

原発性免疫不全症における 10 カラーFACS を用いたリンパ球分画解析に関する研究

研究分担者 森尾友宏 (東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科発生発達病態学 准教授)
研究協力者 今井耕輔 (東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科小児・周産期地域医療学
寄附講座 准教授)
高島健浩 (愛媛大学大学院医学系研究科 小児医学講座 大学院生)

研究要旨：

本研究では 10 カラーFACS により、少量の末梢血で従来の解析を越えるリンパ球分画の解析を可能とすることを目的として研究を行った。健常者 20 例および PID 患者 (遺伝子変異同定例 23 例、CVID 患者 38 例) からインフォームド・コンセントをとり、FACS 解析を行った。また、その結果を抽出した DNA を用いた TRECs(T cell receptor recombination excision circles), KRECs(Ig kappa chain recombination excision circles)の定量と比較して検討した。PBMC パネル、T1,T2,T3 パネル、B1,B3 パネル、DC パネル、を設定し、健常者、PID 患者で検討した。遺伝子変異が同定された患者の中では、毛細血管拡張性運動失調症(ATM)患者で T 細胞数、recent thymic emigrants(RTE)の減少、ナイーブ B 細胞の減少が見られた。また、STAT3 患者と STAT1 患者で Th17 の減少が見られた。STAT1 患者で DNT の上昇が見られた。CVID 患者では、TREC が低下している C 群、D 群で RTE の減少が見られ、B 群、D 群では B 細胞数減少も見られ、pDC の減少と相対的な mDC の増加が見られた。A 群ではスイッチメモリー B 細胞の減少が顕著であった。当初は compensation の取り方、抗体の選り方等に工夫が必要であったが、欧州での標準化プロトコール等も参考にしつつ、条件設定を行い、実際の免疫不全症患者で検討を行った。原因遺伝子の同定された患者では、おおむね既報の通りであったため、疑い患者が紹介されてきたときのスクリーニング方法として、有効であると考えられた。一方、原因不明の患者が含まれている CVID 患者でも、特徴的な分化異常を呈する患者が含まれていたため、今後、こうした患者に対して機能解析を行い、また、全 exome 解析の結果も組み合わせ、原因遺伝子の同定につなげていきたい。

A. 研究目的

原発性免疫不全症 (PID) とくに Common variable immunodeficiency(CVID)などの低ガンマグロブリン血症は、T 細胞の分化、機能障害を伴う複合免疫不全症(CID)や免疫制御異常症が含まれる場合があり、そのリンパ球分画の解析は原因遺伝子検索を行う上でも非常に重要である。これまで我々はヘパリン加末梢血からの単核球分離後 4 カラーFACS を用い、13 パネルで T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞の解析を行い、多検体を処理してきたが、多くの例は、郵送で数日かかること、年少例で採血困難な例もあり、少量サンプルで多カラーにより、パネル数を減らすことが求められていた。本研究では 10 カラーFACS により、少量の末梢血で従来の解析を越えるリンパ球分画の解析を可能とすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

健常者 (20 例、0 歳 2 ヶ月～50 歳) および PID 患者 (遺伝子変異同定例 23 例、0 歳 7 ヶ月～46 歳、CVID 患者 38 例、1 歳～54 歳) からインフォームド・コンセントをとり、EDTA 加末梢血を溶血後、モノクローナル抗体により染色を行い、LSR Fortessa (BD 社) を用いて FACS 解析を行った。また、その結果を抽出した DNA を用いた TRECs(T cell receptor recombination excision

circles), KRECs(Ig kappa chain recombination excision circles)の定量と比較して検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、本学医学部倫理委員会にて承認された研究計画に従い、説明書を被験者に説明の上同意を得た検体について、解析を行った。

C. 研究結果

リンパ球分画を大きく見るための PBMC パネル (CD3/4/8/19/16/56/14/HLADR)、T 細胞を詳しくみる T1,T2,T3 パネル、B 細胞分画を見る B1,B3 パネル、樹状細胞を見る DC パネル、を設定し、健常者、PID 患者で検討した (表 1)。

原因遺伝子の同定された PID 患者としては、STAT1 6 例、Wiskott-Aldrich 症候群 4 例、STAT3 3 例、ATM 5 例、CD40L 2 例、ICOS 2 例、LRBA 1 例だった。また、CVID を TREC,KREC で 4 群に分ける方法 (Kamae *et al*, *J. Allerg. Clin. Immunol.*, 2013) により、A 群(TREC, KREC 正常例)19 例、B 群 1 例 (TRECs 正常, KRECs 低下例) C 群 10 例 (TRECs 低下, KRECs 正常例) D 群 8 例 (TRECs, KRECs 低下例) に亜群分類された (図 1)。遺伝子変異が同定された患者の中では、毛細血管拡張性運動失調症(ATM)患者で T 細胞数 recent thymic emigrants (RTE)の減少、ナイーブ B 細胞の減少が見られた。また、STAT3 患者と STAT1 患者で Th17 の減少が見られた。STAT1

患者で DNT の上昇が見られた。CVID 患者では、TREC_s が低下している C 群、D 群で RTE の減少が見られ、D 群ではさらに B 細胞数減少も見られ、pDC の減少と相対的な mDC の増加が見られた。A 群ではスイッチメモリー B 細胞の減少が顕著であった。

D. 考察

10 カラーのため、当初はコンペンセーションの取り方、抗体の選び方、蛍光色素の組み合わせ等に工夫が必要であったが、欧州での標準化プロトコル等を参考にしつつ、条件設定を行い、実際の免疫不全症患者で検討を行った。原因遺伝子の同定された患者では、おおむね既報の通りであったため、疑い患者が紹介されてきたときのスクリーニング方法として、有効であると考えられる。一方、原因不明の患者が含まれている CVID 患者でも、特徴的な分化異常を呈する患者が含まれていたため、今後、こうした患者に対して機能解析を行い、また、exome 解析の結果も組み合わせ、原因遺伝子の同定につなげていきたい。

E. 結論

健常者検体を用いて少量検体で詳細な免疫担当細胞亜群解析を実施可能な抗体・蛍光色素の組み合わせを模索し、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞亜群を解析可能なパネルを構築した。また、実際に PID 患者検体を用いて解析し、その実用性を検証した。

表 1. FACS パネル

Fraction	FITC	PE	ECD	PC5 PE/Cy5	PE/Cy7	APC	AF-700	APC- Vio770	Vio Blue	Vio Green
PBMC: T, B, NK, Mono	CD16	CD27	CD45RA	CD56	CD8	CD19	CD14	CD45RO	CD4	CD3
DC: mDC, pDC	Lin	CD123	HLA-DR	CD11c	CD83	CD303	-	-	CD45	-
T1: NKT, Memory, Naive	vα24	vβ11	CD45RA	CD62L	CD8	CD31	CCR7	CD45RO	CD4	CD3
T2: γδT, Treg, actT	TCRγδ	TCRαβ	CD8	CD25	CCR4	IL-7R	-	-	CD4	CD3
T3: Th Th1, Th2, Th17	CD38	CCR6	CD8	CXCR5	CD161	CXCR3	HLA-DR	CD45RO	CD4	CD3
B1: Immature, Transitional	CD38	CD24	-	IgM	CD10	CD21	CD5	-	CD19	CD20
B3: Memory, IgG, IgA, IgM	IgD	IgA	-	IgM	CD27	IgG	-	-	CD19	-

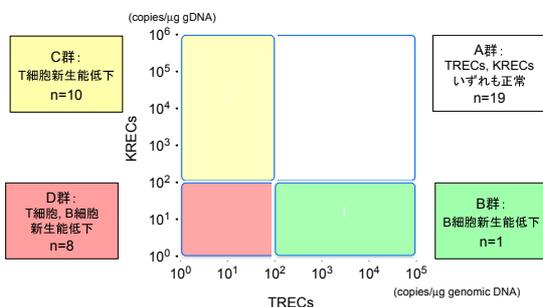


図 2. CVID 症例の TREC_s, KREC_s による亜群分類

		STAT1 n=6	WAS n=4	STAT3 n=3	ATM n=6	CD40L n=4	ICOS n=2	LRBA n=1
T 細胞	T細胞数				↓			
	RTE				↓			
	DNT	↑						
	Th17	↓		↓				
B 細胞	B細胞数							
	Memory B				↑			

図 3. 遺伝子変異同定患者のまとめ

		A群 n=16	B群 n=1	C群 n=10	D群 n=8
T 細胞	T細胞数				
	RTE			↓	↓
B 細胞	B細胞数				↓
	Switched memory B	↓			
DC	mDC/pDC				↑

図 4. CVID 患者のまとめ

F. 健康危機情報 総括にて報告

G. 研究発表

1. 論文発表

- Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowij S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, **Morio T**, Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J. Leukoc. Biol.* 2014. (in press)
- Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, **Morio T**, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T. B-cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using a minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol.* 98: 355-60, 2013.
- Machida S, Tomizawa D, Tamaichi H, Okawa T, Endo A, Imai K, Nagasawa M, **Morio T**, Mizutani S, Takagi M. Successful Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Patient With Ataxia Telangiectasia Using Rituximab. *J Pediatr Hematol Oncol.* 35: 482-5, 2013.

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*. 60: 836-41, 2013.
5. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsui N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammerstrom Q, van Zelm MC, **Morio T**, Imai K, Nonoyama S. Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor and Ig kappa-deleting recombination excision circles. *J Allerg Clin Immunol*. 131: 1437-40, 2013.
6. Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, **Morio T**, Imai K, Mitsui N, Ohara O, Komada Y. A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 290: 164-8, 2013.
7. **森尾友宏**: 分類不能型免疫不全症 (CVID) の多彩な病像と分子基盤 **臨床血液** 54: 1983-91, 2013.
8. **森尾友宏**: 先天性免疫異常症: 内科領域で遭遇する多彩な疾患 **臨床血液** 54: 726-35, 2013.
9. 高木正稔, 今井耕輔, **森尾友宏**, 水谷修紀: The Research Front Line of Immune Thrombocytopenia 原発性免疫不全症候群関連の免疫性血小板減少症 **臨床血液** 54: 357-64, 2013.
10. **森尾友宏**: [検査値を読む 2013] 細胞性免疫検査 リンパ球サブセット検査 **内科** 111: 1404, 2013.
11. **森尾友宏**: [検査値を読む 2013] 細胞性免疫検査 B リンパ球表面免疫グロブリン **内科** 111: 1403, 2013.
12. **森尾友宏**: [検査値を読む 2013] 細胞性免疫検査 T 細胞 B 細胞比率 **内科** 111: 1400, 2013.
13. **森尾友宏**: [血液症候群(第 2 版)-その他の血液疾患を含めて-] リンパ球の異常 リンパ球機能異常と類縁疾患 原発性免疫不全症候群 分類不能型免疫不全症 **日本臨床** 別冊血液症候群 2: 232-6, 2013.
14. **森尾友宏**: [知っておきたい最新の免疫不全症分類-診断から治療まで] 症候と診断 免疫不全症を疑うとき **小児科診療** 76: 376-82, 2013.
15. **森尾友宏**: [免疫反応と疾患] 免疫不全における免疫異常 先天性免疫不全症候群 **Medicina** 50: 484-9, 2013.

学会発表

1. 高島健浩, 今井耕輔, **森尾友宏**, 水谷修紀, 石井栄一: 1 型高 IgE 症候群患者 9 例の臨床的・免疫学的検討, **第 41 回日本臨床免疫学会総会**, 下関, 2013 年 11 月 27 日
 2. 星加将吾, 加藤文代, 角田達彦, 久保充明, 満生紀子, 今井耕輔, **森尾友宏**, 杉原茂孝: 1 型糖尿病に低 γ グロブリン血症、血小板減少、多発性硬化症様病変を併発した LRBA 欠損症の 1 例, **第 4 回関東甲越免疫不全症研究会**, 東京, 2013 年 9 月 22 日
 3. 高島健浩, 満生紀子, 今井耕輔, 水谷修紀, **森尾友宏**: STAT1 変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症 12 例の検討, **第 4 回関東甲越免疫不全症研究会**, 東京, 2013 年 9 月 22 日
 4. **森尾友宏**: Overview2 ヒトリンパ球解析の現状と展望, **日本リウマチ学会総会(シンポジウム(ヒト免疫とリウマチ性疾患))**, 東京, 2014 年 4 月 26 日
 5. **森尾友宏**: 日常診療における免疫不全症, **第 63 回小児科トピックス Meet the Experts 特別講演**, 東邦大学(東京), 2014 年 3 月 13 日
 6. **森尾友宏**: 抗体産生不全症とは: 検査からみえるものとみえないもの **第 3 回(金沢)小児免疫不全症研究会(招待講演)**, 金沢, 2014 年 2 月 8 日
 7. **森尾友宏**: 免疫不全症候群から学ぶ human immunology, **第 41 回日本臨床免疫学会総会(シンポジウム)**, 山口, 2013 年 11 月 27 日 29 日
 8. **森尾友宏**: 分類不能型免疫不全症 (CVID) の多彩な病像と分子基盤, **第 75 回日本血液学会学術集会**, 北海道, 2013 年 10 月 11 日 13 日
 9. **森尾友宏**: 抗体産生不全症の分子病態探索, **第 3 回関西免疫不全症研究会**, 2013 年 7 月 27 日
 10. **森尾友宏**: 原発性免疫不全症からみる血液腫瘍疾患の分子基盤, **第 5 回九州免疫不全症研究会**, 福岡, 2013 年 7 月 13 日
- H. 知的所有権の出願・取得状況**
1. 特許取得
特になし。
 2. 実用新案登録
特になし。
 3. その他
特になし。