

分類不能型免疫不全症における遺伝子・分子病態解析

加藤善一郎

岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学

研究要旨

背景: 分類不能型免疫不全症(CVID)症例の大部分では責任遺伝子が不明であるが、近年一部の症例において徐々に責任遺伝子が明らかになりつつある。

症例: 発端者は、9カ月の男児。血液検査で低 γ グロブリン血症を指摘され、精査目的で当科紹介受診された。異父長女(18歳)が5歳時と17歳時に低IgG血症を指摘され γ グロブリンを補充されている。異父次女(15歳)は1歳4カ月時にADEMを発症した際に、CVIDと確定診断されており、以後定期的に γ グロブリン補充療法を施行されている。父、母に特記すべき異常は無い。

方法: フローサイトメーターでリンパ球の各種表面マーカーを検索した。さらに既知のCVIDの責任遺伝子を解析した。

結果: 発端者とその異父姉2名においてCD20⁺、CD27⁺、IgD⁺細胞(Class switched memory B cell)の低下を認めた。TREC、KRECは正常範囲であった。このことからIgGの低下が認められた3姉弟は全例CVIDと診断された。TACI等のCVIDの既知責任遺伝子群、及び類似病型を示す可能性のある高IgM症候群の既知責任遺伝子群にはいずれも病的変異は同定されなかった。

考察: 同一家系内で発症したCVID症例であるが、その臨床的重症度に相違がみられた。特に発端者では未だ明らかな重症感染症の発症を認めていないが、クラススイッチしたメモリーB細胞の検討によりCVIDと確定診断することができ、早期に γ グロブリン補充療法を開始することができた。責任遺伝子の明らかとなっているCVIDの多くは常染色体劣性遺伝形式を示すが、本家系では異父姉弟で同一疾患を発症しており、母体の卵細胞レベルで生じた体細胞突然変異に起因して常染色体優性(AD)遺伝形式で発症したものと推測している。現在、本家系のExome解析を施行中であるが、発端者には今年度新規に報告されたAD形式の責任遺伝子*TNFSF12*、*NFKB2*には変異は認められず、家系解析により新規責任遺伝子の同定が期待される。

研究協力者

大西秀典¹⁾、川本典生¹⁾、金子英雄²⁾、近藤直実³⁾

1) 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学

2) 国立病院機構長良医療センター臨床研究部

3) 平成医療短期大学

A. 研究目的

分類不能型免疫不全症(CVID)症例の大部分では責任遺伝子が不明であるが、その病因としてナイーブB細胞がメモリーB細胞、形質細胞に分化する過程の障害と考えられている。近年一部の症例においては徐々に責任遺伝子が明らかになりつつある。本

研究では、当科で診断した1家系内に3人のCVID患者がみられた例を対象として遺伝子解析及び各種病態解析を行った。

B. 研究方法

1. 症例: 1歳6ヵ月男児。現病歴: 姉が分類不能型免疫不全症(CVID)にてガンマグロブリン補充療法を施行されているため、生後9ヵ月時に念のため血液検査で免疫グロブリン値を調べたところ血清IgG、IgA、IgMが低値であることが判明したため、近医総合病院にて原発性免疫不全症の疑いで経過観察されていた。1歳5ヵ月時の血清IgG値が190mg/dlと依

然低値であるため、精査目的で当科に紹介。既往歴：特記すべきことなし。家族歴：異父姉（次女、15歳）が1歳4ヵ月時にADEMを発症。1歳6ヵ月時に気管支炎に罹患した際に免疫グロブリン値が低いこと（IgG 14mg/dl）に気付かれ、精査の結果CVIDと診断。以後、定期的にガンマグロブリン補充療法を施行されている。また、ADEMの後遺症としててんかんを発症し、2歳時にレノックスガストー症候群と診断されている。異父姉（長女、18歳）は5歳時に肺炎、17歳時に回腸末端炎に罹患。それぞれ免疫グロブリン値が軽度低下していることを指摘され、ガンマグロブリンを単回補充されている。父、母に特記すべき既往は無い。姉の父は42歳にてアルコール性肝硬変で死去している。

- 患者末梢血血清中の免疫グロブリン値を定量した。
- 患者末梢血リンパ球表面マーカーをフローサイトメーターで確認した。
- 患者ゲノムDNAを末梢血から抽出し、Direct sequence法で既知のCVID責任遺伝子群を解析した。

C. 研究結果

図1

血液検査結果 (当院初診時)					
WBC	9980 / μ l	TP	6.0 g/dl	IgG	196 mg/dl
Neut	28.0%	ALB	4.5 g/dl	IgG1	55.88%
Lymph	60.5%	AST	42 IU/l	IgG2	13.77%
Mono	4.5%	ALT	26 IU/l	IgG3	29.01%
Baso	1.5%	LDH	271 IU/l	IgG4	<1.34%
Eosino	5.5%	ALP	808 IU/l	IgA	22 mg/dl
RBC	554x10 ⁴ / μ l	γ GTP	9 IU/l	IgM	15 mg/dl
Hb	14.1 g/dl	BUN	19.9 mg/dl	IgD	0.7 mg/dl
Hct	41.9 %	CRE	0.21 mg/dl	IgE	<5.0 IU/ml
Plt	31.4x10 ⁴ / μ l	Na	137 mEq/l	C3	91 mg/dl
		K	4.2 mEq/l	C4	15 mg/dl
CD3	53.10%	Cl	107 mEq/l	CH50	46.0 U/ml
CD4	39.30%	Ca	10.4 mg/dl		
CD8	13.10%	Fe	141 μ g/dl	好中球殺菌能	91.20%
CD19	25.20%	UIBC	243 μ g/dl	NK細胞活性	36%
NK	20.40%	CRP	<0.02 mg/dl	LST-PHA	34100 cpm
				LST-Con-A	36600 cpm
				LST-no stimuli	232 cpm

1. 発端者の当院初診時の血液検査所見、本家系の免疫グロブリン値を図1、図2に示す。発端者は、IgG、IgA、IgM共に低値を示し、異父姉（Sister2）だけでなく、Sister1も免疫グロブリン値に異常があることが判明した。

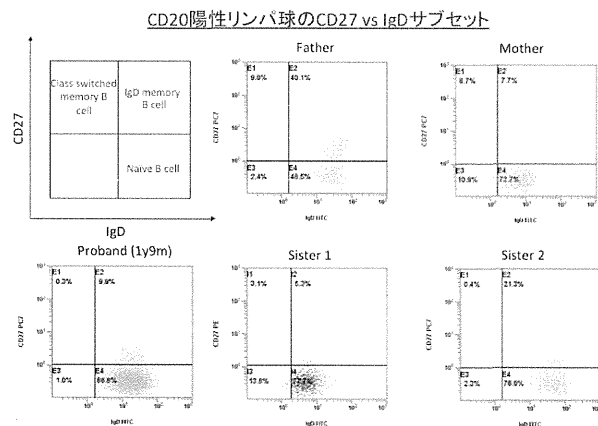
図2

家族の免疫グロブリン値

	Father	Mother	Sister1	Sister2	Proband
Age (year)	42	42	18	15	1.5
IgG (mg/dl)	932	1182	481	replacement	196
IgA (mg/dl)	149	276	596	<5	22
IgM (mg/dl)	95	151	188	6	15
IgD (mg/dl)			27.1	<0.6	0.7
IgE (IU/ml)			<5	<5	<5
IgG1 (mg/dl)			277		118
IgG2 (mg/dl)			24		26
IgG3 (mg/dl)			184		60.3
IgG4 (mg/dl)			<3		<3

2. CD20陽性リンパ球のCD27、IgDサブセットを図3に示す。発端者は1歳9ヵ月時点でもCD20+、CD27+、IgD-細胞（Class switched memory B cell）の比率の低下が認められた。Sister1、Sister2も同じくCD20+、CD27+、IgD-細胞比率が低下している。

図3



3. CVIDの既知遺伝子であるTAC1、CD19、CD81、CD21、CD20、ICOS、BAFF-R、LRBA、PLCG2、TNFSF12、NFKB2には異常は認めなかった。

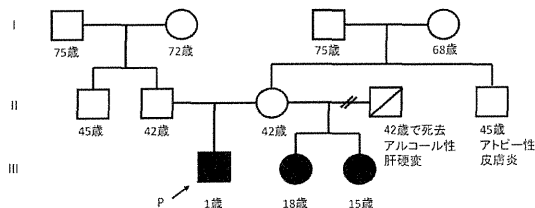
D. 考察

本症例の家系図を示す（図4）。発端者とその姉2名は、父親が異なるにも関わらず同様にCVIDを発症している。母親はCVIDのパターンを示していないが、おそらく体細胞モザイク変異を有しており、常染色体優性遺伝として3名の子どものCVIDが発症したものと考えられる。近年常染色体優性遺伝形

式の CVID の責任遺伝子の報告が相次いでいるが、いずれの遺伝子にも変異は同定されなかった。

図 4

常染色体優性遺伝形式が推定されるCVIDの家系図



E. 結論

常染色体優性遺伝形式が推定される CVID の 1 家系を経験した。おそらく責任遺伝子は同一と考えられるが、それぞれの臨床像は多彩であった。また、乳幼児一過性低ガンマグロブリン血症と CVID の鑑別にメモリーB 細胞の解析が有用であることが再確認できた。現在、エクソーム解析を施行中であるが、遺伝形式が推測可能な遺伝性疾患の多発家系は有望な解析対象であると考えられる。

今後も、引き続き網羅的遺伝子解析及び再生医学的手法を用いた分子病態解析を進めていくことが重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文業績

1. Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z, Shirakawa M, Kondo N. Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes. *Mol Immunol.* 58: 66-76, 2014
2. Funato M, Kaneko H, Sasai H, Kubota K, Ozeki M, Kanda K, Kato Z, Kondo N.

Peripheral blood stem cell transplantation in a significant body weight difference between a smaller donor and a larger recipient: a case report. *Transfus Apher Sci.* 49: 504-6, 2013

学会発表

1. 船戸道德、豊田太郎、近藤恭士、細川吉弥、須藤智美、沖田圭介、浅香 勲、上杉志成、加藤善一郎、太田 章、山中伸弥、近藤直実、長船健二. 病態解析に向けた iPS/ES 細胞の腭外分泌細胞への分化誘導法の開発. 第 12 回日本再生医療学会総会 2013 年 3 月 21-23 日 (横浜)
2. 森本将敬、笠原由貴子、折居建治、寺本貴英、大西秀典、小関道夫、川本典生、加藤善一郎、近藤直実、藤澤智美、清島真理子. BCG 接種後に結核疹を伴い発症した川崎病の 1 乳児例. 第 258 回日本小児科学会東海地方会 2013 年 5 月 19 日 (名古屋)
3. 大塚博樹、桑原秀次、寺本貴英、大西秀典、白上遊、川本美奈子、川本典生、加藤善一郎、近藤直実. 抗 GQ1b 抗体陰性 Bickerstaff 型脳幹脳炎の一例. 第 116 回日本小児科学会総会 2013 年 4 月 19-21 日 (広島)
4. 大西秀典、寺本貴英、久保田一生、加藤善一郎、近藤直実. カナキヌマブで治療した家族性寒冷自己炎症性症候群症例の免疫プロファイルの推移. 第 116 回日本小児科学会総会 2013 年 4 月 19-21 日 (広島)
5. 大西秀典、寺本貴英、久保田一生、加藤善一郎、近藤直実. カナキヌマブで治療した家族性寒冷自己炎症性症候群の 1 家系の免疫プロファイルの推移. 第 25 回日本アレルギー学会春期臨床大会 2013 年 5 月 11-12 日 (横浜)
6. 大西秀典、寺本貴英、川本典生、加藤善一郎、深尾敏幸、金子英雄、臼井新治、新井隆広、山岸篤至、近藤直実. 常染色体優性遺伝形式が推定される分類不能型免疫不全症の 1 家系. 第 4 回東海信州免疫不全症研究会 2013 年 7 月 6 日 (名古屋)

7. 大西秀典、寺本貴英、川本典生、加藤善一郎、深尾敏幸、金子英雄、臼井新治、新井隆広、川尻美和、山岸篤至、近藤直実. 常染色体優性遺伝形式が推測される分類不能型免疫不全症の 1 家系. 第 50 回日本小児アレルギー学会 2013 年 10 月 19-20 日 (横浜)
8. Takeshi Kimura, Naotaka Tsutsumi, Hidenori Ohnishi, Hidehito Tochio, Mariko Ariyoshi, Kyohei Arita, Zenichiro Kato, Masahiro Shirakawa, Naomi Kondo. Structural analysis of the interleukin-18 ligand-receptor complex for the development of new therapeutic molecules. 第 50 回日本小児アレルギー学会 2013 年 10 月 19-20 日 (横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

特になし

実用新案登録

特になし

その他

特になし

PCFT (SLC46A1) 新規変異による遺伝性葉酸吸収不全症 (HFM) の解析

山田雅文¹⁾、千田奈津子¹⁾、有賀 正¹⁾、岸本健治²⁾、小林良二²⁾、小林邦彦²⁾、小原 収³⁾

1) 北海道大学大学院医学研究科小児科学

2) 札幌北楡病院小児科

3) 公益財団法人かずさ DNA 研究所ヒトゲノム研究部

研究要旨

遺伝性葉酸吸収不全症 (HFM) は、消化管での葉酸吸収障害と中枢神経系への輸送障害により生後 1~3 ヶ月頃より巨赤芽球性貧血、易感染性や神経症状を生じる先天性疾患である。常染色体劣性遺伝形式を示し、proton-coupled folate transporter (PCFT) をコードする *SLC46A1* 遺伝子の異常が報告されているが、本邦からは未報告である。今回、臨床的に HFM が疑われた患者において *SLC46A1* 解析を行ったところ、母由来で Gly189Val アミノ酸置換を生じるミスセンス変異 c.566G>T と、父由来の deep intronic mutation, c1166-285T>G のヘテロ接合体であることが判明した。後者は exon 3 と exon 4 の間に 168 bp の intron 3 の挿入配列を生じ、挿入配列内で premature termination を来していると考えられた。いずれも発現が著明に低下することによる機能喪失型変異であると考えられた。

A. 研究目的

遺伝性葉酸吸収不全症 (HFM) では、生後早期より巨赤芽球性貧血に加えて易感染性や神経症状で発症し、迅速な診断・治療開始と適切な治療の継続がなければ致死性感染症で死亡したり、不可逆的な神経学的後遺症を来す可能性の高い遺伝性疾患である。proton-coupled folate transporter (PCFT) をコードする *SLC46A1* 遺伝子の異常が報告されているが、世界的にみても 23 例の報告のみで (図 1) 本邦からの報告はない。また、IUIS による原発性免疫不全症 (PID) 分類には含まれておらず、PID を専門とする施設においても診断されずに見逃されている可能性は否定できない。今回、臨床的に HFM と診断された患者において、HFM の責任遺伝子として報告されている *SLC46A1* 遺伝子に加え、葉酸 transport に関わる reduced folate carrier (RFC) をコードする *SLC19A1* 遺伝子についても遺伝子レベルで検討し、さらには蛋白レベルでの発現や葉酸 transport

機能について解析を行い、疾患の原因、病態を明らかにすることを目的とした。

B. 症例と研究方法

(症例)

4ヶ月女児。

在胎 37 週体重 2,272g で出生。1ヶ月健診で異常を指摘されず、新生児期より人工栄養が開始になった。家族歴に特記事項なく、血族婚なし。同胞は兄 2 人で健康であった。生後 3ヶ月より咳嗽持続、哺乳不良、体重減少、貧血、血小板減少があり、前医入院。体重は 4,042g と 1ヶ月で 300g の減少がみられた。SpO2 83% (room air) と酸素濃度の低下を認めた。皮膚は蒼白で追視、頸定はみられず、表情に乏しかった。胸部 X 線写真ではすりガラス様で喀痰 PCR で *Pneumocystis jiroveci* が検出され、*Pneumocystis* 肺炎と診断した。血液検査では白血球数、好中球数、リンパ球数の減少はなく、リンパ球

分画も naïve T 細胞分画を含めて大きな異常はみられなかったが、PHA, ConA 刺激下のリンパ球幼若化反応は著明に低下し、ほぼ無反応であった。高度の貧血と血小板減少がみられた。血清 IgG は 97 mg/dl と著減し、葉酸は <0.5 ng/ml と感度以下であったが、ビタミン B12 は正常範囲であった。

(研究方法)

正常コントロール、患者、患者両親より採取したへパリン血より比重遠心法で末梢血単核球 (PBMC) を分離した。

DNA 解析: PBMC より genomic DNA を抽出し、かずさ DNA 研究所において *SLC46A1* と *SLC19A1* の各 exon とその近傍 intron について direct sequence 法で遺伝子解析を行った。*SLC46A1* についてはさらに intron 3 配列の解析を行った。

cDNA 解析: PBMC から抽出した total RNA より cDNA を作成し、*SLC46A1* RT-PCR を行った。さらに TA cloning を行い、各 clone の配列を解析した。

Transient transfection による両親由来変異体の PCFT 発現の解析: 全長の *SLC46A1* cDNA Wild-type (Wt), +168 bp (父 mutant), Gly189Val (母 mutant) を作成し、pcDNA3-His vector に乗せかえることにより標識部位に対する抗体でも認識できるようにした。細胞は HeLa を用い、Wt, mutants 間で導入効率が同程度であることを EGFP-V の cotransfection で確認した。whole cell lysate を抽出し、Western blot 解析を行った。C 端を認識する抗 PCFT 抗体に加え、N 端の標識部位に対する抗 Xpress 抗体でも発現を解析した。

コントロールと患者の Epstein-Barr virus 不死化 B (EBV-B) 細胞株を樹立し、葉酸欠乏培地で 7 日間培養後 0、6、12、30、3000nM の葉酸を加え、細胞増殖を解析した。

(倫理面への配慮)

患者の個人情報ならびに臨床データの全ては、北海道大学大学院医学研究科小児科学分野 (以下、本講座) の主治医が厳重に管理する。特に遺伝情報については、その守秘義務を厳格に遂行し、研究結果を発表する場合は個人を識別できないように患者名等を符号化し、本講座において患者連結を行う。

C. 研究結果

遺伝子レベルの解析:

DNA レベルの解析で *SLC19A1* 遺伝子には異常がみられなかったが、*SLC46A1* 遺伝子には Gly189Val アミノ酸置換を生じる塩基置換 c.566G>T をヘテロで認め、母由来であった。Gly189 は種を超えて保存されていた。Gly189Val は SNP としても疾患に関連した変異としても未報告で、健常人 300 人にもみられなかった。SIFT、及び Polyphen-2 software を用いた解析からも疾患に関連した変異である可能性が考えられた。一方父由来の allele を確認するために患者 *SLC46A1* cDNA の TA cloning を行ったところ、exon 3 と exon 4 の間に 168 bp が挿入されていた (図 2)。この挿入配列を挟むような primer を作成して RT-PCR を行ったところ、患者と父のみに 168 bp が挿入された産物を認めた (図 3)。この 168 bp 挿入が生じると、アミノ酸レベルでは Ala389 以降異常アミノ酸配列が続き、20 番目で stop codon により翻訳が停止すると考えられた。挿入配列は intron 3 由来であることが判明した。次に、なぜこの挿入配列を生じるのかを明らかにするために挿入配列とその近傍の DNA 配列を解析したところ、挿入配列の 3' 端の塩基 T が G に置換されていた (c.1166-285T>G) (図 4A)。Splice site prediction software (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) を用いた解析からは、塩基置換部位の 3' 側に隣接した

配列 gt が splice donor site として認識されることにより挿入が生じることが示唆された (図 4B)。さらに、患者 PBMC 由来 cDNA を用い、挿入配列の有無に特異的な RT-PCR を行い、父由来 allele からは 168 bp の挿入された配列しか生じず、母由来 allele からは 168 bp の挿入された配列は生じないことが示された。

各 PCFT mutant の蛋白レベルでの発現の解析：

次に、全長の *SLC46A1* cDNA Wild-type (Wt), +168 bp (父 mutant), G189V (母 mutant) を HeLa 細胞に transient transfection し、各 mutant の蛋白レベルでの発現を解析した。今までの報告と同様、HeLa 細胞の endogenous PCFT の発現はほとんど検出されず、一方 Wt では glycosylation によると考えられる幅の広い PCFT の発現がみられた (図 5A, B)。Gly189Val mutant では著明に発現が低下していたが、わずかな発現を認めた。+168 bp mutant では C 端を認識する抗 PCFT 抗体では予想通り発現は確認できなかったが、N 端の標識部位を認識する抗 Xpress 抗体では、Wt よりも低い位置にバンドがみられた。これが挿入配列によって premature termination を生じたために truncate した産物なのか、さらに degradation されたものであるかについては今回の解析では明らかにできなかった。

EBV-B 細胞株を用いた葉酸欠乏下での増殖

コントロールと患者の EBV-B 細胞株を、葉酸欠乏培地で 7 日間培養後 0、6、12、30、3000nM の葉酸を加え細胞増殖を解析したところ、コントロールでは 6 nM の葉酸濃度でも細胞増殖の低下がほとんどみられなかったが、患者では葉酸濃度が低くなるのに比例した細胞増殖の低下が観察され、EBV-B 細胞株においても患者の葉酸吸収能障害が示唆された。

葉酸投与開始後の臨床経過

経過中みられた症状と入院時の検査結果より臨床的に HFM と診断した。葉酸の経口投与を速やかに開始したが明らかな改善がみられず、葉酸の静脈内投与(iv)に変更したところ、血球系の改善がみられた。肺炎像も消失し、PHA, ConA 刺激下のリンパ球幼若化反応も正常化した。体重、神経発達の catch-up も葉酸 iv 開始後から速やかにみられた。血清 IgG 値は葉酸 iv 開始 5 か月後より上昇し、生後 14 ヶ月より年齢相当となった。

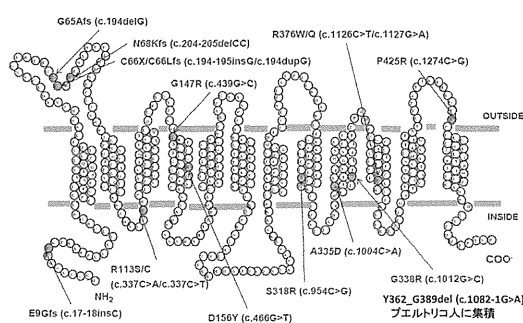


図 1 既報の *SLC46A1* 変異

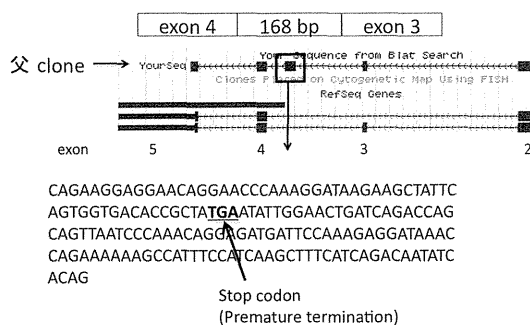


図 2 父由来 allele の TA cloning による解析

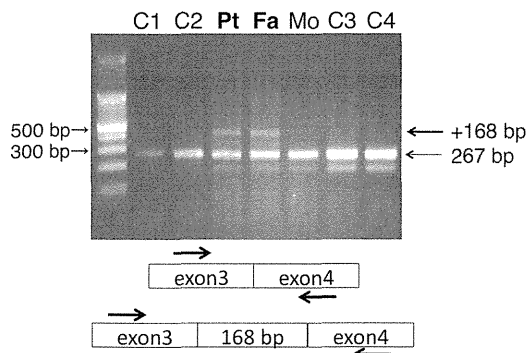
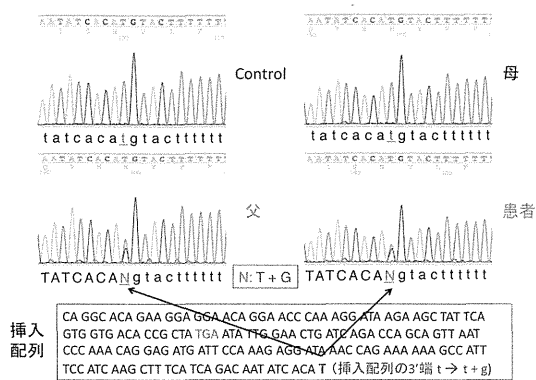


