

顆粒球の浸潤を伴う自己免疫性膵炎の病理組織学的検討

研究報告者 須田耕一 順天堂大学大学院人体病理病態学 教授

共同研究者

高瀬 優, 福村由紀, 柏木聡子, 内藤嘉紀, 阿部 寛, 柿沼千早 (順天堂大学大学院人体病理病態学)

【研究要旨】

本邦の自己免疫性膵炎 autoimmune pancreatitis (AIP) の典型的な組織像である lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis (LPSP) では、好酸球の浸潤を伴うことがあるが、好酸球の浸潤の有無による組織像の違いに関する検討はない。また欧米例の AIP には好中球の浸潤を認める idiopathic duct-centric chronic pancreatitis (IDCP) が含まれ、本邦の AIP とは臨床像が異なる。そこで、AIP において、顆粒球の浸潤の有無による組織像の違いを明らかにする。対象は上記に相当する AIP 7 例である。H.E./E.V.G. 染色での観察のほか、形質細胞に対し IgG4 の免疫組織化学染色を行い Kamisawa らの基準にほぼ準じて、高倍率で一視野あたりの陽性細胞数を評価した。すなわち、(-) を 0～9 個、(1+) を 10～29 個、(2+) を 30～99 個、(3+) を 100 個以上とした。7 例中、LPSP は 6 例 (59～68 歳、男/女は 5/1)、IDCP は 1 例 (28 歳、男) であった。LPSP では好酸球浸潤の著しい 3 例を浸潤 (+) 群、浸潤のない 2 例と散在性に認める 1 例を浸潤 (-) 群としたところ、小葉内・小葉間線維化、リンパ球・形質細胞の浸潤、膵小葉の萎縮と閉塞性静脈炎を全例に認め、IgG4 陽性形質細胞数は浸潤 (+) 群の 1 例で (1+)、他の 5 例で (2+) であった。リンパ濾胞は全例で認めたが、浸潤 (-) 群の 1 例では散在性で、リンパ節は浸潤 (-) 群では (+) 群に対し小さい傾向にあった。IDCP では LPSP 同様に小葉内・小葉間線維化、小葉萎縮を認め、リンパ節は小さかった。細胞浸潤は好中球が圧倒的に多く、リンパ球・形質細胞は軽度で、IgG4 陽性形質細胞は認められなかった。リンパ濾胞はごくわずかで、閉塞性静脈炎はリンパ球・形質細胞の浸潤部にわずかに認められた。以上より、AIP において、LPSP では好酸球浸潤の有無による組織像の違いはなく、IDCP ではリンパ球・形質細胞、リンパ濾胞の形成、リンパ節腫大および閉塞性静脈炎の所見に乏しく、IgG4 陽性形質細胞を認めない。

A. 研究目的

本邦の自己免疫性膵炎 autoimmune pancreatitis (AIP) は高齢男性に好発し、その典型的な組織像が lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis (LPSP)¹⁾ である。LPSP では、リンパ球・形質細胞の他に好酸球の浸潤を伴うことがあるが、好酸球浸潤の有無による組織像の違いに関する検討はない。

また欧米例の AIP には好中球の浸潤を認める例、すなわち idiopathic duct-centric chronic pancreatitis (IDCP)^{2,3)} が含まれる。それは若年発症で男女差がなく、炎症性腸疾患の合併が多く、本邦の AIP とは異なる臨床像を呈している。

そこで、今回 AIP において、顆粒球の浸潤の有無による組織像の違いを明らかにする。

B. 研究方法

対象は順天堂医院および関連施設で得られた AIP 切除例 7 例である。組織学的には本邦および欧米の組織像 (LPSP, IDCP) に相当する像を AIP とした。7 例には自己免疫性疾患・炎症性腸疾患の合併例はなく、血清 IgG4 値はいずれも未検である。施行された切除術式は膵頭十二指腸切除術 3 例、膵体尾部切除術 4 例である。

切除検体はいずれもホルマリン固定後にパラフィン包埋し、4 μ m の薄切片を作成し、H.E. および E.V.G. 染色を行った。形質細胞に対しては免疫組織化学的に IgG4 を染色した (抗 IgG4 抗体: 製造元, The Binding Site; クローン, polyclonal; 希釈倍率, 500 倍)。IgG4 に対する免疫染色の評価は、Kamisawa ら⁴⁾ の基準にほぼ準じた。すなわち、高倍率で一視野あたりの陽性細胞数

表1 自己免疫性膵炎の病理組織像

症例	年齢	性	手術	組織型	線維化		炎症性 細胞浸潤	IgG4陽性 形質細胞	リンパ 濾胞	リンパ節 径(mm)	小葉 萎縮	閉塞性 静脈炎	胆管 狭窄
					小葉内	小葉間							
1	59	男	DP	LPSP	+	+	P, L	2+	+	8	+	+	+*
2	62	男	DP	LPSP	+	+	P, L >>> E (s)	2+	(S)	4.5	+	+	-
3	61	女	PD	LPSP	+	+	P, L, E	2+	+	14	+	+	+
4	67	男	DP	LPSP	+	+	P, L	2+	+	9	+	+	-
5	68	男	PD	LPSP	+	+	P, L, E	1+	+	3**	+	+	+
6	61	男	PD	LPSP	+	+	P, L, E	2+	+	10	+	+	+
7	28	男	DP	IDCP	+	+	N >>> P, L	-	(R)	4	+	(S)	-

DP, distal pancreatectomy; PD, pancreaticoduodenectomy; LPSP, lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis; IDCP, idiopathic duct-centric chronic pancreatectomy; P, plasma cell; L, lymphocyte; E, Eosinophil; N, Neutrophil; (S), scatteredly identified; (R), rarely identified; >>>, 細胞数が4倍以上の異なる場合

* , 総胆管・肝内病変あり

** , 検体の一部のみを検索

が, 0~9個を(-), 10~29個を(1+), 30~99個を(2+), 100個以上を(3+)とした。

(倫理面への配慮)

通常の染色であること, および遺伝子・タンパクの検索を行っていないことから, 倫理上の問題は無いと考えられる。

C. 研究結果

7例では, LPSPが6例(男5例, 女1例, 59~68歳), IDCPが1例(28歳, 男)であった(表1)。LPSPでは好酸球の著しい浸潤を3例に認め, 2例には好酸球を認めなかった。残りの1例では好酸球を散在性に認めたが, 好酸球浸潤(-)群とした。

LPSPでは, 全例に小葉内・小葉間線維化を認めた。炎症性細胞浸潤はいずれもリンパ球・形質細胞からなり, それらは数において2倍以上の違いがなかった。3例の好酸球浸潤(+)群では, 好酸球数は, リンパ球・形質細胞と2倍以上の差を認めなかった(図1)。IgG4陽性形質細胞は, 好酸球浸潤(+)群の1例で(1+) (図2), 他の5例では(2+)であった。リンパ濾胞は全例で認められたが, 好酸球浸潤(-)群3例中1例のみで散在性であった。リンパ節の最大径は, 好酸球浸潤(+)群で14, 10および3 mm, (-)群で9, 8および4.5 mmであった。小葉の萎縮と閉塞性静脈炎は全例に認められた。好酸球浸潤(+)群は3例とも膵頭十二指腸切除術が行われた症例で, いずれにも胆管狭窄を認めた。好酸球浸潤(-)群は3例と

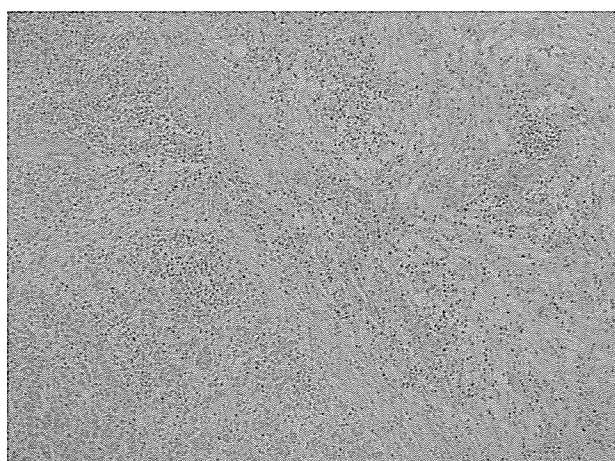


図1 好酸球の浸潤を伴う lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis (症例5)
細胞浸潤は単核球主体で, 好酸球を含んでいる。(H.E.染色, ×100)

も膵体尾部切除術が行われ, うち1例では悪性腫瘍の診断の下に肝右葉切除および肝外胆管切除術も行われた。

IDCPでは, LPSPと同様に小葉内・小葉間線維化と小葉萎縮が認められ, リンパ節は径3 mmであった。炎症性細胞浸潤は好中球が圧倒的に多く, その分布は膵管周囲・内腔および小葉内に目立ち, 線維化内には少なかった(図3, 図4)。リンパ球・形質細胞の浸潤は軽度で, IgG4陽性形質細胞は認められなかった。リンパ濾胞はごくわずかにみられ, 閉塞性静脈炎は形質細胞・リンパ球の浸潤部にわずかに認められた(図5)。

D. 考察

Klöppelらは, AIPを膵管上皮内への顆粒球の

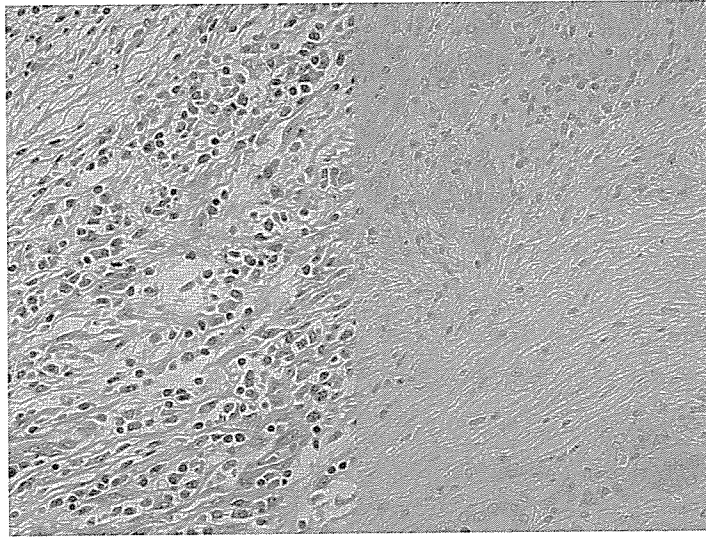


図2 好酸球の浸潤を伴う lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis (症例5)
 左：細胞浸潤の種類は好酸球・形質細胞・リンパ球である。(H.E.染色, ×400)
 右：IgG4陽性形質細胞の評価は(1+)である。(IgG4に対する染色, ×400)

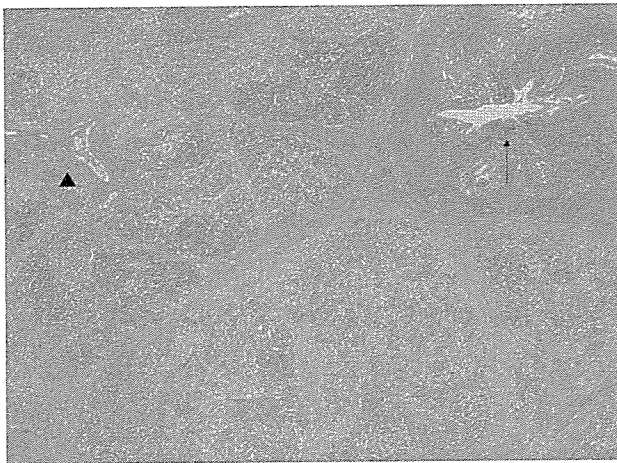


図3 idiopathic duct-centric chronic pancreatitisの弱拡大像 (症例7)
 右上の主膵管(↑)の周囲に著しい細胞浸潤と小葉間の線維化を認める。左上では膵管(▲)の内腔に細胞浸潤が及んでいる。(H.E.染色, ×400)

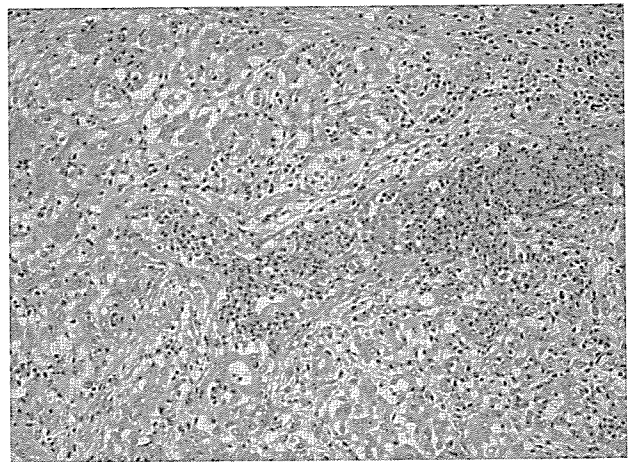


図4 idiopathic duct-centric chronic pancreatitisの拡大像 (症例7)
 極めて多数の好中球が膵管内腔, 膵管上皮細胞内に認められる。形質細胞・リンパ球は認められない。(H.E.染色, ×200)

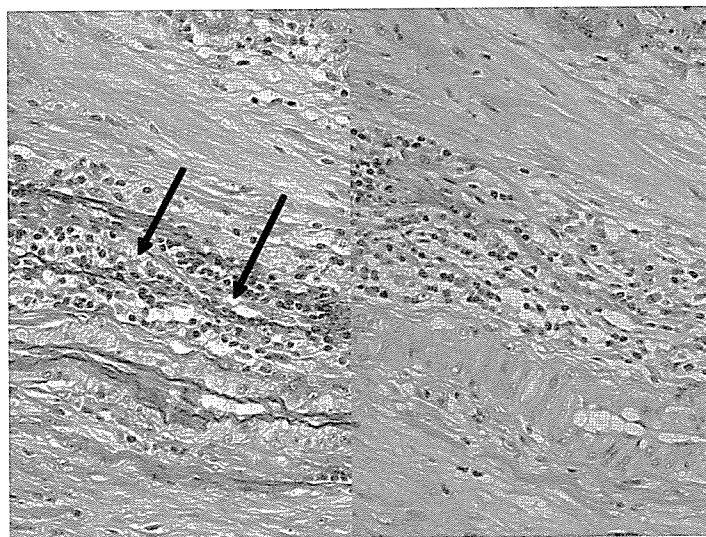


図5 idiopathic duct-centric chronic pancreatitisにおける閉塞性静脈炎 (症例7)
 左：形質細胞・リンパ球の浸潤部では, 閉塞性静脈炎(↓)を認める。(E.V.G.染色, ×270)
 右：動脈に伴走する静脈の内腔がはっきりしない。(H.E.染色, ×270)

浸潤 granulocyte epithelial lesion (GEL)の有無によって大別している⁵⁾。すなわち、GELのないAIPは本邦のAIPと同様な臨床病理像を示すが、GELを伴うAIPは若年発症で男女差がなく、炎症性腸疾患を合併し、本邦のAIPとはやや異なっている。しかし、ここでいう‘granulocyte’とは、Figureを見る限りでは好中球であり、さらにAIPは非腫瘍性の膵切除例のうち、仮性嚢胞・結石・膵癒合不全などを認めない症例から選択されている。自験例のIDCPとした症例7は、このような臨床所見のない非腫瘍性・炎症性疾患であり、組織学的に好中球の膵管上皮内への著しい浸潤を認めたことから、GELを伴うAIPに相当する。

一方、Notoharaらは、膵管周囲に細胞浸潤の多い、膵の炎症性疾患の切除例を組織学的に検討し、LPSPとIDCPに大別している²⁾。前者は、リンパ球・形質細胞の主膵管・小葉間膵管周囲への密な浸潤、小葉間・小葉内線維化、線維化部分(膠原線維間)への細胞浸潤が特徴と記載されている。さらには、好中球浸潤は認められるものの線維化部分(膠原線維間)には稀であるとされ、リンパ濾胞は半数以上の症例にみられ、閉塞性静脈炎をほぼ全例に認めている。一方、IDCPは、小葉全体が浮腫性で好中球・リンパ球・形質細胞の浸潤を主体的に認め、小葉間線維化・脂肪組織内には炎症性細胞が目立たないことを特徴としている。好中球の浸潤は膵管周囲と小葉辺縁部に多く、静脈病変はごく少数の症例にみられ、しかも一部の静脈に限られているとされている。リンパ濾胞に関する記載はない。

