

図 1 Effect of glutathione on Con A cap formation

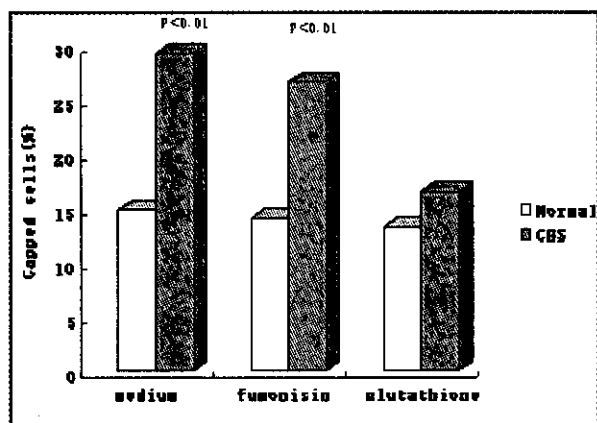


図 2 Effect of N-SMase on Con A cap formation

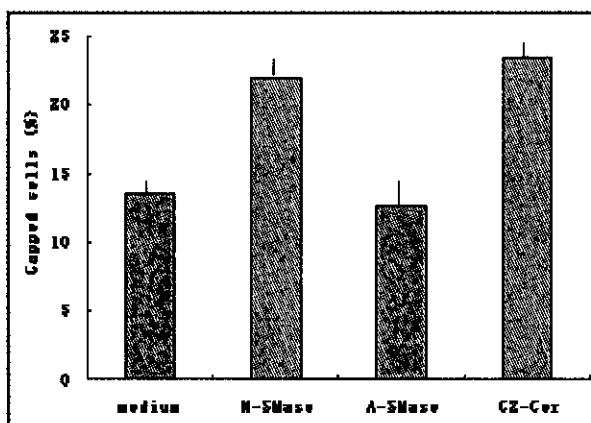
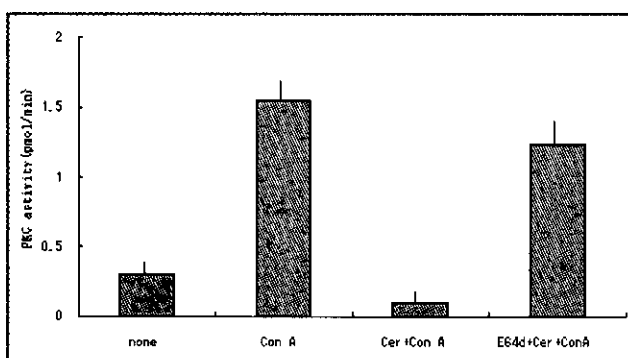


図 3 Effect of C2-ceramide on membrane bound PKC activity



生異常やPKC活性異常およびCon A cap形成や巨大顆粒形成などの細胞機能異常がどの変異体で回復するかを検討中である。これらを詳細に解析することによりCHSの責任遺伝子の役割を解明したいと考えている。

#### 【文献】

- 1) 田辺文憲, 伊藤正彦. Chediak-Higashi症候群の病因・病態と治療, 小児内科, 32, 2036-2039, 2000.
- 2) Perou CM, Moore KJ, Nagle DL, et al. Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. Nature genetics 13, 303-308 1996.
- 3) Barbosa MDFS, Nguyen QA, Tchernev VT, et al. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. Nature 382, 262-265, 1996.
- 4) Ito M, Tanabe F, Takami Y, et al. Rapid down-regulation of protein kinase C in Chediak-Higashi syndrome (beige) mouse by phorbol ester. Biochem.Biophys.Res.Commun. 153, 348-356, 1988.
- 5) Ito M, Sato A, Tanabe F, et al. The thiol proteinase inhibitors improve the abnormal rapid down-regulation of protein kinase C and the impaired natural killer activity in Chediak-Higashi syndrome (beige) mouse. Biochem.Biophys.Res.Commun. 160, 433-440, 1989.
- 6) Sato A, Tanabe F, Ito M, et al. Thiol proteinase inhibitors reverse the increased protein kinase C down-regulation and concanavalin A cap formation in polymorphonuclear leukocytes from Chediak-Higashi syndrome (beige) mice. J.Leukoc. Biol. 48, 377-381, 1990.
- 7) Tanabe F, Cui S-H, Ito M. Abnormal down-regulation of PKC is responsible for giant granule formation in fibroblasts from CHS (beige) mice- a thiol proteinase inhibitor, E-64-d, prevents giant granule formation in beige fibroblasts. J.Leukoc. Biol. 67, 749-755. 2000.
- 8) Tanabe F, Cui S-H, Ito M. Ceramide promotes calpain-mediated proteolysis of protein kinase C  $\beta$  in murine polymorphonuclear leukocytes. Biochem.

Biophys.Res.Comm. 242, 129-133, 1998.

9) Dbaibo G.S., El-Assaad W., Krikorian A., et al. Ceramide generation by two distinct pathways in tumor necrosis factor-induced cell death. FEBS Letters 503, 7-12, 2001.

10) Perou C.M., Leslie J.D., Green W., et al. The

beige/Chediak-Higashi syndrome gene encodes a widely expressed cytosolic protein.

J.Biol.Chem., 272,29790-29794, 1997.

## Study on the mechanism of the increment of ceramide production and the relation to the down-regulation of protein kinase C activity in Chediak-Higashi syndrome

Masahiko Ito<sup>1</sup>, Fuminori Tanabe<sup>2</sup>, Hirotake Kasai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology

<sup>2</sup>Department of Human Science and Fundamentals of Nursing, Faculty of Medicine, University of Yamanashi

In Con A-stimulated Chediak-Higashi Syndrome (CHS) cell lines, ceramide production was significantly enhanced as compared with that in normal cell lines. To examine the mechanism of the increased ceramide production, we used glutathione which inhibits neutral sphingomyelinase (N-SMase) and fumonisin B1 which inhibits *de novo* synthesis of ceramide. We found that glutathione corrected the increased cap formation to almost normal levels in CHS cells, whereas fumonisin B1 did not affect the cap formation. We also showed that N-SMase activity was enhanced in CHS cells when stimulated with Con A and the exogenously added N-SMase increased the capping in normal cells. These findings suggest that N-SMase activity was enhanced by unknown mechanism and it promotes ceramide production in CHS cells, which may cause PKC down-regulation as we reported previously.

## RAG2 遺伝子異常による Omenn 症候群の一例

谷内江 昭 宏 (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)  
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)  
上 甲 忍 (宇和島市立病院小児科)  
林 正 俊 (宇和島市立病院小児科)

RAG1/RAG2 遺伝子異常を背景とした免疫異常として、B- SCID および Omenn 症候群が知られている。これらの疾患の原因遺伝子が RAG1/RAG2 であることが明らかにされて以来、主としてヨーロッパで多数の症例の解析結果が蓄積されてきた。しかし、本邦においてはこれまでに明らかにされた RAG1/RAG2 遺伝子異常は 2 家系 3 例のみであり、いずれも RAG1 遺伝子異常による Omenn 症候群であった。B- SCID の報告はなく、RAG2 異常症も知られていなかった。今回は、本邦で最初となる RAG2 異常を基盤とした Omenn 症候群の臨床像ならびに免疫学的特徴について記載する。診断のきっかけは、臨床医の正確な観察と適切なスクリーニング検査の施行によるところが大きい。今後、免疫学的には救急疾患である複合型免疫不全症の早期発見と治療のために、疾患の診療体系を確立する必要がある。

### 【はじめに】

他の原発性免疫不全症と同様、重症複合免疫不全症 (SCID: severe combined immune deficiency) に分類される疾患群に関しても原因遺伝子の解明がすすみ、多様な病態が明らかにされつつある。特に、B- SCID のなかで放射線感受性を有する一群に Artemis 遺伝子異常を有する症例があることが明らかにされたことは大きな意義がある<sup>1)</sup>。一方、RAG1/RAG2 遺伝子異常に関しては本邦における症例の蓄積は多くはなく、これまでに RAG1 異常症 2 家系、3 人が報告されているにすぎない<sup>2)</sup>。骨髄移植や遺伝子治療などの病因にせまる治療のみでなく、より有効な補助療法を開発するためには多数症例での臨床経験を積み重ねること、さらに多様な病態の発症機序を理解することが必須であると考えられる。特に、RAG 活性が部分的に残存することを特徴とする Omenn 症候群においては、異常に活性化し増加したオリゴクローナルなリンパ球増殖がその病態と密接に関連している

と考えられ<sup>3)・5)</sup>、補助的な治療としての免疫抑制療法の効果期待される<sup>6)</sup>。これらの疾患では生後早期に診断し、治療をできるだけ早く開始するために、多数の症例の知見を蓄積することが最も重要な課題であると考えられる。今回は本邦初となる RAG2 遺伝子異常に基づく Omenn 症候群症例について、その特徴的な臨床像を解析し記載する。

### 【症 例】

症例は在胎 38 週、3192 g、Apgar 9/9 にて出生。生直後より頭部、手掌、足底を含む全身に亀裂と葉状剥離を伴う紅皮症を認めたため、出生当日紹介医入院となった。さらに、末梢血白血球増加、リンパ節腫大、肝脾腫、下痢、体重減少などを伴い全身状態も不良となった。皮膚所見も次第に悪化し、低ガンマグロブリン血症、Bリンパ球欠損、好酸球増加、IgE 高値などより Omenn 症候群を疑われた。

