

平成 30 年 9 月 11 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04832

研究課題名(和文)日本人特異的致死性びまん性肺胞障害の原因となるMUC4遺伝子変異の研究

研究課題名(英文)A study on the MUC4 gene that is a candidate of the cause of the diffuse alveolar damage observed in Japanese

研究代表者

萩原 弘一 (Hagiwara, Koichi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：00240705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の基礎的データとなる各民族での多型頻度の取得，及び発現解析の基礎となる発現ベクターの作成とも順調に進行している。サザンハイブリダイゼーションは200例を終了。次世代シーケンサーで具体的な塩基配列を決定可能にするための遺伝子工学的反応手順，条件を決定し，さらに決定した分子配列をアセンブルするためのソフトウェアをプログラミング言語Rubyにて開発した。MUC4発現ベクター作成に関しては，4種の発現ベクターをBAC中に作成した。これをpUC系plasmidに移し，大量精製を可能にした。COS7細胞へ導入したところ，20%程度の細胞で発現を確認できた。今後シグナル伝達系の解析に入る。

研究成果の概要(英文)：The determination of the frequency of MUC4 polymorphic alleles in multiple ethnic groups, and the construction of the expression vectors are steadily in progress. The procedures that are required for assembling the nucleotide sequences from the output of the next generation sequencers are determined, and the assembler is made using the Ruby programming language. As for the MUC4 expression vectors, 4 different polymorphic sequences were used and the FLAG tag has been added to the C-terminus. Introduction of the vector into COS7 cells successfully expressed the gene in about 20% of the cells. The detailed investigation of the signaling pathway is underway.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：薬剤性肺障害 びまん性肺胞障害 上皮成長因子受容体 上皮成長因子受容体阻害薬 日本人 チロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

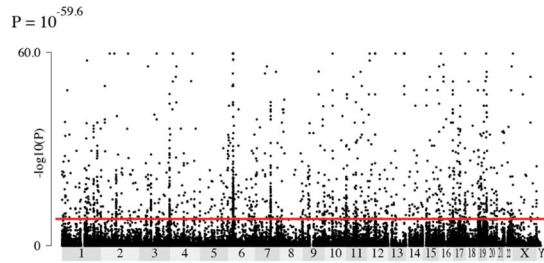
日本人は他民族より、分子標的薬投与、殺細胞性抗癌剤投与、胸部手術、肺への放射線照射後に、びまん性肺胞障害を特徴とする致死的な間質性肺疾患・間質性肺炎(InterstitialLungDisease:ILD)を起こしやすい。分子標的薬である上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)ゲフィチニブ(イレッサ)による薬剤性肺障害・間質性肺炎は代表例で、社会的な耳目を集める訴訟となった。世界的な発症調査が行われたが、他国での発症はほとんどなく、現在、ゲフィチニブによる薬剤性肺障害・間質性肺炎は日本に限定して見られる病態と考えられている。その後、未分化リンパ腫キナーゼ(anaplasticlymphomakinase:ALK)阻害薬クリゾチニブ、第三世代EGFR-TKIAZ9291、免疫チェックポイント阻害薬PD-1でも日本人に高率な肺障害・間質性肺炎がみられることが示されている。日本では、殺細胞性抗癌剤投与時にもびまん性肺胞障害が高率に起こり、特に肺線維化のある患者はリスクが高い(平成23年度厚生労働省びまん性肺疾患に関する研究班報告書)。イリノテカン、ゲムシタピンの肺障害・間質性肺炎はその典型例である。胸部手術、特に肺線維化のある患者では、術後約10%の患者で肺障害・間質性肺炎が起こり、半数が死亡する。術後肺障害・間質性肺炎の外国での頻度は低く、日本人で問題となる。肺への放射線照射でも日本人にはびまん性肺胞障害が起こりやすく劇症化しやすいとされている。上記より、肺線維化のある患者への癌治療はハイリスクとされ、多くの患者が積極的治療を受けることなく緩和医療へと移行する。さらに肺線維化がなくても、癌治療によるびまん性肺胞障害・間質性肺炎で亡くなる患者が多数存在する。これらは癌治療上の大きな問題である。

2. 研究の目的

日本人に高率に発症する肺障害・間質性肺炎の原因となる遺伝因子を同定し、肺障害・間質性肺炎を起こしやすい個人を同定可能にする。その結果を肺障害・間質性肺炎に対する予防法、治療法の開発へと結びつける。

3. 研究の方法

びまん性肺胞障害が日本人に高率に見られることは、日本人に肺脆弱性をもたらす遺伝的素因が存在することを強く示唆する。この仮定に基づき、平成22~24年厚生労働科学研究費難治性疾患等克服研究事業(H22-難治-一般-005)「特異性肺線維症急性増悪及び薬剤性肺障害に関する日本人特異的遺伝素因に関する研究」(研究代表者萩原弘一)を施行。日本人でさまざまな原因による肺障害を起こした患者を対象に末梢血を収集した。合計524症例のサンプルが収集できた。収集した検体のうち、EGFR-TKIによる薬剤性肺障害・間質性肺炎患者を対象にエクソーム



解析を施行、アミノ酸変化を起こす多型(non-synonymous variant)を合計180,215か所同定、その全てに関して一般日本人を対照として関連解析を施行した。その結果、薬剤性肺障害・間質性肺炎患者に集積し、さらに発症頻度の民族差を説明できる唯一の遺伝子としてMUC4(Mucin4)を同定した

図 エクソーム関連解析。横軸は染色体番号。縦軸は $-\log_{10}(P)$ 。赤線はBonferroni補正後の高度有意($P = 0.001/180215$)境界。これより上の部分に存在する変異は高度有意と考えられる。

4. 研究成果

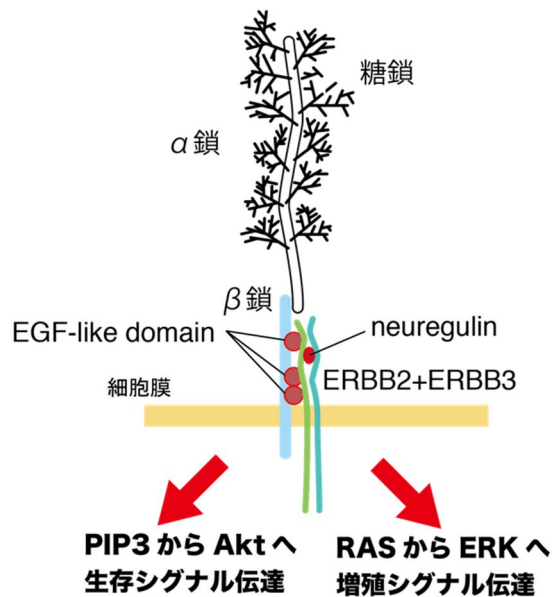


図 MUC4の構造
細胞膜内増殖因子の構造を有する。EGFRファミリーであるERBB2、ERBB3と会合し、細胞内にシグナルを伝達する

MUC4遺伝子には、48塩基対(16アミノ酸)からなる反復配列が354回連続する領域があり、その領域は高度に糖鎖修飾されている。肺障害患者の90%以上(正確な頻度は調査中)において、この領域に3塩基対(1アミノ酸)の挿入配列が見られた。挿入配列の一般日本人頻度は30%であり、挿入配列はEGFR-TKI肺障害と高度に関連していた。MUC4遺伝子の挿入配列が各被験者にホモで存在するかヘテロで存在するかは、遺伝子が巨大で、反復配列内に存在する、まだ確定できていない。この3塩基対以外に、構造異常を引き起こす可能性の

高い配列変化は認められなかった。現在のデータは、日本人特異的肺障害・間質性肺炎の原因がMUC4遺伝子反復配列内の3塩基(1アミノ酸)挿入配列であることを強く示唆している。挿入配列の有無を検索することで、びまん性肺泡障害高リスク患者をあらかじめ同定できると推定される。遺伝子構造、EGFR-TKIが原因になることから考えると、挿入配列によりMUC4のシグナル伝達機能が障害された結果、びまん性肺泡障害が起こると推定される。障害されている機能の補完により、高リスク患者でも安全に分子標的薬投与、殺細胞性抗癌剤投与、胸部手術、肺への放射線照射が行える可能性がある。MUC4は巨大分子であり、長大な反復配列を有するため、mRNAのRT-PCRでcDNAを採取することは不可能である。また、反復配列の人工合成も不可能と考えられる。そのため、発現ベクターの作成は以下のように行った

