

- Kasahara Y, Seki H, Yachie A, Koizumi S. CD8 α α memory effector T cells descend directly from clonally expanded CD8 α + β ^{high} TCR α β T cells in vivo. *Blood*. 100; 4090-7, 2002
- 5) Sarzotti, M., Patel, D.D., Li, Xiaojing. et al : T cell repertoire development in human with SCID after nonablative allogeneic marrow transplantation. *J.Immunol.*, 170:2711-2718, 2003
- 6) Talvensaari, K., Clave, E., Douay, C. et al : A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. *Blood*, 99:1458-1464, 2002
- 7) Verfuert, S., Peggs, K., Vyas, P. et al : Longitudinal monitoring of immune reconstitution by CDR3 size spectratyping after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplant and the effect of donor lymphocyte infusions on T-cell repertoire. *Blood*, 95:3990-3995, 2000
- 8) Wu, C.J., Chillemi, A., Aiyea, E.P. et al: Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. *Blood*, 95:352-359, 2000
- 9) Blythe G.T., Kent A.R., Darla, G. et al : Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood*, 96:2703-2711, 2000
- 10) Schelonka, R.L., Raaphorst, F.M., Infante, D. et al : T cell receptor repertoire diversity and clonal expansion in human neonates. *Pediatr Res.*, 43:396-402, 1998
- 11) Hall, M.A., Reid, J.L., Lanchbury, J.S.: The distribution of human TCR junctional region lengths shifts with age in both CD4 and CD8 T cell. *Int. Immunol.*, 10:1407-1419, 1998

Evaluation of T cell reconstitution after stem cell transplantation by analyzing the diversity of TCR structures in patients with *RAG1/RAG2* gene mutations

Akihiro Yachie¹⁾, Tomoko Toma²⁾, Yoshihito Kasahara³⁾, Shoichi Koizumi²⁾, Satoru Kumaki³⁾, Shigeru Tsuchiya³⁾, Hisamichi Tauchi⁴⁾, Yasushi Ishida⁴⁾, Kazutaka Yamaji⁵⁾, Jun Kaneko⁵⁾, Shinobu Joko⁶⁾ and Masatoshi Hayashi⁶⁾

¹⁾Department of Laboratory Sciences, School of Health Science, Faculty of Medicine, Kanazawa University, ²⁾Department of Pediatrics, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, ³⁾Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, ⁴⁾Department of Pediatrics, Ehime University School of Medicine, ⁵⁾Department of Pediatrics, Aichi Medical University, ⁶⁾Clinic of Pediatrics, Uwajima City Hospital

Stem cell transplantation is the treatment of choice for B- SCID or Omenn syndrome with impaired RAG activity. It has been indicated that the characteristic clinical findings seen in these patients reflect the impaired T cell development and abnormal proliferation of oligoclonal T cells, due to the *RAG1/2* gene defects. In this study, TCR diversity was examined by analyzing TCRV repertoire distributions, TCRV CDR3 size distributions and CDR3 nucleotide sequences in 3 cases of Omenn syndrome with known *RAG1* or *RAG2* gene mutations. Furthermore, the TCR diversities were examined sequentially after stem cell transplantations. It is suggested from our data that evaluation of TCR structure diversity is useful to estimate the levels of T cell differentiation before, and T cell reconstitution after stem cell transplantation.

Non-Hodgkin's lymphomaを合併したDNA ligaseIV (LIG4) syndromeの一例

戸板成昭 (北海道大学医学部小児科)
波多野典一 (北海道大学医学部小児科)
山田雅文 (北海道大学医学部小児科)
小林良二 (北海道大学医学部小児科)
小林一郎 (北海道大学医学部小児科)
川村信明 (北海道大学医学部小児科)
岡野素彦 (北海道大学医学部小児科)
小林邦彦 (北海道大学医学部小児科)

【研究要旨】

DNA ligase IV syndromeの14歳女児例を報告した。多指症・小頭症・低身長などを認め、呼吸器感染症を反復していた。8歳時よりIgA/IgG2/IgG4欠損を伴うCVIDとして免疫グロブリン置換療法を続けたが、さらに末梢血リンパ球減少・低IgM血症などが進行した。臨床像からChromosome breakage syndromeの中でも特にNijmegen breakage syndromeを疑い、skin fibroblastの放射線高感受性や染色体脆弱性を確認したが、その責任遺伝子NBS1には異常を認めなかった。13歳時にnon-Hodgkin's lymphomaを発症し、低用量の化学療法を施行したにも関わらず、血球減少と粘膜障害が強く、最終的には真菌性肺炎も合併して永眠された。その後、臨床的にNijmegen breakage syndromeに類似したLIG4 syndromeが疑われ、DNA修復酵素であるLIG4遺伝子の解析を行い、エクソン2の点変異と5塩基欠失のcompound heterozygoteと同定した。

【KEY WORD】 DNA ligase IV, LIG4 syndrome, Non-Hodgkin's lymphoma

【はじめに】

DNA ligase IV (以下LIG4) syndromeはDNA修復酵素の1つであるLIG4の異常により発育障害、免疫不全、放射線高感受性などをきたす疾患であり、これまでに4症例が報告されているのみである。DNA ligase IVはnon-homologous end-joiningに関与する二本鎖DNA修復酵素であり、TおよびB細胞抗原レセプター遺伝子のV(D)J recombinationにも重要な蛋白である。今回我々はnon-Hodgkin's lymphomaを合併したLIG4 syndromeの14歳女児例を経験し、その経過と遺伝子解析の結果を報告した。

【症例】

症例：14歳、女児

主訴：左上顎歯肉部腫脹。

出生歴：在胎40週3日、出生体重2902kg、正常分娩、左多指症

家族歴：血族結婚(-)、乳児死亡(-)、低身長(-)、奇形(-)

現病歴：出生時の身長・体重は正常範囲内であったが、哺乳不良・体重増加不良のため1歳頃までチューブ栄養を行っていた。1歳時に左多指症の切除術を施行し、術後に肺炎・腸炎などを繰り返した。3歳時にはITPに罹患し、回復後も血小板数は10万/ μ l前後で推移していた。5歳頃から急性中耳炎、気管支炎を繰り返して、

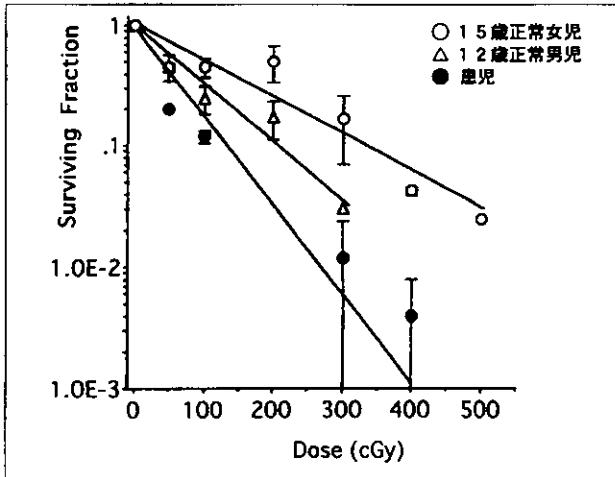


図1. 放射線感受性検査 (skin fibroblast)

IgA・IgG2・IgG4欠損症と診断され、8歳時から免疫グロブリン置換療法が開始された。しかし、その後も臨床症状の著明な改善は認められず、口内炎・中耳炎を繰り返し、血清IgM値も低値であった。11歳時より免疫グロブリン置換療法・ST合剤・Fluconazoleを併用してからは感染頻度が減少していた。しかし、末梢白血球数（特にリンパ球数）・血小板数・血清IgM値などは進行性に減少していった。臨床経過からChromosome breakage syndromeを疑いskin fibroblastにおける放射線感受性検査を施行して、放射線高感受性が確認された（図1）。放射線高感受性を示すAtaxia telangiectasia、Nijmegen breakage syndromeなどの免疫不全症の中では特にNijmegen breakage syndromeを強く疑ったが、NBS1蛋白・遺伝子ともに異常は認めなかった。

13歳時に出現した口内炎が難治性で左上顎歯肉部腫脹が持続したため、同部位の生検を施行し、当科入院となった。

入院時現症：身長125.1cm（-4.9SD）、体重17.7kg（-4.2SD）、体温37.5℃、鳥様顔貌などの特異顔貌は認めず。左上歯肉～上口蓋にかけて白苔を伴う直径3～4cmの腫瘤と潰瘍形成を認めた。

入院時検査所見（表1）：著明な汎血球減少と免疫グロブリンの低値を認めた。リンパ球表面マーカーではT細胞系・B細胞系ともに減少していた。MRI検査（図2）では左上顎洞にT1強調

WBC	1,500 / μ l	IgG	765 mg/dl
Neut	66.0 %	IgA	0 mg/dl
Lym	11.0 %	IgM	4 mg/dl
RBC	$282 \times 10^4 / \mu$ l	CD2	83.6 %
Hb	9.7 g/dl	CD3	64.0 %
Plt	$3.8 \times 10^4 / \mu$ l	CD4	42.3 %
TP	7.0 g/dl	CD8	27.0 %
GOT	22 IU/l	CD16	31.0 %
GPT	13 IU/l	CD20	0.1 %
LDH	472 IU/l	CD56	28.2 %
CRP	2.63 mg/dl	CD57	24.7 %
ESR	77 mm/hr	HLA-DR	73.9 %
C3	159 mg/dl	CD4/CD45RA	0.9 %
C4	52 mg/dl		
CH50	54.5 U/ml		

表1. 入院時検査所見

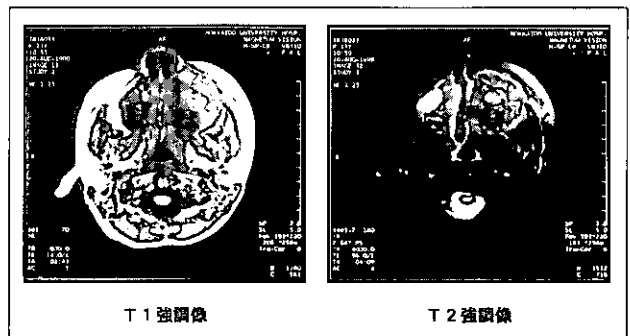


図2. 入院時MRI

像でIso～high intensity、T2強調像でHigh intensityの充実性腫瘤を認めた。生検組織像では、び慢性に増殖した大型異形リンパ球を認め、分裂像も比較的多数認めた。細胞表面マーカーではB細胞系が陽性で、EBウイルス学的検索ではLMP-1・EBNA2・EBERが陽性であった。以上よりEBウイルスに関連したDiffuse large B-cell lymphomaと診断された。

入院後経過：マイトマイシンCに対する感受性は正常であったものの放射線高感受性を認めていたことを考慮して、抗腫瘍剤は減量して治療開始した。ビンクリスチン、サイクロフォスファミド、ピラルビシン、プレドニゾロンを低用量

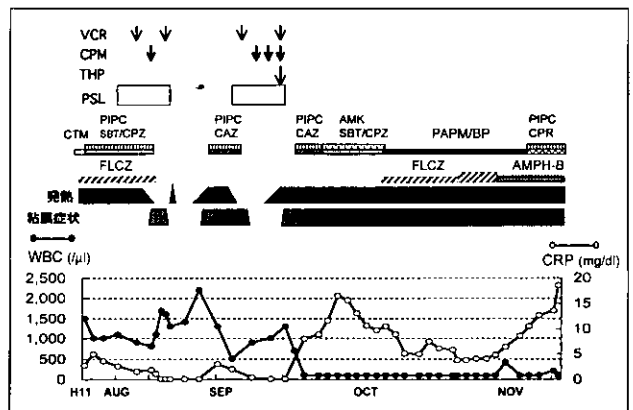


図3. 臨床経過

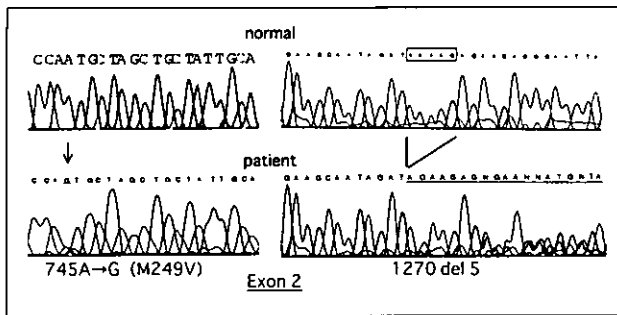


図4. LIG4遺伝子解析

で投与した(図3)が、発熱、下痢、皮膚落屑、粘膜障害が出現し、治療終了後からは白血球数減少・CRP上昇が顕著となった。各種抗生剤・抗真菌剤を投与したが、真菌性肺炎が進行し、最終的には呼吸不全にて永眠された。

その後、成長障害、免疫不全症、放射線高感受性を示すNijmegen breakage syndrome類似の複数の患者でLIG4遺伝子異常が確認され、この疾患をLIG4 syndromeと命名することが提唱された。そこで、本症例についても遺伝子解析を行い(図4)、LIG4遺伝子のExon 2の点変異(745 A→G)と5塩基欠損(1270 del 5)を確認し、compound heterozygoteと同定した。

【考察】

DNA non-homologous end joining (NHEJ)はDNA double-strand breaks (DSBs)の主要な修復機構であり、TおよびB細胞抗原レセプター遺伝子のV(D)J recombinationにも非常に重要である。この過程には、Ku蛋白(Ku70/Ku80)とDNA-PKcsで構成されるDNA-PK複合体とLIG4とXrcc4で構成されるDNA ligase IV/XRCC4複合体が必須である。さらに、Artemisもこの修復機構に関与しており、これらの成分のいずれの分子に異常が生じても、放射線高感受性、DNA DSBs修復障害、V(D)J再構成障害をきたすと考えられる。実際にヒトでこれらの分子の異常が同定されている症例はまだ少ないが、それらは今回報告したLIG4 syndromeと極めて類似した臨床像をとることが予想される。

LIG4遺伝子に異常を認めたこれまでの症例報告は、放射線高感受性/急性リンパ性白血病を認めた1例と免疫不全・成長障害を認めLIG4 syndromeとして報告された4例の計5例のみであり、我が国での報告例はない。また、LIG4遺伝子のpolymorphismと悪性腫瘍の発生との関連性についての報告も散見されるが、LIG4 syndromeとしてこれまでに報告されている症例では悪性腫瘍は認めず、本症例が悪性腫瘍を合併した初めての症例である。

【参考文献】

- 1) Yamada M et al: Combined immunodeficiency, chromosomal instability, and post-natal growth deficiency in a Japanese girl. *Am. J. Med. Genet.* 100:9-12, 2001
- 2) Riballo E et al: Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr. Biol.* 9: 699-702, 1999
- 3) O'Driscoll M et al: DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol. Cell* 8: 1175-1185, 2001
- 4) Riballo E et al: Cellular and biochemical impact of a mutation in DNA ligase IV conferring clinical radiosensitivity. *J. Biol. Chem.* 276: 31124-31132, 2001
- 5) Robins P and Lindahl T: DNA ligase IV from HeLa cell nuclei. *J. Biol. Chem.* 271: 24257-24261, 1996
- 6) Grawunder U et al: DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes. *Mol. Cell* 2: 477-484, 1998
- 7) Roddam L P et al: Genetic variants of NHEJ DNA ligase IV can affect the risk of developing multiple myeloma, a tumour characterised by aberrant class switch recombination. *J. Med. Genet.* 39: 900-905, 2002

