

眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早期発  
症型失調症 (early-onset ataxia with ocular  
motor apraxia and hypoalbuminemia: EAOH)  
9 例の免疫学的検討

た むら よし てる

田 村 義 輝

(成長発達臨床医学専攻)

防衛医科大学校

令和 4 年度

目次	
第1章 緒言	1頁
第2章 材料と方法	
(1) 対象	4頁
(2) フローサイトメトリーによる末梢血単核球表面抗原解析	4頁
(3) リアルタイム PCR 法による T cell recombinant excision circles (TRECs)、 kappa-deleting element recombinant circles (KRECs) 解析	5頁
(4) T細胞受容体レパトア解析	6頁
(5) 患者由来 Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid cells (EBLCL) を用いた 放射線感受性試験 (colony survival assay)	8頁
第3章 結果	
(1) 患者の臨床的特徴および生化学的検査	10頁
(2) 末梢血リンパ球表面抗原解析	10頁
(3) TRECs、KRECs	11頁
(4) T細胞受容体レパトア解析	11頁
(5) 放射線感受性試験	12頁
第4章 考察	13頁
第5章 結論	18頁
謝辞	19頁

略語一覽	20頁
引用文献	21頁
図 表	29 頁

## 第1章 緒言

眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早期発症型失調症 (early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia: EAOH) (MIM 208920) は、DNA 一本鎖切断修復 (single strand break repair: SSB) に関する aprataxin 蛋白 (APTX) (コード遺伝子 *APTX*) の変異によって引き起こされる神経変性疾患である。遺伝性脊髄小脳変性症のひとつであり、常染色体潜性遺伝形式をとる。臨床的には、4歳から8歳という幼少期から小脳失調症状が出現し、小児期には眼球運動失行が起こる。20歳までには、歩行困難から車椅子が必要となる。その後も神経症状は進行し、不随意運動、知覚障害、運動障害、眼振、眼筋麻痺を認め、また、成人期になってから低アルブミン血症が現れる<sup>1-6)</sup>。

APTX の構造は、蛋白-蛋白結合に関与する FHA (forkhead associated) ドメイン、ヌクレオチドの加水分解やリン酸基転移反応を触媒する HIT モチーフ、DNA や RNA の結合に関与する Znf (zinc finger) モチーフによって構成されている<sup>7,8)</sup>。

EAOH に類似した神経症状をとる疾患として、毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia-telangiectasia: AT) (MIM 208900) が知られている。AT は、DNA 二本鎖切断修復 (double strand break repair: DSBR) に関与する ATM 蛋白 (コード遺伝子 *ATM*) の変異が原因である。臨床的には、結膜の毛細血管拡張が特徴的で、神経症

状としては、3歳までに体幹失調を認め、その後も進行し、多くの場合で眼球運動失行があらわれ、10歳までにはやはり車椅子を必要とする。また、神経症状の他に、約70%の症例に免疫不全の合併があり、免疫グロブリン異常として、IgA、IgE、IgGの低値や、リンパ球減少（B細胞減少、CD4<sup>+</sup>T細胞減少、CD8<sup>+</sup>T細胞減少）を認め、呼吸器感染症を反復する。さらには、リンパ腫や白血病を高頻度で合併する<sup>9,10)</sup>。

このATで認める免疫不全は、DNA DSBの障害により説明される。リンパ球は、その成熟過程において、DNA DSBの機構を用いたV(D)J遺伝子再構成が行われることで、抗原に対する多様性を獲得している。しかし、ATでは、ATM蛋白の機能低下によるDNA DSBの障害のために、リンパ球の成熟障害が生じている<sup>11)</sup>。ATM以外にもDNA Ligase IVやArtemisといったDNA DSBに関わる酵素や蛋白質の欠損が原因となる免疫不全症が知られている。このように、DNA DSBの障害と免疫学的異常の関係は明らかにされてきたが、一方で、DNA SSBと免疫学的異常の関係は明らかではなかった。

今回、臨床的にATと診断されていた患者で、遺伝子解析の結果、APTXの変異を認め、EAOHへと診断を修正した1例を経験した。その患者ではCD4<sup>+</sup>T細胞が減少していた。過去には、1980年代に、ataxia ocular motor apraxiaと臨床的に診断された症例のCD4/8比が1未満であったとの報告があるが<sup>12)</sup>、一般的には知られていない。しかしながら、上記患者の例や、APTXがDNA修復に関わるという点

からも、EAOH 患者において潜在的な免疫学的異常が存在しているのではないか、との仮説を立て、APTX 変異が確認された日本国内の EAOH 患者 9 例に対し、免疫学的検討を行った。

なお、本研究はヒト検体を用いるため、防衛医科大学校倫理委員会の承認（受付番号 1275「先天性免疫不全症の遺伝子解析研究」）を得て実施した。検体採取に際しては、対象者またその保護者に研究内容を文書と口頭により説明し、署名同意を得た。

## 第2章 材料と方法

### (1) 対象

日本国内の EAOH 患者 9 名（男性 4 名、女性 5 名、年齢 6 歳から 59 歳、中央値 37 歳）の血液検体を収集した。正常域については、施設基準ならびに国立成育医療研究センターが公表している値を用いた。

### (2) フローサイトメトリーによる末梢血単核球表面抗原解析

FACSCalibur (Becton Dickson (BD), New Jersey, USA) を使用し、解析を行った。細胞染色用のモノクローナル抗体は、以下のものを使用した。T細胞の染色には、FITC-抗CD4抗体 (clone SK4, SK3, BD)、FITC-抗CD45RA抗体 (clone L48, BD)、PE-抗CD31抗体 (clone WM59, BD)、PerCP-抗CD8抗体 (clone SK1, BD)、APC-抗CD3抗体 (clone J3-119, Beckman Coulter, California, USA)、APC-抗CD45RO抗体 (clone UCHL, BD) を、B細胞の染色には、APC-抗CD19抗体 (clone J3-119, Beckman Coulter)、PE-抗CD27抗体 (clone 1A4CD27, Beckman Coulter) をそれぞれ使用した。正常域については、免疫不全データベース (Primary Immunodeficiency Database in Japan: PIDJ) によって公表されているものを用いた。

(3) リアルタイム PCR 法による T cell recombinant excision circles (TRECs) , kappa-deleting element recombinant circles (KRECs) 解析

リアルタイム PCR は、蛍光標識プローブ法で実施した。反応総量は 20  $\mu$ L で、サンプル DNA を 1  $\mu$ L とし、各組成の最終濃度は、2 $\times$ EagleTaq Universal Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) 、プライマーは各々 500 nM、プローブは TaqMan プローブ 250 nM とした。用いたプライマー配列とプローブ配列は以下の通りである。

TREC forward プライマー: 5'-CCATGCTGACACCTCTGGTT-3、

TREC reverse プライマー: 5'-TCGTGAGAACGGTGAATGAAG-3'、

TREC プローブ: FAM-5'-CACGGTGATGCATAGGCACCTGC-3'-TAMRA20、

KREC forward プライマー: 5'-TCAGCGCCCATTACGTTTCT-3'、

KREC reverse プライマー: 5'-GTGAGGGACACGCAGCC-3'、

KREC-プローブ: FAM-5'-CCAGCTCTTACCCTAGAGTTTCTGCACGG-3'-

TAMRA21、

内因性コントロールには TaqMan 20 $\times$ RNaseP Primer-Probe (VIC<sup>TM</sup>dye) Mix (Applied Biosystems) を使用した。リアルタイム PCR は LightCycler<sup>®</sup>480 II リアルタイム PCR システム (Roche, Basel, Switzerland) を用い、96 ウェルプレートを使用し、50 $^{\circ}$ C 2 分、95 $^{\circ}$ C 10 分の初期ステップの後、45 サイクル (95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分) で実施した。

TRECs、KRECs および RNaseP のコピー数は、プラスミド DNA の段階希釈系列の増幅曲線から作成される検量線をもとに算出した。得られた TRECs、KRECs および RNaseP



の測定値は、1 µgDNA あたりの量に換算して最終定量値とし、100copies/µgDNA 未満となった場合に検出感度未満とし<sup>13-15)</sup>、正常域については、免疫不全データベースによって公表されているものを用いた。

