

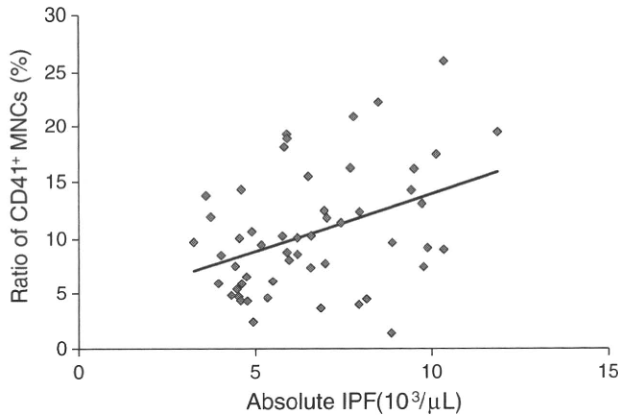


Fig. 4 Association between the ratio of CD41⁺ MNCs and absolute IPF. The ratio of CD41⁺ MNCs was significantly correlated with absolute IPF ($r = 0.39$, $P = 0.01$)

All of the neonates analyzed in the present study with platelet counts of $<150 \times 10^3/\mu\text{L}$ at birth ($n = 11$) showed thrombocytopenia during their clinical course (Table 3). In contrast, 10 neonates with a normal platelet count at birth developed early thrombocytopenia. The percentage of CD41⁺ MNCs in these neonates was significantly lower than that in non-thrombocytopenic neonates even though the IPF percentage did not differ significantly between the two groups (Table 3). These observations suggest that measurement of circulating CD41⁺ MNCs may be more sensitive than that of IPF percentage for predicting thrombocytopenia during the clinical course.

Approximately 20–25% of cases of neonatal thrombocytopenia require one or more platelet transfusions. Significant variability is found in neonatal transfusion practices among institutions and among individual neonatologists. Several groups have published guidelines for the administration of platelet transfusions to neonates based on platelet count and on whether the infant is term or preterm, scheduled for an invasive procedure, or exhibiting active bleeding [22]. However, only very limited evidence is available to guide transfusion decisions. Clinical studies are now exploring how changes in platelet count are related to the different causes of neonatal thrombocytopenia [6]. The correlations observed between the platelet count nadir and percentages of CD41⁺ MNCs or IPF may support a prediction of early onset thrombocytopenia. Our analysis of CD41⁺ cells and IPF percentage in peripheral blood may be useful in deciding whether transfusions are required in thrombocytopenic neonates.

In conclusion, the present study showed that the majority of cases of early thrombocytopenia were associated with a reduced percentage of circulating megakaryocytes and their precursors as well as increased IPF

percentage at birth. This study may be helpful in elucidating the origin of early onset neonatal thrombocytopenia. Further studies are necessary to clarify the pathophysiology of early thrombocytopenia and the mechanism underlying the limited megakaryopoiesis in neonates.

Acknowledgments This study was supported in part by a grant (to MK) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

References

1. Castle V, Andrew M, Kelton J, Giron D, Johnston M, Carter C. Frequency and mechanism of neonatal thrombocytopenia. *J Pediatr*. 1986;108:749–55.
2. Mehta P, Vasa R, Neumann L, Karpatkin M. Thrombocytopenia in the high-risk infant. *J Pediatr*. 1980;97:791–4.
3. Serrarens-Janssen VM, Semmekrot BA, Novotny VM, Porcelijn L, Lotgering FK, Delemarre FM, et al. Fetal/neonatal allo-immune thrombocytopenia (FNAIT): past, present, and future. *Obstet Gynecol Surv*. 2008;63:239–52.
4. Cook RL, Miller RC, Katz VL, Cefalo RC. Immune thrombocytopenic purpura in pregnancy: a reappraisal of management. *Obstet Gynecol*. 1991;78:578–83.
5. Currie BG, Schell D, Bowring AC. Giant hemangioma of the arm associated with cardiac failure and the Kasabach–Merritt syndrome in a neonate. *J Pediatr Surg*. 1991;26:734–7.
6. Roberts I, Murray NA. Neonatal thrombocytopenia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2008;13:256–64.
7. Roberts I, Murray NA. Neonatal thrombocytopenia: causes and management. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003;88:F359–64.
8. Burrows RF, Andrew M. Neonatal thrombocytopenia in the hypertensive disorders of pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1990;76:234–8.
9. Salvendy DR, Brudenell MJ, Nicolaides KH. Fetal polycythemia and thrombocytopenia in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;166:1287–93.
10. Van den Hof MC, Nicolaides KH. Platelet count in normal, small, and anemic fetuses. *Am J Obstet Gynecol*. 1990;162:735–9.
11. Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, Yabu Y, et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res*. 2006;118:463–9.
12. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2004;126:93–9.
13. Cremer M, Paetzold J, Schmalisch G, Hammer H, Loui A, Dame C, et al. Immature platelet fraction as novel laboratory parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2009;144:619–21.
14. Murray NA, Roberts IA. Circulating megakaryocytes and their progenitors in early thrombocytopenia in preterm neonates. *Pediatr Res*. 1996;40:112–9.
15. Watts TL, Murray NA, Roberts I. Thrombopoietin has a primary role in the regulation of platelet production in preterm babies. *Pediatr Res*. 1999;46:28–32.
16. Bonifacio L, Petrova A, Nanjundaswamy S, Mehta R. Thrombocytopenia-related neonatal outcome in preterms. *Indian J Pediatr*. 2007;74:269–74.
17. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell*. 1994;77:1117–24.

18. Peterec SM, Brennan SA, Rinder HM, Wnek JL, Beardsley DS. Reticulated platelet values in normal and thrombocytopenic neonates. *J Pediatr*. 1996;129:269–74.
19. Saigo K, Sakota Y, Masuda Y, Matsunaga K, Takenokuchi M, Nishimura K, et al. Automatic detection of immature platelets for decision making regarding platelet transfusion indications for pediatric patients. *Transfus Apher Sci*. 2008;38:127–32.
20. Sola-Visner M, Christensen RD, Hutson AD, Rimsza LM. Megakaryocyte size and concentration in the bone marrow of thrombocytopenic and nonthrombocytopenic neonates. *Pediatr Res*. 2007;61:479–84.
21. Saxonhouse MA, Rimsza LM, Stevens G, Jouei N, Christensen RD, Sola MC. Effects of hypoxia on megakaryocyte progenitors obtained from the umbilical cord blood of term and preterm neonates. *Biol Neonate*. 2006;89:104–8.
22. Sola-Visner M, Saxonhouse MA, Brown RE. Neonatal thrombocytopenia: what we do and don't know. *Early Hum Dev*. 2008;84:499–506.

好中球減少症

みぞぐち ようこ
溝口 洋子*こばやし まさお
小林 正夫*

要旨

小児期の好中球減少症は、重症先天性好中球減少症 (SCN) と周期性好中球減少症 (CyN) に代表される内因性好中球減少症と、免疫性好中球減少症を含む外因性好中球減少症に大別される。好中球減少症は小児期より細菌や真菌に対する易感染性の原因となり、とくに SCN では感染症の反復と同時に感染の重症化、慢性化が認められ、治療に難渋する場合もある。G-CSF 製剤の投与により感染症に対しての生命予後は改善されたが、長期の G-CSF 投与により骨髓異形成症候群 (MDS) や白血病の合併が報告されており、近年では根治療法として造血幹細胞移植が行われている。本稿では SCN, CyN, 免疫性好中球減少症を中心に、小児好中球減少症の分類、病態生理、診断、治療について最新の知見を含め概説する。

はじめに

好中球は細菌、真菌の感染防御においても重要な血球成分である。好中球減少症は末梢血好中球絶対数 (absolute neutrophil count : ANC) が $1,500/\mu\text{L}$ 未満と定義されているが、臨床上で易感染性を呈することで問題となるのは ANC が $500/\mu\text{L}$ 以下の場合である。好中球減少症は、好中球系細胞自体に原因が存在する内因性好中球減少症と、細胞外に原因がある外因性好中球減少症に大別される (表 1)。内因性好中球減少症として代表的な疾患は重症先天性好中球減少症 (severe congenital neutropenia : SCN), 周期性好中球減少症 (cyclic neutropenia : CyN) がある。また外因性好中球減少症として代表的な疾患としては自己免疫性好中球減少症が挙げられる。

I 発症機序

好中球のライフサイクルは、骨髓での多能性幹細胞からの分化、増殖により骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球、後骨髓球を経て成熟好中球 (桿状核球、分葉核球) に至り、末梢血、組織へ移行する。多能性造血幹細胞は多くの造血因子の作用で 2 能性の顆粒球・マクロファージ系前駆細胞 (CFU-GM) に、次いで顆粒球系のみ単能性前駆細胞 (CFU-G) となる。顆粒球・マクロファージ系コロニー形成に必要な造血因子としては G-CSF 以外に SCF, the ligand for flk2/flat3 (FL), IL-3, GM-CSF が関与している。骨髓芽球は数回の分裂後、分裂能を有しない後骨髓球を経て、成熟好中球となり好中球としての機能を発揮できるようになる。

血球細胞の中でも好中球は全白血球の 70% 以上を占め、侵入した細菌を貪食し生体を感染から守る重要な役割を担っている。好中球の寿

* 広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学
〒734-8551 広島県広島市南区霞 1-2-3

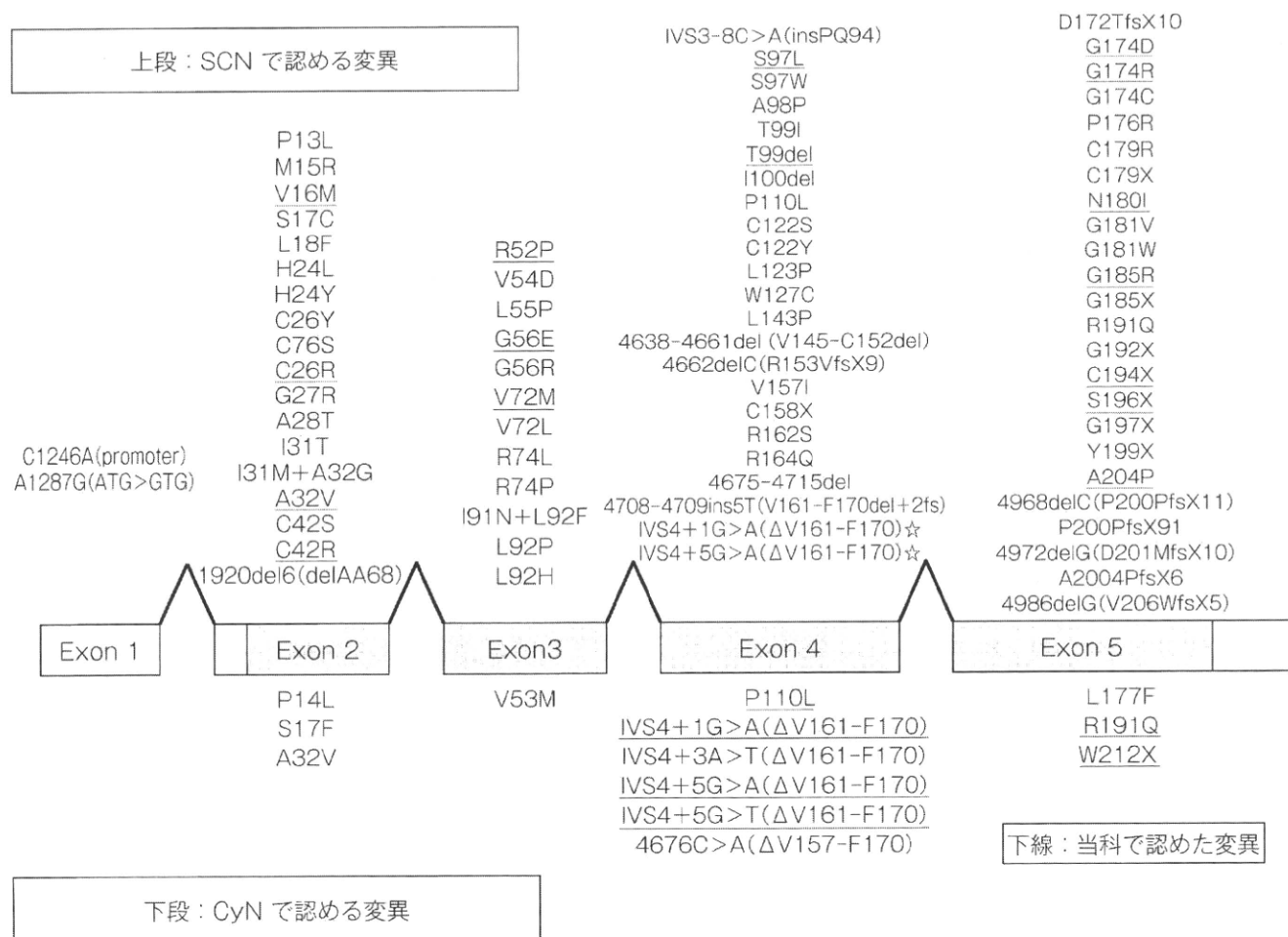
表1 小児期好中球減少症の分類

疾 患	責任遺伝子	遺伝形式	特徴的所見
内因性障害による先天性好中球減少症			
1) 骨髄顆粒球系産生異常			
ELA2 変異に伴う SCN	ELA2	AD	MDS/AML
HAX1 欠失に伴う SCN (Kostmann 症候群)	HAX1	AR	MDS/AML, 精神運動発達遅滞
GFI1 変異に伴う SCN	GFI1	AD	B, T リンパ球異常
周期性好中球減少症	ELA2	AD	周期的好中球減少
特発性好中球減少症	不明	不明	とくになし
2) リボゾーム機能障害による好中球減少症			
Shwachman-Diamond 症候群	SBDS	AR	膵外分泌機能不全, MDS/AML, 骨幹端軟骨異形成
Dyskeratosis congenita	DKC	XR	爪脆弱化, 網目状皮膚色素沈着, 白斑症, 骨髓低形成
3) 顆粒球輸送障害			
Hermansky-Pudlak 症候群 type 2	AP3B1	AR	部分白皮症, 低身長, 血小板機能異常
Chédiak-Higashi 症候群	LYST	AR	部分白皮症, 走化能異常, NK 細胞障害活性低下
Gricelli syndrome type 2	RAB27A	AR	部分白皮症, 血小板減少, T/B/NK 細胞機能異常
MAPBPIP 変異に伴う先天性好中球減少症	MAPBPIP	AR	部分白皮症, 低身長, IgM 低下
4) 免疫異常に合併する好中球減少症			
高 IgM 症候群 (HIGM1, HIGM3)	CD40L/CD40	CR/AR	IgG, IgA, IgE 低下, IgM 増加
WHIM 症候群	CXCR4	AD	myelokathexis, IgG 低下, 疣贅
WAS 蛋白変異に伴う SCN	WAS	XR	単球減少, 血小板数正常
Reticular dysgenesis	不明		重症複合型免疫不全
5) 代謝異常等に合併する好中球減少症			
糖原病 Ib 型	G6PT1	AR	低血糖, 肝腫大, 発達遅滞
G6PC3 異常	G6PC3	AR	先天性心疾患 (心房中隔欠損症), 泌尿生殖器異常, 静脈拡張
Barth 症候群	TAZ	XR	拡張型心筋症, 骨格筋障害
Pearson 症候群	ミトコンドリア	DNA 異常	膵外分泌機能異常, 汎血球減少
外因性障害による好中球減少症			
感染症			
薬剤性			
免疫性好中球減少症			
新生児同種免疫性好中球減少症			
乳幼児自己免疫性好中球減少症			
脾機能亢進症			
無効な骨髄造血			
栄養失調, ビタミン欠乏 (B ₁₂ , 葉酸)			
悪性腫瘍の骨髄浸潤			
化学療法, 放射線照射後			

AD: 常染色体優性遺伝, AR: 常染色体劣性遺伝, XR: 伴性劣性遺伝

命は数日と短く, 生体内では常に前駆細胞から好中球への分化生成が活発に行われている。骨髄内の成熟好中球 (骨髄貯蔵好中球) の一部は末梢血管内に遊出し, 血管内壁に付着した辺縁

プールとして存在し, 血管外の組織へ遊出する。好中球減少はこの一連の過程で, いずれかの異常や障害によって惹起されるが, 主には産生異常, 無効造血あるいは末梢への動員障害, 末梢

図 先天性好中球減少症と周期性好中球減少症における *ELA2* 遺伝子変異

での破壊、消費の亢進である。

Ⅱ 病態生理

1. 重症先天性好中球減少症 (SCN)

乳児期からの慢性好中球減少症、とくに末梢血好中球数が $200/\mu\text{L}$ 未満、骨髓像で前骨髓球、骨髓球での成熟障害、生後より反復する重症細菌感染症を臨床的特徴とする疾患である。1999年に好中球エラスターゼ (neutrophil elastase: NE) をコードする *ELA2* 遺伝子のヘテロ接合性変異が CyN と SCN の半数例で同定され、その後も 10 種類以上に及ぶ種々の責任遺伝子が明らかにされている。近年、常染色体劣性遺伝形式を呈する SCN の家系例 (Kostmann fami-

ly を含む) において *HAX1* (HS-1 associated protein) の責任遺伝子である *HAX1* の異常が報告された¹⁾。ほかにも、*GFIL*, *WAS* 遺伝子異常に伴う SCN が報告されており、SCN は種々の原因によってもたらされる疾患群と考えられている²⁾³⁾。

a. *ELA2* 異常症 (SCN, CyN)

わが国におけるわれわれの検討では、SCN 患者の約 70%、CyN 患者のほぼ全例で *ELA2* の変異が同定されている。常染色体優性遺伝の発現形式をとり、現在までに 50 種類の変異が報告されている^{4)~8)}。図に現在までに報告されている *ELA2* 変異部位を SCN と CyN に分けて示す。*ELA2* は 5 つのエクソンから構成されており、CyN ではすべてのエクソンでの変

異が同定されているが、多くはエクソン 4, 5 に集中している。しかし、SCN で認められる変異と同一の変異をもつ CyN の症例も存在し、その機序は現在のところ不明である⁵⁾。

NE は骨髓系細胞の一次顆粒に存在する酵素の一つである。近年、蛋白輸送に関与する adaptor protein 群の一つである *AP3B1* の遺伝子変異が同定され、SCN, CyN の病因として NE の細胞内輸送異常との関連が指摘されている⁹⁾。NE を代表とする顆粒酵素はゴルジ装置で産生され、細胞内から細胞膜を經由して顆粒内へと移行するが、この蛋白輸送には adaptor protein 群が輸送蛋白としての役割をしている。NE の大部分は C 末端が切断され adaptor protein complex3 (AP3) と結合し、顆粒内へと輸送されるが、一部の C 末端が切断されない NE では AP3 との結合が阻害されるために細胞膜へ移動して結合する。このように NE の輸送が細胞膜に偏る場合には SCN を引き起こし、顆粒内に偏ると周期性好中球減少と関係していることが推定されている。つまり細胞膜に集積した NE が骨髓顆粒球系前駆細胞でアポトーシスを誘導した結果が成熟障害に結びついている可能性がある。

一方、Kollner ら、Grenda らは異常蛋白が細胞内に蓄積することによるフォールディング病としての概念を SCN に応用している¹⁰⁾¹¹⁾。彼らは *ELA2* 変異蛋白がミスフォールディング (蛋白質の折りたたみ異常) を起こすことが、SCN の病因と推測している。フォールディング病としての代表は $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症やプリオン病であるが、小胞体シャペロンである BiP の発現誘導によって蛋白のミスフォールディングを同定している。SCN 患者でみられる遺伝子変異を導入された K562 細胞では BiP の mRNA 発現が wild type に比し 2~6 倍であったこと、実際に患者骨髓系細胞でも高値が認められたことで証明している。NE の細胞内局在の異常と併せてフォールディング

病の可能性を示唆している。しかし、Horwitz らの症例と変異遺伝子導入の結果からは、必ずしも BiP の mRNA の発現上昇は有意ではないことが示されており、フォールディング病としての結論は不明である。

b. *HAX1* 異常症 (Kostmann disease)

HAX1 異常症は、1956 年に Kostmann が常染色体劣性遺伝形式を示す遺伝性好中球減少症として第 1 例を報告した疾患である。2007 年に本疾患が *HAX1* 遺伝子のホモ接合性変異による *HAX1* 蛋白の欠損により起こることが明らかになった¹⁾。*HAX1* 欠損が好中球減少症を誘導する機序について、好中球のアポトーシスへの関与が推測されている。*HAX1* はミトコンドリアに選択的に存在し、アポトーシスを制御する蛋白の一つである。TNF α 刺激により誘導される好中球アポトーシスが亢進しており、*HAX1* 遺伝子が好中球寿命に関与していることを推測している。また *HAX1* 遺伝子変異によりミトコンドリア膜電位維持機能が障害されることが確認されている。

ヨーロッパ、中東における解析で、*ELA2* 遺伝子異常を認めない SCN 患者の 38% (42 例中 16 例) で *HAX1* 遺伝子異常が認められた。これらは全例ホモ接合性の変異で W44X 変異が 15 例と好発変異であった。一方で、Kostmann 家系では Q190X 変異が同定された。*HAX1* 遺伝子異常の頻度は不明であるが、われわれの本邦における解析では SCN 患者の約 20% (24 例中 5 例) で *HAX1* 遺伝子異常が同定され、*ELA2* と並び SCN の主要な責任遺伝子と考えられる¹²⁾¹³⁾。*HAX1* 遺伝子変異の内訳は、R86X ホモ接合性変異が 3 例、R86X/R126fs の複合ヘテロ変異が 2 例 (姉弟例) で、本邦では R86X 変異が好発変異であった。また、*HAX1* 遺伝子異常を認めた 5 例全例で精神発達遅滞を認め、そのうち 3 例で難治性のけいれん発作を合併していた。

HAX1 遺伝子はエクソン 2 におけるスプラ

イシングの違いにより2つの isoform (isoform a, b) からなる。これまで *HAXI* isoform a が単独で障害されると好中球減少を示し、isoform a, b がともに障害されると好中球減少症と神経学的異常を呈するといった遺伝子型と表現型の相関があると考えられてきた¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし最近、isoform a, b がともに障害されているにもかかわらず神経症状を呈さない症例が報告されている^{16)~18)}。また、*ELA2*, *HAXI*, *G6PC3* のうち2つの遺伝子変異をもつ SCN も4例報告されており¹⁶⁾、さらなる症例の蓄積と病態解明が望まれる。

c. *GFI1* 変異による先天性好中球減少症

GFI1 は Zn フィンガー転写抑制因子で、T リンパ球系に強く発現しているが、好中球、マクロファージ系にも発現が認められている。*GFI1* のノックアウトマウスの解析では末梢血での好中球減少と未熟単球の集積が特徴で、*GFI1* の骨髄顆粒球系分化への関与が指摘された¹⁹⁾。Person らは2家系の *GFI1* 遺伝子ヘテロ接合性変異例で、好中球減少症と単球増加、CD4 リンパ球の減少、ナイーブ T, B 細胞の減少を認めている²⁰⁾。*GFI1* の機能低下に基づいた *ELA2* 遺伝子の過剰発現があり、その結果、骨髄系細胞への NE の発現を調節している転写因子であることより、*ELA2* そのものの異常とともに *ELA2* 調節にかかわる遺伝子群経路が、骨髄顆粒球系細胞の分化に強く関係していると考えられる。

2. 周期性好中球減少症 (CyN)

約21日の周期で好中球が減少する疾患である。典型例では好中球減少期に ANC が $200/\mu\text{L}$ 未満となり、同時期に一致して発熱、全身倦怠感、口内炎、皮膚感染、上気道感染などを反復し、3~5日で回復する。好中球減少と同時に網状赤血球、血小板も同様の変化がみられるため、造血幹細胞レベルでの異常が示唆されている。末梢血での変化に先行して、骨髓像での変化がみられる。好中球減少期の数日前の骨髓像

では全体的な低形成とともに、骨髄系細胞全体の減少が認められる。発症頻度は0.5~2/100万人と推定されており、1/2~1/3が小児期発症例である。前述した通りほぼ全例で *ELA2* の変異が認められる。約1/3が家族歴を有しており、常染色体優性の遺伝形式をとる。先天性の CyN では加齢とともに周期性が明瞭でなくなり、感染症の頻度も低下することが多い。

3. 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。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されている。SDS はリボソーム異常の代表的疾患である。SDS の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歳頃と比較的に早期に診断されることが多い²¹⁾。血清トリプシノーゲン、膵アミラーゼの低下、 $1,500/\mu\text{L}$ 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 などの画像検査で膵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、骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome : MDS)、急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia : AML) などの発生頻度が高い²¹⁾。骨髄細胞で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²²⁾。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果たしていることを報告した²³⁾。ヒトの細胞においても、SBDS が細胞周期依存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²⁴⁾。

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²⁵⁾。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²⁶⁾。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²⁶⁾。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²⁷⁾。

4. WHIM 症候群

好中球減少症からは myelokathexis とよばれているが、他の合併症から WHIM (warts,

hypogammaglobulinemia, immunodeficiency, myelokathexis) と称されるまれな症候群である。骨髓中には多くの好中球が存在するものの、末梢血への放出機構障害による好中球減少、T、B リンパ球異常に伴う低 γ グロブリン血症による細菌性感染症の反復、ヒトパピローマウイルスに対する易感染性からの多発性疣贅が特徴的である。近年、本症 7 家系においてケモカイン受容体の一つである CXCR4 の細胞内ドメインの変異が同定された²⁸⁾。CXCR4 シグナル伝達と WHIM 症候群の関係は、CXCR4 のノックアウトマウスと同じく B リンパ球系では B リンパ球の減少と低 γ グロブリン血症を呈しているが、ヒトでみられる骨髓顆粒球系についての好中球減少はマウスでは認められず、好中球減少については他の機構が存在すると考えられる。骨髓からの好中球放出障害、正常な走化能と好中球アポトーシス亢進の認められる家系では、アポトーシス機構の異常が病態に寄与している可能性が推測されている。

5. Hermansky-Pudlak 症候群

Hermansky-Pudlak 症候群は主としてリソゾーム関連の細胞内小器官の異常に基づく疾患であり、種々のタイプが存在している。その中で好中球減少が認められるのはタイプ 2 である。タイプ 2 は AP3 の β サブユニットをコードする遺伝子 *AP3B1* の変異により起こり、慢性好中球減少と白斑、出血傾向がみられる。しかし、細菌感染症の頻度は多くなく、比較的良好的な経過をたどる。AP3 欠損好中球では顆粒の形態や顆粒内蛋白にパターンの異常が認められるが、好中球機能 (走化能、貪食能、殺菌能) に明らかな異常は認められていない²⁹⁾。好中球減少の原因としては、顆粒球素の形態、顆粒酵素や蛋白の構成異常が推測されている。顆粒内の myeloperoxidase と proteinase 3 は正常に存在するものの、NE と gelatinase は酵素活性が低下することが認められている³⁰⁾。NE が好中球数の維持に重要な役割を果たしている可能

性がある。

6. WAS 蛋白異常

WAS 遺伝子は Wiskott-Aldrich 症候群の責任遺伝子として同定され、WAS 蛋白の欠損あるいは機能低下の結果、血小板減少、リンパ球機能異常、湿疹を呈する疾患である。この関連疾患として同じ遺伝子異常で X 連鎖性血小板減少症も存在し、現在までに 150 以上の遺伝子異常が報告されている。WAS 異常に伴う好中球減少症は SCN と同様な臨床所見に、好中球機能異常（走化能、貪食能、シグナル伝達能）、リンパ球減少、NK 細胞減少、リンパ球機能異常を示す³¹⁾³²⁾。いずれの変異も WAS 蛋白の持続的な活性化をもたらすことが特徴であり、Wiskott-Aldrich 症候群や X 連鎖性血小板減少症の遺伝子異常と異なった病態である。一部の症例では MDS/AML への移行が認められている。

7. 免疫性好中球減少症

好中球に対する自己抗体産生によるもので、末梢での好中球破壊の亢進により好中球減少症となる。産生された抗体による末梢での好中球破壊により、末梢血での好中球数の低下がみられる。一方骨髓では顆粒球系細胞の過形成がみられ、数は減少しているものの成熟好中球も認められるため、maturation arrest により成熟好中球がまったく認められない SCN とは異なった像を呈する。抗体は好中球特異抗原に対するものであり、もっとも関与の多い抗原は Fc γ receptor (Fc γ R) IIIb であり、HNA-1 抗原とよばれている。Fc γ R IIIb は好中球に発現し、GPI (glycosyl-phosphatidylinositol) により細胞膜に結合している。塩基配列の polymorphism により HNA-1a 抗原、HNA-1b 抗原、HNA-1c 抗原の 3 つの isoform が存在する。また、FCGR3B 遺伝子欠失により好中球上に Fc γ R IIIb をもたない HNA-null も存在する。HNA-1 抗原の遺伝子頻度には人種差が認められ、欧米では HNA-1b が優位であるが、日本では

HNA-1a が優位である。本症の原因となる抗体は HNA-1a に対するものが最多である。これらに代表される好中球抗原に対する抗体産生が本症発症の原因であり、新生児期にみられる母児間不適合妊娠や頻回輸血で産生される同種抗体によるものと、自己抗体によるものに分けられる。前者の代表が新生児同種免疫性好中球減少症で、後者は乳幼児自己免疫性好中球減少症である。

a. 新生児同種免疫性好中球減少症

新生児同種免疫性好中球減少症は妊娠中母体において、父方由来好中球抗原に感作された母体が好中球抗体を産生し、胎盤を通して児に移行することにより発症する。わが国での HNA-1 系の多型性の頻度は、HNA-1a/HNA-1a が約 48%、HNA-1b/HNA-1b が約 11%、HNA-1a/HNA-1b が約 40%、HNA-null が 0.05~0.1% と推測されている。HNA-1 の homozygote では HNA-1 系に母児間不適合妊娠が起こる可能性があり、これらの妊娠から新生児好中球減少症を発症する頻度は約 6,000 例に一人の割合と推測されている³³⁾。

b. 乳幼児自己免疫性好中球減少症

乳幼児期の慢性好中球減少症では経過中に好中球減少が自然軽快する予後良好な例が多く、慢性良性好中球減少症ともよばれているが、この範疇に属する慢性好中球減少症の約半数で抗好中球抗体が検出される。乳幼児自己免疫性好中球減少症は好中球特異抗原に対する自己抗体産生により、末梢での好中球破壊に亢進が起こり好中球減少症となる。乳幼児期の慢性好中球減少症の原因としてはもっとも頻度が高い。本症と慢性良性好中球減少症では発症年齢、好中球減少の程度、臨床症状や経過から区別することはできず、両疾患の差は血清中の抗好中球抗体検出の有無で区別される。本質的には同じ疾患であると思われる。

本症の発症年齢は生後 3 カ月~3 歳頃までに分布するが、平均発症月齢は 8 カ月であり、14

表2 好中球抗体の強度と臨床症状

好中球抗体	陰 性	弱陽性	強陽性
患者数	12	13	16
性別（男児：女児）	7：5	6：7	8：8
初発時月齢	9.4±3.2	11.7±9.5	11.9±9.8
初発時白血球数（/ μ L）*	5,800±3,000	5,600±2,500	6,900±3,300
初発時好中球数（/ μ L）*	90±120	80±80	130±130
好中球減少から回復した月齢	20.0±7.1	34.6±33.3	47.4±18.4
感染症の程度			
軽症感染症	11	11	12
重症感染症	1	2	4
治療			
抗菌薬予防投与	3	3	7
G-CSF 投与	2	3	5

*：診断時の値

（中村和洋ほか，2004^{34）}より一部改変）

カ月までに90%が発症する³⁴⁾。白血球数は年齢に比して正常もしくはやや減少しており，好中球数は500/ μ L以下と著明に減少している例が多い。骨髓では，顆粒球系細胞の過形成が認められ，成熟好中球，主に分葉核好中球の減少が特徴的である³⁵⁾。感染症合併時には好中球数が増加するため，著明な好中球減少にもかかわらずSCNなどと比較して合併感染症は軽症のことが多い。乳幼児自己免疫性好中球減少症の多くは特別な治療を行わなくても，好中球抗体の消失が先行して好中球減少の自然回復が2～3年以内に認められる。フローサイトメトリーによる好中球抗体の半定量が可能で，抗体価が強い群ほど回復までの期間が長い（表2）。

Ⅲ 診断

乳児期より皮膚感染症（皮下膿瘍，皮膚蜂巣炎），細菌性肺炎，中耳炎，臍帯炎，口腔内感染症などの感染の反復と同時に重症化，慢性化が認められる。SCN，CyNの両疾患において好中球減少（ほとんどの例でANC 200/ μ L以下）と単球，好酸球の増加が認められる。骨髓像では，骨髓顆粒球系細胞の低形成，前骨髓球でのmaturation arrestが特徴的所見である。CyN

における好中球減少は常時認められる所見ではなく，末梢血の血算を週に2～3回，6～8週間行い，約21日間の好中球減少を最低2回確認することが必要である。内因性障害による先天性好中球減少症では表1に示すように，多くの責任遺伝子が同定されているので，好中球減少症の表現型と遺伝子検査から確定診断が可能となる。HAX1欠損症の一部の症例では成長障害，神経学的異常を合併するように，種々の先天性好中球減少症では特徴的臨床所見が認められるので，併せて診断の一助とする必要がある。

免疫性好中球減少症においては，抗好中球抗体の測定（好中球凝集試験，間接免疫蛍光試験）が必須である。抗体測定に関しては抗体の特異性とその感度が重要である。比較的安定した結果を得るには好中球抗原既知の好中球を利用したフローサイトメトリー法が有用である。本法では乳幼児自己免疫性好中球減少症の原因としてHNA-1aに対する抗体が30～70%ともっとも頻度が高い³⁴⁾。

Ⅳ 治療

SCNでは基本的に自然治癒は望めないため，感染症対策が必須である。起炎菌は黄色ブドウ

球菌が多いが、グラム陰性菌、真菌感染に対しても注意が必要であり、感染予防としてイソジン含嗽やST合剤(0.1 g/kg/日)の定期投与が有効である。しかしST合剤については薬剤アレルギー、肝障害を起こす可能性があるため注意を要する。また慢性歯肉炎は必発の合併症であり、小児歯科医との連携による口腔ケアが重要である。以前は十分な感染症対策を行っても予後は不良であったが、G-CSFが用いられるようになり感染症に対する予後が大幅に改善された。G-CSFは5~150 μ g/kg/日の高用量を必要とするが、好中球数の増加、感染症合併頻度の低下が認められる。

感染症の合併頻度の増加、慢性歯肉炎のコントロールが困難であれば、G-CSFの投与を行う。CyNでは好中球減少時のみ低用量(2~3 μ g/kg/日)を使用することで、好中球減少期間の短縮と好中球減少時のANCの増加が認められる。しかしSCNにおいて、G-CSF治療を実施している長期生存例においてAMLやMDSの合併が報告されている。同治療を行っているCyNや特発性好中球減少症においてはAMLの合併は認めないことから、SCN自体がリスクと考えられる。治療中の症例は、AML合併に先立って認められる点突然変異やmonosomy 7の出現に留意して慎重な経過観察が必要である。

近年、治療抵抗性のSCN患者に対し根治療法として造血幹細胞移植が行われている。当施設においても骨髄非破壊的前処置による骨髄移植を行い、良好な結果を得ている。とくにG-CSF投与を長期間にわたり必要とする患者においては、AMLの発症リスクも増大するため、造血幹細胞移植を考慮する必要があると考えられる。

新生児同種免疫性好中球減少症では、抗体の強度によるが、好中球減少が数週間から5カ月くらいまで継続する。好中球減少期間で児が感染症を併発する場合には迅速な抗菌療法、重症

時にはG-CSFの投与が必要である。

乳幼児自己免疫性好中球減少症は自然軽快が見込まれるため、治療としては感染症合併時の抗菌薬投与で十分なことが多い。しかし、頻回に中耳炎などの細菌感染症を合併する場合、ST合剤の予防投与が有効である。感染症併発時には軽度であるが好中球数の増加が認められる。血清中に好中球特異抗原に対する抗好中球抗体の存在を高率に認め、抗体の自然消失に相関して好中球の回復がみられる。またG-CSF投与で、ほぼ全例に好中球増加が認められるため、重症感染症合併時や外科手術前の症例にはG-CSF投与が有効である。

文献

- 1) Klein C et al : HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet* 2007 ; 39 : 86-92
- 2) Welte K et al : Severe congenital neutropenia. *Semin Hematol* 2006 ; 43 : 189-195
- 3) Boxer LA et al : A molecular classification of congenital neutropenia syndromes. *Pediatric Blood & Cancer*. DOI 2007 Jun
- 4) Horwitz M et al : Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat Genet* 1999 ; 23 : 433-436
- 5) Horwitz MS et al : Neutrophil elastase in cyclic and severe congenital neutropenia. *Blood* 2007 ; 109 : 1817-1824
- 6) Dale DC et al : Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic and neutropenia. *Blood* 2000 ; 96 : 2317-2322
- 7) Ancliff PJ et al : Paternal mosaicism proves the pathogenic nature of mutations in neutrophil elastase in severe congenital neutropenia. *Blood* 2002 ; 100 : 707-709
- 8) Kawaguchi H et al : Dysregulation of transcriptions in primary granule constituents during myeloid proliferation and differentiation in patients with severe congenital neutropenia. *J Leuk Biol* 2003 ; 73 : 225-234
- 9) Benson KF et al : Mutations associated with neutropenia in dogs and humans disrupt intracellular transport of neutrophil elastase. *Nat Genet* 2003 ; 35 : 90-96

- 10) Kollner I et al : Mutations in neutrophil elastase causing congenital neutropenia lead to cytoplasmic protein accumulation and induction of the unfolded protein response. *Blood* 2006 ; 108 : 493-500
- 11) Grenda DS et al : Mutations of the ELA2 gene found in patients with severe congenital neutropenia induce the unfolded protein response and cellular apoptosis. *Blood* 2007 ; 110 : 4179
- 12) Matsubara K et al : Severe development delay and epilepsy in a Japanese patient with severe congenital neutropenia due to HAX1 deficiency. *Haematologica* 2007 ; 92 : e123
- 13) Okada S et al : Association of neurodevelopmental abnormalities is common clinical character in Japanese patients with severe congenital neutropenia due to HAX1 deficiency. *Blood* 2007 ; 110 : 665 (abstr)
- 14) Germeshausen M et al : Novel HAX1 mutations in patients with severe congenital neutropenia reveal isoform-dependent genotype-phenotype associations. *Blood* 2008 ; 111 : 4954-4957
- 15) Ishikawa N et al : Neurodevelopmental delay and epilepsy in a Japanese patient with severe congenital neutropenia due to HAX1 deficiency. *J Med Genet* 2008 ; 45 : 802-807
- 16) Germeshausen M et al : Digenic mutations in severe congenital neutropenia. *Haematologica* 2010 ; Epub ahead of print
- 17) Carlsson G et al : Compound heterozygous HAX1 mutations in a Swedish patient with severe congenital neutropenia and no neurodevelopmental abnormalities. *Pediatr Blood Cancer* 2009 ; 53 : 1143-1146
- 18) Faiyaz-Ul-Haque et al : A novel missense mutation in the HAX1 gene in severe congenital neutropenia patients (Kostmann disease). *Clin Genet* 2009 ; 76 : 569-572
- 19) Karsunky H et al : Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat Genet* 2002 ; 30 : 295-300
- 20) Person RE et al : Mutations in proto-oncogene GFII cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet* 2003 ; 34 : 308-312
- 21) Alter BP : Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2007 : 29-39
- 22) Boocock GR et al : Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nat Genet* 2003 ; 33 : 97-101
- 23) Menne TF et al : The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nat Genet* 2007 ; 39 : 486-495
- 24) Austin KM et al : The Shwachman-Diamond SBDS protein localizes to the nucleolus. *Blood* 2005 ; 106 : 1253-1258
- 25) Dror Y, Freedman MH : Shwachman-Diamond syndrome marrow cells show abnormally increased apoptosis mediated through the Fas pathway. *Blood* 2001 ; 97 : 3011-3016
- 26) Watanabe K et al : SBDS-deficiency results in specific hypersensitivity to Fas stimulation and accumulation of Fas at the plasma membrane. *Apoptosis* 2009 ; 14 : 77-89
- 27) Rujkijyanont P et al : SBDS-deficient cells undergo accelerated apoptosis through the Fas-pathway. *Haematologica* 2008 ; 93 : 363-371
- 28) Hernandez PA et al : Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* 2003 ; 34 : 70-76
- 29) Fontana S et al : Innate immunity defects in Hermansky-Pudlak type 2 syndrome. *Blood* 2006 ; 107 : 4857-4864
- 30) Jung J et al : Identification of a homozygous deletion in the AP3B1 gene causing Hermansky-Pudlak syndrome, type 2. *Blood* 2006 ; 108 : 362-369
- 31) Devriendt K et al : Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet* 2001 ; 27 : 313-317
- 32) Ancliff PJ et al : Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood* 2006 ; 108 : 2182-2189
- 33) 小林正夫 : 小児好中球減少症. *日本小児科学会雑誌* 2005 ; 109 : 614-622
- 34) 中村和洋ほか : 抗好中球抗体と乳幼児自己免疫性好中球減少症. *日本小児血液学会雑誌* 2004 ; 18 : 17-22
- 35) Berunini JC et al : Diagnosis and management of chronic neutropenia during childhood. *Pediatr Clin North Am* 1996 ; 43 : 773-792
- 36) Kobayashi M et al : Significance of the detection of antineutrophil antibodies in children with chronic neutropenia. *Blood* 2002 ; 99 : 3468-3471

特集

血液疾患における病態解析研究の進歩

先天性好中球減少症発症機構
解明の進展*

溝口 洋子**

岡田 賢**

小林 正夫**

Key Words : severe congenital neutropenia, *ELA2*,
HAX1, Kostmann disease

はじめに

先天性好中球減少症 (severe congenital neutropenia ; SCN) は慢性好中球減少症, 特に末梢血好中球数が $200/\mu\text{l}$ 未満, 骨髓像で前骨髓球, 骨髓球での成熟障害, 生後より反復する重症細菌感染症を臨床的特徴とする遺伝性疾患である。1956年にKostmannがスウェーデン家系での第1例を報告して以後, 長く病因は不明であった¹⁾。本症は重症細菌感染症を反復することから, 乳幼児期に死亡する例が多かったが, 1990年代よりG-CSFの開発と本疾患群での有効性から長期生存が可能となった²⁾。1999年に好中球エラスターゼ (neutrophil elastase ; NE) をコードする*ELA2*遺伝子のヘテロ接合性変異が周期性好中球減少症とSCNの半数例で同定され, その後も10種類以上に及ぶ種々の責任遺伝子が明らかにされている。近年, 常染色体劣性遺伝形式を呈するSCNの家系例において*HAX1* (HS-1 associated protein) の責任遺伝子である*HAX1*の異常が報告された³⁾。ほかに, *GFI1*, *WAS*遺伝子異常に伴うSCNが報告されており, さらに昨年新たに*G6PC3*遺伝子異常によるSCNが報告された。このようにSCNは種々の原因によってもたらされる疾患群と考

えられている⁴⁾⁵⁾。本稿ではSCNを表1のように分類し, *ELA2*遺伝子変異, *HAX1*異常, *GFI1*異常, *AP3B1*異常, *G6PC3*異常, *CXCR4*異常, *WASP*異常についてその病因との関係を中心に最近の知見を概説する。

*ELA2*遺伝子変異による
先天性好中球減少症

1999年に周期性好中球減少症の多数例で好中球エラスターゼをコードする遺伝子, *ELA2*遺伝子のヘテロ接合性変異が同定された⁶⁾。その後SCNの約60%の症例で, 同じく*ELA2*遺伝子ヘテロ接合性変異の存在が明らかとなった。*ELA2*遺伝子は5つのエクソンから構成され, SCNではすべてのエクソンでの変異が同定されているが多くはエクソン4, 5に集中している。常染色体優性の発現形式をとり, 現在までに50種類の変異が報告されている^{6)~10)}。図1に現在までに報告されている*ELA2*遺伝子変異部位とSCNと周期性好中球減少症に分けて示すが, SCNで認められる変異は主にエクソン5であるが, 周期性好中球減少症で認められる変異部位はイントロン4に集中している。しかしSCNで認められる変異と同一の変異をもつ周期性好中球減少症の症例も存在し, その機序は現在のところ不明である⁷⁾。

多くの変異NEは蛋白分解酵素としての機能は有しているが, 一部の基質に対しては活性の低

* Recent advances in the pathogenesis of severe congenital neutropenia.

** Yoko MIZOGUCHI, M.D., Satoshi OKADA, M.D. & Masao KOBAYASHI, M.D.: 広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学[〒734-8551 広島市南区霞1-2-3]; Department of Pediatrics, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima 734-8551, JAPAN.

表 1 先天性好中球減少症の分類

疾 患	責任遺伝子	合併症・その他
1) 骨髄顆粒球系産生異常 Congenital neutropenia with HAX1欠損 (Kostmann病) Congenital neutropenia with ELA2遺伝子変異 Congenital neutropenia with GFI1遺伝子変異 Cyclic neutropenia 特発性好中球減少症	HAX1 ELA2 GFI1 ELA2 不明	MDS/AML, 神経系異常 MDS/AML, G-CSF受容体遺伝子異常 B, T リンパ球異常 周期的単球増加 特になし
2) リソゾーム機能障害による好中球減少症 Shwachmann-Diamond症候群 Dyskeratosis congenita	SBDS DKC1, TERC, TERT	膵外分泌機能不全, 再生不良性貧血, MDS/AML 汎血球減少, 皮膚色素異常, 爪異形成, 白斑
3) 顆粒輸送障害 Hermansky-Pudlak症候群 Chediak-Higashi症候群 Griscelli症候群 Congenital neutropenia with P14 (MAPBPIP) 遺伝子変異	AP3B1 LYST(CHS1) RAB27A P14/MAPBPIP	部分白皮症, 低身長, 血小板機能異常 部分白皮症, T/NK細胞障害活性低下, 走化能異常 部分白皮症, 血球貪食症候群 部分白皮症, 低身長, 血小板機能異常
4) 免疫異常に合併する好中球減少症 Hyper IgM症候群 Congenital neutropenia with WASP遺伝子変異 WHIM症候群 Reticular dysgenesis	CD40-L WASP CXCR4 不明	IgG, IgA, IgE低下 単球減少, 血小板数正常 Myelokathexis, IgG低下, 疣贅 重症複合型免疫不全
5) 代謝異常等に合併する好中球減少症 糖原病 I b 型 G6PC3異常 Barth症候群 (3-methylglutaconic acidria) Pearson症候群	Glucose-6-phosphate- translocase Glucose-6-phosphatase, catalytic subunit 3 TAZ1 ミトコンドリアDNA欠失	低血糖, 走化能異常 先天性心疾患(心房中隔欠損症), 泌尿生殖 器異常, 静脈拡張 拡張型心筋症, 骨筋症, 低身長 貧血, 膵機能不全

下が認められることから、NEの蛋白分解酵素としての機能異常が病因に関与している可能性はある。Bensonらは周期性好中球減少症のモデル犬であるグレーコリー犬で、蛋白輸送に関与するadaptor protein群の1つであるAP3B1の遺伝子変異を同定し、NEの細胞内輸送異常がSCNと周期性好中球減少症の発症に関与するモデルを提唱した¹¹⁾。NEを代表とする顆粒酵素はゴルジ装置で産生され、細胞内から細胞膜を経由して顆粒内へと移行する。この蛋白輸送にかかわるadaptor protein群の1つであるAP3B1の遺伝子変異を同定し、NEの細胞内輸送異常がCNと周期性好中球減少症の発症に関与するモデルを提唱した。NEを代表とする顆粒酵素はゴルジ装置で産生され、細胞内から細胞膜を経由して顆粒内へと移行する。この蛋白輸送にはadaptor protein群が輸送蛋白としての役割をしている。輸送蛋

白の欠損や異常によりリソゾームや細胞内顆粒の形成が不完全となり、全身諸臓器の障害が誘導される。正常ELA2遺伝子は核内でZnフィンガー転写抑制因子であるGFI1の制御の基に転写後、ゴルジ装置に配置される。NEの大部分はC末端が切断されadaptor protein complex 3(AP3)と結合し、顆粒内へと輸送されるが、一部のC末端が切断されないNEではAP3との結合が阻害されるために細胞膜へ移動して結合する。このようにNEの輸送が細胞膜に偏る場合にはSCNをひき起こし、顆粒内に偏ると周期性好中球減少と関係していることが考えられている。実際に、SCNと周期性好中球減少症の患者好中球での免疫染色から、NEの細胞内分布が明らかに異なることが報告されており、われわれも多くの顆粒内酵素、蛋白の免疫染色で、特徴的な所見を認めている。このように細胞膜に集積したNEが骨髄顆

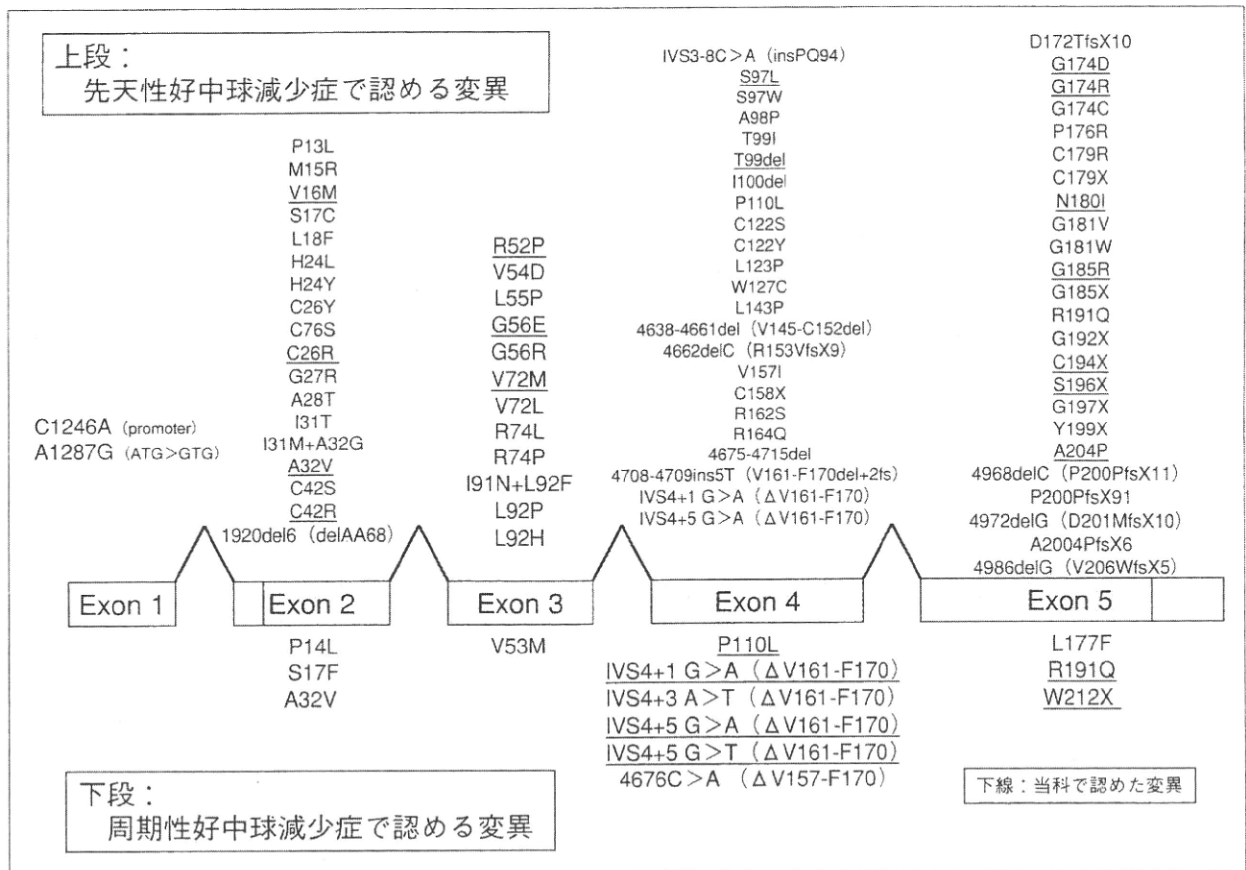


図1 先天性好中球減少症と周期性好中球減少症におけるELA2遺伝子変異

粒球系前駆細胞でアポトーシス誘導した結果が成熟障害に結びついている可能性がある。同時に、NEは骨髓顆粒球系細胞の増殖分化に必須であるG-CSF, ならびにG-CSF受容体を蛋白分解することが証明されている¹²⁾¹³⁾。

近年、Kollnerら、Grendaらは異常蛋白が細胞内に蓄積することによるフォールディング病としての概念をSCNに応用している¹⁴⁾¹⁵⁾。NE変異蛋白がミスフォールディング(蛋白質の折りたたみ異常)を起こすことによるフォールディング病としてSCNの原因が推測されている。フォールディング病としての代表はα1アンチトリプシン欠損症やプリオン病であるが、小胞体シャペロンであるBiPの発現誘導によって蛋白のミスフォールディングを同定している。SCN患者でみられる遺伝子変異を導入されたK562細胞ではBiPのmRNA発現がwild typeに比べ2~6倍であったこと、実際に患者骨髓系細胞でも高値が認められたことで証明している。NEの細胞内局在の異常と併せてフォールディング病の可能性を示唆している。しかし、Horwitzらの症例と変異遺伝子、

導入の結果からは、必ずしもBiPのmRNAの発現上昇は有意ではないことが示されており、フォールディング病としての結論は不明である。

骨髓系細胞の分化に関与する転写因子の1つであるLEF1(cyclin D1, c-myc, c/EBPαの発現を制御している)の発現低下がすべてのSCN患者で認められている。LEF1の発現低下はSCNの本態と考えられる病因の下流に共通した異常と考えられている¹⁶⁾。同様に、SCNでは好中球系細胞のアポトーシス亢進が認められており、アポトーシス関連の種々の遺伝子発現の変化が好中球減少という病態と結びついている可能性が示唆されている¹⁷⁾。

HAX1異常症

1956年にKostmannが常染色体劣性遺伝形式を示す遺伝性好中球減少症として第1例を報告した疾患である。2007年にKleinらは、本症の原因がHAX1遺伝子のホモ接合性変異によるHAX1蛋白の欠損症であることを明らかにした³⁾。中東の症例よりポジショナルクローニングにて1番染

色体に存在する*HAX1*遺伝子を同定し、W44X変異19例、R86X変異1例、スウェーデンのKostmannの元祖家系からQ190X変異の3種類が同定されている。これらの患者では全例ホモ接合性変異が同定されている。本邦でもMatsubaraらが第1例の*HAX1*欠損症例を報告し¹⁸⁾、われわれもほかに4例同定し、本邦で合計5例の*HAX1*欠損によるSCNが明らかとなっている¹⁹⁾。SCNにおける*HAX1*欠損症の頻度は不明であるが、われわれの本邦での解析では約15~20%程度存在すると推測される。

*HAX1*欠損が好中球減少症を誘導する機序について、好中球のアポトーシスへの関与が推測されている。*HAX1*はミトコンドリアに選択的に存在しアポトーシスを制御する蛋白の1つである。好中球アポトーシスへの*HAX1*の関与を調べるために、TNF- α で誘導される好中球アポトーシスをPIとAnnexin-Vの染色によりFACSで解析し、*HAX1*欠損好中球では有意にアポトーシスが亢進しており、*HAX1*遺伝子が好中球寿命に関与していることを推測している。*HAX1*はミトコンドリアの内膜に存在し、ミトコンドリア膜電位を安定化、維持する役割をしている¹⁸⁾。好中球にバリノマイシン(K⁺ ionophore)を作用させてミトコンドリア膜電位変化を測定すると、*HAX1*欠損好中球では膜電位の維持が正常好中球に比べて早期に消失していた。患者骨髓細胞、線維芽細胞への正常*HAX1*遺伝子導入で膜電位維持が是正されることより、*HAX1*遺伝子のミトコンドリア膜電位における役割が確認されている。*HAX1*がミトコンドリアでのアポトーシスを制御することにより好中球減少の原因であると推測されている。

ヨーロッパ、中東における解析で、*ELA2*遺伝子異常を認めないSCN患者の38% (42例中16例) で*HAX1*遺伝子異常が認められた。これらは全例ホモ接合性の変異でW44X変異が15人と好発変異であった。一方で、Kostmann家系ではQ190X変異が同定された。*HAX1*遺伝子異常の頻度は不明であるが、われわれの本邦における解析ではSCN患者の約20% (24例中5例) で*HAX1*遺伝子異常が同定され、*ELA2*と並びSCNの主要な責任遺伝子と考えられた。*HAX1*遺伝子変異の内訳は、R86X

ホモ接合性変異が3例、R86X/R126fsの複合ヘテロ変異が2例(姉弟例)で、本邦ではR86X変異が好発変異であった。また、非常に興味深いことに、*HAX1*遺伝子異常を認めた5例全例で精神発達遅滞を認め、そのうち3例で難治性の痙攣発作を合併していた。*HAX1*遺伝子はエクソン2におけるスプライシングの違いにより2つのisoform (isoform a, b) からなる。ヨーロッパ、中東で好発変異であるW44X変異ではisoform a が単独で障害される。これらの患者では、神経学的異常の合併は認めない。一方、本邦の好発変異であり、神経学的異常に関与するR86X変異ではisoform a, b が同時に障害される(図2)。これらの結果から*HAX1* isoform a が単独で障害されると好中球減少を示し、isoform a, b がともに障害されると好中球減少症と神経学的異常を呈するといった遺伝子型と表現型の相関が明らかとなった²⁰⁾²¹⁾。

*GFI1*遺伝子変異による 先天性好中球減少症

*GFI1*はZnフィンガー転写抑制因子で、Tリンパ球系に強く発現しているが、好中球、マクロファージ系にも発現が認められている。*GFI1*のノックアウトマウスの解析では末梢血での好中球減少と未熟単球の集積が特徴で、*GFI1*の骨髓顆粒球系分化への関与が指摘された²²⁾。Personらは2家系の*GFI1*遺伝子ヘテロ接合性変異例で、好中球減少症と単球増加、CD4リンパ球の減少、ナイーブT、B細胞の減少を認めている²³⁾。*GFI1*の機能低下に基づいた*ELA2*遺伝子の過剰発現があり、その結果、骨髓系細胞へのNEの発現を調節している転写因子であることより、*ELA2*遺伝子そのものの異常とともにその発現調節にかかわる遺伝子経路が、骨髓顆粒球系細胞の分化に強く関係していると考えられる。

*G6PC3*遺伝子変異による 先天性好中球減少症

G6PC3 (glucose-6-phosphatase, catalytic subunit 3) 遺伝子変異による先天性好中球減少症は、2009年にBoztugらによって新規変異として報告された²⁴⁾。彼らは先天性好中球減少を示す2家

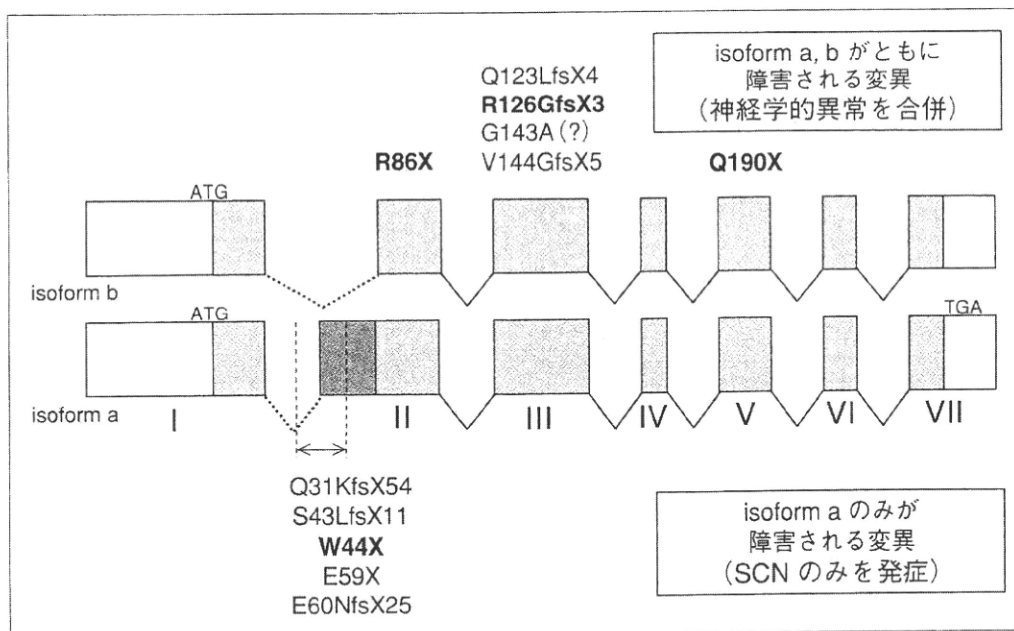


図2 HAX1遺伝子変異

系について連鎖解析を行い、G6PC3遺伝子のエクソン6にホモ接合性のミスセンス変異を認めた。さらにこの2家系の患者においてG6PC3の酵素活性の低下と、患者好中球と線維芽細胞においてアポトーシス感受性の亢進を明らかにし、骨髓球小胞体へのストレスの増加やGSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 β)の活性増加が病態に関与していると推測している。2家系を含む12名の患者が報告され、そのうち8名が先天性心疾患(心房中隔欠損症、三心房心、肺動脈狭窄)を、5名が泌尿生殖器異常(停留精巣、尿膜管瘻)を合併しており、さらにほとんどの患者において表在静脈の可視性の増加、血管拡張が認められた。HAX1やELA2遺伝子に変異を持つ患者と同様に、骨髓における好中球の成熟障害と末梢血好中球のアポトーシス感受性の亢進が認められる。すべての患者においてG-CSFに反応し好中球増加が認められており、現在までに白血病化の報告はない。

WHIM症候群

好中球減少症からはmyelokathexisと呼ばれているが、他の合併症からWHIM(warts, hypogammaglobulinemia, immunodeficiency, myelokathexis)と称される稀な症候群である。骨髓中には多くの好中球が存在するものの、末梢血への放出機

構障害による好中球減少、T、Bリンパ球異常に伴う低 γ グロブリン血症による細菌性感染症の反復、ヒトパピローマウイルスに対する易感染性からの多発性疣贅が特徴的である。近年、本症7家系においてケモカイン受容体の1つであるCXCR4の細胞内ドメインの変異が同定された²⁵⁾。CXCR4シグナル伝達とWHIM症候群の関係はCXCR4のノックアウトマウスと同じくBリンパ球系ではBリンパ球の減少と低 γ グロブリン血症を呈しているが、ヒトでみられる骨髓顆粒球系についての好中球減少はマウスでは認められず、好中球減少については他の機構が存在すると考えられる。骨髓からの好中球放出障害、正常な走化能と好中球アポトーシス亢進の認められる家系では、アポトーシス機構の異常が病態に関与している可能性が推測されている。

Hermansky-Pudlak症候群

Hermansky-Pudlak症候群は主としてリソゾーム関連の細胞内小器官の異常に基づく疾患であり、種々のタイプが存在している。その中で好中球減少が認められるのはタイプ2である。タイプ2はAP3の β サブユニットをコードする遺伝子AP3B1の変異により起こり、慢性好中球減少と白斑、出血傾向がみられる。しかし、細菌感染症の頻度は多くなく、比較的良好な経過を

たどる。AP3欠損好中球では顆粒の形態や顆粒内蛋白にパターンの異常が認められるが、好中球機能(走化能, 貪食能, 殺菌能)に明らかな異常は認められていない²⁶⁾。好中球減少の原因としては、顆粒球素の形態、顆粒酵素や蛋白の構成異常が推測されている。顆粒内のmyeloperoxidaseとproteinase 3は正常に存在するものの、NEとgelatinaseは酵素活性が低下することが認められている²⁷⁾。NEが好中球数の維持に重要な役割を果たしている可能性がある。

WAS蛋白異常

WAS遺伝子はWiskott-Aldrich症候群の責任遺伝子として同定され、WAS蛋白の欠損あるいは機能低下の結果、血小板減少、リンパ球機能異常、湿疹を呈する疾患である。この関連疾患として同じWAS遺伝子の異常でX連鎖性血小板減少症も存在し、現在までに150以上の遺伝子異常が報告されている。WAS蛋白異常に伴う好中球減少症はSCNと同様な臨床所見に、好中球機能異常(走化能, 貪食能, シグナル伝達能)、リンパ球減少、NK細胞減少、リンパ球機能異常を示す²⁸⁾²⁹⁾。これらの患者で認める遺伝子変異ではWAS蛋白の持続的な活性化をもたらすことが特徴であり、Wiskott-Aldrich症候群やX連鎖性血小板減少症の遺伝子異常と異なった病態である。一部の症例ではMDS/AMLへの移行が認められている。

おわりに

先天性好中球減少症はさまざまな遺伝子の異常によりもたらされるheterogenousな疾患群であり、その約90%以上で遺伝子異常が同定されてきた。今後、責任遺伝子変異と好中球減少という病態を解明することにより、正常の骨髓顆粒球細胞の増殖、分化の分子レベルでの解明が期待される。

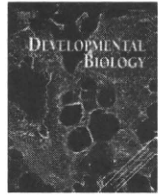
文 献

- 1) Kostmann R. Infantile genetic agranulocytosis. A review with presentation of ten new cases. Acta Paediatr Scand 1975 ; 64 : 362.
- 2) Bonilla MA, Gillio AP, Ruggeiro M, et al. Effects of

- recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia in patients with congenital agranulocytosis. N Engl J Med 1989 ; 320 : 1574.
- 3) Klein C, Grudzien M, Appaswamy G, et al. HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). Nat Genet 2007 ; 39 : 86.
- 4) Welte K, Zeidler C, Dale DC. Severe congenital neutropenia. Semin Hematol 2006 ; 43 : 189.
- 5) Boxer LA, Newburger PE. A molecular classification of congenital neutropenia syndromes. Pediatric Blood & Cancer. DOI, 21 Jun, 2007.
- 6) Horwitz M, Benson KF, Person RE, et al. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. Nat Genet 1999 ; 23 : 433.
- 7) Horwitz MS, Duran Z, Korkmaz B, et al. Neutrophil elastase in cyclic and severe congenital neutropenia. Blood 2007 ; 109 : 1817.
- 8) Dale DC, Person RE, Bolyard AA, et al. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic and neutropenia. Blood 2000 ; 96 : 2317.
- 9) Ancliff PJ, Gale RE, Watts MJ, et al. Paternal mosaicism proves the pathogenic nature of mutations in neutrophil elastase in severe congenital neutropenia. Blood 2002 ; 100 : 707.
- 10) Kawaguchi H, Kobayashi M, Nakamura K, et al. Dysregulation of transcriptions in primary granule constituents during myeloid proliferation and differentiation in patients with severe congenital neutropenia. J Leuk Biol 2003 ; 73 : 225.
- 11) Benson KF, Li FQ, Person RE, et al. Mutations associated with neutropenia in dogs and humans disrupt intracellular transport of neutrophil elastase. Nat Genet 2003 ; 35 : 90.
- 12) Hunter MG, Drunhan LJ, Massullo PR, et al. Proteolytic cleavage of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor by neutrophil elastase induces growth inhibition and decreased cells surface expression of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. Am J Hematol 2003 ; 74 : 149.
- 13) El Ouriaghli F, Fujiwara H, Melenhorst JJ, et al.

- Neutrophil elastase enzymatically antagonizes the in vitro action of G-CSF : implications for the regulation of granulopoiesis. *Blood* 2003 ; 101 : 1752.
- 14) Kollner I, Sodeik B, Schreek S, et al. Mutations in neutrophil elastase causing congenital neutropenia lead to cytoplasmic protein accumulation and induction of the unfolded protein response. *Blood* 2006 ; 108 : 493.
 - 15) Grenda DS, Murakami M, Ghatak J, et al. Mutations of the ELA2 gene found in patients with severe congenital neutropenia induce the unfolded protein response and cellular apoptosis. *Blood* 2007 ; 110 : 4179.
 - 16) Skokowa J, Cario G, Uenal M, et al. LEF-1 is crucial for neutrophil granulocytopoiesis and its expression is severely reduced in congenital neutropenia. *Nat Med* 2006 ; 12 : 1191.
 - 17) Massullo P, Druhan LJ, Bunnell BA, et al. Aberrant subcellular targeting of the G185R neutrophil elastase mutant associated with severe congenital neutropenia induces premature apoptosis of differentiating promyelocytes. *Blood* 2005 ; 105 : 3397.
 - 18) Matsubara K, Imai K, Okada S, et al. Severe development delay and epilepsy in a Japanese patient with severe congenital neutropenia due to HAX1 deficiency. *Haematologica* 2007 ; 92 : e123.
 - 19) Okada S, Ishikawa N, Shirao K, et al. Association of neurodevelopmental abnormalities is common clinical character in Japanese patients with severe congenital neutropenia due to HAX1 deficiency [abstract]. *Blood* 2007 ; 110 : 665.
 - 20) Germeshausen M, Grudzien M, Zeidler C, et al. Novel HAX1 mutations in patients with severe congenital neutropenia reveal isoform-dependent genotype-phenotype associations. *Blood* 2008 ; 111 : 4954.
 - 21) Ishikawa N, Okada S, Miki M, et al. Neurodevelopmental abnormalities associated with severe congenital neutropenia due to the R86X mutation in the HAX1 gene. *J Med Genet* 2008 ; 45 : 802.
 - 22) Karsunky H, Zeng H, Thorsten Schmidt T, et al. Inflammatory reactions and severe neutropenia in mice lacking the transcriptional repressor Gfi1. *Nat Genet* 2002 ; 30 : 295.
 - 23) Person RE, Li FQ, Duan Z, et al. Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet* 2003 ; 34 : 308.
 - 24) Boztug K, Appaswamy G, Ashikov A, et al. A syndrome with congenital neutropenia and mutations in G6PC3. *N Engl J Med* 2009 ; 360 : 32.
 - 25) Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* 2003 ; 34 : 70.
 - 26) Fontana S, Parolini S, Vermi W, et al. Innate immunity defects in Hermansky-Pudlak type 2 syndrome. *Blood* 2006 ; 107 : 4857.
 - 27) Jung J, Bohn G, Allroth A, et al. Identification of a homozygous deletion in the AP3B1 gene causing Hermansky-Pudlak syndrome, type 2. *Blood* 2006 ; 108 : 362.
 - 28) Devriendt K, Kim AS, Mathijs G, et al. Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet* 2001 ; 27 : 313.
 - 29) Ancliff PJ, Blundell MP, Cory GO, et al. Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood* 2006 ; 108 : 2182.

* * *



A 5' untranslated region containing the IRES element in the Runx1 gene is required for angiogenesis, hematopoiesis and leukemogenesis in a knock-in mouse model

Akiko Nagamachi ^{b,1}, Phyto Wai Htun ^{a,c,1}, Feng Ma ^{d,1}, Kazuko Miyazaki ^a, Norimasa Yamasaki ^a, Masamoto Kanno ^c, Toshiya Inaba ^b, Zen-ichiro Honda ^e, Tsukasa Okuda ^f, Hideaki Oda ^g, Kohichiro Tsuji ^d, Hiroaki Honda ^{a,*}

^a Department of Disease Model, Research Institute of Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan

^b Department of Molecular Oncology, Research Institute of Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan

^c Department of Immunology, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan

^d Division of Cellular Therapy, Advanced Clinical Research Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

^e Department of Allergy and Rheumatology, Faculty of Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

^f Department of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medical Science, Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan

^g Department of Pathology, Tokyo Womens' Medical University, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received for publication 15 May 2009

Revised 11 July 2010

Accepted 13 July 2010

Available online 18 July 2010

Keywords:

Internal ribosome entry site (IRES)

Runx1

Runx1/Evi1

Angiogenesis

Hematopoiesis

Leukemogenesis

ABSTRACT

Although internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation is considered important for proper cellular function, its precise biological role is not fully understood. Runx1 gene, which encodes a transcription factor implicated in hematopoiesis, angiogenesis, and leukemogenesis, contains IRES sequences in the 5' untranslated region. To clarify the roles of the IRES element in Runx1 function, we generated knock-in mice for either wild-type Runx1 or Runx1/Evi1, a Runx1 fusion protein identified in human leukemia. In both cases, native promoter-dependent transcription was retained, whereas IRES-mediated translation was eliminated. Interestingly, homozygotes expressing wild-type Runx1 deleted for the IRES element (Runx1^{ΔIRES/ΔIRES}) died *in utero* with prominent dilatation of peripheral blood vessels due to impaired pericyte development. In addition, hematopoietic cells in the Runx1^{ΔIRES/ΔIRES} fetal liver were significantly decreased, and exhibited an altered differentiation pattern, a reduced proliferative activity, and an impaired reconstitution ability. On the other hand, heterozygotes expressing Runx1/Evi1 deleted for the IRES element (Runx1^{+/REΔIRES}) were born normally and did not show any hematological abnormalities, in contrast that conventional Runx1/Evi1 heterozygotes die *in utero* with central nervous system hemorrhage and Runx1/Evi1 chimeric mice develop acute leukemia. The findings reported here demonstrate the essential roles of the IRES element in Runx1 function under physiological and pathological conditions.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Regulation of protein synthesis plays an essential role in the control of proper gene expression. In eukaryotic cells, there are two major mechanisms for translation initiation; i) conventional 5' cap-dependent mechanism, and ii) recently discovered 5' cap-independent, internal ribosome entry site (IRES)-mediated mechanism (Meijer and Thomas, 2002; Pickering and Willis, 2005). The IRES is a *cis*-acting element that initiates protein translation through the direct recruitment of ribosomes to an mRNA (Stoneley and Willis, 2004; Holcik and Sonenberg, 2005; Spriggs et al., 2008). The IRES was originally identified in virus genomes as an element that allowed efficient production of viral proteins, and subsequent studies revealed

that similar IRES sequences (termed "cellular IRES" sequences) exist within the 5' untranslated region (UTR) of a number of eukaryotic cellular mRNAs (Stoneley and Willis, 2004; Holcik and Sonenberg, 2005; Spriggs et al., 2008). Functional studies demonstrated that cellular IRES-mediated translation prevails under conditions when cap-dependent translation is compromised, such as hypoxia, heat shock, irradiation, apoptosis, and tumorigenesis (Stoneley and Willis, 2004; Holcik and Sonenberg, 2005; Spriggs et al., 2008). Nevertheless, the precise roles of IRES-dependent translation under physiological and pathological conditions remain to be determined.

Runx1 (also called AML1, CBFA2, or PEBP2 α) is a transcription factor essential for hematopoiesis and angiogenesis during embryogenesis (Suda and Takakura, 2001; Downing, 2003; Blyth et al., 2005; Mikhail et al., 2006). Disruption of the Runx1 gene results in embryonic lethality at approximately 12.5 days post-coitum (dpc), and leads to central nervous system (CNS) hemorrhages, due to a complete lack of definitive hematopoiesis (Okuda et al., 1996; Wang

* Corresponding author. Tel.: +81 82 257 5819; fax: +81 82 257 1556.

E-mail address: hhonda@hiroshima-u.ac.jp (H. Honda).

¹ The first three authors equally contributed to the work.