

る。細胞は染色体切断、特にT細胞レセプター (TCR) 遺伝子と免疫グロブリンH鎖遺伝子の存在する部位の7番、14番染色体の切断がみられる。

ATの責任遺伝子は二本鎖DNAの切断修復に関与するタンパク質(ATM)をコードするので、AT患者の細胞は、*in vitro*のみならず*in vivo*においてイオン化放射線に感受性が非常に高い。

ウイスコット・オールドリッチ症候群(WAS)ではT細胞の欠陥と免疫グロブリン値の異常がある

ウイスコット・オールドリッチ症候群 Wiskott-Aldrich syndrome (WAS)はX連鎖免疫不全症である。

- WASの男子患者では、
- ・ 小型で異常な血小板がみられ、数も少ない(血小板減少症)。
 - ・ 化膿菌感染、日和見感染のみならず重症の湿疹がみられる。
 - ・ 血清のIgAとIgE値は増加し、IgGは正常だがIgMの低下がみられる。
 - ・ T細胞機能不全があり、細胞性免疫機能不全は進行性に悪化する。

T細胞の形態は細胞骨格の欠陥を反映して走査型電子顕微鏡で独特の異常な様相を示す。それらの細胞表面の微絨毛は正常なT細胞より少ない。

抗体産生におけるT、B細胞の相互作用において、T細胞の細胞骨格は位置を変えるか、B細胞側に集簇する。この現象はWASで欠けていて、その結果免疫細胞の相互作用に欠

陥が生じる。(訳註：責任遺伝子は血球に発現するタンパク質WASPをコードする遺伝子である)

補体タンパク質の遺伝的欠損

補体系タンパク質と免疫系の相互作用については第4章で述べられている。ヒトではほとんどすべての補体タンパク質の遺伝的欠損が発見されていて(図16.11)、これらの欠損は補体の正常な機能について多くのことを語ってくれている(図4.16, 4.17参照)。

補体欠損症では免疫複合体の除去、炎症、食作用、溶菌が障害される

古典経路の成分C1q, C1r, C1s, C4, C2の欠損は全身性エリテマトーデスのような免疫複合体病を起こしやすくする。

Q. なぜこれらの欠損で免疫複合体病が起きるのか。

A. 補体活性化古典経路はC4bやC3bが免疫複合体成分に共有結合することにより免疫複合体を溶解するのに必須である。また、ヒトでは赤血球の上で免疫複合体成分を輸送するために必要である(図4.6参照)。

C3, H因子, I因子の欠損では化膿菌感染にかかりやすい。これはC3が化膿菌のオプソニン化に重要な役割を持つことによる。

後半成分C5, C6, C7, C8および第2経路の成分D因子、プロベルジンの欠損ではナイセリア属の二つの病原菌である淋菌と髄膜炎菌の感染に非常にかかりやすくなる。この

ヒト補体の遺伝的欠損症

群	型	欠損成分	遺伝性		
			AR	AD	XL
I	免疫複合体病	C1q C1sまたはC1r + C1s C2 C4	• • • •		
II	血管性浮腫	C1 阻止因子		•	
III	化膿菌感染反復	C3 H因子 I因子	• • •		
IV	ナイセリア感染反復	C5 C6 C7 C8 プロベルジン D因子	• • • • •		•
V	無症状	C9	•		

図16.11 ヒト補体の遺伝的欠損症。(AR = 常染色体劣性, AD = 常染色体優性, XL = X連鎖劣性)

ことはこの種族の細菌の溶解に第2経路と高分子膜傷害性複合体が必要であることを明確に示している。

これらの遺伝的補体欠損のほとんどは常染色体劣性の遺伝形式をとる。一方、プロベルジン欠損はX連鎖劣性、C1阻止因子欠損は常染色体優性の遺伝をする。

遺伝性血管神経性浮腫 (HAE) はC1阻止因子の欠損による

臨床的に補体系の欠損で最も重要なものはC1阻止因子C1 inhibitorの欠損である。この分子はC1r₂C1s₂に結合して活性化C1を解離させることに関与している。この欠損はよく知られている疾患の遺伝性血管神経性浮腫 hereditary angioneurotic edema (HAE) をもたらす (図16.12)。

HAEは常染色体優性遺伝をする。患者は身体のさまざまな部位に限局性の腫脹(血管浮腫)の発作を反復する。

- ・ 浮腫が腸で起きると激しい腹痛と疝痛を示し、嘔吐を伴う。
- ・ 浮腫が上気道に生じると気道閉塞のために窒息死することがある。それゆえ、上気道の血管浮腫は正常呼吸を保全するための迅速な処置を要する医療救急の対象となる。

C1阻止因子は補体の古典経路を阻止するだけでなく、キニン、プラスミン、凝固系と連結している。

浮腫は補体および接触凝固系の活性化の不全の結果生じる二つのペプチドによってもたらせる。つまり、おのおののペプチドはC2活性化由来のC2キニンと、接触凝固反応由来のブラジキニンである (図16.13)。

これらのペプチドは後毛細血管細静脈に作用し、血管内皮細胞を収縮させ血漿の流出をもたらす隙間ができる (第2章参照)。

HAEには遺伝的に二つの型がある。

- ・ I型はC1阻止因子遺伝子の欠失によるもので転写物ができない。

遺伝性血管神経性浮腫



図16.12 写真は、この病気でみられる一過性の局所性腫脹を示す。

- ・ II型は点変異によるもので欠陥タンパク質が生成されている。

I型とII型との違いは重要で、II型はC1阻止因子のみの定量では診断できない。同時にC4を測定する必要がある。活性化C1が抑制されないためC4が消費されHAE患者血清では、常にC4が低下している。

C1阻止因子の欠損は一定年齢後に獲得性に発症することがある。一部の例でC1阻止因子に対する自己抗体が検出される。ほかの例は慢性リンパ球性白血病、多発性骨髄腫、B細胞リンパ腫のようなモノクローナルなB細胞増殖でみられる。このような患者は過剰産生された免疫グロブリンに対する抗イデオタイプ抗体を産生する。理由は不明であるが、イデオタイプ抗イデオタイプ反応が、C3の沈着と補体

遺伝性血管神経性浮腫の成因

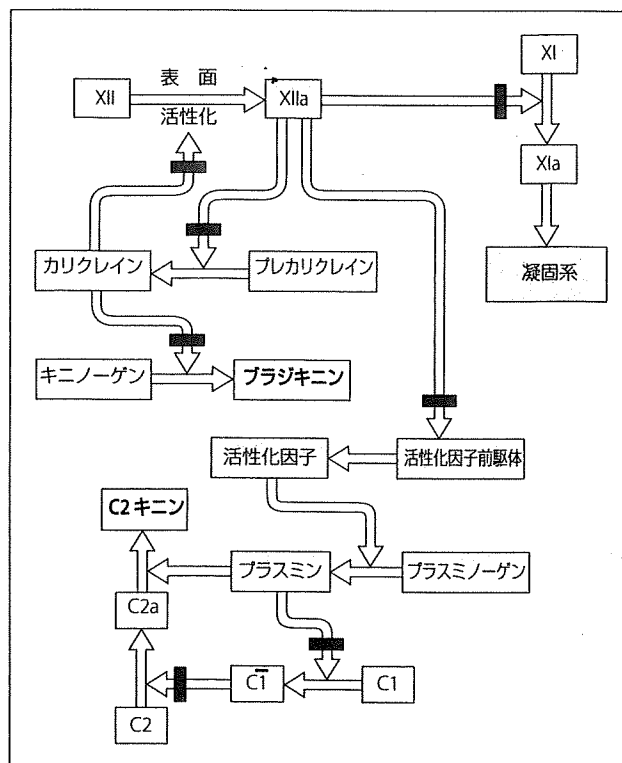


図16.13 C1阻止因子はXII因子(Hageman因子)の表面接触依存的活性化によって活性化される凝固因子、キニン、プラスミンおよび補体系の不活化にかかわっている。C1阻止因子が働く部位を赤色で示す。これらの経路の活性化が制御されないとブラジキニンやC2キニンが形成され、浮腫をきたす。

複合体の除去にかかわる C3 転換酵素の形成なしに C1, C2, C4, C1 阻止因子の消費をもたらしている。

精製 C1 阻止因子が血管浮腫の急性発作の治療のために入手できる。C1 阻止因子を静注することで喉頭浮腫や胃腸症状を速やかに治せる。米国では使用許可がなされていない。

食細胞の遺伝的欠陥は重篤な感染をもたらす

食細胞の多形核白血球や単球/マクロファージ系細胞は、化膿菌やほかの細胞内寄生微生物の宿主防衛に重要である。多形核白血球の高度の減少（好中球減少症 neutropenia）は重篤な細菌感染をもたらす。

食細胞の二つの遺伝的欠陥症は、重症感染にかかりやすく、しばしば致死性であるので、臨床的に重要である。

- ・慢性肉芽腫症 chronic granulomatous disease (CGD)
- ・白血球粘着不全症 leukocyte adhesion deficiency (LAD)

CGD は酸素還元系の欠陥による

CGD 患者は次の反応により O_2 を O_2^- へ還元する触媒酵素の NADPH オキシダーゼ NADPH oxidase の欠陥を有している。



したがって患者では、食細胞が微生物の食食後スーパーオキシドラジカルや過酸化水素を生成できない。

Q. スーパーオキシド生成不全の結果、何が起きるか。

A. 食細胞は食食した細菌や真菌、特にカタラーゼ産生菌を殺すことができない（図 9.30, 第 14 章参照）。

その結果、菌は CGD 患者の食細胞中で生存することになる。このことは存続する細胞内微生物抗原に対する細胞性免疫応答を誘導し、肉芽形成をもたらす。

CGD の患児は肺炎、リンパ節感染（リンパ節炎）、皮膚や肝臓その他の臓器の膿瘍を起こす。

CGD の診断は刺激しても食細胞がニトロブルーテトラゾリウム nitroblue tetrazolium (NBT) 色素を還元できないこととされる。NBT 色素は食細胞に粒子として取り込まれるときは淡黄色、透明である。NBT は NADPH 酸化反応の結果水素を受け取り還元されると、食細胞中で濃紫色の沈殿物を形成する。CGD 患者の食細胞中では沈殿が生じない（図 16.14）。

NADPH 酸化反応は複雑で、酵素複合体はいくつもの基本構成単位からなる。休止期の食細胞では膜に食細胞特異的シトクロム（シトクロム b_{558} ）がある。このシトクロムは 2 鎖からなる。一つは X 染色体短腕上の遺伝子にコードされる 91 kDa 分子、もう一つは 16 番染色体上の遺伝子にコードされる 22 kDa 分子である。

食作用が始まると細胞質のいくつかのタンパク質がリン酸化され、膜に移行しシトクロム b_{558} に結合する。このようにして形成された複合体が NADPH 酸化反応を触媒し酸素ラジカル生成を活性化する酵素として働く（図 16.15）。

CGD の最も多い型は X 連鎖性でシトクロム b_{558} の 91 kDa

ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 試験

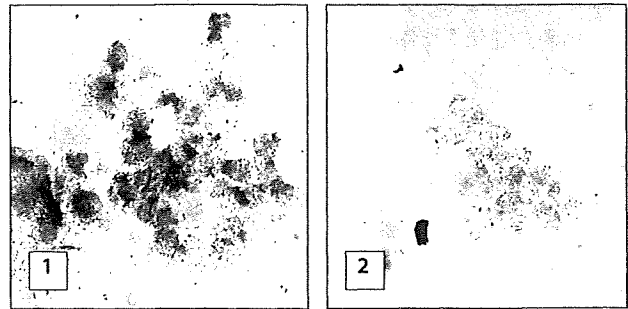


図 16.14 正常の多形核白血球や単球では食食により活性酸素中間体 reactive oxygen intermediates (ROI) が活性化され、黄色の NBT は紫青色のホルマザンに変化する (1)。CGD 患者は ROI を生成できず色素は黄色のままである (2)。(AR Hayward 教授の厚意による)

鎖の欠陥によるものである。

CGD のほかの三つの型は常染色体劣性で、シトクロム b_{558} の 22 kDa 鎖、あるいは $p47^{phox}$ ないし $p67^{phox}$ と呼ばれる二つのタンパク質のいずれかの欠陥である。

LAD はインテグリン遺伝子の異常による

オプソニン化された微生物上の C3bi に結合する食細胞膜レセプターは食細胞による細菌の食食に必須である。このレセプターは補体レセプター 3 complement receptor 3 (CR3) と呼ばれるインテグリンで、LAD 患者で欠損している。そのため患者は重症の細菌感染、特に口腔と胃腸管の感染を呈する。

CR3 は

- ・ 165 kDa の α 鎖 (CD11b)
- ・ 95 kDa の β 鎖 (CD18)

の 2 本のポリペプチドからなっている。LAD では 21 番染色体上の遺伝子にコードされる β 鎖が遺伝的に欠けている。

ほかの二つのインテグリンタンパク質の LFA-1 (リンパ球機能関連抗原 1) と $p150,95$ (第 3 章参照) は CR3 と同様 β 鎖を共有している。それらは固有の α 鎖 (おのおの CD11a と CD11c) を有しているが、LAD ではともに欠けている。

LFA-1 は細胞接着に重要で、血管内皮細胞表面やほかの細胞膜上の ICAM-1 (細胞間接着分子 1) と結合する。LFA-1 の欠損のために LAD 患者の食細胞は血管内皮に接着できず、そのため血管から感染部へと遊走できない。そのため LAD 患者は十分に膿を形成できず侵入細菌の急速な拡散を許す。

NADPH オキシダーゼとその成分

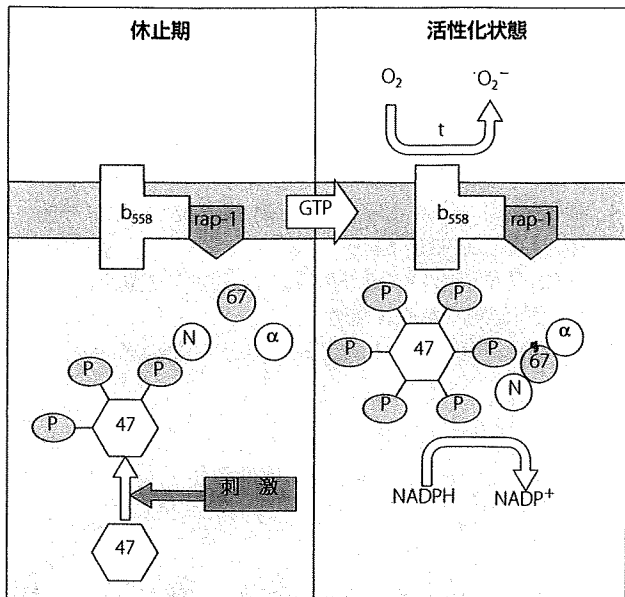


図 16.15 NADPH オキシダーゼの一般的知識では、休止期にはその成分の一部（シトクロム b_{558} とおそらく rap-1）が細胞膜に存在し、ほかの成分（ $p47^{phox}$ 、 $p67^{phox}$ 、NADPH 結合成分 N、仮の第 4 成分 α ）は細胞質に存在する。食食の開始という刺激により $p47^{phox}$ がリン酸化され細胞質成分は集し膜に移動する。細胞質成分がいったん膜成分と結合すると、オキシダーゼは触媒活性を持つようになり $p47^{phox}$ はさらにリン酸化される。シトクロム b_{558} の活性化は酸素の電子還元を触媒しスーパーオキシドアニオン O_2^- を形成する。CGD の各病型では、オキシダーゼの各成分の遺伝子異常がみられる。（phox は phagocytic oxidase の略語、t は電子を示す）（Smith RM, Curnutte JT. Molecular basis of chronic granulomatous disease. Blood 1997;77:673-686 より改変）

LAD2 型はセレクトリンリガンドの生成不全による

流血中の白血球は炎症の場に入ると運動性はセレクトリン selectin 反応により著しく落ちる（図 6.9 参照）。セレクトリン

は白血球に発現し、そのリガンドは炎症巣の内皮細胞表面に発現する。白血球はインテグリンが ICAM-1 のような接着分子と相互反応する前に内皮細胞表面上でローリングを始める。セレクトリンと反応するリガンドはフコース含有糖鎖を持つ糖タンパク質である。例えば、血液型シアリルルイス X がある。マンノースからフコースへの転換に遺伝的に欠陥があるとこれらのセレクトリンリガンドの合成が障害される。そのためこれらの患者の白血球は内皮細胞膜上でローリングができない。これは LAD 2 型 LAD type 2 と呼ばれる LAD の二つ目の病型をもたらす。

マクロファージの殺菌力は $IFN\gamma$ のシグナル伝達の欠陥で障害される

マクロファージでさかんな細胞内寄生性微生物の破壊は、 $IFN\gamma$ によるマクロファージの殺菌力の活性化に依存する。

微生物がマクロファージに取り込まれると、マクロファージは IL-12 を分泌し、ついで IL-12 は T 細胞上の IL-12 レセプターに結合し $IFN\gamma$ を誘導する。

IL-12、IL-12 レセプター、 $IFN\gamma$ レセプターなどをコードする遺伝子に遺伝的に欠陥のある患児は非病原性マイコプラズマに反復感染を呈する。多くはないがサルモネラにも感染を反復する。これらのさまざまな欠陥は常染色体劣性に遺伝し、 $IFN\gamma$ で治療しないと致死的になる。

参考文献

Buckley RH. Primary immunodeficiency diseases due to defects in lymphocytes. N Engl J Med 2000;343:313.
 Conley ME. Molecular approaches to analysis of X-linked immunodeficiencies. Ann Rev Immunol 1992;10:215.
 Curnutte JT, Orkin SH, Dinauer MC. Genetic disorders of phagocyte function. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varmus H, eds. The molecular basis of blood diseases. Philadelphia: PA Saunders; 1994:443.
 Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. N Engl J Med 2000;343:1703.
 Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJP. The primary immunodeficiencies. N Engl J Med 1995;333:43.
 Rosen FS, Seligman M, eds. Immunodeficiencies. Switzerland: Harwood Academic Publishers; 1993.
 Snapper SB, Rosen FS. The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization. Annu Rev Immunol 1999;17:905-929.
 Von Andrian UH, Berger EM, Chambers JD, et al. in vivo behaviour of neutrophils from two patients with distinct inherited leukocyte adhesion deficiency syndromes. J Clin Invest 1993;91:2893.

重要な考察：IgM 増加を伴う免疫不全症 (HlgM) (解説は 497 ページ)

3歳の女児が発熱と頻呼吸で救急外来に運ばれてきた。患児は24ヵ月に肺炎に罹患したことがある。また、中耳炎に10回かかり、それぞれ抗菌薬で治療され治っている。胸部X線検査で左下肺の大葉性肺炎と診断された。血液、喀痰培養から肺炎レンサ球菌が検出された。白血球数は13,500/ μ lで、分画では81%が好中球、14%がリンパ球であった。血清IgM値は470 mg/dl、IgG値は40 mg/dlでIgAとIgEは検出感度以下であった。破傷風に対する抗体は検出できなかった。血液型はA型で、抗B抗体は1:320であった。

1 どのような臨床所見と検査結果からこの患児がHlgMを有することを疑わせるか。また、どのようにこれがCD40リガンドの

遺伝子変異によるものでないと結論するか。

- 2 ほかにどのような検査をすれば確定診断につながるか。
- 3 この患児は破傷風ワクチン接種に反応できないが、血液型B抗原に対する抗体が年齢の割に高い。このことをどのように説明できるか。
- 4 患児のためにどのような治療を両親に勧めるか。また、予後がいかなるものかを伝えるか。
- 5 この患児の母親のX染色体のランダム不活化を調べると、どのような結果が予測されるか。
- 6 この患児の予後について両親にどのように説明するか。

母児不適合妊娠

はじめに

妊娠においては、初期より分娩にいたるまで双方向性の胎児母体間輸血が生じているため、母親由来の同種抗体によって血球減少症が生じうる。好中球には数種類の特異抗原、赤血球系や血小板系と共通の抗原が存在し¹⁾、母親の同種抗体による母児間の不適合妊娠による好中球減少症が認められる²⁾。一般的に新生児同種免疫性好中球減少症の頻度は低いと報告されているが、抗原の多型性から考えると、臨床症状が軽微なために診断にいたっていない例が多いと考えられる。本稿では、われわれの施設（広島大学病院）で経験した症例、あるいは検査を依頼された臨床例を中心に、母児不適合妊娠から生じた新生児同種免疫性好中球減少症を概説する。

1. HNA-1 抗原不適合

患児と母親血清中の好中球抗体は好中球特異抗原の一つである HNA-1 抗原既知のパネル好中球を用いてフローサイトメトリで同定した³⁾。好中球抗原の遺伝子型の検査は後述の PCR-SSCP 法、PCR-SSP 法を用いていたが、現在は湧永製薬から発売されているタイピングキット（PCR-PHFA 法）で同定している^{4,5)}。

当科で経験した HNA-1 抗原の不適合と考えられた新生児同種免疫性好中球減少症の概要を表 2-7 に示す。すべての症例が、生後 30 日までに発熱などの症状を契機に血液検査から好中球減少を指摘されている。感染症は軽微なものが大半であるが、一部には新生児特有の重症感染症にいたるものがあるので注意が必要である。診断時の白血球数は 2,700 ~ 11,000/ μl 、好中球絶対数は 0 ~ 500/ μl であった。いずれの症例も好中球減少のみを示し、他の血球系には異常を認めていない。母親が HNA-1 null を 2 例（症例 3, 4）経験しているが、症例 3 は父親が HNA-1a/HNA-1b のヘテロ、症例 4 は HNA-1b のホモであったため、前者では HNA-1a, HNA-1b の両方の抗体が検出された。

抗体の強さはフローサイトメトリでコントロールに対する比（relative fluorescence intensity ; RFI）で同定したが³⁾、初診時の抗体強度は好中球数の回復までの期間と相関していた。母親からの移行抗体の強さが好中球減少期間を反映していることが推測された。特に、HNA-1 抗原 null の母親は強い抗体産生が認められていた。

本邦での HNA-1 系の多型性の頻度は、HNA-1a/HNA-1a の homozygous が約 48%、

表 2-7 HNA-1 抗原不適合の症例

(広島大学病院小児科)

症例	性	妊娠 分娩歴	診断 日齢	白血球数 (/μl)	好中球数 (/μl)	抗体 特異性	抗体強度 (RFI)*	臨床症状	好中球回復 までの日数	その他
1	男	第1子	15	4,300	0	HNA-1a	2.12	肺炎	42	
2	男	第2子	3	4,500	450	HNA-1a	2.51	羊水混濁	35	
3	女	第3子	3	10,700	107	HNA-1a, HNA-1b	9.52	皮膚化膿症	65	母親: HNA-1 null
4	女	第3子	2	6,600	0	HNA-1a, HNA-1b	10.25	B群溶連菌感染	120	母親: HNA-1 null
5	男	第5子	0	4,500	90	FcγRⅢb	1.52	涙嚢炎	35	
6	男	第1子	10	11,000	0	HNA-1a	1.58	臍炎	90	
7	男	第3子	0	4,300	0	HNA-1b	1.91	なし	53	双生児 (症例 7, 8)
8	女	第3子	0	6,700	70	HNA-1b	1.85	なし	53	双生児 (症例 7, 8)
9	女	第2子	9	9,500	380	HNA-1b	13.9	臍炎	180	
10	女	第1子	4	5,900	236	HNA-1b	2.15	肛門周囲膿瘍	30	
11	女	第2子	0	4,600	250	HNA-1b	1.45	なし	90	
12	男	第1子	30	9,070	0	FcγRⅢb	1.37	なし	90	
13	女	第2子	30	2,700	100	HNA-1a	8.18	発熱	120	
14	女	第2子	26	5,500	500	HNA-1b	4.22	発熱	37	
15	女	第3子	28	4,000	100	HNA-1b	2.07	発熱	60	

*抗体強度は relative fluorescence intensity (RFI) をフローサイトメトリで同定した³⁾

HNA-1b/HNA-1b の homozygous が約 11%, HNA-1a/HNA-1b の heterozygous が約 40%, HNA-null が 0.05 ~ 0.1% と推測されている⁶⁾。HNA-1 系の母児不適合妊娠と母親の抗体産生の頻度について、ポーランドからの報告がある⁷⁾。ポーランドでの HNA-1 系の多型性の頻度は、HNA-1a/HNA-1a の homozygous が約 11%, HNA-1b/HNA-1b の homozygous が約 36%, HNA-1a/HNA-1b の heterozygous が約 53%, HNA null が 0.05 ~ 0.1% であり、欧米白人の頻度とほぼ一致する。本邦と比較すると HNA-1a と 1b の頻度が逆転した状態とみなされる。homozygous の頻度が母児不適合に関与しているとするれば、本邦での不適合の頻度はポーランドより増加している可能性が推測される。1,038 例の母親と児の遺伝子型の検索より、約 47% の母親が homozygous を示すことから、19.6% は不適合妊娠となる。このなかの 19% で母親になんらかの抗体が同定されているが、HNA-1 系の抗体は 4.5% に認められている。さらにそのなかで実際に児の好中球減少が生じた割合はその 3 分の 2 である。総合的にみると、HNA-1 系の不適合妊娠から新生児同種免疫性好中球減少症を発症する頻度は約 6,000 例に 1 人の割合と推測される。HNA-1 抗原の多型性の頻度は上述のように本邦に homozygous の頻度が若干多いと考えれば、不適合妊娠の確率も欧米の 20% よりも多いものと予測されるが、詳細な検討はされていない。また、母児不適合妊娠の割合に対して抗体の同定できる母親の頻度の低さは、現行の間接免疫蛍光法での抗体同定感度の低さに起因している可能性が考えられる。いずれにしても、HNA-1 系の不適合で、実際の好中球減少症を発症する頻度はかなり低いものと思われる。

2. HNA-2 抗原不適合

HNA-2 抗原に関しては、われわれの施設での母児不適合症例の経験はないが、欧米では数例が報告されている。HNA-2a 抗原の表現型は抗原陽性好中球と陰性好中球が混在

表 2-8 HNA-2a 抗原陽性好中球の分布とその頻度⁸⁾

性 (n)	< 5%	5 ~ 20%	21 ~ 40%	41 ~ 60%	61 ~ 80%	> 81%
女性 (244)	2 (0.8)	1 (0.4)	11 (5)	42 (17)	108 (44)	80 (33)
男性 (164)	0 (0)	2 (1)	10 (6)	42 (26)	72 (44)	38 (23)
合計 (408)	2 (0.5)	3 (0.7)	21 (5)	84 (21)	180 (44)	118 (29)

() 内は分布の頻度をパーセントで示す

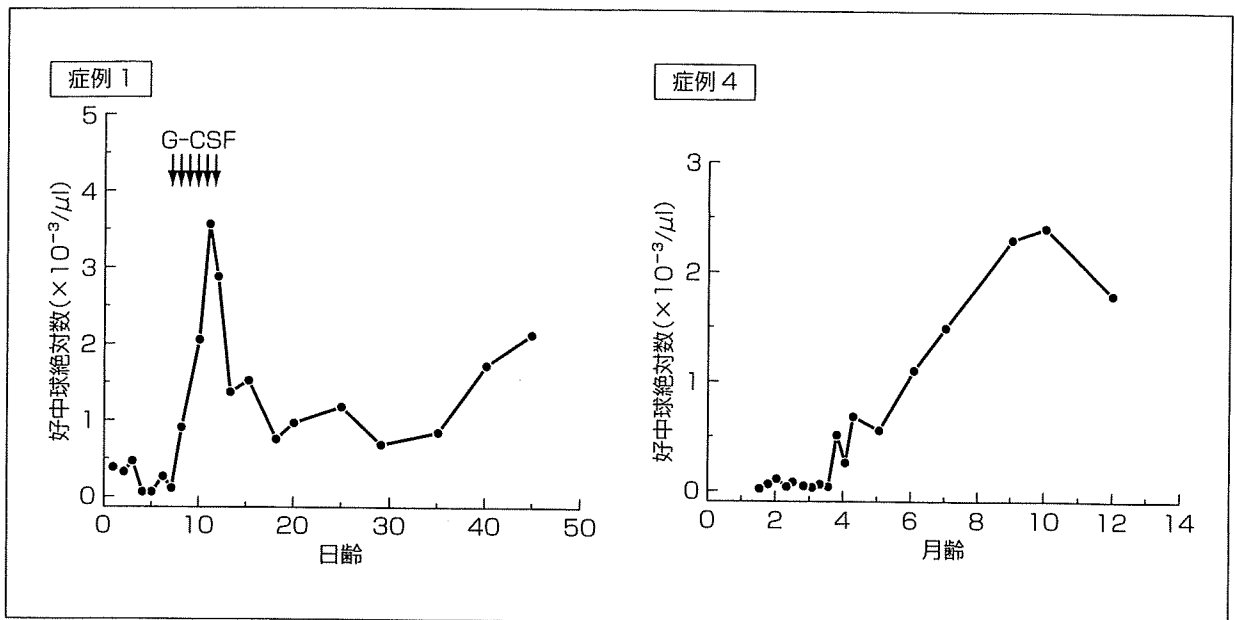


図 2-7 症例 1 と症例 4 の好中球数の推移

している特徴がある。本邦での HNA-2a 抗原の陽性好中球頻度とその分布を表 2-8 に示す⁸⁾。陽性好中球 5% 以下を HNA-2a 抗原陰性と考えると、約 1% の女性に陰性者が存在することになり、不適合妊娠が生じる可能性がある。

新生児同種免疫性好中球減少症では G-CSF は非常に有用であり、ほとんどの症例で投与によりすみやかに好中球増加がみられる。最近、HNA-2a 抗原の不適合児の好中球減少症に対する G-CSF での治療で好中球増加が認められなかった症例が報告されている⁹⁾。G-CSF 治療に不応の機序は明らかでないが、HNA-2a 抗原は G-CSF により抗原の表出が up-regulate されることが示されている。HNA-2a を対応抗原とした免疫性好中球減少症では、G-CSF 使用に伴った抗体産生の増加がその機序として推測されているが、不適合児の抗体は母親由来であることより、異なった機序が考えられている。今後の新生児同種免疫性好中球減少症での有効な G-CSF 治療法の確立が必要である。

3. HLA 抗原不適合

好中球表面には、弱いながら HLA 抗原も存在している。HLA 抗原の母児間不適合により、母親に産生された HLA 抗体による好中球減少症を経験している¹⁰⁾。症例は第 3 子、生後 2 日目に発熱を認め、白血球数は $5,100/\mu\text{l}$ 、ANC $107/\mu\text{l}$ 。G-CSF の使用により、好中球増加と臨床症状の改善を認めている。母親の血清には HLA-A2 抗体が同定され、児

の好中球減少の原因としてHLA抗体が示唆されている。一般にHLAの母児間不適合はかなりの確率で認められるが、実際に抗体が児に移行して血球減少を示すことはまれと考えられている。母親に産生されたHLA抗体は、胎盤のHLA抗原で吸着される可能性と、児の循環血液中に存在する可溶性HLA抗原によって吸収されることが指摘されている。しかし、一部の症例では上述のような母児間のHLA不適合により好中球減少症が生じる可能性も考慮する必要がある。

おわりに

不適合妊娠による好中球抗体、HLA抗体と好中球減少症について、自験例を中心に述べた。今後、本邦における好中球抗原の不適合と抗体産生の頻度、同種免疫性好中球減少症発症の機序とその頻度を明らかにしなければならないであろう。

謝辞

症例ならびに検体に協力いただきました県立広島病院周産母子センター、松江赤十字病院、島根県立中央病院、市立宇和島病院、市立豊中病院、川口市立医療センター、久我山病院、神戸大学医学部附属病院、静岡済生会総合病院、高松赤十字病院、多治見病院、藤枝市立総合病院、武蔵小杉病院、六甲アイランド病院の先生がたに深謝いたします。

引用文献

- 1) Bux, J. : Nomenclature of granulocyte alloantigens. *Transfusion*, 39 : 662, 1999.
- 2) Bux, J. et al. : Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune neonatal neutropenia. *Transf Med*, 2 : 143 ~ 149, 1992.
- 3) Kobayashi M. et al. : Significance of the detection of antineutrophil antibodies in children with chronic neutropenia. *Blood*, 99 : 3468 ~ 3471, 2002.
- 4) Satoh T. et al. : Genotypical classification of neutrophil Fcγ receptor III by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism. *Blood*, 83 : 3312 ~ 3315, 1994.
- 5) Bux, J. : NA gene frequencies in German population, determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion*, 35 : 54 ~ 57, 1995.
- 6) Ohto H. et al. : Neutrophil-specific antigens and gene frequencies in Japanese. *Transfusion*, 29 : 654, 1989.
- 7) Zupanska, B. et al. : The risk of antibody formation against HNA1a and HNA1b granulocyte antigens during pregnancy and its relation to neonatal neutropenia. *Transf Med*, 11 : 377 ~ 382, 2001.
- 8) Taniguchi K. et al. : Human neutrophil antigen-2a expression of neutrophils from healthy adults in western Japan. *Transfusion*, 42 : 651 ~ 657, 2002.
- 9) Maheshwari, A. et al. : Resistance to recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in neonatal alloimmune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen-2a (NB1) antibodies. *Pediatrics*, 109 : 1 ~ 3, 2002.
- 10) Hagimoto R. et al. : A possible role of the maternal anti-HLA antibody in a case of alloimmune neonatal neutropenia. *Transfusion*, 41 : 615 ~ 620, 2001.

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科 小林正夫・中村和洋

山陽女子短期大学 小野寺利恵)

1. 骨髄不全症候群とリボソームの異常

広島大学病院小児科 岡田 賢

広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学教授 小林正夫

key words Diamond-Blackfan anemia (DBA), Shwachman-Diamond syndrome (SDS), Dyskeratosis congenita (DC), Cartilage-hair hypoplasia (CHH), ribosome

動 向

リボソームはすべての生物の細胞内に存在する小器官で、mRNAから蛋白を合成する“翻訳”を行う中心的な場である。近年、骨髄不全、発がん素因を呈する疾患群で、リボソーム蛋白の異常、リボソーム合成に関与する分子群の異常が同定され、リボソームの機能異常と造血障害について注目が集まっている。代表的疾患としてDiamond-Blackfan 貧血、Shwachman-Diamond 症候群、cartilage-hair hypoplasia, dyskeratosis congenitaがあげられ、これらはリボソームの機能異常により発症する遺伝性骨髄不全症候群に分類される。これらの疾患群では表1に示すようにリボソームに関わる多くの責任遺伝子群が同定されている。本稿では、リボソームの機能異常と遺伝性骨髄不全症について、これらの疾患群を中心に概説する。

A. リボソームの構造

ヒトを含む真核生物においてリボソームは、リボソームRNA (rRNA) とリボソーム蛋白の巨大な複合体である2つのサブユニット (40S サブユニット, 60S サブユニット) から構成される。

40Sと60Sの2つのサブユニットにより80Sリボソームとよばれる完全なリボソームが形成される。これらのサブユニットは遠心力をかけたときの沈降速度により名づけられており、単位はSvedberg (Sと略す) で示され、値が大きいほど沈降速度が速い。rRNAは4種類(28S, 18S, 5.8S, 5S)、リボソーム蛋白は少なくとも約80種類は存在すると考えられている。28S, 5.8S, 5S rRNAは60Sサブユニットの、18S rRNAは40Sサブユニットの構成成分である。リボソームはmRNAをペプチドに翻訳する触媒作用をもち、これらの働きの中心的な役割をrRNAが担っている。一方で、リボソーム蛋白はrRNAのプロセッシング、リボソームの安定化などに働いている。

B. Diamond-Blackfan 貧血

Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) は、赤芽球系造血前駆細胞の障害によって赤血球産生が障害される先天性の貧血 (赤芽球癆) である。多くは乳幼児期から症状を呈し、DBAR (The Diamond-Blackfan America Registry) の調査では、貧血が初発する時期の中央値は生後2カ月とされている¹⁾。約15%の症例では白血球減少、血小板減

表1 リボソームに関わる責任遺伝子群

疾患	造血障害以外の症状	遺伝形式	責任遺伝子	頻度	文献
Diamond-Blackfan 貧血	頭部の異常	AD	<i>RPS19</i>	25%	5)
	(小頭, 大頭, 大泉門開大)	AD	<i>RPL5</i>	10%	10)
	顔貌異常	AD	<i>RPL11</i>	6.5%	10)
	口蓋裂	AD	<i>RPS24</i>	2%	7)
		AD	<i>RPL35A</i>	2%	9)
		AD	<i>RPS7</i>	0.5%	10)
		AD	<i>RPS15</i>	0.5%	10)
		AD	<i>RPS17</i>	0.5~4%	8)
		AD	<i>RPS27A</i>	0.5%	10)
		AD	<i>RPL36</i>	0.5%	10)
Dyskeratosis congenita	皮膚の色素沈着	X-linked	<i>DKC</i>	30%	21)
	爪の萎縮	AD	<i>TINF2</i>	~11%	27)
	白斑症	AD	<i>TREC</i>	5%未満	25)
		AD/AR	<i>TERT</i>	5%未満	26)
		AR	<i>NHP2</i>	まれ	28)
		AR	<i>NOPI0</i>	まれ	29)
Shwachman-Diamond症候群	膵外分泌機能不全 骨幹端軟骨異形成	AR	<i>SBDS</i>	95%	32)
軟骨毛髪低形成症	毛髪低形成 軟骨形成不全に伴う四肢短縮 低身長, 細胞性免疫異常	AR	<i>RMRP</i>	80%	36)

少を合併する²⁾。また、約50%の患者で貧血以外の合併症を有することが知られており、顔面頭部の異常(50%)が最も多く、泌尿生殖器系の異常(39%)、上肢・手の異常(38%)、心奇形(30%)、目の異常、低身長などを合併する。血液検査所見では大球性正色素性貧血、網赤血球の減少、HbFの上昇、赤血球アデノシンデアミナーゼの上昇を示し、骨髄検査では赤芽球系細胞の著減を認める。治療は赤血球輸血、ステロイド投与が行われるが、約4割の症例はステロイドに反応せず輸血依存性に、約2~4割の症例はステロイド依存性になる^{2,3)}。機序は不明だが、約2割の症例で血液学的な寛解が認められ、そういった患者では初期のステロイドに対する反応性が良好なことが多い²⁾。また、患者は高い発がん素因を有しており、悪性腫瘍の発生平均年齢は23歳、40~50歳までの悪性腫瘍の累積確率は52%とされ、白血病、MDS、

固形腫瘍などの発生に注意が必要である⁴⁾。

1999年に、DBA症例において、リボソーム蛋白の一つであるRPS19(責任遺伝子*RPS19*)の異常が同定され、DBA症例の約25%で*RPS19*の遺伝子変異が認められることが明らかとなった^{5,6)}。RPS19は40Sサブユニットを構成するリボソーム蛋白の一つで、その後の検討で同じ40Sサブユニットを構成するRPS17、RPS24の異常も報告された^{7,8)}。さらに2008年になって、60Sサブユニットを構成するリボソーム蛋白をコードする遺伝子群(*RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*)の異常がDBA患者で同定された^{9,10)}。なかでも*RPL5*の変異をもった患者では、貧血以外の合併症が多いと報告されている¹⁰⁾。またRPS7、RPS15、RPS17、RPS27a、RPL36の異常も1症例ずつであるが報告されている¹⁰⁾。これまで発見されたDBAの原因遺伝子はすべてリボソーム蛋白をコードする遺伝子であ

り、リボソームの機能異常がDBA発症に重要な役割をはたしていると考えられる。

DBA発症の分子機構の解析は、RPS19の解析を中心に行われてきた。図1にヒトにおけるpre-rRNAがプロセッシングを受ける過程を示した。RPS19はリボソームが生成される核小体に高濃度に存在し18S rRNAの成熟、40Sサブユニット合成に重要な役割をはたしている¹¹⁻¹⁴⁾。RPS19異常をもつDBA患者由来のCD34陰性骨髄細胞では18SE rRNAの減少と、前駆物質である21S rRNAの増加が認められ、図1の★で示したsite Eにおけるpre-rRNAの切断の障害が考えられている¹⁴⁾。そのため最終産物である18S rRNAが減少し、40Sサブユニットの欠乏に至ると考えられている。図2で示すように、赤血球造血の課程におけるリボソーム合成は赤血球の分化に伴い

徐々に増加する。一方でRPS19の発現と40Sサブユニットの合成は、赤血球の分化とともに低下する。そのため、赤血球の最終分化段階で40S/60S比が最も低くなる。RPS19異常を有するDBA患者では、40Sサブユニット合成が障害されており、生理的に40S/60S比が最も低くなる赤血球の最終分化段階で40Sサブユニットの欠乏が顕著となり、グロビンなどの翻訳が障害され赤血球造血の障害にいたると推測されている³⁾。しかし、造血障害以外の症状についての分子機構については明らかとなっておらず、今後の検討が期待される。

C. Dyskeratosis congenita

Dyskeratosis congenita (DC) は、網状色素

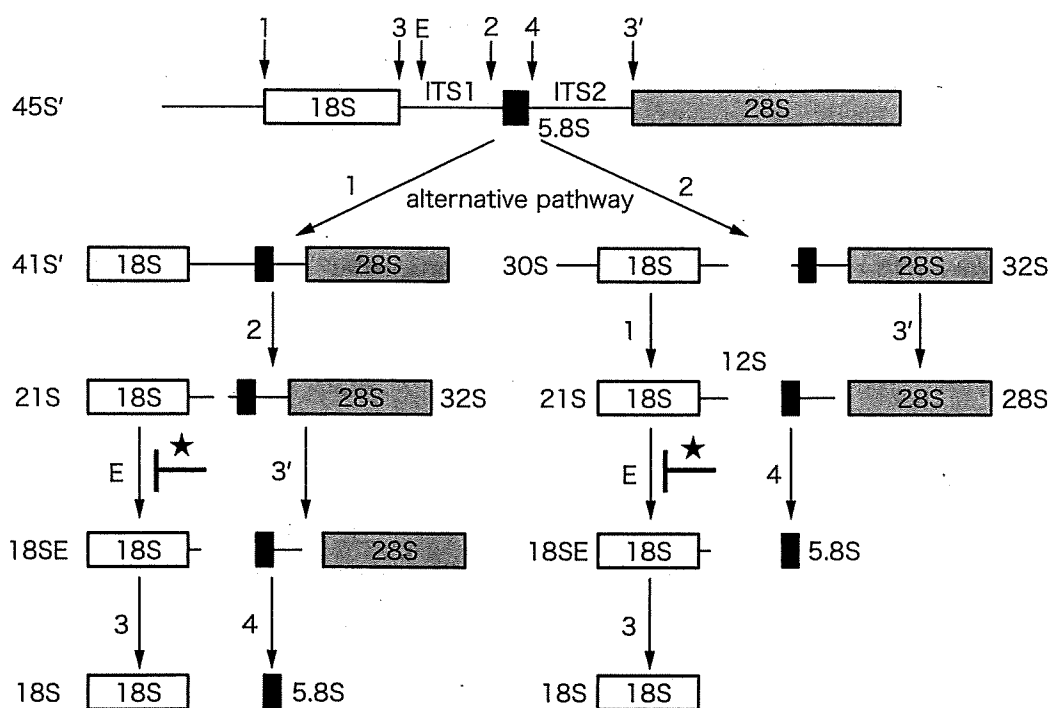


図1 ヒトにおけるpre-rRNAのプロセッシング (文献14, 45, 46より改変)

図中の矢印 (site 1, 2, 3, 3', 4, E) はcleavage siteを示す。図に示すように45S' pre-rRNAがそれぞれのcleavage siteで切断を受け、最終的に5.8S, 18S, 28S rRNAが産生される。RPS19異常によるDBA患者では図中★で示したsite Eにおける切断が障害されており、18S rRNAの減少と、前駆物質である18SE rRNAの増加が認められる。酵母におけるRNase MRPの作用部位であるsite A3のヒトにおける相同部位はsite 2に相当する (ITS: internal transcribed spacer)。

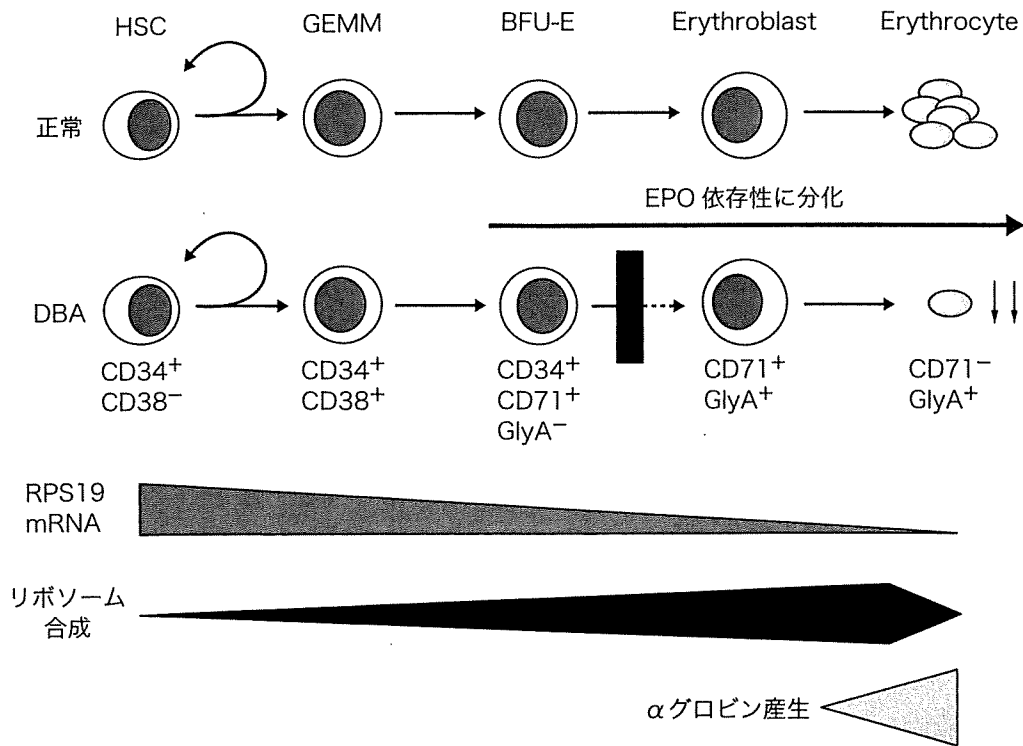


図2 健常人とDBA患者における赤芽球分化の比較 (文献13, 21より改変)
 DBA患者では、BFU-Eからerythroblastへの分化段階において障害が認められる。

沈着, 爪の萎縮, 粘膜白斑症を特徴とする疾患である。これらの特徴的な症状は5~10歳の間で出現することが多く, 各症状の出現時期 (中央値) は, 網状色素沈着が8歳, 爪の萎縮が6歳, 粘膜白斑症が7歳と報告されている¹⁵⁾。骨髓不全は10歳までに約半数の患者で認められ, その後も年齢に伴い発症頻度は増加する¹⁵⁾。他の先天性骨髓不全症候群と同様に発がん素因を有し, 悪性腫瘍発生の平均年齢は28歳, 40~50歳までの累積確率は35%とされている。DCでは固形腫瘍の発生率が高く, 40%は頭頸部の扁平上皮癌が占める^{4,16)}。DC患者由来の細胞では, テロメラーゼ活性の低下, テロメア長の短縮が認められる¹⁷⁾。そのためサザンブロット法やFlow FISH法を用いたテロメア長の測定が行われており, 診断に際して有用な参考所見となる。テロメア長の短縮は特発性再生不良性貧血や骨髓異形成症候群でも認められ, 検査の特異性は高くないという報告がある一方で, テロメア長が著しく短縮している再生不

良性貧血のなかに, 特徴的身体所見を伴わないDCが含まれているという報告もあり興味深い¹⁸⁻²⁰⁾。

1998年に, X連鎖劣性遺伝形式を呈するDC症例でdyskerinをコードしている遺伝子*DKC1*の変異が報告された²¹⁾。dyskerinは, snoRNA (small nucleolar RNAs) の一つで, NOP10, NHP2, GAR1とsnoRNP (small nucleolar ribonucleoprotein) とよばれる複合体を形成する。これまでの研究でsnoRNPはrRNAのプロセッシング, pre-rRNAの転写産物の翻訳後修飾 (pseudouridylation) に関与していると考えられている²²⁾。実際, *Dkcl*変異マウスにおいてpseudouridineの低下, rRNAのプロセッシングの遅延が認められる²³⁾。そのためDCで認める骨髓不全は, 当初はrRNAの成熟障害により惹起されることが推測されていた。しかしながら, 後にsnoRNPがTERC (telomere RNA component: テロメア伸長において鋳型の役割をする) と結合し, テロメラーゼ複合体のプロセッシング, 安定化

に働いていることが明らかとなり、DCとテロメアとの関係が注目されるようになった^{17,24)}。

テロメアは、テロメアDNA (DNAの特徴的な反復配列で、ヒトを含む哺乳類ではTTAGGGの反復配列) と、そこに局在する種々の蛋白質から構成されている。テロメアは、生体内に存在するDNAの分解・修復機構から染色体を保護する働きをもっており、テロメアが失われると染色体の構造異常が起こりやすくなる。また、テロメアの先端にはshelterin複合体 (TIN2, TRF1, TRF2などの複合体) があり、テロメアの短縮を防いでいる。テロメアは染色体の複製に伴い50~200塩基対ずつ短縮する。一方で、生殖細胞や幹細胞ではテロメラーゼが発現しており、テロメアの延長に働いている。テロメラーゼは、テロメア配列の鋳型となるRNA要素のTERC、逆転写酵素のTERT (telomere reverse transcriptase)、snoRNP、その他の蛋白質で構成される複合体である。近年、これらのテロメア制御に関わる分子群の異常がDC患者において次々と報告された。X連鎖劣性遺伝形式を呈する症例で*DKC1*の異常が報告されたのをはじめとして、常染色体優性遺伝を呈する

症例で、テロメラーゼの構成成分である*TERC*、*TERT*の異常が、常染色体劣性遺伝を呈する症例で、snoRNPの構成成分である*NOPI0*、*NHP2*、shelterin複合体の構成成分である*TINF2* (TIN2をコードする) の異常が報告された²⁵⁻²⁹⁾。また、テロメア制御に関わる遺伝子群の異常がDC患者のみならず、Hoyeraal-Hreidarsson症候群、Recesz症候群、再生不良性貧血、MDS患者で認められ、これらの疾患群の一部は図3で示すように共通の分子基盤に基づき発症することが明らかとなってきている^{30,31)}。

D. Shwachman-Diamond症候群

Shwachman-Diamond症候群 (SDS) は、骨髄不全と膵外分泌不全を特徴とする疾患である。患者は、膵外分泌不全に伴う消化不良、脂肪便を呈し、それらに伴う体重増加不良を認める。そのため、平均診断年齢も1歳頃と比較的早期に診断されることが多い⁴⁾。血清トリプシノーゲン、膵アミラーゼの低下、1,500/ μ l未満の好中球減少、単球増加を認める。好中球減少は精査にて初めて

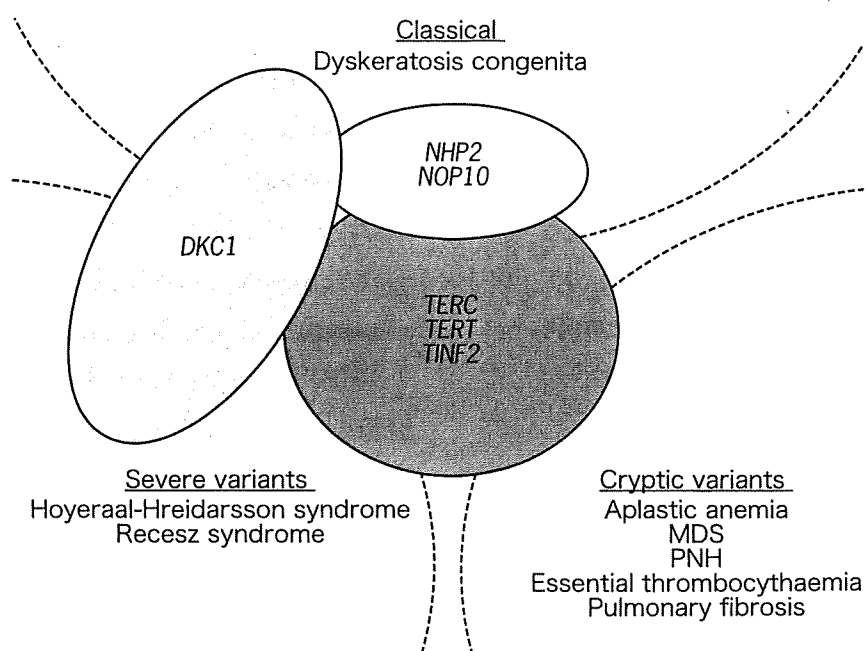


図3 DCと分子基盤を共有する様々な疾患群 (文献30より改変)

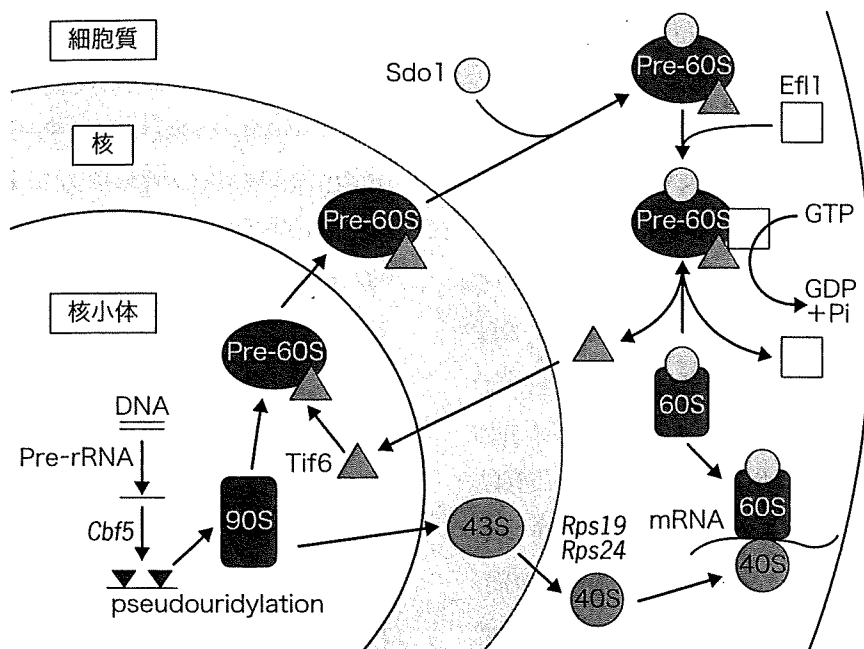


図4 SBDSの酵母における相同体Sdo1の役割 (文献33, 47より改変)

Sdo1は酵母におけるSBDSの相同体である。Tif6はPre-60Sサブユニットが核小体から細胞質へ移行する際に重要な役割をはたす。核小体においてTif6と結合したPre-60Sサブユニットは、細胞質に移動したのちTif6と分離し40Sサブユニットと結合することで成熟したリボソームになる。Sdo1はTif6がPre-60Sサブユニットと離れる際に重要な役割をはたす。実際、Sdo1が変異した酵母は、Pre-60サブユニットの核から細胞質への移行が低下し、60Sサブユニットが相対的に減少する。Sdo1を欠損した酵母は増殖速度が低下するが、この表現型はTif6の変異により補完される。Cbf5のヒトにおける相同遺伝子DKC1はDCの、Rps19, Rps24のヒトにおける相同遺伝子RPS19, RPS24はDBAの責任遺伝子である。

検出されることが多い。また、一部の患者では学習障害が認められる。超音波、CT、MRIなどの画像検査で脾臓に脂肪沈着が認められる。治療には消化酵素複合剤、脂溶性ビタミン（ビタミンA, D, E, K）の補充が行われる。

血液系の悪性腫瘍が高頻度に発生することが知られており、腫瘍発生平均年齢は18歳、40～50歳までの悪性腫瘍の累積確率は71%と報告されており、再生不良性貧血、MDS、白血病などの発生の頻度が高い⁴⁾。骨髓細胞で7番染色体の異常〔monosomy 7, der (7), i (7q)〕を有する細胞群を高頻度で認めるのが特徴で、経過中は注意が必要である。

2003年に、SDSの責任遺伝子としてSBDS (Shwachman-Bodian-Diamond syndrome: 責

任遺伝子SBDS) が同定された³²⁾。SBDSの異常はSDS患者の95%以上で認められる。SBDS遺伝子は7番染色体長腕に存在しているが、その近傍にはpseudogene (SBDSP) が存在する。SDS患者ではSBDSの2つの好発変異 (183-184TA > CT, 258 + 2T > C) が報告されているが、これらは、pseudogeneであるSBDSPとのgene conversionにより起こると考えられている。

SBDSの生体内での機能についてMenneらは、酵母におけるSBDSの相同体Sdo1が60Sサブユニットの成熟に重要な役割をはたしていることを報告した (詳細な分子機構を図4に示す)³³⁾。ヒトの細胞においても、SBDSが細胞周期依的に核小体に局在し、60Sサブユニットと関連してリボソーム生成に重要な役割をもつことが明らかにさ

れている³⁴⁾。

また、SDS発症の機序として、2001年にDrorらは、SDS患者のCD34⁺細胞ではFas経路を介するアポトーシスが亢進していることを報告した³⁵⁾。その後の検討で、SDS患者のCD34⁺細胞では、mRNAレベル、蛋白レベルでのFasの発現量は正常と変わらないものの、細胞膜におけるFasの過剰発現が認められており、Fasの感受性の亢進が示されている³⁶⁾。一方で、蛋白合成阻害処理によるアポトーシスの誘導は認めないことから、これらの現象はSBDSの異常に伴うリボソーム生成障害とは異なる機序により引き起こされている可能性がある³⁶⁾。Fasの過剰発現とFasの感受性の亢進は、SBDSをノックダウンしたHela細胞においても認められている。これらのアポトーシスの亢進は、Fasの抑制またはカスパーゼ8の抑制により改善されることから、Fas経路を介するアポトーシスの亢進が病態形成に関与していると考えられている³⁷⁾。

E. 軟骨毛髪低形成症

軟骨毛髪低形成症 cartilage-hair hypoplasia (CHH) は、軟骨形成不全に伴う四肢短縮、淡色かつ細くて粗な頭髪を特徴とする疾患で、McKusickらにより提唱された歴史をもつ³⁸⁾。患者はこれらの特徴的な臨床所見以外に、様々な程度の細胞性免疫の異常、発がん素因を呈する。2001年にCHH症例において、RNase MRPの構成物質のひとつであるRMRP (ribonuclease mitochondrial RNA processing: 責任遺伝子RMRP) の異常が同定された³⁹⁾。その後の患者解析から70A>Gが好発変異であり、フィンランド人患者では92%、その他の患者では48%で同変異が認められることが明らかとなった⁴⁰⁾。一方で、本邦での好発変異は218A>G、16-bp dup at +3の2つで創始者効果が認められている⁴¹⁾。

RNase MRPはミトコンドリアDNAの複製開始、rRNAのプロセッシングに重要と考えられている。酵母を用いた検討では、RNase MRPはITS1 (internal transcribed spacer) のsite A3 (ヒトにおける相同部位は図1のsite 2に相当する) の切断に重要な働きをもっているとされている⁴²⁾。そのためCHH患者ではRMRPが障害されることでリボソームのプロセッシングが障害され、軟骨細胞やリンパ球のような細胞分裂が多い細胞において細胞周期の進行 (特にM期後期で重要とされている) が障害され、疾患発症につながると考えられている⁴¹⁻⁴³⁾。

むすび

近年の研究により、リボソームの機能異常が造血障害、先天奇形、発がん素因という共通の病態をもつ疾患群の原因になることが明らかとなった。しかしながら、DBA症例の70%以上、DC症例の約50%では、いまだ責任遺伝子が同定されておらず、これらの疾患群の全貌が明らかとなったとはいえない。現在DCは、テロメア制御に関わる分子群の異常が病態形成の中心的な役割をはたしていると考えられているが、テロメア長の短縮はSBDSの造血系細胞でも認められており、これらの疾患群の理解にはさらなる検討が必要と考えられる⁴⁴⁾。

文献

- 1) Bagby GC, Lipton JM, Sloand EM, et al. Marrow failure. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2004; 318-36.
- 2) Campagnoli MF, Garelli E, Quarello P, et al. Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: new findings from the Italian registry and a review of the literature. Haematologica. 2004; 89: 480-9.
- 3) Flygare J, Karlsson S. Diamond-Blackfan anemia: erythropoiesis lost in translation. Blood. 2007; 109: 3152-4.

- 4) Alter BP. Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007; 29-39.
- 5) Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet*. 1999; 21: 169-75.
- 6) Willig TN, Draptchinskaia N, Dianzani I, et al. Mutations in ribosomal protein S19 gene and Diamond Blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression. *Blood*. 1999; 94: 4294-306.
- 7) Gazda HT, Grabowska A, Merida-Long LB, et al. Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet*. 2006; 79: 1110-8.
- 8) Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, et al. Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat*. 2007; 28: 1178-82.
- 9) Farrar JE, Nater M, Caywood E, et al. Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2008; 112: 1582-92.
- 10) Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, et al. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet*. 2008; 83: 769-80.
- 11) Da Costa L, Narla G, Willig TN, et al. Ribosomal protein S19 expression during erythroid differentiation. *Blood*. 2003; 101: 318-24.
- 12) Leger-Silvestre I, Caffrey JM, Dawaliby R, et al. Specific role for yeast homologs of the Diamond Blackfan anemia-associated Rps19 protein in ribosome synthesis. *J Biol Chem*. 2005; 280: 38177-85.
- 13) Choismel V, Bacqueville D, Rouquette J, et al. Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2007; 109: 1275-83.
- 14) Flygare J, Aspesi A, Bailey JC, et al. Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood*. 2007; 109: 980-6.
- 15) Dokal I. Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br J Haematol*. 2000; 110: 768-79.
- 16) Alter BP, Giri N, Savage SA, et al. Cancer in dyskeratosis congenita. *Blood*. 2009; 113: 6549-57.
- 17) Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*. 1999; 402: 551-5.
- 18) Fogarty PF, Yamaguchi H, Wiestner A, et al. Late presentation of dyskeratosis congenita as apparently acquired aplastic anaemia due to mutations in telomerase RNA. *Lancet*. 2003; 362: 1628-30.
- 19) 山口博樹. テロメア異常と骨髄不全症. *日本臨牀*. 2008; 66: 483-9.
- 20) Lee JJ, Kook H, Chung IJ, et al. Telomere length changes in patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2001; 112: 1025-30.
- 21) Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, et al. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet*. 1998; 19: 32-8.
- 22) Chen JL, Greider CW. Telomerase RNA structure and function: implications for dyskeratosis congenita. *Trends Biochem Sci*. 2004; 29: 183-92.
- 23) Cheong C, Hong KU, Lee HW. Mouse models for telomere and telomerase biology. *Exp Mol Med*. 2003; 35: 141-53.
- 24) 矢ヶ崎 博. Dyskeratosis Congenita (DC) 先天性角化不全症. *分子細胞治療*. 2009; 8: 123-8.
- 25) Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, et al. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature*. 2001; 413: 432-5.
- 26) Armanios M, Chen JL, Chang YP, et al. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 15960-4.
- 27) Savage SA, Giri N, Baerlocher GM, et al. TIN2, a component of the shelterin telomere protection complex, is mutated in dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet*. 2008; 82: 501-9.
- 28) Vulliamy T, Beswick R, Kirwan M, et al. Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 8073-8.

- 29) Walne AJ, Vulliamy T, Marrone A, et al. Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: 1619-29.
- 30) Walne AJ, Dokal I. Advances in the understanding of dyskeratosis congenita. *Br J Haematol.* 2009; 145: 164-72.
- 31) Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1413-24.
- 32) Boockock GR, Morrison JA, Popovic M, et al. Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet.* 2003; 33: 97-101.
- 33) Menne TF, Goyenechea B, Sanchez-Puig N, et al. The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nat Genet.* 2007; 39: 486-95.
- 34) Austin KM, Leary RJ, Shimamura A. The Shwachman-Diamond SBDS protein localizes to the nucleolus. *Blood.* 2005; 106: 1253-8.
- 35) Dror Y, Freedman MH. Shwachman-Diamond syndrome marrow cells show abnormally increased apoptosis mediated through the Fas pathway. *Blood.* 2001; 97: 3011-6.
- 36) Watanabe K, Ambekar C, Wang H, et al. SBDS-deficiency results in specific hypersensitivity to Fas stimulation and accumulation of Fas at the plasma membrane. *Apoptosis.* 2009; 14: 77-89.
- 37) Rujkijyanont P, Watanabe K, Ambekar C, et al. SBDS-deficient cells undergo accelerated apoptosis through the Fas-pathway. *Haematologica.* 2008; 93: 363-71.
- 38) Mckusick VA, Eldridge R, Hostetler JA, et al. Dwarfism in the Amish. II. Cartilage-hair hypoplasia. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1965; 116: 285-326.
- 39) Ridanpää M, van Eenennaam H, Pelin K, et al. Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia. *Cell.* 2001; 104: 195-203.
- 40) Kavadas FD, Giliani S, Gu Y, et al. Variability of clinical and laboratory features among patients with ribonuclease mitochondrial RNA processing endoribonuclease gene mutations. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 122: 1178-84.
- 41) Hirose Y, Nakashima E, Ohashi H, et al. Identification of novel RMRP mutations and specific founder haplotypes in Japanese patients with cartilage-hair hypoplasia. *J Hum Genet.* 2006; 51: 706-10.
- 42) Martin AN, Li Y. RNase MRP RNA and human genetic diseases. *Cell Res.* 2007; 17: 219-26.
- 43) Cai T, Aulds J, Gill T, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* RNase mitochondrial RNA processing is critical for cell cycle progression at the end of mitosis. *Genetics.* 2002; 161: 1029-42.
- 44) Thornley I, Dror Y, Sung L, et al. Abnormal telomere shortening in leucocytes of children with Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol.* 2002; 117: 189-92.
- 45) 伊藤悦朗. Diamond-Blackfan anemiaにおける病因研究の進歩. In: 高久史磨, 他編. *Annual Review 血液*. 東京: 中外医学社; 2008. p.66-72.
- 46) Rouquette J, Choismel V, Gleizes PE. Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells. *EMBO J.* 2005; 24: 2862-72.
- 47) 渡辺健一郎. Shwachman-Diamond症候群. *分子細胞治療*. 2009; 8: 105-9.

T Cell Leukemia/Lymphoma 1 and Galectin-1 Regulate Survival/Cell Death Pathways in Human Naive and IgM⁺ Memory B Cells through Altering Balances in Bcl-2 Family Proteins¹

Siamak Jabbarzadeh Tabrizi,* Hiroaki Niiro,^{2†} Mariko Masui,[‡] Goichi Yoshimoto,[†] Tadafumi Iino,[§] Yoshikane Kikushige,[†] Takahiro Wakasaki,[¶] Eishi Baba,[†] Shinji Shimoda,[†] Toshihiro Miyamoto,[‡] Toshiro Hara,* and Koichi Akashi^{†§}

BCR signaling plays a critical role in purging the self-reactive repertoire, or in rendering it anergic to establish self-tolerance in the periphery. Differences in self-reactivity between human naive and IgM⁺ memory B cells may reflect distinct mechanisms by which BCR signaling dictates their survival and death. Here we demonstrate that BCR stimulation protected naive B cells from apoptosis with induction of prosurvival Bcl-2 family proteins, Bcl-x_L and Mcl-1, whereas it rather accelerated apoptosis of IgM⁺ memory B cells by inducing proapoptotic BH3-only protein Bim. We found that BCR-mediated PI3K activation induced the expression of Mcl-1, whereas it inhibited Bim expression in B cells. Phosphorylation of Akt, a downstream molecule of PI3K, was more sustained in naive than IgM⁺ memory B cells. Abundant expression of T cell leukemia/lymphoma 1 (Tcl1), an Akt coactivator, was found in naive B cells, and enforced expression of Tcl1 induced a high level of Mcl-1 expression, resulting in prolonged B cell survival. In contrast, Galectin-1 (Gal-1) was abundantly expressed in IgM⁺ memory B cells, and inhibited Akt phosphorylation, leading to Bim up-regulation. Enforced expression of Gal-1 induced accelerated apoptosis in B cells. These results suggest that a unique set of molecules, Tcl1 and Gal-1, defines distinct BCR signaling cascades, dictating survival and death of human naive and IgM⁺ memory B cells. *The Journal of Immunology*, 2009, 182: 1490–1499.

Primarily human peripheral B cells are made up of heterogeneous subpopulations that include a high proportion of memory B cells compared with those in rodents. Due to the advantage conferred by the usefulness of CD27 as a memory marker in humans, peripheral B cells are divided into at least three distinct subsets: naive (IgM⁺CD27⁻), IgM⁺ memory (IgM⁺CD27⁺), and switched memory (IgG⁺A⁺CD27⁺) B cells (1). Of particular interest are IgM⁺ memory B cells in that they do not exist in mice and could develop through the novel germinal center-independent pathways and express somatically mutated IgM Abs (2). To date, IgM⁺ memory B cells have been proposed to be circulating splenic marginal zone (MZ)³ B cells and to play a critical role in the protection against encapsulated organisms (2, 3).

Although in vivo function of IgM⁺ memory B cells is becoming evident (4), the molecular mechanisms of activation of this subset remain poorly characterized.

Due to random rearrangements of the subunits of a functional BCR from genomic cassettes, a large proportion of developing human B cells in the bone marrow express self-reactive BCRs, but most of these potentially noxious BCRs are purged from the repertoire at several checkpoints in the bone marrow and the periphery (5). Nevertheless, up to 20% of mature naive B cells in normal peripheral blood still express low-affinity self-reactive BCRs (5). In sharp contrast, IgM⁺ memory B cells isolated from normal donors are devoid of such self-reactive BCRs (6). These findings suggest a distinct homeostatic control of human naive and IgM⁺ memory B cells.

BCR transmits the signals that are critical for both the elimination of self-reactive repertoire and the expansion of pathogen-specific repertoire. Upon BCR ligation by Ags, Lyn and Syk protein tyrosine kinases are initially activated. Syk propagates the signal by phosphorylating downstream signaling molecules. This results in activation of key signaling intermediates PI3K and phospholipase C (PLC)γ2. PI3K activates Akt kinase, which is critical for B cell survival (7). PLCγ2 activation leads to the release of intracellular Ca²⁺ and protein kinase C activation, which in turn cause activation of MAPK family kinases (ERK, JNK, and p38 MAPK) and transcription factors including NF-κB and NF-AT. These outputs subsequently connect with further-downstream molecules responsible for determining B cell fates such as survival, growth, and differentiation.

*Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan; †Department of Medicine and Biosystemic Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka; ‡Center for Cellular and Molecular Medicine, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan; §Department of Cancer Immunology and AIDS, Dana-Farber Cancer Institute, MA 02115; and ¶Department of Otorhinolaryngology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Received for publication August 7, 2008. Accepted for publication November 15, 2008.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology in Japan (to S.J.T., H.N., T.H., and K.A.).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Hiroaki Niiro, Department of Medicine and Biosystemic Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. E-mail address: hniiro@med.kyushu-u.ac.jp

³ Abbreviations used in this paper: MZ, marginal zone; Gal-1, galectin-1; Tcl1, T cell leukemia/lymphoma 1; PLC, phospholipase C; h, human; EGFP, enhanced

GFP; CLL, chronic lymphocytic leukemia; BAFF, B cell-activating factor of the TNF family.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

The Bcl-2-regulated pathway plays a critical role in BCR-induced survival and death (8, 9). The Bcl-2 family proteins fall into three subgroups: the first subgroup including Bcl-2, Bcl-x_L, and Mcl-1 inhibits some apoptotic pathways; the second subgroup including Bax and Bak directly induces apoptosis by promoting cytochrome *c* release from the mitochondria; the third subgroup, called BH3-only proteins, consists of at least eight mammalian proapoptotic proteins and is activated in a stimulus-specific, as well as a cell type-specific, manner. Among Bcl-2 family proteins, a BH3-only protein Bim is particularly important in controlling lymphocyte apoptosis. Bim deficiency causes a substantial expansion of autoreactive B cells leading to autoimmune diseases (10). B cells lacking Bim are refractory to BCR-induced apoptosis (10). Bim preferentially binds anti-apoptotic Mcl-1 (11, 12). Conditional knockout of Mcl-1 causes premature death of immature and mature B cells (12), suggesting a pivotal role of Mcl-1 in B cell survival. Based on these findings, tipping the balance between Mcl-1 and Bim expression may be a critical determinant for B cell survival and death. To date, little is known about how BCR signaling dictates the survival and death of human B cell subsets via the Bcl-2-regulated pathway.

In this study, we demonstrate that BCR stimulation rescued naive B cells from apoptosis with Bcl-x_L and Mcl-1 induction, whereas it rather accelerated apoptosis of IgM⁺ memory B cells with Bim induction. Sustained Akt activation in naive but not IgM⁺ memory B cells appears to be critical for reciprocal expression pattern of these Bcl-2 family proteins. Moreover, we demonstrate that T cell leukemia/lymphoma 1 (Tcl1) and galectin-1 (Gal-1), abundantly expressed in naive and IgM⁺ memory B cells, respectively, play a crucial role in regulating Akt activation, thereby affecting their survival and death via the Bcl-2-regulated pathway.

Materials and Methods

Reagents

PE-Cy5-conjugated mouse anti-human (h) CD3, -hCD4, -hCD8, -hCD11b, -hCD14, -hCD56, and -human glycoprotein A mAbs; FITC-conjugated mouse anti-hCD19, -hCD69, -hCD86, -hCD95 mAbs; and PE-conjugated mouse anti-hCD27 mAb were purchased from BD Immunocytometry. FITC-conjugated goat anti-hlgM, -hlgD, -hlgG, -hlgA, rabbit anti-hGal-1 sera and recombinant hGal-1 were obtained from MBL. Goat anti-hlgM and IgG/IgA/IgM F(ab')₂ fragments were purchased from Jackson Immuno-Research Laboratories. Rabbit anti-human phospho-ZAP70/Syk, anti-human phospho-PLCγ2 (Y1217), anti-human phospho-JNK, anti-human phospho-ERK, anti-human phospho-Akt, anti-human Bim, anti-human Tcl1 sera, and rabbit anti-human phospho-p85/p70 S6K, anti-human phospho-NF-κB p65, and anti-human Bcl-x_L mAbs were from Cell Signaling Technology. Mouse anti-β-actin mAb and rabbit anti-human Mcl-1 sera were from Sigma-Aldrich. A PI3K inhibitor (Ly294002) was purchased from Calbiochem (EMD Biosciences).

Isolation and culture of B cell subsets

Human PBMCs were separated from buffy coats kindly provided by Fukuoka Red Cross Blood Center (Chikushino, Japan). The buffy coats originate from kind whole blood donations of RBC transfusion by healthy volunteers (age range, 18–55 years). Informed consent was obtained from all subjects. B cells were isolated with Dynabeads M450 CD19 and DETACHaBEAD CD19 (DynaL Biotech) according to the manufacturer's instructions. Isolated B cells exhibited >99.5% viability confirmed by trypan blue exclusion and >95% purity by flow cytometry. Cells were further purified by cell sorting using a FACSAria (BD Biosciences). A representative sample of human B cell subsets is shown in Fig. 1A. Cells were stained with PE-Cy5-conjugated anti-hCD3, -hCD4, -hCD8, -hCD11b, -hCD14, -hCD56, -human glycoprotein A; FITC-conjugated anti-human IgG; FITC-conjugated anti-human IgA; and PE-conjugated anti-hCD27 to obtain naive (IgG⁺A⁻CD27⁻), IgM⁺ memory (IgG⁻A⁻CD27⁺), and switched memory (IgG⁺IgA⁺CD27⁺) B cells. Isolated B cell subsets exhibited >95% viability confirmed by trypan blue exclusion and >99% purity by flow cytometry (Fig. 1B). Cells were cultured at 1 × 10⁶ cells/ml

in a flat-bottom 96-well microtiter plate in complete RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. Preliminary experiments showed that trace levels of phosphorylation of BCR signaling molecules are observed in B cell subsets immediately after purification probably due to mechanical stress. The cells were thus rested for a couple of hours and used for further analysis throughout the study. Consistent with a previous study (2), IgM⁺ memory B cells exhibited a slightly higher level of IgM and a slightly lower level of IgD than did naive B cells (Fig. 1C). Absence of surface expression of CD95, CD86, and CD69, representative activation markers, in both subsets before stimulation, suggests that these cells are rested (Fig. 1C).

Expression constructs and transient transfection of human B subsets

Constructs encoding human Tcl1- or Gal-1-enhanced GFP (EGFP) fusion proteins (pEGFP-Tcl1 or -Gal-1) were generated by inserting sequence encoding the full-length protein into the pEGFP-N3 vector (Clontech). Transient transfections of B cell subsets with pEGFP-Tcl1 or pEGFP-Gal-1 were conducted using the Nucleofector protocol from AMAXA Biosystems. Cells (1 × 10⁶) were suspended in 100 μl of Nucleofector solution with 5 μg of plasmid DNA and then electroporated using program U-15. Cells were transferred to 2.5 ml of medium containing 15% FCS and harvested 24 h after transfection. The transfection efficiency ranges between 20 and 30% for each experiment.

Annexin V staining

After culture, cells (1–2 × 10⁵) were washed twice with PBS and then suspended in 85 μl of binding buffer (MBL) containing Ca²⁺. Cell suspension supplemented with 10 μl of annexin V-FITC or -PE (MBL) and 5 μg of propidium iodide or 1 μg of 7-aminoactinomycin D was incubated at room temperature for 15 min in the dark. Subsequently, 600 μl of binding buffer were added, and the percentage of early apoptotic cells was measured using flow cytometry.

Mitochondria membrane potential

Assessment of mitochondria membrane potential was performed using Mitotracker Red CMXRos (Invitrogen). Cells were incubated in 50 nM Mitotracker Red at 37°C for 1 h in the dark. Flow cytometric analysis (50,000 events/sample) was performed on FACSCalibur (BD Biosciences). Cell debris was electronically gated out based on the forward scatter. Data were further analyzed using FlowJo software.

Measurement of intracellular free calcium

Cells were washed with RPMI 1640 containing 10% FCS and adjusted at 1 × 10⁶ cells/ml. After incubation at 37°C for 15 min, 1 μg/ml fluo-4-acetoxymethyl esterM (Dojindo) was added, and the cells were incubated for a further 30–45 min with resuspension every 15 min. The cells were centrifuged and resuspended in RPMI 1640 at 2 × 10⁶ cells/ml. The cells were stimulated with anti-IgM (20 μg/ml), and the fluorescence intensity of intracellular fluo 4 was monitored and analyzed using flow cytometry.

Western blot analysis

Unstimulated or stimulated cells (1 × 10⁶) were lysed as described (13). Lysates were then denatured in an equal volume of 2× SDS sample buffer, resolved by a 10% SDS-PAGE gel and electrotransferred to nitrocellulose membranes in non-SDS-containing transfer buffer (25 mM Tris, 0.2 M glycine, 20% methanol, pH 8.5). Western blotting was performed with anti-phospho-Syk (1/2,000), anti-phospho-PLCγ2 (1/2,000), anti-phospho-p85/p70 S6 kinase (1/2,000), anti-phospho-JNK (1/2,000), anti-phospho-ERK (1/2,000), anti-phospho-Akt (1/2,000), anti-phospho-p65 NF-κB (1/2,000), anti-Bim (1/2,000), anti-Bcl-x_L (1/2,000), anti-Mcl-1 (1/5,000), anti-Tcl1 (1/2,000), anti-Gal-1 (1/2,000), and anti-β-actin (1/5,000) followed by a 1/15,000 dilution of anti-rabbit or anti-mouse HRP-conjugated IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Blots were developed with ECL plus kit (Amersham Biosciences). The chemiluminescence intensity was monitored with a laser3000 (FujiFilm) instrument. We quantitated band intensity of the proteins using ImageGauge software (FujiFilm) and normalized their expression in reference to β-actin levels. Using these normalized data, relative expression is subsequently calculated as fold changes in protein expression compared with the controls.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from sorted human B cell subsets using Isogen reagent (Nippon Gene) and treated with DNase I (Invitrogen) to remove contaminating genomic DNA. First-strand cDNA was synthesized using a