺伝子多型を解析、クローニングし発現ベクターを作成した。さらに、患者と健常人の気道上皮細胞の機能の違いを解析するため、肺癌等のために切除した肺から気道上皮の初代培養細胞を樹立、さらに不死化し、細胞株を作成した。

研究成果の概要(英文)：Drug induced lung injury and acute exacerbation of idiopathic interstitial pneumonia are more frequent among Japanese people than people in other countries. The pathology of these disease is diffuse alveolar damage (DAD), and common genetic factors are assumed. We had accumulated Japanese patients with DAD. Mucin 4 (MUC4) was identified as a candidate gene, by carrying out the exome analysis about these patients and comparing with Caucasian, Chinese and healthy Japanese. Genetic polymorphisms of MUC4 among the patients with DAD and healthy subjects were analyzed, and cloned to prepare an expression vector for every genetic polymorphism of MUC4. Furthermore, primary culture cells of the bronchial epithelium were established from the resected lungs for lung cancer and the like, in order to reveal functional differences of the bronchial epithelial cells between patients with DAD and healthy subjects.

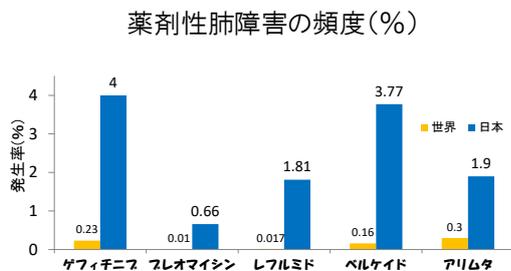
研究分野：呼吸器内科学

キーワード：薬剤性肺障害 特発性間質性肺炎急性増悪 EGFR-TKI びまん性肺胞障害 ムチン

1. 研究開始当初の背景

① 研究の学術的背景

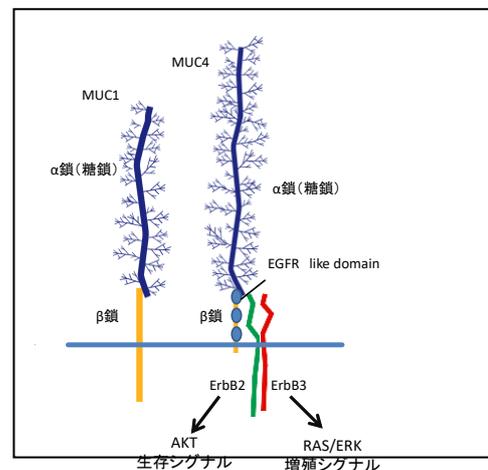
日本人の肺は脆弱であり、(1)薬剤性肺障害が他国(西洋や他のアジア人)より高頻度で見られ、致命的な経過をとる、(2)特発性肺線維症で他国より高頻度で急性増悪が起こり、高い致死率を示すこと、(3)皮膚筋炎のびまん性肺胞上皮障害(diffuse alveolar damage :DAD)型の急性間質性肺炎は海外では非常に少ないこと、(4)特発性肺線維症合併肺手術後の特発性肺線維症急性増悪が海外ではみられないなどの事実が知られている。(Azuma,A et.al. *AM J RespirCrti Care Med*, 2008、Kudoh,S et.al. *AM J RespirCrti Care Med*, 2008)



これらの疾患の病理像は、すべてびまん性肺胞障害で共通し、致命的な臨床経過も共通する。本研究グループでは日本人の肺にびまん性肺障害を起こしやすくする特有の遺伝的要因の存在が予想した。

薬剤性肺障害や特発性間質性肺炎急性増悪に関与する遺伝子は複数あると予想されるが、民族差を説明するには、日本列島が大陸から分断された後に、日本人の中で遺伝子の変異がおこり、その遺伝子が集団内で広がったと考えれば理解しやすい。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。具体的には、全国 30 の協力医療機関より薬剤性障害及び特発性肺線維症急性増悪の患者検体を収集し、診断確実例の劇症例、死亡例 98 例でヒト全遺伝子コ

ード領域シーケンス解析(エクソーム解析)を行い、コーカシアン、中国人、日本人のエクソーム fastq データをデータベースより取得し比較した。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。統計的に有意に肺障害患者で多く認められた変異のみ選択した。これらの遺伝子変異のうち、疫学データに合致し、肺で発現しており、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。(萩原私信)



MUC4 は主に上皮細胞に発現する高分子糖タンパク(ムチン)であり、ヒトでは 18 のサブタイプが知られているが、MUC1 と MUC4 は構造と分布が類似する。MUC1/MUC4 は気管から細気管支まで気道上皮に広く発現していることが知られている。(Albercht,H *Cancer Biother Radiopharm*, 2011)興味深いことに、肺障害のマーカーとして臨床応用されている KL -6 は MUC1 の糖鎖抗原であり、気道上皮細胞における MUC1/MUC4 の重要性を示唆する事実と考えられる。(Kohno,N *J Med Invest*,1999) MUC1/MUC4 は上皮細胞の表面を機械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。MUC4 は EGFR(上皮細胞増殖因子受容体)ファミリーである ERB2/ERB3 と結合し、細胞内に増殖シグナル(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。(Jepson, *Oncogene*,2002) さらに、MUC4 はア

ポトシスへの抵抗性や抗がん剤への耐性に関係することが報告されている。

(Mimeault, *Cancer Letter*, 2010)

以上より、日本人に薬剤性肺障害や間質性肺炎急性増悪などびまん性肺胞上皮障害を多く認められる遺伝的な要因は、MUC4の遺伝子多型がEGFRファミリーの下流のシグナル伝達に影響し、抗アポトーシス機能を障害した結果と推測される。

2. 研究の目的

エキソーム解析から同定したMUC4の変異は、びまん性肺胞上皮障害のほとんどの患者に認め、また、日本人にはコーカシアンや中国人の10倍以上の5-10%に認めるなど、疫学的なデータをほぼ完全に説明可能である。しかし、以下の点については、不明なままである。

- MUC4の遺伝子多型はどのような機能異常と関係するのか。
- MUC4が気管から細気管支領域に発現することが報告されているが、どうしてびまん性肺胞上皮障害に関係するのか。

本研究は、肺癌等の治療ために切除した肺組織から分離した気道上皮細胞の初代培養細胞、MUC4の発現ベクターを用いた実験によって解明することを目的に行われた。

3. 研究の方法

MUC4の遺伝子多型がびまん性肺胞上皮障害を起こす原因を明らかにするため、以下の研究を予定した。

・MUC4の発現ベクターの作製。遺伝子多型ごとに発現ベクターを作成、培養細胞株に導入し、MUC4の遺伝子多型が上皮細胞受容体からの細胞内シグナル伝達機構にどのように影響するかを検討。

・ヒトの切除肺からの気道上皮初代培養細胞の作製。それを用いて、薬剤による耐性がMUC4の遺伝子多型により変異するかどうかを検討。

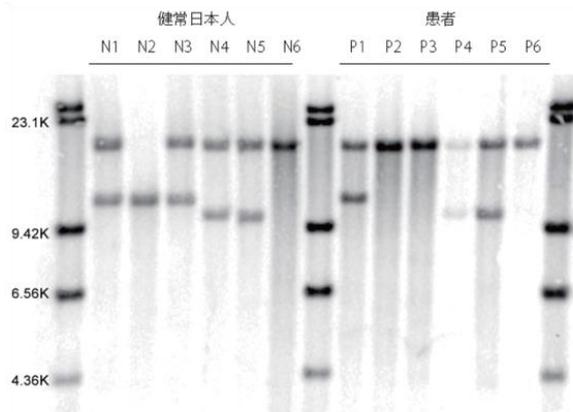
4. 研究成果

4-1. MUC4のVNTR領域の遺伝子多型の解析

MUC4のVNTR領域の遺伝子多型を検討す

るためにヒトゲノムをEcoRIとPstIの制限酵素で切断しサザンブロットを行った。

これまでの解析結果では、日本人のびまん性肺胞障害患者では、サザンブロットで同じバンドを共通して認め、特定の遺伝子多型がびまん性肺胞障害の発症に関係すると予測された。



