

て蛍光differential displayを行った。9種類の下流プライマーと24種類の上流プライマーを使った216通りの組合せで行い発現プロファイルを比較検討した(図2)。また、野生型DT40細胞をM4で刺激後、mRNAをoligoT-sepharose法によって精製し、合成したcDNAをλ ZapII vectorに組込むことによってDNA libraryを作製した。

【結果】

216通りの組合せを検討した結果、Btk欠損細胞では発現誘導が見られないが野生型細胞では発現誘導される遺伝子が4クローン、逆に野生型細胞でのみ発現の抑制がみられる遺伝子が1クローン、また、Btk非依存性にBtk欠損細胞でも野生型細胞でも発現誘導される遺伝子が2クローン、発現が抑制される遺伝子が2クローン確認された。特に上流プライマーNo.2と下流プライマーNo.4の組合せによって検出された、Btk依存的に転写が誘導されるクローン(図3)についてはそのバンドをゲルより切り出し、PCRで増幅後、塩基配列の決定を行ったが、Gen Bankに未登録の新規遺伝子であ

ることが明らかになった。そこで、さらにそのクローンをプローブとして、Northern blotを行ない、そのBtk依存的発現誘導の再現性を確認した(図4)。次に野生型DT40細胞を刺激後に精製したmRNAから作製したcDNA libraryをそのクローンをプローブとしてスクリーニングし、本クローンの全長の解析を進めている。

【考案・結論】

我々が既に報告したようにB細胞抗原レセプターのシグナル伝達におけるBtkの機能のひとつはBLNKとの相互作用を介してPLCγを活性化することである。PLCγはphosphatidylinositol-4,5 bisphosphateをinositol-1,4,5 trisphosphate (IP3)とdiacyl glycerol (DG)に分解し、IP3は小胞体からのカルシウムの動員をおこし、DGはprotein kinase C (PKC)を活性化する。したがってBtk依存的に転写が誘導される分子群の一部はカルシウム、あるいはPKC依存的であることが予想される。しかしながら、上述のように、Btkの下流経路はPLCγ以外にも存在することが示唆されているが、それ

らの経路の活性化によってどのような遺伝子の転写が促進され、さらに細胞の分化増殖に最終的にどのような寄与をするのかは全く不明である。本研究では正常B細胞とBtkを欠失したB細胞との比較によって、BCR刺激後その転写がBtk依存的に早期に誘導される分子(Btk-dependent early transcriptional gene)が存在する事を示した。遺伝子の解析は現在進行中であるが、このような遺伝子を同定し、さらにそのプロモータ部位の解析によってBtkとその遺伝子の中間に存在する分子を同定してゆく事によりBtkの下流経路の全貌が明らかになる事が期待される。

【参考文献】

- 1) Hashimoto, S., Iwamatsu, A., Kurosaki, T., Okawa, K., Yamadori, T., Matsushita, M., Baba, Y., Kishimoto, T., Kurosaki, T., and Tsukada, S. : Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK-Functional significance of Btk-SH2 domain in B cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *Blood*. 94: 2357-2364, 1999.
- 2) Kurosaki, T., and Tsukada, S.: BLNK: Connecting Syk and Btk to Calcium Signals. *Immunity* 12, 1-5, 2000.
- 3) Yamadori, T., Baba, Y., Matsushita, M., Hashimoto, S., Kurosaki, M., Kurosaki, T., Kishimoto, T., and Tsukada, S. : Bruton's tyrosine kinase activity is negatively regulated by Sab, the Btk-SH3 domain-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 6341-6346, 1999.
- 4) Baba, Y., Nonoyama, S., Matsushita M., Yamadori, T., Hashimoto, S., Imai, K., Arai, S., Kunikata, T., Kurimoto M., Kurosaki, T., Ochs, H. D., Yata, J-I., Kishimoto, T., and Tsukada, S. : Involvement of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein in B-Cell Cytoplasmic Tyrosine Kinase Pathway. *Blood*. 93: 2003-2012, 1999.
- 5) Yang W-Y, and Desiderio, S.: BAP-135, a target for Bruton's tyrosine kinase in response to B cell receptor engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 604-609, 1997.

Analysis of B cell receptor-induced early transcriptional genes regulated by Btk

Yoshihiro Baba, Satoshi Tsukada

Department of Molecular Medicine, Osaka University Medical School

Btk (Bruton's tyrosine kinase) is a crucial tyrosine kinase for the normal B cell development and its deficiency leads to human X-linked agammaglobulinemia (XLA). To clarify the Btk function in B cell development, this study attempted to identify B cell receptor-induced early transcriptional genes which are regulated by Btk.

軽症型 RAG1 欠損症患者の病態解析

久間木 悟 (東北大学加齢医学研究所発達病態)
笹原 洋二 (東北大学加齢医学研究所発達病態)
林 露子 (東北大学加齢医学研究所発達病態)
大橋 芳之 (東北大学加齢医学研究所発達病態)
峯岸 正好 (東北大学加齢医学研究所発達病態)
土屋 滋 (東北大学加齢医学研究所発達病態)

我々は軽症型 RAG1 欠損症の 5 才女児例を経験し、その病態を解析した。患児は生後 2 ヶ月頃から母親由来 T 細胞による移植片対宿主病 (GVHD) を発症したが、これはステロイド剤投与にて軽快した。しかし、その後も皮膚化膿症、肺炎に反復罹患している。また患児末梢血中には自己の T 細胞、B 細胞がほとんど存在しなかったため、RAG 欠損症を疑い、RAG1 遺伝子の検索を行なったところ、それぞれの allele に変異が見いだされた。さらに組換え基質を用いた recombination assay ではこれらの変異 RAG1 遺伝子に recombination 活性は認められなかった。しかし、経過中に抗好中球抗体によると考えられた一過性の好中球減少がみられ、さらに三種混合予防接種後ジフテリア特異抗体も検出されている。正常の状態でもごく僅かではあるが、末梢血中に造血幹細胞が存在することが知られていることから、母親由来の造血幹細胞が患児に生着し、ごく小数だが母親由来の B 細胞が抗体産生を行ない、その結果、本症例が重症化せずに経過している可能性が考えられた。

【はじめに】

T 細胞や B 細胞はきわめて多彩な抗原に対応するため、T 細胞受容体や免疫グロブリンの組換え機構を有している。リンパ球に特異的な遺伝子である RAG1 および RAG2 はこの V (D) J recombination に必須の因子である。RAG1 または RAG2 の recombination 活性が無くなると T 細胞、B 細胞とともに欠損した重症複合免疫不全症を発症し¹⁾、部分的に活性がある場合には Omenn 症候群が発症する²⁾。以上の疾患群はいずれも造血幹細胞移植が行われなければ、総じて生後 1 年以内に死亡する³⁾。これまで RAG1 または RAG2 欠損症患者で造血幹細胞移植を施行されずに長期生存したという報告は見あたらない。そこで、我々が外来で経過観察している軽症型 RAG1 欠損症の 5 才女児例について変異 RAG1 の機能解析を行ない、さらに病態についても検討を行なった。

【症例】

家族歴は特記すべきことなし。生下時には特に異常を認めなかったが、生後 2 ヶ月頃より全身性発疹とリンパ節腫脹が出現。生後 3 ヶ月で中耳炎に罹患し、その後も皮疹が憎悪傾向を示したため、生後 4 ヶ月で精査目的に当科紹介、入院となった。初診時検査成績では好酸球の増多を認め、LDH が高値を示し、血清 IgM および IgE も高値を示していた (表 1)。表面マーカー解析では骨髄において B 細胞の maturation arrest を認め、末梢血には活性化 T 細胞および NK 細胞が存在したが、B 細胞はほとんど認められなかった (表 1)。本人および家族の HLA 検索を行なったところ患児の末梢血 T 細胞は母親由来であった。B 細胞はほとんど存在しなかったため、EB virus で transform した LCL を用いて解析を行なったが、本人由来のものであった。皮膚病変および全身の発疹とリンパ節腫脹はステロイド剤の投与で軽快したが、その後も MRSA によ

表 1. 初発時検査成績

WBC	21900/μl (Eosinophils 9308/μl)	
IgG	146 mg/dl	
IgA	54 mg/dl	
IgM	347 mg/dl	
IgE	611 U/ml	
Phenotype	BMMNC(%)	PBL(%)
CD3	9.4	79.6
CD4	13.7	65.6
CD8	5.1	17.9
CD19	61.1	0.3
CD20	14.7	0.5
CD21	0	0
CD34	72.4	0.4
CD56	7.3	13.4
HLA-DR	81.2	81.3

BMMC, bone marrow mononuclear cells; PBL, peripheral blood lymphocytes

る皮膚化膿症に反復罹患している。また、一過性の血小板減少や好中球減少がみられたが、これらはいずれも自然に回復している。最近ではペニシリン耐性肺炎双球菌による肺炎を繰り返している。

【方法】

(1) 遺伝子解析：EBウイルスを用いて樹立した患児由来のB細胞株からDNAを抽出しgenomic PCRを行ない、増幅されたfragmentをTベクターに組み込みDNAオートシーケンサーにて解析した。変異点確認後は家族および正常コントロールについて同部を含むgenomic PCR産物のダイレクトシーケンスを行なうか、制限酵素切断にて変異点を検出する簡便法を用いた。

(2) 蛋白解析およびrecombination assay：患児から単離したRAG1遺伝子を発現ベクターpCDM8に組み込んで293T細胞に遺伝子導入し、蛋白発現をウエスタンブロット法にて確認した。また変異RAG1遺伝子をマウスRAG2遺伝子、組換え基質であるpJH200と共に293T細胞に遺伝子導入し、48時間培養を行ない、組換え基質に再構成を起こさせた後、DNAを回収した。その結果得られた再構成産物を特異的なプライマーを用いたPCR法で確認した⁴⁾。

(3) 抗好中球抗体の検出：患者およびコントロー

ル血清を10分の1に希釈し、健常人から単離した好中球とインキュベートし、好中球と特異的に結合したヒトIgGをFITCでラベルした抗ヒトIgG抗体 (Fab' fragments) を用いフローサイトメーターにて検出した⁵⁾。

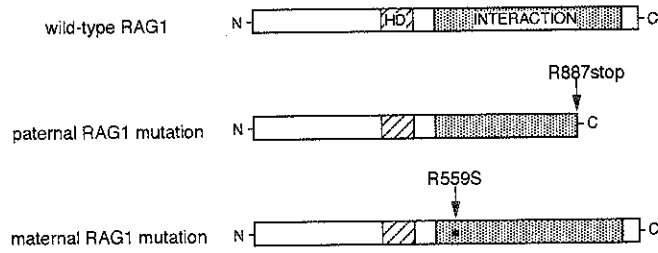
【結果】

患児末梢血中には母親由来のT細胞が存在したが、自己のT細胞およびB細胞を欠いていたため、RAG欠損症を疑い、RAG1遺伝子の検索を行なったところ、それぞれのalleleに変異が見つかった (図1A)。2801番目のCがTに変異した結果、887番目のアルギニンがstop codonに置換されたalleleは、既に報告のあるRAG1欠損症患者のものと同じであった¹⁾。一方、1789番目のGがTに変異したものではRAG2とのinteraction domainにある559番目のアルギニンがセリン置き換わっていた。Polymorphismを否定するために正常人から得た100個のalleleについて遺伝子検索を行なったが、患児と同じ変異は見つからなかった。家族についてもRAG1の遺伝子解析をおこなったところ、887番目の変異は父親由来であり、559番目の変異は母親由来であることがわかった。

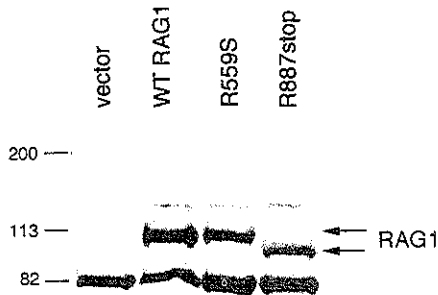
患児から単離した変異RAG1遺伝子を発現ベクターpCDM8 vectorに組み込んで293T細胞に発現させたところ、アミノ酸配列から予想されたサイズのパンドが検出された (図1B)。さらに変異RAG1遺伝子をRAG2遺伝子、組換え基質であるpJH200と共に293T細胞に遺伝子導入し、recombination assayを行なったところ、野性型のRAG1を用いたときにのみPCR法で遺伝子組換え産物の確認ができたが、患児から単離した変異RAG1遺伝子を用いた場合にはいずれのalleleでも組換え基質に再構成は認められなかった (図1C)。

患児の末梢血単核球細胞の様々な刺激に対する反応性については、PHA、PWMなどのマイトージェンに対する反応性は低下していたが、IL-2に対する反応性は逆に亢進していた。また、経過中一過性の好中球減少が認められたので、その時期の患児血清を用いて抗好中球抗体の有無を検討したところ、患児血清中に抗好中球抗体が検出された

図1A



B



C

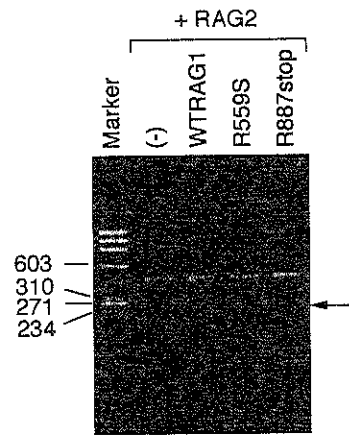


図1. 患児変異RAG1遺伝子とその機能

(A) 変異RAG1遺伝子の模式図 (B) 変異RAG1蛋白の発現を確認するために、変異RAG1遺伝子をpCDM8ベクターに組み込み、293T細胞に遺伝子導入し、ウエスタンブロットを行なった。(C) 変異RAG1遺伝子、マウスRAG2遺伝子、pJH200を293T細胞に遺伝子導入し、48時間培養を行なった後、DNAを回収した。その結果得られたpJH200の遺伝子再構成産物をPCR法にて検出した(矢印)。

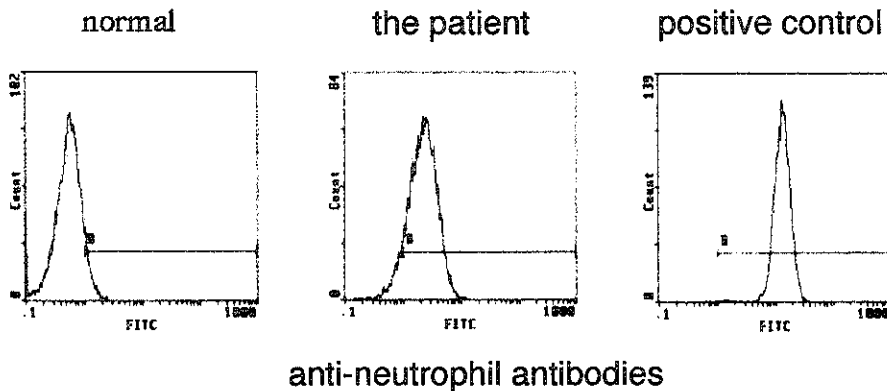


図2. 抗好中球抗体の検出

健常人、本症例および自己免疫性好中球減少症患者(positive control)の血清を、健常人から単離した好中球とインキュベートし、好中球に結合したヒトIgGをフローサイトメーターにて検出した。

(図2)。

【考案結論】

本症例から単離した変異RAG1遺伝子を発現ベクターに組み込んで発現させるとアミノ酸配列が

ら予想されたサイズのバンドが検出された。しかし、これらの変異RAG1遺伝子はpJH200を組換え基質として用いた場合にはrecombination活性が全く認められなかった。このことから、患児自体の変異RAG1遺伝子には抗原受容体の遺伝子再構成

能力が無いことが予想された。しかし、経過中に一過性の血小板減少や好中球減少がみられ、その時期の患児血清中に抗好中球抗体が検出された。このことから、患児の体内で母親由来のT細胞存在下、患児の好中球に対する抗体産生が行なわれ、自己免疫機序により一過性の好中球減少がみられた可能性が疑われた。さらに、患児血清中には三種混合予防接種後、ジフテリア特異抗体も検出されている。正常の状態でもごく僅かではあるが、末梢血中に造血系細胞を完全に再構成できる造血幹細胞が存在することが知られている。免疫不全症患者の末梢血中に母親由来のT細胞が存在することはしばしば経験されるが、これまで母親由来のB細胞も生着していたという報告は見あたらない。本症例では、母親由来の造血幹細胞が生着し、T細胞のみならず、ごく小数はあるが母親由来のB細胞が抗体産生を行なっていることが考えられ、その結果、本症例が重症化せずに経過している可能性が考えられた。

【参考文献】

- 1) Schwarz K, Gauss GH, Ludwig L, et al. RAG mutations in human B cell-negative SCID. *Science* 274: 97-99, 1996.
- 2) Villa A, Santagata S, Bozzi F, et al. Partial V(D)J recombination activity leads to Omenn syndrome. *Cell* 93: 885-96, 1998.
- 3) Stephan JL, Vlekova V, LeDeist F, et al. Severe combined immunodeficiency: a retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 patients. *J Pediatr* 123: 564-72, 1993.
- 4) Roman CA, Baltimore D. Genetic evidence that the RAG1 protein directly participates in V(D)J recombination through substrate recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2333-8, 1996.
- 5) Hartman KR, LaRussa VF, Rothwell SW, et al. Antibodies to myeloid precursor cells in autoimmune neutropenia. *Blood* 84:625-631, 1994.

Analysis of a patient with a mild phenotype of RAG1 deficiency

Satoru Kumaki, Yoji Sasahara, Tsuyuko Hayashi, Yoshiyuki Ohashi, Masayoshi Minegishi, Shigeru Tsuchiya

Department of Pediatric Oncology, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

We experienced a 5 year-old Japanese girl with a mild phenotype of RAG1 deficiency. The patient was referred to our hospital with a 2-month history of GVHD due to maternal T cell-engraftment and intravenous corticosteroid therapy was effective. Since then, she has had recurrent episodes of skin and sino-pulmonary infections. Because the patient initially lacked her own T and B cells in her periphery, we sequenced RAG1 genes and identified a mutation in each allele. Both of the RAG1 mutations exhibited a marked reduction of V(D)J recombination activity assessed by in vitro recombination assay. However, our patient experienced a transient neutropenia with anti-neutrophil antibodies. In addition, specific antibodies against diphtheria toxin were detected after vaccination. Peripheral blood is known to contain hematopoietic stem cells capable of complete hematopoietic repopulation although numbers of these cells are few in the normal steady state. Therefore, it is possible that maternal peripheral blood stem cells are engrafted and they may contribute to the mild phenotype of the patient.

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

谷内江 昭 宏 (金沢大学医学部保健学科)
笠原 善 仁 (金沢大学医学部小児科)
東馬 智 子 (金沢大学医学部小児科)
武井 健 吉 (金沢大学医学部小児科)
和田 泰 三 (金沢大学医学部小児科)
小泉 晶 一 (金沢大学医学部小児科)

Omenn 症候群は重症湿疹，リンパ節腫大，好酸球増多および IgE 高値などの特徴的な臨床像を伴う複合型免疫不全症であり，RAG1/RAG2 遺伝子異常がその原因であることが明らかにされている．またその特徴的な臨床像の背景には，TCR V β repertoire の偏倚と Th2 タイプのサイトカイン異常産生を伴う T 細胞分化異常が認められることが知られている．本研究では Omenn 症候群類似の重症湿疹，好酸球増多を伴う T 細胞機能異常症について，RAG1/RAG2 遺伝子異常の有無を検査すると共に，これらの症例における T 細胞 TCR V β repertoire 分布とサイトカイン産生パターンを解析した．解析した 7 例の内，同朋例 2 例にのみ RAG1/RAG2 遺伝子異常を認めたが，他の 5 例では遺伝子多型と考えられる変異以外は認められなかった．これらの 5 例では，湿疹病変，好酸球増多を認めたが，いずれも IgE は極めて低値を示し典型的な Omenn 症候群とは異っていた．しかし，検索しえた症例では TCR V β repertoire の著明な偏倚と Th2 優位のサイトカイン産生パターンが観察され，これらの異常は RAG1/RAG2 遺伝子異常を含む TCR recombination 機構の障害を基盤とした T 細胞機能異常疾患において共通に認められる所見と考えられた．

【はじめに】

Omenn 症候群は湿疹，リンパ節腫大，好酸球増多，IgE 高値を特徴とする重症複合型免疫不全症 (SCID) であり，最近その発症の背景に RAG1/RAG2 遺伝子異常が存在することが明らかにされた．RAG1/RAG2 酵素活性が全く欠如した場合には B 欠損 SCID となることが知られているが，Omenn 症候群の多くでは部分的な RAG1/RAG2 酵素活性が認められる．本疾患に特徴的に認められる T 細胞分化異常，すなわち TCR V β repertoire の著明な偏倚を伴う oligoclonal な T 細胞増加や Th2 サイトカイン産生への偏りは，このような残存する酵素活性による制限された遺伝子再構成を反映していると考えられる．一方，TCR/Ig 遺伝子再構成に関する酵素群は RAG1/RAG2 以外にも複数知られており，臨床的に Omenn 症候群と診断されている症

例や，Omenn 症候群と極めて類似した臨床症状や検査所見を示す症例の中に，RAG1/RAG2 遺伝子異常を伴わない場合が含まれる可能性がある．さらに，RAG1/RAG2 酵素活性低下の程度により，SCID あるいは Omenn 症候群より軽度の症状を示す症例が存在する可能性も考えられる．本年度は，Omenn 症候群ならびに類似症例に関して，RAG1/RAG2 遺伝子解析を行うと共にその異常の有無と臨床像，免疫学的検査所見を比較検討した．

【対象と方法】

Omenn 症候群ならびに類似疾患 7 症例を解析の対象とした．これらの症例はいずれも末梢血好酸球増多，重症湿疹様皮膚病変，リンパ節腫大，T 細胞機能異常を伴い，臨床的には Omenn 症候群あるいはこれと極めて類似した病態と考えられた．ま

た、対象症例の内 4 例はすでに死亡した症例あるいは骨髄移植後の症例であり、末梢血T細胞機能の詳細な検討はできなかった。RAG1/RAG2 遺伝子解析は末梢血リンパ球、あるいはリンパ節パラフィン包埋切片を材料として PCR を施行、PCR 産物を直接シーケンスした。培養上清中サイトカイン産生は ELISA 法により、細胞内サイトカイン産生および TCR Vβ repertoire 分布はフローサイトメトリー法により解析した。

【結果】

全 7 症例の内、同朋例 2 症例にのみ RAG1 遺伝子の異常を認めた(表 1)。遺伝子変異は C1298T および T2766G の複合ヘテロ接合であり、前者はすでに欧州の症例 2 例で報告されているミスセンス変異であり homeodomain 内の R396C アミノ酸置

換を伴う。後者は新たなミスセンス変異であるが、RAG1 active core 内に L885R アミノ酸置換を伴い酵素活性低下をもたらすことが予想された。その他の 1 症例で RAG1 に A2571G の homozygous 変異を、別の症例には同部位の heterozygous な変異を確認した。しかし、正常対照の検討では約半数に同一の変異が観察されたことより遺伝子多型と考えられた。さらに別の症例では R249H のアミノ酸置換を伴う遺伝子変異が見いだされたが、これはすでに遺伝子多型として報告されている(図 1)。他の RAG1 遺伝子異常を認めた症例はなく、全ての症例で RAG2 遺伝子配列は正常であった。したがって、今回解析した 7 症例の内、RAG1/RAG2 酵素活性の低下を伴う遺伝子異常を認めたのは自験例である同朋 2 例のみであった。

すべての症例で血清 IgG は低値を示し、一例を除き末梢血中 B 細胞数は著明に減少していた。末梢血好酸球は全例で増加していた。IgE は RAG1 遺伝子異常を確認した同朋 2 例では著明に増加していたが、他の症例では全て著減していた(表 2, 3)。リンパ節は検索し得た症例すべてでリンパ球が著

表 1

Omenn 症候群ならびに類似患者における RAG1/RAG2 遺伝子異常

症 例	提供施設	臨床診断	検索材料	RAG 遺伝子異常
1	金沢大学	兄: Omenn	LN 固定標本	RAG1; C1298T, T2766G
2	金沢大学	弟: Omenn	LN 固定標本	RAG1; C1298T, T2766G
3	京都府立医大	Omenn ?	LN 固定標本	変異なし
4	大阪府立母子	Omenn 様	末梢血, LCL	RAG1; A2571G homo
5	愛媛医科大	Omenn 様	末梢血, LCL	RAG1; A2571G, G858A
6	信州大学	Omenn 様	末梢血, LCL	変異なし
7	富山医大	Omenn 様	末梢血, LN, LCL	変異なし

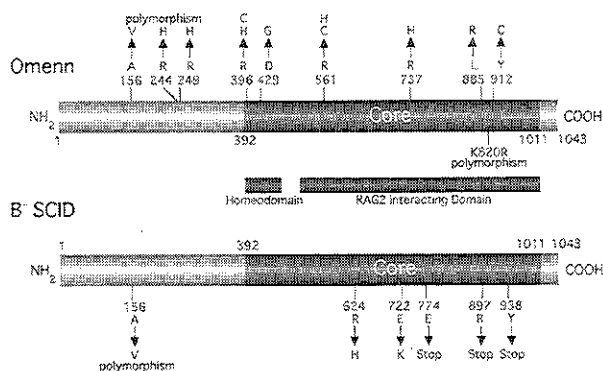


図 1: Omenn 症候群ならびに B-SCID 症例における RAG 遺伝子異常

症例 1, 2 では homeodomain 内に R396C のアミノ酸置換を伴うミスセンス変異を、active core 内に L885R のアミノ酸置換を伴う変異を認め、複合ヘテロ接合であることが示された。症例 4 は K820R のアミノ酸置換を伴う homozygous な変異が観察された。症例 5 では同部位の heterozygous な変異と、R249H のすでに報告されている polymorphism が認められた。

表 2

Omenn 類似症例の臨床所見

	年齢	WBC	Lym	Eo	紅斑	LN	肝脾	IgE
症例 1	2 m	29,700	8,910	6,240	+	+	+	>2,000
症例 2	1 d	14,900	2,980	3,730	+	+	+	2,070
症例 3	10 d	11,000	2,750	2,530	+	-	-	1
症例 4	5 m	9,400	380	9,020	+	+	+	<0.3
症例 5	1 m	33,800	14,870	1,350	+	+	+	0
症例 6	5 m	17,570	2,294	11,244	+	+	+	1
症例 7	4 m	51,900			+	+	-	1

表 3

Omenn 類似症例の末梢血リンパ球亜群分布

	年齢	CD3	CD4	CD8	CD16	CD20	HLA-DR
症例 1	2 m	68.7	35.2	41.3	20.1	0.3	28
	5 m	19.6	9.9	8.8		0.9	
症例 2	1 d	54.0	53.9	18.2	15.2	0.5	53
	10 d	65.4	61.5	8.6		0.5	
症例 3	2 m	60.2	54.1	12.3	N.D.	1.0	53
症例 4	5 m	68.3	64.1	5.8	7.0	0.6	68
症例 5	1 m	75.1	57.4	19.5	7.2	20.1	25
症例 6	5 m	39.1	39.8	0.0	43.1	0.0	38
症例 7	4 m	93.7	20.3	67.0	3.0	0.7	72.8

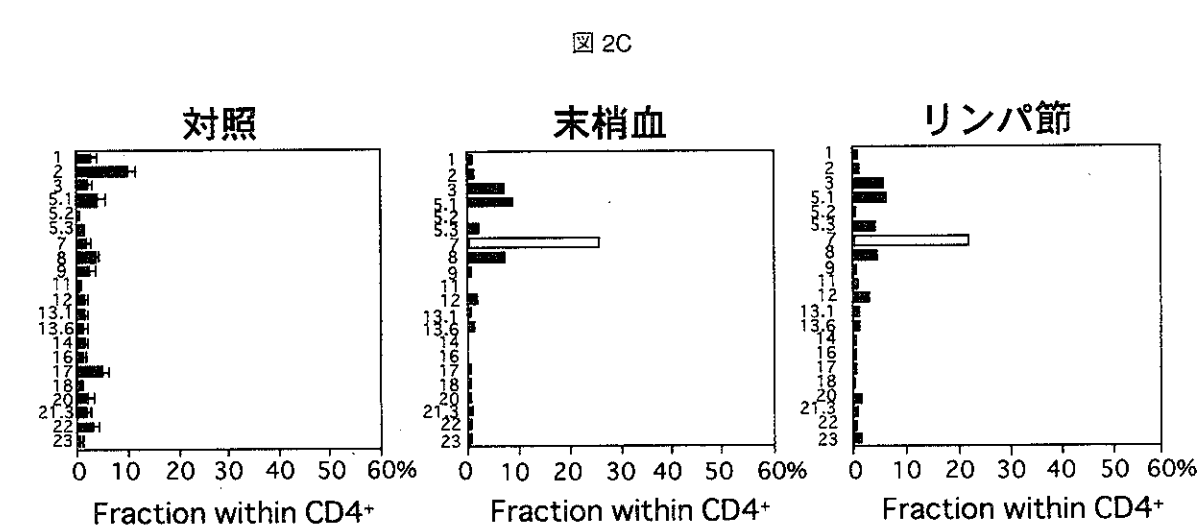
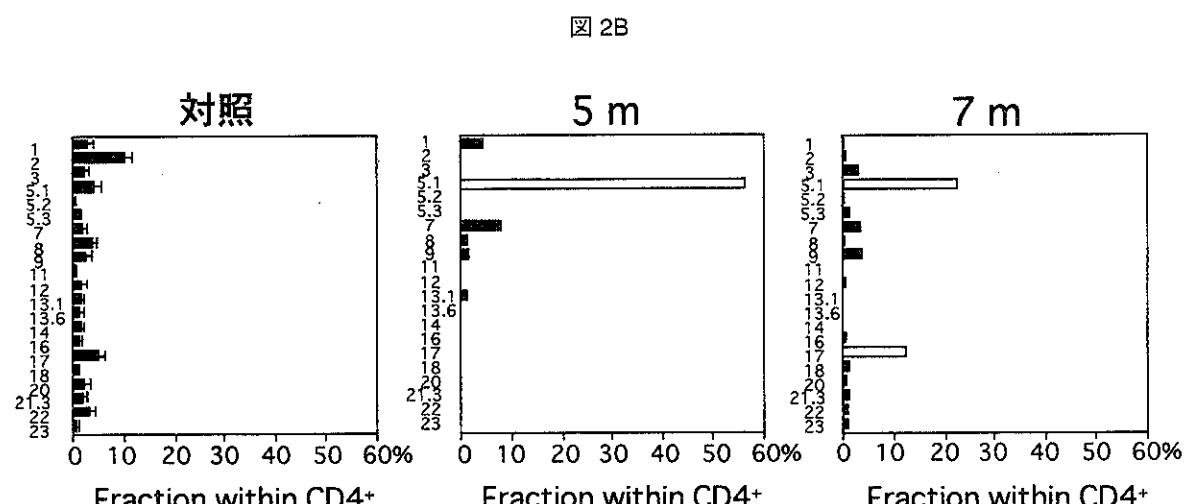
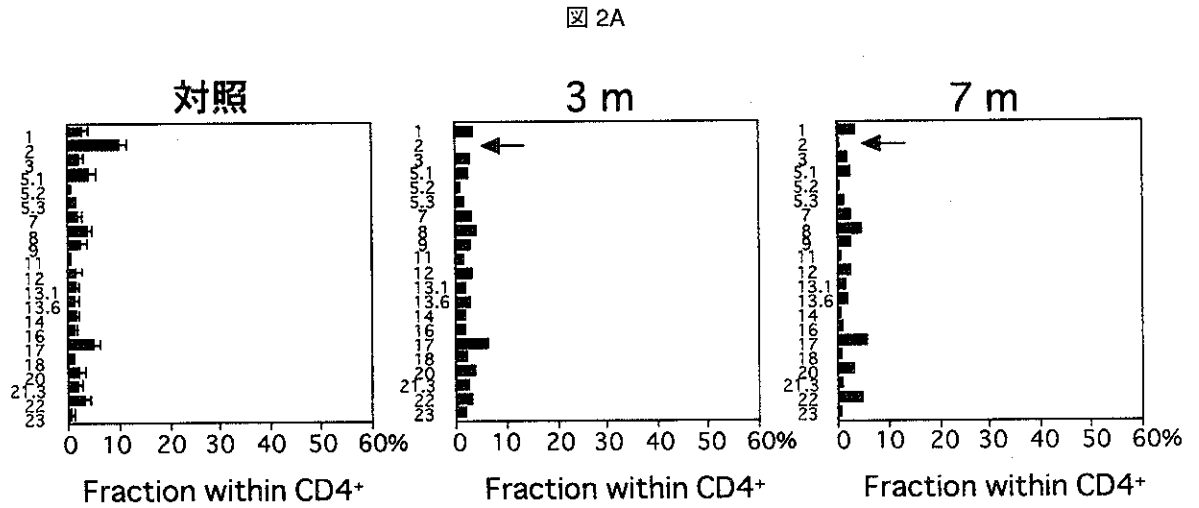


図 2 : TCR Vb repertoire 分布 ; A : 症例 5、B : 症例 6、C : 症例 7
 末梢血リンパ球、あるいはリンパ節細胞浮遊液を対象に各TCR Vb repertoire 抗原に対する単クローン抗体を用いて染色、フローサイトメトリーにて解析した。対照のデータは正常小児 5 例の平均±標準偏差を示す。矢印あるいは白抜き円柱は、異常に減少ないし増加している repertoire を示す。

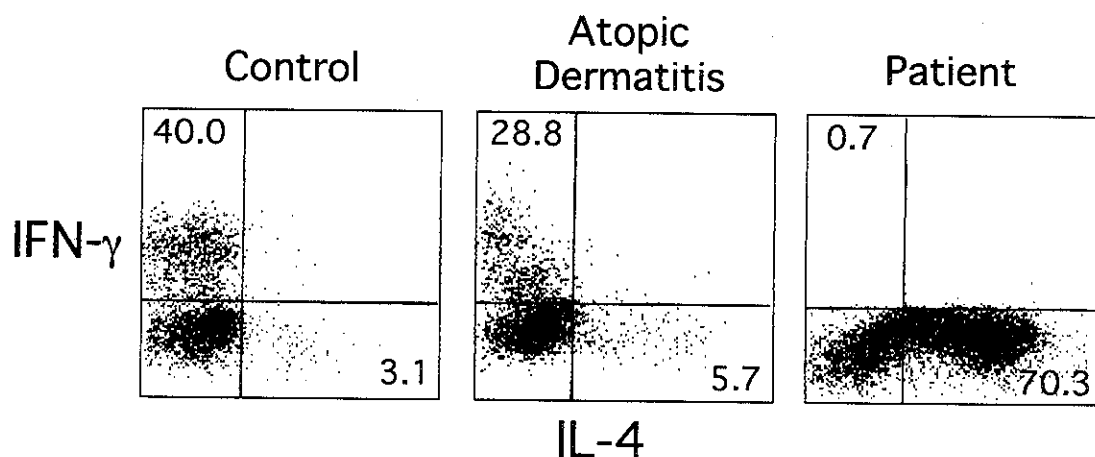


図3：末梢血サイトカイン産生細胞の解析

症例4の末梢血リンパ球をPMAならびにCa ionophore添加にて培養、細胞質内のIFN- γ ならびにIL-4をフローサイトメトリーにより検討した。対照は正常小児ならびに好酸球増多、IgE高値を示すアトピー性皮膚炎患児である。サイトグラム内の数字はリンパ球内の比率を示す。

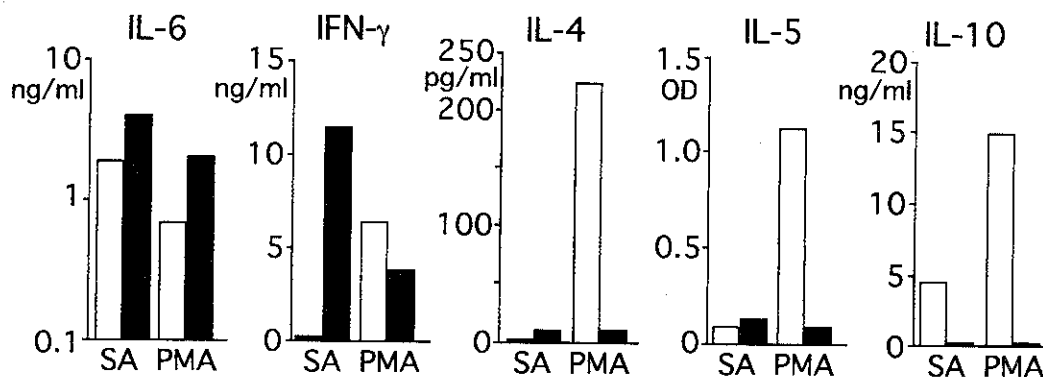


図4：末梢血リンパ球培養上清中サイトカイン産生

症例7の末梢血リンパ球をsuper Ag (SA; SEA+TSST-1+SB)あるいはPMA + Ca ionophore (PMA) 刺激により培養24時間後の培養上清中の各サイトカイン濃度をELISA法により定量した。白抜き円柱は患者を、黒塗り円柱は正常対照を示す。

減、瀘胞を主体とした基本構築が見あたらなかった。3症例において末梢血T細胞TCR V β repertoireの解析が可能であった。症例5では特定の repertoireの増多は確認されなかったが、生後3カ月時ならびに7カ月時のいずれにおいても、CD4陽性T細胞中通常最も多いとされるTCR V β 2の著減が観察された(図2A)。症例6では、生後5カ月時にはCD4陽性細胞中TCR V β 5.1のみの著増が観察されたが、7カ月時にはTCR V β 5.1はやや減少し、TCR V β 17の増加が認められた(図2B)。症例7では末梢血リンパ球ならびにリンパ節細胞浮遊液を同時に解析し得た。いずれにおいても、TCR V β 7

の増多を特徴としたCD4陽性T細胞におけるTCR V β repertoire 偏倚が認められ、末梢血における観察がリンパ節における変化を反映していることが示された(図2C)。以上、検索し得たいずれの症例においても、特定の repertoireの異常増加と多くの repertoireの減少ないし消失を伴う著しい偏倚が観察された。この内1例は母体血由来のT細胞によるGVHDであった。末梢血リンパ球が培養可能であった3症例において、培養上清中、あるいは細胞質内のサイトカイン産生を検討した。症例4においてはIFN- γ 産生細胞は全く観察されず、IL-4産生細胞が顕著に認められた(図3)。症例5でも

同様のサイトカイン産生パターンが観察された。症例 7 では培養上清中のサイトカイン産生が検討されたが、ブドウ球菌スーパー抗原刺激による IFN- γ 産生は患児では全く観察されなかった。一方、PMA と Ca ionophore による刺激では患児リンパ球により著明な IL-4, IL-5 産生が認められた。IL-10 産生は正常対象においてより強く認められた (図 4)。

【考察・結論】

臨床的には Omenn 症候群と診断された症例、ならびに極めて類似した臨床症状、検査所見を示す症例で *RAG1/RAG2* 遺伝子変異を認めない例が

認められ、従来 Omenn 症候群に特徴とされた病態が *RAG1/RAG2* の機能異常以外の要因で惹起されることが明かとなった。また Omenn 症候群で特徴的に観察されると報告されていた TCR V β repertoire の偏倚や、Th2 優位のサイトカイン産生パターンが *RAG1/RAG2* 変異を伴わない症例でも同様に観察された事実は、このような T 細胞分化異常が TCR recombination 機構の障害に基づく共通の異常であることを示唆している。今後、さらに多数の症例を検討し、Omenn 類似疾患の発症機構を明らかにすると共に、軽度の免疫不全症候群の中に *RAG1/RAG2* の部分的な酵素活性低下が含まれる可能性について検討する必要があると考えられた。

RAG gene mutation analysis and characterization of abnormalities in TCR V β repertoire distributions and cytokine productions in patients with Omenn syndrome and related illnesses

Akihiro Yachie¹⁾, Yoshihito Kasahara²⁾, Tomoko Toma²⁾, Kenkichi Takei²⁾, Taizo Wada²⁾, Shoichi Koizumi²⁾

Department of Laboratory Sciences, School of Health Sciences¹⁾, Faculty of Medicine and Department of Pediatrics, School of Medicine²⁾, Faculty of Medicine, Kanazawa University

Omenn syndrome is a form of combined immune deficiency, characterized by severe eczema, lymphadenopathy, eosinophilia and elevated serum IgE. It has been shown recently that the disease is caused by mutations in *RAG1/RAG2* genes. In addition, the characteristic clinical manifestations are known to result from abnormal T cell differentiation with deviated TCR V β repertoire distributions and Th2-polarized cytokine production. In this study, *RAG1/RAG2* gene mutations were analyzed in Omenn-related illnesses with severe eczema, eosinophilia and T cell dysfunction. Furthermore, TCR V β distributions and cytokine productions in these cases were examined at the same time. Among 7 cases analyzed, *RAG1* mutations were detected only in 2 sibling cases. No significant mutation except for polymorphisms was detected in 5 other cases. These cases were different from typical Omenn syndrome in that all of them exhibited extremely low serum Ig concentration, although eczematous skin lesions and peripheral eosinophilia were typically present in each case. However, prominent deviation of TCR V β repertoires and Th2 dominant cytokine production were observed in all cases examined, suggesting that these findings are the result of the disturbed T cell differentiation based on abnormal TCR recombination machineries, including *RAG1/RAG2* gene mutation.

B⁻SCIDにみられたMaternal T細胞のクロナリティーの解析

小林 法元 (信州大学小児科)
上松 一永 (信州大学小児科)
伯耆原 祥 (信州大学小児科)
南雲 治夫 (信州大学小児科)
小宮山 淳 (信州大学小児科)
谷内江 明宏 (金沢大学保健学科)

重症複合免疫不全症 (Severe combined immunodeficiency SCID) では経胎盤的に混入した母親由来のT細胞を排除できずに、そのT細胞によってOmenn症候群様の症状を呈する事が知られている。Omenn症候群様の症状を呈したSCID児に認められた、著明に増殖し活性化したT細胞についてTCRのクロナリティー解析を行った。異性間FISH法とHLAタイピングでは、CD4陽性T細胞は母親由来、NK細胞は本人由来だった。母親由来のT細胞は、TCR BVに強い偏りがありCDR3サイズ解析では検出し得たすべてのTCRBVで1峰性を示した。CDR3 cDNAシーケンスでは、TCRV β 5.3において単一のクローンしか認めなかった。本例は患児と母親のHLAが完全に一致しており、母親由来のT細胞はminor histocompatibility antigen (minor HA) の不一致によるGVHD反応で増殖したと考えられた。

【はじめに】

SCIDにおいて、重症湿疹、リンパ節腫脹、肝脾腫、好酸球増多、高IgE血症を呈するOmenn症候群と呼ばれていた一連の疾患の一部に、経胎盤的に混入した母親からのT細胞の増殖を認めることが知られている。¹⁾ HLAが母子間で異なったSCIDでのMaternal T細胞はoligoclonatyであることが報告されている。²⁾ HLAが完全一致したMaternal T細胞の著明な増殖を伴ったB⁻SCIDでのTCRのクロナリティーを解析したので報告する。

【対象と方法】

症例；5カ月の男児。家族歴として、血族結婚(両親がはとこ)がある。生後3カ月までは異常を認めなかった。生後3カ月から下痢、4カ月から全身の湿疹を認め中耳炎を繰り返した。当院入院時、好酸球増多(11200/ μ l)、無 γ グロブリン血症(IgG 13 mg/dl, IgA 2 mg/dl, IgM 2 mg/dl, IgD <0.8 mg/dl, IgE 3 IU/l)を認めた。リンパ球数は2230/ μ lだった。患児から末梢血単核球を分離し、それぞれ抗CD3

抗体(UCHT-1)、PHA、抗CD2抗体(T11 2/3)存在下で培養し、4日後にThymidineuptakeによりリンパ球の増殖能を測定したところ、患児のT細胞の増殖はすべての刺激において著明に低下していた。FACSによる表面マーカーの検討では、リンパ球はCD4⁺T細胞とNK細胞でしめられており、CD4⁺T細胞はHLA-DRも強陽性であり活性化していた。CD20⁺細胞は認められなかった。CD3⁺CD8⁺細胞はなく、CD8は一部のNK細胞に発現していると考えられた。異性間FISH法ではCD4陽性T細胞はすべてXX、NK細胞はほとんどがXYだった。好中球機能、NK活性は正常だった。HLAタイピングは、母子で完全一致しており、CD4⁺T細胞も同様であったため、Maternal T細胞の混入を伴ったB細胞欠損SCIDと診断した。Adenosine deaminase活性は正常であり(16.5 U/l:正常5.2~18.6U/l)、RAG遺伝子は、cording regionに異常を認めなかった。生後5カ月から、CD4陽性T細胞が増加し、全身のリンパ節腫脹、肝脾腫を認めた(図1)。リンパ節は、リンパ濾胞を認めずCD4⁺T細胞が著明だった。紡錘形

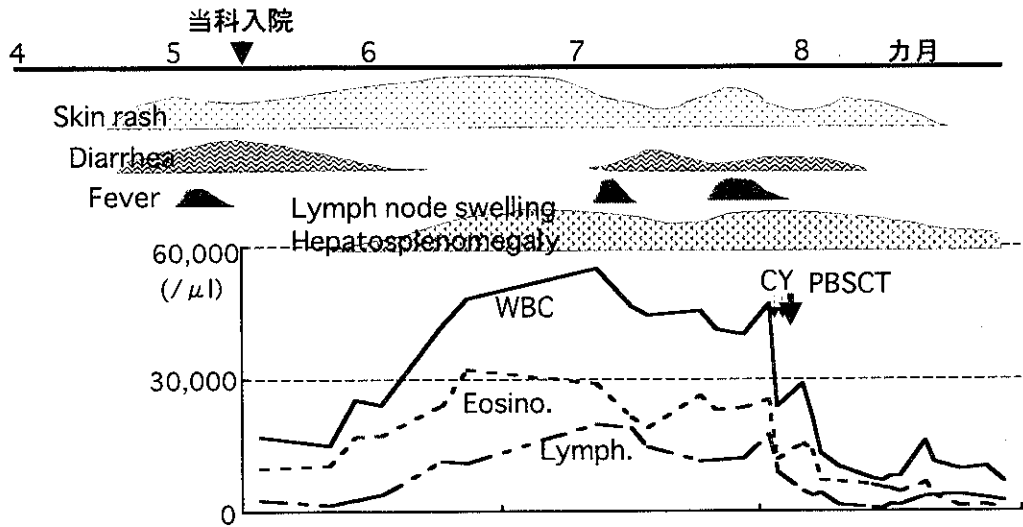


図1 経過

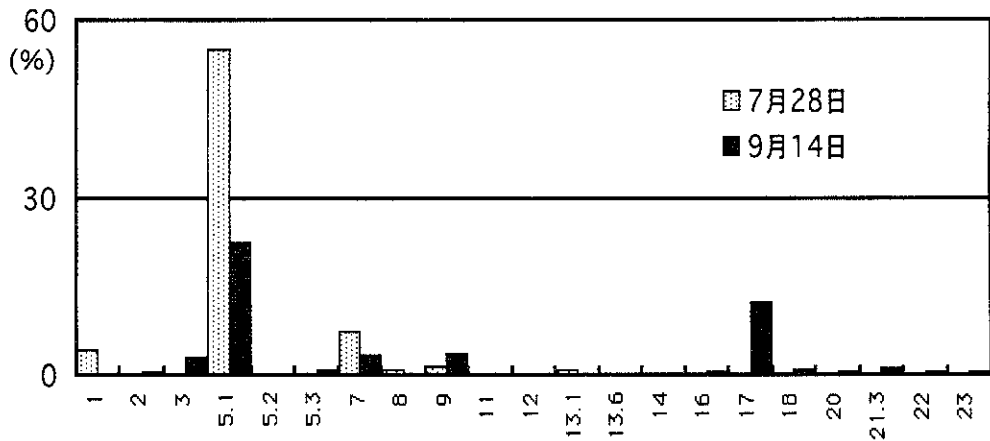


図2 TCR V β repertoire

の樹状細胞がネットワーク様に増殖しており、好酸球の浸潤も目立っていた。CD8⁺細胞、CD20⁺細胞は認められなかった。生後7ヵ月に、母親から前処置を弱めに同種末梢血幹細胞移植を行なった。免疫学的に回復してきているが、慢性GVHDが出現し現在加療中である。

方法；TCRレパトアー解析：入院時と移植前の単核球をCD4と各TCRBV抗体で染色しFACScanをもちいてCD4⁺T細胞のTCRBVレパトアーを解析した。TCR β 鎖のCDR3サイズスペクトラ解析：患児と母親から分離した単核球のmRNAをグアニジン法により抽出し、RT-PCRで合成したcDNAを、各V β の特異的プライマーを用いて増幅し、さらに、3'側の内側に設定した蛍光標識プライマーで

nested PCRを行い、そのPCR産物をABI373DNAシーケンサーにて解析した。TCR β 鎖のCDR3シーケンス：患児の末梢血単核球由来cDNAをもちいてTCRBV5.3 transcriptを増幅しシーケンスによりCDR3領域のアミノ酸配列の多様性を解析した。

【結果】

TCRレパトアー解析(図2)：入院時はリンパ球数1500/ μl であり、移植前は10700/ μl と増加していた。TCRBVレパトアーは入院時と移植前ではともに偏りがありクロナリティーが認められた。入院時はV β 5.1が55.1%だったが、移植前ではV β 5.1が22.5%と減少し、V β 17が12.3%へ増加していた。T細胞の増加により、レパトアーは変化していた。

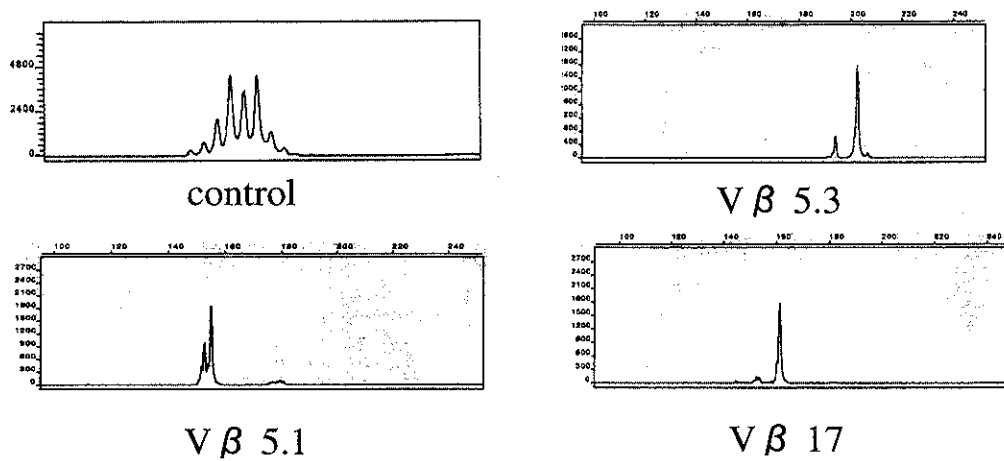


図3 Vβ CDR3 length

表1 TCR Vβ sequences

Clones	Vβ5.3	CDR3	Jβ	Cβ
1	CASS	PGPSGADTQY	FGPGTGTRLTVL	EDL
2	CASS	PGPSGADTQY	FGPGTGTRLTVL	EDL
3	CASS	PGPSGADTQY	FGPGTGTRLTVL	EDL
4	CASS	PGPSGADTQY	FGPGTGTRLTVL	EDL

CDR3 サイズスペクトラ解析 (図3) : 各Vβレパトアで明らかなピークを認めたのは、Vβ5.1, 5.3, 6.1, 12, 13, 15, 16, 17, 21, 22, 23, 24だった。すべてにおいて1峰性のピークを示しており、各レパトアのCDR3領域のサイズは同じであると考えられた。

Vβ5.3 CDR3シーケンス (表1) : CDR3 サイズスペクトラ解析で高いピークを認めた、TCRVβ5.3のCDR3領域のシーケンスを行った。4クローンすべてにおいてアミノ酸配列は同一であった。

以上により、患児に混入したMaternal T細胞は、少数のクローンが増殖していると考えられた。

【考案】

Omenn症候群様の症状を呈したB細胞欠損SCIDに認められたMaternal T細胞について解析した。SCIDの11%でMaternal T細胞が混入しOmenn症候群様の症状をきたすと報告されている。³⁾ 発症の機序は、SCIDでは経胎盤的に混入したT細胞を排除できず、そのT細胞がGVHDを起こすためと考

えられている。⁴⁾ TCRのクロナリティーの解析により、スーパー抗原が関与している可能性も報告されている。²⁾

本例は、HLAが完全一致した希有な例である。また、Maternal T細胞が著明に増殖しており、その点も報告がない。本例のMaternal T細胞はすべてCD4陽性であり、HLA class IIを介する抗原刺激により活性化していると考えられた。TCRのクロナリティーはかなり限られており、何らかの内因性または外因性の抗原ペプチドがHLA class IIにより抗原提示され、その抗原に親和性の高いTCRをもったクローンが反応性に増殖していたと考えられた。増殖の過程でTCRBVが変化していたが、親和性の違いによると思われる。T細胞のoligoclonalityは、GVHDやスーパー抗原の関与が報告されているが、著明な増殖をするためには長期間にわたり抗原刺激を受ける必要が考えられる。感染等によって同一の外因性抗原刺激に長期間暴露される可能性は低く、スーパー抗原の関与は否定的だった。何らかの内因性抗原によりGVHDがおきたと考えられると、移植後のGVHDも説明できる。今後は、他のTCRBVにおけるCDR3のシーケンスを進める予定である。

【参考文献】

1) Knobloch C, et al. Limited T cell receptor diversity of transplacentally acquired maternal T cells in severe combined immunodeficiency. J Immunol. 146:4157-64, 1991.

- 2) Sottini A, et.al. Engrafted maternal T cells in a severe combined immunodeficiency patient express T-cell receptor variable beta segments characterized by a restricted V-D-J junctional diversity. *Blood* 85: 2105-13, 1995.
- 3) Fischer A, et al. European experience of bone-marrow transplantation for severe combined immunodeficiency. *Lancet* 336:850-4, 1990.
- 4) Appleton AL, et al, Differentiation of materno-fetal GVHD from Omenn's syndrome in pre-BMT patients with severe combined immunodeficiency. *Bone Marrow Transplant* 14:157-9, 1994.

Abstract

Engraftment of transplacentally derived maternal T lymphocytes in infants with severe combined Immunodeficiency (SCID) is caused by lack of rejection of the maternal T cells by the recipients immune system. We analyzed the T cell receptor variable beta (TCRBV) of a SCID child with large number of engrafted, mature, activated lymphocytes. TCRBV repertoires were restricted heterogeneity by flow cytometry. The CDR3 length polymorphism analysis showed significant higher degree of restriction within the engrafted T cells. Cloning and sequencing of TCR V β CDR3 from PCR products revealed only one cDNA clone was dominant among the TCR V β 5.3. These results and engrafted of maternal T cells in an HLA-matched setting suggested that his massive T lymphocytosis was similar to those in graft-versus-host disease for mismatch in minor histocompatibility antigen.

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

森 尾 友 宏 (東京医科歯科大学小児科)
今 井 雅 子 (東京医科歯科大学小児科)
今 井 耕 輔 (東京医科歯科大学小児科)
伊 東 祐 之 (東京医科歯科大学小児科)
長 沢 正 之 (東京医科歯科大学小児科)
野々山 恵 章 (東京医科歯科大学小児科)
大 川 洋 二 (東京医科歯科大学小児科)
矢 田 純 一 (東京医科歯科大学小児科)

CD40 分子はB細胞の生存, 増殖, 分化およびクラススイッチにおいて重要な役割を果たしている。CD40 ligand の異常は伴性劣性高IgM 症候群を引き起こす。またCD40 シグナルが異常である免疫不全症も報告されている。一方, Ku は, クラススイッチにおいて不可欠な役割を果たしている分子であるが, 今までCD40 シグナル伝達におけるKu の役割は検討されていなかった。今回の研究では, Ku がCD40の細胞内領域膜直下部と直接会合していること, Ku はヒト末梢血B細胞では細胞内に存在するが, 抗CD40抗体+IL4 刺激によりCD40 より解離し核内移行し, DNA-PK 活性を増加させることを明らかにした。この結果から, Ku がCD40 シグナル伝達において重要な役割をしていることが解明された。

【はじめに】

IgEへのクラススイッチ (Class switch: CS) には2つのシグナル - IL-4レセプター (IL-4R) を介したシグナルとCD40を介したシグナル - が必要である^{1,2)}。その中でもCD40-CD40L systemがCSに重要であるという事実は, CD40L遺伝子異常のあるX連鎖高IgM症候群やCD40, CD40L遺伝子欠損マウスではIgM以下のCSが起きないことから明らかである。しかし, IL-4R/CD40シグナルからsterile transcript が産生され, さらにS領域での二重鎖DNA切断・修復に至るシグナル伝達機構の詳細は不明な点が多い。私たちは, IL-4R/CD40刺激から二重鎖DNA切断・修復に至る機構へのKu 分子の関与を検討した。

Ku分子は全ての体細胞に高発現する分子であり, DNA-PKの構成成分 (酵素活性のない調節成分) で, 二重鎖DNA切断断端に結合するのが主な働きであるとされてきた。しかし近年, Kuはそれ自体に多彩な機能があること, 特に免疫系で重要

な機能を果たすことが明らかになってきた。

一つにはV(D)J 組換えにおける働きである。V(D)J 組換えは二重鎖切断修復機構を用いるため, Ku欠損あるいはDNA-PKに変異のあるマウスでは, T細胞レセプター, B細胞レセプターの再構成が不可能になり, Tリンパ球, Bリンパ球の欠損した重症複合型免疫不全症の表現型をとるようになる。またKuを欠損させたマウスに再構成したB細胞レセプターをtransgeneすると, Kuが欠損した状態でB細胞を分化させることが可能である。このマウスのB細胞をIL-4とanti-CD40で刺激すると, ϵ germline transcriptは産生されるが, switched fragment は検出できないことから, Ku がCSにも関与していることが明らかになった^{3,4,5)}。

もう一つは重要な機能は転写調節活性である。KuはT細胞レセプター β 鎖の転写調節機能があること, CD23の発現調節に関与していることが判明している。またKuは二重鎖DNAの末端に結合することにより, telomereの維持, telomere近傍での転

写活性の抑制にも関与しているとされている。免疫担当細胞に限ったことではないが、Kuは細胞の長期生存の鍵となる分子の一つであると考えられている^{6,7)}。

これらの機能はCD40シグナルによりB細胞に惹起される機能とオーバーラップしている。すなわち、B細胞はCD40シグナルによりCD23の発現を増強し、IL-4RとCD40からの共刺激により長期生存可能である⁸⁾。またCD40シグナルは免疫グロブリンのCSに必須である。これらの事実から、KuはCD40を介するシグナルに重要な役割を果たしていると考えられる。今回、私たちの実験により、IL-4R/CD40刺激から二重鎖DNA切断・修復に至る機構の一端が明らかになったので紹介する⁹⁾。

【対象と方法】

ヒトB細胞は、ヒト末梢血単核球から、CD19ダイナビーズとDetachaビーズを用いて分離した。B細胞株は、BJAB, DND-39, Ramos, Rajiを用いた。抗体は、抗CD40 mAb (G28-5, 626.1), 抗CD27 mAb, 抗ku70 mAb, 抗ku80 mAb, 抗DNA-PKcs mAb, 抗リン酸化チロシン mAb (4G10), 抗CD95 mAb, 抗ku抗血清, 抗CD40 ポリクローナル抗体を用いた。

CD40の細胞質内領域は、pGEX-2TKを用いGST-fusion proteinとして発現させた。また、各種deletion mutantも作製した。免疫沈降、Western blotは常法により行った。細胞質内蛋白および核内蛋白の分離はhypotonic bufferを用いて行った。アミノ酸配列と分子量の決定は、マイクロシーケンシング・ESI-MS解析により行った。

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)は、Kuが二重鎖DNA切断端に結合することを利用し、プローブはプラスミドの一方をblunt end digestionし、もう一方は切断した後Klenow fragmentでradiolabelしたものを用いた。バンドの特異性はKu抗体添加によるsupershiftと、非標識プローブによるKu bandsの消失により確認した。DNA-PK assayは、DNA pull-down assayにて行った。

【結果】

まずCD40の細胞質内領域をGST-fusion proteinの

形で用意し(GST-CD40IC)、BJAB細胞蛋白を用い、anti-phosphotyrosine blotでCD40と共沈する分子を検索したところ、70kDと85kDのリン酸化分子が検出された(図1A)。そこで70kD, 85kD分子を精製しV8 proteaseで切断して、マイクロシーケンシング・ESI-MS解析を行い、アミノ酸配列と分子量を決定したところ、これらの分子はKu70とKu80であることが明らかになった(図1B)。GST-CD40ICは、様々なB細胞株(BJAB, DND-39, Ramos)および新鮮末梢血ヒトB細胞から得た蛋白を用いても、Ku-70, Ku80と結合した(図1C)。KuはDNAに結合するstickyな分子であるが、GST-CD40ICとKuはDNaseI処理後にも会合した。さらに、細胞内でもCD40-Kuの会合が確認できるかどうかを検討するために免疫共沈実験を行ったところ、抗Ku免疫沈降物にはCD40が、抗CD40免疫沈降物にはKuが存在することが明らかになった。一方、CD27, CD30, CD95などはKuと結合しないし、またKuとこれらの分子の共沈は認められなかった(data not shown)。以上のことから、Ku70とKu80がCD40と直接会合していること、また、チロシンリン酸化されることが明らかになった⁹⁾。

そこで、次にKuがCD40のどの部分と会合しているのか検討した。GST fusion proteinの系でCD40の細胞内領域のtruncated formを作製し、どの部分とKuが会合するかを検討したところ、膜近位の14アミノ酸があればKuが結合できることが判明した(図2A,B,C shown)。そのN末端側はlysineが豊富なhighly charged regionである。一方そのC末端側はJAK3の会合するサイトカインレセプター共通box1モチーフをもつ領域である。そこで、N末端側、C末端側を削除した細胞内領域を構築したGST-fusion proteinを用意して、Kuとの会合を検討したところ、Kuとの結合にはその両方が必要であることが判明した(図2D,E,F)。

今までKu70/80は核タンパクであるとされてきた。しかし、上記の実験からKuが細胞質内に存在し、CD40と結合していることが示された。そこで、B細胞株から核抽出物と細胞質抽出物を得て、それぞれにおけるKuの存在をウェスタンブロットで検討したところ、Kuは実際に細胞質内にも

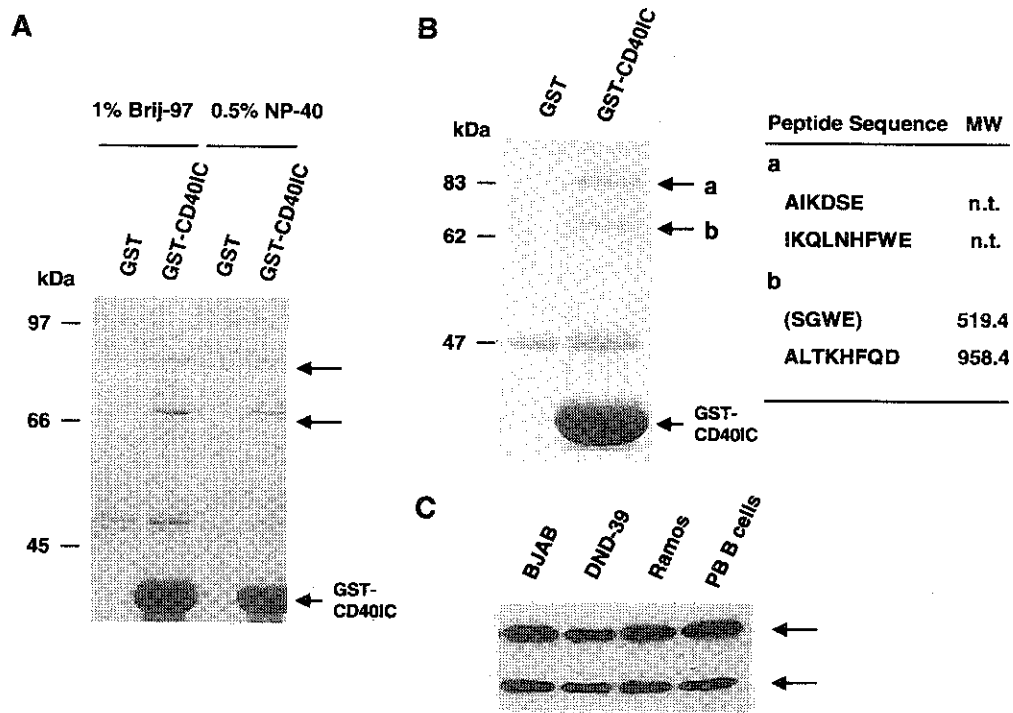


図1 Ku 70/80 はCD40 細胞内領域と結合する。

- A: B cell line BJABを1%Brij-97またはNP-40 cell lysis bufferで溶解し、GST-CD40ICと共沈後、抗リン酸化チロシン抗体でWestern blotを行った。85kDaと70kDaの分子が認められた(矢印)。
 B: GST-CD40ICと共沈してくる85kDa (a) と70kDa (b)の分子をCBB染色後分離し、ペプチドシーケンスを行った。
 C: 各種B細胞株および末梢血B細胞を1%Brij-97 cell lysis bufferで溶解し、GST-CD40ICと共沈後、抗Ku抗体でWestern blotを行った。Ku70とKu80が認められた(矢印)。

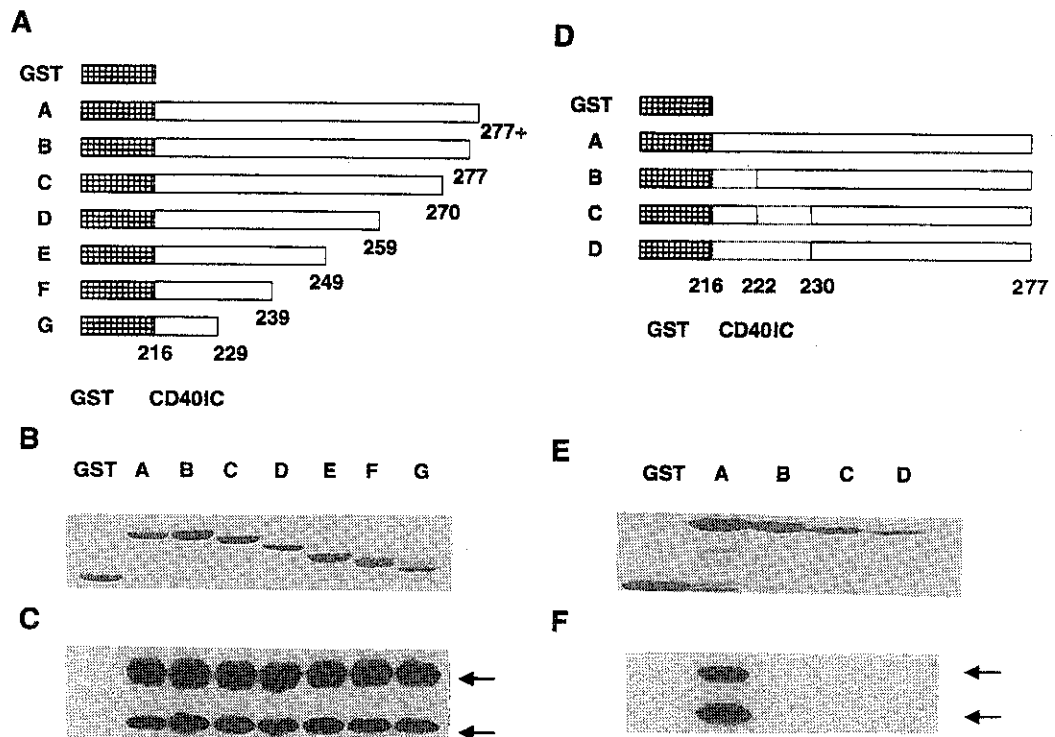


図2 Ku はCD40 細胞内領域の膜近位部と結合する

- A,D: 作製したGST-CD40IC deletion mutants の模式図
 B,E: GST-CD40IC deletion mutants の蛋白発現 (CBB 染色)
 C,F: GST-CD40IC deletion mutants 蛋白とKu 70/80 との結合。Ku70とKu80を矢印で示す。

核内にも存在していた。そこで、さらにCS誘導シグナルを加えた後にKuがどのような分布をするかを検討した。精製した未刺激のヒト末梢血B細胞におけるKuの核内分布及び、IL-4と抗CD40抗体刺激を加えたときのKuの核内における量をEMSAを用いて検討した。その結果未刺激のB細胞、IL-4単独、抗CD40抗体単独で刺激したB細胞では核内にKuの存在が確認されないが、IL-4と抗CD40抗体で72時間培養したB細胞では核内にKuが豊富に検出された(図3)。さらにウェスタンブロットにより、より直接的にKuの分布を調べたところ、Kuは核内で誘導されるのではなく、休止期B細胞では細胞質内に分布しており、IL-4と抗CD40抗体刺激を加えると核内に移行することが判明した。休止期B細胞の核内にはKuの存在が認められなかった。Ku自体は72時間培養により約30%程度の発現量の増加を示したにとどまった。大切なことはIL-4と抗CD40刺激によるKuの核内移行は、実際にCSを起こす末梢血B細胞でしか確認できないという点である。いくつかのB細胞株を検討したが、いずれの細胞でもEBV感染の有無に関わらず、Kuは最初から核内に検出され、IL-4と抗CD40抗体刺激によってもKuの核内での量は若干増加するにとどまった(data not shown)。

そこで、KuがCD40の細胞内領域と会合することと、Kuが細胞質内から核内に移行することはどう関係しているのかについて検討を加えた。ウェスタンブロットによる検討から細胞質内のKuの約30%程度がCD40と会合している計算になり、またCD40のほとんどがKuと会合していることになる。IL-4と抗CD40抗体で刺激するとB細胞の細胞質内でCD40と結合しているKuは、経時的に減少してくる。一方、核内のKuは増加する。このことはIL-4と抗CD40抗体刺激により、CD40の立体構造が変化し、KuがCD40から離れて核に移行する可能性を示唆する。核へのKuの移行にはKu自体の修飾が必要と考えられるが、その点でKuがチロシンリン酸化されるCD40会合分子として同定されたことは興味深い。Kuのチロシンリン酸化、脱リン酸化がKuの局在を決定している可能性がある。

休止期B細胞ではDNA-PK活性が検出されない

という報告がある¹⁰⁾。私たちもヒト休止期B細胞を用いて同様の所見を得た。DNA-PKがp53をリン酸化する酵素活性をDNA pull-down assayにて評価したところ、休止期B細胞の核抽出物中にはDNA-PK活性が殆どなく、IL-4、抗CD40抗体でも誘導できないが、IL-4と抗CD40抗体で刺激した細胞の核抽出物にはDNA-PK活性の誘導を認めた(data not shown)。DNA-PK自体は刺激前後で核内にとどまっていたが、Kuは刺激により細胞質内から、核内に移行する。このことは、Kuの核内移行によりDNA-PK活性が誘導されることを示唆している。

【考案・結論】

CSを誘導するシグナルにより、Kuは核内に誘導され、またDNA-PK活性を誘導した。一般にCSしたfragmentは刺激後7日前後から検出され始めると言われている。しかし私たちの実験ではKuは刺激後24時間の時点から検出する事が可能であった。このことは何を意味しているのであろうか？

一つにはsurvival signalをうけたB細胞が生存できるような状況をいち早く作り出すということがあげられる。実際に末梢血リンパ球は放射線などの二重鎖DNA切断をもたらす侵襲に極めて感受性が高いが、その中でも休止期B細胞はその侵襲により容易に細胞死が誘導される。Kuが核内に不在であることから説明しうる所見である。細胞生存シグナルを受けたB細胞は、外界からの侵襲から身を守るべくKuを核内に用意するといったことは十分に考えられよう。

もう一つにはKuによる転写活性調節があげられる。今までの研究からKuはCD23の発現を調節していることが明らかになっている。興味深いことに、Kuが会合するサイトカインレセプター共通モチーフを欠いたCD40細胞内領域をCD8の細胞外領域と結合させ、キメラレセプターとして発現させると、CD8刺激によるCD23の発現増強効果が消失するとされている。その部位に会合するJAK3はCD23の発現調節に関与しないので、Kuがその発現調節の役をになっている可能性がある。

最も大切なことはしかし、KuがCSを誘導するようなシグナルを受けてはじめて、核内に移行す

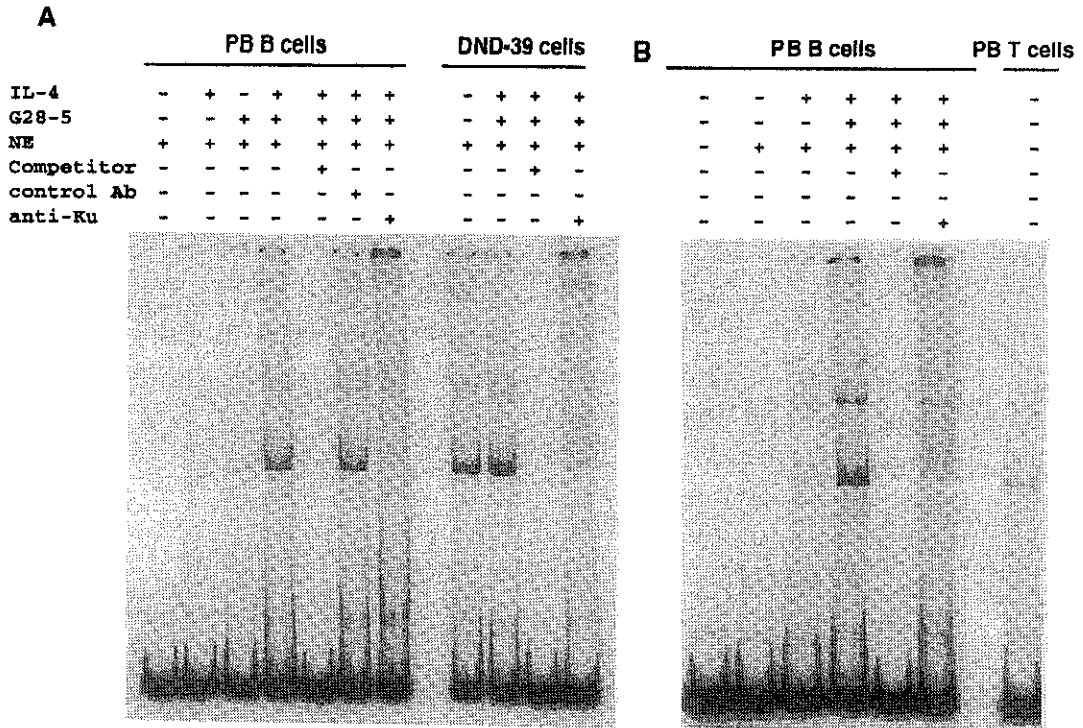
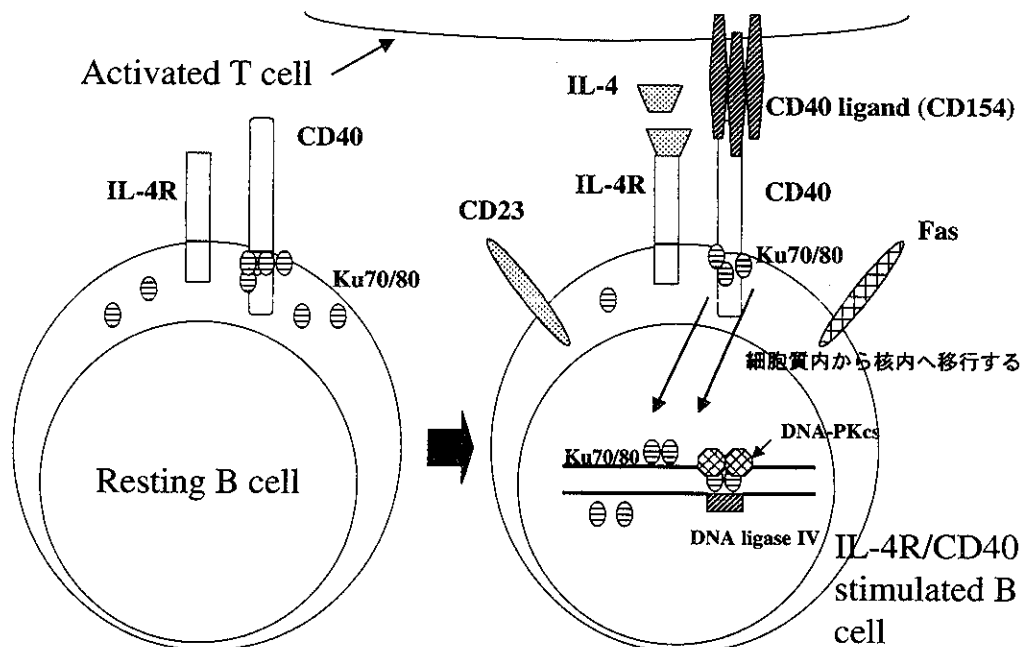


図3 Kuの核内発現は末梢血B細胞を抗CD40抗体とIL-4で刺激後に認められる。末梢血B細胞 (PB B cells), DND-39, 末梢血T細胞 (PB T cells) を抗CD40抗体, IL-4で刺激後, Kuの核内発現をEMSAで検討した。



休止期B細胞の核内にはKuは存在しない
Kuは細胞内に局在し、一部はCD40の細胞内領域に結合している

- (1) 免疫グロブリンクラススイッチ
- (2) CD23などの発現調節
- (3) B細胞のsurvival signal

図4 IL-4R/CD40シグナルシステムにおけるKuの役割

休止期B細胞にIL-4R/CD40からシグナルが入ると, CD40細胞内領域の膜近位部に会合していたKuが解離して, 核内に移行する. Kuの核内移行は免疫グロブリンクラススイッチ, CD23などの表面抗原の発現調節, B細胞の長期生存に関与していると考えられる。