

令和元年6月15日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09392

研究課題名(和文)患者由来腸管オルガノイドを用いた嚢胞性線維症の個別化医療の研究

研究課題名(英文) A study to establish individualized medicine of cystic fibrosis using intestinal organoids derived from patients

研究代表者

石黒 洋 (Ishiguro, Hiroshi)

名古屋大学・総合保健体育科学センター・教授

研究者番号：90303651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：嚢胞性線維症は、CFTR遺伝子の病的変異によりCFTRイオンチャネルの機能が喪失し、気道、腸管、膵管などが粘稠な分泌液で詰まりやすくなる難病である。本研究では、嚢胞性線維症モデルマウスの小腸、大腸、膵臓およびヒト正常大腸粘膜から腸管オルガノイドを作成し、CFTRに依存する腸液分泌を測定した。患者レジストリに2016～2018の3年間で18名を登録した。日本で最もよく見られる $\Delta F508$ 変異の性質を培養細胞(CHO細胞)を用いて調べたところ、蛋白は発現したが成熟化が不十分であり細胞膜に移行しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嚢胞性線維症はヨーロッパ人種に多くアジア人種では稀な疾患であるが、日本の患者は重症が多く2018年現在の平均生存期間は約23年である。原因となっている変異CFTRに対する分子治療薬の使用に向けて、基盤となるデータが必要とされている。本研究では、生体に近い条件で変異CFTRの性質を解析するために、患者の腸管粘膜サンプルからオルガノイドを作成し、CFTRに依存する腸液分泌を測定する方法を確立した。また、患者レジストリの事務局として蓄積した臨床データをもとにして診療の手引きを改訂し、主治医を含む医療関係者、患者とその家族に還元した。

研究成果の概要(英文)：Cystic fibrosis is caused by loss of CFTR function due to severe mutations in both alleles of the CFTR gene. It is an intractable disease that lumen of airway, intestine, pancreatic duct, etc. is obstructed with sticky mucus. To examine CFTR-dependent intestinal secretion, in the present study, organoids were established from small and large intestine and pancreatic duct of a mouse model of cystic fibrosis and samples of human large intestine. Principle investigator organizes the patient registry where 18 patients were registered during 2016-2018. When  $\Delta F508$ -CFTR, the most frequent mutation in Japan, was expressed in CHO cells, maturation of CFTR protein was not sufficient and the mutant CFTR did not reach plasma membrane.

研究分野：消化器生理学

キーワード：嚢胞性線維症 CFTR 腸管オルガノイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis : CF) は、*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) 遺伝子の変異を原因とする劣性遺伝性疾患である。CFTR タンパクは全身の管腔臓器の上皮膜に発現し、Clチャンネルとして働くだけでなく、様々なイオン輸送体を制御する。CF では、CFTR の機能障害により、気道、腸管、膵管、胆管などの管腔内の粘液 / 分泌液が酸性化し過度に粘稠となり、管腔が閉塞して感染し易くなる。典型例では、生直後に胎便性イレウスを起こし、幼児期に膵臓が萎縮して膵外分泌不全による栄養不良を来し、その後、呼吸器感染を繰り返して呼吸不全となる。2015 年 7 月に難病に指定された。

(2) 研究代表者は、厚労科研難治性疾患対策事業の研究分担者として、CF を担当している。日本の CF 患者は重症例が多く、平均生存期間は約 22 年と欧米 ( ~ 35 年 ) に比べて予後が悪い。2013 年より CF の基本的な対症療法薬が全て国内で処方できるようになる等の対策がとられているが、分子治療薬による根本的治療の実現が急務である。

(3) CFTR 遺伝子変異は 2,000 種類を超え、人種によってスペクトルが異なる。それぞれの変異により CFTR 機能障害の性質と程度は様々であり、従って、患者により重症度は多様である。dele 16-17b を含むほとんどの日本人特有の CFTR 変異体については発現と機能の解析が行われておらずクラス分類が不明であり、分子治療薬を使うための基礎データがない。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の主な目的は、CF 患者由来腸管オルガノイドを樹立し、日本人型 CFTR 変異体の *in vivo* における分子病態を明らかにし、分子治療薬の効果を調べ、個別化治療に向けた基礎データを得ることである。

(2) 日本の CF 患者に見られる変異 CFTR タンパクの発現、成熟化、膜 / 細胞内局在、Clチャンネル活性を解析しクラス分類し、レジストリ事務局として収集した臨床上的表現型 (CFTR 機能として汗中 Cl濃度、膵外分泌機能として便中膵エラスターゼ) および重症度 (肺機能、栄養状態) との関係解析する。

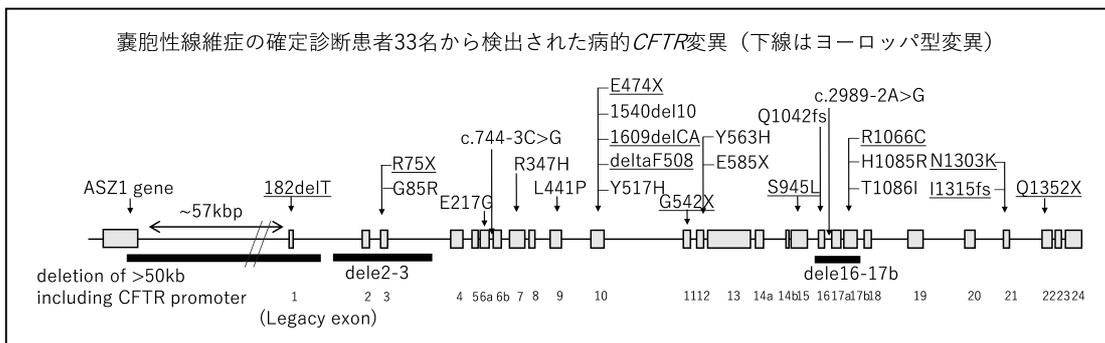
### 3. 研究の方法

(1) CF モデルマウス ( F マウス ) およびヒト正常大腸粘膜からの腸管オルガノイドの作成と CFTR 依存性腸液分泌の解析

粘膜から絨毛をそぎ落とし EDTA で処理して、単離陰窩を得る。種々の成長因子とともに基底膜を主成分とするマトリゲル中で三次元培養すると、腸管オルガノイドが形成され、成長、budding が始まる。budding したオルガノイドをメカニカルに分離処理し継代する。cyst 様になったオルガノイドを用いて、管腔内への腸液分泌を解析した。

(2) アジア型 / 日本型変異 CFTR の分子病態の解析

患者レジストリに 2016 ~ 2018 の 3 年間で 18 名を登録した。これらを合わせて、2007 年以降、全国の医療機関から依頼されて CF の遺伝子診断を実施しており、下図は、33 名の確定診断患者 (全 66 アレル) から検出された 27 種類の病的 CFTR 変異の位置を示す。



変異 CFTR を CHO 細胞に強制発現させ、ウェスタンブロッティングにより蛋白発現および成熟化 (グリコシル化) を、パッチクランプ法により Clチャンネル機能を解析する。また、共焦点顕微鏡を用いて、細胞内、細胞膜局在を解析する。

CF と確定診断されながらもエクソン部に変異が検出されない症例については、鼻粘膜上皮細胞の CFTR トランスクリプト量の減少を RT-PCR を用いて評価するとともに、海外研究協力施設 (シカゴ Case Western Reserve 大学遺伝ゲノム学研究室) と共同で、次世代シーケンサーを用いたプロモーター部および転写調節領域の解析を実施する。

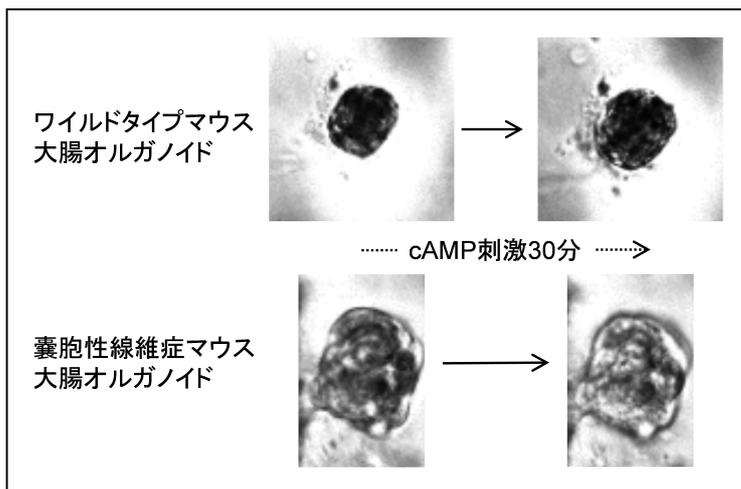
(3) レジストリ事務局として、日本における CF 患者の臨床データ (汗中 Cl濃度、便中膵エ

ラスターゼ、など)を収集する。

#### 4. 研究成果

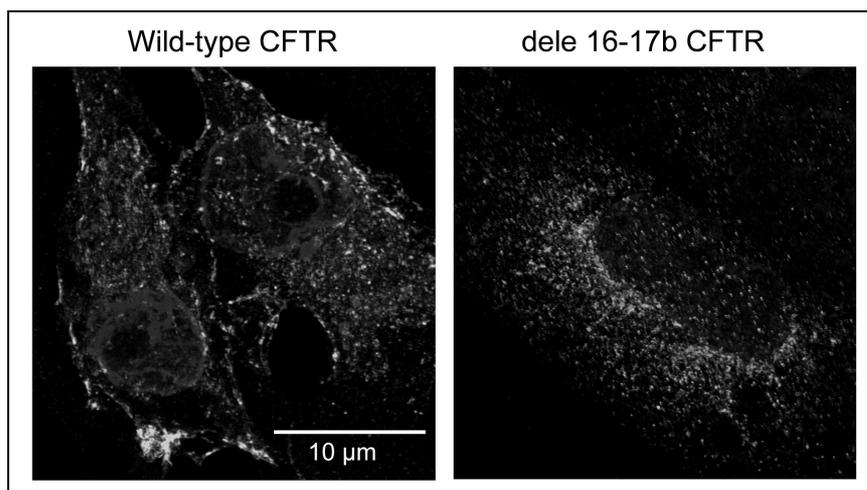
(1) CF モデルマウス ( F マウス ) およびヒト正常大腸粘膜からの腸管オルガノイドの作成と CFTR 依存性腸液分泌の解析

小腸および大腸から腸管オルガノイドを作成、継代培養する系が確立された。マウスおよびヒト腸管オルガノイドで、CFTR 依存性の腸液分泌を確認することができた。また、臓器特異性の有無を確認するために、膵管オルガノイドの作成を試み、作成に成功した。下図は、マウス大腸由来のオルガノイドにおける CFTR 依存性腸液分泌を示す。



(2) アジア型 / 日本型変異 CFTR の分子病態の解析

日本で最もよく見られる *dele 16-17b* 変異の性質を培養細胞 ( CHO 細胞 ) を用いて調べたところ、蛋白は発現したが成熟化が不十分であり細胞膜に移行しなかった。下図のように、正常 CFTR 蛋白は細胞膜に発現したが、*dele 16-17b* 変異 ( 蛋白名は ( G970-T1122 ) -CFTR ) は細胞質 ( 核の周囲 ) にとどまった。分子治療薬 CFTR corrector である lumacaftor / VX-809 の治療効果は見られなかったが、C 末端に FLAG タグを付加すると一部成熟化と細胞膜への移行が見られた。



その他 7 種類のアジア型 / 日本型変異 CFTR についても、同様に検討したところ、その多くは成熟化されないタイプの変異であった。CFTR corrector が治療効果を発揮する可能性がある。

片アレルのみに CFTR 変異が見られた確診 CF 患者の鼻粘膜トランスクリプトの解析を試行した。CFTR トランスクリプト量の減少が見られた患者の CFTR 転写調節領域に検出されたバリエーションについて、転写活性の解析を始めている。

(3) 患者レジストリの事務局として蓄積した臨床データをもとにして診療の手引きを改訂し、主治医を含む医療関係者、患者とその家族に還元した。

#### 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 10 件 )

Characterization of ( G970-T1122 ) -CFTR, the most frequent CFTR mutant identified

in Japanese cystic fibrosis patients. Wakabayashi-Nakao K, Yu Y, Nakakuki M, Hwang TC, Ishiguro H, Sohma Y. *J Physiol Sci* 69: 103-112, 2019. doi: 10.1007/s12576-018-0626-4. 79. 査読有

Screening for regulatory variants in 460kb encompassing the *CFTR* locus in cystic fibrosis patients. Kerschner JL, Ghosh S, Paranjapye A, Cosme WR, Audrézet MP, Nakakuki M, Ishiguro H, Férec C, Rommens J, Harris A. *J Mol Diagn* 21: 70-80, 2019. doi: 10.1016/j.jmoldx.2018.08.011. 査読有

Ethnicity impacts the cystic fibrosis diagnosis: A note of caution. Bosch B, Bilton D, Sosnay P, Raraigh KS, Mak DY, Ishiguro H, Gulmans V, Thomas M, Cuppens H, Amaral M, De Boeck K. *J Cyst Fibros* 16: 488-491, 2017. doi: 10.1016/j.jcf.2017.01.016. 査読有

Bicarbonate-rich fluid secretion predicted by a computational model of guinea-pig pancreatic duct epithelium. Yamaguchi M, Steward MC, Smallbone K, Sohma Y, Yamamoto A, Ko SB, Kondo T, Ishiguro H. *J Physiol* 595: 1947-1972, 2017. doi: 10.1113/JP273306. 査読有

#### 〔学会発表〕(計8件)

Clinical characteristics, prognosis, and *CFTR* mutations of cystic fibrosis in Japan. Ishiguro H, Yamamoto A, Fujiki K, Nakakuki M, Taniguchi I, Kozawa Y, Sohma Y, Naruse S, Takeyama Y. 49th Annual Meeting of American Pancreatic Association (Miami) 2018.11.

嚢胞性線維症の重症度判定基準改訂の提案 石黒洋、山本明子、中萈みゆき、藤木理代、近藤志保、成瀬 達、竹山宜典 第49回日本膵臓学会大会(和歌山)2018.6.

Cystic fibrosis, *CFTR* mutations, and *CFTR*-related pancreatitis in Japanese. Ishiguro H. Symposium "Physiology and pathophysiology of *CFTR* in Asia: Asian CF and *CFTR*-mediated non-CF disease" International Conference of Physiological Sciences 2016 (Beijing) 2016.9.

Nationwide epidemiological survey of cystic fibrosis in Japan. Kozawa Y, Yamamoto A, Nakakuki M, Fujiki K, Naruse S, Ishiguro H. 第47回日本膵臓学会大会 The 20th meeting of the International Association of Pancreatology The 6th meeting of the Asian Oceanic Pancreatic Association 合同会議(仙台)2016.8.

#### 〔図書〕(計2件)

嚢胞性線維症の診療の手引き[改訂2版] 竹山宜典、仁尾正記、成瀬 達、石黒 洋 名古屋大学消費生活協同組合印刷部 2018 140 ページ

嚢胞性線維症の栄養ケア 藤木理代 編著、石黒 洋 監修 名古屋大学消費生活協同組合印刷部 2018 50 ページ

#### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

#### 〔その他〕

##### (1)ホームページ

CF レジストリのウェブサイト([www.htc.nagoya-u.ac.jp/~ishiguro/1hn/cftr.html](http://www.htc.nagoya-u.ac.jp/~ishiguro/1hn/cftr.html))を運営し、CF患者を受け持つ主治医、診療の助言ができる相談医、遺伝子診断(*CFTR* 遺伝子解析)および機能診断(汗試験、便中膵エラスターゼ測定による膵外分泌機能の把握)を提供する協力施設、栄養学の専門家、基礎研究者などが参加し、治療薬情報をウェブサイトに公開し、臨床情報と疫学調査を解析して個人が特定できない形で公表している。

##### (2)情報交換会の開催

CF患者の診療に携わる医療関係者、患者さんとその家族、事務局、基礎研究者の間の緊密な連携を保つために、2015年より毎年1回、「嚢胞性線維症患者と家族の会」(CF家族会)(<http://jcf.n.jimdo.com/>)と合同で、情報交換会を開催している。2017年の会の様子は朝日新聞に掲載された。

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 山本 明子

ローマ字氏名:(YAMAMOTO, Akiko)

所属研究機関名: 名古屋大学

部局名：総合保健体育科学センター

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60402385

研究分担者氏名：洪 繁

ローマ字氏名：(KO, Shigeru)

所属研究機関名：慶応義塾大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：90402578

研究分担者氏名：相馬 義郎

ローマ字氏名：(SOHMA, Yoshiro)

所属研究機関名：国際医療福祉大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60268183

(2)連携研究者

研究分担者氏名：中莖 みゆき

ローマ字氏名：(NAKAKUKI, Miyuki)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：総合保健体育科学センター

職名：研究員

研究者番号（8桁）：30578729

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。