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　第117巻　第4号　139－142（2008）

【総説】

第５回　金沢大学十全医学賞受賞論文

論　文　原発性免疫不全症における遺伝子変異のreversion（復帰）
Somatic revertant mosaicism in primary immunodeficiency diseases

和田　泰三（わだ　たいぞう）

はじめに

遺伝性疾患においては，その原因となる遺伝子異常が世代を超えて引き継がれることから，遺伝子変異は安定であると考えられてきた．しかし近年，遺伝子変異のreversion（復帰），すなわち，ある疾患の原因遺伝子において，変異が正常の配列に戻る（back mutation）か，あるいは元の変異を代償するような第二変異が起こる（second-site mutation）現象の存在が知られてきた．このようなreversionが体細胞の一部に起こると，病因蛋白を発現するようになった細胞（revertant）と元の異常細胞による体細胞モザイク（somatic revertant mosaicism）が生じることになる．

原発性免疫不全症では，まず1990年代半ばに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においてreversion例が報告された．この現象は極めて稀と考えられていたが，2001年以降，Wiskott-Aldrich症候群，Omenn症候群，白血球接着異常症1型，外胚葉形成不全免疫不全症候群，CD3ζ欠損症においても，次々とreversionが報告されるようになった[1]．その他の血液疾患ではFanconi貧血やBloom症候群において，また非血液疾患であるLesch-Nyhan病，Duchenne型筋ジストロフィー，チロシン血症，Charcot-Marie-Tooth病，表皮水疱症においても報告例が散見される．原発性免疫不全症でreversionの報告が増えていることから，原発性免疫不全症にはreversionを起こしやすい，もしくはrevertantを検出しやすい共通の要因があるのかもしれない．またreversionにより臨床症状が改善される場合が知られており，「自然の遺伝子治療」としても注目されている．本総説では，自験例を中心に原発性免疫不全症における遺伝子変異のreversionの最近の知見を概説し，この現象のメカニズムや臨床的意義について論じたい．

Wiskott-Aldrich症候群におけるreversion

Wiskott-Aldrich症候群は，血小板減少，湿疹，易感染性を三主徴とするX連鎖性の疾患で，WASP（Wiskott-Aldrich syndrome protein）遺伝子の異常による．WASPは血球系細胞の細胞質内に発現しており，細胞骨格やシグナル伝達に重要な働きをしている．

筆者にとって最初のreversion例となった症例は，小児期には典型的なWiskott-Aldrich症候群の症状を認めたが20歳代を境に症状が改善するという特異な経過を示した48歳の男性であった[2]．WASP発現をフローサイトメトリーにて解析したところ，T細胞にWASP陽性の細胞群が検出され(図1)，それらは機能的にも回復していた．同細胞では，WASP遺伝子にみられた元の変異である6塩基挿入(ACGAGG)が消失し正常配列に戻っていた．この6塩基挿入は同じ配列が2回繰り返した後に認められており，DNA複製の際のスリップ(DNA slippage)によりreversionが起こったと考えられた．後の解析で本家系では複数の患者に同じreversionが存在することが判明した[3]．

また上記とは異なる家系で，同一のreversionがみられた兄弟例では，元の変異である1塩基挿入を含む19塩基対のフラグメントが除去される第二変異が生じていた[4]．この19塩基対はCCTGという反復配列で挟まれ，また内部で5つのGCペアによるヘアピン構造を形成しうる特徴的な構造をとっており，最初の症例と同様にDNA slippageがreversionに関与したと考えられた（図2）．第二変異によりフレームシフトが回復し，WASP蛋白はアミノ酸で6個短い構造ではあるが発現と機能が戻っていた．しかしながら臨床症状の改善は認められなかった．

これらの報告が契機となり，世界の40の研究グループがWiskott-Aldrich症候群患者272名を調査したところ，上記の症例

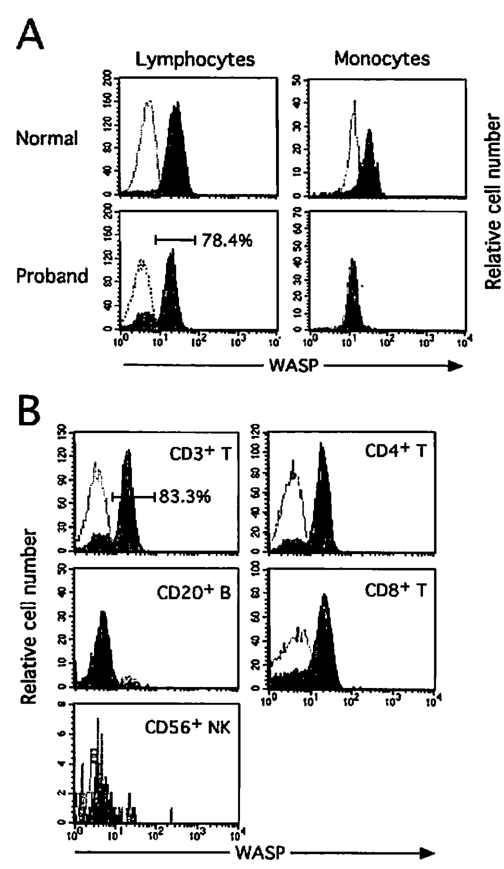

図1　遺伝子変異のreversionを認めたWiskott-Aldrich症候群患者の解析
(A) WASP発現をフローサイトメトリーにて解析したところ，リンパ球にWASP発現の回復した細胞群を認めた．(B) WASP+ 細胞はT細胞で，元の変異が正常配列に戻っていた．(文献2より)

を含め30名にreversionを見出した[5]. 実に全体の約11%にあたる予想外の高頻度であった. 現在までに明らかにされたWiskott-Aldrich症候群におけるreversionの詳細は以下のごとくである[1]. その出現は, 生後3ヶ月から40歳代にわたり, 最も多く検出されるリンパ球サブセットはT細胞であった. T細胞では5〜80%にreversionが認められるが, CD4⁺ T細胞とCD8⁺ T細胞での出現頻度はその症例により様々であった. 複数のリンパ球lineageにreversionが出現した症例が半数以上に認められたが, これまでに骨髄系細胞でのreversionは報告されていない. WASP発現の回復したrevertantは増殖優位性を有し, 時間経過と共にメモリーT細胞や制御性T細胞に集積することが示されている. 分子生物学的観点からは, 正常配列に戻る場合と第二変異による場合は同等に認められる. 約30%のreversionはGC含有率の高いエキソン10に集中している. また最近, 30以上の異なる第二変異が検出された興味深いreversion例が報告された[6]. 通常のダイレクトシークエンスでは, 多数のreversionが存在しても頻度が低い場合には検出しにくく, 技術的な理由からreversionの発生頻度は過小評価されている可能性が示唆される.

Omenn症候群におけるreversion

リンパ球抗原受容体遺伝子再構成を担う酵素であるRAG (recombination activating gene) 1またはRAG2の異常症では, RAG活性が欠損するか, 一部残存するかにより著しく異なる臨床症状を呈する. すなわち, 前者では成熟T細胞とB細胞を欠く重症複合免疫不全症となり, 後者では異常T細胞クローンの

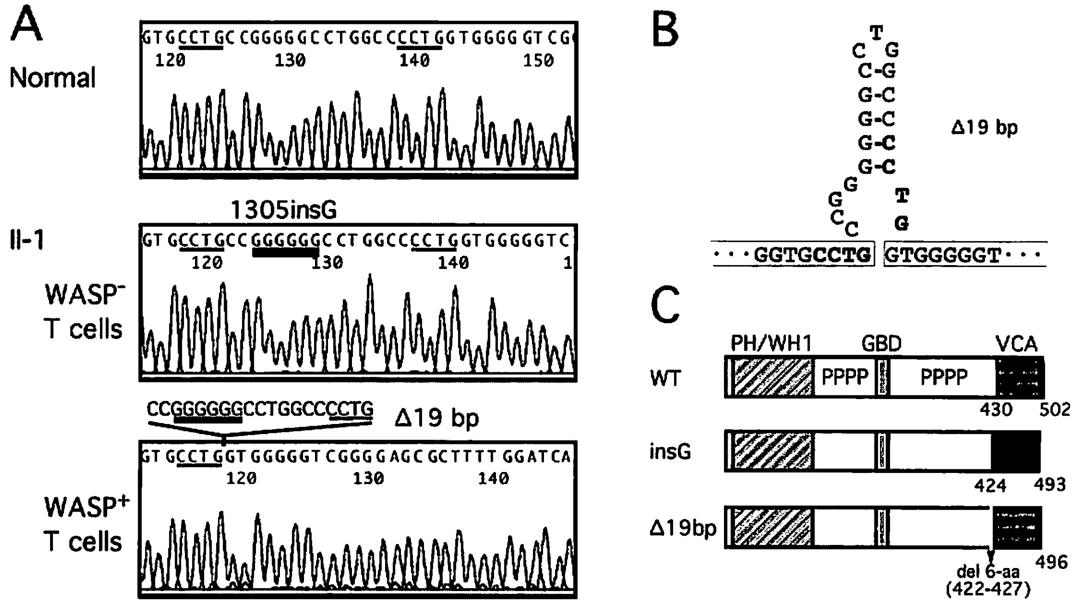

図2 第二変異を認めたWiskott-Aldrich症候群患者の解析
(A) WASP発現が回復していたT細胞を用いてWASP遺伝子を解析したところ, 元の変異である1305insGを含む19塩基対が欠損していた. (B) 19塩基対にはCCTGという反復配列が認められ, また内部に5つのGCペアによりヘアピンループを形成しうる特徴的な配列であった. (C) 第二変異によりフレームシフトが回復し, WASP蛋白はアミノ酸で6個短い構造ではあるが発現と機能が戻っていた. (文献4より)

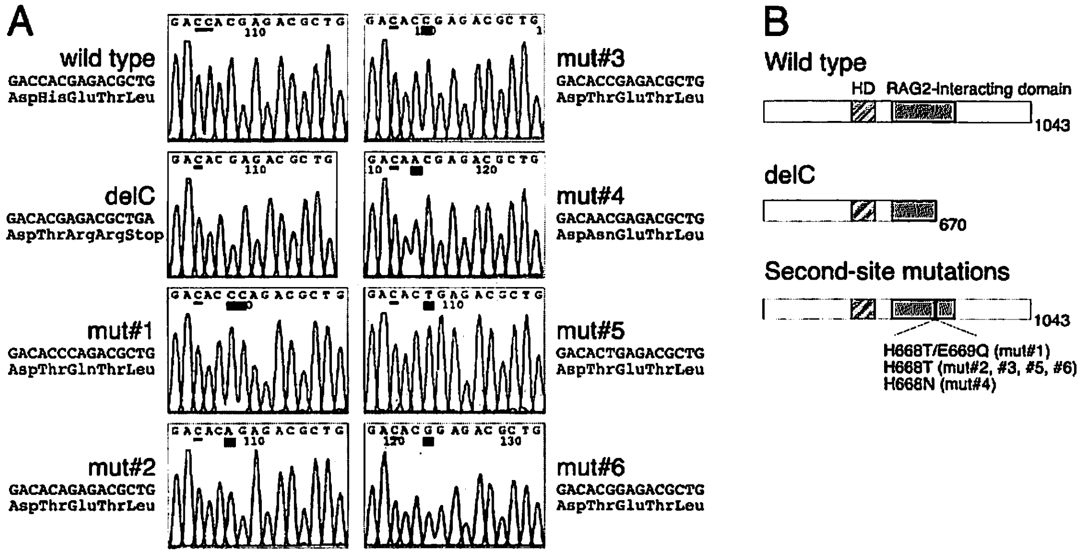

図3 第二変異を認めたOmenn症候群患者の解析
(A) 患者T細胞を用いてRAG1遺伝子を解析したところ, 元の変異である2113delC以外に6つの異なる第二変異が認められた. (B) 第二変異により元のフレームシフト変異は3つの異なるミスセンス変異に変換されていた. (文献7より)

選択的増加に起因した紅皮症，リンパ節腫脹，肝脾腫，好酸球増多，高IgE血症等を特徴とするOmenn症候群となる．

我々は，RAG1遺伝子に2113delCをホモ接合体に有し，RAG1機能の欠損により古典的な重症複合免疫不全症になると予想される患者のT細胞に6つの異なる第二変異を見出した（図3）[7]．これら第二変異により元の変異が3つの異なるミスセンス変異に変換され，変異RAG1蛋白が発現するようになったためOmenn症候群の臨床像を呈したと考えられた．このことは病態修飾因子としてのreversionの重要性を示している．また原発性免疫不全患者から複数のreversionが検出されたという点でも最初の報告例となる本例では，第二変異はT細胞のみに認められたが，すべての変異が$CD4^+$ T細胞と$CD8^-$ T細胞に同様に認められていなかった．このことは，少なくとも第二変異の一部はCD4/CD8の分化が決まった段階以降で独立に起こったことを示唆している．RAGノックアウトマウスの検討から，RAG活性が欠損した場合にはCD4/CD8に分化する以前でT細胞の分化は停止することが知られており，$CD4^+$ T細胞あるいは$CD8^+$ T細胞のみに認められた第二変異は，CD4/CD8の分化が決まる以前の前駆細胞レベルで一度reversionが起き，さらにCD4/CD8に分化した後にもう一度reversion を起こした結果である可能性があり興味深い．

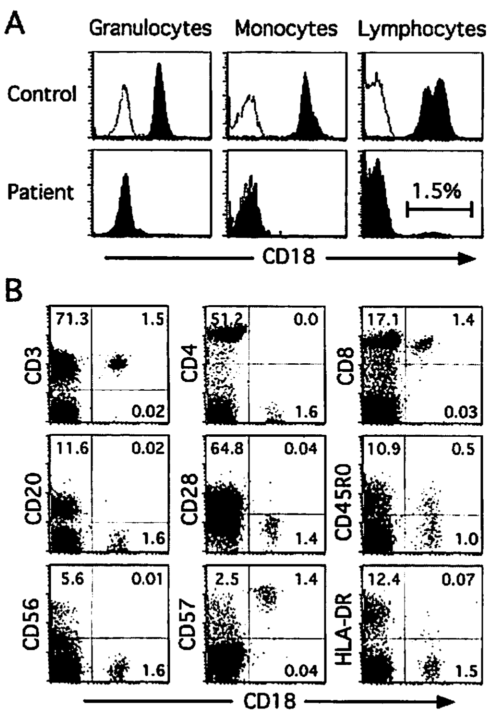

図4　遺伝子変異のreversionを認めた白血球接着不全症1型患者の解析
(A) CD18発現をフローサイトメトリーにより検討したところ，リンパ球の1.5%にCD18発現の回復した細胞群を認めた．
(B) $CD18^-$ 細胞は$CD3^+$ $CD8^+$ T細胞で，父親由来のスプライス変異が消失していた．（文献8より）

白血球接着異常症1型におけるreversion

白血球接着異常症1型は，白血球上のβ2インテグリン（CD18）の欠損による原発性免疫不全症で，重症細菌感染症，白血球異常増多，臍帯脱落遅延，創傷治癒遅延を特徴とする．患児はCD18遺伝子に新規の2つの変異をもつ複合ヘテロ接合体であり，CD18が欠損していたが，リンパ球の約1.5%に$CD18^+$ 細胞が認められた（図4）[8]．同細胞は，$CD3^+$ $CD8^+$ T細胞で，T細胞レセプターVβ22を有するシングルクローンであった．患児への母体血の混入は否定され，父親由来のスプライス変異が正常配列に戻っていたことより，患児の1つの$CD8^-$ T細胞においてreversionが起きたと考えられた．本報告により，reversionは前駆細胞だけではなく，より成熟した細胞でも起こり得ることが示された．この$CD8^+$ T細胞は，CD2刺激に対するin vitroでの増殖反応が回復しており，生体内で増殖優位性を示し集積したものと考えられた．しかしながら，骨髄系細胞にはreversionは検出されず，患児の臨床症状の改善は認められなかった．従ってreversionにより臨床症状が修飾ないし改善されるには，revertantの種類や量，多様性が重要であることが示唆される．

その後，reversionを有する同様の患者3名がUzelらより報告された[1]．我々の症例と同様に，同患者では$CD8^+$ T細胞の5〜20%に$CD18^+$ 細胞を認めた．直接的な証拠は示されていないものの，いずれの患者も炎症性腸疾患に罹患しており，revertantが細胞障害性T細胞として働いている可能性があり興味深い．

X連鎖重症複合免疫不全症におけるreversion

重症複合免疫不全症の中で最も頻度の高いX連鎖重症複合免疫不全症は，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．我々は最近，世界で2番目の報告例となるreversionを有したX連鎖重症複合免疫不全症乳児例を見出した[9]．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

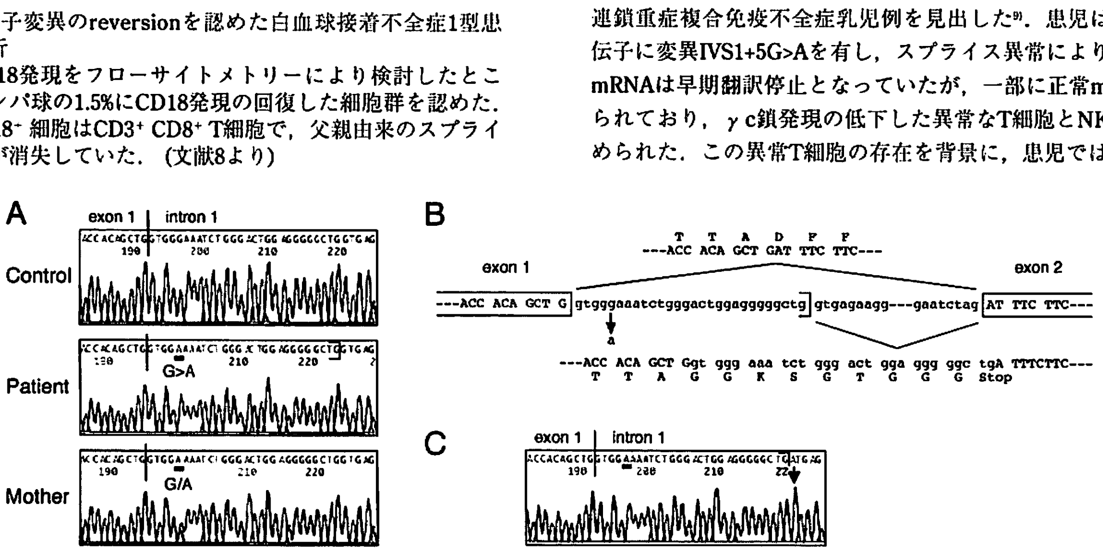

図5　第二変異を認めたX連鎖重症複合免疫不全症患者の解析
(A) 患児はIL2RG遺伝子に変異IVS1+5G>Aを有していた．(B) スプライス異常により大部分のmRNAは早期翻訳停止となるが，一部に正常mRNAも作られていた．(C) γc発現の回復したT細胞では，第二変異IVS1+29G>Aが認められ正常なスプライシングのみが起こっていた．（文献9より）

CD8+ T細胞にreversionが起こり，Omenn症候群様症状を呈していた．Revertantでは元の変異IVS1+5G>Aにより生じるcrypticなスプライス部位の近傍に第二変異IVS1+29G>Aが出現したために，正常なスプライシングが回復していた（図5）．本例の特徴として，reversion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reversionによる体細胞モザイクは，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示された．

ごく最近，3番目のreversion例がSpeckmannらにより報告された．1996年に報告された最初の症例と同様に，患者T細胞では遺伝子変異が正常配列に戻っていた．同細胞は多クローン性でマイトジェンに対する増殖反応も正常であり，臨床症状が改善されていた[1]．

おわりに

以上，reversionは非常に多様性をもった現象であることが判明してきた．すなわち，遺伝子変化は一塩基置換から大きな遺伝子欠失に至るまでの広範なスペクトラムを有し，reversionに関わる細胞タイプは多数の細胞lineageからシングルクローンに限定されているものまで幅広い．このような多様性が生み出される理由はよくわかっていないが，reversionは著しく稀な現象で寿命の長い前駆細胞のレベルで起こり末梢にでてくる，という従来の仮説は再考の余地があるだろう．一部の症例で反復配列によるDNA slippageやヘアピン構造が分子生物学的なメカニズムとして示唆されるが，大部分のケースではreversionが起きる特異的なモデルは存在しない．生理的にみられるDNA修復時のランダムな遺伝子の変化が，好都合にも遺伝子変異を修復する形となり，元の病的細胞に対し強い増殖優位性を付与する結果，revertantが出現する可能性の方が考えやすいかもしれない．原発性免疫不全症患者では，自己抗原や慢性あるいは反復性の感染症，抗生物質への長期暴露などによって免疫担当細胞に持続的な刺激が加わっており，細胞分裂の際の遺伝子変化の起きる割合が影響を受けている可能性がある．一方，GC含有率が高いなど，変異部位の特定の遺伝子の性質がreversion発生に強く関与しているのかもしれない．今後，分子生物学的基盤の解明が期待される．

またreversionによる体細胞モザイクは，異なった細胞lineageにおいて遺伝子変異が回復した際の生物学的な効果やrevertantが患者の臨床像に及ぼす効果を解析するユニークな機会を提供する．今後もreversion例の解析により病因蛋白の生体内での機能への理解が進み[10]，reversionの病態修飾因子としての重要性が認識されるものと思われる．原発性免疫不全症患者で非典型的な臨床症状を示した場合には，常にreversionによる体細胞モザイクが存在しないか注意を払う必要があるだろう．

謝　　辞

第五回金沢大学十全医学賞受賞にあたり，本賞の運営に携わっておられます皆様に厚く御礼申し上げます．本研究遂行にあたり，終始御指導御助言を賜りました恩師金沢大学医薬保健研究域小児科教授谷内江昭宏教授に深謝いたします．また，これまで多大な御協力をいただきました金沢大学医薬保健研究域小児科学教室の諸先生に心より深く感謝いたします．

文　　献

1) Wada T, Candotti F. Somatic mosaicism in primary immune deficiencies. Curr Opin Allergy Clin Immunol 8: 510-514, 2008

2) Wada T, Schurman SH, Otsu M, et al. Somatic mosaicism in Wiskott-Aldrich syndrome suggests in vivo reversion by a DNA slippage mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 8697-8702, 2001

3) Wada T, Schurman SH, Jagadeesh GJ, et al. Multiple patients with revertant mosaicism in a single Wiskott-Aldrich syndrome family. Blood 104: 1270-1272, 2004

4) Wada T, Konno A, Schurman SH, et al. Second-site mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein gene causes somatic mosaicism in two WAS siblings. J Clin Invest 111: 1389-1397, 2003

5) Stewart DM, Candotti F, Nelson DL. The phenomenon of spontaneous genetic reversions in the Wiskott-Aldrich syndrome: a report of the workshop of the ESID Genetics Working Party at the XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest, Hungary October 4-7, 2006. J Clin Immunol 27: 634-639, 2007

6) Davis BR, Dicola MJ, Prokopishyn NL, et al. Unprecedented diversity of genotypic revertants in lymphocytes of a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. Blood 111: 5064-5067, 2008

7) Wada T, Toma T, Okamoto H, et al. Oligoclonal expansion of T lymphocytes with multiple second-site mutations leads to Omenn syndrome in a patient with RAG1-deficient severe combined immunodeficiency. Blood 106: 2099-2101, 2005

8) Tone Y, Wada T, Shibata F, et al. Somatic revertant mosaicism in a patient with leukocyte adhesion deficiency type 1. Blood 109: 1182-1184, 2007

9) Wada T, Yasui M, Toma T, et al. Detection of T lymphocytes with a second-site mutation in skin lesions of atypical X-linked severe combined immunodeficiency mimicking Omenn syndrome. Blood 112: 1872-1875, 2008

10) Konno A, Wada T, Schurman SH, et al. Differential contribution of Wiskott-Aldrich syndrome protein to selective advantage in T- and B-cell lineages. Blood 103: 676-678, 2004

Profile

略歴：平成 4 年 3 月　金沢大学医学部卒業
　　　平成 4 年 4 月　金沢大学小児科学教室に入局
　　　平成 9 年 3 月　金沢大学医学系研究科大学院卒業
　　　平成11～14年　米国衛生研究所（NIH）ヒトゲノム研究所留学
　　　平成17年 4 月　金沢大学医学部附属病院小児科助手
　　　平成20年 7 月　金沢大学附属病院小児科講師
　　　抱負：今後も小児疾患の病態を免疫学的観点から解析することにより臨床に役立てていきたい．