

Exome 解析による原発性免疫不全症候群の原因遺伝子の同定と機能解析

野々山 恵章

防衛医科大学校医学研究科小児科学

研究要旨

Exome 解析により原発性免疫不全症候群の原因遺伝子同定を行い、その機能解析を行った。

Exome 解析により B 細胞、樹状細胞、NK 細胞が欠損する疾患の原因遺伝子が GATA2 であることを見出した。さらに 国内 GATA2 欠損症を 14 例集積し臨床症状を検討し、患者由来 T 細胞の機能解析を行った。その結果 GATA2 は内因性に T 細胞の発生・分化に重要な役割を果たし、T 細胞機能不全の原因となっていることが判明した。

ICF 症候群は免疫不全、染色体異常、顔貌異常を三徴とする遺伝性疾患である。原因遺伝子は DNA のメチル化に関わる酵素をコードする *DNMT3B* および *ZBTB24* であることが確定している。原因不明の低ガンマグロブリン血症とされていた 5 症例で、Exome 解析により *DNMT3B* ないし *ZBTB24* の変異を見出し、染色体解析により ICF 症候群と確定した。すなわち三徴がそろわないため ICF 症候群と診断されず、原因不明の免疫不全症とされている患者がいることを示した。また ICF 症候群ではメモリー B 細胞が欠損していることを示した。

成人発症の B 細胞単独欠損症患者において、Fanconi 貧血の疾患原因遺伝子である、*FANCE* 遺伝子の Compound hetero 変異を同定した。*FANCE* 変異の確定診断は本邦初であった。また、本患者では現時点では Fanconi 貧血で特徴的な骨髄不全や悪性腫瘍の合併はなく、従来との報告とは異なる表現型であった。29 症例の Fanconi 貧血患者の免疫系の解析を行い、7 名で免疫系の異常を認めた。

A. 研究目的

原発性免疫不全症候群の国内患者登録データベースである PIDJ (Primary Immunodeficiency Database in Japan) 設立後、一般小児科および内科医への周知が進み、登録患者数の増加、疾患原因遺伝子の同定が進んでいる。登録患者の中には、骨髄異形成症候群や白血病、悪性腫瘍や神経疾患を合併する原発性免疫不全症も存在する。そのため血液専門医や神経専門医との専門分野を超えた協力がより重要となってきた。

そこで、2011 年度より厚生労働省の”稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究班”における “ 分類不能血液疾患班 ” との共同研究として、PIDJ を通じて原発性免疫不全症として紹介された症例で、Exome 解析により

原因遺伝子を同定し、その機能解析を行うことで病態解明を行った。

B. 研究方法

PIDJ に登録された症例を対象とした。対象患者は、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞が欠損し、GATA2 異常と判明した患者 14 例、ICF 症候群と判明した 5 例 (タイプ 1: 3 例、タイプ 2: 2 例)、Fanconi 貧血 29 例である。原因遺伝子があきらかになっていない症例では、患者家族から文書による同意を得て、末梢血から DNA を抽出し、次世代シーケンズによる Exome 解析を行ったのち、候補遺伝子についてサンガー・シーケンズ法による validation を行った。原因遺伝子の機能解析は、書く遺伝子の予想される機能をもとに、実験を組み立てた。

(倫理面への配慮)

データは匿名化して取り扱った。遺伝子解析、細胞分化実験などは、防衛医大倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

Exome 解析により樹状細胞欠損症で *GATA2* 変異が原因であることを見出した。さらに 国内 *GATA2* 欠損症を 14 例集積し検討した。水痘の重症化、サルモネラ感染の重症化、真菌感染、非定型抗酸菌感染がみられ、T 細胞免疫の低下が疑われた。患者骨髓血より CD34 陽性血液幹細胞を分取し、OP9-DL1 feeder cells 上で、IL-7、Flt3、SCF 添加して 29 から 36 日間培養し double negative T 細胞、double positive T 細胞へと in vitro で分化させた。健常者では double positive T 細胞へと分化したが、*GATA2* 欠損症患者骨髓由来 CD34 陽性細胞からは double negative T 細胞、double positive T 細胞ともに分化しなかった。

また、FACS 解析で thymic naive T 細胞の低下があり、T 細胞新生能を示す TREC も低下していた。

さらに IL4、IL17 産生能を検討したところ、著明に低下していた。さらに T 細胞を活性化すると *GATA2* が発現する事を見出した。

以上、*GATA2* は T 細胞の初期分化、胸腺から末梢への流出、サイトカイン産生細胞への機能的分化におそらく内因的に関与していることが示され、*GATA2* が T 細胞の発生・分化に重要な役割を果たしていると考えられた。

ICF 症候群は免疫不全、染色体異常、顔貌異常を三徴とする遺伝性疾患である。原因遺伝子は、患者の半数で DNA のメチル化に関わる酵素をコードする *DNMT3B* および *ZBTB24* であることが確定している。

原因不明の低ガンマグロブリン血症とされていた症例で、Exome 解析により *DNMT3B* の変異を認め、染色体解析により ICF 症候群に特徴的な染色体異常を認め、ICF 症候群と確定した。顔貌異常はなかった。すなわち三徴がそろわないため ICF 症候群と診

