

いるCINCA症候群患者において、どのような症状が改善されえないかを検討することにより、同細胞死誘導の疾患における意義づけが推測される。

また細胞死のメカニズムとしては、lysosomal leakageを伴い、ミトコンドリア膜電位の低下を認めることを示した。現在までで分かっているところを元にした作業仮説を図に示す(図5)。

E. 結 論

CINCA症候群関連CIAS1遺伝子異常により、ヒト単球THP-1細胞株にカテプシンB依存性ネクローシス様細胞死を誘導することが分かった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Fujisawa A., Kambe N., Saito M., Nishikomori R., Tanizaki H., Kanazawa N., Adachi S., Heike T., Sagara J., Suda T., Nakahata T. and Miyachi Y. Disease-associated mutations in CIAS1 induce cathepsin B-dependent rapid cell death of human THP-1 monocytic cells. Blood, epub, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

IgA 欠損症の病態と病因遺伝子の解析

金子 英雄 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)

鈴木 啓子 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)

深尾 敏幸 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)

近藤 直実 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)

【研究要旨】

近年、IgA 欠損症の病因としてTACI (transmembrane activator and calcium-modulator and cytophilin ligand interactor) 遺伝子異常が報告された。そこで、IgA欠損の病態を明らかにするため、TACIを含めたTNF- α ファミリーの発現、遺伝子解析をおこない、さらに、IgA1, IgA2サブクラスの遺伝子、タンパク発現の検討をおこなった。今回、対象とした症例では選択的IgA欠損症、低IgA血症ともにTACI, BAFF-R, APRIL, BAFF-Rの遺伝子に病因となる変異は存在しなかった。1例のIgA欠損症を除き、健常人、IgA欠損症ともに末梢血単核球細胞のIgA1遺伝子の発現はIgA2より高値であった。この1例のIgA1定常部遺伝子を解析したところIgA1遺伝子が欠失しており、本邦2家系目のIgA1遺伝子欠損症であることが明らかになった。

A. 研究目的

2005年にCVID (common variable immunodeficiency) とIgA欠損症の一部がTNF receptor familyに属するTACI (transmembrane activator and calcium-modulator and cytophilin ligand interactor) 遺伝子変異によることが報告された。そこで、IgA欠損症においてTACI、BAFFR (B cell activating factor of the tumor necrosis factor family receptor) 等のTNF receptor familyとそのリガンドAPRIL (a proliferation-inducing ligand), BAFFに関して解析を行った。さらに、IgA欠損症の病態の解明をめざして、IgAサブクラスの発現につき検討した。IgA欠損症において、IgAサブクラス (IgA1, IgA2) の発現量を明らかにすることは、病態を明らかにする上で重要である。私たちは、IgAサブクラスの発現量を半定量化する方法を開発し、IgA欠損症患者について検討を行った。

B. 研究方法

APRIL, BAFFは6個のエクソン、TACIは5個のエクソン、BAFF-R、BCMAは3個のエク

ソンから構成されている。すべてのエクソンにプライマーを設定し、塩基配列を解析した。

$\alpha 1, \alpha 2$ 遺伝子のJエクソンとCH2エクソンの全く相同な配列部位にプライマーを設定し、そのPCR産物の39塩基の差を利用して電気泳動にてバンドを分離した。ELISA法にてIgA1, IgA2タンパクを測定した。

C. 研究結果

APRIL, BAFFは6個のエクソン、TACIは5個のエクソン、BAFF-R、BCMAにつき、塩基配列を検討したが、病因と考えられる変異は存在しなかった。

IgA1, IgA2の遺伝子発現の検討では、コントロールにおいて、電気泳動によって、3つのバンドを認めた。上から順に hetero duplex formation、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 遺伝子であった。hetero duplex formationはシーケンスを行うと、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ の両方の遺伝子が検出された (図1)。

コントロールでは、 $\alpha 1$ 優位に発現を認めたが、無刺激、TGF $\beta 1$ /PMA刺激後も $\alpha 1$ 優位のままであった。

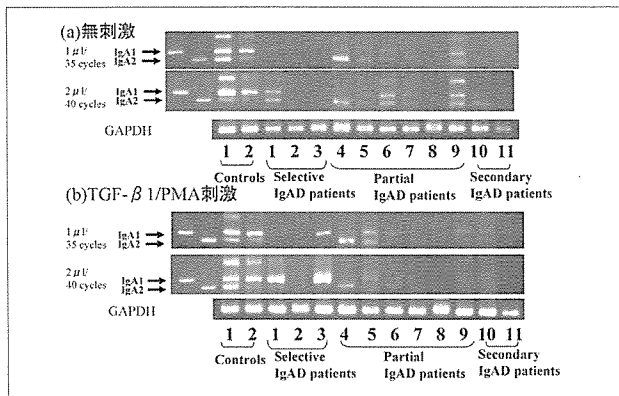


図1 IgA欠損症患者における $\alpha 1$, $\alpha 2$ 遺伝子の発現

発現を認めた症例において、 $\alpha 1$ が優位であったが、IgA完全欠損症患者1, 3は刺激により $\alpha 1$ の発現が強く誘導される傾向を認めた。部分欠損症患者4においては、 $\alpha 2$ 遺伝子の発現のみしか認められず、 $\alpha 1$ 遺伝子の欠損が疑われた。

ELISAにより計測した血漿中のIgA1, IgA2蛋白量においてもIgA1が優位であり、コントロールではIgA1/IgA2比は末梢血で一般的に言われている8:2程度を示した(表1)。

表1 血漿中のIgA1, IgA2蛋白量

Patient No.	Plasma IgA, IgA1 and IgA2 levels(mg/dl)the			IgA1/IgA2 ratio
	IgA	IgA1	IgA2	
Selective IgA deficiency				
1	2.13±0.0141	2.48±0.262	ND	NC
2	ND	ND	ND	NC
3	4.00±0.590	2.16±0.742	ND	NC
Partial IgA deficiency				
4	9.18±2.87	ND	13.7±1.39	NC
5	5.16±0.205	2.71±0.361	ND	NC
6	10.1±0.127	8.28±0.523	0.905±0.247	8.40
7	37.5±8.36	29.3±6.83	4.88±0.542	6.97
8	6.53±0.52	6.28±0.665	0.858±0.452	8.87
Secondary IgA deficiency				
9	11.2±1.91	8.59±1.77	1.17±0.355	6.56
10	0.537±0.0648	0.556±0.0871	0.181±0.0297	3.03
11	4.85±0.315	3.52±0.216	1.44±0.380	3.12
Controls (n=10)	154±37.7	120±34.7	20.4±8.63	7.96±4.14

ND: Not detected, NC: not calculated

IgA欠損症患者では、蛋白を計測できない症例が多かったが、私たちの行ったRT-PCRによって蛋白量を測ることのできない症例においても $\alpha 1$ / $\alpha 2$ 遺伝子発現の比を計測することができ、サブクラスの完全欠損等のスクリーニングにこの方法が有用と考えられた。

患者4ではIgA1の遺伝子発現、タンパク発現ともに認められずIgA1完全欠損と考えられたので免疫グロブリン定常部位における、ゲノムDNAのPCRを行なった。患者4は、 $\alpha 1$, $\gamma 2$, ϵ 遺伝子の欠損を認め、本邦2例目のIgA1-IgG2-IgG4-IgE欠損症であると考えられた(図2)。

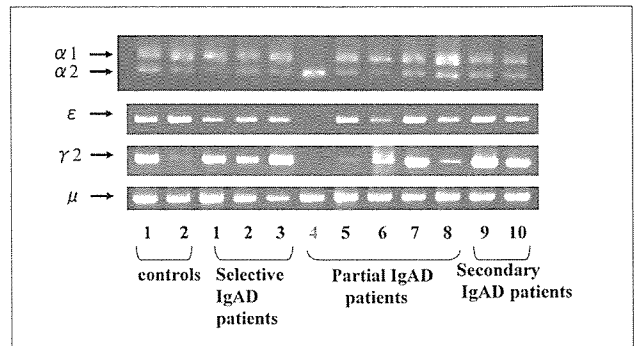


図2 免疫グロブリン定常部位におけるゲノムDNAのPCRの結果

D. 考 察

IgA欠損症とCVIDにTACI遺伝子異常が2005年に報告されたが、その後の報告は散見されるのみであり、TACI遺伝子変異が病因のIgA欠損症はそれほど多くないと考えられる。私たちが対象とした症例でもTACIを含めたTNF- α familyの遺伝子変異は検出できなかった。

IgA1, A2サブクラスの発現を遺伝子とタンパクから検討したところ、IgA欠損患者ではIgA1/A2の比を測定できない患者が存在したが、遺伝子発現では測定でき、より鋭敏であると考えられた。この系を用いて迅速にIgA部分欠損患者の中からIgA1遺伝子欠損の患者を同定することができた。本邦においても、免疫グロブリン定常部の欠失を示す患者は少なくない可能性が示唆された。

