

る。またこれら細胞はSDF-1に対して走化能を持っている^{5),6),7),8)}。またCXCR4はCD4リンパ球におけるHIVのco-receptorとなることが有名である⁹⁾。CXCR4やSDF-1のノックアウトマウスでは胎児で死亡し、小脳形成の異常、腸管膜動脈の異常および造血機能の異常が認められた。Tリンパ球の形成には異常なく、Bリンパ球と骨髄系細胞の形成低下が認められた^{10),11)}。このようにCXCR4は生体内で多彩な機能を有することが考えられるが、細胞内での明確な機序は不明である。本研究の目的は、WHIM症候群における責任遺伝子(CXCR4)の役割を明らかにし、その病態を解明することである。

【症 例】

症例は2卵性双胎の11歳の姉妹で、第1子には心疾患、第2子には1型糖尿病がある。双方とも生後6か月から反復性の呼吸器感染があり、2才時に骨髄検査からミエロカテキシスと診断した。8歳ごろから下肢に疣を認めている。どちらもST(スルファメトキサゾール・トリメトプリム)合剤の予防内服で感染は殆ど認められていない。家族歴として特記すべことなく、易感染性は認めていない。血液検査を表1に示した。白血球減少を伴った好中球減少を認め、IgGはやや低値で、CD19細胞の減少を認める。リンパ球の幼若化は正常である。以上から第1子、第2子ともWHIM症候群と診断した。

		第1子	第2子
WBC	/ μ l	1,300	700
Neutro	(%)	18	24
Lympho	(%)	76	69
IgG	mg/dl	796	579
IgA	mg/dl	35	22
IgM	mg/dl	50	46
CD3	(%)	63	75
CD4	(%)	47	59
CD8	(%)	27	18
CD19	(%)	4	5

表1. 検査所見

【方 法】

1) DNAの解析: EDTA加末梢血からデキストラン沈降法で白血球を分離し、DNAを抽出し、CXCR4の全領域をCXCR4のプライマーを用いてPCR法で増幅し、PRISM3100 (Applied

Exon 1

CXCR4-1 primer: 5'-GCT CGG AGC GTG TTT TTA-3'

CXCR4-7 primer: 5'-ACC TCC AAT GTC CTG GC-3'

Exon2

CXCR4-2 primer: 5'-ATG TCC ATT CCT TTG CCT CT-3'

CXCR4-3 primer: 5'-CCT ATG CAA GGC AGT CCA TGT-3'

CXCR4-4 primer: 5'-GGT AGC GGT CCA GAC TGA TGA-3'

CXCR4-5 primer: 5'-GCT GTC ACA CTC CAA GGG CC-3'

CXCR4-6 primer: 5'-AGC TGG AGT GAA AAC TTG AAG-3'

CXCR4-8 primer: 5'-TGG TCT TGA GGG CCT TGC GC-3'

表2. CXCR4のプライマーデザイン

Biosystems, CA, USA) シークエンサーでダイレクトシークエンス法により解析した。プライマーのデザインを表2に示した。

2) mRNAの解析: EDTA加末梢血からデキストラン沈降法で白血球を分離し、RNAを抽出し、CXCR4の全領域をCXCR4のプライマーを用いてRT-PCRで増幅、ダイレクトシークエンス法により解析した。

3) 免疫沈降法: デキストラン沈降法で白血球を分離し、1% Nonidet P-40で細胞を溶解し、容出物を抗CXCR4抗体12G5 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) で免疫沈降した。免疫沈降したものをProtein G-Sepharose4 Fast Flow beads (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden,) でカップリングさせ、12%のSDSで泳動した。さらにニトロセルロース膜に移動させ、抗CXCR4抗体44716 (DakoCytomation) に反応させ、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体で染色し、ケミルミネッセンス(Boehringer Mannheim GmbH, Germany) で増幅して同定した。

4) CXCR4の発現: 比重遠心法で分離した好中球を10%FCS加RPMI培養液で16時間培養して洗浄後、FITC標識CXCR4抗体(DakoCytomation)を加えてフローサイメトリーで解析した。比重遠心法で分離した分離したリンパ球をTGF β 1 (0.25ng/ml: PeproTech EC LTD, London, UK) とともに10%FCS加RPMI培養液で48時間培養し、FITC標識CXCR4抗体とPE標識CD3 (Coulter Corporation, Miami, USA) 抗体で二重染色し、表面抗原をフローサイメトリー (EPICS-C; Coulter Corp, Hialeah, FL) で解析した。

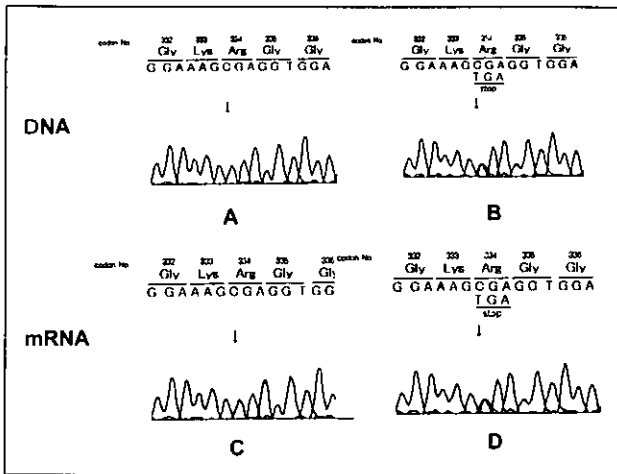


図1

患者2名、父、母、兄、父方祖父、父方祖母のDNAとmRNAをCXCR4領域のprimerで増幅し、シーケンサーで解析した。DNAでは患者2名と父にヘテロにコドン334のCGAがストップコドンとなっている(B)。それ以外はCXCR4領域で遺伝子変異は認められなかった(A)。mRNAでは患者のみにヘテロにコドン334のCGAがストップコドンとなっている(D)。それ以外はCXCR4領域で遺伝子変異は認められなかった(C)。

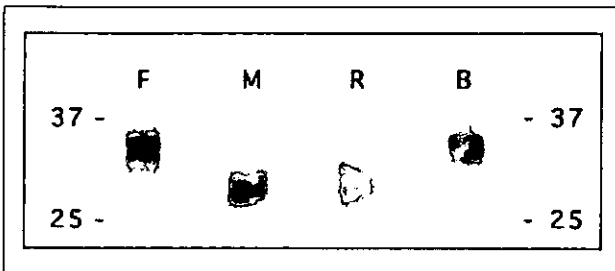


図2

デキストラン沈降法で患者2名と兄、母から白血球を分離し、1% Nonidet P-40で細胞を溶解し、容出物を抗CXCR4抗体(12G5)で免疫沈降した。免疫沈降したものをProtein G-Sepharose 4 beadsでカップリングさせ、12%のSDSで泳動した。さらにニトロセルロース膜に移動させ、抗CXCR4抗体(44716)に反応させ、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体で染色し、ケミルミネッセンスで増幅し、同定した。Fは父、患者2名はMとR、Bは兄である。患者2名に分子量27kdのバンドがみとめられ、また父、兄のバンドより、5kd程分子量が小さいことが認められる。

【結果】

患者2名、兄、父および母でCXCR4領域におけるDNA、mRNAの遺伝子変異を調べた。DNAでは、母と兄とは正常に比べ、この領域では異常を認めなかった。患者2名と父とにヘテロにコドン334でCGAがTGAに変異しストップコドンとなっていた(図1A)。次にRT-PCRによるCXCR4領域のmRNAの変異については、患者にのみ、ヘテロでDNAの異常が認められた。父は正常であった(図1B)。これらのmRNA、DNAの変異は口腔粘膜細胞にも同様に認められた。父方祖父母もCXCR4領域のmRNA、DNAは正常であった。

抗CXCR4抗体による免疫沈降法で患者2名とも、父、兄に比べ、やや低いところでbandが出

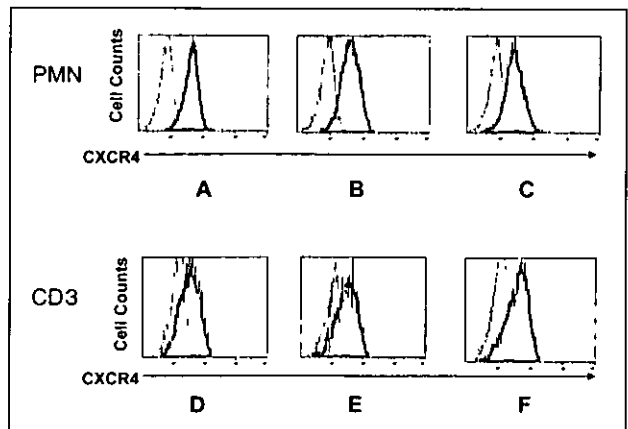


図3

患者2名と正常大人から好中球と単核球を分離し、好中球は16時間、単核球は24時間培養した。その後好中球はFITC標識CXCR4抗体を加え、また単核球はFITC標識CXCR4抗体とPE標識CD3抗体を加え、フローサイトメトリーで解析した。患者2名の好中球(PMN: polymorphonuclear cells)のCXCR4の発現(A, B)は、コントロールと同様に認められた(C)。単核球をCD3でgateし、そのCD3陽性細胞のCXCR4の発現も、患者2名(D, E)もコントロール同様(C)に弱いながらも認められた。

現し、変異蛋白が出現していることが明らかであった(図2)。

CXCR4の表面抗原は、リンパ球、好中球ともに分離直後だと細胞表面に出現していないが、培養すると弱いながらも発現してくる(図3)。患者2名の好中球を10%FCS加RPMIとともに培養し、CXCR4の発現をみると、対照と同様にその発現が認められた。またリンパ球をTGF- β 1とともに培養すると、48時間後に対照と同様、弱いながらもCXCR4の発現が認められている。また細胞内のCXCR4抗原もCD3細胞で培養しなくても認められる。

【考察】

WHIM症候群における分子遺伝学的検討は、Nature Geneticsに報告されたのみであり、さらなる詳細な検討すなわち変異遺伝子の発現機構の検討はまだない。今回我々はその発現機序を1家系で明らかにした。

WHIM症候群では骨髄からの好中球の放出障害が考えられ³⁾、T、Bリンパ球機能障害が症例によって存在する。反復感染症は著明ではなく、経口抗生物質に反応し、炎症時には骨髄からの好中球の放出も良好であるが、致死的な場合もある。疣や低ガンマグロブリン血症は患者によって認められ、遺伝的多様性が考えられる。Hernandezらは7家系18名のWHIM症候群の患者のsampleか

らポジショナルクローニングすることによってその責任遺伝子が2q21のCXCR 4 遺伝子であり、

CXCR 4 レセプターの細胞内domainのC末端に変異を認めることを明らかにした⁴⁾。今回我々の患者はCXCR 4 遺伝子の334番目でヘテロにCGAがTGAに変異していた。その変異は本患者も含め、4家系に334番目の変異が認められ、342番目、343番目がそれぞれ1家系ずつ、また他の1家系はCXCR 4 遺伝子領域に異常を認めていない⁴⁾。われわれの症例では痒や、低ガンマグロブリン血症が双方に認められ、細胞性免疫機能は障害されていない。WHIM症候群のなかでは1番多いタイプのものである。症状の多様性は、CXCR 4 の細胞内domainの場所によるかもしれない。

患者2名にmRNAの変異がbiallelicに発現していた。また父ではDNAの変異は患者と同様に認められるが、mRNAは正常であった。また父方の両親も検索したが、mRNA、DNAともに正常であった。従って、本患者は父がsomatic mutationを起こし、モザイクでヘテロに変異遺伝子が患者に伝わったものと考えられる。またCXCR 4 領域ではimprintingしない領域であることが理解できる。

患者のCXCR 4 の細胞内蛋白では、免疫沈降法で正常より分子量が5 kdほど小さいバンドが認められ、変異遺伝子からの変異mRNAが変異蛋白を合成したのと考えられた。患者では異常なmRNAと正常なmRNAとがbiallelicに発現されており、何らかの機序で正常な蛋白の合成が抑えられ、細胞内domainの欠如した変異蛋白が合成されていることが想像できる。

CXCR 4 のノックアウトマウスではB細胞の欠如と骨髓系細胞の分化障害があり、ほとんどが早期に死亡することが報告されている¹⁰⁾。またCXCR 4 欠損マウス胎児肝細胞を移植された生後4週のキメラマウスでは末梢血中に未分化なB細胞や顆粒球が増加しており¹²⁾、これらは我々のWHIM症候群における末梢血の顆粒球の減少や骨髓における未熟な顆粒球の増加とは全く正反対の病態を示す。機序の面から、患者のB-cell lineを使用し

た検討では、SDF-1 に対するCaイオンの流入は正常細胞の3倍であると報告されている⁴⁾。好中球のCXCR 4 は分離直後では発現しないが、16時間程培養すると発現することが証明されている¹³⁾。またCD 4 細胞もTGF β 1で培養すると24-48時間で弱いが発現すると報告されている¹⁴⁾。われわれの患者でも好中球もリンパ球もどちらも正常と同様に発現していた。

以上のことから、変異CXCR 4 蛋白が細胞表面に至るが、細胞内domainのC末端が欠損しているためにSDF-1 からCXCR 4 への異常なシグナルが細胞内に伝達することによって様々な免疫異常が生じると考えられる。

【参考文献】

- 1) Zuelzer WW. "Myelokathexis"-A new form of chronic granulocytopenia. *N Engl J Med.* 1964 ; 270:699-704.
- 2) Taniuchi S, Yamamoto A, Fujiwara T, Hasui M, Tsuji T, Kobayashi Y. Dizygotic twin sisters with myelokathexis: Mechanism of its neutropenia. *Am J Hematol.* 1999 ; 62 : 106-111.
- 3) Wetzler M, Talpaz M, Kleinerman ES, King A, Huh YO, Gutterman JU, Kurzrock R. A new familial immunodeficiency disorder characterized by severe neutropenia, a defective marrow release mechanism, and hypogammaglobulinemia. *Am J Med.* 1990; 89: 663-72.
- 4) Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, Klotman ME, Diaz GA. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet.* 2003; 34: 70-4.
- 5) Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood. *J*

- Exp Med. 1997; 185: 111-20.
- 6) Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 ; 94: 1925-30.
- 7) Bleul CC, Schultze JL, Springer TA. B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement. J Exp Med. 1998; 187: 753-62.
- 8) D'Apuzzo M, Rolink A, Loetscher M, Hoxie JA, Clark-Lewis I, Melchers F, Baggiolini M, Moser B. The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. Eur J Immunol. 1997; 27: 1788-93.
- 9) Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. Nature. 1996; 382: 829-33.
- 10) Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95: 9448-53.
- 11) Nagasawa, T., S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani, T. Kishimoto. 1996. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. Nature. 1996; 382: 635.
- 12) Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. Immunity. 1999; 10: 463-71.
- 13) Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Imanishi M, Tsuno NH, Matsushima K, Yamamoto K, Morita Y, Hirai K. Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. J Leukoc Biol. 2002; 71: 711-7.
- 14) Franitza S, Kollet O, Brill A, Vaday GG, Petit I, Lapidot T, Alon R, Lider O. TGF- β 1 enhances SDF-1 α -induced chemotaxis and homing of naive T cells by up-regulating CXCR4 expression and downstream cytoskeletal effector molecules. Eur J Immunol. 2002; 32: 193-202.

A role of mutation of CXCR4 gene in twin sisters with WHIM syndrome

Shoichiro Taniuchi, MD*, Yoshimitsu Fujii, MD*, Midori Masuda, PhD#, Yasuko Hatano, MD*, Masafumi Hasui, MD*, Shoji Tsuji, MD*, Taichi Ito MD* and Yohnosuke Kobayashi MD*

Department of *Pediatrics and #Clinical Science and Laboratory Medicine, Kansai Medical University, Osaka, Japan

It has been shown that the responsible gene for WHIM syndrome (warts, hypogammaglobulinemia, immunodeficiency and myelokathexis) is the mutant CXCR4 gene. The purpose of this study is to elucidate a role of the mutant CXCR4 gene in twin sister of WHIM syndrome. The subjects studied were 11-year-old dizygotic twin sisters. The diagnosis of WHIM syndrome was made at the age of 8 years. Nobody of the family was similarly affected. PCR and RT-PCR using primers at the region of CXCR4 gene amplified DNA and RNA isolated from leukocytes, respectively. The PCR products were subsequently analyzed by a direct sequencer. CXCR4 proteins in leukocytes were detected by immunoblotting by using anti-CXCR4 monoclonal antibody. The surface expression of CXCR4 was studied with flow cytometry.

We found a mutation that occurred on CpG dinucleotide, 1000C→T in both patients and their father. Their brother, mother, grandfather and grandmother were all normal in regard to the CXCR4 sequence. Sequence of CXCR4 from mRNA by RT-PCR disclosed the same mutation as DNA in only the patients. The other family members were normal CXCR4 sequence. The mutant protein of CXCR4 in leukocytes was detected at the molecular 27kd, which is smaller than normal CXCR4 protein. These mutant proteins were detected in only the patients. Surface expression of CXCR4 in the patients were the same as that in normal control.

Somatic mutation as CpG dinucleotide, 1000C→T in CXCR4 gene in father may have been transmitted to the patients as a heterozyte, resulting in WHIM syndrome in the pedigree. No occurrence of WHIM in father is due to mosaicism of his cells. The mutation of the CXCR4 gene may cause mutant the CXCR4 proteins which suppress the production of normal CXCR4 protein, resulting in normal expression of the mutant CXCR4 on patients' leukocytes. These phenomenon are thought to be related to the etiology of the immunological disorders in WHIM syndrome.

Chédiak-Higashi症候群患者における原因遺伝子*CHS1*の変異の検討

葛西宏 威 (山梨大学大学院医学工学総合研究部 微生物学)
田辺文 憲 (山梨大学大学院医学工学総合研究部 人間科学・基礎看護学)
伊藤正 彦 (山梨大学大学院医学工学総合研究部 微生物学)
上松一 永 (信州大学大学院 移植免疫・感染症)

【研究要旨】

Chédiak-Higashi症候群 (CHS) は白子症を伴う原発性免疫不全症であり、好中球やマクロファージの殺菌能低下とNatural Killer活性の低下を特徴とする¹⁾。この疾患の責任遺伝子である*CHS1* cDNA は全長13kbと長大で²⁾、その詳細な機能についてはまだ明らかではない。また、これまでにCHS患者の*CHS1*の変異についての情報も十分とはいえない状況である。我々は、CHS患者2例について患者由来の細胞株よりRT-PCRにより*CHS1*のcDNA断片を増幅し、増幅された断片をTAクローニングした後、全長の塩基配列を決定した。その結果、2症例についてそれぞれ、1箇所塩基欠損変異と1塩基の挿入変異が明らかになった。

【はじめに】

遺伝子異常を伴う先天性疾患の病態、発症機序を理解するうえで、責任遺伝子を同定し、変異を明らかにしていくことは基盤となる作業である。また、この作業を通じてChédiak-Higashi症候群 (CHS) 責任遺伝子*CHS1*はcDNAにして全長13kbpsと長大であり²⁾、全長にわたる変異の検討が十分になされていない。そこで、日本におけるCHS患者の*CHS1*変異について解析を行った。

また、一方で我々はCHS患者およびモデル動物であるbeigeマウス由来の細胞における活性化後のPKCの不安定性³⁾、セラミドの蓄積⁴⁾といった生化学レベルでの表現型を報告してきた。また、PKC活性阻害剤、細胞膜透過型セラミドで正常細胞を処理することによって巨大顆粒の形成といった細胞レベルの表現型を再現することが出来る^{3,4)}。このことは、我々が見出してきた表現型は細胞レベルでの異常の原因となりうることを示唆するものであった。そこで、次に*CHS1*とこれらの表現型との関係を分子生物学的手法で解析していこうと考えた。本年度は*CHS1*全長cDNAを単

離し発現系の構築を行った。

【材料と方法】

異なった患者由来の細胞株2種よりmRNAを単離しRT-PCRによりcDNAを増幅し、解析に用いた。cDNA増幅は全長を4領域にわけて増幅した。増幅後のcDNAはTAクローニングし全長塩基配列を決定した。

また、健常人末梢血単核球からmRNAを分離精製しRT-PCRにより全長cDNAの単離を行った。単離したcDNAは各種発現ベクターにサブクローニングした。

【結果】

異なった2症例の患者由来の細胞株より、それぞれ、Open Reading Frame (ORF) 全長を含むcDNA 4断片がえられた (図1)。表1に示したprimerを用い (表1) ORFの全塩基配列を決定した。それぞれの症例について下記に示す。一カ所の欠損変異が明らかになった。症例A: cDNA7284に1塩基欠損 症例B: cDNA11086に1塩

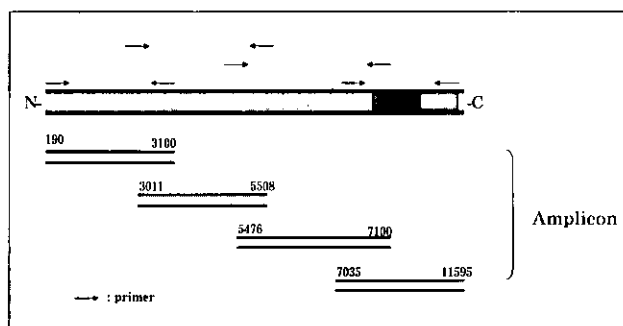


図 1

primer	sequence
CHS 190 F	ATGAGCACCGACAGTAACTCACTGGCACGT
CHS 760 F	CGTTTCCTAAACAGACCACC
CHS 1250 F	TGAATTGCTTAGAGCAGCTTTAAAAA
CHS 1791 F	AAGAGACTGCAGATGGAGATGTTATTATC
CHS 2291 F	TTTGAAGAAGCAGATTACATAGTATACAG
CHS 2791 F	TCCTCAGAGTCTCAGCAAATTTTATGCTG
CHS 3001 F	AGTCATATGCTGCCATGTATATCTC
CHS 3100 F	ACATGTTGAGTTCAGTGTCCAGAAAC
CHS 3540 F	AGAACTAGTCAACAGAAGATGGAATTGGAG
CHS 4100 F	AAAGAATGTTTTCTGCTCATGCAACAGGG
CHS 4691 F	AACAATCATTAAATTTACCAGATAGCAGT
CHS 5000 F	AGGGAAAAGGAGGATTCATGGGAAA
CHS 5426 F	CAACTTACTGTCTGCTCAGTATACCATCT
CHS 5528 F	GAAGTTCAGAGCATCTTATTAGAACCCTCAT
CHS 5780 R	ACCTGATGAATCATAGAAAGTCCATTACAA
CHS 6538 R	CGCTTAGTAGTGAAGAAGTAGGGAATGCT
CHS 7091 R	CCAAACAGTCTTCAGTTACACTGT
CHS 7035 F	TGAGCCAAATTACAACCCGAACCTGCA
CHS 7770 F	GTAATGCTTGGATATCTTCAAAATAGCAAA
CHS 8320 F	GAAGGATTCAAAGTATCTATTGGTTCAAGT
CHS 9120 F	ATAGACAGAAATCAGAAGATGTTGTCAAAC
CHS 9213 R	TTTGTCTTTGACAGTAGAAGAGAAAGAAGATGAG
CHS 9584 F	CAAAATTTATGGTATACTGG
CHS 10750F	TCTGTCTTGTGATGACATATAGCAAGGAAC
CHS 11595 F	CAGCTATGCAGCCGGGTGA

表 1

基挿入 (図 2 それぞれ矢印で示した)。この他に複数のアミノ酸置換があった。これらの意義についてはさらなる検討が必要である。

【考 察】

今回検討した、2 症例についてそれぞれ 1 塩基欠損が確認された。欠損箇所はそれぞれ、症例 A : cDNA7284 番塩基に 1 塩基欠損がみられ第 2429 アミノ酸からアミノ酸置換がおき 2434 番アミノ酸で翻訳が終了する。症例 B : cDNA11086 番塩基に 1 塩基挿入がみられ第 3695 アミノ酸からアミノ酸置換がおき、3731 番アミノ酸で翻訳が終了する。症例 A ではこれまで CHS1 の CHS 病態と強く関連すると考えられている BEACH ドメインを欠損していた。しかし、症例 B において、BEACH ドメインは欠損しない。この他にも複数のアミノ酸置換が確認されたがこれらの意義は明らかではない。症例 B についてアミノ酸置換変異の意義を含め他

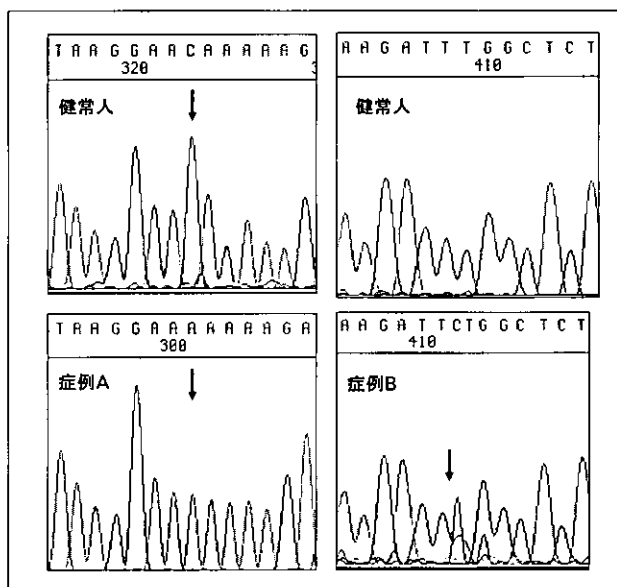


図 2

の変異を検討するとともに、同欠損変蛋白の発現系を構築し、beige、CHS由来細胞に再構築することにより病態との関連を明らかにして行きたい。今後は本 2 症例について、欠損もしくは挿入箇所領域のゲノム配列を検討し、他症例についても同様の検討をして行きたいと考えている。一方で、健康人 PBMC から ORF 全長領域を含んだ CHS1-cDNA 断片の単離に成功した。現在、野生型及び各種の欠損変異体発現系の構築を進めている。今後は分子生物学的な手法を用い CHS1 の機能を特に、PKC の機能調節という観点から解析して行きたいと考えている。

【参考文献】

- 1) Ward DM, Shiflett SL, Kaplan J. Chediak-Higashi syndrome: a clinical and molecular view of a rare lysosomal storage disorder. *Curr Mol Med.* 2002 ; 2(5): 469-77.
- 2) Barbosa MD, Nguyen QA, Tchernev VT, Ashley JA, Detter JC, Blaydes SM, Brandt SJ, Chotai D, Hodgman C, Solari RC, Lovett M, Kingsmore SF. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature.* 1996 ; 382(6588): 262-5.
- 3) Ito M, Tanabe F, Takami Y, Sato A, Shigeta S. Rapid down-regulation of protein kinase C in (Chediak-Higashi syndrome) beige mouse

by phorbol ester. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 ; 153(2): 648-56.

- 4) Tanabe F, Cui SH, 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.* 2000 ; 67(5): 749-55.

Chédiak-Higashi syndrome (CHS) is an autosomal recessive disorder characterized by severe immunologic defects including reduced bacteriocidal activity of neutrophils and impaired natural killer (NK) activity. The diagnostic feature of this syndrome is the presence of giant granules within cells. The gene named *CHS1*, encoded 3801 amino acids, was identified as responsible gene of CHS. In the current, we identified two deletion mutation in *CHS1* from two patients. In first case the 7284th residue of cDNA was deleted and the translation was stopped at the 2434th amino acid residue. In the second case, the 11086th residue of cDNA was deleted and the translation was stopped at the 3731th amino acid residue. Several substitutions were identified, however significance of these substitutions was unknown. While we have cloned cDNA whole encoding region, almost 11kbp and construct the expression systems of CHS1 and its mutants. Using these molecular biological analytical tools, we will try to clarify the role of CHS1 in regulation of PKC activity.

PI3K欠損B細胞におけるシグナル伝達経路の解析

松田 達志 (慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室、科学技術振興機構・CREST)

小安 重夫 (慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室、科学技術振興機構・CREST)

【研究要旨】

我々の研究室では、PI3Kの調節サブユニットであるp85 α を欠損したマウスにおいて、末梢におけるB細胞の割合が著しく低下することを明らかにしてきた。p85 α 欠損B細胞においてはNF- κ B経路の重要なコンポーネントであるc-Relの発現が著しく低下しており、さらに野生型マウス由来の末梢B細胞をPI3K/Akt経路に対する特異的な阻害剤で処理することによってもc-Relの発現低下が認められた。c-RelがB細胞の活性化過程で必須の役割を担うことから、p85 α 欠損B細胞の機能異常はPI3K/Akt経路の機能不全に伴うc-Relの発現低下によってもたらされることが強く示唆された。

【はじめに】

PI3Kは細胞の生存・増殖の過程で重要な役割を担う分子である。しかし、実際にPI3Kによってどのようなシグナル伝達経路が制御されているかについては、不明な点が多く残されている。我々の研究室では、東京大学医学部の門脇教授らと共に、PI3Kの調節サブユニットであるp85 α のノックアウトマウスの解析を行い、末梢のリンパ球のうちB細胞の割合のみが著しく低下することを明らかにしてきた。B1細胞の欠失やTI-II抗原に対する抗体産生能の低下等のp85 α 欠損マウスの表現型は、Xidマウスのそれに類似していることから、当初p85 α 欠損B細胞の機能異常はBtk活性の低下によって説明されるものと考えられた。実際、p85 α 欠損B細胞・Btk欠損B細胞は共に抗原刺激に伴うNF- κ B経路の活性化に異常が認められた。しかし、その後の生化学的な解析から、p85 α 欠損B細胞においても野生型と同程度のBtkの活性化が引き起こされることが明らかとなり、PI3K経路とBtkとは独立にNF- κ B経路を制御していることが示された¹⁾。BtkはPLC- γ 2の活性化を介してPKCの活性化とそれに引き続くIKK

複合体の活性化を引き起こすことが知られている。活性化したIKKはI κ Bのリン酸化とそれに伴うI κ Bの分解を介してNF- κ B経路の活性化を誘導する。本研究では、PI3K経路がどのような機構でNF- κ B経路の活性化を制御しているのかを明らかにすべく各種の解析を行った。

【対象と方法】

p85 α 欠損マウスならびに対照となる野生型(C57BL/6)マウスからそれぞれ脾細胞を調製し、抗B220-MACSビーズで処理した後にAutoMACS (Miltenyi Biotech社)を用いてB細胞を得た(純度>95%)。B細胞は、ヤギ抗マウスIgM抗体F(ab')₂フラグメント(以下、抗IgM抗体)を用いて刺激した。

【結果と考察】

PI3Kによって生産されるPIP3は、PHドメインを持つ分子を膜へとリクルートすることで各種の分子の活性化を引き起こすことが知られている。PHドメインを持つ分子のうち、B細胞におけるNF- κ B活性化に必須な役割を持つ分子として

PLC- γ 2が挙げられる。そこで、我々はまずPLC- γ 2の活性化がPI3K欠損マウスで認められるか否かを検討した。PLC- γ 2の活性化により生じるIP3とDGは、前者が細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こし、後者がRasGRPの活性化を介してRas/ERK経路の活性化を引き起こすことが知られている。PLC- γ 2の活性化の指標として両者を測定したところ、BCR刺激に伴う細胞内カルシウム濃度上昇ならびにERKの活性化は、ともに野生型マウス由来B細胞と比肩するレベルにまで誘導されることが明らかとなった(図、省略)。実際、PLC- γ 2の活性化の結果引き起こされると考えられているI κ B α のリン酸化(図、省略)とそれに引き続く分解(図1)は野生型と同程度に確認され、少なくともNF- κ Bの核移行

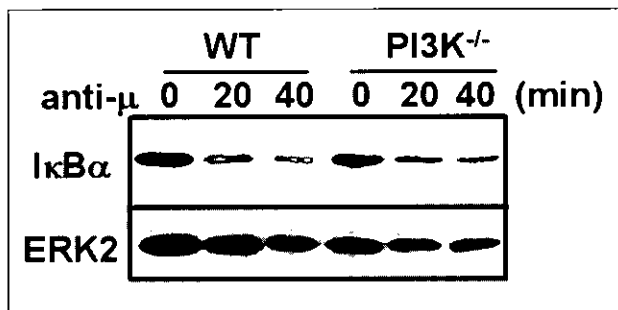


図1. 抗IgM抗体によるI κ B α の分解

脾臓より調製したB細胞を抗IgM抗体(anti- μ)で刺激後、各時間毎に細胞抽出液を調製しI κ B α の発現レベルをImmunoblot法により評価した。下段に抗ERK2抗体を用いたloading controlを示す。

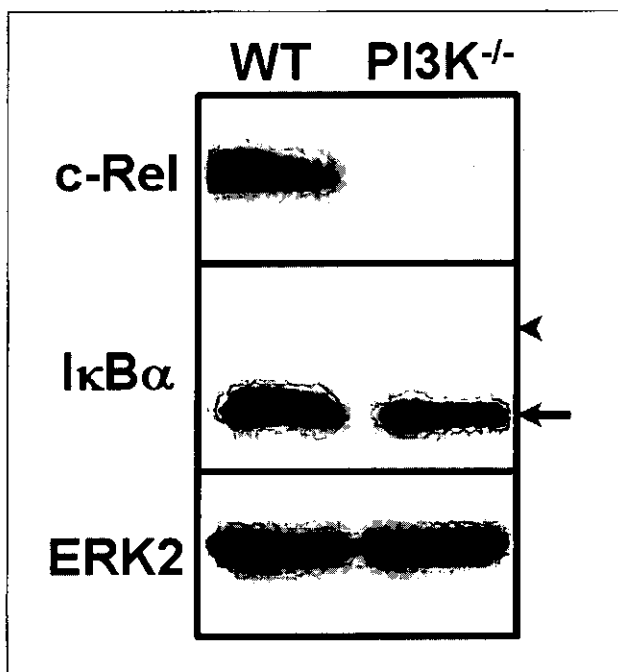


図2. c-Relの発現レベルの評価

脾臓より調製したB細胞から細胞抽出液を調製し、抗c-Rel抗体、抗I κ B α 抗体、ならびに抗ERK2抗体によりImmunoblotを行った。

に至るシグナル伝達経路には異常が認められないものと考えられた。

PI3K欠損マウス由来B細胞においてはAktの活性が著しく低下している¹⁾。Aktは転写調節因子のリン酸化を介して種々の遺伝子発現に関与していることが知られている。そこで我々は、PI3K欠損マウス由来B細胞において、NF- κ B経路に関与する種々の分子の発現レベルに変化が見られるか否かをImmunoblot法を用いて検討した。すると、末梢B細胞のNF- κ Bコンポーネントとして最も重要な役割を担うと考えられるc-Relの発現レベルが、PI3K欠損マウス由来B細胞において著しく低下していることが明らかとなった(図2上段)。一方、RelAの発現レベルに関しては野生型との明確な差は認められなかった(図、省略)。NF- κ Bによって遺伝子発現の調節を受けているI κ B α の発現レベルに差が認められない(図2中段)のは、このRelAによる発現調節を受けているためであろうと予測される。

以上の結果は、末梢B細胞においてはPI3K経路によってc-Relの発現レベルが制御されている可能性を示唆している。そこで、この仮説を検証するために、野生型マウス由来B細胞をPI3Kの阻害剤であるwortmanninならびにAktの阻害剤で処理した後にc-Relの発現レベルに変化が見られるか否かを検討した。脾臓から調製したB細胞に各種薬剤を加え、4時間培養した後に細胞抽出液を調製しc-Relの発現レベルをImmunoblotで調べたところ、PI3K/Akt経路を阻害することで

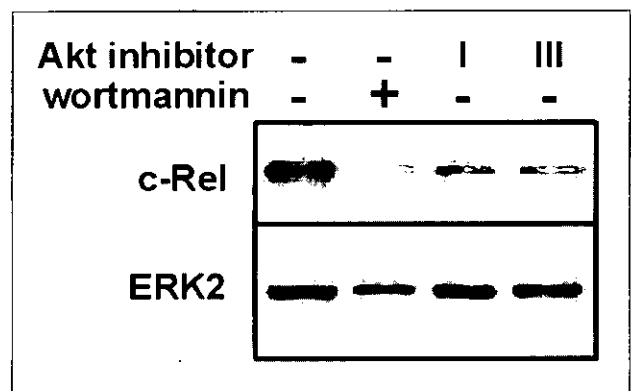


図3. PI3K/Akt経路阻害剤のc-Rel発現に与える影響

脾臓より調製したB細胞をwortmannin (100nM) もしくはAkt inhibitor I (10 μ M)、Akt inhibitor III (10 μ M) 共存下4時間培養した。細胞抽出液を調製した後、抗c-Rel抗体ならびに抗ERK2抗体によってImmunoblotを行った。

c-Relの発現レベルが低下することが明らかとなった(図3)。すなわち、末梢B細胞においてはPI3K/Akt経路がc-Relの発現レベルの維持に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。

興味深いことに、c-Rel欠損マウス由来B細胞においても、PI3K欠損マウス由来B細胞^{1,2)}と同様な、BCR刺激に伴うBcl-xLやCyclinD2の発現抑制が報告されている。我々の結果は、PI3K欠損マウス由来B細胞の示す表現型の少なくとも一部がc-Relの発現低下によって説明されうることを強く示唆するものである。今後は、PI3K欠損マウスの表現型がc-Relの過剰発現で正常化できるか否かを、レトロウイルスを用いて遺伝子導入した骨髄細胞による再構成系を用いて評価する予定である。

【参考文献】

- 1) Suzuki, H., Matsuda, S., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Ohteki, T., Asano, T., Behrens, T. W., Kouro, T., Takatsu, K., Kadowaki, T., and Koyasu, S. PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction. (2003) *Nat. Immunol.* 4 (3), 280-286.
- 2) Glassford, J., Soeiro, I., Skarell, S. M., Banerji, L., Holman, M., Klaus, G. G., Kadowaki, T., Koyasu, S., and Lam, E. W. BCR targets cyclin D2 via Btk and the p85 α subunit of PI3-K to induce cell cycle progression in primary mouse B cells. (2003) *Oncogene* 22 (15), 2248-2259.

Signaling defect in PI3K-deficient B cells

Satoshi Matsuda^{1,2} and Shigeo Koyasu^{1,2}

¹Department of Microbiology and Immunology, Keio University School of Medicine

²CREST, JSTA

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

μ H鎖の品質管理の破綻による免疫不全症ならびに自己免疫疾患の発症

鳥山 一 (東京医科歯科大学大学院感染分子制御学)
峯岸 克行 (東京医科歯科大学大学院感染分子制御学)

【研究要旨】

先天性無ガンマグロブリン血症は、頻度の高い液性免疫不全症の1つで、その患児は小児期より細菌感染症に反復罹患する。その原因としてこれまでに5種類の遺伝子が同定されているが、そのいずれもがプレB細胞レセプター (preBCR) に関連しており、このことは、preBCRがヒトのB細胞分化に必須なレセプターであることを示している。無ガンマグロブリン血症の原因遺伝子の1つに代替軽鎖の $\lambda 5$ がある。以前に我々は、ヒトの $\lambda 5$ 欠損症を報告したが、さらに本症患児骨髄プロB細胞の解析から、代替軽鎖・免疫グロブリン軽鎖のいずれとの会合も必要とせず、細胞表面に単独で発現する異常な μ H鎖が存在することを発見した。この異常 μ 鎖は、CDR3領域に多数の陽性荷電のアミノ酸を有するという構造上の特徴を有しており、正常骨髄プロB細胞に発現する μ H鎖の約10%を占めていた。しかし、プレB細胞以降の分化段階ではこのような異常な μ H鎖は見出されず、何らかのネガティブセレクションがプロB細胞からプレB細胞への分化段階で働いているものと考えられた。本研究ではこの異常な μ H鎖により誘導されるネガティブセレクションについて検討するためにそのトランスジェニックマウスを作成した。このマウスにおいては、末梢B細胞数は、顕著に減少しており、この結果は、 μ H鎖の品質管理の破綻によって免疫不全症が引き起こされる可能性を示唆するものである。

【はじめに】

1993年に伴性無グロブリン血症 (XLA: X-linked agammaglobulinemia) の責任遺伝子として細胞質内チロシンキナーゼをコードするBtkが同定されて以来、B細胞を欠損する原発性免疫不全症の責任遺伝子が次々と明らかにされてきた。これまでに同定された責任遺伝子は、Btk、 μ H鎖、 $\lambda 5$ 、Ig α 、BLNKであるが、興味深いことに、 μ H鎖、 $\lambda 5$ 、Ig α はpreBCR (pre B cell receptor) 自体を構成する分子であり、BtkとBLNKはpreBCRからのシグナル伝達を担う分子であり、いずれもがpreBCRに直接関与のあるものであった。ノックアウトマウスの解析ともあいまって、ヒトにおいてもマウスにおいてもpreBCRが骨髄におけるB細胞初期分化に極めて重要な役割を演じていることが明らかとなった。

PreBCRは μ H鎖、 $\lambda 5$ 、VpreB、Ig α /Ig β から構成されるBCR様のレセプター複合体で、B細胞分化の初期 (大型プレB細胞期) に一過性に細胞表面に発現する。これまでの研究により、プロB細胞の段階でH鎖遺伝子の機能的再構成に成功した細胞が μ H鎖を産生すると、代替L鎖と会合してpreBCRが形成される。これが増殖シグナルならびに分化誘導シグナルを伝達し、プロB細胞からプレB細胞への分化が起こることが判明している。我々は、PreBCRの構成要素である $\lambda 5$ がヒトにおいて欠損した場合、プロB細胞からプレB細胞への分化に重篤な障害を有する無グロブリン血症を呈することを明らかにした。さらに、 $\lambda 5$ 欠損症患児の骨髄細胞の検討により、免疫グロブリン軽鎖の非存在下に細胞表面に発現する特異な免疫グロブリン μ H鎖 (軽鎖非依存性 μ H鎖)

を発見した。この異常な μ H鎖は、正常骨髄プロB細胞に発現する μ H鎖の約10%を占めていたが、プレB細胞以降の分化段階では存在せず、プロB細胞からプレB細胞への移行段階でネガティブセレクションされているものと考えられた。この μ H鎖は、CDR3領域に多数の陽性荷電のアミノ酸を持つという特徴を有していた。これをIg α /Ig β と共にリンパ球に発現させると、リンパ球の活性化、アポトーシスを誘導することが明らかになった。このことは、B細胞の抗原特異的レセプターである免疫グロブリンH鎖分子にこれまでは知られていなかったquality controlのメカニズムが存在する事を示唆していた。そこで、本研究においては、この異常な μ H鎖により生成されるシグナルを詳細に検討するためにトランスジェニックマウスを作成し、その発現がB前駆細胞においてどのような転帰をもたらすかを検討した。

【対象と方法】

A. 軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するトランスジェニックマウスの作成

軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するB細胞の転帰を生理的な条件下で検討するために、この異常な μ H鎖を発現するトランスジェニックマウスを作成した。トランスジーン backbone は、Philip Leder の研究室で作成されたヒト免疫グロブリンの μ 鎖を発現するトランスジェニックマウスのものを用いた。Lederらのトランスジーンは、ヒトのVHプロモーターとE μ エンハンサーを有しており、その可変部領域を我々のクローニングした軽鎖非依存性 μ H鎖の可変部領域または正常の軽

鎖依存性 μ H鎖の可変部領域で置換した。この2つの可変部領域は、いずれもgermlineのVH3-23を有しており、CDR3の部分のみが異なっている。(図1)

B. マウスの免疫学的検討

トランスジェニックマウスならびにコントロールマウスより、骨髄細胞、脾臓細胞、腹腔細胞を常法に従い分離した。その細胞をB細胞に特異的な抗体、分化段階に特異的な抗体で染色して、flow cytometerにて解析した。使用した抗体、CD45R/B220 (RA3-6B2), anti-human μ (G20-127), CD43 (S7), CD117 (2B8), CD25 (7D4), CD2 (RM2.5), CD5 (L17F12)で、いずれもBD-Pharmingenより購入した。また、Goat anti-mouse μ は、Southern biotechnology Incより購入した。細胞周期の解析とDNA含量によるアポトーシス細胞の同定には、細胞表面をB220で染色後、70%エタノールで、細胞を固定、透過処理を行い、Propium Iodide (Sigma) で染色し、flow cytometerにて解析した。

【結果】

A. 軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するトランスジェニックマウスにおける末梢B細胞数の減少と細胞表面IgMの発現低下

トランスジーンを発現しないLitter mate (LM)、コントロールの軽鎖依存性 μ H鎖 (LC-dependent)、軽鎖非依存性 μ H鎖 (LC-independent) トランスジェニックマウスのB細胞分化について検討した。まずそれぞれのマウスにおいてそのマクロの病理所見を検討したところ、軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するトランスジェニックマウスにおいては、脾臓の大きさが著明に縮小していた。それを重量で定量的にあらわすと、生後6週において、Litter mate コントロールでは、 93 ± 9.1 mg (n=6)、コントロールの軽鎖依存性 μ H鎖発現マウスでは、 62 ± 8.4 mg (n=6)であったのに対して、軽鎖非依存性 μ H鎖では、 32 ± 3.9 mg (n=6)とコントロールトランスジェニックマウスと比較して重量が約半分減少していた。さらに、この

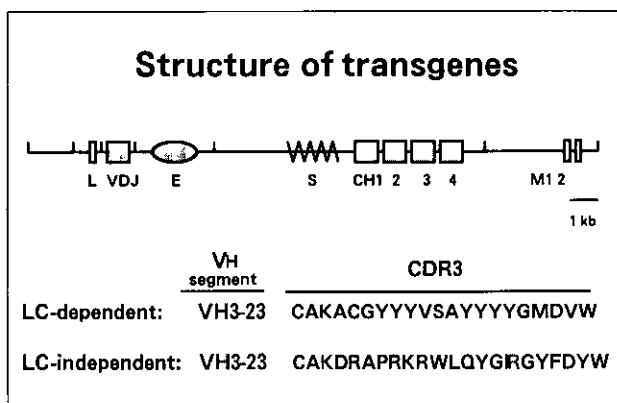


図1

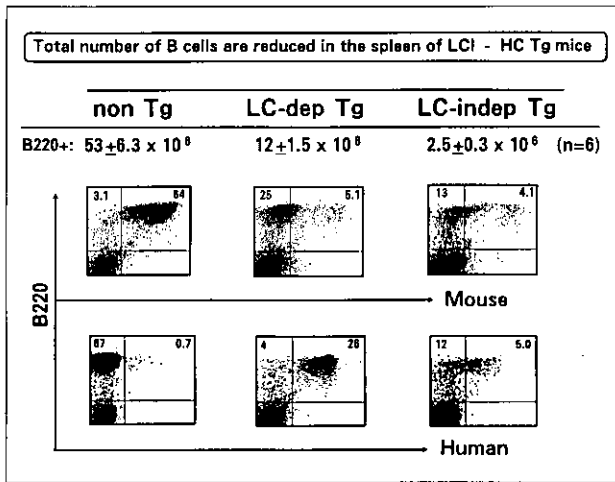


図 2

脾臓細胞のB220陽性のB細胞の絶対数を比較すると、Litter mate コントロールでは、 $53 \pm 6.3 \times 10^6$ (n=6)、軽鎖依存性 μ H鎖発現マウスでは、 $12 \pm 1.5 \times 10^6$ (n=6)であったのに対して、軽鎖非依存性 μ H鎖発現マウスでは、 $2.5 \pm 0.30 \times 10^6$ (n=6)とコントロールトランスジェニックマウスと比較して約5分の1に減少していた。(図2)。さらにトランスジーンヒトIgMの細胞表面発現強度をMFIで比較すると軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するマウスにおいては、コントロールトランスジェニックマウスの10分の1に減少していた。

この軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するトランスジェニックマウスにおける、B細胞数の減少の原因を調べるために、脾臓内B細胞のアポトーシスをDNAプロファイリングにより解析した。軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するマウスにおいて、コントロールの軽鎖依存性 μ H鎖を発現するマウスと比較して明らかなsubG0/G1分画のアポトーシス細胞の増加が認められ、このマウスにおけるB細胞数の減少にはアポトーシスが関与していることが考えられた。

脾臓内のB細胞分化においても、CD21陰性のT1細胞からCD21陽性のT2細胞への移行において細胞数の減少が顕著に認められ、T1細胞からT2細胞への移行期にアポトーシスが亢進している可能性が考えられた。以上まとめると、軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するトランスジェニックマウスにおいては、末梢におけるB細胞分化が障害さ

れており、B細胞アポトーシスの増加によりB細胞数の顕著な減少が認められた。

B. 軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するトランスジェニックマウスにおける骨髄B細胞分化

軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するマウスの骨髄中では、コントロールの軽鎖依存性 μ H鎖を発現するマウスと比較して、細胞表面にIgMを発現する未熟B細胞以降の分化段階のB細胞に減少が認められた。すなわちコントロールの軽鎖依存性 μ H鎖を発現するマウスでは、B220陽性ヒトIgM陽性のトランスジーン依存性にB細胞へと分化した細胞が認められるのに対して、軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するマウスにおいては、骨髄中のこの分画の顕著な減少が認められた。B細胞の早期分化に関しては、軽鎖依存性 μ H鎖、軽鎖非依存性 μ H鎖の両方のトランスジェニックマウスにおいてプロB細胞の減少が見られたが、これはこれまでの報告と同様、VDJ再構成を終了しているトランスジーン導入により、プロB細胞からプレB細胞への分化が促進している結果と考えられた。

C. 軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するトランスジェニックマウスにおける腹腔内B1細胞数の増加

これまでに作成された多くのトランスジェニックマウスのうち、自己反応性の免疫グロブリンをB細胞表面に発現するものや、B細胞レセプターのシグナルを増強するような遺伝子改変動物においては、腹腔内のB1細胞の増加が報告されている。そこで、軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するトランスジェニックマウスにおいても、B細胞レセプターが自発的に活性化されれば、B1細胞の増加が見られる可能性が考えられた。軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するトランスジェニックマウスにおいては、腹腔内B1細胞数がコントロールトランスジェニックマウスと比較して増加しており、軽鎖非依存性 μ H鎖の発現が、Jurkat細胞の活性化を誘導した細胞レベルでの検討と一致して、生理的発現においてもB細胞に活性化を誘導している可能性が示唆された。

【考 察】

われわれは、ヒトの $\lambda 5$ 欠損症の骨髄細胞より、免疫グロブリンL鎖との会合を必要とせずに、細胞表面に単独で発現できる異常な免疫グロブリンH鎖を見出した。この異常H鎖は、ヒト骨髄において、正常プロB細胞の約10%を占めているものの、プレB細胞以降の分化段階では存在せず、何らかのネガティブセレクションを受けているものと考えられた。さらに、この異常H鎖を発現するJurkat細胞は、自発的に活性化され、アポトーシスが誘導されたことから、本研究ではこの異常な μ H鎖を生理的条件化で発現するトランスジェニックマウスを作成しそのB細胞分化の検討を行った。その結果、軽鎖非依存性 μ H鎖の発現はマウスの正常B細胞分化をサポートできないばかりでなく、末梢B細胞数の減少を来すことが明らかになった。さらに、脾臓においてアポトーシスしているB細胞数の増加を認め、これらのことより、生理的条件下においても軽鎖非依存性 μ H鎖の発現は、B細胞にネガティブセレクションを誘導することが証明された。また、末梢に少数存在するB細胞表面のヒトIgMの発現量は、コントロールマウスと比較して、約10分の1に減少しており、このことは、レセプターのダウンレギュレーションによるB細胞トレランスが成立していることを示唆していた。これらの結果は、これまで報告された、どのトランスジェニックマウスモデルとも異なり、われわれのモデルにおいては、クローナルデリーションとレセプターダウンレギュレーションの2層に及ぶトレランスが成立している可能性が考えられた。さらには、このようなトレランスが存在するにもかかわらず、加齢によりこのマウスにおいては自己抗体の出現をみており、このマウスモデルは、自己免疫疾患モデルとしても有用である可能性が考えられた。

軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するトランスジェニックマウスにおいては、腹腔内のB1細胞数がコントロールトランスジェニックマウスと比較して絶対数で増加していた。このことは、これまでに報告された、自己反応性の免疫グロブリンを発現するトランスジェニックマウスや、B細胞レセプター

のシグナルを正に調節する遺伝子改変動物において、腹腔内のB1細胞の増加していることと同じ現象である。このことから、軽鎖非依存性 μ H鎖を発現するトランスジェニックマウスにおいても、この異常な μ H鎖を含むB細胞レセプターは、自発的に活性化される可能性が強く示唆された。

今回我々が作成した「ヒトのB細胞分化段階早期にのみ存在する異常な μ H鎖を発現するトランスジェニックマウス」においては、脾臓のB細胞数は著減しており、そこでのアポトーシスの増加も確認された。この結果は、 μ H鎖の品質管理の破綻によって免疫不全症が引き起こされる可能性を示唆するものである。さらにこのマウスにおいては、加齢とともに自己抗体の出現をみており、どのようなシグナルが、このB細胞トレランスを引き起こし、それが破綻していくかを検討していくことは、今後自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫難病の病態の理解を深め、新たな治療法を開発するうえで重要であると考えられる。

【参考文献】

- 1) Saijo, K., Schmedt, C., Su, I., Karasuyama, H., Lowell, C.A., Reth, M., Adachi, T., Patke, A., Santana, A. and Tarakhovskiy, A.: Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF- κ B activation during B cell development. *Nature Immunol.* 4: 274-279, 2003
- 2) Wang, Y-H., Stephan, R. P., Scheffold, A., Kunkel, D., Karasuyama, H., Radbruch, A. and Cooper M. D.: Differential surrogate light chain expression governs B cell differentiation. *Blood* 99: 2459-2467, 2002.
- 3) Stephan, R. P., Elgavish, E., Karasuyama, H., Kubagawa, H. and Cooper, M. D.: Analysis of VpreB expression during B lineage differentiation in $\lambda 5$ -deficient mice. *J Immunol.* 167: 3734-3739, 2001.
- 4) Minegishi, Y., Conley, M.E. Negative selection at the pre-BCR checkpoint elicited by human μ heavy chain with unusual CDR3

- regions. *Immunity*. 14, 631-641, 2001
- 5) Maki, K., Nagata, K., Kitamura, F., Takemori, T. and Karasuyama, H.: Immunoglobulin β signaling regulates locus accessibility for ordered Ig gene rearrangements. *J. Exp. Med.* 191: 1333-1340, 2000.
- 6) Nomura, K., Kanegane, H., Karasuyama, H., Tsukada, S., Agematsu, K., Murakami, G., Sakazume, S., Sako, M., Tanaka, R., Kuniya, Y., Komeno, T., Ishihara, S., Hayashi, K., Kishimoto, T. and Miyawaki, T.: Genetic defect in human X-linked agammaglobulinemia impedes a maturational evolution of pro-B cells into a later stage of pre-B cells in the B-cell differentiation pathway. *Blood* 96: 610-617, 2000.
- 7) Minegishi, Y., Rohrer, J., Coustan-Smith, E., Lederman, H.M., Pappu, R., Campana, D., Chan, A.C., Conley, M.E. An essential role for BLNK in human B cell development. *Science*, 286, 1954-1957, 1999

Immunodeficiency and autoimmunity might result from the defect in quality check of μ H chain in B cell development

Hajime Karasuyama and Yoshiyuki Minegishi

Dept. of Immune Regulation, Tokyo Medical and Dental Univ.

We recently identified light chain (LC)-independent μ heavy chain (HC), which can be exported from endoplasmic reticulum to cell surface even in the absence of conventional or surrogate immunoglobulin light chain. Approximately 10% of μ HC transcripts in normal human pro-B cells encoded LC-independent μ HC proteins. The transcripts of these proteins were not identified in pre-B cells or later stages of B cell development, indicating the negative selection of the LC-independent μ HC at the transition. By expressing LC-independent μ HC with Ig α and Ig β , Jurkat cells showed spontaneous activation and apoptosis. These results suggested the presence of previously-unidentified quality control mechanism of μ HC at the pro-B cell to pre-B cell differentiation.

To evaluate the functional consequences of the expression of LC-independent μ HC in more physiological context, we established transgenic (Tg) mice expressing human LC-independent μ HC under the control of VH promoter and E μ enhancer. The mice were compared with control transgenic mice expressing human LC-dependent μ HC. Tg mice expressing LC-independent μ HC had only 20% B220⁺ cells in the spleen compared to the control Tg mice, and the B220⁺ cells expressed 10 times less human IgM on the cell surface. The number of B220⁺ apoptotic cells was increased in the spleen of LC-independent μ HC Tg mice. LC-independent μ HC Tg mice had more B-1 cells in peritoneal cavity, which was similar to Tg mice expressing self-reactive immunoglobulins. These results demonstrated that LC-independent μ HC can spontaneously induce B cell activation and apoptosis in physiological context. Further, these results suggested that dysregulation of quality check of μ H chain in early B cell development might be associated with the occurrence of immunodeficiency and autoimmunity.

プロテオーム解析によるリンパ球異常の原因探索の試みに関する研究

河野 雅之 (千葉大学大学院医学研究院・遺伝子制御学、理化学研究所・免疫アレルギーセンター)

斉藤 隆 (千葉大学大学院医学研究院・遺伝子制御学、理化学研究所・免疫アレルギーセンター)

木村 弥生 (かずさDNA研究所・ヒト遺伝子研究部、理化学研究所・免疫アレルギーセンター)

小原 収 (かずさDNA研究所・ヒト遺伝子研究部、理化学研究所・免疫アレルギーセンター)

宮脇 利男 (富山医科薬科大学・小児科学)

【研究要旨】

未知の先天性免疫不全症の原因遺伝子の解明のために、患者リンパ球のプロテオーム解析を用いて欠損蛋白の同定を試みた。単一遺伝子欠損マウスを用いた系では、欠損蛋白の同定が可能であった。患者リンパ球では、発現亢進している蛋白が多かったが、欠失・減少している分子もあり、プロカスペースが候補となった。細胞培養前では発現に変化は無いが、活性化して培養するとプロカスペースが減少し、細胞死に感受性が高いことが判明した。これらから、アポトーシス関連分子に異常があると考えられると共に、プロテオーム解析の有効性も示せた。

【研究目的】

T細胞の反応およびT細胞受容体の発現に異常があるために免疫不全症になっていると考えられる症例の原因遺伝子を同定しようと、これまでT細胞受容体に関与すると推察される数種の遺伝子の配列を調べるとともに、一方では細胞株を樹立して、積極的にcDNAライブラリーを導入することによる発現クローニングを試みてきたが、種々の困難な点によって成功に至っていない。こうした中で昨年度、原因遺伝子そのものでなくても関与する分子の「一端でも掴む」ことを目的に、プロテオーム解析が有効かどうか、を検討することにした。プロテオーム解析の長所はDNA/RNA発現では差がなくても機能的に変異のある蛋白およびそのdownstreamの蛋白の変化を同定できる点である。実際、多くの点変異に基づく免疫不全症では、mRNAレベルは正常に検出できるがタ

ンパク質がない例が多い。昨年度の解析で、細胞骨格分子モエシンの欠損マウスを用いてプロテオーム解析(2次元電気泳動+マスマスペクトロメーター解析)を行った結果、少なくともモエシンの場合には、末梢血由来のサンプルでも確かに単一遺伝子欠損もプロテオーム解析で検出できることが判明した。また、ヒト末梢血でも解像力よく多くのタンパク質が再現性をもって検出可能であることが判明し、細胞ライセート作成の条件も決定できた。そこで、患者由来末梢血リンパ球と正常人とのプロテオーム解析を行った。

【研究方法】

富山医科薬科大学により採取された患者末梢血からリンパ球を単離し、そのままの細胞、または、抗CD3+CD28抗体で刺激し、IL-2存在化で数日培養して増加させた細胞を、解析に用いた。1%