

IV リンパ球の異常

リンパ球機能異常と類縁疾患

原発性免疫不全症候群

Good 症候群 (免疫不全症を伴う胸腺腫)

Good syndrome (immunodeficiency with thymoma)

Key words : 免疫不全症, 自己免疫疾患, 胸腺腫, 腫瘍随伴症候群,
日和見感染

金子英雄

1. 概 念

胸腺腫は胸腺上皮の腫瘍であり, 様々な免疫学的異常を伴う。胸腺腫を有する免疫不全症は Good が 1954 年に報告したのが最初で¹⁾, Good 症候群とも呼ばれている。液性免疫と細胞性免疫の両者が障害されていることが多い, 主として成人に発症する。免疫不全は胸腺腫の摘除前または摘除後のどちらの場合からでも発症するといった特徴がある。胸腺腫の悪性度は低い。骨髓機能の異常による血液症状とリンパ球の減少を伴い, 多くは B 細胞の分化障害により, 無あるいは低ガンマグロブリン血症を呈する。また, 細胞性免疫の低下も示す。胸腺腫の出現と免疫不全の発症は相互に関連していると考えられるが, その機序は明らかでない。以前は, common variable immunodeficiency に包含されていたが, 最近では, 抗体産生不全症の中の一つの病型として独立して位置づけられている²⁾。

2. 疫 学

2007 年の厚生省原発性免疫不全症候群の登録によると, 我が国では男性 5 例, 女性 6 例の計 11 例が登録されている³⁾。本症は良性胸腺腫と無あるいは低ガンマグロブリン血症, 遅延型過敏反応の低下を伴う症候群であるが, その亜型として IgA のみの欠損例, 高ガンマグロブリン血症を伴う症例が報告されている。したがって, Good 症候群は狭義には胸腺腫を伴う抗体

産生不全症であるが, 広義には胸腺腫を伴う免疫グロブリン異常症と定義される。海外での報告では, 胸腺腫に免疫グロブリン低下が合併する割合は, 6-11% と推定されている⁴⁾。

3. 病 因

通常は 40 歳以上 (平均 50 歳前後) にみられる。家族内発症がみられる場合もあるが, 遺伝形式は明らかでない場合も多い。胸腺腫瘍の 30-40% に多彩な腫瘍随伴症候群 (paraneoplastic syndrome) の合併が認められる (表 1)⁵⁾。腫瘍随伴症候群は, 重症筋無力症 (35%), 赤芽球癆 (50%), 免疫不全 (5-10%) の 3 疾患が主要なものである。胸腺腫と免疫不全は何らかの関係があると考えられる。しかし, 胸腺腫の摘出によっても免疫不全は改善されずむしろ悪化した症例が報告されている。遺伝的要因を含め病因は不明である。Good 症候群に, 特異的に V β 8 の CD8 細胞がクローナルに増殖していることが, B 細胞の減少に関連しているという報告がある⁶⁾。また, 著者らは末梢血中に IL-4 などを主として分泌する Th2 タイプの T 細胞分画の減少を報告した⁷⁾。T 細胞のヘルパー作用の障害が抗体産生不全の一因である可能性がある。

4. 病 態

胸腺腫そのものは, 通常臨床症状を呈さないため, 胸部 X 線撮影時に偶然発見されるか, 剖検時に発見されることが多い。Good 症候群に

Hideo Kaneko: Department of Clinical Research, National Hospital Organization, Nagara Medical Center 国立病院機構長良医療センター 臨床研究部

表1 胸腺腫にみられる腫瘍随伴症候群(文献⁵⁾より引用)

血液疾患
赤芽球癆
汎血球減少
自己免疫性溶血性貧血
悪性貧血
神経疾患
イートン・ラムバード症候群
アイザック症候群
末梢神経疾患
辺縁体脳炎
脊髄神経根症
内分泌疾患
甲状腺亢進症
汎下垂体機能低下症
アジソン病
思春期早発症
免疫疾患
重症筋無力症
抗体生不全症(Good 症候群)
関節リウマチ
皮膚筋炎
多発性筋炎
全身性硬化症
SLE
心筋炎(巨細胞性)
高安病
シェーグレン症候群
消化器疾患
ウィップル病
非熱帯性スプルー
潰瘍性大腸炎
限局性腸炎
その他の疾患
胸腺以外の悪性腫瘍
ネフローゼ症候群
肥大性骨関節症
サルコイドーシス
レイノー現象

おける感染症は必発で、上気道炎や皮膚、粘膜の感染がみられる。特に、慢性気管支炎、気管支肺炎の罹患がみられる。しばしば合併する慢性皮膚粘膜カンジダ症は、主としてT細胞機能低下による。

検査成績としては、液性免疫、細胞性免疫両者の障害を示すことが多い(表2)。胸腺腫は通常良性で、紡錘細胞型が多いが、時にリンパ球

細胞型やリンパ腫などの悪性像を示すこともある。リンパ節の組織像では胚中心の形成がみられず、形質細胞は消失し、傍皮質リンパ球も著減している。25%の症例に脾腫を認める。

B細胞の成熟障害により、末梢血中およびリンパ節胚中心での表面免疫グロブリン陽性細胞は著しく減少し無あるいは低ガンマグロブリン血症を呈する。T細胞に関しては数やサブセットには異常が認められないが、様々なレベルのT細胞機能不全を示すことが多い⁶⁾。

concanavalin A, phytohemagglutininなどのマイトジェンに対するリンパ球幼若化反応は低値を示す。ツベルクリン反応などの遅延型過敏反応は低下していることが多い。

5. 診断と鑑別診断

突然の免疫不全の発症、胸腺腫、低ガンマグロブリン血症をみた場合、Good症候群を考える。

合併症として、重症筋無力症、関節炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、潰瘍性大腸炎などの症状を示した報告がみられる。Good症候群の半数以上に造血系の異常が認められる。貧血(溶血性、低形成性、悪性、赤芽球癆)、白血球減少症(無顆粒球症、好酸球減少症、好塩基球減少症)は、半数に観察される。血小板減少症(20%)、汎血球減少症、好酸球増加症も報告されている。SLE、多発性関節炎、あるいは各種自己抗体陽性(抗赤血球、抗胸腺、抗核抗体、抗横紋筋抗体など)が認められる。更に、腫瘍性疾患の合併もみられる。悪性リンパ腫、骨髄腫、Kaposi肉腫、甲状腺腫瘍の合併が報告されている。

鑑別診断としては、Good症候群が成人で発症することが多いことから、続発性の免疫不全症、AIDS、リンパ腫との鑑別が常に問題となる。小児での発症の場合、重症複合型免疫不全症、CVIDなどとの鑑別が必要である。原発性免疫不全症のうち、病因遺伝子が明らかなものは、その解析をすることで、診断が可能な場合もある。小児例も報告されており、胸腺腫摘出後に水痘感染により死亡したとの報告がある。

IV

リンパ球の異常

表2 Good症候群日本人症例の免疫学的検査のまとめ(文献^{7,8)}より引用)

症例	年齢	性別	(%)	mg/dL			(%)			
			免疫グロブリン	IgG	IgM	IgA	CD3 or T cell	CD4	CD8	CD20 or T cell
1	45	M	3.5	380	0	34				
2	43	F	8	low	low	low				
3	50	F	3.4	190	22	10	37.2			4.2
4	52	M		800			76			2
5	69	M	1.8	<200	<40	<30	83			0
6	60	M	11.3	960	72	130	77			17
7	59	F	5.2	660	<40	60	93.7			9.5
8	31	M	5.4	504	18	70	41.3			11.3
9	65	F	1.8	500	34	96	63	26	41	19
10	73	M	6.1	279	45	<2	87.9	30.7	50	3.9
11	71	F		574	<21	<31		18.1	70.7	2.5
12	57	M		887	6.5	56		27	55.8	2
13	78	F	8.6	522	58	39		36	51.6	
14	49	F	6.4	320	<5	11				
15	53	M	7.1	598	14	49	79	26.1	48.6	3.2
16	63	M	6.1	544	39	4	76.9	43.7	37	0.9
自験例	56	F	4.1	178	<5.5	<7.1	71.1	24.5	58.8	1.4

免疫グロブリンの2つ以上のクラスの低値とB細胞数の低値が特徴である。

胸腺腫をみた場合、Good症候群を念頭に置き、免疫系の精査が必要である⁹⁾。今まで正常な免疫能を有していた人が急に免疫不全を発症した場合、胸腺腫の有無についての検索が必要である。

6. 治療と予後

免疫不全(易感染、腫瘍の合併)、造血系異常、自己免疫疾患に対して治療が必要である。

1) 胸腺摘出

胸腺を摘出しても免疫不全は改善されない。

圧迫症状が強い場合は、摘出が必要になる場合もある。合併する赤芽球癆、重症筋無力症に有効な場合があるが、逆に悪化した症例もあり、摘出にあたっては十分な注意が必要である¹⁰⁾。

2) ガンマグロブリン補充療法

血清ガンマグロブリンが低下している症例では、定期的に補充療法を行う。

3) 抗生剤の投与

真菌、ウイルスなど日和見感染が重症化しやすく、適切な抗生剤の投与を早期から行う。

■ 文 献

- 1) Good RA: Agammaglobulinemia—a provocative experiments of nature. Bull Univ Minn Hosp 26: 1-19, 1954.
- 2) Al-Herz W, et al: Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. Front Immunol 2: 54, 2011.
- 3) 岩田 力: 原発性免疫不全症候群症例登録調査. 厚労省特定疾患血液疾患調査研究班 原発性免疫不全症候群分科会. 平成19年度研究業績報告書, 2007.
- 4) Montella L, et al: B-cell lymphopenia and hypogammaglobulinemia in thymoma patients. Ann Hematol 82: 343-347, 2003.
- 5) Morgenthaler TI, et al: Thymoma. Mayo Clin Proc 68: 1110-1123, 1993.
- 6) Masci AM, et al: Clonal expansion of CD8+ BV8 T lymphocytes in bone marrow characterizes thymoma-associated B lymphopenia. Blood 101: 3106-3108, 2003.

- 7) Shimizu T, et al: [Analysis of T cell subset in a case of Good syndrome]. *Nihon Naika Gakkai Zasshi* **97**: 3052-3055, 2008.
- 8) Yamazaki K, et al: Good's syndrome with a block in the early stage of B cell differentiation and complicated by *Campylobacter fetus* sepsis. *Intern Med* **33**: 496-500, 1994.
- 9) Watta RG, Kelly DR: Fatal varicella infection in a child associated with thymoma and immunodeficiency(Good's syndrome). *Med Pediatr Oncol* **18**: 246-251, 1990.
- 10) Kitamura A, et al: Durable hypogammaglobulinemia associated with thymoma(Good syndrome). *Intern Med* **48**: 1749-1752, 2009.

IV

リンパ球の異常

IV リンパ球の異常

リンパ球機能異常と類縁疾患

原発性免疫不全症候群

ブルーム (Bloom) 症候群

Bloom syndrome

Key words : 小柄な体型, 日光過敏性紅斑, 免疫不全症, 高発癌,
姉妹染色分体組換え

金子英雄

IV

リンパ球の異常

1. 概 念

Bloom 症候群は, 生下時からの小柄な体型, 日光過敏性紅斑, 免疫不全症を特徴とする, 常染色体劣性の遺伝性疾患である¹⁾. なかでも, 際立った特徴は, 癌腫の合併が高率に認められることである. 欧米での報告では, 20 歳代までに, 約半数が何らかの癌腫を合併すると報告されている. 病因遺伝子は, 遺伝子の複製・修復に必須な RecQ ヘリカーゼファミリーに属する BLM 遺伝子である²⁾. RecQ ヘリカーゼファミリーには, 老年症を特徴とする Werner 症候群の病因遺伝子 WRN や, 小柄な体型, 特徴的な皮疹 (poikiloderma) を示す Rothmund-Thomson 症候群の病因遺伝子 RecQL4 が属している. Bloom 症候群は遺伝性高発癌症候群, 家族性腫瘍, ヘリカーゼ病, 遺伝子修復異常症, 染色体脆弱症候群といった区分に分類されることも多い³⁾.

2. 疫 学

厚生労働省の難治性疾患克服事業で, 全国の小児科, 皮膚科, がん診療拠点病院に, アンケートを送り, 集計したところ, 9 家系 10 症例の Bloom 症候群の確定例を把握している⁴⁾. アシケナージューイッシュでは保因者が約 100 人に 1 人とされている. German らが行っている世界の Bloom 症候群の登録では, 134 人が登録されている⁵⁾.

3. 病 因

RecQ ヘリカーゼファミリーに属する BLM 遺伝子の障害により発症する. BLM 遺伝子は 15q26.1 に位置し, 1,417 個のアミノ酸をコードしている. 分子量は約 160 kDa であり, 中央にヘリカーゼモチーフを有し, C 末に basic なアミノ酸領域があり, 核移行シグナルとして機能している⁶⁾. 我が国の Bloom 症候群の患者の BLM 遺伝子変異を解析したところ, 16 allele 中 9 allele が 631delCAA だった. 我が国に共通な遺伝子変異と考えられた. アシケナージューイッシュには BLMash と呼ばれる 2281delATCTGAGinsTAGATTC の共通変異が高率に認められる.

4. 病 態

BLM タンパクは姉妹相同組換えの抑制に必須のタンパクである. また, BLM の障害されている細胞では姉妹相同組換え以外の他の染色体異常も生じやすい. BLM タンパクは他の遺伝子の複製・修復にかかわるタンパクと複合体を形成して機能している⁷⁾. 特徴的な症状として日光過敏性紅斑(多くは頬部に対称的)がある. 加齢に伴い消失することもある. 生下時からみられる均整のとれた小柄な体型が認められる. 多くの症例は, 生下時の体重が 2,500 g 未満の低出生体重児である. 免疫不全症も特徴とされているが, 我が国での集計では, 易感染の程度

Hideo Kaneko: Department of Clinical Research, National Hospital Organization, Nagara Medical Center 国立病院機構長良医療センター 臨床研究部

0047-1852/13/¥60/頁/JCOPY

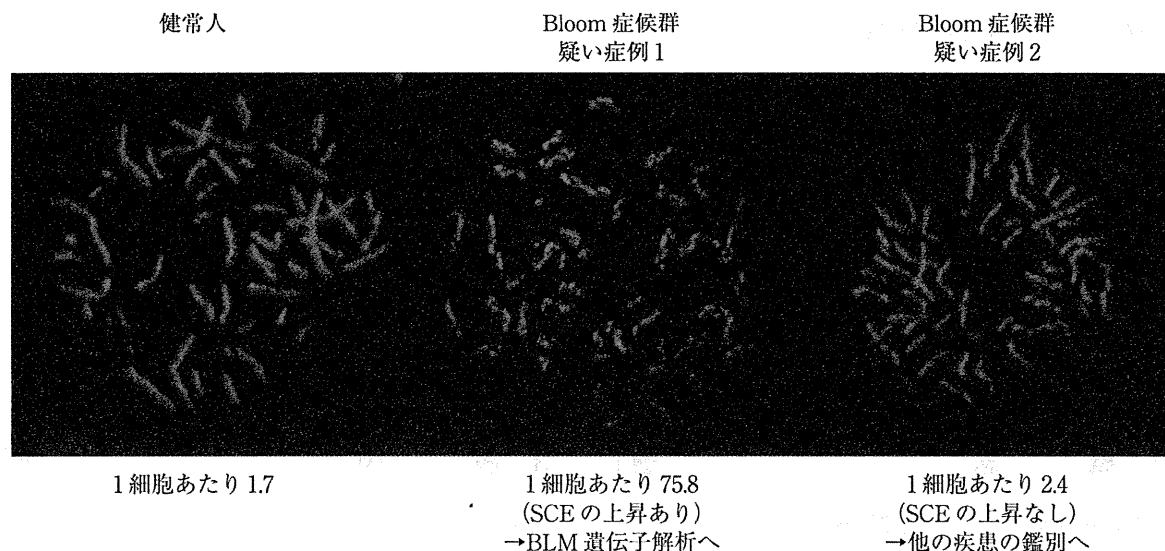


図1 Bloom 症候群における姉妹染色分体組換え (SCE) の頻度の上昇

はそれほど強くなかった。我が国の集計では、骨髄異形成症候群が2例に認められていた。また、鳥様顔貌といわれる特徴的な顔貌が認められることもある。糖尿病は10例中5例に認められ、特徴的な合併症である。I型、II型の糖尿病とも認められていた。性腺機能低下(早期の閉経、不妊)、若年性白内障、慢性肺疾患も本症を疑わせる所見となる。癌腫の種類は、欧米での報告では、基礎疾患を有しない各年齢に発症する癌腫の発症がすべて高率になるとされている。すなわち、若年では、白血病・リンパ腫などの、肉腫が高率に認められ、成人以降は、大腸癌、肺癌といった上皮系の腫瘍が高率に発症するとされている。我が国の集計では、10例中6例にB細胞系のリンパ腫が認められた。

5. 鑑別診断と確定診断

血清IgM 50mg/dL以下が半数以上に認められ、Bloom症候群の免疫不全の特徴と考えられた。Bloom症候群を疑った場合は、姉妹染色分体組換えの頻度の検査を行う。組換えの頻度は、Bloom症候群では、健常人と比較して数十倍に増加している(図1)。

姉妹染色分体組換えの頻度の上昇が認められた場合は、暫定的にBloom症候群とする。最終的には、BLM遺伝子の検索を行い確定診断と

する。鑑別として、RecQヘリカーゼ遺伝子異常により、発症するRothmund-Thomson症候群、Werner症候群などを鑑別する。Cockayne症候群、Fanconi症候群、毛細血管拡張性失調症、色素性乾皮症、先天性角化症などの遺伝子の複製・修復に関与する遺伝子の障害による疾患が、一部同様な表現型を有することから鑑別に上がる。しかし、姉妹染色分体組換えの頻度の上昇は、Bloom症候群に特徴的である。以上の知見を基にして、厚生労働省の難治性疾患克服事業の一環として、Bloom症候群の診断指針を作成した(図2)。

6. 治療と予後

対症療法が基本となる。発癌に対して早期に発見し、早期に治療することが基本方針である。血液検査、各種の画像検査を定期的に行う。放射線感受性がataxia-telangiectasiaほどではないが認められるとの報告もあり、放射線を用いる検査は必要最低限とし、エコー、MRIなどを用いる。発癌した場合の治療法として、どのようなプロトコルを用いるかに関して、明らかなエビデンスはない。多くはその症例ごとに対応されている。抗癌剤に対する感受性が亢進していると考えられるため、著者らの症例も含めて通常のプロトコルの半量程度で行われるこ

臨床症状

- ・日光過敏性紅斑(多くは頬部に対称的)
- ・生下時からみられる均整のとれた小柄な体型
- ・免疫不全症(多くは抗体産生不全)
- ・発癌の既往

参考症状

- ・鳥様顔貌
- ・若年性白内障
- ・性腺機能低下(早期の閉経、不妊)
- ・糖尿病
- ・慢性肺疾患

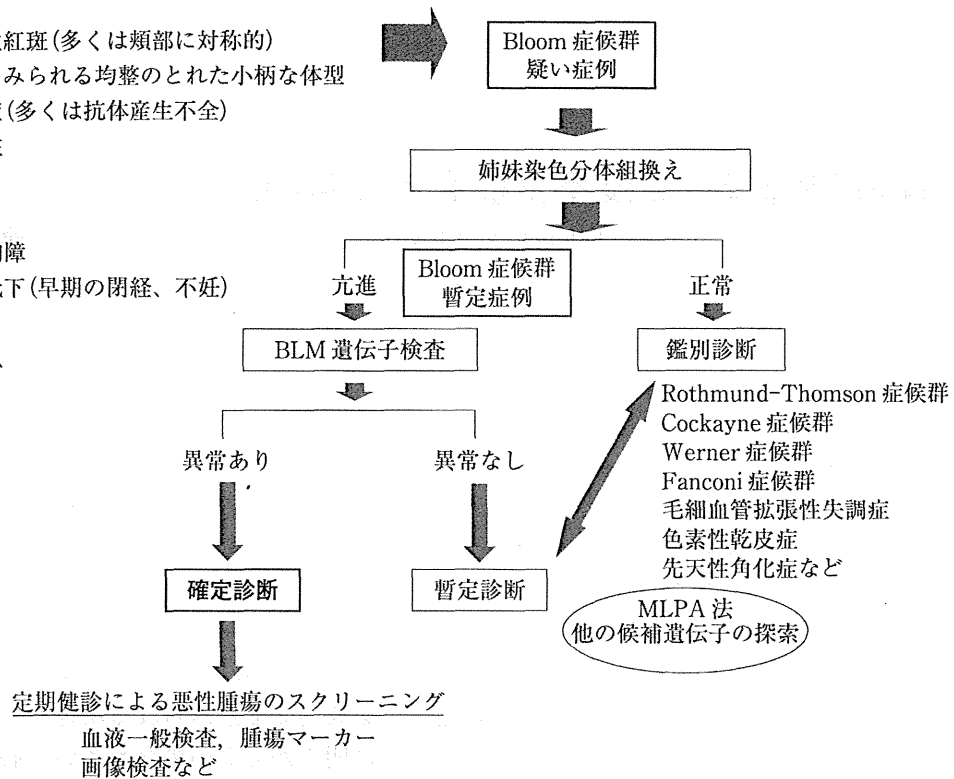


図2 Bloom 症候群診断指針

IV
リンパ球の異常

とが多い⁸⁾。今後、症例を集積しての検討が必要と考えられる。発癌に対して早期から対処す

ることで、QOLの向上、予後の改善につなげることができると考えられる。

■ 文 献

- 1) Bloom D: Congenital telangiectatic erythema resembling lupus erythematosus in dwarfs. *Am J Dis Child* 88: 754-758, 1954.
- 2) Ellis NA, et al: The Bloom syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83: 655-666, 1995.
- 3) German J: Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine (Baltimore)* 72: 393-406, 1993.
- 4) 金子英雄(研究代表者): 遺伝子修復異常症(Bloom 症候群, Rothmund-Thomson 症候群, RAPADILINO 症候群, Baller-Gerold 症候群)の実態調査, 早期診断法の確立に関する研究. 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業. 平成 23 年度 総括・分担研究報告書.
- 5) German J, et al: Syndrome-causing mutations of the BLM gene in persons in the Bloom's syndrome registry. *HumMutat* 28: 743-753, 2007.
- 6) Kaneko H, et al: BLM(the causative gene of Bloom syndrome) protein translocation into the nucleus by a nuclear localization signal. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 348-353, 1997.
- 7) Wang Y, et al: BASC, a super complex of BRACA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14: 927-939, 2000.
- 8) Kaneko H, Kondo N: Clinical features of Bloom syndrome and function of the causative gene, BLM helicase. *Expert Rev Mol Diagn* 4: 393-401, 2004.

Column 3

DNA 修復障害

DNA 修復に関する遺伝子群として、組織非特異的に細胞全般に機能しているものと、リンパ球の遺伝子組み換えに限定して機能しているものがある。リンパ球の遺伝子組み換えに限定して機能している DNA 修復遺伝子は、免疫系の特徴の一つである抗原特異的な受容体の構築に関与している。T 細胞、B 細胞は抗原特異的な受容体を発現しており、それぞれ T 細胞受容体、B 細胞受容体（免疫グロブリン）とよばれる。それぞれの受容体は特異性を獲得するために遺伝子組み換えを行う。この過程は DNA の 2 本鎖切断と結合を伴う。

この遺伝子組み換えに関与している RAG 遺伝子の発現はリンパ球系細胞に限定されていることから、障害はリンパ球系細胞に限定されておこる。そのため、RAG の機能低下は重症複合免疫不全症（severe combined immunodeficiency : SCID）の表現型を示す。その意味では、RAG 遺伝子異常なども DNA 修復障害に含まれるが、本稿ではリンパ球系のみ限定せず、細胞全般の DNA 修復に関する遺伝子群の異常について解説する。

DNA 修復障害を有する疾患としては、毛細血管拡張性小脳失調症（ataxia-telangiectasia）、Nijmegen

breakage 症候群、Bloom 症候群などが含まれる。それぞれの病因遺伝子産物の機能が低下することにより、細胞周期のチェックポイントの障害、DNA の 2 本鎖切断の修復障害、相同組み換えの障害などが生じる。

遺伝子修復異常により免疫不全が生じる病態は、以下のように考えられている。細胞はつねに、紫外線、放射線、フリーラジカルなどによって、その DNA に障害が生じている。障害が修復されずに細胞周期が進んでしまうと、その細胞はアポトーシスが誘導され排除される。細胞の増殖が活発な免疫系の細胞では DNA 修復障害が免疫組織全体に及ぼす影響が大きく、免疫細胞の多様性、クローンの増殖が十分に維持されず免疫不全の状態になると想定されている。DNA の障害を有したまま細胞周期が進むことは同時に発がん遺伝子の活性化が誘導されやすく、高発がんを伴う。これが DNA 修復障害を有する疾患の特徴であり、このことから遺伝性高発がん症候群とよばれることもある。

（金子英雄）

毛細血管拡張性小脳失調症 (ataxia-telangiectasia)

概念

毛細血管拡張性小脳失調症 (ataxia-telangiectasia : A-T, OMIM : 604391) は進行性の小脳失調, 眼球の毛細血管拡張, 免疫不全などを特徴とする常染色体劣性の遺伝性疾患である。A-T はセリン, スレオニン蛋白キナーゼの 1 種で 2 本鎖 DNA 障害修復に重要な ataxia telangiectasia-mutated (ATM) の機能欠損による疾患であると定義することができる。

A-T の責任遺伝子 ATM は 11q22.3 上に位置し, 全長約 150 kb で 66 エクソンをもつ巨大遺伝子である。3,056 アミノ C 酸をコードしており, 蛋白としても分子量は 350.6 kDa と巨大である¹⁾²⁾。C 末端に PI (phosphoinositide)-3 kinase ドメインをもち, TEL1, DNA-PKcs などと全体の構造も似ていることがわかっていてる。

ATM はセリン, スレオニン蛋白キナーゼ活性を有する。ATM にリン酸化を受ける蛋白として p53, chk2, c-abl, BRCA1, NBS-1, BLM などがある³⁾⁴⁾。放射線照射により生じた DNA の 2 本鎖切断のシグナルを受けて ATM は活性化され, p53 をリン酸化する。リン酸化された p53 は細胞周期の制御を行う。一方, ATM は NBS-1 をリン酸化し, Mre11, Rad50 を DNA の切断端にリクルートし, 2 本鎖 DNA の切断が修復される。ATM は相同組み換えよりも非相同組み換えによる修復により重要であると考えられている⁵⁾。A-T 由来の細胞は放射線照射に対して細胞死の増加, 特異的な染色体異常の増加, 細胞周期チェックポイントの異常, アポトーシスの異常などを示す。

症状

1. 進行性小脳失調

もともと明らかな臨床像である。歩き始めの頃から失調が目立ち始める。2~4 歳頃までいったん神経学的に改善がみられることもあるが, その後, 再び失調は進行し始める。不明瞭言語や oculomotor

apraxia (視野を横切るものを追跡できない), 舞踏アテトーゼ (choreoathetosis) も認められる。通常, 10 歳までには車いす生活となる。筋力は最初正常だが, 廃用性の萎縮をきたす。知能は正常であるが, 運動, 言語の反応が遅いため IQ テストでの評価はむずかしい。小脳の萎縮がかなり早くから認められ, MRI では 7~8 歳から小脳が小さいという所見が得られる。これに対応して, Purkinje 細胞の消失と顆粒細胞の減少がみられる。

2. 免疫不全と易感染性

A-T 患者の 60~80% に免疫不全が認められるが, 進行性ではない。肺炎球菌多糖体ワクチンへの抗体産生不全がしばしばみられ, 血清中の IgA, IgE, IgG2 が低い。約 30% の症例では T 細胞不全を伴い, phytohaemagglutinin (PHA) に対する T 細胞の反応性の低下⁶⁾, 遅延型過敏反応の減弱が認められる。気道感染を繰り返す, 慢性気管支拡張症をきたす。

3. 毛細血管拡張

毛細血管拡張は 5 歳までに, 眼球結膜, 耳介などに出現することが多い。美容上, 問題となるが, 出血や瘙痒は伴わず, 年齢によっても変化がみられないことが多い。

検査所見

進行性の小脳失調, 眼球の毛細血管拡張, 血清 α -fetoprotein (AFP) の上昇がそろえば, 本症と臨床診断することは比較的容易である。確定診断には ATM 蛋白の欠損もしくは機能障害, 遺伝子変異の証明が必要となる。また, 培養細胞による放射線高感受性の検査も診断に有用であり, 小脳失調, 血清 AFP の著しい高値, 培養細胞による放射線高感受性がそろえば A-T と診断できるとされている。

1. 血清 AFP

95% 以上の患者において 10 ng/mL 以上に上昇している。しかし, 生後 24 カ月以内の正常小児でも AFP は高値を呈するため注意が必要である。

2. 染色体異常

7番染色体と14番染色体の相互転座が5~15%のA-T患者の末梢血で認められる⁷⁾。A-T患者のリンパ球はPHAに反応しにくく、通常の染色体検査がむずかしいことがある。

鑑別診断と確定診断

1. ATM蛋白のイムノブロット

確定診断にもっとも有用なのはATM蛋白のイムノブロットであり、80~90%のA-T患者ではATM蛋白が検出できない⁸⁾⁹⁾。そして約10%のA-T患者ではATM蛋白が著しく減少しており、1%のA-T患者は正常と同量量のATM蛋白をもつ。リンパ芽球(Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid cell line)がもっとも信頼できる検体である。しかし、A-T患者においてはこのcell lineが作製しにくいこともある。

2. ATM遺伝子診断

ゲノムレベルもしくはcDNAレベルのどちらの解析でも、ATM遺伝子では一般にコモン変異はないとされている。筆者らが日本人のA-T症例の遺伝子解析を行ったところ、10家系20アレル中、7883del5, IVS33+2(T>A)の2変異で9アレルとほぼ半数を占め、比較的、共通変異である可能性が示唆された¹⁰⁾。

3. 鑑別疾患

A-Tの診断には臨床像の小脳失調症(発症時期が重要)、AFP高値、毛細血管拡張、発がんなどの組み合わせが重要である。しかし、眼球結膜の毛細血管拡張が明らかでない年少児においては診断がむずかしい。もし、重度の精神発達遅滞やけいれん、非進行性失調、小頭症などがあればA-Tの診断は疑わしい。臨床症状や細胞学的特徴がA-Tと類似しているNijmegen breakage症候群¹¹⁾、A-T様疾患(A-T like disorder: ATLD)といわれる疾患との鑑別が必要である。

治療

小脳失調や不明瞭発語の進行を遅らせる確立された治療はない。頻回反復感染をきたす患者では、免疫グロブリン置換療法は感染の機会を減らすので考慮すべきである。感染に対しては抗菌薬を用いる。早期からの継続的な理学療法は、拘縮を最小限にするために行うほうがよい。言語療法も必要である。通常、10歳代で車いすでの生活が必要となる。抗酸

化薬(たとえばビタミンE、 α -リポ酸)はまだヒトでのエビデンスに乏しいが、治療薬として期待されている。遺伝子治療、幹細胞移植は研究段階である。

A-T保因者の発がんリスクは一般集団の約4倍で、乳がんがもっとも多い。最近、ATMのミスセンス変異を有する保因者に乳がんの発生率が高いという報告がされた。保因者も定期的に発がんの有無につきモニターするのが望ましい。

予後

この20年でA-T患者の平均寿命はかなり改善した。40歳代、50歳代まで生存する場合もある。年齢が高くなると呼吸不全が主死因となる。

文献

- 1) Savitsky K, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995; **268**: 1749-1753
- 2) Savitsky K, et al. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 2025-2032
- 3) Beamish H, et al. Functional link between BLM defective in Bloom's syndrome and the ataxia-telangiectasia mutated protein, ATM. *J Biol Chem* 2002; **277**: 30515-30523
- 4) Fukao T, et al. Disruption of the BLM gene in ATM⁰ null DT40 cells does not exacerbate either phenotype. *Oncogene* 2004; **23**: 1498-1506
- 5) Orii KE, et al. Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 10017-10022
- 6) Kondo N, et al. Defective calcium-dependent signal transduction in T lymphocytes of ataxia-telangiectasia. *Scand J Immunol* 1993; **38**: 45-48
- 7) Lipkowitz S, et al. Hybrid T cell receptor genes formed by inter-locus recombination in normal and ataxia-telangiectasia lymphocytes. *J Exp Med* 1990; **172**: 409-418
- 8) Fukao T, et al. ATM is upregulated during the mitogenic response in peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 1999; **94**: 1998-2006
- 9) Fukao T, et al. Immunoblot analysis for laboratory diagnosis of ataxia-telangiectasia: Use of Epstein-Barr virus-transformed or phytohemagglutinin-stimulated lymphoblasts for detection of ATM protein. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2000; **10**: 36-40
- 10) Fukao T, et al. Ataxia-telangiectasia in the Japanese population: identification of R1917X, W2491R, R2909G, IVS33+2--->A, and 7883del5, the latter two being relatively common mutations. *Hum Mutat* 1998; **12**: 338-343
- 11) Demuth I, et al. The clinical manifestation of a defective response to DNA double-strand breaks as exemplified by Nijmegen breakage syndrome. *Oncogene* 2007; **26**: 7792-7798

(金子英雄)

Column 3-2

Bloom 症候群

📖 概念・定義

Bloom 症候群 (OMIM : 210900) は、生下時からの小柄な体型、日光過敏性紅斑、免疫不全症を特徴とする常染色体劣性の遺伝性疾患である¹⁾。なかでも際立った特徴は、がん腫の合併が高率に認められることである。欧米の報告では、20 歳代までに約半数がなんらかのがん腫を合併すると報告されている。病因遺伝子は、遺伝子の複製・修復に必須な RecQ ヘリカーゼファミリーに属する *BLM* 遺伝子である²⁾。RecQ ヘリカーゼファミリーには、早老症を特徴とする Werner 症候群の病因遺伝子 *WRN* や、小柄な体型、特徴的な皮疹 (poikiloderma) を示す Rothmund-Thomson 症候群の病因遺伝子 *RecQL4* が属している。Bloom 症候群は遺伝性高発がん症候群、家族性腫瘍、ヘリカーゼ病、遺伝子修復異常症、染色体脆弱症候群といった区分に分類されることが多い³⁾。

厚生労働省難治性疾患克服事業で、全国の小児科、皮膚科、がん診療拠点病院にアンケートを送り集計したところ、わが国では 9 家系 10 症例の Bloom 症候群の確定例を把握している⁴⁾。アシュケナージ系ユダヤ人では保因者が約 100 人に 1 人とされている。German らが行っている世界の Bloom 症候群の登録では、134 人が登録されている⁵⁾。

Bloom 症候群は RecQ ヘリカーゼファミリーに属する *BLM* 遺伝子の障害により発症する。*BLM* 遺伝子は 15q26.1 に位置し、1,417 個のアミノ酸をコードしている。分子量は約 160 kD であり、中央にヘリカーゼモチーフを、C 末端に basic なアミノ酸領域を有し、核移行シグナルとして機能している⁶⁾。わが国の Bloom 症候群患者の *BLM* 遺伝子変異を解析したところ、16 アレル中 9 アレルが 631delCAA だった。わが国に共通な遺伝子変異と考えられた。アシュケナージ系ユダヤ人には *BLMash* とよばれる 2281delATCTGainsTAGATTC の共通変異が認められる。*BLM* 蛋白は姉妹相同組み換えの抑制に必須の

蛋白である。また、*BLM* の障害されている細胞では姉妹相同組み換え以外の染色体異常も生じやすい。

BLM 蛋白は他の遺伝子の複製・修復にかかわる蛋白と複合体を形成して機能している⁷⁾。

📖 症状

日光過敏性紅斑 (多くは頬部に対称的) を呈するが、加齢に伴い消失することもある。生下時からみられる均整のとれた小柄な体型が認められる。多くの症例は、生下時の体重が 2,500 g 未満の低出生体重児である。免疫不全症も特徴とされているが、わが国での集計では易感染の程度はそれほど強くなかった。また、骨髄異形成症候群が 2 例に認められていた。鳥様顔貌といわれる特徴的な顔貌が認められることもある。糖尿病は 10 例中 5 例に認められ、特徴的な合併症である。1 型糖尿病、2 型糖尿病とも認められていた。性腺機能低下 (早期の閉経、不妊)、若年性白内障、慢性肺疾患も本症を疑わせる所見となる。欧米の報告では、基礎疾患を有しない各年齢に発症するがん腫の発症がすべて高率になるとされている。すなわち若年では、白血病・リンパ腫などの肉腫が高率に認められ、成人以降は、大腸がん、肺がんといった上皮系の腫瘍が高率に発症するとされている。わが国の集計では、10 例中 6 例に B 細胞系のリンパ腫が認められた。

📖 検査所見

血清 IgM 50 mg/dL 以下の低値を示す場合が半数以上に認められ、Bloom 症候群の免疫不全の特徴と考えられた。Bloom 症候群を疑った場合は、姉妹染色体体組み換えの頻度の検査を行う。組み換えの頻度は、Bloom 症候群では健常人と比較して数十倍に増加している。

📖 鑑別診断と確定診断

姉妹染色体体組み換えの頻度に上昇が認められた場合は、暫定的に Bloom 症候群とする。最終的には *BLM* 遺伝子の検索を行い、確定診断とする。鑑別す

べき疾患としては、RecQヘリカーゼ遺伝子異常により発症するRothmund-Thomson症候群、Werner症候群などがあげられる。また、Cockayne症候群、Fanconi症候群、毛細血管拡張性小脳失調症 (ataxia-telangiectasia : A-T)、色素性乾皮症、先天性角化異常症などの遺伝子の複製・修復に関与する遺伝子の障害による疾患が、一部同様な表現型を有することから鑑別にあがる。しかし、姉妹染色分体組み換えの頻度の上昇はBloom症候群に特徴的である。

📖 治療と予後

対症療法が基本となる。発がんに対して早期に発見し、早期に治療することが基本方針である。血液検査、各種の画像検査を定期的に行う。放射線感受性がA-Tほどではないが認められるとの報告もあり、放射線を用いる検査は必要最低限とし、画像検査には超音波やMRIなどを用いる。発がんした場合の治療法としては、どのようなプロトコルを用いるかに関して明らかなエビデンスはない。多くはその症例ごとに対応されている。抗腫瘍薬に対する感受性が亢進していると考えられるため、筆者らの症例も含め、通常のプロトコルの半量程度で行われることが多い⁸⁾。今後、症例を集積しての検討が必要と考えられる。発がんに対して早期から対処する

ことで、QOLの向上、予後の改善につなげることができると考えられる。

📖 文献

- 1) Bloom D. Congenital telangiectatic erythema resembling lupus erythematosus in dwarfs. *Am J Dis Child* 1954 ; **88** : 754-758
- 2) Ellis NA, et al. The Bloom syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 1995 ; **83** : 655-666
- 3) German J. Bloom syndrome : a Mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine* 1993 ; **72** : 393-406
- 4) 「遺伝子修復異常症 (Bloom症候群, Rothmund-Thomson症候群, RAPADILINO症候群, Baller-Gerold症候群) の実態調査、早期診断法の確立に関する研究」班. 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 平成23年度総括・分担研究報告書. 研究代表者: 金子英雄, 2012
- 5) German J, et al. Syndrome-causing mutations of the BLM gene in persons in the Bloom's syndrome registry. *Hum Mutat* 2007 ; **28** : 743-753
- 6) Kaneko H, et al. BLM (the causative gene of Bloom syndrome) protein translocation into the nucleus by a nuclear localization signal. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 ; **240** : 348-353
- 7) Wang Y, et al. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 2000 ; **14** : 927-939
- 8) Kaneko H, et al. Clinical features of Bloom syndrome and function of the causative gene, BLM helicase. *Expert Rev Mol Diagn* 2004 ; **4** : 393-401

(金子英雄)

In Vitro Analysis of the Functional Effects of an *NLRP3* G809S Variant with the co-Existence of *MEFV* Haplotype Variants in Atypical Autoinflammatory Syndrome

Kazuo Kubota · Hidenori Ohnishi · Takahide Teramoto · Eiko Matsui · Kana Murase · Hiroyuki Kanoh · Zenichiro Kato · Hideo Kaneko · Mariko Seishima · Naomi Kondo

Received: 24 July 2012 / Accepted: 17 September 2012
© Springer Science+Business Media New York 2012

Abstract

Purpose Hereditary periodic fever syndromes have been considered monogenic diseases. However, some recent reports have described patients with co-existence of recurrent fever responsible genes. This study assessed whether a rare variant, found in Japanese children showing atypical autoinflammatory syndrome, located in the leucine-rich repeat domain of Nod-like receptor family, pyrin domain containing 3 (*NLRP3*) with co-existence of Mediterranean fever (*MEFV*) haplotype variants may contribute to a proinflammatory phenotype using a systematic approach.

Methods Cytokine production in serum or from peripheral blood monocytes was measured by ELISA. DNA sequence analysis of genes including *NLRP3*, *MEFV*, mevalonate kinase (*MVK*), and tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A (*TNFRSF1A*) were performed on patient samples. In vitro functional assays determined the effects of the *NLRP3* variants and pyrin using NF- κ B activation and speck formation assays.

Results A heterozygous genetic variant of *NLRP3*, G809S, was found in samples from both patients. Additionally the previously reported heterozygous *MEFV* variants (P369S-R408Q or E148Q-P369S-R408Q) were also detected in both patients. Serum IL-1ra and sTNFR1 levels increased in the attack phase of the disease in both patients. The production levels of IL-1 β from monocytes isolated from both cases were elevated following LPS and IFN- γ stimulation. The *NLRP3* G809S variant demonstrated no increase of NF- κ B activity following monosodium urate stimulation, whereas it significantly increased speck formation by interacting with apoptosis-associated speck-like protein with caspase recruitment domain.

Conclusions The phenotype of atypical autoinflammatory disease in patients could be modified by a synergistic effect with two other variants of autoinflammatory-associated genes.

Keywords *NLRP3* · leucine-rich repeat domain · autoinflammatory disease · ASC

K. Kubota · H. Ohnishi (✉) · T. Teramoto · E. Matsui · Z. Kato · N. Kondo

Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine,
Gifu University,
1-1 Yanagido,
Gifu 501-1194, Japan
e-mail: ohnishih@gifu-u.ac.jp

K. Murase · H. Kanoh · M. Seishima
Department of Dermatology, Graduate School of Medicine,
Gifu University,
Gifu, Japan

H. Kaneko
Department of Clinical Research, Nagara Medical Center,
Gifu, Japan

Abbreviations

ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
CAPS	Cryopyrin-associated periodic syndrome
CINCA	Chronic infantile neurologic cutaneous, articular
FCAS	Familial cold-induced autoinflammatory syndrome
FMF	Familial Mediterranean fever
HEK	Human embryonic kidney
IL	Interleukin
<i>MEFV</i>	Mediterranean fever

<i>MVK</i>	Mevalonate kinase
<i>MWS</i>	Muckle–Wells syndrome
<i>MSU</i>	Monosodium urate
<i>NBS</i>	Nucleotide-binding site
<i>NLRP3</i>	Nod-like receptor family pyrin domain containing 3
<i>NOMID</i>	Neonatal-onset multisystem inflammatory disease
<i>PAMPs</i>	Pathogen-associated molecular patterns
<i>PBMCs</i>	Peripheral blood mononuclear cells
<i>TNFRSF1A</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A
<i>TRAPS</i>	Tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome

Introduction

Autoinflammatory syndromes are characterized by systemic inflammation without the presence of antigen-specific T cells or high-titers of autoantibodies [1]. Many autoinflammatory syndromes are clinically characterized by recurrent or persistent features that include fever, elevation in the levels of acute-phase reactants, and organ-specific complications such as skin rashes and osteoarticular, serosal, neurologic, and ocular manifestations [2]. To date, well-known hereditary periodic fever syndromes are familial Mediterranean fever (FMF), hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome, cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS), and tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated periodic syndrome (TRAPS). These syndromes are discriminated by some characteristic phenotypes such as varying age of onset, duration of fever, development of cutaneous manifestations, and several other features.

CAPS include familial cold-induced autoinflammatory syndrome (FCAS), Muckle–Wells syndrome (MWS), and neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID), also known as chronic infantile neurologic, cutaneous, articular (CINCA) syndrome. FCAS exhibits cold-induced urticaria-like skin rash whereas MWS develops severe phenotypes, such as periodic fever, neural progressive hearing loss and renal amyloidosis. CINCA/NOMID syndrome shows additional more severe phenotypes, such as severe arthritis, patella overgrowth, aseptic meningitis, and mental retardation [3]. CAPS are caused by mutations in the Nod-like receptors (NLRs) family, pyrin domain containing 3 (*NLRP3*) gene, and more than 80 variants are associated with CAPS, in addition to over 50 variants of unclear significance that have been reported in the INFEVERS database (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/>) to date [4].

NLRs recognize microbial molecules such as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or endogenous

danger-associated molecular patterns, which trigger inflammation as well as Toll-like receptor immune responses. *NLRP3* protein contains an N-terminal pyrin domain, a central nucleotide-binding site (NBS) domain, and C-terminal leucine-rich repeats (LRR) [5]. Most pathogenic mutations associated with autoinflammatory syndromes are located in exon 3 of *NLRP3*, which encodes the NBS domain. In addition, several mutations outside exon 3 on the LRR domain of *NLRP3*, such as G755R, G755A, and Y859C have been found in patients with CINCA syndrome or atypical autoinflammatory disorders [6–8].

This study reports two cases of Japanese children who presented with atypical periodic fever episodes and who had the variants in the LRR domain of *NLRP3* with co-existence of Mediterranean fever (*MEFV*) haplotype variants. The patients showed periodic prolonged fever and erythema, but lacked symptoms typical of CAPS, FMF, and other common autoinflammatory syndromes. By genetic analysis and functional assays of these variants, the data from this study suggest that the phenotype of atypical autoinflammatory disease in patients could be modified by a synergistic effect with other autoinflammatory-associated genes.

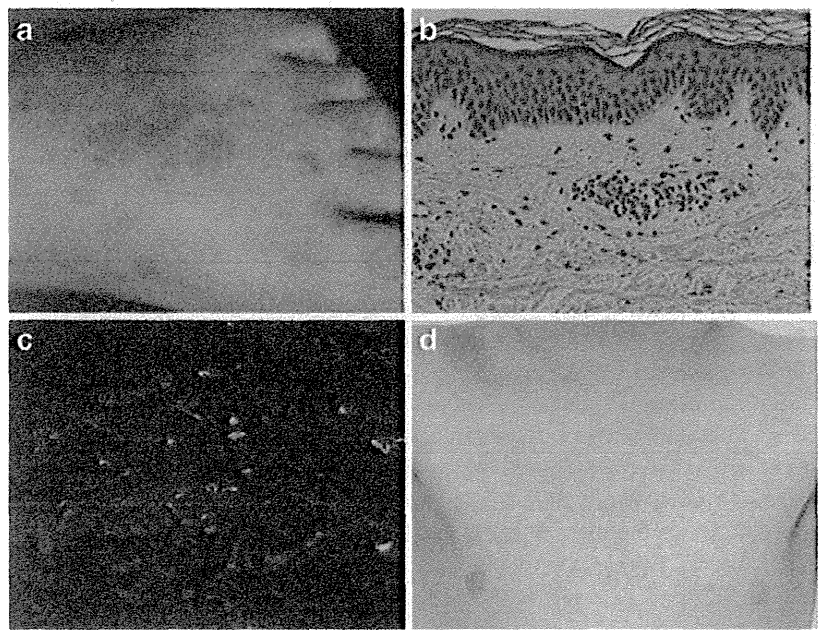
Methods

Subjects

Case 1

The first case was a 9-year-old girl who had experienced recurrent fever episodes approximately three times a year for 6 years from onset at 3 years of age. Although she underwent a tonsillectomy at the age of 5, she still experienced recurrent fever episodes. She presented with mild abdominal pain without signs of peritoneal irritation, peritonitis or pleuritis as typically observed in FMF. High serum C-reactive protein (CRP) levels were observed in the attack phase. She presented with pigmented macules with erythema, which persisted for 6 months, and bilateral petechiae on her legs and dorsa of feet (Fig. 1a). Histological examination of the skin lesion revealed perivascular infiltrate with mononuclear cells in the upper and middle dermis, but vasculitis was not observed (Fig. 1b). Direct immunofluorescence analysis revealed deposits of complement component 3 (C3) at the capillary walls in the upper to middle dermis, but not the presence of immunoglobulin (Ig)A or IgM (Fig. 1c). Rheumatoid factor and autoantibodies were not detected. Colchicine treatment (0.5 mg per day) was effective in treating the erythema and alleviating fever with elevating CRP. Both parents had experienced lasting recurrent fever episodes during their childhood although it was likely that their symptoms were not so severe. The fever episodes of parents resolved spontaneously without specific

Fig. 1 Presence of skin rash in patients with atypical autoinflammatory syndrome. **a** The clinical appearance of rash on the dorsum of foot in case 1. **b** The histopathological examination of a skin biopsy specimen (hematoxylin and eosin stain, original magnification $\times 200$). Perivascular infiltrate with mononuclear cells was observed in the upper and middle dermis. **c** Direct immunofluorescence demonstrates C3 deposits in the capillary walls (original magnification $\times 50$). **d** The clinical appearance of the skin rash on the breast in case 2



medications such as colchicines and corticosteroids or tonsillectomy when they were about 10 years old. However, they do not remember their childhood in detail as it was over 30 years ago. Their episodes may represent autoinflammatory disease.

Case 2

The second case involved a 4-year-old boy, presenting with recurrent episodes of fever of various duration from a few days to weeks, with or without mild liver dysfunction and multiple erythema without skin itch. The frequency of episodes was at least twice a year. The skin erythema was observed during the fever episodes at 18 months old and at 4 years old (Fig. 1d). The cervical lymphadenopathy and diarrhea were observed in almost all of the fever attack episodes. Although fever duration was 1 week, it resolved immediately following oral administration of 1 mg/kg prednisolone. Rheumatoid factor and autoantibodies were not detected. His parents had no symptoms like periodic fever syndromes or rheumatic diseases. The fever did not recur for a few months after the cessation of oral prednisolone treatment. From 3 years old, colchicine treatment was started because of recurrent fever attacks. However, currently this treatment is not effective.

The genotypes and the clinical profiles of these cases are summarized in Table I. This study was performed according to the Helsinki Declaration. All subjects provided informed consent to participate in the study.

DNA Sequencing

Genomic DNA was extracted from leukocytes using SepaGene (EIDIA, Tokyo, Japan). DNA fragments of the *NLRP3*, *MEFV*, mevalonate kinase (*MVK*), and TNF

receptor superfamily, member 1A (*TNFRSF1A*) genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR), and analyzed using big dye terminator bidirectional sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Table I Genotype and clinical profiles of cases

	Case 1	Case 2
Initial diagnosis	FMF	TRAPS
Gender	Female	Male
Clinical features		
Age at onset of attacks	3 years	6 months
Duration of episodes	3–5 days	>1 week
Fever	Yes	Yes
Abdominal signs	Yes	Yes
Arthralgia	No	No
Lymphatic signs	No	Yes
Cutaneous manifestations	persistence of rash (pigmented erythema with petechiae)	Two episodes of rash
Hearing loss	No	No
Neurologic signs	No	No
Proteinuria	No	No
Laboratory findings		
WBC (μl)	11,800	14,620
CRP (mg/dl)	10.1	3.1
ESR (mm/h)	45	32
NLRP3 Genotype	G809S	G809S
MEFV Genotype	P369S, R408Q	E148Q, P369S, R408Q

CRP the serum C-reactive protein level. WBC white blood cells. ESR erythrocytes sedimentation rate. Laboratory findings were the data in the attack phase

Genotyping

Allelic frequency of NLRP3 G809S (rs141389711) was investigated on a Step One Real-Time PCR System using Custom TaqMan SNP Genotyping assays (Applied Biosystems) in 421 healthy subjects. Further, genotype was confirmed by direct sequence analysis.

Cell Culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized blood of control donors and from patients by gradient centrifugation using Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The CD14-positive cells were cultured in medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS), L-glutamine (2 mmol/l), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml). Human embryonic kidney (HEK) 293 T cells and HEK293-ASC cells were cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10 % heat-inactivated FCS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 µg/mL).

Analysis of Serum Cytokine Levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Serum samples of patients and controls were stored at -80°C until assayed. TNF- α concentrations were measured with an Immunoassay Kit (BioSource International, Carlsbad, CA, USA) with a detection limit of 1.7 pg/ml. Similarly, interleukin (IL)-6 and IL-1 β concentrations were measured by immunoassay kit (BioSource) with detection limits of 1.7 pg/ml and 1.0 pg/ml, respectively. IL-1ra and sTNFR1 concentrations were measured by ELISA (R&D Systems) with detection limits of 6.26 pg/ml and 0.77 pg/ml, respectively. IL-18 was assayed by ELISA (MBL, Nagoya, Japan), with a detection limit of 25.6 pg/ml. We defined serum cytokine levels of more than the mean + 2 SD as increasing. Values below the detection limit are shown as not detected.

IL-1 β Production from Monocytes

CD14-positive cells were purified from PBMCs using CD14 MACS MicroBeads and MACS magnetic columns according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany). The CD14 positive cells were seeded to a density of 3.0×10^5 per ml and cultured with the addition of 1.0 µg/mL LPS O127 (Sigma-Aldrich) and 20 µg/ml IFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for 24 h at 37°C in a humidified atmosphere at 5 % CO_2 and pulsed with 5 mM ATP (Sigma-Aldrich) for 30 min before harvesting. The cell-culture supernatants were harvested, and stored at -80°C until

assayed. The IL-1 β was measured with ELISA. The assay was performed at two different times. The statistical significance between control and each case in the IL-1 β production was analyzed using Dunnett's multiple comparison test. *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

Vector Preparations

cDNA encoding NLRP3 tagged at the C-terminus with a FLAG-epitope (NLRP3-FLAG) was cloned into plasmid pcDNA3.1+ (Invitrogen). NLRP3 mutants (D303N, G755R, G809S and Y859C) were generated using the GeneEditor *In vitro* Site-Directed Mutagenesis System (Promega, Madison, WI, USA). A cDNA encoding pyrin tagged at the C-terminus with an HA-epitope (pyrin-HA) was cloned into plasmid pcDNA3.1+. Pyrin variants (P369S+R408Q) were generated using the GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System (Promega). The apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) variant 1 tagged at the C-terminus with a myc-epitope (ASC1-myc) construct was cloned into pcDNA3.1+. The NF- κ B luciferase reporter vector (pGL4.32-luc2P/NF-kappaB-RE/Hygro) and the Renilla luciferase reporter vector (pGL4.74-hRluc/TK) were purchased from Promega.

NF- κ B Reporter Gene Activity

HEK293T cells were transfected with 16 ng per well of pcDNA3.1+ control vector or pcDNA3.1+ NLRP3-FLAG (wild type or mutant) or pcDNA3.1+ pyrin-HA (wild type or mutant) in 96-well plates using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The pcDNA3.1+ ASC1-myc, NF- κ B luciferase reporter, and Renilla luciferase reporter were co-transfected. After transfection, cells were incubated for 24 h. Cells were stimulated with R837 at a concentration of 10 µg/ml (InvivoGen, San Diego, CA, USA) or monosodium urate (MSU) at 250 µg/ml (InvivoGen) for 8 h. Luciferase reporter activity was analyzed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). The statistical significance of differences in luciferase activity between wild-type and mutant gene activity in the NF- κ B reporter assays was analyzed using Dunnett's multiple comparison test. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

Speck Quantification Assay

HEK293 cells were transfected with ASC-myc and positively selected using 1 mg/ml G418 for 4 weeks. HEK293-ASC cells (1×10^5) were co-transfected with 250 ng of each NLRP3 expression plasmid and pyrin expression plasmid using Lipofectamine LTX (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 24-h incubation, cells were fixed with 3.7 % paraformaldehyde in PBS for 10 min,

and washed with 10 mM glycine in PBS. Fixed cells were permeabilized using PBS containing 0.2 % Triton X-100 for 1 h at room temperature. Cells were then incubated with an anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma-Aldrich) and anti-myc antibody (Invitrogen). Primary antibody binding was detected by incubation with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen) secondary antibodies. Fixed cells were incubated with 4'-6-diamidino-2-phenylindole, a nuclear stain, and mounted using Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories Burlingame, CA, USA). The percentage of cells containing ASC specks in the cells expressing *NLRP3* was calculated by randomly selecting at least 10 fields. Differences were analyzed using Dunnett's multiple comparison test. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Detection of *NLRP3* and *MEFV* Mutations in Two Patients with Autoinflammatory Syndrome

In case 1, a heterozygous c.2425G>A (p.Gly809Ser) on LRR in exon5 of *NLRP3* and heterozygous P369S-R408Q in exon3 of *MEFV* were identified (Table I). There are 17 individuals who have the allele of G809S in 421 healthy control subjects. The allele frequency of this variant was 0.02. There were no control subjects carrying P369S-R408Q in *MEFV* in addition to the G809S variant. Interestingly, the same *NLRP3* and *MEFV* haplotype variants were identified in the father of case 1. The heterozygous *MEFV* variant haplotype P369S-R408Q were also observed in the mother of case 1.

Case 2 expressed the same heterozygous *NLRP3* variant found in case 1. In addition, heterozygous E148Q-P369S-R408Q in exon2 and exon3 of *MEFV* were identified (Table I). The G809S variant of *NLRP3* was inherited from his asymptomatic father. His asymptomatic mother was positive for homozygous E148Q and heterozygous P369S-R408Q sequences.

MVK and *TNFRSF1A* mutations were not detected in either case.

The Cytokine Profile of Patients

Serum IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels were not detected in the sera of healthy control subjects. The mean concentration \pm SD of serum IL-18 and IL-1ra in healthy control subjects were 169.2 \pm 85.7 pg/ml and 213.4 \pm 87.1 pg/ml, respectively [9]. The mean concentration \pm SD of serum sTNFR1 in healthy control subjects was 1009 \pm 276.4 pg/ml. Figure 2a and b show the serum cytokine profiles from the patients. The serum cytokine concentrations were measured at two different points at least during fever and inter-ictal periods respectively, and average values were calculated. In both cases, serum IL-1 β ,

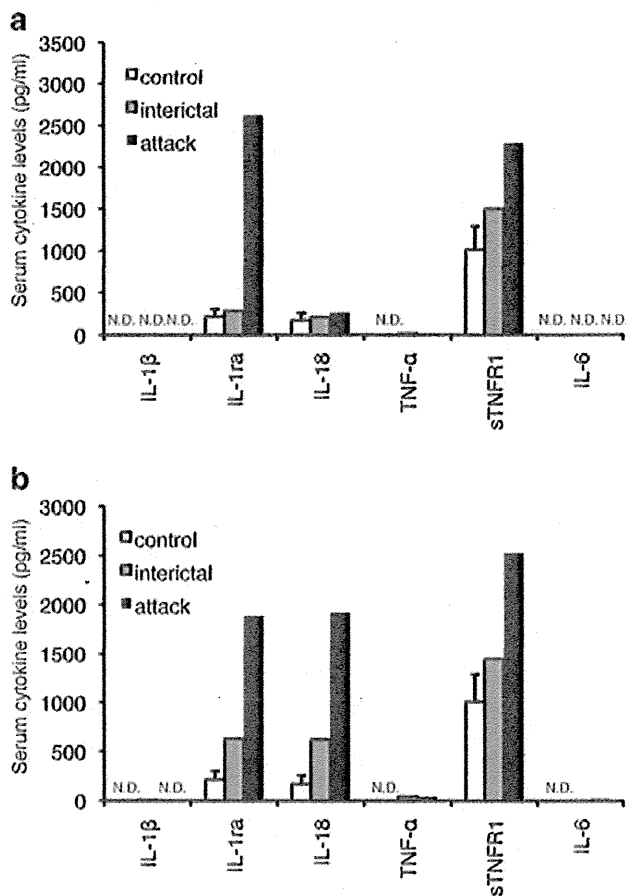


Fig. 2 Inflammatory cytokine levels from two cases during the inter-ictal phase and attack phase. **a** White bars indicate serum inflammatory cytokine levels of control. Grey bars indicate serum inflammatory cytokine levels of case 1 during the inter-ictal period. Black bars indicate serum inflammatory cytokine levels of case 1 during the attack phase. **b** White bars indicate serum inflammatory cytokine levels of control. Grey bars indicate serum inflammatory cytokine levels of case 2 during the inter-ictal period. Black bars indicate serum inflammatory cytokine levels of case 2 during the attack phase

TNF- α , and IL-6 did not increase during the fever episodes, whereas serum IL-1ra and sTNFR1 levels were increased. IL-18 levels during the fever episodes were increased in case 2, not in case 1. Interestingly, the serum IL-1ra and IL-18 levels from case 2 were elevated during the inter-ictal period.

Figure 3 shows the production of IL-1 β from monocytes with LPS, IFN- γ and/or ATP stimulation. The mean concentration \pm SD of IL-1 β from monocytes of healthy control subjects (*n*=5) without stimulation were 5.54 \pm 4.40 pg/ml. The mean concentration \pm SD of IL-1 β from monocytes of healthy control subjects stimulated with 20 ng/ml IFN- γ or 1 μ g/ml LPS were 7.74 \pm 9.81 pg/ml and 236.0 \pm 188.4 pg/ml, respectively. The mean concentration \pm SD of IL-1 β from monocytes of healthy control subjects stimulated with 1 μ g/ml LPS added 5 mM ATP was 166.0 \pm 138.3 pg/ml. The mean concentration \pm SD of IL-1 β from monocytes of healthy

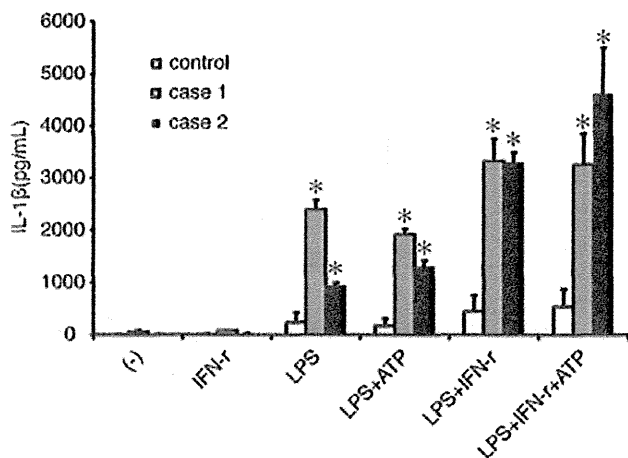


Fig. 3 IL-1 β levels from monocytes in case 1 and 2. White bars indicate IL-1 β levels in control. Grey bars indicate IL-1 β levels in case 1. Black bars indicate IL-1 β levels in case 2. IL-1 β levels from monocytes from case 1 and 2 were significantly increased compared with controls ($n=5$). * $P<0.05$

control subjects stimulated with both 20 ng/ml IFN- γ and 1 μ g/ml LPS were 441.3 \pm 316.5 pg/ml. The mean concentration \pm SD of IL-1 β from monocytes of healthy control subjects stimulated with both 20 ng/ml IFN- γ and 1 μ g/ml LPS added 5 mM ATP was 549.2 \pm 327.3 pg/ml. In both cases, IL-1 β secretion was increased compared with the healthy controls when the monocytes were stimulated with LPS and IFN- γ . Additionally, IL-1 β from monocytes in case 2 stimulated with LPS and IFN- γ was increased in response to ATP. This was not observed for monocytes from case 1.

NF- κ B Reporter Gene Activity of NLRP3 and Pyrin Variants

To assess the function of the *NLRP3* variant G809S on NF- κ B signaling, we compared the G809S sequence with those of wild-type and three *NLRP3* mutations (D303N, G755R and Y859C). D303N, G755R, and Y859C were identified in CAPS patients [6, 10, 11] (Fig. 4). When ASC was co-expressed, D303N and G755R mutations increased NF- κ B reporter gene activity. However, G809S and Y859C did not lead to significant activation of NF- κ B. In the presence of R837, an *NLRP3* inflammasome activator, *NLRP3* D303N and G755R mutations showed enhanced NF- κ B activation, whereas G809S and Y859C did not induce any increase in activity. Subsequently, the evaluation of G809S enhanced NF- κ B activation in the presence of MSU was measured. MSU induced NF- κ B activation of wild-type, D303N and G755R *NLRP3*. However, both G809S and Y859C mutations significantly inhibited NF- κ B activation mediated by MSU.

To investigate the role of mutational effect of pyrin in the NF- κ B signaling pathway, wild-type or variant pyrin (P369S+R408Q) was expressed in HEK293 cells and co-

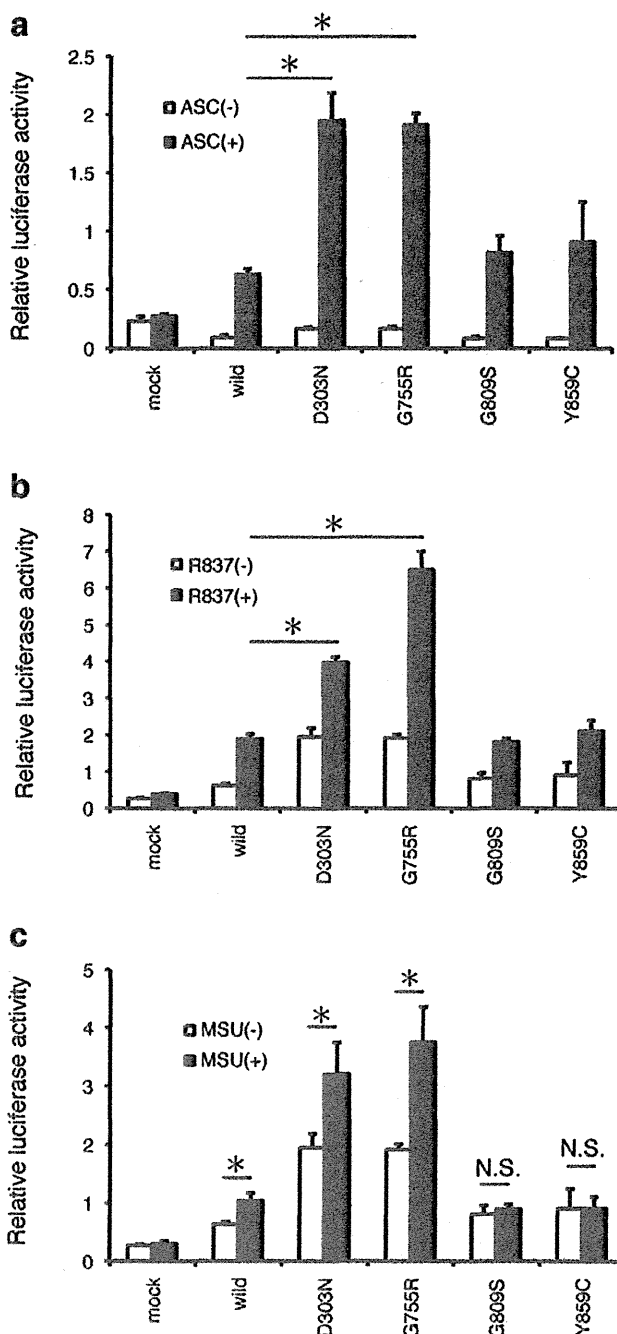


Fig. 4 NF- κ B reporter gene activity of *NLRP3* mutants. Bars represent the mean \pm SD of triplicate assays. **a** White bars indicate the NF- κ B reporter gene activity of the *NLRP3* mutants without co-transfection of ASC. Black bars indicate activity with co-transfection of ASC. ASC-dependent NF- κ B reporter gene activity was increased by mutants D303N and G755R. G809S and Y859C did not induce NF- κ B reporter gene activity. **b** White bars indicate NF- κ B reporter gene activity with co-transfection of ASC. Black bars indicate activity after stimulation with 10 μ g/ml R837. **c** White bars indicate NF- κ B reporter activity following co-transfection of ASC. Black bars indicate activity after stimulation with 250 μ g/ml MSU. * $P<0.05$

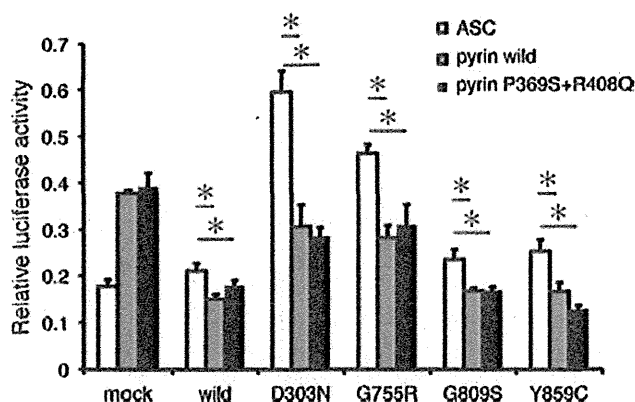


Fig. 5 Pyrin and *NLRP3* mutant-induced NF- κ B reporter gene activity. Bars represent the mean \pm SD of triplicate assays. White bars indicate NF- κ B reporter gene activity with co-transfection of ASC. Grey bars indicate activity with co-transfection of ASC and wild-type pyrin. Black bars indicate activity with co-transfection of ASC and pyrin variant P369S+R408Q. * $P < 0.05$

transfected with ASC (Fig. 5). Although both wild-type and variant pyrin inhibited NF- κ B activation with co-transfection of wild-type or mutant *NLRP3* protein, there was no significant difference in inhibitory capacity between the wild-type and variant pyrin.

Speck Quantification Assay

Previous studies have shown that *NLRP3* LRR variants have an increased ability to induce speck formation in the presence

of ASC [6, 12]. To test the effect of G809S on *NLRP3*-ASC interactions and speck formation, wild-type, *NLRP3* variants or empty vectors and pyrin were transiently transfected with cells stably expressing ASC. Cells transfected with *NLRP3* wild-type displayed speck formation (mean \pm SD, 36.7 \pm 6.1 %). In comparison, the *NLRP3* D303N, G755R, G809S and Y859C mutants induced significantly higher numbers of speck formation (62.1 \pm 8.8 %, 72.6 \pm 4.8 %, 53.1 \pm 10.1 % and 48.8 \pm 13.2 % respectively, Fig. 6).

Discussion

The current study identified a G809S variant within the LRR domain of *NLRP3* with the co-existence of *MEFV* haplotype variants in two unrelated patients with atypical autoinflammatory syndrome. Although we recently reported a CINCA/NOMID patient with the compound heterozygous gene mutations E688K and G809S, it is unclear whether G809S is a pathogenic mutation [9]. To confirm a functional role for the G809S variant, its effect on the NF- κ B signaling pathway was investigated in vitro. Although several variants of *NLRP3* show significant increases of ASC dependent NF- κ B reporter gene activity in a previous report and as data presented here, no significant increase was observed owing to the *NLRP3* G809S variant in this assay. Kambe et al. demonstrated that the *NLRP3* G755R mutation located within the LRR domain could induce significant NF- κ B activation in the presence of an *NLRP3* inflammasome activator, R837 [13]. Therefore,

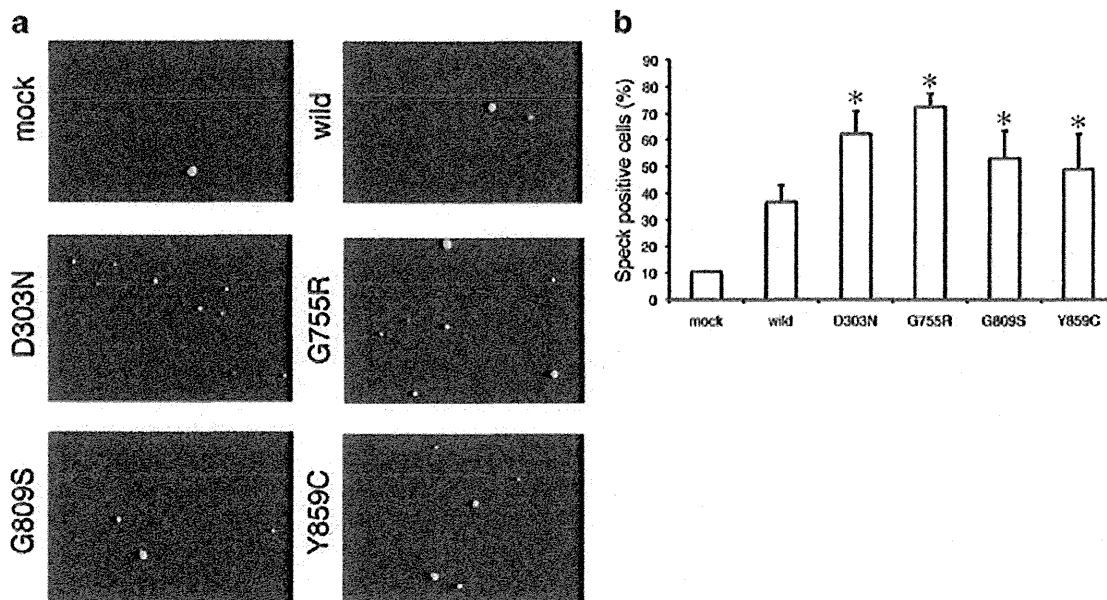


Fig. 6 Effect of the G809S variant on speck formation. Transfection of HEK293-ASC cells with 250 ng each of the *NLRP3* expression plasmids or an empty vector and pyrin expression plasmid was performed. Speck formation was assessed by immunofluorescence microscopy. a

This panel shows examples of fields obtained by immunofluorescence microscopy. b The percentage of cells containing ASC-myc specks was calculated as the mean \pm SD percentage of cells. * $P < 0.05$

G809S may be expected to enhance NF- κ B activation in the presence of R837. However, G809S did not increase NF- κ B activity like as Y859C [6] (Fig. 4b). Since the *NLRP3* LRR domain plays a central role in mediating inflammation induced by another inflammasome activator, MSU crystals, we examined whether G809S affected NF- κ B activation in the presence of MSU [14]. Interestingly, G809S and Y859C mutations did not show any NF- κ B activity responses by MSU stimulation. In contrast, wild-type, D303N and G755R mutations significantly increased NF- κ B activity following MSU stimulation. These data suggest the G809S LRR missense variant, which may diminish the responsiveness to PAMPs as NOD2 LRR variant reported in Crohn's disease, has a pathogenic effect on these pathways [15–17].

Jéru et al. recently identified a pathogenic Y859C mutation in the LRR domain of *NLRP3*, which increased speck formation and pro-caspase 1 processing, but which had no direct effect on *NLRP3* mediated NF- κ B signaling. The G809S variant also increased speck formation relative to wild-type *NLRP3*. These results suggest that G809S, as well as Y859C in the LRR domain, may be a gain of function variant. It should be noted that although the assays used in this study are sensitive, our findings may provide limited evidence to prove that the G809S variant is pathogenic. However, these results indicate that the variant alters the function of *NLRP3*.

The two case studies presented here consistently showed elevated IL-1-related serum cytokines, IL-1ra, during the attack phase. In addition, monocytes from case 1 and 2 secreted high levels of IL-1 β , which may indicate a gain of function variant in *NLRP3*, associated with inflammasome activation. Additionally, we previously reported a CINCA/NOMID patient positive for the compound heterozygous gene mutations, E688K and G809S [9]. This patient developed severe a phenotype compared with her mother, who carried a single mutation, E688K. This genotype-phenotype correlation suggests that the G809S variant may act as an additional genetic factor associated with the severity of CAPS.

However, in this study IL-1 β was not detectable in the serum of patients, as IL-1 β might be rapidly neutralized, metabolized, or captured by a plethora of IL-1 receptors in vivo. Furthermore, although elevated serum IL-18, which is activated by caspase-1 as well as IL-1 β , and IL-6 levels were observed in CINCA/NOMID patient [9], the serum IL-18 levels were increased in case 2 but not case 1, and serum IL-6 levels in both cases did not increase during the fever episodes. Thus, it may be considered that the differences of cytokine profiles and disease phenotypes between case 1 and 2 and typical CINCA/NOMID patients result not only from their genetic background, but also environmental factors.

Additional mutation analysis of our patients also revealed heterozygous variant haplotype of *MEFV*, a gene involved in

the pathogenesis of FMF, in addition to G809S in *NLRP3*. Case 1 was heterozygous for P369S and R408Q in *cis* and case 2 was heterozygous for E148Q, P369S, and R408Q in *cis*. Allele frequencies of P369S and R408Q in the Japanese population are 3.6 % and 4.8 %, respectively, according to the International HapMap Project (<http://www.hapmap.org/>). These frequent variant haplotypes were found to be in strong linkage disequilibrium in the Japanese population. In addition, P369S and R408Q variant haplotype are associated with a variable phenotype and are infrequently associated with typical FMF symptoms [18–21]. Heterozygous P369S and R408Q variant haplotype are also associated with other inflammatory diseases, such as Behçet's disease [18], and systemic lupus erythematosus [21]. Moreover, heterozygous E148Q-P369S-R408Q variant haplotype is more rare, which is associated with chronic recurrent multifocal osteomyelitis [20]. In this report, case 1 and case 2 showed the similar phenotypes as FMF or TRAPS, respectively. Although detailed clinical features and cytokine profiles of the two cases are various, they exhibited a long duration of recurrent fever episodes compared with typical FMF. Thus, these findings suggest that P369S and R408Q variant haplotype may have effects on several inflammatory diseases, but the functional evidence of these variant haplotype remains unclear.

The *MEFV* gene codes for pyrin, that can interact with ASC to induce ASC oligomerization and the activation of procaspase-1, which promotes IL-1 β and IL-18 processing [12, 22]. In contrast, some reports have described that pyrin inhibited *NLRP3*-mediated NF- κ B activation by disrupting the *NLRP3*-ASC interaction [23, 24]. In accordance with the reports, co-expression of *NLRP3* and pyrin in HEK293T cells indicated less ASC-dependent NF- κ B activation than expression of *NLRP3* only, whereas there was no difference in the inhibitory capacity of NF- κ B activity between pyrin variants and the wild-type protein. Interestingly, a recent study using pyrin deficient and mutated pyrin knock-in mice demonstrated a gain of function with pyrin variants located in B-Box domains, which caused autoinflammatory phenotypes [22]. Thus, research using knock-in mouse experiments with *MEFV* exon3 variants into pyrin deficient mice would help clarify the pathogenic effects of the *MEFV* variant.

In general, hereditary periodic fever syndromes have been considered monogenic diseases. On the other hand, recent reports have described patients with heterozygous low penetrance variants in two recurrent fever genes [2, 25, 26]. These indicate that oligogenic inheritance has been related to pathogenesis of autoinflammatory diseases. In some cases, patients presented with specific symptoms of both diseases or with a more severe phenotypes. Although the patients in this study were positive for the *NLRP3* variant, they did not present with typical symptoms of CAPS, such as deafness or cold-induced rash. In addition, variants in *MEFV* have been detected in both cases, but they also lacked typical FMF symptoms. However,