

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 分子標的薬投与、抗がん剤投与、胸部外科手術、放射線治療が原因で発症する致死性びまん性肺胞障害の原因探求と肺障害予測法、予防法開発
(英語) The genetic basis of the lethal diffuse interstitial lung disease elicited by the molecular targeting drug, cytotoxic reagents, thoracic surgery, and radiotherapy
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名： (日本語) 学校法人自治医科大学内科学講座呼吸器内科学部門 教授 萩原弘一
(英語) Jichi Medical University Division of Pulmonary Medicine
Department of Medicine Professor Koichi Hagiwara
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 開発課題名： (日本語) 分子標的薬投与、抗がん剤投与、胸部外科手術、放射線治療が原因で発症する致死性びまん性肺胞障害の原因探求と肺障害予測法、予防法開発
(英語) The genetic basis of the lethal diffuse interstitial lung disease elicited by the molecular targeting drug, cytotoxic reagents, thoracic surgery, and radiotherapy
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名： (日本語) 学校法人自治医科大学内科学講座呼吸器内科学部門 教授 萩原弘一
(英語) Koichi Hagiwara, Professor, Division of Pulmonary Medicine,
Department of Medicine, Jichi Medical University,
- 分担研究 開発課題名： (日本語) MUC4 の分子生物学実験と症例収集
(英語) Investigation of the molecular biological characteristics of MUC4.
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名： (日本語) 学校法人日本医科大学 学長 弦間昭彦
(英語) Akihiko Gemma, President, Nippon Medical School.

- 分担研究 (日本語) MUC4 遺伝子多型と EGFR-TKI による ILD 発症との相関性を検証するための
コホート内ケースコントロールスタディの施行と症例収集
- 開発課題名: (英語) A nested case-control study that examines the association of genetic
polymorphism of MUC4 and the EGFR-TKI-induced ILD.
- 研究開発分担者 (日本語) 学校法人 埼玉医科大学 国際医療センター呼吸器内科 教授 小林国彦
所属 役職 氏名: (英語) Kunihiro Kobayashi, Professor, Department of Respiratory Medicine,
International Medical Center, Saitama Medical University
- 分担研究 (日本語) MUC4 遺伝子多型と EGFR-TKI による ILD 発症との相関性を検証するための
コホート内ケースコントロールスタディの施行と症例収集
- 開発課題名: (英語) A nested case-control study that examines the association of genetic
polymorphism of MUC4 and the EGFR-TKI-induced ILD.
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 東北大学 大学院 医学系研究科 緩和医療学分野
井上彰
所属 役職 氏名: (英語) Akira Inoue, Professor, Division of palliative medicine,
Faculty of medicine, Tohoku University
- 分担研究 (日本語) MUC4 遺伝子多型と EGFR-TKI による ILD 発症との相関性を検証するための
コホート内ケースコントロールスタディの施行と症例収集
- 開発課題名: (英語) A nested case-control study that examines the association of genetic
polymorphism of MUC4 and the EGFR-TKI-induced ILD.
- 研究開発分担者 (日本語) 独立行政法人国立病院機構北海道がんセンター
呼吸器内科 内科系診療部長 大泉聡史
所属 役職 氏名: (英語) Satoshi Oizumi, Chief Physician, Department of Respiratory Medicine,
National Hospital Organization Hokkaido Cancer Center

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

近年、日本人肺の脆弱性が指摘されている。(1) 薬剤性肺障害が他国(西洋や他のアジア人)より高頻度で見られ、高率に致死的な経過をたどること、(2) 肺線維症を有する患者で他国より高頻度に急性増悪が起り、高い致死率を示すと推定されることが典型例である。上記 2 つの病態以外にも、何らかのきっかけでびまん性肺胞障害を特徴とする肺障害が起り、患者が重篤な状態に陥る、または死亡する病態が医療のさまざまな分野で見られるが、それらにも日本人に高率に発症していると推定される病態がある。我々は、日本人に高率に見られるこの病態を、「びまん性肺胞障害症候群」と呼んでも良いのではないかと考えている。

薬剤性肺障害や特発性肺線維症急性増悪に関与する遺伝因子として、遺伝的効果の高い遺伝因子を 1

つ想定すると民族差を説明しやすい。この仮説に基づいて責任遺伝子候補として全エクソーム解析で MUC4 遺伝子を同定した。MUC4 遺伝子は EGF モチーフを 3 つ持ち、ERBB2 と ERBB3 のヘテロダイマーと結合する細胞膜内増殖因子として働いていると考えられている。EGFR 阻害薬により阻害される可能性があり、日本人特異的肺障害の原因として妥当な構造を有している。

びまん性肺胞障害を起こした患者の MUC4 をクローニングし、全塩基配列を決定した。MUC4 反復配列内に、3 塩基挿入配列を確認した。

MUC4 にはさらに少なくとも 6 種類の制限酵素長多型が存在する。3 塩基挿入配列の存在とともに、びまん性肺胞障害における MUC4 の役割を明らかにするためには、制限酵素長多型も検討する必要がある。

びまん性肺胞障害における MUC4 の役割に関して包括的な検討を行った。

(1) MUC4 反復配列中の 3 塩基挿入配列認識システムの作成

高度な繰り返し配列内の挿入塩基配列を確認するため、BstEII, SapI を用いて ligation-mediated PCR を行い、結果を次世代シーケンサーで検討する、特殊な反応系である。本反応系を用いて、健常日本人ゲノム 20 名の検討を行っている。

(2) 各民族 DNA のスクリーニング

この研究開発課題は 2 年計画であり、その 1 年目として日本人 DNA のスクリーニングを 200 検体行った。日本人 DNA の Southern 解析が終了した。

前記の 3 塩基挿入配列認識を用いて、3 塩基挿入配列の有無を確認する。これらの日本人特異性を検証する。

(3) 気道上皮細胞を用いた研究

何らかの疾患で肺切除を受けた患者から、切除側の肺に残った気管支の一部を取得し、テロメラーゼ遺伝子 TERT で不死化した。好中球エラスターゼを培養液中に添加すると、不死化上皮細胞の MUC1、MUC4 発現が増加した。

(4) MUC4 発現ベクターを用いて、3 塩基挿入配列のシグナル伝達系に対する影響を検討する。

MUC4 タンパクは、細胞膜中に存在する ERBB2、ERBB3 と neuregulin の存在の元に会合し、細胞内にシグナルを伝達するといわれている。このため、ERBB2、ERBB3 に tag を付加した発現ベクターを作成し、COS7 細胞を用いて両者を同時に発現する細胞を作成した。

MUC4 の制限酵素長多型、3 塩基挿入配列のそれぞれに関して、肺障害患者にみられる多型に合わせて 5 種類の MUC4 発現ベクターを作成した。

ERBB2、ERBB3 共発現 COS7 細胞に、MUC4 の発現ベクターを導入してシグナル伝達を検討する準備を進めている。

英文

Japanese are considered vulnerable to the diffuse alveolar damage. The reasons are: (1) Drug-induced interstitial lung disease is more frequently observed than western countries or Asian countries. The patients often have a serious clinical course. (2) Patients with idiopathic pulmonary fibrosis more frequently exhibit a serious clinical condition called as the “acute exacerbation”, of which fatality rate is 30-80%. Additionally, diffuse pulmonary disease is often seen in patients who have received radiotherapy or those who received thoracic surgery. The incidence rate seems to be high in Japanese. We think we may be able to call the condition as the “diffuse alveolar damage syndrome”, which accumulates in Japanese.

Assuming that the cause of the syndrome is a single gene with a strong genetic effect, we can easily explain the difference in the incidence rate between the races. We performed an exome analysis comparing patients with diffuse alveolar damage and general Japanese, Chinese, and Caucasians, and identified the *MUC4* gene as the only candidate. *MUC4* has 3 epidermal growth factor (EGF) motifs in the protein, and is considered to work as an intra-plasma membrane-growth factor that transmits signals by binding to the ERBB2-ERBB3 heterodimer. This structure explains why the inhibitors of the epidermal growth factor receptor (EGFR) causes diffuse alveolar damage.

We have cloned the *MUC4* gene from the patients who suffered from the diffuse alveolar damage, and identified a 3-bp insertion that may disrupt the stable structure of *MUC4*.

In addition to the insertion, *MUC4* gene has at least 6 different restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). We have to investigate the effects of both the 3-bp insertion and the RFLPs in order to elucidate the role of *MUC4* in the diffuse alveolar damage.

In the current study, we will perform a comprehensive analysis for the role of *MUC4* in the diffuse alveolar damage.

(1) Establishment of a detection system for the 3-bp insertion in the repeat sequence of *MUC4*.

The 3-bp insertion resides in the repeat sequence of *MUC4*. We therefore designed a ligation mediated-PCR that employs restriction enzymes BstEII, Sap, and the next-generation sequencer. We are now determining the reaction condition.

(2) Screening of DNA obtained from a variety of ethnic groups.

We have completed the RFLP analysis for the 200 Japanese patients. We are going to confirm the presence of the 3-bp insertion using the system stated above. The analysis may reveal a deviation of the Hardy-Weinberg equilibrium for either the 3-bp insertion or the RFLP.

(3) Analysis using the primary culture of the airway epithelium

We have obtained the primary cultures of the airway epithelium from the patients with pulmonary surgery. The epithelium from some of the patients has been immortalized by the introduction of telomerase gene, *TERT*. Addition of the neutrophil elastase to the medium induced the expression of MUC1 and MUC4. This suggests that both MUC1 and MUC4 may have protective effect for the airway epithelium against the airway inflammation.

(4) Construction of the expression vectors.

We have constructed the expression vectored for the ERBB2 and ERBB3, introduced into the COS7 cells and established a stable cell line expressing both the ERBB2 and ERBB3. We have also constructed the *MUC4* expression vectors harboring the 3-bp insertion or having different RFLPs. We are preparing for the experiments introducing the *MUC4* expression vectors to the COS7 co-expressing ERBB2 and ERBB3.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 6 件、国際誌 1 件）

1. Inoue Y, Shiihara J, Miyazawa H, Ohta H, Higo M, Nagai Y, Kobayashi K, Saijo Y, Tsuchida M, Nakayama M, Hagiwara K (2017) A highly specific and sensitive massive parallel sequencer-based test for somatic mutations in non-small cell lung cancer. PLOS ONE 12 (4):e0176525. doi:10.1371/journal.pone.017652
2. 太田洋充、萩原弘一：【呼吸器病学 TOPICS 2016-17】 肺循環・肺損傷 ムチンと気道上皮防御機構. 分子呼吸器病 21(1) : 60-63、2017.
3. 萩原弘一：日本人特異的致死性肺障害における MUC4 の役割. 上原記念生命科学財団研究報告集 30 : 1-4、2016.
4. 坂東政司、萩原弘一：【病態バイオマーカーの"いま"】 炎症・線維化 間質性肺炎マーカー. 生体の科学 67(5) : 448-449、2016.
5. 萩原弘一：【オミックスで加速するがんバイオマーカー研究の最新動向 リスク評価、早期診断、治療効果・予後予測を可能にする新しいバイオマーカー】 (第 6 章)治療薬のコンパニオンバイオマーカー 肺がん. 遺伝子医学 MOOK29 : 198-203、2015.
6. 萩原弘一：【肺癌診断・治療の最前線】 コンパニオン診断薬の現状と問題点. 呼吸器内科 29(3) : 191-194、2016.
7. 萩原弘一：【呼吸器疾患における慢性炎症を考える】 薬剤性肺障害、特発性肺線維症急性増悪の遺伝的素因に関する検索. 呼吸と循環 64(2) : 144-148、2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ポスター発表. 井上慶明、杉山亜斗、青木耕平、福田佑樹、儀賀理暁、泉陽太、小林国彦、中山光男、萩原弘一：高速シーケンサーによる包括的遺伝子変異検索(MINtS)を用いた肺癌手術症例の解析. 第 75 回日本癌学会総会, 2016, 国内
2. 井上慶明、杉山亜斗、青木耕平、儀賀理暁、泉陽太郎、小林国彦、萩原弘一、中山光男：肺癌の分子生物学と外科 高速シーケンサーを用いた遺伝子変異検索システム実用化における問題点とその対策. 日本呼吸器外科学会, 2016, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし