

厚生科学研究費補助金
特定疾患対策研究事業

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

平成13年度総括・分担研究報告書

平成14年3月

分科会長 小宮山 淳

厚生科学研究費補助金
特定疾患対策研究事業

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

目 次

I. 班員名簿	1
II. 年次総括報告	3
班 長 小宮山 淳 (信州大学医学部小児科)	
III. 分担研究報告	
1 原発性免疫不全症候群症例登録調査	7
岩田 力 (東京大学大学院医学系研究科生殖発達加齢医学専攻 小児医学講座発達発育学分野)	
2 常染色体劣性無ガンマグロブリン血症責任遺伝子の同定	12
峯岸克行、野々山恵章、水谷修紀 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)	
3 ナイーブB細胞の解析：クラススイッチと somatic hypermutation の誘導	15
上松一永、南雲治夫、小林法元、山崎崇志、 山田慎二、松崎 聡、小宮山淳 (信州大学小児科) 史 宇軍、長瀬尚志、高本雅哉、菅根一男 (信州大学大学院医学研究科移植免疫感染症)	
4 原発性免疫不全症における変異タンパク質の分解機構の解析	22
松田達志、小安重夫 (慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室)	
5 ヒト臍帯血CD25陽性CD4陽性T細胞の解析	26
野村明彦、高畑 靖、高田英俊、 原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)	
6 ATM, BLM ダブルノックアウト細胞の作成とその特徴	32
近藤直実、深尾敏幸、Philip Chen、 金子英雄 (岐阜大学医学部小児科) Martin F Lavin (Cancer and Cell Biology, Queensland Institute of Medical Research)	
7 重症複合免疫不全症におけるRAG遺伝子解析とTCR diversityの評価	36
谷内江 昭宏、岡田かなえ (金沢大学医学部保健学科) 東馬智子、今野昭宏、長沖周也、 笠原善仁、小泉晶一、(金沢大学大学院医学系研究科小児科学)	

8.	IL-21のX-連鎖重症複合免疫不全症病態形成への関与	41
	久間木 悟、土屋 滋（東北大学加齢医学研究所・発達病態分野） 石井直人、浅尾裕信、菅村和夫 （東北大学大学院・医学系・生体防御講座免疫学分野）	
9	特異なWASP発現パターンを呈したWiskott-Aldrich syndromeの1症例	46
	山田雅文、川村信明、小林邦彦（北海道大学医学部小児科） 有賀 正、崎山幸雄（北海道大学医学部遺伝子治療） 近藤達郎、森内浩幸（長崎大学医学部小児科）	
10	X-linked lymphoproliferative diseaseにおけるNK cell, cytotoxic T cellの機能解析	53
	片村憲司、八角高裕（京都大学大学院医学研究科発達小児科学） 松田達志、小安重夫（慶應義塾大学微生物学免疫学） 眞弓光文（福井医科大学小児科）	
11	日本人の原発性リンパ組織球性血球貪食症候群におけるPerforin異常	59
	菅 尚浩、高田英俊、野村明彦 大賀正一、井原健二（九州大学 成長発達医学） 石井榮一（九州大学 成長発達医学） （佐賀医科大学 小児科） 大島孝一（福岡大学 第一病理） 原 寿郎（九州大学 成長発達医学）	
12	gp91 ^{phox} , p22 ^{phox} 欠損型慢性肉芽腫症患者の遺伝子変異と臨床像解析	65
	布井博幸（宮崎医科大学） 水上智之、石橋史成、岩田真由美（熊本大学医学部附属病院小児科）	
13	X連鎖自己免疫アレルギー調節異常症候群の遺伝子診断	71
	柘植郁哉、宇理須厚雄（藤田保健衛生大学小児科） 蒲池吉朗、早川昌弘、坂本龍雄（名古屋大学小児科）	
14	免疫グロブリン重鎖遺伝子欠損症の一家系	78
	近藤直実、金子英雄、寺田知新、 深尾敏幸、浅野 勉（岐阜大学医学部小児科） 伊部正明、横田俊平（横浜市立大学小児科）	
15	無ガンマグロブリン血症の責任遺伝子Btkの主要下流経路(PLCγ2)の活性化機構	82
	塚田 聡、渡邊 大（大阪大学医学部分子病態内科）	
16	X連鎖無γ-グロブリン血症の診断における国際協力	86
	王 悦、金兼弘和、宮脇利男（富山医科薬科大学小児科） Eun-Kyeong Jo（Chungnam National University） Ozden Sanal（Hacettepe University） Maria Marluce dos Santos Vilela（State University of Campinas）	

17	低 γ -グロブリン血症におけるSAP遺伝子変異	90
	金兼弘和、王 悦、宮脇利男（富山医科薬科大学小児科） 近藤達郎、森内浩幸（長崎大学医学部小児科）	
18	無 γ -グロブリン血症と肺胞蛋白症を呈した免疫不全症： 造血幹細胞移植による改善	95
	篠崎康治、上松一永、南雲治夫、関口幸男、 竹内浩一、安井耕三、小宮山 淳（信州大学小児科）	
19	Establishment of T cell lines from the adult patient with T cell immunodeficiency	97
	竹内 勤、鈴木勝也、津坂憲政、得平道英、 森 茂久（埼玉医科大学総合医療センター 第二内科）	
20	抑制性アダプター分子によるT細胞活性化の負の制御	99
	山崎 晶、斉藤 隆（千葉大学大学院医学研究院遺伝子制御学）	
IV.	発表文献リスト	101

I. 班 員 名 簿

原発性免疫不全症候群調査研究班
班 員 名 簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
分 科 会 長	小宮山 淳	信州大学医学部小児科	教授
分 科 会 員	小林 邦彦	北海道大学医学部小児科	教授
	近藤 直実	岐阜大学医学部小児科	教授
	塚田 聡	大阪大学医学部第三内科	助手
	布井 博幸	宮崎医科大学小児科	教授
	眞弓 光文	福井医科大学小児科	教授
	宮脇 利男	富山医科薬科大学医学部小児科	教授
	野々山 恵章	東京医科歯科大学医学部小児科	講師
	岩田 力	東京大学医学部分院小児科	助教授
	小安 重夫	慶應義塾大学医学部微生物学	教授
	斉藤 隆	千葉大学大学院医学研究科遺伝子制御学	教授
	柘植 郁哉	藤田保健衛生大学小児科	講師
	土屋 滋	東北大学加齢医学研究所発達病態	教授
	原 寿郎	九州大学医学部小児科	教授
	竹内 勤	埼玉医科大学総合医療センター	教授
研 究 協 力 者	谷内江 昭宏	金沢大学医学部保健学科検査技術科学	教授
事 務 局	上松 一永	信州大学医学部小児科	助教授

〒390-8621 長野県松本市旭 3-1-1
電話 (0263) 35-4600 (内線 5269)
ダイヤルイン (0263) 37-2642
FAX (0263) 37-3089

Ⅱ. 年次總括報告

年次総括報告

原発性免疫不全症候群調査研究班

班長 小宮山 淳

(信州大学医学部小児科)

I 研究の目的

本研究班では、原発性免疫不全症候群の疫学調査、責任遺伝子および病態の解明、責任遺伝子を活用した新規診断法の開発、治療法の改良などを行ってきた。本年度もこれらを重点目標として研究を進めた。

我が国では、本研究班によって昭和47年から全国的な登録事業が続けられ、貴重なデータが集積されつつある。原発性免疫不全症候群は疾患の種類が多く、また臨床症状が多彩であり、その診断にはしばしば困難を伴う。近年、遺伝子診断法の導入によって、診断がより正確となり、疫学調査の信憑性も一段と高まってきた。

責任遺伝子の解明は臨床的意義が高いが、それが解明されたのはいまだ一部の疾患にすぎない。そこで、さらに多くの疾患について責任遺伝子、発症機構、および病態を解明するとともに、遺伝子診断法の開発を進めた。

治療法改良をめざして、これまでに造血幹細胞移植の適応拡大と改良を図ってきた。本年度においても、この治療研究を発展させ、治療成績改善の一助とすることを目標とした。また、有効な遺伝子治療の開発をめざして基礎的ならびに臨床的研究を継続した。

インターネット上に開設したホームページを活用し、患者や家族をはじめ医療関係者などの相談に応ずるとともに、原発性免疫不全症候群の診療レベルや患者QOLの向上に寄与できることを期待した。

II 研究成果

1. 疫学調査

全国的な調査によって、4例の新規登録が得ら

れた。これまでの累積登録数は、1197名（男性863名、女性334名）となっている。

既登録症例について、ファイルメーカープロを用いて電子化を行った。約400名を入力したが、家族歴の記載が困難であることなど、電子化に向けての検討課題がいくつか見つかった。

厚生労働省特定疾患治療研究事業に係る臨床調査個人表の平成11年度分を参考に、それら症例の既登録、未登録の分別を開始した。現在、本調査を進めているところである。

2. 責任遺伝子、発症機構および病態の解明

1) 無 γ グロブリン血症

X連鎖無 γ グロブリン血症(XLA)では、チロシンキナーゼであるBtkに変異があることはよく知られている。無 γ グロブリン血症とB細胞欠損がありBtkが正常の症例が存在し、この病型は常染色体劣性無 γ グロブリン血症とよばれる。この病型について責任遺伝子を解析した。その結果、責任遺伝子としてIgM重鎖、Ig α 、 λ 5、BLNK(B cell linker protein)を同定した。これら分子の異常によって、Pre-B細胞抗原受容体のシグナル伝達に欠陥が生じ、成熟B細胞が欠損することを示した。さらに、病態についても明らかにした。

XLAの責任遺伝子Btkは、B細胞抗原受容体のシグナル伝達に関与し、カルシウムのシグナルの主要経路に位置している。しかしながら、その経路で主要な機能を担うホスホリパーゼC γ 2(PLC γ 2)がBtkによって活性化される機構は不明であった。本年度は、PLC γ 2のチロシン酸化部位を決定し、PLC γ 2の活性化機構を解明した。この研究結果から、さらにBtk-PLC γ 2経路の重要性も確立できた。

2) IgG2欠乏症

膜型 IgG2 の変異によって正常な膜型 IgG2 が産生されず、IgG2 欠損が生ずることをすでに報告した。IgG2、IgG4、IgA、IgE 欠損～低値の家系において、免疫グロブリン重鎖遺伝子欠損を同定した。完全なIgGサブクラス欠損症では、その原因としてIgG定常部領域の変異または欠失の可能性を示した。

3) 複合免疫不全症

X連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) の責任遺伝子は γ c鎖遺伝子である。 γ c鎖は、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15の受容体として共通に使用されている。X-CID患者から単離した変異 γ c鎖を発現させた細胞において、IL-21シグナルを伝達できないことを証明した。この成績から、IL-21は γ c鎖をその受容体複合体の一部として使用し、X-SCIDの病態形成に関与していることを示した。

CD8 欠損症患者から単離した責任遺伝子産物、ZAP-70蛋白を解析した。すでに二つの温度感受性変異を報告してきたが、これら変異蛋白の分解は制限温度下における高次構造の変化によって生じることを示した。変異ZAP-70蛋白の分解は、各種プロテアーゼ阻害剤によって抑制されず、新規のプロテアーゼの関与が想定された。さらに、この変異蛋白に特異的に結合する因子の存在を明らかにした。

4) X連鎖リンパ増殖症候群(XLP)

責任遺伝子産物はSAPであり、血球貪食症候群、悪性リンパ腫、免疫グロブリン異常などを発症する。XLP患者においてNK細胞活性と細胞傷害活性の両者が低下していることを見だし、その障害機構の一端を解析した。

5) Ataxia-telangiectasia、Bloom症候群

Ataxia-telangiectasiaとBloom症候群は、高発癌、早老症、DNA不安定性など共通の病態を呈する。責任遺伝子はそれぞれATMとBLMであることは知られている。ATM蛋白とBLM蛋白の相互作用を解析する目的で、ATMとBLMのダブルノックアウト細胞の作成に成功した。今後、この細胞の性状を詳細に検索していく予定である。

6) 慢性肉芽腫症 (CGD)

日本の204家系239名のCGD患者を調査し、シト

クロム構成因子欠損型について遺伝子解析を行った。解析できた158名中135名がシトクロム構成因子欠損型であった。遺伝子変異では、gp91-*phox*およびp22-*phox*のいずれにおいても特定の変異はなく、また変異のホットスポットはなかった。

3. 遺伝子診断法の開発と臨床応用

1) 無または低 γ グロブリン血症

X連鎖無 γ グロブリン血症 (XLA) の責任遺伝子産物を検出する簡易診断法を開発し、すでに臨床的有用性を実証してきた。

我が国の100家系以上の検索から、末梢血B細胞欠損のある無または低 γ グロブリン血症の男性例では、約90%がXLAであることを証明した。一方、B細胞が存在する場合には、高IgM症候群やXLPの可能性を示し、診断上貴重な情報を提供した。

この診断法を用いて韓国、トルコ、ブラジルとの国際協力のもとに、22家系のXLAを診断した。その調査研究のなかで、non-XLAの常染色体劣性無 γ グロブリン血症に遭遇し、それが世界第2例目となるIg α 欠損症であることを同定した。

2) Wiskott-Aldrich症候群

責任遺伝子WASP産物をフローサイトメトリーで検出する簡易診断法を開発し、臨床応用してきた。特異なWASP発現パターンを示す症例を見だし、それがmutation reversionによることを証明した。

4. 治療的研究

1) 造血幹細胞移植の適応拡大

これまでにDiGeorge症候群、先天性好中球減少症、Chediak-Higashi症候群などにおいて造血幹細胞移植を行い、良好な成績を得てきた。本年度はさらに、無 γ グロブリン血症と肺蛋白症を呈した免疫不全症に臍帯血移植を施行し成功をおさめた。先天性肺蛋白症が造血幹細胞移植によって完治した世界で初めての治癒例を経験し、造血幹細胞移植が本疾患における治療選択肢の一つとなる可能性を示した。

2) 遺伝子治療

X連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) における遺伝子治療の有効性が報告されている。本邦にお

いても、本研究班員によってその準備が進んでいる。

5. ホームページの活用

患者およびその家族、医療関係者などからの相談が増えており、免疫不全症候群の診療や患者QOLの向上に役立っているものと期待される。

Ⅲ. 分 担 研 究 報 告

原発性免疫不全症候群症例登録調査

岩 田 力（東京大学大学院医学系研究科生殖発達加齢医学専攻
小児医学講座発達発育学分野）

症例の登録推進については今年度も従来と同様の手法で行った。すなわち、日本小児科学会、各地方会、日本小児感染症学会、日本小児アレルギー学会、日本臨床免疫学会、等の学会報告、論文を渉猟し、原発性免疫不全症候群に関する発表演題または論文の著者へ登録依頼状と、登録票を郵送した。今年度は20件につき登録を依頼し、3症例の新規登録を得た。その他自主的な登録が1件で、合計4例が新規に登録された。1974年以來の登録総数は1197名（男性863名、女性334名）である。現行の登録票で登録されている症例に関し約400症例をファイルメーカープロを用いて電子化した。が、不正確な記載、家族歴の記載の困難さなど、いくつかの問題点がある。

特定疾患調査研究臨床調査個人票の平成11年度新規・更新分を参考にし、それら症例の既登録、未登録の分別を行った。北海道から長野県までの20都道県では、既登録が94症例、未登録が230症例であり、登録率は40.9%であった。臨床調査個人票の活用を通じてより正確な登録事業を推進する必要がある。

【はじめに】

原発性免疫不全症の概念が提出されて以来、その疾患の病因ならびに病態生理を研究することでヒトにおける免疫系の仕組みも研究されてきた。このことは患者の治療の進歩に直結するものであり、より良い治療法を得るためにも多くの症例の蓄積が必要である。1974年以來わが国では本研究班の事業の一つとして原発性免疫不全症候群の登録事業がすすめられているが、これは世界的にみても歴史が古く、米国において単発的な登録の努力がなされてから、ヨーロッパの一部、南米、オーストラリア、中東などにおいて登録が開始されている。これらの国々における登録事業の共通した目的は我が国におけるものと同様、原発性免疫不全症候群という比較的稀ではあるが、致死的な疾患の有症率を明らかにし、稀であるがゆえに個別の研究では進展しにくい病態生理病因論の解析を、研究者間に情報を集積することにより進展させ、新たな治療法の開発を目指すものである。近年は特に疾患の原因遺伝子の同定により、正確な診断が可能となり、本研究班における登録事業も、

主治医と研究者間の連絡、または既登録患者の病因検索などにおいて、班長の許可のもとに研究者に対して一定の患者情報を提供するなどの実績がある。しかし一方で、原発性免疫不全症候群も、その数は少ないながらも診断に関する知識が行き渡ることによって日常臨床の現場での登録への意欲が減退していることも事実であり、新たな登録方法の模索をすべき時期に来ている。本報告では現状どおりの方法論によった登録事業の進捗状況を述べるとともに、特定疾患治療研究事業に係る臨床調査個人票の適切な利用についても述べる。

【対象と方法】

日本国内で発表される原発性免疫不全症候群についての症例報告に関し、日本小児科学会、各地方会、日本小児感染症学会、日本小児アレルギー学会、日本臨床免疫学会、等の学会報告、論文を渉猟し、新規と思われる症例に関し発表演題または論文の著者へ登録依頼状と、登録票を郵送し本研究班への登録を依頼した。

登録の電子化を目指し、現行の登録C票をその

原発性免疫不全症候群登録症例数

厚生省特定疾患「原発性免疫不全症候群」調査研究班
2002年1月15日現在

疾患	登録総数			% ¹⁾ 成人例	% ²⁾
	男	女	合計		
重症複合免疫不全症	84	25	109	9.1	0
ADA 欠損症	6	3	9	0.8	0
PNP 欠損症	0	1	1	0.1	0
MHC Class II 欠損症	0	0	0	0	0
細網異形成症	1	0	1	0.1	0
ZAP70 欠損症 (CD8 欠損症)	1	1	2	0.2	0
小計	91	30	122	10.2	0
伴性無γグロブリン血症	123(+36)	0	123(+36)	10.3	1 0.8
成長ホルモン欠損を伴う伴性型無γグロブリン血症	1	0	1	0.1	0
IgM 増加を伴う免疫不全症	33	11	44	3.7	4 9.1
免疫グロブリン重鎖遺伝子欠損症	0	0	0	0	0
カッパ鎖欠損症	0	0	0	0	0
IgA 欠損症	59	50	109	9.1	15 13.8
IgG サブクラス欠損症	20	5	25	2.1	0
IgM 欠損症	8	5	13	1.1	5 38.5
CVID	107	59	166	13.9	21 12.7
乳児一過性低γグロブリン血症	28	15	43	3.6	0
その他の抗体不全症	5	0	5	0.4	1 20.0
小計	384(+36)	145	529(+36)	44.2	44 8.3
Wiskott-Aldrich 症候群	77	(2)	77(79)	6.4	0
Ataxia telangiectasia	42	36	78	6.5	1 1.3
DiGeorge 症候群 (DiGeorge anomaly)	29	15	44	3.7	0
その他の胸腺低形成症	5	4	9	0.8	0
小計	153	57	210	17.5	1 0.5
短肢侏儒を伴う免疫不全症	1	4	5	0.4	0
高 IgE 症候群	25	22	47	3.9	0
慢性皮膚粘膜カンジダ症	7	9	16	1.3	2 12.5
胸腺腫を伴う免疫不全症	5	4	9	0.8	9 100.0
小計	38	39	77	6.4	11 14.3
慢性肉芽腫症	153(+55)	21(+7)	174(+62)	14.5	2 1.1
Chediak-Higashi 症候群	9	9	18	1.5	0
その他の食細胞機能異常症	11	9	20	1.7	0
小計	173(+55)	39(+7)	212(+62)	17.7	2 0.9
補体成分の欠損症	13	16	29	2.4	7 24.1
その他	10	8	18	1.5	1 5.6
合計	863(+91) (72.1)	334(+7) (27.9)	1197(+98) (100.0)	68 (5.7)	

註1：成人例とは、診断確定時に20歳以上であったもの。

註2：%¹⁾は、登録全症例におけるその疾患の症例数の百分率

註3：%²⁾は、その疾患の症例のうち、成人例の百分率

註4：XLAとCGDの括弧内は本登録以外に存在が判明している症例数

本年は、その他の中に、hypohidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency (HED-ID) (mutated NEMO)の女児例が登録された。

まま用いた形で作成したコンピューターソフトに既登録症例を入力し、入力精度の検討も含めて今後利用できるかどうかの検討を行った。

特定疾患治療研究事業に係る臨床調査個人票の整備にともない、当研究班長のもとに各都道府県から送付された個人票のコピーの閲覧を許可され、平成11年度分につき、各患者の当登録事業における現況を調査した。

【結果】

症例登録のための依頼状を送付した数は20件であった。その中から登録の協力が得られたものは3件であった。さらに1件の自主的な登録があった。例年よりも非常に少ない数であったが、本年度は結局4例が新規に登録された。その内訳は、hyper IgM 症候群男児1例、XSCID 1例、Wiskott-Aldrich症候群1例、その他のカテゴリーとして低汗性外胚葉異形成および免疫不全症 (hypohidrotic

特定疾患治療研究事業に係る臨床調査個人票との比較（中間報告）

	登録済／未登録	(%)
北海道	18／30	(60.0)
青森県	2／0	(∞)
岩手県	3／7	(42.9)
宮城県	0／2	(0.0)
秋田県	0／6	(0.0)
山形県	6／21	(28.6)
福島県	3／8	(37.5)
茨城県	6／12	(50.0)
栃木県	3／5	(60.0)
群馬県	1／4	(25.0)
埼玉県	13／29	(44.8)
千葉県	6／19	(31.6)
東京都	3／5	(60.0)
神奈川県	9／46	(19.6)
新潟県	3／14	(21.4)
富山県	6／2	(300.0)
石川県	1／0	(∞)
福井県	4／5	(80.0)
山梨県	2／5	(40.0)
長野県	5／10	(50.0)
小計	94／230	(40.9)

ectodermal dysplasia and immunodeficiency (HED-ID))の女児例が報告された。本疾患はNEMO (NF kappa b essential modulator)の異常があり、通常男児例において高IgM血症を伴うことが報告されているが、今回の報告では最初高IgE血症症候群として学会報告されていたものである。

本登録事業の累積症例数は、男性863名、女性334名の合計1197名であった。集計結果の表を示す。

既登録症例を電子化するために、ソフトはファイルメーカープロを用いた。Windows版、Macintosh版の双方がクロスプラットフォームで使用できるため、このソフトを選択した。現行の登録C票での症例数は435名であるが、そのうち約400名が入力された。入力精度の検討のため、実際の登録票を用いて照合した。多くの入力上の不備が見つかり、また技術的に家族歴の正確な入力が困難であった。

特定疾患治療研究事業に係る臨床調査個人票の平成11年度分のコピーを利用し、個人名から本研究班における登録の有無を照合した。本報告書作成時点では、北海道から長野県までの20都道県についての検討であるが、表に示すように40.9%の登録率であった。地域的にもばらつきがみられた。

【考案】

原発性免疫不全症候群は易感染性以外に様々な表現型を示す比較的稀な疾患である。しかし、近年その存在が良く知られ、いくつかの疾患については確定診断のための遺伝子診断も国内の一定の研究施設にて、順調に行われるようになった。このような状況下で、極く稀な症例を除いては一例報告として発表される頻度が減少している印象がある。昨年度までは、登録依頼書と登録票を郵送しても症例を記載して返送してもらえる率はおよそ50～60%であった。しかしながら今年度は郵送

の時期が例年よりも遅くなったとはいえ、20件発送し、返送されたものがわずかに3例であった。自発的に報告された1例を加え、今年度は合計4例の新規登録に留まった。このことは、臨床で多忙な医師にとって、登録票を記載することはかなりの負担を与えていることを意味するが、一方で遺伝子診断まで可能な施設への患者検体の依頼をとおして、細かな依頼状作成の結果、確定診断を得ると、改めて依頼された登録への協力もより煩雑に感じられることもある。これらの状況を考慮すると、学会発表や投稿論文などを渉猟する従来の方法では新規登録の効率が悪く、また疫学としての精度の低下につながることを理解される。さらに、特定疾患治療研究事業に係る臨床調査個人票が現行の様式となり、各都道府県において若干の様式の違いがあるとはいえ、検査結果も含めた記載をすることから、本研究班における登録事業との混同があり得て、研究班からの依頼状の真意が伝わりにくい場合もある。

現行の登録C票が用いられたのは1992年からであるが、これまでに435例が登録されている。このうち約400例を電子化した。入力は一注したが、原票における手書きの記載が判読しづらいことが多々ある状況と、検査所見記載欄が自由記載のために一定の方式がなく、医学的知識を持たないものによる入力が不正確になる可能性が大きいこと、さらに家族歴の記載もまた大家族においては手書きによって追加記載されている事項を入力することが技術的に困難であること、さらに依頼した業者による精度向上努力が希薄であったことなど、複数の要因によって入力された事項の逐一の検討が必要であった。これらの問題はようやく解決し、約400症例分については患者名、疾患名から迅速な検索が可能となった。残る35症例ならびに今後増加する新規登録分を誰がどのように入力するかは今後検討されなければならない。

原発性免疫不全症候群の新規登録をさらに推進するためには、小児慢性疾患の申請書、あるいは本研究班の母体である特定疾患治療研究のための申請書を閲覧することが許可され、登録に利用することが許可される必要があると、昨年度報告書で述べた。今年度は特定疾患治療研究事業に係る臨床調査個人票の平成11年度分のコピーを閲覧し、本研究班による登録と比較検討を始めた。解析途中であるが、いくつかの問題点があげられる。(1) まだ20の都道府県のみを集計であるが、登録率は40.9%と低い。(2) 地域によって本研究班への登録率がばらばらである。本研究班班員ならびに研究協力者の存在する地域とそうでない地域とでは差がある可能性がある。(3) 成人発症例は登録されない。(4) 診断の精度を今後改善する必要がある。

登録事業そのものの意義は、日本人における原発性免疫不全症候群の発生頻度をより正確に知るとともに、全国的な研究協力体制の確立に寄与する点にある。すなわち、ある疾患の病因病態の究明と、そのゴールである治療法の確立を図るためには各症例から得られる貴重な生物検体の集積が必要である。臨床現場の主治医と研究者間を結ぶ方策としてこの登録がこれまでも利用されているが、よりいっそうの充実を図る必要がある。昨年度報告においても述べたように、原発性免疫不全症候群そのものは比較的稀な疾患とは言え、その存在と病態が知られるようになると、単発的な症例報告の数は減る傾向にある事も考えられる。多忙な医師からの自発的な登録がそれほど望めないことより、国と地方公共団体が行なっている治療費助成制度との有機的な結合を今後も検討していく必要がある。

Nationwide registry of primary immunodeficiency diseases

Tsutomu Iwata

Developmental Pediatrics, Pediatric Science, Reproductive Developmental and Aging Science, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

The new cases of primary immunodeficiency diseases were surveyed and registered using the same form and method as in the last year. Total of 1197 cases (male, 863; female 334) have been registered so far at the time of January 15th, 2002. Since the current registration form, "Registration Form C", was used, about 420 new cases have been registered. The data of these registered cases were converted to electronic form, using the computer software, "Filemaker Pro". Many typing errors and incorrect parts were found. The electronic version was checked at each record. To achieve more correct data, the principal investigator was allowed to access the official database of patients who were supported in medical care by the Japanese government. In 20 districts, from Hokkaido to Nagano, there were 94 registered cases and 230 unregistered cases. The registration rate was only 40.9%. Under the strict regulation of utilizing the personal data, it is necessary to increase the registration rate and to make the data more precise by accessing the official database.

常染色体劣性無ガンマグロブリン血症責任遺伝子の同定

峯 岸 克 行 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)
野々山 恵 章 (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)

常染色体劣性無ガンマグロブリン血症責任遺伝子として、IgM重鎖、Ig α 、I5、BLNKを同定した。患者骨髄単核球の検索から、Pro B細胞からPre B細胞への分化障害が認められ、これらの分子の異常によりPre BCR シグナル伝達に欠陥を生じ、成熟B細胞の欠損がもたらされると考えられた。その機能解析、臨床所見を合わせて報告する。

【はじめに】

B細胞欠損症は、B細胞分化の異常に起因する免疫不全症である。本症の患児では、母親からの移行抗体の減少する生後2カ月頃より、遅くとも5才までに、中耳炎、副鼻腔炎、肺炎などの細菌感染症を発症、反復する。血清中の免疫グロブリンが著しく減少しており (IgG<200mg/dl, IgA, IgM<20mg/ml以下)、末梢血単核球中のCD19陽性細胞は1%以下である。

B細胞欠損症の約85%は、伴性劣性の遺伝形式をとるX-linked agammaglobulinemia (XLA)で、この遺伝形式の症例では、チロシンキナーゼであるBtkに変異を有しているが、残りの約1/3、全体の約5%の症例では責任遺伝子が不明であった。こうした疾患の責任遺伝子として、 μ 重鎖、Ig α 、 λ 5、BLNKを同定したので報告する。

【対象と方法】

無ガンマグロブリン血症の患者で、Btkが正常である症例を対象とした。方法は、候補遺伝子アプローチを用いた。患者およびその家族より同意を得て末梢血単核球を分離し、genomic DNAを抽出した。候補遺伝子の各exonについてSSCPを行い、異常パターンが患者でのみ認められるexonについて、sequenceを行い、変異を同定した。

B細胞の分化障害が起きていることを確認する

ために、同意を得た上で、患者骨髄単核球および末梢血単核球の表面マーカー分析をFACSを用いて検討した。

【結果】

候補遺伝子としてB細胞の分化に重要な役割を果たしていると考えられるプレB細胞レセプターシグナル伝達複合体を構成する分子について検討した。その結果、患者においてIgM重鎖、代替軽鎖のうちの λ 5、Ig α などのプレB細胞レセプター自身を構成する分子や、さらに、プレB細胞レセプターシグナル伝達複合体に属するアダプター分子BLNKに突然変異を見いだした。両親はヘテロであることを確認した。

IgM重鎖の変異は欠失であり機能的に異常であると考えられた。その後の検討で、複数例の患者が見いだされた。

λ 5欠損症では、変異がstop codonになるものと、exon 3のプロリンからロイシンへの点突然変異が見いだされた。両親はそれぞれの変異をヘテロに持っていた。プロリンからロイシンへの点突然変異が機能的に異常であることを示すために、以下の二つの検討を行った。まず、reducing conditionとnon-reducing conditionで電気泳動を行い、この変異によりタンパクのfoldingの異常が起きることを示した。次に、COS細胞にtransfectionしたとこ

ろ、表面に発現しないことが明らかになり、このことから、タンパクの構造異常により表面への移行が出来ないと考えられた。したがって、この変異は機能的に異常をもたらすと結論した。なお、この点突然変異は、近傍にsilent mutationが2つ存在することから、この配列を持ったpseudogeneとのgene conversionにより起きていることが推定された。

Ig α 欠損症は、splice 異常によりフレームシフトを起こし、下流においてstop codon になる異常のホモであった。この変異により、Ig α は膜貫通部以降が欠失して表面に発現し得ないため、タンパクは機能を持ち得ないと考えられた。なお、両親は同じ変異のヘテロであった。

BLNK 欠損症は、splice 異常であった。RT-PCRにより発現が認められず、この異常ではタンパクも発現していないと考えられた。同時に報告されたBLNK ノックアウトマウスもB細胞の分化障害が認められ、同一の表現型をとることから、BLNKが原因遺伝子であると結論した。

患者でのB細胞の分化障害を確定するため、骨髓血単核球を採取し、表面抗原をFACSにより解析した。その結果、いずれも程度の違いはあるが、Pro B細胞は存在するが、Pre B細胞が著明に減少しており、Pre BCRからのシグナルが障害されたため、B細胞の正常な分化が起こらなかったものと考えられた。

なお、各症例で両親はヘテロの異常を有していたが、血清ガンマグロブリン値およびB細胞数は全ての症例で正常であった。

【考案・結論】

以上のように、常染色体劣性無ガンマグロブリン血症責任遺伝子を4つ新たに同定した。その全てが、プレB細胞レセプターシグナル伝達複合体を構成する分子であった。また、患者骨髓単核球の分化段階の検討から、プレB細胞レセプターは、Pro B細胞からPre B細胞へと分化する段階で、決定的に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

B細胞の分化に重要な役割を果たしていると考

えられる分子は多く、新しい分子もクローニングされてきている。こうした分子の異常は、いまだ原因遺伝子の明らかでない無ガンマグロブリン血症を引き起こしている可能性が示唆される。こうした候補遺伝子をSSCPを用いて、スクリーニングしていくことにより、さらに責任遺伝子を同定できると考えている。特に、家系内発症がない弧発例でも表現型から候補遺伝子を予想できる場合は、この手法を用いることが可能であり、国内の多くの症例を集積して解析を試みたい。

参考文献

1. Minegishi, Y., Conley, M.E. Negative selection at the pre-BCR checkpoint elicited by human m heavy chain with unusual CDR3 regions. *Immunity*. 14, 631-641, 2001.
2. Conley, M.E., Rohrer, J., Rapalus, L., Boylin, E., Minegishi, Y. Defects in B cell development: Comparing the consequences of abnormalities in pre-BCR signaling in the human and the mouse. *Immunol. Rev.* 178, 75-90, 2000
3. Minegishi, Y., Rohrer, J., Coustan-Smith, E., Lederman, H.M., Pappu, R., Campana, D., Chan, A.C., Conley, M.E. An essential role for BLNK in human B cell development. *Science*, 286, 1954-1957, 1999
4. Minegishi, Y., Coustan-Smith, E., Rapalus, L., Ersoy, F., Campana, D., Conley, M.E. Mutations in Ig α (CD79a) result in a complete block in B-cell development. *J. Clin. Invest.* 104, 1115-1121, 1999
5. Minegishi, Y., Hendershot, L. M., Conley, M. E. Novel mechanisms control the folding and assembly of λ 5/14.1 and VpreB to produce an intact surrogate light chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96. 3041-3046. 1999.
6. Conley, M.E., Mathias, D., Treadaway, J., Minegishi, Y., Rohrer, J. Mutations in Btk in patients with presumed X-linked agammaglobulinemia. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1034-1043, 1998
7. Minegishi, Y., Coustan-Smith, E., Wang, Y.H., Cooper, M.D., Campana, D., Conley, M.E. Mutations

- in the human 15/14.1 gene result in B cell deficiency and agammaglobulinemia. *J. Exp. Med.* 187, 71-77, 1998
8. Yel, L., Minegishi, Y., Coustan-Smith, E., Buckley, R. H., Trubel, H., Pachman, L. M., Kitchingman, G. R., Campana, D., Rohrer, J., Conley, M. E. Mutations in the mu heavy-chain gene in patients with agammaglobulinemia. *New Engl. J. Med.* 335, 1486-1493, 1996
9. Minegishi, Y., Akagi, K., Nishikawa, K., Okawa, H., Yata, J. Analysis of the CDR3 region of the rearranged IgH chain genes in patients with severe combined immunodeficiency and severe lymphopenia. *J. Immunol* 156, 4666-4671, 1996
10. Minegishi, Y., Okawa, H., Sugamura, K., Yata J. Preferential utilization of immature JH segment and the absence of somatic mutation in CDR3 junction of the Ig H chain gene in three X-linked severe combined immunodeficiency patients. *Int. Immunol.* 6, 1709-1715. 1994

Identification of the responsible genes for autosomal recessive agammaglobulinemia.

Yoshiyuki Minegishi, Masayuki Nagasawa, Tomohiro Morio, Shigeaki Nonoyama, Shuki Mizutani
Department of Pediatrics, Tokyo Medical and Dental University

We report here that the mutations of μ heavy chain, $Ig\alpha$, $\lambda 5$, BLNK cause the autosomal recessive agammaglobulinemia in human. These patients had the severe defects of Pro B to Pre B cell differentiation in their bone marrow, and had almost no mature B cells in their peripheral blood. Thus, Pre B receptor signal, in which these molecules play important roles, is indispensable for the B cell differentiation.

ナイーブB細胞の解析：クラススイッチと somatic hypermutationの誘導

上 松 一 永、南 雲 治 夫、
小 林 法 元、山 崎 崇 志、
山 田 慎 二、松 崎 聡、
小宮山 淳 (信州大学小児科)
史 宇 軍、長 瀬 尚 志、
高 本 雅 哉、菅 根 一 男
(信州大学大学院医学研究科移植免疫感染症)

CD27分子を発現していないヒト成人末梢血B細胞は (circulating B-cell 1; cB1) は、小型の細胞でsomatic hypermutationを起こしていないことからナイーブB細胞であり (1, 2), 臍帯血, 高IgM症候群や分類不能型免疫不全症患者のB細胞は主にcB1によって構成されている (3, 4)。Sortingによって精製したヒト成人cB1を用いて機能解析を行った。SAC+IL-2+IL-10+CD40 刺激によって, cB1 から, IgGとIgM産生を誘導できたがIgAは産生されなかった。また, 刺激後, AID, mature γ 1, mature γ 2 mRNA発現が認められた。しかし, TGF β 添加によってもIgAは産生されなかった。cB1からCD27発現ならびに形質細胞への分化が可能であったが, ともに somatic hypermutation は誘導できなかった。以上から, ナイーブB細胞から免疫グロブリン産生は誘導されるが低親和性であり, クラススイッチとsomatic hypermutation は異なった過程で生ずるものと思われる (5)。

【はじめに】

ヒト成人末梢血B細胞は, IgDとCD27分子の発現によって3分画に区分される: IgD⁺CD27⁻ (circulating B-cell 1; cB1), IgD⁺CD27⁺ (cB2), IgD⁻CD27⁺ (cB3)。cB1は, 小型の細胞でsomatic hypermutationを起こしていないことからナイーブB細胞である。骨髄から出たナイーブB細胞は, リンパ組織の胚中心で活性化・増殖し, 体細胞突然変異 (somatic hypermutation) とクラススイッチを生ずる。こうしたB細胞は表面にCD27分子を発現しメモリーB細胞として末梢血中を循環している (図1)。再度同じ抗原が侵入するとメモリーB細胞は胚中心で抗原に反応し迅速に抗体産生細胞 (形質細胞) に分化して, 高親和性の免疫グロブリンを大量に産生する (図1)。成人末梢血B細胞において, CD27陰性細胞がナイーブB細胞に相当するため, この分画を精製し, 免疫グロブリン産

生, クラススイッチの誘導, 形質細胞への誘導, somatic hypermutationの誘導の検討を行った。

【方法】

正常成人末梢血と臍帯血単核球からCD19 microbeadsによる positive selectionあるいはsortingによって, CD27陰性ナイーブB細胞などを精製した。

精製B細胞を各種刺激下で培養し, ELISA法によって上清のIgA, IgM, IgGを測定した。

免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子 (VH5) の somatic hypermutation を, RT-PCRで増幅した mRNA をクローン化しsequenceし調べた。

静止期あるいは各種刺激後, RT-PCRによって, mature γ 1,2, AIDの発現を調べた。

B細胞を刺激後, CD38発現によって形質細胞への誘導を検討した。