

れる。

先に述べたようにHyper-IgM症候群で患者の長期予後に関しては、その報告が少ない。患者の臨床的経過観察を続け、患者の遺伝子異常に基づいた長期予後が明らかになれば、より適切な治療法の選択が可能になると考えられる。

#### 【参考文献】

- 1) DiSanto J. P., Bonnefoy J. Y., Gauchat J. F., Fischer A., and de Saint Basile G. CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361: 541-543, 1993.
- 2) Revy P., Muto T., Levy Y., Geissmann F., Plebani A., et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102: 565-575, 2000.
- 3) Levy Y., Espanol-Boren T., Thomas C., Fischer A., Tovo P., et al. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J. Pediatr.* 131: 47-54, 1997.
- 4) Elenitoba-Johnson K. S. J. and Jaffe E. S. Lymphoproliferative disorders associated with congenital immunodeficiencies. *Semin. Diagn. Pathol.* 14: 35-47, 1997.
- 5) Rosen F. S., Cooper M. D. and Wedgwood R. J. P. Review article. The primary immunodeficiencies. *N. Engl. J. Med.* 333: 431-440, 1995.
- 6) Matsutani T., Yoshida T., Tsuruta Y., Iwagami S. and Suzuki R. Analysis of TCRAV and TCRBV repertoires in healthy individuals by microplate hybridization assay. *Hum. Immunol.* 56: 57-69, 1997.
- 7) Nakanishi M., Kikuta H., Tonizawa K., Kojima K., Ishizaka A. et al. Distinct clonotypic Epstein-Barr virus-induced fatal lymphoproliferative disorder in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Cancer* 72: 1376-1381, 1993.
- 8) Banatvala N., Davies J., Kanariou M., trobel S., Levinsky R., et al. Hypogammaglobulinemia associated with normal or increased IgM (the hyper IgM syndrome) : a case series review. *Arch. Dis. Child.* 71:150-152, 1994.
- 9) Hadzic N., Pagliuca A., Rela M., Portmann B., Jones A., et al. Correction of the Hyper-IgM syndrome after liver and bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* 342: 320-324, 2000.

### Analysis of T cell receptor repertoires in a patient with Hyper-IgM syndrome complicated with lymphoproliferative disorder and treatment with bone marrow transplantation.

Kenji Katamura<sup>1)</sup>, Hideki Ueno<sup>1)</sup>, Yuji Akiyama<sup>2)</sup>, Takaji Matsutani<sup>3)</sup>, Ryuji Suzuki<sup>3)</sup>, Mitsufumi Mayumi<sup>4)</sup>

Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Kyoto University<sup>1)</sup>

Department of Pediatrics, Kyoto National Hospital<sup>2)</sup>

Division of Immunology, Shionogi Research Laboratories<sup>3)</sup>

Department of Pediatrics, Fukui Medical university<sup>4)</sup>

We report a patient with Hyper-IgM syndrome who received related allogeneic BMT for lymphoproliferative disorder due to proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells. Molecular analysis revealed that CD4<sup>+</sup> T cells in a lymph node were polyclonal and lacking EBV genome, but demonstrated a specific increase in T cells using Va2.1 and Vb5.2 in periphery. Systemic lymphadenopathy and mediastinal tumor gradually enlarged for several years and main bronchus

was compressed by the tumor before BMT. Related BMT reconstructed cellular immunity and systemic lymphadenopathy disappeared. We discuss the pathology of monoclonally proliferated T cells in periphery and BMT indications for Hyper-IgM syndrome.

---

## Btk蛋白正常なX連鎖無 $\gamma$ -グロブリン血症の3例

金 兼 弘 和 (富山医科薬科大学小児科)  
 王 悦 (富山医科薬科大学小児科)  
 二 谷 武 (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 $\gamma$ -グロブリン血症 (XLA) のフローサイトメトリーによる簡易診断を当教室で樹立し、1998年から2000年までの3年間に100例 (86家系) のB細胞欠損低 $\gamma$ -グロブリン血症男児例を対象としてフローサイトメトリーによるスクリーニングを行った。88例 (74家系) でBtk蛋白の低下を認め、XLAと診断した。二谷らはD521H変異を持つBtk蛋白の正常なXLAを報告しているが、Btk蛋白正常であった12例のBtk遺伝子解析を行ったところ、2例でミスセンス変異 (R28C、R307S) を持つXLAが同定された。二谷らの報告と併せると111家系のXLAのうち108家系 (97%) がフローサイトメトリーにて診断できたが、Btk蛋白正常なXLAが3例存在した。R28、R307、D521はそれぞれPH、SH2、Kinaseドメイン内でシグナル伝達に重要な部位であり、興味深い知見と思われた。

### 【はじめに】

X連鎖無 $\gamma$ -グロブリン血症 (XLA) は繰り返す細菌感染、末梢血B細胞欠損、低 $\gamma$ -グロブリン血症を臨床的特徴とする代表的な免疫不全症である。その責任遺伝子がTsukadaら<sup>1)</sup>、Vetrieら<sup>2)</sup>によりBtkと同定されたことより、Btk遺伝子解析が広く世界的に行われている (BTKbase: <http://www.uta.fi/laitokset/imt/bioinfo/BTKbase>)<sup>3)</sup>。当教室の二谷ら<sup>4)</sup>は抗Btkモノクローナル抗体 (48-2H) を用いたフローサイトメトリーによるXLAの患者・保因者診断法の有用性を報告したが、1998年以降当教室では低 $\gamma$ -グロブリン血症を対象としてフローサイトメトリーによるXLAの診断のスクリーニングを行ってきた。そのスクリーニングの過程で、Btk蛋白正常なXLA患者に遭遇したので、その詳細について報告する。

### 【対象と方法】

1998年1月から2000年12月までの3年間に全国の諸施設より検査依頼を受け100例 (86家系) のB細胞欠損低 $\gamma$ -グロブリン血症男児とその家族を対

象としてフローサイトメトリーによるスクリーニングを行い、88例 (74家系) でBtk蛋白の低下を認め、XLAと診断し得た。74家系のうち72家系では翻訳領域にBtk遺伝子変異 (ミスセンス変異26例、ナンセンス変異11例、欠失17例、挿入4例、スプライシング異常14例) が同定された。二谷らは41家系のXLAをフローサイトメトリーで診断したが、ミスセンス変異の1例 (D521H) ではBtk蛋白が正常であったと報告している。そこでBtk蛋白が正常であった12例においてもBtk遺伝子解析を行った。

表1 Btk蛋白正常のXLAの臨床的特徴とBtk遺伝子変異

患者	1	2	3
診断時年齢	4歳	6歳	8ヶ月
血清IgG (mg/dl)	174	NA	36
血清IgM (mg/dl)	< 29	8	8
血清IgA (mg/dl)	< 29	7	< 8
末梢血B細胞 (%)	< 0.1	< 0.1	0
家族歴	なし	なし	なし
Btk遺伝子変異			
ドメイン	PH	SH2	Kinase
塩基置換	C214>T	A1053>G	G1693>A
アミノ酸変異	R28C	R307S	D521H
キナーゼ活性	NT	NT	なし

NA: 評価不能 ( $\gamma$ -グロブリン置換療法のための)、NT: 未検査

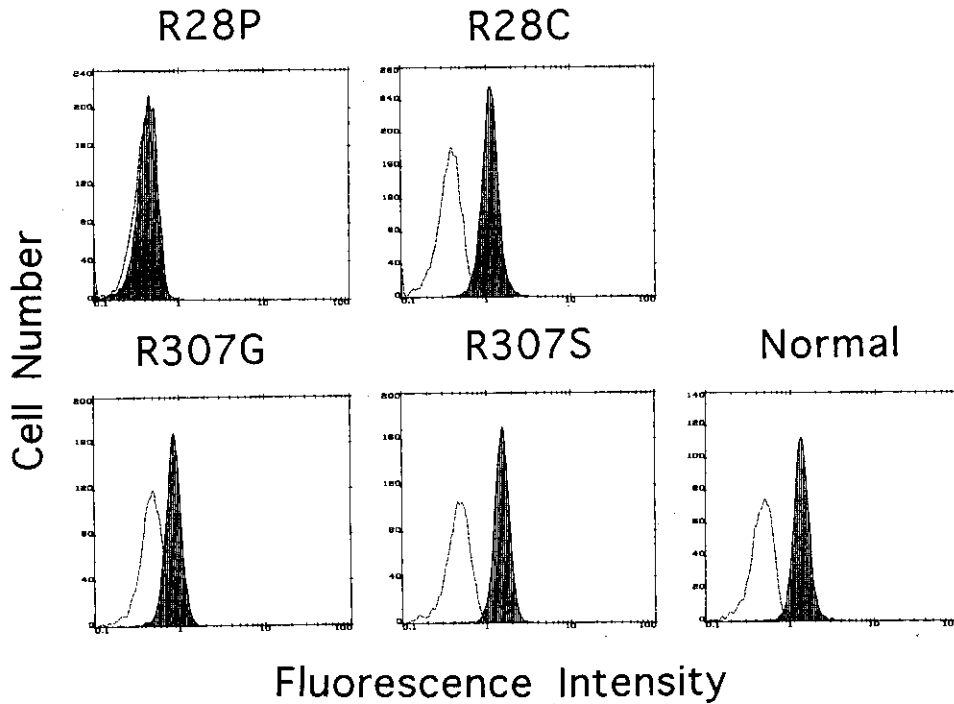


図1 R28ならびにR307アミノ酸置換を伴うXLA患者の単球におけるBtk蛋白の発現  
 抗Btkモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーを行った。実線と点線は  
 それぞれ抗Btkモノクローナル抗体(48-2H)とコントロール抗体による染色を示す。

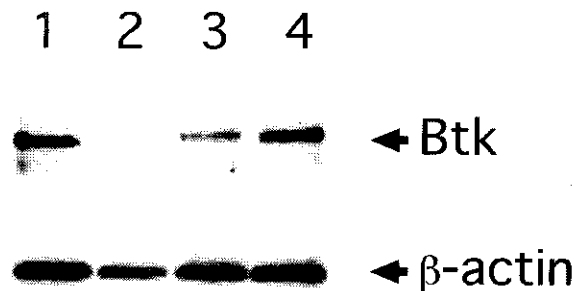


図2 R28PならびにR28Cを伴うXLA患者の単球におけるBtk蛋白の発現  
 R28PならびにR28Cを伴うXLA患者の末梢血単核球よりセルソーティングにて得られた単球にお  
 けるBtk蛋白の発現を抗Btkモノクローナル抗体(PHドメインを認識する13-3B)とβ-アクチンに  
 対する抗体によりウエスタンブロットを行った。レーン1, 4は正常対照, レーン2と3はそれ  
 ぞれR28P, R28CのXLA患者に由来する。

### 【結果】

Btk蛋白正常な低γ-グロブリン血症12例のBtk遺  
 伝子解析を行ったところ、2例でミスセンス変異  
 が同定された。1例はPHドメインのC214>Tによる  
 R28Cであり、もう1例はSH2ドメインのA1053>G  
 によるR307Sであった。それらの臨床的特徴を、  
 以前に二谷ら<sup>4)</sup>が報告したBtk蛋白正常なXLA  
 (D521H)とともに表1に示した。3例とも家族歴  
 はないものの、乳時期から小児期に発症し、著明

な低γ-グロブリン血症、末梢血B細胞欠損を伴い、  
 典型的なXLAの臨床像であった。

R28, R307が別のアミノ酸に置換したR28P,  
 R307GのXLAではフローサイトメトリー上Btk蛋白  
 は低下していた(図1)。またR28PならびにR28C  
 のXLA症例よりセルソーティングにて単球を得  
 て、Btk蛋白に対する別のモノクローナル抗体  
 (43-3B)を用いたウエスタンブロットを行ったと  
 ころ、R28PはBtk蛋白が欠損していたが、R28Pで

はBtk蛋白が検出された (図2)。

### 【考案】

100例 (86家系) のB細胞欠損を伴う低 $\gamma$ -グロブリン血症男児例を対象として、フローサイトメトリーによるスクリーニングを行い、88例 (74家系) をXLAと診断した。Btk蛋白正常であった12例におけるBtk遺伝子解析の結果、2例でミスセンス変異が同定された。二谷ら<sup>4)</sup> の報告と併せると111家系のXLAのうち108家系 (97%) がBtk蛋白の低下を示し、XLAの診断におけるフローサイトメトリーの有用性がさらに確認された。しかしながらBtk蛋白正常なXLAも3例存在し、確定診断にあたってはBtk遺伝子解析も重要である。

フローサイトメトリーで用いた抗Btkモノクローナル抗体 (48-2H) はSH3ドメインを認識する抗体であり<sup>5)</sup>、Btk蛋白正常なXLA 3例で同定されたミスセンス変異 (R28C, R307S, D521H) の部位はそれぞれPH, SH2, Kinaseドメインに存在することより、見かけ上の問題でなく、Btk蛋白の安定性によるものと考えられる。さらに同部位の変異であるR28P, R307GではBtk蛋白の低下を認めた。R28CはXLAのマウスモデルとされるxidマウスで同定されたアミノ酸変異と同一であり<sup>6,7)</sup>、R28はPHドメイン内でイノシトール3リン酸の結合に重要な部位であることが知られている<sup>8)</sup>。R307はSH2ドメイン内でリン酸化チロシン残基と結合する配列 (FLEVRES) 内にあり、BLNKとの結合にも重要であることが報告されている<sup>9)</sup>。D521はKinaseドメインのcatalytic loopに存在し、Btkのキナーゼ活性に重要な部位である。以上のようにBtk蛋白正常なXLAで同定されたミスセンス変異の部位はいずれもBtk蛋白と会合する蛋白の結合に重要な部位であり、興味深い所見と思われた。今後は今回同定されたBtk蛋白の安定性のメカニズムの解明等を行いたい。

### 【文献】

1) Tsukada S, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 72:279-290, 1993.

- 2) 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.
- 3) Vihinen M, et al. BTKbase, mutation database for X-linked agammaglobulinemia (XLA). *Nucleic Acids Res* 26:242-247, 1998.
- 4) 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.
- 5) Hashimoto S, et al. Identification of Bruton's tyrosine kinase (Btk) gene mutations and characterization of the derived proteins in 35 X-linked agammaglobulinemia families: a nationwide survey of Btk deficiency in Japan. *Blood* 88:561-573, 1996.
- 6) Thomas JD, et al. Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science* 261:355-358, 1993.
- 7) Rawlings DJ, et al. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* 261:358-361, 1993.
- 8) Fukuda M, et al. Mutation of the Pleckstrin homology domain of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficiency impaired inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding capacity. *J Biol Chem* 271:30303-30306, 1996.
- 9) Hashimoto S, et al. 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.

## Three cases of X-linked agammaglobulinemia with normal expression of Btk protein

Hirokazu Kanegane, Yue Wang, Takeshi Futatani, Toshio Miyawaki

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

A simple and rapid diagnosis of X-linked agammaglobulinemia (XLA) with flow cytometry has been established in our laboratory, and we have screened 100 hypogammaglobulinemic males with absent B cells (unrelated 86 families) from 1998 to 2000 with the flow cytometric detection of XLA. Eighty eight patients (74 families) demonstrated deficient expression of Btk protein, and they were diagnosed as XLA. In the previous report, an XLA with D521H mutation expressed normal Btk protein. Therefore Btk gene analysis was performed in the 12 patients with normal Btk expression, and two XLA patients with missense mutations (R28C and R307S) were identified. Combined with the previous report, 108 (97%) out of 111 XLA patients could be diagnosed by the flow cytometric analysis, however, 3 XLA patients showed distinctly normal Btk expressions. It was intriguing that the positions of R28, R307, and D521 identified here were known to be important in B-cell signal transduction in PH, SH2, and Kinase domains of Btk gene, respectively.

---

## X-linked agammaglobulinemia (XLA) の女児例

野村明彦 (九州大学成長発達医学)  
高田英俊 (九州大学成長発達医学)  
金兼弘和 (富山医薬大学小児科)  
井原健二 (九州大学成長発達医学)  
塚田聡 (大阪大学分子病態内科学)  
宮脇利男 (富山医薬大学小児科)  
原寿郎 (九州大学成長発達医学)

### 【はじめに】

X連鎖無 $\gamma$ グロブリン血症 (XLA) は、Btk 遺伝子の変異によって起こる伴性劣性遺伝形式をとる液性免疫不全だがXLAの女性保因者は無症状であり、女性のXLAはこれまで報告がない。今回、我々は、Btk 遺伝子の変異を認めたXLAの女性例を経験した。

### 【方法】

#### 1. Btk 遺伝子の解析

患児および家族の単核球より genomic DNA を抽出後、Btk exon 6 から exon 14 の direct sequencing を行った。また、同領域の Btk mRNA の発現を RT-PCR 法にて解析した。

#### 2. 骨髄 B 細胞の解析

骨髄液より単核球を単離後、細胞表面CD19および細胞内 VpreB,  $\mu$ , TdTを染色し、CD19陽性領域でのフローサイトメトリー解析を行った。

#### 3. X 染色体不活化解析

患児、家族の単核球および口腔粘膜細胞より genomic DNA を抽出後、メチル化感受性制限酵素である HpaII 処理および未処理の DNA について、ヒトアンドロゲンレセプター-exon 1のCAG repeat 領域でのPCRを行った。

#### 4. X-inactive specific transcript (Xist) 遺伝子の解析

患児、家族の単核球より genomic DNA および mRNA を抽出後、Xist promoter 領域 (1500bp) の direct sequencing および Xist mRNA の発現を RT-

PCR法にて解析した。

### 【症例】

症例：10か月、女児。

主訴：発熱、咳嗽

家族歴：父がXLAの診断で $\gamma$ -グロブリン療法を受けている。血族結婚ではなく、母方の家族歴には特記すべきことはなかった。

既往歴：発達異常なし

現病歴：平成12年1月(8か月)頃より感冒症状をくり返していた。同年3月、中耳炎を発症。この際、易感染性および免疫不全の家族歴から免疫グロブリンを測定したところ異常低値を認めたため、当科へ入院した。

現症：身長72cm(-0.01SD)、体重8338g(-0.32SD)、体温36.8℃、皮膚異常なし、眼球・眼瞼結膜異常なし、咽頭扁桃認めず、リンパ節触知せず、呼吸音・心音異常なし、腹部肝脾腫なし、外性器正常、外表奇形なし。

主な初診時検査を表1に示す。免疫グロブリンの著明な低下を認めたが、T細胞、NK細胞機能には異常は認められなかった。また、染色体検査ではX染色体の高精度分染を含め異常はなかった。末梢血リンパ球サブセットでは、患児は父親と同様にB細胞が著明に減少していた(表2)。さらに末梢血単核球細胞内Btk蛋白のフローサイトメトリー解析において、患児でBtk蛋白の発現低下が著明に認められた(図1)。患児以外では父親と同様

表 1 入院時検査成績

(血液検査)	(生化学検査)	(血清・免疫検査)
WBC 21,640 / $\mu$ l	T.P 6.4 g/dl	IgG 6 mg/dl
neut 28.5%	BUN 10.0 mg/dl	IgA 1 mg/dl
lymp 63.0%	Cr 0.2 mg/dl	IgM 5 mg/dl
mono 6.5%	U.A 3.0 mg/dl	IgE <50 IU/ml
eos 1.0%	T-Bil 0.2 mg/dl	PHA 315 S.I.%
RBC 450x10 <sup>4</sup> / $\mu$ l	AST 179 IU/l	(normal 321 $\pm$ 67)
Hb 12.0 g/dl	ALT 224 IU/l	NK活性 46.2 % Lysis
Ht 36.3%	LDH 1134 IU/l	(normal 30.8 $\pm$ 10.0)
Plt 50.3x10 <sup>4</sup> / $\mu$ l	ALP 984 IU/l	(染色体検査)
	$\gamma$ -GTP 36 IU/l	G band 46, XX
	CPK 108 IU/l	高精度分染 異常なし
	CRP 0.6 mg/dl	(X q21.3-q22)

表 2 患児および家族の末梢血リンパ球サブセット

	CD3 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>	CD56 <sup>+</sup>
患児	90.5	62.4	25.8	0.06	5.2
父	82.0	41.8	37.8	0.04	7.8
母	82.0	50.3	32.2	5.6	3.4
兄	70.9	43.6	26.4	16.6	5.7
父方祖母	66.6	44.3	19.5	4.7	18.8

数値は単核球分画の発現を%で示す

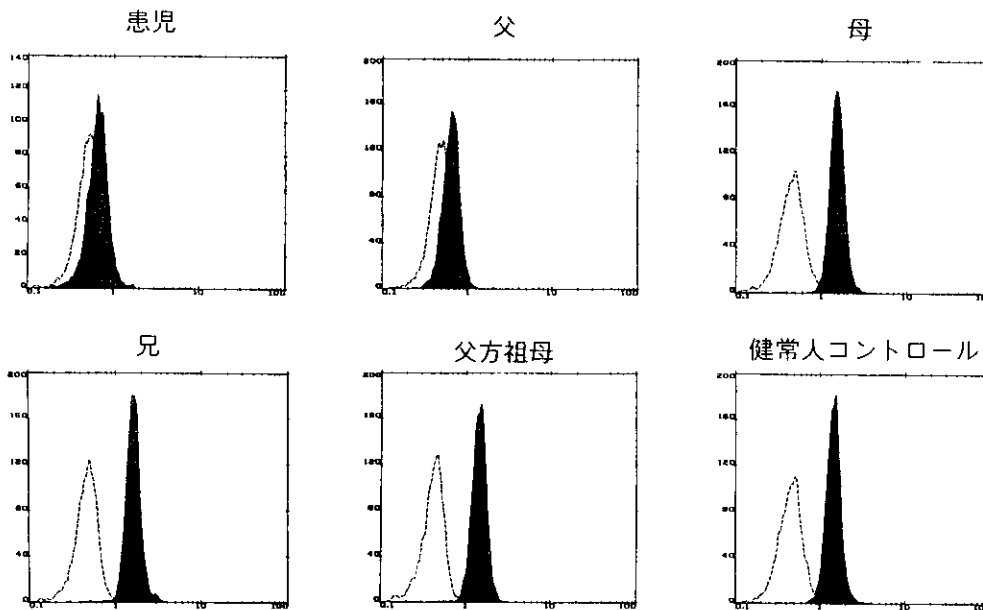


図 1 末梢血CD14陽性細胞内Btk蛋白の発現 ■はBtkを示し、□はコントロールを示す。

の低下がみられたが母親の発現は正常パターンであった。以上の結果よりXLAと診断した。

## 【結果】

### 1. Btk遺伝子解析

Btk genomic DNAからのdirect sequencingにより、父親にintron 11でグアニンからアデニンへの1塩基置換をhomozygousに認め、患児は同部位の変異をheterozygousに認めた(図2)。

Btkエクソン6から13領域のmRNAの発現では、患児、父親ともに正常の723bpのバンドが検出されず、父親では588bpと594bpの2種類、患児はさ

らに643bpを加えた3種類の異常なsmallバンドを認めた(図3A)。これらのバンドについてdirect sequencingを行ったところ、各領域が欠如したsplicing異常が同変異によって起こっていた(図3B)。

### 2. 骨髄B細胞の解析

患児骨髄におけるB前駆細胞のフローサイトメトリー解析を示します。健常人に比べ、患児のCD19陽性細胞のほとんどがpro-B (VpreB<sup>+</sup>, TdT<sup>+</sup>,  $\mu$ <sup>-</sup>)細胞で占めており、Btkの機能異常によるpro-Bからearly pre-Bへの成熟障害を認めた(図4)。

### 3. X染色体不活化解析およびXist遺伝子解析



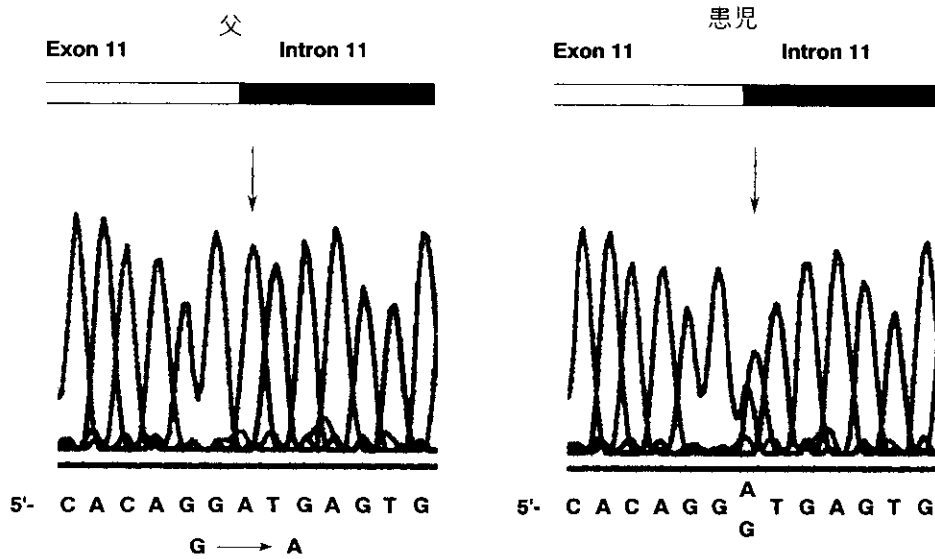


図2 患者および父のBtk遺伝子変異

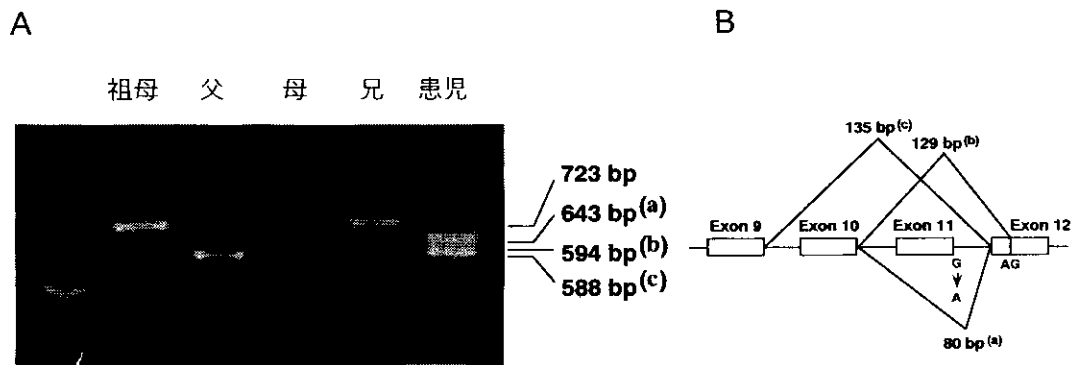


図3 Btk exon 6-exon13領域のcDNA amplification 母、兄、祖母では723 bpのnormal productが認められたが、父では2種 (b, c)、患者では3種 (a, b, c) のsmall size productを認めた (A)。これらは各領域のsplicing異常であった (B)。

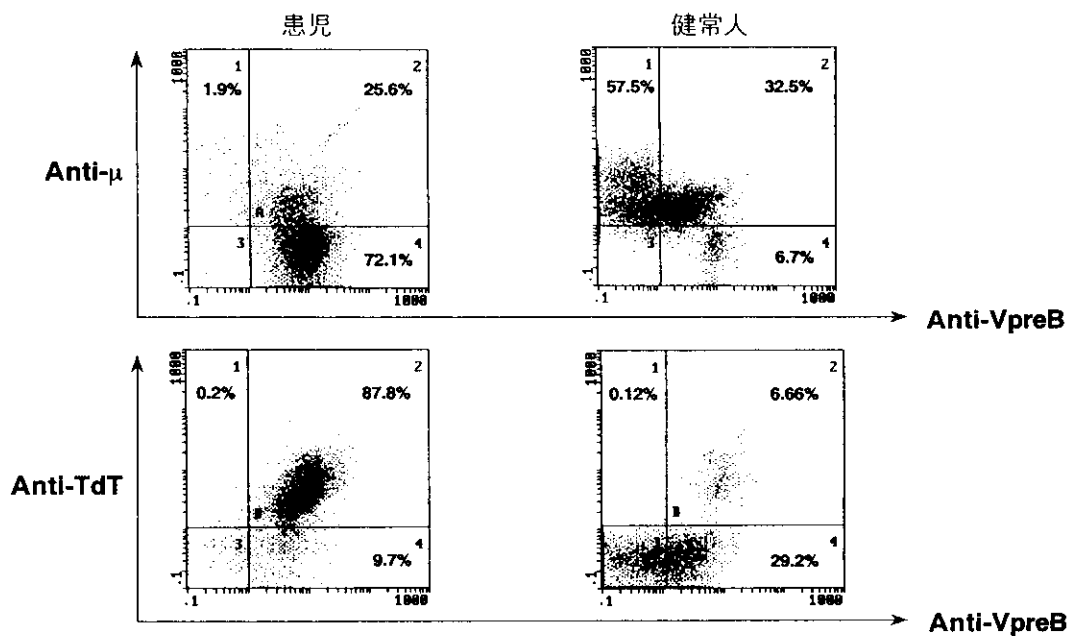


図4 患者骨髄におけるB細胞系のフローサイトメトリー解析

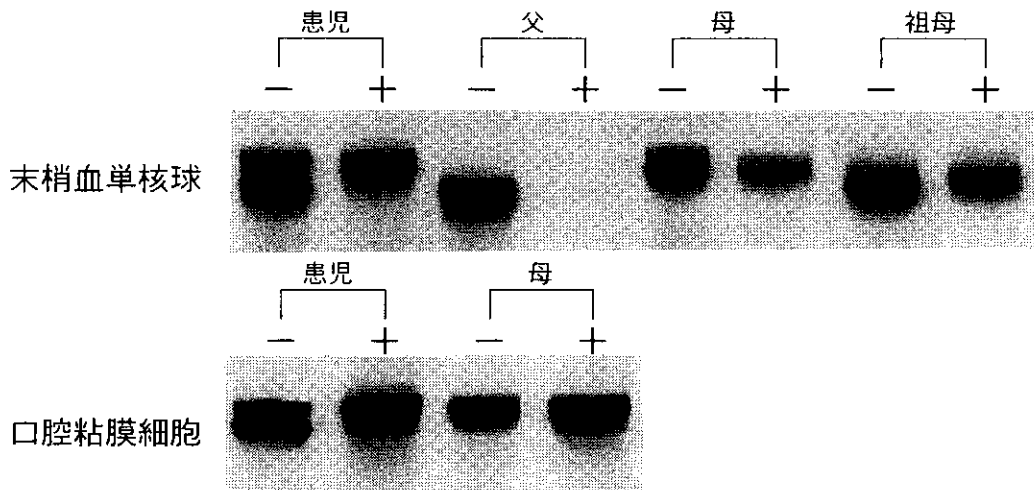


図5 X染色体不活化解析 マイナス(−)はHpa II未処理DNAを示し、プラス(+)はHpa II処理DNAを示す。

患児はBtk遺伝子のheterozygous変異であるにもかかわらずBtk mRNAおよび蛋白の発現を欠き発症に至ったことから、X染色体の不活性化について解析した。母親および父方祖母ではHpa II処理後もそれぞれの両親に由来する2種のバンドが検出されたが、患児では血液細胞、体細胞ともに母親由来のバンドのみが検出され、母親由来のX染色体がほぼ完全に不活性化されていた(図5)。X染色体の不活性化を制御する因子であるXistについてはプロモーター領域のシーケンスおよびXist mRNAの発現に異常は認めなかった。

#### 【考察】

今回、Btk 遺伝子のヘテロ変異にもかかわらず、正常のBtk mRNAや蛋白の発現がみられずXLAを発症した女性例を経験した。その原因として患者では母由来のX染色体のnon-random inactivationがみられた。通常、X染色体は初期の胚形成期にランダムに不活性化され、それぞれの細胞で同じX染色体の不活性化が継代されていく<sup>1)</sup>。これまでX染色体劣性遺伝性疾患におけるX染色体の不活化不均衡による女性での発症はDuchenne型筋ジストロフィー症<sup>2)</sup>やWiscott-Aldrich 症候群(WAS)<sup>3)</sup>などの報告がある。ParoliniらのWASの女性保因者における発症例では、正常なWAS遺伝子を有するX染色体の極端な不活性化により発症したと思われるが、WASの女性保因者でも異常WAS mRNAを発現している成

熟顆粒球やリンパ球が末梢血で見られること<sup>4)</sup>や、X染色体の不活性化がランダムにも関わらずWAS遺伝子のヘテロ変異による女性X-linked thrombocytopeniaの報告<sup>5)</sup>があることなどから、WASにおいては必ずしも正常なX染色体が完全に不活性化されなくとも発症する可能性がある。しかし、Btk分子はB細胞の分化に必須であり、XLAの女性保因者では通常正常なBtk分子を発現しているB細胞のみが選択的に分化し、結果的に成熟B細胞でXLA遺伝子異常のあるX染色体のnon-random inactivationを示す<sup>6)</sup>。すなわち、正常なBtkを有するB前駆細胞が若干でも存在すればそれらの細胞が選択的に成熟してゆくことで発症には至らないと思われることから、本症例では正常なX染色体がほぼ完全に不活性化されていると考えられた。その原因に関連しX染色体の不活性化を制御する因子として知られているXist遺伝子<sup>7)</sup>について検討を行ったが異常を認めず、不活性化の機序については不明であるが、母親ではランダムな不活性化がみられていることから、胎生期における何らかの原因によって引き起こされたものと考えられた。

#### 【文献】

- 1) Lyon MF. Mechanisms and evolutionary origins of variable X-chromosome activity in mammals. Proc R Soc Lond B Biol Sci 1974; 187:243-68.
- 2) Pegoraro E, Schimke RN, Garcia C, et al. Genetic

- and biochemical normalization in female carriers of Duchenne muscular dystrophy: evidence for failure of dystrophin production in dystrophin-competent myonuclei [see comments]. *Neurology* 1995; 45:677-90.
- 3) Parolini O, Ressmann G, Haas OA, et al. X-linked Wiskott-Aldrich syndrome in a girl. *N Engl J Med* 1998; 338:291-5.
  - 4) Ariga T, Yamada M, Wada T, Saitoh S, Sakiyama Y. Detection of lymphocytes and granulocytes expressing the mutant WASP message in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome. *Br J Haematol* 1999; 104:893-900.
  - 5) de Saint Basile G, Lagelouse RD, Lambert N, et al. Isolated X-linked thrombocytopenia in two unrelated families is associated with point mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene. *J Pediatr* 1996; 129:56-62.
  - 6) Fearon ER, Winkelstein JA, Civin CI, Pardoll DM, Vogelstein B. Carrier detection in X-linked agammaglobulinemia by analysis of X-chromosome inactivation. *N Engl J Med* 1987; 316:427-31.
  - 7) Plenge RM, Hendrich BD, Schwartz C, Arena JF, Naumova A, Sapienza C, Winter RM, Willard HF. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nature Genetics* 1997;17:353-6.

## X-linked agammaglobulinemia in a girl

Akihiko Nomura<sup>1</sup>, Hidetoshi Takada<sup>1</sup>, Hirokazu Kanegane<sup>2</sup>, Kenji Ihara<sup>1</sup>, Satoshi Tsukada<sup>3</sup>, Toshio Miyawaki<sup>2</sup>, Toshiro Hara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Toyama Medical and Pharmaceutical University

<sup>3</sup>Department of Medicine III, Osaka University Medical School

X-linked agammaglobulinemia (XLA), one of the most common humoral immunodeficiencies, is caused by mutations in the gene coding for Bruton's tyrosine kinase (Btk) protein. Btk deficiency causes a maturational block of B cells in the stage of pro-B cells to pre-B cells in the bone marrow. Patients with XLA have decreased numbers of mature B cells in their peripheral blood and lack all immunoglobulin isotypes, causing susceptibility to severe bacterial infections. Female carriers of the disorder have been considered to have no clinical symptoms or signs of the gene defect because of the preferential selection of normal, non-mutated X chromosome in their hematopoietic cells. Although X-linked recessive disorders occur in females by nonrandom inactivation of normal X-chromosome, no female patients of XLA have been reported previously. We report here a girl with XLA with heterozygous Btk gene mutation. We found X chromosomes of her peripheral and oral mucosal cells showed nonrandom methylation, while those of her mother's or paternal grandmother's peripheral blood cells were methylated at random. These results confirmed that XLA does occur in females by complete nonrandom X chromosome inactivation.

## BLNKによって媒介されるSyk依存的なBtkの活性化機構

塚 田 聡 (大阪大学医学部分子病態内科)  
馬 場 義 裕 (大阪大学医学部分子病態内科)

伴性劣性無ガンマグロブリン血症 (XLA) の責任分子であるBtkはB細胞内に存在する他のチロシンキナーゼであるLynとSykによって活性化されると考えられる。LynによるBtkの活性化機構については種々の研究があるが、Sykによる活性化の分子機構については不明の点が多い。今回我々はSykによるBtkの活性化がB細胞に発現しているアダプター分子BLNKを介して生じることを明らかにした。

### 【はじめに】

ヒトB細胞分化が正常に進行するには、Btkの活性化が生じ、かつそれが適切に制御されている必要がある。Btkの活性化はB細胞に存在する他のチロシンキナーゼ (以下PTK; Lyn, Syk など) によって媒介されると考えられる。LynなどのSrcファミリーのPTKによる活性化機構は従来次のように考えられてきた。すなわち、B細胞レセプターの刺激後まずLynおよびPI-3キナーゼの活性化が生ずる。活性化したPI-3キナーゼはホスファチジルイノシトール-3, 4, 5三リン酸 (PIP3) を生成するが、BtkのPH (プレクストリン・ホモロジー) ドメインはPIP3と結合親和性を有するため、BtkはPIP3の存在する細胞膜上にリクルートされる。それによって、もともと膜上に存在するLynとBtkが接近し、前者によってBtkのキナーゼドメインに存在する551番のチロシン残基 (Y551) がリン酸化される。Y551のリン酸化はキナーゼドメインのコンフォメーションを変化させ、Btkの活性を上昇させる、と考えられた。最近、Lynとは異なるファミリーに属するPTKであるSykもBtkの活性化に関与することが示唆されてきた。例えば、Sykの欠失したB細胞やマスト細胞ではBtkの活性化が非常に減弱することが報告された。しかしながら非血球系の細胞にBtkとSykを共発現させてもBtkの活性化やリン酸化はみられず

(BtkとLynを共発現させた場合はそれらが生じる)、SykによるBtk活性化には血球細胞特異的に発現する第3の分子が関与していることが推測された。前々回の班会議で我々は血球細胞特異的アダプター分子BLNK (B cell linker protein) がBtkと相互作用し、BtkおよびSykの活性を下流分子へ伝えるリンカーの役割を果たしている事を報告した。我々の観察のようにBLNK上でBtkとSykが相互作用するのであれば、SykによるBtkの活性化にもBLNKが関与している可能性がある。本報告ではBLNKを介したSykによるBtkの活性化機構について解析した。

### 【対象と方法】

キナーゼ活性を欠失したBtk (Btk (K-) あるいはK430R: リジン430番をアルギニンに置換)、SH2ドメインの結合能を欠失したBtk (Btk (SH2-) あるいはR307K: アルギニン307番をリジンに置換)、およびそのdouble mutant [Btk (K-/SH2-)], キナーゼドメインにおけるリン酸化部位を変異させたBtk (Y551F: チロシン551番をフェニルアラニンに置換) はPCR-based mutagenesisによって作製した。Lyn, Syk, あるいはBLNKを欠失させたDT40細胞は関西医大・黒崎知博博士より供与された。マウス抗チキンIgM抗体M4はDr. Max Cooper (アラバマ大学) より供与された。

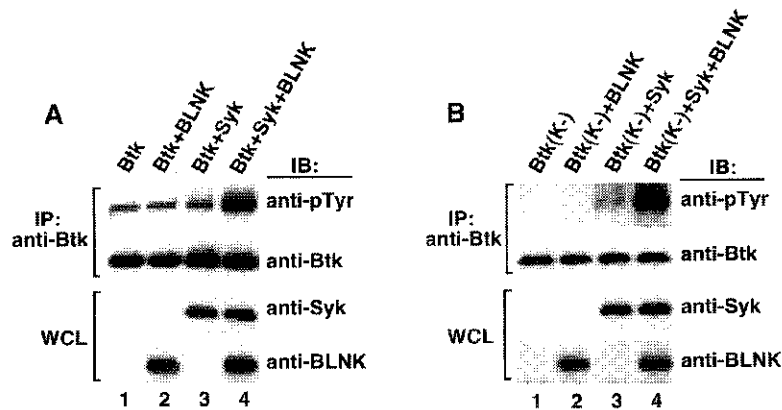


Fig. 1. BLNK mediates Syk-dependent Btk phosphorylation. cDNAs of Btk (A) or Btk(K-) (B) were cotransfected into 293T cells with the indicated combinations of Syk and/or BLNK. Btk was immunoprecipitated (IP) from cell lysates with anti-Btk mAb 48-2H, and the immune complexes were separated by 4–20% gradient SDS-PAGE gels, then immunoblotted (IB) with anti-phosphotyrosine (pTyr) mAb 4G10 (Top). The filter was reprobed with anti-Btk mAb 43-3B to confirm the equal amount of precipitated Btk (second panel). The whole cell lysates (WCL) were immunoblotted with the anti-Syk Ab (third panel) or the anti-BLNK Ab (Bottom) to detect the expression of each protein.

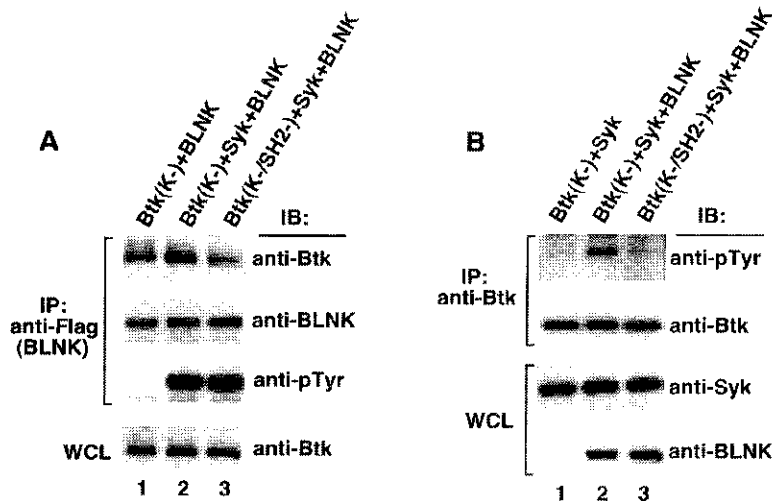


Fig. 2. Syk-dependent Btk phosphorylation requires the interaction of BLNK and Btk-SH2 domain. cDNAs of Btk [Btk(K-) or Btk(K-)/SH2-)] were cotransfected into 293T cells with the indicated combinations of Syk and/or BLNK. (A) Assessments of the coprecipitation of Btk and BLNK were performed by tagging BLNK with Flag sequence as described in our previous report (12). Flag-tagged BLNK was immunoprecipitated from cell lysates with anti-Flag mAb M2. Immune complexes were immunoblotted with anti-Btk mAb 43-3B for detecting the coprecipitation of Btk (Top), followed by reprobing with anti-BLNK Ab (second panel). The Syk-dependent tyrosinephosphorylation of BLNK was detected by immunoblotting with anti-pTyr mAb 4G10 (third panel). Equal expression level: of Btk, Syk, and BLNK in each experiment were confirmed by immunoblotting the whole cell lysates with anti-Btk mAb 43-3B (Bottom), anti-Syk Ab and anti-BLNK Ab (not shown). (B) Btk was immunoprecipitated from cell lysates with anti-Btk mAb 48-2H, and the tyrosinephosphorylation was evaluated by anti-pTyr mAb 4G10 (Top). The filter was reprobed with anti-Btk mAb 43-3B to confirm the equal amount of precipitated Btk (second panel). The whole cell lysates were immunoblotted with the anti-Syk Ab (third panel) or the anti-BLNK Ab (Bottom).

