



Title	Identification of Bruton's Tyrosine Kinase (Btk) Gene Mutations and Characterization of the Derived Proteins in 35 X-Linked Agammaglobulinemia Families : A Nationwide Study of Btk Deficiency in Japan
Author(s)	橋本, 章司
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41053">https://hdl.handle.net/11094/41053</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	橋	本	章	司
博士の専攻分野の名称	博	士	(医	学)
学位記番号	第	1 3 5 8 3	号	
学位授与年月日	平成	10	年	3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当			
学位論文名	Identification of Bruton's Tyrosine Kinase (Btk) Gene Mutations and Characterization of the Derived Proteins in 35 X-Linked Agammaglobulinemia Families: A Nationwide Study of Btk Deficiency in Japan (日本における35家系51名の伴性劣性無ガンマグロブリン血症患者のブルトン型チロシンキナーゼにおける遺伝子変異の同定と変異蛋白質の解析)			
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 忠三			
	(副査) 教授 吉崎 和幸 教授 木下タロウ			

### 論文内容の要旨

【目的】 伴性劣性無ガンマグロブリン血症 (XLA) はブルトン型チロシンキナーゼ (Btk) の欠損により発症し、典型例では完全なB細胞不全 (骨髄での幼若B細胞の分化障害→末梢血液中の成熟B細胞およびガンマグロブリンの極端な減少→細菌に対する易感染性)を示すが、多様な病型(1)特定のクラスの免疫グロブリンが常に検出されたり(サブクラス欠損症様)、末梢血B細胞も検出可能な (CVID様) 症例、(2)経過中に免疫グロブリン産生が急激に低下あるいは変動する症例、(3)同一家系内 (同じ遺伝子異常をもつ同胞) に病型の異なる患者のいる例も複数報告されている。Btkは主にB細胞・骨髄球系細胞・肥満細胞の細胞質内に発現する非レセプター型チロシンキナーゼであり、他の分子との相互作用に必要と推定される4つのドメイン (N末端より PHドメイン、THドメイン、SH3ドメイン、SH2ドメイン) とキナーゼ領域 (SH1ドメイン) から構成される。今回我々は厚生省原発性免疫不全症候群調査研究班の協力を得て、日本における35家系51名(把握されている家系の半数以上に相当する)のXLA患者のBtk遺伝子の変異を同定し、さらにそれらの変異Btk蛋白質の発現およびキナーゼ活性を比較検討した。

【方法】 患者末梢血より抽出したRNAから逆転写反応によりBtk遺伝子のcDNAを合成し、それを7つの断片に分けた形でPCR法により增幅した後、SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) 法によって変異の存在する断片を推定し、その断片の塩基配列を決定することにより変異を同定した。SSCP法により変異の部位が推定できなかった症例については、そのBtk cDNAの全領域のシーケンスを行った。一方患者末梢血の好中球よりBtk蛋白質の発現およびBtkキナーゼ活性の測定を、抗Btkモノクロナル抗体を用いたWestern Blot法およびin vitro kinase assay法にて行なった。

#### 【成績】

- (1)35家系中31家系でBtk遺伝子上に変異が認められた。残り4家系ではBtk cDNA上に変異が存在しなかったが、mRNAの発現量が極端に減少していた。(全例ともBtk自体に何らかの異常が存在した。)
- (2)35家系中32家系でBtkキナーゼ活性が検出感度以下であった。(大多数例で、Btk変異の帰結はそのキナーゼ活性の消失であった。)

- (3)35家系中8家系で Btk 遺伝子上に一アミノ酸置換が認められ、他の報告と併せると、2つの変異の hot spot (PH ドメイン N 末端領域と SH1 ドメインの C 末端側半分の領域) が認められた。
- (4)一アミノ酸置換例のうち PH ドメインに変異の有する 2 家系および SH2 ドメインに変異の有する 1 家系においては弱いながら Btk キナーゼ活性が検出された。これらの患者の母親の B 細胞においては、ゲノム DNA には正常型と変異型の Btk 遺伝子の両方が存在するのにかかわらず mRNA は正常型のみであり、このことはこれらの変異が単なる遺伝子多型ではなく、実際に Btk の機能を障害していることを示していた。
- (5)SH1 ドメインに一アミノ酸置換のある 5 家系のうち、2 家系では Btk 蛋白質の発現自体が消失し、残りの 3 家系では Btk 蛋白質は発現しているがそのキナーゼ活性が消失していた。即ち、Btk 変異の帰結として Btk 蛋白質自体を不安定化させる場合と、特定のドメインの機能のみを消失させる場合のあることが示された。
- (6)CVID(分類不能型低ガンマグロブリン血症)や IgG サブクラス欠損症と診断されていた軽症の低ガンマグロブリン血症 2 症例における Btk 遺伝子にも変異が認められ、臨床診断と遺伝子診断の discrepancy が指摘された。

#### 【総括】

調査した XLA 症例全例とも Btk 自体に何らかの異常が認められ、その大多数例でキナーゼ活性が検出感度以下であった。また一アミノ酸置換例を含む多くの症例で Btk 蛋白質の発現が著減しており、病型（重症度）と遺伝子変異の部位との相関を解析する上で考慮する必要のあることが示された。さらに同一家系内(同じ遺伝子異常をもつ同胞)に病型の異なる複数の患者が生じる原因や、経過中に免疫グロブリン産生が急激に低下・変動する症例の検討も今後必要である。

### 論文審査の結果の要旨

今回の研究では、臨床診断された33家系の伴性劣性無ガンマグロブリン血症患者および2家系の低ガンマグロブリン血症患者の合計35家系のうち31家系においてブルトン型チロシンキナーゼ遺伝子の変異が同定され、残りの4家系において mRNA の発現量の極端な減少が証明されている。さらにこの35家系のうち29家系において変異ブルトン型チロシンキナーゼ蛋白質発現の消失が、残りの 6 家系（全て一アミノ酸置換変異例）においてもその変異が単なるアミノ酸多型ではなく実際にそのドメインの機能を障害していることが示されている。解析症例の多いことに加え、原因遺伝子の変異同定とその変異蛋白質の発現および機能を解析するという点で他の遺伝性疾患解析のモデルになると考えられ、学位の授与に値すると認める。