

進行性肺線維化症例の疫学・治療戦略

須田 隆文¹、稲瀬 直彦²

1 研究分担者 浜松医科大学第二内科

2 東京医科歯科大学呼吸器内科

要旨

特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonias, IIPs) の中で、特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 以外の進行性肺線維化症例 - NSIP (nonspecific interstitial pneumonia) や DIP (desquamative interstitial pneumonia) - の疫学や、臨床、画像、組織所見を明らかにし、その臨床・画像・組織のデータベースを構築するために全国調査 (第一次調査) を行った。日本呼吸器学会認定施設 707 施設に一次アンケート調査表を送付し、159 例 (22.5%) から回答を得た。IIPs 症例の総計は 13,598 例、内訳はそれぞれの施設診断で、IPF 5,750 例、NSIP 2,822 例、RB-ILD 146 例、DIP 98 例、COP 1,836 例、AIP 439 例、LIP 42 例、PPFE 273 例、unclassifiable IIPs 2,192 例であった。外科的肺生検は、IPF 558 例、NSIP 346 例、RB-ILD 18 例、DIP 32 例、COP 63 例、AIP 14 例、LIP 14 例、PPFE 47 例、unclassifiable 239 例に施行されていた。今後は、第二次調査を行い、画像・病理データの収集し、データベース化を進める。

A. 研究目的

特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonias, IIPs) の中で、特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) については、近年、疫学、臨床像、治療、予後などについては多くの知見が積み重ねられてきた、しかし、IPF と同様に進行性の慢性線維化病変を形成するその他の IIPs -NSIP (nonspecific interstitial pneumonia) や DIP (desquamative interstitial pneumonia) - などについてはその疫学や、臨床所見、画像所見、組織所見などを対比して多数例で詳細に検討した報告は少ない。そこで、本研究では、これらの進行性慢性線維化症例の疫学や、臨床、画像、組織

所見を明らかにするために、全国調査を行うとともに、臨床・画像・組織のデータベースを構築することを目的とする。

B. 研究方法

本年度は、第一次調査として、まず、IIPs 症例の全国調査を以下のように行った。

1. 対象施設：

日本呼吸器学会の認定施設 707 施設。

2. 対象症例：

各施設の直近 5 年間の IIPs 症例。

3. 方法：

アンケート票 (表 1) を送付し、第二次調査への協力 (臨床情報や、画像、組織標本の提供) も合わせて確認した。

住所： 〒 431-3129

静岡県浜松市東区半田町 1-20-1

電話： 053-435-2263

FAX： 053-435-2449

E-mail： suda@hama-med.ac.jp

表 1. アンケート票（第一次調査用）

IIPs 診断		患者総数	外科的肺生検実施症例数
Major IIPs			
Chronic fibrosing IP	IPF	(人)	(人)
	NSIP	(人)	(人)
Smoking-related IP	RBILD	(人)	(人)
	DIP	(人)	(人)
Acute/subacute IP	COP	(人)	(人)
	AIP	(人)	(人)
Rare IIPs			
	LIP	(人)	(人)
	PPFE	(人)	(人)
Unclassifiable IIPs		(人)	(人)

interstitial pneumonia, IP: idiopathic pulmonary fibrosis, IPF: nonspecific interstitial pneumonia, NSIP: respiratory bronchiolitis-interstitial lung disease, RBILD: desquamative interstitial pneumonia, DIP: cryptogenic organizing pneumonia, COP: acute interstitial pneumonia, AIP: lymphoid interstitial pneumonia, LIP: pleuroparenchymal fibroelastosis, PPFE: idiopathic interstitial pneumonias, IIPs

表 2. IIPs の各疾患の内訳（第一次調査結果）

		患者総数 (施設診断)	患者総数 (国際分類)	外科的 肺生検例	二次調査対象 (画像・標本提出可)
Major IIPs	IPF	5,750	5,750	558	385 (285)
	NSIP	2,822	346	346	257 (177)
	RB-ILD	146	18	18	16 (10)
	DIP	98	32	32	26 (20)
	COP	1,836	1,836	63	51 (37)
	AIP	439	439	14	9 (9)
Rare IIPs	LIP	42	14	14	10 (9)
	PPFE	273	47	47	39 (33)
Unclassifiable IIPs		2,192	5,116	239	168 (136)
合 計		13,598	13,598	1,331	961 (716)

idiopathic interstitial pneumonias, IIPs: interstitial pneumonia, IP: idiopathic pulmonary fibrosis, IPF: nonspecific interstitial pneumonia, NSIP: respiratory bronchiolitis-interstitial lung disease, RBILD: desquamative interstitial pneumonia, DIP: cryptogenic organizing pneumonia, COP: acute interstitial pneumonia, AIP: lymphoid interstitial pneumonia, LIP: pleuroparenchymal fibroelastosis, PPFE

C. 研究結果

1. 回収率：

159 施設（22.5%）から回答を得た。

2. 症例数：

上記施設から総数 13,598 例の IIPs 症例が集計された。

3. 疾患の内訳（表 2）：

各施設における診断に基づくと、IPF 5,750 例（42.3%）と最も多く、次いで NSIP 2,822 例

（20.8%）、unclassifiable IIPs 2,179 例（16.1%）、COP 1,836 例（13.5%）であった。2013 年の合同声明による国際分類では、NSIP などは基本的に外科的肺生検が必要とされているので、この国際分類に基づいて細分類を行うと、IPF 5,750 例（42.3%）、unclassifiable IIPs 5,116 例（37.6%）、COP 1,836 例（13.5%）となり、unclassifiable IIPs が多くを占めていた。

D. 考察

今回の全国調査（第一次調査）では回収率は22.5%と低かったものの、総数で13,598例のIIPs症例を集積することができた。内訳では、各施設診断ではIIPsが42.3%と最も多く、次いでNSIPが20.8%であった。しかし、これらの各施設診断のNSIPの88%は外科的肺生検が施行されておらず、実臨床では日本呼吸器学会の認定施設であっても外科的肺生検せずにNSIPの診断がされている現状が明らかとなった。

unclassifiable IIPsは、各施設診断で16.1%、国際分類に基づいた診断で37.6%を占めており、実臨床で遭遇するIIPsの約4割をunclassifiable IIPsが占めることが示された。

今後、第二次調査への協力を承諾していただいた施設を対象に、二次アンケートに加え、画像、組織データの収集を行う予定である。

E. 結語

今回の全国調査（第一次調査）では、各施設における診断に基づくと、IPF 5,750例（42.3%）と最も多く、次いでNSIP 2,822例（20.8%）、unclassifiable IIPs 2,179例（16.1%）、COP 1,836例（13.5%）であった。また、国際分類に基づいて細分類を行うと、IPF 5,750例（42.3%）、unclassifiable IIPs 5,116例（37.6%）、COP 1,836例（13.5%）であった。今後は第二次調査を予定している。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Toyoshima M, Suzuki S, Kono M, Nakamura Y, Suda T: Mildly progressive pulmonary lymphangiectasis diagnosed in a young adult, *Am J Respir Crit Care Med* 2014, 189:860-862
2. Katō M, Fujisawa T, Hashimoto D, Kono M, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Hamada E, Mizuzaki O, Kurashita S, Maekawa M, Suda T: Plasma connective tissue growth factor levels as potential biomarkers of airway obstruction in patients with asthma, *Ann Allergy Asthma*

Immunol 2014, 113:295-300

3. Miwa S, Shirai M, Toyoshima M, Shirai T, Yasuda K, Yokomura K, Yamada T, Masuda M, Inui N, Chida K, Suda T, Hayakawa H: Efficacy of clarithromycin and ethambutol for *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. A preliminary study, *Ann Am Thorac Soc* 2014, 11:23-29
4. Enomoto N, Kusagaya H, Oyama Y, Kono M, Kaida Y, Kuroishi S, Hashimoto D, Fujisawa T, Yokomura K, Inui N, Nakamura Y, Suda T: Quantitative analysis of lung elastic fibers in idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis (IPPFE): comparison of clinical, radiological, and pathological findings with those of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), *BMC Pulm Med* 2014, 14:91
5. Akamatsu T, Inui N, Kusagaya H, Nakamura Y, Suda T, Chida K: Evaluation of antibody levels over 3years after 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccination in patients with pulmonary diseases receiving steroids and immunosuppressive agents, *Clin Biochem* 2014,
6. Harada M, Kotake Y, Ohhata T, Kitagawa K, Niida H, Matsuura S, Funai K, Sugimura H, Suda T, Kitagawa M: YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers, *Genes Cells* 2014, 19:504-516
7. Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Hashimoto D, Inui N, Nakamura Y, Suda T: Hermansky-Pudlak syndrome with nonspecific interstitial pneumonia, *Intern Med* 2014, 53:449-453
8. Suzuki S, Toyoshima M, Nihashi F, Tsukui H, Baba S, Sugimura H, Suda T: An autopsy case of malignant pleural mesothelioma associated with nephrotic syndrome, *Intern Med* 2014, 53:243-246
9. Suzuki S, Toyoshima M, Yamashita S, Suda T: Pulmonary arteriovenous fistula occurring within a pulmonary cyst, *Intern Med* 2014, 53:333-334

10. Ito Y, Karayama M, Inui N, Kuroishi S, Nakano H, Nakamura Y, Yokomura K, Toyoshima M, Shirai T, Masuda M, Yamada T, Yasuda K, Hayakawa H, Suda T, Chida K: Aprepitant in patients with advanced non-small-cell lung cancer receiving carboplatin-based chemotherapy, *Lung Cancer* 2014, 84:259-264
11. Fujisawa T, Hozumi H, Kono M, Enomoto N, Hashimoto D, Nakamura Y, Inui N, Yokomura K, Koshimizu N, Toyoshima M, Shirai T, Yasuda K, Hayakawa H, Suda T: Prognostic factors for myositis-associated interstitial lung disease, *PLoS One* 2014, 9:e98824
12. Kono M, Nakamura Y, Enomoto N, Hashimoto D, Fujisawa T, Inui N, Maekawa M, Suda T, Colby TV, Chida K: Usual interstitial pneumonia preceding collagen vascular disease: a retrospective case control study of patients initially diagnosed with idiopathic pulmonary fibrosis, *PLoS One* 2014, 9:e94775
13. Nakashima R, Imura Y, Hosono Y, Seto M, Murakami A, Watanabe K, Handa T, Mishima M, Hirakata M, Takeuchi T, Fujio K, Yamamoto K, Kohsaka H, Takasaki Y, Enomoto N, Suda T, Chida K, Hisata S, Nukiwa T, Mimori T: The multicenter study of a new assay for simultaneous detection of multiple anti-aminoacyl-tRNA synthetases in myositis and interstitial pneumonia, *PLoS One* 2014, 9:e85062
14. Akamatsu T, Shirai T, Kato M, Yasui H, Hashimoto D, Fujisawa T, Tsuchiya T, Inui N, Suda T, Chida K: Switching from salmeterol/fluticasone to formoterol/budesonide combinations improves peripheral airway/alveolar inflammation in asthma, *Pulm Pharmacol Ther* 2014, 27:52-56
15. Matsushima S, Inui N, Yasui H, Kono M, Nakamura Y, Toyoshima M, Shirai T, Suda T: Indacaterol and tiotropium combination therapy in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Pulm Pharmacol Ther* 2014, 30C:11-15

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究報告

II. 難治性気道疾患の治療戦略分科会報告

線毛機能不全症候群の遺伝子診断へ向けて

Study group for intractable diffuse airway diseases

-Establishment of genetic diagnosis for primary ciliary dyskinesia in Japan-

長谷川 好規¹、慶長 直人²、土方 美奈子²、橋本 直純¹
Yoshinori Hasegawa¹, Naoto Keicho², Minako Hijikata², Naozumi Hashimoto¹

1 Department of Respiratory Medicine, Nagoya University Graduate School of Medicine, Japan

2 Department of Pathophysiology and Host Defense, The Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-tuberculosis Association

線毛機能不全症候群（PCD）は、主に常染色体劣性遺伝形式をとる、線毛の構造、機能タンパクの異常に起因する疾患である。本疾患の原因遺伝子として、網羅的に、多くの候補遺伝子や責任遺伝子が同定されるようになった。しかし、わが国では十分な遺伝子診断系が確立されていない上に、分子遺伝学的検査に関係する法と指針を遵守しつつ、診療の一環として行う遺伝学的検査と遺伝カウンセリングの整備が進んでいない。本研究では、日常臨床で簡便に用いられる PCD の診断基準の確立を目的として、PCD 遺伝子診断法の開発と同時に、遺伝子診断を取り入れた診断環境の整備に向けた取り組みを行う。また、結果を臨床に返却するに足る検査精度管理、きわめて多様性に富む本疾患の遺伝子異常をくまなく検索するための効率の良い塩基配列同定システムの活用を検討する。本年度は、そのための予備検討を開始した。

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is characterized by congenital impairment of mucociliary clearance. It is inherited in an autosomal recessive fashion. However, the process is complex, and is still under investigation. PCD is recognized as a heterogeneous disorder, because there are multiple genes from multiple parts of the genome that causes PCD. To date, more than 30 known PCD genes have been reported. In Japan, genetic diagnostic testing for PCD has not been established, that is because of the lack of the clinically useful, and simple methods that detect the PCD genes inclusively. In addition, social environment for genetic diagnosis of PCD, such as acceptance of genetic testing and providing genetic counseling is still on the way. We aimed to develop the genetic testing method for PCD diagnosis, and improve the environment of medical care for genetic testing of PCD. First year of this study, we started to collect information and data, and we started the discussion for the future diagnostic methods for genetic testing of PCD.

研究の背景と目的

線毛機能不全症候群（PCD）は、主に常染色体劣性遺伝形式をとる、線毛の構造、機能タンパクの異常に起因する疾患である。本疾患の原因遺伝子として、古典的な方法により、これまで 10 数個の遺伝子異常が報告されていたが、本疾患の 60% 程度しか診断できなかった。PCD について、わが国で十分な遺伝子診断系を確立するためには、分子遺伝学的検査に関係する法と指針を遵守しつつ、診療の一環として行う遺伝学的検査と遺伝カウンセリングの整備、特に結果を臨床に返却するに足る検査精度管理、きわめて多様性に富む本疾患の遺伝子異常をくまなく検索するための効率の良い塩基配列同定システムの活用が重要である。本年度、そのための予備検討を実施した。

研究方法

国内外の PCD に関する報告書、疫学研究、研究論文、患者団体ホームページから、病態に関する調査、遺伝子変異に関する情報を収集する。専門家への聞き取り調査と、法律と指針についての検索を実施する。

結果

【ヒト遺伝学的検査に関係する法と指針】

一般的には遺伝子検査という言葉がよく使われるが曖昧であるため、遺伝子関連検査という用語を用いて、①ゲノムおよびミトコンドリア内に存在し、原則的に生涯変化せず、その個体が生来保有する遺伝学的情報（生殖細胞系列の遺伝子解析より明らかにされる情報）を明らかにする「ヒト遺伝学的検査」と、②疾患病変部・組織に局限し、病状とともに変化し得る一時的な遺伝子情報を明らかにする「ヒト体細胞遺伝子検査」、③感染症の病原体核酸を検出する「病原体遺伝子検査」の 3 群を総称し、ヒト遺伝学的検査は、①のみを含むものと定義されている。

研究のための遺伝子解析と診療のための遺伝学的検査は、必ずしも厳密に区別できない場合がある。研究目的でのゲノム・遺伝子解析の実施はいわゆる 3 省（文部科学省・厚生労働省・経済産業

省）指針として知られる「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(1) に従うのに対して、解析結果が診療に還元され、医学的に確立されている遺伝学的検査は 3 省指針の適用範囲外である。実際、3 省指針では「診療において実施され、解析結果が提供者及びその血縁者の診療に直接生かされることが医学的に確立されている臨床検査及びそれに準ずるヒトゲノム・遺伝子解析は、医療に関する事項として、今後、慎重に検討されるべき課題であり、本指針の対象としない。」と述べられている。さらに 3 省指針 Q and A（平成 25 年 4 月 22 日）(2) では、その適用範囲について「医学的に確立」とは、医療保険適用となっている、学会においてガイドラインで示されているなど、一般的に臨床検査としての妥当性が認められている場合を示しており、したがって、探究的な位置付けで行われるものはこれに該当しないこと、社会的評価および位置付けを踏まえ、総合的に判断すべきことが述べられている。遺伝学的検査の実施根拠については、分析的妥当性、臨床的妥当性、臨床有用性の 3 つの観点から判断され（表 1）、これらが一定のレベル以上にあることが、研究ではなく、診療のための遺伝学的検査を実施するときの根拠になるものと考えられる。

現在わが国で遺伝学的検査が保険収載されている疾患はデュシェンヌ型筋ジストロフィーなどの 35 疾患に限られており、保険点数 3,880 点で検査会社での受託ないし専門の検査室等で検査を行うことができる。これらの疾患以外の場合、責任遺伝子、責任変異の数によって検査のコストは大きく違う。例えば、遺伝性乳がん、卵巣がん症候群の責任遺伝子である BRCA1/2 の遺伝学的検査が診療において行われる場合、わが国では保険適応が認められておらず、発端者向けに 2 つの遺伝子のすべてのエクソン（non-coding exon を除く合計 48 領域）およびエクソン-イントロンの境界領域の全塩基配列を次世代シーケンサーで解析する場合の検査の自己負担額は現在、25 万円内外とされている。保険適応外の検査の場合、混合診療の問題が生じる場合もあり、診療上の遺伝学的検査の色彩が強くても、実際には 3 省指針を遵守

しつつ、研究目的の遺伝学的検査として研究教育機関の実験室で遺伝子変異同定が行われている遺伝性疾患も数多く存在することが知られている。

3省指針の適用範囲外となる診療のための遺伝学的検査とそれを用いて行われる診断について、日本医学会は平成23(2011)年2月に「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」(3)を発表した。これには基本的事項と原則が書かれており、各学会などの関連するガイドライ

ン・指針の上位に位置するものと考えられる。遺伝医学関連10学会による「遺伝学的検査に関するガイドライン」(4)は、診療行為として位置づけられる遺伝学的検査に関しての統一ガイドラインとして知られている。その他には各診療科の対象とする疾患や診療内容に則した各学会のガイドラインがあり、検査として受託する場合には、業界団体のガイドラインとして社団法人日本衛生検査所協会による「遺伝学的検査受託に関する倫理

表1 遺伝学的検査の実施根拠 参考資料(3)より

分析的妥当性	検査法が確立しており、再現性の高い結果が得られるなど精度管理が適切に行われていることを意味しており、品質管理プログラムの有無、確認検査の方法などの情報に基づいて評価される。
臨床的妥当性	検査結果の意味付けが十分になされていることを意味しており、感度(疾患があるときの陽性率)、特異度(疾患がないときの陰性率)、疾患の罹患率、陽性的中率、陰性的中率、遺伝型と表現型の関係などの情報に基づいて評価される。
臨床的有用性	検査の対象となっている疾患の診断がつけられることにより、今後の見通しについての情報が得られたり、適切な予防法や治療法に結びつけることができるなど臨床上のメリットがあることを意味しており、検査結果が被検者に与える影響や効果的な対応方法の有無などの情報に基づいて評価される。

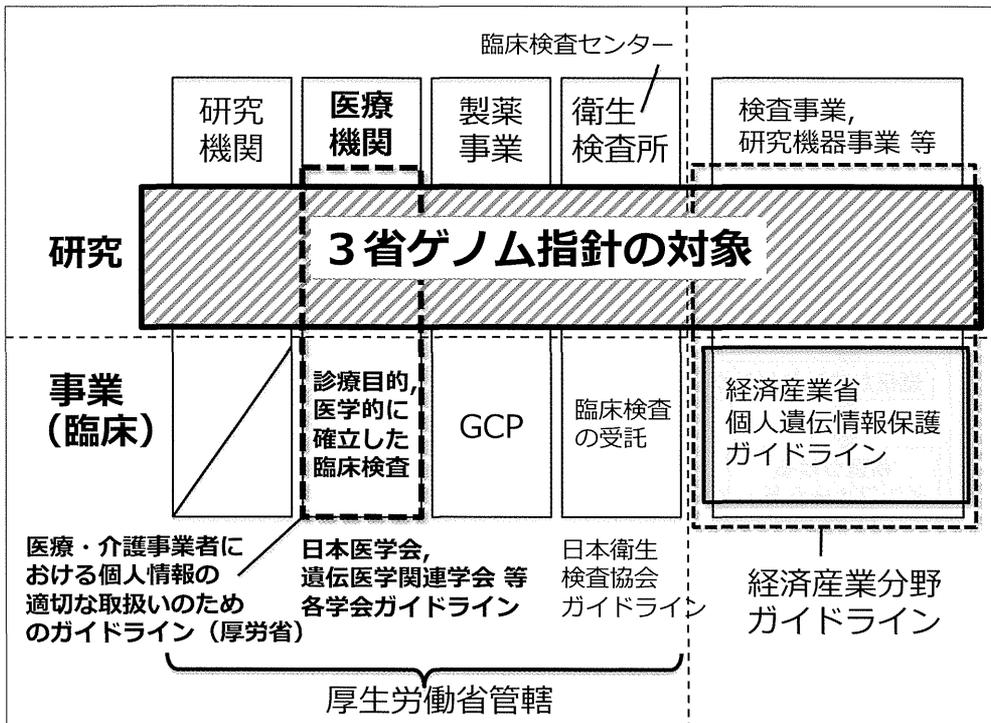


図1 法と指針の整理
 経済産業省「個人遺伝情報の保護に関する取り組みについて(参考資料集)」
http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/mono/bio/Seimeirinnri/sanko-shiryuu-shuu.pdf
 「研究・事業分野における法と指針等の対象の整理」一部改変

指針」(5)がある。さらに、遺伝学的検査を行う際の個人情報保護は、関係する法律をふまえた上で、厚生労働省「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」(平成 16 年 12 月) (6) に、「遺伝情報を診療に活用する場合の取扱い」として個人情報管理のあり方が記載されている。図 1 に法と指針等の対象範囲を示す。

【遺伝学的検査実施の流れ】

上記、各種ガイドラインに沿った形で、発症者を対象とする遺伝学的検査を診療のために行う場合の流れを図 2 にまとめて示す。

(1) 遺伝カウンセリング

日本医学会のガイドライン (3) には、遺伝学的検査・診断に際して、必要に応じて適切な時期に遺伝カウンセリングを実施すると述べられているが、同ガイドラインの Q and A (7) には、確定診断を目的とした遺伝学的検査の際の主治医による事前説明と、検査結果の説明も遺伝カウンセリングの一つであると考えていること、遺伝カウンセリングに関する基礎知識・技能については、すべての医師が習得しておくことが望ましいことが記載されている。また、遺伝学的検査・診断を担

当する医師および医療機関は、必要に応じて、遺伝医療の専門家による遺伝カウンセリングを提供するか、または紹介する体制を整えておく必要があることが書かれている。遺伝医学関連 10 学会によるガイドライン (4) では、「遺伝学的検査は、十分な遺伝カウンセリングを行った後に実施する。」および「遺伝カウンセリングは、十分な遺伝医学的知識・経験を持ち、遺伝子カウンセリングに習熟した臨床遺伝専門医などにより行われるべきである。」とされている。以上から、検査前の遺伝カウンセリングは必要で、臨床遺伝専門医によるカウンセリングが望ましいと判断される。

日本人類遺伝学会と日本遺伝カウンセリング学会が共同で「臨床遺伝専門医」を認定する臨床遺伝専門医制度により、約 1,100 名の臨床遺伝専門医がいる。また、非医師を対象とした認定遺伝カウンセラー制度があり、遺伝カウンセラー養成専門過程を設置した大学院を終了後、認定試験を経て、日本遺伝カウンセリング学会と日本人類遺伝学会が共同認定する認定遺伝カウンセラーとなることができるが、まだ人数は少ない (2014 年 8 月現在約 150 名)。施設内に専門的な遺伝カウンセリング体制が整備されていない場合には、適切な施設と連携し、紹介することが必要になる。「全

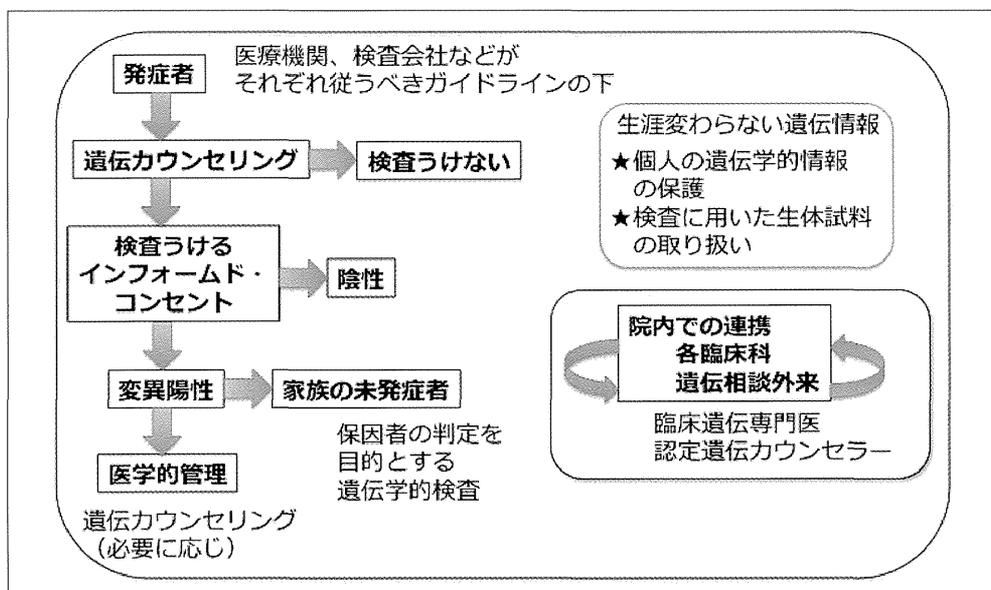


図 2 臨床検査 例：発症者を対象とする遺伝学的検査

国遺伝子医療部門連絡会議」には計 89 の医療施設(75の大学病院と 14の医療機関)が加盟し、ホームページ上に、遺伝子医療実施施設検索システム(<http://www.idenshiiryoubumon.org/search/>)があり、遺伝医療部門がある病院の検索が可能である。しかし、疾患について専門的な知識を有する診療科の医師と、遺伝カウンセリングを行う臨床遺伝専門医との密接な連携は必要であり、どのように総合的な臨床遺伝医療体制を構築するかの検討が必要である。

(2) インフォームド・コンセント

事前に上記のような遺伝カウンセリングを含む説明を行い、被検者がそれらを十分に理解した上で、遺伝学的検査を受けるか受けないか本人が自律的に意思決定し、担当医師は被検者から当該遺伝学的検査に関するインフォームド・コンセントを得なければならない。

(3) 個人遺伝情報の取扱い

遺伝学的検査は、被験者が生来的に保有する生涯変化しない遺伝学的情報を扱うものであり、個人情報、個人遺伝情報の保護、および、検査に用いた生体試料の取扱いには細心の注意を払わなければならない。

(4) 疾患の原因となる遺伝子変異が見出された場合

被検者の医学的管理に結果を反映させる他、必要に応じて遺伝カウンセリングを行い、また血縁者の遺伝学的検査の必要性について新たに判断することになる。発端者向けの検査では、候補となる責任遺伝子全体の解析が必要であっても、血縁者の場合は、発端者で明らかにされた責任変異のみの検討で済む場合もある。

【遺伝学的検査の精度管理】

遺伝学的検査の実施において、基盤技術及び精度保証体制の整備に努めることは重要である。臨床検査施設の精度保証認定機関で、国際的な権威とされる米国臨床病理医協会(College of American Pathologists, CAP)のラボ査察・認定システムには、バリデーション、検体搬送・保管、試薬管理、機器管理、測定方法、精度管理、資料

保管、職員教育、安全管理など、数多くのチェック項目がある。また、遺伝子関連検査に関わる検体の質保証については、「遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル」(特定非営利活動法人 日本臨床検査標準協議会(JCCLS) 遺伝子関連検査標準化専門委員会)(8)、「遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティス・ガイドライン」(日本臨床検査標準協議会 遺伝子関連検査標準化専門委員会)(9)が公表されており、「分子遺伝学的検査における質保証に関する OECD 勧告」(2007年)の原則を尊重、遵守しつつ、実務に関する事項が定められている。日本衛生検査所協会は、上記を含む様々な質保証のための要件を網羅的にまとめ、「遺伝子関連検査の質保証体制についての見解」をホームページ上で公開している(10)。

【PCDの遺伝子検査のための効率の良い塩基配列同定システム】

アメリカのPCD FOUNDATIONのホームページ(<http://www.pcdfoundation.org/>)には、現在2つあるclinical genetic testing(臨床遺伝学的検査)として、Ambry Genetics PCD61TM(11)と、McLendon Clinical Laboratories(12)があることが書かれているが、いずれもDNAI1とDNAH5の2遺伝子の変異検索に限定されたもので、一部の原因遺伝子しか診断できない状況である。次世代シーケンサーにより大量の遺伝子配列が取得できるようになったことを受けて、現在、約30遺伝子が公的遺伝子データベースに登録されている。きわめて多様性に富むPCDの遺伝子変異部位を特定する際に、どのような形で次世代シーケンサーを利用し、より網羅的に展開すべきか、検討すべき時を迎えている。

現在、次世代シーケンサーによるゲノム解析のアプリケーションは、大きく全ゲノム、エクソーム、ターゲットシーケンスに分けられる。約85%の既知の疾患原因変異がエクソン上にあることを考えれば、膨大なデータを扱う全ゲノム解析より、エクソームシーケンスの方が遺伝学的検査に関しては効率的であるかもしれない。ターゲット遺伝子をパネル化したア

アプリケーション、例えば、TruSight One シークエンスパネル（イルミナ社）は、臨床に関与した包括的な 4,800 を超える遺伝子を網羅しており、この内、PCD に関連する遺伝子は 19 遺伝子である。Ambry Genetics の PRIMARY CILIARY DISKINESIA NEXT-GEN SEQUENCING PANEL (INCLUDES CFTR) は PCD 関連約 10 遺伝子を含んでいる。網羅解析による知見の増加に伴い、さらに PCD 責任遺伝子の数は増えるであろうと予測され、ターゲット解析の場合、効率の良いパネルの作成あるいは利用法、どのように標的遺伝子の種類をアップデートしていくかは大きな問題である。

また、シーケンスにより変異が見出されたとき、その意義の判断は必ずしも容易でない。その時点のエビデンス、データベースに基づき、病的変異と確定されるもの、おそらく病的な変異、おそらく良性な変異、遺伝子の機能に全く影響しない遺伝的多型、未確定 (variants or uncertain significance、VUS) の 5 段階に分類することができる。変異の意義を正確に判断するためには、PCD に関連する病的変異のデータベース、および、日本人ゲノムの PCD 遺伝子多型頻度に関わるデータベースの充実が必須である。また、PCD の遺伝学的検査を行っていく時には、同時に得られたデータのデータベース化を行い、常に新たなデータを加えて、更新していくシステムを構築することが重要である。

考察と結論

呼吸器疾患分野における総合的な臨床遺伝医療体制の下で、稀少疾患であり責任遺伝子と変異が多岐にわたる PCD の遺伝学的検査方法を確立するためには、その検査の実施根拠を明確に示した上で、多数の遺伝子変異箇所を同時解析に対応するため次世代シーケンサーを利用することが不可欠と考えられるが、効率の良いシステム構築のために、データベースの現状、利用方法等、さらに検討を加えるべき事項があると考えられる。

【参考資料】

- (1) 文部科学省、厚生労働省、経済産業省．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、平成 17 年 6 月 29 日一部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正、平成 25 年 2 月 8 日全部改正、平成 26 年 11 月 25 日一部改正）
<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10600000-Daijinkanboukouseikagakuka/sisin1.pdf>
- (2) 「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」についての Q&A（平成 25 年 4 月 22 日）
<http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/hokabunya/kenkyujigyuu/i-kenkyu/dl/130507qa.pdf>
- (3) 日本医学会．「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」(平成 23 年 2 月)
<http://jams.med.or.jp/guideline/genetics-diagnosis.pdf>
- (4) 遺伝医学関連 10 学会：日本遺伝カウンセリング学会、日本遺伝子診療学会、日本産科婦人科学会、日本小児遺伝学会、日本人類遺伝学会、日本先天異常学会、日本先天代謝異常学会、日本マススクリーニング学会、日本臨床検査医学会（以上五十音順）、家族性腫瘍研究会．遺伝学的検査に関するガイドライン（平成 15 年 8 月）
<http://jshg.jp/e/resources/data/10academies.pdf>
- (5) 社団法人日本衛生検査所協会．遺伝学的検査受託に関する倫理指針（平成 13 年 4 月 10 日策定、平成 16 年 9 月 16 日改正、平成 19 年 4 月 1 日改正、平成 23 年 10 月 1 日改正）
<http://www.jrcla.or.jp/info/info/dna.pdf>
- (6) 厚生労働省．「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」(平成 16 年 12 月 24 日通達、平成 18 年 4 月 21 日改正)
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/seisaku/kojin/dl/170805-11a.pdf>

- (7) 日本医学会「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」Q&A
http://jams.med.or.jp/guideline/genetics-diagnosis_qa.html
- (8) http://www.jccls.org/techreport/tentative_guideline.pdf
- (9) http://www.jccls.org/techreport/bestpractice_guideline.pdf
- (10) <http://www.jrcla.or.jp/info/info/250726.pdf>
- (11) Ambry Genetics PCD61TM
http://dev4.group22.com/clinical_diagnostic_and_carrier_testing/test_PCD_61.asp
- (12) Mc Lendon Clinical Laboratories at the University of North Carolina, Chapel Hill.
http://labs.unchealthcare.org/labstestinfo/p_tests/pcd_seq.htm

研究発表

特になし

知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究報告

III. 難治性サルコイドーシスの疫学・
治療戦略分科会報告

難治性サルコイドーシスの治療法開発に向けた研究

研究分担者 西村 正治
北海道大学呼吸器内科学分野教授

研究協力者 山口 哲生¹、四十坊 典晴²、今野 哲³、服部 健史⁴

1 JR 東京総合病院 副院長

2 JR 札幌病院 副院長

3 北海道大学呼吸器内科学分野 講師

4 北海道医療センター呼吸器内科

要旨

以下の3項目について検討・研究を行っていく。

I. 難治性サルコイドーシスの全国疫学調査

難治性サルコイドーシスは「慢性に進行し、種々の要因で病状の進行をコントロールできない慢性進行性のサルコイドーシス」と定義される。難治例を明らかにするために過去20年間のサルコイドーシス死亡例の全国調査と剖検輯報による調査を行なう。JR 東京総合病院の同期間の75歳以下の死亡例は13例(男/女;7/6)あり、難治例としての特徴を有していた。第1次調査が終了した後、症例のデータベース管理が十分な施設を選定して難治例に関する第2次調査を行い疾患の病態を解析して治療戦略を検討する。

II. GWAS 解析による難治化要因の検討

近年、ヒトゲノム全体を網羅する数10万カ所のSNPを用いて、疾患関連候補遺伝子を同定するゲノムワイド関連解析(genome-wide association study:GWAS)が行われるようになってきている。われわれは日本人において新規の疾患関連候補遺伝子を同定するために、サルコイドーシス多施設共同GWASプロジェクト(横浜市立大学医学部眼科主導)に参加した。GWASの結果から第6染色体HLAクラスII(HLA-DR 遺伝子)領域は、日本人、Caucasian,African-American16)に共通した第1の候補遺伝子領域であることが確認された。また、Caucasian 集団を加えた replication study (再現性の検討)、そこで特定された候補遺伝子領域の詳細な検討により新規の疾患関連候補遺伝子を同定し、その遺伝子多型と臨床経過(寛解例、難治例)がどのように関わっているのかを解析していく予定である。

III. Pacnes 由来の circulating immune complex を用いた血清診断法の確立

サルコイドーシスの病因として Pacnes が強く示唆されており、この菌の内因性活性化時に病態の悪化がみられることが推測されている。活動性サルコイドーシスで血清中のCICが高値であることが示されているが(江石義信;今回発表)、今後は一般疾患群を対象として全国で追試を行い、本症の早期診断と早期治療に結びつけていく。

A. 研究目的

I. 難治性サルコイドーシスの全国疫学調査

難治例の臨床的特徴を明らかにするためにとくに死亡例について全国調査と日本剖検輯報を用いた調査とを行なう。難治例の実態を明らかにすることによって治療法を検討する。

II. GWAS 解析による難治化要因の検討

患者検体をもちいた GWAS 解析によって疾患感受性遺伝子の同定を行っているところであるが、同時に難治化に関与する遺伝子の同定を行なう。

III. P. acnes 由来の circulating immune complex (CIC) を用いた血清診断法の確立

今回の班会議で「アクネ菌病因論に基づくサルコイドーシス血清診断法の開発 (江石義信)」が報告される。疾患対照群と比較してサルコイドーシス患者群において CIC が高値になることを示し、疾患の早期診断に役立てる。

B. 研究の背景・方法・準備状況

I. 難治性サルコイドーシスの全国疫学調査

サルコイドーシスは原因不明の全身性肉芽腫性疾患であり、自然改善もあり比較的予後は良好のものが多くとされている。しかし一方、慢性に進行し、種々の要因で病状の進行 (遷延化・線維化) をコントロールできない慢性進行性のサルコイドーシスも存在し、これを難治性サルコイドーシスと称している。

(ア) 病理剖検輯報による調査

すでに Iwai らによる 32 年間 (1958 年～1989 年)、320 例の病理剖検輯報のまとめがある (K. Iwai et al. 1993) がその後の調査がなされていない。Iwai らの報告によれば、① 32 年間の経過で剖検例は徐々に増加しており、当初は年間 3.2 人であったが 1989 年には年間 22.2 人であった ② 女性は男性の約 2 倍であり、高齢者女性が多かった。③ 死亡原因として、心臓 (46.9%)、肺 (10.0%)、神経 (3.8%) と心臓による死亡が圧倒的に多く、その他 (38.4%) では悪性腫瘍と心臓血管系疾患が大半を占めた。病理剖検輯報の報告によれば。

表 1 JR 東京総合病院における過去 20 年間のサルコイドーシス死亡症例

症例	性	発病年齢	死亡年齢	経過年	罹患臓器	診断	死亡原因	死亡場所	備考
1	M	28	33	5	C,P	組織	C (不整脈)	院外	自宅死
2	F	31	36	5	P	臨床	P	他院	
3	F	25	39	14	P	臨床	P	他院	
4	F	40	41	1	C,P	組織	C (不整脈)	当院	剖検なし
5	M	28	44	16	P	組織	P (肺高血圧症)	当院	剖検あり
6	M	37	48	11	C,P	組織	C (心不全)	当院	剖検あり
7	M	45	48	3	C,BHL	組織	C (不整脈)	院外	市中死
8	M	30	58	28	P,E	組織	P	当院	剖検なし
9	F	61	61	0	P	組織	がん (胃)	他院	
10	M	22	61	39	P,LN	組織	大動脈瘤破裂, P	当院	剖検あり
11	M	55	63	8	BHL,E	組織	がん (食道)	他院	
12	F	46	68	22	P,BHL,E	組織	がん (胃)	他院	
13	F	69	74	5	C,BHL,LN,	組織	大動脈瘤手術	当院	手術後死亡
14	F	77	88	11	C,P,E	組織	P 肺炎など	他院	
15	F	71	88	17	P,BHL,E,N,D	組織	P 肺炎, 他疾患	当院	剖検なし

C;cardiac, P;pulmonary, LN; lymph node, E; eye, N; nerve, D;derma

2012年のサ症による死亡は23人であり、この23年間で死亡(剖検)数はほぼ不変である。

再度病理剖検輯報でその後の23年間(1990～2012)の調査を行い、サルコイドーシスの死亡症例について検討する。最近では心臓病変に対する検査や侵襲的治療方法が進歩し、またサ症による心臓病変に対する理解が高まってきていることから、以前ほど心臓病変による死亡が多くはないのではないかと推測している。

(イ) 過去20年間のサ症死亡例の全国調査

日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会の会員、本研究班の班員、研究協力者等に向けてアンケート調査を行なう。観察期間が長期にわたり、死亡の頻度などの正確な疫学的検討は難しいと思われるために、報告された各症例の臨床・画像・病理学的特徴などを解析することに主眼を置く。

I. JR 東京総合病院における過去23年間のサルコイドーシス死亡例(表1)

- サルコイドーシス約800例の経過観察例の中から死亡例を抽出した。
- 死亡例は15例(男/女;7/8)であり75歳未満は13例(男/女;7/6)であった。
- 13例中当院での死亡は7例あり、そのうち3例が剖検あり、1例は手術後の死亡であった。
- 60歳未満の死亡8例は、心臓死4例(剖検1例)、肺病変死4例(剖検1例)であった。心臓は低拍出量が主原因とされるものが1例、他の3例は不整脈が原因と思われた。肺病変の1例は臨床的にも肺高血圧症の合併が明らかであり他の死亡例でも肺高血圧症の合併が示唆される例が見られた。肺高血圧症の合併が無いと考えられる肺病変例の主な死因は慢性呼吸不全と肺感染症であった。
- 60歳以降の死亡例5例のうち3例は悪性腫瘍による死亡、2例は大動脈瘤(破裂および手術後)による死亡であった。
- 死亡原因の内容はIwaiらの報告とほぼ近似しているが、心臓死は最近では減少しており、心臓病変の診断・治療の技術の

進歩が反映している可能性がある。

II. GWAS 解析による難治化要因の検討

疾患関連候補遺伝子の同定を目指してゲノムワイド関連解析(GWAS)がドイツおよび米国で実施されており、その結果、最も疾患と関連の強い遺伝子領域は第6染色体(HLAクラスII領域)であり、HLA以外の候補遺伝子領域が複数報告されている。さらに、ゲノム全域を高密度に網羅する遺伝子多型(SNP)を用いて相関解析を行ない、患者群と健常群との間で頻度に差がある遺伝子多型を統計学的に検定する。ゲノム全域を解析することにより、多因子疾患の新たな遺伝要因が網羅的に見出されることが期待されている。

本研究班では、横浜市立大学眼科学教室主導の共同研究で、すでに、日本人集団(患者700例、健常者886例)を対象として、ゲノム全域を網羅するSNP(約56万個)のgenotypingを行い候補SNPのスクリーニングが終わっている。次に、追試による再現性の確認を行なうために、新たな日本人集団(患者931例、健常者1,042例)、およびチェコ人集団(患者271例、健常者264例)を対象として候補SNPのgenotypingを行ない、候補SNPを絞り込む。その後、候補SNP領域の詳細な解析を行って疾患感受性遺伝子を同定する。

同時に、肺病変の予後良好例(BHLのみ、または肺野病変改善後無再発例)と難治例(遷延化・線維化例)との比較による難治化遺伝子の同定を行なう。これによって難治例の早期診断、治療介入、移植などの可能性が高まることが期待される。

III. P. acnes 由来のCICを用いた血清診断法の確立

サ症の発症機序として、深部臓器に潜伏感染するアクネ菌の内因性活性化による細胞内増殖を契機に、本菌に対する宿主側のアレルギー反応が疾病素因となり肉芽腫形成が惹起されるものと想定されている。今回、江石らはアクネ菌のリポテイコ酸に対する2種類の

抗体を利用した sandwich ELISA 法によるヒト血中菌体成分の検出法の開発に成功した。サ症患者 58 例、健常人 35 例の血漿を用いて検出を行った結果、CIC は患者群で有意に高く検出され、ROC 曲線により算出されたカットオフ値を用いた場合、その感度は 74%、特異度は 94% と極めて高く、オッズ比は 49 倍であった。この結果はアクネ菌病因論説を支持し同時に新たな血清診断法として期待される。また本検査法によって患者の病勢判定および抗菌剤対象者の選別や効果判定などにも広く応用できる可能性がある。

現状の結果が欧米の科学論文雑誌に掲載された後に、この検査法を用いた多施設共同研究を企画し遂行する。

C. 健康危険情報

なし

D. 知的財産権の出願・登録状況

なし

E. 研究発表（論文等）

1. Junichi Tanaka, Hiroshi Moriyama, Masaki Terada, Toshinori Takada¹, Eiichi Suzuki³, Ichiei Narita¹, Yoshinori Kawabata⁴, Tetsuo Yamaguchi⁴, Akira Hebisawa⁴, Fumikazu Sakai⁴, Hiroaki Arakawa, An observational study of giant cell interstitial pneumonia and lung fibrosis in hard metal lung disease. *Occupational and environmental medicine*. *BMJ Open* 2014;4:e004407 doi:10.1136 / bmjopen - 2013 - 004407
2. Miyako Morooka, Masao Moroi, Kimiichi Uno, Kimiteru Ito, Jin Wu, Takashi Nakagawa, Kazuo Kubota, Ryogo Minamimoto, Yoko Miyata, Momoko Okasaki, Osamu Okazaki, Yoshihito Yamada, Tetsuo Yamaguchi and Michiaki Hiroe Long fasting is effective in inhibiting physiological myocardial 18F-FDG uptake and for evaluating active lesions of cardiac sarcoidosis *EJNMMI Research* 2014, 4:1 doi:10.1186 / 2191-219X-4-1 (2014.2)
3. Judson MA, Costabel U, Drent M, Wells A, Maier L, Koth L, Shigemitsu H, Culver DA, Gelfand J, Valeyre D, Sweiss N, Crouser E, Morgenthau AS, Lower EE, Azuma A, Ishihara M, Morimoto S, Tetsuo Yamaguchi T, Shijubo N, Grutters JC, Rosenbach M, Li HP, Rottoli P, Inoue Y, Prasse A, Baughman RP, Organ Assessment Instrument Investigators TW. The WASOG Sarcoidosis Organ Assessment Instrument: An update of a previous clinical tool. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2014 Apr 18;31 (1) :19-27.
4. 杉山幸比古（監修）、山口哲生・四十坊典晴（編集）サルコイドーシス診療 Q&A 集 厚生労働科学研究難治性疾患克服事業びまん性肺疾患に関する調査研究班 鈴木印刷、栃木 2014.1
5. 四十坊典晴、山口哲生 特集 びまん性肺疾患の画像－多彩なプロフィール－サルコイドーシス－難治例とその画像所見－日本呼吸器学会誌 /2/521-526, 2014
6. 山口哲生 特集 内科疾患最新の治療明日への指針 サルコイドーシス 内科 113 (6) 1023-1024, 2014
7. 一色琢磨、前村啓太、竹島秀之、横田広佑、平澤康孝、鈴木未佳、河野千代子、山田嘉仁、山口哲生、本間 栄 気胸を合併した間質性肺炎患者におけるステロイド剤の影響の検討 日呼吸誌 3 (2) 207-213, 2014
8. 山口哲生 サルコイドーシス 整形爛漫「整形外科の日常診療 見逃しやすい他科疾患－サルコイドーシス－」2014. 10-11

各個研究

I. 間質性肺炎

病態（基礎）に関する研究

1. BMP-4 (bone morphogenetic protein-4) の炎症と線維化に対する作用
2. リウマチ肺の気管支肺胞洗浄液におけるプロテオミクス解析に関する研究
3. D1CC マウスリウマチモデルの肺病変の病理形態学的に解析と高濃度水素分子 (H₂) 水飲水の病変に対する効果
4. Syndecan-4 は肺の線維化を抑制する
5. 特発性肺線維症 における RAGE (receptor for advanced glycation end-products) の検討
6. 特発性肺線維症 における WNT / β -catenin シグナルの関与
7. 上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition) を標的とした特発性肺線維症治療の試み
8. PINK1-Parkin 系によるミトファジー制御の肺線維化進展 における役割の検討
9. 肺線維症 における fibrocyte の遊走と血小板由来増殖因子 (PDGF) の役割

BMP-4 (bone morphogenetic protein-4) の炎症と線維化に対する作用

武政 聡浩、渡邊 泰治、塩原 太一、知花 和行、石井 芳樹

獨協医科大学 呼吸器・アレルギー内科 びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

【目的】 TGF- β superfamily の一員である bone morphogenetic proteins (BMPs) は、諸臓器の文化と発達に重要であるが、一方で炎症および線維化に関与することが報告されている。さまざまな疾患で生じる炎症の遷延化は線維化に結びつき、その程度は予後悪化の重要な因子である。BMPs の中で BMP-2、BMP-4、BMP-7 は気道の線維化に関与するとされるが、TGF- β 作用との相互関係などを含め、気道の炎症や線維化への関与については十分な検討がされていない。そこで、気道炎症と線維化における肺局所の BMPs の変化と役割を bleomycin (BLM) 誘導肺線維化モデルと short interfering RNA (siRNA) を経気道投与するモデルで検討した。

【方法】 マウスに対し BLM を経気道的に投与し、肺線維化モデルを作成した。BLM 投与後の肺における BMPs の変化を測定し、気道炎症と肺線維化への関与が強いと考えられる BMPs を選択する。気道炎症と線維化に重要と考えられる BMPs の siRNA (small interfering RNA) を 2 回 / 週で経気道投与し炎症と線維化に対する影響を検討した。

【結果】 Bleomycin 誘導肺線維症マウスモデルを用いた BMPs の検討では、炎症や線維化を認める肺において BMP-4、BMP-6 の mRNA が減少していたが、BMP-7 などその他の BMPs の mRNA には有意な変化を認めなかった。Western blotting で蛋白量を測定したところ BMP-4、BMP-6 に有意な減少認めた。BMP-4 の siRNA をマウスに経気道投与すると、投与後 21 日に肺局所の炎症細胞集積と線維化の有意な亢進を認め、IL-1 β 、MIP2、COL1A1 や fibronectin の mRNA 発現増強を認めた。

【結論】 BMP-4 は局所の炎症と線維化に抑制的に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

肺の線維化はさまざまな疾患で発生する炎症の遷延化や高度肺損傷に伴って生じるが、線維化の程度は難治化や予後悪化の重要な因子である。線維化において TGF- β (transforming growth factor- β) は中心的な役割を果たすとされるが、その抑制に関連した治療のみでは適切な治療法に結びついてない。TGF- β superfamily の一員である bone morphogenetic proteins (BMPs) は 14 種類以上存在し (1)、諸臓器の分化や発達以外に炎症および線維化にも関与することが報告されつつある

(2-7)。樹状細胞 (dendritic cells、DC)、気道上皮、T 細胞性免疫反応に作用して免疫応答にも関与し、気道の炎症を通じて線維化に作用する可能性がある (3)。BMPs の中で BMP-2 (3)、BMP-4 (3, 5-7)、BMP-7 (4) は気道の線維化に関与するとされ、TGF- β 作用に拮抗し線維化を抑制するとの報告もある (6)。しかし、これらとは相反する報告もあり (6, 8)、気道の炎症や線維化への関与については十分な検討がされておらず、治療における標的因子となるか結論が出ていない。

B. 研究方法

- 1) C57BL/6 マウスに BLM (3mg/kg) を経気道的に投与し肺線維化モデルを作成した。BLM 誘導肺線維症モデルにおいて肺組織像とその線維化に関する Sircol collagen assay (Biocolor) を用いた肺のコラーゲン定量比較を行う。
- 2) Homogenized lung sample を使用して BMPs のどれが線維化に関与するのか real-time PCR で検討する。
- 3) 関与が示唆される BMPs を絞り、Western blot でタンパク発現に関して検討する (R & D Systems、Cell Signaling Technology)。BMP 拮抗因子に関しては、報告されている gremlin (5) に関して検討する (R & D Systems)。
- 4) 次に関連の強い BMPs の short interfering RNA (siRNA、1mg/kg) を経気道的に投与し (Sigma-Aldrich)、肺局所での発現を抑制することで肺局所における炎症と線維化を、気管支肺胞洗浄液 (BALF) の細胞数と分画、Sircol collagen assay (Biocolor) によるコラーゲン定量比較、炎症と線維化に関わる因子の real-time PCR による検討で解析する。

C. 研究結果

①左肺全体の Sircol collagen assay による肺コラーゲン定量比較 (FUGURE 1)

今回の bleomycin 誘導肺線維症モデルにおいて左肺全体のコラーゲン量を測定すると、BLM 投与後 21 日目にコラーゲン量は最高となり、有意な増加を認めた。

②肺組織中 BMP P-1、2、3、5 の mRNA 発現 (FUGURE 2) と BMP-4、6、7、gremlin の mRNA 発現 (FUGURE 3)

肺組織中 BMPs の mRNA 発現の変化は、BMP-4 と BMP-6 のみが有意に低下した。その他の BMPs は有意な変化を示さず、BMPs 拮抗因子である gremlin も有意な変化を示さなかった。

③肺組織中の BMPs および gremlin のタンパク変化 (FUGURE 4)

肺組織中における BMPs の mRNA 発現変化と同様に、肺組織中 BMP-4 と BMP-6 はタンパク量が低下するが、BMP-7 と gremlin のタンパクは有意な変化を示さなかった。

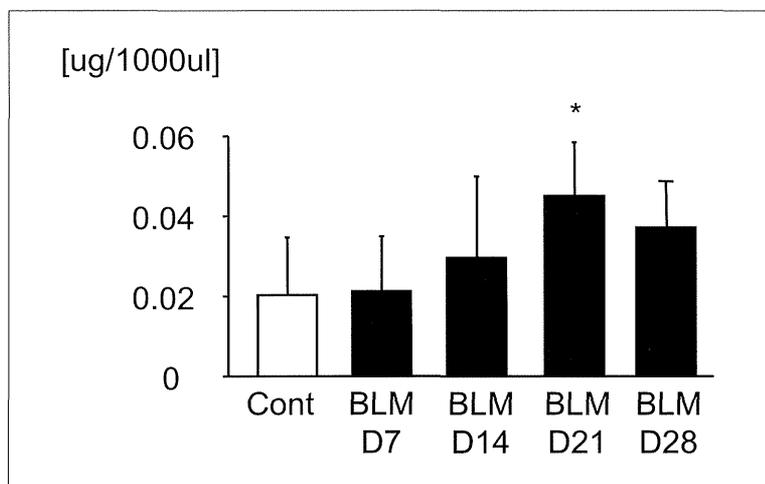


FIGURE 1.
経気管投与後の肺組織 Collagen content

Average \pm SD
**P < 0.05 vs Cont
n=5