

Shindou H, Yoshida M, Nishikado IH, Kawano Y, Minegishi Y, Shimizu T, Karasuyama H, Basophils play a pivotal role in IgG- but not IgE-mediated systemic anaphylaxis in contrast to mast cells. *Immunity* 28, 581-589, 2008

2. Minegishi Y., Karasuyama H., Genetic origins of hyper-IgE syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep.* 8, 386-391, 2008

3. Minegishi Y., Karasuyama H. Defects in Jak-STAT-mediated cytokine signals cause hyper-IgE syndrome: Lessons from a primary immunodeficiency. *Int. Immunol.* 2008 Dec 15.

NOD2遺伝子異常を伴った若年性サルコイドーシス/Blau症候群の臨床像の検討

西小森 隆 太 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)

岡 藤 郁 夫 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)

酒 井 秀 政 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)

八 角 高 裕 (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

若年性サルコイドーシス/Blau症候群は皮疹、関節炎、ブドウ膜炎を三主徴とする主として4歳以下で発症する自己炎症症候群の1つである。近年、病因としてNOD2遺伝子異常との関連が明らかにされた。今回NOD2遺伝子異常を認めた本邦20例の臨床的な特徴をまとめるとともに、変異NOD2遺伝子によるNF- κ B活性化と臨床的重症度との相関について検討した。いずれも変異NOD2遺伝子はリガンド非依存的NF- κ B活性化能をもち、その病因としての重要性が確認された。皮膚症状として魚鱗癬様紅皮症型皮疹+苔癬様型皮疹が大部分で25%に結節性紅斑型皮疹を認めた。関節症状は多関節型、眼症状は全眼型のブドウ膜炎が大部分であった。本邦に特徴的なこととして55%に発熱を認め、全身型若年性特発性関節炎との鑑別が重要と考えられた。病因として重要であることが確認された変異NOD2遺伝子によるリガンド非依存的NF- κ B活性化能と臨床的重症度との相関の検討では、眼症状の予後因子として有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

若年性サルコイドーシス/Blau症候群の臨床像については症例数が少ないため、殆ど報告されていなかった。今回、若年性サルコイドーシス/Blau症候群が臨床的に疑われ、NOD2遺伝子変異が同定された本邦20症例の臨床像を明らかにする。またNOD2遺伝子型-臨床型相関を変異NOD2遺伝子によるNF- κ B活性化能を中心に検討し、NOD2遺伝子型による重症度の予測が可能か検討する。

B. 研究方法

文献的に既報告例の症例、及び遺伝子検査依頼症例を集積し、同意の得られた若年性サルコイドーシス/Blau症候群の患者で、NOD2

遺伝子に変異を認めた20症例について、3主徴及び発熱の病型、発症年齢、現在の視力の状態、他の臓器の合併症等を主治医から聞き取り調査し集計した。また各NOD2遺伝子変異の疾患関連性については、in vitroにおける強制発現系での変異NOD2遺伝子によるNF- κ Bレポーター活性を検討した。またNOD2遺伝子型-臨床病型相関において、同強制発現系でのNF- κ B活性化能を定義し(リガンド刺激なしでの変異NOD2によるNF- κ B活性化能/リガンド刺激ありでの変異NOD2によるNF- κ B活性化能)臨床的重症度との関連を検討した。

(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 consents を得て、患者変異 NOD2 遺伝子解析を行った。

C. 研究結果

患者 20 症例集積でき、男性 9 名、女性 11 名であった。年齢分布は 7-48 歳で中央値は 17 歳で、平均罹病期間は 15 年であった。14 症例が孤発例、6 症例が家族集積例 (3 家系) であった。NOD2 遺伝子変異は R334W (9 例)、R334Q (3 例)、E383G (2 例)、H496L、T605P、D382E、M513T、N670K、C495Y それぞれ各 1 例であった (Table 1)。いずれも変異は NOD 領域に存在し、リガンド非依存性に NF- κ B 活性化を示した (Figure 1)。

発症年齢であるが、5 歳以上で発症している 2 症例が存在した。

各症状での発症であるが、皮膚から発症した症例が 13 例、関節症状 8 例、眼症状 1 例であった。皮膚症状 19 例、関節症状 19 例、眼症状 18 例にそれぞれ各症状をこれまで認めた。また症状の出現順であるが、既報告例通り、皮膚、関節、眼症状の順にみとめ、それぞれ中央値、24 か月、33 か月、4 年 6 か月であった。

皮膚症状としては、魚鱗癬様紅皮症型皮疹 + 苔癬様型皮疹を示すものが大部分であったが、5 例に結節性紅斑様の発疹を認めた (Table 1)。

関節症状として、17 例が多関節型、2 例が少関節型であった。2 例が車いすの使用が必要であった (Table 1)。

眼症状は 18 例にみられ、通常両眼性であった。17 例が全眼型のブドウ膜炎であり、1 例のみ前眼型であった (Table 1)。

上記 3 主徴のほかの症状として特筆すべきものとして、発熱が 11 例にほぼ皮膚、関節症状と同時期にみられた。5 例が稽留熱であり、6 例が弛張熱であった。4 例が他の臓器合併があり、2 例に肺合併症 (間質性肺炎、気管支肉芽腫) をみとめたが、成人型サルコイドーシスに見られる BHL は 1 例も認めなかった。1 例に肝脾腫 + 耳下腺腫脹、1 例に腎石灰化を認めた。

発症誘発因子として、2 例に BCG 接種が認

められた。

疾患の病因として重要と考えられる NOD2 遺伝子変異に伴う NF- κ B 活性化能と同疾患の重症度の比較をおこなった。治療に伴う修飾を避けるため、まず発症時期と NF- κ B 活性化能の相関を検討した。各変異の NF- κ B 活性化能は in vitro にて独立に 3 回レポーター活性をみるにより決定した。また各変異での症例数がすくないため、値により 3 群に恣意的に分割し、相関を検定した (Figure 1)。しかし本研究の症例数では有為な相関は現れなかった (Figure 2)。

続いて予後を規定する重要因子である視力予後について、NF- κ B 活性化能との相関を検討したところ、全体では相関を認めなかった。しかし症例数の多い R334W と R334Q において視力予後について NF- κ B 活性化能との相関をみたところ、NF- κ B 活性化能のより高い R334W において視力予後が不良である傾向が見られた (Table 2)。これはこれまで報告されている R334W、R334Q の比較と同様の結果であった。以上より R334W と R334Q という症例数の多い遺伝子型についてではあるが、臨床予後をある程度推測できる可能性を示した。

D. 考察

諸外国での報告と同様に R334W、R334Q が比較的頻度が高かったが、他の NOD2 遺伝子変異が諸外国よりも多かった。またその変異部位はやはり NOD 領域に集中して、リガンド非依存的に NF- κ B 活性化を引き起こした。若年性サルコイドーシス / Blau 症候群の病因としての変異 NOD2 遺伝子によるリガンド非依存的 NF- κ B 活性化能上昇は重要であった。

臨床所見として、皮膚では魚鱗癬様紅皮症型皮疹 + 苔癬様型皮疹が中心で一部結節性紅斑様皮疹が存在すること、関節所見としては多関節型として発症する機会が多いこと、眼所見は全眼型ブドウ膜炎が多いこと、また臨床症状は皮膚、関節、眼という順に発症していくことが多いこと示された。また特筆すべき症状として稽

