

## 【考案】

重症MAC感染症を合併したAIDS発症患児に、IFN- $\gamma$ とIL-2の併用療法を行った。IFN- $\gamma$ だけでは症状の再発をきたしたが、IL-2を併用することによりCD4<sup>+</sup>T細胞数が回復し、重症MAC感染症は治癒した。

AIDSに合併する日和見感染の中で、MAC感染はCD4<sup>+</sup>T細胞が50~100/ $\mu$ l前後に減少した免疫不全が進行した状態で発症し難治性であることが知られている。肺や消化管に感染し、呼吸器症状、下痢、腹痛などの症状をきたし、全身性の感染では、高熱、悪寒とともに、肝脾腫、黄疸やその他の播種臓器の症状を認める。患児は、血液培養でMACが検出され、全身のリンパ節腫脹をとまっており播種状態と考えられた。MACは抗菌剤に耐性化しやすいことが報告されている。患児も、抗菌剤の変更により一次的に症状は改善したが、短期間で再度症状の悪化をきたしておりMACが耐性化したものと考えられ、抗菌剤のみでの治癒は困難と考えられた。

食細胞による免疫防御は、食細胞が菌を細胞内に取り込みphagosomeを形成する。その後、phagosomeは抗菌物質が蓄えられているlysosome

と融合し(P-L fusion)、殺菌を行うことにより完成する。しかし、MACなどの細胞内寄生菌は、P-L fusionを阻害することにより殺菌からエスケープしてしまうため、T細胞に依存した免疫防御が必須となる。マクロファージにより抗原提示されたCD4<sup>+</sup>T細胞はIFN- $\gamma$ を産生し、IFN- $\gamma$ はマクロファージを活性化する。活性化マクロファージでは、活性酸素生成能やP-L fusion効率が著明に亢進し、細胞内寄生菌を殺菌できるようになると考えられている。患児は、CD4<sup>+</sup>T細胞がほぼ消失し、CD3刺激によるIFN- $\gamma$ 産生が見られなかった。IFN- $\gamma$ は、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、NK細胞などから産生されるが、その主な産生細胞はHIVウイルス感染により減少するCD4<sup>+</sup>T細胞と考えられている。IFN- $\gamma$ の補充を行ったところ、症状の進行は抑えられ改善傾向はみられず、副作用によるIFN- $\gamma$ 療法中止後すぐに再燃した。同様の経過がSquiresらにより報告されている<sup>1)</sup>。重症MAC感染の治癒はIFN- $\gamma$ 療法のみでは困難と思われた。

IL-2は、CD4<sup>+</sup>T細胞から産生され、T細胞やB細胞の増殖や分化に関与するサイトカインである。IL-2療法のAIDSでの臨床応用の試みは、成人例で散見され、CD4<sup>+</sup>T細胞の増加作用が報告されてい

図2. 治療経過

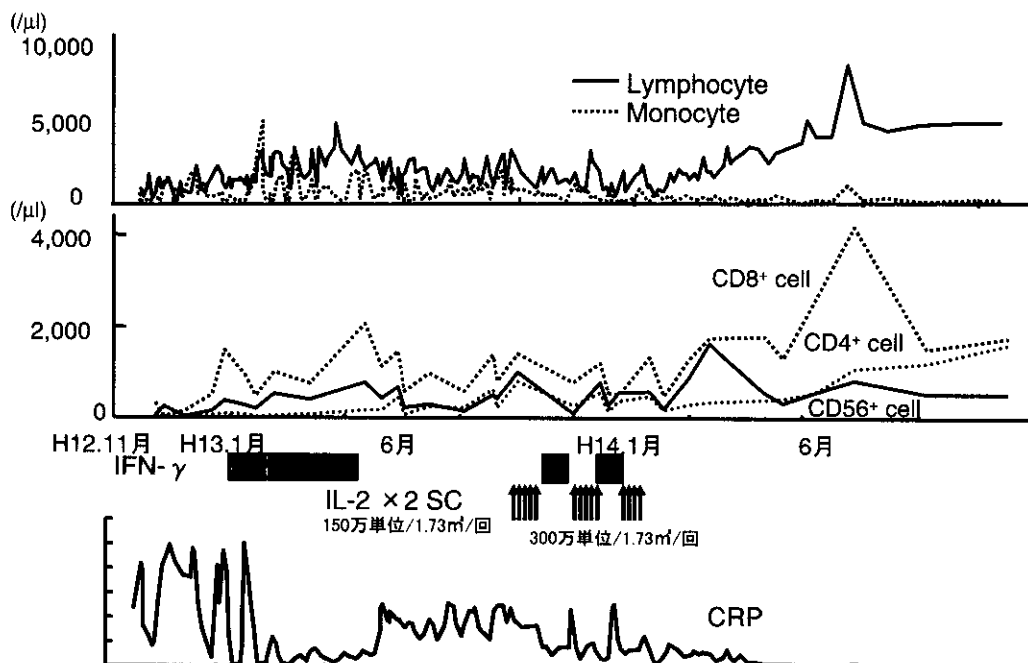


図3. IFN- $\gamma$ による腹部リンパ節腫大傾向の抑制

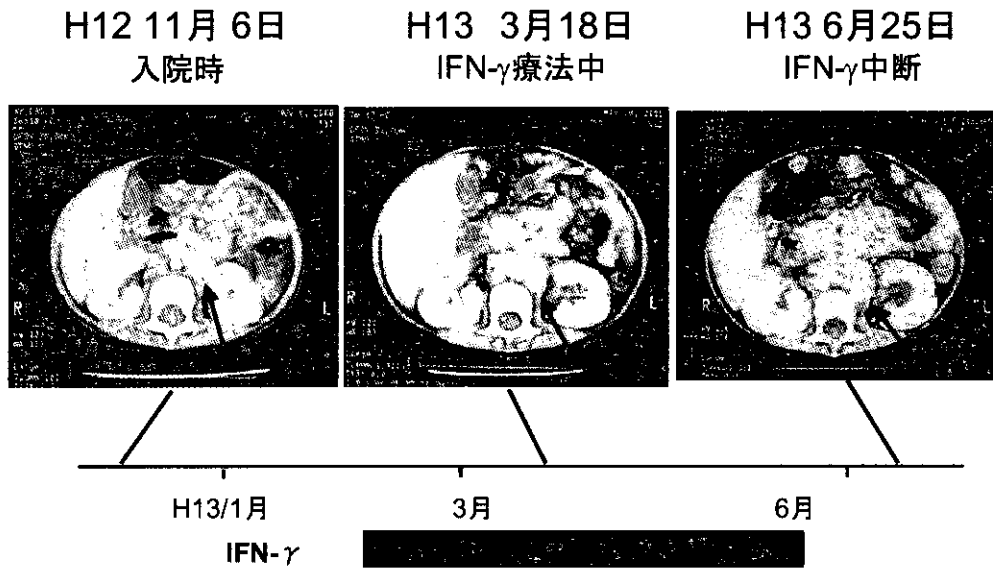
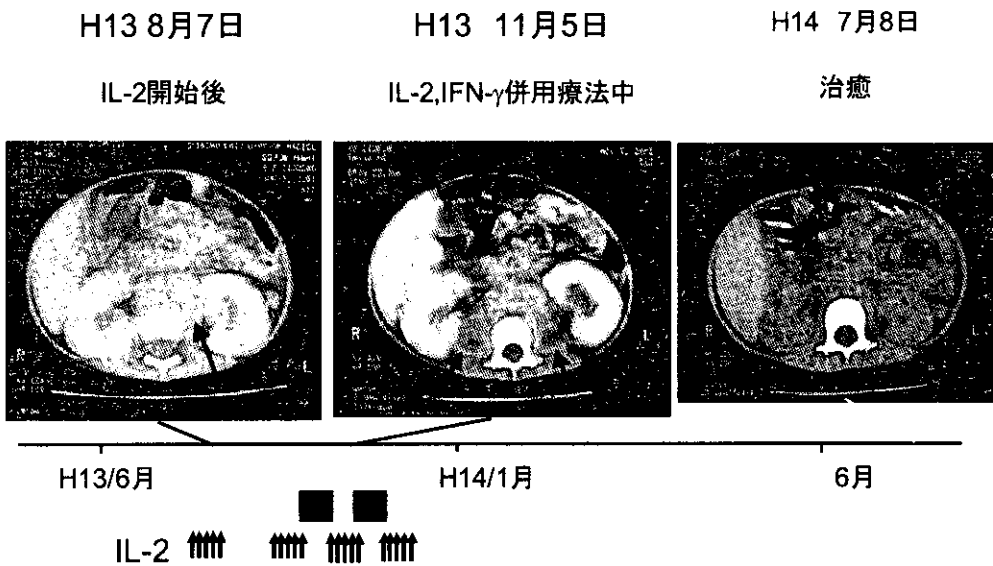


図4. IFN- $\gamma$ /IL-2併用療法による腹部リンパ節腫大の改善



る<sup>2) 3) 4)</sup>。患児も、IL-2の投与によりCD4<sup>+</sup>T細胞の増加を認め、IFN- $\gamma$ 産生能も回復した。CD4<sup>+</sup>T細胞内のBcl-2発現がIL-2投与により強まっており、CD4<sup>+</sup>T細胞の増加の機序の一つにCD4<sup>+</sup>T細胞のアポトーシスを抑制することが示唆された。

IL-2療法単独では、投与終了後CD4<sup>+</sup>T細胞の減少とともにMAC感染症状の再燃を認め、IL-2とIFN- $\gamma$ を併用することにより、IL-2投与の間欠期に患児の状態を保つことが可能となった。患児のような抗菌剤に治療抵抗性の播種性MAC感染症には、IL-2とIFN- $\gamma$ 併用療法が有効であると考えられた。

また、患児はIL-2療法によりCD4<sup>+</sup>T細胞数が正常化し、現在、易感染性を認めていない。HIV感染において、HAART療法でHIV copy数が改善してもCD4<sup>+</sup>T細胞の回復をみないときは、IL-2単独での投与も考慮する必要がある。

#### 【参考文献】

1) Squires KE, Murphy WF, Madoff LC, Murray HW. Interferon-gamma and Mycobacterium avium-

intracellulare infection. J Infect Dis. 1989 159:599-600.

2) Pahwa S, Morales M. Interleukin-2 therapy in HIV infection. AIDS Patient Care STDS. 1998 12:187-97.

3) Davey RT Jr, Murphy RL, Graziano FM, Boswell SL, Pavia AT, Cancio M, Nadler JP, Chaitt DG, Dewar RL, Sahner DK, Duliege AM, Capra WB, Leong WP, Giedlin MA, Lane HC, Kahn JO. Immunologic and virologic effects of subcutaneous interleukin 2 in combination with antiretroviral therapy: A randomized controlled trial.

JAMA. 2000 284:183-9.

4) Levy Y, Capitant C, Houhou S, Carriere I, Viard JP, Goujard C, Gastaut JA, Oksenhendler E, Boumsell L, Gomard E, Rabian C, Weiss L, Guillet JG, Delfraissy JF, Aboulker JP, Seligmann M. Comparison of subcutaneous and intravenous interleukin-2 in asymptomatic HIV-1 infection: a randomised controlled trial. ANRS 048 study group. Lancet. 1999 353:1923-9.

## Remarkable effects of a combination therapy with interferon- $\gamma$ and interleukin-2 on eradication of Mycobacterium avium complex in an AIDS patient

Norimoto Kobayashi, Kazunaga Agematsu, Yukio Sekiguchi, Koji Shinozaki, Haruo Nagumo, Atsushi Komiyama

Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine

We first tried a combination therapy with interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and interleukin-2 (IL-2) for a 5 year-old girl with advanced AIDS and Mycobacterium avium complex (MAC) infections. Limited effects on the eradication of MAC were found by independent IFN- $\gamma$  or IL-2 administration. The severe MAC infection dramatically improved by the combination therapy, accompanied by an increase of CD4<sup>+</sup> T cells and improving of IFN- $\gamma$  producing ability. The combination therapy with IFN- $\gamma$  and IL-2 could reconstruct immune systems and rescue a symptomatic AIDS patient.

## 東洋におけるC9 R95X mutationのFounder effect

Vahid Khajoei (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)

井原 健二 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)

吉良 龍太郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)

武本 環美 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)

鳥巢 浩幸 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)

酒井 康成 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)

Jia Guanjun (Harbin Red Cross Blood Center, Harbin, China)

Park Myoung Hee (Department of Clinical Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, South Korea)

徳永 勝士 (東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学)

原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)

C9 R95X mutationの原因を明らかにするため、C9 R95X mutationとC9遺伝子近傍のD5S2082, D5S634, D5S1994マイクロサテライトマーカー及びCAリピート、GAリピートの多型との関連を検討した。D5S2082, D5S634, D5S1994マイクロサテライトマーカーとC9 R95X mutationとの関連は認められなかった。他方、C9遺伝子近傍に確認されたCAリピート、GAリピートの多型のうち(CA)<sub>12</sub>及び(GT)<sub>20</sub>アレルがすべてのC9欠損症(C9D)で共通して認められ、この(CA)<sub>12</sub> - (GT)<sub>20</sub>はC9 R95X mutationは日本人において有意にhomozygousあるいはheterozygousなC9 R95X mutationと相関していた。中国や韓国でもC9 R95X mutationは認められ、日本、中国、韓国いずれにおいてもC9 R95X mutationのheterozygoteは、最低一つの(CA)<sub>12</sub>リピートアレル及び(GT)<sub>20</sub>リピートアレルを有しており、共通の祖先に由来することが示唆された。

### Introduction

Complement component 9 (C9) is one of the constituents of the membrane attack complex (MAC), which causes lysis and death of target cells upon activation of the complement system. C9 deficiency (C9D) (MIM: 120940) is inherited as an autosomal recessive trait, and is one of the most frequent genetic disorders in Japan, with an incidence of about 1/1,000 (Fukumori et al. 1989), but is very rare in Caucasians (Zoppi et al. 1990). A nonsense mutation at codon 95 (R95X) in exon 4 of the C9 gene is responsible for most Japanese C9D cases (Kira et al. 1998). Actually, one of 15 (6.7%) normal individuals was found to have the R95X mutation in Japan, the estimated frequency of C9D individuals being around 0.12%, which is consistent with the frequency revealed by serological studies (Fukumori et al. 1989).

Studies on the molecular basis of C9D in European and Japanese populations (Kira et al. 1998; Witzel-Schlomp et al. 1997) revealed a great difference in the mutation sites between the two populations. A very high prevalence of the R95X mutation only in Japanese has prompted us to investigate 1) whether the high frequency of the R95X mutation in Japanese is the result of a founder effect or a mutational hot spot, 2) whether this R95X mutation is observed in other Asian countries near Japan, and 3) whether it has a common ancestral origin in East Asia.

## Subjects and Methods

### Study subjects

The Japanese genomic DNA samples were from 100 normal children, 18 heterozygotes for the R95X mutation and 5 C9D patients (homozygotes), whose genotypes were determined in our previous studies (Kira et al. 1998, 1999). Genomic DNA samples were also obtained from 200 individuals in Seoul city in South Korea and 195 in Harbin city in the northeast of China.

### Allele-specific PCR and Markers analysis

Allele-specific PCR for exon 4 of the C9 gene was performed to detect the R95X mutation as previously described (Kira et al. 1998), with the same PCR profile. To confirm R95X heterozygous individuals, SSCP analysis was performed. Genotyping of markers was performed in 40 normal individuals in each country, and all heterozygotes and homozygotes for the R95X mutation. The C9 flanking region containing the (CA)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> repeat was amplified with PCR. PCR was also performed for microsatellite markers D5S634 (Gyapay et al. 1994), D5S2028 and D5S1994 (Dib et al. 1996).

## Results

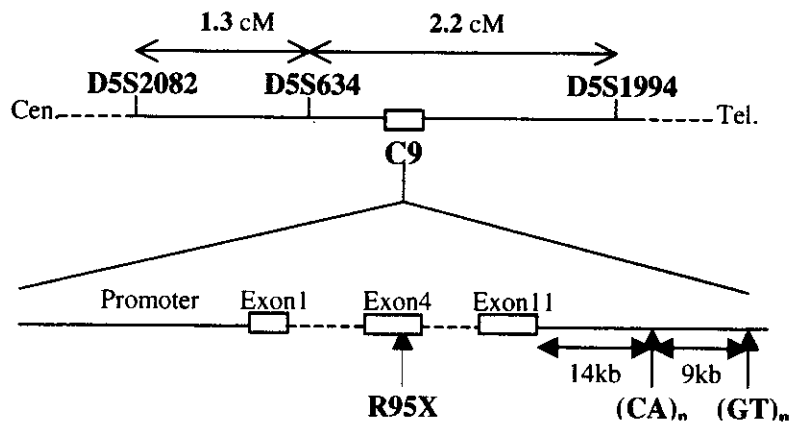
On analysis of microsatellite markers D5S2082, D5S634, and D5S1994 in 5 Japanese patients with C9D, no common alleles were observed, as shown in Table 1.

Table 1. Genotypic analysis of Japanese C9D patients.

Table 1. Genotypic analysis of Japanese C9D patients.

Markers	C9D patients genotypes					Major alleles
	1	2	3	4	5	in normal Japanese (%)
D5S2082	1/1	1/1	2/2	2/2	2/3	2 (71.0), 1 (26.0)
D5S634	3/3	3/3	3/3	4/4	3/4	3 (58.3), 4 (31.0)
R95X mutation	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
(CA) <sub>n</sub>	12/1	12/1	12/1	12/1	12/1	(CA) <sub>12</sub> (75)
	2	2	2	2	2	
(GT) <sub>n</sub>	20/2	20/2	20/2	20/2	20/2	(GT) <sub>12</sub> (41.2)
	0	0	0	0	0	
D5S1994	4/5	4/7	4/5	4/4	4/4	4 (37.6), 5 (25.0)

As the microsatellite markers were far from the C9 gene, as shown in Fig. 1, we then examined two sites of dinucleotide repeat number polymorphisms in the flanking region of the C9 gene.



**Figure 1.** Schematic genomic organization of microsatellite markers, and two repeat number polymorphisms adjacent to and within the C9 gene.

The (CA)<sub>12</sub> and (GT)<sub>20</sub> alleles were common in all the C9D patients, indicating the presence of a founder effect of the C9 R95X mutation. Haplotype analysis in Japanese demonstrated that the (CA)<sub>12</sub>-(GT)<sub>20</sub> haplotype was significantly associated with the R95X mutation in homozygotes as well as in heterozygotes ( $p < 0.0001$ ) (Table 2).

Next, to determine whether the R95X mutation could be observed in Asian countries other than Japan, the R95X mutation was screened for in Korean and Chinese individuals. Four and two heterozygotes for the R95X mutation were found among 200 Korean and 195 Chinese individuals, respectively. The R95X carrier frequencies for Koreans and Chinese were thus 2.0% and 1.0%, respectively.

**Table 2.** Estimated haplotype frequencies in two dinucleotide repeat number polymorphisms in Japanese individuals.

Haplotype	Haplotype frequency (%)			P value
	Wild type	Heterozygotes	Homozygotes	
		for	for	
		R95X mutation	R95X mutation	
CA <sub>12</sub> -GT <sub>20</sub>	29.1	64.8	100.0	<0.0001
CA <sub>12</sub> -GT <sub>21</sub>	22.9	3.1	0.0	0.0075
CA <sub>12</sub> -GT <sub>19</sub>	13.5	12.5	0.0	NS
CA <sub>13</sub> -GT <sub>20</sub>	12.1	7.3	0.0	NS
CA <sub>12</sub> -GT <sub>16</sub>	6.2	5.5	0.0	NS
Minor haplotypes	16.2	6.8	0.0	NS

NS: not significant

P value for each haplotype frequency was calculated by Chi-squared test with a 2 × 3 contingency table.

Then, to determine whether a common founder existed in Japan and other Asian countries, the (CA)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> polymorphisms were examined in Korean and Chinese individuals. Regarding the (CA)<sub>n</sub> repeat number polymorphism, (CA)<sub>12</sub> and (CA)<sub>13</sub> repeat alleles were identified in three wild type populations and their R95X heterozygotes (data not shown). Consistent with the fact that all the Japanese homozygotes for the R95X mutation had only the (CA)<sub>12</sub> allele, all the heterozygotes in Japan, Korea and China carried at least one (CA)<sub>12</sub> allele. With respect to the (GT)<sub>n</sub> polymorphism, there were 10 types as to repeat number, ranging from 15 to 24, in three wild type populations and R95X heterozygotes (data not shown). All the heterozygotes in Japan, Korea and China had at least one (GT)<sub>20</sub> repeat allele, compatible with the finding that the (GT)<sub>20</sub> repeat allele was observed in Japanese homozygotes for the R95X mutation.

## Discussion

On haplotype analysis, we found that the high frequency of the R95X mutation results from a founder effect rather than a mutational hot spot in Japanese and in Koreans and Chinese as well. Thus, the frequency of the R95X mutation with a common ancestral origin showed a gradual increase in geographic order from China, the Korean peninsula and then to the Japan Archipelago (Fig. 2).

There are many theories and much controversy regarding the origins of Japanese population based on studies by anthropologists, archaeologists and geneticists. Hondo (main islands)-Japanese are thought to be mainly derived from the migrants from the north/northeast of the Asian continent around the Aeneolithic Yayoi period (300 BC-300 AD) (Omoto and Saitou, 1997). Therefore, it is possible that the R95X mutation, with a widespread geographic distribution, was derived from a founder mutation, which spread throughout north/northeast Asia and finally to Japan as a result of migration.

The major proportion of the Japanese population is known to be relatively homogeneous, probably because Japan comprises isolated islands, and thus there has been less migration.

Since there were differences in the allele frequencies between Korean and Japanese normal individuals, it is possible that the R95X mutation has been maintained at a high frequency in the Japanese population partly through a bottle-neck effect during migration from the Asian continent to Japan. In addition, in ancient times, C9D individuals might have had a selective advantage because the mortality from meningococcal infections in complement-deficient patients was lower than that in normal individuals, probably due to the attenuated inflammatory response in the absence of MAC (Ross and Densen, 1984; Lehner et al. 1992).

In conclusion, a founder effect and a selective advantage in isolation might be the main reasons for the high frequency of the R95X mutation in Japan.

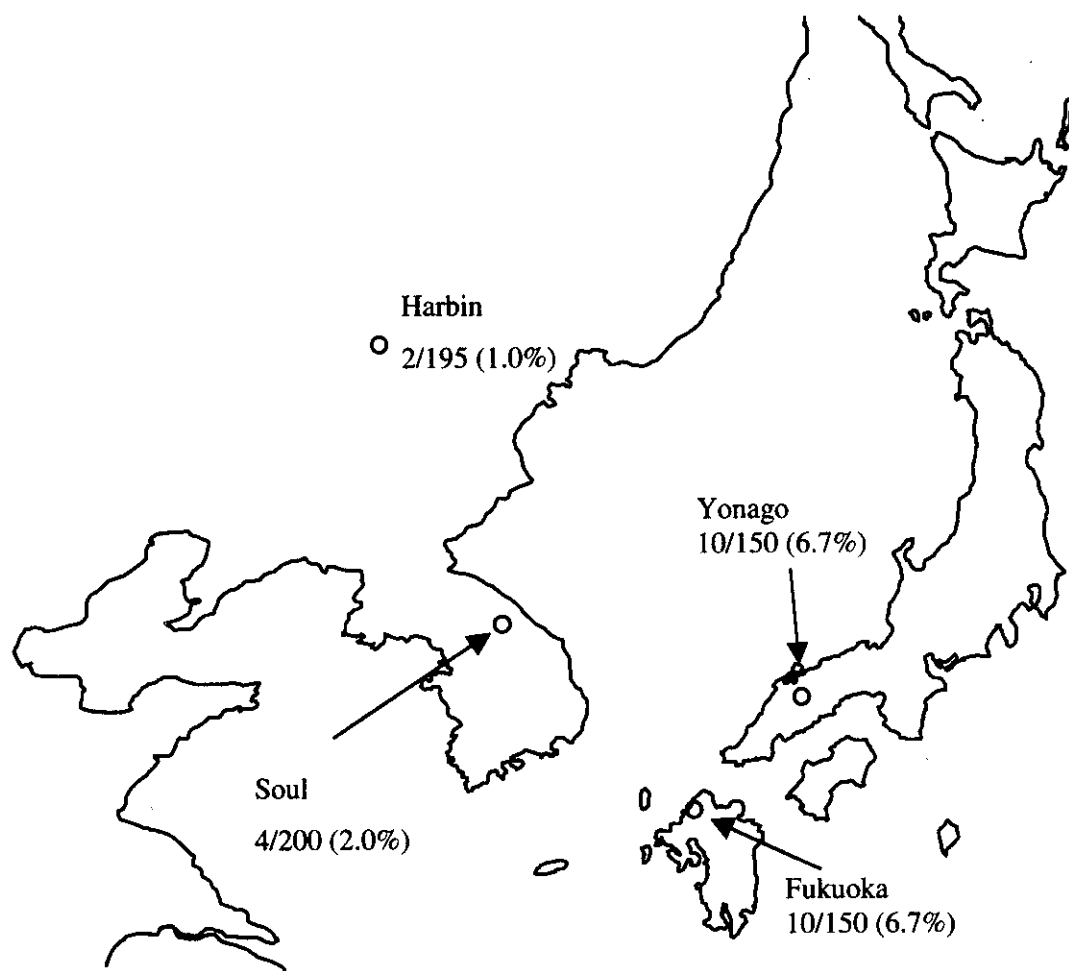


Figure 2. Location of four cities in Japan, Korea and China, with the frequencies of the R95X mutation. The big arrow shows the possible route of Japanese ancestors.

## References

1. Dib C, Faure S, Fizames C, Samon D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellite. *Nature* 380: 152-4
2. Fukumori Y, Yoshimura K, Ohnoki S, Yamaguchi H, Akagaki Y, Inai S (1989) A high incidence of C9 deficiency among healthy blood donors in Osaka, Japan. *Int Immunol* 1: 85-9
3. Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau P, Mark S, Bernardi G, Lathrop M, Weissenbach J (1994) The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nature Genetics* 7: 246-9
4. Kira R, Ihara K, Takada H, Gondo K, Hara T (1998) Nonsense mutation in exon 4 of human complement C9 gene is the major cause of Japanese complement C9 deficiency. *Hum Genet* 102: 605-10
5. Kira R, Ihara K, Watanabe K, Kanemitsu S, Ahmed SU, Gondo K, Takeshita K, Hara T (1999) Molecular epidemiology of C9 deficiency heterozygotes with an Arg95Stop mutation of the C9 gene in Japan. *J Hum Genet* 44: 109-11



6. Lehner PJ, Davies KA, Walport MJ, Cope AP, Wurzner R, Orren A, Morgan BP, Cohen J (1992) Meningococcal septicaemia in a C6-deficient patient and effects of plasma transfusion on lipopolysaccharide release. *Lancet* 340: 1379-81
7. Omoto K, Saitou N (1997) Genetic origins of the Japanese: a partial support for the dual structure hypothesis. *Am J Phys Anthropol* 102: 437-46
8. Ross SC, Densen P (1984) Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine (Baltimore)* 63: 243-73
9. Witzel-Schlomp K, Spath PJ, Hobart MJ, Fernie BA, Rittner C, Kaufmann T, Schneider PM (1997) The human complement C9 gene: identification of two mutations causing deficiency and revision of the gene structure. *J Immunol* 158: 5043-9
- 10 Zoppi M, Weiss M, Nydegger UE, Hess T, Spath PJ (1990) Recurrent meningitis in a patient with congenital deficiency of the C9 component of complement. First case of C9 deficiency in Europe. *Arch Intern Med* 150: 2395-9

## Founder effect of the C9 R95X mutation in Orientals

Vahid Khajooe<sup>1</sup>, Kenji Ihara<sup>1</sup>, Ryutaro Kira<sup>1</sup>, Megumi Takemoto<sup>1</sup>, Hiroyuki Torisu<sup>1</sup>, Yasunari Sakai<sup>1</sup>, Jia Guanjun<sup>2</sup>, Park Myoung Hee<sup>3</sup>, Katsushi Tokunaga<sup>4</sup>, and Toshiro Hara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan, <sup>2</sup>Harbin Red Cross Blood Center, Harbin, China, <sup>3</sup>Department of Clinical Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, South Korea, and <sup>4</sup>Department of Human Genetics, Graduate School of International Health, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

To clarify the cause of high frequency of C9 R95X mutation in Japan, we analysed the association between C9 R95X mutation and microsatellite markers D5S2082, D5S634, D5S1994, and polymorphisms of CA and GT repeats, which locate adjacent to the C9 gene. No common alleles of microsatellite markers D5S2082, D5S634, or D5S1994 were observed in C9 deficiency (C9D) patients. On the other hand, the (CA)<sub>12</sub> and (GT)<sub>20</sub> alleles were common in all the C9D patients. In addition, haplotype analysis in Japanese demonstrated that the (CA)<sub>12</sub> - (GT)<sub>20</sub> haplotype was significantly associated with the C9 R95X mutation in homozygotes as well as in heterozygotes, indicating the presence of a founder effect of the C9 R95X mutation. We found C9 R95X mutation is observed in China and Korea. All the heterozygotes of C9 R95X mutation in Japan, Korea and China carried at least one (CA)<sub>12</sub> allele and at least one (GT)<sub>20</sub> repeat allele, indicating C9 R95X mutation has derived from a common ancestral origin in East Asia.

# PI3K欠損B細胞におけるシグナル伝達経路の解析

松田 達志 (慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室)

小安 重夫 (慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室)

我々の研究室では、PI3Kの調節サブユニットであるp85 $\alpha$ を欠損したマウスにおいて、末梢におけるB細胞の割合が著しく低下することを明らかにしてきた。p85 $\alpha$ 欠損B細胞の反応性とBtk欠損B細胞の反応性との間に高い類似性が認められることから、当初PI3K欠損によってBtkの活性が低下しているものと想定された。しかし、予想に反して、Btkの活性化はPI3K活性に依存していないことが明らかとなった。各種の解析から、p85 $\alpha$ 欠損B細胞における反応性の低下は、PI3Kの下流で機能するAkt/NF- $\kappa$ B経路の活性低下によることが強く示唆された。

## 【はじめに】

PI3Kは細胞の生存・増殖の過程で重要な役割を担う分子である。しかし、実際にPI3Kによってどのようなシグナル伝達経路が制御されているのかについては、不明な点が多く残されている。我々の研究室では、東京大学医学部の門脇らと共に、PI3Kの調節サブユニットであるp85 $\alpha$ のノックアウトマウスの解析を行い、末梢のリンパ球のうちB細胞の割合のみが著しく低下していることを明らかにしてきた<sup>1)</sup>。p85 $\alpha$ 欠損B細胞は、抗原刺激に伴うCyclinD2やBcl-xLの発現誘導がほとんど認められないなど、チロシンキナーゼであるBtkを欠損したB細胞と類似した表現型を示すことが明らかとなった<sup>2)</sup>。種々の細胞株を用いた解析から、BtkはPI3Kによって生産されるPIP3によって膜へとリクルートされて活性化されるというスキームが提唱されており、p85 $\alpha$ 欠損B細胞のシグナル伝達異常はBtkの活性化不全の結果であるものと推測されてきた。そこで本研究では、p85 $\alpha$ 欠損B細胞ならびにPI3K特異的阻害剤を用いて、B細胞のシグナル伝達経路においてPI3K経路の下流にBtkが位置しているかどうかの検証を行った<sup>2)</sup>。

## 【対象と方法】

p85 $\alpha$ 欠損マウス、Btk欠損マウス (Jackson

Laboratoryから購入) ならびに対照となる野生型 (C57BL/6) マウスからそれぞれ脾細胞を調製し、抗B220-MACSビーズで処理した後に、AutoMACS (Miltenyi Biotech) を用いてB細胞を得た。B細胞は、ヤギ抗マウスIgM抗体 F(ab)'<sub>2</sub>フラグメント (以下、抗IgM抗体) を用いて刺激した。

## 【結果と考察】

PI3K (クラスIA) は調節サブユニットであるp85と活性サブユニットであるp110からなるヘテロダイマーとして存在している。B細胞においては、特にp85 $\alpha$ とp110 $\delta$ によって構成されるヘテロダイマーが主たるPI3Kとして機能していることが知られている。p85はp110の細胞内での安定性にも関与することが知られており、p85 $\alpha$ 欠損B細胞においてはp110 $\delta$ の発現もほぼ完全に消失していた (図1A)。それにともない、p85 $\alpha$ 欠損B細胞においては、抗IgM抗体によって誘導されるPI3K活性の上昇が、野生型マウス由来B細胞の約5%程度にまで低下していることが明らかとなった (図1B)。

PI3Kによって生産されるPIP3は、PHドメインを持つ分子を膜へとリクルートすることが知られている。B細胞の活性化に必須の役割を担うチロシンキナーゼBtkは、PHドメインを介して膜へとリ

クルートされることで活性化されるものと考えられてきた。実際、Btk欠損B細胞とp85 $\alpha$ 欠損B細胞とは非常に似通った表現型を示し(図3A)、PI3Kの下流でBtkが機能していることが示唆された1)。そこで、PI3Kの活性化がBtkの活性制御に必須か否かを、Btkのキナーゼ活性を測定することで評価した。野生型マウス由来のB細胞を、PI3Kの特異的阻害剤であるLY294402存在下・非存在下に抗IgM抗体で刺激し、細胞抽出液を調製した後にBtkを免疫沈降し、Btkの自己リン酸化活性を抗ホスホチロシン抗体で評価した(図2A、左パネル)。レーン4とレーン6を比較して明らかのように、LY294402存在下でも対照と同程度にBtkの活性化が誘導されることが明らかとなった。さらに、p85 $\alpha$ 欠損B細胞においても抗IgM抗体刺激に伴うBtkの活性上昇が認められることから(図2A、右パネル)、これまで考えられてきた

スキームとは異なり、Btkの活性化にPI3Kは必要ないことが明らかとなった。一方、Btkが活性化した後に膜近傍で機能するためにPIP3-PHドメインの相互作用が必要である可能性も考えられる。この可能性を検証するために、抗IgM抗体で刺激した後の活性型Btkの膜局在が、PI3K経路に依存しているか否かを検討した(図2B)。その結果、Btkの膜局在に関しても、PI3K経路とは無関係に制御を受けていることが明らかとなった。

Btk欠損B細胞と同様、p85 $\alpha$ 欠損B細胞においても、抗IgM抗体刺激に伴うCyclinD2やBcl-xLの発現誘導が著しく抑制されていることが分かった(図3A)。Bcl-xLの発現に関与する各種のシグナル伝達コンポーネントの解析を行った結果、p85 $\alpha$ 欠損B細胞ならびにBtk欠損B細胞で、ともに抗IgM抗体刺激に伴うNF- $\kappa$ Bの活性化が阻害されていることが明らかとなった(図3B)。同様に、野

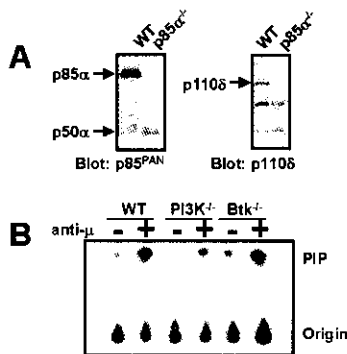


図1：p85 $\alpha$ 欠損B細胞。

(A) 各マウスからB細胞を調製し、PI3Kの調節サブユニット(p85 $\alpha$ ならびにp50 $\alpha$ )、活性サブユニット(p110 $\delta$ )の発現レベルをimmunoblotにより検討した。

(B) 各マウスから得たB細胞を抗IgM抗体で刺激後(anti- $\mu$ )、細胞抽出液を調製し、抗ホスホチロシン抗体で免疫沈降後に回収されたPI3K活性を測定した。PI3K $^{-/-}$ : p85 $\alpha$ 欠損B細胞、以下同じ。

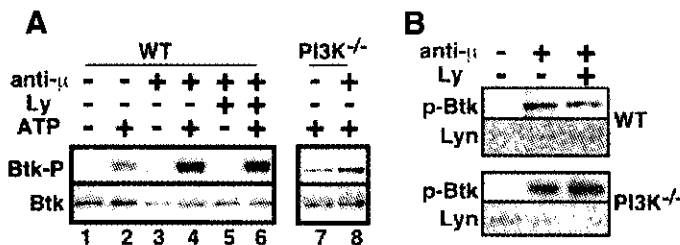


図2：抗IgM抗体によるBtkの活性化。

(A) 脾臓より調製したB細胞(6 x 10<sup>6</sup>)を抗IgM抗体(anti- $\mu$ )で刺激後、細胞抽出液を調製し、抗Btk抗体で免疫沈降を行った。ATP存在下・非存在下にincubationを行い、Btkの自己リン酸化活性(ATP存在下の反応とATP非存在下の反応の差)を抗ホスホチロシン抗体を用いて評価した。

(B) 抗IgM抗体で刺激後、膜画分に存在する活性型Btkを抗ホスホチロシン抗体を用いて検出した。

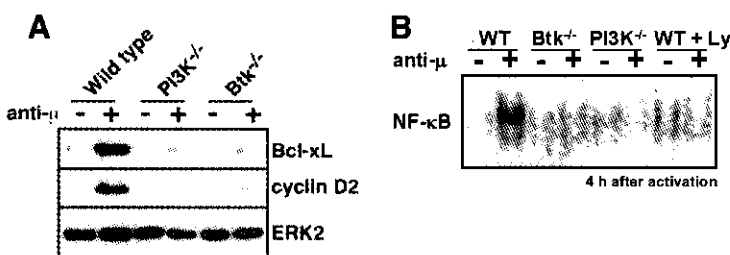


図3：p85 $\alpha$ 欠損B細胞のシグナル伝達。

(A) 各マウスからB細胞を調製し、抗IgM抗体で18時間刺激後CyclinD2とBcl-xL、ならびにERK2の発現をimmunoblotで評価した。

(B) 各B細胞を抗IgM抗体で4時間刺激後EMSAによってNF- $\kappa$ Bの活性化を評価した。

生型B細胞をLY294002存在下に抗IgM抗体で刺激した場合にも、NF- $\kappa$ Bの活性化が阻害されていることが明らかとなった(図3B)。

以上の結果から、Btk経路とPI3K経路がB細胞において互いに独立なシグナル伝達経路を構成していること、ならびに両シグナル伝達経路の共通の下流因子としてNF- $\kappa$ Bが機能していることが明らかとなった。Btk欠損B細胞とp85 $\alpha$ 欠損B細胞との類似した表現型は、おそらくはNF- $\kappa$ B経路の活性化異常で説明されるものと推測される。ヒトにおけるBtkの機能異常がXLAを引き起こすことから、PI3K経路の機能異常やNF- $\kappa$ B経路の異常が同様の病態を引き起こす可能性は高いものと考えられる。非XLAの原因遺伝子の候補として、今後PI3K経路やNF- $\kappa$ B経路のシグナル伝達コンポーネントを考慮に入れる必要が出てくるものと

思われる。

#### 【文 献】

- 1) Suzuki, H., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Aizawa, S., Yazaki, Y., Kadowaki, T., and Koyasu, S. Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85 $\kappa$  subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Science* (1999) 283, 390-392.
- 2) Suzuki, H., Matsuda, S., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Ohteki, T., Asano, T., Behrens, T. W., Kouro, T., Takatsu, K., Kadowaki, T., and Koyasu, S. PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction. *Nat. Immunol.* (2003) (in press)

## Signaling defect in PI3K-deficient B cells.

Satoshi Matsuda, Shigeo Koyasu

Department of Microbiology and Immunology, Keio University School of Medicine

Phosphoinositide-3 kinase (PI3K) is thought to activate the tyrosine kinase Btk. However, through analysis of PI3K $^{-/-}$  and Btk $^{-/-}$  mice, B cell antigen receptor (BCR)-induced activation of Btk in mouse B cells was found to be unaffected by PI3K inhibitors or by a lack of PI3K. Consistent with this observation, PI3K $^{-/-}$  Btk $^{-/-}$  double-deficient mice had more severe defects than either single-mutant mouse. NF- $\kappa$ B activation along with Bcl-xL and cyclin D2 induction were severely blocked in both PI3K $^{-/-}$  and Btk $^{-/-}$  single-deficient B cells. Our results indicate that PI3K and Btk have unique roles in proximal BCR signaling and that they have a common target further downstream in the activation of NF- $\kappa$ B.

## プレB細胞レセプターとB細胞分化障害

烏 山 一 (東京医科歯科大学大学院感染分子制御学)  
河 野 洋 平 (東京医科歯科大学大学院感染分子制御学)  
峯 岸 克 行 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)

B細胞のみを欠損する原発性免疫不全症の責任遺伝子としてこれまでに5種類の遺伝子が同定されているが、そのいずれもがプレB細胞レセプター (preBCR) に関連するものである。このようにpreBCRはB細胞分化に必須な分子であるが、我々はこれまでにpreBCRシグナルが分化誘導のみならず、細胞増殖、Ig遺伝子再構成の制御に深く関与していることを明らかにしてきた。本研究ではB細胞欠損モデルマウスを用いて、preBCRがB細胞レセプター (BCR) の品質管理、レパトリー形成に極めて重要な働きをしていることを明らかにした。

### 【はじめに】

1993年にブルトン型無グロブリン血症 (XLA) の責任遺伝子としてチロシンキナーゼをコードするBtk遺伝子が同定されて以来、B細胞欠損型の原発性免疫不全症の責任遺伝子が次々と明らかにされてきた。これまでに同定された責任遺伝子は、Btk、 $\mu$  H鎖、 $\lambda$ 5、Ig $\alpha$ 、BLNKであるが、興味深いことに、 $\mu$  H鎖と $\lambda$ 5、Ig $\alpha$ はpreBCRを構成する分子で、BtkとBLNKはpreBCRからのシグナル伝達を担う分子であり、どれもがpreBCRに直接かかわりのあるものである。ノックアウトマウスの解析ともあいまって、ヒトでもマウスでもpreBCRが骨髄におけるB細胞初期分化に極めて重要な役割を演じていることが明らかとなった。

preBCRは $\mu$  H鎖、 $\lambda$ 5、VpreB、Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ から構成されるBCR様の複合体で、B細胞分化の初期 (大型プレB細胞期) に一過性に細胞表面に発現する。これまでの研究で、プロB細胞の段階でH鎖遺伝子の機能的再構成に成功した細胞において $\mu$  H鎖が産生されると、代替L鎖と会合してpreBCRが形成されて、増殖シグナルならびに分化誘導シグナルが伝達され、プロB細胞からプレB細胞への分化がおこることが判明している。しかし、H鎖遺伝子の機能的再構成に成功した細胞

において産生される $\mu$  H鎖がすべてpreBCRを形成できるのか、できないとしたらその割合は、という点に関してはまだ踏み込んだ解析がなされていない。そこで、本研究ではB細胞欠損モデルマウスを用いて、 $\mu$  H鎖の品質管理ならびにレパトリー形成におけるpreBCRの役割に関して解析をおこなった。

