

アジア型変異 CFTR の発現と機能の解析

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

相馬義郎, 余 盈君(慶應義塾大学医学部薬理学教室)

山本明子, 中壘みゆき(名古屋大学総合保健体育科学センター)

洪 繁(慶應義塾大学医学部システム医学教室), 吉村邦彦(三井記念病院呼吸器内科)

藤木理代(名古屋学芸大学管理栄養学部), 神田康司(名古屋第二赤十字病院・小児科)

成瀬 達(みよし市民病院)

【研究要旨】

日本人で発見された病因性 CFTR 変異のうち11変異について、発現障害および機能障害を調べた。そのうち7種類は、蛋白は翻訳されるが成熟化に問題があり形質膜まで到達せず分解されてしまう(II型)障害および蛋白翻訳自体が認められない(I型)障害であると考えられた。また、形質膜に発現しているがチャンネル機能が障害されている(III・IV型)障害の変異体2種類の他、野生型に匹敵するチャンネル機能を保っている変異体2種類も認められた。II型変異体のいくつかについては genistein による活性増強が確認でき、これらの変異体を形質膜までリクルートできれば、形質膜上 CFTR 活性を治療領域まで増強できる可能性が示唆された。同じII型変異体のために開発された lumacaftor (VX-809)の日本人II型 CFTR 変異体への効果を調べることも有用であると考えられる。欧米において開発・使用されている CF 治療法の日本人 CF 患者への安全で効率的な適用のためには、日本人 CFTR 変異体の発現・機能研究は非常に重要である。

A. 研究目的

嚢胞性線維症(Cystic Fibrosis : CF) は cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) 遺伝子¹⁾の変異を原因として発症する常染色体劣性遺伝疾患である。この遺伝子産物である CFTR は全身の上皮膜細胞の細胞膜に発現して、陰イオンチャンネルとして機能して Cl^- や HCO_3^- などのイオン拡散透過路を形成するとともに他のイオン輸送体との機能的に相互作用を介して、上皮膜での水・イオン輸送において中心的な役割を果たしている²⁾。膵外分泌腺においては、強アルカリ性膵液の主要陰イオンである HCO_3^- の分泌を担っており、その機能障害により膵外分泌不全による消化不良・脂肪便を引き起こす^{3,4)}。

白人種には、大規模な病因性 CF 変異 F508del の遺伝家系が存在し、白人種25人に1人の割合でヘテロの病因性変異を持ち、3000出生に1人の割合で CF 患者が生まれる³⁾。一方、白

人種に見られるような大規模な CF 変異系統がない、日本人を含めたアジア人には極めて稀な疾患である。しかし、少数ながら日本でも CF 患者が見つかり、それらの原因変異が明らかにされている⁵⁾。

遺伝子変異に基づく CFTR 蛋白の機能異常は、1) CFTR 蛋白の翻訳障害 (I 型)、2) CFTR 蛋白の翻訳後の成熟過程の異常による形質膜表面での発現障害 (II 型)、3) チャンネル開閉調節機能の障害 (III 型)、および 4) チャンネルポアにおける Cl^- の透過性障害 (IV 型) 等に大別される³⁾。最近、米国で、III 型変異体に直接作用してチャンネル機能を改善する薬剤 Ivacaftor (VX - 770)、および白人種で最も高頻度にみられる II 型変異体 F508del に直接作用して、成熟化を補助し形質膜での発現を改善する薬剤 Lumacaftor (VX-809) が開発され、FDA での認可を受けて、Kalydeco (Ivacaftor) および Orkambi (Lumacaftor /Ivacaftor 合剤) として販売・使用

表1 日本人病因性 CFTR 変異体の発現および機能障害

	ホールセル電流レベル		
	比較的大 (野生型レベル)	小	極小
成熟型	T633P, R347H	E267V, T1220I	M152R
未成熟型	Y517H	L441P, G85R*, G98R*, R1066C, T1086I*	

* Genistein (25 μ M) による増強あり

されている⁶⁾。

日本人 CFTR 変異が、どのタイプの障害を引き起こすのかを調べることは、上記のような CFTR 機能障害の直接的是正による CF の根本的治療を目指すために、非常に重要な第一歩である。

B. 研究方法(倫理面への配慮)

日本人 CFTR 変異体 cDNA を、Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞に導入し、変異 CFTR 蛋白発現を試みた⁷⁾。CFTR 蛋白の発現レベルはウエスタンブロッティングを用いて評価した。さらに、生成された CFTR 蛋白は、分子量の違いから、Golgi での糖鎖修飾を受ける前の未成熟型と、糖鎖修飾を受けて形質膜上に発現している成熟型に判別した。CFTR のチャネル機能評価のために、各 CFTR 変異体 cDNA を導入した CHO 細胞にホールセルクランプ法を適用して、形質膜上に発現している CFTR チャネルを通して流れた電流の測定をおこなった。未成熟型変異体の場合には、トランスフェクション後に低温(27°C)条件で培養することにより、形質膜での発現を促した。チャネル機能は、同量の cDNA をトランスフェクションした場合に得られた野生型 CFTR チャネルの電流レベルと比較することによって相対的に評価した。さらに、低活性 CFTR 変異体の活性増強薬 potentiator として知られている genistein の効果も調べた⁷⁾。

(倫理面への配慮)

本研究は、チャネル蛋白を強制発現させた培養細胞を用いた実験であり、特に倫理面への配慮が必要な研究は含まれていない。遺伝子組み換え実験はすべて慶應義塾大学の遺伝子組み換え実験に関する監査委員会に申請書を提出し、

認可を得たうえで実験を行なった。遺伝子組み換えベクターはすべてプラスミドであり、ウイルスベクターは使用していない。

C. 研究結果

日本人で発見された病因性 CFTR 変異のうち11変異を、それによる発現障害および機能障害の程度にしたがって分類すると表1のようになった。

D. 考察

日本で発見された病因性 CFTR 変異体 11 種類のうち、7種類は、生理的温度条件(37°C)下では、糖鎖修飾を受けていない未成熟型で、形質膜まで到達せず分解されてしまう II 型障害 (G85R, G98R, L441P, Y517H, R1066C, T1086I) もしくは発現自体が認められない I 型障害 (M152R) であると考えられた。また、形質膜に発現している成熟型変異体においては、電流量が小さくチャネル機能が障害されている III または IV 型障害 (E257V, T1220I) の他、野生型に匹敵するチャネル機能を保っている変異体 (T633P, R347H) も認められた。

形質膜上での機能発現がある程度は保たれていると考えられる T633P および R347H 変異による病態成立のメカニズムの解明は、重要かつ興味深い。CFTR が持つチャネル機能以外の、他のトランスポータの調節機能等の関与も考えられ、CHO 細胞以外の呼吸・膈管・消化管上皮系培養細胞でも実験をする必要がある。未成熟型変異体のいくつかについては、25 μ M genistein による活性増強効果が確認できた。未成熟型変異体を形質膜までリクルートできれば、genistein 等の活性増強効果によって形質膜上での変異 CFTR 活性を治療領域まで増強できる可能性が示唆された。同じ II 型変異体のた

めに開発された lumacaftor (VX - 809) の日本人未成熟型 CFTR 変異体への効果を調べることも有用であると考えられる。

E. 結論

日本人で発見された病因性 CFTR 変異体の発現および機能を *in vitro* で調べることにより、欧米において開発・使用されている CF 治療法の日本人 CF 患者への安全で効率的な適用に役立てることができると期待される。

F. 参考文献

1. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073.
2. Sohma Y, Hwang TC. Cystic Fibrosis and the CFTR anion channel. Eds. Zheng & Trudeau, *Handbook of Ion Channels*. CRC Press Taylor & Francis Books Inc. 2015; 627-648.
3. Cystic fibrosis mutation data base (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>)
4. 吉村 邦彦, 安斎 千恵子. 日本人の CFTR 遺伝子変異 腭嚢胞線維症の診療の手引き. (大槻 眞, 成瀬 達) *アークメディア* 2008; 14-15.
5. 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 難治性腭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.
6. Kuk K, Taylor-Cousar JL. Lumacaftor and ivacaftor in the management of patients with cystic fibrosis: current evidence and future prospects. *Ther Adv Respir Dis*. 2015; 9: 313-26.
7. Yu YC, Miki H, Nakamura Y, Hanyuda A, Matsuzaki Y, Abe Y, Yasui M, Tanaka K, Hwang TC, Bompadre SB, Sohma Y. Curcumin and genistein additively potentiate G551D-CFTR. *J. Cystic Fibrosis*. 2011; 10: 243-252.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表
 1. 相馬義郎, 余盈君, 中莖みゆき, 石黒 洋
日本人由来の変異 CFTR チャンネルの発現・機能とそれらの臨床像との関係
Expression, function and phenotype of CFTR mutants found in Japanese CF patient
第92回日本生理学会大会
神戸コンベンションセンター(神戸国際会議場・神戸国際展示場)
2015年3月21日(土) ~3月23日(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