自験例でIDCPと診断した症例7は小葉内・小葉間線維化と小葉萎縮がみられ、すなわち閉塞性膵炎の像がみられる^{6~8)}。細胞浸潤の分布は小葉内が小葉間より多く、好中球が主体であり、Notohara, Chariらの分類したIDCPに相当する。本例ではリンパ濾胞の形成・リンパ節の腫大が乏しく、閉塞性静脈炎はごくわずかであった。したがって、これらはAIPに本質的なものではなく、リンパ球・形質細胞の浸潤が軽度であることに起因している。Zahng, ChariらはLPSP, IDCPに対して、免疫組織化学的にIgG4陽性形質細胞の評価を行い、後者においても前者ほど

ではないが、mild-moderate程度の陽性形質細胞を認めることから、IDCPもAIPに含めている³⁾。自験例のIDCPは、病理組織学的には線維化を認めるものの、リンパ球・形質細胞の浸潤は軽度であり、IgG4陽性形質細胞を認めないことから、本邦のAIPとは異なった疾患であると考えられる。

Abrahamらは、25例のLPSP中の好酸球数を定量化し、高度の浸潤を2例、中等度の浸潤を3例、軽度の浸潤を14例に認めたことから、軽—中等度の好酸球浸潤はLPSPではcommonであると記載している⁹⁾。それは、細胞浸潤のほとんどが好酸球で占められている‘好酸球性膵炎’とは異なり、浸潤が散在性であるとしているが、好酸球の浸潤を伴ったLPSPの組織像自体および好酸球浸潤の有無によるLPSPの組織像の違い自体には言及していない。今回の検討では、好酸球の浸潤の有無によるLPSPの組織像の違いは認められなかった。

E. 結論

自己免疫性膵炎において、LPSP (lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis)では好酸球浸潤の有無による組織像の違いはなく、IDCP (idiopathic duct-centric chronic pancreatitis)ではリンパ球・形質細胞、リンパ濾胞の形成、リンパ節腫大および閉塞性静脈炎の所見に乏しく、IgG4陽性形質細胞を認めない。

F. 参考文献

1. Kawaguchi K, Koike M, Tsuruta K, Okamoto A, Tabata I, Fujita N. Lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis with cholangitis: a variant of primary sclerosing cholangitis extensively involving pancreas. *Hum Pathol* 1991; 22: 387–395.
2. Notohara K, Burgart L J, Yadav D, Chari S, Smyrk TC. Idiopathic chronic pancreatitis with periductal lymphoplasmacytic infiltration: clinicopathologic features of 35 cases. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1119–1127.
3. Zahng L, Notohara K, Levy MJ, Chari ST, Smyrk TC. IgG4-positive plasma cell infiltration in the diagnosis of autoimmune pancreatitis. *Mod*

Pathol 2007; 20: 23–28.

4. Kamisawa T, Funata N, Hayashi Y, Tsuruta K, Okamoto A, Amemiya K, Egawa N, Nakajima K. Close relationship between autoimmune pancreatitis and multifocal fibrosclerosis. *Gut* 2002; 52: 683–687.
5. Zamboni G, Lüttges J, Capelli P, Frulloni L, Cavallini G, Pederzoli P, Leins A, Longnecker D, Klöppel G. Histopathological features of diagnostic and clinical relevance in autoimmune pancreatitis: a study on 53 resection specimens and 9 biopsy specimens. *Virchow Arch* 2004; 445: 552–563.
6. Suda K, Mogaki M, Oyama T, Matsumoto Y. Histopathologic and immunohistochemical studies on alcoholic pancreatitis and chronic obstructive pancreatitis: special emphasis on ductal obstruction and genesis of pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 271–276.
7. Suda K, Takase M, Takei K, Kumasaka T, Suzuki F. Histopathologic and immunohistochemical studies on mechanism of interlobular fibrosis of the pancreas. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 1302–1305.
8. Suda K, Takase M, Fukumura Y, Ogura K, Ueda A, Matsuda T, Suzuki F. Histopathologic characteristics of autoimmune pancreatitis based on comparison with chronic pancreatitis. *Pancreas* 2005; 30: 355–358.
9. Abraham SC, Leach S, Yeo CJ, Cameron JL, Murakata LA, Boitnott JK, Albores-Saavedra J, Hruban RH. Eosinophilic pancreatitis and increased eosinophils in the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 334–342.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当あり
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産の出願・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

WBN / Kob ラットの膵炎・耳下腺炎における自己免疫性機序の関与 及び調節性T細胞の免疫応答

研究報告者 岡崎和一 関西医科大学内科学第三 教授

共同研究者

坂口雄沢（関西医科大学内科学第三）

稲葉宗夫，津田雅庸，福井淳一，上田祐輔，大前麻理子，安藤祐吾，郭 可泉，池原 進
（関西医科大学第一病理学）

【研究要旨】

WBN/kob雄ラットは膵実質の広範な線維化・実質脱落を示し膵内外分泌機能低下を呈する自然発症慢性膵炎，膵性糖尿病モデルである．組織学上，単核球優位の炎症細胞浸潤がみられるが，耳下腺においても膵同様に実質の広範な線維化・実質脱落，炎症細胞浸潤を認め，ヒトにおける自己免疫性膵炎にシェーグレン症候群を合併したモデルに類似している．そこで，慢性膵炎モデルラットにおける自己免疫性膵炎に関して解析を加えた．

A. 研究目的

自己免疫性膵炎の病因・病態生理の解明には自己免疫性膵炎の主要自己抗体の検出や膵病変の進展様式の把握と，自己免疫性膵炎に矛盾しない膵病変を発症する動物モデルを用いた研究が必須である．膵炎を自然発症する動物や推定される標的抗原で免疫した動物をモデルとした報告が散見されるが，われわれはWBN/Kobラットを用い，自己免疫性膵炎自然発症動物モデルとして整合性を含め多角的に解析を加え，制御性T細胞も含めた自己免疫性膵炎の病因ならびに病態生理の解析，さらには骨髓移植による自然発症膵炎モデルの発症予防を試みた．

B. 研究方法

1) 動物：雌雄WBN/Kob (RT1a:u), Wistar, Fischer 344 (F344:RT1a:1) (SLC:日本)を用い，関西医科大学動物センター SPF環境の下，飼育維持した．

2) 前処置：骨髓移植1前日に5.0 Gy × 2 = 10Gy; 4時間間隔に分割放射線照射後，Fludarabine (50 mg/kg)経静脈投与．

3) 骨髓移植：骨髓細胞はドナー F344の脛骨・大腿骨より採取(3 × 10⁷/30 μl)し，ホスト(雌雄

6週齢WBN/Kobラット)の骨髓内に直接注入(骨髓内骨髓移植法)した．

4) 免疫染色：骨髓移植後，4・8・12・16週後，全身麻酔後屠殺し，血液及び膵臓・脾臓・涙腺・耳下腺を採取し，ホルマリン固定からHE染色，Masson Trichrome/Sirius red染色，また固定切片から脱パラフィン，抗原賦活処理後，免疫抗体染色(CD4 (FITC), CD8 (PE), CD25, FITC-anti-RT1A1 mAb plus PE-conjugated mAb against CD45R (B220) (PharMingen), CD4, CD8, or CD11b (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) IgG (FITC), DAPI, PAN-B (FITC), IgG2b (PE), IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c (Biotin), Streptavidin (FITC), foxp3 (violetin),) 施行．

5) 生化学解析：移植後1, 2, 4, 9, 16カ月後に生化学測定を行った．随時血糖値(DEXTOR Z II®; Bayer Medical Ltd, Japan), 血清アミラーゼ(total amylase), 血清総蛋白(Biochemistry automated analyzer AU5400; Olympus Corporation), 血清電気泳動, ELISA測定法にてIL-4 (Rat IL-4 Immunoassay Kit, BioSource International, Inc.), IL-10 (Rat IL-10 Immunoassay, R&D

Systems Inc.), IL-12 (Rat IL-12 Immunoassay Kit, BioSource International, Inc.)を測定した。

(倫理面への配慮)

関西医科大学平成16年度動物実験計画承認06-026の下, 愛護的に動物を管理・実験を行った。

C. 研究結果

1. 自己免疫性機序の関与

①WBN/Kobラットにおける慢性腭炎及び腭外病変としてのシェーグレン症候群類似涙腺炎, 病理組織学的に雄性WBN/Kobラットは4週齢より腭間質の浮腫・リンパ球中心の細胞浸潤, 腭管の拡張, 腺房の破壊が起こり, 漸次腺房細胞の破壊が亢進される。また8週齢より間質において線維化の増生が認められる。生後12週齢より小葉間や腭管周囲に炎症細胞浸潤, 浮腫, 出血, ヘモデジリン沈着が出現し, 以降漸次周囲に炎症波及をきたし, 腺房・ラ氏島の孤立化, 線維組織の増生が進行する。WBN/Kob雌性ラットでは, 外涙腺において生後4週齢より炎症細胞の浸潤を認めた。経時的に漸次炎症は増悪し, 外涙腺の小葉構造は保たれているものの, 導管周囲にリンパ球を中心とした炎症細胞の強い浸潤がみられた。また, 腺房細胞自体も, 細胞質内に多数の空胞形成を伴い, 細胞構造変形や核変性・変形が観察される。同時に小葉間には線維成分の増生が著明で慢性炎症の形態を示している。雄性WBN/Kobラットは慢性腭炎を発症することは既知であったが, 雌性WBN/kobラットでは慢性涙腺炎(一部においては耳下腺炎)を発症し形態的にシェーグレン症候群に類似した特長を持っていた。

②WBN/Kobラットにおけるアポトーシス

WBN/Kobラット雌雄性の腭炎・涙腺炎部においてTUNEL染色を行った。膨張変性した腺房細胞の核においてTUNEL陽性所見を散在性に認め, WBN/Kobラット雄性の腭炎のみならず, 雌性の涙腺炎においてもapoptosisが関与しており, apoptosisによる炎症阻止機転の存在が示唆された。

③血清γ-globulin

雌雄性WBN/Kobラット(8週齢), 雌雄性

Wistarラット(8週齢)より血清分離し蛋白電気泳動を行った。血清γ-globulin域はWistarラットに比べて雌雄性WBN/Kobラットではピークの上昇を認めた。また, 血清蛋白測定値(ELISA)よりγ-globulin濃度を算計すると, Wistarラットに比べて雌雄性WBN/Kobラットではγ-globulin濃度の増加を認めた。

④CD4/8

免疫蛍光染色にて雌雄性WBN/Kobラット(8週齢), 雌雄性Wistarラット(8週齢)の腭炎・涙腺炎障害部においてIgG沈着(=II型アレルギー反応)およびCD8+細胞浸潤(=IV型アレルギー反応)を認めた。また, 光学免疫染色にては腭炎・涙腺炎障害部においてCD4+細胞は少なく, CD8+細胞浸潤が大部分であった。また, WBN/Kob雄性ラットでは腭障害部位, WBN/Kob雌性ラットでは涙腺障害部位においてB細胞からIgG2bの分泌を認めた。

⑤特異抗体

雌雄性WBN/Kobラット(8週齢)腭・涙腺組織をホルマリン固定後, パラフィン薄切片を作製。一次抗体としてViotin Rat IgG subclass (1, 2a, 2b, 2c)抗体使用。二次抗体としてStreptavidin FITCにてBiotin-Streptavidin法にて蛍光を増強し, 障害部位に沈着したIgGの内, IgG I, II a, II b, II cと4つのサブクラスより特異抗体の同定を行った。雄性WBN/Kobラットの腭と雌性WBN/Kobラット涙腺においてIgG II bのみ特異的な免疫抗体反応を示した。

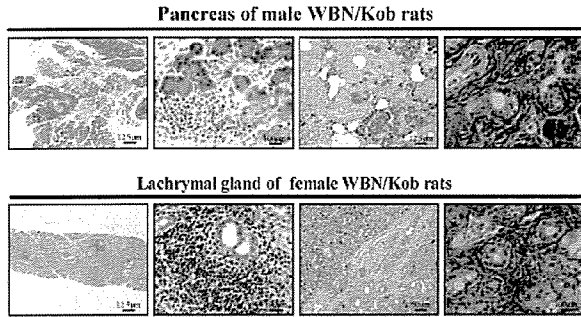
⑥制御性T細胞

WBN/Kob male ratの8週齢, 対照としてWister ratの8週齢を用いて, 末梢血CD4, CD25をFACSにて測定した。(N=5) WBN/Kob male rat $CD4+CD25+(R1)/CD4+(R2)=3.20\%$ とWister rat $CD4+CD25+(R1)/CD4+(R2)=9.79\%$ とWBN/Kob ratにおいて末梢血Tregの減少を認めた。

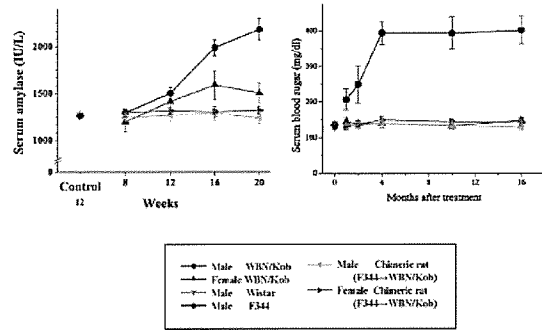
⑦骨髄内骨髄移植法によるWBN/Kobラットの腭炎・シェーグレン症候群発現予防

4週齢F344 ratより4週齢雌雄性WBN/Kobへ骨髄内骨髄移植施行。移植群, コントロール群(F344)(非移植雌雄性WBN/Kob)と3群において経時的に移植後1カ月, 2カ月, 3カ月, 4カ月

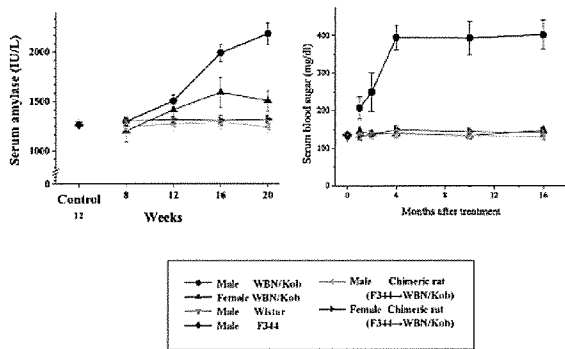
The male WBN/Kob rat is an animal model for chronic pancreatitis. The pancreas of this rat shows wide-ranging fibrosis and disappearance of the parenchyma, resulting in reduced internal and external secretory functions. It is noted that, in the WBN/Kob rat, similar histological findings are observed also in the lacrimal gland, suggesting the resemblance to Sjogren syndrome.



