

201128014A

厚生労働省科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

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  
素因に關する研究

平成23年度総括研究報告書

研究代表者 萩原弘一

平成24(2012)年 3月

厚生労働科学研究補助金

難治性疾患克服研究事業

特発性肺線維症急性増悪及び薬剤性肺障害に関与する日本人  
特異的遺伝素因に関する研究

平成 23 年度研究報告書

## 目次

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| 総括研究報告. . . . .         | 1   |
| 平成 23 年度経過報告. . . . .   | 9   |
| 班会議プログラム. . . . .       | 11  |
| 班会議講演内容. . . . .        | 13  |
| 集積症例画像集. . . . .        | 23  |
| 特発性肺線維症急性増悪. . . . .    | 25  |
| 薬剤性肺障害. . . . .         | 55  |
| 遺伝子解析研究手法開発. . . . .    | 107 |
| 研究成果の刊行に関する一覧表. . . . . | 127 |

厚生労働科学研究補助金 難治性疾患克服研究事業  
特発性肺線維症急性増悪及び薬剤性肺障害に関与する日本人特異的遺伝素因に関する研究

名簿【平成 23 年度】

|       |       |                                |             |
|-------|-------|--------------------------------|-------------|
| 研究代表者 | 萩原弘一  | 埼玉医科大学（埼玉医科大学病院）・呼吸器内科 教授<br>学 |             |
| 研究分担者 | 杉山幸比古 | 自治医科大学（自治医科大学附属病院）・呼吸器<br>内科学  | 教授          |
| 〃     | 酒井文和  | 埼玉医科大学（国際医療センター）・画像診断科         | 教授          |
| 〃     | 田口善夫  | 天理よろづ相談所病院                     | 内科部長        |
| 〃     | 本間栄   | 東邦大学医療センター大森病院・呼吸器内科学          | 教授          |
| 〃     | 谷口博之  | 公立陶生病院・呼吸器内科学                  | 参事・内科部<br>長 |
| 〃     | 滝澤始   | 杏林大学・呼吸器内科学                    | 教授          |
| 〃     | 瀬戸口靖弘 | 東京医科大学・呼吸器内科学                  | 教授          |
| 〃     | 長谷川好規 | 名古屋大学大学院医学系研究科病態内科学講座          | 教授          |
| 〃     | 海老名雅仁 | 東北大学（東北大学病院）・呼吸器内科学            | 准教授         |
| 〃     | 吾妻安良太 | 日本医科大学（日本医科大学付属病院）・呼吸器<br>内科学  | 教授          |
| 〃     | 井上義一  | NPO 近畿中央胸部疾患センター・呼吸器内科学        | 研究部長        |
| 〃     | 小林国彦  | 埼玉医科大学（国際医療センター）・呼吸器内科 教授<br>学 | 教授          |
| 〃     | 桑野和善  | 東京慈恵会医科大学・呼吸器内科学               | 教授          |
| 〃     | 冲永壮治  | 東北大学（東北大学病院）・呼吸器内科学            | 内科部長        |
| 〃     | 西條康夫  | 弘前大学大学院医学研究科                   | 教授          |
| 〃     | 藤田結花  | 国立病院機構旭川医療センター・呼吸器内科学          | 医長          |
| 〃     | 稲瀬直彦  | 東京医科歯科大学・呼吸器内科学                | 教授          |
| 〃     | 上甲剛   | 公立学校共済組合近畿中央病院放射線科             | 部長          |

|   |      |                           |       |
|---|------|---------------------------|-------|
| 〃 | 服部登  | 広島大学（広島大学病院）              | 准教授   |
| 〃 | 岡崎康司 | 埼玉医科大学（ゲノム医学研究センター）・ゲノム医学 | 研究所長  |
| 〃 | 迎寛   | 産業医科大学（産業医科大学病院）・呼吸器内科学   | 教授    |
| 〃 | 幸山正  | 東京大学大学院・呼吸器内科学            | 講師    |
| 〃 | 林龍二  | 富山大学（富山大学附属病院）・呼吸器内科学     | 助教    |
| 〃 | 前門戸任 | 宮城県立がんセンター・呼吸器内科学         | 主任研究員 |
| 〃 | 柴田陽光 | 山形大学医学部附属病院・呼吸器内科学        | 教授    |
| 〃 | 岸一馬  | 冲中記念成人病研究所・呼吸器内科学         | 部長    |
| 〃 | 臼井一裕 | NTT 東日本関東病院・呼吸器内科学        | 医長    |
| 〃 | 千葉弘文 | 札幌医科大学（札幌医科大学附属病院）・呼吸器内科学 | 助教    |
| 〃 | 原田敏之 | 北海道社会保険病院・呼吸器内科学          | 医長    |
| 〃 | 今野哲  | 北海道大学（北海道大学病院）            | 講師    |
| 〃 | 須谷顕尚 | 島根大学医学部内科学 がん化学療法教育学      | 助教    |
| 〃 | 小暮啓人 | 国立病院機構名古屋医療センター・呼吸器内科学    | 医員    |
| 〃 | 石田正之 | 長崎大学（長崎大学病院）・呼吸器内科学       | 助教    |
| 〃 | 森秀法  | 岐阜大学（岐阜大学医学部附属病院）・呼吸器内科学  | 医員    |

# 総括研究報告

- 平成 23 年度研究 -

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。近年、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。薬剤性肺障害や特発性肺線維症急性増悪に関する遺伝因子は多数あると想定されるが、その中でも特に強く関与する遺伝因子を1つ想定すると、民族差を説明しやすい。この考察を支持するものとして、集団の中で良く見られる疾患でも、一人の先祖から生じ集団内に広がった遺伝因子が関与しているという「common disease-common variant-common origin 仮説」がある。本研究では、(1) 薬剤性肺障害に関する遺伝因子が「common disease-common variant-common origin 仮説」に従い日本人に広がった、(2) 特発性肺線維症急性増悪に関する遺伝因子も「common disease-common variant-common origin 仮説」に従い日本人に広がった、という作業仮説にて研究を行っている。

サンプル採集は、薬剤性肺障害および特発性肺線維症急性増悪が疑われる呼吸器疾患患者より、末梢血リンパ球を採取、DNAを分離するとともに、EBウイルスを感染させてB細胞を不死化し、再度のDNA調整に備えている。

今後サンプル収集を継続し、全ゲノムハプロタイプ解析、全ゲノム関連解析、全ゲノムコピー数解析、Homozygosity mapping on homozygosity haplotype、エクソーム解析など、各種手法による解析を行う予定である。