#### (4) T細胞受容体レパトア解析

##### (ア) フローサイトメトリーを用いた T細胞受容体β鎖可変領域レパトア解析

ほとんどの T細胞受容体は、α鎖とβ鎖の2つの糖タンパクから構成され、それぞれ定常領域と可変領域を持っている。そのうち、可変領域は V(D)J 遺伝子の再構成によって、抗原への多様性を獲得している。今回、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞における T細胞受容体β鎖可変領域 (TCR β-chain variable (TCRVβ)) の発現を、IO Test Beta Mark (Beckman Coulter) を用いて検出した。IO Test Beta Mark には、FITC または PE にラベルされた抗 TCRVβ抗体が24種類含まれており、抗体反応後に FACSCalibur を用いて、フローサイトメトリーを実施し評価した。健常人では、この24種類の抗体によって、TCRVβレパトアの60%から70%が結合されるため、正常域を同様に設定した。

##### (イ) complementarity determining region 3 (CDR3) スペクトラタイピング<sup>16)</sup>

相補性決定領域 (CDR) は、T細胞および免疫グロブリンにおける抗原受容体の可変領域の一部で、抗原に直接接触する部分である。CDR1、CDR2、CDR3 が存在し、その中でも CDR3 が最も抗原との結合に関与する。CDR3 は、V(D)J 遺伝子再構成、それ

に伴うランダムな塩基の挿入や欠失によって、変化が大きく、異なるサイズで形成される。今回、T細胞受容体における CDR3 サイズを量的に評価するスペクトラタイピングを行った。ポリクローナルなレパトアを持つ正常なパターンでは、ヒストグラムは正規分布をとるが、異常な場合は、中央以外に突出した1つまたは1つ以上のピークをもったパターンをとる。

autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) により、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞を分離した。RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、RNAを採取し、Transcriptor First Strand DNA Synthesis Kit (Roche) を用いて、complementary DNA (cDNA) を作成した。

得られた cDNA をサンプルとして、TCRV $\beta$  における Constant gene と個々の Variable gene に対するプライマーを反応させ、PCRを行った。用いたプライマーは、common constant gene specific 3' primer: GAACTGGACTTGACAGCGGAAGT と、Variable gene specific 5' primer は個々の領域に合わせた (表 1)。プライマーの最終濃度は 200nM とし、DNA ポリメラーゼには Takara Ex Taq (Takara Bio, Kusatsu, Japan) または、Prime STAR GXL DNA polymerase (Takara Bio) を用いた。PCR サイクルは、初回ステップとして 94°C 2 分の後、40 サイクル (94°C 1 分、60°C (58°C、62°C) 1 分、72°C 90 秒)、72°C 15 分、または 30 サイクル (98°C 10 秒、60°C 15 秒、68°C 60 秒) で実施した。

ここで得られた PCR 産物をテンプレートとして、Labeled 3' constant gene

Primer: FAM-CB3: FAM-ACRGTGCACCTCCTTCCATTCA を用いて、反応させた。プライマーの最終濃度は 200nM とし、DNA ポリメラーゼには Takara Ex Taq (Takara Bio) を用いた。初回ステップとして 95°C 2 分の後、3 サイクル (95°C 2 分、60°C 2 分、72°C 2 分)、72°C 1 分で実施した。

さらにシーケンスを行うために、得られた PCR 産物 5μL に、HiDiFormamide と、Gene Scan-500LIZ size standard (Applied Biosystems) を 20:1 で混合した溶液 10μL を加えて懸濁し、95°C 10 分で反応させた。

Applied Biosystems™ 3500 ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems) を用いてシーケンスを行い、Genemapper (Applied Biosystems) で解析を行った。

(5) 患者由来 Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid cells (EBLCL) を用いた放射線感受性の解析 (colony survival assay<sup>17)</sup>)

健常者由来、患者由来 EBLCL に、MBR-1503R (HITACHI, Tokyo, Japan) を用いて、放射線照射 (1Gy, 2Gy) 後、10-14 日間培養し、形成されたコロニー数を評価した。評価法として、以下の式から survival fraction を計算した。

$$\text{Colony formation efficiency (CFE)} = -\ln[(N-C)/N]/W$$

(N: ウェル数、C: colony 形成した well 数、W: 播種した細胞数)

$$\text{Survival Fraction: CFE\%} = \text{CFE}_i/\text{CFE}_c$$

(CFE<sub>i</sub>: 照射されたプレートでの CFE、CFE<sub>c</sub>: コントロールでの CFE)

Survival fraction は、1Gy を照射した検体で、37%以上が正常域、21%から 37%が中間域、21%以下が放射線感受性域と報告されている<sup>17)</sup>。

### 第3章 結果

#### (1) 患者の臨床的特徴および生化学的検査

患者9名全例で、*APTX*の変異を認めた。臨床症状として、全例で運動失調症状を認め、6名は車椅子を必要としていた。血液検査の結果、リンパ球減少が1名に認められた(P8)。また、2名(P3, P7)でIgGが低値、1名(P7)でIgMが低値であった。Alpha-fetoprotein (AFP) は5名で測定し、うち2名は軽度の上昇を認めた。この結果は、EAOH患者におけるAFP値は、正常範囲または軽度上昇するという過去の報告と同様であった<sup>18-20</sup>。さらに、6名(P4, P5, P6, P7, P8, P9)で、EAOHの特徴である低アルブミン血症を認めた。表2にそのほかの結果を含め記載する。

#### (2) 末梢血リンパ球表面抗原解析

CD4<sup>+</sup>T細胞の割合が、P3で25%と低値で、細胞数としても、P3, P7, P8でそれぞれ、275/ $\mu$ L, 508/ $\mu$ L, 509/ $\mu$ Lと低値であった。一方、CD8<sup>+</sup>T細胞は、割合、細胞数ともにP8で、12.4% (76/ $\mu$ L) と低値であった。CD4/8比は、P1, P3で逆転し、1未満であった。また、CD19<sup>+</sup>B細胞はP7で、10/ $\mu$ Lと極めて低値であった。加えて、P5, P6, P9において、CD4<sup>+</sup>T細胞におけるCD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> (recent thymic emigrants: RTE) の割合が、12.32%, 9.03%, 25.69%と低値であった。RTEは、胸腺から新たに移出されたT細胞であり、この結果は以下に示すTREC<sub>s</sub>低値という結果に矛盾しない。表3にそのほかの結果を含め記載する。

### (3) TRECs、KRECs

TRECs は、P5, P6, P7, P9 において、100 copies/ $\mu$ gDNA 未満であり、P4 においても、 $1.64 \times 10^2$  copies/ $\mu$ gDNA と境界域の結果であった。一方、KRECs は、P7 で 100 copies/ $\mu$ gDNA 未満であった。表 3 にそのほかの結果を含め記載する。

### (4) T 細胞受容体レパトア解析

フローサイトメトリーを用いた方法で、P1, P3, P5, P7, P9 の TCRV $\beta$  レパトアを検討した。この方法では、正常コントロールの場合、上述の通り TCRV $\beta$  レパトアのうち、60%から 70%をカバーする。EAOH 患者においては、CD4<sup>+</sup>T 細胞では正常であったが、CD8<sup>+</sup>T 細胞では、P1 28.72%, P3 24.24%, P5 34.7%, P7 52.25%, P9 28.83%といずれも低値であった。このことは、EAOH 患者の CD8<sup>+</sup>T 細胞では、レパトアが減少しており、いくつかのクローンが欠損している可能性が考えられた。表 4 に結果を示す。

加えて、TCR の CDR3 塩基配列長を評価した。上述の通り、正常コントロールでは正規分布をとり、ポリクローナルと評されるが、EAOH では CD8<sup>+</sup>T 細胞で、ピークの偏倚や減少などがあるオリゴクローナルなパターンを示した。図 1 に結果を示す。なお、自己免疫性疾患でも T 細胞受容体でオリゴクローナルないし、モノクローナルなパターンをとりうるが、今回の検討した患者の中に、自己免疫性疾患を合併した者はいなかった。

(5) 放射線感受性試験

正常コントロールと AT 患者を対照群として、P2 と P8 で実施した。1Gy 照射における survival fractions で評価を行い、P2 33.7%, P8 37.6%と中間域 (21%から 37%) であり、EAOH 患者では、軽度の放射線感受性を認めた (図 2)。

## 第4章 考 察

EAOH 患者の血液検体を用いて、上記の免疫学的検討を行い、9 名中 8 名で何らかの免疫学的異常を認めた。異常の内訳は、CD4<sup>+</sup>T 細胞減少、CD8<sup>+</sup>T 細胞減少、CD4/8 比の逆転、TRECs 低値、B 細胞減少、KRECs 低値、低ガンマグロブリン血症であった（表 5）。TRECs は、T 細胞受容体  $\alpha$  鎖の V(D)J 遺伝子再構成の過程で生じる環状 DNA であり、また KRECs は、免疫グロブリン軽鎖である  $\lambda$  鎖の再構成または  $\kappa$  鎖の対立遺伝子排除によって、 $\kappa$  鎖定常領域が染色体 DNA から切り取られる環状 DNA である。TRECs は T 細胞、KRECs は B 細胞の分化、増殖によっても複製されないという特徴から、それぞれ T 細胞、B 細胞の新生能のマーカーとして利用される（図 3）。すなわち、低値であることは新生能の低下を示している。さらに、T 細胞受容体の多様性の評価のために行った TCRV $\beta$  レパトア解析と CDR3 スペクトラタイピングでは、EAOH 患者の CD8<sup>+</sup>T 細胞において、いずれもオリゴクローナルなパターンを示していた。このことは、一部のレパトアをもった CD8<sup>+</sup>T 細胞に分化が偏っていることを意味しており<sup>21)</sup>、分化の過程で行われる V(D)J 遺伝子再構成に何らかの障害がある可能性が考えられた。

このように、EAOH 患者では、ほとんどの患者で何らかのリンパ球分化障害があることを見出した。この異常は、失調症状が顕著になる以前の若年患者でも認められるため、加齢や神経学的異常、併存する低栄養などが原因の二次的な変化だけではないと考えた。また、EAOH 患者では、おおむね 20 歳以上で低アルブミン血症を認めるという年齢に応じた特徴があるが<sup>6)</sup>、免疫学的異常は年齢とは関連しなかった。



加えて、EAOH 患者由来のリンパ球において、軽度の放射線感受性が認められた。過去にも同様の報告があり<sup>22,23)</sup>、放射線によって生じる DNA 二本鎖切断を修復する機構に異常がある可能性を示した。

今回、得られた結果の要因について考察を加える。B 細胞及び T 細胞の分化、成熟の過程では、V(D)J 遺伝子再構成により、B 細胞受容体（膜型免疫グロブリン）、T 細胞受容体の抗原に対する多様性を獲得している。その過程の中で、RAG (recombination activating gene) 1, RAG2 が V(D)J 遺伝子の DNA 二本鎖切断を起こし、続いて V(D)J 遺伝子再構成が行われる<sup>24)</sup>。再構成の機構としては、主に DNA DSBR の主要経路である古典的非相同末端結合 (classical non homologous end joining: C-NHEJ) が働いている<sup>25, 26)</sup>。C-NHEJ は、1) Ku70/80 が切断部位に結合、2) DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) や Artemisヌクレアーゼなどによる末端加工、3) DNA ポリメラーゼ $\mu$ ,  $\lambda$ による DNA の合成、4) DNA Ligase IV/XRCC4 による再連結というステップをとる (図 4)。この C-NHEJ を中心とした V(D)J 遺伝子再構成の過程には、EAOH の原因である APTX は登場しない。

APTX が関与する DNA SSBR は、1) 切断損傷認識と X-ray repair cross complementing group 1 protein (XRCC1) による修復のための足場形成 (DNA 損傷修復に関わる複数の蛋白質が結合する足場となる)、2) 切断部の 3'末断端を水酸基、5'末断端をリン酸基に変換するエンドプロセッシング、3) DNA ポリメラーゼ $\beta$ による DNA 合成、4) DNA Ligase I/IIIによる切断部の連結といったステップによって行われる<sup>27-31)</sup> (図 5)。APTX

は、DNA 切断部の 3'末断端を水酸基に、5'末断端をリン酸基に変換する活性を有しており、2) エンドプロセッシングで重要な役割を果たしている<sup>28,29)</sup>。さらに、足場蛋白質として1) に関わる XRCC1 は、APTX の FHA ドメインとの相互作用によってリン酸化されることで機能し、また、その発現が定常的に維持される<sup>32,33)</sup>。すなわち、APTX は、XRCC1 の活性化や安定化に必要であり、2) だけでなく、1) の過程にも間接的に作用している。

これまで、APTX は DNA SSBR に関与するが、DNA DSB、ひいては V(D)J 遺伝子再構成には関与せず、リンパ球分化障害も起こさないと考えられていた。しかし、今回得られた結果からは、EAOH 患者においてリンパ球分化障害が生じていると考えられた。つまり、APTX が DNA DSB にも関わっている可能性を示しており、その機序について過去の文献から以下の通り考察する。

APTX の FHA ドメインは、XRCC1 の他に XRCC4 や mediator of DNA damage checkpoint protein1 (MDC1) と相互作用すると指摘されている<sup>34)</sup>。XRCC4 は DNA Ligase IV とともに、C-NHEJ における 4) 連結の過程に関与する<sup>32)</sup>。さらに、MDC1 は、DNA 二本鎖切断部位に  $\gamma$ H2AX とならんで早期に動員され、細胞周期チェックポイント蛋白質として働き、また、53BP1 (p53 binding protein 1) や BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1) といった DNA 修復経路の調整に関わる蛋白質を動員する (図 6)。他方、XRCC1 は、DNA DSB の非相同性末端結合のうち、C-NHEJ の代替経路として知られる、DNA 末端のマイクロホモロジーを利用した microhomology-mediated end joining

(MMEJ) という経路において、重要な役割を持っている<sup>35)</sup>。この経路は、リンパ球分化過程の RAG1, RAG2 による V(D)J 遺伝子切断では、C-NHEJ が働く限りほとんど関与しないとの報告がある<sup>36,37)</sup>。以上から、APTX が XRCC4, MDC1 と相互作用することで、C-NHEJ に関与し、リンパ球分化障害の一因となる可能性が考えられた (図 7)。やはり、DNA DSBR に動員される ATM のような蛋白質の異常による場合と比較すると、影響が少ないことが想定されるが、このことは免疫学的にも放射線感受性もいずれも軽度な異常であったという今回の研究結果に合致する。また、臨床的に、EAOH 患者において易感染性が指摘されていないという点も矛盾しない。

一方、DNA SSB 異常を起点に免疫学的異常につながる可能性も排除できないと考える。増殖細胞において、DNA 一本鎖切断が修復されないことにより、細胞周期の S 期で本来行われる DNA 複製が阻害され、その結果 DNA 二本鎖切断が形成される可能性も示されている<sup>38)</sup>。DNA 損傷修復能を上回るほど損傷を受けた DNA が増加すると、遺伝的な不安定性や細胞死への誘導が生じることから、リンパ球の分化、成熟過程においても同様の理由により、異常が生じている可能性がある。

本研究では、EAOH 患者で免疫学的異常を起こすことを初めて示した。一方、本研究の限界として、上記に考察した APTX の異常によって DNA DSB 異常が生じることの直接的な証明はできていない。今後の課題として、APTX 変異をもつ検体を用いて、DNA DSBR に関わる MDC1 や XRCC4 などの蛋白質の発現量を測定することで、関連性を示す必要がある。さらには、T 細胞受容体や B 細胞受容体の次世代シーケンサーによる解析

や、他の SSBR 関連遺伝子異常症における免疫異常を検討することで、リンパ球分化における SSBR と DSBR のクロストークについて明らかにすることが可能になると思われる。

また、APTX の変異部位によって、神経症状の重症度が異なることが知られているが<sup>39)</sup>、免疫学的特徴の違いは今回の 9 名の検討では、明らかではなかった。今後、さらに多くの症例を評価することでそういった特徴の違いを見出せる可能性があると考ええる。

## 第5章 結 論

EAOH 患者では、様々な免疫学的異常と軽度の放射線感受性があることを示した。このことから、DNA SSBR に関わる APTX が、リンパ球の成熟過程に影響していることが考えられた。さらには、EAOH 患者の診察時に、神経学的な評価だけでなく免疫学的な評価を行う必要があることを示唆している。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、防衛医科大学校免疫・微生物学講座教授 木下学先生、内科学講座准教授 鈴木一詩先生をはじめ諸先生方々には、研究環境面でのご配慮を頂きました。厚く御礼申し上げます。

本研究に際し貴重な御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校小児科学講座教授 野々山恵章先生、今井耕輔先生に深く感謝申し上げます。

また、御助言、御協力を賜りました当校小児科学講座 松本浩先生、新所沢キッズクリニック 小林治先生、御野場病院 石黒英明先生、盛岡友愛病院神経内科 小川雅也先生、名古屋大学神経内科 辻河高陽先生、中部大学生命健康科学部作業療法学科 長谷川康博先生、洛和会音羽病院脳神経内科 坂本光弘先生、国立病院機構鈴鹿病院 小長谷正明先生、帯広厚生病院脳神経内科 保前英希先生、東京医科歯科大学小児科 高木正稔先生、森尾友宏先生、新潟大学大学院 医歯学総合研究科 横関明男先生、新潟大学脳研究所 小野寺理先生に深く感謝の意を表します。

略語一覽

EAOH	early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia
APTX	aprataxin
AT	ataxia-telangiectasia
ATM	ataxia-telangiectasia mutated
TCRV $\beta$	T-cell receptor $\beta$ -chain variable
DSB	double-strand break
SSB	single-strand break
DSBR	double-strand break repair
SSBR	single-strand break repair
LCLs	lymphoblastoid cell lines
TRECs	T-cell receptor excision circles
KRECs	kappa-deleting recombination excision circles
CDR	complementarity-determining region
AFP	$\alpha$ -fetoprotein
TCR	T-cell receptor
C-NHEJ	classical non homologous end joining
MMEJ	microhomology mediated end joining
RAG	recombination activating gene
MDC1	mediator of DNA damage checkpoint gene
53BP1	p53 binding protein 1
BRCA1	Breast cancer susceptibility gene 1
DNA-PKCs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
XRCC	X-ray repair cross complementing protein

## 引用文献

1. Date H, Onodera O, Tanaka H, Iwabuchi K, Uekawa K, Igarashi S, Koike R, Hiroi T, Yuasa T, Awaya Y, Sakai T, Takahashi T, Nagatomo H, Sekijima Y, Kawachi I, Takiyama Y, Nishizawa M, Fukuhara N, Saito K, Sugano S, Tsuji S. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene, *Nat Genet.* 2001, 29(2):184-8.
2. Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Mendonca P, Barros J, Coutinho P, Sequeiros J, Koenig M. Homozygosity mapping of Portuguese and Japanese forms of ataxia-oculomotor apraxia to 9p13, and evidence for genetic heterogeneity, *Am J Hum Genet.* 2001, 68(2):501-8.
3. Onodera O. Spinocerebellar ataxia with ocular motor apraxia and DNA repair. *Neuropathology.* 2006, 26(4):361-7..
4. Onodera O. Molecular mechanism for spinocerebellar ataxias. *Rinsho Shinkeigaku.* 2009, 49(11):750-2.
5. LE Ber I, Moreira MC, Rivaud-Péchoux S, Chamayou C, Ochsner F, Kuntzer T, Tardieu M, Saïd G, Habert MO, Demarquay G, Tannier C, Beis JM, Brice A, Koenig M, Dürr A. Cerebellar ataxia with oculomotor apraxia type 1: clinical and genetic studies. *Brain.* 2003, 126:2761-72



6. Tada M, Yokoseki A, Sato T, Makifuchi T, Onodera O. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia/ataxia with oculomotor apraxia 1. *Adv Exp Med Biol.* 2010, 685:21-33.
7. Clements PM, Breslin C, Deeks ED, Byrd PJ, Ju L, Bieganowski P, Brenner C, Moreira MC, Taylor AM, Caldecott KW. The ataxia-oculomotor apraxia 1 gene product has a role distinct from ATM and interacts with the DNA strand break repair protein XRCC1 and XRCC4. *DNA Repair.* 2004, 3(11):1493-502.
8. Tumbale P, Appel CD, Kraehenbuehl R, Robertson PD, Williams JS, Krahn J, Ahel I, Williams RS, Structure of an aprataxin-DNA complex with insights into AOA1 neurodegenerative disease. *Nat Struct Mol Biol.* 2011, 18(11):1189-95.
9. Amirifar P, Ranjouri MR, Yazdani R, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Ataxia-telangiectasia: A review of clinical features and molecular pathology. *Pediatr Allergy Immunol.* 2019, 30(3):277-88.
10. van Os NJH, Jansen AFM, van Deuren M, Haraldsson A, van Driel NTM, Etzioni A, van der Flier M, Haaxma CA, Morio T, Rawat A, Schoenaker MHD, Soresina A, Taylor AMR, van de Warrenburg BPC, Weemaes CMR, Roeleveld N, Willemsen MAAP. Ataxia-telangiectasia: Immunodeficiency and survival. *Clin Immunol.* 2017, 178:45-55.

11. Bredemeyer AL, Sharma GG, Huang CY, Helmink BA, Walker LM, Khor KC, Nuskey B, Sullivan KE, Pandita TK, Bassing CH, Sleckman BP. ATM stabilizes DNA double-strand-break complexes during V(D)J recombination. *Nature*, 2006, 27;442(7101):466-70.
12. Aicardi J, Barbosa C, Andermann E, Morcos R, Ghanem Q, Fukuyama Y, Awaya Y, Moe P. Ataxia-ocular motor apraxia: a syndrome mimicking ataxia-telangiectasia. *Ann Neurol*. 1988, 24(4):497-502.
13. Morinishi Y, Imai K, Nakagawa N, Sato H, Horiuchi K, Ohtsuka Y, Kaneda Y, Taga T, Hisakawa H, Miyaji R, Endo M, Oh-Ishi T, Kamachi Y, Akahane K, Kobayashi C, Tsuchida M, Morio T, Sasahara Y, Kumaki S, Ishigaki K, Yoshida M, Urabe T, Kobayashi N, Okamoto Y, Reichenbach J, Hashii Y, Tsuji Y, Kogawa K, Yamaguchi S, Kanegane H, Miyawaki T, Yamada M, Ariga T, Nonoyama S. Identification of severe combined immunodeficiency by T-cell receptor excision circles quantification using neonatal Guthrie cards. *J Pediatrics*. 2009, 155(6):829-33.
14. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takeda H, Mitsuki N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of kappa-deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol*. 2011, 128(1):223-5 e2.

15. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin  $\kappa$  - deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol.* 2013, 131(5):1437-40 e5.
16. Currier JR, Robinson MA. Spectratype/immunoscope Analysis of the Expressed TCR Repertoire. *CurrProtoc Immunol.* 2001, Chapter 10:Unit 10.28.
17. Halliang Hu, Nahas SA, Gatti RA. Assaying Radiosensitivity of Ataxia-Telangiectasia. ATM kinase. Humana Press., New York, 2017, Chapter 1:pp. 1-11.
18. Mariani LL, Rivaud-Péchoux S, Charles P, Ewenczyk C, Meneret A, Monga BB, Fleury MC, Hainque E, Maisonobe T, Degos B, Echaniz-Laguna A, Renaud M, Wirth T, Grabli D, Brice A, Vidailhet M, Stoppa-Lyonnet D, Dubois-d'Enghien C, Le Ber I, Koenig M, Roze E, Tranchant C, Durr A, Gaymard B, Anheim M. Comparing ataxia with oculomotor apraxia: A multimodal study of AOA1, AOA2, AT focusing on video-oculography and alpha-fetoprotein. *Sci Rep.* 2017, 10:7(1)15284.
19. Barbot C, Coutinho P, Chorão R, Ferreira C, Barros J, Fineza I, Dias K, Monteiro J, Guimarães A, Mendonça P, do Céu Moreira M, Sequeiros J. Recessive ataxia with ocular apraxia, review of 22 Portuguese patients. *J Arch Neurol.* 2001;58(2):201-5.

20. Renaud M, Moreira MC, Ben Monga B, Rodriguez D, Debs R, Charles P, Chaouch M, Ferrat F, Laurencin C, Vercueil L, Mallaret M, M'Zahem A, Pacha LA, Tazir M, Tilikete C, Ollagnon E, Ochsner F, Kuntzer T, Jung HH, Beis JM, Netter JC, Djamshidian A, Bower M, Bottani A, Walsh R, Murphy S, Reiley T, Bieth É, Roelens F, Poll-The BT, Lourenço CM, Jardim LB, Straussberg R, Landrieu P, Roze E, Thobois S, Pouget J, Guissart C, Goizet C, Dürr A, Tranchant C, Koenig M, Anheim M. Clinical, biomarker, and molecular delineations and genotype-phenotype correlation of ataxia with oculomotor apraxia type 1: JAMA Neurol. 2018, 75(4):495-502.
21. Giovannetti A, Mazzetta F, Caprini E, Aiuti A, Marziali M, Pierdominici M, Cossarizza A, Chessa L, Scala E, Quinti I, Russo G, Fiorilli M. Skewed T-cellreceptor repertoire, decreased thymic output, and predominance of terminally differentiated T cells in ataxia telangiectasia. Blood. 2002, 100(12):4082-9.
22. Hannan MA, Sigut D, Waghray M, Gascon GG. Ataxia-ocular motor apraxia syndrome: an investigation of cellular radiosensitivity of patients and their families. J Med Genet. 1994, 31(12):953-6.
23. Nahas SA, Duquette A, Roddier K, Gatti RA, Brais B. Ataxia-oculomotor apraxia 2 patients show no increased sensitivity to ionizing radiation. Neuromuscul Disord. 2007, 17(11-12):968-9.

24. Notarangelo LD, Kim MS, Walter JE, Lee YN. Human RAG mutations: biochemistry and clinical implications. *Nat Rev Immunol*. 2016, 16(4):234-46.
25. Oster S, Aqeilan RI. Programmed DNA Damage and Physiological DSBs: Mapping, Biological Significance and Perturbations in Disease States. *Cells*. 2020, 10;9(8):1870.
26. Soulas-Sprauel P, Rivera-Munoz P, Malivert L, Le Guyader G, Abramowski V, Revy P, de Villartay JP. V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene*. 2007, 10;26(56):7780-91.
27. Ahel I, Rass U, El-Khamisy SF, Katyal S, Clements PM, McKinnon PJ, Caldecott KW, West SC. The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*. 2006, 443(7112):713-6.
28. Rass U, Ahel I, West SC. Actions of Aprataxin in multiple DNA repair pathways. *J Biol Chem*. 2007, 282(13):9469-74.
29. Hirano M, Yamamoto A, Mori T, Lan L, Iwamoto TA, Aoki M, Shimada K, Furiya Y, Kariya S, Asai H, Yasui A, Nishiwaki T, Imoto K, Kobayashi N, Kiriya T, Nagata T, Konishi N, Itoyama Y, Ueno S. DNA single-strand break repair is impaired in aprataxin-related ataxia. *Ann Neurol*. 2007, 61(2):162-74.
30. Abbotts R, Wilson DM 3rd. Coordination of DNA single strand break repair. *Free Radic Biol Med*. 2017, 107:228-244.

31. Gueven N, Becherel OJ, Kijas AW, Chen P, Howe O, Rudolph JH, Gatti R, Date H, Onodera O, Taucher-Scholz G, Lavin MF. Aprataxin, a novel protein that protects against genotoxic stress. *Hum Mol Genet.* 2004, 13(10):1081-93.
32. Horton JK, Stefanick DF, Çağlayan M, Zhao ML, Janoshazi AK, Prasad R, Gassman NR, Wilson SH. XRCC1 phosphorylation affects aprataxin recruitment and DNA deadenylation activity. *DNA Repair.* 2018, 64:26-33.
33. Luo H, Chan DW, Yang T, Rodriguez M, Chen BP, Leng M, Mu JJ, Chen D, Songyang Z, Wang Y, Qin J. A new XRCC1-containing complex and its role in cellular survival of methyl methanesulfate treatment. *Mol Cell Biol.* 2004, 24(19):8356-65.
34. Becherel OJ, Jakob B, Cherry AL, Gueven N, Fusser M, Kijas AW, Peng C, Katyal S, McKinnon PJ, Chen J, Epe B, Smerdon SJ, Taucher-Scholz G, Lavin MF. CK2 phosphorylation-dependent interaction between aprataxin and MDC1 in the DNAdamage response. *Nucleic Acids Res.* 2010, 38(5):1489-503.
35. Sharma S, Javadekar SM, Pandey M, Srivastava M, Kumari R, Reghavan SC. Homology and enzymatic requirements of microhomology-dependent alternative end joining. *Cell Death Dis.* 2015, 6(3):e1697.
36. Han L, Mao W, Yu K. X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1) deficiency enhances class switch recombination and is permissive for alternative end joining. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012, 109(12): 4604-8.

37. Frit P, Barboule N, Yuan Y, Gomez D, Calsou P. Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks. *DNA repair*. 2014, 17: 81-97.
38. Caldecott KW. Single-strand break repair and genetic disease, *Nat Rev Genet*. 2008, Aug;9(8):619-31.
39. Yokoseki A, Ishihara T, Koyama A, Shiga A, Yamada M, Suzuki C, Sekijima Y, Maruta K, Tsuchiya M, Date H, Sato T, Tada M, Ikeuchi T, Tsuji S, Nishizawa M, Onodera O. Genotype-phenotype correlations in early onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminaemia. *Brain*.2011, 134:1387-99.

図 表

表 1. CDR3 スペクトラタイピングに用いた variable gene specific 5' primer

Vβ1-1	ACAACAGTTCCTGACTTGCA
Vβ2-1	TCATCAACCCATGCAAGCCTGA
Vβ3-1	GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAG
Vβ4-1	TTGACAAGTTCCCATCAGCC
Vβ5-1	CTTCAGTGAGACACAGAGAAA
Vβ5-2	ATTATGAGGAGGAAGAGAGACA
Vβ5-5	ATTATAGGGAGGAAGAGAGAATGG
Vβ6-3,	CCAACAAGACAAATCAGGGCT
Vβ6-4	AAGGCTGCTCAGTGATCGGT
Vβ6-5	TCGCTTCTCTGCAGAGAGGA
Vβ7-1	CTGAATGCCCCAACAGCTCT
Vβ13-1	CAATGGCTACAATGTCTCCAG
Vβ13-2	GGTCCCTGATGGCTACAATG
Vβ13-4	CCGAATGGCTACAACGTCTC
Vβ14-1	GTCTCTCGAAAAGAGAAGAGG
Vβ21-1	TCTGCAGAGAGGCTCAAAGG
Vβ22-1	TCTGCAGAGAGGCTCAAAGG
Vβ25-1	AACAGGTATGCCCAAGGAAAG



表2. EAOH患者の臨床学的特徴および検査結果

Patient	Age (yo) /sex	<i>APTX</i> mutation	Amino acid	Onset of wheelchair use	Conjunctival telangiectasia	WBC (/ $\mu$ L)	Lymph (/ $\mu$ L)	IgG (mg/dL)	IgA (mg/dL)	IgM (mg/dL)	AFP (ng/mL)	Alb (g/dL)
1	6/F	c.689_690insT (homo)	p.Glu232fs	not yet	none	7700	3280	866	88	79	7.5	4.2
2	18/M	c.689_690insT (homo)	p.Glu232fs	11	none	4900	2000	970	156	178	n.d.	4
3	24/F	c.689_690insT (hetero) c.617C>T (hetero)	p.Glu232fs p.Pro206Leu	18	none	5500	1700	780	104	184	n.d.	4.1
4	31/M	c.689_690insT (homo)	p.Glu232fs	12	none	6400	2393	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.3
5	37/M	c.689_690insT (homo)	p.Glu232fs	15	none	7900	2654	1010	299	196	n.d.	2.4
6	43/F	c.689_690insT (homo)	p.Glu232fs	n.d.	none	6560	1719	n.d.	n.d.	n.d.	3.0	2.1
7	52/M	c.689_690insT (hetero) c.617C>T (hetero)	p.Glu232fs p.Pro206Leu	25	+	5600	1248	644	78	32	23.2	1.8
8	54/F	c.788T>G (homo)	p.Val263Gly	44	none	4600	993	n.d.	n.d.	n.d.	7.1	2.7
9	59/F	c.689_690insT (hetero) c.617C>T (hetero)	p.Glu232fs p.Pro206Leu	n.d.	none	5400	2279	1202	275	115	13.1	1.2
Normal range	6 >18					4100–16300 4500–11000	1500–7000 1000–4800	640–1510 795–1745	42–248 77–405	82–329 83–333	<10	3.6–4.7 3.8–5.9

yo: years old, n.d.: not determined AFP:  $\alpha$ -fetoprotein Alb: albumin

表 3. リンパ球表面抗原解析, T-cell recombination excision circles (TRECs) and kappa-deleting element recombination circles (KRECs).

Patient	Age (yo)	CD3 (%)	CD3 (/μL)	CD4 (%)	CD4 (/μL)	CD45RA <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> (%)	CD45RO <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 (%)	CD8 (/μL)	CD4/8	CD19 (%)	CD19 (/μL)	CD27 /CD19 <sup>+</sup> (%)	TRECs (copies/μg DNA)	KRECs (copies/μg DNA)
1	6	72.1	2394	38.49	921	53.85	27.8	52.3	1252	0.73	22.7	745	14.4	1.81×10 <sup>4</sup>	8.18×10 <sup>4</sup>
2	18	78.3	1599	51.5	823	41.19	46.56	34.4	550	1.49	11.2	224	34.7	1.28×10 <sup>4</sup>	1.19×10 <sup>4</sup>
3	24	76.5	1071	24	257	27.93	56.69	67	717	0.35	15	255	32.54	7.52×10 <sup>3</sup>	1.3×10 <sup>3</sup>
4	31	72.9	1541	58.5	901	32.84	46.35	32.75	504	1.79	11.7	280	31.68	1.64×10 <sup>2</sup>	1.45×10 <sup>4</sup>
5	37	74.5	1977	66	1751	12.32	71.9	28.3	751	2.33	8.1	215	40.5	2.7×10 <sup>1</sup>	1.11×10 <sup>3</sup>
6	43	81.1	1204	48	578	9.03	78.14	31.1	374	1.55	9	155	78.73	0	1.1×10 <sup>3</sup>
7	52	84	1048	48.5	508	60.01	16.8	45.7	479	1.06	0.82	10	45.7	0	0
8	54	55.4	611	83.3	509	43	45.62	12.4	76	6.7	11.7	116	13.07	3.36×10 <sup>3</sup>	1.13×10 <sup>4</sup>
9	59	84.3	1921	54.9	1251	25.69	64.8	33.2	756	1.65	8.1	185	43.8	9.44×10 <sup>1</sup>	1.86×10 <sup>3</sup>
Normal range	6	56-75	1400-3700	28-47	700-2200			16-30	490-1300		14-33	390-1400		3.5±2.8×10 <sup>3</sup>	6.4±1.4×10 <sup>3</sup>
	>18	56-84	1000-2200	31-52	530-1300			18-35	330-920	>1.0	6-23	110-570		3.4±3.6×10 <sup>2</sup>	1.9±0.3×10 <sup>3</sup>

yo: years old

表 4. TCRV $\beta$  レパトア解析 (P1, P3, P5, P7, P9)

V $\beta$	CD4					CD8						
	Normal range (mean)	P1	P3	P5	P7	P9	Normal range (mean)	P1	P3	P5	P7	P9
<b>Total</b>	<b>72.25</b>	<b>67.56</b>	<b>80.71</b>	<b>67.77</b>	<b>71.5</b>	<b>76.8</b>	<b>66.58</b>	<b>28.72</b>	<b>24.24</b>	<b>34.7</b>	<b>52.25</b>	<b>28.03</b>
1	1.62–14.2 (3.32)	6.74	5.81	2.63	4.5	5.75	1.4–8.21 (4.24)	0.03	0.02	0.34	0.92	0.16
2	5.43–12.84 (9.36)	7.87	8.86	2.19	8.93	7.87	1.65–12.42 (5.43)	0.47	0.55	0.83	7.14	1.25
3	0.66–10.04 (4.37)	2.01	6.74	3.13	5.76	2.67	0.32–13.8 (4.44)	0.61	0.01	0.4	0.09	0
4	1.20–2.83 (2.03)	8.28	7.78	3.07	4.48	9.19	0.61–4.34 (1.90)	1.67	2.6	1.25	2.99	0.89
5.1	4.67–10.94 (6.71)	2.09	1.2	2.56	2	3.2	1.12–8.92 (3.22)	0.69	0.08	2.67	0.55	0.22
5.2	0.5–2.87 (1.33)	0.42	0.46	0.45	1.81	0.64	0.18–3.53 (1.12)	2.8	1.47	2.7	0.33	2.95
5.3	0.36–2.1 (1.09)	1.83	0.64	2.14	0.91	1.72	0.32–2.64 (0.92)	0.61	0.27	2.42	0.02	3.72
7.1	0.59–3.8 (1.93)	3.49	8.13	2.28	11.32	7.79	0.87–7.14 (3.39)	5	1.28	2.74	0.84	3.05
7.2	0.00–3.10 (1.12)	1.17	0.1	4.77	1.52	2.03	0.01–12.10 (2.44)	0.05	0.02	0.69	16.42	0
8	2.94–6.73 (4.81)	1.78	1.24	2.17	2.27	1.19	0.86–11.43 (4.06)	0.32	0.02	0.23	0.09	0
9	0.78–8.24 (4.07)	1.66	0.32	2.81	0.66	0.87	1.16–7.67 (3.47)	0.43	0.08	0.79	0.02	0.13
11	0.3–1.9 (0.87)	0.37	3.65	0.2	0.28	3.84	0.14–2.25 (0.92)	2.25	1.73	2.91	4.59	2.89
12	1.08–2.8 (1.82)	1.65	0.8	5.18	0.86	1.53	0.33–3.33 (1.29)	0.07	0	0.81	3.32	0.03
13.1	1.93–7.7 (4.03)	4.22	3.47	4.8	2.27	3.43	0.41–5.35 (3.42)	0.75	9.16	0.53	2.89	2.87
13.2	0.72–7.27 (2.81)	0.35	1.23	0.34	2.99	0.28	0.96–9.62 (3.34)	1.44	1.36	2.42	0.39	1.12
13.6	0.86–3.4 (1.86)	2.07	2.26	2.4	2.12	3.58	0.47–4.56 (1.60)	2.6	0.84	2.89	0.56	1.12
14	1.57–4.68 (2.59)	0.87	0.14	4.8	0.17	0.47	1.5–14.3 (5.74)	0	0	0.62	3.44	0
16	0.34–1.8 (0.95)	2.45	11.7	0.87	5.31	4.99	0.02–2.76 (0.57)	1.06	0.04	1.2	1.18	0.13
17	3.12–8.32 (5.46)	2.31	3.32	2.54	2.73	2.75	1.83–11.18 (5.06)	5.27	1.28	3.43	0.71	4.22
18	0.72–3.35 (1.92)	3.79	3.32	4.13	1.92	3.52	0.02–2.76 (0.57)	0.74	1.87	1.86	0.63	1.35
20	0.04–5.3 (2.6)	2.03	2.6	4.53	3.03	3.09	0.08–5.61 (2.31)	0.43	0.01	0.28	0.11	0

21.3	1.53–4.7 (2.46)	1.84	0.27	3.5	0.63	0.92	0.54–4.93 (2.39)	0.03	0.03	0.34	3.61	0
22	1.98–8.48 (4.26)	7.86	6.5	3.16	4.71	4.94	0.54–6.47 (3.17)	0.07	0.42	1.23	0.96	0.62
23	0.13–1.9 (0.48)	0.41	0.17	0.31	0.32	0.54	0.04–5.13 (1.34)	1.33	1.1	2.32	0.45	1.31

表5. EAOH患者における免疫学的異常のまとめ

Patient	免疫学的異常
1	CD4/8 比の逆転、TCR レパトアの偏倚
2	異常なし
3	低 $\gamma$ グロブリン血症, CD4 <sup>+</sup> T 細胞減少, CD4/8 比の逆転 TCR レパトアの偏倚
4	TRECs 低値
5	RTE の減少, memory T 細胞への偏倚, TRECs 陰性 TCR レパトアの偏倚
6	RTE の減少, memory T 細胞への偏倚, TRECs 陰性
7	低 $\gamma$ グロブリン血症, B 細胞異常低値 CD4 <sup>+</sup> T 細胞減少, TRECs 陰性, KRECs 陰性 TCR レパトアの偏倚
8	リンパ球減少, CD4 <sup>+</sup> T 細胞減少, CD8 <sup>+</sup> T 細胞減少
9	RTE の減少, TRECs 陰性, TCR レパトアの偏倚

図1. TCRV $\beta$  CDR3 スペクトラタイピング ヒストグラム (P1, P3, P7, P9)

