

令和元年6月11日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16036

研究課題名(和文)特発性肺線維症急性増悪および薬剤性肺障害におけるMUC4の分子生物学的機序の解明

研究課題名(英文)The role of MUC4 gene on idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbation and drug-induced interstitial lung disease

研究代表者

椎原 淳 (SHI IHARA, Jun)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20737241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究により疾患群と健常人のMUC4 exon2の長さが有意差を持って異なることをSouthern blottingの技法を用いて明らかにした。また、現時点で数名の患者、および健常日本人でMUC4の全塩基解析を完了している。複数のヒトで保存されている領域と、多型が多く見られる部位に分かれることがわかってきている。今後はこのシーケンスを継続して行い、疾患関連塩基配列を同定していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかになる遺伝子多型は、切除不能EGFR遺伝子変異陽性肺がん患者さんに対して劇的な効果が期待されるはずのEGFRチロシンキナーゼ阻害剤を投与後に、不幸にも発症してしまう致死の間質性肺炎に関連するものである。

まだその遺伝子多型の完全な同定には至っていないが、今後解析を続けることによって遺伝子多型が同定できれば、致死的な間質性肺炎の発症を事前に回避、または予測できるようになると思われ、不幸な転帰を辿る患者さんを減らすことにつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Southern blotting analysis revealed that the length of MUC4 exon2 in the patient and healthy human is different with statistical significance. As for now, we have analyzed the full MUC4 exon2 sequence of several patients and healthy Japanese. We found MUC4 exon2 has domains which are preserved in some humans, and those which have many variants. We continue to perform the sequencing of MUC4 exon2 and identify the sequence which has the relation to the diseases.

研究分野：肺癌、間質性肺炎、遺伝子工学

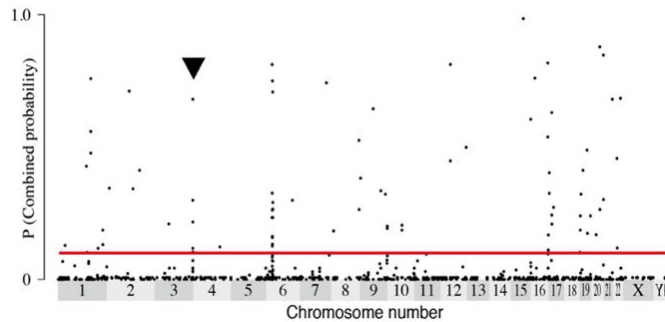
キーワード：薬剤性間質性肺炎 EGFR-TKI

1 . 研究開始当初の背景

日本人は他民族と比較して致死的な間質性肺疾患を起こす頻度が高く、本邦での EGFR-TKI (上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬) による薬剤性肺障害の発症率は約 5%、死亡率は約 30%と報告があり、これは世界で行われた EGFR-TKI の治験では見られなかった高い発症頻度である。また IPF(特発性肺線維症) 急性増悪は、本邦では IPF 患者の 1/3 に見られ、その内 70%が死亡すると報告がある。他国と比較してその発症頻度は明らかに高く、致死率も高いといえる。これらのような明らかな民族差が存在する肺障害は、他国には頻度の少ない日本人特異的な遺伝子変異を仮定すると説明することができる。

この仮定に基づき、これまでに我々は、薬剤性肺障害症例、IPF 急性増悪症例の血液サンプル 524 例を収集した。うち 81 例をコア症例とし、1000 人ゲノムプロジェクトの日本人 DNA データ 70 名を対照として全エクソシーケンセスを行い、MUC4 遺伝子を疾患発症に関連する候補遺伝子として同定した。

さらに引き続いて行った実験で、この MUC4 遺伝子の中で解析を行うと、遺伝子多型が 16 アミノ酸・48 塩基の配列が数百連続している可変長タンDEMリピート(VNTR)構造を有する Exon2 に集積していることが明らかになった。MUC4 は splicing の variant が多いことも報告されており、少数の健常日本人および患者の MUC4 exon2 の southern blotting を用いた解析で、MUC4 の exon2 は 3 つの特定の長さで splicing されていることを明らかにした。さらに複数の患者 DNA を Sanger Sequence で解析した結果、MUC4 の exon2 に見られた変異の実態はタンDEMリピート構造の中の 3 塩基挿入であることが明らかになった。この見つかったリピート部位における 3 塩基挿入が、規則正しいタンパクの立体構造を変化させることにより、MUC4 の機能低下を引き起こし EGFR-TKI による肺障害、および IPF 急性増悪の原因となっている可能性が高いと考えられ、また MUC4 の exon2 の splicing の違いが、発症に関わっている可能性も考えていた。



EGFR-TKI による薬剤性肺障害症例と健常人の関連解析の結果からさらに絞り込んだ manhattan plot

横軸は染色体番号、縦軸は疫学データを満たす確率、は MUC4 遺伝子の位置を示す

2 . 研究の目的

(1) 疾患群、対照群における MUC4 の遺伝子多型 (特に 3 塩基挿入) の頻度を開発している 2 つの assay を併用しながら解析し、疾患発症との関係を明らかにすること。

(2) 疾患群と対照群における MUC4 の splicing の多型の頻度を Southern blotting で調べ、疾患発症との関係を明らかにすること。

(3) MUC4 における遺伝子多型の有無および MUC4 の splicing の違いにより、下流のシグナル伝達に違いがあるかを解明すること。

3 . 研究の方法

(1) MUC4 における遺伝子多型を検出するシステムを完成させる。

・ PNA-LNA PCR-Clamp 法 (Cancer Res. 2005;65;7276-7282) に一部改良・変更を加えて検出システムを完成させる。この方法がうまくいかない場合は制限酵素で切断し、その後 PCR をかける ligation mediated PCR を行う予定であった。

(2) EGFR-TKI による肺障害・IPF 急性増悪症例 (疾患群) と健常日本人・西洋人・中国人 (対照群) における 3 塩基挿入の頻度を 1 で作成したシステムを用いて確認し、両群間で関連解析を行う。

・疾患群として、これまでに収集した EGFR-TKI による薬剤性肺障害症例、および IPF 急性増悪症例を用い、対照群として 健常日本人、中国人、西洋人を用いて、これらにおける MUC4 exon2 の遺伝子多型の頻度を実際の DNA を用いて確認する。

(3) 疾患群と対照群において MUC4 exon2 の southern blotting を行い、疾患群に有意に存在する splicing variant を解析する。

・上記 2 の項で記載した southern blotting の解析は、まだ少数の疾患群、対照群で行ったの

みで、実際に多くのサンプルを用いての検討はこれまで行ってない。解析する数を増やし、多数の southern blotting を行い、2 群における splicing variant を解析する。

(4) 遺伝子多型のある MUC4 を挿入した発現ベクター、遺伝子多型のない MUC4 を挿入した発現ベクターの作成とそのシグナル伝達系の変化を解析する。

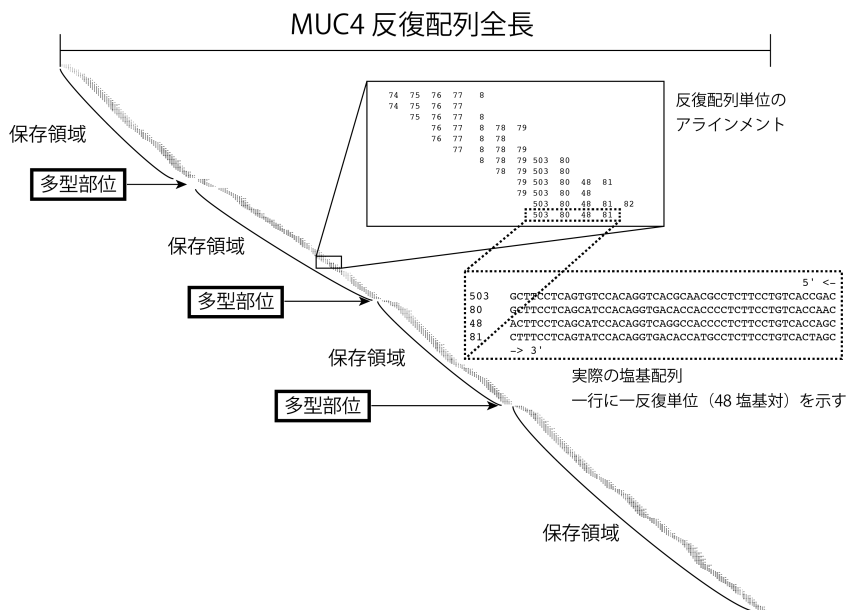
・MUC4 は巨大な分子であり、exon2 に巨大な VNTR 配列を有するため、mRNA の RT-PCR で cDNA を採取することは困難であり、反復配列の人工合成も不可能と考えられるため、(1)で成功した方法を応用して、発現ベクターを作成する。また MUC4 はシグナル伝達を行う機能を持つタンパクであり、MUC4 の機能を解析するための研究を行う。

4. 研究成果

(1) MUC4 の exon2 は 16 アミノ酸 48 塩基のタンデムリピート構造をとっており遺伝子工学的に極めて難易度が高く、これまで同部位のシーケンスには多大な時間と労力を要しているが、これまでの研究により疾患群と健常人の MUC4 exon2 の長さが有意差を持って異なることを Southern blotting の技法を用いて明らかにし、その概要をアジア太平洋呼吸器学会 (APSR) の 2017 年年次総会で口演した。

(2) 当初 MUC4 遺伝子の exon2 に多型 (3 塩基の挿入) を認め、同変異が EGFR-TKI による薬剤性間質性肺炎の原因遺伝子変異と考えたが、健常人のスクリーニングの結果この 3 塩基挿入の変異は疾患関連塩基配列ではない可能性が高くなった。このため MUC4 の exon2 の全配列を決定し、EGFR-TKI による薬剤性間質性肺炎のリスクシーケンスとも言える塩基配列を決定する解析を行っている。

次世代シーケンサー (MiSeq) を用いて断片化した配列のシーケンスを行い、アセンブラを用いてアセンブルするというステップを踏む。48 塩基の配列をそれぞれ数字に置き換え、下記のようにアセンブルを行っている。これにより現時点で数名の全塩基の配列が決定できている。複数のヒトで保存されている領域と多型が多く見られる部位に分かれる事がわかってきている。



(3) 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 による肺障害発症との相関性を見るコホート内 case control study の症例集積を行った。EGFR 遺伝子変異陽性肺癌患者で EGFR-TKI による治療を予定している症例の末梢血を薬剤投与前に採取するもので、平成 30 年度までに 432 例が登録され、11 名が肺障害を発症し、この時点で登録終了としている。この 11 名のケースに対してその 8 倍の 88 名を無作為にコントロールとして抽出し、リスクシーケンスが肺障害ケースに多く見られるかどうか、確認する作業を今後予定している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

発表者名: Jun Shiihara

発表演題: MUC4 Variable Number of Tandem Repeat Polymorphism and Severe Lung Injury

学会名: アジア太平洋呼吸器学会 2017 年年次総会

発表年: 2017 年

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：太田 洋充

ローマ字氏名：OHTA, Hiromitsu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。