

綜 説

臨 床 応 用 遺 伝 学

—原発性免疫不全症における遺伝子診断および治療法の最近の進歩—

宮 川 幸 昭

信州大学医学部小児科学教室

Progress of Clinical and Immunogenetical Analyses in  
Primary Immunodeficiency Syndrome

Yukiaki MIYAGAWA

Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine

**Key words:** primary immunodeficiency syndrome, molecular genetics, prenatal diagnosis, stem cell culture

原発性免疫不全症, 分子遺伝学, 出生前診断, 幹細胞培養

はじめに

原発性(先天性)免疫不全症は、今日の AIDS 禍で、後天性免疫不全症(AIDS)という病名が一躍、世界的なトピックスとなっており、このために原発性(先天性)免疫不全症についても日常会話に登場する一般的な学術用語となってきた。主としてヘルパーT細胞が HTLV-Ⅲウイルス感染破壊によって著滅し、その結果、細胞性免疫、抗体産生能などが壊滅的に破壊される。したがって、日和見感染症やウイルス性発癌と思われる肉腫、癌により、発病後3年以内に死亡するといわれ、人類の最大関心事となった。しかし、この AIDS 禍のためか、我々の免疫アレルギー外来では、その病態の説明に以前は大変苦労した記憶があるが、今日では、"あのエイズの子供版ですか"と比較的に両親に理解していただける。しかし、原発性免疫不全症候群(primary immunodeficiency syndrome: PIDS)の発症頻度は、それ程高いものではなく、表1に示したごとく1988年、厚生省の原発性免疫不全症候群全国登録センターの集計によると約800例の発症が登録されている<sup>1)</sup>。その第1位は Common: variable immunodeficiency (CVID)

で PIDS の約16%を占めている。次いで好中球内の酵素活性のうち、 $O_2^-$ 産生不能から黄色ブドウ球菌や大腸菌を殺菌できない慢性肉芽腫症(CGD)が12.5%、3番目がIgAの選択的欠損症が12.0%、4番目が小児伴性無ガンマグロブリン血症である。このように、現在、われわれが研究対象としているB細胞系の欠損、または、不全症は CVID と伴性無ガンマグロブリン血症を合計すると登録症例の1/4に達している。

次いで表2に PIDS の予後調査結果を示す。発症頻度と重症因子を合わせて考察すると2年間の追跡調査では、重症複合免疫不全症で、発症頻度5位、死亡率84%できわめて予後が悪い。次いで死亡率60%以上の PIDS を列挙してみると、胸腺低形成症・DiGeorge症候群(登録順位8位、死亡率66.7%)、血小板減少、湿疹、反復感染を3主徴とする Wiskott-Aldrich 症候群(登録順位6位、死亡率64.6%)、末梢血白血球内の巨大メラニン顆粒、部分的白子症、易感染性の3徴とする Chediak・東症候群(登録順位13位、死亡率88.9%)が重篤な PIDS であり、全体の死亡率は34%ときわめて死亡率の高い疾患群である。この集計は、抗生物質の発達、イムノグロブリン補充療法、骨髄移

表 1 原発性免疫不全症候群登録総数

病 名	男	女	計	全体に 対する %	初診時 16才以 上の例	(その%)	備 考
1 小児伴性無ガンマグロブリン血症	74	0	74	9.3	0		うち疑い、19
2 胸腺低形成症・DiGeorge 症候群	28	11	39	4.9	0		うち DiGeorge 症候群 28
3 重症複合免疫不全症	54	19	73	9.2	0		うち疑い、8 ADA⊖4
4 網内系無形成症	1	0	1	0.1	0		
5 IgA 選択的欠損症	51	45	96	12.0	37	38.5	うち 3 歳以下 14
6 IgA 以外の Ig の選択的欠損症	11	5	16	2.0	6	37.5	IgM⊖ 12 IgG⊖4
7 Ataxia-telangiectasia	33	27	60	7.5	2	3.3	
8 Wiskott-Aldrich 症候群	49	1	50	6.3	0		女子は疑い例
9 正常ないし増加した Ig を有する免疫不全	15	5	20	2.5	3	15.0	うち Rosen 型 12 疑い 2
10 乳児一過性低ガンマグロブリン血症	26	13	39	4.9	0		うち 2 歳以下 20
11 Common variable immunodeficiency	82	45	127	15.9	27	21.3	
12 胸腺腫を伴う免疫不全	5	5	10	1.3	10	100.0	
13 短肢侏儒を伴う免疫不全	0	2	2	0.3	0		
14 慢性肉芽腫症	85	15	100	12.5	4	4.0	
15 Chediak・東症候群	6	5	11	1.4	0		
16 その他の好中球機能不全	24	20	44	5.5	0		高 IgE 症候群 25
17 慢性皮膚粘膜カンジタ症	4	7	11	1.4	2	18.2	
18 補体成分の欠損症	8	10	18	2.3	7		
19 そ の 他	3	3	6	0.7	1		
合 計	559	238	797	100.0			

1988. 8. 20現在

原発性免疫不全症候群全国登録センター

表 2 原発性免疫不全症候群・全国登録の死亡例数

登 録 症 例 ヒストグラム	免疫不全のカテゴリー	登 録 例 症例〔死〕	再 調 査 症例〔死〕	死亡の割合 %
1 小児伴性無ガンマグロブリン血症		73〔5〕	34〔2〕	9.6
2 胸腺低形成症・DiGeorge 症候群		39〔26〕	7〔 〕	66.7
3 重症複合免疫不全症		68〔56〕	6〔1〕	83.3
4 網内系無形成症		1〔1〕	〔 〕	100.0
5 IgA 選択的欠損症		79〔7〕	34〔4〕	13.9
6 IgA 以外の Ig の選択的欠損症		17〔4〕	3〔 〕	23.5
7 Ataxia-telangiectasia		59〔17〕	23〔8〕	42.4
8 Wiskott-Aldrich 症候群		48〔25〕	13〔6〕	64.6
9 正常ないし増加した Ig を有する免疫不全		19〔7〕	5〔1〕	42.1
10 乳児一過性低ガンマグロブリン血症		39〔3〕	12〔 〕	7.7
11 Common variable immunodeficiency		109〔23〕	33〔4〕	24.8
12 胸腺腫を伴う免疫不全		9〔3〕	2〔2〕	55.6
13 短肢侏儒を伴う免疫不全		2〔 〕	1〔1〕	50.0
14 慢性肉芽腫症		95〔16〕	46〔7〕	24.2
15 Chediak・東症候群		9〔8〕	1〔 〕	88.9

16	その他の好中球機能不全	43 [ 2 ]	24 [ 5 ]	16.3		
17	慢性皮膚粘膜カンジタ症	10 [ 2 ]	4 [   ]	20.2		
18	補体成分の欠損症	16 [ 1 ]	12 [ 1 ]	12.5		
19	そ の 他	2 [ 2 ]	1 [ 1 ]	100.0		
0	50	100	合 計	737[208]	248 [42]	33.9%

植などの支持療法が極度に発達した最近の成績であり、免疫不全症調査研究班の発足当時の死亡率70%台と比較すると著しく改善された調査成績である。

## I 原発性免疫不全症の治療の進歩<sup>2)</sup>

### A インタクト（静注用）免疫グロブリンによる置換療法

無および低ガンマグロブリン血症に対する免疫グロブリン置換療法は免疫グロブリンの isotype が発見された当時から実施されていた。しかし、intact 型の静注用製剤 (IVIg) が広く用いられるようになってから10年ほどの歴史しかない。静注ルートでの置換がルーチン化されてから、肺、呼吸器を中心とする重症感染症の発生頻度の低下は歴然たるものがあり、IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub> のサブクラスの置換も完全であり、この治療法は国際的に確立された方法となった。しかし、10年以上 follow up した4人の成人例の成績では、投与開始当時は正常範囲内にあった肺機能が全症例で flow volume 曲線の下降脚が陥凹し、V<sub>25</sub>/HT 値が予測値の50%以下となり、末梢気道の閉塞性障害が指摘され、今後長期に免疫グロブリンの置換療法を実施する上での警鐘となった。

### B 組換え IL-2 による養子免疫移植療法

この治療法は、われわれが最初に免疫不全症に応用した方法である<sup>3)-11)</sup>。インターリウキン2 (IL-2) はT細胞, B細胞, NK細胞の増殖に関与し、キラーT細胞, LAK (Lymphokine Activated Killer)細胞を誘導する重要な物質である。最も簡便な方法は、リコンビナント IL-2 を 2.5U~10U/kg/日 で連続的に静注法で投与するか、*in vitro* でキラーT細胞, またはLAK細胞を誘導したあと、生体に養子移入してやる方法である。前者は簡便であるため、bed side で実施可能であるが、後者は少々の培養技術が要求される。しかし、後者はきわめて効率良く、キラーT細胞, LAK細胞が誘導されるため、効果も前者の数倍は期待される。しかもその適応は、発生頻度は比較的高い Epstein Barr ウイルスの重症感染例である。この感染症は大多数の人々には不顕性感染として経過するが、

原発性免疫不全症では約10%が重症化し、あるものは悪性リンパ腫へと移行してゆく。したがって現在でも免疫不全症の専門外来での EB ウイルス感染症は、きわめて重大な問題である。われわれは CVID の2症例の EB ウイルス感染症に LAK細胞の養子移入療法を実施し、その1例の間質性肺炎に劇的な効果をみた。他方、重症複合免疫不全症の重症感染症にも応用し、アシクロビル無効例において著効をみた。また現在有効な治療法の確立されていない Wiskott-Aldrich 症候群においても、IL-2 を投与したところ、ヘルパーT細胞活性、遅延型皮膚反応、NK活性の著増がみられ、今後将来性のある治療法として期待されている。

### C 移植療法

重症複合免疫不全症に対する骨髄移植療法は、方法論の改善により、多数の成功例が報告されるようになった。これらの症例の約30%に存在する adenosine deaminase 欠損症の症例に移植細胞を3回に分割して移植したところ、従来不可能であったが移植の生着が報告されている。しかし、この症例は遺伝子導入治療が最先端では精力的に実施されており、すでに数例の報告がなされている<sup>12)13)</sup>。

DiGeorge 症候群においては、胎児胸腺移植が根治的療法である<sup>14)15)</sup>。胸腺組織は、上皮性看護細胞 (epidemic nurse cell) と胸腺ストローマ細胞で構成され、その微少環境に移入した骨髄の pre T細胞は、自己の組織適合抗原 (HLA) を表示し、CD<sub>4</sub> や CD<sub>8</sub> を表示することにより、成熟T細胞へと増殖分化してゆく。しかし、胎児胸腺組織の場合は、その抗原提供細胞の未熟性から、骨髄の pre T細胞が移入し、増殖分化の場を提供することが可能である。しかし、約半数は患者のT細胞機能の構築とともに拒絶反応によって移植胎児胸腺が拒絶されることから、組織適合性のよいドナーの胸腺移植が望まれる。

以上、実際の臨床例を中心に現在の原発性免疫不全症の治療の進歩を概説した。しかし、これらの進歩は、弛まざる、病態研究の結果発展したものであり、次章では現在の病態研究の概要を細胞工学、分子遺伝学的手技を中心に記載する。

## II 免疫担当細胞の遺伝子解析

## A B細胞系の増殖と分化

B細胞系はリンパ系幹細胞からストローマ細胞に乗って増殖分化してくる。成熟過程にしたがって、pro B (pre pre B), pre B( $c\mu^+$ ), 未熟 B ( $S\mu^+$ ), 成熟 B ( $S\mu^+$ ,  $S\delta^+$ ,  $S\gamma^+$ ,  $S\alpha^+$ / $S\epsilon$ ) のB細胞となり、それぞれの形質細胞が形成され、各クラスのイムノグロブリンを産生する (図1)。Ig 遺伝子の再構成は主としてB細胞系に特異的にみられる。概念的に Ig 遺伝子にはまったく組換えがみられないがBリンパ球に分化するべく運命づけられた pro B (pre pre B) には Ig 遺伝子の組換えがおこる。ついで細胞質に  $\mu$  鎖のみを表現し、 $L\kappa$ ,  $L\lambda$  の組換えのみられない細胞を pre B細胞と定義している。これを Ig 遺伝子の動態からみると、図2に示すごとく、染色体第14番 q座に位置するH鎖の D-J 組換えがおこり、次いでV断片と DJ との組換えにより  $\mu$  鎖が完成され、細胞質に  $\mu$ -mRNA の発現、ついで  $\mu$ -Ig を合成する pre B細胞となる。V断片の組換えは完全なV領域の転写に失敗す

るともう一方の染色体で同様の転写を試みる<sup>16)-18)</sup>。かくして一度完全なV領域が完成し、 $\mu$  鎖が発現されると、これが停止信号となってH鎖のV領域の組換えが停止される。遺伝子レベルでアレル (allelic excision) 対立遺伝子排除が完成すると今度は、染色体第2番 q 座に位置する  $L\kappa$  鎖の組換えが開始される。この転写も片方のアレルで失敗すると他方のアレルで組換えが試みられ、完全な  $\kappa$  鎖が完成するとこの組換え作業は停止される。さらに両方のアレルで失敗すると今度は染色体第22番 q 座に位置する  $L\lambda$  鎖の組換えが始められる。われわれの臍帯B細胞を EB ウイルスを使用してクローニングした成績は、 $\kappa:\lambda$  比は3:1であり、ストローマ細胞上でのクローニングの成績は  $\kappa:\lambda$  比5:1であった。

このように培養条件が良い場合は  $\kappa:\lambda$  比は  $\kappa$  の比率が上昇し、逆に培養条件が悪化すると  $\kappa:\lambda$  比は低下する現象がみられる。ともあれ、Ig 遺伝子の H 鎖と L 鎖の組換えが完成して、表面膜型 Ig 陽性のB細胞として各リンパ臓器で活性を発揮できるようになるわけである。これらの現象の概要を図3に示した。

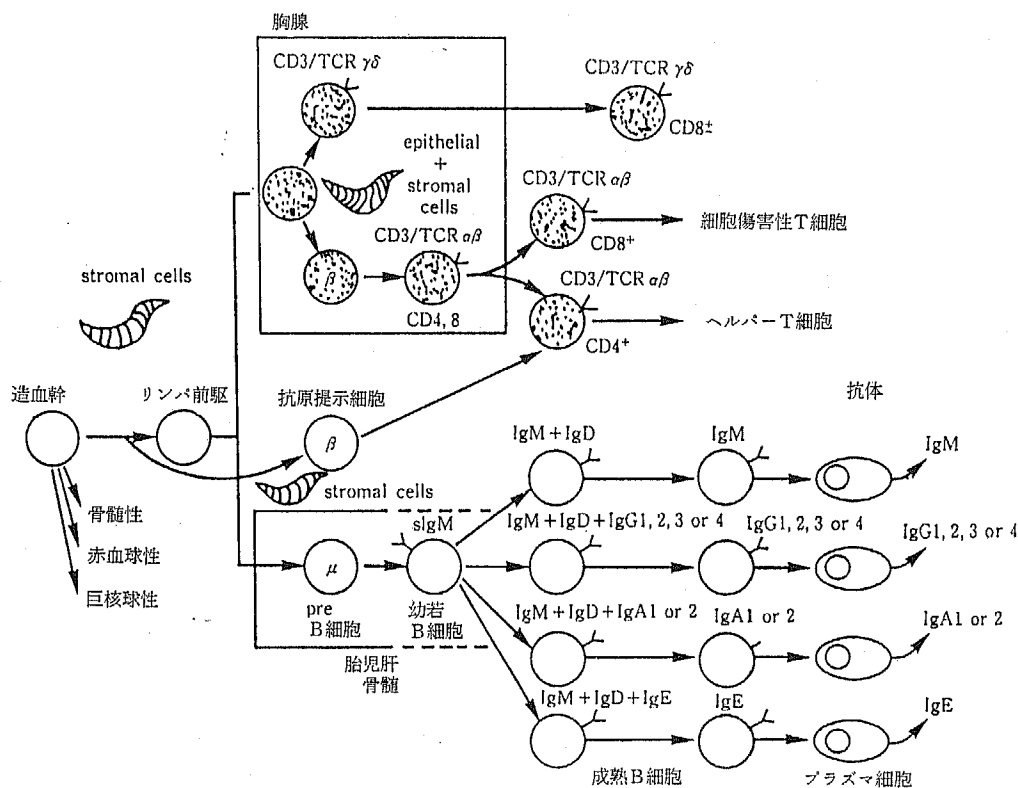


図1 リンパ系細胞の増殖と分化

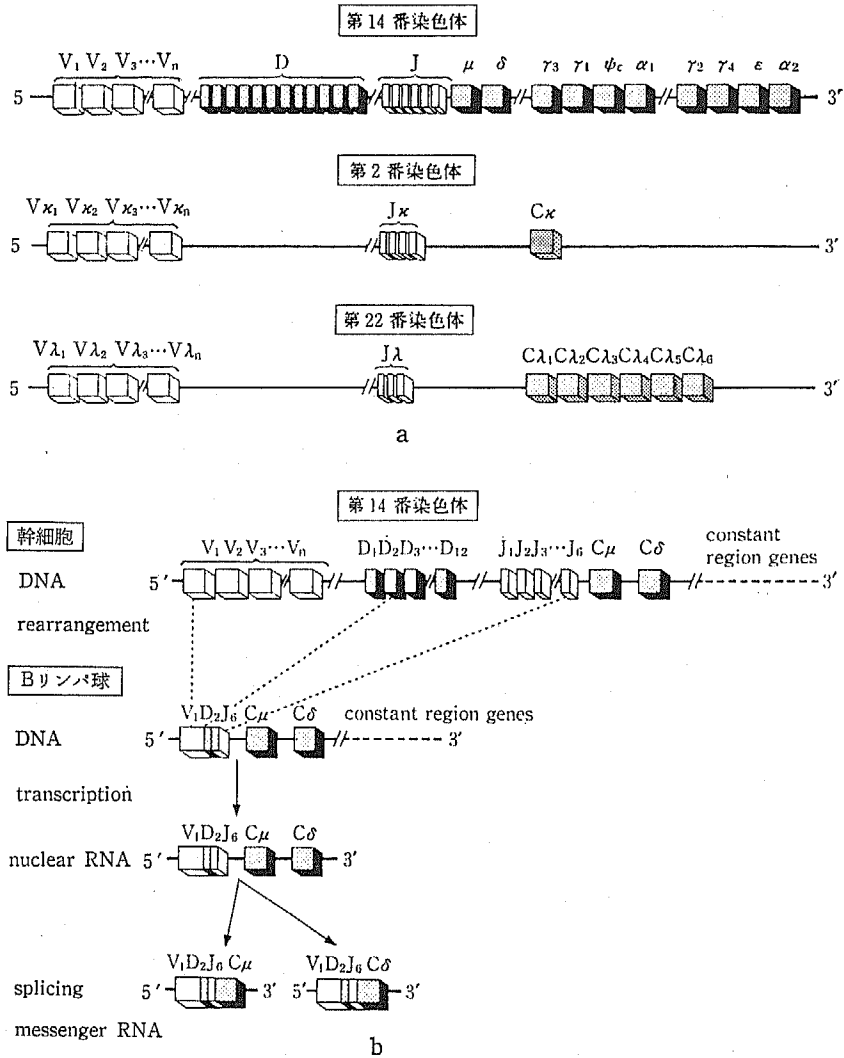


図2 免疫グロブリン遺伝子群と再編成

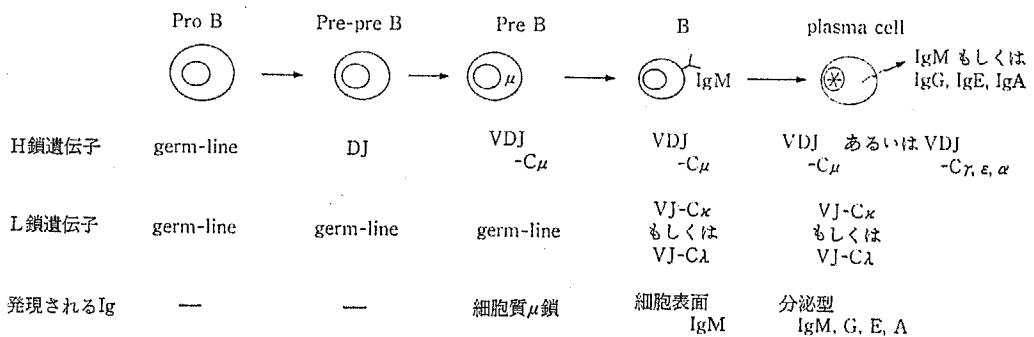


図3 Bリンパ球の分化とIg遺伝子の再構成

成熟B細胞は、完成されたV領域はそのままにして、C領域が $\mu$ 鎖から $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\alpha$ 鎖へと変化し、異なったクラスの免疫グロブリンを産生するようになる。この現象はクラススイッチといわれ、B細胞から形質細胞への分化過程で最重要の現象である。しかもこの現象はC遺伝子の再構成が検出されないことからRNAレベルの調節と考えられている。この時点でIg遺伝子はS（スイッチ）領域を介する別種の組換え（S-S組換え）をおこす<sup>19)</sup>。図1に示すごとく、クラススイッチの中間段階で、2種以上のダブルペアラー（二重発現）、トリプルペアラー（三重発現）の存在も知られており、RNAの発現調節のモデルとして分子生物学者の興味ある研究対象となっている。さらに成熟B細胞は各種の抗原、リンホカイン（IL-4）により活性化されたあと、B細胞増殖因子活性を有するIL-5により増殖、最終的にB細胞分化因子活性を有するIL-6により形質細胞へと分化する。B細胞の膜型Igから、形質細胞の分泌型への切替はRNAスプライシングによりきわめて大量のIgが細胞外に分泌されてくる。

## B T細胞系の増殖と分化

T細胞系の増殖分化は図1の上段に示した。骨髄中に存在する多岐能幹細胞から、リンパ系幹細胞へ分化したあと、骨髄中でpro T ( $CD_5^+$ ,  $CD_7^+$ )に分化し、pre T ( $cyto-CD_5^+$   $CD_5^+$ ,  $CD_7^+$ )でT細胞リセプターのうち、 $T\delta$ ,  $T\gamma$ ,  $T\beta$ の再構成陽性の細胞に分化してくる。この増殖分化過程にストローマ細胞の増殖分化

補助能が必要であり、液性因子だけでは現在のところpre T細胞までは分子化誘導できない。図4に遺伝子解析の概要を示した。まず最初のT細胞リセプター遺伝子（TCR）の再構成は $T\delta$ から始まり、やはり5'側の先端でD-J、ついでV-DJの組換えをおこす<sup>20)21)</sup>。この $\delta$ 鎖遺伝子は $\alpha$ 鎖遺伝子群の上流に存在し、V断片を共有している。ついで $\gamma$ 鎖の組換えが行われ、 $\delta$ と $\gamma$ 鎖の組換えに成功したpre T細胞は、TCR $\delta\gamma$ 陽性細胞としてNK活性を保有する細胞へ増殖分化すると考えられている。われわれの胎児骨髄細胞からクローン化したTCR $\delta\gamma$ 細胞は、ヒトNK活性を測定するK562細胞と接着能はよく発揮されているがkilling活性は確認できなかった。したがって、これらの細胞の機能発現を確認するためには、IL-2でIL-2の $\alpha$ ,  $\beta$ リセプターを刺激したあとストローマ細胞上で成熟NK細胞に分化を誘導してやる必要がある。現在われわれがIL-2とIL-5を添加してそれぞれのリセプターを刺激したpre NK細胞は、NK細胞に特異性をしめすモノクローナル抗体NKH1陽性、Cytoplasmic  $CD_8$ 陽性、 $T\gamma$ -m RNA陽性の細胞がクローニングされている。一方 $\gamma$ 鎖の再構成が不成功に終わると、次に $\beta$ 鎖のD-J、V-DJ組換えが行われる。D-J組換えは両方のアレルで2個のペアで存在し、それぞれにDJ組換えがおこるため、合計4個のDJがつくられる。しかし、1個のVDJ組換えが成功すると、 $\beta$ 鎖の組換えは終了し、 $\alpha$ 鎖の再構成が開始され、

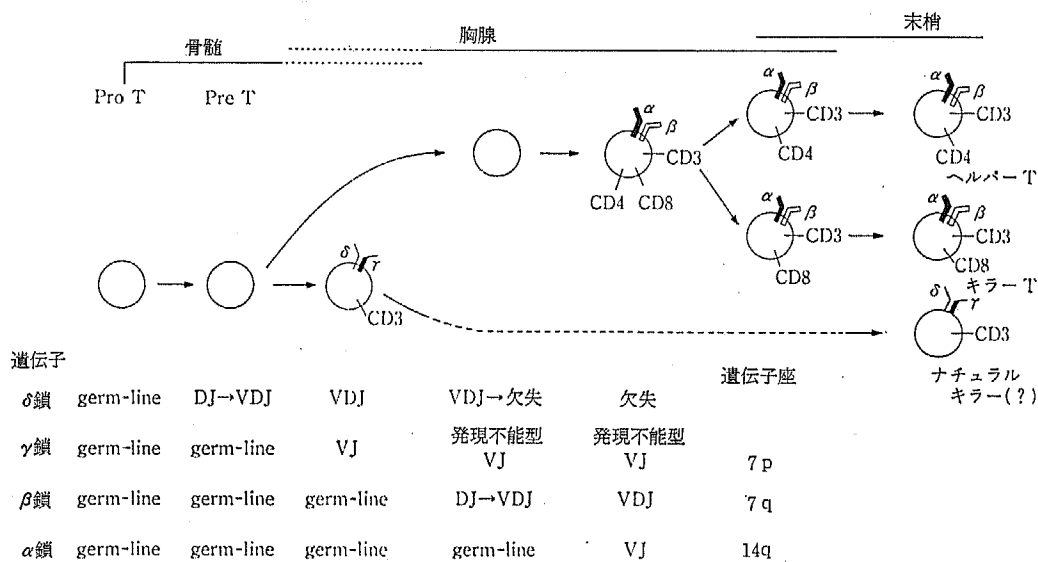


図4 T細胞の分化とTCR遺伝子の再構成

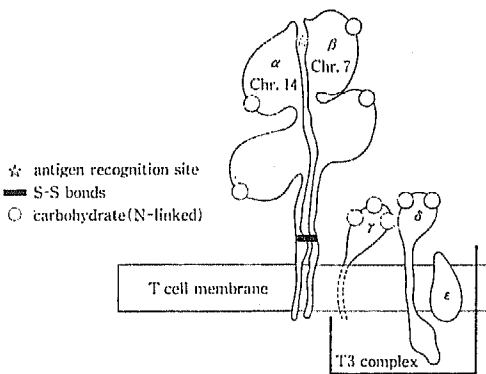


図5 T細胞受容体 (TCR) と T3 複合体<sup>3)</sup>  
TCR は 抗原特異的で, TCR と T3 は  
 $\gamma$  鎖を介して非共有結合している。

$\alpha$  鎖の VJ 組換えに成功すると  $\alpha\beta$  型の TCR  $\alpha\beta$  を pre T細胞の表面に発現する, 図5に TCR と T<sub>3</sub> 複合体の模式図を示す。TCR  $\alpha\beta$ , TCR  $\gamma\delta$  型のいずれの発現にも図で示す CD<sub>8</sub> 抗原が必要である。すでに CD<sub>8</sub> 抗原は骨髓ストローマ細胞上でその細胞質内に合成されており, 胸腺に移行してから始めて膜抗原として認識されるようになる。胸腺内へ移行した TCR  $\alpha\beta$  型 pre T細胞は図1に示すごとく, 胸腺内ストローマ細胞と, 上皮性看護細胞(epithelial nurse cell)の補助のもとに CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> の両抗原を表現する(ダブルポジティブ細胞)となり, 前述の胸腺微小環境によって教育, 選択されたT細胞は CD<sub>4</sub>, または CD<sub>8</sub> の片方のみを発現するT細胞(シングルポジティブ細胞)となり, 胸腺を旅立ち, 全身のリンパ臓器に分布することによりT細胞機能を発揮するようになる。われわれの骨髓ストローマ細胞を使用したクローニングの成績では, クローン化した pre B, pre T細胞の他に約 1/6 のクローンサイズで C $\mu$  と T $\beta$  の T, B細胞の性質を保有する幼若クローンが分離されてくる。

しかし再クローニングでもこの細胞が存在することからB細胞とT細胞の分岐点, T細胞とNK細胞の分岐点は比較的近いという印象を持つが, これらの分岐点を検討する研究は未だ不十分で, 結論を導きえない。しかし, Ig 遺伝子と TCR 遺伝子のV領域の再構成に関与まったく同一の様式を使用し, D-Jの組換えに関与するリコンビナーゼも同一の酵素を使用している可能性はきわめて強い。しかもB細胞の最終産物がIgでありT細胞の最終産物がインターリウキンであることから考えると両者の密接な関係が良く理解される。

ではこれらの基礎知識を基に現在の原発性免疫不全症での分子遺伝学的な解析はどの程度進展しているかを各論的に記述する。

### III 免疫不全症の DNA 解析

原発性免疫不全症の診断に最近とみに DNA 診断が用いられるようになってきた。最近の技術の進歩を紹介すると, まず, 新しい切断部位の移動, 遺伝子の再構成, DNA の欠失, 挿入などを検索する制限酵素マッピング法による変異遺伝子の直接診断法がある。ついで, DNA を一定の制限酵素で切断したあと, 単一のスクレオチド置換, もしくは超可変部の存在によって, DNA の断片を遺伝学的手技により, その変異を証明する restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法による間接診断が使用されている。特異的な RFLP は, 特定の突然変異(対立遺伝子連鎖: allele linkage)や特定の遺伝子座(遺伝子連鎖: locus linkage)と連鎖している場合に利用できる。遺伝子連鎖は家系内に認められるので, 単一遺伝子疾患の出生前診断, 保因者の発見に広く応用されている RFLP の解析で異常遺伝子の局在が証明された原発性免疫不全症として, 小児伴性無ガンマグロブリン血症(XLA), 伴性重症複合免疫不全症(X-SCID), 伴性高IgMを伴うIg欠損症, Wiskott-Aldrich 症候群 Duncan 症候群がある。XLA では非アレル型の遺伝的不均一性があり, RFLP 法ですべてのXLAを確実に診断することはできず, 現実にはXq 21.3-22との関連のない家系も10%前後存在することが知られている。

### IV 遺伝子診断の実際

抗生物質や免疫グロブリン補充療法, 抗ヘルペス剤の開発, インターリウキン2を用いたLAK細胞の養子移入法などを前節で概説したが, これらの補助療法の進歩により, 従来では生存しえない疾患でも巧みな補助療法の組合せにより生存している。したがって, 病態解析も行われるようになり, 出生前診断も盛んになりつつある。特に異常妊娠, 既応に原発性免疫不全症児の出産のある妊娠については精力的な遺伝子診断が行われつつある。胎児DNA診断のDNA, およびRNA材料は羊水から供給される。最近特に威力を発揮し始めている方法がPCR(polymerase chain reaction)法であり<sup>22-24)</sup>, この方法は, オリゴマーをプライマーとしてDNAポリメラーゼで特定の領域を増幅する方法で, 最近, 耐熱性のTaqポリメラー

表3 遺伝性原発性免疫不全症の遺伝子異常

病 型	異常遺伝子の局在	文 献
X-linked 重症複合免疫不全症(SCID)	xq 11-13	25)
X-linked 無ガンマグロブリン血症 (Bruton 型)	xq 21.3-22	26)-28)
Wiskott-Aldrich 症候群	xq 11	29)
EB ウイルス感染による無ガンマグロブリン血症	xq 24-27	30)
高IgM 血症をともなう Ig 欠損症	xq 24-26	31)
adenosine deaminase 欠損症	20 q 13-ter	32)33)
ataxia-telangiectasis	11 q 22.3	34)
purine nucleoside phosphorylase 欠損症	14 q 13.1	35)36)
κ鎖欠損症	2 p 11	37)

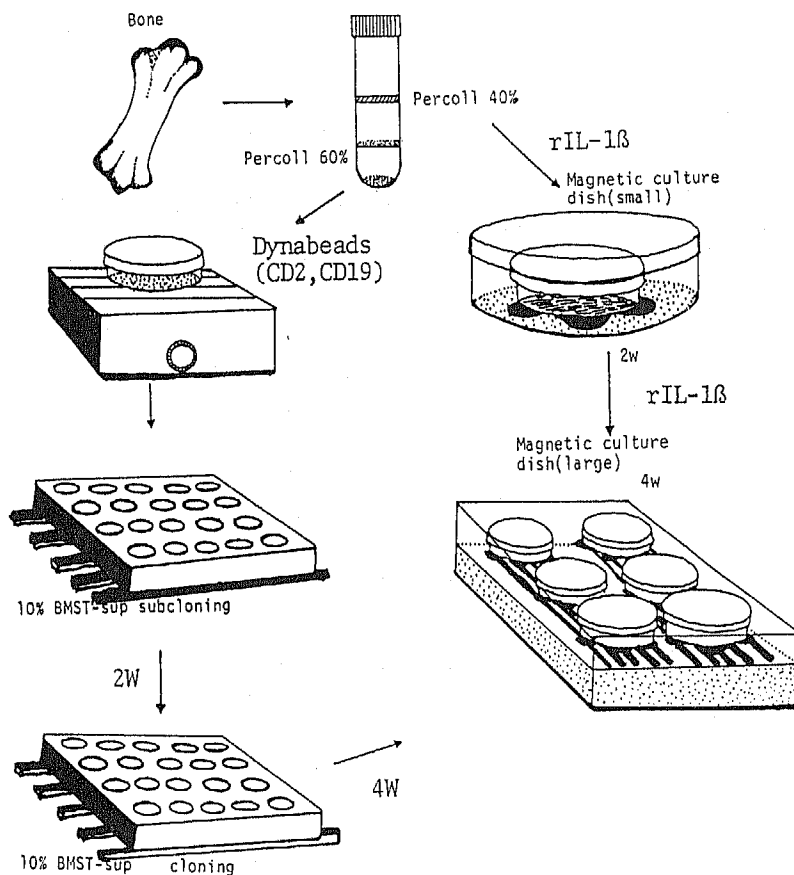


図6 磁力線—ストローマ細胞培養系

が実用化され、さらに自動合成装置が市販されてから、日常診察の中で遺伝子診断が可能となった。目的領域の塩基配列さえ決定されていれば、数時間でその領域を100万倍以上に増幅することが可能である。

1985年から1987年までの3年間の本邦の統計では、248例の95%が羊水細胞採取法で、12例の5%でPCRを用いた絨毛採取法による出生前診断が行われてきた。この方法の特徴は以下のとおりである。



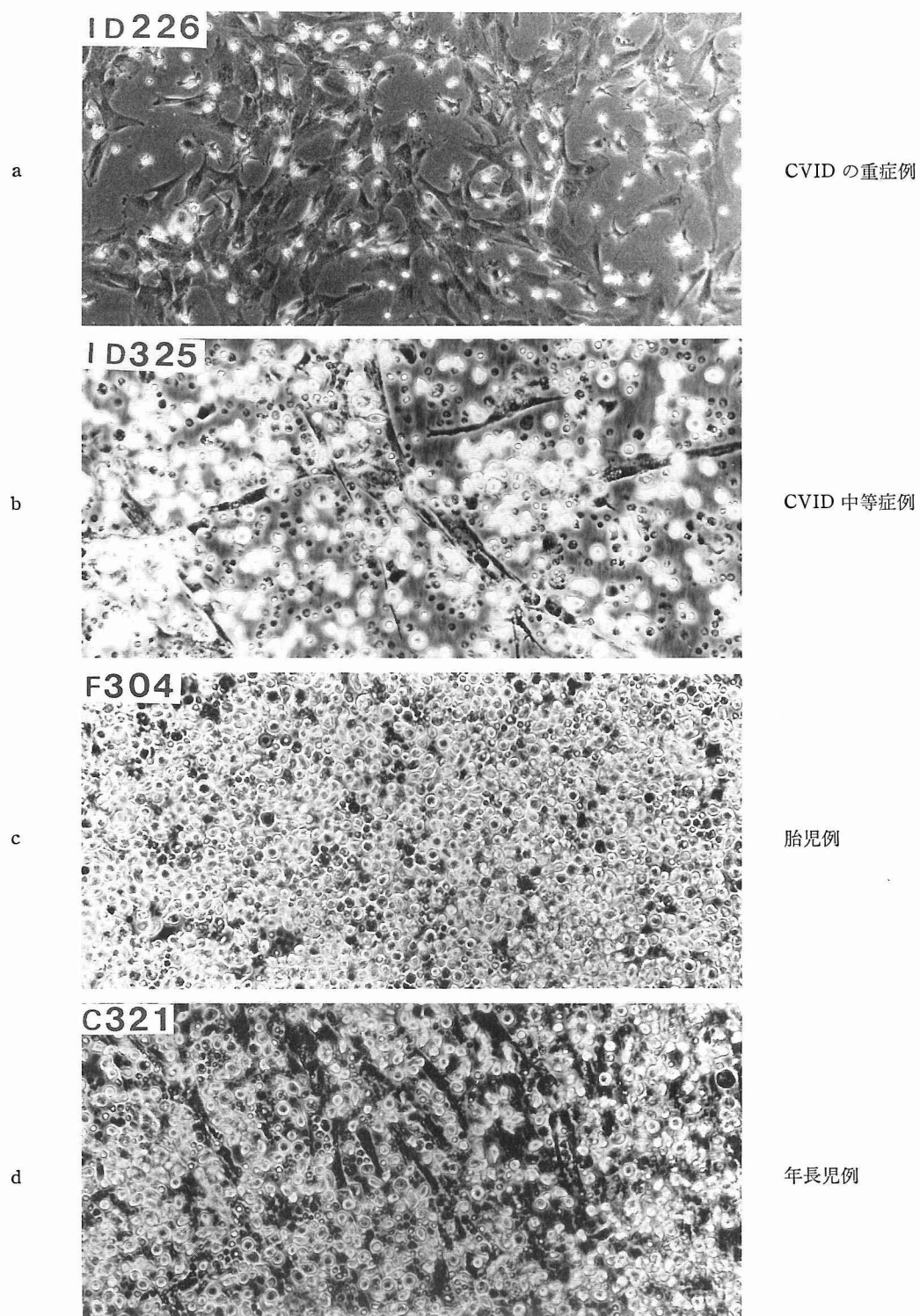


図7 ストローマ細胞とリンパ系細胞の培養

- ① 欠失 (deletion), 挿入 (insertion) の検出。
- ② 制限酵素の認識部位を変化させる遺伝子異常の検出。
- ③ 制限酵素切断片多様型 (RFLP) を用いた診断。
- ④ 合成オリゴヌクレオチドをプローブとする遺伝子異常の検出。

以上の方法でえられた異常遺伝子の局在を表3に示す<sup>25)~37)</sup>。検体 DNA 量のきわめて限られた小児科, 産科領域でも遺伝子解析が最大の威力を発揮する時代に突入した。しかし, 遺伝子治療となると, 遺伝子導入細胞の①長期培養の可能性②生体移入後の発癌性および機能保持等, 検討しなければならない問題が山積している。しかも, 猫も杓子も遺伝子を扱う時代に, ヒトにおける導入細胞が高々, 2~3週の viability を保つ線維芽細胞しか持ち得ないのが現状である。そこでわれわれは生体中で最も寿命が長い骨髄幹細胞, および, その幹細胞と増殖させるストローマ細胞の培養に取り組み, この幹細胞に遺伝子導入を試みている<sup>38)39)</sup>。仮に, われわれの仮説が正しいとすると, 遺伝子導入された幹細胞は, 最も長寿型に導入された場合, 数十年に渡って, 機能を発揮されることが期待される。図6に現在われわれが試みている磁力線培養装置を用

いた骨髄幹細胞培養法の概略を示す。ヒト骨髄細胞を40%, 60%のパーコール比重遠沈法で分離し, 40%以上の細胞に rIL-1 を添加し2週間培養を行うとヒトストローマ細胞がプラスチック表面に培養されてくる。このストローマ細胞を再度, パーコール比重遠沈に乗せ, 40%以上の純化ストローマ細胞を IL-5 と維芽細胞増殖因子 (FGF) を添加培養することにより, 現在のところ, 1年以上に渡ってストローマ細胞の培養が可能となっている。他方, パーコール60%の分画細胞は, リンパ系幹細胞源として, ダイナビーズで成熟BT細胞を除去後, 10%のストローマ培養上清を使用することにより, クローニングされる。このクローニングされたリンパ系幹細胞を実際に純化増殖させたストローマ細胞に乗せて6週間培養した位相差写真を図7に示す。上段2枚のID226(図7a)ID325(図7b)がB細胞欠損症のストローマ細胞と, リンパ芽球様の細胞である。F304(図7c)が胎児, C321(図7d)が年長児のストローマ細胞上に培養されてくるリンパ芽球様細胞である。B細胞欠損の培養では, リンパ系培養細胞濃度は共通して, きわめて粗であるのに対し, 胎児と年長児の培養はきわめて密である。また胎児では単一の大型細胞であるのに対し, 年長児では

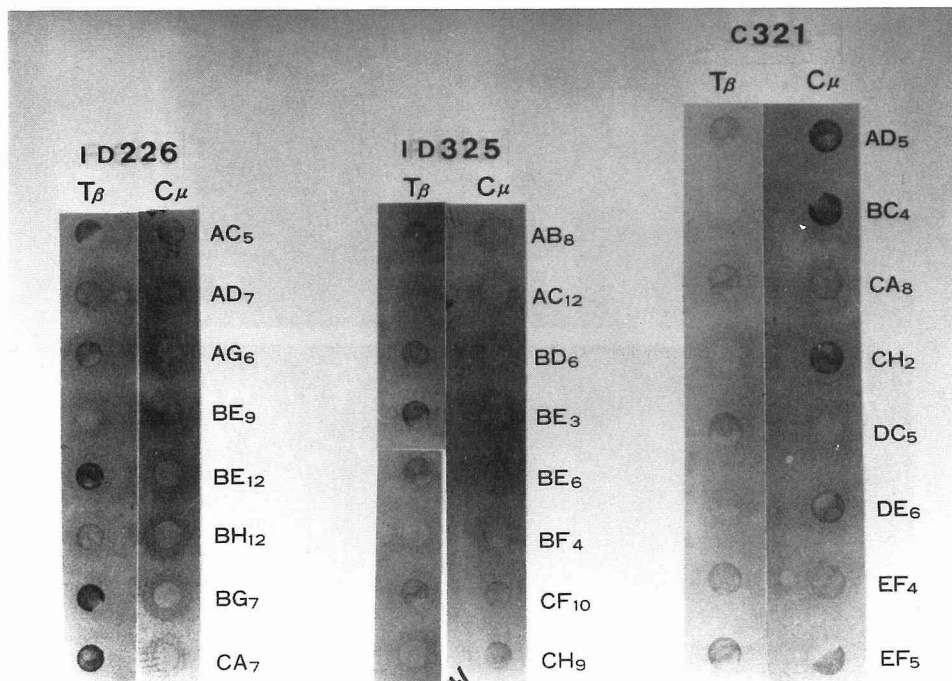


図8 RNA 解析よりみたクローン化細胞

大小不同で成熟傾向を示している。実際にストローマ細胞の培養上清を使用して、クローニングしたリンパ芽球様細胞を再び、ストローマ細胞上で培養し、増殖させたクローン細胞のクローンサイズを  $T\beta$  と  $C\mu$  のプローブを用いて、ドットハイブリダイズさせ、それぞれに対応するクローンサイズを測定したのが図8である。図で示すごとく、B細胞欠損症のストローマ細胞は  $T\beta$  陽性の pre T細胞を養育するのに対し、対照の年長児のストローマ細胞は、pre B細胞の養育が得意である。しかも、このクローンはストローマ細胞を替えることにより1年以上も維持することが可能である。以上の研究により、ヒトにおける遺伝子導入細胞の目処が立ち、現在、これらのストローマ細胞やリンパ系幹細胞に、欠損酵素の遺伝子、インターリウキ

ン遺伝子などをフローバルス法で導入し、*in vitro* でリンパ系の再構築の可能性を検討中である。実際に現在、われわれが開発中の手技が確立されれば、単に、免疫グロブリン産生ばかりでなく、若年性糖尿病や下垂体性小人症などのホルモン補充療法などへも応用が可能であり、その日が近いことを期待して総説を終了したいと思います。

## 謝 辞

なお後半のヒトにおける遺伝子導入細胞の確立は、科学研究費 C 01570521、および厚生省特定疾患免疫不全症候群調査研究班の研究費によった。またヒトリコンビナント IL-5 を大量に提供していただいたサントリ研究所、鶴岡伸夫氏に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 小林 登, 松井一郎: 疫学調査分科会総括報告. 厚生省特定疾患—免疫不全症候群調査研究班 昭和63年度研究報告書 (班長松本脩三), pp. 13-16, 1988
- 2) 松本脩三: 年次総括報告. 厚生省特定疾患—免疫不全症候群調査研究班 昭和63年度研究報告書 (班長松本脩三), pp. 3-11, 1988
- 3) 宮川幸昭: 免疫不全症のために—リンパ球に関する検査—リンホカイン. 小児科 Mook, 41: 213-226, 1986
- 4) 宮川幸昭, 花岡康彦, 加藤正雄, 柳沢光彦: 小児科医のための免疫学免疫不全とインターロイキン. 小児科 Mook, 43: 111-123, 1986
- 5) 宮川幸昭, 加藤正雄, 柳沢光彦, 川合 博, 小宮山淳, 赤羽太郎: 免疫不全症におけるリンホカインによる治療の試み. 臨床科学, 23: 134-142, 1987
- 6) 天野芳郎, 柳沢光彦, 長沼邦明, 川合 博, 宮川幸昭, 小宮山淳, 赤羽太郎: Natural killer 細胞活性を保持する重症複合型免疫不全症の1例—遷延性水痘に対する interferon, interleukin-2 による BRM 療法の経験—. 日本小児科学会雑誌, 92: 1201-1205, 1988
- 7) 山田幸宏, 宮川幸昭: T細胞レセプター欠損症. 臨床免疫, 21: 22-33, 1989
- 8) Kawai, H., Komiyama, A., Katoh, M., Yabuhara, A., Miyagawa, Y. and Akabane, T.: Induction of lymphokine-activated killer and natural killer cell activities from cryopreserved lymphocytes. Transfusion, 28: 531-535, 1988
- 9) Komiyama, A., Ichikawa, M., Kanda, H., Aoyama, K., Yasui, K., Yamazaki, M., Kawai, H., Miyagawa, Y. and Akabane, T.: Defective interleukin-1 production in a familial monocyte disorder with a combined abnormality of mobility and phagocytosis-killing. Clin Exp Immunol, 73: 500-504, 1988
- 10) 宮川幸昭: レセプター異常と免疫病—インターロイキンレセプターと免疫不全症. 臨床免疫, 21: 830-840, 1989
- 11) 小宮山淳, 北原文徳, 藪原明彦, 安井耕三, 柳沢光彦, 川合 博, 宮川幸昭, 赤羽太郎: 小児の免疫不全症における Epstein-Barr ウイルス感染症に対するインターロイキン2療法. 炎症, 9: 241-246, 1989
- 12) Hershfield, M.S., Buckley, R.H., Greenberg, M.L., Melton, A.L., Schiff, R., Hatem, C., Kurzberg, J., Markert, M.L., Kobayashi, R.H., Kobayashi, A.L. and Abuchowski, A.: Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol modified adenosine deaminase. N Engl J Med, 316: 589-596, 1987
- 13) Kantoff, P.W., Kohn, D.B., Mitsuya, H., Armentano, D., Sieberg, M., Zwiebel, J.A., Eglitis, M.A., McLachlin, J.R., Wiginton, D.A., Hutton, J.J., Horowitz, S.D., Gilboa, E., Blaese, R.M. and Anderson, W.F.: Correction of adenosine deaminase deficiency in cultured

- human T and B cell by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 : 6563-6569, 1986
- 14) Steel, R.W., Limas, C., Thurman, G.B., Schuelein, M., Bauer, H. and Bellanti, J.A. : Familial thymic aplasia : attempted reconstitution with fetal thymus in a millipore diffusion chamber. *N Engl J Med*, 287 : 787-791, 1972
  - 15) August, C.S., Levey, R.H., Berkel, A.I., Rosen, F.S. and Kay, H.E.M. : Establishment of immunological competence in a child with congenital thymic aplasia by a graft of fetal thymus. *Lancet*, 1 : 1080-1083, 1970
  - 16) Honjo, T. : Immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol*, 1 : 499-528, 1983
  - 17) Tonegawa, S. : Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302 : 575-578, 1983
  - 18) Honjo, T. and Habu, S. : Origin of immune diversity : Genetic variation and selection. *Annu Rev Biochem*, 54 : 803-830, 1985
  - 19) Shimizu, A. and Honjo, T. : Immunoglobulin class switching. *Cell*, 36 : 801-803, 1984
  - 20) Daois, M.M. and Bjorkman, P.J. : T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, 334 : 395-402, 1988
  - 21) Teh, H.S., Kisielow, P., Scott, B., Kishi, H., Uematsu, Y., Blüthmann, H. and Boehmer, H. : Thymic histocompatibility complex antigen and  $\alpha\beta$  T-cell receptor determine the CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> phenotype of T cells. *Nature*, 335 : 229-233, 1988
  - 22) Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Amheim, N. : Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 : 1350-1354, 1985
  - 23) Erlich, H.A., Gelfand, D.H. and Saiki, R.K. : Specific DNA amplification. *Nature*, 331 : 461-462, 1988
  - 24) Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Schare, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 : 487-491, 1988
  - 25) De, Saint, Basile, G., Arveiler, B., Oberle, I., Malcolm, S., Levinsky, R.J., Lau, Y.L., Hofker, M., Debre, M., Fischer, A., Griscelli, C. and Mandel, J.L. : Close linkage of the locus for X chromosome-linked severe combined immunodeficiency to polymorphic DNA markers in xq11-q13. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 : 7576-7581, 1987
  - 26) Kwan, S-P, Kunkel, L., Bruns, G., Wedgood, R.J., Latt, S. and Rosen, F.S. : Mapping of x-linked agammaglobulinemia locus by use of restriction fragment-length polymorphism. *J Clin Invest* 77 : 649-658, 1986
  - 27) Mensink, E.J.B.M., Thompson, A., Schot, J.D.L., Van, de, Greef, W.M.M., Sandkuyl, L.A. and Schuurman, R.K.B. : Mapping of a gene for x-linked agammaglobulinemia and evidence for genetic heterogeneity. *Hum Genet*, 73 : 327-332, 1986
  - 28) Malcolm, S., De Saint, Basile, G., Arveiler, B., Lau, Y.L., Szabo, P., Fischer, A., Griscelli, C., Debre, M., Mandel, J.L., Callard, R.E., Robertson, M.E., Goodship, J.A., Pembrey, M.E., Pembrey, M.E. and Levinsky, R.J. : Close linkage of random DNA fragments from xq 21.3-22 to x-linked agammaglobulinemia (XLA). *Hum Genet*, 77 : 172-179, 1987
  - 29) Peacocke, M. and Siminovitch, K.A. : Linkage of Wiskott-Aldrich syndrome with polymorphic DNA sequences from the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 : 3430-3434, 1987
  - 30) Ikehara, S., Shimizu, J., Yasumizu, R., Nakamura, T., Inaba, M., Inoue, S., Oyaizu, N., Sugiura, K., Oo, M.M., Hamashima, Y. and Good, R.A. : Thymic rudiments are responsible for induction of functional T cells in nu/nu mice. *Thymus*, 10 : 193-204, 1987
  - 31) Mensink, E.J.B.M., Thompson, A., Sandkuyl, L.A., Krakman, M.E.M., Schot, J.D.L., Espanol, T. and Schuurman, R.K.B. : X-linked immunodeficiency with hyperimmunoglo-

- bulinemia mapp to be linked to the DXS 42 restriction fragment length polymorphism locus. *Hum Genet*, 76:96-101, 1987
- 32) Philip, T., Lenoir, G., Rolland, M.O., phillip, I., Hamet, M., Lauras, B. and Fraisse, J. : Regional assignment of the ADA locus on 20 q 13.2-qter by gene dosage studies. *Cytogenet Cell Genet*, 27:187-196, 1980
  - 33) Aiuti, F., Cooper, M., Eible, M., Good, R., Griscelli, C., Hanson, L., Hitzig, W., Kishimoto, T., Matsumoto, S., Rosen, F., Seligmann, M., Thompson, R., Waldmann, T. and Wedgwood, R. : Primary immunodeficiency diseases : a report of a WHO Scientific Group. *Immunodef Rev*, 1:2-300, 1989
  - 34) Chen, P.C., Lavin, M.F., Kidson, C. and Moss, D. : Identification of ataxia telangiectasia heterozygotes, a cancer-prone population. *Nature*, 274:484-487, 1978
  - 35) Ricciuti, F. and Ruddle, F.H. : Assignment of nucleoside phosphorylase to D14 and localization of X-linked loci in man by somatic cell genetics. *Nature*, 241:180-182, 1973
  - 36) Francke, U., Busby, N., Shaw, D., Hansen, S. and Brown, M.G. : Intrachromosomal gene mapping in man : assignment of nucleoside phosphorylase to region 14 cen—>14 q 21 inter-specific hybridization of cells with a t (x;14) (p22;q21) translocation. *Somatic Cell Genet*, 2:27-34, 1976
  - 37) Bosma, G.C., Davisson, M.T., Ruetsch, N.R., Sweet, H.O., Schulta, L.D. and Bosma, M.J. : The mouse mutation of severe combined immunodeficiency (SCID) is on chromosome 16. *Immunogenetics* (In press).
  - 38) Miyagawa, Y., Komiyama, A., Uehara, Y., Kawai, H. and Akabane, T. : Predominance of T cell lineage clones (CD5<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, T $\beta$ -RNA<sup>+</sup>) in lymphoid cell cultures of human fetal bone marrow by a newly designed magnetic culture system. (Submitted for Publication).
  - 39) Miyagawa, Y., Komiyama A., Uehara, Y., Kitahara, F., Agematsu, K., Kawai, H. and Akabane, T. : Two children of B cell defect immunodeficiency caused by their fetal type immature stromal cells analyzed by a newly designed magnetic culture system. (Submitted for Publication).

(1. 8. 22 受稿)