

表 原発性免疫不全症の分類と一部の例 (文献1) より引用)

1) T細胞およびB細胞免疫不全症 (combined T-cell and B-cell immunodeficiencies) ・ T(-)B(+)重症複合免疫不全症 (SCID) $\gamma$ c欠損症 ・ T(-)B(-)重症複合免疫不全症 (SCID) RAG1/2欠損症	(IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21受容体の $\gamma$ 鎖の欠損) など (RAG1またはRAG2の欠損) など
2) 主として抗体不全症 (predominantly antibody deficiencies) ・ Btk欠損症 ・ CD40L欠損症 ・ CD40欠損症 ・ IgGサブクラス欠損症	(BTK遺伝子の変異) (CD40L遺伝子の変異) (CD40遺伝子の変異) (不明, ただし著者らにより $\gamma$ 2遺伝子の欠損が確認された) など
3) 他のよく定義された免疫不全症候群 (other well defined immunodeficiency syndromes) ・ Wiskott-Aldrich症候群 ・ 毛細血管拡張性小脳失調症	(WASP遺伝子の変異) (ATM遺伝子の変異) など
4) 免疫調節不全の疾患 (diseases of immune dysregulation) ・ X連鎖リンパ増殖症候群 XLP1 ・ 自己免疫性リンパ増殖症候群 (ALPS) CD95 (Fas) 欠損症, ALPS1a型 ・ IPEX (免疫不全, 多内分泌障害, 腸障害, [X連鎖])	(SH2D1A遺伝子の変異) (TNFSF6遺伝子の変異) など (T細胞転写因子をコードしているFOXP3遺伝子の変異) など
5) 食細胞の数・機能・両方の先天性障害 (congenital defects of phagocyte number, function, or both) ・ X連鎖慢性肉芽腫症 ・ 常染色体劣性慢性肉芽腫症 ・ IL-12とIL-23受容体 $\beta$ 1鎖欠損症 ・ IFN- $\gamma$ 受容体1欠損症 ・ IFN- $\gamma$ 受容体2欠損症	[CYBB遺伝子の変異: 電子輸送蛋白 (gp91phox)] [CYBA遺伝子の変異: 電子輸送蛋白 (p22phox)] など (IL-12R $\beta$ 1遺伝子の変異) (IFN- $\gamma$ R1遺伝子の変異) (IFN- $\gamma$ R2遺伝子の変異) など
6) 自然免疫系の障害 (defects in innate immunity) ・ 無汗性外胚葉形成不全免疫不全症候群 (EDA-ID) ・ IL-1受容体関連キナーゼ4 (IRAK4) 欠損症 ・ WHIM (疣, 低 $\gamma$ -グロブリン血症, 感染, 好中球減少) 症候群 ・ 疣贅状表皮異形成症 ・ 単純ヘルペス脳炎	(NF- $\kappa$ B活性化のモジュレーターであるNEMO (IKBKG) 遺伝子の変異, NF- $\kappa$ Bの活性化に障害が生じるIKBA遺伝子の機能獲得型変異) など (TLRシグナル伝達系のIRAK4遺伝子の変異) (CXCL12受容体であるCXCR4遺伝子の機能獲得型変異) (EVER1, EVER2遺伝子の変異) (UNC93B1遺伝子の変異, TLR3遺伝子の変異) など
7) 自己炎症性疾患 (autoinflammatory disorders) ・ 家族性地中海熱 ・ TNF受容体関連周期性症候群 (TRAPS) ・ 高IgD症候群 ・ Muckle-Wells症候群 ・ 家族性寒冷自己炎症性症候群 ・ 新生時期発症多臓器炎症性疾患 (MOMID) または慢性乳児神経皮膚関節 (CINCA) 症候群 ・ 化膿性・無菌性関節炎, 壞疽性膿皮症, ニキビ症候群 ・ Blau症候群	(MEFV遺伝子の変異) (TNFRSF1A遺伝子の変異) (MVK遺伝子の変異) [CIAS1 (PYPAF1あるいはNALP3ともいわれる) 遺伝子の変異] (CIAS1遺伝子の変異) (CIAS1遺伝子の変異) [PSTPIP1 (CD2BP1ともいわれる) 遺伝子の変異] [NOD2 (CARD15ともいわれる) 遺伝子の変異]
8) 補体不全症 (complement deficiencies) ・ C1 inhibitor欠損症 (遺伝性血管性浮腫 HANE) ・ Factor H欠損症 (溶血性尿毒症症候群, 膜性増殖性糸球体腎炎)	(C1 inhibitor遺伝子の変異) (Factor H遺伝子の変異) など

(WHO分類全体は別稿参照)

症を診断するため、問診による症状の把握がまず重要である。易感染性（反復感染・重症感染症）のほかに、各疾患に特徴的な症状・所見も大いに参考になる。必要な検査として、スクリーニング検査で免疫不全症の有無とカテゴリーを決定し、特殊検査で病態を探り病型を決定する。さらに病因遺伝子が明らかな病型では、病因遺伝子の異常を検索することが診断・保因者診断と同時に、病態と症状の理解ひいては治療管理に重要である。

原発性（先天性）免疫不全症については、①古くから確立されてきた原発性（先天性）免疫不全症と、②最近の免疫系の解明により明らかにされてきた自然免疫系を含む原発性（先天性）免疫不全症、に大きく分けることができる。以下に、この両者について概説する。

①古くから確立されてきた原発性（先天性）免疫不全症の臨床遺伝学：表のカテゴリーとしては、1) T細胞およびB細胞免疫不全症、2) 主として抗体不全症、3) 他によく定義された免疫不全症候群、5) 食細胞の数・機能・両方の先天性障害、8) 補体不全症、に属するものの多くの疾患がこれに相当する。これらのうち、近年の分子遺伝子の進歩により、次々と病因遺伝子が解明された疾患が少なくない。その代表的な例の病名と遺伝子異常を表に紹介する。

②最近の免疫系の解明により明らかにされてきた原発性（先天性）免疫不全症の臨床遺伝学：表のカテゴリーとしては、4) 免疫調節不全の疾患、6) 自然免疫系の障害、7) 自己炎症性疾患、に属するものの多くの疾患がこれに相当する。これらの多くは、自然免疫系をはじめとする免疫系の新たな解明とともに、疾患の概念と病態と病因遺伝子の解明が進められてきた。その代表的な例を表に紹介し、以下に概説する。

## 1. 免疫調節不全の疾患

### 1) X連鎖リンパ増殖症候群（X-linked lymphoproliferative syndrome: XLP）

本症は、Epstein-Barrウイルス（EBV）の感染が発症のきっかけとなり、致死的な伝染性単核球症（infectious mononucleosis: IM）や、リンパ増殖性疾患（とくに悪性リンパ腫）、異常免疫グロブリン血症を呈する。この疾患が最初に記述される対象となった家系にちなんで、Duncan病ともよばれている。EBV感染に対する免疫反応が異常である点が特徴である。XLPの病因遺伝子はxq25に位置する遺伝子であり、当初SAP（SLAM associated protein）と命名されたが、現在はSH2D1Aとよばれることが多い。血球貧食症候群を示す。

### 2) 自己免疫疾患を伴う症候群：自己免疫性リンパ増殖症候群（autoimmune lymphoproliferative syndrome: ALPS）

CD95（Fas）、CD95（Fas）ligand、Caspase 10、Caspase 8の欠損により発症する。常染色体劣性の遺伝形式をとる。リンパ節膨脹、肝脾腫、リンパ球アポトーシスの欠損、自己免疫疾患を呈する。臨床症状は慢性活動性EBウイルス感染症と共通のことが多い。

## 2. 自然免疫系の障害による免疫不全症

### 1) 無汗性外胚葉形成不全免疫不全症候群

無汗性外胚葉形成不全免疫不全症候群（anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency: EDA-ID）は歯牙欠損、粗な頭髪、発汗の低下といった外胚葉形成不全の症状に加えて、易感染性を示す免疫不全症候群である。

EDA-IDはNF- $\kappa$ B活性化の異常で生じ、X染色体劣性遺伝形式をとるXL-EDA-IDと常染色体優性遺伝形式をとるAD-EDA-IDが知られている。近年、XL-EDA-IDの原因遺伝子として*IKBKG/NEMO*が、AD-EDA-IDの原因遺伝子として*IKBA*が同定された。両者ともNF- $\kappa$ Bの活性化に重要な分子をエンコードしている。

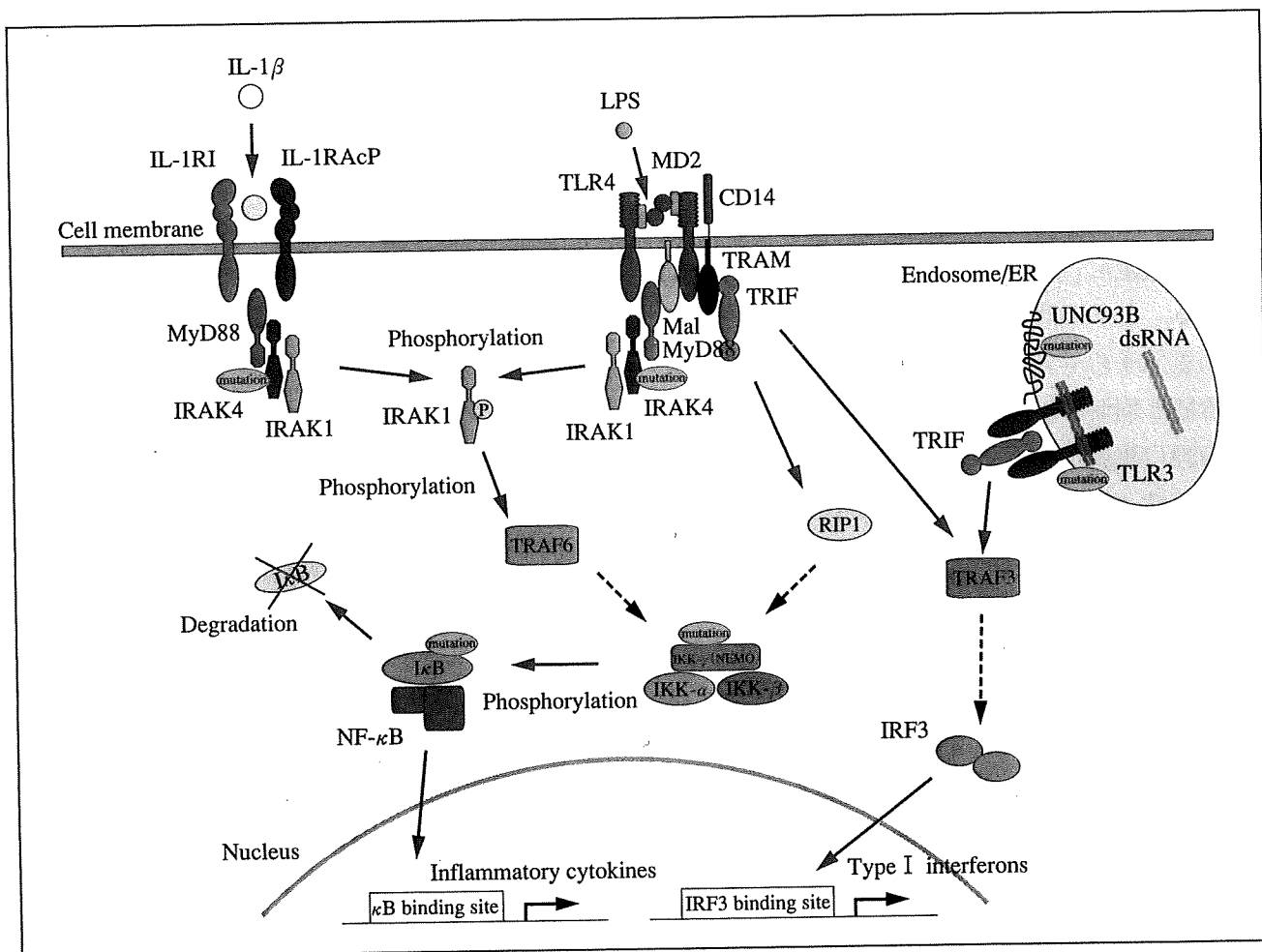


図 TLRおよびIL-1RからNF-κBを活性化するシグナル経路

図に、TLRおよびインターロイキン-1受容体(以下、IL-1Rと略す)からNF-κBを活性化するシグナル経路を示す。

### 2) IRAK4欠損症

Interleukin 1 receptor associated kinase 4 (IRAK4) 遺伝子の異常により、TLRsおよびIL-1Rsのシグナル伝達障害が起こり、自然免疫応答低下ととくにグラム陽性球菌に対する易感染性を示す。常染色体劣性遺伝形式をとるIRAK4欠損症は、2003年に報告されて以来、すでに28を超える症例が報告されている。

多くのIRAK4欠損症患者は、生後まもなくより重症細菌感染症を繰り返す。その多くは*S. pneumoniae*によるものであり、より頻度は下がるが*S. aureus*によるものもある。

### 3) WHIM症候群 (warts, hypogammaglobulinemia, infections, and myelokathexis syndrome)

WHIM症候群は、ヒトパピローマウイルス感染による疣贅、低γ-グロブリン血症、免疫不全、myelokathexis(末梢血では好中球減少を認めるが、骨髄では骨髄顆粒球系細胞過形成を呈する状態)を示し、多くの症例で常染色体優性遺伝形式をとる症候群で、2003年に責任遺伝子としてchemokine receptor 4をエンコードするCXCR4が同定された。

### 4) 単純ヘルペス脳炎

単純ヘルペス脳炎(herpes simplex encephalitis, 以下HSEと略す)は、散発的に生じる急性ウイルス性脳炎としてもっとも一般的であるが、2006年に、常染色体劣性遺伝形式をとるUNC93B1欠損症がHSEの遺伝的病因として最

初に同定され、また2007年には、常染色体優性遺伝形式をとるTLR3欠損症が2番目の遺伝的病因として報告された。両者とも、単純ヘルペスウイルス1型(HSV1)以外の病原体による感染に罹患しやすいわけではなく、HSV1感染についてはHSEに罹患しやすいことが示されている。UNC93B1は12回貫通型膜蛋白質で、小胞体膜に発現している。UNC93B1は核酸系リガンドを認識するTLR群(TLR3, 7, 9)の膜貫通部位に結合する。

### 3. 自己炎症性疾患

自己炎症性疾患は、発熱、皮疹、関節炎などの全身の炎症を反復する疾患である。炎症反応の抑制系の障害、促進系の異常活性化など炎症制御異常により炎症が亢進している病態である。

#### 1) TNF受容体関連周期性症候群 (TNF receptor-associated periodic syndrome: TRAPS)

TNF受容体タイプ1 (TNFR1) をコードするTNFRSF1Aの遺伝子異常が原因である。

#### 2) cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS)

cryopyrin (別名 PYPAF, NALP3) をコードするCIAS1 (cold-induced autoinflammatory syndrome) 遺伝子異常によりおきる疾患であり、familial cold autoinflammatory syndrome (FCAS), Muckle-Wells症候群 (MWS), 新生児期発症多臓器炎症性疾患 (neonatal onset multisystem

inflammatory disease: NOMID)/慢性乳児神経皮膚関節 (chronic infantile neurological cutaneous and articular: CINCA) 症候群の3病型がある。FCASが軽症、MWSは中等症、CINCAは重症ととらえることもできる。

IL-1受容体拮抗薬 (anakinra) がFCAS, MWS, CINCAいずれにも著効を示す。

## おわりに

感染症、免疫異常の臨床遺伝学につき、最近のトピックスを中心に概説した。なお、WHO分類全体については別稿に記載した(178~187頁)。

## ▶ 文献 ◀

- 1) Geha RS et al.: Primary immunodeficiency diseases. J Allergy Clin Immunol 120:776-794, 2007
- 2) Bustamante J et al.: Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. Curr Opin Immunol 20:39-48, 2008
- 3) Bochud PY et al.: Innate immunogenetics: a tool for exploring new frontiers of host defence. Lancet Infect Dis 7:531-542, 2007

### 著者連絡先

〒501-1194 岐阜市柳戸1-1

岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学  
近藤直実

## 総 説

## IgA・IgA サブクラスと IgA 欠損症の病態

金子英雄<sup>\*1,\*2</sup>, 鈴木啓子<sup>\*1</sup>, 近藤直実<sup>\*1</sup>

## IgA subclass and IgA deficiency

Hideo KANEKO<sup>\*1,\*2</sup>, Hiroko SUZUKI<sup>\*1</sup> and Naomi KONDO<sup>\*1</sup><sup>\*1</sup>Division of Pediatrics, Center for Regional Medicine, Gifu University<sup>\*2</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine Gifu University, Gifu, Japan

(Received March 23, 2009)

## summary

There are two subclasses of IgA, IgA1 and IgA2, and its heavy chains are encoded by two different genes,  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  genes. These two subclasses play important roles in the first line of defense, and the amount ratio of these molecules in secretions varies. IgA deficiency (IgAD) is the most common immunodeficiency, however the pathogenesis in most cases of IgAD is unknown. The class switch disorder in IgA producing B lymphocytes is one of the important factors in IgAD patients. The decreased expression levels of  $I\alpha$  germline transcripts before a class switch may be the cause of selective IgAD. The  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  gene expression levels are low in most IgAD patients. Using RT-PCR method in which  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  mRNAs can be separately evaluated, we identified the second case of  $\alpha 1$  gene deletion in Japan. Longitudinal change in the serum IgA of the patient with  $\alpha 1$  gene deletion showed the pattern of the partial IgAD. Patients with  $\alpha 1$  gene deletion can be considered as having partial IgAD.

**Key words**—IgA サブクラス ; IgA1 プロテアーゼ ; germ-line transcripts ; IgA 欠損症 ; TACI ; BAFF ; APRIL ; IgA1 遺伝子欠失

## 抄 録

IgA は IgA1 と IgA2, 2つのサブクラスが存在する。各組織でサブクラスの存在比は異なる。IgA2 は、細菌のプロテアーゼにより認識されるヒンジ領域のアミノ酸配列を欠いているため、IgA1 と比較すると分解されにくく、粘膜面における細菌からの防御に重要である。IgA サブクラスは 14 番染色体長腕に位置する IgA 重鎖遺伝子の  $\alpha 1$  と  $\alpha 2$  遺伝子により決定される。クラススイッチに先立ち  $I\alpha$  germ-line transcripts の転写が必要である。IgA 欠損症は IgA のみの産生低下を示す免疫不全症であるが Ig 欠損症の一部は  $I\alpha$  germ-line transcripts の発現が低下しており、クラススイッチ障害がその病態として考えられた。IgA 欠損症の血漿中の BAFF, APRIL は健常人に比較し有意に高値を示した。サブクラスの発現では IgA 欠損症の多くは  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ともに、発現低下がみられた。 $\alpha 2$  のみの発現を示した partial IgA 欠損は本邦 2 例目の  $\alpha 1$ -pseudoy $\gamma 2$ - $\gamma 4$ - $\epsilon$  遺伝子の欠失によるものであった。今後さらに、IgA サブクラスの異常も含めて、その病態が明らかにされることが期待される。

## はじめに

免疫グロブリンには IgM, IgG, IgA, IgE, IgD のアイソタイプと IgG と IgA にそれぞれサブクラスが存在する。それぞれの、アイソタイプは抗原認識の Fab の部分は、ほぼ同じであるが、Fc の部分が異なっている。それぞれの Fc において補体結合能が異なることや、それぞれの Fc 特異的な Fc リセプターが存在し、それを有する細胞が様々であるた

め、抗原抗体反応のあとの免疫応答に多様性が加わり、より効果的に免疫反応が誘導される。本稿では、特に IgA・IgA サブクラスについて解説し、IgA 欠損症について、これまでの知見を概説したい。

## IgA サブクラス

IgA はヒトの粘膜において多量に分泌されており、粘膜防御機構において最初に抗原と接触する免疫グロブリンである。IgA には IgA1 と IgA2 の二つのサブクラスが存在する。そのサブクラスの比は組織によって異なる。血清中では IgA1 と IgA2 は、9 : 1 で存在するが大腸の分泌液中などではその比

<sup>\*1</sup>岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学, <sup>\*2</sup>岐阜大学大学院医学系研究科・医学部地域医療医学センター

率が逆転する (表 1)<sup>1)</sup>。

IgA2 には IgA2m(1), IgA2m(2) の 2 つのアロタイプが存在し, IgA2m(1) では H 鎖と L 鎖が結合せず L 鎖がお互いにジスルフィド結合している。分泌型 IgA の構造上の特徴は, J 鎖が H 鎖 tail piece と結合し結ばれた 2 量体または多量体 IgA の Fc 部分と分泌成分 (secretory component: SC) が結合している点である。SC は分泌型 IgA が上皮細胞に取り込まれるのに重要と考えられている<sup>2)</sup>。

IgA サブクラスを決定しているのは 14 番染色体長腕に位置する IgA 重鎖遺伝子の  $\alpha 1$  と  $\alpha 2$  遺伝子である<sup>3)</sup>。それぞれの分子量は約 53 kDa であり, それぞれの  $\alpha$  鎖遺伝子には CH1, CH2, CH3 の 3 つのエクソンが存在する。 $\alpha 1$  と  $\alpha 2$  遺伝子は 95% 以上の相同性を有しているが, 最大の相違点は  $\alpha 2$  のヒンジ領域は  $\alpha 1$  鎖と比較して 13 個のアミノ酸配列が欠如している点である。N. meningitidis や H. influenzae などの細菌は IgA1 プロテアーゼを産生することが報告されている。IgA1 プロテアーゼはヒト IgA1 ヒンジ領域のアミノ酸配列を認識し, 分解する。その結果 Fab $\alpha$  と Fc $\alpha$  に IgA は分解される。プロテアーゼで Fab $\alpha$  と Fc に分解された IgA1 の Fab $\alpha$  は, まだ, 細菌への結合能は残っている。細菌に結合はするが Fc がいないため, 抗体としての機能は十分でなく, 逆に細菌への正常な抗体の結合を阻止するため, 細菌が宿主の免疫系から逃避するのを助けている可能性がある。IgA1 プロテアーゼを制御することが, 感染防御につながると思われる。現在, さまざまな研究がおこなわれている。一方, IgA2 はヒンジ領域の 13 アミノ酸を欠いているため, IgA1 プロテアーゼに対して耐性があることが知られている。IgA2 は IgA1 プロテアーゼを有する細菌に対する感染防御に重要であると考

えられる<sup>4,5)</sup>。

## IgA クラススイッチ

免疫グロブリン重鎖部に V/D/J 遺伝子群が存在し, J 遺伝子下流に,  $\mu$ - $\delta$ - $\gamma 3$ -pseudoe- $\alpha 1$ -pseudoy- $\gamma 2$ - $\gamma 4$ - $\epsilon$ - $\alpha 2$  の免疫グロブリン重鎖定常部領域をコードするエクソンが 250 Kb 以上にわたり存在する。まず, プロ B 細胞の段階で H 鎖の VDJ 再構成, 続いてプレ B 細胞の段階で L 鎖の VJ 再構成が生じる。VDJ の再構成された遺伝子は, J のすぐ 3' の  $\mu$  と  $\delta$  遺伝子まで転写され, 両者を含む前駆体 mRNA が転写され, IgM と IgD を同時に発現する成熟 B 細胞へ分化する。その後, 末梢リンパ組織へ移行した B 細胞は抗原の刺激を受け, さらに分化する。このとき,  $\mu$ ,  $\delta$  鎖とはことなる定常部遺伝子を発現する。この, 一連の過程をアイソタイプのクラススイッチとよぶ。このとき,  $\mu$  遺伝子が他の下流の遺伝子と置き換わる。このことをクラススイッチ組み換えとよぶ<sup>6)</sup>。

IgA1 へのスイッチ組み換えは図 1 に示すように S $\mu$  と S $\alpha 1$  領域で生じ, 間にある C $\mu$ - $\delta$ - $\gamma 3$ -pseudoe 遺伝子は環状 DNA として切り出される<sup>7)</sup>。この組み換えの後, C $\alpha 1$  mature transcripts が発現し膜型および分泌型の mRNA が選択的スプライシングにより形成され, IgA1 を分泌する。スイッチ組み換えに先立ち, germ-line transcripts が誘導される。これにより,  $\mu$  と  $\alpha 1$  のそれぞれの S 領域は転写側の 1 本鎖 DNA と RNA がハイブリッドを形成する。この, 構造は R-loop 構造とよばれ, S 領域の数 Kb にわたる。これにより, activation induced cytidine deaminase (AID) が, S 領域にリクルートされ, AID が両方の DNA 鎖において脱アミノ化を開始する。脱アミノ化されたデオキシウリジンは, uracil-DNA glycosylase UNG によりウラシル残基が取り除かれ, apurine/aprimidinic endnuclease (APE) により 1 本鎖 DNA 切断が誘導される。両方の DNA 鎖において 1 本鎖 DNA 切断されると double strand break となり, その切断端が修復され結合するとクラススイッチ組み換えが終了する<sup>8)</sup>。

IgA のクラススイッチには  $\alpha$  領域の germ-line transcripts が必要であるが, TGF- $\beta 1$  は  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  両方の germ-line transcripts を誘導すると考えられている。また,  $\alpha 1$  は Staphylococcus aureus Cowan I といった刺激で誘導されるが,  $\alpha 2$  はあまり誘導されない。mature transcripts については, TGF- $\beta 1$  +

表 1 血清中, 分泌液中の IgA サブクラス

	IgA (mg/dl)	多量体 IgA (%)	IgA1/IgA2 比
血液	328	13	89 : 11
初乳	1234	96	65 : 35
唾液	30.4	96	63 : 37
小腸	27.6	95	70 : 30
大腸	82.7	n.d.	35 : 65
胆汁	10.5	65	74 : 26
鼻汁	25.7	n.d.	95 : 5
気管支分泌液	n.d.	82	67 : 33

n.d.: not determined (文献 1 より引用改変)

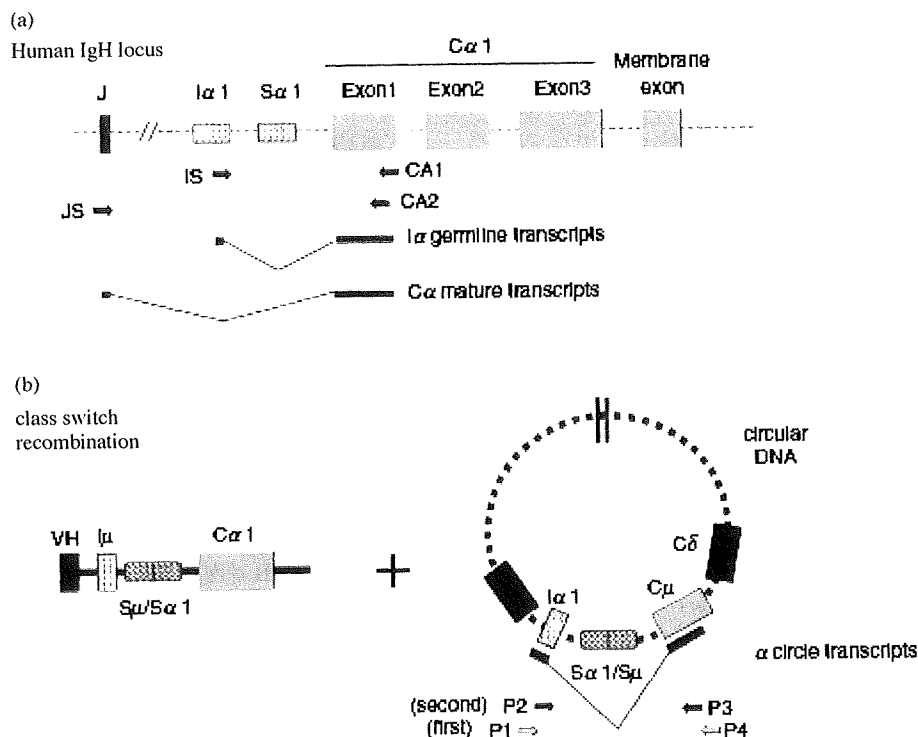


図1 IgA1 クラススイッチの模式図

a) VDJ 再構成後の IgH 鎖上の IgA 遺伝子領域.  $I\alpha$  germline transcripts と  $C\alpha$  germline transcripts を検出するための PCR 法を示す. プライマーは矢印, cDNA から増幅された PCR 断片はスプライシングを表す V 型の線を伴う太線で示す.  
 b) IgA1 へのスイッチ組み換え時の IgH 鎖と切り出される環状 DNA,  $\alpha$  circle transcripts は環状 DNA の  $I\alpha 1$  から  $C\mu$  への転写を示す. プライマーは矢印, PCR 断片はスプライシングを表す V 型の線を伴う太線で示す (文献 7 より引用改変).

SAC+IL-10 で誘導されるが,  $\alpha 2$  に関してはさらに CD40 からのシグナルが必要と考えられている<sup>9)</sup>.

$\alpha$  遺伝子の germ-line transcripts, mature transcripts の発現は  $\alpha 1, \alpha 2$  で共通のシグナルを必要とするが, 一部は固有のシグナルを必要とする. このことが, 各組織において,  $\alpha 1, \alpha 2$  の発現量が異なっている要因の一つと考えられる.

### IgA 欠損症

先天性の免疫不全症の中で最も頻度高い疾患と考えられている. 欧米では 200~2,000 人に一人, 本邦では 3,000~19,000 人に一人とされている. 血清 IgA 値が 5 mg/dl 以下で他の免疫グロブリンは正常範囲内である. IgG あるいは IgM B 細胞は十分に認められるが, 表面 IgA 陽性 B 細胞は, 減少していることが多い. 病態として IgA 産生細胞への分化障害が考えられている. 一部の家系では常染色体劣性遺伝形式を示す. HLA-B8, HLA-DR3 などに連鎖しているとの報告がある. 二次性の IgA 欠損症として抗てんかん薬の服用によるものはよく知られている<sup>10,11)</sup>.

### IgA 欠損症における TNF-receptor family

2005 年に CVID (common variable immunodeficiency) と IgA 欠損症の一部が TNF receptor family に属する TACI (transmembrane activator and calcium-modulator and cytophilin ligand interactor) 遺伝子変異によることが報告された<sup>12,13)</sup>. そこで, CVID, IgA 欠損症において TACI, BAFFR (B cell activating factor of the tumor necrosis factor family receptor) 等の TNF receptor family とそのリガンド APRIL (a proliferation-inducing ligand), BAFF に関して遺伝子解析を行った.

いくつかのサイトカインの発現は加齢に伴い変化することが知られているので, まず, 健常人の BAFF, APRIL の発現に関して, 年齢との関係を解析した. さらに, IgA 欠損症, CVID, X-linked agammaglobulinemia (XLA) における BAFF, APRIL の発現を健常人と比較した. 遺伝子解析の結果, APRIL 遺伝子に G67R, N96S という多型をみいだしたが, 健常人でも, この多型はほぼ同様な頻度で存在した. TACI では P251L という多型をみいだしたが, これも健常人にほぼ, 同様の頻度で

存在した。以上より、今回対象とした症例は APRIL, BAFF, TACI, BAFF-R に病因となる遺伝子変異は存在しないと考えられた<sup>14)</sup>。

次に、抗体産生不全症における BAFF, APRIL の発現につき、検討した。まず、健常人における血漿中の BAFF, APRIL の発現を年齢との関係から比較した。血漿中の BAFF, APRIL とも、年齢と逆相関を示した (BAFF  $p = 0.004$ , APRIL  $p = 0.001$ ) (図 2)。BAFF, APRIL の遺伝子発現に関しても年齢と逆相関が認められるのか、real-time PCR にて解析したが、遺伝子発現に関しては有意な逆相関は認められなかった。IgA 欠損症, CVID, XLA における BAFF, APRIL の発現を検討したところ、IgA 欠損症, CVID, XLA の血漿中の BAFF, APRIL は健常人に比較し有意に高値を示した (図 3)。BAFF の平均値は健常人: 1.59 ng/ml, IgA 欠損症: 1.92 ng/ml, CVID: 15.59 ng/ml, XLA: 15.59 ng/ml。APRIL の平均値は健常人: 2.46 ng/ml, IgA 欠損症: 5.20 ng/ml, CVID: 47.39 ng/ml, XLA: 55.59 ng/ml であった。

IgA 欠損症と CVID における TACI 遺伝子異常

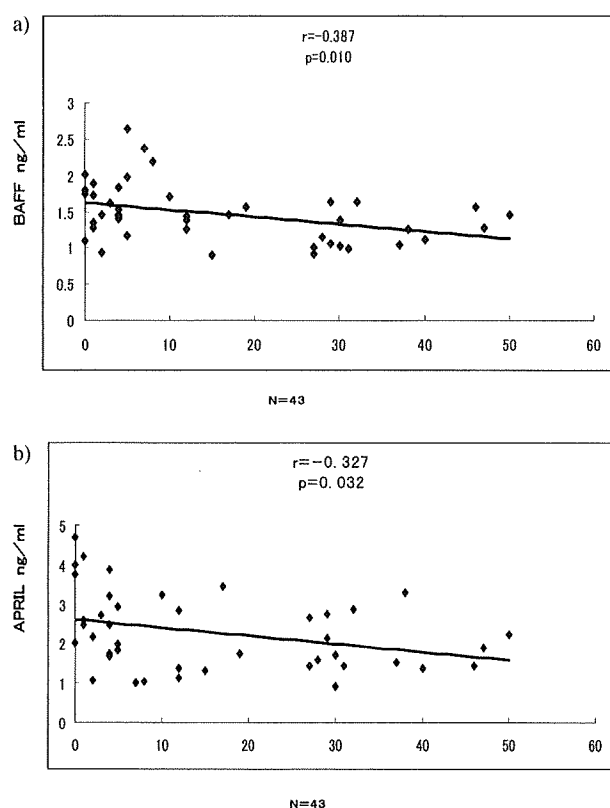


図 2 a) 健常人における血漿中の BAFF の発現。健常人の血漿中の BAFF は年齢と逆相関を示した。  $p < 0.01$ 。  
b) 健常人における血漿中の APRIL の発現。健常人の血漿中の APRIL は年齢と逆相関を示した。  $p < 0.05$ 。

の最初の報告以後、その報告は散見されるのみであり、TACI 遺伝子変異が病因の IgA 欠損症はそれほど多くないと考えられる。筆者らが対象とした症例でも TACI を含めた TNF- $\alpha$  family の遺伝子変異は検出できなかった。本邦では広島大学からの報告が 1 例ある。TACI 遺伝子異常では、単独では、免疫不全を呈するには十分ではなく、TACI 以外の他の遺伝子異常または環境因子が必要との報告もある。筆者らは、抗体産生不全症 (IgA 欠損症, CVID, XLA) の血漿中の BAFF, APRIL タンパクが増加していることを示した。このことは、BAFF, APRIL が抗体産生不全症の共通の病態に関与している可能性を示唆する。マウスの系においては、BAFF は末梢の B 細胞のプールを決定すると考えられており<sup>15)</sup>、ヒトでも、末梢の B 細胞が減少している場合に、それを増加させるため、BAFF の産生が誘導されている可能性も考えられる。もう一つの可能性としては、抗体産生不全症において、感染などの炎症が繰り返されると、産生細胞である単球等が活性化し BAFF 等の産生が誘導されること

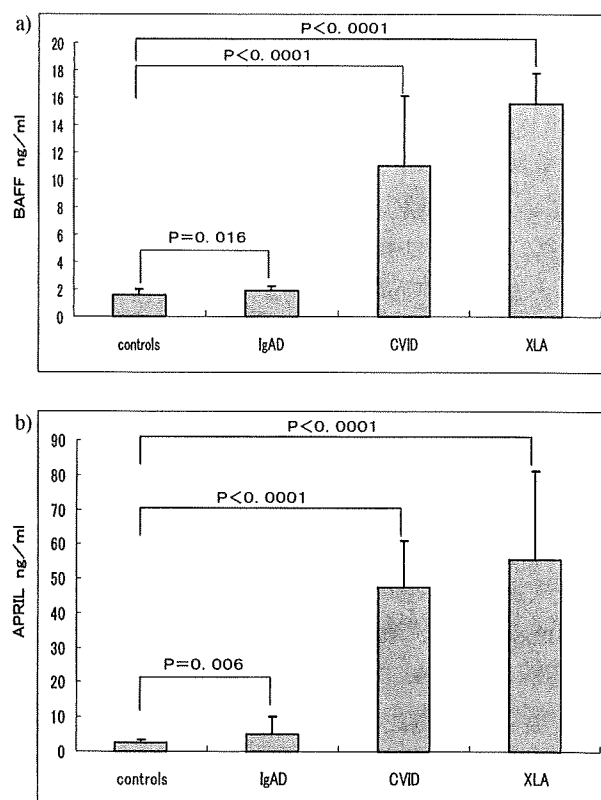


図 3 a) 先天性抗体産生不全症 (IgA 欠損症, CVID, XLA) における BAFF の発現。これらの血漿中の BAFF は健常人に比較し有意に高値を示した。  
b) 先天性抗体産生不全症 (IgA 欠損症, CVID, XLA) における APRIL の発現。これらの血漿中の APRIL は健常人に比較し有意に高値を示した。



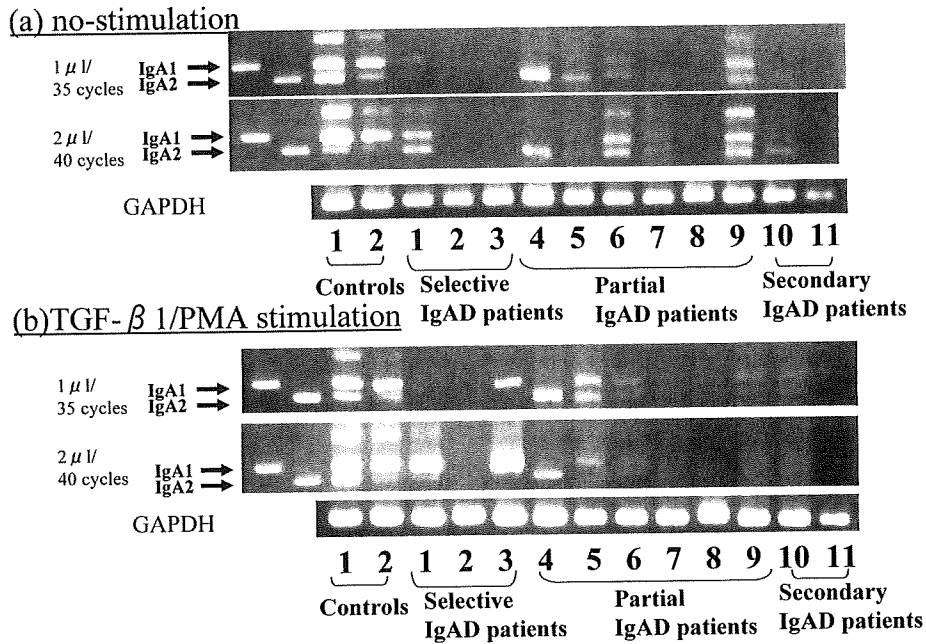


図4 IgA欠損症における $\alpha 1$ および $\alpha 2$ 遺伝子の発現

a) 無刺激, b) TGF- $\beta 1$ +PMAの刺激  
 partial IgA deficiencyの症例4では, 無刺激およびTGF- $\beta 1$ +PMAの刺激下で $\alpha 1$ 遺伝子の発現を全く認めなかった。

も考えられる。

**IgA欠損症におけるサブクラスの発現**

筆者らは, IgAサブクラスの発現を同一のプライマーを用いて, 半定量的に $\alpha 1, \alpha 2$ 遺伝子の発現を解析した(図4)。IgA欠損症の末梢血中のIgAサブクラスの発現につき, 検討したところ, その多くはIgA1, A2両者の発現低下を伴っていた<sup>16)</sup>。1例でIgA2の発現は検出されるが, IgA1が全く発現していない症例が存在した。この症例では,  $\alpha 1$ -pseudog $\gamma$ - $\gamma 2$ - $\gamma 4$ - $\epsilon$ が欠失しており, 本邦2例目のIgA1定常部領域の欠損家系であった<sup>16,17)</sup>。免疫グロブリン重鎖定常部の異常は, この他にも報告されており, 決してまれではないと考えられる<sup>18)</sup>。本症例において通常の血液学的検査では血清のIgAは10 mg/dl前後を推移しており, IgAはすべてIgA2由来であった。partial IgA deficiency(血清IgA値が5 mg/dl以上で検出可能であるが, 年齢の平均の-2SD以下)や, 軽度のIgA産生低下を示す患者のなかにC $\alpha 1$ 遺伝子の欠失を有する場合はあると考えられる。また, IgA2が欠損している場合は粘膜免疫が特異的に障害される病態も考えられる。

**IgA欠損症の臨床症状・治療**

易感染性を示さないものもあるが, 多くの場合, 種々の程度の呼吸器感染, 中耳炎, 皮膚化膿症, な

表2 126人のIgA欠損所に認められた症状(文献19より引用改変)

臨床症状	患者数 (%)
感染症	80(63.5%)
上気道炎	72
肺炎	44
下痢	30
皮膚感染症	4
尿路感染症	3
耳乳突洞炎	2
アレルギー	61(48%)
鼻炎	67
気管支喘息	61
アトピー性皮膚炎	3
自己免疫疾患	24(19%)
甲状腺炎	9
慢性関節炎	5
セリアック病	5
溶血性貧血	3
SLE	1
尋常性白斑	1
硬化性胆管炎	1

どを反復する。尿路感染も時にみられ, これはsino-pulmonary infectionとともに分泌型IgAの欠損ないし低下と特に関連がある。分類不能型免疫不全症, 自己免疫疾患, 悪性腫瘍の合併が認められることがあるので注意が必要である。IgAの各々のサブクラスの発現低下の程度により, 臨床症状が異な

る可能性もあると考えられる。表 2 にブラジルでの 126 人の IgA 欠損症の臨床症状を示す<sup>19)</sup>。IgA 欠損症は、比較的良性的な免疫不全症と考えられてきたが、長期のフォローアップの結果、易感染が小児期に主症状であり、10 歳代からは、易感染傾向は減少し、自己免疫疾患の発症が目立ってくる。この病態の一つの説明として IgA 欠損症では、FC $\alpha$ RI の下流に存在する抑制性のタンパクである SHP-1 のリクルートが生じず細胞の活性化を阻止できないとの仕組みが想定されている。

治療法としてガンマグロブリン製剤中にわずかに混入する IgA が、患者に稀にみられる抗 IgA 抗体と反応する可能性が否定できないので、ガンマグロブリン補充療法は原則的に適応外である。易感染に対して抗生剤を投与する。

#### おわりに

IgA 産生の機構が明らかになるにつれ、IgA 欠損症の病態も少しずつ明らかになってきた。しかし、まだ大部分の IgA 欠損症の病因遺伝子は不明のままであり、今後さらに、IgA サブクラスの異常も含めて、その病態が明らかにされることが期待される。

#### 文 献

- 1) Kerr MA. : The structure and function of human IgA. *Biochem J*, **271** : 285, 1990.
- 2) Woof JM, Kerr MA. : The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol*. **208** : 270-282, 2006.
- 3) Chintalacharuvu KR, Raines M, Morrison SI. : Divergency of human  $\alpha$ -chain constant region gene sequence. A novel recombinant  $\alpha 2$  gene. *J Immunol*, **152** : 5299, 1994.
- 4) Parsons, HK, Vitovski, S., Sayers JR. : Immunoglobulin A1 proteases : a structure-function update. *Biochem Soc Trans*, **32** : 1130, 2004.
- 5) Mistry D, Stockley. : IgA1 protease. *Int J Biochem Cell Biol*, **38** : 1244, 2006.
- 6) Stavnezer J. : Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol*, **8** : 199, 1996.
- 7) Asano T, Kaneko H, Terada T, Kasahara Y, Fukao T, Kasahara K, Kondo N. : Molecular analysis of B-cell differentiation in selective or partial IgA deficiency. *Clin Exp Immunol*. **136** : 284-290, 2004.
- 8) Perlot T, Alt FW. : Cis-regulatory elements and epigenetic changes control genomic rearrangements of the IgH locus. *Adv Immunol*. **99** : 1-32, 2008.
- 9) Kitani A, Strober W. : Differential regulation of C alpha 1 and C alpha 2 germ-line and mature mRNA transcripts in human peripheral blood B cells. *J Immunol*. **153** : 1466-1477, 1994.
- 10) Conley ME, Cooper MD. : Genetic basis of abnormal B cell development. *Curr Opin Immunol* **10** : 399-406, 1998.
- 11) Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Fischer A, Hammarstrom L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck JM, Roifman C, Seger R, Wedgwood J. : Primary immunodeficiency disease : an update from the international union of immunological societies primary immunodeficiency diseases classification committee. : *J Allergy Clin Immunol*. **120** : 776-794, 2007.
- 12) Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, Geha RS. : TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet*. **37** : 829-834, 2005.
- 13) Pan-Hammarström Q, Salzer U, Du L, Björkander J, Cunningham-Rundles C, Nelson DL, Bacchelli C, Gaspar HB, Offer S, Behrens TW, Grimbacher B, Hammarström L. : Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet*. **39** : 429-430, 2007.
- 14) Jin R, Kaneko H, Suzuki H, Arai T, Teramoto T, Fukao T, Kondo N. : Age-related changes in BAFF and APRIL profiles and upregulation of BAFF and APRIL expression in patients with primary antibody deficiency. *Int J Mol Med* **21** : 233-238, 2008.
- 15) Lesley R, Xu Y, Kalled SL, Hess DM, Schwab SR, Shu HB, Cyster JG. : Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. *Immunity*. **20** : 441-453, 2004.
- 16) Suzuki H, Kaneko H, Fukao T. : Various expression patterns of  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  genes in IgA deficiency. *Allergol Int*, **58** : 111-117, 2009.
- 17) Terada T, Kaneko H, Li A-I, Kasahara K, Ibe M, Yokota S, Kondo N. : Analysis of IgG subclass deficiency. : First reported case of IgG2, IgG4 and IgA deficiency caused by deletion of C $\alpha 1$ ,  $\psi$ C $\gamma 1$ , C $\gamma 2$ , C $\gamma 4$  and C $\epsilon$  in a Mongoloid patient. *J Allergy Clin Immunol* **108** : 602-606,

- 2001.
- 18) Tashita H, Fukao T, Kaneko H, Teramoto T, Inoue R, Kasahara K, Kondo N. : Molecular basis of selective IgG2 deficiency. The mutated membrane-bound form of gamma2 heavy chain caused complete IgG2 deficiency in two Japanese siblings. *J Clin Invest.* **101** : 677-681, 1998.
- 19) Jacob CM, Pastorino AC, Fahl K, Carneiro-Sampaio M, Monteiro RC. : Autoimmunity in IgA deficiency : revisiting the role of IgA as a silent housekeeper. *J Clin Immunol.* **28** Suppl 1 : S56-61, 2008.

わが国の小児科医・研究者によって  
新たに提唱・発見された疾患, 疾患概念, 原因の究明された疾患 ②

## Heme Oxygenase 1 欠損症

谷内江昭宏\*  
Akihiro Yachie

### はじめに

今から10年以上まえに私たちが経験した症例は、きわめてまれな症例です。しかしいくつかの幸運が重なり、それがこれまでに報告されたことのない、まったく新しい疾患であることを明らかにすることができました。さらに、臨床症状の記載、蛋白発現の解析、蛋白機能の検討、遺伝子変異の同定、正常遺伝子による機能回復の確認まで、臨床研究の現場で考えるほとんどの仕事を、私たち自身の力で一気にやり遂げることができました。その過程は、今思い出してもどきどきぞくぞくする感動の連続でした。

当初は主治医の責務として始めた、自分の専門とはまったく異なる分野と思われた研究でしたが、やがて本症例で異常が確認された酵素、ヘムオキシゲナーゼ (HO)-1 が、炎症制御に関わるきわめて重要な蛋白であること、すなわち私自身の専門領域 (感染免疫) と深く関わった分子であることも明らかになってきました。この分子の重要性は、一連の解析に関する報告<sup>1)</sup>が論文として掲載された直後に、ニューヨーク医科大学の薬理学教室に招かれ講演をしたときに、あらためて思い知らされました (図1)。そこには、長らくHO-1の研究に携わり、その機能的意義を明らかにすることをライフワークとしてきた多数の研究者が集まっていたのです。HO-1欠損症の発見は、当時の私にとっては非常に珍しい症例の病態解明でしかありませんでしたが、彼らにとってはまさしく隘路に陥っていたHO-1研究にブレイクスルー



図1 New York Medical College での講演の後の会食

1999年4月16日。Nadar Abraham 教授 (後ろで立っている人物) より突然講演の依頼があり、Washington DC での学会のついでに訪問した。ヘムやHO-1の専門家に囲まれ、当惑気味の日となった。会食の席でも専門的な質問攻めでいささか疲れた表情がみえる。左から2番目が筆者。

をもたらすものだったのです。

ここでは、臨床研究の幸運な一例としての私たちの経験をお話すると同時に、新しい炎症制御機構の中心としてのHO-1の可能性について述べてみたいと思います。

### 1. 患児との出会い

患児は2歳ころより発熱、関節痛、皮膚紅斑などの炎症症状が出現し、これらの症状が寛解、増悪をくり返しながら遷延していました。検査所見でも、CRP, LDH, フィブリノゲンの高値が持続、さらにTAT, PIC, APTTなど凝固-線溶系の指標が著しい高値を示しました。蛋白尿、貧血、血小板増加、白血球増加も持続し、末梢血液像では赤血球形態の異常が観察されました (表1, 図2A)。このような多彩な臨床

\* 金沢大学医薬保健研究域医学系小児科 [〒920-8641 金沢市宝町13-1]

TEL 076-265-2313 FAX 076-262-1866 E-mail: yachie@med.kanazawa-u.ac.jp

表 1 当科入院時検査所見

RBC	332 × 10 <sup>4</sup> /μl	Al-p	1,233 IU/l
Hb	7.5 g/dl	AST	298 IU/l
Hct	23.6%	ALT	41 IU/l
Plt	79.0 × 10 <sup>4</sup> /μl	LDH	14,750 IU/l
WBC	28,200/μl	(II~V優位)	
Reticulocyte	3.3%	γGTP	94 IU/l
Erythroblast	50/100 WBC	T-Bil	0.3 mg/dl
HbF	0.8%	T Chol	385 mg/dl
		TG	272 mg/dl
NAP score	195	T Prot	8.7 g/dl
HAM test	negative	Hp	1,309 mg/dl
Sugar-water	negative	IgG	1,440 mg/dl
Coombs dir.	negative	IgM	304 mg/dl
indir.	negative	IgA	183 mg/dl
Ferritin	21,800 ng/ml	IgE	<40 IU/ml
CRP	14.7 mg/dl	IL-6	105 pg/ml
ESR	109 mm/hr	C1qIC	1.0 mg/dl
Fibrinogen	247 mg/dl	C3qIC	5.7 mg/dl
FDP	66.9 mg/ml	RF	<20 IU/ml
D-dimer	48.4 mg/ml	ANA	<×20
TAT	>60.0 mg/l	LE test	negative
PIC	17.0 mg/ml	Anti-DNA Ab	3 IU/ml
CH <sub>50</sub>	77 U/ml	C-ANCA	<×10
C3c	196 mg/dl	P-ANCA	<×10
C4	80 mg/dl		

症状や検査所見から、sJIA や CINCA 症候群など多様な炎症疾患が鑑別疾患として候補となりましたが、いずれも否定されました。

私が主治医となったとき、患児はすでに5歳になっていました。最も驚いたのは血清の外観でした。患児の血清は採血直後から著しく混濁した茶褐色を示し、高脂血症を反映して厚い脂肪層が血清の上部に形成されました(図2B)。末梢血液像では破碎赤血球や赤芽球が認められ、凝固・線溶系の異常と併せて、血管内皮傷害に基づく血管内溶血の存在が強く示唆されました。しかし一方で、1) 重篤な血管内皮傷害が慢性の経過をたどるか、2) 著明な血小板増加はなぜか、3) 血清ハプトグロビン(Hp)の著しい高値はなぜか、4) 血清が混濁し茶褐色を示すほどの溶血が持続しうるのか、5) 血清ビリルビン値が常に低いのはなぜかなど、多くの疑問が湧き出しました。

誰もこのような疑問には答えることができ

ず、結局こんな不思議な血管内溶血など存在するはずがない、患児の場合は何らかの要因で採血後に血球が壊れやすい状態になっているのだろう、などと無理矢理の説明がなされ、それ以上の検索はされないようになりました。しかし、何度採血しても同じようにみえる血清からは、血管内溶血の疑いを捨てることはできませんでした。私の仕事は、この「血管内溶血」を誰にでも納得のいく形で証明することから始まりました。

## 2. 血管内溶血とヘモグロビンの蓄積

まず、異常な血清色調の本態を明らかにするために、患児の血清の吸光度スペクトラムを解析しました。そこには確かに、溶血により出現すると考えられるヘモグロビン(Hb)を示すピークが認められました(図2C)。驚いたことに、通常酸化Hb(OxyHb)のピーク(541 nm および 576 nm)以外にも、630 nm の部位に大きなピークが観察されました(赤い実線)。古い教科書には、Hb 関連の蛋白でこの部位に吸光度ピークを示すものはメトヘモグロビン(MetHb)があることが記載されていました。このことを証明するために、検体を KCN で前処理したうえで再度吸光度を解析してみると、見事に 630 nm のピークは消失、OxyHb に相当するピークが増大しました(黒い実線)。これらの検討から、患児の血清中には多量の OxyHb ならびに MetHb が同時に存在することが明らかになりました。さらに、患児赤血球の新鮮溶血液では OxyHb しか確認されず、血清中の Hb が時間を経て OxyHb から MetHb に変化したものであることが示唆されました。

このように多量の Hb (OxyHb が全血の1%, MetHb は1.5%)が患児血清中に長時間存在すること、さらに血清中に驚くべき濃度

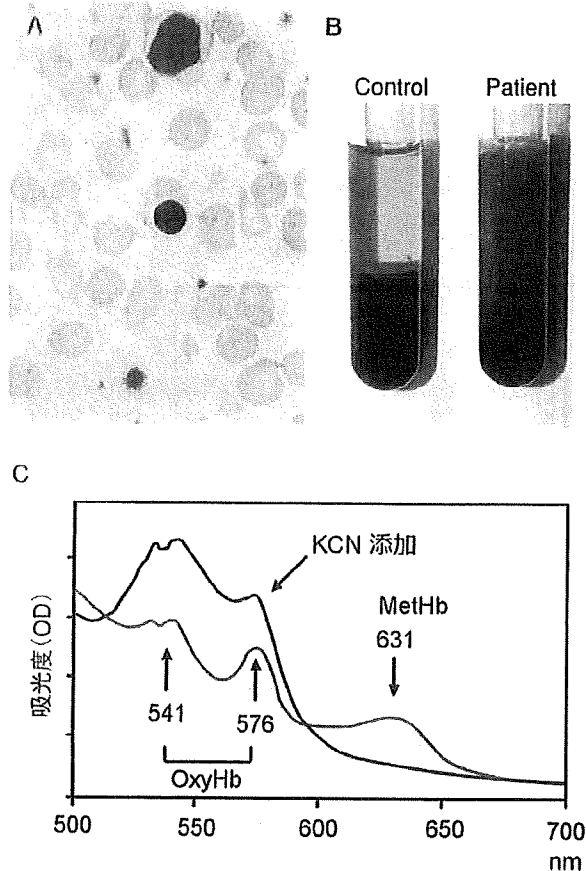


図 2 血清中ヘムの蓄積

A: 末梢血液像。破碎赤血球や赤芽球が目立ち、血小板も増加していることがわかる。B: 血清は常に濃い茶褐色に濁り、上部には厚い脂肪層がみられる。C: 吸光度スペクトラム曲線。患児血清では 541 nm および 576 nm の、OxyHb のピークに加え、631 nm のピークが観察される (赤線)。KCN 添加により、631 nm のピークは消失、OxyHb のピークが増大する (黒線)。

(800~1,200 mg/dl) の Hp が検出されたことから、Hp を介した Hb 代謝に何らかの障害があることが強く疑われました。

その後の解析で、患児血清中では Hb が Hp に結合した状態で蓄積していることが示されました。また、患児の尿を immunoblotting 法により検討すると、多量の Hp が Hb を結合したまま排泄されていることが明らかにされました。さらに、患児の腎組織の免疫染色では、近位尿細管を中心に多量に Hp が検出され、これらの細胞に選択的に認められた細胞傷害と関連

していると考えられました。

### 3. HO-1 欠損症の診断

このようなヘム蛋白の異常な蓄積を説明するものとして、いくつかの機序が考えられます。一つは、Hp 機能異常により、Hb との正常な結合が起こらず、その結果として肝臓での代謝が行われないものです。しかし、先に示しましたように、すでに血清中の Hb の多くは Hp に結合しており、また *in vitro* での検討でも患児血清中の Hp が Hb と結合することが確認されました。次の可能性は、形成された Hp・Hb 複合体が肝臓で取り込まれないことです。この可能性は完全には否定し切れませんでした。当時 Hp・Hb 複合体に対する受容体分子 (CD163) も同定されておらず、これらの取り込みを *in vitro* の実験で確認する方法もないため、検討することはできませんでした。最後の可能性は、肝細胞に取り込まれた Hb が代謝される経路に問題がある場合です。Hb の代謝に関わる酵素としては、heme を biliverdin に分解する heme oxygenase (HO) と、biliverdin をさらに bilirubin にまで分解する biliverdin reductase が知られています。このうち heme oxygenase は 3 つのアイソフォームの存在が知られており、その一つ HO-1 は酸化ストレスや活性化刺激によりその産生が強誘導されます<sup>2-5)</sup>。ヘム代謝経路の中核に位置する HO-1 の欠損があれば、ヘムの蓄積や溶血と低ビリルビン血症の矛盾、持続する炎症、血管内皮傷害に基づく種々の異常がすべて説明可能であることが予想されました。ちょうどこの頃、HO-1 ノックアウトマウスが作成され、その知見から HO-1 の欠損が鉄再利用障害による貧血、酸化ストレスによる細胞傷害の亢進、炎症の促進など、本症例で認められた症状の少なくとも一部と類似した所見を呈することが報告されました<sup>6,7)</sup>。

HO-1 欠損症を疑い、診断をすすめるにあたって幸運だったのは、すでに抗 HO-1 血清が市販されていたこと、そしてヒト HO-1 遺伝子

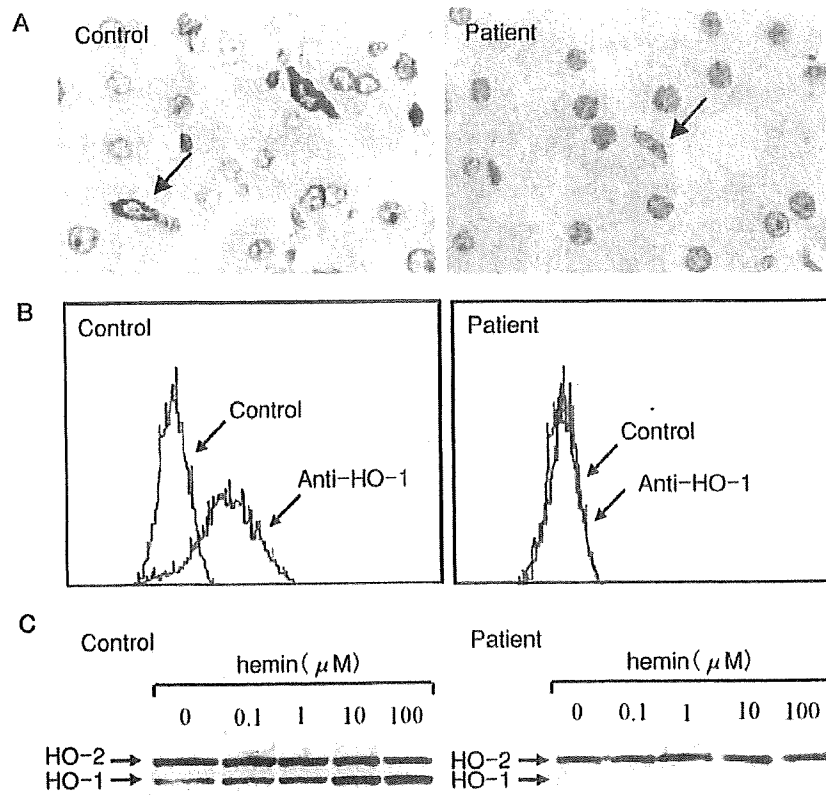


図 3 HO-1 タンパクの欠損

A: 肝 Kupffer 細胞の HO-1 免疫染色。正常対照では Kupffer 細胞に強く HO-1 が染色されるが、患児ではまったく染色されない。B: EBV 感染細胞株 (LCL) を hemin で刺激した後に HO-1 発現を FCM により検討。患児由来の LCL ではまったく HO-1 発現が誘導されない。C: immunoblotting による HO-1 産生の検討。正常対照では、hemin の濃度依存性に HO-1 産生が強く誘導される。一方、患児由来 LCL では HO-2 は恒常的に発現しているが、hemin による HO-1 産生誘導がまったく検出されない。

の配列が明らかにされていたことです。さらに、この患児に関していえば、HO-1 産生が恒常的に観察されると報告されている肝 Kupffer 細胞を検索することが可能であったこと<sup>8)</sup>。患児は 2 歳のときに前医で診断を目的に開腹肝生検を施行されていました。HO-1 免疫染色を施行しますと、対照とした正常肝では Kupffer 細胞のみに強い HO-1 産生が観察されました。一方、患児肝では HO-1 産生がまったく欠如していることが確認されました (図 3 A)。次に、正常対照ならびに患児の末梢血単核球を亜ヒ酸やカドミウムなどの重金属で刺激、酸化ストレス刺激による HO-1 産生誘導を試みました。正常対照の単核球では HO-1 産生が誘導

されましたが、患児の単核球ではまったく検出されませんでした。さらに、正常対照ならびに患児の末梢血より B リンパ球を単離、Epstein-Barr ウイルスを感染させることにより、LCL (lymphoblastoid cell line) を作成しました。これらの細胞株は継代培養をくり返しますので、生体内における二次的な変化の影響を除外して評価することが可能となります。LCL を種々の酸化ストレス刺激下で培養、HO-1 産生を免疫染色、フローサイトメトリー (flow cytometry: FCM) ならびに immunoblotting にて検討しました。図 3 B, C に示すように、いずれの方法を用いても患児 LCL ではまったく HO-1 産生が検出されませんでした。

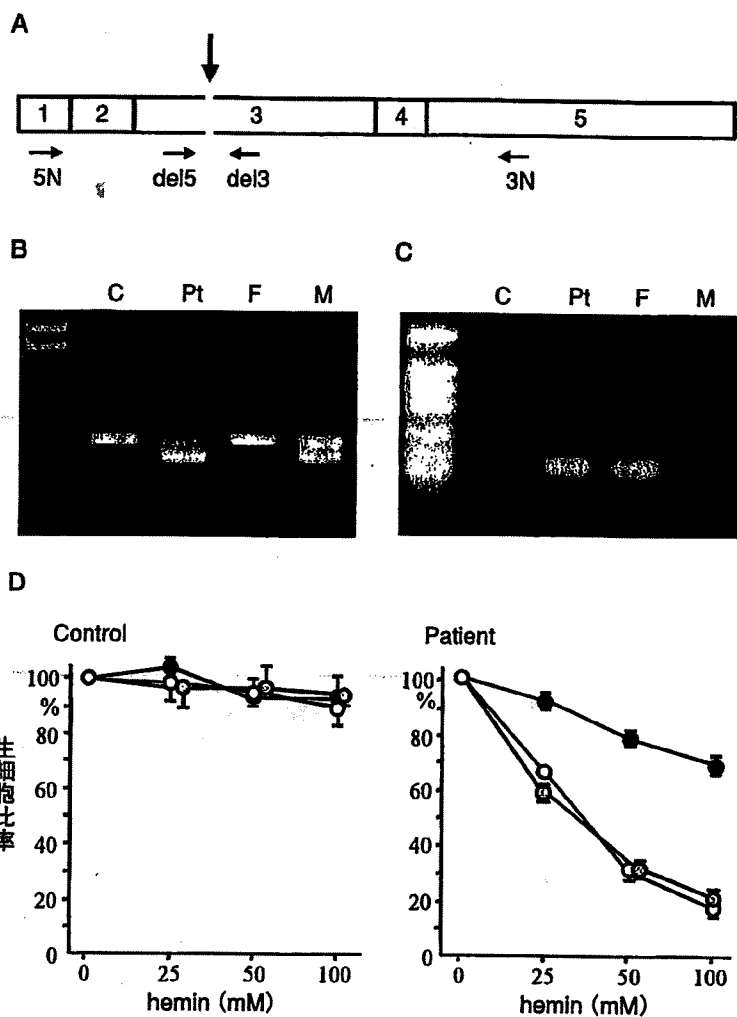


図 4 HO-1 遺伝子検索と遺伝子導入による細胞保護機能の回復

A: HO 遺伝子の exon 1 および exon 5 内にそれぞれ 5'および 3'プライマー (5N および 3N) を設計した。B: 患児および母親では正常サイズの PCR 産物以外に、サイズの短い産物が確認された。C: exon 3 内の 2 塩基欠失を特異的に検出するために、exon 3 内に欠失配列特異的なプライマー (del5 および del3) を設計した。正常対照 (C)、患児 (Pt)、父親 (F) ならびに母親 (M) の LCL を作成、これらより DNA を抽出し HO-1 遺伝子解析を施行した。A に示す太い矢印は exon 3 内の 2 塩基欠失部位を示す。5N/3N RT-PCR の結果を B に、del5/del3 PCR の結果を C に示す。D: 正常対照ならびに患児由来 LCL を種々の濃度のヘミン添加にて 24 時間培養、生細胞比率をフローサイトメトリー法により定量した。対照 LCL (○)、neomycin 耐性遺伝子のみを導入した LCL (◇)、HO-1 遺伝子導入 LCL (●)。

これらの結果から、患児では遺伝的異常を背景に HO-1 産生が欠如していることが示唆されました。

患児、両親ならびに正常対照の LCL を作成、これらの細胞株を用いて HO-1 mRNA 発現を比較しました。HO-1 遺伝子は 5 個のエクソンより構成されています (図 4 A)。第 1 エクソ

ンならびに第 5 エクソンにそれぞれ 5'および 3'プライマーを設定し RT-PCR を施行しました (図 4 B)。正常対照ならびに父親では予想された部位に単一のバンドが検出されましたが、本人および母親ではほぼ正常サイズの産物のほかに明らかにサイズの小さい産物が検出されました。本人でみられた異なるサイズの PCR 産



物についてそれぞれ塩基配列を決定しました。その結果、正常に比べて短い産物は第2エクソンをまったく欠損していること、ほぼ正常サイズの産物は第3エクソン内に2塩基の欠失があることが明らかになりました。母親で同様にみられた小さいPCR産物でも同様の第2エクソン欠損が認められ、この異常が母親由来の allele の変異であることが明らかにされました。また、第3エクソン内の2塩基欠失配列に特異的なプライマーを設定し、PCRを施行すると、患児ならびに父親でのみ産物が検出されることより、この変異が父親由来の allele に存在することが確認されました(図4C)。したがって、患児はHO-1遺伝子変異に関して複合ヘテロ接合体であることが示されました。

#### 4. HO-1欠損症と酸化ストレスの亢進

次に、患児の多様な臨床症状や検査所見の異常がHO-1欠損により説明可能か否かが課題となりました。最初に、酸化ストレスによる細胞傷害に対する感受性を、LCLを用いて検討しました。正常対照LCLではヘミン添加培養後もほとんど細胞死が検出されませんでした。一方、患児のLCLを用いた場合は、添加したヘミンの濃度依存性に細胞傷害が誘導されました。さらに、患児LCLにHO-1遺伝子を導入、HO-1蛋白を構成的に発現する細胞株を用いると、これらの細胞傷害が明らかに抑制されました(図4D)。このように、HO-1欠損が直接細胞傷害に対する感受性と密接に関連することが示され、このことが組織や臓器の傷害を惹起している可能性が示唆されました。

しかし、HO-1欠損症患児においてみられた細胞傷害はすべての臓器や細胞にみられたわけではなく、血管内皮、腎尿細管上皮および単球など、特定の細胞や臓器に集中して観察されました。このことは、これらの細胞群が酸化ストレスのセンサーとしての特異な機能を果たしていること、そのため選択的に細胞傷害を抑制するための抗酸化ストレス機構を有していることを示しているのではないかと想像します。この

表2 HO-1欠損症とノックアウトマウスの比較

所見	本症例	HO-1欠損マウス
胎児死亡	胎児死亡、流産	20%出生率
貧血	+	+
鉄結合能	増加	増加
フェリチン	上昇	上昇
鉄沈着	+	+
肝腫大	+	+
脾腫大	無脾症	+
凝固-線溶系異常	+	?
赤血球破碎	+	?
白血球増多	+	?
血小板増多	+	?
Hp高値	+	?
高脂血症	+	?
遷延する炎症	+	?

ことに関する検討は、腎組織でとくに詳細に行う機会がありました。HO-1は遠位尿細管では恒常的に発現が認められましたが、近位尿細管ではわずかにしか発現していませんでした。一方で、血尿やタンパク尿を伴う腎疾患症例ではその程度に応じて近位尿細管におけるHO-1発現が誘導されていました<sup>9)</sup>。さらに、メサンギウム細胞、近位尿細管上皮などの腎固有細胞の早期継代細胞を用いた *in vitro* での検討でも、近位尿細管上皮細胞では酸化ストレス刺激により強くHO-1産生が誘導されることが明らかにされました<sup>10)</sup>。

#### 5. 単球機能障害としてのHO-1欠損症

選択的HO-1産生は末梢血単核球においても観察されました。末梢血白血球を種々の酸化ストレス刺激の添加により培養すると、単球にのみ選択的にHO-1産生が誘導され、リンパ球や顆粒球など、ほかの細胞にはその産生は認められませんでした<sup>11)</sup>。

HO-1ノックアウトマウスと患児の症状、検査所見を比較してみると、マウスで記載されていない、種々の異常が本症の特徴的な所見として注目されます(表2)。患児の血清中には高濃度のヘムが蓄積しており、血管内皮や血球細胞

は常時強い酸化ストレスに曝露されていたことになりす。私たちの検討では、高濃度のヘム存在下で短時間培養すると、多様な単球活性化抗原発現や貪食能の低下が誘導されました。このような検討から、ヘム蓄積により単球機能低下が起り、免疫能の低下や、高脂血症、老齢血球の増加などを惹起していた可能性が示唆されました<sup>12)</sup>。

単球機能の低下と関連して、もう一つの重要な問題は炎症制御に関わる機能です。当時 HO-1/CO が炎症性サイトカインの産生制御に直接影響を与えている可能性が示唆されはじめていました<sup>13)</sup>。そこで、種々の急性炎症性疾患での単球 HO-1 産生を比較検討しました。その結果、正常対照の末梢血単球ではほとんど HO-1 産生は検出されませんでした。細菌性肺炎、川崎病などの急性炎症性疾患では、末梢血単球の一部に HO-1 産生が確認されました<sup>11)</sup>。

## 6. 単球機能調節による炎症制御の可能性

HO-1 はくり返し生体に襲いかかるストレスに対して、生体の機能恒常性維持にきわめて重要な役割を果たしていると考えられます。また、このような HO-1 の機能は必ずしも、特殊なストレス下でのみならず、おそらく日常的に重要であると考えられ、末梢血単球によりある一定レベルの HO-1 mRNA が常に発現されている事実は、このような HO-1 機能の重要性を示していると考えられます。私たちは最近の研究により末梢血単球のごく一部が恒常的に HO-1 を産生していることを明らかにしました<sup>14)</sup>。さらに、単球表面には Hb・Hp 受容体である CD163 が発現、この分子がステロイド投与により著明に増強すること、これにより Hb・Hp を介した HO-1 産生が亢進することも示しました<sup>15)</sup>。このような事実は、多様な炎症性疾患の治療に関して、「単球機能調節による炎症制御」というまったく新しい概念を導入するものであり、今後の研究の発展が期待されま

す<sup>16)</sup>。

## おわりに

最後に、HO-1 欠損症の発見と HO-1 機能解析に関する私たちの一連の仕事が、炎症制御蛋白としての HO-1 機能を理解するという、普遍的な意義をもたらすことができたことを幸運に思います。臨床の経験のなかでみつけた小さな事実を共通のことばで表現して報告することはとても大切です。これらの積み重ねの延長線上に、より大きな発見や成果がみえてきます。小児科医はとくに、一人ひとりの子どもたちをていねいに診療するなかから、誰も気がつかなかった新しい事を見出す機会に恵まれています。若い小児科医のみならず、簡単に「診断名」をつけることで満足するのではなく、悩みながら病態をていねいに分析する姿勢をもち続けていただきたいと願います。

## 文 献

- 1) Yachie A, Niida Y, Wada T, et al : Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103 : 129-135, 1999
- 2) Abraham NG, Drummond GS, Lutten JD, et al : The biological significance and physiological role of heme oxygenase. *Cell Physiol Biochem* 6 : 129-168, 1996
- 3) Mains MD : Heme oxygenase : function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 2 : 2557-2568, 1988
- 4) Shibahara S, Yoshizawa M, Suzuki H, et al : Functional analysis of cDNAs for two types of human heme oxygenase and evidence for their separate regulation. *J Biochem* 113 : 214-218, 1993
- 5) McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Mains MD : Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247 : 725-732, 1997
- 6) Poss KD, Tonegawa S : Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 10919-10924, 1997
- 7) Poss KD, Tonegawa S : Reduced stress de-

- fense in heme oxygenase 1-deficient cells. Proc Natl Acad Sci USA 94 : 10925-10930, 1997
- 8) Goda N, Suzuki K, Naito M, et al : Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. J Clin Invest 101 : 604-612, 1998
  - 9) Ohta K, Yachie A, Fujimoto K, et al : Tubular injury as a cardinal pathologic feature in human heme oxygenase-1 deficiency. Am J Kidney Dis 35 : 863-870, 2000
  - 10) Yang Y, Ohta K, Shimizu M, et al : Selective protection of renal tubular epithelial cells by heme oxygenase (HO)-1 during stress-induced injury. Kidney International 64 : 1302-1309, 2003
  - 11) Yachie A, Toma T, Mizuno K, et al : Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children. Exp Biol Med 228 : 550-556, 2003
  - 12) Yachie A, Kawashima A, Ohta K, et al : Human HO-1 deficiency and cardiovascular dysfunction. In Wang R (ed) : Carbon Monoxide and Cardiovascular Dysfunctions, CRC Press, New York, pp181-212, 2002
  - 13) Otterbein LE, Bach, FH, Alam J, et al : Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. Nat Med 6 : 422, 2000
  - 14) Mizuno K, Toma T, Tsukiji H, et al : Selective expansion of CD16<sup>high</sup> CCR2<sup>-</sup> subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. Clin Exp Immunol 142 : 461-470, 2005
  - 15) Yamazaki H, Ohta K, Tsukiji H, et al : Corticosteroid enhances heme oxygenase-1 production by circulating monocytes by up-regulating scavenger receptor and amplifying the receptor-mediated uptake of hemoglobin-haptoglobin complex. Biochem Biophys Res Com 358 : 506-512, 2007
  - 16) Yachie A : Heme oxygenase and its role in defense system ; Paradigm shift of anti-inflammatory therapy. Review Jpn J Clin Immunol 30 : 11-21, 2007

## 1. iPS細胞からの造血分化

京都大学大学院医学研究科発達小児科学 丹羽 明

同 発達小児科学教授 中畑龍俊  
京都大学 iPS細胞研究センター副センター長

**key words** induced pluripotent stem cell, embryonic stem cell, hematopoietic differentiation, regenerative medicine, patient-specific stem cell, disease-specific stem cell

### 動 向

2006年にマウスで樹立されたiPS細胞は、そのES細胞にきわめて類似した性質と、胚を用いず、数種の遺伝子導入という比較的単純な手法により体細胞から樹立できる点で、基礎科学、医学の両分野で大きな注目を浴びている。2007年にはヒトiPS細胞も同様の方法で樹立され、再生医療、疾患研究、薬剤スクリーニング、創薬など様々な分野で新たなツールとしての貢献が期待されている。しかし、実際の臨床応用に向けては、樹立・分化の両面で解決すべき課題も多い。特に、再生医療分野で移植治療を実現するためには、目的細胞を選択的かつ効率的に分化培養する技術の開発も肝要である。

iPS細胞研究は、大きく3つの方向に分けられる。すなわち、①体細胞初期化メカニズムの解明、②臨床応用にも耐えうる、より安全なiPS細胞樹立法の確立、③各系統への分化の研究である。iPS細胞の医学応用が実現するためには、これら全ての分野における進歩が不可欠であり、世界中で精力的な研究が行われている。

本項では、そうした研究の一部を含め、iPS細胞の現状と課題について概説する。

### A. iPS細胞の生物学的意義

2006年、山中らはマウスの胎児線維芽細胞(MEF)および成体尾部由来線維芽細胞(TTF)に4つの遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)をレトロウイルスで導入し、ES細胞様の「自己複製能」と「多分化能」を有する細胞を誘導できたことを報告した。これらの細胞は同グループにより「誘導多能性幹細胞 induced pluripotent stem cell (iPS cell)」と名づけられた<sup>1)</sup>。

当初発表されたiPS細胞はキメラ胎生致死で、遺伝子発現やDNAメチル化パターンなどいくつかの点でもES細胞との差異が指摘されていた。しかしその後、導入遺伝子の組み合わせやクロニング法など初期化手法の改良が急速になされ、様々な体細胞から、よりES細胞に類似の生物学的性質とエピジェネティクスを有するiPS細胞を得られることが明らかになった(図1)<sup>2-4)</sup>。そして2007年、マウスiPS細胞の発表からわずか1年後に、山中らを含む複数のグループによるヒトiPS細胞樹立の報告がほぼ同時になされたのである<sup>5-7)</sup>。

iPS細胞の樹立は、まず細胞生物学的な意義が深い。そもそも、1960年代のGurdonらによるア