

FOXP3 の機能はいまだ明確ではないが、転写因子 NF-ATを抑制することで、リンパ球の活性化を制御していると考えられている²⁾。

今回の検討で、我々は在胎26週 3日体重853gにて出生後、難治性の皮膚感染症により死亡した極小低出生体重児の*FOXP3* の遺伝子解析を行い、1150G>A (Ala384Thr) のミスセンス変異を見出した。同一の変異は独立した2家系で報告されており^{3), 4)}、またBennett等は、500個の正常人X染色体を検討してもこの変異は認められなかったと述べており⁴⁾、本変異は、正常人に見られる多型ではなく、XLAADの病因であると考えられた。すなわちこの変異は、現在までに確認された、XLAAD10家系のうち3家系で見つかった変異で、変異のホットスポットを形成していることになる。

症例の兄も、難治性の皮膚炎から、MRSA全身感染症を併発し、10ヵ月時に死亡しており、また、母方の従兄弟2名は、乳児期に著明な好酸球増多を伴う体重増加不良と難治性の気管支喘息を呈した。本報告書作成時点で、これらの患者の変異の有無は確認できていないが、同一の変異が認められる可能性が高い。そうであれば、症例1などは幼児期以降はほとんど健常人と変わらない生活を送り得ており、同一の変異がありながら表現型に大きな差が存在している。成長により、*FOXP3* 欠損による障害を、相当程度補完しうる何らかの機能が充実するのかもしれない。

このように、XLAADは多彩な病像を呈し、かつ同一変異でも表現型が多様であること、通常の

免疫機能検査では異常の検出が難しいこと、早期診断すれば造血細胞移植等により根治の可能性があることより、遺伝子診断が有用であると考えられた。

文 献

1. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest.* 2000, 106:R75-81.
2. Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, et al. Scurfin (*FOXP3*) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem.* 2001, 276: 37672-9.
3. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet.* 2001, 27: 18-20.
4. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of *FOXP3*. *Nat Genet.* 2001, 27:20-1.
5. Bennett CL, Brunkow ME, Ramsdell F, et al. A rare polyadenylation signal mutation of the *FOXP3* gene (AAUAAA->AAUGAA) leads to the IPEX syndrome. *Immunogenetics.* 2001, 53:435-9.

Mutation analysis of Forkhead box P3 (*FOXP3*) gene in a family with X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome (XLAAD)

Ikuya Tsuge¹⁾, Atsuo Urisu¹⁾, Yoshiro Kamachi²⁾, Masahiro Hayakawa²⁾, Tatsuo Sakamoto²⁾

Department of Pediatrics, Fujita Health University¹⁾, Department of Pediatrics, Nagoya University School of Medicine²⁾

Mutations of a forkhead family transcription factor designated Forkhead Box P3 (*FOXP3*) cause X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome (XLAAD, also named as immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX)). This X-linked syndrome presents early in life with a variety of symptoms

such as autoimmunity, allergic disorder and immunodeficient state.

In this report, we analyzed a *FOXP3* gene sequence from a very low birth weight infant (GA 26W3d, BW 853g), who died of intractable skin infection. His older brother had died of generalized MRSA infection after prolonged dermatitis at his 10 months old, and two maternal cousins manifested marked eosinophilia and severe asthmatic bronchitis at their infancy.

Genomic DNA sequencing of his twelve *FOXP3* exons revealed the presence of an Alanine>Threonine substitution at position 384. The same mutation has been reported by Wildin et al. and Bennet et al., and this seemed to be a mutational hot spot of *FOXP3* gene.

The phenotype of XLAAD is multifarious and even the same genotype might express quite different phenotypes. Early diagnosis by conventional immunological methods is difficult, although XLAAD is curable by hematopoietic stem cell transplantation. From these points of view, the DNA diagnosis is especially useful for XLAAD.

免疫グロブリン重鎖遺伝子欠損症の一家系

近藤直実 (岐阜大学医学部小児科)
金子英雄 (岐阜大学医学部小児科)
寺田知新 (岐阜大学医学部小児科)
深尾敏幸 (岐阜大学医学部小児科)
浅野勉 (岐阜大学医学部小児科)
伊部正明 (横浜市立大学小児科)
横田俊平 (横浜市立大学小児科)

先天性免疫不全症候群の一つであるIgGのsubclass欠損症は繰り返す肺炎, 中耳炎を特徴とする。私たちは膜型IgG2の変異により正常な膜型IgG2が作られないことが完全IgG2欠損の病因となることを報告してきたが, 今回, 免疫グロブリン重鎖遺伝子欠損によりIgG subclass欠損が生じている家系を本邦ではじめてみいだした。発端者は1歳11ヶ月の女児。血小板減少性紫斑病の精査時にIgG2, IgG4, IgAの低値に気づかれた。1歳時に気管支肺炎に罹患の既往がある。IgM 185 mg/dl, IgG 1062 mg/dl (IgG1 996.1 mg/dl, IgG2<2.4 mg/dl, IgG3 10.4 mg/dl, IgG4<0.15 mg/dl), IgA<6 mg/dl, IgE 0.06 IU/ml)。Southern hybridizationの結果より, 患児ではC α 1, ψ C γ , C γ 2, C γ 4, C ϵ の遺伝子欠失をhomoで有していることがあきらかになった。完全なIgG subclass欠損症ではその病因としてIgG定常部領域の変異もしくは欠失を考慮することが必要と考えられた。

【はじめに】

先天性免疫不全症候群の一つであるIgGのsubclass欠損症は繰り返す肺炎, 中耳炎を特徴とする。IgG subclass欠損症の多くはその原因が不明である。私たちは膜型IgG2の変異により正常な膜型IgG2が作られないことが完全IgG2欠損の病因となることを報告してきた。それ以外に欧米では, 定常部領域の遺伝子欠失により, subclass欠損が生じることが知られていたが, 本邦では今まで報告がなかった。今回, IgG subclass欠損の病態解析を行うなかで, IgGの定常部領域の遺伝子欠失によりIgG subclass欠損が生じている家系を見出した。

【対象と方法】

IgG subclass欠損を示す4症例を対照とした。症例1は血小板減少性紫斑病の精査時にIgG2, IgG4, IgAの低値に気付かれた。症例2は今までに報告してきた完全IgG2欠損症でC γ 2のexon4に1793insG

という変異があり, 正常な膜型IgG2が作られない。症例3は気道感染をくり返す症例でIgG2, IgG4の低値が認められたが, 約2年後にはIgG2, IgG4の上昇がみられた。症例4はIgG2, IgG4, IgAの軽度低下を認める。

好中球から, DNAを抽出した。C γ 2領域にprimerを設定しPCRをおこなった。増幅されたバンドをT-vectorにsubcloningし塩基配列を決定した。

DNAをBamHIで切断後1% Agarose gelに泳動した。C γ 1, C α 2, C ϵ を³²P-dCTPでラベルシプローブとして用いた。C γ 2領域にprimerを設定しPCRをおこなった。

【結果】

まず, C γ 2領域の異常が患児に存在するか, C γ 2領域にprimerを設定しPCRを行った。control DNAと症例2-4は同じ位置にbandが増幅されたが, 症例1では100bp程大きなsizeのbandが増幅され

た(図1)。塩基配列ではこのbandはC γ 3であった。症例1ではC γ 2領域が欠失している可能性が考えられたためSouthern hybridizationをおこなった。C γ 1をprobeにすると、control DNAと症例2-4ではC γ 1-C γ 4、 ψ C γ のバンドが認められたが、症例1では、C γ 2、C γ 4、 ψ C γ のバンドが認められず、homoでこの領域の遺伝子欠失がおこなっていることが明らかになった(図2)。さらに、C α 、C ϵ をプローブとしたところ、C α 1、C ϵ の遺伝子欠失をhomoで有していることが明らかになった(図3,4)。母はheteroでこの欠失を有していた。

【考察】

ヒト免疫グロブリン重鎖は μ 、 δ/γ 3、 γ 1、 ψ ϵ 1、 α 1/ ψ γ 1/ γ 2、 γ 4、 ϵ 、 α 2の順にならんでいる。この領域は遺伝子レベル、タンパクレベルの両者でpolymorphicである。欧米ではこの領域の欠失もしくは重複の報告が散見される。イタリアでの大規模な調査では2.7%がIg定常部領域の欠失をheteroで有していると報告されている。 γ 4遺伝子の重

複は白人の45%にみられるとの報告もある。7つのdeletion patternが報告されており、その領域は20-150kbにわたっている。今回の症例はC α 1- ψ C γ -C γ 2-C γ 4-C ϵ の約150kbの欠失をhomoで有しており、血清IgG2, IgG4, IgA, IgEが低値を示した。

ヒト免疫グロブリン重鎖は γ - γ - ϵ - α がduplicationをおこなった結果2つのsetが並んでいると考えられる。しかし、相同性が高いために減数分裂時に不均等交差がおきやすく遺伝子の重複または欠失が生じやすい。欧米の報告では、homoの欠失は1400-10000人に一人と報告されているが、本邦では今回が初めての報告である。多くの報告がsevereな免疫不全は呈しておらず、他のsubclassにより代償されている可能性もある。この症例でもIgG1 subclassでの肺炎球菌多糖体に対する抗体が正常人より増加しており、代償機構の存在が考えられた。しかし、重鎖遺伝子欠損患者の免疫能を詳細に解析した報告や長期にわたり経過観察された報告はあまりなく、症例の蓄積と解析が必要と

PCR of genomic DNA by C γ 2 primer

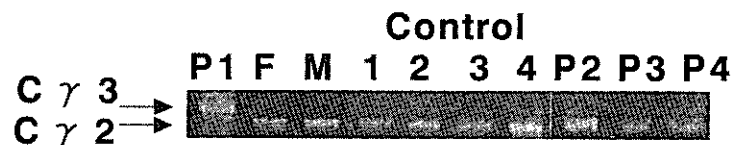


図1

DNA transfer blot analysis for C γ

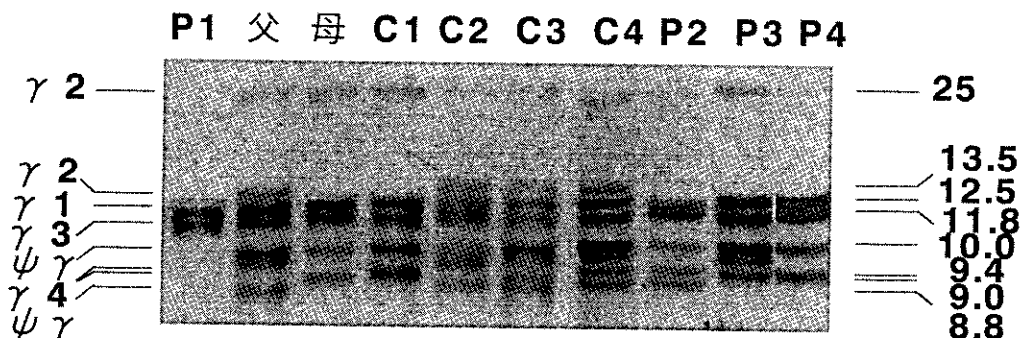


図2

DNA transfer blot analysis for C α

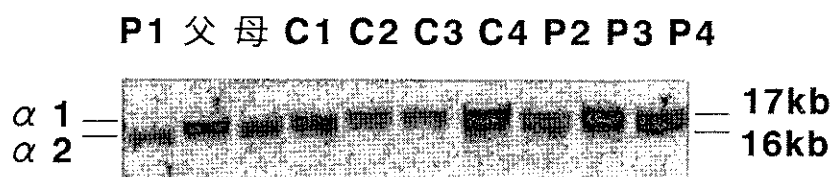


図 3

DNA transfer blot analysis for C ϵ

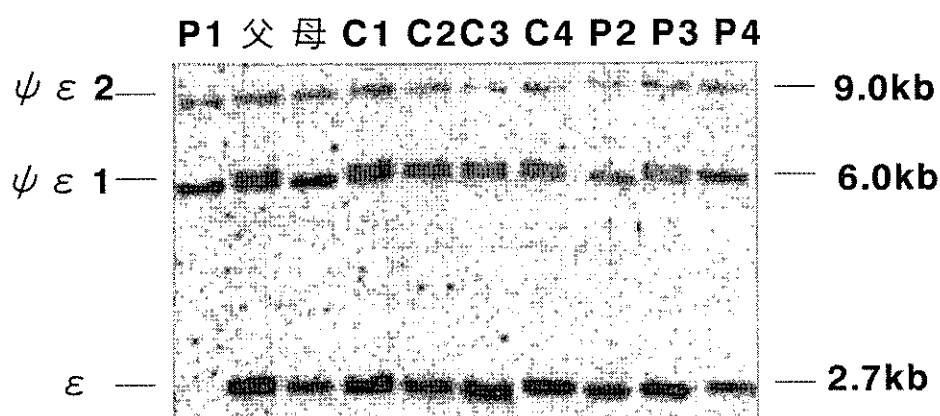


図 4

考えられる。欧米でも想定される頻度の割には報告例がすくなく、見のがされている可能性もある。本邦においても完全なIgG subclass欠損症もしくはIgA欠損症ではその病因としてIgG定常部領域の変異もしくは欠失を考慮することが必要と考えられた。

【参考文献】

1) Tashita H., Fukao T., Kaneko H., Teramoto T., Inoue R., Kasahara K. and Kondo N. Molecular basis of

selective IgG2 deficiency. The mutated membrane-bound form gamma2 heavy chain caused complete IgG2 deficiency in two Japanese siblings. *J. Clin. Invest.* 101: 677-681, 1998.

2) Terada T., Kaneko H., Li A-I., Kasahara K., Ibe M., Yokota S. and Kondo N. Analysis of IgG subclass deficiency. : First reported case of IgG2, IgG4 and IgA deficiency caused by deletion of C α 1, ψ C γ 1, C γ 2, C γ 4 and C ϵ in a Mongoloid patient. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 602-6, 2001

Analysis of Ig subclass deficiency: First reported case of IgG2, IgG4, and IgA deficiency caused by deletion of $C\alpha 1$, $\psi C\gamma$, $C\gamma 2$, $C\gamma 4$, and $C\epsilon$ in a Mongoloid patient.

Naomi Kondo, Hideo Kaneko, Tomoyoshi Terada, Ai Lian Li, Kimiko Kasahara, Masaaki Ibe, Shumpei Yokota

Department of Pediatrics, Gifu University School of Medicine and

Department of Pediatrics, Yokohama City University School of Medicine

The cause of Ig class or subclass deficiencies has been unclear except for IgH gene deletions and a homozygous 1-base insertion (1793insG) in $C\gamma 2$ exon 4 of IgG2 deficiency. In addition, there are no reports that IgH gene deletions are found in patients who are Mongoloid (a category that includes most of the people of Asia, such as the Japanese, Chinese, Indonesians and Malaysians). To investigate the cause of Ig subclass deficiency, we extensively investigated 4 Japanese patients with low serum IgG2 levels. Patient 1 was a 23-month-old girl whose serum

IgG2, IgG4, and IgA levels were under the detection limits; she also had idiopathic thrombocytopenic purpura. Patient 2 was a 5-year-old boy whose serum IgG2 level was under the detection limit. Patient 3 was a 14-month-old boy whose serum IgG2 and IgG4 levels were under the detection limits. Patient 4 was 3-year-old girl whose IgG2 level was low and whose IgA level was under the detection limit. DNA was extracted from neutrophils, and Southern blot analysis was performed.

Southern blot analysis revealed that patient 1 had lost the $C\alpha 1$, $\psi C\gamma$, $C\gamma 2$, $C\gamma 4$, and $C\epsilon$ genes and was a homozygous carrier of the deletion described above. Her mother was of the heterozygous genotype. DNA from patients 2, 3, and 4 revealed no deletions in comparison with control DNA. This is a report of the first case of a Mongoloid in whom IgG2, IgG4, and IgA deficiency was caused by deletion of $C\alpha 1$, $\psi C\gamma$, $C\gamma 2$, $C\gamma 4$, and $C\epsilon$. Our finding contributes to investigations of Ig subclass deficiency.

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 (PLC γ 2) の活性化機構

塚 田 聡 (大阪大学医学部分子病態内科)
渡 邊 大 (大阪大学医学部分子病態内科)

無ガンマグロブリン血症 (XLA) の責任遺伝子である Btk は B 細胞抗原レセプター (BCR) のシグナル伝達に機能しており, 特にカルシウムのシグナルの主要経路に位置しているが, そのキーポイントであるホスホリパーゼ γ 2 (PLC γ 2) が Btk によって活性化されるメカニズムは明らかではなかった。本研究では Btk による PLC γ 2 のリン酸化を解析し, B 細胞における PLC γ 2 の活性化機構を検討した。

はじめに

無ガンマグロブリン血症 (XLA) の責任遺伝子である Btk の B 細胞抗原レセプター (BCR) のシグナル伝達における機能に関しては最近数年間で多くの知見が得られてきた。その内でも重要な知見は, Btk がアダプター分子 BLNK を介して BCR にリンクしたカルシウム (Ca) のシグナルの主要経路に位置しているということである (1, 2)。BCR のクロスリンク後, 一過性に細胞内の小胞体 (ER) からの Ca の動員が生じ, それが引き金となって細胞膜上の Ca チャンネルが開き細胞外から Ca が流入する。その結果生じる細胞内 Ca 濃度の上昇は多くの分子の転写誘導や活性化を引き起こす。BCR 刺激後に生じる ER からの Ca の動員にはホスホリパーゼ γ 2 (PLC γ 2) の活性化が必要であり, PLC γ 2 によって生じたイノシトール 1, 4, 5 三リン酸 (IP3) が ER 上の IP3 レセプターに結合することによって ER からの Ca の流出が始まる。そして Btk はこの PLC γ 2 の活性化に必要であることが明らかになった。そのメカニズムとして, まず, BCR のクロスリンク後チロシンキナーゼ Syk が活性化され, アダプター分子 BLNK をリン酸化する。そのリン酸化 BLNK に Btk が (その SH2 ドメインを介して) 結合する。また, PLC γ 2 もその SH2 ドメインを介してリン酸化 BLNK と結合し, BLNK 上で接近した Btk (および Syk あるいは他のキナーゼ?) が PLC γ 2 を

活性化することが推定された (3)。

しかし, 実際に PLC γ 2 をリン酸化するチロシンキナーゼが Btk なのか, また PLC γ 2 のリン酸化が直接その酵素活性の上昇を意味しているのか等の問題は解決されていなかった。本研究ではそれらの問題を解決するために, Btk による PLC γ 2 の活性化機構を解析した (4)。

材料と方法

in vitro での Btk による PLC γ 2 のチロシンリン酸化部位は以下のふたつの方法で決定した。

1. PLC γ 2 の全配列をカバーし, かつオーバーラップする 15 個の GST 融合蛋白質を作成し, 精製 Btk を酵素源として *in vitro* kinase assay を行い, チロシンリン酸化部位を含む領域を同定した。
2. 同定した領域に存在するチロシン残基の各「X」をフェニルアラニンに置換した変異 GST 融合蛋白質を作成し, それらのチロシンリン酸化を検討することによってリン酸化される残基を決定した。PLC γ 2 欠損 DT40 細胞は黒崎知博博士 (関西医科大学) より供与された。細胞内カルシウムの動員, IP3 産生, および *in vitro* phospholipase activity assay は常法 (4) により行った。

結果と考察

1. Btk による PLC γ 2 のチロシンリン酸化部位の決定

共発現系やin vitroにおいてはSykよりBtkのほうがPLC γ 2をはるかに強くチロシンリン酸化する。このことはSykではなく、BtkがPLC γ 2をリン酸化することを意味していると考えられる。PLC γ 2の活性化におけるチロシンリン酸化の意義を検討するために、in vitroでのBtkによるPLC γ 2のチロシンリン酸化部位を決定した。その部位はSH2 とSH3のリンカーに存在するY753とY759、C末端領域に存在するY1197とY1217の4つのチロシン残基であった(図1)。次にこれらのチロシン残基の各々(Y753F, Y759F, Y1197F, Y1217F)あるいは全て(Y-4F)をフェニルアラニンに置換した変異PLC γ 2をPLC γ 2欠損DT40細胞に導入し、BCRクロスリンク後のPLC γ 2のチロシンリン酸化、細胞内カルシウム動員、およびIP $_3$ 産生を検討した。PLC γ 2 (Y-4F)を発現させた細胞ではwild typeのPLC γ 2 (WT)を発現させた細胞と比べ、BCR刺激によるPLC γ 2のチロシンリン酸化がほぼ消失し(図2A)、細胞内カルシウム動員もわずかにみられるのみで(図2B)、刺激後の細胞内におけるIP $_3$ 産生量も減少していた(図2C)。また、それぞれのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異PLC γ 2 (Y753F, Y759F, Y1197F, Y1217F)発

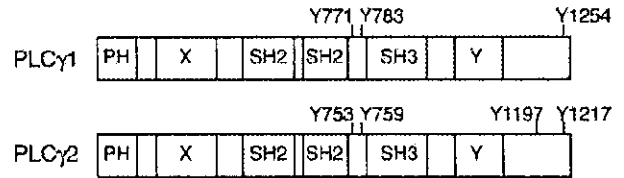


図1. PLC γ のチロシンリン酸化部位

XおよびYは酵素活性領域、PH, SH2, SH3 ドメインはそれぞれpleckstrin homology, Src homology 2, Src homology 3 ドメイン。PHドメインはPIP $_3$ との、SH2ドメインはチロシンリン酸化されたBLNKとの相互作用を有する。Yはリン酸化されるチロシン残基を示している。 γ 1と γ 2においてSH2とSH3のリンカー領域はある程度アミノ酸配列が保存されているが、C末領域はhomologyを認めない。

現細胞においても、細胞内カルシウム動員とIP $_3$ 産生はwild typeのPLC γ 2を発現させた細胞と比べ有意に減少していた。特にC末端領域にあるY1197とY1217が重要であった。以上のことからこれら4つのチロシン残基のリン酸化はPLC γ 2の活性化に必要であることがわかった。

2. チロシンリン酸化によるPLC γ 2の活性化

上記の変異PLC γ 2を用いてその活性化におけるチロシンリン酸化の役割を検討した。Y-4FおよびWTを発現させた細胞のBCRをクロスリンクした後

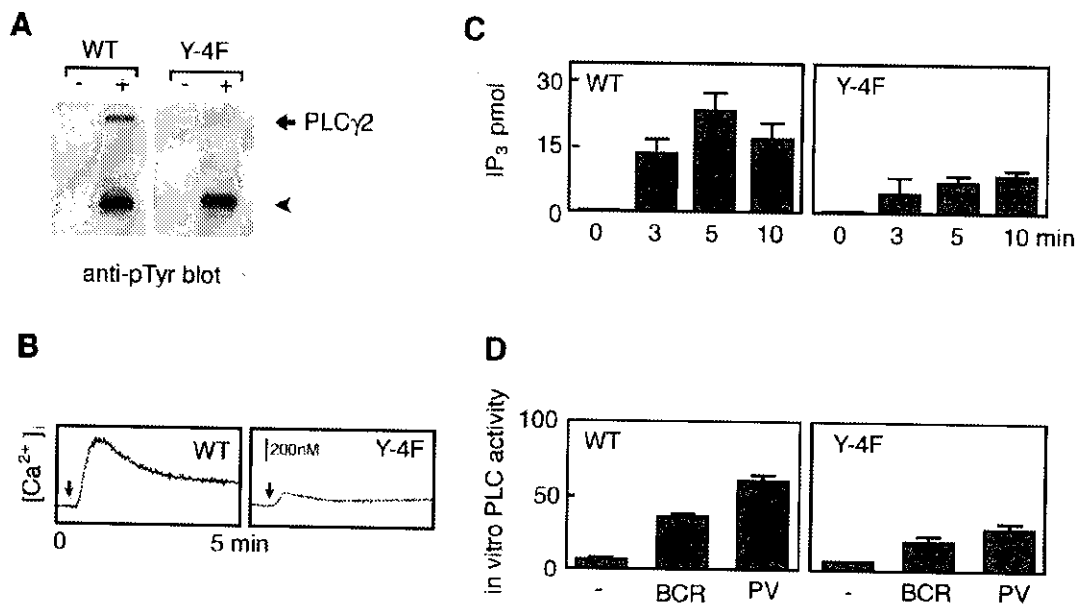


図2. BCR刺激によるWTとY-4FのPLC γ 2のリン酸化と活性化

A: BCR刺激によるWTおよびY-4Fのチロシンリン酸化。矢頭は共沈したBLNKを示している。B, C: WTおよびY-4Fを発現させた細胞におけるBCR刺激による細胞内カルシウム動員とIP $_3$ 産生。D: BCRもしくはpervanadate (PV) 刺激によるin vitroでのphospholipase活性。

そのPLC γ 2を精製し、in vitro phospholipase活性を測定したところ、Y-4FではWTの約50%程度の酵素活性しか認めなかった(図 2D)。以上のin vitroの結果からはチロシンリン酸化が直接PLC γ 2の活性化を導いていると考えられるが、その関与は50%程度で、他の活性化機構も存在することを示唆している。Y-4Fにおいてもアダプター分子であるBLNKとの結合が認められ(図 2A)、精製過程においてもPLC γ 2とBLNKは解離せず結合したままのため、このような分子の蛋白相互作用によっても活性化を受けている可能性もある。しかし、細胞内カルシウム動員をみるかぎりではチロシンリン酸化以外の活性化機構が存在しても、その貢献度はわずかであろう。

3. PLC γ 2とPLC γ 1の比較

PLC γ には γ 1と γ 2が存在し、 γ 1は多くの細胞でその発現が認められるが、 γ 2は血球系の一部の細胞にのみ発現がみられ、B細胞においてはPLC γ 2の発現が主体である。ラットのPLC γ 1は1290のアミノ酸配列、 γ 2は1265のアミノ酸配列からなり、その構造は図 1 になっている。このなかでXおよびYドメインが酵素活性を示す領域で、他のドメインは蛋白や脂質分子との相互作用を有している。受容体型チロシンキナーゼ(EGF受容体・PDGF受容体)によるPLC γ 1のリン酸化部位はY771, 783, 1254と報告されている(5)。受容体型チロシンキナーゼであるEGF受容体によってin vivoおよびin vitroでPLC γ 1をリン酸化させても、in vitroでのphospholipase活性は上昇することから、チロシンリン酸化自身がおそらく蛋白の構造変化をもたらし、基質であるPIP2の認識の違いで酵素活性の上昇を引き起こしていると考えられている。本研究で同定されたPLC γ 2のリン酸化部位をPLC γ 1におけるそれと比較すると(図 1) 場所的には類似性がある。ただし周辺配列の相同性は低い。また、PLC γ 2の4つのチロシン残基はその各々のリン酸化が活性を増強させると結論されたが、PLC γ 1の場合はY783およびY1254のリン酸化は活性を増強させるがY771のリン酸化は逆に活性を低下させると報告されている(5)。

以上の結果をまとめると、BCRの刺激によりPLC γ 2のY753, 759, 1197, 1217がリン酸化を受け、チロシンリン酸化により直接酵素活性が上昇し、細胞内カルシウム動員がおこると考えられる。以前から指摘されていた問題点のひとつに、PLC γ 2をリン酸化するのはSykなのかBtkなのかという問題があった。Btkによるin vitroでのリン酸化部位が、BCR刺激に伴う主要なリン酸化部位と一致したことから、BCR刺激後にPLC γ 2をリン酸化する最も主要なキナーゼはBtkであると思われる。ただしY759はBtkによるin vitroでのリン酸化が非常に弱く、さらに細胞内カルシウム動員における役割もそれほど重要ではなかった。In vitroの系ではSykはC末端部分はリン酸化しなかったものの、このY759をふくむSH2とSH3のリンカー領域をリン酸化するため、Sykも細胞内でPLC γ 2をリン酸化すると思われる。しかし、Btk欠損DT40細胞で報告されているように、Syk単独によるPLC γ 2のリン酸化ではPLC γ 2は活性化には至らない。SykはPLC γ 2を直接リン酸化するよりも、BLNKをリン酸化することによりBLNKとPLC γ 2の結合、BtkによるPLC γ 2のリン酸化をうながすのに必要なのであろう。

おわりに

PLC γ 1のチロシンリン酸化に関する研究は90年代の初めに行われたが、一方、PLC γ 2についてはそれに遅れること約10年でチロシンリン酸化部位が決定された。PLC γ 2をチロシンリン酸化するキナーゼが不明であったために、その部位の同定が遅れたのであろうと思われる。今回のPLC γ 2のチロシンリン酸化部位の決定によって、PLC γ 2の活性化機構が明らかになったのみならず、Btk-PLC γ 2経路の重要性もより確立されたものになったと思われる。

参考文献

- 1) Tsukada, S., Baba, Y. & Watanabe, D.: Btk and BLNK in B cell development. *Adv Immunol*, 77:123, 2001.
- 2) Kurosaki, T. & Tsukada, S.: BLNK: connecting Syk

- and Btk to calcium signals. *Immunity*, 12:1, 2000.
- 3) Hashimoto, S., Iwamatsu, A., Ishiai, M., et al.: Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK-functional significance of Btk-SH2 domain in B-cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *Blood*, 94:2357, 1999.
- 4) Watanabe, D., Hashimoto, S., Ishiai, M., et al.: Four tyrosine residues in phospholipase C- γ 2, identified as Btk-dependent phosphorylation sites, are required for B cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *J Biol Chem*, 276:38595, 2001.
- 5) Kim, H.K., Kim, J.W., Zilberstein, A., et al.: PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC- γ 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell*, 65:435, 1991.

Molecular mechanism of Btk-dependent PLC γ 2 activation

Satoshi Tsukada and Dai Watanabe

Department of Molecular Medicine, Osaka University Medical School

Activation of phospholipase C- γ 2 (PLC γ 2) is the critical step in B cell antigen receptor (BCR)-coupled calcium signaling. While genetic dissection experiments on B cells have demonstrated that Bruton's tyrosine kinase (Btk) and Syk are required for activating PLC γ 2, the exact activation mechanism of PLC γ 2 by these kinases has not been established. In the present study, we identify the tyrosine residues 753, 759, 1197, and 1217 in rat PLC γ 2 as Btk-dependent phosphorylation sites by using an in vitro kinase assay. To evaluate the role of these tyrosine residues in phosphorylation-dependent activation of PLC γ 2, PLC γ 2-deficient DT40 cells were reconstituted with a series of mutant PLC γ 2 in which the phenylalanine was substituted for tyrosine. Substitution of all the four tyrosine residues almost completely eliminated the BCR-induced PLC γ 2 phosphorylation, indicating that these residues include the major phosphorylation sites upon BCR engagement. Cells expressing PLC γ 2 with a single substitution exhibited some extent of reduction in calcium mobilization, whereas those expressing quadruple mutant PLC γ 2 showed greatly reduced calcium response. These findings indicate that the phosphorylations of the tyrosine residues 753, 759, 1197, and 1217, which have been identified as Btk-dependent phosphorylation sites in vitro, coordinately contribute to BCR-induced activation of PLC γ 2.

X連鎖無 γ -グロブリン血症の診断における国際協力

王 悦 (富山医科薬科大学小児科)

金 兼 弘 和 (富山医科薬科大学小児科)

宮 脇 利 男 (富山医科薬科大学小児科)

Eun-Kyeong Jo (Chungnam National University)

Ozden Sanal (Hacettepe University)

Maria Marluce dos Santos Vilela (State University of Campinas)

X連鎖無 γ -グロブリン血症 (XLA) は最も多く見られる先天性免疫不全症のひとつであり、ブルトンズ・チロシン・キナーゼ (BTK) 遺伝子変異によって起る。われわれはフローサイトメトリーによるXLAの患者・保因者診断を開発したが、今回フローサイトメトリーならびに遺伝子解析により韓国、トルコ、ブラジルにおけるXLAの診断に関する国際協力を行い、22家系のXLAを診断した。Non-XLAにおいて常染色体劣性無 γ -グロブリン血症の診断のため、 μ 重鎖、 $\lambda 5/14.1$, $Ig\alpha$ 遺伝子について調べたところ、8歳のトルコ男児において世界で第2例目となる $Ig\alpha$ 欠損症を同定した。

International collaboration study in the diagnosis of X-linked agammaglobulinemia

Yue Wang¹, Hirokazu Kanegane¹, Toshio Miyawaki¹, Eun-Kyeong Jo², Ozden Sanal³, and Maria Marluce dos Santos Vilela⁴

¹) Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, ²) Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University, ³) Division of Immunology, Children's Hospital, Hacettepe University, and ⁴) Department of Pediatrics and Center for Pediatric Research, School of Medicine, State University of Campinas

Abstract

X-linked agammaglobulinemia (XLA) caused by the mutations in Bruton's tyrosine kinase (*BTK*) gene is the commonest form of inherited antibody deficiencies. We previously described that a flow cytometric evaluation of BTK expression in monocytes could easily detect XLA as well as its carriers. By using a flow cytometric assay combined with genetic analysis, we have attempted to search for XLA patients in other countries through international collaborations. This report is the first study of BTK deficiency in Korea, Turkey, and Brazil, in which we identified a total of 22 unrelated XLA families. We further studied μ heavy chain, $\lambda 5/14.1$, and $Ig\alpha$ gene to search for autosomal recessive agammaglobulinemia out of non-XLA patients, and we found a novel mutation in $Ig\alpha$ gene in a 8-year-old Turkish boy, who might be the second case with $Ig\alpha$ deficiency.

Introduction

X-linked agammaglobulinemia (XLA) is the humoral immunodeficiency first described by Bruton in 1952, and it is clinically characterized by an early onset of bacterial infections and an absence of mature B cells. The gene responsible for XLA was identified as Bruton's tyrosine kinase (*BTK*) by Tsukada, et al, and Vetrie, et al in 1993, and the genetic analysis were performed in many countries including Japan. Approximately 90% of patients with presumed XLA was found to have defects in *BTK* gene, and about 5-10% of patients might be caused by defects in μ heavy chain, λ 5/14.1, $Ig\alpha$, *BLNK*, or other genes. We established a flow cytometric detection of XLA patient and its carrier by using anti-*BTK* monoclonal antibody.¹⁾ Our efforts are the first identification of XLA by a flow cytometric assay combined with a genetic analysis in Korea, Turkey, and Brazil through the international collaboration studies.

Patients and methods

Twelve Korean hypogammaglobulinemic males (from 7 unrelated families), sixteen Turkish hypogammaglobulinemic males (from 13 unrelated families), and thirteen Brazilian hypogammaglobulinemic males (from 12 unrelated families) with a lack of circulation B cells (<1%) were enrolled in this study. We performed flow cytometric detection of *BTK* protein in monocytes in Korea and Brazil. *BTK* protein deficiency indicated an XLA patient, and the mutation in *BTK* gene was identified by the direct sequencing method with automatic DNA sequencer. In Turkish patients, the mutation in *BTK* gene was identified by PCR-SSCP and sequencing. To search for autosomal recessive agammaglobulinemia, PCR-SSCP for μ heavy chain, λ 5/14.1, and $Ig\alpha$ genes were also performed in non-XLA patients.

Results and discussion

We detected mutations in the *BTK* gene in 7 families in Korea²⁾ (Table 1), 9 families in Turkey³⁾ (Table 2), and 6 families in Brazil (Table 3), in which 12 novel *BTK* mutations were identified.

Out of the remaining families with non-XLA, an 8-year-old Turkish boy was found to have a novel mutation in $Ig\alpha$ gene.⁴⁾ PCR-SSCP for μ heavy chain, λ 5/14.1, and $Ig\alpha$ gene were carried out in the remaining families with non-XLA. Neither patients had any mutations in the μ heavy chain and λ 5 gene, however an abnormal mobility was detected on a gel by running exon 2 of $Ig\alpha$ gene. The direct sequencing of $Ig\alpha$ gene exon 2 revealed that he had a homozygous

Table 1 *BTK* mutations detected in Korean patients

Patient No.	Nucleotide aberration	Amino acid aberration	Protein domain	<i>BTK</i> %
P1-1	IVS1+5G>A	regulatory defect	Untranslated	18.5
P1-2	IVS1+5G>A	regulatory defect	Untranslated	NT
P2-1	IVS18+1G>T	splice-donor defect	Kinase	0.9
P2-2	IVS18+1G>T	splice-donor defect	Kinase	NT
P3-1	314T>C	I61T	PH	2.3
P3-2	314 T>C	I61T	PH	2.7
P3-3	314 T>C	I61T	PH	0.9
P4-1	IVS6+5G>A	splice-donor defect	TH	1.4
P4-2	IVS6+5G>A	splice-donor defect	TH	1.4
P5	710delAGGG	K237delX275	SH3	1.4
P6	160delG	G54X56	PH	2.3
P7	980bp del	Exon10 skipping	SH3	0.9

Bold letters indicate novel mutations.

Table 2 *BTK* mutations detected in Turkish patients

Patient No.	Nucleotide aberration	Amino acid aberration	Protein domain
P1	248A>G	Y39C	PH
P2	1800-1821del(22nt)	G556delX562	SH1
P3	1843-1847del(5nt)	Y571delX577	SH1
P4-1	1288-1292del(5nt)	S386delX396	SH1
P4-2	1288-1292del(5nt)	S386delX396	SH1
P5	1159C>T	Q343X	SH2
P6	215G>A	R28H	PH
P7	IVS9+5A>G	exon 9 skip	SH3
P8-1	1882G>A	G584R, exon 17 skip	SH1
P8-2	1882G>A	G584R, exon 17 skip	SH1
P9-1	291delG	K53delX56	PH
P9-2	291delG	K53delX56	PH

Bold letters indicate novel mutations.

Table 3 *BTK* mutations detected in Brazilian patients

Patient No.	Nucleotide aberration	Amino acid aberration	BTK (%)	Mother pattern (%)
P1	T1634>C	M501T	13.3	Mosaic (39.8)
P2	C718>T	Q196X	9.0	Mosaic (22.4)
P3-1	G1970>A	G613D	25.6	Mosaic (51.1)
P3-2	G1970>A	G613D	70.2	Mosaic (58.5)
P4	A251>G	251-273del	9.0	Mosaic (53.8)
P5	G215>T	R28L	26.3	Mosaic (49.0)
P6	IVS15+1G>C	1482-1763del	4.4	Not examined

Bold letters indicate novel mutations.

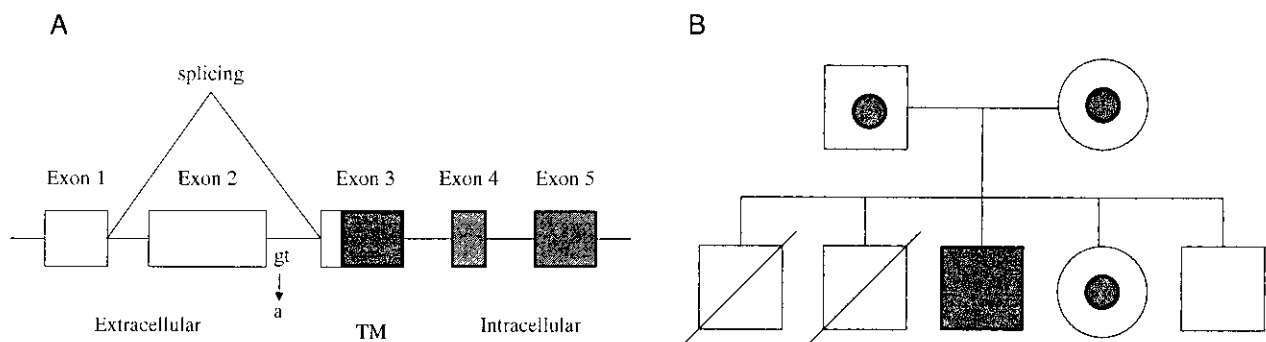


Fig. 1 Identification of a mutation in the $Ig\alpha$ gene

A Schematic diagram of genomic structure of $Ig\alpha$ and skipping of exon 2. Open area indicates the extracellular region, filled area indicates the transmembrane region (TM), and hatched area indicates intracellular region.
 B Pedigree of the patient's family. His elder brothers died of infections in early infancy.

substitution at a splice donor site intron 2 (IVS2+1G>A). Although cDNA from the patient was not available, the homozygous splice donor site alteration might cause skipping of exon 2, and might result in the truncation of $Ig\alpha$ upstream of transmembrane domain (Figure 1A). The sequences of the patient's family members indicated that his father, mother and sister displayed G and A heterozygotes suggesting that they were heterozygous carriers, and his brother is normal (Figure 1B). The patient is the second case of $Ig\alpha$ deficiency in the world, and his mutation was distinctive from the first case of $Ig\alpha$ deficiency.⁵⁾

Through our international collaboration studies, a flow cytometric assay and genetic analysis for the diagnosis of XLA were available in Korea, Turkey, and Brazil. In addition, the identification of the second case of $Ig\alpha$ deficiency suggests that $Ig\alpha$ gene play a critical role in human B cell development. Furthermore, the genetic diagnosis of other primary immunodeficiencies would be applicable in these countries.

References

- 1) Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, Hashimoto S, Kunikata T, Arai S, et al. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood* 91:595-602, 1998.
- 2) Jo EK, Kanegane H, Nonoyama S, Tsukada S, Lee JH, Lim K, et al. Characterization of mutations, including a novel regulatory defect in the first intron, in Bruton's tyrosine kinase gene from seven Korean X-linked agamma-

globulinemia. *J Immunol* 167:4038-45, 2001.

- 3) Wang Y, Kanegane H, Sanal O, Ersoy F, Tezcan I, Futatani T, et al. Bruton tyrosine kinase gene mutations in Turkish patients with presumed X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat* 18:356, 2001.
 - 4) Wang Y, Kanegane H, Sanal O, Tezcan I, Ersoy F, Futatani T, et al. A novel Ig α (CD79a) gene mutation in a Turkish patient with B cell-deficient agammaglobulinemia. *Am J Med Genet* in press.
 - 5) Minegishi Y, Coustan-Smith E, Rapalus L, Ersoy F, Campana D, Conley ME. Mutations in Ig α (CD79a) result in a complete block in B-cell development. *J Clin Invest* 104:1115-21, 1999.
-

低 γ -グロブリン血症におけるSAP遺伝子変異

金 兼 弘 和 (富山医科薬科大学小児科)
王 悦 (富山医科薬科大学小児科)
宮 脇 利 男 (富山医科薬科大学小児科)
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)

当教室ではフローサイトメトリーならびに遺伝子解析によりわが国のX連鎖無 γ -グロブリン血症 (XLA) を100家系以上診断し、末梢血B細胞を欠損した低 γ -グロブリン血症の男性例の約9割がXLAであることを明らかにした。B細胞の存在する低 γ -グロブリン血症の原因はさまざまであるが、男性例では高IgM症候群ならびにX連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) の可能性がある。今回8歳時より分類不能型免疫不全症としてフォローされていた12歳男児例とその弟においてXLPの責任遺伝子であるSAP遺伝子変異を同定したので、報告する。

【はじめに】

低 γ -グロブリン血症は最も頻度の多い免疫不全症であるが、その原因はさまざまである。正確な診断ならびに遺伝カウンセリングのためには遺伝子診断が必要であるが、遺伝子診断は時間と労力がかかり、低 γ -グロブリン血症のスクリーニングとしては必ずしも適切ではない。当教室ではフローサイトメトリーを利用して図1に示すようなアプローチにて低 γ -グロブリン血症の病型診断を行っており、1998年から2001年の4年間でわが国において101例86家系のX連鎖無 γ -グロブリン血症 (XLA) を新たに診断した。そしてB細胞欠損の低 γ -グロブリン血症の男性例の約90%は年齢を問わずXLAであることを報告した¹⁾。低 γ -グロブリン血症の男性例では分類不能型免疫不全症 (CVID) や高IgM症候群はいうまでもなく、X連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) の可能性も考えなければならない。最近CVIDとして考えられていた症例においてXLPの責任遺伝子であるSAPまたはSH2D1A変異を認めたとの報告がなされたが^{2,3)}、私たちが最近これまでCVIDとしてフォローされていた症例においてSAP変異を同定したので、ここに報告する。

【対象と方法】

<症例>

症例1: 12歳, 男児

主訴: 低 γ -グロブリン血症

家族歴: 易感染性なし

既往歴: DPT, ポリオ, 風疹, 日本脳炎, BCGの予防接種を行うも特に問題なし。麻疹, 水痘, ムンプスに罹患するも経過は普通。5歳時に肺炎, 6歳時に気管支炎にて入院したが, 入院経過は特に変わりなし。

現病歴: 7歳時に肺炎にて紹介医に入院した際に, 低 γ -グロブリンを指摘され, 精査目的にてN大学病院に紹介入院となった。

検査所見: WBC 9600/ μ l (St 2% Seg 38% Lym 48% Mo 8% Eo 3% Ba 1%), RBC 508 \times 10⁴/ μ l, Hgb 12.3 g/dl, Ht 38.2%, Plts 39.2 \times 10⁴/ μ l, TP 6.1 g/dl (Alb 74.4% α 1 4.1% α 2 12.2% β 9.3% γ 0%), CRP 3.22 mg/dl, C3 98.4 mg/dl, C4 38.8 mg/dl, IgG 2.21 mg/dl, IgA 13.0 mg/dl, IgM 55.2 mg/dl, IgD <1.0 mg/dl, IgE 2 IU/ml, CD3 73.4% CD4 44.8%, CD8 28.5%, HLA-DR 30.9%, CD19 21.4%, CD20 24.8%, sIgG 8.9%, sIgM 10.5%, sIgA 4.4%, sIgD 10.6%, κ 6.4%, λ 6.0%, IgG抗体価 風疹 2.7未満, 麻疹 75未満, ムンプス230未満

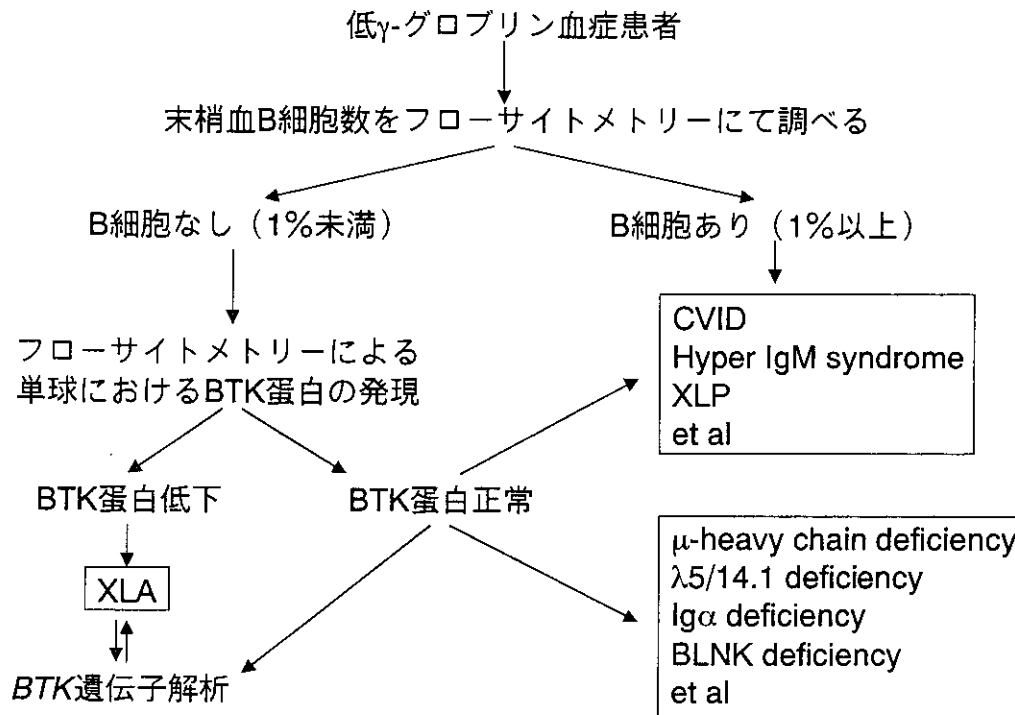


図 1. 低γ-グロブリン血症に対する診断アプローチ
当教室で行っている低γ-グロブリン血症の診断アプローチを示す。

水痘 28未満, PHA 44952 cpm (26000-53000), ConA 33836 cpm (20000-48000), SAC1 7602 cpm (Control 239 cpm), PWM 11888 cpm (Control 239 cpm), カンジダ抗体 (-), ジフテリア抗体 0.002以下, 破傷風抗体 0.02以下 EBV抗体価 VCA IgG 20倍 VCA-IgM 10倍未満 EBNA 10倍

入院後経過：末梢血にB細胞が存在していることより，CVIDと診断され，γ-グロブリン置換療法を4週毎に行っていた。

症例2：10歳，男児

主訴：低γ-グロブリン血症

家族歴：兄（症例1）が低γ-グロブリン血症

既往歴：DPT，ポリオ，麻疹，BCGの予防接種を行うも特に問題なし。水痘に罹患するも経過は普通。1歳時に微熱が1ヶ月以上続いたが，原因不明。

現病歴：7歳時に肺炎にて紹介医に入院した際に，低γ-グロブリン血症を指摘され，N大学病院を紹介受診となった。

検査所見：WBC 12800/μl (St 1% Seg 57% Lym 32% Mo 7% Eo 2% Ba 1%), RBC 480×10⁴/μl, Hgb 12.8 g/dl, Ht 38.1%, Plts 28.6×10⁴/μl, TP 6.6 g/dl (Alb

69.4% α1 3.1% α2 9.3% β 10.9% γ 7.3%), CRP 0.27 mg/dl, C3 77.0 mg/dl, C4 25.9 mg/dl, IgG 552 mg/dl, IgA 188 mg/dl, IgM 153 mg/dl, IgE 0 IU/ml, CD3 70.7% CD4 42.9%, CD8 27.9%, CD22 24.7%, CD20 24.8%, sIgG 8.9%, sIgM 10.5%, CD40 23.0%, CD40L 0.1% EBV抗体価 VCA IgG 320倍 VCA-IgM 10倍未満 EBNA 10倍

経過：現在特に臨床症状を認めないため，γ-グロブリン置換療法は行っていない。

<フローサイトメトリーによるSAP蛋白の発現>

患者ならびに患者家族よりインフォームドコンセントを得てヘパリン加静脈血を採取し，単核球を分離した。PHA-P 5 μg/mlとrIL-2 50 U/mlを加えて5日間刺激培養を行った後にハーベストを行った。細胞内BTK蛋白の染色法に準じて¹⁴⁾，細胞内SAP蛋白の染色を行った。すなわち細胞を4%パラホルムアルデヒドにて固定後，トライトン-Xにて細胞膜透過性を高め，当教室で樹立された抗SAPラットモノクローナル抗体 (KST-3) にて1次染色を行った。洗浄後，FITC標識抗ラットIgG抗体にて2次染色を行い，洗浄後，EPICS XLフロー

トメーターにて解析を行った。

<SAP遺伝子解析>

患者ならびに患者家族由来の末梢血単核球よりゲノムDNAを抽出した。エキソン1～4をそれぞれPCR増幅を行い、Gene Exel 12.5/24ポリアクリルアミドゲルを用いてSSCPを行った。移動度に異常が認められたバンドについてはPCR産物を精製し、PCR増幅に用いたものと同じプライマーにてダイレクトシーケンスを行い、ABI PRISM 310 DNAシーケンサーにて塩基配列を決定した。

【結果】

活性化T細胞における細胞内SAP蛋白の発現をフローサイトメトリーにて調べたところ、父親は正常と同程度に強く発現していたが、症例1, 2ともに正常に比べてその発現は弱くXLPが強く疑われた(図2)。母親ならびに姉は正常と症例1, 2の中間レベルの発現を示し、保因者である可能性が考えられた。

次にPCR-SSCPを行ったところ、SAP遺伝子のエ

キソン1において症例1, 2では明らかに正常と異なる移動度を示し、エキソン1内における変異が示唆された(図3)。母親と姉は正常と患者のヘテロのパターンを示し、保因者であることが示唆された。ダイレクトシーケンスを行ったところ、症例1, 2では34番目のセリンがグリシンに置換したミスセンス変異(S34G)を認めた。SAP遺伝子の29～34残基のYLLRDSは相同するAblのリン酸化チロシン結合部位であるFLVRES配列に一致する。よってS34G変異によってリン酸化チロシンが結合できなくなり、SAPを介するシグナルが下流に伝わらなくなると考えられる。また母親と姉は同部位のヘテロ接合体であり、保因者と診断された。

症例1のその後の臨床経過であるが、平成13年10月7日より、腰痛、微熱を認め、紹介医にて腹部CTを施行したところ、傍大動脈、骨盤腔内リンパ節の増大を認めたため、N大学病院に紹介入院となった。11月に腹部リンパ節生検を行うも、壊死性変化のみであり、悪性所見は認めなかった。しかし12月になり、汎血球減少ならびにフェリチ

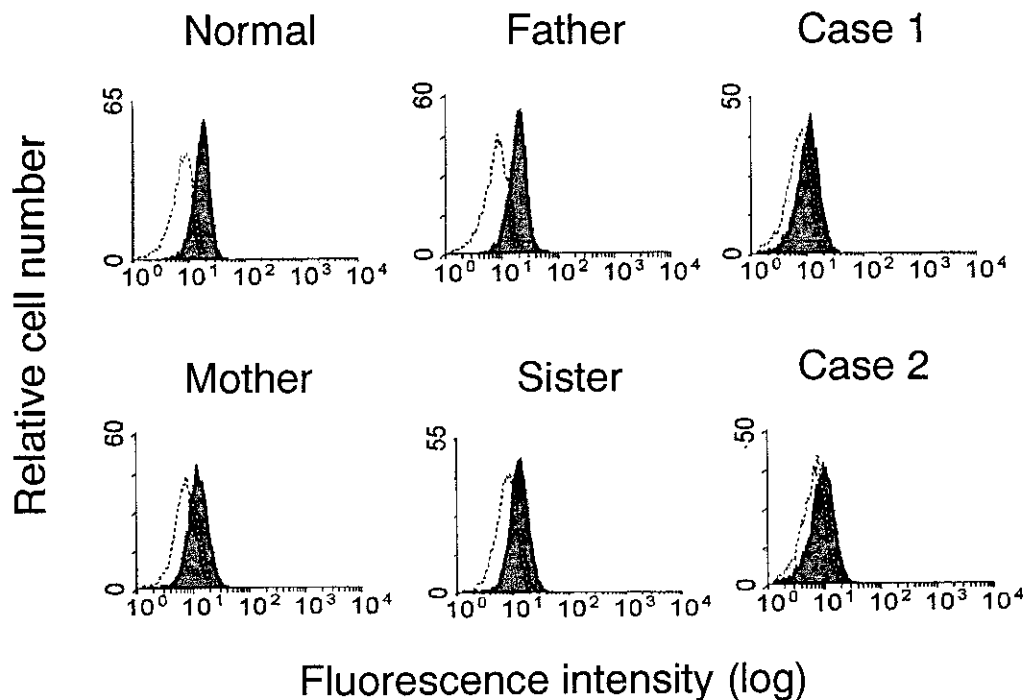


図2. フローサイトメトリーによるT細胞内SAP蛋白の発現

活性化T細胞を固定後、細胞膜透過性を高め、抗SAPラットモノクローナル抗体で染色し、さらにFITC標識2次抗体で染色し、フローサイトメトリーにて解析した。点線はコントロール抗体による染色を示す。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

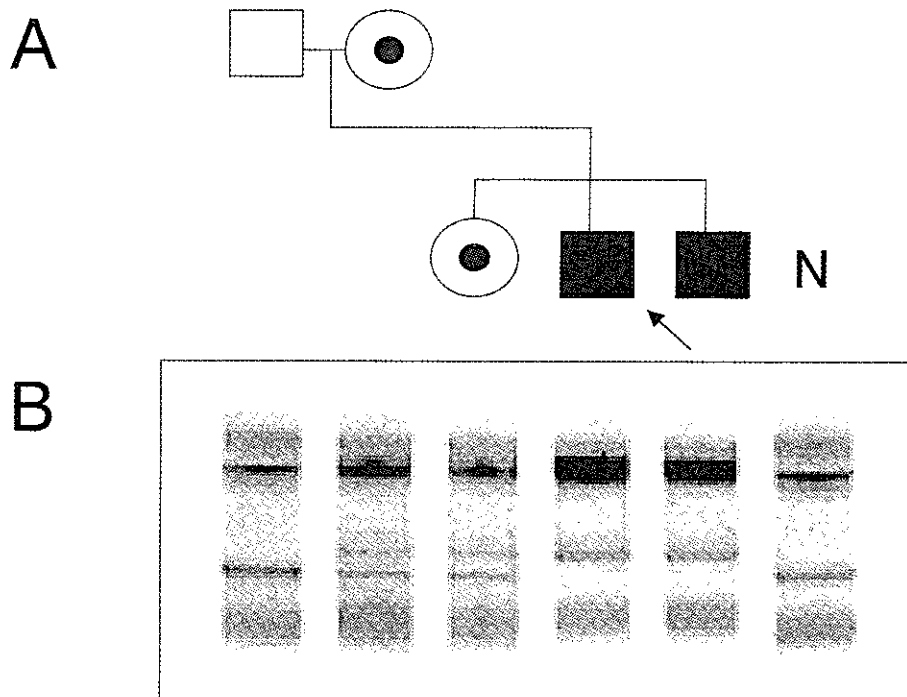


図3. SAP遺伝子解析

- A 家系図。矢印は発端者である症例1を示す。
 B SAP遺伝子エクソン1のPCR-SSCP。SAP遺伝子エクソン1をPCRにて増幅し、Gene Excel 12.5/24ポリアクリルアミドにて電気泳動を行った後に、銀染色を行った。

ン、可溶性IL-2レセプター、 $\beta 2$ ミクログロブリンの上昇を認め、血球貪食症候群と診断した。12月5日より、持続血液ろ過、血漿交換、ステロイド、シクロスポリン、VP16の投与を行ったが、改善せず、胸水も貯留してきた。12月14日に胸水穿刺を行い、細胞診にて悪性リンパ腫と診断された。血球貪食症候群ならびに悪性リンパ腫による多臓器不全のため、12月19日永眠した。

【考案】

CVIDと診断されていた症例について、弟も軽度の γ -グロブリン血症を呈したことより、遺伝性の低 γ -グロブリン血症すなわちXLPの可能性が考えられた。フローサイトメトリーにてSAP蛋白の低下、SAP遺伝子解析によってG34Sのミスセンス変異を認め、弟もともどもXLPと診断した。なお母親と姉は保因者と診断した。

XLPの臨床表現型は多彩であり、致死性的伝染性単核症が約70%を占め、100%においてEBV感染との関連を認めるが、他の表現型である低 γ -グロ

ブリン血症や悪性リンパ腫は必ずしもEBV感染が関与しているわけではない⁵⁾。症例1, 2ともにEBV抗体価は既感染パターンであり、これまでに伝染性単核症の罹患を思わせるエピソードもなかった。よって症例1, 2の低 γ -グロブリン血症は他のウイルス感染が引き金となって発症した可能性がある。

これまでの検討で、わが国においてもXLPは少なからず存在することが明らかであり⁶⁾、低 γ -グロブリン血症の男児例ではXLAやX連鎖高IgM症候群のみならず、XLPの可能性も念頭において図1に示すようなアプローチで病型診断を進めていくべきと考えられる。

【引用文献】

- 1) Kancgane H, Futatani T, Wang Y, Nomura K, Shinozaki K, Matsukura H, et al. Clinical and mutational characteristics of X-linked agammaglobulinemia and its carrier identified by flow cytometric assessment combined with genetic analysis. J Allergy Clin

- Immunol 108:1012-20, 2001.
- 2) Morra M, Silander O, Calpe S, Choi M, Oettgen H, Myers L, et al. Alterations of the X-linked lymphoproliferative disease gene *SH2D1A* in common variable immunodeficiency syndrome. *Blood* 98: 1321-5, 2001.
 - 3) Nistala K, Gilmour KC, Cranston T, Davies EG, Goldblatt D, Gaspar HB, et al. X-linked lymphoproliferative disease: three atypical cases. *Clin Exp Immunol* 126:126-30, 2001.
 - 4) Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, Hashimoto S, Kunikata T, Arai S, et al. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood* 91:595-602, 1998.
 - 5) Sumegi J, Huang D, Lanyi A, Davis JD, Seemayer TA, Maeda A, et al. Correlation of mutations of the *SH2D1A* gene and Epstein-Barr virus infection with clinical phenotype and outcome in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 96:3118-25, 2000.
 - 6) Sumazaki R, Kanegane H, Osaki M, Fukushima T, Tsuchida M, Matsukura H, et al. *SH2D1A* mutations in Japanese males with severe Epstein-Barr virus-associated illnesses. *Blood* 98:1268-70, 2001.

Abstract

We have diagnosed more than 100 families with X-linked agammaglobulinemia (XLA) by a flow cytometric assay combined with genetic analysis in Japan. We identified approximately 90% of hypogammaglobulinemic males without circulating B cells as XLA. Hypogammaglobulinemic patients with peripheral B cells may be caused by a various defects, however, males may be associated with hyper IgM syndrome or X-linked lymphoproliferative syndrome (.XLP). We identified the *SAP* gene mutations in 12-year-old boy who has been diagnosed as common variable immunodeficiency since he was 8 years old, and he and his brother were diagnosed as XLP.

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

篠崎 康 治 (信州大学小児科)
上松 一 永 (信州大学小児科)
南 雲 治 夫 (信州大学小児科)
関 口 幸 男 (信州大学小児科)
竹 内 浩 一 (信州大学小児科)
安 井 耕 三 (信州大学小児科)
小宮山 淳 (信州大学小児科)

はじめに

肺胞蛋白症は、慢性瀰漫性に肺胞内に蛋白様物質が充満する難病である。肺胞マクロファージなどの異常が示唆されており、先天性例においては延命した報告はなく、極めて予後不良である。無 γ -グロブリン血症と肺胞蛋白症とを併発した乳児に臍帯血移植を行い、世界で初めて先天性肺胞蛋白症が治癒したので報告する。

症例

患者は日齢29日の女児。生後から口内炎、外陰部炎、顔面と足底に水疱が出現した。免疫学的検査で低 γ グロブリン血症を認めため、原発性免疫不全症の疑いで当科に入院した。母の免疫グロブリン値には異常はなかった。

入院時検査所見 血算では、血小板の増多を認めた。白血球分画で単球を認めず、その後の経過中も単球の白血球分画に占める比率は、少ない印象であった。免疫グロブリン値は低値で、その後の経過中も上昇しなかった。

皮膚の水疱は増悪と改善を繰り返した。生後2カ月から強い掻痒を伴うアトピー性皮膚炎様の皮疹が全身に出現した。また、下痢が持続した。生後3カ月から多呼吸が出現。同時期から、胸部画像検査上、異常陰影を認め、感染性肺炎を考え治療を行ったが増悪した。生後4カ月からは、持続的に酸素投与が必要になった。免疫グロブリン値は常に低値で、ガンマグロブリンの補充療法が必

要であった。低酸素血症、蓄積性の胸部画像検査結果から肺胞蛋白症を考えた。肺胞蛋白症において血清中で上昇するサーファクタントプロテインAおよびD、CEA濃度を測定したところ、異常高値であった。治療的診断のために生後6カ月時に気管支肺胞洗浄術を行った。得られた気管支肺胞洗浄液は、乳白色でリン脂質に富むものでありPAS染色陽性、含有サーファクタントプロテインAおよびDが異常高値であることから肺胞蛋白症と診断した。

GM-CSF欠損マウスとGM-CSFレセプター欠損マウスでは、肺胞蛋白症を発症することが知られている。患者血清中のGM-CSF濃度は正常値であった。下記に示す患者骨髓単核細胞のcolony assayでは、GM-CSF刺激に対する反応が著明に減少していた。

計11回の気管支肺胞洗浄術を施行したが肺胞蛋白症の再燃を繰り返した。先天性肺胞蛋白症は極めて予後不良で延命例がみられないこと、また、GM-CSFに対するの反応性低下による肺胞マクロファージの機能異常が考えられたため、人工呼吸管理下に非血縁者間臍帯血移植を行った。移植後32日目に人工呼吸管理を離脱し、酸素投与を中止した。アトピー性皮膚炎様皮疹も同時期に治癒した。移植後2カ月の胸部CT写真では、間質の肥厚を認めるものの、肺胞内蓄積物質は完全に消失していた。移植後、免疫グロブリン値は上昇した。