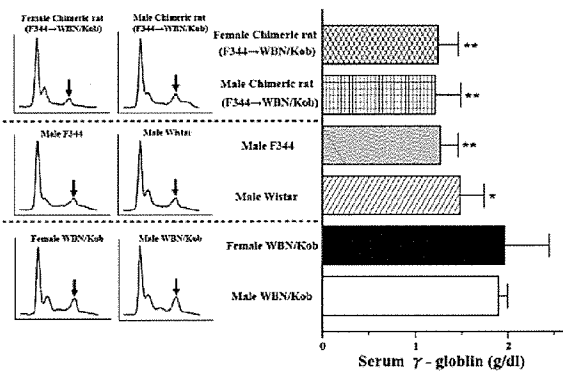
Serum amylase & blood sugar analysis in peripheral blood (ELISA)



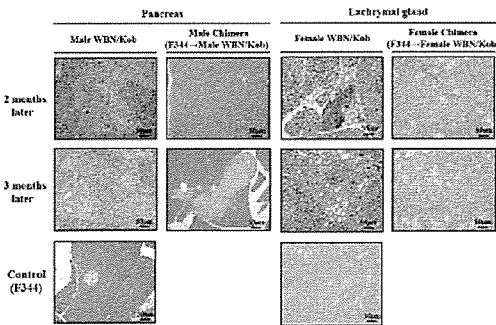
Serum amylase & blood sugar analysis in peripheral blood (ELISA)



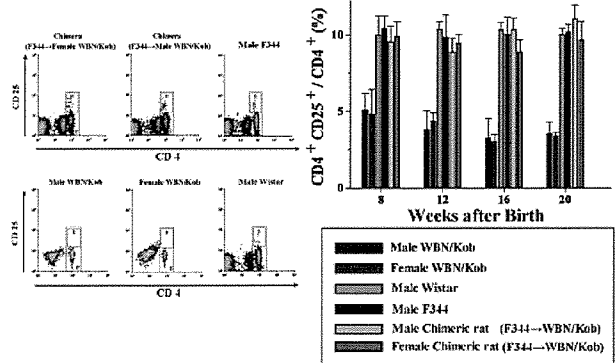
Serum γ -globulin analysis



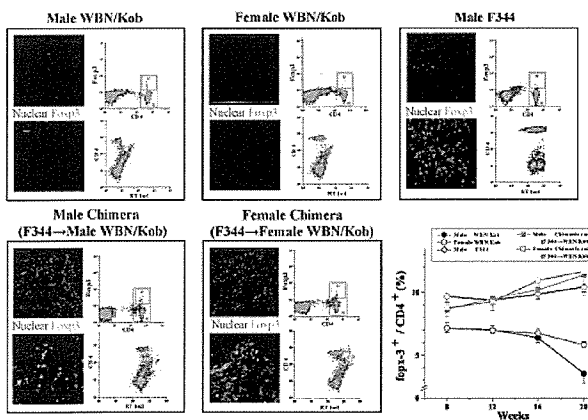
Microscopic observations in pancreas / parotid gland of WBN/Kob rat



Regulatory T-cell (CD4/CD25) analysis after IBM-BMT



Foxp3 analysis in spleen cells after IBM-BMT



Autoimmune mechanism in WBN/Kob rat

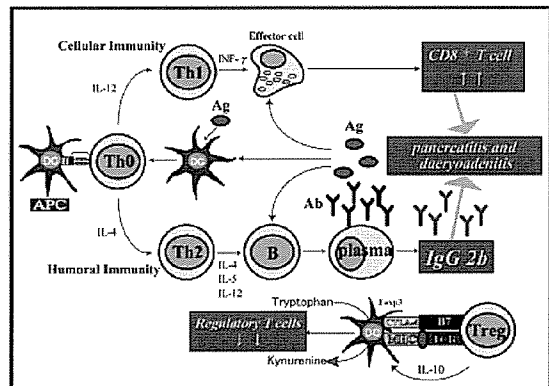


図1 WBN/Kob ラットの免疫学的解析

と病理変化(HE stain)を判定した。F344は膵炎・涙腺炎の発症を認めず、非移植雌雄性WBN/Kobでは8週齢から、炎症細胞浸潤を認め、細胞間浮腫から腺房細胞の破壊を来たした。20週齢を経過したものでは慢性炎症性変化が著明となり、線維成分の増生が強くなり、雄性WBN/Kobではラ氏島の崩壊に伴い耐糖能異常も合併した。

一方、骨髄移植群では移植後4カ月経過しても雌雄性WBN/Kobともに膵炎・涙腺炎の発症を認めず、予防が完遂された。

移植群、コントロール群(F344) (非移植雌雄性WBN/Kob)と3群において経時的に移植後1カ月、2カ月、3カ月、4カ月と免疫蛍光染色にてCD4⁺、CD8⁺抗体にて炎症細胞を染色した。F344は膵炎・涙腺炎の発症を認めず、非移植雌雄性WBN/Kobでは8週齢から20週齢に渡り、膵臓・外涙腺ともにCD8⁺細胞浸潤を認めた。

一方、骨髄移植群では移植後4カ月経過しても雌雄性WBN/Kobともに膵炎・涙腺炎の発症を認めず、CD4⁺、CD8⁺細胞浸潤を認めなかった。

4週齢F344 ratより4週齢雌雄性WBN/Kobへ骨髄内骨髄移植施行。移植群、コントロール群(F344) (非移植雌雄性WBN/Kob)と3群において脾臓摘出し、脾細胞を細分化した後、細胞内サイトカイン測定法を用いてfoxp3をFACSにて経時的に(移植後1カ月、2カ月、3カ月、4カ月)測定した。また、同時に*in situ*にて細胞内蛍光染色も行った。F344から雄性WBN/Kob移植群ではfoxp3/CD4⁺ = 9.5%、F344から雌性WBN/Kob移植群ではfoxp3/CD4⁺ = 11.7%、F344はfoxp3/CD4⁺ = 8.9%、雌性WBN/Kobではfoxp3/CD4⁺ = 6.4%、雌性WBN/Kobではfoxp3/CD4⁺ = 7.7%であった。制御性T細胞の発生・分化と機能を制御する優性寛容機構のマスタ制御遺伝子Foxp3が骨髄内骨髄移植によって回復し、活性化された制御性T細胞が増加した。これらはWBN/Kobにおける免疫寛容が再構築され、自己抗原に対する特異炎症が予防された事を示す。

WBN/Kobラットは雄性の慢性膵炎のみならず、雌性涙腺においても膵同様に実質の広範な線維化・実質脱落、慢性炎症細胞浸潤を認め、ヒトにおける自己免疫性膵炎にシェーグレン症

候群を合併した病態に類似していることが明らかになった。障害臓器ではCD8⁺T細胞群の浸潤とB細胞(形質細胞)からの特異抗体産生(IgG2b sub class)を認め、液性免疫および細胞性免疫から組織傷害が持続されていた。末梢血中、制御性T細胞及び脾臓内foxp3発現の減少も認めることから総合的な自己免疫機序の破綻に伴う多臓器障害性の自己免疫性疾患モデルと考えられた。更に免疫寛容機序の再構築による自己免疫疾患の予防を目的として骨髄内骨髄移植法を行った。移植群では、膵炎・涙腺炎等、炎症性変化を認めず、形態的・機能的にも正常化されており、脾臓内foxp3の発現も正常群まで改善されており、自己免疫性障害は予防でき、総合的な自己免疫機序の破綻に伴う多臓器障害性の自己免疫性疾患モデルと考えられた。

D. 考察

WBN/Kobラットの膵炎・耳下腺炎発症経過や特異抗体の存在、血清γ globulinの増加、耳下腺炎の合併など近年、臨床において提唱されている自己免疫性膵炎と類似した点が多く、WBN/Kobラットは自己免疫機序の破綻に伴う多臓器障害性の自己免疫疾患モデルと考えられた。

E. 結論

骨髄内骨髄移植法により免疫学的寛容破綻を再構築することで自己免疫症の予防が可能であった。この研究は近年、臨床において報告されている自己免疫性膵炎及び合併疾患の治療や成因解明等に寄与し得るものと考えられる。

F. 参考文献

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakaguchi Y, Inaba M, Kusafuka K, Okazaki K, Ikehara S. Establishment of animal models for three types of pancreatitis and analyses of regeneration mechanisms. *Pancreas* 2006; 33: 371-381.

2) Asada M, Nishio A, Uchida K, Kido M, Ueno S, Uza N, Kiriya K, Inoue S, Kitamura H, Ohashi S, Tamaki H, Fukui T, Matsuura M, Kawasaki K, Nishi T, Watanabe N, Nakase H, Chiba T, Okazaki K. Identification of a novel autoantibody against pancreatic secretory trypsin inhibitor in patients with autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2006; 33: 20-26.

2. 学会発表

- 1) 坂口雄沢, 稲葉宗夫, 津田雅庸, 福井淳一, 上田祐輔, 大前麻理子, 李 銘, 郭 可泉, 岡崎和, 池原 進. Autoimmune mechanisms are involved in pancreatitis and sialoadenitis in WBN/Kob rats: Roles of CD4+/CD25+ cells. 第95回日本病理学会総会, 東京 2006年4月30日-5月2日
- 2) 坂口雄沢, 稲葉宗夫, 岡崎和, 池原 進. WBN/Kob ラットの膵炎・耳下腺炎における自己免疫性機序の関与. 第37回日本膵臓学会大会, 神奈川 2006年6月29-30日
- 3) Sakaguchi Y, Inaba M, Tsuda M, Fukui J, Ueda Y, Omae M, Ando Y, Li M, Guo K, Okazaki K, Ikehara S. Prevention of autoimmune chronic pancreatitis in WBN/Kob rats by intra bone marrow - bone marrow transplantation. 第36回日本免疫学会総会, 大阪 2006年12月11-13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

4. 腠囊胞線維症

RNA干渉法 (siRNA) を用いた CFTR 機能異常の解析

研究報告者 成瀬 達 名古屋大学大学院消化器内科学 助教授

共同研究者

洪 繁 (名古屋大学大学院消化器内科学)

石黒 洋, 山本明子, 中莖みゆき, 近藤孝晴 (名古屋大学大学院健康栄養医学)

【研究要旨】

モルモットの膵臓は、ヒトと同様に高濃度(140 mM)の重炭酸イオンを分泌することができ、ヒトの膵導管細胞機能解析に最も良いモデルである。しかし、モルモットのゲノム解析は進んでおらず、重炭酸イオン分泌に重要な役割をはたすCFTR遺伝子の塩基配列は不明である。そこで、本研究ではモルモットcDNAよりCFTR遺伝子をクローニングし、その塩基配列からアミノ酸配列を決定した。モルモットのCFTR蛋白はヒトより1残基多い1481アミノ酸残基より成っていた。モルモットのCFTR機能解析のため、siRNA (small interfering RNA)法を用いて、単離小葉間膵管のCFTR遺伝子ノックダウンを試みた。特異的double-stranded RNA (dsRNA)添加培養36～48時間後には、基礎及びセクレチン刺激下の水分分泌量は、非特異的dsRNA添加群に比べ、約50%に減少した。CFTRはモルモット膵導管細胞における水分分泌に重要な役割を果たしている。

A. 研究目的

cyclic AMP (cAMP)依存性のクロライドチャネルであるCystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)は、膵導管細胞の管腔膜に発現しており、膵の水と重炭酸イオン分泌に最も重要な分子と考えられている。CFTR遺伝子は膵嚢胞線維症(Cystic Fibrosis; CF)の原因遺伝子である。特発性慢性膵炎患者では、CFTR遺伝子変異の保因者の頻度が健常人に比べ約3倍高く、CFTR遺伝子変異は一部の慢性膵炎の原因であると考えられている^{1,2)}。本邦でもアルコール性慢性膵炎患者では健常人に比べ、CFTR遺伝子の発現量が減少する遺伝子多型が多く、アルコール慢性膵炎の発症にCFTR遺伝子の発現低下が何らかの影響を及ぼしている可能性がある³⁾。

ヒトCFTR遺伝子のクローニング(1989年)以来、CFTRの機能解析のためにノックアウトマウス、 $\Delta F508$ 変異導入マウスなどさまざまなCFTR遺伝子改変マウスが作成されてきた^{4,5)}。しかし、マウスの膵液中の重炭酸イオン濃度は最高で70 mM程度といわれており、ヒトの膵導管細胞(140 mM)とは生理学的類似性が低い。し

たがって、マウスの膵導管細胞はヒトのモデルとして必ずしも適切ではない⁶⁾。モルモット膵導管細胞は、げっ歯目の中では唯一、ヒトと同等の重炭酸イオンを含む膵液を分泌できる。したがって、モルモットの膵臓はヒトの膵導管細胞機能解析に最もよいモデルである。

近年ノックアウトマウスを作成し遺伝子機能を解析する方法に対し、新しい遺伝子機能解析手法として遺伝子特異的な二本鎖RNAを細胞に導入することにより遺伝子発現を特異的に抑制するRNA干渉法(RNA interference; RNAi)が線虫を用いて開発された。さらに哺乳類細胞では19-21塩基の二本鎖RNA (small interfering RNA; siRNA)が遺伝子発現抑制に有用であることが報告された⁷⁾。siRNA法はマウスとは違い胚性幹細胞を得ることができない動物の細胞、組織でも遺伝子特異的に発現を抑制することができるため、現在では生物学研究に欠かせないツールとなってきた。

そこで、siRNA法によりモルモットの膵導管細胞のCFTRの機能を抑制することができれば、ヒトの膵導管細胞におけるCFTR機能低下がもたらす病態を再現できるはずである。しかし、

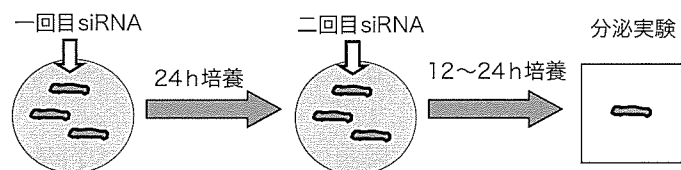


図1 RNA干渉法プロトコール

モルモットのゲノム解析は進んでおらず、モルモットのCFTR遺伝子の塩基配列は不明である。本年度の研究では、まず、モルモット小腸のcDNAよりCFTR遺伝子の塩基配列を決定した。次に、siRNA法で膵導管細胞におけるCFTR遺伝子特異的な遺伝子発現抑制を行うことにより、膵導管細胞の水分分泌におけるCFTRの役割を検討した。

B. 研究方法

1. モルモットの小腸よりcDNAを作成し、ヒトとマウスのCFTR遺伝子の塩基配列の共通部分よりPCR primerセットを作成した。PCRにより得られた断片をダイレクトシーケンシングすることにより、モルモットCFTR遺伝子の塩基配列を決定した。

2. クローニングしたモルモットCFTR遺伝子の塩基配列より、モルモットCFTR遺伝子に特異的な二本鎖siRNAを作成した。

3. モルモットの膵を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。siRNAを含む培養液で24時間培養した後、培養液を交換し、培養開始36~48時間後に実験に使用した(図1)。小葉間膵管からの水分分泌量はビデオ顕微鏡システムを用いて観察、解析した。コントロール群としては実験群で使用したsiRNAの配列を入れ替え、既知の遺伝子塩基配列と同一性のないscrambled RNAを使用した。

(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;17049)を受けている。すべての動物実験はガイドラインに従い、愛護的に行った。

C. 研究結果

1. モルモットのCFTR遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の解析

モルモットCFTR遺伝子の塩基配列はヒト、マウスおよびラットのCFTR遺伝子と高い相同性を示した。遺伝子構造より推定されるモルモットのCFTRは、ヒトのCFTRの403番目と404番目の間にグルタミン酸残基(Q)の挿入があり、ヒトより1アミノ酸残基多い1481アミノ酸残基よりなっていた。モルモットCFTRのアミノ酸配列の相同性は、ヒトとは90.7%、マウスとは82.0%、ラットとは80.2%であった。

トロント大学のCFデータベース(<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/Home.html>)に登録されている約1,400のヒトのCFTR遺伝子変異のうち、アミノ酸配列に変化を起こす遺伝子変異と、モルモットのCFTR遺伝子アミノ酸配列と比較すると、15アミノ酸残基に違いを認めた。そのうち12カ所は、マウス、ラット、モルモットではヒトと異なるアミノ酸残基であった。残りの3カ所ではヒト、マウス、ラットは同じアミノ酸残基であったが、モルモットでは異なっていた(図2AおよびB)。

2. モルモットCFTR遺伝子のノックダウンが膵導管細胞からの水分分泌に与える影響

モルモット膵導管細胞を、37°Cの重炭酸を含む緩衝溶液で還流すると膵導管細胞上皮1 mm^2 あたり $0.74 \pm 0.09 \text{ nl/min}$ (mean \pm SD)の基礎分泌を認めた。1 nMセクレチンで刺激すると水分分泌量は $2.00 \pm 0.15 \text{ nl/min}$ に増加した。CFTR遺伝子特異的なdsRNAで遺伝子のノックダウンを行うと、基礎分泌およびセクレチン刺激下の分泌はおおの $0.25 \pm 0.16 \text{ nl/min}$ 、 $1.19 \pm 0.23 \text{ nl/min}$ へと有意に減少した($p < 0.01$) (図3)。

D. 考察

ヒトの膵導管細胞は140 mMに達する高濃度

A. CF患者で認められる遺伝子異常とモルモットのアミノ酸配列の比較

ヒトの変異	ヒトのCFとの関連	モルモットのアミノ酸残基
H146R	H146R CBAVD	Q
P750L	suspected CF causing mutation	L
L1388Q	L1388Q CBAVD	I

B. モルモット(GP), ヒト(Hu), マウス(Mu), ラット(Ra)のCFTRアミノ酸配列の比較

146		750		1388	
GP:	AIFGLHIGM	GP:	RSNVIHTGP	GP:	ITYQIIRRTI
Hu:	AIFGLHIGM	Hu:	RISVISTGP	Hu:	VTYQIIRRTI
Mu:	AIFGLRIGM	Mu:	RSNMIATGP	Mu:	ITYQVIRRVV
Ra:	AIFGLHIGM	Ra:	RSNMITAGP	Ra:	ITYQVIRRVV

図2 モルモット, ヒト, ラット, マウスのCFTRアミノ酸配列の比較

の重炭酸イオンを含む腠液を分泌する。マウスやラットの腠液中の重炭酸イオン濃度はヒトの半分程度である。ヒトと実験動物では、導管細胞からの重炭酸イオン分泌メカニズムに根本的な違いがあると考えられるが、その詳細は不明である。

重炭酸イオン輸送に関しては、げっ歯目ではモルモットのみがヒト腠導管細胞のよい実験系と考えられている⁶⁾。しかし、モルモットではCFTRをはじめ、多くのイオン輸送担体の遺伝子構造が未解析のため、分子生物学的な手法を用いた細胞における機能解析はできなかった。本研究では、CFTRクロライドチャンネル遺伝子の塩基配列を初めて決定し、そのアミノ酸配列をヒト、マウス、ラットのCFTRと比べることができた。モルモットCFTR蛋白の一次構造は、マウスやラット(約80%)と比べヒトのCFTRと高い相同性(90.7%)を示した。このことは、CFTR分子の機能の違いが、種による重炭酸イオン輸送の違いをもたらしている可能性を示唆している。モルモットでは保存されていないアミノ酸残基の中で、ヒトのCF関連変異と一致する箇所が存在していた(図2)。これらのアミノ酸置換がCFTRの機能に及ぼす影響は、今後の検討課題である。

siRNA法を用いたCFTR遺伝子特異的なノックダウンにより、モルモット単離小葉間腠管でのCFTRタンパクの発現抑制を試みた。単離腠管を特異的dsRNAと36~48時間、比較的短時間培養するという条件で、腠管からの水の基礎ならびにセクレチン刺激分泌が約半分に減少した。

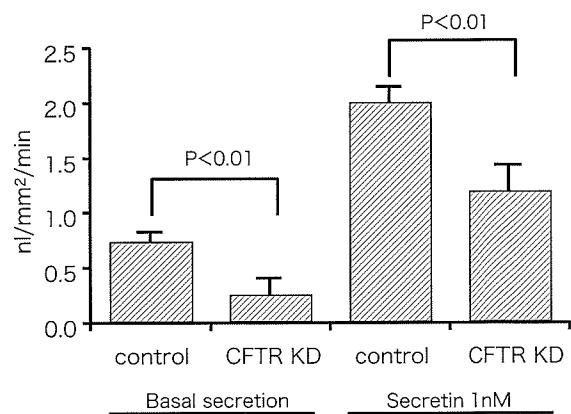


図3 モルモット腠導管細胞からの水分分泌にCFTRのノックダウン(KD)が与える影響

つまり管腔膜に発現するCFTRタンパク量も約50%に減少している可能性が示唆された。海外ではCFTR遺伝子変異の保因者が^{1,2)}、本邦ではCFTR遺伝子の発現量が減少する多型を持つ患者では慢性腠炎の発症率が高くなると報告されており³⁾、CFTRクロライドチャンネル蛋白の発現量の減少が、慢性腠炎発症の一因であると考えられている。今後、特異的ノックダウンによりCFTR蛋白の発現量を減少させた腠管を用いて、イオンおよび水輸送を解析することによりCFTR遺伝子発現の減少と疾患発症の関わりについて明らかにすることができると期待される。

E. 結論

モルモットCFTR遺伝子の塩基配列を決定し、そのアミノ酸配列をヒトのCFTR遺伝子と比較検討した。モルモット単離小葉間腠管のCFTR遺伝子発現をsiRNA法により特異的に抑制する

と、基礎およびセクレチン刺激状態での水分泌はともに抑制され、RNAiの効果が確認できた。

F. 参考文献

- 1) 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* 1998; 339: 645–652.
- 2) Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998; 339: 653–658.
- 3) 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.
- 4) Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O, Koller BH. An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* 1992; 257: 1083–1088.
- 5) Colledge WH, Abella BS, Southern KW, Ratcliff R, Jiang C, Cheng SH, MacVinish LJ, Anderson JR, Cuthbert AW, Evans MJ. Generation and characterization of a delta F508 cystic fibrosis mouse model. *Nat Genet* 1995; 10: 445–452.
- 6) Steward MC, Ishiguro H, Case RM. Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 377–409.
- 7) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494–498.

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

わが国の嚢胞性線維症症例における *CFTR* 遺伝子変異に関する解析

研究報告者 吉村邦彦 国家共済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（国家共済虎の門病院呼吸器センター内科）

衛藤義勝（東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所遺伝子治療研究部門）

【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。CFは約80%の症例で膵外分機能障害(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、すでに20例を超えるわが国のCF症例においてその遺伝子変異が確認された。この中でわれわれが解析し得た症例はこれまで20例に及ぶ。日本人のCF患者における *CFTR* 遺伝子変異は、国際的データベースにもこれまで報告のない新規の変異もしくは、世界的にもかなり稀なものが大半を占め、欧米人の *CFTR* 変異スペクトラムと明らかに様相を異にしている。さらに、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。今後も引き続き日本人CF症例をできる限り多く集積・解析し、原因となる *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、わが国独自の遺伝子変異スクリーニングシステムを確立する予定である。

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、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は欧米白人種に高率に発症するが、一方日本人を含む東洋人種におけるCFの発症頻度は極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の結果、29例の確定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)とおおむね矛盾しないため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ΔF508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

増幅とsingle strand conformation polymorphism (SSCP)解析などが検討されたのみであり、有意な *CFTR* 遺伝子異常は確認されないまま、その変異状況は不明であった^{3,6)}。その後の解析から明らかになるように、この主要な理由はわが国のCF患者における *CFTR* 変異は欧米患者と比較した場合に、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、数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)}。筆者らはPCR-SSCP法、直接シーケンス法などによる27エクソンすべ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確定例ないし疑診例の *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19例のCF症例において遺伝子変異を確認し得た。欧米でも極めて稀な変異や、これまで国際的なCF Mutation Database (CFMD)に登録記載のない *CFTR* 変異が大半を占めている^{9,10)}。

Cys Ile Val Leu Arg Met Ala Val Thr
 T G C A T T G T T C T G C G C A T G G C G G T C A C T

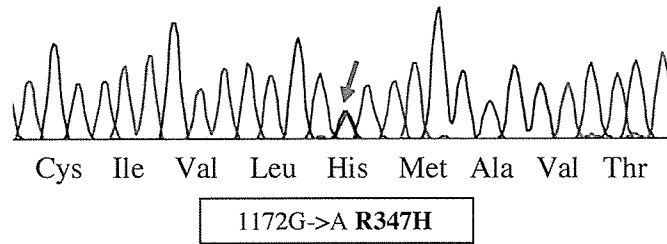


図1 CFTR遺伝子エクソン7のR347H missense変異

B. 研究方法

今年度1例の新規女性CF患者におけるCFTR遺伝子変異を解析した。症例は解析時29歳で、両親の血族結婚はなく満期正常分娩であった。6歳時より咳嗽、喀痰などの気道炎症症状が出現し、その後も複数回肺炎を反復していた。また慢性副鼻腔炎の合併も指摘されている。PABA排泄率をみるPFD試験では69.8%（基準値73.4～90.4%）とごく軽度の腓外分泌機能低下の状態であった。Macroductを用いた汗試験でCl⁻60 mEq/Lと、border lineの値を示した。

（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）に従い、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うえで、同意を取得した。

C. 研究結果

今回の症例（表1の症例20）の遺伝子変異解析では、エクソン1の125C多型と、他方のアリルでエクソン7にミスセンス変異R347Hが認められた（図1）。このR347H変異はcDNAの1172番目の塩基にG→Aの置換が起こり、その結果347番目のアミノ酸コドンがアルギニンからヒスチジンに置き換わったものである。R347H変異はすでに1992年にイタリアのDevoteら¹¹⁾のグループにより報告されている変異で、わが国でもこれまでHojoら¹²⁾の報告に加え、われわれもすでに1例のCF症例で確認している（表1の症例11）。なお125C多型の意義に関してはこれまで報告し

てきている通りである^{3,6)}。

表1にわれわれの施設においてCFTR遺伝子変異解析が行われ、現時点までに変異が突き止められたCF症例の一覧を示す。このうち7例が同一変異を両アリルに有するホモ接合体また、12例が2種以上の異った変異を2つのアリルに有する複号ヘテロ接合体であった。1例のみ（表1の症例16）、片側の遺伝子変異が確認されていない。表2に20症例におけるアリル頻度を示した。

D. 考察

わが国のCF研究は、本研究班およびその前身である厚生省特定疾患難治性腓疾患調査研究班を中心に進められ、主に腓機能不全を呈した重症例の集積と全国施設での実態調査などに主眼が置かれてきた。しかしながら、これら症例における原因遺伝子CFTRの変異解析と遺伝子診断に関しては必ずしも十分ではなかった。近年わが国においても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)}。今年度研究でも改めて明らかにされたように、すでに全世界では1,500種以上の変異が報告されているにもかかわらず、わが国のCF患者におけるCFTR遺伝子変異は極めて稀なもの、あるいはこれまで報告のないものが大半を占め、欧米人の変異スペクトラムと全く様相を異にしている^{3,6)}。したがっ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。一方、CFTRが成因や病態の形成に関わる、いわゆるCFTR一関連疾患は多岐にわたり、さらにその概念が拡大しつつある³⁾。例えば、男性不妊の先天性両側精管欠損症(CBAVD)では、わが国においても健常者やその他の疾患対照に比べ明らか

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	CI ⁻	Mutation	Exon	Mutation	Exon	Outcome
1	15y	F	PI	201	H1085R	17b	H1085R	17b	alive
2	1y5m	F	PI	126	M152R	4	1540del10	10	alive
3	1y1m	F	PI	ND	ΔF508	10	L571S	12	deceased
4	15y	M	PI	74	125C	1	Q98R	4	alive
5	42y	F	PS	ND	E217G	4	Q1352H	22	deceased
6*	21y	M	PI	166	125C	1	L441P	9	alive
7*	16y	F	PI	100	125C	1	L441P	9	deceased
8	9y	F	PI	166	1540del10	10	1540del10	10	alive
9*	30y	M	PS	403	125C+T1086I	1, 17b	125C+T1086I	1, 17b	alive/ABPA
10*	28y	F	PS	ND	125C+T1086I	1, 17b	125C+T1086I	1, 17b	alive
11	17y	F	PS	ND	R75X	3	R347H	7	alive
12	26y	F	PI	121	E267V	6b	T663P	13	alive/TP
13	28y	M	PI	117	125C	1	460insAT	4	deceased
14	11y	M	PI	154	125C+dele16-17b	1, 16-17b	125C+dele16-17	1, 16-17b	deceased
15	24y	F	PI	91	L548Q	11	2848delA	15	alive
16	2y	F	PI	ND	L441P	9	ND	?	deceased
17	18y	M	PS	93	125C+del16-17b	1, 16-17b	125C+del16-17b +V1318I	1, 16-17b, 21	alive/ABPA
18	9y	F	PI	40	5T	intron 8	D924N	15	alive
19	13y	F	PI	55	Q98R	4	Q98R	4	alive
20	29y	F	PI	60	125C	1	R347H	7	alive

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

に変異CFTR対立遺伝子の保有率が高いことが筆者ら¹³⁾のこれまでの研究で明らかにしており、さらにその範疇に属する疾患の概念が拡大している³⁾。

E. 結論

人種や民族によりCFTR変異のスペクトラムが大きく異なっていることがすでに明らかにされている。したがって、診断や保因者スクリーニングのうえで、対象集団の人種、民族性が極めて重要である。今後もわが国の日本人CF症例を本研究班を中心に、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できる限り多く解析し、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、わが国独自の、疾患特異的なスクリーニング体制をさらに確立していきたい。

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

表2 わが国のCF症例のCFTR遺伝子変異のアリル頻度

125C	13
T1086I	4
dele16-17b	4
1540del10	3
L441P	3
Q98R	3
R347H	2
H1085R	2
R75X	1
M152R	1
E217G	1
460insAT	1
E267V	1
ΔF508	1
L548Q	1
L571S	1
T663P	1
D924N	1
2848delA	1
V1318I	1
Q1352H	1

(ホモ接合体 7例, 複号ヘテロ接合体 12例, ヘテロ接合体 1例)

York 1995; 3799-3876.
2. Collins FS. Cystic fibrosis, molecular biology and therapeutic implications. Science 1992; 256: 774-

- 779.
3. 吉村邦彦. のう胞性線維症. 日内会誌 2003; 92: 1198-1205.
 4. Tsui L-C. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: S47-S53.
 5. Cystic Fibrosis Mutation Data Base. [http:// www.genet.sickkids.on.ca/cftr/](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/).
 6. 吉村邦彦, 安斎千恵子, 衛藤義勝. わが国におけるCystic Fibrosis患者のCFTR遺伝子変異検索. 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膝疾患に関する調査研究 平成17年度総括・分担研究報告書 2006; 223-226.
 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* 1997; 24: 544-547.
 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* 2005; 26: 1467-1475.
 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* 1999; 56: 173-175.
 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. Cremonesi L, Ferrari M, Belloni E, Magnani C, Seia M, Ronchetto P, Rady M, Russo MP, Romeo G, Devoto M. Four new mutations of the CFTR gene (541delC, R347H, R352Q, E585X) detected by DGGE analysis in Italian CF patients, associated with different clinical phenotypes. *Hum Mutat* 1992; 1: 314-319.
 12. Hojo S, Fujita J, Miyawaki H, Obayashi Y, Takahara J, Bartholomew DW. Severe cystic fibrosis associated with a deltaF508/ R347H + D979A compound heterozygous genotype. *Clin Genet* 1998; 53: 50-53.
 13. 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* 2003; 2: 14-18.
- G. 研究発表**
1. 論文発表 該当なし
 2. 学会発表
 - 1) Anzai C, Kojima A, Miyamoto A, Sakamoto S, Takaya H, Kawabata M, Kishi K, Tsuboi E, Homma S, Eto Y, Yoshimura K. Analysis of CFTR gene mutations in Japanese individuals with cystic fibrosis. 第46回日本呼吸器学会学術講演会, 東京 2006年6月1-3日
 - 2) Yoshimura K, Anzai C, Miyamoto A, Sakamoto S, Takaya H, Kawabata M, Kishi K, Tsuboi E, Homma S, Eto Y. CFTR gene mutations detected in Japanese individuals with cystic fibrosis. 2006 European Respiratory Society Annual Congress, Munich, Germany, September 2-6, 2006.
- 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

研究成果の刊行に関する一覧表