EAOH 患者の CD8<sup>+</sup>T 細胞ではコントロールと比較し、ピークの偏倚や減少など異なったヒストグラムを呈した

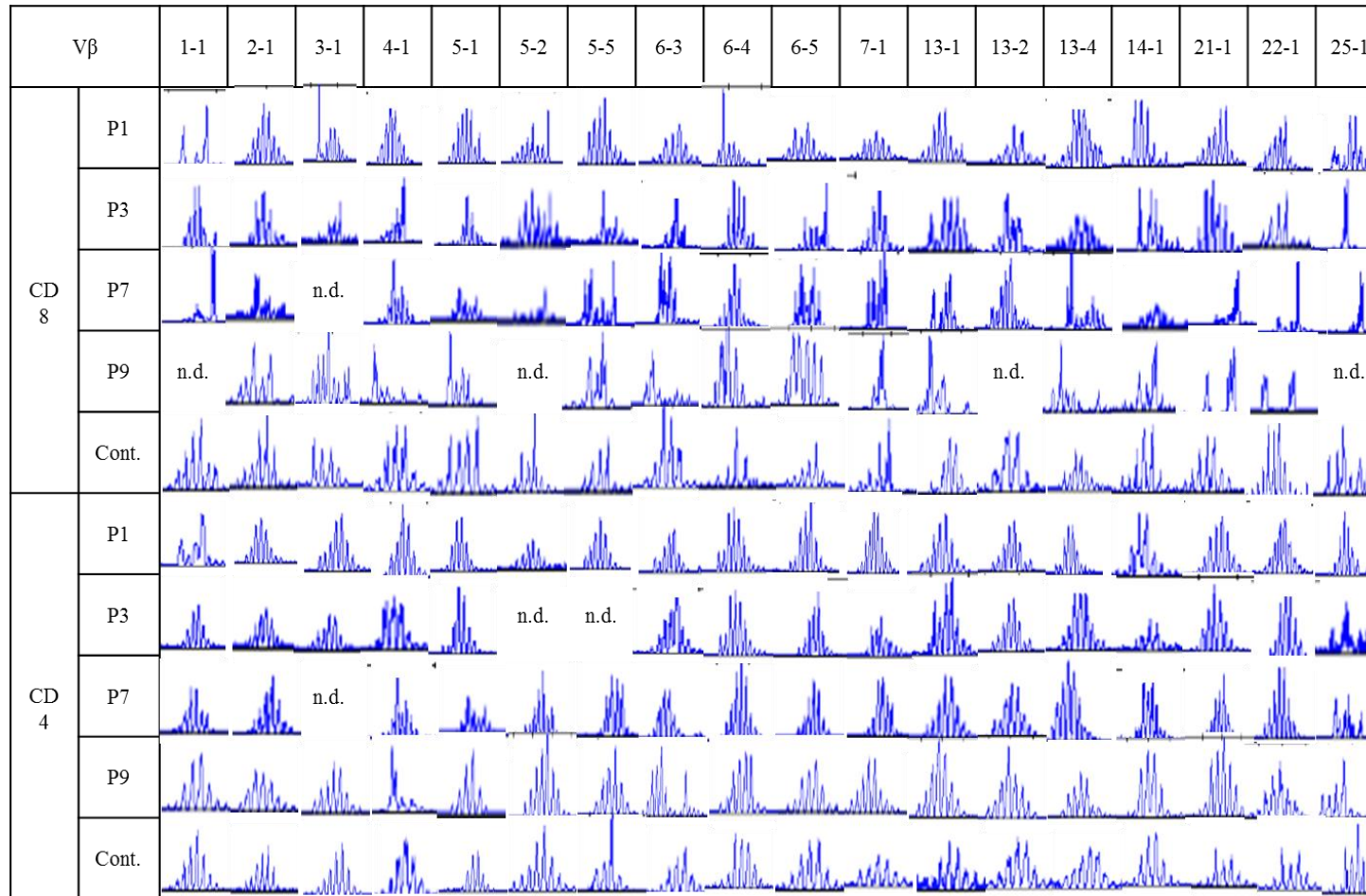


図2. 放射線感受性試験 (P2, P8)

EAOH 患者由来 EBLCL で colony survival assay を行った

EAOH 患者では、1Gy 照射時の survival fraction が intermediate range に含まれた。

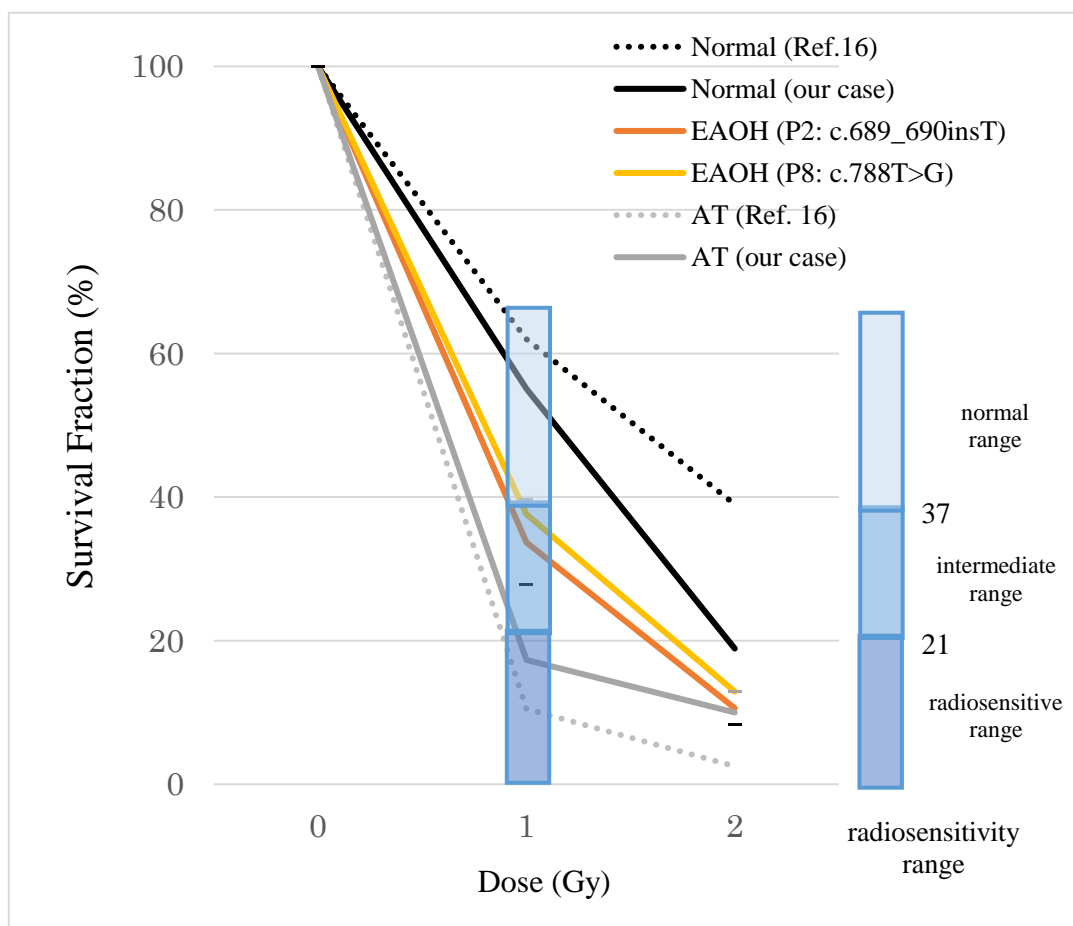


図3. TRECs, KRECsについて

図 3-1. TRECs は、T 細胞の分化の過程で、T 細胞受容体  $\alpha$  鎖の V(D)J 遺伝子再構成の際に生じる環状 DNA である

図 3-2. KRECs は、B 細胞の分化の過程で、免疫グロブリン軽鎖である  $\lambda$  鎖の再構成または  $\kappa$  鎖の対立遺伝子排除によって、 $\kappa$  鎖定常領域が染色体 DNA から切り取られる環状 DNA である

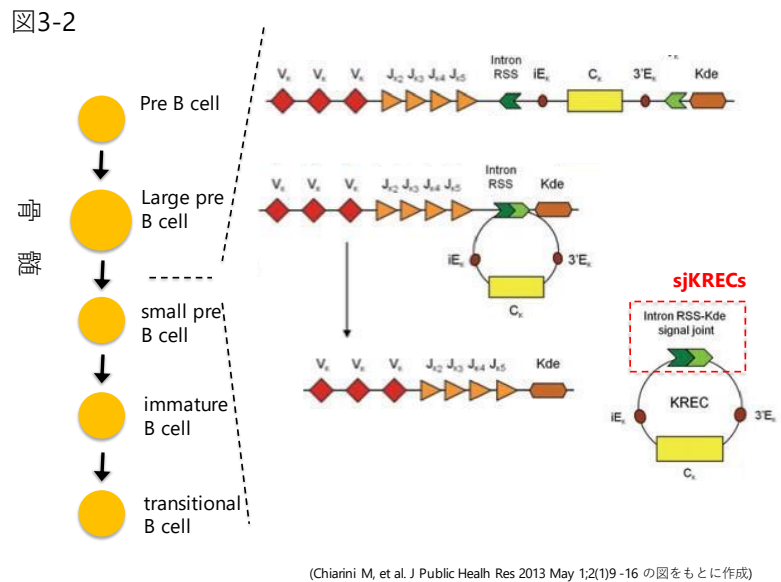
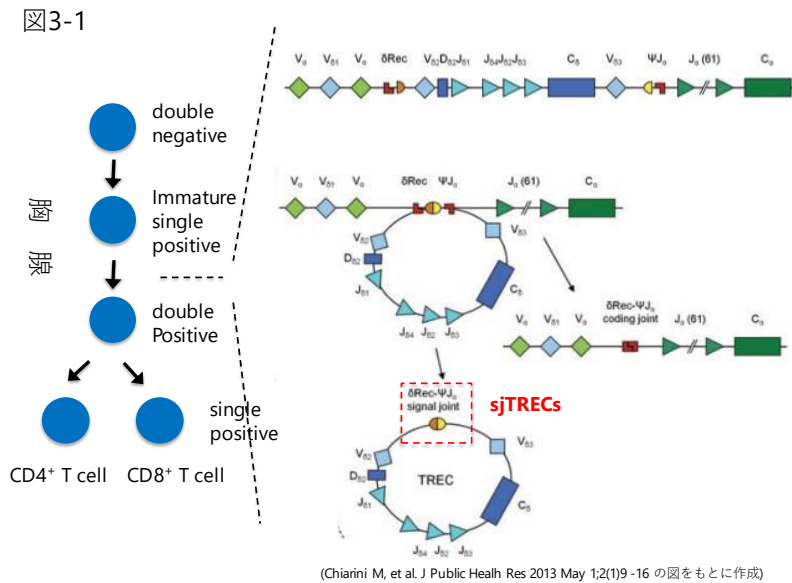




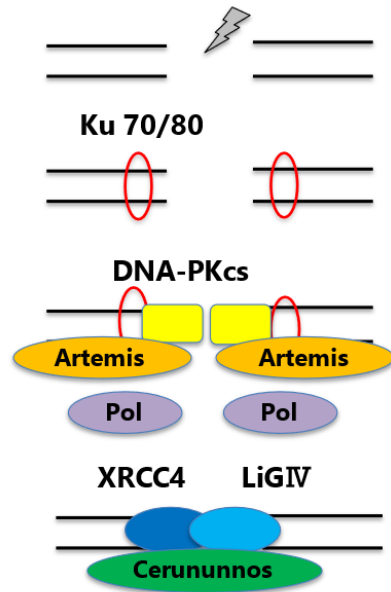
図4. C-NHEJの過程

C-NHEJ は、1) Ku70/80 が切断部位に結合、2) DNA-PKcs や Artemisヌクレアーゼなどによる末端加工、3) DNAポリメラーゼ $\mu$ ,  $\lambda$ によるDNAの合成、4) DNA Ligase IV/XRCC4による再連結というステップをとる

(DNA-PKcs: DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, Pol: DNA polymerase, XRCC4: X-ray repair cross complementing group 4 protein)

DNA DSBRの主要経路であるC-NHEJ

- 1) Ku 70/80が切断部位に結合
- 2) DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) や Artemisヌクレアーゼなどによる末端加工
- 3) DNA Pol  $\mu$ , DNA Pol  $\lambda$  によるDNA合成
- 4) DNA Ligase IV/XRCC4による再連結



(De Falco M et al, Int J Mol Sci, 2021 Dec 10;22(24):13926の図をもとに作成)

図5. DNA SSBRの過程

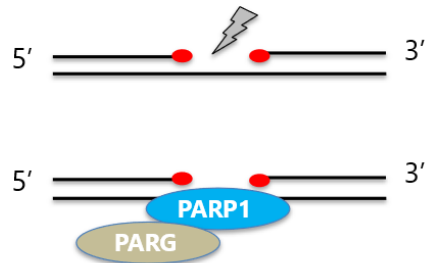
DNA SSBR は、1) 切断損傷認識と XRCC1 による修復のための足場形成、2) 切断部の 3'末端を水酸基、5'末端をリン酸基に変換するエンドプロセッシング、3) DNA ポリメラーゼ $\beta$ による DNA 合成、4) DNA Ligase I/IIIによる切断部の連結というステップをとる

(PARP1: poly ADP-ribose polymerase, PARG: poly ADP-ribose glycohydrolase, Pol $\beta$ : DNA polymerase  $\beta$ , XRCC1: X-ray repair cross complementing group 1 protein, PNKP: Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase, PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen. LIG: DNA ligase)

## DNA SSBR

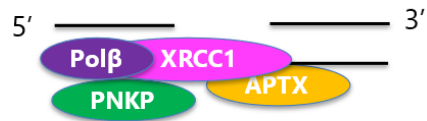
### 1) 切断損傷認識

- ・ PARP1による損傷認識
- ・ XRCC1による足場形成



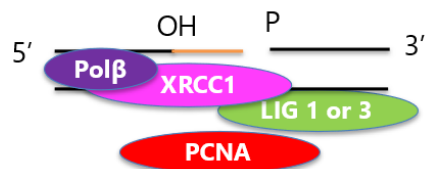
### 2) エンドプロセッシング

- ・ 3'末端をOH基に、5'末端をP基にする



### 3) DNA Pol $\beta$ によるDNA合成

### 4) DNA Ligase による切断部の連結



(Takahashi T et al, Nucleic Acids Res, 2007; 35(11): 3797-809の図をもとに作成)

図6. DNA二本鎖切断応答

DNA 二本鎖切断応答では、1) MRN 複合体が DNA 切断を検知、2) ATM の動員、活性化、3) ATM により、H2AX, MDC1 をリン酸化、4) 53BP1, BRCA1 の動員、が起こり、これにより、修復過程へつながる

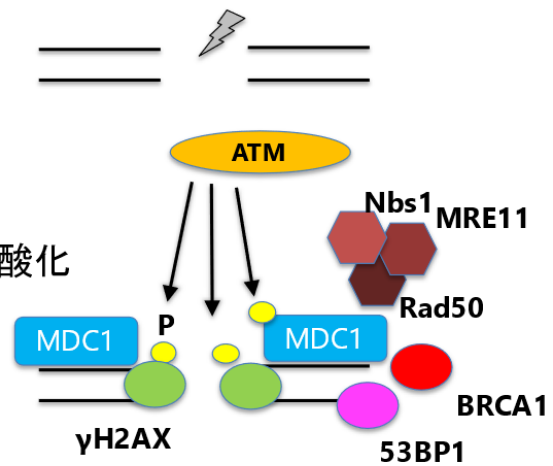
MDC1: mediator of DNA damage checkpoint peotein 1,  $\gamma$  H2AX: :H2AX phosphorylated  
BRCA1: breast cancer susceptibility gene 1, 53BP1: p53 binding protein 1

### DNA二本鎖切断応答

- 1) MRN複合体がDNA切断を検知
- 2) ATMの動員、活性化
- 3) ATMにより、H2AX、MDC1をリン酸化
- 4) 53BP1, BRCA1の動員

その後、修復過程へ

- ┌ C-NHEJ (classical non homologous end joining)
- ├ Alt-EJ (alternative end joining)
- └ HR (homologous recombination)

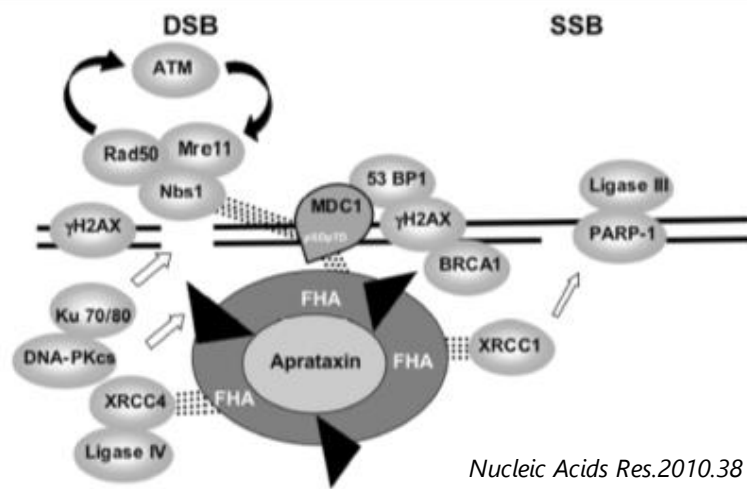


(McKinnon PJ, EMBO Rep, 2004 Aug;5(8):772-6の図をもとに作成)

図7. APTXとDNA DSB

APTX の FHA ドメインは、MDC1、XRCC1、XRCC4 と相互作用する。そのうち、MDC1、XRCC4 は、C-NHEJ において重要な役割を果たしていることから、APTX が C-NHEJ に関わっている可能性がある

## APTXとDNA DSBの関連性



APTXは、MDC1、XRCC1、XRCC4と相互作用

MDC1、XRCC4は、C-NHEJで重要な役割を担う

⇒ APTXが、C-NHEJに関わっている可能性がある