

Ⅳ． 瘳嚢胞線維症

1) 共同研究プロジェクト

第4回腭嚢胞線維症全国疫学調査(共同研究)

研究報告者 成瀬 達 三好町民病院・院長

共同研究者

石黒 洋（名古屋大学大学院健康栄養医学），吉村邦彦（国家共済虎の門病院呼吸器センター内科）
辻 一郎（東北大学大学院公衆衛生学），栗山進一（東北大学大学院公衆衛生学）
菊田和宏（東北大学大学院消化器病態学），下瀬川徹（東北大学大学院消化器病態学）

【研究要旨】

わが国における腭嚢胞線維症の症例数を把握し，臨床経過を明らかにするために，第4回全国疫学調査を立案した．2010年1月に，全国基幹病院(400床以上)の小児科に，2009年1年間および過去10年間の患者の有無と症例数を問い合わせる．「症例有り」と回答した施設，過去10年間の症例報告がある施設に，症例調査票と患者への説明書・同意書を配布し，調査票の記入を主治医に依頼する．また，第3回全国疫学調査(2004年)で把握された症例の追跡調査を併せて行う．本調査計画は，2008年11月に，東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会にて承認された．今後は，名古屋大学医学部生命倫理委員会における審査など本調査の準備を進める予定である．

A. 研究目的

腭嚢胞線維症(CF)は，cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)の遺伝子変異/多型を原因とする常染色体劣性遺伝性疾患である．CFTR Cl⁻チャンネルは全身の上皮膜細胞に発現し，機能不全の程度により，腭，消化管，気道粘膜，輸精管，汗管など全身の上皮膜組織に様々な障害が生じるため，多彩な病態を示す．CFは欧米人に多いが，本邦では極めて稀である．わが国における腭嚢胞線維症の症例数を把握し，臨床経過を明らかにするために，過去3回(1994年，1999年，2004年)の調査に引き続いて，第4回全国疫学調査を立案した．

B. 研究方法

1. 調査期間を2009年1年間および過去10年間とする．
2. 一次調査として，2010年1月に，全国の病床数400以上の総合病院の小児科および小児専門病院に，過去1年間および10年間のCF患者の有無と症例数(死亡例も含む)を問い合わせる．
3. 二次調査としては，①一次調査で「症例有り」と回答された施設，②症例報告(論文発表

および学会発表)がされている施設，③過去3回の全国調査で症例の回答のあった施設へ，調査個人票(資料)を配布する．
(倫理面への配慮)

1. 本研究は，東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会(2008年11月17日承認済：2008-312)および名古屋大学医学部生命倫理委員会(申請準備中)の承認を得て行う．
2. CFは稀少であり，調査に当たっては重複と調査漏れをできるかぎり避ける必要がある．個人調査票には，患者名のイニシャル，生年月日，カルテ番号を用いる．事務局に届いた調査個人票は，個人情報管理者が，症例の重複をチェックした上で，症例の匿名化(連結可能)を行い，症例の対応表を保管する．
3. 調査個人票内の遺伝子診断の項目については，患者(あるいは代諾者)がこの情報を調査票に記入して良いと判断した場合に，主治医が結果を調査票に記入する．

C. 研究結果

本調査研究は，2008年11月17日に，東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の承認を受けた(2008-312)．現在，名古屋大学医学部生

第4回膵臓線維症全国疫学調査調査個人票(案)

事務局使用欄 膵臓線維症全国疫学調査調査個人票 記載日 2010年 月 日
(通し番号) 記載者氏名: _____

貴施設名: _____ 診療科: 1. 小児科 2. その他 ()
所在地: _____
調査票は実施把握のためにのみ使用し、個人の秘密は厳守します。該当する番号を選択、またはご記入ください。
患者イニシャル (姓、名) (氏) (姓) 性別 1. 男 貴施設 カルテ番号
生年月日 年 月 日 患者現住所 都道府県・不明
(切り取り線: 事務局にて切り取ります。)

事務局使用欄	生年月	年	月	性別	1. 男 2. 女
(通し番号)	患者現住所	都道府県・不明			
前回までの調査の登録	1. なし 2. 2004年調査 3. 1999年調査 4. 1994年調査 5. 不明				
家族内発症	1. なし 2. あり (続柄 a. 父 b. 母 c. 兄 d. 弟 e. 姉 f. 妹 g. その他)				
医療費の公費負担	1. なし 2. あり [a. 特定疾患治療研究費 (), b. その他 ()] 3. 不明				
受療状況 (最近1年間)	1. 主に入院 (ヶ月/年) 2. 主に通院 (回/月) 3. 入院と通院 (入院 (ヶ月/年) 5. 死亡 (年 月) 6. 不明				
過去の受療状況	年齢	入院期間	主な入院理由、症状		
	0~5歳 (ヶ月/年)				
	6~10歳 (ヶ月/年)				
	11~15歳 (ヶ月/年)				
	16~20歳 (ヶ月/年)				
	21歳~ (ヶ月/年)				
初診医療機関	1. 貴施設 2. 他施設 ()		推定発症年月	年 月・不明	
診断した医療機関	1. 貴施設 2. 他施設 ()		貴施設初診年月	年 月・不明	
出生時の身長と体重 () cm () kg	母子手帳の成長曲線など、発育の経過がわかる資料がありましたら、匿名の上、コピーを添付していただければ有難く存じます。				
現在の身長と体重 () cm () kg					
診断基準を満たす項目	a. 発汗試験の異常 b. 膵外分泌不全 c. 呼吸器症状 d. その他 (船便性イレウス、家族歴)				
症状	有無	初発年齢	現在の状況 (発症時と比較)		
消化器	a. あり b. なし c. 不明	歳 ヶ月	a. 治癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
脂便	a. あり b. なし c. 不明	歳 ヶ月	a. 治癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
栄養不良	a. あり b. なし c. 不明	歳 ヶ月	a. 治癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
膵炎発作	a. あり b. なし c. 不明	歳 ヶ月	a. 治癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
便秘	a. あり b. なし c. 不明	歳 ヶ月	a. 治癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
呼吸困難	a. あり b. なし c. 不明	歳 ヶ月	a. 治癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
繰り返す感染	a. あり b. なし c. 不明	歳 ヶ月	a. 治癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
副鼻腔炎	a. あり b. なし c. 不明	歳 ヶ月	a. 治癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
気管支拡張症	a. あり b. なし c. 不明	歳 ヶ月	a. 治癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
嚕状胸郭	a. あり b. なし c. 不明	歳 ヶ月	a. 治癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		

その他	低張性脱水	a. あり b. なし c. 不明	歳 ヶ月	a. 治癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明	
	発汗過多	a. あり b. なし c. 不明	歳 ヶ月	a. 治癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明	
	糖尿病	a. あり b. なし c. 不明	歳 ヶ月	a. 治癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明	
	発育不全	a. あり b. なし c. 不明	歳 ヶ月	a. 治癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明	
検査	汗中電解質検査	1. 異常あり 2. 異常なし 3. 検査せず 4. 不明 方法: a. ピロカルピンイオン導入法 b. その他 () 結果 ①: CT () mEq/L, Na ⁺ () mEq/L 施行時年齢: 歳 ヶ月 ②: CT () mEq/L, Na ⁺ () mEq/L 施行時年齢: 歳 ヶ月			
	膵外分泌機能検査	1. 異常あり 2. 異常なし 3. 検査せず 4. 不明 施行時年齢: 歳 ヶ月 方法: 施行項目に○ 結果: a. 便中脂肪測定 b. PFD試験 (BT-PABA試験) c. 便中キモトリプシン d. セクレチン試験 e. 血中膵酵素測定 (トリプシン活性など)			
	喀痰培養検査	1. 施行あり 2. 施行なし 3. 不明 (結果) a. Staphylococcus aureus (MSSA) b. MRSA c. Pseudomonas aeruginosa d. Haemophilus influenzae e. Proteus vulgaris f. Candida albicans g. その他 ()			
	遺伝子診断	1. 施行あり 2. 施行なし 3. 不明 未施行の場合: 遺伝子診断を (施行時年齢: 歳 ヶ月) 1. 希望する 2. 希望しない 結果:			
治療	1. 薬物療法 (薬剤名と量をお書きください。)	a. 抗菌薬 (薬名:) (量:) b. 去痰薬 (薬名:) (量:) c. 気管支拡張薬 (薬名:) (量:) d. 消化酵素剤 (薬名:) (量:) e. その他 (薬名:) (量:)			
	2. 在宅酸素療法				
	3. 栄養療法 (種類とカロリー)	a. 中心静脈 (種類:) (kcal) b. 経腸栄養 (種類:) (kcal)			
	4. 理学療法				
現在の状況 (発症時と比較)	5. 手術 (方法と年齢)	() 歳			
	6. その他				
	1. 治癒 2. 改善 3. 不変 4. 悪化 5. 死亡 最終受診日: 年 月 日				
	死亡の場合 死亡年月日: 年 月 日 死因: () 剖検: 1. あり 2. なし 3. 不明 剖検所見:				
症例報告の有無	学会発表	a. あり b. なし c. 不明			
	学会名: 第 () 回 () 年				
紙上発表	a. あり b. なし c. 不明				
	雑誌名: () 年 () 巻 (~) 頁 (もしありましたら、抄録もしくは論文のコピー等を添付いただければ幸いです。)				

厚生労働省難治性疾患克服研究事業 難治性線維症に関する調査研究班

図1

命倫理委員会への申請準備中である。今回の調査では、事務局を名古屋大学総合保健体育科学センター内に置き、個人情報管理者を小池晃彦氏(准教授, 医師)に依頼する。2004年調査で個人調査票が得られた症例の追跡調査を行うため、名古屋大学倫理委員会の承認を得て、症例の対応表を移管する予定である。

D. 考察

当研究班では、1994年(松野班)¹⁾、1999年(小川班)²⁾、2004年(大槻班)³⁾と、5年毎に過去3回の膵臓線維症全国疫学調査を行ってきた。1999年と2004年の調査は全国の400床以上の病院の小児科を対象に行われ、回収率はいずれも80%以上であった。1999年の調査では、1年間の受療患者数は15人程度と推定され、この年の人口動態統計による0-19歳の人口から発症頻度の推計値は1人/1,740,000人(95%信頼区間: 1/218万-1/145万)であった。2004年の

調査では、2004年中の患者は13名、過去10年間の患者数は38名程度と推定され、男女比はほぼ1:1であった。発症頻度の推計値は1人/1,870,000人(95%信頼区間: 1/202万-1/152万)であった。このように患者数に大きな変化は見られなかったが、生存期間は延長してきている。1994年の調査では20%以上の症例が5歳未満で死亡していたが、1999年と2004年の調査では患者の多くは10代であった。2004年の調査で臨床経過などを調査することができた17症例では、生存期間の中央値は18歳(2歳-36歳)であった。繰り返す呼吸器感染により呼吸不全が進行し、同時に栄養状態が悪化し、入院治療を必要とする期間が長くなり、15~20歳で死亡する症例が多かった。呼吸管理、栄養管理はめざましく進歩し続けており、数年毎に調査を続ける必要がある。

CFの診療においては、早期診断、呼吸器感染の予防と治療、および栄養状態の維持が重要

である。わが国では CF の病態の長期経過に関する報告は全くなく、欧米の教科書を参考に診療が進められてきた。2004年の調査では、個人調査票をもとに CF 患者の病状の経過に加えて、診断と治療の実態をまとめて欧米と比較し、「腭嚢胞線維症の診療の手引き」として出版した⁴⁾。今回の第4回全国疫学調査においても、同様の調査を行い「腭嚢胞線維症の診療の手引き」を改訂する予定である。

E. 結論

わが国における腭嚢胞線維症の症例数を把握し、臨床経過を明らかにするために、第4回全国疫学調査を立案した。全国基幹病院(400床以上)の小児科を対象として、2009年1年間および過去10年間の患者を調査する。また、前回調査で個人調査票が得られた患者の追跡調査を併せて行う予定である。

F. 参考文献

1. 田代征記, 佐々木賢二 本邦における腭嚢胞線維症(Cystic fibrosis)の遺伝子診断, N1303Kの変異解析 厚生省特定疾患難治性腭疾患調査研究班 平成6年度研究報告書 1994: 20-23.
2. 玉腰暁子, 林 櫻松, 大野良之, 小川道雄, 広田昌彦, 衛藤義勝, 山城雄一郎 腭嚢胞線維症全国疫学調査成績 厚生労働省特定疾患対策研究事業「難治性腭疾患に関する調査研究班」平成12年度研究報告書 2001: 92-95.
3. 成瀬 達, 石黒 洋, 玉腰暁子, 吉村邦彦, 広田昌彦, 大槻 眞 第3回腭嚢胞線維症全国疫学調査 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性腭疾患に関する調査研究 平成17～19年度総合研究報告書 2008: 205-215.
4. 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腭疾患に関する調査研究班, 大槻眞, 成瀬 達, 編 腭嚢胞線維症の診療の手引き アークメディア(東京) 2008.

G. 研究発表

1. 論文発表

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究

事業難治性腭疾患に関する調査研究班, 大槻眞, 成瀬 達, 編 腭嚢胞線維症の診療の手引き アークメディア(東京) 2008.

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

Ⅳ． 瘳嚢胞線維症

2) 各個研究プロジェクト

日本人 CF 症例の CFTR 遺伝子変異に関する検討

研究報告者 吉村邦彦 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院呼吸器センター内科 部長

共同研究者

安斎千恵子（虎の門病院呼吸器センター内科）

【研究要旨】

嚢胞性線維症(cystic fibrosis, CF)は、従来わが国では稀な疾患と考えられていたが、その臨床的実態と原因遺伝子 CFTR の変異様相は、次第に明らかにされつつある。古典的な CF は約80%の症例で膵外分泌機能障害(pancreatic insufficiency, PI)を伴うが、大多数は呼吸機能不全で死亡する。PCR 増幅および直接塩基配列解析を用いた遺伝子変異の検出により、われわれはすでにこれまでわが国における23例の CF 患者においてその遺伝子変異を確認した。一部の症例では同一の遺伝子変異が共通に検出されてきている。また、近年 CFTR 関連疾患なる疾患概念が提唱され、1 ないし 2 アリルの CFTR 遺伝子の異常に基づく単一臓器の複数病態が報告されている。今年度は、臨床的に厚生労働省びまん性肺疾患研究班のびまん性汎細気管支炎(DPB)の診断基準をみたす20代の男性兄弟症例において、一方の CFTR アリルにミスセンス変異 T1220I を確認し得たので、典型的 CF との鑑別上の問題点と、DPB の CFTR 関連疾患としての考察を含めて報告した。今後も引き続き日本人 CF および CFTR 関連疾患の症例を出来る限り多く集積・解析し、起因する CFTR 遺伝子の病的変異の種類や頻度を明らかにしたうえで、わが国独自のこれら疾患の遺伝子変異スクリーニングシステムを確立する必要がある。

A. 研究目的

嚢胞性線維症(cystic fibrosis, CF)は肺、膵臓、消化管などの全身の外分泌管腔臓器を冒す常染色体劣性遺伝性疾患であり、多機能蛋白である cAMP 依存性 Cl⁻ イオンチャネル CFTR をコードする遺伝子の突然変異に起因する^{1~5)}。CF は欧米白人種にきわめて高率に発症する疾患であるが、一方、日本人をはじめとする東洋人種における CF の発症頻度はきわめて低いと考えられている³⁾。わが国の CF 症例に関しては昭和57年からの厚生省特定疾患難治性膵疾患研究班による全国調査から29例の確診例が報告されているが⁶⁾、Yamashiro ら⁷⁾の報告によるとわが国ではこれまでに文献的に約120例の CF 臨床診断例が記載され、発症頻度も出生35万人あたり1人程度と推定された。これはハワイ在住の東洋人での CF 発症頻度(出生9万人以上あたり1人)と概ね矛盾しないため⁸⁾、わが国では、およそ出生10万人あたり1人程度の発症率と考えられる。

わが国の患者における CFTR 遺伝子変異解

析に関して、過去には DNA 検体の得られた患者での $\Delta F508$ など欧米で頻度の高い数種の変異検索、あるいは限られた数のエクソンでの PCR 増幅解析などが検討されたが、これらの方法では有意な CFTR 遺伝子異常は確認されず、変異状況は長らく不明であった^{3,6)}。この主要な理由は、わが国の CF 患者における CFTR 変異が欧米患者と比較して、変異の頻度もさることながら、そのスペクトラムが全く異なっていることに起因する。しかしながら、このような経緯の中、約10余年前から、漸くわが国での CFTR 変異の状況が明らかにされてきている^{3,6)}。著者らは PCR-SSCP 法、直接シーケンス法などによる27エクソン全ての変異検出体制を確立し、当研究班によるわが国での全国調査で集積された症例などを中心に CF 確診例ないし疑診例の CFTR 遺伝子変異検索を進めてきた^{3,6)}。この結果、これまでに合計23例の CF 症例において遺伝子変異を確認し得た⁶⁾(表1)。これらの中には、欧米でもきわめて稀な変異や、これまで国際的な CF Muta-

表 1 わが国でこれまでに確認された CF 症例の臨床的特徴とその CFTR 遺伝子変異

Case	Age	Sex	PI/PS	Cl ⁻	Mutation	Exon	Mutation	Exon	Outcome
1	15 y	F	PI	201	H1085R	17b	H1085R	17b	alive
2	1 y 5 m	F	PI	126	M152R	4	1540del10	10	alive
3	1 y 1 m	F	PI	ND	ΔF508	10	L571S	12	deceased
4	15 y	M	PI	74	125C	1	Q98R	4	alive
5	42 y	F	PS	ND	E217G	4	Q1352H	22	deceased
6*	21 y	M	PI	166	125C	1	L441P	9	alive
7*	16 y	F	PI	100	125C	1	L441P	9	deceased
8	9 y	F	PI	166	1540del10	10	1540del10	10	alive
9*	30 y	M	PS	403	125C + T1086I	1, 17b	125C + T1086I	1, 17b	alive/ABPA
10*	28 y	F	PS	ND	125C + T1086I	1, 17b	125C + T1086I	1, 17b	alive
11	17 y	F	PS	ND	R75X	3	R347H	7	alive
12	26 y	F	PI	121	E267V	6b	T663P	13	alive/TP
13	28 y	M	PI	117	125C	1	460insAT	4	deceased
14	11 y	M	PI	154	125C + dele16-17b	1, 16-17b	125C + dele16-17	1, 16-17b	deceased
15	24 y	F	PI	91	L548Q	11	2848delA	15	alive
16	2 y	F	PI	ND	L441P	9	ND	?	deceased
17	18 y	M	PS	93	125C + del16-17b	1, 16-17b	125C + del16-17b + V1318I	1, 16-17b, 21	alive/ABPA
18	9 y	F	PI	40	5T	intron 8	D924N	15	alive
19	13 y	F	PI	55	Q98R	4	Q98R	4	alive
20	29 y	F	PI	60	125C	1	R347H	7	alive
21	11 y	F	PS	22	R1453W	24	ND	?	alive
22	18 y	M	PI	ND	I556V	11	ND	?	alive
23	4 m	F	PI	ND	125C	1	G85R	3	alive

PI/PS: pancreatic insufficiency/sufficiency, CP: consanguineous parents, * siblings, TP: live lung transplantation, ABPA: allergic bronchopulmonary aspergillosis, ND: not detected

tion Database (CFMD)に登録記載のない CFTR 変異が大半を占めている^{9,10)}。

一方、呼吸器病変、とくに難治性気道疾患のなかで CF との鑑別が必要な疾患として、10代以降から成人にみられるびまん性汎細気管支炎 (DPB)、びまん性気管支拡張症、副鼻腔気管支症候群などが挙げられる。とりわけ、DPB あるいは DPB の一部は CF ないし呼吸器病態のみを呈する CF (CFTR) 関連疾患ではないか、という疑問に対して、われわれはわが国の DPB 患者においても CF の原因遺伝子 CFTR の変異が高率に見いだされることをこれまで報告してきた⁽¹¹⁾。さらに、典型的な CF 症例での診断基準の一つである汗の Cl⁻濃度に関して、上記対象とした DPB 患者のうち 3 例で正常上限の 60 mmol/L より高値を示した⁽¹¹⁾。このように少なくとも DPB の一部の症例では CFTR 異常との関連が強く示唆される。

今年度は、臨床的に厚生労働省研究班の DPB 診断基準をみたす 20 代の男性兄弟症例において、一方の CFTR アリルにアミノ酸コド

ンの置換をもたらすミスセンス変異 T1220I を確認し得たので、典型的 CF との鑑別上の問題点と CFTR 関連疾患についての考察を含めて報告する。

B. 研究方法(倫理面への配慮)

今年度は 2 例の兄弟例の CF 類似症例における CFTR 遺伝子変異の解析を行った。症例は解析時 29 歳、25 歳の男性兄弟で、ともに幼少時から咳嗽・喀痰あり、10 代半ばでの慢性副鼻腔炎の手術歴を有していた。両症例で画像上では上葉優位の小粒状陰影と気管支拡張を呈し、とくに兄は囊状拡張した気腔が顕著であった(図 1)。喀痰から持続的に *P. aeruginosa* が検出され、すでにクラリスロマイシンによる長期的な少量マクロライド療法を施行されている。呼吸不全には至っておらず、また脾臓、消化管などの合併病変はなく、精液量、精子の運動能力も正常範囲であった。一方、汗中の Cl⁻濃度はそれぞれ 47, 40 (mmol/L) と境界値 (40 ~ 60 mmol/L) であった。CFTR 遺伝子検索で

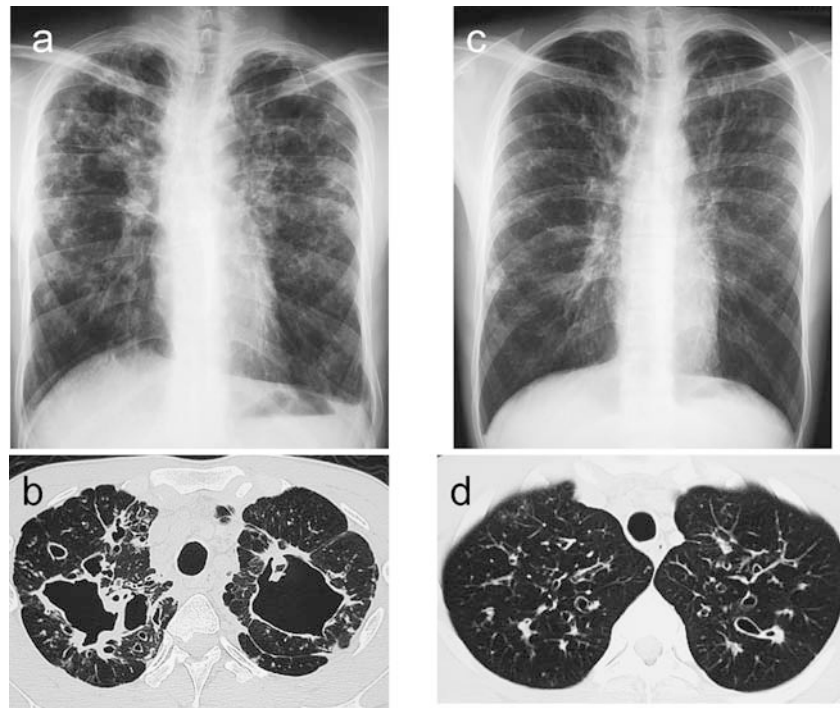


図1 CFTR 関連疾患兄弟例の胸部X線写真とCT画像
(a: 兄の胸部X線写真, b: 兄の胸部単純CT, c: 弟の胸部X線写真, d: 弟の同胸部単純CT)

は、全27エクソンの塩基配列を直接シーケンス法で解析した。

倫理面への配慮:「虎の門病院 ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理委員会」において「日本人嚢胞性線維症患者におけるCFTR 遺伝子変異の検索」研究の審査を受け、承認を得た研究計画(受付番号第2005-5号)に準じて、当該症例のCFTR 遺伝子変異検索の臨床的、遺伝学的意義を患者本人に説明した上、同意を取得した。

C. 研究結果

両症例ともに一方のアリルのエクソン19にT1220I (3791C > T) 変異が検出された。T1220Iは1220番目のアミノ酸がスレオニンからイソロイシンに置換されるCFTRのミスセンス変異であり、これまで1例のCF患者、次いでびまん性気管支拡張症(diffuse bronchiectasis)の患者においても報告されている変異である^{12,13)}。T1220Iの機能的異常に関しては、まだ十分な基礎データが得られていないが、これらの臨床報告からはCl⁻イオンチャネルの機能低下を招来する変異と考えられる。本症例は臨床的にはDPBの診断基準を満たすため、

DPBとの異同に関して示唆に富むCF関連疾患である。

また、その他の多型に関しては、エクソン10においてM470Vが一方のアリルに認められ、イントロン8の(TG)mTn多型は(TG)11T7/(TG)12T7であった。

D. 考察

今回報告した2症例では、汗のCl⁻濃度は境界領域にあり、脾病変も明らかではないことから、診断基準からは典型的CFとはいえないものの、臨床的には幼少期に始まる呼吸器病変を主体とするCF、あるいはCF関連疾患と考えて矛盾しない症例であると考えられる^{1,3,14)}。また、視点を変えれば、実際にDPBと診断可能な病態であり、呼吸器領域ではしばしば鑑別に難渋する症例であった。実際、遺伝子解析では一方のCFTRアリルのみのアミノ酸の置換を伴う異常が確認された。

これまでに、典型的な古典的CFの全ての臓器病態は示さず、副鼻腔、脾臓、男性生殖器などの単一臓器のみを冒す疾患群が注目され、これらの症例では多くが一方のCFTRアリルに何らかの異常を伴うことが報告され、CF-あ

るいは CFTR 関連疾患として総称されている^{14~18)}。このなかで、今回呈示した症例と基本的に同様の病態を呈する DPB において、われわれはその約 40% で少なくとも一方の CFTR に (TG)mT5 (5T) を含む CFTR 遺伝子の変異を確認した¹¹⁾。

近年わが国においても CFTR 変異検出体制が確立され、着実に変異の様相が明らかにされつつある^{3,6,9,10)}。CF に限っても、すでに全世界では 1,600 種以上の変異が報告されている⁵⁾。しかしながら、わが国の CF 患者、あるいは慢性膵炎、先天性両側性精管欠損症 (CBAVD) などの CFTR 関連疾患における CFTR 遺伝子変異は未だ十分に解明されているとは言い難い^{19,20)}。これは、いずれの疾患群においても、きわめて稀な CFTR 変異や、あるいはこれまで報告のない変異が大半を占め、欧米人の変異スペクトラムと全く様相を異にしているからである^{3,6,20)}。したがって、全ての対象疾患において、欧米人を対象としたスクリーニング体系では変異は検出され得ない。

E. 結論

今年度は、CFTR 遺伝子変異を一方のアリルに有し、肺を病変の首座とする CFTR 関連疾患 (臨床的には DPB あるいは副鼻腔気管支症候群) の兄弟例を報告し、その問題点を再度検討した。今後わが国の日本人 CF 症例と、さらに単一臓器病変のみを呈する CFTR 関連疾患にもその対象を広げて出来る限り多く解析し、原因となる CFTR 遺伝子の病的変異の種類、頻度を明らかにしたうえで、その変異検出システムを確立していきたい。

謝辞：症例の呈示を頂いた日本医科大学内科学講座 (呼吸器・感染・腫瘍部門) の臼杵二郎、吾妻安良太両博士に深謝する。

F. 参考文献

1. Welsh MJ, Tsui L-C, Boat TF, Beaudet AL. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th edn. McGraw-Hill, New York, p3799-p3876, 1995.
2. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*, 256: 774-779, 1992.
3. 吉村邦彦. のう胞性線維症. 日内会誌, 92(7): 1198-1205, 2003.
4. Tsui L-C. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med*, 151: S47-S53, 1995.
5. Cystic Fibrosis Mutation Data Base. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>.
6. 吉村邦彦, 安斎千恵子, 衛藤義勝. わが国の嚢胞性線維症患者における責任 CFTR 遺伝子変異の解析. 厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業) 分担研究報告書. 平成 19 年度 総括・分担研究報告書, p263-265, 2008.
7. Yamashiro Y, Shimizu T, Oguchi S, Shioya T, Nagata S, Ohtsuka Y. The estimated incidence of cystic fibrosis in Japan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 24: 544-547, 1997.
8. 吉村邦彦. 日本人における Cystic Fibrosis の実態とその CFTR 遺伝子変異. *Ther Res* 26: 1467-1475, 2005.
9. Yoshimura K, Wakazono Y, Iizuka S, Morokawa N, Tada H, Eto Y. A Japanese patient homozygous for the H1085R mutation in the CFTR gene presents with a severe form of cystic fibrosis. *Clin Genet*, 56: 173-175, 1999.
10. 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 gene mutations M152R and 1540del10. *Hum Mut, Mutation and Polymorphism Report* #109, 2000 (online).
11. Yoshimura K, Iizuka S, Anzai C, Morokawa N, Tanabe O, Kojima A, Nakata K, Eto Y. Diffuse panbronchiolitis is closely associated with mutations of the CFTR gene. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 161: A77.
12. Ghanem N, Costes B, Girodon E, Martin J, Fannen P, Goossens M. Identification of eight mutations and three sequence variations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*, 21: 434-436, 1994.

13. Girodon E, Cazeneuve C, Lebarry F, Chinet T, Costes B, Ghanem N, Martin J, Lemay S, Scheid P, Housset B, Bignon J, Goossens M. CFTR gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. *Eur J Hum Genet*, 5: 149–155, 1997.
14. Noone PG, Knowles MR. “CFTR-opathies”: disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. *Respir Res*, 2: 328–332, 2001.
15. Wang X, Moylan B, Leopold DA, Kim J, Rubinstein RC, Togias A, Proud D, Zeitlin PL, Cutting GR. Mutation in the gene responsible for cystic fibrosis and predisposition to chronic rhinosinusitis in the general population. *JAMA*, 284: 1814–1819, 2000.
16. Sharer N, Schwarz M, Malone G, Howarth A, Painter J, Super M, Braganza J. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med*, 339: 645–652, 1998.
17. Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and chronic pancreatitis. *N Engl J Med*, 339: 653–658, 1998.
18. Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Romero JR, Verlingue C, Claustres M, Nunes V, Ferec C, Estivill X. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of vas deferens. *N Engl J Med*, 332: 1475–1480, 1995.
19. Anzai C, Yoshimura K, Morokawa N, Okada H, Kamidono S, Eto Y. High prevalence of mutations of the CFTR gene in Japanese individuals with congenital bilateral absence of the vas deferens. *J Cystic Fibrosis*, 2: 14–18, 2003.
20. Fujiki K, Ishiguro H, Ko SB, Mizuno N, Suzuki Y, Takemura T, Yamamoto A, Yoshikawa T, Kitagawa M, Hayakawa T, Sakai Y, Takayama T, Saito M, Kondo T, Naruse S. Genetic evidence for CFTR dysfunction in Japanese: background for chronic pancreatitis. *J Med Genet*, 41: e55, 2004.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉村邦彦, 安斎千恵子, 衛籐義勝. わが国の嚢胞性線維症患者における責任CFTR 遺伝子変異の解析. 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)分担研究報告書. 平成19年度 総括・分担研究報告書, p263–265, 2008.
- 2) 吉村邦彦, 安斎千恵子, 衛籐義勝. わが国の嚢胞性線維症患者における責任CFTR 遺伝子変異の解析. 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)分担研究報告書. 平成17年度～19年度 総合分担研究報告書, p300–303, 2008.
- 3) 成瀬 達, 石黒 洋, 玉腰暁子, 吉村邦彦, 広田昌彦, 大槻 眞. 膵嚢胞線維症の診断マニュアルの作成. 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)分担研究報告書. 平成19年度 総括・分担研究報告書, p147–150, 2008.
- 4) 成瀬 達, 石黒 洋, 玉腰暁子, 吉村邦彦, 広田昌彦, 大槻 眞. 第3次膵嚢胞線維症全国疫学調査. 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)分担研究報告書. 平成17年度～19年度 総合分担研究報告書, p205–215, 2008.
- 5) 吉村邦彦. びまん性汎細気管支炎/びまん性気管支拡張症. 今日の治療方針2008, (山口 徹, 北原光夫, 福井次矢 編集). 東京, 医学書院, p216–218, 2008.
- 6) 吉村邦彦. 呼吸器症候群(第2版) I-その他の呼吸器疾患を含めて-Ⅲ 閉塞性肺疾患・気管支の異常 A. 閉塞性肺疾患 嚢胞性線維症別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 8 p654–663, 2008.

2. 学会発表

- 1) 諸川納早, 長谷川詠子, 坂本 晋, 宇留賀公紀, 榎本崇宏, 高谷久史, 宮本 篤, 岸 一馬, 吉村邦彦. 長期マクロイド療養中に増悪を繰り返した難治性びまん性汎細気管支炎の1例. 第6回DPB・難治性気道疾患研究会, 東京, 2008年1月26日.
- 2) 泉川公一, 坂本憲穂, 関 雅文, 澤井豊

光，掛屋 弘，山本善裕，柳原克紀，迎寛，吉村邦彦，河野 茂．当院で経験した
嚢胞性線維症の3例と遺伝子多型について．第48回日本呼吸器学会総会，神戸，
2008年6月15日-17日．

- 3) 蛸井浩行，林 宏紀，服部久弥子，阿部信二，神尾孝一郎，森本泰介，松本亜紀，赤川玄樹，臼杵二郎，吾妻安良太，弦間昭彦，吉村邦彦．CFTR 遺伝子変異を認めた副鼻腔気管支症候群の兄弟例．第182回日本呼吸器学会関東地方会，東京，2008年11月15日．

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

CFTR 遺伝子のプロモーター領域の解析

研究報告者 成瀬 達 三好町民病院 院長

共同研究者

藤木理代（名古屋学芸大学管理栄養学部）

石黒 洋，中莖みゆき，山本明子，近藤孝晴（名古屋大学健康栄養医学）

【研究要旨】

慢性膵炎患者88人（アルコール性慢性膵炎患者65人，特発性慢性膵炎患者23人），健常人118人を対象に，*CFTR* 遺伝子のプロモーター領域（翻訳領域の上流約2 kb）の遺伝子解析を行った．その結果，患者に特有な変異-1523 G/A（1例），-790 ΔT（3例）が見つかった．TFSEARCHを用いた解析により，-790付近は転写調節因子 HFH-2（FOXD3）の結合配列モチーフを持つことがわかった．

A. 研究目的

CFTR は上皮細胞に発現する cAMP 依存性のイオンチャネルで，Cl⁻ および HCO³⁻ 輸送を担っている．膵嚢胞線維症（cystic fibrosis; CF）は *CFTR* 遺伝子の変異によって発症する常染色体劣性疾患で，気道，腸管，膵管，胆管，汗管，輸精管などのイオンおよび水輸送が障害される¹⁾．重篤な機能異常を伴う変異が両アレルに見られる場合，膵外分泌機能不全と気道感染を伴う典型的な CF を呈する．軽度の機能異常を伴う変異や多型のヘテロ接合体を持つ場合，単一臓器に障害を起こす非定型的病態（nonclassic CF）を発症しやすい¹⁰⁾．これは *CFTR* 関連疾患とも呼ばれ，特発性慢性膵炎^{2,3,13)}，先天性両側完全精管欠損症¹¹⁾，気管支拡張症¹²⁾，鼻ポリープなどが含まれる^{2,3,10)}．

慢性膵炎は反復する炎症，線維化，外分泌不全を呈する疾患で，膵石を伴うことが多い．主な成因は，アルコール性および特発性である⁴⁾．膵液の pH は膵導管の *CFTR* による HCO³⁻ 分泌によって調節されており，*CFTR* 機能の低下により膵液が粘稠になると炎症や膵石形成が起りやすくなることが発症機序の一つと考えられている⁵⁾．

CFTR 遺伝子は 27exon よりなり1480アミノ酸残基をコードする．これまでに1000以上の変異・多型が報告されているが，その種類と頻度は民族により異なる．我々はこれまでに，日

本人の慢性膵炎患者および健常人の *CFTR* 遺伝子型を解析し，Exon9 のスプライシング調節部位における遺伝子多型と疾患との関連や，疾患群に多く見られる遺伝子多型を同定してきた⁶⁾．

CFTR は汗腺では Cl⁻ の再吸収に必要なため，*CFTR* 機能が低下すると汗の Cl⁻ 濃度が高くなる．慢性膵炎患者の汗の Cl⁻ 濃度を測定した結果，約半数が基準値（60 mM）を超える高濃度を示した⁷⁾．即ち，わが国の慢性膵炎の一部にも *CFTR* 遺伝子の関連が示唆された．しかし，表現型と遺伝子型が一致しない症例もあった．

これまでは主に遺伝子の翻訳領域の変異および多型を解析してきたが，タンパクの発現量も考慮に入れる必要がある．遺伝子の翻訳領域の上流にはプロモーター領域があり，様々な転写調節因子が結合することによって発現量が調節されている．ヒトにおける *CFTR* 遺伝子の発現調節機構には不明な点が多いが，Exon1 の上流1.6 kb 付近までに，各種転写因子が作用すると推定されるシス作用性配列が存在する¹⁴⁾．

本研究はヒトの *CFTR* 遺伝子のプロモーター領域の変異および多型が，本遺伝子の発現調節および *CFTR* 機能への作用を介して慢性膵炎発症リスクに及ぼす影響を明らかにすることを目的とする．

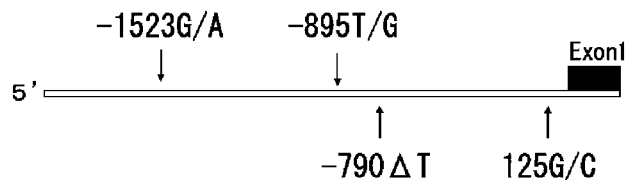


図1 *CFTR* 遺伝子プロモーター領域の変異・多型

表1 *CFTR* 遺伝子プロモーター領域における変異・多型の頻度

変異・多型	-1523 G/A G/A	-895 T/G T/G	-790 delT delT	125 C G/C
アルコール性 慢性膵炎 n=65	GG 64(98.5) GA 1(1.5) AA 0(0.0)	TT 18(27.7) TG 28(43.1) GG 19(29.2)	9T/9T 62(95.4) 9T/8T 3(4.6) 8T/8T 0(0.0)	GG 54(83.1) GC 10(15.4) CC 1(1.5)
特発性 慢性膵炎 n=23	GG 118(100.0) GA 0(0.0) AA 0(0.0)	TT 8(34.8) TG 9(39.1) GG 6(26.1)	9T/9T 23(100.0) 9T/8T 0(0.0) 8T/8T 0(0.0)	GG 22(95.7) GC 1(4.3) CC 0(0.0)
健常人 n=118	GG 118(100.0) GA 0(0.0) AA 0(0.0)	TT 30(25.4) TG 67(56.8) GG 21(17.8)	9T/9T 118(100.0) 9T/8T 0(0.0) 8T/8T 0(0.0)	GG 105(89.0) GC 13(11.0) CC 0(0.0)

(%)

B. 研究方法

インフォームドコンセント(名古屋大学医学研究科倫理委員会にて承認を得た「慢性膵炎における膵炎関連遺伝子の検討」, 承認番号114-2)を得た慢性膵炎患者88人(アルコール性慢性膵炎患者65人, 特発性慢性膵炎患者23人)および健常人118人を対象に, 抹消血から白血球由来のDNAを抽出した. *CFTR* 遺伝子翻訳領域の上流約2 kbをPCR法により増幅し, 直接シーケンス法で遺伝子配列を決定した. 転写調節因子の結合配列モチーフ検索にはTFSEARCHを用いた.

C. 研究結果

CFTR 遺伝子のプロモーター領域における遺伝子変異・多型

図1に*CFTR* 遺伝子のプロモーター領域(Exon1の上流約2 kbp)に同定された遺伝子変異・多型を示す. -1523 G/Aはアルコール性慢性膵炎患者群にのみ1例見つかった. -790 ΔTはアルコール性慢性膵炎患者群にのみ3例見つかった. 変異・多型の頻度を表1に示す.

Haplotype 解析

既に解析済みの翻訳領域の遺伝子多型の結果から, -790 Δtを持つ症例のHaplotypeを解

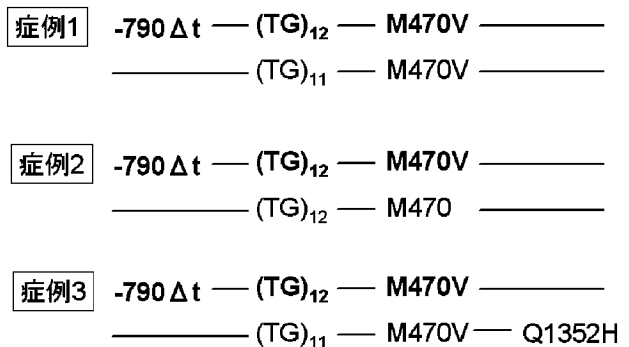


図2 -790 Δtを持つ症例のHaplotype

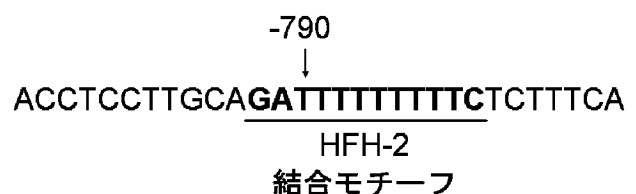


図3 -790付近の転写調節因子結合配列モチーフ

析した. -790 ΔtはIntron8の繰り返し配列(TG)₁₂, Exon10の多型M470Vと同一アレル上にあり, Exon22の多型Q1352Hは同一アレル上にないことがわかった(図2).

転写調節因子結合配列モチーフ検索

CFTR 遺伝子の-790付近の配列に存在する転写調節因子結合モチーフをTFSEARCHにより解析した結果, 転写調節因子TFH-2(FOXD3)の結合モチーフがあることがわかった(図3).

D. 考察

日本におけるCFの発症率は極めて低く⁸⁾, これまで報告のある*CFTR*遺伝子の変異も世界的に極めて稀なタイプのものである⁹⁾. しかし, 我々はこれまでに日本人の慢性膵炎患者の*CFTR*機能解析(汗中Cl⁻濃度測定)⁷⁾や*CFTR*遺伝子多型を解析し⁶⁾, 日本の慢性膵炎と*CFTR*遺伝子との関連を示唆する結果を得てきた. しかし, 表現型と遺伝子型は必ずしも一致しないことから, 本研究では, 遺伝子発現量の減少や, 発現量の上昇による機能低下の補填などの可能性を考え, 遺伝子発現の調節領域の変異・多型解析を行った.

今回行った*CFTR*遺伝子のプロモーター領域(翻訳領域の上流約2 kb)の解析で, アルコール性慢性膵炎患者に特有の変異-1523 G/A および-790 ΔTを同定した. 特に, -790 ΔTはアルコール性慢性膵炎患者にのみ3例(4.6%, アレル頻度2.3%)見つかり, 疾患との関連が示唆された. この変異に関してはトルコ人のCF家系での報告¹⁶⁾はあるが, その他の人種での報告はなく, 疾患との関連も不明である.

-790付近には, 転写調節因子HFH-2 (FOXD3)の結合配列モチーフGATTTTTTTTTCがある. この転写因子は膵臓で発現が認められているが¹⁷⁾, *CFTR*遺伝子発現機構との関連は不明である.

今後これら変異・多型が遺伝子発現量に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイ法で測定する予定である.

E. 結論

慢性膵炎患者および健常人の*CFTR*遺伝子プロモーター領域の解析を行った結果, 患者に特有な変異-1523 G/A および-790 ΔTが見つかった. -790付近は転写調節因子HFH-2 (FOXD3)の結合配列モチーフを持つことがわかった.

F. 参考文献

1. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Mechanisms of disease: Cystic fibrosis. N Eng J Med 2005; 352: 1992-2001.
2. Cohn JA. Reduced *CFTR* function and the pathobiology of idiopathic pancreatitis. J Clin Gastroenterol 2005; 39: s70-77.
3. Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Fujiki K, Hayakawa T. Cystic fibrosis and related diseases of the pancreas. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2002; 16: 511-526.
4. 税所宏光, 他: 慢性膵炎の実態調査, 厚生労働省特定疾患対策事業「難治性膵疾患に関する調査研究班」平成12年度研究報告書, 2001; p43-53
5. 成瀬 達, 藤木理代, 石黒 洋, 慢性膵炎の発症機序と*CFTR*, 最新医学 2007; 62: 62-68.
6. Fujiki K, Ishiguro H, Ko SBH, et al. Genetic evidence for *CFTR* dysfunction in Japanese: background for chronic pancreatitis. J Med Genet 2004; 41: e55.
7. Naruse S, Ishiguro H, Suzuki Y, et al. A finger sweat chloride test for the detection of the high-risk group of chronic pancreatitis. Pancreas 2004; 28: e80-5.
8. 成瀬 達, 他: 第3回膵囊胞線維症全国疫学調査の集計結果について「難治性膵疾患に関する調査研究」平成17年度総括, 分担研究報告書, p123-130, 2006.
9. 吉村邦彦, 他: わが国の囊胞線維症症例における*CFTR*遺伝子変異に関する解析「難治性膵疾患に関する調査研究」平成18年度総括, 分担研究報告書, p261-264, 2007.
10. Noone PG, Zhou Z, Silverman LM, Jowell PS, Knowles MR, Cohn JA. Cystic fibrosis gene mutations and pancreatitis risk: relation to epithelial ion transport and trypsin inhibitor gene mutations. Gastroenterology 2001; 121: 1310-1319.
11. Anzai C, Morokawa N, Okada H, Kamidono S, Eto Y, Yoshimura K. *CFTR* gene mutations in Japanese individuals with congenital bilateral absence of the vas deferens. J Cyst Fibros. 2003; 2: 14-18.
12. Ngiam NS, Chong SS, Shek LP, Goh DL, Ong KC, Chng SY, Yeo GH, Goh DY. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene mutations in Asians with chronic pulmona-

ry disease: a pilot study J Cyst Fibros. 2006; 5: 159-164.

3. その他

該当なし

13. 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.
14. McCarthy VA, Harris A. The CFTR gene and regulation of its expression. Pediatr Pulmonol. 2005; 40(1): 1-8. Review
15. TFSEARCH. <http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>
16. Cystic Fibrosis Mutation Database. <http://www3.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>
17. Perera HK, Caldwell ME, Hayes-Patterson D, Teng L, Peshavaria M, Jetton TL, Labosky PA. Expression and shifting subcellular localization of the transcription factor, Foxd3, in embryonic and adult pancreas. Gene Expr Patterns. 2006; 6: 971-7.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし

2. 学会発表

- 1) 藤木理代, 石黒 洋, 中莖みゆき, 山本明子, 北川元二, 近藤孝晴, 成瀬 達. アルコール性慢性膵炎患者の *ALDH2* および *CFTR* 遺伝子多型の解析. 第39回日本膵臓学会大会(神奈川), 2008年7月30-31日
- 2) 藤木理代, 石黒 洋, 中莖みゆき, 山本明子, 北川元二, 近藤孝晴, 成瀬 達. The genetic background of *CFTR* and *ALDH2* is related to alcoholic chronic pancreatitis in Japanese. 16th United European Gastroenterology Week (Austria), 2008年10月18-22日

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

膵嚢胞線維症における SLC26 の役割

研究報告者 石黒 洋 名古屋大学大学院医学系研究科健康栄養医学・准教授

共同研究者

山本明子, Song Ying, 近藤孝晴（名古屋大学大学院医学系研究科健康栄養医学）

洪 繁（名古屋大学大学院医学系研究科消化器内科学）, 成瀬 達（三好町民病院）

【研究要旨】

強制発現系を用いた研究により, SLC26A6 Cl^- - HCO_3^- exchanger の活性は CFTR に依存し, 両者は協調して HCO_3^- 輸送を担うとされている. 本研究では, モルモットの膵臓から単離した小葉間膵管を用いて *in vivo* における機能連関を検討した. BCECF を用いて細胞内 pH を測定し, アルカリ負荷後の管腔内 Cl^- に依存する HCO_3^- 分泌 (Cl^- - HCO_3^- exchange) を測定した. cAMP 刺激下の Cl^- - HCO_3^- exchange 活性は, CFTRinh-172 (CFTR の阻害剤) を加えると増強された. SLC26A6 Cl^- - HCO_3^- exchanger は CFTR を代償する.

A. 研究目的

cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) は, 膵導管や気道上皮などに発現する陰イオンチャネルであり, 膵嚢胞線維症 (cystic fibrosis; CF) の原因分子である. 強制発現系を用いた研究により, CFTR は, SLC26 陰イオン輸送体ファミリー蛋白と分子複合体を形成することにより, HCO_3^- 輸送を担うと考えられている¹⁾. また, 従来から, 膵導管細胞の管腔膜に Cl^- - HCO_3^- exchange 活性が存在し, その活性は機能的な CFTR の存在下でのみ cAMP によって刺激されることが報告されていた²⁾ が, 責任分子は不明であった. 最近, SLC26 のいくつかは, 上皮膜組織の管腔膜に発現し, Cl^- - HCO_3^- exchanger として機能することがわかってきた³⁾. 膵導管細胞には, SLC26A3 と SLC26A6 が存在する⁴⁾ が, 生理学的なデータから SLC26A6 が主要な Cl^- - HCO_3^- exchanger であろうと考えられている (図 1)^{5,6)}. *slc26a6* ノックアウトマウスでは, 単離膵管の管腔膜における (HCO_3^- 分泌方向の) Cl^- - HCO_3^- exchange 活性が小さい⁷⁾.

本研究計画は, 膵液の HCO_3^- 濃度がヒトと同様に高いモルモットの膵臓から単離した小葉間膵管を用いて, 管腔膜の Cl^- - HCO_3^- exchanger の分子実体, HCO_3^- 分泌における生

理学的役割, CFTR との機能連関, 膵嚢胞線維症と慢性膵炎の発症/進展への関与を明らかにすることを目的とする. 昨年度は, 単離膵管に SLC26A6 と SLC26A3 の mRNA が発現していることを確認し, 管腔内の Cl^- 濃度が高い条件 (腺房に近い末梢の膵管に対応する. 図 1) では, SLC26A6 による Cl^- - HCO_3^- exchange が HCO_3^- 分泌の多くを担っていることを明らかにした⁸⁾. 今年度は, SLC26A6 による Cl^- - HCO_3^- exchange と CFTR の機能連関を解析した.

B. 研究方法

①モルモットから膵臓を摘出し, コラゲナーゼで処理した後, 実体顕微鏡下で直径約 100 μm の小葉間膵管を単離した. pH 感受性蛍光色素である BCECF を用いた microfluorometry により細胞内 pH を測定した. 単離膵管を microperfusion し, 表層を HCO_3^- - CO_2 緩衝液で, 管腔内を HCO_3^- を含まない Hepes 緩衝液 (140 mM Cl^-) で灌流し, acetate pulse (20 mM) により膵導管細胞にアルカリ (HCO_3^-) 負荷した (図 2). 表層灌流液に H_2DIDS (0.5 mM) を加えて基底側膜を介する HCO_3^- efflux を阻害しておけば, 細胞内 pH の変化 (低下) を測定することにより管腔膜を介する Cl^- 依存

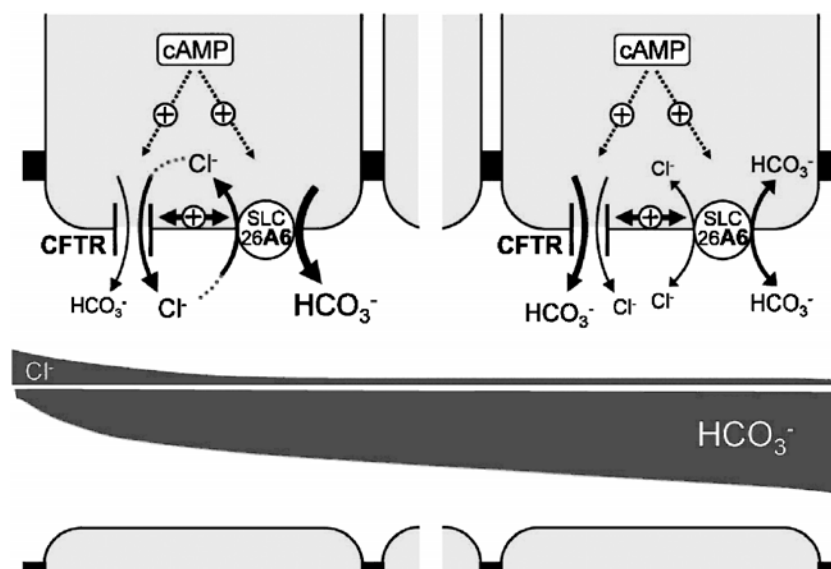


図1 膵導管細胞の HCO₃⁻ 分泌における SLC26A6 の役割(仮説)

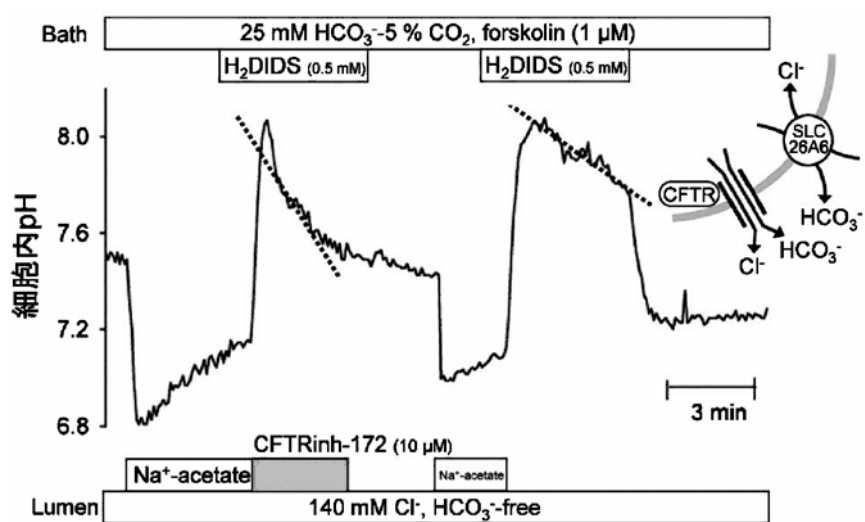


図2 CFTR 阻害剤が Cl⁻ 依存性 HCO₃⁻ 分泌に及ぼす影響

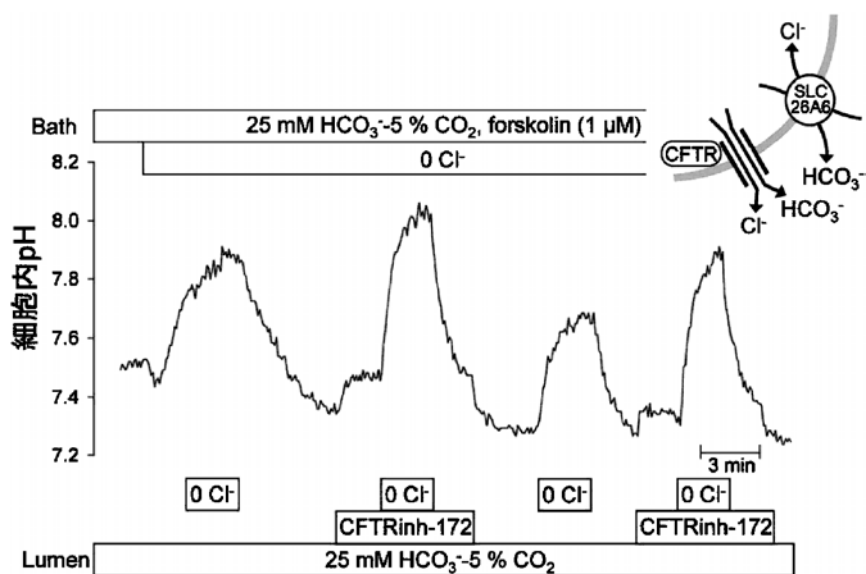


図3 CFTR 阻害剤が Cl⁻-HCO₃⁻ 交換輸送に及ぼす影響

性の HCO_3^- efflux (HCO_3^- 分泌)を経時的に観察することができる。

②単離膵管の表層と管腔内を HCO_3^- - CO_2 緩衝液で灌流し、管腔灌流液の Cl^- 除去および負荷による細胞内 pH の変化から管腔膜上の Cl^- - HCO_3^- exchange 活性を解析した(図 3)。管腔灌流液の Cl^- 除去による細胞内 pH の上昇は細胞内 Cl^- ⇌ 管腔内 HCO_3^- 交換輸送、管腔内 Cl^- 負荷による細胞内 pH の低下は管腔内 Cl^- ⇌ 細胞内 HCO_3^- 交換輸送を示す。

(倫理面への配慮)

動物実験は名古屋大学医学部動物実験委員会の承認(承認番号20020)を受けて行った。

C. 研究結果

①実験は、forskolin ($1\ \mu\text{M}$)を用いて cyclic AMP によって最大刺激された条件で行った。CFTR 阻害剤としては、CFTRinh-172を $10\ \mu\text{M}$ の濃度で用いた。管腔内灌流液に CFTRinh-172を加えると、アルカリ (HCO_3^-) 負荷後の管腔膜を介する Cl^- 依存性の HCO_3^- 分泌が促進された(図 2)。

② 管腔内灌流液に CFTRinh-172 を加えると、管腔膜上の Cl^- - HCO_3^- exchange が促進された。

D. 考察

膵管上皮の管腔膜を介する HCO_3^- 分泌では、CFTR の anion conductance と SLC26 ファミリー輸送体による Cl^- - HCO_3^- exchange 機能が協調して効率のよい分泌が達成されていると考えられている(図 1)^{5,6)}。昨年度の研究において、モルモットの単離膵管には SLC26A6 と SLC26A3 の mRNA が発現しているが、 Cl^- 依存性の HCO_3^- 分泌が管腔内の H_2DIDS ($0.2\ \text{mM}$)により強く抑制されることから、管腔膜の主要な Cl^- - HCO_3^- exchanger は SLC26A6 と推定された⁸⁾。また、slc26a6 ノックアウトマウスでは、単離膵管の管腔膜における (HCO_3^- efflux 方向の) Cl^- - HCO_3^- exchange 活性が小さい⁷⁾。モルモット、マウスともに、管腔内の Cl^- 濃度が高い条件(腺房に近い末梢の膵管に対応する。図 1)では、SLC26A6 によ

る Cl^- - HCO_3^- exchange が HCO_3^- 分泌の多くを担っていると推定される⁶⁾。

膵液中の HCO_3^- は、腺房に近い細い膵管(介在部～小葉内～小葉間膵管の細い部分)から主に分泌され则认为られており、免疫組織学的検討により、この部位の膵管の管腔膜に CFTR と SLC26A6 が共存すると報告されている⁹⁾。CFTR 機能の消失した ΔF マウスから単離した膵管では Cl^- - HCO_3^- exchange 活性が小さく²⁾、また、強制発現系を用いた研究により、SLC26A6 Cl^- - HCO_3^- exchanger の活性は CFTR に依存すると報告されている¹⁾。しかし、活性化された CFTR と活性化された SLC26A6 の間の相互作用についての研究は行われていない。本年度は、モルモットの膵臓から単離した小葉間膵管を用いて *in vivo* における CFTR と SLC26A6 の機能連関を検討した。その結果、cAMP 刺激下において、管腔膜を介する Cl^- 依存性の HCO_3^- 分泌(図 2)と管腔膜上の Cl^- - HCO_3^- exchange 活性(図 3)はともに、CFTR を阻害すると増強された。末梢の膵管では、腺房からの Cl^- 分泌によって管腔内の Cl^- 濃度が高いと推定され、この状態では導管細胞内の Cl^- 濃度は比較的高い¹⁰⁾。CFTR の HCO_3^- 透過性は Cl^- に比べて小さい($0.2\sim 0.5$)ため¹¹⁾、この条件では、管腔膜上の CFTR は HCO_3^- よりも Cl^- を多く分泌してしまうが、SLC26A6 による Cl^- - HCO_3^- exchanger が代償していると考えられる。

E. 結論

モルモットの膵臓から単離した小葉間膵管を用いて細胞内 pH を測定することにより、SLC26A6 と CFTR の HCO_3^- 分泌における機能連関を検討した。cAMP 刺激下の管腔膜上の Cl^- - HCO_3^- exchange 活性は、CFTR を阻害すると増強された。SLC26A6 Cl^- - HCO_3^- exchanger は CFTR を代償する。

F. 参考文献

1. Ko SB, Zeng W, Dorwart MR, Luo X, Kim KH, Millen L, Goto H, Naruse S, Soyombo A, Tho-

- mas PJ, Muallem S. Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 343–50.
2. Lee MG, Choi JY, Luo X, Strickland E, Thomas PJ, Muallem S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in mouse submandibular and pancreatic ducts. *J Biol Chem* 1999; 274: 14670–7.
 3. Mount DB, Romero MF. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflügers Arch* 2004; 447: 710–21.
 4. Greeley T, Shumaker H, Wang Z, Schweinfest CW, Soleimani M. Downregulated in adenoma and putative anion transporter are regulated by CFTR in cultured pancreatic duct cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1301–8.
 5. Steward MC, Ishiguro H, Case RM. Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 377–409.
 6. Ishiguro H, Steward M, Naruse S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and SLC26 transporters in HCO_3^- secretion by pancreatic duct cells. *Sheng Li Xue Bao (Acta Physiologica Sinica/Chinese Journal of Physiology)* 2007; 59: 465–76.
 7. Ishiguro H, Namkung W, Yamamoto A, Wang Z, Worrell RT, Xu J, Lee MG, Soleimani M. Effect of Slc26a6 deletion on apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger activity and cAMP-stimulated bicarbonate secretion in pancreatic duct. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G447–55.
 8. 石黒 洋, Andrew Stewart, 山本明子, 中莖みゆき, 近藤孝晴, 洪 繁, 成瀬 達, 大槻眞 膵重炭酸イオン分泌における CFTR と SLC26 の機能連関の解析 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19年度総括・分担研究報告書 2008: 259–262.
 9. Shcheynikov N, Wang Y, Park M, Ko SB, Dorwart M, Naruse S, Thomas PJ, Muallem S. Coupling modes and stoichiometry of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange by slc26a3 and slc26a6. *J Gen Physiol* 2006; 127: 511–524.
 10. Ishiguro H, Naruse S, Kitagawa M, Mabuchi T, Kondo T, Hayakawa T, Case RM, Steward MC. Chloride transport in microperfused interlobular ducts isolated from guinea-pig pancreas. *J Physiol* 2002; 539: 175–189.
 11. Linsdell P, Tabcharani JA, Rommens JM, Hou YX, Chang XB, Tsui LC, Riordan JR, Hanrahan JW. Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions. *J Gen Physiol* 1997; 110: 355–364.
- 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

膵導管細胞機能障害と CFTR クロライドチャネルの細胞内局在

研究報告者 石黒 洋 名古屋大学大学院健康栄養医学 准教授

共同研究者

洪 繁（名古屋大学大学院消化器内科），水野伸匡（愛知県がんセンター中央病院消化器内科）
山本明子（名古屋大学大学院健康栄養医学），後藤秀実（名古屋大学大学院消化器内科）
山雄健次（愛知県がんセンター中央病院消化器内科），成瀬 達（三好町民病院）

【研究要旨】

【目的】膵液中の重炭酸イオン(HCO_3^-)は導管細胞の管腔膜に存在する CFTR チャネルの働きにより分泌される。慢性膵炎などでは導管細胞からの HCO_3^- 分泌機能障害を特徴とするが、その分子機序は不明である。そこで、 HCO_3^- 分泌機能障害の分子機構を明らかにするために、自己免疫性膵炎患者(AIP)の膵外分泌機能および CFTR クロライドチャネルの関与について検討した。【成績】AIP では、セクレチン試験で膵液中最高重炭酸塩濃度が低下していた。抗 CFTR 抗体を用いた免疫組織化学染色法で、CFTR は膵導管細胞の管腔膜上への発現が減少していた。【結論】AIP では、導管細胞管腔膜上への CFTR の発現が障害されることが HCO_3^- 分泌機能不全の本態である可能性が疑われた。

A. 研究目的

CFTR はヒトの膵導管細胞の管腔膜に発現するクロライドチャネルであり、遺伝子変異により機能が障害されると嚢胞線維症を発症する。ヒトの膵導管細胞は体液の中でも最もアルカリの消化液を分泌するが、このアルカリの分泌には嚢胞線維症の原因遺伝子である CFTR クロライドチャネルが重要な働きをしている。膵液中の重炭酸イオン(HCO_3^-)は導管細胞の管腔膜に存在する CFTR チャネルと同じく膵導管細胞管腔膜上に存在する SLC26 陰イオン交換輸送体の働きにより管腔内に分泌される。慢性膵炎や自己免疫性膵炎の膵障害では、導管細胞からの HCO_3^- 分泌機能障害を特徴とするが、その障害の詳細な分子機構は不明であり、膵導管細胞からの HCO_3^- 分泌に関わるチャネルや輸送体の関わりについてはほとんど明らかではない。

本研究では、膵疾患の膵導管細胞機能障害における CFTR チャネルの役割について検討することを目的とする。膵外分泌機能はセクレチン試験を用いて導管細胞機能を評価する。膵導管細胞機能障害における CFTR チャネルの役

割については、自己免疫性膵炎患者からの膵生検組織を材料に、抗 CFTR 抗体を用いた免疫組織化学染色法で CFTR チャネルの細胞内局在を検討することで解析した。

B. 研究方法

1. 膵外分泌機能検査

自己免疫性膵炎患者の膵外分泌機能は、Secreflo（合成ブタセクレチン：Repligen, USA）又は ChiRhoStim 80 U（合成ヒトセクレチン：ChiRhoClin, Inc. USA）を用いたセクレチン試験で評価した。膵導管細胞機能として液量及び最高重炭酸塩濃度を測定した。各測定項目の正常値は各々、液量 ≥ 183 ml/h, 最高重炭酸塩濃度 ≥ 80 mEq/L である。

2. 膵生検

愛知県がんセンター中央病院消化器内科において、膵癌の除外診断のため膵生検が行われた自己免疫性膵炎を対象とした。通常の超音波内視鏡を用いた膵画像検査に引き続き、超音波内視鏡ガイド下に19ゲージ生検針を用いて膵生検を行った。得られた膵組織は、抗 CFTR 抗体を用いた免疫化学染色法で CFTR クロライ

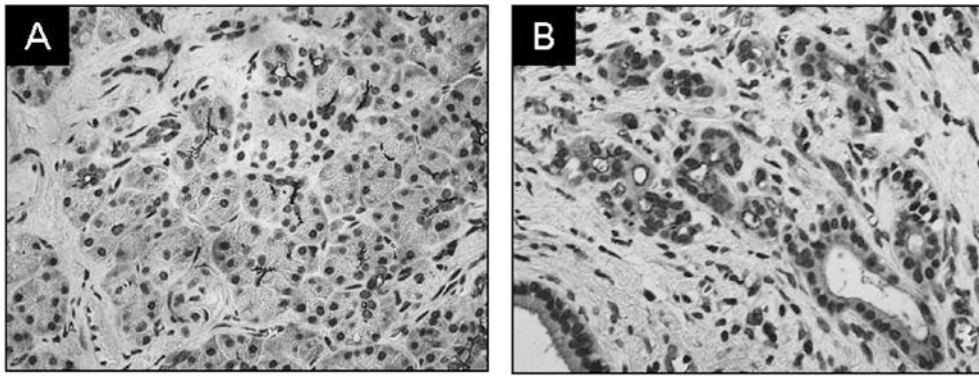


図 1

ドチャネルの細胞内局在について検討した。
(倫理面への配慮)

それぞれの患者に対しては、膵生検の目的、危険性などについて文書及び口頭で説明し、文書で同意を得た。得られた生検組織の研究目的使用に関しては、愛知県がんセンター中央病院の倫理委員会の承認を得ている。また各患者より文書で同意を得た。

C. 研究結果

自己免疫性膵炎では、セクレチン試験を用いた膵外分泌機能検査で、液量(144 ± 32 ml/h; $n = 5$)及び最高重炭酸塩濃度(51.2 ± 14.9 mEq/L; $n = 5$)は有意に低下していた。健常人の膵では、抗 CFTR 抗体を用いた免疫組織化学染色法で、CFTR は細い膵導管細胞の管腔膜にのみ局在していた(図 1A)。一方、自己免疫性膵炎患者の膵組織では、CFTR の管腔膜への発現は減少していた(図 1B)。

D. 考察

膵液はヒトの体液の中で最も高濃度の重炭酸イオン(~ 140 mM)を含んでいるが、この膵導管細胞からの HCO_3^- 分泌に、膵嚢胞線維症の原因遺伝子である CFTR クロライドチャネルがもっとも重要な働きをしていることが明らかとなってきた。膵では細い導管細胞が HCO_3^- 分泌の場であるが、CFTR はこの細い導管細胞の管腔膜にのみ発現している。これまでの研究の結果、ヒトやモルモットなどの高い濃度の HCO_3^- を含む膵液を分泌する導管細胞上皮では、CFTR クロライドチャネルが $\text{SLC26 Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送体の活性を直接調節すること

で HCO_3^- 分泌を制御するメカニズムと、 HCO_3^- が直接導管細胞管腔膜の CFTR チャネルを通過し管腔内に分泌される二つのメカニズムが考えられている。いずれの場合でも、膵導管細胞上皮においては CFTR チャネルの活性が管腔に分泌される HCO_3^- 濃度を決定する。

慢性膵炎や自己免疫性膵炎の膵では、膵外分泌機能障害特に導管細胞機能障害を認めることが報告されているが、これまでの研究では導管細胞からの HCO_3^- 輸送不全における CFTR の役割について検討した報告はない。

今回我々は、特殊な膵炎である自己免疫性膵炎患者の膵外分泌機能をセクレチン試験で評価したところ、著名な水分分泌不全、 HCO_3^- 分泌機能不全を認めた。これらの導管細胞機能不全では、導管細胞管腔膜に存在し Cl^- や HCO_3^- 輸送に関わる膜蛋白特に CFTR チャネルが関わっている可能性があると考えられたため、抗 CFTR 抗体を用いた免疫組織化学染色法で CFTR クロライドチャネルの細胞内局在について検討した。

本研究の結果、導管細胞管腔膜上に存在する CFTR クロライドチャネルの発現量が自己免疫性膵炎患者の膵では、健常人に比べ有意に減少していることが明らかとなった。即ち、膵疾患の導管細胞機能不全特に HCO_3^- 輸送不全に関しては CFTR チャネルの細胞内局在異常が関わっていることが明らかとなった。

E. 結論

自己免疫性膵炎の膵導管細胞機能障害では、導管細胞管腔膜上への CFTR の発現が障害されることが、 HCO_3^- 分泌機能不全の本態であ

る可能性が疑われた。

F. 参考文献

1. Ko SB, Shcheynikov N, Choi JY, Luo X, Ishibashi K, Thomas PJ, Kim JY, Kim KH, Lee MG, Naruse S, Muallem S. A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in cystic fibrosis. *EMBO J*. 2002; 21(21): 5662-72.
2. Ishiguro H, Namkung W, Yamamoto A, Wang Z, Worrell RT, Xu J, Lee MG, Soleimani M. Effect of Slc26a6 deletion on apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger activity and cAMP-stimulated bicarbonate secretion in pancreatic duct. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 292(1): G447-55.
3. Yamao K, Sawaki A, Mizuno N, Shimizu Y, Yatabe Y, Koshikawa T. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (EUS-FNAB): past, present, and future. *J Gastroenterol*. 2005; 40(11): 1013-23.
4. Ito T, Kawabe K, Arita Y, Hisano T, Igarashi H, Funakoshi A, Sumii T, Yamanaka T, Takayanagi R. Evaluation of pancreatic endocrine and exocrine function in patients with autoimmune pancreatitis. *Pancreas*. 2007; 34(2): 254-9.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表
 - 1) 洪 繁, 水野伸匡, 後藤秀実
「膵外分泌機能からみた自己免疫性膵炎に対するステロイド投与の意義」
第50回 日本消化器病学会大会
シンポジウム11「自己免疫性膵炎の診断, 治療: ステロイド投与の意義」
 - 2) 水野伸匡, 洪 繁, 後藤秀実, 山雄健次
「自己免疫性膵炎および特発性慢性膵炎における膵内・外分泌機能相関」
第39回 日本膵臓学会大会
ワークショップ4「膵内・外分泌の基礎と

臨床: 相互相関をめぐって」

- 3) 水野伸匡, 洪 繁, 山雄健次
「自己免疫性膵炎に対するステロイド治療効果判定における機能検査の重要性」
第15回 日本消化器病関連学会週間
シンポジウム14「消化器の機能と治療をめぐって」
- 4) 洪 繁, 成瀬 達, 後藤秀実
「自己免疫性膵炎患者における膵外分泌機能の長期予後」
第38回日本膵臓学会大会
パネルディスカッション4「自己免疫性膵炎の長期予後」

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

