

め、Btk, ADA, RAG1/2, LIG4では陰性となると考えられる。

今回、我々はT細胞欠損、B細胞欠損を早期発見し、感染症発症前の早期治療に結びつけるため、TRECs, KRECs測定により新生児期にスクリーニングすることを目的として以下の研究を行ったので報告する。

B. 研究方法

T細胞欠損、B細胞欠損を早期発見し、より低リスクの治療に結びつけるため、新生児期にスクリーニングする方法を確立することを目的として以下のことを行った。1) TRECsとKRECsの絶対定量法を開発。2) 新生児期のKRECsを測定、基準値を作成。3) SCID、agammaglobulinemia患者のTRECs、KRECsを測定。なお、本研究は、防衛医科大学校倫理委員会の承認済みであり、患者・家族・健常児からは十分な説明のもと、文書による同意を得ている。小児の採血は、医療上必要な採血時にごく少量を同時に採取した。

正常産新生児臍帯血、新生児濾紙血を採取した。また臍帯血より濾紙血を作成した。gDNA濃度5ng/ μ l未満を除外し、臍帯血87例、臍帯血濾紙血78例、新生児濾紙血60例を検討した。健常者末梢血53例(男:女 25:28、年齢23 \pm 36歳(1か月~55歳)、gDNA濃度26.3 \pm 19.7(11.5~59)ng/ μ l)も同様に検討した。

無 γ グロブリン患者は12例(男:女 10:2、年齢 新生児濾紙血~33歳、gDNA濃度28.5 \pm 35.2(6.1~58.8)ng/ μ l)を解析した。

SCID患者は21例。IL2RG 15例(男:女 15:0、年齢 新生児濾紙血~1.6歳、gDNA濃度25.1 \pm 34.6(5.4~73.5)ng/ μ l)、JAK3 2例(女1例、性別不明1例、年齢 新生児濾紙血~6か月、gDNA濃度8.7 \pm 3.8(5.9~13.0)ng/ μ l)、LIG4 2例(男:女 1:1、年齢 2~4歳、gDNA濃度11.7 \pm 10.6(7.9~15.4)ng/ μ l)、ADA 2例(男:女 2:0、年齢 1か月~3か月、gDNA濃度5.9 \pm 0.2

(5.8~6)ng/ μ l)を解析した。ガスリー血は、母由来T細胞生着のX-SCID1例を含む7例で入手できた。

臍帯血や末梢血はEDTA血として100 μ l、ガスリー血は直径6mm大にpunch-outした濾紙血2枚をサンプルとして、キットを用いてDNAを抽出した。DNA濃度を測定した上で、TRECs、cjKRECs、sjKRECs、内在性コントロールとしてRNasePを同時に定量し、コピー数を1 μ gDNAあたりに換算、統計学的解析を加えた。DNA濃度は5ng/ μ l以上を対象とした。

Real time PCRは、濃度の分かっているstandardサンプルと未知サンプルを同じ条件でPCRし、各サイクルでの増幅を検出した。Standardの増幅曲線から標準曲線を引き、未知サンプルの濃度を求めた。

C. 研究結果

正常コントロール

健常新生児(在胎38.8 \pm 3.0(35~41)週、出生体重3076 \pm 972(1870~4195)g)の臍帯血87例を採取した。また臍帯血より濾紙血を作成した。gDNA濃度5ng/ μ l未満を除外し、臍帯血87例、臍帯血濾紙血78例、新生児濾紙血60例を検討した。健常者末梢血53例(男:女 25:28、年齢22 \pm 33歳(1か月~55歳)、gDNA濃度26.3 \pm 19.8(11.5~59)ng/ μ l)も同様に検討した。

免疫不全症のない臍帯血、末梢血で検討すると内因性コントロールのRNasePは年齢による差はなく、TRECs、cjKRECsおよびsjKRECsはngDNAあたりとRNasePあたりで正の相関が認められた。また、TRECs、cjKRECs、sjKRECsいずれも全例で検出できた。

cjKRECsは新生児期は9.3 \pm 16.4 copies/ngDNAと他の年齢層より低く、乳児期(2歳未満)で146 \pm 209 copies/ngDNAと最も高値を示した。幼児期以降は徐々に低下する傾向が認められた。同様にsjKRECsは新生児期は2.0 \pm 3.1 copies/ngDNAと他の年齢層より低く、乳児期(2歳未満)で

24.7±32.5copies/ngDNAと最も高値を示した。幼児期以降は徐々に低下する傾向が認められた。

無 γ グロブリン血症患者

無 γ グロブリン血症患者は12例(男:女10:2)。初回検査年齢 新生児濾紙血~33歳。検体数 新生児濾紙血4例、末梢血27例。gDNA濃度 25.5±29.4(5.1~58.8)ng/ μ l)の解析をした。内因性コントロールのRNasePは健常者と同等であった。

TRECsはすべて年齢相応の正常値を示していた。

cjKRECs、sjKRECsは新生児濾紙血では全例検出感度以下だった。

2歳未満においてcjKRECs(1.0±1.8copies/ngDNA)、sjKRECs(0.73±1.71copies/ngDNA)は検出されたが、それぞれ健常者より有意に低値だった。2歳以上ではほとんどが検出感度以下で、1例のみsjKRECが少量検出された(0.326copies/ngDNA)が、この症例も1カ月前と1カ月後の検体では検出感度以下だった。

SCID患者

SCID患者の新生児濾紙血では、全例で内在性DNA量コントロールとしてのRNasePは健常者と有意差なく、全例検出可能だった。TRECsは、maternal T陽性例を含め全例ごく低値ないし検出感度以下であった。また、乾燥濾紙血が入手できたIL2R欠損SCID、JAK3欠損SCIDでは、cjKRECs、sjKRECsは全例検出可能で健常者と有意な差は認めなかった。

SCID患者の末梢血では、RNasePは全例検出可能で健常者と有意差はなかった。TRECsは、含め全例ごく低値ないし検出感度以下であった。cjKRECs、sjKRECsはIL2RG欠損SCID、JAK3欠損SCIDでは、全例検出可能で健常者と有意な差は認めなかった。LIG4欠損SCID、ADA欠損SCIDでは検出感度以下だった。

D. 考 察

T細胞は胸腺内でまず β 鎖の再編成が起こり、preTCR α 鎖と β 鎖が発現する。その後、 α 鎖の再編成が起こり、この時に α 鎖遺伝子の中に位置する δ 鎖が切り出され、TRECが形成される。測定するTRECは、T細胞胸腺内分化、すなわちT-cell receptorの遺伝子再編成の過程で、 α 鎖遺伝子内に位置する δ 鎖遺伝子が除去される結果、環状DNAとして切り出される。TRECsはT細胞の分化・増殖により複製されることなく、細胞死するまで安定して存在するため、新生T細胞のマーカーとされる。これまでにTRECを用いたSCIDの新生児マススクリーニングや移植後のT細胞機能評価、フォローアップについて報告があるが、今回の結果からも、乾燥濾紙血を用いたTREC定量法SCIDの新生児マススクリーニングに有効であると考えられた。

B細胞の成熟過程においてまず、H鎖遺伝子の再編成が起こり、その後Pre B細胞の段階でL鎖遺伝子の再編成が起こる。このL鎖再編成は κ 鎖、 λ 鎖の順に起こる。 λ 鎖再編成時あるいは κ 鎖のallelic exclusionの際、KRECが形成される。 λ 鎖再編成時あるいは κ 鎖のallelic exclusionの際、 κ 鎖が染色体DNAから切り出され、環状DNAであるsj(signal joint)KRECsが形成され細胞内ではあるが染色体外に放出される。Heavy鎖が有効な遺伝子再構成ができると、次に κ 鎖の再編成が始まる。 κ 鎖のVJ再編成が無効の場合、その κ 鎖を発現させないために κ 鎖定常領域のC κ を含む領域が染色体から切り出される。この切り出されたものがsignal joint KREC、染色体内に残存した配列がcoding joint KRECである。sjKRECsは染色体外にあるため複製されず、細胞分裂を繰り返すと段階希釈されていく。また、再構成された染色体DNAにはcj(coding joint)KRECsが形成され、これは分裂時複製されるため希釈されない。cjKRECsはB細胞の約50%に存在することになり、一方sjKRECsは新生B細胞の数を反映することになる。KRECsを測定するこ

とてB細胞の絶対数と新生能を同時に評価することができる。これまでB細胞欠損症の有効なスクリーニング法について報告はないが、今回の検討で、KRECs測定がB細胞欠損症のスクリーニングに有効と考えられた。

E. 結論

TRECs, KRECsの測定は、T細胞・B細胞欠損症の早期発見、早期診断、早期治療に有用であり、新生児スクリーニングに応用可能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

1. Tsuji Y, Kogawa K, Imai K, Kanegane H, Fujimoto J, Nonoyama S.

Evans syndrome in a patient with Langerhans cell histiocytosis: possible pathogenesis of autoimmunity in LCH. *Int J Hematol.* 2008 87:75-77.

2. Tsuji Y, Tokimatsu I, Sugita T, Nozaki M, Kobayashi D, Imai K, Kogawa K, Nonoyama S.

Quantitative PCR assay used to monitor serum *Trichosporon asahii* DNA concentrations in disseminated trichosporonosis.

Pediatr Infect Dis J. 2008 27:1035-7.

3. Fujimoto M, Imai K, Hirata K, Kashiwagi R, Morinishi Y, Kitazawa K, Sasaki S, Arinami T, Nonoyama S, Noguchi E.

Immunological profile in a family with nephrogenic diabetes insipidus with a novel 11 kb deletion in AVPR2 and ARHGAP4 genes.

BMC Med Genet. 2008 9:42.

4. Matsuo H, Chiba T, Nagamori S, Nakayama A, Domoto H, Phetdee K, Wiriyaermskul P, Kikuchi Y, Oda T, Nishiyama J, Nakamura T, Morimoto Y, Kamakura K, Sakurai Y, Nonoyama S, Kanai Y, Shinomiya N.

Mutations in glucose transporter 9 gene SLC2A9 cause renal hypouricemia.

Am J Hum Genet. 2008 83:744-51.

5. Matsumoto H, Kamae C, Kanai T, Asano T, Wakamatsu H, Nonoyama S.

Molecular detection of anaerobic streptococcus from the cerebrospinal fluid of a patient with a brain abscess.

Pediatr Infect Dis J. 2008 27:1120.

6. Keerthikumar S, Raju R, Kandasamy K, Hijikata A, Ramabadrans S, Balakrishnan L, Ahmed M, Rani S, Selvan LD, Somanathan DS, Ray S, Bhattacharjee M, Gollapudi S, Ramachandra YL, Bhadra S, Bhattacharyya C, Imai K, Nonoyama S, Kanegane H, Miyawaki T, Pandey A, Ohara O, Mohan S.

RAPID: Resource of Asian Primary Immunodeficiency Diseases.

Nucleic Acids Res. 2009 ;37(Database issue):D863-7. Epub 2008 Oct 8.

7. Tsuboi S, Takada H, Hara T, Mochizuki N, Funyu T, Saitoh H, Terayama Y, Yamaya K, Ohyama C, Nonoyama S, Ochs HD.

FBP17 mediates a common molecular step in the formation of podosomes and phagocytic cups in macrophages.

J Biol Chem. 2009 Jan 20. [Epub ahead of print]

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

好中球二次顆粒欠損症の臨床経過と簡易診断法の確立

重村 倫成 (信州大学医学部小児医学講座)

塩原 正明 (信州大学医学部小児医学講座)

上松 一永 (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

好中球二次顆粒欠損症は、転写因子C/EBP ϵ の異常によって二次顆粒が欠損し、黄色ブドウ球菌などの化膿性感染症を反復する疾患である。皮膚膿瘍から菌血症および肺膿瘍を合併した症例の臨床経過と、フローサイトメトリーによる本症の簡易診断法について報告する。症例はC/EBP ϵ 変異(A-nucleotide insertion at nt 1,113)の32歳、女性。顔面右側に膿痂疹が出現し増大した。病巣および血液培養から黄色ブドウ球菌が検出された。肺膿瘍も合併したが、皮膚創部の壊死組織除去と肺の外科的な治療をせずに抗生物質の投与で改善した。フローサイトメトリーによる解析では、一次顆粒のdefensin、二次顆粒の18-kDa cationic antimicrobial protein (CAP18)、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)、lactoferrinの著明な発現低下を認めた。本症は、黄色ブドウ球菌感染に対して抗生物質のみで完治が可能であった。また、細胞内のdefensinなどの検出が早期診断法としてきわめて有効と考えられた。

A. 研究目的

好中球二次顆粒欠損症 (Neutrophil secondary granule deficiency, SGD) は、lactoferrin, neutrophil collagenase, transcobalamin など、好中球内に生成されるべき二次顆粒物質のみならず、一次顆粒中の殺菌タンパクであるdefensinsや三次顆粒タンパクであるgelatinaseが、先天的に著減または欠損することに起因する免疫不全症である^{1,2)}。現在までに世界で5例の報告がある。本疾患の原因としてこれら一連のタンパク生成を転写レベルで制御する分子の異常が示唆されてきた^{3,4)}。DNA binding region と leucine zipper dimerization domain をもつ転写因子であるCCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) family のひとつであるC/EBP ϵ は、骨髄球系造血前駆細胞から好中球への分化、成熟に重要な分子であることが最近の研究から明らかとなってきた⁵⁻⁹⁾。またC/EBP ϵ knockout マウスの好

中球が示す、核の形態異常、成熟障害、機能異常はSGDにおける好中球異常と類似する¹⁰⁻¹³⁾。実際、本邦における自験例を含め2例のSGDにおいてC/EBP ϵ の変異が報告されたことから、本症の原因のひとつとしてC/EBP ϵ が注目されている^{14,15)}。しかしながら、本症は前述のごとくその症例数が不明なため臨床所見が把握されていない。本研究では、当科で長年フォローアップしている好中球二次顆粒欠損症患者の感染症経緯を報告する。さらに、好中球顆粒の存在の有無を短時間で検出するサイトメトリーによる本症の簡易診断法を確立したので報告する。

B. 研究方法

患者は、32歳、女性。主訴は発熱、全身倦怠感、顔面右側の腫瘍。既往歴は乳児期より中耳炎、皮膚膿瘍、肺炎などを反復し、21歳時に肺膿瘍のため入院。家族歴では、兄も易感染

性を認める。現病歴は、顔面右側に膿瘍疹が出現した。自宅で消毒をしながら様子を見ていたが、次第に増大し、5日後に発熱、全身倦怠感も出現した。顔面の腫瘍は右眼がほとんど開けられないほど増大し、経口摂取もほとんどできなくなり、一週間後に当科外来受診し入院した。

細胞内顆粒の検出方法；ヘパリン血を1抗体1チューブあたり100 μ l入れる。DAKOの固定液 reagent Aを同量入れて混和後、15分間室温で放置。PBSで洗浄後に、各蛋白に対する抗体を添加、さらに permialization のための reagent Bを100 μ l入れて4℃で15分放置。洗浄後 FITC ラベル goat anti-mouse IgG を加えて、4℃で15分放置。さらに、PerCP ラベル CD45 抗体をくわえて4℃で15分放置。洗浄後にフローサイトメーターで解析した。

C. 研究結果

1. 自験例では、exon 2 の1,113番目のスクレオチドにA塩基の挿入をホモ接合体で認めた¹⁵⁾。この frameshift mutation により、すべての C/EBP ϵ isoform、p32、p30、p27、p14 において dimerization domain と DNA binding region を欠いた転写活性のない truncated form が生じていた。自験例の両親の解析では、同じ C/EBP ϵ 変異をそれぞれがヘテロでもつことが確認された。また C/EBP ϵ 遺伝子近傍の microsatellite marker を用いた解析で、変異 C/EBP ϵ をもつと考えられるアレルの、両親のシグナルは共通であることからこのアレルは共通の祖先から受け継がれたものであることが示唆された。以上のことはこの疾患が劣性遺伝形式をとることを示唆する(過去の解析結果)。

2. 治療経過；皮膚膿瘍培養および血液培養から黄色ブドウ球菌が検出され、皮膚から血液を介して黄色ブドウ球菌が播種したものと判断した。頭部CTおよび胸部CT写真では膿瘍様の陰影がみられた(図1)。

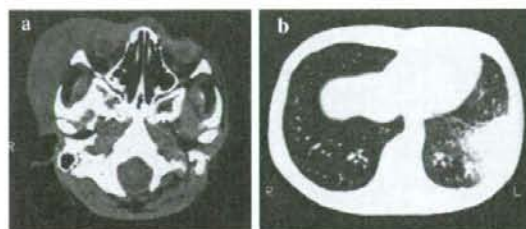


図1 感染時の画像所見 (a)頭部CT写真：右眼近くにてきた広範囲な皮下の腫瘍は、内部に明らかな cystic portion を認めず、膿瘍形成を疑う所見に乏しいことから蜂窩織炎と考えた。炎症は右側頭筋、咬筋、眼瞼に波及していたが、眼窩内脂肪は clear であり、そこまでは炎症は波及していないと考えられた。(b)胸部CT写真：左下肺野の density の高い浸潤影以外に小さな結節影を全肺野の末梢域に散在性に認め、敗血症性肺炎の合併と考えた。

図2に示すとおり、抗生物質および抗真菌剤の多剤併用投与を行ったところ、CRPの低下が徐々に認められ、全身状態の改善、肺陰影の改善がみられた。

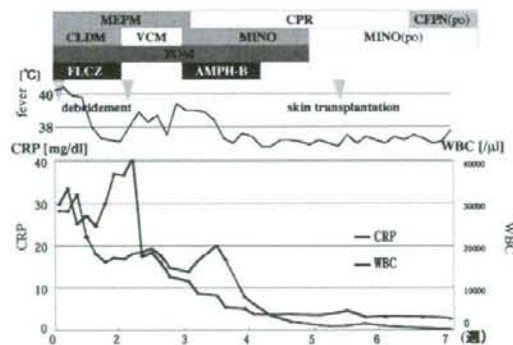


図2 治療経過 抗生物質に反応がよく、debridement と skin transplantation の併用によって治癒できた。

皮膚膿瘍に関しては、debridementを行い、さらに皮膚移植を行った。1か月ほどで黄色ブドウ球菌の排除および炎症所見の消失を認め、感染症の治療は治癒できた。

3. 患者の好中球の核はPelger-Huët様であり、電顕ではbleb, cleft, pocketなどを認める。細胞質では二次顆粒が欠損するとともに、一次顆粒では、電顕上、defensinsを含有する大型で高電子密度顆粒が欠損し、小型で電子密度の低い顆粒に置き換わっている。遊走能、解離能、走化性因子レセプター数の増加、殺菌能などにおける好中球機能異常が報告されているが、これらは好中球二次顆粒欠損および一次顆粒物質の異常に起因する。すなわち、図3に示すように、二次顆粒関連の殺菌性タンパクでは、lactoferrin, transcobalamin I, collagenase, cytochrome bが著減する。膜alkalinephosphataseも低下する。一次顆粒関連の殺菌性タンパクでは、defensinsが欠損する。Defensinには、 α 、 β 、 θ の3種類のアイソタイプが存在するが、ヒト好中球は、 α -defensinを発現し、上皮細胞は β -defensinを発現する。ヒトdefensinsにはhuman neutrophil peptide: HNP 1-4が存在するが、自験例ではこの4種類全部の欠損が認められた。三次顆粒タンパクのgelatinaseも低下する。一方、一次顆粒タンパクであるmyeloperoxidaseやlysozymeの発現は保たれる。

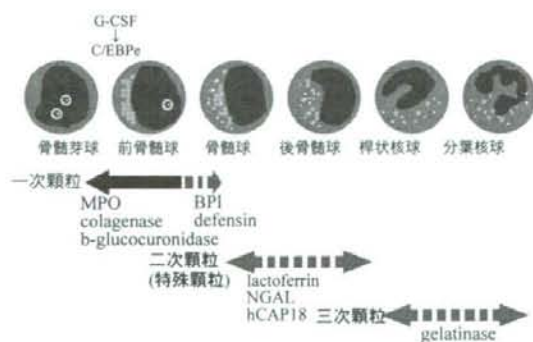


図3 好中球の顆粒発現とC/EBP ϵ 異常による障害部位
Lekstrom-Himes et al. J Exp Med
189:1847-52, 1999より一部改変

4. 簡易診断法

本症における好中球は軽いため、フィコール分離では単核球層に集積する。本方法は末梢血を直接処理して細胞膜に穴をあけた。その後、SSCとCD45RO発現で展開して、好中球部位を同定した。この部位における一次顆粒、myeloperoxidase、bactericidal permeability increasing protein (BPI)、defensin、ならびに二次顆粒、human 18-kDa cationic antimicrobial protein (hCAP18)、lactoferrin、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)の発現をみたところ、正常人ではいずれも強く発現していたのに対して、患者では二次顆粒の発現はなく、一次顆粒形成の後期に発現する α -defensin 1-3の欠損とBPIの発現低下が認められた(図4)。

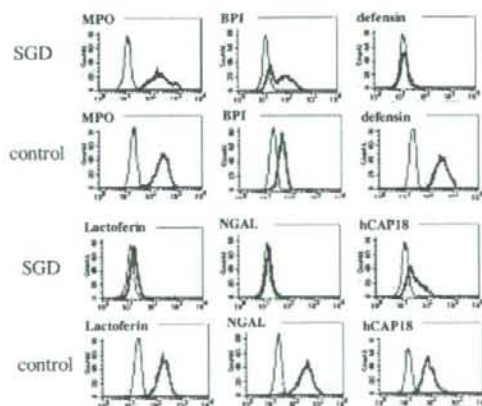


図4 末梢血白血球のFACS解析 Controlと患者(SGD)のbuffy coat細胞をSSCとFSCおよびCD45とSSCで展開した。正常の単球と考えられる領域、好中球と考えられる領域を区別し、好中球領域における各顆粒分子の発現をみた。

好中球二次顆粒および一次顆粒の検出は、好中球二次顆粒欠損症の早期診断に有用であった。

D. 考 察

Basic region/leucine zipper domain (bZIP)を持つ転写因子である C/EBP family (C/EBP $\alpha, \beta, \gamma, \epsilon, \delta$, CHOP-GADD 153) は、標的遺伝子の転写制御領域にある DNA 結合配列 5'-TKNNGYAAK-3' (Y=C または T, K=T または G) を認識し、homodimer または heterodimer を形成し結合する¹⁸⁾。これらの転写因子間では、C 末端側の DNA binding region と dimerization domain の相同性は高いが、N 末端側の transactivation domain は、この領域を欠く CHOP-GADD 153 を除いてそれぞれユニークである。C/EBP ϵ 以外は比較的広範な組織において発現が認められる。

C/EBP ϵ 遺伝子は、染色体上 14q11.2 に位置し、3つの exon からなり、Promoter の違いと differential splicing などの結果、C/EBP ϵ には 4 つの isoform (p32, p30, p27, p14) が存在する。このうち、p32 は最も強力な G-CSF receptor promoter 刺激活性を有するが、p27 における活性は p32 に比べると非常に弱く、p14 にはこの活性はほとんど認められない。C/EBP ϵ の発現は骨髓球系細胞と T 細胞に認められる。骨髓 CD34 陽性細胞を cytokine の添加により骨髓芽球、前骨髓球などの成熟段階を経て好中球に分化させると、C/EBP ϵ の発現は分化にともない著しく増強する⁷⁻⁹⁾。また、C/EBP ϵ は、mim-1, myeloperoxidase, G-CSF receptor, lactoferrin などの骨髓球系細胞特異的遺伝子群の promoter 活性を *in vitro* で増強させる¹⁹⁾。これらのことは、この分子が好中球への分化成熟に重要な役割をになっていることを示唆する。

C/EBP ϵ knockout (KO) マウスの末梢血では核の分葉に乏しい好中球が増加し、好酸球数は減少する¹⁰⁾。好中球の電顕所見では、一次顆粒と二次顆粒の比が上昇し、また三次顆粒はみられない。骨髓細胞を用いた Northern blot による解析では、一次顆粒物質である myeloperoxidase や cathepsin G の発現は正常であるが、二次顆粒物質である lactoferrin や

neutrophil collagenase、三次顆粒物質である neutrophil gelatinase は著減する^{11,13)}。またグラム陰性菌に抗菌活性をもつ peptides である cathelin-related antimicrobial peptide (CRAMP) 1、CRAMP2 の骨髓での発現が著減している。培養した骨髓細胞は形態学上 90% 以上が promyelocyte または myelocyte で、成熟障害を呈する。Flow cytometry による解析では成熟好中球に出現する Gr-1 の発現の減少が KO マウス好中球でみられる。また、好中球および単球の superoxide 産生能が減弱するが、これは NADPH oxidase を構成する p47phox の低下に起因すると考えられる¹¹⁾。また thioglycollate (TG) challenge による実験的腹膜炎では、腹水中の myelocyte や metamyelocyte は増加するが、好中球数の増加はなく、遊走能障害も認められる。これは CD11b および L-selectin 発現の異常に起因する¹³⁾。

自験例の殺菌性タンパクの検討では新たに、二次顆粒タンパクである human 18-kDa cationic antimicrobial protein (hCAP18) と一次顆粒タンパクである bactericidal permeability increasing protein (BPI) が著減することが RT-PCR の解析から明らかとなった。hCAP18 は、マウス CRAMP のヒトホモログで、グラム陰性菌に対する抗菌活性を有するペプチドである²⁰⁾。C/EBP ϵ 発現ベクターを U937 細胞に導入し、C/EBP ϵ の発現を誘導すると hCAP18 の発現も増強することから、hCAP18 は C/EBP ϵ の target gene のひとつと考えられる。また、BPI は分子量 58kD の塩基性タンパクで、グラム陰性菌に対し強い抗菌活性を有する²¹⁾。二つのグラム陰性菌殺菌性タンパクの欠損により、SGD におけるこれらの病原菌に対する易感染性が起こるものと考えられる。また、defensin は、黄色ブドウ球菌の細胞膜に穴をあけて溶菌することが判明しているので、SGD において、黄色ブドウ球菌感染症を起こしやすい理由として defensin の欠損が主な原因と考えられる。

E. 結論

好中球二次顆粒欠損症においては殺菌性蛋白の生成障害を認め殺菌能が低下することから、活性酸素の生成障害のある慢性肉芽腫症にかなり近い病態と考えられる。本症例では好中球二次顆粒欠損症は慢性肉芽腫症と同様に感染を一度起こすと、急速に進行し、重症化しやすいことがわかった。今回の肺膿瘍については、外科的切除を行わずに、内科的治療のみで改善したことから、活性酸素による殺菌能が保たれていれば、病原微生物の排除は抗菌薬で可能である可能性が示唆された。本症では、慢性肉芽腫症と同様に抗菌薬内服による予防が必要と思われる。また、FACS法によって細胞内顆粒を検出することは、本症の早期診断に有用であり、今後細菌感染症を繰り返す患児のスクリーニングに用いていきたい。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

参考文献

1. Strauss R.G. An abnormality of neutrophil morphology with impaired function. *N Engl J Med* 1974; 290; 478-484.
2. Komiyama A, Morosawa H, Nakahata T, et al. Abnormal neutrophil maturation in a neutrophil defect with morphologic abnormality and impaired function. *J Pediatr* 1979; 94; 19-25.
3. Lamox KJ, Gallin JI, Rotrosen D, et al. Selective defect in myeloid cell lactoferrin gene expression in neutrophil specific granule deficiency. *J Clin Invest* 1989; 83; 514-519.
4. Tamura A, Agematsu K, Mori T, et al. A marked decrease in defensin mRNA in the only case of congenital neutrophil-specific granule deficiency reported in Japan. *Int J Hematol* 1994; 59; 137-142.
5. Chumakov AM, Grillier I, Chumakov E, et al. Cloning of the novel human myeloid-cell-specific C/EBP- ϵ transcription factor. *Mol Cell Biol* 1997; 17; 1375-1386.
6. Antonson P, Stellan B, Yamanaka R, et al. A novel human CCAAT/enhancer binding protein gene, C/EBP ϵ , is expressed in cells of lymphoid and myeloid lineages and is localized on chromosome 14q11.2 close to the T-cell receptor α/δ locus. *Genomics* 1996; 35; 30-38.
7. Yamanaka R, Kim G-D, Radomska HS, et al. CCAAT/enhancer binding protein ϵ is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94; 6462-6467.
8. Morosetti R, Park D, Shiohara M, et al. A novel myeloid transcription factor, C/EBP ϵ , is upregulated during granulocytic, but not monocytic, differentiation. *Blood* 1997; 90; 2591-2600.
9. Chi D, Chumakov AM, Park DJ, et al. Modulation of mRNA expression of a novel human myeloid-selective CCAAT/enhancer binding protein gene (C/EBP ϵ). *Blood* 1997; 90; 2987-2994.

10. Yamanaka R, Barlow C, Lekstrom-Himes J, et al. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein ϵ -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94; 13187-13192.
11. Verbeek W, Lekstrom-Himes J, Park DJ, et al. Myeloid transcription factor C/EBP ϵ is involved in the positive regulation of lactoferrin gene expression in neutrophils. *Blood* 1999; 94; 3141-3150.
12. Williams SC, Du Y, Schwartz RC, et al. C/EBP ϵ is a myeloid-specific activator of cytokine, chemokine, and macrophage-colony-stimulating factor receptor gene. *J Biol Chem* 1998; 273; 13493-13501.
13. Lekstrom-Himes JA, Xanthopoulos KG. CCAAT/enhancer binding protein ϵ is critical for effective neutrophil-mediated response to inflammatory challenge. *Blood* 1999; 93; 3096-3105.
14. Lekstrom-Himes J, Dorman SE, Kopar P, et al. Neutrophil-specific granule deficiency results from a novel mutation with loss of function of the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein ϵ . *J Exp Med* 1999; 189; 1847-1852.
15. Gombart AF, Shiohara M, Kwok SH, Agemastu K et al. Neutrophil specific granule deficiency: homozygous recessive inheritance of a frameshift mutation in the gene encoding transcription factor C/EBP ϵ . *Blood* 2001; 97; 2561-2567.
16. Parmley RT, et al. Abnormal peroxidase-positive granules in "specific granule" deficiency. *Blood* 1989; 73; 838-844.
17. Rosenberg HF, Gallin JI. Neutrophil-specific granule deficiency includes eosinophils. *Blood* 1993; 82; 268-273.
18. Tenen DG, Hromas R, Licht JD, et al. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 1997; 90; 489-519.
19. Verbeek W, Gombart AF, Chumakov AK, et al. C/EBP ϵ directly interacts with the DNA binding domain of c-myc and cooperatively activates transcription of myeloid promoters. *Blood* 1999; 93; 3327-3337.
20. Larrick JW, Lee J, Ma S, et al. Structural, functional analysis and localization of the human CAP18. *FEBS Lett* 1996; 398; 74-80.
21. Elsbach P, Weiss J. Bactericidal/permeability increasing protein and host defense against gram-negative bacteria and endotoxin. *Curr Opin Immunol* 1993; 5; 103-107.

原発性免疫不全症の病態解析

森 尾 友 宏 (東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野)

高 木 正 稔 (東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野)

水 谷 修 紀 (東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野)

研究要旨

原発性免疫不全症候群に関する調査研究班にて以前全国調査を行った毛細血管拡張小脳失調症 (Ataxia telangiectasia: 以下AT) について、その簡易診断法の確立を試み、FACSにて診断可能なシステムを構築した。

特定の原発性免疫不全症において病態解析を進めると共に、さらなる疾患の理解を目指して、細胞株で遺伝子改変を行い、さらに野生型、変異型タンパクをProtein transduction domain(PTD)と連結させて細胞に導入するという手法を開発した。この方法は病態解析に始まり、将来的には治療に結びつく可能性があるものと考えられる。

A. 研究目的

毛細血管拡張小脳失調症 (Ataxia telangiectasia: 以下AT) は予後不良で、神経系、免疫系を含む様々な臓器に影響を及ぼす疾患である。確定診断には遺伝子解析が必要となるが、66 exonsからなる長大な遺伝子であること、多くがintron内での変異であることや、heterozygous mutationが多く、タンパク発現や機能解析を行う必要に迫られることがあることなどから、簡易診断法の開発が期待されている。本年度はこの開発に当たった。

また様々な免疫不全症では、その責任遺伝子の機能解析を行い、患者における病態を理解し、それを修復できる手段を模索することが重要である。ここでは、モデル細胞で遺伝子を改変することを試みた。

さらに近年注目されているProtein transduction domain(PTD)を用いて、機能回復を試みた。

B. 研究方法

1) 健常人あるいは患者由来の末梢血単核球、EBV transformed cell line、活性化T細胞に、電離放射線あるいはH₂O₂によるDNA損傷を与え、細胞内でのATMのリン酸化を、抗リン酸化ATM抗体を用いて、FACSで検討した。

2) preB細胞株であるNALM6細胞を用いて、WASP遺伝子に対するtargeting vectorを構築し、電気穿孔法を用いて導入した。相同組換えされた細胞はneomycinによる選択と、DTによるrandom integrationされた細胞の排除によって行った。

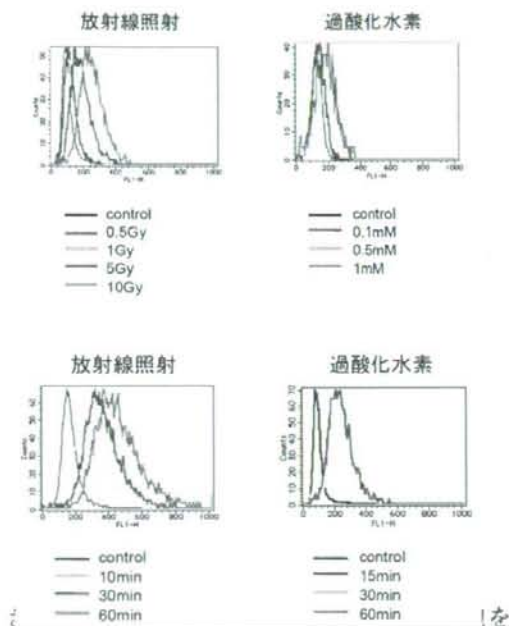
3) PTDは人由来であるHph-Iがタンデムに配列されたHisx6が配置された大腸菌発現ベクターにWASP遺伝子全長を組み込み、IPTG induction後に、Niレジンカラムにて精製した。(倫理面への配慮)

本研究は患者さんからの血液を用いて行われ、また遺伝子改変操作を伴うので、組換えDNA研究承認及び倫理審査委員会の承認を経て研究が行われる。患者さんからの血液採取は最小限のものとする。

C. 研究結果

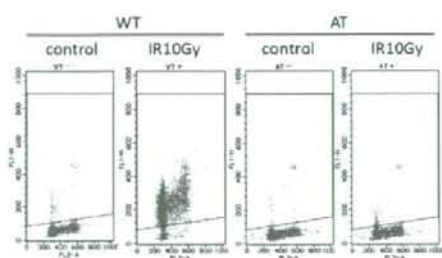
1) リン酸化ATM検出によるATの診断

健常人のEBV-LCLを用いて放射線照射、あるいは過酸化水素刺激し、細胞内リン酸化ATM(pATM)をFACSにて解析したところ以下の結果が得られ、実際に使用に供することができることが判明した。



を用いて、検討を続けた結果、患者での無応答が確認された。

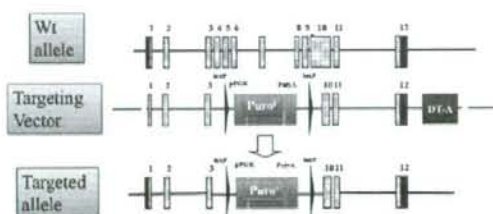
活性化T細胞を用いたWT,ATの比較



本方法はDNA損傷修復機能まで検証している点が優れているが、さらに保因者では健常人と患者の中間的な反応を示すことが明らかになった。また末梢血単核球を用いての解析でも、そのまま分離した細胞でも計測が可能であることが明らかになった。

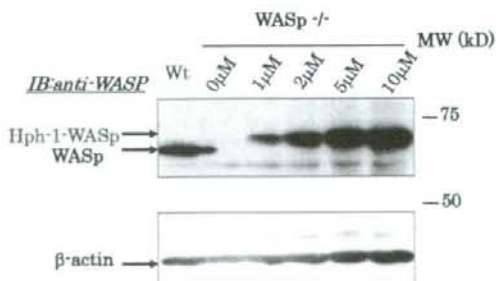
2) 細胞株遺伝子改変と、PTDにより機能回復標的をWiskott Aldrich症候群の責任遺伝子であるWASPとし、PTDはPTD-WASPの産生を試みた。

コンストラクトは以下の通りである。



その結果WASP^{-/-}NALM-6が得られCD47抗体に対する細胞接着能、CD47を介したシグナル伝達の異常などが明らかになった。

さらにHph-1-WASPの作成を試みた。今までの諸外国の研究ではWASPタンパクは不溶化画分に移行し、可溶化が困難とされてきたが、条件検討を重ねることにより、組換えタンパクの合成に成功した。



これを用いて、WASP遺伝子改変NALM6細胞に導入したところ、用量依存的なWASPの発現が認められた。

さらに導入によってWASP欠損細胞の機能は正常化した。

D. 考察

1. 今回の研究からATの簡易診断が行えることが明らかになった。用いた抗体はリン酸化53BP1と交差反応するが、DNA損傷刺激応答を検出するシステムとしては、極めて簡便にできるものと考えている。将来的には、末梢血単核球での確実な診断及び、保因者検出に使用できるよう、さらに条件を検討したい。またこの方法は、化学療法を受けた患者における、DNA損傷の大きさをモニターすることにも応用可能と考えている。

2. 遺伝子改変細胞株の作成は、より詳細な生化学的解析に重要な材料を提供することになると思われるが、一方NALM6細胞のみを標的細胞とした場合、preB細胞であるという特性や、その細胞株のもつ特性から、特徴的な所見が得られない可能性がある。今回のWASP欠損細胞でも大きな表現型は出にくく、今後他の細胞も標的にしたいと考えている。

PTDについては、WASP組換えタンパク産生に成功し、また用量依存的な効率の良い導入、機能的な保完にも成功しており、今後は変異型のWASPの導入を考えたい。また将来的には臨床応用を視野に入れた検討を開始する価値があるものと考えている。

E. 結論

ATの簡易診断法の確立に成功した。ATMの発現、DNA損傷修復応答の初期応答の検出が同時に簡便に行うことができるシステムであり、今後さらなる改良を重ねることにより、実際の臨床応用が近い。

遺伝子改変細胞の作成と、タンパクテリバリにより機能回復が実現できることを示した。この手法により、免疫不全症の病態理解

と、治療法の開発につながることを期待される。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamamoto S, Sugita S, Sugamoto Y, Shimizu N, Morio T, Mochizuki M. Quantitative PCR for the detection of genomic DNA of Epstein-Barr virus in ocular fluids of patients with uveitis. [Journal Article] Japanese Journal of Ophthalmology. 52(6):463-7, 2008

2) Honda M, Takagi M, Chessa L, Morio T, Mizuatni S. Rapid diagnosis of ataxia-telangiectasia by flow cytometric monitoring of DNA damage-dependent ATM phosphorylation. *Leukemia*. 2008 Jul 17. [Epub ahead of print]

3) Kido S, Sugita S, Horie S, Miyana M, Miyata K, Shimizu N, Morio T, Mochizuki M. Association of varicella-zoster virus (VZV) load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. *Br J Ophthalmol*. 92(4):505-8, 2008

4) Suzuki K, Tsugawa K, Oki E, Morio T, Ito E, Tanaka H. Vesical varices and telangiectasias in a patient with ataxia telangiectasia. *Ped. Nephrol*. 23: 1005-1008, 2008.

5) Morio T, Kim H, Ku, Artemis, and Ataxia-Telangiectasia-Mutated: Signaling Networks in DNA Damage. *Int J Biochem*

Cell Biol. 40:598-603, 2008.

6) Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H, Takai T, Kodama T, Morio T, Geha RS, Kitamura D, Kurosaki T, Ellmeier W, Takayanagi H. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell*, 132: 794-806, 2008.

7) Takahashi N, Morio T. Common variable immunodeficiency. *Japanese Journal of Clinical Immunology* 31(1):9-16, 2008

8) Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami M, Morio T, Sugamoto Y, Mochizuki M. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol*. 92:928-32, 2008.

9) Hasegawa D, Fukushima M, Hosokawa Y, Takeda H, Kawasaki K, Mizukami T, Nunoi H, Ochiai H, Morio T, Kosaka Y. Successful treatment of chronic granulomatous disease with fludarabine-based reduced-intensity conditioning and unrelated bone marrow transplantation. *Int J Hematol*. 87:88-90, 2008.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1) 森尾友宏、高橋尚美、水谷修紀 ICOS 欠損症における T 細胞機能異常、第 2 回日本免疫不全症研究会、2009 年 1 月 30 日、東京

2) Tomohiro Morio Ex vivo expansion of CD4 T-cells from cryopreserved cord blood

and its application in adaptive immunotherapy post cord blood transplant. 第 35 回日本低温医学会総会、2008 年 11 月 21 日、東京

3) 森尾友宏、造血幹細胞移植後の細胞治療の現状と展望、第 3 回新潟細胞再生療法フォーラム、2008 年 10 月 24 日、新潟

4) 森尾友宏、造血細胞移植後 ex vivo 増幅 CD4T 細胞輸注療法、第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10 日-12 日、京都

5) 森尾友宏、増殖リンパ球による細胞療法、第 15 回ヘルペス感染症フォーラム、2008 年 8 月 22 日-23 日、札幌

6) 森尾友宏、梶原道子、清水則夫、伊藤仁也、藤原成悦、大隅一興、関根暉彬、造血幹細胞移植後ウイルス感染症に対する活性化 CD4DLI 療法、第 56 回日本輸血・細胞治療学会、2008 年 4 月 26 日、福岡

7) Morio T, Watanabe F, Takahashi N, Sato M, Sato R, Takagi M, Imadome K, Miyawaki T, Domenico Delia, Nakamura K, Richard Gatti, Mizutani S. Ataxia-Telangiectasia in Japan: Phenotypic variations in affected siblings with Ataxia-Telangiectasia. Ataxia telangiectasia workshop 2008, Ohtsu, April 22-25, 2008.

8) Morio T Ataxia telangiectasia: Involvement of ATM in immunodeficiency and leukemogenesis. Symposium on Recent Advances in Cell Function and Defense Mechanism, Seoul, April 18, 2008.

9) Morio T. Immunodeficiencies with impaired DNA damage response. Recent Advances

in DNA Damage Response, Seoul, April 18, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

APPLICATION OF SYNOVIUM-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) FOR CARTILAGE OR MENISUCUS REGENERATION (米国国際特許出願中 YCT-1301) 出願人：関矢一郎、発明者：宗田大、森尾友宏、清水則夫、黒岩保幸

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

本邦における原発性免疫不全症の遺伝子解析

小原 収 (かずさDNA研究所 ヒトゲノム研究部)

大嶋 宏 一 (独立行政法人 理化学研究所 横浜研究所免疫・

アレルギー科学総合研究センター免疫ゲノミクス研究グループ)

研究要旨

かずさDNA研究所では、PIDJ (Primary Immunodeficiency Database Japan) プロジェクトの一員として、100種類を超える免疫不全症関連遺伝子解析を行っている。2008年11月末までに、212サンプル、1074遺伝子(112種類)のPID関連遺伝子解析のDNAシーケンシングによる依頼を受けた。その結果、これまでに、ナンセンス変異15例、フレームシフト13例、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) 以外のミスセンス変異85例、スプライス位置から±2bp以内の変異14例、スプライス位置から±20bp以内の変異71例を明らかにすることができた。ただし、変異を認めない症例や認めた変異が疾患の原因と決定されないままの症例が多数残されていることが明らかとなった。こうした経験を基にして、蓄積された症例情報の活用、より包括的な遺伝子診断法の確立、より効率的かつ正確な遺伝子診断のためのシステム作りが求められる。

A. 研究目的

原発性免疫不全症候群 (primary immunodeficiency; PID) は、適切な治療がなされない場合、生命に関わる重症感染症や生活に支障を来す障害を残す危険があり、早期診断が重要である。近年の研究の進歩から、多数の原因遺伝子や治療法が明らかとなり、多数の疾患でQOL(生活の質)が向上しつつある。しかし、臨床症状が一様ではなく、特殊な検査を要することもあり、診断は必ずしも容易ではない。また、治療や生活管理に関しても、しばしばPIDに専門的な知識と技術が要求される。以上より、広範なライフサイエンス研究者の連携による研究の拡大と深化を実現し、健やかなこどもの成長を願う一般の方々や医療担当者にとってのPIDについての理解の手助けとなり、我が国におけるPIDのより迅速かつ正確な診断と治療法の実現を目指している。今回、かずさDNA研究所で行っているPID関連遺伝子解析の実際とこれまでの解析結果について検討した。

B. 研究方法

かずさDNA研究所において、原発性免疫不全症研究会議施設の13大学および理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センターと連携して進めているPIDJ (Primary Immunodeficiency Database Japan) プロジェクトの下り、2006年9月からPIDの既知の責任遺伝子だけではなく、PID候補遺伝子も含めた100遺伝子を超えるDNAシーケンシングを行っている。

以下にPID関連遺伝子のDNAシーケンシングの解析方法を示す。

1. ゲノムDNAの増幅

現時点では、患者サンプルは依頼施設でDNA抽出され、その後に我々が受け取る形を原則としているが、必要であれば理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センターにて行われている。PIDの患者は小児であることが多く、使用できるサンプルの量が限られているだけではなく、解析遺伝子数が多数に及ぶことも稀では

疾患名	疾患関連遺伝子
重症複合免疫不全症	IL2RG, JAK3, IL7R, RAG1, RAG2, Artemis, CD3D, CD3E, CD3G, ADA, PNP, CD8a, ZAP70, LCK, LIG4, Cernunnos, CD45, ORAI1
B細胞欠損症	BTK, IGHM, IGLL1, BLNK, CD79A, CD79B, VPREB1, LRRC8
分類不能型免疫不全症	ICOS, TACI, BAFF-R, CD19, SH2DIA, ICOSL, APRIL, BAFF, CD21
高IgM症候群	CD40L, CD40, AID, UNG
好中球異常症	ELA2, HAX1, WASP, GFI1, CSF3R(G-CSFR), MAP3K14
Wiskott-Aldrich症候群	WASP
毛細血管拡張性運動失調症	ATM, MRE11, NBS1, RAD50
自己炎症症候群	NALP3(CIAS1), MEFV, TNFRSF1A(TNFR1), MVK, PSTPIP1(C2BP1), NOD2(CARD15), LPIN2, NALP12
IL12/IFN- γ 経路の異常による抗酸菌感染性	IFNGR1, IL12RB1, IL12B, NEMO, STAT1, IFNGR2, Tyk2
慢性肉芽腫症	CYBB, CYBA, NCF1, NCF2
慢性皮膚粘膜カンジダ症	AIRE
血球貪食性リンパ組織球症	PRF1(perforin), MUNC13D, STX11(syntaxin11)
高IgE症候群	Tyk2, STAT3
様々な免疫不全症	未知の候補遺伝子が上記以外に43

表1 これまでに解析依頼のあったPID関連遺伝子

ないために、全例でゲノムDNAを illustra GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare UK Ltd) で増幅してから遺伝子解析を開始している。

2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Multiplex PCR Assay kit (TAKARA BIO INC.)、Prime STAR GXL PCR kit (TAKARA BIO INC.)、LA taq + GC buffer (TAKARA BIO INC.)の3種類のPCRキットを使用し、基本的にはメーカー推奨のPCR条件にて反応を行っており、各遺伝子もしくは各エクソンに適したキット・条件を決定し、標準化を図っている。

3. PCRダイレクトシーケンシング

PCR産物を ExoSAP-IT (GE Healthcare) で酵素的に精製後、シーケンシング反応は BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用して行っている。

4. データ解析

上記のように作成した塩基配列データをDNAシーケンシングアセンブルソフトウェアにて編集し、NCBIのRefseqやEnsemblに登録されているデータを基にして変異の有無を探索している。この際に、我々の共同研究者が開発したMutation@A_Glance (<http://rapid.rcai.riken.jp/mutation/>) も利用している。これは各PID遺伝子構造及びタンパク質構造との関連性を一目で把握できるようにしたツールで、単に既知の病原変異の特徴の把握だけでなく、新たにユーザーが決定した配列情報を投入することで、その配列に見出された公的データベース中の参照配列との違いが塩基多型なのかどうかや、変異の種類(ナンセンス、ミスセンスなど)についての情報を知ることができる。特に、ミスセンス変異については、そのタンパク質の進化的な配列保存性に基づいて、それが機能に致命的な影響を与える可能性があるかどうかの情報も付与してくれる。

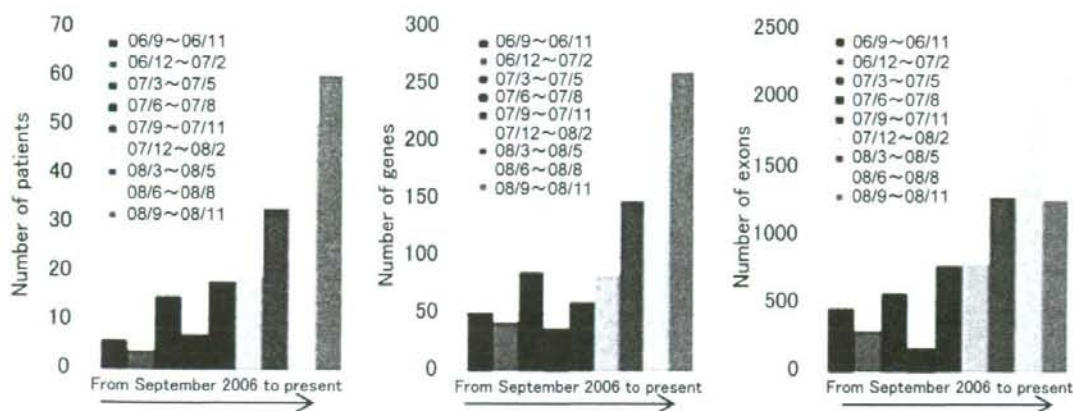


図1 PIDJにおける遺伝子解析依頼数の推移

C. 研究結果

かずさDNA研究所では2008年11月末までに、212サンプル、1074遺伝子（112種類；表1）のPID関連遺伝子のDNAシーケンシング解析依頼を受け、解析数は順調に増加している（図1）。その結果、これまでに、ナンセンス変異15例、フレームシフト13例、一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism; SNP）以外のミスセンス変異85例、スプライス位置から±2bp以内の変異14例、スプライス位置から±20bp以内の変異71例を明らかにすることができた。

D. 考察

以上のように多数のPID症例が集積し、多くの遺伝子異常が見出されているのは、DNA解析を集中的に行う施設とPID専門医、免疫基礎研究者との連携の賜物であり、こうしたネットワーク構築の有益性を示している。

ただし、変異を認めない症例や認めた変異が疾患の原因と決定されないままの症例が多数残されており、より包括的な遺伝子診断法の確立および、より効率的かつ正確な遺伝子診断のためのシステム作りが必要であると考えている。

E. 結論

本邦におけるPIDの遺伝子解析を中心としたPIDJプロジェクトは順調に進行していると考え

られる。更に今後このネットワークを高度化するために必要な課題は、1) 遺伝子変異が遺伝子発現及び遺伝子産物機能にもたらす影響の系統的解析システムの整備、2) 次世代DNAシーケンサーに依拠した、より網羅性の高い塩基配列決定による免疫不全症原因遺伝子変異スクリーニング系の整備、の2点に集約されると我々は考えている。1)については、患者検体のRNAレベル、タンパク質レベルの解析、in vitro系での解析、免疫不全マウスを用いたモデル系での解析などの様々なアプローチが考えられ、既存のゲノミクス技術との組み合わせによる新たな解析システムの整備の実現である。2)については、コスト的な問題が残されているものの、技術的には数百の免疫不全症候補遺伝子のエクソン配列の包括的解析や染色体領域特異的な塩基配列解析は実現可能であることが分かっている。この2つの課題を並行して達成することができれば、未知の病原性変異の迅速な発見に直結し、免疫不全症の診断と治療の飛躍的な進歩に大きく貢献するものと期待される。

参考文献

- 1) Burrows PD, Fischer A: Building networks for immunodeficiency diseases and immunology training. *Nat Immunol* 9: 1005-1007, 2008

高IgE症候群に見られる黄色ブドウ球菌感染症の 部位特異的発症機構の検討

峯 岸 克 行 (東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学)

研究要旨

高IgE症候群は、黄色ブドウ球菌などの細胞外寄生菌による皮膚と肺の易感染性に難治性湿疹・血清IgE高値を合併する原発性免疫不全症である。我々は昨年度、骨・歯牙の異常を合併する1型の高IgE症候群の主要な原因遺伝子がSTAT3であることを報告した。今回われわれは、STAT3の分子異常がどのようなメカニズムで皮膚と肺に選択的な黄色ブドウ球菌感染症を引き起こすかを検討した。その結果、STAT3に異常を有する高IgE症候群症例では、活性化したT細胞からのTh17サイトカインの産生が不良で、そのためケラチノサイトと気管支上皮細胞においてのみ、好中球をリクルートするケモカイン(CXCL8, CXCL1)と β -defensin2/3の産生が不良であることを明らかにした。このことが高IgE症候群に特徴的な皮膚と肺の易感染性の発症に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

1型の高IgE症候群において、その原因遺伝子がSTAT3であることが明らかになったものの、STAT3の分子異常がどのような機構で高IgE症候群の各種の症状を引き起こしているかはほとんど明らかになっていない。特に、STAT3の異常により1)なぜ皮膚と肺に特異的に黄色ブドウ球菌感染症が発症するか、2)高IgE血症とアトピー性皮膚炎を呈するか、3)骨と歯牙の異常が発症するかは全く明らかになっていない。そこで今回我々は、STAT3の分子異常がどのようなメカニズムで皮膚と肺に選択的に黄色ブドウ球菌感染症が発症するかについての分子生物学的機序を解明し、高IgE症候群での黄色ブドウ球菌感染症に対する有効な予防法、治療法を開発することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

正常コントロールまたは患児の末梢血より比重遠心法により単核球を分離し、これを、抗CD3抗体と抗CD28抗体の存在下で培養し、3

日後の上清中の各種サイトカインの濃度をELISA法で検討した。この上清をケラチノサイト、気管支上皮細胞、線維芽細胞、マクロファージに投与して、各種ケモカイン、 β -デフェンシンの産生をELISA法、リアルタイムPCR法で検討した。さらに、この反応を抗IL-17抗体、抗IL-22抗体、抗 β -デフェンシン抗体を加えることで中和できるか否かを検討した。さらにT細胞の産生するTh17サイトカイン(IL-17, IL-17F, IL-22)、古典的炎症性サイトカイン(TNF α , IL-1 β , IFN γ)を直接投与することにより、活性化T細胞の上清の機能がサイトカインによるものであることを検討した。

(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. 1型高IgE症候群における活性化T細胞のサイトカイン産生の検討

正常コントロールまたは患児の末梢血より比重遠心法により単核球を分離し、これを、抗CD3抗体と抗CD28抗体の存在下で培養し3日後の上清中の各種サイトカインの濃度をELISA法で検討した。その結果高IgE症候群の症例においては、コントロールと比較して古典的炎症性サイトカインTNF α 、IL-1 β 、IFN γ の産生は正常であるものの、Th17サイトカインIL-17、IL-22の産生は極端に低下していることが明らかになった。

2. 1型高IgE症候群の活性化T細胞上清のケラチノサイトのケモカイン、デフェンシン産生に与える影響

正常コントロールまたは患児の単核球を抗CD3/D28抗体で活性化した上清をケラチノサイトに投与し、2日後の上清中のケモカインと β -デフェンシン(BD)の産生を検討した。正常コントロールの上清は、CCL2, CXCL8, CXCL1, BD1, BD2, BD3全ての産生を上昇させたが、高IgE症候群の患児の上清はCCL2とBD1の産生を増加させたものの、CXCL8, CXCL1, BD2, BD3の産生はほとんど増加しなかった。リアルタイムPCRによるmRNAを検討しても、同様の結果が得られた。このことから、高IgE症候群患児の活性化したT細胞の上清は、ケラチノサイトからのCXCL8, CXCL1, BD2, BD3の発現を誘導する能力が特異的に欠損しているものと考えられた。

この現象のメカニズムを検討するために、正常コントロールの活性化したT細胞上清に抗IL-17抗体と抗IL-22抗体を添加しその影響を検討したところ、ケラチノサイトからのCXCL8, CXCL1, BD2, BD3の発現上昇はほぼ完全にブロックされた。また、活性化した正常T細胞の上清をケラチノサイトに投与する

と、ケラチノサイト上清の黄色ブドウ球菌に対して殺菌活性は亢進し、これは抗BD3抗体の投与により中和された。以上より、高IgE症候群の患者由来の活性化T細胞上清はTh17サイトカインの産生が低下しているために、好中球をリクルートするサイトカイン(CXCL8, CXCL1, CXCL2)と β -デフェンシン2と β -デフェンシン3の産生が低下していることが明らかになった。

3. 1型高IgE症候群の活性化T細胞上清のその他の系列の細胞に対するケモカイン、デフェンシン産生に与える影響

上記の現象の細胞特異性を検討するために、正常コントロールまたは患児の単核球を抗CD3抗体と抗CD28抗体で活性化した上清を気管支上皮細胞、表皮線維芽細胞、単球由来マクロファージに投与した。気管支上皮細胞においては、ケラチノサイトと同様に正常コントロール由来の活性化T細胞上清によってのみ、CXCL8, CXCL1, BD2, BD3の発現上昇が見られたが、線維芽細胞、マクロファージにおいては、患者由来の活性化T細胞上清によっても、CXCL8, CXCL1の産生上昇が見られた。このことは、Th17サイトカインに対する反応性には細胞特異性がある可能性を示唆しており、またそのパターンは高IgE症候群の患児で皮膚と肺の黄色ブドウ球菌感染症を起こしやすいことと良く一致していた。

4. リコンビナントTh17サイトカインと古典的炎症性サイトカインが各種細胞のケモカイン、 β -デフェンシン産生に与える影響の検討

患児の活性化T細胞上清がケラチノサイトと気管支上皮細胞において特異的にCXCL8, CXCL1, BD2, BD3の産生上昇を誘導できないことの原因が、Th17サイトカインの産生障害であることをより直接的に証明するために、各種のリコンビナントTh17サイトカインと古典的炎症性サイトカインをケラチノサイト、気管支上皮細胞、線維芽細胞、マクロファージに投

与した。これまでに活性化T細胞の上清で得られた結果に一致して、ケラチノサイトと気管支上皮細胞においては、Th17サイトカインがCXCL8, CXCL1, BD2, BD3の産生に重要であり、線維芽細胞とマクロファージにおいては、Th17サイトカインが存在しなくても、古典的炎症性サイトカインのみでCXCL8, CXCL1の産生が十分に起こることが示された。

D. 考察

STAT3の分子異常により発症する高IgE症候群は、その黄色ブドウ球菌感染症が皮膚と肺に比較的選択的に起こることに臨床的特徴があるが、その原因は世界的にも全く不明であった。今回の我々の検討により、1) 黄色ブドウ球菌の感染防御には好中球が重要な役割を果たしているが、高IgE症候群のT細胞においては、Th17サイトカインの産生が低下しており、このため、ケラチノサイトと気管支上皮細胞で特異的に好中球をリクルートするケモカイン(CXCL8, CXCL1, CXCL2)の産生が低下していること、2) 同様なメカニズムでまた、ケラチノサイトと気管支上皮細胞で特異的に黄色ブドウ球菌に対して殺菌活性を有する β -デフェンシン(β -defensin2/3)の産生が低下していることが明らかになった。これらが、高IgE症候群において皮膚と肺に黄色ブドウ球菌が選択的に起こることに関与しているものと考えられた。この研究成果により、高IgE症候群の症例に多剤耐性の黄色ブドウ球菌感染症などがみられる場合など、抗生物質の投与だけでは感染症のコントロールができない場合には、ケモカインや β -デフェンシンの局所投与が、有効である可能性が示唆された。

E. 結論

ヒトのSTAT3の異常により発症する高IgE症候群においては、Th17サイトカインの産生の障害があり、さらにTh17サイトカインが皮膚と肺の上皮細胞からの好中球遊走性ケモカインと β -デフェンシンの産生に必須であること

が、高IgE症候群に独特の黄色ブドウ球菌感染部位の原因となっている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. Minegishi Y., Saito M., Karasuyama H., "Signaling defects in hyper-IgE syndrome." Keystone Symposium "Lymphocyte activation and signaling", Snowbird, Utah, USA, February 3-8, 2008.

2. Minegishi Y., Saito M., Karasuyama H., "Molecular origin and signaling defect in hyper-IgE syndrome" Seminar in Pediatric Immunology, Hematology, and Rheumatology at the Hospital Necker-Enfants Malades Paris, France April 10, 2008

3. Minegishi Y., Saito M., Karasuyama H. European Society for Immunodeficiency "Signaling defect due to the mutations in Tyk2 and STAT3 resulting in hyper-IgE syndrome", 's-Hertogenbosch, Netherlands, Oct. 16-19, 2008

4. Minegishi Y., Saito M., Karasuyama H. "STAT3 and cutaneous or lung hyper-IgE syndrome", Pierre Graber Lecture the Annual meeting of French Society for Immunology, Paris, Nov. 27th, 2008

5. Minegishi Y., Saito M., Karasuyama H. "Molecular origin and pathogenesis of hyper-IgE syndrome" Symposium for PID in Asia at RIKEN Yokohama Institute, Dec. 11th, 2008

2. 論文発表

1. Tsujimura Y, Obata K, Mukai K,