

主論文の要旨

**Functional characteristics of L1156F-CFTR associated  
with alcoholic chronic pancreatitis in Japanese**

〔日本人アルコール性慢性膵炎患者に関連する L1156F-CFTR の機能〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻  
健康増進医学講座 健康栄養医学分野

(指導：石黒 洋 教授)

近藤 志保

## 【緒言】

嚢胞性線維性膜貫通調節因子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator : CFTR) は、上皮細胞の管腔膜に局在するアニオンチャネルである。CFTR 遺伝子の両アレルに変異があり CFTR 機能が失われると、嚢胞性線維症 (cystic fibrosis : CF) を発症する。日本人においては、CF は稀であるが、慢性膵炎患者の約半数で汗中 Cl<sup>-</sup>濃度が高く CFTR の軽度機能低下が推定されている。本研究では、日本の慢性膵炎患者における CFTR 遺伝子の変異および多型を解析し、アルコール性慢性膵炎との関連が新たに判明した L1156F-CFTR の生理機能を解析した。

## 【対象および方法】

**対象** アルコール性慢性膵炎患者 70 名、特発性慢性膵炎患者 18 名および健常者 180 名を対象とした。

**CFTR、SPINK1、PRSS1 遺伝子の解析** 末梢血より DNA を抽出し、特異的なプライマーを用いて Polymerase chain reaction を行った。生成物を精製し、CFTR 全 27 エクソンとその上下流 100-300bp の塩基配列をシーケンス解析し、6つの CFTR 多型 (E217G、I556V、M470V、L1156F、Q1352H、R1453W) を検出した。CFTR 多型を持っていた者については、膵炎関連遺伝子である SPINK1 (膵外分泌性トリプシンインヒビター) の N34S と IVS3+2T>C 変異および PRSS1 (カチオニックトリプシノーゲン) の R112H と N29I 変異の有無を解析した。名古屋大学医学部生命倫理審査委員会にて承認済 (650-3、平成 25 年 8 月 21 日承認) である。

**汗中 Cl<sup>-</sup>濃度の測定** 親指の指腹からの自然発汗の Cl<sup>-</sup>濃度を高感度 Cl<sup>-</sup>電極を用いて測定した。

**膵外分泌機能検査** セクレチン試験にて評価した。

**変異 CFTR 発現ベクターの作成** アルコール性慢性膵炎との関連が新たに判明した L1156F 多型は日本人に特有の多型であったが、世界共通に見られる M470V 多型にリンクしていた。そこで、pcDNA3-CFTR (Wild type) ベクターに M470V-CFTR、L1156F-CFTR、M470V+L1156F-CFTR を導入し、各変異 CFTR について以下の解析を行った。

**HEK293 細胞および CFPAC-1 細胞における変異 CFTR 発現** 細胞は 10%FBS および 1%Penicillin-Streptomycin を加えた DMEM 培地で培養し、変異 CFTR を導入 24-72 時間後に実験に用いた。ウエスタンブロット解析は、タンパク量 30 μg を SDS 電気泳動し、PVDF メンブレンにブロット後、CFTR 抗体を用いて検出した。アルコールとその代謝物の影響を見るために、50 mM エタノール (EtOH)、200 μM アセトアルデヒド (ALD)、100 μM パルミトレイン酸 (POA)、100 μM パルミトレイン酸エチルエステル (POAEE) にて 24-48 時間処理した。

**HEK293 細胞における変異 CFTR Cl<sup>-</sup>チャネル活性** ホールセルパッチクランプ法を用いて膜電位 -60 mV の条件で Cl<sup>-</sup>電流を測定した。

**アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた変異 CFTR の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>輸送および Cl<sup>-</sup>輸送**

ステージ V-VI の卵母細胞に、変異 CFTR の cRNA 5 ng を注入し、18°C の ND96 溶液中に保存、48-120 時間後に実験に用いた。細胞内 pH 電極と Cl<sup>-</sup>電極を用いて、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> および Cl<sup>-</sup> の輸送速度を測定した。

**CFPAC-1 細胞における変異 CFTR 依存性 Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 交換輸送活性** 変異 CFTR を導入した CFPAC-1 細胞に pH 感受性蛍光色素 BCECF を負荷し HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-CO<sub>2</sub> 緩衝溶液で灌流した。フォルスコリン (1 μM) による cAMP 刺激下に、灌流液中の Cl<sup>-</sup> を除いた時の細胞内 pH 上昇速度を Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 交換輸送活性とした。

**CFTR 分子モデル** Discovery studio を用いたホモロジーモデリングにより作成した。

**統計解析** 臨床データの解析には  $\chi^2$  検定を用いた。その他の実験データは平均±標準誤差で表し、*t* 検定または多重解析後にダネット検定を行って解析した。

## 【結果】

**日本人の慢性膵炎患者における CFTR 多型** 慢性膵炎患者および健常者において、CF の原因となる CFTR 遺伝子変異は見られなかった。アルコール性慢性膵炎患者では L1156F 多型と Q1352H 多型のアレル頻度が、健常者に比べて有意に ( $p < 0.01$ ) 高かった (表 1)。L1156F のアレル頻度は 5.0%、Q1352H は 7.9% (健常者はそれぞれ 0.6%、1.9%) であった。特発性慢性膵炎患者では R1453W 多型のアレル頻度が 11.1% であり、健常者 (1.9%) に比べて有意に ( $p < 0.01$ ) 高かった (表 1)。

**L1156F を保有する慢性膵炎患者の遺伝子型、膵外分泌機能および汗中 Cl<sup>-</sup>濃度** L1156F を持つ慢性膵炎患者 8 名のうち、アルコール性慢性膵炎患者は 7 名、特発性慢性膵炎患者は 1 名であり、いずれも片側アレルのみに L1156F があった (表 2)。L1156F 保有者全員が M470V を併せ持ち、そのうち 2 名はさらに Q1352H 多型を併せ持っていた。1 名は SPINK1 の N34S 変異を持っていた。膵石は 7 名に見られた。セクレチン試験を行った 3 名全員の膵液量とアミラーゼ排出量が低値を示し、2 名の膵液中最高重碳酸塩濃度が低値を示した。汗中 Cl<sup>-</sup>濃度を測定した 5 名のうち、3 名が異常高値、2 名が境界値を示した。

**HEK293 細胞における変異 CFTR タンパク発現** L1156F と M470V はリンクしていると考えられたため、M470V 単独、L1156F 単独、M470V+L1156F の影響をウエスタンブロットにより解析した (図 1)。Wild-type CFTR に比べて M470V+L1156F-CFTR では CFTR タンパク発現量が  $60 \pm 10\%$  に低下した ( $p < 0.01$ )。M470V-CFTR および L1156F-CFTR では有意な違いは認められなかった。Wild-type CFTR では、EtOH+ALD 処理により発現量が有意に ( $p < 0.05$ ) 低下したが、M470V+L1156F-CFTR では EtOH+ALD 処理による影響は認められなかった (図 2)。Wild-type CFTR では、POA 処理あるいは POAEE 処理により発現量が有意に ( $p < 0.05$ ) 低下したが、M470V+L1156F-CFTR では影響は認められなかった (図 3)。

**HEK293 細胞に発現させた変異 CFTR の Cl<sup>-</sup>チャンネル活性** アデニル酸シクラーゼを刺激するフォルスコリンを加えると Cl<sup>-</sup>電流が観察され、CFTR の阻害剤グリベンクラミドにより、ほぼ完全に抑制された。M470V+L1156F-CFTR では Cl<sup>-</sup>電流が 78%程度

に低下したが、有意ではなかった。

**アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた変異 CFTR の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> および Cl<sup>-</sup> 輸送** フォルスコリンにより CFTR を刺激し、灌流液の Cl<sup>-</sup> を除くと、細胞内 pH は上昇し(図 4A)、Cl<sup>-</sup> 濃度は低下した(図 4B)。Wild-type CFTR に比べて、M470V+L1156F-CFTR では細胞内 pH と細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度の変化が緩やかであった。細胞内 pH と Cl<sup>-</sup> 濃度の変化率から算出した HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> と Cl<sup>-</sup> の輸送活性は、M470V+L1156F-CFTR において、それぞれ 52%、57% に低下した (p<0.01) (図 4C)。M470V 単独および L1156F 単独では影響が見られなかった。

**CFPAC-1 細胞における変異 CFTR 依存性 Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 交換輸送活性** Wild-type CFTR に比べて、M470V-CFTR、L1156F-CFTR、M470V+L1156F-CFTR では、CFTR 依存性 Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 交換輸送活性がそれぞれ 33%、35%、26% に低下していた (p<0.01) (図 5)。

**CFTR 分子モデルによる M470 および L1156 の局在** M470 と L1156 は離れており、分子モデル上は L1156F と M470V の相乗効果は説明できない(図 6)。

### 【考察】

**日本人の慢性膵炎と CFTR 多型** CFTR 遺伝子変異のスペクトルはヨーロッパ人と日本人を含むアジア人で大きく異なる。CF に見られる CFTR 変異は、慢性膵炎患者には見られなかった。

**L1156F-CFTR の疫学** L1156F は日本人に特有の CFTR 遺伝子多型であり、アルコール性慢性膵炎との関連が強かった(オッズ比 9.0)。L1156F は M470V とリンクしていた。

**L1156F-CFTR 関連慢性膵炎の病態** L1156F を保有するアルコール性慢性膵炎患者では、汗中 Cl<sup>-</sup> 濃度が異常高値～境界値を示し、膵外分泌機能が低下し、ほとんどの症例で膵石が見られた。

**L1156F-CFTR の機能** M470V+L1156F-CFTR は、Wild-type CFTR に比べて、CFTR タンパク発現量、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> と Cl<sup>-</sup> の輸送活性、CFTR 依存性 Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 交換輸送活性が有意に低下していた。

### 【結論】

日本人固有の CFTR 遺伝子多型である L1156F は M470V 多型とリンクしており、アルコール性慢性膵炎患者に多くみられた。M470V 多型と L1156F 多型が共存すると、CFTR のタンパク発現量が低下し、CFTR の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> および Cl<sup>-</sup> 輸送機能が障害された。M470V と L1156F を併せ持つことによる CFTR の軽度機能低下が、日本人におけるアルコール性慢性膵炎の発症リスクであることが示唆された。