## 1. 目的

### 研究の目的と作業仮説

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。

近年、日本人肺の脆弱性が指摘されている(Azuma A, Hagiwara K, Kudoh S. *Am J Respir Crit Care Med.* 177:1397, 2008)。(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(Azuma and Kudo, *JMAJ* 50:1-7, 2007: 表1)、(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り、高い致死率を示すと推定されることが(Azuma et al. *Am J Respir Crit Care Med.* 177:1397, 2008)が典型例である(表1)。これ以外にも(3) 皮膚筋炎に伴うびまん性肺胞障害(DAD)型の急性間質性肺炎は海外では非常に少ない(Kameda et al. *J Rheumatol* 34:1719, 2005 及び亀田私信)。(4) 肺線維症合併肺手術後の肺線維症急性増悪は海外にはあまり見られない(工藤私信)などがある。日本人は、特定の条件下で、びまん性肺胞障害(DAD)を起こしやすいようだ。

世界に民族差が明確な疾患は多数ある。その一例を図1に示す。病態に明確な民族差がある場合、民族特異的な遺伝因子があると考えられる。好例は「下戸の遺伝子」(ALDH2の変異遺伝子: アルコール代謝機能が低下する)である。「酒が飲めない人」は東洋人に限られる。「下戸の遺伝子」は中国で生じ、地域で広がったものだからである(Goeddel et al. *Hum Genet* 88:344, 1992)。日本には弥生時代に渡来人がもたらした。日本に入って2000年程度という新しい遺伝子だが、現日本人に高率に見いだされる(Shibuya et al. *Am J Hum Genet* 43:741, 1988)。特殊な状況(「下戸の遺伝子」ではアルコール摂取)のみで明確になる遺伝子は通常の生活では選択を受けないため、集団内に広がりやすい。

薬剤性肺障害や特発性肺線維症急性増悪に関する遺伝因子は多数あると想定されるが、その中でも特に強く関与する遺伝因子を1つ想定する(下戸におけるALDH2のように)と、民族差を説明しやすい。その遺伝因子が過去の日本で生じたと仮定すると、日本は島国であるため、日本でのみ高率に見られる疾患が生じる。肺の防御力を弱める遺伝因子なら、薬剤性肺障害や特発性肺線維症急性増悪等の共

通の原因にもなりうるだろう。

## 1. 目的

### 研究の目的と作業仮説

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与する遺伝因子の同定を目的としている。

近年、日本人肺の脆弱性が指摘されている (Azuma A, Hagiwara K, Kudoh S. *Am J Respir Crit Care Med.* 177:1397, 2008). (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 (Azuma and Kudo, *JMAJ* 50:1-7, 2007: 表 1), (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 (Azuma et al. *Am J Respir Crit Care Med.* 177:1397, 2008) が典型例である。これ以外にも (3) 皮膚筋炎に伴うびまん性肺胞障害 (DAD) 型の急性間質性肺炎は海外では非常に少ない (Kameda et al. *J Rheumatol* 34:1719, 2005 及び亀田私信)。 (4) 肺線維症合併肺手術後の肺線維症急性増悪は海外にはあまり見られない (工藤私信) などがある。日本人は、特定の条件下で、びまん性肺胞障害 (DAD) を起こしやすいようだ。

世界に民族差が明確な疾患は多数ある。その一例を図 1 に示す。病態に明確な民族差がある場合、民族特異的な遺伝因子があると考えられる。好例は「下戸の遺伝子」 (ALDH2 の変異遺伝子: アルコール代謝機能が低下する) である。「酒が飲めない人」は東洋人に限られる。「下戸の遺伝子」は中国で生じ、地域で広がったものだからである (Goeddel et al. *Hum Genet* 88:344, 1992)。日本には弥生時代に渡来人がもたらした。日本に入って 2000 年程度という新しい遺伝子だが、現日本人に高率に見いだされる (Shibuya et al. *Am J Hum Genet* 43:741, 1988)。特殊な状況 (「下戸の遺伝子」ではアルコール摂取) のみで明確になる遺伝子は通常の生活では選択を受けないため、集団内に広がりやすい。

薬剤性肺障害や特発性肺線維症急性増悪に関与する遺伝因子は多数あると想定されるが、その中でも特に強く関与する遺伝因子を 1 つ想定する (下戸における ALDH2 のように) と、民族差を説明しやすい。その遺伝因子が過去の日本で生じたと仮定すると、日本は島国であるため、日本でのみ高率に見られる疾患が生じる。肺の防御力を弱める遺伝因子なら、薬剤性肺障害や特発性肺線維症急性増悪等の共通の原因にもなりうるだろう。

この考察を支持するものとして、集団の中で良く見られる疾患でも、一人の先祖から生じ集団内に広がっ

た遺伝因子が関与しているという「common disease-common variant-common origin 仮説」がある (図 2)。呼吸器では  $\alpha 1$  アンチトリプシン欠損症、嚢胞性線維症がこの仮説に当てはまる。近年、この仮説は広く多因子疾患に当てはまることが分かって来た。現在施行されている疾患遺伝子解析の多くは、この仮説に基づいて開発された全ゲノム関連解析 (genome-wide association study: GWAS) を用いて行なわれている。呼吸器でも「ドイツのサルコイドーシスに関与する遺伝子 (Hoffman et al. *Nat Genet* 40:1103, 2008)」「ヨーロッパの肺癌に関与する異常ニコチン受容体遺伝子 (Thorgerirsson et al. *Nature* 452:638, 2008)」が見つまっている。

本研究では、(1) 薬剤性肺障害に関与する遺伝因子が「common disease-common variant-common origin 仮説」に従い日本人に広がった、(2) 特発性肺線維症急性増悪に関与する遺伝因子も「common disease-common variant-common origin 仮説」に従い日本人に広がった、という作業仮説のもと、両者が同一である可能性、異なる可能性を共に考慮に入れながら、各種解析手法により、両者の遺伝因子を特定する。両者の遺伝因子が同一か否か、比較対照しながら平行して研究する。

## 2. 方法と結果

### a. サンプル採集

特発性肺線維症急性増悪および薬剤性肺障害が疑われる呼吸器疾患患者より、末梢血リンパ球を採取、DNA を分離するとともに、EB ウイルスを感染させて B 細胞を不死化し、再度の DNA 調整に備える (図 3)。

上記の症例を集積した。EB virus virus による不死化は、ほぼ 5 割の症例において成功している。EB virus による不死化は、通常のリンパ球ならば成功率が高いが、本研究においては高くない。これは、ステロイドパルス療法を行った患者、ステロイド投与を通常行われている患者からのサンプルがある程度の割合を占めるためである。それらの症例では、末梢血リンパ球数が少なく、EB virus 不死化率の低下につながっていると思われる

### b. 臨床情報、画像情報収集

特発性肺線維症急性増悪および薬剤性肺障害で、本研究にて DNA を採集した患者の臨床情報、画像情報を収集し、特に予後不良と密接に結びつく臨床上、画像上の特徴を明らかにするとともに、さまざまな画像上の特徴で症例を層別化し、解析効率を上げる。

### c. SNP 解析



全ゲノム SNP 情報を収集するために、Affymetrix 社の SNP 6.0 により順次解析を行っている。

世界で広く使用されている SNP チップとしては、Illumina 社の 1MDuo と Affymetrix 社の SNP 6.0 が挙げられる。SNP 6.0 を選択した理由は、日本人健常人のデータが約 300 例集積されており、それらをコントロールとして利用可能なこと、Illumina 社と比べて情報やソフトウェアがオープンで、より容易に使用できることが挙げられる。Denmark の AROS 社では、安価な委託解析を行っており、一例 4 万円程度で全ゲノム SNP データを収集できる。そのため、AROS 社の委託解析を積極的に利用し、研究費を効率的に使用することとした。

#### d. 少数例からの SNP データ解析手法の開発

近年、遺伝的効果が極めて大きな遺伝子以外は、全ゲノム関連解析では解析力が不足し、極めて多数の症例を収集しなければならないことが明らかになってきている。本研究で想定している特発性肺線維症急性増悪遺伝子、薬剤性肺障害原因遺伝子は遺伝的効果の大きなものであるが、本研究で対象となる症例は重症の呼吸不全である場合が多く、検体収集は非常に困難である。そのため、少数例の患者データを効率的に解析する手法を使用する必要がある。

本研究では、少数例から効率的に疾患遺伝子を同定する手法を開発し、それをを用いて研究を行うことを一つの柱としている。

我々はホモ接合ハプロタイプ法を報告している。本法は優性遺伝子、劣性遺伝子双方に使用可能な手法であるが、それを多因子疾患であると想定される COPD (慢性閉塞性肺疾患) の疾患感受性遺伝子解析に応用した。この結果は、100 例以下の症例でも解析が可能と言うものであった。

我々は、劣性遺伝子に強力な解析力を発揮するホモ接合マッピング法を、定量化により効率的に使用する手法も開発し、それを利用して OPTN の異常が筋萎縮性側索硬化症を引き起こすことを同定した。

さらに、ホモ接合マッピング法とホモ接合ハプロタイプ法を組み合わせることにより、100 例以下の疾患集団より、その僅か 10% のみを説明する疾患遺伝子を同定することを見いだした (HM on HH 法)。これらの手法を効率的に使用し、本研究を進めていく予定である。

#### e. コピー数多型解析

人の染色体のコピー数には染色体の部位により多型が存在する。全ゲノムで染色体コピー数を見てみると、染

色体の一部が欠失している場合がある (図 5)。このような欠失が薬剤性肺障害、特発性肺線維症急性増悪患者に存在するか否かは検索する必要のある事項である。

#### f. エクソーム解析

本年度は、gefitinib, erlotinib, docetaxel 肺障害, IPF 急性増悪症例のうち、典型例の合計 60 例にエクソーム解析を施行した (図 6-8)。

gefitinib, erlotinib に続き、crizotinib でも致死性の薬剤性肺障害が認められることが明らかになった。これを受け、薬剤性肺障害の責任遺伝子が、tyrosine kinase シグナル伝達系、生存シグナル伝達系、さらに TNF 関連の炎症シグナル伝達系にあるとの仮説を立て、それらの伝達系に関連する遺伝子を中心に検索を開始した。検索遺伝子リストは以下のものである。

A6, A6PS1, A6PS2, A6R, AAK1, ABL, ACK, ACTR2, ACTR2B, ADCK1, ADCK2, ADCK3, ADCK4, ADCK5, AKT1, AKT1, AKT1S1, AKT2, AKT2, AKT3, AKT3, AKTIP, ALK, ALK1, ALK2, ALK4, ALK7, ALPHAK1, ALPHAK2, ALPHAK3, AMPKA1, AMPKA2, ANKRD3, ANPA, ANPB, APAF1, ARAF, ARAF, ARAFPS, ARG, ATM, ATR, AURA, AURAPS1, AURAPS2, AURB, AURBPS1, AURC, AXL, BAD, BARK1, BARK2, BAX, BCKDK, BCL10, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L10, BCL2L11, BCL2L12, BCL2L13, BCL2L14, BCL2L15, BCR, BID, BIKE, BLC2L2, BLK, BMPR1A, BMPR1APS1, BMPR1APS2, BMPR1B, BMPR2, BMX, BRAF, BRAF, BRAFPS, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT, BRK, BRSK1, BRSK2, BTK, BUB1, BUBR1, CAMK1A, CAMK1B, CAMK1D, CAMK1G, CAMK2A, CAMK2B, CAMK2D, CAMK2G, CAMK4, CAMKK1, CAMKK2, CAMLCK, CASK, CASP1, CASP10, CASP12, CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP8AP2, CASP9, CCK4, CCRK, CDC2, CDC37, CDC7, CDK10, CDK11, CDK2, CDK3, CDK4, CDK4PS, CDK5, CDK5PS, CDK6, CDK7, CDK7PS, CDK8, CDK8PS, CDK9, CDKL1, CDKL2, CDKL3, CDKL4, CDKL5, CFLAR, CGDPS, CHAK1, CHAK2, CHED, CHK1, CHK2, CHK2PS1, CHK2PS2, CHUK, CK1A, CK1A2, CK1APS1, CK1APS2, CK1APS3, CK1D, CK1E, CK1G1, CK1G2, CK1G2PS, CK1G3, CK2A1, CK2A1-RS, CK2A2, CLIK1, CLIK1L, CLK1, CLK2, CLK2PS, CLK3, CLK3PS, CLK4, COT, CREB1, CREB3, CREB3L1, CREB3L2, CREB3L3, CREB3L4, CREB5, CRIK, CRK7, CSK, CTK, CYGD, CYGF, CYLD, DAPK1, DAPK2, DAPK3, DCAMKL1, DCAMKL2, DCAMKL3, DDR1, DDR2, DIABLO, DLK, DMPK1,

DMPK2, DNAPK, DRAK1, DRAK2, DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3, DYRK4, EEF2K, EGFR, EPHA1, EPHA10, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHA8, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, EPHB6, ERK1, ERK2, ERK3, ERK3PS1, ERK3PS2, ERK3PS3, ERK3PS4, ERK4, ERK5, ERK7, FADD, FAK, FASTK, FER, FERPS, FES, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGR, FLT1, FLT1PS, FLT3, FLT4, FMS, FOXO1, FRAP, FRK, FUSED, FYN, G11, GAK, GCK, GCN2, GPRK4, GPRK5, GPRK6, GPRK6PS, GPRK7, GSK3A, GSK3A, GSK3B, GSK3B, H11, HASPIN, HCK, HER2/ERBB2, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, HH498, HIPK1, HIPK2, HIPK3, HIPK4, HPK1, HRI, HRIPS, HSER, HSP90AA1, HSP90AA4P, HSP90AA6P, HSP90AB1, HSP90AB2P, HSP90AB3P, HSP90AB4P, HSP90B1, HSP90B3P, HSPA12A, HSPA12B, HSPA13, HSPA14, HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSPA2, HSPA4, HSPA4L, HSPA5, HSPA6, HSPA7, HSPA8, HSPA9, HSPB1, HSPB11, HSPB2, HSPB2-C11ORF52, HSPB3, HSPB6, HSPB7, HSPB8, HSPB9, HSPBAP1, HSPBP1, HSPC072, HSPD1, HSPE1, HSPE1-MOB4, HSPG2, HSPH1, HUNK, HUWE1, ICK, IGF1R, IKBKE, IKBKG, IKGKB, IKKA, IKKB, IKKE, ILK, INSR, IRAK1, IRAK2, IRAK3, IRAK4, IRE1, IRE2, IRR, ITK, JAK1, JAK1, JAK2, JAK2, JAK3, JAK3, JNK1, JNK2, JNK3, KDR, KHS1, KHS2, KIS, KIT, KSGCPS, KSR1, KSR2, LATS1, LATS2, LCK, LIMK1, LIMK2, LIMK2PS, LKB1, LMR1, LMR2, LMR3, LOK, LRRK1, LRRK2, LTK, LYN, LZK, MAK, MAP1A, MAP1B, MAP1LC3A, MAP1LC3B, MAP1LC3B2, MAP1LC3C, MAP1S, MAP2, MAP2K1, MAP2K1, MAP2K1PS, MAP2K2, MAP2K2, MAP2K2PS, MAP2K3, MAP2K3, MAP2K4, MAP2K4, MAP2K5, MAP2K5, MAP2K6, MAP2K6, MAP2K7, MAP2K7, MAP3K1, MAP3K1, MAP3K10, MAP3K11, MAP3K12, MAP3K13, MAP3K14, MAP3K15, MAP3K2, MAP3K2, MAP3K3, MAP3K3, MAP3K4, MAP3K4, MAP3K5, MAP3K5, MAP3K6, MAP3K6, MAP3K7, MAP3K7, MAP3K8, MAP3K8, MAP3K9, MAP4, MAP4K1, MAP4K2, MAP4K3, MAP4K4, MAP4K5, MAP6, MAP6D1, MAP7, MAP7D1, MAP7D2, MAP7D3, MAP9, MAPK1, MAPK10, MAPK11, MAPK12, MAPK13, MAPK14, MAPK15, MAPK1IP1L, MAPK3, MAPK4, MAPK6, MAPK7, MAPK8, MAPK8IP1, MAPK8IP2, MAPK8IP3, MAPK9, MAPKAPK2, MAPKAPK3, MAPKAPK5, MAPKAPKPS1, MARK1, MARK2, MARK3, MARK4, MARKPS01, MARKPS02, MARKPS03, MARKPS04, MARKPS05, MARKPS07, MARKPS08, MARKPS09, MARKPS10, MARKPS11, MARKPS12, MARKPS13, MARKPS15, MARKPS16, MARKPS17, MARKPS18, MARKPS19, MARKPS20, MARKPS21, MARKPS22, MARKPS23, MARKPS24, MARKPS25, MARKPS26, MARKPS27, MARKPS28, MARKPS29, MARKPS30, MAST1, MAST2, MAST3, MAST4, MASTL, MCL1, MELK, MER, MET, MISR2, MLK1, MLK2, MLK3, MLK4, MLKL, MNK1, MNK1PS, MNK2, MOK, MOS, MPSK1, MPSK1PS, MRCKA, MRCKB, MRCKPS, MSK1, MSK2, MSSK1, MST1, MST2, MST3, MST3PS, MST4, MUSK, MYO3A, MYO3B, MYT1, NDR1, NDR2, NEK1, NEK10, NEK11, NEK2, NEK2PS1, NEK2PS2, NEK2PS3, NEK3, NEK4, NEK4PS, NEK5, NEK6, NEK7, NEK8, NEK9, NFKB1, NFKB1, NFKB2, NFKB2, NFKBIA, NFKBIA, NFKBIB, NFKBIB, NFKBID, NFKBID, NFKBIE, NFKBIE, NFKBIL1, NFKBIZ, NIK, NIM1, NLK, NR2C2, NRBP1, NRBP2, NUAK1, NUAK2, OBSCN, OSR1, P38A, P38B, P38D, P38G, P70S6K, P70S6KB, P70S6KPS1, P70S6KPS2, PAK1, PAK2, PAK2PS, PAK3, PAK4, PAK5, PAK6, PASK, PBK, PCTAIRE1, PCTAIRE2, PCTAIRE3, PDGFRA, PDGFRB, PDHK1, PDHK2, PDHK3, PDHK4, PDK1, PDK1, PDK2, PDK3, PDK4, PEK, PFTAIRE1, PFTAIRE2, PHKG1, PHKG1PS1, PHKG1PS2, PHKG1PS3, PHKG2, PIK3AP1, PIK3C2A, PIK3C2B, PIK3C2G, PIK3C3, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD, PIK3CG, PIK3IP1, PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, PIK3R4, PIK3R4, PIK3R5, PIK3R6, PIM1, PIM2, PIM3, PINK1, PITSLRE, PKACA, PKACB, PKACG, PKCA, PKCB, PKCD, PKCE, PKCG, PKCH, PKCI, PKCIPS, PKCT, PKCZ, PKD1, PKD2, PKD3, PKG1, PKG2, PKN1, PKN2, PKN3, PKR, PLK1, PLK1PS1, PLK1PS2, PLK2, PLK3, PLK4, PRKACA, PRKACB, PRKACG, PRKCA, PRKCB, PRKCD, PRKCDBP, PRKCE, PRKCG, PRKCH, PRKCI, PRKCQ, PRKCSH, PRKCZ, PRKX, PRKXPS, PRKY, PRP4, PRP4PS, PRPK, PSKH1, PSKH1PS, PSKH2, PTEN, PYK2, QIK, QSK, RAF1, RAF1, RAF1PS, RASA1, RASA2, RASA3, RASA4, RASA4P, RASAL1, RASAL2, RASAL3, RASD1, RASD2, RASEF, RASGEF1A, RASGEF1B, RASGEF1C, RASGRF1, RASGRF2, RASGRP1, RASGRP2, RASGRP3, RASGRP4, RASIP1, RASL10A, RASL10B, RASL11A, RASL11B, RASL12, RET, RHOK, RIOK1, RIOK2, RIOK3, RIOK3PS, RIPK1, RIPK1, RIPK2, RIPK2, RIPK3, RIPK3, RIPK4, RNASEL, ROCK1, ROCK2, RON, ROR1, ROR2, ROS, RPS6KA1, RPS6KA1, RPS6KA2, RPS6KA2, RPS6KA3, RPS6KA3, RPS6KA4, RPS6KA4,

RPS6KA5, RPS6KA5, RPS6KA6, RPS6KA6, RPS6KB1, RPS6KB2, RPS6KC1, RPS6KL1, RSK1, RSK2, RSK3, RSK4, RSKL1, RSKL2, RYK, RYKPS, SAKPS, SBK, SCYL1, SCYL2, SCYL2PS, SCYL3, SGK, SGK050PS, SGK069, SGK071, SGK085, SGK110, SGK196, SGK2, SGK223, SGK269, SGK288, SGK3, SGK307, SGK384PS, SGK396, SGK424, SGK493, SGK494, SGK495, SGK496, SIK, SKMLCK, SLK, SLOB, SMG1, SMMLCK, SNRK, SPEG, SRC, SRC, SRM, SRPK1, SRPK2, SRPK2PS, SSTK, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6, STK33, STK33PS, STLK3, STLK5, STLK6, STLK6-RS, STLK6PS1, SURTK106, SYK, TAB1, TAB2, TAB3, TAF1, TAF1L, TAK1, TAO1, TAO2, TAO3, TBCK, TBK1, TEC, TESK1, TESK2, TGFBR1, TGFBR2, TIE1, TIE2, TIF1A, TIF1B, TIF1G, TLK1, TLK1PS, TLK2, TLK2PS1, TLK2PS2, TNFAIP1, TNFAIP2, TNFAIP3, TNFAIP6, TNFAIP8, TNFAIP8L1, TNFAIP8L2, TNFAIP8L3, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNK1, TRAD, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6, TRAF7, TRB1, TRB2, TRB3, TRIO, TRKA, TRKB, TRKC, TRRAP, TSSK1, TSSK2, TSSK3, TSSK4, TSSKPS1, TSSKPS2, TTBK1, TTBK2, TTK, TTN, TXK, TYK2, TYRO3, TYRO3PS, ULK1, ULK2, ULK3, ULK4, VACAMKL, VRK1, VRK2, VRK3, VRK3PS, WEE1, WEE1B, WEE1BPS, WEE1PS1, WEE1PS2, WNK1, WNK2, WNK3, WNK4, XIAP, YANK1, YANK2, YANK3, YES, YESPS, YSK1, ZAK, ZAP70, ZC1/HGK, ZC2/TNIK, ZC3/MINK, ZC4/NRK

これらの遺伝子に見られる Non-Synonymous 変異で、さらに日本人特異的な変異を中心に検索をおこなっている。

### 3. 考察

薬剤性肺障害、特発性肺線維症急性増悪は、日本人に高率に認められ、日本で解決しなければならない問題である。今後患者サンプルの収集を継続するとともに、少数例からの疾患解析法を駆使して、疾患感受性遺伝子の解析を進めて行く予定である。

### 4. 英文アブストラクト

Investigation of the genetic factor(s) that involves in the drug-induced interstitial lung disease and acute exacerbation of the idiopathic pulmonary fibrosis

Drug-induced interstitial lung disease and acute exacerbation of the idiopathic pulmonary fibrosis

are serious diseases that are often lethal, and are frequently observed in Japan. Because of an apparent ethnic difference, the involvement of genetic factors are suggested. In order to identify the genetic factor, we are now conducting sample collection and genetic analyses using a variety of method. Firstly, we postulated that the genes just downstream of the EGFR may be the factors. We thus screened the exons in a total of 10 genes located in the EGFR signal transduction pathway and found not mutations in them. Secondly, we postulated that chromosomal deletion may be involved in the disease. We thus screened the chromosomal locations that are frequently deleted using samples from 6 patients with drug-induced interstitial pneumonia. The genes located in these regions will be further investigated. Lastly, we are aiming to perform homozygosity haplotype analysis using more than 100 patients, when the samples of this number become available.

表1 薬剤性肺障害発症頻度の国際比較 (Azuma and Kudoh JMAJ 50:1-7,2007 および中外製薬データ)

日本での頻度 (調査症例数) 海外での頻度 (調査した全症例数)

|         |              |                 |
|---------|--------------|-----------------|
| ゲフィチニブ  | 3.98%(4,473) | 0.3%(23,000)    |
| エロチニブ   | 2.7%(約 1800) | 0.2%(アジア人 372名) |
| レフルノミド  | 1.81%(3,867) | 0.017%(861,860) |
| プレオマイシン | 0.66%(3,772) | 0.01%(295,800)  |



図1 民族差のある呼吸器関連疾患

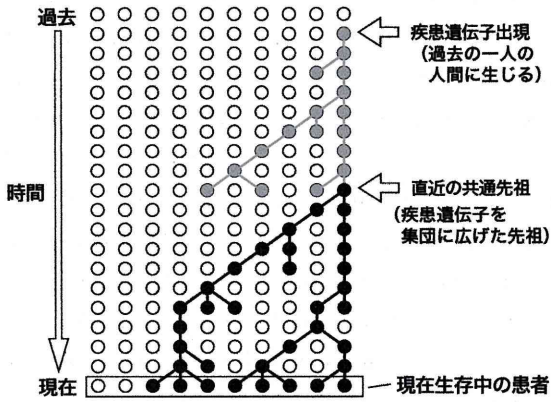


図2 common disease-common variant-common origin 仮説

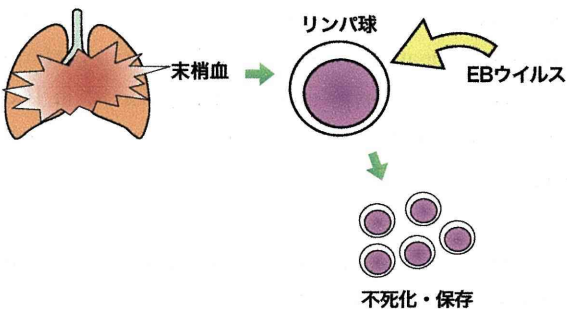


図3 サンプル収集とその手順

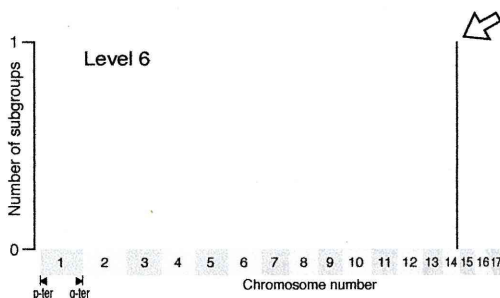


図4 HM on HH 法による解析. 60名の疾患集団より, その僅か10%を占める同一疾患遺伝子保有者が同定可能である.

