

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2008 年

課題番号：19591253

研究課題名（和文） 分類不能型低ガンマグロブリン血症の病態・原因の解明

研究課題名（英文） The cause and pathophysiology of common variable immunodeficiency

研究代表者

高田 英俊（TAKADA HIDETOSHI）

九州大学・大学病院・特任准教授

研究者番号：70294931

研究成果の概要：分類不能型低ガンマグロブリン血症患者末梢血単核球から CD4<sup>+</sup>T 細胞を純化し、Th2 細胞を *in vitro* で誘導し、Th2 細胞における遺伝子発現をマイクロアレイにて健康者と比較した。健康者と比較して、APOB、CHIM、FLIP 1、SLC22A4、TMEM1、UPF2、FAH、SERPINA5、GGCX、SMARCAL1、遺伝子の発現量の低下が著しかった。これらの遺伝子の塩基配列を決定したが、遺伝子異常は認められなかった。次に患者末梢血 B 細胞を純化し、*in vitro* で活性化した後、遺伝子発現量を健康者と比較した。その結果、IGJ、ROR1、FLJ2、PDE3B、CNN3、SGCE、GNG2、TLE1 遺伝子の発現量の低下が著しかった。これらの遺伝子の塩基配列を決定したが、遺伝子異常は認められなかった。今後はさらにそれ以外の遺伝子で発現量の低下しているものに関して遺伝子解析を行い原因を明らかにしたい。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：原発性免疫不全症候群、分類不能型低ガンマグロブリン血症、マイクロアレイ、定量的 PCR

## 1. 研究開始当初の背景

分類不能型低ガンマグロブリン血症（CVID）は、低ガンマグロブリン血症により細菌感染を主体とする易感染性を呈する疾患であり、抗体不全症の中では最も頻度の高い原発性免疫不全症である。25,000 人から 66,000 人に 1 人が発症すると報告されており、孤発例と遺伝性のものが認め

られる。SLE 等の自己免疫疾患や悪性リンパ腫、消化器癌等の悪性腫瘍の合併頻度が高いことも知られており、病因・病態の解明が待たれている。CVID の原因はこれまで明らかではなかったが、Inducible T-cell costimulator（ICOS）欠損症や Transmembrane activator and CAML interactor（TACI）の遺伝子異常によるも

の、B cell activating factor receptor (BAFF receptor) 遺伝子異常によるもの、CD19 欠損症が近年報告された。しかし、ICOS 欠損症や CD19 欠損症は CVID の中で極めてまれであると考えられ、TACI 遺伝子異常による CVID は、27 家系中 3 家系で認められたのみであると報告されている。我が国では ICOS 欠損症、TACI 遺伝子異常症、BAFF 遺伝子異常症、CD19 欠損症はいずれも報告されていないか、数家系が報告されているのみであり、CVID の原因の多くは未だ不明である。ICOS は T 細胞に、TACI、BAFF receptor 及び CD19 は B 細胞に発現し、いずれも B 細胞に対する T 細胞のヘルパー機能や、B 細胞の活性化シグナルに重要な役割を果たしている。CVID は、T 細胞と B 細胞のいずれの異常でも起こりうると考えられ、原因となる分子異常が多数存在する可能性もあり、その病態を解明していく上で、原因となる分子異常を推定することは困難である。

## 2. 研究の目的

分類不能型低ガンマグロブリン血症患者の末梢血単核球の遺伝子発現を健常者と比較することにより、この疾患の遺伝子発現の特徴を明らかにし、さらに発現が低下した遺伝子を責任遺伝子の候補遺伝子として、遺伝子の塩基配列を決定することにより、この疾患の責任遺伝子を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

九州大学病院小児科で診療を受けている CVID 患者 3 名を対象として、九州大学倫理委員会の承認を得た後、患者の同意を得て行った。

### (1) Th2 細胞の誘導

CD4<sup>+</sup>細胞の純化は、単球が CD4 を弱く発現しているため、CD14 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach Germany) 及び LD Column (Miltenyi Biotec GmbH) を用いて単球を除去した後、CD4 マイクロビーズ及び MS Column を用いて CD4<sup>+</sup>T 細胞を純化した。純化した CD4<sup>+</sup>T 細胞を固層化抗 CD3 抗体 (1・g/ml, BD Pharmingen, San Diego, CA)、抗 CD28 抗体 (10・g/ml, BD Pharmingen)、IL-4 (20 ng/ml, R&D, Minneapolis, MN)、抗 IL-12 抗体 (10・g/ml, R&D)、IL-2 (20 U/ml, Genzyme, Cambridge, MA) にて 3 日間培養し、細胞を Wash した後、さらに IL-4 (20 ng/ml)、抗 IL-12 抗体 (10・g/ml) の存在下に 4 日間培養して Th2 細胞

を誘導し、回収した。培養終了後は Th2 細胞の特徴である CRTH2 陽性であることをフローサイトメータにて確認した。

### (2) 活性化 B 細胞の誘導

B 細胞は CD19 マイクロビーズ及び MS Column を用いて純化した。純化した B 細胞を SAC (0.01%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、IL-2 (50 ng/ml, Genzyme)、IL-10 (50 ng/ml, Genzyme)、抗 CD40 抗体 (1・g/ml, Immunotech, Westbrook, ME) の存在下に 2 日間培養し、抗体産生細胞へ誘導した。純化した Th2 細胞と活性化 B 細胞のペレットは遺伝子マイクロアレイ用とプロテインチップ用とに分け、液体窒素に保存した。

### (3) マイクロアレイ

凍結保存しておいた細胞から、Isogen (Nippon Gene) にて RNA を抽出し、AminoAllyl Message Amp aRNA Kit (Ambion, Austin TX) を用いてリニア増幅した後、マイクロアレイ (Acegene Human Oligo 30K, 日立ソフト) を行い、遺伝子発現を比較した。測定は Microarray Scanner FLA 8000 (Fuji Film) で Scan し、Array Vision (Amersham Pharmacia) で定量化した。GAPDH、Actin 等の発現量を基準として遺伝子発現の数値を標準化した。得られた多種の膨大な遺伝子発現に関するデータを Gene Spring Software (Silicon Genetics, Redwood City, CA) で解析した。データは Lowess 法を用いて Normalize した。マイクロアレイを用いて、CVID 患者で遺伝子発現異常 (低発現) を同定し候補遺伝子とした。候補遺伝子については、それらの塩基配列を決定し、遺伝子異常の有無を検討した。

## 4. 研究成果

分類不能型低ガンマグロブリン血症患者および健常者から末梢血を採取し、CD4 陽性 T 細胞をマイクロビーズを用いて純化し、Th2 細胞を誘導し、それらの細胞における遺伝子発現をマイクロアレイにて比較検討した。なお純化した CD4 陽性 T 細胞をフローサイトメーターで解析したところ、いずれも 98% を越えていた。純化した CD4 陽性 T 細胞を固層化抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、IL-4、抗 IL-12 抗体、IL-2 にて 3 日間培養し、細胞を Wash した後、さらに IL-4、抗 IL-12 抗体の存在下に 4 日間培養した。培養後の細胞は 99% 以上が CRTH2 陽性であり、Th2 細胞が誘導されていることが確認された (図 1)。患者由来の Th2 細胞と健常者由来の Th2 細胞の遺伝子発現をマイクロアレイで比較し、遺伝子発現の差が大きい順にリストアップした (表 1)。上

位4遺伝子に関しては、遺伝子発現を定量的PCR法で検討したが、マイクロアレイの結果を支持する結果であった。

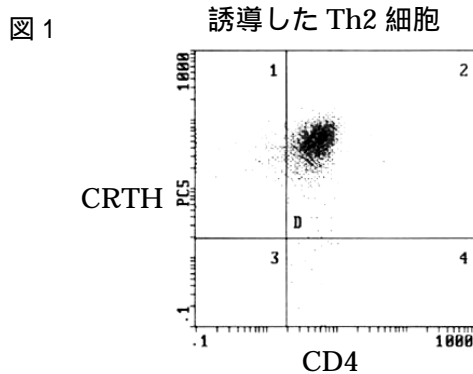


表1 Th2細胞でのマイクロアレイの結果 (CVID患者で発現の低下していた遺伝子)

Number	ID	Gene name	Description	Map	Ratio
1	AGhsA240613	APOB	apolipoprotein b precursor: apob	2q24-p23	0.180
2	AGhsA120306	CHIM	choroideremia (rab escort protein 1): chm	Xq21.2	0.257
3	AGhsB210217	FILP1	cna fj14799 fis clone nt2rp4001351 weakly similar to ovarian cancer downregulated myosin h-chain homolog doc1 mms: unnamed protein product serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade a (alpha-a antiprotease, antitrypsin), member 5; serpinA5	6q14.1	0.276
4	AGhsA161014	SERPINA5	serpinA5	14q32.1	0.279
5	AGhsA050221	FLJ11142	hypothetical protein fj11142: fj11142	3q13.2	0.285
6	AGhsA130101	TMEM1	transmembrane protein 1: tmem1	21q22.3	0.289
7	AGhsA051505	UPF2	regulator of nonsense transcripts 2: rent2	10p14-p13	0.290
8	AGhsA050401	GGCX	gamma-glutamyl carboxylase: ggcx	2p12	0.297
9	AGhsA160508	FAH	fumarylacetoacetylase: fah	15q23-q25	0.298
10	AGhsA101006	SNTG1	syntrophin, gamma 1: sntg1	8q11-q12	0.306
11	AGhsA231317	SMARCAL1	swi/snf related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a-like 1; smarcad1	2q34-q35	0.355
12	AGhsA220318	SLC22A4	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4: slc22a4	5q23.2	0.358
13	AGhsA170104	DLK1	delta-like homolog (drosophila): dlk1	14q32	0.372
14	AGhsA260307	FUT3	fucosyltransferase 3 (galactoside 3(4)-/ - fucosyltransferase, lewis blood group included): fut3	19p13.3	0.383
15	AGhsA141221	VPS4B	vacuolar protein sorting factor 4b: vps4b	18q21.32-q21.33	0.402
16	AGhsA260522		hypothetical protein fj20294: fj20294		0.418
17	AGhsA160608	LOC56965	hypothetical protein from euromage 1977056: loc56965	15q23-q25	0.426

患者において遺伝子変異が著しく低下していたこれらの遺伝子について、遺伝子変異の有無を検討したが、各患者における遺伝子変異は認められていなかった。

次に CVID 患者および健常者末梢血 B 細胞を同様にマイクロビーズを用いて純化した。B 細胞の純度は同様に 98%を越えていた。B 細胞を SAC、IL-2、IL-10、抗 CD40 抗体の存在下に 1 日間培養して活性化 B 細胞を誘導し、細胞ペレットを液体窒素に保存した。これらの細胞の遺伝子発現を、マイクロアレイで比較した。マイクロアレイ解析の結果、健常者と比較して遺伝子発現が著しく低下していたものを表 2 に示す。

表 2 活性化 B 細胞でのマイクロアレイの結果 (CVID 患者で発現の低下していた遺伝子)

Number	ID	Gene name	Description	Map	Ratio
1	AGhsC210710	IGCJ	ig j cain exons 3 and 4: j-chain	4q21	0.350
2	AGhsA250111	ROR1	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1: ror1	1p32-p31	0.370
3	AGhsA220601	FLJ2	hypothetical protein: fj20152	5p15.1	0.403
4	AGhsA041002	PDE3B	phosphodiesterase 3b, cgmp-inhibited: pde3b	11p15.1	0.408
5	AGhsA251307	CNIN3	calpain 3: cnin3	1p22-p21	0.415
6	AGhsA201407	SGCE	sarcoglycan, epsilon: sgce	7q21-q22	0.423
7	AGhsB030224	GNG2	prot107	14q21	0.472
8	AGhsA191020	TLE1	transducin-like enhancer of split 1(e(spl) homolog, drosophila): tle 1	9q21.32	0.474

活性化 B 細胞で遺伝子発現の低下したこれらの遺伝子の塩基配列を調べたが、遺伝子異常は認められなかった。

今回検討したように、Th2 細胞や活性化 B 細胞で、発現量に著しい差が認められた遺伝子には、CVID 患者では異常は認められなかった。今回の結果では、Th2 細胞の誘導では多くの遺伝子で発現量の差が認められたが、活性化 B 細胞では、発現量の差が見られた遺伝子が少ない傾向があった。活性化 B 細胞の刺激条件も再検討する必要があると考えている。これらの結果をもとに、分子相互の関連から、遺伝子発現がそれほど低下していない分子にも可能性があることを考慮し、今回塩基配列を決定していない、下位の遺伝子を検討し、また、末梢血単核球での蛋白発現での比較解析を行う予定である。

## 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 25 件)

1. Furuno K, Takada H, Yamamoto K, Ikeda K, Ohno T, Khajooe V, Mizuno Y, Hara T. Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 and coronary artery lesions in Kawasaki disease. *J Pediatr.* 151: 155-60, 2007
2. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature.* 448: 1058-62, 2007
3. Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, Chrabieh M, Issekutz AC, Cunningham CK, Gallin J, Holland SM, Roifman C, Ehl S, Smart J, Tang M, Barrat FJ, Levy O, McDonald D, Day-Good NK, Miller R, Takada H, Hara T, Al-Hajjar S, Al-Ghonaum A, Speert D, Sanlaville D, Li X, Geissmann F, Vivier E, Maródi L, Garty BZ, Chapel H, Rodriguez-Gallego C, Bossuyt X, Abel L, Puel A, Casanova JL. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med.* 204: 2407-22, 2007

4. 吉川秀人、北村太郎、渡辺周永、虻川大樹、稲垣徹史、武山淳二、今泉益栄、高田英俊、原寿郎。本邦初の Interleukin-1 receptor associated kinase 4 欠損症兄弟例の臨床的特徴 日本小児科学会雑誌 111: 750-4, 2007
5. Ohga S, Nomura A, Takada H, Suga N, Hara T. Successful self-infusion of activated prothrombin complex concentrate for prophylaxis in a child with a factor VIII inhibitor. *Am J Hematol.* 82: 145-9, 2007
6. Ohga S, Ichino K, Urabe K, Ishimura M, Takada H, Nishikomori R, Furue M, Hara T. Early-onset sarcoidosis mimicking refractory cutaneous histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 50: 723-6, 2007
7. Ishimura M, Ohga S, Nagatoshi Y, Okamura J, Tajiri T, Kohashi K, Oda Y, Takada H, Hara T. Malignant hepatic tumor occurring 10 yrs after a histocompatible sibling donor bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Pediatr Transplant.* 11: 945-9, 2007
8. 楠原浩一、高田英俊、原寿郎 結核菌 / 非定型抗酸菌に対する易感染性と IL-12/IFN- $\gamma$  経路 日本サルコイドーシス / 肉芽腫性疾患学会雑誌 27: 9-19, 2007
9. 大賀正一、野村明彦、高田英俊、原寿郎 血球貪食症候群 小児内科 39: 2078-81, 2007
10. 大賀正一、石村匡崇、野村明彦、高田英俊、原寿郎 慢性活動性 EB ウイルス感染症 病態と治療 日本小児皮膚科学会雑誌 26: 69-73, 2007
11. 原寿郎、高田英俊、楠原浩一 自己炎症性症候群 小児科臨床 60: 1505-16, 2007
12. Takada H, Ishimura M, Inada H, Ohga S, Kusuhara K, Moroi Y, Furue M, Hara T. Lipopolysaccharide-induced monocytic cell death for the diagnosis of mild neonatal-onset multisystem inflammatory disease. *J Pediatr.* 152: 885-7, 2008
13. Ohga S, Sanefuji M, Ishimura M, Nomura A, Torisu H, Kira R, Takada H, Mizuno Y, Kazuyama Y, Hara T. Epstein-Barr virus load in cerebrospinal fluid of patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 27: 1027-30, 2008
14. Hoshina T, Yamaguchi Y, Ohga S, Kira R, Ishimura M, Takada H, Tanaka T, Hara T. Sjogren's syndrome-associated meningoencephalomyelitis: cerebrospinal fluid cytokine levels and therapeutic utility of tacrolimus. *J Neurol Sci.* 267: 182-6, 2008
15. Ohga S, Ideguchi H, Kato J, Ishimura M, Takada H, Harada N, Kawanaka H, Hattori Y, Kang D, Hamasaki N, Hara T. Thromboembolic complications in splenectomized patients with dominantly inherited beta-thalassemia. *Acta Haematol.* 120: 31-5, 2008
16. Sanefuji M, Ohga S, Kira R, Nomura A, Torisu H, Takada H, Kusuhara K, Hara T. Epstein-Barr virus-associated meningoencephalomyelitis: intrathecal reactivation of the virus in an immunocompetent child. *J Child Neurol.* 23: 1072-7, 2008
17. 高田英俊、大賀正一、原寿郎 血球貪食症候群の発症機序 サイトカイン血液・腫瘍科 57 [suppl.6]: 40-5, 2008
18. 大賀正一、石村匡崇、菅尚浩、野村明彦、高田英俊、原寿郎 EB ウイルスに伴う血球貪食症候群 発症機序 血液・腫瘍科 57 [Suppl. 6]: 116-21, 2008
19. 高田英俊、原寿郎 自然免疫による免疫不全症 小児科臨床 61: 1783-9, 2008
20. 高田英俊、原寿郎 インターフェロンガンマ受容体異常症と類似疾患 小児内科 40 増刊号 小児疾患診療のための病態生理 1: 1356-9, 2008
21. Tsuboi S, Takada H, Hara T, Mochizuki N, Funyu T, Saitoh H, Terayama Y, Yamaya K, Ohyama C, Nonoyama S, Ochs HD. FBP17 Mediates a Common Molecular Step in the Formation of Podosomes and Phagocytic Cups in Macrophages. *J Biol Chem.* 284: 8548-56, 2009
22. Kusuhara K, Ohga S, Hoshina T, Saito M, Sasaki Y, Ishimura M, Takada H, Fujita M, Hara T. Disseminated Bacillus Calmette-Guérin lymphadenitis in a patient with gp91phox (-) chronic granulomatous disease 25 years after vaccination. *Eur J Pediatr.* 2008 Sep 2 [Epub ahead of print]
23. Ishimura M, Saito M, Ohga S, Hoshina T, Baba H, Urata M, Kira R, Takada H, Kusuhara K, Kang D, Hara T. Fulminant

- sepsis/meningitis due to Haemophilus influenzae in a protein C-deficient heterozygote treated with activated protein C therapy. Eur J Pediatr. 2008 Aug 27 [Epub ahead of print]
24. Yamaguchi K, Ikeda K, Ihara K, Takada H, Kusuvara K, Hara T. Lack of association between E148Q MEFV variant and Kawasaki disease. Hum Immunol. Nov 19. 2008 [Epub ahead of print]
  25. Muneuchi J, Ohga S, Ishimura M, Ikeda K, Yamaguchi K, Nomura A, Takada H, Abe Y, Hara T. Cardiovascular Complications Associated with Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. Pediatr Cardiol. Jan 30. 2009 [Epub ahead of print]

[学会発表](計 10 件)

1. Hara T, Takada H, Hoshina T, Sasaki Y, Saito M, Nomura A, Kusuvara K, Kobayashi M, Miyawaki T: Genetic backgrounds of patients with susceptibility to mycobacterial infections in Japan 25th International Congress of Pediatrics 25-30 August, Athens, Greece 2007
2. Ishimura M, Ohga S, Nagatoshi Y, Okamura J, Oda Y, Takada H, Hara T: Malignant hepatic tumor occurring 10 years after a histocompatible sibling donor bone marrow transplantation for severe aplastic anemia 14th Annual Meeting of the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group, 2007 June 2-3, Nagoya, Japan
3. Ohga S, Koga Y, Ishimura M, Nomura A, Takada H, Hara T: Congenital pure red cell aplasia as a human ribosomopathy SESSION I. Prenatal and Pediatric Research for Future Development of Cure, Care and Prevention of Congenital Disease The 18th Fukuoka International Symposium on Pediatric/Maternal-Child Health Research September 1st, 2007 Fukuoka, Japan
4. Ohga S, Sanefuji M, Ishimura M, Nomura A, Torisu H, Kira R, Takada H, Mizuno Y, Kazuyama Y, Hara T: Central nervous system reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) in chronic active EBV infection and EBV-associated encephalitis The 3rd Congress of Asian Society for Pediatric Research, October 7-8, 2007, Tokyo, Japan
5. Muneuchi J, Ohga S, Ishimura M, Yamawaki K, Kanaya Y, Takada H, Hara T: Clinical outcomes of cardiac complications associated with chronic active Epstein-Barr virus infection (CAEBV). The 3rd Congress of Asian Society for Pediatric Research (Oral), October 7-8, 2007, Tokyo, Japan
6. Ishimura M, Ohga S, Nagatoshi Y, Okamura J, Tajiri T, Kohashi K, Oda Y, Takada H, Hara T: Malignant hepatic tumor occurring 10 years after a histocompatible sibling donor bone marrow transplantation for severe aplastic anemia The 3rd Congress of Asian Society for Pediatric Research, October 7-8, 2007, Tokyo, Japan
7. Hara T, Takada H: NEMO mutation as a cause of familial occurrence of female Behcet's disease patients. XX International Congress of Genetics, 2008.7.16-17 Berlin, Germany
8. Ohga S, Koga Y, Ishimura M, Takada H, Hara T: Pathophysiology and treatment of Diamond-Blackfan anemia SYMPOSIUM 4 Hematological disorders in mature and premature infants by JSPS-NRCT program and the 18th Annual Meeting of the Japan Society of Obstetrical, Gynecological and Neonatal Hematology June 27-28, 2008 Fukuoka
9. Hidetoshi Takada, Yojiro Arinobu, Masataka Ishimura, Koichi Akashi, Toshiro Hara: Novel primary immunodeficiency syndrome with a developmental defect of pro-B cells, NK cells and plasmacytoid dendritic cells 第 38 回日本免疫学会 2008 年 12 月 1-3 日 京都
10. Takehiko Doi, TAKADA Hidetoshi, KANEKANE Hirokazu, TOMIZAWA Mariko, NAKAYAMA Toshinori, OHARA Osamu, MIYAWAKI Toshio, HARA Toshiro, ISHIKAWA Fumihiko: Development of functional human B cells in NOD/SCID/IL2r<sup>-/-</sup> KO mice and the application of the xenotransplant model in studying human immunodeficiency 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008.12.1-3 京都

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高田 英俊 ( TAKADA HIDETOSHI )  
九州大学・大学病院・特任准教授  
研究者番号：70294931

(2)研究分担者

堤 康 ( TSUTSUMI YASUSHI )  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：80419564

田中 珠美 ( TANAKA TAMAMI )

九州大学・大学院医学研究院・学術研究員  
研究者番号：60423547

(3)連携研究者

なし