

化膿性細菌感染に關与するToll様受容体の細胞内シグナル伝達機構の構造生物学的解析

大西秀典 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
加藤善一郎 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
木村豪 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
名田匡利 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
徳見哲司 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
長屋聡一郎 (岐阜大学医学部附属病院高次救命治療センター)
金子英雄 (岐阜大学大学院医学系研究科地域医療医学センター)
近藤直実 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)

研究要旨

近年、IRAK4欠損症に代表されるようにToll様受容体(TLR)シグナル伝達経路の破綻により小児期に発症する免疫不全例の報告が相次いでいる。2008年にIRAK4欠損症と類似の表現型を示し、特にグラム陽性菌群に易感染性を呈するMyD88欠損症の存在が報告された。そこで、MyD88欠損症の表現型発生メカニズムを解明するため、MyD88のタンパク立体構造と相互作用機能解析を行った。MyD88は構造上互いに離れた位置に存在するBBループと α ヘリックスEの2箇所、別のアダプター分子Malと直接相互作用する。MyD88欠損症で同定されたR196C変異タンパクは、Malとの相互作用が減弱していた。これによりMyD88/Mal経路以外の他に代替経路を持たないTLR2経路が障害されると、特にグラム陽性菌に対する易感染性が顕在化してくるのではないかと考えられた。

A. 研究目的

近年、様々な外来病原異物を認識するPattern recognition receptor (PRR)としてToll様受容体(TLR)等が同定されているが、IRAK4欠損症に代表されるようにTLRシグナル伝達経路の破綻により小児期に発症する免疫不全例の報告が相次いでいる。2008年にIRAK4欠損症と類似の表現型を示し、特にグラム陽性菌群に易感染性を呈するMyD88欠損症の存在が報告されたが、その病態について原子レベルの構造生物学的な知見ははまだ報告されていない。またMyD88はTLR3を除く全てのTLRのシグナルを仲介するにもかかわらず、ヒトのMyD88欠損症ではグラム陽性菌群にのみ易感染性を示すという特徴があり、その表現型

発生メカニズムは不明である。そこで、MyD88の構造情報と相互作用情報を基に病態解明を行った。

B. 研究方法

1. MyD88のToll-Interleukin-1 receptor (TIR)ドメインを、大腸菌を用いて安定同位体ラベル化したりコンビナントタンパクとして大量に高純度精製し、溶液NMR法にてタンパク立体構造を決定する。
2. TLR4及びMD2を発現させたHEK293細胞を用いて、構造上表面に位置する極性荷電残基25個をアラニン置換したMyD88-TIR変異体を共発現させ、LPS刺激後のNF- κ B reporter gene活性を測定する。

- 膜誘導性アダプター分子Mal/TIRAPのリコンビナントタンパクの発現精製を行う。
- MyD88野生型及び変異体(R196A,R217A,R288A)とMalの結合をGSTプルダウン法によるIn vitroのタンパク結合実験を行う。
- MyD88欠損症として報告されたものと同様のMyD88変異体(R196C)を、大腸菌を用いてリコンビナントタンパクとして発現精製し、4と同様にGSTプルダウン法でタンパク結合実験を行う。
- MyD88構造等を鋳型として、MyD88欠損症として報告された変異タンパク立体構造モデルを構築する。

C. 研究結果

1. 溶液NMR法で得られたMyD88 TIRドメインの立体構造は、既知のTLR1やTLR2のTIRドメイン構造と主鎖の構造は極めて相溶性が高い構造であった。しかし、特にBBループと α Dヘリックスの立体構造に相違点を認めた(図1)。

しかし、側鎖まで含めた立体構造は極めて異なり、表面の静電ポテンシャルもTIRドメイン間で異なることがわかった(図2)。

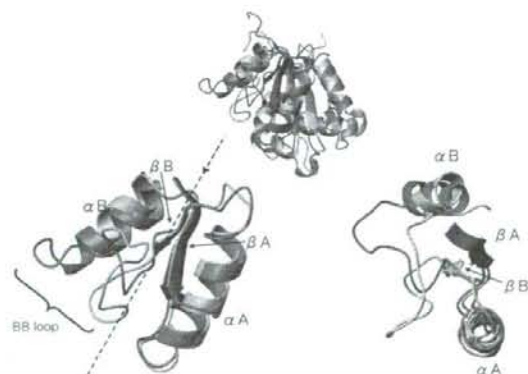


図1 MyD88 TIRドメイン溶液構造とTLR2 TIRドメイン結晶構造の重ね合わせ比較 (Blue: MyD88, Orange: TLR2)

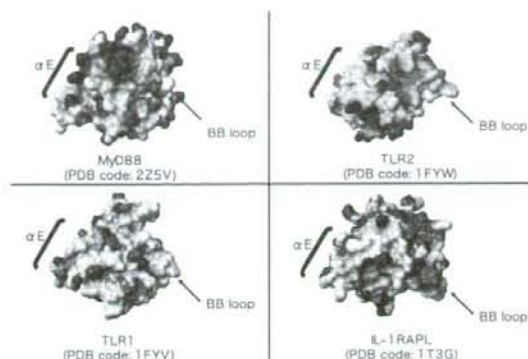


図2 TIRドメイン構造の表面静電ポテンシャルの比較 (Blue: positive charged, Red: negative charged)

2. NF- κ B reporter gene assayの結果、LPS/TLR4シグナルにおいてR196、D197、R217、K282、R288の5つの残基がMyD88の機能的残基であることが判明した(図3)。

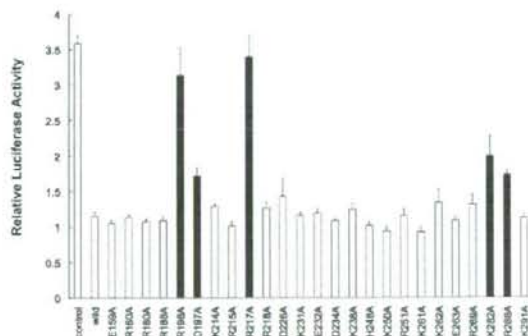


図3 dominant negative MyD88野生型及び変異型による、LPS刺激時のTLR4、MD2発現HEK293細胞でのNF- κ B活性の抑制効果の比較

3. GST-MyD88-TIR野生型及び変異体とMal-TIRの結合実験の結果、R196とR288がMyD88のMalとの相互作用残基であることが判明した(図4)。

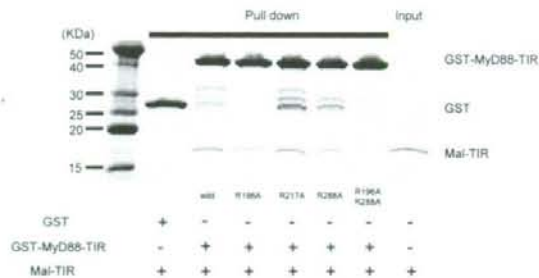


図4 MyD88 TIRドメイン野生型と変異型のMal TIRドメインとの結合実験

4. MyD88欠損症で報告されたTIRドメイン上の変異R196Cのリコンビナントタンパクの精製に成功した。このタンパクは、4.のR196Aと同様Malとの結合が著しく抑制されていた(図5)。

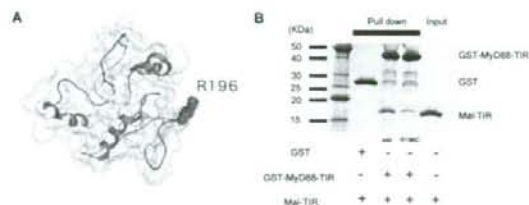


図5 A: Arg196は、MyD88TIRドメイン構造表面に位置している
B: MyD88 TIRドメイン野生型とR196C変異型のMal TIRドメインとの結合の比較

5. NF- κ Bのp105サブユニットのデスドメイン(DD)立体構造を鋳型として、MyD88-DDのモデル構造を構築した(図6)。

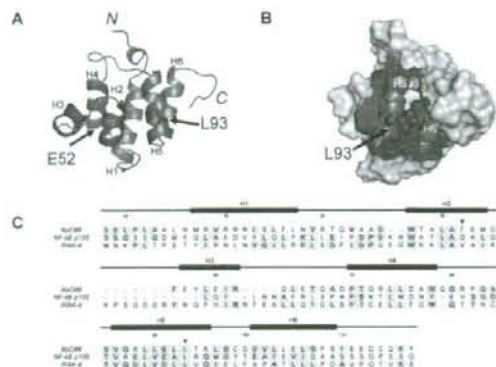


図6 A, B: MyD88 デスドメインのモデル構造
C: デスドメイン間のアミノ酸配列アライメント

D. 考察

MyD88-TIRドメインは、構造上大きく離れて位置するBBループ(Box2)上のR196と α E(Box3)上のR288で別のアダプター分子Malと直接相互作用する。

MyD88欠損症で同定された変異のひとつR196Cタンパクは、Malとの直接相互作用が著しく減弱していた。また、デスドメイン上に同定された残りふたつの変異箇所は、両者ともモデル構造上二次構造領域(H2、H5)に位置しており、変異導入によりタンパクの安定性が損なわれることが示唆された。

TLR4シグナルはMal依存性経路以外に、TRAM/TRIFを利用した代替経路が存在するため、グラム陰性菌に対する感染防御能は保持される。またウイルス感染の際には、MyD88非依存経路を利用するTLR3や細胞内受容体であるRIG-I、MDA5やDAIが認識し免疫反応が惹起される。しかしMyD88とMalの相互作用の減弱により、他に代替経路を持たないTLR2経路が障害されると、特にグラム陽性菌に対する易感染性が主として顕在化してくるのではないかと考えられた。

E. 結 論

MyD88の構造情報及び直接相互作用情報より、ヒトMyD88欠損症の表現型発症メカニズムを解明した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling.

Hidenori Ohnishi, Hidehito Tochio, Zenichiro Kato, Kenji Orii, Ailian Li, Takeshi Kimura, Hidekazu Hiroaki, Naomi Kondo, and Masahiro Shirakawa. submitted

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

WASPの活性化及び蛋白分解機構の解析

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)

渡辺 祐 子 (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)

Looi Chung Yeng (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)

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) のミスセンス変異がWASP結合蛋白質(WIP)結合領域に集中しているが、その理由は解明されていなかった。今回、WIPノックアウトマウス及び患者T細胞の解析から、WASP-WIP複合体の形成がWASP蛋白質の安定化に重要であること、またWASP蛋白質分解機構としてCalpainとユビキチン化の関与が示唆された。

次に、恒常的活性化変異WASPによりX連鎖性好中球減少症とMDSの合併例が報告されているが、発症の分子機構は十分に解明されていない。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、機能的にもpodosome形成を促進することを示した。Genechipを用いて活性化型変異L270P WASPの影響をK562細胞で調べるとG-CSF受容体を始めいくつか骨髄系細胞分化に関わる遺伝子発現の変化が観察され、WASPは細胞核内で遺伝子転写調節にも関わることが示された。

A. 研究目的

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連鎖性の原発性免疫不全症である¹⁾。WASP結合蛋白質 (WIP)²⁾はWASP N末に結合し、WASPの免疫学的シナプスへのリクルートにも関与する蛋白質である³⁾。WAS患者におけるWASPミスセンス変異がWIP結合領域に集中しているがその理由は解明されていなかった。今回、WIPノックアウトマウスおよびWAS患者T細胞を用いて、その分子機構の解明を目的とした⁴⁾。

最近、X連鎖性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⁵⁾。WASP変異と好中球減少症が結びついたことで、骨髄異形成症候群 (MDS) 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⁶⁾。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、その活性化が抑制されている。このため、WASPが活性化変異によりopen conformationを取ったままの状態でのような生物学的機能が引き出されるのか、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。これまで細胞膜や細胞質での機能が解析されていたWASPが、活性化変異WASPをモデルとしてWASPが細胞核内で遺伝子転写調節機構や染色体安定性にどのような機能をもつのかを理解する上で重要な知見と考えられた。本研究では活性化型WASPを発現するCos7細胞、THP-1細胞、K562細胞を作成し、その分子生物学的解析を行なうことを目的とした。

B. 研究方法

1) WIPノックアウトマウスT細胞の解析

マウス脾臓よりT細胞を分離し、WASP mRNAと蛋白質発現量を調べた。また、WIPを再導入することにより、WASP蛋白質発現が回復するかを調べた。

2) WIPの誘導的発現

Jurkat細胞にtetracycline依存性にWIPを発現する発現系を構築し、WIP依存性にWASP蛋白質発現が変化するかを調べた。

3) WASP蛋白分解機構の解析

WASP蛋白質全長をin vitro translation法にて作成し、これがCalpain-1,2およびCaspase-3の基質になるかを調べた。また、Jurkat細胞をCD3刺激後、WASP免疫沈降産物が抗ubiquitin抗体にて認識されるかを調べた。

4) WAS患者T細胞における解析

Informed consent取得後に、末梢血より精製カラムによりT細胞を分離し、WASP蛋白質発現におけるCalpain、proteasome阻害剤の効果を解析した。また機能的にIL-2産生とアクチン重合化が回復するかを定量的に解析した。

5) 恒常的活性化変異WASPの遺伝子導入

pcDNA3.1WASPまたはpcDNA3.1WAS-mutants発現ベクターをin vitro mutagenesis法にて作成した。これらをCos-7細胞、THP-1細胞、K562細胞に遺伝子導入した。K-562細胞はその後限界希釈法にてシングルクローンを得た。

6) WASPチロシンリン酸化とpodosome形成能の解析

野生型および変異WASPを遺伝子導入したCos-7細胞、THP-1細胞にて免疫沈降法にてチロシンリン酸化レベルを比較した。同様にTHP-1細胞におけるpodosome形成細胞の割合を定量した。

7) マイクロアレイ解析

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より、total RNAを抽出しgenechip解析を行なった。GeneChip-R 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、その中でG-CSF受容体の発現レベルをRT-PCR法にて確認した。

C. 研究結果

1) WIPノックアウトマウスT細胞の解析

WIPノックアウトマウスでは野生型と比較しWASP蛋白質は10%以下に減少していたが、mRNAレベルは同等であった。WIPのWASP結合領域を再導入することで、WASP蛋白質発現量は回復した。

2) WIPの誘導的発現

WIPのWASP結合領域を誘導的に発現することにより、WASP発現量は増加した。WASP結合領域以外ではその現象は認めなかった。

3) WASP蛋白分解機構の解析

WASPはCalpain-1,2の基質になることが示された。また、T細胞のCD3刺激後にWASP免疫沈降産物はユビキチン化を受けることがわかった。

4) WAS患者T細胞における解析

Calpain、proteasome阻害剤により、WASP蛋白質発現量は部分的に回復した。しかし、機能的にIL-2産生とアクチン重合化は回復しなかった。

5,6) WASPチロシンリン酸化とpodosome形成能の解析

L270P WASPをはじめ恒常的活性化変異WASPはLck、Fynの存在下で野生型WASPよりも強いY291のリン酸化を受けた。これに伴い、THP-1細胞において機能的にpodosome形成能は亢進した。

7) マイクロアレイ解析

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 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。この結果を確認するために、新たに K562、K562WAS クローンおよび K562 mutant 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 WAS 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。他の K562 クローンでも全く同様の結果であった。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

今回の結果から、WIP は WASP 蛋白質の安定化に重要であり、WASP-WIP 複合体として機能することが示された。また臨床的に WAS 患者でのミスセンス変異が WIP 結合領域に集中している分子レベルでの根拠を示すことができた。しかし、ただ単に WASP 蛋白分解を阻害しただけでは機能的な回復までには至らず、WASP-WIP 複合体としてでないとならない可能性が示唆された。今後、遺伝子治療が行われる際、WASP 蛋白発現の調節機構の理解に、WIP は重要な役割を果たすと考えられる。

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⁷⁾。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。活性化型 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。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が、複雑であり、一つ一つの分子をロ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。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。遺伝子発現プロファイル解析で我々は 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、重症の好中球減少症となる⁸⁾。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

WIP は WASP 蛋白質の安定化に重要であり、WASP-WIP 複合体として機能すること、これがなぜ WASP ミスセンス変異が WIP 結合領域に集中しているかの根拠となることが示された。WASP 蛋白質は Calpain とユビキチン化の基質となることがわかった。

我々が今回取り上げたモデルでは活性化型 WASP が好中球減少症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系であり、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化型 WASP による好中球分化阻害の病態、更に WASP が細胞核内で遺伝子転写調節機構にどのように機能しているかを解明していきたい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1) 第16回日本小児ITP研究会 (平成20年10月25日)

WAS/XLTの分子病態におけるWIPの役割
笹原洋二、土屋滋

2) 第50回日本小児血液学会 (平成20年11月14-16日)

WASP異常症の多様性とその分子病態の解明に向けて
笹原洋二、渡辺祐子、Iooi Yeng Cheng、佐藤美季、箱崎郁子、久間木悟、土屋滋

3) 第50回日本小児血液学会 (平成20年11月14-16日)

Meet the expert: Waltzing with WASP (Wiskott-Aldrich syndrome)
笹原洋二

4) 50th American Society of Hematology Annual Meeting (平成20年12月6-9日)

WIP is a chaperone for WASP.
Yoji Sasahara, Narayanaswamy Ramesh, Shigeru Tsuchiya, Raif S Geha

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

参考文献

1. Derry J.M., et al. (1994) Isolated of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 78: 635-644.

2. Ramesh N., et al. (1997) WIP, a protein associated with Wiskott-Aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.,USA*.94:14671-14676.

3. Sasahara Y., et al. (2002) Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol. Cell* 10: 1269-1281.

4. de la Fuente MA and Sasahara Y, et al. (2007) WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc.Natl.Acad.Sci.,USA*. 104: 926-931.

5. Devriendt K., et al. (2001) Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nature Genet.* 27: 313-317.

6. Ancliff P.J., et al. (2006). Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood* 108: 2182-2189.

7. Guinamard R., et al. (1998) Tyrosine phosphorylation of the Wiskott-Aldrich syndrome protein by Lyn and Btk is regulated by CDC42. *FEBS Lett.* 434: 431-436.

8. Liu F., et al. (1996) Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* 5: 491-501.

B細胞、NK細胞、形質細胞様樹状細胞を欠損した新規免疫不全症

高田 英 俊 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
石村 匡 崇 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
原 寿 郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
菊 繁 吉 謙 (九州大学病院遺伝子細胞療法部)
有 信 洋二郎 (九州大学病院遺伝子細胞療法部)
赤 司 浩 一 (九州大学大学院医学研究院病態修復内科)
土 居 岳 彦 (理化学研究所ヒト疾患モデル研究ユニット)
石 川 文 彦 (理化学研究所ヒト疾患モデル研究ユニット)

研究要旨

生後4か月時にニューモシスティス肺炎にて入院した女児の病態を解析した。患児のリンパ節は欠損しており、IgG、IgM、IgAはいずれも検出感度以下で、末梢血のB細胞及びNK細胞の欠損を認めた。また、骨髄系樹状細胞 myeloid dendritic cells (mDC) は正常に認められたが、形質細胞様樹状細胞 plasmacytoid dendritic cells (pDC) は完全に欠損していた。T細胞数は正常であり、抗CD3/CD28抗体やPHAに対する増殖反応は正常だった。骨髄ではCD19⁺細胞およびCD10⁺細胞は完全に欠損しており、さらに最も未分化なリンパ球系細胞と考えられるCD127⁺CD34⁺細胞が欠損していた。pDCの前駆細胞と考えられるCD123⁺CD38⁺CD34⁺細胞も欠損していた。末梢血単核球のpoly:IC、ODN type A刺激に対するIL-6産生能や、Mumps生ワクチン刺激によるIFN- γ 産生能は著しく低下していた。新生仔NOD/scid/IL2rgKOマウスに患者骨髄CD34⁺細胞を移植したところ患者の表現系が再現された。IKAROS、FLT3、FLT3 Ligand、BCL11A、PU.1遺伝子には異常を認めていない。リンパ球系細胞への分化障害による新規原発性免疫不全症候群として報告する。

A. 研究目的

血球の分化は種々の分子機能によって決定され、転写因子やレセプターシグナル伝達に関連する分子などが重要な役割を果たしている。リンパ球系細胞の分化は造血幹細胞から分化したCommon lymphoid progenitor (CLP) という共通の細胞から、T細胞、NK細胞、B細胞が分化し、形質細胞様樹状細胞 plasmacytoid dendritic cells (pDC) もリンパ球系細胞であると考えられている。

今回、生後4か月でニューモシスティス肺炎を発症した患者を検討したところ、T細胞は正常に認められるものの、B細胞、NK細胞、

pDCが選択的に欠損していることが判明した。この新たな原発性免疫不全症の病態を解析した。

B. 研究方法

患者末梢血白血球分画、および骨髄CD34⁺細胞からの血球分化過程をフローサイトメーターを用いて解析した。末梢血単核球の麻疹、水痘、ムンプス生ワクチン、TLR ligand、Zymosanに対するサイトカイン産生能はBD Cytometric Bead Array システムを用いてフローサイトメーターにて解析した。麻疹ワクチン(ビケンCAM)、水痘ワクチン(ビケン)、

ムンプスワクチン(北研)は、FCS入りRPMIで10倍に希釈して使用した。またPoly:IC、ODN (type A)、LPS、OX-Zymozanはそれぞれ25 μ g/ml、1 μ M、1 mg/ μ l、10 μ g/mlの濃度で使用した。

C. 研究結果

1. 患者の病歴・臨床検査所見

症例は生後4か月の女児。鼻水と咳が持続するため前医で精査したところ胸部CTで両肺のすりガラス状陰影が認められ、血液検査で β -D glucanの上昇が見られたため当科に転院した。入院時理学的所見では、リンパ節の欠損を認めた。白血球数: 22,930/ μ l (リンパ球21%)、KL-6: 3,799、 β -D glucan: 1,257 pg/mlであり、喀痰のPneumocystis jirovecii PCRが陽性であった。免疫学的には、IgG (<50 mg/dl)、IgA (<5 mg/dl)、IgM (<5 mg/dl)はいずれも欠損しており、NK活性の欠損 (5.6% Lysis: 正常値20.9~40.8) を認めた。

末梢血T細胞は正常に認められ(図1)、PHAに対する反応性も正常(519 S.I. (%): 正常値254-388)であったが、B細胞(図1)およびNK細胞が完全に欠損していた(図2上段)。

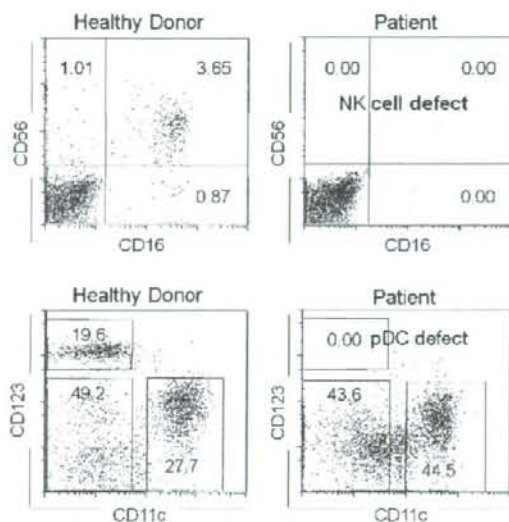


図2. 患者末梢血NK細胞とpDCの欠損

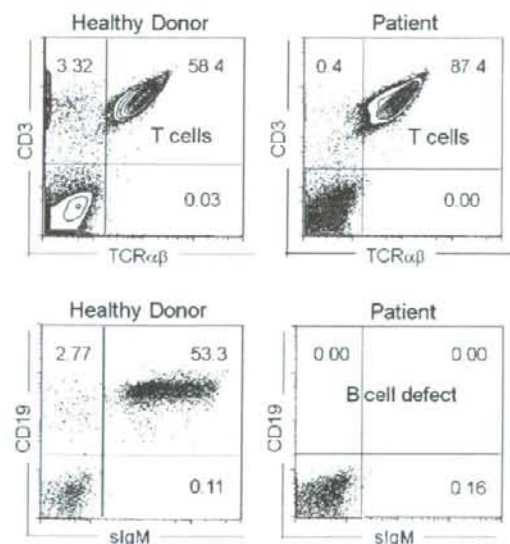


図1. 患者末梢血B細胞の欠損

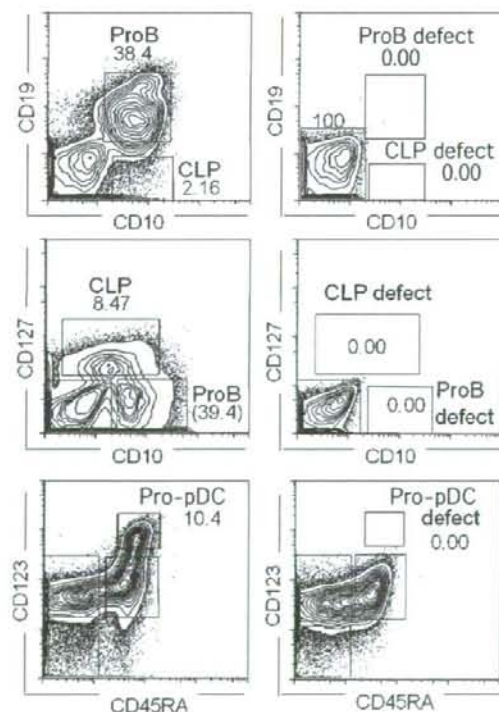


図3. 患者骨髄ProB細胞、Pro-pDC細胞、CLPの欠損

末梢血細胞分画を詳細に検討するために、末梢血DCを検討したところ、骨髓系樹状細胞(mDC)は正常に認められたが、形質細胞様樹状細胞(pDC)は欠損していた(図2下段)。単球や好中球は正常に認められた(data not shown)。

骨髓でのリンパ球系細胞の分化を検討したところ、ProB細胞やpDCの前駆細胞であるPro-pDCが欠損し、さらにはCLPであるlin-CD34⁺ CD38⁺ CD10⁺ CD127⁺細胞が欠損していた(図3)。

他方、末梢血に存在するT細胞はAllo抗原に対して正常な増殖反応を示し(Data not shown)、抗CD3抗体+抗CD28抗体に対する増殖反応も正常であり機能的な異常は認められなかった(図4)。

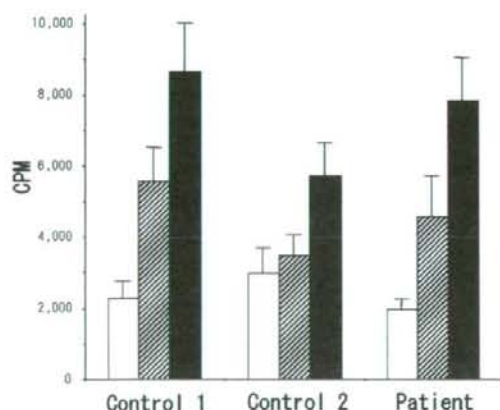


図4. T細胞の抗CD3/抗CD28抗体に対する増殖反応。Open bar: 抗CD3抗体(0 μg/ml)+抗CD28抗体(0 μg/ml)、Shaded bar: 抗CD3抗体(0.1 μg/ml)+抗CD28抗体(1 μg/ml)、Closed bar: 抗CD3抗体(1 μg/ml)+抗CD28抗体(1 μg/ml)にて5日間培養。

樹状細胞の欠損がどのような影響を与えているかを検討するために、末梢血単核球を種々のリガンドで刺激し、その反応性を検討した。

患者末梢血単核球では、Mumps生ワクチンに対するIFN-α産生能が低下していた。また、

poly:ICやODN typeA刺激に対するIL-6産生能も欠損していた。これらの結果はpDC欠損を反映したものであると考えられる。

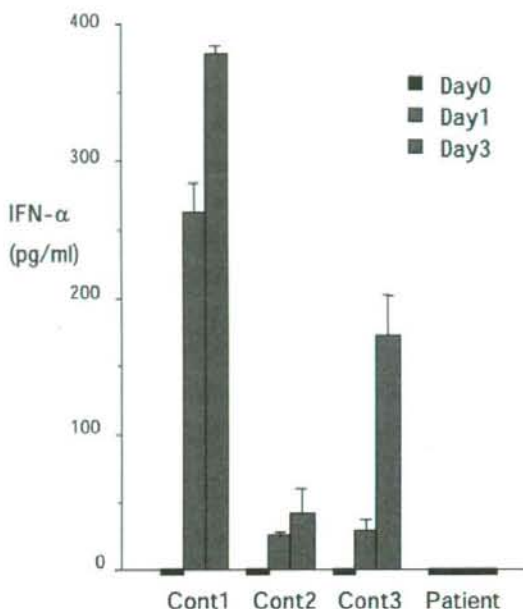


図5. 患者末梢血単核球のMumpsワクチンに対するIFN-α産生能の欠如。

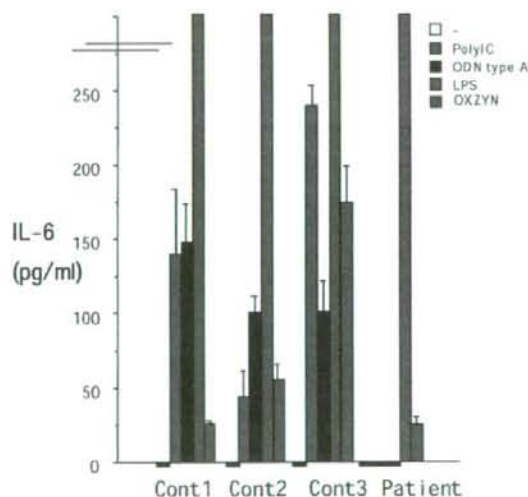


図6. 患者末梢血単核球のpoly:IC、ODN typeA、刺激に対するIL-6産生能の欠如。末梢血単核球を種々のligandで24時間培養し、培養上清中のIL-6濃度を測定。

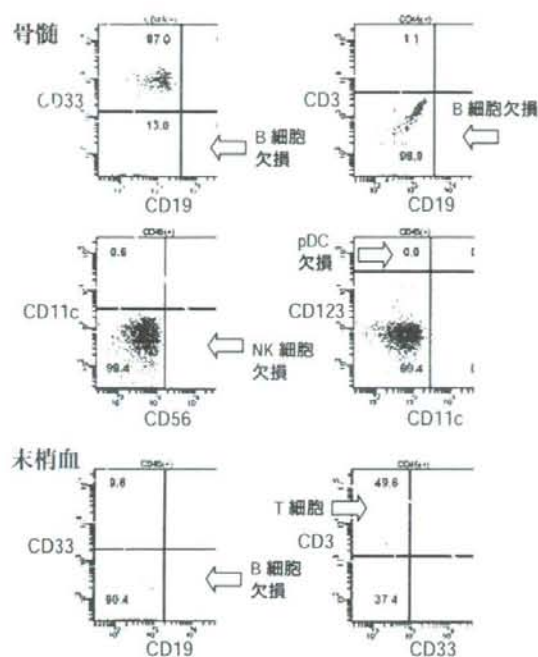


図7. NOD/SCID/IL2rgKO マウス内での患者血球系細胞の分化。NOD/SCID/IL2rgKO マウス内で患者骨髓CD34⁺細胞を移入し、患者血球系細胞を分化させ、フローサイトメーターで解析。

次に、患者骨髓CD34⁺細胞をNOD/SCID/IL2rgKO マウスに移入し、血球系細胞をマウス内で分化させたところ、患者と同様に末梢血T細胞は分化したが、B細胞やNK細胞、pDCは分化しなかった(図7)。これらのことから、患者のリンパ球分化の障害は内在的なものであると考えられる。

D. 考察

今回、B細胞、NK細胞、pDCが完全に欠損する新たな原発性免疫不全症候群を報告した。この疾患では、骨髓におけるCommon lymphoid progenitor以降のリンパ球分化が障害されていたがT細胞は正常に認められた。

リンパ球系細胞の分化は、造血幹細胞からCommon lymphoid progenitorを経て、T細胞、B細胞、NK細胞の各リンパ球系細胞に分化すると考えられてきた。したがって、

Common lymphoid progenitorといわれている細胞以前から、何らかの先天的な異常によりB細胞、NK細胞、pDCへの分化が障害されているものと考えられ、それらの細胞への分化に共通して必要な転写因子が欠損している可能性が考えられる。この場合、T細胞の分化はその異常による影響を受けないのであろう。この疾患の責任遺伝子を同定するために、同様な表現型を示すノックアウトマウスを参考に種々の候補遺伝子(*IKAROS*, *FLT3*, *FLT3 Ligand*, *BCL11A*, *PU.1* 遺伝子)に関して遺伝子配列の異常を検索したが、現時点において異常の認められた遺伝子は確認できていない。また患者および健常者のCD34⁺細胞を純化し、マイクロアレイ法を用いて遺伝子発現の比較を行ったが、現時点では責任遺伝子の同定には至っていない。

マウスではこのCommon lymphoid progenitorからの分化以外のリンパ球分化経路がある可能性も指摘されており、ヒトにおけるCommon lymphoid progenitorの存在に関してさらに詳細な解析が必要であると考えられる。

E. 結論

B細胞、NK細胞、pDCの欠損した新たな原発性免疫不全症を明らかにした。

参考文献

1. Myeloid lineage commitment from hematopoietic stem cell. Iwasaki H and Akashi K. *Immunity* 26:726-740, 2007
2. Early decisions in lymphoid development. Ye Min and Graf T. *Curr Opin Immunol* 19:123-128, 2007

新規の原発性免疫不全症と考えられるIgMメモリーB細胞欠損症の1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)

上松 一 永 (信州大学医学部小児医学講座)

研究要旨

生後12ヵ月からインフルエンザ桿菌による肺炎を反復し、3歳5ヵ月時に肺炎球菌性髄膜炎にて入院した男児において、免疫学的精査を行ったところ、血清IgMとIgMメモリーB細胞の選択的欠損を見いだした。これまでの報告では、選択的IgM欠損症では莢膜多糖体を有する細菌に対する易感染性は著明ではないことなど、本児の肺炎球菌、インフルエンザ桿菌に対する易感染性はIgMメモリーB細胞の選択的欠損が重要な役割を果たしていると考えられた。莢膜多糖体を有する細菌に対して易感染性を示し、IgMメモリーB細胞が選択的に欠損している症例の報告は先天性無脾症とCeliac病以外これまで見当たらず、新規の原発性免疫不全症の可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒトCD27陽性メモリーB細胞は、表面IgM⁺IgD⁺のIgMメモリーB細胞とIgD⁻のswitchedメモリーB細胞に分類されている。IgMメモリーB細胞は主に脾臓のmarginal zoneで産生され、T細胞非依存性に多糖体抗原に対する高親和性IgM抗体を産生し、switchedメモリーB細胞とは異なった分化・成熟過程をたどると考えられている。先天性無脾症、Celiac病、脾摘後や2歳以下の乳幼児と高齢者など肺炎球菌に対して易感染性を呈する疾患や生理的状态ではIgMメモリーB細胞が著減していることが知られており、莢膜多糖体を有する細菌感染防御に脾臓とIgMメモリーB細胞が重要な役割を果たしていることが示唆されている。今回、莢膜多糖体を有する細菌に易感染性を示した3歳男児において、IgMメモリーB細胞の選択的欠損を見いだしたので、臨床的、免疫学的特徴につき検討を行った。

B. 研究方法

症 例

症例は3歳6ヵ月、男児。主訴は易感染性。家族歴、成長・発達歴に特記すべきことはない。既往歴は、生後12ヵ月から肺炎にて近医に4回入院している(いずれの入院でも咽頭培養でインフルエンザ桿菌検出も、入院時以外は検出されない)。3歳5ヵ月時に肺炎球菌性髄膜炎(血培も肺炎球菌陽性)に罹患し近医にて入院加療、検査にてIgM低値(IgG 675mg/dl, IgA 337mg/dl, IgM 20mg/dl以下)を指摘され、精査のため当科紹介となった。(なお髄膜炎罹患後4歳までは、肺炎球菌とインフルエンザ桿菌による肺炎に1回、咽頭炎に2回罹患し入院加療を要したため、発熱直後から抗生剤内服をするようにしたところ入院加療を要することはなくなった)

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子解析を含むため、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得たうえで、その指針に則り行った。

C. 研究結果

1) 臨床検査結果

白血球 $9500/\mu\text{l}$, 好中球 $3100/\mu\text{l}$, リンパ球 $5500/\mu\text{l}$, 血清免疫グロブリン値はIgG 557mg/dl (IgG₁ 239mg/dl , G₂ 378mg/dl , G₃ 20.5mg/dl , G₄ 8.1mg/dl), IgA 242mg/dl , IgM $<10\text{mg/dl}$, IgE 1IU/ml , IgD 34.1mg/dl と血清IgMが著減し、IgGの軽度低下とIgG₁の低下を認めた。血型は表A型であったが、抗B抗体価は1倍以下であった。肺炎球菌特異的IgG₂抗体は $3.9\mu\text{g/ml}$ と陽性であった。腹部CT検査では脾臓の形態異常は認めなかった。

2) 免疫学的解析結果

各種mitogen (PHA, ConA, PWM, SAC) 刺激に対する反応に異常は認められなかった。末梢血リンパ球サブセットでは、CD3 66.8%, CD4 42.1%, CD8 14.9%, CD16/56 3.3%, CD19/20 9.7%, CD19/IgM 10.3%とB細胞、表面IgM陽性細胞ともに正常に存在した。しかし、末梢血CD19⁺B細胞におけるナイーブ・メモリー分画を調べたところ、CD27⁻IgD⁺ ナイーブB細胞81.0% (正常年齢対照者 $75.9\pm 8.7\%$), CD27⁺IgD⁺ IgM memory B細胞1.0% (正常年齢対照者 $7.9\pm 2.4\%$),

CD27⁺IgD⁻ switchedメモリーB細胞6.0% (正常年齢対照者 $10.4\pm 3.4\%$)と患児ではIgM memory B細胞が欠損していた。(図1)

IgM重鎖C μ の膜型および分泌型をコードする領域の遺伝子配列の検討では異常を認めなかった。

好中球におけるCD62L sheddingは正常で、単球におけるTNF- α 産生も正常であった。末梢血単核球分画におけるWASP発現も異常はなかった。

D. 考察

莢膜多糖体を有するインフルエンザ桿菌、肺炎球菌に対して易感染性を示した3歳男児において、免疫学的検討から血清IgMとIgM memory B細胞の選択的欠損を見いだした。

血清IgM低値や肺炎球菌に対して易感染性を呈する原発性免疫不全症として、Wiskott-Aldrich症候群や選択的IgG2欠損症、肺炎球菌特異的IgG2欠損症、IRAK4欠損症、MyD88欠損症などが挙げられるが、免疫学的検討から本症例ではいずれも否定的であった。

本症例のような選択的IgM欠損と選択的IgM memory B細胞欠損の合併例は調べた限り見あたらなかった。これまでの報告から、Celiac

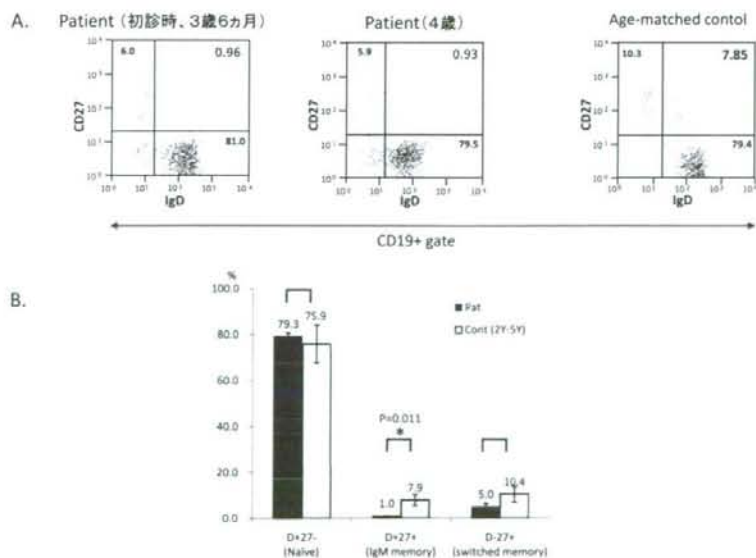


図. 患者末梢血B細胞におけるナイーブ・メモリー分画

病では選択的IgM欠損症とIgM memory B細胞欠損の合併の可能性はあるが、Celiac病では脾臓の萎縮が特徴の1つであり(Goldsteinら(Clin.Dev.Immunol, 2008), Di Sabatinoら(J Allergy Clin Immunol, 2007)), 本症例では、消化器症状などグルテンに対するアレルギー症状は認められず、形態学的な脾臓の異常もなく、Celiac病は否定的である。

小児の選択的IgM欠損症51例をレビューした報告(GoldsteinらClin.Dev.Immunol, 2008)では、肺炎球菌に対して易感染性を示した症例は2例のみと選択的IgM欠損症では肺炎球菌に対する易感染性は必ずしも特徴として認められず、本症例における荚膜多糖体を有する細菌に対する易感染性の原因としてIgM欠損症が重要な役割を果たしている可能性は低いと思われた。一方、先天性無脾症、Celiac病、脾摘後や2歳以下の乳幼児と高齢者など肺炎球菌に対して易感染性を呈する疾患や生理的状态では、IgM memory B細胞が著減していることから荚膜多糖体を有する細菌感染の防御には、IgM memory B細胞が重要な役割を果たしていると考えられている(Agematsuら(J Immunol, 2005)、Carsettiら(J Exp Med, 2003))。したがって、本症例における荚膜多糖体を有する細菌への易感染性は、IgM memory B細胞の欠損が重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられる。IgM memory B細胞はBCRやTLR, TLR様受容体などを介して、局所に侵入してきた荚膜多糖体を有する細菌を特異的に認識し、T細胞非依存性に多糖体抗原に対する高親和性のIgM抗体を早期に産生することが報告されている。本症例ではIgM memory B細胞の欠損により、荚膜多糖体を有する細菌の侵入に対する初期感染防御機構の1つが働かないことが肺炎球菌やインフルエンザ菌に対する易感染性の原因となっている可能性が考えられた。

選択的IgM memory B細胞欠損が認められる場合、選択的IgM欠損症が合併するか否かの検討には今後同様の症例の蓄積が必要と思われるが、本症例で得られた知見から、1) 荚膜多糖

体を有する肺炎球菌、インフルエンザ桿菌による重症感染症の反復。2) IgM memory B細胞の選択的欠損(+選択的IgM欠損症)以外免疫学的異常を認めない3) 脾臓の形態学的異常を認めない。4) 先天性無脾症、Celiac病や他の原発性免疫不全症が除外できる、以上の特徴を有する新規の原発性免疫不全症として、IgM memory B細胞欠損症が示唆された。

E. 結論

新規の原発性免疫不全症として、荚膜多糖体を有する細菌に対して易感染性を呈し、IgM memory B細胞が選択的に欠損しているIgM memory B細胞欠損症を報告した。

謝辞

単球におけるTNF- α 産生能を検討していただきました九州大学大学院成長発達医学 高田英俊先生ならびに貴重な症例をご紹介いただきました中津川市民病院 小児科 安井正宏、安藤秀男先生に深謝致します。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

Ohshima M, Futamura M, Kamachi Y, Ito K, Sakamoto T : Allergic bronchopulmonary aspergillosis in a 2-year-old asthmatic boy with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked. *Pediatr Pulmonol.* 2009 44:297-299.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

原発性免疫不全症モデルマウスの確立と応用

土居 岳彦 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
石川 文彦 (理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター
ヒト疾患モデル研究ユニット)
高田 英俊 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
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)
原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)

研究要旨

自然および獲得免疫能が欠失または高度に低下したマウスにヒト造血幹細胞を移入することにより、ヒトの免疫系を構築したマウスの作成が近年可能となっている。我々はこのヒト化マウスにXLA患者骨髄由来Linage⁻CD34⁺細胞を移植し、ヒトXLAの病態を再現するモデルマウス(XLAレシピエントマウス)の確立が可能か検討した。移植後、正常造血幹細胞を移植した免疫系ヒト化マウスと比べてXLAレシピエントマウスでは著明なB細胞分化障害および機能障害が起きていた。我々は今後このXLAレシピエントマウスを用いて遺伝子治療の有効性・安全性などについて検討を加える予定である。

A. 研究目的

実験動物を用いた研究はin vivoでの解析が可能でありこれまでの医学の発展に大きく寄与してきた。その反面、ヒトと実験動物との間に多くの相違点があることも分かり、ヒト疾患の病態解明に限界があることも分かってきている。この問題を解決するひとつの方法としてヒトの免疫システムを再現する免疫系ヒト化マウス(以下ヒト化マウス)が注目を浴びている。このマウスを利用して癌や血液疾患などヒト特異的疾患のモデルマウスが作成されており病態解明や治療法開発に用いられてきている。

X連鎖性無ガンマグロブリン血症(X-linked agammaglobulinemia: XLA)の患者ではBruton's tyrosine kinase (Btk) 遺伝子の異常に基づいたB細胞の分化障害がみられる。ヒトXLAを再現するマウスモデルの一つにBtk遺伝子異常をもつXIDマウス(murine X-linked immunodeficiency)が知られている。しかし

XIDマウスは、脾臓組織にB細胞が正常マウスの半分程度存在し、血清IgGはIgG3以外のサブクラスは同程度保持されているなどB細胞障害は中等度であると言われており、同じBtk遺伝子の異常であってもヒトとマウスでは表現型が異なることが知られている。今回、XLA患者骨髄から得られたLinage⁻CD34⁺細胞をヒト化マウスに移植し、ヒトにおけるXLAの病態をヒト化マウスにおいても反映させることができるかどうか検討した。

B. 研究方法

5名のXLA患者骨髄よりLinage⁻CD34⁺細胞をcell sorterで純化し、新生仔NOD/SCID/IL2r γ knock outマウスに移植した(XLAレシピエントマウス)。対照として、正常臍帯血よりLinage⁻CD34⁺細胞を分離し同様に新生仔NOD/SCID/IL2r γ knock outマウスに移植した(正常ヒト化マウス)。移植から

5ヶ月以降に骨髄、脾臓および末梢血における各免疫細胞およびB細胞分化についてフローサイトメトリーで解析を行った。またこれらマウスより血清を採取し、血清IgMおよびIgGの計測を行った。

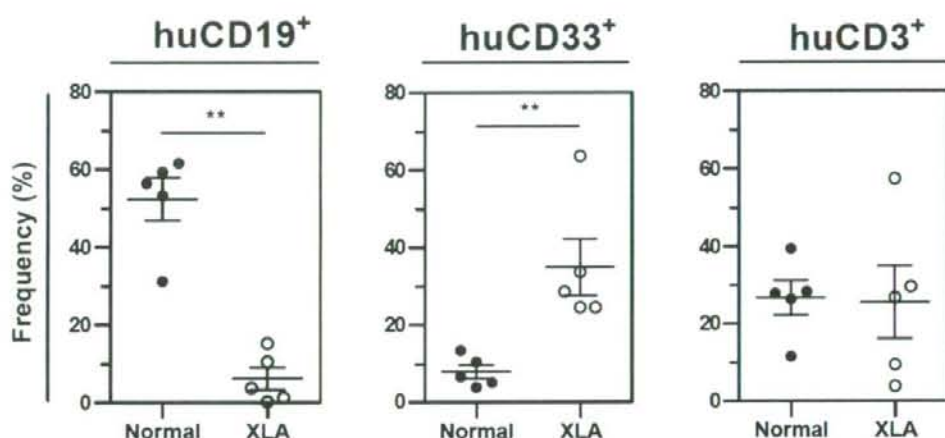
シビエントマウスは正常ヒト化マウスと比較してCD19⁺B細胞の頻度が低下していた。一方で他の免疫細胞サブセットであるCD3⁺T細胞やCD33⁺単球・顆粒球はXLAレシピエントマウスおよび正常ヒト化マウスいずれにも存在していた。(図1)。

C. 研究結果

1. B細胞キメリズムの比較

2次リンパ組織である脾臓において、XLAレ

(図1)



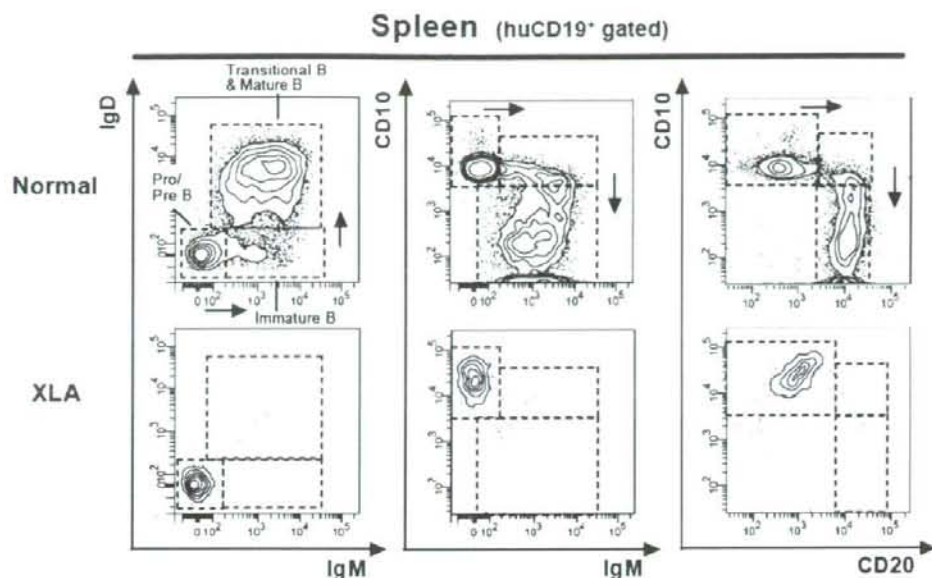
2. B細胞分化の比較

正常ヒト化マウスの脾臓では、CD20陽性B細胞が多く、IgM⁺IgD⁺の成熟したB細胞が増加していたが、XLAレシピエントマウスでは大多数がCD10⁺IgM⁻IgD⁻のProB細胞およびPreB細胞でありB細胞分化の障害が顕著にみられた(図2)。

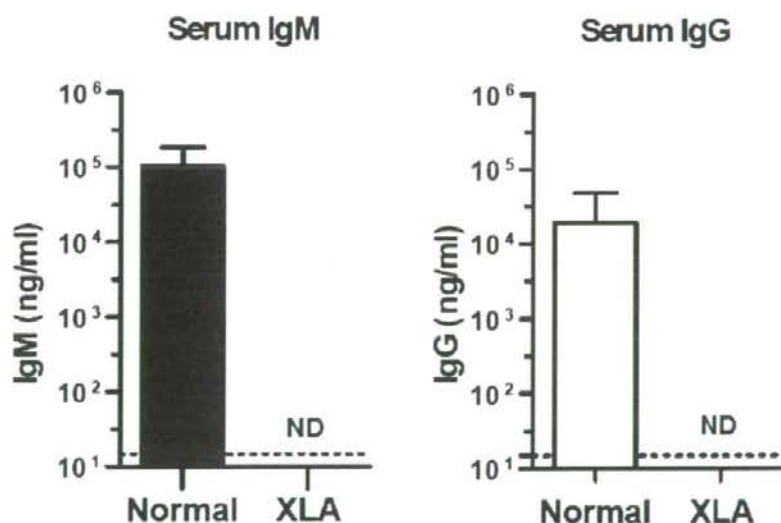
3. B細胞機能の比較

XLAレシピエントマウスおよび正常ヒト化マウスより血清を採取しIgMおよびIgGを測定したところ、XLAレシピエントマウスでは著明な免疫グロブリン産生能の低下を認めた(図3)。一方、正常ヒト化マウスの脾臓B細胞をCD40抗体やIL-4、IL-21などサイトカインで刺激を行ったところB細胞の増殖とIgG産生細胞へのクラススイッチが見られた。

(図2)



(図3)



D. 考 察

今回、5名のXLA患者骨髄からLinage⁻CD34⁺細胞を分離し、ヒト化マウスに移植してXLAレシピエントマウスを作成した。正常臍帯血Linage⁻CD34⁺細胞より作成した正常

ヒト化マウスでは、脾臓で成熟B細胞を認め、IgMやIgGなどヒト免疫グロブリンの産生能を認めていたが、一方でXLAレシピエントマウスは著明なB細胞数の低下、B細胞の分化障害と免疫グロブリンの低下を認めた。これら3点

から XLA レシピエントマウスは XID マウスなど従来のマウスモデルと比較してヒト XLA の病態を反映するモデルマウスとして有用である可能性が高いと考えられた。今後この XLA レシピエントマウスをもちいて、実際の患者では実施できないウイルスベクターを用いた遺伝子治療のモデルを作成し、安全性・有効性の評価に繋がりたいと考えている。

E. 結 論

XLA 患者の骨髄から採取した Linage⁻CD34⁺細胞を移植した XLA レシピエントマウスでは、著明な B 細胞数の低下、B 細胞分化障害および免疫グロブリン産生能の低下がみられていた。ヒト XLA の病態を反映するモデルマウスとして有用である可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

I. DOI Takehiko, TAKADA Hidetoshi, KANEGANE Hirokazu, TOMIZAWA Mariko, NAKAYAMA Toshinori, OHARA Osamu, MIYAWAKI Toshio, HARA Toshiro, ISHIKAWA Fumihiko

Development of functional human B cells in NOD/SCID/IL2rgKO mice and the application of the xenotransplant model in studying human immunodeficiency

第 38 回日本免疫学会総会・学術集会
2008.12.1-3 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願なし

I. 参考文献

1. Ishikawa F et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chain(null) mice. *Blood*. 2005 Sep 1;106

(5):1565-73.

2. Ishikawa F et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol*. 2007 Nov;25(11):1315-21.

造血幹細胞から免疫細胞への分化培養系確立に関する研究

千葉 滋 (筑波大学大学院人間総合科学研究科)

研究要旨

ヒト由来の造血幹細胞やiPS細胞などから体外でリンパ球を誘導する技術を確認できれば、免疫不全症の病態解明や新たな原因遺伝子の同定、さらには治療法開発などへの応用が期待できる。

幹細胞からT細胞やNK細胞を培養によって誘導することは技術的に困難であったが、Notchシグナルを付与するような培養環境を与えることによりT細胞が誘導できることが、近年マウスの系で示された。

われわれはまず、ヒト造血幹細胞からNotchのリガンドを利用してT細胞を誘導することを試みた。マウス造血幹細胞からの誘導は容易であったが、ヒト造血幹細胞からは、胸腺細胞の主体を占めるCD4・CD8ダブルポジティブT細胞より未熟な段階までしか分化を誘導することができなかった。

しかし、NK細胞に関しては、Notchシグナルが必須であることを突き止めた他、NK細胞誘導因子といわれるIL-15の非存在下でも、Notchシグナル付与により細胞障害活性をもつ、機能的なNK細胞に誘導されることを明らかにした。

A. 研究目的

ヒト由来iPS細胞の培養により種々の免疫細胞を誘導できれば、免疫不全症患者の病態解明、新たな原因遺伝子同定、さらには治療法開発など、様々な応用が考えられる。

このような技術開発に向けて、まず造血幹細胞を体外で培養して免疫細胞、特にT細胞およびNK細胞を誘導する技術の確立をめざす。

B. 研究方法

インフォームドコンセントを得て提供された臍帯血から単核球を分離し、抗CD34抗体磁気ビーズを用いてCD34⁺細胞を分取した。

得られたCD34⁺細胞を、stem cell factor (SCF)、flt-3 ligand (FL)、interleukin-15 (IL-15)を含む培養液中で、Delta4-Fc (可溶性Notchリガンド)あるいはコントロールFcをコーティングした培養皿あるいは何もコーティ

ングしない培養皿で培養した。経時的に、総細胞数、および、未熟ないし機能的NK細胞の割合をフローサイトメトリー法および細胞障害性アッセイで解析した。

(本研究における倫理面への配慮)

本研究は出産後の産婦から提供された臍帯血を利用するため、臍帯血の提供に当たり以下の内容を確認した。計画内容は分担研究者の前任施設である東京大学医学系研究科倫理委員会の審査・承認を受けた上で研究を開始した後、今年度その結果を解析した。

(内容1) 提供者の人権保護のため、対象者本人に研究の趣旨を理解してもらい、臍帯血の提供は本人の自由意志によってのみ行われるものとする。提供を拒否した場合も何ら臨床的不利益を蒙らないことを保障する。説明同意文書の内容を本人に極力分かり易い言葉で説明し、説