

画像検査：胸部 X 線写真では、両肺野の高度の過膨張所見に加え、右下肺野には胸膜癒着を認めた (Fig. 1)。同時期の胸部 CT では、両肺に air trapping を現す広範囲なモザイクパターンを認めた (Fig. 2)。

入院後経過：入院後、右気胸を合併し、呼吸困難が悪化したため、同年 9 月 19 日に胸腔鏡下嚢胞縫縮術を施行した。術後の感染に対してメロペネムを 1 度投与したところ、血圧低下、全身発赤を認め、アナフィラキシーショックと考えられたため、直ちにステロイドを投与し、改善を認めた。その後、人工呼吸器からの離脱が困難であったため、気管切開を施行し、人工呼吸器管理を継続した。2003 年 5 月以降は、喀痰量の増加を認め、培養では緑膿菌が頻回に検出されるようになった。

以上、臨床経過から閉塞性細気管支炎と診断し、人

工呼吸器管理下に対症療法を継続し、同年 10 月からは慢性気道感染に対してアジスロマイシンの継続投与を行っていたが、感染のコントロールは困難であった。さらに II 型呼吸不全の増悪をきたしたため、2004 年 2 月より鎮静下に強制換気による人工呼吸器管理を行った。一時、症状の改善を認めたが、肺炎を合併し、同年 2 月 18 日に永眠された。

剖検肺の病理学的所見：肉眼的には、胸膜癒着がびまん性に認められた。両肺の上下葉とも閉塞をきたした気管支が多数認められた。

上葉気管支；気道閉塞は、区域気管支を 1 次として 4~5 次末梢支から始まることが多く、一旦閉塞した後に拡張をきたす気管支が確認された。閉塞部より中枢側の気管支は軽度の管状拡張を示していた。

右中葉および両下葉気管支；ほとんどの気管支が

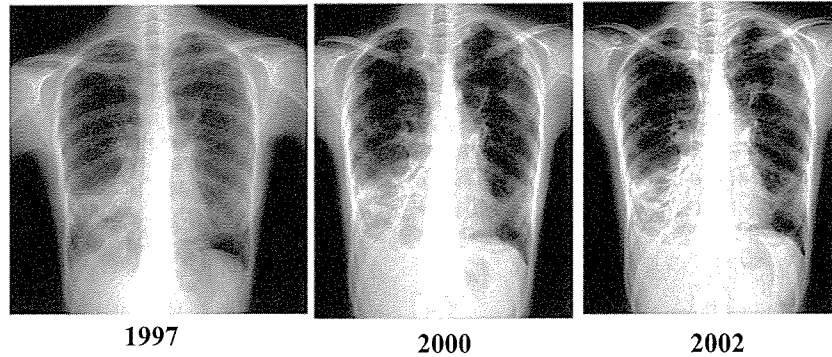


Fig. 1 Sequential changes of chest radiograph in 1997, 2000, and 2002, revealed pleural adhesion in the right lower lung field associated with hyperinflation, and progressive bronchiectasis in both lower lung fields.

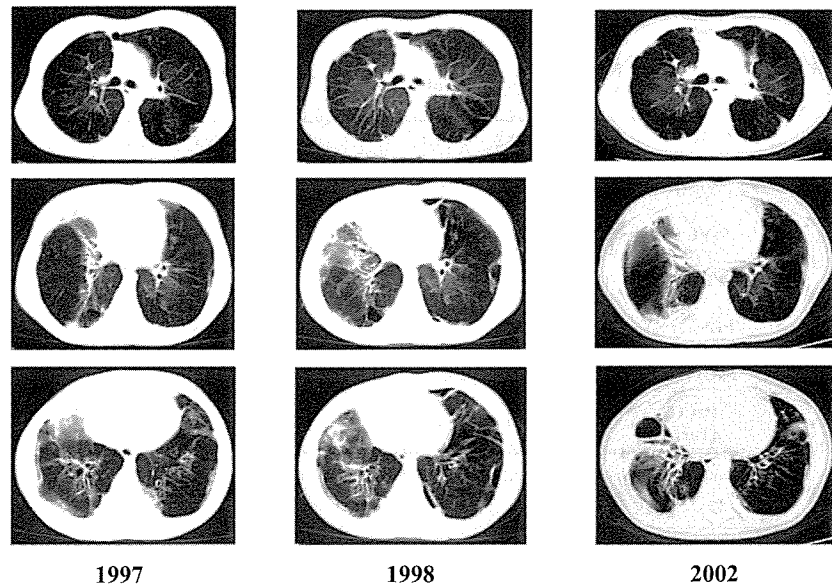


Fig. 2 Chest computed tomography (CT) scan in 1997, 2000, and 2002, revealed a widespread mosaic pattern demonstrating air trapping associated with bronchiectasis in both lung fields.

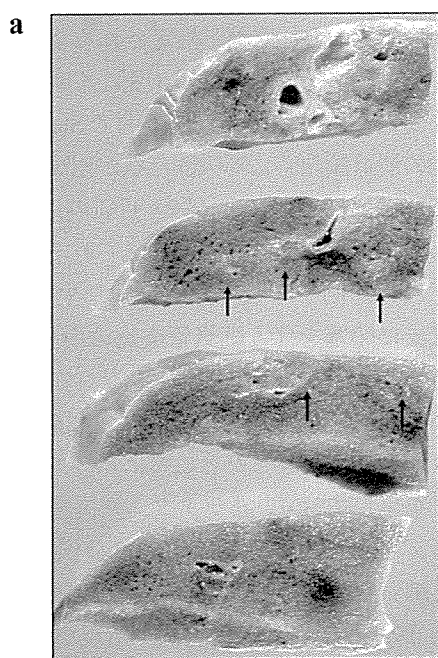


Fig. 3a Macroscopic appearance of the left B1+2c, showing obliterative bronchiolitis (arrows).



Fig. 3b Schematic reconstruction of the left lung, showing obliterative bronchiolitis in the upper and lower lobe. Bronchiectasis with cystic dilatation is frequently seen in the lower lobe.

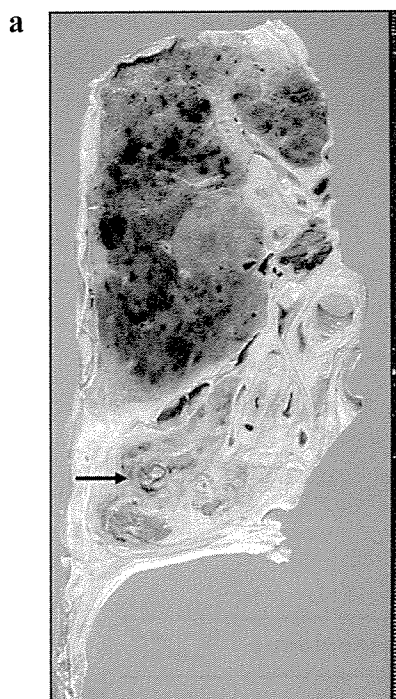
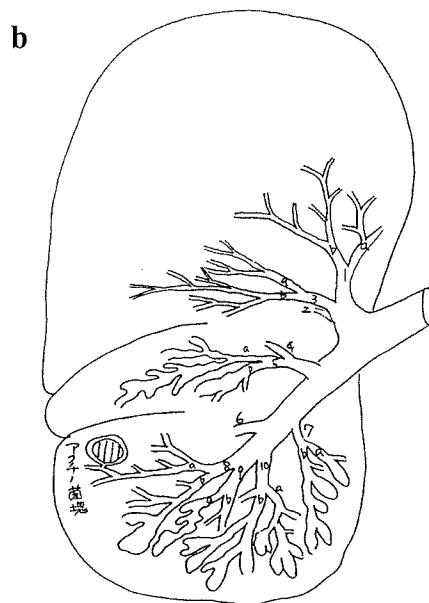


Fig. 4a, 4b Macroscopic appearance and schematic reconstruction of the right lung showed diffuse pleural adhesions and obliterative bronchiolitis in the middle and lower lobes. *Actinomyces* was found in the peripheral lesion of the right S<sup>a</sup>. (arrow).



管状拡張をきたしており、一部では嚢状に拡張した気道も認められた。上葉とほぼ同様の次数で閉塞しているものが多かった (Fig. 3, 4)。

組織学的には、両上葉の気管支閉塞部は、弾性線維の増加をともなう線維組織で気道内腔が閉塞されており、既存の平滑筋や弾性線維はほとんどが残存し、

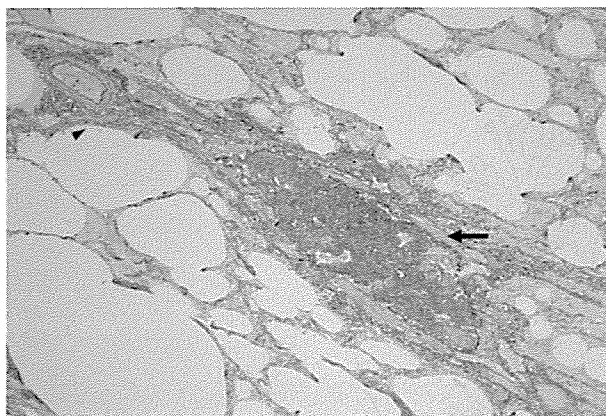


Fig. 5 The lumen of the membranous bronchiole is obliterated by fibrous granulation tissue, while the elastic fiber layer and smooth muscle layer of the bronchial wall are spared. (arrow). (Elastica van Gieson's stain, ×10).

constrictive bronchiolitis obliterans の所見を呈していた (Fig. 5)。一方、右中葉、両下葉の拡張気管支では壁構造が完全に破壊され、線維性組織に置換されていたが、拡張気管支の末梢では、上葉と同様の constrictive bronchiolitis obliterans の所見が認められた。また、右下葉では *Actinomyces* の菌塊が形成されていた。

考 察

閉塞性細気管支炎の原因としては、有毒ガス (アンモニア, NO<sub>2</sub> など) の吸入<sup>4)</sup>、膠原病、特に関節リウマチ<sup>5)</sup>およびマイコプラズマ<sup>6)</sup>やウイルス感染<sup>7)</sup>などによるものが報告されている。最近では骨髄移植などの臓器移植後の報告例が増加しているが<sup>8)</sup>、本症例のように薬剤による Stevens-Johnson 症候群によって生じた BO の報告は少なく、組織学的に確定診断されたものは、本症例が 4 例目であった<sup>9)~11)</sup>。これらの報告を

まとめると、患者は 25 歳から 42 歳までの全例女性に発症しており、原因と推定される薬剤はアンピシリンが 1 例、フェニトインが 1 例、不明が 1 例、アモキシシリンが 1 例であった。全例で Stevens-Johnson 症候群の消退傾向時に呼吸器症状が出現していた。予後に関しては、4 例中 2 例が 2ヶ月以内に死亡しており、きわめて予後不良の疾患と考えられる。組織学的にはいずれの症例も呼吸細気管支より中枢側の非呼吸細気管支に閉塞を伴う細気管支炎の所見を認めた (Table 2)。本症例では、アモキシシリンを内服後に Stevens-Johnson 症候群を合併し、また術後の感染に対してメロペネムを投与したところ、アナフィラキシーショックを呈しており、βラクタム系抗菌薬のアレルギーが考えられた。Stevens-Johnson 症候群に合併する閉塞性細気管支炎では、粘膜、皮膚などの症状の改善後、平均 6.9ヶ月後に呼吸器症状が出現することが多く、本症例も発症 2ヶ月後より呼吸器症状が出現している。その理由として、一般に細気管支病変は組織学的に細気管支上皮細胞の壊死・脱落に始まり、フィブリン・炎症細胞の滲出、さらに泡沫状組織球の集簇、線維芽細胞、毛細血管の増生、最終的に膠原線維の沈着により瘢痕化し、内腔が狭窄・閉塞するため、これらの病変形成に要する時間と考えられている<sup>10)</sup>。

本症例の予後と死因は、繰り返される気道感染に対しては、アジスロマイシンの継続投与と感染増悪時には、ニューキノロン系抗菌薬を使用していたが、次第に菌交代を起こし、多剤耐性緑膿菌が頻回に検出されるようになった。最終的には、感染を契機に慢性呼吸不全の増悪と循環不全をきたしたものと考えられるが、過去の報告例と比べて、全経過 17 年と最も長期生存例であった。

閉塞性細気管支炎 (Bronchiolitis obliterans : BO)

Table 2

No	Year	Age/ Sex	Cause	Histological findings	Duration of survival
1	1986	42 y/F	Unknown	BO in 3 <sup>rd</sup> to 5 <sup>th</sup> branch bronchiole (autopsy)	59 days
2	1990	41 y/F	Ampicillin	Proliferative BO in non-respiratory bronchiole (autopsy)	60 days
3	1995	25 y/F	Phenytoin	Chronic bronchitis (TBLB)	Unknown
4. Our case	2006	27 y/F	Amoxicillin	CBO in 4 <sup>th</sup> to 5 <sup>th</sup> branch bronchiole (autopsy)	17 years

は、呼吸細気管支より中枢側の膜様細気管支および小気管支の内腔が肉芽組織や線維組織で充満し、あるいは壁の線維化によって内腔の著しい狭窄・閉塞が起こった状態である。組織学的には、細気管支内腔に肉芽組織の突出や壁に炎症細胞浸潤の強い cellular BO と細気管支上皮下あるいは壁の線維化によって内腔が高度に狭窄ないし閉塞する constrictive BO に分類される<sup>12)</sup>。さらに蛇澤ら<sup>13)</sup>は、慢性気道感染を伴う閉塞性障害により死亡した症例を病理組織学的に検索し、細気管支壁構造が完全に破壊され、膠原線維に置き換えられてしまった小気管支・細気管支の所見を destructive BO と表現している。また山中ら<sup>3)</sup>が提唱した閉塞性気管支・細気管支炎 (bronchobronchiolitis obliterans: BBO) は BO よりも高位の小気管支にまで病変が及ぶ病態で、特発性の他、関節リウマチや Stevens-Johnson 症候群に伴うことが知られている。本症例の剖検時の病理学的所見としては、多くの気管支が区域支より 4~5 次末梢で閉塞しており、平滑筋や弾性線維などの気道構造は保たれていたが、内腔が線維性に閉塞もしくは著明に狭窄しており、constrictive BBO (絞扼性閉塞性気管支細気管支炎) と考えられた。右中葉、両下葉の拡張した気管支では壁が完全に破壊され、高度の線維化が認められたが、これら気道の末梢では、上葉と同様の constrictive BBO によると思われる閉塞が認められた。また、右下葉では *Actinomyces* が続発性に感染し菌塊を形成しており、constrictive BO に気道感染が続発したものと考えられた。一方で山中ら<sup>3)</sup>は、BO には通常、気管支拡張を来たすことはまれであるとしているが、本症例では両下葉・舌区を中心に明らかな気管支拡張が認められた。これは、Stevens-Johnson 症候群による constrictive BBO がほぼ全肺に起こり、その後 17 年の間に、緑膿菌を含む度重なる感染が両下葉、舌区の気道に加わることで、潰瘍などの炎症が惹起され、気管支拡張が引き起こされたものと考えられた。

本疾患の発症機序には不明な点が多いが、骨髄移植、肺移植、膠原病などで好発することから、免疫反応の異常が発症に重要な役割を果たしているものと考えられている<sup>14)</sup>。

治療に関しては、ステロイド薬、気管支拡張薬、マクロライド療法などが試みられているが、細気管支の閉塞性変化は非可逆性で、予後は不良である。本間ら<sup>12)</sup>は、閉塞性細気管支炎と診断された 15 例に対し

て、ステロイド、シクロスポリン、マクロライドならびにニューキノロン系抗菌薬を単独あるいは併用投与するも、constrictive BO 5 例のうち 4 例、cellular BO 10 例のうち 6 例がそれぞれ不変あるいは悪化したと報告している。本症例は、呼吸器症状の出現から 17 年間の長期生存例であったが、病理組織学的には constrictive BO が主体であり、治療抵抗性であったと推察される。さらに慢性気道感染を繰り返すことによって、病理組織学的に destructive BO へと進行し、慢性呼吸不全の増悪につながったものと考えられた。また、肺移植後に発症した BO に azithromycin (AZM) を投与することにより呼吸機能が改善した<sup>15)</sup> という報告があり、AZM の使用を試みたが、明らかな効果は得られなかった。いずれにしても、いまだ有効な治療法がないのが現状であり、進行例においては肺移植が唯一の治療法となっているが、本症例では、肺移植に対して本人の承諾が得られなかった。

今回我々は、アモキシシリンを内服後に Stevens-Johnson 症候群を発症し、その後、臨床的に閉塞性細気管支炎と診断し、最終的に剖検にて病変を確認しえた貴重な症例を経験した。本症例のように、進行性の呼吸困難を呈し、胸部 X 線で過膨張所見と肺機能検査にて閉塞性障害を認めた場合は、閉塞性細気管支炎も念頭に入れて早期から精査を進める必要があると考えられた。

今後、BO 症例の基礎疾患に基づく臨床、画像、呼吸機能所見の相違点を検索し、次にそれらの肺組織を用いて、細気管支病変の局在・分布を再構築する。さらに肺組織内浸潤リンパ球サブセット、DNA パターン、炎症性サイトカイン分泌の差等を比較検討し、OB の発症機序を臨床病理学的に解明していく。

## 文 献

- 1) 相原道子, 池澤善郎: Stevens-Johnson 症候群. 日本臨床 2002: 60: 322-27.
- 2) 本間 栄: 閉塞性細気管支炎. 医学のあゆみ・呼吸器疾患 2003: 412-14.
- 3) 山中 晃: 慢性閉塞性細気管支炎. 日本胸部臨床 1986: 45: 539-54.
- 4) King Jr TE: Bronchiolitis. In: Schwarz MI, King Jr TE, editors. Interstitial Lung Disease. Hamilton: BC Decker Inc; 2003: 787-824.

- 5) Geddes D.M., Corrin B, Brewerton D.A., et al : Progressive airway obliteration in adults and its association with rheumatoid disease. *Q J Med* 1977 ; 184 : 427-444.
- 6) Isles AF, Masel J, O'Duffy J: Obliterative bronchiolitis due to *Mycoplasma pneumoniae* infection in a child. *Pediatr Radiol* 1987 ; 17 : 109.
- 7) Anthony P.K, Ramsey R.H, Murali M.C., et al : Respiratory viral infection are a distinct risk for bronchiolitis obliterans syndrome and death. *Am J Respir Crit Care Med* 2004 ; 170 : 181-187.
- 8) Roca J, Granena A, Rodriguez-Roisin R, et al : Fatal airway disease in adult with chronic graft-versus-host disease. *Thorax* 1982 ; 37 : 77.
- 9) 神林隆元, 窪田達也, 福家信夫ら : Stevens-Johnson 症候群に遅発性呼吸障害を合併し, 呼吸不全にて死亡した 1 症例. *ICU と CCU* 1986 : 49.
- 10) Tsunoda N. et al : Rapidly progressive bronchiolitis obliterans associated with Stevens-Johnson syndrome. *Chest* 1990 ; 98 : 243-45.
- 11) Yatsunami J, Nakanishi Y, Matsuki H, et al : Chronic bronchobronchiolitis obliterans associated with Stevens-Johnson syndrome. *Internal Medicine* 1995 ; 34 : 772-775.
- 12) Homma S, Sakamoto S, Kawabata M, et al : Comparative clinicopathology of obliterative bronchiolitis and diffuse panbronchiolitis. *Respiration* 2006 ; 73 : 481-487.
- 13) 蛇澤 晶, 馬場基男, 安田公彦 : びまん性気管支拡張症の病理. *病理と臨床* 2002 ; 20 : 898-903.
- 14) 横井豊治, 橋本克訓, 平林紀男ら : 閉塞性細気管支炎. *病理と臨床* 2002 ; 20 : 904-909.
- 15) Susan G.G., John F.M., Reda E.G., et al : Maintenance azithromycin therapy for bronchiolitis obliterans syndrome *Am J Respir Crit Care Med* 2003 ; 168 : 121-125.

# 追 加 発 表

# Discoidin Domain Receptor 1 の特発性肺線維症における 役割について ～肺線維芽細胞における役割～

松山 航 納 光弘\*

特発性肺線維症 (IPF) の病巣では肺線維芽細胞の増殖とコラーゲンの沈着を認める。この過程において肺線維芽細胞はアポトーシスに抵抗性を示すとも言われているがその機序は明らかではない。Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) は近年発見されたコラーゲンを ligand とするレセプターチロシンキナーゼで, in vitro で NF- $\kappa$ B を活性化し (J Immunol 2004 172: 2332.), IPF 組織の fibroblastic foci に発現する。NF- $\kappa$ B は線維芽細胞のアポトーシス抵抗性に重要であるので我々は IPF 患者の肺線維芽細胞を用いて FasL 誘導性アポトーシスにおける DDR1 の役割について検討した。IPF 患者の肺線維芽細胞は非 IPF 患者に比べて有意に多く DDR1 を発現した。免疫組織染色では fibroblastic foci 細胞は DDR1 陽性だったが気管支上皮は陰性だった。DDR1 刺激抗体やコラーゲンによる刺激は FasL 誘導性の肺線維芽細胞のアポトーシスを抑制し NF- $\kappa$ B を活性化した。DDR1 は IPF において肺線維芽細胞の生存に寄与し肺の線維化に関与する可能性がある。

## Role of Discoidin Domain Receptor 1 in idiopathic pulmonary fibrosis ～Role in pulmonary fibroblast～

Wataru Matsuyama, and Mitsuhiro Osame

*Division of Respiratory Medicine, Respiratory and Stress Care Center, Kagoshima University Hospital.  
8-35-1 Sakuragaoka 890-8520 KAGOSHIMA JAPAN*

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), characterized by fibroblast proliferation and accumulation of extracellular matrix, including collagen, is a chronic progressive disorder that results in lung remodeling and fibrosis. However, the cellular mechanisms that may make fibroblasts resistant to apoptosis have not been completely elucidated. Discoidin domain receptor 1 (DDR1), a receptor tyrosine kinase whose ligand is collagen, is expressed in vivo and contributes in vitro to leukocyte differentiation and nuclear factor (NF)- $\kappa$ B activation, which may play an important role in fibroblast survival. In this study, we examined in vivo and in vitro DDR1 expression and its role in cell survival using fibroblasts obtained from IPF and non-IPF patients. Immunohistochemically, fibroblasts present in fibroblastic foci expressed endogenous DDR1. The DDR1 expression level was significantly higher in fibroblasts from IPF patients, and the predominant isoform was DDR1b. In IPF patients, DDR1 activation in fibroblasts inhibited Fas ligand-induced apoptosis and resulted in NF- $\kappa$ B nuclear translocation. Suppression of DDR1 expression in fibroblasts by siRNA abolished these effects, and an NF- $\kappa$ B inhibitor abrogated the anti-apoptotic effect of DDR1 activation. We propose that DDR1 contributes to fibroblast survival in the tissue microenvironment of IPF and that DDR1 up-regulation may occur in other fibroproliferative lung diseases as well.

## はじめに

Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) は近年発見された細胞膜に存在するレセプタータイロシンキナーゼで collagen をその ligand とする<sup>1)</sup>。その役割はこれまで不明であったが近年我々は DDR1 が DDR1 が生体内の単球からマクロファージへの分化及びマクロファージの抗原提示, サイトカイン産生にきわめて重要な役割を果たすこと<sup>2,3)</sup>, DDR1 のシグナルは新しいシグナル蛋白を介する極めて特殊なシグナルであり, 且つそのシグナルを介して単球から樹状細胞への分化及びその抗原提示にもきわめて重要な役割を果たすことを発見した<sup>4)</sup>。さらに我々は特発性肺線維症の肺胞マクロファージが DDR1 を過剰発現し P38MAP キナーゼを介してその病態に関与していること<sup>5)</sup>, 肺サルコイドーシスの組織中に DDR1 が発現し, NF- $\kappa$ B を介してサルコイドーシスの悪化に関与していることも発見した<sup>6)</sup>。これらの研究の際に特発性肺線維症の病巣において Fibroblastic foci が DDR1 を発現していることが確認されていたがその役割はまだ不明であった。

特発性肺線維症は進行性・致死性の肺の線維化を来たす慢性疾患で<sup>7)</sup>, その病巣には DDR1 の ligand である Collagen の大量の沈着が認められる<sup>8)</sup>。肺線維芽細胞は特発性肺線維症において肺の線維化に重要な役割を果たすと考えられている<sup>9)</sup>。特に線維芽細胞巣は肺線維化の最初の段階で発生し, そこを構成する線維芽細胞は  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 陽性の myofibroblast である<sup>10)</sup>, Myofibroblast の病巣からのアポトーシスなどによる clearance が創傷の治癒には重要であるといわれている<sup>11)</sup>。特発性肺線維症の肺線維芽細胞はそうでない肺線維芽細胞に比してアポトーシス誘導因子に対する反応が違うことが報告されている<sup>12)</sup>。

先にも述べたように DDR1 は線維芽細胞の抗アポトーシス作用にも重要な役割をもつ NF- $\kappa$ B を活性化することが出来る。このため我々は肺線維芽細胞における DDR1 の役割について以下の研究を行った。

鹿児島大学病院 呼吸器ストレスケアセンター呼吸器内科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

## 方 法

1. 特発性肺線維症患者で組織診断のために VATS にて摘出された肺より肺線維芽細胞を抽出した。(全 7 例, 男:女=6:1, 平均年齢 59.5 歳) また, 対照として肺癌にて摘出された肺のうち肺癌の含まれない肺葉より肺線維芽細胞を抽出した。(全 6 例, 男:女=4:2, 平均年齢 60.2 歳)
2. 特発性肺線維症患者で組織診断のため VATS にて摘出された肺組織を用いて DDR1 の免疫染色を行った。
3. 抽出した肺線維芽細胞の DDR1 発現をフローサイトメトリー法, ウェスタンブロット法にて調べた。
4. Fas Ligand に対する肺線維芽細胞のアポトーシスを Annexin V 染色を行いフローサイトメトリー法にて調べた。
5. DDR1 の細胞内のシグナルを Immunoprecipitation を組み合わせたウェスタンブロット法, EMSA 法にて調べた。
6. DDR1 の刺激には collagen および DDR1-agonistic monoclonal antibody を使用した。
7. DDR1 の関与の確認には DDR1 に対する siRNA や NF- $\kappa$ B のインヒビター (CAPE) を用いた。

## 結 果

1. Fibroblastic foci 内の Fibroblast が DDR1 陽性に染まった。気管支上皮は DDR1 陰性であった (図 1A & B: ヘマトキシリンエオジン染色, C & E: DDR1 染色, D & F: 陰性コントロール)。
2. 特発性肺線維症の肺線維芽細胞の  $\alpha$ -SMA 陽性細胞は対照の肺線維芽細胞より有意に多かった。特発性肺線維症の肺線維芽細胞の DDR1 陽性細胞は対照の肺線維芽細胞より有意に多かった。特発性肺線維症の肺線維芽細胞の  $\alpha$ -SMA+/DDR1+細胞は対照の肺線維芽細胞より有意に多かった。特発性肺線維症患者の肺線維芽細胞において DDR1 陽性細胞は殆どが  $\alpha$ -SMA 陽性であった (図 2)。
3. 特発性肺線維症患者の肺線維芽細胞は対照の肺線維芽細胞より有意に多くの DDR1 を発現していた。特発性肺線維症患者の肺線維芽細胞の発現する



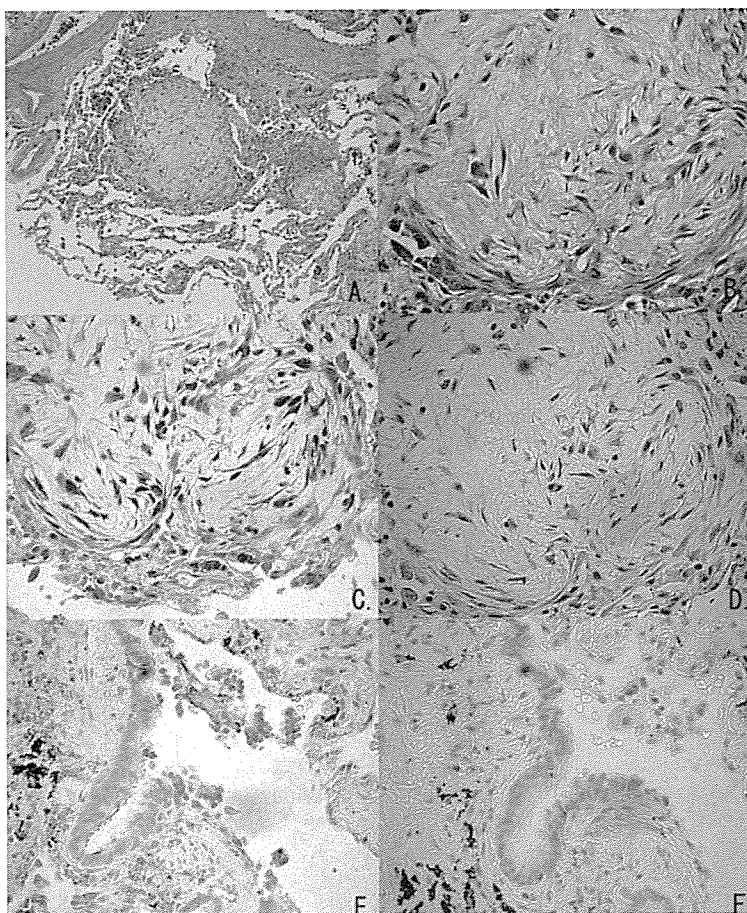


図 1

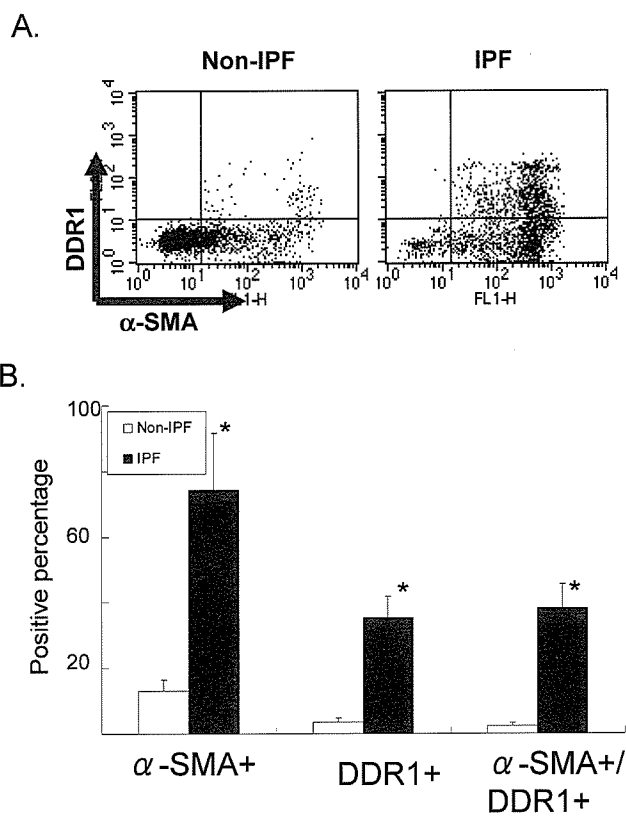


図 2

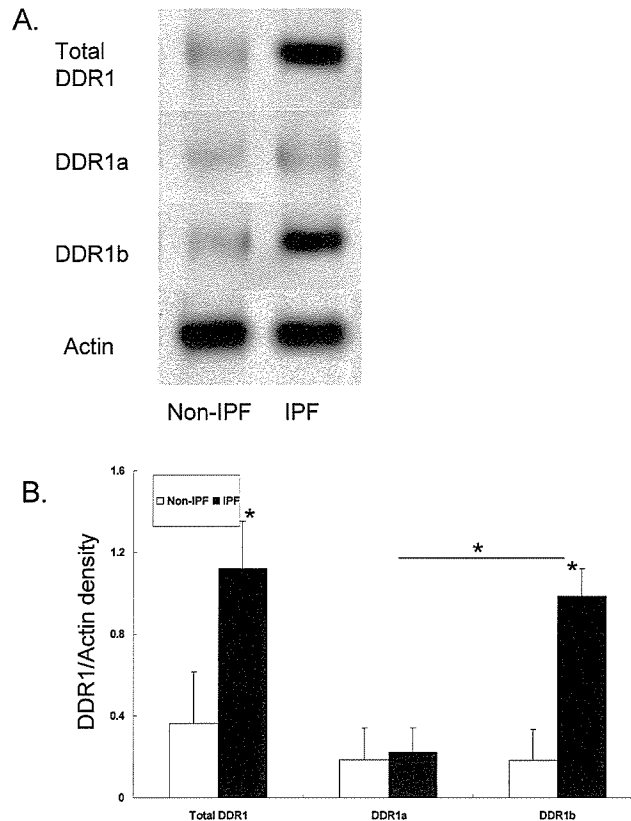


図 3

DDR1 は殆どが DDR1b であった。DDR1a の発現量は特発性肺線維症患者，対照ともに少なく 2 群で差はなかった (図 3)。

4. 特発性肺線維症患者の肺線維芽細胞は対照に比してやや Fas ligand によるアポトーシスに抵抗性であったが有意差はなかった。特発性肺線維症患者の肺線維芽細胞の DDR1 を DDR1 刺激モノクローナル抗体で刺激すると Fas ligand に対する抗アポトーシス作用が有意に増加した。対照の肺線維芽細胞の DDR1 を DDR1 刺激モノクローナル抗体で刺激しても Fas ligand に対する抗アポトーシス作用に変化はなかった (図 4)。

5. DDR1 刺激モノクローナル抗体で特発性肺線維症患者の肺線維芽細胞を刺激すると DDR1 がリン酸化シリン酸化した She が結合した。DDR1 刺激モノクローナル抗体で特発性肺線維症患者の肺線維芽細胞を刺激すると NF- $\kappa$ B の活性化が起こったが対照の肺線維芽細胞では起こらなかった (図 5)。

6. DDR1 に対する siRNA によって特発性肺線維症患者の肺線維芽細胞の DDR1 発現を抑制すると DDR1 刺激モノクローナル抗体による抗アポトーシ

ス作用が有意に抑制された (図 6)。

7. NF- $\kappa$ B インヒビターで特発性肺線維症患者の肺線維芽細胞の NF- $\kappa$ B 活性化を抑制すると DDR1 刺激モノクローナル抗体による抗アポトーシス作用が有意に抑制された (図 7)。

## 考 察

我々は特発性肺線維症患者の肺線維芽細胞において DDR1 が FasL によるアポトーシスに対して抵抗性に働くことを示した。特発性肺線維症において  $\alpha$ -SMA を発現する Myofibroblast はとくに病巣でのコラーゲンの産生と線維化に深く関与するといわれている<sup>13)</sup>。正常の場合は Myofibroblast は速やかにアポトーシスにより病巣から排除される<sup>11)</sup>。しかし特発性肺線維症においては TNF- $\alpha$  などの線維化に関与するサイトカインなどの作用もあいまって分化・活性化し<sup>14)</sup>、アポトーシスに対して抵抗性になるとも言われている<sup>15)</sup>。このように我々の研究結果は過去にも報告された肺線維症における肺線維芽細胞の特徴である抗アポトーシス作用に DDR1 が関与することを示

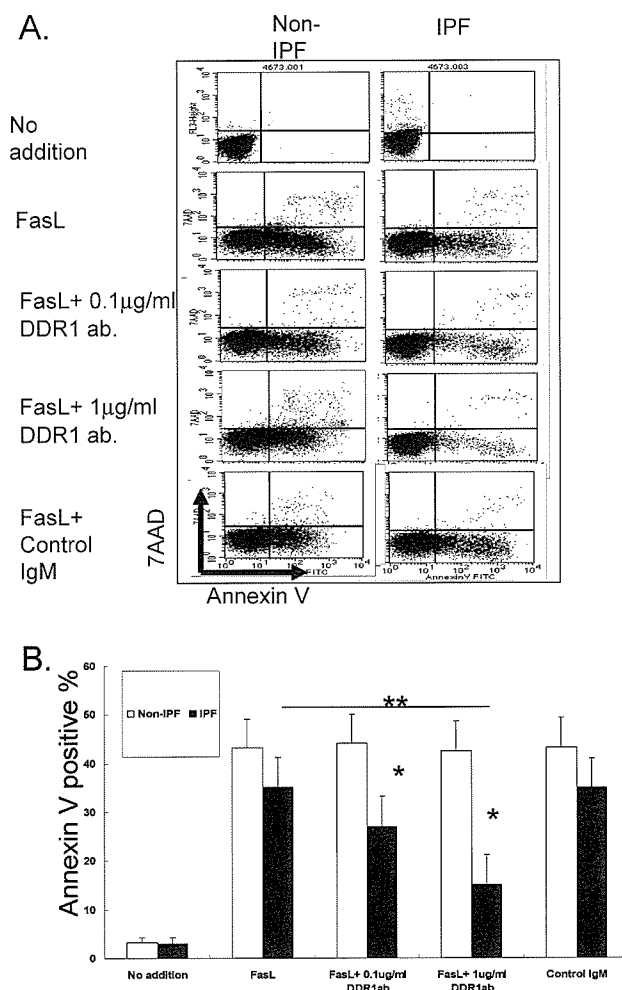


図4

す。特に DDR1 の ligand である collagen は特発性肺線維症の病巣において豊富に存在し<sup>8)</sup>、とくに肺線維芽細胞が遊走してくる際には collagen で構成される基底膜を通らなければならないこと<sup>16)</sup>を考えると特発性肺線維症の病巣において肺線維芽細胞の DDR1 が活性化され肺線維芽細胞の抗アポトーシス作用に深く関与し、腔内の線維化に貢献していることは容易に想像できる。

また我々の研究では肺線維芽細胞の DDR1 を活性化すると NF- $\kappa$ B が活性化された。NF- $\kappa$ B は抗アポトーシスに関与するシグナル因子で<sup>17)</sup>、さまざまな炎症性サイトカインの発現を誘導することも出来る<sup>18)</sup>。ブレオマイシンによる肺線維症のモデルマウスでも NF- $\kappa$ B を抑制すると肺の線維化が抑制されることが報告されている<sup>19)</sup>。DDR1 の抗アポトーシス作用に NF- $\kappa$ B を介することは今後の肺線維症における細胞内シグナルを解明するに当たり極めて重要と考える。

もちろん DDR1 の発現亢進が肺線維症に特異的なものかは不明であるが、少なくとも我々の研究で DDR1 と細胞外マトリックス構成成分の collagen との関わりが特発性肺線維症における肺の線維化に貢献していることが示唆され、特発性肺線維症において慢性に進行する肺の線維化の一つの要因になっていると考える。

#### 参考文献

- 1) Vogel W, Brakebusch C, Fassler R et al. Discoidin domain receptor 1 is activated independently of beta(1) integrin. *J Biol Chem* 2000; 275(8): 5779-5784.
- 2) Matsuyama W, Wang L, Farrar WL et al. Activation of discoidin domain receptor 1 isoform b with collagen up-regulates chemokine production in

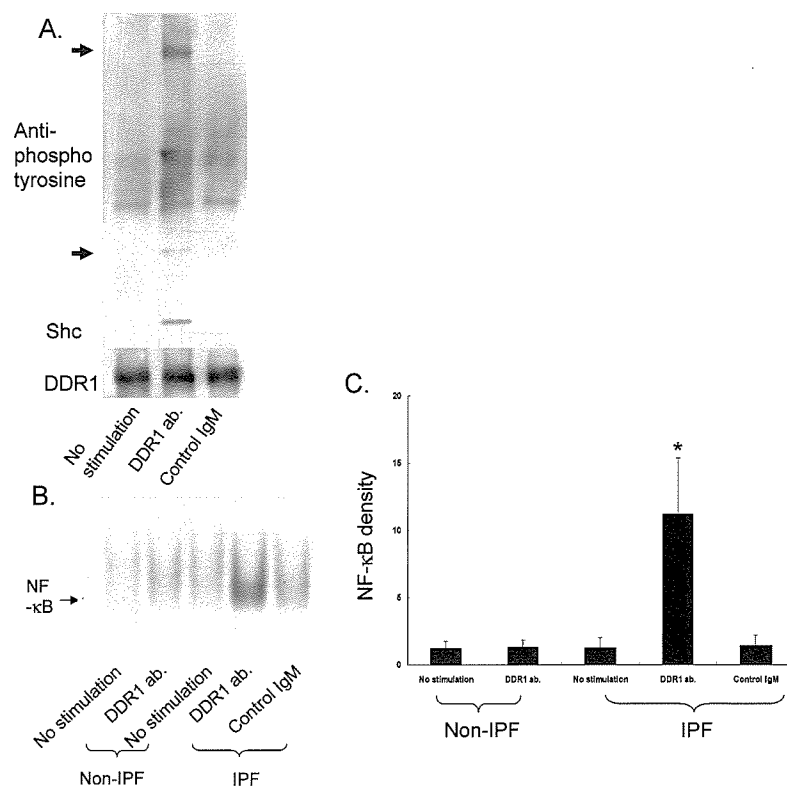


図 5

human macrophages: role of p38 mitogen-activated protein kinase and NF- $\kappa$ B. *J Immunol* 2004; 172(4): 2332-2340.

3) Matsuyama W, Kamohara H, Galligan C et al. Interaction of discoidin domain receptor 1 isoform b (DDR1b) with collagen activates p38 mitogen-activated protein kinase and promotes differentiation of macrophages. *FASEB J* 2003; 17(10): 1286-1288.

4) Matsuyama W, Faure M, Yoshimura T. Activation of discoidin domain receptor 1 facilitates the maturation of human monocyte-derived dendritic cells through the TNF receptor associated factor 6/TGF- $\beta$ -activated protein kinase 1 binding protein 1 beta/p38 alpha mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *J Immunol* 2003; 171(7): 3520-3532.

5) Matsuyama W, Watanabe M, Shirahama Y et al. Activation of Discoidin Domain Receptor 1 on CD14-Positive Bronchoalveolar Lavage Fluid Cells Induces Chemokine Production in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Immunol* 2005; 174(10): 6490-

6498.

6) Matsuyama W, Mitsuyama H, Watanabe M et al. Involvement of discoidin domain receptor 1 in the deterioration of pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33(6): 565-573.

7) Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(4 Pt 1): 1301-1315.

8) Khalil N, O'Connor R. Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment. *CMAJ* 2004; 171(2): 153-160.

9) Ramos C, Montano M, Garcia-Alvarez J et al. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24(5): 591-598.

10) Kuhn C, McDonald JA. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J*

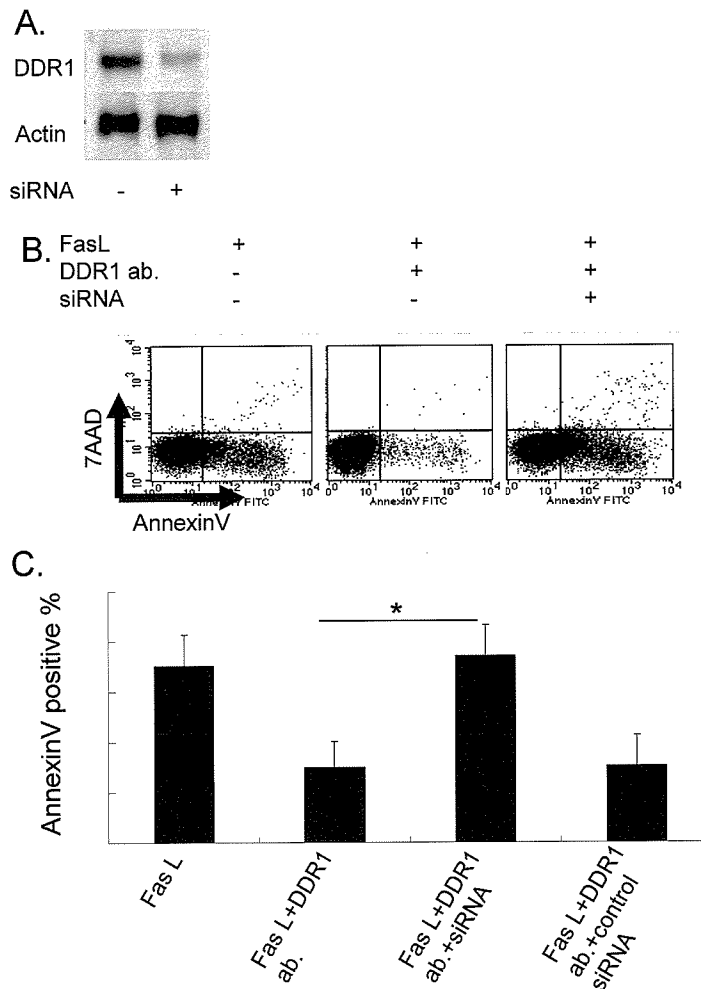


図 6

Pathol 1991 ; 138(5) : 1257-1265.

- 11) Moodley Y, Rigby P, Bundell C et al. Macrophage recognition and phagocytosis of apoptotic fibroblasts is critically dependent on fibroblast-derived thrombospondin 1 and CD36. *Am J Pathol* 2003 ; 162(3) : 771-779.
- 12) Tanaka T, Yoshimi M, Maeyama T et al. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human lung fibroblast. *Eur Respir J* 2002 ; 20(2) : 359-368.
- 13) Zhang K, Rekhter MD, Gordon D et al. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* 1994 ; 145(1) : 114-125.
- 14) Inoue Y, King TE, Jr., Barker E et al. Basic fibroblast growth factor and its receptors in idiopathic pulmonary fibrosis and lymphangioliomyomatosis.

*Am J Respir Crit Care Med* 2002 ; 166(5) : 765-773.

- 15) Moodley YP, Scaffidi AK, Misso NL et al. Fibroblasts isolated from normal lungs and those with idiopathic pulmonary fibrosis differ in interleukin-6/gp130-mediated cell signaling and proliferation. *Am J Pathol* 2003 ; 163(1) : 345-354.
- 16) White ES, Thannickal VJ, Carskadon SL et al. Integrin alpha4beta1 regulates migration across basement membranes by lung fibroblasts: a role for phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 ; 168(4) : 436-442.
- 17) Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002 ; 3(3) : 221-227.
- 18) Stambolic V, MacPherson D, Sas D et al. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* 2001 ; 8(2) : 317-325.

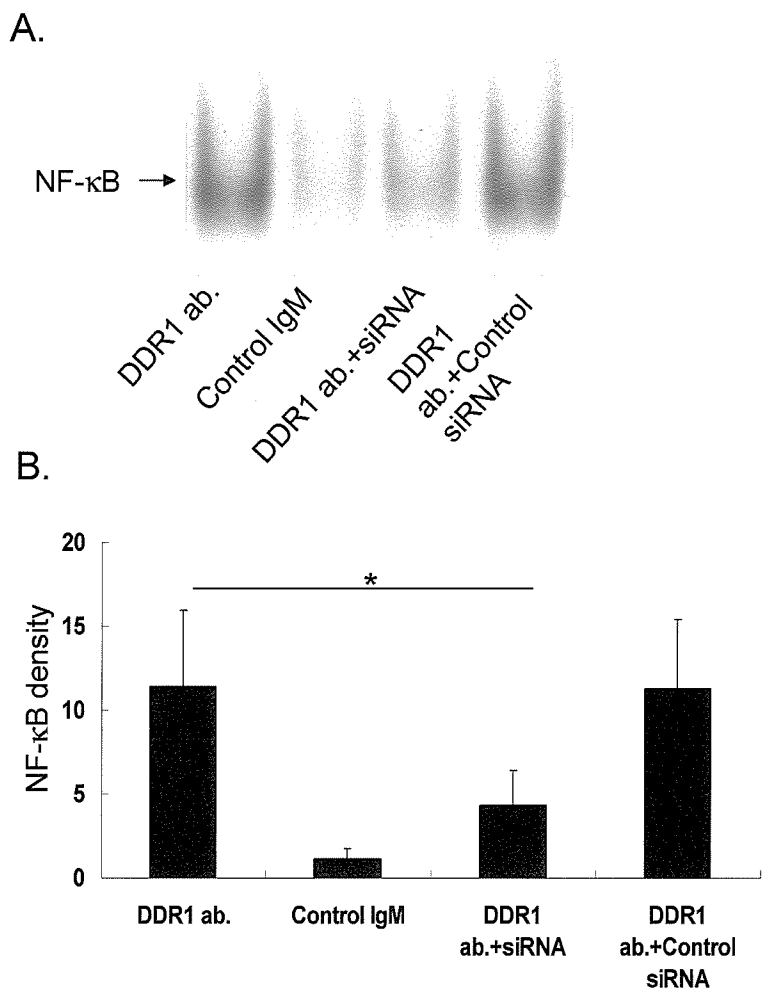


図 7

19) Zhang XY, Shimura S, Masuda T et al. Antisense oligonucleotides to NF- $\kappa$ B improve survival in bleomycin-induced pneumopathy of the mouse.

Am J Respir Crit Care Med 2000; 162(4 Pt 1): 1561-1568.

# 疾患患者で常染色体中に保存されている 同一先祖由来共有断片の探索を，全ゲノムレベルで 可能にするホモ接合ハプロタイプ法の開発

萩原 弘一\*

疾患感受性遺伝子（以後疾患遺伝子と記載）の探索を行う場合，多数の患者が常染色体中に共通に有する共通先祖由来の染色体断片（以後共通先祖由来断片と記載）を探索することは，単因子疾患，多因子疾患双方に有望な手法と考えられる。このような断片では患者間でハプロタイプが保存されており，それを利用して同定できるはずである。しかしながら，ハプロタイプ自体の同定は現在の手法では容易ではなく，全ゲノムレベルで高密度のハプロタイプを得ることは現時点では不可能に近い。我々は，ハプロタイプの代替として，ホモ接合ハプロタイプを考案した。ホモ接合ハプロタイプはホモ接合型の SNP のみを使用して導出するハプロタイプのサブセットであり，高密度 SNP 型情報より容易に得ることができる。2 コピーある相同染色体は同一のホモ接合ハプロタイプを取る。それゆえ 2 本の相同染色体を 1 本であるかのように取り扱うことができる。その結果として，多数の患者の相同染色体を直接比較することが可能になる。我々は，単因子疾患の例として常染色体優性遺伝である Marfan 症候群患者を多数有する大家系のサンプル，多因子疾患の例として 10-25 世代前に存在した共通先祖から由来する疾患遺伝子が原因となって生じた多因子疾患を有する仮想の患者集団の両者を使用して検討を行った。ホモ接合ハプロタイプを使用した解析により，両者で疾患遺伝子の存在領域を同定できた。ホモ接合ハプロタイプは，単因子疾患，多因子疾患の両者に対し，有望な疾患遺伝子同定法となると考えられる。

## **The Homozygosity Haplotype allows a genome-wide search for the autosomal segments shared among disease patients**

Koichi Hagiwara

*Department of Respiratory Medicine, Saitama Medical University*

When identifying disease susceptibility genes for both single and multiple gene diseases, a promising strategy is to search patients' autosomes for shared chromosomal segments derived from a common ancestor. Such segments are characterized by the distinct identity of their haplotype. The methods and algorithms currently available have only a limited capability for determining a high-resolution haplotype genome wide. We herein introduce the homozygosity haplotype (HH), a haplotype described by the homozygous SNPs that are easily obtained from a high density SNP genotyping data. The HH represents haplotypes of both copies of homologous autosomes, allowing for direct comparisons of the autosomes among multiple patients, and enabling the identification of the shared segments. The HH successfully detected the shared segments from members of a large family with Marfan syndrome that is an autosomal dominant single gene disease. It also detected the shared segments from patients with model multigene diseases originating from common ancestors who lived 10-25 generations ago. HH is therefore considered to be useful for the identification of disease susceptibility genes in both single gene diseases and multigene diseases.

はじめに

COPD など、多因子疾患の疾患遺伝子を同定するための現在使用されている方法は、疾患遺伝子とその近傍に存在する多型マーカーが、一緒に世代を超えて遺伝する (共分離) ことを利用している。一本の染色体上の多型マーカーの遺伝型の並びはハプロタイプと呼ばれる。多数の患者を有する大家系では、疾患遺伝子は通常単一の祖先に由来しており、この想定に基づいてハプロタイプ解析<sup>1)</sup> や連鎖解析<sup>2)</sup> が考案され、使用されてきた。同一の疾患を有する兄弟姉妹を解析する同胞解析では、2名の同胞が両親のいずれかから由来した疾患遺伝子を共有していると想定して解析する<sup>3)</sup>。全ゲノム関連解析では、疾患遺伝子は限られた数の古い過去の先祖から由来すると考え、ハプロタイプブロックを究極の検索単位として解析をする<sup>4-6)</sup>。いずれの解析においても、ハプロタイプは最も本質的な情報であるため、ハプロタイプが容易に決定できたなら、全ての解析が非常に容易なものとなると考えられる<sup>7)</sup>。しかしながら、ハプロタイプの決定は容易ではない。人間のような2倍体生物では、多型マーカーの遺伝型は2本の相同染色体上の2つのアレルの遺伝子型の重なりとして検出されるからである。ハプロタ

イプを決定する手法は多数考案されているが<sup>1,7-9)</sup>、それぞれ制限が多い。現時点では、全ゲノムレベルで任意の2名のハプロタイプを比較することは不可能であり、染色体上の共通先祖由来断片を検索することも困難である。本研究ではこれらの問題を部分的にせよ解決するため、ホモ接合ハプロタイプを導入する。ホモ接合ハプロタイプはホモ接合の SNP のみを使用したハプロタイプである。さらに本研究では、Marfan 症候群の大家系、および仮想の多因子疾患集団を使用して、ホモ接合ハプロタイプを利用した疾患解析を例示する。

材料と方法

用語定義

ホモ接合ハプロタイプ (Homozygosity haplotype: HH)

ホモ接合ハプロタイプはホモ接合の SNP のみを使用して導出する。まずヘテロ接合の SNP を除去し (図 1A (i)), ホモ接合の SNP のみを残す (図 1A (ii))。この時点で、双方の相同染色体上のハプロタイプは一意に決定される。なぜなら SNP 型がホモ接合であるため、相同染色体上の2つのアレルは同一の型を取る

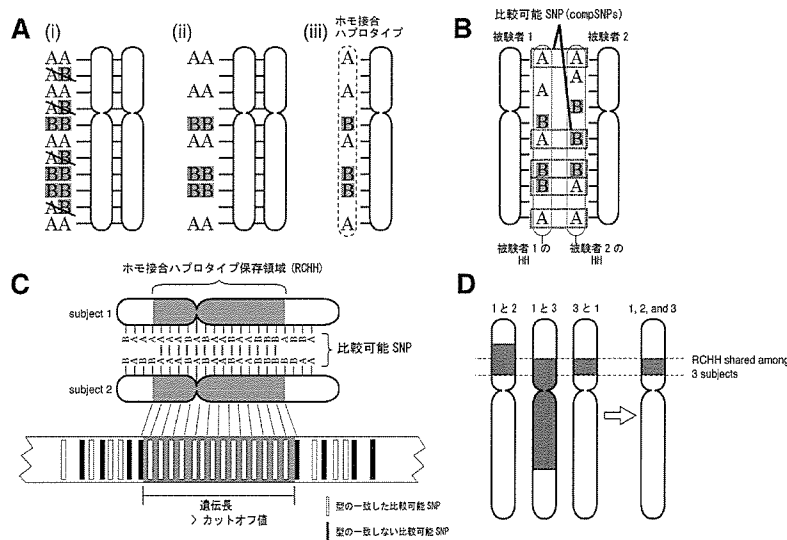


図1 ホモ接合ハプロタイプ解析

A: 各 SNP のメジャーハプロタイプ。B: 各 SNP のマイナーハプロタイプ (A), 比較可能 SNP の定義 (B), ホモ接合ハプロタイプ保存領域の定義。ホモ接合ハプロタイプ保存領域はカットオフ値以上の遺伝長を有する (C), 多数の患者で共有されているホモ接合ハプロタイプ保存領域の定義 (D)。

埼玉医科大学呼吸器内科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者



からである (図 1A (iii)). 2本の相同染色体のホモ接合ハプロタイプは、その全長に亘り同一となることに注意されたい。

### 比較可能 SNP (The comparable SNP: compSNP)

比較可能 SNP は 2名の被験者で共にホモ接合となる SNP である (図 1B). 2名の被験者のホモ接合ハプロタイプが同一かどうかは、その 2名の比較可能 SNP を比較することによって行う (図 1C).

### ホモ接合ハプロタイプ保存領域 (The region with a conserved HH: RCHH)

ホモ接合ハプロタイプ保存領域は、同一型の比較可能 SNP の連続した領域のうち、カットオフ値より長い遺伝長を有するものである (図 1C). ホモ接合ハプ

ロタイプ保存領域の断端は、型の一致しない比較可能 SNP か、または染色体の端である。多人数に共通するホモ接合ハプロタイプ保存領域は、その構成員各 2名のホモ接合ハプロタイプの積集合である (図 1D).

### 共通先祖由来領域 (The region from a common ancestor: RCA)

複数の被験者の共通の先祖の単一染色体から由来し、各被験者に共有されている染色体領域を共通先祖由来領域という (図 2A). 共通先祖由来領域では、各被験者は同一の断片を片方または両方の相同染色体上に有する。そのため、この領域では、各被験者は共通のホモ接合ハプロタイプを有することになる。逆に、被験者が同一のホモ接合ハプロタイプを有する領域があった場合、その領域は共通先祖由来領域である

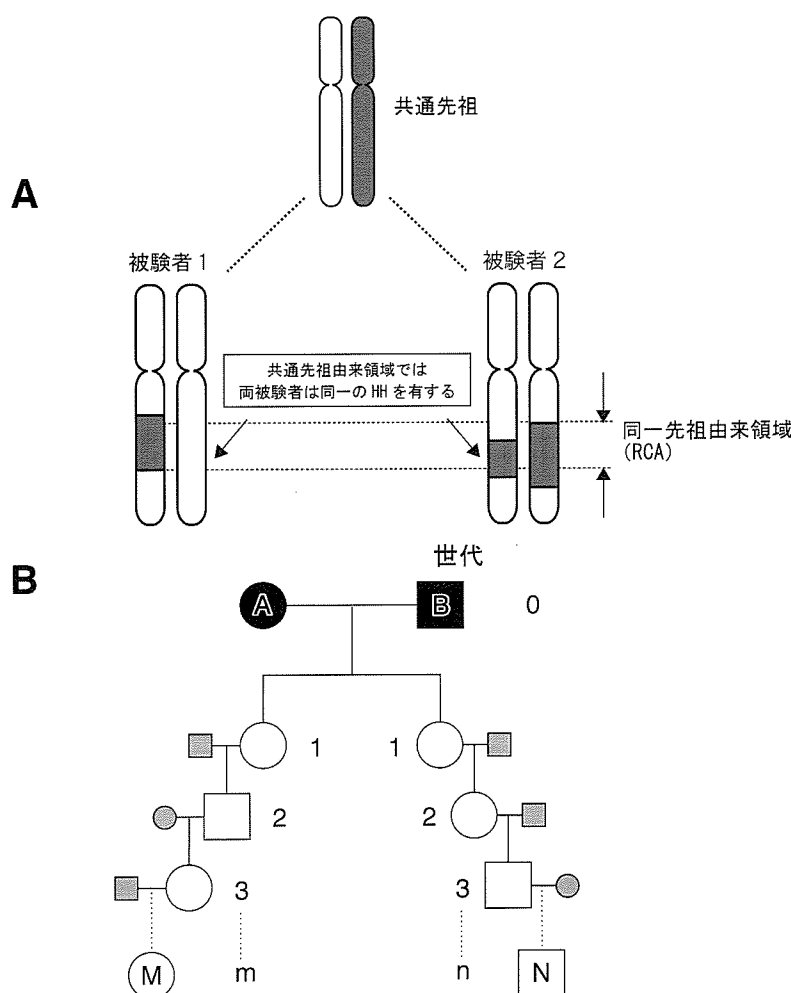


図 2 共通先祖由来領域 (RCA)

共通先祖由来領域の定義。灰色領域は単一の共通先祖由来の領域。近親婚のある場合、相同染色体の両方に断片が存在する可能性がある(A)。モデル家系。AとBは共通先祖。MとNは共通先祖から  $m$ ,  $n$  世代下流の子孫。直接子孫は白図形、それらの配偶者は灰色図形で示す (B)。

可能性がある。

共通先祖由来領域の平均長は、世代を追って短くなる。これは減数分裂時の染色体交叉が原因である。図 2B は共通先祖 A, B を有するモデル家系である。2 名の子孫 M, N は、それぞれ共通先祖から  $m$  世代、 $n$  世代目の子孫である。家系中の各直系子孫の配偶者 (図中灰色で示す) が A, B の子孫ではないと仮定した場合、M, N における A, B 由来の共通先祖由来領域の全長の全相同染色体長に対する割合  $RCA(m, n)$  は、以下の式で表される。

$$RCA(m, n: m \geq n) = \begin{cases} 2^{-m+1} & m \geq 1, n = 0 \\ \frac{3}{4} & m = 1, n = 1 \\ 2^{-m-n+2} & \text{otherwise.} \end{cases} \quad (\text{式 1})$$

式 1 の導出に関する詳しい解説は補遺を参照のこと。  $RCA(1, 0)$  が 1 となることに注意されたい。これは、親と子供 (すなわち  $m=1, n=0$ ) は、常染色体全長に亘ってホモ接合ハプロタイプが同一となることを示している。

### 染色体交叉モデルとデータ解析

われわれは染色体交叉モデルとして、Haldane の Poisson 過程モデル<sup>10)</sup> を使用し、全ての計算をこのモデルに基づいて行った。このモデルは、1 cM 遺伝距離がある場合、1 回の減数分裂で 1% の確率でその領域で交叉が起こるとする古典的なモデルである。このモ

デルに従うと、交叉間の距離は指数分布に従い、交叉の数は Poisson 分布に従うことになる。500 K GeneChips Mapping Array Set (Affymetrix 社) で使用されている SNP に関するデータは、GeneChip annotation files (6/15/2006 版: see Affymetrix のウェブサイトから入手) を使用した。このファイルに記載の各 SNP の各染色体単腕断端からの遺伝距離は、deCODE genetics 発表の、両性の平均データ<sup>11)</sup> から補間計算されたものである。ホモ接合保存領域の遺伝長は、両端のヘテロ接合の比較可能 SNP 間の遺伝距離として計算した。

解析は、GeneChip に使用されている SNP のうち、dbSNP データベースの refID (Genbank のウェブサイト参照) を有する SNP 492,554 個を対象として施行した。プログラムは C 言語で作成し、GNU C コンパイラ 4.0 版 (GNU コンパイラコレクションウェブサイト参照) でコンパイルした。

### ホモ接合ハプロタイプ保存領域、偽陰性、A 型偽陽性、B 型偽陽性

共通先祖を有する 2 名の被験者が同一の疾患を有している場合、同一先祖由来領域に疾患遺伝子が存在する可能性がある。多くの同一先祖由来領域はホモ接合ハプロタイプ保存領域に含まれていると考えられるため、ホモ接合ハプロタイプ保存領域を同定することにより疾患遺伝子の候補領域を同定しようと試みた。前記のように、ホモ接合ハプロタイプ保存領域

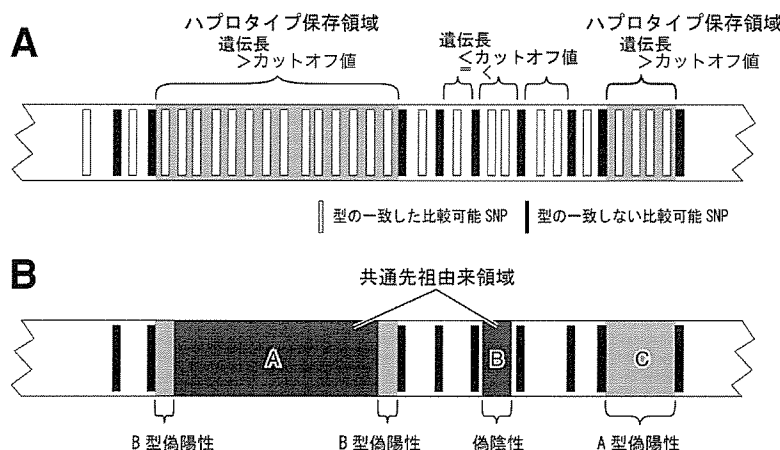


図 3 ホモ接合ハプロタイプ保存領域、偽陰性、A 型偽陽性、B 型偽陽性  
ホモ接合ハプロタイプ保存領域の検出。ホモ接合ハプロタイプ保存領域はカットオフ値より長い遺伝長を有する (A)。ホモ接合ハプロタイプ保存領域と共通先祖由来領域の関係。共通先祖由来領域を濃い灰色で、ホモ接合ハプロタイプ保存領域を薄い灰色で示す。3 種の過誤を定義している。

は同一遺伝型を有する比較可能 SNP の連続する領域であり、またその遺伝長はカットオフ値以上である (図 3A)。多くのホモ接合ハプロタイプ領域は同一先祖由来領域を含んでいるが、あるものは含んでいない。それらの割合を計算するため、まず我々は 3 種の過誤を定義した (図 3B)。偽陰性：同一先祖由来領域でホモ接合ハプロタイプ保存領域に含まれていないもの。A 型偽陽性：ホモ接合ハプロタイプ保存領域で同一先祖由来領域を含んでいないもの。B 型偽陽性：ホモ接合ハプロタイプ保存領域と、それが包含する同一先祖由来領域との間の隙間。これらの 3 種の過誤を計算する式に関しては補遺を参照のこと。まず解析を開始する前に、我々は全常染色体長に対するこれらの過誤の割合を、カットオフ値を変えてそれぞれ計算した。そして、これらの過誤の影響が最小となるカットオフ値を以後の解析に使用した。

## 被験者

この研究は、埼玉医科大学の倫理委員会によって承認されたものである。全ての DNA サンプルは、インフォームドコンセントを取得した後に、被験者の末梢血を採取し、そこから精製した。Marfan 症候群の患者を多数有する家系、及び 46 名の互いに親戚関係のない被験者について SNP 遺伝型を決定した。さらに、Affymetrix のウェブサイトの開示されている、国際ハップマッププロジェクトに参加した 45 名の互いに親戚関係のない被験者の SNP 遺伝型 (各人平均 199,400 個の SNP が 0.05 以下の confidence 値を有していて使用可能) を使用した。

## SNP 遺伝型の決定

全ゲノムレベルの SNP 遺伝型の決定は、500 K GeneChips Mapping Array Set (the GeneChip Human Mapping 250 K Nsp Array と the GeneChip Human Mapping 250 K Sty Array の 2 枚のアレイから成る) (Affymetrix) の 1 枚のアレイまたは 2 枚両方を使用して行った。以後 the 500 K GeneChips Mapping Array Set を 500 k GeneChip と、the GeneChip Human Mapping 250 K Nsp Array を 250 k GeneChip と記載する。Marfan 症候群の解析には 500 k GeneChip を使用した。多因子疾患モデルの解析は 250 k GeneChip

で行った。

## 患者プール

共通先祖由来領域を共有する患者の SNP 遺伝型データは、各患者の SNP 遺伝型データの一部を、この研究で共通先祖と規定した特定の患者の SNP 遺伝型データと置き換えて作成した。置換データの長さ ( $x$ ) は、

$$f(x) = \lambda e^{-\lambda x} \quad \lambda = \frac{m}{100}(cM^{-1}), \quad (\text{式 2})$$

の確率密度関数を有する指数関数分布に従う乱数から無作為に抽出した。

## 統計解析

ホモ接合ハプロタイプ保存領域を共有する被験者の数を「患者群」と「対照群」とで比較した。ここで  $x_1$  をハプロタイプ保存領域を共有する「患者群」被験者数、 $x_2$  をハプロタイプ保存領域を共有する「対照群」被験者数、 $\hat{P}_1^* = \frac{x_1 + 0.5}{n_1 + 1}$ 、 $\hat{P}_2^* = \frac{x_2 + 0.5}{n_2 + 1}$ 、 $\hat{P}^* = \frac{x_1 + x_2 + 0.5}{n_1 + n_2 + 1}$  とした場合、

$$u_0 = \frac{\hat{P}_1^* - \hat{P}_2^*}{\sqrt{\hat{P}^*(1 - \hat{P}^*)\left(\frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}\right)}}$$

が標準正規分布に従うとして  $P$  値を計算した。 $P$  値の値は、

$$P = \int_{u_0}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2}} dx$$

で算出した。

## 結果

### Marfan 症候群家系解析

ホモ接合ハプロタイプの家系解析における有用性を、多数の Marfan 症候群を有する大家系を対象として検討した。Marfan 症候群は全身の結合組織の異常を主徴とする常染色体優性遺伝疾患で、染色体 15 番 q21.1 に存在する fibrillin-1 遺伝子 (FBN-1) または染色体 3 番 p24.2 に存在する TGF- $\beta$ 2 型受容体遺伝

子の異常が原因であることが知られている<sup>12)</sup>。対象家系は既に検索が行われた家系で、6名の有症状患者と3名の無症状保因者が、FBN-1 の 1879C>T (R627C) 変異をヘテロ接合で有していることが分かっている (図 4A)。被験者 I-1 は、この疾患遺伝子に関して、対象家系の共通先祖と考えられる。解析に当たり、我々は以下の2つの疑問を解決することにした。(i) ホモ接合ハプロタイプは6名の有症状患者データより FBN-1 遺伝子存在領域を同定できるか。(ii) さらに3名の無症状保因者のデータを加えることにより、存在領域をさらに狭めることができるか。

解析に先立ち、我々は SNP 遺伝型解析データの正確度に関して検討した。式 1 より、親子間ではホモ接合ハプロタイプは同一になるので、両者間の型の一致

した比較可能 SNP と全比較可能 SNP の比は、SNP 遺伝型決定の正確度を反映するはずである。我々は、3ペアの被験者 II-1 と III-4、II-3 と III-1、II-5 と III-3 に関して検討した。GeneChip 解析では、各 SNP の遺伝型は confidence 値と共に出力される。confidence 値が低いほど正確な遺伝型と考えられる。3被験者ペアでの比較可能 SNP の遺伝型の一致率を図 4B 及び 4C に示した。このデータより、confidence 値のカットオフ値として 0.05 を使用することにした。

次に我々は、ホモ接合ハプロタイプ保存領域を定義するためのカットオフ値 (以後ホモ接合ハプロタイプ保存領域カットオフ値と記載) を決定した。図 4D はホモ接合ハプロタイプ保存領域カットオフ値と3種の過誤との関係を示したものである。我々はカット

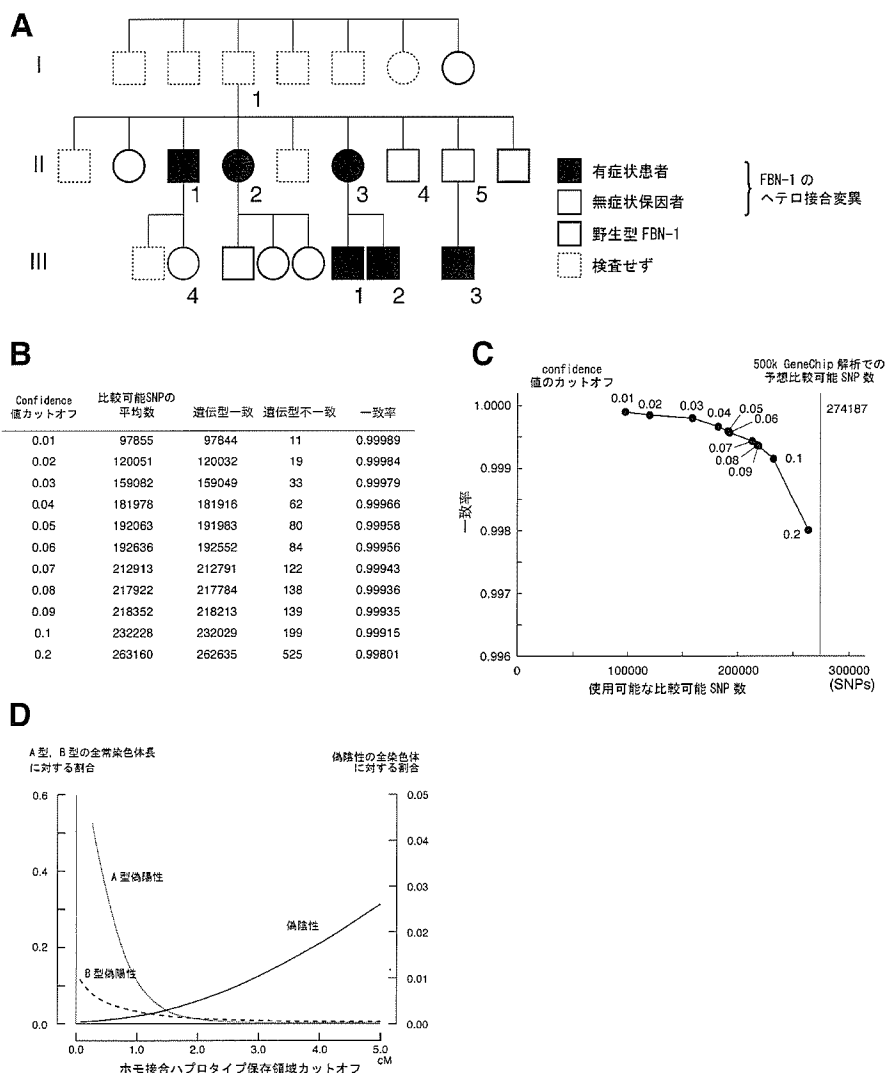


図 4 GeneChip データの正確度 Marfan 症候群家系 (A)、confidence カットオフ値と一致割合 (B)、(B) の図示 (C)、世代 III の 2 名の被験者間での偽陰性と、A 型偽陽性、B 型偽陽性の平均値の全常染色体領域に対する割合を、各種ホモ接合ハプロタイプ保存領域カットオフ値に対して図示した (D)。