

Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/30258

【要約】

修士課程優秀論文

RAG異常症患者の遺伝子変異と組換え活性の解析

Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients

金沢大学大学院医学系研究科血管発生発達病態学

(小児科学)

浅井 絵利香

はじめに

リンパ球の抗原受容体はrecombination activating genes (RAG)1とRAG2を介したV(D)J組換えにより多様性を生じる¹⁾。RAG1/RAG2複合体はこのV(D)J組換えにおいて、V領域、D領域、J領域の各領域に存在するヘプタマーとノナマー、12もしくは23のスペーサーからなる組換えシグナル配列を認識し、再構成を行うことが知られている。RAG遺伝子はRAG1、RAG2とも11番染色体短腕13に位置しており、RAG1は1043個、RAG2は527個のアミノ酸から構成されている。RAG1、およびRAG2のコア領域は外因性プラスミド基質を用いた組み替えに最低限必要とされる領域であるが、近年、非コア領域の重要性も注目されている。このRAG1、RAG2の変異により、さまざまな免疫不全症が引き起こされると報告されている。完全なRAG活性の欠損では成熟T細胞、B細胞を欠き、NK細胞が存在する重症複合免疫不全症 (T⁺B⁻ SCID) になる。一方、部分的な欠損ではOmenn症候群 (OS) になる²⁾。

従来、RAG異常症はRAG欠損の程度によってこの2つに分けられると考えられていたが、近年、部分的なRAG欠損の新たな表現型としてオリゴクローナルなTCR $\gamma\delta^+$ T細胞、自己免疫疾患、サイトメガロウイルス感染を伴う複合免疫不全症 (CID- $\gamma\delta$ /CMV) や、発症が遅く、低ガンマグロブリン血症、T細胞とB細胞の低値、皮膚、粘膜、内臓の肉芽腫の形成を示した患者や、正中線肉芽腫を形成した患者も報告された³⁾。OSは生後早期に発症し、紅皮症、リンパ節腫脹、肝脾腫、長引く下痢、体重増加不良、好酸球増多、低ガンマグロブリン血症、高IgE血症、B細胞の欠損、活性化したオリゴクローナルT細胞の出現を特徴とする。対照的に、CID- $\gamma\delta$ /CMVの患者では自己免疫性の血球減少症、血清IgEの上昇、オリゴクローナルなTCR $\gamma\delta^+$ T細胞、播種性のCMV感染を示すが、B細胞と免疫グロブリン値は正常と報告されている⁴⁾。このようにRAG異常症はRAGの欠損の程度によって臨床像が異なるため、RAG異常症において、遺伝子解析と機能解析の両方を行うことが重要である。

本研究ではRAG異常症患者5人を解析対象とし (表1)、遺伝子変異の同定と、V(D)J組換え試験によるRAG遺伝子の機能評価を行った⁵⁾。患者はいずれも非血族間に生まれた児で、患者1~4は日本人、患者5はインド人の症例である。患者1、2はOSに典型的な所見を示した。患者3は非典型的OSで、末梢血の好酸球や活性化T細胞の増加はなく、典型的な皮膚病変も存在しなかった⁴⁾。患者4は2歳の女児で、下痢、気管支肺炎、肝機能障害、CMV感染が存在した。リンパ球減少、TCR $\gamma\delta^+$ T細胞の増加 (CD3⁺ T細胞の61.7%)、自己抗体の出現を認めたが、免疫グロブリン値は正常であり、CID- $\gamma\delta$ /CMVと診断された。患者5ではNK細胞は存在したが、リンパ球減少、自己由来T⁺B細胞の低値、母親由来のCD4⁺ Tリンパ球が見られ、母親由来のT細胞を伴うT⁺B⁻ SCIDと診断された。2ヶ月までは小頭症と鵝口瘡以外は無症状であっ

た。患者4と5には家族歴が存在した。

結 果

1. 遺伝子変異の解析

患者と健常人末梢血よりDNAを回収し、RAG特異的プライマーを用いてシーケンス解析を行った。表2に示すように、患者1には2つの新規RAG2変異、R73HとQ278X、患者2ではホモ接合体の新規RAG2遺伝子変異M443Iが存在した。患者3ではRAG1にR142XとR396Hの複合ヘテロ接合体変異が見つかった。後者の変異はOS患者にくり返し報告されている。患者4ではRAG1に複合ヘテロ接合体のR474CとL732P変異が存在した。これらの変異は新規だが、類似のミスセンス変異、R474S、R474H、L732FがRAG異常症で報告されている。患者5ではRAG1に新規の変異E770Kがホモ接合体で存在した。RAG2のM443Iを除く全てのミスセンス変異はRAG1とRAG2のコア領域に存在していた。健常人100アレルの解析ではいずれの変異も見られなかった。

2. RAG遺伝子変異の組換え活性

新規遺伝子変異の病的意義を解明するために、人工の細胞外組換え基質であるpJH200を用いてV(D)J組換え試験を行った (表2)。変異RAG1の解析にはヒトRAG1発現ベクター、マウスRAG2発現ベクター、組換え基質pJH200、また変異RAG2の解析にはマウスRAG1発現ベクター、ヒトRAG2発現ベクター、pJH200を用いた³⁾。野生

表1. 患者の免疫学的特徴

患者	1	2	3	4	5
診断	OS	OS	非典型的OS	CID- δ /CMV	非典型的SCID-MFT
発症月齢	0	0	7	8	0
白血球 (/mm ³)	26900	19000	2800	3900	3280
リンパ球 (/mm ³)	8339	5700	1300	546	459
CD3 ⁺ (%)	84.8	41.3	20.0	53.9	7.8
CD4 ⁺ (%)	56.7	16.6	17.3	9.9	7.4
CD8 ⁺ (%)	27.0	37.8	1.3	35.4	0.1
CD19 ⁺ 又は20 ⁺ (%)	0.0	0.2	0.1	11.6	0.1
IgG (mg/dl)	461	220	328	678	1475
IgA (mg/dl)	<4	<1	62	63	114
IgM (mg/dl)	<4	<2	31	65	147
IgE (IU/ml)	7	<2	16	NA	NA

OS, Omenn症候群; CID, 複合免疫不全症; δ , TCR δ^+ T細胞の増加
CMV, サイトメガロウイルス; SCID, 重症複合免疫不全症
MFT, 母親由来T細胞の生着; NA, not available

表2. RAG遺伝子変異と組換え活性

患者	遺伝子	遺伝子変異	アミノ酸変異	組換え活性 (%) ^a
1	RAG2	1419G>A 2033C>T	R73H Q278X	59.3 $\pm$ 4.7 0.4 $\pm$ 0.3
2	RAG2	2530G>T ^b	M443I	8.7 $\pm$ 1.2
3	RAG1	536C>T 1299G>A	R142X R396H	51.2 $\pm$ 9.2 1.0 $\pm$ 0.5
4	RAG1	1532C>T 2307T>C	R474C L732P	47.2 $\pm$ 7.9 0.5 $\pm$ 0.4
5	RAG1	2420G>A ^b	E770K	15.6 $\pm$ 9.1
対照	RAG2	野生型	—	100
	RAG1	野生型	—	100

^a 野生型の活性に対する割合 (%)。

³ 回の独立実験の結果を平均 $\pm$ 標準偏差で表示。

^b ホモ接合体変異。

型RAG1とRAG2を共に293T細胞にトランスフェクトした場合、組換え産物が増幅したが、どちらか一方が欠けている場合は組換え産物は増幅しなかった(図1)。それぞれの変異における組換え活性は野生型の0.4~59.3%と多様で、患者ごとに平均すると有意に低下している事が証明された(図1, 表2)。

さらにミスセンス変異の影響をインターネット上の解析ツールで解析した結果、Mutation@A Glance (<http://rapid.rci.riken.jp/mutation/>)ではRAG1のE770K以外の全ての変異が、MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>)では全てのミスセンス変異が病気の原因になると予想された。

考 察

本研究ではOS3例、CID- $\gamma\delta$ /CMV1例、母親由来のT細胞を伴う非典型的SCID1例を解析し、6つの新規、2つの既報RAG遺伝子変異を確認した。

免疫不全症を引き起こすRAG遺伝子変異のV(D)J組換え活性は、一般的に野生型の30%より低いと報告されている。患者1のR73H (RAG2)、患者3のR142X (RAG1)、患者4のR474C (RAG1)は野生型のほぼ半分の活性を示したが、これらの患者のもう一方の変異は非常に低い活性しか示さなかった。V(D)J組換えの過程でRAG1とRAG2は4量体を形成するため、組換え活性の実質的な低下に至ったと考えられた。類似の結果が野生型の半分の活性を持つW522Cと全く活性の見られないL541CfsX30を持つRAG1異常症患者で報告されている。従って患者1, 3, 4においては、これらの変異の組み合わせの結果、RAG異常症の臨床像が引き起こされたと考えられた。

RAG1とRAG2のコア領域は、*in vivo*での外因性プラスミド基質を用いた組換えと、*in vitro*でのDNAの切断に最低限必要とされる重要な領域である²⁾。しかし患者2のM443Iミスセンス変異は、RAG2の非コア領域上のplant homeodomain (PHD)に位置している。近年V(D)J組換えとリンパ球の発達におけるRAG1とRAG2の非コア領域の重要性が検討されており、RAG2のPHDはクロマチンとイノシトールリン脂質の結合、タンパク質の転換の調節、RAG2の細胞局在化に重大な役割を果たすことが明らかになっている。さらにRAG2のPHDは4つのアミノ酸、Y415, M443, Y445, W453を介して、4番目のリジンがメチル化されたヒストンH3を認識することが報告された。このメチル化されたヒストンH3は転写活性に関与する。これらのデータと一致して、RAG2の非コア領域の8変異(W416L, K440N, W453R, A456T,

