

ップも行い、TREC_s の回復は臍帯血移植でも骨髄移植と同等であり、KREC_s に関しては臍帯血移植に advantage があることが明らかになった。

MAL による好中球の活性化制御は、BTK 欠損症にとどまらず、今後好中球の異常活性化状態における治療の一助になることが期待される。

E. 結論

免疫不全症の適切な診断に向けた基盤を確立した。それをもとに責任遺伝子未同定の抗体産生不全症に対して全エクソン解析を実施した。昨年度に引き続き BTK-MAL の好中球機能制御に関する検討を進めた。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報はない。

G. 研究発表

1) 論文発表

(英文論文)

1. Isoda T, Mitsuiki N, Ohkawa T, Kaneko S, Endo A, Ono T, Aoki Y, Tomizawa D, Kajiwarra M, Araki S, Nagasawa M, Morio T, Takagi M, Mizutani S: Irreversible Leukoencephalopathy After Reduced-intensity Stem Cell Transplantation in a Dyskeratosis Congenita Patient With TINF2 Mutation. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2012 (Epub ahead of print)
2. Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsuiki N, Ohara O, Komada Y: A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* 2012 (Epub ahead of print)
3. Shimizu M, Kanegane H, Wada T, Motoyoshi Y, Morio T, Candotti F, Yachie A: Aberrant glycosylation of IgA in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 (Epub ahead of print)
4. Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S: Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2012 (Epub ahead of print)
5. Isoda T, Takagi M, Piao J, Nishii R, Masaki S, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S: Process for immune defect and chromosomal translocation during early thymocyte development lacking ATM. *Blood.* 120: 789-99, 2012
6. Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T: Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan. *Clinical Endocrinol.* 77: 628-34, 2012
7. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, Morio T: Btk negatively regulates ROS production and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nature Immunol.* 13: 369-78, 2012

8. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan W, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E: Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 119: 2376-84, 2012
 9. Sato R, Iizumi S, Kim E-S, Honda F, Lee S-K, Adachi N, Koyama H, Mizutani S, Morio T: Impaired cell adhesion, apoptosis, and signaling in WASP-gene disrupted Nalm-6 pre-B cells and recovery of cell adhesion using a transducible form of WASp. *Int. J. Hematol.* 95: 299-310, 2012
(著書・総説)
 1. 森尾友宏：(分担執筆) 第21章 先天性免疫不全症 Wiskott-Aldrich症候群、最新ガイドライン準拠 小児科診断・治療指針、遠藤文夫編、p840、中谷書店、東京、2012年9月
 2. 森尾友宏：(分担執筆) 第19章 リウマチ性疾患 アレルギー性疾患 先天性補体欠損症 免疫不全症、赤林朗、大内尉義、黒川峰夫、小池和彦、辻省次、長瀬隆英、藤田敏郎、森屋恭爾、山本一彦編、門脇孝、永井良三編、カラー版内科学、p1333、西村書店、東京、2012年7月
 3. 森尾友宏:先天性免疫不全症の病態と思春期以降のマネジメント *血液内科* 65 (4) 599-607, 2012.
 4. 森尾友宏:【クローズアップ感染症】〈感染性疾患の基礎的な知見の進歩・概念の変化〉感染症と自然免疫 *小児内科* 44 (7) 959-965, 2012.
 5. 森尾友宏:【サイトカインのすべて(完全改訂版)】 サイトカイン投与およびサイトカイン抑制による治療 免疫不全症 *臨床免疫・アレルギー科* 57 : Suppl. 21 838-844, 2012.
 6. 森尾友宏:原発性免疫不全症における臨床遺伝学 T細胞系免疫異常症における遺伝子診療 *日本遺伝カウンセリング* 33 (1) 49-53, 2012.
 7. 森尾友宏:分類不能型免疫不全症 *日本臨床* 70:2011-2021, 2012.
 8. 森尾友宏:分類不能型免疫不全症 Update *日本臨床免疫学会雑誌* 35:14-22, 2012.
- 2) 学会発表
1. Morio T: Primary Immunodeficiencies due the Defect in Signaling Molecules. 2012 KSMCB Annual Meeting. Seoul, Korea. Oct 2012
 2. Isoda T, Takagi M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S: Visualization of chromosomal translocation and early T-cell development failure in ATM deficiency. 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. Oct 2012
 3. Mitsuiki N, Oshima K, Imai K, Ohara O, Morio T, Mizutani S: Genetic analysis for 207 cases with primary immunodeficiency (PID) consulted to a single center through PID network in Japan (PIDJ) in 5 years (2007-2011). 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. Oct 2012
 4. 森尾友宏: Multivirus specific cytotoxic T-cells for post-transplant virus infection. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会(シンポジウム)、横浜、2012年11月30日-12月2日

5. 森尾友宏：細胞内寄生菌にたいする感染防御機構、第44回日本小児感染症学会総会・学術集会（教育セミナー）、北九州、2012年11月23日
6. 森尾友宏：先天性免疫不全症および血液系腫瘍において診断の手がかりとなる皮膚病変と、診断への道筋、第36回日本小児皮膚科学会学術大会（シンポジウム）、前橋、2012年7月15日

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

Hypomorphic *XIAP* 変異による X 連鎖低ガンマグロブリン血症における免疫学的特徴

西田直徳¹⁾、Yang Xi¹⁾、金兼弘和²⁾、宮脇利男¹⁾

1) 富山大学大学院医学薬学研究部小児科学、2) 富山大学附属病院小児科

研究要旨

X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) は *SH2D1A* 変異による XLP1 と *XIAP* 変異による XLP2 がある。今回 *XIAP* 遺伝子の Glu1349del 変異を有する患者では、低ガンマグロブリン血症を来していたが、血球貪食性リンパ組織球症、脾腫、腸炎は認められず、XLP2 とは異なる可能性が示唆された。Glu1349del を有する患者ではメモリーB 細胞の減少、Tfh 細胞、免疫グロブリン産生能の低下を認めたが、アポトーシスによる機能解析では健常者と明らかな違いは認められず、免疫学的にもその他の変異を有する XLP2 と異なる特徴を有していた。日本人 170 名中 6 名 (3.6%) に Glu1349del 変異が認められ、日本人固有の SNP と考えられる。Glu1349del 変異により XLP2 とは異なり、X 連鎖低ガンマグロブリン血症を示す可能性が考えられ、付加的原因がないかをさらに探索中である。

A. 研究目的

X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) は *SH2D1A* 変異による XLP1 と *XIAP* 変異による XLP2 があり、臨床像は血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) のみならず、低ガンマグロブリン血症、悪性リンパ腫など多岐にわたる。今回特定の *XIAP* 変異を有する患者が低ガンマグロブリン血症を来していた。これまで当教室では 12 家系 18 例の XLP2 を同定しているが、Glu1349del 変異を有する患者が 4 家系 5 例認められた。そこで Glu1349del 変異を有する患者における免疫学的特徴を明らかにすることを目的として、本研究を行った。

B. 研究方法

Glu1349del 変異を有する患者ならびにその他の *XIAP* 変異を有する患者家族から文書による同意を得て、ヘパリン加静脈血を得た。単核球に分離後、リンパ球表面マーカー、B 細胞サブセット (ナイーブ、メモリー分画)、CXCR5+CD45RA-C4+ T follicular helper (Tfh) 細胞、IL-21+IL-4+CD40L または CpG+CD40L 刺激による *in vitro* 免疫グロブリン産生能、抗 CD95