健康人、患者のMUC4 VNTRのsouthern blotting

10kb付近、12kb付近、18kb付近の3つの長さのバンドが見られる。濃いバンドは長さの同じexonのホモ接合と考えられる。

4-2. MUC4のVNTR領域のシーケンス

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遺伝子を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sequenceを行った。その後、再度、得られた塩基配列を組合せ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、繰り返し配列にずれが生じており、立体構造の変化が予想される。

```
CCTTCCCTCAGCATCCTCAGGTCACACCACCCCTCTTCTGTCACCGAC
GCTTCCCTCAGTACCCACAGGTCACGCCACCTCTTCTGTCACCGAC
GCTTCCCTCAGTGTCCACAGGTCACGCCACCCCTCTTCTGTCACCGAC
GCTTCCCTCAGTGTCCACAGGTCATGCCACCCCTCTTCTGTCACCGAC
ACTTCCCTCAGTATCTACAGGACAGGCCACCCCTCTTCTGTCACCGAC
CTTCCCTCAGCATC
ATCCACTGGTGACACCACGCCGCTTCTGTCACCGAC
ACTTCCCTCAGCATCCACAGGTCAGGACACCCCTCTTCTGTCACCGAC
CTTCTCAGTATCCACAGGTCACGCCACCCCTCTTCTGTCACCGAC
CCTTCCCTCAGCATCCACAGGTCACGCCACCCATCTTCTGTCACCGAC
```

MUC4の患者群ではVNTR領域に3塩基の挿入を認める。

4-3. MUC4のVNTR領域のシーケンス

これらのクローニングした遺伝子を使用して、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由来のMUC4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。今後、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。

4-4 ヒトの切除肺からの気道上皮初代培養細胞の作製。

当初、肺癌などの治療のために切除した肺の一部(気管支断端)を提供して頂き、プロテアーゼ処理により、組織切片より細胞混濁液を作成し、気道上皮の初代培養細胞の作成を試みた。しかし、生着率が悪く、十分な細胞を回収できなかった。そのため海外のグループの先行論文を参考に肺癌等の手術のために切除した肺から、気道上皮細胞の初代培養細胞を作成する方法を確立した。(Matthew S *Respiratory Research* 2013)

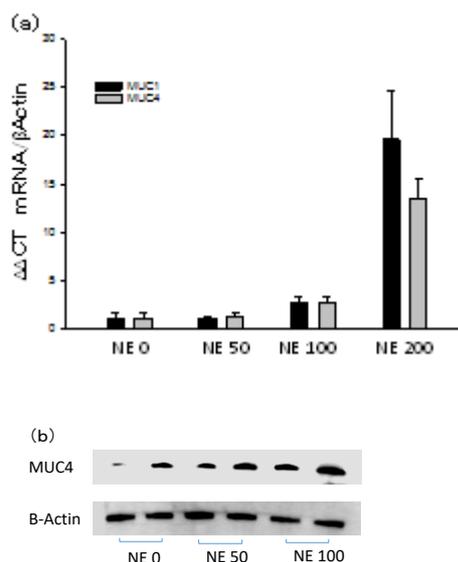
初代気道上皮細胞は通常1-2週間程度の培養で細胞老化(cell senescence)に陥ってしまうため、細胞生物学的実験に使用するのは困難であるが、レトロベクターを使用して、hTERTを導入し長期間安定して培養することに成功した。



切除肺から気道上皮細胞の初代培養細胞を作成。通常は2週間程度で細胞老化(cell senescence)に陥る。(A) hTERTを導入し不死化すると、5代以上継代しても細胞の形態と増殖が維持される。(B)

4-5 正常気道上皮細胞でのMUC4の発現誘導

MUC4の機能を解析するために、まず、培養細胞にMUC4を導入する方法を検討した。正常細胞でのMUC4の正常細胞での機能を検討するため、ヒトの初代気道上皮細胞を使用した。MUC4を誘導する因子として、ステロイドやTNF- α , TGF- β を検討したが、MUC4の発現は誘導されなかった。しかし、好中球エラスターゼを添加すると、用量依存性にMUC4の発現が誘導された。さらに、MUC1の発現も誘導されることがmRNAレベル、さらに、タンパクレベルで確認された。



(a) 正常気道上皮細胞を好中球エラスターゼ(NE)で処理、用量依存性にMUC1, MUC4のmRNAの発現亢進を認める。
(b) さらに、MUC4の発現をウエスタンブロットで確認。NE200g/ μ Lでは細胞死も多く認めため、NE100ng/ μ Lまでで実験した。用量依存性にMUC4の発現の亢進を認める。

本研究期間内に、びまん性肺胞障害の原因遺伝子として同定されたMUC4の遺伝子多型をサザンブロッティングで解析、さらに、遺伝子多型ごとにその配列を同定した。さらに、発現ベクターを作成した。さらに、肺癌等により切除された肺から、初代培養細胞を作成した。また、ヒトの正常気道上皮細胞を好中球エラスターゼで刺激することにより、MUC4の発現を誘導した。

今後、MUC4の発現ベクターや、患者から作成

した不死化した気道上皮細胞を利用し、MUC4の機能についてさらに解析を進める予定である。

5. 主な発表論文

(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 7件)

1. <著書> 太田洋充、萩原弘一 肺循環・肺損傷 ムチンと気道上皮防御機構 分子呼吸器病学 2017年3月 Vol.21 No.21
2. Reck M, Hagiwara K, Han B, Tjulandin S, Grohe C, Yokoi T, Morabito A, Novello S, Arriola E, Molinier O, McCormack R, Ratcliffe M, Normanno N (2016) ctDNA Determination of EGFR Mutation Status in European and Japanese Patients with Advanced NSCLC: The ASSESS Study. J Thorac Oncol. 2016.05.036 (査読あり)
3. Ebina M. Pathognomonic remodeling of blood and lymphatic capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis Respiratory Investigation 2016: 56:
4. <著書> 太田洋充、萩原弘一 Modern Physician 6 「間質性肺炎の臨床 up-to-date」 Vol.35 No.6, 2015
5. Taguchi Y, Ebina M, Hashimoto S, Ogura T, Azuma A, Taniguchi H, Kondoh Y, Suga M, Takahashi H, Nakata K, Sugiyama Y, Kudoh S, Nukiwa T; Pirfenidone Clinical Study Group in Japan. Efficacy of pirfenidone and disease severity of idiopathic pulmonary fibrosis: Extended analysis of phase III trial in Japan. Respir Investig. 2015 53: 279-87. (査読あり)
- 6.<著書> 萩原弘一 (2014) 呼吸器疾患における genetics and genomics. 呼吸器内科 25 (2):143-146
7. <著書> 萩原弘一 (2014) 日本人の間質性肺炎は急性増悪時に重症化しやすいか. 日本医師会雑誌 143 (5):965

[学会発表] (計 2件)

1. 岩井悠紀、渡辺恭孝、工藤史明、長井良昭、小山信一郎、萩原弘一、小山信之 「当院の進展型肺小細胞癌における間質性肺炎の有無の影響及び予後因子の検討」 第57回日本肺癌学会学術集会、2016年12月19日～21日、福岡
2. 椎原淳、井上慶明、宮澤仁志、太田洋充、萩原弘一 「EGFR-TKIによる薬剤性肺障害の検討により明らかになった MUC4 遺伝子における多型とその検出法」 第55回日本肺

癌学会学術集会、2014年11月14日～16日、京都

[図書] (計 0件)

[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

太田洋充 (OHTA, Hiromistu)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号: 40451562

(2) 研究分担者

萩原弘一 (HAGIWARA, Kouichi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00240705
海老名雅仁 (EBINA, Masahito)
東北医科薬科大学・医学部・教授
研究者番号: 10280885