(a)反復配列は、PCRを使用しない古典的クローニング技術でクローニングしたMUC4exon2から切り出して使用。(b)反復配列の5'側のcoding sequence、3'側のcoding sequenceは人工合成。

(c)(a)(b)の3つのfragmentをfosmid vector内に配列。大腸菌内のコピー数が1コピーのfosmid vectorでは、反復配列は安定して保持できた。

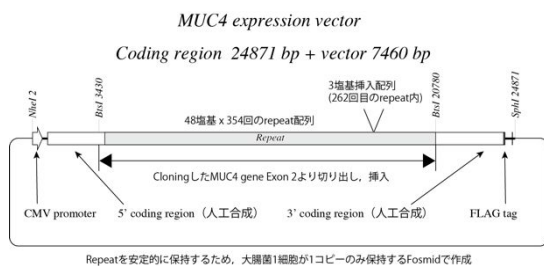
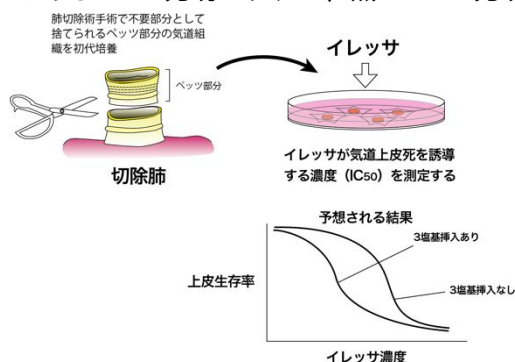


図 MUC4 発現ベクター

この手法により、3塩基挿入のある発現ベクター、無い発現ベクターを、FLAG-tagを付加して作成した。co-transfectionするERBB2、ERBB3発現ベクターを作成し、それぞれHA-tag、V5-tagをつけた。MUC4、ERBB2、ERBB3を培養細胞にco-transfectionさせ、生存シグナル分子(AKTなど)、増殖シグナル分子(ERKなど)の変化を観察する。3塩基挿入配列のあるMUC4発現ベクター、無いMUC4発現ベ



クターでのシグナル伝達系変化を観察する。また、3塩基挿入配列によるシグナル異常の補完を観察できるアッセイ系としても使用する予定である。

図 初代培養細胞を用いたアッセイ

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0件)

〔学会発表〕(計3件)

萩原弘一・分子標的治療の最大効果を目指してTKI関連ILDの感受性遺伝子・日本肺癌学会総会・2017.

澤田 哲郎, 坂東 政司, 瀧上 理子, 山内 浩義, 中山 雅之, 間藤 尚子, 山沢 英明, 遠藤 俊輔, 萩原 弘一・間質性肺炎合併肺癌の術後急性増悪例の臨床的検討・日本呼吸器学会総会学術講演会・2017.

岩井 悠希, 渡辺 恭孝, 工藤 史明, 三輪 千尋, 長井 良昭, 太田 洋充, 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および予後因子の検討・日本肺癌学会総会・2016.

〔図書〕(計3件)

太田洋充, 萩原弘一【呼吸器病学 TOPICS2016-17】肺循環・肺損傷ムチンと気道上皮防御機構・分子呼吸器病 21 : 60-63, 2017.

坂東政司, 萩原弘一・【病態バイオマーカーの"いま"】炎症・線維化間質性肺炎マーカー・生体の科学 67 : 448-449, 2016.

萩原弘一・【呼吸器疾患における慢性炎症を考える】薬剤性肺障害, 特異性肺線維症急性増悪の遺伝的素因に関する検索・呼と循 64 : 144-148, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原弘一 (HAGIWARA, Koichi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：00240705

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()