

氏 名 やん しー  
楊 曦 (YANG XI)

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 175 号

学位授与年月日 平成 27 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院 医学薬学教育部 博士課程  
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 Clinical and genetic characteristics of X-linked  
lymphoproliferative syndrome in Japan  
(わが国の X 連鎖リンパ増殖症候群の臨床的および遺伝的特徴)

論文審査委員

(主査)	教 授	白木 公康
(副査)	教 授	近藤 隆
(副査)	教 授	杉山 敏郎
(副査)	教 授	北島 勲
(指導教員)	教 授	足立 雄一

## 論文内容の要旨

### 目的

X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP) is a rare inherited immunodeficiency and characterized by extreme vulnerability to Epstein–Barr virus (EBV) infection, and the major clinical phenotypes of XLP include EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) (~60%), lymphoproliferative disorder (~30%), and dysgammaglobulinemia (~30%). XLP is divided into two types: XLP1 (SAP deficiency), caused by mutations in the *SH2D1A/SAP* gene, and XLP2 (XIAP deficiency), due to mutations in the *XIAP* gene. Recent studies have demonstrated the similarity and difference between XLP1 and XLP2, but the clinical and immunological features of XLP2 is not fully understood. To better understand the pathogenesis of XLP2, we performed the clinical and immunological study in Japanese patients with XLP2.

### 方法並びに成績

Patients with presumed XLP phenotypes (HLH, especially EBV -HLH, lymphoproliferative disorder or/and dysgammaglobulinemia) were included in this study. Upon the approval of the Ethics Committee of the University of Toyama and after obtaining informed consent, heparinized venous blood was collected from the patients, their mothers and the controls. DNA was extracted from peripheral blood and the mutation analysis was performed by direct sequencing analysis. XIAP protein expression levels were examined by flow cytometry and western blot. Invariant natural killer T (iNKT) cell counts were evaluated by co-expression of TCRV $\alpha$ 24 and TCRV $\beta$ 11 on CD3<sup>+</sup> T cells. Activation-induced cell death assay was

performed in some patients. X-chromosome inactivation (XCI) was evaluated by methylation-specific PCR using methylation-sensitive sodium bisulfide.

We identified 22 patients from 14 families with XLP2 in Japan. Most patients presented with disease symptoms during childhood, but a few patients presented in adolescence and adult. HLH, sometimes recurrent HLH, was the most common feature, and it was not always associated with EBV infection. Although malignant B-cell lymphoma occurs frequently in XLP1 patients, it was not observed in XLP2 patients. Interestingly, hemorrhagic colitis was observed in some XLP2 patients.

Flow cytometry demonstrated deficient and mosaic expressions of XIAP protein in the patients and the carrier, respectively, but some patients showed the normal XIAP expression. XLP1 patients have reduced numbers of iNKT cells, but the number of iNKT cells of XLP2 has been reported to be controversial. In this study, iNKT cells of the patients were decreased compared with those of the controls.

In this cohort, we identified the female HLH patient with heterozygous *XIAP* mutation. This female patient showed deficient XIAP expression and augmented activation-induced cell death, and these data were compatible to the male patients with XIAP deficiency. Normal female carrier usually show nearly random XCI, but this female patient showed non-random XCI towards the wild-type *XIAP* allele.

## 総括

This study disclosed the clinical features of Japanese patients with XLP2, and this was compatible with those of European and American patients. When patients are suspected of XLP, we recommend flow cytometric analysis or western blot of

XIAP expression followed by gene analysis. Female carriers usually have no signs of disease because of random XCI in hematopoietic cells, but the female patient with non-random XCI presented with HLH. This illustrates that a female carrier of XLP may have a risk of developing HLH and should be monitored for early signs of disease.

# 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

## 〔研究目的〕

X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP)は、Epstein-Barrウイルス (EBV) 感染を契機に発症する先天性免疫疾患で、EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH : ~60%)、Lymphoproliferative disorder (~30%)、Dysgammaglobulinemia (~30%) を主要症候とする。XLPの原因遺伝子として、X染色体上のSH2D1A/SLAM-associated protein (SAP) 遺伝子の変異によるXLP1とX-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)/BIRC4遺伝子の変異によるXLP2の2型が存在し、その両者の類似点と相違点が明らかになりつつあるが、臨床的・遺伝学的特徴は明らかになっていない。小児科学講座では、XLPに関する一連の研究を行ってきた。そこで、楊曦 (Yang Xi)君は、倫理審査を経たのちに、日本人XLP2患者の遺伝子変異の解析、蛋白発現、メチル化による遺伝子の不活化等について検討を行い、XLP2の臨床的および遺伝的特徴を明らかにした。

わが国で、XLPに特徴的なEBV-HLH、Lymphoproliferative disorder、Dysgammaglobulinemiaを示す患者を対象として、患者とその母および対照者の同意を得て、血液を試料に以下の解析を行った。変異遺伝子については、末梢血からDNAを抽出後、塩基配列を決定してXLPの遺伝子変異を確認した。XLP1とXLP2のそれぞれの原因遺伝子SAPとXIAP蛋白の発現レベルはFACSで解析し、XIAP蛋白の発現はウェスタンブロット法でも検討した。Invariant Natural Killer (iNKT) 細胞数は、CD3<sup>+</sup>T細胞のTCRV $\alpha$ 24とTCRV $\beta$ 11陽性細胞より算出した。XIAP蛋白はリンパ球の活性化に伴うapoptosisを阻害するが、その機能不全を、Phytohemagglutininによるリンパ球活性化によるapoptosisをAnnexin-V法で検討した。X染色体上のXIAP遺伝子発現の制御に関してはDNAのメチル化による不活化を検討した。

## 〔結果〕

結果は以下のように要約される。

1. XLP が疑われた日本人患者のうち、臨床所見および家系から XLP2 と診断された患者の 14 家系 22 名を検討の対象とした。
2. 多くの患者は小児期に発症していた。
3. HLH が主要症状であったが、必ずしも EBV と関連していなかった。
4. 患者は、HLH、発熱、脾腫、血球減少症、低グロブリン血症、大腸炎などの多様な症状を呈していた。
5. FACS 解析により、患者では XIAP の発現は欠損しており、キャリアではモザイク型であった。
6. B 細胞リンパ腫は XLP1 に伴うが、XLP2 には認められなかった。
7. iNKT 細胞数は XLP1 では減少するが、本研究の対象の XLP2 では対照者に比べ減少していた。

XLP2 症状を示した女性患者では、XLP2 症状を示した女性患者では、XIAP 蛋白の機能

不全の表れとして、リンパ球刺激で健常者よりも高頻度に apoptosis を認めた、そのメカニズムとして、健常 XIAP 対立遺伝子のメチル化を介し XIAP 機能が抑制されている事が示唆され、女性であるが変異 XIAP による XLP2 症状を発症していることを明らかにした。

#### 〔総括〕

わが国のXLP2患者の臨床的・遺伝的特徴を、以上のように明らかにしたが、これらの結果は、ヨーロッパや米国の研究結果とほぼ一致していることが確認された。また、XLPはX染色体の異常に基づく伴性劣性であるが、XIAP遺伝子異常のキャリア女性に、XLP2の臨床症状を確認した。そして、その原因として健常XIAP対立遺伝子のメチル化による遺伝子の不活化により、XLP2を発症していることを明らかにした点は高く評価できる。以上のように、楊曦 (Yang Xi)君は、小児科学講座で行われてきたXLPの研究に参加し、18編の論文に著者として貢献し、そのうちの5報を学位論文としてまとめて、上記のように、わが国のXLP2患者の臨床的および遺伝的特徴を明らかにした。

以上のことから、わが国のXLP2患者の臨床的・遺伝的特徴を明らかにする中で、XIAP遺伝子異常のキャリア女性の臨床症状が遺伝子の不活化によることを初めて明らかにした点は新規性があり、わが国のXLP2の特徴は欧米と類似していることを確認するなど、医学における学術的重要性も高く、FACS解析によるスクリーニングと遺伝子診断法を確立した点は、臨床的発展性が期待できる。以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。