

ハーディーワインベルク平衡 ≥ 0.001

の条件を満たす1,401,249 SNPsとした。

関連解析は、コ克蘭・アーミテージ(傾向性)検定*により行った。

*ケース(患者)群とコントロール(健常人)群との間でリスクアレルの増加(或いは減少)傾向に差があるかどうかの検定。

多重検定の補正については、ボンフェローニ(BF)の不等式により有意水準を設定した。すなわち、検定全体の有意水準を0.05とし、これを検定数(SNPの数)1,401,249で割った値、 3.568×10^{-8} を各検定の有意水準とした。

(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・解析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。

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	
メトトレキサート 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
ゲムシタビン塩酸塩 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・ギメランル・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
ペムト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
クロビドグレル硫酸塩 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
トリズマブ(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
オキサリプラテン 注射薬	その他の腫瘍用剤	7	19	27	28	23	38	31	21	10	-	204
シクロスポリン 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
ダビガトランエテキシラートメタンサルホン酸塩 内用薬	血液凝固阻止剤	5	17	18	-	-	-	-	-	-	-	40
フルオロウラシル 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
カベシタビン 内用薬	代謝拮抗剤	7	16	9	9	5	5	2	1	5	5	64
パクリタキセル 注射薬	抗腫瘍性植物成分製剤	5	16	17	31	30	29	29	26	46	34	263
シタグリプチンリン酸塩水和物 内用薬	糖尿病薬	5	15	30	10	1	-	-	-	-	-	61
ベグインターフェロン 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

- 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、アダリムマブ、エルロチニブ、オキサリプラチン、オテラシル、カルボプラチン、キメラシル、ペバシズマブ、アミオダロン、ウラシル、タキソチール、ビオグリンター、ベメトレキセル、リバビリン、柴胡加竜骨牡蛎湯、半夏瀉心湯、防風通聖散

(3) 遺伝子多型測定結果の解析

図3に、解析した1番染色体上のSNPに対するP値の $-\log_{10}$ の値をプロットものを示した。図3の高い位置にある（p値の低い）SNPほど間質性肺疾患発症との関連が強いことをあらわしている。BFの補正後も有意となるSNPが21種見出され、このうち免疫関連の遺伝子上に位置するSNPが3種（遺伝子は、インターロイキン22受容体 $\alpha 1$ (IL22RA1)、CD2、CD53)、遺伝子の直近に位置するSNPが2種（同、Complement factor H-related4 (CFHR4)、CD1D)であった。

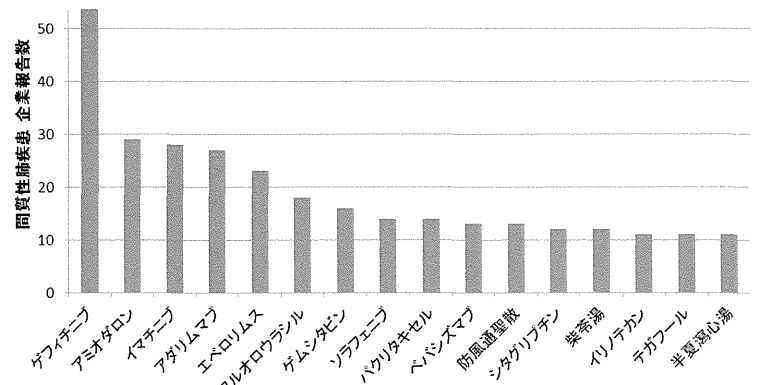


図1 2011/9/27～2013/12/31の企業報告における秘儀役割の集計結果
10件以上の品目を示す。1症例に被疑薬が複数ある場合は、それぞれカウントした。

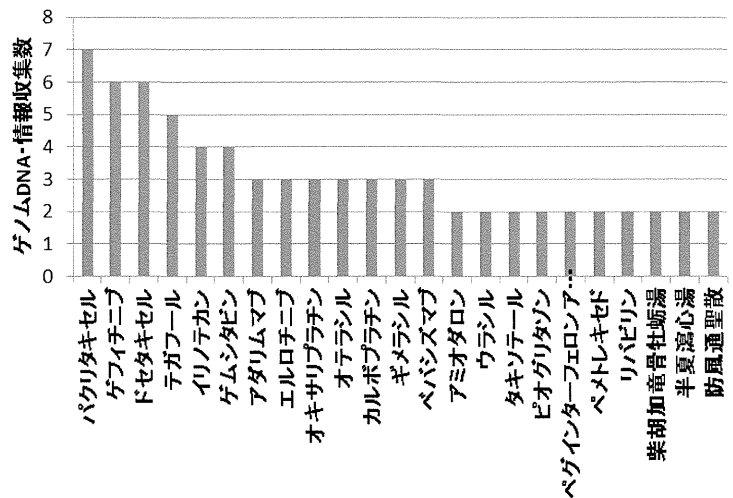


図2 2011/9/27～2013/12/31にゲノムDNAおよび副作用等情報を収集した症例の被疑薬別集計結果。
10件以上の品目を示す。1症例に被疑薬が複数ある場合は、それぞれカウントした。

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。

(3) 遺伝子多型測定結果の解析

多重検定の補正後も有意となった21 SNPsのうち、第1位、2位、10位、13位、17位はそれぞれCFHR4直近、CD2上、CD53上、IL22RA1上、CD1D直近にあり、いずれも免疫関連遺伝子であった。CFHR4は補体成分であるC3bおよびC3dと結合することが報告されており、C3bの不活性化においてH因子のコファクター活性を増強する事が報告されている。CD2は全ての末梢血T細胞表面、多くのNK細胞に発現しており、抗原提示細胞上に発現するLFA-3 (CD58) 抗原を認識する接着分子である。CD53は、細胞表面タンパクであり、T細胞、NK細胞において、CD2が発するシグナルの伝達に関与し、増殖調節に役割を果たすとの報告がある。IL22RA1は、IL22受容体の構成要素であり、呼吸器の上皮細胞に発現している。IL22と結合して炎症惹起と抑制の両作用を有する。CD1DはHLAクラスI様の分子であり、樹状細胞、単球、胸腺細胞で発現し、脂質抗原をT細胞に提示する。これら免疫関連分子と間質性肺疾患発症との因果関係については現時点では不明である。

本解析においては、約140万SNPsを対象に、ケース群18、コントロール群2878に対してゲノムワイド関連解析を行ったが、解析結果の信頼性という点では、ケース群のサンプル数は十分とは言えない可能性がある。このことは、図3のプロットに顕著なピークが認められなかったこと、および、QQ-plotの形状 (data not shown) からも推定された。また、ケース群のサンプル

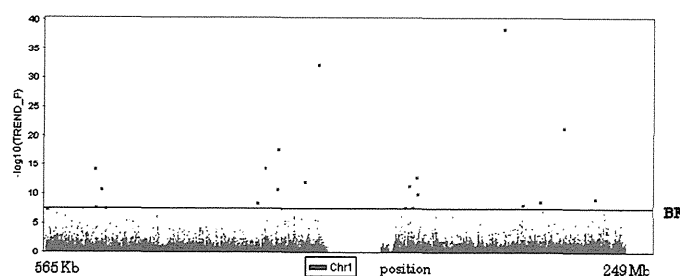


図3 間質性肺疾患の発症と関連する1番染色体上のSNPとP値の分布横軸は1番染色体上のSNPの位置、縦軸はP値の $-\log_{10}$ を示す。BFは多重検定に対するボンフェローニの補正の有意水準を示す。

数が十分でなかったことから、薬剤毎の解析を行う事ができなかった。これらの点を克服すべく、今後、さらに検体を集積し、解析を進めていく必要がある。また、他の染色体についても、今後解析を進める予定である。

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。

(3) 遺伝子多型測定結果の解析

間質性肺疾患患者18例に対して健常人コントロール2,878例のゲノム網羅的多型解析結果（約140万SNPs）を用いて、発症と関連するSNPの解析を行った。一番染色体上でBF補正後も有意な21 SNPsを見出し、このうち5 SNPsは免疫関連遺伝子上或いは近傍に存在した。より信頼性の高い結果を得るためには、さらにケース群の

集積が必要であると考えられた。

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
薬剤性肺障害に関する包括的研究
総合分担研究報告

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】 上皮成長因子受容体阻害剤 (Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitor: EGFR-KTI) による薬剤性肺傷害が欧米人に比べ日本人で高頻度に認められるなど、間質性肺疾患の病態には人種差が存在することが知られている。一方でKrebs von den Lungen-6 (KL-6)、Surfactant protein (SP)-A、SP-Dは本邦で開発され間質性肺疾患の血清バイオマーカーとして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おり、欧米人におけるこれらのバイオマーカーの有用性に関する検討は限られている。また、血清KL-6値がMUC1遺伝子の単塩基多型 (single-nucleotide polymorphisms; SNP) と関連するとの報告があり、遺伝学的背景の異なる人種間ではこれら血清バイオマーカーの値が異なる可能性が示唆されている。

【目的】 本研究の目的は、KL-6、SP-A、SP-Dが欧米人においても間質性肺炎の診断に有用であるか否かを検討し、日本人と欧米人とでこれら血清マーカーの値に違いがあるか否か、さらに両人種間の遺伝学的な違いと血清マーカー値との関連について明らかにすることである。

【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って特発性間質性肺炎 (Idiopathic interstitial pneumonias: IIPs) と診断された249症例、薬剤性肺炎と診断された20例、ならびに健常対象者440例を対象とした。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KL-6はelectrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) 法、血清SP-AおよびSP-D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MUC1および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KL-6、SP-A、SP-D値は健常者に比べ有意に高値であった。血清KL-6値はドイツ人健常者において有意に日本人より高値 ($p < 0.001$) であり、血清SP-D値

はドイツ人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。一方で血清SP-A値には人種間での違いは認めなかった。多変量解析の結果、血清KL-6値はMUC1遺伝子多型rs4072037と有意に相関し、血清SP-D値はSFTPD遺伝子多型rs721917、rs1998374およびrs2243639と有意な相関を認めた。いずれの多変量解析においても、人種の違いと血清KL-6またはSP-D値との関連は有意ではなく、人種間でのこれらのバイオマーカーの値の違いは遺伝子多型頻度の違いに起因するものである可能性が示された。

【結論】ドイツ人と日本人の間で血清KL-6およびSP-D値に人種差を認め、その違いはMUC1および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。

また、血清KL-6値がMUC1遺伝子の単塩基多型 (single nucleotide polymorphisms; SNP) と

関連するとの報告があり、遺伝学的背景の異なる人種間ではこれら血清バイオマーカーの値が異なる可能性が示唆されている。

以上の背景より本研究ではKL-6、SP-A、SP-Dが欧米人においても間質性肺炎の診断に有用であるか否かを検討し、日本人と欧米人とでこれら血清マーカーの値に違いがあるか否かを明らかにしたい。さらに、SNP解析を通じて両人種間の遺伝学的な違いと血清マーカー値との関連についても検討したい。

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249症例 (ドイツ人144例、日本人105例)、薬剤性肺炎と診断された20例 (ドイツ人10例、日本人10例、) を対象とした。同時に健常人 (healthy subject; HS) 440症例 (ドイツ人165例、日本人275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KL-6をelectro-chemiluminescence immunoassay (ECLIA) 法により、血清SP-A、SP-Dをsandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法によりそれぞれ測定した。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KL-6値とSP-D値において日本人と

ドイツ人の間に人種差を認めたことから、これらに影響を与えると思われるSNPを以下のごとく解析対象とし、Fast Real-Time PCR法によりタイピングを行った。

1) 血清KL-6に影響を与えるSNPについては、過去に文献的報告があり市販のタイピングアッセイが入手可能な *MUC1* 遺伝子上の SNP (rs4072037) を解析対象とした。

2) 血清SP-Dに影響を与えるSNPについては、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、過去に文献的報告があり市販のタイピングアッセイが入手可能なrs721917、rs1998374、rs2243639、rs3088308の4 SNPを解析対象とした。

(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日文科省・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) 血清KL-6の人種差と *MUC1* 遺伝子多型との関連

研究対象者のうち、血清KL-6の測定が可能であったIIPs患者267人（ドイツ人：142例、日本人：105例）、薬剤性肺炎患者20例（日本人10例、ドイツ人10例）、ならびに健常者186人（ドイツ人：76例、日本人110例）の患者背景をTable 1に示す。

まずドイツ人における血清KL-6の間質性肺炎診断マーカーとしての有用性を検討した。Figure 1Aに示すように、ドイツ人においても日本人と同様、間質性肺炎症例の血清KL-6値は健常者と比べて有意に高値であった ($p < 0.001$)。また、人種間でのKL-6値の比較を行った結果、健常者においてはドイツ人の血清KL-6値は日本人より有意に高値を示したが ($p < 0.001$)、間質性肺炎患者ではその差は統計学的に有意ではな

