

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, 近藤志保 (名古屋大学大学院健康栄養医学)

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 (慶応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) が疑われた16症例の CFTR 遺伝子解析を行った。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 (7), E217G(1), L441P(2), 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), H1085R(1), 182delT(1), R75X(1), R347H(1), 1609delCA(1), G542X(1), Y563H(1)の9種との合計17種の CF 原因変異が検出された(括弧内はアレル数)。うち6種はナンセンスコドンを生じる変異である。Y517H, Q1042TfsX5 は新規変異である。4アレルでは CF 原因変異が検出されなかったが, そのうち2アレルは気管支拡張症を呈する38歳女性のものである。この女性の鼻粘膜スワブを用いて CFTR 転写体解析を行ったところ, 全長が保存されている 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。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。

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。本研究では, 2007年以降, 臨床症状と汗中 Cl^- 濃度の高値により CF が疑われた16名(表1)の患者の CFTR 遺伝子変異を同定することを目的として, 以下の解析を行った。

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

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。それぞれのゲノム 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)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(図4)^{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

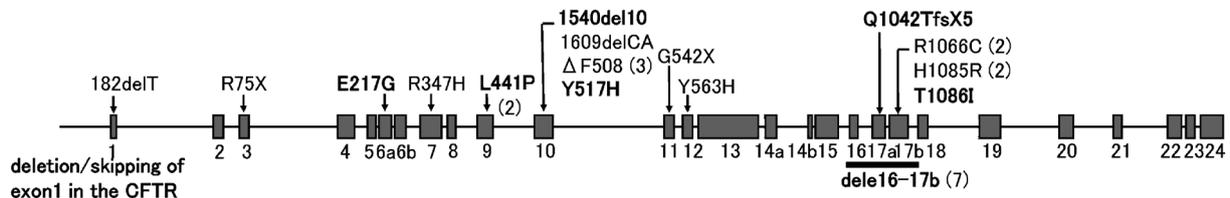
図1に示す CF 原因変異が検出された(表

1). アジア人に特有な dele16-17b³⁾, E217G⁴⁾, L441P⁵⁾, 1540del10⁶⁾, Y517H, Q1042TfsX5, T1086I, exon 1 欠損トランスクリプト³⁾の 8 種, 及び欧米で報告例のある 182delT⁷⁾, R75X⁸⁾, R347H⁹⁾, F508del¹⁰⁾, 1609delCA¹¹⁾, G542X¹²⁾, Y563H¹³⁾, R1066C¹⁴⁾, R1085R¹⁵⁾の 9 種, 合計 16 種の CF 原因変異が検出された(図 1, 表 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. Y517H と Q1042TfsX5 はこれまでに報告の無い新規変異である. 4 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

MLPA 解析は, 各エクソンに対応するピークの相対的な高さによってゲノム上でのエクソンの欠損や重複を検出する¹⁾. 7 アレルに dele16-17b 変異が検出され, 5 症例はヘテロ接合体, 1 症例はホモ接合体であった. 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で dele16-17b 変異であることを確かめた.

MLPA キットには, F508 に対応する probe が含まれている. [delta]F508(c.1521_1523delCTT)変異があると F508 を示すピークが減少する. シーケンスで [delta]F508 変異が検出された症例では, MLPA でも [delta]F508 変異が検出された(表 1).



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 1 わが国の嚢胞性線維症患者に検出された CF 原因変異

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 ⁻ (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	L441P	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	117	○	○	無し	無し
13	38歳	女	ND	ND	54	無し	○	無し	無し
14	6ヶ月	男	Y563H	H1085R	100-120	○	不明	無し	無し
15	36歳	女	dele16-17b	R347H	60	○	○	無し	無し
16	8ヶ月	女	L441P	H1085R	110	○	○	無し	無し

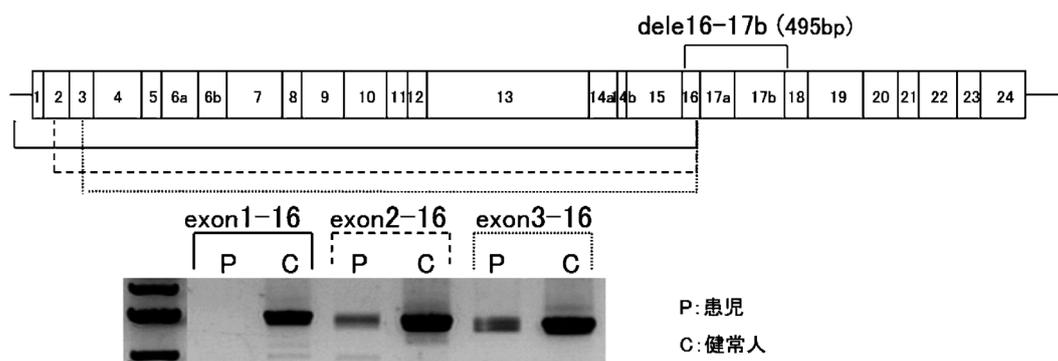
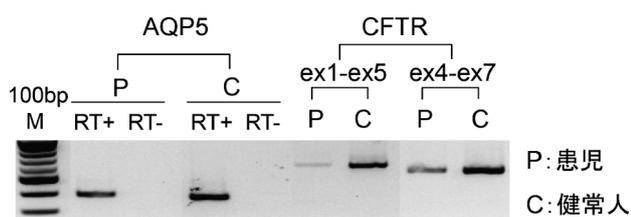


図2 鼻粘膜スワブから抽出した転写体の RT-PCR (症例 2)



	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3 鼻粘膜スワブから抽出した転写体の RT-PCR (症例 13)

その他の genomic rearrangement は認められなかった。

3. CFTR mRNA の解析

症例 2 の鼻粘膜スワブより抽出した CFTR 転写体の RT-PCR により, exon 1 欠損トランスクリプトを検出した。症例 2 では, 片方のアレルに dele16-17b 変異を持ち, 他方のアレル由来のトランスクリプトが exon 1 を欠損していることが分かった(図 2)³⁾。

症例 13 では, exon 4-7 の PCR で患者の CFTR 転写体量が健常人の約 50% に減少し, exon 1-4 の PCR で患者の CFTR 転写体量が健常人の約 10% に減少していた(図 3)。

D. 考察

本研究で CFTR 遺伝子解析を行った 32 アレルのうち, アジア人種特有と思われる変異が 15 アレルに検出された。その中の 2 種の変異は, これまでに報告の無い新規の変異である。わが国で未知の CFTR 遺伝子変異をもつキャ

リアーの存在が示され, わが国の CF あるいは CFTR 関連疾患の CFTR 遺伝子解析を行う場合は, 全エクソンのシーケンス解析の必要性が再認識された。

症例 10 は, R1066C (exon 17b) のホモ接合体であった。シーケンス波形上でエクソン 16~17b の領域の遺伝子変異のホモ接合体に見える場合, その変異と dele16-17b 変異のヘテロ接合体である可能性を疑い, MLPA 解析を行う必要がある。CFTR 遺伝子上の large genomic rearrangement は欧米を中心に 30 種類以上報告されている¹⁶⁾。今回解析した 32 アレル中 13 アレルに欧米型の変異が検出されており, 今後 dele16-17b の他にも large genomic rearrangement を持つ CF 症例が現れる可能性がある。全エクソンのシーケンス解析に加え, MLPA 解析により両方のアレルが欠損, 重複なく保存されていることを確認する必要がある。

症例 2 では, 鼻粘膜トランスクリプトの解析により, exon 1 を欠いた CFTR トランスクリプトが存在することが明らかになった。通常 of 転写開始位置よりも上流から転写が開始され通常とは異なったスプライシング機構が働いているのか¹⁷⁾, exon 1 を欠く CFTR タンパクが合成され細胞膜に発現しているのか, exon 1 を欠く CFTR はチャネル機能を持つのか, 今後解析する必要がある。

重篤な気管支拡張症を呈する女性患者(症例 13)では, 鼻粘膜トランスクリプトの解析により exon 1 から始まる CFTR 転写体の量が健常人の 10% 程度に減少していることが示された。この患者の TG repeat 多型 (intron 8) が 12/12

(TG)であったことから、この転写体の一部はさらに exon 9 をスキップしていると推定されるため¹⁸⁾、鼻粘膜における正常な CFTR タンパクの発現量は10%よりさらに低いと推定される。この患者は汗中 Cl⁻ 濃度は境界領域であり、膵外分泌機能も保たれている。この患者の病態は、pancreatic sufficient の比較的軽症の CF あるいは CFTR 関連疾患に相当すると考えられる。

本研究で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、32アレル中5アレル(16%)には、CF 原因遺伝子変異が検出されなかった。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。

膵嚢胞線維症(嚢胞性線維症)登録制度が発足し、ドルナーゼアルファ(プルモザイム[®])、トブラマイシン吸入薬(トービイ[®])、パンクレリパーゼ(リパクレオン[®])といった CF 治療の基本となる薬剤が国内で発売になり、典型的な CF 症状を呈する前に CFTR 遺伝子検索を依頼され、CF 原因遺伝子が同定されるケースがある(症例14)。早期診断は早期治療開始につながり、予後と QOL が改善することになる。さらに精度の高い遺伝子検査ができるよう、体制を整えたい。

E. 結論

dele16-17b, E217G, L441P, 1540del10, T517H, Q1042TfsX5, T1086I, exon 1 欠損トランスクリプトは、アジア人種に特有な変異であり、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。ゲノム解析で CF 原因変異が検出されなかった気管支拡張症女性患者の鼻粘膜スワブを用いた CFTR 転写体解析により、全長が保存されている CFTR 転写体量は健常人の約10%に減少していることが示された。CFTR ゲノム遺伝子解析としては、全エクソンの直接シーケンスと MLPA 解析の実施が必要であるとともに、ゲノム解析で CF 原因変異が検出されない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。

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.
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 難治性膵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: 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: 2321-32.
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: 166-71.
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: 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: 141–51.
8. Will K, Dork T, Stuhmann M, von der Hardt H, Ellemunter H, Tummeler B, Schmidtke J. Transcript analysis of CFTR nonsense mutations in lymphocytes and nasal epithelial cells from cystic fibrosis patients. *Hum Mutat* 1995; 5: 210–20.
 9. Izumikawa K, Tomiyama Y, Ishimoto H, Sakamoto N, Imamura Y, Seki M, Sawai T, Takeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Mukae H, Yoshimura K, Kohno S. Unique mutations of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene of three cases of cystic fibrosis in Nagasaki, Japan. *Intern Med* 2009; 48: 1327–31.
 10. 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): 1066–73.
 11. 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: 75–6.
 12. Loirat F, Hazout S, Lucotte G. G542X as a probable Phoenician cystic fibrosis mutation. *Hum Biol* 1997; 69: 419–25.
 13. Křenková P, Piskáčková T, Holubova A, Balašáková M, Krulišová V, Čamajová J, Turnovec M, Libik M, Norambuena P, Štambergová A, Dvořáková L, Skalická V, Bartošová J, Kučerová T, Fila L, Zemková D, Vávrová V, Koudová M, Macek M, Krebsová A, Macek M Jr. Distribution of CFTR mutations in the Czech population: positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/*de novo* alleles and relevance for related/derived populations. *J Cyst Fibros* 2013; 12: 532–7.
 14. Casals T, Pacheco P, Barreto C, Giménez J, Ramos MD, Pereira S, Pinheiro JA, Cobos N, Curvelo A, Vázquez C, Rocha H, Sécúli 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: 387–92.
 15. Yoshimura K, Kawazono 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* 1999; 56: 173.
 16. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Cystic Fibrosis Mutation Data Base. <http://www.genet.sickkids.on>.
 17. Lewandowska MA, Costa FF, Bischof JM, Williams SH, Soares MB, Harris A. Multiple mechanisms influence regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; 43: 334–41.
 18. 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* 2004; 41: e55.
- 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: 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. JDDW2012 ワークショップ「遺伝性肝胆膵疾患の病態と治療」. 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