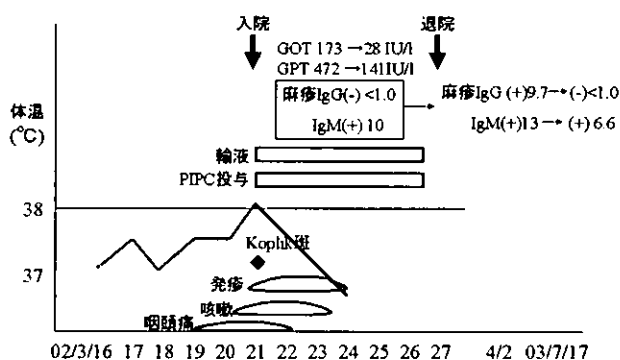


麻疹罹患時の経過



1) AID 遺伝子発現の検討

患者およびコントロールの末梢血単核球を phorbol myristate acetate (PMA) および transforming growth factor (TGF)- β で 24 時間刺激したもの、もしくは無刺激のものより ISOGEN kit (Nippon Gene) を用いて RNA を抽出し cDNA を合成した。RT-PCR 法 AID 遺伝子を増幅しアガロースゲルに泳動した。

2) AID 遺伝子の塩基配列の検討

患者及び両親、兄の末梢血単核球より RNA を抽出し cDNA を合成した。AID cDNA 全長を RT-PCR 法にて増幅し T ベクターにクローニングし、ABI 377 Auto sequencer により塩基配列を決定した。また、好中球より Sepa Gene kit (Sanko Jyunyaku) を用いてゲノム DNA を抽出し、エクソン 1 から 5 にそれぞれプライマーを設定し各エクソンを PCR 法により増幅しダイレクトシーケンスを行い塩基配列を決定した。

3) AID 遺伝子変異部位の検出

エクソン 5 にみとめた変異部位が制限酵素 NdeI で切断されるようなプライマーを人工的に作成し、患者、両親、兄、正常コントロール 100 人の好中球から抽出したゲノム DNA を使用し、PCR で増幅し NdeI で切断後アガロースゲルに泳動した。

4) glutathione S-transferase (GST) AID 融合タンパクの発現

患者の正常 AID と変異 AID の cDNA をそれぞれ pGEX ベクターに組み込み GST との融合タンパクとして大腸菌に発現させタンパクを抽出後 SDS-PAGE で電気泳動した。

【結果】

患者の B 細胞に IL-4 と CD40 の刺激を加え IgE へのクラススイッチを誘導したが、コントロールと異なりほとんど IgE へのクラススイッチは誘導されなかった。また、末梢血中の IgD 陰性 CD27 陽性のいわゆる memory B 細胞と考えられる分画はコントロールに比較して著減していた。

1) AID 遺伝子の発現

患者末梢単核球には無刺激でもコントロール同様 AID 遺伝子が発現しており、PMA と TGF- β の刺激によりさらにその発現が誘導された。

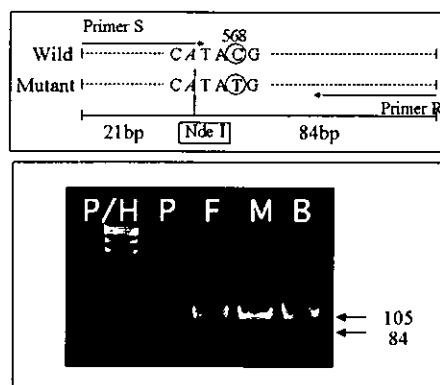
2) AID 遺伝子の塩基配列の検討

患者の cDNA において 568 番目の C が T に変異しその結果 190 番目のアルギニンがストップコドンに置き換わる異常 (R 190 X) がヘテロで検出された。患者ゲノム DNA でもエクソン 5 の同部位に R190X の変異がヘテロで認められた。患者のその他の AID 遺伝子のエクソン上には異常が認められなかった。両親及び兄の AID 遺伝子のエクソン上には異常は認められなかった。

3) R190X AID 遺伝子変異部位の検出

R190X の変異が存在すると NdeI で切断されるように、PCR プライマーを設定し正常コントロール 100 人、200 allele について変異の有無を解析した (図 2)。この変異は患者にのみ認められ正常コントロール 200 allele には存在しなかった。

Nde I による変異部分の検出



4) R190X タンパクの発現

R190X の変異を有する AID 遺伝子も正常 AID 遺伝子と同様に融合タンパクとして発現し、R190X の変異を有する AID タンパクも生体内で安定なタンパクとして存在することが示唆された。

【考案】

最近、Taら²⁾が本症例と同様、R190Xの変異が dominant negative 変異として機能すること、R190Xの変異ではクラススイッチは障害されているが、somatic hypermutation に関しては保たれていること、また、Barretoら³⁾も in vitro の結果から同様な報告している。クラススイッチにはそれに特異的な因子が AID の C-末に結合する可能性が示唆されている。本症例で、VH 3-23 の somatic hypermutation に関して検討したところ、13 クローン中 7 クローンは germline の配列であり、germline のクローンの発現が強く認められた。全体としてはコントロールと比較し somatic hypermutation の割合は低下傾向にみえたが、現在、他の VH family の somatic hypermutation についてさらに検討中である。

今回、比較的 mild な表現型を示す高 IgM 症候群 2 型の患者の AID の C 末端に R190X の変異をヘテロで同定した。この変異以外に AID エクソン上に異常を認めなかった。患者では wild と R190X の AID 遺伝子はほぼ同等に発現し、さらに R190X は融合タンパクとして安定に発現した。以上より R190X は AID が多量体として機能する際に wild タンパクの機能を阻害し、dominant negative 効果を発揮し高 IgM 症候群を生じると考えられた。患者が比較的 mild な表現型を示したのは wild タンパクのみが多量体を形成することで dominant negative 効果をうけない AID の活性が残ったためかもしれない。

AID の catalytic domain 内に in vitro で dominant negative 効果を有する変異は報告されているが、生体内で dominant negative 効果を有すると考えられる変異の報告は R190X の変異が初めてであり、高 IgM 症候群の発症機序さらに、AID の機能について重要な知見をもたらすと考えられる。

【参考文献】

- 1) Kasahara Y., Kaneko H., Fukao T., Terada T., Asano T., Kasahara K., Kondo N. Hyper-IgM syndrome with putative dominant negative mutation in activation-induced cytidine deaminase. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003 112: 755-60.
- 2) Ta VT, Nagaoka H, Catalan N, Durandy A, Fischer A, Imai K, Nonoyama S, Tashiro J, Ikegawa M, Ito S, Kinoshita K, Muramatsu M, Honjo T. AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat Immunol.* 2003 4: 843-8.
- 3) Barreto V, Reina-San-Martin B, Ramiro AR, McBride KM, Nussenzweig MC. C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion. *Mol Cell.* 2003 12:501-8.

Hyper-IgM syndrome with putative dominant negative mutation in activation-induced cytidine deaminase

Hideo Kaneko, Yukiko Kasahara, Toshiyuki Fukao, Tomoyoshi Terada, Tsutomu Asano, Naomi Kondo

Department of Pediatrics, Gifu University School of Medicine

Hyper-IgM immunodeficiency is an immunological disorder characterized by normal or elevated serum IgM levels, and reduced serum IgG and IgA levels, due to the disruption of immunoglobulin-class switching in B cells. Activation-induced cytidine deaminase (AID) is the causative gene for the autosomal recessive form of hyper-IgM syndrome (HIGM 2).

To investigate the relationship between the AID gene mutation and clinical phenotype, we studied the AID gene in a Japanese female with HIGM 2. Genomic DNA and cDNA were extracted from neutrophils, and analyzed by polymerase chain reaction (PCR). The AID gene was expressed as a glutathione S-transferase (GST) fusion protein. RT-PCR was performed after stimulation by phorbol myristate acetate (PMA) and transforming growth factor (TGF)- β .

Despite significantly low serum IgG levels, our patient have not shown predisposition to any severe infections, even without gammaglobulin replacement therapy. We identified a point mutation leading to the stop codon in exon 5 of the AID gene (R 190 X) in the patient. No other mutations of the AID gene were detected in the patient. The same mutation was not detected in other members of her family. The mutant allele fused with the GST protein was expressed stably at the same level as the normal allele. The AID gene expression of the patient was induced by PMA and TGF- β . The mutation of the AID gene is assumed to be of the dominant negative form.

高 IgM 症候群責任遺伝子 uracil-DNA glycosylase (UNG) の同定

野々山 恵 章 (防衛医科大学校小児科)

今 井 耕 輔 (ネッカー小児病院)

Anne Durandy (ネッカー小児病院)

【研究要旨】

高 IgM 症候群は血清 IgG, IgA が低下する一方 IgM が正常ないし高値をとる先天性免疫不全症である。我々は、高 IgM 症候群の責任遺伝子として uracil-DNA glycosylase (UNG) を同定し、病態解析を行った。その結果、免疫グロブリンクラススイッチにおける UNG の役割について知見を得たので報告する。

【KEYWORD】 クラススイッチ、UNG、AID、hyper IgM syndrome

【はじめに】

高 IgM 症候群 (HIGM) は、免疫グロブリンがクラススイッチできないことにより、IgM は正常ないし高値をとるが、血清 IgG, IgA は低値をとる原発性免疫不全症である。現在までに、責任遺伝子として、CD40 ligand, CD40, AID, NEMO が同定されてきた。しかし、これらの分子が正常である高 IgM 症候群患者が存在することが知られていた。

最近 uracil-DNA glycosylase (UNG) ノックアウトマウスが作製され、その B 細胞がクラススイッチの障害を呈することが示された。このことから、UNG が免疫グロブリンのクラススイッチに重要な役割を果たすことが示唆された。

今回我々は、ヒト高 IgM 症候群の新規責任遺

伝子として uracil-DNA glycosylase (UNG) を同定し、病態解析を行ったので報告する。

【対象と方法】

患者対象は、3 人である。この 3 患者は血縁関係にない独立した家系である。臨床データの収集および遺伝子解析は文書による同意を得た。患者臨床データを表 1 に示す。血清 IgG はそれぞれ 50, <50, 209mg/dl と低値を示し、IgM は 740, 267, 785mg/dl と高値を示した。CD19 陽性 B 細胞数は正常であった。

患者 UNG の遺伝子解析は genomic DNA を direct sequence して行った。UNG は mitochondria form と nuclear form の 2 種類があるが、promotor および splice の違いによるものである。Nuclear form を遺伝子解析するために、Exon 1A から Exon VI までを sequence した。

UNG タンパクの発現は、患者および正常対照より樹立した EB 細胞株よりタンパクを抽出し、抗 UNG 抗体 PU1sub により免疫沈降後、抗 UNG 抗体 PU101 により Westernblot を行い検討した。

表 1 患者臨床データ

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Normal range	
Age at diagnosis [years]	7 y.	3 y.	39 y.	3-8 y.	adult
Serum IgM [mg/dl]	740	267	785	50-118	40-230
IgG [mg/dl]	50	< 50	209	680-1260	700-1600
IgA [mg/dl]	48	25	< 7	66-162	70-400
CD19* [/mm ³]*	250	860	138	200-2100	100-500
CD27* [% of CD19]*	17.0	4.6	17.9	10-20	10-40

*Patients were tested at 26 years, 6 years, and 40 years old, respectively.

UNG 活性は、EB 細胞株より PU1sub を用いて抽出した UNG タンパクの uracil (U) 除去能を、³H dUMP ラベル DNA を基質として遊離 uracil を測定する方法により検討した。

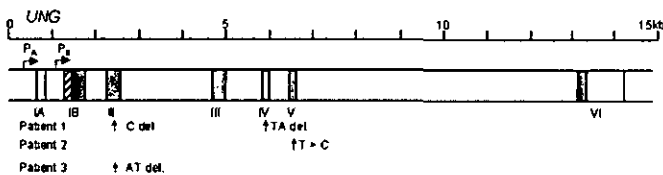
B 細胞のクラススイッチ (class switch recombination, CSR) 能は、B 細胞を CD40+IL4 刺激後に IgE germline transcripts (GLT), circle transcripts (CT), functional transcripts (FT) の発現を RT-PCR で検討した。また、B 細胞を CD40+IL4, CD40+IL10 刺激後、培養上清中の IgE, IgG, IgA, IgM を ELISA で解析した。

【結果】

3 患者において UNG の変異を見出した (図 1)。患者 1 は exon II の一塩基欠失 (462 C deletion) と exon IV の二塩基欠失 (639, 640 TA deletion) であり、frame shift によりコドン 141, 224 でストップコドンになる。患者 2 は、exon V のホモの missense 変異 (T822 C、アミノ酸では Phe 251 Ser) であった。両親は、この変異をヘテロに持つ保因者であった。患者 3 は、exon II のホモの二塩基欠失 (497, 498 AT deletion) であり、frame shift によりコドン 159 でストップコドンになる。これらの変異は UNG の catalytic domain (84-313) に存在した。なお、3 患者とも AID、CD40 ligand、CD40 は正常であった。

EB LCL を用い western blot で検討した結果、

図 1 UNG 遺伝子変異の同定



UNG (nuclear isoform) cDNA

wild type TATCCACCCACACCC
Y P P P H
↓ 462 C del.
Patient 1 TATCCACCCACACCC
(allele 1) Y P P P H

wild type GACATAGAGGATTTT
D T E D F
↓ 639, 640 TA del.
Patient 1 GACAGAGGATTTTGT
(allele 2) D R G F C

wild type CTTGTITTTCTTGCTC
L V F L L
↓ T822C
Patient 2 CTTGTITTCITGCTC
(allele 1,2) L V S L L

wild type IGTGACATAAAAGAT
C D T R D
↓ 497, 498 AT del.
Patient 3 IGTGACAAAAGATGT
(allele 1,2) C D P R C

患者 B 細胞 (P1, P2, P3) では正常対照 (C1, C2) に比較して UNG 発現がタンパクレベルで低下していた (図 2)。RT-PCR での検討では、missense mutation を持つ患者 2 では、RNA レベルで検出されたが、欠失を持つ患者 1、3 では発現が検出できないか低下していて、変異により RNA レベルでの不安定性が起きていると考えられた。DNA から uracil を除去する UNG 活性は、正常対照の EB cell line では検出されたが (C1, C2)、患者では全員 (P1, 2, 3) で低下していた (図 3)。したがって、患者で認められた変異は、UNG タンパク発現、活性低下をもたらすことが明らかになった。

図 2 患者 B 細胞での UNG 発現低下

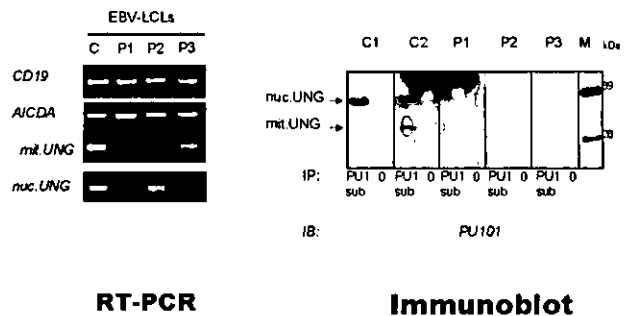
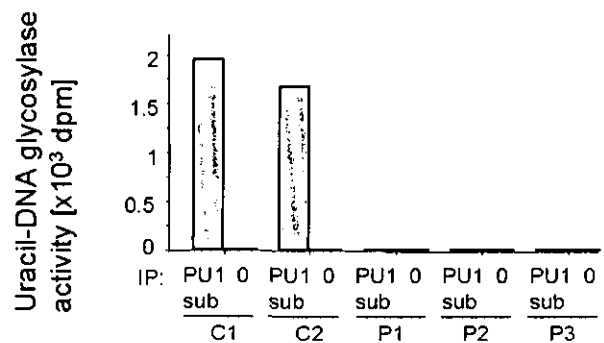


図 3 UNG 活性



患者 B 細胞のクラススイッチ能を検討した。末梢血単核球を CD40+IL4, CD40+IL10 刺激して培養し、上清中の IgE, IgG, IgA, IgM 産生を ELISA で解析したところ、IgM は正常に産生された (図 4)。しかし、IgA, IgG, IgE は産生誘導されなかった。また、CD40+IL4 刺激 B 細胞を RT-PCR による検討したところ、IgE circle transcripts (CT), functional transcripts (FT) の発現は、正常対照では認められたが、患者では

図4 UNG変異患者B細胞のクラススイッチ

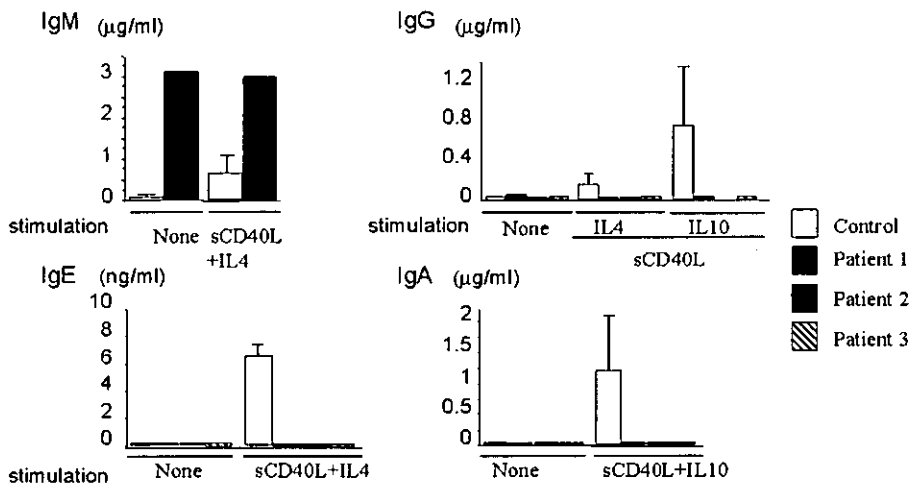
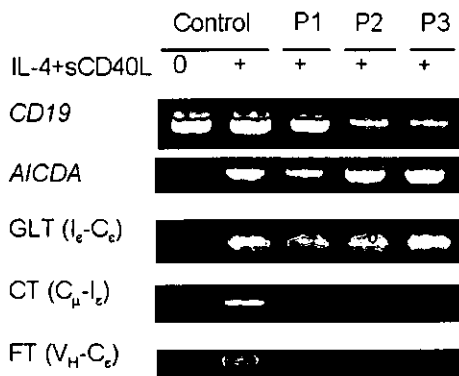


図5 UNG変異患者のCSR



認められなかった (図5)。以上のことから、患者B細胞では、クラススイッチが障害されていることが示された。なお、クラススイッチの初期段階に起きる IgE germline transcripts (GLT) 発現までは正常に進行すること、また、AID mRNA (AICDA) の発現は認められ、AID 発現誘導までの刺激は正常に伝達されると考えられた。

【考案・結論】

今回我々は、血清 IgG, IgA 低値、IgM 高値をとる 3 患者で、UNG 変異を特定した。この変異により UNG は発現、ウラシル除去活性ともに低下していた。また、患者B細胞は class switch recombination (CSR) を起こせないことが明らかになった。このことから、UNG が高 IgM 症候群の新しい責任遺伝子であると考えられた。

UNG 変異によりクラススイッチが障害されるという結果から、免疫グロブリンクラススイッチ

機構において AID が DNA を基質とするモデル (DNA モデル) が示唆された。以下に DNA モデルについて述べる。免疫グロブリンのクラススイッチは S region (スイッチ領域) でおきる。スイッチ領域は G/C 含有率が高い。高 IgM 症候群 2 型の責任遺伝子である AID は、DNA シチジンデアミナーゼとして DNA 鎖の中のデオキシ

シチジン (dC) に働き、デオキシウリジン (dU) に変える (DNA モデル)。すなわち AID は Ig 遺伝子 S 領域の DNA にデオキシウリジン (dU) を挿入する役割を持つ。dU は DNA 鎖の中では異物であるので、修復される必要がある。UNG はウラシル塩基 (U) と糖鎖との間の N-グリコシド結合を切り、ウラシル (U) を除去する。UNG はウラシル塩基 (U) を除去することにより、塩基の欠失部を作る役割を果たす。その後、AP エンドヌクレアーゼ (APE) が塩基の欠失部位を認識し、DNA 鎖のホスホジエステル結合を切断する。こうして、互い違いにできた DNA 一本鎖切断 (SSB) が生じる。S 領域にはこうした部位が多く存在するため、結果的に二重鎖切断 (DSB) をもたらすと考えられる。この前後で、DNA ポリメラーゼ (タイプは不明) による塩基 (X) の補充やエキソヌクレアーゼによる断端の修正が行われる。その後、非相対的組み替え (NHEJ) 反応により遺伝子再構成が完成し、クラススイッチとなる。

すなわち、UNG は、AID により挿入されたウラシル (U) を除去することでその後の DNA 切断、修復機構を誘導していると考えられる。UNG 変異によりウラシル (U) 除去ができなくなると、免疫グロブリン CSR が進まず、ヒト免疫不全症である高 IgM 症候群を発症すると考えられた。

Hyper IgM syndrome caused by the mutation of uracil-DNA glycosylase (UNG)

Shigeaki Nonoyama¹⁾, Kohsuke Imai²⁾, Anne Durandy²⁾

1) Department of Pediatrics, National Defense Medical College

2) INSERM U 429, Laboratoire de developpement normal et pathologique du systeme immunitaire,
Hopital Necker Enfants-Malades

Hyper-IgM syndrome (HIM) is a primary immunodeficiency due to the defect of immunoglobulin class switch recombination (CSR) leading to low serum levels of IgG and IgA with normal to high serum level of IgM. It has been identified that mutations of CD40 ligand, CD40, NEMO, and AID cause HIM. We report here that UNG (Uracil DNA glycosylase) is another responsible gene for hyper-IgM syndrome. This finding indicates that removal of uracil from the S-region by UNG plays a critical role in the Ig class switch recombination.

Flow cytometryを用いた末梢血単核球内WASP分子の 構造的・機能的解析の可能性

有 賀 正 (北海道大学医学部遺伝子治療講座)
中 島 督 (北海道大学医学部遺伝子治療講座)
山 口 晃 司 (北海道大学医学部遺伝子治療講座)
大 津 真 (北海道大学医学部遺伝子治療講座)
崎 山 幸 雄 (北海道大学医学部遺伝子治療講座)

【研究要旨】

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) の原因分子である WAS protein (WASP) は、近年多くの *in vitro* の研究から、多数のシグナル関連分子と会合すること、分子間結合によって構造を変化させて自己活性化抑制機構を有することが報告されている。これまで我々は、末梢血単核球内 WASP 分子を flow cytometry で解析する系を確立し、WAS の病態解析等を行ってきたが、その過程で正常人リンパ球の WASP 陽性細胞が、二群 (強陽性/弱陽性群) を示すことを見出した。今回はその二群がそれぞれどのような細胞構成からなるか、その差が何に基づくものなのかを検討した。その結果、この二群に属するそれぞれのリンパ球サブセットが明らかになった。さらに、二群の差が WASP 分子の量的な差ではなく、構造的、機能的な差に基づく可能性が示唆された。

【はじめに】

WASP は、細胞骨格関連分子として、アクチン重合やシグナル伝達に関与していることが報告されている。しかしその一方で、WAS 患者が示す多彩な臨床症状が WASP 分子の欠陥とどのように関連しているかは未だ明確に理解されていない。我々は、細胞質内の WASP 分子を flow cytometry で解析する系を確立し、WAS、WAS 保因者の診断、血液幹細胞移植を受けた WAS 患者の病態解析などを報告してきた¹⁾⁻³⁾。これらの研究を通して血液細胞の各リネージで、細胞増殖・生存に関する WASP の依存性に差があることを報告している²⁾⁻³⁾。今回、正常者のリンパ球における WASP 陽性細胞が二群あることを見出した。この結果と、リネージによって WASP 依存性に差があるこれまでの結果を合わせ、WASP の生体内での役割の一端を考察した。

【方法】

正常者末梢血単核球の細胞表面を、抗 CD4,8,

20,56,45RA,45RO 抗体にて各リネージに分類し、細胞質内の WASP 分子を異なるエピトープを認識する二種類の抗 WASP 抗体 (3F3A5,D-1) を用いた FCM-WASP で解析した。また、正常人の末梢血より CD3 陽性細胞をビーズにて分離し、さらに CD45RA 陽性細胞と CD45RO 陽性細胞の 2 つのリネージに分類し、RT-PCR および Western blot 法を用いて WASP メッセージと蛋白の量的評価を行った。

【結果】

正常者の単核球内 WASP 分子を 3F3A5 抗体にて染色した際、リンパ球集団にて強陽性/弱陽性の二群を認めた。単球では、二群を認めなかった。(図 1) 二群の割合は、個人差を認めたが、強陽性のリネージは CD56,CD4/CD45RO, CD8/CD45RO であり、弱陽性のリネージは単球、CD20,CD4/CD45RA, CD8/CD45RA であった(図 2)。また、3F3A5 抗体と異なるエピトープを認識する D-1 抗体にて同様に末梢血単核球を染色

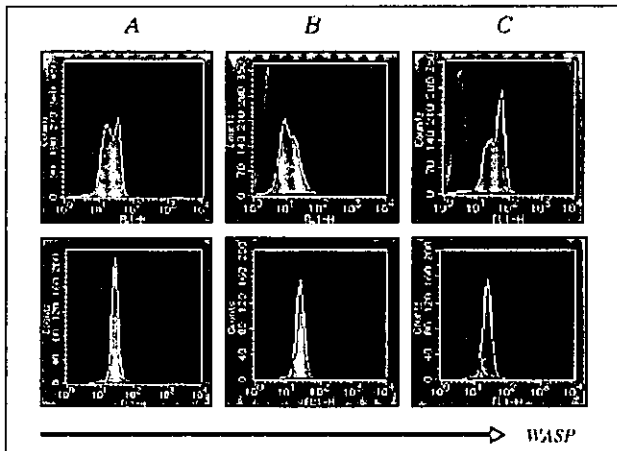


図1. 正常人リンパ球で認めたWASP強陽性と弱陽性の二群。上段はリンパ球。下段は単球。個々の正常人A, B, Cでリンパ球でWASP陽性細胞に二群を認めた。

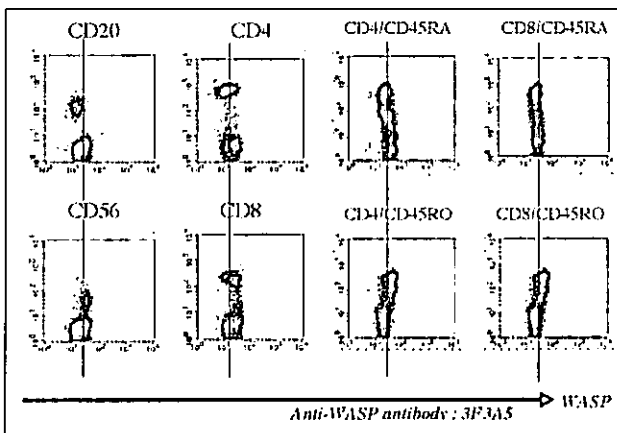


図2. 正常人で認めたWASP強/弱陽性二群の構成細胞。細胞表面抗原との二重、三重染色により、WASP強陽性、弱陽性それぞれを構成する細胞を検索した。

した際には、WASP陽性細胞が二群を呈することはなかった(図3)。さらに正常人からマグネットビーズで分離したCD3/CD45RA、CD3/CD45ROの2つのリネージについてRT-PCRおよびWestern blot法にて解析したところ、両者におけるWASPのメッセージレベル、タンパクレベルでの差異は認められなかった(図4)。

【考察】

今回のFCM-WASPによる結果により、正常人の末梢血リンパ球において、3F3A5抗体を用いた染色では、WASP陽性細胞が二群を生じ、各リネージで、その輝度に差が生じることが明らかになった。一方、D-1抗体による染色の際にはこれらの特徴が認められなかった。このことから、3F3A5抗体で検出されたリンパ球の二峰性はWASPの抗原量の差に基づかない可能性が示唆された。

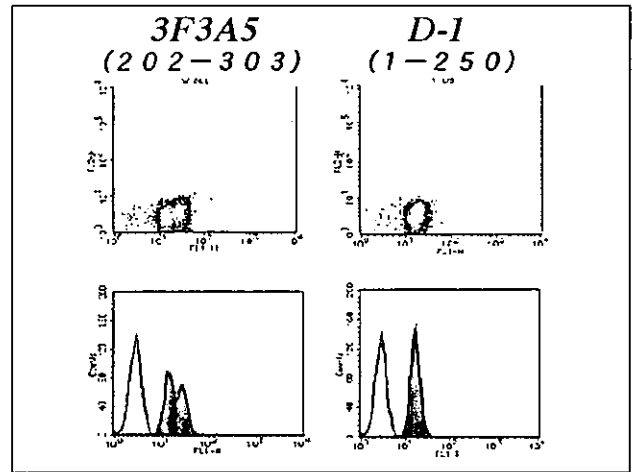


図3. 異なる二種類の抗WASP抗体による正常人リンパ球の検索。異なるエピトープを認識する二種類の抗WASP抗体で正常人リンパ球を検索した。3F3A5抗体で認めた二群の細胞はD-1抗体では検出されなかった。

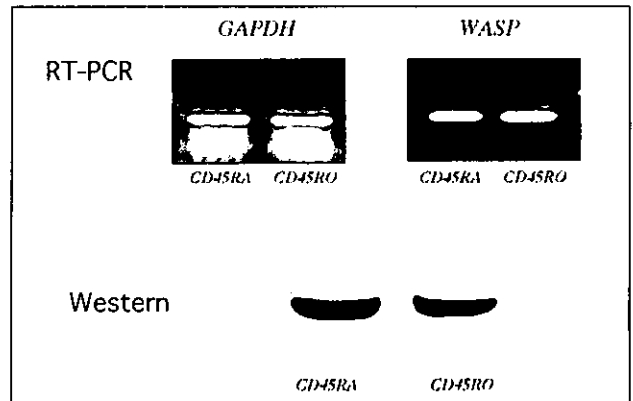


図4. CD45RA T細胞とCD45RO T細胞のWASPメッセージ、タンパク量の比較。正常人リンパ球からT細胞を分離し、さらに45RA、45RO細胞を選別した。RT-PCR、Western法で両者におけるWASPのメッセージ、タンパクレベルでの量の差を検討したが、明らかな差は認められなかった。

このことは、RT-PCRおよびWestern blot法による結果からも支持された。現時点で、我々はこの差がWASPの構造的・機能的な差異によるものである可能性を考慮している。

近年WASPが構造の変化によって、自己の活性型/非活性型を制御するモデルが提唱されている⁶⁾。我々は、今回の二種のWASP抗体による結果がWASPの構造的変化を反映していると考え、次のような仮説を立てた。3F3A5は活性型/非活性型のWASPどちらか一方しか認識できず、D-1は両方を認識できる。3F3A5抗体で認識し得るWASP分子の割合が単核球の各リネージで異なるという仮説である。この考えに基づくと、今回の結果を説明することが可能となる。

また、以前のWASPに関する研究から、我々

は血液細胞のWASP依存性（増殖、生存）がリネージごとに異なることを提唱している。それは、単球はリンパ球より、CD45RAはCD45ROより、B cellはT cellよりもそれぞれ依存性が低いということである。最近、WASPのリバータントの解析においても、B cellのほうがT cellよりも分化・増殖に関するWASPの依存性が低いとする報告がなされている⁷⁾。

以上のことから、活性型／非活性型のWASPの比率にはリネージごとに偏りがあり、それがWASPへの依存性がリネージごとに異なることと関連する可能性が示唆された。今後、今回認められたWASP陽性二群の細胞の差異が機能的・構造の違いであることをより直接証明し、リネージごとにWASPの役割が異なるのかどうかなどを検討していきたい。

【参考文献】

- 1) Yamada M et al. Flow cytometric analysis of Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein in lymphocytes from WAS patients and their familial carriers. *Blood* 93: 756-758, 1999
- 2) Yamada M et al. Determination of carrier status for Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) by flow cytometric analysis of WASP expression in peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol* 165, 1119-1122, 2000
- 3) Yamaguchi K et al. Mixed chimera status of 12 patients with Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) after hematopoietic stem cell transplantation; evaluation by flow cytometric analysis of intracellular WAS protein expression. *Blood* 100:1208-1214, 2002
- 4) Ariga T et al. Detection of lymphocytes and granulocytes expressing the mutant WASP message in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome. *Brit J Haematol* 104: 893-900, 1999
- 5) Ariga T et al. Spontaneous in vivo reversion of an inherited mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Immunol* 166, 5245-5249, 2001
- 6) Rohatgi R et al. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97:221-231, 1999
- 7) Konno A et al. Differential contribution of Wiskott-Aldrich syndrome protein to selective advantage in T and B cell lineages. *Blood*. 103, 676-8, 2004

Possible evaluation of the structural and functional WASP status in peripheral mononuclear cells by flow cytometric studies

Tadashi Ariga, Masaru Nakajima, Koji Yamaguchi, Makoto Otsu, Yukio Sakiyama

Department of Human Gene Therapy, Hokkido University Graduate School of Medicine

The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP), which is defective in Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) patients, is an intracellular molecule expressed in non-erythroid hematopoietic cells. Recent studies reveal that WASP interacts with numbers of intracellular molecules and plays key roles in the signal transduction and the regulation of actin polymerization, although varied clinical symptoms observed in WAS patients have not been fully elucidated from a viewpoint of WASP-deficiency.

We have established the methods to detect intracellular WASP by flow cytometry (FCM-WASP), and applied the methods for the screening for WAS patient and WAS carrier, and so on. During these FCM-WASP studies, we have noticed that lymphocytes from control individuals show double positive peaks. In this study, we studied the basis for the double positive peaks (WASP^{high-bright} and WASP^{low-bright}) of control lymphocytes detected by FCM-WASP. We investigated lymphocyte subsets, which belonged to the respective WASP positive peaks. We also tried to understand the mechanism, by which two positive WASP peaks were composed in control lymphocytes.

Here we report the property of the two WASP peaks. We also propose that the double positive peaks might result not from the different amount of WASP protein in the cells, but from the different structural and functional status of WASP in the cells.

Wiskott-Aldrich症候群の分子病態におけるWIPの役割

笹原 洋 二 (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)

久間 木 悟 (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)

土屋 滋 (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)

【研究要旨】

Wiskott-Aldrich症候群 (WAS) の原因遺伝子WASPは、主にT細胞受容体 (TCR) シグナル伝達系にて細胞骨格系とT細胞活性化を司る分子である。WIP (WASP-interacting protein) はWASP WH1 domain と結合し、常染色体上にコードされ、WASP活性化を負に制御する分子である。今回我々は、まずT-APC間immunological synapse及びlipid raftsへのWASP-WIP複合体のリクルートの分子機構と、その後のWIPリン酸化を介したWASP活性化のメカニズムにつき検討した。その結果、WASPはTCR上流の分子群やWIP、SH3ドメインをもつアダプター分子を介して、immunological synapseへリクルートされること、その後PKCによりWIPはリン酸化され、WASP-WIP間の結合が解離し、WASP活性化に関与することを明らかにした。

次に我々はWASP活性化後のWASP蛋白質分解の機序と、WIPがWASの分子病態にどのように関与しているのかを検討した。WASPはTCR刺激後にcalpain 及びubiquitin-proteasome系により蛋白分解を受けること、更にWIPノックアウトマウス及び他の実験結果から、WIPはWASP蛋白質の安定化に不可欠であることがわかった。WAS患者でのWASPミスセンス変異の9割以上がWIP結合領域に集中している。これらの患者群ではWASP遺伝子変異のためWASP-WIP間の結合が恒常的に解離し、WASP蛋白質はより分解を受けやすく、WIPはWASP蛋白質の安定化を介してWASの分子病態に深く関与している事が示された。

現在、WAS様の臨床所見がありながらWASP遺伝子に異常のない患者を対象に常染色体性Type 2 WAS としてのWIP 欠損症のスクリーニングが進行中であり、国内の検体を募集中である。

【はじめに】

Wiskott-Aldrich症候群 (WAS) は、多様な免疫不全、血小板減少、湿疹を3主徴とする原発性免疫不全症で、その原因遺伝子はWASPである。免疫不全の詳細は多岐に渡るが¹⁾、その根底にはWASP遺伝子変異、WASP蛋白質発現低下に伴う、細胞骨格系の異常があると考えられている。現在までWASPの機能や結合蛋白質に関して数多くの報告がなされており、その中のWIP (WASP-interacting protein) は我々によりクローニングされたWASP結合蛋白質である²⁾。

Immunological synapse (免疫学的シナプス、以下、IS) は、T-APC (抗原提示細胞) 間または

NK-target cell間において、supramolecular activation clusters (SMACs) 及びactin networkにより構成される免疫細胞間相互作用の構造的、機能的な場であり、近年多くの研究結果が報告されている³⁾。Lipid rafts (GEMs) clusteringがIS形成に必要であり、T細胞受容体 (TCR)、co-stimulatory 及びintegrin signalがISに重要なシグナル伝達系である。また、細胞骨格系はISの構造と機能の維持に不可欠であるが、TCRの下流にありactin重合化を制御するWASPが、いかにISにrecruitされ、そこでactivateされるかの詳細は不明であった。

また、これまでのWAS患者でのWASP遺伝子

変異解析の集積から、WASPミスセンス変異の9割以上がWIP結合領域に集中し、そのT細胞での蛋白質発現は有意に低下し、またmRNA発現は正常である例が多い。この臨床の知見を説明するために、WIPノックアウトマウスの解析と、WASP蛋白質分解のメカニズムにつき検討した。

【方法と結果】

TCRシグナルにおけるWASPとの結合分子群

TCRと細胞骨格系をつなぐ手がかりとして、多くのWASP結合蛋白質の報告があるが、機能的に重要なものとして、WASPのC末に結合するArp2/3複合体はアクチン重合化の始点となる。他に、Proline-rich領域と結合するSH3 domains (Nck, Btkなど)は後述のWASPのリクルート機構とチロシンリン酸化に関与する。G蛋白質結合領域と結合するCdc42はWASPのconformationをautoinhibitory からactive formへ変換して活性化に導き、また、N末EVH1領域と結合するWIPはリクルート機構と共に、Cdc42によるWASP活性化を負に調節することが知られている^{1),2),4)}。WAS患者のT細胞にて、TCR刺激後のactin重合化とIL-2産生は有意に低下しており、同様の結果がWASP及びWIP knockout mice にも報告されており、WASP-WIPはTCRと細胞骨格系、T細胞活性化をつなぐkey complexと言える(図1参照)。

WASPのISへのリクルートの機構

TCR刺激後にWASPはlipid raftsへrecruitされることが、我々及び他のグループによって示され^{5),8)}、WIPも同様の動態を示すことが確認された⁵⁾。IS形成には、スーパー抗原存在下でT細胞とMHC class II陽性B細胞を一定時間接触させることにより、またはova-albumin TCR transgenic miceの系を用いて観察可能であるが、単クローン抗体により検出される内因性のWASPは、抗原存在下でT-APC interfaceにrecruitされ、F-actinとco-localizeすることが明らかになった⁵⁾(図2参照)。

このWASPのrecruitmentを制御する分子群は

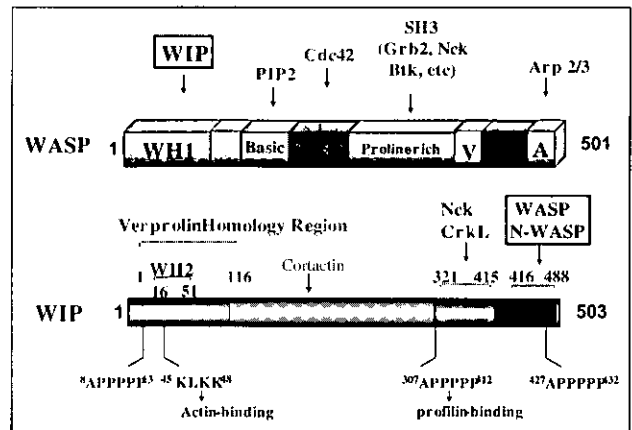


図1. Functional domains of WASP and WIP

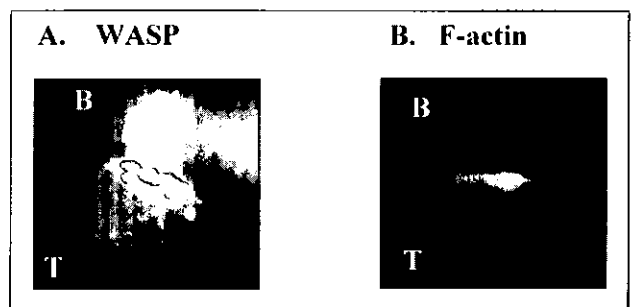


図2. WASPのimmunological synapse (IS) への局在。

- A) スーパー抗原存在下で、T-B interfaceにおけるWASPの局在を蛍光免疫染色にて観察した。
B) Phalloidin染色により、F-actinがWASP同様、ISへ局在することを示す。

何であろうか。WASPと直接結合する分子群の中から、Cannonら⁶⁾は、WASP deletion mutantsの結果より、そのProline-rich領域と結合するSH3 domains、特にNck-SLP76複合体の重要性を報告している⁶⁾。それに加えて、我々は、WIP knockoutおよびWIPと直接結合するアダプター分子CrkLのdominant negative、及びSLP-76欠損T細胞株を用いた実験の裏付けから、EVH1領域と結合するWIP-CrkL複合体もWASP recruitmentとIS形成に関与すること、また、TCR上流の分子群からは、ZAP-70分子自身とその活性の必要性を報告した⁵⁾。Lck⁶⁾の必要性も欠損T細胞株の実験から示されており、現在のところ我々は図3に示したモデル系を提唱したい。更に、アダプター分子NckがTCR刺激後に直接CD3複合体と結合し、下流分子のrecruitmentに関与するという報告もあり⁷⁾、総じてWASPのISへのrecruitmentにはいくつかのredundancyをもって制御されていると考えられる。

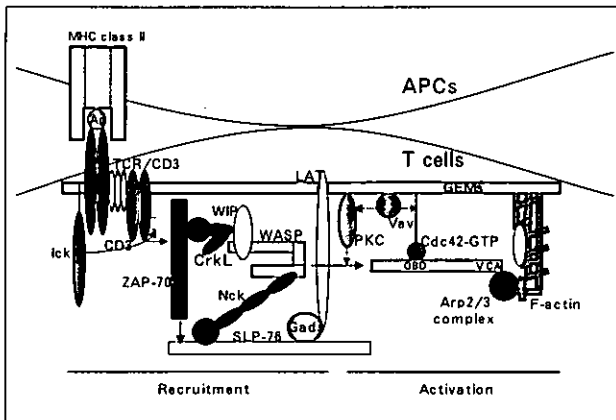


図3. WASPのT-APC間 immunological synapseにおける recruitment/activation機構の現在の模式図。

WASPはSLP76-Nck及びWIP-CrkLなどのalternative pathwaysにより recruitされると考えられるが、その上流のZAP-70活性はそのrecruitmentに不可欠である。その後、Cdc42によるWASPのconformational change、及びWIPリン酸化によるWASP-WIP complexの解離によりWASPはactive formとなり、actin polymerizationとT細胞活性化に寄与すると考えられる。

ISヘリクルート後のWASP機能活性化の機構

数年前から、G蛋白質であるCdc42は、WASPと結合することによりWASPのconformational changeを起こし、Arp2/3 complexをWASPと結合しやすくする事が示されていたが、WASPのG蛋白質結合領域はrecruitmentには関与しないことから、WASPにはrecruitmentとactivationの互いに異なる制御機構が働いていると考えられている⁹⁾。PKC θ はTCR下流にてZAP-70, SLP-76, Vav及びCaにてキナーゼ活性制御を受け、ISに局在する事が知られていたが、我々はWASP活性化を制御する機構のもう一つとして、TCR刺激後にWIPがPKC θ によりセリンリン酸化され、WASP-WIP complexの解離とWASP活性化に関与することを見出した(図3参照)。またIS形成後のT細胞におけるactin重合化とIL-2産生も、WASPとこれらの結合分子群、上流分子群にて制御されていることも示された^{5,12)}。

リクルート後のWASP蛋白質分解の機序と

Wiskott-Aldrich症候群の病態との関わり

活性化されその機能を終えたWASPは蛋白質分解を受けるはずである。TCR ligation後のWASP蛋白質分解のメカニズムにつき、分子生物学的方法およびCbl-bノックアウトマウスなどを用いて検討した。その結果、WASPはCa-dependent proteaseであるCalpain、及びubiquitin-proteasome

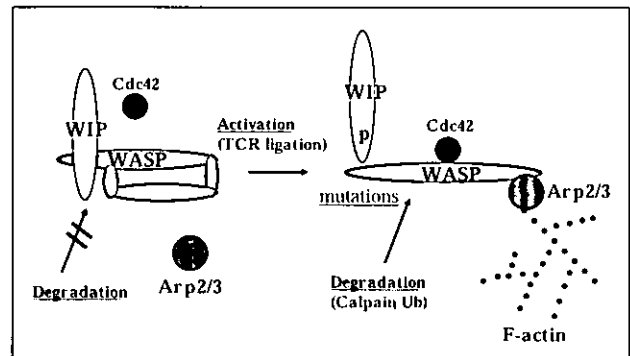


図4. Scheme for WASP-WIP interaction and WASP degradation

系により蛋白質分解を受け、更に後者にはubiquitin ligaseでありTCR signalingのnegativeregulatorであるCbl-bが関与していることを見出した(図4参照)。

WIPノックアウトマウスの表現型を解析したところ、WASPノックアウトマウスと類似し、またT細胞におけるWASP蛋白質発現が有遺に低下していることを発見した。これはWIPがWASP蛋白質の安定化にも重要であることを示唆する。

これまでのWASP遺伝子変異解析の集積から、WASPミスセンス変異の9割以上がWIP結合領域に集中し、そのT細胞での蛋白質発現は有意に低下し、またmRNA発現は正常である例が多いことを考えると、変異により恒常的にWASP-WIP interactionが解離しているWAS患者では、WASPは常に蛋白質分解を受けやすいことが示唆される。我々は主にWIPノックアウトマウス及びWAS患者リンパ球、各種阻害剤、機能的解析法を用いてこれを証明した(以上投稿準備中)。

【考察】

WASの病態は現在までT細胞機能不全とか細胞骨格系の異常について、単一の細胞のlineageで論じられてきたように思われる。しかし、個体(in vivo)では感染後などにおいて免疫細胞間相互作用は極めて重要であり、それを司るISにWASPがいくつかのalternative mechanismsによりrecruitされ、activateされることが示されたことは、WASP遺伝子異常により発症するWASにおいて、抗原提示後のT細胞機能不全をより具体的に理解する手がかりになったのではないかと

考えている。WAS患者でT-APC間ISの形成が有意に低下していること⁸⁾、またNK細胞機能不全とNK-target cell間のWASPの局在⁹⁾、女性WAS症例の解析¹⁰⁾、mast cellにおけるWIPの機能解析¹¹⁾も最近の興味深い知見である。

また、WASP蛋白質分解の過程において、WIPがWASP蛋白質の安定化に不可欠であることが示されたことは、多くのWAS患者がWIP結合領域にミスセンス変異をもつことを説明する上で重要である。また、これらの患者の多くがXL T (X-linked thrombocytopenia) または軽症WASの臨床像を呈しており、リンパ球でのWASP蛋白質発現は残存している例が多い。リンパ球と異なり、核を持たない血小板でのWASP蛋白質の発現が全例で零であり、WIPによるWASP蛋白質の安定化は遺伝子型/表現型の相関を理解する上でも重要と考えている。

現在、WIPノックアウトマウスとWASPノックアウトマウスの表現型が類似していること、また上記のWIPによるWASP蛋白質の安定化という基礎的結果のもと、WAS様の臨床所見がありながらWASP遺伝子に異常のない患者を対象に常染色体性Type 2 WASとしてのWIP欠損症のスクリーニングが進行中であり、国内の検体を募集中である。

【参考文献】

- 1) Thrasher, A. D.: WASP in immune-system organization and function. *Nature Rev.*, 2: 635-646, 2002
- 2) Ramesh, N. et al.: WIP, a protein associated with Wiskott-Aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 14671-14676, 1997
- 3) Krawczyk, C., Penninger, J. M.: Molecular controls of antigen receptor clustering and autoimmunity. *Trends in Cell Biol.*, 11: 212-220, 2001
- 4) Martinez-Quiles, N. et al.: WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat. Cell Biol.*, 3: 484-491, 2001
- 5) Sasahara, Y. et al.: Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of activation following TCR ligation. *Mol. Cell*, 10: 1269-1281, 2002
- 6) Cannon, J. L. et al.: WASP recruitment to T cell:APC contact site occurs independently of Cdc42 activation. *Immunity*, 15: 249-259, 2001
- 7) Gil, D. et al.: Recruitment of Nck by CD3 reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell*, 109: 901-912, 2002
- 8) Dupre, L. et al.: Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity*, 17: 157-166, 2002
- 9) Orange, J. S., Sasahara, Y. et al.: Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunological synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 11351-11356, 2002
- 10) Lutskiy, M.I., Sasahara, Y. et al.: Wiskott-Aldrich syndrome in a female. *Blood*, 100: 2763-2768, 2002.
- 11) Kettner, A., Sasahara, Y., et al.: WIP regulates signaling via the high affinity receptor for IgE in mast cells. *J. Exp. Med.*, in press.
- 12) 笹原洋二: WASPの免疫学的シナプスへのリクルートとT細胞活性化をつなぐ機構。実験医学, 21, 813-815, 2003.

The role of WIP (WASP-interacting protein) in Wiskott-Aldrich syndrome

Yoji Sasahara, Satoru Kumaki and Shigeru Tsuchiya

Department of Pediatric Oncology, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

WIP is a WASP-interacting protein that binds to WH1 domain of WASP, and negatively regulates WASP functions. WASP-mediated actin polymerization and cytoskeletal remodeling are critical for immunological synapse formation. In this study, we identified several signaling pathways to recruit WASP to lipid rafts in T cells and T-APC immunological synapses. After the recruitment of WASP, WIP is phosphorylated by PKC θ and WIP dissociates from WASP, allowing WASP to be activated by Cdc42.

We next identified the mechanisms of WASP protein degradation in T cells. WASP is degraded by Ca-dependent protease calpain and ubiquitin-proteasome pathway following TCR ligation. Analysis of T cells from WIP knockout mice revealed that WIP protected WASP from the degradation.

Most of WASP missense mutations in WAS patients are accumulated in WIP-binding site. These missense mutations result in constitutive dissociation of WASP-WIP interaction and WASP protein instability. We are screening WIP deficient patients as autosomal, type2-WAS patients from patients with WAS-like symptoms, decreased WASP protein expression, normal WASP mRNA but no WASP gene mutation.

RAG1/RAG2 遺伝子異常症におけるTCR構造多様性の解析 血液幹細胞移植後T細胞再構築の評価

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)
久間木 悟 (東北大学加齢医学研究所)
土 屋 滋 (東北大学加齢医学研究所)
田 内 久 道 (愛媛大学医学部小児科)
石 田 也寸志 (愛媛大学医学部小児科)
山 路 和 孝 (愛知医科大学小児科)
金 子 淳 (愛知医科大学小児科)
上 甲 忍 (愛媛県市立宇和島病院小児科)
林 正 俊 (愛媛県市立宇和島病院小児科)

【研究要旨】

RAG1/RAG2 遺伝子異常は重症複合免疫不全症 (B-SCID) あるいはOmenn症候群として知られる臨床像を呈し、早期の骨髄移植によってのみ救命が可能な免疫学的救急疾患である。特にRAG活性を部分的に残すOmenn症候群は特徴的な臨床症状を示す免疫不全症例で、このような臨床症状はRAG遺伝子異常に基づくT細胞分化障害と異常T細胞クローンの選択的増加を反映していることが示されている。本研究ではOmenn症候群の病態評価と、血液幹細胞移植後のT細胞再構築過程を評価する上でのTCR構造多様性解析の意義について検討した。Omenn症候群3例について移植前ならびに、移植後経時的にTCR構造多様性を評価した。TCR V β repertoire解析やCDR3サイズ分布解析がT細胞再構築過程の評価に有用であること、臍帯血幹細胞移植では、極めて早期にTCR構造の多様性が得られることが示唆された。

【はじめに】

重症複合免疫不全症 (SCID: severe combined immune deficiency) は多様な要因により発症する原発性免疫不全症であり、その成因として複数の遺伝子異常が明らかにされ病態解析がすすんでいる。Omenn症候群は重症湿疹様の紅斑、リンパ節腫大、肝脾腫、下痢、発育障害などの臨床的像と、高IgE値、好酸球増加、B細胞の欠損、活性化T細胞の増加などの検査データの特徴とする遺伝性疾患として知られてきた。最近、Omenn症候群の原因遺伝子が、T細胞抗原受容体

(T cell receptor; TCR) 遺伝子や免疫グロブリン (immunoglobulin; Ig) 遺伝子の再構成機序に関わるRAG1/RAG2 遺伝子の異常によることが明らかにされ、本疾患の病態理解も進展してきた^{1),2)}。RAG活性の欠損する遺伝子異常が重症複合免疫不全症の一型であるB-T-SCIDの発症に関与するのに対して、Omenn症候群の多くではRAG活性が部分的に残存、このことがOmenn症候群の特徴的な臨床像と深く関係していると考えられている³⁾。これまでの研究では、重症複合免疫不全症およびOmenn症候群疑い症例におい

	症例1	症例2	症例3
診断時年齢	4m	0m	9m
移植時年齢	5y	4m	13m
臨床症状	LN腫、湿疹	LN腫、肝脾腫、湿疹	呼吸不全、発育不良
検査所見	Eo増加、IgE高値	Eo増加、IgE高値	Eo、IgEほぼ正常
RAG遺伝子変異	RAG1; R559S, R897X	RAG2; R73H, Q258X	RAG1; R142X, R396H

表1. 対象症例の臨床像

てRAG1/RAG2遺伝子解析の結果をまとめると共に、これらの症例の病態評価法の一つとしてのTCR diversity解析の意義について検討してきた。今回は、さらに本疾患に対する血液幹細胞移植後のT細胞再構築過程を評価する目的で、経時的にTCR構造多様性を評価し、その有用性を検討した。

【対象と方法】

今回、RAG遺伝子解析とTCR構造解析の対象とした症例とその臨床像のまとめを表1に示す。末梢血T細胞のTCRVβ repertoire解析はRPE・Cy5標識抗CD4、FITC標識抗CD8ならびにPE標識抗TCRVβ抗体を用いて3カラーフローサイトメトリーを施行、各T細胞亜群中のVβ repertoire分布を定量した。TCRVβ CDR3サイズ分布の解析(CDR3 spectratyping)には末梢血単核球を分離後、immunobeads法によりCD4除去、あるいはCD8除去細胞を得、それぞれCD8⁺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' TCRVβ特異的プライマーと蛍光標識3'TCRCβプライマーを用いてPCR増幅、ABI310により解析した。CDR3サイズ分布の多様性は、主要なピークの数とその大きさからcomplexity score (CS)として算出した¹⁾。さらに一部の症例について、cDNAをTCRBV特異的プライマーと無標識TCRCV特異的プライマーを用いて増幅したPCR産物をサンプルとして、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA USA)によりクローニングを施行した。Colony PCRの後アガロース電気泳動にてインサート領域を含むことを確認した。PCR産物について、dye terminator法によるサイクルシーケンス

により蛍光標識を行った後、ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により塩基配列を自動解析した。

【結果】

1. 末梢血 T 細胞TCRVβ repertoire分布解析 (図1)

症例1、症例2共に移植前においてはTCRVβ repertoire分布の著しい偏りを認めた。また、多くのrepertoireはFCMによる検出が不可能であった。症例3ではこのような偏りは軽度であり、検索可能であったCD4⁺T細胞においては正常対照に近い分布が得られた。母親よりの骨髄移植を施行した症例1においては、移植後すみやかにCD4⁺T細胞におけるTCRVβ repertoire分布は正常化、CD8⁺T細胞においても検出不可能なrepertoireの減少が認められた。一方、CD8⁺T細胞においては移植前より認められた特定のrepertoireの増加が長期にわたって観察された。臍帯血移植を施行した症例2および症例3では、移植後1ヶ月よりCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞共にTCRVβ repertoire分布はほぼ正常となった(図1)。

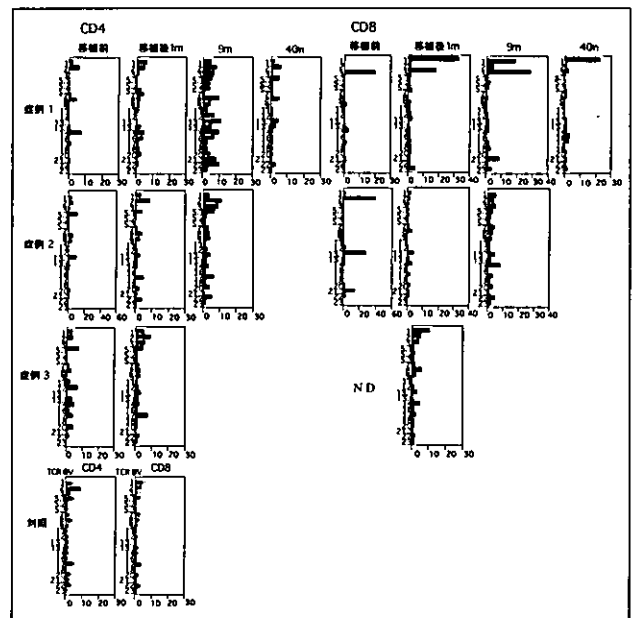


図1. 移植前後におけるTCR Vβ repertoire分布の変化
血液幹細胞移植を施行した3例のOmenn症候群について、移植前後の末梢血TCR Vβ repertoire分布をフローサイトメトリーにより解析した。
N.D.:not done

3. 末梢血 T 細胞亜分画における TCRBV CDR3 サイズ分布解析

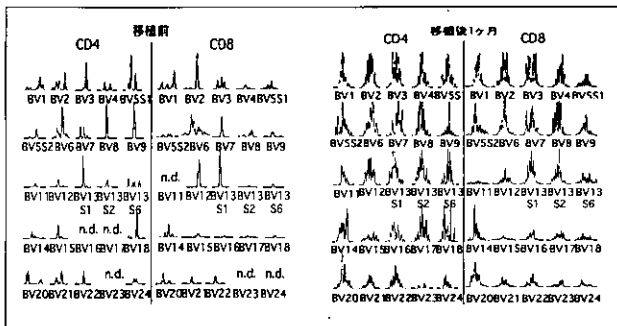


図2. 移植前後におけるCDR3サイズ分布の変化
症例2の移植前ならびに移植後1ヶ月におけるTCRBV CDR3サイズ分布を示す。
n.d.:not detectable

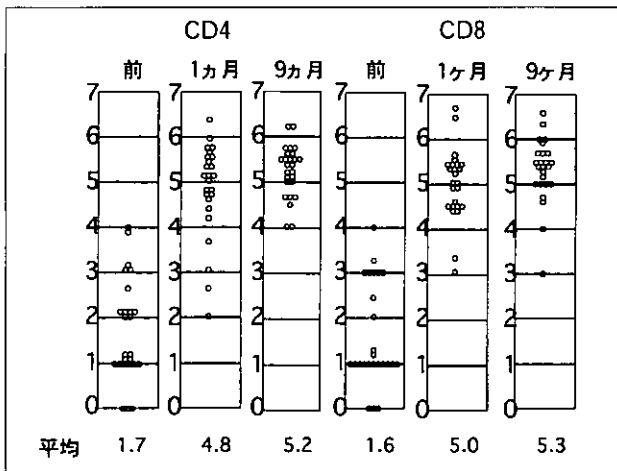


図3. 移植前後におけるCDR3 complexity score (CS) の変化
症例2の移植前のサンプルについて、TCRBV CDR3領域サイズ分布解析を施行。得られた波形からcomplexity score (CS) を算出した。縦軸はCS値を示す。

すべての症例において移植前の CDR3サイズ分布は著しく偏り、CSは低値に分布した。移植後は、これらの分布は正常化した。図2には症例2における解析結果のみを示す。移植前サンプルにおいては、ほとんどすべてのTCRBVでシングルピークの波形が得られ、著しいサイズの偏りがみられた。このうちCD4⁺T細胞 BV16, BV17, BV23、CD8⁺T細胞 BV11, BV23, BV24については波形が得られなかった。得られた波形からCSを算出したところ、すべて4以下とCS低値の偏りを示した。一方、移植後1ヶ月においては、両亜群ともにいずれのBVでも波形を得ることができ、ガウス分布を呈した波形が多く認められた。また、CSも高値となり幅広い値を示した。移植後9ヶ月においては、ガウス分布を呈するBVがさらに多く認められ、CS平均値も上昇した(図3)。

CD4				CD8							
	BV	N-D-N	BJ	Frequency		BV	N-D-N	BJ	Frequency		
CD4BV5S1	前	CASS	FLN	TGELFFG-BJ2.2	10/10	CD8BV13S1	前	CAS	RLID	SYEYFG-BJ2.7	13/13
	後	CASS	FGQG	NEQYFG-BJ2.1	2/17		後	CAS	ASGCG	NIOYFG-BJ2.4	1/15
		CASS	PIN	TGELFFG-BJ2.2	2/17			CAS	SEGG	NOPOHFG-BJ1.5	1/15
		CASS	YRDTGG	LFQF-BJ1.4	1/17			CAS	SSERA	YEQYFG-BJ2.7	1/15
		CASS	LHRG	ETQYFG-BJ2.5	1/17			CAS	SPGGQYK	OYFG-BJ2.7	1/15
		CASS	SQGA	GELFFG-BJ2.2	2/17			CAS	SPGGQ	YEQYFG-BJ2.7	1/15
		CASS	ILQNT	EQYFG-BJ2.1	2/17			CAS	SYG	STQYFG-BJ2.3	2/15
		CASS	LANT	GELFFG-BJ2.2	1/17			CAS	SPGGQ	YEQYFG-BJ2.7	3/15
		CASS	PGT	YNEQFFG-BJ2.1	1/17			CAS	SYSRG	NEQYFG-BJ2.1	1/15
		CASS	CGQ	NTEAFFG-BJ1.1	1/17			CAS	SYGTA	YEQYFG-BJ2.7	1/15
CD4BV8	前	CASS	TGT	SYEYFG-BJ2.7	1/17	CD8BV21	前	CASS	SWLAG	TDIQYFG-BJ2.3	20/20
	後	CAS	TGGAG	OPQHFG-BJ1.5	10/17		後	CASS	SWLAGF	TDIQYFG-BJ2.3	1/7
		CAS	SLDSY	TGELFFG-BJ2.2	1/17			CASS	NPGRTRDH	EQYFG-BJ2.1	2/7
		CAS	NOQGY	NOPOHFG-BJ1.5	1/10			CASS	SGLAGAR	YEQYFG-BJ2.7	1/7
		CAS	SLGG	NTGELFFG-BJ2.2	1/10			CASS	LGTSSGQ	ETQYFG-BJ2.5	1/7
		CAS	SSTSG	OETQYFG-BJ2.5	1/10			CASS	RFTSGH	YNEQYFG-BJ2.1	1/7
		CAS	SLEGVK	DTQYFG-BJ2.3	1/10			CASS	LWRITAS	YNEQYFG-BJ2.1	1/7
		CAS	SLQPER	SPLHFG-BJ1.6	1/10						
		CAS	SSGLS	GATYFG-BJ1.3	1/10						
		CAS	RLAGSP	DTQYFG-BJ2.3	1/10						
	CA	ARRAGD	TGELFFG-BJ2.2	1/10							
	CAS	RRTSGNL	EQYFG-BJ2.7	1/10							
	CAS	SLVTLW	EQYFG-BJ2.7	1/10							

表2. 移植前後のCDR3塩基配列多様性の変化

4. 移植前後における TCRBV CDR3 領域の塩基配列の比較

症例2について、CD4⁺T細胞BV5, BV8およびCD8⁺T細胞BV13.1, BV21の移植前と移植後1ヶ月時のサンプルについてTCRBV CDR3領域の塩基配列を解析した。移植前いずれのBVにおいても全クローンの半数以上を占める優位なクローンが存在したが、移植後においては特定のクローンの選択的増加は認められなかった(表2)。移植前優位に増えていたクローンと同じCDR3長を有するものについて移植前後で塩基配列の多様性を比較した。移植前に得られた配列の数は1または2と少なく、ほとんどすべて同一配列であったのに対して、移植後得られた配列の数は著しく増加し、TCR多様性の拡大が確認された。

【考察】

Omenn症候群においては、RAG活性の低下に伴い正常なT細胞の分化が障害されるのみでなく、異常なT細胞クローンが増加、これが特徴的な臨床症状や検査所見の発現と密接に関連していると考えられる。したがって、Omenn症候群の治療にあたっては、このような異常T細胞クローンを除去し、正常なTCR多様性を有するT細胞を再構築するための、血液幹細胞移植を早期に施行することが極めて重要となる。

今回解析した3例の中では、症例1, 2においてはCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞ともに複数のTCRBVで著しい増加がみられ、正常に比べ偏った分布を示した(図1)。また、CDR3サイズ分

布解析では、ほとんどがT細胞のモノクローナルな増加を示唆するシングルピークを呈し、TCRの多様性が極端に制限されていることが示された(図3)。症例3は、TCRBVの偏りは著明ではなく、このことは臨床症状が非典型的であったことと関連すると考えられる。

移植後1ヶ月時、臍帯血移植を行った症例2、症例3においてはTCR V β repertoireはほぼ正常の分布を示し、TCRBV CDR3サイズ分布解析においてもガウス分布を呈するBVが多くみられ多様性が回復していることが示唆された。症例2における解析では、CDR3部分の塩基配列の多様性も移植後著しく増加しており、移植後1ヶ月後の時点で細胞レベル、遺伝子レベルともにTCRの多様性の回復が確認され、極めて早期にT細胞再構築が起こっていたと考えられる。

一方、症例1においては、CD8⁺T細胞において、TCRBVの偏りが遷延した。CD4⁺T細胞においてはほぼ正常なTCR V β repertoire分布が回復していることから、オリゴクローナルなT細胞増殖を残したままT細胞の再構築が進行していると考えられる。このように、他の2例と異なる経過をとっている背景には、症例1では母親由来の骨髄移植を行ったのに対して症例2, 3では臍帯血移植を行ったことに関連していると考えられる。骨髄移植において移植後100日以内は患者TCRBVには偏りがみられ、同じBVを有するT細胞のオリゴクローナルな増殖がみられるとの報告がある⁵⁾。また、臍帯血移植においても、移植後1年経過後もTCRの多様性は低く、約半数のBVに偏りがみられるとされている⁶⁾。しかし、今回解析した2例においては移植後1ヶ月の時点においてT細胞の多様性がみられ、T細胞の再構築が起こっていることが示唆された。このような早期にT細胞の再構築がみられた理由として、臍帯血を用いたこと、対象が免疫不全症の患者であったこと、移植前の前処置が緩やかであったため残存しているT細胞が増殖した可能性が考えられる^{8), 9)}。しかし、今回多様性がみられたT細胞がもともと移植した臍帯血に含まれていたドナー由来の細胞であるのか、それとも移植後に胸腺を経て末梢血に

出てきたものなのかを明確に区別することは困難である。Talvensaariらは、TREC量を定量することにより、移植後に出現してきたTCR多様性を有するT細胞が胸腺由来であるとしている⁵⁾。しかし、臍帯血T細胞はTREC含有量が高く、TCR構造も多様であることなどから、これらの指標によりレシピエントにおける細胞の由来を区別することは不可能である^{10), 11)}。ドナーT細胞のCDR3構造とレシピエントで再構築されたT細胞のCDR3構造を直接比較することにより、移植後早期に出現するT細胞の由来を明らかにすることができると考えられ、今後の検討課題である。

以上、本研究の結果よりOmenn病をはじめとするTCR遺伝子の再構成障害を有する免疫不全症においては、TCR多様性の形成が障害されることから、TCRBVレパートリー分布解析およびCDR3サイズ分布解析を用いて、TCRの多様性を評価することが重要であるとともに、造血幹細胞移植前後のTCRの多様性を詳細に検討することはT細胞再構築の評価として意義深いと考えられた。

【参考文献】

- 1) Villa, A., Sobacchi, C., Notarangelo, L.D. 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
- 2) Comeo, B., Moshous, D., Gungor, T. et al : Identical mutation in RAG1 or RAG2 genes leading to defective V(D)J recombinase activity can cause either T-B-severe combined immune deficiency or Omenn syndrome. *Blood*, 97:2772-2776, 2001
- 3) Rieux-Laucat, F., Bahadoran, P., Brousee, N. et al : Highly restricted human T cell repertoire in peripheral blood and tissue-infiltrating lymphocytes in Omenn's syndrome. *J.Clin.Invest.*, 102:312-321, 1998
- 4) Konno A, Okada K, Mizuno K, Nishida M, Nagaoki S, Toma T, Uehara T, Ohta K,