

厚生省特定疾患

血液系疾患調査研究班
原発性免疫不全症候群分科会

平成11年度研究業績報告書

平成12年3月

分科会長 小宮山 淳

厚生省特定疾患

血液系疾患調査研究班
原発性免疫不全症候群分科会

平成11年度研究業績報告書

平成12年3月

分科会長 小宮山 淳

厚生省特定疾患

原発性免疫不全症候群調査研究班

目 次

| | |
|--|----|
| I. 班員名簿 | 1 |
| II. 年次総括報告 | 3 |
| 班 長 小宮山 淳 (信州大学小児科) | |
| III. 分担研究報告 | |
| 1 原発性免疫不全症候群症例登録調査 | 5 |
| 岩田 力 (東京大学分院小児科) | |
| 2 レトロウイルスを用いた変異・欠損遺伝子の発現クローニングシステムの確立 | 8 |
| 横須賀 忠, 山崎 晶, 竹内 新, 荒瀬 尚, 齊藤 隆 (千葉大学大学院医学研究科、遺伝子制御学) | |
| 3 サルモネラ感染症患者におけるIFN- γ 産生機構の解析 | 12 |
| 高田英俊, 野村明彦, 金成 豪, 服部浩佳, 井原健二, 原 寿郎 (九州大学小児科) 水野由美 (九州大学小児科) (福岡市立こども病院・感染症センター) 青木知信, 江口克彦 (福岡市立こども病院・感染症センター) | |
| 4 ヒト臍帯血リンパ球のIL-18刺激によるサイトカイン産生能についての検討 | 18 |
| 野村明彦, 高田英俊, 大賀正一, 原 寿郎 (九州大学小児科) | |
| 5 メモリーB細胞の解析: 原発性免疫不全症候群の病態解明への応用 | 22 |
| 上松一永, 篠崎康治, 小宮山 淳 (信州大学小児科) | |
| 6 X連鎖無ガンマグロブリン血症における好中球減少 | 27 |
| 金兼弘和, 野村恵子, 宮脇利男 (富山医科薬科大学小児科) | |
| 7 X連鎖無ガンマグロブリン血症におけるB細胞分化障害 | 30 |
| 野村恵子, 金兼弘和, 宮脇利男 (富山医科薬科大学小児科) 烏山 一 (東京都臨床医学総合研究所) | |
| 8 B細胞抗原レセプター刺激後Btk依存的に早期に転写が促進される遺伝子群の解析 | 34 |
| 馬場義裕, 塚田 聡 (大阪大学医学部分子病態内科) | |
| 9 軽症型RAG1欠損症患者の病態解析 | 37 |
| 久間木 悟, 笹原洋二, 林 露子, 大橋芳之, 峯岸正好, 土屋 滋 (東北大学加齢医学研究所・発達病態) | |

| | | |
|-----|--|----|
| 10 | Omenn 症候群および類似疾患における RAG 遺伝子異常の検索 ならびに TCR V β repertoire とサイトカイン産生異常の解析…………… | 41 |
| | 谷内江昭宏 (金沢大学医学部保健学科) 笠原善仁, 東馬智子, 武井健吉, 和田泰三, 小泉晶一 (金沢大学小児科) | |
| 11 | B-SCIDにみられたMaternal T 細胞のクロナリティーの解析…………… | 46 |
| | 小林法元, 上松一永, 伯耆原 祥, 南雲治夫, 小宮山 淳 (信州大学小児科) 谷内江 明宏 (金沢大学保健学科) | |
| 12 | 免疫グロブリンクラススイッチ誘導シグナルにおけるKu の役割…………… | 50 |
| | 森尾友宏, 今井雅子, 今井耕輔, 伊東祐之, 長沢正之, 野々山恵章, 大川洋二, 矢田純一 (東京医科歯科大学小児科) | |
| 13 | ZAP-70欠損T細胞におけるCD2を介したシグナル伝達の解析…………… | 57 |
| | 上野英授, 片村憲司 (京都大学発達小児科) 小安重夫 (慶応大学微生物) 眞弓光文 (福井医科大学小児科) | |
| 14 | CD8欠損症における温度感受性変異ZAP70タンパク質の分解機構の解析…………… | 62 |
| | 松田達志, 鈴木一 藤本智子, 箕輪明子, 小安重夫 (慶應義塾大学微生物) 上野英樹, 片村憲司 (京都大学小児科) | |
| 15 | Bloom 症候群の迅速診断法の確立とBLMの機能…………… | 68 |
| | 近藤直実, 金子英雄, 深尾敏幸, 森本 航, 寺田知親, 笠原貴美子 (岐阜大学小児科) | |
| 16 | 好中球二次顆粒欠損症における myeloid transcription factor, C/EBP ϵ 遺伝子の変異同定…………… | 73 |
| | 塩原正明, 伯耆原 祥, 上松一永, 小宮山 淳 (信州大学小児科) H. Phillip Koeffler (Cedars-Sinai medical center/UCLA) | |
| 17 | EBウイルスDNA量とEBウイルス特異的免疫能の消長をモニタリングし得た Wiskott-Aldrich症候群骨髓移植例…………… | 76 |
| | 柘植郁哉, 木村 宏 (名古屋大学小児科) 葛島清隆 (愛知県ガンセンターウイルス部) 小島勢二 (名古屋大学成長発達医学) 森島恒夫 (名古屋大学保健学科) | |
| 18 | ADA欠損症におけるPEG-ADA療法…………… | 81 |
| | 川村信明, 小野 暁, 小林邦彦 (北海道大学小児科) 崎山幸雄 (北海道大学遺伝子治療) | |
| 19 | IFN- γ が有効であったgp91- <i>phox</i> 欠損型慢性肉芽腫症…………… | 84 |
| | 布井博幸 (熊本大学小児科) | |
| IV. | 発表文献リスト…………… | 89 |

I. 班 員 名 簿

原発性免疫不全症候群調査研究班
班 員 名 簿

| 区 分 | 氏 名 | 所 属 | 職 名 |
|--|----------------|--|-----|
| 分 科 会 長 | 小宮山 淳 | 信州大学医学部小児科 | 教授 |
| 分 科 会 員 (監 事) | 岩 田 力 | 東京大学医学部分院小児科 | 助教授 |
| | 小 林 邦 彦 | 北海道大学医学部小児科 | 教授 |
| | 小 安 重 夫 | 慶應義塾大学医学部微生物学 | 教授 |
| | 近 藤 直 実 | 岐阜大学医学部小児科 | 教授 |
| | 斉 藤 隆 | 千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学 | 教授 |
| | 塚 田 聡 | 大阪大学医学部第三内科 | 助手 |
| | 柘 植 郁 哉 | 名古屋大学医学部小児科 | 講師 |
| | 土 屋 滋 | 東北大学加齢医学研究所発達病態 | 教授 |
| | 布 井 博 幸 | 熊本大学医学部小児科 | 助教授 |
| | 原 寿 郎 | 九州大学医学部小児科 | 教授 |
| | 眞 弓 光 文 | 福井医科大学小児科 | 教授 |
| 宮 脇 利 男 | 富山医科薬科大学医学部小児科 | 教授 | |
| 矢 田 純 一 | 東京医科歯科大学医学部小児科 | 教授 | |
| (事 務 局) 経理事務連絡担当責任者 | 上 松 一 永 | 信州大学医学部小児科 〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1 電話 (0263) 35-4600 (内線 5269) ダイヤルイン (0263) 37-2642 FAX (0263) 37-3089 | 講師 |

Ⅱ. 年次総括報告

年次総括報告

原発性免疫不全症候群調査研究班

班長 小宮山 淳

(信州大学医学部小児科)

I 研究の目的

本研究班は、昭和49年の発足から一貫して原発性免疫不全症候群の疫学調査、責任遺伝子および病態の解明、新しい遺伝子診断法や治療法の開発、QOLの改善などに大きく貢献してきた。責任遺伝子の解明によって、病因が明らかになるとともに、遺伝子診断法や治療法の開発に途を開くことができる。さらに、正確な診断法の開発は、本研究班が従来から行ってきた疫学調査の信憑性も一段と高めるものと思われる。しかしながら、原発性免疫不全症候群には30種類を超える疾患があり、責任遺伝子が解明されたのはそのごく一部にすぎない。多くの疾患は適切な治療なくしては致死的であり、一層の治療法改良が待たれている。疾患の種類が多くかつ臨床像が多彩であるため、正確な診断や適切な治療には専門的な知識と技術を要する。知識の普及、意見交換などを目的とした、インターネット上のホームページ開設は、診療レベル向上に大いに役立つものと思われる。このような背景のもとに、原発性免疫不全症候群の疫学調査、責任遺伝子および病態の解明、新しい診断法の開発、治療法の改良などを重点目標とした。さらに、ホームページを活用して、広く相談に応じるとともに、知識の普及、正確な診断や適切な治療の手助けをし、免疫不全症候群の診療レベルの一層の向上を図っていくことを計画した。

II 研究成果

1. 疫学調査

全国的調査によって、30例の新規登録が得られた。また、本研究班が中心になって開発したBtk遺伝子診断法を一部の既報告例に適用することによって、従来は分類不能型とされていた症例の中

にX連鎖無 γ グロブリン血症の症例が存在することを確認した。この成績をもとに、既登録データを修正した。さらに、従来の登録表を用いた電子化のためのソフトを作成し、既登録例の電子化を図った。新たに開設したホームページを活用し、登録への協力を呼びかけた。

2. 責任遺伝子、発症機構の解明

1) X連鎖無 γ グロブリン血症

pro-B細胞を越えてpre-B細胞の初期から後期への段階で分化障害が存在することを見いだした。Btkの機能解析の一環として、B細胞抗原レセプター刺激後Btk依存的に早期に転写が促進される遺伝子群を同定した。

2) 分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency)

一部はBtk異常によることが確認できた。男子で、B細胞数が著減している症例では、Btk検査が必須であることが示された。

3) 複合免疫不全症および類縁疾患

RGA1欠損症例について詳細に解析し、その病態を明らかにした。RAG1/RAG2遺伝子異常のあるOmenn症候群および類縁疾患症例において、サイトカイン産生パターンがTh2優位であることを示し、その発症機構の一端を解明した。

CD8欠損症の症例において、責任遺伝子であるチロシンキナーゼZAP-70が温度感受性変異を有することを見いだした。さらに、ZAP-70がCD2刺激伝達経路において、主にカルシウム濃度上昇に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

T細胞系の免疫不全症の責任遺伝子を同定するための基礎的研究として、レトロウイルスを用いた遺伝子発現クローニングシステムを開発した。

3) 高IgM症候群

CD40リガンドの遺伝子異常は、伴性高IgM症候群を引き起こすことが知られている。またCD40シグナルが異常である免疫不全症の報告もみられる。CD40シグナル伝達において、Kuが重要な役割を担っていることを示した。

4) IgG2欠乏症

本疾患の責任遺伝子を世界で初めて明らかにしたが、今回はその遺伝子変異が病態を発現する機構の一端を解明した。

5) Bloom症候群

責任遺伝子BLMの機能、病態発現機構の解明が進んだ。

6) 好中球二次顆粒欠損症

現在、世界でただ一人の生存例として認知されている症例において、責任遺伝子myeloid transcription factor, C/EBP ϵ 変異を同定した。

3. 遺伝子診断法の開発

Bloom症候群において、その責任遺伝子BLM由

来蛋白が刺激リンパ球表面に表出されることから、それが診断に応用できることを示し、その開発を進めた。

4. 治療的研究

Wiskott-Aldrich症候群の骨髄移植に伴うEBウイルス感染症の症例を慎重に診療し、その発症機構についての貴重な知見が得られた。

gp91-phox欠損型の慢性肉芽腫症の症例において、IFN- γ 療法がmRNAレベルで活性酸素産生能を高めることを見いだした。

5. インターネット上にホームページ開設

本研究班の活動の一つとして、ホームページ(<http://www2.lifepassport.or.jp/immunity/>)を開設した。ここには、疾患の解説とともに、患者およびその家族、医療関係者からの相談コーナーを設置しており、診断や治療の向上、QOLの改善に役立つことを期待したい。

Ⅲ. 分 担 研 究 報 告

原発性免疫不全症候群症例登録調査

岩 田 力 (東京大学分院小児科)

わが国における原発性免疫不全症候群の新規症例につき、従来の方法に従い学会発表、症例報告をもとに発表者に対し症例の登録依頼を行なった。本年度の新規登録症例は合計30例で、その内訳はSCID：男児5例、女児2例、合計7例；XLA：15例；IgM増加を伴う免疫不全症：男児1例；IgGサブクラス欠損症：男児1例；CVID：男児1例；AT：男児1例；CGD：男児2例、女児1例；ALPS：男児1例である。XLAに関しては宮脇らの解析対照症例66例と、本研究班登録例とを対比すると、36名が未登録で、21名が既登録例であった。また従来CVIDとされていたもののうち、B細胞欠損例では9例が改めてBtk欠損であることが判明した。このような情報もふまえて、登録一覧表を作成した。班員における特定の疾患に関する研究に対して、既登録症例の情報を、班長の許可のもとに提供した。従来の登録票を用いた電子化のためのソフトを作成した。今後既登録例の電子化を図る。

【はじめに】

平成11年度も、従来の方法にしたがって、登録事業をすすめたが、いくつかの疾患によっては遺伝子解析が班員の研究により進展し、独自の集計もなされるようになってきた。本分担研究ではそのような研究とも連絡を密にし、登録症例の整理も行なった。

【対象と方法】

- ①日本国内で発表される症例報告に関し、新規と思われる症例に対しては従来どおり主治医宛に登録票を送付して、本研究班への登録を依頼した。
- ②平成10年度には、食細胞機能異常症研究会との共同で、慢性肉芽腫症 (CGD) 症例の登録例と、同研究会で解析をした症例との比較を行なったが、その正確度につき改めて検討した。
- ③伴性無ガンマグロブリン血症 (XLA) は、その責任遺伝子Btkの異常であることが既に明らかとなっているが、宮脇らがこれまでに解析した66例の中で、既登録例が何例あるか調査を行なった。また、分類不能型免疫不全症 (CVID) と診断されている症例の中で、男子でかつB細胞数の極端に少ない症例を選択し、Btkの異常を調べることにより、

既登録例の診断の再検討を行なった。

- ④研究班員及びそれ以外の研究者から、いくつかの疾患について、登録済み症例の紹介を依頼され、班長の許可のもとにそれらの登録症例につき主治医を紹介した。
- ⑤懸案である、登録の電子化を目指し、本年は現行の登録C票をそのまま用いた形で、コンピューターソフトを利用できるかどうかの検討を行った。

【結果】

- ①従来より、年間約30件の登録依頼を行っているが、返事を得る率がおよそ50%である。今年度は登録依頼をした一施設から3例の登録があったり、改めた依頼をしていないにも関わらず、3例の新規登録があったりした。また後述のごとく、XLAにおけるBtkの解析結果から、未登録例に新たに登録を依頼し、前年度よりも多くの新規登録が可能であった。一方でCVID症例の検索で、新たにBtk欠損が明らかとなった症例もあり、結局前年度に比較して、差し引き21症例の増加であった。2000年1月1日現在の登録一覧表を作成した。変化分は以下の通りである。重症複合免疫不全症 (SCID)：男児5例、女児2例、合計7例；XLA：

15例（未登録例は36例）；IgM増加を伴う免疫不全症：男児1例；IgGサブクラス欠損症：男児1例；CVID：男児1例（既登録例から9例減）；Ataxia telangiectasia (AT)：男児1例；CGD：男児2例，女児1例（未登録例62例）；Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS)：男児1例。

②昨年度（平成10年度）にはCGDの食細胞機能異常症研究会の集計データをもとに67例が未登録であったと報告したが，その後の検討により，姓名の変更，誤記などから，本研究班に未登録であったものは62名（55名男，7名女）であった。

③Bruton's tyrosine kinase (Btk) の検索により多くのXLAが発見されているが，宮脇らにより解析された症例66例と，本研究班登録例とを対比すると，36名が未登録で，21名が既登録例であった。すなわち，登録一覧表上，XLAは122例であるが，本邦では括弧内に示すようにさらに36例が少なくとも存在している。また，CVIDとして登録されている症例のうち，B細胞の極端に低値であるものについて同様にBtkに関する検討がなされたが，このうち男性9例において，Btk deficiencyであることが判明した。従って，登録票上の診断名を訂正し，CVIDは9例の減少，新規登録1例増，差し引き8例減少となっている。

④班員並びに班外からの研究協力依頼に関しては，まず，九州大学小児科原寿郎教授の依頼により，Hyper IgE syndromeの登録例13例の患者名並びに登録医の情報を送付した。山梨医大微生物学教室伊藤正彦教授の依頼によりChediak-Higashi syndromeの登録例9例の患者名並びに登録医の情報を送付した。これらの症例に関しては，登録医もしくは主治医へ，当該研究者からの依頼により，病態解明へ向けて研究が行われる予定である。また，国

外からは，スウェーデンKarolinska InstituteのProf. Lennart Hammerströmより，IgA欠損症のHLAに関する研究の申し込みがあり，caucasianと黄色人種における差異を見るため，日本人登録症例から血液を採取することが出来ないかという依頼であった。班長御指示のもと，とりあえず，既登録症例に関し，主治医の承諾を得られれば，主治医名を知らせることとした。1992年以降の現行の登録原表を元に，15症例の登録医へ問い合わせ，うち，7例において，協力可能とのことで，その旨Prof. Hammerströmへ通知した。

⑤コンピューターソフト，ファイルメーカープロを用いて，現行の登録票（C票）のデザインそのままを入力可能なものを試作し，1992年以降の症例を入力することを始めているが，次年度においても継続する予定である。

【考案】

原発性免疫不全症候群症例を全国的な規模で集計していくことは，特に疾患の病態を理解し，新たな治療法の構築を図るうえで，各疾患の専門的な研究者に，研究対象を提供することで重要な位置付けがある。しかし一方で，原発性免疫不全症候群の病名が比較的知られるようになると，一例報告のみの発表・論文は少なくなり，新規の症例の発掘が困難な状況となってきている。また，登録済みの症例においても，追跡調査が必要な場合もあり，その都度新たなアンケートを実施することにも人的，時間的な限界がある。各都道府県における，特定疾患臨床調査個人票の参照並びに利用が可能となれば，診断精度の限界はありつつも，全国規模でのより多くの症例を把握することが可能となろう。

Nationwide registry of primary immunodeficiency diseases

Tsutomu Iwata

Department of Pediatrics, Mejirodai Campus, Faculty of Medicine, The University of Tokyo

The new cases of primary immunodeficiency diseases were surveyed and registered using the same form as in the

last year. Total of 1,168 cases have been registered so far at the time of January 1st, 2000. They were 21 more cases than the ones in the last year. The newly registered cases were as follow; 7 patients with SCID (5 males and 2 females), 15 patients with XLA, one male with hyper IgM syndrome, one male with IgG subclass deficiency, one male with CVID, one male with AT, 3 with CGD (2 males and 1 female), and one male with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). Nine cases which had been registered as CVID were revealed to have Btk deficiency. Among 66 cases with Btk deficiency including these 9 cases, 36 were unregistered patients. Whole registered cases were summarized on the table.

原発性免疫不全症候群登録症例数

厚生省特定疾患「原発性免疫不全症候群」調査研究班
2000年1月1日現在

| 疾患 | 登録総数 | | | % ¹⁾ 成人例 | % ²⁾ |
|---------------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|---------------------|-----------------|
| | 男 | 女 | 合計 | | |
| 重症複合免疫不全症 | 82 | 24 | 106 | 9.0 | 0 |
| ADA 欠損症 | 6 | 2 | 8 | 0.7 | 0 |
| PNP 欠損症 | 0 | 1 | 1 | 0.1 | 0 |
| MHC Class II 欠損症 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 細網異形成症 | 1 | 0 | 1 | 0.1 | 0 |
| CD8 欠損症 | 1 | 0 | 1 | 0.1 | 0 |
| 小計 | 90 | 27 | 117 | 9.9 | 0 |
| 伴性無γグロブリン血症 | 122(+36) | 0 | 122(+36) | 10.4 | 1 0.8 |
| 成長ホルモン欠損を伴う伴性型無γグロブリン血症 | 1 | 0 | 1 | 0.1 | 0 |
| IgM 増加を伴う免疫不全症 | 32 | 11 | 43 | 3.7 | 4 9.3 |
| 免疫グロブリン重鎖遺伝子欠損症 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| カッパ鎖欠損症 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| IgA 欠損症 | 58 | 50 | 108 | 9.2 | 15 13.9 |
| IgG サブクラス欠損症 | 18 | 5 | 23 | 2.0 | 0 |
| IgM 欠損症 | 8 | 5 | 13 | 1.1 | 5 38.5 |
| CVID | 106 | 58 | 164 | 13.9 | 21 12.8 |
| 乳児一過性低γグロブリン血症 | 28 | 15 | 43 | 3.7 | 0 |
| その他の抗体不全症 | 5 | 0 | 5 | 0.4 | 1 20.0 |
| 小計 | 378(+36) | 144 | 522(+36) | 44.3 | 44 8.4 |
| Wiskott-Aldrich 症候群 | 75 | (2) | 75(77) | 6.5 | 0 |
| Ataxia telangiectasia | 40 | 34 | 74 | 6.3 | 1 1.4 |
| DiGeorge 症候群 (DiGeorge anomaly) | 29 | 15 | 44 | 3.7 | 0 |
| その他の胸腺低形成症 | 5 | 4 | 9 | 0.8 | 0 |
| 小計 | 149 | 55 | 204 | 17.3 | 1 0.5 |
| 短肢侏儒を伴う免疫不全症 | 1 | 4 | 5 | 0.4 | 0 |
| 高 IgE 症候群 | 22 | 21 | 43 | 3.7 | 0 |
| 慢性皮膚粘膜カンジダ症 | 7 | 9 | 16 | 1.4 | 2 12.5 |
| 胸腺腫を伴う免疫不全症 | 5 | 4 | 9 | 0.8 | 9 100.0 |
| 小計 | 35 | 38 | 73 | 6.2 | 11 15.1 |
| 慢性肉芽腫症 | 148(+55) | 21(+7) | 169(+62) | 14.3 | 2 1.2 |
| Chediak-Higashi 症候群 | 9 | 9 | 18 | 1.5 | 0 |
| その他の食細胞機能異常症 | 11 | 9 | 20 | 1.7 | 0 |
| 小計 | 168(+55) | 39(+7) | 207(+62) | 17.6 | 2 1.0 |
| 補体成分の欠損症 | 13 | 16 | 29 | 2.5 | 7 24.1 |
| その他 | 9 | 7 | 16 | 1.4 | 1 6.3 |
| 合計 | 842(+91) (72.1) | 326(+7) (27.9) | 1168(+98) (100.0) | | 68 (5.8) |

註1: 成人例とは、診断確定時に20歳以上であったもの。

註2: %¹⁾は、登録全症例におけるその疾患の症例数の百分率

註3: %²⁾は、その疾患の症例のうち、成人例の百分率

合計欄の括弧内は未登録であるが、存在が判明している症例数。

レトロウイルスを用いた変異・欠損遺伝子の 発現クローニングシステムの確立

| | |
|-----|------------------------|
| 横須賀 | 忠 (千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学) |
| 山崎 | 晶 (千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学) |
| 竹内 | 新 (千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学) |
| 荒瀬 | 尚 (千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学) |
| 齊藤 | 隆 (千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学) |

T細胞の免疫不全症における原因遺伝子を同定するためのレトロウイルスを用いた遺伝子発現クローニングのシステムづくりを行った。CD3 ζ 欠損細胞に ζ -IRES-GFPを導入しても細胞表面にTCR複合体を発現しないクローンを解析して、TCR β 、CD3 δ 、CD3 γ を欠損した変異細胞がえられることが判明した。一方、TCR発現のない細胞クローンにレトロウイルスcDNAライブラリーを導入して、細胞表面TCR発現を誘導するcDNAを回収し解析した結果、TCR β を同定した。更に、シグナル伝達系の欠損遺伝子を探す方法として、T細胞にNFAT-GFPを導入し、活性化によって発色するシステムを開発した。これらの方法は免疫不全症患者の細胞にも適用可能と思われる。

【はじめに】

リンパ球、とりわけT細胞における免疫不全症として、T細胞抗原受容体 (TCR) の発現のないCD3欠損症のような細胞表面の欠損で起こる場合と、ZAP-70やJak-3のような細胞内シグナル伝達分子の欠損による場合とがある。どちらの場合においても、細胞機能の異常の解析や、タンパクレベルでの解析から原因遺伝子の推測がつく場合もあるが、そのアプローチは一般的には困難を極める。一方、近年レトロウイルスを用いることによって、T細胞への遺伝子導入が極めて簡単かつ効率よくなり、細胞表面分子では発現のある細胞、シグナル伝達分子では機能的にシグナルを誘導できる細胞、を回収することによって、原因遺伝子の発現クローニングが可能であり、そのためのシステム作りを行った。

【対象と方法】

既に作製したCD3 ζ 欠損細胞に ζ -IRES-GFPを導入すると、ほとんどが細胞表面TCRを発現する

が、一部のTCR-GFP⁺の細胞をソーティングして、クローンを解析した。脾細胞 cDNAライブラリーを組み込んだpMX-IRES-GFPベクターを、細胞表面のTCR発現のない細胞に導入した。マウスレトロウイルスをヒトにも用いることができるように、ヒトJurkat細胞にマウスレトロウイルス受容体を導入した細胞を作製した。また、マウスレトロウイルスによって作製したecotropicウイルスを免疫不全症由来のヒト細胞に使用できるようにするために、マウスレトロウイルス受容体を遺伝子導入したJurkat細胞を作製した。

【結果】

T細胞におけるTCR複合体の発現異常の細胞を作製して、それをモデルとしてレトロウイルスの感染によってcDNAライブラリーを導入して、欠損遺伝子の同定をする、システムの確立を目指した。そのために (1) TCR-CD3複合体の発現欠損細胞を作製し、(2) cDNAライブラリーの導入によって欠損遺伝子の発現クローニングを行い、(3)

それを細胞内シグナル伝達分子の欠損細胞にも応用できるようにする，ことを行った。

(1) 既に作製してあるCD3 ζ 欠損細胞株MA5.8は細胞表面のTCR発現がほとんどないが，この細胞にレトロウイルスベクターによって， ζ -IRES-GFPを導入した。大方の細胞は細胞表面のTCR発現が戻ったが，一部はGFP⁺だが細胞表面TCRの変化がなかったため，この細胞をソーティングし，TCR-CD3各鎖を調べたところ，多くがCD3 β ，CD3 γ ，CD3 δ の欠損株であった。これらは確かに遺伝子導入した ζ 鎖は発現していた。

(2) GFP⁺で細胞表面のTCR発現のないクローンを一つ選び，TCR発現欠損細胞のモデルと考えて，この細胞にマウス脾細胞よりレトロウイルスベクターで作製したcDNAライブラリーをpackaging細胞の培養上清を用いて感染させて導入した。感染細胞の中から，細胞表面TCR発現の高い細胞をソーティングすることを3回繰り返すことによって，全てが細胞表面のTCRが高発現の細胞となった。これらの細胞をクローニングして，各細胞クローンよりPCRで導入されたcDNAを回収したところ，全てがTCR β 鎖であった。実際，ライブラリーの導入に用いたもとの細胞を調べた結果，極めて低いレベルのTCR β 鎖しか産生していないことが判明した。

(3) レトロウイルスのcDNAライブラリーを用いた同様のシステムが，細胞内のシグナル伝達分子が欠損している場合にも適応できるかを検討するために，T細胞が活性化された際に，GFP⁺になってFACSで活性化された細胞をソーティングできるかを試みた。T細胞活性化によって活性化されることが知られているNFATを使い，NFAT-GFPをヒトJurkat T細胞およびマウスT細胞ハイブリドーマに導入した。Jurkat細胞ではスーパー抗原で，T細胞ハイブリドーマでは特異的抗原で活性化させたところ，特異的にGFP⁺細胞が出現し，ソーティングによって単離でき，しかもGFPは数日後には消滅し，再活性化によって再びGFP⁺になることが判明した。

(4) マウスレトロウイルス受容体を遺伝子導入したヒトJurkat細胞を作製し，ecotropicマウスレトロ

ウイルスによってIRES-GFPを有する遺伝子を感染させたところ，GFPの発現が検出され，システムが動くことが確認された。

【考察・結論】

今回のモデル系を用いた検討によって，レトロウイルスによる効率の良い遺伝子導入系を用いることによって，細胞株にはcDNAライブラリーを導入して，欠損遺伝子をクローニングできることが明らかになった。今回の結果は残念ながら既知のTCR β が原因遺伝子であったが，細胞表面にTCR発現のない異なるクローンをを用いることによって，これまで知られない新たな遺伝子が同定できる可能性がある。また，免疫不全症の原因がシグナル伝達分子の欠損に基づくものが多いだけに，今回さらに細胞内シグナル伝達分子の欠損の場合にも，同様なレトロウイルスのcDNAを導入して，原因遺伝子を同定できるようなシステムを作るために，特異的な活性化によって一時的にGFP⁺になるような系を開発した。NFATにGFPをつないだNFAT-GFPをT細胞に導入し，抗原特異的に活性化させれば，数日間はGFP⁺となり安定したソーティングができることが解った。単離後はGFP⁺となり，再度の刺激で再びGFP⁺になることから，さまざまなシグナル伝達遺伝子欠損細胞を再構成する系に使用できる可能性を示した。更に，amphotropicウイルス特にcDNAライブラリーの使用は，既知の単一遺伝子の扱いに比べて規制が厳しかったため，マウスecotropicウイルスを用いてヒト細胞に感染できると便利である。そのためにモデル実験をしたところ，マウスレトロウイルス受容体を発現させたJurkat細胞では確かにecotropicウイルスによって効率よく感染が成立した。これらの基礎的な試みの成功によって，種々の免疫不全症の患者由来のT・B細胞株を用いて原因遺伝子の同定に応用するための前提としての基礎を築いたと考えられる。

【文献】

- 1) Suzuki, K., Nakajima, H., Saito, Y., Saito, T., Leonard, W. L. and Iwamoto, I.: Janus kinase 3(Jak 3) is

- essential for common cytokine receptor γ chain (γ c)-dependent signaling: comparative analysis of γ c, Jak3, and γ c and Jak3 double deficient mice. *Int. Immunol.* 12:123-132, 2000.
- 2) Nakatsu, F., Kadohira, T., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Kakuda, H., Copeland, N. G., Saito, T., and Ohno, H.: Genomic structure and chromosomal mapping of the genes encoding clathrin-associated adaptor medium chains μ 1A and μ 1B. *Cytogenet Cell Genet* 87:53-58, 1999.
 - 3) Watanabe, N., Park, S. Y., Ohno, H., Gessner, J.E., Schmidt, R.E., Verbeek, J.S., Izui, S. and Saito, T., : Mast cells induce the autoantibody-mediated vasculitis syndrome through Tumor Necrosis Factor production upon triggering Fc γ receptors. *Blood* 94:3855-3863, 1999.
 - 4) Nakaseko, C., Miyatake, S., Iida, T., Abe, R. and Saito, T.,: CTLA-4 engagement delivers inhibitory signal upon T cell activation in the absence of its tyrosine motif in the cytoplasmic tail. *J. Exp. Med.* 190:765-774, 1999.
 - 5) Arase, K., Saijo, K., Watanabe, H., Konno, A., Arase, H., and Saito, T.,: Ablation of a specific cell population by the replacement of a uniquely expressed gene with a toxin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:9264-9268, 1999.
 - 6) Wild, M.K., Cambiaggi, A., Brown, M.H., Davies, E.A., Ohno, H., Saito, T., and van der Merwe: Dependence of T cell antigen recognition on the dimensions of an accessory receptor-ligand complex. *J. Exp. Med.* 190:31-41, 1999.
 - 7) Yamazaki, T., Hamano, Y., Tashiro, H., Ito, K., Nakano, H., Miyatake, S. and Saito, T.,: CAST, a novel CD3 ϵ -binding protein transducing activation signal for IL-2 production in T cells. *J. Biol. Chem.* 274:18173-18180, 1999.
 - 8) Van Egmond, M., van Vuuren, H., Morton, H. C., va Spruiel, A. B., Shen, L., Hofhuis, F. M. A., Saito, T., Mayadas, T. N., Verbeek, J. S. and van de Winkel, J. G. : Human IgA receptor (Fc α RI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR γ chain and CR3(CD11 β /CD18). *Blood* 93:4387-4394, 1999.
 - 9) Otsuji, M., Aoe, T., Kimura, Y., Okamoto, Y. and Saito, T., (1999): Oxidative stress by tumor-derived macrophages and abnormal structure of T-cell receptor complex. In: Packer, L. and Yodoi, J. (eds) *Redox Regulation of Cell Signaling and its Clinical Application*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp49-64.
 - 10) Ohno, H., Tomemori, T., Nakatsu, F., Okazaki, Y., Aguilar, C., Foelsch, H., Saito, T., Shirasawa, T., Mellman, I. and Bonifacino, J. S.: μ 1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Letters* 499:215-220, 1999.
 - 11) Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Théry, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P. and Amigorena, S.: FcR γ -mediated induction of dendritic cell maturation and MHC class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189:371-380, 1999.

Expression cloning system to identify mutant/deficient genes by the use of retrovirus

Tadashi Yokosuka, Sho Yamasaki, Arata Takeuchi, Hisashi Arase, Takashi Saito
Department of Molecular Genetics, Chiba University Graduate School of Medicine

We tried to establish an expression cloning system to identify the responsible gene which causes immunodeficiency by the use of retrovirus. We isolated several mutant T cell clones lacking the cell surface expression of the TCR complex

by sorting cells deficient for the cell surface TCR expression after transfection of ζ -IRES-GFP into a CD3 ζ -deficient cell line. A cDNA library in a retrovirus vector was introduced into one of such clone lacking the cell surface expression of TCR and the cell population expressing the TCR complex on the cell surface were isolated. TCR β was identified as the responsible gene for the deficiency of the cell surface TCR expression. We further established a human cell line which expresses NFAT-GFP and can be stained upon T cell activation in order to extend this method to identify intracellular signaling molecules. These strategies will be applicable for identification of the responsible gene in T cells from immunodeficient patients.

サルモネラ感染症患者におけるIFN- γ 産生機構の解析

高 田 英 俊 (九州大学小児科)
水 野 由 美 (九州大学小児科)
(福岡市立こども病院・感染症センター)
野 村 明 彦 (九州大学小児科)
金 成 豪 (九州大学小児科)
服 部 浩 佳 (九州大学小児科)
井 原 健 二 (九州大学小児科)
青 木 知 信 (福岡市立こども病院・感染症センター)
江 口 克 彦 (福岡市立こども病院・感染症センター)
原 寿 郎 (九州大学小児科)

サルモネラ感染症において重要な役割を果たしているIFN- γ 産生のメカニズムを検討した。サルモネラ感染症患者の、血清中IL-12, IL-15, IL-18濃度をIFN- γ とともに経時的に測定し、これらのサイトカインのIFN- γ 産生における意義をin vitroで検討した。さらに、末梢血リンパ球表面マーカーや各T細胞分画におけるIFN- γ mRNAの発現を経時的に測定し、サルモネラ感染症における主なIFN- γ 産生T細胞分画を検討した。血清中のIFN- γ , IL-15, IL-18濃度は、胃腸炎型と比較して、全身型においてより長期間高値が持続した。血清中IFN- γ 濃度はIL-12およびIL-18と有意な相関があり、IL-15はIL-18との有意な相関が認められた。サルモネラ生菌刺激による末梢血単核球のIFN- γ 産生は、抗IL-12抗体や抗IL-18抗体によって低下し、IFN- γ 産生におけるこれらのサイトカインの重要性が示唆された。活性化T細胞数はIFN- γ , IL-15およびIL-18濃度と、活性化 $\gamma\delta$ T細胞数は血清中IL-15濃度と相関の傾向が認められた。サルモネラ感染症患者末梢血 $\gamma\delta$ T細胞は $\alpha\beta$ T細胞と比較して、より多くのIFN- γ mRNAを発現しており、このIFN- γ 産生 $\gamma\delta$ T細胞は、 $\alpha\beta$ T細胞とともに、IL-12, IL-18およびIL-15の複雑な相互作用を介して、ヒトサルモネラ感染症に対する防御機構に重要な役割を果たしているものと考えられた。

【はじめに】

マウスサルモネラ感染において、T細胞及びそれが産生するIFN- γ によって活性化されたマクロファージがその感染防御に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。このIFN- γ 産生機構にはIL-12, IL-15, IL-18等のサイトカインが関与している。しかし、ヒトにおいては、細胞内寄生細菌感染症におけるこれらサイトカインの意義を検討した報告は少ない。我々は $\gamma\delta$ T細胞がヒトサルモネラ感染症の防御機構に関与していることを既に報告した。近年、IFN- γ レセプター1, 2, IL-12及びIL-12レセプターの欠損患者において、

細胞内寄生細菌感染症に対する易感染性が報告されている。今回、我々はサルモネラ感染症患者におけるIFN- γ 及びそれを誘導するサイトカインであるIL-12, IL-15, IL-18と末梢血T細胞サブセットを経時的に測定し、またこれらのサイトカインがIFN- γ 産生に及ぼす影響をin vitroで検討することにより、IFN- γ 産生のメカニズムを明らかにした。

【対象と方法】

対象

便培養でサルモネラを検出したサルモネラ感染

症患者36人を対象とした。36人中7人で血液培養にて同じサルモネラ菌を検出した。男16人、女20人、年齢中央値9才9ヶ月(1.2歳-57歳)。この36人の患者を全身型10人(発熱期間が10日間以上)と胃腸炎型(胃腸症状のみ)26人の2群に分け比較検討した。

【方法】

血清中サイトカインIFN- γ , IL-12p70, IL-15, IL-18をELISA kitを用いて測定した。リンパ球表面マーカー(CD3, $\gamma\delta$, HLA-DR, CD69)およびCD3, CD4, CD8および $\gamma\delta$ T細胞での細胞内サイトカイン(IFN- γ , IL-4)をフローサイトメーターを用いて測定した。cell sorterを用いて分離した $\alpha\beta$ および $\gamma\delta$ T細胞のIFN- γ のmRNAの発現をTaq Man法による定量的RT-PCRにより測定した。患者およびコントロールの単核球をS.typhimurium, E.coli, BCGとともに培養し培養上清中のIFN- γ , IL-12p70, IL-15, IL-18を測定するとともに抗IL-12抗体, 抗IL-15抗体および抗IL-18抗体添加時のIFN- γ 産生を測定した。

【結果】

血清中サイトカイン:

急性期の患者血清中IFN- γ およびIL-12はコントロール群に比べ高い傾向があった。IL-15およびIL-18は全身型の患者で胃腸炎型($p<0.01$)やコントロール群($p<0.01$)に比し有意に高値だった(Fig.1)

血清中サイトカインの経時変化:

胃腸炎型の血清中IFN- γ , IL-12p70, IL-15およびIL-18はそれぞれ11-20, 41-60, 31-40および21-30病日で正常化した。全身型では血清中IFN- γ , IL-15およびIL-18は胃腸炎型に比べ高値が持続する傾向があり, それぞれ41-60病日, 100病日以上, 61-100病日でも高値が持続していた。IL-12p70は31-40病日でピークとなり, その後減少した(Fig.2)。血清中IFN- γ とIL-12($p=0.013$)およびIFN- γ とIL-18($p=0.0039$)は強い正の相関関係があり, またIL-15とIL-18も有意な相関関係があった($p=0.00044$, Table 1)。

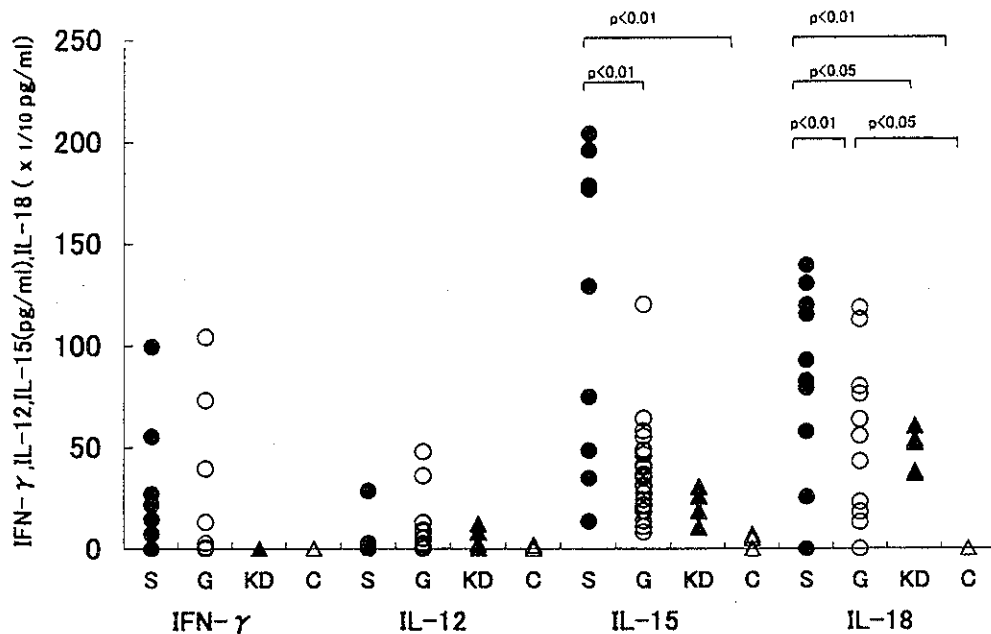


Figure 1: Serum Th1- and Th1-inducing cytokine levels at acute phase.

S: systemic form, G: gastroenteritis form, KD: Kawasaki disease, C: controls. IL-15 and IL-18 levels in systemic form are significantly increased compared with those in gastroenteritis form or in control.

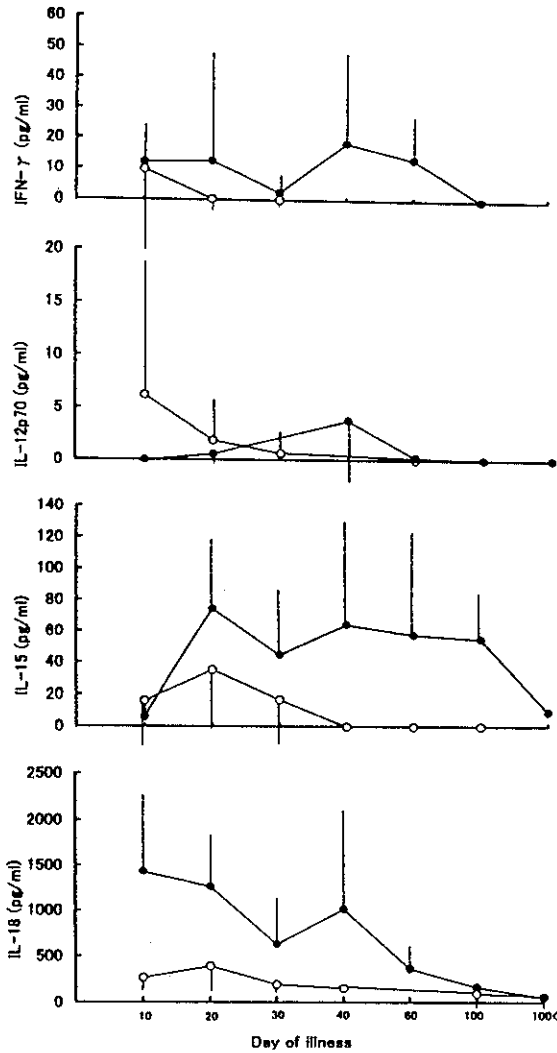


Figure 2: Serial determination of Th1- and Th1-inducing cytokines in systemic and gastroenteritis forms.

Table 1. Correlation between cytokines

| | ρ | P |
|---------------------|--------|---------|
| IFN γ -IL-12 | 0.532 | 0.013 |
| IFN γ -IL15 | 0.313 | 0.063 |
| IFN γ -IL-18 | 0.455 | 0.0039 |
| IL-12-IL-15 | 0.337 | 0.091 |
| IL-12-IL-18 | 0.0258 | 0.94 |
| IL15-IL-18 | 0.632 | 0.00044 |

IFN- γ 産生を促進するサイトカインに関するIn vitroでの検討:

サルモネラ感染症患者およびコントロールの両群で、サルモネラ、E.coli、BCGのいずれの刺激においてもIL-15とIL-18の産生が認められた。しかし、IL-12およびIFN- γ はサルモネラ感染症患者の単核球をサルモネラで刺激した場合により多く産生された (Fig. 3)。サルモネラ刺激によるIFN- γ の産生は抗IL-12抗体 ($p<0.005$) および抗IL-18抗体の添加により著明に抑制されたが、抗IL-15抗体の添加では抑制されなかった (Fig. 4)。

リンパ球表面マーカーと各サイトカインとの関連:

HLA-DR $^+$ T細胞、CD69 $^+$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞およびHLA-DR $^+$ $\gamma\delta$ T細胞は胃腸炎型に比べ全身型で有意に増加しておりこれは以前の我々の報告と一致し

Table 2. Correlation between T cells and cytokines

| cytokine | HLA-DR $^+$ T cell | | HLA-DR $^+$ $\alpha\beta$ T cell | | HLA-DR $^+$ $\gamma\delta$ T cell | |
|---------------|--------------------|-------|----------------------------------|------|-----------------------------------|-------|
| | ρ | P | ρ | P | ρ | P |
| IFN- γ | 0.426 | 0.067 | 0.262 | 0.35 | 0.367 | 0.15 |
| IL-12p70 | 0.255 | 0.26 | 0.201 | 0.39 | 0.188 | 0.43 |
| IL-15 | 0.372 | 0.076 | 0.165 | 0.48 | 0.368 | 0.080 |
| IL-18 | 0.351 | 0.079 | 0.250 | 0.21 | 0.322 | 0.11 |