

T 細胞受容体シグナル伝達系における WASP 蛋白分解機構とその機能的意義

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

Wiskott-Aldrich 症候群の原因遺伝子である *WASP* 遺伝子産物は、*WASP* 結合蛋白質 *WIP* と複合体を形成して T 細胞受容体 (TCR) シグナル伝達系下流に位置し、T 細胞活性化とアクチン重合化を制御することは知られていたが、*WASP* 蛋白分解機構とその機能的意義は不明であった。また、*WIP* が *WASP* 蛋白質安定化に重要であることが我々によって報告されている。今回我々は、T 細胞受容体シグナル伝達系における *WASP* 蛋白分解機構とその機能的意義を明らかにする目的で、ヒト T 細胞、293T 細胞、*WASP* 欠損および *Cbl-b* 欠損マウスの脾臓 T 細胞を用いて解析を行った。その結果、*WASP* 蛋白は TCR 刺激後、経時的に Ca 依存性蛋白分解酵素であるカルパインによる断片化と、*Cbl* ファミリー (*Cbl-b*、*c-Cbl*) ユビキチンリガーゼと共沈してユビキチン化を受け、その後 26S プロテアソームによる分解を受けることが明らかとなった。また、野生型 T 細胞におけるカルパイン特異的阻害剤の添加と、*Cbl-b* 欠損マウス T 細胞においてアクチン重合化が有意に増加した。しかしながら、*WASP* 欠損マウス T 細胞においてはカルパイン阻害の効果は認めなかった。このことから、T 細胞における *WASP* 蛋白分解機構は、*WASP* が活性化された後に、カルパインによる断片化と *Cbl* ファミリーによるユビキチン化によって蛋白分解を受け、TCR シグナル伝達系においてアクチン重合化を機能的に負に制御していることが明らかとなった。

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* 蛋白は 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、恒常的活性化変異によって自身を活性化構造へ変化させて、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) を起こす。一方、T 細胞において *WIP* 蛋白は *WASP* 蛋白の安定化を制御することや、*Cbl* ファミリー蛋白が T 細胞受容体 (TCR) と *WASP*-*WIP* 複合体の間の分子集団に存在し、TCR シグナル経路を負に制御することが知られていた。そこで我々は、T 細胞活性化シグナル下での *WASP* 蛋白分解機構の詳細を体系的に明らかにし、その機能的意義解明することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

主に T 細胞株、293T 細胞、*WASP* および *Cbl* ファミリーノックアウトマウス T 細胞を用いて、分子生物学的手法により、*WASP* 蛋白質分解機構を解析した。

C. 研究結果

1) *WASP* は *in vitro* において、カルパインの基質となり、ユビキチン-プロテアソーム経路で分解された (図 1、2)。

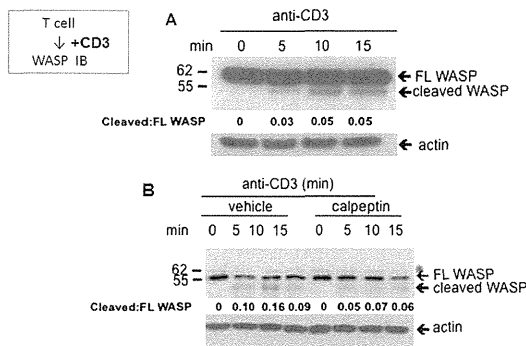


図1 TCRシグナル下で、WASP蛋白はカルパインの基質となる

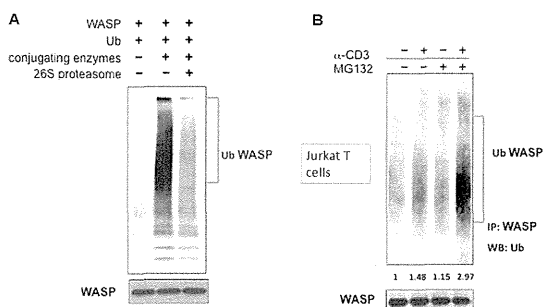


図2 In vitroおよびTCRシグナル下で、ユビキチン化を受けたWASPはプロテアゾームで分解される

2) 同様に WASP は TCR シグナル伝達系においても、経時的にカルパインによって切断され、ユビキチン-プロテアゾーム経路で分解された (図 1, 2)。
 3) c-Cbl と Cbl-b は TCR シグナル伝達系を負に制御するユビキチン E3 リガーゼである。Cbl ファミリー蛋白質は TCR 刺激下にて WASP と複合体を形成し、E3 ユビキチンリガーゼとして働いた。同様の結果が、293T 細胞の一過性発現系においても示された (図 3)。

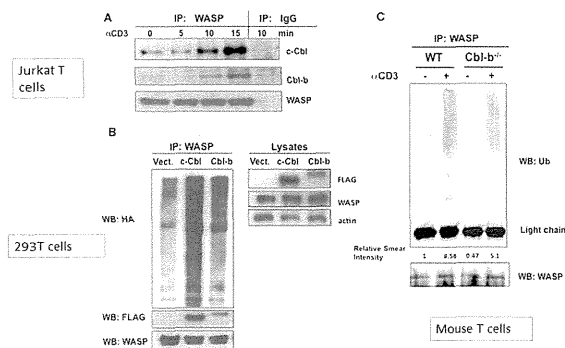


図3 Cblファミリー蛋白はWASPのE3ユビキチンリガーゼである

4) WASP のチロシンリン酸化は、TCR シグナル下において WASP のユビキチン化に関わっていた。
 5) T 細胞においてカルパイン阻害剤はアクチン重合化の downregulation を負に制御したが、WASP ノックアウトマウスでは起こらなかった。また、c-Cbl ノックアウトマウス T 細胞ではアクチン重合化は増強した (図 4)。

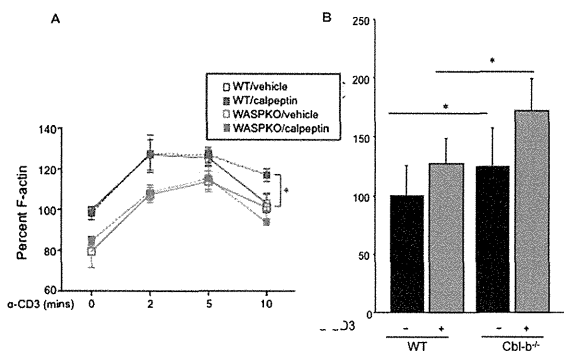


図4 WASP蛋白分解機構は、TCRシグナル伝達系においてアクチン重合化を機能的に負に制御する

D. 考察

TCR シグナル伝達系における WASP 活性化後に起こる WASP 蛋白分解には、カルパインと Cbl ファミリー蛋白によるユビキチン化が関与しており、これを明らかにした。また、この WASP 蛋白分解機構はアクチン重合化を機能的に負に制御している事も明らかとなった (図 5)。

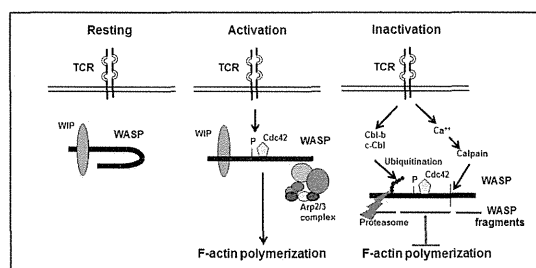


図5 Activation and Inactivation of WASP in TCR signaling

しかしながら、WASP 蛋白と Cbl ファミリー蛋白との結合が直接的か、他蛋白が介在しているかについては不明である。これは c-Cbl が多様な蛋白と関与しているためであり、更なる解明が必要である。また、X 連鎖性 WAS におけるミスセンス変異が WIP

結合領域に集中し WASP 蛋白質の不安定化が病態の根底にある点、および常染色体劣性 WAS としての WIP 欠損症でも WIP ノックアウトマウス同様、WASP 蛋白質の不安定化が報告されている。これらの分子病態の理解に、今回の WASP 蛋白分解機構は重要であると考えられた。

E. 結論

WASP 蛋白は TCR 刺激後、経時的に Ca 依存性蛋白分解酵素であるカルパインによる断片化と、Cbl ファミリーユビキチンリガーゼによってユビキチン化を受け、プロテアソームによる分解を受けることが明らかとなった。また、この WASP 蛋白分解機構は、TCR シグナル伝達系においてアクチン重合化を機能的に負に制御していることが明らかとなった。これらは X 連鎖性 WAS および常染色体劣性 WAS の分子病態を理解する上で重要である。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Looi CY, Sasahara Y, Watanabe Y, Satoh M, Hakozaki I, Du W, Uchiyama T, Kumaki S, Kure S, Tsuchiya S. Open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells. *Int. Immunol.*, in press.
- 2) Horino S, Sasahara Y, Satoh M, Niizuma H, Kumaki S, Abukawa D, Satoh A, Imaizumi M, Kanegane H, Kamachi Y, Sasaki S, Terui K, Ito Y, Kobayashi I, Ariga T, Tsuchiya S, Kure S. Selective expansion of regulatory T cells in mixed chimera after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome. *Pediatr. Transplant*, in press.
- 3) Watanabe Y, Sasahara Y, Ramesh N, Massaad MJ, Looi CY, Kumaki S, Kure S, Geha RS, Tsuchiya S. T cell receptor ligation causes Wiskott-Aldrich syndrome protein degradation and F-actin assembly

downregulation. *J Allergy Clin Immunol*, 132: 648-655, 2013.

- 4) Horino S, Uchiyama T, So T, Nagashima H, Sun S, Sato M, Asao A, Haji Y, Sasahara Y, Candotti F, Tsuchiya S, Kure S, Sugamura K, Ishii N. Gene therapy model of X-linked severe combined immunodeficiency using a modified foamy virus vector. *PLoS One*, 8(8): e71594, 2013.
 - 5) 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*, 98:355-360, 2013.
 - 6) 笹原洋二：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—免疫不全症を伴う特徴的な症候群・Wiskott-Aldrich 症候群、高 IgE 症候群—小児科診療 76(3), 407-412, 2013.
- ##### 2. 学会発表
- 1) Sasahara Y, Watanabe Y, Looi CY, Ramesh N, Geha RS, Kure S. Functional roles of WIP in Wiskott-Aldrich syndrome. 24th Japanese Society of Hematology, International Symposium in Ehime, May 24-25th, 2013, Matsuyama, Ehime, Japan.
 - 2) 大久保幸宗、笹原洋二、二瓶真人、木越隆晶、松木琢磨、渡辺祐子、堀野智史、入江正寛、力石健、菅野潤子、藤原幾磨、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一例 第 6 回日本免疫不全症研究会, 2013 年 1 月 26 日 東京.
 - 3) 笹原洋二、大内芽里、鈴木信、鈴木資、片山紗乙莉、入江正寛、呉繁夫：WASP と IL-10 受容体遺伝子変異を同定した乳児期発症炎症性腸疾患 2 症例の臨床的検討 第 116 回日本小児科学会学術集会, 2013 年 4 月 19-21 日 広島
 - 4) 笹原洋二：シンポジウム:小児免疫不全症の現状と展望 免疫不全症に対する造血幹細胞移植

第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013
年 11 月 29-31 日 福岡

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

成果の普及、活用に関わる活動

仙台市民公開講座 難病医療相談会

原発性免疫不全症の診断と治療についての講演および
質疑応答、個別相談

参加者：患者家族、一般市民約 20 名

2013 年 11 月 26 日

宮城県仙台市 泉区役所

不明熱と免疫不全（サイトカインパターンからの考察）

布井博幸¹⁾、西村豊樹¹⁾、水上智之²⁾

1) 宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学

2) 国立病院機構熊本医療センター

研究要旨

免疫異常症患者では不明熱で発症する人が多い。発熱を契機に心因性発熱、菊池病、悪性高熱症候群、マクロファージ活性化症候群（MAS）を繰り返した若年性関節炎、地中海熱、慢性肉芽腫症と診断した患者の27サイトカインパターンについて比較検討した。方法：Bioplex 27 サイトカイン測定キットで測定した健康成人13名の血中サイトカイン値の平均を1とし、X正常値で表した。結果：健康成人のサイトカインは約X3以内に分布した。心因性発熱患者では26種類のサイトカインがほぼX5-X10を示した。菊池病、悪性高熱症候群と若年性関節炎患者では他のサイトカインはX5の範囲に収まったのに対し、各々IP-10、IL-6、IL-6とIL-18が健康成人サイトカインのX50-500と非常に特徴的なサイトカインパターンを示した。一方、地中海熱や慢性肉芽腫症患者ではサイトカインバランス(IL-6/IL-10など)が崩れているものの、特徴的なサイトカインパターンは得られなかった。結論：27サイトカインパターンを見ると、不明熱患者の病態にかなり特異的なパターンを示す疾患があり、病態を考える上でも重要だと思われた。

A.研究目的

免疫不全患者では不明熱から発症される患者も多い。今回27サイトカイン(加えてIL-18、cytochrome cは症例を選んで測定した)を同時に測定することで、不明熱患者の病態を推察できないか検討した。

B.研究方法

不明熱で紹介された心因性発熱、菊池病、悪性高熱症候群、MASを繰り返した若年性関節炎、慢性肉芽腫症、地中海熱と診断した患者の27サイトカインをBioplexキットで測定した。健康成人13名の各サイトカインのMean±SD(pg/ml)はIL-1β; 1.1±0.5、IL-1α; 84.1±28.4、IL-2; 1.8±1.3、IL-4; 2.4±1.0、IL-5; 1.7±0.9、IL-6; 3.1±1、IL-7; 4.9±2.5、IL-8; 7.9±1.5、IL-9; 10.4±5.1、IL-10; 10.3±9.6、IL-12; 30.8±24.5、IL-13; 5.8±3.8、IL-15; 0.2±0.0、IL-17; 27.6±11.0、Eotaxin; 48.4±43.1、FGF; 14.7±2.5、GCSF; 12.6±2.9、GMCSF; 8.5±4.9、IFN-γ; 88.5±19.4、IP-10; 964.3±870.8、MCP1; 9.7±6.0、MIP1α; 2.4±0.7、PDGF; 3453±1608、MIP1β; 49.4±23.2、RANTES; 2590.3±1707.1、

TNF-γ; 12.8±4.9、VEGF; 58.5±60.6であった。IL-18とcytochrome cはELISA (MBL) およびPicolumi (三光純薬) で測定した。各々の平均はIL-18; 500 pg/ml、cytochrome c; 17ng/mlを標準値とした。比較の際は、各サイトカインの平均値を1とし、X正常値で表した。

症例1 心因性発熱; 14歳7ヶ月男子、夏から2ヶ月間38-40度の発熱があるため登校できていない。入院後監視下検温でも38-9度Cで、朝方が最も高かった。血液検査では白血球数、CRP、血沈など炎症反応は殆ど認められない。後に学校との問題や、本人の社会適応能力にも若干の問題があることが判り、高校への進学と心理訓練をすることにより、現在は平熱になっている。

症例2 菊池病; 12歳男子、37度台の微熱後38-40度の発熱と下痢腹痛認めていた。近医小児科で、好中球減少症(WBC:1700、顆粒球400)を指摘されたが、自宅で経過観察されていた。16病日には左頸部のリンパ節腫脹と圧痛、その後徐々に発熱のピークが上昇し、39-40度台となり、大学病院へ紹介入院となる。

症例 3 マクロファージ活性化症候群 (MAS) を繰り返した若年性関節炎 ; 13 歳女性、頭痛、気分不良で発症、嘔吐、両側前腕、下腿に紅斑出現、病院受診処方されるも、持続発熱 (39°C)、6 病日感染性胃腸炎による敗血症の診断で入院 (WBC 26030、Plt 11.3 万、CRP23、フェリチン 22421 ng/ml、sIL2-R 1680U/ml) CTRX 投与、7 病日紅斑消出、8 病日不定形紅斑が再度出現、PCT 0.9、抗生剤の反応乏しく、生化学所見の再度の悪化があり、12 病日大学病院への転送となる。その後も発熱を繰り返し、JIA の診断のもと MAP 療法に生物学的製剤 (アクテムラ 8mg/kg) を継続するも MAS を繰り返している。

症例 4 地中海熱 ; 13 歳女性、夏場に 38 度台の発熱、頭痛、悪心も認め、解熱傾向もなく CRP 高値のため入院、抗生剤投与されたが発熱が持続し、各種検査に異常なく、2 週間で解熱し退院した。1、2、3、4、5 月後にも 38 度台の微熱があり、当科紹介入院となった。

症例 5 現在 21 歳男性、colitis と Mcleod 症候群を合併した gp91-phox 欠損型慢性肉芽腫症 ; 3 か月時に痔ろう、1 歳で髄膜炎など反復、2 歳 7 か月時に CGD と診断され、4 歳でリンパ節腫脹、7 歳で肺炎などに罹患。9 歳で肝左葉肉芽腫に対し、肝部分切除術を行われている。19 歳の時、種々の抗生物質、抗真菌剤の使用に関わらず、発熱の改善が得られないため、不明熱の精査の一環として大腸ファイバー検査と上部消化管もカプセル内視鏡で検査され、CGD 腸炎の診断を受けている。20 歳で肺アスペルギルスに罹患している。

(倫理的配慮)

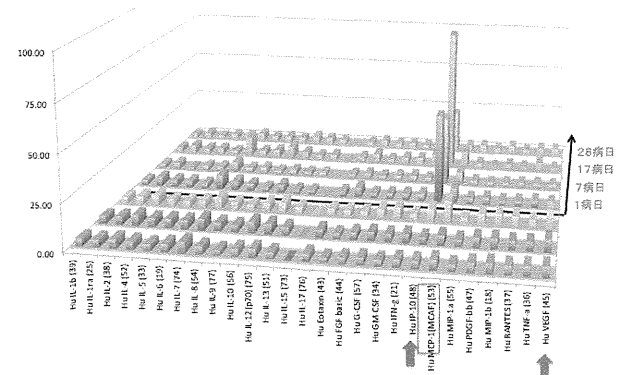
各々の患者さんの採血にあたっては患者自身の IC を頂き、受診時または入院時の採血された残血清を用いて検査を行った。

C. 研究結果

1) 心因性発熱の患者について、サイトカイン測定を行ったが、いずれも正常者よりもやや上昇していることが判った。具体的にそれを示すために、13 名の健常者サイトカインの平均値を 1 として、各々のサイトカインの値をみると (図 1 前半 3 列、いずれも高熱時採血)、

正常者が X0-3 の値であるのに対して、患者では X5-10 であり、IL-6/IL-10 のバランスも保たれていた。

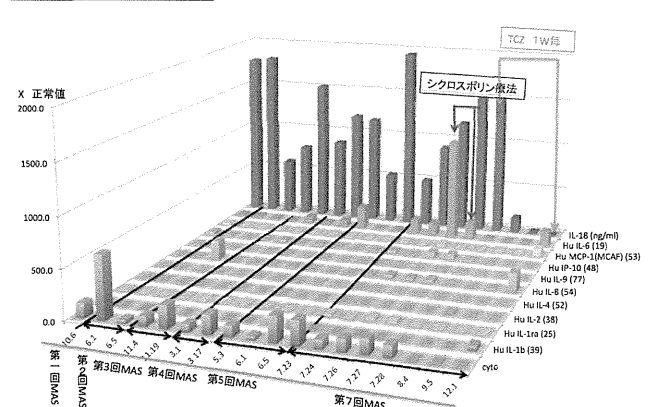
図 1 : 心因性発熱および菊池病患者のサイトカインパターン



2) 菊池病の患者のサイトカインパターンでは IP-10 が特異的に X75 と高値を示していた (図 1 後半 4 例、いずれも高熱時)。IL-6/IL-10 のバランスはやや高値を示していたが、他のサイトカイン(IL-6, IL-9, Eotaxin, MCP-1α)も X10 以内の上昇であり、その他のサイトカインは X5 以内であった(1)。

3) MAS を繰り返した若年性関節炎患者では、第 1、2、3、4、5、7 回目の MAS を起こした時の変動のあったサイトカインについて図 2 に示した。IL-18 と Cytochrome c は別途 ELIZA kit と Picolumi にて測定した。

図 2 : MAS を繰り返した若年性関節炎患者のサイトカインパターン解析

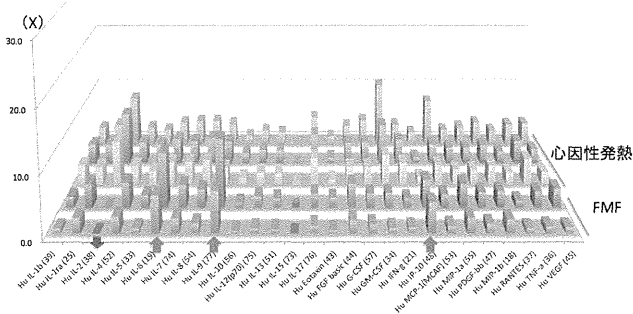


IL-18 は経過を通じて高値をしめし、MAC 再発の際 IL-6 が上昇した (2)。IL-6 はシクロスポリンの 1mg/Kg の持続投与から 3mg/kg の X3 投与により、低下したが、IL-18 は TCZ の 1W 間隔での投与で減少が明らかになった。以降 1W 間隔を 8 回連続で、ほぼ正常域まで改

善し、2W、3W、4W、8W 間隔で投与することにより、IL-18 は正常域を維持でき、1 年半で TCZ も中止できている。

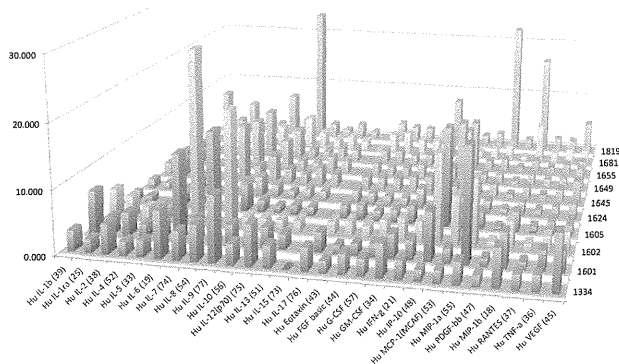
4) 家族性地中海熱患者について、その発熱時のサイトカインパターン解析では、異常高値を示すサイトカインは無かったが、IL-6、IL-9、IP-10 は上昇、IL-2 は低下していた。特に、IL-6/IL-10 は高値を示した。

図 3：家族性地中海熱患者のサイトカインパターン



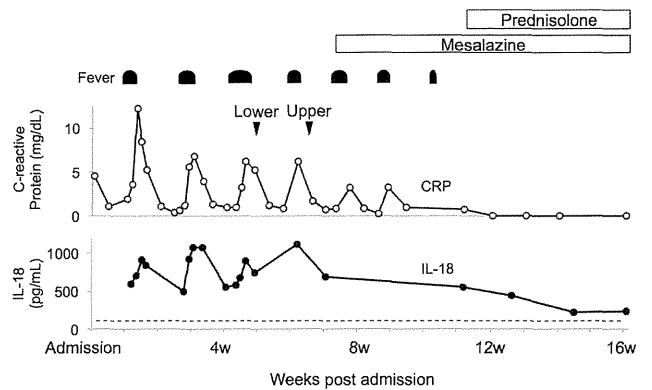
5) 慢性肉芽腫症患者については、患者さんの経過を追ってサイトカインパターンを解析した。IL-6、IL9、IP-10、MIP1α が病勢に応じて X10 以上の高値を示した (図 4)。

図 4：慢性肉芽腫症患者のサイトカインパターン



上記のサイトカインに加えて、CRP の上昇に応じて、IL-18 も上昇しており、大腸ファイバーで、CGD 腸炎の所見を示し、Mesalazine と Prednisolone の投薬にて、いずれも改善した (図 5)。

図 5：慢性肉芽腫症患者の臨床マーカーと IL-18 の変化



D. 考察

心因性発熱や菊池病、MAS を繰り返した若年性関節炎患者では特徴的なサイトカインパターンが認められた。一方で家族性地中海熱 (FMF) や慢性肉芽腫症 (CGD) 患者では、あまり特徴的なサイトカインパターンは示さず、IL-6/IL-10 比が高いなど、病態を反映する所見が得られた。

1) 心因性発熱に関しては、IL-6/IL-10 比も正常で、サイトカインによる炎症性発熱の病態と言うより、発熱に伴うサイトカイン上昇ではないかと思われた。

2) 菊池病に関しては、これまでも菊池らは necrosis と apoptosis に関連した遺伝子の増幅(1)や石村らの IFI44L、CXCL10、GBP1、EPSTI1 and IFI27 遺伝子の増幅(2)などの研究があるが、IP-10 の高値が血管内非細胞と TNFα 刺激で誘導されているという報告もある (3)。

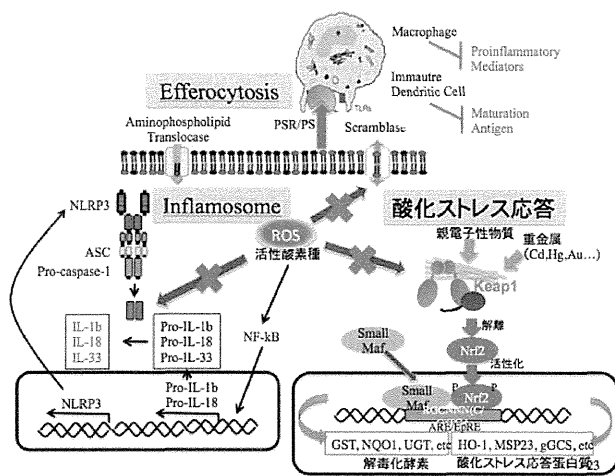
3) MAS を繰り返した若年性関節炎患者では非常に特徴的な IL-18 の持続高値 (130,000pg/ml 以上 X2,000 未満) と MAS 発症時 IL-6 の上昇を認める (図 2) が、その発症機序が説明できるような報告は無い (4)、今後の検討課題だと考えている。Cyclosporin A (3mg/kg) 治療では MAS の勢いを抑制できたが、IL-18 に関しては TCZ の 1 週置き点滴治療で、著効しており、調査が必要だろうと考えられる。

4) 地中海熱ではインフラモソームの過剰活性のために、IL-1β の上昇が予測されていたが、正常領域であった。血中半減期が短いことに加えて、病初期にのみ大量に放出されて、後には影響は残るが発症するころ

には IL-1 β は枯渇してしまって、むしろ減少する等の説が報告されており、IFN- γ 、Th1、VEGFR-1、MIF、sICAM-1、urinal LTB4 も上昇している (5)。この患者さんの発熱時のサイトカインパターン解析では、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-17、IL-18 は上昇しているが、異常高値を示すサイトカインは無く、IL-6、IL-9、IP-10 は上昇、IL-2 は低下していた。特に、IL-6/IL-10 は高値を示しており、典型的なパターンではなかった。

5) 慢性肉芽腫症：サイトカイン産生には NF- κ B が活性酸素 (ROS) で活性化されることが必要だと考えられていたが、CGD でも、種々の刺激 (LPS, CpG) で IL-6、TNF- α 、IFN- γ の過剰産生が報告されていることから、NF- κ B 非依存性のサイトカイン産生経路が考えられている (6)。その CGD 患者でのサイトカイン過剰産生の機構として、1) ROS により Caspase-1 の失活が起こらないための IL-1 β 、IL-18、TNF- α 産生を亢進、2) ROS により Nrf2-Keap1 複合体の活性が起こらないため、抗酸化蛋白 (HO-1, MSP23, GCS など) の誘導がかからず過剰炎症となる機構や、3) フォスパチジル・セリン (PS) が外膜面に輸送させる Scramblase の ROS による活性化が起こらないため Efferocytosis が障害されることにより、炎症が持続化することなどが報告されている (図 6)。

図 6 : CGD と過剰炎症症候群の機序



このような種々の ROS による影響が結果的に、あまり特徴の無いサイトカインパターンや IL-6/IL-10 比の上昇などを引き起こしているのではないかと考えられる。

今後も CGD での活性酸素産生異常が種々の炎症治療過程の制御に影響することが報告されているのではないかと考えられた。

E. 結論

27 サイトカインパターンを見ると、不明熱患者の病態にかなり特異的なパターンを示す疾患があり、病態を考える上でも重要だと思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表、

別表に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

- Ohshima K, Karube K, Hamasaki M, Makimoto Y, Fujii A, Kawano R, Tutiya T, Yamaguchi T, Suzumiya J, Kikuchi MSO, Apoptosis- and cell cycle-associated gene expression profiling of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Eur J Haematol. 2004;72(5):322.
- Ishimura M, Yamamoto H, Mizuno Y, Takada H, Goto M, Doi T, Hoshina T, Ohga S, Ohshima K, Hara T. A non-invasive diagnosis of histiocytic necrotizing lymphadenitis by means of gene expression profile analysis of peripheral blood mononuclear cells. J Clin Immunol. 2013 Jul;33(5):1018-26.
- Fang YS, Zhu LM, Sun ZG, Yu LZ, Xu H., Tumor necrosis factor- α pathway plays a critical role in regulating interferon- γ induced protein-10 production in initial allogeneic human monocyte-endothelial cell interactions. Transplant Proc. 2012 May;44(4):993-5.
- Shimizu M, Nakagishi Y, Yachie A., Distinct subsets of patients with systemic juvenile

idiopathic arthritis based on their cytokine profiles. *Cytokine*. 2013 Feb;61(2):345-8.

5. Notarnicola C, Didelot MN, Seguret F, Demaille J, Touitou I., Enhanced cytokine mRNA levels in attack-free patients with familial Mediterranean fever. *Genes Immun*. 2002 Feb;3(1):43-5.
6. Bylund J, MacDonald KL, Brown KL, Mydel P, Collins LV, Hancock RE, Speert DP., Enhanced inflammatory responses of chronic granulomatous disease leukocytes involve ROS-independent activation of NF-kappa B. *Eur J Immunol*. 2007 Apr;37(4):1087-96.

NLRP3 インフラマソームの細胞内再構成による機能解析

河野 肇

帝京大学医学部内科学講座

研究要旨

- ・HEK293T 細胞において、NLRP3 の発現によるインフラマソーム speckle の形成、Nigericin 投与による更なる speckle 形成の促進を定量的に再構成する系を構築した。
- ・クリオピリン関連周期性発熱と関連する機能亢進型 NLRP3 (D303N, H312P, A352V, R260W) においては、野生型 NLRP3 に比較して、speckle の形成の亢進が認められた。
- ・画像解析が high throughput system 対応であることを生かし、インフラマソーム機能に関連する因子の新規同定を進めている。

A. 研究目的

NLRP3 インフラマソームの機能はクリオピリン関連周期性発熱のみならず、各種感染症、結晶誘発性関節症、死細胞に対する炎症反応、糖尿病や動脈硬化などの慢性炎症性疾患に至るまで広範囲の生体反応において重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかしその分子メカニズムについては未だ十分解明されていない。

B. 研究方法

Fugene6 もしくは electroporation を用いた遺伝子導入により、蛍光 (Cerulean) -ASC を安定的に導入した HEK293T 細胞およびマクロファージ細胞株 RAW264.7 を樹立した。RAW264.7 細胞には遺伝子導入を容易とするためレトロウイルスレセプターを発現させた。これらの細胞は導入遺伝子保持のために puromycin の添加下に培養された。画像取得を蛍光顕微鏡にて行った後、ImageJ ソフトウェアを用いてその細胞面積、およびインフラマソーム活性の指標である speckle の解析を行った。

面積の取得には以下のマクロを用いた

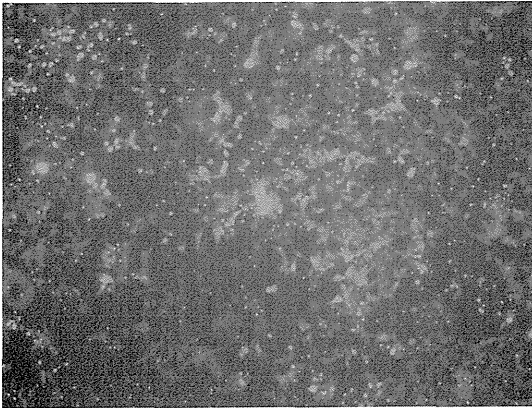
```
run("Set Measurements...", "area area_fraction\nredirect=None decimal=3");\nrun("Set Scale...", "distance=139.88 known=300\npixel=1 unit=microm");\nrun("Subtract Background...", "rolling=200");\nrun("Enhance Contrast", "saturated=0.2");\nrun("8-bit");\n//run("Threshold...");
```

```
setAutoThreshold( " Huang dark " );\nrun("Measure");
```

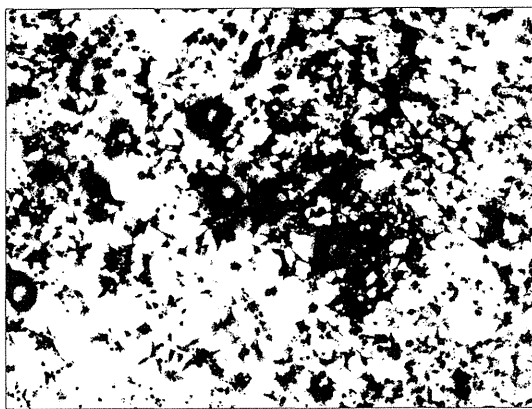
speckle の取得には以下のマクロを用いた。

```
run("Set Measurements...", "area area_fraction\nredirect=None decimal=3");\nrun("Set Scale...", "distance=139.88 known=300\npixel=1 unit=microm");\nrun("Find Maxima...", "noise=20 output=[Maxima\nWithin Tolerance]");\nrun("Analyze Particles...", "size=5-120\ncircularity=0.00-1.00 show=Outlines display clear\nsummarize");
```

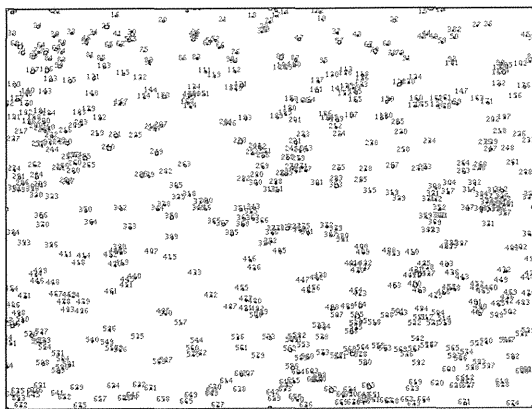
取得画像



面積取得画像



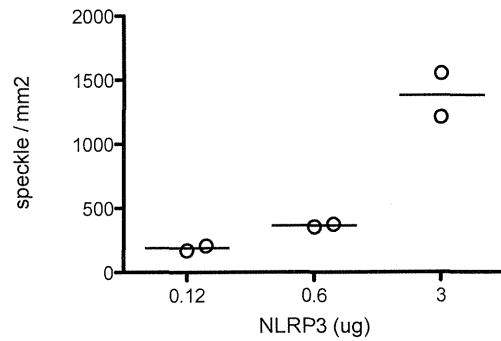
speckle 取得画像



C. 研究結果

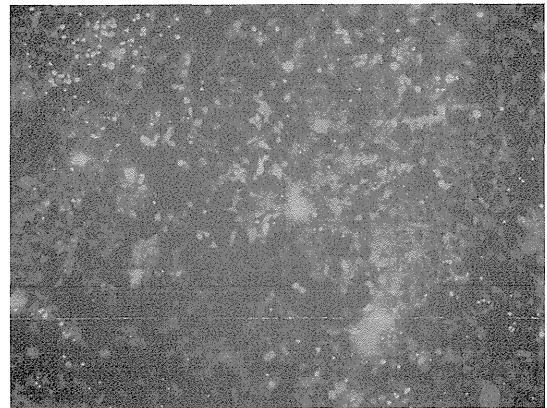
ASC-Cerulean 発現 HEK-293T に野生型 NLRP3 を transfect するとその用量依存性に ASC の細胞一極への集中(speckle)、即ちインフラマソームの形成が観察された。

[図] HEK293T 細胞におけるインフラマソーム再構成

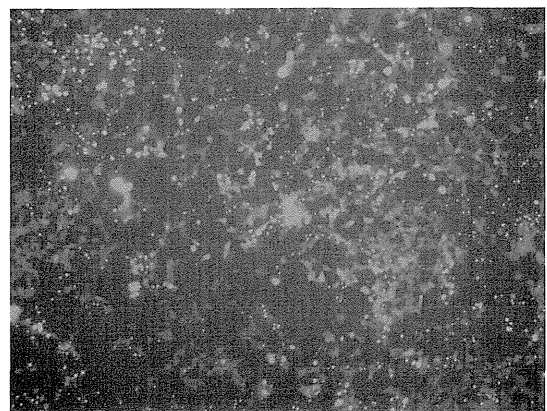


また、Nigericin 投与による speckle 形成の促進が認められた。

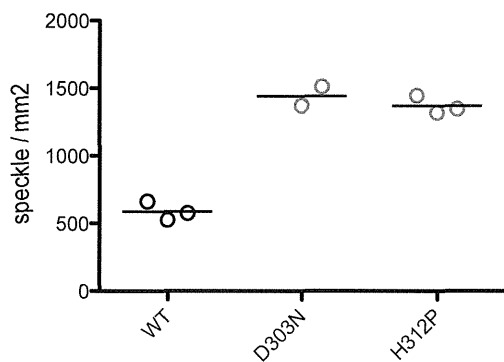
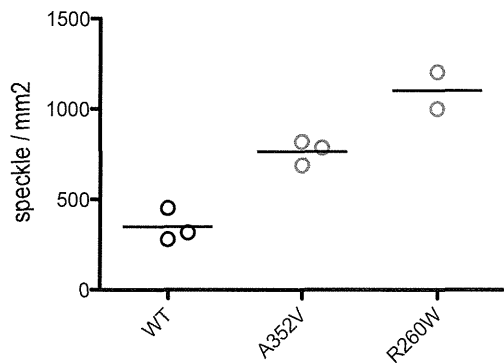
[図] Nigericin 投与前



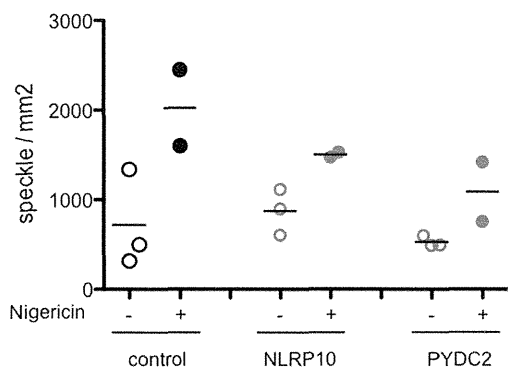
[図] Nigericin 投与後



クリオピリン関連周期性発熱と関連する機能亢進型 NLRP3 (D303N, H312P, A352V, R260W) においては、野生型 NLRP3 に比較して、speckle の形成の亢進が認められた。



また、NLRP3 インフラマソーム形成阻害に関連することが知られている PYDC2 の共発現においては、speckle 形成の低下が認められた。



D. 考察

今後、画像取得およびその処理を自動化し、ハイスループットシステムを構築し、ライブラリースクリーニングを行うことにより新規のインフラマソーム形成制御の分子機構を同定することを目標とする。

E. 結論

HEK293T 細胞において、NLRP3 の発現によるインフラマソーム speckle の形成、Nigericin 投与による更なる speckle 形成の促進を定量的に再構成する系を構築した。

クリオピリン関連周期性発熱と関連する機能亢進型 NLRP3 (D303N, H312P, A352V, R260W) においては、野生型 NLRP3 に比較して、speckle の形成の亢進が認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- De Nardo D, Labzin LI, Kono H, Seki R, Schmidt SV, et al. High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nature Immunology* 2013
- Yanagida T, Orihashi K, Kono H. In vivo evaluation of neutrophil recruitment in response to sterile particulates. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1040: 211-21, 2013
- Kono H, Onda A, Yanagida T. Molecular determinants of sterile inflammation. *Current Opinion in Immunology* 26: 147-156, 2014

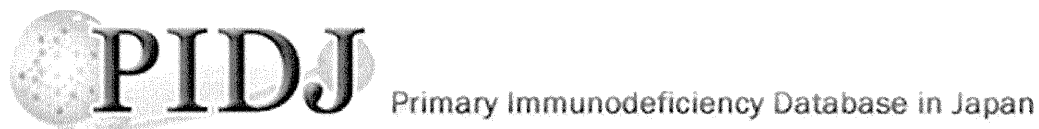
2. 学会発表

Kono H, Yanagida T, Kikuchi H, Asako K. Anti-inflammatory Property of HDL in NOD1 Ligand induced Kawasaki Arteritis in Mice. *ACR2013 2013 San Diego*

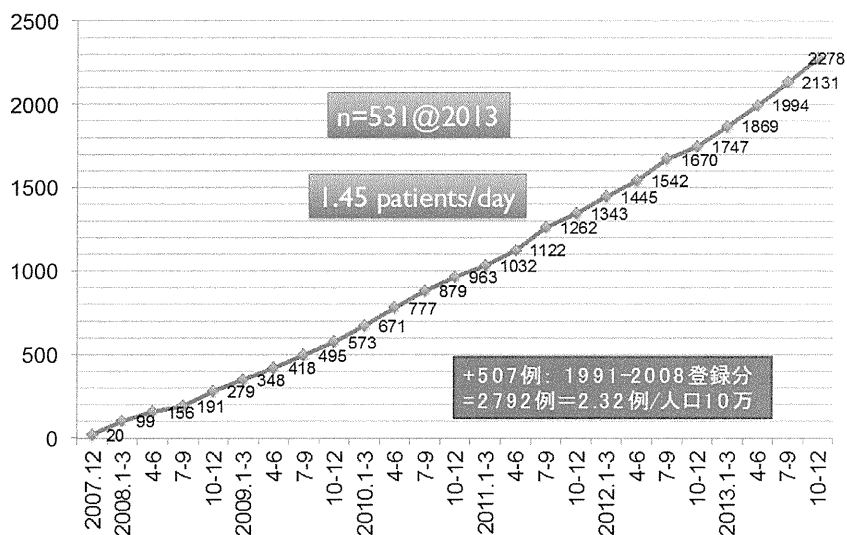
H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

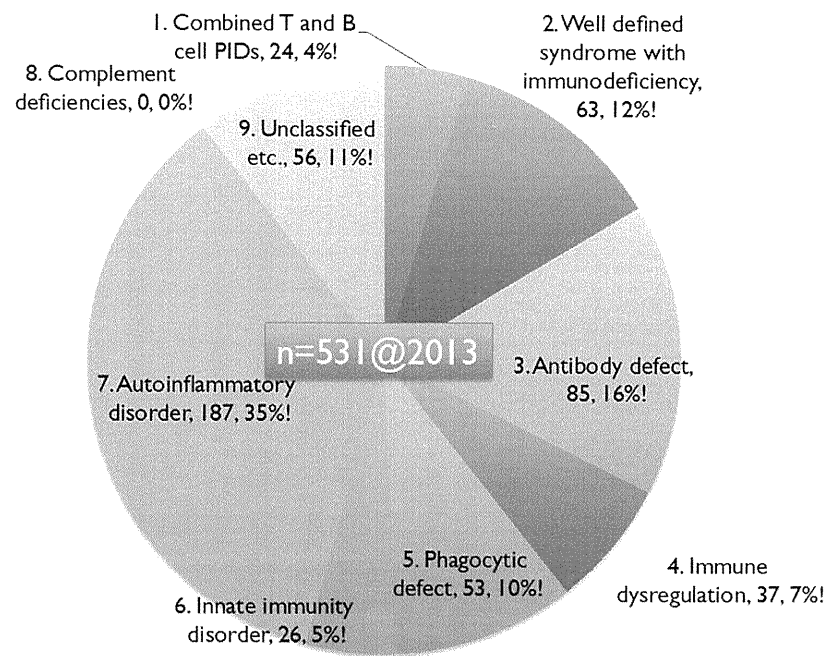
参考資料



患者登録の推移



平成 25 年度に登録された患者の疾患カテゴリー別分類



10:10~10:15

開会挨拶

当番幹事 金沢大学医薬保健研究域医学系 小児科
谷内江 昭宏

一般口演 1
「免疫不全を伴う症候群等」

10:15
≡
11:00

座長 信州大学医学部 小児医学講座

重村 倫成

1-1 皮膚の反復性化膿性病変を契機として診断に至った好中球二次顆粒欠損症の1例

金沢大学大学院医薬保健研究域医学系小児科
村岡 正裕

1-2 CMV感染により致死的経過をたどったComplete DiGeorge症候群の一例

京都大学医学部医学研究科 発達小児科学
柴田 洋史

1-3 食道潰瘍を反復した1型高IgE症候群の1例

岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学
山本 崇裕

一般口演 2
「病態解析」

11:00
≡
12:00

座長 京都大学大学院医学研究科 発達小児科学

平家 俊男

2-1 高IgE症候群患者の臨床的・免疫学的検討

愛媛大学 大学院医学系研究科 小児医学分野
東京医科歯科大学 大学院歯学総合研究科 発生発達病態学分野
高島 健浩

2-2 慢性肉芽腫症における過剰炎症と肉芽腫形成

国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部 遺伝子診断治療研究室
河合 利尚

2-3 Fanconi貧血患者における免疫学的検討

防衛医科大学校病院 小児科
本間 健一

2-4 オーバーラッピングペプチドを用いた多ウイルス特異的T細胞の調製

東京医科歯科大学大学院 発生発達病態学分野
森尾 友宏

12:00~13:30

休憩（各自 昼食をお取りください）

幹事会（PIDJ委員会）

会場：西鉄グランドホテル2F 「真珠の間」（研究会会場より徒歩 約5分）
※幹事会参加者の先生は昼食の準備がごさいます。

一般口演 3
「免疫調節異常」

13:30



14:30

講師 東京医科歯科大学大学院 発生発達病態学分野

森尾 友宏

3-1 X連鎖リンパ増殖症候群タイプ1の1家系におけるメモリーT細胞の体細胞変異

富山大学医学部 小児科

楊 曦

3-2 発症時に肝不全を呈した家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL) 2型の2例

九州大学大学院医学研究院 成長発達医学分野

加藤 稚子

3-3 4ヶ月遷延する発熱・肝脾腫・全身性リンパ節腫脹の精査にて診断に至ったRALD (RAS関連自己免疫性リンパ増殖症候群様疾患)の1歳女児例

北野病院 小児科

本田 吉孝

3-4 血球貪食性リンパ組織球症様症状で発症した自己免疫性リンパ増殖症候群男児例

北里大学医学部 小児科

江波戸 孝輔

一般口演 4
「移植/治療」

14:30



15:45

講師 名古屋大学大学院医学研究科 小児科学/成長発達医学

小島 勢二

4-1 ステロイド抵抗性GVHDに対し間葉系幹細胞輸注療法を施行した慢性肉芽腫症の1例

名古屋大学医学部附属病院 小児科

小島 大英

4-2 消化管病変を合併した慢性肉芽腫症に対して骨髄移植を施行した4例

広島大学病院 小児科

三木 瑞香

4-3 臍帯血幹細胞移植を行った慢性活動性EBウイルス感染症の2例

信州大学医学部 小児科

小林 法元

4-4 酵素補充療法が奏効した造血幹細胞遺伝子治療後のアデノシンデアミナーゼ欠損症の一例

国立成育医療研究センター 免疫科

中澤 裕美子

4-5 ステロイド依存性自己炎症症候群と分類不能型免疫不全症に対しRISTを施行した乳児例

東北大学医学部 小児科

森谷 邦彦

15:45~16:00

Break

一般口演 5
「複合免疫抗体不全」

16:00
≡
17:00

座長 東京医科歯科大学大学院 小児・周産期地域医療学
今井 耕輔

5-1 異なる phenotype を示した非典型的 XSCID の兄弟例

金沢大学医薬保健研究域医学系 小児科

和田 泰三

5-2 複合免疫不全を呈した SLC46A1 新規変異による先天性葉酸吸収不全症

北海道大学医学部 小児科

千田 奈津子

5-3 De novo IL2RG 遺伝子変異の mosaicism による遅発発症型重症複合型免疫不全症の一例

名古屋大学 小児科

奥野 友介

5-4 B細胞欠損の剖検例

埼玉県立小児医療センター 感染免疫アレルギー科

川野 豊

特別講演

17:00~18:00

座長 金沢大学医薬保健研究域医学系 小児科
谷内江 昭宏

**Newborn screening for primary immunodeficiency diseases:
TREC_s and KREC_s coming of age**

Prof. Lennart Hammarström

Head of the division of Clinical Immunology within the department of Laboratory Medicine (Karolinska Institutet) at Karolinska University Hospital Huddinge

18:00~18:10

閉会挨拶

代表幹事 防衛医科大学校小児科学講座

野々山 恵章

Newborn screening for primary immunodeficiency diseases: TRECs and KRECs coming of age

Head of the division of Clinical Immunology within the department of Laboratory Medicine (Karolinska Institutet)

at Karolinska University Hospital Huddinge >>>

Prof. Lennart Hammarström

Severe primary immunodeficiency diseases that are characterized by the lack of T cells (severe combined immunodeficiency - SCID) or B cells (e.g. X-linked agammaglobulinemia - XLA) share a high mortality and morbidity rate if not diagnosed early in life, leading to chronic organ damage, impairment in the overall quality of life, and eventually causing premature death due to infectious complications. Newborn screening programs for metabolic diseases have proven their potential for early diagnosis during the past decades. Accordingly, a neonatal screening test for SCID using a T cell receptor excision circle (TREC) PCR, originally developed by Puck and coworkers using DNA extracted from routinely obtained Guthrie cards from newborn children, was introduced in the USA, starting in Wisconsin in 2008. Based on the success of this program, a nationwide screening program for SCID has been advocated in the USA. A European newborn screening initiative, employing the TREC method, has also recently been started.

A similar PCR method for screening for B cell lymphopenia (deficiency), by examining kappa deleting recombination excision circles (KREC), was developed by Nonoyama and coworkers in 2011. We subsequently combined these two methods (TREC/KREC), together with a beta actin standard, to develop an assay that could simultaneously screen for both T and B cell lymphopenia (deficiency) and have used that on retrospective samples from patients with a variety of different forms of primary immunodeficiency (PID), using DNA from stored Guthrie cards, to prove its diagnostic value. Children with SCID are easily recognized, as are those with XLA and selected other forms of PID. Low levels of TREC and KREC are also seen in a fraction of prematurely born children and those with DiGeorge's syndrome and trisomy 21 and second tier tests have been developed to diagnose the latter.

Based on an analysis of more than 20 000 anonymized samples, suitable cut-off levels of TREC and KREC have been established, forming the basis for a pilot trial in Stockholm on 30 000 newborn children annually. The screening started in November 2013 and will continue for 3 years before a decision is taken on whether this program will be extended nationwide.

Results from the ongoing screening and diagnostic workup procedures will be presented at the meeting.



皮膚の反復性化膿性病変を契機として 診断に至った好中球二次顆粒欠損症の1例

A case of neutrophil specific granule deficiency manifested by recurrent episodes of skin infection.

金沢大学大学院医薬保健研究域医学系小児科 >>> 村岡 正裕、和田 泰三、東馬 智子、谷内江 昭宏

金沢大学大学院 医学系研究科再生分子医学 >>> 赤木 紀之、横田 崇

小松市民病院皮膚科 >>> 加治 賢三

好中球二次顆粒欠損症 (SGD) は、稀な常染色体劣性遺伝の先天性免疫不全症である。転写因子 C/EBP ϵ の異常により lactoferrin や defensin などの顆粒基質が欠損し、皮膚や肺、中耳などに難治性の反復性化膿性病変をきたすことが特徴である。その診断には末梢血スメアやフローサイトメトリーによる細胞解析、遺伝子解析が有用であるが、本症の報告数は極めて少なく、遺伝子変異のバリエーションと表現型の関連など、病態の詳細は未だ不明である。今回、我々は繰り返す皮膚の反復性化膿性病変などの臨床経過を契機として診断に至った SGD の 1 例を経験したので報告する。症例は 55 歳女性。1 歳頃から潰瘍化を伴う皮膚化膿性感染症を繰り返し、46 歳頃から頻度が増え、また治癒機転も約 1 か月以上と遷延していた。血液内科にて精査が行われ慢性単球性白血病疑いとして経過観察されていた。同様の症状だった兄が 11 歳で死亡しており、本人は皮膚化膿性病変のほか 1 年前に重症中耳炎として入院加療した既往歴があった。また、検査結果では顆粒球における顆粒の減少、二核の増加、持続する好塩基球増加、好酸球低下、単球増加、高 IgG、高 IgA 値が特徴的であった。フローサイトメトリーの表面抗原プロフィール検索では、顆粒球ゲートでの CD14 発現の増強、CD16 発現の低下を認めた。NBT 還元試験は正常であった。以上の結果と、好中球機能異常を疑う治癒遷延、先天性疾患を疑う家族歴や既往歴から SGD が疑われた。C/EBP ϵ 遺伝子を検索したところ、Leucine zipper domain に新規の 6 塩基欠失が認められた。抗菌薬の予防的投与が有効と考えられ、現在は ST 合剤内服のうえ慎重に経過観察している。今後、更なる蛋白解析、機能解析を行い、当該年齢まで致死的な感染症なく経過した要因等を解明する予定である。

CMV感染により致死的経過をたどった Complete DiGeorge症候群の一例

A case of complete DiGeorge syndrome with fatal Cytomegalovirus infection.

京都大学医学部医学研究科 発達小児科学 >>> 柴田 洋史、河合 朋樹、八角 高裕、西小森 隆太、
平家 俊男
大阪医科大学医学部小児科 >>> 岸 勘太

【緒言】 Complete DiGeorge症候群は、胸腺無形成を伴い、ナイーブT細胞が欠損する免疫不全症候群で、SCIDの臨床像を呈し、胸腺移植や造血幹細胞移植を行わないと日和見感染症を起こし早期に死亡に至る。造血幹細胞移植ではGVHD発症リスクが高いことが知られており、full match以外での移植成績は不良である。移植前にCMV感染を発症すると予後は著しく悪いことが知られている。

【症例】胎児エコーでFallot四徴症を指摘されており、その際に胸腺の確認ができなかった。X年10月在胎40週6日、APGAR Score 1分値6、5分値8、体重2912gで出生。循環管理目的にNICUに入院となった。生直後よりチアノーゼを認め、胸骨左縁第二肋間に収縮期駆出性雑音Levine 2/6を聴取した。心臓超音波検査でFallot四徴症、左肺動脈離断、動脈管開存を認め、生後1ヶ月頃に手術施行の方針となった。小さい口、耳の変形、鼻の変形などの特徴的顔貌を認め、胸部X線では胸腺の陰影を認めなかった。日齢14に低Ca血症によるテタニーが出現し、副甲状腺機能低下症の診断でCaの補正を行った。日齢27に左肺動脈形成術施行したが、その際に胸腺無形成を確認した。DiGeorge症候群の精査を行い、染色体FISHで22q11.2欠失を認め、T細胞が54/ μ L (CD4陽性T細胞28個)と低値で、ナイーブT細胞が欠損しており、complete DiGeorge症候群と診断した。骨髄移植を行う方針となったが、親族にHLA full matchのドナーがおらず、骨髄バンクにも適切なドナーが見つからなかった。ドナー選定を継続していたところ、日齢81にCMV感染が判明した。CMV antigenemiaを指標にValganciclovir、GanciclovirやFoscarnetの投与を行い、CMV感染のコントロールを行っていたが、日齢210に痙攣様のエピソードが出現し、その後、徐々に活気低下、傾眠傾向が認められるようになり、平行してantigenemiaが上昇傾向となった。呼吸状態も徐々に悪化し、日齢235に人工呼吸器管理となった。胸部CTでは肺野で間質陰影の増強が認められ、頭部MRIでは著明な白質の菲薄化を認めた。血中だけでなく、髄液、気管分泌物からもCMV ウイルスDNAが検出され、CMV肺炎、CMV脳炎を疑った。GanciclovirとFoscarnetの併用やCidofovir投与を行ったが、ウイルス量は低下せず、呼吸状態は徐々に悪化傾向となり日齢285に永眠された。

【結語】 Complete DiGeorge症候群に合併したCMV感染は著しく予後が悪い。早期発見・診断と移植までのCMV感染予防策など対策が必要である。