

## 鼻粘膜 CFTR 転写体の発現低下を確認した気管支拡張症の 1 成人例

研究報告者 石黒 洋 名古屋大学総合保健体育科学センター 教授

### 共同研究者

中莖みゆき, 近藤志保 (名古屋大学大学院健康栄養医学)

高戸葉月 (金沢大学付属病院呼吸器内科), 山本明子 (名古屋大学総合保健体育科学センター)

藤木理代, 北川元二 (名古屋学芸大学管理栄養学部管理栄養学科)

洪 繁 (慶應義塾大学医学部システム医学)

成瀬 達, 近藤 啓 (みよし市民病院)

### 【研究要旨】

患者は気管支拡張症を呈する38歳女性。血液より抽出した DNA を用いて, *CFTR* 遺伝子の27エクソン部, プロモーター部の上下流の直接シーケンス法および MLPA 法による遺伝子解析を行ったが, CF 原因変異は検出されなかった。鼻粘膜スワブを用いて *CFTR* 転写体解析を行ったところ, 全長の保存されている *CFTR* 転写体量が健常人の約10%に減少していることが示された。この患者の汗中  $\text{Cl}^-$  濃度は境界領域(53.6 mM)であった。

### A. 研究目的

嚢胞性線維症(Cystic fibrosis: CF)は, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)の遺伝子変異を原因とする常染色体劣性遺伝性疾患である。現時点で1,900以上の *CFTR* 遺伝子変異・多型が報告されている<sup>1)</sup>。両方のアレルに重度の変異があり *CFTR* 機能が95%以上失われると, 繰り返す呼吸器感染, 膵外分泌機能不全, 胎便性イレウスなどを伴う典型的(古典的)CFを発症する。一方, 変異の組み合わせにより *CFTR* 機能がある程度残存すると, 副鼻腔炎, びまん性汎細気管支炎, 慢性膵炎, 先天性両側輸精管欠損症など単一臓器のみが障害される非古典的 CF あるいは *CFTR* 遺伝子関連疾患を発症する<sup>2)</sup>。

今年度は, 気管支拡張症を呈する38歳女性の *CFTR* 遺伝子及び *CFTR* 機能を解析した。

### B. 研究方法

#### 1. 症例の概要

19歳頃に気管支拡張症を指摘され, びまん性汎細気管支炎と診断された。マクロライド療法が奏功せず, 緑膿菌感染を繰り返し, 徐々に呼吸機能が悪化, 現在は, 在宅人工呼吸器を導

入し, 外出時は酸素吸入を行っている。明らかな消化器症状は見られない。

#### 2. シーケンス解析

末梢血より DNA を抽出し, *CFTR* 全27エクソンとその上下流数百 bp 及びプロモーター部(5'上流約1,000 bp まで)の塩基配列を直接シーケンスした。

#### 3. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)解析

MLPA は, 目的遺伝子上での数エクソンに渉るような欠損や重複などの genomic rearrangement を定量的に検出する解析方法である。ゲノム DNA を, SALSA P091-C1 *CFTR* MLPA キット(MRC Holland)を用いて解析した(詳細は, 2012年度の報告書参照<sup>3)</sup>。

#### 4. *CFTR* mRNA の解析

鼻粘膜拭い液より mRNA を抽出し, *CFTR* の複数のエクソンをまたぐように RT-PCR を行った。

#### 5. 汗中 $\text{Cl}^-$ 濃度測定

Wescor 社製 Macroduct 汗収集システム<sup>4)</sup>を使用したピロカルピン導入法にて実施した。 $\text{Cl}^-$  濃度測定には Sweat-Chek<sup>TM</sup> 汗電導度アナライザー<sup>4)</sup>及び高感度  $\text{Cl}^-$  電極<sup>5)</sup>を使用した。

(倫理面への配慮)

「腭嚢胞線維症および関連疾患における CFTR 遺伝子解析」として、名古屋大学医学部生命倫理審査委員会にて承認済(650, 平成20年9月11日承認)である。

### C. 研究結果

#### 1. ゲノム遺伝子のシーケンス解析

明らかな CF 原因変異は検出されなかった。多型のタイプは, TG12-T7/TG12-T7 (intron 8 の TG repeat-poly T), V/V470(exon 10), I/V556(exon 11)であった。

#### 2. MLPA 解析

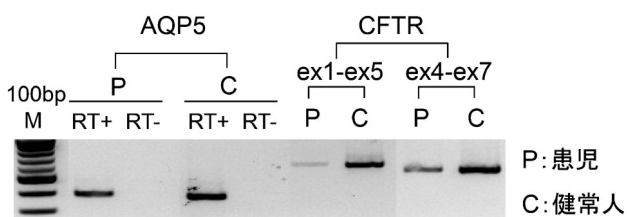
genomic rearrangement は認められなかった。

#### 3. CFTR 転写体の解析

図1に CFTR 転写体の RT-PCR 結果を示す。アガロース電気泳動後の PCR 産物のバンドの濃さをデンシトメーターで読み取り定量化した。患者と健常人サンプルの RNA 回収量の差を, AQP5 の発現量を指標として補正した。exon 4-7 の PCR では, 患者の CFTR 転写体量が健常人の約50%に減少していた。exon 1-5 の PCR では, 患者の CFTR 転写体量が健常人の約10%に減少していた。解析を3回繰り返したが, いずれも同様の結果が得られた。

#### 4. 汗中 Cl<sup>-</sup> 濃度測定

汗の採取量は 35  $\mu$ L であった。Sweat-Chek<sup>TM</sup> 汗電導度アナライザーで測定, 換算した Cl<sup>-</sup> 濃度は 47 mM, 高感度 Cl<sup>-</sup> 電極で測定した Cl<sup>-</sup> 濃度は 53.6 mM であり, 境界域であった。



	patient	control	patient/control
AQP5	1.00	1.00	1.00
CFTR ex1-ex5	0.08	0.69	0.12
CFTR ex4-ex7	0.56	1.10	0.51

図1 鼻粘膜スワブから抽出した転写体の RT-PCR

### D. 考察

CFTR 遺伝子解析として, 直接シーケンスと MLPA を行ったが, 患者に CF 原因変異は検出されなかった。患者は I556V 多型(ヘテロ)を有しているが, 当研究室のデータでは I556V 多型は健常人162人中11人に見られ, CF あるいは CFTR 関連疾患との関連は無いと考えられる。

intron 8 の TG repeat は repeat 回数が多い方が exon 9 をスキップしやすく, 470V 型の CFTR 機能は470M 型より低い<sup>6)</sup>と報告されている。患者の多型は, 12/12(TG), V/V470であった。両アレルに TG12-470V を持つ日本人は稀であり, この遺伝子型が CFTR 発現に与える影響は分かっていない。

この患者の CFTR 発現レベルが, CF あるいは CFTR 関連疾患を引き起こすほどに低下しているかどうかを検討するために鼻粘膜の CFTR 転写体を解析した。CFTR の発現量を評価するために, AQP5 を内部基準として CFTR 転写体量を解析した。exon 1 から始まる CFTR 転写体については, 患者の転写体量が健常人の10%程度に減少していた。一方, exon 4 から始まる CFTR 転写体については, 患者の転写体量が健常人の50%程度に減少していた。この結果は, 患者では両アレルともにスプライシング異常など何らかの転写異常が起こっており, 結果として exon1 を持つ CFTR mRNA の発現量が正常の10%程度まで減少していることを示している。今回観察された mRNA 発現量低下が TG12-470V 遺伝子型による exon 9 のスキップと関連があるか, あるいは TG12-470V 遺伝子型とリンクした別の変異により引き起こされているのかは不明である。

我々は, 以前, 片側アレルに dele16-17b 変異を持つ日本人 CF 患児において, もう一方のアレル由来の CFTR mRNA が exon 1 を欠損していたと報告した<sup>7,8)</sup>。この患児では, exon 16-17b を含む転写体に exon 1 上の primer に反応するものは検出されなかった。今回の女性患者では, 10%程度ではあるが exon 1 上の primer に反応する転写体が存在するため, CFTR 遺伝子異常のタイプは異なると考えら

れる。

今回の女性患者に発現している exon 1 を持つ CFTR 転写体(健常人の10%)の一部は exon 9 をスキップしていると推定されるため、鼻粘膜における正常な CFTR タンパクの発現量は 10% よりさらに低く、残存している CFTR 機能も 10% 以下であると推定される。CFTR 機能低下(汗中 Cl<sup>-</sup> 濃度)は境界域であり、明らかな膵外分泌機能不全は見られない。この患者の病態は、膵外分泌機能が保たれる(pancreatic sufficient)比較的軽症の CF あるいは CFTR 関連疾患に相当すると考えられる。

わが国の CF では、全エクソンとその上下流の直接シーケンス及び MLPA 解析を行っても、約16%のアレルには CF 原因遺伝子変異が検出されない。このような症例では、鼻粘膜スワブの CFTR 転写体解析を行う必要があると考えられる。

#### E. 結論

気管支拡張症を呈した 38 歳女性患者の CFTR 遺伝子解析及び CFTR 機能解析を行った。ゲノム解析では CF 原因遺伝子変異は検出されなかったが、鼻粘膜スワブ中の全長 CFTR 転写体量が健常人の 10% 程度に減少していた。汗中 Cl<sup>-</sup> 濃度は境界域であった。比較的軽症の CF あるいは CFTR 関連疾患に相当する病態と考えられる。

#### F. 参考文献

1. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Cystic Fibrosis Mutation Data Base. <http://www.genet.sickkids.on>.
2. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究班 大槻 眞, 成瀬 達, 編 膵嚢胞線維症の診療の手引き アークメディア(東京)2008
3. 石黒 洋, 中莖みゆき, 山本明子, 近藤志保, 藤木理代, 北川元二, 洪 繁, 成瀬 達. わが国の Cystic fibrosis 患者における CFTR 遺伝子解析 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究 平成23年度総括・分担研究報告書 2012;

367-370.

4. 吉村邦彦. ピロカルピンイオン導入法. 膵嚢胞線維症の診療の手引き(大槻 眞, 成瀬 達 編). アークメディア 2008; 12-21.
5. Naruse S, Ishiguro H, Shirota K, Nakakuki M, Yamamoto A, Kondo T. Sweat chloride measurement with a highly sensitive electrode. *Pancreas*. 2006; 33: 100.
6. Fujiki K, Ishiguro H, Ko SB, et al. Genetic evidence for CFTR dysfunction in Japanese: background for chronic pancreatitis. *J Med Genet*. 2004; 41: e55.
7. Nakakuki M, Fujiki K, Yamamoto A, Ko S, Yi L, Ishiguro M, Yamaguchi M, Kondo S, Maruyama S, Yanagimoto K, Naruse S, Ishiguro H. Detection of a large heterozygous deletion and a splicing defect in the CFTR transcripts from nasal swab of a Japanese case of cystic fibrosis. *J Hum Genet*. 2012; 57(7): 427-433.
8. 石黒 洋, 中莖みゆき, 山本明子, 近藤志保, 藤木理代, 北川元治, 洪 繁, 成瀬 達. わが国の Cystic fibrosis 患者における CFTR 遺伝子変異の特徴 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究 平成24年度総括・分担研究報告書 2013; 264-268.

#### G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし