

18.5の患者は2例であった。

#### D. 考察

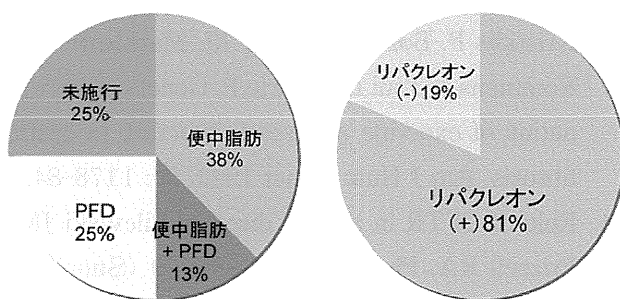
CFを起こすCFTR遺伝子変異は5つのクラスに分類されている<sup>15)</sup>。クラスI変異では変異によって生じた終止コドンや欠失などにより完全なチャネルタンパク質が合成されないため、上皮膜細胞にCFTRチャネルが発現しない。クラスII変異ではチャネルタンパク質は合成されるが、細胞膜に移行しないためチャネル機能が失われる。クラスIII変異では、チャネルの開閉を調節する部位が変異により機能を発現できず、チャネルの開閉ができない。これらの変異が両アレルに存在すると、CFTR機能は1%以下となりCFを発症する<sup>4,5,15)</sup>。腓外分泌不全(PI)を伴う古典的CF患者のCFTR遺伝子変異は、クラスI, II, IIIに属することが知られている<sup>3)</sup>。一方、チャネルタンパク質が膜に発現するが、Cl<sup>-</sup>やHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>のイオン透過性が悪くなるクラスIV変異や、チャネルタンパク質の発現量が低下するクラスV変異ではCFTR機能が5%程度残存する。このため腓外分泌機能がある程度保たれる(PS)ので、非古典的CFもしくは慢性腓炎や先天性両側精管欠損症などCF関連疾患を伴う<sup>4,5,15)</sup>。従って、CFの診断において腓外分泌不全の診断は、重症度や予後の判定と治療の選択の為に重要である。

図4は腓嚢胞線維症(嚢胞性線維症CF)登録制度<sup>14)</sup>に登録された患者の腓外分泌能の評価法を示したものである。2013年5月時点で確認された生存患者16例の内、8例が便の検鏡に

て脂肪便が確認されていた。PFD試験による腓外分泌機能の評価は6例(38%)と、未施行4例を含め約60%の症例において定量的評価がされていない現況が明らかとなった。PFD試験では検査薬を内服後、6時間にわたり蓄尿する必要があるため6歳以下の幼児に施行することは容易ではないことも一因であると推定される。

便中エラスターゼでは、軽度ないしは中等度の腓外分泌障害の診断はできない。しかし、高度の腓外分泌不全は確実に診断できるので<sup>8,9)</sup>、欧米ではCFの腓外分泌不全の診断や経過観察に用いられている<sup>10,11)</sup>。現在、日本人の健常小児の便中エラスターゼの基準値はない。そこで平成24年度は、みよし市の保育園の協力を得て、3歳から6歳の幼児103名の便中エラスターゼ濃度を測定した<sup>13)</sup>。3歳児以上の便中エラスターゼ濃度の中央値(544 μg/g)は日本人の健常成人の値(578 μg/g)に相当していた<sup>9)</sup>。身長、体重(図4)、BMIいずれも便中エラスターゼと有意の相関関係を認めなかったため、この年齢層では成人と同等の腓外分泌能があると推定される。平成25年度は1歳児のデータを追加して、110名となった。その中央値は556 μg/g(最大値784~最小値174)であった。幼児全体の平均値は532 μg/gであり、平均値-2SDの値は207 μg/gであった(表1)。これより低い値を示した幼児は2名(174と207 μg/g)であった。検査マニュアルの判定基準では、便中エラスターゼ<100 μg/gが高度の腓外分泌不全、100-200 μg/gは中等度の腓外分泌不全、正常は>200 μg/gとしている。成人や欧米人の基準値(>200 μg/g)を正常の腓外分泌機能の下限とした場合、異常低値を示した幼児は1名であった。従って、日本人乳幼児においても、この基準値(>200 μg/g)は妥当と考えられる。本法は擬陽性が少なく、特異度の高い検査であるが、乳幼児では便の水分含量が多いので見かけ上の低値となることがある。異常低値が観察された場合には1年後に再検して、原因が外分泌不全であるか、それとも希釈効果によるものであるか確認する必要がある。

CF患者における腓外分泌機能の評価法



登録CF患者(生存例 n=16) 2013年5月20日

図4 CF登録患者における腓外分泌機能の評価法

本研究は、わが国のCF患者の膵外分泌機能に関する最初の調査である。16名のCF患者は、便中エラスターゼの値によりPI患者とPS患者に明快に分類することができた(図2)。クラスI, II, III変異をもつ患者は出生時に膵病変(膵嚢胞線維症)を発症しており、膵外分泌不全を合併する<sup>3)</sup>。今回の結果はこれを裏付けるものであり、0.7歳~11歳の9名の患者が100  $\mu\text{g/g}$ 以下と、高度の膵外分泌不全に相当する値を示した。便中エラスターゼは少量の採便で簡単に膵外分泌不全が診断できるので、乳児期の古典的CFの診断に有用な検査法であるといえる。

欧米では約25%のCF患者は膵外分泌不全を伴わないPS患者である<sup>16)</sup>。しかし、ほとんどのPS患者が経過と共に膵外分泌不全を発症することが知られている。今回の調査では、PS患者は5例(31%)であった。これらの症例では30歳台まで膵外分泌機能は保たれていた(図3)。しかし、肺移植を受けた最長齢のPS患者では、便中エラスターゼが239  $\mu\text{g/g}$ と正常の下限値付近まで低下していた。臨床的にも膵外分泌機能の低下に伴う症状があり、膵酵素補充療法が施行されていた。今後、ドルナーゼアルルファやトブラマイシン吸入薬の普及に伴い、CF患者の予後の改善が期待されている。CFTRチャンネル機能が低下は慢性膵炎のリスク因子でもあり、時間の経過と共に膵外分泌機能の低下が進行する例が存在する。便中エラスターゼは、PS患者における膵外分泌の経過観察にも有用であると思われる。

閉塞性呼吸障害や繰り返す気道感染に伴う咳のため、CF患者ではエネルギー消費が大きい。膵嚢胞線維症全国疫学調査の二次調査の解析では、ほぼ全例が発育や栄養障害を示していた<sup>17)</sup>。18歳以上に達した成人10例におけるBMIの中央値は15.9(13.5~18.5)と9名がBMI<18.5であった。今回の調査では、PI患者(中央値:15.3)とPS患者(中央値:16.6)のBMIには有意差はなかった。BMI>18.5の患者は2例のみであり、膵外分泌不全の有無にかかわらず、低体重の患者が多かった。BMIは患者の予後と密接に関連しており、BMIの

低い患者は予後不良である。このため間食を含め、頻回の食事摂取が推奨されている<sup>17)</sup>。特に、PIを伴うCFでは、食事の度に消化酵素を補充しないと多量の脂肪便が生じる<sup>1)</sup>。医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議の結果を受けて高力価の消化酵素薬が承認されたので、少量の内服で十分な消化を得ることが可能になっている<sup>19)</sup>。今後、便中エラスターゼを測定することにより早期に膵外分泌不全の診断を行い、十分な消化酵素補充療法を行うことによりCF患者の日常生活の質(QOL)および栄養状態の改善が期待される。

## E. 結論

便中エラスターゼを測定することにより、日本人のCF患者における膵外分泌不全の有無を診断した。欧米人のCF患者と同じ基準値>200  $\mu\text{g/g}$ で、膵外分泌不全のある患者(PI)とない患者(PS)を簡単に鑑別できた。便中エラスターゼはCFに伴う膵外分泌不全の早期診断に有用である。

## F. 参考文献

1. 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班. 膵嚢胞線維症の診療の手引き(大槻 眞, 成瀬 達編). アークメディア 2008.
2. 成瀬 達, 石黒 洋, 山本明子, 吉村邦彦, 辻一郎, 栗山進一, 正宗 淳, 菊田和宏, 下瀬川徹. 第4回膵嚢胞線維症全国調査 二次調査の解析 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23年度総括・分担研究報告書 2012: 341-354.
3. Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC, Durie P. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 1178-84.
4. Role of CFTR in airway disease. Pilewski JM, Frizzell RA. *Physiol Rev.* 1999; 79 (Suppl 1): S215-55.
5. Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Fujiki K, Hayakawa T. Cystic fibrosis and related dis-

- eases of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 511-26.
6. 成瀬 達. 膵嚢胞線維症の診断基準. 膵嚢胞線維症の診療の手引き(大槻 眞, 成瀬 達編). *アークメディア* 2008: 18-19.
  7. Szigoleit A, Krause E, Klör HU, Kanacher L, Linder D. Elastase1 and chymotrypsin B in pancreatic juice and feces. *Clin Biochem* 1989; 22: 85-9.
  8. Stein J, Jung M, Szigoleit A, Zeuzem S, Caspary WF, Lembcke B. Immunoreactive elastase I: clinical evaluation of a new noninvasive test of pancreatic function. *Clin Chem* 1996; 42: 222-6.
  9. Naruse S, Ishiguro H, Ko SB, Yoshikawa T, Yamamoto T, Yamamoto A, Futakuchi S, Goto H, Saito Y, Takahashi S. Fecal pancreatic elastase: a reproducible marker for severe exocrine pancreatic insufficiency. *J Gastroenterol*. 2006; 41: 901-8.
  10. Cade A, Walters MP, McGinley N, Firth J, Brownlee KG, Conway SP, et al. Evaluation of fecal pancreatic elastase-1 as a measure of pancreatic exocrine function in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2000; 29: 172-6.
  11. Walkowiak J, Nousia-Arvanitakis S, Agguridaki C, Fotoulaki M, Strzykala K, Balassopoulou A, et al. Longitudinal follow-up of exocrine pancreatic function in pancreatic sufficient cystic fibrosis patients using the fecal elastase-1 test. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36: 474-8.
  12. Hahn JU, Bochnig S, Kerner W, Koenig H, Sporleder B, Lankisch PG, et al. A new fecal elastase 1 test using polyclonal antibodies for the detection of exocrine pancreatic insufficiency. *Pancreas* 2005; 30: 189-91.
  13. 成瀬 達, 星野三生子, 若月 準, 伊藤 治, 中島 守, 木村 純, 柴田時宗, 近藤志保, 中莖みゆき, 山本明子, 石黒 洋, 藤木理代, 北川元二. 便中エラスターゼによる乳幼児の膵外分泌不全の診断. 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24年度総括・分担研究報告書 2013: 259-263.
  14. 石黒 洋, 山本明子, 中莖みゆき, 成瀬 達, 吉村邦彦, 辻 一郎, 栗山進一, 正宗 淳, 菊田和宏, 下瀬川 徹, 新井勝大, 泉川公一, 今井博則, 影山さち子, 加藤忠明, 漢人直尚, 慶長直人, 洪 繁, 小島大英, 坂本修, 佐藤陽子, 真田幸弘, 清水直樹, 小路誠一, 相馬義郎, 東馬智子, 藤木理代, 柳元孝介. 膵嚢胞線維症(嚢胞性線維症 CF)登録制度. 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24年度総括・分担研究報告書 2013: 225-247.
  15. Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Ann Rev Genet* 1995; 29: 777-807.
  16. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW 3rd; Cystic Fibrosis Foundation. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*. 2008; 153: S4-S14.
  17. Stallings VA, Stark LJ, Robinson KA, Feranchak AP, Quinton H. Evidence-based practice recommendations for nutrition-related management of children and adults with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency: results of a systematic review. *J Am Diet Assoc*. 2008; 108: 832-9.
  18. 石黒 洋, 成瀬 達, 山本明子, 吉村邦彦, 辻 一郎, 栗山進一, 菊田和宏, 下瀬川徹. 膵嚢胞線維症患者の栄養障害の実態と治療の現況. 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: 359-364.
  19. 成瀬 達, 石黒 洋, 山本明子, 吉村邦彦, 正宗 淳, 下瀬川徹. 膵嚢胞線維症の新規および未承認薬の現況. 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24年度総括・分担研究報告書 2013: 248-252.