A case of DNA ligase IV (LIG4) syndrome with non-Hodgkin's lymphoma

Nariaki Toita, Norikazu Hatano, Masafumi Yamada, Ryouji Kobayashi, Ichiro Kobayashi, Nobuaki Kawamura, Motohiko Okano, Kunihiro Kobayashi

Department of Pediatrics, Hokkaido University Graduate School of Medicine

We report here a 14-year-old girl with DNA ligase IV syndrome. She had preaxial polydactyly, microcephaly, short stature, and recurrent respiratory tract infections. While the immunoglobulin replacement therapy for IgA/IgG2/IgG4 deficiency was started at the age of eight, the number of peripheral blood lymphocytes and the serum level of IgM were progressively decreased. Cell biological studies of her primary skin fibroblasts demonstrated spontaneous chromosome aberrations and radiation hypersensitivity, but the sequence analysis of a Nijmegen breakage syndrome-responsible gene, *NBS1*, revealed no mutations. At the age of 13 she suffered from non-Hodgkin's lymphoma and was treated with a relatively mild regimen of chemotherapy. However, severe mucosal damage, refractory diarrhea, pancytopenia, and serious fungal pneumonia were subsequently developed, and finally she died of respiratory failure. Thereafter, we analyzed the sequence of *LIG4*, a gene responsible to LIG4 syndrome that clinically resembles Nijmegen breakage syndrome, and demonstrated that the patient was a compound heterozygote consisting of a point mutation and 5-base pair deletion in exon 2 of *LIG4* gene.

XLAおよびXSCIDに対する遺伝子治療の基礎的問題点

右 田 真 (日本医科大学小児科、日本医科大学第2生化学)
田 辺 浩 子 (日本医科大学第2生化学)
早 川 潤 (日本医科大学小児科、日本医科大学第2生化学)
伊 藤 保 彦 (日本医科大学小児科)
塙 秀 樹 (日本医科大学第2生化学)
島 田 隆 (日本医科大学第2生化学)
福 永 慶 隆 (日本医科大学小児科)

【研究要旨】

我々は造血幹細胞を標的としてウイルスベクターを用いた免疫不全症に対する遺伝子治療の検討を行ってきた。1) ヒトXLAの原因遺伝子であるBtk遺伝子を有するオンコレトロウイルス、HIVベクターを作成した。HIVベクターは高い効率で造血幹細胞へBtk遺伝子を導入することが可能であった。Btk遺伝子の変異をもつ自然発症のXid免疫不全マウスを対象に遺伝子導入及び移植を行うとマウスモデルでは遺伝子導入細胞の移植によりB細胞の分化はほぼ正常化したにもかかわらず、免疫グロブリンの上昇は見られなかった。2) さらにIL-2受容体common γ ($C\gamma$) 鎖遺伝子の異常によりXSCIDに対してもオンコレトロウイルス、HIVベクターを作成し検討中である。我々は造血幹細胞を標的としてウイルスベクターを用いた免疫不全症に対する遺伝子治療の検討を行っている。

【はじめに】

伴性無ガンマグロブリン血症 (X-linked agammaglobulinemia; XLA) は1952年にBrutonにより初めて報告された液性免疫不全症である。その病態はXp21.3に存在するBtk (Bruton's tyrosine kinase) 遺伝子の異常によりプロB細胞からプレB細胞への成熟が障害されるものである。今日、ガンマグロブリンの定期的補充療法が行われているが、恒常的治癒を目指した治療が確立されていない。造血幹細胞は多分化能と自己再生能を持つ細胞であり、恒常的治癒を目的とする遺伝子治療の理想的な標的細胞と考えられている。我々はこれまで、この造血幹細胞を標的としてウイルスベクターを用いた免疫不全症に対する遺伝子治療の検討を行ってきた。今回、造血幹細胞に効率良く遺伝子導入することが可能な水疱性口内炎ウイルスG糖蛋白 (VSV-G) をエンベロープに持

つシュードタイプHIVベクターを用いて、XLAに対する遺伝子治療の可能性を自然発症のXLAモデルマウス (Xidマウス) を用いて検討した。

【方 法】

ヒトBtk cDNAを組込んだ、VSV-GシュードタイプHIVベクターを作製した。マウス造血細胞に遺伝子導入してin vitroにおける導入効率はメチルセルロース培地を用いたCFUアッセイを施行した。次にin vivoでの治療の有効性を検討するために、Xidマウスの骨髓細胞に治療遺伝子を導入した後に移植する遺伝子治療群とXidマウス由来の骨髓細胞と正常マウス由来の骨髓細胞を混ぜてXidマウスに移植した骨髓移植群に分けて検討した (図1)。移植後30週にマウスの骨髓、脾臓の単核球に治療遺伝子が導入されているかをPCR法にて検討した。また、両群における血清

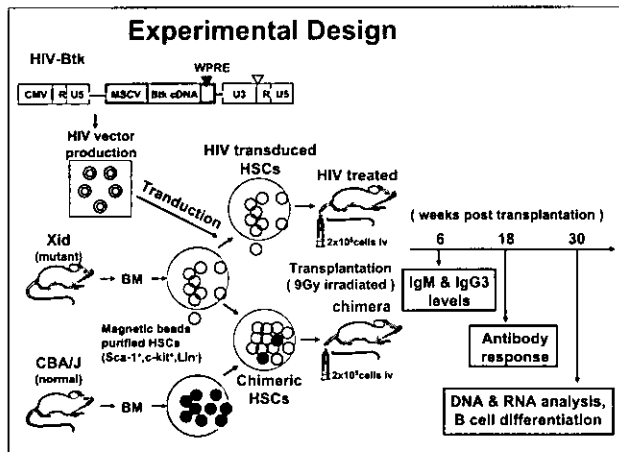


図 1

IgM, IgG3濃度を経時的に測定した。さらにNP-Ficollを投与し両群のマウスにおける抗体産生能を比較した。

【結果】

マウス造血細胞に遺伝子導入したところ、メチルセルロース培地を用いたCFUアッセイでは82コロニー中77コロニー (94%) に効率よく遺伝子導入された。遺伝子導入後に造血幹細胞を移植されたマウスすべてにおいて移植後30週でも安定して骨髄と脾臓の単核細胞にBtk治療遺伝子が検出された。骨髄移植群では骨髄細胞の10から20%が正常細胞に置換されたキメラマウスが作成された。この両群における細胞の分画を検討してみると、脾臓単核球のIgM^{low}IgD^{high}細胞は、骨髄移植群、遺伝子治療群ともにXidマウスと比較すると増加したが、遺伝子治療群での増加は軽微であった。腹腔内 B1 (CD5⁺B220⁺) 細胞の増加も同様であった。骨髄移植によるキメラ群ではBtkの発現が骨髄、末梢血、脾臓の単核球で確認されたが、遺伝子治療群では脾臓においてはBtkの発現が認められなかった。さらに血清IgM、IgG3濃度は骨髄移植群では改善が認められたが、遺伝子治療群では改善が認められず (図2)、NP-Ficoll に対する抗体産生も骨髄移植群では認められたが、遺伝子治療群では認められなかった。

【考案】

レンチウイルスベクターはhuman immunodeficiency virus 1 (HIV-1), simian immunodef-

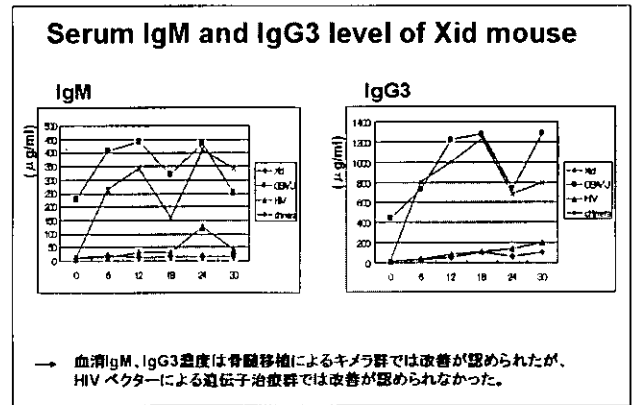


図 2

iciency virus (SIV) などのレンチウイルスから作られたベクターの総称である。オンコレトロウイルスベクターはプレインテグレーション複合体が染色体DNAにたどり着くために細胞分裂時の核膜消失が必要であるため細胞分裂していない細胞に遺伝子導入することができない。このためレンチウイルスベクターは細胞分裂しないか、していても非常にゆっくりであると思われる造血幹細胞、神経細胞、肝細胞、筋細胞に遺伝子導入するには不向きである。一方、レンチウイルスはプレインテグレーション複合体に積極的に核膜を通過する機能があるのでこういった標的細胞には潜在的に有利である。レンチウイルスベクターの中でもっとも研究が進んでいるのはHIV-1ベクターであるが、HIV-1はAIDSの原因ウイルスであるため、安全面での改良が行われてきた^{1,2)}。

今回の我々のXLAに対する遺伝子治療の検討ではXidマウス造血幹細胞にレンチウイルスベクターを用いることでBtk遺伝子を効率よく導入でき、長期に安定して骨髄と脾臓の単核細胞にproviral DNAが検出された。血清IgM, IgG3値に関しては骨髄細胞の10から20%が正常細胞に置換されたキメラ移植群では有意な上昇が認められるのに対して、遺伝子治療群では血清IgM、IgG3のいずれも改善が認められなかった。これは現行のXLAに対する遺伝子治療の方法では十分な表現型の改善に不十分であることを示唆している。この原因として移植した造血幹細胞において、1細胞当たりの導入遺伝子の発現量が低いのか、遺伝子導入ではB細胞の分化の各stageにおいて、Btkの発現量を調節する機構が必要なのか、

同一のBtk遺伝子異常をもつヒトXLA症例で、重症度が異なることから、B細胞の分化の過程に、Btk遺伝子以外の遺伝子が関与しているのかなど、今後の検討が必要である。

レトロウイルスベクターは導入遺伝子が染色体に組み込まれるためこのような遺伝子治療に向いているが、その反面、遺伝子導入部位がほぼ無作為に選択されるため白血病などの悪性新生物の原因となることが危惧されていた。2002年にフランスのAlain Fisherらのグループからレトロウイルスベクターを用いたX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)の遺伝子治療で著明な治療効果を得られたことが報告された^{3,4}、数年後にこの心配が現実のものとなった。

遺伝子治療をうけた10人の患者のうちで、最終的に治療効果のあった9人中、この免疫の再構築が不十分であった2人がT細胞性白血病を発症している⁵。これらの患者の経過は以下のである。一人は遺伝子治療後約30ヶ月で $\gamma\delta$ T細胞の増加を認め、同時期に感染していた水痘によるものと考えられていたが、T細胞数はそのまま指数的に増加した。遺伝子治療後約34ヶ月の時点で脾腫、骨髄浸潤を認め、末梢血細胞の細胞膜表面抗原は成熟T細胞型、免疫スコop分析で $\gamma\delta$ TCRの単クローン(V γ 9V δ 1)を示し、また染色体異常(der(13)t(6;13))も認めた。これらによりT細胞急性白血病と診断され化学療法を施行。遺伝子治療後40ヶ月に非血縁HLA適合ドナーから骨髄移植を受けている。微小残存病変は残っているが現在の状態は良好とのことである。もう一人は遺伝子治療後34ヶ月に貧血を伴う白血球数の急上昇、脾腫、縦隔の拡大を認めた。末梢血細胞の細胞膜表面抗原は同様に成熟T細胞型で、免疫スコop分析で $\alpha\beta$ TCRのオリゴクローン(V β 1, V β 2, V β 23)を示していた。また、SIL-TAL1転座、トリソミー10の染色体異常も認めた。T細胞急性白血病と診断し、化学療法を施行した

ところ臨床的に寛解に至っており現在のところ状態は良好とのことである。遺伝子導入部位をLinear amplification mediated PCR (LAM-PCR)法で解析したところPatient 4では原癌遺伝子LMO2 (LIM domain only-2)の転写開始部位下流約2kbに遺伝子の方向と逆向きに挿入されており、Patient 5では同じ遺伝子(LMO2)の転写開始部位上流約3kbに遺伝子の方向と同じ向きに挿入されており、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療がT-ALLの発症の直接的原因と考えられている⁶。

これらの事実を踏まえ、有効かつ安全な遺伝子治療を実現するためにはさらなる地道な研究が必要である。

【参考文献】

- 1) Zufferey R et al : Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol.* 15 : 871-875, 1997
- 2) Zufferey R et al : Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol.* 72 : 9873-9880, 1998
- 3) Cavazzana-Calvo M et al : Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288 : 669-672, 2000
- 4) Hacein-Bey-Abina S et al : Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med.* 346 : 1185-1193, 2002
- 5) Hacein-Bey-Abina S et al : A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 348 : 255-256, 2003
- 6) Hacein-Bey-Abina S et al : LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 : 415-419, 2003

HIV-mediated expression of Btk in hematopoietic stem cells is not sufficient for restoration of B cell function in X-linked immunodeficient mice

Makoto Migita^{1,2}, Hiroko Tanabe², Jun Hayakawa^{1,2}, Yasuhiko Ito¹, Hideki Hanawa², Takashi Shimada², Yoshitaka Fukunaga¹

¹Department of Pediatrics, ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School

Mutations of Bruton's tyrosine kinase (Btk), which is critical for B cell development and function, cause X-linked agammaglobulinemia (XLA) in humans and X-linked immunodeficiency (xid) in mice. Although the severity of clinical phenotype is different between two species, xid mice are considered useful for evaluating treatment strategies for XLA patients. We injected xid mouse hematopoietic stem cells (HSCs; $1-3 \times 10^5$) transduced with an HIV vector containing the human Btk gene under the control of the internal murine stem cell virus (MSCV) promoter into 4-week-old xid mice. Thirty weeks later, vector sequences remained to be detectable in bone marrow and spleen, but serum concentrations of IgM and IgG3 and the antibody response to NP-Ficoll challenge were not restored. The number of differentiated B cells (IgM^{low}IgD^{high}) was increased, while the peritoneal B1 cell count remained low. The relative expression of human Btk to background mouse mutated Btk in the spleen was significantly lower than that in the bone marrow, suggesting a growth disadvantage for human Btk+ cells in the spleen. These results indicate that HIV-mediated expression of human Btk in bone marrow stem cells promotes B cell development, but cannot restore B cell function in xid mice.

慢性肉芽腫症患者のための日常生活マニュアル作成案

布井博幸（宮崎大学医学部小児科教授）

【研究要旨】

今回慢性肉芽腫症患者の悩みを知るために、食細胞機能異常研究会を通じて105施設206名を対象にアンケート調査を行い、71名（回収率は34.5%、生存者の68.9%）、56施設（52.4%回収率）からの回答を得た。

その結果、全般的に医師からの服薬指導はよく守られていたが、日常生活でのカビ対策の実践的知識が足りず、不安が多く、メリハリのある安全な生活環境の確保出来ていないのではないかと思われた。そこで、日常生活での家庭や学校、食品、住宅について指導要綱をまとめた。

【はじめに】

慢性肉芽腫症は早くから病因遺伝子がわかり、新しい治療薬や骨髄移植法なども開発されてきている。一方で、患者の日常生活が非常に制限されることが多く、QOLの改善が十分でなかったのではないかと反省していた。英国のCGD研究と支援者グループや米国立衛生研究所からはCGD生活マニュアルが出されている（<http://www.cgd.org.uk/downloads.htm>）。

今回はそれにならって、患者日常生活に関するアンケート調査を行った。この調査で気付いた細菌や真菌に対する日常生活上注意すべき点を挙げ、メリハリのある安全な環境を日本で確保するための考察を行った。

【方法】

アンケートは米国立衛生研究所のCGD生活マニュアルの日本語訳をつけ、主に日常生活について問答形式とし、記名方式（イニシャル可）で行った。対象は慢性肉芽腫症患者リストに登録された患者本人または家族とし、患者登録された施設の主治医へ郵送後、患者へ手渡しまたは郵送してもらった。記入後同封筒による郵送返送とした。

【結果】

1) アンケート送付先 国内105施設、患者206に

郵送し、71名（34.5%）の患者から回答を得た。生存が確認できた患者からの回収率は68.9%であった。

2) 患者の生死・投薬状況・近況を調査は国内105施設に郵送し、56施設（52.4%）から回収できた。

3) 生存患者数は103名であった。

4) 死亡患者数は平成9年調査以降8名であった。

5) アンケート回答の結果は添付の表の通り（表1）

6) このほか、色々な質問と御意見を頂いた。（詳しくは製本中）

【考察】

新たな治療選択肢が確立されていくにつれて、CGD患者の生命予後も改善し、就職・結婚される患者も増えてきた。同時に患者の行動範囲は広がり、主治医の予期せぬところで病原菌に暴露され病状が悪化する、または環境衛生上不適切な職場に就職して悪化するという事態にも知られるようになった。今回、食細胞機能異常症研究会が行ったCGD患者日常生活調査の結果と患者さんからの質問などから、以下に生活管理上のポイントとなる点を挙げ考察し、CGD患者および家族のチェック項目（表2：家の周りや通学路、家、日常生活、特別な行事）を同時に作製した。

①日常生活における感染予防の点からは、温水洗

浄便座や空気清浄機の設置などを考えたい。とくに肛囲膿瘍はよく見られる症状のひとつであり、肛囲の洗浄は有効と思われる。空気清浄機も最近では塵埃除去能力の高い製品が出てきている。アンケートのなかで、日常の掃除についての質問があったが、とくに浴室の壁や、冷蔵庫の野菜室内（根菜類にアスペルギルスはいる）などには真菌が棲んでいる。これらの場所は特に注意すべきであるが、他は通常の掃除でも十分であろうと思われる。ただ、絨毯や畳の大掃除の際にはできれば本人は近づかず、または外科用マスクの使用し、十分な予防が必要である。

②保育園・学校における感染予防面からは、落ち葉に潜む真菌が心配で学校の落ち葉の清掃や森林への遠足は十分な予防が必要である。また裸足の運動やプール・海水浴などには注意が必要である。塩素消毒が充分なされるプールはむしろ安全と思われるが、海水浴は場所による。湖・川・溪谷での水浴は避けた方がよい。清掃・体育以外ではとくに学校生活上の制限は必要なさそうである。スポーツについては怪我の少ないテニス・バドミントン・卓球・プールでの水泳などが勧められる。

③食品については、とくに生ものや発酵食品の質問が多かったが、ブルーチーズを除くと、納豆、ヨーグルト、乳酸菌飲料などは問題ないようである（感染の報告はない）。ただしできるだけ新鮮なものを選んで食べさせたい。

④居住環境では、新築・増改築した家への入居、大掃除などは要注意である。建設中播き上げられたおがくずや土壌中のアスペルギルス、畳裏のカビなどが原因と思われる症状悪化例が4家系あった。新築・増改築住宅は充分除菌されるまで入居しない、枯葉や落ち葉のある森林での散歩などを避けるべきである。

⑤間接的ではあるが、医療費補助や公共福祉サービスの周知、遺伝相談や出生前診断の実施、インターネットによる知識の普及などは早期受診、治療、感染予防につながる重要なファクターと考えられる。病態・治療などに関する情報公開・日常生活などに関する意見交換も患者の意識改

善に役立つと思われた。

⑥生存患者103名のうち48名（46.7%）が18歳以上であった。彼らの就職については、衛生環境の保たれる職場が重要である。比較的衛生環境のよい教員や看護師が勧められるが、木材工場やゴミ収集といった職場は大量の真菌に晒される危険性が高い。実際にこれらの患者ではその後病状悪化につながっていた。キノコ栽培工場でのアルバイト中におがくずで増殖するアスペルギルスが原因と思われる肺アスペルギルス症に罹患し、死亡された例の報告もある。今後ますます増加する成人患者への生活指導方針作りも必要である。

欧米のCGDサイトが掲載した「CGD生活指導マニュアル」の日本語訳(<http://www.miyazaki-med.ac.jp/pediatrics/html/cgdmain.html>)を転載しているが、この中には日本の生活事情とは合致しない部分も含まれている。

そこで現在、食細胞機能異常症研究会では、国内のCGD患者を対象とした「日常生活指導マニュアル」の作成を進めている。CGDの一般的・医学的知識の記載だけでなく、カビの知識とカビに対する予防法、患者からの質問に対するQ&Aなどを加えたより実地的なマニュアルの完成を目標としており、先生方の貴重なご意見をお願いしたい。

参考文献として挙げた国際免疫不全家族会のCGDについての項では感染専門の看護師を養成し、電話による相談や、時には家庭訪問を行って、生活指導を行っており、その対応の細かさに驚かされた。これからは単に生活マニュアルだけでなく、実際的な生活指導を含む全国的なケアが稀な免疫不全患者のためには必要である。

【参考文献】

文献：参考文献はあまりないが、国際免疫不全家族の会（International Patients Organisation of Primary Immunodeficiencies (IPOPI) <http://www.cgd.org.uk/downloads.htm>)に詳しい生活指導マニュアルと家族の会のQ&Aが掲載されているので、参考にしたい。

<トイレの形式>			<ペットの飼育>		
水洗洋式	3	(4.5%)	犬	9	
水洗和式	54	(80.6%)	ハムスター	2	
浄化槽	6	(9.0%)	カメ	2	
くみ取り	4	(6.0%)	インコ	1	
			熱帯魚	1	
			リス	1	
<手洗いは>			<クラブ活動>		
水洗い	12	(17.6%)	野球	6	
石けん使用	21	(30.9%)	バスケットボール	2	
薬用石けん	35	(51.5%)	テニス	2	
			サッカー	1	
<家の掃除>			バレーボール	1	
こまめに掃除する(毎日)			剣道	1	
換気をする			卓球	1	
カーペットからフローリングに変えた			将棋など文化系	4	
モップがけの時オスバン希釈して使用			残りは無回答でした		
結露をまめに拭き取る					
<加湿器の使用>			<プールでの水泳>		
使用する	12	(16.9%)	普通に入っている	18	
使用しない	59	(83.1%)	条件付きで入る	6	
			病状をみて判断する	1	
<空気清浄機の使用>			傷のあるときは入らない	4	
使用する	24	(33.8%)	授業で入るのみ	1	
使用しない	47	(66.2%)	入らない	25	
<学校生活指導>			<海水浴>		
特に制限されていない	約8割		普通に水に入る	17	
体育一部制限(持久走など)			条件付きで入る	1	
体育は見学	約2割		病状をみて判断する		
裸足は制限されている場合が多い			入らない	28	
<職業に就かれていますか>			<悪化の原因について>		
教員 看護婦 調理師 美容師			家の新築	4	
医薬品営業職 クリーニング店員			家の火災	1	
自動車整備工 不動産営業職			木材工場就職	1	
土木建築業 冠婚葬祭花店員 など			畳の掃除(裏カビ多量)	1	
ゴミ収集員 木材工場			ゴミ回収車アルバイト	1	
<ST合剤の内服>			<IFN-γの使用>		
投与中患者	62	(93.9%)	投与中患者	26	(40.0%)
投与中止患者	3	(4.5%)	投与中止患者	19	(29.2%)
未投与患者	1	(1.5%)	未投与患者	20	(30.7%)

表1. アンケートの結果

真菌や細菌感染にかかりやすい身の回りのものや場所を一度チェックしましょう。
一般的にはカビ・アレルギーでの注意と似ているところもありますが、基本的にアスペルギルスやカンジダなどの真菌が繁殖しやすい場所への注意が必要です。

1) 家の周りや通学路に以下のような所があるかチェックしてみてください。

- 敷きわら、枯葉
- 木片、製材、木材工場など（キノコも木片で栽培する工場があるようです）
- 庭仕事で出た廃物
- 木片を下に敷いてある遊び場
- 牛やウマの納屋、豚や鶏小屋はどうか？
- 洞窟や鍾乳洞や湿っぽい所は避ける
- 醤油、味噌などの醸造業ではカビや細菌を使用していますので、注意ください

2) 家のチェック（普段の掃除や整理整頓も大切です）特に注意すべき場所のチェックです

- 新築、改築後の入居は注意（十分ブリーチ等できれいにしてから入居）
- カーペット、畳掃除、タイルの張り替えには注意
- 風呂場のカビ
- 冷蔵庫の野菜庫の整理と除菌
- トイレはウオッシュレットの方が良いでしょう。

3) 日常生活でのチェック

- 切り傷や擦り傷は石鹸と水で洗い、オキシドールで消毒
- 加湿器を使用する時にはブリーチでの消毒が必要
- 空気清浄機のチェック、車エアコンも
- 食事は出来るだけ新鮮なものをよく洗って食べましょう
- 裸足で外に出るはいけません
- 庭いじりをするときには、外科用のマスクを（花からなるべく吸入しないよう）
- 家庭菜園の植え替えなどは特に注意
- 生け花、生のクリスマスツリーの水たまり
- ペットはかんなくずをベッドとして使用しないで下さい
彼らの水受けやベッドはいつも清潔にして下さい。

4) 特別な行事

- 大掃除、畳替えは出来るだけ避ける、または外科用マスクを使用
- 運動会、おけいこ事（人込みは出来るだけ避けましょう）
- 温泉の薬浴
- 公共のプールなどは十分塩素消毒がされていれば大丈夫です。むしろ、海水浴、渓谷、川での水浴びは避けたほうがよいでしょう。

5) あまり心配しすぎもよくありません。

（日常生活で上記のようなポイントをもって、注意するようにしましょう）

この他お気づきになることがありましたら、お知らせください。

Fax 0985-85-2403 富崎大学小児科医局

Tel 0985-85-0989 富崎大学小児科医局

表2. CGD患者のチェック項目

WHIM症候群におけるCXCR4遺伝子異常の解析

蒲池 吉 朗 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学)

小島 勢 二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学)

柘植 郁 哉 (藤田保健衛生大学小児科)

【研究要旨】

平成14年度の本会議において我々は18才のWHIM症候群女性患者に対し、HLA一致の姉よりフルグラピンを用いたミニトランスプラントを行い、好中球およびBリンパ球の造血能の正常化をみたことを報告した。その後Hernandezらにより常染色体優性遺伝形式を示す本疾患患者における原因遺伝子としてケモカインレセプターCXCR4の異常が報告された。本患者におけるCXCR4遺伝子異常につき解析したところ、一方の対立遺伝子においてのみC1013Gの1塩基置換によるS338Xのナンセンス変異が見出されたが、もう一方の対立遺伝子に異常はなかった。このS338X変異はCXCR4のC末端細胞質内tail (c-tail) の15アミノ酸の欠失を生ずると考えられるが、マウスIL3依存性骨髓球系白血病細胞株への遺伝子導入実験からはS338X変異を持つCXCR4の細胞膜上への発現に異常は認められなかった。C-tailはレセプター機能の制御に重要な部位であり、本部位の欠失はレセプター機能の制御異常を起こすことが報告されている。このことからS338X変異はgain-of-function mutationの可能性が考えられ、このCXCR4異常蛋白の発現が本疾患の血液、免疫学的機能異常に関与していることが示唆された。

【はじめに】

Myelokathexisは成熟した好中球の著しい変性様形態変化および骨髓における好中球系過形成を特徴とする非常に稀な先天性好中球減少症である。しばしば疣贅 (warts)、低ガンマグロブリン血症 (hypogammaglobulinemia)、細菌感染症の反復 (infections) を伴うことからWHIM症候群と称されている¹⁾。WHIM症候群の原因遺伝子は長らく不明であったが、2002年にHernandezらにより原因遺伝子としてCXCR4の異常が報告された²⁾。CXCR4はCXCKケモカインCXCL12 (SDF-1) に対するレセプターであり、その構造は7回膜貫通型のG蛋白質共役受容体である。通常ケモカインレセプターは複数のケモカインがligandとなり得るが、CXCR4のligandは現在までのところCXCL12 (SDF-1 α) のみである³⁾。CXCR4はHIV感染に必要なco-receptorとして非常によく研究されているが、それ以外にもknock-outマウ

スの実験から顆粒球系とBリンパ球系の造血、心臓の形成、神経細胞の移動、腸管における血管網の構築など多様な生物学的機能を有することが報告されており^{4,5)}、また腫瘍細胞の転移や自己免疫疾患への関与も指摘されている。今回、我々は前年度の本会議において報告したWHIM症候群患者におけるCXCR4遺伝子異常につき解析し、これまで報告されていない新たな変異を同定した。本患者における変異遺伝子の機能異常につき文献的考察を加えて報告する。

【対象と方法】

症例は18才女性で臨床症状、治療経過、血液学および免疫学的検査結果については前回報告したが、簡単にまとめると患者は乳児期から細菌感染による難治性中耳炎や肺炎を繰り返し、7歳時当科紹介、精査にてmyelokathexisと低ガンマグロブリン血症が認められWHIM症候群と診断さ

れた。疣贅については初診時より現在までまったく認められていない。18才時、HLA一致姉よりフルダラピンを用いたミニトランスプラント(RIST)を行い、重篤な副作用なく骨髄細胞は完全キメラ状態となり、顆粒球系およびBリンパ球系の造血能の回復をみた。

CXCR4異常の解析は1) フローサイトメーターにより移植前後における患者骨髄単核球分画におけるCXCR4 (CD184) の膜表面での発現をモノクローナル抗体 (12G5, BD Biosciences) を用いて検討した。2) 遺伝子解析は患者およびドナー(姉)の骨髄顆粒球分画からTRIzol (Invitrogen) を用いてRNAとgenomic DNAをそれぞれ単離し、GenBankのヒトCXCR4塩基配列情報 (accession no.Y14739) を基にプライマーを設定し、型どおりRT-PCRとgenomicPCRを行い、得られた産物のダイレクトシーケンスおよびサブクローニング後にシーケンスを行いABI3100を用いて解析した。認められた遺伝子変異については制限酵素Sau3A1を用いたPCR-RFLP法でも確認した。3) 患者から単離したCXCR4 cDNAを発現ベクターpMKITNeoに組み込み、IL-3依存性マウス骨髄球系白血病細胞株32Dに遺伝子導入し、細胞膜表面上へのCXCR4の発現につきフローサイトメーターにて検討した。

【結果】

CXCR4は細胞膜表面上に発現しているケモカインレセプターであるため、骨髄移植前後における患者骨髄単核球分画におけるCXCR4発現異常の有無につきフローサイトメーターにて検討した

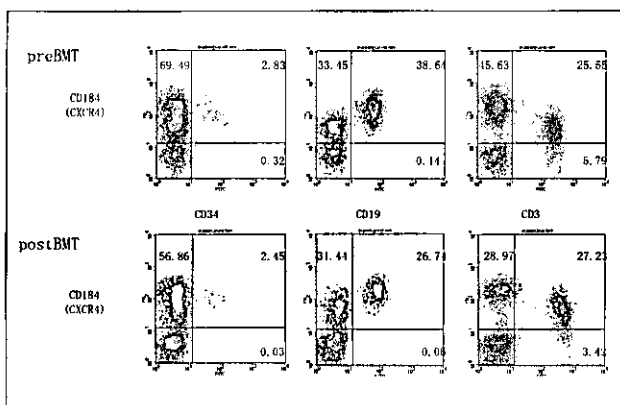


図1. 骨髄移植前後の患者骨髄単核球分画におけるCXCR4の発現

が、CD34, CD19, CD3陽性分画においてCXCR4の細胞膜表面上への発現に骨髄移植前後において異常は認められなかった。(図1)

次にCXCR4の遺伝子レベルでの異常につき検討した。図2Aに示すように患者骨髄顆粒球分画から単離したRNA, genomicDNAとも一方の対立遺伝子においてのみC1013Gの1塩基置換が認められたが、もう片方の遺伝子には異常は認められなかった。このC1013Gの1塩基置換は新たにSau3A1切断部位を生じるため、同部位を挟むプライマーを設定し得られたPCR産物(342bp)をSau3A1で切断したところ、予想された168bpのエキストラバンドが骨髄移植前の患者検体においてのみ認められた。ドナーである姉および骨髄移植後の患者の骨髄移植前の患者検体においてのみ認められた。ドナーである姉および骨髄移植後の患者の骨髄顆粒球分画ではCXCR4遺伝子のシーケンシング、PCR-RFLP解析とも異常は認められなかった。(図2B)

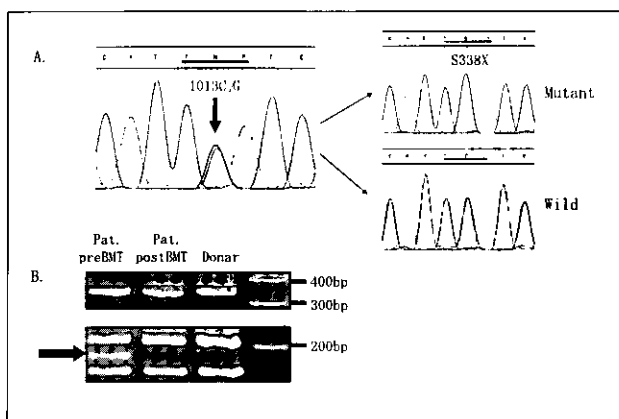


図2. 患者骨髄好中球におけるCXCR4遺伝子異常の解析 (A) cDNA塩基配列解析 (B) PCR-RFLP解析

CXCR4発現に異常は認められなかったが、遺伝子解析の結果、本患者におけるCXCR4の異常が片方の対立遺伝子のみでもう一方は正常遺伝子のためS338X変異をもつCXCR4が細胞膜上に発現可能かどうかを検討するためS338X変異をもつCXCR4が細胞膜上に発現可能かどうかを検討するために、IL-3依存性マウス骨髄球系白血病細胞株32Dに遺伝子導入し、その発現をフローサイトメーターにて検討した結果、その発現は正常遺伝子導入株と比べて相違はなかった。(図3)

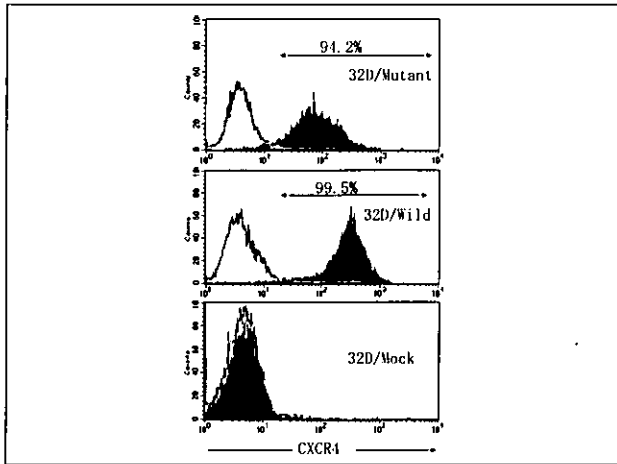


図3. 32D transfectantsにおけるCXCR4遺伝子の発現
32D: (IL-3)-dependent murine myeloid precursor cell line

【考案】

GorlinらはWHIM症候群では主に常染色体優性遺伝形式を示すが、孤発例または常染色体劣性遺伝もあることを報告したが⁶⁾、本症例は家族歴がなく両親とも健康なため常染色体劣性遺伝または孤発例の可能性が考えられた。しかしながら、CXCR4遺伝子解析の結果から一方の対立遺伝子のみが異常を呈すること、またHernandez、谷内らは父親がgermline mosaicの症例を報告しており²⁾、本症例においても今後両親の遺伝子解析を行う必要があると考えられた。

CXCR4はG蛋白質共役受容体であり、その構造は7回膜貫通部位とligandであるCXCL12 (SDF-1 α)との結合部位であるN末端細胞外ドメインおよび45個のアミノ酸からなるC末端細胞質内tail (C-tail) になる³⁾。これまでの実験結果からC-tailはレセプターのdesensitization、internalizationおよびユビキチン化に関与し、レセプター機能の制御に重要な役割を果たしていることが報告されている^{7,8)}。我々の症例も含めてこれまで報告されているWHIM症候群におけるCXCR4の変異部位の図4に示すようにすべてC-tail内の点突然変異またはフレームシフト変異である^{2,9)}。これによりストップコドンが生じC-tailの一部が欠失した異常蛋白質が生じると考えられた。C-tailを完全に欠失させても細胞膜上へのCXCR4の発現に異常は認められないことが報告されており¹⁾、我々の患者の骨髄単核球におけるCXCR4の発現にも異常は認められなかったこと

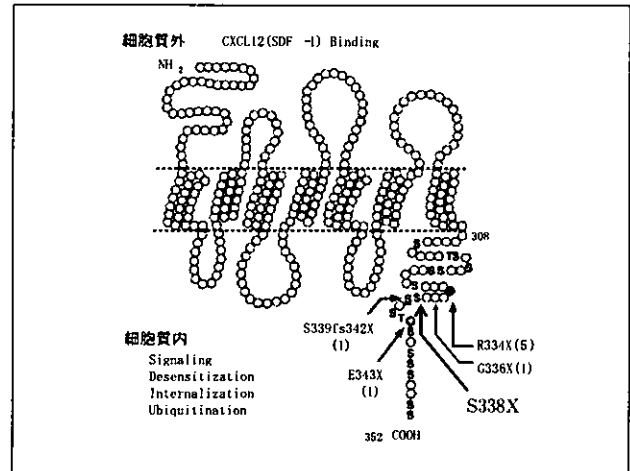


図4. CXCR4の構造と遺伝子異常部位
()内の数字は現在まで報告されている症例数を示す
(Hernandez et al. Nat Genet. 2003 May;34(1):70-4より一部改変)

と患者の変異遺伝子の導入実験でも変異CXCR4の細胞膜上への発現が認められること、また33個のアミノ酸の欠失したC-tailを持つ変異CXCR4の遺伝子導入実験やHernandezらのWHIM症候群患者から樹立したEBウィルス形質転換細胞株を用いた実験からはCXCL12刺激によりインソールリン酸産生の増大と細胞質内カルシウムの放出の増加と延長が認められること^{2,8)} およびknock-outマウスの実験からcxcr^{-/-}マウスは健康で異常が認められないこと^{5,6)} からWHIM症候群におけるCXCR4のC-tail欠失による常染色体優性遺伝のメカニズムとしてはhaploinsufficiencyやdominant negative効果ではなくgain-of-function mutationの可能性が示唆された。このことからWHIM症候群におけるmyelokathexisの原因の一つとしてCXCR4のgain-of-function mutationによりレセプター機能の制御異常によるCXCL12に対する反応性の亢進により成熟好中球の骨髄から末梢への放出が障害され、成熟好中球が骨髄内で貯留し、結果としてapoptosis様の形態変化を生じる可能性が考えられた。しかしながら、CXCR4の生物学的機能はchemotaxisだけではなく細胞の生存やapoptosisに関与することも報告されており¹⁰⁾、WHIM症候群における変異CXCR4が好中球のapoptosis様の形態変化に直接関与している可能性も否定できないため、今回作製したS338X変異を持つCXCR4を発現する32D transfectantを用いて検討を進めていく予定である。

また、今回の我々の検討では患者骨髄単核中のCD19陽性細胞の割合は移植前後において差を認めなかったが、移植前の末梢血B細胞の割合は5%以下に減少していたことから好中球と同様に骨髄から末梢へのB細胞のtraffickingの異常が考えられたが、調べた範囲ではWHIM症候群における骨髄でのB細胞系の分化、成熟過程についての詳細な報告はないため今後の検討が必要と考えられた。

【参考文献】

- 1) Wetzler, M., Talpaz, M., Kleinerman, ES., et al.
A new familial immunodeficiency disorder characterized by severe neutropenia, a defective marrow release mechanism, and hypogammaglobulinemia. *Am J Med* 89: 663-672, 1990
- 2) Hernandez, PA., Gorlin., RJ., Lukens, JN., et al.
Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* 34: 70-74, 2003
- 3) Horuk, R.
Chemokine receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 12 : 313-335, 2001
- 4) Tachibana, K., Horita, S., Lizasa, H., et al
The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393: 591-594, 1988
- 5) Zou, YR., Kottmann, AH., Kuroda, M., et al
Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393: 395-599, 1998
- 6) Gorlin, RJ., Gelb, B., Diaz, GA., et al
WHIM syndrome, an autosomal dominant disorder: Hematological, and molecular studies. *Am J Med Genet* 91: 368-376, 2000
- 7) Roland, J., Murphy, BJ., Ahr, B., et al.
Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1 - mediated signaling. *Blood* 101: 399-406, 2003
- 8) Haribabu, B., Richardson, RM., Fisher., I., et al
Regulation of human chemokine receptors CXCR4. *J Biol Chem* 272: 28726-28731, 1997
- 9) Gulino, AV.
WHIM syndrome: a genetic disorder of leukocyte trafficking. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 3: 443-450, 2003
- 10) Vlahakis, SR., Villasis-Keever, A., Gomez, T., et al
G protein-coupled chemokine induce both survival and apoptotic signaling pathways. *J Immunol* 169: 5546-5554, 2002

Analysis of CXCR4 gene mutation in a patient with WHIM syndrome

Yoshihiro Kamachi¹⁾, Seiji Kojima¹⁾, Ikuya Tsuge²⁾

Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine¹⁾, Department of Pediatrics, Fujita Health University²⁾

Last year reported that we had done the non-myeloablative bone marrow transplantation using fludarabine for the 18-year-old female patient with WHIM syndrome from her HLA-matched sibling donor, and that we found the recovery of both myelopoiesis and B lymphopoiesis. In 2002, Hernandez et. al. reported the mutations of the chemokine receptor CXCR4 as the causative gene of WHIM syndrome which showed an autosomal dominant inheritance pattern. Nonsense mutation (S338X) by one base substitution of C1013G was found only in one allele in patient, but there was no mutation to another allele. It was thought that this S338X mutation caused truncation of 15 amino acids of the C-terminal cytoplasmic tail domain (C-tail) of CXCR4. Although we stably transfected the murine IL3-dependent myeloid cell line, 32D with S338X expression constructs, they showed that there was no defect in the expression of this truncated CXCR4. In addition, other experimental evidence has previously showed that the deletion of the C-tail of CXCR4 caused increased responsiveness to CXCL12 which is the ligand for the CXCR4 and the dysregulation of receptor function. These findings support the hypothesis that truncation of the C-tail leads to a gain-of-function of the mutated CXCR4 in our patient. It is possible to speculate that the expression of truncated CXCR4 might be involved in the abnormality of both hematological and immunological function in WHIM syndrome patients.

WHIM症候群における責任遺伝子の解析：CXCR 4 遺伝子変異蛋白の同定

谷 内 昇一郎 (関西医科大学小児科)
藤 井 喜 充 (関西医科大学小児科)
蓮 井 正 史 (関西医科大学小児科)
辻 章 志 (関西医科大学小児科)
畑 埜 泰 子 (関西医科大学小児科)
伊 藤 太 一 (関西医科大学小児科)
小 林 陽之助 (関西医科大学小児科)
栞 田 緑 (関西医大臨床検査学)

【研究要旨】

WHIM症候群（先天性免疫不全症）の責任遺伝子がケモカインレセプター（CXCR 4）であることが明らかになった。今回の研究目的は、本疾患でのCXCR4変異遺伝子の役割を解明することである。症例は11歳の2卵性双胎姉妹。8歳時本疾患と診断し、家族歴に異常はない。まず白血球からDNAとRNAを抽出し、CXCR 4領域のプライマーを用いて、PCR法とRT-PCR法それぞれで増幅し、ダイレクトシーケンス法によりCXCR 4領域のDNAとmRNAの遺伝子変異を解析した。姉、妹および父でCXCR 4領域の334番目（1000C-T）がヘテロに変異し、ストップコドンとなった。母と兄とでは変異を認めなかった。CXCR 4領域のmRNAの解析では、姉と妹とで同じ部位でヘテロに変異を認めたが、父では認められなかった。父方祖母、祖父ともに、DNA、mRNAに変異は認めた。CXCR 4抗体を使用した免疫沈降法では、白血球内のCXCR 4蛋白は姉と妹とで、兄と正常人とに比し、分子量が5kdほど小さい変異蛋白が認められた。フローサイメトリーを用いた白血球膜上のCXCR 4の発現は、対照と比較して差がなかった。以上のことから、本家系は父でCXCR 4のコドン334番目（1000C-T）が体細胞突然変異をおこし、その変異遺伝子が患児に遺伝したためWHIM症候群が発症したと考えられた。父が発症しなかったのは、モザイクであると考えられた。また変異遺伝子は変異蛋白を産生し、その蛋白がWHIM症候群での免疫異常と関わることが示唆された。

【はじめに】

ミエロカテキシスはZuelzer¹⁾らが1964年に最初に報告し、白血球減少を伴った慢性好中球減少と、骨髓好中球の特徴的な形態異常が特徴的である。別名WHIM (wart, hypogammaglobulinemia, immunodeficiency, myelokathexis) syndromeといわれ、疣贅（いぼ）、低ガンマグロブリン血症、免疫不全、好中球減少を特徴とする²⁾。我々は、本疾患の好中球減少と形態異常とが骨髓好中

球のアポトーシスの異常によることを明らかにした³⁾。しかしそのアポトーシスの異常の原因、あるいはその責任遺伝子は不明であった。2003年にHernandezら がWHIM症候群の責任遺伝子がケモカインレセプターの一つであるCXCR 4であることを明らかにした⁴⁾。CXCR 4はストローマ細胞由来因子1 (stromal cell-derived factor 1: SDF-1) のレセプターであり、CD34細胞、B前駆細胞、成熟T細胞、B細胞、単球に発現してい