

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590758
 研究課題名（和文） 慢性膵炎におけるCFTR遺伝子の役割：非コード領域による発現調節と発症との関係
 研究課題名（英文） Role of CFTR gene expression in the pathogenesis of chronic pancreatitis: regulation by non-coding region
 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・准教授
 研究者番号：90303651

研究成果の概要：

嚢胞線維症の原因遺伝子であるCFTRは、上皮細胞に発現し陰イオンチャネルとして機能する。CFTRの機能低下は汗中のクロール濃度の高値によって評価できる。我々の以前の研究では、慢性膵炎患者の約半数でCFTRの機能低下が示唆されたが、CFTR遺伝子の翻訳領域の変異/多型とは必ずしも一致しなかった。本研究では、CFTR遺伝子のプロモーター領域（翻訳領域の上流約2kb）の遺伝子解析を行い、慢性膵炎患者に特有な変異-1523G/Aと-790ΔTを同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：CFTR、慢性膵炎、プロモーター領域

1. 研究開始当初の背景

慢性膵炎は腺房細胞の脱落と線維化を主体とする進行性の炎症疾患である。成因としてはアルコール性が最も多いが、多飲者の数%しか慢性膵炎を発症しないこと、飲酒習慣がなくても発症することなどから、本症の発症にはなんらかの遺伝的素因が存在することが推定されてきた。嚢胞線維症 (cystic fibrosis) の原因である cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

(CFTR) 遺伝子は候補遺伝子の1つである。CFTRは膵導管細胞の管腔側の細胞膜に発現している陰イオンチャネルであり、膵の水と重炭酸イオン (HCO_3^-) 輸送に最も重要な役割を果たしている。遺伝子変異により機能が消失すると、膵導管細胞の水と HCO_3^- 分泌が著明に減少するため、膵導管は濃厚で粘稠な分泌液により嚢胞様に拡張し、腺房細胞は脱落して線維化が進行し、嚢胞線維症を発症する。一方、遺伝子変異により機能低下が生じた場合には、出生時には膵外分泌機能が保たれ、

外分泌不全は徐々に進行する。

CFTR は汗腺では Cl^- の再吸収に必要なため、CFTR 機能が低下すると汗の Cl^- 濃度が高くなる。我々は、慢性膵炎患者の約 50% が汗の Cl^- 濃度異常高値を示すことを報告した。即ち、日本人の慢性膵炎においても CFTR 遺伝子が関与している可能性が高いことが示された。CFTR 遺伝子は 27exon よりなり 1480 アミノ酸残基をコードする比較的大きな遺伝子である。まず、これまでに知られている白人および日本人の CF 遺伝子変異を検索した所、全て陰性であり、慢性膵炎に関連する変異はあるとすれば日本人に固有のものであると推測された。そこで慢性膵炎患者を対象に全 27exon とその intron との境界領域を直接シーケンス法で解析したところ、exon 部に新しい変異を含む 9 つの変異・多型を同定した。更に、M470V および intron8 と exon9 の境界部 (TG) n 多型において日本人の CFTR 遺伝子は白人とは異なる進化を遂げており、チャネル機能が 67% 程度になる遺伝型が最も多いことが判明した。

我々のこれまでの解析から、M470V 以外に日本人の健常人の約 20% が CFTR 機能に影響を与えるアミノ酸置換を伴う CFTR 遺伝子変異・多型をもつことが明らかとなった。この内、約 10% が慢性膵炎関連変異・多型と推定される。それでは、これらの変異・多型を有して慢性膵炎になるヒトとならないヒトがいるのはなぜか？ 新たな疑問が生まれた。CFTR 遺伝子は全長 250kb の大きな遺伝子であり、これまでに解析を行った全 27exon は全体の 2.4% に過ぎない。intron 部には (TG) n 多型など CFTR 蛋白の発現量に影響を与える多型が存在する。ヒトにおける CFTR 遺伝子の発現調節は未だ明らかになっていないが、本遺伝子のプロモーター領域には各種転写因子が作用すると推定されるシス作用性配列が存在する。また、DNase I フットプリント法により CFTR 遺伝子には複数の高感受性部位 (DHS) が同定されている。これら非コード領域の多型が組織特異的 CFTR の転写またはプロセッシング調節異常を介して CFTR 蛋白の発現量に影響を与える可能性がある。

2. 研究の目的

CFTR は上皮細胞に発現する cAMP 依存性のイオンチャネルで、 Cl^- および HCO_3^- 輸送を担っている。膵嚢胞線維症は CFTR 遺伝子の変異によって発症する常染色体劣性疾患で、気道、腸管、膵管、胆管、汗管、輸精管などのイオンおよび水輸送が障害される。慢性膵炎は反復する炎症、線維化、外分泌不全を呈する疾患で、膵石を伴うことが多い。主な成因は、

アルコール性および特発性である。膵液の pH は膵導管の CFTR による HCO_3^- 分泌によって調節されており、CFTR 機能の低下により膵液が粘稠になると炎症や膵石形成が起こりやすくなると考えられている。

我々はこれまでに、日本人の慢性膵炎患者の CFTR 遺伝子型を解析し、Exon 9 のスプライシング調節部位における遺伝子多型と疾患との関連や、疾患群に多く見られる遺伝子多型を同定してきた。しかし、表現型 (汗中 Cl^- 濃度の高値) と遺伝子型が一致しない症例が多かった。遺伝子の翻訳領域の上流にはプロモーター領域があり、様々な転写調節因子が結合することによって発現量が調節されている。ヒトにおける CFTR 遺伝子の発現調節機構には不明な点が多いが、Exon 1 の上流 1.6 kb 付近までに、各種転写因子が作用すると推定されるシス作用性配列が存在する。本研究はヒトの CFTR 遺伝子のプロモーター領域の変異および多型が、本遺伝子の発現調節および CFTR 機能への作用を介して慢性膵炎発症リスクに及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

インフォームドコンセント (名古屋大学医学研究科倫理委員会にて承認を得た「慢性膵炎における膵炎関連遺伝子の検討」、承認番号 114-2) を得た慢性膵炎患者 88 人 (アルコール性慢性膵炎患者 65 人、特発性慢性膵炎患者 23 人) および健常人 118 人を対象に、抹消血から白血球由来の DNA を抽出した。CFTR 遺伝子翻訳領域の上流約 2kb を PCR 法により増幅し、直接シーケンス法で遺伝子配列を決定した。転写調節因子の結合配列モチーフ検索には TFSEARCH を用いた。

4. 研究成果

CFTR 遺伝子のプロモーター領域における遺伝子変異・多型を解析した。下図に CFTR 遺伝子のプロモーター領域 (Exon1 の上流約 2kbp) に同定された遺伝子変異・多型を示す。-1523G/A はアルコール性慢性膵炎患者群にのみ 1 例見つかった。-790 Δ T はアルコール性慢性膵炎患者群にのみ 3 例見つかった。変異・多型の頻度を表に示す。

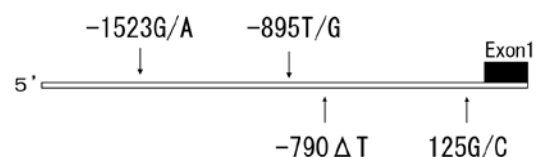


表1 CFTR 遺伝子プロモーター領域の変異・多型の頻度

	-1523 g/a	-895 t/g	-790 Δt	125 g/c
慢性膵炎 88人 (176 allele)	1 (0.01)	87 (0.49)	3 (0.02)	13 (0.07)
健常人 118人 (236 allele)	0 (0.00)	109 (0.46)	0 (0.00)	13 (0.06)

(アレル頻度)

既に解析済みの翻訳領域の遺伝子多型の結果から、-790 Δt を持つ症例の Haplotype を解析した。-790 Δt は Intron 8 の繰り返し配列(TG) 12、Exon10 の多型 M470V と同一アレル上にあり、Exon22 の多型 Q1352H は同一アレル上にないことがわかった。

転写調節因子の結合配列モチーフの検索を行った。CFTR 遺伝子の-790 付近の配列に存在する転写調節因子結合モチーフを TFSEARCH により解析した結果、転写調節因子 HFH-2 (FOXD3) の結合モチーフがあることがわかった。

上皮細胞に発現する cAMP 依存性のイオンチャネル CFTR の遺伝子多型と慢性膵炎との関連を解明するため、慢性膵炎患者 (69 人)、健常人 (48 人) を対象に CFTR 遺伝子多型の解析を行った。翻訳領域の遺伝子多型の解析は既に終了しているため、転写調節に影響を及ぼすと推定される非翻訳領域 (プロモーター領域を含む翻訳領域の上流約 2kb) の遺伝子解析を行った。その結果、これまでに世界でも報告のない変異-1523G/A が患者群で 1 例、-1523G/A は健常人で 1 例、-790delT は患者群にのみ 3 例見つかった。その他、-895T/G、125G/C の遺伝子多型が見つかった。-895T/G のアレル頻度は健常群で 46.9%、患者群で 50.7%、125G/C のアレル頻度は健常群で 6.3%、患者群で 5.2%であった。また表現型の解析として、慢性膵炎患者 (48 人)、健常人 (40 人) を対象に我々が以前に考案した指先汗クロライド試験法を用いて汗の Cl⁻濃度を測定した。その結果、アルコール性慢性膵炎患者のうち 17 例 (47.2 %) が基準値 (60 mmol/l) を超える高値を示した。特発性慢性膵炎患者で基準値を超えた症例は 3 例 (25.0 %)、健常群では 7 例 (17.5 %) であった。現在、翻訳領域および非翻訳領域の遺伝子多型と汗の Cl⁻濃度との相関を検討中である。また、非翻訳領域の遺伝子多型が転写量に及ぼす影響を検討するために、患者および健常人の鼻の粘膜より RNA を抽出した。現

在、リアルタイム PCR 法により CFTR 遺伝子の発現量を定量するため、最適なプライマーの設計を行っているところである。慢性膵炎患者および健常人の CFTR 遺伝子プロモーター領域の解析を行った結果、患者に特有な変異-1523G/A および-790 ΔT が見つかった。-790 付近は転写調節因子 HFH-2 (FOXD3) の結合配列モチーフを持つことがわかった。

日本における CF の発症率は極めて低く、これまで報告のある CFTR 遺伝子の変異も世界的に極めて稀なタイプのものである。しかし、我々はこれまでに日本人の慢性膵炎患者の CFTR 機能解析 (汗中 Cl⁻濃度測定) 7) や CFTR 遺伝子多型を解析し、日本の慢性膵炎と CFTR 遺伝子との関連を示唆する結果を得てきた。しかし、表現型と遺伝子型は必ずしも一致しないことから、本研究では、遺伝子発現量の減少や、発現量の上昇による機能低下の補填などの可能性を考え、遺伝子発現の調節領域の変異・多型解析を行った。今回行った CFTR 遺伝子のプロモーター領域 (翻訳領域の上流約 2kb) の解析で、アルコール性慢性膵炎患者に特有の変異-1523G/A および-790 ΔT を同定した。特に、-790 ΔT はアルコール性慢性膵炎患者にのみ 3 例 (4.6%、アレル頻度 2.3%) 見つかり、疾患との関連が示唆された。この変異に関してはトルコ人の CF 家系での報告はあるが、その他の人種での報告はなく、疾患との関連も不明である。-790 付近には、転写調節因子 HFH-2 (FOXD3) の結合配列モチーフ GATTTTTTTTC がある。この転写因子は膵臓で発現が認められているが、CFTR 遺伝子発現機構との関連は不明である。今後これら変異・多型が遺伝子発現量に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイ法で測定する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Stewart AK, Yamamoto A, Nakakuki M, Kondo T, Alper SL, Ishiguro H. Functional coupling of apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange with CFTR in stimulated HCO₃⁻ secretion by guinea pig interlobular pancreatic duct. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009 [Epub ahead of print]. 査読有り
2. Ishiguro H, Stewart MC, Naruse S, Ko SB, Goto H, Case RM, Kondo T, Yamamoto A. CFTR functions as a bicarbonate channel in pancreatic duct cells. J Gen Physiol 2009; 133(3): 315-26. 査読有り

3. 中莖 みゆき、石黒 洋、代田桂一、山本明子、洪 繁、後藤秀実、藤木理代、近藤孝晴、遠藤 彰、成瀬 達 汗中クロライド濃度の簡便な測定法の開発 膵臓 2008; 23(4): 486-493. 査読有り
4. 石黒 洋、山本明子、近藤 孝晴 ΔF マウスと slc26a6 null マウスを用いた膵 HCO₃⁻分泌機構の解析 2008; 23(1): 25-30. 査読有り
5. Ishiguro H, Steward M, Naruse S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and SLC26 transporters in HCO₃⁻ secretion by pancreatic duct cells. Sheng Li Xue Bao-Acta Physiologica Sinica (Chinese Journal of Physiology) 2007; 59(4): 465-76. 査読有り
6. Ishiguro H, Namkung W, Yamamoto A, Wang Z, Worrell RT, Xu J, Lee MG, Soleimani M. Effect of Slc26a6 deletion on apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger activity and cAMP-stimulated bicarbonate secretion in pancreatic duct. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007; 292(1): G447-55. 査読有り
7. Naruse S, Fujiki K, Ishiguro H. Is genetic analysis helpful for diagnosing chronic pancreatitis in its early stage? J Gastroenterol 2007; 42 Suppl 17: 60-5. 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

1. Yamamoto A, Ishiguro H, Kondo T. Regulatory interaction of the apical Na⁺-H⁺ exchange in HCO₃⁻ secretion in mouse pancreatic duct cells. 16th United European Gastroenterology Week (Vienna) 2008/10/22
2. Fujiki K, Ishiguro H, Nakakuki M, Yamamoto A, Kitagawa M, Kondo T, Naruse S. The genetic background of CFTR and ALDH2 is related to alcoholic chronic pancreatitis in Japanese. 16th United European Gastroenterology Week (Vienna) 2008/10/22
3. 藤木理代、石黒 洋、中莖みゆき、山本明子、北川元二、近藤孝晴、成瀬 達 アルコール性慢性膵炎患者の CFTR および ALDH2 遺伝子多型の解析(要望演題) 第 39 回日本膵臓学会大会(横浜)2008/7/30
4. 石黒 洋、山本明子、近藤孝晴 slc26a6 ノックアウトマウスから単離した小葉間膵管の重炭酸イオン輸送 第 85 回日本生理学会大会(東京)2008/3/25
5. Yamamoto A, Ishiguro H, Ko SB, Naruse S, Kondo T. Interaction between cystic

- fibrosis transmembrane conductance regulator and Na⁺-H⁺ exchange in mouse pancreatic ducts. Asian Pacific Digestive Week 2007 (Kobe) 2007/10/19
6. Ishiguro H. Role of SLC26A6 in ductal HCO₃⁻ secretion. Symposium "Frontiers in Exocrine Pancreatic Physiology and Pathophysiology". European Pancreatic Club 2007 (Newcastle-Gateshead) 2007/7/7
7. 石黒 洋、山本明子、近藤孝晴 ΔF マウスおよび Slc26a6 ノックアウトマウスから単離した小葉間膵管の重炭酸イオン輸送 ワークショップ「膵研究モデルの作成、選択、適用」第 38 回日本膵臓学会大会(福岡)2007/6/29

[図書] (計 2 件)

1. 大槻 眞、成瀬 達、近藤孝晴、石黒 洋、山本明子、洪 繁、他 膵嚢胞線維症の診療の手引き アークメディア(東京) 2008 74 ページ
2. 石黒洋、近藤孝晴、山本明子、成瀬達 CFTR の機能異常と慢性膵炎 Annual Review 消化器 2007(中外医学社) 2007, 213-219.

6. 研究組織

(1) 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・准教授
研究者番号: 90303651

(2) 研究分担者

山本 明子 (YAMAMOTO AKIKO)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・助教
研究者番号: 60402385

藤木 理代 (FUJIKI KOTOYO)
名古屋学芸大学・管理栄養学部・講師
研究者番号: 50454450