

内に点状に局在し、SH2 domain の変異でも同様の傾向が見られ、いずれの変異でもリン酸化を認めた。Loop deletion 変異では刺激後、細胞質内に点状に局在したが、リン酸化は見られなかった。Transactivation domain の変異では、リン酸化部位の変異体とそれ以外の変異体で差があり、前者ではまったくSTAT3 が移動せずリン酸化もみられなかったのに対し、後者では核内に均一に分布する移行を示しリン酸化も見られた。

2. 2量体解析

いずれの変異体も正常 STAT3 と 2量体化をおこしており、この過程には異常はないと判断した。

3. DNA の結合能

COS7 細胞への変異 STAT3 移入による解析では、ほぼすべての変異体で DNA 結合が低下していた。

4. HepG2 細胞への変異体移入後の転写活性は、R335W を除くすべての変異体で著しく低下していた。

5. 患者末梢血単核球を IL-6 で刺激し、STAT3 のリン酸化をフローサイトメーター

ン酸化は認めなかった。SH2 domain については、傾向顕微鏡の所見と異なっており再検している。

D. 考察

高IgE症候群STAT3変異は、IL-6, IL-10, IL-15などの刺激に対し、その反応性が低下している。いずれのSTAT3変異体の移入においても、刺激後のDNA結合能や transcriptional 活性がwild-type に比べ低下しており、STAT3関連のサイトカインの応答性を証明できた。しかしながら、サイトカイン受容体からtranscriptionのカスケードのどの過程でSTAT3変異が関与しているか明確にはわからなかった。二量体形成には問題はなく、核移行もさまざまなパターンを呈するものの移行は認められた。核移行への障害がtranscriptional 活性を低下させている可能性が考えられた。

STAT3リン酸化については、変異体移入と患者検体でSH2 domain変異で解離がみられた。移入に用いたHeLa細胞の違いなども考えられるが、SH2 domain変異患者では若

	WT	DNA-binding domain				SH2 domain		Spacer loop	Transactivation domain	
		R335W	R382W	R423E	del exon 11	T622I	V637M	del 690-699	Y705C	V713L
細胞内での局在 (HeLa細胞)	核内辺縁に点状	核内辺縁に点状	細胞質内に点状	細胞質内に点状	細胞質内に点状	細胞質内に点状 (遅延)	細胞質内に点状	細胞質内に点状	全体に均一 (変化なし)	核内に均一
STAT3 リン酸化 (HeLa細胞)	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	なし	なし	あり
STAT3 リン酸化 (患者末梢血単核球)	あり		あり				なし	なし	なし	なし
2量体化 (Cos7細胞)	あり		あり				あり	あり		
DNAとの結合 (HepG2細胞)	あり	減弱	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし
転写活性 (HepG2細胞)	あり	あり	著しく低下	著しく低下	著しく低下	著しく低下	著しく低下	著しく低下	著しく低下	?

で解析したところ、SH2 domain, space loop, transactivation domain の変異においてリ

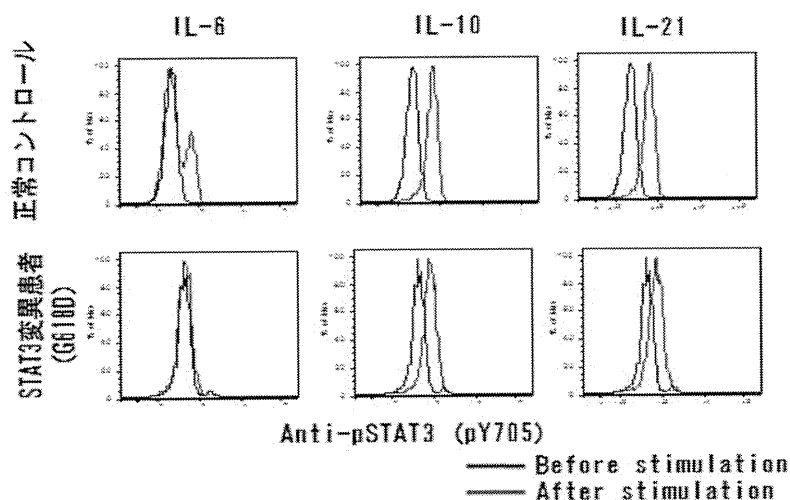
干リン酸化が落ちている可能性も考えられる。最近行ったSH2 domain変異患者のプロ

ーサイトメーターによるリン酸化を提示する (図)。IL-6によるリン酸化が低下しており、今後は症例を集積して詳細に検討を行いたい。

F. 研究発表

1. 論文

1. Minegishi Y, Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S,



図の説明

正常健康者とSTAT3変異患者 (G610D) の単核球を各々の刺激で15分刺激し、fixation buffer室温15分、Perm bufferIII 4度30分処理後にAnti-pSTAT3 (pY705)-APCで染色しFACScantoで解析した。

DNA binding domain のR335W変異では、どの過程においても異常が認められなかった。ポリモルフィズムの可能性もあり、臨床症状との詳細な照らし合わせが肝要と考えられる。

最後に、本研究によって高IgE症候群STAT3変異のシグナル経路の異常が判明したが、ドミナントネガティブ作用がどの過程でどのように働いているかは不明である。これらが明らかになり、この難治性疾患の治療が向上されることを期待する。

E. 結論

STAT3遺伝子変異部位によって、IL-6, IL-10, IL-21などの刺激によるシグナル経路にさまざまな違いが生じている。しかしながら、最終的な転写活性は低下しており、臨床症状がほぼ一致していることを反映しているものと思われる。また、R335W変異に関してはポリモルフィズムの可能性も考えられる。

Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Karasuyama H. Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J Exp Med.* 206:1291-301,2009.

2. 学会発表

1. 上松一永：免疫不全症の責任遺伝子と感染防御について 熊本免疫不全学術講演会、熊本 2011年2月

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

ヒト iPS 細胞からの血球分化系の構築と、 これを用いた先天性免疫不全症の病態解析

中畑 龍俊 (京都大学 iPS 細胞研究所)

研究要旨

先天性免疫不全症の病因解明、病態解析のため、血球分化系を構築した。ヒト iPS 細胞から血球の発生過程を模倣する形で中胚葉分化、血液、血管内皮共通の母細胞であるへマンジオブラストを経て各種血液細胞が産生される系を構築できた。さらに従来の OP9 フィーダー細胞を用いた血球分化系を改良し、無血清、フィーダー細胞を用いない培養法を確立した。分化させた単球、マクロファージ、樹状細胞は、貪食能、抗原提示能、機能的なサイトカイン産生などを認め、患者の病態解析に使用できる可能性が示唆された。今後、免疫不全症の疾患 iPS 細胞に応用し、本疾患の病態解析を進めていきたい。

A. 研究の目的

先天性免疫不全症は、易感染性を呈し、適切な診療を行わなければ致死的になりうる疾患であるが、早期の介入により予後の改善が期待できる。しかし、病因や発症のメカニズムが判明していない患者が多数存在し、これらの患者の病態解明が行えれば臨床的な貢献は大きいと考えられる。そこで我々は、先天性免疫不全症の iPS 細胞を用いた解析を行い、病態解明を行うことを目的としている。iPS 細胞は京都大学の山中らによって見出された多能性幹細胞で、皮膚や血球などから樹立することができ、様々な体細胞に分化させることができる。患者 iPS 細胞を各種免疫担当細胞に分化させ、その分化過程や形成された細胞の機能を正常人 iPS 細胞由来の細胞と比較、解析することにより、先天性免疫不全症の病態解明や創薬に向けた手がかりを目指す。

B. 研究方法

免疫不全症の iPS 細胞を用いた解析のためには、まず適切な血球分化系を構築する必要

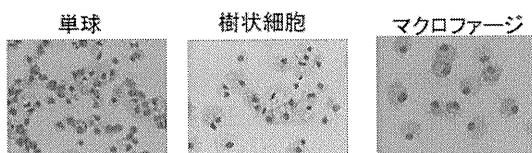
があるため、この課題に取り組んでいる。今年度は、より安定した分化系とするためフィーダーフリー、無血清の二次元培養法について検討した。

各種先天性免疫不全症患者皮膚生検材料より iPS 細胞の樹立を試みた。

C. 研究結果

昨年、OP9 フィーダー細胞を用いた血球分化系を報告したが、より安定した分化系を構築するため、フィーダーフリー、無血清の二次元培養で血球を分化させる系を開発した。ヒト iPS 細胞から血球の発生過程を模倣する形で中胚葉分化、血液、血管内皮共通の母細胞であるへマンジオブラストを経て各種血液細胞が産生される系を構築できた。様々な血球が産生されたが、自然免疫異常の解析に重要な単球、マクロファージ、樹状細胞は、貪食能、抗原提示能、機能的なサイトカイン産生などを認め、患者の病態解析に使用できる可能性が示唆された (図)。

図. 血清/フィーダーフリーでの
単球系細胞の段階的な分化



各種先天性免疫不全症患者の皮膚を生検により採取し、培養にて線維芽細胞のストックを作成した。iPS 細胞の樹立は、標準的手法である 4 因子 (Oct, Klf, c-Myc, Sox4) をレトロウイルスベクターやセンダイウイルスベクターで導入する方法でおこなった。この方法で樹立不能な例では最近開発されたエピゾーマルベクターを試みている。

D. 考察

以上のように血球分化系とその評価に成功している。さらに、自然免疫異常の解析に重要な単球、マクロファージ、樹状細胞を機能を持った細胞として誘導することが可能となった。各種先天性免疫不全症患者の iPS 細胞の解析を進めていきたい。

E. 結論

研究は順調に進捗している。今後は T 細胞の適切な分化を支持する系なども開発したいと考えている。また、他施設と連携して様々な先天性免疫不全症患者の疾患 iPS 細胞の樹立を進めていきたい。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 中畑龍俊：特別講演：iPS 細胞を用いた今後の医療。第 60 回日本医学検査学会 2011 年 6 月 5 日 東京国際フォーラム 東京
2. 中畑龍俊：特別講演：小児疾患における

iPS 細胞の応用。第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会 2011 年 11 月 25～27 日 (25 日) ベイシア文化ホール 前橋市

3. 中畑龍俊：教育講演：疾患特異的 iPS 細胞を用いた今後の医療。第 28 回日本医学会総会 2011 年 9 月 18 日 東京国際展示場 東京
4. 中畑龍俊、伊藤 守：再生医療の基礎研究に有用なヒト化動物。第 57 回日本実験動物学会総会 シンポジウム 3 (テーマ：再生医療の幕を開く動物実験) 2011 年 5 月 14 日京都テルサ 京都市
5. Nakahata T: Various clinical applications of human induced pluripotent stem cells. (Keynote Lecture) 2011 International Symposium on Recent Advances in Pluripotent Stem Cells & 7th Annual Meeting of Taiwan Society for Stem Cell Research 2011 年 10 月 1 日 Taipei Medical University Taipei, Taiwan
6. 栗屋智就、加藤竹雄、柴田 実、中畑龍俊、平家俊男：ヒト ES/iPS 細胞から骨格筋への分化誘導と筋疾患への応用。第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 12-14 日 (13 日) (口演) グランドプリンスホテル新高輪 東京
7. 田中孝之、斎藤 潤、西小森隆太、平家俊男、中畑龍俊：患者特異的 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群細胞モザイクでの病態の再現と解析。第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 14 日グランドプリンスホテル新高輪 東京
8. 酒井秀政、岡藤郁夫、西小森隆太、阿部純也、八角高裕、中畑龍俊、平家俊男：Langhans 型巨細胞の形成には CD40-CD40L シグナルが必須である。第 114 回日本小児科学会学術集会

2011年8月13日 グランドプリンス
ホテル新高輪東京

9. 田中尚子、井澤和司、斎藤 潤、作間未織、大嶋宏一、小原 収、西小森隆太、森本 剛、中畑龍俊、平家俊男：NLRP3 体細胞モザイクは CINCA 症候群の 25%以上に認められる。第 114 回日本小児科学会学術集会 2011年8月13日グランドプリンスホテル新高輪 東京
 10. Tsumura M, Okada S, Sakai H, Nishikomori R, Yasunaga S, Ohtsubo M, Heike T, Nakahata T, Takihara Y, Kobayashi M: Identification of a novel type of AD- STAT1 deficiency with mutations in the SH2 domain. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011年10月15日 名古屋国際会議場 名古屋市
 11. 中畑龍俊 : Derivation of Engraftable Myogenic Precursors from Murine ES/iPS cells and Generation of Disease-specific iPS cells from Patients with Duchenne Muscular dystrophy (DMD) and Other Diseases. 51st Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (第 51 回日本神経学会総会) Symposium 7 (The Forefront of Regenerative Medicine Research) 5月20-22日(22日) 東京国際フォーラム 東京都
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 発明の名称
多能性幹細胞から樹状細胞を製造する方法
 2. 国際出願日：2011年2月23日
 3. 国際出願番号：61/445,856
- 文献
1. Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Adachi S., Suemori H., Nakahata T., Heike T.: Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J. Cell. Physiol.* 226(5): 1283-1291, 2011.
 2. Heike T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Nakahata T.: Auto-inflammatory diseases-a new entity of inflammation. *Inflammation and Regeneration* 31: 125- 136, 2011.
 3. Kamio T., Ito E., Ohara A., Kosaka Y., Tsuchida M., Yagasaki H., Mugishima H., Yabe H., Morimoto A., Ohga S., Muramatsu H., Hama A., Kaneko T., Nagasawa M., Kikuta A., Osugi Y., Bessho F., Nakahata T., Tsukimoto I., Kojima S.: Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica* 96: 814- 819, 2011.
 4. Yoshida N., Yagasaki H., Hama A., Takahashi Y., Kosaka Y., Kobayashi R., Yabe H., Kaneko T., Tsuchida M., Ohara A., Nakahata T., Kojima S.: Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica* 96: 771-774, 2011.
 5. Kawagoe S., Higuchi T., Xing-Li M., Shimada Y., Dhimizu H., Fukuda T., Chang H., Nakahata T., Fukada S., Ida H., Ohashi T., Eto Y.: Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells derived from a murine model of Pompe disease and differentiation of Pompe-iPS cells into skeletal muscle cells. *Mol. Genet. Metab.* 104:

- 123-128, 2011 Sep-Oct. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.05.020.
6. Niwa A., Heike T., Umeda K., Oshima K., Kato I., Sakai H., Suemori H., Nakahata T., Saito M.: A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PloS ONE* 2011; 6(7): e22261.
 7. Murata Y., Yasumi T., Shirakawa R., Izawa K., Sakai H., Abe J., Tanaka N., Kawai T., Oshima K., Saito M., Nishikomori R., Ohara O., Ishii E., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc 13-4 protein. *Blood* 118: 1225-1230, 2011.
 8. Yahata N., Asai M., Kitaoka S., Takahashi K., Asaka I., Hioki H., Kaneko T., Maruyama K., Saido T.C., Nakahata T., Asada T., Yamanaka S., Iwata N., Inoue H.: Anti-Ab Drug Screening Platform Using Human iPS Cell-Derived Neurons for the Treatment of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 2011;6(9):e25788. Sep
 9. Kato I, Niwa A, Heike T, Fujino H, Saito MK, Umeda K., Hiramatsu H., Ito M., Morita M., Nishinaka Y., Adachi S., Ishikawa F., Tatsutoshi Nakahata T.: Identification of Hepatic Niche Harboring Human Acute Lymphoblastic Leukemic Cells via the SDF-1/ CXCR4 Axis. *PLoS ONE* 2011; 6(11): e27042.doi: 10.1371/journal.pone.0027042
 10. Tanaka N, Nishikomori R, Saito M, Izawa K, Sakuma M, Morimoto T, Kambe N, Watanabe S, Oshima K, Ohara O, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Arostegui J.I, Yague Jm Joost F, van Gijn M.E., SaintBasile G, Pontillo A, Kawai T, Yasumi T, Nakahata T., Horiuchi H, Heike T: High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome patients; the results of an international multi-center collaborative study. *Arthritis Rheum.* 63: 3625-3632, 2011.
 11. Hiejima E, Komatsu H, Takeda Y, Sogo T, Inui A, Okafuji I, Nishikomori R, Nakahata T., Fujisawa T: Acute liver failure in young children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis without macrophage activation syndrome: Report of two cases. *J. Pediatr. Child Health* in press.
 12. Sakai H., Okafuji I., Nishikomori R., Abe J., Izawa K., Kambe N., Yasumi T., Nakahata T., Heike T.: The CD40-CD40L axis and INF- γ play critical roles in Langerhans giant cell formation. *Int. Immunol.* In press.
 13. 中畑龍俊: iPS 細胞は長寿へ導く夢のタイムマシンである (特集 02 カラダを再生する画期的な細胞の誕生). *Back Up* 30:8-12, 2011.
 14. 中畑龍俊: 小児医療をめぐる最先端医学 iPS 細胞を用いた今後の医療. (特集 小児医療の最先端—これからの新たな展望—) *東京小児科医学会報* 29 (3) : 26-33, 2011.

15. 中畑龍俊：iPS 細胞の臨床応用の展望. BIO Clinica 26 (9):16-17 2011.
16. 中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子治療・個別化医療. 小児科 52 (12) :1743-1749, 2011.
17. 中畑龍俊：再生医療の進歩（Ⅱ再生医療の進歩）. 小児科診療 75(1):57-63, 2012.

原発性免疫不全症の病態解析

森尾 友宏 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)

満生 紀子 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)

高木 正稔 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)

水谷 修紀 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)

研究要旨

原発性免疫不全症における根治療法として、造血幹細胞移植は重要な位置を占める。本研究では同疾患群に対する臍帯血移植の成績を解析し、予後や合併症、予後に関与する因子を明らかにした。また HLA-Flow 法を用いて移植前後の精緻なキメリズム解析を行った。X連鎖無 γ グロブリン血症においては、感染症罹患時の好中球減少のメカニズムをタンパク導入や inhibitor 実験などを通じて明らかにした。

A. 研究目的

- 1) 原発性免疫不全症に対する臍帯血移植成績をまとめ、適切な移植前管理、ドナー選択、移植前処置、移植後管理方法を明らかにする。
- 2) HLA-Flow 法により移植前後のキメリズム解析を行い、移植後拒絶、混合キメラなどとの関係を明らかにする。
- 3) X連鎖無 γ グロブリン血症における好中球減少の分子機構を明らかにする。

B. 研究方法

- 1) 1998 年～2008 年に行われた臍帯血移植 88 症例につき、解析を行い、各疾患毎あるいは全体での 5 年生存率、生着、GVHD、5 年生存率に関与する因子などについて解析した。
- 2) 重症複合型免疫不全症 2 例において、ドナーとレシピエントで異なる HLA 抗原に対する単クローン抗体を用いて、多色フローサイトメータ測定を行うことにより、移植前のキメリズム解析(母親の細胞の混在)、移植後のキメリズム解析を行った。1 例においては骨髄において、骨髄前駆細胞

、骨髄単球系前駆細胞、赤芽球系前駆細胞などにゲーティングして、キメリズムを解析した(東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター、渡辺恵里、渡辺信和、中内啓光先生との共同研究)。

- 3) X連鎖無 γ グロブリン血症(X-linked agammaglobulinemia: XLA)患者の好中球を用いて、活性酸素産生能、刺激後アポトーシスを解析し、さらに NADPH oxidase 複合体の修飾や、Btk 会合分子の動態、シグナル伝達分子の局在などを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者検体を用いて解析を行う。実際には診療に役立つ情報が得られるが、採取量及び、採取時の苦痛には十分な配慮を行う。また遺伝子解析については各種指針に則り、患者個人情報の保護について十分な配慮を行う。本研究は医学部倫理審査委員会の承認をえて行われたものである。

C. 研究結果

- 1) 重症複合型免疫不全症(Severe

combined immunodeficiency: SCID)

(40)、Wiskott-Aldrich症候群(Wiskott-Aldrich syndrome: WAS) (23)、慢性肉芽腫症(7)、重症先天性好中球減少症(Severe congenital neutropenia:SCN)

(5)、その他の免疫不全症(13)における臍帯血移植データを解析した。5年生存率は69%であり、移植後100日までの主な死亡原因は感染症であった(17/19)。それ以降はGVHDによるものが5/7で認められた。多変量解析では移植前の感染症、前処置なし、HLA2抗原以上のミスマッチ、SCID, WAS, SCN以外の疾患が予後不良因子としてあげられ、今回の解析からは骨髄非破壊的前処置が骨髄破壊的前処置よりも優れている可能性が示唆された(ただし疾患により使用の偏りがあった)。3度以上の急性GVHDの頻度は8%、慢性GVHDの頻度は13%であった。

2) SCID(RAG1 異常症)において、リンパ球数の増加と Omenn 様の皮疹が認められ、解析を行ったところ母親由来の T 細胞、および本人由来の T 細胞の両者が増加していることが明らかになった。移植後母親由来の T 細胞及び本人由来の T 細胞は速やかに消失し、現在ドナー由来の造血系に移行している。もう 1 例の SCID 患者(Artemis 欠損症)においては、移植後経時的に末梢血及び骨髄において HLA-Flow 法でキメリズムを解析した。患者における B 細胞、T 細胞はドナー由来であるが、好中球や単球では約半数がレシピエント由来であることが明らかになった。このキメリズムは骨髄でも同様であり、多種の抗体の組み合わせにより骨髄前駆細胞レベルでのキメリズムを検討したところ、むしろレシピエント由来のものが多く、sorting して得た細胞の解析からは colony forming ability もまたレシピエント由来のものが高いことが明らかになった。

3) Btk は Tec キナーゼファミリータンパクに属し、骨髄での B 細胞分化に必須の分子である。その欠陥により、骨髄での B 細胞分化が障害され、ヒトにおける代表的な B 細胞欠損症である XLA が発症する。患者ではまた感染症を契機にして好中球減少を示すことがあるが、その原因は今まで不明であった。

今回の研究によって、Btk が好中球の活性化を調節する鍵となる分子であることが初めて明らかになった。Btk 欠損好中球は様々な刺激に対して、過剰な活性酸素(Reactive oxygen species: ROS)を産生し、ROS によりアポトーシスに至る。Btk 欠損好中球に組換え Btk タンパクを導入することにより ROS 産生やアポトーシスは正常化した。

好中球からの ROS 産生には NADPH oxidase 複合体の活性化が必要であるが、その最初の活性化段階には Mal (MyD88-adaptor like protein)の膜移行→PI(3)キナーゼの活性化が重要である。今回の検討で、Btk は通常は細胞質内で Mal (MyD88-adaptor like protein)と会合していて、その膜移行を阻止していることが明らかになった。Btk が欠損すると Mal は膜に移動し、PI(3)K と会合し、そのために NADPH oxidase 複合体が活性化準備状態になっていた。Btk は軽微な刺激では好中球が活性化しないように監視する分子のようである。Btk に欠陥があるとまた様々なチロシンキナーゼが活性化し、これらもまた Mal の膜移行に関与していることが明らかになった。

D. 考察

(1) 継続的なデータ収集と再解析により、原発性免疫不全症候群に対する臍帯血移植の予後と、予後に影響を及ぼす因子が明らかになった。本移植においては、非血縁間骨髄移植と同等の成績を示すのみなら

ず、移植時期の選定に融通性があり、今後血縁間 HLA 一致骨髄移植について有望な移植源となることが示唆された。一方待機できる症例においての、骨髄移植との優劣は今後の検討課題である。本移植においてはまた GVHD の意義は最小であり、HLA 一致度が高いこと (5/6 以上であること) が望ましいことが明らかになった。しかし移植を行えなかった症例や、前処置なし移植の経緯などを考えると、今後は移植対象疾患の早期診断 (新生児期スクリーニング) が重要となると考える。

(2) HLA-Flow 法は HLA 不一致移植であること、用意できる抗体に限りがあることなどの問題点があるが、SCID などの maternal T の混在症例や、移植後の複雑なキメリズムが想定される症例では極めて強力な解析手段であることが明らかになった。今回前駆細胞も抗原発現様式により分別したが、さらにそれらの細胞を sorting してコロニーアッセイを行うことにより、各細胞集団が、想定したとおりの特徴的な前駆細胞であることが明らかになった。

(3) XLA 患者における好中球減少の原因は今まで明らかではなく、マウスの実験からは骨髄の分化に異常があるとされてきた。しかし今回の検討からは、Btk 分子の transduction によって機能や細胞死が正常化しており、好中球減少は軽微な刺激によって ROS 産生→アポトーシスという、Btk が欠損している事実そのものによる現象であることが明らかになった。Btk が細胞質内に Mal をとどめているという事実や、Btk がチロシンキナーゼの活性化を抑制しているという事実も突き止められ、今後敗血症時の好中球減少などにおいても Btk の導入などにより治療介入できる可能性を示唆している。

E. 結論

原発性免疫不全症候群に対する臍帯血移植成績の解析、移植前後の flow cytometer を用いたキメリズム解析、XLA 患者における好中球機能減少の原因探索などの領域で成果を上げた。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

国外

Morio T. Dissection of Common Variable immunodeficiency With Distinct Phenotype. 2011 Pediatric Academic Societies & Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting Denver, Colorado, USA. 2011.4.30 - 5.3

国内

1. 大川哲平、遠藤明史、富澤大輔、今井耕輔、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀. IKBA 遺伝子異常 (外胚葉形成不全免疫不全症) に対し非血縁者間骨髄移植を施行した 1 例. 第 5 回日本免疫不全症研究会, 東京, 2012 年 1 月 21 日
2. 磯田健志、高木正稔、森尾友宏、水谷修紀、河本 宏. ATM 欠損早期 T 細胞分化におけるリンパ球分化異常と発がんへの分岐点を可視化. 第 5 回日本免疫不全症研究会, 東京, 2012 年 1 月 21 日
3. 力石 健、北沢 博、森尾友宏、峯岸正好、笹原洋二、土屋 滋: 悪性リンパ腫を合併した成人期 Wiskott- Aldrich 症候群患者に対する骨髄非破壊的前処置による造血細胞移植の経験、第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋、2011 年 11 月 25 日-27 日

4. 磯田健志、高木正稔、朴今 花、増田喬子、伊川友活、東 みゆき、森尾友宏、河本 宏、水谷修紀：遺伝性毛細血管拡張性小脳失調症の Double Negative 期における T リンパ球分化以上と発がんメカニズムの関係、第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋、2011 年 11 月 25 日-27 日
 5. 町田静香、富澤大輔、高木正稔、金子節子、金親あや乃、原田浩之、大川哲平、遠藤明史、梶原道子、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：毛細血管拡張性運動失調症の女兒に発症した diffuse large B-cell lymphoma に対する rituximab 併用化学療法の実験、第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋、2011 年 11 月 25 日-27 日
 6. 東 良紘、長谷川俊史、平野玲史、橘高節明、森尾友宏、市山高志：肺膿瘍をきたした高 IgE 症候群の 1 男児、第 43 回日本小児感染症学会総会・学術集会、第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋、2011 年 11 月 25 日-27 日
 7. 東 良紘、長谷川俊史、平野玲史、橘高節明、森尾友宏、市山高志：肺膿瘍をきたした高 IgE 症候群の 1 男児例、第 43 回日本小児感染症学会総会・学術集会、岡山、2011 年 10 月 29 日-30 日
 8. 田中沙季、松原知代、三浦真梨子、田中 登、鈴木恭子、大日方薫、清水俊明、森尾友宏：血球貧食症候群を呈した重症複合型免疫不全症の乳児例、第 43 回日本小児感染症学会総会・学術集会、岡山、2011 年 10 月 29 日-30 日
 9. 渡辺恵理、渡辺信和、森尾友宏、安部泰子、原 寿郎、中内啓光：重症複合免疫不全症に対する前処置軽減臍帯血移植後の混合キメラ病態の解析、第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋、2011 年 10 月 14 日-16 日
 10. 森尾友宏：分類不能型免疫不全症の病態解明へのアプローチ、第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会、東京、2011 年 9 月 17 日
 11. 磯田健志、高木正稔、森尾友宏、水谷修紀：毛細血管拡張性小脳失調症 (AtaxiaTelangiectasia) における細胞分化異常の解析、第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会、東京、2011 年 9 月 15 日
 12. 高木正稔、篠田邦大、朴今 花、満生紀子、森 真理、松田和之、村松秀城、土居崎小夜子、長澤正之、森尾友宏、笠原善仁、小池健一、小島勢二、高尾 明、Oliveira Joao B、水谷修紀：RAS associated ALPS like disease(RALD)の提唱、第 114 回日本小児科学会学術集会 教育セミナー、東京、2011 年 8 月 12 日
 13. 森尾友宏：T 細胞系免疫異常症における遺伝子診療、第 18 回日本遺伝子診療学会大会、第 35 回日本遺伝子カウンセリング学会学術集会、第 17 回日本家族性腫瘍学会学術集会、京都、平成 23 年 6 月 16 日～19 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

B・NK・DC・単球欠損を伴う GATA2 異常症の病態に関する検討

本間 健一	(防衛医科大学校医学研究科小児科学)
今井 耕輔	(東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)
釜江智佳子	(防衛医科大学校医学研究科小児科学)
石田 宏之	(松下記念病院小児科)
伊藤 嘉規	(名古屋大学大学院医学系研究科小児科)
小島 勢二	(名古屋大学大学院医学系研究科小児科)
横須賀とも子	(横浜市立大学附属病院小児科)
金兼 弘和	(富山大学附属病院小児科)
笹原 洋二	(東北大学大学院医学系研究科発生発達医学講座小児病態学)
森尾 友宏	(東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)
渡辺 信和	(東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター病態解析領域)
小原 収	(かずさ DNA 研究所、理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター)
古関 明彦	(理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター)
河本 宏	(理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター)
大嶋 宏一	(京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA))
斉藤 潤	(京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA))
中畑 龍俊	(京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA))
野々山 恵章	(防衛医科大学校医学研究科小児科学)

研究要旨

樹状細胞(DC)は、自然免疫と獲得免疫の橋渡しをしている重要な細胞であるが、最近までその欠損を伴う、原発性免疫不全症(PID)は見いだされていなかった。我々は、PIDJを介して紹介された患者について、2010年2月より FACS 解析に DC を含めて 118 例解析し、そのうちの 4 例で Myeloid DC (mDC)、Plasmacytoid DC (pDC)がともに欠損している患者を見出した。2 例で Exome 解析を行い、GATA2 異常が原因であることを明らかにした。さらに国内 6 例で GATA2 異常があることを確定し、その臨床像を解析した。

GATA2 異常症は 2011 年に初めて報告され、B.NK.DC,単球欠損を伴い、T 細胞は正常とされている。我々は TREC、T 細胞分画、サイトカイン産生を解析することで、本疾患が T 細胞異常を合併していることも新たに解明した。

A. 研究の目的

樹状細胞(DC)は、自然免疫と獲得免疫の橋渡しをしている重要な細胞であるが、最近までその欠損を伴う、原発性免疫不全症(PID)は見いだされていなかった。

原因不明の NK 細胞減少～欠損症例が散見されることから、成熟 NK 細胞の分化維持に重要な IL-15 の産生を主として担う DC の欠損が合併している可能性も考え、2010年2月より当科紹介患者全例で DC も測定し、樹状細胞欠損症を同定することとした。

B. 研究方法

2010年2月-2011年に当科で紹介のあった国内原発性免疫不全症患者 118例を対象とした。FACSにてT, B, NK, Mo, pDC (Plasmacytoid DC), mDC (Myeloid DC)を検討した。

Exome解析は次世代シーケンサーを用い、患者DNAを末梢血より抽出して行い、GATA2変異はキャピラリーシーケンサーで確認した。

TREC, KREC解析は既報告の方法で、患者末梢血を用い、real time PCRにて定量的に測定した。TCRレパートリー解析はFACSにて行った。

サイトカイン産生能は、PMA+CaIで患者末梢血単核球を刺激し、FACSで細胞内サイトカインを測定する方法で解析した。

C. 研究結果

1. 国内 GATA2 異常症

FACS解析により、4症例で末梢血 pDC, mDC が完全欠損していることを見出した。この中の2症例で Exome 解析を行い、GATA2 変異を見出した。キャピラリーシーケンスでも変異を確認した。

さらに、現時点まで、国内 GATA2 異常症 6例を同定した。4例で B・NK・DC・単球欠損を伴っていた。2例は親子例で、こうした細胞分画の欠損はないものの骨髄異形成症候群(MDS)を発症していた。

2. FACS 解析

GATA2異常症の患者2例のFACS解析を行った。CD19陽性B細胞は0.18%/lymph、0.8%/lymphと2例とも欠損しており、CD3陰性 CD16 陽性 CD56 陽性 NK 細胞も0.06%/lymph、0.16%/lymphと欠損していた。さらに、lineage 陰性 HLA-DR 陽性 CD123 陽性の pDC、lineage 陰性 HLA-DR 陽性 CD11c 陽性の mDC は、双方とも

0.00%/WBCと欠損していた。また、単球も0.72%、0.55%/WBCと減少していた。

T細胞分画はCD4/CD8比0.24、0.42と逆転を認めた。CD4陽性 CD45RA陽性 naive T細胞は72.5%、35.8%/CD4陽性T細胞認めた。さらに、naive T細胞の中でもTREC⁺陽性細胞といわれるCD4陽性 CD45RA陽性 CD31陽性 thymic naive T細胞が、19.2%、22.8%/CD4陽性T細胞と減少していた。Tregを含むと考えられるCD25陽性 CD127弱陽性T細胞は9.1%、1.8%と1例で減少していた。

CD4陽性T細胞のIFN- γ 、IL-4、IL-17産生能をPMA+CaI刺激により解析し、産生異常を見出した。T細胞の分化異常を認めたことから、TREC⁺を測定したところ、両患者で測定感度以下であった。

その一方でCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞のTCR Repertoireの多様性は保たれていた。

3. 臨床像の解析

GATA2異常があり、かつB.NK.DC.単球減少症を示した4例中、3例でVZV重症感染の既往があり、2例で持続感染を認めた。また、VZV重症感染の既往のない1例では、非抗酸菌感染症の既往を認めた。また、1例で下肢のリンパ浮腫を合併し、Emberger症候群の表現形をとった。GATA2異常の全6名中4名で骨髄異形成症候群を発症していた。2名は父子例で家族性骨髄異形成症候群と考えられた。

D. 考察

GATA2は、ヒト造血系において、未分化前駆細胞の増殖に必須の転写因子であり、ヒトGATA2ヘテロ異常により造血幹細胞分化異常を来すと考えられる。

これまでの免疫不全症の解析でTREC陰性患者では、T細胞新生能低下を反映してnaive T細胞は減少していた。しかし、

GATA2 異常患者では、naive T 細胞率は正常であった。これは、GATA2 異常症では、造血障害のため T 細胞新生能が低下していること、末梢血 CD45RA 陽性 T 細胞中の CD31 陰性細胞が多く、自己増殖により TREC が低い Central naive T 細胞に偏倚していること、樹状細胞などの抗原提示細胞の減少により、CD45RO 陽性メモリー T 細胞への分化障害を来していることなどによるのではないかと考えられた。また、既報告で GATA2 異常による T 細胞分画異常についての詳細な報告はないが、今回の解析により GATA2 異常症患者で T 細胞のサイトカイン産生能が低下していたことから、GATA2 遺伝子が T 細胞機能分化に関わっている可能性も考えられた。

E. 結論

B. NK. DC. 単球欠損を伴う PID 患者、および家族性 MDS 患者から、GATA2 異常症を国内で 6 例同定した。

B. NK. DC. 単球欠損を伴う GATA2 異常症 2 例において、T 細胞は存在したが、TREC_s 陰性、サイトカイン産生異常を認め、T 細胞の分化異常、機能異常が示唆された。

GATA2 変異で、易感染性、骨髄異形成症候群、DC 欠損、B 細胞欠損、NK 欠損、単球欠損、Emberger 症候群など多彩な症状を示すことが示された。今後、さらに症例を集積し、*in vitro* の分化実験などにより病態生理を明らかにしたい。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Takizawa M, Ishiwata T, Kawamura Y, Kanai T, Kurokawa T, Nishiyama M, Ishida H, Asano Y, Nonoyama S. Contribution of Sarco-plasmic Reticulum Ca²⁺Release and

Ca²⁺ Transporters on Sarcolemmal Channels to Ca²⁺ Transient in Fetal Mouse Heart. *Pediatr Res.* 2011, 69: 306-311.

2. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsui N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarstrom Q, Hammarstrom L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol.* 2011, 128: 223-225.

3. Matsumoto H, Hatanaka D, Ogura Y, Chida A, Nakamura Y, Nonoyama S. Severe human herpesvirus 6 associated encephalopathy in three children: Analysis of cytokine profiles and the carnitine palmitoyltransferase 2 gene. *Pediatr Infect Dis J.* 2011, 30:999-1001

4. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Fischer A, Franco JL, Geha RS, Hammarström L, Nonoyama S, Notarangelo LD, Ochs HD, Puck JM, Roifman C, Seger R, Tang MLK. Primary Immuno- deficiency Diseases: an update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Front. Immun.* 2011. 2:1-26

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

家族性血球貪食性リンパ組織球症 2 型の CD8⁺ T 細胞における CD5 発現低下

和田 泰三 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)
榑原 康久 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)
東馬 智子 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)
笠原 善仁 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)
谷内江昭宏 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

研究要旨

家族性血球貪食性リンパ組織球症 2 型 (FHL2) は、パーフォリンの異常に起因する。細胞傷害活性の低下によりウイルス感染細胞等の除去が制限され、リンパ球やマクロファージの異常活性化と高サイトカイン血症が引き起こされる。今回、FHL2 の 4 症例において、高サイトカイン血症が存在する急性期に、CD5 発現が低下した異常な活性化 CD8⁺ T 細胞が共通して存在することを見出した。同細胞の比率は、炎症の程度と相関し、生存例では治療とともに減少した。最近我々は、同様の細胞集団が EB ウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症において特徴的に認められ、それらが EBV 感染 CD8⁺ T 細胞であることを報告している。以上より、活性化 CD8⁺ T 細胞の CD5 発現低下は、血球貪食性リンパ組織球症でみられる制御不能な異常活性化と関連している可能性があると考えられた。

A. 研究の目的

血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) は、遺伝性と二次性の 2 つに分類される。遺伝性 HLH には、細胞傷害性顆粒やその放出に関連した異常による家族性 HLH (FHL) や一部の原発性免疫不全症が含まれる。一方、二次性 HLH は、感染症、悪性腫瘍や膠原病に続発する。HLH の基本病態は、CD8⁺ T 細胞を中心とするリンパ球やマクロファージの異常活性化と高サイトカイン血症と考えられている。最近我々は、代表的な二次性 HLH である EB ウイルス (EBV) 関連 HLH において、EBV 感染 CD8⁺ T 細胞のクローン性増殖と CD5 発現低下を伴う異常活性化が病態に関与していることを報告した。本研究では、最も頻度の高い遺伝性 HLH である FHL2 (パーフォリン異常症) 4 例において、CD5 発現を含む免疫学的解析を行い、その特徴と病態との関連を評価した。

B. 研究方法

対象は、FHL2 の 4 例である。症例 1 と症例 2 は新生児期、症例 3 は 2 歳時、症例 4 は 3 ヶ

月時に発症した。各症例とも典型的な HLH の臨床所見を示した。症例 1 と症例 3 は、それぞれ 6 ヶ月、2 歳時に造血幹細胞移植を受け、生存中である。症例 2 は日齢 12 に死亡した。症例 4 は造血幹細胞移植の待機中である。

NK 細胞中におけるパーフォリン発現の解析は、抗 CD3 抗体、抗 CD56 抗体、抗パーフォリン抗体を用いて、フローサイトメトリーにより解析した。パーフォリン遺伝子解析は、末梢血より抽出したゲノム DNA を用いて、ダイレクトシーケンシング法により行った。末梢血の T 細胞レパトア解析は、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体ならびに各種抗 TCR V β 抗体を用いて、各 T 細胞亜群中の V β レパトア分布をフローサイトメトリーにより定量した。血中の各種炎症性サイトカインは、市販の ELISA キットを用いて定量した。

C. 研究結果

1) パーフォリン解析

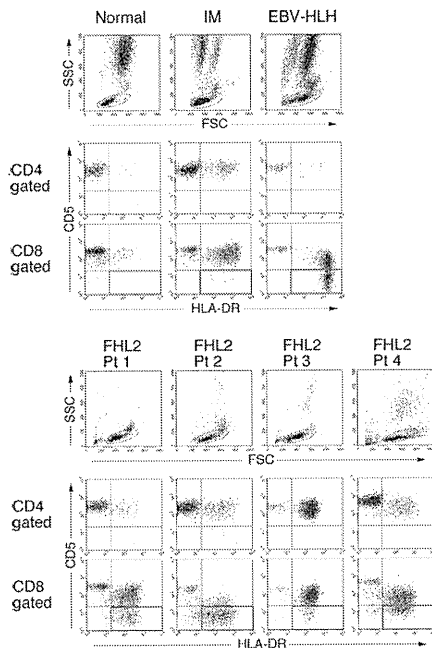
いずれの症例でも NK 細胞におけるパーフォリン発現は対照に比べ著しく低下していた。パ

一フォリン遺伝子解析の結果、症例 1 は L364fs と Y521C、症例 2 は P333fs と L364fs、症例 3 は Q416X と T450M の変異を、それぞれ複合ヘテロ接合性に有していた。症例 4 は L364fs をホモ接合性に有していた。

2) CD8⁺T 細胞における CD5 発現低下

症例 1~4 の急性期すべてにおいて、末梢血中に CD5 発現が低下し HLA-DR を強く発現する活性化 CD8⁺T 細胞が、それぞれ 22.1%、58.3%、8.8%、31.2%と増加していた（正常対照 1.1±1.3%）（図 1）。いずれの症例もネオプテリン、IL-6 や可溶性 TNF レセプターなどの炎症性サイトカインが高値を示し、強い炎症状態にあると考えられた。経過を追うことができた症例 1 と 4 では、治療によりフェリチンや炎症性サイトカインが減少していくのに伴い、CD5 発現の低下した CD8⁺T 細胞比率も低下した。一方、症例 2 では炎症性サイトカイン値はむしろ増悪し、同細胞比率も高いまま推移した。死亡直前に T 細胞レパトア解析を施行したところ、CD5 陽性の CD8⁺T 細胞が多クローン性を維持していたのに対し、CD5 発現の低下した CD8⁺T 細胞は、オリゴクローン性に増殖していることが示された。

図 1. CD8⁺T 細胞における CD5 発現低下



D. 考察

最近我々は、EBV 関連 HLH において、クローン性に増殖した EBV 感染 CD8⁺T 細胞が、CD5 発現の低下した活性化 CD8⁺T 細胞として同定できることを報告した。同様の特徴を示す細胞が FHL2 の急性期においても共通して認められることが、本研究により明らかになった。汎 T 細胞マーカーとして知られる CD5 は単鎖糖タンパクで、細胞間認識やシグナル伝達に negative regulator として機能するとされる。CD5 ノックアウトマウスの T 細胞では、TCR 刺激に対し過剰反応を示したことが報告されている。したがって、EBV 関連 HLH や FHL2 でみられた CD5 発現低下は、CD8⁺T 細胞の異常活性化、増殖を助長している可能性がある。実際、両疾患でみられた CD5 発現の低下した CD8⁺T 細胞の比率は、炎症の程度と相関していた。

以上より、活性化 CD8⁺T 細胞における CD5 発現低下は、EBV 関連 HLH のみならず FHL2 でも認められ、HLH の基本病態と関連している可能性が考えられた。今後、他の原因による HLH の CD8⁺T 細胞においても、CD5 発現を解析し、CD5 発現と HLH の病態との関連をさらに検討する予定である。

E. 結論

FHL2 の CD8⁺T 細胞において、CD5 発現の低下した異常な細胞を見出した。この特徴は EBV 関連 HLH でも認められ、両疾患に共通する異常免疫応答が存在する可能性が示唆された。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) 和田泰三、榊原康久、東馬智子、他. 第 114 回日本小児科学会学術集会. 2010 年 8 月 12-14 日. 東京
- 2) Wada T, Sakakibara Y, Shimizu M, et al.

Increased subpopulation of CD8⁺T cells with CD5 down-regulation in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 2. XIVth Meeting of the European Society of Immunodeficiency. October 6-9 2010, Istanbul/ Turkey.

3) Sakakibara Y, Wada T, Toga A, et al. Increased subpopulation of CD8⁺T cells with CD5 down-regulation in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 2. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research. April 30- May 3 2011, Denver/ USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

参考文献

[1] Karandikar NJ, Kroft SH, Yegappan S, et al. Unusual immunophenotype of CD8⁺ T cells in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 104 (2004) 2007-9.

[2] Toga A, Wada T, Sakakibara Y, et al. Clinical significance of cloned expansion and CD5 down-regulation in Epstein-Barr Virus (EBV)-infected CD8⁺ T lymphocytes in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Infect Dis* 201 (2010) 1923-32.

細胞核に局在する WASP 蛋白質の機能解析

笹原 洋二 (東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学)
Looi Chung Yeng (東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学)
渡辺 祐子 (東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学)
内山 徹 (東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学)
久間木 悟 (みやぎ県南中核病院小児科)
土屋 滋 (東北文化学園大学)

研究要旨

これまで WASP の機能解析の局在は細胞膜と細胞質が中心であったが、近年 T 細胞核内で WASP の有無が Th1/Th2 分化関連遺伝子群の転写調節を制御する事が報告されている。今回我々は、骨髓球系細胞株を用い、野生型及び XLN 関連恒常的活性化変異 WASP の局在と細胞核内での機能を解析した。野生型と比較し、恒常的活性化変異 WASP はチロシンリン酸化が亢進し、より細胞核内へ局在した。ChIP 法にて WASP は DNA と共沈し、免疫沈降法にて p54nrb、RNA polymerase II と複合体を形成した。また microarray 法により WASP 活性化変異により骨髓球系細胞分化関連分子群の発現の差異が観察され、ChIP on chip 法にてこれら遺伝子群転写調節領域への WASP 結合親和性が異なることが示唆された。以上より、WASP は骨髓球系の細胞核内において遺伝子転写調節因子として機能することが示された。

A. 研究の目的

Wiskott-Aldrich 症候群(WAS)は、多様な免疫不全、難治性湿疹、血小板減少を 3 主徴とした X 染色体連鎖性原発性免疫不全症であり、Xp11.22-p11.23 に存在する WASP 遺伝子が原因遺伝子である。WASP 蛋白質は主に T 細胞活性化やアクチン重合化に重要な役割を果たす。また、恒常的活性化変異は自身を活性化型 3 次構造へ変化させ、X 染色体連鎖性好中球減少症 (X-linked severe congenital neutropenia; XLN) や骨髓異形成症候群 (myelodysplastic syndrome; MDS) の原因となる。これまで WASP の機能解析の局在は、細胞膜と細胞質内が中心であったが、近年 T 細胞内での WASP の有無が Th1/Th2 分化関連遺伝子群の転写調節因

子として機能することが報告されている (Vyas Y, et al, Science Tras Med, 2011)。

そこで今回我々は、WASP を発現していない骨髓球系細胞株 K562 を用いて、野生型および X-linked neutropenia (XLN)関連恒常的活性化変異 WASP の局在と細胞核内での機能を解析し、WASP が骨髓球系細胞において遺伝子発現調節因子として機能するかにつき解析する事を目的とした。

B. 研究方法

主に細胞株および WASP を発現していない骨髓球系細胞株 K562 を用いて、免疫沈降法と Western blot 法、恒常的および一過性遺伝子導入、蛍光イメージング、ChIP 法、microarray 法及び ChIP on

chip 法などの分子生物学的手法を用いて、WASP の細胞核への局在、細胞核内における機能を解析した。

C. 研究結果

- 1) 野生型 WASP と比較し、恒常的活性化変異 WASP(L270P、S272P、I294T)はいずれも Lck あるいは Fyn によるチロシンリン酸化が亢進した (図 1)。
- 2) WASP は NLS (Nuclear Localization Signals) をもっており、open conformation への 3 次構造の変化により、NLS が露出する可能性がある。WASP は細胞核内にも発現していることが GFP 付加 WASP の局在から明らかとなった。恒常的活性化変異 WASP(L270P)は常に open conformation となるが、野生型と比較しより細胞核内へ局在した (図 2)。
- 3) WASP を発現していない骨髓球系細胞株 K562 に野生型および恒常的活性化変異 WASP(L270P)を恒常的に遺伝子導入した。この系において ChIP 法を行い、WASP は DNA (GAPDH promoter

region)と共沈することが明らかとなった。また、その程度は野生型よりも恒常的活性化変異 WASP(L270P)においてより強く認められた (図 3)。

4)免疫沈降法にて、細胞核内の WASP は p54nrb 及び RNA polymerase II と複合体を形成することが明らかとなった (図 4)。

5) K562 に野生型および恒常的活性化変異 WASP(L270P)を恒常的に遺伝子導入した複数のクローンを microarray 法にて遺伝子発現様式を解析したところ、複数の遺伝子発現に差異が認められた。野生型 WASP と比較し、恒常的活性化変異 WASP を導入したクローンでは G-CSF 受容体、Runx1 の発現が低下し、逆に CD45 の発現は亢進していた (図 5)。この遺伝子発現の差異は、各々の蛋白質レベルでの解析でも確認された。

6) ChIP on chip 法を用いた解析では、これら遺伝子群の転写調節領域への WASP 結合親和性が異なることが観察された (図 6)。

図 1 恒常的活性化変異WASPは野生型と比較し、Lck, Fynによるチロシンリン酸化が亢進する