## G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表
  - 1) 成瀬 達, 柴田時宗, 近藤志保, 中莖みゆき, 山本明子, 藤木理代, 北川元二, 石黒 洋. 便中エラスターゼによる小児の膵外分泌不全の診断. 第44回日本膵臓学会大会. 仙台. 2013年7月26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

## 膵嚢胞線維症（嚢胞性線維症 CF）の栄養状態の評価

研究報告者 成瀬 達 みよし市民病院 院長

### 共同研究者

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）

石黒 洋，山本明子（名古屋大学総合保健体育科学センター）

中莖みゆき，近藤志保（名古屋大学大学院健康栄養医学）

下瀬川徹，正宗 淳（東北大学病院消化器内科），

CF 登録制度のメンバー

### 【研究要旨】

CF 患者の多くは膵酵素の分泌不全により脂質やタンパク質の消化吸収不良を呈している。本研究では CF 患者18名(3 ヶ月～37歳)の栄養状態を評価した。体格については，成長期(18歳未満)の患者11名全員において，身長が身体発育曲線の10パーセンタイルを下回り，体重は25パーセンタイルを下回っていた。また，18歳以上の患者7名の BMI は $16.3 \pm 3.4$ であった。生化学検査値については，血清アルブミン値が低値(3.5 g/dl 以下)の者は21.1%(4/19名)，ヘモグロビン値が低値(12 g/dl 未満)の者は21.1%(4/19名)であった。患者1名(11歳)の食事調査および栄養相談を開始した。

### A. 研究目的

膵嚢胞線維症(CF; cystic fibrosis)は，乳児期から発症し，腸閉塞，栄養不良，繰り返す呼吸器感染を来す遺伝性の難治性疾患である。CF 患者の多くは，膵酵素の分泌不全により，脂質やタンパク質の消化吸収不良を呈している。そのため，適切な栄養管理を行うことは，患者の予後に係わる。CF は欧米では多くみられる疾患だが，日本を含むアジア人種では非常に稀で，我が国における CF 患者の食事療法は十分に確立されていない。そこで本研究では，日本の CF 患者の栄養状態および栄養管理状況を把握するとともに，適切な栄養管理法の確立を目指す。

### B. 研究方法

CF 登録制度に登録されている患者19名(3 ヶ月～37歳，男性10人，女性9人)を対象とした。主治医より集められた個人票の項目のうち，身長，体重，膵外分泌機能，血中アルブミン値，血中ヘモグロビン値について解析した。

### C. 研究結果

CF 患者の栄養評価を表1に示す。体型については，成長期(18歳未満)の患者11名の身長および体重を，身体発育曲線を用いて評価した。その結果，身長は10パーセンタイルを下回り，体重は25パーセンタイルを下回っていた(図1a-d)。18歳以上の患者7名については，BMI が $16.3 \pm 3.4$ で，適正值(18.5～25.0)の範囲内にある者は1名のみであった(図2)。

血中アルブミン値が低値(3.5 g/dl 以下)の者は21.1%(4/19名)，血中ヘモグロビン値が低値(12 g/dl 未満)の者は42.1%(8/19名)であった。

### D. 考察

本研究では我が国の CF 患者の栄養評価を行った。その結果，成長期の CF 患者では同世代の者に比べ身長および体重が低値であり成長不良が見られた。このことは特に身長で顕著であった。発育期には種々の栄養素を必要とするが，中でもビタミンDは骨の発育に重要である。しかし，脂質の消化吸収能力が低下している CF 患者では，ビタミンDのような脂溶性

表 1 CF 患者の栄養評価

ID	年齢	性別	身長 cm	体重 kg	BMI	腺外分泌異常	アルブミン g/dL	ヘモグロビン g/dL
B1	3 ヶ月	男	54.4	3.3	11.2	あり	2.1	7.3
A12	2	男	73.0	9.1	17.1	あり	4.3	14.0
A7	5	男	98.8	14.3	14.6	あり	3.5	11.8
A9	5	女	99.7	14.8	14.9	あり	4.3	14.5
A13	5	女	97.4	12.6	13.2	あり	4.0	13.3
A6	6	女	104.5	16.8	15.4	不明	4.1	13.5
A11	6	女	102.8	16.0	15.1	あり	3.1	10.9
A17	8	女	108.9	18.0	15.2	あり	3.7	10.5
A10	9	女	115.8	19.9	14.8	脂肪便	4.1	13.3
A14	9	女	124.5	22.1	14.3	あり	4.4	12.8
A15	11	女	128.0	24.0	14.6	あり	4.0	9.3
A8	18	男	157.5	53.2	21.4	不明	4.7	16.4
A4	23	男	140.1	29.6	15.1	不明	3.7	12.4
A1	25	男	157.5	45.5	18.3	あり	4.6	13.7
A16	25	男	182.0	57.3	17.3	なし	3.8	14.3
A3	29	男	161.3	33.4	12.8	あり	2.9	9.2
C2	30	男	169.2	50.0	17.5	不明	4.3	14.9
B2	33	男	不明	不明	不明	不明	2.6	10.0
A2	37	女	154.0	27.5	11.6	なし	3.9	10.2

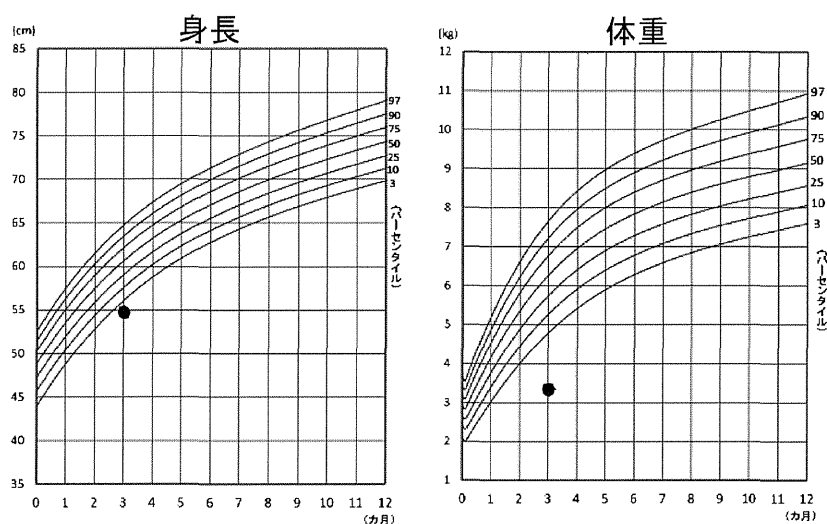


図 1-a 身体発育曲線：乳幼児期(男児)  
● 3 ヶ月 (ID: B1)

ビタミンは不足しがちな栄養素となる。欧米では、CF 患者の成長や健康維持のために、ビタミン D の積極的な摂取を推奨している<sup>1,2)</sup>。我が国でも今後 CF 患者の血中貯蔵型ビタミン D (25(OH)D) および活性型ビタミン D (1,25

(OH)2D)) を測定し、ビタミン D の不足の状況を調査し、摂取の推奨を行う必要がある。

BMI については、ほとんどの患者において低値であった。アメリカ栄養士会は、CF 患者の BMI と肺機能との相関を示し、適切な食事

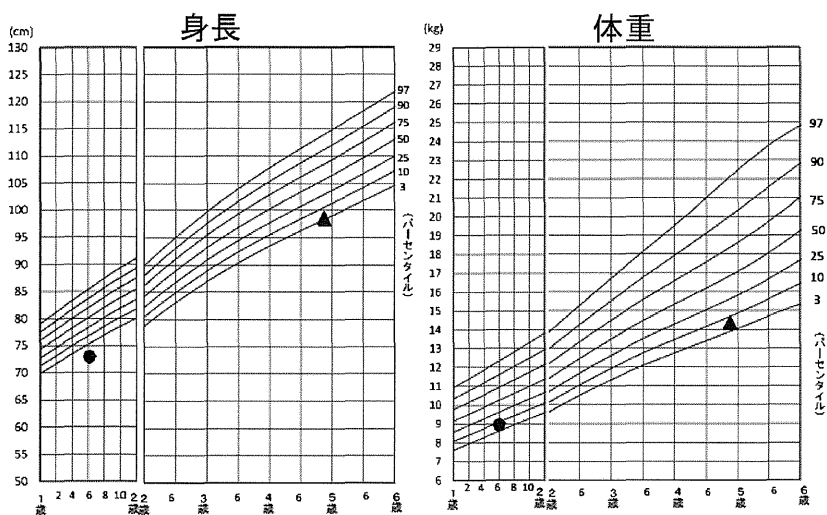


図 1-b 身体発育曲線：幼児期(男児)  
 ● 1歳6ヵ月(ID:A12) ▲ 4歳8ヵ月(ID:A7)

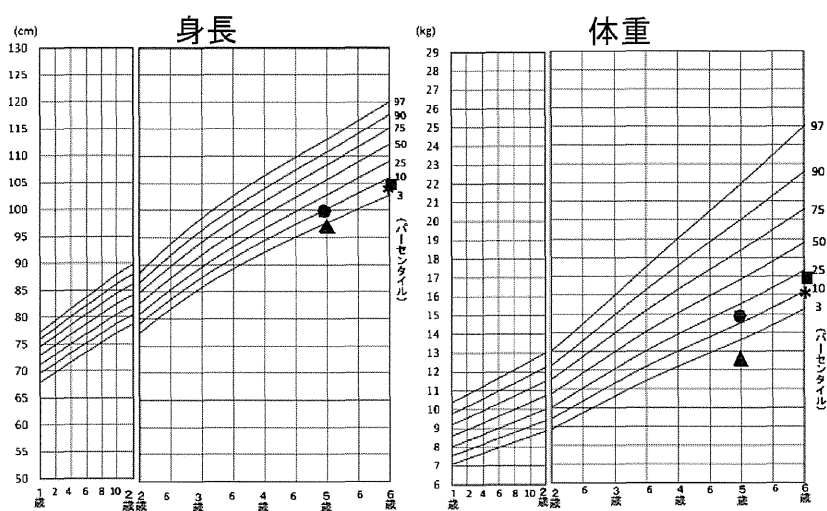


図 1-c 身体発育曲線：幼児期(女児)  
 ● 4歳10ヵ月 (ID:A9) ▲ 4歳11ヵ月 (ID:A13) ■ 6歳1ヵ月 (ID:A6) \* 6歳 (ID:A11)

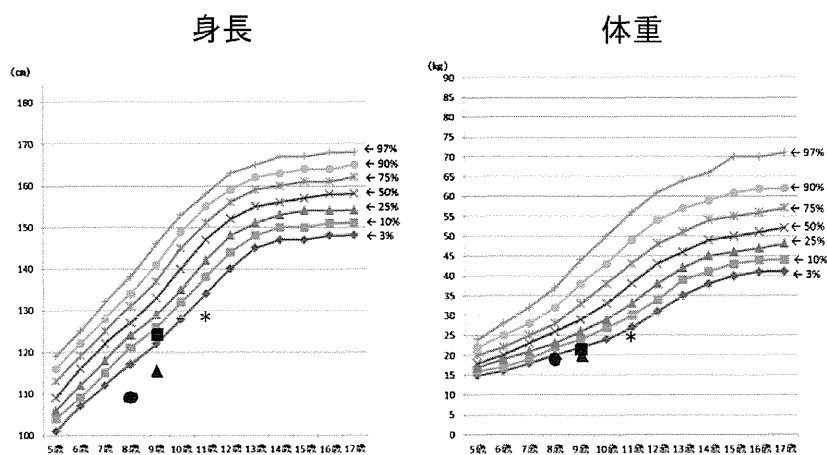
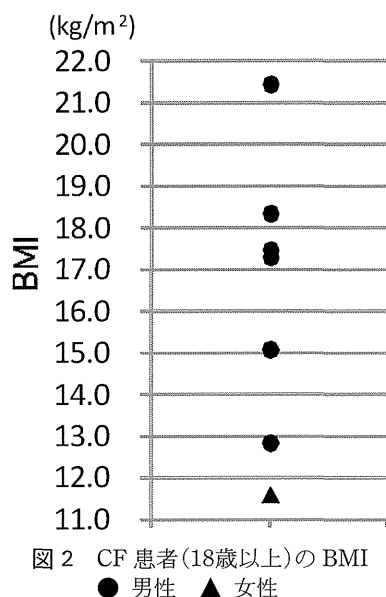


図 1-d 身体発育曲線：学童期(女児)  
 ● 8歳 (ID:A17) ▲ 9歳 (ID:A10) ■ 9歳 (ID:A14) \* 11歳 (ID:A15)



指導によるBMIの上昇の必要性を述べている<sup>3)</sup>。我が国におけるCF患者の栄養管理法はまだ確立されていない。今後、患者の食事調査を行い栄養摂取状況を把握するとともに、患者および家族への食事指導法を確立する必要がある。

#### E. 結論

我が国のCF患者において成長不良およびBMIの低値が認められた。今後適切な栄養ケアを行う必要がある。

#### F. 参考文献

1. Sermet-Gaudelus I, Bianchi ML, Garabedian M, Aris RM, Morton A, Hardin DS, Elkin SL, Compston JE, Conway SP, Castanet M, Wolfe S, Haworth CS, European cystic fibrosis bone mineralisation guidelines. *J Cyst Fibros*. 2011 Jun; 10 Suppl 2: S16-23.
2. Finklea JD, Grossmann RE, Tangpricha V, Vitamin D and chronic lung disease: a review of molecular mechanisms and clinical studies. *Adv Nutr*. 2011 May; 2(3): 244-53.
3. Stallings VA, Stark LJ, Robinson KA, Feranchak AP, Quinton H; Clinical Practice Guidelines on Growth and Nutrition Subcommittee; Ad Hoc Working Group. Evidence-based practice recommendations for nutrition-related

management of children and adults with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency: results of a systematic review. *J Am Diet Assoc*. 2008 May; 108(5): 832-9.

#### 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



Ⅲ. 腭嚢胞線維症  
2) 各個研究プロジェクト

## わが国の嚢胞性線維症(cystic fibrosis)患者の病態解析と新規治療の検討

研究報告者 吉村邦彦 日本赤十字社大森赤十字病院呼吸器内科 部長

### 共同研究者

安齋千恵子(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)

石黒 洋(名古屋大学総合保健体育科学センター), 成瀬 達(みよし市民病院)

下瀬川徹(東北大学病院消化器内科)

### 【研究要旨】

嚢胞性線維症(cystic fibrosis, CF)は、欧米コーカサス系白人種に多い常染色体劣性遺伝性疾患であり、CFTR 遺伝子の変異に起因するが、すでに2,000種近い病的 CFTR 変異がデータベース上に登録されている。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 の変異様相が、次第に明らかにされつつある。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、われわれが解析し得た症例はこれまで2011年度に報告した2例を含めて合計27例に及んだ。わが国の CF 患者における CFTR 遺伝子変異は、国際的 CFTR 遺伝子変異データベース(CFMD)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。

一方、欧米では CF に対する薬物療法の進歩がめざましい。米国 Vertex 社の CFTR 蛋白“potentiator”である ivacaftor (VX-770)が、遺伝子変異 G551D(クラスⅡ変異)を有する CF 患者で肺機能(1秒量のベースラインからの変化量)を有意に増加させることが示され、2012年1月末に CF 患者の治療薬として米国 FDA の承認後、Kalydeco™として販売開始された。その後、同年7月にヨーロッパ、12月にカナダ当局の承認を受けるに至っている。さらに新規の CFTR 蛋白の“corrector”として lumacaftor (VX-809)が同社で開発され、CFTR F508del(クラスⅢ変異)ホモ接合体患者を対象とした ivacaftor との併用療法効果を検討する試験が行われた。2012年度にはこれらの新規開発薬物の治療に関して考察を行った。

2013年度には新規に本研究班によって CF 症例登録制度が始まり、国内の複数施設から CF 症例が登録されるようになった。2013年度には CF 症例の胸部画像に関して、登録された18症例のうち、CT 画像が確認できる13例につき検討を行った。症例は3歳から36歳と幅のある年齢分布を示し、罹病期間に相関して画像所見にも差異が認められた。典型的な画像所見は小葉中心性に散布する小粒状影、管状ないし嚢状の気管支拡張所見、斑状の濃度上昇、無気肺所見、などであった。わが国の CF に認められる胸部画像所見はこれまでの成書に記載された欧米の CF 症例の画像所見ときわめて類似した特徴を有していた。

### 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<sup>-</sup> 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<sup>1~5)</sup>。CF は欧米白人種においては高頻度に発症するが、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<sup>3)</sup>。わが国の CF 症例に関しては昭和57年からの厚生省

特定疾患難治性稀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<sup>6)</sup>、Yamashiro ら<sup>7)</sup>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。ハワイ在住の東洋人での CF 発症頻度が出生9万人以上あたり1人であり<sup>8)</sup>、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 検体の得られた少数例の患者での“c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del)” (legacy name: 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 SSCP 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<sup>3,5,6)</sup>。これはわが国の CF 患者における CFTR 変異が欧米患者と比較して、変異の頻度およびそのスペクトラムが全く異なっていることに起因する。このような経緯の中、ほぼ10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<sup>3,6)</sup>、2011-2013 年度においては、引き続きわが国の CF 患者における CFTR 遺伝子変異の実態を解明することを目的とし、合わせて欧米における新規 CF 薬の開発とその臨床応用の現状を調査した。さらに、2013年度には同年より始まったわが国の CF 患者登録制度に全国より集積された CF 患者について、とくに呼吸器病態の中の画像所見の特徴に関して解析を行った。

## B. 研究方法

2011年度の CFTR 遺伝子変異検索では、検査の趣旨説明と同意取得の上で末梢血の単核球から DNA を抽出し、CFTR 遺伝子の全27エクソンの塩基配列を、それぞれの 5', 3' 近接領域を含めて、直接シークエンス法で解析した。

新規 CF 治療薬に関しては、2012年内に欧米で認可された ivacaftor、ならびに臨床試験中の lumacaftor (VX-809) に関する有効性、有用性に関して文献的に検証した。

2013年度より当研究班の活動として始まった CF 症例登録制度で国内の複数施設から確診例および疑い例を含む CF 症例がかなりの数で登録されていることに鑑み、登録された生存例16症例、死亡例2例の計18例の CF 症例のうち、CT 画像が複数断面で確認できる13例につき検討を行った。胸部 CT で検出できる病変を、気管支拡張(管状、嚢状を含む)、小葉中心性粒状影、斑状影、無気肺、嚢胞性変化に分類してその有無を確認した。また、気道病変の成因に密接にかかわる緑膿菌感染の有無に関して

も、症例カードから情報の得られる範囲内で検討した。

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、主治医から当該症例の CFTR 遺伝子変異検索の臨床的、遺伝学的意義を患者本人ないし未成年の場合は保護者に説明した上、同意を取得した。画像所見に関しては患者情報を性別、年齢以外は匿名として、個人情報をも特定できない配慮を行った。

## C. 研究結果

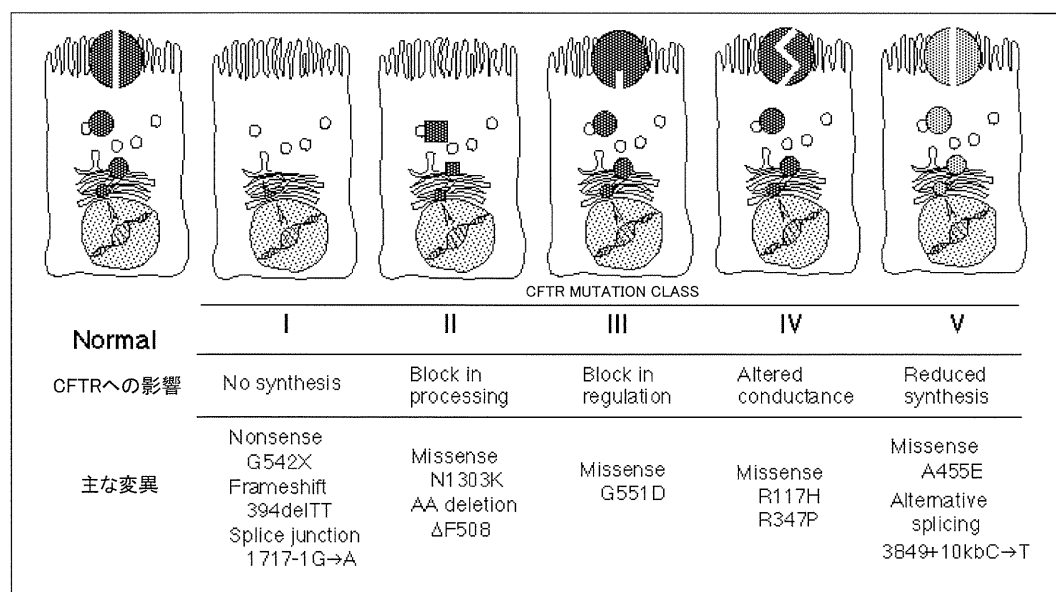
2011年度に施行した日本人の姉妹例の遺伝子解析では、いずれの症例でも一方の CFTR 遺伝子アレルの exon 4 に p.M152R[c.455T>G]変異が確認された。この変異は2000年にわれわれが当時1歳半の CF 女児において世界で初めて報告した変異であり、cDNA の455番目の塩基が T→G に変わるため、結果として152番目のアミノ酸残基がメチオニンからアルギニンに変わるミスセンス変異で、すでに CFMD に報告されている変異である<sup>5,9)</sup>。以上、これまでにわれわれが遺伝子変異解析し得た CF 症例は合計27例となった。表1にその概略をまとめた。

