

主 訴

左鼠径部・臀部の皮下腫瘍

現病歴

20歳頃から口内炎や顔面のニキビ様皮疹が寛解と増悪を繰り返し、SLEやベーチェット病などの膠原病を疑われ当科にて精査を行ったが、診断には至らなかった。平成15年11月頃（27歳時）から左鼠径部に皮下腫瘍を認めた。近医にて皮下膿瘍と考えられ切開・排膿を行うも治癒傾向とはならず潰瘍化していた。平成16年8月には臀部にも同様な皮下腫瘍を認め、当院皮膚科を紹介受診。皮下腫瘍は弾性軟であり皮膚生検にて悪臭を伴う真皮から皮下組織に癒痕化した肉芽組織を認め、炎症細胞浸潤は形質細胞が主体であった。感染症による慢性炎症と考えられ、抗生剤投与にて皮下腫瘍の改善傾向はみられるも創傷治癒が遅延傾向であることから基礎疾患に自己免疫疾患や免疫不全などの免疫異常の可能性が疑われ、当科にて精査を行った。白血球数5850/ μ L（好中球52%）、IgM 181mg/dl、IgG 2850mg/dl、IgA 352mg/dl、IgD 3.0mg/dl、CH50 74.8IU/ml、CD4 487.8/ μ L、CD8 968.9/ μ L、ConA/PHAは正常であり、免疫不全は明らかでなかった。しかし、NB T試験では陽性細胞は少なく、フローサイトメトリーを用いた好中球殺菌能は9.6%と著明に低下しておりCGDの症候性遺伝子保因者を疑い、gp91-phoxの遺伝子解析を行った。

<好中球殺菌能 (H₂O₂産生能)>

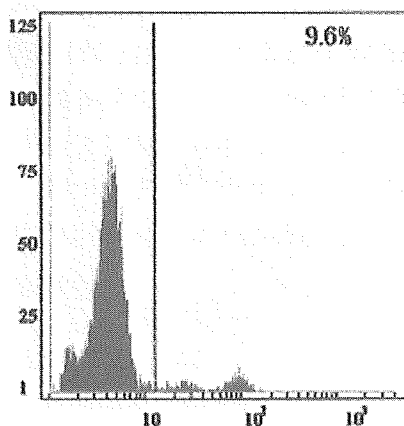


図1 After stimulation with PMA

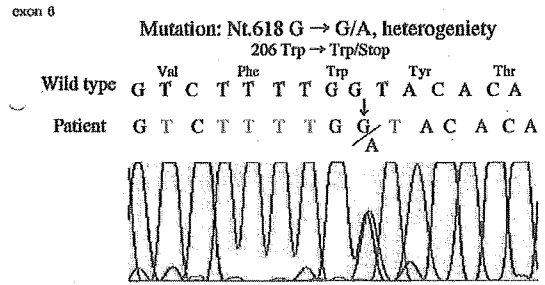


図2 gp91-phox gene

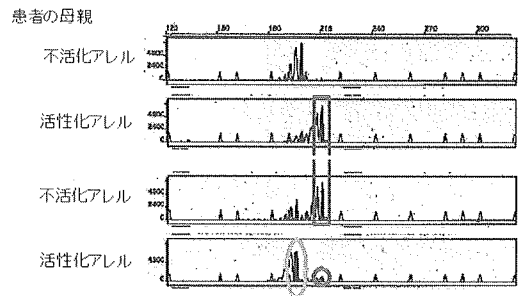


図3 X chromosome inactivation

結 果

exon6の618番目のGがAに変異する塩基置換をヘテロで有し、この置換によりコドン206のTrp (TGG) が停止コドン (TGA) とナンセンス変異を認め、CGDの症候性遺伝子保因者と診断。また、患者及びその母親におけるX染色体不活性化解析を行った。患者症例は、父由来X染色体が活性化/母由来X染色体が不活性化パターンを認め、現在父親は感染を繰り返すことなく生存していることから、父由来のX染色体が精子形成過程でde novo mutationを起こし、その後加齢とともに母由来の正常X染色体が不活性化され、成人女性でかつ孤発でCGDを発症したものと推定された。

結 語

成人女性で家族歴がなくても易感染兆候を認めれば、X-linked CGDを鑑別疾患の一つとして考慮する必要がある。

参考文献

- 1) A. Rosen-Wolff et al. Ann Hematol. 2001
- 2) Andreas Lun et al. Clin. Chem. 2002
- 3) Mindy Anderson-Cohen et al. Clin. Immunol. 2003
- 4) Baruch Wolach et al. Blood. 2005

遺伝子導入ES細胞由来の樹状細胞を用いた細胞ワクチン療法の開発

西村 泰治 (熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野教授)

【研究要旨】

我々は、胚性幹 (ES) 細胞から *in vitro* において樹状細胞 (ES-DC) を分化誘導する技術を確立し、遺伝子導入により抗原を発現させたES-DCを用いた細胞ワクチンの開発をめざして基礎研究を行なっている。一般にES細胞由来の細胞を用いる医療技術においては、ES細胞とレシピエントの間におけるHLAをはじめとする遺伝的背景の違いが問題になると予測される。しかしながら、アロ (同種異系) ES-DCを用いた細胞ワクチンの場合は、ES-DCに発現するHLAの一部がレシピエントと共有されていれば、そのHLAに拘束された抗原特異的なT細胞を活性化して、抗原に対する免疫応答を惹起することが可能であると考えられる。本年度の研究では、この仮説をマウスのシステムを用いて実証した。すなわち、MHCの一部を共有するセミアロジェニックなマウスES-DCの投与により、細胞ワクチン効果が得られることを確認した。

A. 研究目的

近年の研究から、樹状細胞が、生体内における主要な抗原提示細胞であることが明らかにされた。すなわち、感染性微生物の侵入に際しては、各組織に分布する樹状細胞がこれを認識して貪食し、これに由来する抗原のエピトープを細胞表面のMHC分子上に提示し、抗原特異的なT細胞を活性化することにより、免疫応答が開始される。

我々は、マウスのES細胞を *in vitro* において樹状細胞 (ES-DC) へ分化させる技術を開発している。さらに、ES細胞段階で遺伝子導入を行ない、これをES-DCに分化させることにより、任意の遺伝子導入を行なったES-DCを作製する技術を開発している。以前の研究により、この方法による遺伝子導入により特定の抗原を発現するES-DCを遺伝的背景が同一のマウス個体へ移入することにより、このES-DCが発現する抗原に対するT細胞反応を誘導できることを明らかにしている。

一般に、ES細胞から分化させた細胞や臓器を用いて臨床的に治療を行うためには、患者と同一の遺伝的背景を有する (少なくともHLAの一致した) ES細胞が必要であると考えられる。しかしながら、アロ (同種異系) ES-DCであっても、

これが発現するHLAの一部を共有するレシピエントにおいて、抗原に対する免疫応答を惹起することが可能であると考えられる。

本年度の研究では、このような可能性を検証するために、MHCを部分的に共有するセミアロジェニックなES-DCの免疫により、抗原特異的なT細胞応答を惹起できるかどうかを、マウスモデルを用いて検討した。

B. 研究方法

まず、モデル抗原である卵白アルブミン (OVA) の発現ベクターを作製した。この発現ベクターには、遺伝子導入細胞の選択に用いるマーカーとして、internal ribosomal entry site (IRES) 配列の下流に、薬剤耐性遺伝子が配置されている。これらの発現ベクターを電気穿孔法によりマウスES細胞TT2に導入し、選択薬剤を含む培養液中で培養することにより、高発現体を選択した。そして、これまでの研究により確立しているES細胞からES-DCへの分化誘導法を用いることにより、これらの遺伝子導入ES細胞からOVA抗原を発現するES-DCを作製した。

このようにして作製した遺伝子導入ES-DCをES細胞TT2と同系の (CBA x C57BL/6) F1

(CBF1) マウス (H-2^{k/b})、およびセミアロジェニックな関係のC57BL/6マウス (H-2^b) あるいは (Balb/c x C57BL/6) F1 (CBF1) マウス (H-2^{d/b}) の腹腔内へ7日間隔で2回投与した。2回目の投与から7日後にマウスを屠殺し、脾細胞を回収した。回収した脾細胞をH-2k^bに結合するOVA由来のペプチドとインターロイキン-2 (IL-2) 存在下で5日間培養した。その後、この培養脾細胞中に存在するH-2K^bに拘束されたOVA抗原特異的な細胞傷害性T細胞を、Cr遊離試験により解析した。細胞傷害性試験における標的細胞としては、OVA由来のペプチドを負荷したC57BL/6マウス由来の細胞株EL-4を用いた。

さらに、同様にOVA抗原を発現するES-DCをマウスの腹腔内へ投与した後に、OVAを発現するC57BL/6マウス由来のメラノーマ細胞株B16をマウスの皮下に移植し、腫瘍の増殖速度とマウスの生存期間を観察した。

(倫理面への配慮) 本研究では、ヒトに由来する検体等を用いた解析は行っていない。マウスを用いた実験に際しては、熊本大学動物実験委員会の承認を得たうえで、動物愛護に十分配慮しつつ実験を行なった。

C. 研究結果

ES-DC と同系の (CBA x C57BL/6) F1 (CBF1) マウス (H-2^{k/b})、およびセミアロジェニックな関係のC57BL/6マウス (H-2^b) あるいは (BALB/c x C57BL/6) F1 (CBF1) マウスのいずれにおいても、OVAを発現するES-DC (H-2^{k/b}) を腹腔内投与することにより、H-2K^bに拘束されたOVA抗原特異的な細胞傷害性T細胞が誘導されることが確認された。さらに、このES-DCを腹腔内投与された (CBA x C57BL/6) F1 (CBF1) マウス (H-2^{k/b}) およびC57BL/6マウス (H-2^b) において、OVAを発現する同系マウス由来の腫瘍細胞の増殖が明らかに抑制され、さらに腫瘍細胞移植後の生存期間が有意に延長することを観察した。

D. 考察

MHCを一部共有するアロES-DCを投与することにより、共有されたMHCクラスI分子に拘束された腫瘍抗原に特異的な細胞傷害性T細胞が活性化され、抗腫瘍免疫応答が誘導されることが確認された。これまでに、世界各国において、数十株のヒトES細胞株が樹立されている。各々のヒトES細胞は、各民族集団中で遺伝子頻度が高いHLA対立遺伝子を発現していると期待される。日本人集団では、約60%がHLA-A24を、また約40%がHLA-A2を発現する。将来、このように各民族集団中で遺伝子頻度が高いHLA対立遺伝子を発現するヒトES-DCを用いた、抗腫瘍免疫療法の可能性が期待される。

E. 結論

以上の研究成果より、ヒトES-DCを用いた、細胞ワクチン法の可能性が示唆された。

ES-DCを用いた細胞ワクチンについては、モデル腫瘍抗原を発現するES-DCにNKT細胞の活性化リガンドである α -galactosyl ceramide負荷することにより、抗腫瘍効果を増強できることも発見した。また、ES-DCを用いることにより、モデル抗原であるOVAのみでなく、ヒトとマウスの腫瘍細胞に共に発現している腫瘍抗原であるGlypican-3に対する免疫応答を誘導し、抗腫瘍効果を誘導することにも成功している。さらに、本年度の研究では、抗原と免疫抑制分子であるTRAILあるいはPDL1を同時に発現するES-DCを用いて、自己免疫疾患モデルであるEAE(実験的自己免疫性脳脊髄炎)の予防および治療が可能であることを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukuma, D., Matsuyoshi, H., Hirata, S., Kurisaki, A., Yoshitake, Y., Sinohara, M., Nishimura, Y., and Senju, S. Anti-cancer

- immunotherapy with semi-allogeneic embryonic stem cell-derived dendritic cells genetically engineered to express a model tumor antigen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 335: 5-13, 2005.
- 2) Matsuyoshi, H., Hirata, S., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Fukuma, D., Kurisaki, A., Nakatsura, T., Nishimura, Y., and Senju, S.: Therapeutic effect of α -galactosylceramide-loaded dendritic cells genetically engineered to express SLC/CCL21 along with tumor antigen against peritoneally disseminated tumor cells. *Cancer Science* 96:889-896, 2005.
- 3) Motomura, Y., Senju, S., Nakatsura, T., Matsuyoshi, H., Hirata, S., Monji, M., Komori, H., Fukuma, D., Baba, H., and Nishimura, Y.: Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing Glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Research* in press
- 4) Hirata, S., Senju, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., Uemura, Y. and Nishimura, Y. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1. *J. Immunol.* 174: 1888-1897, 2005.
- 2) Shinya Hirata, Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis via induction of T cell with regulatory function by transfer of ES-DC expressing MOG peptide along with TRAIL. 4th International Workshop of Kyoto T Cell Conference, Kyoto 2005 April8-10
- 3) Akari Kurisaki, Shinya Hirata, Hidetake Matsuyoshi, Daiki Fukuma, Manami Shimomura, Yasuharu Nishimura and Satoru Senju, Successful Vaccination by Genetically Modified ES Cell-Derived Dendritic Cells, 熊本大学臨床医学疫学研究連携事業国際シンポジウム, September 15-16, 2005 (Aso)
- 4) ES細胞由来の樹状細胞を用いた免疫応答制御技術の開発, 千住 覚, 第16回日本樹状細胞研究会 (福岡), 平成17年7月14~15日 (招聘)
- 5) 新規癌胎児抗原 Glypican-3の遺伝子を導入したES細胞由来の樹状細胞による抗腫瘍免疫療法の開発, 本村裕, 千住 覚, 中面哲也, 松吉秀武, 平田真哉, 門司幹男, 小森宏之, 西村泰治, 第35回日本免疫学会総会・学術集会 (横浜), 平成17年12月13~15日
- 6) MHCを共有するアロES細胞由来の樹状細胞を用いた抗原特異的抗腫瘍免疫療法の開発, 福岡大喜, 松吉秀武, 平田真哉, 栗崎朱里, 吉武義泰, 本村 裕, 篠原正徳, 西村泰治, 千住 覚, 第35回日本免疫学会総会・学術集会 (横浜), 平成17年12月13~15日

2. 学会発表

- 1) Satoru Senju, Therapeutic control of immune responses by genetically modified ES cell-derived dendritic cells, 4th International Workshop of Kyoto T Cell Conference, Kyoto 2005 April8-10

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

GM-CSF及びM-CSF誘導マクロファージにおける抗酸菌刺激による遺伝子発現プロファイルのマイクロアレイによる解析

高田 英俊 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
Vahid Khajoei (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
齋藤 光正 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
楠原 浩一 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
野村 明彦 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
吉田 眞一 (九州大学大学院医学研究院細菌学)
吉開 泰信 (九州大学生体防御医学研究所感染防御研究センター
感染制御学)
原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)

【研究要旨】

GM-CSFで誘導したヒトマクロファージ (GM-M ϕ) は結核菌に対して感受性であるのに対して、M-CSFで誘導したマクロファージ (M-M ϕ) は抵抗性である。この機能の差がどのような分子によってもたらされているかを明らかにするために、我々はマイクロアレイ法を用いて遺伝子発現の違いを検討した。末梢血単球をGM-CSFあるいはM-CSF存在下に7日間培養し、GM-M ϕ およびM-M ϕ を誘導し、これらの細胞のBCG刺激後の遺伝子発現の変化をマイクロアレイで解析した。FN1遺伝子はGM-M ϕ で、FCGR2B遺伝子はM-M ϕ で最も発現が亢進していた。BCG刺激により、4つのケモカイン遺伝子、*Osteopontin (SPP1)*、*CXC chemokine ligand 7 (CXCL7)*、*CC chemokine ligand 11 (CCL11)*、および*CCL20*が、GM-M ϕ と比較してM-M ϕ で発現が亢進していた。SPP1あるいはCXCL7刺激により、GM-M ϕ の結核菌H37Ra感染に対する抵抗性が亢進した。SPP1あるいはCXCL7で刺激したGM-M ϕ はsuperoxide産生能の亢進が認められた。SPP1とCXCL7は抗酸菌に対する感染防御において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

はじめに

近年、IFN- γ receptor (IFN- γ R) 1、IFN- γ R 2、IL-12 receptor- β 1 (IL-12R β 1)、IL-12p40、やSTAT1欠損症等が解明され、ヒトにおける抗酸菌に対する生体防御機構の一部が明らかになった。またlinkage/association studyによりHLAや*NRAMP1*、*IFNG*、*TNFA*、*IL10*、*IL-1RN*、*MBL*、*VDR*、*TLR2* 遺伝子などが抗酸菌の感受性に関連していることが報告されている。感染後、抗酸菌は主としてマクロファージ (M ϕ) 内に存在する。その刺激によりM ϕ は種々のサイトカインを産生し、T細胞を活性化する。T細胞から産生されるIFN- γ はM ϕ を活性化する重要なサイ

トカインの一つであり、抗酸菌抵抗性に重要な役割を果たす。活性化したM ϕ はreactive oxygen intermediate (ROI) 等の種々の活性物質を産生する¹⁾。In vitroでは、末梢血単球は、その生存や分化にgranulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) あるいはmacrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 等のCSFが必要である。GM-CSFで培養したM ϕ (GM-M ϕ) は卵円形の形態をしており、CD71を強く発現し、抗酸菌に感受性である。それとは対照的にM-CSFで培養したM ϕ (M-M ϕ) は紡錘形の形態をしており、CD14を強く発現し、抗酸菌に抵抗性である^{2,3)}。抗酸菌抵抗性に関係す

る新たな遺伝子を明らかにするため、今回我々は、このGM-M ϕ とM-M ϕ の遺伝子発現、およびこれらのM ϕ をBCGで刺激した後の（GM-M ϕ -BCGとM-M ϕ BCG）遺伝子発現をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

B. 研究方法

M ϕ の培養

Buffy coat から Microbeads を用いて CD14⁺ 細胞を純化した (purity > 95%)。CD14⁺ 細胞を GM-CSF (100ng/ml、PeproTech London、UK) あるいは M-CSF (75ng/ml、PeproTech) で 7 日間培養し、GM-M ϕ と M-M ϕ を得た。GM-M ϕ -BCG と M-M ϕ BCG は、GM-M ϕ と M-M ϕ に BCG (BCG Tokyo 172、Japan BCG Laboratory、Japan) を 3 時間 10mg/ml の濃度で感染させ、その後細胞を wash し、さらに 24 時間培養し、それぞれの細胞を回収した。GM-M ϕ を種々の濃度の SPP1 (osteopontin: Biogenesis、Poole、UK) あるいは CXCL7 (Sigma-Aldrich、St Louis、MO) で培養し、これらの chemokine の効果を検討した。

結核菌 (H37Ra) の調製と感染

M. tuberculosis H37Ra を Middlebrook 7H9 液体培地 (Difco、Detroit、MI) で培養し aliquot にして -80°C で凍結したものを使用した。*M. tuberculosis* H37Ra を感染させる際には、これを解凍し mid-exponential growth phase まで増殖させ、sonicate し、MOI 比 1 : 1 で 3 時間感染させた。経時的に M ϕ を scraper ではがして回収し、sonicate した後、段階希釈して Middlebrook 7H10 agar plate (Difco) にまき、3 週間後コロニーをカウントし、菌数を測定した。

マイクロアレイ

mRNA を抽出した後、Amino Allyl MessageAmp aRNA Kit (Ambion、Austin、TX) を用いて linear 増幅した。Antisense RNA (aRNA) を作成し、Cy3 あるいは Cy5 と反応させ標識し Acegene Human Oligo Chip 30K slide

(Hitachi Software Engineering、Yokohama、Japan) に hybridization させた。Fluorescence signal は FLA-8000 (Fuji film、Tokyo、Japan) で検出し、Arrayvision software ver. 6.0 (Imaging Research、Ontario、Canada) で定量化した後、GeneSpring ver. 6.2. (Silicon genetics、Redwood City、CA) でデータ解析した。Dust によるものや、signal が background の 3 倍以内のものはデータから削除した。

TaqMan 定量的 PCR

PCR primer と TaqMan probe は、Assay-on-Demand Gene Expression Products (Applied Biosystems、Foster City、CA) を使用し、ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems) を用いて解析した。

Superoxide 産生能

細胞を 5×10^4 / 0.5ml に suspend し、antibody-opsionized zymosan (1mg/ml、Sigma-Aldrich) で 37°C で刺激し、Liminol-based detection system (DIOGENES : National Diagnostics、Atlanta、GA) を用いて luminometer にて測定した。

結果

1. GM-M ϕ と M-M ϕ 特徴

末梢血 CD14⁺ 細胞を 7 日間 GM-CSF あるいは M-CSF で培養した結果得られた GM-M ϕ および M-M ϕ の特徴を検討した。既に報告されている様に、GM-M ϕ は卵円形の形態をしており、M-M ϕ は紡錘形の形態をしていた。両者は HLA-D R を発現していたが、GM-M ϕ は CD71 を強く発現し、逆に M-M ϕ は CD14 を強く発現していた (図 1 A)。また赤川らが報告しているように、M-M ϕ は GM-M ϕ と比較して、*M. tuberculosis* H37Ra 感染に対して抵抗性で (図 2)、高い superoxide 産生能を有していた (図 3 B)。

2. GM-M ϕ と M-M ϕ との遺伝子発現の違い

GM-M ϕ および M-M ϕ から mRNA を抽出し、

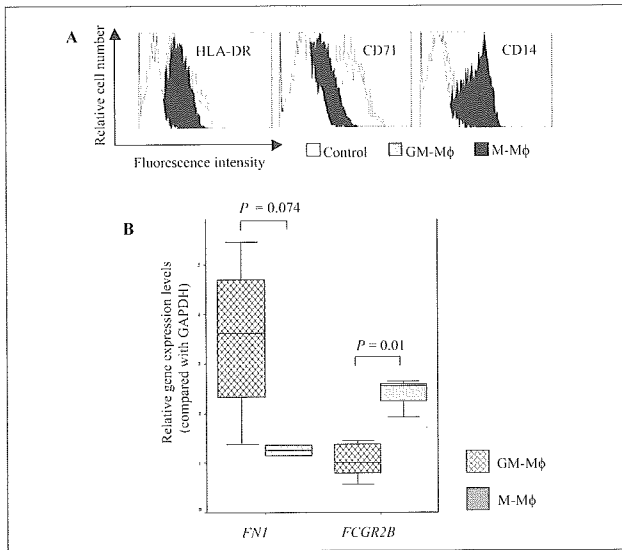


図1 GM-MφとM-Mφの違い。

A: CD14+細胞をGM-CSFおよびM-CSFで培養して得られたGM-MφとM-Mφの表面マーカーをフローサイトメータで検討した。
B: 定量的PCRを用いて*FN1*と*FCGR2B*の発現レベルをGM-MφとM-Mφで検討した。

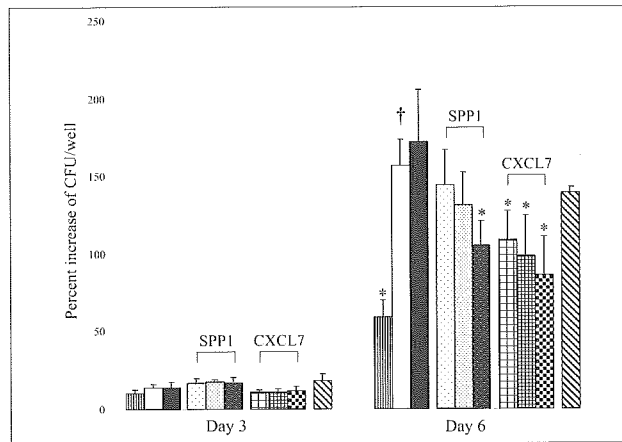


図2 *M. tuberculosis* H37感染に対するSPP1とCXCL7の効果
各々の細胞に*M. tuberculosis* H37を感染させ、SPP1とCXCL7を種々の濃度で加えて培養し、3日目と6日目の菌数を測定した。

■: M-Mφ + GM-CSF, □: GM-Mφ with GM-CSF, ▨: GM-Mφ without cytokine,
GM-Mφ + SPP1 □: 0.02, ▨: 0.25, ▩: 2.5 μg/ml
GM-Mφ + CXCL7 ▨: 0.05, ▩: 0.15, ▪: 0.5 μg/ml
GM-Mφ + CCL11 ▨: 50 ng/ml
*: †と比較して有意差 $p < 0.05$

マイクロアレイ法にて遺伝子発現を比較検討した。GM-MφとM-Mφとを比較した結果、*FN1*はGM-Mφで最も発現が高く、*FCGR2B*はM-Mφで最も発現が高かった(表1)。この2つの遺伝子がコードする蛋白は結核菌と結合することができる。このマイクロアレイの結果は定量的PCR法でも確認された(図1B)。

3. GM-Mφ-BCGとM-Mφ-BCGの遺伝子発現解析

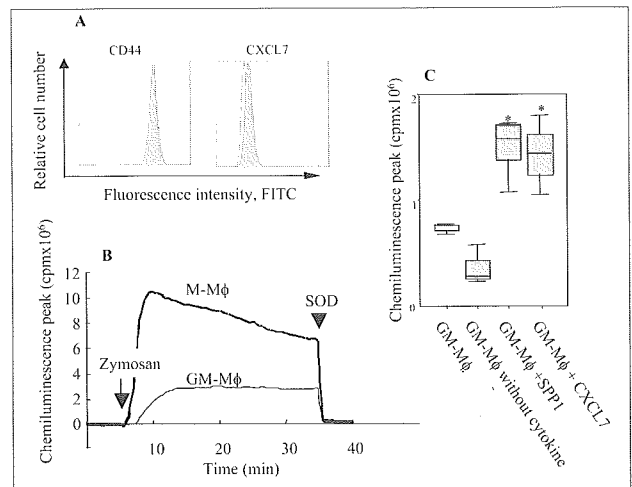


図3 GM-Mφに対するSPP1とCXCL7の効果

A: GM-MφにおけるCD44 (SPP1 receptor)とCXCR2 (CXCL7 receptor)の発現をフローサイトメータで確認した。
B: GM-MφとM-Mφのsuperoxide産生能をchemiluminescence法で検討した。矢印はantibody-opsonized zymosanの添加を示す。
C: GM-MφにSPP1あるいはCXCL7を加えた場合のsuperoxide産生能の変化
*: $p < 0.05$

GM-MφとM-MφをBCGで刺激した後の遺伝子発現の変化をマイクロアレイで検討した。いずれの細胞においても*IL1B*の発現がBCG刺激により最も亢進し、*SOD*の発現も両者で著しく亢進した(表2) GM-Mφ-BCGとM-Mφ-BCGを比較した結果、*SPP1*の発現がM-Mφ-BCGで最も亢進していた(表3)。6つのHLA関連遺伝子の発現がGM-Mφ-BCGで亢進しており、*SPP1*や*CXCL7*を含む4つのchemokine遺伝子の発現がM-Mφ-BCGで亢進していた。

4. GM-Mφに対するSPP1およびCXCL7の効果

GM-MφにはSPP1のreceptorであるCD44や、CXCL7のreceptorであるCXCR2が発現していた(図3A)。GM-MφをSPP1とCXCL7で刺激したところ、H37Raに対する感染抵抗性が上昇し(図2)、Superoxide産生能も亢進した(図3C)。

考 察

今回、GM-MφとM-Mφとで発現の異なる遺伝子を同定することができ、それらの遺伝子は結核菌感染免疫に関連している可能性があると考えられる。Fibronectin (FN)をcodeする*FN1*は、GM-Mφで発現が高かった(表1)。FNは肺に

発現しており¹⁾、結核菌と結合した後 complement receptor や integrin receptor を介して結核菌が容易に貪食され、細胞内の菌量を増加させることに参与している可能性がある^{5,6)}。他方、Fc γ R2b を code する *FCGR2B* は M-M ϕ で発現が高かった (表 1)。Fc γ R1 や Fc γ R2a、Fc γ R3 と異なり、Fc γ R2b は immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) を持た

ず⁷⁾、Fc γ R2b は細胞機能を抑制する働きを有し、M ϕ の貪食を抑制することで、細胞内の結核菌量を抑制している可能性がある³⁾。

IL-1 β code する *IL1B* と superoxide dismutase 2 を code する *SOD2* は、GM-M ϕ および M-M ϕ いずれにおいても BCG 刺激によって発現が亢進した (表 2)。IL-1 は抗酸菌感染防御において極めて重要なサイトカインであることは既に明らか

である。また抗酸菌感染に伴って誘導される superoxide による細胞傷害を防ぐために *SOD* は重要な役割を果たしているのかもしれない。これら 2 つの遺伝子は GM-M ϕ および M-M ϕ いずれにおいても発現が亢進しており、GM-M ϕ と M-M ϕ との抗酸菌にたいする抵抗性の違いを説明するものとは考えにくい。

BCG 刺激した GM-M ϕ と M-M ϕ の遺伝子発現を比較した結果、発現の最も亢進した 10 遺伝子中に、SPP1 や CXCL7 等 4 種類の chemokine 遺伝子が含まれていた (表 3)。

Chemokine は抗酸菌の感染部位に種々の炎症細胞、特に T 細胞を recruit させ、肉芽腫の形成や維持に参与している。この機能に加えて、今回、SPP1 と CXCL7 はヒト GM-M ϕ の抗酸菌感染抵抗性に直接関与し (図 2)、superoxide 産生能を上昇させること (図 3C) を初めて明らかにした。慢性肉芽腫症患者では抗酸菌に対する易感染性があり⁸⁾、superoxide は抗酸菌に対する感染防御に重要な役割を果たしている⁹⁾。SPP1 は肺胞 M ϕ と腹腔 M ϕ いずれの細胞にも発現している多機能性蛋白である¹⁰⁾。SPP1 欠損マウスは結核菌に対して感受性であり、肉芽形成に異常があると報告されている¹¹⁾。また SPP1 は proinflammatory cytokine であり、T 細胞の遊走・

Table 1 Gene expression profiles of GM-M ϕ and M-M ϕ .

(A) Genes whose expression was up-regulated in GM-M ϕ (top 10) compared to those in M-M ϕ .
(B) Genes whose expression was up-regulated in M-M ϕ (top 10) compared to those in GM-M ϕ .

A				
Gene no.	Name	Access	Gene Description	ratio
1	FN1	ENSG00000115414	Fibronectin 1	3.81
2	unknown	ENSG00000079310	ensembl prediction	3.12
3	unknown	ENSG00000085063	ensembl prediction	2.93
4	CCL7	NM_006273_1	monocyte chemoattractant protein 3 precursor; scya7	2.86
5	AD158	AL136919_1	hypothetical protein; dkfzp586j1119	2.83
6	ARPC2	AF116702_1	pro2446	2.56
7	KIAA1838	XM_035688_1	hypothetical protein xp_035688; koc94580	2.53
8	unknown	AC064875.4.1.35064.1	ensembl gensecan prediction	2.53
9	HBD	NM_000519_1	hemoglobin, delta	2.35
10	ABCC3	AF085692_1	multidrug resistance-associated protein 3b; mrp3	2.17

B				
Gene no.	Name	Access	Gene Description	ratio
1	FCGR2B	NM_004001_1	fc fragment of igg, low affinity α b, receptor for (cd32)	4.14
2	unknown	ENSG0000024862	ensembl prediction	3.90
3	MHC Ag	L34093_1	mhc class ii hla-dq-alpha chain	3.64
4	unknown	ENSG00000126461	ensembl prediction	3.01
5	C15orf12	AK001830_1	cdna fj10968 fis clone place 1000863 moderately similar to putative mitochondrial 40s ribosomal protein yhr148w	2.90
6	unknown	AC069384.3.87217.105230.1	ensembl gensecan prediction	2.85
7	unknown	AP002767.1.52387.73825.2	ensembl gensecan prediction	2.84
8	MMP9	NM_004994_1	matrix metalloproteinase 9 preproprotein	2.82
9	TM7SF1	NM_003272_1	transmembrane 7 superfamily member 1 (upregulated in kidney)	2.70
10	unknown	AC003958.1.1.127834.1	ensembl gensecan prediction	2.50

Analysis was done by using GeneSpring ver. 6.2.
Access indicates GenBank accession number.

表 1

Table 2: Genes (top 10) whose expression was up-regulated in GM-M ϕ -BCG compared to those in GM-M ϕ (A), and in M-M ϕ -BCG compared to those in M-M ϕ (B).

A				
Gene no.	Name	Access	Gene Description	ratio
1	IL1B	NM_000576_1	interleukin 1, beta	74.62
2	CCL20	NM_004591_1	small inducible cytokine subfamily a (cys-cys), member 20	59.71
3	ARHGEF1	NM_004706_1	rho guanine nucleotide exchange factor 1	56.29
4	CCL7	NM_006273_1	monocyte chemoattractant protein 3 precursor	27.49
5	SOD2	NM_000636_1	superoxide dismutase 2, mitochondrial	25.94
6	IL8	NM_000584_1	interleukin 8	17.98
7	unknown	AC064875.4.1.35064.1	ensembl gensecan prediction	16.33
8	SERPINB2	NM_002575_1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade b (ovalbumin), member 2	15.81
9	TNFAIP6	NM_007115_1	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	15.29
10	HIF2	NM_005319_1	h1 histone family, member 2	14.06

B				
Gene no.	Name	Access	Gene Description	ratio
1	IL1B	NM_000576_1	interleukin 1, beta	46.66
2	SOD2	NM_000636_1	superoxide dismutase 2, mitochondrial	13.62
3	MT1G	XM_048213_1	metallothionein 1g	10.71
4	CLECSF9	AB024718_1	macrophage c-type lectin m1ncle; m1ncle	6.28
5	CCL1	M57502_1	secreted protein i-309; scya1	5.96
6	BCL2A1	NM_004049_1	bcl2-related protein a1	5.85
7	AKR1C3	L43839_1	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase; 3alpha-hsd	5.72
8	unknown	AC005027.2.1.157073.2	ensembl gensecan prediction	5.62
9	GRO1	NM_001511_1	gro1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha)	5.61
10	MT1H	NM_005951_1	metallothionein 1h	5.38

Analysis was done by using GeneSpring ver. 6.2.
Access indicates GenBank accession number.

表 2

Table 3: Genes (top 15) whose expression was up-regulated in GM-M ϕ -BCG compared to those in M-M ϕ -BCG (A), and in M-M ϕ -BCG compared to those in GM-M ϕ -BCG (B).

A				
Gene no.	Name	Access	Gene Description	ratio
1	HLA-DRA	NM_019111_1	major histocompatibility complex, class ii	6.86
2	HLA-DMA	NM_006120	major histocompatibility complex	6.79
3	ID2	NM_002166_1	inhibitor of dna binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	6.06
4	HLA-DP	S66883_1	major histocompatibility complex class ii antigen beta chain	5.81
5	HLA-DQA	L34093_1	mhc class ii hla-dq-alpha chain	5.30
6	PRG1	NM_002727_1	proteoglycan 1, secretory granule	4.88
7	RGC32	NM_014059_1	rge32 protein	4.72
8	TNFSF13B	NM_006573_1	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	4.44
9	unknown	AC026785.3.13728.33112.2	ensembl gensecan prediction	4.31
10	unknown	XM_016170_1	hypothetical protein xp_016170; loc88021	4.17
11	DDIT3	NM_004083_1	dna-damage-inducible transcript 3	4.06
12	WARS	NM_004184_1	tryptophanyl-tna synthetase	4.02
13	PTPRE	NM_006504_1	protein tyrosine phosphatase, receptor type, e	3.72
14	HLA-DQB1	NM_002123_1	major histocompatibility complex, class ii	3.63
15	HLA-DRB5	NM_002125	major histocompatibility complex	3.57

B				
Gene no.	Name	Access	Gene Description	ratio
1	SPP1	NM_000582_1	secreted phosphoprotein 1 (osteononin)	22.37
2	unknown	AC064875.4.1.35064.1	ensembl gensecan prediction	19.20
3	CXCL7	NM_002704_1	pro-platelet basic protein (NAP2, SCYB7, CTAP3, PPBP)	15.08
4	FLJ20033	NM_017629_1	hypothetical protein flj20033	9.43
5	LOC64182	NM_022359_1	similar to rat myomegalin	8.82
6	unknown	BC000845_1	unknown (protein for image:3457769)	7.01
7	CSB	NM_000066_1	complement component 8, beta polypeptide	6.78
8	unknown	BC006174_1	unknown (protein for image:4053618)	6.73
9	STK4	NM_006282_1	serine/threonine kinase 4	6.62
10	CCL11	NM_002986_1	small inducible cytokine subfamily a (cys-cys), member 11 (eotaxin)	6.60
11	CCL20	NM_004591_1	small inducible cytokine subfamily a (cys-cys), member 20	6.59
12	PLSCR3	NM_020360_1	phospholipid scramblase 3	6.44
13	PIN	NM_003746_1	dyncin, cytoplasmic, light polypeptide	6.31
14	TM4-B	NM_012466_1	tetraspanin tm4-b	6.13
15	ERO1L	NM_014584_1	ero1-like (s. cerevisiae)	6.04

Analysis was done by using GeneSpring ver. 6.2.
Access indicates GenBank accession number.

表 3

接着能、IFN- γ 産生能を亢進させる¹⁰⁾。CXCL7 は好中球の細胞内カルシウム濃度を上昇させ、脱顆粒を誘導し、遊走能や superoxide 産生能を亢進させることが報告されている^{12,13)}。

SPP1やCXCL7は多くの機能を有し、in vivo ではさらに重要な役割を果たしている可能性も考えられる。これらの分子が抗酸菌に対する生体防御における役割についてのさらなる解明が待たれる。

- 1) Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 2001; 1:20–30.
- 2) Akagawa KS. Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Int J Hematol* 2002; 76:27–34.
- 3) Ma J, Chen T, Mandelin J et al. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:2334–46.
- 4) Dean DC. Expression of the fibronectin

- gene. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989; 1:5–10.
- 5) Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:593–623.
- 6) Bing DH, Almeda S, Isliker H et al. Fibronectin binds to the C1q component of complement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:4198–201.
- 7) Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:275–90.
- 8) Lau YL, Chan GC, Ha SY et al. The role of phagocytic respiratoryburst in host defense against Mycobacterium tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26:226–7.
- 9) Cooper AM, Segal BH, Frank AA et al. Transient loss of resistance to pulmonary tuberculosis in p47 (phox-/-) mice. *Infect Immun* 2000; 68:1231–4.
- 10) Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V et al. Osteopontin - a molecule for all seasons. *Q J Med* 2002; 95:3–13.

- 11) O'Regan AW, Hayden JM, Body S et al. Abnormal pulmonary granuloma formation in osteopontin-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:2243–7.
- 12) Walz A, Baggiolini M. A novel cleavage product of beta-thrombo-globulin formed in cultures of stimulated mononuclear cells activates human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159:969–75.
- 13) Walz A, Meloni F, Clark-Lewis I et al. $[Ca^{2+}]_i$ changes and respiratory burst in human neutrophils and monocytes induced by NAP-1/interleukin-8, NAP-2, and gro/MGSA. *J Leukoc Biol* 1991; 50:279–86.

Ataxia telangiectasia (毛細血管拡張性運動失調症) の病態に関する分子生物学的解析

折 居 建 治 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学助手)
深 尾 敏 幸 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学助教授)
金 子 英 雄 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学講師)
近 藤 直 実 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学教授)

【研究要旨】

毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia telangiectasia) は進行性の小脳変性症を伴う免疫不全症であり、IgAの欠損、IgGサブクラス欠損、リンパ球芽球化能の低下を特徴とする。この疾患の原因遺伝子であるATMは2本鎖DNA切断修復において重要な役割を果たしている。今回、我々は2種類の2本鎖DNA切断修復機構 (非相同末端結合 (NHEJ)、相同組換え修復 (HR)) と神経系発達との関連およびATM蛋白質、p53蛋白質との関係を調べるため、NHEJ欠損マウス (DNA ligase4 deficiency) とHR欠損マウス (Xrcc2 deficiency) を使用した。それらの発達期大脳皮質における神経細胞死を比較検討し2種類の2本鎖DNA切断修復機構が神経系発達におよぼす影響について検討した。

A. 研究目的

2本鎖DNA切断修復には非相同末端結合 (NHEJ) と相同組み換え修復 (HR) の2種類があることが知られている。これらの異なる修復機構はゲノムDNAの安定性の維持に必要である。最近、これらの2本鎖DNA切断修復機構にはATM kinaseのシグナルが重要であることが培養細胞を使った実験で示唆されている。また、1本鎖DNA切断修復蛋白の欠損が遺伝性小脳変性疾患の原因であることが報告されてきており、DNA修復と神経変性との関連が注目されてきている。

今回、我々は2種類の2本鎖DNA切断修復機構と神経系発達との関連およびATM蛋白質、p53蛋白質との関係を調べるため、NHEJ欠損マウス (DNA ligase4 deficiency) とHR欠損マウス (Xrcc2 deficiency) を使用した。それらの発達期大脳皮質における神経細胞死を比較検討し2種類の2本鎖DNA切断修復機構が神経系発達におよぼす影響について検討した。

B. 研究方法

NHEJ欠損マウス (DNA ligase4 deficiency) とHR欠損マウス (Xrcc2 deficiency) を使用し胎仔期大脳 (E14.5) における神経細胞死をTUNEL染色により検出した。

増殖細胞のマーカーであるKi67、細胞分裂後早期の神経系細胞のマーカーであるTuj1とTUNEL染色との2重染色を行うことで神経細胞死がどのような細胞に起こっているのか検討した。

神経細胞死がおこるシグナル伝達のメカニズムを明らかにするためにATM欠損マウスまたは、p53欠損マウスとかけ合わせてdouble knockout mouseを作成しATM欠損またはp53欠損の神経細胞死への影響を検討した。

C. 研究結果

HR欠損マウスでは、神経細胞のアポトーシスがE9.5からE14.5にかけて増殖細胞に主にみられた (ventricular zone)。NHEJ欠損マウス大脳では、神経細胞のアポトーシスがE13.5からE16.5にかけて分裂後早期の神経細胞に主にみられた

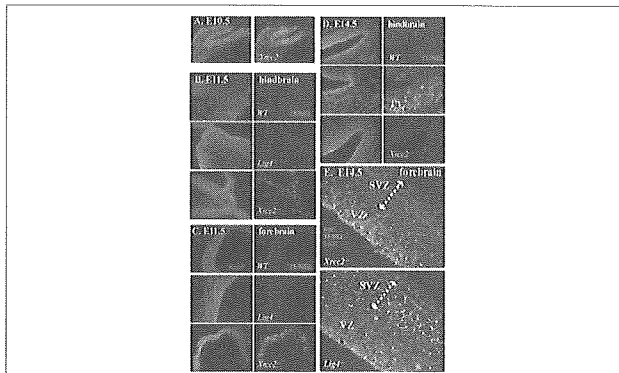


図1 マウス胎仔大脳においてNHEJ欠損とHR欠損によっておこるアポトーシスの検出
 Ki67 (増殖細胞のマーカー) : red
 TUNEL (アポトーシス) : green
 DAPI (核染色) : blue

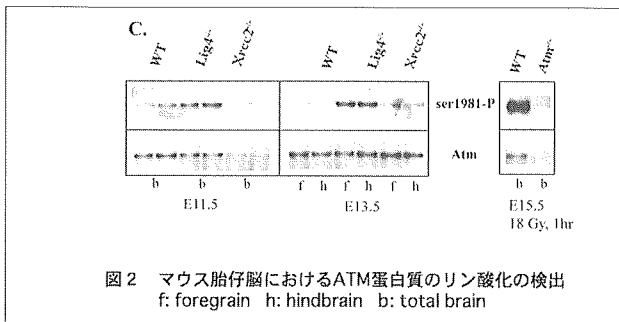


図2 マウス胎仔脳におけるATM蛋白質のリン酸化の検出
 f: foregrain h: hindbrain b: total brain

(subventricular zone)。 (図1)

2本鎖DNA切断修復欠損マウス胎仔脳におけるATM蛋白質のリン酸化をE11.5とE13.5のマウス胎仔脳において検出した。NHEJ欠損マウス胎仔脳においてATM Ser1981のリン酸化が著明にみられているがHR欠損マウスではみられなかった。(図2)

マウス胎仔大脳において神経細胞がアポトーシスを起こす過程でp53がどのような役割を果たしているか検討するためにp53のリン酸化を検出した。HRの欠損ではp53のリン酸化は主に脳室表面に局在するG2/M期の神経細胞に多くみられた。(図3)

NHEJ欠損マウス大脳のアポトーシスは主にsubventricular zoneにみられATMが欠損すると見られなくなった。またp53が欠損してもアポトーシスはみられなくなった。HR欠損マウス大脳のアポトーシスは主にventricular zoneにみられATMが欠損しても変化は見られなかったがp53が欠損するとみられなくなった。(図4)

このことからATMは分裂後早期の神経細胞がアポトーシスをおこすために重要であることが示唆され、増殖期の細胞がアポトーシスを起こす過

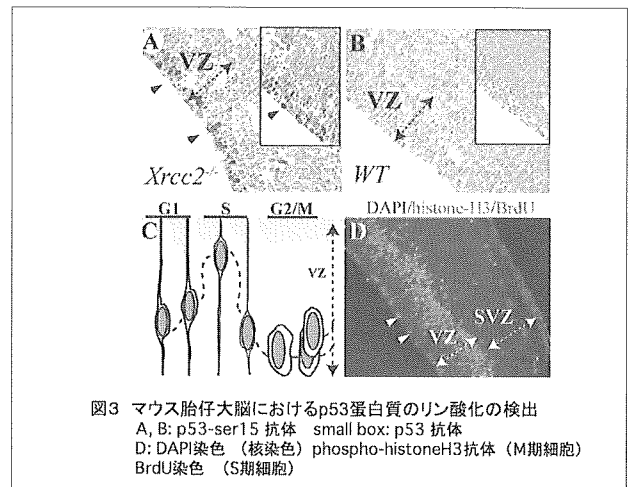


図3 マウス胎仔大脳におけるp53蛋白質のリン酸化の検出
 A, B: p53-ser15 抗体 small box: p53 抗体
 D: DAPI染色 (核染色) phospho-histoneH3抗体 (M期細胞)
 BrdU染色 (S期細胞)

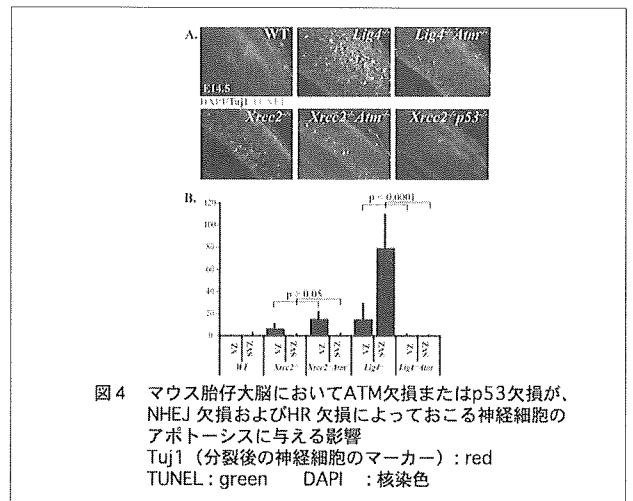


図4 マウス胎仔大脳においてATM欠損またはp53欠損が、NHEJ欠損およびHR欠損によっておこる神経細胞のアポトーシスに与える影響
 Tuj1 (分裂後の神経細胞のマーカー) : red
 TUNEL : green DAPI : 核染色

程には重要ではない事が示された。

D. 考察

今回の研究により、マウス発達期大脳において2種類の2本鎖DNA切断修復機構(NHEJ, HR)はそれぞれ重要な働きをしていることがあきらかになったが、ATMのシグナルはよりNHEJの系に重要であった。これは毛細血管拡張性運動失調症の小脳症状の発症機序を考える上で重要な結果であった。

今回、我々はATM抗体、リン酸化ATM抗体を利用した免疫沈降反応を初めてマウス脳組織を用いて行った。NHEJ欠損マウスにおいてアポトーシスがみられる以前からATMがリン酸化されていることが明らかになり胎仔期におけるATM蛋白質の機能を知る上で重要な結果であった。

E. 結 論

- 1) 胎仔期大脳においてHRの欠損では主に増殖期の細胞(ventricular zone) にE9.5からE14.5にかけて神経細胞死がみられたがNHEJの欠損では増殖後の分化している細胞(subventricular zone) にE13.5からE15.5にかけて神経細胞死がみられた。
- 2) HRの欠損ではp53のリン酸化は主にG2/Mの細胞にみられた。
- 3) NHEJ欠損マウス大脳におけるDNA障害後の細胞死はATM欠損またはp53欠損マウスとの掛け合わせdouble knockout mouseを作成したところみられなくなった。HR欠損マウス大脳におけるDNA障害後の細胞死はp53が欠損

するとみられなくなるがATMが欠損しても変化はみられなかった。

- 4) ATMのリン酸化はNHEJ欠損マウスにおいて顕著にみられ、HR欠損マウスではみられなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

常染色体劣性高IgE症候群の原因遺伝子の検討

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

【研究要旨】

高IgE症候群は、難治性湿疹と血清IgE高値を合併する原発性免疫不全症である。本症候群には、免疫系以外の骨、歯牙などの異常を有する常染色体性優性のものと、免疫系のみで異常を呈する常染色体性劣性のものがある。これらの原因遺伝子は明らかにされていないが、Th1細胞への分化障害とTh2細胞への過剰な分化が病態の中心にあると考えられている。

今回我々は、典型的な常染色体性劣性の高IgE症候群の症状に、細胞内寄生菌に対する易感染性を合併する免疫不全症の原因遺伝子の検討を行った。本症例のT細胞は、PMAとIonomycinの刺激後、ほぼ正常にIFN γ を産生するにもかかわらず、IL-12とIL-18の刺激後には、全くIFN γ を産生しなかった。IL-12刺激後のSTAT4のリン酸化が完全に欠損しており、さらにIFN α 刺激後のSTAT4のリン酸化も障害されていた。IL-12とIFN α の両者のシグナル伝達の異常が存在することから、Jakファミリーの細胞内チロシンキナーゼTyk2に異常が存在することが始めて明らかにされた。

A. 研究目的

高IgE症候群は、血清IgEが高値で、難治性のアトピー性皮膚炎様の湿疹に、各種感染症に対する易感染性を呈する疾患である。黄色ブドウ球菌の感染症、Pneumatoceleを形成する肺炎を特徴とし、常染色体優性遺伝で、骨、歯牙の異常を合併する群と、常染色体劣性遺伝で、伝染性軟属腫、その他のウィルス感染症などの日和見感染症に頻回に罹患する群の2群がある。高IgE症候群の原因は、Th1細胞とTh2細胞のバランスの乱れがその原因に関与しているものと考えられているが、これまでのところその病因は明らかにされていない。抗生物質や抗真菌薬の予防的投与や、局所への軟膏の塗布による湿疹の管理が有効であるが、原因に対する治療法は存在しない。今回我々は、本疾患の原因遺伝子を同定し、本症候群の病態を正確に理解し、より有効な診断法、治療法を開発する目的で、高IgE症候群の原因遺伝子の検討を行った。

B. 研究方法

患児よりインフォームドコンセントを得たあとで、患児の末梢血より比重遠心法により単核球を分離した。これを各種の刺激後、サイトカインの産生はELISA法にて、タンパクのリン酸化はウェスタンブロッティング法にて、遺伝子発現はRT-PCR法にて、Th1/Th2分化は細胞内染色とフローサイトメトリーにて解析した。また、末梢血単核球よりDNA, cDNAを抽出し、PCRとdirect sequencingにより塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト遺伝子解析を含むので、試料提供者の人権および利益の保護の取り扱いについて慎重に配慮した。そのため遺伝子解析は個人識別情報管理者により連結可能匿名化で行い、また本研究における遺伝子解析に関しては、東京医科歯科大学倫理委員会で承認を得ているので、その指針を遵守して行った。

C. 研究結果

1. 高IgE症候群の症例におけるTyk2遺伝子の異常

本高IgE症候群のT細胞において、PMAとカルシウムイオノフォアの刺激では、ほぼ正常のIFN γ の産生が見られたが、IL-12とIL-18に対してはIFN γ の産生が、ほとんど見られず、IL-12 and/or IL-18のシグナル伝達経路が障害されているものと考えられた。さらにIL-12刺激に対して、STAT4のリン酸化が全く見られずに、IL-12のシグナル伝達が障害されていることが明らかになった。さらにIFN α 刺激後のSTAT4のリン酸化も障害されていた。以上の結果より、Tyk2、STAT4の塩基配列の検討を行ない、Tyk2のコーディング領域に、4ベースの欠失があることを見出した。この遺伝子異常により、Tyk2のタンパクは、全長1187アミノ酸のうち、コドン90がストップコドンとなり、Tyk2の機能的に重要と考えられるすべてのドメインが欠失していた。さらに患者T細胞のウェスタンブロッティングで、Tyk2タンパクの欠損が確認された。両親は、血族結婚で、父親、母親の両方に4ベースの遺伝子欠失が、ヘテロで認められたが、両親のIgE値、免疫能は正常であった。

2. ヒトのTyk2はI型インターフェロンのシグナル伝達に必須である

Tyk2は、ヒトのI型インターフェロンのシグナル伝達に必須の因子として同定されたが、ノックアウトマウスの検討では、I型インターフェロンのシグナル伝達に限定的な役割しか果たしていない。ヒトにおけるI型インターフェロンのシグナル伝達に対するTyk2欠損の影響を検討した。正常T細胞株においては、I型インターフェロン投与により、Jak1とJak2のチロシンリン酸化、STAT1とSTAT2のチロシンリン酸化が起こるが、本症例のT細胞株においてはいずれも全く見られなかった。さらに、患者末梢血単核球をI型インターフェロンで刺激した際の、IFN応答性遺伝子のNMI、MxAなどの発現上昇にも、Tyk2は必須であることも明らかにされた。さらに大量のI

型インターフェロン投与により、患者の末梢血単核球においては、MHCクラスI分子の発現亢進がI型インターフェロン投与によっても見られなかった。以上より、ヒトのTyk2はI型インターフェロンのシグナル伝達に必須の役割を果たしていることが明らかにされた。

3. ヒトのTyk2は、Th1分化の促進とTh2分化の抑制に必要である

本症例の末梢血T細胞を抗CD3抗体と、IL-12またはIL-4で刺激してTh1細胞、Th2細胞への分化能を検討した。細胞内染色によるIFN γ とIL-4の産生による評価で、患者T細胞においては、Th1細胞へのIL-12による分化誘導が、著しく阻害され、逆にTh2細胞への分化が亢進していることが認められた。

4. Tyk2の遺伝子導入により、IL-12とI型インターフェロンのシグナルは回復する

本症例においてTyk2の異常が、疾患が原因であることを証明するために、正常Tyk2のcDNAを組み込んだレトロウイルスを用いて、Tyk2発現により、T細胞機能が正常に回復できるかどうかを検討した。正常Tyk2を導入することにより、患者T細胞はIL-12とIL-18刺激により、正常にIFN γ の産生し、さらにIFN α 刺激に対するMxAの転写が回復した。このことより、本症例の免疫異常の原因は、Tyk2分子の欠損であることが証明された。

D. 考 察

Tyk2の発現はユビキタスであるが、Tyk2の欠損によっても、ヒトのリンパ球、顆粒球、血小板、赤血球のどの造血細胞の分化には異常が見られず、さらには全身の発育発達は正常であることから、Tyk2分子はこれらの過程に必須ではないことが明らかにされた。また、Tyk2の欠損症は、ヒトのTyk2分子はヒトとマウスにおいて、Tyk2欠損症の表現系が異なることより、Tyk2の機能がヒトとマウスでは少なくとも一部異なっているものと考えられた。ヒトの細胞内寄生菌やウイルスに

対する易感染性、高IgE血症などの症状を呈する疾患に対して、遺伝子診断の手段が提供され、さらには、遺伝子治療の可能性が拓かれた。

E. 結 論

ヒトにおいて、Tyk2の欠損により、高IgE症候群を発症することが明らかとなり、さらに、ヒトのTyk2は、I型インターフェロンのシグナル伝達に必須の役割を果たしていることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 学会発表

第35回日本免疫学会 2005.12.13-15. 横浜
常染色体劣性高IgE症候群の原因遺伝子の検討

峯岸克行、齋藤雅子、森尾友宏、水谷修紀、上松一永、野村明彦、原寿郎、金子秀雄、近藤直美、川村信明、有賀正、崎山幸雄、土屋滋、谷内江昭宏、柘植拓也、大石勉、城宏輔、岩田力、別所文雄、宮脇利男、野々山恵章、烏山一

2. 論文発表

Mukai K, Matsuoka K, Taya C, Suzuki H, Yokozeki H, Nishioka K, Hirokawa K, Etori M, Yamashita M, Kubota T, Minegishi Y, Yonekawa H, Karasuyama H. Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity*. 23:191-202. 2005

造血幹細胞移植を施行したWAS 5例の検討

波多野 典 一 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)
戸 板 成 昭 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)
小 林 良 二 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)
川 村 信 明 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)
有 賀 正 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)

【研究要旨】

過去10年間に当科で造血幹細胞移植を施行したWAS 5症例の治療成績を報告した。全例が1才までに臨床的/遺伝子学的に診断され、4才までに移植が施行された。移植源は骨髄3例、臍帯血2例であり、ドナーは母1例(保因者)、姉1例(非保因者)、非血縁者3例で、全例がHLA 6/6一致であった。移植前処置はBUS 4mg/kg x 4 days, CY 50mg/kg x 4 daysで、3例ではALGを併用した。GVHD予防はCsA + MTXが4例、CsA + mPSLが1例であった。骨髄移植3例では $3.8\sim 10.7\times 10^8$ /kg、臍帯血移植2例では $3.1\sim 6.4\times 10^7$ /kgの総細胞数を輸注した。骨髄移植の1例で慢性GVHDを、臍帯血移植の1例で急性および慢性GVHDを認めたが、5例全例に生着が得られ、現在まで完全キメラが継続しており、臨床的に極めて良い状態で生存している。

研究目的

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) は、サイズの低下を伴う血小板減少、難治性湿疹、易感染性を3主徴とするX連鎖形式の免疫不全症である。Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) 遺伝子とその責任遺伝子として同定されたが、その後同様の血小板減少のみを呈するX-linked thrombocytopenia (XLT) でもWASP遺伝子の異常が確認されている。WASは生存者の平均年齢が11歳と、長期的予後が不良な疾患である。死因としては感染症(44%)、出血(23%)が多いが、悪性腫瘍も高頻度に合併し死因の26%を占めている。根治治療として造血幹細胞移植が行われているが、これまでに標準化されたプロトコールは確立されておらず、治療成績も一定していないのが現状である。今回我々は過去10年間に当科で造血幹細胞移植を施行したWAS 5症例の治療成績を検討したので報告する。

研究方法

(対象)

対象患者は1995年5月から2005年5月までの10年間に、当科で造血幹細胞移植を施行したWASの男児5例である。診断時の年齢は1ヶ月から1才(中央値3ヶ月)で、造血幹細胞移植時の年齢は5ヶ月から4才(中央値1才3ヶ月)であった。診断から移植までの期間は2ヶ月から4年(中央値10ヶ月)であった。観察期間は4年から10年(中央値7年)である。

(患者のプロフィール)

各症例のプロフィールを表1に示す。全例で生後1年以内にWASの診断が臨床的、遺伝子学的に確定した。4歳までに全例で造血幹細胞移植が行われたが、移植前合併症としては細菌性中耳炎やカテーテル感染、サイトメガロウイルス肝炎などが認められた。

(フローサイトメトリー検査)

フローサイトメトリーによる細胞質内WASP

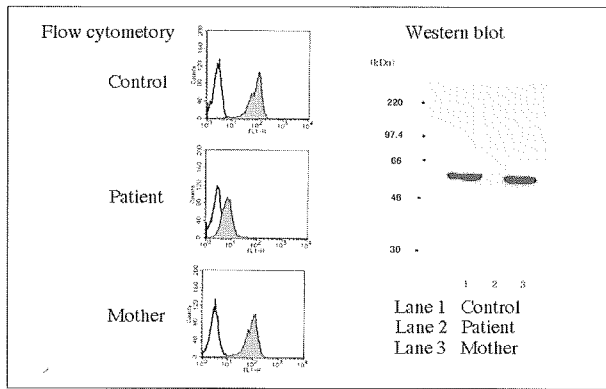


図1 Evaluation of WASP expression Patient 5

day-9	BUS	4mg/kg
day-8	BUS	4mg/kg
day-7	BUS	4mg/kg
day-6	BUS	4mg/kg
day-5	CY	50mg/kg, ALG 15mg/kg
day-4	CY	50mg/kg, ALG 15mg/kg
day-3	CY	50mg/kg, ALG 15mg/kg
day-2	CY	50mg/kg, ALG 15mg/kg
day-1	HST	
day 0	(related BMTの際はALGを除く)	
day-7~+35	acyclovir(ゾビラックス)	po
day-6~+90	CMV Ig	(×1/w, U-BMTのときはday+120まで)
GVHD prophylaxis:	CsA+short term MTX (related BMT)	
	FK506+short term MTX (unrelated BMT)	
	CsA+mPSL (unrelated CBSCT)	

図2 北海道大学小児科における前処置

の検索が、全症例の早期診断に非常に有用であった。この方法はWASP検出法として従来のウェスタンブロット法に比し、簡便、かつ鋭敏であった。図1に症例5でのフローサイトメトリーとウェスタンブロット法によるWASPの検索結果を示す。

(移植前処置プロトコール)

当科における造血幹細胞移植の前処置のプロトコールを図2に示す。血縁HLA一致ドナーの場合はブスルファン4mg/kg x 4 daysとエンドキサン50mg/kg x 4 daysを、非血縁ドナーの場合は上記の前処置に加えATGを併用した。

(移植手技)

移植手技を表2に示す。移植源は骨髄3例、臍帯血が2例であり、ドナーは母1例(保因者)、姉1例(非保因者)、非血縁者3例であった。全例で、HLA完全一致のドナーによる移植を行った。移植前処置は骨髄破壊的レジメを行い、BUS

Patient No.	Age at diagnosis	WASP Mutation	Age at SCT	Pre-transplant complication
1	12Mo	WASP (-) 1base deletion exon 1	4y	Zoster, HSV infi Otitis media, Th
2	10Mo	WASP (-) Missense exon1	1y7Mo	Gonarthriti, Catheter infecti
3	2Mo	WASP (-) Nonsense exon7	1y	CMV hepatitis, Enteropathy
4	1Mo	WASP (-) Missense exon 1	1y3Mo	CMV hepatitis
5	3Mo	WASP (-) 2bases deletion exon 1	5Mo	Non

表1 Profile of WAS Patients

Patient No.	Source	Donor	HLA matching	Conditioning	GVHD prophylaxi
1	BM	mother (carrier)	6 / 6	BUS+CY+ALG	CsA+short MTX
2	BM	sibling (non carrier)	6 / 6	BUS+CY	CsA+short MTX
3	BM	unrelated	6 / 6	BUS+CY+ALG	CsA+short MTX
4	CB	unrelated	6 / 6	BUS+CY	CsA+short MTX
5	CB	unrelated	6 / 6	BUS+CY+ALG	CsA+mPSL

表2 Transplantation procedure

Patient No.	Source	No. of cells transplanted		Engraftment.	Chimerism/Status
		Nucleated cells (x10 ⁶ /kg)	CD34 ⁺ cells (x10 ⁶ /kg)		
1	BM	6.20	14.5	Yes	Complete / Alive
2	BM	10.7	(no data)	Yes	Complete / Alive
3	BM	3.75	3.41	Yes	Complete / Alive
4	CB	0.64	0.17	Yes	Complete / Alive
5	CB	0.31	0.15	Yes	Complete / Alive

表3 Number of cells transplanted and outcome

4mg/kg x 4 days, CY 50mg/kg x 4 daysで3例ではALGを併用した。GVHD予防は、サイクロスポリンAとメソトレキセートで行ったものが4例、サイクロスポリンAとメチルプレドニゾロンで行ったものが1例であった。

研究結果

(輸注細胞数と結果)

輸注細胞数と最終的な移植の結果を表3に示す。骨髄移植の3例では体重(kg)あたり総細胞数3.75~10.7 x 10⁸個、CD34陽性細胞数は3.41~14.5 x 10⁶個であった。また臍帯血移植の2例では体重あたり総細胞数は3.1~6.4 x 10⁷個、CD34陽性細胞数は1.5~1.7 x 10⁵個であった。移植の結果、5例全例に生着が得られており、現在まで

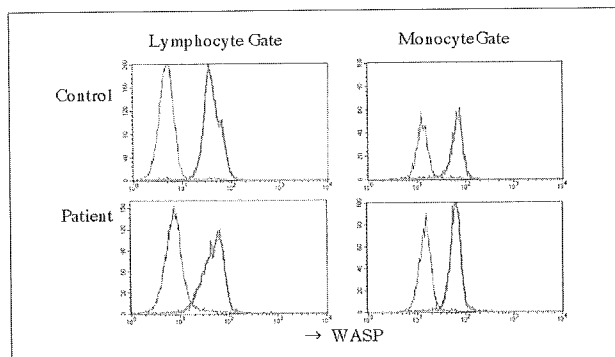


図3 Chimerism analysis Patient 5 on day 222 after HST

Patient No.	Source	Neu.>500/ μ l (day)	Plt.>5.0 $\times 10^4$ / μ l (day)	Ret. >10% (day)
1	BM	+11	+11	+21
2	BM	+11	+42	+19
3	BM	+15	+31	+34
4	CB	+17	+126	+63
5	CB	+17	+66	+3

表4 Engraftment

完全キメラの状態では生存している。

(キメリズム)

キメリズムの検索は、症例1, 2, 4は、性染色体FISH法と血液型で、症例3は血液型で、症例5はSTRで行った。さらに、フローサイトメトリーによる細胞質内WASPの発現により、キメリズムを確認した。症例5における移植後の細胞質内WASPの発現を図3に示す。リンパ球、単球ともに、WASPの発現を認め、完全キメラの状態が確認できた。

(生着)

移植後の生着に要した日数を表4に示す。好中球数が500/ μ lを超えるのに要した日数の平均は、骨髄移植群で12.3日に対し、臍帯血移植群で17.0日であった。血小板数が50,000/ μ lを超えるのに要した日数の平均は、骨髄移植群で28.0日に対し、臍帯血移植群で96.0日であった。網状赤血球数が10%を超えるのに要した日数の平均は、骨髄移植群で24.7日に対し、臍帯血移植群で48.0日であった。

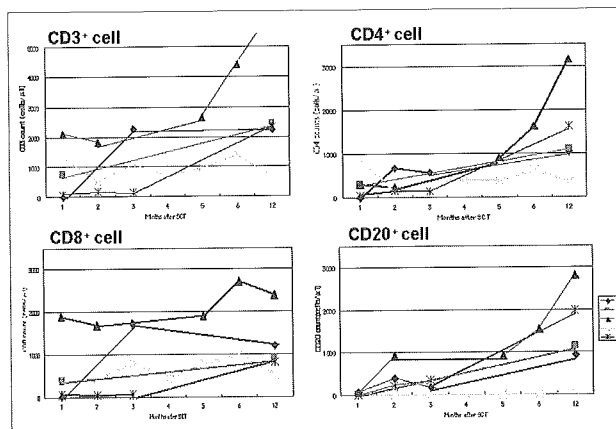


図4

Patient No.	aGVHD (Grade)	cGVHD	post-transplant complication
1	(-)	Oral mucosa, Liver	Catheter infection, Sepsis
2	(-)	(-)	Non
3	(-)	(-)	CMV infection
4	3	Liver	SIADH, Pancreatitis, Sepsis, CMV infection
5	(-)	(-)	Non

表5 GVHD and post-transplant complication

(GVHDと移植後合併症)

移植後のGVHDおよび合併症を表5に示す。Grade 3の急性GVHDを1例に、慢性GVHDは2例で認めた。慢性GVHDは口腔・肝の病変として認められた。GVHDに対する治療はプレドニゾロンにて行った。移植後の合併症では、カテーテル感染を含む敗血症が2例、サイトメガロウイルス感染症が2例で認められた。感染症以外の合併症としては、1例でADH不適合分泌による低ナトリウム血症と急性膵炎を認めた。移植前にサイトメガロウイルス感染症を認めた2例では、移植後もサイトメガロウイルス感染症を合併していた。

(移植後のリンパ球再構築)

各症例における移植後の末梢血リンパ球数(CD3, CD4, CD8, CD20陽性細胞)の推移を図4に示す。GVHDの治療のためステロイドが使用された症例1, 4では、細胞数の増加が緩慢な時期も認められるが、他の症例では概ね順調に細胞数の増加が認められた。またステロイドが使用された症例でも、ステロイド治療終了後から徐々に

に末梢血リンパ球数の回復を認めた。

考 察

過去10年間に当科で造血幹細胞移植を施行したWAS 5症例の成績を検討した結果、全例に生着と完全キメラが継続しており、臨床的にも良好な状態で生存していた。この良好な成績が得られた要因としては、全例で4才以前の早期に移植を実施できたこと、HLA6/6一致のドナーから十分な細胞数を移植できたことが最も重要と考えられる。原発性免疫不全症では一般的に早期の移植ほど良好な成績が得られていることから、WASの造血幹細胞移植においても早期診断の意義は大きいと考えられた。その意味で、フローサイトメトリーによる細胞質内WASPの検出法は簡便で迅速に結果が得られ、早期診断に有用な検査である。一方、同じWASP遺伝子の異常を認めながら血小板減少のみを主体としたXLTとの鑑別も重要であり、造血幹細胞移植の適応の決定にあたっては的確な臨床診断も大切である。今回は、BU+CY(+ATG)による前処置、CsA+MTX/mPSLによるGVHD予防法も有効と考えられるが、他法との比較はできなかったため、今後は長期的な評価も含めたさらなる検討が必要である。また、骨髄移植3例および臍帯血移植2例の全例で生着が得

られ非血縁ドナー（骨髄・臍帯血）の成績も良好であった。臍帯血移植では造血の回復が遅い傾向であったが、移植決定後早期に実施可能であり、今後有効な治療法として期待される。移植前にCMV感染症に罹患していた症例では、移植後もCMV感染症の合併が認められことから注意が必要と考えられる。なお、当科でこれまでに施行した造血幹細胞移植170例での検討では、悪性疾患や先天性代謝異常症・再生不良性貧血など他の非悪性疾患における移植後のサイトメガロウイルス感染の発生頻度と、原発性免疫不全症における移植後の同ウイルス感染の発生頻度との間には統計学的な有意差を認めていない。

結 論（結語）

当科において過去10年間に5例のWAS患者に対して造血幹細胞移植を施行し、全例に生着、完全キメラが継続し、臨床的に良好な状態を維持している。全例で早期に診断を確定し、4歳までにHLA 6/6一致ドナーから十分量の細胞数を移植できたことが、好成績につながったと考えた。臍帯血移植でも良好な成績が得られたことから、移植条件の標準化などにより今後移植成績の更なる向上を期待したい。