

学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	山下 基
論文審査担当者	主査 東 みゆき 副査 神奈木 真理、山岡 昇司
論文題目	A synonymous splice site mutation in <i>IL2RG</i> gene causes late-onset combined immunodeficiency
<p>(論文内容の要旨)</p> <p><要旨></p> <p>X連鎖重症複合免疫不全症(X-linked severe combined immunodeficiency, X-SCID)は、最重症型の免疫不全を呈する重症複合免疫不全症(SCID)の中では最多を占める。<i>IL2RG</i> 遺伝子の機能喪失型変異により発症し、T細胞、NK細胞の欠損が特徴的で乳児期に重症感染症を反復する。我々は慢性の皮膚ウイルス感染症に罹患した家族例において<i>IL2RG</i>のスプライスサイトの同義変異を同定した。患者末梢血にはT細胞、NK細胞ともみられたが、T細胞新性能は障害されていた。<i>IL2RG</i>の発現はスプライス異常により mRNA レベルで低下していたが、leaky に産生される正常 mRNA は正常 γc タンパクに翻訳され、タンパク発現はごくわずかながら残存していた。患者では残存する γc により、γc-JAK-STAT シグナルが保たれて T細胞、NK細胞が産生されると考えられた。また、患者 T細胞では γc-JAK-STAT シグナルが残存していたが、NK細胞では γc-JAK-STAT シグナルは著明に障害されており、NK細胞免疫不全が慢性の皮膚ウイルス感染症発症に関与した可能性が示唆された。</p> <p><諸言></p> <p>複合免疫不全症は、T細胞、B細胞、NK細胞などのリンパ球の機能低下により細胞性免疫、液性免疫の両方が障害される。生後1年以内に致死的な感染症を発症する SCID の中で最多を閉めるのが X-SCID である。X-SCID の患者においては T細胞、NK細胞は欠損もしくは著明に減少し、B細胞数は保たれる。X-SCID は X染色体上に位置する <i>IL2RG</i> 遺伝子の機能欠損型変異により引き起こされる。<i>IL2RG</i> はリンパ球の分化に必須の複数のサイトカイン(IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21)の受容体のサブセットである共通γ鎖(common γ chain: γc)をコードし、これらのサイトカインの刺激により Janus キナーゼ(JAK)、さらに下流のシグナル伝達兼転写活性化因子(signal transducers and activator of transcription, STAT)のリン酸化を介してリンパ球の分化に必須の遺伝子群を転写調節する。<i>IL2RG</i>の機能喪失型変異はリンパ球の発生障害をきたす。</p> <p>近年、比較的軽症の複合免疫不全症を示す <i>IL2RG</i> 変異が報告されている。ミスセンス変異によって γc の機能が残存したり、leaky に正常スプライスをおこすスプライスサイトやイントロンの変異により正常 γc 発現が保たれ軽症の表現型となることがわかっている。一方で、スプライ</p>	

ス異常をきたす変異の中には γc の発現が全くみられず、典型的な X-SCID の表現型を取るものもある。

この研究では慢性の皮膚ウイルス感染症を呈した非典型 X-SCID の患者の詳細な分子細胞学的な解析を通じて、スプライスサイトの同義変異が軽症の表現型をとるメカニズムを明らかにした。

<方法>

慢性の汎発性ヒトパピローマウイルス感染症をきたした 16 歳の男児と、反復性伝染性軟属腫と慢性気道感染を起こした前述男児の従兄弟の家族例の解析を行なった。患者末梢血のリンパ球サブセット解析を、フローサイトメトリーを用いて行なった。これらの患者の T-cell receptor recombination excision circles (TRECs) を末梢血から抽出した DNA を用いてリアルタイム PCR にて定量し、T 細胞新性能について検討した。

遺伝学的解析として、28 の既知の SCID 遺伝子と複合免疫不全症をきたす ATM 遺伝子の全エクソンをマルチプレックス PCR によって増幅し、次世代シーケンサーにてシーケンスを行ない *IL2RG* の同義変異を同定した。

患者末梢血単核球における mRNA レベルでの γc の発現をリアルタイム PCR を用いて定量した。タンパクレベルでの γc の発現はウェスタンブロットイングおよびフローサイトメトリーにて確認した。

同定した *IL2RG* 変異の機能的な帰結を検討するため、患者末梢血単核球を IL-2 および IL-15 で刺激して T 細胞や NK 細胞など各リンパ球サブセットにおける STAT5 のリン酸化を、フローサイトメトリーを用いて調べた。また、NK 細胞の脱顆粒活性を調べるために患者末梢血を K562 細胞と共培養して、CD107a の発現を検討した。

患者において産生されている T 細胞のレパトアを、次世代シーケンサーを用いて *TRB* 遺伝子の CDR3 領域をシーケンスすることで調べた。患者末梢血より抽出された RNA を、*TRB* 遺伝子の V 領域と C 領域に結合するプライマーを用いて VDJ 再構成の起きた *TRB* 遺伝子の特異的に増幅し、次世代シーケンサーにてディープシーケンスした。得られた配列からは iRepertoire 社のパイプラインを通じて、T 細胞のレパトアを決定した。

<結果>

患者はともにリンパ球分画は T 細胞、B 細胞、NK 細胞が存在したが、CD4+ T 細胞の減少が見られた。ナイーブ CD4+ T 細胞や recent thymic emigrant (RTE) の減少も見られ、TRECs の低下からも T 細胞の新性能が障害されていることが推察された。

患者は慢性の皮膚ウイルス感染を呈し、T 細胞の軽度の分化障害を認めたことから SCID 遺伝子のハイポモルフィック変異の可能性を考えて 28 の SCID 遺伝子と *ATM* のシーケンスを行なった。両患者に *IL2RG* の同義変異 (c.924G>A, Ser308Ser) を認めた。この変異はエクソン 7 の最終塩基に位置し、*IL2RG* のスプライシングに影響を与えている可能性を考えた。

末梢血単核球から抽出した RNA を用いて *IL2RG* 全長の逆転写-PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) を行なった。PCR 産物をクローニングして 50 クローンをシーケンスすると、予想通りエクソン 7 スキップやイントロン 7 がスプライスされずに残存した mRNA が検出されたが、正

常スプライシングが起きているものが 10%程度検出され、さらに同義変異が見られない野生型の mRNA も 10%程度検出された。また、リアルタイム PCR を用いた *IL2RG* mRNA の定量では患者では *IL2RG* mRNA が健常者の 1/10 程度に低下していることがわかった。

次に患者リンパ球の細胞表面の γ_c の発現をフローサイトメトリーにて検討した。また末梢血単核球の細胞ライセートを用いて γ_c のウェスタンブロットを行なった。フローサイトメトリーではリンパ球表面上の γ_c の発現低下を認め、ウェスタンブロットでは患者末梢血単核球において γ_c はほとんど検出されなかった。

IL2RG c.924G>A 変異の機能的意義を検討するため、 γ_c -JAK-STAT シグナルアッセイを行なった。サイトカイン刺激後に、STAT5 のリン酸化をフローサイトメトリーにて評価した。IL-2、IL-7 刺激後の STAT5 リン酸化は両患者の T 細胞で低下していた。一方で、NK 細胞においては IL-2 刺激後の STAT5 リン酸化が両患者とも全く見られなかった。NK 細胞における γ_c -JAK-STAT シグナルの選択的な障害の可能性が示唆されたため、NK 細胞の分化・増殖に重要とされる IL-15 刺激後の STAT5 リン酸化を評価した。患者の NK 細胞においては IL-15 刺激後の STAT5 リン酸化も全く見られなかった。

NK 細胞機能を評価するため K562 細胞と共培養ののちに CD107a の発現をフローサイトメトリーによって検討した。患者 NK 細胞において CD107a の発現は健常コントロールと同等に見られ、NK 細胞の脱顆粒能は正常であると考えた。

患者において産生された T 細胞のレパトアを、VDJ 再構成を経た *TRB* 遺伝子の CDR3 領域をディープシーケンスすることで評価した。患者における T 細胞レパトアは健常コントロールに比べて制限されており、偏倚していた。

<考察>

X-SCID は通常 T 細胞、NK 細胞が欠損し、乳児期に致死的な感染症を発症するが、我々は慢性の皮膚ウイルス感染症（尋常性疣贅、伝染性軟属腫）を呈した若年成人例において *IL2RG* のスプライスサイトの同義変異を同定し非典型 X-SCID と診断した。この変異はスプライシングに影響し、 γ_c の著明な発現低下と γ_c -JAK-STAT シグナル障害をきたすことを示した。一方で、この変異は同義変異であるために、わずかに産生される正常スプライシングを受けた mRNA は正常な γ_c タンパクに翻訳され、残存する γ_c -JAK-STAT シグナルによって T 細胞や NK 細胞が産生され軽症の表現型を示していると考えられた。T 細胞数が保たれているのにも関わらず、T 細胞レパトアの偏倚が見られることは、残存する γ_c -JAK-STAT シグナルによって生存優位性を持つ T 細胞が分化し末梢にて増殖したことを示唆していると考えられる。

今回解析した変異 *IL2RG* (c.924G>A, Ser308Ser) と同じ位置の同義変異 *IL2RG* (c.924G>C, Ser308Ser) がすでに報告されている。*IL2RG* c.924G>C 変異を持つ症例は典型的な X-SCID の表現型をとる。 *In silico* で c.924G>A と c.924G>C のスプライシングに与える影響を解析すると、c.924G>C の方が異常スプライシングを起こしやすいと予測された。同じ位置の同義変異 (c.924G>A と c.924G>C) にも関わらず、違う表現型をとった理由は、正常スプライシングの起きる確率の違いによると考えられる。

尋常性疣贅や伝染性軟属腫といった皮膚ウイルス感染症は、非典型 X-SCID や X-SCID の造血

幹細胞移植後に報告されている。NK 細胞欠損症でも汎発性の尋常性疣贅をきたすことが知られており、今回我々の患者で見られた NK 細胞での著明な γ c-JAK-STAT シグナル障害も併せると NK 細胞免疫の障害が、今回の患者や他の非典型 X-SCID、SCID 移植後にみられるヒトパピローマウイルス感染の原因となっている可能性が考えられる。しかし、その詳細な機序や、細胞種間で異なる γ c-JAK-STAT シグナル応答を示すメカニズムに関しては明らかにできておらず、今後の課題と考える。

患者の臨床経過から X-SCID を疑うのは困難であった。しかしながら、末梢血リンパ球サブセット（ナイーブ CD4+ T 細胞や RTE の減少）や TRECs 低値から複合免疫不全症であると考え、SCID 遺伝子のハイポモルフィック変異の可能性を考えた。候補遺伝子のエクソンのシークエンスを、網羅的に次世代シーケンサーを用いてすることで診断にいたることができた。非典型例の免疫不全症患者には、今後このようなアプローチでの網羅的遺伝的解析が有用であることを示す例であると考え。

<結論>

IL2RG のスプライスサイトの同義変異で晩発性複合免疫不全症をきたす変異を同定した。Leaky に起きる正常スプライシングにより産生される γ c により γ c-JAK-STAT シグナルが残存していた。

論文審査の要旨および担当者

報告番号	甲第 5706 号	山下 基
論文審査担当者	主 査 東 みゆき 副 査 神奈木 真理、山岡 昇司	
【論文審査の要旨】 1. 論文内容 本論文は、反復性の皮膚ウイルス感染症を呈した若年成人患者 2 症例について詳細な解析を行い、 <i>IL2RG</i> 遺伝子の第 7 エクソン末端部の同義変異 (synonymous mutation) を見出し、共通サイトカイン受容体 common gamma (γ c)鎖の発現、NK 細胞における IL-15 刺激による Stat5 リン酸化、および T 細胞抗原受容体レパトアの低下などを明らかにし、晩発性の軽度表現型の複合免疫不全症であることを明らかにしたものである。 2. 論文審査 <u>1) 研究目的の先駆性・独創性</u> <i>IL2RG</i> 遺伝子機能喪失型変異により発症する X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID)の多くは、乳児期に重症の感染症を反復する重度複合免疫不全症を呈するが、非典型 X-SCID も報告されている。本症例では、 <i>IL2RG</i> 遺伝子スプライスサイトの同義変異が起こっており、この変異が mRNA およびタンパク発現に及ぼす影響、T 細胞および NK 細胞の機能異常が軽度表現型となるメカニズムについての詳細な検討を行った初めての報告であり、その内容は評価に値する。 <u>2) 社会的意義</u> 本研究で得られた主な結果は以下の通りである。 1. 慢性皮膚ウイルス感染症を呈する非典型 X-SCID 患者において、 <i>IL2RG</i> 遺伝子エクソン 7 の末端塩基に同義変異を見出し、スプライシングに影響を与えていることを示した。 2. γ c mRNA 発現はヘテロであり、タンパク発現レベルではウェスタンブロット解析において顕著な低下が認められた。 3. 患者末梢血 T 細胞および NK 細胞は存在していたが、T 細胞新生能および T 細胞抗原受容体遺伝子レパトア多様性の制限、T 細胞あるいは NK 細胞における IL-2 および IL-15 刺激による STAT5 リン酸化の低下から分化・増殖の機能低下が示された 以上の新規知見は、 <i>IL2RG</i> 遺伝子の特定部位の同義変異が、非典型 X-SCID の軽度症状を示すメカニズムについての多くの示唆を与えるものであると思われた。また、今後の非典型 X-SCID 診断に役立つと考えられた。 <u>3) 研究方法・倫理観</u>		

研究手法は適切で、臨床検査および臨床診断に加えて、患者およびその家族からの末梢血を利用しての遺伝子解析およびフローサイトメトリー解析などが実施されており、周到な準備と理解、正しい倫理観のもとで実施されたことが窺えた。

4) 考察・今後の発展性

同義変異であるために、正常タンパクが存在する理由やスプライシングに与える影響、T細胞やNK細胞における機能異常が軽度にとどまっている理由、既存報告との異同などについて適切な考察がされており、今後の非典型免疫不全症患者の診断に役立つものと評価できた。

3. その他

特になし。

4. 審査結果

以上から、本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分な価値があるものと認められた。