

平成21年 4月10日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19591244
研究課題名（和文） 複合免疫不全症の多様な臨床像とその背景となる分子生物学的基盤に関する研究
研究課題名（英文） Molecular mechanisms underlying the complex clinical features of combined immunodeficiency disorders.
研究代表者 谷内江 昭宏（YACHIE AKIHIRO） 金沢大学・医学系・教授 研究者番号：40210281

研究成果の概要：X-SCID は通常、T 細胞ならびに NK 細胞を欠損し、複合免疫不全症の病態を示すが、本研究では Omenn 症候群様の異常 T 細胞増殖と重症皮膚病変を示した症例の病態を解析した。その結果、皮膚に浸潤する T 細胞には共通  $\gamma$  鎖遺伝子に第二変異が起こっていることが確認された。これまでの研究でも、第二変異あるいは遺伝子変異の復帰により増殖したクローンが病態を修飾している症例を経験しており、本症例はこれまでの一連の研究と関連し、わずかなクローンに生じた新たな変異が臨床症状に多大な影響を及ぼすという、原発性免疫不全症ならではの現象を確認することとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：血管発生発達病態学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：Omenn 症候群，重症複合免疫不全症，第二変異，T 細胞抗原受容体解析，免疫寛容機構

## 1. 研究開始当初の背景

原発性免疫不全症の多くについてその遺伝的背景が明らかにされてきている。その結果、多様な遺伝子異常により免疫機能障害が引き起こされることが示されると同時に、同一の遺伝子異常によっても変異の種類や環境因子との相互作用により、多様な臨床症状が惹起されることも知られるようになってきた。すなわち、従来より報告されている典型的な免疫学的特徴を有しない、思いがけな

い臨床症状や検査所見を合併する症例が数多く存在することが明らかとされている。このような経験の蓄積から、その時点で観察される免疫学的特徴のみを手だてとして遺伝子異常を推定し特定の遺伝子解析を行うことが適切ではないことが明らかとなっている。しかし、多数の関連遺伝子の解析を網羅的に行うことは効率的ではなく、原因遺伝子がコードする蛋白の発現や機能を指標にスクリーニングすることが必要となっている。

T細胞分化障害を惹起する免疫異常の内、ヒトでの遺伝子異常が明らかとされているものは数少ないが、同様の臨床像を示す遺伝子異常が数多く存在する。特にT細胞の成熟障害を伴う重症複合免疫不全症では、わずかに存在する自己T細胞や母体由来T細胞、変異遺伝子の正常への回復(reversion)を起こしたT細胞クローンの存在などにより複雑な臨床像が形成される。また一方、重症アトピー性皮膚炎などの、本来良性疾患である疾患において、重症化に伴い強い全身炎症、低免疫グロブリン血症、好酸球増加など、一見T細胞分化障害と酷似した臨床像を認める例があることが知られる。

## 2. 研究の目的

このような多様な病態を整理してRAG1/RAG2異常症やArtemis異常などの典型的な抗原受容体再構成機構の異常を診断するためには、T細胞での抗原受容体多様性解析などの機能的評価システムを確立することがきわめて重要であると考えられる。本研究では、特にリンパ球分化障害が示唆される多様な免疫不全症候群について、1)その早期機能診断としてのTCR構造解析の意義を明らかにすること、2)さらにこのような解析を通して、類似する臨床像を示す疾患群の分子病態を明らかとする、3)また、血液幹細胞移植後のT細胞再構築過程の指標としてのTCR構造多様性解析の重要性を示す。

## 3. 研究の方法

- 1) **Omenn症候群ならびに類似疾患における臨床像と免疫機能とTCR構造多様性との関連の解析**: これまでに集積された症例のデータについて、TCR構造多様性との比較により再検討を行う。また、今後新たに依頼される症例についても解析対象として加えて評価する。TCRV $\beta$  repertoire分布とCDR3サイズ分布解析を駆使したTCR多様性の定量的解析の臨床的意義を明らかにする。予備的な検討では次ページ図に示すように、RAG異常症の移植前後で顕著な多様性の差を表現できることが示されている。
- 2) **血液幹細胞移植によるT細胞回復機構の解析**: これらの複合免疫不全症例の血

液幹細胞移植後の経過を、T細胞TCR多様性回復の観点から評価する。特に、移植後超早期における機能的T細胞集団の存在は、免疫不全症のみでなく多様な疾患に対する血液幹細胞移植後の経過に密接に関わると考えられる。今回の研究では、どのようなTCRV $\beta$  usageとCDR3塩基配列の情報をもとに移植前後のT細胞クローンの変化を追跡する。

**【対象】**リンパ球分化異常(特にOmenn症候群)を疑われてRAG1/RAG2遺伝子検索を依頼された症例ならびに正常対照、重症アトピー性皮膚炎症例。

### 【方法】

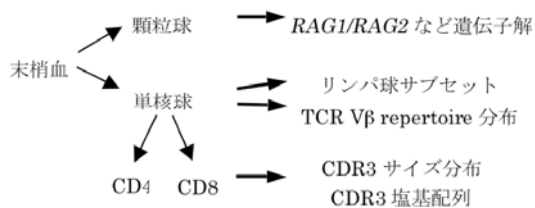
- 1) **末梢血リンパ球亜群解析**: FITC標識抗HLA-DR抗体、抗CD16抗体、抗CD45RO抗体、PE標識抗CD3抗体、抗CD20抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体を用いて末梢血白血球を染色、フローサイトメトリー法により解析、リンパ球分布の異常、T細胞の活性化状況、T細胞ナイーブ/メモリー比率などを評価する。解析には既設のFACS Caliburを用いる。
- 2) **TCRV $\beta$ 鎖発現の解析**: 21種類のPE標識抗TCRBV抗体、FITC標識抗CD8抗体ならびにRPE-Cy5標識抗CD4抗体を用いた3-カラーフローサイトメトリー法により末梢血T細胞亜群中のTCRBVレパートリー分布を解析する。解析には既設のFACS Caliburを用いる。
- 3) **CDR3サイズ分布の解析**: 25種類の5' TCRBV特異的プライマー(BV1~20, BV21~24)と6Fam標識3' TCRBC特異的プライマーを用いる。PCR反応液は、10  $\times$  PCR Buffer (100mM Tris-HCl; pH8.3, 500mM KCl)、25mM MgCl<sub>2</sub>、2mM dNTP、20  $\mu$ M 5' BVプライマー、20  $\mu$ M 6Fam標識3' BCプライマー、Ampli Taq Gold 0.75U、cDNA 3  $\mu$ l および水を添加、全量を30  $\mu$ lとし、Gene Amp PCR System 9700を用いて、95°C  $\times$  1分、55°C  $\times$  1分、72°C  $\times$  1分、35サイクル増幅させる。各PCR産物2  $\mu$ l、Formamide 12  $\mu$ l、Gene Scan 500ROX 0.5  $\mu$ lを混和、

あ95°C×2分で熱変性後、急速冷却の後、サンプルをABI 310 Gene Scanにて自動解析する。また得られたサイズ分布より、各TCRVβ内での多様性の指標となる、complexity score (CS)を算出する。サイズ分布パターンをTCRVβ鎖発現データと統合して3D解析の資料とする(図)。

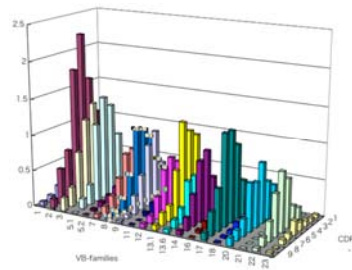
4) **末梢白血球分画の単離**: 末梢血よりデキストラン法を用いて白血球濃縮血漿を得る。さらに、フィコールハイパーク比重遠心法にて顆粒球と単核球分画に分離した。単核球はさらに、Eロゼット法によりT細胞を分離した。その後BD IMag抗CD4、CD8を用いて、CD4<sup>+</sup>T細胞とCD8<sup>+</sup>T細胞を単離する。B細胞は非ロゼット形成細胞からBD IMag抗CD19により単離、NK細胞は単核球から直接BD IMag抗CD56を用いて単離する。これらの細胞分画をTCR解析あるいはmRNA、DNA解析の試料とする。

5) **CDR3塩基配列の解析**: cDNAをTCRBV特異的プライマーと無標識TCRCV特異的プライマーを用いて増幅したPCR産物をサンプルとして、TOPO TA Cloning Kitによりクローニングを施行する。移植前に関しては約20個、移植後は50個のコロニーを選んだ後、Colony PCRの後アガロース電気泳動にてインサート領域を含むことを確認する。その後、PCR産物5μlとExoSAP-IT 2μlを混合、Gene Amp PCR System 9600を用いて、37°C×15分、85°C×15分反応させた。このうち1μlを鋳型として用いて、dye terminator法によるサイクルシーケンスにより蛍光標識を行った後、ABI 3100 Genetic Analyzerにより自動解析する。

解析ダイアグラム



3-D display による TCR 多様性の評価



#### 4. 研究成果

##### 1) 血液幹細胞移植による T 細胞再構成過程の解析

血液幹細胞移植は血液悪性腫瘍のみでなく、重症免疫不全症に対する根治療法として重要な治療法である。一方血液幹細胞移植後の免疫再構築が感染症を含む様々な合併症を最小限にとどめて治療を成功させるために必須と考えられる。しかしながら、移植後の免疫再構築機構の詳細、特にその経時的変化については不明の点が多かった。本研究では、重症複合免疫不全症症例を対象に、TCR 構造解析を用いることにより T 細胞多様性の回復過程をダイナミックに観察した。その結果、1) 移植後極めて早期に一過性の多様性回復が起こること、2) このような多様性の回復はその後低下し、数ヶ月の間隔をおいて本格的な回復が起こること、3) 移植後早期の多様性はドナー由来の成熟 T 細胞の増殖を反映している可能性があること、などが明らかにされた。

##### 1) 遺伝子変異復帰症例の解析 ; X-SCID

は通常、T細胞ならびにNK細胞を欠損し、複合免疫不全症の病態を示すが、本研究では Omenn 症候群様の異常 T 細胞増殖と重症皮膚病変を示した症例の病態を解析した。その結果、皮膚に浸潤する T 細胞には共通 γ 鎖遺伝子に第二変異が起こっていることが確認された。本来の変異によりスプライス異常のため蛋白欠損となるべきものが、第二変異によりスプライス異常が回避され T 細胞のクローン性増殖と活性化が惹起されたものと推定された。これまでの研究でも、多様な第二変異あるいは遺伝子変異の復帰により増殖したクローンが病態を修飾している症例を経験しており、本症例はこれまでの一連の研究と関連し

て、わずかなクローンに生じた新たな変異が臨床症状に多大な影響を及ぼすという、原発性免疫不全症ならではの現象を確認することになった。

2) 自己免疫疾患における T 細胞抗原受容体解析 ; 原発性免疫不全症においては、特定の付加的遺伝子変異を有するクローンが病態に影響を及ぼすことが明らかとされたが、本研究では、T 細胞が関与することが推定されている自己免疫疾患の一つとして甲状腺疾患を対象として解析した。TCR 構造解析の手法を用いて、様々な病期にある慢性甲状腺炎、あるいはバセドウ氏病の患者について、解析を施行した。その結果、1) バセドウ氏病では TCR 構造の多様性に異常はほとんどみられないこと、2) 経過の長い慢性甲状腺炎症例では多くの場合に TCR 構造の多様性に偏りが見られることが明らかにされた。この結果は、甲状腺にリンパ球浸潤が起こることを特徴とする慢性甲状腺炎などでは、CD8<sup>+</sup> T 細胞が病態形成/遷延化に強く関与していることを示唆している。

3) ヘムオキシゲナーゼ 1 の炎症制御と免疫システムに与えるインパクト ; ヘムオキシゲナーゼはヘム代謝の律速酵素として同定されたが、最近では CO 産生や IL-10 産生を介して強力な抗炎症作用、細胞保護作用を発揮することが明らかにされつつある。本研究では、当教室で報告した HO-1 欠損症の病態解析を基盤に、HO-1 が炎症制御や特異免疫機能に与えるインパクトを多角的に検証した。免疫異常病態の理解や新しい治療戦略の開発に、HO-1 とその関連する機能分子の役割が注目される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Okajima M, Wada T, Nishida M, Yokoyama T, Nakayama Y, Hashida Y, Shibata F, Tone Y, Ishizaki A, Shimizu M, Saito T, Ohta K, Toma T, Yachie A. Analysis of T cell receptor Vb diversity in peripheral CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in patients with autoimmune thyroid diseases. Clin Exp Immunol 2008; 155: 166-172. [査読有]
2. Wada T, Yasui M, Toma T, Nakayama Y,

Nishida M, Shimizu M, Okajima M, Kasahara Y, Koizumi S, Inoue M, Kawa K, Yachie A. Blood 2008; 112: 1872-1875. [査読有]

3. Okamoto H, Arai C, Shibata F, Toma T, Wada T, Inoue M, Tone Y, Kasahara Y, Koizumi S, Kamachi Y, Ishida Y, Inagaki J, Kato M, Morio T, Yachie A. Clonotypic analysis of T cell reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in patients with severe combined immunodeficiency. Clin Exp Immunol 2007; 148: 45-460. [査読有]
4. Shibata F, Toma T, Wada T, Inoue M, Tone Y, Ohta K, Kasahara Y, Sano F, Kimura M, Ikeno M, Koizumi S, Yachie A. Skin infiltration of CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> natural killer cells in a case of X-SCID with Omenn syndrome-like manifestations. Eur J Haematol 2007; 79: 81-85. [査読有]
5. Wada T, Kurokawa T, Toma T, Shibata F, Tone Y, Hashida Y, Kaya H, Yoshida T, Yachie A. Immunophenotypic analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-infected CD8<sup>+</sup> T cells in a patient with EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. Eur J Haematol 2007; 79: 72-75. [査読有]
6. 谷内江昭宏 ヘムオキシゲナーゼと生体防御機構 ; 抗炎症治療のパラダイムシフト Jpn J Clin Immunol 2007; 30: 11-21. [総説 ; 査読なし]
7. Yamazaki H, Ohta K, Tsukiji H, Toma T, Hashida Y, Ishizaki A, Saito T, Arai S, Koizumi S, Yachie A. Corticosteroid enhances heme oxygenase-1 production by circulating monocytes by up-regulating hemoglobin scavenger receptor and amplifying the receptor-mediated uptake of hemoglobin-haptoglobin complex. Biochem Biophys Res Commun 2007; 358: 506-512. [査読有]

[学会発表] (計 15 件)

1. 蚊刺による水疱の細胞成分を解析した慢性活動性 EB ウイルス感染症の 1 例. 和田泰三, 中川裕康, 橋田暢子, 柴田文恵, 刀祢裕美, 清水正樹, 東馬智子, 笠原善仁, 谷内江昭宏. 第 19 回 EB ウイルス感染症研究会, 第 5 回血球貧食症候群研究会. (2009, 3, 7, 東京)

2. 少量抗原摂取により誘発された food protein-induced enterocolitis syndrome(FPIES)の一例. 梅 暁子, 柴田文恵, 和田泰三, 金兼千春, 東馬智子, 谷内江昭宏. 第 45 回日本小児アレルギー学会(2008, 12, 13~14, 横浜)

3. Omenn Disease and Related Syndrome; Variable Genetic Backgrounds and Common Pathogenesis. Yachie A. (2008, 12, 11~12, Yokohama)

4. クルクミンによる HO-1 産生誘導と炎症制御. 谷内江昭宏, 柴田文恵, 和田泰三, 金兼千春, 東馬智子. 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2008, 11, 27~29, 東京)

5. 小児腎尿路疾患における尿中 hemeoxygenase-1 の発現とバイオマーカープロファイリング. 清水正樹, 横山忠史, (太田和秀: 金沢医療センター小児科), 谷内江昭宏. 第 36 回日本臨床免疫学会総会(2008, 10, 17~18, 東京)

6. Multiple reversion mosaicism of common gamma chain ( $\gamma_c$ ) mutation causing X-linked severe combined immunodeficiency restored enough T-cell repertoires to mount anti-varicella immunity. (Kawai T, Saitoh M, Nishikomari R: Pediatrics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto Japan), (Okafuji I: Kobe City Medical Center General Hospital, Kobe, Japan), (Sakai H, Murata Y, Tanaka N, Tanaka T, Ohmori K), (Murakami T: Pediatrics, Nara City Hospital, Nara, Japan), (Mori Y: Laboratory of Virology and Vaccinology, National Institute of Biomedical innovation, Ibaraki, Japan), (Imai K: Pediatrics, National Defense Medical College Hospital, Tokorozawa, Japan), Wada T, Yachie A. (Heike T, Nakahara T).13th Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID) (2008, 10, 16 ~ 19 , 's-Hertogenbosch The Netherlands)

7. Detection of revertant T lymphocytes in skin lesions of atypical X-linked severe combined immunodeficiency mimicking Omenn syndrome. Wada T, (Yasui M: Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Department of Hematology/Oncology, Osaka Japan), Toma T, Nakayama Y, Nishida M, Shimizu M, Okajima M, Kasahara Y, Koizumi S, (Inoue M, Kawa K), Yachie A. 13th Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID) (2008, 10, 16~19, 's-Hertogenbosch The Netherlands)

8. ヘム分解の異常と疾患. 谷内江昭宏. 第 81 回日本生化学会大会, 第 31 回日本分子生物学会年会 同時開催 (2008, 10, 9~12, 神戸)

9. 病原性大腸菌 O157 による出血性大腸炎に続発した劇症型抗リン脂質抗体症候群 (CAPS) の一例. 清水正樹, 谷内江昭宏, (太田和秀: 金沢医療センター小児科). 第 18 回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 (2008, 10, 3~5, 札幌)

10. 慢性活動性 EB ウイルス感染症男児例における蚊刺後の水疱内細胞成分の解析. 和田泰三, 柴田文恵, 中川裕康, 橋田暢子, 刀祢裕美, 清水正樹, 東馬智子, 笠原善仁, 谷内江昭宏. 第 16 回北陸ウイルス感染症研究会. (2008, 9, 13, 金沢)

11. 各種腎尿路系疾患における尿沈渣中 hemeoxygenase-1 の発現~尿中バイオマーカーから炎症性腎疾患の病態を把握する試み~. 横山忠史, 清水正樹, 谷内江昭宏, 小泉晶一, (太田和秀: 金沢医療センター小児科). 第 43 回日本小児腎臓病学会学術集会 (2008, 6, 13~14, 福岡)

12. Omenn 症候群ならびに類似疾患の遺伝子異常と特徴的病態の発症機構. 谷内江昭宏, 柴田文恵, 和田泰三, 金兼千春, 東馬智子, 笠原善仁, (小泉晶一: 金沢大学子どものこころの発達研究センター). 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2008, 6, 12~14, 東京)

13. 種痘様水泡症で気付かれた慢性活動性 EB ウイルス感染症(CAEBV)の 4 歳女児例. 梅 暁子, 馬瀬新太郎, 刀祢裕美, 清水正樹, 和田泰三, 東馬智子, 犀川 太, 笠原善仁, 谷内江昭宏, (小泉晶一: 金沢大学子どものこころの発達研究センター), (長谷川 稔: 金沢大学皮膚科学), (全 陽, 中田聡子: 金沢大学病理部). 第 293 回日本小児科学会北陸地方会 (2008, 6, 8, 福井県吉田郡)

14. Omenn 症候群様症状を呈した非典型的 X-SCID にみられた遺伝子変異の復帰. 和田泰三, 東馬智子, 刀祢裕美, 笠原善仁, 小泉晶一, 谷内江昭宏, (安井昌博, 井上雅美, 河 敬世: 大阪母子保健総合医療センター血液腫瘍科). 第 111 回日本小児科学会学術集会 (2008, 4, 25~27, 東京)

15. 急性 EBV 感染を契機に発症した全身型若年性特発性関節炎の 1 例. 横山忠史, 伊川泰広, 和田泰三, 東馬智子, 笠原善仁, 谷内江昭宏, (長沖優子, 和田英男: 公立能登総合病院小児科). 第 111 回日本小児科学会学術集会 (2008, 4, 25~27, 東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷内江 昭宏 (YACHIE AKIHIRO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 40210281