

NP40溶液で溶解し、IEF sample bufferを加え、可溶成分と不溶成分に分けて調整し、IEF/SDS-PAGEの2次元ゲルで展開して解析した。可視化にはCyber greenで、蛋白同定にはCoomasie BBを使って染色し、MALDI-TOFを用いて同定した。

#### （倫理面への配慮）

患者サンプルのプロテオーム解析に関しては、既に千葉大学・富山医科薬科大学・理化学研究所・かずさDNA研究所における倫理委員会の承認を得ており、患者さんの承諾をとっているサンプルの解析を進めている。

#### 【研究結果】

すでに行ったヒト末梢血リンパ球由来の細胞ライセートの解析では、1000以上の蛋白質スポットが検出され、独立して調整したサンプルとほぼ完全に一致した。これから患者サンプルを比較できる基礎条件が設定されたと思われる。

3度にわたって、患者および正常人由来の末梢血リンパ球サンプルの2次元電気泳動解析を行い、共通して変化があり、両者において発現に差のある分子の検出を行った。その結果、多くの差のある蛋白では、患者由来T細胞が高発現していた。これらには、一方では、MX蛋白など感染などに伴って発現するものが増加しており患者の生体で感染やそれに対する免疫・代謝反応が起こっているものと考えられ、他方Rhoファミリーなどの細胞骨格系関連分子も増加していることが判明した。一方、患者リンパ球で発現が低くなっているものは少なかったが、数個の分子を見出した。そのうちアデノシンデアミナーゼ（ADA）は顕著に減少し、プロカスペース3は検出できなかった。これらの蛋白の発現を直接細胞ライセートを用いてウェスタンブロットにて解析した結果、ADAでは大きな変化は見出せなかった。カスペース3は、患者サンプルでは、分解された活性化型が見られるものの、プロカスペース3は検出されないほどであった。同様にその上流のカスペースであるカスペース8についても同様であることが解った。

このサンプルはIL-2存在かで数日培養したものであるので、培養によって変化している可能性も考えられたので、培養しない直接の細胞を解析した。その結果、直接作成した細胞ライセート中では変化の無いことが判明した。そこで、抗CD3+CD28抗体で刺激してIL-2存在下で培養することによってカスペースの分解が促進されるかを検討した。実際、患者リンパ球では、培養に伴ってプロカスペース3が減少してゆくことが観察された。

#### 【考 察】

原因不明の免疫不全症における原因遺伝子の探索は、関係する機能からの類推による検索以外は、家系に基づく歴史的にはポジショナルクローニングしかなかった。今回のケースもTCR複合体の発現・機能に関与するので関連分子の解析を進めてきたが、変異のある分子は見つからなかった。患者由来のT細胞株を樹立して発現クローニングを試みたが、成功までには相当な困難があり、至らなかった。そこで、とにかく何らかの関連分子でも掴む目的で、特異的方法から一步戻りプロテオーム解析でどこまでアプローチできるかを試した。TOF-MASSの使用によって、2次元電気泳動のゲルからの蛋白を直接同定できるので、単一遺伝子欠損と考えられるケースに応用できるかは大変重要な試みと考えられる。最初の試みとして昨年行ったモエシン欠損マウス由来の脾臓細胞では、欠損の同定に成功した。今回、患者末梢血由来リンパ球を用いて解析し、正常人に比べて欠損・著減している分子を検索した。驚いたことに、患者サンプルに多く発現している蛋白が多かった。この患者さんは感染症を繰り返し、さらに幾つかの組織では細胞浸潤も伴うような状態にあり、T細胞機能不全にともなう免疫不全ではあるものの活性化のような状況もあり、むしろ種々蛋白が高発現していると思われる。これもプロテオームアプローチの難しさと思われる。ここでの解析はあくまでも患者側で欠損・減少している分子の同定であるので、検出できないものを探し、現状ではカスペースに違いがあることを見出した。しかも驚いたことに、培養しない直接のリンパ球では、

特に正常人と発現が変わらないことが解ったことから、カスペースの遺伝子異常ではないと思われる。実際、カスペース変異ではリンパ球異常増殖を伴うALPSになることが知られている。活性化してIL-2存在下で培養すると、またカスペースの減少が見られ、細胞が死にやすくなるので、何らかのアポトーシスに感受性が高くなっていることが考えられる。一つの可能性は、アポトーシスを誘導するDISC（細胞死誘導シグナル複合体）の

中にある制御分子などの変異・異常である。これらの可能性を明らかにするための、カスペースとしての酵素活性、アポトーシスの解析、およびDISCの解析を引き続き行う予定である。

また、このプロテオーム解析が広く遺伝子欠損や異常にともなう免疫不全症に応用できるかどうか、を解析するために、XLA患者由来の細胞株をもちいたBtkの検出、などの可能性と検出限界を決めて、今後の応用の可能性を考えてゆきたい。

# 高IgE症候群患者の遺伝子発現の特徴 ～マイクロアレイを用いた解析

田 中 珠 美 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)  
高 田 英 俊 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)  
野 村 明 彦 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)  
大 賀 正 一 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)  
原 寿 郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)

## 【研究要旨】

高IgE症候群 (HIE) 患者末梢血単核球 (PBMC) から単球を純化し、マイクロアレイ法による解析を行い、新たな知見を得たので報告する。健常成人やアトピー性皮膚炎 (AD) 患者と比較して、HIE患者単球において2倍以上の高発現を示した遺伝子が39あり、そのうち8遺伝子は統計学的有意差があった。逆に健常成人やAD患者と比較してHIE患者で発現が2倍以上低かった遺伝子は9認められたが統計学的有意差はなかった。そのなかの遺伝子を定量的PCR法で解析した結果、A遺伝子は健常成人に比べHIEで有意に高発現であり、B遺伝子はNormalに比べHIEで有意に低発現であった。A遺伝子/B遺伝子比はAD、健常成人に比べ、HIEでは有意に高かった ( $p=0.004$ )。HIEではTh1機能とは直接関連しない分子の発現にも異常が認められることが明らかとなり、またA遺伝子/B遺伝子比は、HIEの新たな診断法として有用であると考えられた。

## 【背景】

高IgE症候群 (HIE) は易感染性、湿疹、高IgE血症を三徴候とする原発性免疫不全症であり、特に黄色ブドウ球菌に対し易感染性を示すが免疫異常の病態は不明である。また、常染色体優性遺伝形式をとり、遺伝子座が4q21であるとの報告 [1] もあるが、これまで原因遺伝子の特定には至っていない。また、HIEと重症のアトピー性皮膚炎 (AD) を鑑別診断することは時に困難である。そこで、HIEにおける免疫異常の評価および疾患特異的分子の同定を目的に、HIE患者の末梢血CD14陽性細胞 (単球) の遺伝子発現についてマイクロアレイを用いた解析を試みた。マイクロアレイの結果より抽出した遺伝子の末梢血単核球 (PBMC) での発現をTaqMan定量PCR法で解析し、臨床応用の可能性を探った。

## 【対象と方法】

### 1. 対象

マイクロアレイに関しては、HIE 2例、AD 1例、健常成人 2例についておこなった。また、定量PCRについては、HIE 5例、AD 2例、健常成人 8例を用い、遺伝子の定量、およびシーケンスについては、HIE 9例、Normal 18例についておこなった。

### 2. マイクロアレイ

Sampleとして、HIE、AD、健常成人それぞれのPBMCを分離後、CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いてCD14陽性細胞を分離、RNAを抽出し、AminoAllyl Message Amp aRNA kit (Ambion) を用いてRNAをリニア増幅した。また、Controlとして、健常成人5人分のPBMCを分離しRNAを抽出、等量ずつ混合し、Control mix RNAを作成し、Sampleと同

様にリニア増幅した。SampleをCy3にControlをCy5に標識し、3万個の遺伝子を搭載しているオリゴチップであるAceGene Human Oligo 30K (日立ソフト) にHybridizeした。FLA-8000 (Fuji) を用いてスキャンし、Array Vision (Amersham Pharmacia) にて数値化、Gene Spring (Silicon Genetics) を用いて、各Sample間の比較解析を行った。

### 3. 定量PCR

それぞれPBMNCを分離し、RNAを抽出、First-strand cDNA synthesis kit (Amersham Pharmacia) にてcDNA合成をし、TaqMan定量PCR法でmRNAの定量をおこなった。内在性コントロールには $\beta$ -actinを使用した。

### 4. B遺伝子の欠損の有無の確認

PrimerおよびTaqManProbeをB遺伝子のgenomeのみにかかるように設定し、B遺伝子のgenomeをTaqMan定量PCR法にてgenomeを定量した。21q22.3に位置するS100 $\beta$ 遺伝子のgenomeの定量をおこない、B遺伝子との比をとることにより、遺伝子の欠損を判定した(理論上、欠損がなければ数値は1に近付き、heteroで欠損があれば数値は0.5に近付き、homoの欠損であれば0に近付き[2])。

B遺伝子の各Exonの外側にPrimerを設定し、genomeからSequenceをおこなった。

## 【結果】

### 1. マイクロアレイ

HIE 2例の平均が健常成人2例とAD1例の計3例の平均より2倍以上高い発現を示した遺伝子は39認められ、うち8遺伝子はウェルチのt検定によりp値が0.05以下と有意であった。また、HIE 2例の平均が健常成人とADの平均より2倍以上低い発現を示した遺伝子は9つ認められたが、ウェルチのt検定では有意なものはない(表1)。

### 2. 定量PCR

マイクロアレイで得た結果より、HIEで高発現

A		B																																																																																																																																												
HIE 2例の平均がNormal 2例AD1例の平均より2倍以上高い遺伝子(9遺伝子)		HIE 2例の平均がNormal 2例AD1例の平均より2倍以上低い遺伝子(9遺伝子)																																																																																																																																												
A遺伝子	<table border="1"> <tr><td>Gene</td><td>Ratio</td><td>Sign.</td><td>p value</td></tr> <tr><td>HMO2</td><td>1.78</td><td>up</td><td>0.15</td></tr> <tr><td>HMO1</td><td>3.10</td><td>up</td><td>0.02</td></tr> <tr><td>HMO3</td><td>1.68</td><td>up</td><td>0.03</td></tr> <tr><td>HMO4</td><td>2.82</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> </table>	Gene	Ratio	Sign.	p value	HMO2	1.78	up	0.15	HMO1	3.10	up	0.02	HMO3	1.68	up	0.03	HMO4	2.82	up	0.01	B遺伝子	<table border="1"> <tr><td>Gene</td><td>Ratio</td><td>Sign.</td><td>p value</td></tr> <tr><td>S100B</td><td>2.85</td><td>down</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>S100A2</td><td>2.56</td><td>up</td><td>0.1</td></tr> <tr><td>S100A3</td><td>2.26</td><td>up</td><td>0.03</td></tr> <tr><td>S100A1</td><td>2.02</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>S100A6</td><td>2.11</td><td>down</td><td>0.02</td></tr> <tr><td>S100A4</td><td>2.10</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>S100A7</td><td>2.09</td><td>up</td><td>0.02</td></tr> <tr><td>S100A8</td><td>2.04</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>S100A9</td><td>2.01</td><td>down</td><td>0.02</td></tr> </table>	Gene	Ratio	Sign.	p value	S100B	2.85	down	0.01	S100A2	2.56	up	0.1	S100A3	2.26	up	0.03	S100A1	2.02	up	0.01	S100A6	2.11	down	0.02	S100A4	2.10	up	0.01	S100A7	2.09	up	0.02	S100A8	2.04	up	0.01	S100A9	2.01	down	0.02																																																																															
Gene	Ratio	Sign.	p value																																																																																																																																											
HMO2	1.78	up	0.15																																																																																																																																											
HMO1	3.10	up	0.02																																																																																																																																											
HMO3	1.68	up	0.03																																																																																																																																											
HMO4	2.82	up	0.01																																																																																																																																											
Gene	Ratio	Sign.	p value																																																																																																																																											
S100B	2.85	down	0.01																																																																																																																																											
S100A2	2.56	up	0.1																																																																																																																																											
S100A3	2.26	up	0.03																																																																																																																																											
S100A1	2.02	up	0.01																																																																																																																																											
S100A6	2.11	down	0.02																																																																																																																																											
S100A4	2.10	up	0.01																																																																																																																																											
S100A7	2.09	up	0.02																																																																																																																																											
S100A8	2.04	up	0.01																																																																																																																																											
S100A9	2.01	down	0.02																																																																																																																																											
C遺伝子	<table border="1"> <tr><td>Gene</td><td>Ratio</td><td>Sign.</td><td>p value</td></tr> <tr><td>HMO6</td><td>2.81</td><td>up</td><td>0.13</td></tr> <tr><td>HMO7</td><td>2.65</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO8</td><td>2.17</td><td>up</td><td>0.03</td></tr> <tr><td>HMO9</td><td>2.55</td><td>up</td><td>0.02</td></tr> <tr><td>HMO10</td><td>2.18</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO11</td><td>2.29</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO12</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO13</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO14</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO15</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO16</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO17</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO18</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO19</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO20</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO21</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO22</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO23</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO24</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO25</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO26</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO27</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO28</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO29</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO30</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO31</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO32</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO33</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO34</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO35</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO36</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO37</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO38</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>HMO39</td><td>2.28</td><td>up</td><td>0.01</td></tr> </table>	Gene	Ratio	Sign.	p value	HMO6	2.81	up	0.13	HMO7	2.65	up	0.01	HMO8	2.17	up	0.03	HMO9	2.55	up	0.02	HMO10	2.18	up	0.01	HMO11	2.29	up	0.01	HMO12	2.28	up	0.01	HMO13	2.28	up	0.01	HMO14	2.28	up	0.01	HMO15	2.28	up	0.01	HMO16	2.28	up	0.01	HMO17	2.28	up	0.01	HMO18	2.28	up	0.01	HMO19	2.28	up	0.01	HMO20	2.28	up	0.01	HMO21	2.28	up	0.01	HMO22	2.28	up	0.01	HMO23	2.28	up	0.01	HMO24	2.28	up	0.01	HMO25	2.28	up	0.01	HMO26	2.28	up	0.01	HMO27	2.28	up	0.01	HMO28	2.28	up	0.01	HMO29	2.28	up	0.01	HMO30	2.28	up	0.01	HMO31	2.28	up	0.01	HMO32	2.28	up	0.01	HMO33	2.28	up	0.01	HMO34	2.28	up	0.01	HMO35	2.28	up	0.01	HMO36	2.28	up	0.01	HMO37	2.28	up	0.01	HMO38	2.28	up	0.01	HMO39	2.28	up	0.01	
Gene	Ratio	Sign.	p value																																																																																																																																											
HMO6	2.81	up	0.13																																																																																																																																											
HMO7	2.65	up	0.01																																																																																																																																											
HMO8	2.17	up	0.03																																																																																																																																											
HMO9	2.55	up	0.02																																																																																																																																											
HMO10	2.18	up	0.01																																																																																																																																											
HMO11	2.29	up	0.01																																																																																																																																											
HMO12	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO13	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO14	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO15	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO16	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO17	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO18	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO19	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO20	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO21	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO22	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO23	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO24	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO25	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO26	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO27	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO28	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO29	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO30	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO31	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO32	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO33	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO34	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO35	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO36	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO37	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO38	2.28	up	0.01																																																																																																																																											
HMO39	2.28	up	0.01																																																																																																																																											

表1. マイクロアレイの結果  
AはHIEで高発現を示す遺伝子、BはHIEで低発現を示す遺伝子

であったA遺伝子、C遺伝子、またHIEで低発現であったB遺伝子についてPBMNCのmRNAの定量をおこなった。A遺伝子に関しては、マンホイットニーの検定でHIEが健常成人に比べて有意(p=0.015)に高値であるということが認められた。C遺伝子に関しては、有意差は認められなかった。B遺伝子に関してはHIEが健常成人に比べて有意(p=0.028)に低値であるということが認められた。また、A遺伝子/B遺伝子の比の値はHIEは健常成人(p=0.004)およびAD(p=0.015)に有意差をもって高値になることが認められた(図1)。

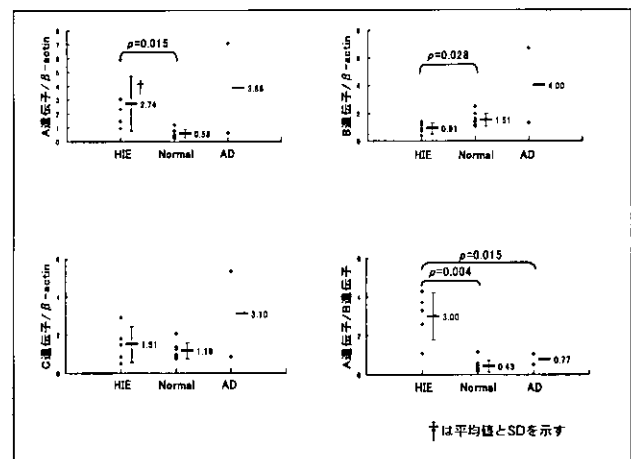


図1. 各遺伝子の定量PCR解析

### 3. B遺伝子の欠損の有無の確認

B遺伝子が4q21に位置しており、HIEで低発現であることから、欠損や変異を疑い、ゲノムの定量およびシーケンスをおこなった。ゲノムの定量的結果は、健常成人、HIEともに1に近い値を示しており、B遺伝子の全長の欠損の可能性は低いと考えられた(図2)。シーケンスでは

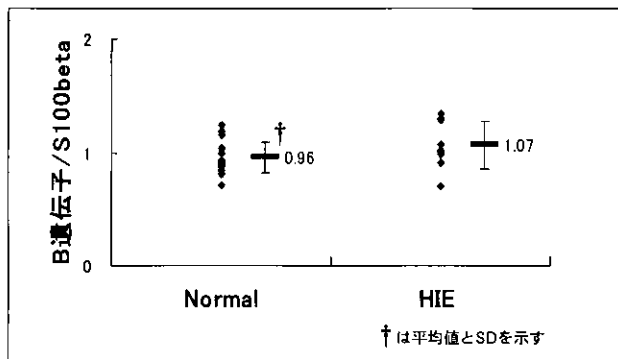


図2. B遺伝子のゲノムの定量

HIE 1例のみで翻訳領域にアミノ酸置換のある変異がheteroで見つかったが、その他のHIE、健常成人の検体では変異は認められなかった。

### 【考察】

高IgE症候群は易感染性、湿疹、高IgE血症を三徴候とする原発性の免疫不全症であり、常染色体優性遺伝形式をとり、遺伝子座が4q21であるとの報告もある[1]が、これまで原因遺伝子の特定には至っていない。また、高IgE症候群と重症のADを鑑別診断することは時に困難である。今回、マイクロアレイでのCD14陽性細胞の解析にて、高IgE症候群に特異的な遺伝子発現を示すものを検討した。その結果をもとに、A遺伝子、B遺伝子については、定量PCRにおいて、PBMNCでの発現が、健常成人とは有意に異なるということが判明したが、ADとの鑑別は難しいと思われた。しかし、A遺伝子/B遺伝子の発現比は高IgE症候群と健常成人のみならず、ADとも有

意に異なり、この値は高IgE症候群の迅速診断に有用であると考えられた。

B遺伝子に関しては、過去に報告がある4q21上に位置していることから[1]、欠損や変異を疑い、検索を試みた。ゲノムの定量では、欠損を示唆するものは得られず、全長欠損の可能性は低いと思われる。シーケンスではHIE 1例のみにアミノ酸置換のある変異がheteroで見つかった。しかし、この遺伝子近傍の公開されている情報が乏しく、SNPである可能性も否定できない。今後、母数を増やしての検索が必要である。

HIEではTh1機能とは直接関連しない分子の発現にも異常が認められることが明らかとなり、またA遺伝子/B遺伝子比は、HIEの新たな診断法として有用であると考えられた。A遺伝子/B遺伝子の値がなぜ疾患を分けているのかの原因は不明であり、今後、これらの遺伝子発現を制御する分子機構を検討することによりこの疾患の病態解明がさらに進むものと考えられる。

### 【参考文献】

- 1) Grimbacher B, Schaffer A, et al. Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4. *Am. J. Hum. Genet.* 1999;65: 735-744.
- 2) Kariyazono H, Ohno T, et al. Rapid detection of the 22q11.2 deletion with quantitative real-time PCR. *Mol Cell Probes.* 2001; 15(2):71-3.

## 成人の低 $\gamma$ グロブリン血症における遺伝子解析

二 谷 武 (富山医科薬科大学小児科)  
金 兼 弘 和 (富山医科薬科大学小児科)  
種 市 尋 宙 (富山医科薬科大学小児科)  
吉 田 文 俊 (富山医科薬科大学小児科)  
宮 脇 利 男 (富山医科薬科大学小児科)  
金 子 英 雄 (岐阜大学小児科)  
近 藤 直 実 (岐阜大学小児科)

### 【研究要旨】

X連鎖無 $\gamma$ グロブリン症を代表とする低 $\gamma$ グロブリンを示す先天性免疫不全症は繰り返す細菌感染症を契機に小児期に診断されることが多い。しかし、中には小児期に明らかな感染のエピソードを示さず成人期になって易感染性が出現する例や、検査にて偶然低 $\gamma$ グロブリンが発見される成人例も見受けられる。また、小児期に発症しながら確定診断がつかず、成人期にキャリアオーバーする例も存在する。近年の原発性免疫不全症の責任遺伝子の解明により低 $\gamma$ グロブリン血症をきたす多くの原因遺伝子が明らかとなり、それに伴い成人期発症・発見の非典型例が知られるようになった。今回、成人の低 $\gamma$ グロブリン血症で遺伝子解析の未実施例・未診断例について遺伝子検索を含む検討を行い、成人における低 $\gamma$ グロブリン血症例中における既知の遺伝子変異による免疫不全症の存在の有無について検討した。臨床免疫学会員のうち1424名を対象に成人低 $\gamma$ グロブリン血症の有無を調査し、63施設で成人低 $\gamma$ グロブリン血症ありとの回答を得た。うち、インフォームドコンセントの得られた23例に対して血液採取を行い、それぞれの臨床症状や検査所見から想定し得る原因遺伝子の解析を試みた。その結果、XLA 2例、XHIM 1例、XLP 1例、IgG1欠損症 1例の合計5例、全体の22%において原因が確定された。今回の調査により、成人低 $\gamma$ グロブリン血症の症例の中には既知の遺伝子異常を持ちながら診断されずに観察されている症例が比較的多く存在することが明らかとなった。原因遺伝子を明らかにし、確定診断を行うことは、より正確な遺伝子カウンセリングや治療方針を決定する上で重要であり、さらに症例を集め検討する必要があると考えられる。

### 【はじめに】

低 $\gamma$ グロブリン血症を示す疾患としてX連鎖無 $\gamma$ グロブリン血症、常染色体劣性無 $\gamma$ グロブリン血症 (Ig $\alpha$ , Ig $\beta$ , BLNK,  $\mu$  heavy 鎖)、高IgM症候群、分類不能型免疫不全症などがある。CVIDの一部を除いては通常小児期に繰り返す細菌性の上下気道炎にて発見されることが多い。しかし、一部の症例においては繰り返す感染症状があっても重症化にいたらず、外来治療にて成人期

に至っている例や、小児期には明らかな易感染性はなく成人期になって突然発症する例、また明らかな感染のエピソードを持ちながら確定診断には至らず成人期にキャリアオーバーしている症例も少なからず存在するものと思われる。以前に我々が行ったB細胞減少を伴うCVID男性例23例の調査ではX連鎖無 $\gamma$ グロブリン血症が7例に認められており、かなりの症例で正確な遺伝子診断がなされていない現状があるものと考えられた。その

現状を明らかにするため、今回われわれは未だ遺伝子診断の試みられていない成人低 $\gamma$ グロブリン血症の症例に対し、その臨床経過や検査成績より原因として考えられ得る遺伝子についての解析を行った。

### 【対象と方法】

全国における成人低 $\gamma$ グロブリン血症の調査。

臨床免疫学会員を対象として成人低 $\gamma$ グロブリン血症で治療または経過観察されている症例の有無と、症例有りの場合に遺伝子解析を希望と採血の可能性の可否につき、ハガキによるアンケートを行った。症例ありと回答を得た例のうち、遺伝子解析の希望があり、また血液採取可能例に対して、富山医科薬科大学倫理委員会にて承認された、低 $\gamma$ グロブリン血症の遺伝子解析研究に関する同意書を送付し書面によるインフォームドコンセントを得た上で検体の採取を行った。

### 【検体解析】

送付されたヘパリン加血液から比重遠心法により単核球を分離し、表面マーカー解析、蛋白発現解析、cDNA分離に用いた。また、同時に得られたbuffy coatから白血球を分離し、常法によりgenomic DNAを分離した。

B細胞数が<1%の症例は性別にかかわらず単球におけるBtk発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。発現低下例ではBtkの遺伝子検索を行った。男性例ではBtk発現の有無にかかわらず、cDNAを用いてBtk全コーディング領域の解析を行った。Btk正常女性例や一部のBtk遺伝子変異のない男性例ではCD79 $\alpha$ 、 $\lambda$ 5 遺伝子をSSCPによりスクリーニングした。B細胞数正常の低 $\gamma$ グロブリン血症ではPMA、Ionomycinによる刺激後のCD40 ligandの発現やリンパ球内SAP発現、B細胞CD40発現、 $\kappa$ 軽鎖、 $\lambda$ 軽鎖の発現等の解析を行った。

### 【結果】

アンケート回収率

1440の医師に対しアンケートを送付し、770通

(55%) から回答が得られた。うち、成人の低 $\gamma$ グロブリン血症の症例を持つとの回答があったものは63施設で、うち、48施設において遺伝子解析の希望があった。48施設に対し、文章による同意書を送付し、うち、23施設から同意書並びに血液検体が得られた。

### 低 $\gamma$ グロブリン血症の内訳 (表1)

低 $\gamma$ グロブリン血症にて採血を行った症例の一覧を表1に示す。診断名はCVID (Good症候群を含む) が16例、XLA1例、選択的IgG欠損2例、IgM欠損1例、IgA欠損1例、IgM/IgA欠損1例、高IgM症候群1例であった。23例中11例はB細胞の減少 (<1%) を伴う低 $\gamma$ グロブリン血症であり、うち6例が男性例、5例が女性例であった。

症例	性別	診断名	診断年齢	IgG	IgA	IgM	B細胞数
1	M	IgA 欠損 SLE	36	635	6	105	0.1%
2	F	CVID	35	313	45	50	5.8%
3	F	CVID	76	146	55	38	5.1%
4	M	CVID	57	28	2	13	0.6%
5	F	Good Synd	67	388	33	2	0.3%
6	M	CVID	38	462	108	253	10%
7	M	Good Synd	67	588	100	9	0.7%
8	M	XLA	3	478	<23	<17	0.8%
9	F	CVID	53	697	173	219	17.9%
10	F	CVID	29	41	187	121	20.5%
11	F	CVID	36	196	<10	<10	1.0%
12	M	CVID	30	534	161	60	5.4%
13	F	CVID	32	275	1	1	0.5%
14	M	IgA/M 欠損	41	1034	44	21	13%
15	F	IgM 欠損	35	1537	363	32	7%
16	F	CVID	25	235	<1	2	3%
17	F	CVID	20	596	224	144	0.1%
18	F	CVID	54	98	<23	<18	0.1%
19	M	CVID(Good)	41	397	34	5	0.2%
20	M	選択的 IgG 欠損	9	123	400	927	8.9%
21	F	高 IgM	15	122	<20	165	19%
22	M	CVID	16	66	4	44	0.04%
23	M	選択的 IgG1 欠損	31	524	310	246	15.0%

表1

### 遺伝子解析結果

解析23症例中5例(23%)に原因遺伝子の変異が検出された。残り18例では、今回の検討では原因遺伝子が確定できなかった。確定できた5例の内訳はXLAが症例1、症例22の男性例の2例、XHIMが症例20の男性例で1例、XLPが症例8の男性例で1例、IgG定常領域での変異が症例23の男性例で1例であった(表2)。以下にこれら5例の詳細を示す。

症例	性別	解析前診断	遺伝子解析結果
1	M	IgA 欠損 SLE	XLA
8	M	XLA	XLP
20	M	選択的 IgG 欠損	XHIM
22	M	CVID	XLA
23	M	選択的 IgG1 欠損	選択的 IgG1 欠損

表 2

【症 例】

症例 1 は40歳の男性例で生来健康、家族に易感染性を示す者はない。35歳時に慢性副鼻腔炎を発症。副鼻腔炎に対する手術の際に低γグロブリン血症が発見された。尿潜血陽性、尿蛋白陽、抗核抗体陽性であり、腎生検にてループス腎炎と診断された。38歳時に肺炎から敗血症を併発。初診時 IgG 635mg/dl, IgA 6mg/dl, IgM 105mg/dl であったが、IgG 223mg/dl、IgA <5mg/dl、IgM 26mg/dl と低γグロブリン血症の進行が認められたためSLEを合併したCVIDとして39歳時よりγグロブリン補充療法が開始された。CD20 0.16% と著明なB細胞の減少を認めた。フローサイトメトリーによるBtk蛋白発現の解析では単球におけるBtk発現の減弱が認められた。cDNAの解析でBtkコード領域末端の12bpのinframeの欠失が認められXLAと診断された(図1)。

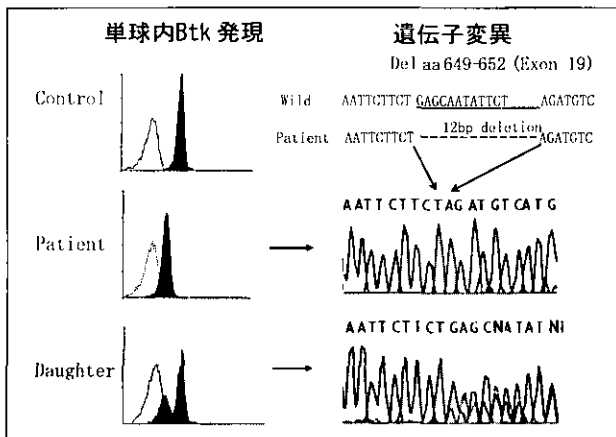


図 1

症例22は15歳の男性例で家族に易感染性を示す者はない。乳児期より発熱することが多く、IgAが低いと言われていた。9歳時に膿胸に罹患。IgG 66mg/dl, IgA 4mg/dl, IgM 44mg/dl と低値であり、以降 CVIDとしてγグロブリンの補充が行われていた。CD20 0.02% と著明なB細胞

の減少が認められ、フローサイトメトリーによるBtk蛋白発現は著明に減弱しており、cDNAの解析でキナーゼドメインにおけるミスセンス変異が認められXLAと診断された。(図2)

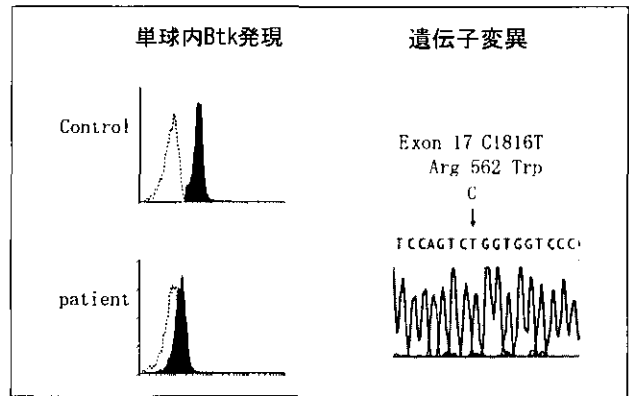


図 2

症例20は27歳の男性で、9歳時に慢性中耳炎のため鼓室形成術を施行された。IgGが低値であったため選択的IgG欠損症と診断され、γグロブリン補充療法が開始された。27歳時に肺炎で入院した際、IgG 201mg/dl, IgA 468mg/dl, IgM 1227mg/dl とIgMの高値が認められた。リンパ球表面マーカーではCD3 73.5%, CD4 40.9%, CD8 31.0%, CD20 8.9% と異常なし。PMA、Ionomycinによる刺激後のリンパ球におけるCD40 ligand発現は全く正常であった。しかし、cDNAの解析でCD40 ligandのexon 5における6bpの欠失と1bpの塩基置換を伴ったinframeの変異が認められX連鎖高IgM症候群と診断された。(図3)

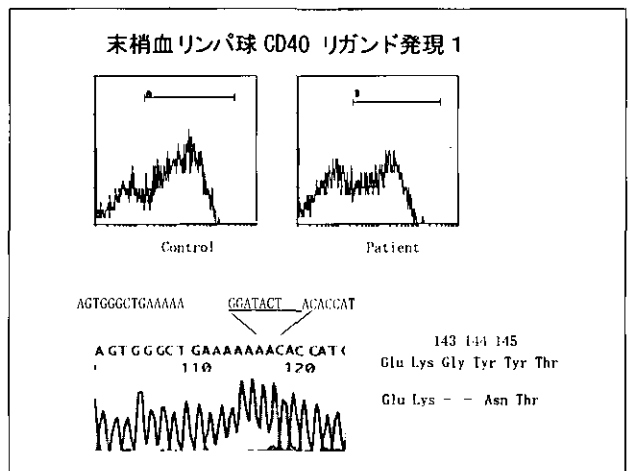


図 3

症例 8 は20歳の男性で、3歳時にEBVによる伝染性単核球を発症。重症化は認められなかった



が、その後、低 $\gamma$ グロブリン血症を呈したため $\gamma$ グロブリン補充療法が開始された。18歳時にカリニ肺炎に罹患。19歳時に発熱に伴って記憶力低下が出現。脳内の多発性の小結節性病変が認められた。その後、血球貪食症候群を合併。IgG 478 mg/dl, IgA < 23 mg/dl, IgM < 7mg/dl。CD19 0.8%とB細胞の減少を認めた。EBV感染後の低 $\gamma$ グロブリン血症であったため、XLPを疑いPHA-blast細胞におけるSAP発現をフローサイトメトリーにて解析したところ発現の減弱が認められた。Genomic DNAを用いた遺伝子解析にてexon 1における一塩基置換が認められX連鎖リンパ増殖症候群と診断された。(図4)

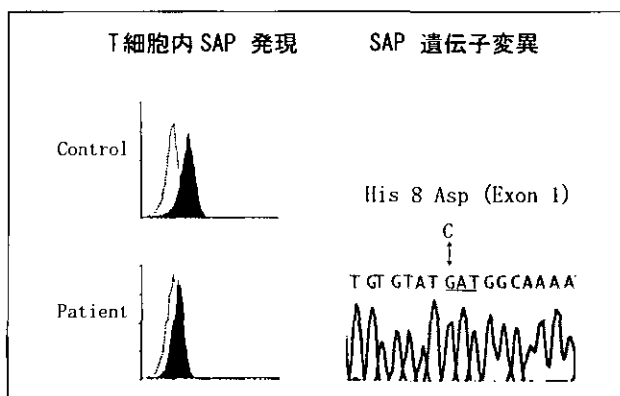


図4

症例23は31歳の女性で、両親がいとこ婚。結節性紅斑を伴う高熱にて受診した際、IgG 524mg/dl、IgA 310mg/dl、IgM 246mg/dlとIgGの減少が認められ、IgG1が感度以下であったためIgG1サブクラス欠損が疑われた。岐阜大学小児科にてIgG定常部領域に欠失が認められIgG1欠損症と診断された。

### 【考察】

成人期に遭遇する低 $\gamma$ グロブリン血症は、腎疾患や消化器疾患に伴う喪失性のものや、免疫抑制剤、放射線治療などに伴う産生抑制によるものが多い。しかし、明らかな基礎疾患を持たず、偶然的検査を契機に成人期になって低 $\gamma$ グロブリンが発見される例や、成人期に入ってから易感染性が出現し発見される例、小児期に発症しながら確定診断がされず、成人期にキャリアオーバーする例も存在する。以前、われわれが行ったB細胞減少

を伴うCVID男性例11例の調査ではその中に7例のXLAが発見された(1)。このことは遺伝子診断が広く施行されるようになった現在においても、成人の低 $\gamma$ グロブリン血症の症例中には未だ確定診断に至らない既知遺伝子異常による原発性免疫不全症が紛れ込んでいる可能性があることを推測させる。今回の調査では原因不明の低 $\gamma$ グロブリン血症として医療機関に受診しているケースが男女含めて48例確認され、うち、解析を施行した23例のうち5例、22%で原因遺伝子変異が確定され、かなり高い率で既知遺伝子異常に基づく低 $\gamma$ グロブリン血症が診断されずに観察されている現状が明らかとなった。今回の検討ではB細胞減少を示す低 $\gamma$ グロブリン血症の原因遺伝子のうちBtk変異のみ全例でスクリーニングを行われているため、さらに今後、検討を進めることにより確定診断に至る症例が増加するものと考えられる。

$\gamma$ グロブリン血症の遺伝子解析のアプローチとして、個々の症例に対して、低 $\gamma$ グロブリン血症の原因となりうるすべての遺伝子の解析を行うのは費用、労力を多大に要するため、今回は臨床所見と低 $\gamma$ グロブリン値のパターン、B細胞数より想定しうる遺伝子変異を絞り込み、解析を行った。具体的にはB細胞が1%未満の症例では、まずBtk蛋白発現をフローサイトメトリーにて解析し、発現異常例ではBtk遺伝子解析を施行した。B細胞数正常の低 $\gamma$ グロブリン血症では刺激リンパ球でのCD40 ligandの発現を解析し、異常例ではCD40 ligand遺伝子の解析を行った。また、CD40 ligand発現正常でも高IgMが認められた例に関してはCD40 ligand遺伝子解析を行った。明らかにIgGサブクラスの欠損が疑われる症例は岐阜大学小児科にIgG遺伝子解析を依頼した。このアプローチでは現在のすべて低 $\gamma$ グロブリン血症を網羅できないため、最近報告されたICOS遺伝子異常(2)などをはじめとして検出されない疾患が多く残る事は否めない。今後、これら疾患を含めたスクリーニングを検討する必要があると考える。

今回、遺伝子変異が発見された症例で、phenotypeとgenotypeという面から興味深い結果が得

られた。症例1のXLAと最終診断された症例は成人に至るまで易感染性を示さず、免疫グロブリン値も徐々に低下を示した非典型例である。その遺伝子変異はBtkのコード領域の最も末端に位置し、キナーゼ活性にも影響がないと推測される部位におけるinframeの欠失であり、Btk発現もフローサイトメトリーで明らかに認められた。推測の域は出ないが、この変異においてはBtk機能がある程度残存している可能性があり、その結果として非典型例をとった可能性がある。症例20はXHIMとしては軽症に経過している症例であり、その遺伝子変異はCD40の結合に重要とされる位置のinframeの変異である(3)。しかし、患者の免疫グロブリン値をみると明らかにクラススイッチが認められており、また、刺激されたT細胞上のCD40 ligand発現も全く正常であった。このことはこの変異は蛋白発現に影響を与えず、さらにCD40とCD40 ligandの相互作用機能が残存しているまれなタイプのもと考えられた。成人における非典型例としての症例を調査することにより今まで明らかでなかったphenotype-genotypeの関連がある程度見いだされるようになるかもしれない。

遺伝子解析は治療方針を考える上でも重要である。症例8はXLAとして治療されていた症例であるが、遺伝子解析にXLPであることが判明し、XLPが予後不良であることを考慮すると、骨髄移植が治療として考慮される必要がある。また、症例20においても、現在は軽症であり骨髄移植の適応ではないが、将来的にも細胞免疫機能不全を合併するようであれば骨髄移植も治療の一つとして視野に入れなければならない。成人γグロブリン血症は非常に多くの疾患スペクトラムがあるため、それらに対してその原因遺伝子を確定することは労力と費用は小さくないが、それぞれの患者のもつ不安は大きく、原因を明確にし、その情報を正確に提供することは正確な遺伝カウンセリングを行う上でも、また、適切な治療方針を決定するうえでも意義が大きいと考えられる。

今回の調査にご協力頂きました以下の先生方に感謝いたします。

大坂大学 渡辺 大先生、和歌山県立医科大学 前島悦子先生、大谷晴久先生、東京厚生年金病院 羽原 隆先生、自治医科大学 奈良浩之先生、久留米大学 岡村孝先生、福岡県立柳川病院 江森啓悟先生、国立晴嵐荘病院 原口典博先生、近畿大学医学部奈良病院 椿和央先生、賛育会病院 合地研吾先生、国立別府病院、伊藤能清先生、順天堂大学浦安病院 金子礼志先生、埼玉医科大学総合医療センター 亀田秀人先生、北里大学病院 岡田 純先生、公立阿伎留病院 西成田進先生、市立札幌病院 後藤明子先生、向井正也先生、前橋北病院 小林節雄先生、兵庫医科大学 緒方 篤先生、富田林病院 藤井 隆先生、国立育成医療センター 村島温子先生、福島赤十字病院 宮田昌之先生、聖マリアンナ医科大学東横病院 野村真智子先生、聖マリアンナ医科大学 中島夏樹先生、順天堂伊豆長岡病院 小池道明先生

#### 【参考文献】

- 1) Kanegane H, Tsukada S, Iwata T, et al. Detection of Bruton's tyrosine kinase mutations in hypogammaglobulinaemic males registered as common variable immunodeficiency (CVID) in the Japanese Immunodeficiency Registry. Clin Exp Immunol. 2000 120(3):512-7.
- 2) Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. Nat Immunol. 2003 4(3):261-8.
- 3) Bajorath J, Marken JS, Chalupny NJ, et al. Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis. Biochemistry. 1995 34(31):9884-92.

# Genetic analysis of adult cases with hypogammaglobulinemia

Takeshi Futatani<sup>1</sup>, Hirokazu Kanegane<sup>1</sup>, Hiromichi Taneichi<sup>1</sup>, Taketoshi Yoshida<sup>1</sup>,  
Toshio Miyawaki<sup>1</sup>, Hideo Kaneko<sup>2</sup>, Naomi Kondo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Gifu University School of Medicine

Humoral immunodeficiencies, such as X-linked agammaglobulinemia, hyper IgM syndrome, are usually diagnosed in childhood due to recurrent bacterial infections. However, some of them are not diagnosed until later in life because of mild clinical manifestations, or just not having opportunity to be genetically tested. The aims of this study are to search primary immunodeficiency diseases among adult cases with hypogammaglobulinemia with unknown etiology, and to clarify the true incidence of primary immunodeficiency diseases among these cases. We sent questionnaires to 1,424 doctors belonging to The Japan Society for Clinical Immunology, and found 63 adult cases with hypogammaglobulinemia. Among them, we were able to analyze 23 cases and identified five patients with causative mutations resulting in hypogammaglobulinemia, consisting of two XLA, one XHIM, one XLP, and one selective IgG1 deficiency were identified. Although mutation analysis is applied widely in Japan, considerable numbers of patients suffering from hypogammaglobulinemia seem to be left undiagnosed on a molecular basis.

# IgG subclass 欠損症における定常部領域の遺伝子欠失

金子 英雄 (岐阜大学小児科)  
 浅野 勉 (岐阜大学小児科)  
 深尾 敏幸 (岐阜大学小児科)  
 近藤 直実 (岐阜大学小児科)  
 向井 正也 (市立札幌病院)

## 【研究要旨】

先天性免疫不全症候群の1つであるIgG subclass欠損症は繰り返す肺炎、中耳炎を特徴とする。我々は膜型IgG2の変異により完全IgG2欠損を生じた家系について報告してきた。今回は、他のIgG subclass欠損症について定常部領域の異常の有無について検討したので報告する。患者は結節性紅斑に伴う発熱で受診時に免疫グロブリン値の異常を指摘された女性例。IgM 246 mg/dl, IgG524 mg/dl, IgA 310 mg/dl, IgE 20 IU/mlとIgGの低値を認めた。IgG subclassはIgG1のみ低値を示した。患者では、PCRでC $\gamma$ 1は増幅されず、Southern hybridizationの結果よりC $\gamma$ 1を欠失していると考えられた。完全なIgG subclass欠損症ではIgG定常部領域の変異もしくは欠失を考慮することが必要と考えられた。

【KEY WORD】 IgG subclass 欠損症、IgG定常部領域

## 【はじめに】

先天性免疫不全症の一つであるIgG subclass欠損症はくり返す肺炎、中耳炎を特徴とする。IgG subclass欠損症の多くはその原因が不明である。Ig heavy chainにはスイッチおよび定常部領域が存在する。IgGは4つのサブクラス、IgAは2つのサブクラスがある。B細胞はVDJ組み換えをしたのちまずIgM産生細胞となる。その後、CD40とサイトカインの刺激により各Ig定常部領域の上流に存在するスイッチ領域どうしのクラススイッチ組み換えがおきる。例えば、IgG2産生の場合、S $\mu$ /S $\gamma$ 2間で組み換えが起こり、IgG2産生細胞となる。私たちはIgG2 subclass欠損症において、膜型IgG2が作られないことが完全IgG2欠損の病因となることを報告してきた。また、定常部領域の大きな欠失によりIgG2-IgG4-IgA-IgEの欠損を生じる家系についても報告した(1)。今回、IgG1 subclass欠損を示す患者についてIgGの定常部領域について検討した。

## 【対象】

患者P1は結節性紅斑を伴う、高熱で受診時にIgG1の低値を指摘された。IgGが602mg/dlと低値でIgGサブクラスではIgG1のみが低値で他は正常範囲内だった。他のIgGサブクラス値に異常

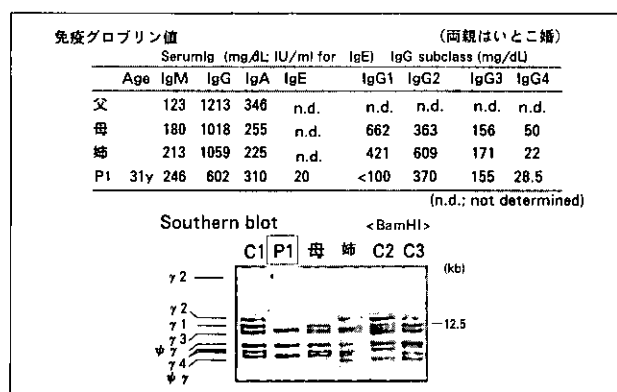


図1

## 【結果】

C $\gamma$ 1プローブでのサザンハイブリダイゼーションでは、12.5キロのC $\gamma$ 1のバンドが認められず、ホモで欠失していると考えられた。また、SacIで

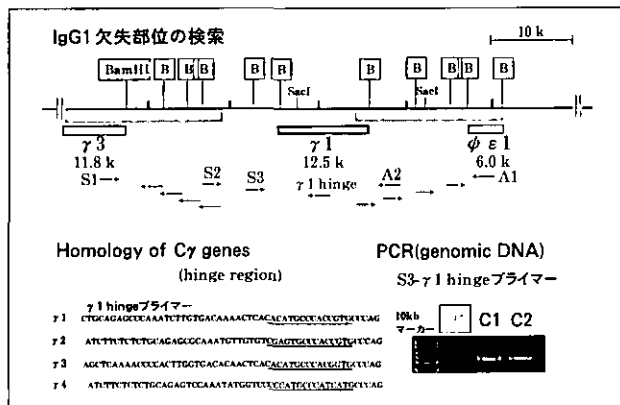


図2

PCRによるC568T遺伝子変異の検出。上段に示すように105bpのPCR産物がC568Tが存在するとNdeIにより84bpと21bpのバンドに切断される。P: patient, F: patient's Father, M: patient's Mother, B: patient's brother

酵素切断後、C $\gamma$ プローブを用いたサザンも施行したが、P1で、14.5キロの $\gamma$ 1の欠失を認めた。C $\epsilon$ プローブでのサザンでは、欠失を認めなかった。次にP1における、IgG1欠失部位の検索を行った。サザンプロットの結果より、 $\gamma$ 3と $\phi$   $\epsilon$  1は存在を確認したため、それぞれ、 $\gamma$ 3の3'側、 $\phi$   $\epsilon$  1の5'側に矢印で示したプライマーを立てて、PCRを行なった(図2)。

C $\gamma$ 1から4まで、coding, non coding regionとも90%以上の相同性が存在する。Hinge領域は、最も差がある領域だが、特異的にPCRで増幅するにはプライマーの位置とPCRの条件設定が大切である。Annealing temp.を66°Cまであげて、S2あるいはS3プライマーと $\gamma$ 1ヒンジプライマーを用いた所、P1では、増幅されなかった。その間の領域で欠失、組み換えが起きていると考えられる。現在さらに幅をせばめて検討している。

### 【考案】

IgG2, IgG4のsubclass欠損は比較的頻度が多いが、IgG1の欠損は稀である。IgG1はIgGのうち最も多くを占めているのでその欠損症は興味深い。今までにIgG1の定常部領域の欠失により生じたIgG1 subclass 欠損症はSmithらによる1例のみである(2)。その症例は呼吸器感染、気管

支喘息により頻回に入院をくり返していた。また、ウイルスに対する抗体はIgG3とIgG4にのみ存在したと報告されている。

ヒト免疫グロブリンの定常部領域は $\gamma$ - $\gamma$ - $\epsilon$ - $\alpha$ がduplicationをおこし2つのsetが並んでいると考えられる。そのため、相同性が非常に高く減数分裂時に不均等交差がおきやすく遺伝子の重複または欠失がおきやすい。欧米での報告ではhomoの欠失は1400-10000人に一人と報告されているが、本邦では今回が二家系目の報告である。

免疫グロブリンの定常部領域の欠失についてはLefrancらを初めいくつかの報告がある。Lefrancは定常部領域の欠失を1から6のタイプに分類し報告している。以前報告した症例ではA1、 $\phi$  G, G2, G4, Eの欠失があり、IIIの欠失パターンを示している。本症例ではG1のみの欠失パターンを考えているが、2本のアレルが、ホモでG1のみ欠失を示しているのか、それとも他の複数の定常部領域がヘテロで欠失しているのかは、現在、解析中である。完全なIgG subclass欠損症ではIgG定常部領域の変異もしくは欠失を考慮することが必要と考えられた。

### 【参考文献】

- 1) Terada T., Kaneko H., Li A-I., Kasahara K., Ibe M., Yokota S. and Kondo N. Analysis of IgG subclass deficiency.: First reported case of IgG2, IgG4 and IgA deficiency caused by deletion of C $\alpha$  1,  $\phi$  C $\gamma$ , C $\gamma$  2, C $\gamma$  4 and C $\epsilon$  in a Mongoloid patient. J. Allergy Clin. Immunol. 2001 108: 602-606.
- 2) Smith CIE., Hammarstrom L., Henter JI. and DeLange G. Molecular and serologic analysis of IgG1 deficiency caused by new forms of the constant region of the IgH chain gene deletions. J. Immunol. 1989 142: 4514-9.

# Molecular analysis of IgG1 deficiency caused by C $\gamma$ 1 gene deletion.

Hideo Kaneko<sup>1</sup>, Tsutomu Asano<sup>1</sup>, Toshiyuki Fukao<sup>1</sup>, Naomi Kondo<sup>1</sup>, Masaya Mukai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Gifu University School of Medicine and <sup>2</sup>Sapporo Municipal Hospital

The patient with IgG subclass deficiency suffered from recurrent respiratory tract infection or otitis media. Selective IgG1 deficiency is a rare disease. We report a familiar form of IgG1 deficiency in which IgG1 was undetectable. The defect in the proband was caused by a homozygous deletion of structural gene for C  $\gamma$  1. A southern blot analysis using Bam HI demonstrated that she had no C  $\gamma$  1 bands. The mutation or deletion in C  $\gamma$  region should be considered when the patient with IgG subclass deficiency showed the complete IgG deficiency.

# ICOS/B7h相互作用の免疫応答における役割と分類不能型免疫不全症における発現

上 松 一 永 (信州大学医学部小児科、信州大学医学研究科感染免疫)  
加 納 洋 (信州大学医学部小児科、信州大学医学研究科感染免疫)  
瀧 澤 正 浩 (信州大学医学部小児科、信州大学医学研究科感染免疫)  
松 崎 聡 (信州大学医学部小児科、信州大学医学研究科感染免疫)  
銭 雪 松 (信州大学医学部小児科、信州大学医学研究科感染免疫)  
小 林 法 元 (信州大学医学部小児科、信州大学医学研究科感染免疫)  
山 崎 崇 志 (信州大学医学部小児科、信州大学医学研究科感染免疫)

## 【研究要旨】

分類不能型免疫不全症 (Common variable immunodeficiency : 以下CVIDと略) は低 $\gamma$ グロブリン血症 (hypogammaglobulinemia) と反復する細菌感染症 (bacterial infections) を主徴とする免疫不全症である。末梢血B細胞数や他の免疫担当細胞数にも異常を認めないことが多く、病的に異なる種々の疾患群の集合と考えられている。临床上遭遇することが多く、免疫不全症候群のなかでも比較的良好にみられる疾患である。CVIDの責任遺伝子はこれまで不明であったが、2家系4患者に、CD28/CTLA4ファミリーに属するInducible costimulator (ICOS) の遺伝子変異が見出された(1)。ICOSとそのリガンドB7hの作用は、T/B相互作用による免疫応答において重要であるが、不明な点も多く、特にヒトにおいては十分な解析がなされていない。本研究ではICOS/B7hについてヒトにおける免疫応答における役割を解析し、本邦のCVID患者におけるICOS/B7hの変異の有無について検討した。

## 【方 法】

### Reagent :

CD20-FITC, CD3-FITC, IgD-FITCは、DAKOから購入した。ICOS mAbは、日本たばこから恵与された。B7h mAbは、Dr. G. Freeman (Dana-Farber Cancer Institute, Boston) から恵与を受け、Biotin化は当科で行なった。

### Cells :

正常成人ならびに分類不能型免疫不全症患者からヘパリン血を採取した。フィコールによって単核球を、ロゼットセップを用いて、CD4<sup>+</sup> T細胞とB細胞を精製した。

### 細胞表面解析 :

静止期や各刺激下で細胞表面分子の発現は、FACSを用いて解析した。

### 免疫グロブリン産生 :

免疫グロブリン産生は、ELISAにより測定した。

### サイトカイン測定 :

上清中のサイトカインは、Cytometric Bead Array system (CBA: BD Pharmingen, San Diego, CA) を用いて測定した。

## 【結 果】

### B7hとICOSの発現

正常ヒト単核球においては、B7hはCD20陽性B細胞に発現が認められ、ICOSは静止期の単核球やCD3陽性T細胞には発現はみられなかった。一方、刺激によってCD3陽性T細胞はICOSを強く発現した(図1)。ICOS発現の推移は、活性化

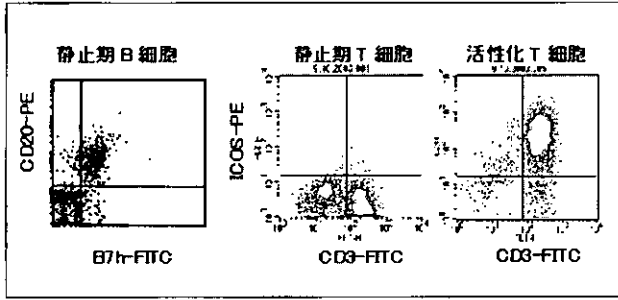


図1. B7h/ICOS発現

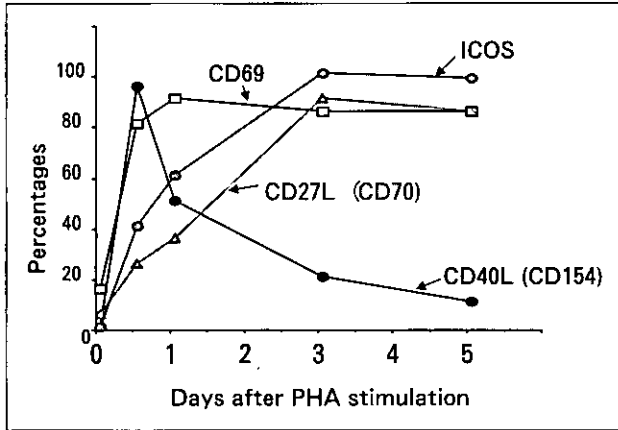


図2. ICOS発現の推移

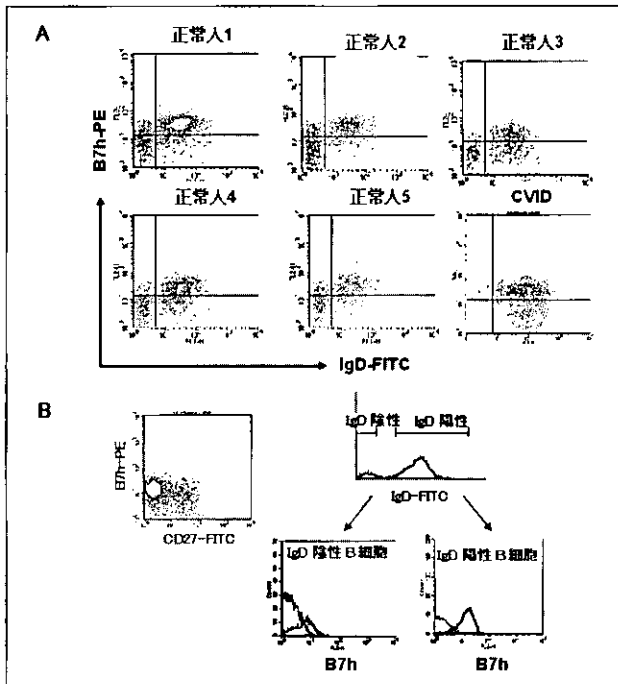


図3. ナイーブ・記憶B細胞におけるB7発現

後、T細胞はCD40LやCD69を早期に発現するのに対して、ICOS発現は、CD70発現のように遅延し、2-3日後にピークになり、その後発現は持続した(図2)。興味あることに、静止期B細胞におけるB7hは、IgD陽性のナイーブB細胞側に発現しており、CD27陽性記憶B細胞やIgD陰性

のクラススイッチを起こした記憶B細胞ではその発現が低下していた。記憶B細胞が欠損するCVID患者では、ナイーブB細胞はほぼ正常にB7hを発現していた(図3A, B)。以上から、B7h/ICOSの相互作用は、ナイーブB細胞と活性化T細胞の相互作用に関与していることが推測された。

### B7h発現の制御

マウスにおいてB7hは、B-cell receptorやIL-4刺激によってその発現が低下し、CD40シグナルによってその発現低下がレスキューされること、CD40シグナルではその発現に影響を与えないことが知られている(2)。ヒトにおいてはマウスと異なることが判明した。B-cell receptorやIL-4刺激によってB7h発現は、ほとんど変化しないか軽度減少したが、CD40シグナルはB7h発現を著明に増強した。CD40シグナルによるB7h発現の増強は、B-cell receptorやIL-4などの刺激に影響を受けなかった(図4)。以上から、B7hの発現は、CD40シグナルによってのみ制御されているものと考えられた。

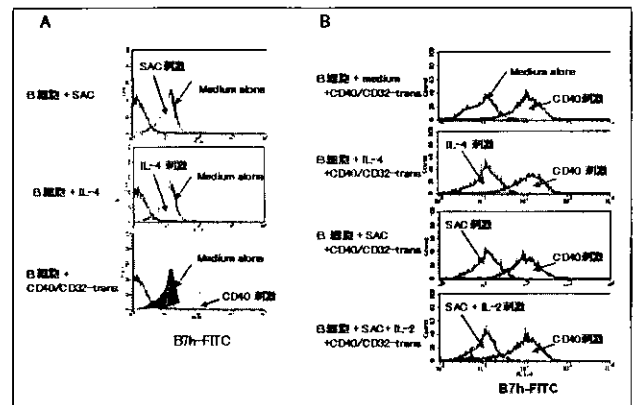


図4. CD40シグナルによるB7h発現の制御

### 免疫グロブリン産生

B7h/ICOS相互作用は、B7hからICOSへの刺激によるものと考えられている。免疫グロブリン産生に与える影響を検討するために、各種刺激下において、抗B7hブロッキング抗体を加えて培養し、上清中のIgG値を調べた。ICOS/B7hの作用阻害によって免疫グロブリン産生は減少した(図5)。以上から、B7h/ICOS相互作用は免疫グロブリン産生に関わっていることが判明した。



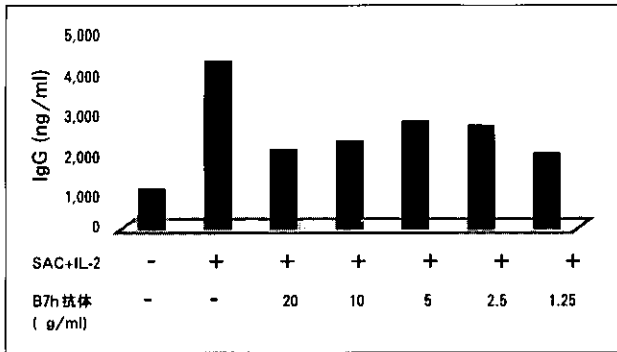


図5. ICOS/B7hの作用阻害による免疫グロブリン産生への影響  
サイトカイン産生

CD4<sup>+</sup>T細胞にB細胞を加え培養すると各種サイトカインの産生が増強する。こうしたT-B細胞相互作用に、B7h/ICOS相互作用が関わっているかをみるために、抗B7hブロッキング抗体を加えてサイトカイン産生を検討した。図6に示すように、ICOS/B7h作用を阻害すると、軽度であるがIFN- $\gamma$ 産生が減少した。さらに、B7hを強発現させてから加える系を用いると、ICOS/B7h作用阻害によって明らかなIFN- $\gamma$ 産生の減少が認められた。このことから、T-B細胞相互作用のICOS/B7hの役割として、IFN- $\gamma$ 産生の増強が考えられた。

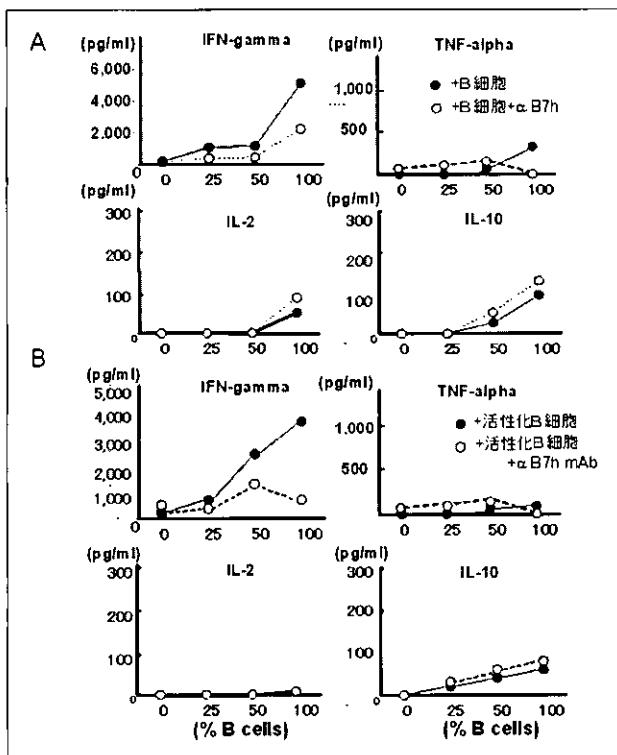


図6. T-B細胞相互作用によるサイトカイン産生におけるB7h/ICOS相互作用の関与

## CVID患者における検討

本邦における典型的なCVID15例（同胞例1組を含む）において、ICOS/B7hはともに正常に発現していた。

## 【考察】

ICOSは、1999年から2000年にかけて、日本やドイツなどのグループを中心に、胸腺腫細胞株や活性化T細胞からクローニングされ、データベース解析の結果、CD28/CTLA4と構造的に類似したCD28/CTLA4ファミリー分子であることが判明した。ICOSは活性化T細胞が発現し、Th1/2サイトカインの産生や移植片の拒絶などへの関与が報告されている。ICOSを刺激するリガンドは、遺伝子の構造解析から、CD28/CTLA4のリガンドのCD80/86ファミリーに属するB7hであることが判明した。B7hは末梢血B細胞上に強く発現されており、T/B細胞相互作用の一翼を担っていると考えられる。

私たちの解析では、B7hはヒトナイーブB細胞の大部分に発現しているが、メモリーB細胞においては、その発現が減少しており、その約50%において発現を認めなかった。以上から、B7hはナイーブB細胞と活性化T細胞の相互作用に重要な役割を担っているものと思われる。さらに興味深いことは、マウスにおける発表と異なり、ヒトでは、ナイーブB細胞上のB7hは、CD40刺激によって発現が増加し、他の刺激ではほとんど発現に変化がみられないことである。B7h発現はCD40シグナルによってのみ制御されているものと思われる。ICOS刺激によるサイトカイン産生についてはさまざまな発表がある。私たちのCD40刺激B細胞でICOSを刺激する系にブロッキング抗体を用いる実験では、B7h/ICOS相互作用は、特にIFN- $\gamma$ 産生を促すものと考えられた。

Grimbacherらによって、CVID患者の中からICOS異常が見出された。報告によりと、ICOS欠損の4患者は、2家系で、ともに同胞である。発症年齢は19歳から28歳で、反復する気道や腸管の細菌感染症によって発見されている。典型的なCVIDであり、一部にみられる脾腫や自己免疫疾

患などの合併はない。末梢血B細胞の割合は、リンパ球0.7-3.3%とCVID患者の中でも低いほうである。末梢血免疫グロブリン値は、患者2では、IgG値が440mg/dlであるが、他の値は著明に低下している。本邦におけるCVID患者では、B7h/ICOS異常は見出されなかった。さらに、ヨーロッパ・アメリカの研究でもその後新しいICOS異常は見出されていない(180例の解析、Grimbacherとのpersonal communication)。以上から、ICOSの異常に基づく分類不能型免疫不全症はきわめて稀と考えられる。

CVIDは明らかにひとつの疾患群として重要でしかも患者数の多い免疫不全症である。しかしながら、原因が不明であり、また、発症が遅いためとらえどころのない疾患と考えられてきた。本研究におけるヒトB7h/ICOS相互作用の解析では、CVIDを発症させるような機能解析結果は得られなかった。やはりB7h/ICOS KO miceで認めら

れた胚中心の低形成傾向がCVIDの発症に関係してきている可能性が高いと推測される。しかしながら、Adult-onsetのCVIDが遺伝子異常によって発症していることが証明されたことは、CVIDの原因を探る上できわめて価値のあることであり、今後本症患者の治療に役立つものと思われる。

#### 【参考文献】

- 1) Grimbacher B et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol.* 4:261-268, 2003
- 2) Liang L, Porter EM, Sha WC. Constitutive expression of the B7h ligand for inducible costimulator on naive B cells is extinguished after activation by distinct B cell receptor and interleukin 4 receptor-mediated pathways and can be rescued by CD40 signaling. *J Exp Med.* 196:97-108, 2002

#### IV 研究成果の刊行に関する一覧

## 研究成果の刊行に関する一覧

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
金兼弘和, 宮脇利男	原発性免疫不全症候群	杉本恒明他	内科学第八版	朝倉書店	東京	2003	1322-1327
岩田 力	免疫異常	糸川嘉則	ミネラルの事典	朝倉書店	東京	2003	636-643
近藤直実	小児の気管支喘息	山口 徹, 北原光夫	今日の治療指針 45	医学書院	東京	2003	927-928
近藤直実	QOL	西間三馨, 森川昭廣	小児科シリーズII 45 コ・メディカルと患者 家族のための小児の気 管支喘息	現代医療社	東京	2003	209-216
近藤直実	感染とアレルギー	狩野庄吾, 中川武正	先端医療シリーズ19 アレルギー・リウマチ・ 膠原病の最新医療	先端医療 技術研究所	東京	2003	117-124
加藤善一郎, 寺本貴英, 近藤直実	小児科領域治療薬	狩野庄吾, 中川武正	先端医療シリーズ19 アレルギー・リウマチ・ 膠原病の最新医療	先端医療 技術研究所	東京	2003	199-202
近藤直実	免疫疾患	森川昭廣, 内山 聖	標準小児科学 5	医学書院	東京	2003	248-270
近藤直実	小児での薬物療法の 留意点	中川武正, 片山一郎, 岡本美孝	アレルギー疾患 専門 医にきく最新の臨床	中外医学社	東京	2003	126-128
近藤直実	若年性関節リウマチ	大関武彦, 古川 漸, 横田俊一郎	今日の小児治療指針 13	医学書院	東京	2003	198-199
近藤直実	アレルギー性疾患	清野佳紀, 小林邦彦, 原田研介, 桃井眞里子	NEW小児科学 改訂 第2版	南江堂	東京	2003	289-304
近藤直実	検査値を読む上での 注意事項	眞弓光文, 亀山順治, 寺澤秀一	コア・ローテーション 小児科	金芳堂	京都	2003	104-105
近藤直実, 森本直子	ロイコトリエン受容 体拮抗薬の副作用と その対策	足立 満	ロイコトリエン受容体 拮抗薬のすべて	先端医学社	東京	2003	148-155
近藤直実	遺伝	西間三馨, 森川昭廣	小児科シリーズIII 小 児のアレルギー性鼻炎	現代医療社	東京	2003	43-52
近藤直実	喘息児と保護者の QOLの評価と活用 のコツ	森川昭廣	小児科外来診療のコツ と落とし穴 1 小児喘 息診療	中山書店	東京	2003	226-227
近藤直実	喘息の遺伝要因		臨床と研究	大道學館出 版部		2003	
原 寿郎	高IgE症候群		総合アレルギー学	南山堂	東京	2003	
原 寿郎	免疫疾患	阿部敏明, 飯沼一宇, 吉岡 博	小児科学・新生児学テ キスト改訂第四版	診断と治療 社	東京	2003	
原 寿郎	先天性免疫不全症 PARTV		病弱教育の視点からの 医学事典	ジァース 教育新社	東京	2003	
原 寿郎, 水野由美	細菌・真菌感染症		小児科学 (第9版)	文光堂	東京	2003	