Table 1 - The clinical characteristics of study subjects for KL-6 analysis

Patients with ILDs	German	Japanese	p value
Number of subjects	152	115	
Age, years	67.4 ± 0.8	67.5 ± 0.8	0.659
Gender, Male / Female	94 / 58	77 / 38	0.388
Smoking status, Non / Ex / Cu / unknown	68 / 56 / 15 / 13	44 / 55 / 14 / 2	0.282
VC, percent predicted	67.3 ± 1.6	72.0 ± 2.1	0.103
DLco, percent predicted	48.3 ± 1.5	47.5 ± 1.8	0.642
Diagnostic categories of ILDs			
IPF, n	92	61	0.320
NSIP, n	44	34	
COP, n	6	10	
Drug-induced ILD, n	10	10	
Healthy subjects	German	Japanese	p value
Number of subjects	76	110	
Age, years	45.1 ± 1.2	45.8 ± 0.7	0.345
Gender, Male / Female	33 / 43	62 / 48	0.083
Smoking, Non / Ex / Cu / unknown	36 / 9 / 19 / 12	66 / 15 / 29	0.876

Data are shown as mean ± SEM. Statistical significance was tested by Mann-Whitney *U* test or Chi-square test. ILD, interstitial lung disease; Non, non-smoker; Ex, ex-smoker; Cu, current smoker; VC, vital capacity; DL_{CO}, diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; IPF, idiopathic pulmonary fibrosis; NSIP, nonspecific interstitial pneumonia; COP, cryptogenic organizing pneumonia.

かった。

次に間質性肺炎患者と健常者とでROC解析を行ったところ、曲線下面積 (area under the curve; AUC) はドイツ人で0.967 ($p < 0.001$, Figure 1B)、日本人で0.987 ($p < 0.001$, Figure 1C)とともに有意であり、血清KL-6がドイツ人においても間質性肺炎の診断マーカーとして有用であることが示された。また、Table 2に示すように、最良の感度・特異度を示す血清KL-6の診断的カットオフ値は、ドイツ人で659 U/ml、日本人で461 U/mlであった。

*MUC1*遺伝子多型rs4072037の遺伝子型ごとに血清KL-6値を比較したところ、Figure 2Aに示すようにいずれの遺伝子型においても間質性肺炎患者のKL-6値は有意に健常者より高値であり、Figure 2B-Dに示すように間質性肺炎患者と健常者を鑑別する血清KL-6のAUCはA/A : 0.991 ($p < 0.001$)、A/G : 0.990 ($p < 0.001$)、G/G : 1.000 ($p < 0.001$)といずれも人種別ROC曲線のAUCより大きく、診断的カットオフ値はA/A : 397 U/ml、A/G : 461 U/ml、G/G : 503 U/mlであった (Table 2)。

血清KL-6値に与えるrs4072037遺伝子型の影響を線形回帰による多変量解析で検討した結果、Table 3に示すようにrs4072037遺伝子型は、年齢、人種、間質性肺炎の有無といった他因子とは独立して有意に血清KL-6値と相関することが示されたが ($p = 0.009$)、人種の違いと血清KL-6値との相関は有意ではなかった ($p = 0.328$)。

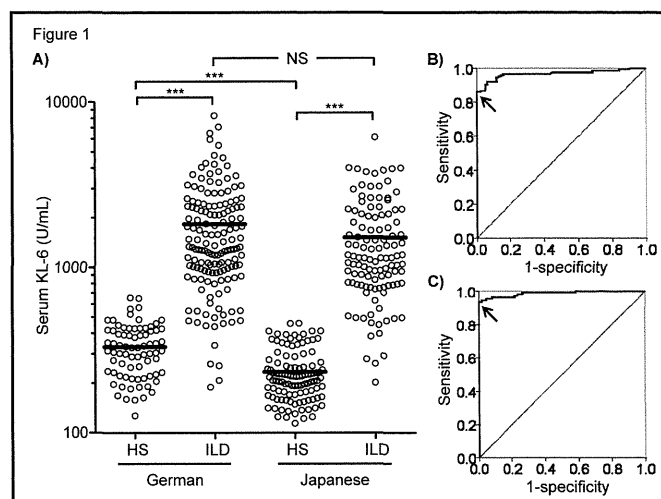


Figure 1 (A) Serum levels of KL-6 according to ethnicity, compared between healthy subjects and patients with interstitial lung diseases (ILDs). Each point represents the serum KL-6 level in the studied subjects (HS, healthy subjects; ILDs, patients with interstitial lung diseases; NS, not significant). The horizontal bars represent the mean values. The significance level was set at $\alpha = 0.0125$ (4 comparisons in 4 groups). *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney *U* test). Receiver operating characteristic (ROC) analyses were performed for patients with ILDs and healthy subjects in (B) German and (C) Japanese cohorts. Arrows at the top left corner show the points with best sensitivities and specificities.

2) 血清SP-Dの人種差と*SFTPD*遺伝子多型との関連

研究対象者のうち、血清SP-AならびにSP-Dの測定が可能であったのは、Table 4に示す通りIIPs患者232人 (ドイツ人138例、日本人94例) および健常者440人 (ドイツ人165例、日本人275例) であった。

まずドイツ人における血清SP-AおよびSP-Dの間質性肺炎診断マーカーとしての有用性を検討した。Figure 3Aおよび3Bに示すように、ドイツ人においても日本人と同様、SP-A、SP-Dのいずれも健常者と比較してIIPs患者において有意に高値であった。また、Figure 3Cおよび

Table 2 - Optimal cutoff values of serum KL-6 according to ethnicity or rs4072037 genotype

	Ethnicity		rs4072037 genotype		
	German	Japanese	A/A	A/G	G/G
Cutoff value, U/ml	659	461	397	461	503
Sensitivity	0.862	0.939	0.958	0.986	1.000
Specificity	1.000	1.000	1.000	0.981	1.000
Accuracy	0.908	0.969	0.977	0.984	1.000

The optimal cutoff values are determined as the serum levels of KL-6 which show the best sensitivity and specificity in ROC analysis.

