

*CIAS1*変異陰性CAPS(cryopyrin-associated periodic syndrome)における*CIAS1*遺伝子モザイシズム

西小森 隆 太 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)
斎 藤 潤 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)
平 家 俊 男 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)
中 畑 龍 俊 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)

研究要旨

CINCA症候群は、慢性髄膜炎に伴う中枢神経障害、関節障害、生下時より認める蕁麻疹様発疹を特徴とする自己炎症症候群の1つである。約40%の症例に責任遺伝子*CIAS1*の変異を認めない事が知られている。今回日本における*CIAS1*変異を検出できなかったCINCA症候群3例、Muckle-Wells 症候群1例のCAPS 4症例を集積し、*CIAS1*モザイシズムの有無を検討した。*CIAS1*変異陽性細胞を濃縮する方法としては、同細胞がLPS刺激で細胞死に陥る性質を利用した。結果として4例中3例に*CIAS1*モザイシズムを認めた。*CIAS1*モザイシズムはCINCA症候群等のCAPSの発症において重要な役割を果たしている事がわかった。

A. 研究の目的

CINCA症候群の約40%は*CIAS1*変異を認めないことが知られている。2005年、我々は*CIAS1*体細胞モザイクで発症した世界で初めての症例を経験した。その症例が示したことは、モザイクの状態でもCINCA症候群が発症可能であり、またモザイシズムの頻度が少なければ通常のsequencingでは見逃される事であった。*CIAS1*変異を認めないCINCA症候群もしくはその軽症型を含むCAPS (CINCA症候群、Muckle-Wells 症候群、FCAS) 症例において、見逃されている*CIAS1*モザイシズムがどのぐらい存在するか検討した。

B. 研究方法

*CIAS1*変異を検出できなかったCINCA症候群症例3例、Muckle-Wells 症候群1例、また*CIAS1*変異を認めた同症例6例、前述*CIAS1*モザイク症例1例の末梢血を用いて解析をおこなった。まず*CIAS1*変異陽性CINCA症候群において*CIAS1*変異特異的な性質を検討した。さらに同定された*CIAS1*変異細胞特異的な性質を用いて、同定されているモザイク症例で実際*CIAS1*変異

細胞が濃縮できるか検討した。最後に樹立した方法を*CIAS1*変異陰性4症例に適応して、*CIAS1*変異モザイシズムが存在するか検討した。*CIAS1*変異が新規変異の場合、ASC依存性NF- κ B活性化、THP-1細胞への強制発現による細胞死の誘導(H18年報告書)で変異*CIAS1*活性を検討した。また*CIAS1*モザイシズムも検出できなかった症例は、サブクローニング法をもちいて*CIAS1*モザイシズムの有無を再検討した。また*CIAS1*遺伝子モザイクが健康正常人に存在するかアリアル特異的PCRを用いて検出感度0.8%をカットオフとして検討した。

(倫理面への配慮)

当院倫理委員会の承認をうけた遺伝子検査の承諾書にてinformed consentを得て、患者異常*CIAS1*遺伝子解析を行った。

C. 研究結果

*CIAS1*変異により*CIAS1*インフラマソームが活性化して、IL-1 β 過剰産生されることが病態の本質と考えられている。そのためまずモザイク状

態である細胞集団においてIL-1 β の産生が各細胞でどうなっているか検討するため、*CIAS1*を発現しIL-1 β 産生源と考えられる単球におけるIL-1 β 細胞内染色をおこなった。しかし当科で同定したモザイク症例において、IL-1 β 高産生群、低産生群に分けられることはなく、同方法を用いて*CIAS1*変異細胞を濃縮するとは不可能であった。産生されたIL-1 β が正常単球細胞を活性化することが原因と考えられた。しかし解析の過程で、*CIAS1*変異陽性CINCA症候群患者単球がLPS刺激で細胞死にいたることを観察した。この細胞死は、アポトーシスではなくネクローシス様で、カテプシンB活性依存性、Caspase-1活性非依存性であった。この性質は単球細胞株THP-1に疾患関連変異*CIAS1*を強制発現した際に認められる細胞死（H18年報告書）と酷似していた。

続いてモザイク症例の単球細胞にLPS刺激を加えて、モザイク比率及び総細胞数を検討したところ、LPS刺激により*CIAS1*変異単球が選択的に消失していた。これは生物製剤アナキソラ治療の有無に関係なく見られる現象であり、治療及びそれに伴う生体での炎症所見の有無にかかわらず、LPS刺激により*CIAS1*変異単球が選択的に細胞死に陥る事を示した。

次にLPS刺激で細胞死にいたるという*CIAS1*変異単球に特徴的な性質を用いて、LPS刺激で細胞死に陥りつつある細胞を回収、変異陽性細胞を濃縮することにより*CIAS1*変異部位が診断可能となるか、前述モザイク患者細胞を用いて検討した。LPS刺激後比較的早期の1, 2, 4時間後のCD14+PI+細胞を回収し、該当*CIAS1*変異の頻度の変化を検討したところ、変異陽性細胞は約25%から80%まで増加し同方法が有効であることがわかった。

本邦でこれまで*CIAS1*変異陰性と考えられていたCINCA症候群3例、Muckle-Wells症候群1例を上記方法で変異が発見できるか検討した。CINCA症候群3例中2例でいずれも当時新規変異L264F及びG307S、Muckle-Wells症候群で新規変異E567Kが検出され、モザイク頻度としては約8-13%の*CIAS1*モザイク症例であることが明らか

になった。以上の遺伝子変異がSNPでないことを健康成人100人で検討するとともに、アレル特異的PCRを用いて健康正常成人100人において0.8%の検出感度においてモザイクが存在しないことを確認した。さらに同変異が疾患関連であるかASC依存性NF- κ B活性化能、THP-1細胞死誘導能で検討した。いずれも同定された変異は上記2活性を強く誘導し、疾患関連性ありと考えられた。なお最後の1症例については*CIAS1*各エクソンをサブクローニング法で変異がないのを確認した。以上よりCAPS4症例中3例に疾患関連*CIAS1*変異モザイクが存在することが分かった。

D. 考 察

これまで*CIAS1*変異陰性CINCA症候群については、臨床的に変異陽性群と変わらないこと、またアナキソラ治療に対する反応が変わらないこと、さらに私信ではあるがcDNAアレイでも変異陰性、陽性で変わらないことが報告されてきた。また*CIAS1*関連遺伝子が責任遺伝子として検討されてきたが、これまで該当する新規責任遺伝子は報告されていなかった。今回の研究で*CIAS1*変異陰性CINCA症候群もしくはCAPSにおいて、*CIAS1*モザイクが見逃されている可能性を示した。

CAPSにおける*CIAS1*遺伝子変異は、遺伝子型-臨床型関連が報告されており、また我々の検討では、臨床的な重症度とASC依存性NF- κ B活性化能及びTHP-1細胞死誘導能との間に正の相関がみられた。今回見つかった*CIAS1*変異は新規変異であったが、いずれも上記活性化能が強く、潜在的に臨床的に重症となりうる変異がモザイクとして存在していた。

一方以前我々が報告したY570Cモザイク症例では、ヘテロ変異症例と比べ軽症であり遺伝子発現量と臨床的な重症度はある程度の正の相関がみられるようであり、潜在的に重症となりうる*CIAS1*変異がモザイクにより軽症化した発現型をとっている可能性が推測された。当科のモザイク症例と同じ*CIAS1*変異ヘテロ症例との比較検討が将来期待される。

今回の我々の検討では全単球中約10%の変異陽性細胞が存在するだけで臨床的に発症しうる事を示した。これはCAPSがIL-1 β の過剰産生という一種のサイトカイン産生病であり、さらに正常な単球も分泌されたIL-1 β で活性化されるために発症するのかもしれない。ただこの低頻度モザイクという現象が自己炎症性疾患の発症機序として認められたことは、同機序を外挿して、TRAPS,家族性地中海熱等の他の自己炎症疾患症例においても遺伝子異常が同定できない場合、モザイシズムが関与している可能性を示唆した。

E. 結 論

CIAS1 モザイシズムはCINCA症候群等のCAPSの発症において重要な役割を果たし、これまで*CIAS1*変異陰性CAPS症例において*CIAS1*モザイシズムが見逃されていたことを示唆した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Saito, M., R. Nishikomori, N. Kambe, A. Fujisawa, H. Tanizaki, K. Takeichi, T. Imagawa, T. Iehara, H. Takada, T. Matsubayashi, H. Tanaka, H. Kawashima, K. Kawakami, S. Kagami, I. Okafuji, T. Yoshioka, S. Adachi, T. Heike, Y. Miyachi, and T. **Nakahata**. 2007. Disease-associated *CIAS1* mutations induce monocyte death, revealing low-level mosaicism in mutation-negative cryopyrin-associated periodic syndrome patients. Blood in press.
2. Tono, C., Y. Takahashi, K. Terui, S. Sasaki, T. Kamio, S. Tandai, T. Sato, K. Kudo, T. Toki, N. Tachibana, T. Yoshioka, T. **Nakahata**, T. Morio, R. Nishikomori, and E. Ito. 2007. Correction of immunodeficiency associated with NEMO mutation by umbilical cord blood transplantation

- using a reduced-intensity conditioning regimen. Bone Marrow Transplant 39:801-804.
3. Kanegane, H., T. Itazawa, M. Saito, R. Nishikomori, T. Makino, T. Shimizu, Y. Adachi, T. **Nakahata**, and T. Miyawaki. 2008. A *CIAS1* mutation in a Japanese girl with familial cold autoinflammatory syndrome. Eur J Pediatr 167:245-247.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

IRAK4欠損症: 国内外の症例の検討

高田 英俊 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
野村 明彦 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
吉川 秀人 (宮城県立こども病院神経科)
北村 太郎 (宮城県立こども病院神経科)
今泉 益栄 (宮城県立こども病院血液腫瘍科)
武山 淳二 (宮城県立こども病院臨床病理科)
久間木 悟 (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)
Cheng-Lung Ku, Jean-Laurent Casanova
(Necker Medical School, University Paris Rene Descartes)

研究要旨

我々は、肺炎球菌による髄膜炎を繰り返し死亡した2歳男児及びその弟妹がIRAK4欠損症であることを国内で初めて明らかにし、臍帯脱落遅延が認められた事、及びフローサイトメーターを用いた末梢血単球のLPSに対するTNF- α 産生能の測定がそのスクリーニング法として有効であることを明らかにした。発端者である第1子以外は感染予防を受け現在まで明らかな易感染性はない。IRAK4欠損症の国際共同研究により、肺炎球菌による重症感染症が極めて多いこと(79%)、さらにそれを再発していること(59%)、IRAK4欠損症患者の約半数が感染症で死亡していること、8歳以上では死亡例はなく、14歳以上では重症感染がないことなどが明らかになった。IRAK4欠損症では乳幼児期の重症感染症を予防することが極めて重要であることが再確認された。

A. 研究の目的

Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) は、Toll-like receptor (TLR) やIL-1 receptor (IL-1R) のシグナル伝達に必須な分子である。IRAK4欠損症はグラム陽性球菌、特に肺炎球菌を主体とした易感染性を呈する原発性免疫不全症である。しかしIRAK4欠損症は稀な疾患であり、その臨床像の詳細は不明であり、この疾患について、どのように診断するか、どのような感染予防が適切か、どのような経過をとるのかなど、解明すべき問題は多い。今回、国内外の症例を検討し、その臨床像を詳細に検討し、新たに開発した迅速診断法の有用性に関して検討した。

B. 研究方法

1. IRAK4欠損症の臨床像の解析

IRAK4遺伝子解析にて確定診断された症例に

対して、臨床像をアンケート調査で解析した。

IRAK4欠損症患者は18家系29名で、そのうち国内症例は1家系3名である。

2. IL-1RおよびTLR刺激に対する反応性の検討 (国内症例に対して)

末梢血単核球をIL-1 β (100 ng/ml, Genzyme Diagnostics, Cambridge MA)、Lipoteichoic acid (LTA, 10 μ g/ml, Sigma, St Louis MO)、Lipopolysaccharide (LPS, 0.1 μ g/ml, Sigma)、Poly:IC (50 μ g/ml, Sigma)、Phorbol myristate acetate (PMA, 25ng/ml, Sigma)、Ionomycin (Iono, 1.0 μ g/ml, Sigma)等の存在下に24時間培養し、培養上清中のIL-6とTNF- α 濃度をBD Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine Kit (BD Bioscience Pharmingen, San Diego CA)を用いてフローサイトメーターにて測定した。

3. LPS刺激後の末梢血CD14⁺細胞（単球）細胞内TNF- α 産生能（国内症例に対して）

全血をBrefeldin A (10 μ g/ml、Sigma) の存在下に、LPS (1 μ g/ml、Sigma)で4時間37°Cで刺激し、CD14抗体で染色した後、Fastimmune Intracellular Staining System (BD Bioscience Pharmingen) を用いて細胞内TNF- α を染色した。EPICS XL (Beckman Coulter、Miami FL) を用いて解析を行い、CD14⁺細胞にゲートをかけ、TNF- α 産生細胞の割合を検討した。

C. 研究結果

1. 国内の症例

国内症例の1家系は、長兄が肺炎球菌による髄膜炎を繰り返し2歳時に死亡したことからIRAK4欠損症が疑われ、IRAK4遺伝子変異(c.167_172insA)を認めIRAK4欠損症と診断した。その弟及び妹を解析したところいずれも同じIRAK4遺伝子変異を認めIRAK4欠損症であると診断した。父及び母はそのheterozygoteであった(図1)。

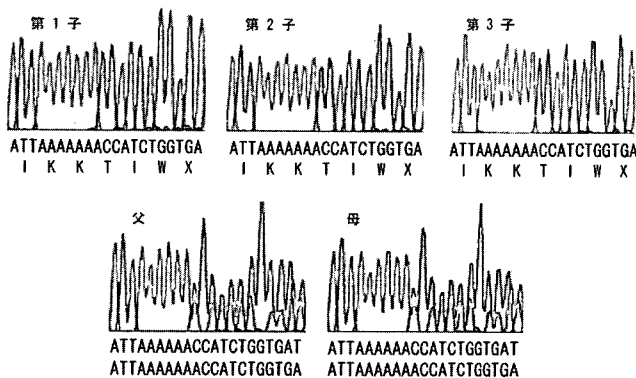


図1 国内症例のIRAK4遺伝子変異(c.167_172insA)

これらの患者ではいずれも臍帯脱落遅延があり、臍帯脱落遅延はIRAK4欠損症の臨床症状の一つであることが判明した。第2子、第3子の末梢血単核球をLTA (TLR2 ligand)、LPS (TLR4 ligand)、poly:IC (TLR3 ligand) 及びIL-1 β で刺激した結果、これらの患者ではIL-6及びTNF- α の産生が欠如していた(図2)。

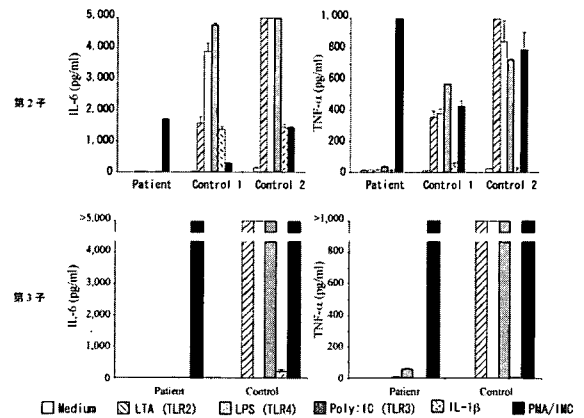


図2 末梢血単核球のTIRに対する反応性の欠如(国内症例)

これらの結果をもとに、末梢血全血をLPSで4時間刺激し、単球におけるTNF- α の産生能を検討してみると、健常者では単球のほとんどの細胞がTNF- α を産生するのにに対して、IRAK4欠損症患者では、TNF- α の産生がみられないことが判明し、IRAK4欠損症の迅速診断に有用であると考えられた(図3)。

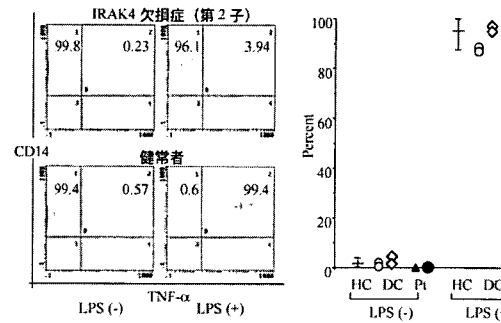


図3 IRAK4欠損症の迅速スクリーニング法

末梢血をLPSで4時間刺激し、単球における細胞内TNF- α 産生能をFastimmune Intracellular Staining System (BD Bioscience Pharmingen)で検討。
HC: 健常小児(10名)
DC: 疾患コントロール(○: 慢性肉芽腫症患者、◇: 高IgE症候群患者)
Pt: IRAK4欠損症患者(▲: 第2子、●: 第3子)

感染予防として、第2子(現在2歳8カ月)には生後2カ月時よりST合剤投与を行い、3カ月よりAMPC追加した。またガンマグロブリン補充を生後6カ月から1歳まで行った。さらに1歳時に2回7価肺炎球菌ワクチン、2歳時に23価肺炎球菌ワクチン接種を行った。感冒症状時など発熱や血清CRP値の上昇の有無に関わらず抗生剤静注を行っている。第3子も同様の感染予防を行っている。海外の症例はすべてのIRAK4欠損症患者が重症感染症に罹患しているが、これらの感染予防により、第2子、第3子は重症感染症に罹患していない。

2. 国内外の患者の臨床像

海外の症例と国内の18家系28例のまとめを図4-6に示す。IRAK4遺伝子変異としては海外ではQ293Xが多い。患者の43%が死亡しており、以前考えられていたよりも死亡率が高いことが判明した。患者の79%が重症肺炎球菌感染症に罹患し、その59%が再発している (data not shown)。32%が重症ブドウ球菌感染症に罹患していた。グラム陰性桿菌による重症感染症は25%の患者でみられた。患者から得られたEBV-B cellやSV40-fibroblastを、IL-1 β やpoly:IC (TLR3 ligand)、3M-13 (TLR7 ligand)、3M-2 (TLR8 ligand)、R-848 (TLR7/8 ligand) で刺激した結果、poly:IC刺激以外はTNF- α 産生やIL-6産生が欠如しており、TLR-3以外全てのTRLでシグナル伝達が障害されていた (図7、data not shown)。

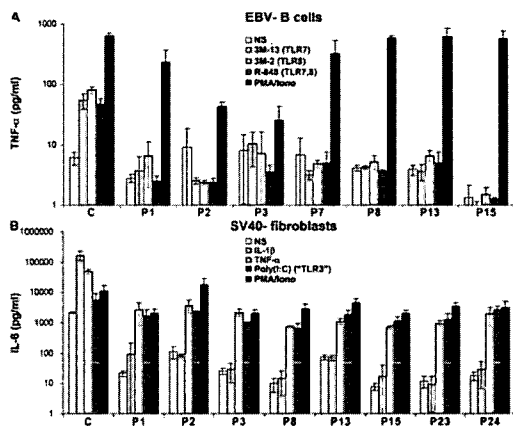


図7 IRAK4欠損症患者末梢血細胞のTIR刺激に対する反応性の欠損

臨床経過で特徴的な点は、しだいに易感染性が軽減していくことであり、8歳以上での死亡例はなく、14歳以上での重症感染症はなかった (図8)。

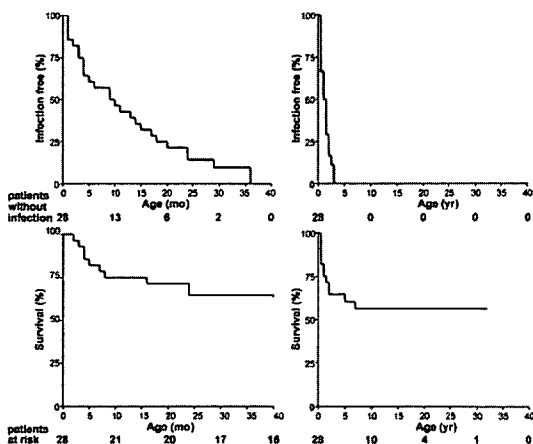


図8 IRAK4欠損症患者における重症感染症の発症 (上段) と生存率 (下段)

D. 考 察

今回の研究から、IRAK4欠損症は以前考えられていたよりも死亡率が高いことが判明した。また次第に易感染性が軽減していくことが今回の研究でさらに詳細に明らかになった。IRAK4欠損症ではマウスと同様にTLR3からのシグナル伝達には異常がない可能性も示唆されたが、末梢血単核球の検討ではTLRシグナル伝達も著しく障害されており、細胞の種類によってTLRシグナル伝達におけるIRAK4の重要性が異なる可能性が考えられた。

E. 結 論

IRAK4欠損症を疑う臨床検査材料に乏しい為、診断が困難なことが多いと考えられていたが、今回、フローサイトメータを用いた迅速診断が可能であることが明らかになった。IRAK4欠損症はこれまで考えられていた以上に死亡率が高く、乳幼児期における感染予防が極めて重要であることが判明した。

参考文献

1. Takada H, Yoshikawa H, Imaizumi M, Kitamura T, Takeyama J, Kumaki S, Nomura A, Hara T. Delayed separation of the umbilical cord in two siblings with interleukin-1 receptor-associated kinase 4 deficiency: rapid screening by flow cytometer. *J Pediatr.* 2006 148:546-8.
2. Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, Chrabieh M, Issekutz AC, Cunningham CK, Gallin J, Holland SM, Roifman C, Ehl S, Smart J, Tang M, Barrat FJ, Levy O, McDonald D, Day-Good NK, Miller R, Takada H, Hara T, Al-Hajjar S, Al-Ghonaium A, Speert D, Sanlaville D, Li X, Geissmann F, Vivier E, Mardi L, Garty BZ, Chapel H, Rodriguez-Gallego C, Bossuyt X, Abel L, Puel A, Casanova JL. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med.* 2007 204:2407-22.

Muckle-Wells症候群の免疫学的解析とIL-1阻害薬の効果

山崎 崇志 (信州大学医学部小児医学講座)
重村 倫成 (信州大学医学部小児医学講座)
小池 健一 (信州大学医学部小児医学講座)
増本 純也 (信州大学医学部病理組織学)
小林 真二 (信州大学医学研究科移植免疫感染症学)
上松 一永 (信州大学医学研究科移植免疫感染症学)

研究要旨

Muckle-Wells症候群 (MWS) は常染色体優性遺伝の疾患であり、*CIAS1* 遺伝子に変異を認める。*CIAS1* は cryopyrin をコードし、cryopyrin は IL-1 β や IL-18 のプロセッシングを制御している inflammasome の構成成分である。繰り返す発熱、蕁麻疹様の発疹、結膜炎、関節炎、感音性難聴などの臨床症状から MWS と診断した 8 歳女児の症例を報告する。検査所見では C-reactive protein (CRP)、血清アミロイド A (SAA) および IL-1 β が高値であり、*CIAS1* 遺伝子においてアミノ酸変異 R260W を認めた。患者の単核球を培養すると無刺激下でも IL-1 β の著明な産生がみられ、muramyl dipeptide (MDP) および lipopolysaccharide (LPS) の刺激下ではさらに産生が亢進した。IL-1 受容体拮抗薬である anakinra で治療したところ、CRP、SAA および IL-1 β の値は正常化し、IL-1 β の産生が高まることなく臨床症状は消失したが、患者の単核球は活性化されたままであるように見えた。驚いたことに感音性難聴は完全に改善した。以上より、anakinra は IL-1 受容体刺激を遮断しているのみならず、cryopyrin inflammasome に直接作用することにより、MWS の臨床症状および検査所見を著明に改善させているものと推測する。

A. 研究の目的

自己炎症疾患は、自己抗体を持たず、かつ自己反応性の T 細胞がなく、自然発生的に炎症が起きる疾患群である。Muckle-Wells 症候群 (MWS) は慢性的な皮疹、繰り返す発熱、関節痛、進行性の感音性難聴および潜在性の全身性 AA アミロイドーシスを特徴とした常染色体優性遺伝疾患である。MWS は cold-induced autoinflammatory syndrome 1 (*CIAS1*) 遺伝子のヘテロ接合体変異と関連しており (1)、*CIAS1* 遺伝子の産物は細胞内の病原体認識受容体である cryopyrin と推定されている (2)。*CIAS1* は最初 familial cold autoinflammatory syndrome (FCAS)/familial cold urticaria (FCU) の責任遺伝子として発見されたが、MWS および neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID)/chronic infantile

neurologic, cutaneous and articular syndrome (CINCA) の責任遺伝子でもあることが判明した。

リコンビナントのヒト IL-1 受容体拮抗薬である anakinra の治療が AA アミロイドーシスを合併した MWS の 2 症例に対し著効を示したことが報告され (3)、cryopyrin に変異のある患者において IL-1 β が炎症の重要な役割を担っていることがうかがえる。

cryopyrin に R260W 変異をもつ MWS の女児例について、anakinra による治療の前後における臨床症状と血液検査所見の変化、および末梢血単核球のサイトカイン産生を比較検討したので報告する。

B. 研究方法

【症例】 8 歳の女児。在胎 36 週 5 日、体重 1,528g で出生し、生後 4 か月から蕁麻疹様の皮疹を顔面にしばしば認めていた。6 歳時に持続的な蕁麻疹

様の発疹、周期的な発熱、結膜炎および関節痛を訴え受診された。以後、末梢血白血球数10,000/ μ l以上、血清中のCRP 2-8 mg/dl、アミロイドA (SAA) 39-732mg/ml (基準値<8)、IL-1 β 329 pg/ml、IgD 27-40mg/ml (基準値<9)に上昇していた。周期的な発熱を認めるようになってからおよそ1年半を経た8歳時のオーディオグラムで高音域における両側の感音性難聴を認め、その後進行していった(図1)が、自覚はしていなかった。結膜炎、関節痛および蕁麻疹様皮疹は常時認められ、1-2日間の発熱が毎月のように現れた。これらの症状から臨床的にMWSと考え、患児の末梢血単核球(MNCs)から得られたゲノムDNAを解析したところ、*CIAS1*遺伝子の778番目の塩基がCからTに変化し、260番目のアルギニンがトリプトファンに変化した変異(R260W)を認めた。

炎症が持続し感音性難聴が進行してきたために信州大学倫理委員会の承認を得て、anakinra (Kineret, Amgen, Cambridge, UK)を治療薬として使うことを決め、患児およびその両親に同意を得た。anakinra 1 mg/kg/日の皮下注射を連日行ったところ、2週間後の血清中のCRP 0.01mg/dl、SAA 2.5mg/ml、IL-1 β 20pg/ml未満、IgD 6.5mg/dlまで低下し、さらに白血球増多や全身倦怠感も改善していた。anakinraの治療開始3か月後のオーディオグラムでは感音性難聴は完全に改善していた(図1)。皮疹、発熱、関節痛は全く認めなくなり、体重や身長も良くなってきた。

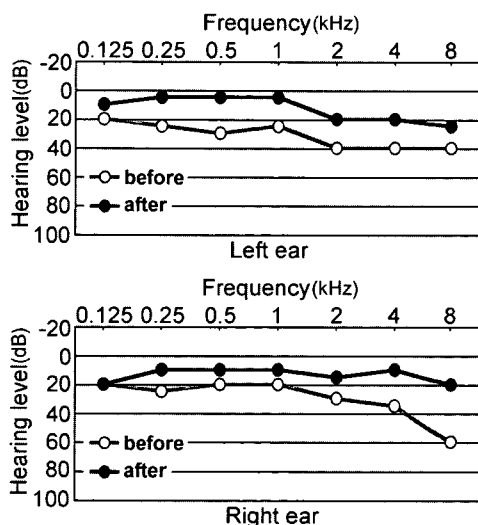


図1 MWSの患者のanakinra治療前と治療開始3か月後のオーディオグラム。

"before"はanakinra治療前の検査を示し、"after"は治療開始3か月後の検査を示している。

C. 研究結果

1) 血清サイトカイン濃度の測定

anakinraの治療前後においてCytometric Bead Array Systemを用いて、患者血清中のIL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 (IL-12) およびTNF- α 濃度をフローサイトメーターで測定した。各サイトカインの測定限界の下限値は20pg/mlであった。

治療前の血清においてはIL-1 β , IL-6, IL-8 およびIL-12の値は増加していたが、IL-10とTNF- α の値は増加していなかった(表)。治療開始3日後には血清IL-1 β の値は著明に低下し、IL-6, IL-8およびIL-12の値は検出感度以下になっていた(表)。

	Before treatment (pg/ml)	3 days after treatment (pg/ml)
IL-1 β	329	72
IL-6	41	\leq 20
IL-8	25	\leq 20
IL-10	\leq 20	\leq 20
IL-12	57	\leq 20
TNF- α	\leq 20	\leq 20

表 anakinra治療前後における患者血清中のサイトカイン濃度

2) 培養したMNCsの上清中のサイトカイン測定

muramyl dipeptide (MDP) およびlipopolysaccharide (LPS)をSigma-Aldrichから購入した。末梢血からMNCsを分離し、MDPおよびLPSの刺激下あるいは刺激無しで8時間培養した。IL-1 β とTNF- α の培養上清中の濃度をELISA法で測定した。

anakinra治療前に患者から分離したMNCsは健常コントロールのそれに比べてIL-1 β を大量に産生し、cryopyrin inflammasomeを活性化するとされているMDPあるいはLPS刺激に対して過剰反応を示した(図2)。TNF- α

産生に関しては、患者のMNCsはMDPやLPSの刺激に対しわずかな反応しか示さないのに対し、健常コントロールのMNCsは正常な反応を示した(図2)。anakinra治療開始3週間後には、患者MNCsのIL-1 β 産生は健常コントロールのそれと同様のほぼ正常なパターンになっていたが、患者からのTNF- α 産生のパターンは変化していなかった(図2)。

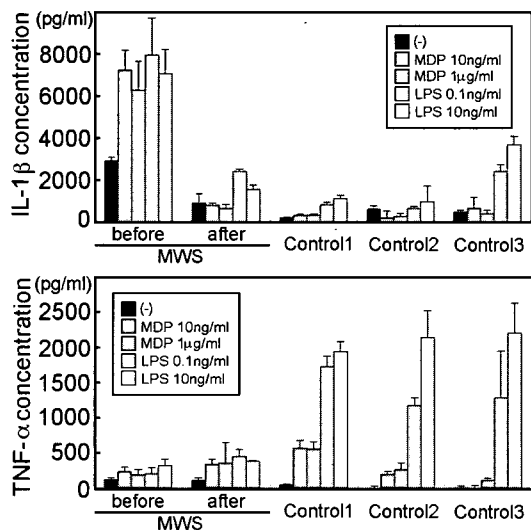


図2 MWSおよび健常コントロールから得た末梢血単核球からのIL-1 β およびTNF- α の産生。

患者と健常人から末梢血単核球を分離しMDPおよびLPS刺激下あるいは刺激なしで8時間培養した。上清中のIL-1 β およびTNF- α の濃度をELISA法で測定した。結果は3つの平均+SDで表示している。MWS患者において、"before"はanakinra治療前の検体を示し、"after"は治療開始5か月後の検体を示している。(-)は無刺激を意味する。

D. 考 察

慢性的な蕁麻疹様皮疹、関節痛、進行性の感音性難聴および誘因無く上昇しているCRPといった所見はMWSを強く疑わせるものである。MWSは*CIAS1*遺伝子のヘテロ接合体変異と関連している。この患児ではR260Wのアミノ酸変異を認め、同じ変異はMWSにおいてすでに報告されている(4)。*CIAS1*変異はMWS同様、FCAS/FCUおよびNOMID/CINCAの原因とも関連している。

*CIAS1*遺伝子の産物であるcryopyrinは免疫細胞と軟骨細胞に発現している(1)。Goldbach-Manskyら(5)はNOMID/CINCA患者を高解像MRIにおいて検査したところ、蝸牛のある中枢神経部分の画像が増強されていたと報告しており、IL-1 β の局所的な産生がNOMID/CINCAの蝸牛部分の炎症を引き起こしている可能性について言及している。アミロイドシスはコルチ器官や蝸牛神経には認められないことから、アミロイドが難聴に直接影響しているとは考えにくい。MWS患者においてはIL-1 β が感音性難聴の病態形成に関係していると思われる(6)。MWS患者の聴力は炎症とともに徐々に障害されてくるが、感音性難聴がanakinra治療により改善することはすでに報告されている(6,7)。この症例ではanakinra治療により感音性難聴が完全に改善しており、IL-1 β 産生による局所の炎症が難聴に関係していることが示唆される。anakinraのMWSに対する大きな効果は、この症例においても治療開始2週間でCRP、SAAが正常化し、3日間でIL-1 β が著明に低下することからもうかがえる。

*CIAS1*変異がある患者では血清中の炎症性サイトカインが増加していることが報告されているが(8)、この症例でも同様であった(表)。*CIAS1*変異があるNOMID/CINCAの患者の単球からは、LPSやcryopyrin inflammasomeの活性化因子と考えられているMDPによる刺激が無くてもIL-1 β が多量に産生されていることが報告されている(9)。*CIAS1*変異は細胞内においてcryopyrin inflammasomeを恒常的に活性化しており、結果としてcaspase-1の活性化とIL-1 β のプロセッシングを高めていることが報告されている(8)。このことは、患者のMNCsへの刺激がなくてもその培養上清中から高い濃度のIL-1 β が検出されることや、MDPやLPSに過剰反応することを説明している。注目すべきはIL-1 β とTNF- α が異なった産生パターンをとることである。anakinra治療開始後は患者のMNCsからのIL-1 β 産生はコントロールと同等レベルまで落ち着いたが、TNF- α 産生はMDPやLPSの刺激に対して低い反応のまま変化していなかった(図2)。このことから

anakinra治療後もMNCの状態は過剰に活性化したまま変化していないと考えられる。TNF- α 産生はNF- κ Bの下流にあることが知られている。anakinra治療にかかわらず患者のMNCsはR260Wをもつcryopyrinを恒常的に活性化しており、ゆえにNF- κ Bを活性化し続け、このことがTNF- α 産生に負のフィードバックをかけ続けていることにつながっている。NOMID/CINCAに対して抗IL-6受容体抗体を使用した例で、治療後にIL-6がさらに増多したことが報告されている(10)。同様にIL-1 β 受容体を阻害することによりフィードバックがかかってIL-1 β 産生がさらに促進されることも予想される。しかし実際は、anakinra治療により患者の症状が劇的に抑えられてしまうのみならず、IL-1 β の過剰産生も起こっていない。anakinra治療ではなぜIL-1 β の過剰産生を引き起こさないのか。この問いに答えるにはさらなる研究が必要だが、anakinraはIL-1 β 受容体を阻害するのみならず、cryopyrin inflammasomeそのものを制御し、感音性難聴を含めた臨床症状を改善しているのではないかと我々は推察している。

E. 結 論

IL-1受容体拮抗薬であるanakinraで治療したMWSの一女兒例を報告した。anakinra治療は安全であると思われ、MWSの女兒の症状改善、特に感音性難聴の改善に対して大きな効果をもたらした。そしてその効果はIL-1 β 受容体を阻害するのみならずcryopyrin inflammasomeを直接制御することからもたらされるのではないかと推測する。

【謝辞】

治療薬であるanakinraをご提供いただいたAmgen (Cambridge, UK)、その手配をご支援いただいた西小森隆太先生(京都大学小児科)、ならびに*CIAS1*遺伝子の解析を行っていただいた大石勉先生(埼玉県立小児医療センター感染免疫科)に深謝いたします。

参考文献

- 1) Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 2001;29:301-5.
- 2) Franchi L, McDonald C, Kanneganti TD, Amer A, Nunez G. Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors: intracellular pattern recognition molecules for pathogen detection and host defense. *J Immunol* 2006;177:3507-13.
- 3) Hawkins PN, Lachmann HJ, McDermott MF. Interleukin-1-receptor antagonist in the Muckle-Wells syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:2583-4.
- 4) Dode C, Le Du N, Cuisset L, Letourneur F, Berthelot JM, Vaudour G, et al. New mutations of *CIAS1* that are responsible for Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria: a novel mutation underlies both syndromes. *Am J Hum Genet* 2002;70:1498-506.
- 5) Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, Gelabert A, Jones J, Rubin BI, et al. Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1 β inhibition. *N Engl J Med* 2006;355:581-92.
- 6) Mirault T, Launay D, Cuisset L, Hachulla E, Lambert M, Queyrel V, et al. Recovery from deafness in a patient with Muckle-Wells syndrome treated with anakinra. *Arthritis Rheum* 2006;54:1697-700.
- 7) Rynne M, Maclean C, Bybee A, McDermott MF, Emery P. Hearing improvement in a patient with variant Muckle-Wells syndrome in response to interleukin 1 receptor antagonism. *Ann Rheum Dis* 2006;65:533-4.
- 8) Aksentijevich I, Nowak M, Mallah M,

- Chae JJ, Watford WT, Hofmann SR, et al. De novo CIAS1 mutations, cytokine activation, and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID): a new member of the expanding family of pyrin-associated autoinflammatory diseases. *Arthritis Rheum* 2002;46:3340-8.
- 9) Martinon F, Agostini L, Meylan E, Tschopp J. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol* 2004;14:1929-34.
- 10) Matsubara T, Hasegawa M, Shiraishi M, Hoffman HM, Ichiyama T, Tanaka T, et al. A severe case of chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome treated with biologic agents. *Arthritis Rheum* 2006;54:2314-20.

1型高IgE症候群の原因遺伝子STAT3の発見

峯 岸 克 行 (東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学)
鳥 山 一 (東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学)

研究要旨

高IgE症候群は、難治性湿疹と血清IgE高値に細胞外寄生細菌に対する易感染性と"Cold abscess"の形成を特徴とする原発性免疫不全症である。本症候群には、免疫系以外の骨、歯牙などの異常を有する1型のものと、免疫系のみで異常が限局しウイルス感染症に罹患する2型のものがある。本症候群は、1966年にDavis, Wedgewoodらにより最初に報告されたが、その後の多くの研究にもかかわらず、病態、原因遺伝子は明らかにされていなかった。そこで、昨年我々は、2型の高IgE症候群に細胞内寄生菌に対する易感染性を合併する免疫不全症の原因遺伝子の検討を行い、Tyk2遺伝子の異常が本疾患発症の原因であることを明らかにした。さらに、Tyk2欠損症においてはI型インターフェロン(IFN)、IL-6、IL-10、IL-12、IL-23などの各種のサイトカインのシグナル伝達が障害されていることを明らかにした。今年は、このTyk2欠損症の発見を契機にして、1型の高IgE症候群のサイトカインシグナル伝達の検討を行い、その原因遺伝子の同定を試みた。

A. 研究の目的

高IgE症候群は、血清IgEが高値で、難治性のアトピー性皮膚炎様の湿疹に、細胞外寄生細菌に対する易感染性と"Cold abscess"の形成を特徴とする原発性免疫不全症である。黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍、Pneumatoceleを形成する肺炎を特徴とし、常染色体優性遺伝することがあり、骨・歯牙の異常を合併する1型と、常染色体劣性遺伝することが多く、伝染性軟属腫、ヘルペスウイルス感染症などに頻回に罹患する2型に分類できる。抗生物質や抗真菌薬の予防的投与や、局所への軟膏の塗布による湿疹の管理が有効であるが、診断確定までに時間を要し、肺の気管支拡張症や肺嚢胞が完成してから確定診断にいたることも多い。今回我々は、1型高IgE症候群の原因遺伝子を同定することにより、より有効な早期診断法、治療法を開発することを目的とする検討を行った。

B. 研究方法

患児または代諾者よりインフォームドコンセントを得たあとで、患児の末梢血より比重遠心法により単核球を分離し、免疫磁気ビーズにてCD14

陽性の単球を得た。これをGM-CSFの存在下で培養しマクロファージを得た。末梢血単核球、培養マクロファージをそれぞれEBウイルスとIL-6、IL-10とLPSの組み合わせで刺激して、IgMとサイトカインの産生能をそれぞれ検討した。cDNAまたはDNAを用いて塩基配列を検討した。常法に則ってルシフェラーゼアッセイを行い、STAT3認識配列に対する結合能は、ELDIA法(Clontech)により行なった。

(倫理面への配慮) 本研究は、ヒト遺伝子解析を含むので、試料提供者の人権および利益の保護の取り扱いについて慎重に配慮した。そのため遺伝子解析は個人識別情報管理者により連結可能匿名化を行い、また本研究における遺伝子解析に関しては、東京医科歯科大学倫理委員会で承認を得ているので、その指針を遵守して行った。

C. 研究結果

1. 1型高IgE症候群におけるサイトカインシグナルの検討

Tyk2欠損症の発見は、ヒトにおけるTyk2の機

能を明らかにしたばかりでなく、同様のサイトカインのシグナル伝達障害が、1型の高IgE症候群の原因である可能性をも示唆した。そこで、典型的な1型の高IgE症候群の2例のサイトカインシグナル伝達を、Tyk2欠損症と比較した。すると1型の高IgE症候群においてもTyk2欠損症と同様に、IL-6とIL-10のシグナル伝達は障害されていたが、一方、IL-12とIFN α に対する応答は、Tyk2欠損症とは異なり正常だった。

2. 1型高IgE症候群におけるSTAT3分子の遺伝子変異の発見

IL-6とIL-10のシグナル伝達に必須で、IL-12とIFN α のシグナル伝達には必要ではない分子が、I型高IgE症候群の候補遺伝子となった。そこで、この2例のI型高IgE症候群のSTAT3の塩基配列を検討すると、1例はSTAT3のDNA結合領域の1アミノ酸の欠失 (Δ V463)、もう1例はDNA結合領域の1アミノ酸置換 (R382W) が認められた。さらに13例の散发性の1型高IgE症候群のSTAT3について検討したところ、そのうちの6例に同様にDNA結合領域の突然変異を認めた。この6例の突然変異は Δ V463が2例、R382W、R382Q、H437Y、T389Iが各1例ずつだった。STAT3分子のDNA結合領域は種間で非常に良く保存されており、正常コントロール1,000例中にこれらの変異は1例も存在しなかった。また、高IgE症候群の症例の両親・兄弟のSTAT3遺伝子の検討を行ったが、1例も高IgE症候群の症例と同じ変異を有するものはなく、これらの突然変異は*de novo*で起こったものと考えられた。

3. 1型高IgE症候群由来細胞におけるSTAT3機能の検討

STAT3に突然変異を有する症例において、患者血液細胞を用いてSTAT3のシグナル伝達についての検討を行った。正常コントロール由来のB細胞株はIFN α に反応してSTAT3をチロシンリン酸化するが、このチロシンリン酸化は、STAT3に変異を有する患者でも正常だった。さらに、STAT3にHAまたはFLAGのタグをつけて

STAT3同士の相互作用を免疫沈降法とウェスタンブロッティングを用いて検討したところ変異を有するSTAT3の正常STAT3に対する結合力は正常STAT3と同等であり、変異を持つSTAT3も正常STAT3とダイマーを形成できる可能性が示唆された。次に、STAT3が核内に移行してSTAT3の認識配列に結合できるかを検討した。B細胞株をIFN α で刺激した後に核抽出液を調整し、活性化されたSTATがそのターゲットのオリゴヌクレオチドに結合できるか否かを検討した。するとSTAT3に変異を有する細胞株においては、IFN α の刺激により活性化されたSTAT1は正常にDNA結合活性を上昇させるのに対して、STAT3のSTAT3認識配列に対する結合活性が正常の約4分の1に低下していた。このことより、正常STAT3同士のホモダイマーを形成したもののみがDNA結合活性を持ち、正常と異常STAT3のヘテロダイマー、異常STAT3のホモダイマーは正常のDNA結合活性を持たないことが示唆された。

4. STAT3変異体の機能解析

STAT3変異体の機能をより詳細に検討する目的でSTAT3の変異体を作成し、これをあらかじめSTAT3をsiRNAでノックダウンしたHela細胞に導入し、STAT3-ルシフェラーゼのレポーターコンストラクトを用いてSTAT3の活性を検討した。するとsiRNAによりノックダウンされたSTAT3の機能が、正常のSTAT3を導入することにより回復するのに対して、変異STAT3を導入してもそのタンパクは検出されるものの、活性は全く見られずに、この変異体が単独ではSTAT3の活性を有していないことが明らかになった。この変異体がドミナントネガティブとして働く可能性を検討するために変異タンパクをヒト肝細胞のHepG2または、マウス肥満細胞MC/9に導入し、それぞれIL-6、IL-10のシグナル伝達に対する影響を検討した。すると変異STAT3タンパクを導入することによりいずれの実験系においても内因性のSTAT3の活性が抑制される、すなわちこれらの変異体はドミナントネガティブとして働くことが明らかになった。

D. 考 察

ヒトのSTAT3異常症は、IL-6とIL-10に対するシグナル応答が障害されている。そのため、肝臓におけるIL-6による急性期反応が障害されていれ、正常な炎症反応が起こらずcold abscessを形成する可能性が示唆された。またこのことは、STAT3異常症においては、感染初期における感染症の重症度を評価するマーカーとしてCRP (C-reactive protein) は不適當で、IL-1, IL-6などのより早期の指標を用いるべきであることを意味している。また、この研究成果によって、新生児早期から重症なアトピー性皮膚炎を呈する症例に早期の遺伝子診断をすることで、予防的抗生物質を早期から投与開始し、感染症の反復による肺嚢胞などの肺の器質的障害を予防することが可能となり、本疾患のQOLが改善することが期待される。また、高IgE症候群の原因としてTyk2欠損症とSTAT3異常症を同定したことは、高IgE症候群はmultiple cytokine signal defect病である可能性を強く示唆しており、いまだ原因が同定できていない高IgE症候群においても同様の遺伝子異常が原因となっている可能性が示唆された。

E. 結 論

多くのヒトの1型高IgE症候群においては、STAT3のドミナントネガティブ突然変異がその原因となっていることが明らかになり、高IgE症候群の早期診断、早期治療開始が可能となった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

1. Minegishi Y., Saito M., Nonoyama S. Karasuyama H.; Human Tyk2 deficiency reveals requisite roles of Tyk2 in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. Keystone Symposium "Jaks, STATs, and Immunity", Steamboat springs, 2007, 1, Colorado, USA.

2. Minegishi Y., Primary Immunodeficiency; Identification and elucidation of complex primary immunodeficiency, hyper-IgE syndrome, 9th FIMSA advanced immunology training course and workshop, 2007, 2, Jeju, Korea.

3. Minegishi Y. Molecular genetics and functional characterization of human hyper-IgE. JSI-RCAI workshop 2007 "Lessons learned from primary immunodeficiency", 2007, 5, RCAI, Yokohama,

4. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会
峯岸克行、齋藤雅子、高田英俊、原 寿郎 川村信明、有賀 正、土屋 滋、柘植郁哉、烏山 一 高IgE症候群の原因遺伝子の検討, 2007, 11, 横浜

5. 第37回日本免疫学会総会・学術集会
Y. Minegishi, Late breaking symposium. Dominant negative mutations in STAT3 gene result in Hyper-IgE syndrome. 2007, 11, 品川.

2. 論文発表

1. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature*. 448, 1058-1062, 2007

2. Minegishi Y, Saito M, Karasuyama H. Response: The hyper IgE syndrome and mutations in TYK2. *Immunity*. 26, 536, 2007

3. Minegishi Y. Karasuyama H. Hyper IgE syndrome and Tyk2 deficiency. *Current Opinion in Allergy Clinical Immunol*, 7, 506-509, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 分担研究報告書

DNA損傷修復異常を伴う免疫不全症の解析

森 尾 友 宏（東京医科歯科大学大学院 発達病態小児科学分野准教授）
水 谷 修 紀（東京医科歯科大学大学院 発達病態小児科学分野教授）

研究要旨

Ataxia-telangiectasia (A-T)、A-T類似疾患及びDNA損傷修復異常症の診断手段を確立し、Western blot及びDNA塩基配列決定を用いて、A-T（12名）、DNA Ligase IV欠損症（2名）、Cernunnos欠損症（1名）、Ataxia-telangiectasia like disease (ATLD)（2名）の診断を行った。

免疫学的異常に加え、高悪性腫瘍発生、神経症状など多彩な症状を呈するDNA損傷修復異常症においては、患者由来細胞を用いて、生化学的・分子生化学的特徴を明らかにした。

基礎的解析からは、これらのDNA損傷修復に関与する分子が、悪性腫瘍前段階では活性化し、腫瘍化すると活性が低下すること、一部ではその際にp53変異が導入されていることなどを明らかにした。

A. 研究目的

Ataxia-telangiectasia (A-T) は比較的稀な原発性免疫不全症であり、Ataxia telangiectasia mutated (ATM) 遺伝子異常により発症する。主たる症状は小脳失調であり、約70%の症例で免疫異常が検出される。またリンパ系悪性腫瘍を高頻度に合併することも特徴である。

ATMはMre11, NBS1, Rad50, Artemis, Chk1, Chk2, p53などを基質とし、それらの分子との相互作用によってDNA損傷修復や細胞周期チェックポイント制御を行っている。したがって、ATとその他のDNA損傷修復異常症での症状・所見は類似するものも多い。確定診断を行える施設が少ない現状を鑑み、この研究ではまず、ATをはじめとするDNA損傷修復異常症患者の診断法の確立を目的とした。

DNA損傷修復異常症は多彩な原因から成り立っている。様々な症状を呈し、免疫異常を呈するものもあるが、症例数は少ない。病態を解明するために、各症例で詳細な検討を行った。

DNA損傷修復異常症ではまた悪性腫瘍の発生が大きな問題である。DNA損傷修復反応

(DDR)に関わる分子を欠損したマウスの検討から、その分子機構が少しずつ明らかになっているが、ヒトにおいてDNA損傷修復に関与する分子が、腫瘍化段階において、どのような働きをしているかについての検討は少ない。患者における高頻度悪性腫瘍発生の病態探索を目的として、腫瘍発生段階におけるDDR及び染色体転座の分子機構について検討を加えた。

B. 研究方法

(1) A-T及び関連疾患の診断法の確立

AT疑いあるいはDNA損傷修復異常症疑い患者の末梢血からDNAを抽出すると共に、末梢血から固相化CD3抗体とIL-2を用いて増殖活性化T細胞を作成し、またEBV感染B細胞株 (EBV-LCL) を樹立した。主に増殖活性化T細胞からタンパクを抽出し、抗ATM抗体にてWestern blot解析を行った。

ATM以外のDNA損傷修復異常症に関しては、細胞株から抽出したタンパクを用いて、抗ATR, 抗Mre11, 抗NBS1, 抗Rad50, 抗Artemis, 抗DNA ligase IV, 抗DNA-PKcs, 抗Ku70/80抗体

にてWestern blot解析を行った。

最終確定診断のために、DNA ligase IV、Cernunnos、Mre11、NBS1、Rad50、ArtemisについてはDNA塩基配列決定のための至適プライマー設定を行った。ATMに関しては、まずはcDNAを合成し、8つの領域を19のprimerで遺伝子解析し、さらに異常を認められたexon/intronにおいてgenomic sequencingを行った。

(2) DNA損傷修復異常症の解析

DNA損傷修復異常症では、T cell receptor excision circle (TREC) の測定及び、リンパ球サブセット解析、T細胞レセプターレポーター解析を行った。DDRを体系的に解析するためには、増殖活性化T細胞及びEBV-LCLを用いて、電離放射線照射を行い、動きのある分子をmRNA expression profilingにて検討して、健常同胞との比較を行った。

(3) ATM及び関連分子の染色体異常－悪性腫瘍－の発生における挙動の解析

骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome: MDS) をモデルとして前がん段階 (RA, RAEB-I, RAEB-II) と白血病化した状態 (Overt leukemia: OL) でのDDRを、骨髄穿刺塗抹標本を抗リン酸化ATM、抗リン酸化Chk2、 γ -H2AX抗体染色して検討した。またRAEB-IからOLに移行した患者では、ATMのLOHや、p53変異についても検討を加えた。

(倫理面への配慮)

ATM及び関連分子のタンパク解析及び遺伝子解析、体系的mRNA発現解析に関しては、東京医科歯科大学医学部遺伝子倫理審査委員会に承認を受けた「免疫不全症患者の(網羅的)遺伝子解析」で用いる説明書・同意書を用いて、主治医より患者親権者(及び患者本人)説明を行い、同意が得られた患者さんからの検体にて解析を施行した。

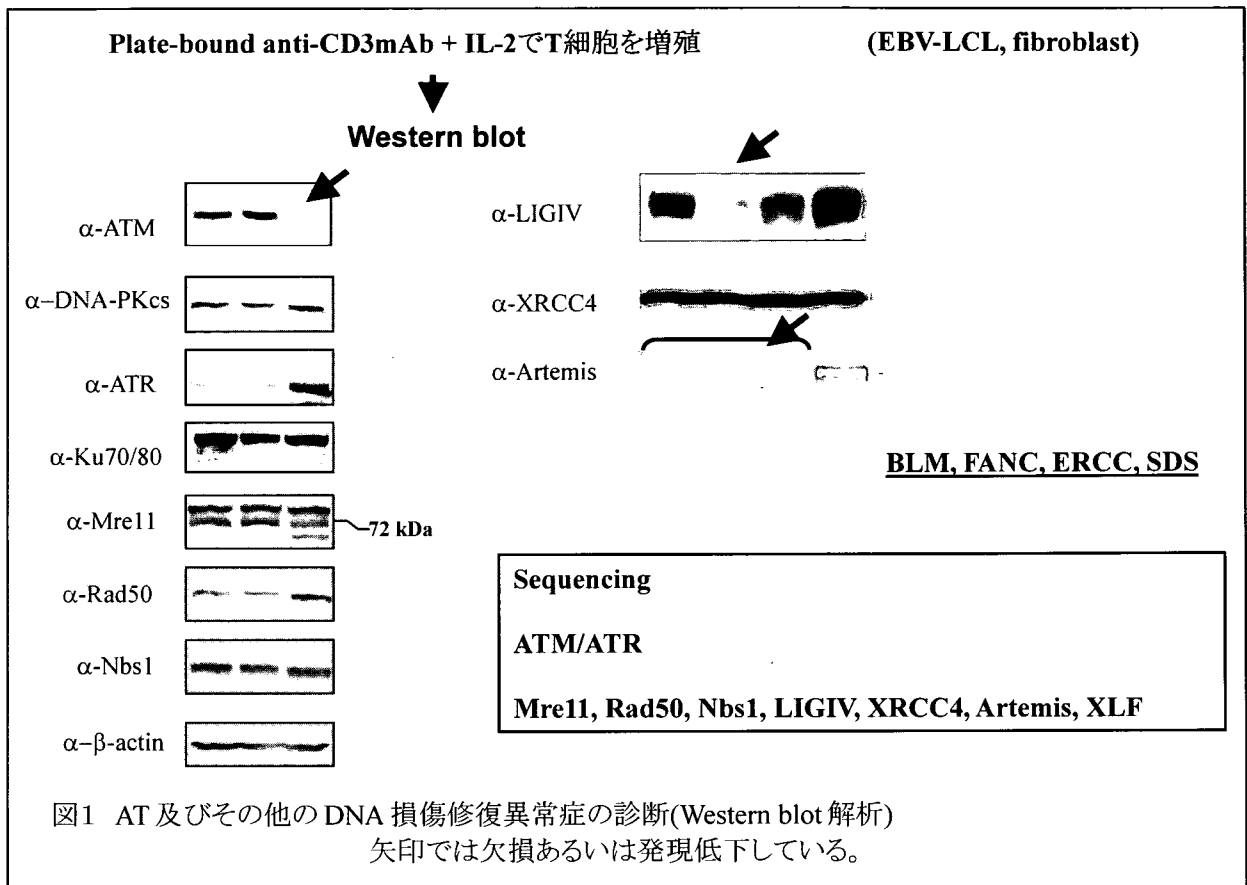
DNA損傷修復異常症における細胞の解析については、東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の承認を得、患者親権者(及び患者本人)に説明を行い、同意を得られた場合に、検討を行った。

C. 研究結果

1. A-T及びDNA損傷修復異常症の診断

15名のA-T疑い症例から活性化T細胞培養とEBV-LCL樹立を行い、Western blot解析を行ったところ、12名にてATMタンパクの発現低下あるいは消失を認めた(図1)。これらの症例にてcDNA sequencing→genomic sequencingを行った結果、1名にて両アリの、3名にて一側のアリの遺伝子変異が判明した(表1)。多くはsplicing mutationあるいはframe shiftであった。また3名ではさらにもう1側のアリでの遺伝子変異を継続している。A-Tの簡易診断のために、現在ATMあるいはDNA損傷刺激後のリン酸化ATMのflowcytometryでの検出を試みている。

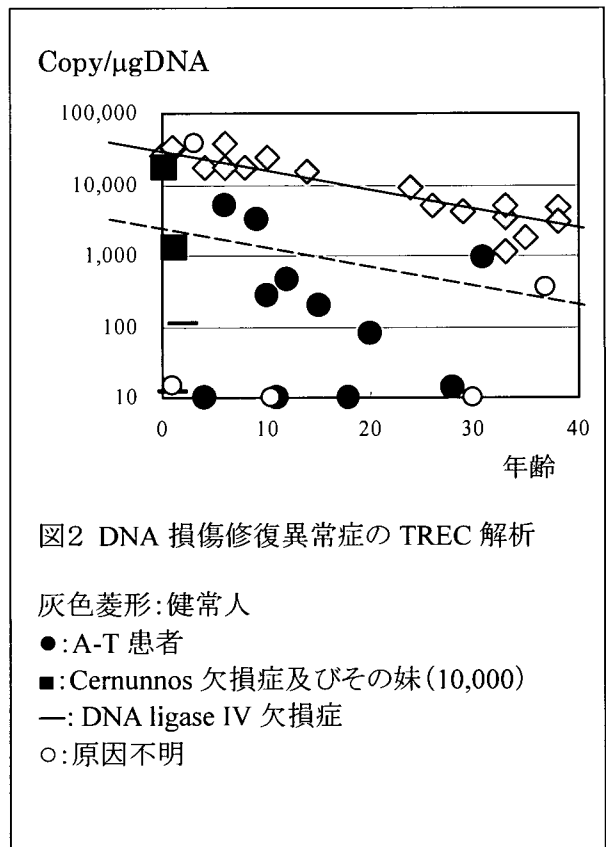
その他のDNA損傷修復異常症疑いでは、DNA ligase IV欠損症の兄妹例(低身長・小頭症・B細胞欠損→汎血球減少(兄)、過剰指・小頭症・体重増加不良・B細胞欠損(妹))、Cernunnos欠損症(低身長・リンパ球減少、無 γ グロブリン血症)、Mre11欠損症兄弟例(小脳萎縮、小脳失調、発達遅滞、肺腫瘍)が明らかになっている。図1ではArtemis欠損症とDNA ligase IV欠損症の解析が示されている。



患者	変異1	変異2
JPAT1	SM	PT
JPAT2	FS	FS
JPAT3	SM	SM
JPAT4*	SM	FS
JPAT5*	SM	FS
JPAT6	FS	NYI
JPAT8*	SM	NYI
JPAT9*	SM	NYI
JPAT10	SM	SM
JPAT11*	SM	LD
JPAT12*	SM	LD
JPAT13	PM	PM

表1 A-Tの遺伝子変異
* 同胞症例

Splicing mutation: SM
Premature termination: PT
Frame shift: FS
Not yet identified: NYI
Large deletion: LD
Point mutation: PM



2. DNA損傷修復異常症の解析

DNA損傷修復異常症（疑い）患者でのTREC解析を行った。-はDNA ligase IV欠損症、■はCernunnos欠損症で、■のうち10,000copy以上となっているものは、健常同胞である。Mre11欠損症では今後解析を行う予定である。○はまだ原因の判明していない患者であるが、点線より下にある、TRECが1 log以上低下した症例では、DNA損傷修復異常が胸腺からのT細胞産生低下につながっている可能性があり、今後検討を進める予定である。

このうちのDNA ligase IV欠損症について、細胞を用いてさらに検討を行った。患者では44 delC/W447Cのcompound heterozygoteであり、DNA ligase IVの発現が低下している。兄は低身長、小頭症、B細胞減少症、腸管感染症→汎血球減少症で、放射線高感受性であり、2002年にRISTで移植を受け、前処置に伴う副反応で逝去している。その妹は小頭症、B細胞減少症、低ガンマグロブリン血症、過剰指、先天性股関節脱臼を認めている。患児では、B細胞の減少（1-3%）、NK細胞増多（30-50%）、及び $\gamma\delta$ T細胞の増加（12-25%）が認められ、CD8細胞においてT細胞レセプターレパートアの偏りを認めた。

妹においては、>99%に純化された活性化T細胞を用いて電離放射線照射後に動く遺伝子を体系的に検討したところ、表2に示すような遺伝子群にて誘導の異常を認めた。今後兄の保存T細胞にて同様の検討を行い、またA-Tやその他のDNA損傷修復異常症患者の細胞を用いて解析し、DNA ligase IV欠損症に特有の現象を明らかにしていく予定である。

Fold change		Common name
patient	Sister (healthy)	
1.05	2.00	AXUD1
1.44	2.00	BAX
0.36	2.32	DNAJC12
0.75	2.37	ATXN1
0.93	2.65	DAF
1.25	2.77	BBC3
0.40	0.79	TNFSF13
2.11	0.85	BRD4
0.83	0.30	RASA3
1.05	0.37	DAP3
0.78	0.43	FANCA
0.96	0.49	CHES1
2.33	0.50	CHES1

表2 電離放射線照射後に反応を認めなかったあるいは過剰反応が認められた分子群

3. ATM及び関連分子の染色体異常—悪性腫瘍—の発生における挙動の解析

MDSをモデルとして前がん段階（RA, RAEB-I, RAEB-II）と白血病化した状態（Overt leukemia:OL）での、DDRを検討した。まずは骨髓穿刺塗抹標本を用いて、リン酸化ATM、リン酸化Chk2、 γ -H2AXを染色し、RA（10例）、RAEB-I（13例）、RAEB-II（8例）、OL（10例）の標本における発現程度を、なし、中等度、高度に分類したところ、RAではDDRがほとんど起きておらず、陰性40%、中等度60%であった。RAEB-Iでは陰性15%、中等度38%、高度47%、RAEB-IIでは陰性25%、中等度37%、高度38%となっており、高度発現群が少なくなっていたが、これはOLではさらに顕著で20%のみが高度発現であった（図3）。この結果、前がん状態の初期にはDDRは弱く、制御困難な増殖やDNA損傷が起こる時期にはDDRが亢進し、さらに明らかな腫瘍化を起こした時期にはDDRがむしろ終焉に向かうことが示された。

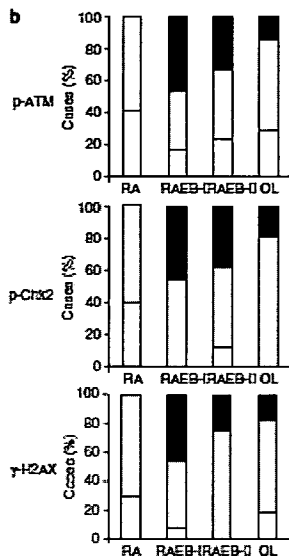


図3 MDS及びOIにおけるDDR
 白抜きはno stainingを、灰色はintermediate stainingを、
 黒はstrong stainingをあらわす。
 (Horibe *et al*, Leukemia, 2006より)

D. 考 察

A-T及びA-T類似疾患、DNA損傷修復異常症の確定診断方法を模索した。ATMは66のexonによりコードされており、intron領域での遺伝子変異やlarge deletionも認められることから、単一施設での検討方法としては、タンパク発現検索→塩基配列決定法が理にかなっていると考えられる。しかし今後primerの設定により、集約的な塩基配列決定法に向かうことが可能と考えられる。また現在開発中のFACSによるATM, phospho-ATM検出は患者の第一次スクリーニングとしては、最適なものとなる可能性があり、さらに検討を続けたい。

ATRについても同様の手法がとられるべきであるが、Mre11, NBS1, Rad50, DNA ligase IV, Cernunnos, Artemisなどに関しては、網羅的 genomic sequencing法が適している。一方Western blotの検討から、Mre11欠損でのNBS1発現低下などが明らかになり、タンパクレベルの解析が、病態解析において重要であることについては論を待たないと思われる。なお現時点で、低身長、易感染性、神経症状、免疫異常などDNA損傷修復異常症を疑わせる患者で、診断に至っていない症例は5例であり、今後新規分子異常を含

めての探索が必要と考えている。

DNA損傷修復異常症においては、神経学的異常、骨系統異常、免疫異常など様々な病態を呈し、また原因分子は相互作用しながらDNA切断→修復をつかさどっている。それぞれがしかし、異なるスペクトラムの病像、所見を呈することは興味深く、今回行った電離放射線照射後のmRNA発現プロファイリングを、様々な疾患で比較検討することにより、新たなDDR pathwayの解明や、病態把握に結びつく可能性があると考えられる。

DNA損傷修復異常症はまた、悪性腫瘍発生頻度が高い。今回明らかにした、(細胞増殖ストレス・DNA損傷)→DDRの亢進→MDS→DDRの低下→ATMなどのLOH・p53への遺伝子変異→Overt leukemiaという経路は、DDRが活性化されている状態は、腫瘍発生の第一段階に至っていることを示すものであり、今後患者にての腫瘍発生のモニタリングなどに有用となる可能性もある。今後はATM異常における脂質代謝異常や、その他のDNA損傷修復異常症における骨・軟骨形成異常などにも焦点を当てて検討する予定である。

E. 結 論

昨年度に引き続き研究により、A-Tを含むDNA損傷修復異常症の診断法の確立と、臨床所見・検査所見・免疫学的所見の集積を行った。単一施設としての診断の流れは確立し、今後さらに簡便な方法を模索しているところである。明らかになったDNA損傷修復異常症の症状・所見・腫瘍発生などは多岐に渡り、今後患者細胞を用いた多角的検討から、明らかになる点も多いと考えている。この研究では、DDRに関与する分子の腫瘍発生における役割の一端も明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表：

渡邊文晶、森尾友宏、清野透、水谷修紀 DNA 損傷応答における Artemis のリン酸化の生物学的意義 (Biological significance of Artemis phosphorylation in DNA damage response)、日本癌学会総会、2007年10月、横浜

1. Suzuki K, Tsugawa K., Oki E, **Morio T**, Ito E, Tanaka H. Vesical varices and telangiectasias in a patient with ataxia telangiectasia. *Pediatr. Nephrol.* in press
2. **Morio T**, Kim H. Ku, Artemis, and Aataxia-Telangiectasia-Mutated: Signaling Networks in DNA Damage. *Int J Biochem Cell Biol.* in press.
3. Horibe S, Takagi M, Unno J, Nagasawa M, **Morio T**, Arai A, Miura O, Ohta M, Kitagawa M, Mizutani S. DNA damage check points prevent leukemic transformation in myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 10:2195-8, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし