

- 5) Ryerson CJ, Hartman T, Elicker BM, et al. Clinical features and outcomes in combined pulmonary fibrosis and emphysema in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2013 Jan 31. doi: 10.1378/chest.12-2403.
- 6) Wells AU, Desai SR, Rubens MB, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: a composite physiologic index derived from disease extent observed by computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 962-969.
- 7) 本間行彦, 齋木茂樹, 土井修他, 他. 特発性間質性肺炎 (IIP) の臨床的診断基準 第3次改定案. 厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班平成3年度報告書, 1992; 20-32.
- 8) Sugino K, Ishida F, Kikuchi N, et al. Comparison of clinical characteristics and prognostic factors of combined pulmonary fibrosis and emphysema versus idiopathic pulmonary fibrosis alone. *Respirology* 2013 doi: 10.1111/resp.12207
- 9) Akagi T, Matsumoto T, Harada T, et al. Coexistent emphysema delays the decrease of vital capacity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2009; 103: 1209-15.
- 10) Mejía M, Carrillo G, Rojas-Serrano J, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and emphysema: decreased survival associated with severe pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2009; 136: 10-5.
- 11) Kishaba T, Shimaoka Y, Fukuyama H, et al. A cohort study of mortality predictors and characteristics of patients with combined pulmonary fibrosis and emphysema. *BMJ Open*. 2012 May 15; 2(3). pii: e000988. doi: 10.1136/bmjopen-2012-000988.
- 12) Latsi PI, du Bois RM, Nicholson AG, et al. Fibrotic idiopathic interstitial pneumonia: the prognostic value of longitudinal functional trends. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 531-7.
- 13) Schmidt SL, Nambiar AM, Tayob N, et al. Pulmonary function measures predict mortality differently in IPF versus combined pulmonary fibrosis and emphysema. *Eur Respir J* 2011; 38: 176-83.

III. 基礎研究

間質性肺炎がもたらす組織微小環境と 組織微小環境誘導上皮間葉移行に対する PTEN リン酸化部位制御の重要性

橋本 直純 長谷川好規*

間質性肺炎は微小環境として線維化病変形成を直接促進する。PTENは新規に intrinsically disordered protein (IDP) と分類されてそのPTENC末端リン酸化部位が intrinsically disordered region (IDR) と同定された。組織微小環境がもたらすさまざまな上皮間葉移行(EMT)誘導刺激が、IDRであるPTENC末端部位リン酸化修飾をもたらしPTENの生理活性は減弱することを明らかにした。PTEN C末端遺伝子変異を導入してPTENC末端側リン酸化部位制御をすることによりTGFβ刺激によるβ-cateninの細胞膜から細胞質内への局在移行を完全に制御することの結果としてTGFβ誘導EMTを制御することを明らかにした。組織微小環境によるIDRであるPTENC末端側リン酸化部位修飾を詳細に解析することは、肺線維症における線維芽細胞とPTENを標的とする治療戦略上極めて有意義なものであると考えられた。

名古屋大学 大学院医学研究科 呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

A. 研究目的

微小環境を形成する上皮間葉移行(EMT)の制御は間質性肺炎の治療戦略上きわめて重要なものとなる。我々は、IDRであるPTENC末端リン酸化部位修飾による微小環境因子誘導EMTの機序を明らかにして、IDRであるPTENC末端リン酸化部位を治療標的とすることを目的とした。

B. 研究方法

- 1) 肺上皮細胞を用いてTGFβ刺激および遷延化低酸素刺激によるPTEN発現、PTEN C末端リン酸化部位リン酸化、その表現型変化における影響を評価した。
- 2) 薬物(Dox)調節型遺伝子導入システムを導入した肺上皮細胞H358細胞に薬物(Dox)調節型GFP、GFP-PTENwildおよびGFPPTEN4A(PTEN C末端リン酸化部位遺伝子変異)を導入した後、TGFβ刺激によるEMTを介した表現型変化を検討した。
- 3) これらの細胞株を用いて、TGFβ刺激によるβ-catenin細胞質内移行を免疫染色で評価した。

C. 結 果

- 1) PTEN発現およびPTEN C末端リン酸化部位リン酸化におけるTGFβ刺激および遷延化低酸素刺激の影響

肺上皮細胞においてTGFβ刺激または、遷延化低酸素刺激によりPTEN発現抑制とともにPTENリン酸化(p-PTEN)の亢進を認めた。その結果p-PTEN/PTEN ratioの有意な増加を認めた。

- 2) TGFβ誘導EMT表現型獲得におけるPTEN C末端リン酸化部位遺伝子変異による制御効果の検討の役割

TGFβ投与Dox非投与肺上皮細胞ではEMTを認めた。TGFβ投与Dox投与肺上皮細胞ではGFP-PTEN4A導入細胞株でのみ、EMT表現型誘導の抑制が認められた。

- 3) TGFβ刺激下Dox投与肺上皮細胞ではGFPおよびGFP-PTENwild導入細胞株ではβ-cateninは細胞膜から細胞質へ移行した。一方、GFP-PTEN4A導入細胞株ではTGFβ投与によってもβ-cateninは細胞膜に局在したままであった。

D. 考察と結論

我々は、線維化病変から過剰産生されるTGFβ・遷延化低酸素刺激により、肺上皮細胞は有意なPTEN発現抑制とPTEN C末端リン酸化亢進がもたらされることを明らかにした。これによってp-PTEN/PTEN ratio亢進が誘導されPTEN活性減弱がおこる。その結果TGFβ・遷延化低酸素誘導シグナルの活性化亢進がおこる状態になることを明らかにした。TGFβなど組織微小環境因子刺激はβ-cateninの細胞質内移行を誘導してEMT獲得に至るが、PTEN4Aはβ-cateninの細胞質内移行を制御してEMT表現型獲得を完全に抑制した。これらの結果よりIDRであるPTEN C末端リン酸化部位のリン酸化制御は極めて有用な治療標的となることが示唆された。肺線維症における線維芽細胞とPTENを標的にしたこれらの課題は極めて有意義なものである。

E. 研究発表

1. Hashimoto, N. and Sakamoto, K., et al. 2012. Differential modulation of surfactant protein D under acute and persistent hypoxia in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303(1):L43-53.
2. Hashimoto, N. and Aoyama, D., et al. 2013. Involvement of TGFβ-induced phosphorylation of the PTEN C-terminus on TGFβ-induced acquisition of malignant phenotypes in lung cancer cells. *PLoS One*. 8(11):e81133.

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

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

萩原 弘一*

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。

要 旨

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 (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

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

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α1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)」が見つかっている.

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.

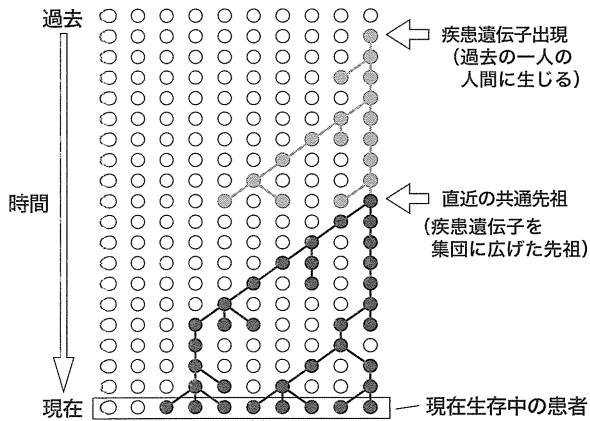


図2 common disease-common variant-common origin 仮説

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).

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、画像情報を収集した。特に予後不良と密接に結びつく臨床、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

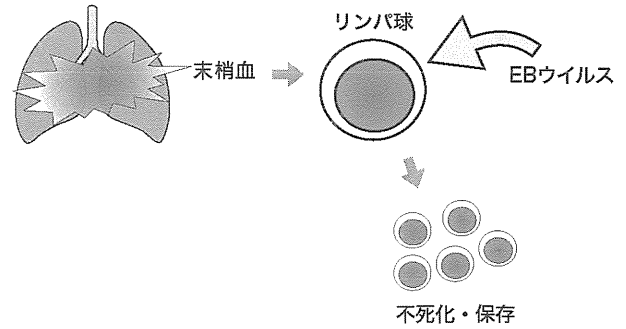


図3 サンプル収集とその手順

+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、Probablistic 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は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 の可能性がある。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

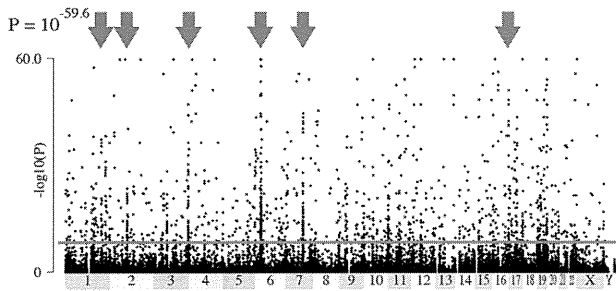


図4 non-synonymous 変異部位の関連解析. 横軸は染色体番号. 縦軸は $-\log_{10}(P)$. 矢印は尖塔状の領域で、真の関連を示している可能性が高いと考えられた領域. 赤線は $P = 0.001/180215$ を示す.

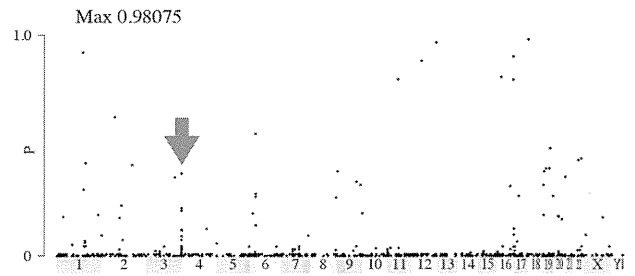


図5 各変異が疫学データを満たす確率P(縦軸). 横軸は染色体番号. Gene Xの位置を矢印で示す.

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.

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.

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となることが分かる. 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

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.

3. 考 察

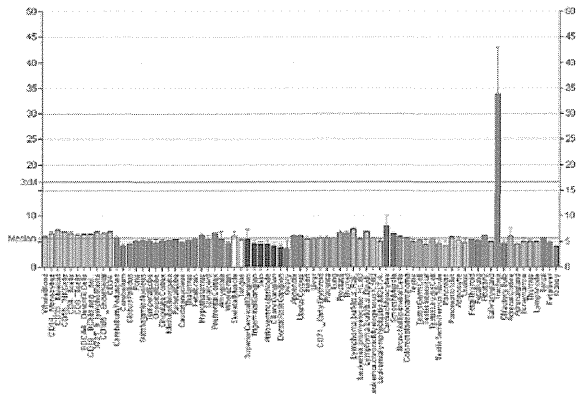
Gene Xは気管から細気管支にわたる気道上皮で高発現している.

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思われる.

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

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)

EIF2C1-002	eukaryotic translation initiation factor 2C, 1	ANKRD20A1	ankyrin repeat domain 20 family, member A1
CDCP2	CUB domain containing protein 2	OR13C2	olfactory receptor, family 13, subfamily C, member 2
NBPF9	neuroblastoma breakpoint family, member 9	TOR2A	torsin family 2, member A
NBPF16	neuroblastoma breakpoint family, member 16	RABL6	RAB, member RAS oncogene family-like 6
DCAF8	DDB1 and CUL4 associated factor 8	LCN12	lipocalin 12
DUSP27	dual specificity phosphatase 27 (putative)	CDH23	cadherin-related 23
PIK3C2B	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 beta	TNKS1BP1	tankyrase 1 binding protein 1, 182kDa
OBSCN	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF	NCKAP5L	NCK-associated protein 5-like
TRIB2	tribbles homolog 2 (Drosophila)	FZD10	frizzled family receptor 10
DYSF	dysferlin, limb girdle muscular dystrophy 2B	PLEKHO2	pleckstrin homology domain containing, family O member 2
ANKRD36C	ankyrin repeat domain 24	WDR90	WD repeat domain 90
RGPD3	RANBP2-like and GRIP domain containing 3	61E3.4	nuclear pore complex-interacting protein-like 3
FOXD4L1	forkhead box D4-like 1	RP11-419C5.2	Uncharacterized protein
NCKAP5	NCK-associated protein 5	ZCCHC14	zinc finger, CCHC domain containing 14
SCN9A	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit	ZNF276	zinc finger protein 276
PPP4R2	protein phosphatase 4, regulatory subunit 2	RP11-356C4.2	
SHOX2	short stature homeobox 2	MINK1	misshapen-like kinase 1
Gene X	mucin 4, cell surface associated	RAI1	retinoic acid induced 1
PABPC4L	poly(A) binding protein, cytoplasmic 4-like	MYO15A	myosin XVa
ATXN1	ataxin 1	SLC46A1	solute carrier family 46
OR2W1	olfactory receptor, family 2, subfamily W, member 1	SLC38A10	solute carrier family 38, member 10
HLA-G	major histocompatibility complex, class I, G	C19orf26	chromosome 19 open reading frame 26
HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A	CACTIN	
TRIM39	tripartite motif containing 39	ANKRD24	ankyrin repeat domain 24
TRIM39-RPP21	TRIM39-RPP21 readthrough	GPR108	G protein-coupled receptor 108
DDR1	discoidin domain receptor tyrosine kinase 1	MYO9B	myosin IXB
VARS2	valyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	DMKN	dermokine
C6orf15	chromosome 6 open reading frame 15	WDR87	WD repeat domain 87
HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	DYRK1B	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1B
BTNL2	butyrophilin-like 2 (MHC class II associated)	GP6	glycoprotein VI (platelet)
HLA-DOA	major histocompatibility complex, class II, DO alpha	NINL	ninein-like
HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	MATN4	matrilin 4
VNN3	vanin 3	DNTTIP1	deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 1
CNOT4	CCR4-NOT transcription complex, subunit 4	HELZ2	helicase with zinc finger 2, transcriptional coactivator
USP17L2	ubiquitin specific peptidase 17-like family member 2	ARFRP1	ADP-ribosylation factor related protein 1
PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	PDXK	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase
FLJ43860	uncharacterized protein LOC389690	TXNRD2	thioredoxin reductase 2
GLIS3	GLIS family zinc finger 3	GGT2	gamma-glutamyltransferase 2
		TRIOBP	TRIO and F-actin binding protein
		RNF128	ring finger protein 128, E3 ubiquitin protein ligase



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

図6 Gene Xの臓器別発現

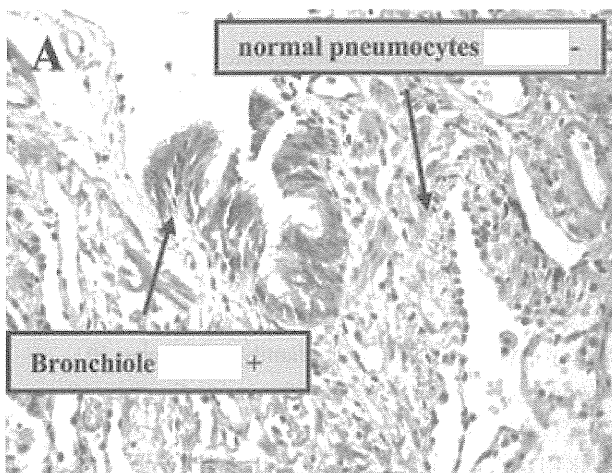


図7 肺組織でのGene X発現. 細気管支上皮に発現が見られる. (J Histochem Cytochem)

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.

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.

Exon 2領域はVNTR領域であるため, 一つの標準

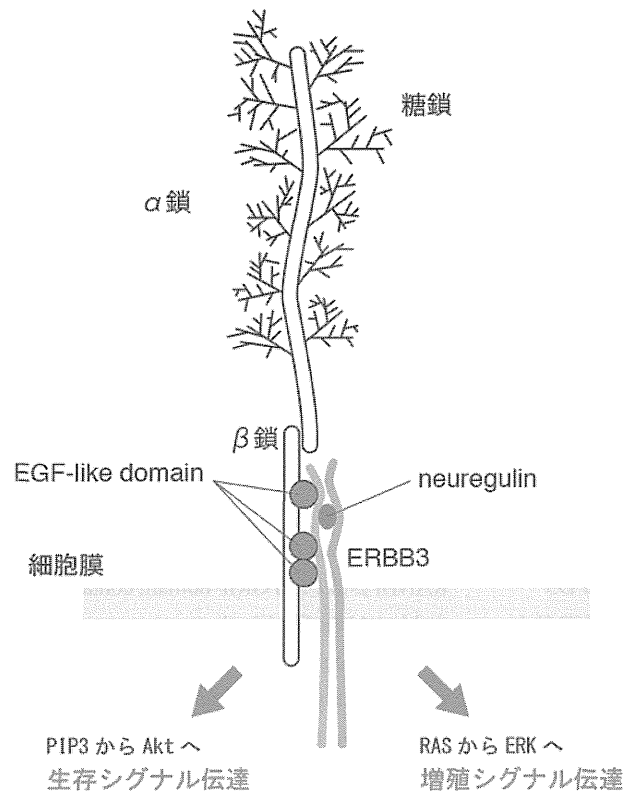


図8 Gene Xの構造. Gene Xは増殖因子としての役割を持っている. (FASEB Jより改変)

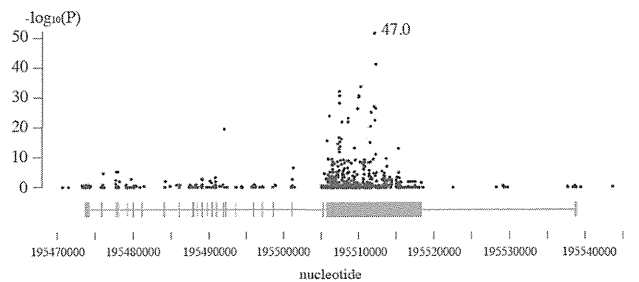


図9 Gene X領域の関連解析. Gene Xは染色体上reserve strandに存在するため, 図の右側がアミノ末端をコードする exon 1である. Exon 2に強い関連が見られる. Exon 2は糖鎖が付着する領域で, 16アミノ酸をコードする48塩基対が可変長タンDEMリピート(variable number of tandem repeat : VNTR)を形成している.

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

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.

	Caucasian			Chinese			Japanese			Iressa Tarceva		
	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt
rsX	51	0	2	68	0	0	65	0	5	0	0	36
rsY	53	0	0	68	0	0	67	0	3	2	0	34

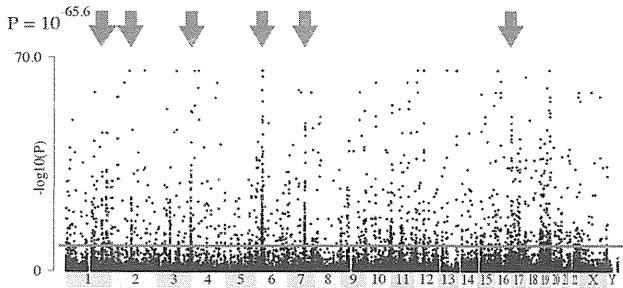


図10 特発性肺線維症急性増悪患者を用いた関連解析データ. 図4のイレッサ肺障害+タルセバ肺障害の図で示した矢印と同じ位置に矢印を置いた. 同一の部位に尖塔状の領域が見られる. 特発性肺線維症急性増悪とイレッサ肺障害+タルセバ肺障害の原因が同一であることを強く示唆する.

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。

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。

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

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.

	Caucasian			Chinese			Japanese			IPF AE		
	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt
rsX	51	0	2	68	0	0	65	0	5	0	0	45
rsY	53	0	0	68	0	0	67	0	3	5	0	40

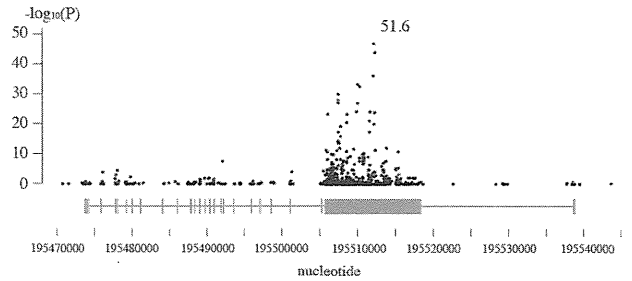


図11 特発性肺線維症急性増悪患者データ. 図9と対応している.

表6 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.

	Caucasian			Chinese			Japanese			DOC			Crizotinib		
	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt	Ref/Ref	Ref/Alt	Alt/Alt
rsX	51	0	2	68	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

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。

1. 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
2. なぜ、リウマチ薬で肺障害が起こるのか

3. なぜ、イレッサの肺障害は日本人に多発するのか
 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
 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
 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
 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あるのか、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。

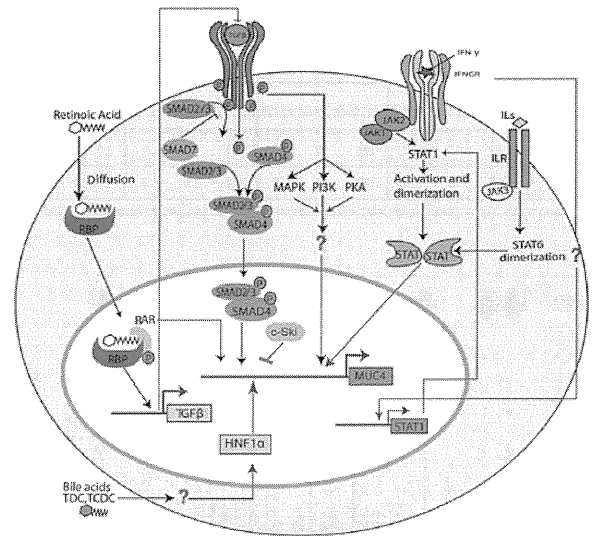


図12 Gene Xの発現調節(FASEB J)

1. 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、その結果肺障害が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。

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

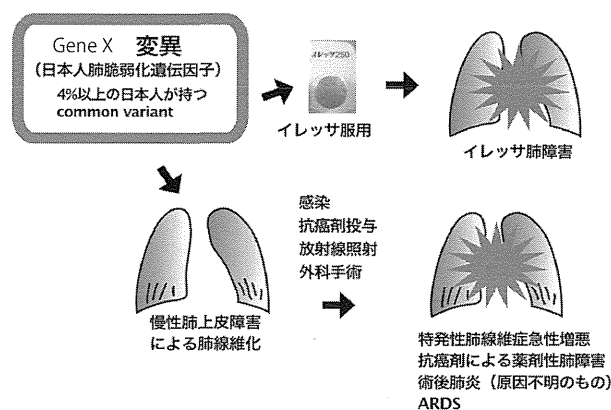


図15 Gene X変異と各種病態の関連図(推定)

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よう。図15にGene X変異と各種病態の関連(推定)をまとめた。

【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ある。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

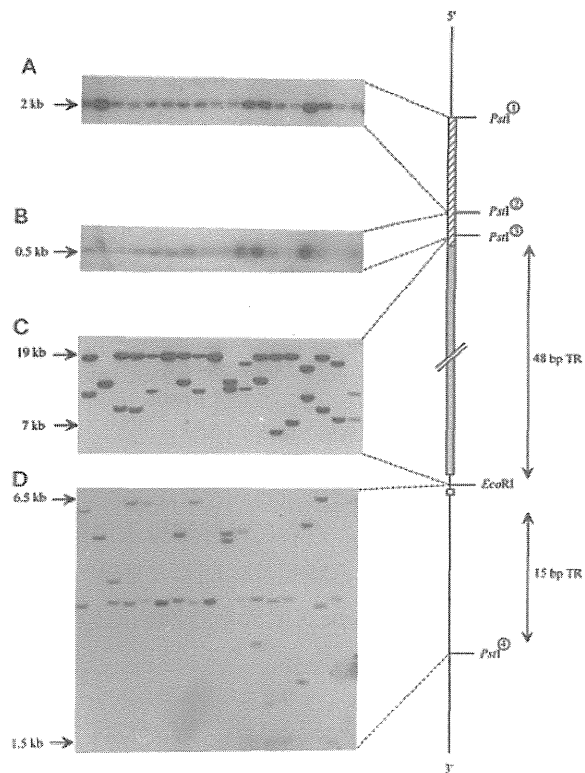


Figure 7 Location of sequence polymorphisms

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)

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.

【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。

特発性肺線維症における midkine の役割

谷野 功典 美佐 健一 王 新涛 福原奈緒子 二階堂雄文
鈴木 康仁 植松 学 福原 敦朗 佐藤 俊 斉藤 純平
横内 浩 石田 卓 棟方 充*

Midkine はヘパリン結合性成長因子であり、中期胚に強く発現し発生期に重要な役割を果たしていることが知られている。また、悪性腫瘍で発現が亢進していることや炎症や修復の過程で発現が増強することが報告されているが、肺の炎症性疾患における midkine の役割についてはよく知られていない。そこで、特発性肺線維症 (IPF) における midkine の役割を検討するために、IPF 患者の血清と気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中の midkine 濃度を測定し、種々の臨床パラメーターとの関連を検討した。更に、C57/BL6 マウスに bleomycin (BLM) を気管内投与し、肺組織における midkine mRNA の発現を検討した。IPF 患者では、健常者と比較して血清 midkine 濃度が高値であったが、BAL 液中では、膠原病に伴う間質性肺炎、サルコイドーシスとは差がみられなかった。IPF 患者における血清・BAL 液中 midkine 濃度と臨床パラメーターとの関連性の検討では、血清・BAL 液中 midkine は BAL 液中の炎症細胞分画と正の相関関係がみられた。更に、BLM 気管内投与後のマウス肺組織では、投与後早期 (day 3) と後期 (day 14, 21) で midkine mRNA の増加が認められた。以上の結果より、IPF において発現が増加している midkine は肺の炎症反応に関与しており、肺線維化病態への関与が示唆される。

Table 1. Clinical Characteristics of Healthy Volunteers and Patients with IPF, IP-CTD and Sarcoidosis

	Healthy volunteers	IPF	IP-CTD	Sarcoidosis
Subjects (n)	10	40	21	21
Age (yrs)	32.6 ± 2.4	69.5 ± 1.1	59.0 ± 2.3*	50.7 ± 4.8*†
Gender (M/F)	4/6	34/6	11/10*	8/13*
WBC (/ μ L)	N/A	7590 ± 491	6986 ± 489	5481 ± 465*
LDH (U/ml)	N/A	237 ± 10	269 ± 18	196 ± 7*†
CRP (mg/dl)	N/A	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.3 ± 0.1
ESR (mm/hr)	N/A	20 ± 3	22 ± 4	15 ± 3
KL-6 (U/ml)	N/A	1251 ± 111	1748 ± 364	518 ± 161*†
SP-A (ng/ml)	N/A	107.2 ± 13.5	79.4 ± 10.3	41.3 ± 11.5*
SP-D (ng/ml)	N/A	241.2 ± 26.8	210.4 ± 30.7	63.2 ± 12.1*†
P/F ratio	N/A	405.1 ± 11.8	432.3 ± 17.1	435.9 ± 12.5

IP-CTD: Interstitial pneumonia associated with connective tissue disease.

*: $p < 0.05$ vs IPF, †: $p < 0.05$ vs IP-CTD. Mean ± SEM.

はじめに

Midkineは、発生期、特に中期胚に強く発現する成長因子として同定された¹⁾。出生後にはその発現は低下し、成人では腸管には強く発現しているがその他の臓器にはあまり発現していない。一方、種々の悪性腫瘍においてもmidkineの発現が亢進し、膀胱癌、neuroblastoma、glioblastomaでは発現が強いと予後が不良であることが報告されている^{2,3)}。また、これまでに急性並びに慢性炎症におけるmidkineの役割も検討され、糖尿病性腎症では糸球体、間質、尿管管でmidkineの発現が亢進し、糖尿病性腎症モデル⁴⁾や虚血再灌流障害モデル⁵⁾ではmidkine欠損マウスは野生型マウスと比較して尿管管・間質の傷害が軽度であったことや、関節リウマチ患者の血清や関節液でmidkine濃度が上昇し、マウス関節炎モデルでは野生型マウスと比較してmidkine欠損マウスでは関節破壊が軽度であったことなどが報告され⁶⁾、midkineの炎症における役割が示唆されている。肺においては、健常成人肺では発現が弱い、cystic fibrosisでは気道上皮などでmidkineの発現が亢進し、喀痰中のmidkine濃度も高値であることが報告され⁷⁾、肺の炎症においてもmidkineが重要な役割を果たしていることが考えられる。

特発性肺線維症 (IPF) は、5年生存率が約50%の予後不良の難治性肺線維化疾患であり、肺の傷害に

引き続く過剰な修復による線維芽細胞からコラーゲンなど細胞外マトリックスの過剰産生がその病態の本態である⁸⁾が、その詳細については不明な点が多い。今回、我々は、IPF患者の血清、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中のmidkine濃度と臨床パラメーターの関連性と、マウスbleomycin (BLM) 肺傷害・線維化モデルの肺組織におけるmidkineの発現を解析することにより、midkineのIPFにおける役割を検討した。

方 法

当科に入院したIPF患者の血清とBAL液中midkine濃度をELISA kit (R&D systems) を使用して測定し、健常者、膠原病に伴う間質性肺炎 (IP-CTD)、サルコイドーシス患者と比較 (Table)。次に、IPF患者の血清とBAL液中midkine濃度と血液中パラメーター、BAL液所見、呼吸機能検査値との関連を比較検討した。最後に、C57BL/6JマウスにBLM (1.0 mg/kg) を気管内投与し、投与3, 7, 14, 21日後のマウス肺組織でのmidkine mRNA発現を定量的real-time PCR (qPCR) にて比較検討した。

結 果

Midkineの血清中濃度は、IPF患者において健常者より高値を示した (Figure 1) が、BAL液中ではIP-CTD、サルコイドーシス患者と差はみられなかった

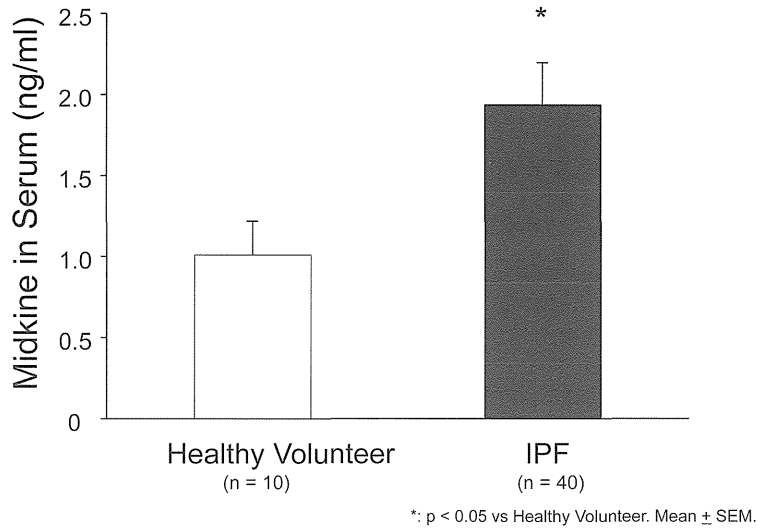


Figure 1. Midkine in Serum from Healthy Volunteers and Patients with IPF

Table 2. Correlation between Serum Midkine and Clinical Parameters in Patients with IPF

	Correlation coefficients	P value
WBC (/μl)	-0.010	0.960
LDH (mg/dl)	0.313	0.105
CRP (mg/dl)	0.279	0.151
ESR (mm/hr)	0.203	0.300
KL-6 (U/ml)	0.003	0.988
SP-A (ng/ml)	-0.013	0.948
SP-D (ng/ml)	0.040	0.838
P/F ratio	0.088	0.655
Lym in BALF (%)	0.351	0.079
Neu in BALF (%)	0.481	0.013
Eos in BALF (%)	0.368	0.065
%VC (%)	0.076	0.701
Midkine in BALF (pg/ml)	0.365	0.067

(data not shown). また、血清 midkine 濃度は BAL 液中好中球比率と正の相関関係、リンパ球、好酸球比率とは正の相関傾向を認め (Table 2)、BAL 液中 midkine 濃度は BAL 液中好酸球比率と正の相関関係、好中球、リンパ球比率とは正の相関傾向を認めた (Table 3)。更に、C57BL/6 マウスへの BLM 気管内投与後、肺組織において 3、14、21 日後に mikinde mRNA の増加が認められた。(Figure 2)。

結論と考察

今回、我々は IPF における midkine の役割を明らかにするために、IPF 患者の血清、BAL 液中 midkine 濃度を健常者や他の肺疾患患者と比較し、更に IPF 患者において血清、BAL 液中 midkine 濃度と臨床パラメーターとの関連を検討した。また、マウス BLM 肺傷害・線維化モデルにおいて肺組織におけ

Table 3. Correlation between Midkine in BAL Fluid and Clinical Parameters in Patients with IPF

	Correlation coefficients	P value
Lym in BALF (%)	0.292	0.080
Neu in BALF (%)	0.274	0.101
Eos in BALF (%)	0.383	0.019
%VC (%)	0.017	0.922

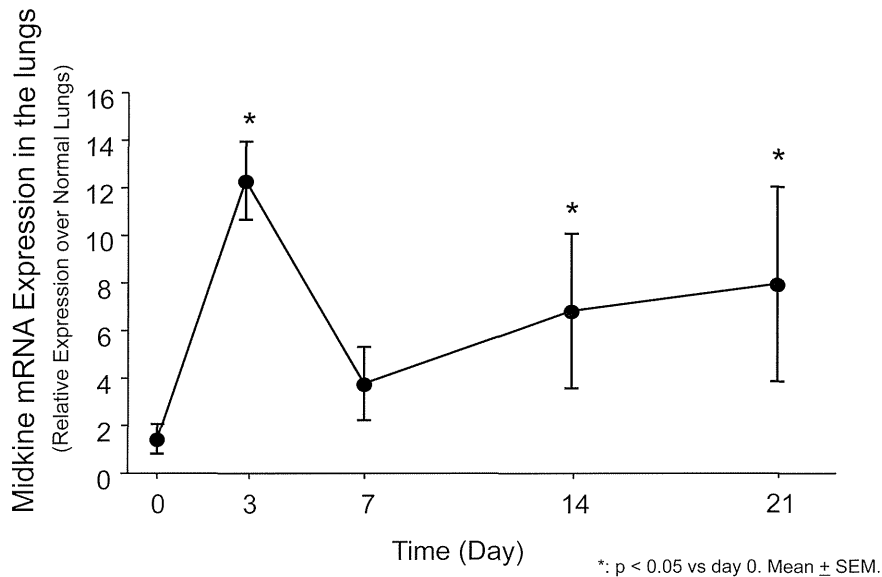


Figure 2. Midkine mRNA Expression in the Lungs after Intratracheal BLM Instillation in Mice

る midkine の発現も検討した。Midkine は、IPF 患者の血清で上昇しており、マウス肺組織においても BLM 投与後発現が亢進していた。更に、IPF 患者において血清、BAL 液中 midkine 濃度は BAL 液中炎症細胞比率と正の相関関係を認めた。以上の結果から、midkine が IPF の病態において重要な役割を果たしていることが示唆された。Midkine は、発生期、特に中期胚に強く発現する成長因子として同定されたが¹⁾、成人では腸管以外の臓器では、発現が少ないことが報告されている。しかし、肺癌など種々の悪性腫瘍において midkine の発現が亢進し⁹⁾、膀胱癌、neuroblastoma、glioblastoma では発現が強いと予後が不良であることが報告されている^{2,3)}。また、炎症における midkine の役割も検討され、糖尿病性腎症、腎虚血再灌流障害や関節リウマチなどにおける midkine の重要性も示されている^{4,5)}。肺においては、健常成人肺では発現が弱い、cystic fibrosis では気道上皮などで midkine の発現が亢進し、喀痰中の

midkine 濃度も高値であること⁷⁾や、midkine は低酸素状態で血管内皮細胞で発現が亢進すること¹⁰⁾、真菌や緑膿菌に対する抗菌活性をもつこと^{7,11)}も報告され、肺の炎症において重要な役割を果たしていることが示唆されている。本研究では、血清と BAL 液中 midkine 濃度と BAL 液中の好中球などの炎症細胞比率と正の相関関係が認められた。Midkine は好中球や単球などの炎症細胞で発現していること¹⁰⁾から、midkine 濃度の増加が肺における炎症細胞増加の結果である可能性も考えられるが、midkine 自体に好中球遊走活性があること¹²⁾や、好中球や単球で発現が増加した midkine は炎症細胞外には分泌されないこと¹⁰⁾も報告されているため、肺において増加した midkine が肺への炎症細胞増加に関与していることが考えられる。IPF の病態における炎症の役割については議論が多いものの、BAL 液中好中球比率の多い IPF は予後が不良であることも報告されており¹³⁾、midkine が IPF における肺の線維化病態に関

与していることが示唆される。また、midkineは皮膚のfibroblastでのcollagenやglycosaminoglycanの産生を増加させること¹⁴⁾や、keratinocyteにおいて上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition) を引き起こすこと¹⁵⁾、更にmidkineは抗apoptosis作用をもつこと¹⁶⁾もIPFにおけるmidkineの重要性を示唆している。

今回の検討により、midkineがIPFにおいて増加し肺の炎症に関与していることが明らかになった。今後、IPFの肺線維化における役割を解明するために、さらに詳細な検討が必要と考えられる。

参考文献

- 1) Kadomatsu K *et al*: cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 151: 1312-1318, 1988.
- 2) Tsuysui J *et al*: A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res* 53: 1281-1285, 1993.
- 3) O'Brien T *et al*: The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res* 56: 2515-2518, 1996.
- 4) Kosugi T *et al*: Growth factor midkine is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol* 168: 9-19, 2006.
- 5) Satō W *et al*: Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulointerstitium in ischemic renal injury. *J Immunol* 167: 3463-3469, 2001.
- 6) Maruyama K *et al*: Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50: 1420-1429, 2004.
- 7) Nordin SL *et al*: High expression of midkine in the airways of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49:935-942, 2013.
- 8) Raghu G. Idiopathic pulmonary fibrosis: increased survival with “gastroesophageal reflux therapy” : fact or fallacy? *Am J Respir Crit Care Med* 184:1330-1332, 2011.
- 9) Robert I *et al*: Reciprocal expression of pleiotrophin and midkine in normal versus malignant lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9:463-466, 1993.
- 10) Weckbach LT *et al*: Midkine acts as proangiogenic cytokine in hypoxia-induced angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303:H429-H438, 2012.
- 11) Nordin SL *et al*: The epithelium-produced growth factor midkine has fungicidal properties. *J Antimicrob Chemother* 67:1927-1936, 2012.
- 12) Takada T *et al*: Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis. *J Biochem* 122:453-458, 1997.
- 13) Kinder BW *et al*: Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 133:226-232, 2008.
- 14) Yamada H *et al*: Stimulation of collagen expression and glycosaminoglycan synthesis by midkine in human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 289:429-433, 1997.
- 15) Huang Y *et al*: Midkine induces epithelial-mesenchymal transition through Notch2/Jak2-Stat3 signaling in human keratinocytes. *Cell cycle* 7:1613-1622, 2008.
- 16) Osada K *et al*: Midkine inhibits caspase-dependent apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in cultured neurons. *J Neurochem* 73:2084-2092, 1999.