

図 1. Treg による自己反応性 T 細胞の抑制モデル

健常人では、FOXP3 を有する CD4⁺CD25⁺T 細胞によって自己反応性 T 細胞の機能が抑制され、自己免疫反応が抑制されているが、IPEX 症候群患者では、FOXP3 遺伝子変異により Treg の欠損または機能低下があり、自己反応性 T 細胞を抑制することができず、重症腸炎、糖尿病、甲状腺炎、湿疹などの自己免疫が生じる。

患で、通常、新生児期もしくは乳児期早期に発症し、適切な治療がおこなわなければ、重篤な腸疾患または致死的な感染症のため乳幼児期に死亡することが多い。治療としては、免疫抑制療法が第 1 選択としておこなわれるが、現時点では造血幹細胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation: HSCT) が唯一の根本的治療である^{6)~9)}。IPEX 症候群の責任遺伝子として、染色体 Xp11.23 に位置する FOXP3 遺伝子が同定された¹⁰⁾。FOXP3 遺伝子は、ヒトでは 11 個のエクソンから成り立ち、431 個のアミノ酸をコードする。FOXP3 は forkhead ファミリーに属する転写因子であり、forkhead (FKH) DNA-binding domain, leucine zipper, zinc finger-binding domain を含んでいる。現在まで約 20 の異なる FOXP3 遺伝子変異が、同定されているが、多くは FKH DNA-binding domain に位置する¹⁰⁾。

Scurfy マウスは IPEX 症候群のマウスモデルであり、魚鱗様皮膚病変、発育不良、貧血、血小板減少、リンパ節腫脹、肝脾腫、易感染性、下痢

など他臓器にわたる自己免疫性・炎症性疾患を発症して、生後 3~4 週で死亡する。この scurfy マウスにおいても、Foxp3 遺伝子変異が同定されている¹¹⁾。

このように、Treg は末梢免疫寛容 (免疫調節) の維持のために重要な役割をもつことがわかっており²⁾³⁾、さまざまな免疫関連疾患に深くかかわっている。数的あるいは機能的異常が自己免疫疾患やアレルギー疾患に関与していると報告があり、数的あるいは機能的な亢進が感染症や担癌患者において報告されている。

本稿では、IPEX 症候群を概説することによって、Treg の機能を理解することの助けになれば幸いである。

1. IPEX 症候群の臨床像

1982 年に Powell ら¹²⁾は、今日の IPEX 症候群にあたる新たな疾患 “an X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy” をはじめて報告した。おもな臨床症

状として、発育不全、難治性重症下痢、IDDM や甲状腺機能低下症、皮疹を認め、その他の症状として、自己免疫性溶血性貧血、血小板減少、リンパ節腫脹、肝脾腫、易感染性などが認められる。大半の患者は、3歳前に低栄養や感染症、その他の合併症によって死亡する⁴⁾⁵⁾。その後、この疾患の報告は散見されるが、きわめてまれな疾患であると考えられている。まとまった症例数を検討した報告は少ないが、Gambineriら¹³⁾がIPEX患者14例の報告をおこなっており、われわれも、わが国におけるIPEX患者6例(5家系)についてまとめた(表1)。

発症年齢は乳児期早期であることが多いが、年長児以降での発症も報告されている¹²⁾。多彩な症状を呈するため早期診断は非常に困難であると思

われるが、Gambineriら¹³⁾は湿疹の有無にかかわらず、IgE上昇を伴った自己免疫性腸炎(難治性下痢)とIDDMの症状を認めた乳児例では、積極的にIPEX症候群を疑うべきであると述べている。

発育不全は、おもに腸疾患に伴う長期的な吸収障害にもとづくものであるが、IDDMなどの内分泌異常や長期にわたるサイトカインの過剰も影響している可能性がある。過去の報告でも、IPEX症候群患者において最も頻度の高い症状は、乳児期早期に発症する難治性下痢である。これは絨毛萎縮と広範囲にわたる小腸粘膜へのリンパ球浸潤を伴い、結果として水様性下痢や粘血便を呈し、時にイレウスが合併することもある。ミルク変更や食事摂取を中止して、中心静脈栄養にしても下痢は持続することが多い。小腸粘膜生検では、絨

表 1. わが国の IPEX 患者における臨床的特徴と免疫学的特徴

患者 no.	1	2	3	4	5	6
発症年齢	日齢 5	2ヵ月	日齢 19	2ヵ月	4ヵ月	6ヵ月
現在年齢	19 歳	10 歳	18 歳	7 歳	5 歳	26 歳
身長	74.7 cm (-16.5 SD)	116.5 cm (-3.7 SD)	157.1 cm (-2.4 SD)	109 cm (-2.6 SD)	100 cm (-2.2 SD)	157.2 cm (-2.3 SD)
体重	9.15 kg	26.2 kg	44.6 kg	21 kg	14.7 kg	48.95 kg
家族歴	あり	あり	あり	なし	あり	あり
遺伝子変異	227delT (L76fsx53)	Ala384Thr (1150G>A)	Ala384Thr (1150G>A)	Phe373Val (1117T>G)	748delAAG (ΔK250)	IVS1+1A>T
初発症状	自己免疫性 甲状腺炎	アトピー性皮膚炎 哺乳不良	好酸球性胃腸炎	自己免疫性腸炎	糖尿病	糖尿病
その他の 症状	溶血性貧血 腸炎 尿細管障害 骨粗鬆症	気管支喘息 副腎不全 アトピー	アトピー 全身脱毛	なし	ミルクアレルギー アトピー ネフローゼ	ネフローゼ 腸炎
治療	タクロリムス ステロイド	ステロイド ステロイド吸入	ステロイド外用 抗アレルギー剤	免疫グロブリン シクロスポリン A 同種移植	シクロスポリン A ステロイド 同種移植	シクロスポリン A ステロイド

患者 2, 3 は同胞例。患者 4, 5 は同種骨髄移植後。SD : standard deviation (標準偏差)

毛の萎縮、粘膜びらん、粘膜下層・粘膜固有層へのリンパ球浸潤が認められる。血清中に抗 enterocyte 抗体が証明されている症例が多く、その抗原の1つとして、自己免疫性腸症関連 75 kDa 抗原 (autoimmune enteropathy-related 75 kDa antigen: AIE-75) が同定されている¹⁴⁾。その後、抗 AIE-75 抗体は、下痢を呈した IPEX 12 例全例で陽性であったことが確認されている¹⁵⁾。

多腺性内分泌障害として、IDDM や甲状腺機能低下症が高頻度で認められる。とくに新生児期や乳児期に発症する IDDM は、IPEX 症候群の早期診断には重要な症状であり、インスリンによる血糖コントロールも困難であることが多い。膵臓や甲状腺組織にリンパ球の浸潤が認められ、抗膵島細胞抗体、抗甲状腺ミクロソーム抗体などが検出され、自己免疫の機序によって生じ、臓器の形成不全によるものではない。IPEX 症候群では、副甲状腺や副腎機能異常はまれで、副腎機能低下症が過去に 1 例報告されているのみである。

IPEX 症候群で上記 2 つにつづいて多い症状は、皮疹である。落屑性皮疹、アトピー性皮膚炎などを呈するが、最も一般的であるのは、全身性湿疹である。重篤な湿疹患者では、全身脱毛を伴った症例もある。皮膚炎の病理学的な特徴は、リンパ球浸潤である。

IPEX 症候群のその他の症状として、クームス陽性の溶血性貧血、自己免疫性血小板減少や好中球減少を認め、血清中で特異抗体がしばしば検出される。腎疾患は患者の約 1/3 程度に認められ、大半が間質性腎炎であるが、軽微な蛋白尿や血尿を呈する症例や急速進行性糸球体腎炎を合併する症例も存在する。自己免疫性肝炎は約 20% の患者に認められる。その他肝脾腫、リンパ節腫脹や重症感染症を合併する。とくに敗血症、髄膜炎、肺炎、化膿性関節炎などが報告されており、治療に使用される免疫抑制薬が原因と考えられる症例もあるが、免疫抑制薬未使用例にも易感染性がみられる。免疫異常が存在する可能性はあるが、自

己免疫性好中球減少症に伴うものや、皮疹や腸炎に関連して病原体が侵入しやすいこと、低栄養状態なども易感染性に関与していると考えられる。病原菌として、*Enterococcus*, *Staphylococcus*, cytomegalovirus, candida が多い⁴⁾。

2. IPEX 症候群の検査所見

IPEX 症候群患者の血液検査では、血清 IgE, IgA の上昇、好酸球増多を認めるが、末梢血リンパ球の CD4/CD8 比は正常で、phytohemagglutinin や pokeweed mitogen, concanavalin A に対するリンパ球幼若化反応も正常である。また *FOXP3* 遺伝子変異を有する大半の患者では、フローサイトメトリーにて *FOXP3* を発現している CD4⁺CD25⁺ T 細胞 (Treg) は著しく減少しており、診断に有用である (図 2)¹⁶⁾。

3. IPEX 症候群の病態

FOXP3 遺伝子は、Treg の発生・分化や機能をつかさどるマスター遺伝子と考えられている。Treg が自己反応性 T 細胞の活性化、増殖を抑制することで、能動的自己寛容を維持している。この Treg は胸線で分化し、*FOXP3* 遺伝子を発現していることが特徴である。*FOXP3* 遺伝子は、他の CD4⁺T 細胞や CD8⁺T 細胞にはほとんど発現していない。IPEX 症候群は、*FOXP3* 遺伝子異常のため Treg の機能が獲得できず、能動的自己寛容に破綻をきたし、臓器特異的自己免疫疾患、アレルギー疾患、炎症性疾患など、さまざまな免疫異常による症状を呈する。保因者では X 染色体の不活化はランダムであり、*FOXP3* 遺伝子異常がある T 細胞は、*FOXP3* 遺伝子が正常に機能している Treg によって制御されていると考えられる。また近年では、*FOXP3* 遺伝子変異を認めない IPEX-like syndrome が報告されており、プロモーター領域やエンハンサー領域など翻訳領域以外の変異や *FOXP3* 関連遺伝子による変異の可能性が示唆されている¹⁷⁾。

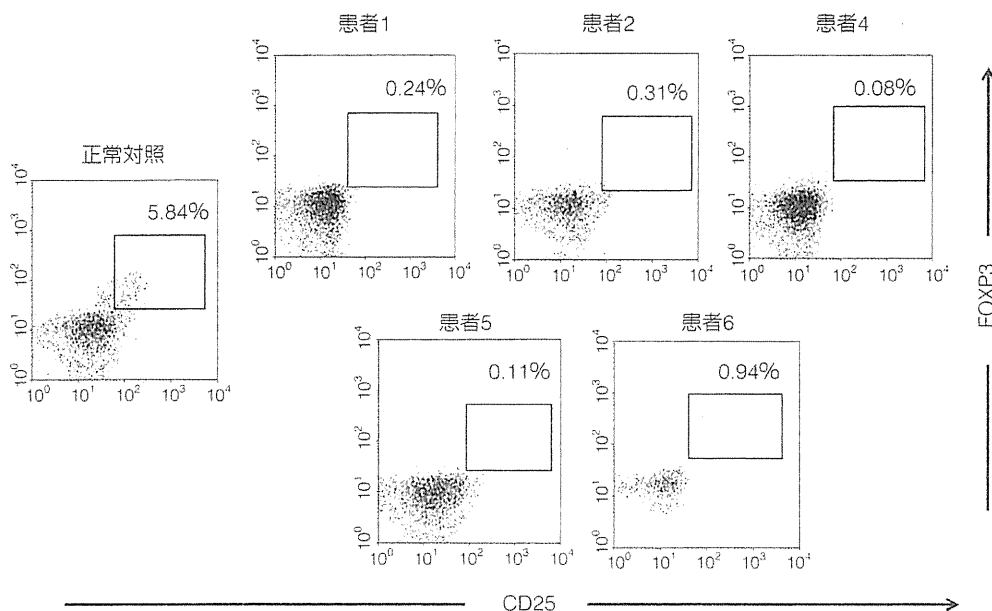


図 2. わが国の IPEX 症候群患者における FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞
末梢血単核球を固定し、細胞膜透過性を高めた後に、抗 FOXP3、CD4、CD25 抗体による 3 重染色をおこない、CD4⁺T 細胞における FOXP3 と CD25 の発現を評価した。FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞は、健康人では約 5% 認められるが、IPEX 症候群患者ではほとんど認められない。

4. IPEX 症候群の genotype

IPEX 症候群の詳細な分子機能はいまだ不明である。現在までに約 20 の遺伝子変異が報告されており、ミスセンス、ナンセンス、挿入、欠失、スプライス異常などが報告され、FKH DNA-binding domain に変異が集中しているが、その他の部位にも変異は散在している^{51,53}。現在のところ、遺伝子変異部位による表現型の違いは明らかではなく、またまったく同じ部位の変異であっても、臨床症状や重症度が異なる症例が報告されており、FOXP3 mRNA の発現量の違いやそれ以外の因子が関与している可能性がある。

5. IPEX 症候群の治療

早期診断が、最終的な予後を決定する重要な因子である。症状に応じて、輸血やインスリン投与、経静脈栄養などをおこなうが、IPEX 症候群患者では、種々の抗原に対してアレルギー反応を呈す

るので注意が必要である。予防接種や分枝鎖アミノ酸補液などによるアレルギー反応に関連した死亡例の報告もある。免疫抑制薬は一定の患者には有効であるが、一般的には効果は限定的であり、長期間の寛解状態を得ることは困難で、重症感染症を引き起こす可能性がある。シクロスポリン A やタクロリムスがステロイドと併用で使用されることが多いが、その他にはメトトレキサート、インフリキシマブ、リツキシマブも使用されている。近年海外では、sirolimus が腎機能障害も少ないため使用されているが、わが国では入手困難である。Sirolimus はエフェクター T 細胞の増加を抑制し、Treg を増加させるという報告もあり、効果に期待がもたれる^{18,19}。しかし IPEX 症候群患者において、唯一有効な治療法は HSCT である。近年では、HSCT が施行され完全寛解に至っている症例報告も認められ、また治療強度を弱めた前処置 (reduced-intensity conditioning : RIC) で施行された成功例も散見される^{20,21}。しかし、移植

方法は未確立で、治療成績の詳細も明らかではない。また、IPEX 症候群の移植では生着不全が起こりやすい。この生着不全は、宿主の Treg が機能しないためドナー抗原に対する反応性 T 細胞が除去されないことから、拒絶を受けやすいのかもしれない。IPEX 症候群患者に HSCT が施行されるようになり、移植後の FOXP3⁺Treg 再構築の報告も散見されるようになった²⁰⁾²¹⁾。過去の報告によると、FOXP3⁺Treg の数が正常化する時期は 1~18 ヶ月と幅があり、一定していない。FOXP3⁺Treg の回復は、過去の治療、移植細胞数、前処置、移植片対宿主病 (graft versus host disease : GVHD) 予防薬など、さまざまな因子が影響している可能性がある。移植後、長期間経過観察されている症例や、FOXP3 発現維持についての報告はなく、今後も RIC をはじめとする移植方法について、更なる症例の積み重ねが必要と考えられる。

おわりに

FOXP3⁺Treg は、免疫恒常性の維持にとって本質的な機能を担っており、この Treg のマスター遺伝子である *FOXP3* 遺伝子の発見により、その発生・分化と抑制機能の分子機構に対する理解が急速に進んでいる。そしてこの Treg の解析はまた、IPEX 症候群患者の病態の解明に寄与した。一方で、*FOXP3* 遺伝子異常の見つからない IPEX 症候群様の疾患も存在しており、これらの原因解明や IPEX 症候群に対する HSCT や遺伝子治療などの治療法の確立のためにも、更なる症例の蓄積、検討が望まれる。

文 献

- 1) Sakaguchi S *et al* : Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155** : 1151-1164, 1995
- 2) Hori S *et al* : Control of regulatory T cell development by the transcription factor *Foxp3*. *Science* **299** : 1057-1061, 2003
- 3) Fontenot JD *et al* : Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4** : 330-336, 2003
- 4) Bennett CL *et al* : IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena. *Curr Opin Pediatr* **13** : 533-538, 2001
- 5) Torgerson TR *et al* : Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked : forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* **120** : 744-750, 2007
- 6) Baud O *et al* : Treatment of the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) by allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* **344** : 1758-1762, 2001
- 7) Mazzolari E *et al* : A new case of IPEX receiving bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **35** : 1033-1034, 2005
- 8) Rao A *et al* : Successful bone marrow transplantation for IPEX syndrome after reduced-intensity conditioning. *Blood* **109** : 383-385, 2007
- 9) Lucas KG *et al* : Submyeloablative cord blood transplantation corrects clinical defects seen in IPEX syndrome. *Bone Marrow Transplant* **39** : 55-56, 2007
- 10) Bennett CL *et al* : The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of *FOXP3*. *Nat Genet* **27** : 20-21, 2001
- 11) Wildin RS *et al* : X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* **27** : 18-20, 2001
- 12) Powell BR *et al* : An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr* **100** : 731-737, 1982
- 13) Gambineri E *et al* : Clinical and molecular profile of a new series of patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome : inconsistent correlation

- between forkhead box protein 3 expression and disease severity. *J Allergy Clin Immunol* **122** : 1105-1112, 2008
- 14) Kobayashi I *et al* : A 75-kD autoantigen recognized by sera from patients with X-linked autoimmune enteropathy associated with nephropathy. *Clin Exp Immunol* **111** : 527-531, 1998
 - 15) Patey-Mariaud de Serre N *et al* : Digestive histological presentation of IPEX syndrome. *Mod Pathol* **22** : 95-102, 2009
 - 16) Owen CJ *et al* : Mutational analysis of the *FOXP3* gene and evidence for genetic heterogeneity in the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **88** : 6034-6039, 2003
 - 17) Fuchizawa T *et al* : Developmental changes of FOXP3-expressing CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and their impairment in patients with *FOXP3* gene mutations. *Clin Immunol* **125** : 237-246, 2007
 - 18) Battaglia M *et al* : Rapamycin promotes expansion of functional CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol* **177** : 8338-8347, 2006
 - 19) Coenen JJ *et al* : Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells. *Bone Marrow Transplant* **39** : 537-545, 2005
 - 20) Dorsey MJ *et al* : FOXP3 expression following bone marrow transplantation for IPEX syndrome after reduced-intensity conditioning. *Immunol Res* **44** : 179-184, 2009
 - 21) Zhan H *et al* : Immune reconstitution and recovery of FOXP3 (forkhead box P3)-expressing T cells after transplantation for IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) syndrome. *Pediatrics* **121** : e998-e1002, 2008

X連鎖リンパ増殖症候群

—SAP欠損症とXIAP欠損症
X-linked lymphoproliferative syndrome



金兼弘和

Hirokazu KANEGANE

富山大学附属病院小児科

◎X連鎖リンパ増殖症候群(XLP)は、Epstein-Barr ウイルス(EBV)に対する特異的免疫応答の欠陥を有する先天性免疫不全症であり、致死性的伝染性単核症、異常γグロブリン血症、悪性リンパ腫を臨床的三徴とする。ほとんどの症例(XLP タイプ1)はSLAM-associated protein(SAP)をコードする *SH2D1A* 遺伝子変異によって生じるが、XLP タイプ2と称される患者でX-linked inhibitor of apoptosis(XIAP)をコードする *XIAP* 遺伝子変異が明らかとなった。XLP患者ならびに *Sap* ノックアウトマウスの観察から、SAPの欠損によりナチュラルキラーおよびCD8⁺T細胞による細胞障害活性、T細胞からのサイトカイン産生、活性化によって誘発される細胞死、胚中心の形成、ナチュラルキラーT細胞の産生が障害されることが明らかとなったが、XIAPの欠損による分子病態はまだ明らかではない。SAP欠損症とXIAP欠損症の臨床像ならびに分子病態を明らかにすることによって、EBV特異的のみならず普遍的な免疫応答の異常が明らかになると思われる。

Key word : X連鎖リンパ増殖症候群(XLP), Epstein-Barrウイルス(EBV), 免疫不全症,
SLAM-associated protein(SAP), X-linked inhibitor of apoptosis protein(XIAP)

X連鎖リンパ増殖症候群(X-linked lymphoproliferative syndrome : XLP)は比較的まれな先天性免疫不全症であり、致死性的伝染性単核症(fatal infectious mononucleosis : FIM), 異常γグロブリン血症、悪性リンパ腫を臨床的三徴とする^{1,2)}。1970年代にはじめてこの症候群が認識され³⁾、1998年にその原因遺伝子 *SH2D1A* が報告され⁴⁻⁶⁾、2006年に第2の原因遺伝子として *XIAP* が報告された⁷⁾。それぞれの遺伝子はSLAM-associated protein(SAP)ならびにX-linked inhibitor of apoptosis(XIAP)をコードし、XLPはタイプ1(SAP欠損症)とタイプ2(XIAP欠損症)に分けられる。

本稿ではそれぞれの臨床的・分子病態学的特徴の違いについて述べることによって、XLPに対する理解を深めてもらいたい。

臨床的特徴

乳児期にEpstein-Barrウイルス(Epstein-Barr virus : EBV)感染を契機に発症することが多いが、興味深いことにほとんどの患者ではEBV感染前はまったく健康である^{1,2)}。しかし、EBV感染後にはしばしばTまたはB細胞増殖症をきたし、いわゆる血球貪食性リンパ組織球症(hemophagocytic lymphohistiocytosis : HLH)を発症する。異常γグロブリン血症や悪性リンパ腫もよく認められるが、これらはEBV陰性の患者でも認められる(表1)。その他、再生不良性貧血、リンパ性血管炎、肺リンパ様肉芽腫症や腸炎、乾癬などの自己免疫疾患を呈することもある。以前は非常に予後不良な疾患であったが、疾患の認識と診断技術の向上で予後は改善してきている。唯一の根治療法は造血幹細胞移植である。

表 1 SAP欠損症とXIAP欠損症の特徴²⁾

特徴	SAP 欠損症	XIAP 欠損症
臨床像		
HLH	あり	あり
低γ-グロブリン血症	あり	あり
悪性リンパ腫	あり	なし
再生不良性貧血	あり	なし
血管炎	あり	なし
遺伝子		
原因遺伝子	<i>SH2D1A</i>	<i>XIAP</i>
局在	Xq25	Xq25
コードする蛋白	SAP	XIAP
免疫機能		
NK 細胞障害活性	低下	正常
NKT 細胞数	欠損	低下～さまざま
再活性化による細胞死	低下	亢進
メモリー B 細胞数	低下	報告なし
治療		
HLH	免疫抑制療法 化学療法 rituximab を考慮	免疫抑制療法 化学療法 rituximab を考慮
液性免疫不全	IgG 補充	IgG 補充
悪性リンパ腫	標準的化学療法	
根治療法	造血幹細胞移植	造血幹細胞移植

HLH : hemophagocytic lymphohistiocytosis (血球貪食性リンパ組織球症)。

原因遺伝子

XLP の原因遺伝子は 1998 年に 3 つのグループから独立して報告され⁴⁻⁶⁾, *SH2D1A* と同定され, これまで 70 以上のさまざまなタイプの遺伝子変異が報告されている. ほとんどの変異で SAP 蛋白の発現低下または欠損を示すが, 遺伝子変異の種類と疾患の重症度には相関関係はない.

SAP 蛋白は 128 個のアミノ酸からなり, 1 個の SH2 ドメインを有する (図 1). SAP は T 細胞, ナチュラルキラー (natural killer : NK) 細胞, NKT 細胞に発現するが, B 細胞にはほとんど発現していない. SAP は SLAM に限らず, SLAM ファミリーに属するレセプターにおけるシグナル伝達にかかわっている.

2006 年に *SH2D1A* 変異を認めない XLP を呈する 3 家系 12 例の患者で *XIAP* 変異が同定された⁷⁾. 興味深いことに *XIAP* は *SH2D1A* のきわめて近傍に局在する. *XIAP* 変異は *SH2D1A* 変異と同様に機能喪失をきたし, *XIAP* 蛋白の発現は低下または欠損する. *XIAP* がコードする XIAP は inhibitor of apoptosis (IAP) ファミリーに属する. XIAP は 3 つの baculovirus IAP repeat (BIR) ドメ

インからなり, カスパーゼとの相互作用にかかわる. 一方, C 末端に存在する Ring ドメインは E3 ユビキチンリガーゼ活性を有する. XIAP はすべての血液担当細胞に存在する. SAP も XIAP もその欠損により EBV 関連 HLH を発症するが, XIAP 欠損症における臨床的特徴は SAP 欠損症とは完全にオーバーラップしていない^{8,9)}.

SAPシグナルとXLPの病態

SAP は最初 SLAM レセプターの細胞内ドメインに結合する蛋白として同定され, このレセプターの細胞内シグナルを制御するものと考えられた⁶⁾. その後, 構造的に SLAM と相同性を有する SLAM ファミリーレセプターのシグナルにもかかわることが明らかとなってきた¹⁰⁾. SLAM ファミリーレセプターには 2B4 (CD244 ; SLAMF4), NTB-A (SLAMF6), CRACC (CD319 ; SLAMF7), CD84 (SLAMF5), Ly9 (CD229 ; SLAMF3) が存在する. これらのレセプターは, 基本的には細胞外の 2 個の免疫グロブリン様ドメイン, 膜貫通部, すくなくとも 2 個のチロシン残基を含む細胞内テールから構成されている. チロシン残基が SAP と相互

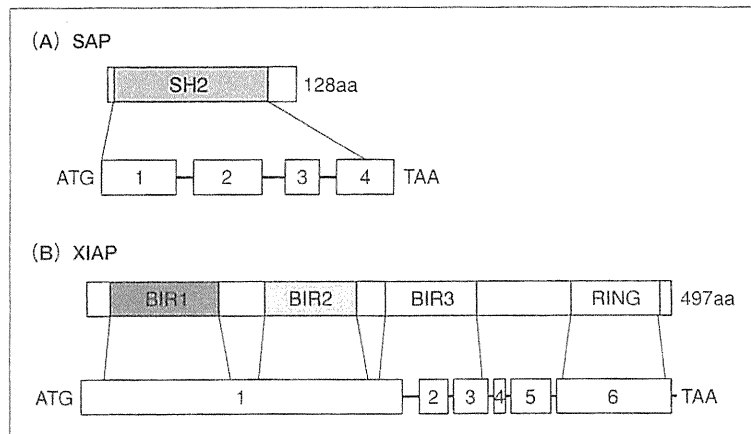


図 1 SAP(A)ならびにXIAP(B)の蛋白ならびに遺伝子構造
 SAP 蛋白は 128 個のアミノ酸からなり、1 個の SH2 ドメインを有する(A)。
 XIAP 蛋白は 497 個のアミノ酸からなり、3 個の BIR ドメインと C 末端の RING ドメインから構成される(B)。

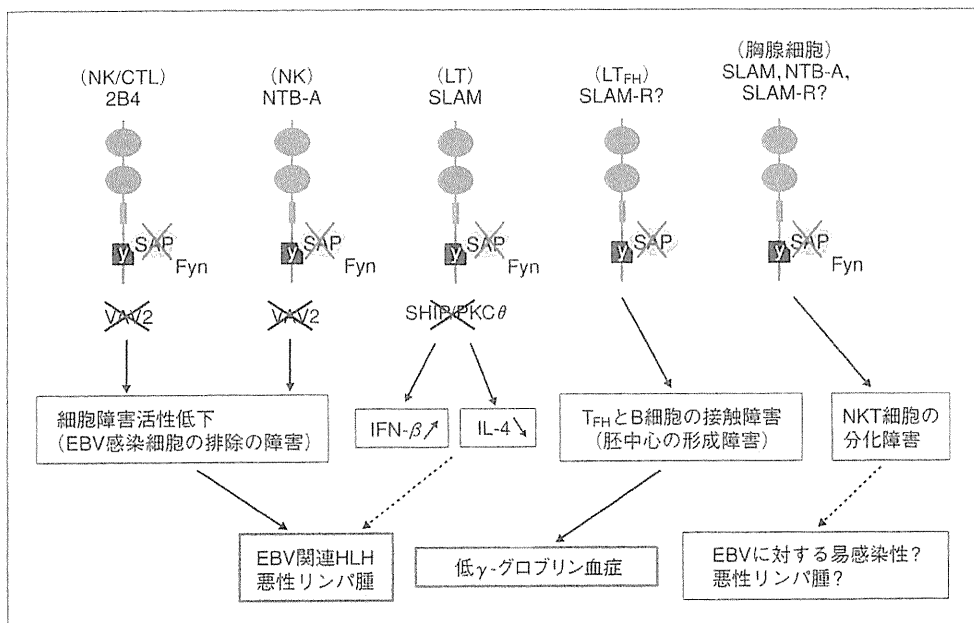


図 2 SLAMレセプターファミリーとSAP欠損症の病態形成
 SAP の異常によって SLAM レセプターファミリーのシグナル伝達障害をきたし、SAP 欠損症の病態にかかわると考えられる。

作用し、シグナル伝達を制御している。

SAP の異常によって NK 細胞ならびに細胞障害性リンパ球(cytotoxic lymphocyte : CTL)における 2B4 や NTB-A のシグナルの異常をきたし、細胞障害活性の低下のために EBV 感染細胞の排除の障害が生じ、EBV 関連 HLH や EBV 陽性悪性リ

ンパ腫を発症するものと思われる(図 2)。SLAM のシグナル異常によって IFN-β の産生増加や IL-4 の産生低下が生じ、これらのサイトカイン産生障害も EBV 関連 HLH や悪性リンパ腫の病態に関与しているかもしれない。また、濾胞ヘルパー T (follicular helper T : T_{FH})細胞のシグナル異

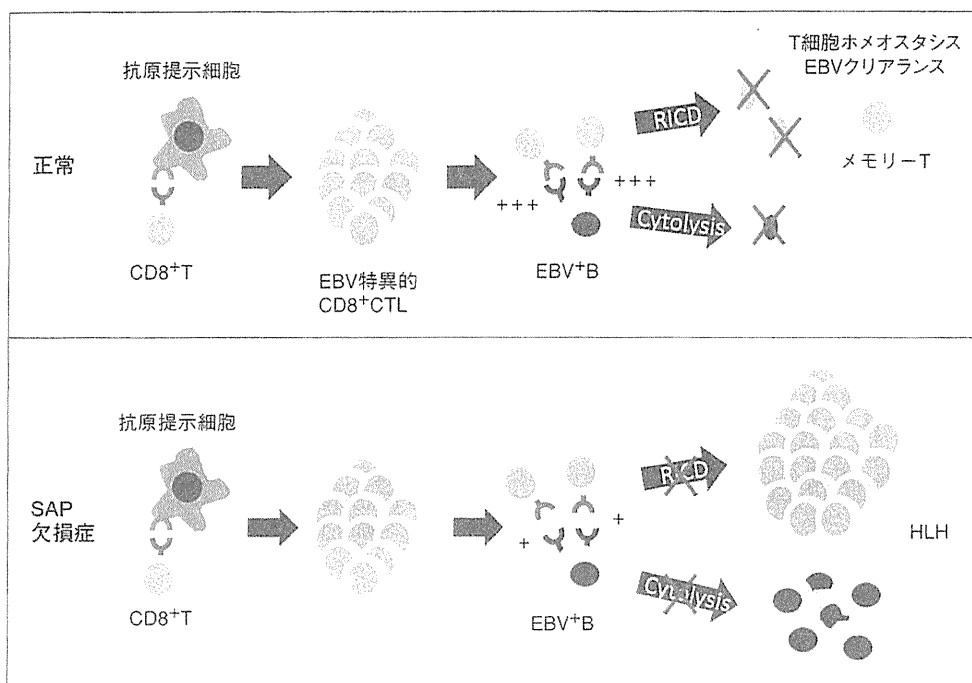


図 3 SAP欠損症におけるRICDの異常

SAP 欠損症の患者では、RICD(アポトーシス)の異常のために、EBV 感染症後に HLH を発症しやすいと考えられる。

常によって、 T_{FH} と B 細胞の接触障害が生じ、リンパ節における胚中心の形成障害をきたし、低 γ -グロブリン血症を呈すると思われる。NKT 細胞の分化障害も認められ、EBV に対する易感染性や悪性リンパ腫の発症にかかわっていると考えられている。

EBV感染に対する易感染性

EBV は普遍的なウイルスであり、通常は不顕性感染であるが、ときに一過性 T 細胞増殖症として伝染性単核症を発症する。しかし、SAP 欠損症では NK 細胞や $CD8^+$ T 細胞における 2B4 を介するシグナル伝達異常により EBV 感染細胞の排除を行うことができず致死的な伝染性単核症あるいは EBV 関連 HLH を発症する。SAP 欠損症では再活性化によって誘導される細胞死(reactivation-induced cell death: RICD)の障害があり、HLH の重症化をきたすと考えられている(図 3)¹¹⁾。すなわち、健常人では EBV 感染後に増殖した EBV 特異 $CD8^+$ T 細胞は EBV 感染 B 細胞と反応することによって、B 細胞は細胞融解し、一方、増殖し

た T 細胞は RICD によって細胞死に至ることによって、EBV 感染細胞が排除され、少数のメモリー T 細胞が残存するという T 細胞のホメオスタシスが働く。しかし、SAP 欠損症では B 細胞の融解が生じないばかりか、RICD が生じないため、T 細胞の異常増殖がみられ、これが HLH の病態を形成すると考えられている。

また、EBV 関連リンパ増殖症として、近親婚のトルコ人姉妹例において *interleukin-2 inducible T cell kinase (ITK)* の変異が報告された¹²⁾。SAP 欠損症と同様に NKT 細胞の減少が認められ、*ITK* 欠損マウスでも NKT 細胞の分化障害と T 細胞機能異常が報告されている。T 細胞と NKT 細胞の機能異常が EBV 感染細胞の排除に働かないため、EBV 関連リンパ増殖症を発症するものと考えられる。

異常 γ -グロブリン血症

SAP 欠損症では低 γ -グロブリン血症または高 IgM 血症が認められる。致死性 EBV 感染症をまぬがれた患者のほとんどで認められるが、EBV 陰性

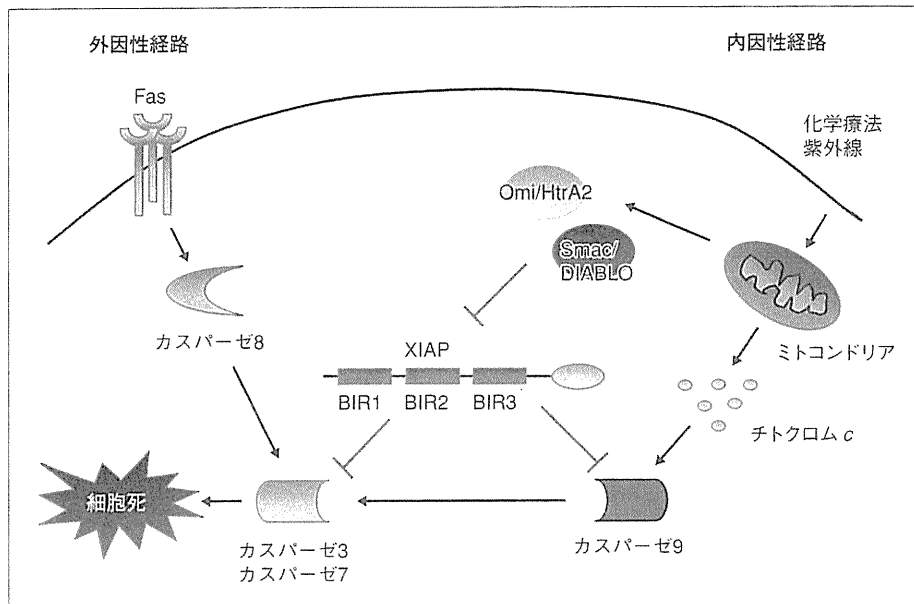


図 4 アポトーシス経路におけるXIAP
 XIAP は、BIR ドメインを介してカスパーゼ 3, 7 および 9 を抑制し、外因系および内因系のアポトーシスを制御している。

の患者でもときに観察される。

悪性リンパ腫

約 30% の患者で悪性リンパ腫を初発症状とする。多くの患者は EBV 感染 B 細胞の悪性転化の結果としてリンパ腫を発症するが、EBV 感染の既往が明らかでない患者も存在する。ほとんどが B 細胞リンパ腫であり、約半数は Burkitt タイプである。中枢神経などの節外性のリンパ腫もある。

XIAP 欠損症の臨床的特徴

XLP と区別しがたい臨床的特徴を有する 3 家系 12 例の男性患者において、はじめて XIAP 変異が同定された⁷⁾。最初の報告ではほとんどの患者が EBV 関連 HLH を発症し、約 1/3 の患者が低 γ -グロブリン血症をきたすとされた。しかし、その後の報告例が増えるにつれて臨床的特徴がより明らかになってきた(表 1)^{8,9)}。HLH はほとんどの患者で認められるが、EBV 関連とは限らず、比較的軽症で反復するものも多い。低 γ -グロブリン血症は認められるが、悪性リンパ腫の発症は 1 例も認められていない。また、SAP 欠損症に認められた再生不良性貧血や血管炎の報告もない。一方、

持続する脾腫や出血性大腸炎が少なからず認められる点が SAP 欠損症と異なる点である。SAP 欠損症と XIAP 欠損症はオーバーラップするところは多少あるが、臨床的に区別しうる別の疾患と考えられるようになってきた。

XIAP 欠損症の病態

XIAP 変異によってなぜ HLH 様の症状を呈するのか SAP 欠損症ほどにはわかっていない。XIAP は、カスパーゼ 3, 7, 9 の活性を抑制することによって内因性および外因性の細胞死を抑制している(図 4)。したがって、XIAP 変異によって細胞死が誘導されると考えられ、事実 *in vitro* の実験でも患者由来 T 細胞は健常人に比べて刺激後細胞死に陥りやすいがその差はわずかであり、細胞死の程度の違いのみで XIAP 欠損症の病態を説明することは困難であり、今後の解明が望まれる。

SAP および XIAP 欠損症の診断

致死のあるいはそれに近い EBV 感染症、HLH、低 γ -グロブリン血症の男児、とくに母方男性に家族例を有する場合には SAP または XIAP 欠損症の可能性が考えられる。当教室で開発された flow

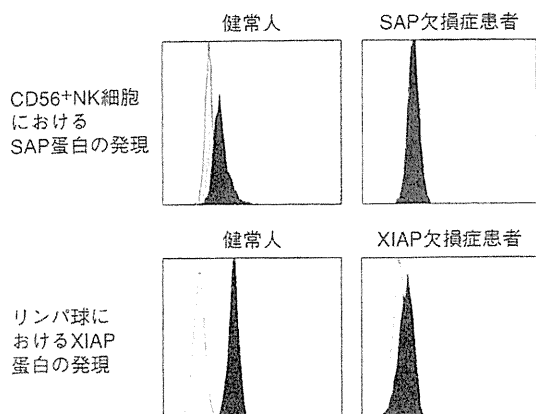


図 5 Flow cytometryによるXLPの診断

SAP 欠損症患者では、CD56⁺NK 細胞内の SAP 蛋白の発現が健康人に比べて低下している(上段)。XIAP 欠損症患者では、リンパ球内の XIAP 蛋白の発現が健康人に比べて低下している(下段)。

cytometry により SAP または XIAP 蛋白の発現を調べる方法がもっとも効率よく診断できる(図 5)¹³⁻¹⁵⁾。臨床症状ならびに flow cytometry の結果から XLP が疑われた場合には *SH2D1A* または *XIAP* 遺伝子解析を行う。

SAPおよびXIAP欠損症の治療

臨床表現型に応じた治療が基本である。低γ-グロブリン血症に対しては、免疫グロブリン定期補充療法、悪性リンパ腫に対しては標準的的化学療法を有効である。HLH に対しては HLH2004 プロトコールに準じた治療を行うが、EBV 感染 B 細胞を排除するために抗 CD20 モノクローナル抗体である rituximab が有効との報告がある¹⁶⁾。根治的療法としては造血幹細胞移植であるが、XIAP 欠損症に対する移植例はまだ少ない。他の原発性免疫不全症と同様に、骨髄非破壊の前処置による造血幹細胞移植が有用かもしれない¹⁷⁾。

おわりに

SAP と XIAP は、遺伝子の局在が近いといってもまったく異なる遺伝子変異によって、なぜよく似た臨床像をとるのかまだ明らかではない。今後の解析が期待される。

XLP はわが国にも少なからず存在し、これまで当教室では 32 例の SAP 欠損症、9 例の XIAP 欠

損症を同定している。疾患の予後を左右するのは、早期診断による造血幹細胞移植も含めた早期治療介入と思われる。すこしでも XLP が疑われる症例があれば著者まで連絡いただければ幸いである。

文献

- 1) Seemayer, T. A. et al. : X-linked lymphoproliferative disease : twenty-five years after the discovery. *Pediatr. Res.*, **38** : 471-478, 1995.
- 2) Rezaei, N. et al. : X-linked lymphoproliferative syndrome : a genetic condition typified by the triad of infection, immunodeficiency and lymphoma. *Br. J. Haematol.*, **152** : 13-30, 2011.
- 3) Purtilo, D. T. et al. : X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet*, **1** : 935-940, 1975.
- 4) Coffey, A. J. et al. : Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat. Genet.*, **20** : 129-135, 1998.
- 5) Nichols, K. E. et al. : Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95** : 13765-13770, 1998.
- 6) Sayos, J. et al. : The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through co-receptor SLAM. *Nature*, **395** : 462-469, 1998.
- 7) Rigaud, S. et al. : XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature*, **444** : 110-114, 2006.
- 8) Marsh, R. A. et al. : XIAP deficiency : a unique primary immunodeficiency best classified as X-linked familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and not as X-linked lymphoproliferative disease. *Blood*, **116** : 1079-1082, 2010.
- 9) Pachlopnik Schmid, J. et al. : Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency). *Blood*, **117** : 1522-1529, 2011.
- 10) Latour, S. and Veillette, A. : Molecular and immunological basis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol. Rev.*, **192** : 212-214, 2003.
- 11) Snow, A. L. et al. : Restimulation-induced apoptosis of T cells is impaired in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by SAP deficiency. *J. Clin. Invest.*, **119** : 2976-2989, 2009.
- 12) Huck, K. et al. : Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *J. Clin. Invest.*, **119** : 1350-1358, 2009.
- 13) Shinozaki, K. et al. : Activation-dependent T cell expression of the X-linked lymphoproliferative disease gene product SLAM-associated protein and its assessment for patient detection. *Int. Immunol.*, **14** : 1215-1223, 2002.
- 14) Zhao, M. et al. : Early and rapid detection of X-

- linked lymphoproliferative syndrome with SH2D1A mutations by flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.*, **80** : 8-13, 2011.
- 15) Marsh, R. A. et al. : A rapid flow cytometric screening test for X-linked lymphoproliferative disease due to XIAP deficiency. *Cytometry B Clin. Cytom.*, **76** : 334-344, 2009.
- 16) Milone, M. C. et al. : Treatment of primary Epstein-Barr virus infection in patients with X-linked lymphoproliferative disease using B-cell-directed therapy. *Blood*, **105** : 994-996, 2005.
- 17) Amerolia, P. : Nonmyeloablative stem cell transplantation for congenital immunodeficiencies. *Blood*, **96** : 1239-1246, 2000.

* * *

トッランナーに聞く

11

最先端の医療に挑む若手研究者への直撃インタビュー

関節リウマチの発症メカニズム解明と
その制御機構を追い求めて松本 功 筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 臨床免疫学分野
膠原病・リウマチアレルギー内科 准教授

—最先端の医療に挑む若手研究者への直撃インタビュー「トッランナーに聞く」の第 11 回ゲストは筑波大学の松本 功先生です。松本先生は解糖系酵素 GPI に関連する関節炎で幅広い研究をされていますが、最初に、関節リウマチ (RA) の自己免疫機序の解明に関する研究を始めたきっかけを教えてください。

松本 「免疫」という目に見えないシステムに興味を持ち、そのシステムが自分を攻撃してしまう自己免疫疾患に学生時代から接する機会がありました。その中で、患者さんが非常に多く、当時は進行性で難病であった RA の複雑な病態メカニズムを詳細に解明し、医療に貢献できたら良いなと思ったのがきっかけです。

—GPI 誘導関節炎モデルに着目したのはなぜですか。

松本 留学当時の研究で用いていた T 細胞受容体のトランスジェニックマウスである K/BxN マウスは、自然発症関節炎モデルとして 1996 年に明らかにされ、そのモデルの血清成分 (特に抗体成分のみ) を他のマウスに転移するだけで同じような関節炎を起こすことが分かっていました。そのターゲットを調べたところ GPI だったということがこの研究をスタートし

たきっかけです。当初ユビキタな抗原が RA に関係するとは想像していなかったわけですが、いろいろ検討していくうちにさまざまな臓器に発現している自己抗原であり、可溶性で血清中にも存在することが分かってきました。その抗原に対する自己抗体が単独で関節炎を惹起するという事は、その当時としては驚きでした。RA は関節特異的な自己抗原が関連する病気であると思われていたわけですから、それを覆す 1 つのデータだったと考えています。その後ヒトの合成 GPI タンパク質を免疫することにより DBA/1 マウスに関節炎が惹起されることも明らかとなり、この関節炎モデルに対する生物学的製剤の有効性が RA のプロファイルと非常に近似していることも分かりました。K/BxN マウスからの抗 GPI 抗体だけで関節炎は誘発できますが、GPI 誘導関節炎マウスの抗体だけでは関節炎を転移できません。我々の検討でも RA 患者さんの自己抗体だけでは関節炎が誘発されるとは考えにくく、自己抗体の依存度や薬剤有効性がヒト RA に近いモデルを開発し使いたいと思い、検索したのがきっかけです。

—実際にヒトに発症している RA も GPI が抗原

1965 年 東京都杉並区生まれ、北海道大学を卒業後、千葉大学医学部附属病院、成田赤十字病院に勤務。千葉大学にて博士号を取得し、フランス IGBMC 研究所、のち米国ハーバード大医学部に留学。2001 年 10 月より筑波大学講師、2002 年 11 月より科学技術振興機構さきがけ 21 研究員を兼任。2008 年より現職。



松本 先生

K/BxN 関節炎マウスを用いて解糖系酵素 GPI に対する自己抗体が単独で関節炎を惹起することを明らかにし、RA 患者では、重症な関節炎患者にこの自己抗体が存在し、抗原特異的な T 細胞誘導や Fcγ 受容体の活性化を介して RA 病態が起きることが推測されました。さらに生物学的製剤の有効プロファイルが RA に近い GPI 誘導関節炎の研究を進め、Th17 細胞と IL-6 のリンクや、新規 TNF 誘導分子を同定し、RA を制御する分子の同定・治療法の開発を目的として研究を進めています。

となっているのですか。

松本 RA の患者さんで GPI 抗原が過剰に産生されていることは判明していますが、抗 GPI 抗体の発現頻度は 15% くらいと高くないので、GPI と RA が直接リンクしているかどうかは詰められていません。ただ、RA でも関節炎以外にも臓器障害を持つ悪性関節リウマチ (MRA) のような特殊病態の患者さんでは、抗 GPI 抗体が高頻度に同定されていることが確認できています。

—関節炎になるような方では GPI 抗原は多いけれども、抗 GPI 抗体については特殊病態を持っているような人だけに認められるということになるのでしょうか。

松本 RA に対して自己抗体が重要なのは明らかなのですが、もし自己抗原が GPI と同じような局在をし、同じような特徴を持っていた

ら、万人の RA 患者さんの治療に役立つと思います。1つの抗原に対して起きる自己免疫応答が関節炎という炎症を伴うことが、流れの中で証明されると考えていますが、そのメカニズムを詳細に解明し、自己免疫応答という観点での共通項を見つけるというのが我々の本論と考えています。

—アミノ酸が 15 個残基くらいの GPI ペプチドでも関節炎が起こるということですが、

松本 EAE という脳脊髄炎の自己免疫疾患モデルでは、ペプチドで誘発されることが分かっていますし多くの研究もなされていますが、関節炎に関しては、ペプチド免疫で惹起されることは我々の報告以前には全くありませんでした。我々は GPI 誘導関節炎の T 細胞エピトープのみで非常に強い関節炎をほぼ 100% 起こすことを証明しましたので、関節炎の治療薬の研究には良いモデルと思っています。なぜかと言うと、現状の GPI 誘導関節炎の場合はタンパク質を精製しなければならず、そのステップの簡略化は難しいですが、ペプチドであればある程度安定して合成できるので汎用性も高くなります。

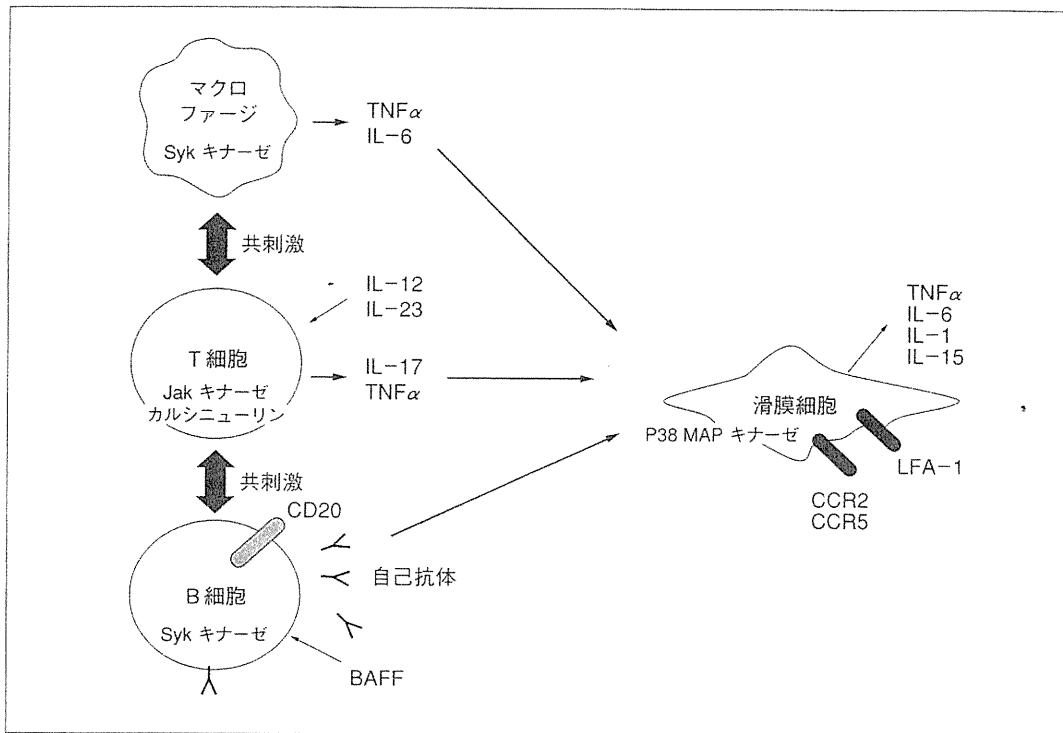
—RA の患者さんは女性が多い点については GPI 誘導関節炎モデルで説明がつくものなのでしょうか。

松本 難しい問題ですね。自己免疫疾患のように抗体が疾患の成因に関係する疾患は女性が多いと言われていて、一方、炎症だけを伴うものは男性が多いと言われていて、ですから、自己免疫応答の段階において女性ホルモンをはじめとしたホルモンが関係するのかもしれないし、逆に男性に防御性の因子があるのかもしれない。

—RA の発症に女性ホルモンの関与が考えられるということですが、同じ自己免疫疾患の全身性エリトマトーデス (SLE) の場合は 10 代や 20 代の方に多いと言われ、RA の場合は年齢層の高い閉経されているような方に多いと思いますが、そのあたりについてはどのように考えたらよいのでしょうか。

松本 その点は解明しなければならないことだと思います。自己免疫の場合には HLA とい

図1 関節リウマチの分子標的と治療



う重要なトリガーと染色体の中の何か微細な因子が関与する可能性があると思います。また自己免疫には閾値があり、女性のほうが閾値に達しやすい要因があるのかもしれませんが、それを説明できるモデルの作成はなかなか難しいのが現状です。もともと関節炎を自然発症するK/BxN マウスはオスでもメスでも関節炎が発症します。閾値をはるかに超えてしまった場合は別ですが、ボーダーラインの場合は性ホルモンで制御できるものがあるのかもしれませんが、また女性の場合、妊娠により胎内に子どもを宿しますが、男性を出産した方では自己免疫疾患が起きやすいとも言われています。胎盤を通して胎児に由来するY染色体が体内に残るために、Y染色体に対する免疫応答が表在化しやすいというマイクロメリズムが幾つかの自己免疫疾患で指摘されています。

—GPI 誘導関節炎モデルマウスを用いた実験について、簡単にご説明いただけますか。

松本 既存のⅡ型コラーゲンによる関節炎は

発症まで3週間以上かかりますが、GPI 誘導関節炎モデルマウスはヒト GPI 合成タンパク質をアジュバントと一緒に一度免疫するだけで、わずか1週程度で強い関節炎が誘発できます。昨今劇的な有効性が評価されている生物学的製剤での治療プロファイルが RA に近似しており、関節炎の制御メカニズムを知るうえで、また今後の創薬を考えるうえで非常に有用なモデルと考えております。また、先ほども申しましたが GPI のT細胞エピトープのみでも関節炎が誘発できることが判明しており、こちらも再現性が高く興味深いモデルです。

—RA に対して現在使われている生物学的製剤の開発時にも、GPI 誘導関節炎モデルマウスは使われていたのですか。

松本 その当時はⅡ型コラーゲンによる関節炎モデル (CIA) マウスを使っていましたから、どちらかと言うと IL-1 に依存性が強い関節炎モデルでした。したがって IL-1 を抑える IL-1 受容体アンタゴニストなどが期待されて、現在

でも海外で使われていますが、ヒト RA に対する有効性は乏しいことが臨床上判明しています。TNF α に対する生物学的製剤についてはヒトの滑膜細胞を使った研究から開発されたわけですが、CIA モデルとヒトの関節炎の間にはサイトカイン依存性に乖離があることも確かであり、GPI 誘導関節炎モデルでその乖離を埋めることができたらいいなと思っています。また、GPI 誘導関節炎モデルで発症した関節炎に対して TNF α アンタゴニストや IL-6 受容体抗体も非常によく効くことが分かっており、この2剤の有効性を検証できる貴重なモデルでもあります。

—GPI の合成タンパク質で誘導された関節炎もペプチドで誘導された関節炎も、全く同じものと考えて良いのでしょうか。

松本 いずれもプロファイルは同じですが、関節炎のグレードが違います。ペプチドでは誘導にトキシシンを使うため関節炎が強く出て、1週間くらいでピークに達し、病態がやや遷延する強い関節炎モデルと考えています。その点 GPI ではトキシシンを使わないので、そこまで関節炎が強く出ることはありません。

—GPI 誘導関節炎モデルによる関節リウマチの自己免疫機序の解明により、新しい治療法の開発は進んでいるのでしょうか。

松本 我々は GPI 誘導関節炎モデルの TNF α 依存性に着目し、研究を進めていく中で見いだされたのが、制御性分子と考えられる TNF 誘導分子である TIARP でした。TIARP 遺伝子欠損マウスでは関節炎を自然発症し、また関節炎誘導に対して強い反応を起こしやすいことが分かってきたので、そのメカニズムを詳細に解析しているところです。TIARP は RA 発症に重要と考えられているマクロファージに強く発現していますので、炎症性サイトカインの制御をしているものと考えています。現在 TIARP を介した炎症の制御メカニズムを細胞レベル、細胞シグナルレベルで詳細に検討しており、今後新しいことが分かってくることを期待しています。

—RA 以外の自己免疫疾患も、GPI 誘導関節炎モデルを用いて疾患メカニズムの解明ができるのでしょうか。

松本 TNF α や IL-6 といった炎症性サイトカインがかかわる疾患や、Th17 細胞がかかわるような自己免疫疾患のメカニズム解明に使用できる可能性はあると思います。

—疾患メカニズムの解明により新しい治療法の開発も進んでいますが、疾患事態に罹らないようにする先制医療、遺伝子治療などは自己免疫疾患でも可能なのでしょうか。

松本 抗原が分かればワクチンも可能だと思います。1つの抗原に対して起こるスタートポイント、いわゆるインダクションはモデルを使うとより詳細に分かるので、何のトリガーであることが分かれば予防も可能になると思います。

—研究を進めるうえで一番大切にしていることはどのようなことでしょうか。

松本 大事なことは、しっかりと真実を見極めることだと思います。1回だけの結果を信頼しないとか、再現性がある信頼性のあるデータを積み上げていかないと将来が見えてきません。真実のみを明らかにするという気持ちを持ち続けることです。

—これまで研究を進めて行くうえで大変だったことや面白かったことはどんなことでしょうか。

松本 海外に行って劇的なモデルを扱って、面白い結果が得られましたから、それを見つけたときの興奮度は今までの人生の中で一番大きかったと思います。ただ、マウスモデルとヒトの間には大きな違いがあり、特にヒトの研究では多様性をどう克服するかが難しい点だと思います。また、モデルから疾患を見ていくのではなく、疾患からモデルを見ていくのを座右の銘として研究を行っています。

—最近、臨床研究の必要性が言われていますが、先生のお考えは。

松本 両方大事だと思います。なぜかと言うと、患者さんからの検体も数に限りがありますし、多様性が大きいからです。その多様性を克服するために単一モデルでの研究も大事であり、

その結果をヒトで証明していかなければなりません。ヒト→マウス→ヒトといった流れを見ていくことが、真の医療に最も近づける道だと信じています。

—話は変わりますが、趣味や休日はどうにお過ごしですか。

松本 体を動かすことは大好きで、時間はあまりとれませんが隙を見つけてスポーツ全般をしています。特にテニスやゴルフが一番のストレス解消になります。また子どもたちと遊んだり、家族と買い物などをして過ごすことが多いです。

—今後、どのようなことにチャレンジしたいですか。

松本 我々が目指しているのは創薬研究で

す。良い薬はたくさんありますが、自己免疫病態をリセットできるような、この薬を飲めば病気が治るといような薬を創りたいです。

—最後に若い人たちに伝えたいことをお願いします。

松本 常に洞察力を持ち疑問を持つこと。その中で自分が興味を持ったことをより掘り下げ、それを克服する努力を惜しまず、疑問をそのままにしないでほしいですね。つらいことも幾つかあると思いますが、自分を信じて進んでほしいです。

—本日はありがとうございました。

(とき：平成23年9月2日 ところ：筑波大学)

Mutation@A Glance: An Integrative Web Application for Analysing Mutations from Human Genetic Diseases

ATSUSHI Hijikata¹, RAJESH Raju^{2,3,4}, SHIVAKUMAR Keerthikumar^{2,3,4}, SUBHASHRI Ramabadran^{2,3}, LAWANYA Balakrishnan^{2,3}, SURESH KUMAR Ramadoss², AKHILESH Pandey^{3,5}, SUJATHA Mohan^{2,3}, and OSAMU Ohara^{1,6,*}

Laboratory for Immunogenomics, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan¹; Research Unit for Immunoinformatics, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan²; Institute of Bioinformatics, International Technology Park, Bangalore 560 066, India³; Department of Biotechnology and Bioinformatics, Kuvempu University, Jnanasahyadri, Shimoga 577 451, India⁴; McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, 733 N. Broadway, BRB Room 527, Baltimore, MD 21205, USA⁵ and Laboratory of Genome Technology, Department of Human Genome Research, Kazusa DNA Research Institute, 2-6-7 Kazusa-Kamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan⁶

*To whom correspondence should be addressed. Tel. +81 45-503-9696. Fax. +81 45-503-9694.
Email: oosamu@rcai.riken.jp

Edited by Katsumi Isono

(Received 17 January 2010; accepted 8 March 2010)

Abstract

Although mutation analysis serves as a key part in making a definitive diagnosis about a genetic disease, it still remains a time-consuming step to interpret their biological implications through integration of various lines of archived information about genes in question. To expedite this evaluation step of disease-causing genetic variations, here we developed Mutation@A Glance (<http://rapid.rcai.riken.jp/mutation/>), a highly integrated web-based analysis tool for analysing human disease mutations; it implements a user-friendly graphical interface to visualize about 40 000 known disease-associated mutations and genetic polymorphisms from more than 2600 protein-coding human disease-causing genes. Mutation@A Glance locates already known genetic variation data individually on the nucleotide and the amino acid sequences and makes it possible to cross-reference them with tertiary and/or quaternary protein structures and various functional features associated with specific amino acid residues in the proteins. We showed that the disease-associated missense mutations had a stronger tendency to reside in positions relevant to the structure/function of proteins than neutral genetic variations. From a practical viewpoint, Mutation@A Glance could certainly function as a 'one-stop' analysis platform for newly determined DNA sequences, which enables us to readily identify and evaluate new genetic variations by integrating multiple lines of information about the disease-causing candidate genes.

Key words: genetic disease; mutation; polymorphism; bioinformatics; protein structure

1. Introduction

Genetic diseases are caused by structural changes in genes and/or chromosomes. In the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim>) database, more than 2200 genes are known to have mutations

causing genetic diseases.¹ For instance, primary immunodeficiency diseases (PIDs) are caused by congenital defects in genes involved in the development and maintenance of the immune system,^{2,3} and they can be diagnosed using mutation analysis that identifies pathogenic mutations in candidate PID genes. This process plays a critical role in improving

© The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of Kazusa DNA Research Institute.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

the quality of life for PID patients.⁴ In this regard, the recent advances in DNA sequencing technology will extremely expedite this process. Thus, the next bottleneck to be addressed is obviously how to clarify the associations between newly identified patient-specific genetic variations and disease phenotypes, even when familial disease history is absent. To eliminate the bottleneck in mutation analysis, we need a bioinformatics tool that would enable us to readily evaluate the impact of a genetic variation on the structure/function of a gene product at the molecular level. Towards this end, our first step was to develop an integrated 'one-stop' analysis platform where we could cross-reference multiple lines of information regarding known genetic variations, including a huge amount of non-synonymous (ns) single-nucleotide polymorphisms (nsSNPs) in healthy individuals,⁵⁻⁷ in genes of interest.

Bioinformatics resources and methods played an indispensable role in creating this platform.⁸⁻¹² Although a number of databases regarding reported human disease mutations and SNPs have been already constructed,¹³⁻²⁵ these databases were launched as a static archive for genetic variation data, not necessarily an interactive tool for evaluating newly identified sequence variation data. Several computational algorithms for predicting the effects of ns substitutions on a corresponding protein have been developed using evolutionary and protein three-dimensional (3D) structure information.²⁶⁻³¹ However, despite public availability of these software/web servers, there are at least two hurdles, especially for clinical researchers to exploit them for the mutation analysis: (i) since these servers usually require information about the position of the genetic variation occurred in a submitted sequence as a query input, the users have to specify the variation position in the sequence before submitting the query; (ii) since these servers do not necessarily incorporate known disease-associated mutation data into their systems, the users have to manually compare their newly identified genetic variation data from patients with previously reported data. Thus, we thought it was important to integrate predictive bioinformatics tools, such as the one described above, with a comprehensive set of known genetic variation data, to create a 'one-stop' mutation analysis platform.³²

In this context, here we present Mutation@A Glance (<http://rapid.rcai.riken.jp/mutation/>), a new web-based integrated bioinformatics tool for analysing mutations from human genetic diseases. The user-friendly graphical interface of Mutation@A Glance makes it possible to allocate known disease-associated mutation data on the nucleotide and amino acid sequences of a gene of interest, and to link these mutation data to the 3D structure of the gene product

along with various lines of information about the mutated amino acid residues (e.g. the extent of evolutionary sequence conservation, post-translational modifications and molecular interactions). Furthermore, this tool enables users to identify and evaluate newly identified sequence variations in a query DNA sequence from a gene of interest by comparing them with known disease-associated mutation data and using the SIFT program,²⁶ which is one of the most accurate and widely used program to specifically predict the effects of ns substitutions based on evolutionary information for each residue position.³³ Therefore, Mutation@A Glance surely serves as a 'one-stop' informational platform to identify and evaluate new genetic variations by integrating multiple lines of information about the disease-causing candidate genes.

2. Materials and methods

2.1. Data resources for disease-associated genes and sequence variations

Human disease-associated mutation data were obtained from the following three databases: OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>),¹ UniProt (<http://www.uniprot.org/>)³⁴ and RAPID (<http://rapid.rcai.riken.jp/>).¹⁷ Sequence variations that were associated with OMIM in the dbSNP database (Build 130, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)¹⁸ were considered to be disease-associated mutations and other variations were considered non-disease associated. For the mutation data in the UniProt database, VARIANT features associated with diseases in the human entries were considered. RAPID is a molecular database that we have recently established for reported disease mutation data in genes causing PIDs.¹⁷ The RAPID database is directly connected to our local server and the mutation data (as of August 2009) are retrieved using a Perl script. The human genome sequence (Build 36.3), RefSeq sequences for nucleotides and proteins of human were downloaded from the NCBI ftp site (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/>). Information regarding residue-wise functional features (Transmembrane helix, signal peptide, nucleotide binding, disulphide bond, metal binding, active site and post-translational modification site) was extracted from the human entries in the UniProt database. Information regarding the exon-intron structures of each gene was downloaded from the NCBI ftp site.

2.2. Calculation of sequence conservation in ns substitution sites

Homologous protein sequences in other organisms to the human proteins encoded by disease-causing genes were identified using the BLAST program³⁵ against the RefSeq database (6 691 817 amino acid