

論 文 内 容 要 旨

Inherited CARD9 Deficiency in a Child with
Invasive Disease Due to *Exophiala dermatitidis*
and Two Older but Asymptomatic Siblings

(*Exophiala dermatitidis* による侵襲性感染症を
発症した CARD9 欠損症の小児例、
及び無症状の兄妹 2 例)

Journal of Clinical Immunology, 2021, in press

主指導教員：岡田 賢教授

(医系科学研究科 小児科学)

副指導教員：松浦 伸也教授

(原爆放射線医科学研究所 放射線ゲノム疾患)

副指導教員：川口 浩史准教授

(医系科学研究科 小児科学)

今中 雄介

(医歯薬保健学研究所 医歯薬学専攻)

論文内容要旨

CARD9 欠損症は、*CARD9* 遺伝子の機能喪失型変異により発症する原発性免疫不全症(PID)であり、常染色体劣性遺伝を示す。CARD9 は、真菌の構成成分を認識する受容体である Dectin-1、Dectin-2、Mincle の下流で働く分子であり、NF- κ B 活性化に重要な役割を果たす。本症患者は、真菌に対する認識機構の障害を分子背景として真菌に易感染性を示し、とりわけ中枢神経感染症に代表される侵襲性真菌感染症を好発する。主な起炎菌は、*Candida* 属、*Trichophyton* 属である。一方、*Exophiala dermatitidis* を起炎菌とする症例は少なく、現在までに 2 例が報告されているのみである。本症の浸透率はほぼ 100%と考えられているが、発症時期は小児期から成人期までと幅広い。そのため、*CARD9* 遺伝子に有害変異を保有する無症状の小児例の存在が想定される。しかし、これらの無症状例に対して真菌に対する反応性を検討した報告はない。本研究で、*Exophiala dermatitidis* による侵襲性真菌感染症を発症した本邦初の CARD9 欠損症患者を経験し、患者末梢血単球を用いて真菌成分による刺激に対するサイトカイン産生能を検証することで、*CARD9* 遺伝子変異の病的意義の評価が可能であることを示した。また、*CARD9* 遺伝子に変異を有する無症状の兄弟でも、同様の検証法により *CARD9* 遺伝子変異の病的意義の評価が可能であることを示した。

症例は生来健康な日本人女兒で、近親婚は認めていない。4 歳時に構音障害、右上下肢脱力を契機に頭蓋内多発腫瘍、全身リンパ節腫脹が同定され、リンパ節生検、培養にて *Exophiala dermatitidis* が検出された。経過より PID を疑い遺伝子パネル解析を実施し、*CARD9* 遺伝子に新規変異(c.586A>G(p.K196E))、及び既知変異(c.1118G>C(p.R373P))を同定した。家系解析で、p.R373P が父親由来、p.K196E が母親由来であることが示され、これらの変異は複合ヘテロ変異であることが確認された。さらに、長男、長女も同遺伝子の複合ヘテロ接合変異を保有することが判明した。父、母、長男、長女に真菌感染症の既往は認めなかった。

新規変異である p.K196E は、健常人データベース(gnomAD)におけるアリル頻度が低く(MAF 0.000044)、タンパク質構造異常のバインインフォマティクス解析(CADD)でも病的変異と判定されたことから、有害変異である可能性が高いと考えられた。本研究で、新規変異である p.K196E の病的意義を検証するために機能解析を実施した。初めに、健常人末梢血を対象として qPCR 法による発現解析を行い、*CARD9* mRNA が好中球、単球で高発現することを確認した。そこで、CD14 陽性単球を用いて *CARD9* の mRNA、タンパク発現(ウエスタンブロット法)を比較検討したところ、患者は健常人と同程度の発現量を示した。HEK293T 細胞を用いた強制発現実験でも、p.K196E 変異は野生型と同程度のタンパク発現を示した。一連の結果から、p.K196E は mRNA、タンパクレベルは正常発現することが確認された。次に、p.K196E 変異が *CARD9* タンパクの機能に及ぼす影響を検討するため、HEK293T 細胞を用いて NF- κ B 転写活性を指標としたレポーターアッセイを実施した。しかし本評価系は、p.K196E 変異のみならず、既知変異の p.R373P においても機能障害を示すことができなかった。

次に末梢血から分離した CD14 陽性単球を用いて、cytometric bead array 法で各種刺激に対するサイトカイン産生能を解析した。患者 CD14 陽性単球は、*Exophiala dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* の菌体成分による刺激で、TNF- α 、IL-6 の著明な産生低下を示した。一方、LPS 刺激に対する TNF- α 、IL-6 産生能は健常人と同程度であった。これらの結果は、既知の CARD9 欠損症患者で認める所見と一致していた。そのため、患者で同定された複合ヘテロ接合変異は有害変異と判断し、CARD9 欠損症と診断した。また、無症状である兄弟の CD14 陽性単球も同様の所見を示し、真菌感染症を発症する潜在的なリスクを持つことが示された。

CARD9 欠損症は、現在までに 17 カ国から 55 家系 78 症例の報告があるが、本邦からの報告はない。本研究により、本邦初の CARD9 欠損症の同定に至り、かつ新規変異(p.K196E)の病的意義の検証に成功した。さらに、末梢血単球を用いて真菌成分による刺激に対するサイトカイン産生能を検証することで、症状の有無に関わらず、CARD9 遺伝子の病的意義の評価が可能であることを示すことができた。