

を連結可能匿名化することにより、個人情報の保護を行った。

### C. 研究結果

国内75例のHIGM患者を解析した。うちわけはタイプ1は39例、タイプ2は15例、タイプ5は1例、原因遺伝子不明のタイプXは20例である。HIGMタイプ1はCD40 ligand 遺伝子異常によるHIGMである。30家系、39例のHIGM1を同定した。遺伝子変異は29種類認められた。診断時年齢は1ヶ月から37歳、中央値2歳で、血清IgG 4-625mg/dl, IgA <3-292mg/dl, IgM 31-2010mg/dl, IgE <1-81 IU/mlであった(図1)。感染症としては、P. Carinii肺炎16例、Cryptosporidium感染4例のほか、JCウイルスによる進行性多巣性白質脳症などT細胞機能不全による感染症を多数認めた。好中球減少は19例に認めた。予後を検討したところ、生存27例、死亡12例(31%)であり、20歳での生存率は38.7%であった(図2)。死因としては脳炎2例、PCP1例、JCV-PML1例、Cryptococcus髄膜炎1例、BMT合併症2例、突然死1例、交通事故1例、不明2例であった。また、ST合剤の予防投与を行った16例ではP. Carinii肺炎の発症は認められなかったが、予防投与を行わなかった13例では12例でP. Carinii肺炎の発症を認めており、本タイプでのST合剤の予防投与の有効性が有意に認められた(図3)。骨髄移植は12例(31%)で行われていた。早期の移植により根治ができる事が示され、本タイプは造血幹細胞移植の適応であると考えられた。

AID変異による高IgM症候群タイプ2患者は13家系15例で10種類の変異を認めた。診断時年齢は1歳から60歳(平均31.2歳)であり、診断年齢は優位にタイプ1に比較して高値であった(図4)。年齢の高さは、先天性の疾患である事から、診断の遅れが原因であると考えられる。血清IgGは全例100mg/dl以下で、IgMは968-6440mg/dlと高値であった。すなわちタイプ2では、タイプ1と比較して優位にIgG, IgAが低値であり、IgMは高値であった。Ig遺伝子V領域の体細胞突然

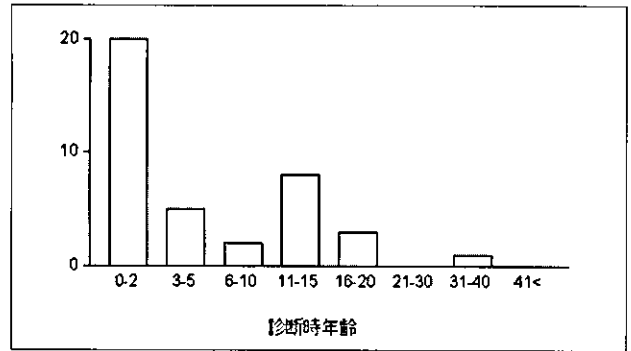


図1. HIGM1の診断時年齢

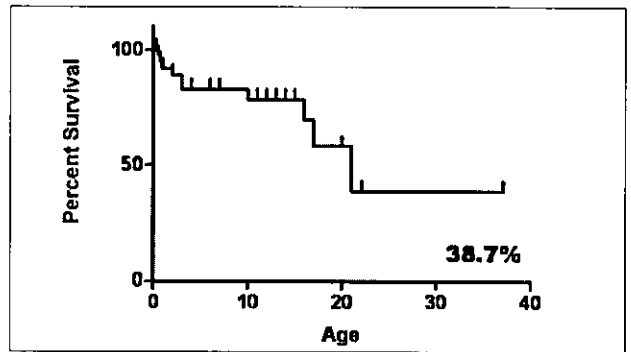


図2. HIGM1の長期予後

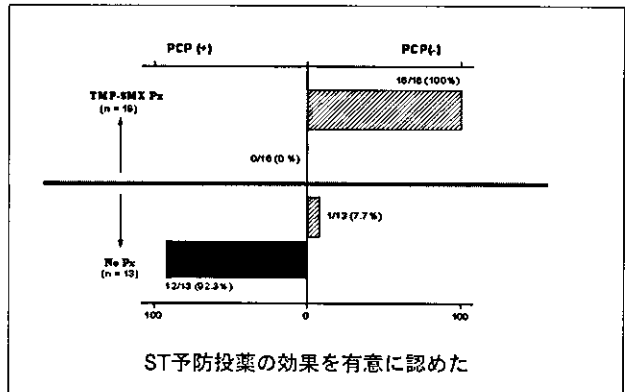


図3. HIGM1におけるST予防投薬の効果

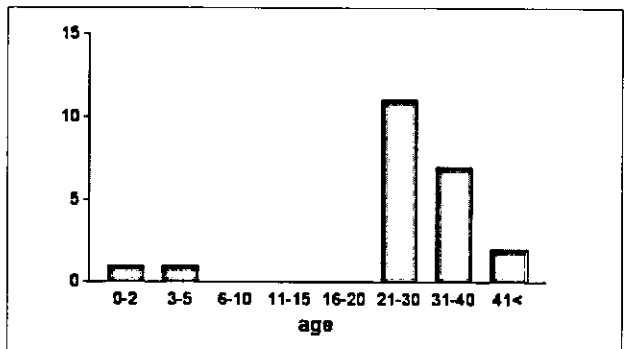


図4. HIGM2の診断時年齢

変異(SHM, somatic hyper mutation)を検討したところ、B細胞、CD27陽性B細胞のいずれで解析しても、HIGM2患者では、体細胞突然変異が正常と比較して優位に低値であった。この結果

は、本タイプではクラススイッチの障害に加え、高親和性抗体の産生ができない事を示している。易感染性は低γグロブリン血症によるものが主体であり、カリニ肺炎などの日和見感染は見られなかった。T細胞機能不全による日和見感染が見られない事から、ガンマグロブリン定期補充療法を早期から適切に行えば、予後は良好であると予想された。今回の調査でも、15例中15例が生存していた。しかし繰り返す肺炎による慢性肺疾患を起し、在宅酸素療法が必要になっている症例も存在したので、早期診断、早期治療の必要性が確認された。なお、自己免疫疾患、発癌のリスクが高いかについては経過観察期間、患者数が少ないため、今後の継続的な調査が必要である。

HIGM 症候群の新規遺伝子として UNG (Uracil-DNA glycosylase) を同定し、HIGM 症候群タイプ 5 と命名した。すなわち、CD40L, CD40, AID 正常 HIGM 患者 3 症例の B 細胞の SHM を解析したところ、SHM の頻度は正常であるが、dG:dC の変異が dA:dT に偏っていた。このことは、dC の脱アミノ化が固定されていると考えられる。この 3 例の患者では CSR 刺激時の IgM スイッチ領域 (Sm領域) DNA 二重鎖切断 (DSB) が欠損していた。クラススイッチも起きなかった。また、germ line transcript および AID の発現は正常であった。以上のことから、UNG を候補遺伝子と予想し、患者での遺伝子変異を見たところ、3 例とも遺伝子異常を認めた。フレームシフトを伴う塩基欠損が 2 例で、ミスセンス変異が 1 例であった。蛋白発現、酵素活性ともに低下していた (図 5)。これらの事実から、UNG が HIGM タイプ 5 の責任遺伝子である事

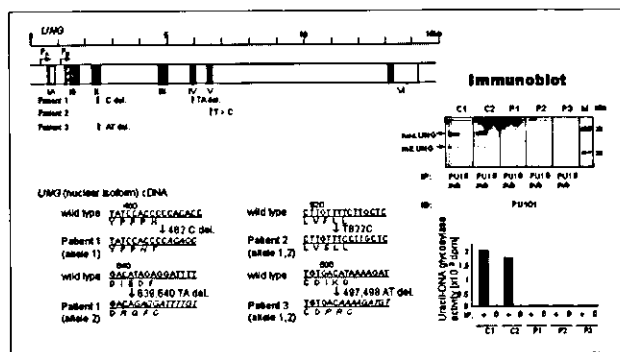


図 5. UNG 遺伝子変異の同定/蛋白発現/酵素活性

を確定した。この発見により、クラススイッチの機構において、AID の標的が DNA 内のウラシルであることが証明された (図 6)。なお、臨床症状からは、HIGM2, HIGM4 と区別できない病像であった。

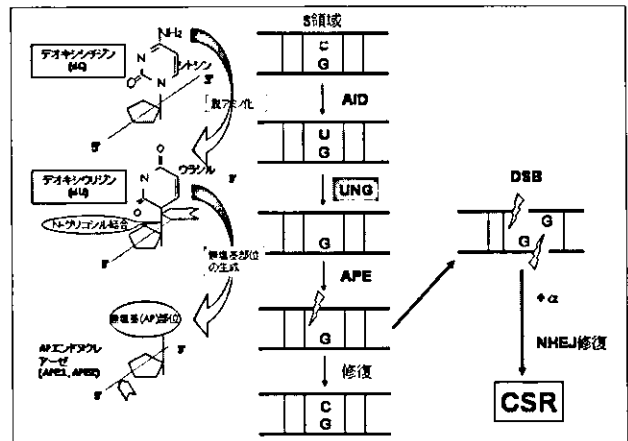


図 6. 免疫グロブリン遺伝子多様化獲得の DNA 脱アミノ化モデル  
Neuberger らが 2002 年に提唱したモデル (一部改変) [2002, Petersen-Mahrt]. AID により DNA 鎖内に導入された dU は、DNA 複製により dC → dT、dG → dA の transition 変異につながる (phase IA-SHM)。また、DNA 二重鎖中では dU:dG の mismatch 塩基対として、Msh2/Msh6 を中心とした分子により認識され、エラー頻度の高いポリメラーゼにより修復されることにより、周辺塩基も含めた変異導入につながる (Phase II-SHM)。UNG は、主に DNA 複製中に DNA 鎖中の dU を認識し、N-グリコシド結合を切断することにより、無塩基部位を作る。ここで DNA 複製がおきると無塩基部位は適当な塩基で埋められるため、dC/dG 部位の dN への変異につながる (Phase B-SHM)。APE (apurinic/apurinic endonuclease) は無塩基部位を認識して 5' 側のホスホジエステル結合を切断、反対鎖でも同じことが起きれば、DNA 二重鎖断 (DSB) がおきる。非相同鎖断修復 (NHEJ) (Ku70/80, DNAPKcs/XRCC4/LigIV 等を含む) を用いて異なる S 領域同士が結合すると、クラススイッチ再構成 (CSR) へとつながる。

さらに、CD40 ligand, CD40, AID, UNG, NEMO が正常の HIGM 症候群患者を 20 例見いだした。HIGM タイプ 4 と呼んでいるが、B 細胞数、B 細胞増殖能正常、Sμ 領域の DSB は正常、SHM は正常である。これらの事実から、クラススイッチ機構の中で、S 領域の 2 重鎖切断後の修

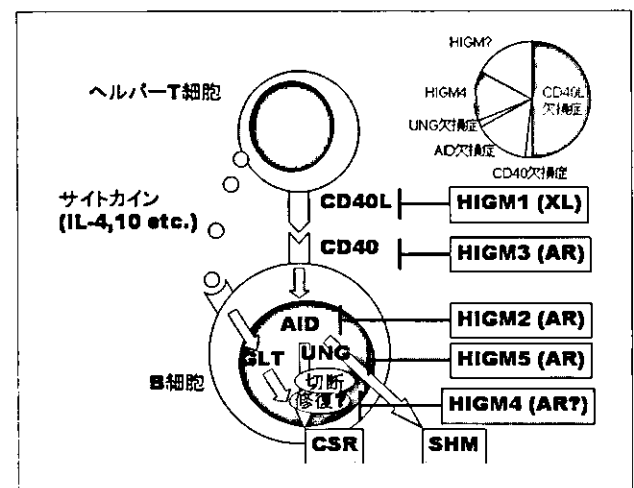


図 7. 高IgM 症候群の分子病態による分類

復過程にかかわる分子の異常を想定している。

以上の研究結果から高 IgM 症候群の分類を、分子病態レベルでまとめたものを図 7 に示す。

#### D. 考 察

免疫不全症である HIGM 症候群について検討を加えた。

タイプ 1 は CD40 ligand 遺伝子異常であり、T 細胞機能不全を伴う事を示し、長期予後が不良であり造血幹細胞移植が必要であることを示した。

タイプ 2 は AID 異常であり、B細胞のクラススイッチと体細胞突然変異の異常があり、臨床的には低 $\gamma$ グロブリン血症の症状が主体であることとガンマグロブリン定期補充により生命予後は良好である事が示された。しかし診断が遅れている症例が多い現状と、治療開始の遅れにより慢性肺疾患に陥る事が明らかになった。

タイプ 5 については UNG が責任遺伝子である事を確定し、その結果から、免疫グロブリンクラススイッチの機構が、CD40による AID 発現の誘導、AID による Ig 遺伝子S領域の DNAのCがUに変換され、UNG がUを除去することにより、2重鎖切断に至ることで進行している事が示された。

タイプ 4 については DNA 2重鎖切断以降の DNA 修復機構に原因があると考えられ、現在原因遺伝子を同定すべく検討中である。

今後今回の研究結果をもとに本症候群のタイプ別の診断法と治療法のガイドライン作製と啓蒙活動を行い、患者の早期診断と早期治療による予後改善につとめたい。また、遺伝子が解明されていないタイプ 4 についてはさらに責任遺伝子を同定する事が、診断と治療法の確立に重要であると考えられた。

# 重症度の異なる X 連鎖高 IgM 症候群 CD40 リガンドの機能解析

小林 法 元 (信州大学小児医学講座)  
安井 耕 三 (信州大学小児医学講座)  
野々山 恵 章 (防衛医科大学校小児科)  
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)  
宮脇 利 男 (富山医科薬科大学小児科)  
上松 一 永 (信州大学医学研究科移植感染免疫学講座)

## 【研究要旨】

X 連鎖高 IgM 症候群 (XHIM) は造血幹細胞移植の適応とされるが、免疫グロブリン補充療法のみで予後良好な例や無治療例も散見される。本研究では、この重症度の違いを明らかにするために、種々の XHIM 患者における CD40 リガンド機能を解析した。患者は、移植を行った重症例 1 例、免疫グロブリン補充療法のみで経過をみている軽症例 1 例および無治療例 1 例。方法は、それぞれの変異 CD40 リガンドを発現した transfectants を作成し解析に用いた。CD40L polyclonal 抗体を使用した Western blotting では、CD40 リガンドは正常なサイズを示した。3 例とも変異 CD40L-transfectants は、B 細胞上の CD86 の発現を増強せず、B 細胞の増殖および免疫グロブリン産生に対する作用も認めなかった。このことから、本疾患の重症度の違いは、B 細胞に対する作用の差でないことが示唆された。dendritic cell (DC) に対する作用では、IL-6 産生に差異を認めなかった。今後、DC における IL-12 などの産生を検討していく必要がある。

## A. 研究目的

X 連鎖高 IgM 症候群 (X-linked hyper-IgM syndrome: XHIM) の責任遺伝子は X 染色体短腕の CD40L 遺伝子である。CD40L 異常により B 細胞のクラススイッチを誘導できないため、IgG、IgA が産生されない。また、単球・マクロファージや樹状細胞を活性化できないため、IL-12 が産生されず、その結果、T 細胞の機能的分化障害がおきることが知られている。XHIM の予後として、25 歳での生存率は 20% と報告されている。そのため、治療として早期の造血幹細胞移植が推奨されている。しかし、XHIM の一部に致死的な感染を認めない軽症例が存在し、自然に易感染性が消失することがあり、移植の適応を決める上で問題となる。重症度の異なる XHIM における B 細胞および樹状細胞での CD40/CD40L 相互作用を解析した。

## B. 研究方法

症例：症例 1 (Pt1) は、3 歳に易感染性に気づかれ  $\gamma$ -グロブリン補充療法を受けていた。発症時から IgA が認められ、PHA で刺激した活性化 T 細胞上の CD40L は抗 CD40 monoclonal 抗体で検出された。27 歳ではじめて CD40 リガンドの異常が指摘された。定期的な  $\gamma$ -グロブリン補充療法のみで易感染性は抑えられている。症例 2 (Pt2) は、1 歳発症。活性化 T 細胞上の CD40L は検出されなかった。現在、20 歳を超え、免疫グロブリン値は低値であるが、 $\gamma$ -グロブリンの補充は必要とせず健常人と変わらぬ生活を行っている。症例 3 (Pt3) は発症が生後 3 ヶ月と早く、まだ母体由来と考えられる IgG が存在した。兄が XHIM だったため、早期に診断された。 $\gamma$ -グロブリン補充療法でも易感染性が改善せず造血幹細胞移植を施行された。各症例の CD40L 遺伝子変異部

位を図1に示す。すべての症例で細胞外領域の TNF $\alpha$  相同部位に変異を認めた。

表1 症例

	Pt 1	Pt 2	Pt 3
発症	3 y.o.	1 y.o.	3 m.o.
IgG (mg/dl)	323*	40	332
IgM (mg/dl)	1218	1,100	358
IgA (mg/dl)	449	<5	<5
活性化T細胞上の CD40L発現 (by TRAP1)	+	-	-
好中球減少	-	-	-
易感染性	+/-	-	+
$\gamma$ -globulin 補充療法	+	-	+

\*  $\gamma$ -globulin 補充後の値

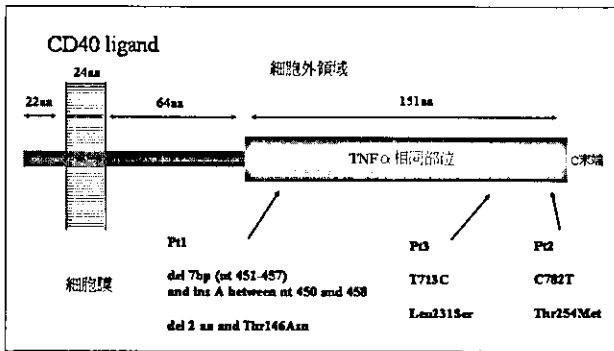


図1 症例のCD40L遺伝子変異部位

トランスフェクタント：症例および健常人の末梢血単核球をPHAで24時間刺激し、RT-PCRでそれぞれのCD40L mRNAを抽出した。BCMGShygベクターを用いて300-19細胞に移入し、G418に対し高い耐性を獲得したクローンの中からフローサイトメーターでもっともCD40Lが発現しているものを選択した。しかし、Pt2およびPt3のCD40Lの発現は、polyclonal抗体を用いてもわずかだった。CD40L遺伝子が入入されているかを確認するため、transfectant ( $2 \times 10^6$ 個)のCD40L mRNAの発現をRT-PCRで確認したところ、健常人と症例で同程度のCD40L mRNAの発現が確認された。また、同数のtransfectantから抗CD40 polyclonal抗体を用いてCD40L蛋白の発現を調べたところ、健常人とPt1はほぼ同程度のCD40L蛋白の発現が認められた。Pt2およびPt3でも弱いながら同じ大きさのCD40L蛋白の発現が確認された。

細胞：Rosette-Sepを用いて、健常人の末梢血Buffy coatからB細胞を純化した。また、同様に単球を純化し、IL-4およびGM-CSFで7日間

培養し、浮遊している細胞をフローサイトメーターで解析した。刺激前と比較してCD14の発現が弱まりCD11c、CD1a、CD1b、CD80、CD86、HLA-DRが強発現している細胞群となり、この細胞群を単球由来未熟樹状細胞として使用した。

培養： $1 \times 10^5$ 個/mlの濃度の純化B細胞をそれぞれのtransfectantとともに7日間培養し上清中の免疫グロブリン値をELISAを用いて測定した。B細胞の活性化マーカーCD80とCD86の発現に対する影響を、純化B細胞を同数のCD40L transfectantとともに48時間培養し、フローサイトメーターで検討した。B細胞の増殖に対する作用を、純化B細胞をCD40L transfectantとともに4日間培養し、 $^3\text{H}$ サイミジンインコーポレーションを用いて検討した。樹状細胞に対する作用を検討するため、単球由来未熟樹状細胞をCD40L transfectantとともに、IFN- $\gamma$ の存在下または非存在下で48時間培養した。上清中サイトカインをCytometric Bead Arrayを使用しフローサイトメーターで測定した。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断は、患者または保護者の同意のもと行われた。連結不可能匿名化された検体を使用した。

### C. 研究結果

B細胞に対する作用：

免疫グロブリン産生に対する作用では、それぞれのtransfectantのみではIgG、IgA、IgMとも産生されなかった(図2)。IL-10存在下では、正常CD40Lを発現したtransfectantのみが多量

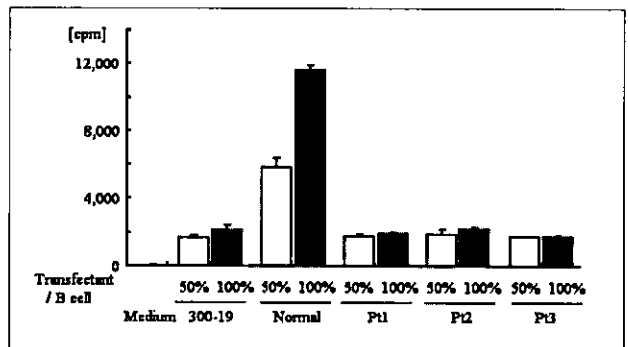


図2 B細胞の免疫グロブリン産生に対する作用  
 $1 \times 10^5$ 個/mlの濃度の純化B細胞をそれぞれのtransfectantとともに7日間培養し上清中のIgG(A)、IgM(B)、IgA(C)値をELISAで測定した。

のIgGを産生した(図2A)。3種類のmutant CD40L transfectantは、なにも移入していない300-19細胞と同様に、IgG産生を増強せず、transfectantを増加してもIgG産生は認めなかった。IgA、IgM産生に関しては、IL-10存在下で正常CD40L transfectantでの刺激では細胞数に依存した産生の増加を認めた。一方3種類のmutant CD40L transfectantは、IgGと同様にIgA、IgM産生を増強しなかった(図2B、C)。B細胞の活性化に対する影響に関しては、すべてのtransfectantにおいてB細胞上のCD80の発現には明らかな作用の差はなかった。CD86の発現は、正常CD40L transfectantのみ増強作用を認めた。

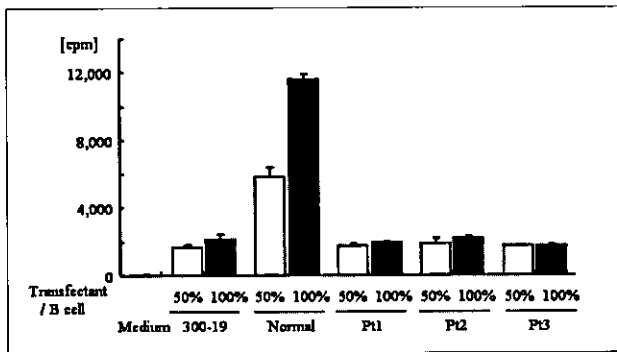


図3 B細胞増殖に対する作用

純化B細胞をCD40Lトランスフェクタントとともに4日間培養し、<sup>3</sup>Hサイジンインコーポレーションを用いて検討した。

B細胞の増殖に対する作用については、正常CD40L transfectantでは、投与量に依存したB細胞の増殖作用を認めた(図3)。しかし、mutant CD40L transfectantは、なにも移入していない300-19と同様にB細胞増殖に対する増強効果がなかった。

樹状細胞に対する作用：

単球由来未熟樹状細胞のIL-6産生に対する作用の結果を図4に示す。正常CD40L transfectantのみIL-6を産生する傾向があった。

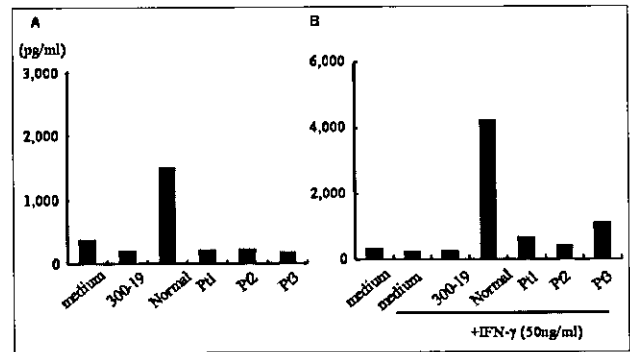


図4 樹状細胞のIL-6産生に対する作用

単球由来未熟樹状細胞をCD40L transfectantとともに、IFN- $\gamma$ の存在下または非存在下で48時間培養した。上清中サイトカインをCytometric Bead Arrayを使用しフローサイトメーターで測定した。

#### D. 考 察

本研究では、移植が行われた1例、免疫グロブリン補充療法が必要な1例および、治療が不要な1例のXHIMの変異CD40リガンドのB細胞および樹状細胞に対する機能について解析した。作成したCD40L transfectantは、Pt1の軽症例にのみフローサイトメーターでCD40Lの発現が確認された。しかし、変異CD40L transfectantは、軽症例、重症例とも、B細胞の免疫グロブリン産生、B細胞活性化、B細胞増殖への作用に差がなかった。また、樹状細胞のIL-6産生に差がなかった。

XHIMは、一般的な免疫機能検査では重症度の判定が困難であり、移植適応の是非については経過をみる必要がある。しかし、成長してからの移植は、不顕性感染の危険が増加し、体重のため臍帯血移植が困難になるなど問題がある。また、軽症例でも突然カリニ肺炎により死亡した例も報告されている。そのため、移植の適応について、発症早期に判断できる基準が求められている。今回の実験系ではB細胞への作用に関して重症度の差を説明できなかった。しかし、今後、樹状細胞や単球のIL-12などのサイトカイン産生に対する作用の解析を進めていきたいと考えている。

# 簡易診断と遺伝子解析に基づく X連鎖無ガンマグロブリン血症の同定：7年間のまとめ

金 兼 弘 和 (富山医科薬科大学医学部小児科講師)  
二 谷 武 (富山医科薬科大学医学部周産母子センター講師)  
宮 脇 利 男 (富山医科薬科大学医学部小児科教授)

## 【研究要旨】

当教室では1998年から現在に至るまでフローサイトメトリーによる簡易診断と*BTK*遺伝子解析に基づいてX連鎖無ガンマグロブリン血症(XLA)の診断を行っており、これまでに診断した135例についてまとめた。臨床的発症年齢は1歳未満が最多であったが、乳児期以降に発症したと思われる例も相当数あり、思春期、成人期以降の発症例も少なからず存在した。それに対して低ガンマグロブリン血症に気づかれた年齢は乳児期以降が多く、発症から約2年を要していると思われた。1998-2000年の前期と2001年以降の後期に分けてみると、後期では低ガンマグロブリン血症に気づかれてから1年以内にXLAと確定診断される症例が増加していた。

## A. 研究目的

X連鎖無ガンマグロブリン血症(XLA)は、乳児期より始まる反復性細菌感染症と末梢血B細胞の欠損、血清免疫グロブリン値の低下を臨床的特徴とするが、非典型例も少なからず存在し、家族歴がない場合には臨床診断が難しいこともある。1993年にXLAの責任遺伝子*BTK*が同定されて以来、遺伝子解析による確定診断が可能となった<sup>1,2)</sup>。しかし、遺伝子解析は時間と労力を有する。そこで当教室ではモノクローナル抗体を利用したフローサイトメトリーによる簡易診断を開発し、XLAの患者・保因者診断に有用であることを報告した<sup>3)</sup>。フローサイトメトリーによる簡易診断と遺伝子解析によって当教室でこれまでに診断したわが国のXLAの臨床的特徴について明らかにすることを本研究の目的とする。

## B. 研究方法

1998年1月より2004年11月までの7年間に富山医科薬科大学小児科学教室においてフローサイトメトリーによる簡易診断または遺伝子解析によってXLAと確定診断された135例を対象として、主治医によって提供された臨床アンケートの記載を

もとに解析を行った。

(倫理面への配慮)

XLAにおける遺伝子解析研究は富山医科薬科大学の倫理委員会の承認済みであり、試料の提供にあたっては患者または代諾者より同意を得た。

## C. 研究結果

年次別にみたXLAの診断例を図1に示す。当教室においてXLAの診断を開始した1998年は49例と最多であり、1999年から2001年は年間20例前後の診断を行った。2002年以降も年間10例前後の診断を行っている。

臨床アンケートの記載をもとに推定された臨床的発症年齢を図2に示す。1歳未満が36例ともっ

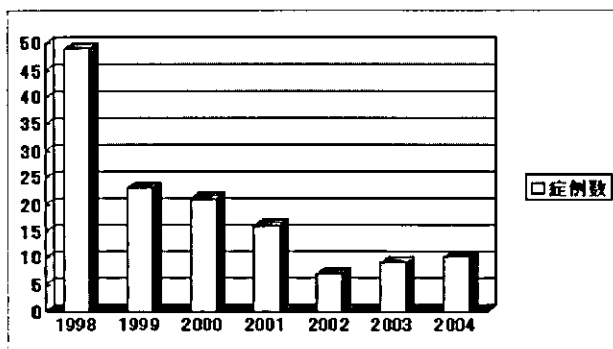


図1 年次別にみたXLAの診断数

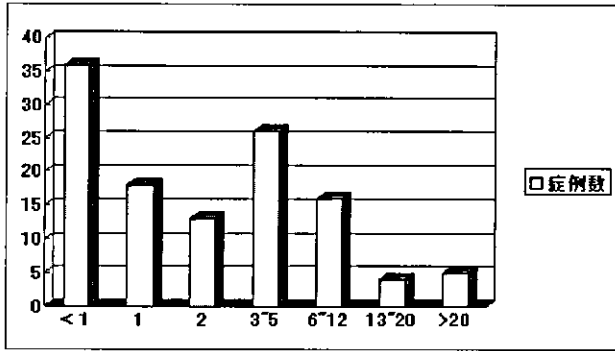


図2 推定される臨床的発症年齢

とも多かったが、3～5歳、6～12歳もそれぞれ26例、16例あり、乳幼児以降の発症例も相当数存在した。また思春期（13～20歳）、成人（20歳以降）に発症したと考えられる非典型例もそれぞれ4例、5例と少なからず存在した。

XLAの診断のきっかけとなる低ガンマグロブリン血症に気づかれた年齢を図3に示す。1歳未満、1歳、2歳はそれぞれ21例、19例、16例であり、3～5歳が33例と最多であり、6～12歳の25例がそれに続いた。また13～20歳、20歳以降によりやく低ガンマグロブリン血症に気づかれたXLAもそれぞれ4例、8例認められた。

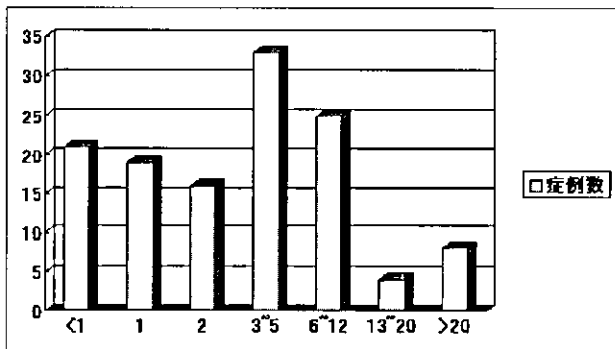


図3 低ガンマグロブリンに気づかれた年齢

当教室で簡易診断ならびに遺伝子解析によってXLAと確定診断した年齢を図4に示す。1歳未満、1歳、2歳の乳幼児期に確定診断した症例はそれぞれ8例、10例、6例とそれほど多くなかった。3～5歳、6～12歳、13～20歳に確定診断した例がそれぞれ25例、26例、24例であり、20歳以降に確定診断された例が31例も認められた。

低ガンマグロブリン血症に気づかれてから1年以内に当教室にてXLAと確定診断される症例の割合は131例中52例（40%）であった。これを診断年が1998～2000年の前期と2001～2004の後期に

分けてみると前期の89例中31例（35%）に比べて、後期では42例中21例（50%）と増加していた。

家族歴を有する症例は117家系中33家系（28%）であり、前期では77家系中24家系（31%）であったのに対して、後期では40家系中9家系（23%）と減少していた。

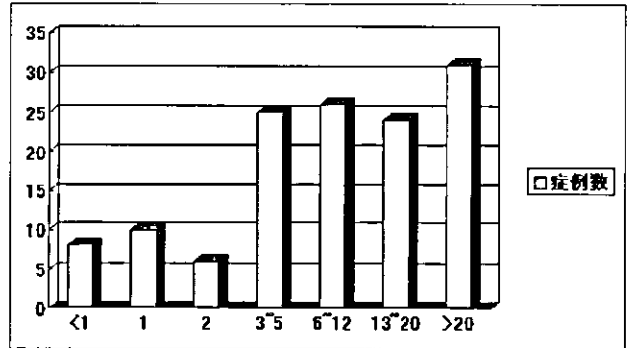


図4 当教室でXLAと確定診断した年齢

#### D. 考察

当教室の Futatani ら<sup>3)</sup>はモノクローナル抗体を利用したフローサイトメトリーによるXLAの簡易診断法を開発し、すでに遺伝子解析済みのXLA症例を中心に解析し、診断法の有用性を報告している。1998年以降この簡易診断法と遺伝子解析を組み合わせてこれまで全国のXLAの診断を行っている。当初の1998年は49例のXLAを診断し、1999年、2000年はそれぞれ23例、21例の診断を行った。1998～2000年の解析例についてはすでに報告<sup>4)</sup>しているが、それ以降も年間10例前後の診断を行っている。

XLAは一般に母親からの移行抗体が消失した6ヶ月頃より発症し、2歳くらいまでに発症するとされている。今回の検討では1歳未満での発症例が36例と最多であったが、2歳以下での発症例は67例と全体の57%に過ぎず、3歳以上での発症例もかなり多く、思春期以降、成人以降の発症例も稀ならず認められた。

XLAの臨床診断の端緒となるのは低ガンマグロブリン血症であるが、低ガンマグロブリン血症に気づかれた年齢は前述の発症年齢に比べて遅れており、2歳以前に低ガンマグロブリン血症に気づかれたのは126例中56例（44%）であり、3～5歳で低ガンマグロブリン血症に気づかれた例が



33例と最多であった。また成人になり、ようやく低ガンマグロブリン血症に気づかれた例も8例認められた。したがって臨床的発症から低ガンマグロブリン血症に気づかれるまで約2年を要していると思われる。

当教室にて最終的にXLAと確定診断された年齢は3歳以降が多く、成人になって始めて診断された例が最も多かった。XLAの臨床診断は家族歴があればそれほど難しくないが、家族歴がないだけで分類不能型免疫不全症と診断されていた症例について遺伝子解析を行ったところ、相当数でXLAと診断されたこともあり<sup>5)</sup>、正確な遺伝カウンセリングを行うためには是非遺伝子診断を行いたい。

低ガンマグロブリン血症と気づかれてから1年以内に当教室にてXLAと診断された症例の割合は前期の35%に比べて後期では50%と増しており、低ガンマグロブリン血症の患児をみた場合にXLAを疑い当教室に検査依頼を行っている主治医が増えていることを思わせる。

またXLAでは家族歴が重要であるが、欧米でも家族歴を有するのは約半数とされ、わが国では少子化を反映し、さらに少なく前期では約3割であった。家族歴がなくても、末梢血B細胞欠損の男児ではXLAを疑うべきと報告<sup>4)</sup>してきたが、後期では家族歴を有する症例は約2割とさらに孤発例が増加していた。

## E. 結 論

当教室でこの7年間にフローサイトメトリーによる簡易診断と遺伝子解析によってXLAと診断した症例についてまとめた。XLA患者はガンマグロブリン置換療法によって健常人と変わらない生活を送ることができるが、診断・治療の遅れはQOLの低下に繋がる。患者のQOL向上のためには早期診断により早期治療開始が重要である。早期診断のためには、易感染性を示す男児で、いかに早く低ガンマグロブリン血症の存在に気づいて、当教室に検査依頼を行うことが重要である。前期に比べると後期ではそのような事例が増えてきて

はいるが、さらなるQOLの向上のために全国の医師に対する啓蒙活動が今後も必要であろう。

## 参考文献

- 1) Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993; 72: 279-290.
- 2) Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinase. *Nature* 1993; 361: 226-234.
- 3) Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, et al. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood* 1998; 91: 595-602.
- 4) Kanegane H, Futatani T, Wang Y, et al. Clinical and mutational characteristics of X-linked agammaglobulinemia and its carrier identified by flow cytometric assessment combined with genetic analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 108: 1012-1020.
- 5) Kanegane H, Tsukada S, Iwata T, et al. Detection of Bruton's tyrosine kinase mutations in hypogammaglobulinemic males registered as common variable immunodeficiency (CVID) in the Japanese Immunodeficiency Registry. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 512-517.

## F. 研究発表

特になし。

## G. 知的所有権の取得状況

特になし。

# IgGサブクラス測定の臨床的必要性の検討

金 兼 弘 和 (富山医科薬科大学医学部小児科講師)  
種 市 尋 宙 (富山医科薬科大学医学部小児科)  
二 谷 武 (富山医科薬科大学医学部周産母子センター講師)  
宮 脇 利 男 (富山医科薬科大学医学部小児科教授)

## 【研究要旨】

易感染性を引き起こす病態としてIgGサブクラス欠損症が注目されている。そこで、本研究ではIgGサブクラス測定の臨床的必要性を知るために全国アンケート調査を行った。全国の3256施設にIgGサブクラス測定に関するアンケート用紙を郵送したところ、1291施設(40.1%)より回答が得られた。IgGサブクラス測定を行ったことがある施設は643(49.8%)であり、将来測定するかもしれないと考えている施設145を加えると、全体の61.0%であった。対象疾患は反復気道感染症が568例と最も多かったが、次いで重症細菌感染症179例、先天性免疫不全症139例、低ガンマグロブリン血症131例であった。測定の結果、IgGサブクラス欠損症が221例診断されていた。1062施設(95.2%)ではIgGサブクラス測定の健康保険適応を望んでいた。多くの施設で易感染性を有する小児の診断のために、個人あるいは病院負担でIgGサブクラスの測定を行っている実態が明らかとなった。

## A. 研究目的

ヒト免疫グロブリン(Ig)は5種類のクラス、IgG、IgA、IgM、IgD、IgEで構成され、生体防御に最も関与しているものはIgGである。さらにヒトIgGは、H鎖恒常領域(C<sub>H</sub>)の抗原性の違いにより、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4の4つのサブクラスに分類される。この抗原性の違いはC<sub>H</sub>部の一次構造、すなわちアミノ酸配列の違いによるが、サブクラス間では95%もの相同性を有する。しかし、このわずかなアミノ酸配列の違いにより、サブクラス間で物理化学的および生物学的性状が異なる。1970年に、易感染性を示す患者において選択的Ig欠損症が報告されて以来<sup>1)</sup>、IgGサブクラス欠損症の報告が相次いでなされている。易感染性を引き起こす病態として、X連鎖無ガンマグロブリン血症(XLA)や分類不能型免疫不全症(CVID)などの低ガンマグロブリン血症はもちろんであるが、IgGサブクラス欠損症も忘れてはならない。しかしIgGサブクラス測定は健康保険適応でないために、簡単に

測定することができず、その実態は明らかではない。そこで本研究ではIgGサブクラス測定 of 臨床的必要性を知るために全国アンケート調査を行った。

## B. 研究方法

全国の小児科を標榜している3256施設にIgGサブクラス測定およびIgGサブクラス測定およびIgGサブクラス欠損症に関するアンケート用紙を郵送した。

(倫理面への配慮)

今回の調査研究は無記名のアンケート調査であり、倫理面への配慮は特に必要としない。

## C. 研究結果

3256施設中、35施設(1.1%)はすでに小児科を標榜しておらず、対象となった3221施設中、1291施設から回答があり、回収率は40.1%であった。IgGサブクラス測定を行ったことがある施設は643施設(49.8%)であり、測定を行ったこ

とがない施設は503施設（39.0%）であった。一方、これまでに測定を行ったことはないが、将来測定するかもしれないと考えている施設は145施設（11.2%）あった。

対象疾患は中耳炎（312例）や肺炎（305例）などの反復気道感染症が568例と最も多かった（表1）。次いで髄膜炎（79例）、肺炎（78例）などの重症細菌感染症が179例、先天性免疫不全症の疑いが139例、低ガンマグロブリン血症が131例であった。

表1 IgGサブクラス測定の対象疾患（複数回答あり）

症例数		症例数	
A)反復気道感染症	568	E)その他	
中耳炎	312	喘息	10
副鼻腔炎	91	反復感染・不明熱	7
扁桃炎	111	てんかん・抗痙攣薬の副作用	6
肺炎	305	アレルギー疾患	4
気管支拡張症	34	皮膚膿瘍	4
頸部リンパ節炎	1	アトピー	3
上気道炎	1	腎炎	3
		IgA欠損症	2
B)重症細菌感染症	179	AIDS	1
髄膜炎	79	Periodic fever	1
敗血症	48	化膿性耳下腺炎	1
肺炎	78	ダウン症	1
腎盂炎	6	高ガンマグロブリン血症	1
関節炎	4	脊髄硬膜外膿瘍	1
		川崎病頻回発症	1
C)低ガンマグロブリン血症	131	慢性活動性EBウイルス感染症	1
		白血球数の高値	1
D)先天性免疫不全症の疑い	139	兄がIgGサブクラス欠損症	1
		AML骨髄移植後の見の予防接種前検査	1
		薬剤性低ガンマグロブリン血症疑い	1

IgG サブクラス測定の結果、特に異常なしが、473例と最多であった（表2）。しかしIgG サブクラス欠損症が221例も診断されていた。

測定施設としては受託検査（99例）、大学研究室（24例）、旧ミドリ十字などの製薬会社への依頼（81例）なども少数あったが、537例（70.8%）がSRLやBMLなどの外注検査でIgG サブクラス測定を行っていた。

IgG サブクラス測定検査の費用負担はさまざまであり、患者個人負担が176件、病院負担が266件、大学校費が37件、研究費が113件、その他としてメーカー等のサービスが102件であった。

Ig サブクラス測定検査の健康保険収載については、1062施設（95.2%）で健康保険適応を望ん

表2 最終診断（複数回答あり）

	症例数
A) 特に異常なし	473
B) IgG サブクラス欠損症	221
C) X連鎖無ガンマグロブリン血症	18
D) 重症複合免疫不全症	9
E) 高IgM症候群	9
F) CVID	40
G) Ataxia telangiectasia	4
H) Wiskott-Aldrich 症候群	1
I) 乳児一過性低ガンマグロブリン血症	93
J) その他	
IgG サブクラス低下症	13
IgA 欠損症	5
食物アレルギー	3
AIDS	2
肺炎球菌特異 IgG2欠損症	2
高IgD血症	1
低補体血症 (C1q)	1
骨髄異形成症候群	1
良性好中球減少症	1
Immotile cilia syndrome 疑い	1
Periodic fever syndrome 疑い	1
慢性粘膜炎カンジダ症	1
慢性活動性EBウイルス感染症疑い	1
染色体異常に伴う異常高IgA血症	1
複合型免疫不全症	1
低ガンマグロブリン血症女児	1
IgE欠損、IgA欠損	1

でいた。その理由としては感染を反復する患者の診断に有用である（888施設）、IgG サブクラス欠損症の診断に必須である（776施設）、乳幼児ではIgG サブクラス低下状態があり感染のモニタリングに有用である（267施設）、ある種の先天性免疫不全症の診断の決め手となる（387施設）、他の免疫疾患の診断の助けとなる（242施設）と種々の理由で健康保険収載を希望していた。

#### D. 考 察

今回のアンケート調査は1291施設から回収され、回収率も40.1%と良好であり、本調査に対する小児科医の関心の高さを反映しているものと思われる。

IgG サブクラス測定を行ったことがある施設は全体の49.8%と半数近くであり、将来測定するかもしれないと考えている施設も11.2%あり、全体の61.0%がIgG サブクラス測定に強い関心を持っていることが明らかである。

中耳炎や肺炎などの気道感染症を反復する小児でIgGサブクラス欠損症を疑って、積極的にIgGサブクラス測定を行っていることが判明した。また髄膜炎などの重症細菌感染症や、先天性免疫不全症を疑った場合にもIgGサブクラス測定を行っている。Grossら<sup>2)</sup>は反復気道感染症の小児267例中の6例で-2SD以下のIgG2低下を認め、石坂ら<sup>3)</sup>も気道の易感染性を示した小児100例中4例でIgG2欠乏症を見出している。したがって、反復する中耳炎、気管支炎、肺炎ではIgGサブクラス欠損症を疑い、IgGサブクラス測定が望ましいと思われる。

反復気道感染症を認め、IgGサブクラス測定を行ったものの、特に異常なしが473例であり、IgGサブクラス欠損症と診断されたのは221例であった。この数字は厚生労働省の原発性免疫不全症候群登録例(2004年1月28日現在)におけるXLA(131例)やCVID(167例)の登録数よりも多く、IgGサブクラス欠損症患者が意外に多く存在していることをうかがわせる。しかしこれまでわが国において遺伝子レベルでIgGサブクラス欠損症と確定診断された症例は膜型IgG2のホモ接合体変異によるIgG2欠損症の兄弟例<sup>4)</sup>、IgG2-IgG4-IgA欠損症<sup>5)</sup>、選択的IgG1欠損症<sup>6)</sup>の3家系のみである。

IgGサブクラスの測定施設としては70.8%がSRLやBMLなどのコマーシャル・ラボを利用していた。現在、製薬会社への依頼は中止されており、今後はコマーシャル・ラボへの依存度が益々高くなると思われ、精度管理の向上が望まれる。

IgGサブクラス測定検査はこのように多くの小児科医が関心を持ち、測定を行っているが、検査に健康保険適応がなく、患者個人負担、病院負担、大学校費、研究費、メーカーのサービス等などのさまざまな費用負担で行われていた。そのため95.2%の施設ではIgGサブクラス測定検査の健康保険適応を望んでいた。

## E. 結 論

以上、今回のアンケート調査の結果をまとめた。IgGサブクラス測定は現在健康保険適応となっ

ていないが、多くの施設で反復気道感染症を有する小児におけるIgGサブクラス欠損症の鑑別診断のために、患者個人あるいは施設負担などで測定を行っている実態が明らかとなった。今後は、全国レベルでのIgGサブクラス測定方法の統一ならびに信頼しうる健康小児の正常値を作成することが必要と思われる。またIgGサブクラス欠損症の病態や予後を調査し、診断ならびに治療指針を作成することも必要と思われる。最後に、IgGサブクラス測定は多くの小児科医が健康保険収載を望んでおり、近い将来、実現されることを望みたい。

## 参考文献

- 1) Schur PH, Borel H, Gelfand EW, et al. Selective gamma-G globulin deficiencies in patients with recurrent pyogenic infections. *N Engl J Med* 1970; 283: 631-634.
- 2) Gross S, Blaiss MS, Herrod HG. Role of immunoglobulin subclasses and specific antibody determinations in the evaluation of recurrent infection in children. *J Pediatr* 1992; 121: 516-522.
- 3) 石坂明人、小島公一、富沢一浩、他。IgG2欠乏症4例の臨床的観察。日児誌 1991; 95: 1168-1174.
- 4) Tashita H, Fukao T, Kaneko H, et al. Molecular basis of selective IgG2 deficiency: The mutated membrane-bound form of  $\gamma$  2 heavy chain caused complete IgG2 deficiency in two Japanese siblings. *J Clin Invest* 1998; 101: 677-681.
- 5) Terada T, Kaneko H, Li AL, et al. Analysis of Ig 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.
- 6) 金子英雄、浅野勉、深尾敏幸、他。IgG subclass 欠損症における定常部領域の遺伝子欠失(抄録)。日児誌 2004; 108: 172.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 金兼弘和、種市尋宙、二谷武、他。IgGサブクラス測定 of 臨床的必要性の検討。日児誌 2005,109:16-21

### 2. 学会発表

- 1) 金兼弘和、二谷武、宮脇利男。IgGサブク

ラス測定 of 臨床的ニード：アンケート調査による検討。第107回日本小児科学会学術集会、平成16年4月、岡山。

- 2) 野村恵子、金兼弘和、二谷武、他。IgGサブクラス測定 of 臨床的ニードとIgGサブクラス欠損症の実態。第36回日本小児感染症学会、平成16年11月、東京。

# CD3 delta 欠損による重症複合免疫不全症

高 田 英 俊 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学講師)

野 村 明 彦 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学助手)

原 寿 郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学教授)

## 【研究要旨】

重症複合免疫不全症の原因として新たに CD3 delta 欠損症が報告された。我々は、重症複合免疫不全症の姉弟に関して、*CD3 delta* 遺伝子異常の有無について患者末梢血を用いて検討した。

患者末梢血リンパ球を解析したところ、いずれの患者においても T 細胞の欠損を認めたが、B 細胞や NK 細胞は正常に認められた (T-B+NK+ SCID)。*CD3 delta* 遺伝子を解析したところ、intron 2 に homozygous な遺伝子変異を認め、その結果、膜貫通領域、一部の細胞外領域と細胞内領域に相当する exon 3 が splice out された mRNA のみが発現し、正常な mRNA は発現していなかった。これらの結果より、この姉弟は CD3 delta 欠損症であると診断した。両親には同部位の heterozygous な遺伝子異常を認めた。

この疾患では、他の重症複合免疫不全症と異なり、胸腺が正常の大きさで存在することが特徴であるとされている。しかし、今回 2 人の患者では、縮小した胸腺が胸部単純 X 線および胸部 CT にて確認された。T-B+NK+ SCID では、胸腺の大きさに関わらず CD3 delta の検索が必要であると考えられた。

## A. 研究目的

重症複合免疫不全症は乳児期早期から易感染性を呈し、造血幹細胞移植や遺伝子治療が行われなければ乳児期に死亡する予後不良な疾患である。この疾患は common  $\gamma$  鎖欠損症、ADA 欠損症等、原因が明らかとなったものが多いが、未だに原因が不明であるものも存在する<sup>1,2)</sup>。新たな重症複合免疫不全症の原因として、CD3 delta 欠損症が報告された<sup>3)</sup>。この疾患では末梢血 T 細胞の欠損が見られるが、B 細胞や NK 細胞は正常に存在している (T-B+NK+SCID)。また胸腺が正常の大きさと認められる点は、他の重症複合免疫不全症ではみられない特徴である。我々は、T-B+NK+SCID を呈した姉弟がこの疾患である可能性を考慮し、CD3 delta 欠損の有無につき検討した。

## B. 研究方法

患者末梢血から DNA を抽出し *CD3 delta* 遺伝子の各 exon 及びその近傍を PCR 法にて増幅し、

塩基配列を決定した。また *CD3 delta* 遺伝子の splicing 異常を検討するために、患者末梢血単核球から cDNA を抽出し exon 2 から exon 5 にかけて増幅し splicing 異常の有無を検討した。コントロールとして、健常成人末梢血単核球、および正常臍帯血から Microbeads やセルソーターを用いて純化した NK 細胞より cDNA を抽出して用いた。

## C. 研究結果

### 1. 患者の病歴

姉 (第一子、患者 1) : 生後 3 ヶ月時に重症複合免疫不全症、サイトメガロウイルス肺炎にて当科に入院した。造血幹細胞移植を行ったが、全身のサイトメガロウイルス感染にて死亡した。

弟 (第二子、患者 2) : 在胎 38 週 2 日、選択的帝王切開術にて出生。出生後から無菌的に管理。出生時、フローサイトメータによる解析にて T 細胞の欠損を認め、重症複合免疫不全症と診断。生

後30日目に臍帯血移植を施行した。GVHDの合併があったが、経過は順調。両親は血族結婚ではない。

## 2. 臨床検査成績

患者の臨床検査成績を表1に示す。T-B+NK+SCIDであり、PHAに対する反応は著しく低下していたが、NK活性は正常に認められた。T-B+NK+SCIDの原因としてIL-7R  $\alpha$  の欠損症が知られているため<sup>4)</sup>、IL-7R  $\alpha$  遺伝子を検討したが、異常は認められなかった。

表1 重症複合免疫不全症患者の入院時検査結果

	患者1(3ヶ月)	患者2(0日)
WBC	3,610 / $\mu$ l	11,720 / $\mu$ l
Neut	74%	82.5%
Lym	21%	8.5%
Hb	10.1 g / dl	16.9 g / dl
Plt	$21.8 \times 10^4$ / $\mu$ l	$22.2 \times 10^4$ / $\mu$ l
IgG	936 mg/dl	772 mg/dl
IgA	< 20 mg/dl	< 5 mg/dl
IgM	< 30 mg/dl	10 mg/dl
CD 3	1.7%	0.17%
CD 19	67.6%	39.1%
CD 16 / 56	23.5%	33.5%
NK 活性 (20.8-40.8%)	52.0%	26.0%
PHA	1,669 CPM (24,000-53,000)	101 S.I.(%) (238-388)
ADA	正常	正常
IL-7R $\alpha$ 鎖遺伝子	異常なし	異常なし

## 3. CD3 delta 遺伝子の解析結果

近年、T-B+NK+SCIDの原因として、新たにCD3 delta 欠損症が報告された<sup>3)</sup>。そこでこの2人の患者について、CD3 delta 欠損の有無を検討した。患者末梢血からDNAを抽出し、CD3 delta 遺伝子の各 exon およびその近傍の intron をPCR法にて増幅し、塩基配列を決定した。その結果、intron 2 の splicing acceptor site に、AからGへ

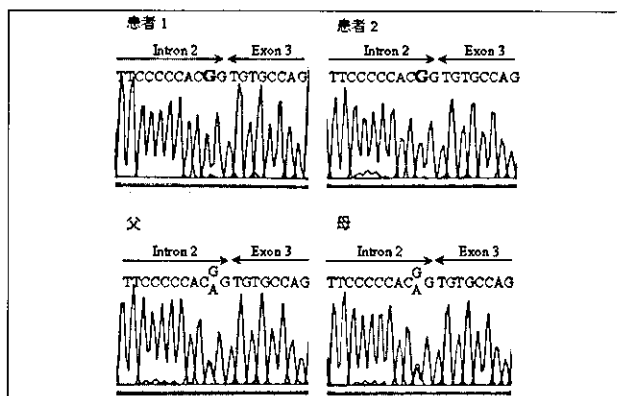


図1 重症複合免疫不全症患者における CD3 delta 遺伝子異常。患者末梢血からDNAを抽出し、各 exon およびその近傍をPCR法にて増幅後、塩基配列を決定した。重症複合免疫不全症患者では intron 2 の splicing acceptor site にAからGへの homozygous な遺伝子変異を認めた。両親はこの遺伝子変異の heterozygote であった。

の homozygous な塩基置換が認められた (図1)。両親はこの heterozygote であった (図1)。

これらの結果より、CD3 delta の splicing 異常が生じると考えられ、以下のように検討した。臍帯血や胎児のNK細胞はCD3 delta 遺伝子を発現していることが知られている<sup>5)</sup>。患者末梢血にはT細胞が存在しないがNK細胞は正常に認められるので、臍帯血や出生後早期の患者末梢血単核球を用いて、splicing 異常の有無を検討した。CD3 delta 遺伝子の exon 2 と exon 5 内にPCR primer を設定し (図3)、PCRにて増幅した。その結果、純化した臍帯血NK細胞や成人健常者末梢血単核球には、3つの異なる PCR product が認められた (図2上段、lane 1-2、5-6)。それぞれの塩基配列を決定した結果、410 bp の正常 splicing のもの、278 bp の exon 3 が splicing 異常により skip したもの、およびその二つが結合したもの (dimer) であることがわかった (図2下段)。従ってCD3 delta の splicing において、exon 3 の skip は正常でもわずかに起こっているものと考えられた。2人の患者では正常 splicing のもの (410 bp) は認められず、exon 3 が skip したものしか認められなかった (図2上段、lane 3-4)。これらの結果から、この重症複合免疫不全症患者では、CD3 delta 遺伝子変異により正常に splicing した CD3 delta 分子は発現しないことが確認された。

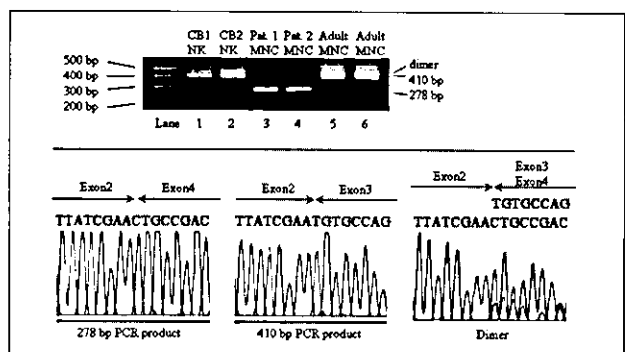


図2 重症複合免疫不全症患者における CD3 delta 遺伝子の splicing 異常。

健常人臍帯血 (CB) からNK細胞を Microbeads (lane 1) あるいはセルソーター (lane 2) で純化したもの (それぞれ97%以上、99%以上の purity)、患者末梢血単核球 (lane 3: 患者1、lane 4: 患者2)、健常人末梢血単核球 (lane 5-6) よりcDNAを抽出し、CD3 delta の exon 2 と exon 5 内に設定したPCR primer (図3) を用いて増幅した。臍帯血NK細胞および健常人末梢血単核球では3つのPCR product が検出され、それぞれの塩基配列を決定した結果、これらは410 bpの正常 splicing のもの (下段中央)、exon 3 が skip した278bpのもの (下段左)、およびそのふたつが結合したもの (dimer、下段右) であった。患者末梢血では、exon 3 が skip したのもののみが認められ、正常 splicing のものは認められなかった。

CD3 delta 遺伝子の exon 3は膜貫通領域と一部の細胞外領域、細胞内領域を code している (図3)。従って exon 3を欠損した CD3 delta 分子は、細胞表面に発現せず、この分子が実質上欠損していることが確認された。

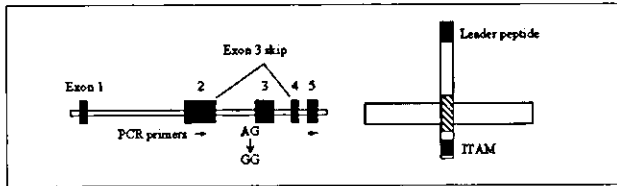


図3 重症複合免疫不全症患者みられた CD3 delta 遺伝子の splicing 異常。

重症複合免疫不全症患者ではintron 2の遺伝子変異により、exon 3をskipしたmRNAのみが生じていた(図左)。CD3 delta 遺伝子の exon 3は、膜貫通領域および一部の細胞外、細胞内領域に相当するため(図右斜線部)、正常の CD3 delta は発現しない。

#### 4. 胸腺に関する検討

Dadi ら<sup>3)</sup>は、患者の胸腺は正常の大きさで存在すると報告している。この重症複合免疫不全症の2人の患者を検討したところ、胸部単純撮影および胸部CT検査にて、患者1の胸腺はほとんど検出できず、患者2の胸腺は正常と比較して著しく縮小していた(図4)。患者1には重症のサイトメガロウイルス感染症が認められたため、その影響によってある程度胸腺が萎縮している可能性も考えられるが、患者2の場合、移植前の評価であり、感染や薬剤の影響も考えられない。

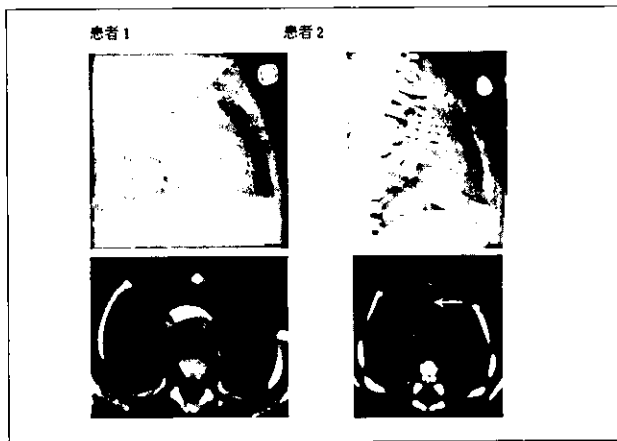


図4 重症複合免疫不全症患者の胸腺

重症複合免疫不全症患者の胸部単純X線像(上段)と胸部CT像(下段)により胸腺を確認した。患者1では胸腺はほとんど検出できなかった。患者2では著しく縮小した胸腺を認めた(矢印)。

#### D. 考 察

重症複合免疫不全症は種々の遺伝子異常によって生じる。CD3 delta 欠損症は Dadi ら<sup>3)</sup>により2003年に初めて報告された。これまでに北米とヨー

ロッパの4家系しか報告されておらず、米国で検討された結果では CD3 delta 欠損症は極めて稀であると考えられ、Buckley らは重症複合免疫不全症患者174例中1例にしか見られなかったと報告している<sup>2,6)</sup>。CD3 delta 欠損マウスでは、TCR  $\alpha\beta$ 型T細胞が欠損しているが、TCR  $\gamma\delta$ 型T細胞は末梢に存在すると報告されている<sup>7)</sup>。マウスとヒトで CD3 delta 欠損によるT細胞の分化への影響が異なっている点は興味深い、その理由は明らかではない。

CD3複合体を形成する分子の中で、CD3 gamma 及びCD3 epsilon の欠損では軽症のT細胞不全が生じると考えられていた。しかし最近、CD3 epsilon 完全欠損では重症複合免疫不全症を発症することが明らかとなり、CD3 delta 欠損に類似している<sup>6)</sup>。

図5にこれまでに報告された CD3 delta 欠損症の遺伝子変異部位を示しているが、今回の症例に見られた遺伝子変異は報告されていないものである。今回検討した患者の両親に同じ heterozygous な mutation を認めたが、近縁結婚ではなかった。この遺伝子変異は日本人に頻度が高い可能性も考えられる。また、CD3 delta 欠損症では、胸腺が縮小している例もあることから、原因不明のT-B+ $\text{NK}$ +SCIDでは、胸腺の大きさにかかわらず CD3 delta 欠損症の可能性を考慮する必要があると考えられた。

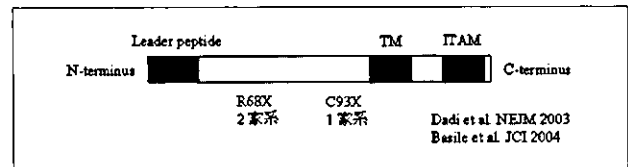


図5 これまで報告されているCD3 delta欠損症の遺伝子異常部位。これまで4家系のCD3 delta欠損症が報告されている。そのうち3家系の遺伝子異常部位を示す。(他の1家系は遺伝子異常部位が記載されていない。)

#### E. 結 論

T-B+ $\text{NK}$ +SCIDの姉弟例に関して、CD3 delta 遺伝子の異常を検討した。これらの患者では intron 2 の splicing acceptor site に遺伝子変異を認め、これによって CD3 delta 遺伝子の splicing 異常が生じていた。患者胸腺は著しく縮小しており、胸腺の縮小の有無に関わらず、T-



B+NK+ SCID患者ではCD3 delta の検索が必要であると考えられた。

#### 参考文献

- 1) Fischer A. Have you seen the last variant of severe combined immunodeficiency? *N Engl J Med* 2003;349:1789-1792.
- 2) Buckley RH. The multiple causes of human SCID. *J Clin Invest* 2004;114:1409-1411.
- 3) Dadi HK, Simon Aj, Roifman CM. Effect of CD3  $\delta$  deficiency on maturation of  $\alpha/\beta$  and  $\gamma/\delta$  T-cell lineages in severe combined immunodeficiency. *New Engl J Med* 2003;349:1821-1828.
- 4) Puel A, Ziegler SF, Buckley RH, Leonard W. Defective IL7R expression in T-B+NK+severe combined immunodeficiency. *Nature Genet* 1998;20:394-397.
- 5) Phillips JH, Hori T, Nagler A, Bhat N, Spits H, Lanier LL. Ontogeny of human natural killer (NK) cells: Fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3  $\epsilon$ ,  $\delta$  proteins. *J Exp Med* 1992;175:1055-1066.
- 6) de Saint Basile G, Geissmann F, Flori E, Uring-Lambert B, Soudais C, Cavazzana-Calvo M, Durandy A, Jabado N, Fischer A, Le Deist F. Severe combined immunodeficiency caused by deficiency in either the delta or the epsilon subunit of CD3. *J Clin Invest* 2004;114:1512-1517.
- 7) Dave VP, Cao Z, Browne C, Alarcon B, Fernandez-Miguel G, Lafaille J, de la Hera A, Tonegawa S, Kappes DJ. CD3  $\delta$  deficiency arrests development of the  $\alpha\beta$  but not the  $\gamma\delta$  T cell lineage. *EMBO J* 1997;16:1360-1370.

# 非血縁臍帯血造血幹細胞移植を行った Janus kinase 3(JAK3)異常を呈する重症複合免疫不全症の一例

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】

Janus kinase 3 (JAK3) 異常を呈する重症複合免疫不全症 (SCID) の7ヶ月女児にHLA一座位不一致非血縁臍帯血造血幹細胞移植 (CBSCT) を行った。前処置は行わず、移植片対宿主病 (GVHD) 予防には短期メソトレキサート (sMTX) とFK506を用いた。移植後 Day13には末梢血CD3陽性細胞の出現とPHA, ConAに対するリンパ球芽球化反応を認め、Day150にはCD3陽性細胞数 $1000/\mu\text{l}$ となりPHA, ConAに対する反応も正常化し、細胞性免疫能の改善をみた。経過中急性、慢性GVHDは認められなかった。臍帯血バンクドナーを用いたCBSCTはHLA一致血縁ドナーが得られない症例において短期間にドナーが得られることやドナーの負担がないこと、成人血と異なりHLA不適合移植においても比較的GVH反応が弱いことや潜伏ウイルス感染のリスクがほとんどないことなどから今後SCIDの根治療法の有望な選択肢の一つになり得ると考えられた。

本患者のJAK3異常は757T>CによるL221Pのホモ接合性ミスセンス変異であった。この変異はこれまで報告されていない新たな変異であった。EBウイルス形質転換細胞株と末梢血B細胞を用いてウェスタンブロットおよびフローサイトメーター (FCM) によるJAK3蛋白の発現と機能解析を行ったところ、本症例では異常蛋白の産生は認められるが、変異部位が $\gamma^c$ 鎖との会合およびkinase活性の制御に関与するN末端FERMドメイン内に存在するため、JAK3と $\gamma^c$ 鎖との会合が出来なくなりJAK3を介した細胞内シグナル伝達不全が生じることが示唆された。JAK3異常が示唆されるSCIDにおいて患者末梢血B細胞とFCMを用いたJAK3蛋白の発現ならびに機能解析を行うことでJAK3異常の簡易診断が可能となった。

## A. 研究目的

重症複合免疫不全症 (SCID) は先天的に細胞性、液性免疫能ともに重篤に障害されているため、造血幹細胞移植などによる免疫学的再建が成功しない限り感染症により二歳頃までに亡くなってしまいう予後不良の疾患であり、小児救急疾患として診断後速やかに根治療法を行う必要がある。現在のところSCIDにおける根治療法としてはHLA一致同胞ドナーからの骨髓移植が第一選択となるが、同胞ドナーが得られない場合これまでは両親からのT細胞除去HLAハプロ一致骨髓移植やCD34陽性選択による骨髓または末梢血造血幹細胞移植がおもに行われてきた。しかし、これらの方法は移

植片を得るための手技が煩雑であったり、生着不全や生着までに時間を要するなどの欠点もあるため、今回我々はJAK3異常を呈するSCID患者に臍帯血バンクドナーからの非血縁臍帯血造血幹細胞移植を行いその有用性につき検討した。また、これまでJAK3異常の解析には遺伝子診断が行われてきたが結果を得るまでに時間を要することから、患者末梢血B細胞を用いることでJAK3蛋白発現の有無と機能異常についてフローサイトメーターによる簡易診断が可能かどうかにつき検討した。

## B. 研究方法

### 1. 症 例

症例は5ヶ月女児。両親は血族結婚であった。生後4ヶ月より咳嗽出現、徐々に悪化。

発熱、喘鳴は認めなかったが、多呼吸、哺乳量減少、体重減少、下痢を認めたため生後5ヶ月時近医受診、間質性肺炎が疑われ入院となった。検査結果より重症複合免疫不全症 (SCID) を疑い、精査ならびに造血幹細胞移植目的にて当科入院となった。当科入院時、体重5900 g (-1.3SD)、近医での治療により多呼吸、哺乳力低下および全身状態は軽快していた。肝臓、脾臓、全身リンパ節は触知せず、口蓋扁桃も認めなかった。近医入院時の血清ガンマグロブリン値はIgG 31mg/dl、IgA 2 mg/dl以下、IgM 21mg/dlと低ガンマグロブリン血症を認めた。白血球数は $5600/\mu\text{l}$ 、リンパ球 $1960/\mu\text{l}$ 、当科入院時の免疫学的検査において末梢血リンパ球サブセットは $\text{CD3}^+1.8\%$ 、 $\text{CD4}^+0.4\%$ 、 $\text{CD8}^+1.5\%$ 、 $\text{CD56}^+0.15\%$ 、 $\text{CD20}^+95.4\%$ 、 $\text{CD20}^+132^+/\text{CD20}^+95.5\%$ 、PHA, ConA, PWMに対するリンパ球芽球化能はおのおの268cpm (stimulation index (S.I.) 1.1), 276cpm (S.I. 1.1), 332cpm (S.I. 1.4) と極めて低反応であったが、Staphylococcus aureus Cowan I (SAC) 刺激では4570cpm (S.I. 18.8) と有意に反応した。*In vitro* 免疫グロブリン産生能、NK細胞活性は著減していた。ADA活性は正常であった。これらの結果および遺伝子検査の結果 (後述) より本症例をJAK3異常によるSCIDと診断した。造血幹細胞移植による根治療法を目的としてHLA一致血縁ドナーの検索を行ったが見つからず、臍帯血バンクより非血縁一座ミスマッチの臍帯血を用いて造血幹細胞移植を行った。患者とドナーの性別、血型はどちらも女性でO型Rh(+). HLAは患者ではA24,1 B62,54 DR4 (0403, 0405)、ドナーはA 24,26 B 62,54 DR 4 (0403, 0405)であった。前処置は行わず、GVHD予防には短期メソトレキセートとFK506を用いた。輸注総細胞数は $10.9 \times 10^7/\text{kg}$ 、CD34陽性細胞数は $10.9 \times 10^5/\text{kg}$ であった。

### 2. EBウイルス形質転換B細胞株の作製

移植前の患者、家族および健康成人の末梢血よ

りEBウイルス形質転換B細胞株 (EBLCL) を作製した。

### 3. JAK3塩基配列の決定

作製したEBLCLと末梢血白血球からTRIzol (Invitrogen) を用いて total RNAと genomic DNAをそれぞれ単離し、RT-PCRとPCRを行い得られた産物のダイレクトシーケンス (Big Dye terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) を行いABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

### 4. JAK3, STAT5, リン酸化STAT5(pSTAT5) 蛋白の解析

Mammalian Cell Lysis Kit (Sigma) を用いてEBLCLから蛋白を抽出し、ウサギポリクローナル抗ヒトJAK3抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、マウスモノクローナル抗STAT5抗体 (B&D Biosciences)、ECL Plus (Amersham Biosciences) を用いてウエスタンブロットを行った。免疫沈降はImmunoprecipitation Kit (Roche) とヤギポリクローナル抗ヒト $\gamma\text{c}$ 鎖抗体 (R&D systems) を用い、検出にはウサギポリクローナル抗ヒトJAK3抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、ECL Plusを用いてウエスタンブロットを行った。

フローサイトメーター (FACScan) による末梢血単核球 (PBMNC) およびEBLCLにおける細胞質内JAK3, STAT5の検出には Fix & Perm Kit (Caltag Laboratories) と1次抗体としてウサギポリクローナル抗ヒトJAK3抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、マウスモノクローナル抗STAT5抗体 (BD Biosciences)、2次抗体としておのおのFITC標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (Caltag Laboratories) とFITC標識ウマ抗マウスIgG抗体 (Vector Laboratories) を用いた。pSTAT5の検出にはIL-2 (1000U/ml) にて刺激したEBLCL またはSAC+IL-2にて刺激したPBMNC とPE標識マウスモノクローナル抗phospho-STAT5抗体 (B&D Biosciences) を用いた。

(倫理面への配慮)

これらの研究は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て、患者の両親へ書面による説明と同意を得て行われた。

### C. 研究結果

移植後の経過を図1に示す。Day13には末梢血CD3陽性細胞が6.8% (150/ $\mu$ l) 出現し、PHA, ConAに対するリンパ球芽球化能もおおの7350 cpm (S.I. 25.7), 4366cpm (S.I. 15.2) と反応を認めた。しかし、その後はCD3陽性細胞の増加やPHA, ConAに対するリンパ球芽球化能の改善を認めないため、Day 63よりFK506を中止したところDay75よりリンパ球芽球化能の改善が認められ、Day110よりCD3陽性細胞数も増加し始め、Day150にはCD3陽性細胞数950/ $\mu$ l となりPHA, ConAに対する反応も正常化し、細胞性免疫能の改善をみた。Day210でのキメリズム解析ではCD3陽性細胞 (purity99.6%) では95%以上がドナータイプで、CD19陽性細胞 (purity65%) では44%がドナータイプであった。しかし、血清IgG値の増加はなく、*in vitro* IgG産生も認められず(データ未提示)、ガンマグロブリン補充療法は継続中である。NK細胞はDay210において1.5% (50/ $\mu$ l) と低値ではあるが出現が認められるようになった。経過中急性、慢性GVHDは認められなかった。

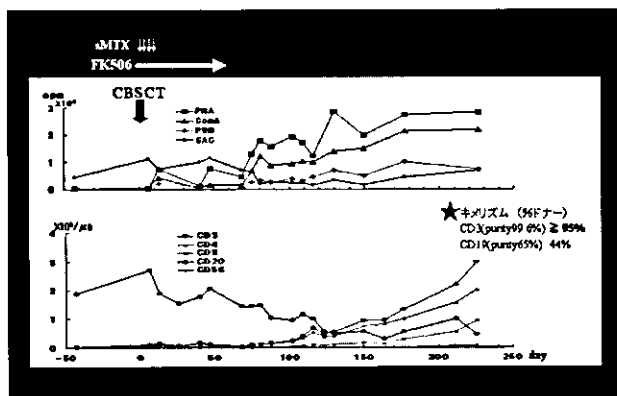


図1 移植後の経過

本患者におけるJAK3の遺伝子解析では、エクソン5の757番目のTがCへのホモ接合性変異であり、221番目のアミノ酸ロイシンのプロリンへの置換 (L221P) を生じるミスセンス変異と考えられた。両親は二人とも同部位のヘテロ接合体であった (図2 A)。健康成人50人で同部位の変異につき検討したが見出せず、この変異は遺伝子多型ではないと考えられた。L221P変異は $\gamma$ c鎖との会合およびkinase活性の制御に関与するN末端FE

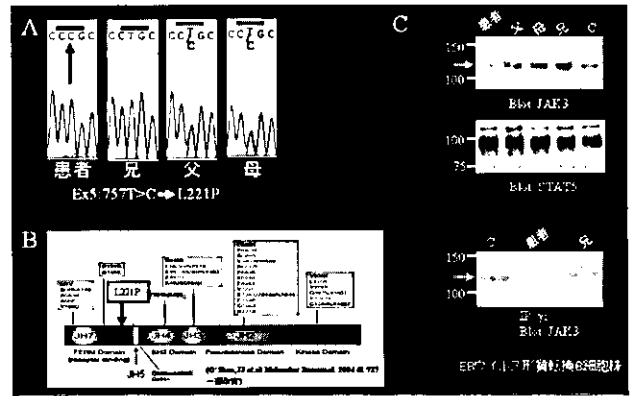


図2 患者におけるJAK3異常の解析

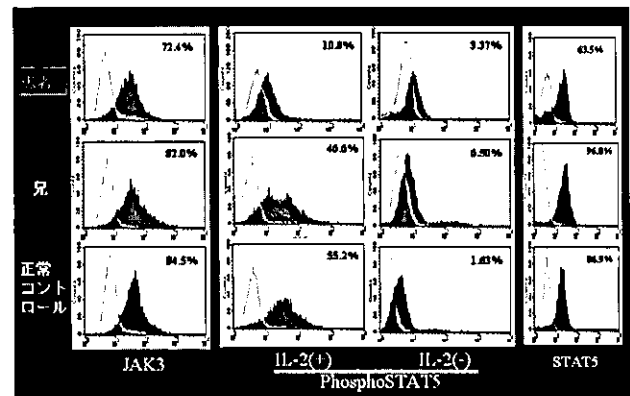


図3 EBウイルス形質転換B細胞株におけるJAK3の発現およびIL-2刺激によるSTAT5のリン酸化

RMドメイン内に存在した (図2 B)。EBLCLを用いた変異蛋白の検討ではウェスタンブロットで患者、正常コントロールともJAK3蛋白の発現を認めたが、抗 $\gamma$ c鎖抗体を用いた免疫沈降では患者においてのみJAK3蛋白の共沈は認められなかった (図2 C)。次にフローサイトメーター (FCM) を用いてEBLCLでのJAK3蛋白の発現ならびに機能解析を行った。患者、正常コントロールともJAK3およびSTAT5蛋白の発現は認められたが、IL-2刺激にてJAK3によりリン酸化されるSTAT5のリン酸化が患者では著減していた (図3)。JAK3異常のSCIDでは末梢血中にB細胞が認められるため、EBLCLでの解析と同様に移植前の患者B細胞とFCMを用いてJAK3異常の解析を行なうことで簡易診断が可能かどうかを検討した。図4に示すようにCD19陽性分画における患者JAK3の発現はコントロールと同程度認められた。しかし、EBLCLと異なりIL-2単独刺激ではコントロールCD19陽性分画におけるSTAT5のリン酸化は認められなかった (データ未提示)。このため