

若年性骨髄単球性白血病様の臨床像を呈した Wiskott-Aldrich症候群の2例

蒲池 吉朗 (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)

吉見 礼美 (名古屋大学医学部造血細胞移植情報管理学)

研究要旨

出生時から血小板減少を示し、乳児期早期より末梢血白血球と単球の増加、巨大血小板を伴う血小板減少、末梢血中の芽球の出現を認め、精査の結果、若年性骨髄単球性白血病 (JMML) と診断された男児2例において、アトピー性皮膚炎様湿疹の出現からWiskott-Aldrich syndrome (WAS) を疑い、WAS protein (WASP) 異常についての解析によりWASの診断に至った。近年WASに骨髄異形成症候群 (MDS) を合併した症例の報告もあり、WASP遺伝子異常の表現型としてJMML/MDS様疾患が存在する可能性が示唆された。JMML/MDS様疾患が疑われる男児において、出生時から血小板減少を認める場合はWASを鑑別診断として考慮するべきであると考えられた。

A. 研究の目的

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) は、小型血小板を伴う血小板減少、難治性湿疹、易感染性を3主徴とする伴性劣性遺伝形式を示す原発性免疫不全症である。その責任遺伝子はWiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) であるが、WASP遺伝子異常による表現型としてWAS以外にX-linked thrombocytopenia (XLT) とactivating mutationによるX-linked neutropenia (XLN) が知られており、またこれらの疾患に骨髄異形成症候群 (MDS) を合併した例の報告もある。しかしながら、WASP遺伝子異常では小型血小板を伴う血小板減少以外に血液像に関する詳細な報告はこれまでほとんどなかった。今回、乳児期早期に末梢血白血球と単球の増加、巨大血小板を伴う血小板減少、末梢血中の芽球の出現といった若年性骨髄単球性白血病 (JMML) 様の症状を呈した2男児例において、アトピー性皮膚炎様湿疹、IgE高値を示したため、WASとの鑑別のためWASP遺伝子異常の有無を検討し、その臨床的、血液学的特徴についても併せて検討した。

B. 研究方法

1. 症例

症例1：正常経膈分娩により出生した8ヵ月男児。妊娠分娩歴にて出生前に双胎の別子が早期胎内死亡。家族歴に特記すべきことはない。日齢3に黄疸出現し、血液検査にて血小板減少 ($4.2 \text{万}/\mu\text{l}$) を指摘され、日齢9より血便が出現した。生後1ヵ月頃より、白血球、単球増加、Hb低下、末梢血に芽球の出現を認め、血便が持続したためA病院入院となった。入院時身体所見では、発育正常、肝臓右季肋下2cm触知、脾臓触知せず、リンパ節腫脹はなかった。入院時検査所見では、WBC $35,500/\mu\text{l}$ (blast 3%, myelo 8%, meta 13%, band 10%, seg 16%, eosino 3%, mono 25%; $8875/\mu\text{l}$, lym 20%, erythroblasts $15/100\text{WBCs}$), Hb 8.9g/dl , Plt $4.4 \times 10^4/\mu\text{l}$ であった。

症例2：正常経膈分娩により出生した4ヵ月男児、妊娠分娩歴、家族歴に特記すべきことはない。出生時に出血斑、血小板減少 ($4.0 \text{万}/\mu\text{l}$) を認め、日齢20日に血便、下痢が出現、生後3ヵ月頃より体幹部のアトピー様湿疹が目立つようになり、精

査のためB病院入院となった。入院時身体所見では、発育正常、肝臓脾臓とも触知せず、リンパ節腫脹もなかった。入院時検査所見では、WBC 15,500/ μ l (blast 2%, myelo 2%, meta 1%, band 2%, seg 32%, eosino 12%, baso 2%, mono 13%: 2015/ μ l, lym 28%, atypical lympho 6%), Hb 10.9g/dl, Plt 4.1 \times 10⁴/ μ lであった。

2. 方法

患者骨髓単核球またはCD34陽性細胞とMethocultGF4434培地、GM-CSFを用いてコロニーアッセイおよびGM-CSF高感受性試験を行なった。末梢血単核球における細胞質内WASP蛋白の発現は、モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー法 (FACS) により解析した。WASP遺伝子異常の解析は、末梢血白血球よりDNAを抽出し、PCRによる各エクソン増幅産物を用いてダイレクトシーケンス法により行なった。

C. 研究結果

症例1、2とも、末梢血液像にて単球増多、芽球、骨髓球系前駆細胞の出現、巨大血小板を認め、骨髓像では骨髓球系造血が優位で軽度の異形成を示し、巨核球にも軽度の異形成を認めた (図1a,b)。コロニーアッセイでは2例ともspontaneous colony試験陽性で、GM-CSFに対する高感受性試験を行なった症例2では陽性であった。2例ともJMML症例の70~80%に変異が認められているPTPN11、N-RAS、K-RAS遺伝子変異は認めず、染色体検査は46XYと正常核型だった。表1に示すように2例ともNiemeyerらのJMML診断基準を満たし、身体所見、検査所見、末梢血/骨髓像から日本小児血液学会MDS委員会中央診断にてJMMLと診断された。しかしながら、症例1において生後8ヶ月ころからアトピー性皮膚炎様湿疹が顕著となり、血小板減少、IgE増加 (494 IU/ml)、男児であることから鑑別診断としてWASPを疑い、WASPについての検討を行った。FACSによるWASP発現解析では、CD3陽性細胞におけるWASP陽性細胞は0.7% (年齢対照正常者: 91.9 \pm 5.0%) と著減しており、遺伝子解析

ではExon4に5塩基挿入(L140fs262X:新規変異)を認めたため、本症例をWASPと診断した。症例2は症例1と同様、出生時からの血小板減少、新生児期からの血便とアトピー性皮膚炎様湿疹、男児であったことから鑑別診断のためWASPについての検討を行った。FACSによるWASP発現解析では、CD3陽性細胞におけるWASP陽性細胞は3.7% (年齢対照正常者: 91.9 \pm 5.0%) と著減し、遺伝子解析ではExon1のR13X変異 (既報告) を認めたため、本症例をWASPと診断した。

D. 考察

今回検討した2例においてはいずれも、乳児期早期 (生後1ヶ月と3ヶ月) に白血球数増多、単球増多、末梢血中の芽球、骨髓球系前駆細胞の出現が認められJMMLとしての特徴と、出生時からの血小板減少や新生児期からの血便と乳児期のアトピー性皮膚炎様湿疹などWASPとしての特徴の両方の臨床症状を示した。一方、2例ともJMMLに特徴的な肝脾腫やHbFの増加を認めず、またWASPに特徴的とされている小型血小板ではなく巨大血小板を認めたため臨床症状からの鑑別は困難であった。そのため、WASPの原因遺伝子であるWASP遺伝子異常につき検討したところ、フローサイトメトリーによる蛋白発現解析で2症例ともWASPの発現が著減しており、遺伝子解析で2例ともstop codonを生じる変異を認めたためWASPの確定診断に至ることができた。

JMMLは、*in vitro*におけるGM-CSFに対する高感受性を特徴とし、乳幼児期に好発する骨髓異形成と骨髓増殖性の性質を合わせ持つ疾患である。JMMLの主な病因として、これまでにGM-CSFレセプターからのRas/ERKシグナル伝達系に位置する3種類の遺伝子 (RAS, PTPN11, NF-1) 変異の関与が報告されている。一方、WASPはすべての造血細胞系統に発現し、造血細胞におけるシグナル伝達系とアクチン重合化による細胞骨格の制御に重要な役割を果たしており、*in vitro*の実験からはヒトの造血幹細胞の分化、増殖に関与することも報告されている。しかしながら、WASPとGM-CSFレセプター/Ras/ERK

シグナル伝達系との機能的な関連についてはこれまで報告はなく、また赤血球および顆粒球造血に対するWASPの役割についても現在のところ不明のままである。これまでWAS/XLTにおける血液異常は小型血小板が特徴的な所見であるが、今回報告の2例ともに末梢血中に巨大血小板が認められた。WASにおける骨髓および末梢血像を詳細に検討した報告は調べた限りでは見当たらず、今後症例を積み重ねての検討が必要と考えられた。

平成19年度第1回当会議での報告後、森尾らは新生児期発症の炎症性腸疾患を合併したMDS（森尾らとの私信）症例において、また我々は乳児期発症のJMML症例においてWASP遺伝子異常の検討からいずれもWASと診断した例を経験した。これまでWASP遺伝子異常による表現型は、小型血小板を伴う血小板減少、難治性湿疹、易感染性を3主徴とする古典的WAS、血小板減少を主症状とするXLTとWASP遺伝子のactivating mutationによる好中球減少を主症状とするXLNが報告されている。また、WASはリンパ球系悪性腫瘍を合併しやすいことが知られているが、骨髓球系悪性腫瘍の報告はこれまで見当たらなかった。しかし最近、今井らにより日本のWAS50例中3例にMDSを認めたことが報告され、これら3例はいずれも乳幼児期に発症し、全例脾腫を伴っていた（今井との私信）ことからJMML様の病態の合併も示唆された。これまで我々の3例と今井、森尾らの4例の計7例のWASがJMML/MDS様疾患として発症していることから、WASP遺伝子異常の表現型として乳幼児期発症のJMML/MDS様疾患が存在する可能性が考えられた。また、我々の3例と森尾らの1例の検討からはWASP遺伝子異常に伴うJMML/MDS様疾患における臨床的特徴として出生直後からの血小板減少と新生児期からの血便が挙げられる。JMMLやMDSが疑われる男児で出生直後からの血小板減少と新生児期からの血便を認める場合は、小型血小板の有無に係わらずWASを鑑別診断として考慮すべきであると考えられた。

E. 結 論

乳児期早期に発症したJMMLと診断されながら、WASP遺伝子異常の検討からWASの確定診断に至った2男児例を経験した。共通の臨床症状としてWASに特徴的な小型血小板は認められず巨大血小板が認められ、出生早期からの血小板減少と血便が特徴的であった。WASP遺伝子異常の表現型としてこれまで報告されていないがJMML（またはMDS）様疾患が存在する可能性が示唆された。JMML（またはMDS）が疑われる男児で出生早期からの血小板減少と血便を認める場合は、小型血小板の有無に係わらずWASを鑑別診断として考慮すべきであると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

Watanabe N, Yoshimi A, Kamachi Y, Kawabe T, Muramatsu H, Matsumoto K, Manabe A, Kojima S, Kato K.

Wiskott-Aldrich syndrome is an important differential diagnosis in male infants with juvenile myelomonocytic leukemia-like features. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007 29:836-838.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

参考文献

1. Ochs HD, Thrasher AJ. The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:725-38
2. Niemeyer CM, Fenu S, Hasel H, et al. Differentiating juvenile myelomonocytic leukemia from infectious disease (Correspondence). *Blood.*1998;91:365-367
3. Devriendt K, Kim AS, Mathijs G, et al. Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet.* 2001;27:313-7.

4. Imai K, Morio T, Zhu Y, et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood*. 2004;103:456-64.
5. Ancliff PJ, Blundell MP, Cory GO, et al. Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood*. 2006;108:2182-9.
6. Kajiwara M, Nonoyama S, Eguchi M, et al. WASP is involved in proliferation and differentiation of human haemopoietic progenitors in vitro. *Br J Haematol*. 1999;107:254-62

恒常活性化型変異L270P WASPを遺伝子導入したヒト白血病細胞株K562のマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル解析

Looi Chungyeng (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)
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

Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) 変異の一つとして知られるL270P WASPは活性化型変異であるが、この変異でなぜ好中球減少がおこるかについての分子機構は十分に解明されていない。まず、我々は活性化型WASP変異がLckなどのチロシンキナーゼで容易にリン酸化されることを示した。このことからY291のリン酸化がおこると顆粒球産生に重要な分子が誘導され、細胞の生物学的活性が変わると予想された。そこで、genechipを用い活性化型変異L270P WASPの影響をK562細胞で調べた。GenechipとRT-PCRの結果から、野生型WASPを安定に発現させたK562細胞ではG-CSF受容体の発現誘導が認められたのに対し、L270P WASPを発現させた細胞ではG-CSF受容体の発現誘導は認められなかった。

A. 研究の目的

Wiskott-Aldrich症候群 (WAS) は血小板減少、湿疹、繰り返す感染症で特徴づけられるX連鎖性の免疫不全症である。WASP遺伝子変異で機能喪失をしめすもう一つの病型としてX連鎖血小板減少症 (XLT) があげられる¹⁾。

最近、X連鎖好中球減少症の原因遺伝子の一つとしてL270P WASPを含む活性化型WASP変異があげられることが示された²⁾。WASP変異と好中球減少症が結びついたことで骨髄異形成の原因となるIle294Thr WASP変異と古典的な重症先天性好中球減少症 (SCN) の原因となるSer270Pro WASPの新しい活性化変異が同定された³⁾。WASPは外からの刺激を受けない限り自己抑制的な構造を取っており、その局在や活性化が抑制されている。このため、WASPがopen conformationを取ったままの状態でのどのような効果や生物学的活性や引き出されるのか、そしてどうして好中球減少の状態になるのかについてはまだよく分かっていない。

細胞の遺伝子発現は周囲の環境の変化に応じて

ダイナミックに変化し、生存や増殖を維持するのに役立っている。細胞のおかれた状況と遺伝子発現の相互作用を解析することで、様々なシグナル伝達に関わる分子の複雑な関係が解き明かされる可能性がある。本研究ではL270P WASPを発現するK562細胞と野生型WASPを発現する細胞を比較し、L270P WASPを発現する細胞ではG-CSF受容体の発現誘導能がないことを示した。

B. 研究方法

1) 遺伝子導入K562細胞株の樹立

pcDNA3.1WASまたはpcDNA3.1WASMutL270Pを 2×10^6 個のK562細胞にGene Pulser II (Biorad)を用い電気穿孔法にて遺伝子導入した。遺伝子導入時の条件は280V 500mFで行った。遺伝子導入した細胞は48well platesに播き $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ のGeneticin (Gibco) で3週間セレクションを行った。生えてきたコロニーをウエスタンブロットで確認した。その後96well plates (Nulgene)を用い限界希釈しシングルクローンを得た。

2) 一過性遺伝子導入法

COS-7細胞に2 μ gのpcDNA3.1 wild-type, Y291F, L270P WASP, vector単独をFugene6 (Roche) で遺伝子導入した。また、2 μ gのwild type lckと共に遺伝子導入する実験も行った。遺伝子導入後、細胞は40-48時間培養し、実験に用いた。

3) RT-PCR

Total RNAはRNeasy mini kit (Qiagen) を用いマニュアル通りに精製した。2 μ gのtotal RNAを用いoligo (dT) プライマーでSuper Script MMLV transcriptase (Invitrogen) によりfirst strand DNAを作成後、Takara rTaqまたはKOD plus high fidelity PCR system (Toyobo) を用いて遺伝子増幅を行った。PCR反応は100ngのsingle-stranded cDNAを鋳型に、5 μ MのG-CSF receptor oligonucleotide primer存在下にTakara Minidice Thermal Cyclerを用いて行った(30 cycles, denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 1 min, annealing at 60 $^{\circ}$ C at 30 sec, extension at 68 $^{\circ}$ C for 1min)。増幅の結果得られたサンプル8 μ lを1.5% agarose gelに流し、ethidium bromide染色しScion imagerで定量化した。

4) cDNA マイクロアレー解析

野生型WASPを遺伝子導入したK562クローンとL270P WASPを遺伝子導入したクローンのWASPの発現レベルをRT-PCRとウエスタンブロットで確認した。Total RNAはRNeasy Mini Kitを用いて精製し、K562細胞株(親株)、K562野生型WASP (was19) 2サンプルとK562 L270P WASP (clone9) 2サンプルをgenechip解析に送った。実験デザインは最初にpair comparisonを行い、次にそれぞれのサンプルを基準としてpair to pair eliminationを行った。グループ分けは以下のように行った;(1)**K562** vs K562WAS, **K562** vs K562 mutant, (3)**K562** vs K562 WAS2, (4)**K562** vs k562 mutant-2, (5)**K562 WAS** vs K562 mutant, (6)**K562WAS** vs

K562WAS2, (7) **K562WAS** vs k562mutant2, (8), **K562WAS2** vs K562 mutant2, (9) **K562WAS2** vs K562 mutant, (10) **K562 mutant** vs k562 mutant2 (Bolded lettersは基準として用いたことを示す)。GeneChipR Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) を用いて解析を行ったが、このgenechipにはほとんどの遺伝子をカバーする約54000プローブが載っている。データ解析はAgilent Genespring viewer softwareを用いた。Candidate genesを選択しRT-PCRで発現を確認した。

C. 研究結果

L270P WASPはLckの存在下で野生型WASPよりも強いY291のリン酸化を受ける。

野生型WASPは外からの刺激が入らない状態でGBD domainと VCA domainが結合し、自己抑制状態を維持している。WASP 291番目のチロシン残基に起こるリン酸化は、この自己抑制的なconformationにより厳格に制御されているため、外からの刺激が入らない限りは、Btk, Lynなどのチロシンキナーゼによる活性化が起こらないような仕組みになっている⁴⁾。これらのキナーゼによるリン酸化にはWASPを活性化する他のシグナル、例えばCdc42を介したシグナルが必要である。L270P WASPはLck存在下で野生型WASPに比べて強くリン酸化を受けており、自己抑制性conformationを形成できないL270P WASPはリン酸化を受けやすいことを示している (Figure1)。

K562細胞にL270P WASPを発現させてもG-CSF受容体 (G-CSFR) は誘導されない。

恒常的にリン酸化を受けたWASPは下流のシグナルにも影響を与えるものと考え、L270P WASPを遺伝子導入したK562細胞株の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイで解析した。Genechip解析の結果、興味深いことにK562WASとK562WAS-2ではG-CSFR mRNAの発現が親株のK562やK562 mutantに比べそれぞれ3.3倍と1.8倍に増強していた (Table 1)。この結果を確

認するために、新たにK562、K562 WAS19クローンおよびK562 mutant9クローンからRNAを精製し、G-CSFRプライマーを用いてRT-PCRを行った。RT-PCRの結果はG-CSFR mRNAがK562 WAS19クローンだけに発現しており、Genechipの結果と矛盾しなかった (Figure 3)。他のK562クローンでも類似した結果が得られるかどうか確認するため、他のクローンを用いて実験を行ったが、全く同様の結果であった (Figure 3)。これらの結果からL270P WASPは骨髄系細胞K562においてG-CSFR発現誘導能がないことが確認された。

D. 考 察

活性型WASPが原因で起こる好中球減少症の報告は、WASPと骨髄系細胞分化との関連について示唆を与える。WASPがTCRからのシグナルに与える影響は良く研究されているが、骨髄系細胞分化に及ぼす役割についてはあまり明らかになっていない⁵⁾。Open conformationをした活性化WASPに多様なシグナル系の様々な分子が結合することは良く知られているが、複雑であり、一つ一つの分子をノックアウトしてどの経路がどのような役割を果たしているかについて調べていくことは現実的ではない。そこで我々はGenechipマイクロアレイを用いて、この変異を発現する骨髄系細胞の遺伝子発現プロファイルを検討することにした。WASPはほとんどの血球系細胞に発現しているが、例外的に骨髄系細胞株K562には発現しておらず、L270P WASPの機能をみるのに適しており、今回の実験で使用した。

これまでの実験結果はGenetipが有効で信頼できるものであることを裏付けるものであった。遺伝子発現プロファイル解析で我々はこれまでにG-CSF受容体など好中球減少を説明することが可能なくつかの遺伝子を同定できた。G-CSFとその受容体を遺伝子欠損したマウスモデルでは骨髄中の顆粒球前駆細胞と骨髄系前駆細胞が減少し、重症の好中球減少となる⁶⁾。このことからG-CSFとその受容体は好中球の発生、分化に重要な役割を果たしていることがわかる。

E. 結 論

我々が今回取り上げたモデルでは活性型WASPが好中球減少をなぜ発症してくるかについて一つの示唆を与える結果が得られた。しかし、細胞株という限られたモデルでは骨髄系細胞の分化で重要な役割を果たすと考えられている全ての遺伝子 (ELA2やGFI1など) を解析することはできない。好中球減少を来す活性型WASPの全体像を把握するためには、WASPと会合することのできる多数の分子と無数の細胞におけるその複雑な相互作用を解明するさらなる研究が必要である。今後、マウスモデルを使った実験や患者の細胞を用いた研究により活性型WASPによる好中球減少の病態を解明していきたい。

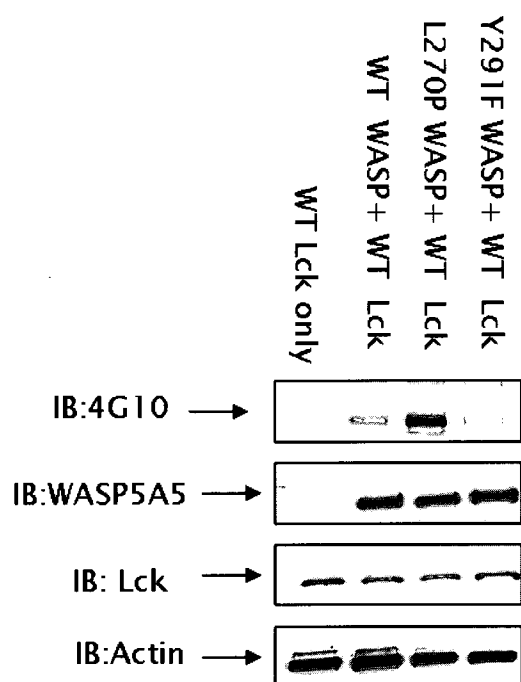
参考文献

1. Derry, J.M., H.D. Ochs, and U. Francke, Isolated of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*, 1994. 78: 635-644.
2. Devriendt, K., et al., Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nature genetics*, 2001. 27:313-317.
3. Ancliff, P. J., Blundell, M. P., Cory, G. O., Calle, Y., Worth, A., Kempinski, H., Burns, S., Jones, G. E., Sinclair, J., Kinnon, C., et al. Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood* 2006. 108:2182-2189.
4. Guinamard, R., et al., Tyrosine phosphorylation of the Wiskott-Aldrich syndrome protein by Lyn and Btk is regulated by CDC42. *FEBS Lett.*, 1998. 434:431-436.
5. Sasahara, Y., et al., Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Molecular Cell*, 2002. 10: 1269-1281.
6. Liu, F., Wu, H. Y., Wesselschmidt, R.,

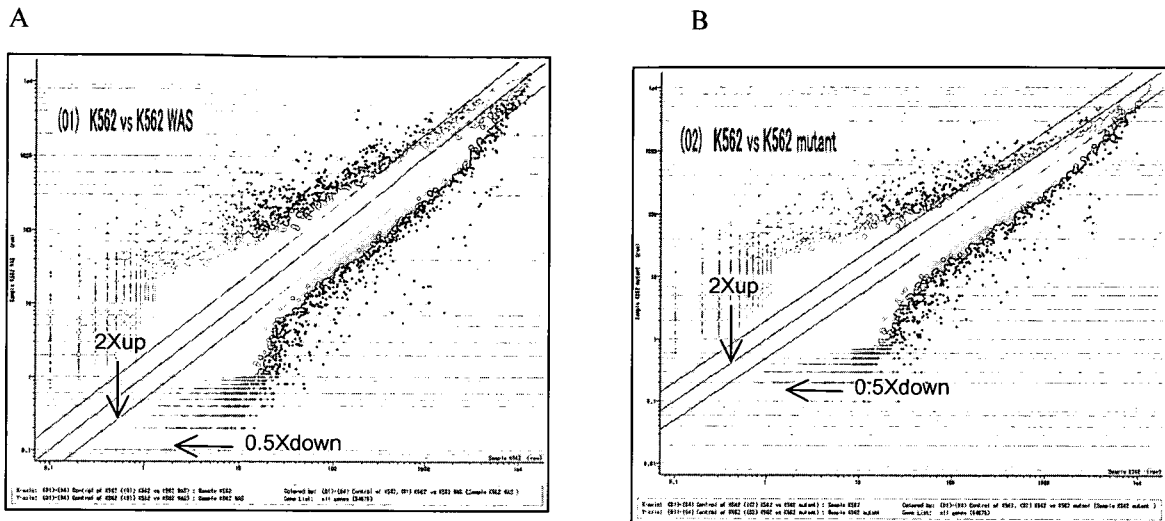
Kornaga, T., and Link, D. C. Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* 1996, 5:491-501.

GeneBank Accession	Gene Name	Data normalized to 1(K562 as standard)				
		K562	K562 WAS	K562mut	K562WAS2	K562mut2
NM_172313	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte, G-CSFR)	1	3.267	0.979	1.845	0.932
NM_000116	tafazzin (Barth syndrome)	1	2.435	6.02	1.512	5.666
NM_001971	elastase 2A	1	0.642	4.501	2.54	4.518
NM_002993	CXCL6 (granulocyte chemotactic protein 2)	1	5.986	0.421	3.725	0.234
NM_004119	fms-related tyrosine kinase 3	1	1.559	11.06	1.905	4.386
U03858	fms-related tyrosine kinase 3 ligand	1	1.827	0.744	1.896	0.952
NM_001806	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	1	0.953	0.364	0.679	0.439

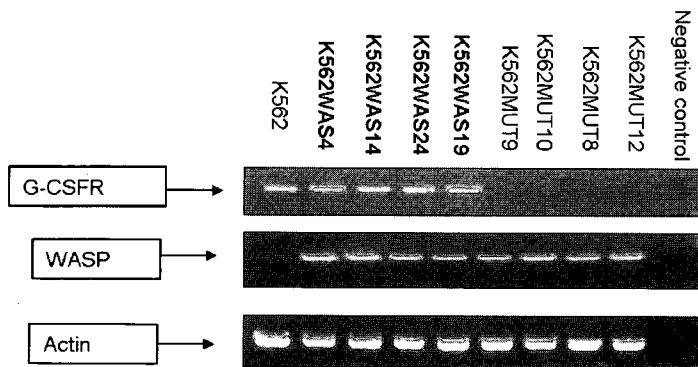
(Table 1) A part of list showing candidate genes after screening of overlapped genes using Genespring software. The final candidate genes were further confirmed using RT-PCR.



(Figure 1) Western-blot showing tyrosine phosphorylation profile of wild-type WASP and L270P WASP and Y291F WASP cotransfected with wild-type Lck in Cos-7 cells.



(Figure 2) Scatter plots showing expression level of genes in two different samples. (A) K562 vs K562WAS, (B) K562 vs K562mutant (Upper line-2 times upregulated; middle line-no changes; Lower line-0.5 times downregulated) Genes that were above upper limit (2Xup) or below lower limit (0.5X down) were selected and the final list of screened genes was listed in Table1.



(Figure 3) Confirmation of microarray results using RT-PCR. Total RNA was extracted from K562, K562WAS19 and K562MUT9 (The same clones sent for Microarray analyses), reverse transcribed and PCR using G-CSFR primers. Total RNA from other clones of wild-type WASP K562 stable clones (K562WAS4, K562WAS14, K562WAS24) and L270P clones (K562MUT12, K562MUT8, K562MUT10) were extracted, reverse transcribed PCR using G-CSFR primers.

任意のMHCクラスI分子を発現するES細胞由来の樹状細胞の作製

千住 覚 (熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野)
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)

研究要旨

我々は、昨年度までの研究により、マウス、カニクイザルおよびヒトの胚性幹 (ES) 細胞から、T細胞刺激活性と抗原提示機能を有する樹状細胞 (ES-DC) を分化誘導する方法を開発している。また、マウスを用いた実験により、遺伝的改変によりその機能を修飾したES-DCが抗腫瘍免疫の誘導、あるいは自己免疫疾患の予防において非常に有用であることを証明している。ところで、一般に再生医療などES細胞由来の分化細胞を用いて治療を行う場合、レシピエントとES細胞の間の遺伝的背景の違いが問題となる。特に、ES細胞とレシピエントの間のHLAクラスI対立遺伝子に不一致がある場合、レシピエント体内のアロHLAクラスI分子を認識する細胞障害性T細胞により、移植した細胞が速やかに排除されてしまうと予想される。そこで、レシピエントの免疫系からアロMHCクラスI分子として認識される内因性のMHCクラスI分子を発現せず、レシピエントと共有したMHCクラスI分子のみを発現するES-DCを作製する手法を開発することを試みた。本年度の研究では、マウスES細胞においてMHCクラスI分子の細胞表面への発現に必須の働きをするTAPおよび $\beta 2$ ミクログロブリンの遺伝子を標的破壊することにより、任意のMHCクラスI分子を発現するES-DCを作製するシステムを樹立した。

A. 研究の目的

我々は、マウス、カニクイザル、およびヒトの胚性幹 (ES) 細胞から、免疫学的機能を有する樹状細胞 (ES-DC) を分化誘導する方法を開発している。また、マウスを用いた実験により、遺伝的改変により機能を修飾したES-DCを生体に移入することにより、個体の免疫応答を制御できることを確認している。

ところで、ES細胞由来の分化細胞を用いて治療を行う際には、レシピエントとES細胞の間の遺伝的背景による組織不適合性が問題となる。特に、ES細胞とレシピエントの間のHLAクラスI対立遺伝子に不一致がある場合、アロHLAクラスIを認識するレシピエント体内の細胞障害性T細胞により、移植した細胞が排除されてしまうと予想される。

この問題を解決するために、レシピエントの免疫系からアロとして認識される内因性のMHCクラスI分子を発現せず、レシピエントと共有した

MHCクラスI分子のみを発現するES-DCを作製するという方法が考えられる。本年度の研究では、MHCクラスI分子の細胞表面への発現に必須の働きをするTAP (transporter associated with antigen presentation) 1および $\beta 2$ ミクログロブリン($\beta 2$ -microglobulin)の遺伝子を標的破壊するという方法をマウスES-DCを用いて検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) $\beta 2$ -ミクログロブリン ($\beta 2m$) 遺伝子欠損ES細胞の作製

$\beta 2m$ は、クラスI分子重鎖と会合する分子であり、この遺伝子を破壊すると全てのMHCクラスIの細胞表面への発現が消失する。今回の研究では、米国ハーバード大学のR. Jaenish博士より、 $\beta 2m$ 遺伝子が標的破壊されたマウスES細胞 (H-2bアレル) の供与を受けた。この細胞から、高濃度G418選択法によりホモ接合のノック

アウト ($\beta 2m^{-/-}$) ES細胞を作製した。さらに、この細胞に、 $\beta 2m$ を共有結合させた H-2dハプロタイプのMHCクラスI分子 (H-2Kd) の遺伝子を導入した。

2) TAP1遺伝子欠損ES細胞の作製

TAPは、細胞質内でプロテアソームによる限定分解により産生された抗原ペプチドをMHCクラスI分子へ負荷させるべく小胞体内へ輸送するポンプの働きをする。TAP遺伝子を標的破壊した細胞では、抗原ペプチドの供給が断たれるため、細胞表面へのMHCクラスI分子の発現がほぼ消失する。このような細胞に細胞外からクラスI分子と結合親和性を有する合成ペプチドを加えることにより、加えたペプチドと当該クラスI分子のみを発現する細胞を作成することができると考えられる。

今回の研究においては、群馬大学の根岸泉博士より、TAP1遺伝子の標的破壊ベクターの供与を受け、E14ES細胞(H-2bアレル)においてTAP1遺伝子の標的破壊を行った。さらに、TAP1欠損ES細胞にH-2dハプロタイプのMHCクラスI分子(H-2Kd)の遺伝子を導入した。

3) ES細胞から樹状細胞への分化誘導および機能解析

以前の研究で開発しているES細胞から樹状細胞への分化誘導法を用いて、上記の遺伝子改変ES細胞からの樹状細胞分化誘導を行った。MHCクラスI分子の発現は、フローサイトメーターで解析した。アロMHCクラスI反応性(H-2d>H-2b)細胞傷害性T細胞の調整は、BALB/cマウスの脾臓細胞とX線照射を行った129系統マウス脾臓細胞を5日間培養したものから、CD8陽性細胞を回収することにより行った。細胞傷害性T細胞の反応は、ELISPOT法あるいはCr遊離試験により解析した。

(倫理面への配慮) 本研究におけるマウスを用いた実験は、熊本大学動物実験委員会の承認を得た実験計画に基づき、動物愛護に配慮しつつ行った。

C. 研究結果

$\beta 2$ -ミクログロブリン ($\beta 2m$) 遺伝子あるいはTAP1遺伝子を欠損ES細胞から作製したES-DCは、MHCクラスI分子の発現を完全に欠損していた。このようなES-DCは、H-2bハプロタイプを認識するアロ反応性細胞傷害性T細胞から認識されなくなった。

$\beta 2m$ を欠損させ、さらに $\beta 2m$ -Kdを導入したES-DCでは、H-2Kdのみが発現していた。この遺伝子改変ES-DCにKdに結合性を有するRespirator Syncytial Virus (RSV) 由来のペプチドを負荷し、BALB/cマウスに投与することにより、H-2KdでRSV特異的な細胞傷害性T細胞を誘導することができた。

TAPを欠損させ、さらに、Kdを導入したES-DCに、上述のRSV由来のペプチドを負荷することにより、Kdのみを細胞表面へ発現させることができた。

D. 考察

以上の結果は、ES細胞における遺伝的改変により、任意のMHCクラスI分子を発現するES-DCを作製することが可能であることを示すものである。さらに、このような遺伝的改変を行ったES-DCをマウス個体に投与することにより細胞ワクチンとしての効果が得られることも確認できた。

E. 結論

ES細胞においてMHCクラスI分子の細胞表面発現に関与する遺伝子を改変することにより、レシピエントに合わせて任意のMHCクラスI分子を発現するES-DCを作製することが可能であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Senju, S., Suemori, H., Zembutsu, H., Uemura, Y., Hirata, S., Fukuma, D., Matsuyoshi, H., Shimomura, M., Haruta, M., Fukushima, S., Matsunaga, Y., Katagiri, T., Nakamura, Y., Furuya, M., Nakatsuji, N., and Nishimura, Y. Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* 25:2720-2729, 2007

Tsukamoto, H., Irie, A., Senju, S., Hatzopoulos, A.K., Wojnowski, L. and Nishimura, Y. B-Raf-mediated signaling pathway regulates T cell development. *Eur. J. Immunol.* in press

Yokomine, K., Nakatsura, T., Senju, S., Nakagata, N., Minohara, M., Kira, J., Motomura, Y., Kubo, T., Sasaki, Y., and Nishimura, Y. Regression of intestinal adenomas by vaccination with heat shock protein 105-pulsed bone marrow-derived dendritic cells in ApcMin/+mice. *Cancer Science* 98 :1930-1935, 2007

2. 学会発表

Genetic engineering of human embryonic stem cell-derived dendritic cells, 13th International Congress of Immunology, August 21-25, 2007, Rio de Janeiro (Brazil)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

自己免疫性リンパ増殖症候群(ALPS)III型における CD95モザイズム

笠原 善 仁 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)
和田 泰 三 (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)
徳山 美 香 (東邦大学医学部佐倉病院小児科)
谷内江 昭 宏 (金沢大学医学部保健学科)
金兼 弘 和 (富山大学医学部小児科)
宮脇 利 男 (富山大学医学部小児科)

研究要旨

ALPSはCD95誘導性細胞死の欠失により、リンパ節腫脹、脾腫、double negative T (DNT)細胞の増加、高 γ グロブリン血症、自己免疫疾患の合併を認めるが、CD95誘導性細胞死が正常で遺伝子異常を認めないALPS III型が存在する。DNT細胞の増加(2%以上)、自己免疫疾患の合併、CD95誘導性細胞死正常からALPS型と診断した日本人症例6例においてCD95遺伝子異常のモザイズムを解析した。5例ではCD95, caspase-8, -10に遺伝子変異を認めなかったが、1例のDNT細胞分画においてintron 7 +1 G→Aによるexon 7 mRNA欠失を認めた。変異特異的PCR法による解析から、変異細胞の存在比率は、DNT細胞は100%、末梢血リンパ球分画、顆粒球、赤芽球、骨髄CD34+細胞では約1-10%であり、ALPS type Imと診断した。さらに口腔粘膜上皮細胞、骨髄繊維芽細胞においても約1%変異細胞が存在し、胚細胞分裂時に発生したde novo CD95遺伝子変異による現時点で報告のないALPS type Imと考えられた。発症年齢、DNT細胞比率、血清可能性CD95L、可能性IL-2R濃度はtype Im症例において典型的type Ia症例のものと同等で、type III症例とは異なり、臨床的にtype Im型を推測する指標と考えられた。

A. 研究の目的

自己免疫性リンパ増殖症候群 (Autoimmune lymphoproliferative syndrome) は、CD95, CD95L, caspase-10, -8の遺伝子変異により、CD95誘導性細胞死システムが機能しなくなることにより発症する。ALPSの診断基準として慢性非腫瘍性リンパ節腫脹、肝脾腫、TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ double negative (DN) T細胞の1%以上の増加、活性化T細胞におけるCD95誘導性細胞死の欠損が挙げられ、自己免疫疾患、家族歴の存在やリンパ節または脾臓の典型的な組織像、CD95, CD95L, caspase-10, -8の遺伝子異常が参考となる。遺伝子変異により、CD95のホモの遺伝子変異 (type 0)、CD95ヘテロ変異 (type Ia)、

CD95L変異 (type Ib)、caspase-10変異 (type IIa), caspase-8変異 (type IIb)に分類される。ALPSとして所見をもつが、遺伝子変異が見いだせないtype IIIが存在すること、さらに近年、このtype IIIの症例においてCD95遺伝子変異の体細胞変異が存在することが報告された。現在まで本邦においてもALPS type 0, type Ia患者が同定してきたが、その中でDNT細胞の増加やALPS臨床症状が存在するにもかかわらず、CD95, CD95L, caspase-10, -8の遺伝子異常が見いだされないtype IIIと考えられる6症例が存在するため、CD95遺伝子変異のモザイクの存在について解析を加え、臨床所見との関連につき検討した。

B. 研究方法

臨床症状および検査所見からALPSが疑われた症例からインフォームドコンセントを得た上で、末梢血を採取、TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻CD8⁻double negative (DN) T細胞比率を解析すると共に、活性化T細胞の作成し、抗CD95抗体添加による細胞死の誘導を解析した。CD95遺伝子変異は、活性化T細胞あるいはEBV不死化B細胞を用いて解析した。Type 1m症例については末梢血からBD IMagにてDNT細胞、CD4⁺, CD8⁺, NK, B, TCR $\gamma\delta$ 細胞および単球、顆粒球を、骨髄からはCD34⁺, glycoporphin A⁺, CD10⁺細胞を分離し、DNAを抽出した。また、口腔粘膜表皮細胞および骨髄由来fibroblastを採取し、変異特異的PCRによって変異細胞比率を半定量化した。

C. 研究結果

日本において解析可能であったALPS症例(表1)は19例であり、全てDNT細胞の増加を認められ、臨床症状では肝脾腫、リンパ節腫脹を大多数の認め、合併疾患は自己免疫性血球減少が最も多く(10/19例)、腎炎、自己免疫性肝炎、血球貪食症候群も認めた。悪性疾患としてHodgkin病が1例認められた。19例中13例はCD95遺伝子変異が同定され、1例はホモの遺伝子変異を有するtype 0、残りは全てヘテロの遺伝子変異によるtype Iaであった。確定した遺伝子変異については、hot spotは認められないが、splice異常が13例中10例と多数を占めた(図1)。19例中6例(表1、No14-19)では活性化T細胞におけるCD95抗体誘導性細胞死は正常と同様であり、CD95のみならず、caspase-10、-8にも遺伝子変異は検出されなかった。

CD95遺伝子変異のモザイクの存在を検討する目的で、DNT細胞を分離し、exon5-9のmRNAのRT-PCR解析したところ、症例14において正常長のバンドに加え短いバンドを認め(図2)、塩基配列解析でexon 7が欠失していること、DNA上検索からintron 7+1G→A変異を同定した。遺伝子変異はDNT細胞においては検出されたが、

活性化T細胞では通常の塩基配列解析では同定されなかった。他の5例においても同様の解析を加えたが、CD95モザイクは検出できなかった。

遺伝子変異モザイクの存在比率が、DNT細胞では100%であったが、その他の細胞においては塩基配列解析からは検出できなかったため、遺伝子変異特異的PCRを設定し、末梢リンパ球分画および骨髄CD34⁺幹細胞などにおける遺伝子変異を有する細胞比率を半定量的に求めた(図3)ところ、顆粒球、単球や骨髄glycophorin A細胞等では1-2%しか存在しなかったが、DNT細胞以外の末梢血リンパ球分画では10%前後存在した。さらに口腔粘膜上皮細胞や繊維芽細胞においても1%程度遺伝子変異が検出された。

臨床的観点からtype IIIとtype Iaを比較検討すると(図4)、発症年齢、DNT細胞比率、血清可能性CD95L濃度で有意な差を認めた。今回見出されたtype 1m症例のこれらの臨床的指標はtype Iaのものに近い値を示した。

D. 考 察

日本人ALPS type III患者5名からCD95遺伝子変異をモザイクに有するtype 1mの1例を日本で初めて同定した。既報告のtype 1m症例では、口腔粘膜や繊維芽細胞などの非血液系細胞においては、遺伝子変異が検出されておらず、血液免疫幹細胞における体細胞変異と考えられている。一方、本症例においては、外胚葉、中胚葉由来の口腔粘膜上皮細胞や繊維芽細胞において変異が存在し、胚細胞分裂時におけるde novoの変異によるモザイクである点が特徴的な症例であった。

ALPSにおいて増加が特異的であるDNT細胞では、本症例では一番変異細胞比率が高く、その他のリンパ球亜群において10%前後の変異が存在し、CD95/CD95Lシステムによる細胞死機構が生体内で機能している細胞であることが間接的にはあるが示される。Germ-line遺伝子変異が検出されない場合、DNT細胞の検索がtype 1mの診断には必要と考えられる。一方、DNT細胞に増加が認められたが、モザイク変異も見出されなかったtype III4症例では、type Ia, 1mと可能性CD

95L, DNT細胞比率、発症年齢等の臨床的マーカーでも異なる点があり、CD95特異的細胞死以外の細胞死誘導システムの異常や最近報告されたNRAS変異によるtype IVの可能性の検索が必要を思われた。

参考文献

- 1) E Holzlova, C Vonarbourg, MC Stolzenberg., PD. Arkwright, F Selz, AM Prieur, S Blanche, J Bartunkova, E Vilmer, A Fischer, F Le Deist, and F Rieux-Laucat. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N Eng J Med*, 351:1409-18, 2004.
- 2) Rossler J, Enders A, Lahr G, Heitger A, Winkler K, Fuchs H, Kopp M, Niemeyer C, Ehl S. Identical phenotype in patients with somatic and germline CD95 mutations requires a new diagnostic approach to autoimmune lymphoproliferative syndrome. *J Pediatr*. 147:691-4, 2005.
- 3) J. B. Oliveira, N. Bide`re, JE. Niemela., Lixin Zheng., K. Sakai, C.P. Nix, R. L. Danner, J. Barb, P.J. Munson, J.M. Puck, J. Dale, S.E. Straus, T.A. Fleisher and M.J. Lenardo. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Am Soc*. 104;8953-8958, 2007.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) リンパ球のみにCD95 (Fas) 体細胞性遺伝子変異を有する自己免疫性リンパ増殖症候群。徳山美香, (下平佳代子: 東邦大学第一小児科), (内野由美子), 和田泰三, (小原 明: 東邦大学輸血部), (月本一郎), 笠原善仁, 小泉晶一. 第110回日本小児科学会学術集会 (2007, 4, 20~22, 京都)
- 2) 自己免疫性リンパ増殖症候群(ALPS)におけるDNT細胞の表面抗原発現パターンをTCR repertoiresの多様性の検討。(徳山美香: 東邦大学医療センター佐倉病院小児科), (小原 明: 東邦大学医療センター大森病院輸血部), (石田也寸志: 愛媛大学小児科), (脇口 宏: 高知大学小児思春期医学), (稲井郁子, 真部 淳: 聖路加国際病院小児科), (野田幸弘: 関西医科大学小児科), (杉田完爾: 山梨大学小児科), (金兼弘和: 富山医科薬科大学小児科), 笠原善仁, 小泉晶一. 第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会 合同開催 (2007, 10, 11~13, 横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

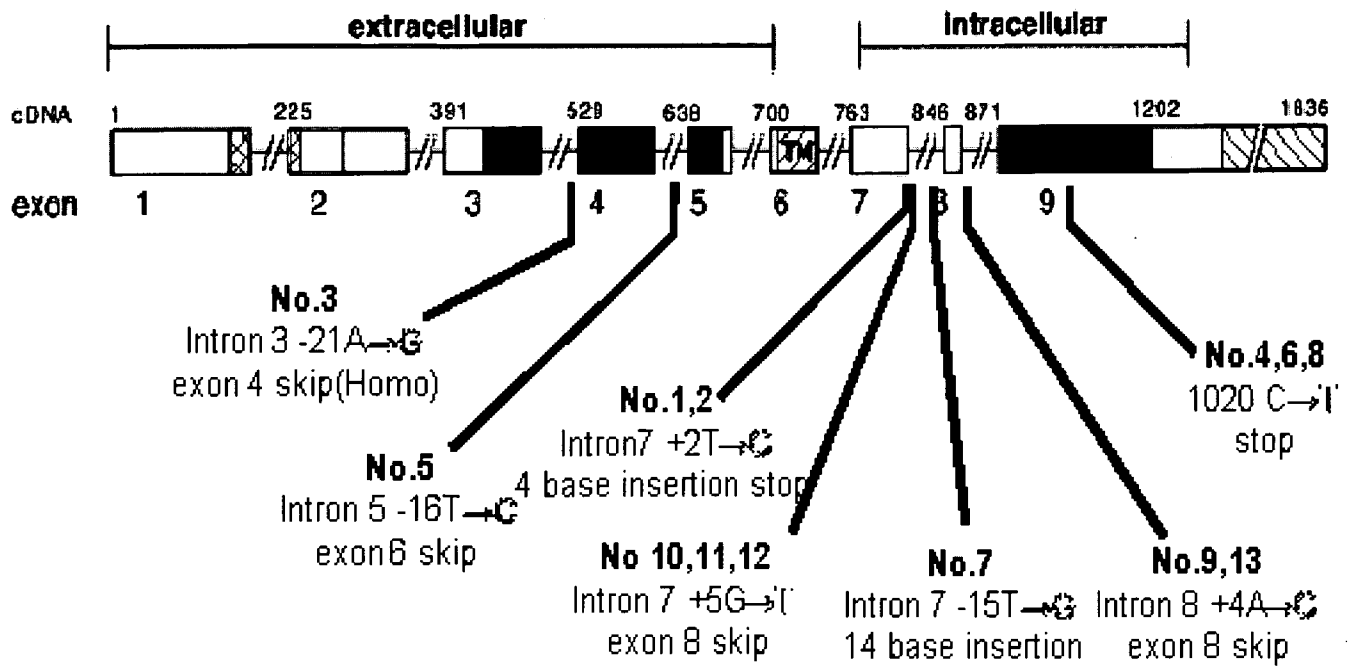


図1 日本人ALPSにおけるCD95遺伝子変異

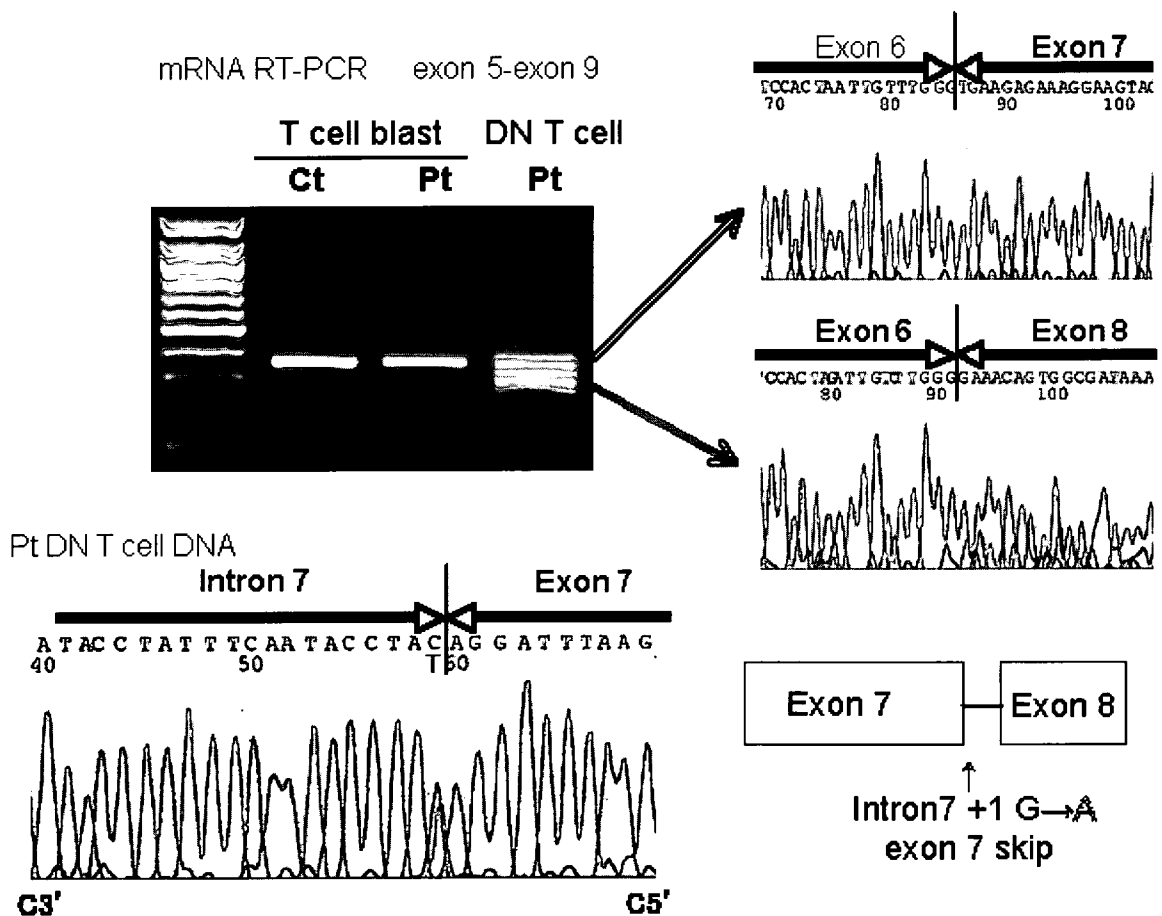


図2 ALPS type 1m症例におけるCD95遺伝子変異

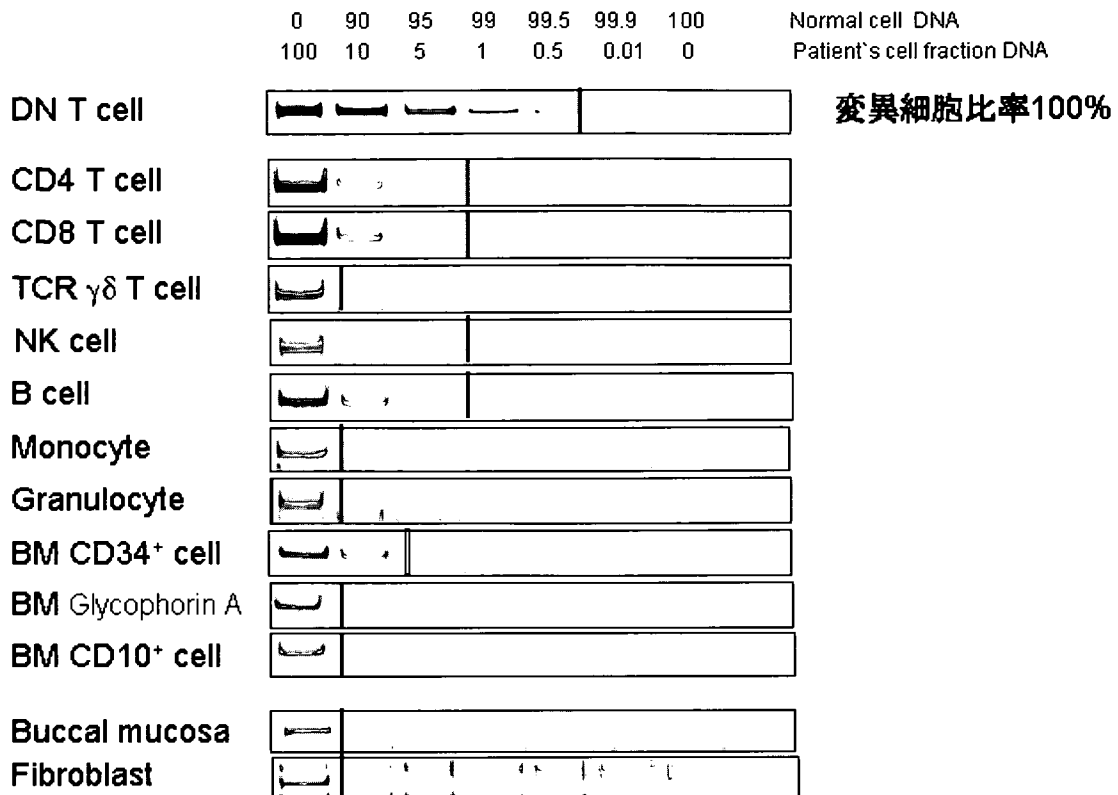


図3 type Im症例の各種細胞におけるCD95変異細胞比率の解析

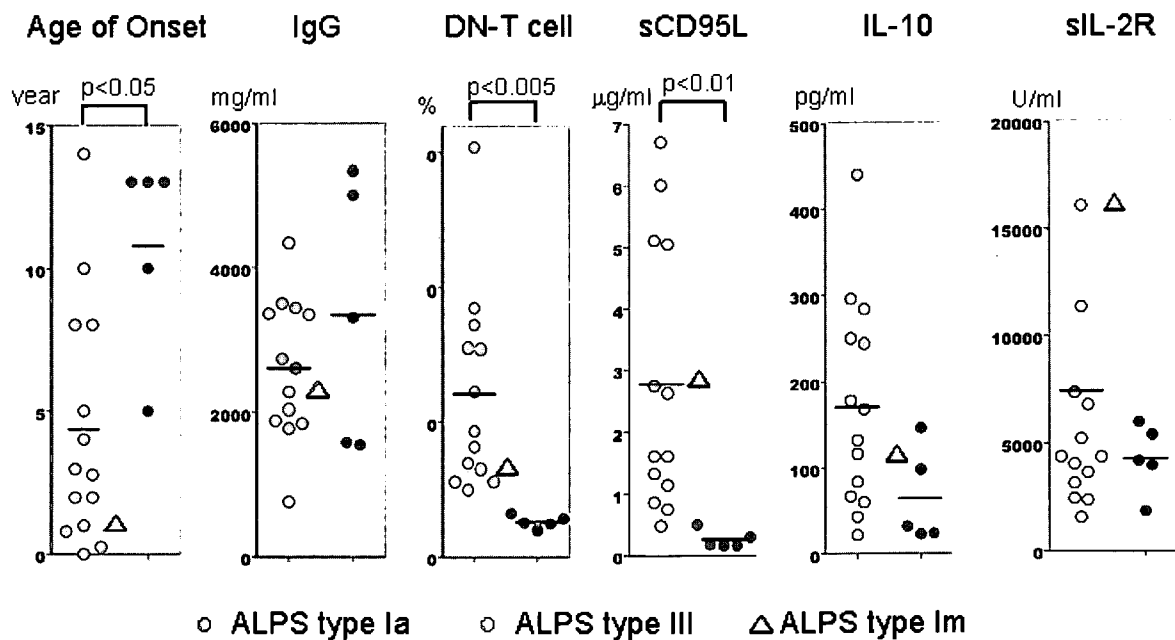


図4 ALPS型別の各種指標の相違

No	年齢(m)/ 性	家族歴	肝臓/脾臓/リンパ節	疾患	DN T cells (%)	Type
1	8 / F	+	++/+/++	AIHA, ITP, Hodgkin	8.1	Ia
2	30 / M	+	+/+/+	ITP, Germinoma	5.6	Ia
3	0 / F	-	++/+/++	Hydrops fetalis	6.4	0
4	86 / F	-	-/-	ITP	9.3	Ia
5	156 / M	-	-/+/++	MPGN	30.4	Ia
6	24 / M	-	+/+/+	EBV-related	6.5	Ia
7	1 / M	-	+/+/++	AIHA, ITP	14.2	Ia
8	/ M	-	++/+/++		18.5	Ia
9	3 / M	+	+++/+/+/++		17.2	Ia
10	/ F	+	-/+/	ITP	6.9	Ia
11	/ M	+	-/+/	ITP	15.4	Ia
12	36 / M	-	+/+/+		15.5	Ia
13	12 / F	-	+/+/+		12.2	Ia
14	9 / F	-	+/+/++	AIHA	5.6	III
15	156 / F	-	-/+/+	AIHA	2.4	III
16	156 / F	-	+/-	AIH	3.2	III
17	156 / M	-	/+/++	AN, ITP	2.0	III
18	93 / F	-	++/+/+	AIH	2.8	III
19	96 / M	-	+/+/+	HLH	2.8	III

表1 日本人ALPS症例の臨床的特徴

IgG1受容体の正常B細胞発現を呈するIgG1欠損症

上 松 一 永 (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)
伯 耆 原 祥 (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)
伊 藤 哲 郎 (伊藤内科医院)
菅 根 一 男 (信州大学医学研究科感染防御学)

研究要旨

症例は成人女性。大学生の頃にかぜをひきやすかったため近医を受診し、血清IgG値の低下を認めた。IgGサブクラス検査でIgG1欠損がみられたが、他の免疫学的所見に異常はなかった。血清IgG1値は、種々の検査法でも検出感度以下であり、その後生まれた男児においても母親からのIgG1移行抗体はみられなかった。興味深いことに、患者記憶B細胞の一部は、IgG1を正常人と同じように表面に発現していた。また、In vitroで患者B細胞は、さまざまな刺激下においてIgG1を産生した。サザンブロット解析では、重鎖免疫グロブリン遺伝子 $\gamma 1$ を含み欠損はなく、sequence解析では、 $\gamma 1$ 遺伝子CH1, CH2, CH3領域に遺伝子変異はなかった。 $\gamma 1$ 遺伝子のmembranous domain (M1, M2)にも変異はなかった。IgG1受容体のシグナルも確認された。Homozygousに新奇な遺伝子変異があり、母親も保因者であった。膜IgG1受容体が正常で分泌型IgG1が欠損する新たな抗体不全症を報告する。

A. 研究の目的

IgGサブクラスは、IgG1, IgG2, IgG3, IgG4で構成され、細菌などの病原微生物に対する感染防御として、サブクラス毎に重要な役割を担っていると考えられる。特にIgG2欠乏症では、肺炎球菌やインフルエンザ菌による下気道感染症や中耳炎を繰り返す。IgG2欠乏症の多くは一過性であり、1歳6ヵ月ほどで改善することが多い。持続性のIgGサブクラス欠損症の原因として、重鎖免疫グロブリン遺伝子の広範囲の欠損例がみられる。ヨーロッパなどでの報告が多いが、本邦においても見い出されている。これに対して、ポイント変異はきわめて少なく、IgG2欠損症の2例のみである(1, 2)。1例は本邦例で岐阜大学小児科の症例である(1)。IgG2遺伝子の分泌型は正常であるが、膜結合型の膜部分およびサイトプラスミックドメインができないため、膜結合型のIgG2ができない、その結果として血清IgG2が完

全欠損している症例である。

$\gamma 1$ 遺伝子はCH1, CH2, CH3領域からなり、興味深い構造としてCH3 exon内に分泌型と膜型を区分する部分がある。分泌型は8塩基ほどの付加であるが、膜型はCH3からさらに下流のmembranous domain (M1, M2)に結合して膜結合部分(M1)と細胞質ドメイン(M2)を構成する。膜結合型の免疫グロブリンの重要性については、ノックアウトマウスを用いた研究によって証明がなされている(2, 3)。IgG1あるいはIgEの膜部分を欠損させたもので、ともにマウス血清中のIgG1あるいはIgEが著減している。細胞表面の免疫グロブリン受容体がないとin vivoで血清免疫グロブリンが産生されないことを証明している。

IgG1欠損症は、IgG2欠損症よりも少なく、重鎖免疫グロブリン遺伝子の広範囲の欠損例が報告されているのみである。膜IgG1受容体は正常であるが、血清IgG1が検出されない症例を報告する。