

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は連結匿名化の上、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と思われるが、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: $p < 6.03 \times 10^{-8}$, rs9633334: $p < 6.44 \times 10^{-5}$)。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

