

原発性免疫不全症“ICF症候群”の原因遺伝子の同定

研究分担者 高田 英俊 九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学 教授
研究協力者 伊藤 雄哉 九州大学生体防御医学研究所ゲノム制御学部門
エピゲノム制御学分野 大学院生

研究要旨

ICF (Immunodeficiency, Centromeric instability, and Facial anomaly) 症候群は原発性免疫不全症候群に分類される稀な常染色体劣性遺伝病で、患者は成熟 B 細胞を有さず低 グロブリン血症を呈し、重症感染症に繰り返し罹患する。ICF 症候群はエピジェネティクス関連疾患であり、セントロメア近傍の反復配列 (サテライト 2・3) の DNA メチル化の低下と、それに伴うヘテロクロマチン構造の不安定性に起因する染色体構造異常を特徴とする。ICF 症候群の約半数を占める 1 型 ICF 症候群の原因遺伝子は *de novo* DNA メチル化酵素 *DNMT3B* である。*DNMT3B* に変異を持たない ICF 症候群はサテライト 2・3 の DNA メチル化の低下に加えて、セントロメアの サテライト領域の DNA メチル化の低下を合併する。このような ICF 症候群の約半数の原因遺伝子として *ZBTB24* (2 型 ICF 症候群) が同定されていたが、残りの約半数で原因遺伝子が未同定であったため、我々はそれらの原因遺伝子が未同定の患者でエキソーム解析を行い、5 人で *CDCA7* (3 型 ICF 症候群) を、さらに 5 人で *HELLS* (4 型 ICF 症候群) を原因遺伝子として同定した。(Thijssen, *et al.*, Nat. Commun. (2015)). 同定された遺伝子はマウス胎仔線維芽細胞で DNA メチル化の維持に参与していた。本研究により、ICF 症候群の原因遺伝子は 90%以上の患者で同定することが出来るようになった。

A . 研究目的

原発性免疫不全症で、エピジェネティクス関連疾患である ICF 症候群は稀な常染色体劣性遺伝病である。患者は低・無 グロブリン血症を呈す免疫不全、染色体の不安定性、顔貌異常を特徴とする。ICF 症候群はサテライト近傍のサテライト 2・3 の DNA メチル化の低下と、それに伴う 1・9・16 番染色体のヘテロクロマチン領域の不安定性に起因する染色体構造異常により診断することが出来る。ICF 症候群の約半数は DNA メチル化酵素である *DNMT3B* に変異を持つ。*DNMT3B* に変異を持たない ICF 患者は、サテライトの DNA メチル化の低下を呈する。それらの患者の半数で、機能未

知だが、血球の分化を調整する ZBTB タンパクファミリーに属する *ZBTB24* が原因遺伝子として同定されたが、残り半数では原因遺伝子は同定されていなかった。我々はそれらの患者の原因遺伝子を同定することで、ICF 症候群の診断を確実なものとし、さらにそれらの遺伝子の機能を解析することで、免疫不全症とエピジェネティックな制御機構を解明することを目標とした。

B . 研究方法

ICF 症候群の特徴を有し、サテライト 2・3 と サテライトの DNA メチル化の低下を呈する ICF 症候群患者で、原因遺伝子の同定され

ていない13人のICF患者のサンプルを用いた。

各患者の genomic DNA を 500ng 用い、SureSelect Human All Exon V5 kit で DNA ライブラリーを作製した。シーケンシングを Illumina HiSeq2500 で 100bp の paired-end reads でデータ解析を行った。Read データは Burrows-Wheeler Alignment tool (BWA v0.7.4) で reference human genome (UCSC hg19) にマッピングした。重複リードを Picard (v1.87) で除去し、Genome Analysis Toolkit (GATK v2.5-2) を用いて、SNV と Indel をコールした。Annotate Variation (ANNOVAR) でアノテーションを行った。患者に近親婚の情報がある、または示唆される患者がいたことから、Homozygosity mapping の手法を用いた。SNV、Indel の中で、ホモ接合性領域が連続する領域内に存在する非同義アミノ酸置換を引き起こすホモ接合性のものを抜き出し、それらの中でアレル頻度が1%以下のもの、または新規のものを抜き出した。出てきた遺伝子の中で、患者間で共通の遺伝子に変異をもつものを同定した。