## 【結果】

1. 非血球系細胞においてBLNKはSykによるBtkのリン酸化を媒介する。

非血球系細胞である293 T細胞において、Syk 依存的な Btk のリン酸化を検討した (Fig. 1A)。Btk 単独を発現させる事によっても自己リン酸化によるわずかなリン酸化が認められるが、このリン酸化は BLNK あるいは Syk との共発現によっては変化しない。それに対して、Btk, Syk, BLNK3 者を

共発現させると Btk の強いリン酸化が認められた。自己リン酸化によるバックグラウンドの存在しない Btk (K-) を使ってさらに検討した (Fig. 1B)。Btk (K-) を Syk のみと共発現させた時観察される Btk (K-) のリン酸化はわずかであるが、Btk (-), Syk, BLNK を共発現すると Btk (K-) の非常に強いリン酸化が認められた。

2. Sykによる Btk のリン酸化には、Btk の SH2ドメインによる BLNK との相互作用が必要である。

BLNKはSykによってリン酸化されることが知ら

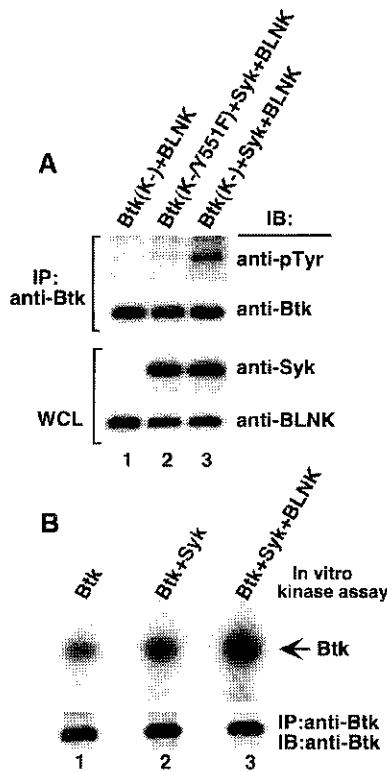


Fig. 3. Syk phosphorylates Y551 of Btk and enhances Btk activity in the presence of BLNK. (A) cDNAs of Btk [Btk(K-) or Btk(K- /Y551F)] were cotransfected with Syk and/or BLNK into 293T cells. Btk was immunoprecipitated with anti-Btk mAb 48-2H, and immunoblotted with anti-pTyr mAb 4G10 (Top), followed by reprobing with anti-Btk mAb 43-3B (second panel). Expression levels of Syk or BLNK were evaluated by immunoblotting the whole cell lysates with the anti-Syk Ab (third panel) or the anti-BLNK Ab (Bottom). (B) Btk expressed in 293T cells with or without Syk and BLNK was immunoprecipitated with anti-Btk mAb 48-2H, and an *in vitro* kinase assay was carried out as described in *Materials and Methods* (Top). The second panel indicates the equality of Btk protein in immunoprecipitates.

れているが、我々は前々回の班報告でリン酸化された BLNK は、Btk とその SH2ドメインを介して結合することを報告した。Fig.2A にも示すように Btk (K-) と BLNK の結合は Syk の存在下増強するが、SH2ドメインに変異を入れた Btk (K-/SH2-) においては、その BLNK との結合は Syk の存在によっても増強しない (なお、Syk非存在下での Btk (K-) と BLNK との結合は、Btk の SH3ドメインと BLNK のプロリンに富んだ配列との相互作用によるものである)。そこで次に、Syk に依存する Btk のリン酸化における、Btk の SH2ドメインの必要性について検討した (Fig.2B)。上述のように、Syk 依存的な Btk のリン酸化は BLNK の存在によって著明に増強するが、SH2ドメインに変異を有する Btk (K-/SH2-) のリン酸化の増強はみられな

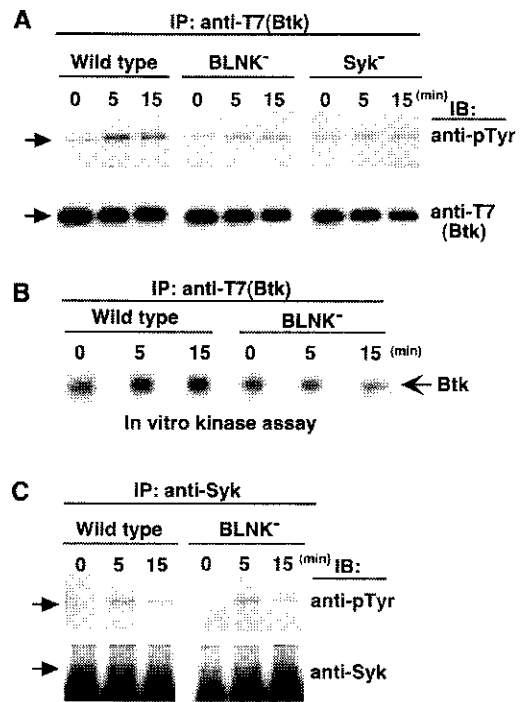


Fig. 4. BCR-induced tyrosine phosphorylation and activation of Btk are reduced in BLNK-deficient DT40 cells. Wild-type or mutant (BLNK-deficient and Syk-deficient) DT40 cells expressing T7-Btk were stimulated with anti-chicken IgM mAb M4 (4  $\mu$ g/ml) for the indicated periods. Lysates were immunoprecipitated with the anti-T7 mAb (A) or the anti-Syk Ab (C), and then immunoblotted with anti-pTyr mAb 4G10 (A and C, Top), followed by reprobing with the anti-T7 mAb (A, Bottom) or the anti-Syk Ab (C, Bottom). (B) After stimulation of wild-type and BLNK-deficient DT40 cells with mAb M4, T7-Btk was immunoprecipitated with the anti-T7 mAb, and an *in vitro* kinase assay was carried out as described in *Materials and Methods*. The equality of Btk protein in immunoprecipitates was confirmed by anti-Btk immunoblotting (data not shown).

かった。このことは、BLNK 上で Syk が Btk をリン酸化するためには、SH2ドメインを介した Btk と BLNK の結合が必要であることを示している。

3. BLNK の存在下で Syk は Btk の 551 番のチロシン残基をリン酸化し、Btk のキナーゼ活性を増強する。

一般にチロシンキナーゼは、そのキナーゼドメインに存在する特定のチロシン残基がリン酸化されることにより活性化されることが知られている。Lyn に依存した Btk の活性化の場合、Lyn によって Btk のキナーゼドメインに存在する 551 番のチロシン残基 (Y551) がリン酸化される。Syk も Lyn と同じく Btk の活性を増強させるのであれば、Syk によって Btk の Y551 がリン酸化されることが予想される。この可能性を、Y551 をフェ

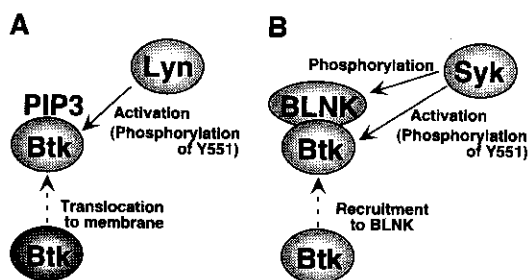


Fig. 5. Proposed mechanism of Btk activation. (A) It has been proposed that BCR crosslinking promotes the activation of Lyn and the translocation of Btk to membrane-localized phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate. This translocation puts Btk in close proximity with Lyn, which subsequently phosphorylates Btk on its tyrosine 551. (B) We propose another Btk activation mechanism that the activated Syk phosphorylates BLNK, and then the recruitment of Btk to the phosphorylated BLNK enables Syk to phosphorylate Btk on its tyrosine 551.

ニルアラニンに変異させた Btk (K-/Y551F) によって検討した。Fig.3A に示すように、Syk による Btk のリン酸化は Btk (K-/Y551F) ではほとんど認められず、Syk による Btk のリン酸化部位は主に Y551 であることが示された。さらに、同じく 293T 細胞の共発現系で、BLNK の存在下で、Syk により Btk の活性は増強 (BLNK 不在の時の約 2.5 倍) することが示された。これらの結果は、BLNK の存在下で Syk は Btk の positive regulator として働くことを示している。

4. B 細胞抗原レセプター (BCR) 刺激によって生じる Btk のリン酸化および活性化には BLNK が必要である。

Syk の欠失した DT40 ニワトリ B 細胞では BCR 刺激によって生じる Btk のチロシンリン酸化が減弱することが知られている。もし、BCR 刺激後の Syk 依存的な Btk の活性化が上記のように BLNK によって媒介されるのであれば、BLNK の欠失した B 細胞では Syk の欠失した細胞と同様に Btk のリン酸化および活性化の減弱がみられると予想される。Fig.4 に示すように、実際、BLNK の欠失した DT40 細胞では、BCR 刺激後の Btk のチロシンリン酸化および活性化が野生型細胞のそれと比して

著明に減弱していた (Fig.4A, B)。Syk のチロシンリン酸化は両細胞で差がなく (Fig.4C)、観察された Btk 活性化の減弱は Syk の活性変化に伴うものではないことが示された。

#### 【考察】

前々回報告したように、BLNK の機能は Btk と Syk の両チロシンキナーゼの活性を下流のエフェクター分子 (ホスホリパーゼ C など) へ伝達することである。今回、我々は BLNK の新しい機能として Syk の活性を Btk へ伝達することを見出した。このことは BLNK の存在下で Syk は Btk の positive regulator として働くことを示している (Fig. 5)。従来の研究は、Btk の膜分画への移行がその活性化にとって重要であることを示しているが、Btk の膜移行は PIP3 (BCR 刺激後に活性化された PI3 キナーゼによって生成する) との相互作用によって生じると想定されてきた。BLNK もまた、BCR 刺激後に膜へ移行することが知られており、したがって BLNK によって Btk と Syk の相互作用のみではなく、Btk と膜上に存在する Lyn との相互作用も促進される可能性がある。Lyn-依存的あるいは Syk-依存的な Btk 活性化における BLNK の寄与はさらに検討される必要があると思われる。

#### 【参考文献】

- 1) Kurosaki, T. and Tsukada, S. BLNK: Connecting Syk and Btk to calcium signals. *Immunity* 12: 1-5, 2000.
- 2) Baba, Y., Hashimoto, S., Matsushita, M., Watanabe, D., Kishimoto, T., Kurosaki, T. and Tsukada, S. BLNK mediates Syk-dependent Btk activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* in press (Feb. 13, 2001)

## BLNK mediates Syk-dependent Btk activation

Tsukada,S. and Baba,Y.

Department of Molecular Medicine, Osaka University Medical School

Btk is a critical molecule in B cell antigen receptor (BCR) -coupled signaling and its activity is regulated by Lyn and Syk. Although the molecular mechanism of Lyn-dependent Btk activation has been investigated, that of Syk-dependent Btk activation has remained unidentified. We have demonstrated that BLNK mediates Syk-dependent Btk activation. In a reconstitution cell system, coexpression of BLNK allows Syk to phosphorylate Btk on its tyrosine 551, leading to the enhancement of Btk activity. This phosphorylation depends on the interaction of Btk and BLNK via the Btk-SH2 domain. The existence of such an activation mechanism is supported by the observation that the BCR-induced Btk phosphorylation and activation are significantly reduced in BLNK-deficient B cells as well as in Syk-deficient B cells. While previous observations have identified the function of BLNK as the linker that integrates the action of Btk and Syk into downstream effectors such as phospholipase C $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2), our present study indicates another function of BLNK that connects the activities of Syk and Btk.

---



## 分類不能型免疫不全症 (Common variable immunodeficiency) の メモリー B 細胞解析

上 松 一 永 (信州大学小児科)  
伯耆原 祥 (信州大学小児科)  
小宮山 淳 (信州大学小児科)  
塚 田 聡 (大阪大学)  
二 谷 武 (ワシントン大学感染免疫)  
Hans D. Ochs (ワシントン大学感染免疫)

分類不能型免疫不全症 (Common variable immunodeficiency: CVID) は低 $\gamma$ グロブリン血症と反復する細菌感染症を主徴とする原発性免疫不全症であり, 病因的に異なる種々の疾患群の集合と考えられている。本症の病態を解析するためにCD27 memory B cell markerを用いて末梢血B細胞の検討を行った。対象は25例のCVIDで性差はなく発症はlate-onset。全例の患者の末梢血B細胞においてIgD-CD27+メモリーB細胞は欠損していた。VH5遺伝子にsomatic hypermutationをほとんど認めず, naive B細胞と考えられた。IgA産生を認めず, IgMとIgG産生はコントロールに比べ軽度低下がみられた。IL-4とCD40強刺激下でIgE産生はコントロールに比べ正常であった。T細胞増殖にはほぼ正常で, 一部の患者にCD154発現の低下を認めるものの, 著明な発現低下は認めなかった。CVIDの末梢血B細胞はIgD-CD27+メモリーB細胞が欠損しており, こうした病態が本症の病因のてががりになるものと考えられる。

### 【はじめに】

分類不能型免疫不全症 (Common variable immunodeficiency : 以下CVIDと略) は低 $\gamma$ グロブリン血症 (hypogammaglobulinemia) と反復する細菌感染症 (recurrent bacterial infections) を主徴とする免疫不全症である<sup>1,2)</sup>。末梢血B細胞数や他の免疫担当細胞数にも異常を認めないことが多く, 病因的に異なる種々の疾患群の集合と考えられている。臨床上遭遇することが多く, 免疫不全症候群のなかでも比較的良好にみられる。本研究では, 本症の病態を解析するためにCD27 memory B cell markerを用いて末梢血B細胞の検討を行った<sup>3)</sup>

### 【方法】

対象は25例のCVIDで性差はなく発症はlate-onset (臨床検査所見を表1に示す)。末梢血単核球をIgD, CD27, CD20抗体で染色後flow cytometry

でCD27 陽性memory Bの割合を調べた。一部の患者において, 免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子 (VH5) のsomatic hypermutationの有無を調べた。単核球を各種刺激後, ELISA法によって上清のIgA, IgM, IgG, IgEを測定した。刺激後のT細胞増殖とCD154発現を検討した。

### 【結果】

B細胞が減少していると思われるCVID患者ではBtkは正常に発現していた (図1, 表2)。PHA刺激によるT細胞増殖にはほぼ正常で, 一部の患者にCD154発現の低下を認めるものの, 著明な発現低下は認めなかった (表2)。患者の末梢血にはIgD-CD27+ memory B細胞は欠損しており, IgD+ CD27+を認めるものと見られないものがあつた。2例において, IgD+CD27+B細胞の著明な増加がみられた (図2)。VH5遺伝子のsomatic hypermutationはIgD+

Table 1 Characteristics of CVID patients

	age/sex	Serum Ig levels (mg/dl)			T-cell number (/m l)			% of B cells in lymphocytes	Age of onset or diagnosis
		IgA	IgM	IgG	CD3	CD4	CD8		
P1	38/M	<7	6	91	825	458	328	8%	39
P2	70/F	<7	21	182	1243	687	687	1.20%	49
P3	28/M	<7	10	81	3630	981	2600	10.70%	28
P4	32/F	<7	38	173	1255	678	526	6.60%	31
P5	29/M	<7	24	118	855	290	316	7%	5
P6	32/F	<7	34	111	2560	1440	1090	17.20%	21
P7	21/M	<7	83	302	1564	860	606	4.40%	21
P8	31/F	46	9	10	1462	815	466	13.30%	13
P9	61/F	<7	11	65	1200	878	274	3.40%	51
P10	42/M	13	10	320	3474	960	2383	1.20%	25
P11	59/F	238	207	1140	570	425	184	10.30%	58
P12	38/M	<7	30	281	1480	1000	426	4.00%	36
P13	54/F	<7	28	205	1636	635	866	10.20%	49
P14	35/M	<7	8	<33	987	658	318	5.70%	28
P15	46/F	<7	15	120	478	240	198	8.20%	22
P16	45/M	<7	8	62	921	428	514	4.40%	27
P17	83/M	<7	30	72	1193	153	1010	6.00%	57
P18	20/F	10	41	138	809	475	390	3.80%	1
P19	36/F	<7	1	31	1780	1074	633	6.51%	17
P20	38/M	<7	33	279	790	398	313	10.28%	37
P21	56/F	<7	28	125	1322	854	581	5.20%	55
P22	28/F	<7	56	318	1001	458	407	1.70%	27
P23	44/F	<7	7	255	1962	451	1480	3.90%	1
P24	51/M	<7	42	235	1283	680	627	4.90%	45
P25	41/F	<7	9	150	815	504	293	5.94%	25

Table 2 The expression of Btk and CD40 ligand and T-cell proliferation

	Btk expression	CD40 ligand expression	T-cell pro- liferation*
P1	DN	Normal	ND
P2	Normal	Normal	ND
P3	DN	Low levels	ND
P4	DN	Normal	ND
P5	DN	Normal	Normal
P6	DN	Normal	Normal
P7	DN	Normal	Normal
P8	DN	Normal	ND
P9	DN	Low levels	ND
P10	Normal	Normal	ND
P11	DN	Normal	Normal
P12	DN	Low levels	Normal
P13	DN	Low levels	Normal
P14	DN	Normal	ND
P15	DN	Normal	Normal
P16	DN	Normal	Normal
P17	DN	Low levels	Normal
P18	DN	Normal	Normal
P19	ND	Normal	Normal
P20	ND	Normal	Normal
P21	ND	ND	Normal
P22	Normal	Low levels	Normal
P23	Normal	Normal	Normal
P24	ND	normal	Normal
p25	ND	ND	ND

\*MNCs were stimulated with PHA

CD27+B細胞のあるなしにかかわらずほとんど認められなかったため、naive B細胞と考えられた。IgA産生を認めず、IgMとIgG産生はコントロールに比べ軽度低下がみられた(図3)。IL-4とCD40強刺激下でIgE産生は6例を除きコントロールに比べ正常であった(図3)。

## 【考案】

1995のWHO分類では、抗体欠乏を主徴とする免疫不全をB細胞の内因性欠陥またはT-B細胞相互作用の異常によって抗体産生が障害される疾患群として9疾患に分類している<sup>2)</sup>。この中で7番目に分類不能型免疫不全症(Common variable immunodeficiency, CVID)が位置づけられている。CVIDの診断として抗体欠乏を主徴とする他の免疫不全症との鑑別が必要である。X-linked agammaglobulinemia (XLA)との鑑別が特に重要となる。XLAでは女性例は見出されていないがCVIDでは性差はない。CVIDは末梢血B細胞数は正常であるが、XLAにおいては、B細胞の割合は末梢血リンパ球数の1%を越えることはない。末梢血B細胞数がリンパ球の1%以下のものは、責任遺伝子であるBruton tyrosine kinase (Btk) 蛋白の発現がないことをフローサイトメーターを用いて単球上で確認した。X連鎖高IgM症候群の診断は、活性化CD4陽性T細胞に責任遺伝子であるCD40リガンド(CD154)が発現しないことをフローサイトメーターを用いて確認した。

CVIDの病因については不明であるが、これまでにCVIDの病因についてさまざまな検討と研究がなされてきた。CVIDの原因として大きくB

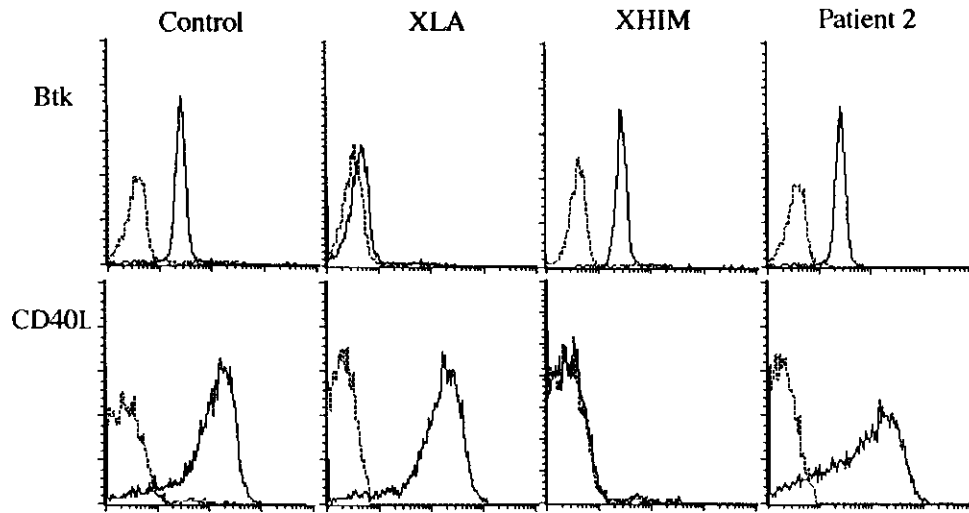


図1 Btk と CD40L 発現

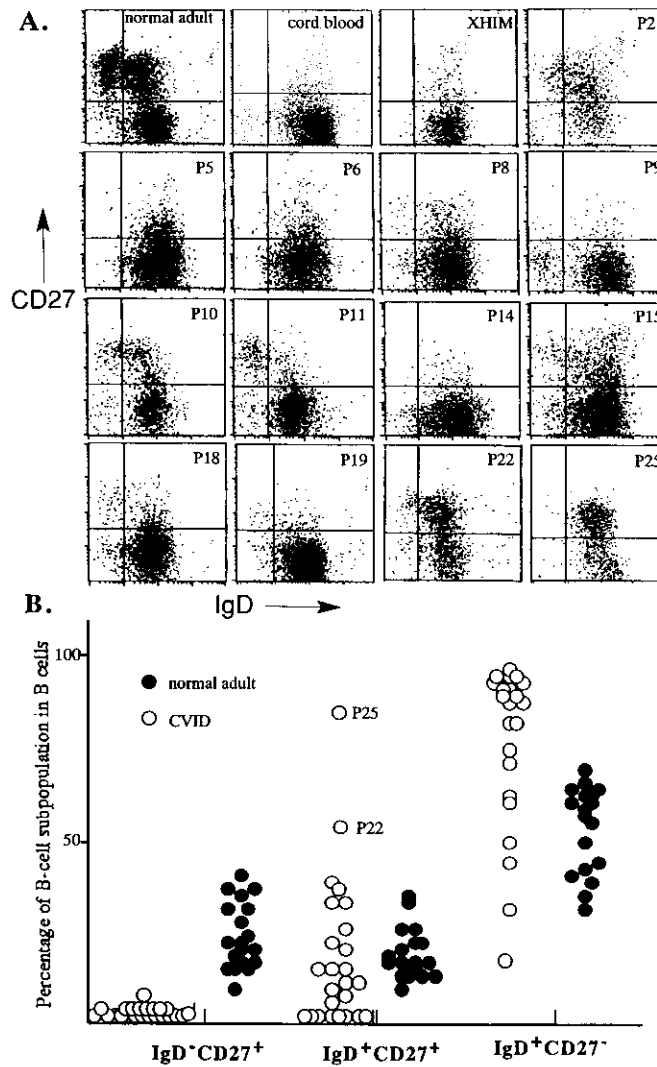


図2 メモリーB細胞の割合

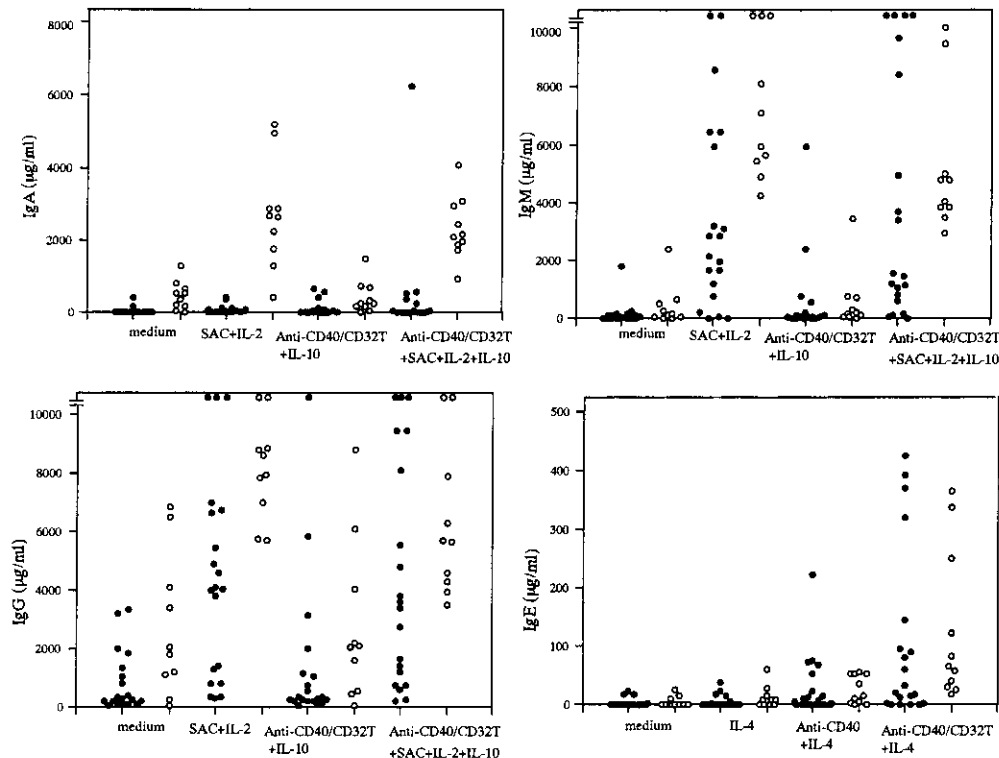


図3 免疫グロブリン産生 (●：患者, ○：コントロール)

細胞自体の異常とヘルパーT細胞の機能異常が考えられている。T細胞側の異常として、CVID患者のヘルパーT細胞からのサイトカイン産生の低下とB細胞上のCD40分子を刺激するCD40リガンド(CD154)発現の低下が報告されている。しかし、Spickettら<sup>2)</sup>が指摘するように、これらは本症の多様性から考えて本質的なものでないと思われる。確かに一部のCVID患者にみられるT細胞サイトカイン産生やCD154発現の低下は欠損ではなく減弱であるためhypogammaglobulinemiaにはならないように思われる。

B細胞自体の異常としては、CVIDでは末梢血B細胞数は正常のことが多いが、免疫グロブリン産生能の低下や抗体特異的免疫グロブリン産生能の低下が示唆されている。また、抗体産生細胞である形質細胞への分化障害が考えられている。しかしながら、これまでB細胞機能解析には限界があり、またCVID患者から大量のB細胞を精製することが困難であったため、十分な検討がなされていないのが現状である。骨髓から末梢血に放出されたB細胞は抗原や種々の刺激によってリンパ組織の胚中心でメモリーB細胞に分化する。この

メモリーB細胞は末梢血中を循環しており再度同じ抗原が侵入すると迅速にしかも大量の高親和性抗体産生がなされる。ヒト末梢血B細胞がCD27分子の発現の有無によって、メモリーB細胞(CD27陽性)とナイーブB細胞(CD27陰性)に分かれるが、この方法を用いることによって、メモリーB細胞が容易に検出できる<sup>3)</sup>。CVID患者では、末梢血B細胞がナイーブB細胞のみで構成されていることから、CVID患者の末梢血B細胞は臍帯血B細胞に類似していることが判明した。また、メモリーB細胞は免疫グロブリン重鎖遺伝子の可変領域にmutationを持ちそれによって抗原との結合の強い抗体を産生している(somatic hypermutation)が、患者ではsomatic hypermutationがほとんど検出されなかった。免疫グロブリン産生においてもIgA産生がないなど臍帯血B細胞に類似していた。以上の所見から、CVIDの病因は多種多様であるものの病的にはメモリーB細胞が欠如しているため、形質細胞への分化不良や抗体産生不全が生じるものと考えられる。なぜメモリーB細胞に分化しないのかを解明することが本疾患群の病因解明への糸口になると思われる。