

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02820

研究課題名（和文）日本人特異的肺障害に関与するMUC4分子内責任配列同定に関する研究

研究課題名（英文）Detection of DNA sequence responsible for the interstitial lung disease specific for 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） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、薬剤性肺障害および特発性肺線維症急性増悪に関する遺伝因子の同定を目的としている。日本人肺の脆弱性が指摘されている（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、高率に致死的な経過をたどること（2）肺線維症を有する患者で他国より高頻度に急性増悪が起こり、高い致死率を示すと推定されることが典型例である。薬剤性肺障害および特発性肺線維症急性増悪は医療に伴って発症するため、安全な医療の障害になる。我々は、それらに関与する遺伝因子を同定し、予防法、治療法を確立することを目的とした。患者、健康人の比較により、MUC4遺伝子が関連している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人には肺障害が高率に発症する。2004年、肺がん治療薬ゲフィチニブが上市された直後から肺障害が多発した。ゲフィチニブによる肺障害は海外では報告されていない。特発性肺線維症急性増悪も、ゲフィチニブ肺障害同様、日本で高頻度に発生し、同じ病理像を示す。我々は、日本人特有の単一遺伝因子が薬剤性肺障害および特発性肺線維症の原因という作業仮説を設定し原因遺伝子を追求することとした。

研究成果の概要（英文）：The aim of the current study is to identify a genetic factor responsible for the interstitial lung disease specific for Japanese. Recently, vulnerability of Japanese to interstitial lung diseases has been widely recognized. First, drug-induced interstitial lung disease occurs at a higher frequency in Japanese than people in other ethnic groups. Second, acute exacerbation is more frequently observed in the patients with interstitial pulmonary fibrosis. These conditions often occur in medical services, and hinders safe medical services. We decided to elucidate the genetic factors that cause interstitial lung diseases in Japanese, and thus help to contribute to a safer medical services. We compared the non-synonymous SNPs in patients and healthy people and identified the MUC4 gene as a candidate gene.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：薬剤性肺障害 EGFR EGFR-TKI MUC4

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 (Interstitial Lung Disease: 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 (anaplastic lymphomakinase: ALK) 阻害薬クリゾチニブ , 第三世代 EGFR-TKI オシメルチニブ , 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

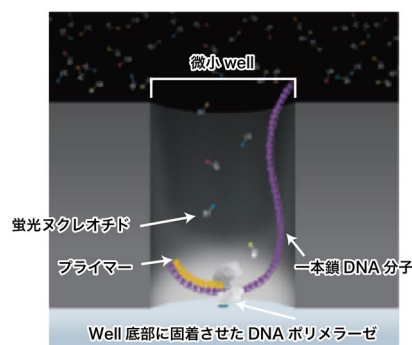
本研究は , 薬剤性肺障害および特発性肺線維症急性増悪に關与する遺伝因子の同定を目的としている .

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) 「特発性肺線維症急性増悪及び薬剤性肺障害に關与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 . この 524 症例から , 典型的な特発性肺線維症急性増悪 , 典型的な EGFR-TKI による薬剤性肺障害症例 (コア症例) 98 名 (イレッサ肺障害 + タルセバ肺障害 36 名 , 特発性肺線維症急性増悪 45 名 , ザーコリ肺障害 2 名 , ドセタキセル肺障害 15 名) を選択し , ヒト全遺伝子コード領域シークエンス解析 (エキソーム解析) を施行した . 対照として , コーカシアン (53 名) , 中国漢人 (68 名) , 日本人 (70 名) エクソーム fastq データを , 1000 人ゲノムプロジェクト sequence read archive データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) より取得した . 全てのデータは , CLC Genomics Workbench (CLC bio) にてヒトゲノム標準配列 (hg19) に mapping した . 各患者で , 90% 以上の exon 領域が 10 回以上読まれていることを確認したのち , Probabilistic variant detection アルゴリズムにて , ヒト標準配列と異なる塩基配列 (以下 , 変異と記す) を取得した . 各 non-synonymous 変異に關し , 日本人 ILD 患者と日本人健常人で ILD の有無に關する差を , 日本人健常人と西洋健常人 , 日本人健常人と中国人健常人との差で各 non-synonymous 変異の民族差を検討した . そして , 日本人 ILD 患者に有意に存在し , 日本での ILD 頻度と西洋 , 中国 ILD 頻度の差を説明できる民族差のある変異を有する遺伝子を抽出した . 抽出された遺伝子のうち , 遺伝子発現部位 , 遺伝子機能から , 肺障害原因遺伝子として妥当な遺伝子を選択した .

肺障害患者と MUC4 多型との関連を見る際に , 肺障害の認定などが恣意的にならないよう , NEJSG 臨床試験グループの協力を得て , EGFR 阻害薬投与患者検体を前向きに集積した (NEJ022 試験) . そして , 独立判定委員により肺障害 (ILD) の有無を判定した .

現時点で , MUC4 のような長い反復配列を有する遺伝



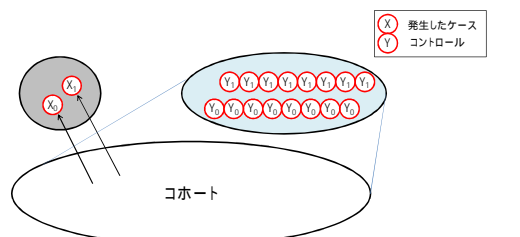
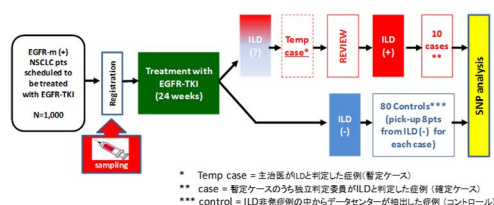
第三世代一分子シークエンサー
微小な Well の底面に一分子の DNA
ポリメラーゼを固着させ , そこで
DNA 伸長反応を行う . 取り込まれた
一分子の蛍光ヌクレオチドが発する
微少な蛍光を検出する . 次世代
シークエンサーでは決定困難だった
長い標的塩基配列を決定できる .

子配列の決定方法は確立されていない。そのため、本研究では使用手法の多くを独自開発した。長い反復配列の増幅では反復配列内にプライマーを作成できず、さらに増幅産物がプライマーとして類似配列を増幅するため、PCR 条件は極めて特殊である。最終データのアセンブルでは、複数の反復配列が一塊となって反復する repeat on repeat の構造が随所に見られるため、既存の類似配列比較ルーチンでは類似配列を並べきれない。これを処理するため、独自プログラムを開発した。また、実際の塩基配列も、短鎖を多数回読む次世代シーケンサーで採取したものでは、反復配列のためにアセンブルできない。そのため、長鎖を読むことができる第三世代シーケンサーで取得した。MUC4 が実際の肺障害の原因になっているかを確認するため、NEJSG 臨床試験グループの協力を得て、EGFR 阻害薬投与患者検体を前向きに集積した (NEJ022 試験)。そして、独立判定委員により肺障害 (ILD) の有無を判定した。このサンプルを用い、MUC4 の構造と ILD との関連をコホート内ケースコントロール研究として行うこととした。

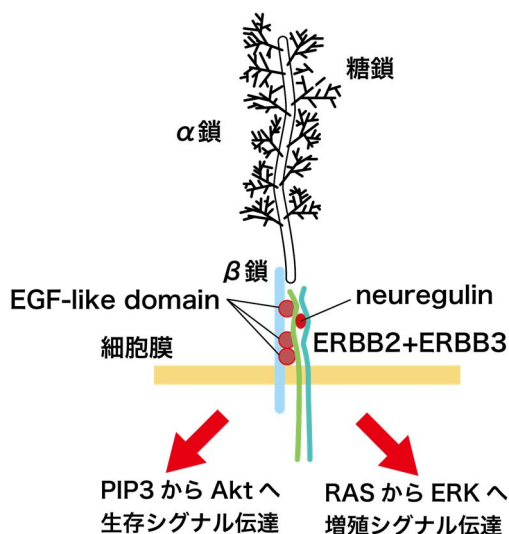
4. 研究成果

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。MUC4 は気道に高発現し、EGF モチーフを有し、細胞生存、増殖シグナルを伝達する。その遮断により肺障害が起こる可能性の高い分子である。類似遺伝子として知られる MUC1 は、肺障害の時に上昇するバイオマーカーである KL-6 を有する遺伝子であり、MUC4 と肺障害の関連性が示唆される。

NEJ022 コホート内ケースコントロール研究では、報告書作成時点で症例集積が終了、独立判定委員会による ILD の判定、ケース、コントロールの選定が終了している。NEJ022 症例の MUC4 遺伝子配列は 90% 以上の症例の解析が終了している。中間解析結果では、MUC4 多型はいくつかの subgroup からなることが明らかになった。図にその一部を示す。NEJ022 試験 ILD 症例は cos2 群に高率に集積しており、この部位に ILD 関連多型が存在する可能性が高い。症例固定を経て、2021 年 9 月末に NEJ022 試験の最終結果をまとめることが決定されている。



NEJ022 試験のシエマ
コホート内ケースコントロールスタディー形式の試験。肺障害ケースが発生した場合、コホート内からコントロールを取り、両者を比較する。



MUC4 の構造
主として気道上皮で発現、EGF-like domain で ERBB2+3 と会合し、気道上皮に生存、増殖シグナルを伝達する。

アレル名	MUC4 先祖遺伝子					
	cos2 群			93s 群		
repeat 数	353 個	264 個	265 個	122 個	217 個	199 個
日本人集団内アレル頻度	41%	6%	2%	4%	17%	30%

現在までに得られた結果から構築した MUC4 反復配列の分子進化。現時点で、肺障害関連配列は cos2 アレル (いくつかのサブグループからなっている) の中に存在すると推定している。このアレルは、我々が以前から注目している 3 塩基対挿入を持つアレルでもある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------