

アデノシンデアミナーゼ欠損症の2家系における 遺伝子解析と興味ある保因者の検出

学位論文内容の要旨

【緒言】アデノシンデアミナーゼ(adenosine deaminase; ADA)欠損症は常染色体劣性遺伝の原発性免疫不全症で、発症頻度はほぼ出生100万に1と考えられている。ADAは細胞の核酸を構成するアデノシンとデオキシアデノシンの代謝に関与する酵素で、その遺伝子は第20番目の染色体上(20q.13.11)にある。32040塩基対-12個のエクソンから構成され364個のアミノ酸をコードしている。ADA遺伝子の両アレルに変異を持つ患児は正常な機能をもつADAを合成できないため、患児の細胞には本来イノシン、デオキシイノシンに代謝されるべきアデノシンとデオキシアデノシンが蓄積される。他の体細胞においてはこれらの蓄積はほとんど障害とならないが、リンパ球特に未成熟T細胞ではリン酸化が盛んで、デオキシアデノシンリン酸化物(dAXP)などの細胞障害性の高い物質に変換され細胞内に蓄積される。これらの細胞障害によってT細胞は増殖・分化の障害、機能異常、細胞死をきたすと考えられている。ADA欠損症の臨床像は重症複合免疫不全症(SCID)、3~5歳で発症する遅発型、5~8歳で発症する遅延型、正常の免疫機能を持つ部分ADA欠損症の4つに分類される。SCIDの場合、生後間もなくからリンパ球減少、低γグロブリン血症を呈し、重症感染症により一歳前後までに死亡する。治療には骨髓移植や、酵素補充療法が適応となり遺伝子治療も行われている。本研究では新たにADA欠損症を疑われた2症例に対し、ADA活性の測定と共に確定診断と病態把握を目的とした遺伝子解析を実施してADA遺伝子の新たな変異を検出した。また家族検索において部分ADA欠損症の希な一例と思われる保因者を検出しその機序を解析した。

【対象】重度の気道感染症を主訴として小児科を受診した女児ATと、難治性の膿痂疹を主訴として小児科を受診した女児MTが対象である。ATは白血球数の減少、リンパ球減少、CD3陽性細胞減少、IgG低値を認め、SCIDが疑われた。ADA定性検査によって赤血球中ADA活性の欠損が示唆された。MT同様の症状により本症が疑われた。

【方法】AT、MTとその家族から得た末梢血をフィコールバックにて比重遠心分離を行いPBMCを分離した。PBMC分離後メチルセルロースを用いて顆粒球を得た。また一部PBMCからエプスタインバーウイルス産生B95-8細胞株の上清を用いてB細胞株(EBV-B)を樹立した。ADA活性の測定には、細胞をTris-BSAに浮遊させ凍結、融解を繰り返した遠心後の上清を用いた。この上清と基質としての標識化合物 ^{14}C -アデノシンを至適濃度で混合し薄層クロマトグラフィー法にてADA活性を測定した。塩基配列の解析にはPCR Direct Sequencing法を用いた。ADA遺伝子を各エクソンを含む9つのフラグメントに分割し、PCRにて増幅した。増幅産物はGTGアガロースで電気泳動し、目的の大きさのバンドを切り出した。切り出したDNAを精製しシーケンス反応を行った。シーケンスプライマーはPCRに使用したのと同じものを希釈して使用した。反応物はDNAジェネティックアナライザーによって塩基配列を解析した。制限酵素処理は変異部分を含むフラグメントをPCRにて増幅、それぞれの変異配列を認識する制限酵素によって処理後、電気泳動した。ADA蛋白の検出にはWestern Blotting法を用いた。ADAの検出には抗ヒトADAヤギ血清を用いた。2次抗体にはベルオキシダーゼ標識抗ヤギIgG(H+L)-ウサギ抗体を使用した。熱処理はEBV-Bより蛋白質を抽出して遠心後の上清を得、 56°C にて5、10、15、20分間の熱処理を行った。

【結果】患者のPBMCおよび顆粒球のADA活性はいずれも正常の $1/10\sim 1/30$ であった。ATの父母およびMTの父におけるPBMCと顆粒球は正常の $1/3\sim 1/5$ であり、保因者と考えられた。しかしMTの母と兄では患者とほぼ同値を示した。EBV-BでMTはPBMCよりわずかに高値であるのに対し母、兄ではPBMCに比し約20倍高値であった。赤血球中のdAXP濃度は患者で著しく高値であった。しかしMTの母、兄ともに部分ADA欠損症のレベルであった。遺伝子変異はATではエクソン4の領域に父と患児に共通の変異CAG $\rightarrow$ TAGがあり、またエクソン8の領域には母と患児に共通の変異CGG $\rightarrow$ CAGを認めた。患児MTでは父と患児に共通の変異CAC $\rightarrow$ CCなる一塩基(A)欠損をエクソン4の領域に、また母親と患児に共通の変異CGG $\rightarrow$ CAGをエクソン8の領域に認めた。患児MTの母親と兄のADA活性が著しく低値であったため、その原因を解明するために両者を対象として遺伝子解析を行った。その結果エクソン10内にATG $\rightarrow$ ACGなる共通の変異を検出した。ADA蛋白質の検出では、MTの父のPBMCでは正常とほぼ同程度検出されたが、母と兄のPBMCではほとんど検出されず、そのADA活性と一致した。しかしEBV-BではMTの母、兄で明らかにPBMCとは異なりADA蛋白質の存在が認められ、それらのADA活性と一致した。熱処理によるADA活性と蛋白質の変化も示された。MTの母と兄のEBV-BではADA活性がリンパ球よりも明らかに高いことが示された。また熱処理前のADA活性に対する熱処理後のADA活性は正常人とMTの父で変化は

認めなかったが、MTの母と兄で共にほぼ活性の消失を認めた。

【考察】AT、MTはPBMC、顆粒球、赤血球のいずれもADA活性が欠損し、赤血球中dAXP濃度は著増しておりADA欠損症と診断された。今回患児の家族検索を行っている中で、非常に興味深い保因者を見出した。MTの母と兄はPBMC、赤血球ともADA活性は患児レベルに近い低値を示し、赤血球中のdAXP濃度は部分欠損症レベルの増加を認めた。しかし他の保因者と同様、2人とも全く健康で、この母と兄でPBMC、赤血球のADA活性は生体内でのADA活性を正確には反映していない可能性が示唆された。MTの母と兄の2人に共通する変異310M→Tの他にADA活性がほとんどないと思われる病的変異もそれぞれ有している。したがって保因者であるが、ADA活性が患児と同程度に欠損し、赤血球中dAXPが部分欠損症レベルに増加しているのは病的変異と310M→T変異との共存によると考えられる。この2人から樹立したEBV-Bでは明らかなADA活性の存在が見出されたことは、310M→T変異のADAが不安定な性状をもつADA変異蛋白質である可能性を示唆した。今後は310M→Tの結果生じた変異ADAの*in vitro*での活性や蛋白質量、その構造などに関してさらに検討が必要であると考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 口 春 久
副 査 教 授 森 田 学
副 査 教 授 田 村 正 人
副 査 教 授 崎 山 幸 雄

学 位 論 文 題 名

アデノシンデアミナーゼ欠損症の2家系における 遺伝子解析と興味ある保因者の検出

審査は森田、田村、崎山および小口審査委員それぞれ個別に、学位申請者に対して提出論文の内容とそれに関連する学科目について口頭試問の形式によって行われた。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

学位申請者は、重度の気道感染症を主訴として小児科を受診した患者およびその家族を対象として、確定診断と病態把握を目的とした遺伝子解析を行った。ADA 活性の測定には、薄層クロマトグラフィー法を用い、塩基配列の解析には PCR Direct Sequencing 法を用いた。制限酵素処理は変異部分を含むフラグメントを PCR にて増幅し、電気泳動を行った。ADA 蛋白の検出には Western Blotting 法を用いた。ADA の検出には抗ヒト ADA ヤギ血清を用いた。

以上の方法によって得られた結果は次のようである。患者では白血球における ADA 活性が欠損し、赤血球中の毒性物質濃度は著増しており、かつ ADA 遺伝子に両親から受け継いだと考えられる遺伝子変異を確認したことから、ADA 欠損症と診断された。患者の家族検索を行っている中で、非常に興味深い保因者を見出し、検索を詳細に行った。患者の PBMC および顆粒球の ADA 活性はいずれも正常の 1/10~1/30 であった。患者1の父母および患者2の父における PBMC と顆粒球は正常の 1/3~1/5 であり、保因者と考えられた。しかし患者2の母と兄では患者とほぼ同値を示した。EBV-B で患者2は PBMC よりわずかに高値であるのに対し母、兄では PBMC に比し約 20 倍高値であった。赤血球中の dAXP 濃度は患者で著しく高値であった。しかし患者2の母、兄ともに部分 ADA 欠損症のレベルであった。遺伝子変異は患者1ではエクソン4の領域に父と患児に共通の変異 CAG→TAG があり、またエクソン8の領域には母と患児に共通の変異 CGG→CAG を認めた。患者2では父と患児に共通の変異 CAC→CC なる一塩基(A)欠損をエクソン4の領域に、また母親と患児に共通の変異 CGG→CAG をエクソン8の領域に認めた。患者2の母親と兄の ADA 活性が著しく低値であったため、その原因

を解明するための遺伝子解析を新たに行った。その結果エクソン 10 内に ATG→ACG なる共通の変異を検出した。ADA 蛋白質の検出では、患者 2 の父の PBMC では正常とほぼ同程度検出されたが、母と兄の PBMC ではほとんど検出されず、その ADA 活性と一致した。しかし EBV-B では患者 2 の母、兄で明らかに PBMC とは異なる ADA 蛋白質の存在が認められ、それらの ADA 活性と一致した。熱処理による ADA 活性と蛋白質の変化を追跡したところ、患者 2 の母と兄の EBV-B における ADA 活性がリンパ球よりも明らかに高いことが示された。また熱処理前の ADA 活性に対する熱処理後の ADA 活性は正常人と患者 2 の父で変化は認めなかったが、患者 2 の母と兄で共にほぼ活性の消失を認めた。患者 1、患者 2 は PBMC、顆粒球、赤血球のいずれも ADA 活性が欠損し、赤血球中 dAXP 濃度は著増しており ADA 欠損症と診断された。また、患者 2 の母と兄は PBMC、赤血球とも ADA 活性は患児レベルに近い低値を示し、赤血球中の dAXP 濃度は部分欠損症レベルの増加を認めた。しかし他の保因者と同様 2 人とも全く健康で、この母と兄で PBMC、赤血球の ADA 活性は生体内での ADA 活性を正確には反映していない可能性が示唆された。患者 2 の母と兄の 2 人に共通する変異 310M→T の他に ADA 活性がほとんどないと思われる病的変異もそれぞれ有している。したがって保因者であるが、ADA 活性が患児と同程度に欠損し、赤血球中 dAXP が部分欠損症レベルに増加しているのは病的変異と 310M→T 変異との共存によると考えられる。この 2 人から樹立した EBV-B では明らかな ADA 活性の存在が見出されたことは、310M→T 変異の ADA が不安定な性状をもつ ADA 変異蛋白質である可能性を示唆した。

学位申請者に対して論文内容に関連する質問が行われたが、これらの質問に対しそれぞれ適切な回答が得られ、ADA 欠損症の遺伝子解析への貢献と将来的展望について評価された。さらに、学位申請者は変異 ADA の *in vitro* での活性測定や蛋白質量の測定、構造等を検討する準備をすすめており、他の疾患に関する遺伝子解析への応用性も高く評価された。

したがって、学位申請者は博士(歯学)の学位授与に相応しい者と認められた。