

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業
(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24年度 総括研究報告書

研究代表者 萩原弘一

平成25(2013)年 3月

厚生労働科学研究補助金

難治性疾患等克服研究事業（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 24 年度研究報告書

目次

総括研究報告.	1
追加資料.	15
Gene X 説明スライド	23
健康危機情報報告.	29
特許出願受領書.	31
研究班平成 24 年度経過報告	33
第一回班会議講演内容.	37
第二回班会議講演内容.	41
遺伝学的解析プログラム集.	47
集積症例画像集.	57
研究成果の刊行に関する一覧表.	143

厚生労働科学研究補助金 難治性疾患等克服研究事業（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

名簿【平成 24 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 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	教授 内科学
〃	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 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	教授 内科学
〃	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 学
〃	桑野和善	東京慈恵会医科大学・呼吸器内科学	教授
〃	小倉高志	神奈川県立循環器呼吸器病センター	副院長
〃	冲永壮治	東北大学（東北大学病院）・呼吸器内科学	准教授
〃	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（富山大学付属病院）・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（札幌医科大学付属病院）・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
〃	永川博康	聖隷横浜病院・呼吸器内科	部長
〃	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
〃	上田哲也	大阪府済生会中津病院・呼吸器内科	副部長
〃	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
〃	森本浩之輔	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 24 年度研究 -

注意

本研究では、薬剤性肺障害および特発性肺線維症急性増悪の候補遺伝子を同定している。しかしながら、同遺伝子は学術雑誌に未発表であり、報告書執筆時点でも追加データを積み重ねている。本報告書は Web 公開される可能性がある。その場合、本報告書の内容を学術雑誌に投稿した場合、二重投稿と見なされる可能性を否定できない。報告書に記載したため、学術雑誌に投稿できなくなることは、厚生労働科学研究の本来の趣旨にそぐわず、国益を損ねることになる。よって、本報告書では候補遺伝子名を明確にせず、Gene X と記載する。また、Gene X の中で、重要な役割を演じていると考えられる塩基変化部位の dbSNP rsID を rsX, rsY などの暗号で記載する。

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学的研究

埼玉医科大学 呼吸器内科 萩原弘一

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。(1)薬剤性肺障害が他国(西洋や他のアジア人)より高頻度で見られ、高率に致死的な経過をたどること、(2)肺線維症を有する患者で他国より高頻度に急性増悪が起こり、高い致死率を示すと推定されることが典型例である。薬剤性肺障害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。

本研究では、上記の仮説に合致する遺伝子を発見した。この遺伝子は、両病態の民族差を明確に説明可能であり、また、現在までに両病態に関して得られている知見を説明可能である。

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。

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.

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)

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.



図 1 民族差のある呼吸器関連疾患

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.

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)」が見つかった.

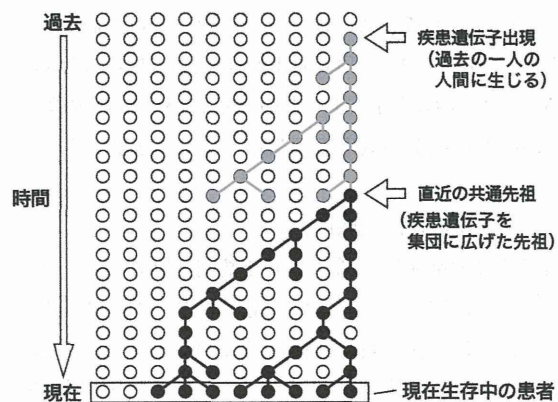


図 2 common disease-common variant-common

origin 仮説

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 調整に備えた (図 3)。

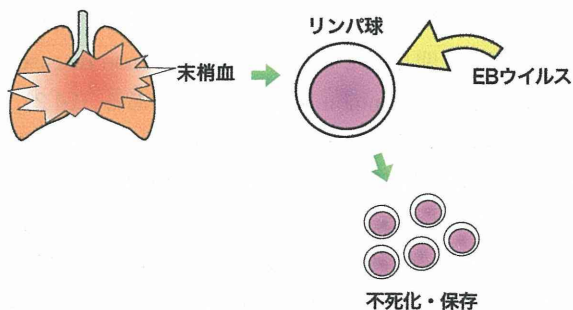


図3 サンプル収集とその手順

上記の症例を集積した。EB 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、画像情報を収集した。特に予後不良と密接に結びつく临床上、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する予定である。

c. エクソーム解析

全国30の協力医療機関より、442例の患者検体(イレッサ肺障害+タルセバ肺障害49例、ザーコリ肺障害3例、ドセタキセル38例など薬剤性肺障害合計262例、特発性肺線維症急性増悪141例など間質性肺疾患180例)を収集した。そのうち、患者データ+患者画像を279例収集して診断の確認を行った。診断確実例のうち劇症例、死亡例を中心に、ヒト全遺伝子コード領域シーケンス解析(エクソーム解析)を98名(イレッサ肺障害+タルセバ肺障害36名、特発性肺線維症急性増悪45名、ザーコリ肺障害2名、ドセタキセル肺障害15名)に対して施行した。対照として、コーカシアン(53名)、中国漢人(68名)、日本人(70名)エクソームfastqデータを、1000人ゲノムプロジェクトのデータを収集しているsequence read archiveデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>)より取得した。全てのデータは、CLC Genomics Workbench (CLC bio)にてヒトゲノム標準配列(hg19)にmappingした。各患者で、90%以上のexon領域が10回以上読まれていることを確認したのち、Probabilistic variant detection アルゴリズムにて、ヒト標準配列と異なる塩基配列(以下、変異と記す)を取得した。

日本人(患者98名+対照70名)の1名以上で検出された変異のうち、アミノ酸変化を生じる変異(non-synonymous 変異)が全ゲノムで180215カ所存在した。これら全てについて、イレッサ肺障害患者+タルセバ肺障害患者合計36名と一般日本人70名で関連解析を行った。結果を図4に示す。多重検定であるため、Bonferroniの補正を行い、P値が0.001/180215以下のものを有意とした。この値は、通常の統計検定で、高度な有意差であるP=0.001に相当するものである。

エクソン捕捉の効率を使用しているエクソン捕捉キットごとに異なると考えられるため、孤立点はエクソン捕捉効率の違いによるartifactの可能性はある。本研究では、コントロールとして1000人ゲノムのデータを使用しているため、このようなartifactには注意を払う必要がある。しかし、有意点が尖塔状に集合している部分は、広い染色体領域において、変異に両群間の頻度差があることを示しており、artifactではない真の関連を示している可能性が高いと考えられた。

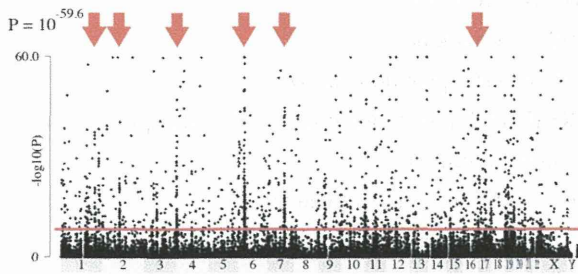


図4 non-synonymous 変異部位の関連解析. 横軸は染色体番号. 縦軸は $-\log_{10}(P)$. 矢印は尖塔状の領域で、真の関連を示している可能性が高いと考えられた領域. 赤線は $P = 0.001/180215$ を示す.

次に、有意な P 値を示した変異のみを選択し、それらに関して民族間頻度の比較をした。イレッサ肺障害、タルセバ肺障害では、以下の疫学データが知られている。

1. 日本人の発症頻度は 4% である。
2. 西洋人の発症頻度は日本人の 1/10 以下である。
3. 中国人での頻度は日本人ほど高くない

これを遺伝学的に翻訳すると以下ようになる。

イレッサ肺障害、タルセバ肺障害の責任遺伝子があるとすると、

1. 日本人での保有頻度は 4% 以上である。
2. 西洋人での保有頻度は日本人の 1/10 以下である。
3. 中国人での保有頻度は日本人ほど高くない。

ある変異がイレッサ、タルセバ肺障害の原因であるならば、その変異は上記 1, 2, 3 を同時に満たす必要がある。各変異に関して、上記 1, 2, 3 を満たす確率をそれぞれ P_1, P_2, P_3 とした。 P_1, P_2, P_3 はエクソームデータを用い、ベイズ統計学によりベータ関数を用いて計算できる。各変異に関し、疫学データすべてを同時に満たす確率 P を $P = P_1 \times P_2 \times P_3$ として計算した。結果を図 5 に示す。

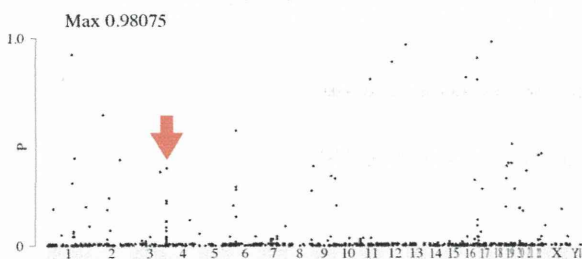


図5 各変異が疫学データを満たす確率 P (縦軸). 横軸は染色体番号. Gene X の位置を矢印で示す.

多くの変異は疫学データを説明することができず、その確率がほぼ 0 となるのが分かる。前記のように、

エクソーム捕捉キットの捕捉効率の違う部分の変異は、大きな確率 P を取る artifact を生じる可能性がある。そのため、図 5 で確率 P が 0 でない変異は、真の原因変異と artifact の両方が混ざっていると考えられる。

図 5 より、真の原因変異を選び出すため、疫学データを満たす確率 P が 0.1 以上の変異を全て集め、その変異の存在する遺伝子の機能、遺伝子発現部位を検討した。検討遺伝子数は 78 であった。遺伝子リストを表 1 に示す。その結果、肺で発現しており、イレッサ肺障害、間質性肺疾患と関連のある機能を有する遺伝子は Gene X のみであった。

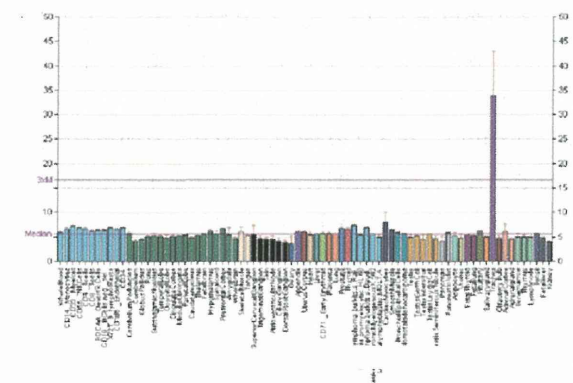
EIF2C1-002	eukaryotic translation initiation factor 2C, 1
CDCP2	CUB domain containing protein 2
NBPF9	neuroblastoma breakpoint family, member 9
NBPF16	neuroblastoma breakpoint family, member 16
DCAF8	DDB1 and CUL4 associated factor 8
DUSP27	dual specificity phosphatase 27 (putative)
PIK3C2B	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 beta
OBSCN	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF
TRIB2	tribbles homolog 2 (Drosophila)
DYSF	dysferlin, limb girdle muscular dystrophy 2B
ANKRD36C	ankyrin repeat domain 24
RGPD3	RANBP2-like and GRIP domain containing 3
FOXD4L1	forkhead box D4-like 1
NCKAP5	NCK-associated protein 5
SCN9A	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit
PPP4R2	protein phosphatase 4, regulatory subunit 2
SHOX2	short stature homeobox 2
Gene X	mucin 4, cell surface associated
PABPC4L	poly(A) binding protein, cytoplasmic 4-like
ATXN1	ataxin 1
OR2W1	olfactory receptor, family 2, subfamily W, member 1
HLA-G	major histocompatibility complex, class I, G
HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A
TRIM39	tripartite motif containing 39
TRIM39-RPP21	TRIM39-RPP21 readthrough
DDR1	discoidin domain receptor tyrosine kinase 1
VARS2	valyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial

C6orf15 chromosome 6 open reading frame 15
 HLA-B major histocompatibility complex, class I, B
 BTNL2 butyrophilin-like 2 (MHC class II associated)
 HLA-DOA major histocompatibility complex, class II, DO alpha
 HLA-DPA1 major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1
 VNN3 vanin 3
 CNOT4 CCR4-NOT transcription complex, subunit 4
 USP17L2 ubiquitin specific peptidase 17-like family member 2
 PTK2 PTK2 protein tyrosine kinase 2
 FLJ43860 uncharacterized protein LOC389690
 GLIS3 GLIS family zinc finger 3
 ANKRD20A1 ankyrin repeat domain 20 family, member A1
 OR13C2 olfactory receptor, family 13, subfamily C, member 2
 TOR2A torsin family 2, member A
 RABL6 RAB, member RAS oncogene family-like 6
 LCN12 lipocalin 12
 CDH23 cadherin-related 23
 TNKS1BP1 tankyrase 1 binding protein 1, 182kDa
 NCKAP5L NCK-associated protein 5-like
 FZD10 frizzled family receptor 10
 PLEKHO2 pleckstrin homology domain containing, family O member 2
 WDR90 WD repeat domain 90
 61E3.4 nuclear pore complex-interacting protein-like 3
 RP11-419C5.2 Uncharacterized protein
 ZCCHC14 zinc finger, CCHC domain containing 14
 ZNF276 zinc finger protein 276
 RP11-356C4.2
 MINK1 misshapen-like kinase 1
 RAI1 retinoic acid induced 1
 MYO15A myosin XVA
 SLC46A1 solute carrier family 46
 SLC38A10 solute carrier family 38, member 10
 C19orf26 chromosome 19 open reading frame 26
 CACTIN
 ANKRD24 ankyrin repeat domain 24
 GPR108 G protein-coupled receptor 108

MYO9B myosin IXB
 DMKN dermokine
 WDR87 WD repeat domain 87
 DYRK1B dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1B
 GP6 glycoprotein VI (platelet)
 NINL ninein-like
 MATN4 matrilin 4
 DNTTIP1 deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 1
 HELZ2 helicase with zinc finger 2, transcriptional coactivator
 ARFRP1 ADP-ribosylation factor related protein 1
 PDXK pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase
 TXNRD2 thioredoxin reductase 2
 GGT2 gamma-glutamyltransferase 2
 TRIOBP TRIO and F-actin binding protein
 RNF128 ring finger protein 128, E3 ubiquitin protein ligase
 表2 疫学データを満たす確率Pが0.1以上の遺伝子の全リスト (合計78遺伝子)

3. 考察

Gene Xは気管から細気管支にわたる気道上皮で高発現している。



<http://commons.wikimedia.org/wiki/>

図6 Gene Xの臓器別発現

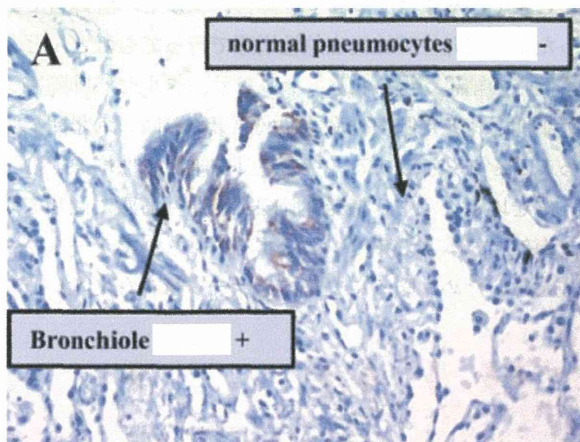


図7 肺組織での Gene X 発現. 細気管支上皮に発現が見られる. (J Histochem Cytochem)

図8に Gene X の構造を示す. Gene X は一つの遺伝子でコードされたタンパクが細胞外領域の α 鎖と細胞膜を貫通する β 鎖に分かれ, 図5のような構造を作る. α 鎖は高度に糖鎖が付くムチンとしての特徴的な構造を有している. β 鎖は3つの EGF (上皮細胞増殖因子) 様領域 (EGF-like domain) を有し, この領域を介して EGFR (上皮細胞増殖因子受容体) ファミリーである ERBB3 と結合し, 細胞内に生存シグナル, 増殖シグナルを伝達する. ヒトは20種近いムチン遺伝子を持っているが, このような構造を有するものは Gene X のみである. すなわち, Gene X は気道上皮において, EGF と同様の働きをしている. イレッサが, EGFR ばかりでなく, 構造の類似した ERBB3 のキナーゼ活性を遮断すると仮定すれば, 気道上皮全体での生存シグナル遮断, 増殖シグナル遮断につながり, 肺障害の原因となりうると考えられる.

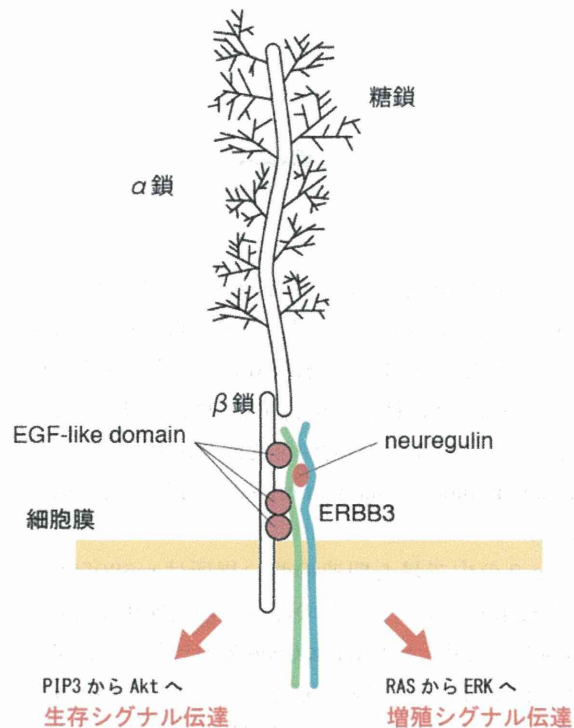


図8 Gene X の構造. Gene X は増殖因子としての役割を持っている. (FASEB Jより改変)

図8に Gene X の構造を示す. Gene X は一つの遺伝子でコードされたタンパクが細胞外領域の α 鎖と細胞膜を貫通する β 鎖に分かれ, 図5のような構造を作る. α 鎖は高度に糖鎖が付くムチンとしての特徴的な構造を有している. β 鎖は3つの EGF (上皮細胞増殖因子) 様領域 (EGF-like domain) を有し, この領域を介して EGFR (上皮細胞増殖因子受容体) ファミリーである ERBB3 と結合し, 細胞内に生存シグナル, 増殖シグナルを伝達する. ヒトは20種近いムチン遺伝子を持っているが, このような構造を有するものは Gene X のみである. すなわち, Gene X は気道上皮において, EGF と同様の働きをしている. イレッサが, EGFR ばかりでなく, 構造の類似した ERBB3 のキナーゼ活性を遮断すると仮定すれば, 気道上皮全体での生存シグナル遮断, 増殖シグナル遮断につながり, 肺障害の原因となりうると考えられる.

エクソーム解析で Gene X 遺伝子領域において得られた全ての変異 (関連解析では non-synonymous 変異のみを用いたが, 今回は synonymous 変異を含む) に関して, イレッサ肺障害患者+タルセバ肺障害患者合計36名と一般日本人70名で関連解析を行った. 結果を図9に示す.

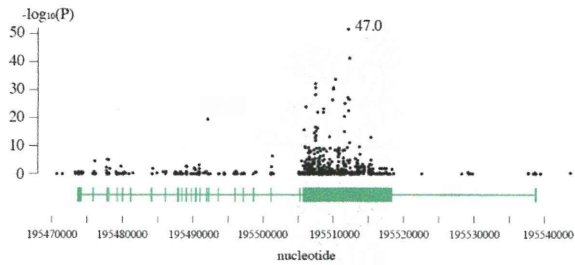


図9 Gene X領域の関連解析. Gene Xは染色体上 reserve strand に存在するため、図の右側がアミノ末端をコードする exon 1 である. Exon 2 に強い関連が見られる. Exon 2 は糖鎖が付着する領域で、16 アミノ酸をコードする 48 塩基対が可変長タンデムリピート (variable number of tandem repeat : VNTR) を形成している.

Exon 2 の中で最も関連の強い場所は rs6805660, rs62282486 であった. この部位での変異頻度を表 2 に示す. 表 2 中, Ref/Ref は Gene X のヒトゲノム参照配列 (標準的なヒトゲノム配列) のホモ, Ref/Alt は標準配列と変異配列のヘテロ, Alt/Alt は変異配列のホモである. 変異配列はコーカシアン, 中国人にはほとんど見られず, 日本人の 5-10% が保有し, イレッサ肺障害 + タルセバ肺障害患者ではほぼ全員が保有している. 疫学データから示される集団内遺伝子頻度と見事に合致している.

	Caucasian	Chinese	Japanese	Iressa Tarceva
rsX	51	0	2	68
rsY	53	0	0	68

表3 rsX, rsY での多型頻度. Ref/Ref はヒトゲノム標準配列のホモ接合, Alt/Alt は変異配列のホモ接合, Ref/Alt はヘテロ接合を示す.

Exon 2 領域は VNTR 領域であるため, 一つの標準配列に mapping するエクソームの手法は, このような領域では解釈に注意が必要である. Ref/Ref と Alt/Alt に mapping された個人が, この領域で異なる配列を有していることは間違いない. しかしながら, その違いは, rsX, rsY のような一塩基アミノ酸変異ではなく, VNTR の repeat 数を間接的に表している可能性が高い. rsX, rsY が Hardy-Weinberg 平衡に従っていないように見えるのも, これが原因と考えられる. すなわち, 表 2 で Ref/Alt のヘテロの患者が存在しない理由は, この mapping の影響を否定できない. Gene X のどのような変異が疾患と関連しているのか, 今後の VNTR 領域の解析が必要である.

ここまでの解析はイレッサ肺障害, タルセバ肺障害で行ったが, 特発性肺線維症急性増悪で行ってもほとんど全く同一の結果が得られる. イレッサ, タルセバ肺障害患者集団と特発性肺線維症急性増悪集団が同一の集団であることを強く示唆する. 特発性肺線維症急性増悪でのデータを以下に示す. 特発性肺線維症急性増悪に関しては, 海外と日本との頻度差に関する正確な疫学データが存在しないため, 図 5 に対応するデータは存在しない.

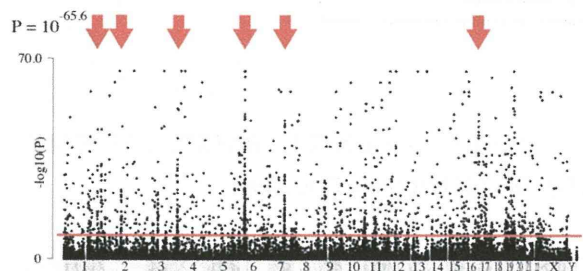


図10 特発性肺線維症急性増悪患者を用いた関連解析データ. 図4のイレッサ肺障害+タルセバ肺障害の図で示した矢印と同じ位置に矢印を置いた. 同一の部位に尖塔状の領域が見られる. 特発性肺線維症急性増悪とイレッサ肺障害+タルセバ肺障害の原因が同一であることを強く示唆する.

	Caucasian	Chinese	Japanese	IPF AE
rsX	51	0	2	68
rsY	53	0	0	68

表4 特発性肺線維症急性増悪のデータ (IPF AE: 特発性肺線維症急性増悪). 表3に対応している.

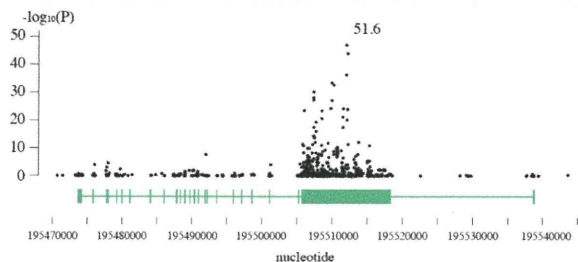


図11 特発性肺線維症急性増悪患者データ. 図9と対応している.

表6に, 抗がん剤タキソテル (docetaxel : DOC), 分子標的薬ザーコリ (crizotinib) による肺障害患者の多型データを示す. 症例数は少ないが, rsX, rsY に関連が認められる. 日本人に見られる肺障害が Gene X 変異と関連していることを示唆するデータである.

	Caucasian			Chinese			Japanese			DOC			Crizotinib		
	Ref/	Re	Alt/Alt/	Ref/	Re	Alt/Alt/	Ref/	Re	Alt/Alt/	Ref/	Re	Alt/Alt/	Ref/	Re	Alt/Alt/
	f	t	t	f	t	t	f	t	t	f	t	t	f	t	t
rsX	51	0	2	88	0	0	65	0	5	0	0	15	0	0	2
rsY	53	0	0	68	0	0	67	0	3	1	0	14	0	0	2

表6 ドセタキセル肺障害, ザーコリ肺障害患者データ。表4, 5 と対応している。

本研究で現在までに得られているデータは以上である。本来なら、もう少しデータを収集してから報告すべきと思われるが、Gene Xがヒト遺伝子の包括的解析でイレッサ肺障害の原因遺伝子として妥当性を有すると考えられた唯一の遺伝子であり、Gene Xの既知の構造、機能が、イレッサ肺障害、特発性肺線維症急性増悪、さらには肺線維化に関して現在までに知られている以下の疑問点に関して明確な回答を与えるものであり、さらにGene Xがイレッサ肺障害、特発性肺線維症急性増悪、肺線維化関連の病態の原因遺伝子であった場合、年間数千名の日本人の直接死亡原因となっている可能性が高く、「国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報」として想定されるため、ここに報告することとした。

Gene X変異はGene X機能減弱を引き起こすと想定している。

【イレッサ肺障害、特発性肺線維症急性増悪、さらには肺線維化に関する疑問について】

前記、イレッサ肺障害、特発性肺線維症急性増悪、さらには肺線維化に関して現在までに知られている疑問点とは、以下のようなものである。

- なぜ、イレッサ、タルセバ、クリゾチニブで肺障害が起こるのか
- なぜ、リウマチ薬で肺障害が起こるのか
- なぜ、イレッサの肺障害は日本人に多発するのか
- イレッサ肺障害、特発性肺線維症急性増悪は同一の原因なのか
- なぜ、イレッサの肺障害頻度はイレッサ服用患者の4%なのに、特発性肺線維症急性増悪の頻度は特発性肺線維症患者の1/3に及ぶのか
- なぜ、肺線維化のある患者では抗癌剤、放射線照射、手術で急性増悪を起こすのか
- なぜ、肺線維化がなくても急性増悪様症状を起こす人がいるのか、すなわち、急性進行性間質性肺炎の(少なくとも一部の)原因は何か

以下、これらに関して述べる。

- なぜ、イレッサ、タルセバ、ザーコリで肺障害が起

こるのか

この問題は、なぜ肺障害が問題になる薬剤が、チロシンキナーゼ阻害薬のうち、細胞内チロシンキナーゼドメインを作用点とするものに集中するのか、とも言い換えることができる。

チロシンキナーゼは、一つの先祖分子から発達したものであるため、全てのチロシンキナーゼのキナーゼ領域アミノ酸配列は酷似している。その結果、一つのチロシンキナーゼに対する阻害薬が他のチロシンキナーゼを同時に阻害する可能性は高い。イレッサはERBB2 (HER2) に対して阻害作用を有しないことは確認されているが、ERBB3 に対する情報は無い。イレッサ、タルセバ (EGFR チロシンキナーゼ阻害剤)、ザーコリ (ALK チロシンキナーゼおよび ROS チロシンキナーゼ阻害剤) が ERBB3 をも阻害すれば、気道上皮の生存シグナルの減弱につながる。今回同定された Gene X 変異が、Gene X の機能低下を来すものならば、ERBB3 阻害は大量の気道上皮細胞死を引き起こす可能性がある。すなわち、イレッサ肺障害、タルセバ肺障害、ザーコリ肺障害の原因は、気道上皮の ERBB3 阻害が原因である可能性が高い。

一方、チロシンキナーゼの細胞外領域は、各分子で大きく異なっている。このため、細胞外領域を標的とする抗 EGFR 抗体薬は、ERBB3 と反応せず、肺障害の原因とならないと推定される。

2. なぜ、リウマチ薬で肺障害が起こるのか

Gene X の発現は、炎症系のシグナル伝達の影響を受けていることが知られている (図9)。炎症系シグナル減弱は、Gene X 発現減弱につながる可能性があり、その結果肺障害を引き起こされる可能性がある。しかしながら、この図9だけでは、なぜリウマチ薬のうちアラバ (leflunomide) のみで高率に肺障害が起こるのかは明確でない。より詳しい研究が必要である。

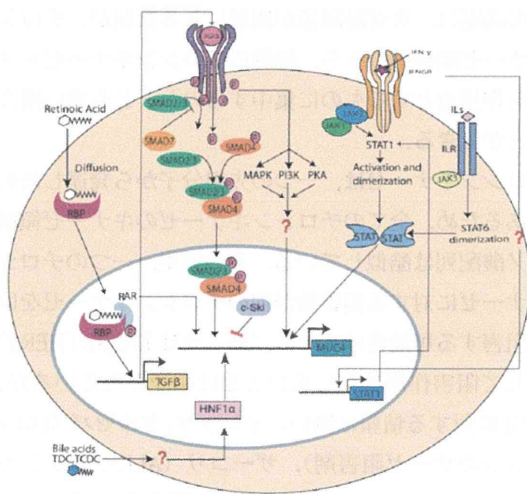


図 12 Gene X の発現調節 (FASEB J)

3. なぜ、イレッサの肺障害は日本人に多発するのか

Gene X 変異が日本人に多い変異であるためと説明できる (表 4)。

4. イレッサ肺障害, 特発性肺線維症急性増悪は同一の原因なのか

図 10, 表 5 のデータは, 特発性肺線維症急性増悪の原因も Gene X 変異であることを強く示唆している。

5. なぜ、イレッサの肺障害頻度はイレッサ服用患者の 4% なのに、特発性肺線維症急性増悪の頻度は特発性肺線維症患者の 1/3 に及ぶのか

イレッサを服用する患者は非小細胞肺癌患者である。非小細胞肺癌発生と Gene X 変異の関連が無いと想定する (現時点では明確なデータは無い)。この場合、日本人での Gene X 変異頻度は 4% 以上であることになる。

Gene X 変異が特発性肺線維症急性増悪の原因であり、特発性肺線維症急性増悪が特発性肺線維症患者の 1/3 で見られるならば、それは、Gene X 変異が特発性肺線維症急性増悪のみならず、特発性肺線維症自体の原因にもなっていることを示唆している。Gene X 変異を有する患者では、気道上皮の生存シグナルが減弱しており、慢性的な気道上皮障害が生じやすいと考えられる。Gene X の機能を考えると、この慢性気道上皮障害にステロイドは無効である。これは、特発性肺線維症にステロイドが無効なことと合致する。喫煙などによる刺激があると、気道上皮障害は促進されるだろう。その結果として特発性肺線維症が生じると考えると、喫煙高齢者に特発性肺線維症が多い事実が説明できる。そして、特発

性肺線維症の患者のうち Gene X 変異を有する患者は大きな割合を占めることになる。特発性肺線維症患者に大きな割合で急性増悪が生じる理由が、これで説明できる。

上記の仮説を検証するためには、特発性肺線維症患者での Gene X 変異保有率を確認する必要がある。

6. なぜ、肺線維化のある患者では抗癌剤, 放射線照射, 手術で急性増悪を起こすのか

Gene X 変異のある患者では、潜在的な慢性気道上皮障害が生じるため、線維化が起こりやすいと考えられる。よって、線維化のある患者には Gene X 変異が存在する可能性が高い。このような患者に抗癌剤, 放射線照射, 手術などの侵襲を加えると、変異 Gene X からの減弱した生存シグナルでは上皮の生存を支えきれず、大量の気道上皮細胞死が生じると考えられる。

7. なぜ、肺線維化がなくても急性増悪様症状を起こす人がいるのか、すなわち、急性進行性間質性肺炎の (少なくとも一部の) 原因は何か

気道上皮の生死は、生存シグナルと外部からの刺激とのバランスで決定されると考えられる。外部からの刺激が生存シグナルが耐えられないほど強いものであれば、Gene X 変異を有する患者では大量の気道上皮細胞死が生じる可能性がある。

以上、Gene X の機能は、イレッサ肺障害, 特発性肺線維症急性増悪, さらには肺線維化に関して現在までに知られている疑問点に関して明確な回答を与える。図 15 に Gene X 変異と各種病態の関連 (推定) をまとめた。

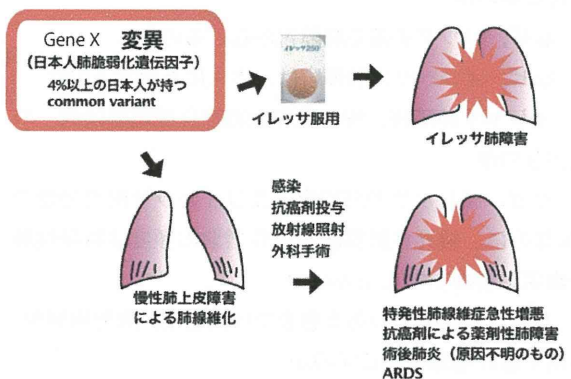


図 15 Gene X 変異と各種病態の関連図 (推定)

【今後導入される分子標的治療薬に関して】

本研究の結果が正しいと仮定した場合、細胞内チロシンキナーゼ阻害剤導入時には、その薬が ERBB3 を阻害

するか検証する必要が生じる。ERBB3 を阻害する薬剤は肺障害を起こす可能性が高い。

今回、新たなリウマチ薬として JAK3 キナーゼ阻害薬が日本に導入されることになった。JAK3 キナーゼ阻害薬が Gene X 転写を抑制するならば、それが肺障害を起こす可能性は否定できない (図 12)。慎重な観察が必要である。

【Gene X の exon 2 領域に関して】

Gene X の exon 2 領域は、遺伝子工学技術が最も苦手とする VNTR 構造を有している。このため、現時点では、変異 Gene X 保有患者を同定する手法は、本研究で用いたエクソーム解析を用いた手法しか存在しない。サザンハイブリダイゼーションを用いて、VNTR の長さでエクソーム解析で見いだされる Gene X 変異との明確な関連が見いだされれば、エクソーム解析の代わりにサザンハイブリダイゼーションを用いることができる。変異 Gene X を有する患者を同定する簡便な手法の確立、および変異 Gene X の明確な構造と機能との相関の解明には、今後一年余りの研究が必要と想定される。

Gene X の exon 2 領域の長さに関する検討を行った論文は 1 つある (図 13 Biochem J)。この論文では、どの患者も比較的長い VNTR を有するアレルを 1 つ以上有しており、短いアレルのホモの患者は存在しないことを指摘している (図 13C。48TR は 48 塩基のタンデムリピートを示す)。このことは、短いアレルがホモの個人は、発生過程または若年で死亡することを示唆している。VNTR が短い Gene X は機能が減弱しているという報告もある。Gene X 変異の本質は、VNTR の長さの短縮ではないか、と考える理由である。

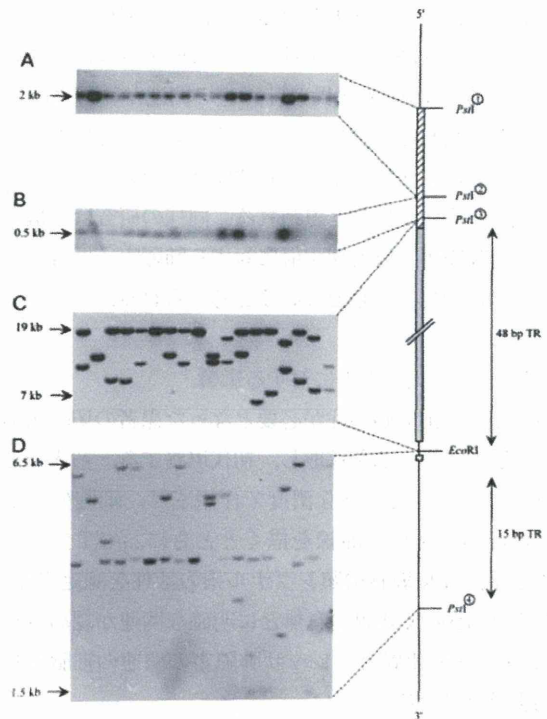


Figure 7 Location of sequence polymorphisms

図 14 VNTR 領域のサザンハイブリダイゼーション (Biochem J)。最初の PstI から EcoRI の直前までの box が exon 2。3 番目の PstI から EcoRI の直前までが VNTR (48TR と書かれた部分)。15 bp TR はイントロンにある repeat。18 名の健常者を調べたもの (各レーンが一人の被験者に相当する)

【今後行うべき検討】

以下の点に関して、早急な検討が必要である。

1. Gene X 変異患者の簡便な同定法の確立

現時点では、エクソーム解析を行って、ヒト標準配列に mapping し、rsX、rsY 領域を見るしか方法が無い。rsX、rsY の周囲はリピート配列であり、この 2 カ所を PCR を用いて観察することはできない。サザンハイブリダイゼーションが有効か否かを確認するとともに、Gene X 変異の正確な塩基配列を決定する必要がある。Gene X exon 2 のような repeat は、大腸菌内で極めて不安定になることが知られている。大腸菌などの宿主を通さずにクローニングして塩基配列を決定する cell-free cloning の手法を用いる必要があるかもしれない。

2. Gene X 変異の同定法が確立されたのち、本当にこの Gene X 変異がイレッサ肺障害の原因となっているか、いくつかの手法で確認する必要がある。

a. イレッサ肺障害に関する前向き臨床試験

イレッサ投与を行う患者を連続登録し、末梢血を収集する。定期的（例えば一ヶ月ごと）に収集された末梢血を検査する。Gene X 変異と肺障害の関連が統計学的に有意になった時点で試験を中止する。非介入で倫理的に問題の少ない手法で確認する必要があるため、この手法に類似した手法が良いと思われる。同様の研究は、抗癌剤による肺障害、放射線照射に対する肺障害、外科手術後の肺障害の全てで必要になると考えられる。

b. イレッサの気道上皮に対する影響

何らかの理由で肺切除が必要となった患者の切除側肺より気道上皮の一部を採取し、初代培養する。初代培養細胞にイレッサを様々な濃度で作用させ、細胞死を生じる濃度の容量反応曲線を描くとともに、AKT 生存シグナル系、ERK 細胞増殖シグナル系の活性を測定する。これらと Gene X 変異の有無とに明確な関連が認められれば、Gene X 変異とイレッサ肺障害の関連の細胞生物学的裏付けになる。

c. 肺線維化を有する患者に関する横断的検索

ある特定の日時を決め、その日から試験参加医療機関を受診し、過去またはそのときの臨床データで肺線維化が存在する患者に関して Gene X 変異の有無を検索する。肺線維化と Gene X 変異との関連を示す有力なデータとなる。

【厚生行政への生かし方】

本研究のデータは、Gene X 変異が日本人の 5-10% が保有する common variant であることを示唆している。Gene X 変異が気道上皮の生存減弱の原因になるという推定は、日本人の 5-10% が肺の脆弱性を有していることを示唆するものであり、日本人の生命、健康に大きな影響を及ぼす事項である。詳細な検討が早急に必要である。

Gene X は生殖細胞系列変異 (germ-line mutation) であるため、生涯変化することはない。よって、一度検索すれば、その情報は一生利用できる。

イレッサ服用、抗癌剤投与、放射線照射、外科手術を行う患者では、その前に Gene X 変異の有無を検索する必要がある。Gene X 変異が存在しなければ、安全にそれらの処置を受けられる可能性が高い。Gene X 変異が存在する場合、胸部 CT などで線維化の有無を慎重に評価するとともに、処置後の肺障害出現に細心の注意を払う必要があるだろう。

Gene X 変異のある患者では、喫煙などにより肺線維

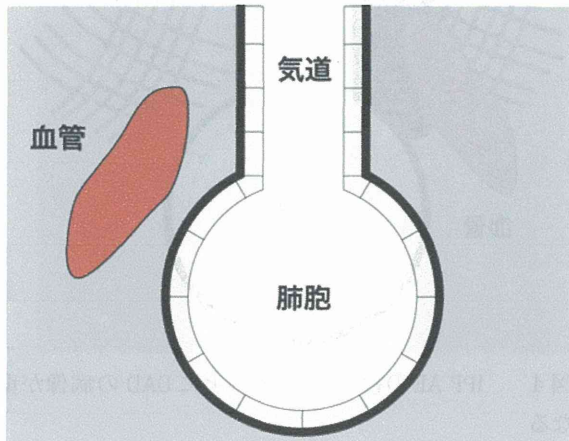
化が生じる可能性がある。希望する個人に Gene X 変異検査を行い、変異保有者には禁煙などを強力に進めることが必要だろう。

Gene X 変異により減弱している細胞生存シグナルを増強する薬剤を検索することにより、Gene X 変異のある患者でも安全にイレッサ服用、抗癌剤投与、放射線照射、外科手術などが行える可能性がある。去痰剤として知られるムコダインが気道上皮の AKT シグナル伝達系を刺激することが観察されている (石井私信)。ムコダインがどのような経路で気道の AKT シグナル伝達系を刺激するかは現時点では明らかにされていないが、それが Gene X を通じてのものならば、ムコダイン類似の薬剤が有力な候補になる可能性がある。

追加資料

1. 間質性肺疾患の用語集

間質性肺疾患の概念は明確であるが、診断が難しい。

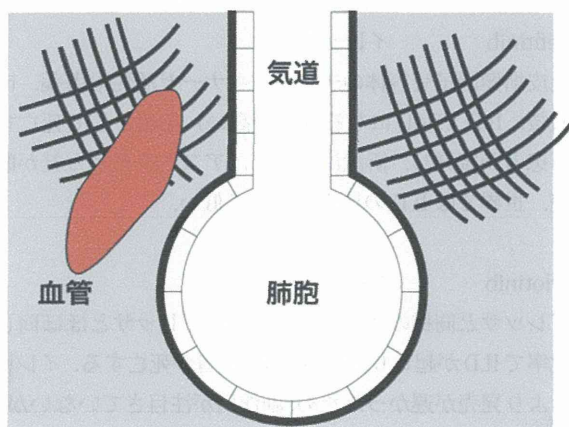


ILD interstitial lung disease 間質性肺疾患
肺の間質（空気＋一層の上皮を除いた部分）に病変が起こる疾患の総称。通常の肺炎は実質に起こるため、ILDではない。

肺の間質に病変の起こる疾患を診断するためには、通常の肺炎、心不全による肺水腫、膠原病による肺病変など、多数の病態を鑑別することが必要である。レントゲン、CTの精密な読影を含めた臨床技術が必要で、診断自体が非常に難しい。熟練した呼吸器科医でも誤ることが多い。イレッサ市販直後は、イレッサがILDを起こすことが知られていなかった。そのため、当初は肺炎として見逃され、被害が拡大した。

Drug-induced ILD 薬剤性肺障害（薬剤性肺炎と書かれる場合もあるが、通常の肺炎と混同しやすく、用語として好ましくない）

薬剤が原因となって生じるILD。感染、アレルギー反応、膠原病なども類似の病態を起こすため、薬剤が原因かどうかの診断が難しいことが多い。



IP interstitial pneumonia 間質性肺炎

間質に炎症を起こす病気の総称。ILDとほぼ同義。Drug-induced ILD（薬剤性肺障害）はIPに含まれる。原因不明のIPを、原因不明であることを強調して言う場合は、idiopathic IP（IIP）と称する。現在の医学レベルでは、IPを診断してもその原因を同定することが難しい場合が多い。そのため、臨床でIPと診断される多くのIPはIIPである。Drug-induced ILDは、原因が薬剤と分かっているので、IPではあるが、IIPではない。

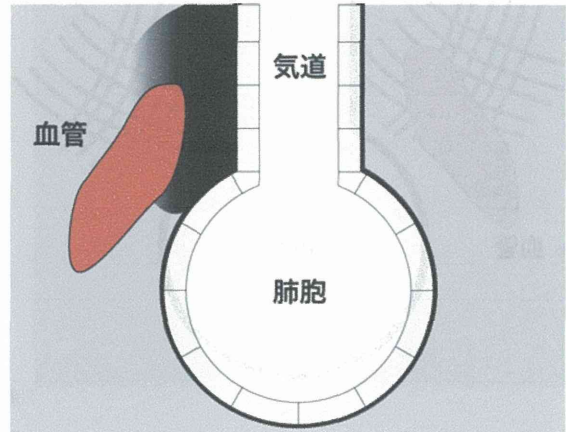


図1 IPの模式図

DAD diffuse alveolar damage びまん性肺胞障害
肺全体が「ただれた」状態になる病態。病理学的名称。ILDの重症型はDADになる。ARDS（成人呼吸窮迫症候群：中村勘三郎の病態）もDADになる。肺が激烈な炎症を起こすと、原因が何であれ、DADになることが多い。また、DADになってしまうと、元の原因が何だったか、後からでは分からないことが多い。DADを起こすような急性の肺の障害を、急性肺障害（acute lung injury）と言うことがある。

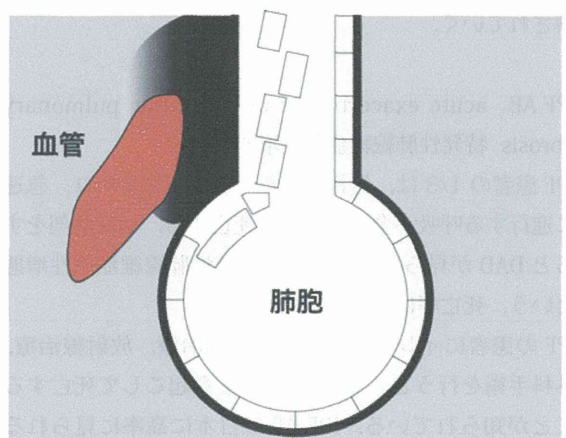


図2 DADの模式図。上皮がはがれ落ちていることに注意。

IPF idiopathic pulmonary fibrosis 特発性肺線維症

厚生労働省特定疾患（難病）の一つ。慢性疾患。慢性的に肺が壊れていき、呼吸不全、感染、急性増悪などで死亡する。日本の患者数は15000人。5年で半数が死亡する。

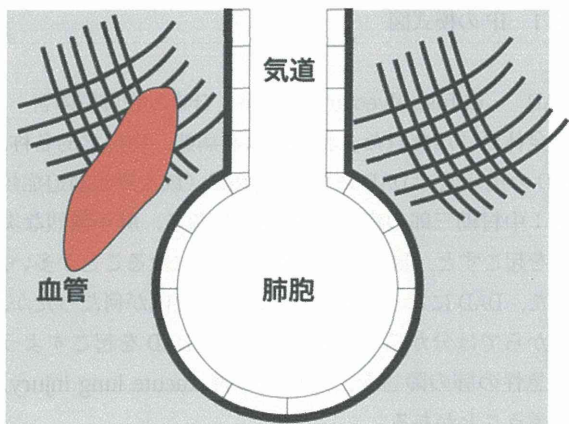
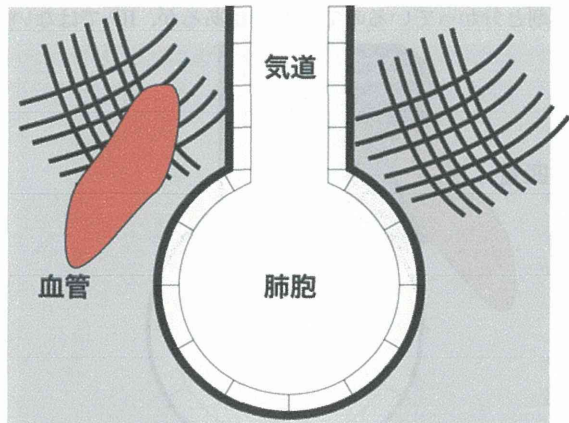


図3 IPFの模式図。慢性的な障害のため、肺組織が破壊されていく。

IPF AE acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis 特発性肺線維症急性増悪

IPF患者の1/3は、慢性だった病態が突然変わり、急速に進行する呼吸不全を起こして死亡する。病理解剖をするとDADが見られる。これを特発性肺線維症急性増悪という。死亡率は70%に達する。

IPFの患者にイレッサ投与、抗癌剤治療、放射線治療、外科手術を行うと、高率にIPF AEを起こして死亡することが知られている。IPF AEは日本に高率に見られるが、世界ではそれほど多くないようだ。IPF AEは日本人にとっては大きな問題だが、世界では非常に関心が低

い。昨年アメリカ胸部疾患学会では、IPF AEの発表は日本からのみであった。

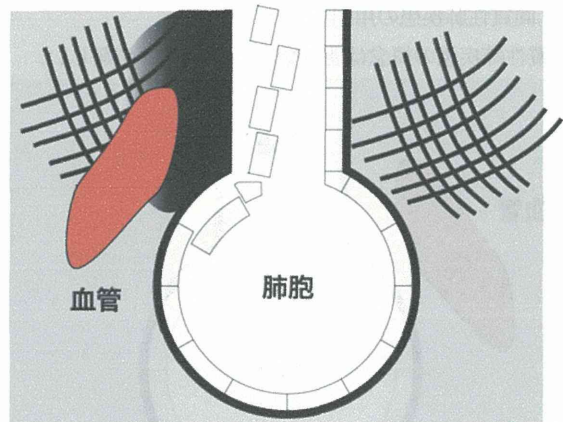


図4 IPF AEの模式図。IPFの上にDADの病像が重なる

びまん性肺胞障害症候群

(萩原造語。今回の発明を説明するために適切と考えられる新たな疾患概念)

何らかの外的刺激により生じる、致死性のびまん性肺胞障害を特徴とする症候群。しばしば免疫治療薬による治療に抵抗性を示し、しばしば再発性であり、治療中に増悪を繰り返すことがある。日本人に他民族より高頻度に認められる

以下の名称で呼ばれる病態を含む

- イレッサILD、タルセバILD、クリゾチニブILD
- IPF急性増悪
- IP患者への抗癌剤投与で見られる急速進行性間質性肺炎
- IP患者の術後にみられる急速進行性間質性肺炎
- 照射野以外の肺に広範に広がる放射線肺臓炎
- 皮膚筋炎患者にみられる致死性急速進行性間質性肺炎
- IPF以外のIP患者に見られる急速進行性間質性肺炎
- ARDSの一部

gefitinib イレッサ

上皮増殖因子受容体のチロシンキナーゼ活性阻害薬。市販後、ILD（DADになる確率が高い）を起こして死亡する患者が続発し、訴訟になった。アストラゼネカ社が販売。世界ではILDの比率は極めて低い。

erlotinib タルセバ

イレッサと同様の作用を持つ薬剤。イレッサとほぼ同じ比率でILDが起こり、同じ比率で患者が死亡する。イレッサより発売が遅かったため、副作用が注目されていないが、