

されるため、肺内では血行性に薬物の暴露が起こる。したがって肺内の血管内皮細胞は肺障害の発生において何らかの関与があると推測される。これまでの研究報告、調査等において、肺障害の画像解析が詳細に検討された薬が散見される。分子標的治療薬のなかではボルテゾミブの画像所見が特徴的なパターンとしてcapillary leak syndrome様パターンあるいは非心原性肺水腫パターンを示すことが報告されている(Mukai H, et al. Rinsho Ketsueki. 2011;52(12):1859-69.)。これらは肺障害のなかでも稀な画像パターンであり、特に血管透過性が亢進した病態を推測されるものである。そこで、ボルテゾミブが血管透過性亢進を起こしやすいのかについて、血管内皮細胞株(HUVEC)を用いてCultrex® in vitro血管透過性アッセイキット(Trevigen, Inc.)により検討した。ボルテゾミブのほか、いくつかの他の抗がん薬(ブレオマイシン、テムシロリムス、ゲフィチニブ、クリゾチニブ)についても実験したが、ボルテゾミブでは細胞のviabilityに影響のない濃度かつ臨床用量の血中濃度に近い条件下(20ng/mL)でも有意に透過性亢進が認められた(図1)。

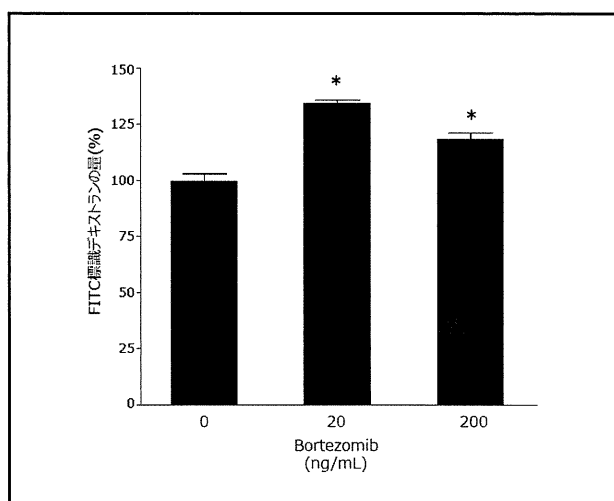


図 1

D. 考察

今年度は、新たに得られた分子標的治療薬の肺障害に関する情報として、エルロチニブの腓

がんにおける発現状況が最も興味深いものであった。エルロチニブはゲフィチニブに続いて二番目に発売されたEGFRチロシンキナーゼ阻害薬である。非小細胞肺癌におけるエルロチニブの肺障害は4.5%に発現し、発現した症例の死亡率は34.8%であったが、これはゲフィチニブと同様の数値であるため、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬はおおよそこの程度の発現状況であろうと考えられた。しかし、腓がんを対象としたエルロチニブの全例調査(中間解析結果)では、肺障害の発現頻度こそ6.07%と高いものの、発症後の転帰は死亡率は10%強(19例中2例)であり、非小細胞肺癌におけるエルロチニブの肺障害とは致死率の点で異なる結果となった。同じ薬剤でも対象疾患によって肺障害の発現状況が異なる要因が何かしらあるはずであるが、詳細は全例調査の最終結果を踏まえてさらに検討されると思われる。

ペメトレキセドの肺障害については、自施設で検討した結果0.8%と低い頻度であった。既に報告されている悪性胸膜中皮腫を対象とした全例調査における肺障害の発現頻度は1.1%(Pemetrexed ILD Advisory Boardによる検討)、非小細胞肺癌の特定使用成績調査(全例調査ではない)における肺障害の発現頻度は2.6%であり、これらと比較して大きな違いはないものと考えられた。自施設での非小細胞肺癌に対するペメトレキセド使用例では4例に既存の間質性肺炎があり、4例中1例で肺障害が発現した。この1例は治療前の経過のなかで間質性肺炎の進行を認めており、他の肺障害を起こさなかった3例では間質性肺炎の進行は認めなかった。症例数が少ないため、結論づけることは難しいが、肺障害の危険因子とされる既存の間質性肺炎は、病勢が明らかな場合には化学療法後に肺障害を発現するリスクが高い可能性が示唆された。

薬剤性肺障害の病態は様々であるが、肺障害誘発の端緒として薬剤の直接的あるいは間接的

な血管内皮障害の関与も想定される。最近の詳細な画像解析から、薬剤によっては特徴的なパターンを示すものが存在することがわかってきており、ボルテゾミブの肺障害では、一部に非心原性肺水腫様、capillary leak syndrome様のパターンが見られることが知られ、他の薬剤では稀な特徴的所見である。今回、薬剤による直接的な血管内皮障害について、血管透過性を指標としてボルテゾミブをはじめいくつかの抗がん薬で検討したが、ボルテゾミブでは血管透過性亢進が確認された。すでにボルテゾミブはHUVECのG2/M期に働き細胞増殖を抑制する作用と血管透過性亢進作用を有することが報告されており (Tamura D, et al. *Cancer Sci.* 2010;101(6):1403-8.)、実験条件は異なるものの、血管透過性亢進の点については今回の検討でも再現された。ボルテゾミブで見られる非心原性肺水腫様あるいはcapillary leak syndrome様の肺障害は、ボルテゾミブ投与後離脱時のNF- κ B活性化によるTNF- α 、IL-6等のサイトカイン発現に伴う炎症の誘導やボルテゾミブまたは代謝物によるNF- κ Bや様々なシグナル伝達経路への影響による肺胞上皮傷害などが提唱されている (Dun X, et al. *Hematol Oncol.* 2010;28(1):49-52.)。今回の基礎実験の検討と過去の報告 (Tamura D, et al. *Cancer Sci.* 2010;101(6):1403-8.) とから、Dunらの提唱以外に直接的な血管透過性亢進作用も肺障害の病態に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

分子標的治療薬の肺障害は、薬剤によって発現率と予後が異なる。今年度はエルロチニブの肺障害に関して、非小細胞肺癌と腺がんとの予後が異なることがわかった。エルロチニブ以外にも今後は同じ薬剤でも投与対象が異なり、対象疾患ごとに肺障害の発現状況が異なるケースが出てくる可能性があり、注意深い観察が必要と考えられた。また、薬剤性肺障害の病態の

詳細は不明な部分が多い。得られた臨床的特徴から病態を探ることも重要と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshizawa K, Mukai HY, Miyazawa M, Miyao M, Ogawa Y, Ohyashiki K, Katoh T, Kusumoto M, Gemma A, Sakai F, Sugiyama Y, Hatake K, Fukuda Y, Kudoh S. Bortezomib therapy-related lung disease in Japanese patients with multiple myeloma: Incidence, mortality and clinical characterization. *Cancer Sci.* 2013 Dec 14. doi: 10.1111/cas.12335.
- 2) Shiozawa T, Tadokoro J, Fujiki T, Fujino K, Kakihata K, Masatani S, Morita S, Gemma A, Boku N. Risk factors for severe adverse effects and treatment-related deaths in Japanese patients treated with irinotecan-based chemotherapy: a postmarketing survey. *Jpn J Clin Oncol.* 2013 May;43(5):483-91.
- 3) Saito Y, Nagayama M, Miura Y, Ogushi S, Suzuki Y, Noro R, Minegishi Y, Kimura G, Kondo Y, Gemma A. A case of pneumocystis pneumonia associated with everolimus therapy for renal cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2013; 43(5):559-62.
- 4) 齋藤 好信, 弦間 昭彦 がん診療UP TO DATE- 第V章 副作用のマネジメント 6. 肺毒性 日経メディカルブックス 778項-786項 2013年
- 5) 齋藤 好信, 弦間 昭彦 Everolimusによる肺障害 臨床的特徴, 診断, 治療について Annual Review 2013 呼吸器 中外医学社 125項-130項 2013年
- 6) 齋藤 好信, 弦間 昭彦 抗がん薬(分子標的治療薬)による肺障害 アレルギー・免疫

- 6) 齋藤 好信, 弦間 昭彦 抗がん薬(分子標的治療薬)による肺障害 アレルギー・免疫 第20巻3号 389項-395項 2013年
- 7) 齋藤 好信, 弦間 昭彦 【抗がん剤外来治療コンセプトシート2013】 外来での有害事象管理 BortezomibとmTOR阻害薬による間質性肺疾患 医学のあゆみ 第246巻9号 794項-799項 2013年

2. 学会発表

- 1) 三浦 由記子, 豊川 優, 小齊平 聖治, 野呂 林太郎, 峯岸 裕司, 齋藤 好信, 功刀 しのぶ, 福田 悠, 吾妻 安良太, 弦間 昭彦 当施設におけるペメトレキセドによる薬剤性肺障害の検討. 第110回日本内科学会総会・講演会 2013年4月東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

研究分担者 徳田 均
社会保険中央総合病院呼吸器内科 部長

研究要旨

研究協力施設として、薬剤性肺障害と診断された患者で当研究への同意を得られた1名の患者から、血液サンプルを採取し、主任研究施設に送付した。同時に臨床経過、データの詳細を記入した個人票を作成し、送付した。

主任研究施設で背景となる遺伝子解析が進行中である。

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、その効果も優れている反面、重篤な薬剤性肺障害の報告が増加している。これら薬剤性肺障害の発生頻度については、遺伝的要因が関与している可能性が考えられる。

本研究では、薬剤性肺障害に関与する共通の遺伝的背景を検討する。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、肺障害誘発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。

B 研究方法

平成25年4月から平成26年3月までの間に、社会保険中央総合病院で、薬剤性肺障害と診断（診断は薬剤性肺障害の評価、治療についてのガイドライン（日本呼吸器学会、2006）に則る）された患者のうち、同意が得られた患者について、血液サンプルを採取する。同時に臨床経過、データの詳細を記入した個人票を作成し、これらを主任研究施設に送付する。主任研究施設では、血液からDNAを抽出し、HLA-DNA

タイピングを行い、肺障害発症群、非発症群でその頻度を比較する。

C 研究結果

平成25年4月から平成26年1月現在で、薬剤性肺障害の診断基準を充たす症例につき、患者に説明を行い、同意の得られた1名について、血液サンプル及び詳細な個人票を作成し、信州大学第一内科に送付した。

その内訳は、ベプリジル塩酸塩水和物（ベプリコール®）1例、であった。現在信州大学第一内科にて解析が進行中である。

人権面の配慮として、個人情報保護には格段の意を用い、主任研究施設には患者の個人名は知らせず、当院の整理番号のみを伝えた。

また、患者への説明については、所定の説明用紙を用い、研究目的、方法、意義、利益と不利益、将来の研究への再利用の可否、などにつき、詳細な説明を行い、理解を得た上で、同意書に署名を得た。

D 考察

主任研究施設での解析結果を待ちたい。

E. 結論

主任研究施設での解析結果を待ちたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

現在のところ、この主題に関しては、発表はない。

薬剤性肺障害関連の論文としては、

1) 薬剤性肺障害(座談会)

久保 惠嗣(信州大学 医学部内科学第1講座), 弦間 昭彦, 酒井 文和, 徳田 均
呼吸32巻2号 Page115-125 (2013. 02)

2) 薬剤性肺障害の手引きー生物学的製剤による呼吸器感染症の特異性

大河内 康実, 徳田 均
アレルギー・免疫20巻3号 Page410-417 (2013. 02)

3) 生物学的製剤と非結核性抗酸菌症

徳田 均
結核88巻3号 Page341-344 (2013. 03)

4) 関節リウマチに対してアバタセプト投与中に発症したニューモシスチス肺炎の1例

田中 有紀子(社会保険中央総合病院 呼吸器内科), 大河内 康実, 藤原 高智, 笠井 昭吾, 徳田 均
日本呼吸器学会誌2巻3号 Page300-304 (2013. 05)

5) 生物学的製剤使用中の呼吸器感染症の現状と背景、頻度、リスクを探る

徳田 均(社会保険中央総合病院 呼吸器内科)
分子リウマチ治療6巻4号 Page161-165 (2013. 10)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

薬剤性肺障害の疫学調査の立案・実行、 資料の回収・分析、遺伝子学的検討

研究分担者 斎藤 嘉朗
国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 部長

研究協力者 中村 亮介
国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 室長

研究協力者 須藤 チエ
国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 派遣研究員

研究要旨

本邦における薬剤性の間質性肺疾患の発生状況を明らかにする一法として、昨年度に引き続き、薬事法に基づくPMDAへの報告数が多い医薬品品目を、公開資料から集計した。過去10年間では、ゲフィチニブが最も多く、次いでメトトレキサート、エルロチニブの順であった。また2012年度に限定すると、メトトレキサート、ドセタキセル、エルロチニブ、ゲムシタビン、エベロリムスの順であった。また、間質性肺疾患患者の発生情報を全国から収集し、その被疑薬を集計した。報告数の最も多い品目は、ゲフィチニブであり、次いでアミオダロン、イマチニブ、アダリムマブの順であった。さらに同意が得られた患者よりゲノムDNA試料（累計で81例）を収集したが、これまでに収集数が多い品目は、パクリタキセル、ゲフィチニブ、ドセタキセル、テガフルの順であった。

A 研究目的

臨床試験段階では患者数が十分でない、患者背景が類似している等の理由から、比較的頻度の低い重篤副作用は検出されない可能性がある。重篤副作用のうち、間質性肺疾患は、肺胞の壁や周辺（間質）に炎症が起こり、ガス交換ができずに低酸素血症をきたし呼吸困難に陥るものである。症状が進行すると、肺線維症に至る場合があり、発生機序としては、主として抗腫瘍薬による細胞障害型と免疫反応に起因するアレルギー型が考えられている。従来の医薬品から新しい分子標的薬や抗体医薬まで、多くの医薬品が原因となりうる。さらに、ある種の医

薬品では、その発生頻度が白人等に比して、日本人で高いことも報告されている。従って、本邦における間質性肺疾患の発生状況を明らかにし、さらに関連する遺伝因子を見いだして発症しやすい患者を明らかにすることは重要である。

重篤副作用が発生すると、薬事法第77条4の2の規定に従い、製造販売業者は医薬品医療機器総合機構（PMDA）に報告する義務を有しており、PMDAはこれらをラインデータとして公開している。本研究では、上記PMDAが公開している間質性肺疾患が疑われる発症数を集計し、報告数が多い医薬品を明らかにする。また発症

予測バイオマーカーの探索のため、間質性肺疾患患者のゲノムDNAが必要である。国立衛研では、厚生労働省、PMDA、日本製薬団体連合会の協力の下、信州大学との共同研究として、全国より間質性肺疾患の資試料を収集した。その収集状況を報告する。

B. 研究方法

(1) PMDA公表資料の解析

PMDAのホームページ (http://www.info.pmda.go.jp/fsearchnew/jsp/menu_fukusayou_base.jsp) 上で公開されている医薬品毎の集計値において、2012年度の集計数が5件以上の医薬品を選定し、当該医薬品に関して、2004年度以降の集計値を収集した。なお、2013年度は、2013年4月1日から2013年8月31日までの5ヶ月間の集計値である。表1に示した薬効分類は、日本標準商品分類番号の薬効分類番号に基づく。なお、PMDA より公開されている報告副作用数

は、1) 企業経由および医療機関経由など、重複して副作用が報告されるケースは重複してカウントされる可能性がある、2) 法律で義務づけられているものの、全ての副作用症例が報告されているとは確認されていない、3) 個別に医薬品と副作用との関連性を評価したものではなく、企業等からの報告数である、等の注意を要するものである。

(2) 遺伝子多型解析用ゲノムDNA試料の収集
前述のように、重篤副作用が発生すると、薬事法第77条4の2の規定に従い、製造販売業者は医薬品医療機器総合機構 (PMDA) に報告する義務を有しているが、本研究への協力を日本製薬団体連合会に依頼する厚生労働省医薬食品局安全対策課長通知に基づき、PMDAより症例毎に、協力を依頼するFAXを報告企業にしていた。各企業より国立衛研宛に症例発生

表1 薬事法に基づく間質性肺疾患症例のPMDAへの報告数

医薬品名	薬効分類(代表例)	年度 ^{a)}										合計
		2013 ^{b)}	2012	2011	2010	2009	2008	2007	2006	2005	2004	
マトレキサート 内用薬(合算)	代謝拮抗剤	31	81	65	50	61	74	78	93	111	124	768
ドセタキセル水和物 注射薬	抗腫瘍性植物成分製剤	22	73	69	85	55	43	55	55	37	46	540
エルロチニブ塩酸塩 内用薬	その他の腫瘍用剤	21	71	65	86	134	244	45	-	-	-	666
ゲムシタピン塩酸塩 注射薬	代謝拮抗剤	23	68	86	51	60	57	68	53	70	58	594
エベロリムス 内用薬	他に分類されないその他の代謝性医薬品	15	66	80	109	1	0	0	-	-	-	271
テムシロリムス 注射薬	その他の腫瘍用剤	12	58	100	13	-	-	-	-	-	-	183
アミオダロン塩酸塩 内用薬	不整脈用剤	27	44	46	43	40	50	33	53	35	40	411
ゲフィチニブ 内用薬	その他の腫瘍用剤	30	40	62	57	65	106	95	126	185	285	1051
テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム配合剤 内用薬	代謝拮抗剤	14	38	33	42	35	37	51	38	22	27	337
ベバシズマブ(遺伝子組換え) 注射薬	その他の腫瘍用剤	16	36	19	25	13	24	10	-	-	-	143
インフリキシマブ(遺伝子組換え) 注射薬	その他の消化器官用薬	11	33	24	19	12	16	15	18	13	16	177
ベムレキセドナトリウム水和物 注射薬	代謝拮抗剤	12	33	34	40	46	6	6	1	-	-	178
クロピドグレル硫酸塩 内用薬	その他の血液・体液用薬	1	27	13	15	21	26	7	1	-	-	111
エタネルセプト(遺伝子組換え) 注射薬	他に分類されないその他の代謝性医薬品	9	26	29	37	34	27	35	42	35	-	274
パニツムマブ(遺伝子組換え) 注射薬	その他の腫瘍用剤	9	26	42	36	-	-	-	-	-	-	113
クリゾチニブ 内用薬	その他の腫瘍用剤	17	24	-	-	-	-	-	-	-	-	41
イリノテカン塩酸塩水和物 注射薬	抗腫瘍性植物成分製剤	10	21	27	29	24	38	15	24	19	15	222
トシズマブ(遺伝子組換え) 注射薬	その他の生物学的製剤	8	21	24	17	22	17	0	0	0	-	109
アダリムマブ(遺伝子組換え) 注射薬	他に分類されないその他の代謝性医薬品	5	20	21	28	34	4	-	-	-	-	112
オキサリプラチン 注射薬	その他の腫瘍用剤	7	19	27	28	23	38	31	21	10	-	204
シクロスボリン 内用薬	他に分類されないその他の代謝性医薬品	0	17	3	2	3	11	5	5	4	4	54
セツキシマブ(遺伝子組換え) 注射薬	その他の腫瘍用剤	10	17	14	15	55	10	-	-	-	-	121
ダビガトランエチキシルアトメタンサルホン酸塩 内用薬	血液凝固阻剤	5	17	18	-	-	-	-	-	-	-	40
フルオロウラルシ 注射薬	代謝拮抗剤	5	17	15	27	14	29	9	7	8	7	138
イマチニブメシル酸塩 内用薬	その他の腫瘍用剤	2	16	15	26	23	16	14	16	17	23	168
カベシタピン 内用薬	代謝拮抗剤	7	16	9	9	5	5	2	1	5	5	64
バクリタキセル 注射薬	抗腫瘍性植物成分製剤	5	16	17	31	30	29	29	26	46	34	263
シタグリブチン酸塩水和物 内用薬	糖尿病薬	5	15	30	10	1	-	-	-	-	-	61
ベダインターフェロン α -2b(遺伝子組換え) 注射薬	その他の生物学的製剤	2	15	6	13	18	18	20	40	15	0	147
柴苓湯 内用薬	漢方製剤	4	15	5	5	5	6	3	4	5	5	57

^{a)}「-」は未発売を示す

^{b)}2013年度に関しては、2013年4月1日～2013年8月31日までの5ヶ月間の集計値

本研究への協力を依頼する文書を返信し、各企業より副作用患者の担当医に協力依頼をして頂いている。担当医が同意された場合には、この段階で初めて医師の連絡先情報が国立衛研側に伝えられ、以後は国立衛研側の担当者が直接、担当医と連絡を取り、倫理申請、患者説明と同意の取得、採血、確定診断のためのケースカード（患者背景情報、投薬情報、副作用情報等を含む）への記入に関する説明をお願いしている。ケースカードに基づき、信州大学医学部内科学第一講座（呼吸器センター）の専門医師により確定診断がなされている。

（倫理面での配慮）

本研究は、匿名化されたヒト試料（血液より抽出したゲノムDNA）および患者情報を収集する研究であるため、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に基づき、機関研究倫理審査委員会に申請し、承認を得た上で研究を遂行している（受付番号205、課題名：「間質性肺疾患の発症に関連するバイオマーカーの探索研究」）。

C. 研究結果

（1）PMDA公表資料の解析

自発報告の集計基準（2012年度の集計数が5件以上）に合致した71品目のうち、上位30品目を表1に示す。薬効別では上位30品目中、21品目を腫瘍用薬が占めている。2012年度の特徴としては、メトトレキサート、ドセタキセル、ゲムシタビン、アミオダロン等の従来から発生数が多かった医薬品に加え、ベバシズマブ等の抗体医薬品が7例、エルロチニブ等の低分子分子標的薬が4例と、近年の承認数・使用数の増加に伴い、上位を占めるようになってきている。

また、2004年度からの10年弱の累計では、以下の様な特徴が認められた。

1) 累計では、ゲフィチニブ（1,051件）、メトトレキサート（768件）、エルロチニブ（666

件）、ゲムシタビン（594件）、ドセタキセル（540件）の順で報告数が多い。

2) 2004年度に285件報告されたゲフィチニブはそれ以降減少傾向にあり、ここ4年間では40-65件となっている。また2008年度に244件報告されたエルロチニブも、2011年度に65件、2012年度に71件と最近では70件程度となっている。

3) 長期収載医薬品については、過去5年間で、メトトレキサートは50-81件、ドセタキセルは43-85件、ゲムシタビンでは51-86件と安定している。

4) 最近5年間では、テムシロリムス、パニツムマブ、クリゾチニブ、ダビガトラン、シタグリプチンリンが上位30品目に入るようになった。

（2）遺伝子多型解析用ゲノムDNA試料の収集

試料収集を開始した2011年9月27日から2013年12月31日までの約2年3ヶ月間について、当所での資試料集積のため製薬企業より症例発生報告を受けた間質性肺疾患症例の被疑薬で、10件以上の上位16品目は、図1に示すとおりである。ゲフィチニブが突出しており、次いでアミオダロン、イマチニブ、アダリムマブ、エベロリムス、フルオロウラシル、ゲムシタビンの順となっている。

また、このうち、担当医が研究協力を承諾し、さらに患者の同意が得られて、ゲノムDNAおよび副作用等情報が収集されたものは、累計で81例となった（うち、2例は、被疑薬不明）。これまでに収集数が多い品目は、パクリタキセル、ゲフィチニブ、ドセタキセル、テガフル、イリノテカン、ゲムシタビンの順であった（図2に収集2例以上の被疑薬を示す）。

D. 考察

（1）PMDA公表資料の解析

薬事法に基づくPMDAへの報告数が直近で多い医薬品品目を、ホームページでの公開試料から集計した。抗体医薬品や低分子分子標的薬等が約40%を占めており、新たな被疑薬となっ

ていることが明らかとなった。販売当初、問題となったゲフィチニブを被疑薬とする報告は、ドセタキセルやゲムシタビン等の他の抗腫瘍薬と、近年は同程度となっており、緊急安全性情報や添付文書の改訂等の行政施策、および日本肺癌学会の「ゲフィチニブ使用に関するガイドライン」等の安全対策が奏効していると考えられた。一方で、メトトレキサート、ドセタキセル、アミオダロン、ゲムシタビン等を被疑薬とする報告は依然として多く、各年度の数は安定しており、減少傾向は認められなかった。この結果は、添付文書の改訂等の従来からの事後対応型安全対策の限界を示唆しており、今後は、ゲノム等のバイオマーカーを活用して発症リスクを有する患者を特定し、同効の別種医薬品を投与するなどの予測・予防型安全対策が必要になると考えられる。薬剤性間質性肺疾患の重篤性を考慮した場合、発症予測バイオマーカーの同定は急務である。

(2) 遺伝子多型解析用ゲノムDNA試料の収集

発症予測バイオマーカーの同定を目的とした間質性肺疾患の資試料集積のため製薬企業より症例発生報告を受けた間質性肺疾患症例の被疑薬は、一部の例外を除き、上記薬事法に基づく報告数と、おおむね同様であった。一方で、ゲノムDNAを収集できた症例は、必ずしも報告数を反映した結果とはなっていない。多忙な医師の協力が得られるよう、CRCの雇用による同意取得の負担軽減等の対策を取る必要があると考えられる。

なお現在、これらのゲノムDNA試料に関し、イルミナ社2.5Mアレイによるゲノム網羅的遺伝子多型 (SNP) 測定を行っている。

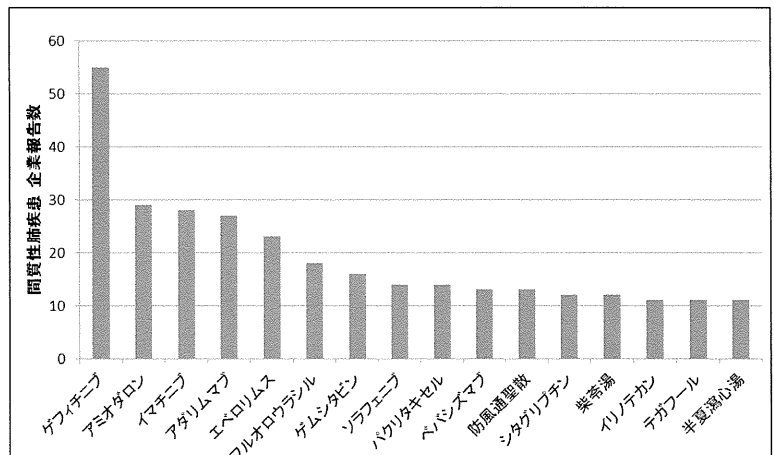


図1 2011/9/27~2013/12/31の企業報告における被疑薬別の集計結果。10件以上の品目を示す。1症例に被疑薬が複数ある場合は、それぞれカウントした。

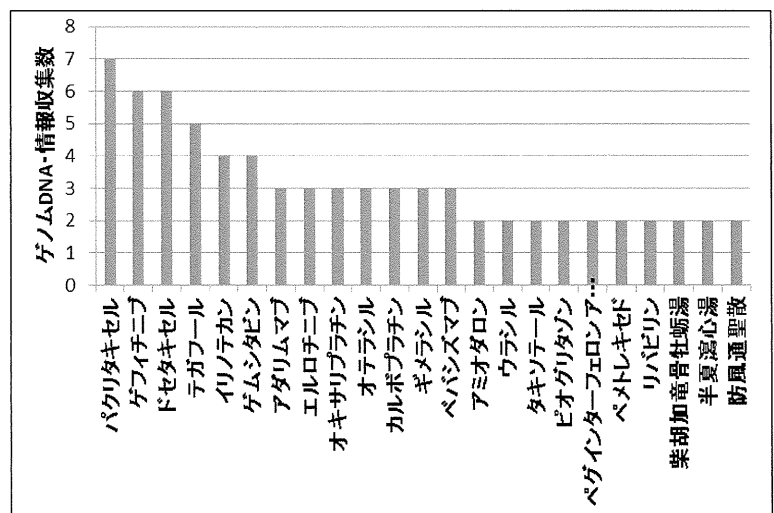


図2 2011/9/27~2013/12/31にゲノムDNAおよび副作用等情報を収集した症例の被疑薬別集計結果。10件以上の品目を示す。1症例に被疑薬が複数ある場合は、それぞれカウントした。

E. 結論

(1) PMDA公表資料の解析

直近で薬事法に基づくPMDAへの報告数が多い医薬品品目を、公開資料から集計した。近年、承認された、エルロチニブ、エベロリムス、テムシロリムス等の分子標的薬や、ベバシズマブ、インフリキシマブ、トシリズマブ等の抗体医薬品が多いものの、依然としてメトトレキサート、ドセタキセル、アミオダロン、ゲムシタビン、テガフル等の従来から用いられている医薬品の報告数も多く、事後対応型から予

測・予防型の製造販売後安全対策への転換が求められる。

(2) 遺伝子多型解析用ゲノムDNA試料の収集

発症予測バイオマーカーの同定を目的とした間質性肺疾患の資試料集積のため製薬企業より症例発生報告を受けた間質性肺疾患症例の被疑薬の種類は、ゲフィチニブ、アミオダロン、イマチニブ、アダリムマブの順であった。さらに同意が得られた患者よりゲノムDNA試料（累計で81例）を収集したが、これまでに収集数が多い品目は、パクリタキセル、ゲフィチニブ、ドセタキセル、テガフルの順であった。

F. 健康危険情報：

該当無し

G. 研究発表：

1. 論文発表

- 1) 斎藤嘉朗, 前川京子, 田島陽子, 児玉進, 黒瀬光一: 市販後安全性確保に係るバイオマーカーと診断. レギュラトリーサイエンス学会誌, 3: 43-55, 2013.

2. 学会発表

- 1) 斎藤嘉朗: 重篤副作用安全対策と予測バイオマーカー研究。信州薬剤性肺障害研究会 (2014. 3、松本)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

間質性肺炎のバイオマーカーの欧米人における 有用性に関する検討

研究分担者 服部 登

広島大学大学院医歯薬学総合研究科・分子内科学 准教授

堀益 靖 広島大学病院呼吸器内科 医科診療医

石川暢久 広島大学大学院医歯薬学総合研究科・分子内科学 講師

河野修興 広島大学大学院医歯薬学総合研究科・分子内科学 教授

研究要旨

【背景】間質性肺炎の血清バイオマーカーであるKrebs von den Lungen-6(KL-6)、Surfactant protein (SP)-A、SP-Dは本邦で開発され臨床応用されているが、欧米での利用は研究目的に限られている。われわれはこれまで、血清KL-6とSP-Dが日本人よりもドイツ人で高値となること、血清KL-6値の人種差には*MUC1*遺伝子の単塩基多型(SNP)が関与していることを報告した。

【目的】ドイツ人と日本人における血清SP-D値の人種差が*SFTPD*遺伝子中のSNPとどのように関連しているかについて明らかにする。

【方法】広島大学病院およびドイツRuhrlandklinik, University Hospital Essenの国際共同研究において、ATS/ERSのガイドラインに従い、臨床、画像、組織パターンに基づいて特発性間質性肺炎 (Idiopathic interstitial pneumonias: IIPs) と診断された232症例ならびに健常対象者440例を検討対象とした。なお、白人もしくは日本人のみを対象とし、それ以外の人種のもの除外した。血清SP-AおよびSP-D値はenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法により測定し、末梢血から抽出したゲノムDNAを用いて*SFTPD*遺伝子中のSNPのタイピングを行った。

【結果】ドイツ人、日本人ともにIIPs患者の血清SP-AおよびSP-D値は健常者に比べ有意に高値であった。ドイツ人の血清SP-D値は、IIPs患者 ($p = 0.005$) および健常者 ($p < 0.001$) のいずれも日本人に比して有意に高値であったが、血清SP-A値には人種間での違いは認めなかった。また、*SFTPD*遺伝子中のrs721917、rs1998374およびrs2243639の遺伝子型と血清SP-D値の間には有意な相関を認めた。SNPsの遺伝子型、人種およびIIPsの有無を説明変数とした重回帰分析を行った結果、これら3つのSNPsと血清SP-D値の間には有意な相関を認めたが ($p < 0.001$, $p = 0.001$, $p = 0.038$)、人種の違いと血清SP-D値には有意な相関を認めなかった。

【結論】ドイツ人と日本人の間で血清SP-A値には人種差を認めなかったが、血清SP-D値には人種差を認め、その違いは*SFTPD*遺伝子多型の頻度の違いによるものである可能性が示唆された。

A. 研究目的

間質性肺炎は肺泡領域における間質の炎症を首座とする200種類以上の疾患の総称である。間質性肺炎の原因としては、薬剤やサプリメントなどの健康食品、粉じんの吸入、膠原病やサルコイドーシスなどの全身性疾患に付随して発症するものなど多数あることが知られているが、原因が特定できないものは特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonias : IIPs) と呼ばれている。間質性肺炎、特にIIPsの中には難治性で予後不良な病態があることが知られており、早期の診断と適切な治療介入が重要である。現時点ではIIPsの診断は理学所見、胸部X線検査および呼吸機能検査などを基に進めていくこととされているが、より早期の診断が可能で低侵襲かつ低コストな診断ツールとしての血清バイオマーカーの応用は、臨床上きわめて有用と考えられる。

間質性肺炎の血清バイオマーカーであるKrebs von den Lungen-6 (KL-6)、Surfactant protein (SP)-A、SP-Dは、わが国において開発された臨床検査である。1999年より世界に先駆けてわが国ではこれらのバイオマーカーを日常診療において使用することが可能になり、現在年間約200万検体以上の測定が行われている。しかしながら、欧米ではこれらの血清バイオマーカーは研究的に測定されているのみであり、欧米人における有用性のデータは限られている。

私たちはこれまでに、KL-6、SP-A、SP-Dがドイツ人においてもROC解析で高いAUC値を示しIIPsの診断に有用であることを報告し、さらにドイツ人における血清KL-6値が日本人に比し高値であること、その違いはMUC1遺伝子上の単塩基多型 (single nucleotide polymorphisms; SNP) の頻度の違いによって引き起こされるものであることを報告してきた。

以上の背景より本研究では私たちは血清SP-D値の日本人とドイツ人における人種差に注目し、SFTPD遺伝子上のSNPsと血清SP-D値の関係を調べることで人種間の遺伝学的相違が間質

性肺炎のバイオマーカーに与える影響について明らかにすることを目指したい。

B. 研究方法

2007年 2月から2011年 12月までに広島大学病院ならびにドイツRuhrlandklinik, University HospitalでATS/ERSのガイドラインに従い、臨床、画像、組織パターンに基づいてIIPsと診断された232症例 (日本人94症例、ドイツ人138症例) を対象とした。同時に健常人 (healthy subject; HS) 440症例 (日本人275症例、ドイツ人165症例) も対象とした。

初診時に血清を採取し、遠心分離した後、 -80°C で凍結保存した。その後、血清SP-A値、SP-D値を sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。DNAの抽出は -80°C で凍結保存した全血を用い、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈降法によって行った。血清SP-D値の人種差に影響を与えるSNPを抽出するため、HapMapプロジェクトデータベースを用いてCEU (Utah residents with ancestry from northern and western Europe) コホートとJPT (Japanese in Tokyo, Japan) コホート間でカイ2乗検定を行い、遺伝子型頻度に差を認めたSFTPD遺伝子上の18 SNPsを同定した。これらのうち、過去に血清SP-D値との関連が報告されているものや市販のタイピングアッセイが入手可能なものに絞り、rs721917、rs1998374、rs2243639、rs3088308の

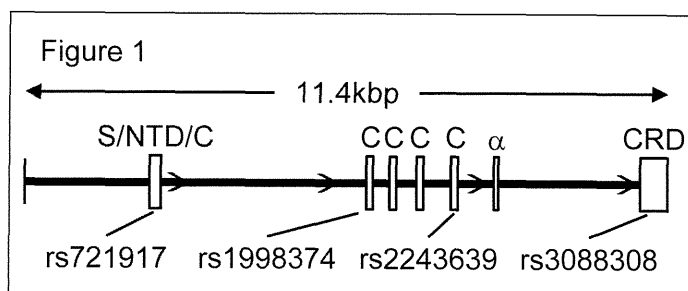


Figure 1 - Functional features of the SFTPD gene

The thick horizontal bar represents the intronic region, and the white boxes represent exons. S, signal peptide; NTD, N-terminal domain; C, collagen domain; α , α -helical neck region; CRD, carbohydrate recognition domain.

4 SNP (Figure 1) について、Fast Real-Time PCR 法によりタイピングを行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) 患者背景

Table 1に示すように、IIPs症例においては日本人とドイツ人の間に年齢、性別、喫煙歴、呼吸機能検査値などに差を認めなかったが、健常人については年齢、性別、喫煙歴ともに差を認めた。

2) 血清SP-A、SP-Dのドイツ人における診断マーカーとしての有用性および日本人との差異

まず、最初にこれらの間質性肺炎の血清バイオマーカー値のドイツ人における有用性を検討し

た。Figure 2Aおよび2Bに示すように、いずれの血清バイオマーカー値（SP-A値、SP-D値）も、健常人と比較してIIPsの症例において、ドイツ人においても日本人と同様に有意差を持って高値を認めた。また、Figure 2Cおよび2Dに示すように、IIPs患者と健常人とのROC解析では、ドイツ人における血清SP-AのAUC値が0.940、SP-DのAUC値が0.977と、日本人（血清SP-AのAUC値が0.902、SP-DのAUC値が0.973）と同様にドイツ人においてもこれらの血清マーカーがIIPsの診断に有用であることが示された。

また、ドイツ人の血清SP-D値はIIPs患者 ($p = 0.005$) においても健常人 ($p < 0.001$) においても日本人より有意に高値であった (Figure 2B) 一方で、血清SP-A値には人種間の差を認めなかった (Figure 2A)。

3) IIPs患者と健常人におけるSFTPD遺伝子上のSNP頻度の比較検討

研究対象者のうち、ゲノムDNA解析に同意して全血の保存が行われた477例（ドイツ人139例、日本人338例）について、ゲノムDNAの抽出とrs721917、rs1998374、rs2243639、rs3088308のタイ

Table 1 - Characteristics of study subjects

	German	Japanese	<i>p</i> value
Patients with IIPs			
Number of the subjects	138	94	
Age (years)	67.4 ± 0.8	68.0 ± 1.0	0.982
Gender (male / female)	88 (63.8%) / 50 (36.2%)	64 (68.1%) / 30 (31.9%)	0.497
Smoking (Cu / Ex / Non / ND)	14 (10.1%) / 54 (39.1%) / 64 (46.4%) / 6 (4.4%)	11 (11.7%) / 46 (49.0%) / 35 (37.2%) / 2 (2.1%)	0.297
VC (percent predicted)	66.1 ± 1.6	70.3 ± 2.2	0.163
DL _{CO} (percent predicted)	47.7 ± 1.6	44.8 ± 1.8	0.255
Diagnostic category (IPF / NSIP)	94 (68.1%) / 44 (31.9%)	61 (64.9%) / 33 (35.1%)	0.609
Healthy subjects			
Number of the subjects	165	275	
Age (years)	36.5 ± 0.9	49.8 ± 0.4	< 0.001
Gender (male / female)	60 (36.4%) / 105 (63.6%)	227 (82.5%) / 48 (17.5%)	< 0.001
Smoking (Cu / Ex / Non / ND)	41 (24.8%) / 20 (12.1%) / 90 (54.6%) / 14 (8.5%)	82 (29.8%) / 62 (22.6%) / 131 (47.6%) / 0 (0.0%)	0.026

Data are shown as mean ± SEM.

Statistical significance was tested by Mann-Whitney *U*-test or Chi-square test.

Cu, current smoker; Ex, ex-smoker; Non, non-smoker; ND, no data; IIPs, idiopathic interstitial pneumonias; VC, vital capacity; DL_{CO}, diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; NSIP, nonspecific interstitial pneumonia.

ピングを行った。Table 2に示すように、ドイツ人IIPs患者、ドイツ人健常人、日本人IIPs患者、日本人健常人のすべてにおいて、これら4つのSNPの遺伝子型分布はHardy-Weinberg平衡に従っていた。また、IIPs患者と健常人との間に、4つのSNPの遺伝子型分布の差はいずれも認められなかった。

なお、HapMapデータベースの結果と同様に、われわれの検討でもこれら4つのSNPの遺伝子型分布はドイツ人と日本人の間では有意に異なっていた。

4) SFTPD遺伝子上のSNPsが血清SP-D値に与える影響についての検討

Figure 3に示すように、4つのSNPsのすべての遺伝子型において、IIPs患者の血清SP-D値は健常人よりも有意に高値だった。一方で、Figure 3Aに示すように、IIPs患者、健常人のいずれにおいても、rs721917の遺伝子型ごとに血清SP-D値が異なる傾向を認め、C/C群でSP-D値が最も低く、T/T群で高い傾向を認めた。同様にrs1998374とrs2243639についても遺伝子型ごとにSP-D値が異なる傾向を認めたが、rs3088308については遺伝子形とSP-D値の関係は認めなかった。

SFTPD遺伝子の多型が血清SP-D値に与える影響について更に検証するため、血清SP-D値を目的変数とした線形回帰分析を行った。

Table 3に示す通り、rs721917、rs1998374、rs2243639については単変量解析で有意に血清SP-D値との相関を認めたが、rs3088308については有意な相関は見られなかった。有意な相関を認めた3つのSNPについて、年齢、人種、IIPsの有無を含めた多変量解析を行った結果、いずれのSNPも人種の違いやIIPsの有無とは独立して血清SP-D値と相関することが示された(rs721917; $p < 0.001$, rs1998374; $p = 0.001$, rs2243639; $p = 0.038$)。一方で、人種の違い

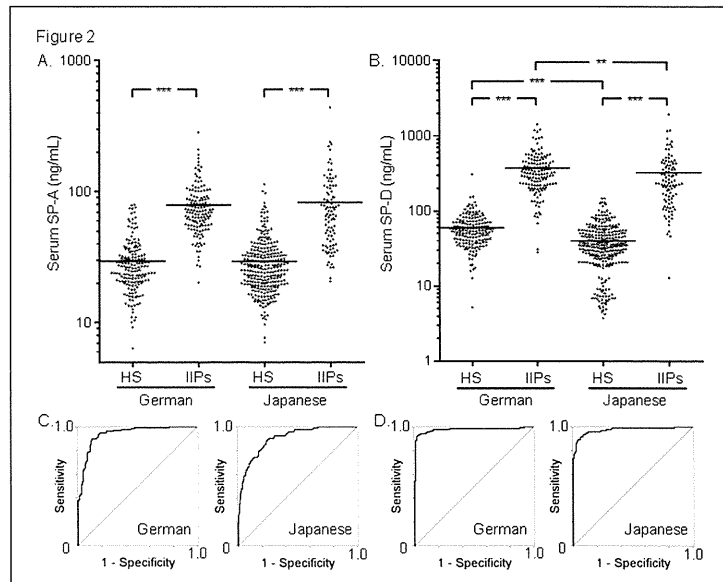


Figure 2 - Comparison of serum SP-A and SP-D levels between the cohorts

(A) Serum SP-A and (B) SP-D levels in German and Japanese cohorts. Receiver operating characteristic (ROC) curves of (C) serum SP-A and (D) SP-D in German (left panel) and Japanese (right panel) cohorts. The horizontal bars represent the mean values. The significance level was defined $\alpha = 0.013$ (four comparisons in four groups). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.013$ (Mann-Whitney *U*-test).

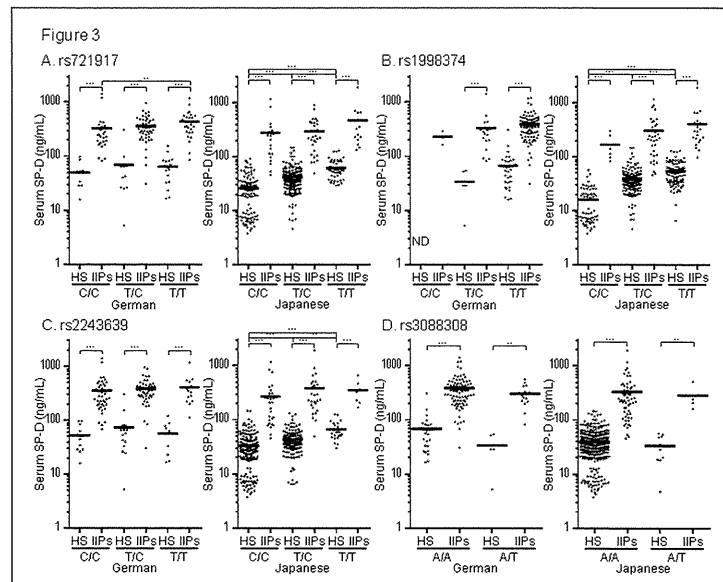


Figure 3 - Relationship between genotype and serum SP-D levels

Serum SP-D levels were compared between each genotype: (A) rs721917, (B) rs1998374, (C) rs2243639, and (D) rs3088308. For each genotype, data of the German cohort are shown in the left and those of the Japanese cohort are shown in the right. The horizontal bars represent the mean values. (A), (B), (C) The significance level was defined as $\alpha = 0.006$ (nine comparisons in six groups). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.006$ (Mann-Whitney *U*-test). (D) The significance level was defined as $\alpha = 0.0125$ (four comparisons in four groups). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.013$ (Mann-Whitney *U*-test).

Table 2 - Genotype distributions of single nucleotide polymorphisms in *SFTPD* gene – patients with IIPs vs HS –

		German				HWE	Japanese				HWE
		Total	C/C	T/C	T/T		Total	C/C	T/C	T/T	
rs721917	Total										
Patients with IIPs	102	25 (24.5%)	47 (46.1%)	30 (29.4%)	0.862	63	19 (30.2%)	30 (47.6%)	14 (22.2%)	0.973	
Healthy subjects	37	9 (24.3%)	11 (29.7%)	17 (46.0%)	0.266	275	95 (34.5%)	136 (49.5%)	44 (16.0%)	0.960	
Chi-square test		$p = 0.140$					$p = 0.476$				
rs1998374	Total										
Patients with IIPs	102	3 (2.9%)	18 (17.7%)	81 (79.4%)	0.655	63	6 (9.5%)	35 (55.6%)	22 (34.9%)	0.561	
Healthy subjects	37	0 (0.0%)	5 (13.5%)	32 (86.5%)	0.913	275	57 (20.7%)	125 (45.5%)	93 (33.8%)	0.679	
Chi-square test		$p = 0.464$					$p = 0.102$				
rs2243639	Total										
Patients with IIPs	102	43 (42.2%)	45 (44.1%)	14 (13.7%)	0.960	63	28 (44.4%)	28 (44.4%)	7 (11.1%)	1.000	
Healthy subjects	37	13 (35.1%)	15 (40.6%)	9 (24.3%)	0.741	275	140 (50.9%)	113 (41.1%)	22 (8.0%)	0.996	
Chi-square test		$p = 0.324$					$p = 0.563$				
rs3088308	Total										
Patients with IIPs	102	86 (84.3%)	16 (15.7%)	0 (0.0%)	0.711	63	59 (93.7%)	4 (6.3%)	0 (0.0%)	0.968	
Healthy subjects	37	32 (86.5%)	5 (13.5%)	0 (0.0%)	0.913	275	265 (96.4%)	10 (3.6%)	0 (0.0%)	0.955	
Chi-square test		$p = 0.752$					$p = 0.330$				

IIPs, idiopathic interstitial pneumonias; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium.

Table 3 - Correlations between serum SP-D levels and *SFTPD* gene polymorphisms

variable	Regression coefficient (95% CI.)	p value	VIF
rs721917			
Univariate model			
C/C vs T/C vs T/T	55.276 (28.473 - 82.079)	< 0.001	
Multivariate model			
C/C vs T/C vs T/T	35.149 (15.341 - 54.957)	< 0.001	1.031
age	-0.444 (-2.009 - 1.121)	0.578	1.978
Japanese vs German	24.061 (-13.125 - 61.246)	0.204	1.437
HS vs patients with IIPs	307.740 (260.743 - 354.736)	< 0.001	2.515
rs1998374			
Univariate model			
C/C vs T/C vs T/T	86.550 (59.832 - 113.269)	< 0.001	
Multivariate model			
C/C vs T/C vs T/T	36.172 (14.289 - 58.056)	0.001	1.203
age	-0.353 (-1.918 - 1.213)	0.658	1.972
Japanese vs German	11.114 (-28.165 - 50.393)	0.578	1.598
HS vs patients with IIPs	304.645 (257.602 - 351.689)	< 0.001	2.511
rs2243639			
Univariate model			
C/C vs T/C vs T/T	38.179 (8.965 - 67.393)	0.011	
Multivariate model			
C/C vs T/C vs T/T	22.707 (1.310 - 44.104)	0.038	1.017
age	-0.360 (-0.449 - 0.654)	0.654	1.976
Japanese vs German	29.314 (-8.000 - 66.627)	0.123	1.423
HS vs patients with IIPs	306.421 (259.045 - 353.798)	< 0.001	2.514
rs3088308			
Univariate model			
A/A vs A/T	37.750 (-37.732 - 113.231)	0.326	

The genotypes of each single nucleotide polymorphism are arranged in the order of lowest to highest serum SP-D levels. CI, confidence interval; HS, healthy subjects; IIPs, idiopathic interstitial pneumonias; VIF, Variance inflation factor.

なかった。

D. 考察

本研究では、血清SP-AならびにSP-Dが日本人と同様ドイツ人でもIIPsの診断マーカーとして有用であることが示された。さらに、血清SP-A値には人種間で差がないが、血清SP-D値はIIPs患者においても健常人においても、日本人よりドイツ人で有意に高値であることが示された。また、多変量

解析によって*SFTPD*遺伝子上の3つのSNP (rs721917、rs1998374、rs2243639) が人種の違いやIIPsの有無とは独立して血清SP-D値に影響していることが明らかになった。

解析によって*SFTPD*遺伝子上の3つのSNP (rs721917、rs1998374、rs2243639) が人種の違いやIIPsの有無とは独立して血清SP-D値に影響していることが明らかになった。

た。

本研究の重要な点は、血清SP-D値が*SFTPD*遺伝子の多型によって異なることを2つの人種コホートを用いて明らかにした点である。SP-D分子は、N-terminal domain (NTD)、collagen domain、 α -helical neck region、carbohydrate recognition domainの4領域から成り、NTD領域のジスルフィド結合によって多量体を形成することが知られている。これまでにNTD領域に位置するrs721917の遺伝子型とSP-D分子の重合の程度が関連していることが報告されており、この重合の違いが血清SP-D値に影響を与えていることが推測される。本研究結果により、collagen domainに位置するrs1998374およびrs2243639と血清SP-D値の関連が明らかになったことから、この領域もSP-D分子の重合に関与している可能性が示唆された。

多変量解析の結果、これらのSNPと血清SP-D値との関連が統計学的に独立したものであることが示され、一方で人種の違いと血清SP-D値との関連は有意ではない結果が示された。したがって、ドイツ人と日本人における血清SP-D値の違いは、*SFTPD*遺伝子の多型に起因するものである可能性が示された。

E. 結論

ドイツ人と日本人の間で血清SP-A値には人種差を認めなかったが、血清SP-D値には人種差を認め、その違いはSFTPD遺伝子多型の頻度の違いによるものである可能性が示唆された。欧米人におけるこれらの血清バイオマーカーの有用性の検証と適切なカットオフ値の設定のためには、さらに多数症例での前向きな国際共同研究を行う必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kubo K, Azuma A, Kanazawa M, Kameda H, Kusumoto M, Genma A, Saijo Y, Sakai F, Sugiyama Y, Tatsumi K, Dohi M, Tokuda H, Hashimoto S, Hattori N, Hanaoka M, Fukuda Y; Japanese Respiratory Society Committee for formulation of Consensus statement for the diagnosis and treatment of drug-induced lung injuries. Consensus statement for the diagnosis and treatment of drug-induced lung injuries. *Respir Investig* 51:260-77, 2013
- 2) Sugiyama A, Hattori N, Haruta Y, Nakamura I, Nakagawa M, Miyamoto S, Onari Y, Iwamoto H, Ishikawa N, Fujitaka K, Murai H, Kohno N. Characteristics of inspiratory and expiratory reactance in interstitial lung disease. *Respir Med* 107:875-82, 2013
- 3) Masuda T, Hattori N, Senoo T, Akita S, Ishikawa N, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Kohno N. SK-216, an inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1, limits tumor progression and angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 12:2378-88, 2013
- 4) Hattori N, Horimasu Y. Reply to letter to the Editor: rs4072037 Polymorphisms and their

role in gastrointestinal carcinogenesis. *Respir Med* 107:159, 2013

- 5) Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Tanaka S, Bonella F, Ohshimo S, Guzman J, Costabel U, Kohno N. Differences in serum SP-D levels between German and Japanese subjects are associated with SFTPD gene polymorphisms. *BMC Med Genet*. in press

2. 学会発表

- 1) Ishikawa N, Horimasu Y, Iwamoto H, Ohshimo S, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Hattori N, Kohno N. Gene expression profiles of chronic hypersensitivity pneumonitis: identification of disease specific and diagnostic markers and molecular targets. American Thoracic Society International Conference (2013.5.17-22, Philadelphia)
- 2) Ohshimo S, Horimasu Y, Bonella F, Ishikawa N, Hattori N, Tanigawa K, Kohno N, Guzman J, Costabel U. KL-6 and CCL18 as predictors for acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis. American Thoracic Society International Conference (2013.5.17-22, Philadelphia)
- 3) Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Tanaka S, Bonella F, Ohshimo S, Guzman J, Costabel U, Kohno N. Difference of serum SP-D levels between German and Japanese are associated with SFTPD gene polymorphisms. American Thoracic Society International Conference (2013.5.17-22, Philadelphia)
- 4) Ishikawa N, Yoshioka K, Horimasu Y, Iwamoto H, Ohshimo S, Hattori N, Kohno N. KL-6, SP-D and MMP-7 as serum biomarkers for early detection of interstitial lung diseases. European Respiratory Society Annual Congress (2013.9.7-11, Barcelona)
- 5) Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Tanaka S, Bonella F, Ohshimo S, Guzman J, Costabel U,

Kohno N. MUC5B promoter polymorphism is significantly associated with idiopathic interstitial pneumonia in German but not in Japanese patients. European Respiratory Society Annual Congress (2013.9.7-11, Barcelona)

- 6) Ohshimo S, Ishikawa N, Horimasu Y, Hattori N, Kohno N, Bonella F, Guzman J, Costabel U. Ethnic Difference And Serum KL-6 As Predictors For Acute Exacerbation Of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (2013.11.11-14, Yokohama)
- 7) Ishikawa N, Matsuda T, Nakashima T, Iwamoto H, Ohshimo S, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Hattori N, Kohno N. Comparison Of KL-6, Sp-A, Sp-D, 8-Isoprostane, Mmp-9, And Timp-1 As Serum Biomarkers For Patients With Combined Pulmonary Fibrosis And Emphysema 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (2013.11.11-14, Yokohama)
- 8) Hamai K, Ishikawa N, Nakashima T, Iwamoto H, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Hattori N, Kohno N. Increase Of Receptor Type Tyrosine Kinase Ros1 In Interstitial Lung Disease. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (2013.11.11-14, Yokohama)
- 9) Horimasu Y, Ishikawa N, Nakashima T, Iwamoto H, Seno T, Ohshimo S, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, Hattori N, Kohno N. Bronchoalveolar Lavage Cellular Pattern Can Predict The Prognosis Of Patients With Chronic Hypersensitivity Pneumonitis. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (2013.11.11-14, Yokohama)

3. その他

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

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
薬剤性肺障害に関する包括的研究
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 准教授

研究要旨

分子標的薬剤として使用されている難治疾患・癌疾患治療薬剤は、薬剤効果が優れている反面、薬剤による薬剤性肺障害を誘発する報告例が近年増加している。特に、この障害発症は民族間で相違が認められることから、遺伝的要因が関与している可能性が示唆されている。この遺伝的要因解明のために、昨年までに我々は、薬剤性肺障害を起こした症例と、起こさなかった症例について、Affymetrix社のGeneChip Human Mapping 500K Array Set (500,568 SNPs)を用いた相関解析 (GWAS:genome-wide association study) を行い、薬剤性肺障害発症に統計学的有意 ($p < 0.0001$) な相関を示す候補遺伝子を幾つか報告してきた (*HIVEP3* 1p34.2, *NME7* 1q24.2, *IL17RD* 3p14.3, *ATP11B* 3q26.33, *SCRCS3* 10q25.1, *PAAF1* 11q 13.4, *CAND1* 12q14.3, *COL4A2* 13q3.4, *SLC39A11* 17q25.1, *CABLES1* 18q11.2)。今回、GWAS解析時 (発症例19例、非発症例14例) より多くの症例数 (発症例58例、非発症例66例) が収集されたので、これらのサンプルについて薬剤性肺障害発症感受性・抵抗性についての確認試験を行った。解析は*HIVEP3*と*NME7*遺伝子領域内に局在するSNPsについてABI TaqMan SNP genotyping assayを行い、相関の有無を確認した。*HIVEP3*遺伝子内に設けた3種類のSNP (rs10493099, rs710235, rs2165303) は何れも肺障害発症に正の相関を示した ($p < 0.0019$, $R.R.=2.28$)。また、*NME7*遺伝子についても、3種類のSNPsと強い正の相関を示した (rs3820056: $p < 6.03 \times 10^{-8}$, rs9633334: $p < 6.44 \times 10^{-5}$, rs6688038: $p < 7.63 \times 10^{-7}$)。

A. 研究目的

本研究は日本人における薬剤性肺障害に遺伝学的要因が影響しているかについて検討した。Affymetrix社のGeneChip Human Mapping 500K Array Set (500,568 SNPs)を用いた相関解析 (GWAS:genome-wide association study) で、 $p < 0.0001$ の有意差を示すSNPsから薬剤性肺

障害に影響を与えていると考えられた遺伝子のなかで、*HIVEP3* (Human Immunodeficiency Virus Type I Enhancer-Binding Protein 3) 遺伝子と *NME7* (NonMetastatic Cells 7) 遺伝子について、相関の確認試験を行った。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

により肺障害を発症した症例は、GWAS解析時は14人、非発症例は19人であったが、本解析では発症例58人、非発症例66人であった。

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発症した発症群58人と無症状の非発症群66人の血液を用いた。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を抽出した。

② 肺障害発症候補遺伝子 *HIVEP3* (Human Immunodeficiency Virus Type I Enhancer Binding Protein 3) と *NME7* (NonMetastatic Cells 7) 遺伝子の相関に関する確認試験

Affymetrix社のGeneChip Human Mapping 500K Array Set (500,568 SNPs)を用いたGWASで強い相関を示した*HIVEP3*と*NME7*両遺伝子内のSNPsと新たに設けたSNPsを用いて薬剤性肺障害発症群と非発症群における相関解析を行った。SNPタイピングはABI TaqMan SNP genotyping assay kitを用い、TaqMan Real Time PCR (7500 Real Time PCR System, ABI) で行った。

統計解析は、 χ^2 test, Fisher's exact test, Hardy Weinberg Equilibrium testを行った。(倫理面への配慮)

全ての血液提供者に対して研究の目的、研究の期間と方法等、研究に関わる事項を十分説明して、インフォームドコンセントを得た上で参加して頂いた。得られた個人情報に連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報は管理者により厳重に管理されている。また、研究にあたっては、信州大学の倫理委員会で承認を受けている。

C. D. E. 研究結果と考察

① *HIVEP3*遺伝子内SNPsを用いた確認試験

*HIVEP3*は300 kb以上で10個のエクソンからなる遺伝子であり、Zinc Fingerプロテインファミリーに属し、DNA結合タンパクである。この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し、転写因子を調節すると言われている。GWAS解析で薬剤性肺障害発症群と非発症群で強い有意差を示した*HIVEP3*遺伝子内のSNPsの中で、5種類のSNPs (SNP1~SNP5) について相関解析を行った。そのうち2種類 (SNP4, SNP5) は新たに設けたSNPsである。相関解析の結果は表1に示すように、GWASで肺障害発症群に強い相関を示した ($p < 0.0019$, R.R.=2.28)。今回症例数が増加しても*HIVEP3*遺伝子内に設けた3種類のSNPsは統計学的に有意な相関を示したことから、肺障害発症に影響を及ぼしていること示唆されるが、GWASでの解析結果と比較し、P値とR.R.値が低くなっていることから、今後の統計学的検討と機能的解析が必要と考えられる。

② *NME7*遺伝子内SNPsを用いた確認試験

*NME7*遺伝子の機能については多くは不明であるが、細胞分裂時に働く重要な分子であると考えられている。また、遺伝子発現の減弱は癌抑制遺伝子の活性に影響すると言われている。

GWASで薬剤性肺障害発症群と非発症群で強い有意差を示した*NME7*遺伝子内のSNPsの中で、4種類のSNPs (SNP1~SNP4) について相関解析を行った (表2)。3種類 (SNP1, SNP2, SNP3) はGWAS解析には用いられていない新たなSNPsである。SNP3 (rs10800418) 以外の3つのSNPはいずれも強い相関を示した (rs3820056: $p < 6.03 \times 10^{-8}$, rs963334: $p < 6.44 \times 10^{-5}$)。特にGWASで肺障害発症群に強い相関を示したSNP4 (rs6688038) は、TaqManを用いた確認試験で更に強い相関 ($p < 7.63 \times 10^{-7}$) を示した。今回の症例数を増やした解析結果が、GWAS解析時より著しく強い相関を示したことから、

表1 HIVEP3遺伝子内SNPとの相関解析

dBSNP ID	SNP No	Chr.	Chr. Position	Detection	Alleles	Risk allele	P	RR
rs4526604		1p34.2	41954731	GWAS	[C/T]	C	0.000219	12.24
rs10493099	1	1p34.2	41959792	GWAS TaqMan	[A/G]	G	0.000219 0.00187	12.24 2.58
rs12088923		1p34.2	41964947	GWAS	[A/T]	A	0.000219	12.24
rs710235	2	1p34.2	41975301	GWAS TaqMan	[A/G]	G	0.000219 0.00187	12.24 2.58
rs710234		1p34.2	41975444	GWAS	[C/T]	T	0.000219	12.24
rs12126740		1p34.2	41996496	GWAS	[A/G]	G	0.000273	12.00
rs4660204		1p34.2	41999389	GWAS	[A/G]	A	0.000219	12.24
rs2165303	3	1p34.2	42000606	GWAS TaqMan	[C/T]	T	0.000219 0.00187	12.24 2.58
rs393950	4	1p34.2	42016136	TaqMan	[G/T]	G	0.889	0.95
rs2786480	5	1p34.2	42043750	TaqMan	[T/G]	T	0.00605	2.11

Risk allele は発症群について危険アリルを示す。

GWASで示した値は障害発症 14 人、非発症 19 人から得た結果である。

表2 NME7遺伝子内SNPとの相関解析

dBSNP ID	SNP No	Chr.	Chr. Position	Detection	Alleles	Risk allele	P	RR
rs7541564		1q24.2	167406175	GWAS	[C/T]	C	0.000187	9.64
rs3820056	1	1q24.2	167415902	TaqMan	[T/G]	T	6.03x10 ⁻⁸	5.51
rs12067018		1q24.2	167416957	GWAS	[C/T]	T	0.000187	9.64
rs9633334	2	1q24.2	167436480	TaqMan	[T/C]	T	6.44x10 ⁻⁵	4.19
rs10800418	3	1q24.2	167450009	TaqMan	[A/C]	A	0.0320	2.62
rs6688038	4	1q24.2	167457196	GWAS TaqMan	[C/T]	T	0.000871 7.63 x10 ⁻⁷	16.59 7.10
rs12145969		1q24.2	167458734	GWAS	[C/T]	T	0.000871	16.59

Risk allele は発症群について危険アリルを示す。

GWASで示した値は障害発症 14 人、非発症 19 人から得た結果である。

このNME7遺伝子と薬剤肺障害発症との因果関係について機能的解析を含めた、より詳細な解析が必要である。

in a Japanese Population: A Case Control Study Using Polymorphic Microsatellite Markers. PLoS One. 2013 Aug 22;8(8):e71993

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 論文発表

1. Kobayashi N, Hanaoka M, Droma Y, Ito M, Katsuyama Y, Kubo K, Ota M. Polymorphisms of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 Gene Are Associated with Resistance to High-Altitude Pulmonary Edema (HAPE)

H. 知的財産権の出願・特許状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし