

A unique T cell immunodeficiency with decreased p56lck expression in an adult male patient

竹内 勤 (埼玉医科大学総合医療センター 第二内科)
鈴木 勝也 (埼玉医科大学総合医療センター 第二内科)
津坂 憲政 (埼玉医科大学総合医療センター 第二内科)
得平 道英 (埼玉医科大学総合医療センター 第二内科)
森 茂久 (埼玉医科大学総合医療センター 第二内科)

成人発症の特異なT細胞性免疫不全症の男子例を経験した。先天性難聴を有し、全身に広がる尋常性疣贅、ステイル病様の弛張熱と関節炎を来した。ステロイドによる対症的治療で発熱、関節炎は一時軽快したものの、3年の経過で骨髄異形成症候群に進展し、肺炎で死亡した。ツベルクリン反応陰性、レクチン幼若化反応低下からT細胞性免疫不全が考えられた。末梢血T細胞のCD3, TCRの発現は正常であったが、CD2, CD4, CD8, CD45の発現は低下しており、抗CD3抗体刺激によるチロシンリン酸化がpp60に認められない事が明かとなった。それが、srcファミリーのp56lckである可能性を考え、免疫プロット法で確認したところ、p56lckの蛋白発現が明らかに低下している事が証明された。P56lckの発現低下を伴った成人のT細胞性免疫不全症について、若干の考察を加え報告する。

【はじめに】

先天性免疫不全症候群の多くは、小児期に認められる疾患であるが、最近では治療技術の進歩による予後の改善や、診断技術の向上に伴う軽症例の増加によって、成人へのキャリアオーバー例が増えている。このため、成人期に見られる免疫不全症候群が注目されているが、少数ながら成人期に発症する免疫不全症候群が存在する。教室で過去に経験したこれら症例の中から、分子機序について若干の知見が得られた症例について報告する。

【症例】：K. R.、21歳、男性

現病歴：1995年12月左膝関節痛出現、その後右膝にも出現したため近医整形外科にて非ステロイド系抗炎症薬を処方されたが改善しなかった。1996年1月下旬より発熱、嘔吐、両手指関節痛も伴うようになった。その後弛張熱が続くため、1996年2月9日当科に第1回入院となった。

既往歴：両側先天性難聴

家族歴：3人兄弟で兄が湿疹。母親の弟が生後数カ月で肺炎、髄膜炎後脳性まひとなり28歳時肺炎で死亡。

第1回入院時現症：左肩、両手MP, PIP関節痛、両膝、足首関節痛および腫脹、両手足底部の尋常性疣贅。

第1回入院時検査所見

末梢血：WBC 3900/ μ l (Neutro. 83%)、Hb 7.1g/dl、Plt 26.1×10^4 / μ l、

生化学：Fe 15、Ferritin 1438、

炎症反応 ESR 124mm/hr, CRP 21.5mg/dl、

凝固系：APTT 44.3、PT 82.6、Fib 579、

免疫学的検査：ASO 107、ASK640、ANA陰性、抗Sm抗体陽性、IgG 1122、IgA 93、IgM 139、IgD 1.0、IgE 310、CH50 45.2、C3 174、C4 39.2。ツ反陰性。PHA幼若化試験、ConA幼若化試験、PWN幼若化試験は正常の50%に低下。

ウイルス学的検査：CMV (CF) 16、EBV VCA

Fig1 Tyrosinephosphorylation of peripheral blood T cells stimulated by anti-CD3 mAb

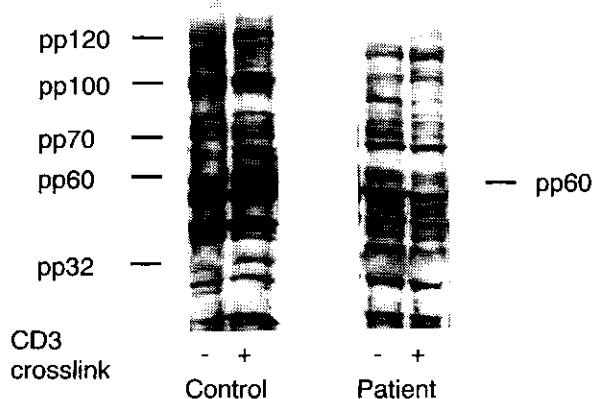
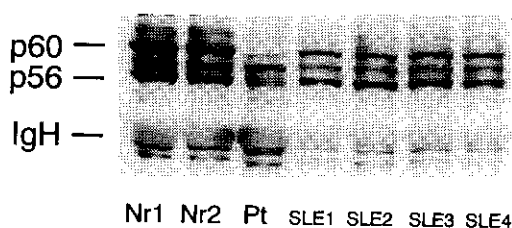


Fig 2 Expression of p56lck on peripheral blood T cells by immunoblotting analysis



IgG (FA) 640 HTLV1 (-), HIV (-)、
骨髄検査：slightly hypocellular marrow, NCC1.4万、
Mgk6, 顆粒球系、赤芽球系の低形成、染色体46,
XY, +der (1;12) (q10;q10), -12, (5/20)

培養検査：陰性、

胸部、腹部XP：異常なし

心エコー：左房内血栓、MR, MVP

Gaスキャン：下部胸椎に集積

体部CT：異常なし

入院後経過：入院後弛張熱が続いた。白血球数減少のみが典型的ではなかったが、多関節痛、弛張熱、Ferritin 高値より成人発症Still病を疑い、同年3月9日よりPSL30mg開始された。翌日より発熱、関節痛、炎症反応は著明に改善、その後貧血もHgb12.1g/dlまで改善した。PSLを減量し、18mgにて同年4月25日退院となった。

退院後外来にて経過観察され、PSL12mgに漸減されその後同量で維持されていた。1997年4月貧血がHgb 6.8g/dlまで進行したため、同年4月14日第2回入院となった。入院後多関節痛、めまいも認め、活動性上昇に対して4月23日よりPSL30mgが開始された。その後貧血はHgb 11.4g/dlまで改善したが、1997年5月に入り、血小板減少(7.4万 μ l)を認めた。骨髄穿刺では巨核球数は42/ μ lと数は正常であったが、3系統に軽度の形態異常を認めていた。1998年1月、関節痛増強、汎血球減少の進行のため(WBC 1100/ μ l、Hb 5.7mg/dl、Plt 3.3 \times 10⁴/ μ l)、第3回目入院となった。骨髄：芽球5.0%、

顆粒球系、赤芽球系に形態異常あり、単芽球、単球の増加を認めた。CD45-Blast gating法による表面マーカー解析：CD34、33、13、HLA-DR陽性。NAP score 43。染色体：46, XY, +1, der (12) t (1;12) (q10;q10), +8, +8 (7/20)。骨髄異形成症候群(Myelodysplastic syndrome:MDS, RAEB)と診断し、low dose AraC療法を施行したが、肺炎を合併した。汎血球減少は改善せず、6月骨髄検査にて芽球50.5%を認め、Leukemic phaseと診断した。low dose AraC、少量VP-16経口療法を施行したが、効果はなかった。感染がコントロールできずBMTは断念、消火管出血、胸水貯留、心嚢水貯留をきたし、呼吸不全のため12月6日永眠された。

【分子免疫学的解析】

ツベルクリン反応陰性、末梢血リンパ球幼若化試験低反応から、T細胞性免疫不全を考えた。

- 1) 末梢血リンパ球の表面抗原解析：CD3, TCRは正常であったが、CD2, CD4, CD8, CD45の平均蛍光強度は低下し、逆にインテグリン接着分子の発現は亢進していた。CD4/CD8は0.7で、CD4の平均蛍光強度は、正常の151に対し38、CD45の平均蛍光強度も正常の896に対して90と著明な低下が確認された。CD4, CD8サブセットは、CD45RA (-), CD25 (+), HLA-DR (+)のメモリー活性化T細胞数が増加していた。
- 2) in vitroチロシンリン酸化：T細胞性免疫不全

の分子機序を明らかにするため、患者末梢血T細胞を分離後、in vitroで抗CD3モノクローナル抗体と、抗マウス抗体によって表面分子を架橋して刺激後、細胞内分子のチロシンリン酸化を免疫ブロット法で解析した。その結果、正常人T細胞では、pp32, pp60, pp70, pp100, pp120のチロシンリン酸化バンドが認められたが、患者では、pp60のチロシンリン酸化が誘導されない事が明かとなった（図1）。

- 3) p56lckの蛋白発現：pp60は、srcファミリーのチロシンキナーゼである可能性が考えられたため、T細胞に発現されCD4からのシグナル伝達に重要な役割を果たしているp56lckの発現を、免疫ブロット法によって検索した。そ

の結果、患者T細胞では、p56lck蛋白発現が明らかに低下していることが判明した（図2）。

【考案】

進行性のT細胞性免疫不全を伴う特異な症候群として、Wiskott-Aldrich症候群、Ataxia-teleangiectasia症候群、DiGeorge症候群が知られているが、臨床的、遺伝学的に本患者は、そのいずれにもあてはまらない。P56lckの遺伝的欠損家系の報告も見られない事から、本例におけるp56lckの蛋白発現低下の分子機序を遺伝子レベルで検討し、免疫不全や、皮膚症状、難聴などとの関連を明らかにする必要がある。

レトロウイルスライブラリーを用いた 免疫不全症原因遺伝子クローニングの試み

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)
篠 崎 健太郎 (富山医科薬科大学医学部小児科学)
金 兼 弘 和 (富山医科薬科大学医学部小児科学)
宮 脇 利 男 (富山医科薬科大学医学部小児科学)
齊 藤 隆 (千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学)

レトロウイルスcDNAライブラリーを導入して原因遺伝子をクローニングするシステムをマウスについて昨年報告したが、今年は免疫不全ヒトT細胞におけるシステムの開発を試みた。T細胞レセプターの発現が著しく低下している免疫不全症の患者のT細胞をHTLV-1感染によって株化し、レトロウイルスに感染しやすいクローンを選択した。Jurkat細胞では高頻度で感染は成立したが、この細胞での感染効率は10-20%が最大であった。現在cDNAライブラリーを導入した細胞を蓄積している。

【はじめに】

先天性免疫不全症の原因遺伝子を発現クローニングの方法を用いて同定することが可能となれば多くの症例に適応できると思われる。これを成功させるためには、効率の良い遺伝子導入法が必要であることと、患者由来の細胞が有する機能不全やある分子の発現異常を反映する細胞株の樹立が必要である。既に昨年、我々はマウスのシステムで、レトロウイルスライブラリーを用いる発現クローニングの方法によって単一の欠損遺伝子をクローニングすることに成功した。この方法がヒトの免疫不全症の患者由来の細胞株に応用することが可能かどうか検討した。

【対象と方法】

1) レトロウイルスライブラリー。レトロウイルス発現ベクターpMXを用いてヒトJurkatよりcDNAライブラリーを作製した。マウスでは脾臓細胞由来のライブラリーを作製して用いた。2) HTLV-1 transformation。患者の末梢血リンパ球を分離し、マイトゲンにて刺激し、細胞増殖をしている2H以降に、HTLV-1産生細胞株MT-2と共培養した。

IL-2の存在下で増殖してくる細胞をライン化し、更にlimiting dilutionにてクローニングした。3) 患者。現在13才になる患者(PT)は、生後すぐより種々の感染などを繰り返している。TCRを介する刺激に低応答性だが、抗CD3抗体にはほぼ正常に反応する。解析の結果、T細胞上のTCR発現が低いことが判明した。この患者の兄も同様な症状で既に死亡している。

【結果】

TCR-CD3複合体の解析。PT由来の末梢血T細胞は、細胞表面におけるTCR alpha beta発現は非常に低い、CD3発現は少し低い程度で、TCRとCD3との乖離が判明した。そこで、TCR-CD3複合体に関与する分子のcDNAの塩基配列を調べたが、TCR alpha, beta, CD3 gamma, delta, epsilon, zetaの各鎖には変異は見つからなかった。同様に、機能的に増殖反応やIL-2産生においても、anti-TCR刺激やPHA刺激などには低応答性を示したが、anti-CD3刺激にはanti-TCRに比べてあまり差はなかった。チロシンリン酸化においても同様であった。また細胞表面のCD3複合体の構成も相違があるとは思えな

い。更に、TCRシグナルに重要なLATもその発現に差は無かった。即ち、既知の分子の発現異常や変異が検出されなかった。1) HTLV-1 transformed cell lineの確立。そこで、未知の原因遺伝子を検索する方向を取ることにし、レトロウイルスライブラリーを導入するためのPT由来の細胞株の作製を試みた。PT末梢血リンパ球をPHAで刺激し増殖する細胞をHTLV-1産生細胞と共培養して、IL-2依存的に増殖する細胞株を得た。細胞表面のFACS解析では、元のPT細胞とほぼ同様なTCR、CD3発現レベルを示した。2) レトロウイルスライブラリーの導入。ヒト細胞にpMXベクターで作製したライブラリーを導入するモデルとして、ヒトJurkat細胞に感染させた。Amphotropic virusを用いると70%程度が感染した。また、ecotropic virus libraryを用いてもecotropic virus receptorを発現させたJurkatでは高い感染効率を得た。一方、HTLV-1 transformed cellではamphotropic virusでも非常に感染効率が低く、更にVsv virus envelope proteinを用いて感染させて1-10%程度の感染が得られた。感染効率の良いPT細胞クローンを得るために、更にlimiting dilutionによって得た数多くのクローンから感染効率のもっとも良いクローンをスクリーニングした。この細胞には10-20%の感染が成立した。感染の回数を重ね、ライブラリーのスクリーニングができる細胞数を蓄積している。

【考察・結論】

未確定の原因の免疫不全症の患者の末梢血リンパ球を解析し、通常では見られないTCRとCD3の発現の解離があることが判明した。これまでに存在するCD3gammaおよびCD3epsilonの変異による免疫不全症の場合も、CD3分子のノックアウト分子の場合にも、TCRとCD3の細胞表面発現レベルは常にパラレルに変異している。そこで、このPT細胞ではユニークな分子の異常を伴うと考えられる。TCR-CD3複合体に関与する分子全部をシーケンスしたが特に遺伝子レベルでの変化も、RNAレベルでの発現量の変化もなかった。そこで未知の遺伝子を目指して発現クローニング法を適用することにした。すでにHerpes Similiによってtransformした細胞株を作製した例があるが、ほとんどの場合増殖が遅く、レトロウイルスライブラリーを導入するのは困難であり、今回HTLV-1にてtransformed cell lineを作った。しかし、もっとも感染しやすいクローンもスクリーニングしたにも関わらず、2つの大きな問題点を発見した。一つは、HTLV-1 transformationして2ヶ月もすると自然にTCRレベルが低下してくることが判明したことである。もう一つは、Vsvの様な強力な形でレトロウイルスの感染をしてもせいぜい10%程度であり、一般的な方法には使えない、点である。

Approach to expression cloning of a gene responsible for immunodeficiency by using retrovirus library

Tadashi Yokosuka¹⁾, Sho Yamasak¹⁾, Kentaro Shinozak²⁾, Hirokazu Kanegane²⁾, Toshio Miyawaki²⁾, Takashi Saito¹⁾

Department of Molecular Genetics, Chiba University Graduate School of Medicine¹⁾, Pediatrics, Toyama Medical and Pharmaceutical University²⁾

We reported murine system of cloning responsible gene by introducing retrovirus cDNA library last year. Now, we tried to examine the establishment of a human system in immunodeficient human T cells. Infection frequency of the HTLV-1 cells was 10-20% while Jurkat had 60-70% infection. We are collecting cDNA-transfected cells.

完全IgG2欠乏症に検出された変異膜型重鎖遺伝子の発現異常とその機能に関する検討

近 藤 直 実 (岐阜大学医学部小児科)

寺 田 知 新 (岐阜大学医学部小児科)

金 子 英 雄 (岐阜大学医学部小児科)

IgG2欠乏症は肺炎球菌等の多糖体抗原に対する特異抗体の欠乏と反復する中耳炎、気道感染などを特徴とする。我々はIgG2が持続的に測定感度以下を示す本症兄弟例において、C γ 2 exon4内のalternative splice site直前に膜型IgG2の膜貫通領域および細胞質内領域にframe shiftを生じさせる1塩基挿入(1793insG)をホモで同定し、本症の病因遺伝子を世界で初めて同定した。しかしこの遺伝子変異が、IgG2の完全欠損をひきおこす理由については不明のままである。今回正常およびこの変異を組み込んだ変異膜型IgG重鎖を作製し、これを恒常的に発現する細胞系を確立してその機能解析を行い、本症の発症機序を明らかにした。フローサイトメーターにて正常膜型IgG重鎖は22.1%の細胞の膜表面に発現を認めたと、変異膜型IgG重鎖の発現は認められなかった。イムノプロットでは正常膜型IgG重鎖はホモジネート上清および沈澱分画に同定されたが、変異膜型IgG重鎖はいずれにも同定されなかった。パルスチェイスでは正常膜型IgG重鎖は1hパルス、6hチェイスにて同定されたが、変異膜型IgG重鎖ではほとんど同定されなかった。以上より1793insGの変異を有するIgG2重鎖は細胞内ですみやかにdegradationするために細胞膜上に表出されずB細胞レセプターとしての機能が発揮されないことを明らかにし、膜結合型重鎖の正常な発現がB細胞のシグナル伝達や分泌型免疫グロブリンの産生に重要であることを証明した。患者では、膜型IgG2を有するB細胞が存在せず、これにより分泌型IgG2産生B細胞への分化ができないためIgG2欠損になると考えられた。

【はじめに】

免疫グロブリンサブクラス欠乏症の1つにIgG2欠乏症がある。IgG2欠乏症はIgGサブクラス欠乏症の代表的な疾患であり、本症は肺炎球菌等の多糖体抗原に対する特異抗体の欠乏と反復する中耳炎、気道感染などを特徴とする。我々は本症の病因遺伝子を同定したが、この変異により膜型IgG2のB細胞表面上への発現が障害され、その結果細胞内情報伝達をも障害されることが推測された¹⁾(図1,2)。変異膜型IgG重鎖の機能解析を通じてこの異常タンパクのゆくえを同定し、細胞内情報伝達を明らかにし、膜型Igから分泌型Igへの分化のstepを明らかにすることはその他の選択的免疫グロブリン欠乏症の病因やその機能の解明において役立つものと期待される。

IgG2が産生されるためには、免疫グロブリン遺伝子群においてVDJの再構成が生じたのちに、いくつか存在する重鎖定常部遺伝子のうちC γ 2がVDJ領域と近接するための遺伝子再編成であるクラススイッチが生じなければならない。クラススイッチを生じると、IgG2重鎖が産生されることになるが、Ig重鎖には通常分泌型とB細胞レセプターとして機能する膜型が存在し、マウスにおいて膜型重鎖の正常な発現がB細胞の正常な反応や分泌型免疫グロブリン産生に必要であるという論拠が散見される²⁻⁴⁾。

本研究では、以上のことを踏まえ、完全IgG2欠乏症患者に検出された1793insGは膜型IgG2としての機能にどのような影響を与えるか検討するため、変異膜型IgG2重鎖をマウスミエローマ細胞に

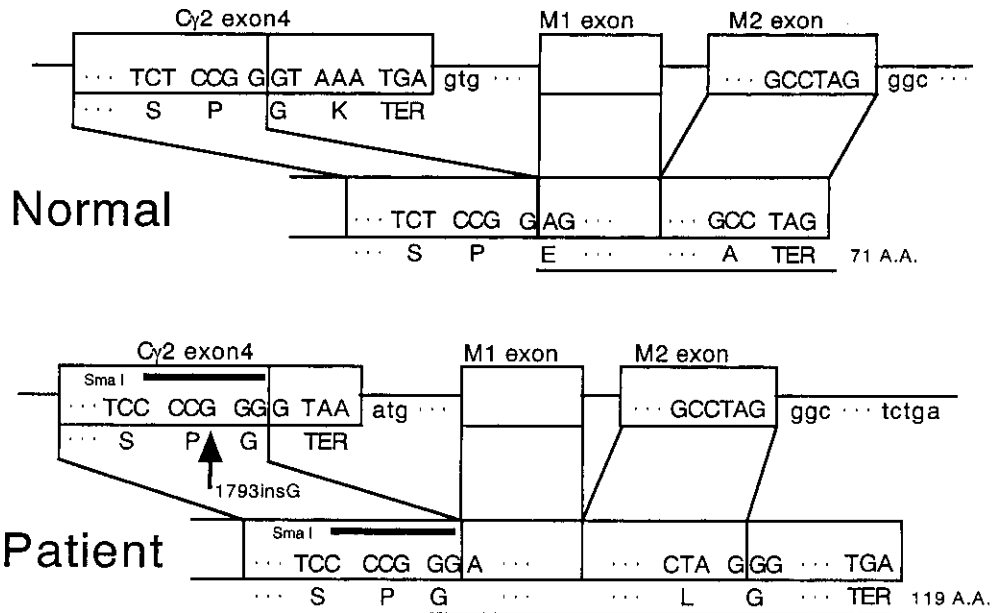


図1：遺伝子変異と分泌型および膜型IgG2重鎖に与える影響。正常および患者の遺伝子の模式図を上段に、膜型Cγ2 transcriptの模式図を下段に示した。上段には分泌型のアミノ酸配列を、下段には膜型のアミノ酸配列を並記した。

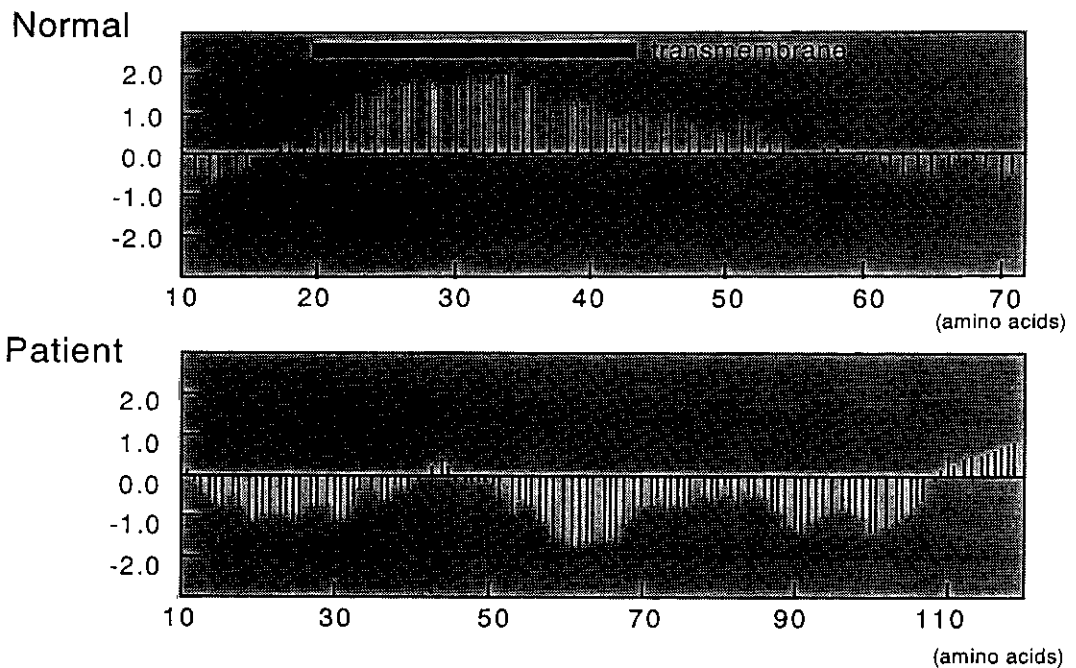


図2：Kyte and Doolittleの疎水性プロフィール。aは正常、bは変異膜型IgG2重鎖の膜貫通部および細胞内領域のプロフィール。膜貫通部位を太線で示す。

トランスフェクションし発現を検討した⁹⁾。変異膜型IgG重鎖は膜貫通領域の保存されている配列がframe shiftにより失われているために細胞内ですみやかにdegradationし細胞膜上に表出されることが明らかになった。これによりクラススイッチ

を生じてIgG2陽性B細胞が産生されても、変異膜型IgG重鎖は細胞膜上に表出できないために、増殖シグナルをはじめとする種々のシグナルを受け取ることができなくなり、死滅すると考えられた。

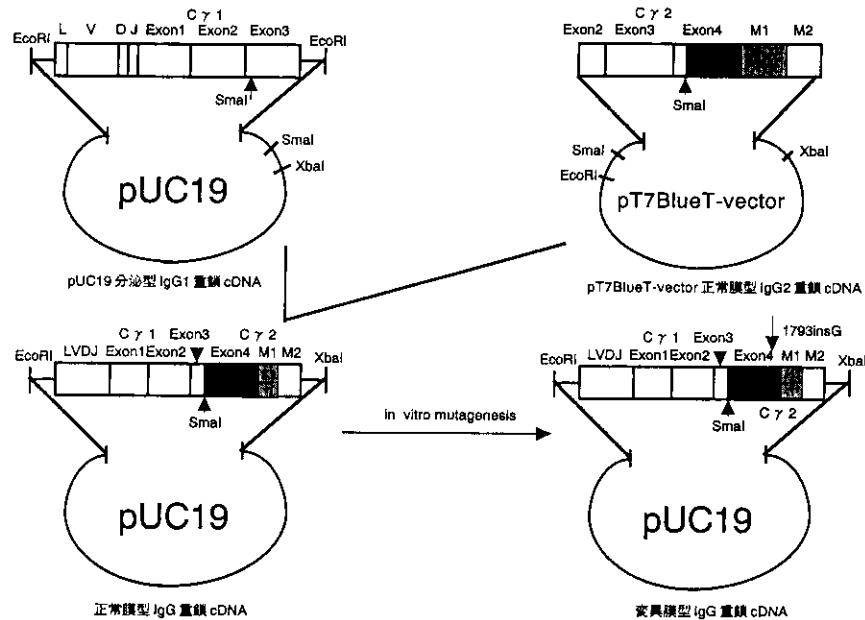


図3：正常および異常膜型IgG重鎖cDNAのconstruction。L：リーダーペプチド、V：可変部領域、D：多様性領域、J：結合部領域、C：定常部領域、M：膜領域。pUC19に入っている分泌型IgG1重鎖cDNAをSmaIとXbaIでdigestionしSmaI以降の3'部分を膜型γ2重鎖に置き換えたキメラcDNAを作製した（pUC19正常膜型IgG重鎖cDNA）。これにin vitro mutagenesisを用いて1793insGを挿入した（pUC19変異膜型IgG重鎖cDNA）。これらをEcoRIとXbaIでdigestionしてBluescript KS+に挿入した。これらをさらにXhoIとNotIでdigestionしBCMGSHygにrecloneした（BCMGSHyg正常膜型IgG重鎖cDNA、BCMGSHyg変異膜型IgG重鎖cDNA）。

【対象と方法】

1) 正常膜型IgG重鎖および変異膜型IgG重鎖の作製および遺伝子導入

分泌型IgG1重鎖cDNAのCγ3にあるSmaI以降の3'部分を我々のクローニングした正常膜型γ2重鎖に置き換えたキメラcDNAを作製し、BCMGSHygベクターに挿入した（BCMGSHyg正常膜型IgG重鎖cDNA）。また1793insGをin vitro mutagenesisにて挿入した変異膜型γ2重鎖を同様にしてBCMGSHygに組み込んだ（BCMGSHyg変異膜型IgG重鎖cDNA）。軽鎖はBCMGSNeoに組み込んだものを用いた（BCMGSNeo軽鎖cDNA）（図3）。リポフェクチンを用いてP3X63Ag8653（mouse myeloma cell line）に正常膜型IgG重鎖cDNAもしくは変異膜型IgG重鎖cDNAと軽鎖cDNAをco-transfectionし、ハイグロマイシン、ネオマイシン存在下で安定発現細胞を得た（Ag8N-L, Ag8M-L）。同様に分泌型IgG1重鎖cDNAと軽鎖cDNAをco-transfectionし、安定発現細胞を得た（Ag8G1-L）。なお、分泌型IgG1重鎖cDNAおよびBCMGSNeoLCは澤井先生（兵庫医科大学）から供与された。

2) 半定量PCR

Ag8N-LおよびAg8M-LよりRNAを抽出し逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、Cγ2 Exon4およびM2 Exonの領域にプライマーを設定し半定量PCRを行い2%アガロースゲルにて泳動した。

3) フローサイトメーター

ヤギ抗ヒトIgG抗体（FITC-conjugated）にて上記の細胞を染色し、フローサイトメーターにて解析した。

4) イムノプロットによる正常および変異膜型IgG重鎖蛋白の同定

正常および変異膜型IgG重鎖を組み込んだ安定発現細胞（各々 1×10^7 cells）にextraction bufferを加えて超音波破碎し、ホモジネート上清および沈澱分画を10% SDS-PAGEゲルで泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。蛋白はペルオキシダーゼ標識抗IgG抗体で検出した。

5) パルスチェイスによる正常および変異膜型IgG重鎖蛋白の同定

正常および変異膜型IgG重鎖を組み込んだ安定発現細胞（各々 5×10^5 cells）をpre-incubation mediumで培養後に 35 S-メチオニンでラベルした。さらに

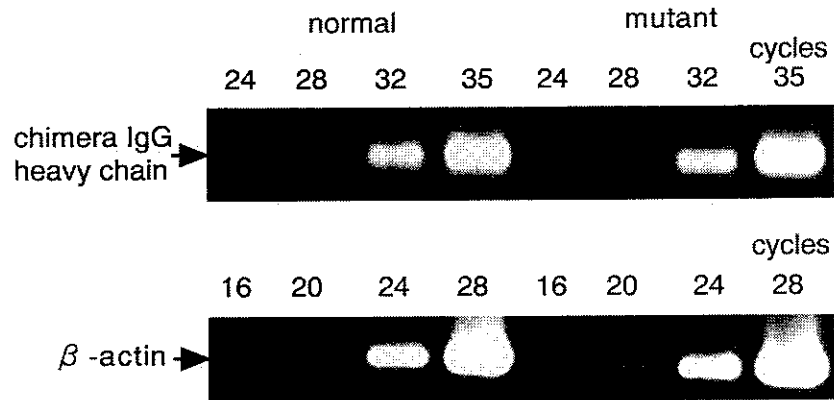


図4：半定量PCRによる正常および変異膜型IgG重鎖の半定量。C γ 2エクソン4およびC γ 2膜エクソンにプライマーを設定し、Ag8N-LおよびAg8M-L由来cDNAを用いて半定量PCRを行い、導入遺伝子の発現レベルを比較した。正常および変異膜型IgG重鎖のmRNAの発現量はほぼ同等であった。

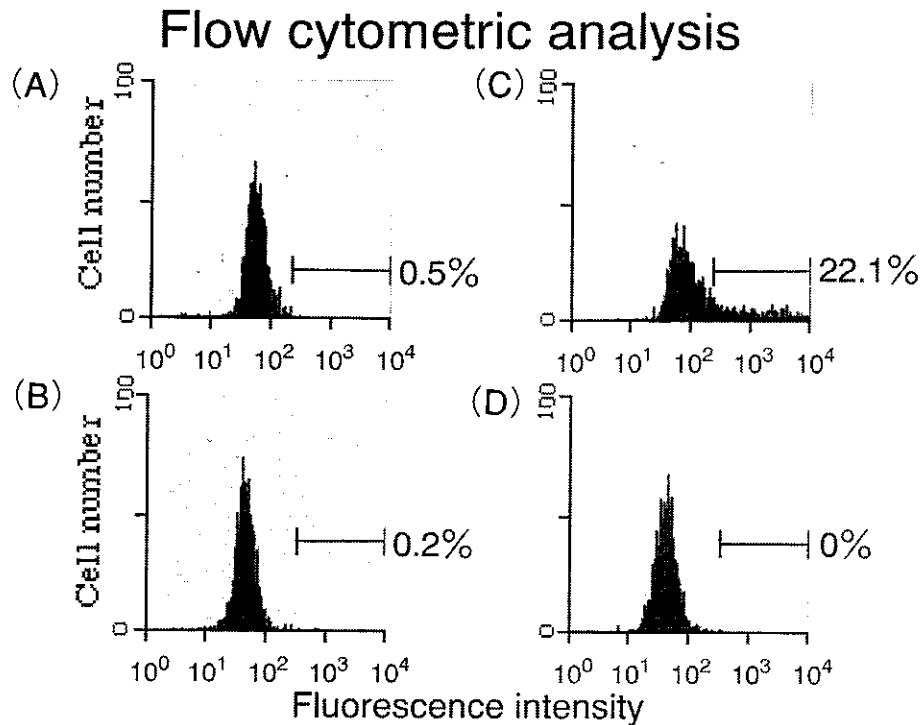


図5：フローサイトメーターによる膜表面IgGの検出。A: Ag8N-L (無刺激) B: Ag8N-L (ヤギ抗ヒトIgG抗体) C: Ag8M-L (無刺激) D: Ag8M-L (ヤギ抗ヒトIgG抗体)。正常膜型IgG重鎖は22.1%の細胞の膜表面に発現を認めたが、変異膜型IgG重鎖の発現は認められなかった。

RPMI1640 mediumで培養し各々 0, 6, 24時間後に回収した。プロテアーゼ阻害剤の入ったバッファーを加えて超音波破碎した後、IgG重鎖を免疫沈降法にて回収し、10% SDS-PAGEゲルで泳動し、オートラジオグラフィーにて検出した。

【結果】

正常膜型IgG重鎖および変異膜型IgG重鎖を軽鎖とともにP3X63Ag8653 (mouse myeloma cell line) に

co-transfectionし、ハイグロマイシン、ネオマイシン存在下で安定発現細胞を樹立した (Ag8N-L, Ag8M-L)。半定量PCRにおいては、正常および変異膜型IgG重鎖とも messageの発現に差は認められなかった (図4)。

フローサイトメーターにおいては、正常膜型IgG重鎖は22.1%の細胞の膜表面に発現を認めたが、変異膜型IgG重鎖の発現は認められなかった (図5)。次に、イムノプロットによる正常および変異膜型

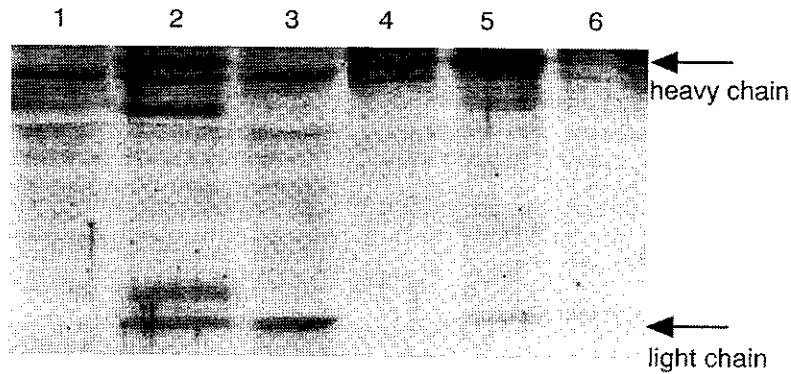


図6：イムノプロットによる正常および変異膜型IgG重鎖蛋白の同定。Lane1: P3X63Ag8653 Lane2: Ag8N-L Lane3: Ag8M-L Lane4: P3X63Ag8653 Lane5: Ag8N-L Lane6: Ag8M-L Lane1-3:ホモジネート上清。Lane4-6:沈澱分画正常膜型IgG重鎖蛋白はホモジネート上清および沈澱分画に同定されたが、変異膜型IgG重鎖蛋白はいずれにも全く同定されなかった。

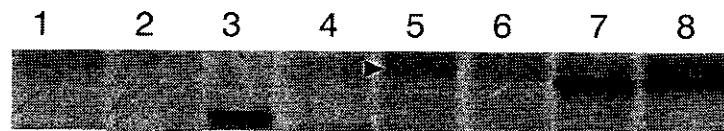


図7：パルスチェイスによる正常および変異膜型IgG重鎖蛋白の同定。Lane1, 2: P3X63Ag8653, Lane3, 4: Ag8G1-L, Lane5, 6: Ag8M-L, Lane7, 8: Ag8N-L (Lane1, 3, 5, 7: 1時間パルス、Lane2, 4, 6, 8: 6時間チェイス) 正常膜型IgG重鎖蛋白は1時間パルスおよび6時間チェイスにて同定されたが、変異膜型IgG重鎖蛋白はほとんど同定されなかった。

IgG重鎖蛋白の同定をおこなった。正常膜型IgG重鎖蛋白はホモジネート上清および沈澱分画に同定されたが、変異膜型IgG重鎖蛋白はいずれにも全く同定されなかった(図6)。パルスチェイスによる正常および変異膜型IgG重鎖蛋白の動態を解析したところ正常膜型IgG重鎖蛋白は1時間パルスおよび6時間チェイスにて同定されたが、変異膜型IgG重鎖蛋白はほとんど同定されなかった(図7)。

【考案・結論】

我々が同定した遺伝子変異(1793insG)では分泌型IgG2重鎖は最後のアミノ酸残基リジンを欠失するのみである。しかし膜型IgG2重鎖はframe shiftにより膜貫通領域および細胞質内領域の配列が119アミノ酸からなる全く異なる配列へと変化する。また、膜エクソンにコードされるアミノ酸配列についてKyte and Doolittleの疎水性プロファイルをとってみると、正常でみられる2をこえる疎水性の領域が変異膜型IgG2重鎖ではそのほとんどが親水性に変化しており、膜貫通すると考えられる領域が消失していた。さらにマウスのIgG1, IgA, IgEにおいて膜型重鎖の正常な発現がB細胞

の正常な反応や分泌型免疫グロブリン産生に必要であることも示されている。これらのことより、変異膜型IgG2重鎖は細胞膜上に発現できないか、発現が認められても細胞内シグナル伝達に異常をきたすと考えられた。このことを確認するために、正常膜型IgG2重鎖と変異膜型IgG2重鎖をマウスミエローマ細胞株に発現させ、その細胞内での動態を検討した。正常膜型IgGではミエローマ細胞膜表面に発現が認められた。しかし興味深いことに安定発現細胞にも関わらず、その約1/5の細胞しかIgを膜表面に発現していなかった。それに対し、変異膜型Ig重鎖は全くミエローマ細胞膜表面上に発現されなかった。イムノプロットでは正常膜型IgG重鎖はホモジネート上清および沈澱分画に同定されたが、変異膜型IgG重鎖はいずれにも同定されなかった。パルスチェイスでは正常膜型IgG重鎖は1時間パルス、6時間チェイスにて同定されたが、変異膜型IgG重鎖ではほとんど同定されなかった。またデータは示していないがサンドイッチELISA法にて培養上清中に正常膜型IgG重鎖および変異膜型IgG重鎖はともに分泌されていない。以上より1793insGの変異を有するIgG2重鎖は細胞

内ですみやかにdegradationするために細胞膜上に表出されずB細胞レセプターとしての機能が発揮されないことを明らかにし、膜結合型重鎖の正常な発現がB細胞のシグナル伝達や分泌型免疫グロブリンの産生に重要であることを証明した。従ってクラススイッチを生じて膜型IgG2タンパクを作ることのできるB細胞が生じても、変異膜型IgG重鎖は細胞膜上に表出できないために、増殖シグナルをはじめとする種々のシグナルを受け取ることができなくなり、死滅すると考えられた。

【参考文献】

- 1) Tashita H, Fukao T, Kaneko H, Teramoto T, Inoue R, Kasahara K, Kondo N. Molecular basis of selective IgG2 deficiency: the mutated membrane-bound form of gamma2 heavy chain caused complete IgG2 deficiency in two Japanese siblings. *J. Clin. Invest.* 101:677-681, 1998.
- 2) Weiser P, Muller R, Braun U, Reth M. Endosomal targeting by the cytoplasmic tail of membrane immunoglobulin. *Science* 276:407-409, 1997.
- 3) Kaisho T, Schwenk F, Rajewsky K. The roles of gamma 1 heavy chain membrane expression and cytoplasmic tail in IgG1 response. *Science* 276:412-415, 1997.
- 4) Achatz G, Nitschke L, Lamers MC. Effect of transmembrane and cytoplasmic domains of IgE on the IgE response. *Science* 276:409-411, 1997.
- 5) Terada T, Kaneko H, Fukao T, Tashita H, Li A, Takemura M, Kondo N. Fate of the mutated IgG2 heavy chain. : lack of expression of mutated membrane-bound IgG2 on the B cell surface in selective IgG2 deficiency. *Int. Immunol.* 13: 249-256, 2001.

Selective IgG2 deficiency: analysis of characterization and function of the mutated membrane-bound form of gamma2 heavy chain.

Naomi Kondo, Tomoyoshi Terada, Hideo Kaneko

Department of Pediatrics, Gifu University School of Medicine

IgG2 deficiency is clinically characterized by sinopulmonary infections caused by *Pneumococcus* and *Hemophilus*. We reported a homozygous one-base insertion (1793insG) in the C γ 2 gene in two Japanese siblings in whom serum IgG2 levels were under detection limits. The 1793insG was present in exon 4, just upstream from the alternative splice site for M exons, the result being a complete amino acid change in transmembrane and cytosolic parts of membrane-bound γ 2 heavy chain. To determine why this mutation caused selective and complete IgG2 deficiency, we constructed expression vectors of normal and mutant membrane-bound chimeric IgG heavy chain cDNAs. Stable transformants, Ag8N-L and Ag8M-L, expressing either normal and mutant chimeric IgG heavy chain with light chain respectively were obtained using P3X63Ag8653, as recipient cells. 22.1% of the Ag8N-L were surface IgG positive, however, none of the Ag8M-L were surface IgG positive. Addition of an anti-human IgG antibody induced cell death of Ag8N-L and we considered that the expressed chimeric IgG protein on Ag8N-L, might function as the Ig receptor for signal transduction. However, Ag8M-L did not express mutant IgG on its surface nor did it secrete this mutant into culture medium. The mutant chimeric IgG protein was rapidly degraded within Ag8M-L. Thus, the mutated IgG2 heavy chain in our patient could not be expressed on the cell surface because of loss of the transmembrane domain and the evolutionally conserved cytoplasmic domain. In humans, B cells expressing surface IgG are indispensable for secretion of IgG.

高IgM 症候群 II 型の検討

野々山 恵 章 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)
今 井 耕 輔 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)
今 井 雅 子 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)
長 沢 正 之 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)
森 尾 友 宏 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)
水 谷 修 紀 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)

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 の異常はクラススイッチに障害がある伴性劣性高IgM 症候群を引き起こす。一方CD40 ligand は正常で、CD40 シグナルが異常である高IgM 症候群が報告されていた。最近、RNA editing に関与した分子 AID (activation-induced cytidine deaminase) が、高IgM 症候群 II 型の原因遺伝子であることが判明した。本邦における高IgM 症候群 II 型の患者の AID 変異、B 細胞機能、臨床所見について検討したので報告する。

【はじめに】

高IgM症候群は、免疫グロブリンのクラススイッチが起こらず、血清中のIgG, IgA は低値を示し、IgM は正常ないし高値をしめす原発性免疫不全症である。X連鎖高IgM症候群の責任遺伝子は、活性化T細胞に発現するCD40 ligand (CD40L, CD154) であることが判明している。CD40L が異常であるため、B 細胞に発現しているCD40 を刺激することができず、その結果 B 細胞にクラススイッチを誘導することができない。

一方、CD40L が正常である高IgM症候群が存在することが知られていた。この疾患では患者 B 細胞をCD40刺激してもクラススイッチが起きないため、CD40の下流にある何らかの分子の異常であると考えられていた。ごく最近、AID (Activation-Induced Cytidine Deaminase) がこうした高IgM症候群の責任遺伝子であることが判明し、AID 異常がある場合は高IgM症候群 II 型と称する (1)。AID は12番染色体上にあり、常染色体劣性遺伝する。これまでに12家系17患者で、10種類のAID 遺伝子変異が報告されていて、多くは血縁結婚の家系で発症している。

我々は、これまで国内の高IgM症候群症例を検討し、CD40L が異常であるX連鎖高IgM症候群を32例診断した (未発表データ)。その検討の中で、CD40L は正常で、CD40 刺激によりクラススイッチが起きない高IgM症候群も集積してきた。今回の研究では、こうした症例について、AID の異常を検討した結果、AID遺伝子変異を見出した。変異を持った症例の B 細胞機能と臨床症状について検討を加えたので報告する。

【対象と方法】

血清IgG, IgA が低値でIgM が正常ないし高値を示した患者16人を対象とした (Table 1)。これらの患者は、CD40 ligand は正常であり、かつ B 細胞は抗CD40 mAb+IL-4 刺激で、IgE を産生しない。2人が姉妹例 (P1, P2) で、この姉妹の両親はいとこ婚であった。2人が、兄、妹例 (P3, P4) であったが、両親は血縁結婚でなかった。他は孤発例で、家族歴がなく血縁結婚はなかった。

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。CD23 発現は、B 細胞を、IL-4 単独、抗CD40 mAb

```

          FR1          CDR1          FR2          CDR2          FR3
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYHWVRQMPGKGLEWNGIYYPGDSSTRYSPFPQQVTTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
1  -----D-----T--N--A-----H-T--A-----E-GT-E-----
2  -----D-----TDS--N--V-----Y-K-----H--V--N--H-G--E-----
3  -----D-----TDS--N--V-----Y-K-----H--V--N--H-G--E-----
4  -----D-----TDS--N--V-----Y-K-----H--V--N--H-G--E-----
5  N-----S-----D-----I--K--A--T-----D-----T-----DT-E--SGI--
6  -L-----D--N-----TDS--K--V-----Y-K-----H-----N--H-G--E--R--
7  -----A--T--I-----Y-K-----H-----N--H-G--E--R--
8  -----A--T--I-----Y-K-----H-----N--H-G--E--R--
9  -----P-----R-----S--S-----R-D-S--YSN-----H--V-----S-----
10 -L-----D--N-----TDS--N--V-----Y-K-----H--V--N--H-G--E-----

1  R-----V-----
2  -----
3  -----
4  -----
5  -P-----
6  -----
7  -----
8  -----
9  -----

1  -----R-----
2  -----
3  -----
4  -----
5  -----
6  -----
7  -----
8  -----
9  -----
10 -----

```

Fig.1 Somatic hypermutation の解析

Table 1 Laboratory findings of 16 non-x-linked hyper IgM syndrome

Patients	Sex	Age (year)	Serum immunoglobulin concentrations				
			IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IgD (mg/dl)	IgE (U/ml)
P1*	F	32	<10	<5	3160	nd	<10
P2*	F	37	<10	<5	2660	52.8	<10
P3+	F	25	<10	<5	1520	nd	<10
P4+	M	31	<10	<5	1380	nd	<10
P5	F	48	<10	<5	5400	30.9	<10
P6	F	27	<10	<5	6440	118	<10
P7	M	33	<8	<6	1110	nd	<10
P8	F	5	<2	<1	1910	nd	<10
P9	F	4	<2	<1	1400	16.3	<10
P10	F	1	58	<5	1330	nd	<10
P11	F	31	<10	<5	5380	100	<10
P12	F	60	45	<2	2261	nd	<10
P13	F	4	<50	<5	267	nd	<10
P14	F	11	225	1	137	nd	<10
P15	M	3	1	1	51	nd	<10
P16	F	24	<10	<5	350	nd	<10
Normal values			870-1,700	110-410	33-190	<11.5	<170

*, +: These patients are siblings.
nd: not determined

Table 2 AID mutations observed in patients with HIMII

Patients	Nuclotide change	Predicted effect
P1, P2	C70T, C70T	R24W, R24W
P3, P4, P5, P6, P7	G335A, G335A	R112H, R112H
P8	C334T, C544 deletion	R112C, FS
P9	T31G, T226 deletion	F11V, FS

Table 3 In vitro IgE production by B cells obtained from patients with hyper IgM syndrome type 2

Pts	IgE production (pg/ml)*	
	-	anti-CD40 + IL-4
P1*	<50	<50
P2*	<50	<50
P3+	<50	<50
P4+	<50	<50
P5	<50	<50
P6	<50	<50
P7	<50	<50
P8	<50	<50
P9	<50	<50
Healthy controls	<50	18377 ± 6624

(G28-5) 単独, 抗CD40 mAb+IL-4 で刺激し16時間後にPE 標識CD23 mAb で染色し, FACS で測定した。

IgE 産生は B 細胞を抗CD40 mAbとIL-4 で刺激し12日間培養し, その培養上清をIgE 特異的ELISAにて測定した。

somatic hypermutation は, 末梢血単核球からRNAを抽出後, VH5 とC μ 領域に特異的なprimerによりRT-PCRを行い, 得られたPCR産物をTAクローニングし, 10クローン以上をsequenceして, germ lineのsequenceと比較して, その変異の頻度を比較検討した。

CD40 ligand (CD154) 発現は, 末梢血単核球をPMA+Ca ionophore で6時間刺激後, 抗CD40 ligand

mAb (5c8) で染色し, FACS で測定した。活性化の指標としてCD69抗原の発現を検討した。また, CD40 ligandのDNA sequenceも行った。

AID 遺伝子異常の検討は, 末梢血単核球からEBウイルスにてB cell lines を作製し, mRNAを抽出後cDNAを合成し, TA cloning vector にサブクローニングし, sequenceした。見出された変異は顆粒球より抽出したgenomic DNAをsequenceすることで確認した。

【結果】

RT-PCRによる検討では, resting B cells ではAIDの発現はみられなかった。抗CD40抗体とIL-4による刺激で, 4日後より発現が認められた。ま

た、EB cell lineでは正常コントロールおよび患者で発現が認められた。

そこで、EB cell lineから得られたRNAをもとにRT-PCRを行い、AID変異を16例で検討した結果、AID変異を持った患者が9人見出された (Table 2, P1-P9)。姉妹例 (P1, P2)、兄妹例 (P3, P4) ではAID変異がホモで認められた。他の孤発例3例でも、AID変異がホモに認められた。Arg112に変異を持つ患者が9人中6人に認められ、ホットスポットである可能性が考えられた。なお、P10-P16はAID sequenceは正常であった。

正常B細胞では、抗CD40 mAbとIL-4刺激により多量のIgEが産生される。しかし患者B細胞では全例で産生が認められなかった (Table 3)。一方、CD23発現は検討し得た3例では誘導され得た。somatic hypermutationの検討では、頻度については個人差はあるものの、いずれも正常者よりも著明な減少をみた。Fig. 1に典型的な結果を示す。腸重積を繰り返した症例で、その原因と考えられる肥大した腸管膜リンパ節が認められたため切除した。病理標本では、著明な杯中心の拡大が認められた (data not shown)。また、リンパ節、扁桃肥大は、AID変異を持った全症例において認められた。

なお、AID、CD40 ligandがともに正常であるが、血清IgG、IgA、IgEは低下しIgMは1000 mg/dl以上の高値をとる症例が7存在した。

【考案・結論】

AID遺伝子解析により、高IgM症候群II型の国内患者9人を見いだした。これらの患者では血清IgG、IgA、IgEは全て検出感度以下であった。このことから、生体内においてAIDはクラススイッチに不可欠な分子であることがわかる。AID発現はCD40刺激により誘導されること、患者B細胞の検討ではCD40+IL-4刺激でIgE産生が全く誘導されなかったことから、AIDはCD40の下流に存在していて、CD40刺激が引き起こすdeletional recombinationにおいて重要な役割を果たし、おそらくrecombinaseに直接的な影響を与えている分子であることが推察される。AIDはRNA editingに関

与した分子であり、Apo BのRNA editingを起こすAPOBECと相溶性が高い。AIDはCytidine deaminase活性を持っていることは証明されているが、その基質が何かについては不明である (2, 3)。今後、AIDと会合する分子群の同定により、AIDがクラススイッチにおいて果たす役割が解明されていくと考えられる。なお、多くのcommon variable immunodeficiency (CVID)患者B細胞は、抗CD40 mAbとIL-4刺激でIgEを産生するので、この点は、高IgM症候群II型とCVIDを鑑別する検査所見になると考えられる。

AIDはsomatic hypermutationにも重要な役割を果たしていると報告されているが、今回の検討でも、患者VH5領域 somatic hyper mutation 検討では、著明な低下が認められた。しかし、個人差が見られ、正常よりは減少しているものの、ある程度 somatic hypermutation が起きている症例も見られた。これが、AIDの変異の種類によるものか、環境要因などによるものかについては、今後症例を増やして検討する必要があると考えられた。

また、X連鎖高IgM症候群では、P. Carinii, Cryptococcus, CryptosporidiumなどT細胞機能不全による感染症が高頻度に見られるが、高IgM症候群II型患者では今までのところ認められていない。感染症としては細菌性の肺炎、中耳炎を反復することが多く、高IgM症候群II型患者では易感染性は、液性免疫の低下によるものが主体であると考えられた。

AID変異については、Arg112がHot spotである可能性が考えられた。今回見出された症例のうち5例は家族歴の見られない散発例であった。血縁結婚はなかったが、患者両親は、Arg112のヘテロ変異を有していた。これらのことから、Arg112変異をヘテロで保有している保因者は本邦で多くみられる可能性があり、今後検討していく予定である。このArg112の変異は現在までに報告されていないため、本邦のみに特徴的なhot spotであるかどうかについては明らかでない。また、この変異がどのような機能的異常をもたらすかについて、cytidine deaminase活性の異常、核移行、会合分子との結合障害を含め、今後の検討が必要であ

る。また、リンパ節、扁桃の肥大が全症例において認められた。リンパ節病理組織では、杯中心の過形成が認められた。この過形成が起きる原因については不明である。

なお、AID, CD40 ligand がともに正常な高IgM症候群も存在した。これらの患者でも B 細胞は抗 CD40 mAb と IL-4 刺激で IgE 産生しないことを認めている。したがって、AID 以外にも、クラススイッチに重要な役割を果たす CD40 下流のシグナル伝達分子が存在することが予測される。

【参考文献】

1) Revy, P. Muto, T. Levy, Y. et al. : Activation-Induced

Cytidine Deaminase (AID) Deficiency Causes the Autosomal Recessive Form of the Hyper-IgM Syndrome (HIGM2). *Cell*, 102:565-575, 2000.

2) Muramatsu, M. Kinoshita, K. Fagarasan, S. et. al. : Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell*, 102: 553-563, 2000.

3) Muramatsu M. Sankaranand VS. Anant S. et al. : Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* 274:18470-18476, 1999.

Characterization of hyper IgM syndrome type 2 patients.

Shigeaki Nonoyama, Kohsuke Imai, Masako Imai, Masayuki Nagasawa, Tomohiro Morio, Shuki Mizutani
Department of Pediatrics, Tokyo Medical and Dental University

Nine Japanese patients with hyper IgM syndrome type 2 were characterized. All patients had mutations in AID. Seven patients were from non-consanguineous families, and six of them had a missense mutation in the same codon, suggesting that this codon is the hot spot of AID mutation. In all patients, IgG, IgA and IgE levels in the sera were undetectable, and somatic hyper mutations were impaired in their peripheral blood B cells. B cells failed to produce detectable amounts of IgE if cultured with anti-CD40 and IL-4. These results indicate that AID plays indispensable roles in class switch and somatic hypermutation in human B cells.

Lymphoproliferative disorderをきたしたHyper-IgM syndromeの女児における T細胞レパートワーの解析と同種骨髄移植による治療

片 村 憲 司 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)
上 野 英 樹 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)
秋 山 祐 二 (国立京都病院小児科)
松 谷 隆 治 (塩野義製薬医科学研究所免疫部門)
鈴 木 隆 二 (塩野義製薬医科学研究所免疫部門)
眞 弓 光 文 (福井医科大学小児科)

Hyper-IgM症候群は性染色体劣性遺伝でCD40リガンドの遺伝子に異常があるタイプが報告されていたが、最近新しく常染色体劣性遺伝形式のActivation-induced cytidine deaminase遺伝子に異常を持つタイプも報告された。また、性染色体劣性遺伝形式を持つタイプに関してはその予後が悪いことがはじめて報告され、未だ責任遺伝子の明らかにされていないタイプも含め、これらの疾患の治療法についてはコンセンサスが無いのが現状である。我々はLymphoproliferative disorderを発症したHyper-IgM症候群の女児におけるT細胞レセプターレパートワーの解析を、生検したリンパ節と末梢血について行った。また、次第に全身のリンパ節腫脹が進行することより学内の倫理委員会に諮った後、HLA一致の弟より同種骨髄移植を行った。T細胞レセプターレパートワーの結果および、移植の方法、経過などについて報告し、Hyper IgM症候群における骨髄移植を含めた治療について考察する。

【はじめに】

Hyper-IgM症候群は高IgM血症を伴い感染症を繰り返す原発性免疫不全症であるが、単一の遺伝子異常ではなくこれらの症状をきたすいくつかの疾患の集まりであると考えられる。現在までに遺伝子異常が報告されたものとしては、CD40Lのmutationによる性染色体劣性遺伝を示すもの(HIGM1)¹⁾、activation-induced cytidine deaminase (AID)のmutationによる常染色体劣性遺伝を示すもの(HIGM2)²⁾があげられる。最近、HIGM1に関して、その予後がこれまで考えられていた以上に不良であることが報告され³⁾、抗体の補充を主とするこれまでの治療方針に関して再考の時期にあると考えられる。

一方、原発性免疫不全症におけるlymphoproliferative disorder (LPD)は非特異的反応性増殖を示す比較的軽いものから、悪性リンパ腫まで広範囲な組織

学的所見を示す多様な疾患であり、Hyper-IgM症候群は原発性免疫不全症の中でもLPDを起こす頻度の高い疾患の一つである^{4,5)}。

我々は、HIGM1、HIGM2のいずれにも分類されない女性の高IgM症候群においてLPDの発症を経験し、そのT細胞レセプターレパートワーを検索するとともに、進行するLPDに対し骨髄移植治療を行ったので報告する。また、自験例をもとにHyper-IgM症候群の治療について考察する。

【症例の現病歴及び検査】

症例は11才の女児で乳児期より気管支炎や中耳炎を繰り返している。5才時に肝脾腫と全身のリンパ節腫脹を主訴として他院を受診した。この時、高IgM血症と低IgG、IgA血症(IgG; 1.5 g/L, IgA; 0.4 g/L, IgM; 13 g/L)を指摘され、Hyper-IgM症候群と診断を受け、以後不定期的に免疫グロブリン

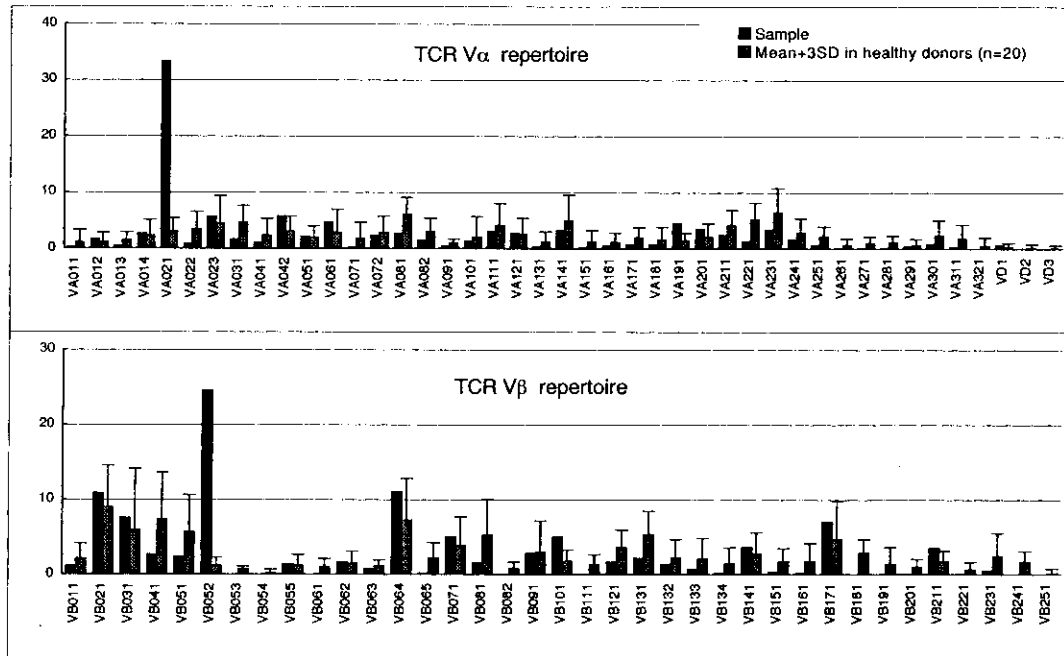


図1 患者末梢血 T 細胞レパートワの解析

の補充を受けていた。両親に血縁はなく、近親者に易感染性を示すものもない。その後 9 歳の時に、抗体の補充にもかかわらず肝脾腫、全身性のリンパ節腫脹が進行するため当院を紹介され受診、検査のため入院している。受診時の血清免疫グロブリン値は IgG が 1.22 g/L と依然低く、IgM は 16.4 g/L であった。サイトメガロウイルスの抗原血症が PCR で証明され、全身の CT で著名な肝脾腫と全身性の直径 1 から 4 cm のリンパ節腫脹を頸部、腋窩、傍大動脈部、腸管膜、肝脾門部に認めた。胸部縦隔には気管に接して大きな腫瘍を認めた。頸部リンパ節の生検では反応性増殖と考えられ EBER 陽性細胞が一部に見られた。

退院の後、外来で定期的にサイトメガロウイルス高力価の免疫グロブリンを定期的に補充しつつ経過を見ていたが、除々にではあるが全身のリンパ節腫脹が進行し、縦隔の腫瘍も増大し気管を圧迫するようになったため 11 才時に再入院となった。末梢血のリンパ球のサブセットでは CD4 (10.8%), CD8 (77.9%), CD20 (2.7%), CD56 (7.2%) と CD19, CD4 の減少と CD8 の増加を認めた。また、生検した腋窩リンパ節のリンパ球サブセットは CD4 (78.6%), CD8 (16.0%), CD20 (5.3%),

CD56 (0.5%) と CD4 陽性細胞が大部分を占めており、これらの CD4 陽性 T 細胞は RO 陽性でメモリータイプであった。リンパ節の悪性転化を疑い T 細胞レセプターと B 細胞免疫グロブリンの再構成をサザンプロット法で検討したが germ line のバンドを認めるのみであった。また、B 細胞や T 細胞、NK 細胞に EB ウイルスが感染することが報告されており、我々の症例でも腋窩リンパ節組織は EB ウイルスは PCR では陽性であったため、EB ウイルスゲノムの terminal repeat を用いた Southern blot 法で検討したが陰性であった。一方 adapter ligation PCR 法⁶⁾を用いた T 細胞レセプター α 鎖、 β 鎖レパートワの解析を行ったところリンパ節ではポリクローナルに分布が見られたが、末梢血では V α 2.1 と V β 5.2 のレセプターがそれぞれ 33.3%, 24.5% と著名に増加していた (図 1)。これらのレセプターを発現する細胞の clonality を検討するために、さらに CDR3 size spectratyping analysis により解析したところ、これらのレセプターは他のレセプターと異なり single band であり、これらのレセプターの組み合わせを持つ T 胞が末梢で単クローン性に増加していると考えられた (図 2)。また、⁶⁷Ga を用いたシンチグラムでは縦隔に集積が認められ

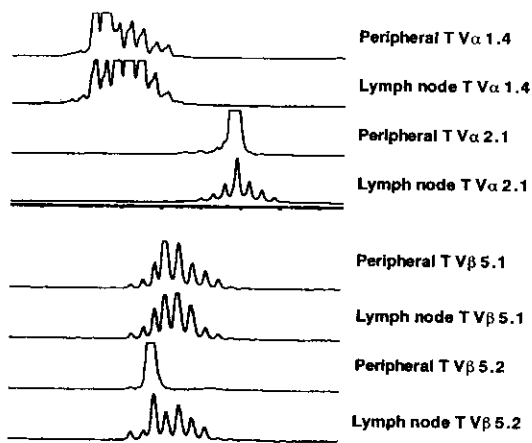


Figure 2. CDR3 size spectratyping analysis of peripheral T cells and lymph node T cells

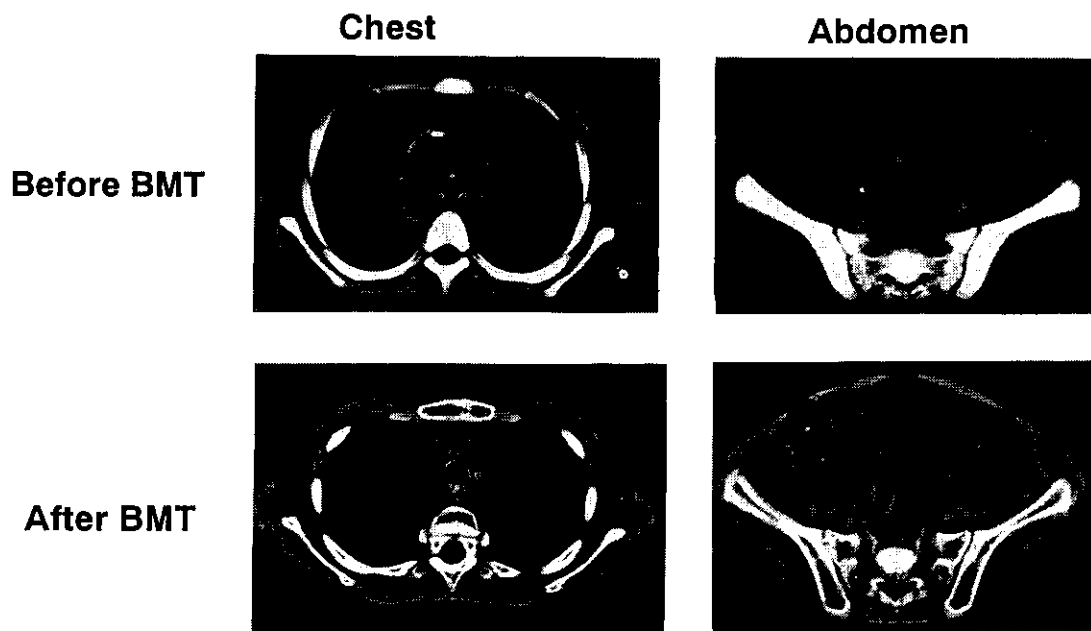


Figure 3. Mediastinal tumor and generalized lymph nodes' swelling

た。患児はCD4陽性 T 細胞のポリクローナルな増殖によるLPDを発症しており、その一部がいずれかのリンパ節で単クローン性に増殖し末梢血に流出した可能性が考えられた。

【骨髄移植】

患児は肺や消化管に慢性の感染症を持っており危険性はあったが、上記の結果から骨髄移植による治療が必要と考えられたため、大学の倫理委員会に諮った上で両親よりインフォームドコンセントを得、HLA一致、血液型不適合の弟より赤血球除去の骨髄移植を行うこととした。患児は

cytomegalovirus のアンチゲネミアがあり、腸管より *Salmonella london* と *Campylobacter* が分離されたため、移植 1ヶ月前よりCefoperazone (75 mg/kg/day) とganciclovir (10 mg/kg/day) を静注した。前処置はbusulfan (4 mg/kg×4) とcyclophosphamide (50 mg/kg×4) で行い、GVHD予防は移植前日よりのciclosporin Aと、methotrexate (15 mg at day 1 and 10 mg at day 3 and 5) で行った。HLA一致の弟より、血液型不適合があるため赤血球を除去し 5.2×10^9 個の単核球 (5.9%のCD34陽性細胞を含む) を移植した。移植40日に皮膚、眼、肺、肝、消化管にGVHDを発症し、methylprednisolone によるパル

ス治療を行ったがコントロールは困難であった。その後tacrolimus, predonisolone, methotrexateなどの組み合わせで治療を行いつつ、ステロイドを減量したところ咳嗽、喘鳴が出現し、FVC, FEV1.0等の呼吸機能が急速に低下した。Bronchiolitis obliteranceを合併したと診断し、最終的にはステロイドとmycophenolate mofetilの併用でコントロールした。全身のリンパ節腫脹と縦隔の腫瘍はGVHD発症後急速に縮小、消失した(図3)。患児は移植後約2年で呼吸機能障害を残し退院した。

【考察】

1) 末梢血中に認められたVβ2.1とVβ5.2のレセプターを持つT細胞について

これらのレセプターを持つT細胞はCDR3 length analysisではsingle peakであったため、単クローン性の増殖の結果と考えられる。頸部リンパ節ではこれらのレセプターを持つクローンは特異的に増殖していなかったが、生体のいずれかの部位で単クローン性の増殖を起こしていた可能性が高い。LPDでは生検したリンパ節の組織所見や分子生物学的検査結果が、採取した部位によって異なる場合があることが報告されており⁷⁾、今回の症例で採取した腋窩リンパ節では多クローン性の増殖であったことは、末梢血での結果と矛盾するものではない。単クローン性の増殖の部位として、⁶⁷Gaシンチグラムで陽性に出た縦隔腫瘍や、消化管透視や腹部CT検査で検出された消化管領域の大きなリンパ節などが考えられる。

また、LPDにおいては良性と考えられる反応性増殖から悪性リンパ腫まで様々な組織所見を示し、その原因にはEBウイルスが関与している場合が多い^{4, 5)}。従って、T細胞の増殖の原因を考えるに当たって、どこまでが免疫反応の結果としての増殖か、どこからが腫瘍細胞としての増殖か、判定困難な場合もある。今回の症例もLPDは観察されてから約6年の経過で徐々に進行し、⁶⁷Gaシンチグラムで陽性の縦隔腫瘍ですらシンチで陽性を確認してから約1年間その増大は非常にゆっくりしたものであった。これらの結果は今回検出された単クローン性のT細胞増殖が、患児が慢性に感

染していたEBウイルスや cytomegalovirus などのウイルスあるいは細菌などの何らかの pathogen に対する免疫防御反応の結果拡大したクローンである可能性も示唆する。

2) Hyper-IgM 症候群の治療について

当初Hyper-IgM 症候群の治療は抗体の補充でよいとされていた⁸⁾ がその後、原因遺伝子の一つであるCD40Lが明らかにされて以来、T細胞免疫不全も合併すること、その予後が25才では生存率が約20%と長期的には不良であることが報告され⁹⁾、この疾患に対する骨髄移植治療も考慮されるようになってきた。言うまでもなくHyper-IgM症候群は単一疾患ではないので、全てをまとめて論じるわけにはいかない。しかし、経過を観察する過程で、感染症、特に呼吸器の慢性感染症が治癒しない場合は、呼吸機能の持続的な低下をきたし将来骨髄移植が必要になった状況下で、移植不可能な状態になっていることが予想される。また、この疾患では硬化性胆管炎の合併頻度が高く、最近では肝機能障害のために先に肝臓移植を行ってから、骨髄移植を行った例も報告されている⁹⁾。従って、抗体の十分な補充を行っても、感染症をコントロールできず呼吸機能が持続的に低下する場合や、この症例のようLPDが観察期間中次第に進行する場合、進行性の硬化性胆管炎の合併がある場合などは、慢性の感染症により患者の状態が悪くならないうちに骨髄移植を考慮する事も選択肢の一つと考えられる。

また、この症例では血縁のHLA完全一致のドナーであったにもかかわらず、重度のGVHDを合併しその治療に苦慮した。また、慢性閉塞性細気管支炎の合併により呼吸機能が著しく低下し日常生活にも障害が残っている。一般に状態がよい場合には移植にふみきるのが難しい場合が多いことが予想されるだけに、理想的なドナーが見つかった場合でも場合によってはこのような重篤な合併症を起こす可能性があることは、両親あるいは本人に十分説明する必要がある。その上で患者よりの希望があれば、その時点で骨髄移植がこの疾患の治療選択肢となってもよいのではないかと考えら