### 【対象と方法】

B細胞欠損変異マウスならびに正常マウスの骨髓細胞をpreBCRに対する各種抗体で細胞内染色をして、flow cytometerにて解析した。B細胞欠損変異マウスとして、 $\mu$  H鎖をまったく産生しないRAG欠損マウス、膜結合型 $\mu$  H鎖を産生しない $\mu$  H鎖膜貫通エクソン欠損マウス ( $\mu$  m欠損マウス)、RAG欠損マウスに機能的再構成をした $\mu$  H鎖トランスジーンを発現させたマウス ( $\mu$  HTg RAG欠損マウス)、いずれも8-12週齢を使用した。RAG欠損マウスならびに $\mu$  m欠損マウスでは、骨髓でのB細胞分化はプロB細胞段階で停止しているのに対し、 $\mu$  HTg RAG欠損マウスではプロB細胞から小型プレB細胞まで分化が進んでいる。両側大腿骨から骨髓細胞を調整し、B220陽性のB系細胞を抗B220抗体結合ビーズにて回収、濃

縮した。正常マウスの場合には、骨髄細胞から抗Ig抗体結合ビーズにて細胞表面Ig陽性細胞（成熟並びに未熟B細胞）をあらかじめ除去したのちに、抗B220抗体結合ビーズにてB220陽性B系細胞を回収、濃縮した。その後、B220陽性細胞を細胞内染色するために、細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、さらに界面活性剤にてパーミアライズした。

細胞内染色に用いた抗体は抗 $\mu$  H鎖抗体、抗 $\lambda$  5抗体（LM34）あるいは抗VpreB抗体（VP245）、抗preBCR抗体（SL156）である。SL156は非常におもしろい抗体で、preBCRを構成するそれぞれの分子（ $\mu$  H鎖、 $\lambda$  5、VpreB）とは反応しないが、3者が複合体を形成した場合にそのconformational epitopeを認識するものである。したがって、この抗体を使えば、代替L鎖と $\mu$  H鎖が単にそれぞれ独立に存在するのか、実際に会合してpreBCRを形成しているのかを識別することが可能となる。3カラー解析をおこなうために、抗 $\mu$  H鎖抗体にはAPC、抗 $\lambda$  5抗体・抗VpreB抗体にはPE、抗preBCR抗体にはalexa488が標識されている。細胞内染色をした骨髄細胞をFACSCaliburにて解析した。

## 【結果】

### 1. RAG欠損マウスならびに $\mu$ HTg RAG欠損マウスの解析

まず、解析システムがきちんと機能するかどうかを確認するために、RAG欠損マウスならびに $\mu$  HTg RAG欠損マウスを用いたモデル実験をおこなった。RAG欠損マウスでは $\mu$  H鎖が産生されないため、preBCRが形成されず、B細胞分化はプロB細胞の段階で留まっている。実際に細胞内染色で解析してみると、代替L鎖陽性細胞（LM34陽性）はすべて $\mu$  H鎖陰性、preBCR陰性で、プロB細胞の表現型であることが確かめられた。これに対して、 $\mu$  HTg RAG欠損マウスでは、代替L鎖陽性細胞の大部分が、 $\mu$  H鎖陽性かつpreBCR陽性であり、プロB細胞から大型プレB細胞への分化誘導が非常に効率よくおこなわれていることが確認された。この場合、すべてのプレ

B細胞に発現する $\mu$  H鎖はトランスジーン由来の同一のものであり、多様性はまったくない。トランスジーン由来の $\mu$  H鎖は効率よく代替L鎖と会合し、preBCRを形成したものと考えられる。また、preBCR陽性細胞はサイズがプロB細胞や小型プレB細胞より大きく、増殖している集団であることが強く示唆された。

### 2. 正常マウス骨髄細胞の解析

正常マウスの骨髄では、上記の $\mu$  HTg RAG欠損マウスの場合とは異なり、プレB細胞の段階で産生されてくる $\mu$  H鎖は単一ではなく、多様性に富んでいる。ここで問題となるのは、産生されてくる $\mu$  H鎖のうちどの程度のものが、代替L鎖と会合してpreBCRを形成できるのか、すなわち分化誘導能を示すのかという点である。そこで、実際に正常マウス骨髄のB220陽性sIgM陰性細胞（プロB細胞+プレB細胞）を細胞内染色で解析してみると、代替L鎖陽性かつ $\mu$  H鎖陽性細胞の集団の中で、1/4-1/3の細胞は抗preBCR抗体で染色されないことが判明した。PreBCR陽性細胞の方は、 $\mu$  HTg RAG欠損マウスの場合と同様に、サイズがプロB細胞や小型プレB細胞より大きく、増殖しているものと考えられたが、preBCR陰性細胞はサイズが小さく、増殖していないものと考えられた。すなわち、後者の細胞においては、preBCRを構成する $\mu$  H鎖と代替L鎖はともに産生されているが、お互いに会合できず、preBCRを形成することができないので、増殖ならびに分化誘導シグナルが伝達されないことが強く示唆された。

### 3. $\mu$ m欠損マウス骨髄細胞の解析

$\mu$  m欠損マウスでは、RAG欠損マウスの場合と同様にB細胞分化はプロB細胞の段階で停止している。細胞内染色で解析してみると、 $\mu$  m欠損マウスではRAG欠損マウスとは異なり、代替L鎖陽性細胞の10-15%は細胞内 $\mu$  H鎖を発現していることが判明した。膜結合型ではなく分泌型の $\mu$  H鎖が産生されているものと考えられる。この代替L鎖陽性かつ $\mu$  H鎖陽性細胞の集団をさらに詳しく調べてみると、1/4-1/3の細胞しか抗preBCR抗体で染色されないことが明らかとなった。しかも、

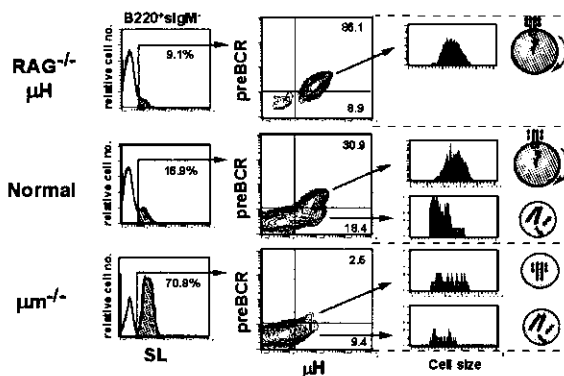


図1：骨髄プレB細胞におけるpreBCR形成の解析

のこりのpreBCR陽性細胞も、正常マウスや $\mu$  H Tg RAG欠損マウスの場合とは異なり、サイズが小さく、増殖していないものと考えられた。すなわち、このマウスでは $\mu$  H鎖が産生され、その一部が代替L鎖と会合してpreBCRを形成するが、細胞膜に表出することができず、その結果、増殖・分化誘導シグナルが伝達されないことが示唆された。

### 【考察】

正常マウス骨髄細胞の解析から、プロB細胞においてH鎖遺伝子の機能的再構成の結果産生されてくる $\mu$  H鎖のすべてが代替L鎖と会合してpreBCRを形成するわけではないことが明らかとなった。以前にも、プロ/プレB細胞からクローニングした $\mu$  H鎖遺伝子をプロB細胞に導入発現させた実験から、すべての $\mu$  H鎖がpreBCRを形成しないであろうということは示唆されていたが、実際の骨髄細胞におけるpreBCRの形成を直接解析したのは本研究がはじめてである。

H鎖遺伝子の機能的再構成の結果産生されてくる $\mu$  H鎖のうち、どの位の割合の $\mu$  H鎖が代替L鎖と会合しpreBCRを形成可能なのであろうか？正常マウスの場合、代替L鎖陽性かつ $\mu$  H鎖陽性細胞の集団のうち、2/3-3/4はpreBCR陽性であるが、preBCRが増殖シグナルを伝達することを考慮すると、preBCR形成可能な $\mu$  H鎖の頻度は2/3-3/4よりもずっと低いはずである。事実、preBCR形成可能ではあるがpreBCRからの増殖シグナルが入らない $\mu$  m欠損マウスでは、代替L鎖陽性か

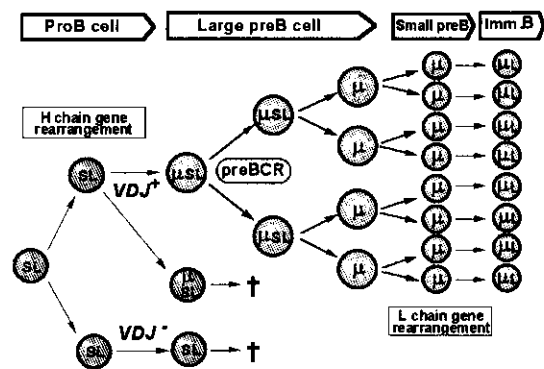


図2：preBCRによる $\mu$  H鎖の産生と品質の管理

つ $\mu$  H鎖陽性細胞の集団のうち1/4-1/3の細胞しかpreBCR陽性ではなかった。したがって、これまで予想していたよりもずっと少ない割合の $\mu$  H鎖しかpreBCRを形成できないものと考えられる。

以前の研究で代替L鎖と会合できない $\mu$  H鎖のほとんどがL鎖( $\kappa$ 鎖、 $\lambda$ 鎖)と会合できないことが示されている。多様性に富んだL鎖の代わりに、多様性のない代替L鎖をL鎖のプロトタイプとして、まず $\mu$  H鎖との会合の有無をチェックして、将来的にL鎖と会合できないような低品質な $\mu$  H鎖をはじくというのが、preBCRのひとつの重要な役目であると考えられる。一方、将来L鎖と効率よく会合できる高品質の $\mu$  H鎖を産生した細胞においては、preBCRからの増殖シグナルが伝達されるので、たとえそのような高品質の $\mu$  H鎖が産生される確率は低くとも、この選択的増幅過程を経ることによって、高品質の $\mu$  H鎖を産生した細胞が多数産生されるわけである。このようにあらかじめL鎖と会合可能な $\mu$  H鎖を選択してあるので、次にL鎖の遺伝子再構成がおこることによって、効率の良いBCRの形成が保証される。すなわち、preBCRはB細胞分化の初期において $\mu$  H鎖の産生ならびに品質をチェックする重要な働きを担っているといえる。今後、ヒトにおいてもpreBCRが同様の役割を果たしているかどうか、解析する予定である。

### 【参考文献】

1. Saijo, K., Schmedt, C., Su, I-h., Karasuyama, H., Lowell, C.A., Reth, M., Adachi, T., Patke, A.,

- Santana, A. and Tarakhovsky, A.: Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF- $\kappa$ B activation during B cell development. *Nature Immunol.* in press
2. Wang, Y-H., Stephan, R. P., Scheffold, A., Kunkel, D., Karasuyama, H., Radbruch, A. and Cooper M. D.: Differential surrogate light chain expression governs B cell differentiation. *Blood* 99: 2459-2467, 2002.
3. Stephan, R. P., Elgavish, E., Karasuyama, H., Kubagawa, H. and Cooper, M. D.: Analysis of VpreB expression during B lineage differentiation in lambda5-deficient mice. *J Immunol.* 167: 3734-3739, 2001.
4. Maki, K., Nagata, K., Kitamura, F., Takemori, T. and Karasuyama, H.: Immunoglobulin  $\beta$  signaling regulates locus accessibility for ordered Ig gene rearrangements. *J. Exp. Med.* 191: 1333-1340, 2000.
5. Nomura, K., Kanegane, H., Karasuyama, H., Tsukada, S., Agematsu, K., Murakami, G., Sakazume, S., Sako, M., Tanaka, R., Kuniya, Y., Komeno, T., Ishihara, S., Hayashi, K., Kishimoto, T. and Miyawaki, T.: Genetic defect in human X-linked agammaglobulinemia impedes a maturational evolution of pro-B cells into a later stage of pre-B cells in the B-cell differentiation pathway. *Blood* 96: 610-617, 2000.

## Quality check of $\mu$ H chain by preBCR formation in early B cell development

Hajime Karasuyama and Yohei Kawano (Dept. of Immune Regulation, Tokyo Medical and Dental Univ.), Yoshiyuki Minegishi (Dept. of Human Ontogeny and Childhood Development, Tokyo Medical and Dental Univ.)

Five genes have been identified to be responsible for B cell-deficient primary immunodeficiency in human. All of the genes encode either preBCR components or signaling molecules involved in preBCR signaling. These observations as well as the analysis of knock-out mice clearly indicate that preBCR formation and signal transduction are essential in early B cell development. PreBCR has been shown to play roles not only in induction of B cell differentiation but also in induction of cellular proliferation and regulation of Ig gene rearrangements. In the present study, we examined the ability of each  $\mu$  H chain produced in bone marrow pro/preB cells to associate with surrogate L chain to form preBCR complex by analyzing bone marrow cells from normal and B cell-deficient mutant mice. Our results indicated that only 1/4-1/3 of  $\mu$  H chains have ability to form preBCR in association with surrogate L chain. PreBCR appears to function as a checkpoint in early B cell development to select for preB cells producing a good quality of  $\mu$  H chains that could associate with conventional L chain in next step of B cell development.



## プロテオーム解析によるリンパ球異常の原因探索の試みに関する研究

河野 雅之 (千葉大学大学院医学研究院・遺伝子制御学)  
山崎 晶 (千葉大学大学院医学研究院・遺伝子制御学)  
斉藤 隆 (千葉大学大学院医学研究院・遺伝子制御学)  
木村 弥生 (かずさDNA研究所・ヒト遺伝子研究部)  
小原 収 (かずさDNA研究所・ヒト遺伝子研究部)

未知の先天性免疫不全症の原因遺伝子の解明のために、患者リンパ球での欠損蛋白を検出し、そこから関連分子を解析アプローチとして、プロテオーム解析の適応性を試みた。まず、果して単一遺伝子の欠損がプロテオーム解析で検出可能かについて、細胞骨格を構成するモエシンの欠損マウスを用いて調べた結果、欠損スポットの解析からモエシン欠損が同定され、このアプローチで欠損蛋白の同定が可能であることを示した。

### A. 研究目的

T細胞受容体の発現に異常があるために免疫不全となっていると考えられる症例の原因遺伝子を同定しようと、これまでT細胞受容体に関与すると推察される数種の遺伝子の解析を行うとともに、一方では細胞株を樹立して、積極的にcDNAライブラリーを導入することによる発現クローニングを試みてきたが、種々の困難な点があり、成功に至っていない。原因遺伝子そのものでなくても関与する分子の「一端でも掴む」ことを目的に、プロテオーム解析が有効かどうか、を検討することにした。プロテオーム解析の長所はDNA/RNA発現では差がなくても機能的に変異のある蛋白およびそのdownstreamの蛋白の変化を同定できる点である。このアプローチの初めとして、既知の遺伝子を欠損したマウスを用いて、欠損遺伝子が2次元電気泳動のゲルによって検出可能かどうか、を検討した。使用した遺伝子欠損マウスは、細胞骨格を形成し、レセプターとアクチン系を繋ぐ役割をしているERM蛋白の一つモエシンである。T細胞では特にERMのうちモエシンが多いこと、および細胞集団に大きな変化がないことが知られていることから対象とした。

### B. 研究方法

モエシン欠損マウスは京大・月田先生より供与された。脾細胞をそのまま1% NP40溶液で溶解し、IEF sample bufferを加え、可溶成分と不溶成分に分けて調整し、IEF/SDS-PAGEの2次元ゲルで展開して解析した。可視化にはCyber greenで、蛋白同定にはCoomassie BBを使って染色し、MALDI-TOFを用いて同定した。

(倫理面への配慮)

今回の解析はモデルマウスなので該当しない。今後の患者サンプルの解析を進める際には、既に倫理委員会の承認と、患者さんの承諾をとっているサンプルの解析を進める。

### C. 研究結果

モエシン欠損マウスは、これまでの解析から、どこにも異常が見いだせないマウスとして報告されている。T細胞では、ERMの中ではmoesinが最も高く発現しており、続いてezrinで、radixinは殆ど発現していなかった。果たしてmoesin欠損マウスのcell lysateの解析から、moesin蛋白の欠損を検出できるかが大きな問題であった。Moesin欠損マ

ウスの脾臓をコラジェナーゼ処理して、脾細胞を1% NP40でlysateを作り、2次元電気泳動によって解析した。およそ1000以上の蛋白が検出されたが、既知の蛋白解析よりmoesinのスポットの位置が解り、そのスポットは、欠損マウス由来のサンプルには欠損していた。これより、単一遺伝子欠損でもこの方法で検出可能であることが判明した。次に、実際にヒト末梢血リンパ球由来のサンプルを解析してみたところ、同様に1000以上のスポットが検出され、独立して調整したサンプルとほぼ完全に一致した。これから患者サンプルを比較できる基礎条件が設定されたと思われる。

#### D. 考 察

原因不明の免疫不全症における原因遺伝子の探索は、関係する機能からの類推による検索以外は、家系に基づく歴史的にはポジショナルクローニングしかなかった。今回のケースもTCR複合体の発現・機能に関与するので関連分子の解析を進めてきたが、変異のある分子は見つからなかった。発現クローニングを目指して、HTLV1 transformationによって患者由来のT細胞株を樹立したが、細胞増殖が遅い上に、培養中で自然にTCR発現が低下することもわかり、cDNAライブラリーを導入して試みたが、クローニングには相当な困難があり、成功には至らなかった。そこで、今回はとにかく何らかの関連分子でも掴みたいということで、特異的な方法から一般的な方法に戻り、DNAアレイとプロテオーム解析でどこまでアプローチできるかを試した。TOF-MASSの使用によって、2次元電気泳動のゲルからの蛋白を直接

同定できるので、単一遺伝子欠損と考えられるケースに応用できるかは大変重要な試みと考えられる。最初の試みとして、細胞集団に大きな変化のないmoesin欠損マウスを選んで解析した。あるリンパ球サブセットがない場合などは、単純に総蛋白を比較するのは簡単ではないと思われる。果たして、moesin欠損マウス由来の脾臓細胞では、moesin欠損が2次元ではっきり検出され、アプローチの可能性を示した。サンプルの調整方法もいろいろ検討した結果、凍結させたリンパ球サンプルでもほぼ同様な結果が得られることも判明した。可溶性分画と不溶性分画では、明らかに解析できる蛋白集団が異なるので、分画についても更に検討する必要がある。また、今回は細胞骨格関連の分子で比較的検出されやすい分子と考えられるのに対して、既知の免疫不全症の原因遺伝子としてのシグナル伝達分子などはその発現は非常に低いと考えられるので、適当なタンパク分画によるenrichmentが必要になるとも考えられる。これに関してはXLA患者由来の細胞株（富山医科薬科大・金兼先生との共同研究）を使って、果たしてBtkと関連蛋白が検出できるのか、どのような分画にした場合には可能なのか、を検討して行きたいと考えている。

#### E. 結 論

単一遺伝子欠損マウスのリンパ球のプロテオーム解析の結果から、単一遺伝子欠損でも分子によっては検出可能であり、免疫不全症患者のリンパ球を解析して、原因遺伝子の探索に応用することが可能であることが判明した。

# Chediak-Higashi症候群におけるceramide産生増加の機序と protein kinase C 活性低下との関連について

伊藤 正彦 (山梨大学医学部微生物学)

田辺 文憲 (山梨大学医学部人間科学・基礎看護学)

葛西 宏威 (山梨大学医学部微生物学)

原発性免疫不全症であるChediak-Higashi症候群 (CHS) の患者由来の細胞株をconcanavalin A (Con A) で刺激すると健常人細胞株に比べ細胞内のceramide産生の有意の増加がみられた。ceramide産生に参与するneutral SMase (N-SMase) を阻害するglutathioneはN-SMaseを阻害する濃度でCHSの増加したCon A cap形成をほぼ正常レベルに回復させた。一方、ceramideのde novo合成を阻害するfumonisins B1はcap形成に影響を及ぼさなかった。また、CHS cellのN-SMase活性はCon A刺激後に高まっており、逆に正常細胞をN-SMaseで前処理するとCon A cap形成が増加することもわかった。さらに、細胞透過性のC2-ceramideは細胞膜のPKC活性を低下させることも示した。これらの結果より、CHSでは何らかの機序でN-SMaseが異常に活性化することによりceramide産生の増加をもたらし、既に報告したPKC活性の低下をひき起こすことが示唆された。

## 【はじめに】

CHSは白子症を伴う常染色体劣性遺伝の原発性免疫不全症の1つであり、好中球を含む多くの細胞に巨大顆粒が存在し、ライソゾーム酵素活性の低下やリンパ球のナチュラルキラー (NK) 活性の低下が特徴である<sup>1)</sup>。患者は黄色ブドウ球菌などの細菌感染を繰り返し、多くは小児期に死亡する。CHSの責任遺伝子CHS1は、cDNAが13kbと非常に長くその機能もまだ明らかにされていない<sup>2,3)</sup>。筆者らは、CHSの動物モデルであるベージュマウスおよびCHS患者由来の細胞株において、Con AまたはPMA刺激後のPKC活性に異常低下がみられ、これがNK活性低下やCon A cap形成増加などの細胞機能異常に深く関与することを明らかにした<sup>4,5,6,7)</sup>。また筆者らは、細胞内脂質であるceramideがPKCβのcalpainによる分解を促進すること<sup>8)</sup>、およびCon Aで刺激したCHS細胞ではceramideが有意に増加していることを見い出しているため、今回はこのceramide増加の機序について検討した。

## 【材料と方法】

細胞は、本研究に同意の得られたCHS患者3例と健常者コントロール3例由来のEB virus-transformed cell lineを用いた。PKCの抽出は、種々の薬剤で刺激した細胞をEDTA, EGTA, leupeptinを含むTris buffer (pH7.5) に浮遊させ、4℃で10秒、3回sonicationを行った。さらに、4℃で100,000g、1時間超遠心し得られた上清を細胞質分画、0.01% TritonX-100で可溶化した沈査を膜分画とした。PKC活性は、PKC enzyme assay system (Amersham社)を用い、PKCの特異的基質ペプチドへの<sup>32</sup>Pの取り込みを液体シンチレーションで測定した。

Con A cap形成は、種々の薬剤で前処理した細胞にFITC-Con A (20 μg/ml) を加えて30分incubateした後、paraformaldehydeで固定し、蛍光顕微鏡で200個以上の細胞を400倍で観察し、cap形成細胞を判定した。

細胞内ceramideおよびsphingomyelin (SM) の測定は、細胞に<sup>3</sup>H-palmitic acidを一晩取り込ませた後、脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーで展開し

表1 Ceramide levels in CHS cell lines

Cells		Ceramide	Sphingomyelin
Normal	none	450.4±34	828.8±79
	Con A	545.7±76	835.4±75
CHS	none	457.8±21	656.1±48
	Con A	810.5±44 *	420.6±32*

\*P<0.01, significant when compared with unstimulated CHS cells

た。展開後の標準となる脂質のスポットを削りその放射活性を測定した。

Sphingomyelinase(SMase)活性の測定は、<sup>14</sup>C-SMを基質として用い、中性および酸性条件下で反応後の分解産物の放射活性を測定することにより求めた。

Con A、N-SMase、A-SMase、C2-ceramideはSigma社のものを使用した。

### 【結果】

CHS cell lineではCon A 15分刺激後にceramideが有意に増加することを表1に示す。一方、SMは刺激後に減少することがわかった。Ceramideの主な産生経路には、serineとpalmitoyl-CoAから合成されるde novo産生経路とSMがSMaseによって分解されceramideが産生される経路の2つがある。そこで、de novo産生経路を阻害することが知られているfumonisin B1(10 μM)とneutral SMase(N-SMase)を阻害することが知られているglutathione(5mM)を用いて<sup>9)</sup>、CHS cell lineで増加しているCon A capが回復するかどうかを検討した。図1に示すように、CHSの細胞ではcap形成が正常人コントロールに比べ約2倍増加していたが、glutathioneで30分前処理すると有意差がなくなる程度まで減少することがわかった。一方、fumonisin B1はcap形成に影響を与えなかった。

次に、Con A(20 μg/ml)で15分刺激した前後でCHS cellのSMase活性を測定してみた。表2に示すように、CHSのN-SMase、A-SMaseともにCon A刺激により活性に有意の増加がみられた。

図2に示すように市販されているN-SMaseおよびA-SMaseを正常細胞に加えcap形成を調べたとこ

表2 Activity of SMase in CHS cells

Cells		N-SMase	A-SMase
Normal	none	248.3±12	693.8±64
	Con A	258.3±17	773.0±15
CHS	none	236.2±28	545.5±37
	Con A	453.7±21*	1028.3±44 *

\*P<0.01, significant when compared with unstimulated CHS cells

ろ、N-SMaseはcap形成を有意に増加させることがわかった。細胞透過性のceramide(C2-ceramide)もcap形成を増加させた。

また、正常細胞にC2-ceramide(1 μg/ml)で前処理後Con A刺激をしたときの膜分画のPKC活性は著明に低下することを示した(図3)。図には示さないが、N-SMase処理後もPKC活性は低下することを確認した。さらに、ceramideによるPKC活性の低下はPKCを分解するcalpainの阻害剤であるE64d(1 μg/ml)により消失することもわかった。

これらの結果から、少なくともN-SMaseがCHSのceramide産生に関与し、ceramideがPKCのcalpainによる分解をひき起こしていることが示唆された。

### 【考察】

今回の実験により、CHSにおけるPKC活性の制御異常はceramideの異常増加により生じること、およびN-SMaseの異常な活性化によりceramideの産生が増加していることが示唆された。N-SMaseの活性化の機序はまだ明らかではないが、この活性化機構にCHSの責任遺伝子が関与していることが考えられる。CHS 1蛋白は3801アミノ酸からなる巨大分子で、lysosomal fissionに関与するとの報告はあるが<sup>10)</sup>、生体内での役割はまだ明らかにされていない。CHSの患者のなかには成人まで生存する例もあるなど、症状の程度の違いもあり、CHS1のmutationの相違が影響していることが推察される。したがって筆者らは現在、CHS1分子内におけるBEACH、WD40などの領域を考慮し、種々の欠損変異体を作成しその発現系を構築している。それらの変異体を用い、CHSのceramide産