

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591350

研究課題名（和文） 抗体産生不全症における自然免疫系の異常に関する研究

研究課題名（英文） Study of innate immunity in primary antibody deficiency

研究代表者

金兼 弘和（KANEGANE HIROKAZU）

富山大学・大学病院・講師

研究者番号：00293324

研究成果の概要（和文）：BTK 欠損による X 連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA）患者においては約 15-20% で好中球減少を認め、感染症の重症化に関わっていると考えられる。XLA 患者由来好中球はさまざまな刺激に対して、過剰な活性酸素（ROS）を産生し、ROS によりアポトーシスに陥る。XLA 患者由来好中球に BTK 蛋白を導入すると好中球の ROS 産生やアポトーシスが正常化した。以上より、XLA 患者における好中球減少時には BTK 蛋白の導入により、治療介入できる可能性を示唆すると思われる。

研究成果の概要（英文）：Approximately 15-20% of patients with X-linked agammaglobulinemia (XLA), which is caused by BTK deficiency, have neutropenia, and it is associated with the severity of infection. BTK-deficient neutrophils had more production of reactive oxygen species (ROS) after various stimuli, which was associated with more apoptosis. The production of ROS and apoptosis of BTK-deficient neutrophils were reversed by transduction of recombinant BTK. These data suggest that severe neutropenia in patients with XLA can be treated with recombinant BTK.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2010 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2011 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：小児免疫・アレルギー・膠原病学

キーワード：抗体産生不全症・自然免疫・X 連鎖無ガンマグロブリン血症・Toll 様受容体・ブルトンチロシンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

近年 T 細胞や B 細胞による獲得免疫と並んで自然免疫が注目されるようになり、特に Toll 様レセプター（TLR）の発見により、自然免疫の研究が進展し、自然免疫の異常による先天性免疫不全症（NEMO 欠損症や IRAK4 欠

損症など）も同定されるようになった。最近の研究では XLA の原因遺伝子である BTK が TLR のシグナル伝達に関連するとの報告がいくつかなされている。私たちも XLA 患者由来の樹状細胞に各種 TLR リガンドの刺激による TNF- α 産生が低下していることを観察して

おり、このことが XLA における感染症の重症化、特にエンテロウイルス感染症の重症化に関わっていると考察している (Clin Immunol 126:148, 2008)。

2. 研究の目的

抗体産生不全症における複雑な病態は免疫グロブリン産生低下のみならず、自然免疫の異常が関わっていることが考えられるので、本研究においては抗体産生不全症における自然免疫系の異常を明らかにすることを主たる目的とする。

3. 研究の方法

XLA 患者ならびに健常者から文書による同意を得て、ヘパリン化静脈血を採取し、好中球に分離後、各種実験に用いた。

4. 研究成果

XLA 患者由来の BTK を欠損した好中球は TLR や TNF に対するレセプターを介する刺激に対して、過剰な活性酸素 (Reactive oxygen species: ROS) を産生し、ROS によりアポトーシスに陥る。この BTK を欠損した好中球に組み換え BTK 蛋白を導入すると好中球の ROS 産生やアポトーシスが正常化した。

好中球からの ROS 産生には NADPH オキシダーゼ複合体の活性化が必要であり、その最初の活性化段階には Mal の膜移行を介して PI(3)キナーゼの活性化が重要とされる。BTK は通常、細胞質内で Mal と会合し、Mal の膜移行を阻止しており、BTK が欠損すると Mal が膜に移行し、PI(3)キナーゼと会合し、NADPH オキシダーゼ複合体が活性化準備状態になっていることが明らかとなった。BTK は軽微な刺激では好中球が活性化しないように負に制御する分子と考えられる。BTK に欠陥があるとさまざまなチロシンキナーゼも活性化し、これらも Mal の膜移行に関与していることが明らかとなった。

以上の結果から、XLA 患者における好中球減少を伴った重症感染症時には BTK 蛋白の導入により、治療介入できる可能性を示唆すると思われる。

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 20 件)

- ① Yang X, Kanegane H, 他 15 名、Clinical and genetic characteristics of XIAP deficiency in Japan. J Clin Immunol、査読有、32、2012、411-420
- ② Yang X, Kanegane H, 他 11 名 (13 番目)、

Characterization of Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in two patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 and type 2. Herpesviridae、査読有、3、2012、1.

- ③ Honda F, Kanegane H, 他 7 名 (3 番目)、The kinase Btk negatively regulates the production of reactive oxygen species and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. Nat Immunol、査読有、13、2012、369-378
- ④ Kanegane H, 他 7 名、Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) in Japan identified by the combination of flow cytometric assay and genetic analysis. Pediatr Allergy Immunol、査読有、2012 Mar 21. [Epub ahead of print]
- ⑤ Nakaoka H, Kanegane H, 他 15 名、Delayed onset adenosine deaminase deficiency associated with acute disseminated encephalomyelitis. Int J Hematol、査読有、2012 Mar 24. [Epub ahead of print]
- ⑥ Mohammadzadeh I, Kanegane H, 他 10 名 (9 番目)、Severe primary antibody deficiency due to a novel mutation of micro heavy chain. J Investig Allergol Clin Immunol、査読有、22、2012、78-79.
- ⑦ Zhao M, Kanegane H, 他 10 名、Early and rapid detection of X-linked lymphoproliferative syndrome with SH2D1A mutations by flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom、査読有、80、2011、8-13.
- ⑧ Booth C, Kanegane H, 他 46 名 (39 番目)、X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on the manifestations, management, and outcome of the disease. Blood、査読有、117、2011、53-62.
- ⑨ Kawakami C, Kanegane H, 他 4 名 (4 番目)、X-linked agammaglobulinemia complicated with endobronchial tuberculosis. Acta Paediatr、査読有、100、2011、466-468.
- ⑩ Pachlopnik Schmid J, Kanegane H, 他 31 名 (7 番目)、Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1

- (XLP-1/SAP-deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP-deficiency). *Blood*, 査読有、117、2011、1522-1529.
- ⑪ 竹綱庸仁、金兼弘和、他 8 名 (10 番目)、幼児期に見逃されてしまった X連鎖無ガンマグロブリン血症の 1 例、小児科臨床、査読無、64、2011、61-65.
- ⑫ Tadaki H, Kanegane H, 他 14 名 (3 番目)、Exonic deletion of CASP10 in a patient presenting with systemic juvenile idiopathic arthritis, but not with autoimmune lymphoproliferative syndrome type IIa. *Int J Immunogenet*, 査読有、37、2011、287-293.
- ⑬ Nakagawa N, Kanegane H, 他 22 名 (3 番目)、Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol*, 査読有、128、2011、223-5. e2.
- ⑭ Nomura K, Kanegane H, 他 5 名、Autoimmune lymphoproliferative syndrome mimicking chronic active Epstein-Barr virus infection. *Int J Hematol*, 査読有、93、2011、760-764.
- ⑮ Arai T, Kanegane H, 他 8 名 (3 番目)、Genetic analysis of contiguous X-chromosome deletion syndrome encompassing the BTK and TIMM8A genes. *J Hum Genet*, 査読有、56、2011、577-582.
- ⑯ Imamura M, Kanegane H, 他 13 名 (7 番目)、Disseminated BCG Infection Mimicking Metastatic Nasopharyngeal Carcinoma in an Immunodeficient Child with a Novel Hypomorphic NEMO Mutation. *J Clin Immunol*, 査読有、31、2011、802-810.
- ⑰ Otsubo K, Kanegane H, 他 15 名、Identification of FOXP3-negative regulatory T-like ($CD4^+CD25^+CD127^{low}$) cells in patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Clin Immunol*, 査読有、141、2011、111-120.
- ⑱ Fujioka T, Kanegane H, 他 6 名 (7 番目)、Atypical case of X-linked agammaglobulinemia diagnosed at 45 years of age. *Pediatr Int*, 査読有、53、2011、611-612.
- ⑲ Ohta H, Kanegane H, 他 12 名 (12 番目)、Hematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning from a family

haploidentical donor in an infant with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Int J Hematol*, 査読有、94、2011、285-290.

- ⑳ Ishimura M, Kanegane H, 他 13 名 (6 番目)、Nationwide Survey of Patients with Primary Immunodeficiency Diseases in Japan. *J Clin Immunol*, 査読有、31、2011、968-976.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Kanegane H, SAP and XIAP deficiency in hemophagocytic lymphohistiocytosis, The 3rd Symposium for PID in Asia, May 1, 2011, Denver, Colorado, USA.
- ② 金兼弘和、原発性免疫不全症における臨床遺伝学「抗体産生不全症における臨床遺伝学」遺伝医学合同学術集会2011、2011、6、京都.
- ③ 金兼弘和、教育講演「腸管出血性大腸菌O111の集団発生から学んだこと」第43回日本小児感染症学会、2011、10、岡山市.

[図書] (計 5 件)

- ① 金兼弘和、医学書院、原発性免疫不全症、「今日の小児治療指針第15版」、2012、282-283
- ② 西田直徳、金兼弘和、東京医学社、コロナウイルス、ブニavirus、JCウイルス、プリオン、「日常診療に役立つ 小児感染症マニュアル2012」2012、548-561.
- ③ 金兼弘和、診断と治療社、免疫調節障害、小児の発熱A to Z、2012、174-177.
- ④ 金兼弘和、他、医薬ジャーナル社、免疫不全関連リンパ増殖性疾患、小児がん診療ハンドブック～実地診療に役立つ診断・治療の理念と実践～ 2011、414-419.
- ⑤ 金兼弘和、南江堂、先天性免疫不全症、血液専門医テキスト、2011、340-343.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金兼 弘和 (KANEGANE HIROKAZU)
富山大学・大学病院・講師
研究者番号：00293324

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

石川 文彦 (ISHIKAWA FUMIHIKO)

理化学研究所免疫アレルギー科学総合研
究センター・ヒト疾患モデル研究ユニッ
ト・ユニットリーダー

研究者番号：30403918