血清免疫グロブリンの内、IgM ならびに IgA が

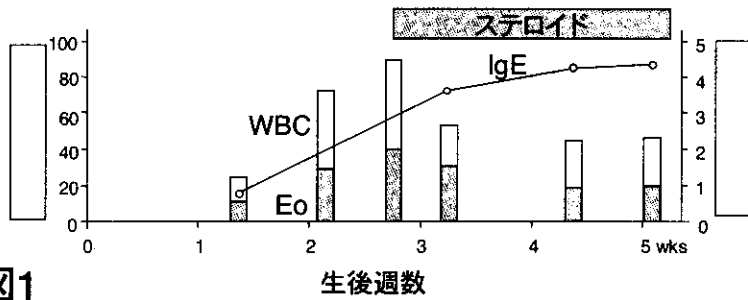


図1

共に感度以下と著明に低下。IgEは7 IU/Lと年齢に比し高値を示していた。末梢血白血球数は26,900/ $\mu$ lと著しく増加し、そのうち半数近くが好酸球であった。リンパ球サブセットでは、B細胞がほとんど検出されないのに対して、T細胞は著しい増加を示していた。これらのT細胞はHLA-DR、CD25などの活性化抗原を強く発現、さらにCD45ROがほぼすべて陽性のメモリー形質を示していた。NK細胞は検出可能であった。経過を観察すると、末梢血白血球数は次第に増加、最大80,000/ $\mu$ l以上に達した。一方、血清IgAは一貫して低値であったが、IgMは次第に増加、生後31日には142 mg/dlとなった。IgEは急速に増加し、生後23日で5,700 IU/Lと著しい高値を示した(図1)。

### 【方法】

末梢血T細胞のTCRV $\beta$  repertoire解析はRPE・Cy5標識抗CD4、FITC標識抗CD8ならびにPE標識抗TCRV $\beta$ 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V $\beta$  repertoire分布を定量した。TCRV $\beta$  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 $^+$ T細胞ならびにCD4 $^+$ 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' TCRV $\beta$ 特異的プライマーと蛍光標識3' TCRC $\beta$ プライマーを用いてPCR増幅、ABI310によりPCR産物のサイズを測定した。CDR3サイズの多様性はそのサイズ分布パターンを解析すると同時に、主要なピークの数とその大きさからcomplexity score (CS)を算出した。

図1：症例14の臨床経過。生後間もなくより末梢血好酸球数、血清IgEは急激に増加した。ステロイド投与開始により末梢血好酸球数は減少傾向を示し、臨床症状にも改善が認められたが、IgE高値は持続した。

### 【結果】

リンパ球サブセット：生後23日目のリンパ球サブセットはCD20 $^+$  B細胞0.1%以下、CD16 $^+$  NK細胞7.2%、CD4 $^+$  T細胞56.7%、CD8 $^+$  T細胞27.1%、TCR $\gamma$   $\delta$  $^+$  T細胞0.5%と、B細胞がほぼ欠損、NK細胞は正常に認められた。T細胞のほとんどは活性化抗原HLA-DR、CD45ROならびにCD25を発現していた。

TCR V $\beta$  repertoire分布：正常対照に比べ、患者ではCD4 $^+$  T細胞、CD8 $^+$  T細胞共に著しいV $\beta$  repertoire分布の偏りが観察された。特に、CD4 $^+$  T細胞ではV $\beta$  5.1ならびにV $\beta$  13.1、CD8 $^+$  T細胞ではV $\beta$  2ならびにV $\beta$  13.1、V $\beta$  21.3の著しい増加が認められた(図2)。

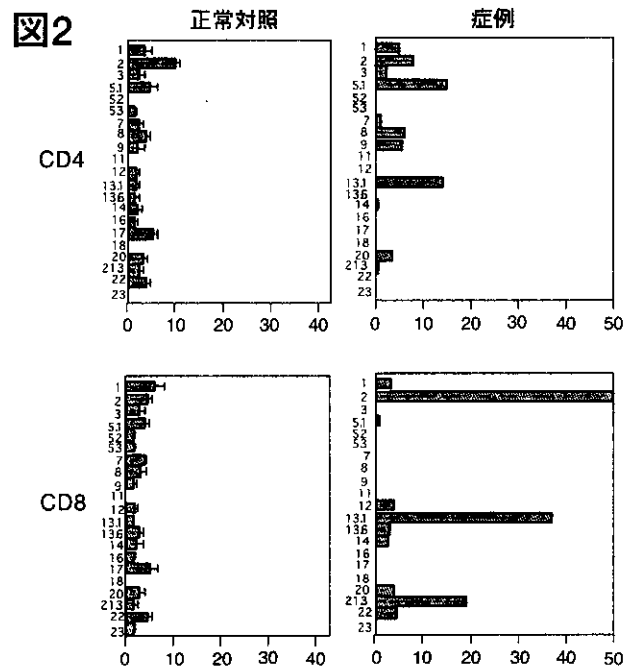


図2：末梢血T細胞TCR V $\beta$  repertoire分布。末梢血T細胞各分画(CD4 $^+$ ならびにCD8 $^+$ )のTCR V $\beta$  repertoire分布をフローサイトメトリーにより解析した。いずれの分画においても、オリゴクローナルな増殖ならびに多くのrepertoireの欠損が認められた。

CDR3サイズ分布：V $\beta$  repertoire 分布で特に増加が著しかった repertoire ではCDR3サイズ分布が明らかに低下していた（図3A）。正常対照と患者末梢血T細胞分画すべてにおけるサイズ分布の複雑さをcomplexity score を指標として図3Bに示した。対照ではcomplexity scoreがほぼ全ての repertoire で4以上を示したが、患者では正常対照に比しサイズ分布の多様性が著しく低下、そのほとんどが3未満であった。

RAG1/RAG2遺伝子解析：患者ならびに両親の末梢血顆粒球よりDNAを抽出、RAG1ならびにRAG2遺伝子解析を施行した。RAG1遺伝子では、片方の対立遺伝子に本邦において高頻度に認められる820番目のアミノ酸変異（K820R）が確認され、遺伝子多型と考えられた。

一方、RAG2遺伝子では図に示すように2箇所の遺伝子変異が確認された。母親由来の変異は73番目のアルギニンがヒスチジンとなる missense mutation（R73H）、父親由来の変異は278番目のQが停止コドンとなる、nonsense mutation（Q278Stop）であった。

患者のT細胞よりDNAを抽出し検索すると、顆粒球と同様、両方の変異が確認された。このことから、母体由来のT細胞によるGVHDの合併は否定的と考えられた。

### 【考察】

表1に本症例の臨床症状ならびに検査所見をまとめ、これまでに本邦でRAG1/2遺伝子解析の対

象となったSCID症例のデータと比較した。本症例はリンパ節腫大、肝脾腫、特徴的な皮膚症状、末梢血好酸球増加、IgE増加に加え、B細胞の欠損、活性化T細胞の増加など、Omenn症候群に特徴的な所見を全て満たしていた。さらに、TCRの多様性に関する検索も、T細胞分化が著しく障害されていることを示しており、RAG欠損症、あるいは何らかの要因によるリンパ球分化障害が存在することが強く示唆された。これまでに、本邦で検索された14例の多くはOmenn症候群を示唆する臨床症状を呈していたが、好酸球増多およびIgE高値などの検査所見の特徴を伴う症例は4例のみである。したがって、RAG1/2遺伝子異常を背景にしたOmenn症候群を診断するにあたっては、このような特徴的な臨床症状と検査所見の信頼性はかなり高いと考えられる。一方、B細胞低下やT細胞機能異常を伴う症例の多くは、V $\beta$  repertoire やCDR3サイズ分布の異常などを認めており、遺伝子異常の種類に関わらずリンパ球分化障害を示唆する共通の所見として、これらの疾患の診断を進めていくには重要な情報であることが確認された。特に、症例6は血清IgE低値であること以外はOmenn症候群に類似した症例であったが、Kobayashiらの解析によりArtemis遺伝子の異常であることが明らかにされている<sup>7)</sup>。さらに、症例5はOmenn症候群と非常に類似した臨床症状を呈したが、TCRの多様性形成には全く異常を認めず、RAG1/2の変異も遺伝子多型以外には確認できなかったことから、リンパ球分化異常とは全く異な

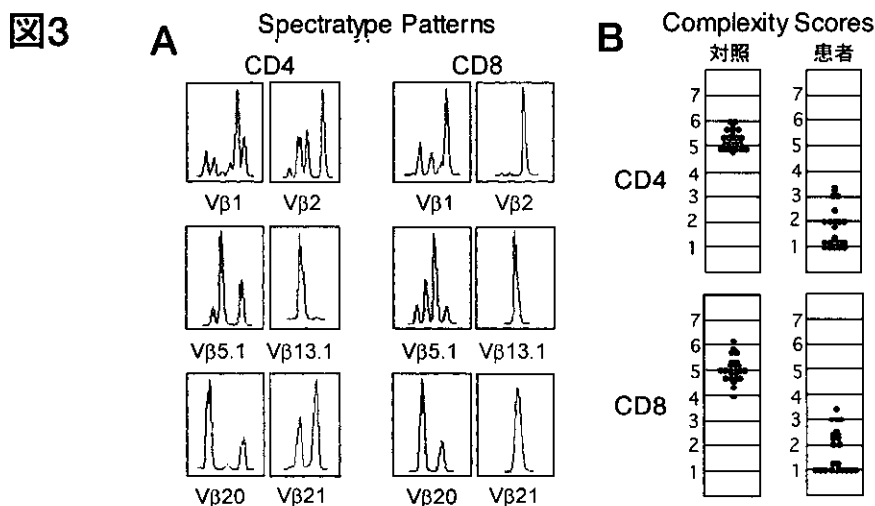


図3：CDR3サイズ分布。末梢血T細胞分画のCDR3サイズ分布をGene scan法により解析した。ほとんどすべてのV $\beta$  repertoire においてサイズ分布の多様性は消失し、オリゴクローナルな細胞増殖が示唆された。Aは代表的な repertoire のサイズ分布パターンを、Bはすべての repertoire についてサイズ分布の多様性を complexity scoreとして示した。

表 1

SCID 症例における臨床所見ならびに検査データ

症例	提供施設	LN 腫大	肝脾腫	皮疹	Eo増加	CD3	CD20	CD16	IgE	Vβ Repertoire	CDR3 Complexity
1	金沢大学	+	+	+	+	69	0.3	20	>2,000	n.d.	n.d.
2	金沢大学	+	+	+	+	54	0.5	15	2,070	n.d.	n.d.
3	京都府医大	—	—	+	+	60	1	n.d.	1	n.d.	n.d.
4	大阪府母子	+	+	+	+	68	0.6	7	0.3	skewed	n.d.
5	愛媛大	+	+	+	+	75	20	7	0	normal	normal
6	信州大学	+	+	+	+	39	0	43	3	skewed	n.d.
7	東京医歯大	?	?	+	—	71	0.1	20	低値	n.d.	n.d.
8	富山医薬大	+	—	+	+	94	0.7	3	1	skewed	reduced
9	山梨医科大	+	+	+	+	0	0	49	0	n.d.	n.d.
10	琉球大学	+	+	+	+	56	18	26	1	skewed	reduced
11	東京医歯大	—	—	+	±	n.d.	n.d.	n.d.	700	n.d.	n.d.
12	東北大	+	—	+	+	66	9	23	611	skewed	reduced
13	信州大	?	?	?	—	5	1	74	1	n.d.	n.d.
14	宇和島病院	+	+	+	+	95	<0.1	7	14,000	skewed	reduced

表 2

SCID症例におけるRAG1/RAG2遺伝子異常

症例	提供施設	RAG1	RAG2
1	金沢大学	R396C,L885R	変異なし
2	金沢大学	R396C,L885R	変異なし
3	京都府医大	変異なし	変異なし
4	大阪府母子	K820R (hom o)	変異なし
5	愛媛大	K820R,R249H	変異なし
6	信州大学	変異なし	変異なし
7	東京医歯大	K820R	変異なし
8	富山医薬大	変異なし	変異なし
9	山梨医科大	K820R,R249H	変異なし
10	琉球大学	K820R (hom o)	変異なし
11	東京医歯大	K820R*	変異なし
12	東北大	R559S,R897stop	変異なし
13	信州大	変異なし	変異なし
14	宇和島病院	K820R	R73HQ 278stop

る病態であることが示唆された。

本症例のRAG1/2遺伝子解析では、RAG1遺伝子に本邦で高頻度に認められる遺伝子多型と考えられる変異が認められ。一方、RAG2遺伝子では対立遺伝子の両方に変異が認められた。父親由来の対立遺伝子の変異は停止コドンとなるnonsense mutationであり、RAG活性の消失を伴うと予想された。一方、母親由来の対立遺伝子の変異はこれまでに報告されておらず、そのアミノ酸変異がRAG2の機能に与える影響は確認されていない。しかし、本症例が典型的なRAG活性の低下を示唆

する臨床像を呈すること、ならびに以下の理由からRAG2活性の低下を伴う変異であることが推定された。

1) RAG2遺伝子の多型報告は少なく、本邦での検索した症例ではこれまでにRAG2遺伝子のいかなる場所にも変異を見い出していない。

2) RAG2は図4に示すように6-blades β propeller構造を有しており、その活性部位は6枚のbladesの片側、βシートを連結するループが集中する部位にある。この症例での変異は、これまでの報告症例と同様の活性部位近くに位置してい

る<sup>8)</sup>。

3) この部位に人工的に作成した変異蛋白は recombination 活性が著しく低下することが報告されている<sup>9)</sup>。

表2にこれまでに、本邦で検索された RAG1/2 遺伝子変異の結果をまとめたものを示す。症例12は、東北大学で検索された症例である。本症例は臨床症状、検査所見ならびに遺伝子解析の結果から、本邦初となる RAG2 遺伝子異常を背景とした Omenn 症候群として良いと考えられた。

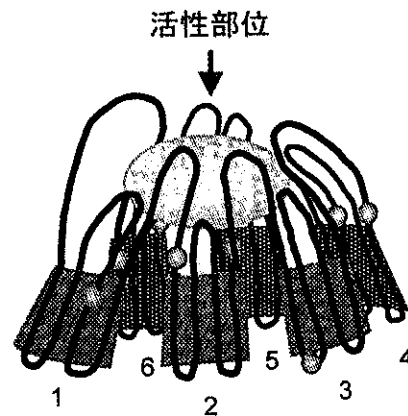
### 【おわりに】

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が重要であることがあらためて確認された。

最近、RAG2 に関してはマウスでの遺伝子治療モデルが報告され<sup>10)</sup>、本疾患においても遺伝子治療によるアプローチの可能性が示されている。RAG1/2 異常症はその残存酵素活性の程度により幅広い臨床像を示すと考えられているが、いずれにしても免疫学的 emergency であることには違いない。早期診断と治療的介入が必須であり、骨髄移植あるいは遺伝子治療などの根本治療に至るまでの待機治療、管理がますます重要となってくる。疑わしい症例を経験した場合に、早期にスクリーニング検査ならびに遺伝子診断を行い、治療方針を決定するための体系作りが今度の課題である。

### 【参考文献】

- 1) Noordzij J.G. et al.: Radiosensitive SCID patients with Artemis gene mutations show a complete B-cell differentiation arrest at the pre-B-cell receptor checkpoint in bone marrow. *Blood* 101: 1446-1452, 2003.
- 2) 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.
- 3) Villa A. et al.: Partial V(D)J recombination



C. Branden et al; Introduction to Protein Structure 2nd ed.

図4: 6-blades  $\beta$  propeller 構造を示す蛋白の構造と、RAG2 遺伝子異常部位。Neuraminidase に代表される 6-blades  $\beta$  propeller 構造を示す蛋白の一般構造を示す。4本の  $\beta$  シートが一枚の blade を構成、これが6枚連なった propeller 構造が特徴で、酵素活性部位は各 blade を連ねるループに囲まれた部分にあると考えられている。○で示した場所はこれまでに報告された RAG2 異常症での変異部位。太い線で囲った○は本症例を示す。多くの変異は blade 内、あるいはループに存在する。

activity leads to Omenn syndrome. *Cell* 93:885-896, 1998.

4) 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.

5) Villa 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.

6) Meyer-Bahlburg A. et al.: Treatment with cyclosporin A in a patient with Omenn's syndrome. *Arch Dis Child* 87: 231-234, 2002.

7) Kobayashi N. et al.: Novel Artemis gene mutations of radiosensitive severe combined immunodeficiency in Japanese families. *Hum Genet* in press.

8) Corneo B. et al.: Three-dimensional clustering of human RAG2 gene mutations in severe combined immune deficiency. *J Biol Chem* 275: 12672-12675, 2000.

9) Fugmann S.D. et al.: Identification of basic residues in RAG2 critical for DNA binding by the RAG1-RAG2 complex. *Mol Cell* 8: 899-910, 2001.

10) Yates F. et al.: Gene therapy of RAG-2 -/-

mice: sustained correction of the immunodeficiency. *Blood* 100: 3942-3949, 2002.

## A case of Omenn syndrome caused by *RAG2* gene mutations : The first reported case in Japan.

Akihiro Yachie<sup>1)</sup>, Tomoko Toma<sup>2)</sup>, Yoshihito Kasahara<sup>2)</sup>, Shoichi Koizumi<sup>2)</sup>, Shinobu Joko<sup>3)</sup> and Masatoshi Hayashi<sup>3)</sup>

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

<sup>2)</sup>Department of Pediatrics, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, and <sup>3)</sup>Pediatric Clinic, Uwajima Municipal Hospital.

We report a case of Omenn syndrome caused by mutations in *RAG2* genes. The patient exhibited characteristic clinical manifestations soon after birth, including lymph node swelling, hepatosplenomegaly, eczema-like skin lesions and growth failure. Laboratory data were also compatible with Omenn syndrome. Peripheral blood eosinophil counts and serum IgE levels increased progressively. B cell was not detectable and activated T cells with memory phenotype predominated in the peripheral blood. NK cells were present. TCR diversity was extremely limited, as determined by TCR V $\beta$  repertoire distribution by flow cytometry and CDR3 spectratyping analysis. A *RAG1* gene mutation was detected with amino acid substitution K820R, which is frequently observed among Japanese and regarded as polymorphism. *RAG2* mutations were identified within both alleles. The maternal allele contained R63H missense mutation and the paternal allele showed Q278Stop nonsense mutation. The case was the fourth case of Omenn syndrome with *RAG1/2* gene mutations and the first case of *RAG2* mutation in Japan.



## TCR $\alpha\beta$ 型T細胞の選択的な欠損を呈する複合免疫不全症の一例

野村明彦 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)  
高田英俊 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)  
大賀正一 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)  
水野由美 (福岡市立こども病院・感染症センター)  
原寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)

症例は2歳9か月、男児。家族歴、既往歴に特記すべきことはなく、麻疹および風疹ワクチン、BCG接種を受けているが副反応は認めていない。平成13年12月、水痘が遷延し、アシクロビル点滴静注およびガンマグロブリン投与を受け、3週間の経過で軽快した。免疫能の評価の為、当科に紹介入院した。白血球数 $3,300/\mu\text{L}$  (リンパ球49.7%)、リンパ球中のCD3陽性T細胞は70.1%であったが、TCR  $\alpha\beta$  型T細胞が著減し (4.6%)、ほとんどがTCR  $\gamma\delta$  型T細胞で占められていた。さらにリンパ球幼若化試験が低値であり、細胞性免疫不全を認めた。サイトメガロウイルス (CMV) 網膜炎を発症していたため、ガンシクロビル投与を開始した。その後、アデノウイルスおよびCMVによる重症かつ難治性の腸炎を発症したため、免疫能の再構築を目的として同胞間骨髄移植を行った。移植後TCR  $\alpha\beta$  型T細胞は回復し、感染症も軽快した。これまで既知の該当疾患はなく、分類不能の複合免疫不全症であるが、免疫不全の原因としてTCR  $\alpha\beta$  型T細胞の分化に関連した分子の異常などが推定される。

### 【はじめに】

原発性免疫不全症のうち著明な細胞性免疫不全をきたす疾患は重症複合免疫不全症 (SCID) に代表され、そのほとんどはT細胞の欠損を伴う。一部のSCIDではT細胞が保たれているが、TCR  $\gamma\delta$  型T細胞が優位を占め、 $\alpha\beta$  型T細胞のみの欠損を呈した例の報告はない。今回我々は、総T細胞数は正常であるにもかかわらず、そのほとんどをTCR  $\gamma\delta$  型T細胞が占め、TCR  $\alpha\beta$  型T細胞の著明な減少による細胞性免疫不全を呈し、CMVによる日和見感染症を発症した原因不明の免疫不全症を経験した。

### 【症例】

(症例) 2歳9か月、男児。

(主訴) 遷延性水痘。

(既往歴) アレルギー性鼻炎、熱性痙攣。

(ワクチン歴) 麻疹、風疹、ポリオ、BCG、

DPT。副反応なし。

(家族歴) 特記事項なし。

(現病歴) 生来健康で易感染はなかった。2歳6か月時、水痘疹が10個ほど出現し、アシクロビル内服投与を受けた。10日ほどで痂皮化した。その数日後より発熱とともに再び水痘疹が出現したため、近医にてアシクロビル点滴静注およびガンマグロブリン製剤投与を受けて軽快した。水痘が遷延し免疫不全症を疑われ、当科へ紹介入院した。(現症) 身長 83.0cm (-0.1SD)、体重 11.8kg (+0.59SD)、体温 36.5℃、咽頭扁桃を認めた。頸部リンパ節腫脹や肝脾腫は認めなかった。また、外表奇形や発達遅滞はなかった。眼科による眼底検査で両側網膜に網膜炎を示唆する浸出斑を認めた。

(入院時検査) 血液学検査では、白血球数がやや低下していたがリンパ球数は正常であった。免疫グロブリン値、血清補体価、好中球機能は正常

表1 入院時検査

(血液)		(生化学)		(血清学, その他)	
WBC	3000 / $\mu$ l	TP	6.9 g/dl	IgG	949 mg/dl
Neut	35.4 %	Aib	4.1 g/dl	IgA	328 mg/dl
Lymph	49.7 %	BUN	16 mg/dl	IgM	177 mg/dl
Mono	8.8 %	Cr	0.22 mg/dl	IgE	<50 IU/ml
Eos	5.8 %	AST	51 U/l	CH50	48 U/ml
RBC	448 X 10 <sup>4</sup> / $\mu$ l	ALT	26 U/l	C3	115 mg/dl
Hb	10.9 g/dl	LDH	370 U/l	C4	28 mg/dl
Plt	15.9 X 10 <sup>4</sup> / $\mu$ l	ALP	511 U/l	ANA	(-)
PT	9.6(11.3) sec	ChE	225 U/l	抗ds-DNA抗体	<5 IU/ml
APTT	25.1(28.7) sec	UA	5.9 mg/dl	好中球殺菌能	90.1%
Fib	226 mg/dl	Ca	9.5 mg/dl	好中球食食能	87.0%
		Glu	95 mg/dl	検尿	異常なし
		CK	70 U/l	胸部X-p	異常なし
		CRP	0.04 mg/dl		

表2 リンパ球分画

	絶対数	リンパ球領域 (%)
白血球	3300 / $\mu$ l	
総リンパ球	1640 / $\mu$ l	
CD3陽性細胞	1131 / $\mu$ l	69.0
$\alpha$ $\beta$ 型T細胞	98 / $\mu$ l	4.6
CD4 <sup>+</sup> $\alpha$ $\beta$ 型T細胞	30 / $\mu$ l	1.8
CD8 <sup>+</sup> $\alpha$ $\beta$ 型T細胞	59 / $\mu$ l	2.8
$\gamma$ $\delta$ 型T細胞	870 / $\mu$ l	53.9
CD19陽性細胞	144 / $\mu$ l	8.7
NK細胞	302 / $\mu$ l	18.4
$\gamma$ $\delta$ 型T細胞のphenotype (% / $\gamma$ $\delta$ T cells)		
CD4	0.0	V $\gamma$ 1 2.6
CD8 <sup>dim</sup>	83.2	V $\gamma$ 4 85.1
CD45RO	60.2	V $\gamma$ 9 10.3
HLA-DR	32.0	V $\delta$ 1 96.8
		V $\delta$ 2 0.1
		V $\delta$ 3 0.1

表3 細胞性免疫能関連検査

リンパ球増殖能:
PHA 108 SI% (354-388), ConA 3.5 SI% (52-458)
rIL-2 (100 U/ml) 2.79 SI (control: 17.58)
rIL-7 (100 ng/ml) 2.15 SI (control: 12.16)
NK活性: 41.9 %Lysis (30.8 $\pm$ 10.0)
サイトカイン産生能: IL-2 <50 U/ml, IFN- $\gamma$ <0.4 IU/ml
DTH: PPD 陰性, VZV 陰性
SCIDほか関連検査:
ADA, PNP活性 正常, IL-7R発現 正常, WASP発現 正常,
染色体 46XY, 22q11欠失 なし,
HIV RNA 陰性, 胸腺 MRI上低形成 (18.5 x 5mm)

表4 ウイルス検査

(ウイルス定量PCR) (コピー/ml)			
CMV 末梢血	1 x 10 <sup>3</sup>		
前房水	8 x 10 <sup>4</sup>		
EBV 末梢血	<2 x 10 <sup>2</sup>		
VZV 末梢血	<2 x 10 <sup>2</sup>		
(特異抗体価)			
CMV		風疹	
IgG	7.38 (+)	IgG	60.9 (+)
IgM	0.21 (-)	IgM	4.32 (+)
EBV		麻疹	
VCA IgG	<10 (-)	IgG	21.3 (+)
VCA IgM	<10 (-)	IgM	0.22 (-)
EADR IgG	<10 (-)		
EBNA	<10 (-)		

であった (表1)。

(細胞性免疫能検査) 末梢血リンパ球分画では総T細胞数は正常であるにもかかわらず、TCR  $\alpha$   $\beta$ 型T細胞が著減し、ほとんどをTCR  $\gamma$   $\delta$ 型T細胞が占めていた。増加しているTCR  $\gamma$   $\delta$ 型T細胞のほとんどがV $\gamma$  4V $\delta$  1のrepertoireを有していた (表2)。PHAおよびConAに対するリンパ球幼若化試験はいずれも低値を示し、IL-2およびIL-7に対する増殖反応もほとんど見られなかった。染色体異常、HIV感染、ADA、PNP欠損、WASP異常は認められなかった。(表3)。

(ウイルス検査) 入院時、両側網膜炎を呈していたことから、主なウイルスDNAおよび特異抗体を調べた。表4に示すように末梢血および前房水でサイトメガロウイルス (CMV) DNAが検出された。CMV、風疹、麻疹に対する特異抗体が認

められたが、風疹については1年前に予防接種を受けているにもかかわらず、風疹特異的IgMが検出された。

(入院後の経過) 入院後の経過を図1に示す。CMV網膜炎を発症していたことから、入院後直ちにガンシクロピルの点滴静注 (10mg/kg/day)を開始した。治療により、CMV DNAは末梢血より検出されなくなり眼底所見も改善したため、4週間後、ガンシクロピルを維持量 (5mg/kg/day)に減量した。本疾患が原因不明であり、一過性の経過をとる可能性も考えられたため、ガンシクロピルの維持療法のみ継続していたが、下痢および腹痛が出現し始めた。下痢は水様性で激しい腹痛を伴うようになり、体重減少が認められた。大腸ファイバーでは斑状紅斑が部分的にみられ、粘膜組織よりCMV DNAが検出された。一方、便のウ

ウイルス分離検査ではアデノウイルス7型が検出された。以上より、CMVおよびアデノウイルスによる腸炎と診断し、ガンシクロピルの増量、ガンマグロブリンの定期投与、高カロリー輸液を開始したが、免疫能の回復はなく、症状の改善も認められなかった。

免疫能の再構築を目的に、HLA matchの弟をドナーとして骨髄移植を行った。ドナーのリンパ球表面マーカー及びリンパ球機能は正常であった。前処置はBU + CY、GVHD予防はCsAで行った。移植後、一時血中にCMV DNAが検出されたが骨髄の回復とともに消失した。また、皮膚に1度のGVHDを呈したがプレドニンの併用にて軽快した。骨髄の回復とともに正常なリンパ球分画を呈するようになり、TCR  $\alpha\beta$  型T細胞数およびリンパ球幼若化試験の正常化がみられ、腹部症状も徐々に軽快した (図1)。

### 【考 察】

本例は著しい細胞性免疫不全によって、特にヘルペス属ウイルスに対し易感染性を示したが、既知のSCIDと異なり、乳児期に易感染性はなく、特異抗体産生を認めた。本例の特徴としてはTCR  $\alpha\beta$  型T細胞が選択的に著明に減少していることおよび末梢血において通常ではみられないV $\delta$ 1を有するTCR  $\gamma\delta$  型T細胞が著増していた点である。

通常、ヒト末梢血TCR  $\gamma\delta$  型T細胞のほとんどはV $\gamma$ 9V $\delta$ 2であり、細胞内寄生菌感染症などで増加する報告があるが、V $\delta$ 1を有するTCR  $\gamma\delta$  型T細胞の増加はAIDSでの報告がほとんどであり、さらに同細胞はCMVにより誘導されるMHC class I 関連分子であるCD1cを認識するとの報告<sup>2)</sup>もあることから、本例では細胞性免疫不全によるCMV感染により反応性にV $\delta$ 1を有するTCR  $\gamma\delta$  型T細胞が増加した可能性があるものと推測している。また、これまでT細胞の分化や機能に関連する分子異常による原発性免疫不全症のなかで、本例のようにTCR  $\alpha\beta$  型T細胞のみが選択的に減少する報告はない。胸腺も低形成であったことから、胸腺機能不全により、胸腺外分化したTCR  $\gamma\delta$  型T細胞が代償性に増加した可能性も考えられた。一方、本例の臨床像は、残存するTCR  $\alpha\beta$  型T細胞により抗体産生はある程度維持されているものの、CMVなどの日和見感染症を起こす点などでAIDSに類似していたが、HIVの感染は認めなかった。造血幹細胞移植により正常なTCR  $\alpha\beta$  型T細胞の回復がみられていることから、少なくとも免疫細胞自身の異常が原因であった可能性が高く、特にTCR  $\alpha\beta$  型T細胞は正常以上に増加していたことから、TCR  $\alpha\beta$  型T細胞の分化・選択に関与する分子異常<sup>3) 4)</sup>が推定される新たな免疫不全症であることが示唆された。

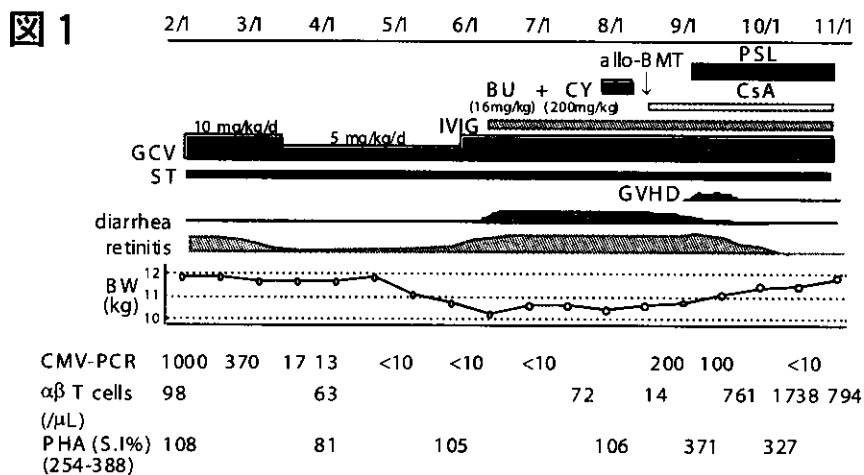


図1：入院後経過

## 【文 献】

1. Kabelitz D, Wesch D. Role of gamma delta T-lymphocytes in HIV infection. *Eur J Med Res* 6: 169-74, 2001.
2. Dechanet J, Merville P, et al. Implication of  $\gamma \delta$  T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest* 103: 1437-1449, 1999.
3. Allman D, Punt JA, Izon DJ, et al. An invitation to T and more: notch signaling in lymphopoiesis. *Cell* 109 Suppl:S1-11, 2002.
4. Aifantis I, Azogui O, et al. On the role of the pre-T cell receptor in alphabeta versus gammadelta T lineage commitment. *Immunity* 9: 649-55, 1998.

## A case of combined immunodeficiency with selective defect of $\alpha \beta$ T cells

Akihiko Nomura<sup>1</sup>, Hidetoshi Takada<sup>1</sup>, Shoichi Ohga<sup>1</sup>, Yumi Mizuno<sup>2</sup>, Toshiro Hara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

<sup>2</sup>Fukuoka Children's Hospital and Medical Center for Infectious Diseases

A 2-year-old boy was admitted to our hospital because of the severe and prolonged manifestation of chicken pox. He had no history of adverse effects of measles, rubella, or BCG vaccination. When he admitted to our hospital, he had cytomegalovirus (CMV) retinitis. Laboratory data showed WBC with 3,300 / $\mu$ l, and lymphocytes with 1,640 / $\mu$ l. Although CD3-positive cells shared 70.1% of the lymphocytes, the percentage of  $\alpha \beta$  T cells in CD3-positive cells was profoundly decreased to 4.6%. On the other hand, the percentage of  $\gamma \delta$  T cells with V $\gamma$  4V $\delta$  1 repertoire was significantly increased to share most of the T cells in peripheral blood. Functional analysis of peripheral blood lymphocytes revealed profoundly reduced response to T cell mytogens. He was treated with ganciclovir with partial response. As he had severe enteritis caused by CMV and adenovirus in the course of the disease, he received bone marrow transplantation (BMT) from HLA-identical sibling. After BMT, the number of  $\alpha \beta$  T cell was recovered, and CMV enteritis and retinitis subsided. This is a new immunodeficiency disorder which seems to be caused by the defect of one of the genes which are associated with  $\alpha \beta$  T cell-development.

## 末梢血T細胞遺伝子治療後の Adenosine deaminase 欠損症における 酵素補充療法の中断に伴う臨床経過および免疫学的解析

大 津 真 (北海道大学大学院医学研究科遺伝子治療講座)  
市 村 龍之介 (北海道大学大学院医学研究科遺伝子治療講座)  
吉 田 重 慶 (北海道大学大学院医学研究科遺伝子治療講座)  
波多野 典 一 (北海道大学大学院医学研究科小児科学講座)  
小 林 一 郎 (北海道大学大学院医学研究科小児科学講座)  
川 村 信 明 (北海道大学大学院医学研究科小児科学講座)  
有 賀 正 (北海道大学大学院医学研究科遺伝子治療講座)  
岡 野 素 彦 (北海道大学大学院医学研究科小児科学講座)  
小 林 邦 彦 (北海道大学大学院医学研究科小児科学講座)  
崎 山 幸 雄 (北海道大学大学院医学研究科遺伝子治療講座)

1995年8月から1997年3月まで末梢血T細胞を標的にレトロウイルスベクターLASNによる遺伝子治療臨床研究をAdenosine deaminase (ADA)欠損症患者1例に施行した。治療により現在まで免疫能の改善を認めているが、Polyethylene glycol (PEG)-ADAによる酵素補充療法を併用しているため、遺伝子治療単独の効果の評価は困難である。

今回我々は血液幹/前駆細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究を計画し、フランスでの遺伝子治療の副反応の報告からその実施は延期されたものの、当患者のPEG-ADAを一時中断し経過を観察する機会を得た。3週間の中断により、血漿ADA濃度は減少し、赤血球毒性代謝産物の蓄積が観察されたが、そのレベルは1才時の補充療法前の約20%であった。末梢血リンパ球数は著明に減少し、PEG-ADAの再開により増加したが、CD4 およびCD8 T細胞、B細胞、NK細胞全てにおいて、そのカイネティクスに差を認めた。PEG-ADA中断に伴いLASN遺伝子陽性細胞の比率は0.12から0.28コピー/細胞と増加し、再開後前値に復した。同時に末梢血単核球中ADA活性も5単位から10単位まで上昇した。これらの結果から、T細胞を標的とした遺伝子治療後の患者において末梢血リンパ球の維持は各分画ともにPEG-ADA補充療法に依存していること、およびPEG-ADAの中断によりLASN陽性T細胞の生体内生存優位性が示されたもののその顕性化にはより長期の休薬が必要であることが示唆された。

### 【はじめに】

骨髄移植のための至適ドナーが存在しないADA欠損症患者において、遺伝子治療は免疫能の再建が期待できる魅力的な治療法である。我々は以前、ADA欠損症患者に末梢血T細胞を標的とした遺伝子治療を施行し、現在まで比較的良好な臨床経過を経験しているが<sup>1)</sup>、PEG-ADA補充療法を継続しているため、遺伝子治療単独の効果判定が困難であるという問題点を抱えている。今回、1

才の診断時より継続してきたPEG-ADAを短期間中断する機会を得たので、その際の臨床経過、免疫学的解析の結果につき報告する。

### 【対象と方法】

症例は11才のADA欠損症男児で生後1才時に診断され、1992年4月1日からPEG-ADA (375 U/週)の補充療法を開始された。1995年8月から1997年3月まで、PEG-ADAの継続下にレトロウイルス

図1 PEG-ADA 中断に伴う血漿 ADA 濃度および赤血球中 dAXP 値の変化

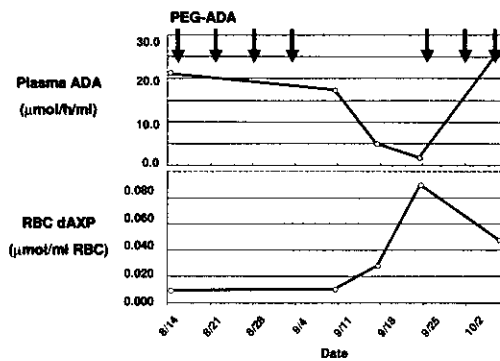


図2 診断時からの血漿 ADA 濃度および赤血球中 dAXP 値の推移

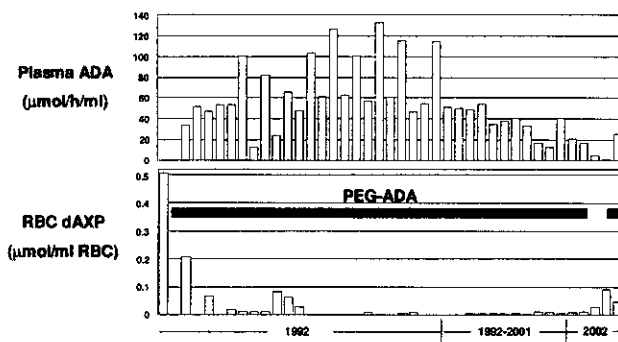


図3 末梢血リンパ球数の変化

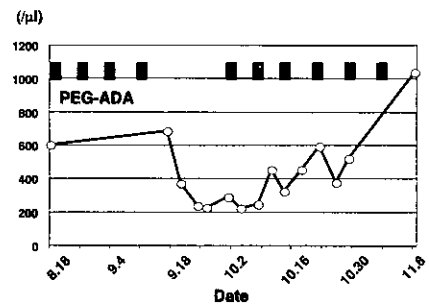
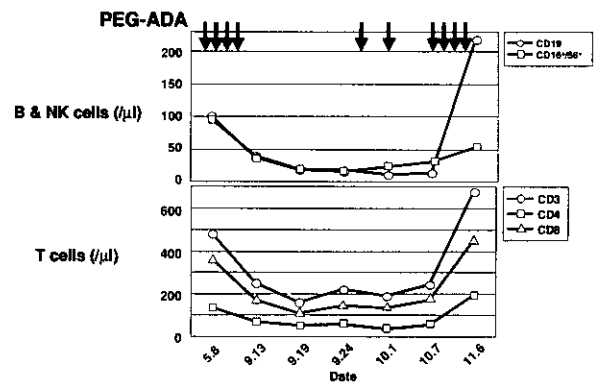


図4 各リンパ球分画の絶対数の変化



ベクターLASNを使用した末梢血T細胞への遺伝子導入を計11回施行し、免疫能の部分的再構築が観察された。2002年9月に骨髓血CD34陽性細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究に参加するため北海道大学病院に入院した。

血漿中ADA濃度および赤血球中dAXP (RBC-dAXP) 値はDuke大学Michael S. Hershfield 博士に依頼し、測定した。末梢血におけるフローサイトメトリー解析は当院中央検査室において施行した。LASN遺伝子の末梢血単核球におけるコピー数はリアルタイム定量PCR法を用いて解析した<sup>2)</sup>。末梢血単核球ADA酵素活性の測定は薄層クロマトグラフィー法を用いて行った<sup>3)</sup>。

## 【結果】

入院時、患児の末梢血リンパ球数は600/μlで、感染徴候もなく状態は安定していたため、臨床計画に基づき9月3日の投与を最後にPEG-ADAを中断した。しかしながら、同時期にフランスから、X連鎖重症複合免疫不全症に対するレトロウイルス

スペクターを用いた同様の遺伝子治療臨床研究における副反応の報告がなされ、疾患および治療法の類似性から当研究においても副反応が危惧されたため治療の実施を中止とし、9月27日にPEG-ADAを再開した(休薬期間23日)。休薬期間中、発熱等の感染徴候もなく、児の状態に特に変化はみられなかった。

図1にPEG-ADA中断に伴う血漿中ADA濃度およびRBC-dAXP毒性代謝産物の推移を示す。最終投与後1週間では両値ともに著変はみられなかったが、ADA濃度は2週目に著減し、3週目に1.66 μmol/h/mlまで減少した。RBC-dAXP 値は3週目に著増を示し、最高0.090 μmol/ml RBC に達した。PEG-ADA再開2週後にはADA濃度は前値に復し、RBC-dAXP値も速やかに減少傾向を示した。しかしながら観察されたRBC-dAXP値のピークは、患児の診断時すなわちPEG-ADA補充療法開始前の値、0.506 μmol/mlに比較すると5分の1以下のレベルであった(図2)。

次に末梢血リンパ球数の推移を図3に示す。PEG-

ADA継続中および最終投与1週目の時点では600-700/ $\mu$ lであったが、2週目には著減し3週目に220/ $\mu$ lまで減少した。酵素補充再開後1週目には増加傾向を示し、5週目には中断前の値を越え1000/ $\mu$ lに達した。フローサイトメトリー解析により各リンパ球分画別にみると、CD19陽性B細胞数はPEG-ADA中断後速やかに減少し、補充再開2週後までは低値のままであったが、5週目には中断前の値を大きく越え200/ $\mu$ lまで増加した(図4)。CD16陽性/CD56陽性NK細胞もPEG-ADA中断後速やかに減少したが、補充再開後1週目には増加し、以後緩やかな増多を続けた(図4)。図5Aに実際の細胞表面マーカー染色の結果を示すが、CD16染色における強陽性分画の消失、再度の出現が特徴的であった。このCD16強陽性細胞の動向はCD16/CD56-2重染色解析でより明らかであった(図5B)。T細胞では、CD4陽性細胞数は緩やかに減少し、補充再開後しばらくは低値が続いたが、5週目には中断前値を越えほぼ200/ $\mu$ lまで回復した。CD8細胞数にも減少がみられたが、B細胞、NK細胞と異なり3週目に微増する傾向がみられカイネティクスに差異を認めた(図4)。次に末梢血単核球におけるLASN陽性細胞の比率

を検討する目的で、定量PCR法を用いてLASN遺伝子配列のコピー数を解析した。PEG-ADA中断前のサンプルでは0.12-0.16コピー/細胞であったが、中断中は最高0.28コピー/細胞まで増加し、補充再開後には0.13コピー/細胞と前値に復した(図6)。同様に末梢血単核球中ADA活性もPEG-ADA中断前の5.4単位から2週目で10.6、3週目に11.6単位と上昇した(図7)。

### 【考察】

ADA欠損症は遺伝子治療の対象疾患として早くよりその研究が進み、1990年から現在にいたるまで末梢血T細胞、臍帯血幹細胞、骨髄血幹細胞を標的としたレトロウイルスベクターによる遺伝子導入が試みられてきた<sup>1), 4), 5), 6)</sup>。それより以前、PEG-ADAによる酵素補充療法が開発され多くの患児において有効性、安全性が証明されている<sup>7)</sup>。しかしながら、PEG-ADA補充療法の継続によって、遺伝子導入によりADA活性の改善した細胞が、導入遺伝子非陽性細胞に対して本来持つべき生体内での生存/増殖有利性(in vivo selective advantage)が損なわれると考えられ<sup>8)</sup>、ADA欠損症における遺伝子治療でのPEG-ADAの投与、中

図5A フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの解析

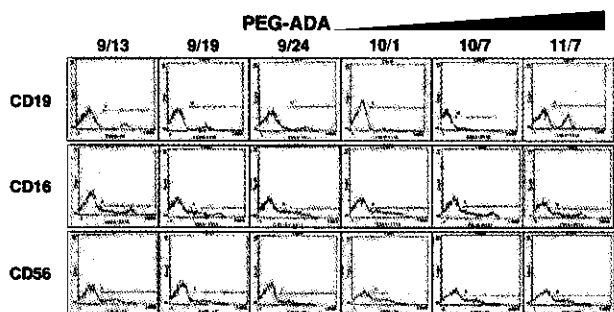


図5B NK細胞表面マーカーの解析

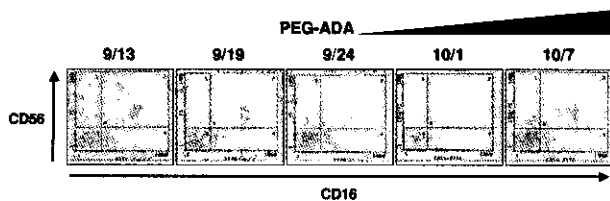


図6 末梢血単核球中 LASN コピー数の変化

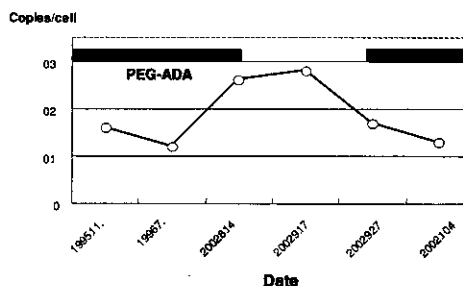
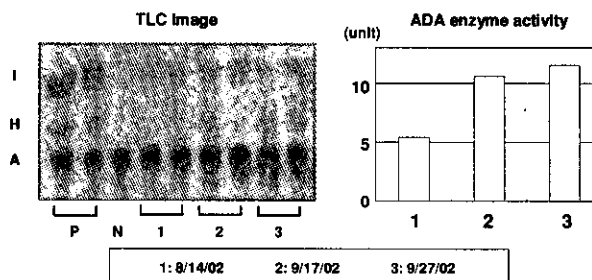


図7 末梢血単核球中 ADA 活性の変化



TLC: 標準70マダラフィー、E: イリシン、N: ビゾキサンチン、A: アデリシン、P: 陽性コントロール、N: 陰性コントロール

止が治療効果を大きく左右することが予想される。今回、短期間ではあるがPEG-ADAを中断する機会があり、将来の遺伝子治療におけるPEG-ADA補充療法の投与方法を決定する上で有用な知見を得ることを目的としてその間の免疫学的解析を試みた。

PEG-ADAの中断と再開に伴い、全てのリンパ球分画において絶対数の減少、増多が観察された。患児ではB細胞ならびにNK細胞においてもその絶対数の維持はPEG-ADAに大きく依存していることが示され、T細胞のみを標的とする治療法に比して、血液幹細胞を標的とした遺伝子導入がより多様な免疫細胞の機能を改善することが可能であると考えられた。T細胞においては特にCD8陽性細胞において絶対数の減少が他のリンパ球分画ほど顕著ではなく、LASN遺伝子陽性細胞の存在がこの現象に寄与している可能性が示唆された。

RBC-dAXP値の計測の結果から、PEG-ADA中断により毒性代謝産物の蓄積は3週目に顕著であった。しかしながら、そのピークは患児の診断時、PEG-ADA療法開始前に比べ明らかに低く、酵素補充療法の効果が完全に消失し治療前の状態が再現されるにはさらに長期の中断が必要であると考えられた。酵素補充療法の中断に伴い、LASN遺伝子陽性細胞が選択的に生存することにより、末梢血T細胞でのLASNコピー数はKohnらの研究で観察されたように、ほぼ1コピー/細胞に達することが予想されたが<sup>9)</sup>、実際には微増にとどまり、先の仮説を裏付ける結果であると考えられた。しかしながら、末梢血単核球のADA活性も、顕著ではないものの有意に上昇しており、導入遺伝子陽性細胞の*in vivo selective advantage*がPEG-ADAの中断により顕性化しうることが示された。

以上のことから、将来のADA欠損症における遺伝子治療においては既にPEG-ADA補充療法が開始されている患者では、赤血球中ADA毒性代謝産物等をモニターしつつ、児の状態の許す限り十分な期間補充を中断することで、導入遺伝子陽性細胞の*in vivo selective advantage*を最大限に生かすことが治療効果の向上につながると考えられた。

## 【文 献】

- 1) Onodera, M., Ariga, T., Kawamura, N., Kobayashi, I., Ohtsu, M., Yamada, M., Tame, A., Furuta, H., Okano, M., Matsumoto, S., Kotani, H., McGarrity, G. J., Blaese, R. M. and Sakiyama, Y. (1998) *Blood*. 91, 30-36
- 2) Yoshida, J., Otsu, M., Ariga, T., Ichimura, T., Oguchi, H., and Sakiyama, Y. (2002) *Hokkaido J. Dent. Sci.* 23, 113-122
- 3) Kohn, D. B., Mitsuya, H., Ballow, M., Selegue, J. E., Barankiewicz, J., Cohen, A., Gelfand, E., Anderson, W. F. and Blaese, R. M. (1989) *J Immunol.* 142, 3971-3977.
- 4) Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P. and et al. (1995) *Science*. 270, 475-480.
- 5) Kohn, D. B., Hershfield, M. S., Carbonaro, D., Shigeoka, A., Brooks, J., Smogorzewska, E. M., Barsky, L. W., Chan, R., Burotto, F., Annett, G., Nolte, J. A., Crooks, G., Kapoor, N., Elder, M., Wara, D., Bowen, T., Madsen, E., Snyder, F. F., Bastian, J., Muul, L., Blaese, R. M., Weinberg, K. and Parkman, R. (1998) *Nat Med.* 4, 775-780.
- 6) Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Marinello, E., Cattaneo, F., Vai, S., Servida, P., Miniero, R., Roncarolo, M. G. and Bordignon, C. (2002) *Science*. 296, 2410-2413.
- 7) Hershfield, M. S. (1995) *Hum Mutat.* 5, 107-112
- 8) Ariga, T., Oda, N., Yamaguchi, K., Kawamura, N., Kikuta, H., Taniuchi, S., Kobayashi, Y., Terada, K., Ikeda, H., Hershfield, M. S., Kobayashi, K. and Sakiyama, Y. (2001) *Blood*. 97, 2896-2899.



## Clinical observation and immunological analysis associated with discontinuation of PEG-ADA replacement therapy in an ADA-deficiency patient previously treated with retroviral-mediated, T cell-directed gene therapy

Makoto Otsu<sup>1</sup>, Tatsunosuke Ichimura<sup>1</sup>, Jukei Yoshida<sup>1</sup>, Norikazu Hatano<sup>2</sup>, Ichiro Kobayashi<sup>2</sup>, Nobuaki Kawamura<sup>2</sup>, Tadashi Ariga<sup>1</sup>, Motohiko Okano<sup>2</sup>, Kunihiro Kobayashi<sup>2</sup>, Yukio Sakiyama<sup>1</sup>

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

We have previously treated a boy with adenosine deaminase (ADA) deficiency by retroviral-mediated gene correction of peripheral T lymphocytes. Although some clinical benefit has been apparent for the patient, concomitant use of enzyme replacement therapy (PEG-ADA) has been obscuring its own efficacy of corrective gene transfer.

After 5 years since the last infusion of gene-modified T cells, the new clinical protocol "hematopoietic stem cell-directed gene therapy for ADA-deficiency" was proposed for this patient. According to the protocol, the enzyme replacement was tapered off without significant problems. Although a report from France of serious adverse event in the case of similar protocol had postponed our clinical trial, we had an opportunity to know to what extent the gene transfer itself had been contributing to the patient's immunity. Discontinuation of PEG-ADA led to a rapid drop of plasma ADA levels and the accumulation of toxic metabolites in erythrocytes in 3 weeks. Concomitantly, lymphocyte counts rapidly decreased and gradually recovered after reinstallation of the enzyme replacement. Interestingly, different lymphocyte subsets, i.e. CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>-T cells, B cells, and NK cells, showed a unique kinetics of each in cell count alteration, indicating that the dependency on PEG-ADA regarding cell survival significantly varies among the subsets. The LASN-proviral copy numbers and ADA enzyme activity in peripheral blood mononuclear cells exhibited slight increase during the observation period, indicating that in vivo selective advantage for LASN-positive T cells was shown but not fully enhanced by 3 week-discontinuation of PEG-ADA. These findings will provide a basis to determine how the enzyme replacement therapy be managed to achieve better outcome for ADA-deficiency patients in the future gene therapy trials.

## X連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する治療法の選択

久間木	悟	(東北大学加齢医学研究所・発達病態分野)
峯岸	正好	(東北大学医学部附属病院・輸血部)
大橋	芳之	(東北大学加齢医学研究所・発達病態分野)
阿南	和昭	(東北大学加齢医学研究所・発達病態分野)
浅田	洋司	(東北大学加齢医学研究所・発達病態分野)
遠藤	幹也	(岩手医科大学・小児科)
山本	克哉	(仙台市立病院・小児科)
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-SCIDに対して $\gamma$ c鎖遺伝子を用いた遺伝子治療がフランスで開始された。我々もX-SCID患者に対する遺伝子治療を計画し、既に厚生労働省の認可を受けている。しかし、フランスから遺伝子治療の副作用(白血病)の報告があったため、我々も遺伝子治療を保留している。ところが、その間にカリニ肺炎で人工呼吸器管理を要したX-SCID患者が発生した。この患者には血縁HLA一致ドナーが存在しなかった。結局、HLAハプロ一致の母親をドナーとして末梢血幹細胞から純化した大量のCD34陽性細胞を前処置なしで移植した。その結果、生着が早期にえられ、カリニ肺炎から回復できた。このことから、HLAハプロ一致純化CD34陽性末梢血幹細胞大量移植はHLA一致血縁ドナーの存在しないX-SCID患者に対する有望な治療法の一つとなりうると考えられた。

### 【はじめに】

X連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)はT細胞及びNK細胞が欠如あるいは著減し、B細胞も機能的に異常であるという免疫学的特徴を有する原発性免疫不全症である。患児は生後数カ月以内から呼吸器系や腸管の感染症を繰り返し、同種骨髄移植などの根本的治療を施さなければ乳児期に死亡する重篤な疾患である<sup>1)</sup>。HLA一致ドナーが家族内に存在する場合の予後は良好であるが、それ以外の長期生存率は50-70%台である。この長期生存率の低下は、移植片対宿主病(GVHD)、T細胞の生着遅延による感染症の危険、生着不全、自己免疫性溶血性貧血などの合併によるもので、たとえ生着しても約半数の患者では免疫再構築が不完全なままで低ガンマグロブリン値が持続し、生涯にわたる免疫グロブリンの補充療法が必要となる<sup>2,3)</sup>。

一方、1999年3月にフランス、パリのネッケル小児病院でAlain Fischer博士らにより、家族内にHLA一致ドナーの存在しないX-SCID患者に対して $\gamma$ c鎖を用いた遺伝子治療が開始された<sup>4)</sup>。2002年4月に論文に発表された5症例のうち4症例ではT細胞の数と機能がほぼ完全に正常化し、免疫不全状態は改善してきていた<sup>5)</sup>。これらの患者では、T細胞、NK細胞が治療後比較的早期に出現し、免疫グロブリン補充療法も中止できた。我々も、これまで行われてきた遺伝子治療の中で最も高く評価されたX-SCIDの遺伝子治療を本邦に導入することを目指し準備を進め、2002年6月17日に厚生労働省から遺伝子治療実施の許可を受けていた。しかし、遺伝子治療を受けた患者の1人に $\gamma/\delta$ T細胞性白血病が発生したため、我々も実施を一時保留している<sup>6)</sup>。その間、家族内にHLA一致ドナー

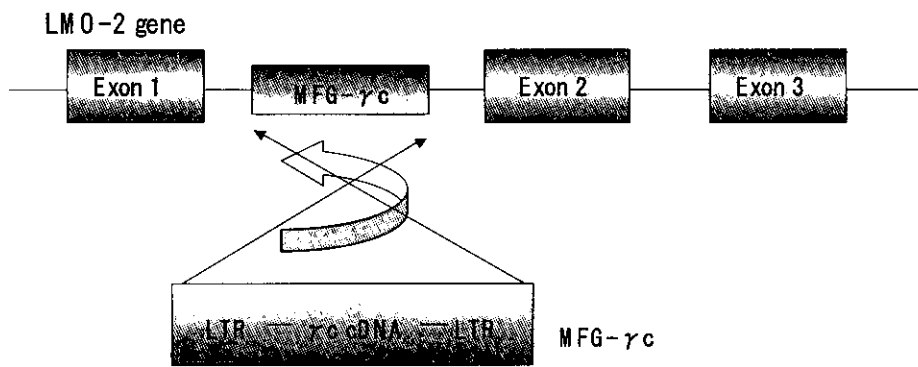


図 1. MFG- $\gamma c$ のLMO-2遺伝子への挿入

Ex vivoで遺伝子導入した $\gamma c$ 鎖を含むレトロウイルスベクター、MFG- $\gamma c$ が、逆向きにLMO-2遺伝子の第一イントロンに組み込まれていた。

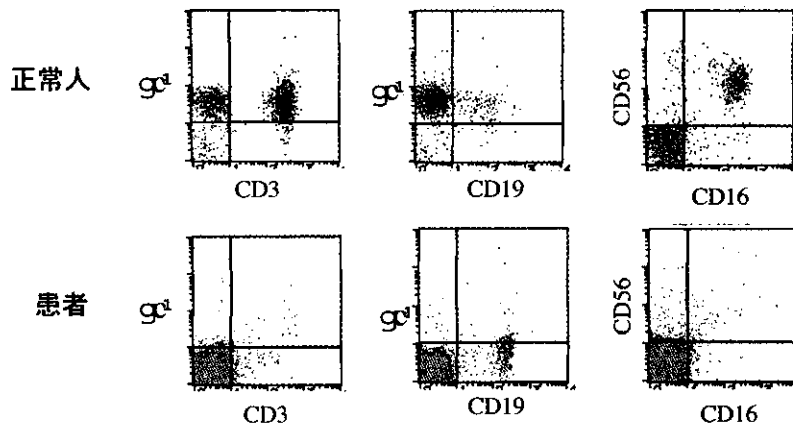


図 2. リンパ球分画における $\gamma c$ 鎖発現パターンとNK細胞

T細胞分画はCD3陽性細胞で、B細胞分画はCD19陽性細胞で代表して示す。また、成熟NK細胞はCD16/CD56陽性細胞に属する。

が存在しないX-SCID患者が発生した。患児は人工呼吸器管理を要した重症のカリニ肺炎を合併していた。このため、HLAハプロ一致の母親から末梢血幹細胞を採取し、Isolex300iを用いてCD34陽性細胞を純化し、前処置なしで移植した。移植後の経過は良好であることから、今後重症の感染症を合併するX-SCID患者のうちHLA一致血縁ドナーが存在しない患者に対する治療の有望な選択肢となる可能性が示された。

#### 【X-SCID患者に対する遺伝子治療の副作用】

2002年8月末に遺伝子治療の重篤な副作用、白血病の発症が報告された<sup>6)</sup>。症例は4番目に遺伝子治療を受けた患者で、遺伝子治療後30カ月めの

定期検査で成熟形態を持つ $V\gamma 9/V\delta 1$ ,  $\gamma/\delta$  T細胞が単クローン性に増殖しているのが判明した。Linear-amplification mediated polymerase chain reaction analysis (LAM-PCR)解析でレトロウイルスベクターは第11染色体短腕上のLMO-2遺伝子第2エクソンに逆方向に挿入され、LMO-2の過剰発現が認められた(図1)。LMO-2の過剰発現は $\gamma/\delta$  T細胞受容体型の急性リンパ芽球性白血病で報告されており、insertional mutagenesisが白血病化の原因となった可能性が大きいと考えられた。患者は遺伝子治療後30-34カ月の間にリンパ球数が30万/ $\mu$ lとなり、肝脾腫も出現したため、化学療法を施行され、現在寛解となっている。

### 【症例の病歴および検査】

フランスから遺伝子治療の副作用報告があったため、我々は遺伝子治療臨床計画を一時保留としていた。しかし、その間に我々の地域でX-SCID患者が発生した。

症例は6カ月男児で、生後4カ月頃から咳嗽、下痢などが出現し、生後5カ月で肺炎の診断で入院した。入院時胸部X線にて両肺野に浸潤影を認め、胸部CTではスリガラス状間質性肺炎病変と肺胞性病変を認めた。末梢血検査所見では白血球数 $10,000/\mu\text{l}$ （リンパ球23.8%）、CD3 0.5%、CD4 1.5%、CD8 0.3%、CD19 87%、CD16/56 0%とT細胞、NK細胞を欠き、PHAやconcanavalin Aなどのレクチンに対する反応は見られなかった。また、血清IgG 146 mg/dl、IgA 23 mg/dl、IgM 18 mg/dlと免疫グロブリン値も低値であった。血液型はB型であったが抗A抗体は検出されず、isohemagglutininは産生されていなかった。図2に示すようにFACS解析で $\gamma\text{c}$ 鎖の発現は認められず、X-SCIDの診断がついた。変異は $\gamma\text{c}$ 鎖の第七エクソン-イントロンジャンクションにあった（図3）。入院後呼吸状態はさらに悪化し、メチルプレドニンのパルス療法を行い一時臨床症状軽快するも、再度憎悪し、人工呼吸管理が必要となった。経過中喀痰からPneumocystis Cariniiが検出され、ST合剤、ペンタミジンを投与したが症状は改善せず、移植を行うまでステロイドパルス療法をさらに2度繰り返した。

### 【純化CD34陽性細胞大量移植】

患児には家族内にHLA一致ドナーは存在しなかった。しかし、前述の理由で遺伝子治療を実施できないため、HLAハプロ一致の母親からCD34純化末梢血幹細胞大量移植を行うことにした。患児は重症呼吸器感染症を合併しており、抗癌剤による前処置をおこなうにはあまりにも状態が悪く、前処置なしで移植を行うことにした。また、CD34陽性細胞の純化はG-CSFで誘導した末梢血幹細胞からIsolex300iを用いて行うこととした。この治療計画は東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会の承認および両親からの同意を得てから

施行した。末梢血幹細胞は母親からCOBEスペクトラを用いて採取した。この中に含まれていたCD34陽性細胞数は $1.022 \times 10^6$ 個であった。Isolex 300i処理後のCD34陽性細胞数は $8.7 \times 10^7$ 個であり、回収率は85.1%で、患児体重あたり $11.8 \times 10^6$ 個のCD34陽性細胞が確保された。一方、CD3陽性細胞はIsolex 300i処理前には $2.4 \times 10^9$ 個存在したが、処理後は $4.8 \times 10^8$ 個（ $6.5 \times 10^4$ 個/Kg）に減少していた。移植片対宿主病（GVHD）の予防はFK506単独で行っていたが、移植後10日目頃手掌、足底から四肢に軽度の皮疹が出現（急性GVHD、Grade I）した。しかし、これは一過性で他は順調に経過した。移植後1カ月めには呼吸状態も安定し、酸素投与も必要なくなり、末梢血の異性間FISHではXX 5%、XY95%とキメリズムが成立し、 $\gamma\text{c}$ 鎖を発現するT細胞が末梢血中に出現した（図4）。さらに移植後1カ月半後には成熟NK細胞も出現した（図4）。しかし、まだPHAやconcanavalin Aなどのレクチンに対する反応は回復していない。

### 【考 察】

X-SCIDに対する根本的治療法で、現在確立している唯一のものは同種骨髄移植法である<sup>1,3)</sup>。HLA一致ドナーが家族内に存在する場合の予後は良好であるが、それ以外の場合は予後不良であるため、フランスで遺伝子治療が開始された<sup>4)</sup>。当初は、T細胞、NK細胞が治療後比較的早期に出現し、免疫グロブリン補充療法も中止できたことなど治療効果が明白であったことから、有望な治療法であると考えられた<sup>5)</sup>。しかし、4番目に遺伝子治療を受けたX-SCID患者で遺伝子治療後2年半後に $\gamma/\delta$ T細胞性白血病が発生した<sup>6)</sup>。その時点でネッケル小児病院では既に11例に遺伝子治療が施行され9例で症状の改善が見られていた（FDA meeting報告、2002年10月13日、Gaithersburg）。白血病発症の原因としてレトロウイルスベクターのLMO-2遺伝子への組み込みによる同遺伝子の異常活性化の可能性が示された。これが発がんの原因だとすると、レトロウイルスベクターを用いた全ての遺伝子治療に発がんの危険性が実際にあることになる。ただし、現時点ではこの副作用の発