CFTR 変異は結果的に生じる CFTR 蛋白機能の質的・量的障害に基づいてクラス I~V に分類される(図1)<sup>4,10)</sup>。米国 Vertex Pharmaceuticals Inc. (Vertex 社)が開発した CFTR 蛋白の“potentiator”である ivacaftor (VX-770) が、クラス III の CFTR 遺伝子変異 G551D を少なくとも一方のアレルに有する12歳以上の CF 患者での二重盲検臨床試験において、予測1秒量を投与開始後24週以上48週まで約10%増加させることが示された<sup>11)</sup>。このほか、ivacaftor 群で急性増悪の危険性が55%減ずること、自覚症状の改善、体重の平均3.1 kg の増加、汗中 Cl<sup>-</sup> イオン濃度の -48 mEq/L 改善、QOL (CFQ-R スコアで6ポイント改善)においても

表 1 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 <sup>-</sup>	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 + dele16-17b	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	deceased/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
21	11y	F	PS	22	R1453W	24	ND	?	alive
22	18y	M	PI	ND	I556V	11	ND	?	alive
23	4m	F	PI	ND	125C	1	G85R	3	alive
24	42y	F	PS	ND	E217G	4	Q1352H	22	alive
25	2y	F	PS	207	dele16-17b	16-17b	dele16-17b	16-17b	deceased
26*	7y	F	PI	150	M152R	4	ND	?	alive
27*	3y	F	PI	ND	M152R	4	ND	?	alive

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



(文献4より引用, 一部改変)

図 1 CFTR 遺伝子変異の蛋白産生に及ぼす影響のクラス分類と代表的な変異

有意に優れた結果が示された<sup>11)</sup>。この成績をもとに、2012年1月末にCF患者の治療薬として米国FDAによる承認を受け、Vertex社はivacaftorをKalydeco™として販売開始した。その後、同年7月にヨーロッパ、12月にカナダ当局の臨床使用承認を受けるに至っている。一方、クラスIIのCFTR遺伝子変異の代表格であるF508delに対して、同様にVertex社の開発したCFTR蛋白“corrector”であるlumacaftor(VX-809)のIIa相のCFTR F508delホモ接合体患者を対象とした臨床試験では、lumacaftor単剤での肺機能に対する有効性は確認されず、唯一汗中Cl<sup>-</sup>イオン濃度の僅かな低下(-8 mEq/L)が得られるに留まった<sup>12)</sup>。その後、lumacaftorとivacaftorとの併用療効果を検討するPhase II試験をCFTR F508delホモ接合体患者を対象に行い、肺機能(1秒量)の改善(予測1秒量の6.1%の増加)、汗中Cl<sup>-</sup>イオン濃度の約10 mEq/L程度の低下得られることを、Boyleらが2012年10月の北米CF会議

で報告している<sup>13)</sup>。

2013年度にわが国のCF症例登録制度で主治医から登録された症例のうち、症例番号のA1~17は調査登録時で生存例、B1~2は死亡例である。胸部単純X線写真のある症例ではその所見も加えた。胸部CT所見に関しては、上記所見の有無を記載するにとどめ、定量ないし半定量的な評価は今回行わなかった。その結果は表2に示す通りである。胸部所見は基本的に患者の年齢、罹病期間、気道感染症起炎菌における緑膿菌の関与、などによって概ね共通の所見を呈していた。胸部X線写真では気管支の透亮像を伴う浸潤影、気管支の拡張像が半数以上の症例で認められた。胸部CTでは囊状ないし管状の気管支拡張が胸部CTの評価可能な13例中11例(84.6%)に、斑状影が8例(61.5%)、小葉中心性粒状影が7例(53.8%)、無気肺5例(38.5%)、囊胞性変化3例(23.1%)に認められた。気管支拡張、囊胞性変化は気道病変の罹病期間の長さを反映する構造改変と考えら

表2 わが国のCF登録症例の胸部画像所見

症例番号	性別	年齢	緑膿菌気道感染	胸部 Xp	胸部 CT				
					気管支拡張	小葉中心性粒状影	斑状影	無気肺	囊胞性変化
A1	M	24	+	円形無気肺	-	-	-	+	-
A2	F	36	+	過膨張, 開胸術後	+	+	-	-	+
A3	M	29	+						
A4	M	23			+	+	+	-	-
A6	F	5	-		-	+	+	+	-
A7	M	4	+						
A8	M	17		浸潤影, 気管支拡張	+	+	+	-	+
A9	F	5	-						
A10	F	8	-		+	-	-	-	-
A11	F	6	-	浸潤影, 気管支拡張					
A12	M	1							
A13	F	5	-	斑状影, 気管支拡張	+	+	+	-	-
A14	F	9	-		+	-	-	-	-
A15	F	10			+	+	+	-	-
A16	M	25	+		+	-	+	+	-
A17	F	7	-		+	+	+	-	-
B1	M	1	+	斑状影, 気管支拡張	+	-	+	+	-
B2	M	34	+	気管支拡張, 囊胞	+	-	+	-	+

(A:登録時生存例, B:登録時死亡例)

れ、緑膿菌の持続的気道感染のある症例は画像で確認できる気管支の構造改変に加え、患者年齢も多くが高く、CF発症からの経過の長さが、画像所見、難治性緑膿菌気道感染の成立に密接に関わることが推察された。