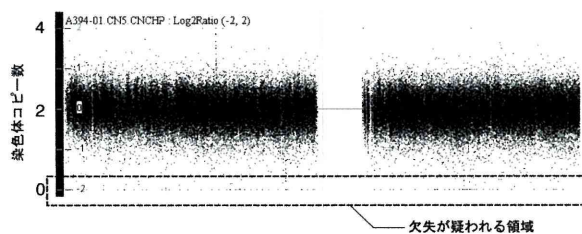


図5 染色体コピー数解析  
gefitinib 肺障害患者の染色体4番のデータを例として示す. 左が短腕, 空いている部分がセントロメア, 右が

長腕の一部. 染色体各部位のコピー数には個人差がある (copy number variation) ことが知られている. 通常のコピー数は2. 染色体の一部が存在しない (欠失) 部位 (図で染色体コピー数0の領域) の多くは非コード領域にあるが, コード領域にある場合には疾患原因となる.

|                     |               |        |
|---------------------|---------------|--------|
| Read length         | 100 bp        |        |
| Paired              | Yes           |        |
| Mapped reads        | 28,997,503    | 86.28% |
| Mapped confidently  | 27,032,210    | 80.43% |
| Mapped repetitively | 1,965,293     | 5.85%  |
| Reads not mapped    | 4,611,591     | 13.72% |
| no mapping          | 1,378,135     | 4.10%  |
| low quality         | 3,198,823     | 9.52%  |
| ribosomal RNA       | 19,323        | 0.06%  |
| primer              | 1,210         | 0.00%  |
| control (phiX-174)  | 14,084        | 0.04%  |
| Total reads         | 33,609,094    |        |
| Total bases         | 3,360,909,400 |        |

図6 1サンプルのエクソーム解析の内容. この程度のデータが得られる

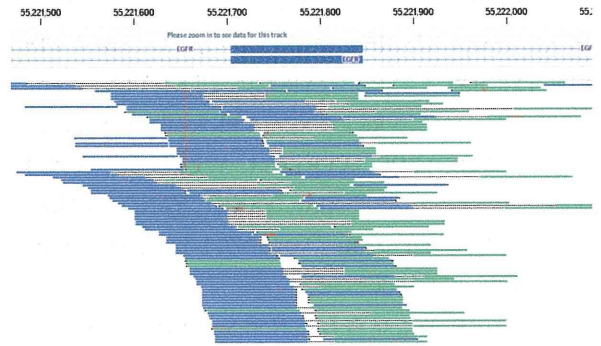


図7 1サンプルのエクソーム解析の mapping. EGFR の一エクソンを例に取った. 赤が reference sequence と異なる配列. 比較的良好な制度でシーケンスされている



図8 図7の部分拡大図

## 研究班平成 23 年度経過報告

厚生労働省 難治性疾患克服研究事業

「特発性肺線維症急性増悪及び薬剤性肺障害に関与する日本人特異的遺伝素因に関する研究」(H22-難治-一般-005)

#### 平成 23 年度第 1 回班会議プログラム

日時： 平成 23 年 7 月 22 日 (金曜日) 16:00 ~ 17:00

場所： 崎陽軒 本店 会議室 6F 2 号室

〒 220-0011 横浜市西区高島 2-13-121 TEL.045-441-8880 FAX.045-453-7808 <http://www.kiyoken.com/>

16:00 開会挨拶 研究代表者 埼玉医科大学 萩原弘一

16:05-16:45 「ゲノム科学の最先端と臨床医学」

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター センター長 岡崎康司先生

16:45-17:00 「症例収集, SNP データ収集の進行状況報告」 萩原弘一

17:00 閉会挨拶 萩原弘一

#### 平成 23 年度第 2 回班会議プログラム

日時： 平成 23 年 12 月 17 日 (土曜日) 14:00 ~ 15:00

場所： TKP 東京駅丸の内会議室「カンファレンスルーム 4」

「バイオマーカーに基づいた肺癌個別化治療における分子標的治療薬の至適治療法を検証するランダム化第Ⅲ相比較試験 (研究代表者 井上彰)」班会議と合同で施行

14:00 研究進捗状況報告 萩原弘一

## 第一回班會議講演內容

平成22年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

「特発性肺線維症急性増悪及び薬剤性肺障害に関する日本人特異的遺伝素因に関する研究」  
(H22-難治一般-005)

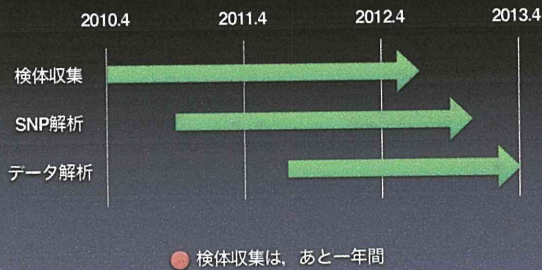
平成23年度第1回班会議

2011.7.22 崎陽軒本店 6F会議室

### 本研究班の目的

- 特発性肺線維症急性増悪に関する遺伝因子の同定
- 薬剤性肺障害に関する遺伝因子の同定
- ・ 上記の目的を達成するため、患者末梢血DNAを収集、解析する。

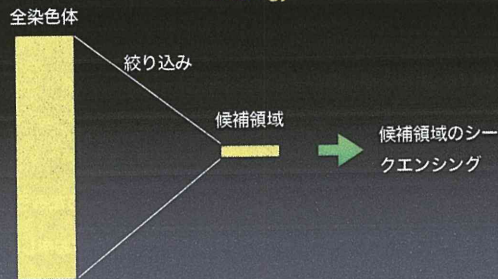
### 研究スケジュール（工程表）



### 収集症例

- 2011.07.22現在、データベースに419例登録
- （おそらく）特発性肺線維症急性増悪100例、薬剤性肺障害50例は解析に適した症例
- 250例近くに関しては、臨床情報、画像情報未収集
- 症例数をできるだけ多くしていきたい

### Strategy

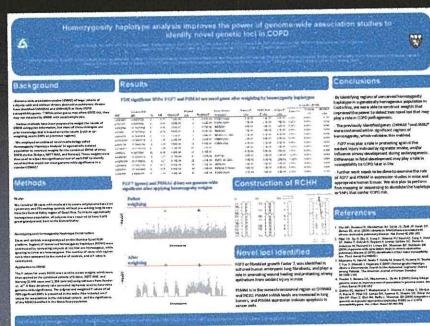


### 候補領域絞り込みのための手法

- GWAS
  - ・ GWASの限界が明らかになって来ているため、本解析ではあくまで補助的な手法との位置づけ
- Homozygosity haplotype法
- HM on HH法
- Massive parallel sequencingをどのように組み合わせるか

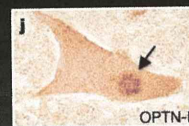
### Homozygosity haplotype

Am J Hum Genet 80, 1090-1102, 2007



Thorax in revision

### Amyotrophic lateral sclerosis



OPTN gene異常が筋萎縮性脊索硬化症を引き起こす

LETTERS

### Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis

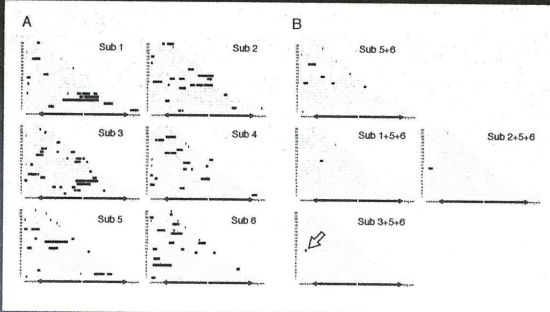
Hirofumi Maruyama<sup>1</sup>, Hiroyuki Morino<sup>1</sup>, Hidetami Ino<sup>1</sup>, Yasuhito Izumi<sup>1</sup>, Hidemasa Kato<sup>1</sup>, Yasuhiro Watanabe<sup>1</sup>, Yoshimi Kinoshita<sup>1</sup>, Masaki Kamada<sup>1</sup>, Hiroyuki Nodera<sup>1</sup>, Hideoori Suzuki<sup>1</sup>, Osamu Kemura<sup>1</sup>, Shinya Matsura<sup>1</sup>, Keitaro Kobatake<sup>1</sup>, Nobutoshi Morimoto<sup>1</sup>, Koji Abe<sup>1</sup>, Naoki Suzuki<sup>1</sup>, Masashi Aoki<sup>1</sup>, Akhiro Kawata<sup>1</sup>, Takashi Hirai<sup>1</sup>, Takao Kato<sup>1</sup>, Kazumasa Ogasawara<sup>1</sup>, Asoo Hirose<sup>1</sup>, Tetsu Takumi<sup>1</sup>, Hirotsune Kuwata<sup>1</sup>, Koichi Higawara<sup>1</sup>, Ryuji Kaj<sup>1</sup> & Hideaki Kawakami<sup>1</sup>

Nature 465:223-226, 2010

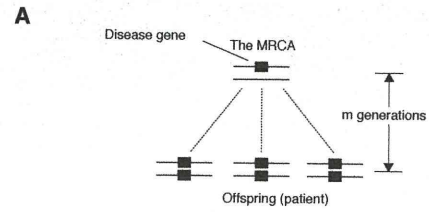


## qHomozygosity mapping

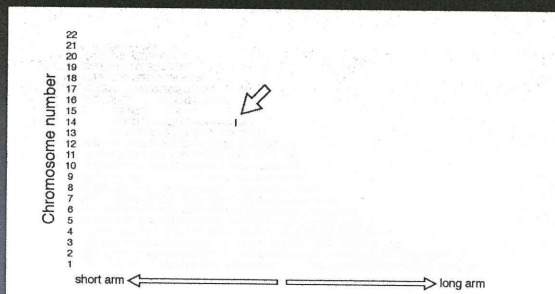
BMC bioinformatics 11 Suppl 7, S5, 2011



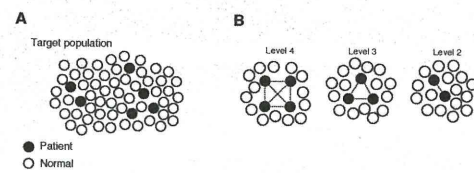
## HM on HH analysis



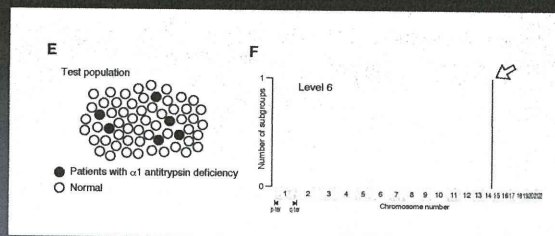
## HM on HH analysis



## HM on HH analysis



## HM on HH analysis



## まとめ

- 症例収集の期間はあと一年と思われる
- 順次症例データと画像データの収集をご依頼致します
- ことしの秋から実際のSNPデータでの解析が可能になるだろう
- 収集サンプルを他のゲノム解析手法で解析希望の先生はお申し出ください

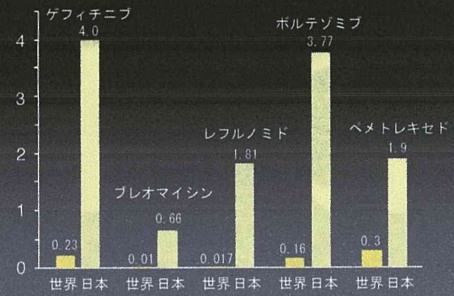
## 第二回班会議講演内容

### 特発性肺線維症急性増悪および薬剤性肺障害に関する日本人特異的遺伝素因に関する研究

埼玉医科大学呼吸器内科 萩原弘一

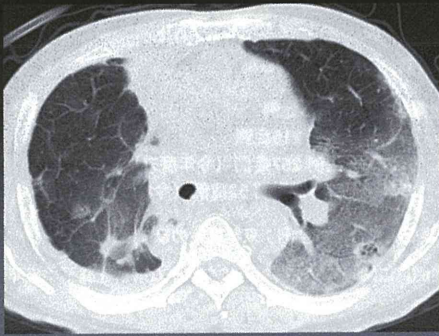
2011.12.17

### 日本と世界の薬剤性肺障害発生率



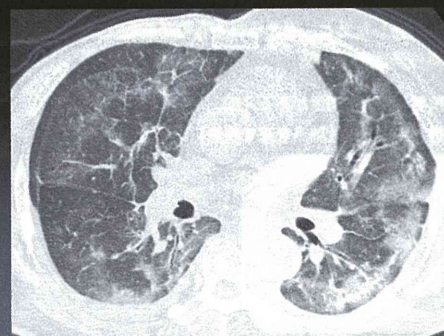
日本人は特定の薬剤で薬剤性肺障害を起こしやすい

症例CT写真



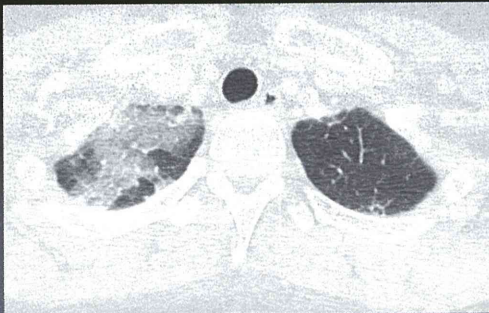
ゲフィチニブ

症例CT写真



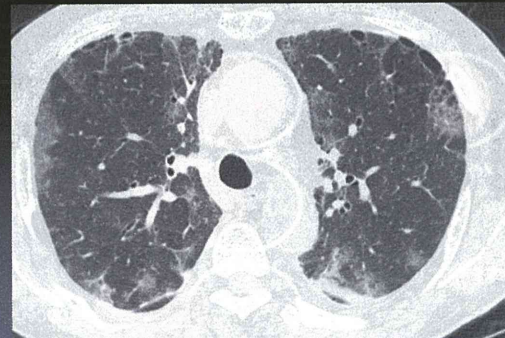
ハクリタキセル

症例CT写真



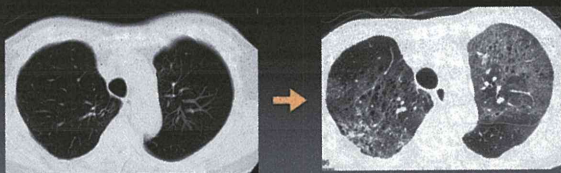
プレオマイシン

症例CT写真



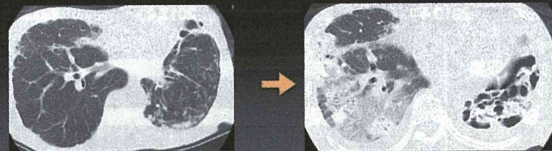
ドセタキセル

症例CT写真

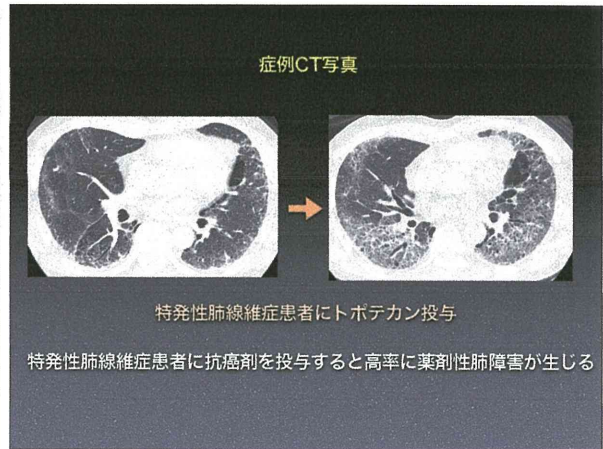
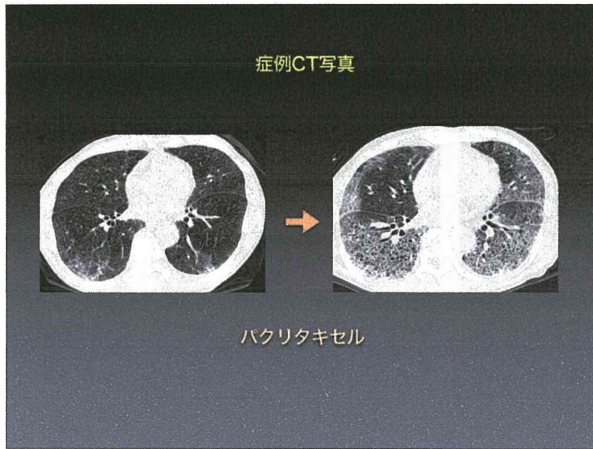


ゲフィチニブ

症例CT写真



UFT



薬剤性肺障害の診断

他疾患を除外したあと、考えられるものが薬剤性肺障害のみの場合に薬剤性肺障害と診断

- 薬剤投与と密接な関係がある発症
- 他疾患（特に間質性肺炎を来す疾患）を除外

SARSによる間質性肺炎（ウイルス性肺炎）

集積症例

おかげさまで、ここまで来ました

- 全集積症例数 433症例
  - 画像収集症例 215症例
  - SNP解析症例 257症例（今年度末）
  - エクソーム解析症例 52症例（今年度末）

画像収集をできるだけ全例：来年度始めまで

「コア症例」に関してSNP解析、エクソーム解析を終了：来年度中頃まで

誤診と集積症例数

臨床診断

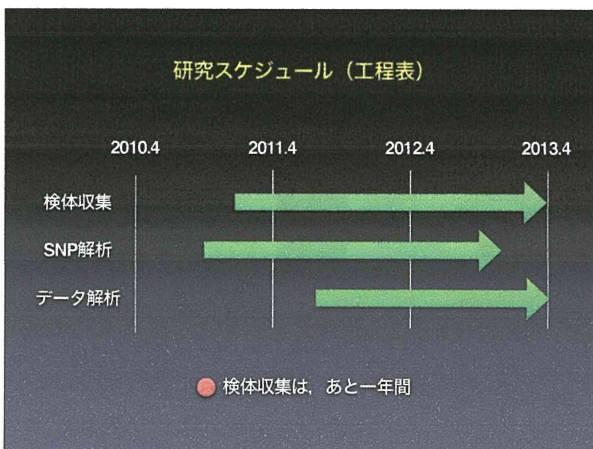
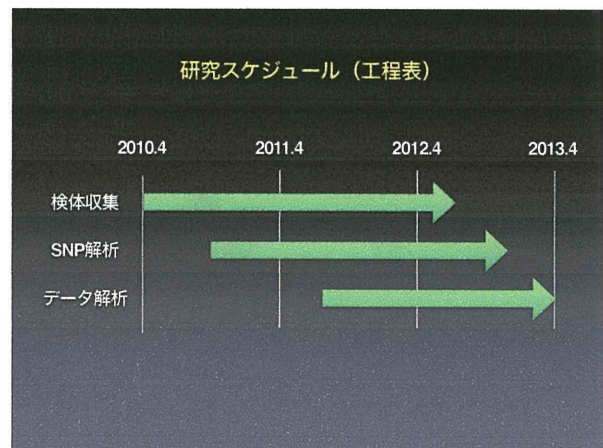
遺伝子Xの多型、変異

臨床家を中心とした研究が必須

100例程度

300例程度

1000例程度



薬剤性肺障害内訳

|             |    |            |     |
|-------------|----|------------|-----|
| ● イレッサ+タルセバ | 41 | ● S-1      | 4   |
| ● ドセタキセル    | 23 | ● インターフェロン | 3   |
| ● メトトレキサート  | 11 | ● UFT      | 2   |
| ● ハクリタキセル   | 11 |            |     |
| ● アリムタ      | 8  |            |     |
| ● アムルピシン    | 8  |            |     |
| ● アミオダロン    | 7  | ● IPF AE   | 109 |
| ● ゲムシタビン    | 6  |            |     |
| ● 漢方薬       | 6  |            |     |
| ● イリノテカン    | 4  |            |     |
| ● レボフロキサシン  | 4  |            |     |