Accuracy = (true positives + true negatives) / total subjects

3Bに示すように、ドイツ人においても日本人と同様、SP-A、SP-Dのいずれも健常者と比較してIIPs患者において有意に高値であった。また、Figure 3Cおよび3Dに示すように、IIPs患者と健常者とのROC解析では、ドイツ人 (SP-A: AUC = 0.940、SP-D: AUC = 0.977) においても、日本人 (SP-A: AUC = 0.902、SP-D: AUC = 0.973) と同様に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 3B) 一方で、血清SP-A値には人種間の差を認めなかった (Figure 3A)。

*SFTPD*遺伝子多型rs721917、rs1998374、rs2243639、rs3088308の遺伝子型ごとに血清SP-D値を比較したところ、Figure 4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値は健常者よりも有意に高値だった。一方で、Figure 4Aに示すように、IIPs患者、健常者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については遺伝子型とSP-D値の関係は認めなかった。

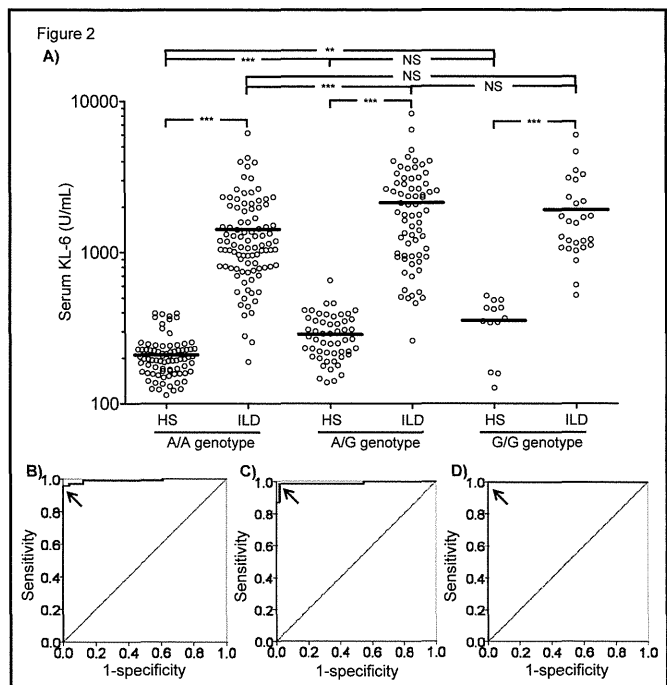


Figure 2 (A) Serum levels of KL-6 according to rs4072037 genotype, compared between healthy subjects and patients with interstitial lung diseases. Each point represents the serum KL-6 level in the studied subjects (HS, healthy subjects; ILDs, patients with interstitial lung diseases; NS, not significant). The horizontal bars represent the mean values. The significance level was set at $\alpha = 0.0056$ (9 comparisons in 6 groups). ** $p < 0.0056$, *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney *U* test).

Receiver operating characteristic (ROC) analyses were performed between patients with ILDs and healthy subjects in (B) A/A cohort, (C) A/G cohort, and (D) G/G cohort of rs4072037. Arrows at the top left corner show the points with best sensitivities and specificities.

血清SP-D値に与える*SFTPD*遺伝子多型の影響を線形回帰分析で検討した結果、Table 5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

Table 3. Linear regression analysis for serum KL-6

	Regression coefficient	standard error	<i>p</i> value
Univariate analysis			
Age, years	35.413	4.090	<0.001
Gender, female vs male	135.546	133.043	0.309
Smoking, Non vs Ex vs Cu	23.001	88.610	0.795
Ethnicity, Japanese vs German	730.926	125.844	<0.001
rs4072037, A/A vs A/G vs G/G	333.670	93.596	<0.001
With or without ILDs, HS vs ILDs	1489.534	104.439	<0.001
Multivariate analysis			
Age, years	4.989	5.263	0.344
Ethnicity, Japanese vs German	117.823	120.173	0.328
rs4072037, A/A vs A/G vs G/G	213.973	81.802	0.009
With or without ILDs, HS vs ILDs	1533.652	159.022	<0.001

Non, non-smoker; Ex, ex-smoker; Cu, current smoker; HS, Healthy subjects; ILDs, interstitial lung diseases.

Table 4 - Characteristics of study subjects for KL-6 analysis

	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.

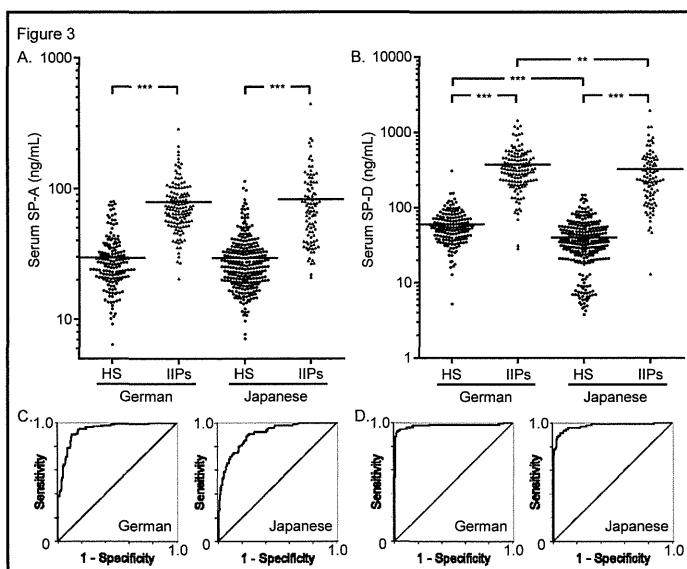


Figure 3
 (A) Serum SP-A and (B) SP-D levels in German and Japanese cohorts. Receiver operating characteristic (ROC) curves of (C) serum SP-A and (D) SP-D in German (left panel) and Japanese (right panel) cohorts. The horizontal bars represent the mean values. The significance level was defined $\alpha = 0.013$ (four comparisons in four groups). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.013$ (Mann-Whitney *U*-test).

