

c-Rel ならびに RelA といったNF- $\kappa$ Bコンポーネントの発現低下によって引き起こされている事が強く示唆された。PI3K経路は、これらNF- $\kappa$ Bコンポーネントのタンパク質レベルでの安定化に重要な役割を担っているものと予想される。PI3K欠損マウスと Xid マウスの類似性から鑑みて、PI3K経路によるNF- $\kappa$ Bコンポーネントの安定性の分子機構の解明は、XLA類似症例の原因遺伝子特定へと繋がる事が期待される。

#### 参考文献

- 1) Suzuki, H., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Aizawa, S., Yazaki, Y., Kadowaki, T., and Koyasu, S. Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85 $\alpha$  subunit of phosphoinositide 3-kinase. (1999) *Science*. 283 (5400), 390-392.
- 2) Suzuki, H., Matsuda, S., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Ohteki, T., Asano, T., Behrens, T. W., Kouro, T., Takatsu, K., Kadowaki, T., and Koyasu, S. PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction. (2003) *Nat. Immunol.* 4 (3), 280-286.
- 3) Koyasu, S. Role of class IA phosphoinositide 3-kinase in B lymphocyte development and functions. (2004) *Biochem. Soc. Trans.* 32 (Pt2), 320-325.

# ヒトの $\lambda 5$ 欠損症で高頻度に出現する軽鎖非依存性異常 $\mu$ H鎖の構造機能解析

烏 山 一 (東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学)  
峯 岸 克 行 (東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学)

## 【研究要旨】

先天性無ガンマグロブリン血症の1つに $\lambda 5$ 欠損症があるが、本疾患においては、代替軽鎖・免疫グロブリン軽鎖のいずれも必要とせず、細胞表面に単独で発現する異常な $\mu$ H鎖が高頻度で存在する。本研究により、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖は、 $\lambda 5$ 遺伝子を欠損する遺伝的背景においては、プロB細胞からプレB細胞への分化に対して促進的に働くことが明らかにされた。さらに、この異常 $\mu$ H鎖をコードするためには、CDR3領域の塩基性アミノ酸が重要であることが示され、CDR3領域の陽性荷電アミノ酸の発現を制御することは、 $\mu$ H鎖の品質管理と正常なB細胞分化に必須であることが明らかになった。

## A. 研究目的

先天性無ガンマグロブリン血症は、頻度の高い液性免疫不全症の1つで、その患児は小児期より細菌感染症に反復罹患する。その原因としてこれまでに5種類の遺伝子が同定されているが、そのいずれもがプレB細胞レセプター (preBCR) に関連しており、このことは、preBCR がヒトのB細胞分化に必須なレセプターであることを示している。無ガンマグロブリン血症の原因の1つに代替軽鎖の $\lambda 5$ 欠損症がある。以前に我々は、ヒトの $\lambda 5$ 欠損症を報告したが、その骨髄プロB細胞の解析から、代替軽鎖・免疫グロブリン軽鎖のいずれとの会合も必要とせずに、細胞表面に単独で発現する異常な $\mu$ H鎖が存在することを発見した。この異常 $\mu$ H鎖は、CDR3領域に多数の陽性荷電のアミノ酸を有するという構造上の特徴を有しており、正常骨髄プロB細胞に発現する $\mu$ H鎖の約10%を占めていた。しかし、プレB細胞以降の分化段階ではこのような異常な $\mu$ H鎖は著しく減少しており、何らかのネガティブセレクションがプロB細胞からプレB細胞への分化段階で働いているものと考えられた。

我々は、さらに $\lambda 5$ 欠損症の骨髄細胞を詳細に検討することにより、本疾患においては、ほかの

先天性無ガンマグロブリン血症 (伴性無ガンマグロブリン血症、 $\mu$ H鎖欠損症、Ig $\alpha$ 欠損症、BLNK欠損症) と比較して、異常な軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖の発現頻度が約3倍に増加していることを見出した。このことは、 $\lambda 5$ の非存在下においては、この異常な $\mu$ H鎖がプロB細胞の生存または増殖に有利に働く可能性を示唆する。そこで、 $\lambda 5$ 欠損症の病態を理解することを目的として、 $\lambda 5$ 欠損症においてこの異常な $\mu$ H鎖の頻度が高い原因を検討し、さらに異常な $\mu$ H鎖の生成される条件を分子生物学的に検討した。

## B. 研究方法

1.  $\lambda 5$ 遺伝子を欠損し、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖を発現するトランスジェニックマウスの作成  
軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖を発現するトランスジェニックマウスは、常法に従い作成し、その詳細は昨年度に報告した。このマウスと $\lambda 5$ 遺伝子を欠損するマウスとを交配し、 $\lambda 5$ 遺伝子を欠損し軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖を発現するダブルトランスジェニックマウスを作成した。遺伝的バックグラウンドを同一にするために、C57BL/6と8世代以上交配し、これを検討に用いた。
2. ダブルトランスジェニックマウスの解析

トランスジェニックマウスならびにコントロールマウスより、骨髄細胞、脾臓細胞、腹腔細胞を常法に従い分離した。その細胞をB細胞に特異的な抗体、分化段階に特異的な抗体で染色して、flow cytometerにて解析した。使用した抗体、CD45R/B220 (RA3-6B2), anti-human  $\mu$  (G20-127), CD43 (S7), CD117 (2B8), CD25 (7D4), CD2 (RM2.5), CD5 (L17F12)で、いずれもBD-P harmingenより購入した。

### 3. 人工的な免疫グロブリン $\mu$ H鎖の作成とその機能解析

ヒト骨髄細胞より得られた、免疫グロブリン可変部領域を鋳型として、VH領域を *in vitro* mutagenesisにより改変し、各種の分泌型の免疫グロブリン $\mu$ H鎖の変異体を作成した。これを、COS7細胞に遺伝子導入し、細胞内と上清中の $\mu$ Hタンパクの量を検討することにより、軽鎖非依存性 $\mu$ 重鎖を構成するための条件を検討した。

## C. 研究結果

### 1. $\lambda 5$ 遺伝子を欠損するマウスにおいては、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖の発現は、プロB細胞からプレB細胞への分化を促進する

$\lambda 5$ 遺伝子を欠損する遺伝的背景において、トランスジーンを発現しない Litter mate (LM)、コントロールの軽鎖依存性 $\mu$ H鎖 (LC-dependent)、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖 (LC-independent) トランスジェニックマウスのB細胞分化について検討した。 $\lambda 5$ 遺伝子を欠損するマウスにおいては、その骨髄内B細胞分化がプロB細胞から、プレB細胞への分化段階で強く障害されているため、図1のLMにおいては、 $B220^+ CD117^+$ のプロB細胞集団は、正常に存在するが、次の分化段階の $B220^+ CD117^-$ のプレB細胞が著減している。正常の軽鎖依存性 $\mu$ H鎖を発現するマウス (LC-dependent) においても、同様のプロB細胞からプレB細胞への分化のブロックが見られた。これに対して、この軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖を発現するトランスジェニックマウス (LC-independent) においては、正常にプロB細胞からプレB細胞への移行が認められ、 $B220$ 陽性細胞のほとんどが、C

D117陰性になっていた。このことは、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖は、 $\lambda 5$ 遺伝子を欠損する遺伝的背景においては、プロB細胞からプレB細胞への分化に対して促進的に働くものと考えら、ヒトの $\lambda 5$ 欠損症において軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖が増加していることと一致する現象と考えられた。

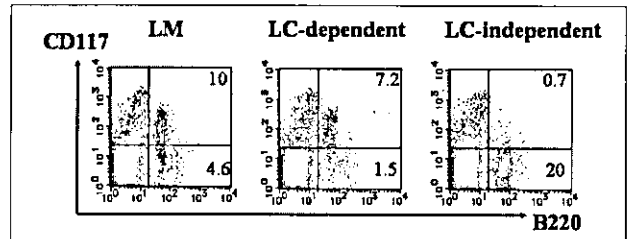


図1  $\lambda 5$ 欠損症において、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖の発現は、プロB細胞からプレB細胞への分化を促進する

### 2. 免疫グロブリン可変部にVH3-23分節とCDR3領域に4個の連続した塩基性アミノ酸があれば軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖となる

次に、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖を生成するための条件を検討するために、VH領域を *in vitro* mutagenesisにより改変し、各種の分泌型の免疫グロブリン $\mu$ H鎖の変異体を作成、これが軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖であるか否かを、COS7細胞に遺伝子導入して検討した。まず、CDR3領域について検討するためにVH分節にはVH3-23を用いて、CDR3に人工的なアミノ酸配列を導入した。具体的には、4個の中性アミノ酸グリシン、4個の塩基性アミノ酸のアルギニンとリジンとヒスチジン、酸性アミノ酸のアスパラギン酸をCDR3に挿入し、これらの免疫グロブリン $\mu$ H鎖のCOS7細胞内での挙動を免疫沈降法により検討した。その結果、VH3-23とCDR3領域内の4個の連続するアルギニンまたはリジンがあれば、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖

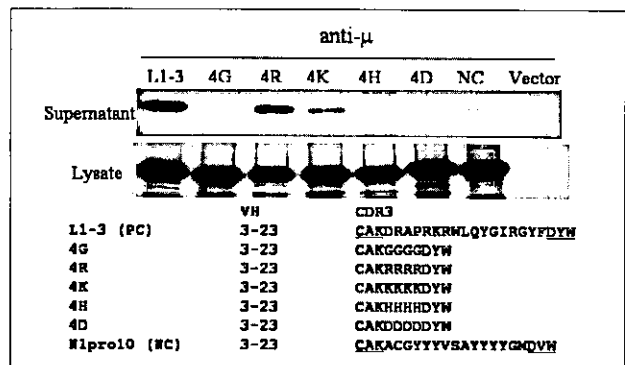


図2 VH3-23分節とCDR3領域の4個の連続したArgまたはLysがあれば軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖となる

をコードできることが明らかになった (図2)。

### 3. VH3-23も軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖の形成に重要である

さらに、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖を生成するための条件をVHの側から検討するために、VH3-23を有する陽性コントロールのクローンL1-3と同一のCDR3を持ち、VHをそれぞれ、VH3-7、VH3-11、VH3-13、VH3-15、VH3-30、VH3-33、VH3-74に変更した $\mu$ H鎖を作成し、同様の検討を行った。その結果、VH分節は、VH3-23、VH3-7、VH3-15の様に軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖を形成しやすいものと、VH3-11、VH3-13の様に軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖を構成しにくいものとに分けられることが明らかとなった (図3)。また、このことは、ヒトの軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖においては、VH3-23、VH3-7、VH3-15が高頻度で使用され、VH3-11、VH3-13が見られないこととよく一致していた。

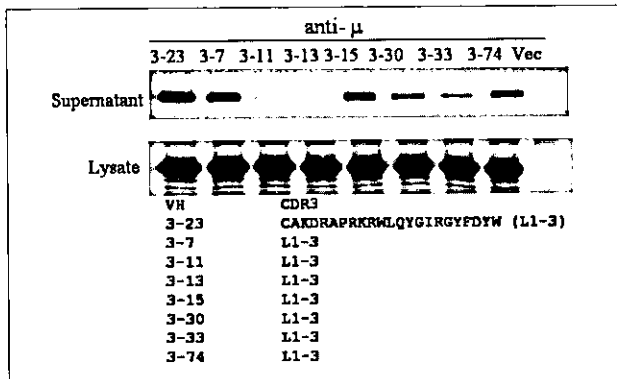


図3 VH3-23も軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖の形成に重要である

## D. 考察

われわれは、ヒトの $\lambda$ 5欠損症の骨髄細胞より、免疫グロブリンL鎖との会合を必要とせずに、細胞表面に単独で発現できる異常な免疫グロブリンH鎖を見出した。この異常H鎖は、ヒト骨髄において、正常プロB細胞の約10%を占めているものの、プレB細胞以降の分化段階ではほとんど存在せず、何らかのネガティブセレクションを受けているものと考えられた。そこで、この異常H鎖を発現するトランスジェニックマウスを作成したところ、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖の発現はマウスの正常B細胞分化をサポートできないばかりでなく、末梢B細胞数の減少を来すことが明らかになった。また、末梢に少数存在するB細胞表面のヒトIgM

の発現量は、コントロールマウスと比較して、約10分の1に減少しており、このことは、レセプターのダウンレギュレーションによるB細胞トレランスが成立していることを示唆していた。

本研究においては、このトランスジェニックマウスを用いて、ヒトの $\lambda$ 5欠損症においては、この異常な軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖が逆に増加している謎を追究した。その結果、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖は、 $\lambda$ 5遺伝子を欠損する遺伝的背景においては、プロB細胞からプレB細胞への分化に対して促進的に働くことが明らかになされ、ヒトの $\lambda$ 5欠損症において軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖が増加していることとよく一致していた。軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖は、プロB細胞からプレB細胞への分化に対して促進的に働くものの、それ以後のB細胞分化はヒトにおいても、このトランスジェニックマウスにおいてもいずれにおいても支持することはできなかった。この原因を解明し、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖により、末梢のB細胞への分化を誘導することができれば、ヒトの $\lambda$ 5欠損症の原因療法となりうるため、さらなる研究を進めている。

軽鎖非依存性異常 $\mu$ H鎖の構造と機能についての検討から、VH3-23とCDR3領域の4個の連続するアルギニンまたはリジンがあることが、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖をコードするための十分条件であることが明らかとなった。正常の免疫グロブリンレパトアにおいては、CDR3領域の塩基性アミノ酸の出現頻度が低く、この異常な $\mu$ H鎖を発現するトランスジェニックマウスでは、B細胞の末梢でのアポトーシスが亢進し、B細胞数の顕著な減少を伴う免疫不全症を発症することからも、CDR3領域の陽性荷電アミノ酸の発現を制御することは、 $\mu$ H鎖の品質管理と正常なB細胞分化に重要であることが明らかになった。

## E. 結論

1.  $\lambda$ 5遺伝子を欠損するマウスにおいては、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖の発現は、プロB細胞からプレB細胞への分化を促進する。このため、ヒトの $\lambda$ 5欠損症においては、軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖の発現頻度が上昇していたものと考えられる。

2. 免疫グロブリン可変部にVH3-23を有し、CDR3領域に4個の連続した塩基性アミノ酸 (ArgあるいはLys)があれば軽鎖非依存性 $\mu$ H鎖となる。
3. VH3-23分節を他のVH分節に変えると、軽鎖非依存性は減少するが、その程度は、各々のVH分節により様々である。
4. 免疫グロブリン可変部のCDR3領域の陽性荷電アミノ酸の発現を制御することは、免疫グロブリン $\mu$ H鎖の品質管理と正常なB細胞分化に重要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tomizawa D, Imai K, Ito S, Kajiwara M, Minegishi Y, Nagasawa M, Morio T, Nonoyama S, Mizutani S. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for seven children with X-linked hyper-IgM syndrome: a single center experience. *Am J Hematol.* 2004 76(1):33-39
- 2) 小児内科36特集 免疫不全症  
ヒトにおけるB細胞の発達過程  
峯岸克行、烏山 一 1697-1701, 2004
- 3) 小児内科36特集 免疫不全症  
常染色体劣性の遺伝形式をとる無ガンマグロブリン血症 峯岸克行 1740-1743, 2004

### 4) B細胞初期分化異常と疾患

峯岸克行、烏山 一 医学の歩み  
221(6)、663-668、2004

### 5) キーワードで理解する免疫学イラストマップ

羊土社 烏山 一編

6章免疫と疾患 4節 免疫不全症 峯岸克行  
p204-p213

### 6) サイトカインのシグナル伝達異常により発症する免疫不全症

Primary immunodeficiency resulting from defects in cytokine signaling

別冊医学の歩み state of arts サイトカイン  
p292-295, 2004

### 2. 学会発表

第12回国際免疫学会 モントリオール カナダ  
In vivo functional characterization of light chain independent  $\mu$  heavy chain  
Yoshiyuki Minegishi, Hiroki Yasudo, Yohei Kawano, Mary Ellen Conley, Hajime Karasuyama 071804-072504

第34回日本免疫学会総会・学術集会

$\mu$ 重鎖の軽鎖非依存性を決定する可変部領域の構造解析と軽鎖非依存性 $\mu$ 重鎖のリガンドの検討

東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学  
峯岸克行、安戸裕貴、河野洋平、烏山 一  
120104-120304

# プロテオーム解析による免疫不全症の原因分子探索の試みに関する研究

河野 雅 之 (千葉大学大学院医学研究院、  
理化学研究所・免疫アレルギーセンター・免疫シグナル)  
斉藤 隆 (理化学研究所・免疫アレルギーセンター・免疫シグナル)  
木村 弥生 (理化学研究所・免疫アレルギーセンター・免疫ゲノミクス)  
小原 収 (かずさDNA研究所・ヒト遺伝子研究部、  
理化学研究所・免疫アレルギーセンター・免疫ゲノミクス)  
金兼 弘和 (富山医科薬科大学・小児科学)  
宮脇 利男 (富山医科薬科大学・小児科学)

## 【研究要旨】

原因不明な免疫不全症の原因遺伝子の同定へのプロテオーム解析の適応を試みた。まず、既知の単一遺伝子欠損マウス及び免疫不全症細胞を用いて2次元電気泳動(2D)解析を行った。細胞骨格を構成するモエシン欠損マウスの細胞では、モエシンの欠損が検出された。XLA及びWAS患者由来の細胞株の解析では、Btk欠損は検出可能であったがWASPは困難であった。しかし、4つのWAS患者由来細胞株は同様な2Dパターンを示し、患者細胞に特異的な蛋白が同定できたことから、プロテオーム解析による疾病関連蛋白同定の可能性が示唆された。TCR発現低下を伴う未知先天性免疫不全症と考えられる患者の末梢リンパ球にこの2D解析を応用した。TCR刺激培養後に患者特異的に欠損している蛋白として procaspase-3 を同定した。しかし刺激前の患者リンパ球では procaspase-3 が発現し、活性化されていることが判明した。caspase-8も同様であり、アポトーシスシグナルの制御に異常があると考えられた。

## A. 研究目的

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

ルは正常に検出できるがタンパク質がない例が多い。これまでのプロテオーム解析で、TCR刺激培養後に患者特異的に欠損している蛋白として procaspase-3 を同定した。しかし、刺激前の患者リンパ球では procaspase-3 が発現していたことから、遺伝子の発現欠損ではなくTCR刺激による caspase 活性化の異常ではないかと考え、caspase シグナル系の上流である caspase-8 とともに caspase 活性を測定するとともに、caspase の活性調節分子の変異解析を行った。

一方、プロテオーム解析が広く遺伝子欠損や異常に伴う免疫不全症への応用の可能性を検討するために、X連鎖無 $\gamma$ グロブリン血症(XLA)患者及びWiskott-Aldrich症候群(WAS)患者由来細胞株を用いて、それぞれの原因遺伝子であるBtk及びWASP欠損の検出、および患者に共通

して増減する蛋白の同定を試みた。

## B. 研究方法

XLA患者、WAS患者及び健常者由来のEpstein-Barrウイルス形質変換系B細胞株をRipa Bufferで溶解し、遠心処理後の可溶画分にIEF sample bufferを加え、IEF/SDS-PAGEの2次元ゲルで展開して解析した。SYPRO Ruby染色により可視化しMALDI-TOFを用いて蛋白同定した。Btk及びWASPスポット同定には、患者及び正常サンプルそれぞれ2枚のIEF/SDS-PAGEの2次元ゲルで展開しPVDFメンブレンにtransferした。一方はそれぞれの特異的抗体でスポットを検出し、もう一方は金コロイド染色により全スポットを可視化した。

富山医科薬科大学により採取された患者及び健常人の末梢血からリンパ球を単離した。そのままの細胞、または、抗CD3+CD28抗体で刺激し、caspase-3/8 assay kit (B-Bridge)を用いてFACS解析した。また、得られた無刺激のリンパ球からm-RNAを単離精製しマイクロアレイ解析によって調節分子の発現を解析した。

(倫理面への配慮)

患者サンプルのDNAアレイ・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、患者さんの承諾を受けたサンプルの解析を進めている。

## C. 研究結果

XLA患者及び健常者由来細胞株のライセートを2次元ゲルで展開しSYPRO Ruby染色後に比較解析した。両者とも1000以上の蛋白スポットが検出され大半のスポットは一致していた。Btk抗体でのwestern blotによりスポットを特定し、金コロイド染色されたメンブレンで正常のみBtkスポットが検出できた。WAS細胞株でも同様な解析を行ったが、WASPスポットの同定は困難であった。

次にWAS患者由来の5種類の細胞株と健常者由来細胞株との比較により、患者細胞共通に変動

する蛋白が見出せるかどうかを調べた。SYPRO Ruby染色により可視化した結果、一例を除き、4例の患者細胞と正常細胞のパターンはほぼ一致した。WAS患者細胞特異的に発現上昇がみられた蛋白として、アクチン重合/脱重合制御に関するcapping protein (actin filament)を同定した。また、WAS患者細胞特異的に発現低下がみられた蛋白としては、SHP-1、Annexin IV、HLA-B、putative breast adenocarcinomaを同定した。

TCR発現低下を伴う未知先天性免疫不全症患者と考えられる患者の末梢リンパ球を用いて2D解析を行い、原因遺伝子の解明を試みた。TCR刺激培養後に患者特異的に欠損している蛋白としてprocaspase-3を同定した。しかし、刺激前の患者リンパ球では正常レベルのprocaspase-3が発現していること、及び刺激前からcaspaseの活性化が誘導されていることが判明した。caspase-8も同様な傾向がみられることから、アポトーシスシグナルの制御に異常があると考えられ、アポトーシスに伴うDISC-caspase-8/3を制御するシグナル分子(Caspase-8、Flip、FLASH及びFADD)の発現をマイクロアレイにより解析したが変化はみられなかった。

## D. 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、歴史的には家系に基づくポジショナルクローニングしかなかった。そこで新たな解析アプローチとしてプロテオーム解析の可能性を検討してきた。既知の単一遺伝子欠損及び免疫不全症細胞を用いて2D解析により欠損分子を同定できるかどうか調べた。細胞骨格分子モエシン欠損マウスと野生型マウスの2Dゲル比較解析では銀染色レベルでモエシン分子の欠損が確認できた。XLA患者由来細胞株と正常細胞株の2Dゲル比較解析では、Btk抗体を用いウエスタンブロットでBtkの位置を特定したうえで、より高感度な金コロイド染色によりBtkスポットを正常細胞株のみ検出することができた。WAS患者由来細胞株と正常細胞

株の2Dゲル比較解析では、Btkと同様な操作を行ったが、WASPスポットの検出は困難であった。今回の3種の蛋白解析のなかで、モエシンは比較的容易に検出できたが、Btkは等電点電気泳動においてBtk蛋白の一部が不溶化する現象がみられ、WASPはウェスタンブロットで複数スポットが分散して検出された。現行の2次元電気泳動による蛋白分離法ではシグナル伝達に関わるような発現の少ない分子のスポットとしての検出はまだ困難であり、細胞の可溶化条件の検討、成分の分画化による解析、等電点電気泳動の分離能の改良等、いくつかの律速となる問題点を改良しなければ、正常細胞での少量の内在性蛋白の解析は困難と思われる。

免疫不全症細胞株を用いた2D解析により疾患に関連する分子の探索が可能かを試みた。XLA患者由来細胞株は樹立が困難であり2株のみ解析できた。一方が他方の患者細胞及び正常細胞と大きくパターンが異なっており、患者細胞共通に変動する蛋白の探索は不可能であった。一方、WASでは4例の患者細胞と正常細胞間においてスポットパターンがほぼ一致していた。WAS患者細胞特異的に発現上昇がみられたcapping protein (actin filament)はアクチンフィラメントの末端に結合し、アクチン分子の付加と脱離を抑える分子で、WASP欠損に伴うアクチン重合制御に関与している可能性が考えられる。また、WAS患者細胞特異的に発現低下がみられた蛋白の中で、SHP-1は免疫細胞のnegative-regulator、Annexin IVは抗炎症作用及び抗血液凝固作用を示し、これらがWASの多彩な症状とどのように関連性があるかを今後検討していく予定である。

TCR発現低下を伴う未知先天性免疫不全症と考えられる患者に関しては、これまでT細胞受容体に関与すると推察される遺伝子を解析してきた。この間、プロテオーム解析によりcaspase-3/8の活性化異常を見出したことによりcaspase及びアポトーシスを誘導するDISC(細胞死誘導シグナル複合体)を制御する分子に異常がある可能性を考え、解析を進める予定である。

## E. 結 論

今回の解析により、免疫不全症患者の細胞および細胞株を用いることによるプロテオーム解析では、欠損が検出可能な場合もあるが、同定は困難であることが判明した。しかし、患者由来細胞によって、疾患に特異的に増減している蛋白を同定することは可能であり、関連分子の同定には有効と思われる。プロテオーム解析により、この3年間解析してきたTCR発現異常を伴う患者については、アポトーシスの抑制系分子の異常の可能性が示唆された。

## 謝 辞

WAS患者由来細胞株をご供与いただきました、東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野の土屋滋先生、防衛医科大学小児科学の野々山恵章先生に深謝いたします。

## F. 研究発表

- 1) Sakurai, D., Yamasaki, S., Arase, K., Park, S. Y., Arase, H., Konno, A. and Saito, T.: FcRI-immunoreceptor tyrosine-based activation motif is differentially required for mast cell function in vivo. *J. Immunol.* 172(4):2374-2381 2004.
- 2) Shiratori, I., Ogasawara, K., Saito, T., Lanier, L. L.: Activation of natural killer cells and dendritic cells upon recognition of a novel CD99-like ligand by paired immunoglobulin-like type 2 receptor. *J. Exp. Med.* 199(4):525-533, 2004.
- 3) Kuroyama, H., Ikeda, T., Kasai, M., Yamasaki, S., Tatsumi, M., Utsuyama, M., Saito, T. and Hirokawa, K.: Identification of a novel isoform of ZAP-70, truncated ZAP kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315(4): 935-941, 2004.
- 4) Yamasaki, S., Ishikawa, E., Kohno, M. and Saito, T.: The quantity and duration of FcR $\gamma$  signals determines mast cell degranulation and survival. *Blood.* 103(8):



- 3093-3101, 2004.
- 5) Ishizuka, M., Toyama, Y., Watanabe, H., Fujiki, Y., Takeuchi, A., Yamasaki, S., Yuasa, S., Miyazaki, M., Nakajima, N., Taki, S. and Saito, T.: Overexpression of human acyl CoA thioesterase upregulates peroxisome biogenesis. *Exp. Cell. Res.* 297(1):127-141, 2004.
  - 6) Ohtsuka, M., Arase, H., Takeuchi, A., Yamasaki, S., Shiina, R., Suenaga, T., Sakurai, D., Yokosuka, T., Arase, N., Iwashima, M., Kitamura, T., Moriya, H., and Saito, T.: NFAM1, a new ITAM<sup>+</sup> surface molecule that regulates development and signaling of B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(21):8126-8131, 2004.
  - 7) Ishikawa, S., Arase, N., Suenaga, T., Saita, Y., Noda, M., Kuriyama, T., Arase, H. and Saito, T.: Involvement of FcR  $\gamma$  in signal transduction of osteoclast-associated receptor (OSCAR). *Int. Immunol.* 16(7): 1019-1025, 2004.
  - 8) Tomassini, B., Malisan, F., Franchi, L., Nicolo, C., Brea-Calvo, G., Saito, T. and Testi, R.: Calnexin suppresses GD3 synthase-induced apoptosis. *FASEB J.* 18(13):1553-1555, 2004.
  - 9) Nakatsu, F., Okada, M., Mori, F., Kumazawa, N., Iwasa, H., Zhu, G., Kasagi, Y., Kamiya, H., Harada, A., Nishimura, K., Takeuchi, A., Miyazaki, T., Watanabe, M., Yuasa, S., Manabe, T., Wakabayashi, K., Kaneko, S., Saito, T., and Ohno, H.: Defective function of GABA-containing synaptic vesicles in mice lacking the AP-3B clathrin adaptor *J. Cell Biol.* 167(2):293-302, 2004.
  - 10) Hara, H., Bakai, C., Wada, T., Bouchard, D., Rottapel, R., Saito, T. and Penninger, J. M.: The molecular adapter Carma1 controls entry of IKK into the central immune synapse. *J. Exp. Med.* in press.
  - 11) Tamura T, Ariga H, Kinashi T, Uehara S, Kikuchi T, Nakada M, Tokunaga T, Xu W, Kariyone A, Saito T, Kitamura T, Maxwell G, Takaki S, Takatsu K.: The role of antigenic peptide in CD4<sup>+</sup> T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int Immunol.* 16(12):1691-9, 2004.
  - 12) Yamasaki, S. and Saito, T.: Inhibitory adaptors in lymphocytes. *Semin Immunol.* 16(6); 421-427, 2004.
  - 13) Kohno, M., Yamasaki, S., Tybulewicz, VL and Saito, T.: Rapid and large amount of autocrine IL-3 production is responsible for mast cell survival by IgE in the absence of antigen. *Blood* in press.
  - 14) Suzuki, N., Suzuki, S. and Saito, T.: IRAKs: key regulatory kinases of innate immunity. *Curr. Med. Chem.* in press.
  - 15) Takahashi, S., Kataoka, H., Hara, S., Yokosuka, T., Takase, K., Yamasaki, S., Saito, Y. and Saito, T.: *In vivo* overexpression of CTLA-4 suppresses lymphoproliferative diseases and thymic negative selection. *Eur. J. Immunol.* In press.

# 膠原病様症状を伴った外胚葉形成不全免疫不全症症例の解析

布井博幸 (宮崎大学医学部小児科教授)

水上智之 (宮崎大学医学部小児科助手)

## 【研究要旨】

幼少期より易感染性と下痢を伴った症例を経験し、歯牙形成不全と発汗異常を伴っていたこと、IKK- $\beta$  蛋白をコードするNEMO遺伝子変異が証明されたことより外胚葉形成不全免疫不全症と診断した。同患者は3歳の時より激しい痛みを伴った間質性肺炎像、また4歳の時には歩行困難なほどの膝関節炎を伴った膠原病様症状を呈し、現在ステロイド剤およびメソトレキセート少量療法とシクロスポリンで小康を得ている。同疾患では臨床症状が多彩であることが知られているが、自己免疫性疾患の症状を示した症例の報告が無く注目すべき症例と考え文献的考察を加えて報告する。

## A. 研究目的

Zonanaら<sup>1)</sup>は色素失調症で歯牙欠損、粗な頭髮、発汗の低下といった外胚葉形成不全の症状と免疫不全を伴う家系が知られていたことより、色素失調症が原因遺伝子(NF- $\kappa$ B Essential Modulator: NEMO)の大きな欠失であるのに、この易感染性を示す外胚葉形成不全免疫不全症(Ectodermal Dysplasia and Immunodeficiency: EDA-ID)ではNEMO遺伝子変異であることを明らかにした。これまで、歯牙欠損、粗な頭髮、発汗の低下を伴った免疫不全症は、X染色体劣性遺伝形式をとるタイプ(XL-EDA-ID)ではNEMOが、また常染色体優性遺伝形式をとるタイプ(AD-EDA-ID)ではI $\kappa$ B $\alpha$ が原因遺伝子など、NF- $\kappa$ B活性過程の異常が同定されている。

前者はTLR, IL-1R, TNF- $\alpha$ R, CD40R, IL-18R, TCR, BCR, Ectodysplasia 等などのレセプターからのシグナルを受けてNF- $\kappa$ Bの活性化するのに重要な分子であることが知られていた。そのため、LPS, TNF- $\alpha$ 等に対する反応低下、B細胞でのクラススイッチの低下、皮膚歯牙の発生のシグナル異常による症状が引き起こされると理解されていた。特に、肺炎球菌やインフルエンザ桿菌、非定型抗酸菌、カリニ肺炎、サイトメガロウイルス肺炎にも罹患しやすいと報告されている。X420WのNEMO変異では大理石病と下肢のリン

パ浮腫の合併や低ガンマグロブリン血症、高IgM血症などの合併例も報告されている。

しかし、これまで、我々が経験したような自己免疫性疾患様の症状合併した報告されたことがなく、非常に貴重な症例と思われたので報告する。

## B. 研究方法

患者の臨床経過：患者は平成14年度の報告で「IFN- $\gamma$ 産生能低下と白血球増多症を呈した症例の免疫学的検討」として3歳児まで報告した症例であるので概略に留めるが、その後JIA様の症状を呈し、NEMO遺伝子変異が同定されたので、加筆し報告する。

在胎41週6日出生、直後より白血球数が3万台と高く、NICUに入院となる。退院後も不明熱を繰り返し、白血球増多の状態であった。生後1ヶ月から発熱を繰り返し、2ヶ月に水痘、生後3ヶ月にPRSP化膿性髄膜炎に罹患し、カルベニン点滴にて軽快している。5ヶ月帯状疱疹不明熱や難治性下痢にて、免疫不全が疑われ何度も入院している。その後も白血球増多症(3万)、血小板増多(80万)、鉄欠乏性貧血が持続し、以後も咽頭炎、腸炎、肺炎などで同院入院を繰り返していた。4歳時には胸痛を伴う発熱でBOOP(器質性肺炎をとまう閉塞性細気管支炎)と診断され、ステロイドの長期治療を受け、減量中でも手足首顔に

圧痛を伴う紅色の発疹が出現していた。5歳時には発熱と両膝関節痛と腫脹を伴い歩行困難となり、若年性関節リウマチと診断し、ステロイド15mg/dayまで減量した頃より手足皮疹の増加、WBC増多(14,800/ $\mu$ L)、CRP高値(3.4mg/dL)が出現した。高脂血症、高血圧、体重増加などステロイドの副作用が顕著であり、MTX 5mg/wk(7.5mg/m<sup>2</sup>/wk)の併用開始、シクロスポリンA増量90mg/day(当時体重の4.5mg/kg)にて軽快を継続している。

家族歴：父親に高血圧、脳出血がある以外、特に異常なし(後の遺伝子解析で母親が健康保因者であることが判明した)

実験方法：平成14年度報告で詳細に述べたので、新たに追加変更した方法のみ記載する。

塩基配列決定<sup>2)</sup>：NEMO遺伝子DNAでの各 exon 及び cDNA の塩基配列決定を行った。

### C. 結 果

1) 塩基配列決定：G505C(A169P)のアミノ酸置換を伴うNEMO遺伝子変異を認めた。この変異は、これまでに報告のないもので、JSNPでも、このSNPは登録されていない。実際活性が低下しているかを見る必要がある。母親にも同様なヘテロの変異と認めた(図1)。IL-12, IL-12 Receptor, JAK2, STAT4の遺伝子塩基配列決定にて異常なし。

2) エクリン腺の免疫組織的検査：エクリン腺特異的抗体(a-CEA)による免疫組織的検査で、エクリン腺が認められなかった(図2)。

3) 疫学的検査：

Ig mg/dl	IgG	IgA	IgM	IgE
3歳	1252	1791	31	62
5歳	1525	1404	90	
6歳	983	884	63	

IgG1 1000, IgG2 106, IgG3 101, IgG 45mg/dl(3歳)

PHA, ConA反応正常、

NK活性0.8(正常12.2)低下、LAK活性低下

3) PHA, ConA, LPSによるリンパ球サイトカイン産生能(表1：平成14年度報告 表1)

IL-2, -4, -5, -10, IFN- $\gamma$ 産生能低下があるが、IL-6, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ の産生はむしろ亢進していた。

4) リンパ球細胞表面マーカーの変化：

	CD3+	CD4+	CD8+	CD20+	CD56+/HLA-DR
3歳時	25.4	6.6	14.8	69.2	3.2/
6歳時	42.5	8.3	16.7	36.2	/33.9
治療後	67.9	21.6	47.8	18.9	/22.6

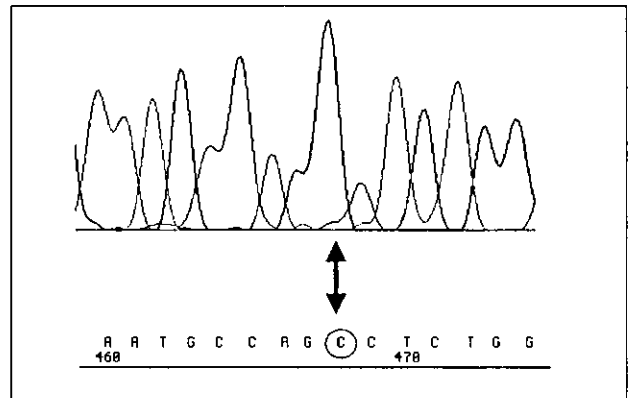


図1 NEMO遺伝子解析結果 京都大学西小森先生による。

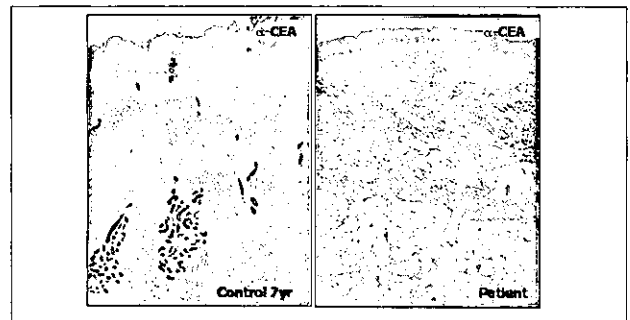


図2 無汗症：皮膚エクリン腺の欠損 解析は熊本大学皮膚科影下登志郎先生による。

5) Th1細胞解析

IFN- $\gamma$ +(%)	CD4+	CD8+	CD56+
8M	1.14	8.83	2.00
1y	3.18	70.40	66.29
4y	11.89	65.48	82.79

Th1およびTh2細胞低下、乳幼児期はCD4, CD8, CD56細胞でのIFN- $\gamma$ の産生細胞割合は極めて低値であったが、年を経る毎にやや回復傾向はあるものの、時期によりその値は非常に不安定であった。

6) IL-12反応性：3歳時のT細胞およびNK細胞のIL-12反応性は極めて低レベルであった(表2：平成14年度報告 表2)。

7) TCRレポーター解析：TCRのVβおよびVαのレポーター解析を行ったところ、そのレポーターにかなり偏りが認められた。(図3：平成14年度報告 図4)

#### D. 考 察

NEMO遺伝子に変異を有する外肺葉形成不全免疫不全症候群を経験した。

我々の症例でも3歳までは肺炎球菌やインフルエンザ桿菌に頻回に罹患していた。免疫能検査ではB細胞(B1細胞様)の増加とT細胞の低下が認められている。B細胞異常についてはそのポピュレーションの異常と血清免疫グロブリンの異常、とくにIgA高値が認められている。このような異常はNEMO異常症では色々報告されており、Jain AらはCD40Lで刺激したときのp65とc-Rel活性化が傷害されていることを3名のC417RおよびC417Y変異の患者で証明している<sup>3)</sup>。

T細胞機能ではインターフェロン・ガンマ産生T細胞(Th1)の低下も認められた。NK細胞機能も低下していた。Th1細胞の低下があったため、IL-12でリンパ球を刺激し、インターフェロン産生細胞への分化を誘導したが、反応がコントロールに比べ極めて低いことが示された(表1)。

α-CD3/CD28 activated T cell (44Hr)						
		IL-12				
		0	10	100	1000	10000
Pt		<20	<20	41	128	120
Cont	CD2+T	1320	1280	840	2540	2900
Cont		<20	290	2360	7340	7150

CD56+		-				5×10 <sup>4</sup> Mo			
		0	100	1000	10000	0	100	1000	10000
Pt		<20	<20	<20		173	459	430	
Cont1		57	196			2818	5814		
Cont2		929	1909	2817	<10	1683	2903	4704	

表1 IFN-γ産生能

解析はルイ・バストール医学研究センター宇野賀津子先生による。

そこで、IL-12 ReceptorおよびJAK2, STAT4の塩基配列決定を行ったが何の変異も認められなかった。今回明らかになったNEMO遺伝子変異ではTLR, IL-1R, TNF-αR, CD40R, IL-18R, TCR, BCR, Ectodysplasia 等などのレセプターからのNF-κBの活性化の過程に障害があると考えられる。種々の刺激によるサイトカイン産生については自ら産生したサイトカインによるautocrine的な刺激もあり、IL-18がIL-12存在下でNF-κBの

活性化を通じてTh1への分化誘導を促進することから我々の症例ではIL-18によるTh1への誘導が十分にかからない状態ではないかとも考えられ、更なる検討が必要である。またサイトカイン産生では、IL-6, TNF-α, MIP-1α産生は刺激後または刺激なしでもかなり産生亢進していたが、PHA刺激でIL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN-γ産生が、LPS刺激ではIL-5, IL-10, IFN-γ, TNF-α産生が低下していた(表2)。PHAやConAに対する反応性についてははっきりしないが、LPS刺激ではTLRを介したNF-κBの活性化が重要であることから、同疾患でのNF-κBの活性化障害の結果を示していると考えられた。

	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-10	IFN-γ	TNF-α	MIP-1α
—	6.8	7.8	4.3	370.4	5.3	3.0	81.4	2223.0
control	5.1	4.0	84.9	99.3	4.9	3.0	10.6	47.0
PHA	48.1	12.5	3.8	1409.0	43.6	573.5	1520.5	28404.0
control	254.0	366.1	443.2	1981.0	1302.5	2526.5	1750.7	1198.6
ConA	8.3	7.8	4.8	905.9	57.5	200.0	525.5	9944.1
control	8.1	48.4	23.4	1145.4	140.1	162.9	220.0	5956.4
LPS	16.8	11.4	6.4	2028.5	59.7	411.1	791.2	11211.8
control	13.7	7.5	39.2	4591.1	1008.3	1088.4	10773.7	16675.4

表2 サイトカイン産生能

24時間培養後のサイトカイン産生能を示す。

5歳および6歳時にはBOOPやJIAを発症している。JIAを合併したEDA-IDの症例はOrangeらが1例だけ報告<sup>5)</sup>されているが、十分説明されていない。我々の症例ではIL-6, TNF-αとMIP-1α産生が亢進していることがJIAを引き起こした原因の一つではないかと考えている。一方、TCRのレポーターを検索したところ、Vβ, Vαにも偏りが認められた(図3)。更に、JIA発症後のT細胞増加とB細胞低下が認められたが、ステロイド等の治療後にはリンパ球表面マーカーがほぼ正常化している。Th1/Th2細胞もなお変動はあるものの正常域になっている。以上のことから、何らかの原因で自己免疫疾患発症に關与する

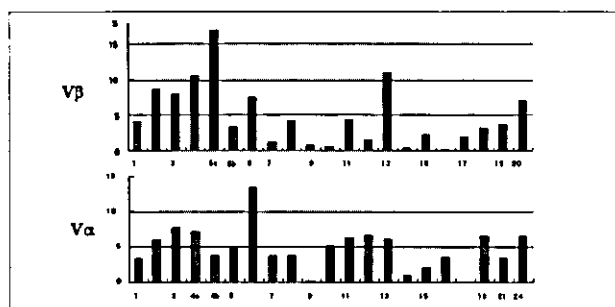


図3 TCRVレポーター解析

T細胞クローンが増殖してきたのではないかと考えている。その原因のひとつにNF- $\kappa$ Bの活性化障害により、TNF- $\alpha$ にアポトーシスが適切に誘導出来ずに、疾患発症に関与するT細胞の増殖を促したとも考えられる。

外肺葉形成不全免疫不全症候群 (XL-EDA-ID) では症状が極めて多彩であることが知られている。しかし、更に解析することにより、NF- $\kappa$ B活性化経路の重要性が明らかになってくると思われる。

## E. 結 語

幼少期はこの疾患に特徴的な細菌感染への易感染性を示した。しかし、4歳時からBOOP、5歳時からは関節炎を伴い自己免疫性疾患様の症状が主体となってきたため、ステロイドおよびサイクロスポリンにメソトレキセート少量療法を追加することにより、小康を得ている。外肺葉形成不全免疫不全症候群 (XL-EDA-ID) では症状が極めて多彩であることが知られているが、この様な自己免疫性疾患様の症状を示した報告は現在のところ見られない。今後も注意深い観察が必要である。

## 参考文献

- 1) Zonana J, Elder M E, Schneider LC, et al. *Am. J. Hum. Genet.* 67:1555-1562, 2000
- 2) Nishikomori R, Akutagawa H, Maruyama K, et al, *Blood.* 103:4565-72.2004
- 3) Jain A, Ma CA, Lopez-Granados E, et al, *J Clin Invest.* 114:1593-602.2004
- 4) Papadakis KA, Prehn JL, Landers C, et al. *J Immunol.* 172:7002-7,2004
- 5) Orange JS, Jain A, Ballas ZK, et al, *J Allergy Clin Immunol.* 113:725-33,2004

## F. 研究発表

### A) 学会発表；

1. Nunoi H, Ishibashi F, Mizukami T, Hidaka F. Clinical evaluation of interferon-gamma treatment to chronic granulomatous disease patients with splice site mutations. Internatinal Peroxidase meeting. Kyoto Oct. 2004

### B) 発表誌名巻号・頁・発行年

1. Nunoi H, Ishibashi F, Mizukami T, Hidaka F. Clinical evaluation of interferon-gamma treatment to chronic granulomatous disease patients with splice site mutations. *Jpn J Infect Dis.* 57(5):S25-6. 2004
2. Kawada J, Kimura H, Ito Y, Ando Y, Tanaka-Kitajima N, Hayakawa M, Nunoi H, Endo F, Morishima T. Evaluation of systemic inflammatory responses in neonates with herpes simplex virus infection. *J Infect Dis.* 190(3):494-8. 2004
3. 水上智之、布井博幸、慢性肉芽腫症－基礎と臨床の進歩－ *日本小児血液学会雑誌* 18: 69～78, 2004
4. 高木純一、布井博幸、多臓器不全 (MOD) 内科医・小児科研修医のための小児救急医療治療ガイドライン 75～78, 2004
5. 盛武 浩、他8名、定期フォロー中に肉眼的血尿より Wilms 腫瘍が発見されたWAGR症候群の1例 *小児がん* 41: 130～133, 2004
6. 布井博幸、遺伝子治療の現状－原発性免疫不全症、慢性肉芽腫症を含めて－*小児内科* 36・11・1807～1811, 2004

# 日本人 Bloom 症候群における common なBLM遺伝子変異の同定

近藤直実 (岐阜大学大学院医学研究科小児病態学教授)  
金子英雄 (岐阜大学大学院医学研究科小児病態学講師)  
深尾敏幸 (岐阜大学大学院医学研究科小児病態学助教授)  
川本典生 (岐阜大学大学院医学研究科小児病態学医員)

## 【研究要旨】

Bloom 症候群 (BS) は小柄な体型、日光過敏性紅斑、免疫不全さらには高率に癌腫を合併する常染色体劣性の遺伝性疾患である。病因遺伝子BLMは helicase 活性を有し、DNAの複製・修復に関与すると考えられている。BSの診断は sister chromatid exchange の増加が参考になるが、他の染色体脆弱症候群との境界例も存在し診断に苦慮する場合も少なくない。そこで、BSのBLM遺伝子変異について解析した。BSの5症例を対象とした。4名に悪性リンパ腫の合併をみた。5症例のうち3症例が631delCAA の homozygous であった。1症例が631delCAA と1610insA の compound heterozygous、1症例が631delCAAと735delCAAの compound heterozygous であった。631delCAAを簡便に検出する方法で日本人の健常人200 alleleについて検討したが、631delCAAは存在しなかった。今回検討したBS症例10 alleleのうち、8 alleleが631delCAAであり、日本人に比較的共通した変異であると考えた。

## A. 研究目的

Bloom 症候群 (BS) は生下時よりみられる小柄な体型、日光過敏性紅斑、免疫不全、高率な癌腫の合併を伴う常染色体劣性の遺伝性疾患である。BSの病因遺伝子BLMは Werner 症候群の病因遺伝子WRN、酵母 Sgs1などと共にDNAヘリカーゼと相同性を有しており、DNAの複製・修復に関与している。BSでは sister chromatid exchange の増加が診断の参考になるが、他の染色体脆弱症候群との境界例も存在し、臨床上診断に苦慮する場合も少なくない。そのような場合は遺伝子変異の同定が確定診断となる。

German とEllisは14種類のBLM遺伝子変異を報告した。ミスセンス変異は3種類、ナンセンス変異は6種類、フレームシフトをおこす変異は2種類、エクソンスキップをおこす変異は2種類、大きな欠失の変異は1種類であった。Ashkenazi Jewsには blmAsh と呼ばれる6-bp deletion/7-bp insertion の変異が約1/107の割合で存在する common な変異として知られている。しかし、

日本人にはそのような common な変異は報告されていない。そこで、今回日本人5名のBS患者のBLM遺伝子変異について検討した。

## B. 研究方法

- 1) Case1は26歳女性。13歳時に Burkitt's lymphoma を発症。Case2は13歳女性。13歳時に Burkitt's lymphoma を発症。Case 3,4はすでに報告している兄妹例。Case5は12歳女性。
- 2) 末梢血単核球から、DNAを抽出しPCRでBLMの20個のエクソンを増幅し、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。
- 3) 631delCAA変異の簡易検出法：プライマーに人工的に HinfI site を導入した。正常では HinfI で切断され、631delCAAが存在すると HinfI で切断されない系を作製した。
- 4) blmAsh 変異の簡易検出法：blmAshが存在すると BstNI site が出現するため、PCR後 BstNI で切断し、アガロースゲルに電気泳動し blmAsh の変異が存在するかを検討した。

### C. 研究結果

5名のBS患者のうち4名に悪性リンパ腫の発症を伴った。BLM遺伝子配列を検討したところ5症例のうち3症例が631delCAAの homozygous であった。1症例が631delCAAと1610insAの compound heterozygous、1症例が631delCAAと735delCAAの compound heterozygous であった(表1)。ミスマッチプライマーを用いて631delCAAを簡便に検出する方法で健常人200の alleles について検討したが、631delCAAは存在しなかった(631delCAAの homozygous レーン1、heterozygous レーン2、wild type レーン3, 4)(図1)。Ashkenazi Jewish に高率に認められる blmAsh と名付けられた6bp-deletion/7-bp insertion の変異を日本人健常者の200 alleles について検討したが、認められなかった(blmAshの homozygous レーンB1、2、heterozygous レーン B3、残りはwild type)(図2)。Silent mutationのA1055C(Thr to Thr)の変異が健常者に認められた。

	Zyosity of the mutation	mRNA sequence alteration	Predicted protein alteration
case 1	heterozygous	631delCAA 1610insA	S186X 614-1-X
case 2	homozygous	631delCAA	S186X
case 3	homozygous	631delCAA	S186X
case 4	homozygous	631delCAA	S186X
case 5	heterozygous	631delCAA 735delACTG	S186X 221-10-X

表1 Relatively common mutation in Japanese Bloom syndrome

### D. 考 察

5名のうち4名に糖尿病の合併も認められ免疫異常との関係が考えられる。さらに、5名のうち4名に悪性リンパ腫の発症が認められた。今まで報告されているように、BSは家族性に腫瘍を発症する疾患群のなかでも、もっとも高率に悪性腫瘍の合併を認める疾患の一つであることがわかる。BSでは、複数の癌腫の発症が報告されている。また抗癌剤に対する感受性の亢進も報告されており、正確な診断が治療方針を決定するうえで重要である。診断をするうえで、臨床症状からの絞り込みをおこなったうえで、sister chromatid

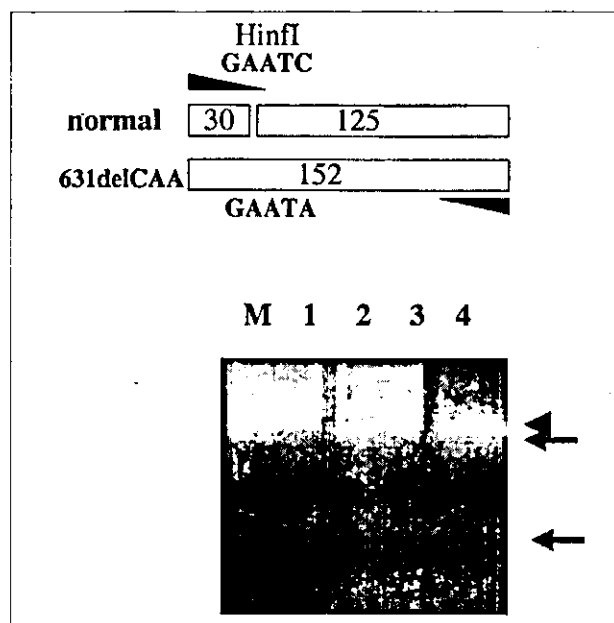


図1 631delCAA遺伝子変異の簡易検出法

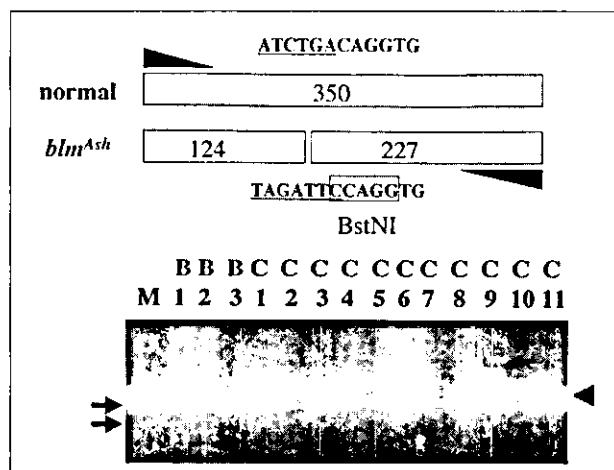


図2 blmAshの簡易検出法

exchangeの増加が重要であるが、非典型例では遺伝子診断が必要となる。今回、私たちが明らかにした日本人BLM患者でみられる common な変異はBS患者のスクリーニングとして有用と考えられる。

### E. 結 論

日本人BS患者5人の10 allelesのうち8 allelesが631delCAAであり、日本人BS患者の遺伝子変異で比較的 common なものと考えられた。

### F. 研究発表

1. 論文発表  
別紙参照

2. 学会発表  
別紙参照

G. 知的所有権の取得状況  
なし



# 転写開始コドンの第二変異によりN末を欠失したWASPを 発現するようになった Wiskott-Aldrich 症候群患者の解析

Du Wei (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)  
久間木 悟 (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)  
笹原 洋二 (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)  
内山 徹 (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)  
土屋 滋 (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)

## 【研究要旨】

我々は第二変異がWASP翻訳開始点に存在するため、第一変異の下流に位置する2番目のATGから分子量の軽い“N末を一部欠失したWASP”が翻訳されるWAS患者を同定し、この変異WASPがWIPと結合できることを証明した。この患者ではもともとWASP発現が認められなかったことから、変異WASPを発現したT細胞とNK細胞の前駆細胞が増殖優位性を獲得し、細胞集団の一部を占めるようになったものと推測された。以上より、WASPはN末の一部を欠失してもWIPと結合でき、増殖シグナルを伝達できるものと考えられた。

## A. 研究目的

Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) は血小板減少症、易感染性、アトピー性皮膚炎様湿疹を3主徴とする症候群で、その責任遺伝子は Xp11.22-23 に存在する WASP 遺伝子である<sup>1)2)</sup>。この WASP 遺伝子から翻訳される WASP タンパクは細胞骨格系と免疫系で重要な役割を果たすことがわかり、今まで多くの研究が行われてきている<sup>3)</sup>。しかし、WAS の発症機構や分子病態の理解はまだ十分ではない。そこで、我々は非典型的 WAS 患者における変異 WASP の機能解析を行い、分子病態の理解を深め、将来の治療に結びつけることを目的として研究を行った。

## B. 研究方法

### 1) 症例

15歳男性。家族には特記すべきことなし。生後1ヶ月から血小板減少が認められ、経過中にアトピー性皮膚炎様湿疹と易感染性があった。8才時に該嗽が続き肺門部リンパ節腫脹を認めたため、肺門リンパ節生検を施行され、ホジキン病と診断された<sup>4)</sup>。このため化学療法と局所

放射線療法を受け、現在も寛解を維持している。

### 2) フローサイトによる WASP 解析

マウス抗ヒト WASP 単クローン抗体 5A5 による細胞内染色を行い、FACS Calibur にて解析を行った<sup>5)</sup>。この際、CD4、CD8、CD19、CD56 と二重染色を行いそれぞれの分画について WASP 発現を確認した。

### 3) 発現プラスミドの作成と遺伝子導入

野生型 WASP cDNA は Immunex 研究所の Dr. D. Jonathan より供与を受けた<sup>2)</sup>。この cDNA を発現ベクター pcDNA3 に組み込み、pcDNA3/WASP を作成した。このベクターをもとに、まず、45delG 変異を作成した (pcDNA/WASPdelG)。最後に pcDNA/WASPdelG に A35T 変異を導入し、pcDNA/WASP2m を作成した。これらのベクターを単独で、あるいは WIP 発現ベクターとともに COS-7 細胞に FuGene を用いて遺伝子導入した。

### 4) 免疫沈降およびウエスタンブロット

遺伝子導入した COS-7 細胞を可溶化後、5A5 またはラビット抗ヒト WIP 抗体 C45 にて免疫沈降およびウエスタンブロットを行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断については、「原発性免疫不全症の遺伝子診断」というタイトルで東北大学医学部倫理委員会に申請し、既に承認されている内容に従い、患者及びその親権者に対して事前に十分な説明を行った上で、自由意思に基づく同意（インフォームドコンセント）を文書で得た上で実施した。

### C. 研究結果

#### 1) 患者T細胞およびNK細胞の一部に見られたWASP発現

WASPタンパクに対する単クローン抗体5A5を用いて、WAS患者の末梢血単核球細胞の細胞内染色を行い、フローサイトメーターで解析してきたが、ほとんどの患者ではWASPタンパクの発現は認められなかった。しかし、本症例ではCD4陽性T細胞の約半数とCD8陽性T細胞の大半、およびCD56陽性NK細胞の一部にのみWASP発現を認めた（図1）。しかし、CD19陽性B細胞にはWASP発現は認められなかった。患者T細胞およびNK細胞の一部に発現しているWASPをウエスタンブロットで解析したところ、正常より小さいWASPが発現していることがわかった（図2）。

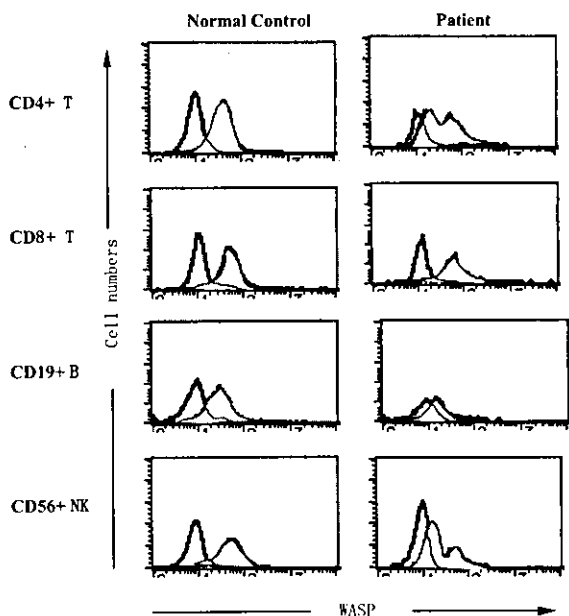


図1 リンパ球分画におけるWASP発現  
マウス抗ヒトWASP抗体5A5を用いて細胞内染色後、フローサイトメーターで解析した。

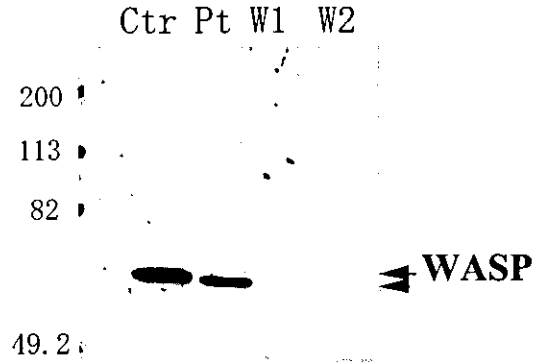


図2A 末梢血単核球中のWASP蛋白発現  
正常コントロール (ctr)、本症例 (pt)、WAS患者2例 (W1、W2) の末梢単核球を用いて、ウエスタンブロットを施行した。

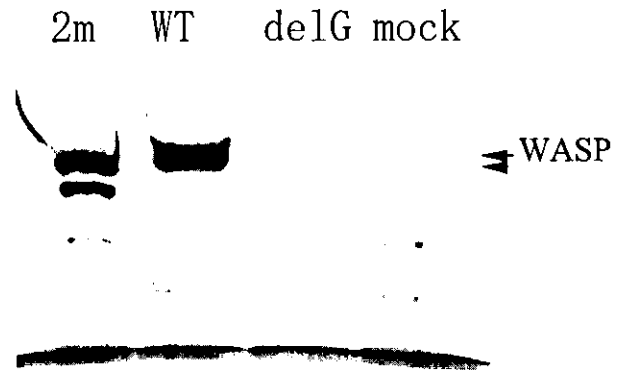


図2B 変異WASP遺伝子発現の検討  
野生型WASP cDNA (WT)、45delG変異を含むWASP cDNA (delG)、A35T変異および45delG変異を含むWASP cDNA (2m)、またはベクターコントロール (mock)をCos-7細胞に遺伝子導入し、ウエスタンブロットを施行した。

#### 2) 転写開始コドンに存在する第二変異

本症例にはもともと第一エクソンに1塩基欠失 (45delG) があった。この変異の結果、フレームシフトがおこり、タンパク発現は認められない。ホジキン病に対する化学療法を施行してから7年後、T細胞とNK細胞の一部にWASP発現が認められた。このため、患者末梢血単核球をCD4陽性細胞、CD8陽性細胞、CD19陽性細胞およびCD56陽性細胞にソートした後、ゲノムシーケンスを行った。図3に示すように、45delGはすべての細胞分画に認められたが、転写開始コドンに存在する第二変異 (A35T) はCD4陽性細胞、CD8陽性細胞および

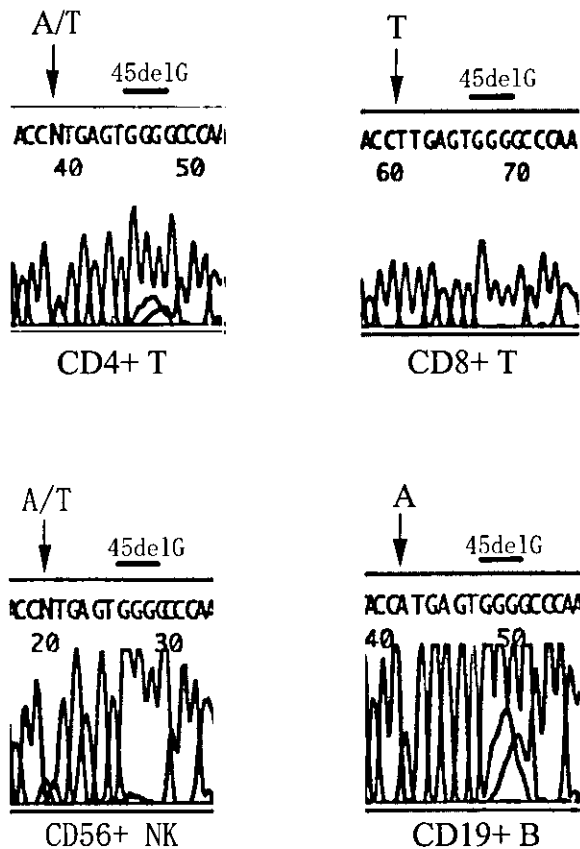


図3 リンパ球各分画のWASP変異

抗体をつけたマグネットビーズで末梢血単核球をCD4、CD8、CD19、CD56分画に分離し、ゲノムシーケンシングを行った。

CD56陽性細胞のみに存在した。以上のことから、第二変異の存在する細胞では第一変異の下流に位置する2番目のATGから分子量の軽い“N末を一部欠失したWASP”が翻訳されたものと考えられた。

### 3) 変異WASPの発現とWIPとの結合

本症例のWASP cDNAが翻訳され発現することを確認するために、変異WASP cDNAを発現ベクターに載せ、COS-7細胞に遺伝子導入して一過性発現系で検討した。その結果、第二変異を持つWASP cDNAから翻訳されるタンパク質は、サイズがやや小さいものの発現レベルは野生型WASP cDNAと同等であった。これに対し本症例に元来存在する45delG変異WASP cDNAを遺伝子導入した細胞ではWASPタンパクが検出されなかった。

次にこの変異WASPがWIPと結合できるかどうかについて検討するために、変異WASP cDNAとWIP cDNAを同時にCOS-7細胞に発現させ、免疫沈降を行った。その結果、この分

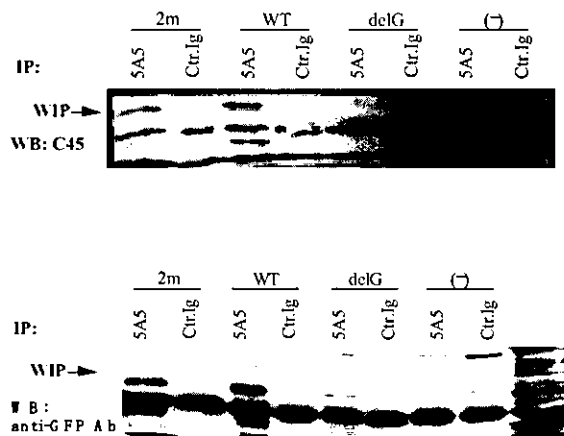


図4 変異WASPとWIPの会合

野生型WASP cDNA (WT)、45delG変異を含むWASP cDNA (delG)またはA35T変異および45delG変異を含むWASP cDNA (2m)をWIP cDNAと共にCos-7細胞に遺伝子導入し、図に示すように5A5またはcontrol IgGで免疫沈降した後で、抗WIP抗体C45 (上段)または抗GFP抗体 (下段)でウェスタンブロットを施行した。

子量のやや軽い変異WASPは、野生型WASPと同様にWIPと結合できることが証明された(図4)。

## D. 考 察

本研究ではT細胞の一部にWASPタンパクを発現するWAS患者のうち、第二変異がWASP遺伝子翻訳開始点に存在する(ATG→TTG)患者のWASPタンパクを解析した。この患者のT細胞およびNK細胞の一部では第二変異が存在するため第一変異(45delG)の下流に位置する2番目のATGから分子量の軽いWASPが翻訳されると推測された。母親の末梢血ゲノム解析では、この第二変異は認められなかったことから、第二変異は患者体細胞に起こった変異であると考えられた。WAS患者を含め知りうる範囲ではこのような翻訳開始点の第二変異によるタンパク発現はこれまでに報告はない。本症例ではT細胞およびNK細胞の一部でWASP発現が認められたことから、第二変異のため分子量の小さなWASPタンパクを発現した1個の前駆細胞が、WASPタンパクを発現していないT細胞およびNK細胞に対し増殖優位性を獲得し、末梢血の一部を占めるようになったと考えられた。このことからWASPはN末の一部を欠失しても、機能を維持できる可能性が示唆された。さらに第二変異により発現するよう

になった分子量の軽いWASPはWASP活性化を負に制御する分子であるWIPとも結合できることから、本症例に発現しているWASPはTCRからの刺激を正負に制御できる可能性が示唆された<sup>6)7)</sup>。

## E. 結 論

T細胞およびNK細胞の一部に分子量の小さなWASPを発現するWAS患者の解析から、第二変異がWASP遺伝子翻訳開始点に存在する(ATG→TTG)ことを証明した。このことからWASPはN末を一部欠失しても、機能を維持でき、T細胞のみならずNK細胞でも増殖優位性を獲得できることがわかった<sup>8)</sup>。この結果は、WAS患者に対する遺伝子治療に示唆を与えるものである。

## 参考文献

- 1) Aldrich RA, Steinburg AG, Campbell DC. Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics* 1954; 13: 133-138
- 2) Derry JMJ, Ochs H, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 1994; 78:635-644
- 3) Ochs HD. The Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2001; 20:61-86.
- 4) Sasahara Y, Fujie H, Kumaki S, et al. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Acta Paediatr* 2001; 90:1348-51
- 5) Kawai S, Minegishi M, Ohashi Y, et al. Flow cytometric determination of intracytoplasmic Wiskott-Aldrich syndrome protein in peripheral blood lymphocyte subpopulations. *J Immunol Methods* 2001; 260: 195-205
- 6) Remesh N, Anton I.M., Hartwig JH, Geha RS. WIP, a protein associated with Wiskott-Aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1997; 94:14671-14676
- 7) Sasahara Y, Rachid R, Byrne M, et al. Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol Cell* 2002; 10: 1269-1281
- 8) Konno A, Wada T, Schurman S.H. et al. Differential contribution of Wiskott-Aldrich syndrome protein to selective advantage in T-and B-cell lineages. *Blood* 2004; 15:676-678