同定した遺伝子変異については、PCR を使って Sanger シーケンスで確認した。

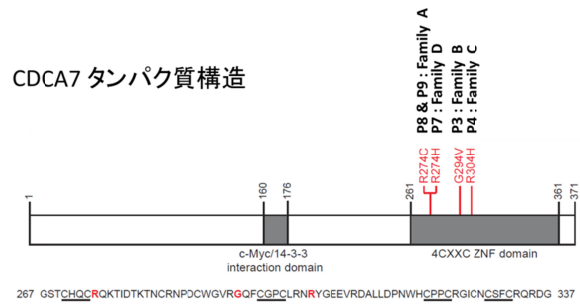
(倫理面への配慮)

全患者サンプルは採取後、匿名化され処理された。患者またはその保護者に遺伝的解析の説明を行い、同意を得た。当研究は九州大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会及び、Leiden 大学医療倫理委員会の承認を得て行われた。

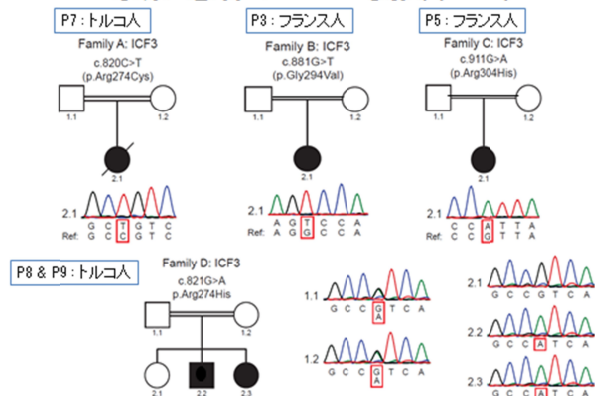
C . 研究結果

エキソーム解析に Homozygosity mapping の手法を用いて、ICF 症候群の新規原因遺伝子として4家系5人の患者で CDCA7 に遺伝子変異を、4家系5人の患者で HELLS に遺伝子変異を同定した。

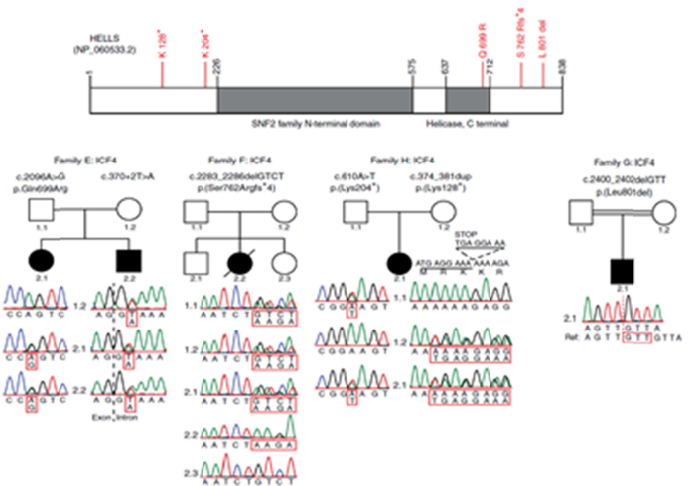
CDCA7 タンパク質構造



4家系5患者の CDCA7 変異 (ICF3)



HELLS タンパク質における変異カ所および4家系5患者の HELLS 変異 (ICF3)



CDCA7 の変異はすべてホモ接合性のミスセンス変異で、4-CXXC のモチーフをもつ Zinc Finger ドメインの中に変異を認めた。HELLS の変異は3人の複合ヘテロ変異と2人のホモ接合性変異を認め、変異の起こった場所は様々であった。

