

## 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

谷内江 昭 宏 (金沢大学医学部保健学科)  
岡 田 かなえ (金沢大学医学部保健学科)  
東 馬 智 子 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)  
今 野 昭 宏 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)  
長 沖 周 也 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)  
笠 原 善 仁 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)  
小 泉 晶 一 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)

*RAG1/RAG2* 遺伝子異常は重症複合免疫不全症あるいはOmenn症候群の原因であるが、多数の症例解析が進むにつれてその臨床像が多彩であることが明らかとなってきた。また、T細胞分化異常やTh2タイプサイトカインの過剰産生による臨床症状発現など、Omenn症候群に特徴的な臨床症状を示す免疫不全症例で*RAG*遺伝子異常を全く認めない症例も存在することが明かとなり、類似症例を解析するにあたってはTCR再構成機構に障害をもたらす複数の遺伝子異常を念頭におく必要が示唆された。さらに、臨床的にOmenn症候群と診断された症例の中には*RAG*遺伝子異常がないだけでなく、TCR diversityが全く正常な例があり、一見複雑な臨床症状を呈するOmenn類似症例の解析の際にTCR V $\beta$  repertoire分布、CDR3サイズ分布など、TCR diversityの評価が有用であることが示された。

### 【はじめに】

重症複合免疫不全症 (SCID: severe combined immune deficiency) は多様な要因により発症する原発性免疫不全症であり、その一部は複数の遺伝子異常が明らかにされ病態解析がすすんでいる。Omenn症候群は重症湿疹様の紅斑、リンパ節腫大、肝脾腫、下痢、発育障害などの臨床的特徴と、高IgE値、好酸球増加、B細胞の欠損、活性化T細胞の増加などの検査データを特徴とする遺伝性疾患として知られてきた。最近、Omenn症候群の原因遺伝子が、T細胞抗原受容体 (T cell receptor; TCR) 遺伝子や免疫グロブリン (immunoglobulin; Ig) 遺伝子の再構成機構に関わる*RAG1/RAG2* 遺伝子の異常によることが明らかにされ、本疾患の病態理解も進展してきた<sup>1)</sup>。*RAG*活性の欠損する遺伝子異常が重症複合免疫不全症の一型であるBT SCIDの発症に関与するのに対して、Omenn症候群の多くでは*RAG*活性が部分的に残存、このことがOmenn症候群の特徴的な臨床像と深く関係していると考

えられている。一方、我々の検討ではOmenn症候群に類似するいくつかの臨床所見を有しながら、*RAG1/RAG2* 遺伝子異常を認めない症例が明かとなり、臨床的にOmenn症候群が疑われる症例において*RAG1/RAG2* 遺伝子解析を行うことが重要であることが示された。今回の研究では、重症複合免疫不全症およびOmenn症候群疑い症例において*RAG1/RAG2* 遺伝子解析の結果をまとめると共に、これらの症例の病態評価法の一つとしてのTCR diversity解析の意義について検討した。

### 【対象と方法】

検体を提供頂いた症例の内、パラフィン包埋標本しか残されていない過去の症例の多くでは、遺伝子解析に十分なDNAが得られないか、*RAG*遺伝子解析に必要なPCR産物が得られなかった。これらの症例は今回の検討からは除外した。*RAG*遺伝子解析が可能であった症例とその臨床像のまとめを表1に示す。ただし、最後の症例の*RAG*遺伝子解

表 1. 対象とした複合免疫不全症例の臨床像

症例	提供施設	易感染	LN	肝脾	皮疹	Eo	CD3	CD20	CD16	IgE
1	金沢大学	+	+	+	+	+	69	0.3	20	>2,000
2	金沢大学	+	+	+	+	+	54	0.5	15	2,070
3	大阪府母子	+	+	+	+	+	68	0.6	7	0.3
4	信州大学	+	+	+	+	+	39	0	43	3
5	富山医薬大	+	+	-	+	+	94	0.7	3	1
6	京都府医大	+	-	-	+	+	60	1	n.d.	1
7	東京医歯大	+	?	?	+	-	71	0.1	20	低値
8	山梨医科大	+	+	+	+	+	0	0	49	0
9	信州大	+	?	?	?	-	5	1	74	1
10	琉球大学	+	+	+	+	+	56	18	26	1
11	愛媛医科大	+	+	+	+	+	75	20	7	0
12	東京医歯大	+	-	-	+	±	n.d.	n.d.	n.d.	700
	東北大	+	+	-	+	+	66	9	23	611

析は東北大学加齢医学研究所久間木らの結果をこちらで確認したものである。末梢血T細胞のTCRVβ repertoire 解析はRPE・Cy5 標識抗CD4, FITC標識抗CD8ならびにPE標識抗TCRVβ抗体を用いて3カラーフローサイトメトリーを施行, 各T細胞亜群中のVβ repertoire分布を定量した。金沢大学医学部附属病院小児科外来を受診した患者を対照とした。ただし, 発熱, リンパ節腫大, 肝機能障害などなんらかの感染症の徴候がある患者, あるいは既知の免疫不全症患者を除外した。TCRVβ CDR3 サイズ分布の解析 (CDR3 spectratyping) には末梢血単核球を分離後, immunobeads法によりCD4 除去, あるいはCD8 除去細胞を得, それぞれCD8<sup>+</sup>T細胞ならびにCD4<sup>+</sup>T細胞として用いた。これらよりcDNAを作成, 鋳型として使用した。25種類の5' TCRVβ 特異的プライマーと蛍光標識3' TCRCβ プライマーを用いてPCR増幅, ABI310により解析した。CDR3 サイズ分布の多様性は, 主要なピークの数とその大きさからcomplexity score (CS) として算出した。

## 【結果】

解析対象とした12例の内, 皮疹, リンパ節腫大, 肝脾腫, B細胞の欠損, 活性化T細胞の増加, 血清

IgE高値など, 古典的なOmenn症候群の臨床像に合致する症例は症例 1, 2 の同胞例のみであった。症例 3, 4, 5, 6, 7 は易感染性, 重症湿疹様皮疹, B細胞の欠如, 活性化T細胞の増加など, Omenn症候群類似の臨床症状を認めたが, いずれも血清IgEは低値に留まった。症例 7 はカリニ肺炎と思われる重症肺炎の合併や皮疹が認められたが, 好酸球増加は見られなかった。症例 8, 9 はB細胞, T細胞が共に欠損し, NK細胞が増加していることから, RAG活性の欠損によるSCIDが疑われた。症例 10, 11はOmenn症候群に極めて類似する臨床症状を示したが, いずれも末梢血B細胞は高値を示し, 血清IgEも低値であった。ただし, 症例11では経過と共にB細胞は著減した。症例12は生前の免疫学的検索が十分でないが, 易感染性, 皮疹の存在, 一過性好酸球増加, 血清IgE高値などが認められた。最後の症例は東北大学にてすでに遺伝子解析済みの症例であるが, 母体由来のT細胞の生着が確認されており, 末梢血中にはB細胞も確認され, 臨床的にはOmenn症候群の像を呈していた。

これらの症例の内, 末梢血リンパ球が十分得られた症例に関してTCR diversityの検索を施行した。TCR Vβ repertoire分布の解析は症例 3, 4, 5, 10, 00で施行した。症例00を除いていずれの症例でも

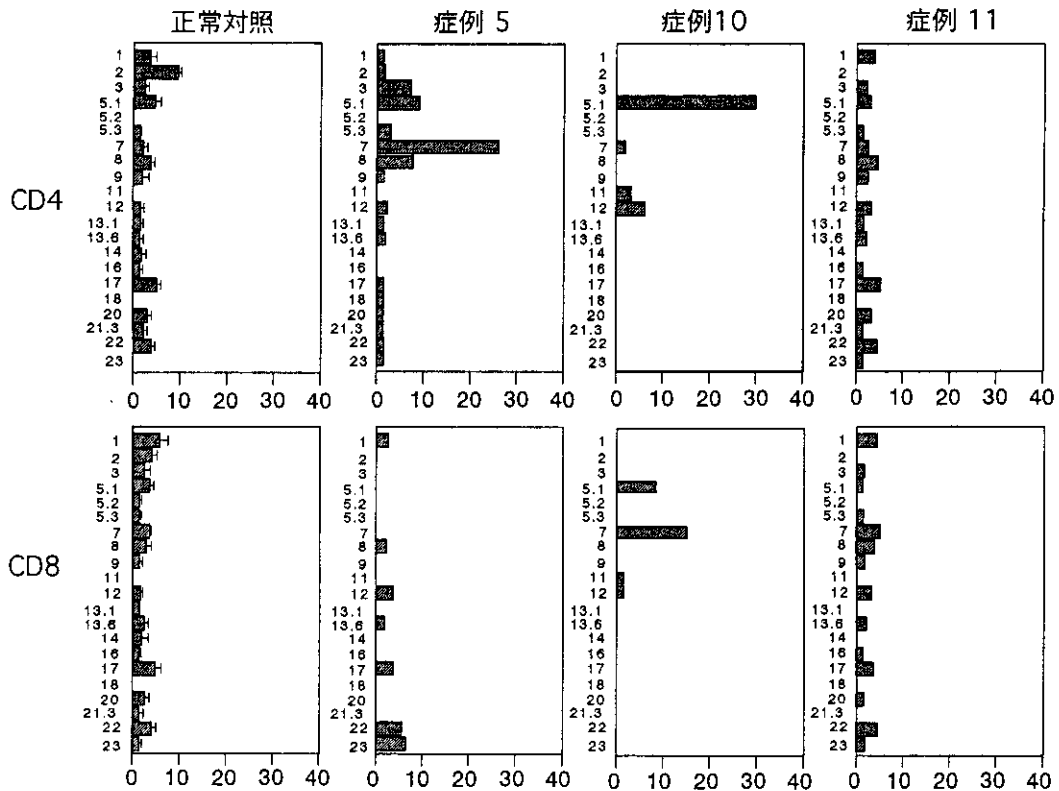


図 1. TCR Vβ Repertoire 分布

特定のTCR Vβ repertoire が異常に増加，多くの repertoireが著減あるいは欠損していた。症例11ではTCR Vβ2のみがCD4，CD8いずれの分画でも著減，経過を追って検索したが同様の所見が持続した。症例 5 では末梢血とリンパ節で同時に解析が可能であったが，いずれの解析もほぼ同様のパターンが得られた。図 1 に正常対照 (n=20 平均±標準偏差)，症例 5，症例10および症例11のTCR Vβ repertoire分布を示す。

症例 5，10，11および東北大学の症例はCDR3 サイズ分布の解析も施行した。症例11では，CD4，CD8いずれの分画においてもCDR3 サイズ分布は正常対照と同様，全てのVβに関してGauss分布となり，CSは 5 前後の正常値を示した。一方，症例 5 ならびに症例10ではほぼ全てのVβについてCSが 4 以下と著明に低下，TCR diversityが失われていることが示唆された (図 2)。

当科で検索した症例の内，RAG活性の欠損ないし低下を来す遺伝子異常を有すると考えられたのは，症例 1，2 の同胞例のみであった (表 2)。症例 1，2 で確認されたRAG1 遺伝子変異はいずれもミ

スセンス変異であった。一方はhomeodomain内の R396Cで欧米でも高頻度で報告されている変異であるが，もう一方の変異はRAG2 interacting domain内のL885Rであり，これまでに報告がない。症例 3，7，8，10，12で認められた変異K820Rは今回の検索では24 allele中 8 alleleと高頻度で認められており，遺伝子多型と考えられた。また，症例 8 および11の一方の alleleで認められた変異はすでに遺伝子多型として報告される変異であった。

#### 【考察】

Omenn 症候群が B-SCID の一部の症例と同様，RAG1/RAG2 遺伝子異常によるIg遺伝子/TCR遺伝子再構成の障害により発症することが明らかにされた<sup>1)</sup>。以来，Omenn 症候群および関連疾患でのRAG1/RAG2 遺伝子解析が進められるにつれ，この遺伝子異常が当初考えられていたよりも幅広い臨床スペクトラムを有する疾患であることが示唆されている<sup>2), 3)</sup>。RAG酵素活性が全く欠損するタイプの異常の場合にはT細胞，B細胞を共に欠損する，重症複合免疫不全症となるが，酵素活性

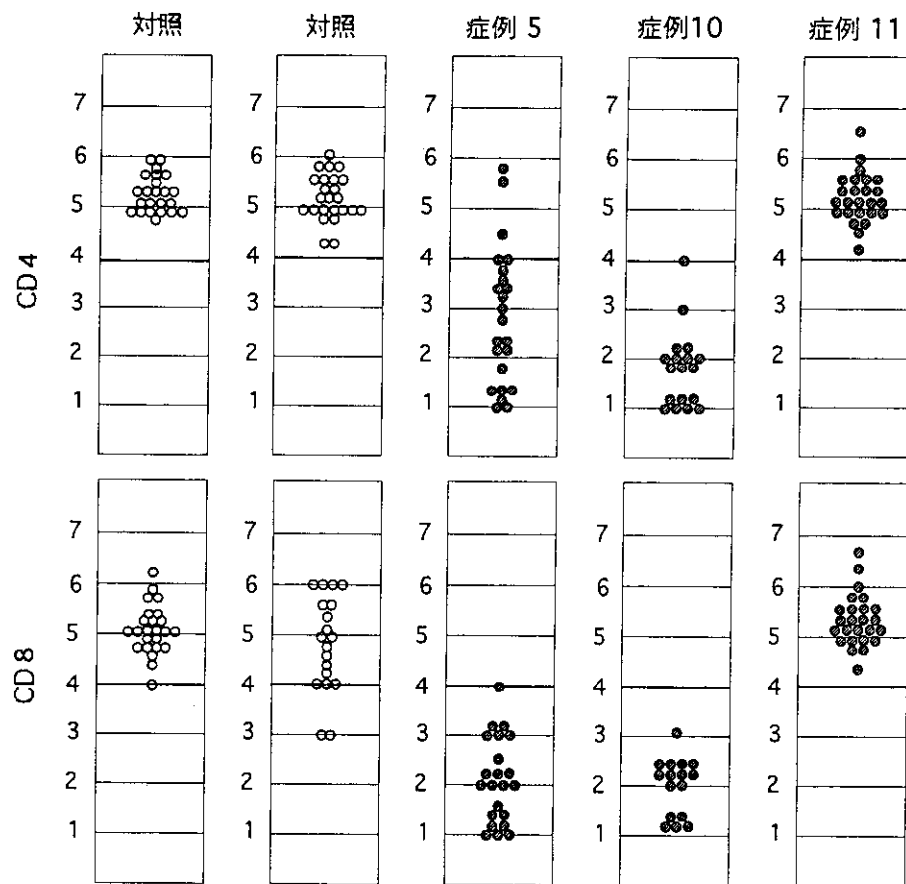


図 2. 末梢血T細胞抗原受容体 CDR3 サイズ分布の多様性

表 2. RAG1/RAG2 遺伝子異常と TCR diversity

症例	RAG 遺伝子	V $\beta$ Repertoire	CDR3 Complexity
1	RAG1; R396C, L885R	n.d.	n.d.
2	RAG1; R396C, L885R	n.d.	n.d.
3	RAG1; K820R (homo)	skewed	n.d.
4	変異なし	skewed	n.d.
5	変異なし	skewed	reduced
6	変異なし	n.d.	n.d.
7	RAG1; K820R	n.d.	n.d.
8	RAG1; K820R, R249H	n.d.	n.d.
9	変異なし	n.d.	n.d.
10	RAG1; K820R (homo)	skewed	reduced
11	RAG1; K820R, R249H	normal	normal
12	RAG1; K820R*	n.d.	n.d.
東北大	RAG1; R559S, R897stop	skewed	reduced

が部分的に残存する場合、活性の程度によって多様な臨床像が形成されると考えられる。さらに、われわれの検討では、少なくとも本邦においては、Omenn症候群と類似の臨床像を示す症例の中に *RAG1/RAG2* 遺伝子に全く異常を認めない症例が数多く存在することが明かとなった<sup>4)</sup>。

しかし、臨床的に易感染性、B細胞欠損あるいはIg低値、T細胞欠損あるいは活性化T細胞増加など、複合型免疫不全の像を呈する症例の多くはTCRの再構成障害を示唆する所見を有していた。すなわち、検索し得た限りの症例では末梢血T細胞のTCRVβ repertoire分布に著明な偏りを認め、さらにCDR3サイズ分布の異常を認めた。これらの症例はRAG以外の、しかしRAG異常症と共通する、遺伝子再構成機構に関与する遺伝子の異常を基盤とする疾患と考えられる。一方、易感染性や臨床症状からは複合免疫不全の存在が強く示唆された症例11ではいずれの解析によっても全く異常が認められず、T細胞分化障害の存在は否定的であった。したがって、この症例で認められた変化は何らかの抗原刺激に伴う二次的な変化と考えざるを得ない。

多様な臨床像を示す複合免疫不全症およびその関連疾患の解析にあたっては、その基盤にIg/TCR再構成障害があるかどうかをTCR diversity解析により評価することは有用であると考えられた。

#### 【参考文献】

- 1) Villa A. et al.: Partial V(D)J recombination activity leads to Omenn syndrome. *Cell* 93:885-896, 1998.
- 2) Corneo B. et al.: Identical mutations in *RAG1* or *RAG2* genes leading to defective V(D)J recombinase activity can cause either T-B- severe combined immune deficiency or Omenn syndrome. *Blood* 97: 2772-2776, 2001.
- 3) Vill A. et al.: V(D)J recombination defects in lymphocytes due to *RAG* mutations: severe immunodeficiency with a spectrum of clinical presentations. *Blood* 97: 81-88, 2001.
- 4) Wada T. et al.: Characterization of immune function and analysis of *RAG* gene mutations in Omenn syndrome and related disorders. *Clin Exp Immunol* 119: 148-155, 2000.

## *RAG* gene mutation analysis and evaluation of TCR diversity in severe combined immune deficiency

Akihiro Yachie<sup>1)</sup>, Kanae Okada<sup>1)</sup>, Tomoko Toma<sup>2)</sup>, Akihiro Konno<sup>2)</sup>, Shuya Nagaoki<sup>2)</sup>, Yoshihito Kasahara<sup>2)</sup> and Shoichi Koizumi<sup>2)</sup>

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

<sup>2)</sup> Department of Pediatrics, Kanazawa University Graduate School of Medical Science.

Severe combined immune deficiency and Omenn disease are caused by mutation in *RAG1/RAG2* genes. It has been disclosed that *RAG* gene abnormalities leads to wide spectrum of clinical symptoms. In addition, it was reported that there exist immune deficiency disorders with clinical symptoms characteristic of Omenn syndrome, including T cell differentiation defects and Th2 dominant cytokine production, but without *RAG* gene abnormality. These findings indicated that any genetic defect leading to defective recombination pathway should be considered whenever one perform gene analysis of Omenn syndrome or related diseases. We experienced a case of Omenn illness with normal *RAG* genes and normal TCR diversity. It was suggested from these that evaluation of TCR diversity by TCR Vβ repertoire distribution and CDR3 spectratyping provide useful information for the analysis of Omenn related illnesses.

## IL-21のX-連鎖重症複合免疫不全症病態形成への関与

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・医学系・生体防御講座免疫学分野)  
浅尾 裕信 (東北大学大学院・医学系・生体防御講座免疫学分野)  
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)  
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) の原因遺伝子から生成される  $\gamma$ c 鎖は、IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 の受容体として共通に使われていることが知られている。最近IL-2, IL-4, IL-15に類似した構造を有するIL-21が同定された。またその受容体であるIL-21受容体もIL-2受容体 $\beta$ 鎖, IL-4受容体 $\alpha$ 鎖に類似していた。これらのことから、我々はIL-21もまた $\gamma$ c鎖を受容体の一部として使用している可能性を考え検討を行った。その結果、正常 $\gamma$ c鎖を発現させた細胞ではIL-21刺激によるシグナルが伝達されたが、X-SCID患者から単離した変異 $\gamma$ c鎖を発現させた細胞ではIL-21のシグナルを伝達できなかった。以上よりIL-21は $\gamma$ 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が示唆された。

### 【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、免疫学的には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>。X-SCID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鎖遺伝子である<sup>2)</sup>。典型的X-SCID患者から単離した $\gamma$ c鎖は上記サイトカインの受容体としての機能を欠如していたこと、さらに $\gamma$ c鎖遺伝子ノックアウトマウスではX-SCIDと類似の症状を示したことから、X-SCID患者が呈する重篤な免疫不全状態は $\gamma$ c鎖の機能異常によるものであることが示唆された<sup>2)</sup>。

最近、活性化CD4陽性T細胞から分泌されるサイトカインIL-21が発見された<sup>3)</sup>。このサイトカインは構造がIL-2, IL-4, IL-15と類似しており、その受容体もIL-2受容体 $\beta$ 鎖, IL-4受容体 $\alpha$ 鎖と似ていたことから、 $\gamma$ c鎖を受容体複合体の一部として使用していることが予想された。そこで我々は、 $\gamma$ c鎖がIL-21のシグナル伝達に関与しているかどうかを明らかにする目的で、内因性の $\gamma$ c鎖

を発現していないED細胞とその細胞に正常 $\gamma$ c鎖遺伝子またはX-SCID患者から単離した変異 $\gamma$ c鎖遺伝子を導入した細胞を用いて、IL-21刺激によるシグナル伝達能を比較検討した<sup>4)</sup>。

### 【方法】

#### (1) 細胞株

本研究にはhuman T cell leukemia virus-I (HTLV-I) でトランスフォームしたT細胞株、ED細胞を用いた。この細胞株は内因性の $\gamma$ c鎖発現を欠く。この細胞に野生型 $\gamma$ c鎖cDNAを遺伝子導入した細胞をED- $\gamma$ c細胞、典型的X-SCID患者から単離した細胞内領域50アミノ酸を欠く変異 $\gamma$ c鎖cDNAを遺伝子導入した細胞をX-SCID細胞とした。

#### (2) 免疫染色

細胞表面の $\gamma$ c鎖発現は抗ヒト $\gamma$ c鎖単クローン抗体であるTUGh4を用いて染色した。IL-21の細胞表面への結合は、ビオチン化したIL-21を4℃で60分間、細胞とインキュベートした後、ストレプトアビジンと反応させ、フローサイトメーターにて検出した。

#### (3) 免疫沈降とウエスタンブロット

細胞を10 ng/mlのIL-21または1 nMのIL-2で10分間刺激したあと、Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2の抗体で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体P-Tyr-100を用いたウエスタンブロット法にてリン酸化チロシンを検出した。STATのリン酸化については、細胞を10 ng/mlのIL-21または1 nMのIL-2で30分間または60分間刺激した後、抗リン酸化STAT1抗体 (pY701), 抗リン酸化STAT3抗体 (pY705), 抗リン酸化STAT5抗体 (pY694)で検出した。

### 【結果】

IL-21受容体複合体に $\gamma c$ 鎖が含まれているかどうかについて検討するため、まず、ED細胞上の $\gamma c$ 鎖とIL-21受容体の発現を確認した。以前から報告されているように、ED細胞上には内因性の $\gamma c$ 鎖の発現はみられなかったが、ビオチン化したIL-21を用いた細胞表面上へのIL-21の結合実験結果から、IL-21は $\gamma c$ 鎖の関与なしにED細胞表面に結合できることがわかった (図1)。正常 $\gamma c$ 鎖を遺伝子導入したED- $\gamma c$ 細胞でも親株のED細胞と同様なIL-21結合パターンが認められた。また、いずれのED細胞からも同等量のIL-21 mRNAがRT-PCR法で検出された (データは示さず)。

次に、IL-21からのシグナル伝達に $\gamma c$ 鎖が関与しているかどうかを明らかにする目的で、 $\gamma c$ 鎖を発現していないED細胞と、その細胞に正常 $\gamma c$ 鎖遺伝子を導入したED- $\gamma c$ 細胞とで、IL-21刺激によるシグナル伝達能を比較検討した。細胞をIL-2またはIL-21で刺激した後、Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2に対する抗体で免疫沈降し、リン酸化チロシン抗体でウエスタンブロットを行った。その結果、Jak1とJak3のチロシンリン酸化は正常 $\gamma c$ 鎖を遺伝子導入したED- $\gamma c$ 細胞で認められたが、親株のED細胞では認められなかった (図2A)。このことから $\gamma c$ 鎖がIL-21のシグナル伝達に必須であることが証明された。また、IL-2またはIL-21刺激ではTyk2のリン酸化チロシンは検出されなかったが、Jak2はかすかにリン酸化を受けていた (データは示さず)。Jak2の発現が極めてわずかであることからIL-21によるJak2のチロシンリン酸化は有意である可能性が考えられた。

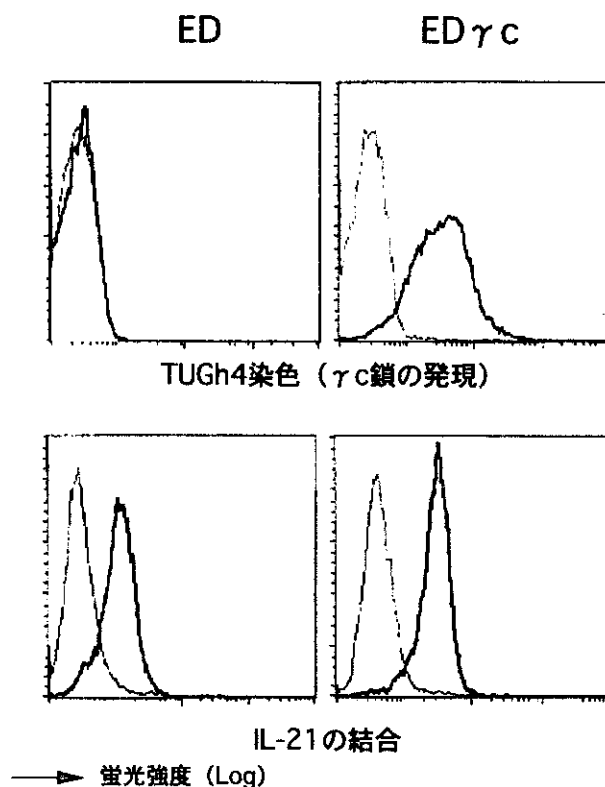


図1. ED細胞とED  $\gamma c$  細胞の  $\gamma c$  鎖発現とIL-21結合能

我々はJakの下流のシグナル伝達分子であるSTATsがIL-21によりリン酸化を受けるかどうか、さらに、典型的なX-SCID患者から単離した $\gamma c$ 鎖にIL-21のシグナルを伝達する能力があるかどうかについて検討した。結果は、ED- $\gamma c$ 細胞でのみIL-2またはIL-21刺激によるSTAT1, STAT3のチロシンリン酸化が検出された。これに対し、親株のED細胞及びX-SCID患者から単離した $\gamma c$ 鎖遺伝子を導入したED細胞ではSTAT1, STAT3のチロシンリン酸化は認められなかった (図2B)。一方、STAT5については正常 $\gamma c$ 鎖を発現したED細胞でIL-2刺激によるSTAT5の有意なチロシンリン酸化が検出されたが、IL-21ではSTAT5の明らかなチロシンリン酸化は検出されなかった (図2B)。以上のことから、IL-21刺激によりSTAT1及びSTAT3がチロシンリン酸化を受けること、さらにX-SCID患者から単離した $\gamma c$ 鎖遺伝子を発現させたED細胞ではこれらのシグナル伝達がみられないことが示された。

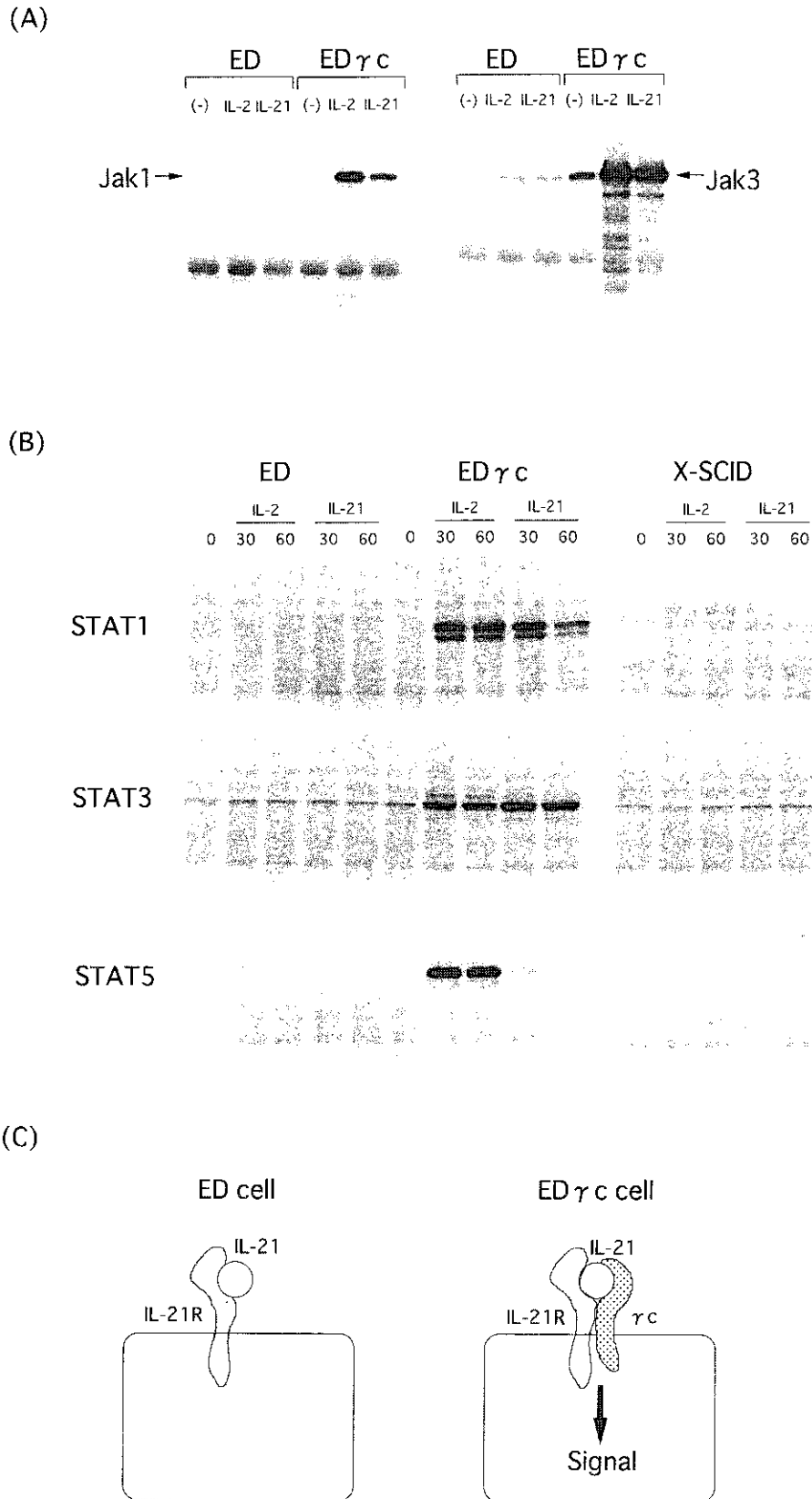


図 2. IL-21からのシグナル伝達には $\gamma$ c鎖が必須である。

(A) IL-21による Jak1、Jak3 のチロシンリン酸化。細胞をIL-2、IL-21で10分間刺激した後、Jak 1 または Jak 3 の抗体で免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体 P-Tyr-100でウエスタンブロットを行った。(B) IL-21によるSTAT1、STAT3のチロシンリン酸化。細胞をIL-2、IL-21で刺激した後、リン酸化STAT1、STAT3、STAT5 の抗体でウエスタンブロットを行った。(C) ED細胞とED $\gamma$ c細胞におけるIL-21からのシグナル伝達の模式図。



## 【考案・結論】

本研究により、 $\gamma$ c鎖はIL-21受容体複合体の一部を構成するのみならず、IL-21のシグナル伝達に重要な役割を果たしていることがわかった。これで、 $\gamma$ c鎖を受容体複合体の一部として使用していることがわかったサイトカインは、少なくともIL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21の6種類となった。

X-SCID患者末梢血の免疫学的特徴は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点にある。ノックアウトマウスを用いた研究から、これまでにX-SCIDのT細胞欠損については、 $\gamma$ c鎖を介したIL-7からのシグナルがT細胞の発生に重要な役割を果たしていることが示唆されている<sup>5) 6)</sup>。ヒトにおいてもIL-7受容体 $\alpha$ 鎖欠損症の患者ではT(-)B(+)NK(+)の型のSCIDになることが示された<sup>7)</sup>。このことから、IL-7がヒトにおいてもT細胞の発生、ひいてはX-SCIDの発症に重要な役割を果たしている可能性が示された。また、X-SCID患者のNK細胞欠損については、IL-15受容体複合体を形成する $\gamma$ c鎖が欠損することでIL-15からのシグナルが伝達されないことによることが、ノックアウトマウスを用いた実験から示されている<sup>8) 9)</sup>。

IL-21は活性化CD4陽性細胞から分泌されるため、T細胞を欠くX-SCID患者では血中IL-21の値は著しく低下していることが予測される<sup>3)</sup>。さらに本研究の結果から典型的なX-SCID患者から単離した $\gamma$ c鎖はIL-21刺激によるシグナルを伝達できないことが示された。これらのことから、IL-21が $\gamma$ c鎖遺伝子の変異により発症するX-SCIDの病態形成に関与している可能性が示唆された。現在までに報告されているIL-21の生物学的作用は、B細胞、T細胞、NK細胞の増殖及び分化に関わる作用である<sup>3)</sup>。X-SCIDの免疫学的特徴の一つで、その病態がまだ解明されていないB細胞機能異常発症へのIL-21の関与や、T細胞、NK細胞の発生・分化におけるIL-21とIL-7, IL-15との相乗効果の可能性についての検討はこれからの研究課題である。

## 【参考文献】

1. Fischer A. Severe combined immunodeficiency (SCID). *Clin Exp Immunol* 122: 143-149, 2000.
2. Sugamura K, Asao H, Kondo M, Tanaka N, Ishii N, Ohbo K, Nakamura M, Takeshita T. 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.
3. Asao H, Okuyama C, Kumaki S, Ishii N, Tsuchiya S, Foster D, Sugamura K. The common  $\gamma$ -chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* 167: 1-5, 2001.
4. von Freeden-Jeffrey U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SEG, Murray R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181:1519-1526, 1995.
5. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, Park LS, Ziegler SF, Williams DE, Ware CB, Meyer JD, Davison BL. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180:1955-1960, 1994.
6. Puel A, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard WJ. Defective IL7R expression in T-B+NK+severe combined immunodeficiency. *Nature Genet* 20: 394-397, 1998.
7. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos, Trettin S, Ma A. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9: 669-676, 1998.
8. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, Brasel K, Morrissey PJ, Stocking K, Schuh JCL, Joyce S, Peschon J. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 191: 771-780, 2000.
9. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, Johnston J, Madden K,

Xu W, West J, Schrader S, Burkhead S, Heipel M, Brandt C, Kuijper JL, Kramer J, Conklin D, Presnell SR, Berry J, Shiota F, Bort S, Hambly K, Mudri S, Clegg C, Moor M, Grant FJ, Lofton-Day C, Gilbert T, Raymond F, Ching A, Yao L, Smith D, Webster

P, Whitmore T, Maurer M, Kauchansky K, Holly RD, Foster D. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408: 57-63, 2000.

## Involvement of IL-21 in the development of X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID).

Satoru Kumaki, Naoto Ishii\*, Hironobu Asao\*, 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. The  $\gamma$ c chain is an indispensable subunit of the functional receptor complexes for IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, and IL-15. Recently, a novel cytokine, IL-21 and its receptor were identified. Structural similarities between IL-21 and IL-2, IL-4, and IL-15 and between IL-21R and the IL-2R  $\beta$  chain and the IL-4R  $\alpha$  chain led us to speculate that IL-21 also shares the  $\gamma$ c chain as a functional subunit of its IL-21R complex. Here, we show that IL-21-induced signals were mediated through the wild type  $\gamma$ c chain but not through mutant  $\gamma$ c chains isolated from X-SCID patients. These results suggest that IL-21 utilizes the  $\gamma$ c chain as an essential component of IL-21R and may play an important role of the development of X-SCID.

---

## 特異なWASP発現パターンを呈したWiskott-Aldrich syndromeの1症例

山田 雅文 (北海道大学医学部小児科)  
川村 信明 (北海道大学医学部小児科)  
有賀 正 (北海道大学医学部遺伝子治療)  
崎山 幸雄 (北海道大学医学部遺伝子治療)  
近藤 達郎 (長崎大学医学部小児科)  
森内 浩幸 (長崎大学医学部小児科)  
小林 邦彦 (北海道大学医学部小児科)

フローサイトメトリーを用いたWASP発現解析 (FCM-WASP) において特異なWASP発現パターンを呈したWAS症例について報告する。症例は32歳男性で、特徴的な臨床症状とWASP遺伝子解析結果 (A-354→G, Tyr-107→Cys) よりWASと診断していた。また患者母についても患者と同一遺伝子変異をもつWAS保因者であることを確認している。今回末梢血リンパ球FCM-WASPを施行し、WASP発現が正常 (WASP<sup>bright</sup>)、低下 (WASP<sup>dim</sup>) の二峰性の分画を認めた。一方、単球ではWASP<sup>dim</sup>分画のみであった。リンパ球表面マーカーとWASPとの二重染色によりT細胞の一部がこのWASP<sup>bright</sup>分画を構成していることが示されたが、B細胞には認められなかった。その分画の遺伝子解析ではWASP遺伝子の正常な塩基配列が認められ、遺伝子変異が解消されていた (mutation reversion)。HLA DNA typing および マイクロサテライト法による polymorphism 解析結果より、この細胞分画は患者由来であることが確認された。以上のことからこの mutation reversion は患者において in vivo に生じたものと考えられた。

### 【はじめに】

私たちはこれまで、フローサイトメトリーを用いたWASP発現の解析 (FCM-WASP) がWiskott-Aldrich syndrome (WAS) 患者及び保因者の迅速診断に有用であることを報告してきた<sup>1,2)</sup>。今回は、この解析法を用いることにより見出すことのできた、特異なWASP発現パターンを呈したWAS症例について報告する<sup>3)</sup>。

### 【対象と方法】

患者は32歳男性。WASの臨床診断は1歳時、WASP遺伝子解析による確認は29歳時に行っている。年齢と共に臨床スコアが高値となり、25歳で脳のmalignant lymphomaを発症し、32歳で永眠した。29歳時に行った全血を用いたWASP遺伝子解析では、exon 3におけるA-354→G (Tyr-107→Cys) のmissense mutationを認めた。母は同様の方法で、

患者と同一の遺伝子変異をヘテロにもつWAS保因者であることを確認している。

FCM-WASPは以前の方法に準じ、PharMingen社のCytofix/ Cytoperm solutionを用いて細胞の膜処理を行った後に抗ヒトWASPマウスモノクローナル抗体、さらには二次抗体との反応を行った。リンパ球表面マーカーとWASPとの二重染色については、この膜処理の前に表面マーカーの染色を行った。Herpes saimiri virusを用いて樹立したT細胞株においても同様の方法を用いて解析した。

### 【結果】

まず、患者末梢血においてFCM-WASPを施行した。単球ではWASP発現の低下した (WASP<sup>dim</sup>) 分画のみを認めたが、リンパ球ではこの分画に加え、正常発現の (WASP<sup>bright</sup>) 分画を認め、この分画はリンパ球全体の約10%を占めていた (図1)。そこ

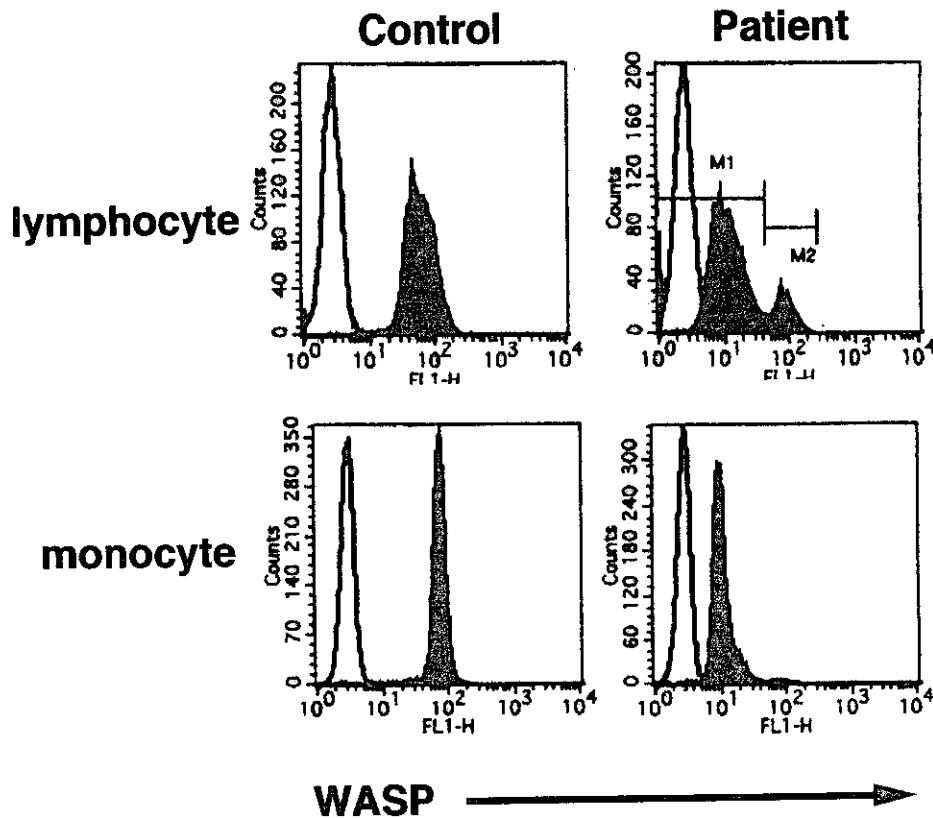


図 1. リンパ球、単球を用いた FCM-WASP 解析結果

で、どのようなリンパ球がこのWASP<sup>bright</sup>分画を構成しているのかを明らかにするために、リンパ球表面マーカーとWASPとの二重染色を行った。CD20陽性細胞ではこの分画はなく、CD3陽性細胞でこの分画を認めた。そして、CD4、CD8陽性細胞のいずれにも認められた(図2)。

T細胞に認められるWASP<sup>bright</sup>分画についてさらに詳細に解析するために、Herpes saimiri virusを用いてT細胞株の樹立を試みた。樹立したT細胞株は95%がCD8陽性で、これをCD8細胞株とし、この株よりMagnetic Cell Sorting (MACS)を用いてCD4陽性細胞を分離して樹立した細胞株をCD4陽性細胞株とした。CD8陽性細胞株では樹立直後WASP<sup>bright</sup>細胞は60%で樹立後2週間でもほぼ同じ割合だったのに対し、CD4陽性細胞株では樹立直後0.5%であったWASP<sup>bright</sup>細胞が樹立後2週間で80%にまで増加していた(図3)。

次に、WASP遺伝子解析を末梢血単核球とT細胞株とを用いてgenomic DNA direct sequence法により施行した。まず、末梢血単核球について解析を行うと、保因者である患者母では正常のA-354と

変異したG-354のシグナルが同程度みられ、患者では変異したGが主だがわずかにAのシグナルも認められた。一方、患者T細胞株での解析では、WASP<sup>bright</sup>分画が40%のサンプルでは変異したGのシグナルが主であったが、この分画が60%、80%と増加するにつれて、正常のAのシグナルが増強していた(図4)。このように、WASP<sup>bright</sup>分画の割合と正常配列のシグナルの強さとの間には相関関係が認められた。患者の遺伝子変異によって認識しなくなる制限酵素であるAcc 1を用いたWASP-exon 3のPCR産物の解析からもWASP<sup>bright</sup>分画では正常の塩基配列を有することが確認され、この患者のWASP<sup>bright</sup>分画においてはWASP遺伝子変異が解消している(mutation reversion)と推測された。

次にこのmutation reversionを生じた細胞の由来を明らかにするために、HLA DNA typing、及びマイクロサテライト法によるpolymorphism解析を行った。WASP<sup>bright</sup>分画が大部分を占めている患者T細胞株と、WASP<sup>dim</sup>分画のみを認める患者B細胞株(Eptein-Barr virus-transformed cell line)とを用いて解析した。HLA class I及びDRB1 alleleについての

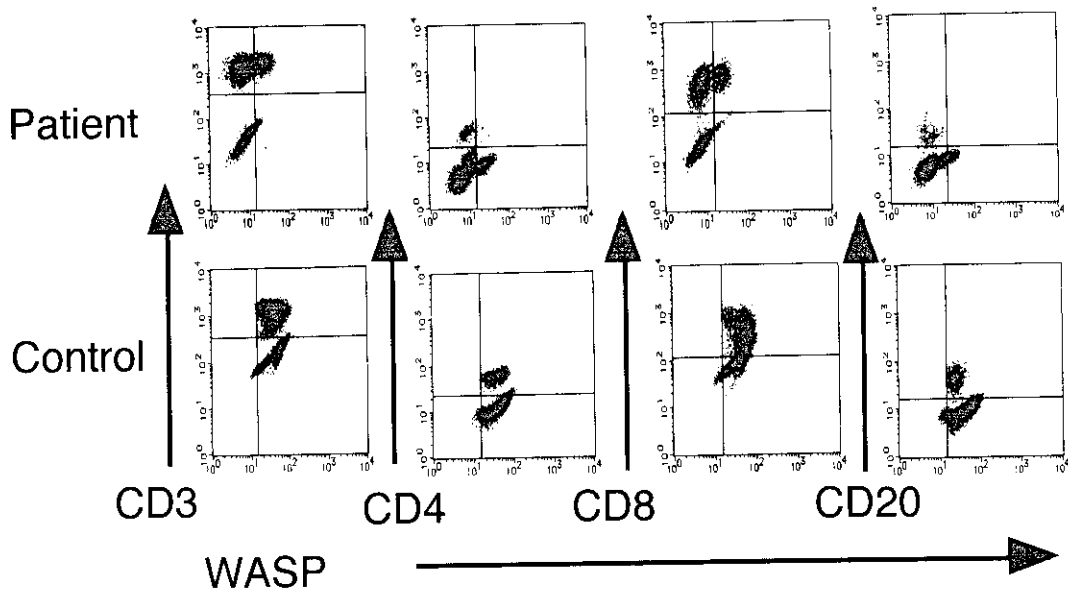


図 2. リンパ球表面マーカーと WASP との二重染色

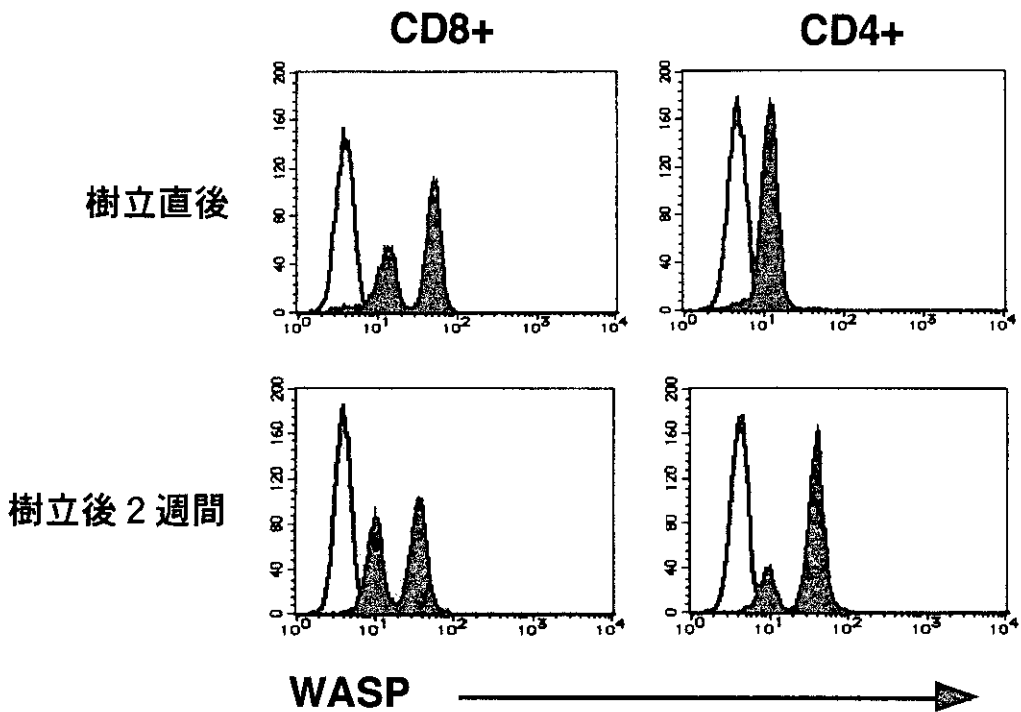


図 3. 患者 T 細胞核における WASP 発現解析

DNA typingでは、両細胞株は同一のパターンを示した。マイクロサテライト法による polymorphism 解析では、6つの異なる microsatellite polymorphic loci を用いて解析したが、やはり両細胞株は同一のパターンを示した(図5)。したがって、WASP<sup>bright</sup>分画は患者由来であることが強く示唆された。

さらに、患者T細胞株におけるT細胞レセプターレパトアを、variable region に対する抗体を用い、フローサイトメトリーで解析を行った。オリゴクローナルな分布であり、少なくともT細胞レセプターの rearrangement が完成する前に mutation reversion が生じたことを示唆するものであった(表)。

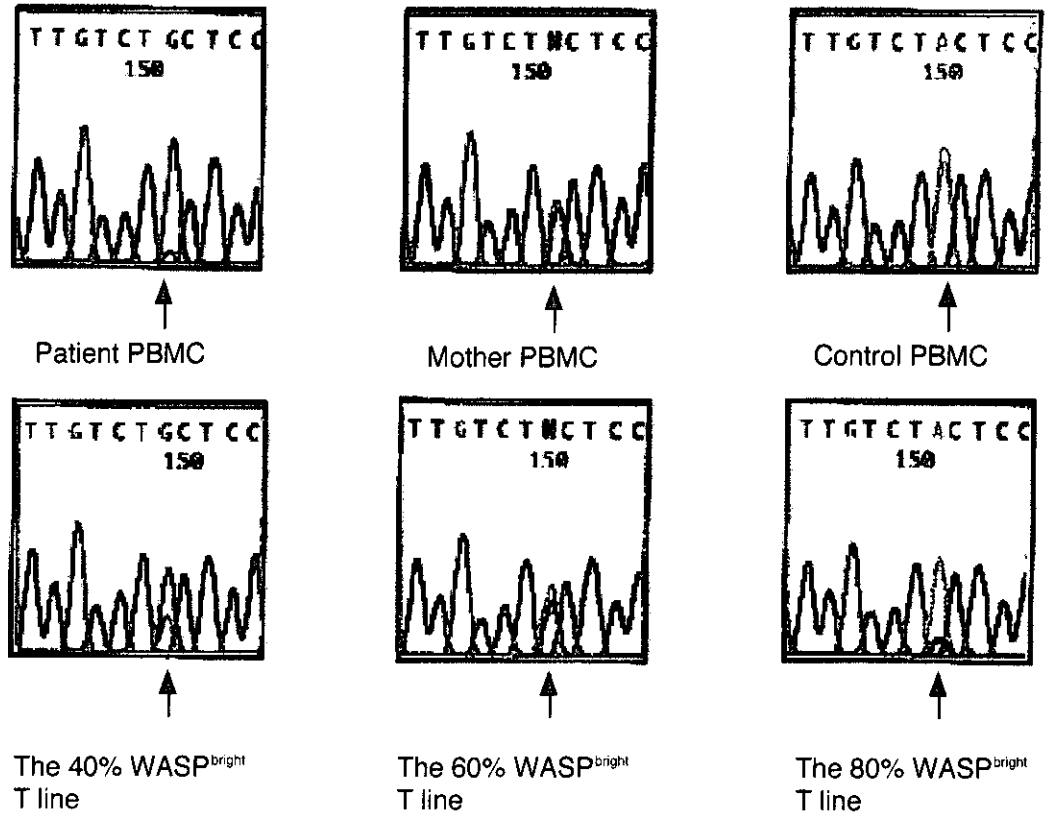


図 4. WASP<sup>bright/dim</sup> と正常/変異 WASP との関係

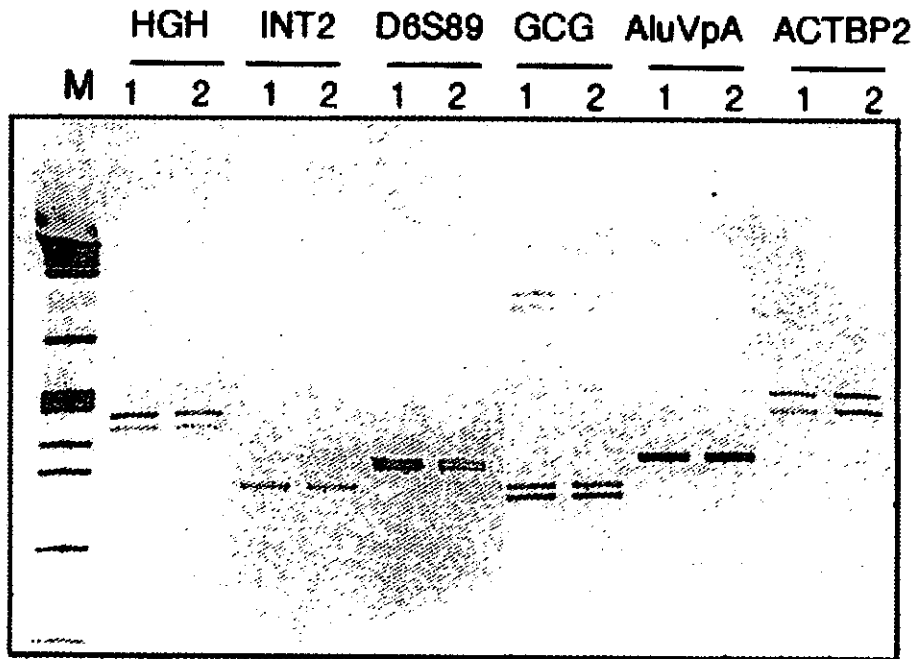


図 5. マイクロサテライト法による polymorphism 解析

- 1: WASP<sup>bright</sup> T cell line, 2: WASP<sup>dim</sup> B cell line
- HGH: the human growth hormone locus
- INT2: the int-2 protooncogene locus
- D6S89: the D6S89 locus
- GCG: the human preproglucagone gene
- AluVpA: an Alu variable poly (A)
- ACTBP2: the human  $\beta$ -actin-related pseudogene H- $\beta$ -Ac-psi-2

表 T細胞レセプターレパトア解析

	患者T cell line (%)	コントロール PBMC (%)
V $\alpha$ 2	1.1	2.5
V $\alpha$ 12.1	0.8	2.1
V $\beta$ 3.1	31.5	5.1
V $\beta$ 5(a)	1.2	8.0
V $\beta$ 5(b)	1.4	1.0
V $\beta$ 5(c)	32.6	3.5
V $\beta$ 6.7	0.9	1.6
V $\beta$ 8(a)	0.4	3.5
V $\beta$ 12	0.7	2.6
V $\beta$ 13	1.0	3.5

WASP<sup>bright</sup>分画が約80%を占める患者T細胞株の位相差電子顕微鏡による形態をみた。患者T細胞株では大部分が正常の形態をもった細胞で、一部WAS患者と同様の形態をとっていた(図6)。

【考察】

今回末梢血T細胞の一部でWASP<sup>bright</sup>分画を認めるという特異なWASP発現パターンを呈したWAS症例を経験した。この分画を解析した結果、WASP遺伝子変異が解消されている(mutation reversion)ことが示された。そこで、この分画の由来について検討した。まず、受精期早期のde novo変異によるchimerismの可能性については、母がこの患者と同一のWASP遺伝子変異をもった保因者であるので考えにくい。また、HLA DNA typing及びマイクロサテライト法を用いたpolymorphism解析の結果より、WASP<sup>bright</sup>分画とWASP<sup>dim</sup>分画とは同じ個体由来であると考えられ、胎児期における母親の細胞や輸血中の細胞が生着した可能性は否定的である。WAS患者の細胞株で*in vitro* mutation reversionを生じた例も報告されているが、今回は末梢血採取時点ですでにWASP<sup>bright</sup>分画を認めており、この可能性も考えられない。また、XY/XXYモザイクの可能性については、WASP<sup>dim</sup>分画では正常alleleは存

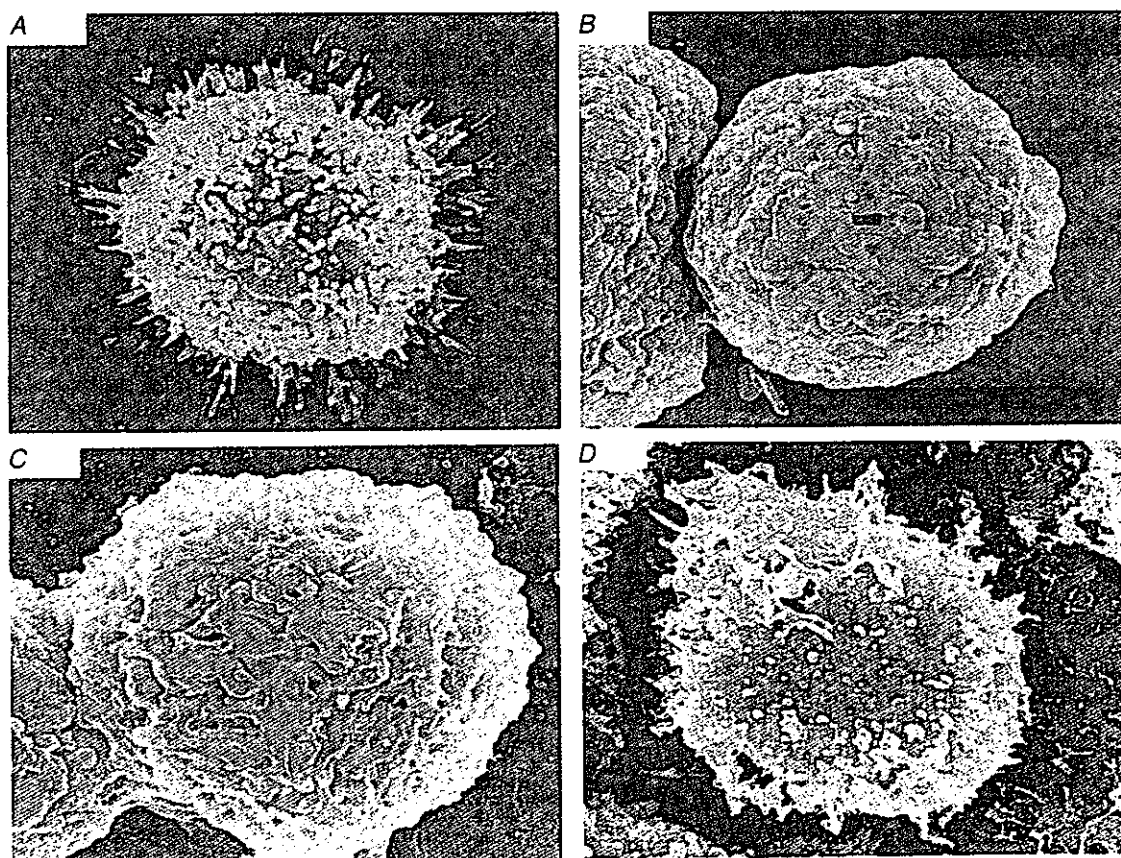


図6. 位相差電顕による WASP<sup>bright/dim</sup> 細胞の形態

A: 患者T細胞株の大部分。 B: 患者T細胞株の一部。  
C: 別のWAS患者T細胞株。 D: 正常人T細胞株

在せず否定した。これらのことから、WASP<sup>bright</sup>分画は患者において*in vivo*でのmutation reversionの結果生じたものと結論した。

*in vivo* mutation reversionはこれまでも X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID)<sup>4)</sup> や adenosine deaminase (ADA) 欠損症<sup>5)</sup>, Bloom症候群<sup>6)</sup> といった原発性免疫不全症や、それ以外にも Fanconi 貧血<sup>7)</sup>, Duchenne muscular dystrophy<sup>8)</sup>, Epidermolysis bullosa<sup>9)</sup>, Tyrosinemia type I<sup>10)</sup> などの疾患で報告がみられる。*in vivo* mutation reversionはさらに種々の疾患、遺伝子に生じている可能性もあるが、reversionにより圧倒的な増殖優位性を獲得できない場合にはこれが認識されないと考えられる。

WAS 患者における *in vivo* mutation reversion については、最近他施設からも 1 例報告がみられ、この患者においても T 細胞でのみこの現象を認めている<sup>11)</sup>。このことから、これら 2 例の WAS 患者においてはいずれも T 細胞系に分化した後の細胞で mutation reversion が生じた可能性が考えられる。しかし、もっと幼若な幹細胞レベルでこの mutation reversion が生じた場合にも、これにより T 細胞系だけが圧倒的な増殖優位性を獲得する場合には、末梢血中では今回みられたような T 細胞に限局した現象として認められる可能性がある。前回報告した WAS 保因者の解析から、単球に比してリンパ球において WASP がより重要な役割を果たしていることが推察された。今回の解析結果は、リンパ球間においても WASP がその増殖、生存に及ぼす重要性が異なっており、T 細胞系でもっとも重要な役割を果たしている可能性を示唆するものと考えられた。mutation reversion により臨床的に軽症化がみられる例が多いが、今回の報告例では明らかな軽症化はみられず、32歳で悪性リンパ腫にて死亡している。mutation reversion が生じた時期は明らかにできなかったが、軽症化をみるにはこの時期が遅すぎた可能性がある。また、今回 T 細胞に限局して約 10% みられた WASP<sup>bright</sup> 分画だけでは臨床的な軽症化をもたらすのに十分でなかった可能性も考えられた。

## 【参考文献】

- 1) Yamada M, Ohtsu M, Kobayashi I, Kawamura N, Kobayashi K, Ariga T, Sakiyama Y, Nelson DL, Tsuruta S, Anakura M, Ishikawa N, Flow cytometric analysis of Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein in lymphocytes from WAS patients and their familial carriers., Blood 93: 756-7, 1999
- 2) Yamada M, Ariga T, Kawamura N, Yamaguchi K, Ohtsu M, Nelson DL, Kondoh T, Kobayashi I, Okano M, Kobayashi K, Sakiyama Y., Determination of carrier status for the Wiskott-Aldrich syndrome by flow cytometric analysis of Wiskott-Aldrich syndrome protein expression in peripheral blood mononuclear cells., J Immunol. 165: 1119-22, 2000
- 3) Ariga T, Kondoh T, Yamaguchi K, Yamada M, Sasaki S, Nelson DL, Ikeda H, Kobayashi K, Moriuchi H, and Sakiyama Y, Spontaneous *in vivo* reversion of an inherited mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome., J Immunol. 166: 5245-9, 2001
- 4) Stephan V, Wahn V, Deist FL, Dirksen U, Broker B, Fleckenstein IM, Horneff G, Schrotten H, Fischer A, Basile GS, Atypical X-linked severe combined immunodeficiency due to possible spontaneous reversion of the genetic defect in T cells., NEJM 335: 1563-7, 1996
- 5) Hirschhorn R, Yang DR, Puck JM, Huie ML, Jiang CK, Kurlandsky LE, Spontaneous *in vivo* reversion to normal of an inherited mutation in a patient with adenosine deaminase deficiency., Nature Genetics 13: 290-5, 1996
- 6) Ellis NA, Ciocci S, German J, Back mutation can produce phenotype reversion in Bloom syndrome somatic cells., Hum Genet. 108: 167-73, 2001
- 7) Gregory JJ Jr, Wagner JE, Verlander PC, Levrin O, Batish SD, Eide CR, Steffenhagen A, Hirsch B, Auerbach AD, Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells., Proc Natl Acad Sci U S A 98: 2532-7, 2001



- 8) Klein CJ, Coovert DD, Bulman DE, Ray PN, Mendell JR, Burghes AH, Somatic reversion/suppression in Duchenne muscular dystrophy (DMD): evidence supporting a frame-restoring mechanism in rare dystrophin-positive fibers., *Am J Hum Genet* 50: 950-9, 1992
- 9) Jonkman MF, Scheffer H, Stulp R, Pas HH, Nijenhuis M, Heeres K, Owaribe K, Pulkkinen L, Uitto J, Revertant mosaicism in epidermolysis bullosa caused by mitotic gene conversion., *Cell* 88: 543-51, 1997
- 10) Kvittingen EA, Rootwelt H, Berger R, Brandtzaeg P.J, Self-induced correction of the genetic defect in tyrosinemia type I., *Clin Invest* 94: 1657-61, 1994
- 11) Wada T, Schurman SH, Otsu M, Garabedian EK, Ochs HD, Nelson DL, Candotti F, Somatic mosaicism in Wiskott-Aldrich syndrome suggests *in vivo* reversion by a DNA slippage mechanism., *Proc*

## Spontaneous *in vivo* reversion of an inherited mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome

Masafumi Yamada <sup>1)</sup>, Nobuaki Kawamura <sup>1)</sup>, Tadashi Ariga <sup>2)</sup>, Yukio Sakiyajima <sup>2)</sup>, Tatsuro Kondoh <sup>3)</sup>, Hiroyuki Moriuchi <sup>3)</sup>, Kunihiko Kobayashi <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Pediatrics, Hokkaido University Graduate School of Medicine, <sup>2)</sup> Department of Human Gene Therapy, Hokkaido University Graduate School of Medicine, <sup>3)</sup> Department of Pediatrics, Nagasaki University School of Medicine

In this study, we report a 32-year-old WAS patient who showed the unique pattern in the flow cytometric analysis of WASP expression (FCM-WASP). WAS diagnosis was made from the clinical evaluation when he was 1 year old and was confirmed by molecular studies (A-354→G in the WASP gene) at 29 years of age. His mother was diagnosed as a WAS carrier by genetic studies having the same mutant WASP allele. Mononuclear cells from the patient consisted of the small population of normal expression of WASP (WASP<sup>bright</sup>) together with the major population of diminished expression of WASP (WASP<sup>dim</sup>). The WASP<sup>bright</sup> cells were detected in T cells, but not in B cells nor in monocytes. The molecular studies of the WASP<sup>bright</sup> cells revealed that the inherited mutation of WASP gene was reversed to normal. His mother was proved as a WAS carrier, and HLA DNA typing studies and microsatellite polymorphic studies proved that the WASP<sup>bright</sup> cells derived from the patient himself. Therefore, we concluded that the WASP<sup>bright</sup> cells resulted from spontaneous *in vivo* reversion of the inherited mutation.

## X-linked lymphoproliferative diseaseにおけるNK cell、 cytotoxic T cellの機能解析

片 村 憲 司 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)  
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 (慶應義塾大学微生物学免疫学)  
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)

X-linked lymphoproliferative disease (XLP) は伴性劣性遺伝形式をとる原発性免疫不全症で1998年にその責任遺伝子産物がSAP (SH2D1A) と同定された。その後、XLPの臨床症状は当初報告されたEBウイルス感染に伴うhemophagocytic syndromeのみならず、malignant lymphoma, dysgammaglobulinemiaなどを発症することも明かとなり、その病態の解明が重要な課題である。

我々は、EBウイルス感染症に伴ってhemophagocytic syndromeを発症し、XLPと診断された患者のリンパ球を用いてNK細胞活性、細胞傷害性T細胞活性を測定したので考察を加えて報告する。

### 【はじめに】

XLPは重症EBウイルス感染症を発症する原発性免疫不全症で、初回感染による死亡率も高く、回復してもdysgamma globulinemia や malignant lymphoma等を発症する事が報告されている。当初はEBウイルス特異的な原発性免疫不全症と考えられていたが、遺伝子が同定され正確に診断されるようになってから、EBウイルス感染以前にmalignant lymphomaを発症する例なども報告され、現在ではその病態基盤に必ずしもEBウイルス特異的ではないこの疾患特有の免疫不全が存在し、その結果様々な症状を呈すると考えられている<sup>1,2)</sup>。

一方、1998年にXLPの責任分子がSLAM-associated protein (SAP) あるいはSH2D1Aと同定され以後、孤発例も含めた臨床診断や病態の解明の進歩のきっかけとなった<sup>3, 4)</sup>。現在ではSAP knock out miceも作成され、病態が次第に明らかにされつつあるが、ヒトにおけるSAPの免疫系における役割など、まだまだ明らかにしていかなければならない点も多い。

我々はEBウイルス感染に伴ってhemophagocytic syndromeを発症した患者の血液を用いてNK細胞、

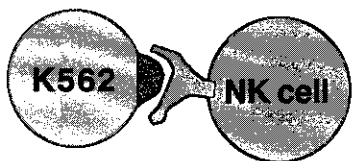
細胞傷害性T細胞活性を測定したのでその結果を報告する。

### 【対象と方法】

患者はEBウイルス初感染時にhemophagocytic syndromeを発症し、軽快後dysgammaglobulinemiaを発症している男児である。患者血液より比重遠心法を用いて単核球を分離し、これらの単核球をPHA (1µg/ml) とIL-2 (50 IU/ml) の存在下で刺激培養した。

**NK細胞活性の測定：**NK細胞感受性株K562, NK細胞非感受性株P815 をCalcein-Mで20 min labelした後洗浄し、target細胞として用いた<sup>5)</sup> (図1)。培養したTblastを洗浄後5% FCSを加えたHanks' buffered salt solution (HBSSF) に浮遊し、effector細胞として用いた。これらの細胞をE:T ratio 40:1, 4:1で96 well U-bottmed-plateに加え、軽く遠心した後3時間培養し上清中に放出されたCalceinの蛍光を蛍光plate readerで測定した。P815と抗CD16抗体を用いたre-direct assayではanti-CD16 mAb (3G8) を2µg/mlの濃度で培養液中に加えた。Target細胞を加えないwellの3時間後の上清を100µl採取し

1) K562をtargetにしたassay



2) 抗CD16抗体を用いたre-direct assay

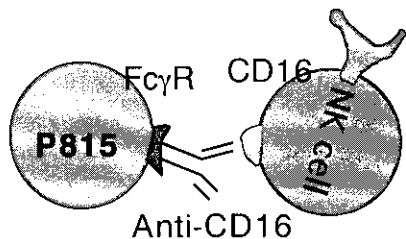


図 1. NK 細胞機能の in vitro assay

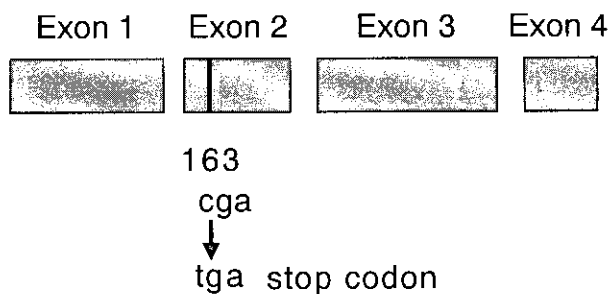


図 2. Patient SAP gene

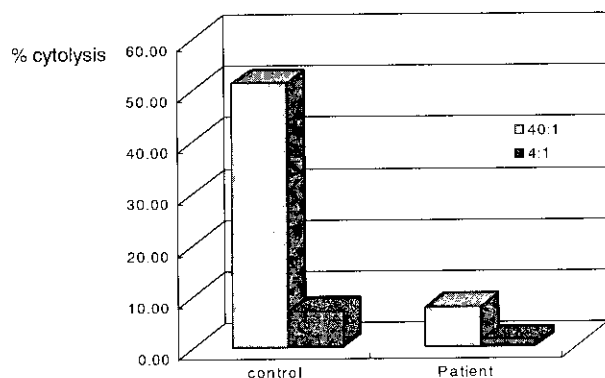


図 3. K562 に対する NK cell activity

spontaneous release, well に lysis buffer を加え完全に溶解した後、同様に100μl 採取し total release とした。% cytotoxicity は以下の式を用いて計算した。  

$$\frac{(F_{\text{assay}} - F_{\text{spontaneous}})}{(F_{\text{total}} - F_{\text{spontaneous}})} \times 100 = \% \text{ cytotoxicity}$$
 (Fは蛍光)。

Cytotoxic T lymphocyte assay : Fas 遺伝子に突然

変異を持つ患者より樹立したEB-virus-transformed B cell line (Fas<sup>+</sup> EB-1) を同様に Calcein-M を用いて label し標的細胞として用いた。Effector 細胞と標的細胞を図中に示した E:T ratio で 2 μg/ml の抗 CD3 mAb (UCTH-1) の存在下で 3 時間培養し、NK 細胞の場合と同様、上清中の蛍光を測定し anti-CD3-dependent % cytotoxicity を算出した<sup>5)</sup>。

sap 遺伝子解析 : 残りの T blast より mRNA を抽出し RT-PCR 法を用いて cDNA を作成した後、sap 特異的 PCR primer を用いて増幅し解析した。

CD8 陽性 T 細胞株の作成 : 患者末梢血を PMA と ionomycin で 24 時間刺激した後、100,000 rad 照射した MT-2 細胞と IL-2 の存在下で培養し、transform した。これらの細胞株から、抗 CD4, 抗 CD8 mAb を用いて MACS で positive selection し CD4 陽性細胞 (D4.4) CD8 陽性細胞株 (D8.4) を作成した。Control として健康人より同様の方法で CD4 陽性株 (K4.4), CD8 陽性株 (K8.4) も作成した。

FasL, Granzyme A, Granzyme B の intracellular staining : transform して得られた各細胞株を anti-FasL mAb (Biotin-conjugated 4H9, MBL), anti-Granzyme A mAb (Pharmingen), anti-Granzyme B mAb (CalTag) を用いて染色し、Flow cytometry で解析した。

IFN-γ 産生の測定 : 各細胞株を抗 CD3 抗体と抗 CD 28 抗体を用いて 48 時間刺激し培養上清中の IFN-γ を ELISA 法で測定した。

【結果】

sap 遺伝子解析 : 得られた sap cDNA を解析したところ、exon 2 において 163 C to T の変異を認め、TGA の stop codon を形成していた (図 2)。

NK 細胞活性 : K562 を target 細胞とする assay では図 3 に示すように、コントロールに比して著明な % cytotoxicity の低下を認めた。

NK 細胞活性は NK レセプターを介する細胞傷害以外にも、NK 細胞上の CD16 分子と NK 非感受性株である P816 の Fcγ receptor を抗 CD16 抗体を用いて link する事によっても発揮される。そこで患者 T blast を用いて抗体依存性 NK 活性を測定したが、K562 の場合と同様、患者では著明な低下を認めた。(図 4)

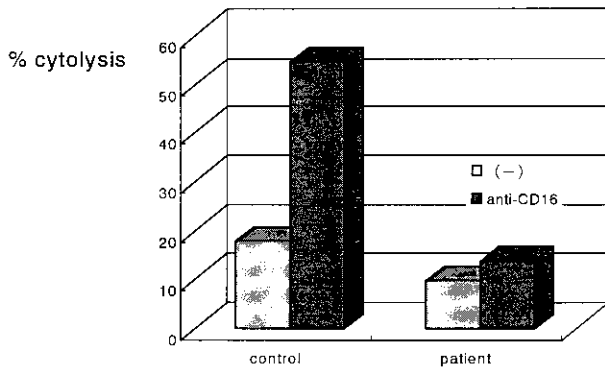


図 4. 抗CD16抗体によるNK細胞活性のre-direct assay

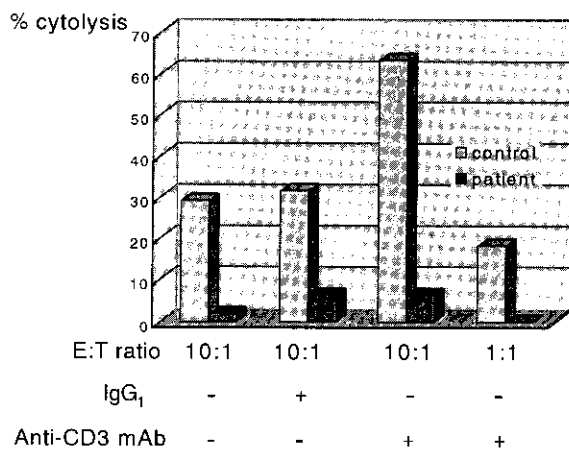


図 5. Fas<sup>+</sup> EB-transformed cell line を target にしたAnti-CD3-dependent CTL assay (I)

細胞傷害性T細胞機能：Fas<sup>+</sup> EB-I をtarget細胞とし，PHA blastをeffector細胞とするanti-CD3-dependent cytotoxic T lymphocyte (CTL) assay ではNK細胞活性と同様著明な活性の低下を認めた。(図5)

これらの病態を明らかにするため，患者T細胞をHTLV-1でtransformしcell lineを作成し，D4.4 (CD4陽性T細胞株)，D8.4 (CD8陽性T細胞株)をpositive selectionで得た。これらのCD8陽性T細胞株を用いて同様のCTL assayを行った。図6に示すように全体としての% cytotoxicity活性は健常コントロールでもやや低下したが，患者T細胞株では全く認められなかった。

FasL, Granzyme A, Granzyme Bの細胞内染色：これらの細胞傷害能の欠損がeffector分子であるFasL, Granzyme A, Granzyme B等の発現異常によるものかを明らかにするために，これらの細胞株におけるこれらeffector分子の細胞内染色を行った。図7に示すようにこれらの分子はいずれも健

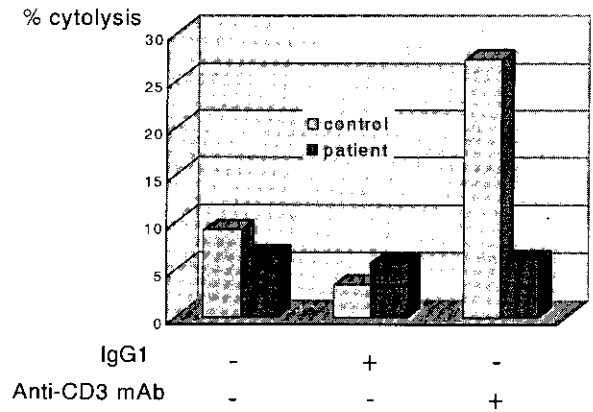


図 6. Fas<sup>+</sup> EB-transformed cell line を target にしたAnti-CD3-dependent CTL assay (II) (HTLV-L-transformed CD8<sup>+</sup> T cell)

常者と差はなく細胞内に存在していた。

T細胞レセプターを介するシグナル伝達：T細胞レセプターを介するシグナル伝達を検討するため，T細胞株を抗CD3抗体と抗CD28抗体で刺激し培養上清中のサイトカインを測定した。図8に示すようにこれらのT細胞株は無刺激の状態でもIFN- $\gamma$ を産生していたが，CD3, CD28を介する刺激によりIFN- $\gamma$ 産生は増加し，患者T細胞株においても健常者と変わらず，この増加は認められた。IL-4については測定したが，感度以下であった。

### 【考察】

XLPにおけるnatural killer cellの機能異常は以前から報告されていた<sup>6)</sup>。しかしその機序については明確なものが無く，1998年に原因遺伝子である*sap*が報告されて以来，次第に解析されるようになった<sup>7)</sup>。中でも特筆すべきはMorettaらにより，XLPの患者のNK細胞では2B4 (CD244)を介するシグナルによりNK細胞活性が抑制されていることが明らかにされた点である。彼らは2B4を抗体でブロックすることにより，NK活性が回復することを示した<sup>7)</sup>。2B4はそのシグナル伝達経路の下流にSAP蛋白を持ち，T細胞，NK細胞において様々な刺激伝達に修飾を加えていると考えられる。MorettaらはさらにNTB-4という新しいCD2 familyに属する分子をcloningし，この分子がSAPとassociateすること等を報告し，NK細胞におけるXLPの障害を次第に明らかにしつつある<sup>8)</sup>。