



Title	A congenital mutation of the novel gene LRRC8 causes agammaglobulinemia in humans
Author(s)	澤田, 明久
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45310
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 さわ だ あき ひさ
澤 田 明 久

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 8 5 0 4 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 16 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科生体統合医学専攻

学 位 論 文 名 A congenital mutation of the novel gene *LRRC8* causes
agammaglobulinemia in humans
(新規遺伝子 LRRC8 の先天的変異はヒトの無ガンマグロブリン血症の原因となる)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 大 菌 恵一

(副査)
教 授 金 倉 譲 教 授 戸 田 達史

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

末梢血 B リンパ球を欠く先天性無ガンマグロブリン血症患者の約 80%は、男児に発症する Bruton 型無ガンマグロブリン血症である。X 染色体上の *Btk* 遺伝子の異常が原因であり、この遺伝子産物は Pro-B 細胞から pre-B 細胞に分化するのに必須な細胞内シグナル伝達にかかわる蛋白のひとつであることが分かってきた。近年になって、常染色体上の BLNK や、Ple-B 受容体複合体を構成する μ 重鎖、 λ 5/14.1、CD79a の異常が報告されてきたが、非常にまれである。残る約 20%の患者の原因はほとんど解明されていない。

われわれは、上述の臨床所見および顔面小奇形を有する女児が白血球の染色体検査で均衡転座を認めたことから、病因の究明ならびに B リンパ球分化の解明のため、転座部位より新規遺伝子を単離した。さらに患児に認められたその遺伝子の変異が B リンパ球の分化に与える影響を検討したので報告する。

〔方法ならびに成績〕

患児の末梢血単核球は染色体転座 t (9; 20) (q33.2; q12) を有していた。第 20 番染色体 (chr_20) 長腕の転座領域近傍に位置する PAC、BAC の contig を準備した。これらをプローブとして FISH 解析を行った。PAC の dJ890O15 が、第 9 番に由来の派生染色体 (der (9)) と、第 20 番に由来の派生染色体 (der (20)) の両方に hybridize した。この PAC の全長 74,549 bp 内に転座点があると考えられた。ゲノムサザン法、逆向き PCR 法、直接シーケンス法により der (9) と der (20) の転座点および近傍の塩基配列を決定した。ヒトゲノム塩基配列と比較検討したところ、第 9 番染色体上に新規遺伝子の候補が存在し、RACE 法で確認した。野生型遺伝子は 2 つのエクソンから構成されていた。変異型遺伝子はイントロンで転座しており、変異型 mRNA は本来の位置でスプライシングを受けずにイントロン 105 bp の後に停止コドンを持っていた。野生型および変異型 mRNA を RT-PCR 法で確認した。

特異度の高い領域を発現ベクターに組み込んで、ウサギでポリクローナル抗体を作成した。本蛋白は 810 アミノ酸残基からなる 94.2 kDa の分子と予想され、ウェスタン法で矛盾しないことが確認された。アミノ酸配列はマウスオルソログと 99% 相同であった。ヒトでもマウスでも、末梢血より骨髓での発現の方が高かった。本蛋白は N 末端側

に4つの膜貫通領域と、そのあとの細胞外領域に1つの単独の、さらにC末端側に8つの連続するロイシンリッチリピートが予想された。ロイシンリッチリピートを持つ第8番目の蛋白ということで **Leucine-rich repeat-containing 8 (LRRC8)** と命名された。変異蛋白はロイシンリッチリピートの連続が5個半の後、ポリペプチドが付加されていた。患児は野生型と変異型の両方を発現していた。

変異型蛋白をマウス造血幹細胞に強制発現させる系でその意義を検討した。マウス幹細胞ウイルス (MSCV) に由来し、選択標識として黄色蛍光蛋白 (YFP) を発現するベクター (MIY) をコントロールとした。そして MIY に変異型 cDNA を組み込んだ MutY を用意した。マウス C57BL/6 の骨髄に *ex vivo* で MIY または MutY を感染させ、あらかじめ致死量の放射線を照射しておいた近交系マウスに尾静脈より移植し、3か月後の末梢血を解析した。B細胞を蛍光標識単クローン抗体 CD19-PE、T細胞を CD3-PE で、顆粒球と好中球を Gr1-PE と Mac1-PE で染色し、フローサイトメーターで解析したところ、MutY を導入した骨髄を移植されたマウスの末梢血は B に加え T リンパ球も著減していた。骨髄を解析すると Pro-B 細胞の段階で分化が停止していた。正常マウスで LRRC8 を最も多く発現していたのが Pro-B 細胞であり、分化するにつれ減少していった。

[総括]

本遺伝子 **LRRC8** は患児の病因遺伝子と考えられた。また LRRC8 蛋白は B リンパ球の分化に必須な分子である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文の要旨は以下の通りである。末梢血に B リンパ球を欠く無ガンマグロブリン血症の女兒に染色体転座 t (9、20) を認めた、患児の転座点より新規遺伝子を同定し、**LRRC8** と命名した。野生型の本遺伝子は第9番染色体長腕に位置し、エクソンは2つであった。コードされているのは810アミノ酸からなる膜蛋白であり、細胞外にロイシンリッチリピートを持ち、Pro-B細胞でよく発現しており、マウス **LRRC8** と99%相同であった。患児は野生型と変異型の両方を発現していた。変異型 **LRRC8** の cDNA を発現ベクターに組み込み、マウス造血幹細胞に導入したところ、骨髄では Pro-B 細胞の段階で発生・分化が停止しており、末梢血では B リンパ球が著減していた。患児の病因は変異型 **LRRC8** と考えられ、また B リンパ球の発生・分化に **LRRC8** が重要である可能性が考えられた。

無ガンマグロブリン血症の臨床例から新規の原因遺伝子を同定した研究であり、ゆえに学位に値すると考える。