抗体または TRAIL 刺激によるアポトーシスならびに activation-induced cell death (AICD) を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト検体を用いて解析を行うものであり、検体量および採取時の苦痛には十分な配慮を行った。遺伝子解析については各種指針を遵守して、患者個人情報の保護について十分な配慮を行った。

C. 研究結果

Glu1349del 変異を有する患者では低ガンマグロブリン血症を認めたが、XLP2 に特徴的とされる HLH、脾腫、腸炎は認められなかった。XLP2 では末梢血リンパ球における *XIAP* 蛋白の発現を認めることが多いが、Glu1349del 変異を有する患者では *XIAP* 蛋白の発現は正常であった。

リンパ球サブセット解析では Glu1349del 変異を有する患者ならびにその他の変異を有する患者で CD16+CD56+NK 細胞が健常者に比べて有意に低下していたが、これら 2 群での有意差は認められなかった。B 細胞は CD27-IgD+ のナイーブ

B細胞と CD27+IgD-のメモリーB細胞に分けられるが、Glu349del 変異を有する患者ではその他の変異を有する患者ならびに健常者に比べて有意にメモリーB細胞の減少を認めた (図1)。

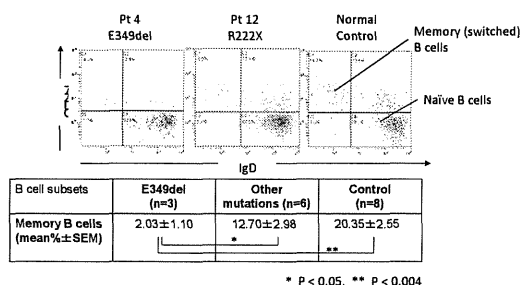


図1 B細胞サブセット

Glu349del 変異を有する患者ならびにその他の変異を有する患者は健常者に比べて有意に Tfh の減少を認めた (図2)。

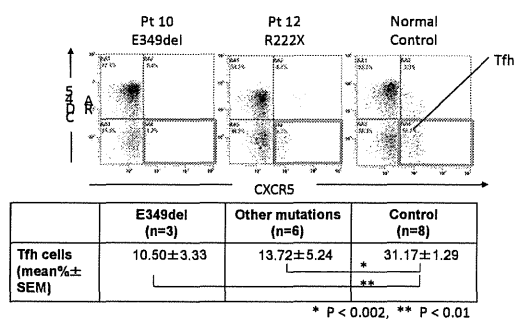


図2 CXCR5+CD45RA-C4+ T follicular helper (Tfh)細胞

免疫グロブリン産生能はいずれの刺激系においても XLP 患者では産生能の低下が認められたが、IL-21+IL-4+CD40L 刺激では有意差なく、CpG+CD40L 刺激では Glu349del 変異を有する患者では健常者に比べて有意に低下していた (図3)。

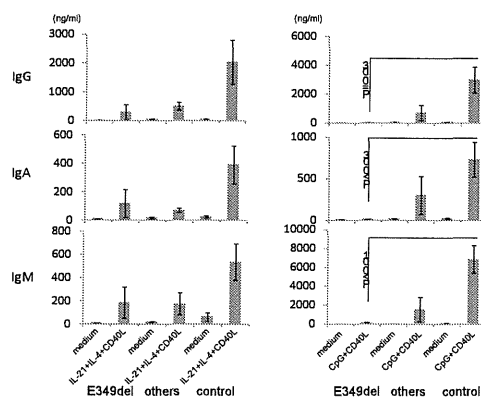


図3 *in vitro*免疫グロブリン産生能

アポトーシスによる機能解析を行ったところ、いずれの刺激系でも Glu349del 変異を有する患者では健常者に比べて明らかな差は認められなかった。TRAIL 刺激ではその他の変異を有する患者でのみ有意にアポトーシスが亢進していた (図4)。

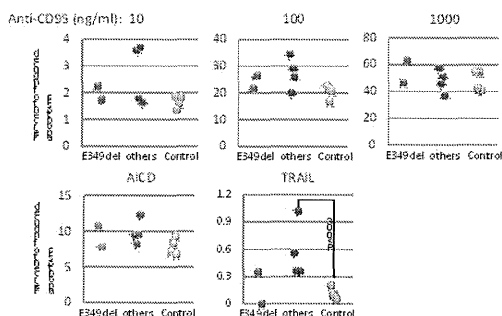


図4 アポトーシスによる機能解析

日本人 170 例の健常者のうち 2 例でヘミ接合体、4 例でホモ接合体に Glu349del 変異が認められ、計 6 人 (3.6%) で Glu349del 変異が認められた。

D. 考察

XIAP 遺伝子の Glu349del を有する患者では低ガンマグロブリン血症を認めたが、XLP2 に特徴的な臨床症状である HLH、脾腫、腸炎は認められず、XLP2 とは異なる可能性が示唆された。免疫学的特徴としてメモリーB細胞の減少、Tfh細胞、免疫グロブリン産生能の低下を認めたが、

アポトーシスによる機能解析では健常者と明らかな違いは認められず、免疫学的にもその他の変異を有する XLP2 と異なる特徴を有していた。日本人 170 名において 6 名 (3.6%) に Gu1349del 変異が認められたが、フランス人において同変異は認められず、日本人固有の SNP と考えられる。

E. 結論

Gu1349del は日本人固有の SNP と考えられるが、XLP2 の原因遺伝子ではないと思われる。しかし Gu1349del 変異により X連鎖低ガンマグロブリン血症を示す可能性が考えられ、現在 whole exome sequencing 等によりその他の付加的原因がないかを探索中である。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

特になし

2) 学会発表

1. Nishida N, Yang X, Kanegane H, Sanayama K, Goi K, Sugita K, Kato K, and Miyawaki T: X-linked dysgammaglobulinemia caused by hypomorphic *XIAP* mutation. The 15th biennial meeting of the European society of Immunodeficiencies 2012 Florence, Italy
2. Kanegane H, Yang X, Nishida N, Ishii E, and Miyawaki T: Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) and type2 (XIAP deficiency) in Japan. The 28th Annual Meeting of the Histocyte Society 2012 London, UK

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

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

横田俊平

横浜市立大学医学研究科小児科学

研究要旨

12歳5ヶ月のXLP type 2 男児症例を経験した。7歳時に下痢、腹痛より下部消化管内視鏡にて潰瘍性大腸炎として治療をうけていたが、今回、発熱、腹痛、頻回の水様便を主訴に当科に入院となった。入院後より白血球数と血小板数の減少、LDHの上昇、尿中 β 2-ミクログロブリンの上昇などが進行し、血球貪食リンパ組織球症と診断した。ステロイドおよびシクロスポリンの治療により改善をみたが、兄にEBウイルス関連血球貪食症候群の既往があり、家族性血球貪食リンパ組織球症を疑い、perforin 欠損症などの遺伝子検索を行ったが、いずれも正常であった。本人と母方伯父に炎症性腸疾患を認めることからXLP type 2を疑い、XIAP 遺伝子の変異を検索したところ、ミスセンス変異が認められ、家族検索により兄、母方伯父にも同一の変異が認められた。さらに、母、母方祖母も保因者であることが判明した。

XLP type 2でも少なからず炎症性腸疾患様症状を合併することが知られており、今回の1家系は貴重な経験と思われた。XLPに対する根治的治療は、造血幹細胞移植であり、早期診断と早期の治療介入が必須である。患児も、今後の治療選択として造血幹細胞移植の是非を検討している。

A. 研究目的

12歳5ヶ月のXLP type 2 男児症例を経験した。大変示唆に富む症例と考えられたので、概略を報告する。

B. 研究方法

以下、本症例の臨床経過について報告する。

C. 研究結果

【症例】12歳、男児

【主訴】発熱、腹痛、頻回の水様便

【家族歴】兄：3歳時にEBV-HLHに罹患

母方伯父：小児期発症のCrohn病

【既往歴】特になし

【現病歴】7歳時に肺炎を罹患し、下痢、腹痛を認め近医にて下部消化管内視鏡(CF)を施行し、大腸に潰瘍性大腸炎(UC)と診断され、5ASAの内服を開始されていた。9歳時に体重減少、貧血、

成長障害を認め、プレドニゾロンを開始されたが改善に乏しく、10歳時に当院IBDセンターに紹介受診となった。小腸、大腸に縦走潰瘍、アフタ性びらんを認め小腸大腸型Crohn病と診断された。難治性病態と考えられ、11歳時よりインフリキシマブ(IFX)が導入された。

今回、発熱、腹痛、頻回の水様便を主訴に当科に入院となった。入院後より白血球数と血小板数の減少、LDHの上昇、尿中 β 2-ミクログロブリンの上昇などが進行し、血球貪食リンパ組織球症(HLH)と診断した。ステロイドおよびシクロスポリンの治療により改善をみたが、兄にEBウイルス関連血球貪食症候群の既往があったことから、家族性血球貪食リンパ組織球症を疑い、perforin欠損症などの遺伝子検索を行ったが、いずれも正常であった。本人と母方伯父に炎症性腸疾患を認めることからXLP type 2を疑い、XIAP 遺伝子の変異を検索したところ、ミスセン

ス変異が認められ、家族検索により兄、母方伯父にも同一の変異が認められた。さらに、母、母方祖母も保因者であることが判明した。

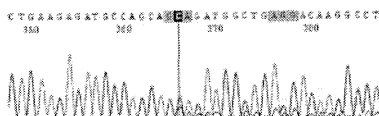
家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL) の検査
京都大学小児科で施行

兄(16歳)、弟(12歳)

Perforin, Munc13-4, STX11, Munc18-2の発現正常
NKの脱顆粒も正常

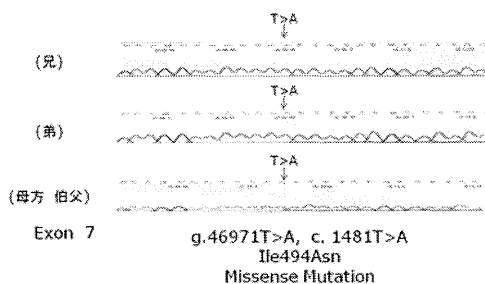
既知のFHLは否定

外肺葉形成不全免疫不全症
京都大学小児科で施行

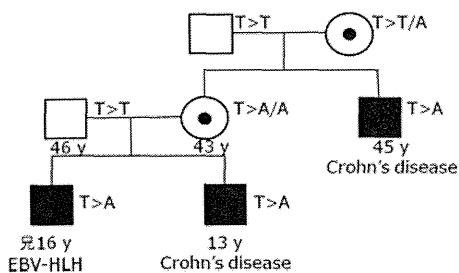


再検査で患児、兄、両親、母方伯父 全て正常であった
NEMO異常症、IKBA異常症は否定された

XIAP 遺伝子シーケンス解析
富山大学小児科で施行



XIAP 遺伝子変異



D. 考察

家族歴を有する血球貪食リンパ組織球症で、同一家系内に炎症性腸疾患(様)の家族歴がある場合には、X連鎖劣性の遺伝形式が疑われ慢性肉芽腫症や NEMO 欠損症などの原発性免疫不全症を疑うことが多い。

しかし、XLP type 2 でも少なからず炎症性腸疾患様症状を合併することが知られており、今回の症例は貴重な経験と思われた。

XLP に対する根治的治療は、造血幹細胞移植であり、早期診断と早期の治療介入が必須である。患児も、今後の治療選択として造血幹細胞移植の是非を検討している。

XLP-type2(XIAP deficiency)

Rigaudが最初にXIAP遺伝子を報告(2006 nature)

本症例の遺伝子変異はMarshが報告(2010 Blood)

	SAP-γγ, n (%)	XIAP-γγ, n (%)	P*
HLH	18 of 33 (55)	22 of 29 (76)	NS
HLH relapses (HLH survivors)	2 of 7 (29)	11 of 14 (79)	NS
EBV at first HLH	11 of 12 (92)	15 of 18 (83)	NS
Fatal HLH	11 of 33 (33)	5 of 20 (25)	NS
Fatal HLH (HLH patients)	11 of 18 (61)	5 of 22 (23)	0.039
Hypogammaglobulinemia	14 of 21 (67)	8 of 24 (33)	0.077
Lymphoma	19 of 33 (58)	9 of 30 (30)	0.010
Cytopenias (in the absence of full-blown HLH)	4 of 33 (12)	11 of 21 (52)	0.020
Splenomegaly (in the absence of full-blown HLH)	2 of 29 (7)	20 of 23 (87)	<.0001
Hemorrhagic colitis	0 of 33 (0)	5 of 30 (17)	0.203 (Schmid 2011)

臨床像としては再発するHLH、出血性腸炎が多い

E. 結論

- 7歳より消化器症状を認め、12歳よりHLHと同様のエピソードを頻回に認める男児を経験した。
- 遺伝子検査によりXLP type 2 (XIAP deficiency)と診断された。
- 炎症性腸疾患にHLHを合併する場合にはXLP type 2 (XIAP deficiency)を疑い精査する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Yokota S, Nishikomori R, Takada H, Kikuchi M, Nozawa T, Kanetaka T, Kizawa T, Miyamae T, Mori M, Heike T,

- Hara T, Imagawa T: Guidance on the use of canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome in Japan. *Mod Rheumatol.* 2012 (Epub ahead of print)
2. Imagawa T, Takei S, Umebayashi H, Yamaguchi K, Itoh Y, Kawai T, Iwata N, Murata T, Okafuji I, Miyoshi M, Onoe Y, Kawano Y, Kinjo N, Mori M, Mozaffarian N, Kupper H, Santra S, Patel G, Kawai S, Yokota S: Efficacy, pharmacokinetics, and safety of adalimumab in pediatric patients with juvenile idiopathic arthritis in Japan. *Clin Rheumatol.* 2012 (Epub ahead of print)
 3. Kawabata T, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Hayashi YK, Nishino I, Momomura M, Kizawa T, Imagawa T, Yokota S: A pediatric patient with myopathy associated with antibodies to a signal recognition particle. *Brain Dev.* 34 (10): 877-80, 2012
 4. Yokota S, Imagawa T, Murata T, Tomiita M, Itoh Y, Fujikawa S, Takei S, Mori M: Guidance on the use of adalimumab for juvenile idiopathic arthritis in Japan. *Mod Rheumatol.* 22 (4): 491-7, 2012
 5. Mori M, Takei S, Imagawa T, Imanaka H, Nerome Y, Higuchi R, Kawano Y, Yokota S, Sugiyama N, Yuasa H, Fletcher T, Wajdula JS: Safety and efficacy of long-term etanercept in the treatment of methotrexate-refractory polyarticular-course juvenile idiopathic arthritis in Japan. *Mod Rheumatol.* 22 (5): 720-6, 2012
- 2) 学会発表
 1. 小児疾患と炎症性サイトカイン 北里大学 サイトカインセミナー特別講演 2012年2月15日
 2. Yokota S: 「炎症性サイトカインと小児疾患」ソウルASPLAR2012 2012年5月17-19日
 3. Yokota S: 仙台「小児リウマチ性疾患～考え方の進歩と治療への応用」宮城地方会特別講演仙台 2012年6月16日
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

免疫不全症の QOL 調査、移植研究

小島勢二¹⁾、村松秀城²⁾

1) 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学、2) 名古屋大学医学部附属病院小児科

研究要旨：

IKZF1 germline 変異を有する B・NK 細胞欠損の原発性免疫不全症の児が、*NOTCH1* somatic 変異を獲得し 13 歳時に T-ALL を発症した。*Ikzf1* の DNA 結合 ZF 内に点変異を持つ変異マウス (IKAROS-Plastic) は、B・NK 細胞欠損の免疫不全から脾腫を伴う preleukemic phase を経て、T 細胞性白血病を発症し、その白血化には *Notch1* somatic 変異獲得を高頻度に伴うことが報告されている。本児は、*Ikzf1* 変異マウスにおける T 細胞白血化の表現型を正確に反映した世界初の臨床例である。

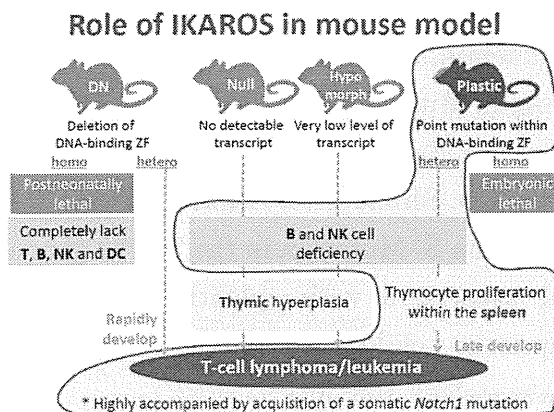
A. 背景

IKZF1 遺伝子は、Zinc finger DNA 結合タンパクである Ikaros をコードするリンパ球分化に必要な不可欠な遺伝子である。*Ikzf1* ヘテロ変異マウスは、B 細胞機能異常、脾臓内での胸腺細胞の増殖、T 細胞性白血病発症など、免疫不全症を含む様々な臨床像を呈する (図 1)。また、*Ikzf1* 変異マウスの T 細胞性白血病発症において *Notch1* の活性型変異が高頻度に認められる。

B. 症例

我々は、*Ikzf1* 変異マウスの表現型に一致し、T 細胞性急性リンパ性白血病を発症した重症複合型免疫不全症候群の症例を経験した。患者は、9 か月時に著明なリンパ球減少および B 細胞・T 細胞機能異常で発症した (図 2)。HLA 不一致の母より造血幹細胞移植を受けたが、拒絶されたものの患者自身の T 細胞機能不全が回復した。患者はその後、好中球減少および脾腫大を呈し、ガンマグロブリンの定期補充が必要であった。13 歳時に T 細胞性急性リンパ性白血病を発症し、第一寛解期に非血縁同種骨髄移植を施行した (図 3)。

図 3. *Ikzf1* モデルマウスの表現型



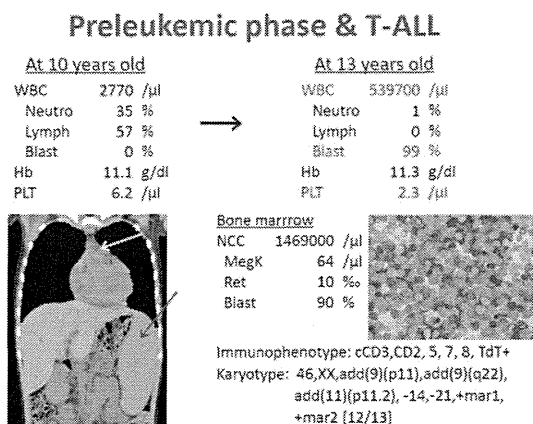
C. 研究方法

上記症例の免疫不全発症時、T 細胞性急性リンパ性白血病細胞、白血病寛解時それぞれの genomic DNA を抽出し、*IKZF1* および *NOTCH1* 遺伝子変異を解析した。

図 2. 免疫学的検査結果

	Patient		Reference Range
	9 mo	4 y	
WBC, cells/ μ l			
Leukocytes	6100	2600	5200-11000
Lymphocytes	160	2054	2300-8000
Granulocytes	5650	494	NA
Monocytes	150	1170	NA
Serum Immunoglobulin			
IgG, mg/dl	21	200-800**	310-1360
IgA, mg/dl	<5	<5	26-135
IgM, mg/dl	6	9	40-190
Lymphocyte subgroup	%	cells/ μ l	%
CD3	73.9	132	95.9
CD4	53.8	140	20.9
CD8	24.4	63	66.0
CD19	6.0	15	1.3
CD56/CD16	ND	ND	2.6
Cytolytic activity of NK cells, % of Cr-51 released	ND	4	18-40
T-cell proliferation, cpm			
PHA	1109	12099	26000-53000
Con-A	1120	20553	20000-48000

図 3. 白血病発症時の臨床情報



D. 研究結果

遺伝学的解析の結果、本症例では DNA-binding domain に *IKZF1* の germline ヘテロ変異が同定された。さらに、白血病細胞のみで *NOTCH1* の somatic 変異が確認され、白血病発症に寄与した second hit であると考えられた (図 4)。

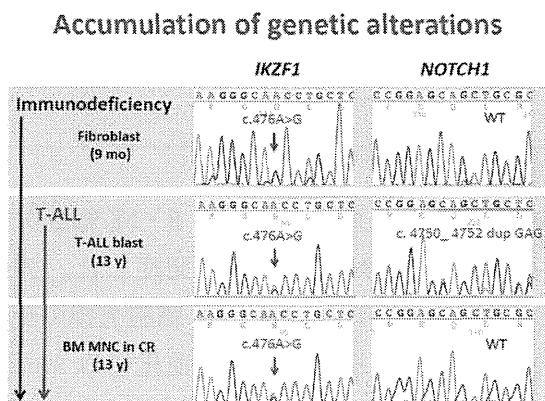
E. 結論

IKZF1 germline 変異を有する B・NK 細胞欠損の原発性免疫不全症の児が、*NOTCH1* somatic 変異を獲得し 13 歳時に T-ALL を発症した。

Ikzf1 の DNA 結合 ZF 内に点変異を持つ変異マウス (IKAROS-Plastic) は、B・NK 細胞欠損の免疫不全から脾腫を伴う preleukemic phase を経て、T 細胞性白血病を発症し、その白血化には *Notch1* somatic 変異獲得を高頻度に伴うことが報告されている。本児は、*Ikzf1* 変異マウ

スにおける T 細胞白血化の表現型を正確に反映した世界初の臨床例である。

図 4. 遺伝子変異解析結果



F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S: Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatric blood & cancer* 2012.
2. Wang X, Muramatsu H, Sakaguchi H, Xu Y, Narita A, Tsumura Y, Doisaki S, Tanaka M, Ismael O, Shimada A, Hama A, Takahashi Y, Kojima S: Mutation in the THPO gene is not associated with aplastic anaemia in Japanese children. *British journal of haematology* 158: 553-5, 2012
3. Shimada A, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Ismael O, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Nishio N, Tanaka M, Yoshida N, Matsumoto K, Kato K, Watanabe N,

- Kojima S: Excellent outcome of allogeneic bone marrow transplantation for Fanconi anemia using fludarabine-based reduced-intensity conditioning regimen. *International journal of hematology* 95: 675-9, 2012
4. Sakaguchi H, Takahashi Y, Watanabe N, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kudo K, Kojima S: Incidence, clinical features, and risk factors of idiopathic pneumonia syndrome following hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatric blood & cancer* 58: 780-4, 2012
 5. Sakaguchi H, Makishima H, Muramatsu H, Visconte V, Jerez A, Jankowska AM, Tiu RV, Maciejewski JP, Kojima S: Mutational analysis of RNA splicing machinery components in 206 children with myeloid malignancies. *Leukemia research* 2012
 6. Saito Y, Aoki Y, Muramatsu H, Makishima H, Maciejewski JP, Imaizumi M, Rikiishi T, Sasahara Y, Kure S, Niihori T, Tsuchiya S, Kojima S, Matsubara Y: Casitas B-cell lymphoma mutation in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research* 36: 1009-15, 2012
 7. Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Nishio N, Hama A, Shimada A, Ito M, Kojima S: Autoimmune-like hepatitis following unrelated BMT successfully treated with rituximab. *Bone marrow transplantation* 47: 600-2, 2012
 8. Muramatsu H, Makishima H, Maciejewski JP: Chronic myelomonocytic leukemia and atypical chronic myeloid leukemia: novel pathogenetic lesions. *Seminars in oncology* 39: 67-73, 2012
 9. Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, Clemente MJ, Ng KP, Muramatsu H, O'Keefe C, Sauntharajah Y, Maciejewski JP: CBL mutation-related patterns of phosphorylation and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia* 26: 1547-54, 2012
 10. Kato K, Otake H, Tagaya M, Takahashi Y, Ito Y, Hama A, Muramatsu H, Kojima S, Naganawa S, Nakashima T: Progressive hearing loss following acquired cytomegalovirus infection in an immunocompromised child. *American journal of otolaryngology* 2012
 11. Jerez A, Sugimoto Y, Makishima H, Verma A, Jankowska AM, Przychodzen B, Visconte V, Tiu RV, O'Keefe CL, Mohamedali AM, Kulasekararaj AG, Pellagatti A, McGraw K, Muramatsu H, Moliterno AR, Sekeres MA, McDevitt MA, Kojima S, List A, Boulwood J, Mufti GJ, Maciejewski JP: Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: clinical associations and genomic pathogenesis. *Blood* 119: 6109-17, 2012
 12. Ismael O, Shimada A, Hama A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Yoshida N, Ito M, Takahashi Y, Akita N, Sunami S, Ohtsuka Y, Asada Y, Fujisaki H, Kojima S: Mutations profile of polycythemia vera and essential thrombocythemia among Japanese children. *Pediatric blood & cancer* 59: 530-5, 2012
 13. Ismael O, Shimada A, Hama A, Elshazley M, Muramatsu H, Goto A, Sakaguchi H, Tanaka M, Takahashi Y, Yinyan X, Fukuda M, Miyajima Y, Yamashita Y, Horibe K,

- Hanada R, Ito M, Kojima S: De novo childhood myelodysplastic/myeloproliferative disease with unique molecular characteristics. *British journal of haematology* 158: 129-37, 2012
14. Hama A, Muramatsu H, Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, Jasek M, O'Keefe C, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Shimada A, Watanabe N, Kato K, Kiyoi H, Naoe T, Kojima S, Maciejewski JP: Molecular lesions in childhood and adult acute megakaryoblastic leukaemia. *British journal of haematology* 156: 316-25, 2012
15. Fukushima H, Fukushima T, Hiraki A, Suzuki R, Mahmoud SS, Yoshimi A, Nakao T, Kato K, Kobayashi C, Koike K, Fukasawa M, Morishita Y, Doisaki S, Muramatsu H, Sumazaki R: Central nervous system lesions due to juvenile myelomonocytic leukemia progressed in a boy undergoing first line chemotherapy. *International journal of hematology* 95: 581-4, 2012
16. Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S: Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 120: 1485-8, 2012
17. Abu Kar S, Jankowska AM, Makishima H, Visconte V, Jerez A, Sugimoto Y, Muramatsu H, Traina F, Afable M, Guinta K, Tiu RV, Przychodzen B, Sakaguchi H, Kojima S, Sekeres MA, List AF, McDevitt MA, Maciejewski JP: Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 2012.
- 2) 学会発表
吉田奈央, 坂口大俊, 村松秀城, 嶋田明, 濱麻人, 高橋義行, 岸田聡, 門松健治, 小関道夫, 大西秀典, 寺本貴英, 近藤直実, 松本公一, 加藤剛二, 小島勢二: T細胞性白血病を発症した原発性免疫不全症における IKZF1 遺伝子変異の同定 第74回日本血液学会学術集会 2012年10月24日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

WASPとIL-10受容体遺伝子変異を認めた乳児期発症炎症性腸疾患2症例の臨床的検討

笹原洋二

東北大学大学院医学系研究科小児病態学

研究要旨

乳児期発症の炎症性腸疾患を伴う原発性免疫不全症としてはこれまで、慢性肉芽腫症、IPEX、NEMO 異常症、Wiskott-Aldrich 症候群などが知られているが、近年新たに IL-10 受容体異常症が報告されている。今回我々は、乳児期発症の炎症性腸疾患症例から、IL-10 受容体 A 遺伝子 (IL10RA) にコンパウンドヘテロ変異を認めた IL-10 受容体異常症症例と、WASP のヘテロ変異を認めた female WAS 症例を確定診断したので、その臨床像と分子病態について報告する。IL-10 受容体異常症の報告は本邦では初めてである。

WASP および WIP ノックアウトマウスは T 細胞浸潤を伴う炎症性腸疾患を伴い、Th2 偏位と制御性 T 細胞の減少、IL-10 シグナル異常が報告されている。IL-10 シグナルは過剰な免疫反応を抑制する系として重要であり、その欠損症の病態は腸管免疫系における IL-10 シグナルの役割を理解する上で重要である。

乳児期発症の炎症性腸疾患は臨床的に確定診断が困難な場合があり、治療方針の決定に苦慮するが多い。今後臨床への反映を目的に、IL-10 受容体異常症を含めた乳児期発症炎症性腸疾患の網羅的遺伝子診断系と病態解析系の確立を進める予定である。

A. 研究目的

乳児期発症の炎症性腸疾患を伴う原発性免疫不全症としてはこれまで、慢性肉芽腫症、IPEX、NEMO異常症、Wiskott-Aldrich症候群などが知られているが、近年新たにIL-10受容体異常症が報告されている。乳児期発症の炎症性腸疾患は臨床的に確定診断が困難な場合があり、治療方針の決定に苦慮するが多く、また遺伝子異常の全体像は本邦では未だ明らかにされていない。今回、遺伝子異常を同定した自験例2例を報告し、今後臨床への反映を目的に、WASP遺伝子変異およびIL-10受容体異常症、他の候補遺伝子解析による乳児期発症炎症性腸疾患症例の遺伝子診断と臨床的相関の検討を行い、乳児期発症炎症性腸疾患の網羅的遺伝子診断系と病態解析系の確立を進めることを目的とする。

B. 研究方法

今回の2症例は以下の臨床経過である。

症例1) 3歳女児

日齢12日に発熱、嘔吐、肺炎の診断で近医入院し、抗生剤で肺炎は改善したが炎症所見が陰性化せず、嘔吐も持続した。下痢、粘血便、驚口瘡を認めた。特異的IgE: α ラクトアルブミンclass2、 β ラクトグロブリンclass2、カゼインclass2でミルクアレルギーと考えMA-1ミルクと抗アレルギー剤の内服開始。HSV IgM陽性から新生児HSV感染症も疑われACV投与を併用した。その後症状は安定し、日齢38で退院となった。日齢54日から肛門周囲膿瘍と臀部蜂窩織炎が出現し、肛門のskin tag がみられた。抗生剤、抗真菌剤、エレンタールPへの変更が試みられた。易感染性、ミルクアレルギー、炎症性腸疾患、肛門周囲病変から、原発性免疫不全症が疑われ、3

か月時に当院小児科、小児外科紹介となった。
症例2) 10か月女児

生後2か月より頻回の下痢と粘血便が出現。ミルクアレルギーを疑われて加水分解乳に変更するも改善なく、体重増加不良も呈したため某大学病院入院。加療後も低アルブミン血症、体重増加不良、貧血、血便、頻回下痢が続き、CSで直腸狭窄を認めたため、クローン病疑いとして宮城県立こども病院転院となった。また、診断目的に当院小児科紹介となった。

この2症例につき、臨床所見をまとめ、血清サイトカイン測定はELISA法にて行い、WASPフローサイトメトリー法は既報に従い施行した。また、WASP およびIL-10受容体遺伝子解析は末梢血単核球DNAを検体として、PCR法とダイレクトシーケンス法にて行った。

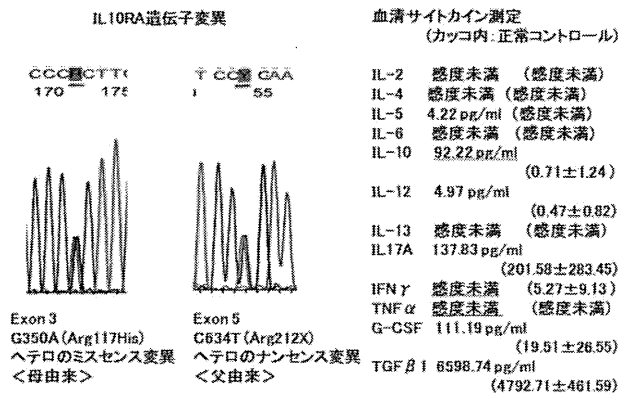
(倫理面への配慮)

患者検体による遺伝子解析は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に従い、書面によるインフォームドコンセントと同意書による同意確認のもとで施行した。東北大学医学系研究科臨床研究倫理委員会において、原発性免疫不全症の遺伝子診断の承認を得ている。

C. 研究結果

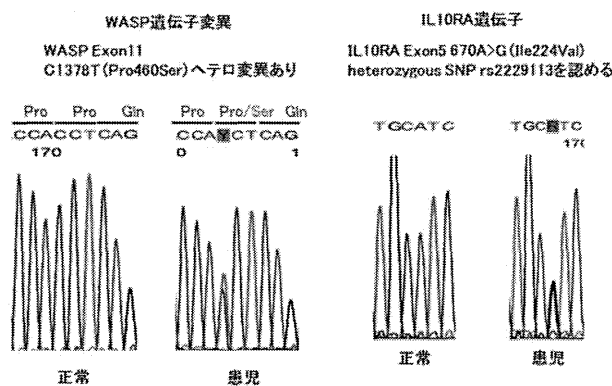
症例1は新生児期より肛門病変を呈した女児で、非特異的腸炎症所見とアレルギー症状を呈し、免疫学的スクリーニング検査は正常であったが、特異的IgE陽性とアレルギー症状を呈していた。また、血清サイトカイン値では、IL-10値が高値であった。内視鏡検査にて直腸の狭窄と非特異的炎症所見を認めた。IL10受容体遺伝子検索の結果、*IL10RA* 遺伝子に各々父母由来であるミスセンス変異とナンセンス変異を認めた(図1参照)。

図1 症例1におけるIL-10受容体遺伝子異常と血清サイトカインプロファイル



症例2は乳児期女児で血便と血小板減少および慢性炎症による直腸狭窄を伴っていた。内視鏡検査にて直腸狭窄と非特異的炎症、繊維化が認められた。遺伝子解析にて、WASP 遺伝子の Exon 11 にヘテロのミスセンス変異を認めたが、WASP フローサイトメトリー法では蛋白発現は正常であった。同時に早期炎症性腸疾患発症との有意性が報告されているIL-10RA遺伝子のSNPを認め、両方の変異が発症に関与していると考えられた(図2参照)。

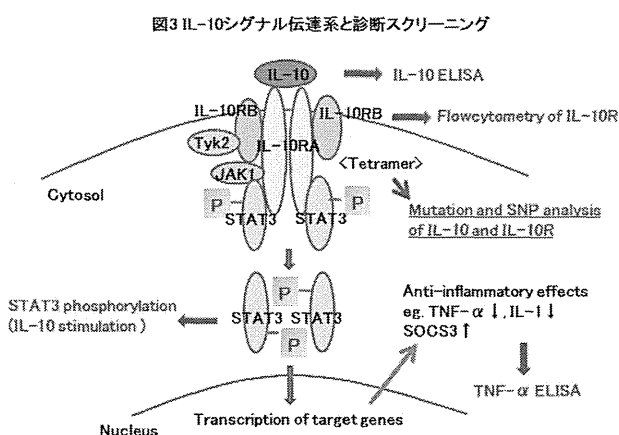
図2 症例2におけるWASP遺伝子異常とIL-10受容体遺伝子SNP



D. 考察

腸内細菌からの刺激を受けて、腸管免疫における生体防御機構には、制御性T細胞 (Treg)、Tregから産生されるIL-10とそのシグナル伝達系が負の制御系として重要である。また、IL-10及びIL-10受容体ノックアウトマウスは腸内細

菌存在下で、炎症性腸疾患を呈することが報告されている。今回の症例1であるIL-10受容体異常症症例から、これは他の因子では代償できない重要な系であることが示唆された。IL-10とIL-10受容体異常症の診断スクリーニングには、遺伝子変異検索の他に、血清ELISA法によるIL-10, TNF- α の測定、下流シグナル分子であるSTAT3のIL-10刺激後のチロシンリン酸化を検討することで可能である(図3参照)。



WASPおよびWIPノックアウトマウスも炎症性腸疾患を呈するが、そのダブルノックアウトマウスではさらに著明となる。その要因としては、Th2への偏位、Tregの減少、IL-10シグナル伝達系の異常、減弱が報告されている。今回の症例2では、WASPのヘテロ変異とIL-10受容体A遺伝子の発症リスクに關与するSNPの両方が発症に關与していると推測された。

E. 結論

乳児期発症の炎症性腸疾患は臨床的に確定診断が困難な場合があり、治療方針の決定に苦慮する場合が多い。今回の症例解析から、IL-10シグナル伝達系は腸管免疫の恒常性維持に代償できない重要な役割を果たしていることが示唆された。今後臨床への反映を目的として、IL-10受容体異常症、OX40あるいはSOCS3遺伝子範囲を含めた乳児期発症炎症性腸疾患の網羅的遺伝子

診断系と病態解析系の確立を進める予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

- Moriya K, Suzuki M, Watanabe Y, Takahashi T, Aoki Y, Uchiyama T, Kumaki S, Sasahara Y, Minegishi M, Kure S, Tsuchiya S, Sugamura K, Ishii N: Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice. PLoS One 7 (6): e37892, 2012
- Uchiyama T, Adriani M, Jagadeesh GJ, Paine A, Candotti F: Foamy virus-mediated gene correction of a mouse model of Wiskott-Aldrich syndrome. Mol. Ther. 20 (6): 1270-9, 2012
- Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Kinoshita A, Nakadate H, Kanazawa T, Oozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Nonoyama S, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S: Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukemia. Pediatr. Blood & Cancer (in press)
- 笹原洋二: 複合免疫不全症 小児の発熱A to Z 診断と治療社, p155-159, 2012
- 笹原洋二: DiGeorge症候群 小児疾患の診断治療基準改定4版 小児内科44巻(2012年)増刊号 東京医学社, p234-235, 2012

2) 学会発表

- Yoji Sasahara, Yuko Watanabe, Looi Chung

Yeng, Shigeru Tsuchiya, Shigeo Kure:
Functional roles of WIP in Wiskott-Aldrich
syndrome. 8th Congress of Asian Society for
Pediatric Research. May 17-19th, 2012,
Seoul, Korea

2. 笹原洋二、佐藤美季、斉藤由佳、小沼正栄、
入江正寛、内山徹、力石健、呉繁夫：
Spontaneous reversion を伴う原発性免疫不
全症 2 症例における長期的臨床経過の検討。
第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4
月 20-22 日、福岡
3. 笹原洋二、鈴木信、大内芽里、渡辺祐子、小
沼正栄、入江正寛、内山徹、力石健、峯岸正
好：RIST を施行した当科年長児および成人期
WAS/XLT3 症例の臨床的検討。第 25 回東北 BMT
研究会 2012 年 7 月 16 日、仙台
4. 笹原洋二：細胞外寄生菌に対する感染防御機
構 第 44 回日本小児感染症学会学術集会
ad hoc 教育セミナー 小児感染免疫
up-to-date 2012 年 11 月 23 日、北九州
5. 大久保幸宗、入江正寛、内山徹、力石健、笹
原洋二、呉繁夫：ACTH 不応症、Fanconi 貧血
様の症状と悪性リンパ腫を合併した原発性
免疫不全症の 1 例 第 6 回日本免疫不全症研
究会 2013 年 1 月 26 日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

TIR ドメイン含有アダプター分子 TRAM の新規機能の解明

近藤直実、大西秀典、加藤善一郎、川本典生、木村 豪、久保田一生、山本崇裕

岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学

研究要旨

To11 様受容体 (TLR) シグナル伝達を仲介する TIR ドメイン含有アダプター分子は、ヒトでは 5 つが知られている。そのうち MyD88 欠損は肺炎球菌等の侵襲性感染を引き起こし、TRIF (TICAM1 とも呼ばれる) 欠損は単純ヘルペス脳炎を引き起こす。平成 22 年度の分担研究において、我々は Mal (TIRAP とも呼ばれる) の本邦での機能損失型亜型の存在を報告したが、最近 Mal 欠損も報告された。残る 2 分子は TLR シグナルに対する影響が限定的と推測され、いまだヒトでの欠損症の報告は無いが、我々は MyD88 機能解析の過程で TRAM (TICAM2 とも呼ばれる) の新たな機能を見いだすことができた。In vitro の機能解析により IL-18 受容体-TRAM-MyD88 の複合体形成が証明され、TRAM は MyD88 を細胞膜へと誘導する sorting adaptor であることが判明した。また、IL-18 によるヘルパー I 型 T 細胞からの INF- γ 産生誘導に TRAM が強く関与していることが明らかとなった。ヒト TRAM 欠損では、自然免疫機能の低下だけでなく IL-18 の機能減損に起因した Th1 細胞や NK 細胞活性の低下によって、Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD) 様の症状がみられるかもしれない。

A. 研究目的

To11 様受容体 (TLR) シグナル伝達を仲介する TIR ドメイン含有アダプター分子は、ヒトでは 5 つが知られている。そのうち MyD88 欠損は肺炎球菌等の侵襲性感染を引き起こし、TRIF (TICAM1 とも呼ばれる) 欠損は単純ヘルペス脳炎を引き起こす。平成 22 年度に、我々は Mal (TIRAP とも呼ばれる) の本邦での機能損失型亜型の存在を報告したが、最近 Mal 欠損も報告された。残る 2 分子は TLR シグナルに対する影響が限定的と推測され、いまだヒトでの欠損症の報告は無い。また、樹状細胞やマクロファージにおいて TLR2 や TLR4 のシグナル伝達には、TLR の細胞内 TIR ドメインと、細胞膜誘導型アダプター分子 Mal の TIR ドメイン、シグナル伝達型アダプター分子である MyD88 の TIR ドメインの会合と、それに伴う MyD88 のデスドメイン (DD)、IRAK4 の DD、IRAK1 あるいは IRAK2 の DD の会合を組み合わせ

た高次複合体 (Myddosome) の形成が惹起されるが、IL-18 受容体を発現する 1 型ヘルパー T (Th1) 細胞や NK 細胞においては、Mal はシグナル伝達に関与しておらず、どのような Myddosome 形成が起きるか詳細には判明していない。

本研究では、Th1 反応に重要な IL-18 シグナル伝達経路において、TLR シグナルにおける Mal と同様の細胞膜誘導機能を果たす分子の同定を進めた。

B. 研究方法

1. MyD88-TIR, TRAM-TIR, Mal-TIR, TLR1-TIR, IL-18R α -TIR, IL-18R β -TIR を、pGEX 系発現ベクターに組み込み、大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換し、各種 TIR ドメインタンパクを発現させ、液体クロマトグラフィー法で単離あるいは GST 融合タンパクとして精製した。

2. pcDNA3.1+に、TRAM-FLAG、myc-MyD88(全長及びTIRドメイン)、IL-18R β を組み込み、pACGFP1-C1及びpDsRed-Monomer-N1ベクターにそれぞれMyD88とTRAMを組み込んだ発現ベクターを構築した。

3. 1&2.の発現ベクターに対して、GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System(Promega)を使用して、遺伝子置換を行った。

4. Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare)を使用してGST融合タンパクと単離TIRタンパクの結合実験を行った(GSTプルダウン法)。

5. Reporter gene assay用のplasmidとして、pGL3-basicベクターにNF- κ B結合配列を組み込み、pGL4-LucベクターにINF- β promoter領域の配列を組み込んだ。

6. siRNAによるノックダウン実験用に、Invivogen社のpsiRNA-h7SKgz-Scr、psiRNA-TICAM-2を購入した。

7. HEK293T細胞及びHEK293-hTLR4-MD2-CD14細胞(Invivogen)を、10%FCSを添加したDMEM培地で培養した。各種Plasmid群の形質転換にはLipofectamine2000(Invitrogen)を使用した。

8. Reporter gene assayは、Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega)で行った。

9. 免疫沈降実験は、MultiMACS Protein G MicroBeads(Miltenyi Biotec)を使用して行った。

10. TRAM欠損マウス、MyD88欠損マウスとバックグラウンドマウス(C57BL/6)の脾組織を、Oriental Bio Serviceから提供を受け、汎T細胞をPan T Cell Isolation Kit II(Miltenyi Biotec)で分離抽出して、抗マウスCD3抗体及びmouse IL-12p70添加下で10%FCSを添加したRPMI1640培地で4日間培養することでTh1細胞に分化誘導させ、さらにIL-18とIL-12p70で刺激後培養上清を回収した。

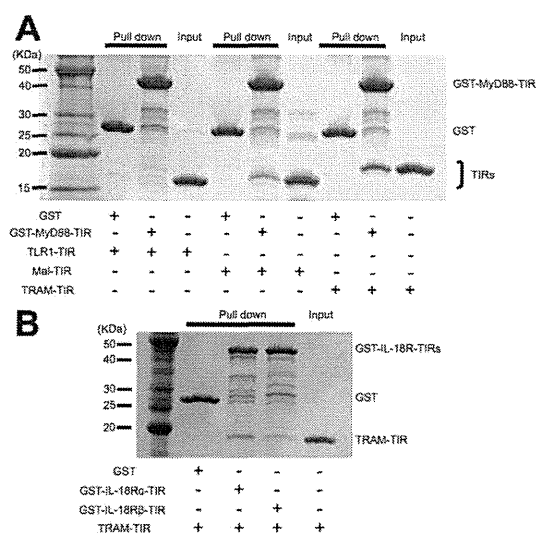
11. マウス細胞の培養上清中のmouse IFN- γ を、ELISA法で測定した。

12. GFPあるいはDsRed融合タンパクの細胞内局在は、Zeiss LSM5 EXCITER confocal microscopeで観察した。

C. 研究結果

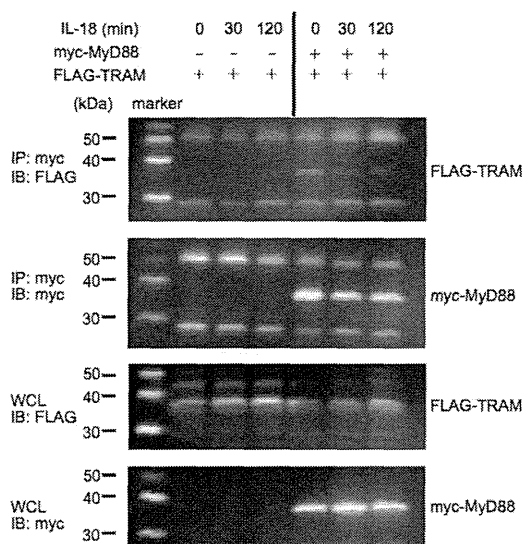
1. MyD88-TIRとTLR1-TIRは、GSTプルダウン法で直接結合は検出できないが、MyD88-TIRとMal-TIR及びTRAM-TIRの結合が強く検出された。また、IL-18R α -TIRとIL-18R β -TIRは共にTRAM-TIRと結合した(図1)。

図1



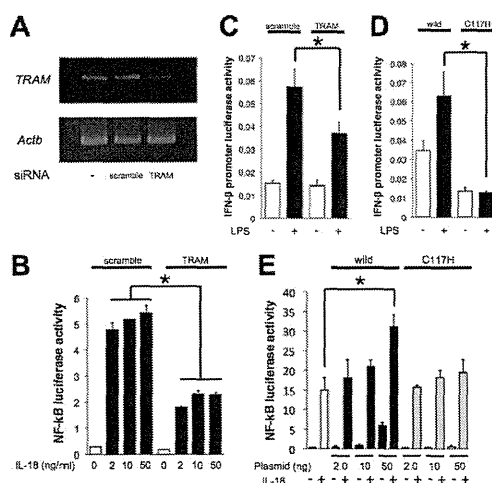
2. 免疫沈降実験で、細胞内でMyD88とTRAMの相互作用が観測され、さらにその結合はIL-18刺激下で経時的に解離していくことが判明した(図2)。

図 2



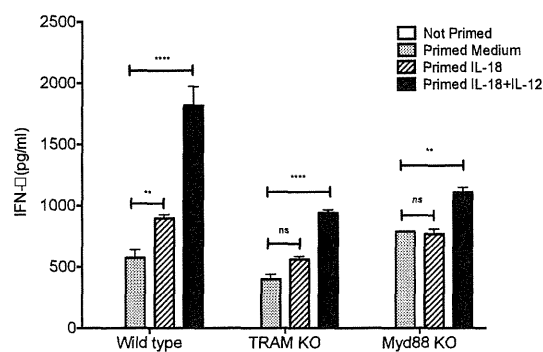
3. TRAM を siRNA 発現ベクターでノックダウンした場合、あるいは TRAM の優性阻害変異 (C117H) を発現させた場合、LPS 刺激による IFN- β promoter 活性上昇のみならず、IL-18 刺激後の NF- κ B 活性上昇も有意に抑制された (図 3)。

図 3



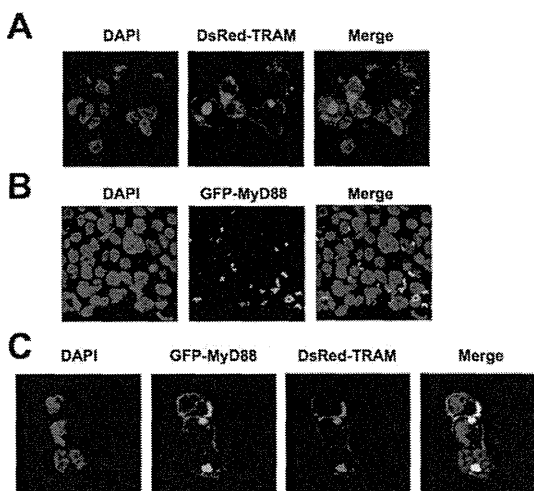
4. マウス脾由来 Th1 細胞を、マウス IL-12 とマウス IL-18 の組み合わせで刺激したところ、バックグラウンドマウスでは、IL-18 単独刺激、IL-12 と IL-18 の共刺激のいずれにおいても有意に IFN- γ の産生が誘導されるが、TRAM 欠損マウス及び MyD88 欠損マウスでは、IL-18 単独刺激による IFN- γ の産生誘導が減弱していた (図 4)。

図 4



5. HEK293 細胞に MyD88 を発現させると、細胞質内にタンパクが凝集した foci を形成する。TRAM は、一部は細胞質内に存在し、細胞膜にも局在が認められる。MyD88 と TRAM を共発現させると、MyD88 の局在が大きく変化し、細胞膜に局在するようになる (図 5)。

図 5



6. MyD88-TIR の優性阻害効果を利用して、IL-18 刺激に関与する MyD88-TIR 上のアミノ酸残基を判定したところ、R196, D197, R217, K238, R269, K282, R288 が野生型及び他残基群と比して有意差が認められた。これらの残基の一部は、LPS/TLR4 シグナルにおいて機能的に重要な残基群とオーバーラップしている (図 6A-B)。

7. 変異導入した GST-MyD88-TIR と TRAM-TIR の結合は、R196A, R288A 及び R196A-R288A で減弱が認められた (図 6C)。