C446W, N474S, C478Y, H481P)がT-B⁻ SCIDとOS患者で見ついている。患者2で同定したM443I変異が著しい組換え活性の低下を示したことから、RAG2のPHD領域はV(D)J組換えにおいて重要であると考えられた。

患者3のR142X (RAG1)はナンセンス変異であるため、機能は完全に欠損すると予想されたが、実際は部分的に活性が残っていた。R142X変異は典型的なOS患者でも報告されており、その患者のもう一方のアレルにはRAG1のコア領域上に機能のないフレームシフト変異が存在した。この症例がOSの表現型を示したことからもR142X変異のV(D)J組換え活性は一部残存していると考えられた。R142Xの組換え活性の残存理由として、代替的な翻訳開始部位の存在が考えられた。過去の報告からもRAG1の2番目と3番目のメチオニン(M183, M202)による代替的な翻訳開始部位の存在が示唆されている。また、我々が行った翻訳開始予想プログラム、NetStart 1.0を用いた解析でも、M183とM202が代替的な翻訳開始部位になりうると予想された(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetStart/>)。したがって、患者3ではN末端が欠けた、すなわち、部分的な機能しか示さないRAG1によりOSが引き起こされたと考えられた。

患者4の臨床症状はCID- $\gamma\delta$ /CMVと一致した。組換え活性の低下にも関わらず、患者4では免疫グロブリン値と末梢血B細胞の割合は正常を示した。これらはSCIDやOSとは対照的だが、CID- $\gamma\delta$ /CMVの報告例の所見と一致していた。

典型的T-B⁻ SCID患者のRAG遺伝子変異は通常、ほぼ完全な組換え活性の抑制を示すが、患者5のE770K変異(RAG1)のV(D)J組換え活性は残存していた。SCID患者ではナンセンス変異やフレームシフト変異の様な重篤な変異をもつ傾向がある一方で、ミスセンス変異がSCIDを引き起こすことや、同じ変異が別の臨床像を示す事も知られている。これらの所見はV(D)J組換え活性が単独で病気の責任になっているのではないことを示唆している。RAG異常症の臨床像に影響する追加の因子を評価するために、さらなる研究が必要である。

結 語

今回5人のRAG異常症患者から新規6変異を含む8つのRAG遺伝子変異を見出し、それらの病的意義を明らかにした。RAG異常症患者の遺伝子解析と機能評価を行うことで、今後、V(D)J組換えにおけるRAGの役割が明らかとなり、さらにはRAG異常症の多様な表現型への理解が深まることが期待される。

引 用 文 献

1. M. Gellert, V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 71 (2002) 101-32.
2. A. Villa et al., Partial V(D)J recombination activity leads to Omenn syndrome. *Cell* 93 (1998) 885-96.
3. J.P. de Villartay et al., A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection. *J Clin Invest* 115 (2005) 3291-9.
4. H. Okamoto, et al., Clonotypic analysis of T cell reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in patients with severe combined immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 148 (2007) 450-60.
5. E. Asai et al., Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients. *Clin Immunol* 138 (2011) 172-177

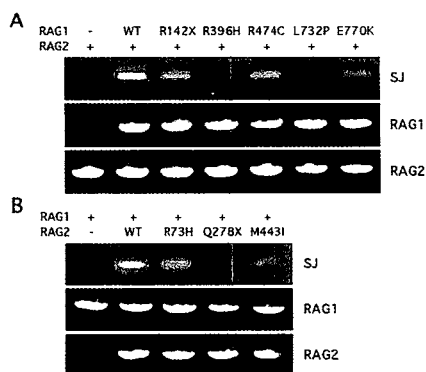


図1. V(D)J組換え試験

pHJ200と共に変異RAG1と野生型RAG2 (A), 野生型RAG1と変異RAG2 (B)を293T細胞にトランスフェクトし、組換え産物(signal joints, SJ)をPCRで解析した(上)。RAG1とRAG2の存在はベクター特異的なPCRによって確認した(中, 下)。

Clin Immunol 138 (2011) 172-177



Profile

2009年3月 金沢大学医学部保健学科卒業
2009年4月 金沢大学医学系研究科医科学専攻 入学
2011年3月 金沢大学医学系研究科医科学専攻 卒業
2011年4月 シミック株式会社 勤務