

が高いが、日本人の報告が圧倒的に少なく、これらは海外での発症が多いDADを起こす薬剤である可能性を示している。

## D. 考 察

2006年4月に日本呼吸器学会から発刊された「薬剤性肺障害の評価、治療についてのガイドライン」<sup>2)</sup>では、薬剤性肺障害に対して臨床医の適切な対応のための情報が掲載されている。しかし、事態の性質から根拠となる学術論文の大半が、無作為化試験を組むことが困難な領域であり、したがってエビデンスレベル4（無作為化されていない後ろ向き解析）あるいはエビデンスレベル5（症例集積あるいはコントロールのない臨床報告など）に止まっている。唯一、肺障害の多発したgefitinibは、きわめて治療効果の期待される症例が存続することから、従来の化学療法と比較する形で、薬剤性肺障害の前向き試験を組むことができた画期的な事例である<sup>3)</sup>。しかし、人種差を明らかにするためには、少なくとも投与量や投与期間などの、患者背景が合致する群間で比較してはじめて、エビデンスレベルの高い議論が成立する。

薬剤関連肺障害の情報を得ようとするとき、情報が比較的得やすく繁用されているのは厚生労働省ホームページ(<http://www.mhlw.go.jp/index.html>)からアクセスできる、「医薬品等安全性関連情報」であり、国際的、科学的情報収集についてはPNEUMOTOX(<http://www.pneumotox.com>)がある。そのため、本研究では、国際比較を念頭に置き、PNEUMOTOXの情報からびまん性肺泡損傷(DAD)を来す薬剤を検索し、検討、考察した。

その結果、最近注目されたDADをきたす薬剤については、やはりPNEUMOTOXによって検索

された論文からも裏付けられる傾向にあった。しかし、このように論文を情報源として類推することは、疫学的推論を行う場合バイアスがかかる。特に、人種間格差を論じる場合、複数のアプローチで傾向を確認する必要があると思われる。さらに、日本人により少ない傾向にある薬剤の可能性も考えに入れておく必要があるだろう。

Gefitinibやleflunomideに象徴されるように、日本人は薬剤により致命的急性肺障害に陥りやすいのではないかという疑問は、もう一つの大きな命題、すなわち背景にある間質性肺炎・肺線維症の急性増悪が、日本人で多いのではないかという疑問と呼応している。これまで特発性肺線維症(IPF)の急性増悪は、日本からの報告が多い事実がある。しかし、ATSガイドラインでは世界中で普遍的な病態であるという見方が強く、共通認識の普及に重心が置かれている<sup>4)</sup>。情報の共有は大変重要な作業であるが、誤った認識を誘導する危険性がある。

## E. 結 論

今回のテーマである薬剤性肺障害が日本人に多いか、否か？頻度の差を「多い場合」と「少ない場合」を想定しながら、グローバル化する医薬品開発に対して、日本人の安全を確保するために、その裏側にある検証作業を、進めていかなければならない。

## 文 献

- 1) Azuma A, Kudoh S. High Prevalence of Drug-induced Pneumonia in Japan. *Japan Medical Association Journal (JMAJ)* 50(5):405-411, 2007.
- 2) 薬剤性肺障害の評価、治療についてのガイドライン「呼吸器専門医、一般臨床医家に向け

た情報提供と適切な対応を期待して」、編集：  
日本呼吸器学会薬剤性肺障害ガイドライン作  
成委員会.2006年4月.

- 3) Kudoh S, Kato H, Nishiwaki Y, et al. Interstitial lung disease in Japanese lung cancer patients—A cohort and nested case—control study. *Am J Respir Crit Care Med* (in press)
- 4) Collard H et al. IPF Net Investigation. Pulmonary Perspectives: Acute exacerbation of IPF. *Am J Respir Crit Care Med* 176 (7):636—43,2007.
- 5) 市販後のベルケイド安全性情報 <http://www.janssen.co.jp/sickness/velcade/safety.html>

## F. 健康危険情報

上記のとおり

## G. 研究発表

1. Azuma A, Kudoh S. High Prevalence of Drug—induced Pneumonia in Japan. *Japan Medical Association Journal (JMAJ)*50(5): 405—411, 2007.
2. Kudoh S, Kato H, Nishiwaki Y, et al. Interstitial lung disease in Japanese lung cancer patients—A cohort and nested case—control study. *Am J Respir Crit Care Med* (in press)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 薬剤性肺障害の発現状況の国際比較に関する研究 分担研究報告

### Gefitinib使用患者における血清KL-6値 モニタリングの意義に関する研究

石川 暢久 広島大学大学院医歯薬学総合研究科・分子内科学 助教  
服部 登 広島大学大学院医歯薬学総合研究科・分子内科学 准教授  
河野 修興 広島大学大学院医歯薬学総合研究科・分子内科学 教授

#### 研究要旨

【背景】我々は間質性肺疾患の血清マーカーであるKL-6は、薬剤性肺障害の重症度や予後の指標になりうること、肺癌の腫瘍マーカーとしての性質も有することを報告してきた。【目的】Gefitinibの使用前後でKL-6値を測定し、その測定意義を後ろ向きに検討すること。【方法】Gefitinib治療を受けた非小細胞肺癌76症例を検討対象として、血清KL-6値、CEA値、CYFRA値を治療前後でモニタリングした。【結果】1)Gefitinibによる薬剤性肺障害発症例（6症例）の検討では、経過中血清KL-6値が上昇しなかった3症例は、治療に反応したが、KL-6が上昇した3症例は、gefitinib投与中止ならびに副腎皮質ステロイドパルス療法などの治療に抵抗性であった。2)Gefitinibによる薬剤性肺障害非発症例（70症例）では、治療前血清KL-6値が高値を示す症例はGefitinib治療に対して反応性が乏しくかつ予後不良であった。治療開始後2週間でのKL-6の変化は、gefitinib治療の反応性ならびに予後を早期に予測可能であることが明らかになった。【結論】Gefitinib治療開始前後で血清KL-6値が上昇してくる症例は、gefitinibによる致死的な薬剤性肺障害の発症あるいはgefitinib治療に反応性が乏しい可能性が高く、胸部X線CT検査を行い、治療方針を決定することが重要と思われる。

#### A. 研究目的

薬剤の開発がグローバル化する中で、上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤（epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors; EGFR-TKI）の臨床効果とその薬剤性肺障害の発生頻度に人種的な差異を認めることが明らかと

なった。その解明は、EGFR-TKIの有効症例が多い一方で、薬剤性肺障害も多いとされるわが国が先進的に進めるべき重要な研究課題であり、gefitinib治療の適応を早期に正確に予測できれば、無効な治療を受ける患者を減らし、最適な治療を患者に与えることが可能と思われる。

KL-6は私達の発見した高分子量糖蛋白であり、

ヒトMUC1ムチンにクラスター分類されたものであり、間質性肺炎に特異性の高い診断マーカーとして臨床応用されている。少数例(30例)の検討ではあるが、KL-6が薬剤性肺障害と呼吸器感染症との鑑別、薬剤性肺障害の重症度や予後の指標になりうることを報告してきた。一方で、KL-6は当初肺腺癌の組織マーカー、血清腫瘍マーカーとして開発された経緯もあり、肺癌の診断マーカーとしても有用性が示唆されている。

以上の背景より、本研究では薬剤性肺障害を惹起しやすいgefitinibの使用前後において、血清KL-6値の測定意義すなわち薬剤性肺障害早期発見の可能性、薬剤性肺障害の治療反応性、薬剤性肺障害の予後の予測の可能性などを明らかにすることを目指したい。

## B. 研究方法

病理学的に非小細胞肺癌と診断され、広島大学病院ならびに愛媛大学病院で2002年8月から2007年5月までにgefitinib治療を受けかつ患者本人から文書で同意が得られた症例を対象とした。具体的には、以下の基準（臨床病期：ⅢB期、Ⅳ期または術後再発、前治療として、化学療法を1レジメン以上施行、年齢：20歳以上、上限なし、PS (ECOG)：0-3、測定可能病変を有する、主要臓器機能が保たれている）を満たした74症例に、他院でgefitinibの投与が開始され、gefitinibによる薬剤性肺障害が発症した後に広島大学病院に転院した2症例も検討に加え、計76症例を検討対象とした。

治療前後で経時的に血清を採取し、遠心分離した後、-80℃で凍結保存し、その後、血清KL-6値、CEA値、CYFRA値を測定し、その臨床的意義について検討を行った。さらに33症例のホルマリン固定後の診断時の肺癌組織を入手し、EGFR遺伝

子変異の有無についてPNA-LNA PCR clamp法を用いて検討した。剖検時に採取された薬剤性肺障害組織におけるKL-6の発現を免疫組織染色により検討した。

（倫理面への配慮）

本研究の対象者は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に沿って作製され、当院のヒトゲノム研究倫理審査研究会で承認された文書によるインフォームド・コンセントが得られた症例とした。患者のプライバシーを厳守して研究を実施している。

## C. 研究結果

### 1) 薬剤性肺障害発症例におけるKL-6モニタリングの意義(Table 1, Figure 1)

Gefitinibによる薬剤性肺障害が発症した6症例におけるKL-6値をモニタリングし、臨床的意義について検討を行った。経過中血清KL-6値が上昇しなかった3症例は、治療に反応し薬剤性肺障害は改善した。一方で、KL-6が経過中に上昇した3症例は、胸部CT上は急性間質性肺炎パターンに分類され、gefitinib投与中止並びに副腎皮質ステロイドパルス療法などの治療に反応せずに死亡した。死後3症例すべてに剖検が行われたが、新旧のDADが混在するという従来のgefitinibによる薬剤性肺障害に合致する所見であった。新旧のDAD組織を抗KL-6抗体によって組織免疫染色を施行した所、器質化しつつある古いDAD組織と比較して、新しいDAD組織で上皮細胞においてKL-6タンパクが強く染色された。

### 2) 薬剤性肺障害非発症例におけるKL-6モニタリングの意義(Table 2, Figure 2, 3, 4)

Gefitinibによる薬剤性肺障害を発症しなかつ

た70症例についても血清KL-6モニタリングの意義について検討した。患者背景と治療前の血清KL-6値はいずれの臨床病理学的因子とも相関を認めなかった。治療効果に関与する臨床病理学的因子としては、これまでに報告されている性別、喫煙歴、PSなどのほかに治療前の血清KL-6値が高い患者群では、gefitinib治療に対して反応性が乏しかった。

Gefitinib治療前の血清KL-6値と予後の検討では、KL-6値が高い患者群は、overall survival (OS) ならびにprogression-free survival (PFS)ともに有意に予後不良であった。血清CEA値、血清CYFRA値については、生存期間に有意差を認めなかった。さらに、多変量予後解析の結果、gefitinib治療前の血清KL-6高値は独立した予後不良因子であった。

Gefitinib治療開始前後での血清KL-6値の変化と治療効果について検討した。Gefitinib治療前と治療開始後2週および4週後に血清KL-6値を測定し、治療開始後のKL-6値の増加は、進行

(progressive disease; PD)患者群で有意に大きいことがわかった。次に治療前後の血清KL-6値の変化と予後について検討した所、2週後、4週後とも、KL-6 ratio (治療前後の比) が1.2未満の症例では、gefitinibによる生存期間の延長が期待されることがわかった。EGFR遺伝子変異を検討しえた33症例中、18例にEGFR遺伝子変異を認め、変異のある症例では、PFSの延長を認めたが、OSの延長を認めなかった。

Table 1. Characteristics of patients with gefitinib-induced interstitial lung disease (N=6)

Number	Age	Sex	Smoking history	Histologic type	EGFR Mutation	Onset (days)	CT findings	Current status
1	73	M	Current	ADC*	ND **	10	AIP ***	Non-survivor
2	84	F	Former	ADC	Wild	16	AIP	Non-survivor
3	68	F	Never	ADC	Wild	15	AIP	Non-survivor
4	60	M	Never	ADC	ND	35	AEP ****	Survivor
5	67	F	Never	ADC	Deletion	44	Non specific	Survivor
6	57	M	Former	ADC	L858R	51	AEP	Survivor

\*ADC: adenocarcinoma

\*\*ND: not detected

\*\*\*AIP: Acute Interstitial Pneumonia

\*\*\*\*AEP: Acute Eosinophilic Pneumonia

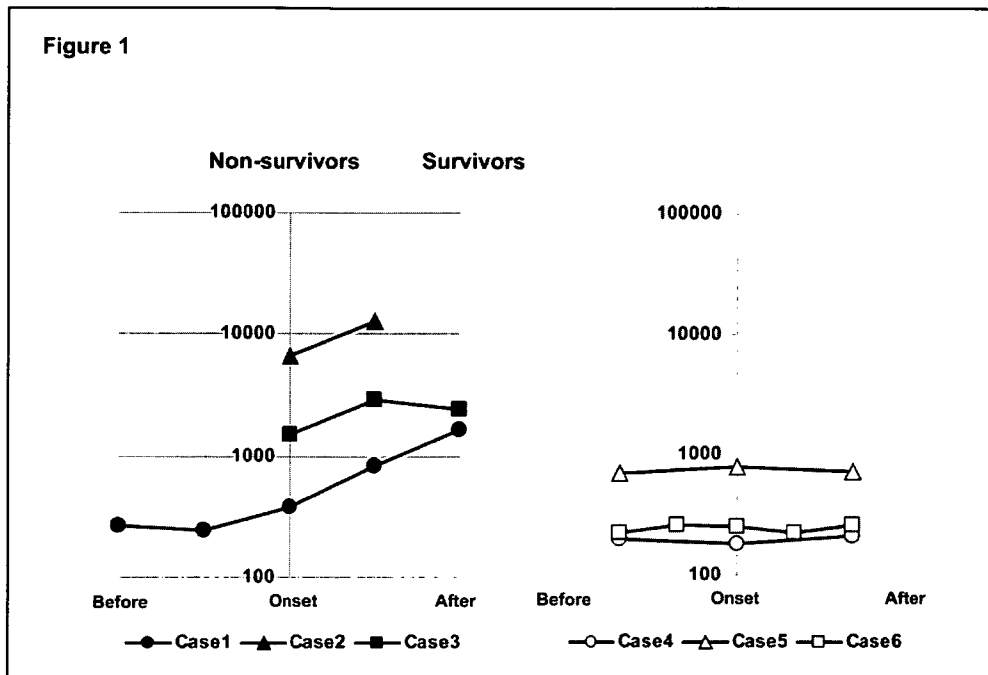


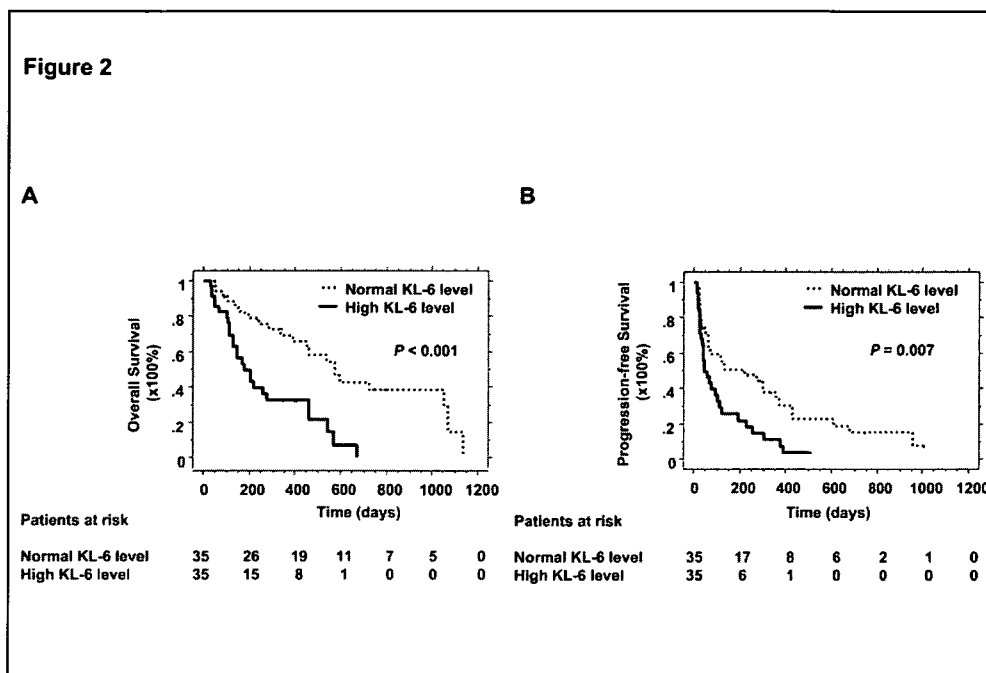
Figure. 1

Serum KL-6 levels in patients with gefitinib-induced interstitial lung disease. Serum levels of KL-6 in survivors did not increase. Serum levels of KL-6 in non-survivors increased without responding to treatment.

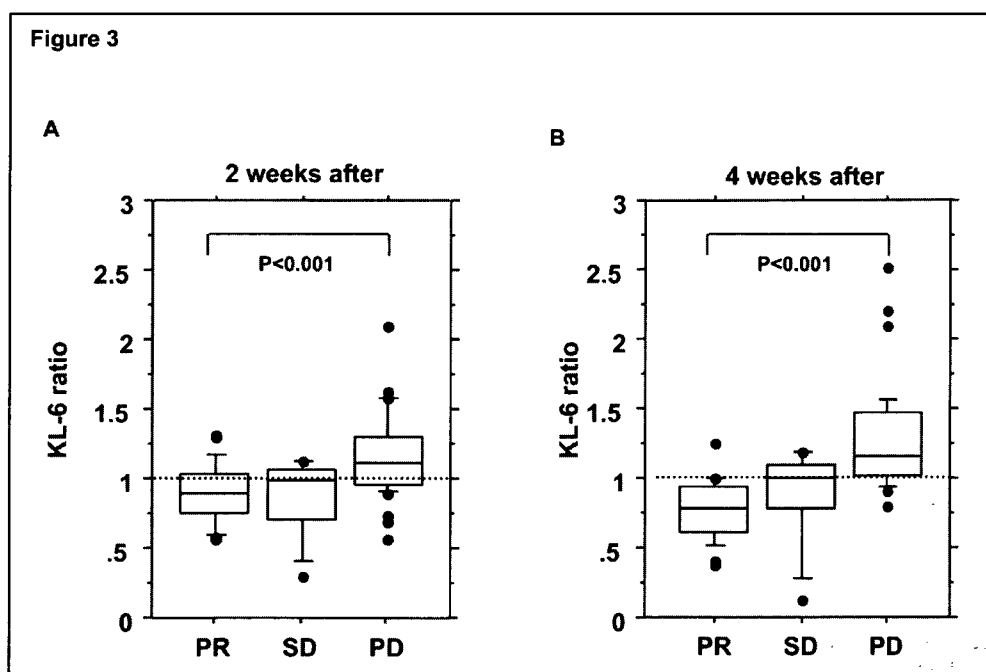
**Table 2. Association between the NSCLC patient characteristics and the response to EGFR-TKI therapy (N = 70)**

Variables	Total n = 70	KL-6 ≥ 500 n = 35	KL-6 < 500 n = 35	P-value
Age				
<60	32	16	16	
≥60	38	19	19	>0. 999
Sex				
Male	42	22	20	
Female	28	13	15	0. 808
Histologic type				
ADC	58	29	29	
SCC	9	4	5	>0. 999*
ASC	3	2	1	
Disease stage				
IIIB	8	4	4	
IV	45	25	20	>0. 999**
Recurrence after surgery	17	6	11	
Performance Status				
<2	55	26	29	
≥2	15	9	6	0. 561
Smoking history				
Never	30	15	15	
Former	21	8	13	>0. 999***
Current	19	12	7	
No. of prior chemotherapy regimens				
<2	45	23	22	
≥2	25	12	13	>0. 999
Serum CEA level				
Normal	16	8	8	
High	54	27	27	>0. 999
Serum CYFRA21-1 level				
Normal	17	9	8	
High	48	22	26	0. 779

Abbreviations: ADC, adenocarcinoma; SCC, squamous cell carcinoma; ASC, adenosquamous cell carcinoma.  
 \* Adenocarcinoma versus other histology (squamous cell carcinoma and adenosquamous cell carcinoma).  
 \*\* IIIB versus others  
 \*\*\* Never versus others  
 P < 0. 05 (Fisher's exact test)



**Figure. 2**  
The overall survival and progression-free survival of the 70 patients with advanced NSCLC treated with EGFR-TKI in relation to the serum KL-6 (A and B) levels. Differences between the two groups were evaluated using the log-rank test.



**Figure. 3**  
The ratios of the serum KL-6 levels obtained 2 weeks (A) and 4 weeks (B) after the start of EGFR-TKI to the pretreatment serum KL-6 level. The response to EGFR-TKI was evaluated in the 70 patients with advanced NSCLC. Twenty-five, 9, and 36 patients were categorized into partial response (PR), stable disease (SD), and progressive disease (PD), respectively. Differences among the three groups were evaluated with the Kruskal Wallis test.

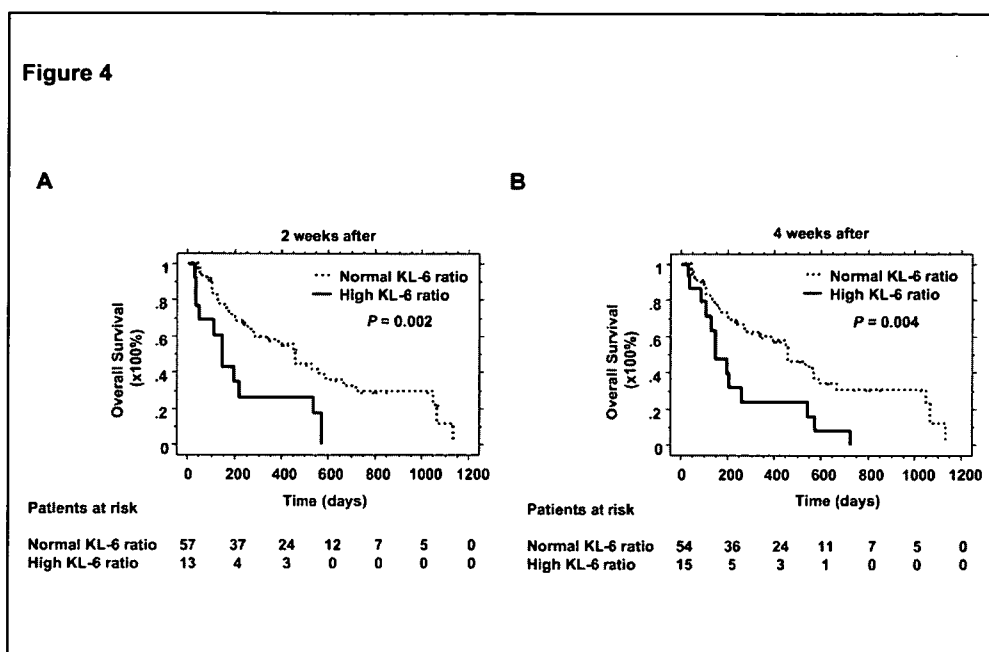


Figure. 4

The overall survival of the 70 patients with advanced NSCLC treated with EGFR-TKI in comparison to the ratios of the serum KL-6 levels obtained 2 weeks (A) and 4 weeks (B) after the start of EGFR-TKI to the pretreatment serum KL-6 level. After we set the cut-off value for this ratio as described in the Results section, the studied patients were divided into those with high ( $\geq 1.2$ , high KL-6 ratio group) and those with low ( $< 1.2$ , normal KL-6 ratio group) serum KL-6 ratios. Differences between the two groups were evaluated using the log-rank test.

**Table 3. Association between the characteristics of NSCLC patients who were treated with EGFR-TKI and circulating KL-6 levels (N = 70)**

Variables	Total n=70	PR n=25	SD n=9	PD n=36	P-value (PR vs SD+PD)	P-value (PR+SD vs PD)
Age(Years)						
< 60	32	9	4	19		
$\geq 60$	38	16	5	17	0.3171	0.241
Sex						
Male	42	8	5	29		
Female	28	17	4	7	<0.001 <sup>+</sup>	<0.001 <sup>+</sup>
Histologic type						
ADC	58	22	7	29		
SCC	9	3	1	5	0.517*	0.754
ASC	3	1	0	2		
Disease stage						
IIIB	8	1	3	4		
IV	45	17	3	25	0.244**	>0.999**
Reoccurrence after surgery	17	7	3	7		
Performance status						
< 2	55	22	9	24		
$\geq 2$	15	3	0	12	0.226	0.019 <sup>+</sup>
Smoking history						
Never	30	18	4	8		
Former	21	5	3	13	<0.001*** <sup>+</sup>	<0.001*** <sup>+</sup>
Current	19	2	2	15		
No. of prior chemotherapy regimens						
< 2	45	19	7	19		
$\geq 2$	25	6	2	17	0.193	0.048 <sup>+</sup>
Serum KL-6 level (U/ml)						
Medium		403	298	648.5	0.180	0.039 <sup>+</sup>
Range		186-4201	200-9475	155-8300		
Serum CEA level (ng/ml)						
Medium		24.6	11.0	22.6	0.394	0.996
Range		1.2-736.4	1.0-408.2	0.8-1040.4		
Serum CYFRA 21-1 level						
Medium		6.1	3.5	5.1	0.967	0.477
Range		0.9-58.4	0.9-9.9	1.5-267.5		

ADC, adenocarcinoma; SCC, squamous cell carcinoma; ASC, adenosquamous cell carcinoma,

\* Adenocarcinoma versus other histology (squamous cell carcinoma and adenosquamous cell carcinoma),

\*\* IIIB versus others

\*\*\* Never versus others

P < 0.05 (Fisher's exact test or Mann-Whitney test)



**Table 4A. Cox's proportional hazards model analysis of the overall survival in patients with NSCLC**

Variables	Hazards ratio	95% CI	Unfavorable/Favorable	P-value
Univariate analysis				
Age ( years )	1. 291	0. 710-2. 351	60 ≥ / <60	0. 403
Sex	1. 680	0. 913-3. 289	Male / Female	0. 095
Histology	1. 650	0. 812-3. 444	Others/ ADC	0. 166
Stage	1. 071	0. 476-2. 410	Others / IIIB	0. 869
Performance status	7. 289	3. 463-15. 346	2 ≥ / <2	<0. 001 <sup>+</sup>
Smoking history	1. 539	0. 844-2. 807	Smoker / Never	0. 1598
Serum KL-6 level	3. 336	1. 744-6. 380	High / Normal	<0. 001 <sup>+</sup>
Serum CEA level	1. 846	0. 824-4. 136	High / Normal	0. 403
Serum CYFRA21-1 level	1. 973	0. 912-4. 271	High / Normal	0. 084
Multivariate analysis				
Performance status	7. 163	3. 395-15. 113	2 ≥ / <2	<0. 001 <sup>+</sup>
Serum KL-6 level	3. 285	1. 714-6. 295	High / Normal	0. 003 <sup>+</sup>

Abbreviations: ADC、 adenocarcinoma

P &lt; 0. 05 (Cox's proportional-hazard regression model with a step-down procedure)

+

**Table 4B. Cox's proportional hazards model analysis of the progression-free survival in patients with NSCLC**

Variables	Hazards ratio	95% CI	Unfavorable/Favorable	P-value
Univariate analysis				
Age ( years )	1. 069	0. 632-1. 808	60 ≥ / <60	0. 805
Sex	2. 661	1. 506-4. 704	Male / Female	0. 001 <sup>+</sup>
Histology	1. 563	0. 811-3. 012	Others/ ADC	0. 183
Stage	1. 391	0. 654-2. 958	Others / IIIB	0. 391
Performance status	1. 829	0. 965-3. 465	2 ≥ / <2	0. 064
Smoking history	2. 059	1. 198-3. 538	Smoker / Never	0. 009 <sup>+</sup>
Serum KL-6 level	2. 081	1. 205-3. 594	High / Normal	0. 009 <sup>+</sup>
Serum CEA level	1. 513	0. 799-2. 866	High / Normal	0. 204
Serum CYFRA21-1 level	1. 244	0. 651-2. 375	High / Normal	0. 509
Multivariate analysis				
Sex	2. 011	0. 959-4. 218	Male / Female	0. 065
Smoking history	1. 413	0. 692-2. 886	Smoker / Never	0. 342
Serum KL-6 level	2. 028	1. 148-3. 584	High / Normal	0. 015 <sup>+</sup>

Abbreviations: ADC、 adenocarcinoma

+ P &lt; 0. 05 (Cox's proportional-hazard regression model with a step-down procedure)

## D. 考 察

少数例（6症例）での検討ではあるが、血清KL-6値はgefitinibによる薬剤性肺障害、特に致死性肺障害であるdiffuse alveolar damage(DAD)を来す症例で上昇する可能性が示唆された。剖検症例を用いた免疫組織学的検討では、KL-6タンパクは新旧のDADの中でも特に新しいDADで発現が強いことがわかった。今後、多施設の前向きな研究でgefitinibによる薬剤性肺障害における血清KL-6値モニタリングの意義について検討を行い、強いエビデンスを作る必要があると思われる。

Gefitinibによる薬剤性肺障害を発症しなかった70症例の検討では、gefitinib治療前血清KL-6値が高値を示す症例はgefitinib治療に対して反応性が乏しくかつ予後不良であることがわかった。さらに、gefitinibによる治療開始後2週間でのKL-6の変化は、gefitinib治療の反応性ならびに予後を早期に予測可能であることがわかった。EGFR遺伝子変異は、gefitinib治療に対して部分奏効(partial response; PR)患者群を予測するのに有用であるとされているが、腫瘍部から直接組織を採取することが必要であり、多くの患者においては検査に必要な最低限の量の腫瘍組織の採取が難しい、検査に時間、労力、費用がかかるなどの理由でgefitinib治療の決定に汎用されているとは言えないのが現状である。一方で、血清KL-6値の測定は、低侵襲、低コストの迅速検査であり、PD症例を選択するのに有用であることと合わせて临床上重要であると思われる。また、治療前血清KL-6値が高い症例は、すべての化学療法に抵抗性である可能性が考えられるが、私達は今回の検討と同時期にgefitinib治療が行われなかったIIIB、IV期非小細胞肺癌症例の診断時血清KL-6値と予後との関係について検討したが、優位な相関

を認めなかった。以上より、その詳細なメカニズムについては今後の検討課題であるが、KL-6分子がgefitinib治療の耐性あるいは抵抗性に関係しているのではないかと考えている。

では、KL-6は一体、どこで産生されているかという疑問が生じてくる。そこで、私達は外科的治療切除を受けた非小細胞肺癌患者25名の治療前後のペア血清で血清KL-6値を検討し、いずれの症例においても原発巣の切除に伴い、血清KL-6値が低下することを確認した。また、非小細胞肺癌原発巣の免疫組織染色では、原発巣でKL-6タンパクの発現を認め、その発現パターンと血清中のKL-6値が相関することを確認した。以上より、非小細胞肺癌患者において、薬剤性肺障害、特にDADを発症した際には、腫瘍ならびに間質性肺炎のいずれにおいてもKL-6を産生している可能性が考えられる。

## E. 結 論

Gefitinib治療開始前後で血清KL-6値が上昇してくる症例は、gefitinibによる致死的な薬剤性肺障害を発症している、あるいはgefitinib治療に対して反応性が乏しい可能性が高く、直ちにgefitinibの投与を中止することを検討する必要があると思われる。また、gefitinibによる薬剤性肺障害と腫瘍が増大しているかを鑑別することは、血清KL-6値のモニタリングのみでは困難である。直ちに高分解能胸部X線CT検査を行い、治療方針を決定することが重要と考えられた。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, Tanaka S, Nishino R, Yoshioka K, Ohshimo S, Fujitaka K, Ohnishi H, Hamada H, Arihiro K, Kohno N: Usefulness monitoring of circulating KL-6 in patients with advanced non-small cell lung cancers treated with gefitinib therapy. *Int J Cancer* (2007 in press)
- 2) Ishikawa N, Takano A, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Ito H, Miyagi Y, Nakayama H, Fujita M, Hosokawa M, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y, Daigo Y: Cancer-Testis Antigen, LY6K is a Serologic and Prognostic Biomarker and a Therapeutic Target for Lung and Esophageal Carcinomas. *Cancer Res* (2007 in press)
- 3) Taniwaki M, Takano A, Ishikawa N, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y, Daigo Y: Activation of KIF4A as a Prognostic Biomarker and Therapeutic Target for Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 13:6624-6631, 2007.
- 4) Sakurai J, Hattori N, Nakajima M, Moriya T, Suzuki T, Yokoyama A, Kohno N: Differential expression of the glycosylated forms of MUC1 during lung development. *Eur J Histochem* 51:95-102, 2007.
- 5) Ohshima M, Yokoyama A, Ohnishi H, Hamada H, Kohno N, Higaki J, Naka T: Overexpression of suppressor of cytokine signalling-5 augments eosinophilic airway inflammation in mice. *Clin Exp Allergy* 37:735-42, 2007.
- 6) Yamabuki T, Takano A, Hayama S, Ishikawa N, Kato T, Miyamoto M, Ito T, Ito H, Miyagi Y, Nakayama H, Fujita M, Hosokawa M, Tsuchiya E, Kohno N, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y: Dkkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res* 67:2517-25, 2007.
- 7) Inata J, Hattori N, Yokoyama A, Ohshimo S, Doi M, Ishikawa N, Hamada H, Kohno N: Circulating KL-6/MUC1 mucin carrying sialyl Lewis x oligosaccharide is an independent prognostic factor in patients with lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* 120:2643-9, 2007.
- 8) Shoda H, Yokoyama A, Nishino R, Nakashima T, Ishikawa N, Haruta Y, Hattori N, Naka T, Kohno N: Overproduction of collagen and diminished SOCS1 expression are causally linked in fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 353:1004-10, 2007.
- 9) 河野修典、久保恵嗣、井上義一、小山徹、坂口文: 座談会 薬剤性肺障害をめぐって。日本内科学会雑誌96;1168-86, 2007.
- 10) 石川暢久、河野修典: 誌上臨床講義 薬剤性肺障害について。広島市内科医会報60; 8-14, 2007.
- 11) 石川暢久、河野修典: 肺癌の腫瘍マーカー。「呼吸器コモンディズィーズの診療」。編著: 工藤翔二。文光堂, 東京, p99-103, 2007.
- 12) 石川暢久、河野修典: 医原性肺疾患。「呼吸ケアのための呼吸器疾患事典」。編著: 安間文彦。メディカ出版, 大阪, 196-203, 2007.

## 2. 学会発表

- 1) 河瀬成穂、服部登、石川暢久、秋田慎、吉岡宏治、田中惣之輔、藤高一慶、峠岡康幸、有廣光司、河野修興: Gefitinib による薬剤性肺障害における血清KL-6 値の有用性の検討. 第48回日本肺癌学会総会、2007年11月、名古屋.
- 2) 田中惣之輔、服部登、石川暢久、秋田慎、河瀬成穂、吉岡宏治、藤高一慶、峠岡康幸、春田吉則、河野修興: 原発性肺癌における血清可溶性Interferon Alpha、Beta and Omega Receptor 2 (sIFNAR2) の臨床的意義. 第48回日本肺癌学会総会、2007年11月、名古屋.
- 3) 吉岡宏治、秋田慎、河瀬成穂、田中惣之輔、石川暢久、藤高一慶、春田吉則、峠岡康幸、服部登、河野修興: 血清KL-6 値のモニタリングによってGefitinib による治療効果ならびに予後を早期に予測可能である. 第48回日本肺癌学会総会、2007年11月、名古屋.
- 4) 秋田慎、服部登、石川暢久、田中惣之輔、吉岡宏治、河瀬成穂、藤高一慶、春田吉則、峠岡康幸、河野修興: 肺癌手術症例における血清KL-6 値の予後マーカーとしての有用性の検討. 第48回日本肺癌学会総会、2007年11月、名古屋.
- 5) 谷脇雅也、藤高一慶、石川暢久、春田吉則、峠岡康幸、服部登、河野修興: 小細胞肺癌治療におけるNSE 値の新たな意義. 第48回日本肺癌学会総会、2007年11月、名古屋.
- 6) Taniwaki M, Daigo Y, Nishino R, Takano A, Ishikawa N, Nakatsuru S, Hosokawa M, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y: Cancer-specific Receptor Kinase, LERTK1 as a Serologic Biomarker and Therapeutic Target for Lung and Esophageal Cancers. 第66回日本肺癌学会総会、2007年10月、横浜市.
- 7) Ueda K, Daigo Y, Katagiri T, Ishikawa N, Irie S, Sato T, Kohno N, Nakamura Y: Novel glycoproteomic approach for serum tumor marker screening using SELDI-TOF MS system. 第66回日本肺癌学会総会、2007年10月、横浜市.
- 8) Takano A, Daigo Y, Ishikawa N, Nakatsuru S, Miyagi Y, Yasui W, Inai K, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y: Identification of LASEP1 as a Novel Serological and Prognostic Biomarker for Lung Cancer. 第66回日本肺癌学会総会、2007年10月、横浜市.
- 9) Tanaka S, Ishikawa N, Nishino R, Ohshimo S, Tomoda Y, Fujitaka K, Taooka Y, Hattori N, Yokoyama A, Kohno N: Evaluation of Serum levels of Interferon Alpha, Beta and Omega Receptor 2(IFNAR2) in Lung Cancer Patients. 第66回日本肺癌学会総会、2007年10月、横浜市.
- 10) Ishikawa N, Hattori N, Tanaka S, Taniwaki M, Nishino R, Fujitaka K, Taooka Y, Hamada H, Yokoyama A, Kohno N: Significance of Circulating KL-6/MUC1 as a Prognostic Factor in Node-negative Non-Small Cell Lung Cancer. 第66回日本肺癌学会総会、2007年10月、横浜市.
- 11) 谷本琢也、服部登、妹尾直、風呂中誠、横山彰仁、河野修興: ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) を高発現するBach-1ノックアウトマウスにおける高濃度酸素肺傷害の検討. 第47回日本呼吸器学会総会、2007年6月、東京都.
- 12) 妹尾直、服部登、谷本琢也、風呂中誠、石川暢久、藤高一慶、春田吉則、峠岡康幸、横山彰仁、河野修興: プレオマイシン肺線維症モデルにおける、RNA干渉を利用したPAI-1

の発現抑制による抗線維化作用の検討. 第47回日本呼吸器学会総会、2007年6月、東京都.

- 13) Nakashima T, Yokoyama A, Inata J, Ishikawa N, Haruta Y, Hattori N, Kohno N: KL-6/MUC1 mucin with selectin ligands as a prognosis predictor in patients with Acute Respiratory Distress syndrome. 第47回日本呼吸器学会総会、2007年6月、東京都.
- 14) Shoda H, Yokoyama A, Nishino R, Nakashima T, Ishikawa N, Haruta Y, Hattori N, Naka T, Kohno N: A causal relationship between overproduction of collagen and the diminished SOCS1 expression in fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis. 第47回日本呼吸器学会総会、2007年6月、東京都.
- 15) Ishikawa N, Yokoyama A, Doi M, Tanaka S, Kondo K, Ohnishi H, Hattori N, Kohno N. Anti-tumor effect of the anti-KL-6/MUC1 monoclonal antibody. First JCA-AACR Special Joint Conference. The Latest Advances in Lung Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics. 2005, Nagoya.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 参考文献

- 1) 石川暢久. 主な薬剤性肺障害. 新規の分子標的薬. 日本内科学会雑誌 96; 1129-36, 2007.
- 2) Kohno N, Inoue Y, Hamada H, Fujioka S, Fujino S, Yokoyama A, Hiwada K, Ueda N, Akiyama M. Difference in sero-diagnostic values among KL-6-associated mucins classified as cluster 9. Int J Cancer Suppl 1994; 8: 81-3.
- 3) Stahel RA, Gilks WR, Lehmann HP, Schenker T. Third International Workshop on Lung Tumor and Differentiation Antigens: overview of the results of the central data analysis. Int J Cancer 1994; 8: 6-26.
- 4) Hirasawa Y, Kohno N, Yokoyama A, Inoue Y, Abe M, Hiwada K. KL-6, a human MUC1 mucin, is chemotactic for human fibroblasts. Am J Respir Cell Mol Biol 1997; 17: 501-7.
- 5) Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, Fukuhara H, Yamakido M, Akiyama M. New serum indicator of interstitial pneumonitis activity. Sialylated carbohydrate antigen KL-6. Chest 1989; 96: 68-73.
- 6) Kohno N, Awaya Y, Oyama T, Yamakido M, Akiyama M, Inoue Y, Yokoyama A, Hamada H, Fujioka S, Hiwada K. KL-6, a mucin-like glycoprotein, in bronchoalveolar lavage fluid from patients with interstitial lung disease. Am Rev Respir Dis 1993; 148: 637-42.
- 7) Kohno N, Akiyama M, Kyoizumi S, Hakoda M, Kobuke K, Yamakido M. Detection of soluble tumor-associated antigens in sera and effusions using novel monoclonal antibodies, KL-3 and KL-6, against lung

- adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 1988; 18: 203–16.
- 8) Inata J, Hattori N, Yokoyama A, Ohshimo S, Doi M, Ishikawa N, Hamada H, Kohno N. Circulating KL–6/MUC1 mucin carrying sialyl Lewis x oligosaccharide is an independent prognostic factor in patients with lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* 120: 2643–9, 2007.
- 9) Ohnishi H, Yokoyama A, Yasuhara Y, Watanabe A, Naka T, Hamada H, Abe M, Nishimura K, Higaki J, Ikezoe J, Kohno N. Circulating KL–6 levels in patients with drug induced pneumonitis. *Thorax* 2003; 58: 872–5.
- 10) Ohshimo S, Yokoyama A, Hattori N, Ishikawa N, Hirasawa Y, Kohno N. KL–6, a human MUC1 mucin, promotes proliferation and survival of lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 1845–52.

## 厚生労働科学研究費補助金

### 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

# 薬剤性肺障害の発現状況の国際比較に関する研究 分担研究報告

## 薬剤性肺障害における遺伝子学的検討、HLAの解析

分担研究者 太田 正穂  
信州大学医学部法医学教室

### 研究要旨

薬剤服用により、喘息、間質性肺炎、好酸球性肺炎、肺水腫、胸膜炎など多様な肺病変を示す薬剤性肺障害は、人種間で使用する薬剤により障害度の差異が指摘されてきた。また、同一民族間においても薬剤性肺障害に対して感受性・抵抗性を示す遺伝的素因の存在が疑われている。本年度は、薬剤性肺障害誘発に関係すると思われる個体差、民族差の遺伝学的要因の解明のために、最近内外で報告された文献からの情報収集と、効果的な解析を行うための戦略について検討した。特に欧米人と日本人において肺障害誘発の相違を示す新規分子標的薬ゲフィチニブについては、多数の文献が紹介されているが、民族的相違をもたらす遺伝的要因や同一民族間での遺伝的要因についての解析結果は得られていない。この問題解決のために、①薬剤障害発症群と非発症群との全ゲノムレベルでの多型解析（STR: short tandem repeat, SNP: single nucleotide polymorphism）、②両群におけるマイクロアレイ解析、③両群におけるトランスクリプトーム解析を行うことにより、薬剤障害発症候補遺伝子の検索と発現全遺伝子の構造解析による機能を推定することが必要である。また、これまで100種類以上の疾患と相関を認めているHLA（Human Leukocyte Antigen）については、HLA遺伝子そのものが発症に関わる危険因子であるか、4 Mbにおよぶ遺伝子領域内の別の遺伝子が関与しているかについて、⑤高解像度HLA-DNAタイピングとマイクロサテライト解析によりHLA遺伝子と薬剤障害発症誘発との関係を解析する必要がある。さらに、⑥薬剤代謝酵素（チトクロムP450等）や薬物排出に関与するABC(ATP binding cassette)トランスポーター（MDR1やMRP1等）の遺伝子多型との関係について解析も重要であると考えられる。これらの解析についての手法はすでに準備が整っていることから、今後解析資料の収集を積極的に行い、次年度は具体的なデータ作成と解析を行う予定である。

## A. 研究目的

今日、新薬開発により難治疾患・癌疾患治療に次々と新規の薬剤が導入され、その効果が期待されている。これらの薬剤は分子標的薬として、作用点が明確なうえに薬剤効果も優れている一方、薬剤による副作用例も多く報告されている。その中でも、薬剤性肺障害を示す報告例が海外に比べ日本において増加していることからその発症機序についての検討が必要とされている。ところが薬剤性肺障害発生機序については、少数の薬剤を除いてほとんど解明されていないのが現状であり、その上薬剤性肺障害はいくつかの臨床病型に分類されるので発症に関与する因子や機序の解明を困難にしている。しかし、基本的には細胞障害薬剤による気道上皮細胞毒性と免疫細胞の賦活化によるものと考えられており、そこには幾つかの因子が関与していると推測されている。それらは、活性酸素が関与した細胞障害性機序、IL5やHLA分子が絡んだ免疫系細胞の活性化、加齢に伴う発症年齢との関係、喫煙などによる先行性肺病態の影響と遺伝子素因や人種などを含んだ遺伝的背景等が提唱されている。

上皮成長因子チロシンキナーゼ阻害剤として開発された新しいタイプの抗がん剤であるゲフィチニブは重篤な薬剤性肺障害は日本人において2～4%の割合で発生し、死亡率は2%にも及ぶと報告されている。さらに、この発生頻度は海外と比較をすると10倍以上にも及ぶことからこの薬剤における障害発症の感受性について遺伝的要因が示唆される。

そこで、本研究では日本人における薬剤性肺障害が遺伝的要因に影響されるのかを検討する。本年度は、薬剤性肺障害を起こした検体収集、遺伝的要因を解明するためのストラテジーの作成、およびこれまでに報告されている文献的考察を行っ

た。

## B. 研究方法および得られる情報

### ① 薬剤性肺障害を起こした検体収集

薬剤性肺障害発症には各種薬剤が関与している。肺癌治療薬・ゲフィチニブ、抗リウマチ薬・レフルノミド、抗癌薬・プレオマイシン、多発性骨髄治療薬・ボルテゾミブ等による報告例が日本では外国に比較して多いことが報告されている<sup>1, 2)</sup>が、薬剤間での副作用に相違がみられるのか、肺障害発症者間に遺伝学的な共通点がみられるのか、日本人で高頻度に発症する要因は遺伝学的相違であるのか、等を解析するために、厳格な診断のもとにサンプリングを行うことが必要である。

### ② 薬剤性肺障害発症を促す遺伝的要因の解析

薬剤性肺障害は日本人に高頻度で発症していることから、民族的相違をもたらす遺伝的要因や同一民族間での遺伝的要因についての解析が必要である。そのためには、国内外で共通に利用されている薬剤による発症例について検討することが重要であると考えられる。特に、ゲフィチニブによる肺障害は日本人では欧米人に比べ19倍程の頻度で発生していると報告されている。この薬剤は、多くの癌化された組織に発現する上皮成長因子(EGFR: epidermal growth factor)チロシンキナーゼ(TK: tyrosine kinase)の阻害剤として癌治療薬として用いられている。この薬剤の感受性はEGFRのTKドメイン部の突然変異などに関連するとの報告が多く見られている<sup>3-9)</sup>(exon19の欠損, exon21のT2573G→L858R, C2369T→T790M, T2155G→G719C, A2582T→L861Q)。これらTKドメイン内での変異が日本人における薬剤感受性との関係があるか検討する必要がある。とくに、薬剤性肺障害を発症した症例間での共通な変異部分があるか、また、日本人に特徴的な変異が生じている



かを解析することが重要であると思われる。

同じ薬剤を同条件下で処方されたときにその有効性に個体差が生じるのは、年齢・性別・体格・健康状態や環境要因等多くの因子が関与すると考えられるが、遺伝要因も考慮する必要がある。日本における薬剤性肺障害の発症率が地域性に関係なく数%で見られるのは、遺伝要因の関わりがあると示唆される。このような状況下で遺伝要因を検索するには、一般的には相関解析が用いられる。相関解析は薬剤障害発症群と非発症群とに分けて、全ゲノムレベルでの多型解析<sup>10-13)</sup> (STR: short tandem repeat, SNP: single nucleotide polymorphism) を行い、両群に統計学的有意差が生じたマーカーの近傍の遺伝子について、更に詳細な検討を行う。この手法では解析に利用するサンプル数が多い程、検査結果の精度が増すことから通常は各群数百以上の試料が必要である。

薬剤性肺障害を発症している組織中の遺伝子発現状況を調べることにより原因となる遺伝子の機能異常を推測することが可能である。これは、DNAの遺伝情報を写し取りたんぱく質合成の基礎となるRNAの情報量を解析するトランスクリプトーム解析である。この手法により特定遺伝子の発現の有無、発現量を知ることができることから、薬剤障害発症の候補遺伝子の検索と発現異常に関する情報が得られると考えられる。

HLAは獲得免疫および自然免疫において重要な機能を果たしている。この分子はヘルパーT細胞、キラーT細胞、ナチュラルキラーT細胞のリガンドとして情報の受け渡しをしている。さらにHLAは100種類以上の疾患と相関を示すことが報告されており、自己免疫性疾患を始め各種疾患の感受性に関与している<sup>14-18)</sup>。この遺伝子と疾患感受性との関係については、遺伝子そのものが発症に関わる危険因子であるか、染色体6p21.3に位置する4 Mbにおよぶ遺伝子領域内に200以上存

在する別の遺伝子が関与しているのか解析する必要がある。そのために高解像度HLA-DNAタイピングおよび、HLA近傍に存在するマイクロサテライト解析を用いた連鎖改易を行い薬剤障害発症誘発との関係を調べる事が可能である。

薬剤性肺障害発症には薬物効果に対する薬物応答性の個人差が見られる。これは体内に投与された薬剤が全身的な薬物動態(吸収、代謝、排泄)を介して薬物作用分子近傍に到達後、作用分子と相互作用し、薬物効果を発揮するまでの過程で幾つかの機能性タンパクが影響を及ぼしていると考えられる。この機能性タンパクには薬物排出や運搬に機能するABC(ATP binding cassette; ATP結合カセット)トランスポータースーパーファミリーの一員であるMDR1(Multidrug resistance), MRP1(Multidrug resistance protein 1) MRP2/cMOATなどや、薬物代謝酵素であるチトクロムP450があげられる<sup>19-21)</sup>。これらの遺伝子には遺伝子多型が存在することから、その多型が薬物反応性の個人差に影響を及ぼしていると推測される。このような薬物動態に関与する機能分子と薬剤効果に関して多数の報告例があり、今後の解析に有益な資料と考える。次年度は解析試料の収集を積極的に行い、具体的なデータ作成と解析を行う。

## C. 参考文献

1. 工藤翔二、日本人にとっての薬剤性肺障害。日本胸部臨床, 65:963-970, 3006.
2. 吾妻安良太、薬剤性肺炎と日本人。日本内科学会雑誌, 96:1077-1082, 2007.
3. Pao W, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. Proc

- Natl Acad Sci. 101:13306–13311, 2004.
4. Lynch TJ, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non–small–cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 350:2129–2139, 2004.
  5. Kobayashi S, et al. EGFR mutation and resistance of non–small–cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 352:786–792, 2005.
  6. Pao W, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*. 2(3):e73 225–235, 2005.
  7. Cappuzzo F. et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non–small–cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 97:643–655, 2005.
  8. Suk R. et al. Polymorphisms in ERCC1 and grade 3 or 4 toxicity in non–small cell lung cancer patients. *Clinical Cancer Res*. 11:1534–1538, 2005.
  9. Ogino A, et al. Emergence of epidermal growth factor receptor T790M mutation during chronic exposure to gefitinib in a non–small cell lung cancer cell line. *Cancer Res*. 67:7807–7814, 2007.
  10. Risch, NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 405:847–856, 2000.
  11. Cardon, LR and Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nature Genet*, 2:91–99, 2001.
  12. Evas, DM and Cardon LR. Guidelines for genotyping in genomewide linkage studies: single–nucleotide–polymorphism maps versus microsatellite maps. *Am J Hum Genet*. 75:687–692, 2004.
  13. The wellcome Trust Case Control Consortium. Genome–wide association study of 14,000 cases of seven common disease and 3,000 shared controls. *Nature*, 447:661–678, 2007.
  14. Ota M, et al. The critical region for Behcet disease in the human major histocompatibility complex is reduced to a 46–kb segment centromeric of HLA–B, by association analysis using refined microsatellite mapping. *Am. J. Hum. Genet*, 64:1406–1410, 1999.
  15. Hill, AVS. Immunogenetics and genomics. *Lancet*, 357:2037–2041, 2001.
  16. Stewart CA, et al. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res*. 14:1176–1187, 2004.
  17. Ghodke, Y. et al. HLA and disease. *Eur J Epidemiol*. 20:475–488, 2005,
  18. de Bakker PI, et al. A high–resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. *Nature Genet*. 38:1166–1172, 2006.
  19. Nakamura Y, et al. Gefitinib (“Iressa”, ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, reverses breast cancer resistance protein/ABCG2–mediated drug resistance. *Cancer Res*, 65:1541–1546, 2005.
  20. Elkind, NB et al, Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Res*, 65:1770–1777, 2005.
  21. PanJH et al. CYP450 polymorphisms predict clinic outcomes to vinorelbine–based chem

otherapy in patients with non-small-cell lung cancer. Acta Oncol.46:361-366,2007.

#### D. 健康危険情報

特記事項なし

#### E. 論文発表

1. Hanaoka M, Yu X, Urushihata K, Ota M: Fujimoto K, Kubo K. Leptin and Leptin Receptor Gene Polymorphisms in Obstructive Sleep Apnea Syndrome. Chest, in press 2008.
2. Ito M, Hanaoka M, Droma Y, Hatayama O, Sato E, Katsuyama Y, Fujimoto K, Ota M: The association of transforming growth factor beta 1 gene polymorphisms with emphysema phenotype of COPD in Japanese, Respirology, submitted
3. Ota M, Fukushima H, Kulski JH, Inoko H. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Nature Protocols. 2:2857-2864,2007.

#### F. 知的財産権の出願・特許状況

なし

平成19年度研究成果の刊行に関する一覧表