E. 結 論

IgADとCVIDの病態を明らかにするため、TNF familyに属するAPRIL, BAFFとそのレセプターTACI, BAFF-R, BCMAに関して解析したが、対象とした症例では病因となる遺伝子変異は検出されなかった。

IgA欠損症患者において、IgAサブクラスの遺伝子発現を検討した。IgA欠損症患者においては、 $\alpha 1$, $\alpha 2$ 遺伝子ともに発現が低下していた。IgA欠損症患者においては、 $\alpha 1$ / $\alpha 2$ 遺伝子発現比はコントロールと比較して低値であった。この方法により、本邦2例目のIgA1遺伝子欠損症患者を同定した。本患者は、IgA1-IgG2-IgG4-IgE遺伝子欠損症であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Orii KE, Lee Y, Kondo N, McKinnon P J. : Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. Proc Natl Acad Sci U S A. 103:10017-22, 2006.
- 2) Kawamoto N, Kaneko H, Takemura M, Seishima M, Sakurai S, Fukao T, Kasahara K, Iwasa S, Kondo N. : Age-related changes in intracellular cytokine profiles and Th2 dominance in allergic children. Pediatric Allergy and Immunology 17: 125-133, 2006.
- 3) Kaneko H, Matsui E, Shinoda S, Kawamoto N, Nakamura Y, Uehara R, Matsuura N, Morita M, Tada H, Kondo N. : Effect of dioxins on the quantitative levels of immune components in infants. Toxicology and Industrial Health 22:131-136, 2006.
- 4) Kaneko H, Matsui E, Asano T, Kato Z, Teramoto T, Aoki M, Kawamoto K, Li A-L, Kasahara K, Kondo N. : Suppression of IFN-gamma production in atopic group at the acute phase of RSV infection Pediatric Allergy and Immunology 17: 370-375, 2006.
- 5) Kaneko H, Isogai K, Kondo M, Hosoi K, Asano T, Funato M, Kondo N. : Autologous peripheral blood stem cell transplantation in a patient with relapsed pleuropulmonary blastoma. Journal of Pediatric Hematology and Oncology 28: 383-385, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

あるCommon variable immunodeficiency患者で発現低下のみられた Interferon regulatory factor 5の B細胞活性化能について

山田 雅文 (北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻生殖・発達講座小児科学分野)

有賀 正 (北海道大学大学院医学研究科病態制御学専攻生殖・発達講座小児科学分野)

Haiying Qin (NIH, NCI, Metabolism Branch)

Lan Tian (NIH, NCI, Metabolism Branch)

Donn M. Stewart (NIH, NCI, Metabolism Branch)

David L. Nelson (NIH, NCI, Metabolism Branch)

(NIH: National Institutes of Health, NCI: National Cancer Institute)

【研究要旨】

Interferon regulatory factor 5 は IRF ファミリー転写因子で、樹状細胞や B 細胞で発現がみられることが報告されている。最近の IRF5-knockout mice の解析から、Toll-like receptor 刺激による樹状細胞からの炎症性サイトカイン産生に重要であることが示されたが、B 細胞における役割については全く明らかになっていない。ある Common variable immunodeficiency 患者の末梢血単核球を用いたマイクロアレイ解析で IRF5 の発現が種々の刺激前後で常に有意に低下しており、naive B 細胞でも同様であった。IRF5 遺伝子配列には異常がなかったが、B 細胞における IRF5 の発現制御と機能の解明が患者の病因、病態の理解につながる可能性を考えた。IRF5 は IFN- α のみならず Interleukin 4 と CD40 ligand 刺激により相乗的に誘導され、さらに Daudi B 細胞株を用いた IRF5-stable transfectant の解析から IRF5 が B 細胞活性化を直接 positive に制御していると考えられた。

研究目的

Common variable immunodeficiency (CVID) は血清の免疫グロブリン低下を特徴とする heterogeneous な疾患群である。最近いくつかの遺伝子が CVID の責任遺伝子として報告されているが、多くの患者においては未だに原因不明である。本研究では乳児期より易感染性を呈した一人の CVID 患者の末梢血単核球を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、Interferon regulatory factor 5 (IRF5) の発現が種々の刺激前後で常に有意に低下しており、purified naive B 細胞においても同様であった。しかし、IRF5 遺伝子の coding region や promoter region として報告されている領域の配列には異常がなく、IRF5

自体の問題ではないと考えられた。

IRF ファミリー転写因子は Helix-turn-helix DNA-binding motif をもつ転写因子で、ウイルス感染の際の type I IFN 発現誘導に重要だが、最近免疫系の制御において多様な役割をもっていることが明らかになっている。これまでに IRF 1-9 までの 9 種類が報告されており、このうちの IRF5 は樹状細胞や B 細胞で発現がみられ、樹状細胞においては、Toll-like receptor 刺激に反応し炎症性サイトカインを産生するのに重要であることが IRF5-knockout mice の解析から明らかになっている。しかし、B 細胞における機能についてはまったく解明されていない。

今回の研究では、B 細胞における IRF5 の発現

制御と機能の解明が患者の病因、病態の理解につながる可能性を考え、検討を行った。

研究方法

(患者)

37歳男性で、乳児期より肺炎、副鼻腔炎などを繰り返し、4歳時に血清IgG及びIgA値の低下よりCVIDと診断された。家族歴に特記すべきことはない。ガンマグロブリン補充療法開始後、感染はコントロールされている。

(末梢血単核球、naive B細胞、及びCD19陽性細胞の分離とその培養)

末梢血単核球はFicoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences) を用いた比重遠心法で分離した。Naive B細胞は末梢血単核球をNaive B cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) を用いて分離した。CD19陽性細胞は末梢血単核球をMACS CD19 beads (Miltenyi Biotec) を用いて分離した。

(オリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析と定量PCR解析)

刺激前と、抗CD3抗体 + 抗CD28抗体で6時間刺激、及び抗CD3抗体 + 抗CD28抗体 + IL-4 + 抗IFN- γ 中和抗体で24時間刺激という2種類のT細胞刺激後の末梢血単核球を用いた。Age-matchedの正常者と患者の末梢血単核球より分離したtotal RNAよりそれぞれ蛍光色素Cy-5とCy-3で標識したamplified RNAを作製した。これをNational Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) array centerで作製された70-mer long oligo arrayにhybridizeし、正常者と患者との間で有意な発現の差のみられた遺伝子を抽出した。IRF5と2つのhousekeeping genes (CD19とGAPDH) をtwo-step quantitative TaqMan RT-PCRを用いて解析した。

(DNA constructsとstable transfectants)

IRF5全長(IRF5FL)と、DNA-binding domainを有するがtransactivation domainを持たないIRF5 dominant negative (IRF5DN) をpIRES 2-EGFP vectorで作製した。これをNucleofectorを用いてDaudi 成熟B細胞株にtransfectionし、

G418によるdrug selectionとEGFP陽性細胞のFACSVantage (BD Biosciences) を用いたsortingによりtransfectantを分離し、さらにlimiting dilutionによりクローン化した。

(Electrophoretic mobility-shift assay, EMSA)

IRF5のStat6-binding motifとCD23b promoter gamma-interferon-activated sequence (GAS) を [γ -32P]-ATPで標識して行った。nuclear extract 5 μ gと20分、室温でincubateした後にNovex 6% DNA retardation gelにloadし、解析を行った。

研究結果

患者末梢血単核球を用いたマイクロアレイ解析を行った。2回の刺激前の末梢血単核球で正常者と患者との間でいずれも2.8 fold以上の差がみられた遺伝子群と、2種類のTCR刺激後の末梢血単核球でいずれも2.2 fold以上の差がみられた遺伝子群を示す(図1 A, B)。Interferon- γ などのTh1系の遺伝子やIL-1 β , TNFなどの炎症性サイトカインの発現が患者で高く、反対に種々の免疫グロブリン遺伝子の発現が落ちていた。そして、なぜかIRF5の発現が患者で常に劇的に落ちていた。患者末梢血におけるIRF5の発現低下は定量PCR法で確認され、さらにpurified naive B細胞においても同様であった(図2 A, 図2 B)。なぜIRF5の発現が患者のB細胞で低下しているの

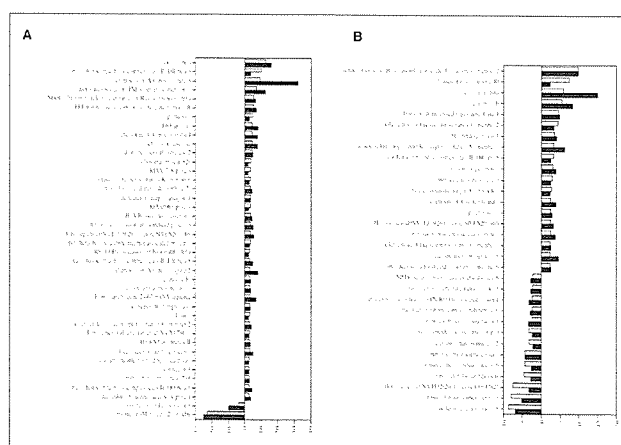


図1. 末梢血単核球を用いたマイクロアレイ解析結果
A: 刺激前の検体で患者と正常者との間で2.8 fold以上の発現の差がみられた遺伝子群。
B: 2種類のT細胞刺激後の検体で患者と正常者との間で2.2 fold以上の発現の差がみられた遺伝子群。(Ⓔ:抗CD3抗体 + 抗CD28抗体で6時間刺激, Ⓒ:抗CD3抗体 + 抗CD28抗体 + IL-4 + 抗IFN- γ 中和抗体で24時間刺激)

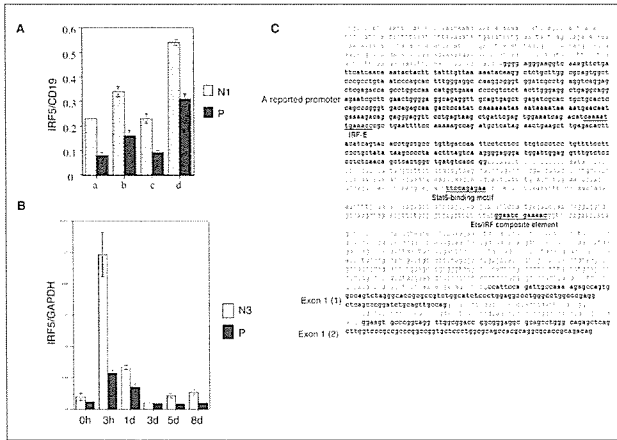


図2. 定量PCR法によるIRF5発現の解析とIRF5プロモーター解析
 A: 末梢血単核球におけるIRF5発現の解析
 a) 0 hr, b) 抗CD3抗体 + 抗CD28抗体で6時間刺激, c) IL-4 + CD40Lで7日間刺激,
 d) 抗CD3抗体 + IL-4で4日間刺激
 B: purified naive B細胞におけるIRF5発現の解析
 0時間、及びIL-4 + CD40L刺激後3時間, 1日, 3日, 5日, 8日
 C: IRF5プロモーターのmotif解析

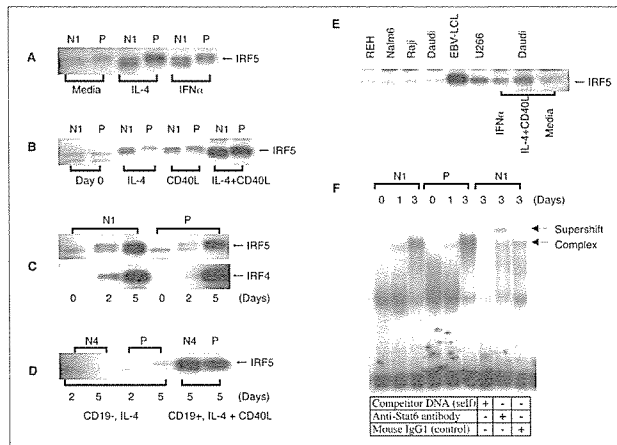


図3. Western blot法によるIRF5蛋白発現の解析とIRF5プロモーター領域Stat6-binding motifを用いたEMSA解析
 A-C: 末梢血単核球の刺激前及び各種刺激後の核内IRF5発現
 D: 末梢血単核球より分離したCD19陽性、陰性細胞の核内IRF5発現
 E: 種々のB細胞株の核内IRF5発現
 F: 末梢血単核球におけるIRF5プロモーター領域のStat6-binding motifを用いたEMSA解析IL-4 + CD40L刺激後の日数を各laneの上に示す。N1, N4: 正常者, P: 患者

かについて、IRF5遺伝子そのものの異常による可能性を考え、IRF5のcoding regionやIRF5 promoterとして報告されている部位の遺伝子配列を解析した。IRF5についてはtranscriptional variantがいくつか報告されているが、DNAのレベルで30塩基があるものもないものが正常者でもみられており、報告されているものの一部は allelic variantであることが判明した。患者は30塩基をもっている2つのalleleで構成されていたが、遺伝子配列には異常はなく、またIRF5 promoterとして報告されている領域にも異常を

認めず、IRF5遺伝子そのものの異常によるものではないと思われた。

それではなぜIRF5の発現が患者のB細胞で低下しているのかについて検討するために、IRF5の発現調節に関わるpromoter領域の解析を行った。これについては既に報告されており、そこにIFN α によるIRF5誘導に関わるIRF-element (IRF-E)が存在するが、この下流にStat6が結合する可能性のある配列 (Stat6-binding motif) を認めた (図2C)。Stat6はinterleukin 4 (IL-4) 刺激により活性化されてその標的分子の発現を誘導するので、もしStat6がIRF5 promoterにも結合するのであれば、IL-4刺激によりIRF5の発現も誘導される可能性がある。末梢血単核球に刺激を加えると、報告されているようにIFN- α によって確かにIRF5が誘導されたが、IL-4刺激によっても誘導された。そしてさらにCD40Lを加えるとIRF5が相乗的に誘導され、それも刺激後日数が経つに従って増強していた。そして実際にB細胞で強くIRF5が発現しているのが確認された (図4A, B, C, D)。さらにelectrophoretic mobility-shift assay (EMSA) 解析にて、IL4+CD40L刺激によりIRF5のStat6-binding motifにcomplexが形成され、これが抗Stat6抗体により supershiftすることから、Stat6がこれを構成していることが示された (図3F)。そして、Stat6がこのpromoterに結合するパターンは、IRF5の発現が誘導されるパターン (図3C) とまさに同一であり、IL-4刺激によって活性化されたStat6が実際にこのmotifに結合することによってIRF5が誘導

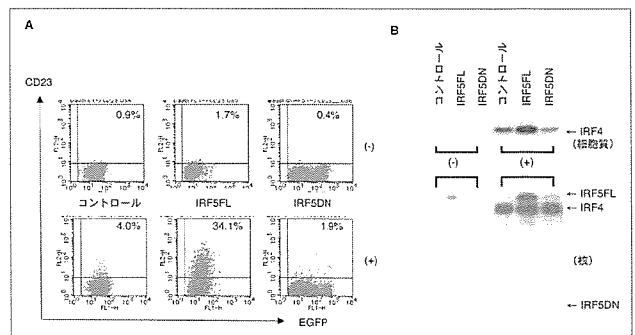


図4. IRF5FLおよびIRF5DN stable transfectantsにおけるCD23及びIRF4発現の解析
 A: フローサイトメトリーによる細胞表面CD23発現の解析。CD23陽性細胞の割合(%)を示す。
 B: Western blot法による細胞質内と核内のIRF5及びIRF4発現の解析 (-):刺激なし, (+):IL-4+CD40L刺激後1日

されていることが示唆された。

次に、IL-4とCD40L刺激で誘導されたIRF5はB細胞において何をしているのかを明らかにするために、末梢血B細胞と同様にこの刺激によって活性化マーカーであるCD23とともにIRF5が誘導されるDaudi 成熟B細胞株を用いて解析した。このDaudi 細胞でIRF5全長を常に発現するもの(IRF5FL)と、IRF5のtransactivation domainを持たないために内因性IRF5の働きを阻害すると考えられるIRF5 dominant negative (IRF5DN)のstable transfectantを作製し、IL-4+CD40L刺激前後での細胞間の反応の違いを解析した。無刺激、及びIL4 +CD40L刺激後1日及び5日で解析したところ、刺激後1日のCD23の発現に大きな違いがみられた。ほかのものについてはこれ程明らかな違いはみられなかった。コントロール細胞、IRF5FL細胞とIRF5DN細胞における細胞表面CD23の発現を示す(図4A)。刺激前は細胞間で差はみられないが、IL-4とCD40Lの刺激後は、IRF5FL細胞でCD23が強く誘導され、反対にIRF5DN細胞ではコントロール細胞よりもさらにCD23の発現が減弱していた。このことからIRF5はCD23の発現、さらにはB細胞の活性化をpositiveに制御していることが示唆された。IL-4 +CD40L刺激後のB細胞活性化については、IRF5と同じfamilyに属するIRF4が関わっていることが報告されており、IRF5によるB細胞活性化の制御もIRF4を介している可能性を考え、IRF4の発現を解析した。細胞質におけるIRF4の発現には細胞間で差がみられたが、転写因子が作用する場である核においては、IRF4の発現に差がみられなかった(図4B)。しかし、それにも関わらずCD23の発現には細胞間で差がみられた(図4A)ことから、IRF5によるB細胞活性化は単にIRF4を介しているのではなく、むしろIRF5が直接B細胞の活性化を制御しているのではないかと考えた。そこで、Stat6やIRF4などが結合し、CD23の誘導に関わると考えられているCD23b promoter GAS領域を用いたEMSAを行った。この領域にはIL-4 +CD40L刺激によってcomplex, C1が形成され(図5A)、supershift assayの結果よりIRF5とStat6がこれを構成していることが明らかになった(図5A, B)。これらの結果より、B細胞においてはIL-4とCD40Lの刺激で誘導されたIRF5はStat6とともに直接CD23b promoterに結合し、CD23の発現、さらにはB細胞の活性化を誘導すると考えられた。

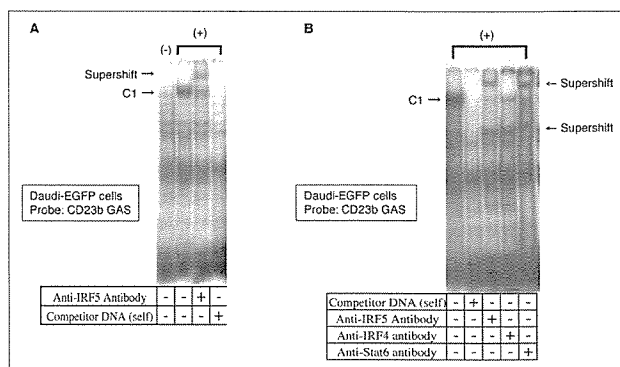


図5. Daudi B細胞株におけるCD23b promoter GAS領域を用いたEMSA

A: IL-4 +CD40L刺激前後でのEMSA及びsupershift解析

B: IL-4 +CD40L刺激後のEMSA及びsupershift解析

(-):刺激なし、(+):IL-4+CD40L刺激後1日

果よりIRF5とStat6がこれを構成していることが明らかになった(図5A, B)。これらの結果より、B細胞においてはIL-4とCD40Lの刺激で誘導されたIRF5はStat6とともに直接CD23b promoterに結合し、CD23の発現、さらにはB細胞の活性化を誘導すると考えられた。

考察

IRF5の発現がこの患者のB細胞で強く低下している原因については今のところ明らかにはなっていない。遺伝子解析結果に加え、蛋白レベルでも患者IRF5が正常者と同程度に誘導されているので、IRF5遺伝子そのものの異常によるものではないと思われる。また今回は示さなかったが、他の22例のCOVID患者の末梢血単核球を用いたマイクロアレイ解析で、この患者と同様にIRF5の標的と考えられる炎症性サイトカインの発現が正常者に比べて高い例が多いにも関わらずIRF5の発現が落ちている例がないことから、単にIRF5の下流分子からのnegative feedbackによるものでもないと思われる。一つ興味深いと思われるのは、IRF5のpromoter領域にEts/IRF composite elementがみられる(図2C)ことで、これは免疫グロブリンlight chainのenhancer領域にもみられるelementである。今回のマイクロアレイ解析では種々のlight chain遺伝子の発現もIRF5と同様に落ちていた。このelementを共通して持つ遺伝子群の発現が一様に落ちているということはこれを制御するEts/IRF複合体を構成する分子自

体またはその制御に問題がある可能性があり、この Ets/IRF composite element へのアプローチが IRF5 発現低下の原因を解明する手がかりになる可能性があると思われた。

今回の解析で、IRF5 の蛋白発現は IL-4 + CD40 L 刺激後時間が経過するに従って強く誘導されることが示された。このことから B 細胞の活性化よりももっと後の event にも関係する可能性があると思われる。IL4 + CD40L 刺激後の IRF5 の発現誘導は IRF4 の誘導のパターンと非常に類似している。IRF4 は前述のように B 細胞の活性化に重要であるが、形質細胞への分化にも必須と考えられている分子である。また形質細胞株である U266 細胞で有意な IRF5 の蛋白発現がみられる (図 3 E) ことより、IRF5 は形質細胞への分化、または形質細胞における何らかの機能に重要である

可能性があると考えられ、今後の解析が重要である。また、IRF5 発現の低下は患者の病態とも関連している可能性があり、さらに検討を行う。

研究発表

論文発表

特になし。

学会発表

1. Yamada M, Qin H, Tian L, Candotti F, Ariga T, Stewart DM, and Nelson DL. Interferon regulatory factor 5 is critical for B cell activation
European Society of Immunodeficiency
2006

獲得免疫を介さないナイーブB細胞による感染防御機構について

山崎 和子 (信州大学大学院医学研究科移植免疫感染症)
林 琢磨 (信州大学大学院医学研究科移植免疫感染症)
上松 一永 (信州大学大学院医学研究科移植免疫感染症)
山崎 崇志 (信州大学医学部小児医学講座)
南雲 治夫 (信州大学医学部小児医学講座)
小池 健一 (信州大学医学部小児医学講座)

【研究要旨】

分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency:CVID) はB細胞が欠損する無 γ グロブリン血症に比し、症状が軽い傾向がある。ナイーブB細胞が有する獲得免疫によらない自然免疫による感染防御機構を検討した。Toll-like受容体様のRP105 (CD180) 刺激はTLR9刺激と相乗的、爆発的にナイーブB細胞の増殖、サイトカイン産生、寿命を亢進した。免疫グロブリン産生や重鎖免疫グロブリン遺伝子可変領域の体細胞突然変異には影響を与えなかったが、IL-21の添加によって、形質細胞分化誘導ならびに抗体産生が増強した。さらに、成人ナイーブB細胞、臍帯血B細胞、CVID患者B細胞はこれらの刺激によって肺炎球菌特異抗体を産生できることが分かった。CVID患者のナイーブB細胞は、細菌などの病原体の侵入に際し、ポリクローナルな低親和性抗体を産生し、感染防御を行っている可能性が示唆された。

A. 研究目的

ナイーブB細胞が病原微生物を直接的に認識し、自然免疫として感染防御を行うかどうか検討した。また、抗体不全患者は、記憶B細胞が欠損していることが多い。このような患者でB細胞が自然免疫として感染防御を行うか検討した。

B. 研究方法

患者背景：平均年齢は27歳 (16歳から42歳まで) の女性で既にCVID と診断され、 γ グロブリンの定期補充療法を受けている3名の患者の末梢血B細胞の機能解析を行った。末梢血B細胞数は症例1で末梢血リンパ球の7%、症例2で3%、症例3で4.7%であり、そのうち95 \pm 3%がCD27⁻ナイーブB細胞で構成されていた。
細胞：細胞は正常成人末梢血、および臍帯血、CVID患者末梢血よりロゼットセップを用いてB細胞を採取し、正常成人B細胞については抗CD27抗体 magnetic micro-beads を用い、

MACS systemで CD27⁺メモリーB細胞とCD27⁻ナイーブB細胞に分離し解析した。

Reagent：抗RP105抗体は東京大学医科学研究所の三宅教授より恵与された。

解析：1 \times 10⁶/ml濃度のB細胞をSAC, 抗CD40抗体、CpGを加えて48時間培養し、RP105の発現をまたそれらの刺激に抗RP105抗体を加えて48時間培養しB細胞の活性化マーカーCD86の発現をフローサイトメーターで検討した。B細胞の増殖に対する反応をCD27⁺メモリーB細胞とCD27⁻ナイーブB細胞に分けてそれぞれの刺激と抗RP105抗体を添加したもので4日間培養し、³Hサイミジンコーポレーションを用いて検討した。サイトカイン産生について同様に48時間培養し、Cytometric Bead Array systemを用いて測定した。細胞の生存数については同様の培養を行い7日目、14日目にPIにてstainingしフローサイトメーターで死細胞数と生存細胞数を検討した。免疫グロブリン産

生は同様の刺激にて7日間培養し、ELISAで測定した。肺炎球菌特異抗体産生はニューモバックス（萬有製薬）でCoatingしたプレートを用いてELISAで測定した。NF κ Bの活性化はCpGと抗RP105抗体刺激にて、核内と細胞質内抽出を行い、Immunoblot解析を行って検討した。

C. 研究結果

RP105の発現

B細胞上のRP105の発現を検討したところCD27⁺メモリーB細胞とCD27⁻ナイーブB細胞ともに静止期の状態でRP105の発現が見られた。またSAC、抗CD40抗体、CpG刺激下でRP105の発現が上昇した。（図1）

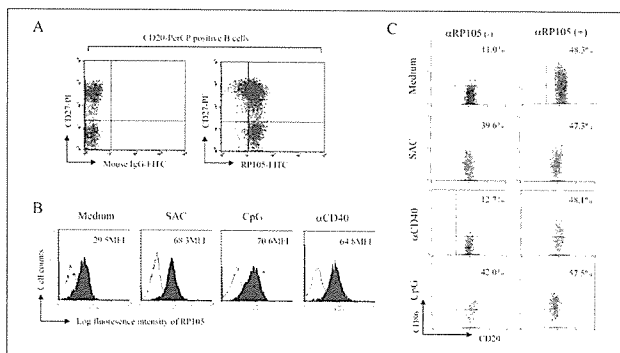


図1

B細胞の活性化

RP105単独刺激下、およびSAC、抗CD40抗体、CpGに抗RP105抗体を添加した刺激下でB細胞の活性化マーカーCD86の発現が上昇した。（図1）

B細胞増殖と細胞サイズの拡大

CD27⁺メモリーB細胞とCD27⁻ナイーブB細胞に分けてB細胞の増殖を検討したところメモリーB細胞では、SAC、抗Ig抗体、抗CD40抗体、IL-4、CpG刺激に抗RP105抗体を加えても増殖増強効果は見られなかったが、ナイーブB細胞ではCD40、IL-4、CpGにRP105刺激を加えたところ増強効果がみられ、特にCpGにRP105を添加した刺激下では著明な増殖が認められた。（図2）またCpGとRP105を加えた刺激下ではナイーブB細胞のペレットが大きく拡張し、個々の細胞のサイズも拡大していた。

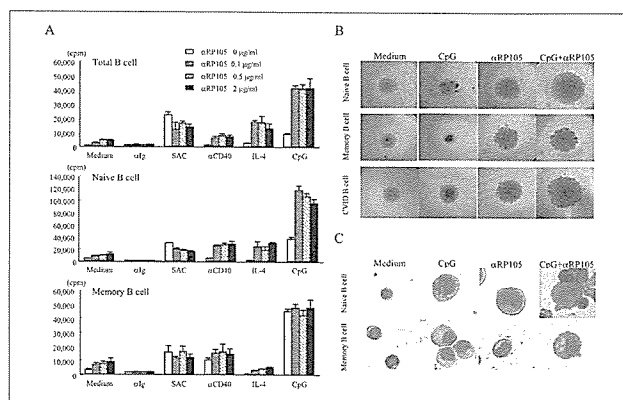


図2

サイトカイン産生

メモリーB細胞、ナイーブB細胞ともにRP105刺激を添加したところIL-10、IL-6、IL-8、TNF- α の産生がみられ、IL-10、IL-6についてはナイーブB細胞、メモリーB細胞ともCpGとRP105の混合刺激で産生が著しく、その傾向はナイーブB細胞のほうが強かった。（図3）

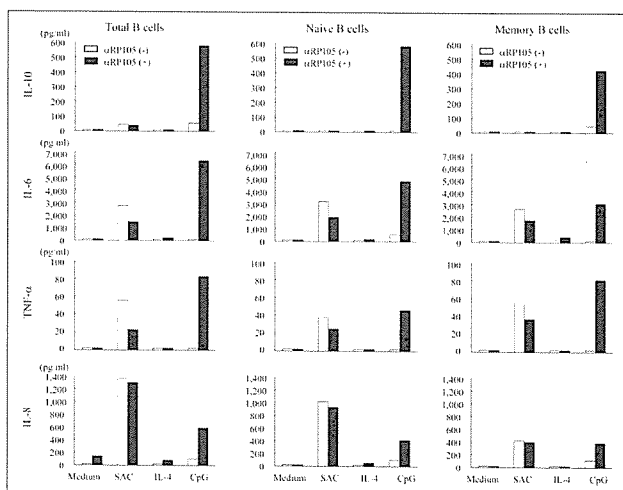


図3

NF κ Bの活性化

RP105がナイーブB細胞を活性化、増殖させ、サイトカイン産生を上昇させることが分かったので、NF κ Bの活性化について細胞質内のI κ B α のdegradationとその結果NF κ Bが核内移行しているかを検討した。CpGやRP105の刺激をうけて細胞質内でI κ B α がdegradationをおこし、そこにproteasome inhibitorであるMG132を加えたところそのdegradationは抑制された。核内ではRelA、p50のNF κ Bがみられた。以上よりRP105もTLR9と同様にNF κ Bを活性化しているといえる。（図4）

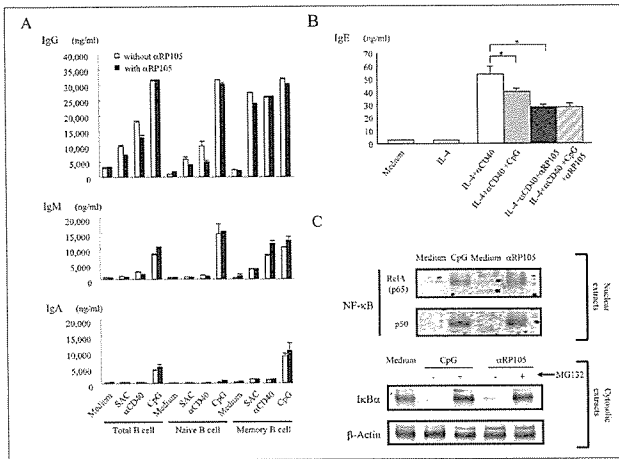


図4

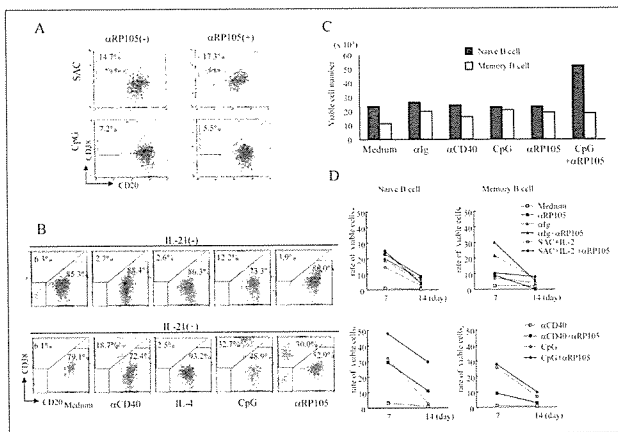


図5

免疫グロブリン産生とナイーブB細胞の形質細胞分化誘導

免疫グロブリン産生はB細胞の重要な機能であるが、RP105刺激を加えたことによるIgG、IgM、IgAの産生の増加はみられなかった。興味深いことにIgE産生についてはCpGと同様にRP105刺激もIL-4と抗CD40抗体に加えたところその産生を減弱させていた。ナイーブB細胞の形質細胞への分化誘導についても RP105刺激には分化誘導作用はなかったが、IL-21との相乗作用でCD40、CpG、RP105刺激は著明に形質細胞へ分化誘導された。(図4、5)

B細胞の寿命

生存細胞数もCpGとRP105を加えた刺激下ではナイーブB細胞の生存細胞数が有意に増加していた。(7日目培養)さらに培養期間を延長して検討したところ、7日目、14日目の培養でもCD40とRP105の混合刺激、およびCpGとRp105の混合刺激では生存細胞の割合が増加する傾向がみられ

たが、特にナイーブB細胞で増加していた。(図5)

肺炎球菌特異抗体産生

TLR9とRP105のシグナルが共作用してナイーブB細胞が活性化、増殖し、生存が促され、そのプールが増えると考えられた。そこにIL-21の関与により形質細胞へ分化誘導されると考えられる。そこでこれらのナイーブB細胞が病原体特異抗体を産生出来るかどうかをみるために肺炎球菌特異抗体の産生について調べた。成人末梢血のナイーブB細胞はCpGおよびCpGにIL-21を添加した刺激下でメモリーB細胞と同様に肺炎球菌特異IgGを産生し、特異IgMについてはCpGとIL-21の混合刺激下でメモリーB細胞より産生が増加していた。(図6) これらの抗体が高親和性かどうかをみるために重鎖免疫グロブリン遺伝子可変領域の体細胞突然変異を調べたが、変異の頻度の増加は無く、低親和性抗体と考えられた。以上のことを確認するために、メモリーB細胞がなく、ナイーブB細胞のみで構成されているヒト臍帯血中B細胞でも同様に検討した。ヒト臍帯血中B細胞もCpGとIL-21の混合刺激下で特異IgMを産生した。(図6)

また、メモリーB細胞がなく、ナイーブB細胞のみで構成されているCVID患者末梢血B細胞についても同様に検討した。CVID患者でもCpGとIL-21の混合刺激下で肺炎球菌特異IgMを産生していた。(図6)

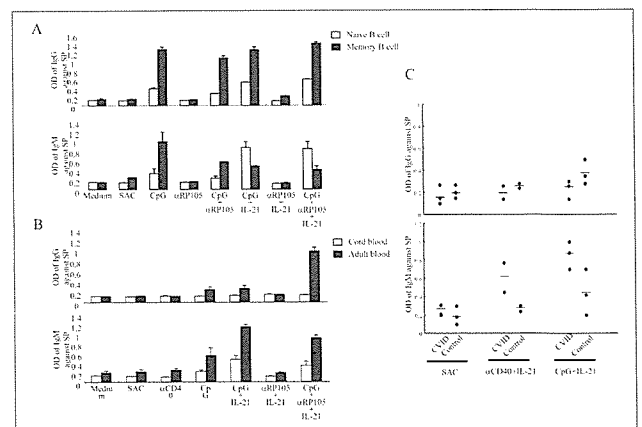


図6

D. 考 察

病原体の侵入の防御機構については様々なメカニズムが働いている。B細胞は自然免疫と獲得免疫つなぐ重要な役割を担っている。しかし、B細胞自体の自然免疫における作用は不明である。COVIDとXLAの臨床上の重症度の差異にはこのナイーブB細胞による直接的な感染防御機構が役立っている可能性がある。

本研究では、TLR9とToll-like受容体様のRP105共作用して、ナイーブB細胞が爆発的に増殖し、細胞の寿命が延び、サイトカイン産生が促進された。これによりナイーブB細胞のプールを増加させていると考えられた。また免疫グロブリン

産生や重鎖免疫グロブリン遺伝子可変領域の体細胞突然変異には影響を与えなかったが、IL-21などのサイトカインの関与によりナイーブB細胞は形質細胞へ分化誘導され、肺炎球菌特異抗体などの特異抗体産生が促された。

成人ナイーブB細胞、人臍帯血B細胞、COVID患者B細胞でこのシステムを用いて肺炎球菌特異抗体産生が促されたことから、新生児やCOVID患者ではナイーブB細胞が病原体侵入に際し、獲得免疫によらず、TLRやTLR様受容体、サイトカインなどの相互作用でポリクローナルな低親和性抗体を産生し、急性期の感染防御を行っていると考えられる。

T細胞に遺伝子変異のreversionを認めた白血球接着異常症 1型患者の解析

谷内江 昭 宏 (金沢大学医学部保健学科)
和 田 泰 三 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)
刀 祢 裕 美 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)
柴 田 文 恵 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)
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】

白血球接着異常症1型 (LAD-1) は、 $\beta 2$ インテグリン (CD18) の欠損による原発性免疫不全症で、重症細菌感染症の反復、白血球異常増多、臍帯脱落遅延、創傷治癒遅延を特徴とする。今回我々は、遺伝子変異のreversionを認めたLAD-1乳児例を世界で初めて見出し報告した。患児は、ITGB2 (CD18) 遺伝子にスプライス変異 (G>A (+1), intron4) と一塩基欠失 (674delC) をもつ複合ヘテロ接合体であり、単球や顆粒球においてはCD18、CD11b、CD11cの発現は全く認められなかった。しかし、患児リンパ球のごく一部でCD18⁺細胞が認められた。同細胞は、CD3⁺CD8⁺T細胞で、T細胞レセプターV β 22を有するシングルクローンであった。患児への母体血の混入は否定され、父親由来のスプライス変異が消失していたことより、患児の1つのCD8⁺T細胞においてreversionが起きたと考えられた。

A. 研究目的

白血球接着異常症1型 (LAD-1) は、常染色体劣性遺伝形式を示す原発性免疫不全症で、責任遺伝子は $\beta 2$ インテグリンに共通するCD18をコードするITGB2遺伝子である。LAD-1では、 $\beta 2$ インテグリン欠損による接着障害のため、重症細菌感染症の反復、白血球異常増多、臍帯脱落遅延、創傷治癒遅延などがみられる。

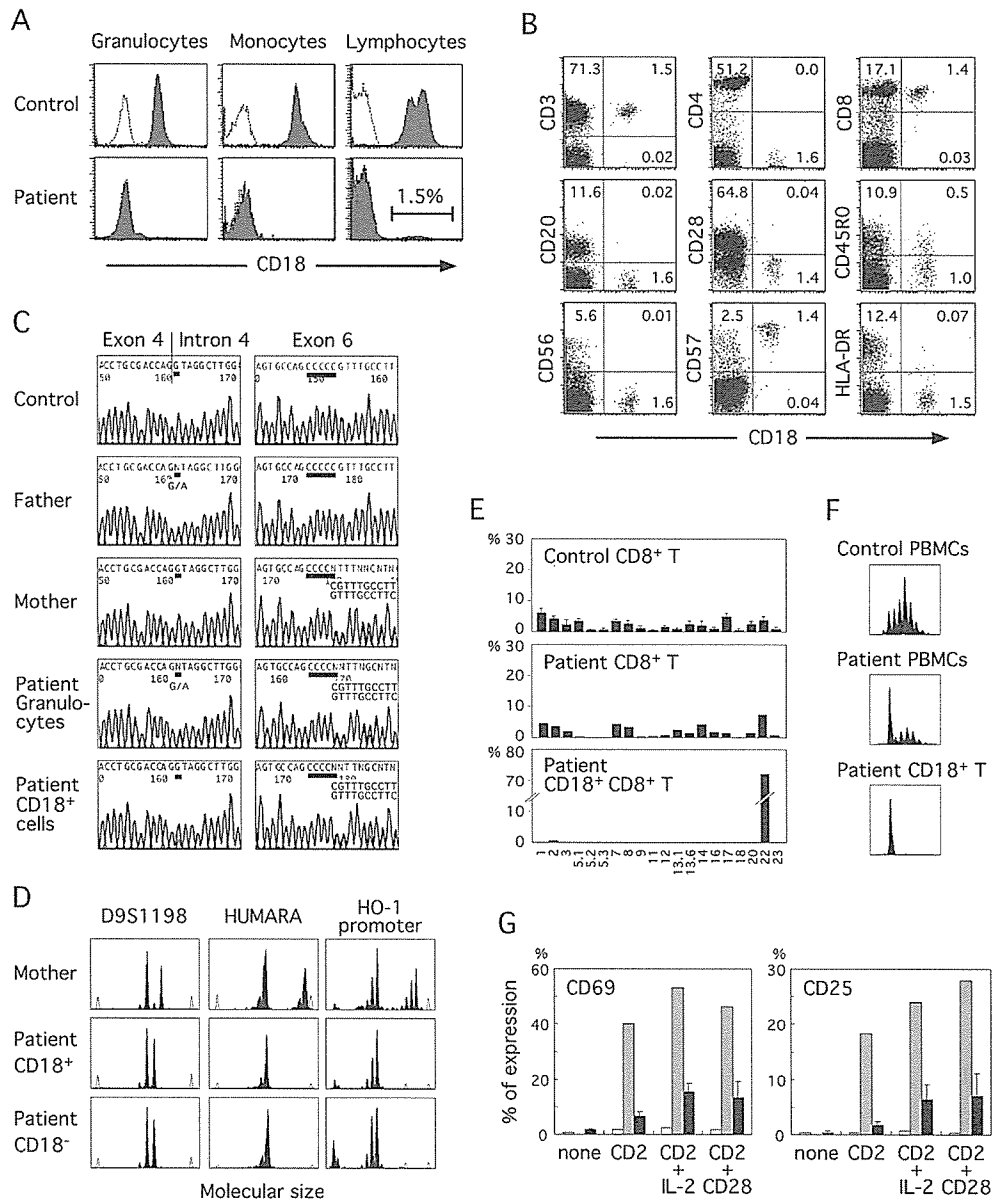
近年、特に原発性免疫不全症において遺伝子変異のreversion、すなわち、その疾患の原因となる遺伝子変異が正常の配列に戻るか、あるいは元の変異を代償する第二変異が起こる現象の報告が増えている。Reversionを起こした症例では、細胞の機能が回復し臨床症状の改善や修飾をみる例から症状が不変の例まで幅広く、またreversionが引き起こされる機構については不明な点が多い。今回、我々はこれまで報告のなかったLAD-1に

おいて、遺伝子変異のreversionを有する症例を初めて見出し、reversionを起こした細胞の種類や分化段階、またreversionが細胞や病態に与える影響について検討した。

B. 研究方法

1. 症 例

症例は血族結婚のない両親から出生した第1子。日齢1にB群溶連菌による臍炎を発症したが (WBC 45,000/ μ l、CRP 5.2mg/dl)、抗生剤投与により改善した。臍帯は日齢17に脱落した。2ヶ月時に尿膜管臍瘻を指摘され、感染を繰り返すため切除術が施行された。術後、創傷治癒遅延を認め、白血球増多 (22,500–48,200/ μ l) が持続するため、3ヶ月時に当科紹介となった。フローサイトメトリ解析により、顆粒球・単球においてCD18、CD11b、CD11cの発現が全く認められ



(A) 顆粒球、単球、リンパ球における CD18 発現。(B) リンパ球亜群における CD18 発現。数字は各 4 分画の構成比率 (%) を示す。(C) *ITGB2* 遺伝子解析。下線は変異の部位を示す。(D) 3つのマーカーと用いたマイクロサテライト解析。(E) フローサイトメトリー法による患児 CD8⁺ T、CD18⁺CD8⁺ T 細胞における TCR V β repertoire 分布の解析。(F) spectratyping 法による TCR V β 22 CDR3 サイズ分布の解析。(G) 抗 CD2 抗体による T 細胞活性化の解析。末梢血単核球を 16 時間刺激培養し、患児 CD18⁻CD8⁺ T (□)、CD18⁺CD8⁺ T 細胞 (■) における CD69 と CD25 抗原の発現をフローサイトメトリーにて評価した。■は正常コントロールを示す。

図 1. CD18発現、ITGB2遺伝子、TCR V β repertoireおよびT細胞機能の解析

ず、LAD-1と診断した（図1A）。ST合剤が開始されたが、5ヶ月時から肛門周囲の蜂窩織炎を繰り返した。輸血の既往はない。

2. 方法

白血球亜群におけるCD18発現は、PE標識抗CD18抗体ならびにFITC標識した各白血球亜群特異的抗体を用いたフローサイトメトリー法により評価した。CD18⁺T細胞の単離はmagnet beads法により施行した。DNAを各白血球亜群より抽出し、*ITGB2*遺伝子変異ならびにキメラ解析のための遺伝子多型部位の検索を施行した。*ITGB2*遺伝子の塩基配列は、ABI3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により自動解析した。遺伝子多型の解析は、一方を蛍光標識したD9S1198、HUMARA (human androgen receptor gene)ならびにHO-1 (heme oxygenase-1)プロモーター特異的プライマーを用いて多型部位を増幅し、ABI310により施行した。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TCRV β 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V β repertoire分布を定量した。TCRV β CDR3サイズ分布の解析 (CDR3 spectratyping) は、単核球と単離したCD18⁺T細胞より作成したcDNAを鋳型として使用した。5'TCRV β 22特異的プライマーと蛍光標識3'TCRCプライマーを用いて増幅し、ABI310により解析した。さらに増幅したPCR産物をTAクローニングし、それぞれのクローンについて塩基配列を決定した。In vitroでのT細胞活性化は、末梢血単核球を抗CD2抗体 (Beckman Coulter) 単独あるいはIL-2や抗CD28抗体添加により16時間培養し、各T細胞亜群における細胞表面のCD69とCD25抗原発現をフローサイトメトリー法により評価した。

C. 研究結果

顆粒球由来のDNAを用いたダイレクトシーケンシング解析により、患児は*ITGB2*遺伝子に新規の異なる2つの変異をもつ複合ヘテロ接合体であることが明らかとなった（図1C）。父親由来の

スプライス変異 (G>A (+1), intron4) はエキソン4のスキップを引き起こし、また母親由来の一塩基欠失 (674delC) はエキソン6に存在するため、どちらもフレームシフトを起こし非常に短い変異蛋白となることが予想される。このため本来なら患児においては、CD18発現は全く認められないはずであり、実際、単球や顆粒球においてはCD18やCD11b、CD11cの発現は全く認められなかった。しかしながら、リンパ球のごく一部にCD18⁺細胞が存在することが判明した（図1A）。多重染色により同細胞は、CD3⁺CD8⁺のT細胞で、CD28⁻CD57⁺のメモリー/エフェクター形質を有していた（図1B）。

そこで、CD18⁺T細胞を単離し、上記の遺伝子変異が存在するか検討したところ、父親由来の変異が消失していた（図1C）。遺伝子多型の解析より同細胞は母親由来ではなく、輸血歴もないことから、患児において遺伝子変異のreversionが起きたと考えられた（図1D）。

次に、CD18⁺T細胞のクローナリティーを検討するため、TCRV β repertoireをフローサイトメトリー法とCDR3 spectratyping法にて解析した。図1E・1Fに示すように、CD18⁺T細胞は、TCRV β 22を有し単クローン性に増殖していた。さらに増幅したPCR産物をTAクローニングし、それぞれのクローンについて塩基配列を決定し、シングルクローンであることを確認した（表1）。

	BV	N-D-N	BJ	Frequency
Normal PBMCs	CASS	EWGF	TDTQYFGPGTRLTVL	2/18
	CASS	ELVRA	NSPLHFGNGTRLTVT	2/18
	CAS	TEGTGV	YNEQFFGPGTRLTVL	2/18
	CASS	FRV	HEQYFGPGTRLTVT	1/18
	CAI	ATGA	SYEQYFGPGTRLTVT	1/18
	CASS	RSTGLSD	SGANVLTFGAGSRLTTL	1/18
	CAS	RRTG	ETQYFGPGTRLLVL	1/18
	CAS	TDRGA	NTGELFFGEGSRLTTL	1/18
	CASS	EP	YEQYFGPGTRLTVT	1/18
	CAS	GGDHV	TDTQYFGPGTRLTVL	1/18
	CASS	ELI	TDTQYFGPGTRLTVL	1/18
	CAS	RGTVT	YNEQFFGPGTRLTVL	1/18
	CASS	AGSM	NTEAFFGQGTRLTVV	1/18
	CASS	EGGGG	TEAFFGQGTRLTVV	1/18
	CASS	EALQGALN	EQYFGPGTRLTVT	1/18
	Patient CD18 ⁺ T cells			
CASS	PD	NEQFFGPGTRLTVL	24/24	

表1. Junctional amino acid sequences of TCR V 22

最後に、CD18⁺T細胞の機能を検討するため、抗CD2抗体を用いたin vitroでのT細胞活性化をフローサイトメトリーにて解析した。図1Gに示すように、コントロールに比べ、CD18⁻CD8⁺T細胞は、活性化マーカーであるCD69やCD25抗原の発現増強がみられない。一方CD18⁺CD8⁺T細胞では抗CD2抗体刺激に対する反応性が回復していた。

D. 考 察

原発性免疫不全症における遺伝子変異のreversionは、adenosine deaminase欠損症、X連鎖重症複合免疫不全症、Wiskott-Aldrich症候群、NEMO異常症、CD3 δ 欠損症で報告されているが、LAD-1での報告は今回が初めてとなる。本症例では、父親由来のスプライス変異がsite-specificに正常配列に戻るtrue back mutationであった。

Reversionの結果生じたCD18⁺細胞がCD8⁺T細胞のみに認められ、かつTCRV β repertoire解析から同細胞がシングルクローンであったことから、reversionが引き起こされたのは、CD8にコミットした1個のT細胞であると考えられた。これまでに報告された他の原発性免疫不全症におけるreversion症例では、reversionはprogenitorレベルで起こったと考えられている。しかし我々の症例により、progenitorから分化し、ある程度成熟した細胞でもreversionは起こり得ることが明らかとなった。また、reversionを起こした1個のCD18⁺T細胞がフローサイトメトリーにて検出されるレベルまで増殖していることから、CD18⁺T細胞はCD18⁻T細胞に対してselective growth advantageを有することが示唆された。

LAD-1のT細胞では、T11.1とT11.2エピトープに対する抗CD2抗体の組み合わせで刺激した際に活性化が障害されていることが知られている。このことを利用して、reversionの結果生じたCD18⁺CD8⁺T細胞が機能的にも回復しているか否かを検討したところ、予想通り抗CD2抗体への反応性が回復していた。LAD-1の重症度は、白血球上のCD18発現量が1~10%残存している場合に

は軽症型となり、1%未満しか認めない場合には重症型となることが知られている。患児では、リンパ球の1.5%にCD18⁺細胞の出現を認めているが、臨床症状は重症型のままで改善や修飾は認めていない。この理由として、おそらくmyeloid系にreversionが起こっていないためと考えられた。これらの結果や他の原発性免疫不全症におけるreversion自験例の解析から、reversionが臨床像に与える影響は、reversionが起きた細胞の種類や量、またそれら細胞の多様性や機能回復の程度に依存していると思われた。

以上、本研究により原発性免疫不全症における新たなreversion例が見出され、reversion症例では必ずしも臨床症状の改善や修飾がみられない可能性やreversionを起こした細胞が生体内でselective growth advantageを持つようないかなる遺伝性疾患においてもreversionは起こり得る可能性などが示された。

E. 参考文献

1. Anderson DC, Smith CW. Leukocyte adhesion deficiencies. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. Vol III. New York, NY: McGraw-Hill; 2001: 4829-4856.
2. Hirschhorn R. In vivo reversion to normal of inherited mutations in humans. J Med Genet. 2003; 40: 721-728.
3. Wada T, Konno A, Schurman SH, et al. Second-site mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein gene causes somatic mosaicism in two WAS siblings. J Clin Invest. 2003; 111: 1389-1397.
4. Wada T, Toma T, Okamoto H, et al. Oligoclonal expansion of T lymphocytes with multiple second-site mutations leads to Omenn syndrome in a patient with RAG1-deficient severe combined immunodeficiency. Blood. 2005; 106: 2099-2101.

5. Kuijpers TW, Van Lier RA, Hamann D, et al. Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional 2 integrins. J Clin Invest. 1997;100:1725-1733.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

Tone Y, Wada T, Shibata F, et al. Somatic revertant mosaicism in a patient with leukocyte adhesion deficiency type 1. Blood 2007; 109: 1182-1184.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Reticular Dysgenesisの病態解析

蒲池 吉 朗 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学)

谷ヶ崎 博 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学)

小島 勢 二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学)

【研究要旨】

Reticular Dysgenesis(RD)は新生児期に発症するリンパ球及び好中球減少を主徴とする重症複合免疫不全症(SCID)の一型で、その原因はリンパ球と好中球に共通の造血幹細胞の異常によると考えられている。わが国の全国登録でも過去に1例の報告があるのみの極めて稀な疾患であり、近年、原発性免疫不全症候群の原因遺伝子が次々と解明されているなかでその原因が解明されていない数少ない疾患の一つである。今回、日齢2に末梢白血球数 $1500/\mu\text{l}$ (好中球 $120/\mu\text{l}$ 、リンパ球 $1020/\mu\text{l}$)のため、先天性造血不全症候群が疑われ当科紹介、精査の結果、母親から経胎盤移行したCD8陽性T細胞が患児の好中球造血能を抑制し、RDの病像を示したと考えられたB+NK+SCIDの女兒例を経験した。本児はHLA一致の兄より同種骨髄移植を行い、完全キメラとなり、免疫能、好中球造血能とも順調に改善したが、その後、難聴の合併が明らかとなった。これまでの文献報告ではRDの中に経胎盤移行した母T細胞を有し、B+NK+の表現型を示し、難聴も合併する例が報告されているが、原因遺伝子が検索された例は見当たらなかった。我々は、B+NK+SCIDの原因遺伝子として既報告のIL-7R α 、CD3 δ 、CD3 ϵ およびJAK3遺伝子異常につき検討したがすべて異常を認めず、本症例の原因遺伝子は不明であった。これまでRDと分類されていた症例の中に難聴を伴うB+NK+SCIDとして新たな一群が存在する可能性が示唆された。

【はじめに】

Reticular Dysgenesis (RD)は新生児期に発症するリンパ球及び好中球減少を主徴とする重症複合免疫不全症 (SCID) の極型として1959年にDe VaalとSeynhaeve¹⁾により報告された。その後、好中球減少は合併しているが、必ずしもリンパ球数の減少を認めない症例や経胎盤移行した母T細胞が存在する症例もRDとして報告されている²⁾。これまでのところRDの原因遺伝子は同定されておらず、遺伝子診断に基づく正確な疾患分類は困難であり、RDはheterogeneousな一群の疾患の可能性も考えられる。今回我々は、RDの女兒例を解析し、これまでの報告例と合わせて検討した結果、RDの中に特徴を持った一群が存在する可能性を見出したので報告する。

【症例ならびに結果】

症例は日齢5の女兒。近医にて在胎24週に胎児エコーで腹水が認められたが出生時には消失。在胎36週4日、経膈分娩で出生した。出生体重3068g、APGAR scoreは8点(1分)/10点(5分)であった。出生後軽度の酸素飽和度の低下があり、血液検査で白血球数 $2900/\mu\text{l}$ と減少していた。日齢2には白血球数 $1500/\mu\text{l}$ (好中球 $120/\mu\text{l}$ 、リンパ球 $1020/\mu\text{l}$)とさらに低下、CRP値も2.3と上昇したためG-CSFと抗生剤の投与を行なったが改善が認められず、当科紹介、入院となった。本児は第3子で二人の兄はどちらも健康で、他に特記すべき家族歴はなかった。

入院時現症は、体重2800g、体温 37.0°C 、心拍数120回/分、呼吸数40回/分。呼吸音：清。心音：整、雑音なし。腹部：軟、平坦、肝臓3cm、脾臓1cm 触知。頸部、腋窩部、臍径部リンパ節は触

入院時検査所見 (表1)

末梢血検査		生化学検査			
WBC	200 / μ l	TP	6.1	g/dl	
好中球	8.7 %	BUN	5	mg/dl	
リンパ球	69.6 %	CRE	0.5	mg/dl	
単球	5 %	Na	141	mEq/l	
RBC	365万 / μ l	K	5.0	mEq/l	
Hb	13.2 g/dl	Cl	107	mEq/l	
Hct	39 %	GOT	21	IU/l	
Ret	16 % ₀₀	GPT	5	IU/l	
Plt	8.2万 / μ l	ALP	394	IU/l	
血清免疫グロブリン		LDH	289	IU/l	
IgG	802 mg/dl	TB	3.7	mg/dl	
IgA	<10 mg/dl	DB	1.8	mg/dl	
IgM	<10 mg/dl	GLU	36	mg/dl	
		CRP	1.4	mg/dl	
		染色体検査: 正常女性核型			
		抗HLA抗体: 陰性(母親血清)			

知せず。口蓋扁桃は認めず。皮疹も認めなかった。胸部CT検査にて胸腺低形成を認めた。

入院時検査所見では、末梢血白血球200/ μ l (好中球17/ μ l、リンパ球140/ μ l)と著減し、血小板8.2万/ μ l、CRP1.4以外特記すべきことはなかった(表1)。骨髓検査では、顆粒球成熟障害を認めたが、他の血球系には異常を認めなかった。末梢血リンパ球の表面マーカーは、CD3⁺ 9.86%, CD4⁺ 0.23%, CD8⁺ 13.9%, CD8⁺HLA-DR⁺ 17.2%, CD8⁺CD45RO⁺ 8.30%, CD8⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ 12.5%, CD16⁺ 14.2%, CD19⁺20⁺ 25.1%とT細胞は著減し、そのほとんどが活性化したメモリーCD8陽性細胞であり、B細胞は増加、NK細胞は正常範囲内であった。リンパ球芽球化能は、PHA, ConA, PWM, SACに対してS.Iは各々0.9, 1.1, 1.5, 1.7と著減していた。T cell Receptor Excision Circle (TREC) は10copy/ μ g DNA以下であった。in vitro免疫グロブリン産生も認められなかった(表2)。

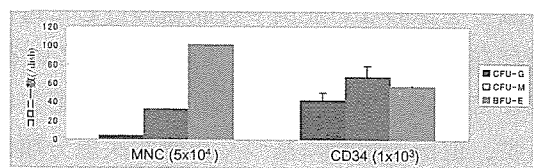
患児末梢血リンパ球中CD4陽性細胞はほとんど認められなかったが、CD8陽性細胞が14%存在し、

免疫検査(表2)

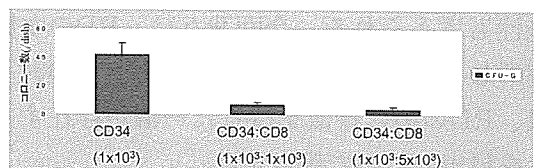
末梢血リンパ球表面マーカー				
CD2 ⁺ 18.54%	CD8 ⁺ DR ⁺ 17.22%	CD16 ⁺ 14.16%		
CD3 ⁺ 9.86%	CD8 ⁺ CD45RO ⁺ 8.30%	CD19 ⁺ CD20 ⁺ 25.1%		
CD4 ⁺ 0.23%	CD8 ⁺ TCR $\alpha\beta$ ⁺ 12.46%			
CD8 ⁺ 13.92%	CD8 ⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ 0.30%			
リンパ球芽球化能				
(-)	PHA	ConA	PWM	SAC
Count (cpm)	540.0	488.5	598.0	836.5
S.I.	-	0.9	1.1	1.5
TREC: <10 copy/ μ g DNA				
in vitro免疫グロブリン産生: 認めず				
NK細胞活性 (E/T 20:1): 20 % (control 18~40%)				
ADA活性: 正常				
胸部レントゲン: 胸腺陰影 認めず				
胸部CT: 胸腺低形成				

ほとんどがHLA-DR⁺, CD45RO⁺であったことから、経胎盤移行した母CD8細胞の存在を疑った。AutoMACSを用いて患児末梢血リンパ球中のCD8, CD19, CD56陽性細胞をそれぞれ分離し、short tandem repeat (STR)を用いたキメリズム解析を行ったところ、患児CD8細胞は母親由来、B細胞とNK細胞は患児由来と考えられた。

以上より、本症例は母CD8細胞を有するSCIDに好中球減少も合併していたことから、Reticular Dysgenesis (RD)と診断した。しかしながら、患児好中球減少の原因として母由来CD8陽性細胞が何らかの役割を果たしている可能性が考えられたため、患児好中球造血に対する母由来CD8陽性細胞の影響につき検討を行った。AutoMACSを用い、患児の骨髓単核球からCD34陽性細胞とCD8陽性細胞をそれぞれ分離し、Methocult GF4434培地を用いて、コロニーアッセイを行った。分離前の骨髓単核球ではCFU-Gは4 \pm 1と著減していたが、分離したCD34陽性細胞では42 \pm 8と回復を認めた。また、CD34陽性細胞に、分離したCD8陽性細胞をCD34:CD8細胞比1:1と1:5で添加したところCFU-Gは各々7 \pm 2, 4 \pm 2と再び著減した(図1)。以上のことから、本症例の好中球減少は母CD8細胞による二次的なものと考えられた。末梢血リンパ球表面マーカーおよびキメリズム解析の結果より、本症例はB細胞、NK細胞を有することから、これまで原因遺伝子として報告されているIL-7R α 、CD3 δ 、CD3 ϵ およびJAK3遺伝子異常につき検討したがすべて異常を認めず、原因遺伝子は不明であった。



患者骨髓CD34陽性細胞純化による造血能の回復



患者骨髓中CD8陽性細胞添加によるCFU-Gの抑制
骨髓造血幹細胞の測定(図1)