

200940078A

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

薬剤性肺障害における遺伝子マーカーに
関する遺伝子学的検討等に係る研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 久保 恵 嗣

平成22(2010)年3月

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

薬剤性肺障害における遺伝子マーカーに
関する遺伝子学的検討等に係る研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 久保 恵 嗣

平成22(2010)年3月

目 次

班員名簿

I. 総括研究報告	1
	久保 恵嗣
II. 分担研究報告	
薬剤性肺障害の発症に関与する遺伝子学的検討に関わる研究	7
	太田 正穂
薬剤性肺障害における遺伝子マーカーに関する遺伝子学的検討等に係る研究	11
	花岡 正幸
III. 研究成果の刊行物一覧表	17

薬剤性肺障害における遺伝子マーカーに関する遺伝子学的
検討等に係る研究班員名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究代表者	久 保 恵 嗣	信州大学医学部内科学第一講座	教 授
研究分担者	太 田 正 穂	信州大学医学部法医学教室	准 教 授
	花 岡 正 幸	信州大学医学部内科学第一講座	准 教 授

總括研究報告

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

総括研究報告書
薬剤性肺障害における遺伝子マーカーに関する
遺伝子学的検討等に係る研究

研究代表者 久保 恵嗣
信州大学医学部内科学第一講座 教授

研究要旨

1. 太田

細胞性障害機序が疑われた薬剤により薬剤性肺障害を起こした症例と、起こさなかった症例の遺伝的背景を比較し、薬剤性肺障害に関わる候補遺伝子を検索するために、HLA (Human Leukocyte Antigen) タイピングとAffymetrix社のGeneChip Human Mapping 500K Array Set (500,568 SNPs)を用いた全ゲノム網羅的な相関解析 (GWAS: genome-wide association study) を行った。HLAタイピングは昨年度の検体を再検査し、新たに本年度追加したサンプルも検査した。解析には、薬剤投与により薬剤性肺障害を誘発した発症群 (14人) と薬剤障害が認められなかった非発症群 (19人) から得たDNAを用いた。その結果HLAでは、発症群にHLA-A*0206アリル頻度が高かったが、統計学的有意差は認められなかった。また、GWASでは1番染色体短腕上に設けた1遺伝子内の8個のSNPsでアリル頻度に有意な相違 ($p=9.2 \times 10^{-6}$) を認めた。今後更に症例数を増やし、再現性についての検討が必要である。

2. 花岡

遺伝子解析を実施した薬剤性肺障害12例の臨床的特徴をまとめた。ほとんどが発熱、息切れ・呼吸困難で発症し、薬剤はジェムシタピンが5例と多く、次いでエタネルセプトが2例であった。薬剤の投与期間は20日から1年2ヶ月とばらつきが大きく、用量依存性は認めなかった。血液中のKL-6が増加する症例が多く、胸部高分解能CTでは両側下肺野優位のすりガラス陰影の頻度が高かった。気管支肺胞洗浄 (BAL) 検査が施行された症例では、細胞分画にてリンパ球が増多するケースが多かったが、正常のBAL所見を呈する場合もあった。薬剤リンパ球刺激試験 (DLST) の陽性例は1例のみで、残りの症例は臨床的に診断された。大多数が副腎皮質ステロイド薬にて治療され、臨床的改善を認めた。以上の検討から、薬剤性肺障害は多様性に富む疾患であり、確定診断には他疾患の鑑別が非常に重要と考えられた。さらに、遺伝子情報など薬剤性肺障害における体質的素因が明らかとなれば、診断の有力な根拠になる可能性があると思われた。

研究分担者

太田 正穂（信州大学医学部法医学教室 准教授）

花岡 正幸（信州大学医学部内科学第一講座 准教授）

A. 研究目的

難治疾患・癌疾患治療に導入された新規の薬剤は、薬剤効果も優れているが、重篤な薬剤性肺障害の報告が増加している。これら薬剤の代表である分子標的薬・ゲフィチニブと新規抗リウマチ薬・レフルノミドの肺障害の発生頻度については、我が国と海外では、我が国で著しく高いことが報告され、日本人の薬剤性肺障害に対する感受性の高さが示唆され、その発症に遺伝的要因が関与している可能性が考えられる。

本研究の目的は、薬剤による薬剤性肺障害に関与する共通の遺伝的背景を検討することであり、薬剤投与により薬剤性肺障害を起こした群と、起こさなかった群の遺伝的背景を比較することで、肺障害発症に関与する候補遺伝子を検討し、肺障害発症機序を解明する。

1. 太田

日本人における薬剤性肺障害が遺伝学的要因に影響されるか検討した。そのために、分子標的薬ゲフィチニブ、新規抗リウマチ薬レフルノミド、抗がん薬ブレオマイシン、ボルテゾミブ等の薬剤により肺障害を発症した発症群14人と無症状の非発症群19人から得たDNAを用いて、HLA遺伝子多型と500,568 SNPsを用いた全ゲノム網羅的な相関解析(GWAS: genome-wide association study)を行った。解析に用いたサンプル数は統計学的解析を行うにはあまりにも少なかったが、HLA解析およびGWAS解析結果が、薬剤性肺障害に影響を及ぼす遺伝的要因追求の前段階として有効であるかについて検討した。

2. 花岡

近年、薬剤による肺障害の報告が増加しているが、診断は必ずしも容易ではない。薬剤性肺障害の診断は、すべての薬剤に肺障害を起こす可能性があることを認識し、疑うことから始まる。薬剤性肺障害の診断として、次のような基準が提唱されている。

