

79. 日本人特異的致死性肺障害における MUC4 の役割

萩原 弘一

*埼玉医科大学 医学部 呼吸器内科学講座

Key words : 肺障害, びまん性肺胞障害, MUC4

緒言

日本人は他民族より、分子標的薬投与、殺細胞性抗癌剤投与、胸部手術、肺への放射線照射後に、びまん性肺胞障害を特徴とする致死的な間質性肺疾患・間質性肺炎 (Interstitial Lung Disease: ILD) を起こしやすい¹⁾。

分子標的薬である上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) ゲフィチニブ (イレッサ) による薬剤性肺障害・間質性肺炎²⁾ は代表例で、社会的な耳目を集める訴訟となった。世界的な発症調査が行われたが、他国での発症はほとんどなく、現在、ゲフィチニブによる薬剤性肺障害・間質性肺炎は日本に限定して見られる病態と考えられている。その後、未分化リンパ腫キナーゼ (anaplastic lymphoma kinase: ALK) 阻害薬クリゾチニブ、第三世代 EGFR-TKI AZ9291、免疫チェックポイント阻害薬 PD-1 でも日本人に高率な肺障害・間質性肺炎がみられることが示されている。日本では、殺細胞性抗癌剤投与時にもびまん性肺胞障害が高率に起こり、特に肺線維化のある患者はリスクが高い (平成 23 年度厚生労働省びまん性肺疾患に関する研究班報告書)。イリノテカン、ゲムシタピンの肺障害・間質性肺炎はその典型例である。胸部手術、特に肺線維化のある患者では、術後約 10 % の患者で肺障害・間質性肺炎が起こり、半数が死亡する³⁾。術後肺障害・間質性肺炎の外国での頻度は低く、日本人で問題となる。肺への放射線照射でも日本人にはびまん性肺胞障害が起こりやすく劇症化しやすいとされている。

上記より、肺線維化のある患者への癌治療はハイリスクとされ、多くの患者が積極的治療を受けることなく緩和医療へと移行する。さらに肺線維化がなくても、癌治療によるびまん性肺胞障害・間質性肺炎で亡くなる患者が多数存在する。これらは癌治療上の大きな問題である。

方法

びまん性肺胞障害が日本人に高率に見られることは、日本人に肺脆弱性をもたらす遺伝的素因が存在することを強く示唆する。この仮定に基づき、平成 22~24 年厚生労働科学研究費 難治性疾患等克服研究事業 (H22-難治-一般-005) 「特発性肺線維症急性増悪及び薬剤性肺障害に関与する日本人特異的遺伝素因に関する研究」(研究代表者 萩原弘一) を施行。日本人でさまざまな原因による肺障害を起こした患者を対象に末梢血を収集した。合計 524 症例のサンプルが収集できた。

収集した検体のうち、EGFR-TKI による薬剤性肺障害・間質性肺炎患者を対象にエクソーム解析を施行、アミノ酸変化を起こす多型 (non-synonymous variant) を合計 180,215 か所同定、その全てに関して一般日本人を対照として関連解析を施行した。その結果、薬剤性肺障害・間質性肺炎患者に集積し、さらに発症頻度の民族差を説明できる唯一の遺伝子として *MUC4* (*Mucin4*) を同定した。(図 1)

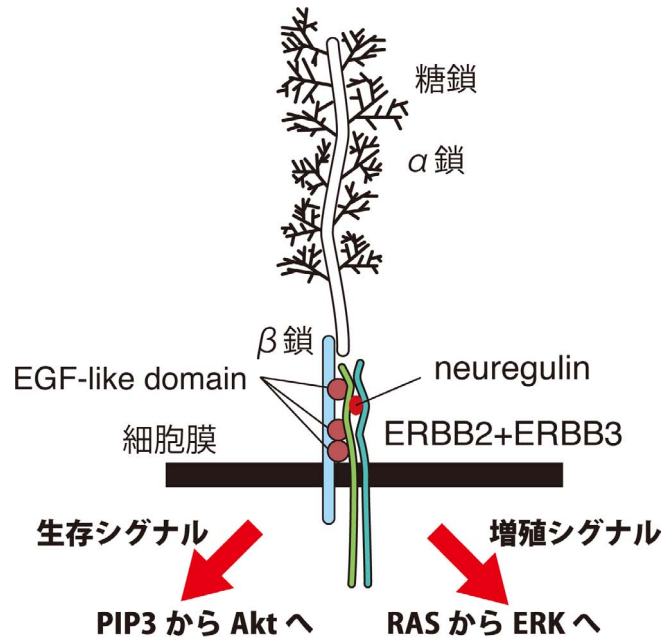


図1. MUC4 の構造

ERBB2+ERBB3 のヘテロダイマーと会合して細胞内にシグナルを伝達する。
MUC4 は細胞膜内に存在する増殖因子として働く。

同遺伝子は気道上皮に発現し、粘膜を潤滑する作用を有し、自然免疫として微生物除去作用を有する上に、EGFR シグナル伝達系に属するシグナル伝達分子としても働く。EGFR-TKI による肺障害患者 DNA より MUC4 遺伝子をクローニングし、詳細な構造解析を行った。

結果

MUC4 遺伝子には、48 塩基対 (16 アミノ酸) からなる反復配列が 354 回連続する領域があり、その領域は高度に糖鎖修飾されている。肺障害患者の 90 % 以上 (正確な頻度は調査中) において、この領域に 3 塩基対 (1 アミノ酸) の挿入配列が見られた。挿入配列の一般日本人頻度は 30 % であり、挿入配列は EGFR-TKI 肺障害と高度に関連していた。*MUC4* 遺伝子の挿入配列が各被験者にホモで存在するかヘテロで存在するかは、遺伝子が巨大で、挿入配列が反復配列内に存在するため、まだ確定できていない。この 3 塩基対以外に、構造異常を引き起こす可能性の高い配列変化は認められなかった。

現在のデータは、日本人特異的肺障害・間質性肺炎の原因が *MUC4* 遺伝子反復配列内の 3 塩基 (1 アミノ酸) 挿入配列であることを強く示唆している。挿入配列の有無を検索することで、びまん性肺胞障害高リスク患者をあらかじめ同定できると推定される。遺伝子構造、EGFR-TKI が原因になることから考えると、挿入配列により MUC4 のシグナル伝達機能が障害された結果、びまん性肺胞障害が起こると推定される。障害されている機能の補完により、高リスク患者でも安全に分子標的薬投与、殺細胞性抗癌剤投与、胸部手術、肺への放射線照射が行える可能性がある。MUC4 は巨大分子であり、長大な反復配列を有するため、mRNA の RT-PCR で cDNA を採取することは不可能である。また、反復配列の人工合成も不可能と考えられる。そのため、発現ベクターの作製は以下に行った。

