

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591247

研究課題名（和文） 原発性免疫不全症における復帰変異による体細胞モザイクの意義と分子生物学的基盤

研究課題名（英文） Research of clinical significance and molecular mechanisms of somatic revertant mosaicism in primary immunodeficiency.

研究代表者

和田 泰三 (WADA TAIZO)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：30313646

研究成果の概要（和文）：原発性免疫不全症において復帰変異による体細胞モザイクの報告が増えている。復帰変異により機能回復した細胞が増殖優位性を示す場合、一部の症例で臨床症状の改善が認められる。本研究では復帰変異のため Omenn 症候群様の症状を呈した X連鎖重症複合免疫不全症症例を見出し、復帰変異の機序や病態修飾因子としての重要性を明らかにした。本現象の解析は、病因蛋白の生体内での役割を理解する上でも有用であり、今後のさらなる進展が期待される。

研究成果の概要（英文）：Somatic revertant mosaicism has been described in an increasing number of primary immunodeficiency. Revertant cells with a selective advantage in vivo have been associated with attenuated clinical phenotype in some cases. In this research, we report an atypical case of X-linked severe combined immunodeficiency presenting with Omenn syndrome-like syndrome due to revertant mosaicism. We show the underlying mechanism and the importance of revertant mosaicism as a possible cause for variable phenotypic expression. The study of this fascinating phenomenon also continues to provide unique opportunities to evaluate the biological effects of restored gene expression and deserves close investigation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：血管発生発達病態学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：免疫学、遺伝子、原発性免疫不全症、復帰変異、体細胞モザイク

1. 研究開始当初の背景

遺伝的なモザイクとは、1個体が2種類以上の異なった遺伝子型もしくは異なった染色体構成の細胞から成ることである。染色体異常としてのモザイクがよく知られている

が、それ以外に、生殖細胞における突然変異によって起こる生殖細胞系列（germ-line）モザイクや胚形成段階における突然変異によって起こる体細胞モザイクが、ヒトの遺伝性疾患の原因として報告されている。しかし、近年これらと逆ともいえる、復帰変異

(reversion) による体細胞モザイクの存在が明らかにされつつある。復帰変異とは、ある疾患の原因遺伝子において、遺伝子変異が正常の配列に戻るか、あるいはもとの変異を代償するような第二変異が起こることである。復帰変異はこれまでに、Fanconi 貧血、表皮水疱症などで報告されている他、原発性免疫不全症では、Wiskott-Aldrich 症候群、Omenn 症候群、白血球接着異常症 1 型、アデノシンデアミナーゼ欠損症、X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) 等で報告されている。特に原発性免疫不全症では、復帰変異により機能が回復した細胞がもとの細胞に対し増殖優位性を持つ可能性があり、臨床症状の改善が期待され、「自然の遺伝子治療」としても注目されている。しかし、復帰変異が臨床像に与える影響やそのメカニズムに関しては、不明な点が多い。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、原発性免疫不全症において、復帰変異による体細胞モザイクを有する症例を数多く報告し、復帰変異が起きた細胞の種類や量、またそれら細胞の多様性や機能回復の程度を解析することにより、復帰変異が臨床像に与える影響やそのメカニズムを検討してきた。本研究は、新規に発見された、復帰変異を有する X-SCID の病態解析を行い、復帰変異の臨床的意義とその分子生物学的機序の解明を行うものである。また、種々の原発性免疫不全症の症例、特に非典型的な経過や所見を示し、復帰変異が疑われる症例について病態解析を行い、様々な知見を集めることをも目的とした。

3. 研究の方法

【対象】 復帰変異が見出された X-SCID 症例は、当初 Omenn 症候群が疑われた生後 5 ヶ月の男児である。血族結婚のない両親から出生し、生後 2 ヶ月より微熱・咳嗽を繰り返す、難治性下痢による低蛋白血症のため入院となった。全身のアトピー性皮膚炎様皮疹、リンパ節腫脹、肝脾腫、白血球増多、IgG 低値、IgE 高値を認めたが、Omenn 症候群の原因として最も多い Rag 遺伝子に異常は認めなかった。

【方法】

1) リンパ球における γc 鎖発現の解析: リンパ球亜群における γc 鎖発現は、PE 標識抗 CD132 抗体ならびに、FITC 標識された各リンパ球亜群特異的抗体を用いた 2 カラーフローサイトメトリー法により評価する。

2) γc 鎖 (IL2RG) 遺伝子解析: 免疫磁性ビーズ法により単離した末梢リンパ球亜群や生検材料より DNA と cDNA を作製する。PCR 法により γc 鎖遺伝子を増幅し、自動シーケンサーにより塩基配列を解析する。必要に応じ、増幅した PCR 産物を TA クローニングし、それぞれのクローンについて塩基配列を決定する。正常に対する変異 mRNA の発現量を検討するために、一方を蛍光標識した特異的プライマーを用いて増幅し、シーケンサーを用いた GeneScan 法により解析する。

3) 遺伝子多型によるキメラ解析: 復帰変異を有する細胞が患児自身の細胞であることを証明するために、遺伝子多型によるキメラ解析を行う。実際には、一方を蛍光標識した D9S1198 や H0-1 (heme oxygenase-1) プロモーター等の特異的プライマーを用いて多型部位を増幅し、シーケンサーを用いた GeneScan 法により解析する。

4) T 細胞レセプター (TCR) レパトアの解析: 復帰変異を有する T 細胞の性状を明らかにするために TCR レパトアの解析を行う。RPE・Cy5 標識抗 CD4、FITC 標識抗 CD8 ならびに PE 標識抗 TCRV β 抗体を用いた 3 カラーフローサイトメトリー法と、単離した CD4⁺/CD8⁺ T 細胞より作製した cDNA を用いて TCRV β CDR3 サイズ分布の解析 (CDR3 スペクトラタイピング) により行う。CDR3 サイズは、24 種の 5' TCRV β 特異的プライマーと蛍光標識した 3' TCR 定常部プライマーを用いて PCR 法にて増幅し、GeneScan 法により解析する。必要に応じ、増幅した PCR 産物を TA クローニングし、それぞれのクローンについて塩基配列を決定する。

5) 皮膚浸潤リンパ球の解析: 皮膚浸潤リンパ球の解析は、通常の免疫染色による方法のほか、採取された皮膚を細切、細胞浮遊液とした後に、フローサイトメトリー法にて表面抗原の解析も行う。

6) T 細胞株の樹立とクローニング: X-SCID 患児由来の T 細胞株は、末梢血単核球を抗 CD3 抗体とインターロイキン 2 にて刺激培養し、ヘルペスウイルスサイミリを感染させて作製する。限界希釈法によりクローニングし、もとの変異のみを有する T 細胞株と、もとの変異と復帰変異を有する T 細胞株を得る。正常対照からも T 細胞株を樹立する。

7) T 細胞株の表面抗原発現や機能の解析: γc 鎖発現やその他の表面抗原の発現、インターロイキン 2 への反応性などのプロフィールを正常対照と比較する。

4. 研究成果

重症複合免疫不全症の中で最も頻度の高い X-SCID は、サイトカインレセプターである γc 鎖の異常に起因し、T 細胞と NK 細胞の発生が障害されることが特徴である。我々は、世界で 2 番目の報告例となる復帰変異を有した X-SCID 乳児例を見出し報告した (Wada T et al. Blood 2008.)。患児は IL2RG 遺伝子に変異 IVS1+5G>A を有し、スプライス異常により大部分の mRNA は早期翻訳停止となっていたが、一部に正常 mRNA も作られており、 γc 鎖発現の低下した異常な T 細胞と NK 細胞が認められた。この異常 T 細胞の存在を背景に、患児では皮膚浸潤 CD8⁺ T 細胞に第二変異 IVS1+29G>A が生じていた。患児由来 T 細胞株の検討から、本復帰変異は、元の変異 IVS1+5G>A により生じる cryptic なスプライス部位の近傍に生じたため、正常なスプライシングを回復させることがその分子生物学的メカニズムであると判明した。本例の特徴として、第二変異を有する T 細胞が末梢血中では検出されず、皮膚にのみ認められたことがあげられる。おそらく感染や自己抗原などの局所の要因により revertant クローンが増殖したためと考えられた。このように復帰変異による体細胞モザイクは、僅かなクローンに生じた場合でも、原発性免疫不全症患者の臨床症状に複雑な変化をもたらし得ることが明らかにされた。

その後、本症例の弟が出生し、同一の IL2RG 遺伝子変異 IVS1+5G>A を有することが判明した。自己 NK 細胞の出現は認めたものの、自己 T 細胞や復帰変異を有した T 細胞の出現は認められなかった。さらに、自己 NK 細胞を有する別の非典型的 X-SCID 症例の解析でも、復帰変異の出現は認められなかった。原発性免疫不全症において非典型的所見を示した場合、必ずしも復帰変異がみられるわけではないが、その頻度は予想異常に高いことが知られている。したがって、常にその存在に注意する必要があり、また治療に応用できる可能性もありその分子生物学的基盤のさらなる解明が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu H,

- Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients. Clin Immunol. 2011; 138: 172-177. (査読有)
2. Wada T, Tone Y, Shibata F, Toma T, Yachie A. Delayed Wound Healing in Leukocyte Adhesion Deficiency Type 1. J Pediatr. 2011; 158: 342. (査読有)
3. Radhakrishnan N, Yadav SP, Sachdeva A, Pruthi PK, Sawhney S, Piplani T, Wada T, Yachie A. Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia. J Pediatr Hematol Oncol. 2011; 33: 74-78. (査読有)
4. Shimizu M, Tone Y, Toga A, Yokoyama T, Wada T, Toma T, Yachie A. Colchicine responsive chronic recurrent multifocal osteomyelitis with MEFV mutations: A variant of familial Mediterranean fever? Rheumatol. 2010; 49: 2221-2223. (査読有)
5. Wada T, Mase S, Shibata F, Shimizu M, Toma T, Yachie A. Differential resistance to antiviral drugs in an immunocompromised patient with cytomegalovirus encephalitis. J Clin Virol. 2010; 49: 223-224. (査読有)
6. Shimizu M, Yokoyama T, Yamada K, Kaneda H, Wada H, Wada T, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Yachie A. Distinct cytokine profiles of systemic juvenile idiopathic arthritis-associated macrophage activation syndrome with particular emphasis on the role of interleukin-18 in its pathogenesis. Rheumatol. 2010; 49: 1645-1653. (査読有)
7. Shimizu M, Yokoyama T, Wada T, Yachie A. Bicipital synovial cyst in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. J Pediatr. 2010; 157: 168. (査読有)
8. Toga A, Wada T, Sakakibara Y, Mase S, Araki R, Tone Y, Toma T, Kurokawa T, Yanagisawa R, Tamura K, Nishida N, Taneichi H, Kanegane H, Yachie A. Clinical significance of CD5 downregulation in Epstein-Barr virus (EBV)-infected CD8⁺ T lymphocytes in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. J Infect Dis. 2010; 201: 1923-1932. (査読有)
9. Wada T, Yokoyama T, Nakagawa H, Asai E, Toga A, Sakakibara Y, Shibata F, Tone Y, Shimizu M, Toma T, Yachie A. Flow cytometric analysis of skin blister

- fluid induced by mosquito bites in a patient with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Int J Hematol.* 2009; 90: 611-615. (査読有)
10. Okajima M, **Wada T**, Nishida M, Yokoyama T, Nakayama Y, Hashida Y, Shibata F, Tone Y, Ishizaki A, Shimizu M, Saito T, Ohta K, Toma T, Yachie A. Analysis of T-cell receptor V β diversity in peripheral CD4+ and CD8+ T lymphocytes in patients with autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol.* 2009; 155: 166-172. (査読有)
 11. **Wada T**, Candotti F. Somatic mosaicism in primary immune deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008; 8: 510-514. (査読なし)
 12. **Wada T**, Yasui M, Toma T, Nakayama Y, Nishida M, Shimizu M, Okajima M, Kasahara Y, Koizumi S, Inoue M, Kawa K, Yachie A. Detection of T lymphocytes with a second-site mutation in skin lesions of atypical X-linked severe combined immunodeficiency mimicking Omenn syndrome. *Blood.* 2008; 112: 1872-1875. (査読有)
 13. **和田泰三**. 原発性免疫不全症における遺伝子変異の reversion (復帰). *金沢大学十全医学会雑誌.* 2008; 117: 139-142. (査読なし)
- [学会発表] (計 14 件)
1. **和田泰三**, 榊原康久, 東馬智子, 新井田要, 谷内江昭宏, 平松正行, 堀澤徹, 岡田直樹, 伊藤順庸, 中村常之, 犀川太. Intermittent X-linked thrombocytopenia の 1 例. 第 4 回日本免疫不全研究会 (2011. 1. 22, 九州大学医学部百年講堂, 福岡県)
 2. **和田泰三**, 榊原康久, 榊暁子, 横山忠史, 清水正樹, 東馬智子, 谷内江昭宏. 蚊アレルギー/蚊刺過敏症における水疱内細胞成分の解析. 第 42 回日本小児感染症学会 (2010. 11. 27-28, 仙台国際センター, 宮城県)
 3. **Wada T**, Sakakibara Y, Shimizu M, Nishimura R, Toma T, Ueno Y, Horita S, Yasumi T, Ohara O, Yachie A. Increased subpopulation of CD8+ T cells with CD5 down-regulation in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 2. XIVth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (2010. 10. 6-9, Istanbul Lutfi Kirdar Convention Center, トルコ)
 4. Asai E, **Wada T**, Sakakibara Y, Toma T, Shimizu T, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in patients with RAG1/2 deficiency. XIVth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (2010. 10. 6-9, Istanbul Lutfi Kirdar Convention Center, トルコ)
 5. **和田泰三**, 榊暁子, 榊原康久, 東馬智子, 柳沢龍, 金兼弘和, 谷内江昭宏. EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症における EBV 感染 CD8 陽性 T 細胞の特徴. 第 72 回日本血液学会学術集会 (2010. 9. 24-26, パシフィコ横浜, 神奈川県)
 6. **Wada T**, Toga A, Sakakibara Y, Toma T, Yanagisawa R, Kanegane H, Yachie A. Clinical significance of CD5 downregulation in Epstein-Barr virus (EBV)-infected CD8+ T lymphocytes in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. 14th International Congress of Immunology (2010. 8. 22-27, 神戸国際展示場, 兵庫県)
 7. **和田泰三**, 榊暁子, 榊原康久, 東馬智子, 谷内江昭宏, 柳沢龍, 金兼弘和. EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症における EBV 感染細胞の特徴. 第 20 回 EB ウイルス感染症研究会 (2010. 3. 6, ベルサール八重洲, 東京都)
 8. **Wada T**. Revertant Somatic Mosaicism in Primary Immunodeficiency. The 2nd Symposium for PID in Asia (2010. 2. 4-5, かずさアカデミアホール, 千葉県)
 9. **和田泰三**. 原発性免疫不全症における遺伝子変異の reversion (復帰). 十全医学会総会・学術集会 (2009. 7. 25, 金沢大学医学部記念館, 石川県)
 10. **和田泰三**, 中川裕康, 橋田暢子, 柴田文恵, 刀裨裕美, 清水正樹, 東馬智子, 笠原善仁, 谷内江昭宏. 蚊刺による水疱の細胞成分を解析した慢性活動性 EB ウイルス感染症の 1 例. 第 19 回 EB ウイルス感染症研究会 (2009. 3. 7, ベルサール八重洲, 東京都)
 11. **和田泰三**, 柴田文恵, 中川裕康, 橋田暢子, 刀裨裕美, 清水正樹, 東馬智子, 笠原善仁, 谷内江昭宏. 慢性活動性 EB ウイルス感染症男児例における蚊刺後の水疱内細胞成分の解析. 第 16 回北陸ウイルス研究会 (2008. 9. 13, 金沢都ホテル, 石川県)
 12. **和田泰三**. EB ウイルス関連血球貪食症候群における EBV 感染細胞と CD5 発現の解析. 第 4 回小児皮膚免疫アレルギー (2008. 6. 18, ホテル日航金沢, 石川県)
 13. **Wada T**, Yasui M, Toma T, Nakayama Y, Nishida M, Shimizu M, Okajima M, Kasahara Y, Koizumi S, Inoue M, Kawa K,

Yachie A. Detection of T lymphocytes with a second-site mutation in skin lesions of atypical X-linked severe combined immunodeficiency mimicking Omenn syndrome. XIIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (2008.10.16-19, Theater aan de Parade, オランダ)

14. **和田泰三**, 東馬智子, 刀祢裕美, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏, 安井昌博, 井上雅美, 河敬世. Omenn 症候群様症状を呈した非典型的 X-SCID にみられた遺伝子変異の復帰. 第 111 回日本小児科学会学術集会 (2008.4.25-27, 東京国際フォーラム, 東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 泰三 (WADA TAIZO)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号 : 30313646

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし