

C3欠損症における遺伝子変異と臨床像の相関に関する研究

当科で解析した3例および報告例の解析

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 補体系は30種以上の血清遊離蛋白、膜蛋白からなり、自然免疫の一部として重要な役割を果たしている。補体系には古典経路、第二経路、レクチン経路の3つの独立した活性化経路を有する。それぞれの経路の機能はC3を活性化することに集約され、C3は補体活性化の中心的役割を果たしている。C3遺伝子は41exonからなり、exon1からexon16は645アミノ酸からなるβ鎖、exon16からexon41は991アミノ酸からなるα鎖をコードしている。C3は13のドメインから構成されている。C3欠損症は常染色体劣性遺伝形式をとる非常にまれな疾患であり、易感染性と免疫複合体病両者の病態が認められるとされているが、症状は一様ではなく、遺伝子型と表現型の関係も明らかではなかった。

今回、当科における自験例3家系を含めた報告例26家系におけるC3欠損症の臨床像と遺伝子変異を解析し、その関連について検討した。

【対象と方法】

1. 当科における解析症例

当科へ遺伝子検査を依頼されたC3欠損症2症例に関しては遺伝子解析結果を既に報告しており、臨床像に関する後方視的解析を行った。今回新たに依頼されたC3欠損症1症例(自験例3)は下記方法で遺伝子解析を行った。

2. 遺伝子解析

北海道大学医学研究科の倫理審査委員会の規約に基づき患者およびその家族から遺伝子解析を施行する同意を得た。患者と両親、兄、正常者の末梢血単核球よりgenomic DNA、RNAをそれぞれ抽出しC3遺伝子解析とReverse transcription-PCR(RT-PCR)を行った。PCR、RT-PCR産物はdirect sequence法で遺伝子解析を施行した。さらに患者と両親における転写産物の配列を明らかにするため、RT-PCR産物をクローニングした後、各クローンの塩基配列を確認した。

3. 対象論文の抽出

C3欠損症の既報告例の検索はPubMed、医学中央雑誌より2010年10月までに発行された英語または日本語の論文を抽出し、原著より遺伝子変異と臨床症状に関する情報を得た。

【結果】

1. 自験例3例の臨床像

自験例1 現在15才の男児で両親に血縁関係がある。7才時に初めて血尿を指摘され、C3欠損症であることがわかった。易感染性は認められていない。

自験例2 現在6才の男児で両親に血縁関係はない。乳児期より易感染性がありC3欠損症であることがわかった。4才時よりDiscoid lupus erythematosusが出現、以後口腔内潰瘍、抗核抗体が陽性、ループス腎炎の所見を認めSLEの診断で現在加療中である。

自験例3 現在7才の男児で両親に血縁関係はない。2才より易感染性を認めC3欠損症であることがわかった。6才より滑膜炎の所見を認め現在加療中である。

2. 当院における遺伝子解析の結果

自験例1では、C3 遺伝子に 3736_3737del (F1246X) のホモの変異を認め、両親は同変異のヘテロ接合体であることがわかった。自験例2は 3116dupT (L1039fs)、C3243G (Y1081X) のコンパウンドヘテロ変異を認め、前者は父由来、後者は母由来であった。今回新たに解析した自験例3においては、C3 遺伝子の exon12 に 1432C>T (Arg 478 Term)、IVS9 -2 a>t の塩基置換を認めた。1432C>T は母由来、IVS9 -2 a>t は父由来であることがわかった。IVS9 -2 a>t 変異の転写産物は他と比較して少なかった。さらに RT-PCR の産物の解析より、IVS9 -2 a>t 変異は exon10 の 5'側の 4 塩基がスキップし、フレームシフトにより 14 コドン下流に早期終始コドン形成することが予測された。

3. 自験例を含む報告例の臨床像と遺伝子型のまとめ

世界中から 26 家系 (34 人) の報告がある。そのうち日本からの報告は自験例の 3 家系を含む 6 家系ある。これらの C3 欠損症の臨床像は下記のようにまとめることができる。

- ① 重症感染症：細菌性髄膜炎をはじめ様々な感染症を認めている。起因菌は *Streptococcus pneumoniae* が最も多い。
- ② SLE または SLE 様症状：3 家系 3 人で SLE (ACR の診断基準 11 項目のうち 4 項目を満たす)、1 家系 2 人で SLE 様症状、1 家系 1 人で Subacute lupus erythematosus を呈している
- ③ 腎症状：7 家系 9 人で重症度は様々であるが何らかの腎症状を認めている。5 人で病理組織学的な診断が行われている。膜性増殖性糸球体腎炎 1 型が 2 人、メサンギウム増殖性糸球体腎炎が 2 人 (このうち 1 人は IgA 腎症)、ループス腎炎 (WHO 分類 Class IIIA) が 1 人である。
- ④ 皮膚症状：SLE または SLE 様症状を認めた症例以外の 7 症例において、感染時に一時的に皮疹を伴っている。紅色の斑丘疹を認めることが多い。
- ⑤ 遺伝子型-表現型相関：C3 欠損症の症例で分子遺伝学的解析が施行されているのは自験例を含め 13 家系で、そのうち両アレルの遺伝子変異が同定できている症例は 10 家系であった。C3243G (Y1081X) は自験例2と SLE 様の症状を呈した日本人症例の 2 家系で認めているが、その他の変異に関しては明らかな集積は認められていない。 β 鎖上および α 鎖の CUB ドメインないしそれよりも N 末端側に変異を持つ症例は全て易感染性を主症状としているのに対し、 α 鎖上の TED ドメインないしそれよりも C 末端側に変異を持つ症例は SLE、SLE 様症状ないし腎炎を認めている。

【考察】 従来 C3 欠損症においては明らかな遺伝子型-表現型の相関はないとされてきたが、今回の検討で変異部位と臨床症状の相関が示唆された。

遺伝子解析されている症例はすべてナンセンス変異あるいはフレームシフト変異であり、従って変異部位より C 末端側は完全に欠失するか本来の蛋白とは全く異なることになる。TED ドメインの N 末端側に接する CUB ドメインより N 末端側に生じる変異は C3 蛋白の大きな欠失につながり、感染防御に役立たない可能性がある。一方、SLE (様) ないし腎炎を主症状とする症例は全て C3d 中の TED ドメイン以降の欠失 (3736_3737del、3116dupT、C3243G) であり、H 因子結合部位もしくは CR2 結合部位を欠くことになる。これらのドメインは C3d を介した B 細胞免疫寛容やアポトーシス体の処理能に重要であることが知られている。さらに蛋白翻訳後の不安定性や蛋白分泌の低下などにより、感染防御にはある程度役立つものの自己免疫疾患を惹起しやすいことが推測された。

【結論】 自験例も含めた C3 欠損症 26 家系における解析から、N 末端側の変異では重症感染症が、 α 鎖の TED ドメインより C 末端側の変異では SLE 様症状ないし腎炎が主症状となることを見いだした。いずれもナンセンス変異あるいはフレームシフトによることから、前者では C3 蛋白の完全欠失が、後者では蛋白の不安定性、分泌異常、機能ドメインの欠失などのメカニズムが考えられた。

学位論文審査の要旨

主査 教授 小池 隆 夫
副査 教授 今村 雅 寛
副査 教授 佐藤 典 宏
副査 教授 有賀 正
副査 准教授 田中 淳 司

学位論文題名

C3欠損症における遺伝子変異と臨床像の相関に関する研究

当科で解析した3例および報告例の解析

補体系は30種以上の血清遊離蛋白、膜蛋白からなり、自然免疫の一部として重要な役割を果たしている。補体系には古典経路、第二経路、レクチン経路の3つの独立した活性化経路を有する。それぞれの経路の機能はC3を活性化することに集約され、C3は補体活性化の中心的役割を果たしている。C3遺伝子は41exonからなり、exon1からexon16は645アミノ酸からなるβ鎖、exon16からexon41は991アミノ酸からなるα鎖をコードしている。C3蛋白は13のドメインから構成されている。C3欠損症は常染色体劣性遺伝形式をとる非常にまれな疾患であり、易感染性と免疫複合体病両者の病態が認められるとされているが、症状は一様ではなく遺伝子型と表現型の関係は明らかではなかった。

今回、当科において新たに検出した3症例目となるC3欠損症の遺伝子解析を行いC3遺伝子にC1432T (R478X)とIVS9・2 a>tのコンパウンドヘテロ変異を同定した。両親の解析の結果、前者は母由来、後者は父由来であった。次に転写産物の解析によりIVS9・2 a>tはexon10の5'側の4塩基をスキップしフレームシフトにより14コドン下流に早期終始コドンを形成することが予想された。C3欠損症は自験例3家系を含め世界中で26家系34症例の報告があるが、その臨床症状は①感染症、②全身性エリテマトーデス(SLE)またはSLE様症状、③腎症状、④皮膚症状にまとめることができた。感染症の既往のない症例が6症例(17.6%)存在しそれらの多くがSLEまたは腎炎といった自己免疫性疾患を有していることに注目し、遺伝子解析が施行されている10家系の遺伝子型と表現型の相関について検討した。C3遺伝子変異の位置がCUB₂ドメインよりN末側に存在する症例ではいずれも易感染性を認めている。一方TEDドメインよりC末側に存在する症例では自己免疫性疾患が主症状となっておりCUB₂ドメインとTEDドメインの間で主症状が二分されることが示された。遺伝子変異の種類はすべてナンセンス変異あるいはフレームシフト変異であるため、感染症を主症状とする症例ではC3蛋白は大きな欠失によりほとんど産生されず、一方自己免疫性疾患を主症状とする症例では実際には変異C3蛋白は存在し感染症

コントロールに寄与している可能性を推測した。一般に前期補体成分欠損症では免疫複合体の除去やアポトーシスを起こした細胞の処理機構に問題があるため自己免疫性疾患を発症するリスクが高いと考えられている。今回の検討により、C3 欠損症において自己免疫性疾患を主症状とする症例では遺伝子変異が C3d フラグメント上に集中して存在することが明らかとなった。C3d は抗原提示細胞上の complement receptor 2 (CR2) と複合体を形成し抗体産生を増強すると同時に B 細胞の negative selection に関与する可能性も示唆されている。CR2 の single nucleotide polymorphism と SLE 発症の関連や、CR2 ノックアウトマウスでは self tolerance の破綻を来し自己抗体を産生しやすいことが報告されており、C3d フラグメント上の遺伝子変異は C3d-CR2 interaction の異常を来し自己免疫性疾患の 1 つの要因となっていることを推測した。

公開発表に際し、今村教授から、実際にヒトの系では C3d や CR2 の異常に関する報告があるのか質問があった。田中准教授より C3 欠損症で認められる多彩な症状は C3 分子の欠損で一元的に説明可能か質問があった。佐藤教授より易感染性と自己免疫疾患の両者を有する症例をどのように説明するか、また表現型が二分されることに気づいた経緯などに関する質問があった。小池教授より N 末側に変異を有する場合蛋白の大きな欠失につながるが自己免疫性疾患を発症していない理由、また C3 は補体の中心的役割を果たしているにも関わらず他の先天性免疫不全症より重症感が感じられない理由に関する質問があった。最後に有賀教授よりこの仮説を証明するための今後検討すべき課題に関する質問があったが、申請者はいずれの質問にも妥当に回答した。

本研究は C3 欠損症の症状は一様ではなく、遺伝子・表現型相関を初めて指摘したことに意義があり、今後、存在していると仮定した変異 C3 蛋白の同定方法を検討することにより、C3 分子の機能解明につながる可能性がある。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。