

題 目

樹状細胞欠損症の原因としての GATA2 異常の同定と、
GATA2 異常患者の免疫学的検討

成長発達臨床医学 専攻

本 間 健 一

平成 25 年 5 月 29 日

目次

第1章 諸言	1 頁
第2章 原発性免疫不全症患者における樹状細胞の測定	3 頁
第3章 樹状細胞欠損症患者における Exome 解析	6 頁
第4章 GATA2 異常症患者における臨床症状の検討	11 頁
第5章 GATA2 異常症患者における血液細胞分化異常	18 頁
第6章 GATA2 異常症患者における TREC、sjKREC 解析	21 頁
第7章 GATA2 異常症患者における T 細胞分画異常	26 頁
第8章 GATA2 異常症患者におけるサイトカイン産生能の測定	29 頁
第9章 結論	32 頁
謝辞	33 頁
引用文献	34 頁
単語説明	41 頁
図表	46 頁

第1章 緒言

原発性（先天性）免疫不全症（**primary immunodeficiency**）は、細菌、ウイルス、真菌といった病原体から体を守っている免疫系において重要な役割を果たしている分子の遺伝子異常により免疫能が低下し、種々の病原体に対する易感染性を示す疾患群であり、現在では180以上の責任遺伝子が知られている¹⁻³⁾。

我々は、一般臨床医からの紹介情報をもとにした原発性免疫不全症患者の前方視的データベース **PIDJ (Primary Immunodeficiency Database in Japan)** を開発し⁴⁾、これまでに800例を超える原発性免疫不全症の患者データを得てきた。

集積した患者群から、既知の原発性免疫不全症の責任遺伝子変異を認めない原因不明の **B** 細胞および **NK** 細胞欠損症患者を複数例認めた。これまでに、原発性免疫不全症には免疫担当細胞の分化異常を伴う多くの病型が報告されているが、**T** 細胞が存在し、**B** 細胞、**NK** 細胞を欠損するような細胞分化異常を伴う原発性免疫不全症の報告はなかったことから⁵⁾、これらの患者が新規原発性免疫不全症の可能性が高いと考えられた。

その一方で、基礎研究では **T** 細胞が存在し、**B** 細胞、**NK** 細胞、樹状細胞欠損を伴うような **Flt3**、**Flt3L**⁶⁻⁸⁾、**PU.1**⁹⁾、**IKAROS**¹⁰⁾ **Knock-out (KO) mouse** などの遺伝子組換えマウスが複数報告されていた。

こうした動物での知見から、樹状細胞欠損を伴う患者が疾患責任遺伝子未同定の原発性免疫不全症患者の中にも存在しているのでは考え、2010年2月より、当科に **PIDJ** を通じて紹介された原発性免疫不全症患者の全例で樹状細胞 (**Dendritic Cell**、以下 **DC**) を測定することとし、樹状細胞欠損症を含めた細胞分画異常を伴う原発性免疫不全症の同定をすることとした。

本研究の目的は、樹状細胞欠損症患者を診断して、その疾患責任遺伝子を同定し病態を明

らかにすることで、樹状細胞欠損症患者の臨床症状を把握し、樹状細胞欠損症患者の早期診断や適切な治療方法を明らかにすることを目的とした。

なお、本研究はヒト検体を用いるため、防衛医科大学校倫理委員会の承認（受付番号 1095「原発性免疫不全症の早期診断法の確立に関する研究」）（受付番号 1143「原発性免疫不全症の早期診断法の確立に関する研究」）を得て実施した。検体採取に際しては、対象者もしくはその保護者に研究内容を文書と口頭により説明し、署名と同意を得た。

第2章 原発性免疫不全症患者における樹状細胞の測定

第1節 背景

DC は、1974 年ラルフ・スタインマンらによって発見された細胞¹¹⁾で、強い抗原提示能を持ち、補助因子、MHC (major histocompatibility complex: 主要組織適合遺伝子複合体) 分子を発現し、T 細胞を活性化することにより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。

ヒトでは、末梢血中に存在する DC は大きく 2 分画に分けられ、マウスの CD11c⁺B220⁻ conventional DC に該当する骨髄球系樹状細胞 (myeloid DC、以下 mDC)、CD11c⁺B220⁺ plasmacytoid DC (以下 pDC) に該当する形質細胞様樹状細胞 (pDC) の存在が知られている¹²⁾。

mDC は、通常の状態では組織内に定住する細胞で、IL-12 の産生や、T 細胞への抗原提示を担っている。pDC は、type I interferon を主に産生する細胞で、抗原提示、T 細胞の応答に関与し、免疫反応、免疫寛容に関わっている。

既報によると、正常小児の白血球 (White blood cell、以下 WBC) 中の樹状細胞率は、mDC 0.28 ± 0.10 %/ WBC、pDC 0.16 ± 0.08 %/ WBC¹³⁾で、mDC は年齢による正常値の変化はないが、pDC は年齢依存性に樹状細胞率、樹状細胞ともに若干の減少を認める¹³⁻¹⁵⁾。

また、先行研究における原発性免疫不全症における樹状細胞の解析では、*BTK* 遺伝子変異による B 細胞単独欠損症である X-linked agammaglobulinaemia (以下 XLA) や、責任遺伝子変異未同定の分類不能型免疫不全症 (Common variable immunodeficiency) 患者の一部で mDC、pDC が減少していることを報告されている¹⁶⁾が、mDC、pDC を完全に欠損したヒト樹状細胞欠損症の報告はこれまでになかった。

しかし、KO マウスを用いた基礎研究では、DC 欠損マウスが多数報告されており、一部の

KO マウスでは、B 細胞、NK 細胞等の免疫担当細胞の欠損を合併していることが報告されている¹²⁾。そのため、未診断の原発性免疫不全症患者の中には、樹状細胞が欠損している患者がいるのではないかと推測した。特に、既知の原発性免疫不全症としては診断されていない B 細胞、NK 細胞欠損患者においては、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^{17,18)} の欠損が背景にある可能性を考えた。

そこで、原発性免疫不全症患者として紹介された患者全例の末梢血中の mDC、pDC を測定し、樹状細胞欠損症患者が存在するのかを検討した。

第 2 節 対象および方法

(1) 対象と検体採取

2010 年 2 月より PIDJ を通じて防衛医科大学校小児科に原発性免疫不全症の免疫学的検討の依頼を受け、同意を得た上で末梢血 3~5ml を EDTA 加血液として入手できた患者 181 名。

(2) 細胞の調整

得られた末梢血検体を 1×Lysis Buffer (Becton Dickinson、以下 BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) と混合し、室温で 15 分間静置することで赤血球を溶解した。溶解後、室温で 1700 rpm、5 分間遠心し、細胞上清を廃棄することを 2 回繰り返し、末梢血由来顆粒球、単核球を得た。

次いで、細胞を氷上で Round Bottom Tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) に加え、フローサイトメトリー用の抗体を用いて 20~25 分間染色した。

抗体は、Lineage (Lin) Cocktail 1 (Anti-CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) FITC labeled Ab、Anti-HLA-DR PE labeled Ab、Anti-CD123 PE-Cy5 labeled Ab、Anti-CD11c APC labeled Ab を用いた。Anti-CD123 抗体は eBioscience (San Diego, CA) から購入し、それ以外の抗体は BD から抗体を購入した。

細胞を染色後、フローサイトメトリー (FACS calibur、BD) を用いて解析した。

既報に従い、ヒト mDC を、 $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^+ \text{CD11c}^+$ 細胞分画と定義し、pDC を、 $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^+ \text{CD123}^+$ 細胞分画と定義してそれぞれを測定した¹⁹⁾。

第3節 結果

原発性免疫不全症患者 181 人の末梢血白血球分画中の mDC、pDC 細胞率を測定した (図 2)。その結果、mDC は、 $0.25 \pm 0.19 \% / \text{WBC}$ 、pDC は、 $0.17 \pm 0.15 \% / \text{WBC}$ であった。

このうち、mDC および pDC 両方の樹状細胞を欠損する患者 (mDC=0.00%、pDC=0.00%) を 6 名認めた。

第4節 考察

mDC、pDC 両方の樹状細胞欠損症患者を 6 名認めた。樹状細胞欠損症患者の報告はなく、新規の原発性免疫不全症と考えられた。

このうち、水痘の重症感染を契機に原発性免疫不全症を疑われ精査に至った症例を 3 例認めた。この 3 名の患者では、当科紹介前の免疫学的検討として B 細胞、NK 細胞、単球の欠損が指摘されており、樹状細胞欠損マウスの一部で、B 細胞、NK 細胞、単球の欠損が合併していたという基礎研究での結果と一致した。

そのため、樹状細胞欠損症患者における共通の疾患責任遺伝子の存在を考え、疾患責任遺伝子の同定を行うこととした。

第5節 小括

ヒトの樹状細胞欠損症を 6 例同定した。共通の疾患責任遺伝子の存在を考え、遺伝子同定を行うこととした。

第3章 Exome 解析による樹状細胞欠損症患者における *GATA2* 遺伝子異常の同定

第1節 背景

樹状細胞分化に必須である遺伝子は、マウスにおける基礎研究で複数報告されていたが、ヒトにおいて樹状細胞欠損症の報告はなかった。そのため、マウスの既報に従い *Flt3*、*Flt3L*、*IKAROS* 等の候補遺伝子における患者の遺伝子配列を、ダイレクトシーケンス法により解析したが、遺伝子は正常型で疾患責任遺伝子の同定には至らなかった（データ示さず）ため、Exome 解析による樹状細胞欠損症の責任遺伝子同定を行った。

第2節 対象および方法

(1) 対象と検体採取

防衛医科大学小児科で原発性免疫不全症患者の免疫学的検討を行い、樹状細胞の欠損を認めた患者6名のうち、同意を取れた2名で Exome 解析を行った。次いで、Exome 解析で遺伝子変異を認めた、*GATA2* 遺伝子についてダイレクトシーケンス法による遺伝子変異部位の確認を行った。

(2) 細胞の調整、gDNA の抽出

末梢血1検体当たり 200 μ l をサンプル量とし、QIAamp DNA Micro キット (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて gDNA を溶出量 100 μ l で抽出した。得られた DNA はすべて Qubit フルオロメーター (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) または Gene Quant pro (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) を用いて濃度を測定した。

(3) Exome 解析

抽出した gDNA を、Sureselect Human All Exone Kit (Agilent, California, USA) を用いてキャプチャーし、ライブラリを作成後、HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, USA) を用いて Exome 解析を行なった。得られたリードデータから、Integrative Genomics Viewer (Broad Institute, USA) を用いて DNA 塩基配列結果を解析した。

(4) 候補遺伝子シーケンス

①PCR 法による各遺伝子の増幅

抽出した gDNA を、各遺伝子のエクソンおよびエクソン・イントロン境界域を含む部分を Polymerase Chain Reaction (以下 PCR) 法によって増幅した。プライマーは、GENETYX-MAC (GENETYX, JAPAN) を用いて設計し作成した。PCR 反応物は、High Fidelity PCR Master (Roche, Grenzachstrasse, Basel, Schweiz) を用いて調整し、Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems、以下 ABI, Foster, California, USA) を用いて、PCR 法による増幅反応を行った。PCR の反応条件は、初期変性 94°C 5 分間後、40 サイクル(熱変性 94°C 60 秒, アニーリング 60°C 60 秒, 伸長反応 72°C 60 分) 繰り返した後、72°C 10 分間で最終伸長として PCR を実施した。次いで、反応液を 1.2%アガロースゲルにて電気泳動し、PCR 産物を確認した。

②ダイターミネーター法によるダイレクトシーケンス

次に、精製した PCR 産物をシーケンス反応液 [PCR 精製物 1 μ l、BigDye® Terminator v1.1 (ABI) 4 μ l, BigDye® Terminator Sequencing Buffer (ABI) 2 μ l, Primer (10 μ M) 0.5 μ l、H₂O 12.5 μ l] として調整し、Dye Terminator 法により、Gene Amp® PCR system 9700 (ABI) を用いて増幅反応を行った。PCR の反応条件は初期変性 96°C 1 分間を行

った後、40 サイクル（熱変性 96°C10 秒、アニーリング 50°C5 秒、伸長反応 60°C4 分）繰り返した後、60°C4 分間で最終伸長とした。

シーケンス反応産物は Millipore Multiscreen (Millipore, Billerica, MA, USA)、Sephadex TM G-50 Superfine (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を用いて精製した後、Hi-Di ホルムアミドにより希釈し、3130xL Genetic Analyzer (ABI) により遺伝子配列を決定した。

第3節 結果

Patient1 では、目的とする Exon を含む塩基配列部分を 10 回以上繰り返し読めた (Read) 領域は 74.65% (4 回以上繰り返し読めた領域 88.7%) であった。

ミスセンス変異 (Missense mutation) や、ナンセンス変異 (Nonsense mutation) などの点突然変異のホモ変異 (塩基配列を複数回読んだうち、変異率 \geq 80%と定義) を、33 遺伝子変異認め、ヘテロ変異 (30% \leq 変異率 $<$ 80%と定義) を 1304 遺伝子変異認めた。

塩基の挿入または欠損による遺伝子変異 (Insertion-Deletion mutation; Indel) では、ホモ変異 を 8 遺伝子変異認め、ヘテロ変異を 107 遺伝子変異認めた。

Patient2 では、目的とする Exon を含む塩基配列部分を 10 回以上繰り返し読めた領域は 73.81% (4 回以上 87.67%) であった。

このうち、ミスセンス変異や、ナンセンス変異などの点突然変異のホモ変異を 37 遺伝子変異認め、ヘテロ変異を 1186 遺伝子変異認めた。

塩基の挿入または欠損による遺伝子変異では、ホモ変異を 10 遺伝子変異認め、ヘテロ変異を、127 遺伝子変異認めた。

これらの遺伝子変異を全て確認したところ、2 人に共通する遺伝子異常を認めず、既知疾

患の疾患責任遺伝子変異も認めなかったが、造血幹細胞の増殖、維持に必須とされる *GATA2* 遺伝子異常を Patient2 で認めた。そこで、ダイレクトシーケンス法で *GATA2* 遺伝子配列を確認したところ、Patient1、2 ともに *GATA2* 遺伝子変異を認めた (図 3)。

第 4 節 考察

1) *GATA2* 遺伝子について

GATA2 は血液造血幹細胞の増殖や維持に必須の転写因子^{20, 21)}である。

GATA 転写因子ファミリーに属し、Zinc finger domain (ZF) という DNA 結合ドメインを 2 つ持つ (ZF1、ZF2) ことが特徴で、哺乳類では *GATA1*~*6* まで報告されている。*GATA1*~*3* は主に造血系で高発現していることから造血系 *GATA* 因子と総称されている²²⁾。*GATA2* はこの ZF 部位で、PU.1 や FOG1 といった他の造血に関わる転写因子とヘテロ 2 量体を形成して蛋白-蛋白結合する²¹⁾。そのため、*GATA2* は造血幹細胞の増殖や維持に必須で^{20, 23-25)}、*GATA2* KO マウスでは、重度の貧血のために、胎齢 10~11 で死亡する²⁰⁾。また、*GATA2* ハプロ不全マウスでは骨髄中の初期造血細胞の減少を認め、骨髄細胞由来のコロニーアッセイでは顆粒球、マクロファージの前駆細胞である GMP (granulocyte-macrophage progenitor) 細胞の減少を認める^{24, 25)}。その一方で、*GATA2* を強発現させても造血が阻害されることがわかっている²⁶⁾。このように、*GATA2* は様々な転写因子の活性を促進、抑制することで血液細胞分化に関わっていることがわかっていたが、*GATA2* 異常症の報告はこれまで報告されていなかった。

2) *GATA2* 遺伝子胚細胞異常による免疫不全症候群

しかし、今回の *GATA2* 遺伝子変異同定に前後して、*GATA2* 遺伝子が、3 疾患の原因遺伝子であることが相次いで報告された。まず、米国のグループにより単球減少 (Monocytopenia) を認め、抗酸菌 (*Mycobacterium avium complex*: 以下 MAC) に易感染

性を示す新規免疫不全症として MonoMAC(monocytopenia, B and NK cell lymphopenia and mycobacterial, fungal and viral infections) 症候群が報告された²⁷⁾。次いで、英国のグループより樹状細胞 (DC)、単球、B細胞を欠損する疾患として DCML 欠損症 (dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency) が報告される²⁸⁾ と、この両者の疾患原因遺伝子が *GATA2* であることが同定された^{29,30)}。また、*GATA2* 異常が家族性の骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome、以下 MDS) / 急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia、以下 AML) の原因遺伝子となること³¹⁾、原発性リンパ浮腫、感音性難聴、疣贅、免疫異常、MDS/AML を合併する Emberger 症候群の原因遺伝子も *GATA2* であることが報告³²⁾ され、*GATA2* 遺伝子の胚細胞ヘテロ変異により、3つの疾患を発症することが明らかになった。

これら 3つの疾患の表現型は異なるものの、最終的には高率に MDS/ AML を発症するのが特徴で、様々な臨床症状を伴いながら造血異常の進行により最終的に MDS/ AML を合併する症候群と考えられた。

そのため、これら 3つの表現型を示すような原発性免疫不全症患者、家族性 MDS/AML 症例についても *GATA2* 遺伝子診断をすることが必要と考えられた。

第 5 節 小括

新規樹状細胞欠損症である、*GATA2* 遺伝子異常症を同定した。

B細胞、NK細胞、DC、単球欠損症患者、家族性 MDS/ AML 患者の疾患責任遺伝子として、*GATA2* 遺伝子異常の有無を検討することが必要と考えられた。

第4章 GATA2 異常症患者における臨床症状の検討

第1節 背景

前述したように、GATA2 異常症患者において、DC 以外にも B 細胞、NK 細胞欠損を共通して認めたこと、家族性 MDS/ AML の患者家系でも GATA2 遺伝子異常が報告された³¹⁾ことから、PIDJ を通じて他大学から紹介のあった B 細胞、NK 細胞欠損症患者や家族性 MDS/ AML 患者の GATA2 遺伝子変異を同定することとした。同定できた患者については、臨床症状を検討することで、既報と国内での臨床症状について検討した。

第2節 対象および方法

(1) 対象と検体採取

PIDJ を通じて防衛医科大学小児科を含む国内 13 大学に原発性免疫不全症の免疫学的検討の依頼のあった患者 2594 名の中で、B 細胞、NK 細胞欠損や、家族性に MDS/AML の発症を認めた患者 16 名を対象とした。

このうち、当科の同意書に基づいて、血液検体が入手可能であった 7 名の患者では、第 3 章と同様の方法を用いて細胞の調整、gDNA の抽出を行い、GATA2 遺伝子をダイレクトシーケンス法で解析した。

また、9 名の患者では、他大学の同意書に基づいて、同意書取得施設で GATA2 遺伝子解析を実施し、GATA2 異常症の確定診断に至った症例について、当科の同意書を取得の上、臨床症状の検討を行った。

(2) 国内 GATA2 異常症の臨床症状の検討

PIDJ を通じて、GATA2 遺伝子異常を同定できた国内全症例について、遺伝子変異部位、臨床症状を比較検討した。

第3節 結果

前章で同定した2名の患者 (Patient、以下 Pt.1,2) に加え、*GATA2* 遺伝子変異を16名中、8家系8名で同定した (Pt.3-9,11、表1)。また、*GATA2* 遺伝子変異を認めた8名に加え、Pt.10はPt.9の母親で、Pt.12はPt.11の母親であり、それぞれ家族性にMDSを発症しておりPt.10、12の*GATA2* 遺伝子変異は現在確認中であるが、*GATA2* 異常症患者の可能性が高いと考えられた。しかし、一方で残りの6名では*GATA2* 遺伝子は、正常型であった。

これらの患者では、全例で*GATA2* 遺伝子のヘテロ変異を認め、1名がミスセンス変異、3家系3名がナンセンス変異、3家系5名がフレームシフト変異、1家系1名が塩基の欠損による遺伝子変異であった。また、これらの変異の多くは*GATA2* 遺伝子において、DNAや他の転写因子と結合するZF部位の変異であった (図4)。

この結果、国内の*GATA2* 異常症患者を、前章で同定された2名を加え、合計12名同定した。これらの*GATA2* 異常症患者の確定診断前の臨床診断は、MonoMAC症候群の患者6名 (Pt.1~6)、家族性MDS/AML患者6名 (Pt.7~12) であった。

患者の感染歴 (表1) では、MonoMAC症候群と臨床診断された6名の患者のうち、3名で水痘の重症感染の罹患を契機に原発性免疫不全症を疑われ診断に至っていた。

また、非定型抗酸菌の感染歴を5名で認めた。重症サルモネラ腸炎に2名が罹患し、ノカルジア肺炎、クリプトコッカス髄膜炎に1名が罹患していた。経過中にMDSを4名で合併した。原発性免疫不全症、骨髄異形成の進行のため、6名中5名の患者で造血幹細胞移植が施行された。造血幹細胞移植の未施行例 (Pt.6) は、非定型抗酸菌の持続感染のため5年間治療中であった。

家族性MDS/AML3家系6名の患者では、臨床経過から免疫不全の合併は否定的と主治医に診断されていたが、無治療経過観察中に、敗血症に罹患し死亡した1例 (Pt.12)、蜂窩織炎でCRP 30 mg/dl以上の増加を認め治療に難渋した1例 (Pt.10) を認めた。また全例で

MDS の診断を受けており、AML を発症した 1 例では、造血幹細胞移植後の再々発で死亡していた (Pt.11)。

また、GATA2 異常症を疑った 16 名のうち、6 名の患者では、B 細胞、NK 細胞の欠損や、DC 欠損を認めたにも関わらず、GATA2 遺伝子は正常型であった。

69 これらの患者における検討結果でも、B 細胞、NK 細胞の欠損や DC 欠損に加えて、汎血球減少や、MDS の合併を認め、GATA2 異常症患者と表現型が類似しており、GATA2 遺伝子関連疾患の可能性が高いと考えられた。そのため、これらの患者も新規原発性免疫不全症患者の可能性が高いと考え、疾患責任遺伝子を同定中である (データ示さず)。

第 4 節 考察

1) GATA2 遺伝子変異について

GATA2 遺伝子の胚細胞ヘテロ変異により発症する。GATA2 遺伝子変異部位を図 4 に示すが、ZF 部分を中心に幅広く報告されている。

国内症例の検討では、ミスセンス変異の症例を 1 名 (Pt.2) 認め、ZF2 部分内の変異であった。それ以外の変異は、ナンセンス変異、フレームシフト変異、塩基や大きな遺伝子配列の欠損による遺伝子変異といった mRNA の nonsense-mediated Decay (NMD : ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構) により、mRNA の発現レベルで障害を受けていると推測される変異を認めた。

既報では、発症機序として、GATA2 変異による Familial MDS/ AML の患者で dominant negative 効果を認めていたことが報告されている³¹⁾。しかし、表現型に関しては、同一の GATA2 遺伝子変異でも異なっており、genotype-phenotype が明らかではない。例えば、ZF2 の安定化に関与すると考えられている 354 番目のアミノ酸トレオニン (T) は、T354M 変異によりメチオニン (M) に変化することで、DNA 結合能、転写活性の減少を生じる変異であ

るが、MonoMAC 症候群として発症した症例²⁹⁻³⁰⁾、Familial MDS/AML として発症した症例^{31, 33, 34)}としてそれぞれ報告されている。

2) GATA2 異常症による感染歴について

MonoMAC 症候群の表現型を示す GATA2 異常症では、血液細胞分化異常に伴い免疫不全を示す。

国内症例では、水痘感染の重症化を発端に原発性免疫不全症を疑われた患者を 3 名認めた。水痘に対する感染防御は、CD8⁺キラーT 細胞による感染細胞の破壊が主であるが、その誘導には CD4⁺ヘルパーT 細胞による補助が必要で、T 細胞機能不全により重症化することが多い³⁵⁾。GATA2 異常症で水痘重症化を多く認めたことから T 細胞機能不全が示唆された。

また、細胞内寄生菌である抗酸菌感染を 5 名、サルモネラ腸炎の重症感染を 2 名で認めた。これは、GATA2 異常症の既報でも同様に報告されており、GATA2 異常症と同時期に報告された、抗酸菌に易感染を示す IRF8 欠損症 (樹状細胞欠損症)³⁶⁾ や、IFN gamma/ IL-12 欠損により樹状細胞機能不全を示すメンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症 (mendelian susceptibility to mycobacterial diseases、MSMD)³⁷⁾ と同様の感染スペクトラムと考えられる。

また、真菌感染の合併は、T 細胞機能不全や、食細胞異常、IL-17 産生障害を示す慢性皮膚粘膜カンジタ症 (Chronic Mucocutaneous Candidiasis、CMCC) 等で認める³⁸⁾ ことが知られている。孤発性 MDS においても、好中球減少による細菌感染を来すことが知られている³⁹⁾ が、GATA2 異常症では、日和見感染、真菌感染を MDS 発症前から早期に認めることから、原発性免疫不全症としての精査が必要と言える。

。

3) GATA2 異常症における MDS/ AML を含めた悪性腫瘍の合併について

GATA2 異常症の患者では MonoMAC 症候群患者で 6 名中 4 名、家族性 MDS/AML 患者で

は、6名中6名で、MDSを発症していた。

平均発症時年齢が70～80歳である、孤発性のMDS患者と比べて小児期に発症するのが特徴⁴⁰⁾で、*de novo*症例ではMDS/AMLの合併を契機に診断されることも多い。また、Chronic myelomonocytic leukemiaや慢性HPV、EBV感染に伴う悪性腫瘍の発症なども報告もされている。

GATA2異常症の同定以前から、孤発性MDS/AML患者の一部でGATA2が高発現していることが報告されており、*GATA2*遺伝子の発現異常と血液造血器腫瘍の関連が指摘されていた⁴¹⁻⁴³⁾。さらに、最近の報告ではAMLにおけるGATA2高発現は予後不良因子であることがわかってきている^{44, 45)}。

血液造血器腫瘍細胞における*GATA2*遺伝子変異の最初の報告は2008年で、慢性骨髄性白血病患者の急性転化症例の報告である。この報告では、腫瘍細胞に*GATA2*のZF2部位のL359Vや、A341_G346delといったアミノ酸変異が起こることで、*GATA2*遺伝子の機能獲得型変異(gain of function)が起こり、GATA2転写活性の増加、特に骨髄系細胞におけるPU.1の活性阻害効果の増強の結果、急性転化に至った症例で、予後不良であったと報告されている^{46, 47)}。

同様に、biallelic *CEBPA* 遺伝子変異陽性のAML患者において、腫瘍細胞に*GATA2*のZF1部位の変異を39.4% (13/33例)⁴⁸⁾、18.3% (18/98例)⁴⁹⁾と高頻度に認めたという報告がされている。*CEBPA*は顆粒球造血に関わる転写因子⁵⁰⁾で、*GATA2*とも蛋白-蛋白結合する。biallelic AML症例では*GATA2*のZF1部位の変異により*CEBPA*の転写活性は抑制されており、有意差を認めないものの、予後の良い傾向があったと報告されている⁴⁸⁾。

また、急性単球性白血病(AML M5)患者で、*GATA2*遺伝子変異を3.6% (4/112例)認めたという報告⁵¹⁾、小児AML患者で*GATA2*遺伝子変異を2.2% (5/230例)認めたことが報告⁴⁵⁾がされており、*GATA2*異常と血液造血器腫瘍の関連が次々と報告されている。

最近では *KRAS* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌と、*GATA2* シグナルの関連も報告されており固形腫瘍の発症にも関わっている可能性が指摘されている⁵²⁾。

4) *GATA2* 異常における MDS/ AML 発症機序

GATA2 異常による MDS の発症機序として、ストレス造血の蓄積による造血幹細胞 (hematopoietic stem cell、以下 HSC) の枯渇が、MDS の発症を引き起こしているという概念が考えられる⁵³⁾。

血球は大まかに HSC、造血前駆細胞 (hematoprogenitor cell、以下 HPC) 、各血球系の前駆細胞、血球へと分化する。貧血や低酸素状態といった条件下におけるストレス造血では、ストレスシグナルにより *GATA2* の発現増加を介した HPC の増殖によって造血を増加させるため、HSC からの造血は一定である。しかし、*GATA2* に変異があると、HPC の増殖が妨げられるため各血球系の前駆細胞が減少する。このため、HSC からの新しい HPC の産生が必要となる。このストレス造血が続くことによって、最終的に HSC の供給が枯渇し、MDS を発症するという概念である。

ただし、この概念では *GATA2* 異常は MDS の発症にとって必須の変異となるが、実際には *GATA2* 変異の全例で MDS 発症に至るわけではない。そのため、*GATA2* 異常症患者では、*GATA2* 遺伝子変異に加えて、さらに他の遺伝子異常の蓄積がさらに加わることによって発症に至っていると考えられる。

このように、造血幹細胞の増殖、維持に必須の *GATA2* 異常が、血液造血器腫瘍の発症に強く関わっていることが明らかとなっており、更なる病態の解明の進展と同時に、MDS/ AML を早期に発症する *GATA2* 異常症の治療の進歩につながることを期待される。

5) リンパ浮腫について

国内症例において、リンパ浮腫の合併を 2 名 (Pt.2, 9) で認めた。Emberger 症候群の一症状ではあるが、我々が症例報告したように、MonoMAC 症候群⁵⁴⁾、家族性 MDS/ AML 患者の一部でもリンパ浮腫を合併することが報告されており、GATA2 異常によるリンパ管細胞の分化異常³³⁾ が原因で、Emberger 症候群に特異的な所見ではないと考えられる。

第 5 節 小括

国内 GATA2 異常症患者を 8 家系 12 名認めた。

国内 GATA2 異常症患者では、水痘重症感染が原発性免疫不全症の診断の契機となったのが特徴的で、真菌感染、HPV 感染等の感染歴も認め、T 細胞機能不全の存在が示唆された。

第5章 GATA2 異常症患者における血液細胞分化異常

第1節 背景

GATA2 異常症の報告では、さまざまな血球の分化異常が報告されている。

GATA2 異常症の表現型の一つである MonoMAC 症候群では単球欠損を認め、mDC、pDC 両方の樹状細胞が欠損し、リンパ球分画では B 細胞、NK 細胞、Regulatory T cell (以下 Treg) を欠損²⁸⁾するが、T 細胞は存在するため、リンパ球の絶対数としては一見正常範囲内のことがある。

Emberger 症候群、家族性 MDS/ AML では、MonoMAC 症候群でも報告されている CD4/ CD8 比の低下を報告されている。

骨髄細胞の FACS 解析では、MonoMAC 症候群において樹状細胞、単球、リンパ球の前駆細胞である MLP (multi-lymphoid progenitor) 分画、顆粒球、マクロファージの前駆細胞である GMP (granulocyte-macrophage progenitor) 分画の減少が報告されている²⁸⁾。

骨髄病理所見では巨核球の異形成を認め、骨髄低形成、繊維化を認める症例が多く、骨髄異形成の進行に伴いモノソミー7、トリソミー8等の染色体異常を認めるようになる⁵⁵⁾。

このように、GATA2 異常では、種々の血液細胞分化異常を伴うため、国内 GATA2 異常症患者においても、リンパ球分画を詳細に検討することとした。

第2節 対象および方法

(1) 対象および検体採取

国内 GATA2 異常症患者 5 名より同意を得て、EDTA 加末梢血 3~5ml を入手した。また 2 名 (Pt.3,9) は造血幹細胞移植前の凍結単核球検体を、1 名 (Pt.4) は、造血幹細胞移植前の

検体を得られなかったため、入院施設での解析結果を参考とし、合計 7 名のリンパ球分画を解析した。

正常コントロールは、原発性免疫不全症疑いとして当科に紹介され、臨床経過、一般血液検査、フローサイトメトリー等の免疫学的検討の結果、原発性免疫不全症が否定された患者、もしくは健常人で同意を得られた 22 名とした。

(2) 細胞の調整

末梢血検体を第 2 章の樹状細胞測定時と同様の方法を用いて細胞調整し、細胞を抗体で染色後、フローサイトメトリー (FACS calibur、BD) を用いて解析した。

抗体は、表 2 の抗体を用いた。

第 3 節 結果

免疫学的検討として、移植前の検体を得られた GATA2 異常症患者 7 名 (Pt.1, 2, 3, 6, 7, 9, 10) のフローサイトメトリーによる解析を行った。また 1 名 (Pt4) は、造血幹細胞移植前の主治医施設での解析結果とした (表 3)。

T 細胞は存在したが、CD4⁺細胞の減少により、CD4/ CD8 比は低下し、CD4/ CD8 比の逆転 (CD4/ CD8<1) を 8 名中 6 名で認めた。

B 細胞、NK 細胞の解析では、家族性 MDS/ AML の親子例である Pt. 9、10 のみで、CD19⁺B 細胞を 6.7 %/ lymphocytes (以下 lymph)、7.6 %/ lymph、CD3⁻CD16⁺CD56⁺NK 細胞を 30.7 %/ lymph、12.4 %/ lymph と認めたが、それ以外の症例では B 細胞、NK 細胞は欠損していた。

樹状細胞は、MonoMAC 症候群の患者では 4 例全例で mDC、pDC の完全欠損を認めた。

家族性 MDS/AML 患者では 1 名 (Pt.10) で mDC、pDC は存在したが、2 名の患者では pDC の欠損、mDC の減少を認めた。

第 4 節 考察

GATA2 異常症では、MonoMAC 症候群、家族性 MDS/ AML、Emberger 症候群と 3 つの表現型があることが報告されたが、家族性 MDS/ AML、Emberger 症候群患者では B 細胞、NK 細胞欠損についての報告はなかった。しかし、今回の検討では MonoMAC 症候群の患者全例で B 細胞、NK 細胞、単球、DC の欠損を認め、家族性 MDS/AML の患者でも B 細胞、NK 細胞、DC の減少を認めた。そのため、血液細胞分化異常の存在は臨床症状からは推測できず、GATA2 異常が疑われるような患者では全例でリンパ球分画の解析は必要と考えられた。

その一方で、家族性 MDS/ AML 患者の親子例 2 名 (Pt.9, 10) において、Pt.9 では mDC の減少、pDC の欠損を認めたが、B 細胞、NK 細胞は存在した。この親子で認めた GATA2 変異は ZF 部位を含む大きな欠失を伴う変異 (S340_N381del) で、GATA2 構造に影響の大きいアミノ変異であった。それにも関わらず、B 細胞、NK 細胞が存在していることから、GATA2 異常による血液細胞分化異常は、遺伝子変異と表現型が明確に一致しているとは言えない。そのため、GATA2 異常による、血液細胞分化異常は、ストレス造血による HSC の枯渇が、GATA2 遺伝子変異部位に関係なく進行するため、患者により血液細胞分化異常の程度の差が出ている可能性や、解析時には既に MDS と診断されているような患者では、異常な MDS クローン由来の B 細胞、NK 細胞が存在している可能性等が考えられる。

第 5 節 小括

GATA2 異常症患者では、表現型に関わらず、B 細胞、NK 細胞、DC 分化障害を認めた。T 細胞では、CD4/ CD8 比の低下を認めた。

第6章 GATA2 異常症患者における TREC、sjKREC 解析

第1節 背景

国内 GATA2 異常症患者 12 例の臨床経過では、水痘の重症発症により免疫不全を疑われた患者を 3 名認め、抗酸菌、真菌の合併、ウイルスの重症感染例も認めたことから、T 細胞機能不全の存在を疑われた。しかし、既報では CD4/ CD8 比の低下、CD4 細胞の減少、Treg の欠損が指摘されていたのみで、それ以外の T 細胞分化異常、機能異常についての報告はなく、国内 GATA2 異常患者でも同様の結果であった。また、末梢血に B 細胞が存在した症例では、解析時には MDS を発症しており、MDS クローン細胞の可能性が示唆されことから、正常な T 細胞新生能、B 細胞新生能を評価する必要があると考え、T-cell receptor excision circles (以下 TREC) 、signal joint kappa-deleting recombination excision circles (以下 sjKREC) を測定することとした。

これらの絶対定量測定は、当教室の森西⁵⁶⁾、中川⁵⁷⁾らが開発した測定方法で、TREC は T 細胞新生能、sjKREC は B 細胞新生能を示すとされており、少量の血液検体から測定することができる⁵⁸⁾。

TREC は、Double positive (以下 DP) 細胞が Single Positive (SP) 細胞になる直前の段階で、T 細胞受容体 α 鎖の VDJ 再構成時に生じる環状 DNA である。TREC をリアルタイム PCR 法による絶対定量を行うことで、重症複合免疫不全症の新生児期マススクリーニング法として応用する方法を開発し、注目されてきている^{56,59,60)}。

sjKREC は、B 細胞軽鎖の allelic exclusion あるいは isotypic exclusion の際に切り出される sjKREC をリアルタイム PCR 法により相対定量し B 細胞の複製歴を測定する方法である。この sj KREC は細胞分裂の過程で、染色体から切り出され、2 重鎖環状 DNA として細胞内に残るが、最初に形成された以降の細胞分裂では、娘細胞のどちらか一方にしか保存さ

れないため分裂毎に濃度は2倍希釈される。そのため、sjKRECがB細胞の複製歴と関連することが示されている⁶¹⁾。また、sjKRECはpre B細胞の最後に生成されるため、B細胞欠損を認める*Btk*, *ADA*, *RAG1/2*, *LIG4*欠損症では陰性となり、B細胞欠損症のマスキリング法として応用できることが報告されている⁵⁷⁾。

また、このTREC、sjKREC測定により、既知遺伝子未同定の患者を含む、分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency、以下CVID)の解析において、患者の病因、病態評価の臨床マーカーとして利用できることを、当科の釜江が報告しており⁶²⁾、GATA2異常症患者においてもTREC、sjKRECの解析により、T細胞新生能、B細胞新生能を評価することとした。

第2節 対象および方法

(1) 対象と検体採取および検体調整

国内GATA2異常症患者より同意を得て、造血幹細胞移植前の末梢血が得られた8名。また、原発性免疫不全症疑いとして当科に紹介され、臨床経過、一般血液検査、フローサイトメトリー等の免疫学的検討の結果、原発性免疫不全症が否定された患者、健常人で同意を得られた22名を正常コントロールとして、第3章の方法に従い、gDNA抽出した。

(2) 定量リアルタイムPCRと定量結果の解析

リアルタイムPCR法による絶対定量には、コピー数が既知のスタンダードサンプルの段階希釈系列が必要である。そのため、まず成人末梢血由来のgDNAを鋳型とし、TREC、sjKRECをプライマー (TREC forward primer ; 5'-TCGTGAGAACGGTGAATGAAG-3'、
ψJa primer; 5'-CCATGCTGACACC' TCTGGTT-3'、
TREC reverse primer; 5'-CCATGCTGACACC' TCTGGTT-3、

sjKREC-forward primer; 5'- TCAGCGCCCATTACGTTTCT-3'、

sjKREC-reverse primer; 5'- GTGAGGGACACGCAGCC-3') と

High Fidelity PCR Master (Roche, Grenzachestrasse, Basel, Schweiz) を用いて Gene Amp PCR System 9700 (ABI) にて、94°C 5分後、40 サイクル(94°C 30秒, 60°C 30秒, 72°C 2分)、72°C 7分の条件で PCR を実施した^{56, 57)}。

PCR 産物を TA クローニング法にてプラスミドベクター (pCR4-TOPO TA vector, Invitrogen) に組み込み、大腸菌 (One Shot TOP10, Invitrogen) に形質転換した。プラスミド DNA として抽出後、配列を確認した上で、スタンダードサンプル (TREC プラスミド, sjKREC プラスミド) とした。同様に、リアルタイム PCR の際に内在性コントロールとなる RNaseP (RNaseP RNA component H1, RPPH1) についても RNaseP プラスミドを作成した。スタンダードサンプルは分子量からコピー数を算出し、段階希釈系列にした (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 copies/ μ l)。

(3) 定量リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は蛍光標識プローブ法、いわゆる TaqMan プローブ法で実施した。反応総量は 20 μ l で、サンプル DNA を 1 μ l とし、TREC 測定における各組成の最終濃度は、TaqMan 2 \times Universal PCR Master Mix (ABI)、500 nM TREC forward primer および TREC reverse primer、250 nM TaqMan プローブ (TREC probe FAM-5'-CACGGTGATGCATAGGCACCTGC-3' -TAMRA) とした。

同様に sjKREC における各組成の最終濃度は、TaqMan 2 \times Universal PCR Master Mix (ABI)、500 nM sjKREC-forward primer および sjKREC-reverse primer、250 nM TaqMan プローブ (sjKREC probe, FAM-5'-CCAGCTCTTACCCTAGAGTTTCTGCACGG-3'-TAMRA) とした。

内在性コントロールである RNaseP については、反応総量は 20 μ l で、反応組成はサンプル

ル DNA 1 μ l、TaqMan 2 \times Universal PCR Master Mix、TaqMan 20 \times RNaseP Primer-Probe (VICTMdye) Mix (ABI) とした。TREC、sjKREC および RNaseP のコピー数は、プラスミド DNA の段階希釈系列の増幅曲線から作成される検量線をもとに算出した。PCR は、7900HT Fast Real Time PCR System (ABI) を用いて、50 $^{\circ}$ C 2分、95 $^{\circ}$ C 10分の初期ステップの後、40 サイクル (95 $^{\circ}$ C 15秒、60 $^{\circ}$ C 1分) で実施した。

PCR で得られた TREC、sjKREC および RNaseP の測定値は、1 μ gDNA あたりに換算して最終的な定量値とした。

(4) 統計学的解析

TREC、sjKREC、RNaseP の任意の群での平均値を示す場合には、平均値 \pm 標準誤差で表した。本研究を通し、全ての統計学的解析は、GraphPad Prism version 4.00 (GraphPad Software, San Diego, California USA) を使用した。p<0.05 を統計学的有意差ありとした。

第3節 結果

移植前の末梢血由来の gDNA を得ることができた8例 (Pt. 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9,10) で TREC、sjKREC の解析を行った。TREC は GATA2 異常症患者で有意な低下を認め、4例で測定感度以下であった ($P<0.001$ 、図5)。sjKREC は GATA2 異常症患者全例で低下を認め、7例で測定感度以下であった ($P<0.001$ 、図6)。

第4節 考察

GATA2 異常症では、TREC、sjKREC とともに低下していた。

T 細胞欠損症患者では、TREC は測定感度以下となるが、Ataxia telangiectasia (AT) や CVID といった原発性免疫不全症患者の一部において、T 細胞が存在しているにも関わらず、TREC が低下することが知られている⁶²⁾。これらの既知疾患では、末梢血中の T 細胞はほ

ば全て CD45RO⁺memory T 細胞に偏倚していることが報告されており、T 細胞新生能低下により、胸腺からの CD45RA⁺naïve T 細胞の供給が減少し、CD45RO⁺memory T 細胞が末梢血中で増殖することで、補われていると考えられている。

GATA2 異常症では T 細胞の欠損や、機能異常の報告はなかったが、水痘や真菌に易感染を認めること、TREC も低下することから、GATA2 遺伝子異常患者における、T 細胞分化障害が示唆された。

また、GATA2 異常症では、MonoMAC 症候群や、家族性 MDS/AML といった臨床症状の違いに関わらず、全例で sjKREC 低下を認めた。これはリンパ球分画の解析で CD19⁺B 細胞を認めた、2 例 (Pt9、10) でも同様の結果であった。B 細胞欠損症患者では、sjKREC が陰性になることを、当科の中川らが報告しているが、今回のように CD19⁺B 細胞が存在するにも関わらず、sjKREC が陰性という結果は健常者では認めず、GATA2 異常症患者における B 細胞分化異常が示唆された。

第 5 節 小括

GATA2 異常症患者では、表現型に関わらず、TREC、sjKREC の低値を認め、T 細胞、B 細胞の分化異常が示唆された。

第7章 GATA2 異常症患者における T 細胞分画異常

第1節 背景

GATA2 異常症において T 細胞が存在するにも関わらず、TREC の低値を認めたことから、GATA2 異常症患者の T 細胞分画を、さらに検討することとした。

第2節 対象および方法

(1) 対象および検体採取

国内 GATA2 異常症患者で同意を得られた 7 名。原発性免疫不全症疑いとして当科に紹介され、臨床経過、一般血液検査、フローサイトメトリー等の免疫学的検討の結果、原発性免疫不全症が否定された患者、健常人で同意を得られた 22 名を正常コントロールとして、末梢血 3~5ml を EDTA 加血液として採取して検討した。

(2) 細胞の調整

末梢血検体を第 2 章の樹状細胞測定時と同様の方法を用いて、細胞調整し、細胞を抗体で染色後、フローサイトメトリー (FACS calibur、BD) を用いて解析した。

抗体は、表 2 の抗体を用いた。

(3) 統計学

測定結果における任意の群での平均値を示す場合には、平均値±標準誤差で表した。本研究を通し、全ての統計学的解析は、GraphPad Prism version 4.00 (GraphPad Software, San Diego, California USA) を使用した。p<0.05 を統計学的有意差ありとした。

第3節 結果

免疫学的検討として、移植前の検体が得られた GATA2 異常症患者 7 名 (Pt. 1, 2, 3, 6, 7, 9, 10) のフローサイトメトリーによる解析を行った。

まず、CD4⁺CD45RA⁺naive T 細胞率を測定したところ、GATA2 異常症患者では正常コントロールと比べ有意差なく認めた(P= 0.10; 患者群 mean55.5± 27.2 %、range 9.8– 82.3 %、n= 7、コントロール群 mean 73.7± 15.8 %、range 44.0– 93.9 %、n = 22、図 7-A)。

しかし、naive T 細胞の中でも特に幼弱である CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺thymic naive T 細胞を測定したところ、正常コントロール群と比べ有意な減少を認めていた(P < 0.001; 患者群 mean,49.8± 21.1 %、range23.2– 82.5 %、n = 7、コントロール群 mean84.1± 5.9 %; range 76.0– 95.4 %、n = 22、図 7-B)。

第 4 節 考察

T 細胞分化異常を認め、TREC が低下するような原発性免疫不全症では、末梢血中に存在するほぼ全ての T 細胞は、CD45RO⁺memory T 細胞へ偏倚する⁶³⁾。しかし、GATA2 異常症では、TREC 低値を示す患者でも、CD45RA⁺naive T 細胞率が正常に保たれている症例を認め、正常コントロールと比べても有意差なく存在した。

これは、既知の原発性免疫不全症では認めない、GATA2 異常症で特徴的な所見であった(データ示さず)。そこで、胸腺内分化を経て末梢血中に最初に移出し、TREC を多く含む CD4⁺ CD45RA⁺ CD31⁺ thymic naive T 細胞を測定したところ、GATA2 異常症患者では、著明に減少しており、CD4⁺ CD45RA⁺ CD31⁻ central naive T 細胞の相対的増加を認めた。

この検討結果から、CD45RA⁺ naive T 細胞が保たれているためにも関わらず、TREC が低下していると考えられた。

このことから、GATA2 遺伝子異常自体による T 細胞の成熟障害、もしくは抗原提示細胞の欠損による CD45RO⁺ memory T 細胞への分化障害の可能性が考えられた。

第 5 節 小括

GATA2 異常症患者では、T 細胞成熟障害の合併が示唆された。

第 8 章 GATA2 異常症患者におけるサイトカイン産生能の測定

第 1 節 背景

GATA2 異常症では、TREC 低値にも関わらず T 細胞は存在するが、CD4⁺ CD45RA⁺ Naïve T 細胞率は正常範囲内であった。これは、原発性免疫不全症では認めず⁵⁶⁾、GATA2 異常症の特徴と考えられた。

また、CD45RO⁺ Memory T 細胞を正常に認めるにもかかわらず、ウイルスの重症感染例を認めることから、T 細胞の機能、成熟異常を疑い、GATA2 異常症患者における CD4⁺T 細胞のサイトカイン産生能を測定することとした。

第 2 節 対象および方法

(1) 対象および検体採取

国内 GATA2 異常症患者で同意を得られた 5 名。また、原発性免疫不全症疑いとして当科に紹介され、臨床経過、一般血液検査、フローサイトメトリー等の免疫学的検討の結果、原発性免疫不全症が否定された患者で同意を得られた患者、コントロールを含め 6 名を正常コントロールとして、末梢血 3~5ml をヘパリン加血液として入手した。

(2) 細胞の調整と細胞内サイトカイン染色

採取した末梢血は Lymphoprep™ (Axis-Shield, Oslo, Norway) を用いた比重遠心法により末梢血単核球 (PBMC) に分離した。得られた細胞 2×10^6 cells/ml に対し、Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (PMA) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) 50 ng/ml、Ca Ionomycin (Sigma Aldrich) 1 μ g/ml を加え、37°C、5%CO₂ で 5 時間培養を行った。

細胞培養時に、サイトカインをゴルジ体内に固定するため、GolgiStop™ Protein Transport Inhibitor (BD) を 4 μ l/6ml 投与した。

培養後、Human Th1 / Th2 / Th17 Phenotyping Kit (BD) を用いて、プロトコールに従い、細胞の固定、浸透を行った後に、Anti-CD4 PERCP-CY5.5 labeled Ab (BD) 、 Anti-IFN- γ FITC labeled Ab (BD) 、 Anti-IL-17A PE labeled Ab (BD)、 Anti-IL-4 APC labeled Ab (BD) を用いて冷所で 20~25 分間染色した。細胞を染色後、フローサイトメトリー (FACS calibur、BD) を用いて解析した。

第3節 結果

GATA2 異常症患者の CD4⁺ T 細胞のサイトカイン産生細胞率を測定し、コントロール群と比較検討した。その結果、IFN- γ 産生 CD4⁺ 細胞は、コントロール群と比べ、有意差を認めなかった ($P=0.54$; 患者群 mean 25.7 ± 15.4 %、range 6.9– 41.7 %、n=5、コントロール群 mean 19.2 ± 4.7 %、range 14.4– 26.9 %、n=6、図 8) が、IL-4 産生細胞 ($P=0.004$; 患者群 mean 0.86 ± 0.19 %、range 0.65– 1.13 %、n=5、コントロール群 mean 3.76 ± 1.41 %、range 2.62– 6.46 %、n=6、図 8) 、IL-17A 産生細胞 ($P=0.017$; 患者群 mean 0.83 ± 0.31 %、range 0.60– 1.35 %、n=5、コントロール群 mean 1.96 ± 0.83 %、range 1.24– 3.44 %、n=6、図 8) の減少を認めた。

第4節 考察

GATA2 異常症患者では、IL-4、IL-17 産生細胞の減少を認め、T 細胞の成熟、機能障害が示唆された。

IL-4 は、T helper 2 cell (Th2) と言われる T 細胞分画から主に産生され、免疫グロブリンのクラススイッチに関与し、活性化 B 細胞に作用することで IgG₁ や IgE の産生を誘導する。IL-4 は特に即時型アレルギー反応や、寄生虫に対する免疫応答に関与しているが、ヒトにおいて IL-4 産生細胞の欠損を来す疾患の報告はない。マウスでの基礎研究により、Th2 細胞の

分化には GATA3 がマスターレギュレータとして必須であることが報告されており⁶⁴⁾、ヒト GATA3 異常症である HDR (hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia) 症候群患者では副甲状腺機能低下症、感音性難聴、腎異形成を来することが知られている⁶⁵⁾。GATA3 異常症患者における免疫学的検討の報告はなく、GATA2 異常症患者における、IL-4 産生細胞の低下と易感染性の関連については検討が必要である。

IL-17 は、T helper 17 cell (Th17) と言われる T 細胞分画から主に産生され、*C.albicans* や *Aspergillus fumigatus* といった真菌感染防御に重要である⁶⁶⁾。IL-17 KO、IL-17/ IL-17F double KO マウスでは、*C.albicans* への感受性亢進が知られている⁶⁷⁾。ヒトでは、*AIRE*⁶⁸⁾、*CARD9*⁶⁹⁾、*STAT1*⁷⁰⁾、*STAT3*⁷¹⁾ 欠損症でも、IL-17 産生 T 細胞の分化障害を生じることで、真菌感染に対し易感染性を示すことが知られている。

GATA2 異常症患者では、真菌にも易感染性を示すことが報告されており、今回検討した GATA2 異常症患者でも、ノカルジア肺炎や、クリプトコッカス髄膜炎の感染歴を認めた。GATA2 異常症患者における IL-17A 産生障害が、真菌に対する易感染性の原因の一つであることが示唆された。

第 5 節 小括

GATA2 異常症患者で、IL-4 産生細胞、IL-17 産生細胞の低下を認め、T 細胞成熟、機能障害を認めた。

第9章 結論

原発性免疫不全症患者の未診断例から樹状細胞欠損症を同定し、その疾患責任遺伝子として GATA2 異常症を同定した。

そこで、他の GATA2 異常症と診断されている患者を調べたところ、水痘重症感染や抗酸菌、真菌感染等の免疫不全症状、血液造血器腫瘍の発症から、多くの患者で造血幹細胞移植を必要とした。免疫不全の原因として、B 細胞、NK 細胞、単球、DC といった免疫担当細胞の欠損に加え、T 細胞では TREC 低値、Thymic Naïve T 細胞の減少を認め、T 細胞の分化異常を認めた。また、CD4⁺ T 細胞では、IL-4、IL-17 産生細胞が減少し、T 細胞の成熟障害が示唆された。

謝辞

本稿を終えるにあたり、全般にわたりご指導を賜りました防衛医科大学校小児科学講座野々山恵章教授に深甚なる謝意を表します。また、研究をご指導賜りました先生方、貴重な症例を御紹介くださった先生方、そして検体採取にご同意くださいました患者様およびその保護者の方々に深謝いたします

防衛医科大学校小児科学講座

東京医科歯科大学小児・周産期地域医療学講座
京都府立大学小児科
名古屋大学小児科

横浜市立大学附属病院小児科
富山大学小児科
東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野
東北大学大学院医学系研究科血液免疫病学分野

大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学小児科学
信州大学医学部小児医学講座
中国中央病院血液内科
福山市立病院内科
広島大原爆放射線医科学研究所血液・腫瘍内科
順天堂大学血液内科
東京医科歯科大学小児科
かずさ DNA 研究所
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
理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)

川口裕之 先生
釜江智佳子先生
加藤 環 先生
賀佐希美子氏
富田香織 氏
今井耕輔先生
石田宏之先生
村松秀城先生
伊藤嘉規先生
小島勢二先生
横須賀とも子先生
金兼弘和先生
笹原洋二先生
藤原亨先生
張替秀郎先生
橋井佳子先生
中沢洋三先生
増成太郎先生
末次慶收先生
一戸辰夫先生
原田浩徳先生
森尾友宏先生
小原收先生
渡辺信和先生
古関明彦先生
河本宏先生
大嶋宏一先生
斉藤潤先生
中畑龍俊先生

引用文献

1. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova j-l, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Front Immunol.* 2011;2:1-26
2. Casanova JL, Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science.* 2007;317:617-9.
3. Marodi L, Notarangelo LD. Immunological and genetic bases of new primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:851-61.
4. Burrows PD, Fischer A. Building networks for immunodeficiency diseases and immunology training. *Nat Immunol.* 2008;9:1005-7.
5. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:S182-94.
6. D'Amico A, Wu L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med.* 2003;198:293-303.
7. Onai N, Obata-Onai A, Tussiwand R, Lanzavecchia A, Manz MG. Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development. *J Exp Med.* 2006;203:227-38.
8. Onai N, Obata-Onai A. Flt3 in regulation of type I interferon-producing cell and dendritic cell development. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1116:253-261.
9. Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, Duprez E, Iwasaki-Arai J, Mizuno S, et al. Distinctive and indispensable roles of PU. 1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood.* 2005;106:1590.
10. Sun L, Liu A, Georgopoulos K. Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J.* 1996;15:5358-69.
11. Steinman R, Cohn Z. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. *J Exp Med.* 1973;137:1142-1162.
12. Merad M, Manz MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood.* 2009;113:3418-27.

13. Vakkila J, Thomson AW, Vettenranta K, Sariola H, Saarinen-Pihkala UM. Dendritic cell subsets in childhood and in children with cancer: relation to age and disease prognosis. *Clin Exp Immunol.* 2004;135:455-61.
14. Teig N, Moses D, Gieseler S, Schauer U. Age-related changes in human blood dendritic cell subpopulations. *Scand J Immunol.* 2002;55:453-7.
15. Jyonouchi H, Cui C, Geng L, Yin Z, Fitzgerald-Bocarsly P. Age-dependent changes in peripheral blood dendritic cell subsets in normal children and children with specific polysaccharide antibody deficiency (SPAD). *Eur J Pediatr.* 2010;169:1233-9.
16. Yong PF, Workman S, Wahid F, Exley A, Webster AD, Ibrahim MA. Selective deficits in blood dendritic cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia but not specific polysaccharide antibody deficiency. *Clin Immunol.* 2008;127:34-42.
17. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity.* 2007;26:503-17.
18. Mortier E, Woo T, Advincula R, Gozalo S, Ma A. IL-15 α chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med.* 2008;205:1213-25.
19. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood.* 2002;100:4512-20.
20. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature.* 1994;371:221-6.
21. Vicente C, Conchillo A, Garcia-Sanchez MA, Odero MD. The role of the GATA2 transcription factor in normal and malignant hematopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;82:1-17.
22. Bresnick EH, Katsumura KR, Lee HY, Johnson KD, Perkins AS. Master regulatory GATA transcription factors: mechanistic principles and emerging links to hematologic malignancies. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:5819-31.
23. Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood.* 1997;89:3636-43.

24. Rodrigues NP, Boyd AS, Fugazza C, May GE, Guo Y, Tipping AJ, et al. GATA-2 regulates granulocyte-macrophage progenitor cell function. *Blood*. 2008;112:4862-73.
25. Rodrigues NP, Janzen V, Forkert R, Dombkowski DM, Boyd AS, Orkin SH, et al. Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood*. 2005;106:477-84.
26. Persons DA, Allay JA, Allay ER, Ashmun RA, Orlic D, Jane SM, et al. Enforced expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis. *Blood*. 1999;93:488-99.
27. Vinh DC, Patel SY, Uzel G, Anderson VL, Freeman AF, Olivier KN, et al. Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. *Blood*. 2010;115:1519-29.
28. Bigley V, Haniffa M, Doulatov S, Wang XN, Dickinson R, McGovern N, et al. The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J Exp Med*. 2011;208:227-34.
29. Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, Calvo KR, Lemieux JE, Patel SY, et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood*. 2011;118:2653-5.
30. Dickinson RE, Griffin H, Bigley V, Reynard LN, Hussain R, Haniffa M, et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood*. 2011;118:2656-8.
31. Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, Wilkins EJ, Brautigan PJ, Li XC, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2011;43:1012-7.
32. Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, Steward CG, Brice G, Woollard WJ, et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet*. 2011;43:929-31.
33. Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ, Rosenfeld JA, Wildin RS, Cuellar-Rodriguez J, et al. Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature. *Blood*. 2012;119:1283-91.
34. Bodor C, Renneville A, Smith M, Charazac A, Iqbal S, Etancelin P, et al.

Germ-line GATA2 p.THR354MET mutation in familial myelodysplastic syndrome with acquired monosomy 7 and ASXL1 mutation demonstrating rapid onset and poor survival. *Haematologica*. 2012;97:890-4.

35. Gnann JW, Jr. Varicella-zoster virus: atypical presentations and unusual complications. *J Infect Dis*. 2002;186 Suppl 1:S91-8.

36. Hambleton S, Salem S, Bustamante J, Bigley V, Boisson-Dupuis S, Azevedo J, et al. IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N Engl J Med*. 2011;365:127-38.

37. Rosenzweig SD, Holland SM. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol Rev*. 2005;203:38-47.

38. Lionakis MS. Genetic Susceptibility to Fungal Infections in Humans. *Curr Fungal Infect Rep*. 2012;6:11-22.

39. Foran JM, Shammo JM. Clinical presentation, diagnosis, and prognosis of myelodysplastic syndromes. *Am J Med*. 2012;125 Suppl 7:S6-13.

40. Calvo KR, Vinh DC, Maric I, Wang W, Noel P, Stetler-Stevenson M, et al. Myelodysplasia in autosomal dominant and sporadic monocytopenia immunodeficiency syndrome: diagnostic features and clinical implications. *Haematologica*. 2011;96:1221-5.

41. Fadilah SA, Cheong SK, Roslan H, Rozie-Hanisa M, Yen GK. GATA-1 and GATA-2 gene expression is related to the severity of dysplasia in myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 2002;16:1563-5.

42. Lahortiga I, Vazquez I, Agirre X, Larrayoz MJ, Vizmanos JL, Gozzetti A, et al. Molecular heterogeneity in AML/MDS patients with 3q21q26 rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;40:179-89.

43. Bullinger L, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, Tibshirani R, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350:1605-16.

44. Vicente C, Vazquez I, Conchillo A, Garcia-Sanchez MA, Marcotegui N, Fuster O, et al. Overexpression of GATA2 predicts an adverse prognosis for patients with acute myeloid leukemia and it is associated with distinct molecular abnormalities. *Leukemia*. 2012;26:550-4.

45. Luesink M, Hollink IH, van der Velden VH, Knops RH, Boezeman JB, de Haas V,

et al. High GATA2 expression is a poor prognostic marker in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;120:2064-75.

46. Zhang SJ, Ma LY, Huang QH, Li G, Gu BW, Gao XD, et al. Gain-of-function mutation of GATA-2 in acute myeloid transformation of chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:2076-81.

47. Zhang SJ, Shi JY, Li JY. GATA-2 L359 V mutation is exclusively associated with CML progression but not other hematological malignancies and GATA-2 P250A is a novel single nucleotide polymorphism. *Leuk Res*. 2009;33:1141-3.

48. Greif PA, Dufour A, Konstandin NP, Ksienzyk B, Zellmeier E, Tizazu B, et al. GATA2 zinc finger 1 mutations associated with biallelic CEBPA mutations define a unique genetic entity of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;120:395-403.

49. Fasan A, Eder C, Haferlach C, Grossmann V, Kohlmann A, Dicker F, et al. GATA2 mutations are frequent in intermediate-risk karyotype AML with biallelic CEBPA mutations and are associated with favorable prognosis. *Leukemia*. 2013;27:482-5.

50. Tong Q, Tsai J, Tan G, Dalgin G, Hotamisligil GS. Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2005;25:706-15.

51. Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011;43:309-15.

52. Kumar MS, Hancock DC, Molina-Arcas M, Steckel M, East P, Diefenbacher M, et al. The GATA2 transcriptional network is requisite for RAS oncogene-driven non-small cell lung cancer. *Cell*. 2012;149:642-55.

53. Migliaccio AR, Bieker JJ. GATA2 finds its macrophage niche. *Blood*. 2011;118:2647-9.

54. Ishida H, Imai K, Honma K, Tamura S, Imamura T, Ito M, et al. GATA-2 anomaly and clinical phenotype of a sporadic case of lymphedema, dendritic cell, monocyte, B- and NK-cell (DCML) deficiency, and myelodysplasia. *Eur J Pediatr*. 2012;171:1273-6.

55. Bigley V, Collin M. Dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency defines the lost lineages of a new GATA-2 dependent myelodysplastic syndrome.

Haematologica. 2011;96:1081-3.

56. Morinishi Y, Imai K, Nakagawa N, Sato H, Horiuchi K, Ohtsuka Y, et al. Identification of severe combined immunodeficiency by T-cell receptor excision circles quantification using neonatal Guthrie cards. *J Pediatr*. 2009;155:829-33.

57. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, et al. Quantification of kappa-deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128:223-5

58. Serana F, Chiarini M, Zanotti C, Sottini A, Bertoli D, Bosio A, et al. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *J Transl Med*. 2013;11:119.

59. Chan K, Puck JM. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:391-8.

60. Baker MW, Grossman WJ, Laessig RH, Hoffman GL, Brokopp CD, Kurtycz DF, et al. Development of a routine newborn screening protocol for severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124:522-7.

61. van Zelm MC, Szczepanski T, van der Burg M, van Dongen JJ. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J Exp Med*. 2007;204:645-55.

62. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, et al. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin kappa-deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131:1437-40.

63. Schandene L, Ferster A, Mascart-Lemone F, Crusiaux A, Gerard C, Marchant A, et al. T helper type 2-like cells and therapeutic effects of interferon-gamma in combined immunodeficiency with hypereosinophilia (Omenn's syndrome). *Eur J Immunol*. 1993;23:56-60.

64. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997;89:587-96.

65. Van Esch H, Groenen P, Nesbit MA, Schuffenhauer S, Lichtner P, Vanderlinden G, et al. GATA3 haplo-insufficiency causes human HDR syndrome. *Nature*. 2000;406:419-22.

66. Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, Montagnoli C, Bozza S, Moretti S, et al. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol.* 2007;37:2695-706.
67. Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, Kakuta S, Ishigame H, Akitsu A, et al. Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity.* 2010;32:681-91.
68. Kisand K, Boe Wolff AS, Podkrajsek KT, Tserel L, Link M, Kisand KV, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med.* 2010;207:299-308.
69. Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, Schaffer AA, Woellner C, Salzer U, et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med.* 2009;361:1727-35.
70. Liu L, Okada S, Kong XF, Kreins AY, Cypowyj S, Abhyankar A, et al. Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med.* 2011;208:1635-48.
71. Minegishi Y, Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, et al. Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J Exp Med.* 2009;206:1291-301.

主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex、MHC)

MHC は、細胞膜に存在する表面抗原で、自己を認識するためのマーカーとして働く。MHC 分子が自己のものでない場合、非自己と認識され、免疫応答がおこる。体細胞では MHC クラス I が、樹状細胞やマクロファージ、B 細胞といった抗原提示細胞で MHC クラス II が発現している。

X連鎖無 γ グロブリン血症 (X linked agammaglobulinemia、XLA)

先天性 B 細胞欠損症のうち最も多い疾患。責任遺伝子は *BTK*。B 細胞欠損症男性患者の 85~90% を占める。プレ B 細胞の分化が障害されるため、末梢血中 B 細胞は 2% 以下に減少している。細菌・エンテロウイルスに易感染性を示す。

分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency、CVID)

抗体産生不全と細菌感染症を主徴とする免疫不全症。B 細胞数は正常から低値で、免疫グロブリンの著明な減少を認める。25,000~66,000 人に 1 人発症し、原発性免疫不全症の中で最も発症頻度が高い。

ダイレクトシーケンス

分子生物学の解析技術。DNA 分子をクローニングすることなく、PCR 産物などからそのまま塩基配列の決定を行うこと。

Exome 解析

DNA の塩基配列のうち、Exon 部分のみを網羅的に捕捉するプローブを用いて、Exon 部分のみに断片化された DNA を抽出し、この Exon 部分配列のみを、次世代シーケンサーにより網羅的に解析する実験技術。

Exon

DNA の塩基配列のうち、タンパク質合成の情報をもつ塩基配列部分。DNA 中の遺伝 s 情報は、情報を持たない塩基配列 (Intron) の介在によって分断されているが、mRNA が合成される過程で Intron は除外され、Exon 部分のみがつなぎ合わされて mRNA が完成し、タンパク質合成の鋳型となる。

ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction、PCR)

DNA ポリメラーゼを用いて連鎖反動的に DNA を増幅する方法である。増幅しようとする DNA とその両端の配列に相補的な一対の DNA プライマー、耐熱 DNA ポリメラーゼを用いて、目的とする DNA を増幅する。この、PCR 処理を n サイクル行うことで、標的 DNA は 2^n 倍に増幅される。この PCR 処理には 3 段階あり、温度変化の第 1 段階 (約 94°C) で、標的二本鎖 DNA を熱変性して一本鎖とし、第 2 段階 (約 60°C) でプライマーを一本鎖 DNA と結合 (アニーリング) させ、第 3 段階 (約 74°C) で DNA の伸長反応を進める。

ミスセンス変異 (missense mutation)

単一塩基の置換により、正常なアミノ酸とは異なるアミノ酸が配置されることにより異常たんぱくが産生されること。点突然変異の一つ。

ナンセンス変異 (nonsense mutation)

単一塩基の置換により、アミノ酸のコドンを終止コドンに変える変異。通常合成されるタンパク質よりも、短いポリペプチド鎖になる。

点突然変異

遺伝物質である DNA や RNA の 1 ヌクレオチド塩基 (A、G、C、T/U) が別のヌクレオチド塩基に置き換わる突然変異のこと。

ホモ変異

両親から受け継いだ一対の対立遺伝子のうち、片方の対立遺伝子のみで変異を認め、異なる種類の遺伝子を受け継いだ場合、ヘテロ変異 (ヘテロ接合) という。

ヘテロ変異

両親から受け継いだ一対の対立遺伝子のうち、両方の遺伝子で同一の変異を認める場合、ホモ変異 (ホモ接合) という。

塩基の挿入または欠損による遺伝子変異 (Insertion-Deletion mutation)

DNA や RNA のヌクレオチド塩基配列中に、塩基の挿入や欠失が起こることで、正常なアミノ酸とは異なるアミノ酸が配置されることにより異常たんぱくが産生されたり、アミノ酸のコドンが終止コドンに変化し、通常合成されるタンパク質よりも、短いポリペプチド鎖になること。

ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (nonsense-mediated Decay、NMD)

遺伝子変異により異常タンパクが翻訳、生成されるのを防ぐため、異常変異を持つ mRNA を特異的に分解する機構のこと。

慢性皮膚粘膜カンジタ症

皮膚、爪、粘膜などの再発性、難治性カンジダ感染を特徴とする原発性免疫不全症。ヘルパーT細胞(Th)の一つであるTh17細胞の異常の関与が示唆されている。

de novo 変異

親から受け継いだ遺伝子変異ではなく、ある個体において新しく発生した遺伝子変異のこと。生殖細胞(精子または卵子)における突然変異や、胚形成早期の受精卵それ自体に生じた突然変異。

ストレス造血

造血幹細胞は、自己複製能と多分化能を維持しながら個体の一生を通じて造血を支えている。血液分化の過程では、この造血幹細胞が、多能性を失いながら機能的に特化していくことで、細胞の増殖も巧妙に調節されている。このため、末梢血や組織中に放出される血液細胞は定常状態ではほぼ一定に維持される。一方、出血や低酸素状態、外来病原微生物などの侵入などの緊急時には、赤血球、血小板や好中球など機能的に成熟した細胞が大量に必要なため、生体の需要に応じて、造血能が亢進することにより成熟血液細胞を補う。このような条件下での造血をストレス造血という。

重症複合型免疫不全症 (severe combined immunodeficiency、SCID)

T細胞の分化障害に伴う液性および細胞性の両免疫能の低下を特徴とし、著しい易感染性により乳児期早期に重症日和見感染症を発症する致死性の先天性免疫不全症。発症頻度は5万から10万人に1人。責任遺伝子としてB細胞の存在する *IL2RG*, *JAK3*, *IL7RA*, *CD45*, B細胞も欠損している *RAG1*, *RAG2*, *Artemis*, *ADA*, *LIG4* などがある。

T cell receptor excision circles (TREC)

T細胞受容体遺伝子再構成の過程でゲノムDNAから切り出される環状DNA。一度生成されると、増殖せず、細胞分裂に伴い希釈されるため、T細胞新生能を反映する。SCIDでは責任遺伝子ならびに表現型は異なるものの新生T細胞数の低下という共通した特徴を有するため、TRECsの欠損あるいは減少を呈する。SCIDの新生児マススクリーニングへのTRECs

検査導入が期待されている。

kappa-deleting recombination excision circles (KREC)

B 細胞の発生過程において、重鎖の有効な遺伝子再構成ができると、次に κ 鎖の再編成が始まる。その際 κ 鎖の VJ 再構成が無効の場合、その κ 鎖を発現させないために κ 鎖定常領域の C_{κ} を含む領域が染色体から切り出される。この切り出された環状 DNA が signal joint (sj) KREC である。

対立遺伝子排除 (allelic exclusion)

一つの B 細胞では一種類の免疫グロブリンのみを産生させるため、対立遺伝子を不活化する仕組み。

Isotypic exclusion

一つの B 細胞では一種類の免疫グロブリンのみを産生させるため、 λ 鎖遺伝子が発現する際に κ 鎖遺伝子を不活化する仕組み。

リアルタイム PCR

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅産物をリアルタイムにモニタリングする解析技術。PCR により 1 サイクルごとに DNA が 2 倍になっていく増幅の様子を蛍光により検出し、増幅曲線から DNA の定量を計算する。

メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症 (mendelian susceptibility to mycobacterial diseases, MSMD)

BCG や非結核性抗酸菌など弱毒抗酸菌に易感染性を呈することを特徴とする。この疾患では強毒である結核菌や、サルモネラなどの細胞内寄生菌感染症も重症化する。一方他の微生物の感染に対しては易感染性を呈しない。MSMD は *IFN- γ R1/2*, *IL-12p40*, *IL-12R β 1*, *STAT1* のような細胞内寄生菌感染症に対する生体防御機構の責任遺伝子の異常によっておこる

カンジダ感染と外胚葉形成異常を伴う自己免疫性多腺性内分泌不全症 (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dysplasia, APECED)

胸腺髄質上皮細胞に発現する AIRE をコードする遺伝子の変異で生じる。AIRE の変異により自己抗原が胸腺で発現しないと適切なネガティブセレクションが起こらず、自己抗原に強く反応する T 細胞が成熟して末梢に流出し、多彩な自己免疫疾患を呈すると考えられてい

る。本疾患ではさらに慢性皮膚粘膜カンジダ症を呈するが、近年これが真菌感染防御に必要なサイトカインに対する自己抗体産生が原因と報告されている。

Ataxia telangiectasia (AT)

責任遺伝子は *ATM*。進行性免疫不全(T細胞成熟異常)、進行性眼球運動失行、小脳性運動失調、言語障害、眼皮膚末梢血管拡張、放射線感受性、染色体不安定性、高発癌性(10-15%が悪性リンパ腫合併)、内分泌異常を呈する。100万出生に3人の発症率。*ATM* 蛋白は V(D)J 再構成中に2重鎖切断された DNA を安定化させ、正常な細胞周期チェックポイントの調節・DNA 修復に関わる。

図1

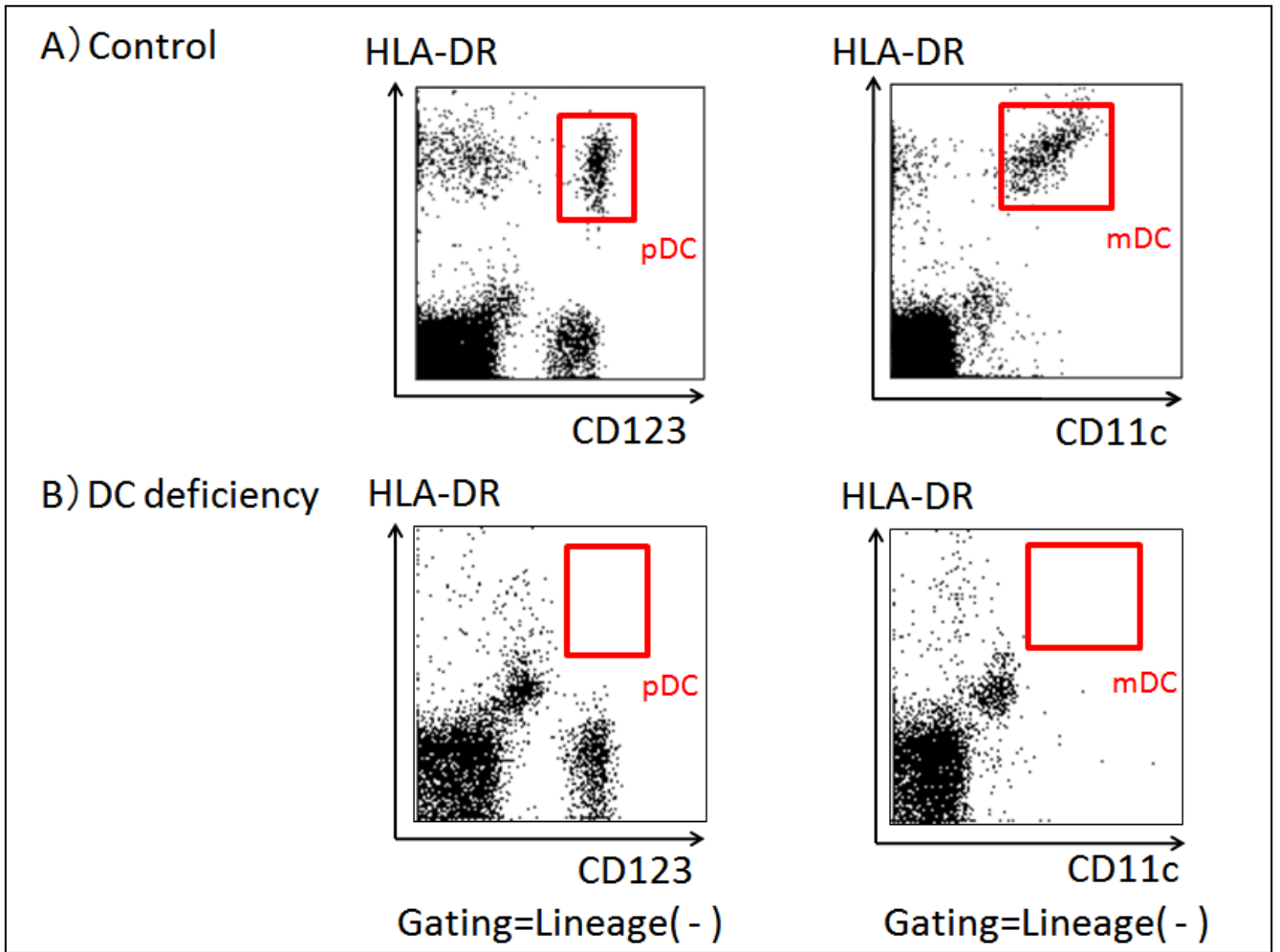


図1 フローサイトメトリーによる末梢血DCの測定

末梢血中の赤血球を溶血後、Lineage (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) cocktail 1抗体、抗HLA-DR抗体、抗CD123抗体、抗CD11c抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。

顆粒球、単球、リンパ球全体をGatingし、Lineage negative cocktail抗体陰性部分をさらにGatingした分画において、HLA-DR⁺CD123⁺細胞をPlasmacytoid Dendritic cell (pDC)、HLA-DR⁺CD11c⁺細胞をMyeloid Dendritic cell (mDC)と定義した。

A) 正常コントロールにおける、DC分画

B) 樹状細胞欠損症患者における、DC分画

図2

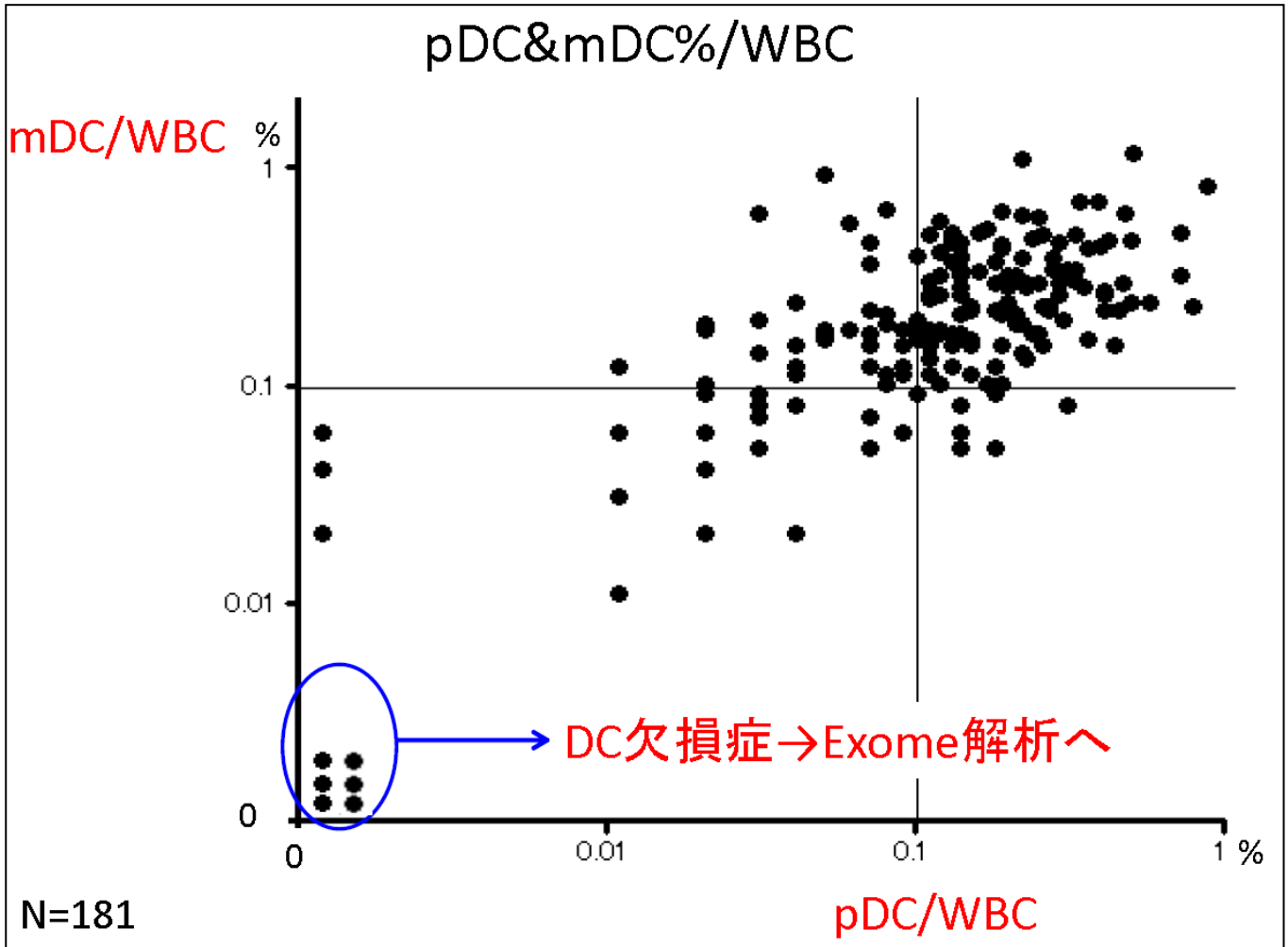


図2 原発性免疫不全症患者における末梢血DCの測定

2010年2月よりPIDJを通じて防衛医科大学校小児科に原発性免疫不全症の免疫学的検討の依頼を受けた181名について、末梢血中のpDC、mDC細胞率を測定した。

pDC/ WBC : 白血球中におけるpDC細胞率 (%)

mDC/ WBC : 白血球中におけるmDC細胞率 (%)

Exome結果 (Patient2)

GATA2 heterozygous mutation : c.1187G>A,p.Arg396Gln

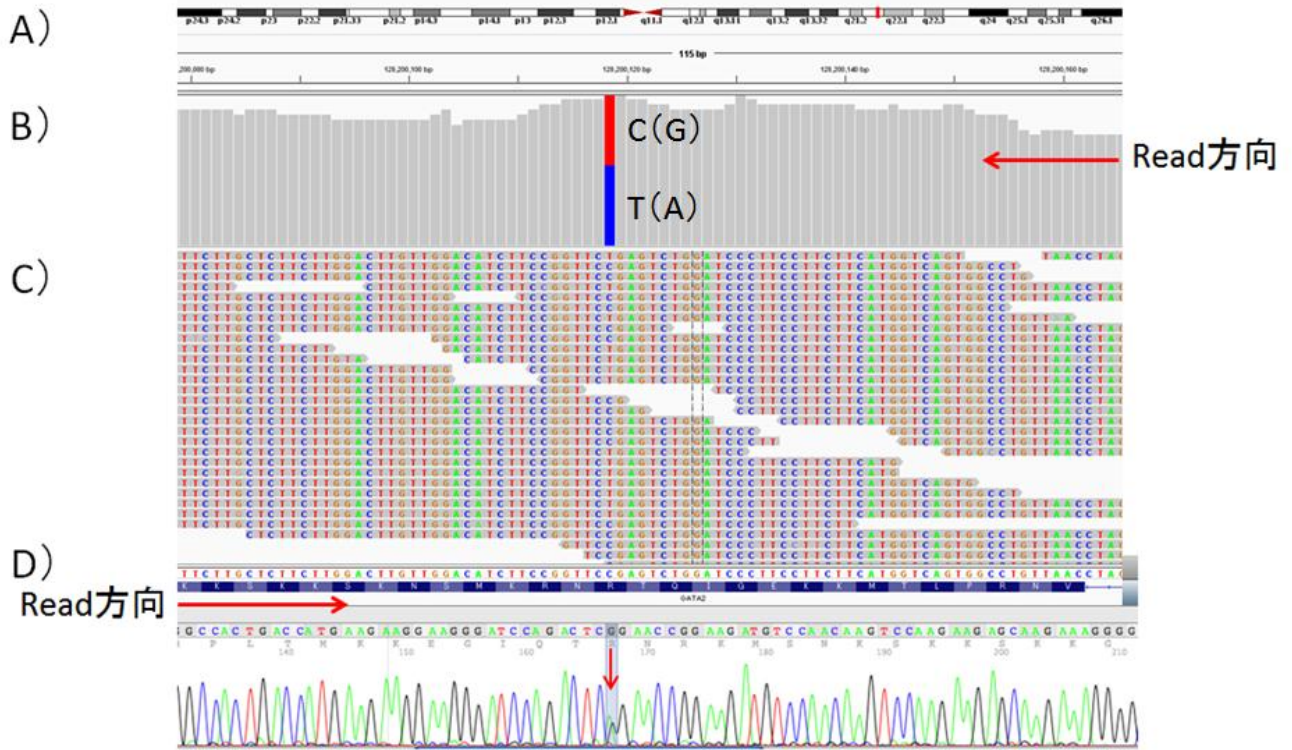


図3 *GATA2* 遺伝子異常の同定

樹状細胞欠損症において、Exome解析を行った。

(A) *GATA2* 遺伝子は、ヒト第3染色体長腕上に位置する。

(B) 変異部位周辺のRead回数を縦軸で表す。遺伝子変異部位は、C(青色)、T(赤色)を約半数ずつ認め、ヘテロ変異であった。

(C) 各Read毎の塩基配列を1列に並べた。*GATA2* 遺伝子変異部位は、C 16read、T 13readであった。

(D) *GATA2* 遺伝子異常部位を、ダイレクトシーケンス法で確認した。Exome解析での*GATA2* 変異部位において、同様にG、Aのヘテロ変異を認めた。

図4

GATA2異常症患者の遺伝子変異部位

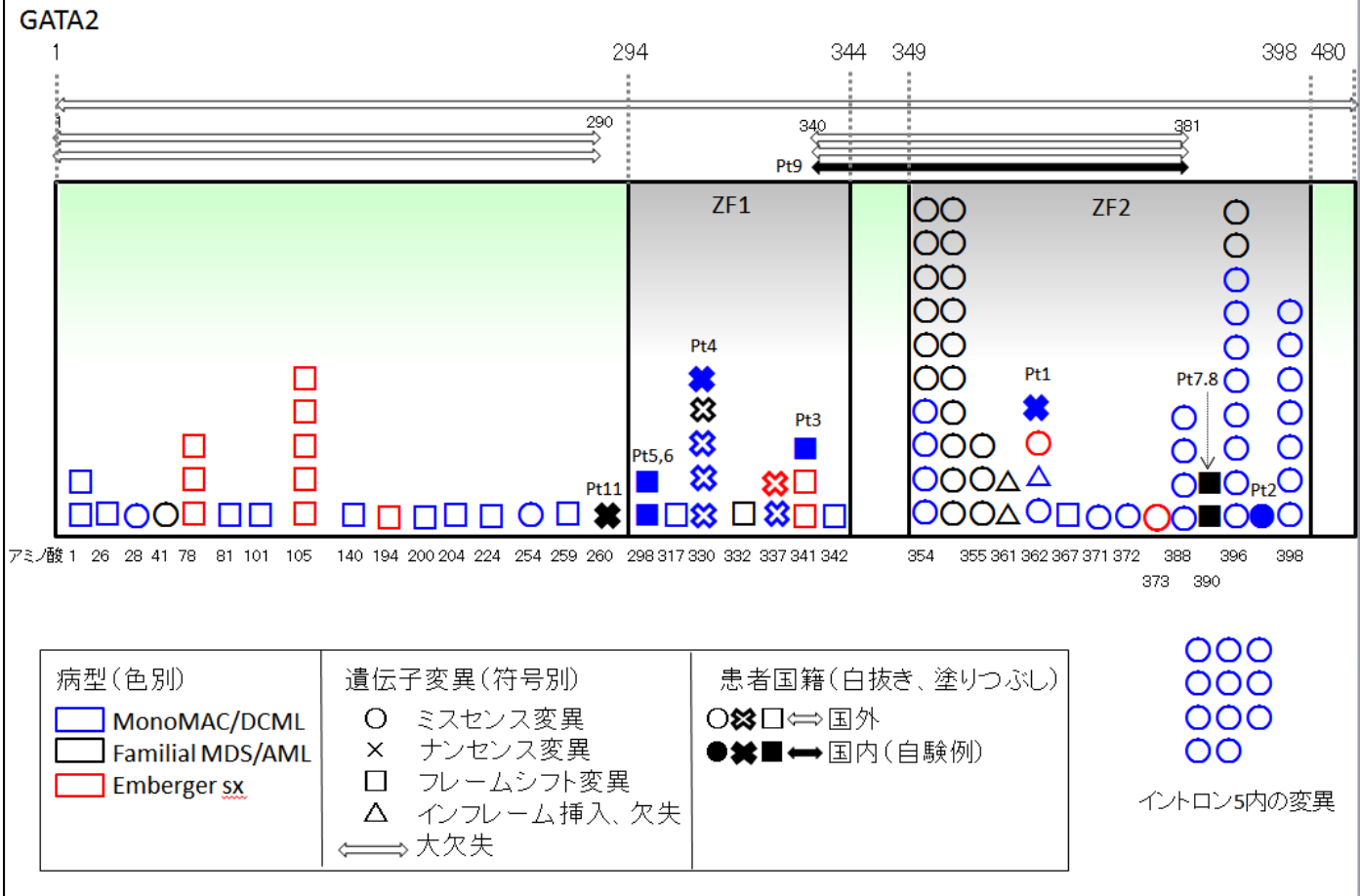


図4 GATA2 異常症患者の遺伝子変異部位

(R Katherine Hyde & P Paul Liu. Nature Genetics. 43; 926-927, 2010より改変)

GATA2異常症患者のGATA2遺伝子変異部位を図に示す。

各患者の遺伝子変異部位を各符号として示す。数字はアミノ酸変異部位。

各符号の色は、3病型(青色:MonoMAC症候群、黒色:家族性MDS/AML、赤色:Emberger症候群)を示し、各符号の種類は、○:ミスセンス変異、×:ナンセンス変異、□:フレームシフト変異、△:インフレーム挿入、欠失による変異、↔:大欠失を示す。

また、白抜きの符号は国外のGATA2異常患者の遺伝子変異部位を示し、各色で塗りつぶした符号は、国内の同定患者(自験例)の遺伝子変異部位を示す。

ZF1: Zinc Finger1、ZF2: Zinc Finger2、Pt: Patient、MonoMAC: monocytopenia, B and NK cell lymphopenia and mycobacterial, fungal and viral infections、DCML: dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency、MDS: myelodysplastic syndrome、AML: acute myeloid leukemia

GATA2異常症患者ではTREC低下を認める

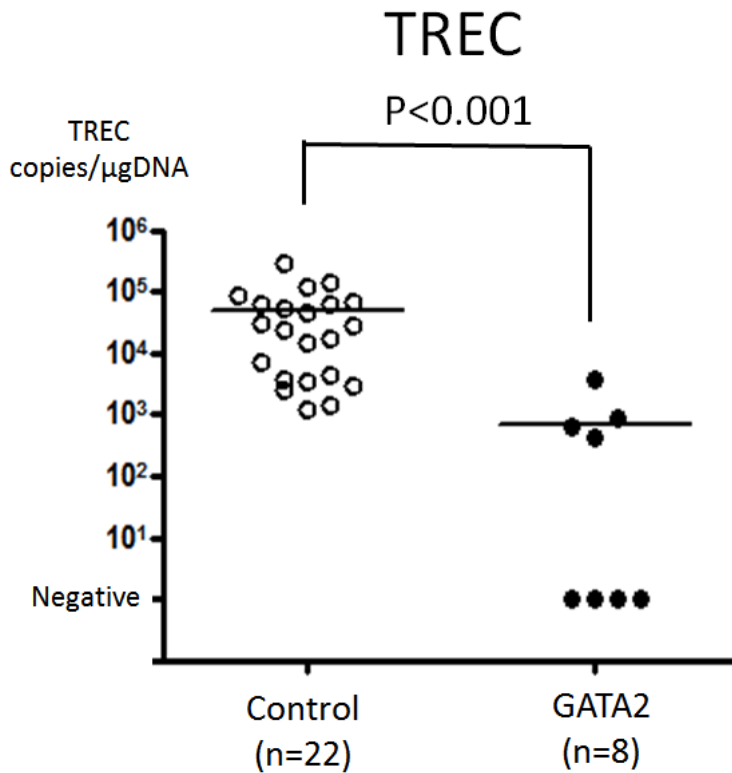


図5 GATA2異常症患者におけるTREC低下

TRECは、T cell receptor (TCR) α鎖のVDJ遺伝子再構成 (TCRD deletion) の過程で生じる環状DNAで、T細胞の分化・増殖により複製されず、安定して存在するため、新生T細胞のマーカーとして利用可能である。

そこで、免疫不全症が否定された正常コントロール22名、GATA2異常症患者7名において、TRECをRT-PCR法により測定し比較検討した。

Y軸はコピー数 (copy/ μgDNA) を示す。100 copies/ μgDNA未満は陰性 (negative) とした。各検体はそれぞれ3回ずつ測定し、平均値を採用し、P<0.05を有意差ありと判断した。

GATA2異常症患者ではsjKREC低下を認める

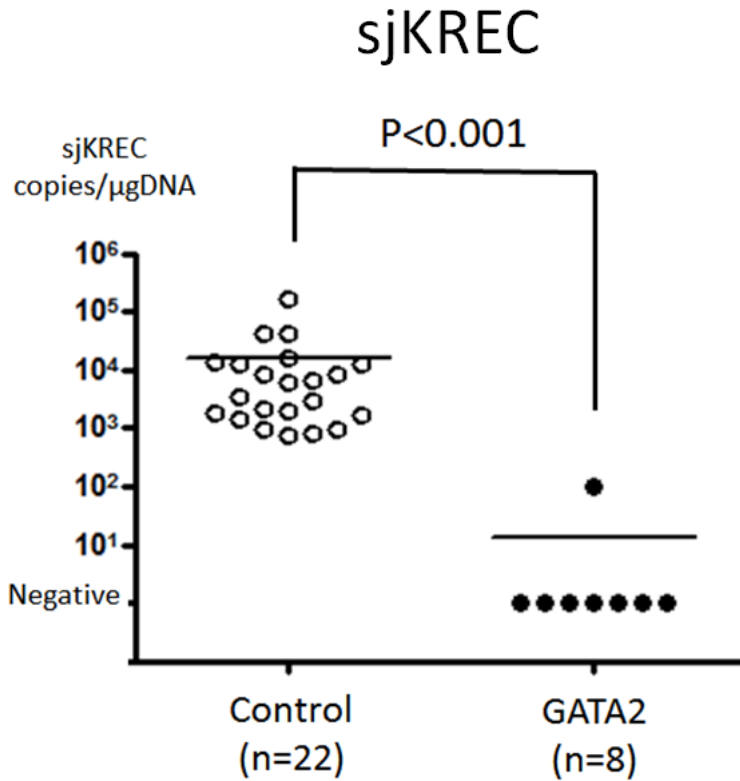


図6 GATA2異常症患者におけるsjKRECの低下

sjKRECは、λ鎖再構成時あるいはκ鎖のallelic exclusionのために、κ鎖定常領域(Cκ)が染色体DNAから切り出された際に生じる環状DNAで、B細胞の分化・増殖により複製されず、安定して存在するため、新生B細胞のマーカーとして利用可能である。

そこで、免疫不全症が否定された正常コントロール22名、GATA2異常症患者7名において、sjKRECをRT-PCR法により測定し比較検討した。

Y軸はコピー数 (copy/ μgDNA) を示す。100 copies/ μgDNA未満は陰性 (negative) とした。各検体はそれぞれ3回ずつ測定し、平均値を採用し、P<0.05を有意差ありと判断した。

GATA2異常症患者では
naïve T細胞率は正常に存在するが
naïve T細胞中のThymic Naïve T細胞が減少している

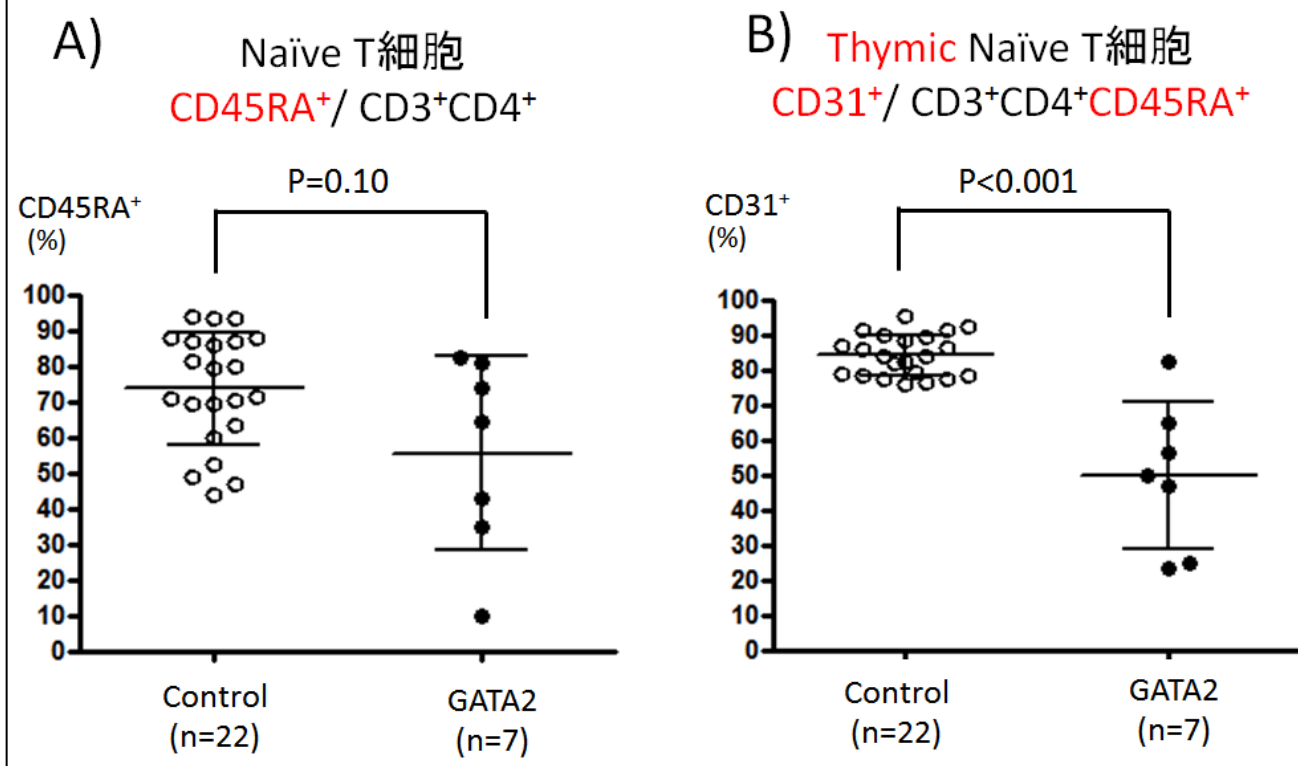


図7 GATA2異常症患者におけるThymic Naïve T細胞の減少

(A)末梢血中におけるCD3⁺CD4⁺T細胞中における、CD45RA⁺ naïve T細胞率を、免疫不全症が否定された正常コントロール22名、GATA2異常症患者7名において測定し、比較検討した。

(B)末梢血中におけるCD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ naïve T細胞中における、CD31⁺ thymic naïve T細胞率を、免疫不全症が否定された正常コントロール22名、GATA2異常症患者7名において測定し、比較検討した。

それぞれP<0.05を有意差ありと判断した。

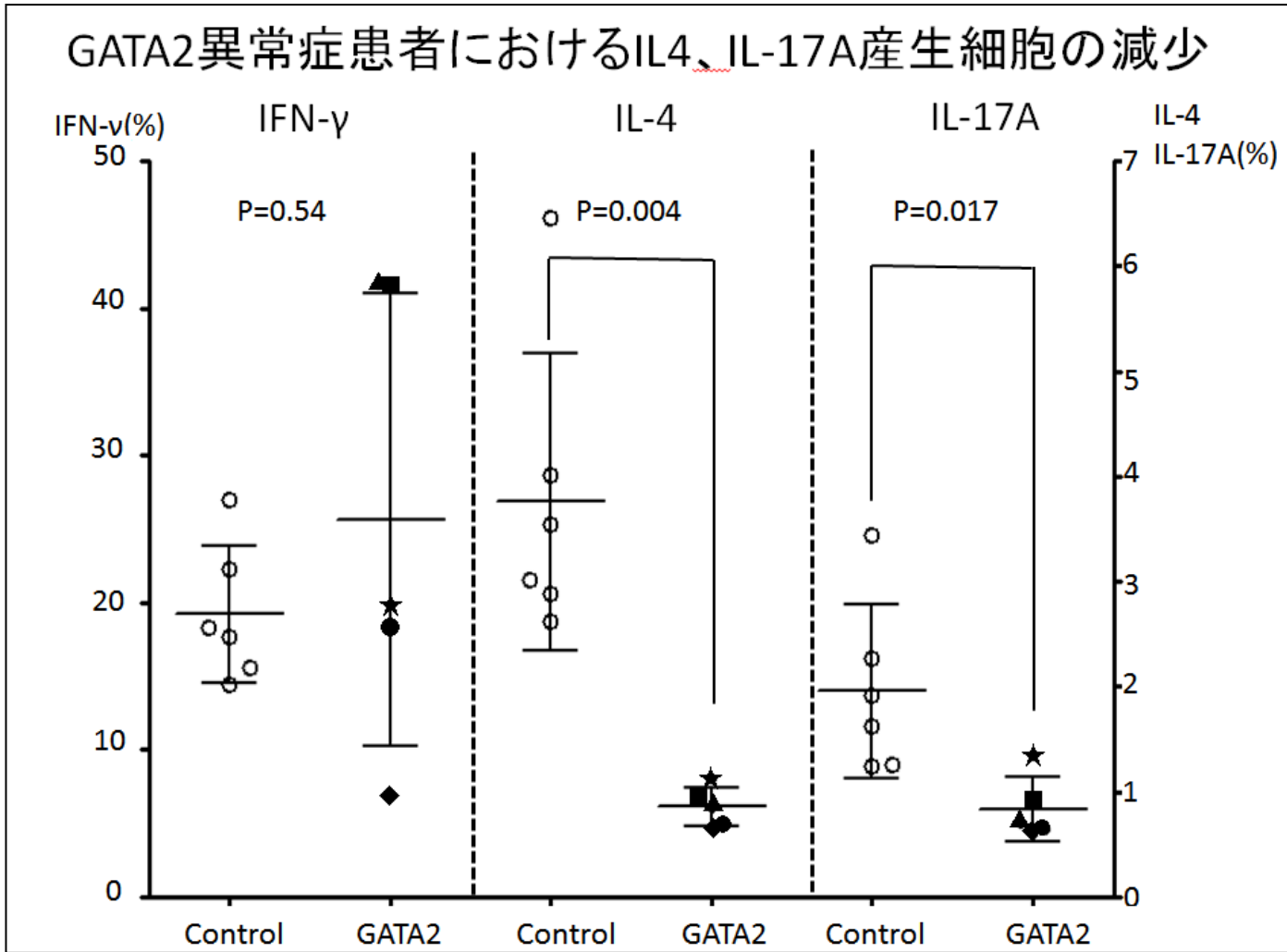


図8 GATA2異常症患者におけるIL4, IL-17産生T細胞の減少

末梢血中のCD4⁺細胞中のIFN- γ , IL-4, IL-17産生細胞率を、免疫不全症が否定された正常コントロール22名、GATA2異常症患者7名において測定し、比較検討した。

Y軸(左軸)は、IFN- γ 産生細胞率を示し、Y軸(右軸)は、IL-4産生細胞率、IL-17A細胞率を示す。それぞれP<0.05を有意差ありと判断した。

図9

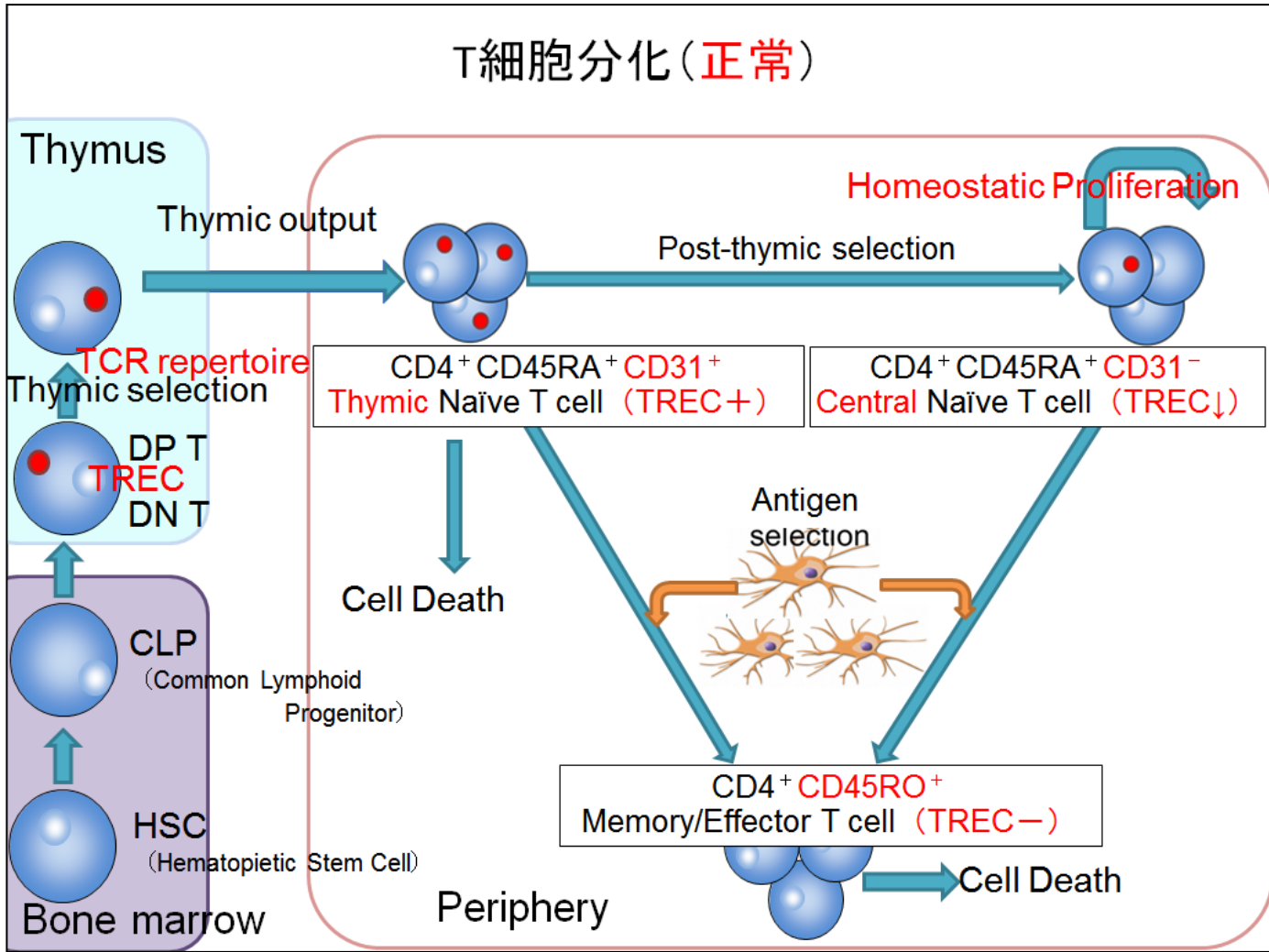


図9 正常者におけるT細胞分化モデル

骨髄中の造血幹細胞 (HSC) は、リンパ球共通前駆細胞 (CLP) へ分化後、胸腺へ移動する。胸腺内では、Double negative (DN) T細胞、Double positive (DP) T細胞へと分化後、末梢血中へと供給され、CD4⁺ CD45RA⁺ CD31⁺ Thymic naïve T 細胞として循環する。

末梢血中へ移動後、Thymic naïve T 細胞は、樹状細胞、B細胞、マクロファージ等の抗原提示細胞から抗原提示を受けて、CD4⁺ CD45RO⁺ Memory/ Effector T 細胞へと分化する。

また、Thymic Naïve T細胞は末梢血で、Post-thymic selectionを受けて、CD4⁺ CD45RA⁺ CD31⁻ central naïve T細胞へと分化する。Central naïve T 細胞は、末梢血でHomeostatic Proliferationによって増殖し、その後Thymic Naïve T細胞同様に抗原提示を受けて、Memory/ Effector T細胞へ分化する。

TRECは、DN T細胞から、DP T細胞への分化の際に作製される。末梢血中のT細胞分画では、Thymic Naïve T細胞に最も多く含まれ、T細胞が分裂、増殖するごとに希釈され相対的に減少していく。

図10

T細胞分化 (GATA2異常・仮説)

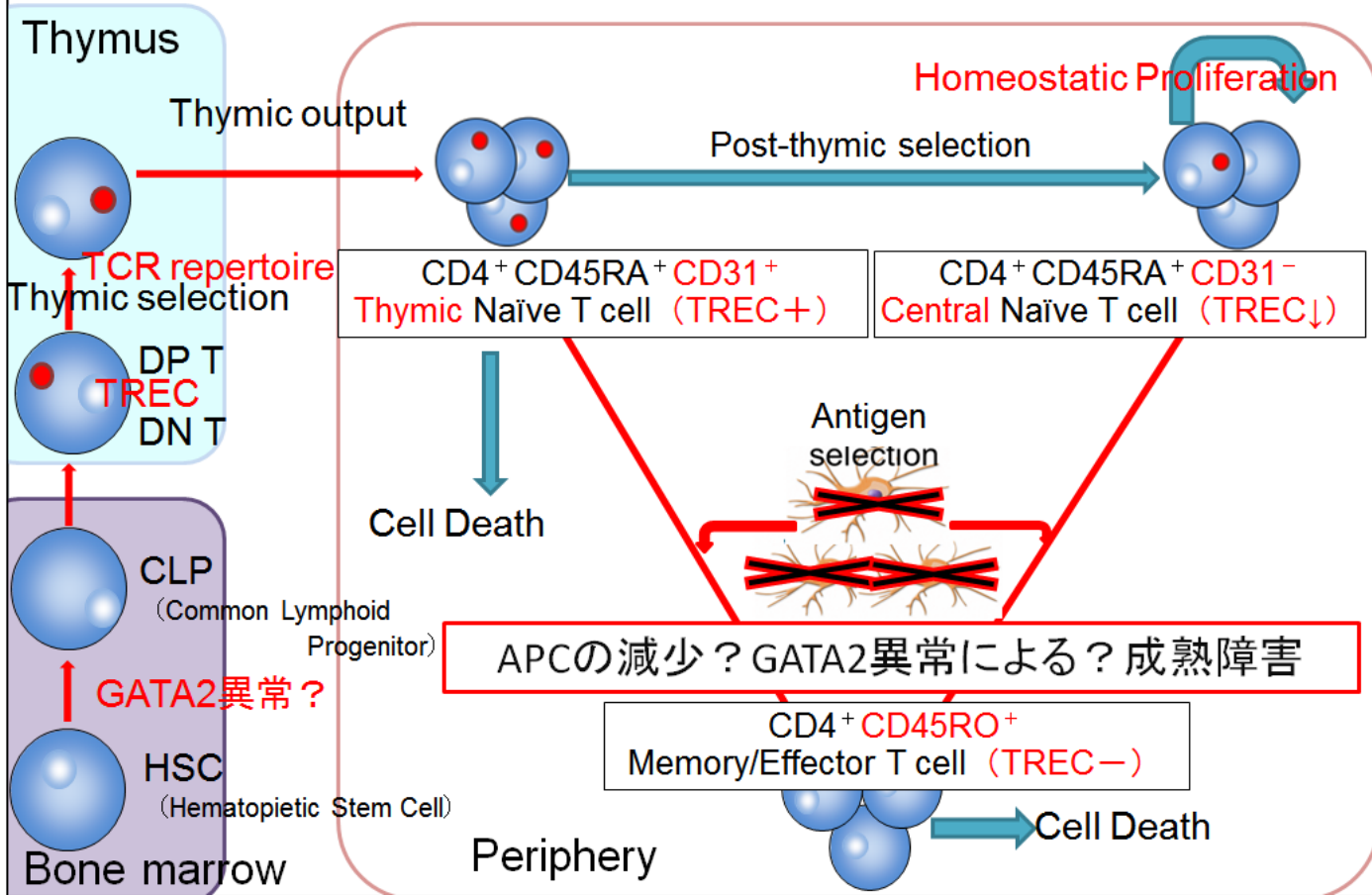


図10 GATA2異常症患者におけるT細胞分化

GATA2遺伝子は、HSCの増殖、維持に必要な転写因子で、GATA2遺伝子異常により、造血幹細胞からのT細胞分化が障害される。

そのため、TRECも低値で、胸腺から、末梢血へと供給されるT細胞数も減少している。

T細胞欠損を伴うSCIDでは、T細胞分化障害部位を乗り越えることができたleaky T細胞では、その後の分化は正常に行われるため、末梢血中のT細胞はすべて、CD45RO⁺ Memory/Effector T細胞へと偏移していることが特徴である。

しかし、GATA2異常症の場合、GATA2異常症自体によるT細胞成熟障害、樹状細胞を含む抗原提示細胞の欠損により、CD45RA⁺細胞、CD45RO⁺細胞率は保たれている。

また、末梢血中のPost-thymic selectionは正常であるため、CD31⁺ Thymic Naive T細胞は、CD31⁻ Central Naive T細胞へと分化は行われ、この分画が増加する。

TRECはこの間、分裂によって増えることはないため、相対的に希釈され、GATA2異常症では、TREC低値となる。

表1

Pt No	Age	Mutation	Viral Infection	Intracellular Bacteria	Bacterial/ Fungal Infection	MDS/ AML	HSCT
1	8	R310X	Severe VZV infection with ARDS and DIC(4ys)	Salmonella enterocolitis infection(5ys)	—	—	Yes
2	19	R396Q	Severe VZV infection(2ys) Influenzal pneumonia(17ys)	Salmonella enterocolitis infection(8ys)	—	MDS(RCMD) (18ys)	Yes
3	10	A341fsX	VZV-VAHS(9ys)	—	—	—	Yes (10ys)
4	36	R330X	HPV infection(24ys)	Mycobacterium kansasii(27ys) Mycobacterium intracellulare(31ys)	Nocardia pneumonia(16ys) Cryptococcus meningitis(34ys)	MDS (RAEB II) (34ys) AML(35ys)	Yes (35ys)
5	28	C298fsX	Recurrent HSV infections(13ys) HPV infection(18ys)	Mycobacterium avium(18ys)	Liver abscess(25ys)	MDS(RAEB) (25ys)	Yes (25ys)
6	31 No5兄	C298fsX	—	Mycobacterium avium(26ys)	—	MDS	No
7	11	K390fsX	No severe infection	—	—	MDS	Yes
8	40 No7父	K390fsX	No severe infection	—	—	MDS	Yes (32ys)
9	9	S340_N 381del	No severe infection	—	—	MDS(RCMD)	Yes (10ys)
10	43 No9母	NA	HPS/Cellulitis	—	—	MDS	No
11	NA	G260X	No severe infection	—	—	MDS/ AML再発2回	Yes (dead)
12	46 No1母	NA	Sepsis(46ys)	—	—	MDS	No (dead)

表1 GATA2異常症患者の臨床症状

Pt :Patient

HSCT :hematopoietic stem cell transplantation

VZV : varicella zoster virus

ARDS : acute respiratory distress syndrome

DIC : disseminated intravascular coagulation

VAHS : virus-associated hemophagocytic syndrome

HPV : human papillomavirus

MDS : myelodysplastic syndrome

AML : acute myeloid leukemia

RAEB : refractory anemia with excess blasts

RCMD : refractory cytopenia with multilineage dysplasia

表2

Antibody	色素	試薬会社	clone
CD3	FITC	BD	SK7
CD3	APC	BC	UCHT1
CD4	FITC、PerCP	BD	SK3
CD4/CD8/CD3	FITC/ PE/ PerCP	BD	SK3/ SK1/ SK7
CD8	PerCP	BD	SK1
CD16	PE	BD	B73.1
CD19	FITC、APC	BC	J4.119
CD20	PE	BD	L27
CD25	FITC	BD	2A3
CD31	PE	BD	WM59
CD45RA	FITC	BD	L48
CD45RO	APC	BD	UCHL1
CD56	PE-Cy5	BC	N901 (NKH-1)
CD127	PE	BD	hIL-7R-M21
HLA-DR	PE	BD	L243
TCRV α 24	FITC	BC	C15
TCRV β 11	PE	BC	C21
TCR α/β	FITC	BD	WT31
TCR γ/δ	PE	BD	11F2

表2 フローサイトメトリーにおける使用抗体

BD: Beckton Dickinson

BC: BECKMAN COULTER

表3

Pt No	Age	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/ 8	CD19 (%)	NK (%)	mDC (%)	pDC (%)	Mono (%)
1	8	98.9	17.6	73.1	0.24	0.13	0.06	0.00	0.00	0.72
2	19	96.9	17.0	40.6	0.42	0.68	0.21	0.00	0.00	0.55
3	10	82.3	23.5	72.8	0.32	0.14	1.39	0.00	0.00	0.89
4	36	89.8	17.6 (単染色)	25.2 (単染色)	0.70	1.5	1.3* ¹	NA	NA	0 (目視)
5	28	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6	31	84.8	55.7	38.7	1.44	0.16	0.02	0.00	0.00	0.07
7	11	97.8	39.8	55.9	0.71	1.3	0.22	0.02	0.00	2.16
8	40	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	9	41.6	36.1	55.9	0.65	6.7	30.7	0.04	0.00	NA
10	43	76.2	55.7	38.4	1.45	7.6	12.4	0.20	0.40	NA
11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12	46	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

表3 GATA2異常症患者のリンパ球分画

Pt4 : 移植施設での解析結果を示す。

NA : Not available

CD3(%)=CD3+(%)/ lymphocytes

CD4(%)=CD4+(%)/ CD3+lymphocytes

CD8(%)=CD8+(%)/ CD3+lymphocytes

CD19(%)=CD19+(%)/ lymphocytes

NK(%)=CD3⁻CD16⁺CD56⁺(%)/ lymphocytes

mDC(%)=Lineage(CD3,CD14,CD16,CD19,CD20,CD56)⁻HLA-DR⁺CD11c⁺(%)/ white blood cells

pDC(%)=Lineage(CD3,CD14,CD16,CD19,CD20,CD56)⁻HLA-DR⁺CD123⁺(%)/ white blood cells

Mono(%)=Analysis of lysed whole blood or peripheral blood mononuclear cells using FSC/ SSC

*1=CD16⁺CD56⁺cells/ lymphocytes