

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、それ以外の人種のは除外した。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

間質性肺炎は肺胞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

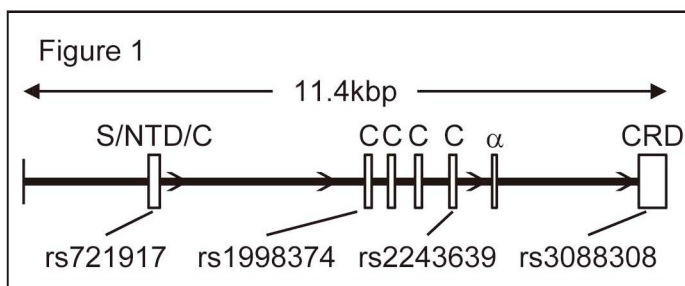


Figure 1 - Functional features of the SFTPD gene

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	p 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

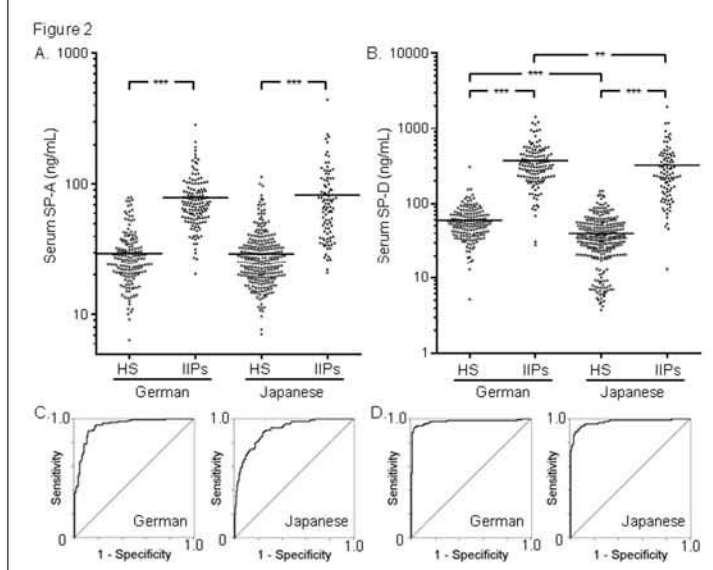


Figure 2 - Comparison of serum SP-A and SP-D levels between the cohorts

(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).

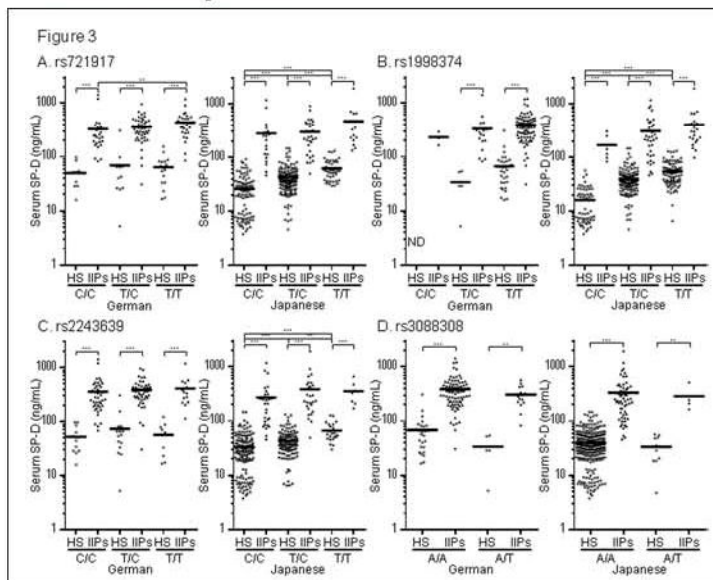


Figure 3 - Relationship between genotype and serum SP-D levels

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					Japanese				
	Total	C/C	T/C	T/T	HWE	Total	C/C	T/C	T/T	HWE
rs721917										
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										
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										
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										
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.

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。

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

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 KI-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 KI-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。