図3 挿入配列を挟む RT-PCR とそのダイレクシーケンス解析

A



B

Donor site predictions					
Start	End	Score	Exon	Intron	
242	256	0.91	ATCACAGg	tactcttt	
			Scoreなし	atcaca	tgtactcttt

図4 (A) 挿入配列とその近傍の DNA レベルのダイレクシーケンス解析

(B) Splice site prediction software による解析

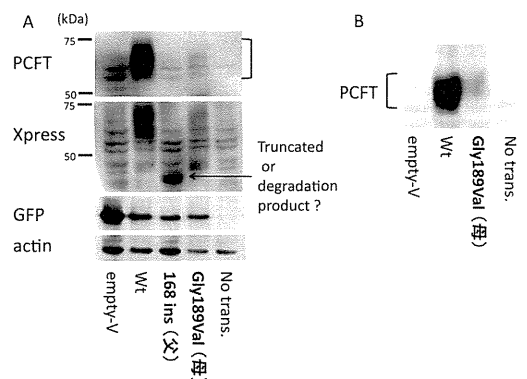


図5 (A) 父、母 mutant の Western blot 法による PCFT 発現解析

(B) 母 mutant の Western blot 法による PCFT 発現解析

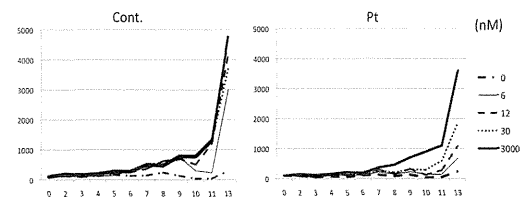


図6 EBV-B細胞株を用いた葉酸欠乏下での増殖の解析

D. 考察

本症例は *SLC46A1* 遺伝子の新規 compound heterozygous mutations による HFM 症例であり、いずれも PCFT 発現が著明に低下することが機能喪失の主因になっていると考えられた。Gly189Val mutant を random mutagenesis で人工的に作成した研究 (Am J Physiol Cell Physiol, Zhao, 2012) では、今回の報告と同様に PCFT 発現は若干認められるものの葉酸 transport 能は完全に欠損していた。Gly189に隣接する Ile188 は葉酸結合 pocket を形成し、また Glu185 は proton coupling に関わることが示唆されており (Am J Physiol Cell Physiol, Unal, 2009)、この領域は葉酸 transport に重要であると考えられた。したがって、Gly189Val mutant は PCFT の発現低下に加え、機能自体の喪失も有している可能性がある。

SLC46A1 遺伝子変異に起因する HFM 症例は本邦からは未報告であったが、本症例のような deep intronic mutation を有している場合には、通常の DNA 解析のみでは見逃されてしまっている可能性がある。貧血や神経症状を呈する原発性免疫不全症患者においては本疾患も積極的に疑い、注意深く解析していく必要がある。

血球系への葉酸吸収については主に RFC が機能すると考えられるが、今回の研究で、葉酸欠乏下においては PCFT も重要な役割を果たしている可能性が示唆され、今後さらに検討を行っていく必要がある。

E. 結論

今回報告した症例は、*SLC46A1* 新規遺伝子変異による本邦初の HFM 症例である。世界的にみても稀な疾患であり、IUIS の PID 疾患に分類されていないことから馴染みがなく見逃されている可能性がある。貧血や神経症状を呈する免疫不全症患者においては本疾患も念頭に置く必要がある。迅速な診断と効果的な治療の開始とその維持が重要と考えられる。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 学会発表

第7回日本免疫不全症研究会（2014年1月25日）
複合免疫不全を呈した *SLC46A1* 新規変異による先天性葉酸吸収不全症
千田奈津子、山田雅文、岸本健治、小林良二、小林邦彦、小原収、有賀正

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

参考文献

1. Qui A, et al. (2006) Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption. *Cell* 127:917-928.

2. Desmoulin SK, et al. (2012) The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer. *Cancer Biol Ther.* 13:1355-1373.
3. Mahadeo KM, et al. (2011) Prevalence of a loss-of-function mutation in the proton-coupled folate transporter gene (*PCFT-SLC46A1*) causing hereditary folate malabsorption in Puerto Rico. *J Pediatr.* 159:623-627.
4. Zhao R, et al. (2007) The spectrum of mutations in the *PCFT* gene, coding for an intestinal folate transporter, that are the basis for hereditary folate malabsorption. *Blood* 110:1147-1152.
5. Zhao R, et al. (2012) Identification of a functionally critical GXXG motif and its relationship to the folate binding site of the proton-coupled folate transporter (*PCFT-SLC46A1*). *Am J Physiol Cell Physiol.* 303:C673-C681
6. Unal ES, et al. (2009) Role of the glutamate 185 residue in proton translocation mediated by the proton-coupled folate transporter *SLC46A1*. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C66-C74.

家族性血球貪食性リンパ組織球症 3 型の迅速診断法に関する検討

八角高裕¹⁾、堀 雅之¹⁾、西小森隆太¹⁾、小原 収^{2) 3)}、平家俊男¹⁾

1) 京都大学大学院医学研究科発達小児科学

2) 公益財団法人かずさ DNA 研究所ヒトゲノム研究部

3) 理化学研究所横浜研究所免疫アレルギー科学総合研究センター

研究要旨

本邦の家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL) 症例の殆どを 2 型 (FHL2) と 3 型 (FHL3) が占めるが、perforin 発現解析による FHL2 スクリーニング法が確立しているのに対し、FHL3 に対するスクリーニング法は十分に確立されているとは言い難い。我々は、NK 細胞脱顆粒機能解析と Munc13-4 蛋白発現解析を用いて FHL3 スクリーニングを行って来たが、NK 脱顆粒機能は 2 次性 HLH 症例でも一過性に低下している場合があり、逆に FHL3 症例でも比較的残存している場合があり、感度・特異度とも低い事が問題となっていた。我々が診断した FHL3 症例では全例で Munc13-4 発現が低下していたため迅速診断が可能であったが、FHL3 診断における Munc13-4 蛋白発現解析の有効性についても十分に評価されていない。これらの問題を解決すべく、FHL3 症例の迅速診断における NK 細胞/CTL を用いた脱顆粒機能解析の有用性と、UNC13D ミスセンス変異による FHL3 症例の診断に対する Munc13-4 蛋白発現解析の有用性を評価した。

その結果、CD57+CD3+CD8+分画を用いた解析は、NK 細胞を用いた脱顆粒機能解析に比較して感度・特異度とも高く、FHL3 の機能スクリーニングとして優れている事が判明した。更に、これまで FHL3 として報告されている UNC13D ミスセンス変異のほぼ全てで Munc13-4 蛋白発現低下を来すことが確認された。以上の結果より、CD57+CTL を用いた脱顆粒機能解析と Munc13-4 蛋白発現解析の組み合わせは、FHL3 の迅速スクリーニング法として非常に有用であることが示された。

A. 研究目的

血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) は、サイトカインストームを基本病態とし、組織球の増殖と血球貪食像を病理学的特徴とする症候群である。感染や膠原病・悪性腫瘍などに続発する 2 次性症例と単一遺伝子異常を原因とする原発性症例とに大別されるが、治療法の選択や造血幹細胞移植の適応判断の為、原発性症例に対する迅速診断法の確立が重要である。

家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL) は原発性 HLH の代表疾患であり、FHL2-FHL5 の 4 病型が知られている。何れの病型も NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の細胞傷害活性に関与する分子の異常が原因であり、FHL2 は標的細胞の形質膜に孔を形成して細胞死を誘導する蛋白である perforin の異常、FHL3-5 は perforin を含む細胞内顆粒放出機構の異常が原因である。本邦に於ける FHL 症例の殆どを FHL2 と FHL3 が占めるため、特にこれら 2 病

型に対するスクリーニング法の確立が重要であるが、FHL2 に対して NK 細胞内の perforin 発現解析によるスクリーニング法が確立しているのに対し、FHL3 に対するスクリーニング法は十分に確立されているとは言えない。FHL3-5 に対しては、一般的に NK 細胞の脱顆粒機能解析によるスクリーニングが行われているが、脱顆粒機能が比較的残存する FHL3 症例は珍しくなく、一時的に脱顆粒機能低下を示す 2 次性 HLH 症例が存在する事も確認されている。

我々は、FHL3 の原因蛋白である Munc13-4 (責任遺伝子は *UNC13D*) の血小板内発現解析を用いた FHL3 スクリーニング法を開発し、迅速診断に用いている。これまで FHL3 症例で Munc13-4 蛋白発現が正常であった症例の報告は無く、蛋白発現解析は診断に有用であると考えられるが、大半の症例では蛋白発現解析がなされておらず、評価は定まっていないのが現状である。

以上を背景として、本研究では FHL3 の迅速診断法に関する有効性の検討を行った。

B. 研究方法

①患者検体の解析：当科に解析依頼のあった HLH 症例（FHL2：5 症例、FHL3：8 症例を含む）に対し、NK/CTL の脱顆粒機能と血小板内 Munc13-4 蛋白発現を解析した。

I. 脱顆粒機能解析：患者血及び正常人コントロール血より末梢血単核球（PBMC）を分離し、一部は直接、残りは IL-2 存在下で 48 時間培養後に K562 細胞と 2 時間共培養し、CD3 陰性 CD56 陽性細胞中に占める CD107a 陽性細胞の割合をフローサイトメトリー法にて解析した。加えて、IL-2 存在下で培養した PBMC の一部を P815 細胞と抗 CD3 抗体（OKT3）の存在下で 2 時間共培養し、CD3 陽性 CD8 陽性 CD57 陽性細胞中に占める CD107a 陽性細胞の割合を解析した。

II. 患者検体蛋白発現解析：患者末梢血より分離した血小板を用い、ウェスタンブロット法とフローサイトメトリー法にて Munc13-4 発現を検討した。

②既報告 *UNC13D* ミスセンス変異が Munc13-4 蛋白発現に与える影響の検討：文献上報告されている *UNC13D* ミスセンス変異の内、以下の条件を満たす変異の cDNA コンストラクトを作成し、HEK293T 細胞に強制発現させて Munc13-4 蛋白の発現レベルを検討した。

※) 解析対象 *UNC13D* ミスセンス変異の条件

- 1.患者サンプルの解析で、脱顆粒機能又は NK 活性の低下が確認されている。
- 2.蛋白発現解析を施行されていない。
- 3.*UNC13D* の両アレルに変異が認められている。
- 4.ミスセンス変異と同一アレルに既知の病的変異を認めない。

(倫理面への配慮)

研究を行うに当たり、京都大学倫理委員会の指針に基づき、承認を得て informed consent を取得の上で解析を行った。

C. 研究結果

分離直後の NK 細胞を用いた脱顆粒機能解析では、

正常コントロールに比して FHL3 症例では全例機能低下が認められたが、二次性症例でも一過性の機能低下を認める症例が数多く確認され、特異度が低い事が判明した。IL-2 添加培養後の NK 細胞を用いた脱顆粒機能解析では、多くの FHL3 症例で正常コントロールと同程度の脱顆粒が認められ、感度が低い事が確認された。一方、IL-2 添加培養後の CTL（CD57+CD3+CD8+細胞分画）の脱顆粒機能の評価した所、ほぼ FHL3 症例に特異的に低下している事が確認された。

既報告ミスセンス変異が蛋白発現に与える影響の検討では、現時点で解析の終了した全ての変異で Munc13-4 蛋白発現の低下が確認された。

D. 考察

NK 細胞と CTL とは、ほぼ同一の細胞障害活性機構を用いていると考えられているが、今回の検討より、CTL の脱顆粒機能低下は NK 細胞のそれに比してより FHL3 に特異的であることが示唆される。この事は、NK 細胞と CTL の細胞障害性顆粒の放出機構に差異があり、Munc13-4 蛋白に対する依存性が異なる可能性を示唆するものである。試験管内での解析がどの程度生体内での機能を反映するかという問題は残るが、FHL3 と二次性 HLH 症例の病態の違いを考える上で興味深い。

本研究では、疾患関連性のあるほぼ全ての *UNC13D* ミスセンス変異が Munc13-4 蛋白発現の低下を招く事も明らかとなった。このことは、Munc13-4 蛋白発現の安定化により細胞障害活性を回復させ、ひいては FHL3 の病態を安定化させられる可能性を示唆するものである。異常な蛋白を正常化するのではなく、その安定性を高める薬剤の発見・開発により FHL3 治療が行える可能性を示唆するものであり興味深い。

E. 結論

CD57+CTL を用いた脱顆粒機能解析と Munc13-4 蛋白発現解析の組み合わせは、FHL3 の迅速スクリーニングとして非常に有用であることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakagawa K, Gonzalez-Roca E, Souto A, Kawai T, Umebayashi H, Campistol JM, Cañellas J, Takei S, Kobayashi N, Callejas-Rubio JL, Ortego-Centeno N, Ruiz-Ortiz E, Rius F, Anton J, Iglesias E, Jimenez-Treviño S, Vargas C, Fernandez-Martin J, Calvo I, Hernández-Rodríguez J, Mendez M, Dordal MT, Basagaña M, Bujan S, Yashiro M, Kubota T, Koike R, Akuta N, Shimoyama K, Iwata N, Saito MK, Ohara O, Kambe N, Yasumi T, Izawa K, Kawai T, Heike T, Yagüe J, Nishikomori R, Aróstegui JI. Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis.* (In press)
2. Abe J, Nakamura K, Nishikomori R, Kato M, Mitsui N, Izawa K, Awaya T, Kawai T, Yasumi T, Toyoshima I, Hasegawa K, Ohshima Y, Hiragi T, Sasahara Y, Suzuki Y, Kikuchi M, Osaka H, Ohya T, Ninomiya S, Fujikawa S, Akasaka M, Iwata N, Kawakita A, Funatsuka M, Shintaku H, Ohara O, Ichinose H, Heike T. A nationwide survey of Aicardi-Goutieres syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study. *Rheumatology (Oxford)*. (In press)
3. Kawai M, Yoshikawa T, Nishikomori R, Heike T, Takahashi K. Obvious optic disc swelling in a patient with cryopyrin-associated periodic syndrome. *Clin Ophthalmol.* 7:1581-5. 2013
4. Ser36Tyr, presents with mild ectodermal dysplasia and non-infectious systemic inflammation. Yoshioka T, Nishikomori R, Hara J, Okada K, Hashii Y, Okafuji I, Nodomi S, Kawai T, Izawa K, Ohnishi H, Yasumi T, Nakahata T, Heike T. Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency caused by a novel NFKBIA mutation, p. *J Clin Immunol.* 33(7):1165-74. 2013
5. Taniuchi S, Nishikomori R, Iharada A, Tuji S, Heike T, Kaneko K. MEFV Variants in Patients with PFAPA Syndrome in Japan. *Open Rheumatol J.* 7:22-5. 2013
6. Imagawa T, Nishikomori R, Takada H, Takeshita S, Patel N, Kim D, Lheritier K, Heike T, Hara T, Yokota S. Safety and efficacy of canakinumab in Japanese patients with phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndrome as established in the first open-label, phase-3 pivotal study (24-week results). *Clin Exp Rheumatol.* 31(2):302-9. 2013
7. 内尾寛子、額田貴之、井庭憲人、深尾大輔、橋本有紀子、田部有香、井上美保子、濱畑啓悟、吉田晃、百井亨、河合朋樹、西小森隆太、平家俊：NEMO 蛋白異常をフローサイトメトリーにより早期診断した色素失調症の新生児例 *日本小児科学会雑誌* 117 巻 8 号 1303-1307. 2013
8. 河合朋樹、平家俊男：メンデル遺伝型マイコバクテリア感染症 *臨床免疫・アレルギー科* 60 巻 5 号 548-52. 2013
9. 阿部純也、西小森隆太、平家俊男：Aicardi-Goutieres 症候群アレルギー・免疫 20 巻 10 号 62-9. 2013
10. 河合朋樹、平家俊男：患者レジストリーと遺伝子診断 *アレルギー・免疫* 20 巻 10 号 14-23. 2013

2. 学会発表

1. 河合朋樹、中川権史、八角高裕、西小森隆太、平家俊男：本邦における自己炎症性疾患データベース 第23回日本小児リウマチ学会
2. 西小森隆太、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、河合利尚、梅林宏明、武井修治、小林法元、小原收、Eva Gonzalez-Roca Juan I. Arostegui 平家俊男：Muckle-Wells 症候群におけるNLRP3 体細胞モザイク変異の検討中川権史 第41回日本臨床免疫学会
3. 中川権史、志村七子、白崎善隆、山岸舞、井澤和司、西小森隆太、河合朋樹、八角高裕、平家俊男、小原收：CINCA 症候群/NOMID 患者単球における IL-1 β 分泌能の一細胞解析 第34回日本炎症・再生医学会
4. Kawai T, Nishikomori R, Yasumi T, Awaya M, Ohara O, Nakahata T, Saito M, Hara T, Yokota S, Kondo N, Ida H, Kanbe N, Kanazawa N, Agemitsu K, Yachie A, Nonoyama S, Takei S, Heike T. Autoinflammatory diseases database in Japan. 7th International Congress of FMF and AIDs.
5. Nakagawa K, Shimura N, Shirasaki Y, Yamagishi M, Izawa K, Nishikomori R, Kawai T, Yasumi T, Heike T, Ohara O. Single Cell Fluorescent Immunoassay of CINCA/NOMID. 7th International Congress of FMF and AIDs

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

XIAP 欠損症における血清 IL-18 の持続的高値

和田泰三¹⁾、金兼弘和²⁾、東馬智子¹⁾、谷内江昭宏¹⁾

1) 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科小児科

2) 富山大学大学院医学薬学研究部小児科学

研究要旨

XIAP 欠損症は、X 連鎖リンパ増殖症候群タイプ 2 として見出された原発性免疫不全症である。タイプ 1 の SAP 欠損症と同様、EB ウイルスに対する特異的免疫応答が障害されており、致命的伝染性単核球症を発症する。XIAP 欠損症では反復性の血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) など、SAP 欠損症とは異なる症状を示すことが知られている。今回、XIAP 欠損症の血清サイトカインを解析し、病態との関連について検討した。対象は XIAP 欠損症 10 例である。HLH 急性期と安定期における種々のサイトカインを ELISA により定量した。XIAP 欠損症では、HLH 急性期の IL-18 値が、SAP 欠損症、家族性 HLH、EB ウイルス関連 HLH に比べ極めて高値を示した。治療により IL-6 などの他の炎症性サイトカインが沈静化したあとも、IL-18 の高値は持続した。10 歳以上の患児においても血清 IL-18 は高値であり、長期間の持続高値を示唆していた。以上より、XIAP 欠損症では持続性の血清 IL-18 高値と HLH 罹患時における増悪が特徴であると考えられた。また IL-18 の持続高値が反復性の HLH と関連している可能性が示唆された。

A. 研究の目的

XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) はアポトーシス抑制蛋白の一つで、その欠損は X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) タイプ 2 を引き起こす。XLP は EB ウイルス (EBV) に対する特異的免疫応答に欠陥があり、致命的な EBV 関連血球貪食症候群 (HLH) を発症する先天性免疫不全症である。XLP の約 8 割が XLP タイプ 1 の SAP 欠損症、約 2 割が XIAP 欠損症と報告されている。XIAP 欠損症では、SAP 欠損症と異なり、反復性の HLH や出血性腸炎、脾腫を認めることが特徴であるが、その原因は不明である。そこで今回、XIAP 欠損症の血清サイトカインを解析し、病態との関連について検討した。

B. 研究方法

対象は、XIAP 欠損症 10 例 (9 家系) である。XIAP 蛋白発現解析は、末梢血より分離した単核球を用いて、フローサイトメトリー法もしくはウエスタンブロット法で解析した。各症例の HLH 急性期と安定期において血清を採取し、IFN- γ 、IL-6、IL-18、neopterin、TNF- α を ELISA により定量した。疾患コントロールとして、SAP 欠損症 4 例、家族性血球貪食症候群 2 型 (FHL2 ; perforin 欠損症) 6 例、EBV-HLH 11 例も解析した。一部の XIAP 欠損症症例では、末梢血から単核球を分離し、LPS と ATP で刺激し、24 時間後の上清中の IL-18 を測定した。

表 1. 解析対象

	Pt1	Pt2.1*	Pt2.2*	Pt3	Pt4	Pt5	Pt6	Pt7	Pt8	Pt9
変異	c. 847C>T	c. 1021_1022delAA	c. 1021_1022delAA	c. 664C>T	c. 712C>T	c. 650delG	c. 1056+1G>A	c. 1141C>T	c. 1445G>G	c. 310C>T
Effect	Q283X	N341fs	N341fs	R222X	R238X	W217fs	splice 異常	R381X	P482R	Q104X
蛋白発現	-	±	±	±	±	-	-	-	±	-
発症時年齢	1ヶ月	17ヶ月	15ヶ月	5ヶ月	20ヶ月	2ヶ月	3歳	8ヶ月	乳児期	8歳
現在の年齢	5歳	3歳	15歳	2歳	7歳	12歳	9歳	10ヶ月	死亡	死亡
家族歴	なし	あり	あり	なし	なし	あり	なし	あり	なし	あり
HLH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
反復性HLH	+	+	+	+	+	+	+	-	NA	+
発熱	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
脾腫	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
血球減少	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
EBV	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
低γグロブリン血症	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
腸炎	-	-	-	-	+	-	-	-	NA	NA
リンパ腫	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
治療	PSL, GsA	IVIg, Dex	PSL	Dex, GsA PSL	PSL, GsA Dex tocilizumab	PSL, GsA	PSL	Dex, GsA	HLH 2004, IT 治療を 含む	Dex rituximab
造血幹細胞移植	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+

*兄弟例. 文献 1)より

C. 研究結果

1) 遺伝子変異と XIAP 発現

ほとんどの患児が XIAP 遺伝子にナンセンス変異かフレームシフト変異を有していた。これらのうち新規の変異は、Pt1 の c.847C>T (Q283X)、Pt3 の c.664C>T (R222X)、Pt6 の c.1056+1G>A であった。

Pt1 と Pt6 では XIAP 蛋白発現は欠損し、Pt3 では変異蛋白の弱い発現が認められた (表 1)。

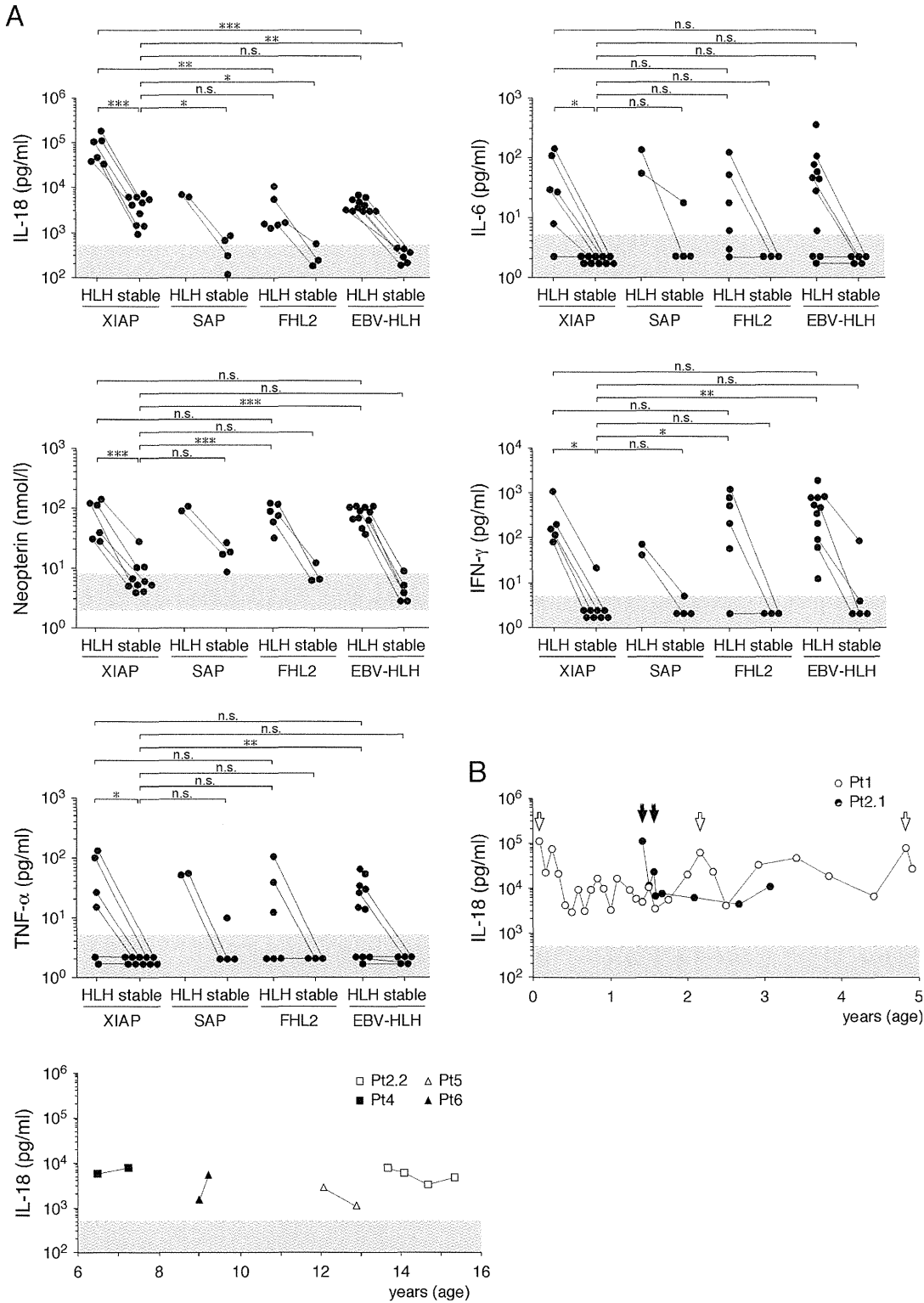
2) サイトカインプロファイル

XIAP 欠損症では、HLH 急性期の IL-18 値 (平均 86,500 pg/mL) が、SAP 欠損症 (平均 6,600 pg/mL)、FHL2 (平均 3,680 pg/mL)、EBV-HLH (平均 4,256 pg/mL) に比べ極めて高値を示した。治療により IL-6 などの他の炎症性サイトカインが沈静化したあとも、XIAP 欠損症においてのみ、IL-18 の高値が持続した (平均 4,090 pg/mL) (図 1A)。経時的に血清 IL-18 を解析したところ、持続的な高値と HLH 時の増悪が認められた (図 1B)。

3) PBMC の IL-18 産生能

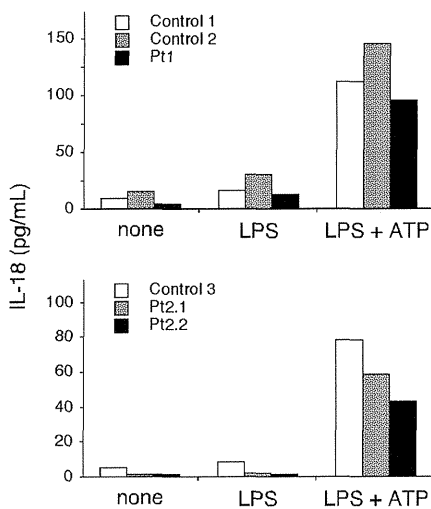
XIAP 欠損症において IL-18 が単核球から過剰に分泌されているか否かを検討するために、患児由来の単核球を LPS と ATP を用いて刺激した。しかし正常コントロール同程度の IL-18 産生を認めるのみであった (図 2)

図 1. XIAP 欠損症におけるサイトカインプロファイル



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. 矢印は HLH を示す. 文献 1) より.

図 2. IL-18 産生



D. 考察

HLH の急性期においては、原疾患の違いにかかわらず、様々な炎症性サイトカインが上昇する。しかし XIAP 欠損症では、XLP タイプ 1 である SAP 欠損症、遺伝性 HLH の代表である FHL2、二次性 HLH の代表である EBV-HLH と比べ、HLH 急性期において血清 IL-18 が著しく上昇していた。また、HLH から回復し他の炎症性サイトカインが正常化した後も、血清 IL-18 の高値は持続した。さらに、10 歳以上の患児においても血清 IL-18 は高値であり、長期間の持続高値が示唆された。このようなサイトカインプロファイルは、全身性若年性特発性関節炎のサイトカインプロファイルと極めて類似していた。一方、XIAP 欠損症患児の末梢血単核球を LPS と ATP にて刺激した際の IL-18 産生は、正常対照と同程度であり、血清 IL-18 が高値となる機序に関しては現時点では不明であった。IL-18 の異常産生の機序を解明することで、XIAP 欠損症の病態や XIAP 蛋白の生体内での機能の理解が進むと考えられ、今後、さらなる検討が必要と考えられた。

E. 結論

XIAP 欠損症では持続性の血清 IL-18 高値と HLH 罹患時における増悪が特徴であると考えられた。また IL-18 の持続高値が反復性の HLH と関連している可能性が示唆された。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Wada T, Kanegane H, Ohta K, et al. Sustained elevation of serum interleukin-18 and its association with hemophagocytic lymphohistiocytosis in XIAP deficiency. *Cytokine* 2014; 65: 74-8.

2. 学会発表

1) 和田泰三. 血球貪食を伴う PID とサイトカイン. 第 4 回関東甲越免疫不全症研究会. 2013 年 9 月 22 日. 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

女児例を含む X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) タイプ 2 (XIAP 欠損症) の同胞例に関する研究

金兼弘和¹⁾、楊 曦¹⁾、國津智彬²⁾、池田勇八²⁾、多賀 崇²⁾、八角高裕³⁾、平家俊男³⁾、和田泰三⁴⁾、谷内江昭宏⁴⁾、三宅邦夫⁵⁾、久保田健夫⁵⁾、村松秀城⁶⁾、小島勢二⁶⁾、吉田健一⁷⁾、小川誠司⁷⁾

- 1) 富山大学大学院医学薬学研究部小児科学
- 2) 滋賀医科大学小児科
- 3) 京都大学大学院医学研究科発達小児科学
- 4) 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科小児科
- 5) 山梨大学医学部環境衛生遺伝医学
- 6) 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学
- 7) 京都大学医学部腫瘍生物学

研究要旨

X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) タイプ 2 (XIAP 欠損症) は血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) を特徴とする稀な原発性免疫不全症であり、本来男児のみに発症するが、今回我々は世界初と考えられる女児例を同定した。症例 1 (1 歳 1 か月男児) は 4 回の HLH を発症し、症例 2 (5 歳男児) も HLH を発症したため、家族性血球貪食症候群のスクリーニングを行ったが、陰性であった。そこで全エクソームシーケンシングを行ったところ新規の *XIAP* 変異が認められた。症例 3 は 7 歳女児(姉)で、症例 1・2 の姉であるが、弟たちと同様に HLH を発症した。症例 3 は遺伝学的には保因者であったが、*XIAP* 蛋白の発現低下が認められた。正常 *XIAP* 遺伝子アレルの不活化を示す X 染色体の非ランダムな不活化が確認され、女性 XLP2 と診断した。サイトカインプロファイルならびにアポトーシスも XLP2 に特徴的なパターンを示した。本研究によって、女児例であっても HLH を繰り返す病歴や家族歴から原因疾患として XLP も念頭に置く必要があることが示された。

A. 研究目的

X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) タイプ 2 (XIAP 欠損症) は血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) を特徴とし、時に低ガンマグロブリン血症、脾腫、腸炎を呈する比較的稀な原発性免疫不全症である。原因遺伝子 *XIAP/BIRC4* は X 染色体長腕に存在するため、X 連鎖劣性遺伝形式をとり、本来男性にしか発症しない。しかし X 連鎖劣性遺伝形式をとる X 連鎖無ガンマグロブリン血症や Wiskott-Aldrich 症候群などで X 染色体の不活化の異常により女性保因者でありながら疾患を発症した報告がある。今回、女性保因者でありながら、X 染色体の不活化の異常により発症した女性 XLP2 を世界で初めて同定したので、その病態を明らかとすることを本研究の目的とする。

B. 研究方法

症例 1、2、3 は 1 歳男児、5 歳男児、7 歳女児の同胞例であり、家族から文書による同意を得て、ヘ

パリン加ならびに EDTA 加静脈血を得た。フローサイトメトリー、ウェスタンブロット法、次世代シーケンサーを用いた全エクソームシーケンシング、サンガー法によるシーケンシング、X 染色体不活化アッセイ、血清サイトカイン測定、アポトーシスアッセイなどの各種解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト検体を用いて解析を行うものであり、検体量および採取時の苦痛には十分な配慮を行った。遺伝子解析については各種指針を遵守して、患者個人情報の保護について十分な配慮を行った。

C. 研究結果

症例 1 は HLH を 4 回発症し、症例 2 は HLH を 1 回発症した。最初は家族性血球貪食症候群が疑われたが、症例 1、2 ともに Perforin、Munc13-4、Munc18-2、Syntaxin11 はいずれも陽性であった。そこで症例 1 について全エクソーム解析を行ったと

ころ、新奇 *XIAP* 変異 (p.Asp151ArgfsX11) が同定され、サンガー法にて症例 2 に同じ変異を有し、母親はヘテロ接合体であり、XLP2 家系と診断した (図 1)。

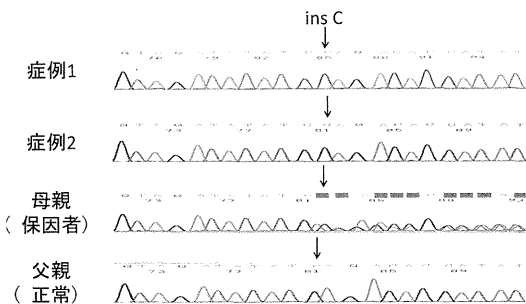


図 1 サンガー法による *XIAP* 遺伝子解析

症例 3 は症例 1、2 の姉であるが、弟と同様に HLH を発症した。そこで *XIAP* 蛋白を調べたところ、症例 1、2 と同様に *XIAP* 蛋白の発現低下を認め、女性 XLP2 が疑われた (図 2)。ウェスタンブロット法でも症例 1、2、3 で *XIAP* 蛋白の発現低下が認められた。

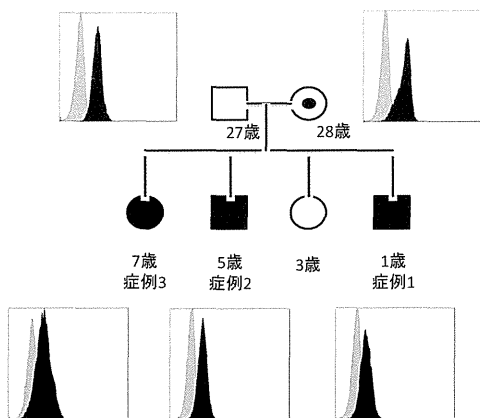


図 2 リンパ球における *XIAP* 蛋白発現

症例 3 は遺伝学的に保因者であるにも関わらず *XIAP* 蛋白の欠損を認めたのは X 染色体の不活化の異常によるものの可能性が考えられ、ヒトアンドロゲンレセプターの多型を利用した X 染色体不活化アッセイを行ったところ、症例 3 は父親由来の X 染色体のみが不活化し、母親由来の変異 *XIAP* 遺伝子を有する X 染色体のみが活性化していた (図 3)。

メチル化特異的 PCR を用いた X 染色体不活化の解析によっても母親由来のアレルのみ活性化していることが示された。

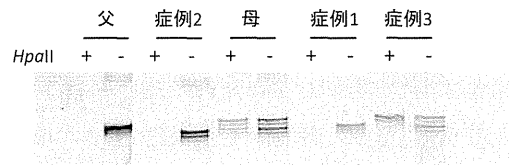


図 3 X 染色体不活化アッセイ

各種サイトカインを調べたところ、症例 3 は症例 1、2 と同様に HLH 回復期にも拘わらず血清 IL-18 が高値を示していた (表 1)。また activation-induced cell death (AICD) を調べたところ、症例 3 では症例 1、2 と同様に正常対照に比べて AICD が促進していた (図 4)。

表 1 サイトカインプロファイル

	正常範囲	症例1	症例2	症例3	母親
IL-6 (pg/mL)	<5	<3	<3	14	<3
IL-18 (pg/mL)	<500	10,800	6,800	3,000	250
Neopterin (nmol/L)	<5	14.3	7.2	11.3	5.1
sTNF-R I (pg/mL)	484-1,407	1,640	1,160	1,140	700
sTNF-R II (pg/mL)	829-2,262	18,300	7,100	8,100	1,780

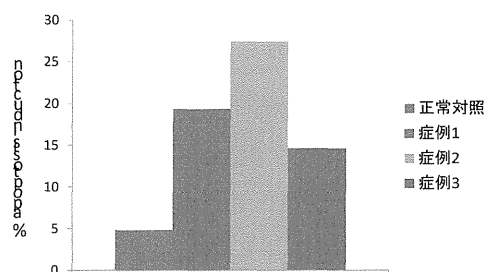


図 4 activation-induced cell death

D. 考察

遺伝学的に保因者である女兒が、XLP2 (*XIAP* 欠損症) の二人の弟と同様に HLH を発症した。弟と同様に *XIAP* 蛋白の発現低下が示され、女性 XLP2 と考えられた。X 染色体不活化アッセイにて正常

XIAP 遺伝子アレルの不活化を示唆する X 染色体の非ランダムな不活化が確認された。血清 IL-18 高値ならびに AICD の促進という XLP2 に特徴的なパターンを示していた。

特になし

E. 結論

世界初と考えられる女性 XLP2 患者を同定した。女性例であっても HLH を繰り返す病歴や家族歴から原因疾患として XLP も念頭に置く必要があることが本研究によって明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Marsh RA, Rao K, Satwani P, Lehmsberg K, Müller I, Li D, Kim MO, Fischer A, Latour S, Sedlacek P, Barlogis V, Hamamoto K, Kanegane H, Milanovich S, Margolis DA, Dimmock D, Casper J, Douglas DN, Amrolia PJ, Veys P, Kumar AR, Jordan MB, Bleesing JJ, Filipovich AH: Allogeneic hematopoietic cell transplantation for XIAP deficiency: an international survey reveals poor outcomes. *Blood* 121: 877-83, 2013
2. Wada T, Kanegane H, Ohta K, Kato F, Imamura T, Nakazawa Y, Miyashita R, Hara J, Hamamoto K, Yang X, Filipovich AH, Marsh RA, Yachie A: Sustained elevation of serum interleukin-18 and its association with hemophagocytic lymphohistiocytosis in XIAP deficiency. *Cytokine* 65: 74-8, 2014

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況