- ① 原因となる薬剤の摂取歴がある。
- ② 薬剤に起因する臨床病型の報告がある。
- ③ 他の原因疾患が否定される。
- ④ 薬剤の中止により病態が改善する。
- ⑤ 再投与により増悪する。

すなわち、薬剤性肺障害は除外診断であり、病歴、自覚症状、血液検査、画像所見および気管支肺胞洗浄所見などを総合した臨床診断に頼っているのが現状である。そこで、今回遺伝子解析を行った薬剤性肺障害16例中12例の臨床像をまとめ、その特徴を分析した。

B. 研究方法

1. 太田

① 解析サンプル

解析に使用した症例は、薬剤による肺障害を起こした14例と無症状であった19例である。これらのサンプル血液から自動DNA抽出器(Quick Gene, FUJIFILM Co.)を用いてDNAを得た。

② HLA-DNAタイピング

HLA-DNAタイピングは、LABType SSO試薬(One Lambda Inc.)にて、HLA-A*, -B*, -C*, -DRB1*, -DQB1*をLuminex

法で検査した。

全ゲノム網羅的な相関解析 Affymetrix社のGeneChip Human Mapping 500K Array Set (500, 568 SNPs)を用いて薬剤性肺障害を来した患者群14人と、無症状の19人について、全ゲノム網羅的な相関解析 (GWAS: genome-wide association study) を行った。

(倫理面への配慮)

信州大学医学部倫理委員会で承認された研究である。課題名；薬剤性肺障害における遺伝子学的検討。承認日時および番号；平成20年4月8日、No.243。

2. 花岡

2008年3月から2009年6月までの間に信州大学医学部附属病院へ入院し、薬剤性肺障害と診断された12例を対象とした。全例が男性で、平均年齢は72歳であった。基礎疾患は、肺癌4例、関節リウマチ3例、残りは間質性肺炎、膵臓癌、胆嚢癌、心房細動、筋委縮性側索硬化症がそれぞれ1例ずつであった。

(倫理面への配慮)

信州大学医学部倫理委員会で承認された研究である。課題名；薬剤性肺障害における遺伝子学的検討。承認日時および番号；平成20年4月8日、No.243。

C. 研究結果

1. 太田

① HLAタイピング

薬剤障害発症群は、非発症群に比べ、HLA-A*0201のアリル頻度は低く(3.6%)、A*0206の頻度が高かった(21.4%)。しかし、

統計学的には有意差が見られなかった。健常日本人におけるA*02のアリル頻度(*0201=11.2%、*0206=9.2%)と比較すると障害発症群は抵抗性の有意差($p=0.04$)を示し、A*0206では感受性の有意差(R.R.=2.69, $p=0.02$)を示した。

② 全ゲノム網羅的な相関解析

Affymetrix社の50万個のSNPを用いたGWAS解析では、アリル頻度の χ^2 検定で $p<1 \times 10^{-5}$ の有意差で、2種類以上のSNPsを遺伝子内に相関を示した遺伝子は5つあった。その中でcall rateが高く、HWE値が外れていないSNPsを含む遺伝子が1つ見られた。この遺伝子内にある7種類のSNPsは、薬剤性肺疾発症群と非発症群において強い有意差($P<9.2 \times 10^{-6}$)を示した。

しかし、両群を結合した疾患群36人と一般健常者群650人との間に遺伝子型頻度およびアリル頻度に有意差は認められなかった。

2. 花岡

自覚症状は、発熱、息切れ・呼吸困難が圧倒的に多く、無症状で偶然発見されたのは1例のみであった。原因薬剤はジェムシタピンが5例と多く、次いでエタネルセプトが2例、残りはメトトレキサート、カルベジロール、塩酸ペプリジル、エルロチニブ、リルゾールがそれぞれ1例ずつであった。薬剤の平均投与期間は4.2ヶ月であったが、内訳は20日から1年2ヶ月とばらつきが大きく、用量依存性は認めなかった。9例で血液中のKL-6が増加し、12例の平均は913.7 U/mlと高値を示した。全例に高分解能CT検査が施行されており、画像所見として両側下肺野優位のすりガラス陰影の頻度が高かったが、一部に網状影、斑状影、浸潤影なども認められた。7例に気管支肺胞洗浄(BAL)検査が施行され、細胞分画でリンパ球

増多を5例に、好酸球増多を2例に認めたが、1例は正常BAL所見であった。薬剤リンパ球刺激試験(DLST)は8例に行われたが、陽性例は1例のみで、残りの7例は陰性であった。DLST陽性例以外は、他疾患を除外することにより臨床的に診断されていた。治療として12例中10例で副腎皮質ステロイド薬が使用されたが、2例は薬剤の中止のみであった。基礎疾患として関節リウマチを有した2例は重篤な呼吸不全を呈し、ステロイドの他、免疫抑制剤の併用と人工呼吸管理を要した。いずれの症例も入院治療により臨床的改善を認めた。

D. 考察

1. 太田

① HLAタイピング

昨年度のHLA検査では、障害発症群と非発症群で、A*0206で有意差が見られたが、今回の解析では有意差が消失した。これは検査したサンプルが僅かであるが増加したことによる。今後サンプル数を増加することにより、統計学的解析結果が明確になると思われる。

② 全ゲノム網羅的な相関解析

今回薬剤により肺障害を起こした群は、肺に急性の繊維化を示した群であり、また非発症群は繊維化をもたさなかった群である。ここで有意差を示したSNPsをもつ遺伝子はある特定のアリルにより相反する症状を示す方向に誘導していると思われる。また、両群を統合した場合には健常者群とは全くアリル頻度に有意差を示していないことからこの遺伝子の機能が関係しているようである。本解析で候補になった遺伝子は、急性炎症やアポトーシスなど免疫反応に中心的役割を果た

す転写因子と競合作用をする転写因子を調節する遺伝子と言われている。

今後この遺伝子内のSNPsを用いたFine Mappingを行い再現性を検討する予定である。

今回HLAタイピングおよびGWASを行ったサンプル数はとても統計学的な精度を確証できるものではない。通常GWASを用いたケースコントロール研究では、オッズ比3の関連の強さをもつSNPを検出力80%で見つけるためには集団300人以上が必要とされている。統計学的な信憑性を得るには更に多くのサンプルについて検討しなければならない。しかし、今回のようなある疾患患者に、薬剤による薬剤性肺障害をもたらすか、否かの遺伝的背景を解析するコホート研究は、サンプリング段階で多くのバイアスを排除しているので、検体数がケースコントロール研究のように多くなくても信頼性の高い結果が得られると考えられる。特に、今回の結果では、有意差を示したSNPsは何れも相対危険度(R.R.: Relative Risk)が20倍以上の値を示していることからこの遺伝子は、薬剤性肺疾患、特に特発性肺線維症などの間質性肺炎をもたらす遺伝的要因として働いている可能性が高いと思われた。

2. 花岡

今回の検討から薬剤性肺障害の臨床像は次のように要約できる。

- 1) 原因となる薬剤の投与中に、発熱や呼吸困難で発症する。
- 2) 薬剤の投与期間や用量には依存しない。
- 3) 血液中のKL-6が増加する症例が多い。
- 4) 高分解能CTで両肺にすりガラス陰影を認める症例が多い。

- 5) BALの細胞分画でリンパ球あるいは好酸球が増多する症例が多い。
- 6) DLSTの陽性率は低い。
- 7) ほとんどの症例が原因薬剤の中止と副腎皮質ステロイド薬の投与により改善する。

すなわち、薬剤性肺障害の確定診断は必ずしも容易ではなく、基礎疾患の肺病変の悪化や感染症などと十分に鑑別することが必要である。

過敏性反応による薬剤性肺障害の診断として、

- ① 薬物開始後（1～6週）に肺障害を認める。
- ② 初発症状として発熱、咳嗽、呼吸困難、発疹を認める（2項目以上を陽性とする）。
- ③ 末梢血液像に好酸球増多または白血球増多を認める。
- ④ 薬剤感受性テスト（リンパ球刺激テスト、パッチテスト）が陽性である。
- ⑤ 偶然の再投与により肺障害が再現する。

の5項目のうち、確定診断には①、④または①、⑤を満たすことが必要で、疑い例は①、②または①、③を満たすこととされている。これらの中で、客観的な診断項目は末梢血の好酸球増多と薬剤リンパ球刺激試験（DLST）である。特にDLSTは、定量化により陽性基準が設定されており、一部では信頼性の高い検査として汎用されている。しかし、偽陰性率が高いことは良く知られており、この偽陰性・偽陽性の問題、検査に使用する薬剤の濃度基準の問題、不溶性薬剤の問題など幾つかの問題点が指摘されている。今回検討した12例でも、DLSTが陽性であったのは僅か1例であった。現状では薬剤性肺障害を客観的に確定できる検査は存在せず、本症の診断をより難しくしている。

2007年度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」において、信州大学の太田正穂らは薬剤性肺障害群にHLA-A*0206アリルと薬物代謝酵素

(CYP2C19)の遺伝子多型が高頻度であったと報告した。薬剤性肺障害において、このような遺伝子解析が進めば、発症予備軍のスクリーニングに威力を発揮することは想像に難くない。さらに、発症機序を踏まえた遺伝子解析の成果は、本症の診断に極めて有用と思われる。DLSTに代わる診断ツールの構築に向け、症例の蓄積と遺伝子解析の継続が重要と考える。

E. 結論

1. 太田

薬剤性肺障害発症群と非発症群との比較において、HLAでは発症群にHLA-A*0206アリル頻度が高かったが、統計学的有意差は認められなかった。また、GWASでは1番染色体短腕上に設けた1遺伝子内の8個のSNPsでアリル頻度に有意な相違を認めた。今後更に症例数を増やし、再現性についての検討が必要である。

2. 花岡

薬剤性肺障害の臨床像は多様性に富んでいる。明確な診断基準はなく、除外診断による臨床診断に頼っているのが現状である。本症の遺伝子解析が進めば、遺伝情報に基づいた診断方法と治療戦略の構築が期待される。さらに症例数を増やし、臨床データの分析と疾患感受性遺伝子の解析を行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ota M, Asamura H, Oki T, Sada M. Restriction enzyme analysis of PCR products. *Methods Mol Biol* 2009; 578: 405–14.
- 2) Hanaoka M, Droma Y, Ota M, Ito M,

- Katsuyama Y, Kubo K. Polymorphisms of human vascular endothelial growth factor gene in high-altitude pulmonary edema susceptible subjects. *Respirology* 2009; 14: 46-52.
- 3) 花岡正幸、久保恵嗣. COPDの治療—増悪時. *臨床と研究* 第86巻第2号 第19頁～第22頁 2009年.
 - 4) 花岡正幸. 高地肺水腫. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.9 呼吸器症候群 (第2版) II—その他の呼吸器疾患を含めて—. 第225頁～第228頁 2009年.
 - 5) 花岡正幸. 血胸. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.10 呼吸器症候群 (第2版) III—その他の呼吸器疾患を含めて—. 第374頁～第376頁 2009年.
 - 6) 花岡正幸、久保恵嗣. 肺塞栓症—Overview. *呼吸* 第28巻第4号 第371頁 2009年.
 - 7) 花岡正幸、久保恵嗣. COPDの病態生理と病因. *呼吸器科* 第16巻第2号 第153頁～第157頁 2009年.
 - 8) 花岡正幸. 呼吸器疾患に伴う肺高血圧症. *総合臨床* 第58巻第11号 第2281頁～第2285頁 2009年.
 - 9) 花岡正幸. 肺高血圧症をめぐる—肺高血圧症の治療指針. *呼吸器科* 第16巻第3号 第216頁～第221頁 2009年.
 - 10) 花岡正幸. 小中高校生の集団登山における注意. *登山の医学ハンドブック 改訂第2版*. 第153頁～第158頁 2009年.
 - 11) 花岡正幸、久保恵嗣. 禁煙教育. チーム医療のための呼吸ケアハンドブック. 第127頁～第138頁 2009年.
 - 12) 花岡正幸. 低酸素への順化と高地性心肺脳障害の成因と対策 —呼吸器病学における最近の進歩から—. *登山医学* 第29巻第1号 第50頁～第54頁 2009年.
- ## 2. 学会発表
- 1) Hanaoka M, Chen Y, Droma Y, Voelkel NF, Kubo K. Endothelin-1 is involved in the pathogenesis of pulmonary emphysema in rats. 8th International Pulmonary Hypertension Forum, March 2009, Barcelona, Spain.
 - 2) 花岡正幸. シンポジウム「肺高血圧症、肺血栓塞栓症の治療の新展開」低酸素性肺血管攣縮と肺高血圧症. 第49回日本呼吸器学会学術講演会 2009年6月 東京.
 - 3) 花岡正幸. ワークショップ「禁煙治療の現状と課題」—医師の立場から—. 第19回日本呼吸ケア・リハビリテーション学会学術集会 2009年10月 東京.
- ## G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 - (太田) なし
 - (花岡) なし
 2. 実用新案登録
 - (太田) なし
 - (花岡) なし
 3. その他
 - (太田) なし
 - (花岡) なし

分 担 研 究 報 告

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

薬剤性肺障害における遺伝子マーカーに関する
遺伝子学的検討等に係る研究
分担研究報告

薬剤性肺障害の発症に関与する遺伝子学的検討に関わる研究

研究分担者 太田 正穂

信州大学医学部法医学教室

研究要旨

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、薬剤による薬剤性肺障害の報告が増加している。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、使用する薬剤により人種間で障害度に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。分子標的薬ゲフィチニブ、新規抗リウマチ薬レフルノミド、抗がん薬ブレオマイシン、ボルテゾミブ等の薬剤により欧米人と比較し、特発性肺線維症などの間質性肺炎で急性増悪(病的にDAD)を招来する頻度が日本人で多いという事実から、日本人特有の線維化、あるいはDADをもたらしやすい共通の遺伝子素因や遺伝的背景が存在する可能性が示唆される。

今回、細胞性障害機序が疑われた薬剤により薬剤性肺障害を起こした症例と、起こさなかった症例の遺伝的背景を比較し、薬剤性肺障害に関わる候補遺伝子を検索するために、HLA (Human Leukocyte Antigen) タイピングとAffymetrix社のGeneChip Human Mapping 500K Array Set (500,568 SNPs)を用いた全ゲノム網羅的な相関解析 (GWAS: genome-wide association study) を行った。HLAタイピングは昨年度の検体を再検査し、新たに本年度追加したサンプルも検査した。解析には、薬剤投与により薬剤性肺障害を誘発した発症群 (14人) と薬剤障害が認められなかった非発症群 (19人) から得たDNAを用いた。その結果HLAでは、発症群にHLA-A*0206アリル頻度が高かったが、統計学的有意差は認められなかった。また、GWASでは1番染色体短腕上に設けた1遺伝子内の8個のSNPsでアリル頻度に有意な相違($p=9.2 \times 10^{-6}$)を認めた。今後更に症例数を増やし、再現性についての検討が必要である。

A. 研究目的

本研究は日本人における薬剤性肺障害が遺伝学的要因に影響されるか検討した。そのために、分子標的薬ゲフィチニブ、新規抗リウマチ薬レフルノミド、抗がん薬ブレオマイシン、ボルテゾミブ等の薬剤により肺障害を発症した発症群14人と無症状の非発症群19人から得たDNAを用いて、HLA遺伝子多型と500,568 SNPsを用いた全ゲノム網羅的な相関解析 (GWAS: genome-wide association study) を行った。解析に用いたサンプル数は統計学的解析を行うにはあまりにも少なかったが、HLA解析およびGWAS解析結果が、薬剤性肺障害に影響を及ぼす遺伝要因追求の前段階として有効であるかについて検討した。

B. 研究方法

① 解析サンプル

解析に使用した症例は、薬剤による肺障害を起こした14例と無症状であった19例である。これらのサンプル血液から自動DNA抽出器 (Quick Gene, FUJIFILM Co.) を用いてDNAを得た。

② HLA-DNAタイピング

HLA-DNAタイピングは、LABType SSO試薬 (One Lambda Inc.) にて、HLA-A*, -B*, -C*, -DRB1*, -DQB1* をLuminex法で検査した。

③ 全ゲノム網羅的な相関解析

Affymetrix社のGeneChip Human Mapping 500K Array Set (500,568 SNPs) を用いて薬剤性肺障害を来した患者群14人と、無症状の19人について、全ゲノム網羅的な相関解析 (GWAS: genome-wide association study) を行った。

C. 研究結果と考察

① HLAタイピング

薬剤性肺障害発症を患者群、非発症をコントロール群としたHLAアレル判定結果を表1に示した。薬剤障害発症群は、非発症群に比べ、HLA-A*0201のアレル頻度は低く(3.6%)、A*0206の頻度が高かった(21.4%)。しかし、統計学的には有意差が見られなかった(表2)。健常日本人におけるA*02のアレル頻度(A*0201=11.2%, A*0206=9.2%)と比較すると障害発症群は抵抗性の有意差($p=0.04$)を示し、A*0206では感受性の有意差(R.R.=2.69, $p=0.02$)を示した。昨年度のHLA検査では、障害発症群と非発症群で、A*0206で有意差が見られたが、今回の解析では有意差が消失した。これは検査したサンプルが僅かであるが増加したことによる。今後サンプル数を増加することにより、統計学的解析結果が明確になると思われる。

② 全ゲノム網羅的な相関解析

Affymetrix社の50万個のSNPを用いたGWAS解析では、アレル頻度の χ^2 検定で $p < 1 \times 10^{-5}$ の有意差で、2種類以上のSNPsを遺伝子内に相関を示した遺伝子は5つあった。その中でcall rateが高く、HWE値が外れていないSNPsを含む遺伝子が1つ見られた。この遺伝子内にある7種類のSNPsは、薬剤性肺疾発症群と非発症群において強い有意差($P < 9.2 \times 10^{-6}$)を示した(表3)。

しかし、両群を結合した疾患群36人と一般健常者群650人との間に遺伝子型頻度およびアレル頻度に有意差は認められなかった(表4)。

今回薬剤により肺障害を起こした群は、肺に急性の繊維化を示した群であり、また非発症群は繊維化をもたらさなかった群である。ここで有意差を示したSNPsをもつ遺伝子はある特定

表1 HLAタイピング結果

	Sample Name	A*		B*		Cw*		DRB1*		DQB1*		
薬剤障害発症群	P1	0206	2402	4002	5401	0102	0303	0405	1501	0401	0602	
	P2	0206	2402	1518	3901	0702	0704	0401	0410	0301	0402	
	P3	0206	2402	4001	5201	0304	1202	1101	1502	0301	0601	
	P4	2402	2601	4402	4801	0501	0801	0405	1301	0401	0603	
	P5	0206	3101	5102	5901	0102	1502	0405	1501	0401	0602	
	P6	1101	3303	1501	5801	0302	0401	0406	1302	0302	0609	
	P9	0201	0206	4001	4601	0102	0304	0803	1101	0301	0601	
	P10	1101	3101	4001	4003	0304	0304	0405	0405	0401	0401	
	P11	2402	2402	4002	5401	0102	0304	0405	1302	0401	0604	
	P13	2402	2402	0702	3501	0102	0702	0101	0405	0401	0501	
	P14	2602	3101	1501	4006	0303	0801	0901	1501	0303	0602	
	P15	0206	1101	5502	5901	0102	0102	0405	0405	0401	0401	
	P17	0101	2402	3701	5201	0602	1202	1001	1502	0501	0601	
	P18	2402	3101	0702	5401	0102	0702	0101	0405	0401	0501	
	非発症群	C1	2402	2601	3501	5601	0303	0702	0803	1101	0301	0601
		C2	0301	3101	4001	4402	0304	0501	1301	1302	0603	0604
		C3	2402	2402	4006	5901	0102	0801	0405	0901	0303	0401
		C4	2402	2402	5201	5502	0102	1202	0405	1201	0303	0401
C5		2402	3303	4403	5201	1202	1403	1302	1502	0601	0604	
C6		1101	2402	3501	6701	0702	0801	0403	0901	0302	0303	
C7		0201	2402	4002	4601	0102	1502	0803	1201	0310	0601	
C8		0201	2402	1501	5201	0702	1202	1406	1502	0301	0601	
C10		0201	1101	3501	4601	0102	0303	0405	0803	0302	0601	
C11		0206	2402	1301	5401	0102	0304	1202	1405	0301	0503	
C12		0201	2402	5401	5401	0102	0102	0405	0405	0401	0401	
C13		2402	2402	5201	5901	0102	1202	0405	1502	0401	0601	
C14		0101	2402	3701	5102	0602	1502	1001	1401	0501	0502	
C15		0201	2402	3501	5201			0403	1502	0302	0601	
C16		0201	0206	1511	4801	0303	0801	0803	1401	0502	0601	
C17		2402	2602	0702	4403	0702	1403	0101	0804	0302	0501	
C18		2402	3101	3901	5201	0702	1202	0101	1502	0501	0601	
C19		0201	0206	3901	4006	0702	0801	0405	0405	0401	0401	
C20		2603	3101	5101	5101	0304	1402	1101	1401	0303	0502	

表2 HLA *0201, *0206アリル頻度の相関

	HLA	GF (%)		HLA	p値	OR; 95%CI
発症群	*0201	3.6	発症群 vs 非発症群	*0201	0.04	0.09<0.30<0.97
	*0206	21.4		*0206	0.11	0.75<3.18<13.48
非発症群	*0201	18.4	発症群 vs 健常人	*0201	0.04	0.09<0.30<0.95
	*0206	7.9		*0206	0.02	1.19<2.69<6.04
健常人	*0201	11.2	非発症群 vs 健常人	*0201	0.15	0.81<1.79<3.96
	*0206	9.2		*0206	0.74	0.31<0.85<2.29

健常人の遺伝子頻度は中央骨髄データセンターより引用(<http://www.bmdc.jrc.or.jp/index.html>)

GF: gene frequency

のアリルにより相反する症状を示す方向に誘導していると思われる。また、両群を統合した場合には健常人群とは全くアリル頻度に有意差を示していないことからこの遺伝子の機能が関係しているようである。本解析で候補になった遺伝子は、急性炎症やアポトーシスなど免疫反応に中心的役割を果たす転写因子と競合作用をする転写因子を調節する遺伝子とされている。

今後この遺伝子内のSNPsを用いたFine Mappingを行い再現性を検討する予定である。

今回HLAタイピングおよびGWASを行ったサンプル数はとても統計学的な精度を確証できるものではない。通常GWASを用いたケースコントロール研究では、オッズ比3の関連の強さをもつSNPを検出力80%で見つけるためには集団300人以上が必要とされている。統計学的な信憑性を得るには更に多くのサンプルについて検討しなければならない。しかし、今回のようなある疾患患者に、薬剤による薬剤性肺障害をもたらすか、否かの遺伝的背景を解析するコ

表3 GWASの解析結果

Marker	Chr	Alleles A/B	2 P値	R.R	Call Rate	Minor Allele	HWE p値	DD		Dd		dd		DD		Dd		dd	
								発症	非発症	発症	非発症	発症	非発症	健康人	健康人	健康人	健康人	健康人	
SNP-01	1	[C/T]	9.19E-06	20.8	1	C	0.863	2	0	11	2	1	17	36	224	356			
SNP-02	1	[A/G]	9.19E-06	20.8	1	G	0.863	2	0	11	2	1	17	33	253	364			
SNP-03	1	[A/T]	9.19E-06	20.8	1	A	0.863	2	0	11	2	1	17	32	264	361			
SNP-04	1	[A/G]	9.19E-06	20.8	1	G	0.863	2	0	11	2	1	17	29	255	369			
SNP-05	1	[C/T]	9.19E-06	20.8	1	T	0.863	2	0	11	2	1	17	29	234	369			
SNP-06	1	[A/G]	9.19E-06	20.8	1	A	0.863	2	0	11	2	1	17	28	260	369			
SNP-07	1	[C/T]	9.19E-06	20.8	1	T	0.863	2	0	11	2	1	17	30	200	368			

表4 発症・非発症群と健康人とのアリル頻度の相関

Marker	2x3 DD+Dd/dd		OR	2x3 DD+Dd/dd		OR	2x3 DD+Dd/dd		OR
	p値	OR		p値	OR		p値	OR	
SNP-01	0.0008	0.00016	17.8	0.021	0.0057	0.16	0.933	0.713	1.14
SNP-02	0.0011	0.00028	16.55	0.014	0.0037	0.15	0.964	0.87	1.06
SNP-03	0.0014	0.00038	15.85	0.011	0.0028	0.14	0.953	0.964	1.02
SNP-04	0.0008	0.00024	16.89	0.016	0.0042	0.15	0.903	0.824	1.08
SNP-05	0.0005	0.00013	18.24	0.024	0.0066	0.17	0.873	0.662	1.17
SNP-06	0.0008	0.00026	16.66	0.015	0.0038	0.15	0.883	0.855	1.07
SNP-07	0.0002	0.000039	20.8	0.045	0.013	0.19	0.724	0.422	1.33
	発症群 vs 健康人			非発症群 vs 健康人			発症・非発症群 vs 健康人		

ホート研究は、サンプリング段階で多くのバイアスを排除しているため、検体数がケースコントロール研究のように多くなくても信頼性の高い結果が得られると考えられる。特に、今回の結果では、有意差を示したSNPsは何れも相対危険度(R.R.: Relative Risk)が20倍以上の値を示していることからこの遺伝子は、薬剤性肺疾患、特に特発性肺線維症などの間質性肺炎をもたらす遺伝的要因として働いている可能性が高いと思われた。

D. 論文発表

1. Hanaoka M, Droma Y, Ota M, Ito M, Katsuyama Y, Kubo K. Polymorphisms of human vascular endothelial growth factor gene in high-altitude pulmonary oedema high-altitude pulmonary oedema susceptible subjects. *Respirology* 14:46-52, 2009.

2. Ota M, Asamura H, Oki T, Sada M. Restriction enzyme analysis of PCR products. *Methods Mol Biol*; 578:405-14, 2009.

E. 知的財産権の出願・特許状況

なし

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

分担研究報告
薬剤性肺障害における遺伝子マーカーに関する
遺伝子学的検討等に係る研究

分担研究者 花岡 正幸

信州大学医学部内科学第一講座 准教授

研究要旨

遺伝子解析を実施した薬剤性肺障害12例の臨床的特徴をまとめた。ほとんどが発熱、息切れ・呼吸困難で発症し、薬剤はジェムシタビンが5例と多く、次いでエタネルセプトが2例であった。薬剤の投与期間は20日から1年2ヶ月とばらつきが大きく、用量依存性は認めなかった。血液中のKL-6が増加する症例が多く、胸部高分解能CTでは両側下肺野優位のすりガラス陰影の頻度が高かった。気管支肺胞洗浄（BAL）検査が施行された症例では、細胞分画にてリンパ球が増多するケースが多かったが、正常のBAL所見を呈する場合もあった。薬剤リンパ球刺激試験（DLST）の陽性例は1例のみで、残りの症例は臨床的に診断された。大多数が副腎皮質ステロイド薬にて治療され、臨床的改善を認めた。以上の検討から、薬剤性肺障害は多様性に富む疾患であり、確定診断には他疾患の鑑別が非常に重要と考えられた。さらに、遺伝子情報など薬剤性肺障害における体質的素因が明らかとなれば、診断の有力な根拠になる可能性があると思われた。

A. 研究目的

近年、薬剤による肺障害の報告が増加しているが、診断は必ずしも容易ではない。薬剤性肺障害の診断は、すべての薬剤に肺障害を起こす可能性があることを認識し、疑うことから始まる。薬剤性肺障害の診断として、次のような基準が提唱されている。

- ① 原因となる薬剤の摂取歴がある。
- ② 薬剤に起因する臨床病型の報告がある。
- ③ 他の原因疾患が否定される。

④ 薬剤の中止により病態が改善する。

⑤ 再投与により増悪する。

すなわち、薬剤性肺障害は除外診断であり、病歴、自覚症状、血液検査、画像所見および気管支肺胞洗浄所見などを総合した臨床診断に頼っているのが現状である。そこで、今回遺伝子解析を行った薬剤性肺障害16例中12例の臨床像をまとめ、その特徴を分析した。

B. 研究方法

2008年3月から2009年6月までの間に信州大学医学部附属病院へ入院し、薬剤性肺障害と診断された12例を対象とした。全例が男性で、平均年齢は72歳であった。基礎疾患は、肺癌4例、関節リウマチ3例、残りは間質性肺炎、膵臓癌、胆嚢癌、心房細動、筋委縮性側索硬化症がそれぞれ1例ずつであった。

(倫理面への配慮)

本研究は信州大学医学部倫理委員会より実施を承認されており(課題名; 薬剤性肺障害における遺伝子学的検討, 承認日時および番号; 2008年4月8日、No.243.)、今回の検討では全症例から、文書による同意を得ている。

C. 研究結果

自覚症状は、発熱、息切れ・呼吸困難が圧倒的に多く、無症状で偶然発見されたのは1例のみであった。原因薬剤はジェムシタピンが5例と多く、次いでエタネルセプトが2例、残りはメトトレキサート、カルベジロール、塩酸ペプリジル、エルロチニブ、リルゾールがそれぞれ1例ずつであった。薬剤の平均投与期間は4.2ヶ月であったが、内訳は20日から1年2ヶ月とばらつきが大きく、用量依存性は認めなかった。9例で血液中のKL-6が増加し、12例の平均は913.7 U/mlと高値を示した。全例に高分解能CT検査が施行されており、画像所見として両側下肺野優位のすりガラス陰影の頻度が高かったが、一部に網状影、斑状影、浸潤影なども認められた。7例に気管支肺胞洗浄(BAL)検査が施行され、細胞分画でリンパ球増多を5例に、好酸球増多を2例に認めたが、1例は正常BAL所見であった。薬剤リンパ球刺激

試験(DLST)は8例に行われたが、陽性例は1例のみで、残りの7例は陰性であった。DLST陽性例以外は、他疾患を除外することにより臨床的に診断されていた。治療として12例中10例で副腎皮質ステロイド薬が使用されたが、2例は薬剤の中止のみであった。基礎疾患として関節リウマチを有した2例は重篤な呼吸不全を呈し、ステロイドの他、免疫抑制剤の併用と人工呼吸管理を要した。いずれの症例も入院治療により臨床的改善を認めた。

D. 考察

今回の検討から薬剤性肺障害の臨床像は次のように要約できる。

- 1) 原因となる薬剤の投与中に、発熱や呼吸困難で発症する。
 - 2) 薬剤の投与期間や用量には依存しない。
 - 3) 血液中のKL-6が増加する症例が多い。
 - 4) 高分解能CTで両肺にすりガラス陰影を認める症例が多い。
 - 5) BALの細胞分画でリンパ球あるいは好酸球が増多する症例が多い。
 - 6) DLSTの陽性率は低い。
 - 7) ほとんどの症例が原因薬剤の中止と副腎皮質ステロイド薬の投与により改善する。
- すなわち、薬剤性肺障害の確定診断は必ずしも容易ではなく、基礎疾患の肺病変の悪化や感染症などと十分に鑑別することが必要である。

過敏性反応による薬剤性肺障害の診断として、

- ① 薬物開始後(1~6週)に肺障害を認める。
- ② 初発症状として発熱、咳嗽、呼吸困難、発疹を認める(2項目以上を陽性とする)。
- ③ 末梢血液像に好酸球増多または白血球増多を認める。
- ④ 薬剤感受性テスト(リンパ球刺激テスト、

パッチテスト)が陽性である。

⑤ 偶然の再投与により肺障害が再現する。

の5項目のうち、確定診断には①、④または①、⑤を満たすことが必要で、疑い例は①、②または①、③を満たすこととされている。これらの中で、客観的な診断項目は末梢血の好酸球増多と薬剤リンパ球刺激試験(DLST)である。特にDLSTは、定量化により陽性基準が設定されており、一部では信頼性の高い検査として汎用されている。しかし、偽陰性率が高いことは良く知られており、この偽陰性・偽陽性の問題、検査に使用する薬剤の濃度基準の問題、不溶性薬剤の問題など幾つかの問題点が指摘されている。今回検討した12例でも、DLSTが陽性であったのは僅か1例であった。現状では薬剤性肺障害を客観的に確定できる検査は存在せず、本症の診断をより難しくしている。

2007年度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」において、信州大学の太田正穂らは薬剤性肺障害群にHLA-A*0206アリルと薬物代謝酵素(CYP2C19)の遺伝子多型が高頻度であったと報告した。薬剤性肺障害において、このような遺伝子解析が進めば、発症予備軍のスクリーニングに威力を発揮することは想像に難くない。さらに、発症機序を踏まえた遺伝子解析の成果は、本症の診断に極めて有用と思われる。DLSTに代わる診断ツールの構築に向け、症例の蓄積と遺伝子解析の継続が重要と考える。

E. 結論

薬剤性肺障害の臨床像は多様性に富んでいる。明確な診断基準はなく、除外診断による臨床診断に頼っているのが現状である。本症の遺伝子解析が進めば、遺伝情報に基づいた診断方法と治療戦

略の構築が期待される。さらに症例数を増やし、臨床データの分析と疾患感受性遺伝子の解析を行う必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hanaoka M, Droma Y, Ota M, Ito M, Katsuyama Y, Kubo K. Polymorphisms of human vascular endothelial growth factor gene in high-altitude pulmonary edema susceptible subjects. *Respirology* 2009; 14: 46-52.
- 2) Chen Y, Hanaoka M, Chen P, Droma Y, Voelkel NF, Kubo K. Protective effect of beraprost sodium, a stable prostacyclin analog, in the development of cigarette smoke extract-induced emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 296(4): L648-56.
- 3) Komatsu Y, Fujimoto K, Yasuo M, Urushihata K, Hanaoka M, Koizumi T, Kubo K. Airway hyper-responsiveness in young adults with asthma that remitted either during or before adolescence. *Respirology* 2009; 14: 217-23.
- 4) Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, Geraci MW, Hanaoka M, Loyd JE, Newman JH, Phillips JA 3rd, Soubrier F, Trembath RC, Chung WK. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(1 Suppl): S32-42.
- 5) Suzuki T, Hanaoka M, Yokoyama T, Koizumi

- T, Kubo K. Gradual progression of interstitial pneumonia induced by bepridil. Intern Med 2009; 48: 2033-5.
- 6) Droma Y, Hanaoka M, Kubo K, Kobayashi T. An association study of polymorphisms of the hypoxia-inducible factor and von Hippel-Lindau tumor suppressor protein genes with symptoms of acute mountain sickness in Sherpas. Japanese Journal of Mountain Medicine 2009; 29: 133-8.
- 7) Kanda S, Fujimoto K, Komatsu Y, Yasuo M, Hanaoka M, Kubo K. Evaluation of respiratory impedance in asthma and COPD by an impulse oscillation system. Intern Med 2010; 49: 23-30.
- 8) 花岡正幸、久保恵嗣. COPDの治療—増悪時. 臨床と研究 第86巻第2号 第19頁～第22頁 2009年.
- 9) 花岡正幸. 高地肺水腫. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.9 呼吸器症候群 (第2版) II—その他の呼吸器疾患を含めて—. 第225頁～第228頁 2009年.
- 10) 花岡正幸. 血胸. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.10 呼吸器症候群 (第2版) III—その他の呼吸器疾患を含めて—. 第374頁～第376頁 2009年.
- 11) 花岡正幸、久保恵嗣. 肺塞栓症—Overview. 呼吸 第28巻第4号 第371頁 2009年.
- 12) 吾妻俊彦、小泉知展、安尾将法、漆畑一寿、山本洋、花岡正幸、藤本圭作、久保恵嗣. Gemcitabine/Docetaxel併用化学療法後に免疫性溶血性貧血を来した肺扁平上皮癌の1例. 癌と化学療法 第36巻第7号 第1145頁～第1147頁 2009年.
- 13) 花岡正幸、久保恵嗣. COPDの病態生理と病因. 呼吸器科 第16巻第2号 第153頁～第157頁 2009年.
- 14) 花岡正幸. 呼吸器疾患に伴う肺高血圧症. 総合臨床 第58巻第11号 第2281頁～第2285頁 2009年.
- 15) 花岡正幸. 肺高血圧症をめぐる—肺高血圧症の治療指針. 呼吸器科 第16巻第3号 第216頁～第221頁 2009年.
- 16) 横山俊樹、山本 洋、福嶋敏郎、吾妻俊彦、牛木淳人、松原美佳子、小林孝至、田名部毅、安尾将法、漆畑一寿、花岡正幸、小泉知展、藤本圭作、久保恵嗣. エタネルセプト使用中に発症した間質性肺炎の1例. 日本呼吸器学会雑誌 第47巻第10号 第870頁～第874頁 2009年.
- 17) 花岡正幸. 小中高校生の集団登山における注意. 登山の医学ハンドブック 改訂第2版. 第153頁～第158頁 2009年.
- 18) 花岡正幸、久保恵嗣. 禁煙教育. チーム医療のための呼吸ケアハンドブック. 第127頁～第138頁 2009年.
- 19) 原田智紀、安藤隼人、井出里香、稲次潤子、井本重喜、梶谷 博、金子 宏、神尾重則、上子牧憲寛、久保恵嗣、黒川 恵、児玉 康、許斐真由子、小林俊夫、斉藤 繁、笹尾 玄、志賀尚子、関口令安、高山守正、夏井裕明、西岡隆文、貫田宗男、橋本しをり、花岡正幸、増山 茂、堀井昌子. 3年目に入ったJSMM登山者検診ネットワークで見えてきた疾患関連遭難事故防止への方策. 登山医学 第29巻第1号 第29頁～第35頁 2009年.
- 20) 花岡正幸. 低酸素への順化と高地性心肺脳障害の成因と対策 —呼吸器病学における最近の進歩から—. 登山医学 第29巻第1号 第50頁～第54頁 2009年.