#### D. 考察

2011年度に報告した2症例は、胎便イレウス、臍機能不全、難治性呼吸器感染症と呼吸不全を呈し、姉症例では汗Cl<sup>-</sup>濃度の異常高値も確認された典型的なCFである。一方のCFTR遺伝子にp.M152R[c.455T>G]変異が検出されたが、既報告例とは血縁関係はなく、出生地も異なる<sup>9)</sup>。詳細な検討にもかかわらず、もう一方のアリルでのCFTR変異は確認されていない。現時点ですでに重症であるため、今後の予後の厳しさが推定される。これまで解析した27例のCF症例における遺伝子変異ではCFTRdele16-17b変異がアリル頻度6となり、最頻の変異となっている<sup>6)</sup>。

2012年度に引用・検討したCFTR治療薬は、上述のように主としてivacaftor(VX-770, KALYDECO<sup>TM</sup>)とlumacaftor(VX-809)であるが、いずれもCFTR蛋白の機能を調整することで、肺機能の改善などの臨床効果を得るといふ、これまでの対症的CF治療薬にはない画期的な分子レベルの調整薬である<sup>10)</sup>。

図1に示した様に、ivacaftorはG551Dに留まらずその他のクラスⅢの変異への臨床応用と、R117H, R347PなどのクラスⅣの変異へ治療効果も期待されている<sup>10)</sup>。

2013年度にCF症例登録制度で研究班に登録されたわが国のCF症例は小児から成人まで年齢構成では幅広く分布していた。画像データで観察可能な病変は、小気管支や細気管支を中心にした炎症所見を表わす小葉中心性の小粒状影、炎症反復の結果生じた管状や嚢状の気管支拡張所見、気管支肺炎を表わす斑状影、肺胞の破壊と気腔拡大を表わす嚢胞性変化、などと記載することができる。とくに、気管支拡張所見は気道病変の罹病期間の長さを反映する構造改変と考えられ、年齢が比較的高く、CFとしても罹病期間の長い症例に認められている。ま

た、緑膿菌の喀痰からの持続検出は同様に罹病期間、重症度に相関しており、気管支拡張や嚢胞などのcolonizationしやすい形態的環境が関与しているものと考えられる。一方、肺炎を示唆する浸潤影のうち、比較的小範囲の斑状影は、気道病態に加えて肺実質の感染症である気管支肺炎の存在を意味しており、時に増悪して入院治療を要する際に、比較的高頻度に検出されることが伺われた。これらの所見は、従来欧米人の小児や成人のCF患者で認められる画像所見として成書に記載された報告にきわめて酷似しており、今後CFが疑われる症例では画像所見からもCF診断へのアプローチが可能であることを示唆している<sup>14,15)</sup>。

#### E. 結論

CF症例においては人種や民族により臨床像や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上で対象集団の人種、民族性がきわめて重要である。今後わが国の日本人CF症例に関し、本研究班を中心として、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遺伝子変異を解析し、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、わが国独自の疾患特異的なスクリーニング体制を確立すべきであると考えられた。

CF症例登録制度をもとに国内の複数施設から登録されたCF症例のうち、胸部画像に関しては欧米CaucasianのCF症例との共通性が確認できた。

今後は欧米で認可されたivacaftor(VX-770)、ならびに臨床試験中のlumacaftor(VX-809)などの薬物が、わが国のCF症例に対しても臨床応用が可能であるかの検証が必要と考えられる。

#### 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. 日本における嚢胞性線維症. *呼吸*, 30(6): 535–545, 2011.
  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, 安齋千恵子. わが国における嚢胞性線維症症例のCFTR 遺伝子変異解析. 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年度総合研究報告書, p371–374, 2012.
  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. 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 Mutat (Online)*, May; 15(5): 485, 2000.
  10. Rowe SM, Borowitz DS, Burns JL, Clancy JP, Donaldson SH, Retsch-Bogart G, Sagel SD, Ramsey BW. Progress in cystic fibrosis and the CF Therapeutic Development Network. *Thorax*, 67: 882–890, 2012.
  11. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevinek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordonez C, Elborn JS; VX08–770–102 Study Group. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*, 365: 1663–1672, 2011.
  12. Clancy JP, Rowe SM, Accurso FJ, Aitken ML, Amin RS, Ashlock MA, Ballmann M, Boyle MP, Bronsveld I, Campbell PW, De Boeck K, Donaldson SH, Dorkin HL, Dunitz JM, Durie PR, Jain M, Leonard A, McCoy KS, Moss RB, Pilewski JM, Rosenbluth DB, Rubenstein RC, Schechter MS, Botfield M, Ordonez CL, Spencer-Green GT, Vernillet L, Wisseh S, Yen K, Konstan MW. Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax*, 67: 12–18, 2012.
  13. Boyle M. The investigational CFTR corrector, VX-809, co-administered with the oral potentiator ivacaftor improved CFTR and lung function in F508del homozygous patients: Phase 2 study results. Poster #260 in the 2012 North American Cystic Fibrosis Conference.
  14. Davis SD, Fordham LA, Brody AS, Noah TL, Retsch-Bogart GZ, Qaqish BF, Yankaskas BC, Johnson RC, Leigh MW. Computed tomography reflects lower airway inflammation and tracks changes in early cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 175: 943–950, 2007.
  15. Robinson TE. Computed tomography scanning techniques for the evaluation of cystic fibrosis lung disease. *Proc Am Thorac Soc*, 4: 310–315, 2007.
- ## G. 研究発表
1. 論文発表
    - 1) 吉村邦彦, 安齋千恵子. わが国の cystic fibrosis 患者における CFTR 遺伝子変異の解析状況. 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; 315–318.
    - 2) 吉村邦彦, 安齋千恵子. わが国の cystic fibrosis 患者における 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 難治性膵疾患に関する調査研究. 平成20–22年度総合研究報告書 2011; 433–437.

- 3) 吉村邦彦. 日本における嚢胞性線維症. 呼吸 2011; 30(6): 535-545.
  - 4) 吉村邦彦, 安斎千恵子. わが国における嚢胞性線維症症例のCFTR 遺伝子変異解析. 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年度総合研究報告書 2012; 371-374.
  - 5) 吉村邦彦, 江島美保. 嚢胞性線維症. 別冊日本臨床. 新領域別症候群シリーズ No. 20, 先天代謝異常症候群(第2版)下. 一病因・病態研究, 診断・治療の進歩— 2012; 821-830.
  - 6) 吉村邦彦. わが国のCF. 日本胸部臨床 2012; 71(増刊号): S101-S109.
  - 7) 吉村邦彦, 江島美保. のう胞性線維症におけるトランスレーショナルリサーチ. 呼吸器内科 2012; 21(6): 565-574.
  - 8) 石黒 洋, 山本明子, 中莖みゆき, 成瀬達, 吉村邦彦, 菊田和宏, 正宗 淳, 下瀬川徹, 新井勝大, 泉川公一, 今井博則, 影山さち子, 加藤忠明, 漢人直之, 慶長直人, 洪 繁, 小島大英, 坂本修, 佐藤陽子, 眞田幸弘, 清水真樹, 少路誠一, 相馬義郎, 東馬智子, 藤木理代, 柳元孝介. 肺嚢胞線維症(嚢胞性線維症 CF)登録制度. 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24年度総括・分担研究報告書 2013; 225-247.
  - 9) 成瀬 達, 石黒 洋, 山本明子, 吉村邦彦, 正宗 淳, 下瀬川徹. 肺嚢胞線維症の新規および未承認薬の現況. 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24年度総括・分担研究報告書 2013; 248-252.
  - 10) 吉村邦彦, 安斎千恵子. 嚢胞性線維症に対する新たな薬物療法. 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24年度総括・分担研究報告書 2013; 255-258.
  - 11) 吉村邦彦. cystic fibrosis と鼻副鼻腔病変. JOHNS 2013; 29(5): 871-875.
2. 学会発表
- 1) Yoshimura K, Anzai C, Ejima M, Tsujikawa Y, Maniwa K, Tomoyasu H. CFTR Gene Mutation Detected in Japanese Individuals with Cystic Fibrosis are Quite Distinct from those of the Caucasians. 第51回日本呼吸器学会学術講演会. 東京. 2011年4月22日
  - 2) Yoshimura K, Anzai C, Ejima M, Tsujikawa Y, Maniwa K. Genetic Analysis of the CFTR Gene Mutations in Japanese Patients with Cystic Fibrosis. 第52回日本呼吸器学会学術講演会. 神戸. 2012年4月22日
  - 3) Yoshimura K, Anzai C, Ejima M, Tsujikawa Y, Maniwa K. Genetic Analysis Of The CFTR Gene Mutations In Japanese Patients With Cystic Fibrosis. American Thoracic Society International Conference, San Francisco, California, USA. 2012.5.18-23.
- 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 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

中荻みゆき, 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  $\text{Cl}^-$  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  $\text{dele16-17b}$ (7),  $\text{E217G}$ (1),  $\text{L441P}$ (2),  $\text{1540del10}$ (1),  $\text{Y517H}$ (1),  $\text{Q1042TfsX5}$ (1),  $\text{T1086I}$ (1),  $\text{exon1}$  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  $\text{F508del}$ (3),  $\text{R1066C}$ (2),  $\text{H1085R}$ (1),  $\text{182delT}$ (1),  $\text{R75X}$ (1),  $\text{R347H}$ (1),  $\text{1609delCA}$ (1),  $\text{G542X}$ (1),  $\text{Y563H}$ (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。 $\text{Y517H}$ ,  $\text{Q1042TfsX5}$  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  $\text{Cl}^-$  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)<sup>1)</sup>。

#### 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)<sup>2,3)</sup>。

(倫理面への配慮)

「膵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

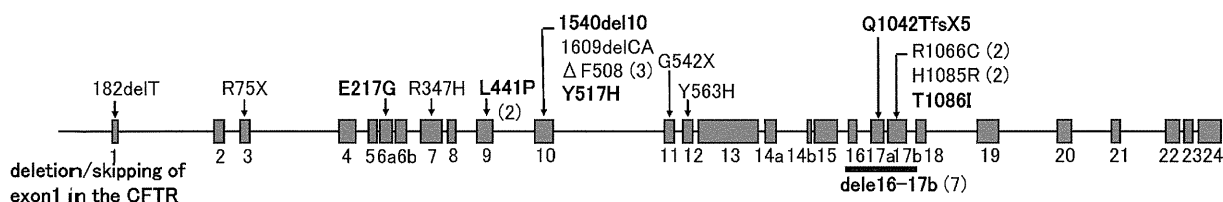
図1に示す CF 原因変異が検出された(表

1). アジア人に特有な dele16-17b<sup>3)</sup>, E217G<sup>4)</sup>, L441P<sup>5)</sup>, 1540del10<sup>6)</sup>, Y517H, Q1042TfsX5, T1086I, exon1 欠損トランスクリプト<sup>3)</sup>の 8 種, 及び欧米で報告例のある 182delT<sup>7)</sup>, R75X<sup>8)</sup>, R347H<sup>9)</sup>, F508del<sup>10)</sup>, 1609delCA<sup>11)</sup>, G542X<sup>12)</sup>, Y563H<sup>13)</sup>, R1066C<sup>14)</sup>, R1085R<sup>15)</sup>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<sup>1)</sup>. 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 PCR<sup>2)</sup>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 <sup>-</sup> (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

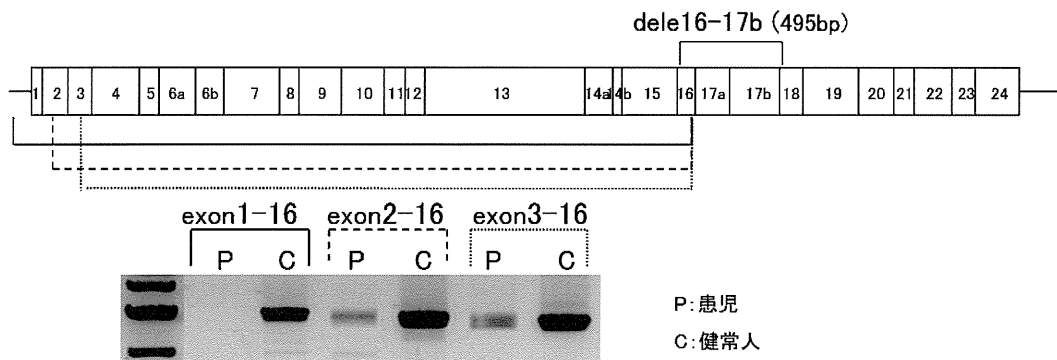
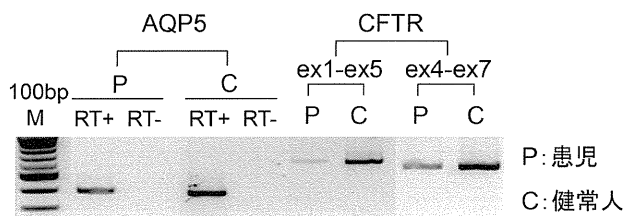


図2 鼻粘膜スワブから抽出した転写体の RT-PCR (症例 2)



	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)<sup>3)</sup>。

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<sup>16)</sup>。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。通常の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<sup>17)</sup>, 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<sup>18)</sup>、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<sup>-</sup> 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<sup>®</sup>)、トブラマイシン吸入薬(トービイ<sup>®</sup>)、パンクレリパーゼ(リパクレオン<sup>®</sup>)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