我々は CDCA7 に変異を持つ患者を3型 ICF 症候群、HELLS に変異を持つ患者4型 ICF

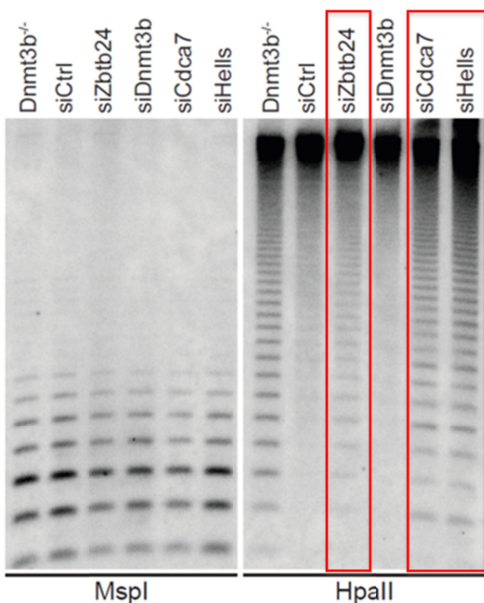
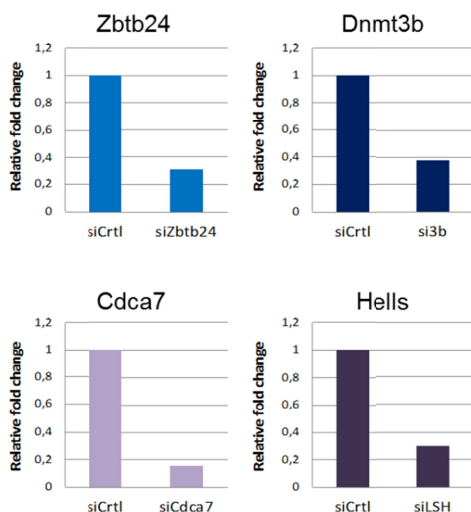
症候群として報告した。

この結果により、90%以上の ICF 症候群の患者の原因遺伝子を同定することが出来た。

ICF 症候群の分類	1型	2型	3型	4型	不明
原因遺伝子	<i>DNMT3B</i>	<i>ZBTB24</i>	<i>CDCA7</i>	<i>HELLS</i>	unknown
報告されている患者数	23	13	5	5	3
サテライト2、3のメチル化	低下	低下	低下	低下	低下
α-サテライトのメチル化	正常	低下	低下	低下	低下

同定したこれらの遺伝子をマウス胎仔線維芽細胞において siRNA を用いてノックダウンすると、セントロメア領域のマイナーサテライトにおいて、DNA メチル化の低下を認めた。

マウス胎仔線維芽細胞における ICF 症候群の原因遺伝子のノックダウンとサザン法による DNA メチル化解析



D. 考察

3 型 ICF 症候群の原因遺伝子の *CDCA7* は腫瘍形成や MYC 依存性のアポトーシス、造血幹細胞の出現に関わることが知られていたが、エピジェネティックな機能は知られていない。一方、4 型 ICF 症候群の原因遺伝子の *HELLS* はシロイヌナズナのオルソログである *DDM1* の変異体で Transposable element の DNA メチル化が低下すること、*HELLS* のノックアウトマウスにおいて、セントロメアの反復配列を含むゲノム全体の DNA メチル化が低下することが報告されていた。本研究で *CDCA7* と *HELLS* が ICF 症候群の原因遺伝子として同定され、DNA メチル化の維持に関与していることが示された。今後これらの遺伝子の機能をさらに解明することで、DNA のメチル化と免疫不全症の関係に重要な示唆が得られる。また、まだ少数の患者で原因遺伝子がされていないため、これらの患者の原因遺伝子が同定されれば、ICF 症候群の病態解明、治療に向けて手がかりが得られる。

E. 結論

ICF 症候群の新規原因遺伝子として *CDCA7* と *HELLS* の 2 つの遺伝子を同定した。マウス胎仔線維芽細胞におけるノックダウン実験により、これらの遺伝子が DNA メチル化の維持に関与していることがわかった。

本実験により 90%以上の ICF 患者の原因遺伝子が同定できた。このことは原発性免疫不全症の早期診断、治療介入に有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Thijssen, P. E. et al. Mutations in *CDCA7* and *HELLS* cause immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies syndrome. *Nat. Commun.*6:7870 doi: 10.1038/ncomms8870 (2015).

2. 学会発表

- 1) 2014年11月20・21日 第59回日本人類遺伝学会 ポスター発表。
- 2) 2015年5月25日 第9回日本エピジェネティクス研究会年回 ショートトーク。
- 3) 2015年10月15・16日 第60回日本人類遺伝学会 ポスター発表。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし