

IL-2とSACにより刺激したところコントロールにおけるリン酸化STAT5は10.3%であったが、患者では1.2%と差が認められた。

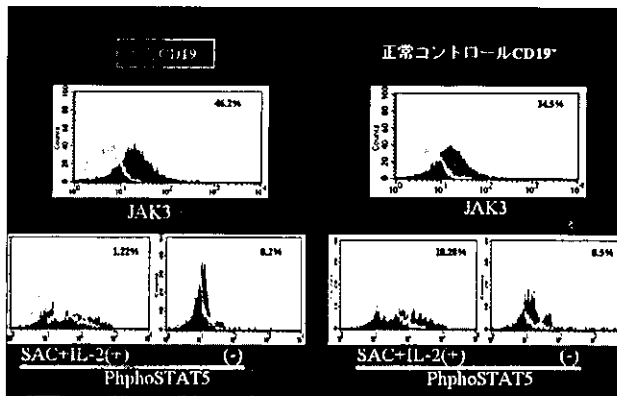


図4 末梢血単核球CD19⁺分画におけるJAK3蛋白の発現とSAC+IL-2刺激によるSTAT5のリン酸化

D. 考 察

今回の症例ではHLA一致血縁ドナーが存在しなかったため、前処置なしの臍帯血バンクドナーを用いた非血縁臍帯血造血幹細胞移植（CBSCT）を選択した。臍帯血移植の欠点として生着までに時間を要したり、生着不全が多いことが挙げられているが、今回の症例では速やかなT細胞の生着が認められ、急性、慢性GVHDや移植後の潜伏ウイルス感染症罹患なども認められなかった。本症例より以前に我々は2例のSCIDに対してCBSCT（前処置なし1例、骨髄非破壊的前処置あり1例）を行ったが2例ともドナーT細胞の速やかな生着を認めている（未発表データ）。また、これまでSCIDでの臍帯血移植において生着不全による再移植の報告例は調べた限りでは認められなかったことなどから、今後症例の集積が必要ではあるが、SCIDにおける臍帯血移植では前処置の有無にかかわらず生着不全は生じにくい可能性が示唆された。このことから重症感染症に罹患して全身状態が悪い患者においても前処置なしにCBSCTを行うことで速やかな免疫能の改善による感染症からの回復が期待できると考えられた。本症例では生着は速やかであったが、その後の免疫能の回復は遅延した。使用した免疫抑制剤FK506の血中トラフ値は5~10ng/mlと高値ではなかったが本剤の影響を考慮し、漸減、中止したところ

その後は速やかなT細胞数とPHA、ConAに対するリンパ球芽球化能の改善を見た。生着後の免疫能の回復が遅延する症例では免疫抑制剤の減量や中止も考慮する必要があると考えられた。一方、CBSCTでは成人血と異なりHLA不適合移植においてもGVH反応が比較的弱いといわれており、本症例ではドナーT細胞の生着後もまたFK506中止後も急性、慢性GVHDの発症は認められなかった。本例も含めてCBSCTを施行した自験例3例中2例では全く急性、慢性GVHDの発症を認めなかったが、1例ではドナーT細胞の生着とともにGradeIV（皮膚StageIV）の急性GVHDとその後慢性GVHDへの移行をみていることや重症のGVHD発症は稀ではあるが報告されていることからCBSCTにおいてもGVHDには十分な注意が必要と考えられた。移植後のキメリズム解析からT細胞はほぼ100%ドナータイプであったが、B細胞では44%がドナータイプであった。しかし、CD19陽性分画の純度は65%であったことを考慮するとX-SCIDやJAK3異常症のようなB細胞を有するSCIDでは、前処置を行わない場合非血縁CBSCTではB細胞のドナー細胞への置換は生じず、ほとんどがレシピエントタイプのままと思われた。実際、現在まで血清IgG値の増加はなくB細胞機能の回復を認めず、免疫グロブリン補充療法中である。このことからドナーB細胞の生着による移植後のQOLの向上を目的に今後は患児の状態がよければ骨髄非破壊的前処置を行うことも考慮する必要があると考えられた。

本症例のJAK3におけるL221P変異は γ c鎖との会合およびkinase活性の制御に関与するN末端FERMドメイン内に存在した。このL221P変異はこれまで報告のないFERMドメイン内の新たな変異であった。これまでの報告ではFERMドメイン内のミスセンス変異では変異蛋白の発現を認めることがあり、本症例につきウェスタンブロットで検討したところJAK3蛋白の発現を認めたが、抗 γ c鎖抗体を用いた免疫沈降ではJAK3蛋白の共沈を認めなかった。また健康成人50人で同部位の変異につき検討したが見出せなかった。これらの結果から221番目のロイシンからプロリンへの

アミノ酸置換は遺伝子多型ではなく、JAK3の機能異常による細胞内シグナル伝達不全を生じさせることが示唆された。これまでJAK3異常の確定診断には遺伝子解析が行われてきたが、結果を得るまでに時間を要することからフローサイトメーターと患者末梢血B細胞を用いた迅速診断につき検討した。本症例のミスセンス変異では変異蛋白の発現が認められるため、細胞内JAK3蛋白の発現をフローサイトメーター（FCM）を用いて検討するだけでは不十分と思われ簡易診断のためには機能解析が必要と考えられた。これまで報告されている方法に従いIL-2刺激したEBLCLを用いてJAK3によりリン酸化された細胞質内STAT5の有無をFCMにて検討したところ患者ではリン酸化STAT5が著減していることが認められ本法は有用であると考えられた。本法を正常コントロールの末梢血B細胞で行ったところリン酸化STAT5を検出できなかった。種々のB細胞刺激法を検討したところIL-2とSACで刺激することによりリン酸化STAT5を検出することが可能であることが判明したため、患者B細胞で検討したところリン酸化STAT5は著減していた。このようにFCMと末梢血B細胞を用いて、蛋白の発現と機能解析をあわせて行うことでJAK3異常の簡易診断が可能になると考えられた。

E. 結 論

JAK3異常を呈するSCIDに前処置なしの臍帯血移植を行い、移植後早期にドナーT細胞の生着

ならびに細胞性免疫能の改善をみた。SCIDにおける臍帯血移植はHLA一致血縁ドナーが得られない場合、根治療法の有効な選択肢の一つになり得ると考えられた。

JAK3異常が示唆されるSCIDにおいて患者末梢血B細胞を用いてフローサイトメーターによるJAK3蛋白の発現と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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe N, Kamachi Y, Koyama N, Hama A, Liang J, Nakamura Y, Yamamoto T, Isomura M, Kudo K, Kuzushima K and Kojima S.

Expansion of human CMV-specific cytotoxic T lymphocytes to a clinical scale: a simple culture system using tetrameric HLA-peptide complexes.

Cytotherapy 2004; 6:514-22

2. 学会発表

蒲池吉朗、徐 銀燕、清井 仁、尾関和貴、中村陽一、柘植郁哉、小島勢二

WHIM症候群におけるCXCR4遺伝子異常の解析

2004.9.17 第66回日本血液学会・第46回日本臨床血液学会

骨髓非破壊的臍帯血移植を施行したX-SCIDの免疫機能再建過程

波多野 典 一 (北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座小児科学分野)
戸 板 成 昭 (北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座小児科学分野)
小 林 良 二 (北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座小児科学分野)
川 村 信 明 (北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座小児科学分野)
岡 野 素 彦 (北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座小児科学分野)
小 林 邦 彦 (北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座小児科学分野)
有 賀 正 (北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座小児科学分野)

【研究要旨】

症例は7ヶ月男児。難治性真菌性肺炎、低 γ グロブリン血症、リンパ球減少症より紹介入院。flow cytometry で共通 γ 鎖欠損を確認しX-SCIDと診断した。遺伝子検索でIL2RGの exon5に682 T→G;Val223Glyの missense mutation を認めた。家族内HLA一致ドナーがなく非血縁者間臍帯血移植を施行した。また移植前処置を行わない場合混合キメラが多いことより Fludarabine 180mg/m²と Busulfan 8mg/kgによる骨髓非破壊的前処置を選択した。移植細胞数は 11.18×10^7 /kg、CD34陽性細胞数は 6.74×10^5 /kgであった。GVHD予防はCsAとmPSLで行ったが明らかなGVHDはなく、移植前からの真菌性肺炎はMCFG、ITCZにて軽快した。day+19に好中球が $500/\mu\text{l}$ を超え、リンパ球も好中球とほぼ同時に増加した。T細胞とNK細胞の増加が先行し、B細胞はday+56以降に急激に増加した。day+62でのB細胞の解析で99%に共通 γ 鎖の発現を認めた。移植後4ヶ月でConAとPHAによるリンパ球幼若化試験は正常反応を示し、その後血清免疫グロブリン値も維持されている。X-SCIDに対する Fludarabine と Busulfan を用いた骨髓非破壊的前処置による臍帯血移植は有効であると考えられた。

【はじめに】

X-SCIDは、生後数ヶ月から重症感染症をくり返し、造血幹細胞移植などの根本的治療を施さなければ乳幼児期に死亡する重篤な疾患である。近年造血幹細胞移植のひとつとして臍帯血幹細胞移植症例が増加している。一般的に臍帯血幹細胞移植では、ドナーとのコーディネーションを必要としないため、迅速な移植が可能で、GVHDの発症が少ない等の利点がある一方、造血回復が遅く生着不全をきたしやすい等の不利な点も指摘されている。今回、我々はX-SCIDの症例に対し骨髓非破壊的前処置による臍帯血移植を施行したのでその免疫機能再建過程を報告する。

【症 例】

症 例：7ヶ月、男児
出生歴・既往歴：特記すべきことなし
予防接種歴：BCG、三種混合2回、Polio1回、インフルエンザワクチン1回
現病歴：生後7ヶ月まで発熱等の感染の症状はなし。平成15年12月18日より咳嗽、鼻汁、発熱出現。近医より抗生剤の処方を受けるも症状改善みられず1/14地方中核病院受診。WBC $6900/\mu\text{l}$ Lym $1380/\mu\text{l}$ IgG 1mg/dl IgA 0mg/dl IgM 30mg/dlと、リンパ球減少症・低 γ グロブリン血症を認め、1/16同院入院となった。 β -D-グルカン 31.6pg/ml CRP1.19mg/dlで肺炎を認めたため、IVIG、SBT/CPZ、FCZ、S T、INHによる治療を開始。末梢血のフローサ

イトメトリ検査にて、CD3 (0.2%) CD4 (1.3%) CD8 (0.1%) CD19 (98.5%) CD56 (0.4%) とT細胞、NK細胞の欠損を認めたため、SCIDの精査・治療目的で、1/24北大病院転院となった。

現 症：身長68.5cm 体重7.0kg 嚔口瘡あり
多呼吸あり、両肺野でラ音を聴取。Room airで酸素飽和度90%前後。

検 査：胸部レントゲン写真で両側の肺炎像。血型 A(+)、真菌遺伝子分析 (PCR) でアスペルギルス陽性、カンジダ抗原陰性

経 過：真菌性肺炎に対して、MCFGによる治療を開始した。

末梢血のフローサイトメトリ検査では、T (-) B (+) NK (-) のSCIDであり、さらにリンパ球で共通γ鎖の欠損が確認された。

遺伝子解析では、exon5にあるcDNA number 682において Thymine から Guanine への置換；アミノ酸では223番目の Valine が Glycineへ変化する missense mutation を認めた。なお、IL2RGbase上にこの変異の報告例はなかった。また、母親の遺伝子検索では、この部位がヘテロであり、保因者であると診断した。

造血幹細胞移植を考え、HLAの検索を行ったところ、患児は、A、B、DR座のホモであったため、両親からの移植も考えられたが、骨髄バンク、臍帯血バンクから完全一致のドナーが得られることが判明した。移植までの期間、合併症を考え、臍帯血移植を選択した。また、移植前処置を行わない場合、混合キメラが多いことから骨髄非破壊レジメを用いることとした。移植前処置は Fludarabine 30mg/m² 6日間と Busulfan 4mg/kg 2日間とした。GVHD予防として Cyclosporin Aとm-PSLを用いた。また、移植後90日まで、高CMV抗体価ガンマグロブリンの投与を行った。

平成16年2月25日に臍帯血バンク（血型B+の非血縁者女性）から臍帯血移植を行った。移植細胞数は 14.88×10^7 /kg、CD34陽性細胞数は 8.59×10^5 /kg、生細胞率は78.5%であった。明

らかなGVHDはなく、末梢血異性間BMT/FISHで移植後5日ではXX0.2%、XY99.8%であったが、移植後12日ではXX99.2%、XY0.8%と逆転した。移植後19日にはG-CSFを使用していないにもかかわらず好中球が500/μlを超えた。網状赤血球が1%を超えたのは移植後13日、血小板数が5万/μlを超えたのは移植後28日であった。

(移植後末梢血の推移)

移植後14日よりリンパ球数の回復がみられ、その時点で最初に回復が見られたのは、CD4陽性細胞であった。移植後30日にかけて、リンパ球数の回復にあわせて、CD4陽性細胞、CD8陽性細胞、CD56陽性細胞が増加しているが、移植後30日の段階ではCD20陽性細胞の増加は見られなかった。移植後50日を境にリンパ球数が著明に増加し、それに伴いCD20陽性細胞が急激に増加してきた。(図1)

比較のため、WASに対する臍帯血幹細胞移植の造血回復過程を示す。HLA一致の臍帯血で、

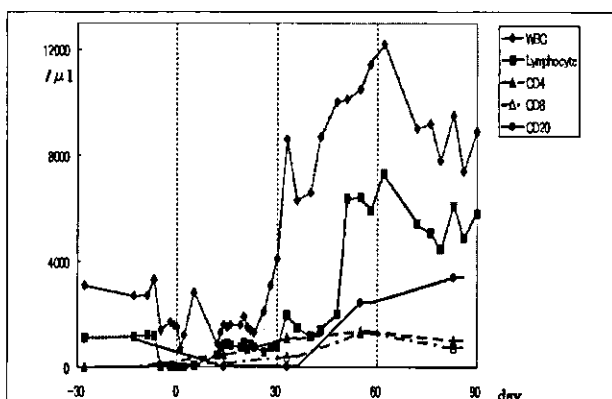


図1 移植後末梢血の推移

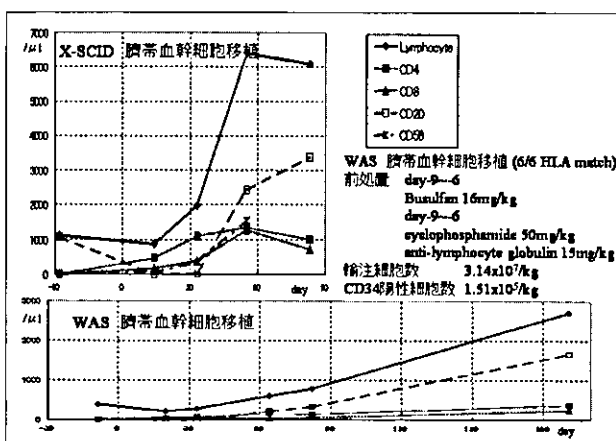


図2 移植後末梢血の推移

前処置は、Busulfan、Cyclophosphamide、抗ヒトリンパ球グロブリンを用いている。輸注細胞は 3.14×10^7 /kg、CD34陽性細胞は 1.51×10^5 /kgであった。WASに対する臍帯血幹細胞移植では造血回復が遅く、6ヶ月の段階でもリンパ球数の増加に伴ってCD20陽性細胞の回復が見られるものの、CD4、8陽性細胞の回復はなお不十分であった。(図2)

(移植後早期の共通γ鎖発現)

移植後19日の時点で既にCD4、CD8陽性細胞が出現しており、そのCD4、8陽性細胞のすべてにCD132の発現を認めた。しかし、CD19陽性細胞は出現していなかった。移植後62日には、CD19陽性細胞が出現し、その98%以上の細胞にCD132の発現を認めた。(図3)

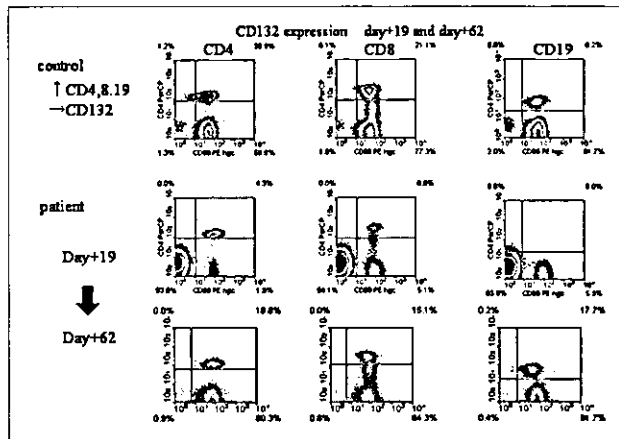


図3 移植後早期の共通γ鎖発現

(移植4ヶ月後の共通γ鎖発現)

CD4、CD8、CD19、CD56のリネージ毎で、すべての細胞にCD132の発現を確認した。この時のCD19陽性細胞は43.9%とB細胞分画の増加を認めた。(図4)

(移植後62日と120日の表面マーカーの比較)

移植後62日目のフローサイトメトリー検査では、CD4陽性細胞の中でCD45RA陰性のメモリー細胞が61.1%、CD45RA陽性のナイーブ細胞が20.6%と、早期の段階でメモリーT細胞の出現が認められた。120日ではCD45RA陰性メモリー細胞が34.5%、CD45RA陽性のナイーブ細胞が38.5%となっている。CD19陽性B細胞では、62日、120日ともに、ほとんどがIgD陽性、CD27陰性の細胞であった。(図5)

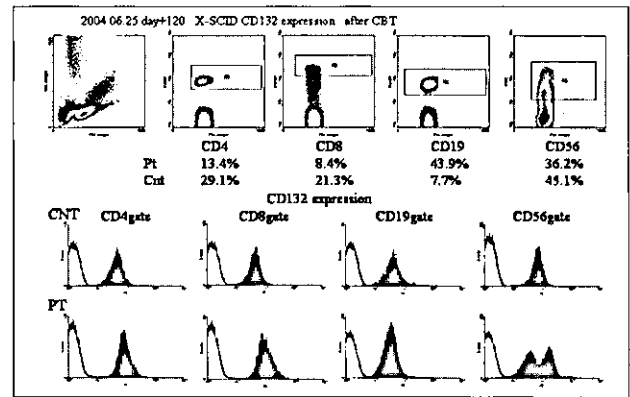


図4 移植4ヶ月後の評価：共通γ鎖発現

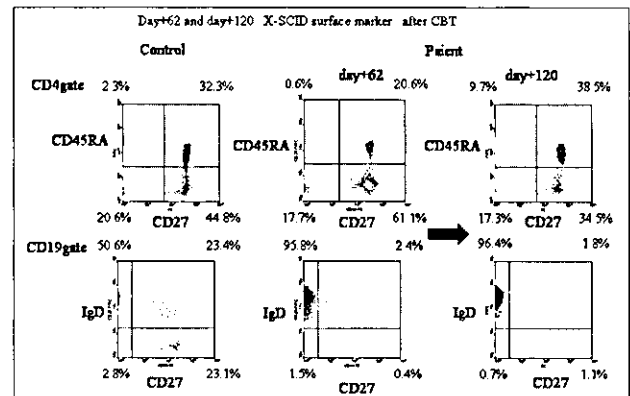


図5 移植4ヶ月後の評価：メモリー細胞

(移植後4ヶ月後のリンパ球機能検査)

SAC刺激による proliferation assay と、ConA刺激、PHA刺激によるリンパ球幼若化試験では、正常反応を示した。移植後90日でIVIGを中止した後も、患者血清免疫グロブリン値は維持されている。

移植後225日の血液型検査で、B(+)とドナーの血液型に変化した。しかし、裏試験ではAB型で、抗赤血球抗体の産生は見られていない。今後ワクチンによる特異抗体産生能の評価を予定している。(図6)

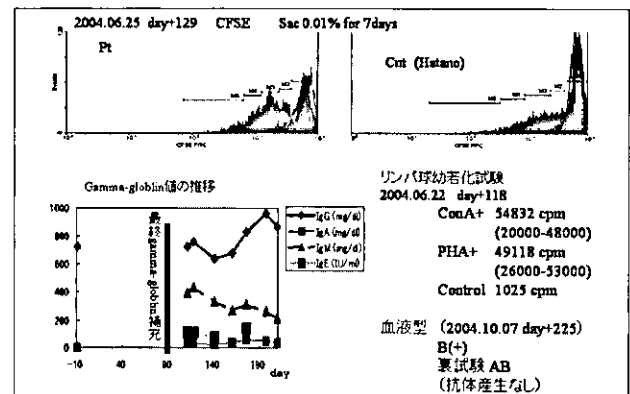


図6 移植4ヶ月後の評価：リンパ球機能検査

【考 察】

これまでのX-SCID以外の臍帯血移植の報告をみると、末梢血におけるリンパ球数の回復については、臍帯血移植と骨髄血移植ではほぼ同様であり、NK細胞は2から3ヶ月、B細胞は6ヶ月、T細胞ではCD8陽性細胞が8から9ヶ月、CD4陽性細胞は12ヶ月を要するとされている¹⁾²⁾。

この症例で見られた造血回復過程は、まず移植後14日よりCD4陽性細胞数が最初に増加し、移植後30日にかけて、リンパ球数の回復にあわせて、CD4陽性細胞、CD8陽性細胞、NK細胞の細胞数が上昇している。その後、移植後50日を境にリンパ球数の急激な回復がみられた。また、移植後60日という早期の段階でCD4陽性メモリー細胞が出現した。これは、一般的なパターンとは完全に逆で、しかも回復が早い。一般的に、移植幹細胞が骨髄に生着してから、胸腺を経て成熟して末梢血中に出るまでには数ヶ月かかるとされているが、X-SCIDではT細胞、NK細胞が欠損しているために、成熟、増殖するスピードが早いためと考えられる。早期のメモリーT細胞の出現は、臍帯血中に含まれるCD45RA(+)ナイーブT細胞が直接刺激を受けて成熟したものであると考えられ、その後のB細胞の急激な回復は、先に回復したT細胞からの刺激が影響したものと推測された。

今回、B細胞が完全にドナータイプに置換し、ガンマグロブリンの産生も認めている。T細胞だけではなく、B細胞の再構築も目標としたX-SCIDの造血幹細胞移植を考える際、どのような造血幹細胞を使用するか、その際どのような条件の前処置を選択すればよいのかということに関してはまだ確立されていない。

HLA haploidentical T-cell-depleted BMTでは8 mg/kg Busulfan and 200mg/kg Cyclophosphami

deによるCRでは有効ではなかったとの報告がある³⁾一方、前処置なしでドナータイプに置換したものもあり⁴⁾、前処置の「強さ」はそれだけでは判断できないと考えられる。今回の臍帯血移植の場合では、臍帯血中の輸注造血幹細胞数が多かったことやHLAが完全一致であったことが良い結果に結びついている可能性がある。

XSCIDに対する造血幹細胞移植として Fludarabineと Busulfan を用いた骨髄非破壊的前処置による臍帯血移植は有効であると考えられるが、今後更なる検討が必要である。

- 1) Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, et al: Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* 96(8):2703-2711, 2000
- 2) Niehues T, Rocha V, Filipovich AH, et al: Factors related or unrelated cord blood transplantation in children - a Eurocord analysis. *Br J Haematol* 114(1):42-48, 2001
- 3) Ting SS, Tangye SG, Ziegler JB, et al: Reduced memory B-cell populations in boys with B-cell dysfunction after bone marrow transplantation for X-linked severe combined immunodeficiency. *Br J Haematol* 112:1004-1011, 2001
- 4) Haddad E, Le Deist F, Fisher A, et al: Long-term chimerism and B-cell function after bone marrow transplantation in patients with severe combined immunodeficiency with B cells: a single-center study of 22 patients. *Blood* 94(8):2923-2930, 1999

重症複合免疫不全症における血液幹細胞移植後のT細胞再構築； TCR構造多様性を指標とした定量的解析

谷内江 昭 宏 (金沢大学医学部保健学科)
東 馬 智 子 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)
笠 原 善 仁 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)
小 泉 晶 一 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)

【研究要旨】

重症複合免疫不全症 (B⁻SCID) に対する根治治療は血液幹細胞移植である。しかし、症例数が少ないこともあり、幹細胞移植を標準化し安定した成果が得られる段階には達していない。より確実な治療効果を得るためにはSCID症例の病態評価と移植後の免疫能回復を客観的に評価する指標が重要となる。本研究では、SCID症例4例について末梢血T細胞抗原受容体 (TCR) の多様性を指標としてT細胞機能を評価した。TCR多様性はTCR V β repertoire 分布ならびにCDR3サイズ解析により評価した。また、これらの症例について血液幹細胞移植後のT細胞再構築を同様の手法により経時的に解析した。血液幹細胞移植前はいずれの症例においてもTCR多様性は著しく制限されていた。一方、移植後1ヶ月後ではCD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞のいずれにおいてもTCR多様性の著しい改善が認められた。経時的な観察では、GVHDや感染症の合併に伴いTCR多様性の低下が認められ、このような傾向は特にCD8⁺ T細胞において顕著であった。これらの結果は、胸腺由来のナイーブT細胞が末梢血中に増加する以前の早い段階で、ドナー由来の成熟T細胞の増殖が起ること、それらが移植後早期のT細胞機能回復に重要な役割を果たす可能性を示唆していた。また移植後合併症が少なく順調に回復した症例では、移植後早期のTCR多様性は経過を追って維持されており、T細胞再構築の客観的評価の指標としてTCR多様性解析は重要であると考えられた。

A. 研究目的

重症複合免疫不全症 (SCID:severe combined immune deficiency) は多様な要因により発症する原発性免疫不全症であり、その成因として複数の遺伝子異常が明らかにされ病態解析がすすんでいる。このうち、RAG1/RAG2異常症は免疫グロブリン遺伝子やTCR遺伝子の再編成に関わるRAG1/RAG2の欠損あるいは機能低下に起因することが明らかにされている。RAG1/RAG2の欠損症例ではB細胞T細胞を共に欠損するSCIDとなるが、部分的な欠損あるいは機能低下症例では異常なT細胞クローンの選択的増殖により、リンパ節腫大、肝脾腫、重症湿疹様病変、好酸球増加などの、いわゆる Omenn 症候群の臨床像を示すことが知られている。また、Artemis は遺伝子再

編成の後の修復過程に重要な役割を果たすことから、その異常はRAG異常症と同様の臨床症状を示すことが知られている。本研究では、RAG異常症ならびに Artemis 異常症などのT細胞分化障害を基盤とするSCID症例について、病態評価を目的としてTCR構造の多様性を評価した。また同時にこれらの症例に対する血液幹細胞移植後のT細胞再構築過程を評価する目的で、経時的にTCR構造多様性を評価し、その有用性を検討した。

B. 研究方法

今回、TCR構造解析の対象としたSCID症例の臨床像と血液幹細胞移植の条件を表1に示す。末梢血T細胞のTCRV β repertoire 解析はRPE・

Cy5標識抗CD4、FITC標識抗CD8ならびにPE標識抗TCRVβ抗体を用いて3カラーフローサイトメトリーを施行、各T細胞亜群中のVβ repertoire分布を定量した。TCRVβ CDR3サイズ分布の解析(CDR3 spectratyping)には末梢血単核球を分離後、immunobeads法によりCD4除去、あるいはCD8除去細胞を得、それぞれCD8⁺T細胞ならびにCD4⁺T細胞として用いた。これらよりcDNAを作成、鋳型として使用した。25種類の5' TCRVβ特異的プライマーと蛍光標識3' TCR Cβプライマーを用いてPCR増幅、ABI310により解析した。CDR3サイズ分布の多様性は、主要なピークの数とその大きさから complexity score (CS)として算出した。さらに一部の症例について、cDNAをTCRBV特異的プライマーと無標識TCRCV特異的プライマーを用いて増幅したPCR産物をサンプルとして、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA USA)によりクローニングを施行した。Colony PCRの後アガロース電気泳動にてインサート領域を含むことを確認した。PCR産物について、dye terminator法によるサイクルシーケンスにより蛍光標識を行った後、ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により塩基配列を自動解析した。

C. 研究結果

1. 臨床像(表1)

症例1は本邦初のRAG2異常症であり、好酸球増多、IgE高値、肝脾腫大、重症皮膚病変など、典型的なOmenn症候群の臨床像を示した。症例2はRAG1異常症であるが、活性化T細胞の異常増殖が顕著でなく、Omenn症候群としての臨床像も非典型的であった。この症例は皮膚症状ではなく、呼吸器感染の増悪が診断のきっかけとなった。症例3はArtemis異常であり、B-T SCIDの臨床像を呈した。この症例においても活性化T細胞の増殖は顕著でなく、呼吸器症状が主体であった。症

例4ではRAG1遺伝子の変異によりRAG1活性がほぼ消失することが予想され、B-T SCIDの表現型をとることが推定されたが臨床的にはOmenn症候群と考えられた。RAG1/2遺伝子変異の精査の結果、複数の2nd site mutationがT細胞レベルで起り、これにより部分的なRAG1活性を有するT細胞が選択的に活性化・増殖しOmenn症候群様の症状を惹起していると考えられた。

2. 末梢血T細胞TCRVβ repertoire分布解析

血液幹細胞移植前は、いずれの症例においても末梢血T細胞TCRVβ repertoire分布は偏っていた。しかしOmenn症候群としては非典型例である症例2ではこのような偏りは比較的軽度であった。特に検索可能であったCD4⁺T細胞においては、ほぼ正常対照に近いTCRVβ repertoire分布が得られた。

移植後1ヶ月においては、すべての症例においてCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞のいずれもほぼ正常に近いTCRVβ repertoire分布が観察された。特に、臍帯血移植を施行し、合併症が軽微であった症例1では、その後の経過も順調で移植後9ヶ月での解析ではいずれのT細胞亜群も正常な分布を示した。一方、その他の症例では重度のGVHDやMAC感染を反映して一過性にTCRVβ repertoire分布の偏りと特定のTCRVβ repertoireを発現するT細胞の選択的増殖が観察された。このような傾向は特にCD8⁺T細胞においてより顕著に認められた。

表1 対象症例の臨床像ならびに血液幹細胞移植条件

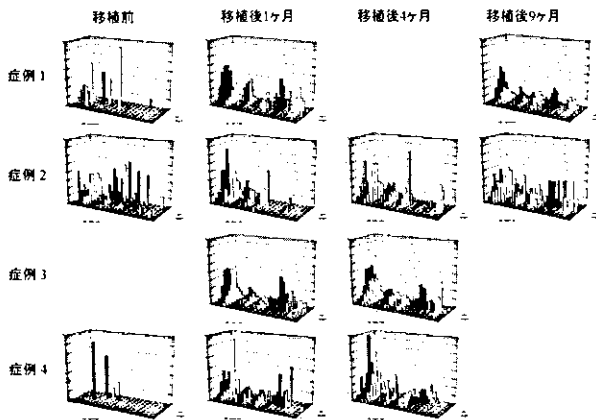
	症例1	症例2	症例3	症例4
診断時年齢	0 m	10 m	6 m	3 m
移植時年齢	4 m	13 m	8 m	7 m
臨床症状	LN腫、肝脾腫 湿疹	咳嗽、呼吸不全 発育不良	咳嗽 カリ二肺炎	湿疹、中耳炎 敗血症、肝腫
検査所見	Eo増加、IgE高値	Eo、IgE正常	Eo増加、IgE高値	Eo増加、IgE低値
遺伝子変異	RAG2	RAG1	Artemis	RAG1
臨床診断	Omenn症候群	Atypical Omenn	B-T SCID with MFT	Omenn症候群
移植細胞	臍帯血	臍帯血	父親骨髓	臍帯血
前処置	Flu+Bu+ATG	Flu+CyA+TBI	Flu+Bu	Flu+L-PAM+ATG
GVHD予防	CyA	FK506+sMTX	FK506+sMTX	CyA+mPSL
合併症		皮膚GVHD	腸管GVHD III 皮膚GVHD II	MAC感染 皮膚GVHD II T細胞での 2 nd site mutation
その他				

図1 血液幹細胞移植前後におけるTCR構造多様性の変化

A: CD4⁺ T細胞, B: CD8⁺ T細胞

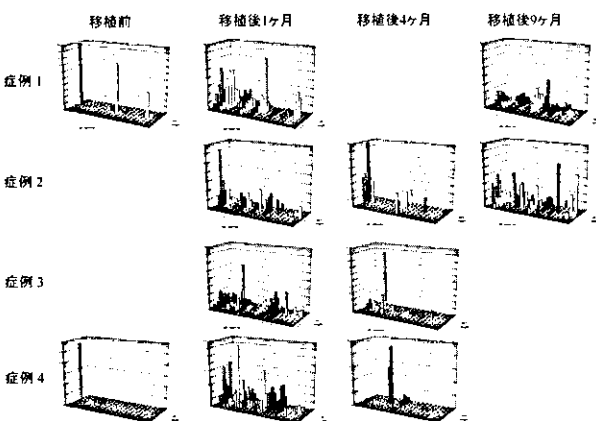
末梢血リンパ球T細胞亜群におけるTCR Vβ 発現頻度を、蛍光標識単クローン抗体を用いたフローサイトメトリー法にて定量した。一方、各T細胞亜群におけるTCR CDR3サイズの分布を異なるVβ 毎に gene scan法により解析した。これらのデータを基に、TCR構造の多様性を3次元表記した。長軸は異なるTCR Vβ、短軸はCDR3サイズを、縦軸は比較的频率を示す。

図1 A: 移植前後におけるTCR多様性の変化(CD4⁺T細胞)



血液幹細胞移植を施行した4例のSCID症例について、移植前後の末梢血CD4⁺ T細胞のTCR構造多様性の変化をVβ repertoire CDR3サイズ分布により表現した。

図1 B: 移植前後におけるTCR多様性の化(CD8⁺ T細胞)



血液幹細胞移植を施行した4例のSCID症例について、移植前後の末梢血CD8⁺ T細胞のTCR構造多様性の変化をVβ repertoire CDR3サイズ分布により表現した。

3. 末梢血T細胞亜分画におけるTCRBV CDR3サイズ分布解析

すべての症例において移植前のCDR3サイズ分布は著しく偏り、CSは低値に分布した。移植後は、これらの分布は次第に正常化した。CD4⁺ T細胞に比べCD8⁺ T細胞ではCDR3サイズ分布の正常化は遅延した。特に重度のGVHDを合併したりMAC感染症を合併したりした症例2-4では、移植後1ヶ月後に比べ移植後4ヶ月時点での

CDR3サイズ分布の偏りがより顕著となった。このようなTCR構造多様性の異常とその回復は、TCRVβ repertoire 分布とCDR3サイズ分布を同時に3次元表示することによりそれぞれを単独に表示するよりも明確に把握された(図1 A, B)。

4. ドナーT細胞ならびに移植後T細胞のCDR3塩基配列の比較

症例3において、ドナーT細胞と移植後1ヶ月後の末梢血T細胞についてCDR3塩基配列の比較を試みた。現在まだ解析が進行中であるが、CD4⁺ T細胞亜群のVβ 2について行った予備的な検討では、複数のT細胞クローンが共有されていることが確認された(図2)。

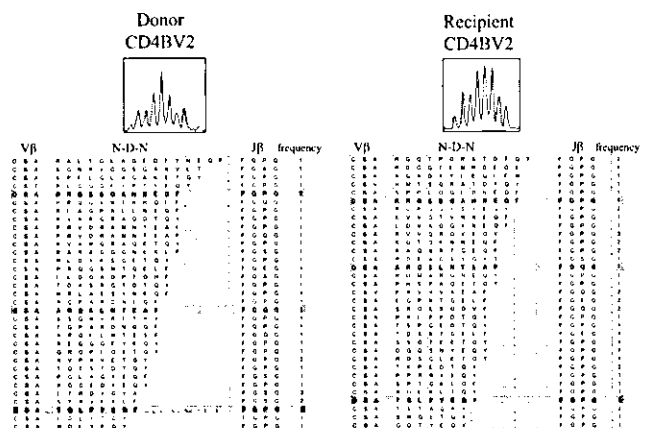


図2 ドナーおよびレシピエントにおけるT細胞クローンの共有
血液幹細胞移植後の患者末梢血およびドナーの血液について、共有するT細胞クローンの有無を検索した。CD4⁺ T細胞中のVβ 2陽性細胞についてCDR3部分の塩基配列をTAクローニング法により解析し比較した。

D. 考 察

RAG異常症ならびに Artemis など、TCR遺伝子の再編成に関与する酵素の異常を背景とした免疫不全症では、T細胞分化障害を反映して末梢血T細胞のTCR構造多様性が著しく低下する。したがって、TCR Vβ repertoire 分布やCDR3サイズ分布の解析は、これらの疾患に共通の、T細胞分化異常を評価する上で有用であると考えられる。さらに、血液幹細胞移植後のT細胞の多様性回復を客観的に評価する指標としての意義も大きいと考えられる。

SCID患者に対する根治治療としては血液幹細胞移植が最も重要なものとなるが、これらの患者に対する移植方法は定まっていない。特に血液幹

細胞の源として骨髄が良いのか、臍帯血が良いのか、移植前処置はどの程度にすべきか、移植後どのように免疫学的再構築が起るか、など不明な点が多い。また移植後のT細胞再構築評価の多くは、T細胞表面抗原発現を指標としてナイーブT細胞の定量や、新たな胸腺からの output の指標としてTREC量を定量することが行われている。しかし、これらの指標はあくまでリンパ球集団全体の平均を示すものであり、T細胞クローンの多様性拡大を評価することはできない。本研究では特に移植後のT細胞の再構築を客観的かつ定量的に評価することにより、移植方法の確立のための有用なデータを提供することを目的とした。

今回の解析では特にTCR V β repertoire 分布とCDR3サイズ分布を3次元表示することにより、多様性の異常やその回復過程がより明解に示された。

移植後1ヶ月では、いずれの症例においてもTCR構造の多様性が増加、正常対照に近いパターンを示した。特に、CD4⁺T細胞亜群ではこのような傾向が続き、移植後9ヶ月ではほぼ正常パターンとなった。一方、CD8⁺T細胞についてはGVHDや感染症の合併を反映して一過性のオリゴクローナルなT細胞増殖が出現、TCR構造多様性も低下した。これらの結果より、移植後1年以内の早期においても十分なTCR構造多様性の回復が得られる一方、様々な合併症によりその多様性は強い影響を受けることが明らかとなった。

ドナーT細胞において確認された複数のクローンが移植後末梢血T細胞において同定されたことから、移植後早期におけるT細胞回復の少なくとも一部がドナー血に含まれる成熟T細胞の一過性増殖を反映している可能性が示された。このことを明らかにするためには、移植後末梢血T細胞中のドナー由来T細胞クローンの頻度を経時的、定量的に解析する必要があり、今後の検討を予定している。

以上、本研究の結果より Omenn 病をはじめとする TCR遺伝子の再構成障害を有する免疫不全症においては、TCR多様性の形成が障害されることから、V β repertoire 分布解析およびCDR3

サイズ分布解析を用いて、TCRの多様性を評価することが重要であるとともに、造血幹細胞移植前後の TCRの多様性を詳細に検討することは T細胞再構築の評価として意義深いと考えられた。また、移植後早期のT細胞回復が胸腺由来の新しい thymic output よりも、むしろドナーT細胞由来の成熟T細胞の一過性増殖を反映している可能性が示された。この点に関しては、さらに症例を加えて詳細に検討する予定である。

謝 辞

本研究のために患者の臨床情報ならびに移植前後の検体を提供して頂いた下記施設の諸先生に感謝する。

東北大学医学部加齢医学研究所；久間木 悟、

土屋 滋

群馬県立小児医療センター；加藤 政彦

東京医科歯科大学；森尾 友宏

名古屋大学；蒲池 吉朗

愛知医科大学；金子 淳、山路 和孝

信州大学；上松 一永

愛媛大学；田内 久道、石田也寸志

奈良県立医大；稲垣 二郎

市立宇和島病院；上甲 忍、林 正俊

参考文献

- 1) Villa, A., Sobacchi, C., Notarangelo, L.D. et al : V(D)J recombination defects in lymphocytes due to RAG mutations: severe immunodeficiency with a spectrum of clinical presentations. *Blood*, 97:81-88, 2001
- 2) Rieux-Laucat, F., Bahadoran, P., Brousee, N. et al : Highly restricted human T cell repertoire in peripheral blood and tissue-infiltrating lymphocytes in Omenn's syndrome. *J.Clin.Invest.*, 102:312-321, 1998
- 3) Noordzij, J.G., Verkaik N.S., van der Burg M. et al : Radiosensitive SCID patients with Artemis mutations show a complete B cell differentiation arrest at the pre-B cell receptor checkpoint in bone marrow.

- Blood, 101: 1446-1452, 2003.
- 4) Konno A, Okada K, Mizuno K, Nishida M, Nagaoki S, Toma T, Uehara T, Ohta K, Kasahara Y, Seki H, Yachie A, Koizumi S. CD8 α α memory effector T cells descend directly from clonally expanded CD8 α β ^{hi} TCR α β T cells in vivo. Blood. 100; 4090-7, 2002
 - 5) Sarzotti, M., Patel, D.D., Li, Xiaojing. et al : T cell repertoire development in human with SCID after nonablative allogeneic marrow transplantation. J.Immunol.,170:2711-2718,2003
 - 6) Talvensaari, K., Clave, E., Douay, C. et al : A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation. Blood,99:1458-1464,2002
 - 7) Verfuërth, S., Peggs, K., Vyas, P. et al : Longitudinal monitoring of immune reconstitution by CDR3 size spectratyping after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplant and the effect of donor lymphocyte infusions on T-cell repertoire. Blood,95:3990-3995,2000
 - 8) Wu, C.J., Chillemi, A., Aiyea, E.P. et al: Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. Blood,95:352-359,2000
 - 9) Bltlyhe, G.T., Kent A.R., Darla, G. et al : Analysis of engraftment,graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. Blood,96:2703-2711,2000
 - 10) Haddad, E., Le Deist, F., Aucouturier, P. et al : Long-term chimerism and B-cell function after bone marrow transplantation in patients with severe combine immunodeficiency with B cells: A single center study of 22 patients. Blood, 94: 2923-2030, 1999
 - 11) Bielorai, B., Trakhtenbrot, L., Amariglio, N. et al : Multilineage hamatopoietic engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation without conditioning in SCID patients. Bone Marrow Transplant 34:317-320, 2004

アデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症における血液幹細胞を標的とした遺伝子治療臨床研究

大津 真 (筑波大学大学院・人間総合科学研究科・講師)
前山 義博 (北海道大学大学院・医学研究科・遺伝子治療講座・大学院生)
中島 督 (北海道大学大学院・医学研究科・遺伝子治療講座・大学院生)
貴田 みゆき (北海道大学大学院・医学研究科・遺伝子治療講座・大学院生)
戸板 成昭 (北海道大学大学院・医学研究科・小児科学講座)
波多野 典一 (北海道大学大学院・医学研究科・小児科学講座)
川村 信明 (北海道大学大学院・医学研究科・小児科学講座・助教授)
岡野 素彦 (北海道大学大学院・医学研究科・小児科学講座・講師)
立澤 幸 (国立成育医療センター)
小野寺 雅史 (筑波大学大学院・人間総合科学研究科・講師)
Fabio Candotti (National Institutes of Health)
Michael Hershfield (Duke University)
崎山 幸雄 (手稲溪仁会病院小児センター・センター長)
有賀 正 (北海道大学大学院・医学研究科・小児科学講座・教授)

【研究要旨】

アデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症に対する治療法としての、血液幹/前駆細胞へのレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入について、その安全性および治療効果を検討する。

A. 研究目的

ADA欠損症患児においてヒト白血球抗原 (HLA) の一致する同胞が存在する例ではその同胞をドナーとする骨髄移植を行うことで治癒が期待される。しかしながら、ハプロタイプ一致の片親あるいはHLA一致の非血縁ドナーからの移植、または酵素補充療法 (PEG-ADA) 単独での生命予後は必ずしも良好とはいえず、これらの代替療法として血液幹/前駆細胞を標的とした遺伝子治療 (以下、単に遺伝子治療) の研究が世界的に進められている。本研究においてはADA欠損症患児2例より骨髄幹/前駆細胞を採取し、基礎検討により至適化された方法により臨床試験グレードのレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った後、患児体内に輸注する手技を実際に行い、安全性、有効性を評価することを目的とする。

B. 研究方法

1) 倫理面への配慮

対象はADA欠損による重症複合免疫不全症 (SCID) の4才女児 (Pt.1) と13才男児 (Pt.2) である。本臨床研究の方法、意義、安全性、危険性について、第3者の立ち会いのもと両親 (Pt.2においては本人にも) に対する十分な説明を行い、インフォームド・コンセントを得る。

2) 遺伝子導入方法

骨髄採取に先立ち、PEG-ADAの投与を中断する。生体内の残存するADAが十分に減少した時点で全身麻酔下に骨髄を採取する。全骨髄液から赤血球沈降、および溶血手技にて赤血球を可及的に除いた後、ISOLEX 300™を用いてCD34陽性細胞分画を採取する。前刺激として、ガス透過性バッグ内にて無血清培地 (X-VIVO15™+ヒトアルブミン)、サイトカイン

(SCF, TPO, flt3-ligand, IL-6, soluble IL-6 receptor) 存在下に2日間培養する。遺伝子導入はフィブロネクチン断片CH296 (レトロネクチン™) をコートしたガス透過性バッグ内にて1日1回、3日間行なう。初日のみ細胞の混入前にレトロウイルスベクターPG13/GcsapM-ADAをバッグ内にプレロードする。以降はウイルス液と上述した無血清培地の1:1混合培地にて培養する。全培養期間6日間の後、細胞を回収、洗浄し、生理食塩水の浮遊液として患児の末梢静脈より輸注する。

3) 評価方法

(i) 安全性の評価

遺伝子導入細胞における安全性：一般細菌検査、マイコプラズマ感染の有無、エンドトキシン定量、逆転写活性。

患児のモニタリング：一般血液検査、生化学検査、細菌学的検査、免疫学的検査、フローサイトメトリー解析によるクロナリティー検索。増殖能獲得野生型ウイルス (RCR) の出現のモニタリング。導入遺伝子陽性リンパ球の増加があれば遺伝子挿入部位の解析。

(ii) 有効性の評価

遺伝子導入細胞の解析：導入遺伝子の検索、ADA活性測定による機能評価、前駆細胞のコロニー形成能の評価。マイトジェン刺激に対する増殖反応。

患児のモニタリング：一般血液検査、生化学検査。免疫学的検査。血漿中ADA値および赤血球中代謝毒性産物 (dAXP) 濃度の測定。

C. 研究結果

臨床経過

両患児ともにPEG-ADAの最終投与から5週間後に遺伝子導入細胞の輸注を行った (Pt.1: 2003年12月22日、Pt.2: 2004年2月2日)。中断後3週目頃よりリンパ球数が著減し、好中球数の低下も観察された。4週目頃から肝機能障害を反映して血中トランスアミナーゼ値 (AST, ALT) が上昇し、軽度の嘔気、食欲不振、活動性の低下がみられた。遺伝子導入細胞

輸注後からAST, ALT値は改善し、患児1においては細胞輸注後6週で、患児2においては10週でそれぞれ正常化した。肝機能の改善に伴い上記臨床症状も軽快した。個室管理下にて重症感染症の罹患なく、細胞輸注から約6ヶ月後に退院し、現在 (Pt.1で1年、Pt.2で10.5ヶ月) まで両患児ともPEG-ADA非投与下で良好な健康状態を維持している。

遺伝子導入

両患児ともに全身麻酔下に約15 ml/kgの骨髓血を採取し、骨髓採取に伴う副反応はみられなかった。計画通りの操作を行い、それぞれ 1.2×10^6 /kg, 5.7×10^5 /kgのCD34陽性細胞が得られた。培養および遺伝子導入操作はバッグを用いた閉鎖系で行い、細胞は良好な生細胞率を保ち、それぞれ 1.4×10^6 /kg, 9.2×10^5 /kgのCD34陽性細胞の輸注が可能であった。

遺伝子導入細胞の解析

安全性試験では一般細菌、真菌、マイコプラズマ全て陰性であった。最終日の非希釈培養上清中に微量のエンドトキシンが検出されたが、洗浄後の輸注細胞では検出感度以下であり、実際にも輸注に伴う悪寒等の副反応は認めず問題はみられなかった。定量PCR法、およびメチルセルロース培地でのコロニー形成細胞を用いたPCR解析による評価では、2例とも40-50%の良好な導入効率が得られた。導入細胞におけるADA活性はPt. 1では遺伝子導入前1.9 U、導入後318.2U (正常162.5U)、Pt.2ではそれぞれ1.4U、299.4U (正常90.1U) と正常化しており、ADA機能蛋白の発現が確認された。

患児のモニタリング

両患児ともにADA欠損による代謝毒性の顕性化と考えられる肝機能異常を認めたが (前述)、遺伝子導入細胞輸注後に改善した。

血液検査では、両患児ともにPEG-ADA中断後の急激な減少に引き続き、緩徐なリンパ球数の増加を認めたが、細胞輸注後20週頃から安定し始め、Pt.1では200-400/ μ l、Pt.2では400-600/ μ lで経過している。増加の主体はTリンパ球であり、BおよびNK細胞の増多はみられ

ていない。現在までに特定のTリンパ球サブセットのクローナルな増殖を認めていない。好中球数は最低500/ μ l程度にまで減少したが、Pt.1では1000-2000/ μ l、Pt.2では1000-1500/ μ lで経過しており、異常増殖はみられていない。

免疫グロブリン値は低値のままであり、検査値を見ながら免疫グロブリン置換療法を継続しているが、Pt.2においては徐々に投与間隔が開いてきており、抗体産生能の改善が示唆される。骨髓採取および採血手技に伴い軽度の貧血を認めたが改善し、血小板数は正常のまま経過している。その他、腎機能、電解質等にも異常を認めていない。

Duke 大学に依頼し、赤血球中%dAXP値を測定したところ、PEG-ADA中断後1週目から代謝毒性産物の蓄積を反映して急激な上昇が観察されたが、遺伝子導入細胞輸注後2-3週から漸減に転じ、現在はPt.1では約10%、Pt.2では約15%で安定しており、HLAハプロ一致の骨髓移植成功例と同等の値で経過していることが確認された。

導入遺伝子の検索では、治療後6ヶ月でリンパ球にごく低頻度で導入遺伝子が検出される程度であったが、Pt.1では10ヶ月の時点で導入遺伝子コピー数の明らかな増加が観察されており、好中球においても同様の傾向がみられている。これに一致してPt.1の末梢血単核球中のADA活性も10ヶ月でキャリアである両親と同等の値まで改善していた。

血液細胞のクロナリティー解析は、リンパ球減少が続いている現時点においては、白血球分画およびフローサイトメトリーにより検討しているが、特定の分画、リンパ球サブセットのクローナルな増殖は認めていない。輸注細胞の一部および毎週の血液検査時に得られる血液細胞サンプルは、今後予定している導入遺伝子の検索、遺伝子挿入部位の解析用に凍結保存を続けている。

D. 考 察

まず本研究の特色である、治療に先立つPEG-ADAの中断により次の点が明らかになった。ひ

とつめはPEG-ADAを継続して投与されたADA欠損症患者においての、その中断に伴う血漿ADA値および赤血球中dAXP値の動向である。両患者ともに中断前には正常人血漿ADA値を大きく越える値を維持していたが、中断後急速に値は減少し、最終投与から5週目に最低値となり現在までの観察期間中ほぼその値が維持されている。今回の臨床研究においてはこの5週目の時点で遺伝子導入細胞が輸注されたが、これより早期での遺伝子導入操作では、酵素中断により期待される治療効果の増強が損なわれ、またこれより遅い導入スケジュールでは患者の免疫能、体力の低下による骨髓採取に伴うリスクの増加が懸念される。今後さらに検討の余地はあるものの、PEG-ADA 中断から遺伝子導入陽性細胞輸注までを5週間とする日程は術前術後のトラブルもなく2例とも安全に施行することができ、妥当であると考えられた。

ふたつめは、PEG-ADA中断によってADA欠損に起因する血液、免疫系以外の症状が顕性化したことである。全身へのアデノシン関連代謝毒性産物dAXPの蓄積を反映して、肝機能障害、食欲不振、嘔気、活動力低下が両患者に共通して観察された。遺伝子導入細胞輸注後にdAXPレベルは低下し、肝機能および上記症状ともに改善したため、特別な治療は不要であった。通常、年長児においてのADA欠損症の無治療での症状を観察する機会のごく稀であるため、今回の結果はADA欠損症が全身性代謝性疾患である事実を年長児において示したという点で意義があると同時に、その治療においては血液、免疫系の再建のみならず全身における代謝毒性の改善をも目標とする必要性を再認識させるものである。

遺伝子導入手技についてはバッグを用いた閉鎖系を用いることで無菌操作を確実に行うことが可能であった。ISOLEX™によるCD34陽性細胞分離、無血清培地、IL-6, soluble IL-6 receptorを含んだ特長あるサイトカインカクテルの使用、バッグへのレトロネクチン™コート、ウイルス上清によるバッグのプレロード等、基礎検討により至適化された方法を用いることによって、前駆細胞での検討で50-70%の高効率の遺伝子導入が可能で

あった。さらには輸注細胞サンプル中でADA活性の正常化が観察され、遺伝子導入による患児骨髓細胞の機能的修復も確認された。

治療後10.5-12ヶ月の時点での臨床効果については、まだ十分な観察期間とは言えないが、ひとまずは次のように評価される。

- 1) 通常の生活を送るに十分な免疫能の維持をほぼ完全にPEG-ADAに依存していた両患児において、およそ1年間その投与をせずに問題なく経過していることの意義は大きいと考えられる。幹細胞への遺伝子導入については現時点では確実ではないものの、少なくとも多分化能を有し、ある程度の寿命を持った前駆細胞への遺伝子導入、その細胞の骨髓への生着、および導入遺伝子の継続的発現が本研究において達成されていると考えられる。
- 2) 本研究においては、リンパ球数の増加はイタリアの遺伝子治療例に比較して緩慢であり、またBおよびNK細胞数の増多も現時点ではみられていない。イタリアでは遺伝子細胞輸注に先立ち、busulfan投与による骨髓前処置を施行しており、このことが両者の臨床経過の差に影響しているものと考えられた。臨床効果の面からは前処置の施行がより早期の免疫能の再建には必要に思えるが、本研究においても今後の免疫能再建は十分に期待でき、またイタリアの症例でのbusulfanによる晩期障害の発現等の懸念もあることから、より長期に渡り経過をみることでより効果的かつ安全性の高い治療法の確立を目指す必要があると考えられる。
- 3) 米国の4例においては、本研究と同一のウイルスベクターを用い、さらに遺伝子導入手技にも大きな差がないにもかかわらず、導入遺伝子陽性細胞の末梢血への出現はほとんど達成されていないことから、遺伝子導入操作時にPEG-ADAを中断し、体内をADA欠乏状態にすることが効果の発現には重要であると考えられる。しかしながら、細胞輸注後2週ほどは全身倦怠、食欲不振、嘔気、肝機能障害等が顕性化した事実から、さらに安全性を強化した治療スケジュールの検討が必要と考えられる。

E. 結 論

- 1) PEG-ADA中断に伴い、リンパ球減少等の免疫能の低下のみならず肝機能障害、食欲不振などADA欠損に起因する症状が顕性化した。
- 2) 上記症状は遺伝子導入細胞輸注後に改善し大きな問題とならず、今回の臨床研究においては、酵素補充の中断、骨髓採取から細胞輸注までの一連の手技を比較的安全に行うことが可能であった。
- 3) 遺伝子導入細胞の解析から、遺伝子導入操作は無菌的に行われ、少なくとも血液前駆細胞のレベルで高い導入効率と機能修復が可能であったことが示された。
- 4) 患児は、造血細胞より供給されるADAによりADA欠損に起因する毒性代謝産物レベルが低下し、PEG-ADA非投与下に日常生活が可能となった。
- 5) Tリンパ球は緩徐に増加し、導入遺伝子陽性細胞の割合、末梢血単核球中ADA活性も増加傾向にあり、また好中球にも導入遺伝子の検出が可能となったことから、多分化能を有する造血細胞への遺伝子導入と骨髓への生着が強く示唆された。
- 6) 観察期間中、増殖性野生型ウイルスの発生、特定の血液細胞のクローナルな増殖等の副反応は認められなかった。

F. 研究発表

2) 学会発表

M Otsu, et al. Discontinuation of PEG-ADA replacement therapy in a patient with ADA-deficiency previously treated with retroviral-mediated, T cell-directed gene therapy. American Society of Gene Therapy The 6th meeting, Washington DC, June 5-8, 2003

M Otsu, et al. A clinical trial in Japan of retroviral-mediated gene transfer to bone marrow CD34⁺ cells as a treatment of adenosine deaminase (ADA)-deficiency. American Society of Gene Therapy The 7th meeting, Minneapolis, June 2-6, 2004

先天性免疫不全症に対する遺伝子治療の基礎的研究

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

【研究要旨】

我々は造血幹細胞を標的としてウイルスベクターを用いた免疫不全症に対する遺伝子治療の基礎研究を行っている。これまでにレトロウイルスベクターを用いてX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)に対する遺伝子治療、休止期の造血幹細胞にも遺伝子導入が可能なレンチウイルスベクターを用いて伴性無ガンマグロブリン血症(X-linked agammaglobulinemia; XLA)やX-SCIDに対する遺伝子治療の可能性を検討した。

A. 研究目的

X-SCIDやXLAは生後まもなくより重篤な感染症を罹患することが多い先天性免疫不全症である。XLAに対してはガンマグロブリンの定期的補充療法が行われているが、いずれの疾患も恒常的治癒を目指した治療としてはalloの造血幹細胞移植のみである。しかし、この造血幹細胞移植にはHLA適合ドナーが必要であり、さらに移植時の危険も伴う。造血幹細胞は多分化能と自己再生能を持つ細胞であり、恒常的治癒を目的とする遺伝子治療の理想的な標的細胞と考えられている。そこで自己の造血幹細胞を標的としてウイルスベクターを用いた免疫不全症に対する遺伝子治療の検討を行っている。

1) レトロウイルスベクターを用いたX-SCIDに対する遺伝子治療

(方法)

X-SCIDに対する遺伝子治療のためにマウス白血病ウイルスを基本骨格としたPG1とMyeloproliferative sarcoma virus (MPSV)を基盤としてプロモータ領域5'LTRを改良したMNDの2種類のベクターを作製した。治療遺伝子IL-

2受容体 common γ 鎖のcDNAを挿入した。ヒト造血幹細胞に遺伝子導入するウイルスベクターを産生するパッケージング細胞はGPAm12細胞を用いて作成し、ヒト臍帯血由来のCD34陽性細胞への遺伝子導入を試みた。

(結果)

ヒトCD34細胞に遺伝子導入してin vitroにおける導入効率はメチルセルロース培地を用いたCFUアッセイを施行した。MNDベクターはPG1ベクターと同等の32%と高い導入効率を示した。

2) レンチウイルスベクターを用いたXLAに対する遺伝子治療

(方法)

ヒト Btk cDNA を組込んだ、VSV-GシェードタイプHIVベクターを作製した。マウス造血細胞に遺伝子導入してin vitroにおける導入効率はメチルセルロース培地を用いたCFUアッセイを施行した。次にin vivoでの治療の有効性を検討するために、Xidマウスの骨髓細胞に治療遺伝子を導入した後に移植する遺伝子治療群とXidマウス由来の骨髓細胞と正常マウス由来の骨髓細胞を混ぜてXidマウスに移植した骨髓移植群に分

けて検討した (図1)。移植後30週にマウスの骨髄、脾臓の単核球に治療遺伝子が導入されているかをPCR法にて検討した。また、両群における血清 IgM, IgG3濃度を経時的に測定した。さらにNP-Ficollにを投与し両群のマウスにおける抗体産生能を比較した。

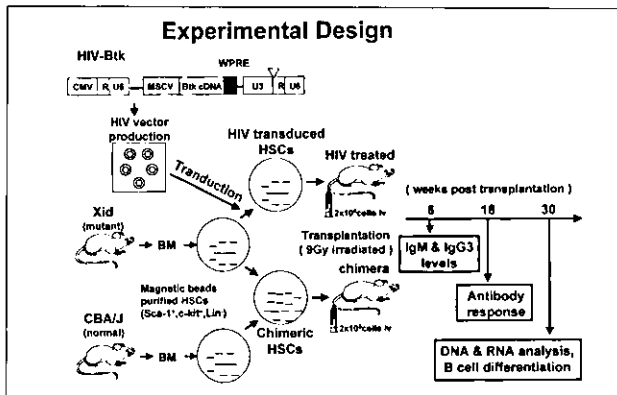
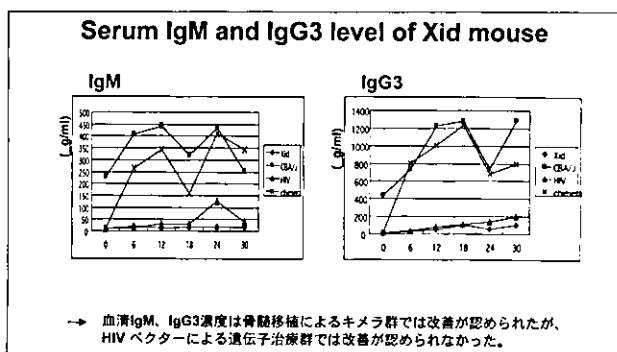


図1

(結果)

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



→ 血清IgM, IgG3濃度は骨髄移植によるキメラ群では改善が認められたが、HIVベクターによる遺伝子治療群では改善が認められなかった。

図2

遺伝子治療群では脾臓においては Btk の発現が認められなかった。さらに血清 IgM, IgG3濃度は骨髄移植群では改善が認められたが、遺伝子治療群では改善が認められず (図2)、NP-Ficollに対する抗体産生も骨髄移植群では認められたが、遺伝子治療群では認められなかった。

(考案)

レトロウイルスベクターは導入遺伝子が染色体に組み込まれるため造血幹細胞を標的とした遺伝子治療に適したベクターシステムである。我々の作成したMNDベクターはこれまでのマウス白血病ウイルス由来のベクターと比較して長期の蛋白発現が期待できる有望なベクターシステムであると考えられる。

レンチウイルスベクターは human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)、simian immunodeficiency virus (SIV) などのレンチウイルスから作られたベクターの総称である。オンコレトロウイルスベクターはプレインテグレーション複合体が染色体DNAにたどり着くために細胞分裂時の核膜消失が必要であるため細胞分裂していない細胞に遺伝子導入することができない。このためレトロウイルスベクターは細胞分裂しないか、していても非常にゆっくりであると思われる造血幹細胞、神経細胞、肝細胞、筋細胞に遺伝子導入するには不向きである。一方、レンチウイルスはプレインテグレーション複合体に積極的に核膜を通過する機能があるのでこういった標的細胞には潜在的に有利である。レンチウイルスベクターの中でもっとも研究が進んでいるのはHIV-1ベクターであるが、HIV-1はAIDSの原因ウイルスであるため、安全面での改良が行われてきた。今回の我々のXLAに対する遺伝子治療の検討ではXidマウス造血幹細胞にレンチウイルスベクターを用いることでBtk遺伝子を効率よく導入でき、長期に安定して骨髄と脾臓の単核細胞に proviral DNA が検出された。血清 IgM, IgG3 値に関しては骨髄細胞の10から20%が正常細胞に置換されたキメラ移植群では有意な上昇が認められるのに対して、遺伝子治療群では血清 IgM, IgG3のいずれも改善が認められなかった。これ

は現行のXLAに対する遺伝子治療の方法では十分な表現型の改善に不十分であることを示唆している。この原因として移植した造血幹細胞において、1細胞当たりの導入遺伝子の発現量が低いのか、遺伝子導入ではB細胞の分化の各stageにおいて、Btkの発現量を調節する機構が必要なのか、同一のBtk遺伝子異常をもつヒトXLA症例で、重症度が異なることから、B細胞の分化の過程に、Btk遺伝子以外の遺伝子が関与しているのかなど、今後の検討が必要である。しかしながら、レトロウイルスベクターに共通した問題点として染色体のどの部位に挿入されるかわからないことがあげられていた。このために白血病などの悪性新生物の原因となることが危惧されていた。2002年にフランスのAlain Fischerらのグループからレトロウイルスベクターを用いたX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)の遺伝子治療で著明な治療効果を得られたことが報告されたが、数年後にこの心配が現実のものとなった。遺伝子治療を受けた10人の患者のうちで、最終的に治療効果のあった9人中、この免疫の再構築が不十分であった2人がT細胞性白血病を発症している。これらの患者の経過は以下のようなものである。一人は遺伝子治療後約30ヶ月で $\gamma\delta$ T細胞の増加を認め、同時期に感染していた水痘によるものと考えられていたが、T細胞数はそのまま指数的に増加した。遺伝子治療後約34ヶ月の時点で脾腫、骨髄浸潤を認め、末梢血細胞の細胞膜表面抗原は成熟T細胞型、免疫スコープ分析で $\gamma\delta$ TCRの単クローン(V γ 9 V δ 1)を示し、また染色体異常(der(13)t(6;13))も認めた。これらによりT細胞急性白血病と診断され化学療法を施行。遺伝子治療後40ヶ月に非血

縁HLA適合ドナーから骨髄移植を受けている。微小残存病変は残っているが現在の状態は良好とのことである。もう一人は遺伝子治療後34ヶ月に貧血を伴う白血球数の急上昇、脾腫、縦隔の拡大を認めた。末梢血細胞の細胞膜表面抗原は同様に成熟T細胞型で、免疫スコープ分析で $\alpha\beta$ TCRのオリゴクローン(V β 1, V β 2, V β 23)を示していた。また、SIL-TAL1転座、トリソミー10の染色体異常も認めた。T細胞急性白血病と診断し、化学療法を施行したところ臨床的に寛解に至っており現在のところ状態は良好とのことである。遺伝子導入部位をLinear Amplification Mediated PCR (LAM-PCR)法で解析したところPatient 4では原癌遺伝子LMO2 (LIM domain only-2)の転写開始部位下流約2kbに遺伝子の方向と逆向きに挿入されており、Patient 5では同じ遺伝子(LMO2)の転写開始部位上流約3kbに遺伝子の方向と同じ向きに挿入されており、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療がT-ALLの発症の直接的原因と考えられている。これらの事実を踏まえ、有効かつ安全な遺伝子治療を実現するためにはさらなる地道な研究が必要である。

論 文

Zhi CL, Migita M, Hayakawa J, Fukunaga Y. Establishment of modified retroviral vector targeting X-linked severe combined immunodeficiency J Nippon Med Sch 71:51-56,2004

埴 秀樹、島田 隆 レトロウイルスベクターによる遺伝子治療 ウイルス 53:177-183,2003

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RelAの発現低下も観察された。p85 α 欠損B細胞におけるc-Rel遺伝子の発現レベルは野生型マウス由来B細胞と同程度であり、PI3K経路の活性がc-Relタンパク質の細胞内での安定性に寄与している可能性が強く示唆された。

A. 研究目的

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^{1,3)}。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、BtkのPHドメインに点突然変異を有するXidマウスの表現型に類似しており、BtkのPHドメインがPI3Kによって生産されるPIP₃に*in vitro*で結合しうることなどから、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¹⁾。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²⁾。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のリン酸化を介してI κ Bの分解を誘導しNF- κ B経路の活性化を引き起こす。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。

B. 研究方法

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%)。同様に、Xidマウスならびにその対照となるCBAマウスからもB細胞を調製した。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。

C. 研究結果とD. 考察

B細胞受容体(BCR)を介したシグナルは、Lyn等のSrcファミリー分子の活性化とそれに引き続くBtkの活性化によって下流へと伝えられる。特にNF- κ B経路の活性化に関してはBtk

の活性化を介したPLC- γ 2の活性化が重要な役割を担うものと考えられている。すなわち、PLC- γ 2によって生成されるIP₃とDGが、PKC β II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し、その結果I κ B α のリン酸化と分解が誘導されることでNF- κ B経路のシグナルが核内へと伝えられる。PI3K欠損マウス由来B細胞においては、BCR刺激に伴うPLC- γ 2の活性化やPKCの活性化、ならびにI κ B α の分解の程度は野生型マウス由来B細胞と同程度であった(図、省略)。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法により検討した。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1A)。Xidマウス由来のB細胞においては、そのような変化は認められなかった(図1B)。さらに、RelAの発現レベルについても有意な低下が認められた(図1C)。同様の結果は野生型B細胞をPI3Kの阻害剤であるwortmanninやLY294002で処理した際にも観察され(図、省略)、末梢B細胞においてはPI3K経路がc-RelならびにRelA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。

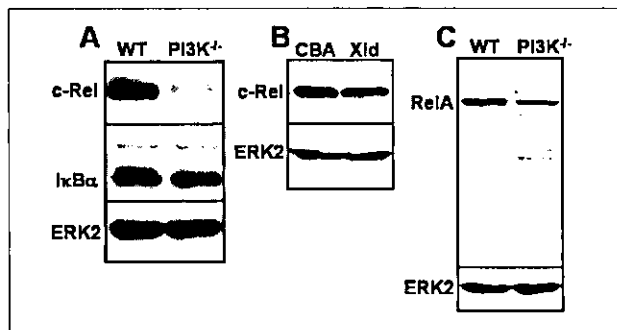


図1 NF- κ Bコンポーネントの発現レベルの評価
 各々のマウスの脾臓より調製したB細胞から細胞抽出液を調製し、抗c-Rel抗体、抗RelA抗体、抗I κ B α 抗体ならびに抗ERK2抗体でimmunoblot解析を行った。

次に我々は、PI3K経路によるこれらNF- κ Bコンポーネントの発現調節が遺伝子発現レベルで行われているか否かの検討を行った。野生型B細胞ならびにPI3K欠損B細胞からcDNAを調製し、

PCR法によりc-Relの発現を比較したところ、図2Aに示すようにほぼ同程度の発現が確認された。より定量的な解析を行うために、real-time PCR法を用いて β -actinならびにc-RelのmRNAの発現レベルを評価した場合にも、発現レベルに有意差は認められなかった(図2B)。RelAの発現レベルに関しても、同様に有意差は認められなかった(図、省略)。以上の結果は、PI3K経路がc-RelやRelAの発現調節をmRNA量レベルではなくタンパク質レベルで行っていることを強く示唆している。予備的な解析からは、PI3K経路がこれらNF- κ Bタンパク質の安定性の上昇に関与する事が示唆されている(図、省略)。実際、PI3K欠損B細胞由来の細胞抽出液中には抗RelA抗体に反応する低分子量のバンドが再現的に確認されており(図1C)、安定性低下に伴うRelAタンパク質の限定分解が生じている可能性を示している。

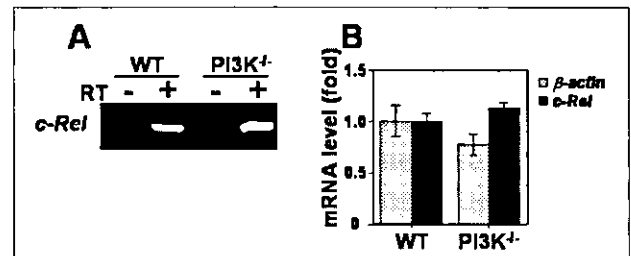


図2 c-Rel遺伝子の発現レベルの評価
 野生型B細胞ならびにPI3K欠損B細胞から各々cDNAを調製して、PCR法(A)ならびにreal-time PCR法により、c-Rel mRNAの発現レベルの評価を行った。

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^{2,3)}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B細胞の示す表現型の少なくとも一部がc-Relの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。現在、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、レンチウイルスを用いてc-Rel遺伝子を導入した骨髄細胞による再構成系を用いて解析している。

E. 結論

PI3K欠損マウスにおけるB細胞の機能不全は、Btkの活性化の異常を介したのではなく、