MUC4 expression vector

Coding region 24871 bp + vector 7460 bp

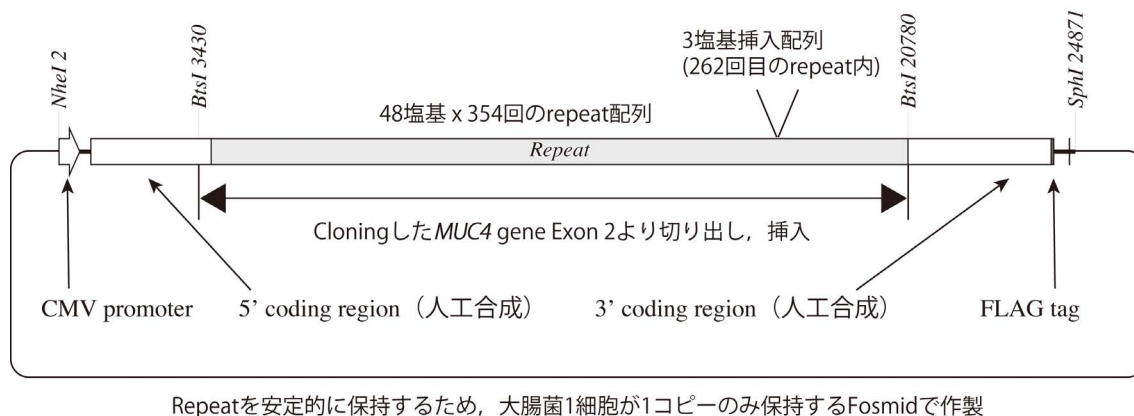


図2. MUC4 発現ベクター

発現ベクターの作製方法を示す。

- (a) 反復配列は、PCR を使用しない古典的クローニング技術でクローニングした *MUC4* exon 2 から切り出して使用。
- (b) 反復配列の 5'側の codinging sequence、3'側の codinging sequence は人工合成。
- (c) (a)、(b) の 3つの fragment を fosmid vector 内に配列。大腸菌内のコピー数が 1 コピーの fosmid vector では、反復配列は安定して保持できた。

この手法により、3塩基挿入のある発現ベクター、無い発現ベクターを、FLAG-tag を付加して作製した。co-transfection する ERBB2、ERBB3 発現ベクターを作製し、それぞれ HA-tag、V5-tag をつけた。

MUC4、ERBB2、ERBB3 を培養細胞に co-transfection させ、生存シグナル分子 (AKT など)、増殖シグナル分子 (ERK など) の変化を観察する。3塩基挿入配列のある *MUC4* 発現ベクター、無い *MUC4* 発現ベクターでのシグナル伝達系変化を観察する。また、3塩基挿入配列によるシグナル異常の補完を観察できるアッセイ系としても使用する予定である。

考 察

原因遺伝子同定を目的として施行したエクソーム解析により、民族差を説明でき、肺で発現し、疾患原因を説明できる機能・構造を有し、さらに患者で異常配列を有する遺伝子として *MUC4* 遺伝子を同定した。*MUC4* はコード領域が 24 kb と長大で、コード領域内に 48 塩基×354 回の繰り返し配列を持つため、通常の遺伝子工学操作が困難である。*MUC4* をクローニング、全塩基配列を決定し、患者 *MUC4* 配列に 3塩基の異常挿入配列を見出した。薬剤性肺障害患者の 90%がこの 3塩基挿入を有し、一般日本人の保有率が 30%であり、西洋人の保有率が 10%程度であることより、3塩基挿入が日本人薬剤性肺障害と高度に関連していることは明らかである。

今後、今回の研究で作製した発現ベクターを用い、*MUC4* の機能解析を進め、日本人肺障害における *MUC4* の役割を解明していく予定である。

文 献

- 1) Azusa A and Kudoh S. High Prevalence of Drug-Induced Pneumonia in Japan. *JMAJ*. 2007; 50(5):001-007.
- 2) Inoue A, Saijo Y, Maemondo M, Gomi K, Tokue Y, Kimura Y, Ebina M, Kikuchi T, Moriya T, Nukiwa T. Severe acute interstitial pneumonia and gefitinib. *Lancet*. 2003 Jan 11;361(9352):137-9. PMID: 12531582. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12190-3.
- 3) Sato T, Teramukai S, Kondo H, Watanabe A, Ebina M, Kishi K, Fujii Y, Mitsudomi T, Yoshimura M, Maniwa T, Suzuki K, Kataoka K, Sugiyama Y, Kondo T, Date H; Japanese Association for Chest Surgery. Impact and predictors of acute exacerbation of interstitial lung diseases after pulmonary resection for lung

cancer. J Thorac Cardiovasc Surg. 2014 May;147(5):1604-1611.e3. doi: 10.1016/j.jtcvs.2013.09.050. Epub 2013 Nov 20. PMID: 24267779.