断されず、原因不明の免疫不全症とされている事を示した。

さらに ICF 症候群患者 5 症例を候補遺伝子解析により見出し、タイプ 1 の原因遺伝子 *DNMT3B*、タイプ 2 の原因遺伝子 *ZBTB24* の変異を見出し、染色体解析により ICF 症候群と確定した。FACS 解析で、ICF 症候群タイプ 2 でも、ICF 症候群タイプ 1 と同様に、CD37 陽性のメモリー B 細胞の完全欠損があることを見出した。

成人発症の B 細胞単独欠損症患者において、Fanconi 貧血の疾患原因遺伝子である *FANCE* 遺伝子の Compound hetero 変異を同定した。*FANCE* の機能異常を確認するため、染色体断裂試験を行ったところ、MMC, DEB, CY, BU, BLM 全てにおいて exchange を多く含む著明な断裂を認め Fanconi 貧血のパターンをとった。モノユビキチンアッセイでは Fanconi 貧血に典型的なパターンを取った。なお *FANCE* 変異による Fanconi 貧血患者の確定診断は本邦初である。

そこで、Fanconi 貧血と診断されている 29 例について免疫学的解析を行った。その結果、6 名でリンパ球減少、2 名で B 細胞欠損、3 名で CD4/CD8 比の逆転を認めた。TREC/KREC 解析では、KREC のみ陰性者が 5 名、TREC/KREC とともに陰性者が 2 名存在した。

これまで *FANCE* を含めた Fanconi 貧血の疾患原因遺伝子変異により、B 細胞の単独欠損を認めたとする報告はなく、また免疫系の異常を解析した報告も無い。今回の解析で、Fanconi 貧血患者の一部で免疫不全を呈することが明らかになった。

D. 考察

原発性免疫不全症候群の原因遺伝子を同定することで、遺伝子解析による早期診断が可能になる。また、原因遺伝子の機能解析を行うことで病態解明につながり、より良い治療の開発につながる。本研究では新しく原発性免疫不全症患者の新規原因遺伝子として、Exome 解析により *GATA2* を同定した。ま

た原因不明の低ガンマグロブリン血症を呈する疾患が ICF 症候群や Fanconi 貧血であることを Exome 解析で明らかにした。

さらに、GATA2 欠損症、ICF 症候群、Fanconi 貧血について国内症例を集め、その免疫系の解析と、臨床症状をまとめた。

これらの結果をもとに、ガンマグロブリン定期補充療法の必要性、造血幹細胞移植の適応、バクタの予防内服の必要性などが判明し、より病態に即した治療を選択することが可能になった。

E. 結論

Exome 解析により、原発性免疫不全症患者の新規原因遺伝子の同定ができ、患者の病態解析、患者臨床データのまとめができた。それをもとに、より適した治療法の選択に有効であった。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol.* 131:1437-1440, 2013.
2. Kakiuchi S, Nonoyama S, Wakamatsu H, Kogawa K, Wang L, Kinoshita-Yamaguchi H, Takayama-Ito M, Lim CK, Inoue N, Mizuguchi M, Igarashi T, Saijo M. Neonatal herpes encephalitis caused by a virologically confirmed acyclovir resistant herpes simplex virus type 1. *J. Clin. Microbiol.* 51:356-359, 2013.
3. Kojima R, Fujiwara T, Matsuda A, Narita M, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Factors Associated with Steroid Phobia in Caregivers of Children with Atopic Dermatitis. *Pediatr Dermatol.*, 30:29-35, 2013.
4. Kojima R, Matsuda A, Nomura I, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Salivary Cortisol Response to Stress in Young Children with Atopic Dermatitis. *Pediatr Dermatol.* 30:17-22, 2013.
5. Bousfiha A, Jeddane L, Ailal F, Al-Herz, Conley M.E., Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Fischer A, Franco J.L., Geha R.S., Hammarström L, Nonoyama S, Ochs H.D., Roifman C, Seger R, Tang M.L.K., Puck J.M., Chapel H, Notarangelo L.D., Casanova J.L. A Phenotypic Approach for IUIS PID Classification and Diagnosis: Guidelines for Clinicians at the Bedside. *J Clin Immunol.* 33:1078-1087, 2013.
6. Kojima R, Ohno T, Iikura M, Niki T, Hirashima M, Iwaya K, Tsuda H, Nonoyama S, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. Galectin-9 enhances cytokine secretion, but suppresses survival and degranulation, in human mast cell line. *PLoS One.* 2013(in press)
7. Horiuchi K, Imai K, Mitsui-Sekinaka K, Yeh ZW, Ochs HD, Durandy A, Nonoyama S. Analysis of somatic hypermutation in the IgM switch region in human B cells. *J Clin Allergy Immunol.* (in press)

学会発表

1. Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin kappa deleting recombination excision circles. ICI 2013(International Congress of Immunology). Milano, Italy. Aug.2013.
2. Nonoyama S. KRECS assay for detecting Bcell deficiencies and other Primary Immunodeficiencies. Jeffery Modell Centers Summit. Berlin, Germany. July.2013.
3. Nonoyama S. Primary immunodeficiency electronic record (Pier) for the PID patients. Invited speaker. International Primary Immunodeficiency Congress. (Estoril, Portugal, November, 2013)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし