

わが国の Cystic fibrosis 患者における CFTR 遺伝子変異の特徴

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, 山本明子, 近藤志保 (名古屋大学総合保健体育科学センター健康栄養医学)

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 (みよし市民病院)

【研究要旨】

臨床症状と汗中 Cl⁻ 濃度の高値より Cystic fibrosis (CF) と診断された12症例の CFTR 遺伝子解析結果を報告する. 27エクソン部とその上下流の直接シーケンス, MLPA, 鼻粘膜 CFTR トランスクリプトの解析を行った. アジア人に特有な dele16-17b(6), E217G(1), L441P(1), 1540del10(1), Y517H(1), Q1042TfsX5(1), T1086I(1), exon1 欠損トランスクリプト(1)の8種の変異と, 欧米で報告例のある F508del(3), R1066C(2), 182delT(1), R75X(1), 1609delCA(1), G542X(1)の6種との合計14種の CF 原因変異を検出した(括弧内はアレル数). そのうち6種はナンセンスコドンを生じる変異であった. Y517H と Q1042TfsX5 は新規変異である. 2アレルでは CF 原因変異が検出されなかった.

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. 当研究室では, 2007年以降, 臨床症状と汗中 Cl⁻ 濃度の高値より Cystic fibrosis (CF) と診断された12症例(表1)の CFTR 遺伝子解析を行った.

B. 研究方法

1. ゲノム遺伝子の解析

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.

2. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)解析

表1 CFTR 遺伝子解析症例

症例	年齢	性別	アレル1変異	アレル2変異	汗中 Cl ⁻ 濃度 (mmol/l)	腺外分泌不全	呼吸器症状	胎便性イレウス	家族歴
1	10ヶ月	女	1609delCA	G542X	156	○	○	無し	無し
2	1歳	男	dele16-17b	deletion/skipping of exon1 in the CFTR	122	○	○	○	無し
3	38歳	男	T1086I	dele16-17b	88	○	○	無し	○
4	19歳	男	R75X	dele16-17b	96	○	○	○	無し
5	20歳	男	E217G	ND	>60	○	○	無し	無し
6	2歳	女	dele16-17b	dele16-17b	238	(発育不全)	○	○	無し
7	6歳	女	p.Leu441Pro	ND	114	○	○	○	無し
8	3歳	女	182delT	[delta]F508	60	○	○	無し	無し
9	5歳	女	dele16-17b	[delta]F508	66	○	○	無し	無し
10	8ヶ月	男	R1066C	R1066C	235	○	○	○	無し
11	4ヶ月	男	[delta]F508	Q1042TfsX5	152	○	○	○	無し
12	10歳	女	1540del10	Y517H	53	○	○	無し	無し

MLPA は、数エクソンに渡る欠損や重複などの genomic rearrangement を定量的に検出する解析方法である。SALSA P091-C1 CFTR MLPA キット (MRC Holland) を用いた (詳細は、昨年度の報告書参照)¹⁾。

3. 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^{2,3)}。

(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. ゲノム遺伝子の解析

図 1 に示す CF 原因変異が検出された。症例 7~12 は、今年度解析した患者である (表 1)。アジア人に特有な E217G⁴⁾, L441P⁵⁾, 1540del10⁶⁾, Y517H, Q1042TfsX5, T1086I の 6 種、及び欧米で報告例のある 182delT⁷⁾, R75X⁸⁾, F508del⁹⁾, 1609delCA¹⁰⁾, G542X¹¹⁾, R1066C¹²⁾ の 6 種、合計 12 種の CF 原因変異が検出された (図 1)。そのうち 182delT, R75X, 1540del10, 1609delCA, G542X, Q1042TfsX5 の 6 種はナンセンスコドンを生じる変異である。図 2(a) に、R1066C のホモ接合体 (症例 10) の波形を示す。Y517H と Q1042TfsX5 (図 2(b)) は新規変異である。2 アレルでは CF 原因変異が検出されなかった (表 1)。

2. MLPA 解析

dele16-17b 変異は、MLPA を用いると、得

られた波形のエクソン 16, 17a, 17b に対応するピークの相対的な高さによって検出される¹⁾。

本研究では 24 アレル中 6 アレルに dele16-17b が検出されており、そのうち 1 症例がホモ接合体、4 症例は片方のアレルに dele16-17b を持っていた。欠損領域を挟み込む PCR²⁾ を行い、得られた断片をシーケンスすることにより、正確な欠損領域を確認済である (c.2908+1085_3367+260del7201)。

MLPA kit には、F508del 変異を検出するために、c.1521_1523 の CTT を含む 12 塩基にハイブリダイズする probe が含まれている。F508del (c.1521_1523delCTT) 変異があるとハイブリダイズされず、F508 を示すピークが減少する。図 3 は症例 9 の MLPA 波形であるが、父親由来の F508del 変異と母親由来の dele16-17b 変異のヘテロ接合体であることを示している。

今回の検討では、その他の genomic rearrangement は認められなかった。

3. CFTR mRNA の解析

症例 2 の鼻粘膜拭い液より抽出した CFTR mRNA の RT-PCR により、exon1 欠損トランスクリプトを検出した (図 4)。症例 2 は、片方のアレルに dele16-17b 変異が検出されていたが (表 1)、もう一方の dele16-17b の無いアレル由来のトランスクリプトが exon1 を欠損していた³⁾。

D. 考察

今までに当研究室で CFTR 遺伝子解析を行った 12 症例 24 アレルのうち、アジア人種特有と思われる遺伝子変異が 13 アレルに検出され

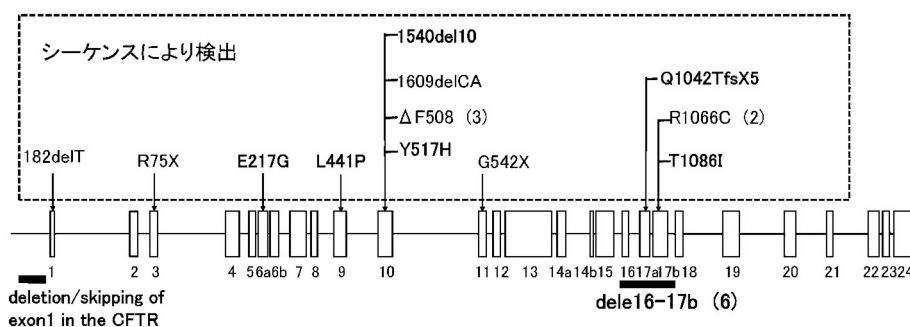


図 1 検出された CF 原因変異
アジア人に特有な CF 原因変異を太字で示した。
変異が複数のアレルで検出された場合、アレル数を括弧内に示す。

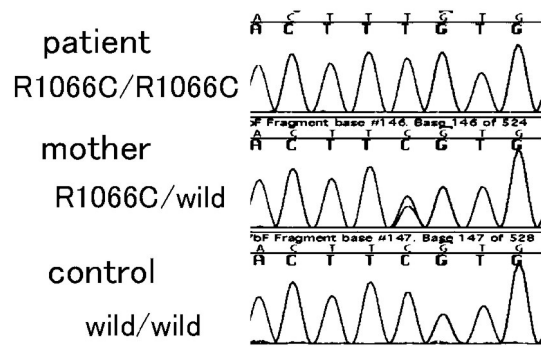


図 2(a) R1066C(exon17b)シーケンス波形 症例10
cDNAname: c.3196C>T

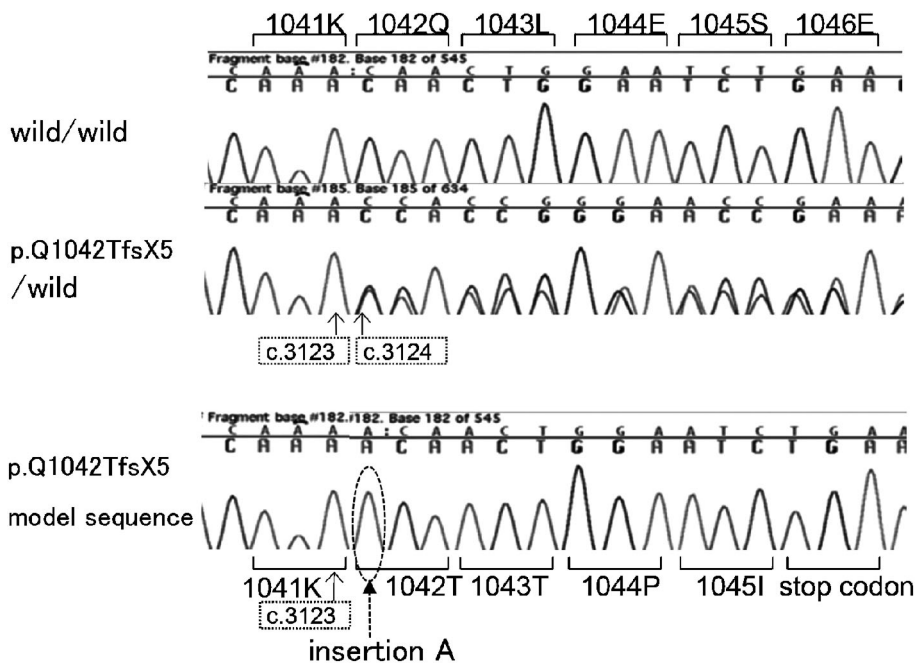


図 2(b) p.Q1042TfsX5(exon17b)シーケンス波形 症例11
cDNAname: c.3123_3124insA

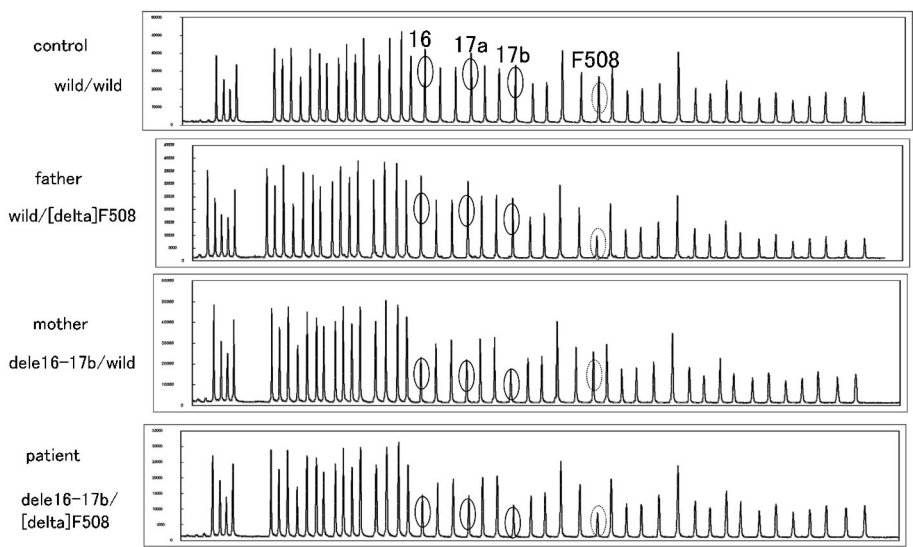


図 3 症例 9 の家系の MLPA 解析波形

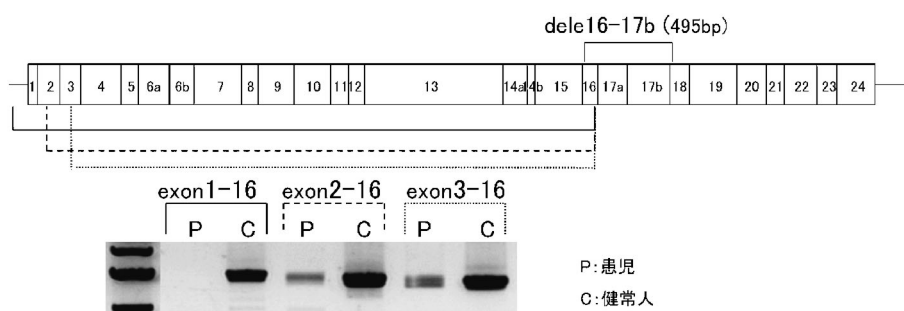


図4 deletion/skipping of exon1 in the CFTR transcript 症例2

た. そのうち2種の変異は新規に見つかった変異である. 今後も, CFTR 全27エクソンの直接シーケンスを続ける必要がある.

現在 CFTR 遺伝子上の large genomic rearrangement は30種類以上報告されている¹³⁾. その中で dele16-17b 変異は日本人の CF 患者で最も頻度の高い CF 原因変異である. dele16-17b が一方のアレルに存在する場合, ゲノムの直接シーケンスでは検出されず, MLPA あるいは dele16-17b 検出用フラグメントテスト¹⁾²⁾³⁾を実施する必要がある. 特に, 直接シーケンス解析により, エクソン16から17bの領域にある遺伝子変異のホモ接合体と判定された場合, 実際にはその変異と dele16-17b のヘテロ接合体である可能性がある. 症例10は, dele16-17b が無いことを確認し, R1066C(エクソン17bにある)のホモ接合体と判定された. また, 今回の解析では24アレル中9アレルに欧米型の変異が検出されており, 今後の症例で, dele16-17b 以外の large genomic rearrangement が検出される可能性がある.

片方のアレルに dele16-17b を持ち他方のアレルには遺伝子変異が検出されていなかった症例(症例2, 表1)について, 鼻粘膜スワブの解析により, 他方のアレル由来の CFTR トランスクリプトがエクソン1を欠くことが分かった. このスプライシング異常のメカニズムと原因, 一部欠損のある CFTR 蛋白が合成されているのか, CFTR 活性が残っているのか, などは不明である. エクソン1欠損トランスクリプトの検出方法を確立する必要がある.

E. 結論

dele16-17b, E217G, L441P, 1540del10, Y517H, Q1042TfsX5, T1086I, exon1 欠損トランスクリプトはアジア人種に特有な CFTR 遺伝子変異であり, そのうち dele16-17b は日本人で最も頻度の高い CF 原因変異である. 今後の CFTR 遺伝子解析には, 全エクソンの直接シーケンスに加え, MLPA 解析を行う必要がある.

F. 参考文献

1. 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 難治性肺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.
2. 石黒 洋, 中莖みゆき, 山本明子, 洪 繁, 藤木理代, 丸山真介, 柳元孝介, 伊藤 治, 中島守夫, 成瀬 達. 日本人嚢胞性線維症1症例の 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 難治性肺疾患に関する調査研究 平成22年度総括・分担研究報告書 2011; 319-324.
3. 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.
4. Lee JH, Choi JH, Namkung W, Hanrahan JW,

- Chang J, Song SY, Park SW, Kim DS, Yoon JH, Suh Y, Jang IJ, Nam JH, Kim SJ, Cho MO, Lee JE, Kim KH, Lee MG. A haplotype-based molecular analysis of CFTR mutations associated with respiratory and pancreatic diseases. *Hum Mol Genet.* 2003; 12: 2321–2332.
5. Gee HY, Kim CK, Kim SW, Lee JH, Kim JH, Kim KH, Lee MG. The L441P mutation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its molecular pathogenic mechanisms in a Korean patient with cystic fibrosis. *J Korean Med Sci.* 2010; 25: 166–171.
 6. Morokawa N, Iizuka S, Tanano A, Katsube A, Muraji T, Eto Y, Yoshimura K. Severe cystic fibrosis in a Japanese girl caused by two novel CFTR (ABCC7) gene mutations: M152R and 1540del10. *Hum Mutat.* 2000; 15(5): 485.
 7. Shackleton S, Hull J, Dear S, Seller A, Thomson A, Harris A. Identification of rare and novel mutations in the CFTR genes of CF patients in southern England. *Hum Mutat.* 1994; 3(2): 141–151.
 8. Will K, Dork T, Stuhmann M, von der Hardt H, Ellemunter H, Tummler B, Schmidtke J. Transcript analysis of CFTR nonsense mutations in lymphocytes and nasal epithelial cells from cystic fibrosis patients. *Hum Mutat.* 1995; 5: 210–220.
 9. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245 (4922): 1066–1073.
 10. Chillon M, Palacio A, Nunes V, Casals T, Gimenez J, Estivill X. Identification of a frameshift mutation (1609delCA) in exon 10 of the CFTR gene in seven Spanish cystic fibrosis patients. *Hum Mutat.* 1992; 1: 75–76.
 11. Loirat F, Hazout S, Lucotte G. G542X as a probable Phoenician cystic fibrosis mutation. *Hum Biol.* 1997; 69: 419–425.
 12. Casals T, Pacheco P, Barreto C, Giménez J, Ramos MD, Pereira S, Pinheiro JA, Cobos N, Curvelo A, Vázquez C, Rocha H, Séculi JL, Pérez E, Dapena J, Carrilho E, Duarte A, Palacio AM, Nunes V, Lavinha J, Estivill X. Missense mutation R1066C in the second transmembrane domain of CFTR causes a severe cystic fibrosis phenotype: study of 19 heterozygous and 2 homozygous patients. *Human Mutat.* 1997; 10(5): 387–392.
 13. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Cystic Fibrosis Mutation Data Base. <http://www.genet.sickkids.on>.
- G. 研究発表**
1. 論文発表
 - 1) 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.
 2. 学会発表
 - 1) 中莖みゆき, 石黒 洋, 成瀬 達. わが国の嚢胞性線維症患者のCFTR遺伝子変異の特徴 ワークショップ「遺伝性肝胆膵疾患の病態と治療」 JDDW2012 神戸 2012年10月
 - 2) 中莖みゆき, 藤木理代, 山本明子, 山口誠, 近藤志保, 丸山慎介, 柳元孝介, 成瀬 達, 石黒 洋. 鼻粘膜スワブから抽出した転写体の解析により同定できた日本人嚢胞性線維症患者のCFTR遺伝子変異 日本人類遺伝学会第57回大会 東京 2012年10月
- 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