

Figure 3: In vitro cytokine production upon bacterial stimulation in salmonellosis and controls:

MNC were incubated with Salmonella, BCG, E.coli or medium alone for 4 hours, washed and cultured in the presence of antibiotics for 1 day for IL-12, IL-15 and IL-18 determination and for 1 or 3 day (s) for IFN- γ . Culture supernatants were assayed with ELISA.

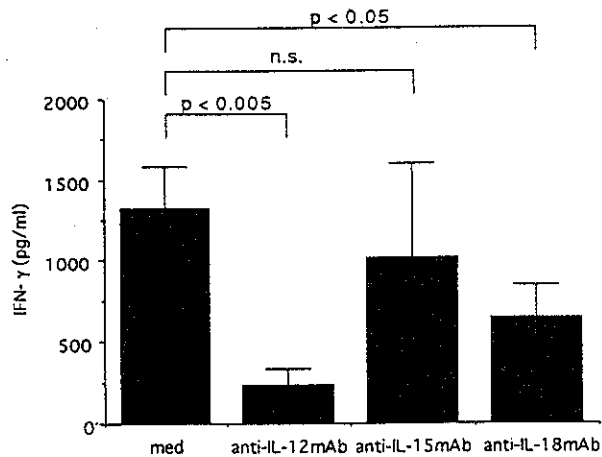


Figure 4: Effects of anti-cytokine monoclonal antibodies on Salmonella-induced IFN- γ production in controls.

Anti-IL-12 and anti-IL-18 monoclonal antibodies significantly inhibit Salmonella-induced IFN- γ production.

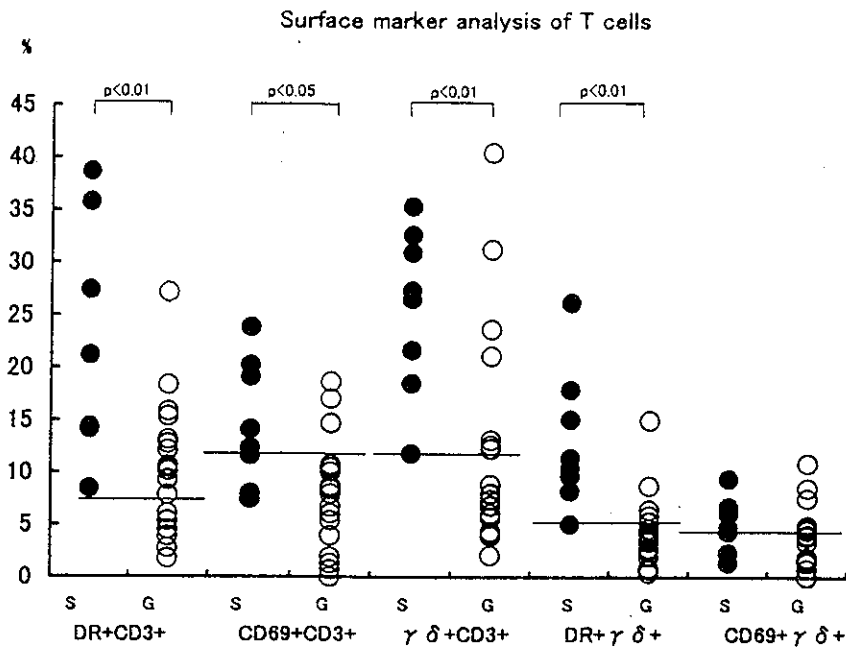


Figure 5: Surface marker analysis of T cells in systemic and gastroenteritis forms of Salmonella infection. Horizontal lines indicate the mean + 2SD values of healthy controls.

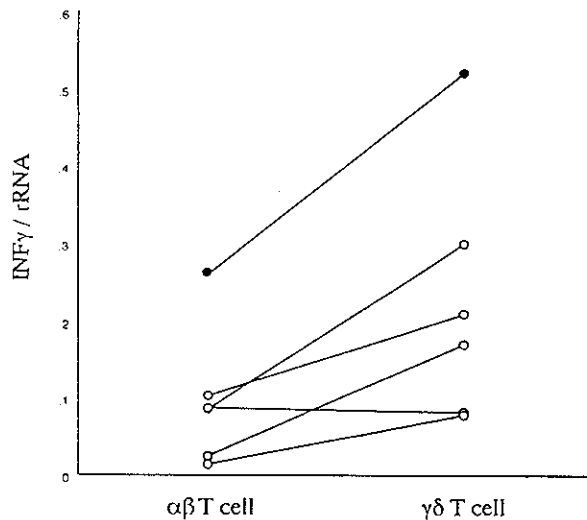


Figure 6: TaqMan quantitative PCR analysis of IFN-γ mRNA from sorted γδ T cells and αβ T cells in systemic and gastroenteritis forms.

ていた。T細胞の活性化はαβ T細胞よりγδ T細胞で顕著だった (Fig. 5)。HLA-DR⁺T細胞数はIFN-γ、IL-15およびIL-18と相関する傾向があった (Table 2)。HLA-DR⁺γδ T細胞数は血清中IL-15と弱い相関が見られたが ($p=0.080$)、HLA-DR⁺αβ T細胞数との相関はなかった。

αβ T細胞とγδ T細胞におけるIFN-γ mRNA発現量の比較：

サルモネラ症患者末梢血のαβ T細胞及びγδ T細胞をcell sorterで純化し、発現するIFN-γ mRNA量をReal-time PCR法にて測定した。全身型および胃腸炎型いずれのサルモネラ感染症患者においてγδ T細胞はαβ T細胞に比べてより高いIFN-γ mRNAの発現が認められた (Fig. 6)。また全身型の患者では、γδ T細胞、αβ T細胞ともに、回復期 (IFN-γ / rRNA : γδ T細胞 0.153, αβ T細胞 0.088) に比べ、急性期 (IFN-γ / rRNA : γδ T細胞 0.499, αβ T細胞 0.269) においてより高いIFN-γ mRNAの発現が認められた。

【考察】

サルモネラ感染急性期においてIL-15およびIL-18は全身型では胃腸炎型に比べ、有意に長期にわたり高値が持続し、Th1およびTh1誘導サイトカインの全身型感染での発熱等の全身症状の持続への関与が示唆された。IL-12およびIL-18は強力なIFN-γ誘導因子であることが知られているが、今回の解析でも血清中IFN-γとIL-12およびIL-18に相関が見られた。IL-15はまたIL-18と相関があったが、こ

れらがともにマクロファージ/単球より生産されることと関連していると考えられる。In vitroの結果も同様にサルモネラ生菌刺激によるIFN- γ 産生においてはIL-12およびIL-18が重要な意義をもつことが明らかとなった。活性化T細胞数はIFN- γ 、IL-15およびIL-18と相関がみられた。一方、活性化 $\gamma\delta$ T細胞数は血清中IL-15濃度と有意な相関が認められ、IL-15が $\gamma\delta$ T細胞の増多を誘導するサイトカインであるとする知見に一致するものであった。サルモネラ感染症全身型および胃腸炎型ともに末梢血 $\gamma\delta$ T細胞において $\alpha\beta$ T細胞より多くのIFN-mRNAの発現が見られたことは、IFN- γ 産生 $\gamma\delta$ T細胞が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ことを強く示唆するものと考えられる。IL-12、IL-18およびIL-15は複雑な相互作用をもってT細胞および $\gamma\delta$ T細胞の活性化に関与しサルモネラ感染防御にかかわるIFN- γ の産生を誘導すると考えられる。

【参考文献】

- 1) Manstroeni P, Harrison JA, Hormaeche CE. Natural resistance and acquired immunity to Salmonella. *Fund. Clin. Immunol.* 2: 83-95, 1994.
- 2) Sztejn MB, Wasserman SS, Tacket CO, Edelman R, Hone D, Lindberg AA, Levine MM. Cytokine production patterns and lymphoproliferative responses in volunteers orally immunized with attenuated vaccine strains of Salmonella typhi. *J. Infect. Dis.* 170: 1508-1517, 1994.
- 3) Jones BD, Falkow S. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu.Rev.Immunol.* 14: 533-561, 1996.
- 4) Liles WC, VanVoorhis WC. Review: nomenclature and biologic significance of cytokines of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J. Infect. Dis.* 172: 1573-1580, 1995.
- 5) Wilson M, Seymour R, Henderson B. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infect. Immun.* 66: 2401-2409, 1998.

Mechanism of IFN- γ production in patients with Salmonellosis

Takada H¹, Mizuno Y^{1,2}, Nomura A¹, Jin S¹, Hattori H¹, Ihara K¹, Aoki T², Eguchi K², Hara T¹

¹Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyusyu University, Fukuoka, Japan.

²Fukuoka Children's hospital and Medical Center for Infectious Diseases.

To evaluate the mechanism of IFN- γ production in patients with salmonellosis which plays an important role in the host defence, we analyzed serum levels of IL-12, IL-15 and IL-18 along with IFN- γ , and the association of cytokines and T cell subsets of peripheral blood from 36 patients. IL-12, IL-18 and IL-15 appeared to be involved in T cell activation as well as $\gamma\delta$ T cell expansion, resulting in IFN- γ producing cells in Salmonella infection in humans. IFN- γ production from peripheral blood mononuclear cells by live Salmonella stimulation was blocked by anti-IL-12 mAb and anti-IL-18 mAb in vitro. IFN- γ producing $\gamma\delta$ T cells in addition to the $\alpha\beta$ T cells were suggested to play an important role in the protection against Salmonella in humans.

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

野村 明彦 (九州大学小児科)
高田 英俊 (九州大学小児科)
大賀 正一 (九州大学小児科)
原 寿郎 (九州大学小児科)

IFN- γ inducing factorであるIL-18はpro-inflammatory cytokineとして近年同定されたサイトカインである。今回、臍帯血リンパ球のIL-18に対するIFN- γ 産生能を成人末梢血リンパ球と比較検討した。臍帯血および成人末梢血単核球より、T細胞、CD45RA⁺T細胞およびNK細胞を磁気ビーズ法およびcell-sorting法にて単離し、IL-12と各濃度のIL-18にて72時間または48時間培養後、上清中のIFN- γ をELISA法にて測定した。T細胞のIFN- γ 産生はIL-18の濃度依存的に増加したが、臍帯血T細胞のIFN- γ 産生能は成人末梢血T細胞に比べ有意に低値であった。しかし、CD45RA⁺T細胞ではIL-18とIL-12刺激に対するIFN- γ 産生能は両群間で差を認めなかった。一方、臍帯血NK細胞はIL-18とIL-12刺激に対し、成人末梢血NK細胞に比べ有意に強いIFN- γ 産生が見られた。さらに、臍帯血NK細胞ではIL-18に対しCD69の発現やNK活性においても強い反応性が認められた。以上のことから臍帯血T細胞のIL-18に対する反応性の低下はナイーブT細胞であるCD45RA⁺T細胞の割合に依存しており、臍帯血移植においてGVHDが起こりにくい要因の一つと思われた。一方、臍帯血NK細胞のIL-18に対する高反応は、新生児の生体防御や臍帯血移植での抗腫瘍作用を担っている可能性が示唆された。

【はじめに】

臍帯血リンパ球の機能についてはこれまで様々な面で報告されている。一般的に臍帯血T細胞は、抗原刺激、マイトジェン、IL-12などのサイトカインに対する反応性が低いことが知られており[1,2]、一方、臍帯血NK細胞の細胞傷害活性は非刺激の状態では成人末梢血NK細胞に比べ低いが、IL-2、IL-12、IL-15などのサイトカインにより成人末梢血NK細胞と同レベルになることなどが知られている[2,3]。これら臍帯血リンパ球の機能解析は新生児期の感染防御能や臍帯血移植における移植片対宿主疾患 (graft versus host disease: GVHD) や抗腫瘍効果を知る上で重要であると思われる。一方、近年、IFN- γ を誘導する新しいサイトカインとしてIL-18 (IFN- γ inducing factor) が同定された[4]。このサイトカインの特徴としては、T細胞、NK細胞

に対し、IL-12と相乗的に作用し強くIFN- γ 産生を誘導することが知られている[5]。臍帯血リンパ球のIL-18に対する反応性についてはこれまで報告が無く、今回、臍帯血リンパ球のIL-18に対する反応性について成人末梢血リンパ球と比較検討した。

【対象と方法】

1. 対象

臍帯血は妊娠、分娩歴に異常のない正期産臍帯血を用い、健常成人末梢血を対照とした。

2. T細胞、CD45RA⁺T細胞およびNK細胞の単離

臍帯血および成人末梢血より、比重遠心分離法にてそれぞれ単核球に分離後、T細胞は、抗CD14、CD16、CD19、CD33、CD34、CD56抗体およびGPA抗体にて反応後、抗マウスIgG結合磁気ビーズを用いnegative selection法にて単離した。また、

CD45RA⁺T細胞はPECy5標識抗CD14, CD16, CD19, CD34, CD56抗体およびFITC標識抗CD33, CD45RO, GPA抗体にて, NK細胞はPECy5標識抗CD3, CD14, CD19, CD34抗体およびFITC標識抗CD33, GPA抗体にて染色後, それぞれリンパ球領域内, FITC陰性, PECy5陰性領域をcell-sortingにて単離した. 各細胞の純度は93%以上であった.

3. IFN- γ 産生能

単離したT細胞 (1×10^6 /ml) とCD45RA⁺T細胞 (2×10^5 /ml) は, 40 ng/mlのrIL-12と各濃度のrIL-18 (0, 10, 100 ng/ml) にて72時間培養し, NK細胞 (2×10^5 /ml) は同条件下に48時間培養し, 各培養上清を回収し, ELISA法にてIFN- γ を測定した.

4. NK活性およびNK細胞表面上のCD69発現の解析

臍帯血および成人末梢血単核球をrIL-12(40ng/ml) とrIL-18 (100 ng/ml) にて48時間刺激後, K562細胞を標的細胞としたCr release assayにて解析した. また, CD69の発現は単離したNK細胞を同条件下にて刺激後, PE標識抗CD69抗体を用いフローサイトメトリーにより解析した.

【結果】

1. IL-18およびIL-12刺激に対するT細胞のIFN- γ 産生能

当初, IL-18単独刺激でのT細胞のIFN- γ 産生能を測定したが, 高濃度 (100 ng/ml) のIL-18刺激においても臍帯血, 成人末梢血T細胞ともにIFN- γ は検出感度以下であった (データ未掲載). 臍帯血と成人末梢血のT細胞をそれぞれIL-12 (40 ng/ml) 存在下に培養した場合, IL-18の濃度依存的にIFN- γ 産生の増加を認めた. 臍帯血と成人末梢血の両群間の比較ではIL-18濃度が100 ng/mlで臍帯血T細胞のIFN- γ 産生が有意に低く, また, この値をIL-12単独刺激時のIFN- γ の値で除して得られたIL-18投与によるIFN- γ 産生の増加率も臍帯血で有意に低値であった (図1).

さらに, 臍帯血T細胞は成人末梢血T細胞に比べ, CD45RA陽性のナイーブT細胞の割合が多いことが特徴の一つであることから, CD45RA⁺T細胞のIFN- γ 産生能を検討した. CD45RA⁺T細胞に単離し, 同条件下に刺激した場合, 100 ng/ml のIL-18

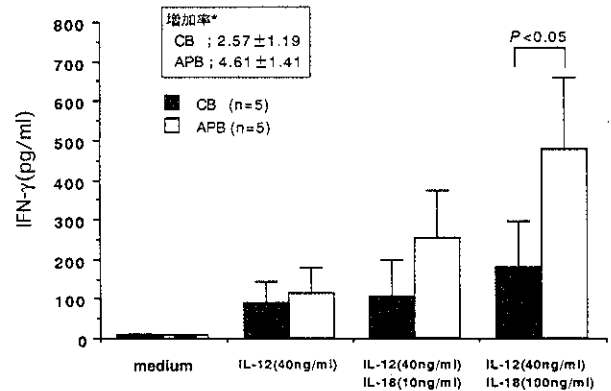


図1 IL-18およびIL-12に対するT細胞のIFN- γ 産生能
増加率*: IFN- γ 濃度 (IL-12 40ng/ml +IL-18 100ng/ml刺激) / IFN- γ 濃度 (IL-12 40ng/ml 刺激)

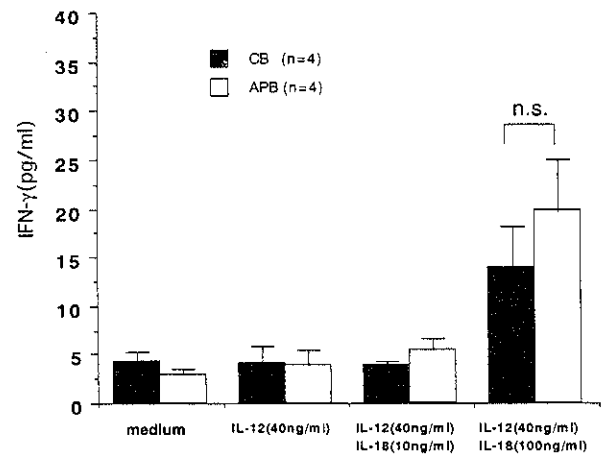


図2 IL-18およびIL-12に対するCD45RA陽性T細胞のIFN- γ 産生能

刺激においても両群間に有意差はみられなかった (図2).

2. IL-18およびIL-12刺激に対するNK細胞のIFN- γ 産生能, NK活性, CD69抗原発現

単離したNK細胞をIL-18およびIL-12にて48時間培養した際のIFN- γ を測定した. 臍帯血NK細胞では成人末梢血NK細胞に比べ, 非常に強いIFN- γ の産生が認められた (表1). さらに臍帯血のNK活性は, IL-18およびIL-12刺激後, 成人末梢_よりも強いNK活性を有していた (図3). また, フローサイトメトリーによるNK細胞活性化マーカーの解析においても, 臍帯血NK細胞では成人末梢血NK細胞に比べ, 刺激後, CD69抗原がより強く発現していた (図4).

表 1 IL-18およびIL-12に対するNK細胞のIFN- γ 産生能

stimulation	IFN- γ (pg/ml)	
	CB NK細胞 (n=5)	APB NK細胞 (n=5)
medium	6.3 \pm 3.0	4.0 \pm 2.6
IL-12(40 ng/ml)	7.2 \pm 1.7	6.3 \pm 2.2
IL-12(40 ng/ml) IL-18(10 ng/ml)	18.9 \pm 7.0 ^a	7.2 \pm 2.1
IL-12(40 ng/ml) IL-18(100 ng/ml)	581.0 \pm 207.9 ^b	129.7 \pm 16.0

^a P < 0.05 : APB NK細胞と比較, ^b P < 0.01 : APB NK細胞と比較

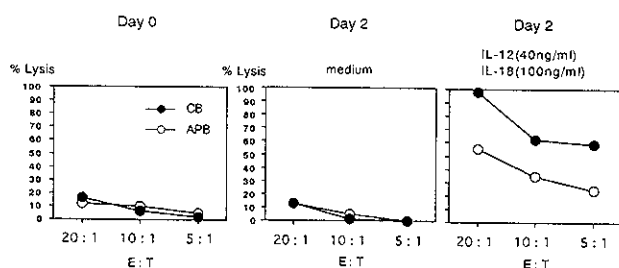


図 3 IL-18およびIL-12刺激前後でのNK活性の比較

【考察】

今回、臍帯血リンパ球のIL-18に対する反応性を成人末梢血リンパ球と比較した。IL-18はT細胞に対し、IL-12と相乗的に作用してIFN- γ を産生しTh1細胞への分化を促進することが知られている[5]。われわれの結果でもIL-18単独刺激ではIFN- γ 産生を認めず、IL-12の存在下ではIL-18の濃度依存的にIFN- γ 産生の増加が見られたが、IFN- γ 産生能は臍帯血T細胞で有意に低値であった。これまで、臍帯血T細胞のIL-12に対する反応性は成人末梢血T細胞に比べ低いとされていることから[2]、今回の結果がIL-12に対する反応性の違いを反映している可能性が考えられたが、低濃度IL-12単独刺激でのIFN- γ 産生能には両群間に差がなく、IL-18を添加することによるIFN- γ の増加率は臍帯血では有意に低いことから、IL-18に対する反応性も臍帯血T細胞では低いと考えられた。臍帯血T細胞は、前述のIL-12以外にも抗原刺激、IL-2、マイトジェンなどに対しても低反応性を示すことが知られており[1]、この理由の一つとして臍帯血T細胞のほとんどをCD45RA陽性であるナイーブT細胞が占めて

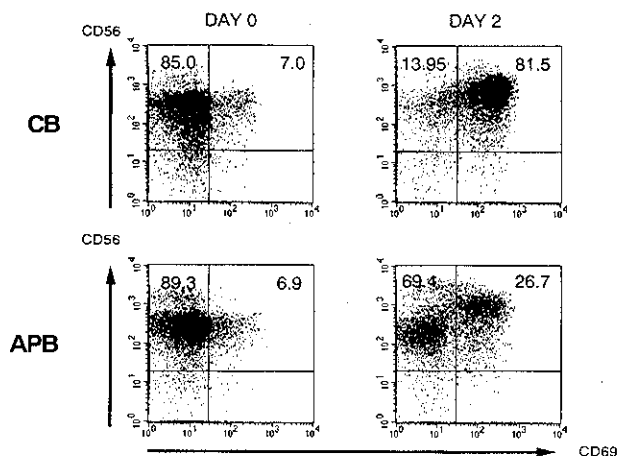


図 4 IL-18およびIL-12刺激前後でのNK細胞上のCD69発現の変化

いることがあげられる。今回の場合もCD45RA⁺T細胞に単離して比較した場合には両群間に有意差はみられなかったことから、IL-18に対する臍帯血T細胞の低反応性はCD45RA⁺T細胞の割合に依存していることが示唆された。この結果は臍帯血移植でのGVHDの起こりにくい原因の一つと考えられた。一方、臍帯血NK細胞は成人末梢血NK細胞に比べ、IL-12刺激下でIL-18による強いIFN- γ 産生増強作用を認め、さらにNK細胞表面上のCD69の発現の増加およびNK活性の増強も認められたことから、臍帯血NK細胞はIL-18により、IFN- γ 産生能を含め、成人末梢血T細胞に比べ全般に強く活性化を受けていた。これまで、臍帯血NK細胞は非刺激での活性は低く、種々のサイトカインに対するNK活性やIFN- γ 産生能は成人末梢血NK細胞のレベルに回復することが知られているが、今回、IL-18に対しては成人末梢血NK細胞以上に高反応性を示しており、このことは新生児の生体防御や臍帯血移植での抗腫瘍作用を担う可能性が示唆された。

【文献】

- 1) Cohen SB, Perez-Cruz I, et al. Analysis of the cytokine production by cord and adult blood. Hum Immunol. 1999; 60(4): 331-6.
- 2) Lee SM, Suen Y, et al. Decreased interleukin-12 (IL-12) from activated cord versus adult peripheral

- blood mononuclear cells and upregulation of interferon- gamma, natural killer, and lymphokine-activated killer activity by IL- 12 in cord blood mononuclear cells. *Blood* 1996; 88(3): 945-54.
- 3) Qian JX, Lee SM, et al. Decreased interleukin-15 from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and the effect of interleukin-15 in upregulating antitumor immune activity and cytokine production in cord blood. *Blood* 1997; 90(8): 3106-17.
- 4) Ushio S, Namba M, et al. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 1996; 156(11): 4274-9.
- 5) Dinarello CA. Interleukin-18. *Methods* 1999; 19(1): 121-32.

IL-18 response of cord blood T and NK cells

Akihiko Nomura, Hidetoshi Takada, Shouichi Ohga, Toshiro Hara

Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine Sciences, Kyushu University

IL-18, originally termed interferon (IFN)- γ -inducing factor, is a pro-inflammatory cytokine that has recently been characterized. We compared IL-18-induced IFN- γ production of cord blood (CB) lymphocytes in the presence of IL-12 with that of adult peripheral blood (APB) lymphocytes. T cells, CD45RA⁺ T cells and NK cells were purified by magnetic beads or by cell-sorting from CB and APB MNC. After the stimulation with IL-18 (0,10,100ng/ml) in the presence of IL-12 (40ng/ml) for 48h (NK cells) or 72h (T cells and CD45RA⁺ T cells), IFN- γ produced by these subsets was measured by ELISA. Although IL-18 induced a significant increase of IFN- γ production from both CB and APB T cells in the presence of IL-12, IFN- γ production by CB T cells was lower than that of APB T cells. However, CD45RA⁺ T cells from CB and APB produced nearly the same levels of IFN- γ after the stimulation with IL-18 and IL-12. On the other hand, CB NK cells produced a significantly higher amount of IFN- γ after the stimulation with IL-18 and IL-12. Furthermore, CB NK cells showed higher responses to IL-18 with respect to the expression of CD69, and NK activity, compared with APB NK cells. The present study suggests that a low response of CB T cells to IL-18 is due to a higher proportion of naive (CD45RA⁺) T cells in CB, which may be one of the factors responsible for the low incidence of graft-versus-host disease in patients receiving CB stem cell transplantation. On the other hand, a high response of CB NK cells to IL-18 may contribute to the host defense of neonate and antitumor effects in cord blood transplantation.

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

上 松 一 永 (信州大学小児科)
篠 崎 康 治 (信州大学小児科)
小宮山 淳 (信州大学小児科)

CD27抗原はメモリーB細胞の重要な細胞表面マーカーであり、その刺激により形質細胞への分化が誘導される。成熟B細胞の分化や抗原との接触の場である胚中心の機能を解析するため、扁桃腺B細胞をCD27とIgD発現に基づいて3つのpopulationに分け検討したところ、形態およびsomatic hypermutationの解析から、扁桃腺において、IgD-CD27+B細胞はmarginal zoneなどに存在するmemory B細胞、IgD-CD27-B細胞はgerminal centerB細胞を含むpopulation、そして、IgD+CD27-B細胞はmantle zoneなどのnaive B細胞であることが判明した。

【はじめに】

B-lineage 細胞はその分化過程で免疫グロブリン遺伝子のさまざまな変化を受ける。骨髄において、pro-, pre-B 細胞はVDJ再構成によってVHとVL部位遺伝子を集め可変領域が形成される。機能的な免疫グロブリン受容体の形成が成功すると、それらはナイーブB細胞として末梢血に放出され蓄積される。ナイーブB細胞からメモリーB細胞分化は胚中心で起こるとされ、そこで活性化ナイーブB細胞は増殖、免疫グロブリン遺伝子V領域の体細胞突然変異、クラススイッチ、抗原との反応、そして、メモリーB細胞と形質細胞の分化がなされる¹⁾²⁾。

免疫学的記憶によって、抗原の再進入に際し初回の反応よりも早くしかも強力な免疫応答が惹起されが、これらはメモリーB細胞とメモリーT細胞によって担われる³⁾。T細胞に関してはCD45 isoformがそのマーカーとして有用であるが⁴⁾、全メモリーB細胞を検出するB細胞表面抗原については見いだされていなかった⁵⁾。最近、CD27抗原がメモリーB細胞の重要な細胞表面マーカーであり、その刺激により形質細胞への分化が誘導されることが判明した⁶⁾。CD27分子はmemory B細胞のマーカーであり、ヒト末梢血B細胞はその発現の有無に

よりmemory B細胞とnaive B細胞に分かれる。成熟B細胞の分化や抗原との接触の場である胚中心の機能を解析するため、扁桃腺B細胞をCD27とIgD発現に基づいて3つのpopulationに分け検討した。

【方法】

扁桃腺摘出術によって得られた扁桃腺細胞をヒツジ赤血球を用いてT細胞を除き、CD19あるいはCD20陽性B細胞(96%)を精製した。IgD、IgM、CD27、CD38抗体を用いたフローサイトメトリー法でその発現を調べた。Sortingにより、IgD-CD27+、IgD-CD27- およびIgD+CD27-のpopulation(いずれも98% pure)を精製し、メイ・ギムザ染色で形態を調べた。また、RNAを抽出後、免疫グロブリン遺伝子V領域(VH5)とCmu部分のprimerを用いてRT-PCRを行った。TAクローニングキットによりVH5のクローンを得、sequenceによりsomatic hypermutationの有無を解析した。

【結果】

①扁桃腺B細胞は大きく3 population, IgD-CD27+, IgD-CD27- およびIgD+CD27-分類され、それぞれIgM発現は±, ±, +であり、CD38発現は-, +, low +であった。形態的にはIgD+CD27-は比較的小型で

あり、IgD-CD27+は比較的大型で胞体に富んでいた。IgD-CD27-はきわめて大型の細胞の混在がみられた(図1, 2)。②VH5のsomatic mutationは、IgD-CD27+ではほとんどクローンに変異がみられ、

対照的に、IgD+CD27-ではgermlineであった。興味あることに、IgD-CD27-細胞の一部に明らかな somatic hypermutationが認められた(図3)。

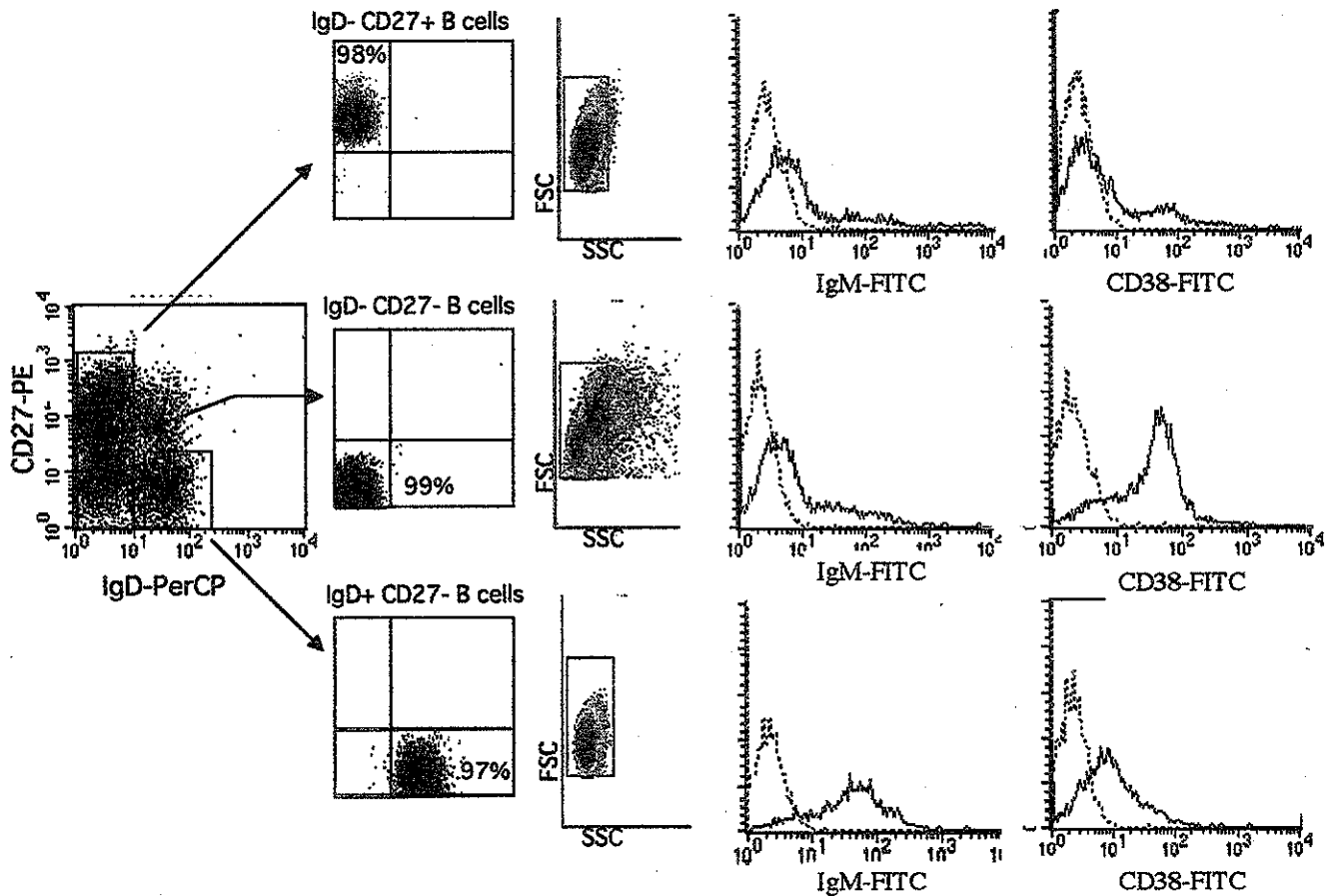


図 1

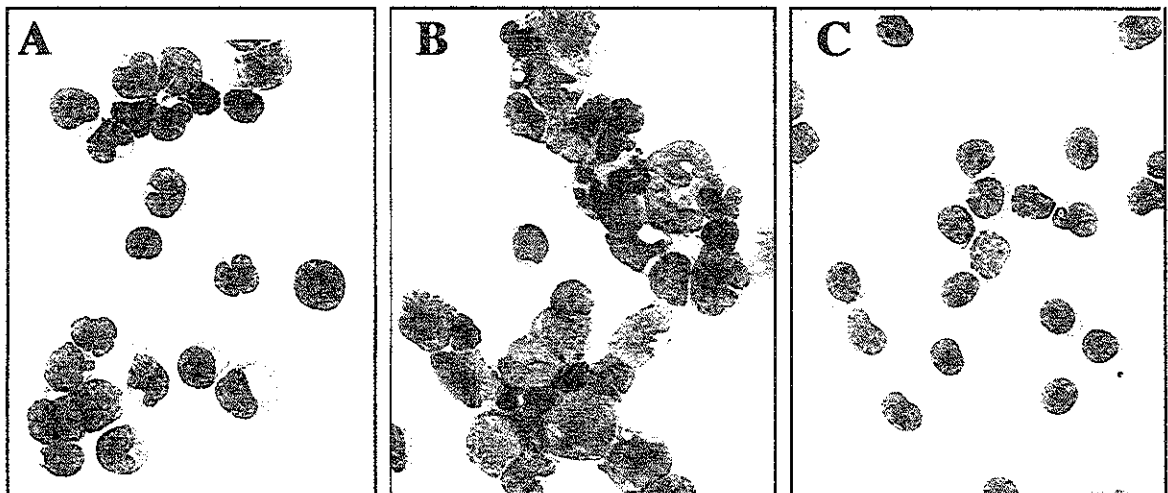


図 2

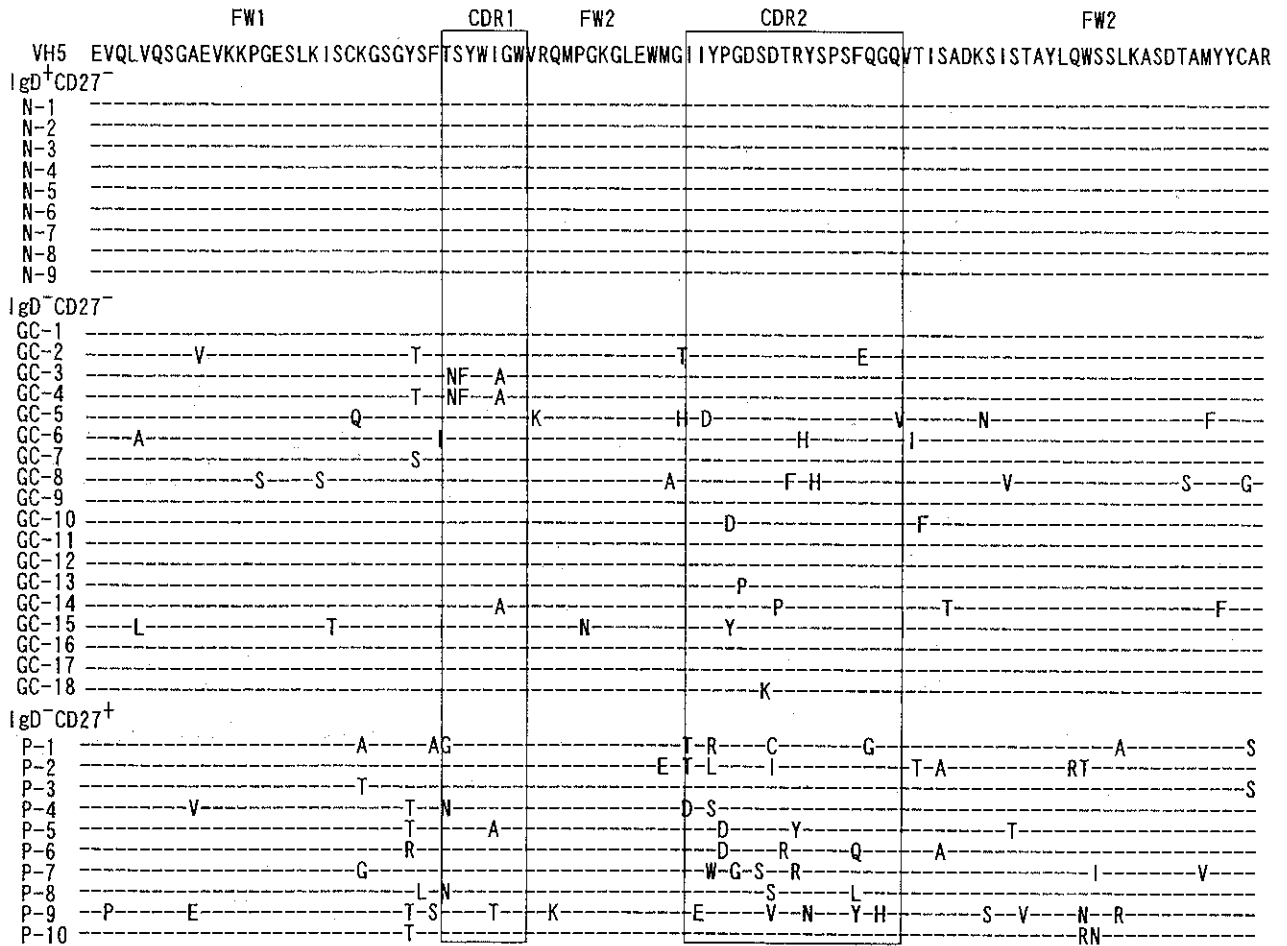


図 3

【結語】

形態およびsomatic hypermutationの解析から、扁桃腺において、IgD-CD27+B細胞はmarginal zoneなどに存在するmemory B細胞、IgD-CD27-B細胞はgerminal center B細胞を含むpopulation、そして、IgD+CD27- B細胞はmantle zoneなどのnaive Bと考えられた。

【考案】

メモリー B細胞としては表面IgDの欠如、IgGやIgAの発現細胞あるいはリンパ組織におけるIgD-CD38- B細胞などが考えられていた。しかし、この基準はメモリーB細胞の一部を検出しているにすぎず、すべてのメモリーB細胞をカバーするものではなかった⁵⁾。近年、ヒト末梢血や扁桃腺B細胞がCD27分子によって新しく2つに分類された⁶⁾。CD27はユニークなcysteine-richモチーフを持つTNF

レセプターファミリーに属しするtype I glycoproteinで大多数のT細胞と一部のB細胞に発現している^{7) 8) 9)}。臍帯血B細胞では発現が見られないが、年齢に伴いその発現が増加し、成人ではやく40%の末梢血B細胞に発現が認められる。形態的にもこの2つの集団には明らかな違いがみられる。すなわちCD27陽性B細胞は大型で細胞質に富んでいるのに対し、CD27陰性B細胞は小さく細胞質に乏しい⁷⁾。機能的にも違いがみられる。SAC+IL-2などの刺激により、CD27陽性B細胞では大量のIgA、IgM、IgGおよびIgGサブクラス産生がみられるが、CD27陰性B細胞ではその産生を認めない^{7) 8)}。IgE産生に関してもCD27陽性B細胞はCD27陰性B細胞に比べその産生能は高い⁹⁾。これらの所見はメモリーB細胞の特色に合致するものと思われる。

原発性免疫不全症候群の1つであるX連鎖無γグロブリン血症は、CD40のリガンドであるCD154

の遺伝子異常により、CD40/CD154相互作用が障害され胚中心が形成されず、メモリーB細胞の産生がおきないと考えられている。本症の末梢血B細胞にはCD27陽性B細胞はほとんど検出されず、臍帯血と同様にCD27陰性ナイーブB細胞で構成されていた¹⁰⁾。この所見もCD27分子のメモリーマーカーとしての重要性を示唆している。

メモリー細胞におけるCD27分子の役割を明らかにするためには、寿命などさらに検討する必要がある。しかし、これまでに得られたデータ、すなわち、形態的、年齢に伴う発現増強、免疫グロブリン産生能、V領域遺伝子の体細胞変異、X連鎖無γグロブリン血症患者におけるCD27分子の欠損、形質細胞への分化誘導作用などからCD27発現B細胞がメモリーB細胞と思われる。

最近の胚中心に関する知見の普及は、成熟B細胞の分化過程を説明可能にした。しかしながら、免疫グロブリン遺伝子体細胞変異の発症機構についてはいまだ不明である。どんな分子がそれを引き起こし、その導管は何であろうか。CD27分子を用いたメモリーB細胞の検出方法は免疫学的記憶や体細胞変異の解析に極めて強力な手段になるであろう。

【文献】

- 1) Kelsoe, G. The germinal center reaction. *Immunol. Today* 16: 324, 1995
- 2) Liu, Y.-J. Reuse of B lymphocytes in germinal centers. *Science* 278: 268, 1997

- 3) Sprent, J. T and B memory cells. *Cell* 76: 315, 1994
- 4) Beverley, PCL. Human T-cell memory. *Curr. Topics Microbiol. Immunology* 159: 111, 1990
- 5) Liu, Y.-J., Barthelemy, C. and de Bouteiller, O. Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by up-regulation of B7-1 and B7-2. *Immunity* 2; 239, 1995
- 6) Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunology Today* 21:204-206, 2000
- 7) Agematsu, K., Nagumo, H., Yang, F. C. et al : B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur. J. Immunol.* 27:2073, 1997.
- 8) Nagumo, H., and Agematsu, K. Synergistic response of IL-10 and CD27/CD70 interaction in B cell immunoglobulin synthesis. *Immunology* 94: 388, 1998.
- 9) Nagumo, H., Agematsu, K., Shinozaki, K. et al : CD27/CD70 interaction augments IgE secretion by promoting the differentiation of memory B cells into plasma cells. *J. Immunol.* 161: 6496, 1998.
- 10) Agematsu, K., Nagumo, H., Shinozaki, K. et al. : Absence of IgD- CD27+ memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome. *J. Clin. Invest.* 102:853, 1998.

B-cell memory in human peripheral blood and lymphoid tissue: analysis by CD27 expression and somatic hypermutation of immunoglobulin V region genes

Kazunaga Agematsu, Koji Shinozaki, and Atsushi Komiyama.

From the Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine, Asahi 3-1-1, Matsumoto 390, Japan.

Memory B cells, which carry somatic hypermutations of immunoglobulin (Ig) variable (V) region genes resulting in increased affinity for antigen, are prone to differentiate to plasma cells and make Ig rapidly and robustly in the secondary immune response. We investigated memory B cells in human by means of CD27-surface antigen as a memory B-cell marker. CD27⁺ B cells in peripheral blood or tonsil exhibited characteristics of memory B cells displaying large

cells, higher expression of bcl-2 and hypermutated IgV region genes, but naive B-cell future in both of IgD⁺ CD27⁻ B cells. On the other hand, a half of IgD⁻ CD27⁻ tonsil B cells, a majority of which expressed CD38 implying germinal center (GC) B cells, carried somatic hypermutations. Cross-linking of CD40 by anti-CD40 mAb plus CD32-transfectants or Staphylococcus aureus cowan (SAC) plus IL-2 increased numbers of CD27⁺ B cells, but not induced somatic mutations, from cord blood and sort-pure adult IgD⁺ CD27⁻ naive B cells. These results show unequivocal evidence that all of CD27⁺ B cells have somatic hypermutations and the induction of somatic hypermutations occur during the expansion in GC before expressing CD27 on their surface. In addition, CD27 expression from naive B cells was inducible, but not somatic hypermutation, by the stimulation via immunoglobulin receptors and CD40 in cooperation of cytokines.

X連鎖無ガンマグロブリン血症における好中球減少

金 兼 弘 和 (富山医科薬科大学小児科)
野 村 恵 子 (富山医科薬科大学小児科)
宮 脇 利 男 (富山医科薬科大学小児科)

X連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) は抗体産生不全のために易感染性を示し、少なからず好中球減少を認めることが知られている。今回Btk遺伝子変異が同定されたXLA59例を対象にアンケート調査を行ったところ、回答のあった57例中12例 (21%) で好中球減少を認めた。いずれもガンマグロブリン補充療法前に認められ、うち2例は敗血症により死亡していた。XLAにおける易感染性には抗体産生不全に加えて好中球減少も関与しているものと考えられた。

【はじめに】

X連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) は液性免疫不全を呈する原発性免疫不全症のひとつである。1993年にその原因遺伝子がBtkと同定された¹⁾²⁾。BtkはB細胞の分化に重要な分子であり、B細胞以外に骨髄系細胞や単球にも発現しているが、それらの細胞における機能はよくわかっていない²⁾³⁾。XLAでは低ガンマグロブリン血症によると思われる細菌感染が頻回にみられ、少なからず好中球減少を認めることが報告されている⁴⁾⁵⁾。そこでこれまで当科で診断したXLAにおける好中球減少の有無についてアンケート調査を行った。

【方法と対象】

これまでに当科にフローサイトメトリーならびにBtk遺伝子解析によりXLAと診断した51家系59例を対象として、500/ml以下の好中球減少の有無について主治医にアンケートを行った。59例中57例で回答が得られ、57例中12例 (21%) で好中球減少を認めた。それら12例の主治医に臨床的特徴などに関する2次アンケートを行い、一部の症例ではハイドロコチゾン負荷試験を行った。

【結果】

回答が得られた57例中12例 (21%) で500/ μ l以下

の好中球減少を認めた。うち2例は好中球減少のエピソードを3回ずつ認め、計16エピソード認められた (表1)。好中球減少はすべてXLAの診断前に認められ、ガンマグロブリン補充療法開始後に好中球減少は認められなかった。好中球減少の絶対数は200/ μ l以下が14エピソード、0/ μ lも5エピソード認められ、重篤な好中球減少を多く認めた。好中球減少が1500/ μ l以上に回復するのみ要した日数は、遅くとも11日以内に回復した。好中球減少を認めた時点で何らかの感染症に罹患しており、症例6ではウイルス感染症に罹患していたが、ほとんどの症例で中耳炎や肺炎などの中等症の細菌感染症の罹患が多かった。疑い例を含めて4例の敗血症がみられ、うち2例は多臓器不全のため入院24時間以内に死亡した。起炎菌は同定された5エピソードのうち4エピソードで緑膿菌が検出された。治療はほとんど抗生剤投与がなされ、約半数はガンマグロブリン投与が行われ、5エピソードではG-CSF製剤の投与も行われていた。

好中球減少を認めたXLA12例におけるBtk遺伝子変異を検討したところ、ミスセンス変異が3例、欠失が3例、挿入が2例、スプライス異常が3例であった (表2)。

症例1, 3, 7と好中球減少を認めなかったXLA1例でハイドロコチゾン負荷試験を行った (図

表 1 好中球減少を合併したXLAの臨床的特徴

症例	診断時 年齢	好中球 減少時	白血球数 (/μl)	好中球 (%)	好中球 (/μl)	回復に 要した日	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	感染症	起炎菌	治療
1	4ヵ月	3ヵ月	2400	0	0	4日	167	2	17	中耳炎	緑膿菌	抗生剤+γ-gI+G-CSF
2	6ヵ月	6ヵ月	1600	1	16	2日	NA	NA	NA	肺炎、中耳炎	緑膿菌	抗生剤
3	7ヵ月	5ヵ月	1400	0	0	4日	141	<2	9	臍痙攣→敗血症疑い	MRSA→不明	抗生剤+γ-gI+G-CSF
4	7ヵ月	7ヵ月	400	0	0	死亡	9	<6	7	敗血症	緑膿菌	γ-gI+G-CSF+ステロイド
5	11ヵ月	11ヵ月	7400	0	0	6日	8	<26	66	咽頭炎、中耳炎	不明	抗生剤+γ-gI
6	1歳3ヵ月	5ヵ月	5780	2	116	不明	165	<5	30	突発疹	-	抗生剤
		8ヵ月	3480	2	70	不明	215	<5	16	風疹	-	抗生剤
		10ヵ月	6140	7	430	11日	427	<5	47	麻疹	-	抗生剤+ステロイド
7	1歳7ヵ月	8ヵ月	13000	1	130	不明	NA	NA	NA	肺炎、中耳炎	不明	抗生剤
		1歳2ヵ月	10100	1.5	152	8日	NA	NA	NA	肺炎、中耳炎	B.catarrhalis	抗生剤
		1歳7ヵ月	19000	2	380	4日	1	3	18	肺炎、無気肺	不明	抗生剤+γ-gI+G-CSF
8	1歳8ヵ月	1歳8ヵ月	200	0	0	3日	11	<6	7	肺炎	不明	抗生剤+γ-gI
9	1歳9ヵ月	1歳9ヵ月	7600	2	152	8日	<100	<8	22	敗血症疑い	不明	抗生剤+γ-gI
10	5歳	5歳5	1500	6	90	死亡	17	<8	14	肺炎、敗血症	緑膿菌	抗生剤+γ-gI+G-CSF +ステロイド
												抗生剤
11	5歳ヵ月	3歳5ヵ月	3850	5	193	不明	NA	NA	NA	咽頭炎	不明	抗生剤
12	11歳	10歳	2500	3	75	9日	629	<8	583	膿皮症	不明	抗生剤

NA: 未検査、γ-gI: ガンマグロブリン製剤

表 2 好中球減少を合併したXLAにおけるBtk遺伝子変異

症例	Btk遺伝子変異
1	G787 (1 bp deletion)
2	G1699-G2040 (exon 16-18 skip)
3	Arg562→Trp
4	A1925-T1926 (2 bp deletion)
5	G1482-G2040 (exon 16-18 skip) T1699-G2040 (exon 17-18 skip)
6	G1089-T1090 (2 bp deletion)*
7	G909-G1106 (exon 9-11 skip) G1310-G1763 (exon 14-16 skip)
8	1 bp insertion between A612 & A613
9	Ala582→Val
10	2 bp insertion between C861 & T862
11	G1089-T1090 (2 bp deletion)*
12	Glu567→Asp

*患者6と11は兄弟例

1). 症例 1 はほとんど好中球数の増加を認めず、他の 3 例は増加を認めたものの増加数は3000/μl 以下であった。

【考案】

今回の検討でXLAの21%で好中球減少が認められた。一方Ledermanら⁴⁾、Farrarら⁵⁾はそれぞれ10%、26%の好中球減少が認められたと報告している。またFarrarら⁵⁾の報告にもあるが、ガンマグロブリン補充療法を受けているXLAでは好中球減

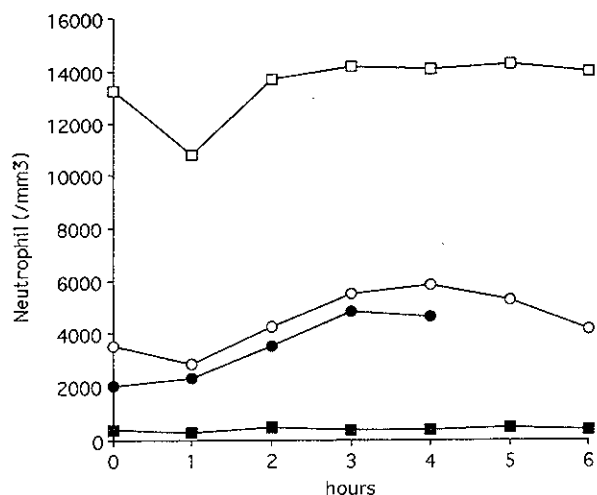


図 1 XLAにおけるハイドロコチゾン負荷試験

ハイドロコチゾン5mg/kgを静注し、経時的(前、1、2、3、4、5、6時間後)に採血し、好中球数を調べた。白丸、黒丸、白四角、黒四角はそれぞれ好中球を認めないXLA、症例 3、症例 7、症例 1を示す。なお症例 3は都合により4時間で中止した。

少が認められなかった。しかしなぜガンマグロブリン補充療法前の感染症罹患時にのみ好中球減少を認めるのかは不明である。XLAでみられる易感染性の原因として抗体産生不全のみならず好中球減少も関与していると考えられる。

XLAの原因遺伝子はBtkであり、変異部位はすべてのドメインにあり、変異も多様性がある。好

中球減少を合併したXLAにおけるBtk遺伝子変異にも多様性があり、一定の相関はみられなかった。BtkはB細胞のみならず、単球や骨髄系細胞にも発現しているが、XLAでしばしば好中球減少が認められることより、Btkがそれらの細胞において何らかの機能的役割を果たしている可能性が考えられる。ハイドロコチゾン負荷試験の結果より骨髄より末梢血への好中球の動員に障害があることが示唆された。好中球の動員に関与すると思われる単球や骨髄系細胞に発現する何らかの液性因子(ケモカインやサイトカインなど)がBtkとの相互作用により機能異常を来している可能性が考えられ、今後の研究が期待される。

【参考文献】

- 1) Vetrie D, et al.: The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 361:226-233, 1993.
- 2) Tsukada S, et al.: Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 72:279-290, 1993.
- 3) Futatani T, et al.: Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood* 91:595-602, 1998.
- 4) Lederman HM, et al.: X-linked agammaglobulinemia: An analysis of 96 patients. *Medicine* 64:145-156, 1985.
- 5) Farrar JE, et al.: Neutropenia in X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol Immunopathol* 81:271-276, 1996.

Neutropenia in X-linked agammaglobulinemia

Hirokazu Kanegane, Keiko Nomura, Toshio Miyawaki

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University

X-linked agammaglobulinemia (XLA) is described as a defect in humoral immunity, and affected males have recurrent bacterial infections. Neutropenia has been reported in patients presumed to have XLA. In the present study, the referring physician was asked to complete a clinical survey including questions about the incidence of neutropenia. Of the 59 patients for whom we identified mutations in Btk, adequate clinical information was available for 57 patients. Twelve of the 57 patients (21%) had a past history of neutropenia, and 2 patients were fatal by sepsis. Neutropenia was not seen in any patients with XLA receiving intravenous gammaglobulin. The susceptibility to infections may be associated with not only a defect in humoral immunity but also neutropenia.

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

野村 恵子 (富山医科薬科大学小児科)
金兼 弘和 (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)
宮脇 利男 (富山医科薬科大学小児科)

代替軽鎖 (SL鎖) (VpreB/λ5) はB前駆細胞に発現しているが、XLAにおけるB細胞分化障害を明らかにすることを目的として、責任遺伝子Btkが同定されているXLA13症例ならびに正常人24名の骨髓B細胞を抗VpreB抗体を用いて解析した。SL鎖とμ重鎖は細胞質内に発現しているため、細胞膜の透過性を高め、フローサイトメトリーにて解析した。正常骨髓ではB細胞はμSL⁺⁺(pro-B), μ^{low}SL⁺⁺(pre-B1a), μ^{low}SL⁺(pre-B1b), μ^{low}SL⁻(pre-B2), μ^{bright}SL⁻(immature-B)の順序で分化するものと考えられた。正常骨髓では、pre-B1a細胞は大型の細胞に富んでいた。乳児期では骨髓におけるB細胞の割合が高く、年齢とともに減少していた。XLA骨髓では正常骨髓に比しB細胞比率の有意な減少がみられ、大部分はpro-B細胞で占められ、少数ながら存在するpre-B細胞は小型細胞から成っていた。このことより、XLAにおいてはpro-B細胞を越えてpre-B細胞の初期の段階から後期の段階への分化障害が存在するものと考えられた。

【はじめに】

X連鎖無-γグロブリン血症 (XLA) は成熟B細胞の欠損を特徴とする液性免疫不全で、XLA患者の大部分で責任遺伝子Btkの変異が同定されているが、B細胞の初期分化におけるBtkの機能的役割は明らかでない。われわれは代替軽鎖 (SL) 鎖VpreB特異的単クローン抗体を用い、XLAおよび正常骨髓におけるB前駆細胞の分布様式を比較検討し、ヒトにおけるB細胞分化パターンおよびXLAのB細胞分化障害のレベルを明らかにした。

【対象と方法】

インフォームドコンセントを得たBtk変異を有するXLA13症例、明らかな血液免疫異常を有さない小児19名、成人ボランティア5名より骨髓を採取。骨髓の単核球をFicoll-Hypaqueで分離し、SL鎖は主として細胞質内に発現するので、細胞を4% paraformaldehydeで固定、0.5% saponinで細胞膜透過性を高めた後、蛍光標識単クローン抗体 [VpreB (HSL96), CD19, CD10, CD34, TdT] ならびに

ポリクローナル抗体 (μ重鎖, κ/λ軽鎖) を組合せ染色、フローサイトメトリーにてthree-color解析を行った。

【結果】

各年齢層の健常者3例、XLA2例、B cell SCIDの骨髓における細胞質内VpreB, CD19, TdTまたはμ重鎖の発現については、健常者と患者では明らかに異なる分布様式をとっていた (図1)。CD19はB-lineageの比較的初期の段階から発現しているとされるが、CD19⁺VpreB⁺細胞が存在したため、VpreBとCD19とを組合せた部分が骨髓中のB系細胞全体をあらわすと考え、以下この部分について解析を行った (図1A)。健常者に比べXLAではVpreB⁺μ⁺TdT⁺細胞 (pro-B細胞) が著増しており、SCIDでは大部分を占めていた (図1B)。

次に細胞を固定し、膜透過性を高めた後に染色を行う方法でimmature-B細胞が分別可能かを調べるため、細胞質内μ重鎖と細胞表面μ重鎖の関係について調べた (図2)。図の四角で囲んだ表面μ

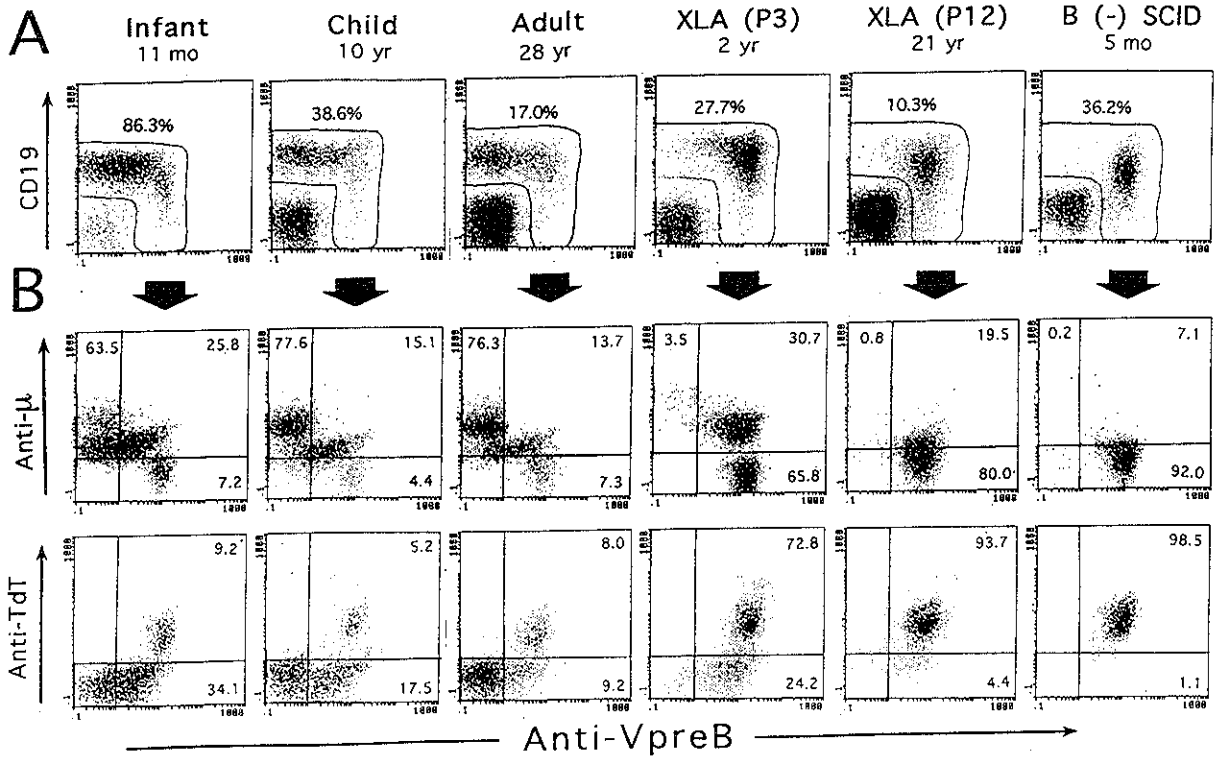


図1 各年齢層の健常者3例, XLA 2例, B cell SCIDの骨髄における細胞質内VpreB, CD19, TdTまたは μ 重鎖の3-color解析。
 (A) VpreBとCD19を組み合わせた部分が骨髄中のB系細胞全体をあらわすと考えられる。健常者と患者では明らかに異なる分布様式をとっている。
 (B) 健常者に比べXLAではVpreB⁺ μ ⁺TdT⁺細胞 (pro-B細胞) が著増しており, SCIDでは大部分を占めている。

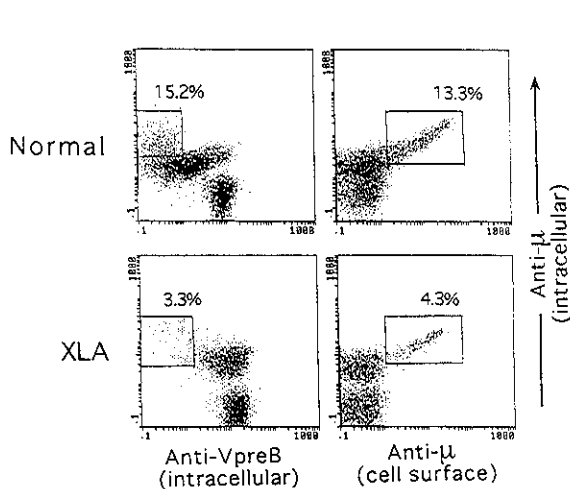


図2 細胞質内 μ 重鎖と細胞表面 μ 重鎖との関係。四角で囲んだ表面 μ を発現する部分は細胞質内 μ も強く発現しており, したがって細胞質内のみを染色する方法でもimmature-B細胞の分別が可能と考えられる。

を発現する部分は, 細胞質内 μ も強く発現しており, 従って細胞質内のみを染色する方法でもimmature-B細胞の分別が可能と考えられた。

骨髄B系細胞を μ 重鎖とVpreBの発現から五段階に分け, μ SL⁺⁺ (R1) はpro-B細胞, μ ^{bright}SL⁻ (R5) はimmature-B細胞, その間の μ ^{low}な部分 (細胞質内 μ ⁺) はpre-B細胞と考えられ, VpreBの発現の強度からpre-B細胞を μ ^{low}SL⁺⁺ (R2), μ ^{low}SL⁺ (R3), μ ^{low}SL⁻ (R4) の三段階に分け, それぞれpre-B1a, pre-B1b, pre-B2と名付けた (図3)。

健常者とXLAとを比較するとXLAではR3以降の割合が少ないことに気づかれた (図3A)。各々の段階について, forward scatterにより細胞の大きさを解析したところ, 健常者ではR2が比較的大型の細胞に富むのに対し, XLAでは全段階を通して小型細胞から成っていた (図3B)。

骨髄リンパ球系細胞におけるB細胞の割合は乳児期が高く, また小児では比較的未熟な細胞の造成为活発であるが, 加齢とともに減少していくことが観察された。XLAでは各年齢を通じてB細胞比率の有意な減少がみられ, 大部分はpro-B細胞で占められていた (図4)。

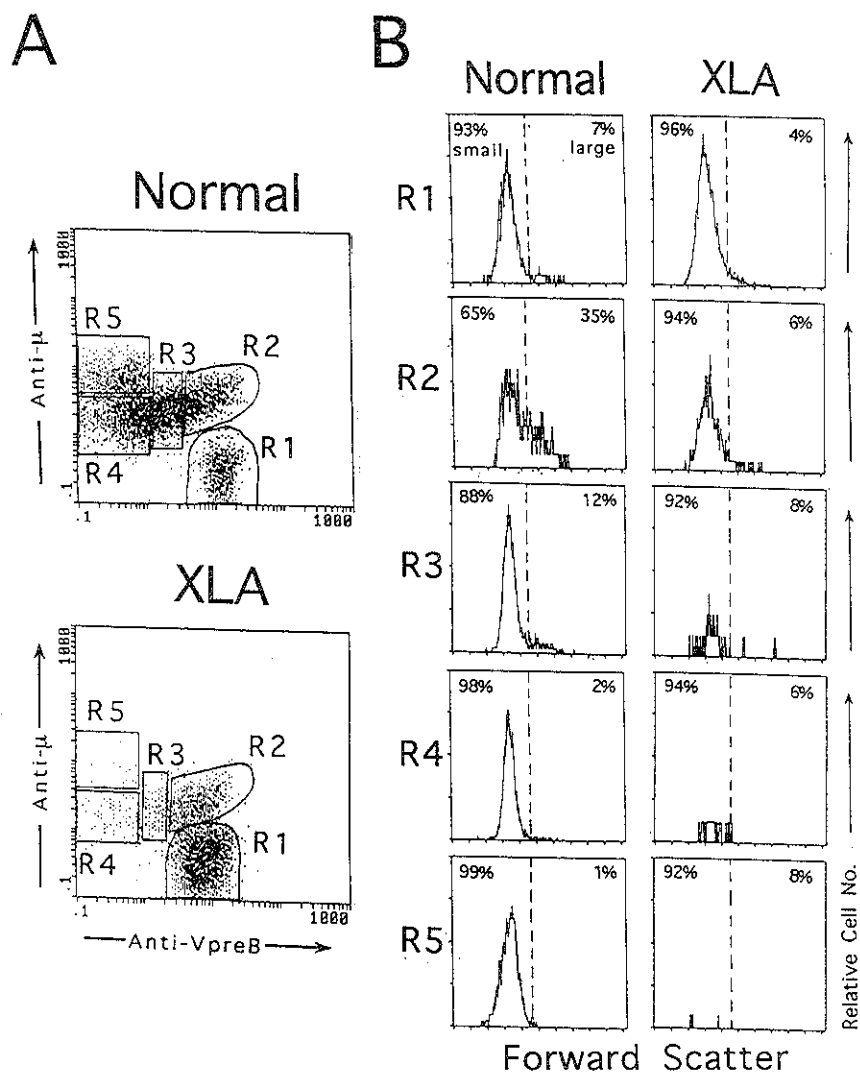


図3 (A) μ 重鎖とVpreBの発現様式から骨髄B系細胞を5段階 [$\mu^{\text{low}}\text{SL}^{++}$ (R1), $\mu^{\text{low}}\text{SL}^{++}$ (R2), $\mu^{\text{low}}\text{SL}^{+}$ (R3), $\mu^{\text{low}}\text{SL}^{-}$ (R4), $\mu^{\text{bright}}\text{SL}^{-}$ (R5)] に分類. XLAではR3以降の割合が少ない.
 (B) R1からR5の各段階についてforward scatterにより細胞の大きさについて解析. 健常者ではR2が比較的大型の細胞に富むのに対し, XLAでは全段階を通して小型細胞から成っている.

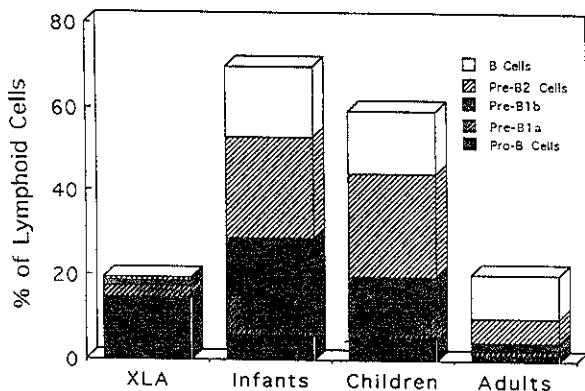


図4 骨髄B系細胞の各分化段階の割合について, 健常者の年齢による変化とXLAとの比較. B系細胞の割合は乳児期で高く, また小児では比較的不成熟な細胞の造성이活発であるが, 加齢とともに減少. XLAではB細胞比率の有意な減少がみられ, 大部分はpro-B細胞で占められている.

【考案】

正常骨髄では, ヒトB細胞分化は, $\mu^{\text{low}}\text{SL}^{++}$ (pro-B) \rightarrow $\mu^{\text{low}}\text{SL}^{++}$ (pre-B1a) \rightarrow $\mu^{\text{low}}\text{SL}^{+}$ (pre-B1b) \rightarrow $\mu^{\text{low}}\text{SL}^{-}$ (pre-B2) \rightarrow $\mu^{\text{bright}}\text{SL}^{-}$ (immature-B) の順序で進むものと推察された. XLA骨髄ではpro-B細胞からpre-B1a細胞への移行段階で分化障害が存在することが判明し, プレB細胞レセプターを介したシグナル伝達にBtkが重要な役割を果たすことが示唆された(図5).

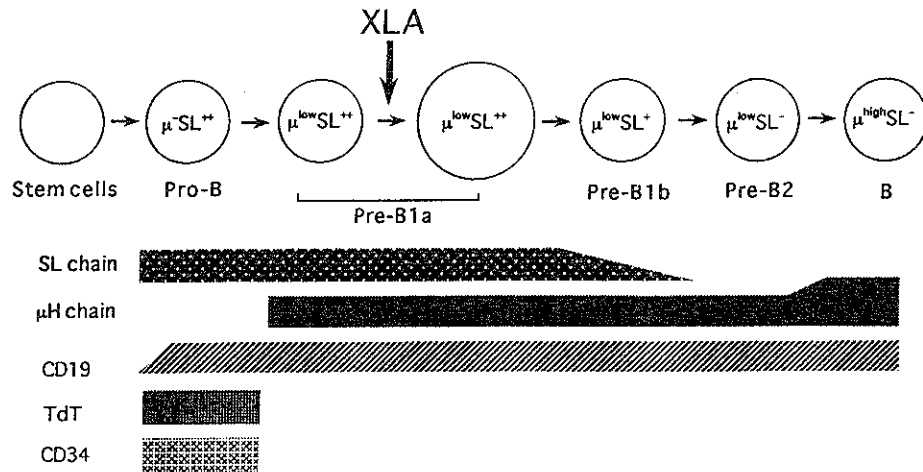


図5 骨髓B細胞の分化とXLAにおける分化障害. 正常骨髓では, B細胞分化は, $\mu^{\text{SL}^{++}}$ (pro-B) \rightarrow $\mu^{\text{lowSL}^{++}}$ (pre-B1a) \rightarrow $\mu^{\text{lowSL}^{+}}$ (pre-B1b) \rightarrow $\mu^{\text{lowSL}^{-}}$ (pre-B2) \rightarrow $\mu^{\text{highSL}^{-}}$ (immature-B) の順序で進み, XLA骨髓ではpro-B細胞からpre-B1a細胞への移行段階で分化障害が存在.

The maturational defect of B cells in human X-linked agammaglobulinemia

Keiko Nomura¹⁾, Hirokazu Kanegane¹⁾, Hajime Karasuyama²⁾, Toshio Miyawaki¹⁾

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University¹⁾,

Department of Immunology, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science²⁾

Surrogate light chains (15/VpreB) are selectively expressed in early precursors of B cells. To elucidate the nature of B-cell defect in X-linked agammaglobulinemia (XLA), which is caused by mutation in the gene for Btk, early B-lineage cells in bone marrow samples from thirteen XLA patients and twenty-four normal donors of different ages were comparatively analyzed using an anti-human VpreB monoclonal antibody. Expression of surrogate light (SL) and μ -heavy chains were examined after cell membrane permeabilization, because they are mainly expressed in the cytoplasm of early B-lineage cells. The flow cytometric analysis of normal bone marrow (BM) identified five discrete cell types of B cells, namely, $\mu^{\text{SL}^{++}}$ (pro-B), $\mu^{\text{lowSL}^{++}}$ (pre-B1a), $\mu^{\text{lowSL}^{+}}$ (pre-B1b), $\mu^{\text{lowSL}^{-}}$ (pre-B2), $\mu^{\text{brightSL}^{-}}$ (immature-B) cells. The larger cells, presumably in cycling states, were enriched in pre-B1a cells. The frequencies of B-lineage cells in BM were higher in young children, and declined with advancing age. In contrast, XLA showed the profound reduction in BM B-lineage cells. In XLA BM, an expansion of pro-B cells with some small pre-B1a cells was marked, but other cells were negligible. These observations have illustrated B cells maturation defect in XLA as well as normal human B cell differentiation pathway. The results suggest that the genetic defect in XLA may impede the evolution of pro-B cells beyond the earlier pre-B stage into the later stage of pre-B cells in B cell development.

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

馬場 義裕 (大阪大学医学部分子病態内科)
塚田 聡 (大阪大学医学部分子病態内科)

Btk (Bruton's tyrosine kinase) はその欠損によって生じる免疫不全症である伴性劣性無ガンマグロブリン血症 (XLA) の病態が示すようにB細胞の分化増殖に必須の分子である。本研究ではBtkの機能の全貌を明らかにするために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同定を行なった。

【はじめに】

本研究は無ガンマグロブリン血症 (XLA) の責任遺伝子Btkの、Bリンパ球分化とその細胞内シグナル伝達における機能を明らかにすることによって、XLAの発症機序を明らかにし、それによってXLAに対する特異的な治療法を開発することを目的としている。我々はこれまで特にBtkと相互作用する分子および基質となる分子を同定してゆくことによってBtkの機能を明らかにしようと試みてきた。そして、BtkのSH2ドメインと相互作用する分子としてアダプター分子BLNKを同定し、その結果B細胞抗原レセプター刺激後に生じるカルシウムシグナルにおけるBtkの機能を明らかにした。すなわち、B細胞抗原レセプター刺激後チロシンキナーゼSykによってリン酸化されたBLNKにBtkがリクルートされ、BLNK上でBtkがphospholipase C γ (PLC γ) をリン酸化することが細胞内カルシウム動員が始まるのに必須であることを示した^{1,2)}。またBtkのSH3ドメインと結合する新規分子Sab (SH3BP5) を同定し、Sabが *in vitro* でも細胞内でもBtkの活性を抑制する分子として作用する事を明らかにした³⁾。さらに細胞内におけるBtkの基質となる分子としてWASP (Wiskott-Aldrich症候群の責任遺伝子) を同定し、そのBtkによるリン酸化部位の同定によってBtkの基質特異性を明らかにした⁴⁾。Btkはチロシンキナーゼであるから、基質と

なる分子をリン酸化する事によってさらに下流にシグナルが伝達され、それによって種々の分子の転写が促進あるいは抑制され、最終的にB細胞の分化増殖がおこると考えられる。Btkの基質としては上述のようにPLC γ 、WASPが同定され、さらにBAP135 (TFII-1) という分子も同定されているが (図1)、それが全てであるかは現在明らかでなく、またどのような分子の転写がBtkに依存しているのかも明らかではない。本研究はB細胞抗原レセプターの刺激後、B細胞内でBtk依存的にその転写が変化する分子の同定を行なう事を目的とした。

【対象と方法】

正常B細胞とBtkを欠失させたB細胞上のB細胞抗原レセプター (BCR) を刺激後、mRNAを抽出し、differential display法により刺激前後で発現量に変化している遺伝子をピックアップし、さらにBtkが存在する細胞と存在しない細胞でその発現量の変化が異なっている遺伝子を同定した。B細胞としてはニワトリB細胞株DT40および *in vitro* targeting法によってBtkを欠損させたDT40 (関西医大・肝臓研・黒崎知博博士らが樹立) を用いた。1 \times 10⁷個のDT40細胞を10 μ g/mlのmouse-anti chicken IgM antibody M4 (Dr. Max Cooperより供与) によって1時間刺激した後、RNAを抽出し、これを鋳型とし