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、人種の違いと血清SP-D値との相関は有意ではなかった。

D. 考察

本研究により、KL-6、SP-DおよびSP-Aが日本人と同様ドイツ人でも間質性肺炎の診断に有用な血清マーカーであることが明らかとなった。同時に、健常者の血清KL-6値が日本人に比べてドイツ人で有意に高値であり、ROC解析から求めた血清KL-6のカットオフ値がドイツ人と日本人とで異なることが示された。さらに、*MUC1*遺伝子多型 rs4072037の遺伝子型が他の因子とは独立して血清KL-6値に影響を及ぼすことが明らかになった。また、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者においても、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。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。

本研究の重要な点は、血清KL-6ならびに

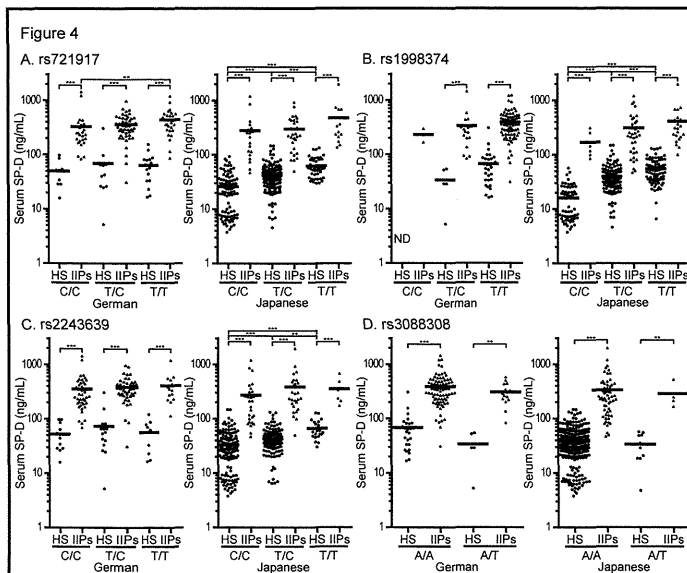


Figure 4
Serum SP-D levels were compared between each genotype: (A) rs721917, (B) rs1998374, (C) rs2243639, and (D) rs3088308. For each genotype, data of the German cohort are shown in the left and those of the Japanese cohort are shown in the right. The horizontal bars represent the mean values. (A), (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).

SP-Dの値が*MUC1*、*SFTPD*の各遺伝子上のSNP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。rs4072037は*MUC1*遺伝子のtandem repeat (TR) 数と連鎖不平衡にあることが知られており、TR数はrs4072037のAアレルで小さく、Gアレルで大きいとされる。TR領域にはKL-6抗体の抗原とされるシアル化糖側鎖が多く存在することから、TR数の大きいMUC1分子は多くのKL-6抗原を有し、血清KL-6値も高値となることが推測される。一方でSP-D分子はN-terminal domain (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おり、その度合いによって血清SP-D値が異なる可能性が示唆されている。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は過去に報告されているが、本研究結果により、collagen domainに位置

Table 5 - Correlations between serum SP-D levels and *SFTPD* gene polymorphisms

	variable	Regression coefficient (95% CI.)	<i>p</i> 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
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
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
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.

するrs1998374およびrs2243639と血清SP-D値の関連も明らかになったことから、この領域もSP-D分子の重合に関与することで血清SP-D値に影響を及ぼす可能性が示唆された。

興味深いことに、多変量解析の結果、血清KL-6、SP-Dのいずれについても、各遺伝子上のSNPと血清マーカーの値が統計学的に独立して関連していることが明らかとなった。一方で人種の違いと血清KL-6、SP-D値との間には独立した関連は見られず、ドイツ人と日本人の間のこれら血清マーカー値の違いは、MUC1および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。

以上の結果から、血清KL-6、SP-DおよびSP-Aの間質性肺炎診断マーカーとしての有用性が欧米人においても示されたが、KL-6とSP-Dについては日本人と欧米人とで値が異なることから、間質性肺炎の診断のためのカットオフ値も欧米人では日本人と異なる値を設定する必要があると考える。本研究は対象者数に限りがあることから、今後欧米人における血清KL-6およびSP-Dの適切な診断カットオフ値設定のために、より大規模な前向き多施設共同研究の実施が望まれる。

E. 結論

血清KL-6、SP-DおよびSP-Aは日本人と同様ドイツ人でも間質性肺炎の診断に有用な血清マーカーであることが明らかとなった。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KL-6およびSP-D値には人種差を認め、その違いはMUC1およびSFTPD遺伝子上のSNPに起因す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) Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N, Kawase S, Tanaka S, Yoshioka K, Yokoyama A, Kohno N, Bonella F, Guzman J, Ohshimo S, Costabel U. Different MUC1 gene polymorphisms in German and Japanese ethnicities affect serum KL-6 levels. *Respir Med* 106:1756-64, 2012
- 2) Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, Kohno N. Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases. *Respir Investig* 50:3-13, 2012
- 3) Osterholzer JJ, Christensen PJ, Lama V, Horowitz JC, Hattori N, Subbotina N, Cunningham A, Lin Y, Murdock BJ, Morey RE, Olszewski MA, Lawrence DA, Simon RH, Sisson TH. PAI-1 promotes the accumulation of exudate macrophages and worsens pulmonary fibrosis following type II alveolar epithelial cell injury. *J Pathol* 228:170-80, 2012
- 4) Tanaka S, Hattori N, Ishikawa N, Horimasu Y, Deguchi N, Takano A, Tomoda Y, Yoshioka K, Fujitaka K, Arihiro K, Okada M, Yokoyama A, Kohno N. Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2 is a prognostic biomarker for lung cancer. *Pathobiology* 79:24-33, 2012
- 5) Tanaka S, Hattori N, Ishikawa N, Shoda H, Takano A, Nishino R, Okada M, Arihiro K, Inai K, Hamada H, Yokoyama A, Kohno N. Krebs von den Lungen-6 (KL-6) is a prognostic biomarker in patients with surgically resected nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 130:377-87, 2012

- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) **Hattori N**, Horimasu Y. Reply to letter to the Editor: rs4072037 Polymorphisms and their role in gastrointestinal carcinogenesis. *Respir Med* 107:159, 2013
- 10) 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) 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 (2012.5.18-23, San Francisco)
- 2) Horimasu Y, **Hattori N**, Ishikawa N, Tanaka S, Yoshioka K, Bonella F, Ohshimo S, Guzman J, Kohno N, Costabel U. Different serum cut-off values of KL-6 for German and Japanese to diagnose idiopathic interstitial pneumonias are related to different Mucin-1 gene polymorphisms. American Thoracic Society International Conference (2012.5.18-23, San Francisco)
- 3) Kohno N, Ishikawa N, Deguchi N, Iwamoto H, Ohshimo S, Fujitaka K, Haruta Y, Murai H, **Hattori N**. KL-6 is a useful serum biomarker for early detection of interstitial lung disease. European Respiratory Society Annual Congress (2012.9.1-5, Vienna)
- 4) Ishikawa N, **Hattori N**, Taniwaki M, Horimasu Y, Matsuda T, Kohno N. Gene expression profiles of idiopathic interstitial pneumonias: Identification of disease-specific diagnostic markers and molecular therapeutic targets. European Respiratory Society Annual Congress (2012.9.1-5, Vienna)
- 5) Horimasu Y, **Hattori N**, Ishikawa N, Tanaka S, Yoshioka K, Bonella F, Ohshimo S, Guzman J, Costabel U, Kohno N. Different cutoff values of serum SP-D for German and Japanese to diagnose idiopathic interstitial pneumonias are related to different SFTPD gene polymorphisms. European Respiratory Society Annual Congress (2012.9.1-5, Vienna)
- 6) Ohshimo S, Bonella F, Horimasu Y, Ishikawa N, **Hattori N**, Hirohashi N, Tanigawa K, Kohno N, Guzman J, Costabel U. KL-6 as a prognostic factor in Caucasian patients with idiopathic pulmonary fibrosis. European Respiratory Society Annual Congress

- (2012.9.1-5, Vienna)
- 7) Ohshimo S, Bonella F, Horimasu Y, Ishikawa N, Hattori N, Hirohashi N, Tanigawa K, Kohno N, Guzman J, Costabel U. KL-6 compared to LDH as a prognostic factor in Caucasian patients with idiopathic pulmonary fibrosis. European Respiratory Society Annual Congress (2012.9.1-5, Vienna)
 - 8) Iwamoto H, Hattori N, Haruta Y, Sugiyama A, Nakamura I, Nakagawa M, Miyamoto S, Onari Y, Ishikawa N, Fujitaka K, Murai H, Kohno N. Characteristics of inspiratory and expiratory reactance in interstitial lung disease. European Respiratory Society Annual Congress (2012.9.1-5, Vienna)
 - 9) Ihara D, Hattori N, Okamoto H*, Kohno N. Intratracheal administration of dry powdered low-molecular-weight chitosan/siRNA complexes suppressed gene expression in the airway and metastatic tumors in murine lung. European Respiratory Society Annual Congress (2012.9.1-5, Vienna)
 - 10) 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)
 - 11) 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)
 - 12) 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)
 - 13) 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)
 - 14) 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)
 - 15) 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)
 - 16) 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)
 - 17) 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)

- 18) 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)

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
薬剤性肺障害に関する包括的研究
総合分担研究報告

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

難治疾患・癌疾患治療に効果が期待されている分子標的薬は、作用点が明確なうえに薬剤効果も優れている一方、薬剤による薬剤性肺障害の報告が増加して見られる。薬剤服用により、喘息、間質性肺炎、好酸球性肺炎、肺水腫、胸膜炎など多様な肺病変を示す薬剤性肺障害は、使用する薬剤により人種間で障害度に差異が生じることが指摘され、また同一民族間においても薬剤感受性・抵抗性が認められていることから、薬剤性肺障害発症に遺伝的素因が関わっていることが示唆される。

この2年間の研究は、近年薬剤副作用（ADRs: adverse drug reactions）発現とHLA（Human Leukocyte Antigen）との相関、HLAが特定の薬剤副作用発現の個人差に影響するとの報告例から、薬剤性肺障害とHLAとの相関を、これまでの蓄積した試料（発症例55、非発症例35）を用いて行った。更に少数例（発症例19、非発症例14）であるが、50万種類のSNPsで選出された候補遺伝子のうち、*HIVEP3*と*NME7*遺伝子について、遺伝子内に設けたSNPsのTaqMan SNP genotyping assayを行った。検査はこれまでに収集された症例（発症例58例、非発症例66例）を用いて行った。

*A,B,C,DRB1,DQB1*のアリルタイピングによるHLAとの相関では、両群に $p < 0.05$ で有意差を示すアリルは検出されなかった。しかし、健常人との比較では、*DRB1*04:05, DQB1*04:01*アリル頻度が、肺障害発症患者群で有意に上昇していた（*DRB1*04:05*; $p=0.022$ OR=2.10, *DQB1*04:01*; $p=0.018$ OR=2.17）。

またSNPsと薬剤性肺障害発症については、*HIVE3*遺伝子内に設けた3種類のSNP（rs10493099, rs710235, rs2165303）が肺障害発症に正の相関を示した（ $p < 0.0019$, R.R.=2.28）。*NME7*遺伝子についても、3種類のSNP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的要因が影響しているかについて検討した。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り肺障害を発症した発症群（HLA:55例、SNPs:58例）と無症状の非発症群（HLA:35例、SNPs:66例）について相関解析を行った。

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と無症状の非発症群のヒトの血液を用いた。DNA抽出は自動DNA抽出器(Quick Gene, FUJIFILM Co.)を用いて行なった。

② HLA-DNAタイピング

HLA-DNAタイピングは、LABType SSO試薬(One Lambda Inc.)にて、HLA-A*, -B*, -DRB1*, -DQB1*をLuminex法で検査した。

SNPタイピング

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 発症群と非発症群との比較

薬剤性肺障害発症群と非発症群におけるHLAアレル頻度および両群における相関解析結果は表1に示したように、アレル頻度、アレル陽性者頻度について、両群間に統計学的有意差($p < 0.05$)を示すアレルは認められなかった。

② 健常人との比較

健常人201人との相関解析では、健常人に比べアレル陽性率で、発症群にHLA-DRB1*04:05 (OR:2.10, $p=0.022$)とDQB1*04:01 (OR:2.17, $p=0.018$), -C*01:02 (OR:1.86, $p=0.049$)が有意差を示した

(表2)。また、非発症群においてはHLA-A*24:02 (OR:2.51, $p=0.012$), -C*01:02 (OR:2.10, $p=0.047$), -C*12:02 (OR:2.59, $p=0.039$), -DRB1*15:02 (OR:0.31, $p=0.029$), -DQB1*06:01 (OR:2.10, $p=0.047$), -DQB1*06:02 (OR:0.22, $p=0.012$)が有意差を示した(表2)。

③ HIVEP3遺伝子内SNPsおよびNME7遺伝子内SNPsを用いた確認試験

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ところ、表3に示したように肺障害発症群に強い相関 ($p < 0.0019$, R.R.=2.28)を示すSNPが3種類確認された。

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)。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SNP4(rs6688038)は、GWASで見られたようにTaqManを用いた確認試験でも、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、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。また、薬剤性肺障害発症患者群ではHLAクラスII遺伝子であるHLA-DRB1*04:05とHLA-DQB1*04:01が健常人に比較して、統計学的有意に増加していたことより、この遺伝子が肺障害発症に関して機能的な役割をしていることが推測される。更に、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投与をしても疾患発症を示さなかった患者群では、HLA-DRB1*15:01とHLA-DQB1*06:02のアレル保有率が有意に減少していた。しかし、肺障害発症群と非発症群間においては、HLAのアレル頻度、アレル保有率に有意な相違は無かった。

これまでの解析結果から、機能的にも興味あ

表 1 薬剤性肺障害発症群と非発症群間における HLA アリル頻度とアリル保有率

HLA-locus	alleles	Allele Frequency		Allele Positivity		HLA-locus	alleles	Allele Frequency		Allele Positivity	
		DILD(+), n (%)	DILD(-) n (%)	DILD(+), n (%)	DILD(-) n (%)			DILD(+), n (%)	DILD(-) n (%)		
A*	01:01	1(0.91)	1(1.43)	1(1.82)	1(2.86)	B*	07:02	6(5.45)	2(2.86)	6(10.91)	2(5.71)
	02:01	14(12.73)	8(11.43)	14(25.45)	8(22.86)		13:01	0(0.00)	1(1.43)	0(0.00)	1(2.86)
	02:06	15(13.64)	9(12.86)	15(27.27)	9(25.71)		15:01	10(9.09)	5(7.14)	10(18.18)	5(14.29)
	02:07	2(1.82)	1(1.43)	2(3.64)	1(2.86)		15:07	1(0.91)	0(0.00)	1(1.82)	0(0.00)
	03:01	0(0.00)	1(1.43)	0(0.00)	1(2.86)		15:11	2(1.82)	1(1.43)	2(3.64)	1(2.86)
	11:01	8(7.27)	6(8.57)	8(14.55)	6(17.14)		15:18	1(0.91)	0(0.00)	1(1.82)	0(0.00)
	24:02	36(32.73)	28(40.00)	30(54.55)	23(65.71)		35:01	4(3.64)	5(7.14)	4(7.27)	5(14.29)
	24:20	1(0.91)	0(0.00)	1(1.82)	0(0.00)		37:01	1(0.91)	1(1.43)	1(1.82)	1(2.86)
	26:01	4(3.64)	1(1.43)	4(7.27)	1(2.86)		39:01	5(4.55)	5(7.14)	5(9.09)	5(14.29)
	26:02	2(1.82)	2(2.86)	2(3.64)	2(5.71)		39:02	3(2.73)	0(0.00)	3(5.45)	0(0.00)
	26:03	1(0.91)	4(5.71)	1(1.82)	4(11.43)		40:01	6(5.45)	2(2.86)	6(10.91)	2(5.71)
	31:01	13(11.82)	4(5.71)	9(16.36)	4(11.43)		40:02	7(6.36)	5(7.14)	7(12.73)	5(14.29)
	33:03	13(11.82)	5(7.14)	13(23.64)	5(14.29)		40:03	1(0.91)	0(0.00)	1(1.82)	0(0.00)
	C*	01:02	25(22.73)	17(24.29)	22(73.33)		15(42.86)	40:06	6(5.45)	3(4.29)	6(10.91)
03:02		1(0.91)	0(0.00)	1(3.33)	0(0.00)	44:02	1(0.91)	1(1.43)	1(1.82)	1(2.86)	
03:03		12(10.91)	10(14.29)	11(36.6)	8(22.86)	44:03	9(8.18)	6(8.57)	9(16.36)	6(17.14)	
03:04		12(10.91)	6(8.57)	11(36.67)	6(17.14)	46:01	3(2.73)	4(5.71)	3(5.45)	4(11.43)	
04:01		3(2.73)	1(1.43)	3(10.00)	1(2.86)	48:01	2(1.82)	2(2.86)	2(3.64)	2(5.71)	
05:01		1(0.91)	1(1.43)	1(3.33)	1(2.86)	48:04	1(0.91)	0(0.00)	1(1.82)	0(0.00)	
06:02		1(0.91)	1(1.43)	1(3.33)	1(2.86)	51:01	10(9.09)	2(2.86)	10(18.18)	1(2.86)	
07:02		18(16.36)	10(14.29)	18(60.00)	10(28.57)	51:02	1(0.91)	1(1.43)	1(1.82)	1(2.86)	
07:04		1(0.91)	0(0.00)	1(3.33)	0(0.00)	52:01	10(9.09)	8(11.43)	10(18.18)	8(22.86)	
08:01		8(7.27)	7(10.00)	8(26.67)	7(20.00)	54:01	7(6.36)	9(12.86)	7(12.73)	9(25.71)	
12:02		9(8.18)	8(11.43)	9(30.00)	8(22.86)	55:02	2(3.64)	2(2.86)	3(5.45)	2(5.71)	
14:02		7(6.36)	1(1.43)	7(23.33)	1(2.86)	56:01	1(0.91)	1(1.43)	1(1.82)	1(2.86)	
14:03		9(8.18)	6(8.57)	9(30.00)	6(17.14)	58:01	1(0.91)	0(0.00)	1(1.82)	0(0.00)	
15:02		3(2.73)	2(2.86)	3(10.00)	2(5.71)	59:01	5(4.55)	3(4.29)	5(9.09)	3(8.57)	
					67:01	2(1.82)	1(1.43)	2(3.64)	1(2.86)		

DILD: drug induced lung disease, DILD(+)=110, DILD(-)=70

HLA-locus	alleles	Allele Frequency		Allele Positivity		HLA-locus	alleles	Allele Frequency		Allele Positivity	
		DILD(+), n (%)	DILD(-) n (%)	DILD(+), n (%)	DILD(-) n (%)			DILD(+), n (%)	DILD(-) n (%)		
DRB1*	01:01	7(6.36)	4(5.71)	7(12.73)	4(11.43)	DQB1*	03:01	15(13.64)	7(10.00)	14(25.45)	6(17.14)
	04:01	1(0.91)	0(0.00)	1(1.82)	0(0.00)		03:02	7(6.36)	5(7.14)	7(12.73)	5(14.29)
	04:03	0(0.00)	2(2.86)	0(0.00)	2(5.71)		03:03	10(9.09)	10(14.29)	10(18.18)	10(28.57)
	04:05	22(20.00)	11(15.71)	20(36.36)	9(25.71)		03:10	0(0.00)	1(1.43)	0(0.00)	1(2.86)
	04:06	6(5.45)	1(1.43)	6(10.91)	1(2.86)		04:01	22(20.00)	10(14.29)	20(36.36)	8(22.86)
	04:10	5(4.55)	0(0.00)	5(9.09)	0(0.00)		04:02	6(5.45)	0(0.00)	6(10.91)	0(0.00)
	08:02	2(1.82)	1(1.43)	2(3.64)	1(2.86)		05:01	7(6.36)	5(7.14)	7(12.73)	5(14.29)
	08:03	7(6.36)	11(15.71)	7(12.73)	10(28.57)		05:02	3(2.73)	5(7.14)	3(5.45)	5(14.29)
	08:04	0(0.00)	1(1.43)	0(0.00)	1(2.86)		05:03	3(2.73)	1(1.43)	3(5.45)	1(2.86)
	09:01	8(7.27)	7(10.00)	8(14.55)	7(20.00)		06:01	17(15.45)	18(25.71)	17(30.91)	15(42.86)
	09:02	0(0.00)	1(1.43)	0(0.00)	1(2.86)		06:02	10(9.09)	3(4.29)	10(18.18)	2(5.71)
	10:01	1(0.91)	1(1.43)	1(1.82)	1(2.86)		06:03	1(0.91)	1(1.43)	1(1.82)	1(2.86)
	11:01	2(1.82)	3(4.29)	2(3.64)	3(8.57)		06:04	8(7.27)	4(5.71)	8(14.55)	4(11.43)
	12:01	5(4.55)	3(4.29)	5(9.09)	3(8.57)		06:09	1(0.91)	0(0.00)	1(1.82)	0(0.00)
	12:02	2(1.82)	2(2.86)	2(3.64)	2(5.71)						
	13:01	1(0.91)	1(1.43)	1(1.82)	1(2.86)						
	13:02	9(8.18)	5(7.14)	9(16.36)	5(14.29)						
	14:03	1(0.91)	0(0.00)	1(1.82)	0(0.00)						
	14:05	0(0.00)	1(1.43)	0(0.00)	1(2.86)						
	14:06	5(4.55)	1(1.43)	5(9.09)	1(2.86)						
	14:54	5(4.55)	5(7.14)	5(9.09)	5(14.29)						
	15:01	10(9.09)	4(5.71)	10(18.18)	3(8.57)						
	15:02	10(9.09)	5(7.14)	10(18.18)	5(14.29)						

表 2 肺障害発症群・非発症群と健常者群との HLA アリル保有率の相関関係

alleles	Allele Positivity			DILD(+) vs Control		DILD(-) vs Control	
	DILD(+), n (%)	DILD(-) n (%)	Control, n (%)	OR	P	OR	P
24:02	30(54.55)	23(65.71)	86(42.79)	1.86	0.049	2.51	0.012
01:02	22(73.33)	15(42.86)	53(26.37)			2.10	0.047
12:02	9(30.00)	8(22.86)	21(10.45)			2.59	0.039
04:05	20(36.36)	9(25.71)	43(21.39)	2.17	0.018	0.31	0.029
15:01	10(18.18)	3(8.57)	51(25.37)			0.22	0.012
04:01	20(36.36)	8(22.86)	42(20.90)				
06:02	10(18.18)	2(5.71)	50(24.88)				

DILD: drug induced lung disease, DILD(+)=110, DILD(-)=70, Control =201

表3 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4 NME 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	6.03×10^{-8}	5.51
rs12067018		1q24.2	167416957	GWAS	[C/T]	T	0.000187	9.64
rs9633334	2	1q24.2	167436480	TaqMan	[T/C]	T	6.44×10^{-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 7.63×10^{-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。

るNME7遺伝子の薬剤性肺障害発症に及ぼす影響を更に検討する必要がある。

of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 Gene Are Associated with Resistance to High-Altitude Pulmonary Edema (HAPE) 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. Hanaoka M, Droma Y, Basnyat B, Ito M, Kobayashi N, Katsuyama Y, Kubo K, Ota M. Genetic variants in EPAS1 contribute to adaptation to high-altitude hypoxia in Sherpas. PLoS One 2012; 7(12) e40566.
2. Kobayashi N, Hanaoka M, Droma Y, Ito M, Katsuyama Y, Kubo K, Ota M. Polymorphisms

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

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業
総合分担研究報告

薬剤性肺障害に関する包括的研究

分担研究者 花岡 正幸
信州大学医学部内科学第一講座 教授
研究協力者 牛木 淳人
信州大学医学部附属病院呼吸器・感染症内科 助教

研究要旨

2年間の研究期間中に解析した薬剤性肺障害71例の臨床的特徴をまとめた。臨床症状は約半数の症例で発熱、咳嗽、呼吸困難を認める症例が多かったが、無症状の症例も15例認めた。原因薬剤として多かった薬剤は抗悪性腫瘍薬（46例）、漢方薬（14例）であった。また分子標的薬に分類される薬剤が原因の症例は17例であった。薬剤の投与期間は3日から1,420日で中央値は50日であった。血清KL-6の平均値は935.6 U/mLと増加していたが、正常範囲の症例も19例に認めた。胸部高分解能CTでは両側性のスリガラス影、浸潤影が多かったが（56例）、片側性の陰影を呈した症例も9例認めた。18例に気管支肺泡洗浄検査が施行されたが、細胞分画にはばらつきがあった。薬剤リンパ球刺激試験は25例に施行され、12例で陽性であった。治療としては69例で被偽薬が中止され、31例でパルス療法を含む副腎皮質ステロイドが使用された。予後は68例が治癒もしくは軽快であったが、2例の死亡例も認めた。

以上から薬剤性肺障害は多様性に富む疾患であり、ときに致死的になりうると考えられる。抗悪性腫瘍薬など薬剤性肺障害をきたしやすい薬剤を投与されている患者では、血清KL-6の値や胸部高分解能CTなどを参考に本疾患を積極的に考慮する必要があると思われた。

A. 研究目的

近年、薬剤による肺障害の報告が増加しているが、診断は必ずしも容易ではない。薬剤性肺障害の診断は、全ての薬剤に肺障害を起こす可能性があることを認識し、疑うことから始まる。薬剤性肺障害の診断として、次のような基準が提唱されている。

- ① 原因となる薬剤の摂取歴がある。
- ② 薬剤に起因する臨床病型の報告がある。
- ③ 他の原因疾患が否定される。

- ④ 薬剤の中止により病態が改善する。
- ⑤ 再投与により増悪する。

すなわち、薬剤性肺障害は除外診断であり、病歴、自覚症状、血液検査、画像所見および気管支肺泡洗浄所見などを総合した臨床診断に頼らざるを得ない。そこで、2年間の研究期間中に収集した薬剤性肺障害71例の臨床像をまとめ、その特徴を分析した。