

## Degradation of mutant ZAP70 and Btk proteins causing immunodeficiency through a proteasome-independent pathway

Satoshi Matsuda<sup>1)</sup>, Kenji Katamura<sup>2)</sup>, Hirokazu Kanegane<sup>3)</sup>, Toshio Miyawaki<sup>3)</sup>, Shigeo Koyasu<sup>1)</sup>

Department of Immunology, Keio University School of Medicine<sup>1)</sup>, Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Kyoto University<sup>2)</sup>, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University<sup>3)</sup>

We have identified two novel missense mutations in the zap70 genes of a CD8-deficiency patient. One mutation (P80Q) affects a residue in an SH2 domain, and another (M572L) in the kinase subdomain XI. Both mutations cause degradation of ZAP70 protein in a temperature-sensitive (ts) manner through an ATP-dependent and proteasome-independent pathway. We further demonstrate that two mutations found in Btk causing XLA also result in degradation of the mutant protein through a proteasome-independent manner. These results indicate the presence of a novel proteolytic pathway degrading mutant proteins in vivo.

---

## 末梢血CD8<sup>+</sup>T細胞のCD8β鎖発現の変化とその機能的意義

今野 昭 宏 (金沢大学医学部小児科)  
岡田 かなえ (金沢大学医学部保健学科)  
東馬 智子 (金沢大学医学部小児科)  
筈原 善仁 (金沢大学医学部小児科)  
小泉 晶一 (金沢大学医学部小児科)  
谷内江 昭 宏 (金沢大学医学部保健学科)

末梢血CD8<sup>+</sup>TCRαβ細胞の一部にCD8<sup>+</sup>β鎖発現が低下している細胞 (β<sup>low</sup>CD8<sup>+</sup>) があることが知られている。その表面分子発現の解析により、この細胞群はエフェクター機能を持っている可能性が示唆されている。しかし、この細胞群がβ<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup>とlineageを異にする細胞なのか、in vivoでの抗原刺激によりαβ鎖発現を低下させたのか明らかではない。今回の研究では、年齢によるβ<sup>low</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の変化を検索した。更に、多種のTCR VβのCDR3 size分布解析によりCD8β鎖強発現、弱発現の各集団のクローナリティーを検討した。β<sup>low</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞はCD62L発現が低下、CD57陽性でエフェクター形質を示した。β<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞は多様性のあるガウス分布様のCDR3 size分布を示した。しかし、β<sup>low</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞、更にβ-CD8<sup>+</sup>T細胞はsize peak数は著明に減少していた。CDR3の塩基配列を決定したところ、これらのpeakは同一クローンが多くを占めていた。更に全く同じクローンがβ<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞とβ-CD8<sup>+</sup>T細胞中に認められた。これらのことより、CD8β鎖はin vivoで抗原刺激によりdown regulationを起し、結果β<sup>low</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞中に分裂増殖したオリゴクローナルなT細胞が濃縮されていることが示唆された。

### 【はじめに】

CD8分子はT細胞レセプター (TCR) のco-receptorとして働き、胸腺におけるT細胞の分化、末梢T細胞の活性化において極めて重要な役割をはたしている。この分子はα鎖とβ鎖の2種類のサブユニットからなっており、ヒトではααのホモダイマー、またはαβヘテロダイマーの2種類のCD8があることが知られている。一般的に、胸腺由来のαβT細胞はCD8αβヘテロダイマーを発現し、一部のNK細胞、γδT細胞、腸管上皮内リンパ球の一部のαβT細胞はCD8ααホモダイマーを発現している。しかし、CD8β鎖発現の機能的意義に関しては不明な点が多く、種々の病態との関連についても殆ど知られていない。我々は、複合免疫不全症状を呈している児と若年性皮膚筋炎の患児で、末梢血CD8陽性細胞のある特定のレパトアが増加しており、

この細胞群はCD8β鎖が陰性または発現を低下させていることを観察している。また、最近Wiskott-Aldrich症候群患者の末梢血中にCD8ααT細胞の割合が増加しているといった報告がされた(1)。更に、human immunodeficiency virus (HIV) やfeline immunodeficiency virus (FIV) 感染症のCD8陽性T細胞で、CD8β鎖の発現が低下し、この細胞が強い抗ウイルス活性を持つEffector細胞であることが報告されている(2,3)。これらの細胞がCD8β<sup>high</sup>の細胞群とcell lineageに異にするのか、抗原刺激によりβ鎖の発現低下をもたらしたのかは明らかではない。今回、正常小児ならびに成人末梢血でのβ鎖<sup>low</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の動態を検索し、complementarity-determining region 3 (CDR3) size分布により各細胞集団のクローナリティーを検討した。

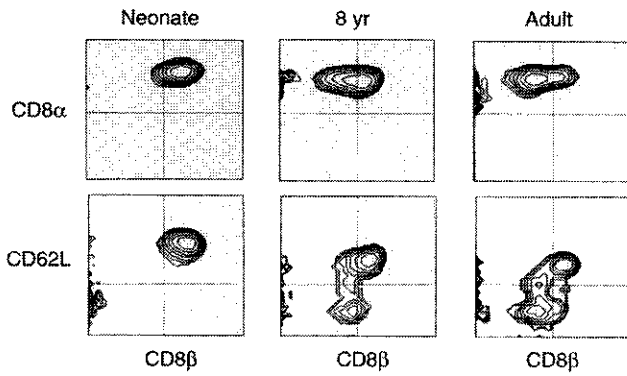


図1：TCRαβ陽性細胞におけるCD8β発現

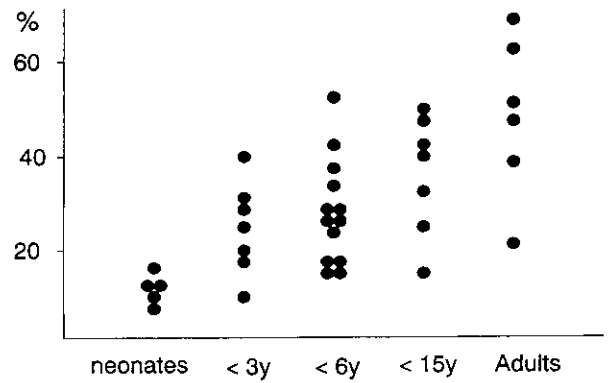


図2：各年齢群でのCD8<sup>+</sup>細胞におけるCD8β<sup>low</sup>/細胞の割合

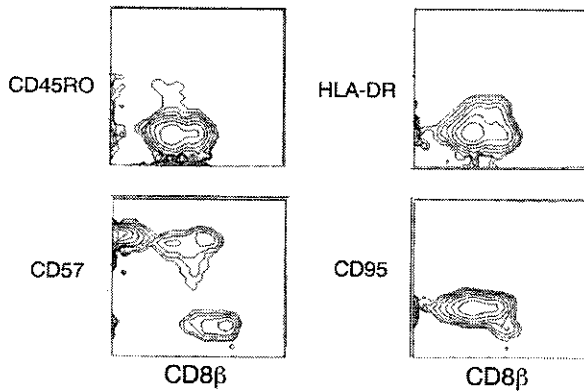


図3：CD8<sup>+</sup>細胞上のCD8β鎖と他の表面抗原発現

### 【対象と方法】

健康小児，成人の末梢血を蛍光標識単クローン抗体で染色し，フローサイトメトリー法によりリンパ球regionの細胞表面抗原発現を解析した。また，成人の末梢血より単核球を分離し細胞表面抗原を染色，TCRαβ<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup>細胞でCD8β鎖を強く発現している分画，弱く発現している分画，発現していない分画にセル・ソーターを用いて単離した。各々の分画の細胞よりRNAを抽出しcDNAを合成した。様々なTCR Vβ にそれぞれ特異的なプライマーとCβに特異的な蛍光標識プライマーを用いPCR法で増幅し(4)，自動DNAシーケンサーを用いPCR産物のsizeを解析した。また，ある特定のVβのPCR産物をサブクローニングし，塩基配列を決定した。

### 【結果】

TCRαβ鎖陽性細胞におけるCD8α，CD62Lと

CD8β発現を対比染色したrepresentative dataを示す(図1)。新生児では殆どの細胞がCD8β<sup>high</sup>の細胞である。個人差はあるものの，年齢が進むとCD8β発現が低下する細胞が多くなる。CD8β<sup>low</sup>の細胞のCD8αの蛍光強度はそれ程変化なく，CD8β<sup>low</sup>の細胞ではCD8αの蛍光強度はわずかに低下している。また，CD8β<sup>low</sup>の細胞群はCD62Lの発現も低下している。

次にCD8α陽性T細胞中のCD8β鎖発現が低下，または消失している細胞の割合を各年齢群でプロットした(図2)。新生児期にはCD8β鎖の発現低下細胞はごく僅かだが，年齢が高い群で次第にCD8βの発現が低下している細胞の割合が増加していく傾向が観察された。このようなCD8β<sup>low</sup>細胞の性質を明らかにするために，その表面抗原発現の特徴を検討した(図3)。CD8β<sup>low</sup>細胞の多くはCD45RO陰性でHLA-DR抗原発現も認められず，通常の活性化抗原は認められなかった。しかし，CD57抗原発現は極めて強く，キラーエフェクター形質を示していた。

CD8β鎖発現が異なる細胞集団におけるT細胞のクローン多様性を検討するために，これらのTCRVβ CDR3スペクトラタイプを比較した。CD8β鎖強発現群のパターンでは，一部にskewしているレパトアも認めるがほぼ正常のガウス分布を示すものが大部分を占める(図4A)。CD8β鎖弱発現群では強発現群に比べピークの少ない，skewされたVβが多くなってきている傾向を認めた(図4B)。更にCD8β陰性，いわゆるCD8ααT細胞群では一層パターンに偏りが認められるようになり，

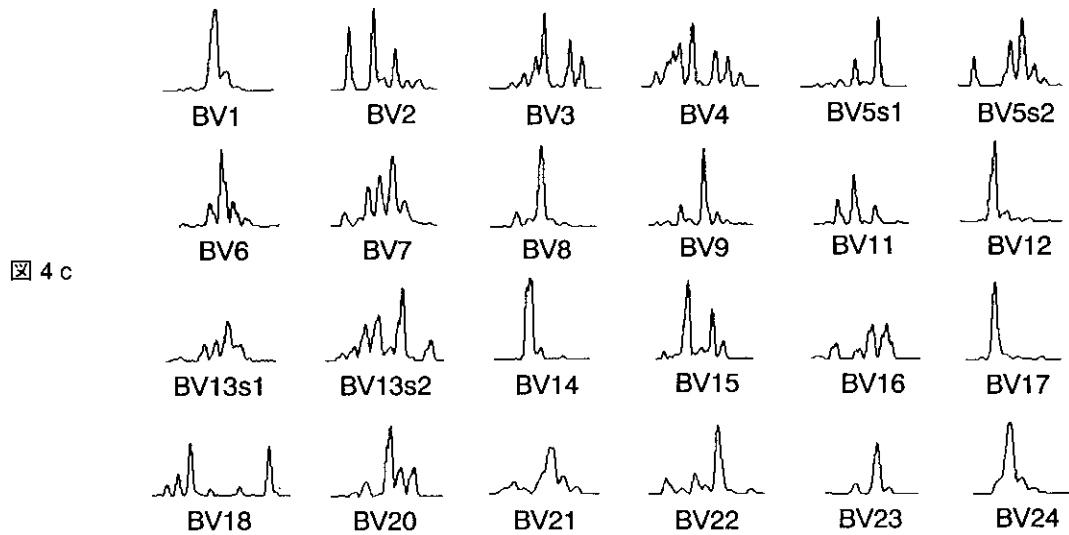
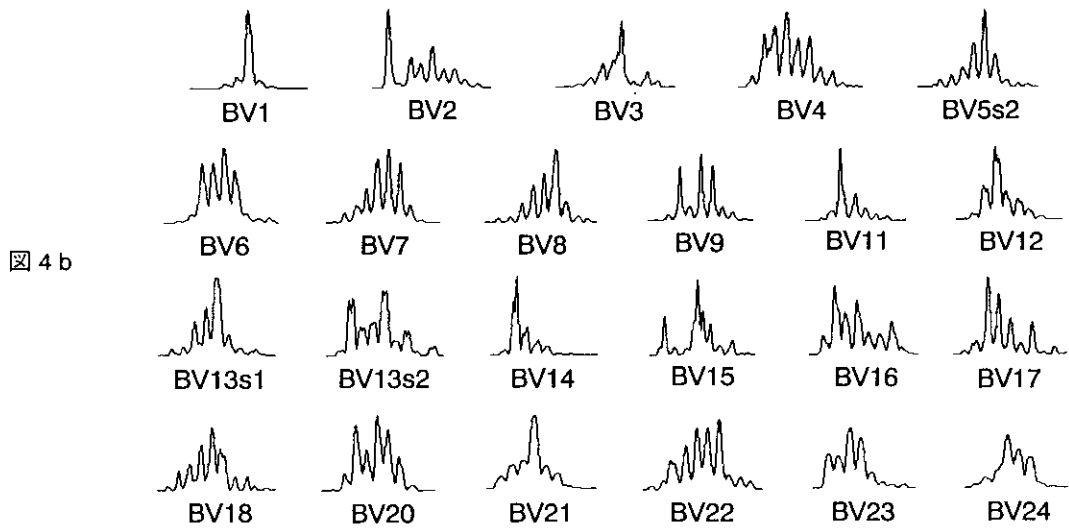
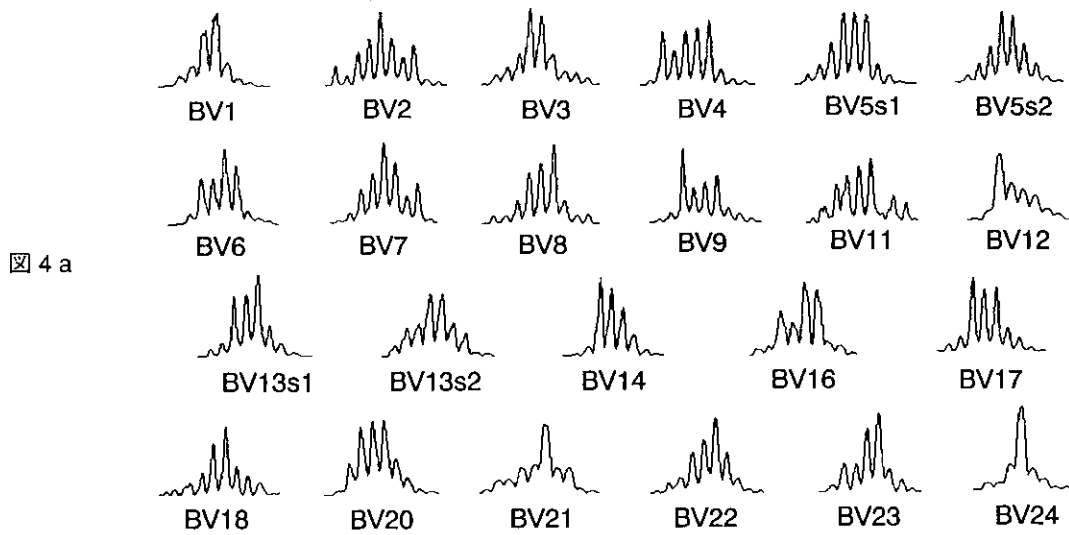


図 4 : TCR Vβ スペクトラタイプ  
 A: CD8β<sup>high</sup> CD8<sup>+</sup>細胞, B: CD8β<sup>low</sup> CD8<sup>+</sup>細胞, C: CD8β<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>細胞

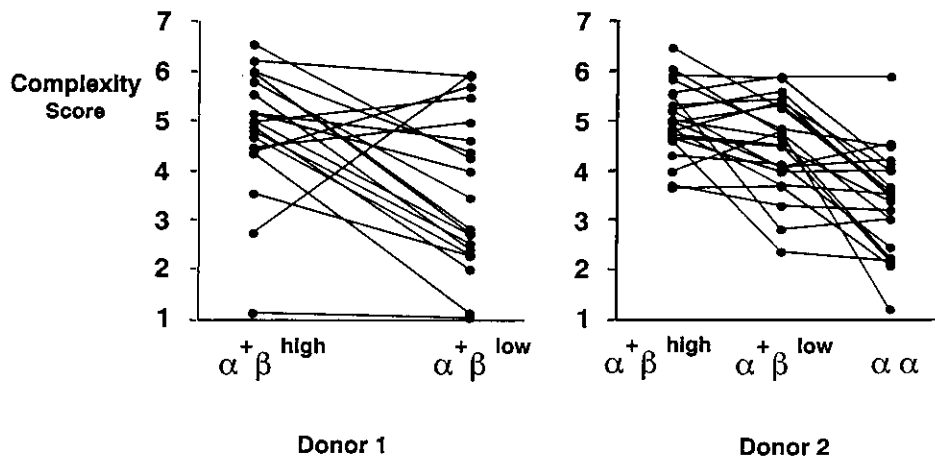


図 5 : CDR3 complexity score  
 対照 1 ではCD8β<sup>high</sup> CD8<sup>+</sup>細胞とCD8β<sup>low</sup> CD8<sup>+</sup>細胞, 対照 2 ではCD8β<sup>high</sup> CD8<sup>+</sup>細胞, CD8β<sup>low</sup> CD8<sup>+</sup>細胞, CD8β<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>細胞のBVsでのcomplexity scoreを算出し各々のBVを線で結んだ。

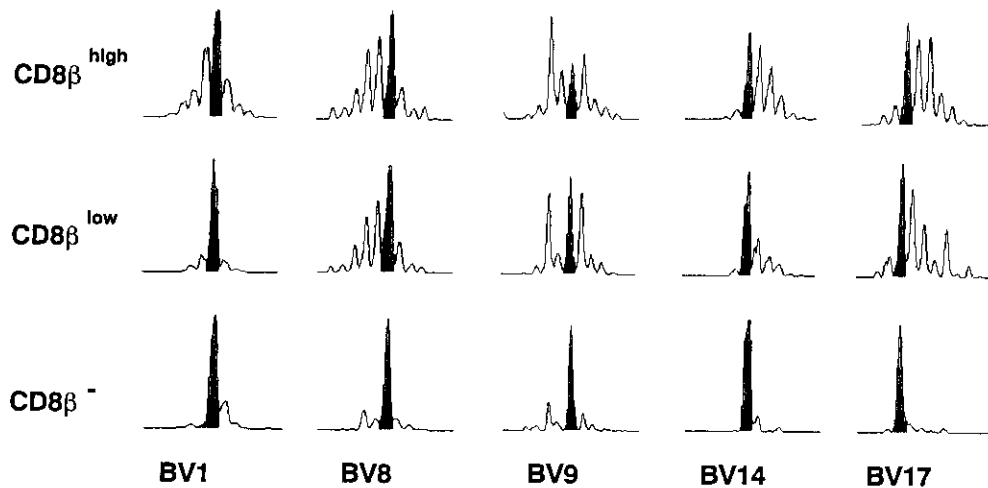


図 6 : CD8β発現におけるCDR3サイズ分布の比較

ほぼシングルピークを示すレパトアが多く認められた(図4C)。

これらのパターンを基にcomplexity scoreを求めた(図5)。complexity scoreは(major peakの高さ(蛍光強度)の合計/全てのpeakの高さの合計)/major peakの数で計算される(major peakは全てのpeakの高さの合計の10%以上の高さを持つものとする)(5)。CD8α陽性T細胞は成人対照1ではCD8β鎖強陽性群と弱陽性群に別れ対照2では強, 弱, 陰性の3群に別れていた。いずれの例においても, CD8β鎖発現の強い細胞群でcomplexity scoreが高く, CD8β鎖発現の低い群ないしは陰性の群

ではcomplexity scoreの著しい低下が観察された。このことは, CD8β鎖発現の低い群がクローン多様性の少ないオリゴクローナルな細胞集団から構成されている可能性を示唆している。また, CD8β鎖発現の違いによる代表的なレパトアのCDR3 sizeを比較すると, CD8β<sup>-</sup>群で認めるピークサイズはCD8βを強く発現している群にもあり, この中に同一クローンが存在する可能性も考えられた(図6)。

そこで, CD8β鎖強陽性群, 陰性群において特定のレパトアのVβのPCR産物をサブクローニングし塩基配列を決定した(図7)。CD8β鎖陰性, つま

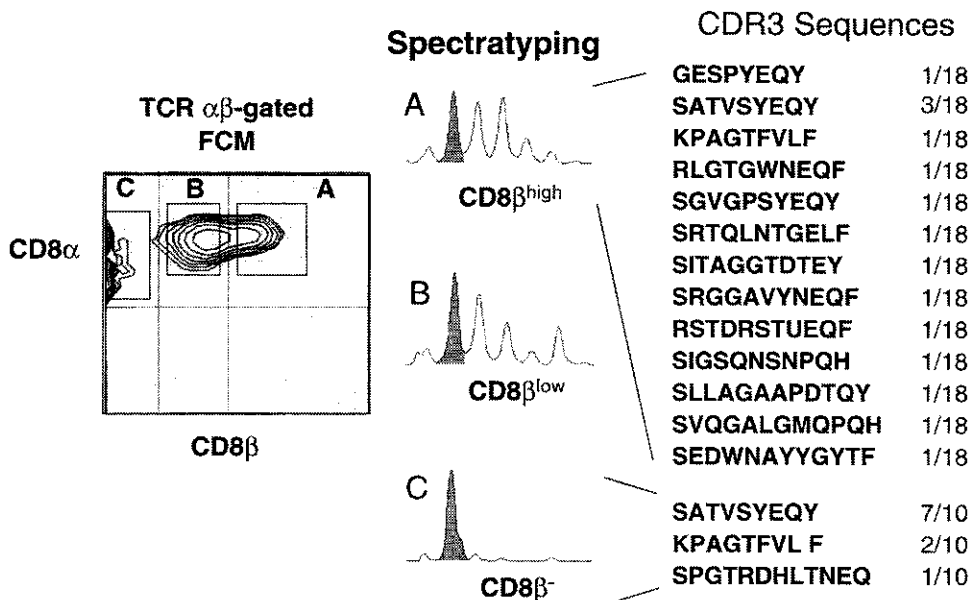


図7：TCR V $\beta$  のCDR3塩基配列  
 $\beta^{\text{low}}$  CD8 $^+$ 細胞と $\beta^{\text{high}}$  CD8 $^+$ 細胞を単離しサブクローニングを行ない、それぞれの塩基配列を決定した。CDR3のアミノ酸配列を示す。

り CD8 $\alpha$ T細胞では10クローン中7クローンが SATVSYEQY, 2クローンがKPAGTFVLFであった。そして期待通り同一の塩基配列を有するクローンがCD8 $\beta$ 鎖強陽性群にも18クローン中それぞれ3, 1ヶ同定され、CD8 $\alpha$ T細胞と同じlineageに属するCD8 $\alpha$ T細胞が存在することが示された。

#### 【考察・結論】

いわゆるCD8 $\alpha$ T細胞はCD8 $\alpha$ ホモダイマーとCD8 $\alpha$ ヘテロダイマーの両者を発現しており、おそらくその割合はCD8 $\alpha$ ホモダイマーが多くを占めていると予想される。CD8 $\beta$ 鎖発現が低下している細胞群は表面マーカーより、その多くは Effector 細胞と考えられる。CD8 $\beta$ 鎖発現の強弱に関わらず同じlineageと考えられる細胞が存在し、CD8 $\beta$ 鎖の発現が減少するに従ってそのクローンが濃縮されていることを考えれば、持続する抗原刺激に対応するCD8 $\alpha$ T細胞がCD8 $\alpha$ ヘテロダイマーをdownregulateさせながら長期にわたって存在し続けるといったことが予想される。以上のように、CD8 $\beta$ 鎖発現はダイナミックに動いており、その状態の把握は自己免疫疾患、HIV感染症、Wiskott-Aldrich症候群などの病態を考える上で重要であると思われる。

#### 【文献】

- 1) Kawabata, K., M. Nagasawa, T. Morio, H. Okawa, and J. Yata. 1996. Decreased alpha/beta heterodimer among CD8 molecules of peripheral blood T cells in Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 81:129-35.
- 2) Schmitz, J. E., M. A. Forman, M. A. Lifton, O. Concepcion, K. A. Reimann, C. S. Crumpacker, J. F. Daley, R. S. Gelman, and N. L. Letvin. 1998. Expression of the CD8alpha beta-heterodimer on CD8 (+) T lymphocytes in peripheral blood lymphocytes of human immunodeficiency virus- and human immunodeficiency virus+ individuals. *Blood* 92:198-206.
- 3) Gebhard, D. H., J. L. Dow, T. A. Childers, J. I. Alvelo, M. B. Tompkins, and W. A. Tompkins. 1999. Progressive expansion of an L-selectin-negative CD8 cell with anti-feline immunodeficiency virus (FIV) suppressor function in the circulation of FIV-infected cats. *J Infect Dis* 180:1503-13.
- 4) Zeng, W., S. Nakao, H. Takamatsu, A. Yachie, A. Takami, Y. Kondo, N. Sugimori, H. Yamazaki, Y. Miura, S. Shiobara, and T. Matsuda. 1999.

Characterization of T-cell repertoire of the bone marrow in immune-mediated aplastic anemia: evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in cyclosporine-dependent aplastic anemia. *Blood* 93:3008-16.

5) Bomberger, C., M. Singh-Jairam, G. Rodey, A.

Guerrero, A. M. Yeager, W. H. Fleming, H. K. Holland, and E. K. Waller. 1998. Lymphoid reconstitution after autologous PBSC transplantation with FACS-sorted CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors. *Blood* 91:2588-600.

## Modulation of CD8 $\beta$ chain expression on peripheral blood CD8<sup>+</sup> T cells and its functional significance.

AKIHIRO KONNO <sup>1)</sup>, KANAE OKADA <sup>2)</sup>, TOMOKO TOMA <sup>1)</sup>, YOSHIHITO KASAHARA <sup>1)</sup>,  
SHOICHI KOIZUMI <sup>1)</sup>, AKIHIRO YACHIE <sup>2)</sup>,

Department of Pediatrics, School of Medicine <sup>1)</sup>, Faculty of Medicine and Department of Laboratory Sciences, School of Health Sciences <sup>2)</sup>, Faculty of Medicine, Kanazawa University

A small fraction of peripheral blood TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells expresses significantly low levels of CD8 $\beta$  chain ( $\beta^{\text{low}}$  CD8<sup>+</sup>). Analysis of surface antigen expression on these CD8 $\beta^{\text{low}}$  cells suggests that they exhibit effector phenotypes. It is not clear, however, if these cells constitute a distinct subpopulation from CD8 $\beta^{\text{high}}$  population or they have downregulated CD8 $\beta$  chain after antigen stimulation in vivo. In the present study, we examined age-dependent change in the distribution of CD8 $\beta^{\text{low}}$  fraction. Furthermore, we compared clonal diversity of CD8 $\beta^{\text{high}}$  and CD8 $\beta^{\text{low}}$  populations based on the analysis of CDR3 size distributions of multiple TCR V $\beta$  repertoires.  $\beta^{\text{low}}$  CD8<sup>+</sup>T cells showed low CD62L and high CD57 expression suggesting effector functions.  $\beta^{\text{high}}$  CD8<sup>+</sup>T cells exhibited relatively diverse Gaussian CDR3 size distributions. In marked contrast,  $\beta^{\text{low}}$  CD8<sup>+</sup>T cells and to further extent,  $\beta^-$  CD8<sup>+</sup>T cells were composed of significantly reduced number of size peaks. CDR3 sequence analysis revealed that the majority of the oligoclonal peaks consisted of identical T cell clones. In addition, exactly identical clones were found within both CD8 $\beta^{\text{high}}$  and CD8 $\beta^-$  populations. These results strongly indicated that CD8 $\beta$  chain is actively downregulated in vivo by antigen stimulation and as a result CD8 $\beta^{\text{low}}$  population are enriched with expanded oligoclonal T cell clones.

## X連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) 患者32症例における 変異 $\gamma$ c鎖の解析

久間木 悟 (東北大学加齢医学研究所発達病態分野)  
石井 直人 (東北大学大学院医学研究科生体防御講座免疫学分野)  
峯岸 正好 (東北大学加齢医学研究所発達病態分野)  
大橋 芳之 (東北大学加齢医学研究所発達病態分野)  
菅村 和夫 (東北大学大学院医学研究科生体防御講座免疫学分野)  
土屋 滋 (東北大学加齢医学研究所発達病態分野)

X連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) はSCIDの約半数を占め、その原因遺伝子は $\gamma$ c鎖をコードする*IL2RG*遺伝子である。免疫学的特徴としてはT細胞及びNK細胞を欠如し、B細胞も機能的に異常であることが挙げられる。我々はこれまでに本邦28症例と外国症例4例の計32例のX-SCID患者について $\gamma$ c鎖変異を同定している。 $\gamma$ c鎖の細胞表面への発現については、82%で $\gamma$ c鎖の発現はみられず、X-SCIDの診断に結びついた。本邦例に限ってみると大きな欠失が認められた2症例を除く26症例で変異が $\gamma$ c鎖全体に散在し、本邦特異的なホットスポットは認められず、そのうち11種類は未報告変異であった。これらの変異 $\gamma$ c鎖の一部について機能解析を行った。

### 【はじめに】

X連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) はSCIDの約半数を占め、その原因遺伝子はIL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15の5つのサイトカインの受容体として共用されている $\gamma$ c鎖である<sup>1)</sup>。これらの患者の末梢血はT細胞及びNK細胞が欠如または著減し、B細胞数は正常またはそれ以上存在するが機能的に異常であるという特徴を有する<sup>1)</sup>。

昨年フランスでAlain FischerらがX-SCID患者に対してCD34陽性骨髄細胞を用いた遺伝子治療を施行した<sup>2)</sup>。この遺伝子治療が成功したことで、今後原発性免疫不全症に対する遺伝子治療が広く行われていくものと思われる。我々も本疾患に対する遺伝子治療を念頭に置き、X-SCID家系の把握、個々の $\gamma$ c鎖変異の病態解明を目的として解析を行った。

### 【方法】

(1) 細胞表面への $\gamma$ c鎖の発現はビオチン化した

抗ヒト $\gamma$ c鎖単クローン抗体、TUGh4、を用いたフローサイトメトリー法により確認した。末梢血単核球を用いた場合、母親由来のT細胞の存在を否定するために、CD19またはCD20とTUGh4を用いた2重免疫染色を行った。

(2) 遺伝子変異は患児末梢血から抽出したRNAを用いRT-PCRを行なった後、そのPCR産物で直接シーケンスを行い塩基配列を決定した。RT-PCR産物が得られない場合、または変異がエクソン-イントロンジャンクションに存在することが予想される場合にはゲノムをPCRにて増幅し直接シーケンスを行った。遺伝子に大きな欠失がある場合にはサザンブロットを施行した。

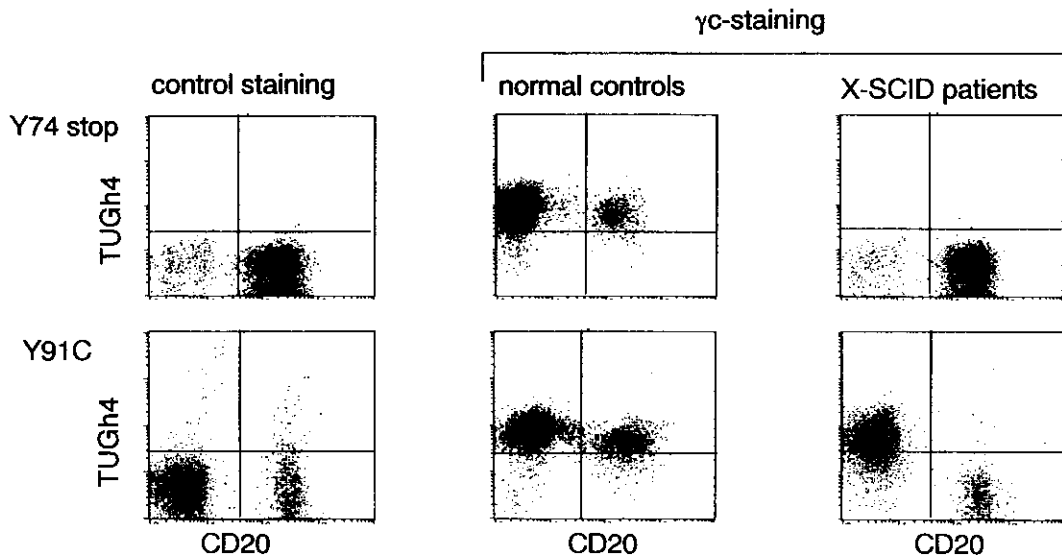
(3) 変異 $\gamma$ c鎖遺伝子導入細胞の $\gamma$ c鎖の発現は、患児から単離した変異 $\gamma$ c鎖cDNAをCOS7細胞に遺伝子導入し、コンフォールマイクروسコピーにて蛋白発現を確認することにより行った。



表 1 本邦 X-SCID 患者28症例の特徴

| Patient number | Mutated exon | Family History | Nucleotide Alteration | Protein alteration | Reported mutation | TUGh4 Staining | Lymphocytes per mm <sup>3</sup> | T cells per mm <sup>3</sup> | B cells per mm <sup>3</sup> | NK cells per mm <sup>3</sup> |
|----------------|--------------|----------------|-----------------------|--------------------|-------------------|----------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1              | 2            | -              | 216 G→A               | E68K               | 2                 | -              | 5196                            | 78                          | 2624                        | 691                          |
| 2              | 2            | +              | 216 G→A               | E68K               | 2                 | -              | 2244                            | 2                           | 1788                        | 91                           |
| 3              | 2            | -              | 235 G→A               | Y74stop            | -                 | -              | 677                             | 2                           | 536                         | 5                            |
| 4              | 2            | +              | 283 (+2)T→C           | del exon 2         | -                 | -              | 595                             | 10                          | 478                         | nd                           |
| 5              | 3            | +              | 284 (-15) A→G         | W90 frameshift     | 4                 | -              | 1440                            | 14                          | 1382                        | 0                            |
| 6              | 3            | +              | 286 A→G               | Y91C               | -                 | -              | 2950                            | 106                         | 2260                        | nd                           |
| 7              | 3            | -              | 306 A→T               | K98stop            | -                 | -              | 525                             | 11                          | 478                         | 11                           |
| 8              | 3            | -              | 336 T→C               | S108P              | -                 | -              | 5709                            | 51                          | 4282                        | 131                          |
| 9              | 3            | +              | 391 del A             | Q126 stop          | -                 | -              | 2420                            | 39                          | 2289                        | 68                           |
| 10             | 3            | -              | 444 C→T               | Q144 stop          | 2                 | -              | 856                             | 11                          | 837                         | 7                            |
| 11             | 4            | ?              | 469 T→C               | V152A              | 1                 | -              | 1250                            | 18                          | 1120                        | 31                           |
| 12             | 4            | +              | 481 C→T               | A156V              | 1                 | +              | 435                             | 10                          | 335                         | nd                           |
| 13             | 4            | +              | 568 A→G               | H185R              | -                 | nd             | 1600                            | 6                           | 890                         | 6                            |
| 14             | 4            | ?              | 582 del15             | R190 (del 5a.a.)   | 1                 | -              | 2500                            | 50                          | 2125                        | 0                            |
| 15             | 5            | +              | 618 ins ATCA          | V202 frameshift    | -                 | -              | 2520                            | 20                          | 2278                        | 13                           |
| 16             | 5            | +              | 690 C→T               | R226C              | 12                | -              | 14416                           | 7784                        | 6343                        | 94                           |
| 17             | 5            | +              | 691 G→A               | R226H              | 8                 | -              | 5070                            | 5                           | 4700                        | nd                           |
| 18             | 5            | ?              | 717 C→T               | Q235 stop          | 4                 | -              | 1148                            | 34                          | 930                         | 11                           |
| 19             | 5            | +              | 717 C→T               | Q235 stop          | 4                 | -              | 1581                            | 300                         | 743                         | 17                           |
| 20             | 5            | +              | 771 (+1)G→T           | del 101 a.a.       | -                 | -              | 14421                           | 7326                        | 4644                        | nd                           |
| 21             | 6            | -              | 830 del GATT          | L272 frameshift    | 1                 | -              | 1550                            | 388                         | 930                         | 19                           |
| 22             | 6            | +              | 838 ins G             | S275 frameshift    | -                 | nd             | 3800                            | 500                         | 2800                        | 0                            |
| 23             | 6            | -              | 868G→A                | R285Q              | 8                 | -              | 760                             | 30                          | 440                         | 22                           |
| 24             | 7            | ?              | 923 C→A               | Y303 stop          | 1                 | +              | 4700                            | 94                          | 4183                        | nd                           |
| 25             | 7            | -              | 930 ins G             | N306 frameshift    | -                 | +              | 1196                            | 1                           | 343                         | 7                            |
| 26             | 8            | +              | 972 del AG            | L319 frameshift    | 1                 | +              | 1860                            | 93                          | 1171                        | nd                           |
| 27             | -            | +              | large deletion        | -                  | -                 | -              | 446                             | 1                           | 271                         | 3                            |
| 28             | -            | +              | large deletion        | -                  | -                 | -              | 4480                            | 224                         | 3763                        | nd                           |

図 1 X-SCID 患者末梢血 B 細胞表面の  $\gamma$ c 鎖発現



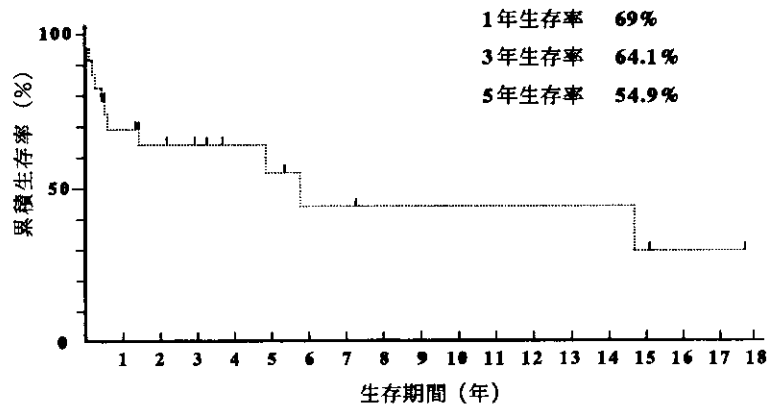


図2 X-SCID患者造血幹細胞移植後生存率  
(本邦例 23例について)

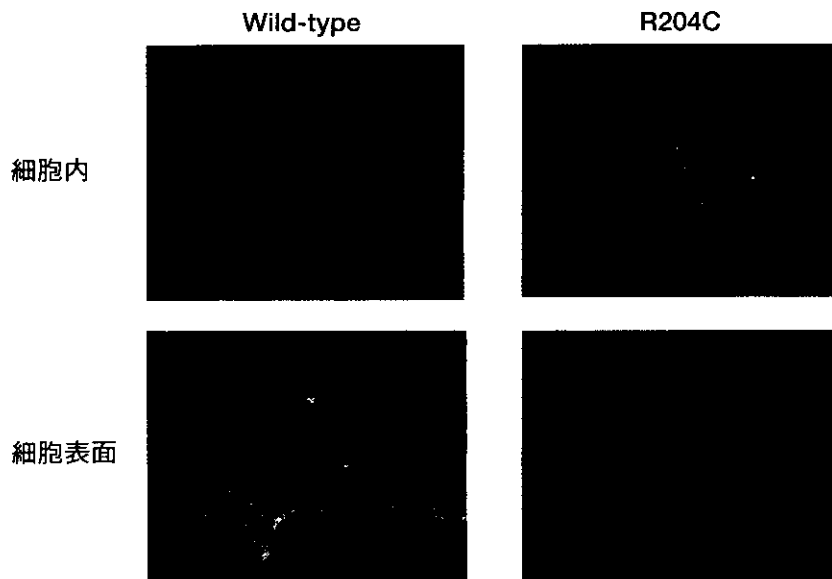


図3 変異 $\gamma$ c鎖 (R204C) は細胞表面に発現できない

### 【結果】

#### 細胞表面への $\gamma$ c鎖の発現

X-SCIDの簡易診断として、まず細胞表面への $\gamma$ c鎖の発現を抗ヒト $\gamma$ c鎖単クローン抗体、TUGh4、を用いたフローサイトメトリー法にて確認した。その際、B細胞のマーカーであるCD19またはCD20を横軸にとって末梢血中の $\gamma$ c鎖の発現を見た。その結果、患者ではB細胞が大多数を占めるが、 $\gamma$ c鎖の発現は認められなかった(図1上段)。

また、SCID患者では経胎盤的に流入してきた母親由来のT細胞が生着していることをしばしば経験する。図1下段に示すように母親由来のT細胞が生着している患者では、母親由来のT細胞にのみ $\gamma$ c鎖が発現していることがわかる。こうした場合には $\gamma$ c鎖が発現していないB細胞をソーティングしてきて、遺伝子診断を行った。

#### X-SCID患者の変異 $\gamma$ c鎖の特徴

我々はこれまでに本邦28症例と外国症例4例の

計32例のX-SCID患者について $\gamma$ c鎖変異を同定している<sup>3-7)</sup>。細胞表面への $\gamma$ c鎖発現をTUGh4を用いて解析した症例のうち、82%で $\gamma$ c鎖の発現を認めず、X-SCIDの診断に結びついた。本邦例28症例に限ってみると表1に示すように $\gamma$ c鎖が細胞表面へ発現しているのは15%に過ぎず、TUGh4による $\gamma$ c鎖の免疫染色を行うことにより85%のX-SCID患者で診断がついた。また、家族歴は67%に認められた。 $\gamma$ c鎖変異の種類については57%がミスセンスあるいはナンセンス変異であり、 $\gamma$ c鎖の大きな欠失を持つ2症例を含む6症例は欠失変異であった。4症例は挿入変異で、2症例はスプライス変異であった。変異はエクソン1を除く $\gamma$ c鎖全体に広く分布しており、本邦特異的なホットスポットは認められなかった。また、今回調査したX-SCID患者の造血幹細胞移植後の5年生存率は54.9%であった(図2)。

我々が解析したX-SCID患者の変異 $\gamma$ c鎖の中に、従来 $\gamma$ c鎖がわずかに発現するホットスポットとして報告されている変異(R204C)が含まれていた<sup>10)</sup>。しかし、我々の症例では $\gamma$ c鎖の細胞表面への発現は認められなかった。このため単離した変異 $\gamma$ c鎖cDNAをCOS7細胞に遺伝子導入し、 $\gamma$ c鎖の発現をTUGh4で確認したところ、細胞内には変異 $\gamma$ c鎖の発現を認めたが、細胞表面には $\gamma$ c鎖を検出できなかった(図3)。以上のことからこの変異 $\gamma$ c鎖は1アミノ酸置換があるために細胞表面へ発現できないことが証明された。

この他にも変異 $\gamma$ c鎖の解析を通していくつかの知見が得られている。その1つは典型的なX-SCID患者から単離した変異 $\gamma$ c鎖(939番目のGの欠失)がIL-2及びIL-4のシグナルを部分的に伝達できることから、 $\gamma$ c鎖-Jak3のシグナル伝達閾値によりX-SCIDの表現型が決定されることが示唆されたこと<sup>5)</sup>。さらに、以前本研究班でも報告したように正常と同等のNK活性を持つ非典型X-SCID症例で、変異 $\gamma$ c鎖がIL-2及びIL-15のシグナルを伝達できるが、IL-4及びIL-7によるシグナルが減弱しており、ヒトにおいてもIL-7とIL-15からのシグナルがT細胞とNK細胞の発生にそれぞれ重要な役割を果たしている可能性が示唆されたことが挙げ

られる<sup>6)</sup>。

### 【考案結論】

これまで本邦のX-SCID患者についてまとまった報告がなかったため、今回我々は本邦非血縁X-SCID患者28症例についてIL2RGの変異及び $\gamma$ c鎖の細胞表面への発現を検討した<sup>1)</sup>。従来、欧米からの報告ではいくつかのホットスポット変異が示されていた<sup>10)</sup>が、本邦例では変異が $\gamma$ c鎖全体に広く分布しており、特に本邦特異的なホットスポットは認められず、さらに未報告の変異も11例と多くみられた。

また、 $\gamma$ c鎖の細胞表面への発現の有無によりX-SCIDの診断を行うことに関しては、欧米からの報告では細胞表面への $\gamma$ c鎖発現がわずかに認められる症例が多く存在することから否定的であった<sup>10)</sup>。我々はビオチン化したTUGh4による $\gamma$ c鎖の細胞表面の染色を行い82%の患者において $\gamma$ c鎖が細胞表面に発現しないことを示した。我々の結果と欧米からの報告の違いを明らかにする目的で、従来 $\gamma$ c鎖がわずかに発現するホットスポットとして報告されている変異 $\gamma$ c鎖cDNAを用いた遺伝子導入実験を行い、この変異 $\gamma$ c鎖が、細胞内では発現できるが、細胞表面には発現できないことを証明した。これらのことから実際には細胞表面に発現していないものが従来の報告ではわずかに発現しているものの中に含まれている可能性が示された。

昨年Alain Fischerたちは、HLA一致同胞の存在しないX-SCID患者で骨髄移植後の予後が思わしくない事から、この群の患者2例に対して遺伝子治療を施行し、2例とも順調に経過していると報告した<sup>2)</sup>。今回集計した本邦のX-SCID患者の造血幹細胞移植後の成績は5年生存率で約55%であり、満足のいくものではなかった。こうした点からも、本疾患における遺伝子治療は今後、考慮すべき治療法と考えられ、遺伝子治療を的確な時期に安全に行うためにX-SCID家系の把握、個々の $\gamma$ c鎖変異の病態解明を今後も続けていくことが必要であると考えられた。

#### 【協力施設および共同研究者名（敬称略）】

東京医科歯科大小児科（野々山恵章，今井耕介，森尾友宏），名古屋大学小児科（栢植郁哉），手稲溪仁会小児科（宮ノ下昭彦），北海道大学遺伝子治療（崎山幸雄），旭川赤十字病院小児科（三浦純一），京都大学小児科（片村憲司），東京大学医科研（平家俊男），福井大学小児科（眞弓光文），九州大学小児科（高田英俊），茨城県立こども病院小児科（泉維昌），筑波大学小児科（須磨崎亮），産業医科大学小児科（神菌淳司），京都府立医科大学小児科（日比成美），倉敷中央病院小児科（佐々木博），静岡こども病院小児科（木村光明），福島県立医科大学小児科（菊田敦），久留米大学小児科（伊達是志），大阪市立総合医療センター小児科（迫正廣），大阪赤十字病院小児科（田中晴樹），神戸大学小児科（佐野公彦）

#### 【参考文献】

- 1) Sugamura K, Asao H, Kondo M, et al. The interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol* 14:179-205, 1996.
- 2) Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288: 669-672, 2000.
- 3) Kumaki S, Ishii N, Minegishi M, et al. Characterization of the  $\gamma$  c chain among 27 unrelated Japanese patients with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID). *Hum Genet* 107:406-408, 2000.
- 4) Kumaki S, Ochs HD, Timour M, et al. Characterization of B-cell lines established from two X-linked severe combined immunodeficiency patients: interleukin-15 binds to the B cells but is not internalized efficiently. *Blood* 86:1428-1436, 1995.
- 5) Kumaki S, Ochs HD, Kuropatwinski KK, et al. A novel mutant  $\gamma$  c chain from a patient with typical phenotype of X-linked severe combined immunodeficiency has partial signaling function for mediating IL-2- and IL-4-receptor action. *Clin Exp Immunol*, 115:356-361, 1999.
- 6) Kumaki S, Ishii N, Minegishi M, et al. Functional role of IL-4 and IL-7 in the development of X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood* 93:607-612, 1999.
- 7) Ishii N, Asao H, Kimura Y, et al. Impairment of ligand binding and growth signaling of mutant IL-2 receptor  $\gamma$  -chains in patients with X-linked severe combined immunodeficiency. *J Immunol* 153: 1310-1317, 1994.
- 8) Izuhara K, Heike T, Otsuka T, et al. Signal transduction pathway of interleukin-4 and interleukin-13 in human B cells derived from X-linked severe combined immunodeficiency patients. *J Biol Chem* 271:619-622, 1996.
- 9) Minegishi Y, Ishii N, Maeda H, et al. Three novel mutations in the interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain gene in four Japanese patients with X-linked severe combined immunodeficiency. *Hum Genet* 96:681-683, 1995.
- 10) Puck JM, Pepper AE, Henthorn PS, et al. Mutation analysis of IL2RG in human X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood*, 89: 1968-1977, 1997.

## Characterization of the $\gamma$ c chain among 32 unrelated patients with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID).

Satoru Kumaki, Naoto Ishii\*, Masayoshi Minegishi, Yoshiyuki Ohashi, Kazuo Sugamura\* and Shigeru Tsuchiya

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

\*Department of Immunology, Tohoku University School of Medicine.

X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) is a rare, fatal disease that is caused by mutations in the gene encoding the  $\gamma$  c chain. In this study, 32 unrelated patients with X-SCID were examined in terms of genetic mutations and surface expression of the  $\gamma$  c chain. Among 30 patients examined, excluding 2 patients with large deletions, 28 different mutations were identified in the IL2RG gene. One patient bearing an extracellular mutation and all of four patients bearing intracellular mutations after exon 7, expressed the  $\gamma$  c chain on the cell surface. Overall, 82% of patients lacked surface expression of the  $\gamma$  c chain leading to a diagnosis of X-SCID. Limiting to Japanese patients with X-SCID, IL2RG mutations were dispersed over the entire gene excluding exon 1 and 11 novel mutations were identified.

---

## 重症複合免疫不全症に対するCD34陽性選択骨髄移植後の キメリズム解析特に抗体産生能回復との関連について

柘 植 郁 哉 (名古屋大学小児科)

小 島 勢 二 (名古屋大学成長発達医学)

HLA一致同胞、HLA近似血縁者、臍帯血バンクのいずれにも、適切なドナーが見つからなかった伴性遺伝型重症複合免疫不全症患者に、ハプロタイプ一致の母親よりCD34陽性選択による骨髄移植を実施し、1年後のキメリズムと抗体産生能について解析した。患者は7カ月男児。肺炎にて岡崎市民病院入院、挿管呼吸管理が施行されたが肺炎の改善が思わしくなく、また血清IgG値が4mg/dlと低下しており、免疫不全症の精査目的で名大病院転院となった。転院時軽度のい瘦、多呼吸、胸部ラ音を認め、検査所見ではT細胞の著明な減少を認め、T細胞芽球化能も消失していた。骨髄移植目的でHLAの検索を開始したが、親族、臍帯血バンクにドナーが見つからなかったため、ハプロタイプ一致の母親より、CD34陽性選択法による骨髄移植を施行した。前処置は行わず、GVH予防はMTXとタクロリムスを用いた。骨髄移植後の合併症は、軽度の発熱以外認められなかった。免疫系の再構築も順調で、骨髄移植後2カ月半頃から芽球化能が出現し始め、4カ月目からはT細胞数も増加した。移植後6カ月目に退院となりIgGの補充を中止したが、血清IgG値は500mg/dl以下には下がらず、IgM値共々増加傾向に転じており、抗体産生能の回復が示唆された。移植後1年目の末梢血単核球のキメラ状態をHLA-A30抗体を用いて検討したところ、CD3陽性T細胞と、CD16陽性NK細胞はドナー由来と考えられ、CD20陽性B細胞、CD14陽性単球は患者由来と考えられた。PBMCをPWM存在下に1週間培養し、HLA-A30抗体と抗IgG抗体とで2重染色したところ、細胞表面IgG陽性細胞は患者由来であったが、細胞質内IgG陽性細胞はドナー由来の細胞にも認められた。この結果は抗体産生不全の病因を患者由来の欠陥B細胞が骨髄移植後も残存することに求める仮説と一致するが、HLA一致の骨髄移植ならB細胞は残存しても抗体が産生される場合が多い等十分に説明しきれない点も残されている。今後も、キメリズムおよび抗体産生能を検討することで、こうした疑問を解決し、より完全な骨髄移植法を開発する必要があると考えられた。

### 【はじめに】

重症複合免疫不全症(SCID)は感染症に罹患してから発見されることが多く、また、たとえ診断時に重篤な感染がなくても、一刻も早い造血幹細胞移植が望まれるから、HLA一致同胞が見つからない場合には、両親からハプロタイプ一致T細胞除去骨髄移植が行われてきた。T細胞除去法としては、欧米の主要な施設は、大豆レクチンとヒツジ赤血球ロゼットを組み合わせたいわゆるReisner法を用い、Duke大学<sup>1)</sup>やSloan-Kettering癌センタ

ー<sup>2)</sup>からは70%台の良好な生存率が報告されている。しかし、同法は手技が煩雑であり、また、除去される細胞のlineageが不明確なため日本では普及せず、単クローン抗体によるT細胞除去が試みられたが、最近では、CD34陽性選択の報告が多い。

HLA一致同胞ドナー以外からの造血幹細胞移植のもう一つの問題点は、幸いT細胞機能が回復しても、抗体産生不全状態に留まる症例が多い点である。特に、B細胞の存在する伴性型SCIDに前処置なしで移植した場合、患者由来B細胞が存続し

表1 入院時所見

入院時現症

体重；6975 g 身長；68 cm 体温；37.1°C、  
 呼吸数；64/分 脈拍；148/分  
 胸部；湿性ラ音（両肺野）呼吸音減弱（左）  
 腹部；平坦、肝脾腫(-)  
 口腔；咽頭発赤軽度、驚口蒼(-)、  
 頸部リンパ節；不触

入院時検査所見

|                        |           |                   |                           |          |            |
|------------------------|-----------|-------------------|---------------------------|----------|------------|
| TP                     | 5.8 g/dL  | RBC               | 451 x10 <sup>4</sup> /mL  | CRP      | 0.5 mg/dL  |
| ALB                    | 3.4 g/dL  | Hb                | 10.5 g/dL                 | β-Glucan | 16.1 pg/mL |
| Glu                    | 104 mg/dL | Plt               | 52.1 x10 <sup>4</sup> /mL | CMV-Ag   | 0,0        |
| GOT                    | 25 IU/L   | WBC               | 13000 /mL                 |          |            |
| GPT                    | 7 IU/L    | Seg               | 85.8 %                    | IgG      | 4 mg/dl    |
| LDH422                 | IU/L      | Lym               | 9.2 %                     | IgA      | 2> mg/dl   |
| ALP368                 | IU/L      | Mo                | 5.0 %                     | IgM      | 26 mg/dl   |
| T.Bil                  | 0.2 mg/dL | Lymphocyte subset |                           |          |            |
| BUN                    | 5 mg/dL   | CD3               | 1.2 /mL                   | (0.1%)   |            |
| CRE                    | 0.2 mg/dL | CD4               | 23.9 /mL                  | (2.0%)   |            |
| Na                     | 138 mEq/L | CD8               | 9.6 /mL                   | (0.8%)   |            |
| K                      | 4.3 mEq/L | CD56              | 7.2 /mL                   | (0.6%)   |            |
| Cl                     | 108 mEq/L | CD20343           | /mL                       | (28.7%)  |            |
| CK                     | 25 IU/L   | Blastogenesis     |                           |          |            |
| PaO <sub>2</sub>       | 60.3mmHg  | PHA               | 441 cpm                   | (SI=3.4) |            |
| PaCO <sub>2</sub>      | 31.3mmHg  | SAC               | 1233 cpm                  | (SI=9.5) |            |
| (FIO <sub>2</sub> 0.4) |           |                   |                           |          |            |

表2 骨髄移植

|        |                         |                               |           |
|--------|-------------------------|-------------------------------|-----------|
| HLA    | 患者                      | A26, A30, B13, B35, Cw3, Cw6, | DR9, DR12 |
|        | 母                       | A26, A24, B52, B35, Cw3,      | DR9, DR2  |
|        | 父                       | A2, A30, B13, B46, Cw1, Cw6,  | DR8, DR12 |
| 前処置    | 施行せず                    |                               |           |
| GVH 予防 | FK506+sMTX              |                               |           |
| 骨髄細胞処理 | CD34 positive selection |                               |           |
|        | 採取骨髄有核細胞数               | 8x10 <sup>9</sup>             |           |
|        | Ficoll-Paque 比重遠心       | 4.2x10 <sup>9</sup>           |           |
|        | CD34 陽性分画               | 3.0x10 <sup>7</sup>           |           |
|        |                         | CD34 陽性細胞:                    | 92.4%     |
|        |                         | CD3 陽性細胞:                     | 1.57%     |

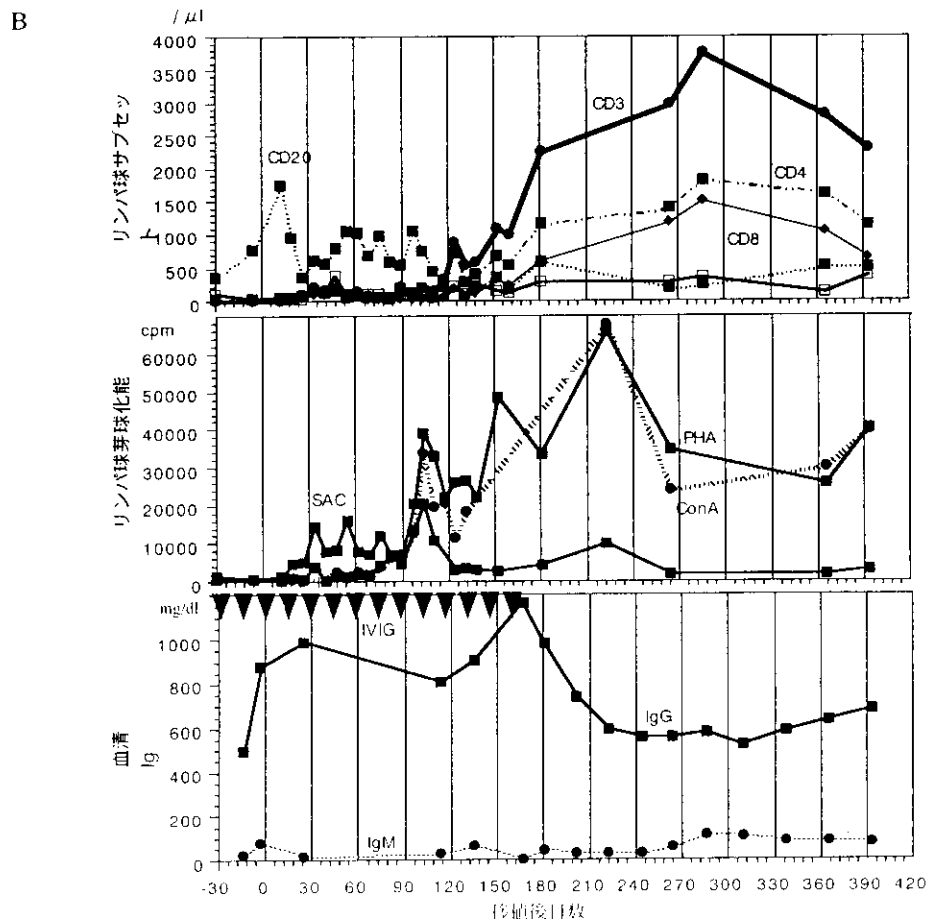
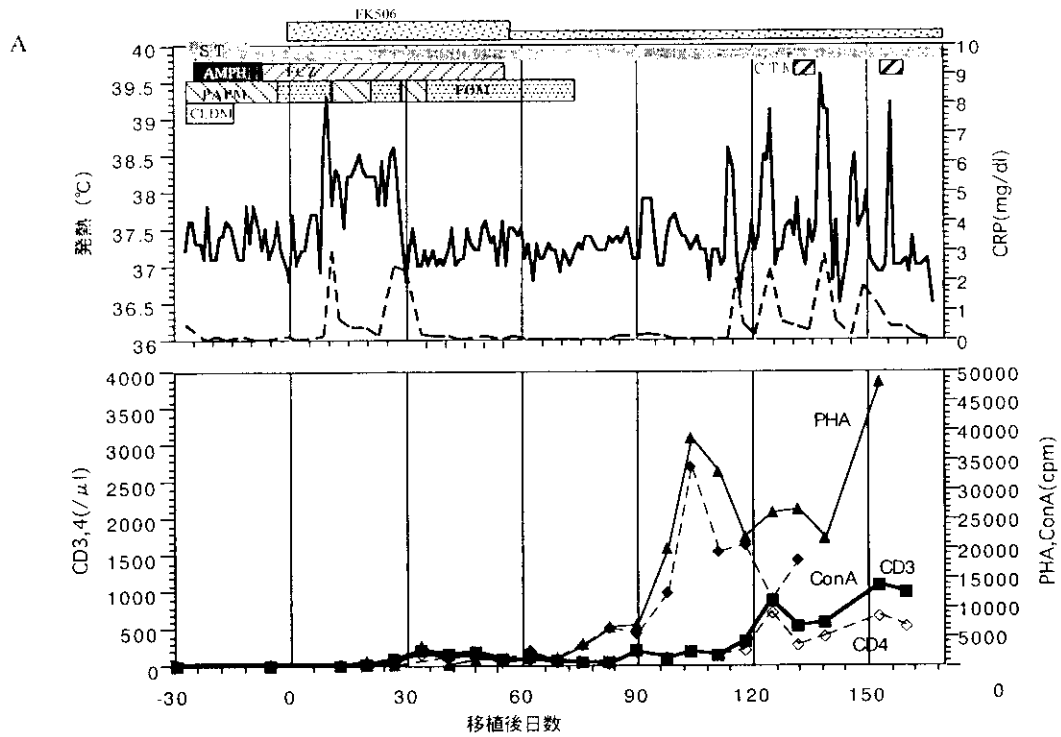


図1 移植後経過表。A；入院中の経過。 B；移植後1年間の免疫能の推移。



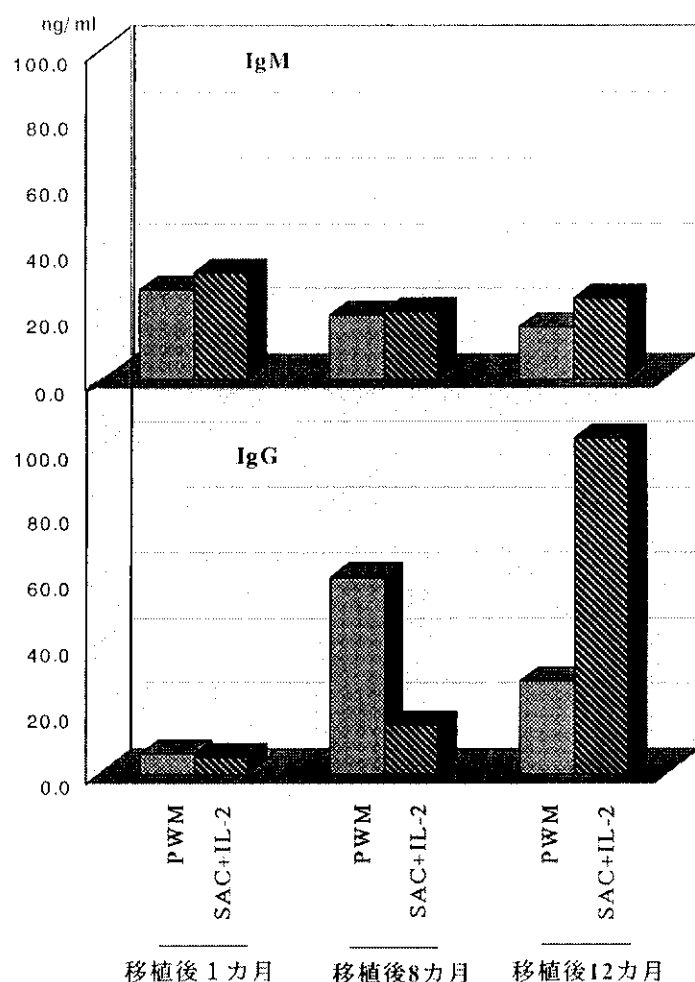


図2 移植後のin vitro IgM, IgG産生能の推移。

て、抗体産生能が回復しない場合が多い。

今回、HLA一致同胞、HLA近似血縁者、臍帯血バンクのいずれにも、適当なドナーが見つからなかった伴性遺伝型SCID患者に、ハプロ一致の母親よりCD34陽性選択による骨髓移植を実施し、キメリズムと抗体産生能について解析したので報告する。

### 【方法】

#### 1. HLA-A30抗体を用いたキメリズム解析。

患者末梢血単核球および単核球をPWM存在下に1週間培養した細胞について、HLA-A30抗体と各種lineage markerにより2重染色して、フローサイトメトリーを行った<sup>2)</sup>。IgG産生細胞の同定には、Fix & Perm (Caltag Laboratories) により固定した後、

HLA-A30抗体と抗IgG抗体と2重染色した。

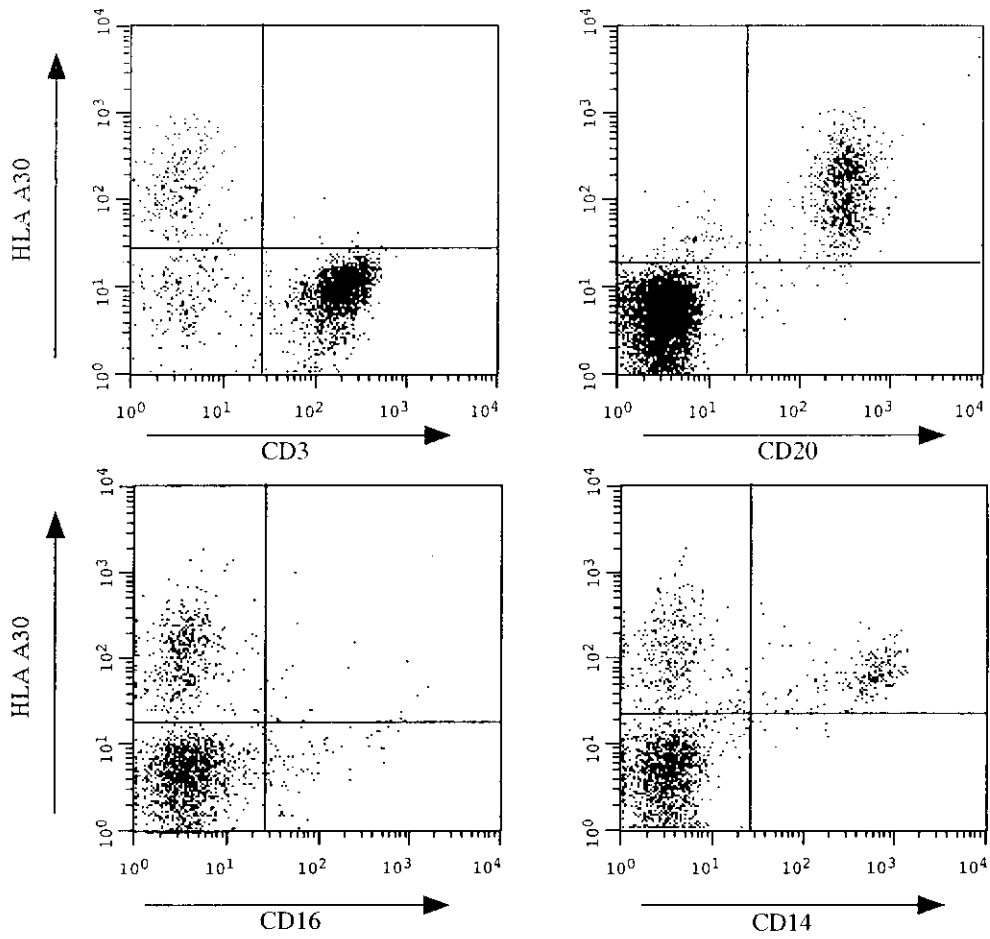
#### 2. in vitro抗体産生能

$1 \times 10^5$ 個のB細胞に *S. aureus* Cowan I 株菌体 (SAC) (最終4000倍希釈)、IL-2 (最終100U/ml)、PWM (最終10ng/ml) を種々の組み合わせで添加してUボトムマイクロプレートにて7日間培養した後、培養上清中のIgG, MをELISAで測定した。

### 【症例】

症例は7カ月男児。生後1カ月頃より湿性咳嗽が続き、生後6カ月頃より時に38℃以上の発熱を見るようになった。H11.9.22 (7カ月時) より微熱、下痢出現。9.26より高熱となり、近医にて経口抗生剤投与を受けるも不応。10.2肺炎として、岡崎市民病院紹介入院となる。入院後CTM・EMの

A



B

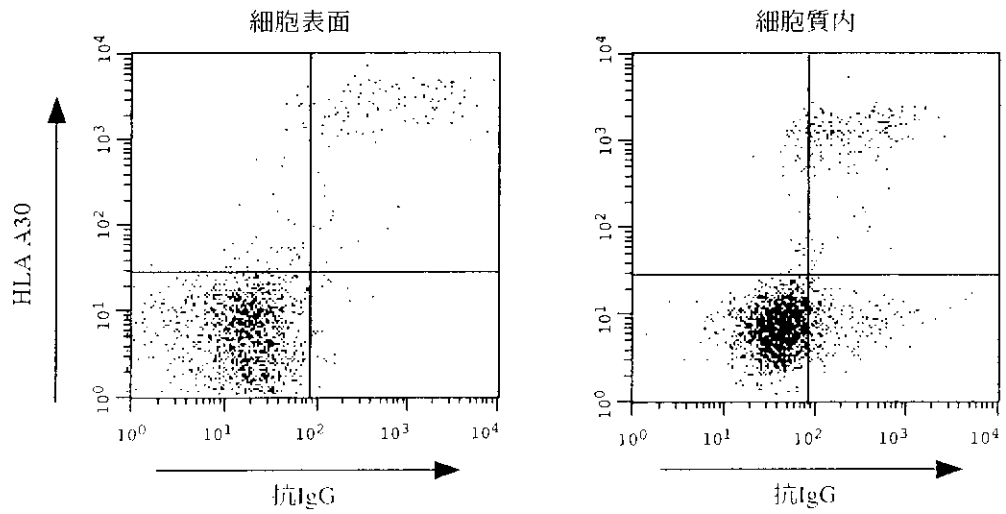


図3 抗HLA-A30抗体を用いた移植1年後のキメラリズム解析。

投与を受けるも、呼吸困難増悪し、10.5挿管呼吸管理が施行された。10.13一旦抜管となるも、酸素投与は必要で、肺炎の改善が思わしくなかった。10.19血清IgG値が4mg/dlと低下しており、免疫不全症の精査目的で、名大病院転院となった。

転院時(表1)軽度るい瘦、多呼吸、胸部ラ音を認めた。検査所見はリンパ球特にT細胞の著明な低下を認め、T細胞芽球化能も消失していた。家族歴、妊娠歴に特記すべきことはなかった。

以上よりB(+)**SCID**と診断し、骨髄移植目的でHLAの検索を開始したが、親族、臍帯血バンクにドナーが見つからなかったため、平成11年11月17日ハプロタイプ一致の母親より、CD34陽性選択法による骨髄移植を施行した(表2)。前処置は行わず、GVHD予防はMTXとタクロリムスを用いた。

移植後退院までの経過を図1Aに示した。High riskを覚悟して臨んだ骨髄移植であったが、軽い発熱以外ほとんど合併症は起きなかった。免疫系の再構築も、骨髄移植後2カ月半頃から、芽球化能が出現し始め、4カ月目からはT細胞数も増加した。移植後6カ月目に退院となったが、その後も大きな合併症はなく、T細胞数、芽球化能も正常化している。増加していたB細胞数も正常化した。NK細胞数は低値に留まっている(図1B)。退院を契機にIgGの補充を中止したが、血清IgG値は500mg/dl以下には下がらず、IgM値共々増加傾向に転じており、抗体産生能の回復が示唆された。現在各種予防接種を開始し、特異的抗体産生能を検討中である。

## 【結果】

骨髄移植後のin vitro抗体産生能の経時的变化を図2に示した。未だ低値ではあるが、PWMあるいはSAC+IL-2刺激によるIgG産生の増加傾向が認められた。IgM産生は移植直後より軽度認められたが、低値に留まっている。

移植後1年目の末梢血単核球のキメラ状態をHLA-A30抗体を用いて検討した(図3)。CD3陽性T細胞と、数はまだ少ないがCD16陽性NK細胞はHLA-A30陰性でドナー(母親)由来と考えられ、CD20陽性B細胞、CD14陽性単球はHLA-A30陽性

で患者由来と考えられた。

血清IgG値が増加傾向に転じたことから、抗体産生能の回復が示唆されたので、IgG産生細胞のキメリズムを検討した。PBMCをPWM存在下に1週間培養し、HLA-A30抗体と抗IgG抗体とで2重染色した。細胞表面IgG陽性細胞は患者由来であったが、細胞質内IgG陽性細胞はドナー由来の細胞にも認められた。

## 【考案】

重症複合免疫不全症患者に、HLA Iハプロタイプ一致の母親よりCD34陽性選択骨髄移植を行い、T細胞機能の再建を得た。移植後漸く1年を経過した現在、液性免疫能の評価は難しいが、IgG製剤の補充なしに血清IgG値500mg/dl以上を維持して健康であり、液性免疫能も再建し得たと期待される。

重症複合免疫不全症の骨髄移植療法の成功率は、欧米の主要な施設からはHLA一致同胞間では90%以上、それ以外では50%から80%の間とされている。臍帯血バンクが充実すれば、更なる向上が期待されるが、本症の骨髄移植では移植後にも液性免疫不全が高率に残存するという問題が存在する。そのメカニズムは不明だが、HLA一致の程度、骨髄移植前処置の有無とそれに影響されるキメリズム状態が関与すると考えられている。特に伴性遺伝型重症複合免疫不全症など患者のB細胞が存在する病型では、サイトカイン受容体やシグナル伝達機構に障害があり抗体産生能に欠陥のあるB細胞が、移植後も残存するために、ドナー由来の正常B細胞の分化を阻害し、抗体産生障害が持続すると考えられている<sup>3)</sup>。しかし、B細胞も欠損する病型でも、あるいは骨髄移植前処置を行っても抗体産生不全は発症し得うるし、また、B細胞が残存しても、HLA一致の移植では抗体産生能も回復する場合が大部分であるなど発症のメカニズム、予防法は必ずしも明確ではない。

今回我々は、骨髄移植1年後のキメリズムを、患者由来細胞に存在し、ドナー由来細胞には存在しないHLA-A30に対する抗体を用いて解析した。結果は予想通り、T、NK細胞はドナー由来、B細胞、単球は患者由来であった。In vitroの培養で抗

体産生細胞を誘導して、細胞質内にIgGを産生している細胞を検討した結果では、ドナー由来のB細胞は極めて少ないにもかかわらず、抗体産生細胞は検出可能であった。細胞表面にIgGを有する細胞が多いため、患者由来のIgG産生細胞の同定はできなかった。すなわち、移植1年後もB細胞の大部分は患者由来で、末梢血ではドナー由来B細胞は検出感度以下であるが、ドナー由来IgG産生細胞は誘導できることが示された。この結果は上述した残存する患者由来B細胞に抗体産生不全の病因を求める仮説と一致するが、それなら何故、HLA一致ならB細胞は残存しても抗体が産生される場合が多いのか等の疑問は解決されない。今後、キメリズムおよび抗体産生能を検討することで、こうした疑問を解決し、より完全な骨髄移植法を開発する必要があると考えられた。

#### 【文献】

- 1) Buckley RH, Schiff SE, Schiff RI, et al. Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 340:508-16, 1999.
- 2) O' Reilly RJ, Friedrich W, Small TN: Hematopoietic cell transplantation for immunodeficiency disorders. In Thomas ED, Blume KG, Forman SJ (eds): *Hematopoietic Cell Transplantation*, ed2. Blackwell Science, Malden, MA, p1154, 1999.
- 3) White H, Thrasher A, Veys P, Kinnon C, Gaspar HB. Intrinsic defects of B cell function in X-linked severe combined immunodeficiency. *Eur J Immunol*. 30:732-7, 2000.

### An assessment of blood cell chimerism after CD34+ progenitor cell transplantation to an infant with severe combined immunodeficiency. Correlation with recovery of humoral immunity.

Ikuya Tsuge <sup>1)</sup>, Seiji Kojima <sup>2)</sup>

Department of Pediatrics <sup>1)</sup>, Department of Developmental Pediatrics <sup>2)</sup>

We report here a successful CD34+ progenitor cell transplantation to a severe combined immunodeficient (SCID) patient from haplo-identical mother and an assessment of blood cell chimerism at one year after transplantation.

The patient suffered from low-grade fever and diarrhea at seven months old, and pneumonia developed. As the pneumonia was refractory to usual therapy and low serum IgG value was pointed out, he transferred to Nagoya University Hospital. Blood examination revealed profound T lymphocytopenia and loss of proliferative responses to T cell mitogen. As the HLA identical or partially mismatched donor could not be found, CD34+ progenitor cell transplantation from haplo-identical mother was performed without bone marrow conditioning.

No serious complication occurred after transplantation. At 2.5 months after transplantation T cell mitogen responses appeared and the number of T cells began to increase at four months. After his discharge from hospital at six months after transplantation, intravenous IgG replacement was discontinued. His serum IgG did not decrease below 500 mg/dl, and serum IgM began to increase, suggesting recovery of humoral immunity.

An assessment of blood cell chimerism was performed one year after transplantation using anti-HLA-A30 antibody and flowcytometry. CD3+ T cells and CD16+ NK cells were revealed to be derived from the donor, and CD20+ B cells and CD14+ positive monocytes were patient origin. Although most of cell surface IgG positive cells were patient origin, cytoplasmic IgG positive cells were found within donor derived cells after one-week culture with PWM.

These results were consisted with former hypothesis that persistent defective B cells inhibit maturation of normal B cells derived from donor. However, the hypothesis cannot explain the fact that humoral immunity is usually recovered