

経過：HLA一致の兄がいたため兄妹間の同種骨髄移植を行った（生後4ヵ月）。本症例では母由来CD8細胞が存在し、患児好中球造血能の抑制を認めたため、Fludarabine (total: 125mg/m²)、L-PAM (total: 80mg/m²) による前処置を行なった。輸注総細胞数は1.87x10⁸/kgで、CD34陽性細胞は3.91x10⁶/kgであった。GVHD 予防は、短期メソトレキセートとサイクロスポリンAを用いた。好中球500/μl 以上はday21、リンパ球1000/μl 以上はday22、網状球10%以上day26、血小板20000/μl 以上はday28であった。移植後Day3に急性心不全を発症したが、対症療法のみにてDay41には軽快した。急性および慢性GVHDの発症は認めなかった（図2）。移植後のFISH法を用いたキメリズム解析では、末梢血リンパ球CD3, CD19, CD56細胞分画におけるXY陽性細胞は各々100%, 100%, 99.4%であり（Day70）、骨髄細胞ではXY陽性細胞は95.8%（Day90）と完全キメラと考えられた。ガンマグロブリン補充はDay206以降中止したが、IgG 1000mg/dl以上を維持しており、PHA, ConAに対する芽球化能はDay40には各々26094cpm、19679cpmとなり、Day62にはCD3陽性細胞1500/μl となり（図3）、免疫学的

再建は順調であった。しかしながら、移植後1年6ヵ月経過（1歳9ヵ月）頃に母より難聴の訴えがあり、意味のある発語も現在までないため（2歳3ヵ月）、確認のため聴性脳幹反応（ABR）を予定中である。

【考案】

今回の症例の検討から、RDの好中球減少の原因の一つとして経胎盤移行した母T細胞により好中球系造血能が障害されている可能性が示唆された。RDにおいては40~100%の症例に母T細胞を認めることが報告されているが^{3), 4)}、好中球成熟障害の原因として母T細胞の関与について検討した報告はこれまで見当たらなかった。SCIDでは経胎盤移行した母T細胞による全身のGVHD様の症状が認められることがあるが、母T細胞がCD8陽性細胞の場合、無症状であったり、症状が比較的軽度であることが多いことも報告されている⁵⁾。本症例の母T細胞はCD8陽性細胞であり、皮疹や肝機能異常といったGVHDによる全身症状は認められなかったが、患児末梢血の検査所見や骨髄細胞のコロニーアッセイの検討から、活性化した母CD8陽性細胞が患児好中球系造血を特異的に抑制していると考えられた。一つのシナリオとして多様な母T細胞クローンが経胎盤移行したが、そのなかにHLAクラスIを介して患児好中球系細胞にのみ発現しているマイナー抗原に対して親和性のあるαβ型T細胞レセプター（TCR）を持つ母CD8陽性細胞が存在したために、特異的に活性化され、細胞障害性T細胞（CTL）として患児好中球造血のみを特異的に抑制した可能性が推測された。この母CD8陽性細胞のclonalityについては、TCRβ鎖可変部領域のCDR3サイズ分析とアミノ酸配列の多様性を指標として現在検討中である。

Small³⁾らは、8例のRDの検討から7例に聾を認めている。本症例でも、移植後ではあるが難聴を認めた。難聴の原因が移植時の細胞毒性をもつ薬剤の使用による可能性は否定できないが、Smallらは移植前に聴力検査を行った2例でも聾を認めていることから、RDにおける難聴は先天

性のものである可能性が考えられた。Smallらはまた、8例全例で母T細胞を検出し、末梢血リンパ球表面マーカーが解析できた5例中4例がB+NK+で、1例はB-NK-で、聾も認めなかったことを報告している。彼らは原因遺伝子検索や母T細胞の患児好中球造血に対する検討は行っていないが、本症例もB+NK+の表現型を示し、母T細胞を検出し、難聴も認めることから、B+NK+の表現型を示すSCIDにおける既報告の原因遺伝子の異常につき検討したが、全て異常を認めなかった。Reticular dysgenesisと分類されている症例の中に、好中球減少の原因は好中球系に特異的なCTL活性を持った母T細胞による2次的なものであり、未知の遺伝子異常により難聴を伴うB+NK+SCIDの表現型を示す新たなSCIDの一群が存在する可能性が示唆された。

【参考文献】

1. De Vaal OM, Seynhaeve V: Reticular Dysgenesis. *Lancet* 2: 1123-25, 1959
2. Ownby DR, Pizzo S, Blackmon L, et al: Severe combined immunodeficiency with leucopenia (reticular dysgenesis) in siblings. Immunologic and histopathologic findings. *J Pediatr* 89: 382-7, 1976
3. Small TN, Wall DA, Kurtzberg J, et al: Association of reticular dysgenesis (thymic aplasia and congenital aleukocytosis) with bilateral sensorineural deafness. *J Pediatr* 135: 387-9, 1999
4. Bertrand Y, Mullar SM, Casanova JL, et al: Reticular dysgenesis: HLA non-identical bone marrow transplants in a series of 10 patients. *Bone Marrow Transplantation* 29: 759-62, 2002
5. Mullar SM, Ege M, Potharst A, et al: Transplacentally acquired maternal T lymphocytes in severe combined immunodeficiency: a study of 121 patients. *Blood* 98: 1847-1851, 2001

gp91^{phox}蛋白の新しい機能ドメイン異常が示唆された慢性肉芽腫症症例 — 日本における gp91^{phox}蛋白陽性患者解析結果を含めて —

布 井 博 幸 (宮崎大学生殖発達医学講座小児科学分野)
水 上 智 之 (宮崎大学生殖発達医学講座小児科学分野)
日 高 文 郎 (宮崎大学生殖発達医学講座小児科学分野)
小 原 めぐみ (宮崎大学生殖発達医学講座小児科学分野)
小 尾 真喜子 (静岡県立こども病院感染症科)
宮 野 佳 (九州大学生体防御医学研究所細胞機能制御学部門)
前 原 優 一 (九州大学生体防御医学研究所細胞機能制御学部門)
住 本 英 樹 (九州大学生体防御医学研究所細胞機能制御学部門)

【研究要旨】

gp91^{phox}は慢性肉芽腫症の最も多い病因蛋白であり、活性酸素を産生する酵素の中心をなす膜蛋白質である。今回我々は日本の gp91^{phox}蛋白陽性の慢性肉芽腫症患者の遺伝子解析を行った。その中で、CYBB遺伝子の exon 6 に6 baseの Duplication で2 アミノ酸の繰り返し挿入が認められた変異で新規な機能ドメインの障害を示す慢性肉芽腫症症例を見いだした。この変異 gp91^{phox}を遺伝子導入した活性再構成実験でも活性がないことが確認出来たので報告する。

A. はじめに

慢性肉芽腫症患者は原発性免疫不全症候群の登録患者中で約18%を占める。その中でも病型別ではX連鎖の gp91^{phox}欠損型が75%を占め最多である。

gp91^{phox}を細胞外から認識できるヒト特異的モノクローナル抗体は、これまで7D5モノクローナル抗体しかなく、患者の診断にこの抗体が使用されてきた。

この抗体は Phage display 法で解析すると、第4と第5ヘリックスの間に存在する細胞外アミノ酸配列で、exon 5と exon 7にコードされる¹⁶⁰IKNP¹⁶³と²²⁶RIVRG²³⁰の2領域を認識すると報告されている(1,2)。

今回7D5モノクローナル抗体で明らかな gp91^{phox}陽性と確認できている日本の患者で、CYBB遺伝子異常が確認され、新規な機能ドメイン障害と思われる症例を見いだしたので、これまでの gp91^{phox}陽性患者も含めて考察する。

B. 方 法

1. 今回の症例

症例は当時1歳1ヶ月の男児。生後9ヶ月頃肛門周囲膿瘍に罹患、1歳頃伝染性膿痂疹。1歳1ヶ月に39°Cの発熱、抗生剤で2度解熱するも再発、1歳2ヶ月時には腹部腫瘤が触知され、3カ所の肝膿瘍と横隔膜下膿瘍の診断で外科入院となった。肝膿瘍部から *Staphylococcus aureus* が検出され、ABK+PAPM治療でも横隔膜膿瘍の増大があり、小網にも新たな膿瘍をみとめた。入院2ヶ月目に再開腹を行い、肝臓と横隔膜に計4カ所の肉芽腫を伴う膿瘍を認めた。

家族歴では、近親者に同疾患および何らかの免疫不全症状を示した者はいない。

2. 好中球機能検査および蛋白、遺伝子の解析

好中球の活性酸素産生能および gp91^{phox}発現はDHR-123法および7D5モノクローナル抗体によるFACS検査にて行った。また、塩基配列決定についても従来の方法で行った(3)。

僅かに7D5に反応している症例(コントロール

の1~4%)は多く観察されたが、ここでは peak channel でコントロールと比較して4%以上を示す患者を明らかなgp91^{phox}陽性(7D5陽性)の患者と考えた。また、DHR-123法にてコントロールの1%以上の活性酸素産生能を示した症例を活性陽性者と考えた。一部gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}の解析はペプチド抗体およびモノクローナル抗体を用いたwestern blotting法により行った。

3. 活性の再構築実験

COS-7細胞に患者変異gp91^{phox}をpcDNA-3.0-gp91またはpEF-Flag-gp91, pEF-BOS-Myc-p67, pEF-BOS-Rac1(Q61L), pEF-BOS-HA-p47などの発現ベクター系を用い、Lipofectamine (Invitrogen)にて遺伝子導入を行った。スーパーオキシド産生はPMA(200ng/ml)刺激後SODで抑制される蛍光量(DIOGENES; National Diagnostics)をルミノメータ(Auto Lumat LB953; EG&G Berthold)にて測定した。

対照症例として、3ヶ月の左臀部の腫脹と肛門周囲膿瘍で気付かれ、3アミノ酸422SVW424が欠失した慢性肉芽腫症患者を用い、同様にin vitro発現実験をおこなった。この患者は好中球機能検査にて殺菌能3.5%、貪食能57.8%、gp91^{phox}発現率は11%で、DHR123法にて12%の活性酸素産生能が認められた

C. 結果

1. gp91^{phox}陽性患者の統計と遺伝子解析

現在我々の教室で慢性肉芽腫症登録されている患者は271名であった。そのうちgp91^{phox}欠損患

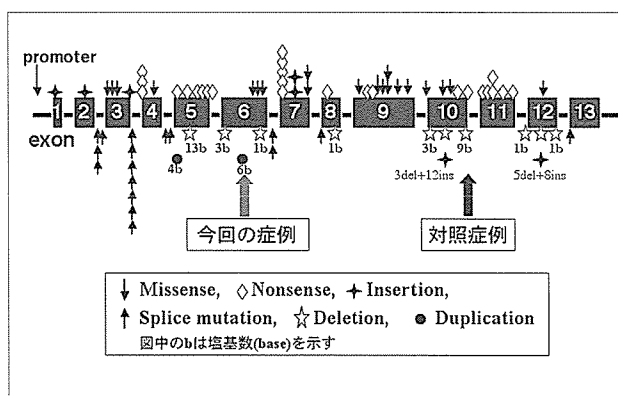


図1 gp91^{phox}での変異部位

者が154名、遺伝子解析が終了した患者が72名である。国内のgp91^{phox}欠損患者の変異の部位と変異の種類を図1に示す。

そのうちgp91^{phox}陽性患者は21名(29%)であった。Splice変異8名(3変異), Nonsense変異8名(3変異), Missense変異1名(1変異), Deletion変異2名(2変異), Insertion2名(2変異)であった(表1)。Splice変異ではC252Aのサイレント変異が8例5家系、nonsense変異では3種類の同一変異(C271T(R91X)3家系、C676T(R226X)6症例5家系、G1399T(E467X)1家系)が認められた。

番号	変異の種類	変異部位	変異核酸	変異アミノ酸	7D5(%)	DHR(%)
1	Splice異常	Intron2	-12 c>t		7.5	7.6
2	Splice異常	Exon 3	G252A	A84A	20	6
3	Splice異常	Exon 3	G252A	A84A	17	11
4	Splice異常	Exon 3	G252A	A84A	23	0
5	Splice異常	Exon 3	G252A	A84A	33	0.68
6	Splice異常	Exon 3	G252A	A84A	5	0
7	Splice異常	Intron 7	+2 D>c		6.6	4
8	Splice異常	Exon 12	-2 a>g		14	1
9	Nonsense	Exon 4	C271T	R91X	50	0
10	Nonsense	Exon 4	C271T	R91X	9.8	0
11	Nonsense	Exon 7	C676T	R226X	8.4	0
12	Nonsense	Exon 7	C676T	R226X	18	0
13	Nonsense	Exon 7	C676T	R226X	3.3	1.8
14	Nonsense	Exon 7	C676T	R226X	43	1.9
15	Nonsense	Exon 11	G1399T	E467X	14	0
16	Nonsense	Exon 11	G1399T	E467X	36	0
17	Missense	Exon 6	A665G	H222R	6.5	2
18	Insertion	Exon 1	ins G after 6 G	frameshift	21	1
19	Insertion	Exon 6	583_588 dup AAAACC	ins KT after 196T	32.6	7.5
20	Deletion	Exon 5	394_406 del AATAATTCTGATC	frameshift	12	12.1
21	Deletion	Exon 10	1265_1274 del CAGTCTGGT	del 422_424 SVW	11	12

表1 血漿中のIgA1, IgA2蛋白量

2. 今回の症例の解析

症例はDHR-123法による活性酸素産生能解析で7.5%の活性が、また7D5によるgp91^{phox}発現は約32%の発現が認められた(図2)。塩基配列決定ではexon 6の第589-594塩基に6塩基の繰り返し配列が挿入され195KT196の後にKTの2アミノ酸が挿入されていた。

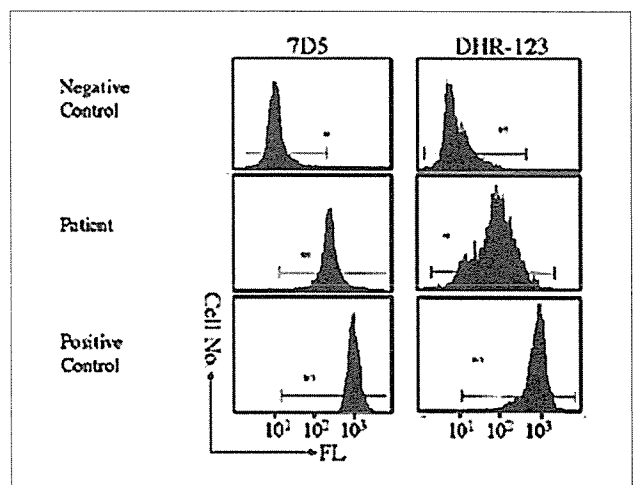


図2 患者好中球機能FACS解析

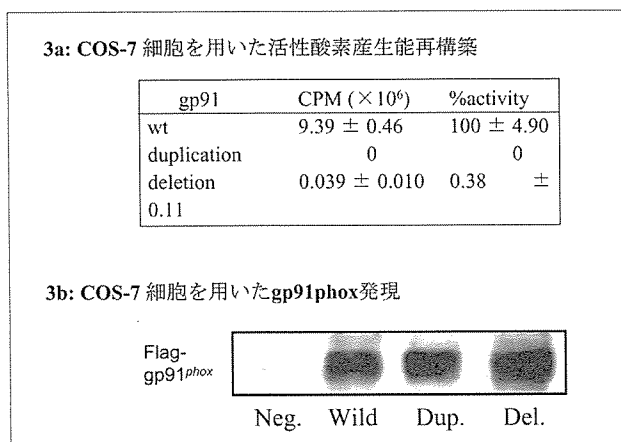


図3 再構築実験での解析

3. 活性再構築実験 (図3)

Cos-7細胞で活性酸素産生再構築実験を行ったところ、今回の症例の2アミノ酸挿入gp91^{phox}では活性が認められなかったが、コントロール症例の3アミノ酸欠失gp91^{phox}では1~3%の活性酸素産生能を認めた(図3a)。pEF-Flag-gp91を用いて、変異gp91^{phox}の発現量を正常と比較したところほぼ正常と同等の変異蛋白の発現を認めた(図3b)。

D. 考 察

現在までに我々の教室に登録されているgp91^{phox}陽性患者(遺伝子解析が終了し、7D5モノクローナル抗体でコントロールの4%以上)は21名(29%)で、その内訳は表1に示すとおりであった。

gp91^{phox}陰性患者も含めると、splice変異ではC252Aのサイレント変異が8例5家系、nonsense変異では3種類の同一変異(C271T (R91X) 3家系、C676T (R226X) 6症例5家系、G1399T (E467X) 1家系)が認められた。同一変異症例間での7D5陽性率はC252A 8例5家系のサイレント変異で0.2~33%、nonsense変異ではC271T (R91X) 3家系で2.5~50%、C676T (R226X) 6症例5家系で0~43%、G1399T (E467X) 1家系で14~36%、missense変異の兄弟間でも0~6.5%であった。この様に同一変異同一家系でも7D5陽性率に大きな変動が認められた。Splice変異ではIFN- γ によりその発現が大きく変化していることを既に我々が報告している(4)。日本で

は7D5モノクローナル抗体によるgp91^{phox}の発現検査を行っているが、外国ではwestern blotting法を用いる施設が多い。FACS解析に比べると感度が下がり、必ずしも同等に比較出来ないが、外国からの報告でもgp91^{phox}陽性の報告は多い(5, 6)。

また、遺伝子解析が終了している7D5陽性(gp91^{phox}陽性)でDHR-123検査でコントロールの1%以上陽性患者は14名であった。Splice変異が3名、nonsense変異が3名、missense変異が1名、insertion変異2名、deletion変異2名であった。Splice変異でC252Aのサイレント変異を示した5家系8名間でも、また検査出来た時とIFN- γ 使用後とも活性が0~30%と大きく違っており(4)、採血直後に測定できればさらに活性が認められるかもしれない。Nonsense変異、missense変異、insertion変異、deletion変異などout of frameになっているにも関わらず、僅かでありながら明らかに活性酸素産生能が残っていることに関して何らかの説明が必要であると思われる。

この数年、エクソン内に存在するexonic splicing enhancer (ESE)、exonic splicing silencer (ESS)などが新たなスプライスシグナルとして知られてきた。実際、missense変異の16~20%以上がESEを破断すると予想され、変異蛋白の発現実験では、機能異常を証明出来ないmissense変異はESEを破壊するスプライシング変異であることが多い(7)と考えられている。またnonsense変異に関してもnonsense-mediated altered splicingなどが報告されている(8)。このようなスプライス異常の観点からの解析が検討され、gp91^{phox}蛋白の発現や活性の再構築の新たな制御機構が明らかになれば、治療につながるのではないかと考えている。

今回提示した症例は、exon 6の第589-594塩基に6塩基の繰り返し配列が挿入されC-loop(N末の膜貫通部位の一部で細胞質へ出ている部分)にLys-Thrの2アミノ酸が挿入されていた。この患者の好中球は7D5蛋白を32%発現しており、7.5%の活性酸素産生能を示した(図2)。gp91^{phox}蛋

白はこれまでNADPH結合ドメイン、FAD結合ドメイン、ヘム結合ドメイン、膜貫通ドメイン、糖鎖結合ドメイン、p47^{phox}/p67^{phox}結合ドメイン等が報告されている(9)。gp91^{phox}のB-loop配列⁷⁰PVCRNLLSFLRGSSACCSTRIRRRQLDRNLTFHK¹⁰²はp47^{phox}, p67^{phox}との相互作用をする部位として報告されている(10)。D-loopの¹⁹¹TSSTKTIRRS²⁰⁰配列については、Liら(11)は同配列の変異gp91^{phox}をX-CGD PLB985細胞に導入し、活性と発現を検討し、p47^{phox}/p67^{phox}結合ドメインではなく、電子伝達系に関わるドメインと考えていた。しかし、これまで同部位に変異をもつ患者が発見されず、in vitro細胞実験だけであった。今回我々の症例は同部位の2アミノ酸の挿入された症例であり、患者好中球でも活性酸素再構築したCos-7細胞でもgp91^{phox}のD-loop配列の重要性が明らかにされた(図3)。

参考文献

1. Burritt JB, et al., J Biol Chem.2001; 276:2053-61.
2. Yamauchi A, et al., Microbiol Immunol. 2001; 45: 249-57.
3. Ishibashi F, et al., Hum Genet. 2000; 106:473-81.
4. Ishibashi F, et al., Blood. 2001; 98:436-41.
5. P.G. Heyworth, et al. Blood Cells Mol and Dis. 1997; 23: 443-450
6. Rae, J., Am J Hum Genet. 1998; 6: 1320-31
7. Blencowe BJ. Trends Biochem Sci. 2000; 25: 106-10

8. Cartegni L, et al., Nat Rev Genet. 2002; 3: 285-98
9. Roos D., Immunol Today. 1996; 17: 517-21.
10. Karla J. et al., J Biol Chem. 1999; 274: 10451-7
11. Li XJ,et al., J Biol Chem. 2005; 280: 14962-73.

<発表論文>

1. 小野真由子、藤田直人、浜本和子、水上智之、布井博幸、小林正夫、慢性肉芽腫症に対するHLA一致同胞からの骨髄非破壊的同種骨髄移植. 日本小児血液学会雑誌 20:34-38,2006
2. Hidaka F, Matsuo S, Muta T, Takeshige K, Mizukami T, Nunoi H. et al., A missense mutation of the Toll-like receptor 3 gene in a patient with influenza-associated encephalopathy. Clinical Immunology 119:188-194,2006
3. 久保尚美、大塚珠美、小泉博彦、此元隆雄、高木純一、布井博幸、柳邊安秀、インフルエンザ流行時期に心膜心筋炎に横紋筋融解症を合併した10歳女兒例、小児科 47(9):1413~1417, 2006
4. 小泉博彦、高木純一、大塚珠美、久保尚美、布井博幸、ガンマグロブリン療法(IVIG)不応であった川崎病女兒2症例に対するステロイド治療, Medical Postgraduates 44(4):82~92, 2006

安全性を高めたX連鎖重症複合免疫不全症に対する遺伝子治療法の開発：自殺遺伝子の遺伝子治療への応用

内 山 徹 (東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学分野)
久間木 悟 (東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学分野)
笹 原 洋 二 (東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学分野)
D u W e i (東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学分野)
佐 藤 美 季 (東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学分野)
土 屋 滋 (東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学分野)

【研究要旨】

X連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する γ c鎖を用いた遺伝子治療ではその有用性が確認された一方で、レトロウイルスベクターの挿入変異によるリンパ性白血病発症が報告された。我々は、発癌した場合でも癌化した細胞を排除できるように自殺遺伝子Herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) を治療用の γ c鎖と同時に発現するレトロウイルスベクターを開発しその有用性を検討した。X-SCID患者から樹立したB細胞株にそのベクターを遺伝子導入したところ機能的な γ c鎖を発現すること、また抗ウイルス薬であるガンシクロビルによって遺伝子導入細胞のみを選択的に死滅させることができることを確認した。さらにこのベクターを用いてX-SCIDマウスの遺伝子治療を行ったところ、 γ c鎖を発現したリンパ球の回復が認められた。これらのリンパ球はin vitroでガンシクロビルに高い感受性を示し、in vivoでもガンシクロビルの腹腔内投与によりマウス体内から選択的に消失した。

A. 研究目的

X-SCIDに対するレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療では、免疫系の再構築が得られ、その有用性が証明された^{1), 2)}。しかし、遺伝子治療3年目に発癌 (Tリンパ性白血病) が報告され、レトロウイルスベクターの挿入変異による癌原遺伝子の活性化が原因と判明した³⁾。そのため、より安全な遺伝子治療の開発が望まれるが、選択肢の一つとして自殺遺伝子の利用が挙げられる。今回われわれは白血病が発症した場合でも癌化した細胞を排除できるように、Herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) を治療用の γ c鎖遺伝子と同時に組込んだレトロウイルスベクターを開発した。このベクターを用いて、X-SCID患者から樹立したB細胞株およびX-SCIDマウスに遺伝子導入を行いその有用性を検討した。

B. 研究方法

1) レトロウイルスベクター

マウス幹細胞ウイルス (Murine stem cell virus, MSCV) のLTRを有するレトロウイルスベクターを基盤として、ヒト γ c鎖およびHSVtk遺伝子を持つベクターpD- γ c/TKを作製した。

2) B細胞株への遺伝子導入

X-SCID患者から樹立したB細胞株 (BCL1、BCL2) にpD- γ c/TKを用いて遺伝子導入を行った。 γ c鎖の発現はモノクローナル抗体であるTU Gh4による染色後、FACS Caliburにて確認した。また γ c鎖に直接会合するtyrosine kinaseであるJak3分子のリン酸化によりシグナル伝達を確認した。

3) X-SCIDマウスへの遺伝子導入

X-SCIDマウス (γ c鎖ノックアウトマウス)

の骨髄細胞より分離した単核球細胞を lineage marker にて染色後、AutoMACSを用いた negative selectionにより造血幹細胞を分離した。分離した細胞にpD- γ c/TKによる遺伝子導入を行い、洗浄後再びX-SCIDマウスの尾静脈より注入した。移植後8~12週に末梢血でのリンパ球の回復および γ c鎖の発現をフローサイトメーターにて確認した。

4) Ganciclovir (GCV) による処理

(A) 患者B細胞株

自殺遺伝子HSVtkの効果を検討するため、抗ウイルス薬であるGCVによる処理を行った。遺伝子導入したB細胞株をGCVを含む培地で培養し、 γ c鎖発現細胞が消失するかどうかを経時的に解析した。また、遺伝子を導入していない細胞を同様の条件で培養し、GCVの細胞毒性(生存率と増殖)も検討した。

(B) X-SCIDマウス

遺伝子導入後のマウスの末梢血からリンパ球を採取し、IL-2およびCon A存在下で培養後、GCVを添加して効果を検討した。さらに、遺伝子導入後のマウスに対しGCVを腹腔内投与(50 mg/kg、7日間)し、マウス体内における遺伝子導入リンパ球への効果も検討した。

C. 研究結果

pD- γ c/TKを用いてX-SCID患者から樹立したB細胞株に遺伝子導入を行った結果、患者細胞表面に γ c鎖が発現した(patient1: 17%, patient 2: 11%) (図1)。IL-2刺激によるJak3分子のリン酸化も認められ、導入した γ c鎖によるサイト

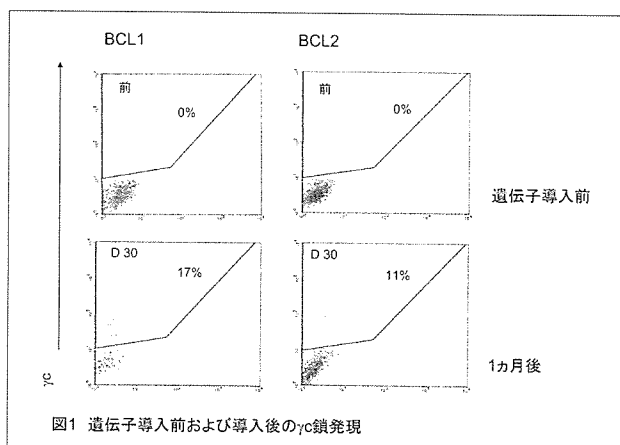


図1 遺伝子導入前および導入後の γ c鎖発現

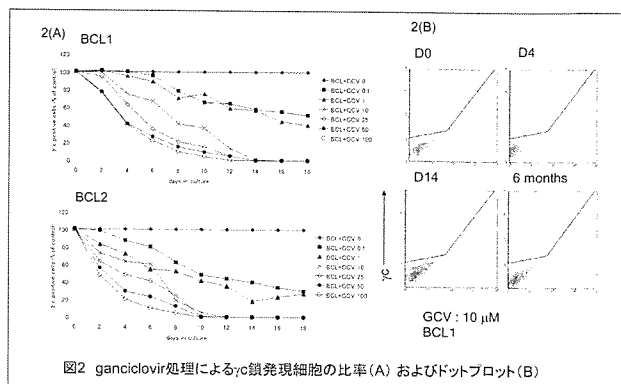


図2 ganciclovir処理による γ c鎖発現細胞の比率(A) およびドットプロット(B)

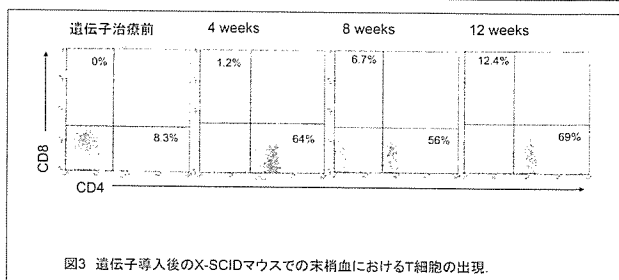


図3 遺伝子導入後のX-SCIDマウスでの末梢血におけるT細胞の出現

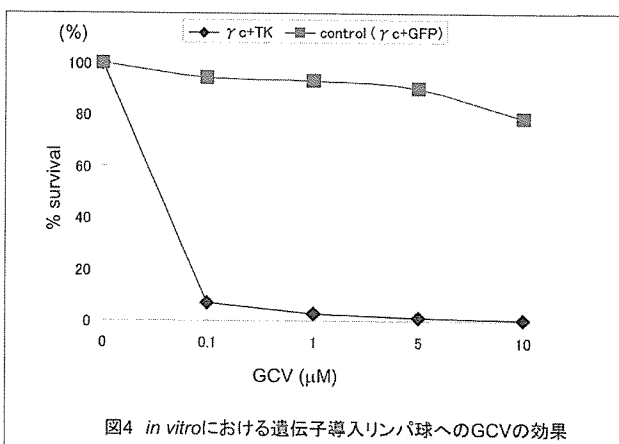


図4 *in vitro*における遺伝子導入リンパ球へのGCVの効果

カインシグナルの伝達も確認された。

次に遺伝子導入細胞をGCVにより処理したところ、10 μ M以上の濃度ですべての γ c鎖発現細胞が消失した(図2)。10 μ M~25 μ Mの濃度では細胞毒性が認められず、これらの濃度では遺伝子導入細胞のみ消失することがわかった。導入した γ c鎖の発現は6ヶ月以上安定して認められ、またGCVへの感受性も維持されていた。

pD- γ c/TKによりX-SCIDマウスに遺伝子治療を行った結果、8~12週後のマウスでは末梢血中においてTリンパ球の回復が認められ(図3)、これらのリンパ球は*in vitro*にてGCVに対して高い感受性を示した(図4)。またGCVを遺伝子治療後のマウスに腹腔内投与した結果、遺伝子導入リンパ球のみ選択的に消失することが確認された(図5)。

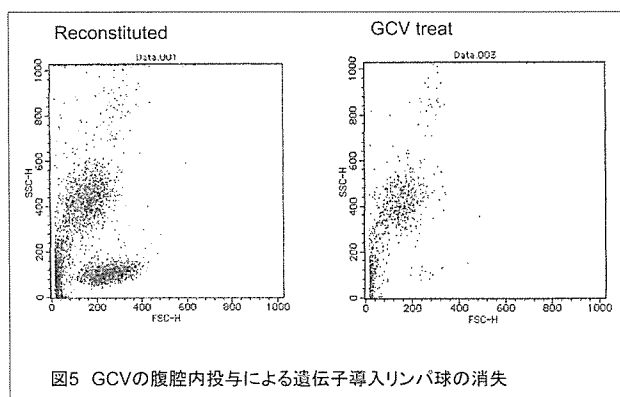


図5 GCVの腹腔内投与による遺伝子導入リンパ球の消失

D. 考 察

以上の結果より、*in vitro*および*in vivo*の両方において、細胞毒性が低い濃度のGCVによって遺伝子導入細胞が選択的に消失することが確認された。

ヒトリンパ球にHSVtkを導入した以前の報告⁴⁾に比べて、今回B細胞株（EBウイルス転換B細胞株）を用いた実験では高濃度のGCVが必要であった。しかしGCVへの感受性は細胞の種類によって異なり、また遺伝子治療後のX-SCIDマウスのリンパ球が低濃度のGCVに感受性を示していることから、ヒトにおいても遺伝子導入幹細胞から分化したリンパ球に対してはより低濃度で効果があると考えられた。

遺伝子治療における自殺遺伝子の利用では、不活化（サイレンシング）が大きな問題となる。われわれも過去の実験で、LTRのCpGメチレーションによると思われる発現量の減少を経験しており、本研究ではMSCVレトロウイルスベクターを使用した。さらに γ c鎖とHSVtkの発現量のばらつきを抑えるため、IRES配列を介して2つの遺伝子が同一のプロモーター（LTR）により発現されるようにした。しかし、IRES配列のメチレーションによるHSVtkの不活化の可能性もあるため、更なる改良が必要と考えている。

そのほか実際に癌化した細胞に対する自殺遺伝子の効果に関しても現在研究をすすめている。癌化した細胞を完全に死滅させられるかについての検討は難しいところであるが、増殖細胞に対して効果を示すというGCVの性質上、癌化した細胞へはより強い効果を示すと思われる。万が一根治

できない場合においても、他の治療法と併用する場合には自殺遺伝子の効果によって標的である癌細胞を減少させることは非常に有用であると考えられる。

E. 結 論

今回我々は、挿入変異によって発癌した場合でも癌化した細胞を自殺遺伝子HSVtkで排除できるレトロウイルスベクターを開発した。

このベクターを利用して、患者B細胞株とX-SCIDマウスに対してそれぞれ遺伝子導入を行った。遺伝子導入細胞は*in vitro*、*in vivo*の両方において、GCVにより選択的に消失することがこの結果はX-SCID患者に対するより安全な遺伝子治療として自殺遺伝子の有用性を示唆すると考えられた。

F. 研究発表

1. 学会発表

1) Uchiyama T, Kumaki S, Ishikawa Y, Ishii N, Onodera M, Sato M, Sasahara Y, Tanaka N, Sugamura K, Tsuchiya S. Application of HSVtk suicide gene to X-SCID gene therapy: Ganciclovir treatment selectively eliminates gene corrected cells *in vitro* and *in vivo*. American Society of Gene Therapy 9th Annual Meeting, May 31-June 4, 2006

2) Uchiyama T, Kumaki S, Ishikawa Y, Ishii N, Onodera M, Sato M, Sasahara Y, Tanaka N, Sugamura K, Tsuchiya S. Application of HSVtk suicide gene to X-SCID gene therapy: Ganciclovir treatment selectively eliminates gene corrected cells *in vitro* and *in vivo*. Japan Society of Gene Therapy 12th Annual Meeting, July 2-30, 2006

2. 論文発表

1) Uchiyama T, Kumaki S, Ishikawa Y, Onodera M, Sato M, Du W, Sasahara Y, Tanaka N, Sugamura K, Tsuchiya S.

- Application of HSVtk suicide gene to X-SCID gene therapy: Ganciclovir offsets gene corrected X-SCID B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341(2):391-8, 2006
- 3) Du W, Kumaki S, Uchiyama T, Yachie A, Looi Chung Yeng, Kawai S, Minegishi M, Ramesh N, Geha R S, Sasahara Y, Tsuchiya S. A second-site mutation in the initiation codon of WASP gene results in expansion of subsets of lymphocytes in an Wiskott-Aldrich syndrome patient. *Hum. Mut.* 27(4): 370-5, 2006
- 4) Ishikawa Y, Tanaka N, Murakami K, Uchiyama T, Kumaki S, Tsuchiya S, Kugoh H, Oshimura M, Calo M P, Sugamura K. Phage ϕ C31 integrase-mediated genomic integration of the common cytokine receptor gamma chain in human T-cell lines
J. Gene Med. 8(5): 646-53, 2006
- (参考文献)
1. M. Cavazzana-Calvo, S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID) -X1 disease. *Science* 288 (2000) 669-672.
 2. H. B. Gaspar, K. L. Parsley, S. Howe, et al. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364 (2004) 2181-87.
 3. S. Hacein-Bey-Abina, C. Von Kalle, M. Schmidt, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 (2003) 415-419.
 4. C. Bonini, G. Ferrari, S. Verzeletti, et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276 (1997) 1719-1724.

高IgE症候群を呈するTyk2欠損症の病態形成機構

峯 岸 克 行 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体環境応答
学系専攻免疫アレルギー学分野)

烏 山 一 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体環境応答
学系専攻免疫アレルギー学分野)

【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とがある。本症候群は、1966年にDavis, Wedgewoodらにより最初に報告されたが、その後の多くの研究にもかかわらず、病態、原因遺伝子は明らかにされていなかった。

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い、Tyk2遺伝子の異常により、Tyk2タンパクが存在しないことが本疾患発症の原因であることを明らかにした。Tyk2の欠損によりI型インターフェロン (IFN) , IL-6, IL-10, IL-12, IL-23などのサイトカインのシグナル伝達が障害されており、Th1細胞の分化障害とTh2細胞への過剰な分化、I型IFNのウイルス複製抑制の欠如により本症が発症しているものと考えられた。さらに、Tyk2を欠損するマウスとの比較で、ヒトにおいてはマウスと異なり、I型IFN, IL-6, IL-10のシグナル伝達にTyk2が必須の役割を果たしていることを始めて明らかにした。

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。黄色ブドウ球菌の皮膚膿瘍、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、その他のウイルス感染症などの感染症に頻回に罹患する群の2群がある。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開始し、常染色体劣性高IgE症候群の原因遺伝子としてTyk2を同定した。本症においては、Tyk2の欠損によりTh1細胞の分化障害とTh2細胞の分化の亢進が見られるが、

ヒトのIL-12R β 1欠損症では、IL-12のシグナル伝達障害により、Th1細胞の分化障害は見られるものの、Th2細胞への分化促進は見られない。さらに、ヘルパーT細胞の分化には、樹状細胞が重要な役割を果たしていること、樹状細胞の機能は、I型IFNやIL-10により制御されていることが知られている。そこで、我々はヒトのTyk2欠損樹状細胞の機能を検索することにより、高IgE症候群の病態との関連を検討した。

B. 研究方法

患児または代諾者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、免疫磁気ビーズにてCD14陽性の単球を得た。これをGM-CSF+IL-4の存在下で培養し未熟樹状細胞を得た。これをLPSで刺激し、成熟樹状細胞を得た。これらの樹状細胞の分化のプロセスを細胞表面マーカーとFITC-

dextranの貪食能とで検討した。さらに、この樹状細胞をナイーブなCD4陽性T細胞と共培養し、そのときの細胞増殖とサイトカイン産生を測定した。細胞増殖は³H-サイミジンの取り込みで、サイトカインの産生はELISA法にて解析した。

(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. Tyk2欠損症の末梢血単球はGM-CSF+IL-4の刺激に反応して、正常に樹状細胞に分化した

Tyk2欠損症の単球由来樹状細胞の分化について検討するために、Tyk2欠損症の末梢血単球をGM-CSF+IL-4存在下で5日間培養し、フローサイトメトリーにて樹状細胞の分化マーカーを検討した。Tyk2欠損症においては、健常人と同様にlineage marker陰性、CD1a陽性の未熟樹状細胞への分化が見られ、CD80, CD86の発現レベルも同等だった。さらに、この未熟樹状細胞をLPS刺激したときのCD80, CD86, CD83分子の発現レベルもコントロールと同等で、樹状細胞の成熟も正常と考えられた。さらに、FITC-dextranを用いた貪食能の検討でも、Tyk2欠損樹状細胞は、正常コントロールと同等にLPSの刺激で貪食能を低下させた。さらに、ナイーブCD4T細胞との共培養による検討でもTyk2欠損樹状細胞は、T細胞増殖の誘導、サイトカイン産生の誘導とも正常コントロールと同等であった。以上より、Tyk2欠損単球のGM-CSF+IL-4による未熟樹状細胞への分化、LPSによる樹状細胞の成熟は正常と考えられた。

2. Tyk2を欠損した樹状細胞は、IL-10による樹状細胞の機能抑制が見られなかった

Tyk2欠損症の単球由来樹状細胞に対するIL-10の効果を検討するためにTyk2欠損症の末梢血単球をGM-CSF+IL-4存在下で培養中の3日目よりIL-10を添加して培養を継続した。この培養条件では未熟樹状細胞への分化は正常に見られたものの、正常コントロールでは、IL-10添加によりCD80, CD83, CD86の発現で評価したLPSによる成熟がほぼ完全に消失したのに対して、Tyk2欠損樹状細胞では、IL-10未添加時と同等にLPSによるこれらのマーカーの発現上昇が見られた。さらにFITC-dextranを用いた貪食能の検討でも、正常コントロールでは、IL-10の前処理により貪食能の低下が抑制され成熟障害を呈したのに対して、Tyk2欠損樹状細胞は、IL-10非存在下と同様にLPS刺激により貪食能を低下させた。以上より、Tyk2欠損症の樹状細胞では、IL-10のシグナル伝達が障害されており、IL-10による免疫応答の抑制機構が正しく働かない可能性が考えられた。

そこで、Tyk2欠損樹状細胞のT細胞に対する影響を検討するために、ナイーブCD4陽性T細胞との共培養により、T細胞増殖とサイトカイン産生の誘導を正常コントロールと比較した。正常コントロールの樹状細胞では、IL-10の前処理により、T細胞増殖の誘導が約1/10に低下するのに対して、Tyk2欠損樹状細胞ではこの抑制が全く見られなかった。さらに、サイトカインの産生においても、正常コントロールの樹状細胞では、IL-10の前処理によりIL-12, IFN γ , IL-4の産生が顕著に抑制されるのに対して、Tyk2欠損樹状細胞ではこの抑制も全く見られなかった。以上より、Tyk2欠損樹状細胞においては、IL-10のシグナル伝達が障害されているために、IL-10による免疫応答の抑制機構が働かないものと考えられた。

D. 考 察

ヒトのTyk2欠損症においては、Th1細胞の分化障害とTh2細胞の分化の亢進が見られるが、同様のIL-12のシグナル伝達障害が見られるヒトのIL-12R β 1欠損症では、Th1の分化障害は見られるものの、Th2への分化促進は見られない。このことは、IL-12以外のサイトカインシグナル伝達

障害がTyk2欠損症の病態形成に関与している可能性を示唆している。さらに、ヘルパーT細胞の分化は、樹状細胞により制御されており、樹状細胞の機能は、I型IFNやIL-10などのサイトカインにより各種の調節を受けている。そこで、我々はヒトのTyk2欠損状態での樹状細胞機能について検討し、Tyk2欠損樹状細胞においては、IL-10のシグナル伝達が障害されているために、IL-10による免疫抑制が働かないことを明らかにした。この樹状細胞の機能異常により、T細胞の増殖抑制、サイトカイン産生抑制が働かず、これが高IgE症候群の病態形成に関与している可能性が強く示唆された。

E. 結 論

ヒトのTyk2の欠損症においては、樹状細胞のIL-10に対する応答が障害されており、これが、ヒトのTyk2欠損症の病態に関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 学会発表

第56回日本アレルギー学会秋季学術大会

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、金子英雄、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、鳥山一；高IgE症候群の原因遺伝子の検討。2006.10.20-22. 東京

第36回日本免疫学会総会・学術集会

峯岸克行、齋藤雅子、野々山恵章 鳥山一（東京医歯大・院・免疫アレルギー）；常染色体劣性高IgE症候群の原因遺伝子の検討。2006.12.11-13.大阪

2. 論文発表

Minegishi Y., Saito M., Morio T., Watanabe K., Agematsu K., Tsuchiya S., Takada H., Hara T., Kawamura N., Ariga T., Kaneko H., Kondo N., Tsuge T., Yachie A., Sakiyama Y., Iwata T., Bessho F., Ohishi T., Joh K., Imai K., Kogawa K., Shinohara M., Fujieda M., Wakiguchi H., Pasic S., Abinun M., Ochs H.D., Renner E.D., Jansson A., Belohradsky B.H., Metin A., Shimizu N., Mizutani S., Miyawaki T., Nonoyama S. & Karasuyama H.: Human Tyk2 deficiency reveals requisite roles of Tyk2 in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity* 25: 745-755, 2006

常染色体優性遺伝を呈するIFN- γ receptor 1異常症の解析

岡田 賢 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻病態
情報医科学講座小児科学)

小林 正夫 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻病態
情報医科学講座小児科学)

【研究要旨】

IFN- γ 、IL-12はTh1分化において重要な働きを持っている。近年、IFN- γ /IL-12経路の異常により、抗酸菌、サルモネラなどの細胞内寄生菌に対してのみ易感染性を呈する疾患群の存在が明らかとなり、これまで5つの遺伝子 (IFNGR1、IFNGR2、IL12RB1、IL12B、STAT1) の関与が報告されている。IFN- γ receptor 1 (IFN R1) 異常症は、IFN- γ /IL-12経路異常症の1つで、多発性骨髄炎を代表的症状とし比較的臨床症状の軽度な常染色体優性遺伝のものと、重篤な多臓器の感染症状を呈し、症例によっては造血幹細胞移植が考慮される常染色体劣性遺伝のものがある。今回我々は、多発性骨髄炎を呈した患者において、IFN γ R1の責任遺伝子IFNGR1 (NM_000416) に新規変異を同定し、常染色体優性遺伝を呈するIFN γ R1異常症と診断し、詳細な解析を行った。

A. 研究目的

1. 本症例で認めた774番目の塩基からの4塩基欠失 (774del4) がもたらす機能的な異常の証明。
2. 常染色体優性遺伝を呈するIFN γ R1異常症の病態の分子生物学的な解析。

B. 研究方法

1. 患者背景

主訴：微熱、左膝部痛、腰痛

既往歴：生後4ヶ月時にBCGを接種する。接種2ヶ月後にBCGに伴うリンパ節炎を合併し、イソニアジドによる治療を3年間行われていた既往がある。

現病歴：半年前より腰痛、左膝部痛が出現。4ヶ月前より37°C台の微熱が持続していた。近医の精査で、CTにて骨腫瘍が疑われたため当院紹介となった。

現症：初診時、WBC 9,260/ μ l、CRP 4.5mg/dl、IgG 4,050mg/dl。骨シンチにて多発性の骨病変を認めた。左膝部の骨病変から生検を行ったところ、病理所見で壊死組織と肉芽組織の混在、炎症

細胞の浸潤所見を認めた。また、PCRで *M. Avium* complexが検出され、非結核性抗酸菌による多発性骨髄炎と診断した。

2. 遺伝子解析

患者末梢血白血球からDNAを分離し、ダイレクトシーケンス法により *IFNGR1* の全エクソンのシーケンスを行った。患者の末梢血から比重遠心法にて単核球を分離し、RNAを抽出後cDNAを作成した。 *IFNGR1* のcoding region全長をPCRで増幅しTAクローニングを行い、正常の *IFNGR1* と774del4変異 *IFNGR1* 得た。本症において、最も頻度の多い変異 (818del4) はPCRによるmutagenesisで作成した。

3. IFN- γ 刺激に対するTNF- α の産生の解析

患者の末梢血単核球からImag cell separation system (Becton-Dickinson) を用いてCD14⁺細胞を純化した。CD14⁺細胞をLPS (500ng/mL) と様々な濃度のIFN- γ (10^2 - 10^5 IU/mL) 存在下で48時間培養し細胞上清におけるTNF- α の濃度をLuminexにて測定した。

4. IFN- γ 刺激に対するSTAT-1リン酸化の解析

患者末梢血単核球をIL-12 (100U/ml)、PHA

(1 $\mu\text{g/ml}$) 存在下で96時間培養した後、これらを除きさらに24時間培養した。これらの細胞を、LPS (50pg/ml)、IFN- γ (10,000U/ml) で30分間刺激し、BD Phosflow anti-Stat1 (pY701) antibodyを用いてFACSにて解析をした。

5. 発現実験

正常 *IFNGR1*、774del4変異、818del4変異を発現ベクター (pcDNA) を用いてリン酸カルシウム法にてHEK293細胞に遺伝子導入を行った。遺伝子導入後24時間で (1) cell lysate作成しウェスタンブロットでIFN γ R1の発現を解析した。(2) シクロヘキシミド (CHX) (20 μM) で3時間処理を行い、新たな蛋白合成を阻害した状態で培養を行い、レセプターの分解をFACS、ウェスタンブロットにより解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト遺伝子解析を含むもので、資料提供者の人権および利益の保護に慎重に配慮し、本人やその代諾者に対して十分な説明と文書による同意を得て行った。本研究における遺伝子解析は、広島大学倫理委員会で承認を得たうえで、その指針に沿って行った。

C. 研究結果

1. 患者における変異解析

患者において、IFN γ R1の責任遺伝子 *IFNGR1* にexon 6の774番目の塩基から4塩基 (TCTA) の欠失を認めた (774del4)。患者両親には同変異を認めなかった。この欠失によりフレームシフトが起こり、下流に停止コドン (nt 827-829: TGA) を形成する。常染色体優性遺伝を呈するIFN γ R1欠損症で最も頻度が高い変異 (818del4) でも同一部位で停止コドンを形成するため、同様の病態を疑い以下の解析を進めた。

2. 患者細胞の解析

FACSによる解析で、患者のCD14⁺細胞は健常人と比較して、細胞表面にIFN γ R1の発現が亢進しており (図1)、IFN- γ 刺激に対するSTAT-1のリン酸化が部分的に障害されていた (図2)。更にこれらの細胞は、LPS、IFN- γ 存在下で反

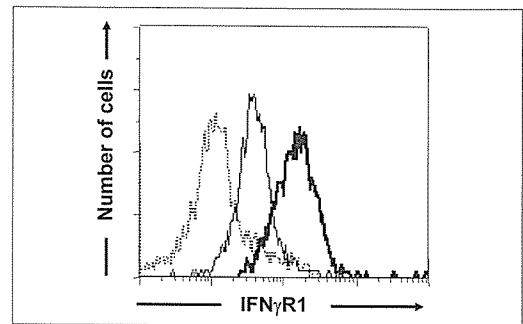


図1. 細胞表面のIFN R1の解析

CD14⁺細胞の表面に発現するIFN γ R1をフローサイトメーターで解析した。

実線：健常人におけるIFN γ R1の発現

太線：患者におけるIFN γ R1の発現

点線：isotype control

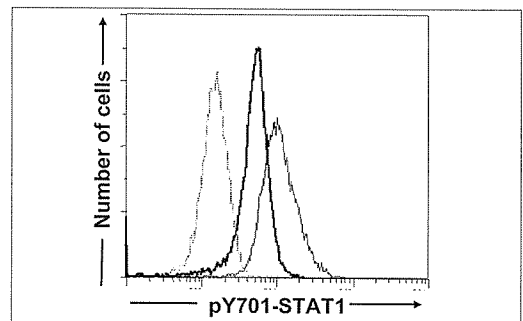


図2. IFN- γ 刺激に対するSTAT-1リン酸化

LPS、IFN- γ 刺激後のSTAT-1リン酸化をフローサイトメーターで解析した。

実線：健常人におけるSTAT-1のリン酸化

太線：患者におけるSTAT-1のリン酸化

点線：isotype control

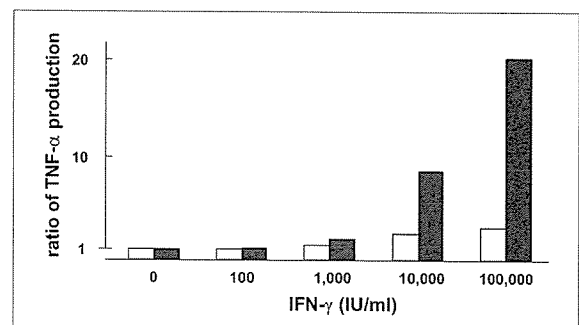


図3. LPS、IFN- γ 刺激に対するTNF- α の産生

CD14⁺細胞をLPS、IFN-g存在下で培養、48時間後上清のTNF- α を測定した。

■：患者由来のCD14⁺細胞

□：健常人由来のCD14⁺細胞

応性に産生されるTNF- α の産生が障害されていた (図3)。

3. 変異IFN γ R1の機能解析

本症例の774del4変異が持つ機能的な異常を証明し、さらには常染色体優性遺伝を呈するIFN γ R1欠損症の病態を解明する目的で、774del4変異、818del4変異を導入した *IFNGR1* を作成し、HEK 293細胞に遺伝子導入を行い解析した。ウエスタ

成するためNMDから逃れ、mRNAが安定に存在する。このことが発症原因の一つに考えられる。第二に、変異レセプターが自身の蛋白分解が障害されていることがある。これは、遺伝子導入によりHEK293細胞上に発現した変異レセプターが、CHX処理に対して安定に細胞表面に存在し、蛋白分解が障害されているという実験結果から示された。これら二つの機序より、変異レセプターが細胞表面に過剰に発現することが想定された。

他にも我々は、BCG後のリンパ節炎の既往を持ち、多発性骨髄炎を呈した男子においてIFNGR1にG832T変異（以前に報告のある変異）を同定しており、実際には想像以上に多くの症例が存在する可能性がある。今後、解析を進め本症の理解を深めていくとともに、広く啓蒙を行っていくことが重要と考えられる。

E. 結 論

*M. Avium*による多発性骨髄炎を呈した患者において、*IFNGR1*に新規変異を同定し、解析を行った。その結果我々は、常染色体優性遺伝を呈するIFN γ R1異常症では、細胞内ドメインを失いIFN- γ のシグナル伝達能を持たない異常なレセプターが、自身の分解が障害された結果、細胞表面に過剰に発現していることを証明した。過剰に発現した異常レセプターが正常のレセプターの機能を障害するドミナントネガティブ効果が、本症の発症機序に関与していることが強く示唆された。

F. 研究発表

学会発表

1. 岡田 賢, 石川暢恒, 川口浩史, 安永晋一郎, 大坪素秋, 瀧原義宏, 小林正夫. 非定型抗酸菌による多発性骨髄炎を呈したIFN- γ レセプター1異常症. 第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会合同総会, 横浜, 2005年9月17~19日
2. Satoshi Okada, Nobutsune Ishikawa, Kenichirou Shirao, Hiroshi Kawaguchi, Miyuki Tsumura, Yoshinori Ohno,

Shin'ichiro Yasunaga, Motoaki Ohtsubo, Yoshihiro Takihara, Masao Kobayashi. A novel mutation 774del4 in *IFNGR1*, which produces truncated form of Interferon γ receptor 1, causes a dominant-negative effect on Interferon γ signal transduction. American Society of Hematology 48th Annual Meeting, Ohland, December 9-12, 2005

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

H. 参考文献

- 1) Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, and Levin M. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996; 335: 1941-1949.
- 2) Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, Levin M, Blanche S, Seboun E, Fischer A, and Casanova JL. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N Engl J Med* 1996; 335: 1956-1961.
- 3) Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, Dorman SE, Fondaneche MC, Dupuis S, Doffinger R, Altare F, Girdlestone J, Emile JF, Ducoulombier H, Edgar D, Clarke J, Oxelius VA, Brai M, Novelli V, Heyne K, Fischer A, Holland SM, Kumararatne DS, Schreiber RD, and Casanova JL. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet* 1999; 21: 370-378.
- 4) Dorman SE, Picard C, Lammas D, Heyne K, van Dissel JT, Baretto R, Rosenzweig SD, Newport M, Levin M, Roesler J,

- Kumararatne D, Casanova JL, and Holland SM. Clinical features of dominant and recessive interferon gamma receptor 1 deficiencies. *Lancet* 2004; 364: 2113-2121.
- 5) Sasaki Y, Nomura A, Kusuhara K, Takada H, Ahmed S, Obinata K, Hamada K, Okimoto Y, and Hara T. Genetic basis of patients with bacille Calmette-Guerin osteomyelitis in Japan: identification of dominant partial interferon-gamma receptor 1 deficiency as a predominant type. *J Infect Dis* 2002; 185: 706-709.
- 6) Villella A, Picard C, Jouanguy E, Dupuis S, Popko S, Abughali N, Meyerson H, Casanova JL, and Hostoffer RW. Recurrent *Mycobacterium avium* osteomyelitis associated with a novel dominant interferon gamma receptor mutation. *Pediatrics* 2001; 107: E47.
- 7) Dorman SE, Uzel G, Roesler J, Bradley JS, Bastian J, Billman G, King S, Filie A, Schermerhorn J, and Holland SM. Viral infections in interferon-gamma receptor deficiency. *J Pediatr* 1999; 135: 640-3.
- 8) Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 89-99.
- 9) Culbertson MR, and Neeno-Eckwall E. Transcript selection and the recruitment of mRNA decay factors for NMD in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 2005; 11: 1333-1339.
- 10) Amrani N, Sachs MS, and Jacobson A. Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 415-425.

FOXP3陽性CD25⁺CD4⁺T細胞の成長に伴う変化と *FOXP3*遺伝子変異例における異常

伊藤 靖 典 (富山大学大学院医学薬学研究部小児科学)
淵 澤 竜 也 (富山大学大学院医学薬学研究部小児科学)
東 山 弘 幸 (富山大学大学院医学薬学研究部小児科学)
金 兼 弘 和 (富山大学大学院医学薬学研究部小児科学)
足 立 雄 一 (富山大学大学院医学薬学研究部小児科学)
宮 脇 利 男 (富山大学大学院医学薬学研究部小児科学)

【研究要旨】

内在性CD25⁺CD4⁺制御性T細胞は、免疫自己寛容において重要な役割を果たし転写因子FOXP3はその発生や分化のmaster分子とされる。マウス抗ヒトFOXP3単クローン抗体を用いてCD4⁺T細胞亜群におけるFOXP3の発現をフローサイトメトリーにて解析したところ、健常者ではFOXP3陽性細胞の大部分はCD25⁺CD4⁺T細胞に属し、CD4⁺T細胞に占めるFOXP3陽性細胞の比率は乳児から成人までほぼ一定(4-5%)であったが、日齢0(臍帯血)でのみ有意に低値(2.87%)であった。*FOXP3*遺伝子変異を有する患者ではFOXP3陽性CD25⁺CD4⁺T細胞は皆無であった。また乳幼児期早期におけるFOXP3陽性CD25⁺CD4⁺T細胞は主にCD45RA陽性細胞で認め、加齢と共にCD45RO陽性細胞が優位となっていた。

A. 研究目的

CD25⁺CD4⁺T細胞(制御性T細胞)は末梢性の免疫寛容に重要な役割を演じており、FOXP3遺伝子が制御性T細胞の産生ならびに機能発現におけるマスター遺伝子であることが明らかとなっている。FOXP3遺伝子の異常により*scurfy*マウスやIPEX症候群として知られる出生早期の自己免疫疾患を発症する。制御性T細胞の生物学的な役割を解明するため、FOXP3に対するモノクローナル抗体を用いて小児の末梢血におけるFOXP3陽性細胞について検討した。さらにFOXP3遺伝子異常が明らかとなっている患者についてもこの抗体を用いて解析した。

B. 研究方法

健常者147名(日齢0~50歳)ならびにFOXP3遺伝子変異が証明された患者4例を対象として、マウス抗ヒトFOXP3単クローン抗体を用いてCD4⁺T細胞亜群におけるFOXP3の発現をフローサ

イトメトリーにて解析した。他の表面マーカーとしてCD4、CD25、CD45RA、CD45ROも染色し測定した。

C. 研究結果

1) 健常者ではFOXP3陽性細胞の大部分はCD25⁺CD4⁺T細胞に属し、CD4⁺T細胞に占めるFOXP3陽性細胞の比率は乳児から成人までほぼ一定(平均3.95~5.33%)であったが、日齢

図1 各年齢におけるCD4⁺細胞におけるFOXP3陽性CD25⁺細胞の発現

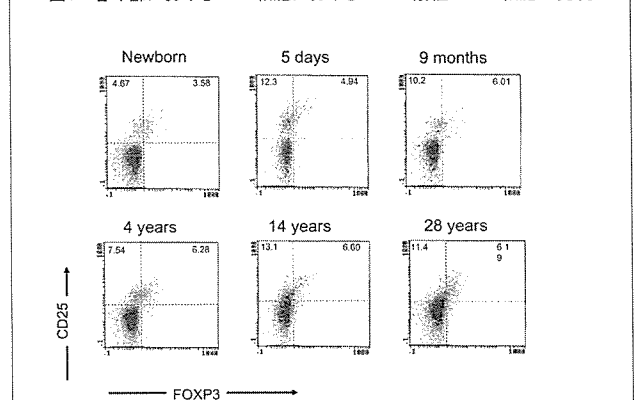


表1 成長に伴うFOXP3陽性CD25⁺CD4⁺細胞の割合の変化

Subjects	No.	% FOXP3 ⁺ cells in CD4 ⁺ T cells	% Total CD25 ⁺ cells in CD4 ⁺ T cells	% FOXP3 ⁺ cells in CD25 ⁺ CD4 ⁺ T cells
Newborn	12	2.87±1.45 (1.45-4.95)**	10.2±3.7 (3.7-15.2)*	30.0±13.1 (13.1-44.3)
4-14 days	14	4.66±1.85 (1.64-8.45)	12.7±2.4 (9.3-16.4)***	36.7±14.0 (17.0-59.3)
1-2 months	13	3.95±0.97 (2.82-5.74)	11.8±2.3 (9.1-15.2)**	33.8±7.1 (20.1-48.5)
4-9 months	9	4.18±1.17 (2.41-5.98)	12.2±3.5 (7.2-17.64)***	34.9±6.1 (28.3-44.3)
1-3 years	27	4.54±1.71 (2.24-7.86)	13.2±3.4 (8.0-20.2)***	34.8±11.3 (19.1-60.8)
4-6 years	12	5.33±1.68 (3.39-8.60)	14.5±2.4 (10.9-19.9)	35.4±8.5 (24.5-50.9)
7-12 years	25	4.48±1.19 (2.77-6.38)	14.8±3.3 (9.5-19.1)	30.3±4.6 (22.2-39.2)
13-18 years	14	4.57±1.27 (2.13-6.93)	15.5±2.8 (8.6-19.2)	29.7±7.4 (16.7-47.3)
Adult	21	4.57±1.12 (3.09-7.16)	15.7±3.2 (9.2-19.2)	30.1±7.7 (18.0-46.4)

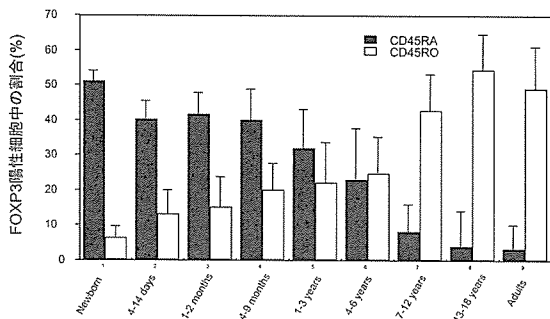
Parentheses indicate the ranges of respective values.

*P<0.0005, **P<0.001, ***P<0.02, ****P<0.03 as compared with adult subjects.

0 (臍帯血)でのみ有意に低値であった(2.87±1.45、P<0.001)。(図1、表1)

2) 乳幼児期早期におけるFOXP3陽性CD25⁺CD4⁺T細胞は主にCD45RA陽性細胞中で認め、加齢と共にCD45RO陽性細胞で優位となった。(図2)

図2 成長に伴うFOXP3陽性細胞のCD45RA、ROの発現の変化

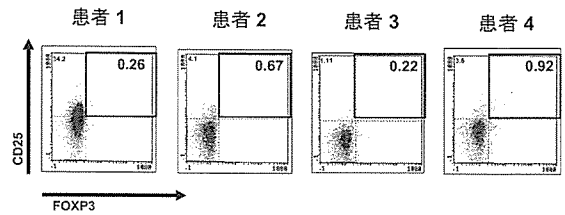


3) FOXP3遺伝子変異(IPEX症候群)全例で、FOXP3陽性CD25⁺CD4⁺T細胞は皆無であった。(表2、図3)

表2 IPEX症候群患者の臨床症状および遺伝子異常

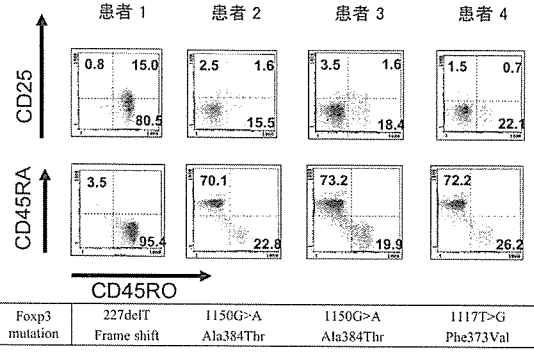
	患者1	患者2	患者3	患者4
発症年齢	5日	2ヶ月	19日	2ヶ月
現在の年齢	15歳	6歳	15歳	3歳
家族歴	あり	あり	あり	なし
FOXP3遺伝子異常	227delT Frame shift Novel mutation	1150G>A Ala384Thr Reported mutation	1150G>A Ala384Thr Reported mutation	1117T>G Phe373Val Novel mutation
初発症状	自己免疫性 甲状腺炎	アトピー性皮膚炎 体重増加不良	好酸球性腸炎 アトピー性皮膚炎	自己免疫性腸炎
現在の合併症	自己免疫性貧血 自己免疫性膵炎 尿管異常 脊髄しよう症	気管支喘息 副腎機能不全	アトピー性皮膚炎	特になし
成長障害	重度	中等度	なし	なし
治療	タクロリムス ステロイド	吸入ステロイド	なし	シクロスポリン γグロブリン

図3 IPEX症候群患者におけるFOXP3陽性CD4⁺CD25⁺T細胞のフローサイトメトリーを用いた解析



4) 変異例でのT細胞の活性化亢進は、FOXP3遺伝子のフレームシフトの異常により典型的なIPEXの臨床症状を有する症例でのみ観察された。(図4)

図4 IPEX症候群患者の表面マーカー(CD25、CD45RA、CD45RO)の比較



D. 考察

今回の研究により出生時から成人に至るまではCD4⁺細胞の4-5%という一定の割合でFOXP3陽性細胞が存在することが明らかとなった。ただし臍帯血では約2.8%と若干少ない傾向が見られた。またFOXP3陽性細胞の表面マーカーが成長に伴いCD45RAのナイーブなphenotypeからCD45ROのメモリーphenotypeに変動していたが、これらの機能的な役割の違いについては今後の検討課題である。またFOXP3遺伝子異常のある患者ではこのモノクローナル抗体ではFOXP3陽性細胞は検出されずスクリーニングとしても有効な手段と考えられた。またフレームシフト異常のある患者では、典型的なIPEX症候群の症状、T細胞の異常な活性化が認められたが、ミスセンスの患者では臨床症状、T細胞の活性化は軽微でありFOXP3遺伝子の異常はgenotypeの違いによりphenotypeの違いになっている可能性が示唆さ