

氏名 ほしの あきひろ  
星野 顕宏

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 186 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 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 **Selective dysregulation of Epstein-Barr virus infection in  
hypomorphic ZAP70 mutation**  
(部分的機能低下型 ZAP70 変異は EB ウイルスに対して選択的な免疫  
応答の異常をきたす)

論文審査委員

|        |    |       |
|--------|----|-------|
| (主査)   | 教授 | 白木 公康 |
| (副査)   | 教授 | 山本 善裕 |
| (副査)   | 教授 | 清水 忠道 |
| (副査)   | 教授 | 木村 友厚 |
| (指導教員) | 教授 | 足立 雄一 |

## 論文内要の要旨

### 〔目的〕

原発性免疫不全症の中には、Epstein-Barrウイルス（EBV）に対して特異的に免疫応答の異常をきたす疾患が知られている。われわれは、それまでに易感染性を認めずに生後21か月時にEBV関連リンパ増殖症（EBV-LPD）を発症した男児において、新規の*ZAP70*変異を同定した。*ZAP70*はT細胞受容体（TCR）のシグナル伝達に重要な役割を担っているチロシンキナーゼであり、TCRの刺激によって*ZAP70*がCD3に結合して活性化され、下流分子をリン酸化することで最終的にはT細胞の活性化や増殖、胸腺においてはT細胞の分化を誘導する。*ZAP70*欠損症はCD4<sup>+</sup>T細胞の機能不全とCD8<sup>+</sup>T細胞の欠損を伴う重症複合免疫不全症として報告されており、生後早期に致死的感染症を発症する。自験例においてEBVに対する選択的な免疫応答の異常をきたした機序を解析することを目的とした。

### 〔方法並びに成績〕

リンパ節生検によって得られた検体を免疫染色した。リンパ節の構造はある程度保たれ、CD20とEBV-encoded RNA signal（EBER）陽性の細胞が増殖していた。latent membrane protein 1（LMP1）とEBV nuclear 2（EBNA2）は陽性であり、EBV感染様式はLatency IIIであった。末梢血単核球の表面抗原を染色して、リンパ球亜分画を解析した。CD4<sup>+</sup>T細胞数は正常で、CD8<sup>+</sup>T細胞数は正常下限であり、B細胞数とNK細胞数は正常であった。iNKT細胞とEBV特異的CD8<sup>+</sup>T細胞が欠損していた。また、生ワクチン接種後の特異抗体（麻疹、風疹）は上昇していたが、発症3週間後に測定したEBVに対する抗体は陰性であった。これらのことからEBVに対する特異的な免疫応答の異常が示唆された。

単一遺伝子の異常による疾患を想定されたため、文書による同意を得て患者と両親のDNAを用いて全エクソーム解析を行ったところ、*ZAP70*複合ヘテロ接合体変異（c.703-1G>A、c.1674G>A）が同定された。それぞれの変異は父親、母親由来であった。前者では*ZAP70*とCD3と鎖が結合する部位が欠失し、後者の変異では種をこえて保存されているアミノ酸であるメチオニン558がイソロイシンに置換された。フローサイトメトリーを用いた*ZAP70*蛋白発現は、CD4<sup>+</sup>T細胞とCD8<sup>+</sup>T細胞で低下していた。

既報の*ZAP70*欠損症と比較して軽症の表現型であったため（重症複合免疫不全症を呈さない、CD8<sup>+</sup>T細胞が欠損していない）、その原因を解析した。全エクソーム解析による変異アリル頻度は50%であり、ドロップレットデジタルPCRを用いて解析したX染色体とY染色体の比は1であったことから、リバータントモザイクや母親由来T細胞生着は否定的であった。cDNAを用いて*ZAP70*全長をクローニング後にシーケンスしたところ、45クローン中20クローンがスプライシング異常、22クローンでミスセンス変異、3クローンは正常アリルであった。スプライスサイト変異がありながらも、一部に正常スプライシングが生じていたことが証明され、このことが軽症の表現型となった原因と判断した。

T細胞機能解析を行った。単核球をイオノマイシン（TCRを介さない刺激）または抗CD3（TCR

を介する刺激) 刺激後にカルシウム流入についてフローサイトメトリーを用いて解析した。抗CD3刺激でのみ、CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞のカルシウム流入が低下していた。次に、CFSEで単核球を染色後に各種刺激をしてフローサイトメトリーを用いて細胞増殖を評価した。CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞はイオノマイシン刺激で増殖した。抗CD3刺激では大部分の細胞が増殖しない一方で、少量の細胞が増殖した。この結果は少数の細胞で正常スプライシングがみられたことと一致した。

T細胞の分化を評価するため、次世代シーケンサー (NGS) を用いて単核球由来のRNAから *TRBV* における相補性決定領域 (CDR3) の塩基配列を解析した。*TRBV* の使用割合やCDR3長は従来の方法を用いて解析したZAP70欠損症の報告と同様に軽度の偏移のみが認められたが、V領域とJ領域の組み合わせに著明な偏移が認められた。また、既報のEBV特異的塩基配列は認めなかった。このことはZAP70変異によって胸腺におけるT細胞分化が障害され、V、D、J領域の非ランダムな使用が生じていることと同時に、それによってEBV特異的T細胞の新生がなされないことを示唆している。

#### 〔総括〕

ZAP70変異の一部の症例は、EBVに選択的に易感染性を有してEBV-LPDを発症し得る新たな疾患群である可能性がある。その機序はZAP70変異によってEBV特異的T細胞やiNKT細胞の分化が障害されるためであることが示唆され、逆にEBVに対する免疫応答にはEBV特異的T細胞やiNKT細胞が必要不可欠であることが示された。なお、ZAP70はiNKT細胞の分化に関与しノックアウトマウスではiNKT細胞が欠損すること、iNKT細胞はEBV感染細胞を認識して細胞を傷害することが報告されている。

また、NGSを用いたCDR3塩基配列の解析によって特異的なT細胞を解析する報告は乏しいものの、今後多くの抗原特異的CDR3配列が知られば、この方法は他の感染症や自己免疫疾患にも応用可能と思われる。

# 学位論文審査の要旨

## 〔目的〕

原発性免疫不全症の中には、Epstein-Barr ウイルス (EBV) に対して特異的に免疫応答の異常をきたす EBV 関連リンパ増殖症 (EBV-LPD) が知られており、当大学小児科ではこれまでに多くの研究を行ってきた。zeta-chain associated protein kinase 70kDa (ZAP70) は T 細胞受容体 (TCR) のシグナル伝達に重要な役割を担うチロシンキナーゼであり、T 細胞の分化、活性化や増殖を誘導する。ZAP70 欠損症は CD4+T 細胞の機能不全と CD8+T 細胞の欠損を伴う重症複合免疫不全症として報告されている。星野顕宏君は、生後 21 か月で致死感染 EBV-LPD を発症した男児において、ZAP70 の遺伝子変異を同定し、EBV に対する選択的な免疫応答の異常をきたす機序を明らかにした。

## 〔方法並びに成績〕

リンパ節生検によって得られた検体を用い、EBV 関連抗原に対する免疫染色を行った。リンパ節の構造はある程度保たれており、リンパ球の EBV 特異抗原の発現状況から EBV 感染様式は Latency III であった。末梢血 CD4+、CD8+T 細胞数、B 細胞数と NK 細胞数はほぼ正常であった。一方、iNKT 細胞と EBV 特異的 CD8+T 細胞が欠損していた。また、生ワクチン接種後の特異抗体 (麻疹、風疹) は上昇していたが、発症 3 週間後に測定した抗 EBV 抗体は陰性であった。

以上より、EBV 特異的な免疫応答の異常が示唆されたので、患者と両親の DNA を用いて全エクソーム解析を行い、ZAP70 複合ヘテロ接合体変異 (c.703-1G>A、c.1674G>A) を同定した。前者の変異は父親由来で ZAP70 と CD3 $\zeta$  鎖が結合する部位が欠失し、後者は母親由来で種をこえて共通するメチオニン 558 がイソロイシンに置換されていた。フローサイトメトリーを用いた ZAP70 蛋白発現は、CD4+T 細胞と CD8+T 細胞で低下していた。ドロップレットデジタル PCR 法及び各クローンの ZAP70 全長の塩基配列の決定などにより、スプライスサイト変異を同定した。また、一部に正常スプライシングが生じており、イオノマイシン処理でも機能的正常細胞を認めることから、ZAP70 欠損症に比べ、軽症の表現型となったと判断している。

さらに、T 細胞の分化を評価するため、T-cell receptor excision circles (TRECs) 法による解析を行った結果、T 細胞新生能の低下を認めた。また、単核球由来の RNA から T cell receptor beta variable (TRBV) genes おける相補性決定領域 (CDR3) の塩基配列を解析したところ、V 領域と J 領域の組み合わせに著明な偏移を認め、既報の EBV 特異的塩基配列は認めなかった。このことから ZAP70 変異によって胸腺における T 細胞分化が障害され、V、D、J 領域の非ランダムな使用が生じていることと同時に、それによって EBV 特異的 T 細胞の新生がなされないと推定している。

## 〔総括〕

星野顕宏君は、EBV-LPD の症例より、ZAP70 遺伝子のアミノ酸変異とスプライスサイトの変異を同定した。これらの変異に伴う iNKT 細胞と EBV 特異的 CD8+T 細胞の欠損、

T細胞の分化の障害を確認し、EBV-LPDのEBV特異的T細胞が新生されないことによる免疫不全を生じる病態を明らかにした。さらに、同様な免疫不全症に対する遺伝子異常の同定法と診断法を確立しようとしている。

以上のことから、これまで知られていなかった*ZAP70*遺伝子変異によりEBV-LPDを発症すること、そして、そのEBV特異的免疫不全の病態形成のメカニズムを初めて明らかにした点で新規性があり、さらに、同様な免疫不全症に対する遺伝子異常の同定と診断方法の道筋をつけた点は、医学における学術的重要性も高く評価できる。今後、免疫不全症診断のためのアルゴリズムと発展できれば、臨床的發展性が期待できる。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。