

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461570

研究課題名(和文) 遺伝性リンパ増殖症の新たな診断法の開発と病態解析

研究課題名(英文) Establishment of novel diagnosis and analysis of pathogenesis of hereditary lymphoproliferative disorders

研究代表者

金兼 弘和 (Kanegane, Hirokazu)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：00293324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝的要因を有すると考えられるリンパ増殖症の患者を対象に全エクソーム解析を行い、NRAS体細胞変異によるRAS関連自己免疫性リンパ増殖症候群様疾患、X染色体の不活化異常による女性XIAP欠損症、IL2RG遺伝子の体細胞モザイクを有する非典型的X連鎖重症複合免疫不全症、SH2D1A遺伝子の体細胞モザイクを有する非典型的X連鎖リンパ増殖症候群1型、ZAP70遺伝子の部分的機能低下型変異を有するEBウイルス関連リンパ増殖症(EBV-LPD)、IKAROS欠損症を同定した。そこでEBV-LPDの原因遺伝子を次世代シーケンサーを利用して網羅的に診断する方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：We performed whole exome sequencing in patients with possible hereditary lymphoproliferative disorders, and identified NRAS-associated lymphoproliferative disorder, female XIAP deficiency caused by extremely skewed X-chromosome inactivation, atypical X-linked severe combined immunodeficiency with IL2RG mosaicism, atypical X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 with SH2D1A mosaicism, Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorder (EBV-LPD) caused by hypomorphic ZAP70 mutation and IKAROS deficiency. It has been proved that EBV-LPD might be associated with at least 23 candidate genes. Therefore, we established comprehensive diagnostic tool by using multiplex PCR and next-generation sequencer.

研究分野：小児科学

キーワード：X連鎖リンパ増殖症候群 自己免疫性リンパ増殖症候群 SH2D1A XIAP NRAS ZAP70 IKZF1

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性リンパ増殖症は遺伝的要因によってリンパ球の異常増殖が生じ、悪性リンパ腫や血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) などを呈する疾患であり、早期に診断し、適切な治療介入を行わないと予後不良となりうる。代表的疾患として X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) と自己免疫性リンパ増殖症候群 (ALPS) がある。筆者は XLP ならびに ALPS に関する研究では国内随一であり、これまでこれらの疾患の臨床的・遺伝学的特徴を国内のみならず国際共同研究によって明らかにしてきた。

XLP および ALPS のほとんどは遺伝子解析によって診断可能であるが、その原因遺伝子は複数におよび、生殖細胞変異のみならず体細胞変異による症例も少なからず存在することが明らかになってきた。また XLP および ALPS と診断できない類縁疾患も少なからず存在することがわかってきた。そこで次世代シーケンサーを利用して網羅的かつ効果的な遺伝子診断法の開発が望まれた。

## 2. 研究の目的

XLP の原因遺伝子は約 80% が *SH2D1A* (XLP1)、約 20% が *XIAP* (XLP2) とされている。その他の XLP 様疾患の原因遺伝子として *ITK*, *CD27*, *MAGT1*, *CTPS1* などが報告されている。また ALPS の原因遺伝子はほとんどが *FAS* であるが、*FASLG*, *FADD*, *CASP10* も報告されている。また ALPS 類縁疾患の原因遺伝子として *CASP8*, *NRAS*, *KRAS* も報告されている。このように XLP および ALPS は類縁疾患も含めて多様な原因によって発症しているため、網羅的遺伝子解析が必要である。また体細胞モザイク例も少なからず存在する。そこで次世代シーケンサーによる網羅的診断法ならびに全エクソーム解析による新規原因遺伝子の同定を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 患者または家族から文書による同意を得て、静脈血を採取し、フローサイトメトリーによるスクリーニングを行う。XLP および ALPS が強く疑われるものに対してはサンガー法による遺伝子解析を行う。

(2) 上記遺伝子解析によって原因が同定できなかった XLP および ALPS 類縁疾患を対象に本人ならびに両親から DNA を得て、全エクソーム解析を行う。原因遺伝子が同定された場合には機能的解析によって真に原因であるかどうかを確認する。

(3) 遺伝子リンパ増殖症の原因遺伝子をマルチプレックス PCR で一度に増幅し、増幅されたアンプリコンを次世代シーケンサーで解析することによって網羅的に診断可能な方法を開発する。

## 4. 研究成果

(1) Double-negative T (DNT) 細胞の増加を伴っていたが、*FAS* 遺伝子変異が同定されなかった ALPS 類縁疾患患者を対象に全エクソーム解析を行ったところ、*NRAS* の体細胞変異が同定され、*RAS* 関連 ALPS 様疾患 (RALD) であると診断できた。従来 RALD では DNT 細胞の増加は認められなかったが、自験例は DNT 細胞の増加を伴っていた点がユニークであった (J Clin Immunol 2015;35:454-8)。

(2) 同一家系の女兒 1 例、男児 2 例が血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) を発症したが、家族性 HLH の原因遺伝子は同定されなかった。そこで全エクソーム解析を行ったところ、*XIAP* 変異が同定され、XLP2 (*XIAP* 欠損症) 家系と診断された。女兒も男児と同様に *XIAP* 蛋白の発現低下を認め、X 染色体の異常な不活化による女性発症例であることが証明された。すなわち世界初の HLH を発症した女性 *XIAP* 欠損症であった (J Clin Immunol 2015;35:244-8)。

(3) 原因不明の複合免疫不全症の患者を対象に全エクソーム解析を行ったところ、X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) の原因遺伝子である *IL2RG* の変異が同定された。しかも患者では細胞毎に体細胞モザイク比率が異なっていた。通常 X-SCID は生後数か月で発症するが、自験例では体細胞モザイクのため、遅発発症で非典型的な症状を呈していたと考えられた (J Clin Immunol 2015;35:610-4)。

(4) 低ガンマグロブリン血症を呈する男子 3 例を含む 1 家系について全エクソーム解析を行ったところ、*SH2D1A* 遺伝子変異が同定され、XLP1 家系と診断した。上記 3 例を対象に、リンパ球亜群における SAP 蛋白の発現、リンパ球亜群における *SH2D1A* 遺伝子変異、EBV 感染細胞に対する細胞傷害性 T 細胞機能などを評価した。XLP1 は通常リンパ球における SAP 蛋白欠損を特徴とするが、今回同定された 3 例ではメモリー (CD45RO 陽性) CD8<sup>+</sup>T 細胞の一部に SAP 陽性分画が認められ、さらに 1 例では SAP 陽性分画がメモリー CD4<sup>+</sup>T 細胞にも認められた。磁気ビーズ法でメモリー T 細胞群をソーティングして、*SH2D1A* 遺伝子解析を行ったところ、正常アレルのピークが観察され、TA クローニングによって正常アレルの存在が確認された。SAP 陽性 CD8<sup>+</sup>T 細胞分画は自己の EBV 不死化 B 細胞株に対する細胞傷害性機能を有していることが、CD137 の発現で確認され、SAP 陽性 CD4<sup>+</sup>T 細胞分画は選択的に IL-10 の産生能を有していた *SH2D1A* 体細胞変異により SAP 陽性細胞がメモリー T 細胞に選択的に認められた XLP1 の 1 家系を同定した。この家系においては、わずかであるが正常機

能を有する SAP 陽性 T 細胞が免疫能を代償し、軽症化に関わっているものと考えられる (投稿準備中)。

(5) それまでに易感染性が明らかでなく生後 21 か月時に EBV ウイルス関連リンパ増殖症 (EBV-LPD) をきたした男児に対して遺伝・免疫学的解析を行った。患児の血液由来 DNA を用いて、全エクソーム解析で新規の ZAP70 複合ヘテロ接合体変異を同定した。既報の ZAP70 欠損症は CD4<sup>+</sup>T 細胞の機能障害と CD8<sup>+</sup>T 細胞の欠損を伴う SCID として報告されているが、自験例では CD8<sup>+</sup>T 細胞数は軽度の減少のみで機能的な CD4<sup>+</sup>T 細胞も少量存在した。患児の血液由来 RNA からは少量の正常転写産物が確認でき、このことが SCID とならず、病原体に対して一定の防御機構をもつ原因と考えられた。また EBV 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞と iNKT 細胞は欠損しており、次世代シーケンサーを用いた T 細胞受容体レパトア解析では著明な偏移を認めるとともに相補性決定領域における EBV 特異的塩基配列の欠如がみられた。部分的な機能低下型 ZAP70 変異は EBV-LPD を呈する新たな疾患群である可能性がある (投稿中)。

(6) *IKZF1* によってコードされる IKAROS は造血に重要な働きをする転写因子である。*IKZF1* の体細胞変異は白血病の発症に関わるが、IKAROS 欠損による原発免疫不全症についてはまだよくわかっていない。低ガンマグロブリン血症または自己免疫疾患を有する患者を対象に全エクソーム解析を行ったところ、6 家系 9 例で *IKZF1* のヘテロ接合体生殖細胞変異が同定された。8 例は B 細胞欠損を伴う低ガンマグロブリン血症を呈していた。4 例は ITP、IgA 血管炎、SLE といった自己免疫疾患を合併していた。変異 IKAROS 蛋白は DNA 結合能ならびに核移行の異常が認められた。骨髄では共通リンパ球前駆細胞の減少が認められた。生殖細胞系列のヘテロ接合体 *IKZF1* 変異は低ガンマグロブリン血症、B 細胞欠損、自己免疫疾患の原因となりうることが示された (J Allergy Clin Immunol. 2016 Dec 1. [Epub ahead of print])。

(7) 遺伝学的に EBV に対する免疫応答の欠陥のために EBV-LPD を発症する疾患も知られており、代表的なものは XLP である。XLP の原因遺伝子として *SH2D1A* (XLP1) ならびに *XIAP* (XLP2) が同定されている。この他、*ITK*、*CD27* なども同定され、原因遺伝子の多くは臨床的に XLP に類似する臨床像を呈する。これらの原因遺伝子は、現在まで全エクソーム解析により同定されてきたが、コストと時間を要する。そこで迅速にかつ比較的安価に EBV-LPD を診断すべくターゲットシーケンスによる網羅的診断法を開発した。候補となる 23 遺伝子についてエキソ

近傍のイントロンを含む領域を増幅するプライマーを設定し、マルチプレックス PCR にてすべてのアンプリコンを増幅する。増幅されたアンプリコンを次世代シーケンサーにて塩基配列を決定し、既知の SNP を除いたものを候補遺伝子として報告する。この網羅的診断法を用いて、変異が確定している 8 遺伝子の患者サンプルを用いて精度検証を行った。さらに、臨床的に EBV-LPD が疑われる 16 名の患者に対して網羅的診断法を行ったところ、2 例で原因遺伝子が同定された (投稿準備中)。

## 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 12 件)

Hoshino A, Kanegane H (29 番目、他 27 名) Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in humans with germline *IKZF1* mutations. **J Allergy Clin Immunol** 査読あり 2016 Dec 1. [Epub ahead of print]

Takagi M, Kanegane H (12 番目、他 23 名) Haploinsufficiency of TNFAIP3 (A20) by germline mutation is involved in autoimmune lymphoproliferative syndrome. **J Allergy Clin Immunol** 査読あり 2016 Nov 12. [Epub ahead of print]

Tsujita Y, Kanegane H (18 番目) , Ohara Q (29 番目、他 30 名) Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause activated phosphatidylinositol 3-kinase  $\delta$  syndrome-like immunodeficiency. **J Allergy Clin Immunol** 査読あり 2016;138(6):1672-1680.e10. doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.055.

Ono S, Kanegane H (17 番目、他 15 名) Hematopoietic Stem Cell Transplantation for XIAP Deficiency in Japan. **J Clin Immunol**. 査読あり 2017;37(1):85-91. doi: 10.1007/s10875-016-0348-4.

Sato T, Ohara Q (15 番目), Kanegane H (16 番目、他 14 名) Novel compound heterozygous mutations in a Japanese girl with Janus kinase 3 deficiency. **Pediatr Int**. 査読あり 2016;58(10):1076-1080. doi: 10.1111/ped.13070.

Suzuki T, Kanegane H (10 番目、他 10 名) Targeted Sequencing and Immunological Analysis Reveal the Involvement of Primary Immunodeficiency Genes in Pediatric IBD: a Japanese Multicenter Study. **J Clin Immunol**. 査読あり

2017;37(1):67-79. doi:  
10.1007/s10875-016-0339-5.  
Ikegame K, Kanegane H (5 番目、他 10 名 ) Allogeneic stem cell transplantation for X-linked agammaglobulinemia using reduced intensity conditioning as a model of the reconstitution of humoral immunity. **J Hematol Oncol** 査読あり 2016;9:9. doi: 10.1186/s13045-016-0240-y.  
Okuno Y, Kanegane H (24 番目、他 22 名 ) Late-onset combined immunodeficiency with a novel IL2RG mutation and probable revertant somatic mosaicism. **J Clin Immunol** 査読あり 2015;35(7):610-4. doi: 10.1007/s10875-015-0202-0.  
Nishida N, Kanegane H (16 番目、他 14 名) Dysgammaglobulinemia associated with Glu349del, a hypomorphic XIAP mutation. **J Investig Allergol Clin Immunol** 査読あり 2015;25(3):205-13.  
Hiejima E, Kanegane H (8 番目、他 19 名) Reduced Numbers and Proapoptotic Features of Mucosal-associated Invariant T Cells as a Characteristic Finding in Patients with Inflammatory Bowel Disease. **Inflamm Bowel Dis.** 査読あり 2015;21(7):1529-40. doi: 10.1097/MIB.0000000000000397.  
Shiota M, Kanegane H (20 番目、他 18 名) Somatic mosaicism for a NRAS mutation associates with disparate clinical features in RAS-associated leukoproliferative disease: a report of two cases. **J Clin Immunol** 査読あり 2015;35(5):454-8. doi: 10.1007/s10875-015-0163-3.  
Yang X, Kanegane H (17 番目、他 15 名) A female patient with incomplete hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by a heterozygous XIAP mutation associated with non-random X-chromosome inactivation skewed towards the wild-type XIAP allele. **J Clin Immunol** 査読あり 2015;35(3):244-8. doi: 10.1007/s10875-015-0144-6.

[学会発表](計 8 件)

金兼弘和: 教育講演 原発性免疫不全症と血液学. 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016, 10, 横浜

Kanegane H: Recent advances in primary antibody immunodeficiency and immunoglobulin replacement therapy. 21th Congress of Chinese Pediatric Society, 2016, 10, Zhuhai, China

Kanegane H: Immunoglobulin replacement for agammaglobulinemia – intravenous or

subcutaneous? APSID Main Congress, 2016, 5, Hong Kong, China

Kanegane H: Use of flow cytometry in PID diagnosis. APSID Spring School, 2016, 4, Hong Kong, China

金兼弘和: 免疫不全時の感染症. 第 47 回日本小児感染症学会 2015, 10-11, 福島

金兼弘和: シンポジウム「免疫不全と感染症 予防接種のガイドラインを含めて -免疫不全症と感染症 overview-」第 64 回日本感染症学会東日本地方会学術集会, 2015, 10, 札幌

Kanegane H: XLP (X-linked lymphoproliferative syndrome) and Epstein-Barr virus infection. V Simpósio Internacional de Imunodeficiências Primárias—SIDEPE, 5, Belo Horizonte, Brazil, 2015

Kanegane H: Reemerging subcutaneous immunoglobulin replacement therapy for primary antibody deficiency. ASPR Meeting, 2015, 4, Osaka, Japan

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/med/ped/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

金兼 弘和 (KANEGANE, Hirokazu)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号: 00293324

### (2)研究分担者

廣野 恵一 (HIRONO Keiichi)  
富山大学・大学病院・助教  
研究者番号: 80456384

### (3)連携研究者

小原 収 (OHARA Osamu)  
公益財団法人かずさ DNA 研究所・ヒトゲノム研究部・副所長  
研究者番号: 20370926

### (4)研究協力者

星野 顕宏 (HOSHINO Akihiro)