留熱、弛張熱を伴う症例が約半数に見られた。関節症状+発熱で全身型若年性特発性関節炎との鑑別が大変重要となる。また発熱を伴わない症例でも、RF陰性多関節型若年性特発性関節炎との鑑別が重要となる。関節所見として比較的痛みが少なく、囊腫状腫脹を伴い、また camptodactyly を合併することが特徴とされている。疑わしい症例は積極的にNOD2 遺伝子検査を行う事が有効である。

今回の検討では変異NOD2 遺伝子と臨床的な重症度を発症時期として検討したが、有為のものは見られなかった。ただ眼症状の予後としてR334WがR334Qより予後不良であり、これはNF- κ B活性化能と相関ありという結果となった。しかし症例数が少なく、我々の検討が妥当であるかどうかは症例の集積後の検討が必要と考えられた。またNOD2 遺伝子の下流シグナルとしてCARD9を介したMAPKsの活性化も報告されている。同変異のMAPKsへの影響も将来の検討課題として重要と考えられた。

若年性サルコイドーシスは5歳未満で発症するというのが定義であったが、NOD2 遺伝子の変異をもとに解析したところ、2例で5歳以上の発症が認められた。診断する上で、発症年齢をもって鑑別することの危険性を示唆した。

また同じ変異での臨床的な重症度のばらつきがみられ、それは同一家系内でも見られた。原因として遺伝学的な相違、また環境因子の相違、治療の相違が影響していると考えられる。さらなる症例の蓄積、および前方視的な研究の必要性が示唆された。

E. 結 論

日本におけるNOD2 遺伝子変異を持つ若年性サルコイドーシス/ Blau 症候群の臨床像を明らかにした。変異NOD2 遺伝子によるNF- κ B活性化能は、眼症状の予後予測因子になり得る可能性を示した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(論文発表)

Okafuji, I., R. Nishikomori, N. Kanazawa, N. Kambe, A. Fujisawa, S. Yamazaki, M. Saito, T. Yoshioka, T. Kawai, H. Sakai, H. Tanizaki, T. Heike, Y. Miyachi, T. Nakahata. Role of NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. *Arthritis Rheum*, 60:242, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the patients with Blau syndrome/early-onset sarcoidosis*

Patient/ age/sex	Genotype	Fever		Skin rash		Arthritis		Uveitis		Visual acuity		Ref.
		Age at onset	Type	Age at onset	Type	Age at onset	Type	Age at onset	Type	OD	OS	
1/15/F†	E383G	2 yr 3 mo	Int	8 mo	LP/SE/EN	3 yr	Poly	11 yr	A/P	20/50	20/67	
2/48/F†	E383G	5 yr	Per	5 yr	LP/SE/EN	11 yr	Poly	11 yr	A/P	HM	Null	
3/36/F	H496L	-	-	1 yr	LP/SE	3 yr	Poly	5 yr	A/P	20/20	20/20	7
4/16/M	R334Q	1 yr 8 mo	Int	6 mo	LP/SE	1 yr 8 mo	Poly	1 yr 10 mo	A/P	20/22	20/22	
5/19/M	R334Q	2 yr 7 mo	Per	1 yr 4 mo	LP/SE/EN	10 mo	Poly	5 yr	A/P	20/50	20/20	17
6/8/F	R334Q	-	-	-	-	3 yr	Poly	-	-	20/20	20/20	
7/8/M	T605P	-	-	7 mo	LP/SE	1 yr 6 mo	Poly	3 yr 3 mo	A/P	20/25	20/50	7
8/18/F	D382E	-	-	3 yr 4 mo	LP/SE	4 yr	Poly	5 yr 4 mo	A/P	20/20	20/25	7, 18
9/13/M	R334W	8 mo	Per	1 yr 3 mo	LP/SE/EN	8 mo	Poly	1 yr 8 mo	A/P	20/29	20/33	
10/32/M	R334W	2 yr	Int	2 yr	LP/SE	1 yr 3 mo	Poly	6 yr	A/P	Blind, 20 yr	Blind, 20 yr	6, 7
11/21/F	R334W	2 yr 1 mo	Per	2 yr 1 mo	LP/SE	6 yr	Poly	4 yr	A/P	20/670	20/330	7, 19
12/33/M	R334W	-	-	2 yr	LP/SE	-	-	13 yr	A/P	20/29	20/20	7
13/31/F	R334W	-	-	2 yr 6 mo	LP/SE	8 yr	Poly	3 yr 6 mo	A/P	20/100	20/200	7
14/10/F†	R334W	1 yr	Per	1 yr	LP/SE	1 yr	Poly	2 yr	A/P	20/40	Null	
15/46/F†	R334W	-	-	44 yr	LP/SE	8 yr	Poly	3 yr	A/P	Blind, 28 yr	Blind, 28 yr	
16/16/M†	R334W	-	-	6 yr	SE	1 yr	Oligo	6 yr	A/P	20/13	20/13	20
17/18/F†	R334W	-	-	12 yr	SE	8 yr	Oligo	12 yr	A/P	20/40	20/25	20
18/8/M	M513T	2 yr 10 mo	Int	2 yr 8 mo	SE	2 yr 9 mo	Poly	2 yr 11 mo	A	20/17	20/17	7
19/15/F	N670K	1 yr 8 mo	Int	5 mo	LP/SE/EN	1 yr 8 mo	Poly	3 yr	A/P	20/200	20/200	7
20/7/M	C495Y	1 yr	Int	1 yr	LP/SE	1 yr	Poly	-	-	20/20	20/20	

* Patient 5 also had left ventricular dysfunction and pulmonary hemorrhage due to bronchial granuloma. Patient 10 also had interstitial pneumonia. Patient 11 also had hepatosplenomegaly and parotid swelling. Patient 18 also had renal calcification. OD = right eye; OS = left eye; yr = years; mo = months; Int = intermittent; LP = multiple lichenoid papules; SE = scaly erythematous plaques; EN = erythema nodosum-like lesion; Poly = polyarticular; A = anterior; P = posterior; Per = persistent; HM = hand motion; Oligo = oligoarticular.
† Familial case.

Table 2. Correlation between visual impairment and the 2 most frequent genotypes

	Visual impairment			Disease duration, median (range) years
	Normal	Moderate	Severe	
Present study				
R334Q	3	0	0	15 (5-19)
R334W	5	2	2	19 (9-43)
Previous study (9)				
R334Q	8	0	0	12 (3-26)
R334W	8	2	1	16 (5-44)

* Except where indicated otherwise, values are the number of patients.

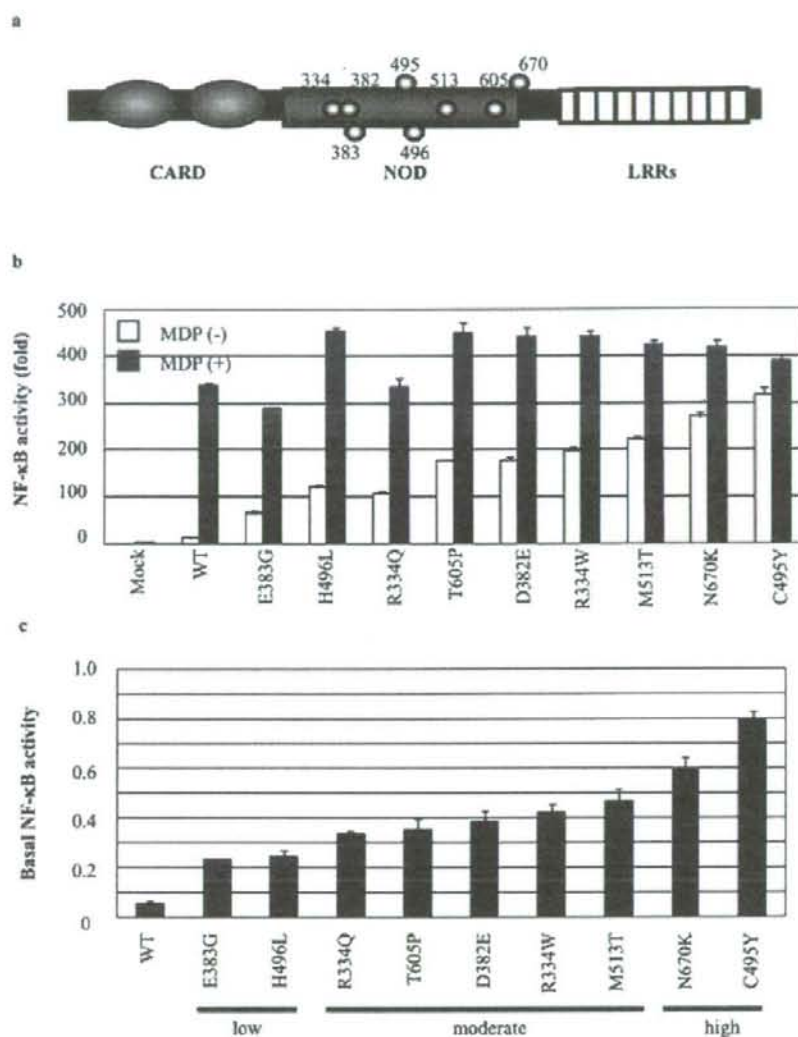


Figure 1. Biologic effects of *NOD2* mutants discovered in patients with Blau syndrome/early-onset sarcoidosis (EOS). **a**, Schematic presentation of *NOD-2* protein. Numbers indicate the positions of mutated amino acid residues identified in our cohort. **b**, Increased basal NF- κ B activity due to different mutated *NOD2* genes in patients with Blau syndrome/EOS. HEK 293T cells were cotransfected with a *NOD2* mutant together with the NF- κ B reporter plasmid and internal control plasmid, and NF- κ B reporter activity was measured after 12 hours of incubation with or without muramyl dipeptide (MDP; 5 μ g/ml). Mock vector and wild-type (WT) *NOD2* were used as controls. Bars show the mean and SD of normalized data (mock without muramyl dipeptide = 1) from triplicate cultures. Results are representative of 3 independent experiments. **c**, Basal NF- κ B activity due to mutated *NOD2* in patients with Blau syndrome/EOS. Bars show the mean and SD results from 3 independent experiments. CARD = caspase activation and recruitment domain; LRRs = leucine-rich repeats.

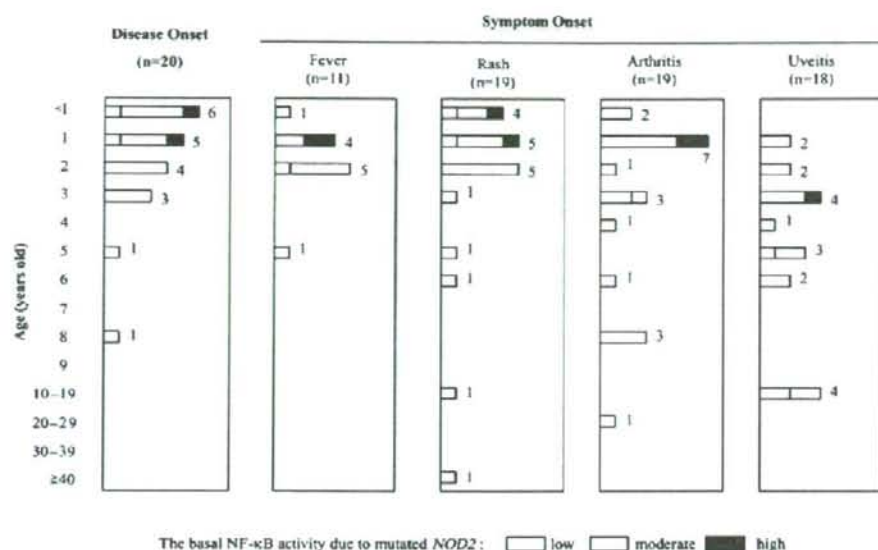


Figure 2. Relationship between age at disease or symptom onset and basal NF- κ B activity due to mutated *NOD2*. Among the 9 patients without fever, 8 had moderate and 1 had low basal NF- κ B activity. One patient without rash had moderate basal NF- κ B activity, and 1 patient without arthritis had moderate basal NF- κ B activity. Of 2 patients without uveitis, 1 had high and the other had moderate basal NF- κ B activity.

隣接遺伝子欠失による難聴合併X連鎖無ガンマグロブリン血症の遺伝子解析

金 兼 弘 和 (富山大学医学部小児科)
趙 美 娜 (富山大学医学部小児科)
二 谷 武 (富山大学医学部小児科)
宮 脇 利 男 (富山大学医学部小児科)
山 田 雅 文 (北海道大学医学部小児科)
有 賀 正 (北海道大学医学部小児科)
大 石 勉 (埼玉県立小児医療センター感染免疫アレルギー科)

研究要旨

X連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) では時に難聴を合併するが、多くは反復性中耳炎によるものである。まれに進行性の難聴とジストニア (Mohr-Tranebjaerg症候群; MTS) を合併することがある。XLAとMTSの原因遺伝子はそれぞれ*BTK*と*TIMM8A*であり、これらが隣接していることから隣接遺伝子欠失によりXLAとMTSを発症しうる。今回難聴と自閉症を合併した10歳のXLA患者の遺伝子解析を行ったところ、*BTK*の3'端と*TIMM8A*のみならず、さらにセントロメア側に存在する*TAF7L*と*DRP2*の欠失を伴い、約150kbの大欠失であった。切断点は5'端が*DRP2*の4.4kb上流、3'端が*BTK*のイントロン5に存在しており、わずか3塩基の相同配列で組み換えを生じていた。従来組み換えはイントロン内のAlu配列などの繰り返し配列を利用して生じることが多いとされていたが、今回はAlu配列部位ではなく、しかも大欠失であったことより、新たなメカニズムによるものと推察される。

A. 研究目的

X連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) は *Bruton's tyrosine kinase (BTK)* 遺伝子の変異に基づくB細胞の初期分化障害によって発症する。XLAでは時々難聴を合併するが、そのほとんどは繰り返す中耳炎による伝音性難聴である。しかし稀に感音性難聴とジストニアを合併することがあり、これらはMohr-Tranebjaerg症候群 (MTS) と称される^{1,2)}。この症候群の責任遺伝子は*BTK*遺伝子のセントロメア側に位置する*DDP1/TIMM8A*遺伝子である³⁾。今回は難聴と自閉症を合併したXLA患児の遺伝子解析を行い、X染色体の隣接遺伝子症候群によることを証明し、さらに切断点を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) 症例

症例は10歳男児で、生後12か月から中耳炎と副鼻腔炎を繰り返していた。生後18か月からは難聴と自閉傾向も指摘されていた。8歳時に低ガンマグロブリン血症 (IgG 12 mg/dl, IgA 0 mg/dl, IgM 5 mg/dl) とB細胞欠損 (CD19 0%, CD20 0%) が見付き、XLAが疑われた。フローサイトメトリー解析により単球におけるBTK蛋白の発現低下が示され、XLAと診断された。遺伝子解析では*BTK*遺伝子のC末の欠失が示された。合併した難聴の原因としてMTSの可能性が示唆された。

2) Fluorescence in situ hybridization解析

BTK-TIMM8A, *TAF7L*, *DRP2*特異的プローブを用いたFluorescence in situ hybridization (FISH)解析を行うため、それぞれの遺伝子をLA-PCRで増幅して、digoxigenin-11-dUTPでラベルした。これらのプローブを抗digoxigenin rhodamineで染色し、FISH解析を行った。

3) Comparative genomic hybridization解析

患者末梢血よりDNAを抽出してComparative genomic hybridization (CGH)アレイを用いて解析を行った。

4) シークエンス

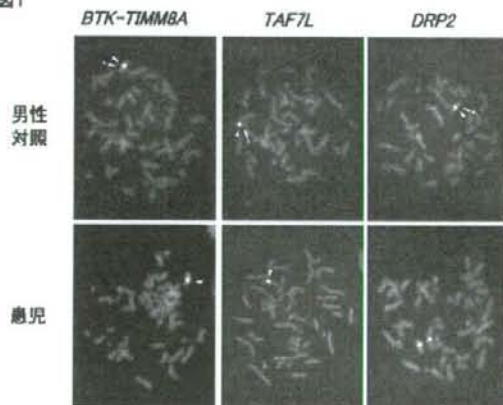
CGHアレイにて欠失を認めた部位の外側にプライマーを設定し、PCRで増幅が認められた産物についてダイレクトシークエンスを行った。

C. 研究結果

1) FISH解析

患児の末梢血由来染色体では*BTK-TIMM8A*のみならず、*TAF7L*, *DRP2*特異的プローブの発色は認められず、これらの遺伝子が欠失しているものと思われた(図1)。

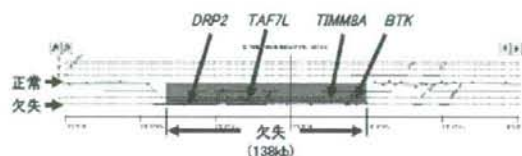
図1



2) CGH解析

CGHアレイ解析の結果、少なくとも*BTK*の一部(3'側)、*TIMM8A*, *TAF7L*, *DRP2*遺伝子を含む少なくとも138kbの欠失が明らかとなった(図2)。

図2



3) 患児の切断点のシークエンス

患児の切断点をシークエンスしたところ、5'側の切断点は*DRP2*遺伝子の4.4kb上流に位置し、3'側の切断点は*BTK*遺伝子のエキソン5と6の間(イントロン5)に位置していた。切断点においては3塩基のホモロジーを認めたが、切断およびその近傍にAlu配列などのトランスポゾン由来の繰り返し配列は認められなかった。

図3



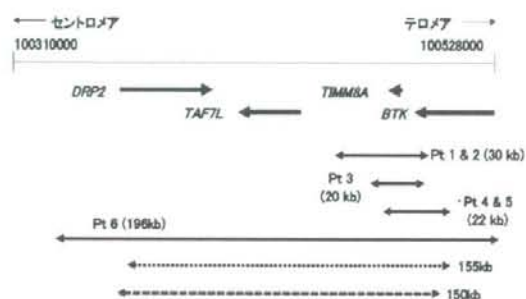
D. 考察

MTS(別名難聴・ジストニア症候群)は稀なX連鎖劣性の難聴症候群であり、ジストニアその他の神経学的異常を伴う^{1,2)}。責任遺伝子はXq22の*BTK*遺伝子のセントロメア側に隣接する*DDP1/TIMM8A*遺伝子である³⁾。*DDP1/TIMM8A*遺伝子は97アミノ酸残基からなる小さなポリペプチドをコードする。*DDP1/TIMM8A*とその酵母におけるホモログであるTim8の機能解析から、新しく合成された前駆蛋白のミトコンドリア内膜への移動に関

与する分子であると考えられているが、詳細は明らかではない⁴⁾。

今回難聴と自閉症を合併したXLA患児がMTSを合併した隣接X染色体欠失症候群であることがFISH解析ならびにCGH解析によって明らかになった。これまで欠失部位が明らかにされた*BTK*、*TIMM8A*、*TAF7L*、*DRP2*遺伝子を含む隣接X染色体欠失症候群は5家系報告されている。Sediváら⁵⁾は*BTK*と*TIMM8A*遺伝子を含む30kb、20kb、22kb欠失の3家系と*BTK*から*DRP2*遺伝子にまたがる196kbの大きな欠失の1家系を報告している(図4)。

図4



またJyonouchiら⁶⁾はMTSを伴ったXLAの双子例においてアレイCGH解析を行い、*BTK*から*DRP2*遺伝子にまたがる155kbの欠失を明らかにしている。自験例も欠失は*BTK*から*DRP2*遺伝子にまたがっていたが、切断部位は異なるようである。

今回の研究によって切断点のシーケンスを行ったところ、*DRP2*遺伝子の4.4kb上流と*BTK*遺伝子のイントロン5の部位で3塩基のホモロジーで組み換えを起こしていた。これまでは大欠失はAlu配列に代表されるイントロン内におけるトランスポゾン由来の繰り返し配列で組み換えを来すことが多いとされていたが、わずか3塩基のホモロジーで組み換えを来した。そのメカニズムを明らかとするためにはさらなる症例の積み重ねが必要と思われる。

E. 結論

難聴を合併したXLAは*BTK*と*TIMM8A*を含む隣接X染色体症候群によって起こることがあり、FISH解析およびアレイCGH解析はこの症候群の診断に有用である。欠失は149.7kbの大きさであり、5'側と3'側の切断点はそれぞれ*DRP2*遺伝子の4.4kb上流と*BTK*遺伝子のイントロン5にあった。その切断点はわずか3塩基のホモロジーしかなく、トランスポゾンに由来するエレメントを介する組み換えとは異なる点が興味深い。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

1) Kanegane H, Yamada M, Zhao M, Futatani T, Ariga T, Sakiyama Y, et al. A Japanese patient with X-linked agammaglobulinemia and deafness caused by contiguous X-chromosome deletion including the *BTK*, *TIMM8A*, *TAF7L* and *DRP2* genes. XIIIth ESID meeting 2008 in 's-Hertogenbosch, The Netherlands.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

参考文献

- 1) Mohr J, Mageroy K. Sex-linked deafness of a possibly new type. Acta Genet Stat Med 10:54-62, 1960.
- 2) Tranebjaerg L, Lou H, Andresen J. New X-linked syndrome with apraxia, ataxia, and mental deficiency: clinical, cytogenetic and neuropsychological studies in two Danish families. Am J Med Genet 43:498-502, 1992.
- 3) Jin H, May M, Tranebjaerg L, Kendall E, Fontan G, Jackson J, et al. A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in

familie with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness. *Nat Genet* 14:177-180, 1996.

- 4) Roesch K, Curran SP, Tranebjaerg L, Koehler CM. Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM13 complex. *Hum Mol Genet* 11:477-486, 2002.
- 5) Šedivá A, Smith CIE, Asplund AC, Hadač J, Janda A, Zeman J, et al. Contiguous X-chromosome deletion syndrome encompassing the *BTK*, *TIMM8A*, *TAF7L*, and *DRP2* genes. *J Clin Immunol* 27:640-646, 2007.
- 6) Jyonouchi H, Geng L, Törüner GA, Vinekar K, Feng D, Fitzgerald-Bocarsly P. Monozygous twins with a microdeletion syndrome involving *BTK*, *DDPI*, and other two genes; evidence of intact dendritic cell development and TLR responses. *Eur J Pediatr* 167:317-321, 2008.

欠失断端を決定したCYBB遺伝子を含む隣接遺伝子症候群の2例

山田 雅 文 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)

川村 信 明 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)

有賀 正 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)

大石 勉 (埼玉県立小児医療センター)

荒井 孝 (埼玉県立小児医療センター)

研究要旨

X連鎖性慢性肉芽腫症(X-CGD)はCYBB遺伝子異常に起因し、食細胞の殺菌能障害を特徴とする原発性免疫不全症である。そのほとんどはCYBB遺伝子内における変異によるが、複数の遺伝子に及ぶ欠失によりMcLeod症候群やOTC欠損症などを合併した例も報告されている。しかしその大部分は欠失断端が決定されておらず、詳細な欠失範囲や欠失機構は不明である。今回CYBB遺伝子を含む隣接遺伝子症候群(CGS)を呈した2例について、array CGH解析結果に基づきPCR法とDNA Walking法により遺伝子欠失断端を決定した。症例1は現在8歳の男児で、生後早期より重症のOTC欠損症症状が出現、乳児期からは感染症を繰り返すようになりCGDと診断されている。PCRにてOTC、CYBB、XK遺伝子がいずれも増幅されないことからCGSの可能性を考え、array CGH解析を行ったところ、これらの遺伝子を含む3.47 Mbの欠失が認められた。PCR法により断端領域を狭めた後に断端の両側からのPCRを行い、その産物のdirect sequenceにより断端を決定した。網膜色素変性症の責任遺伝子RPGRとX-linked mental retardationの責任遺伝子TSPAN7も欠失領域に含まれていた。症例2は現在24歳の男性。生後早期より感染を繰り返し1歳時にCGDと診断された。18歳時に本人と家族の希望で病型・遺伝子診断依頼があり当科で解析したところ、CYBBの全exonがPCRで増幅されず、完全欠損を疑った。Kell抗原も低下していたことからCGSを疑い、array CGHを施行したところ、CYBB、XKを含む約0.8 Mbの欠失がみられた。テロメア側断端領域には染色体6や13とhomologyの高い領域が存在しており、PCR法のみでは断端領域を狭めるのが困難であったため、断端近傍のセントロメア側配列にprimerを設定しDNA Walking法を行った。これにより両側の断端位置とその間への36 bpの挿入を決定しえた。この挿入配列は欠失領域中に存在するantisense配列と一致し、これが逆位で挿入されたと考えられた。このような大きな欠損や複数の遺伝子に及ぶ欠失の原因としてlow-copy repeats(LCR)とよばれる10~400 kbのhomologyの高い配列同士でのhomologous recombination(HR)によって生じたと考えられる例がWilliams症候群やneurofibromatosisなどで報告されている。症例1の断端近傍には特徴ある配列は存在しなかったが、症例2ではテロメア側断端を含む約31 kb配列が、36 bpの挿入部位を含んだ欠失領域のantisense配列と約96~99%のhomologyを有しており、LCRs間でのHRが欠失に関わった可能性がある。同一部位を断端とする例や同一の遺伝子欠失範囲をもった例の報告はみられなかった。正確な断端の決定例の蓄積により、Xp21.1領域の欠失メカニズムを明らかにできる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

CYBB 遺伝子の存在する Xp21.1 領域の隣接遺伝子症候群 (CGS) は近年の分子学的手法の進歩により報告例が増加している (1, 2, 3, 4, 5)。しかし実際に欠失断端の決定された例はわずかであり (3)、詳細な欠失範囲や欠失機構は不明である。今回 CYBB 遺伝子を含む CGS の 2 例について、array comparative genomic hybridization (array CGH) 法を用いて欠失領域を明らかにし、さらに PCR 法や DNA Walking 法により欠失断端を明らかにすることで、欠失領域に含まれている遺伝子の詳細や、欠失を生じたメカニズムについて検討した。

B. 症例と研究方法

(症例)

症例 1：現在 8 歳の男児。出生歴、家族歴：特記すべきことなし。生後 36 時間で痙攣重積から心停止をきたし、低酸素脳症になった。高アンモニア血症 (1054 $\mu\text{g/dl}$)、尿中オロト酸高値、血液アミノ酸分析から、Ornithine transcarbamylase (OTC) 欠損症と診断された。その後に行われた肝生検で OTC 酵素活性は欠如していた。母は、アロプリノール負荷試験の結果から OTC 欠損症保因者の可能性は否定的であった。またこの例は乳児期早期から肛門周囲膿瘍、1 歳からは肺炎や急性中耳炎も繰り返すようになり、3 歳で骨盤内膿瘍をきたした際に当科に精査入院した。顆粒球の活性酸素産生能は患者で完全に欠如しており、gp91phox 発現も認めず、typical な CGD と診断した。母は正常であった。CYBB, OTC 遺伝子は全ての exon が PCR で増幅されず、完全欠損を疑った。末梢血塗沫標本では有棘赤血球が 13.3% と増加し、XK 遺伝子は PCR で全ての exon が増幅されず、完全欠損を疑った。染色体検査では高精度分染法でも明らかな異常を認めなかった。

症例 2：現在 24 歳の男性。第二子が生後 14 日目に緑膿菌による敗血症で死亡しているが、詳細は不明である。生後早期より感染を繰り返

し、1 歳時に CGD と診断。18 歳時に本人と家族の希望があり、当科に病型診断、遺伝子解析の依頼があった。活性酸素産生は患者では欠如、母は 2 峰性で X-CGD の保因者と考えた。症例 2 も PCR で CYBB 遺伝子の exon がいずれも増幅されず、完全欠損を疑った。末梢血塗沫標本では有棘赤血球増多がみられ、Kell 抗原も欠損していた。その後重症感染症を機に造血幹細胞移植が行われ、現在完全キメラ状態を維持している。

(研究方法)

Array CGD 解析：Agilent 社の array CGH を用いた。患者と男のコントロールの DNA を制限酵素で断片化し、患者を Cy-5、コントロールを Cy-3 で標識した。これを混合してアレイ上のオリゴプローブに競合的に hybridization し、解析を行った。

PCR 法による欠失断端の決定法：まず array CGH 解析で明らかになった欠失領域の両端の隣り合う検出・非検出プローブの位置と配列をまず確認し、その検出プローブ領域が PCR でも増幅され、非検出プローブ領域が PCR でも増幅されないことを確認した。次にテロメア側、セントロメア側それぞれについて検出・非検出プローブの間の PCR を行い、断端の存在する領域を狭めた。これを繰り返して十分に断端領域を狭めた後に断端のテロメア側 primer とセントロメア側の primer を用いて PCR を行い、増幅産物の direct sequence によって断端の決定を行った。

DNA Walking 法：症例 2 では BD 社の DNA Walking Kit を用い、セントロメア側の存在する領域にデザインした Primary PCR primer: ACCTCAGGCATGAAACAGAGTCTGAAA, Secondary PCR primer: CAGAGTGACCGTTAGTGTTGACGACTG を用い、protocol にしたがって解析した。

Array CGH解析結果はUCSC2004 assembly によるため、本研究の解析結果の表記は全てこれに従った。

C. 研究結果、考察

両症例においてCGSの可能性を考え、array CGHによる解析を行った。症例1は*XK*, *CYBB*, *OTC*遺伝子を含む約3.5 Mbの範囲で、症例2では*XK*, *CYBB*遺伝子を含む約0.8 Mbの範囲で欠失がみられた(図1)。方法に示したPCR法による欠失断端の決定法に従い、まずarray CGH検出プローブ領域がPCRで増幅され、非検出プローブ領域がPCRで増幅されないことを確認した上で断端の存在する領域を狭め(図2)、断端の両側からのPCRを行いdirect sequenceによって断端を決定した(図3A)。

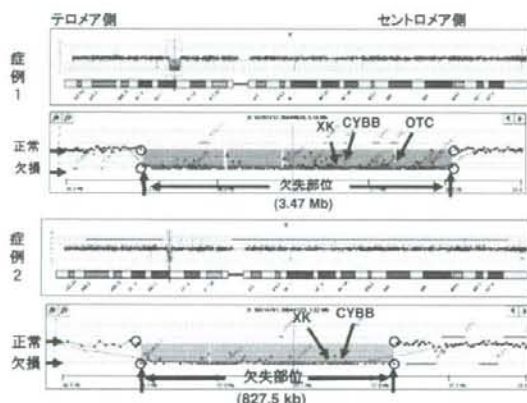


図1 症例1、症例2のarray CGHによる解析結果

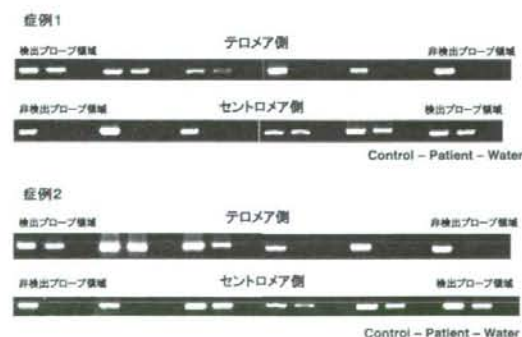


図2 症例1、症例2のPCR法を用いた欠失領域の確認

症例1の欠失断端はテロメア側がchrX: 35,168,892、セントロメア側がchrX: 38,655,273、欠失範囲は3,486,379 bpであった。欠失断端はテロメア側が*FAM47B*と*MAGEB16*、セントロメア側が*MID11P1*と*BCOR*の間のintergenic regionに存在し、網膜色素変性症の責任遺伝子*RPCR*とX-linked mental retardationの責任遺伝子*TSPAN7*も欠失領域に含まれていた(図5)。患者で増幅のみられた断端両側からのPCRで母は増幅がみられず、母が保因者ではないことが確認された(図3B)。

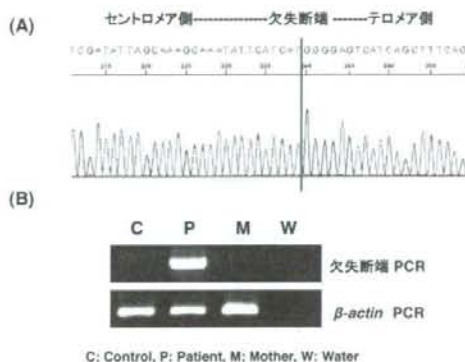


図3 (A) 症例1の欠失断端両側からのPCRによる解析 (B) 患者で得られた増幅産物のdirect sequence解析

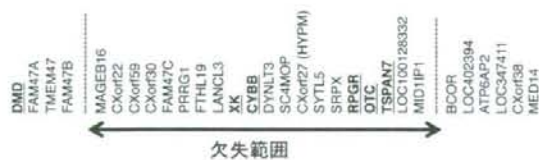
一方症例2ではテロメア側の断端領域が染色体6や13とも高いhomologyをもっていた。実際にテロメア側領域のPCR産物のdirect sequenceでは染色体6や13の配列が混在し、実際にこの領域が存在するか否か判定困難であった。そこで、セントロメア側の存在することが確認された断端近傍配列にprimerを設定し、これに隣接する配列をDNA Walking法で解析した。2回のDNA Walkingにより、セントロメア側配列から挿入配列を介してセントロメア側配列につながっているのが確認された。断端の両側からのPCRで増幅された産物のdirect sequenceにより、テロメア側断端chrX: 36,775,400、セントロメア側断端chrX: 37,610,734と、その間の36 basesの挿入が

確認された (図 4 A)。この挿入配列は断端の間に存在する antisense の配列 (chrX: 37,183,818-37,183,853) と、テロメア側断端の 8120 base 上流の配列 (chrX: 36,767,280 - 36,767,315) と完全に一致した。上流側の配列は元の位置に存在しており、おそらくは断端の間に存在する配列が逆位で挿入されたと考えた。患者で増幅された断端両側からの PCR では母でも増幅がみられ、母が保因者であることが確認された (図 4 B)。



図 4 (A) 症例 2 の欠失断端両側からの PCR による解析 (B) 患者・患者母で得られた増幅産物の direct sequence 解析結果の schema

症例 1



症例 2

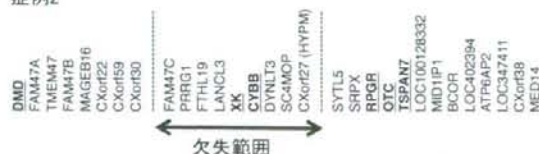


図 5 症例 1、2 の欠失領域の遺伝子群疾患との関連が明らかでない遺伝子を太字下線で示し、pseudogene は省略した。

テロメア側断端は *CXorf30* と *FAM47C* の間、セントロメア側断端は *CXorf27* と *SYTL5* の間の intergenic region にあることが確認された (図 5)。

欠失断端を決定した報告例は限られているが (3)、同一の欠失断端をもった例の報告はなく、また同一の遺伝子群を欠失した例の報告もみられなかった。

DNA レベルでの大きな欠損や複数の遺伝子に及ぶ欠失が、low-copy repeats (LCRs) とよばれる 10~400 kb の非常に類似した配列同士での homologous recombination (HR) によって生じる例が Williams 症候群や neurofibromatosis などで報告されている (6,7)。症例 1 の断端近傍にはほかの部位と homology の高い領域は存在しなかったが、症例 2 ではテロメア側断端を含む約 31 kb 配列が、36 bp の挿入部位を含んだ欠失領域の antisense 配列と約 96% の homology を有していた (図 6)。

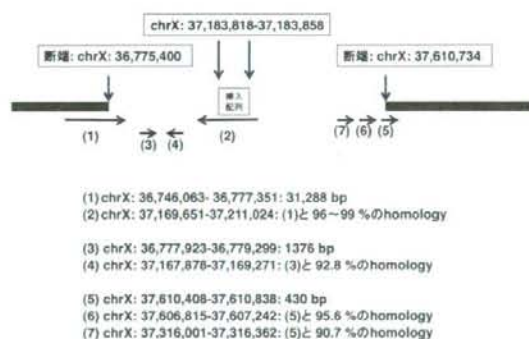


図 6 症例 2 の欠失断端周辺領域の homology 検索結果

正確な欠失機構は不明であるが、LCRs間でのHRが症例2の欠失に関わった可能性がある。テロメア側とセントロメア側配列との間にはhomologyは認めなかった。今後Xp21.1領域のCGS例の断端の決定とその周辺配列の詳細な解析を蓄積することによって、この領域における欠失メカニズムを明らかにできる可能性があると考えられた。

D. 結論

欠失断端を決定したCYBB遺伝子を含む隣接遺伝子症候群の2例を経験した。欠失がMbに及ぶ場合には欠失部位の決定にarray CGH解析が有用であった。homologyの高い領域での断端決定にはDNA Walking法が有用であった。CYBB遺伝子を含む隣接遺伝子症候群の欠失機構にもLCRs間でのHRが関与している可能性がある。

参考文献

- 1) Deardorff MA, Gaddipati H, Kaplan P, Sanchez-Lara PA, Sondheimer N, Spinner NB, Hakonarson H, Ficicioglu C, Ganesh J, Markello T, Loechelt B, Zand DJ, Yudkoff M, Lichter-Konecki U. Complex management of a patient with a contiguous Xp11.4 gene deletion involving ornithine transcarbamylase: A role for detailed molecular analysis in complex presentations of classical diseases. *Mol Genet Metab.* 94:498-502, 2008
- 2) El Nemer W, Colin Y, Collec E, Gane P, Cartron JP, Kim CL. Analysis of deletions in three McLeod patients: exclusion of the XS locus from the Xp21.1-Xp21.2 region. *Eur J Immunogenet.* 27:29-33, 2000
- 3) Peng J, Redman CM, Wu X, Song X, Walker RH, Westhoff CM, Lee S. Insights into extensive deletions around the XK locus associated with McLeod phenotype and characterization of two novel cases. *Gene* 392: 142-150, 2007
- 4) Brown J, Dry KL, Edgar AJ, Pryde FE, Hardwick LJ, Aldred MA, Lester DH, Boyle S, Kaplan J, Dufier JL, Ho MF, Monaco AM, Musarella MA, Wright AF. Analysis of three deletion breakpoints in Xp21.1 and the further localization of RP3. *Genomics.* 37:200-210, 1996
- 5) Jakubiczka S, Bettecken T, Mohnike K, Schneppenheim R, Stumm M, Tönnies H, Volleth M, Wieacker P. Symptoms of OTC deficiency but not DMD in a female carrier of an Xp21.1 deletion including the genes for dystrophin and OTC. *Eur J Pediatr.* 166:743-745, 2007
- 6) Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet.* 18:74-82, 2002
- 7) Raedt TD, Stephens M, Heyns I, Brems H, Thijs D, Messiaen L, Stephens K, Lazaro C, Wimmer K, Kehrer-Sawatzki H, Vidaud D, Kluwe L, Marynen P, Legius E. Conservation of hotspots for recombination in low-copy repeats associated with the NF1 microdeletion. *Nat Genet.* 38:1419-1423, 2006

Omenn症候群様症状を呈した非典型的X連鎖重症複合免疫不全症にみられた遺伝子変異のreversion

和田 泰 三 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

東馬 智 子 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

笠原 善 仁 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

谷内江 昭 宏 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

研究要旨

γ c鎖の異常によるX連鎖重症複合免疫不全症(XSCID)は、T/NK細胞の発生が障害されるため、T⁺B⁺NK⁻ SCIDとなる。今回我々は、自己T/NK細胞が出現しOmenn症候群様の症状を呈した非典型的XSCIDの症例において、第二変異による遺伝子変異のreversionを見出した。症例は5ヶ月男児。患児はIL2RG遺伝子に変異IVS1+5G>Aを有し、スプライス異常により大部分のmRNAは早期翻訳停止となっていた。しかし一部に正常mRNAも作られており、 γ c鎖発現の低下した異常なT細胞とNK細胞が認められた。この異常T細胞の存在を背景に、患児では皮膚浸潤CD8⁺T細胞にreversionが起こり、Omenn症候群様症状を呈していた。Revertantでは元の変異IVS1+5G>Aにより生じるcrypticなスプライス部位の近傍に第二変異IVS1+29G>Aが出現したために、正常なスプライシングが回復していた。以上より、XSCIDの臨床スペクトラムは幅広く、またreversionは病態を修飾する重要な因子となる得ることが示された。

A. 研究目的

重症複合免疫不全症の中で最も頻度の高いX連鎖重症複合免疫不全症(XSCID)は、サイトカインレセプターである γ c鎖の異常に起因し、T細胞とNK細胞の発生が障害されることが特徴である。

近年、特に原発性免疫不全症において遺伝子変異のreversion、すなわち、その疾患の原因となる遺伝子変異が正常の配列に戻るか、あるいは元の変異を代償する第二変異が起こる現象の報告が増えている。Reversionを起こした症例では、細胞の機能が回復し臨床症状の改善や修飾をみる例から症状が不変の例まで幅広い。今回、我々はこれまで1例しか報告のなかったXSCIDにおいて、遺伝子変異のreversionを有する症例を見出し、reversionが病態に与える影響について検討した。

B. 研究方法

1. 症例

症例は血族結婚のない両親から出生した5ヶ月男児。生後2ヶ月より微熱・咳嗽を繰返し、難治性下痢による低蛋白血症のため入院となった。全身のアトピー性皮膚炎様皮疹、リンパ節腫脹、肝脾腫、白血球増多、IgG低値、IgE高値を認め、Omenn症候群が疑われ当科に紹介となった。

2. 方法

白血球亜群における γ c鎖発現は、PE標識抗CD132抗体(TUGh4)ならびにFITC標識した各白血球亜群特異的抗体を用いてフローサイトメトリー(FACS)により評価した。リンパ球亜群の単離はmagnet beads法により施行した。DNAとcDNAを各白血球亜群や皮膚片より作製し、IL2RG遺伝子変異を検索した。塩基

配列は、ABI3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により自動解析した。cDNAに関しては、蛍光標識したプライマーを用いたGeneScan法も追加した。遺伝子多型の解析は、一方を蛍光標識したD9S1198ならびにheme oxygenase-1プロモーター特異的プライマーを用いて施行した。末梢血T細胞のTCRV β レパトア解析はRPE-Cy5標識抗CD4、FITC標識抗CD8ならびにPE標識抗TCRV β 抗体を用いて3カラーフローサイトメトリーを施行、各T細胞亜群中のV β レパトア分布を定量した。TCRV β CDR3サイズ分布の解析(CDR3スペクトラタイピング)は、CD4 $^+$ TとCD8 $^+$ T細胞より作成したcDNAを鋳型として使用した。患児由来の不死化B細胞株とT細胞株は、それぞれEBウイルス、ヘルペスウイルスサイミリを用いて作製した。

C. 研究結果

患児の末梢血リンパ球亜群を解析したところ、CD4 $^+$ T細胞、CD8 $^+$ T細胞は共に強いHLA-DR発現を示し、そのほとんどはCD45RO $^+$ メモリー形質を示した。B細胞とNK細胞はともに少ないが検出された。CDR3スペクトラタイピングでは、CD4 $^+$ T細胞の多くはガウス分布を示したが、CD8 $^+$ T細胞ではskewingを示すものが多かった。しかしFACSによるTCRV β レパトア分布は、CD4 $^+$ T細胞、CD8 $^+$ T細胞ともほぼ正常で多様性を保っていた。遺伝子多型によるキメラ解析では、患児検体ではいずれも母親に固有のピークは検出されなかった。末梢血リンパ球ならびにリンパ球亜群の γ c鎖(CD132)発現はいずれも正常対照に比べ低下していた。

患児DNAを解析したところ、IL2RG遺伝子にIVS1+5G>Aの変異を認めた(図1A)。母親はキャリアであった。患児mRNAは、スプライス異常により28bpが挿入されていた。ただしexon1以降に正常の配列も一部検出されており、leakyに正常mRNAも作られていた(図1B-D)。患児末梢血よりB細胞株とT細胞株を

樹立したところ、B細胞株では γ c鎖は低下していたが、T細胞株の一部に γ c鎖発現の正常な細胞が認められた(図1E)。 γ c鎖発現の低下したクローン(#3-4)と正常なクローン(#3-1)を作製したところ、後者では新たなドナーサイトに出現した第二変異により正常のスプライシングのみが生じ、 γ c鎖発現が回復していた(図1E-G)。

末梢血リンパ球亜群や皮膚から抽出したDNAを解析したところ、皮膚において第二変異が一部検出された(図1H)。末梢血リンパ球亜群や皮膚から抽出したmRNAを用い、GeneScan法により正常mRNAと変異mRNAの発現量を比較したところ、皮膚では正常mRNAがより多く発現しており、第二変異を有するリンパ球が皮膚に多く浸潤していると考えられた(図1I)。皮膚から作成した細胞浮遊液を用いて表面抗原発現とTCRV β レパトアを解析したところ、浸潤細胞はCD3 $^+$ T細胞とNK細胞が主体で、T細胞のうちCD8 $^+$ T細胞が9割を占め、その多くがTCRV β 2 $^+$ 細胞であった(図1J)。実際、免疫染色では真皮や表皮にCD8 $^+$ T細胞が多数浸潤していた(図1K)。

D. 考察

本例では臨床症状からOmenn症候群が疑われたが、TCRV β レパトアは多様性を比較的保ち、またRAG遺伝子に異常を認めなかった。マイクロサテライト解析により母体血混入の可能性は否定された。FACSにより γ c鎖を解析したところ発現は低下し、IL2RG遺伝子解析にてイントロン1に変異IVS1+5G>Aを認め、非典型的なXSCIDと診断した。患児では、スプライス異常により早期翻訳停止となるが、一部に正常mRNAも作られていることからT細胞、NK細胞の発生が障害されなかったと考えられた。また、患児末梢血から樹立したT細胞株より γ c鎖発現の正常なクローンが得られ、同クローンでは、第二変異により正常のスプライシングのみが生じていた。末梢血リンパ球亜群や皮膚浸潤リンパ球を解析したところ、主に皮膚

浸潤リンパ球に第二変異が検出された。おそらく感染や自己抗原などの局所の要因により revertant クローンが皮膚にて増殖したため、皮膚のみに reversion を有する T 細胞が検出され、末梢血中には検出されなかったと考えられた。皮膚では、CD8⁺ T 細胞がクローン性に増殖しており、本クローンが第二変異を有し皮疹と関連している可能性が示唆された。このように reversion による体細胞モザイクは、原発性免疫不全症患者の臨床症状に複雑な変化をもたらし得ることが示された。

E. 結論

XSCID の臨床スペクトラムは幅広く、また遺伝子変異の reversion は病態を修飾する重要な因子となる得ることが示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 学会発表

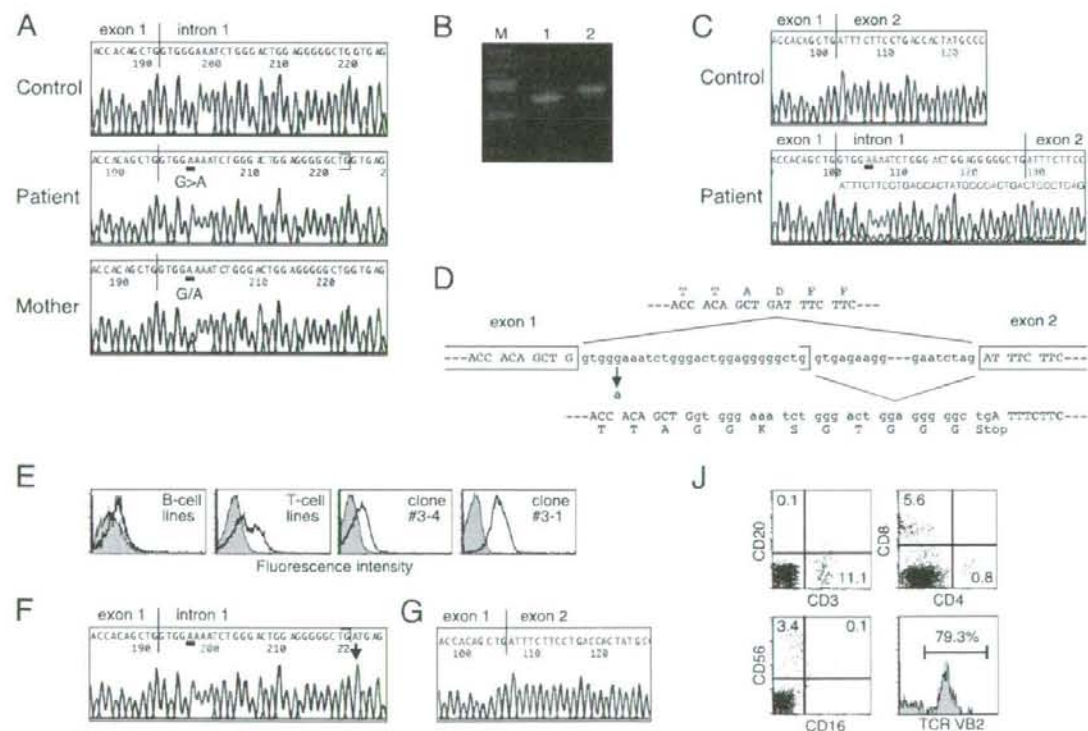
Detection of revertant T lymphocytes in skin lesions of atypical X-linked severe combined immunodeficiency mimicking Omenn syndrome. ESID 2008. ('s-Hertogenbosch, The Netherlands, Oct. 16-19, 2008)

2. 論文発表

Wada T, Yasui M, Toma T, et al. Detection of T lymphocytes with a second-site mutation in skin lesions of atypical X-linked severe combined immunodeficiency mimicking Omenn syndrome. Blood. 2008; 112: 1872-1875.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。



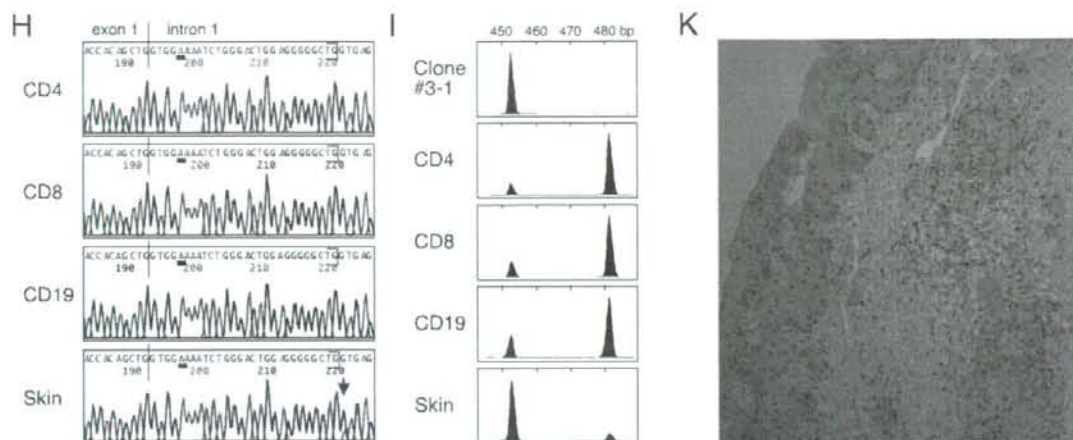


図 1. IL2RG 遺伝子の解析

(A) IL2RG 遺伝子の解析 (DNA)。下線は変異部位を示す。(B) IL2RG RT-PCR。レーン 1, 2 はそれぞれコントロールと患児を示す。(C) IL2RG cDNA の解析。(D) スプライス異常の模式図。(E) B および T 細胞株の γc 鎖発現。(F) clone#3-1 の IL2RG 遺伝子解析。矢印は第二変異を示す。(G) clone#3-1 の IL2RG cDNA の解析。(H) 各細胞亜群における IL2RG 遺伝子の解析 (DNA)。(I) IL2RG cDNA の GeneScan 法による解析。(J) 皮膚浸潤リンパ球の表面抗原発現の解析。(K) 皮膚生検の抗 CD8 抗体を用いた免疫染色。