

学位論文題名

Determination of Carrier Status for the Wiskott-Aldrich Syndrome by Flow Cytometric Analysis of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells.

(フローサイトメトリーを用いた  
Wiskott-Aldrich syndrome 保因者の解析)

学位論文内容の要旨

[はじめに] Wiskott-Aldrich症候群 (WAS)は、X染色体連鎖性の原発性免疫不全症であり、その臨床的特徴は血小板減少による出血傾向、難治性の湿疹、免疫不全による易感染性である。その原因遺伝子としてWASP遺伝子が近年同定され、その産物であるWASPがさまざまな血液細胞に発現していることが報告されている。申請者は既にリンパ球の細胞内WASPを検出するフローサイトメトリー法によるWAS患者診断法を確立しているが、この方法は保因者と正常者との間で差を認めず保因者診断には適さない。本研究は、保因者診断に有用な方法の確立を目的として単球における細胞内WASPの検出およびそのフローサイトメトリー法の有用性について検討したものである。

[方法] ヘパリン血から比重遠心法により末梢血単核球を分離した。次いで Cytofix & Cytoperm solution (PharMingen) にsuspendし、20分間、4℃におき、Phosphate-Buffered Saline (PBS)で2回洗浄後、一次抗体との反応を行った。抗体にはヒトWASPに対するマウスモノクローナル抗体、3F3-A5、を1:200希釈で用い、陰性対照にはこの抗体と同じサブクラスのマウスIgG<sub>1</sub>抗体を1:5希釈で用いた。30分間、4℃の反応後、PBSで2回洗浄し二次抗体との反応を行った。二次抗体にはfluorescein isothiocyanate (FITC)標識抗マウスIgG<sub>1</sub>抗体を1:100希釈で用い4℃で30分間反応させた。PBSで2回洗浄後、フローサイトメトリーによる解析を行った。FSC, SSCのドットプロットで認められる単球分画の20,000個について評価を行った。

[結果と考察] WAS患者5例についてフローサイトメトリーを用いた単球細胞内WASPの解析を行ったところ、全例で正常者と明らかなWASP発現の差を認め、単球においてもWASPの検出が可能であることが示された。そこで、遺伝子診断された保因者9例と保因者より骨髄移植を受けたWAS患者1例について解析を行った。WASP遺伝子変異は、missense mutationが5例のほか、exon 7でのnonsense mutation 1例、exon 3からexon 7に及ぶ欠損1例、exon 1及びexon 9での1塩基欠損によりそれぞれのexon 内で

premature terminationをきたしたものの各1例であった。保因者より骨髄移植を受けたWAS患者はexon 1での1塩基欠損の例であった。また、非保因者であるWAS患者の母1例についても解析を行った。正常人と非保因者であるWAS患者の母ではWASP陰性細胞分画を認めなかったのに対し、WAS保因者9例と保因者をドナーとして骨髄移植を受けたWAS患者1例では、全例でこの分画を認めた。その割合は3.5~50.7%であり、3.5%の例においても明らかにWASP陰性細胞分画として認識できた。このことから、フローサイトメトリーを用いた単球細胞内WASPの解析が保因者診断に有用であることが示された。

次に、これらの保因者を単球におけるWASP陰性細胞分画の割合から、I, II, IIIと大きく3つの群に分類した。I群はWASP陰性細胞分画の割合が10%未満のもの、II群は10%以上30%未満のもの、III群は30%以上のものとした。I群にはexon 7におけるnonsense mutationの1例とexon 3~exon 7に及ぶ欠損の1例が含まれた。II群には、exon 1及びexon 3におけるmissense mutationの計3例とexon 1及びexon 9における1塩基欠損の各1例が含まれた。III群にはmissense mutationの2例が含まれた。

以上の結果より、単球におけるWASP陰性細胞分画の割合とWASP遺伝子変異から予想される分子障害との間にはある程度の相関関係が認められた。すなわち、遺伝子変異から予測されるWASP分子の障害が大きいと考えられる症例ではWASP陰性細胞分画の割合は少なく、反対にこの障害が小さいと考えられる症例では多い傾向にあった。WASPは細胞の活性化、増殖のシグナル伝達に関与していると推測されており、単球の増殖、生存においても重要と考えられる。したがって、今回の保因者単球にみられたWASP陰性細胞分画の偏りは、遺伝子変異をもつ側のX染色体が不活化している細胞と正常のX染色体側が不活化している細胞との増殖、生存の差による二次的なX染色体不活化パターンの偏りを反映したものと考えられる。しかし、exon 1における1塩基欠損によりWASPがほぼ完全に欠損するWAS患者の保因者と、この保因者より骨髄移植を受けた患者はII群に含まれたことから、単球においては遺伝子変異によるWASP障害の程度だけでなく他の因子もWASP陰性細胞分画の割合に影響しうると推測された。一方、リンパ球での検討ではmissense mutationの2名を除いてWASP陰性細胞分画を認めなかった。また、この細胞分画を認めた2例においても単球での割合よりも有意に少なかった。従って、リンパ球においてはWASPはその増殖、生存に極めて重要な役割を担っており、WASP障害の程度が厳密にX染色体不活化パターンの偏りを規定していると考えられた。保因者に認められた単球とリンパ球でのWASP陰性細胞分画の相違は、WASP分子の細胞増殖における重要性が、血液細胞の種類によって異なることを示唆している。WASの保因者では血液幹細胞レベルで既にX染色体不活化に偏りを認めるとの報告もあるが、今回の研究結果は、この偏りが幹細胞レベルで完成するのではなく、各系統に分化するにつれ進行する可能性を示している。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

### Determination of Carrier Status for the Wiskott-Aldrich Syndrome by Flow Cytometric Analysis of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells.

(フローサイトメトリーを用いた  
Wiskott-Aldrich syndrome 保因者の解析)

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS)は、出血傾向、難治性湿疹、易感染性を主徴とする X 連鎖遺伝性の原発性免疫不全症であり、責任遺伝子として WASP 遺伝子が単離同定されている。その遺伝子産物である WASP は様々な血液細胞に発現しており、細胞の増殖や生存に重要な役割を担っていると考えられている。申請者は既にリンパ球細胞内 WASP を検出するフローサイトメトリー (FCM)法による WAS 患者診断法を確立しているが、この方法は保因者診断には適さない。本研究は、保因者診断に有用な方法の確立を目的として FCM を用いた単球細胞内 WASP の検出を試みた。方法は、まず末梢血単核球を分離した後、細胞の固定と細胞膜の透過性を高める目的で Cytofix & Cytoperm solution (PharMingen) を用いた。一次抗体にはヒト WASP に対するマウスモノクローナル抗体, 3F3-A5, を用い、陰性対照には isotypic なマウス IgG1 抗体を用いた。二次抗体には fluorescein isothiocyanate (FITC)標識抗マウス IgG1 抗体を用い、単球にゲートをかけた FCM 解析を行った。WAS 患者 5 例の解析では全例で正常者に比べ明らかな WASP 発現の低下を認め、単球細胞内 WASP の検出が可能であった。次に、遺伝子診断された WAS 保因者 9 例と保因者より骨髄移植を受けた WAS 患者 1 例、及び非保因者である WAS 患者の母 1 例の解析を行った。正常人と非保因者である WAS 患者の母では WASP 発現の低下した分画 (WASP 陰性細胞分画)を認めず、一方 WAS 保因者 9 例と保因者より骨髄移植を受けた WAS 患者 1 例では全例でこの分画を認めた。その割合は 3.5~50.7%で、3.5%の例でも明らかにこの分画を認識でき、この方法が WAS 保因者診断に有用であることが示された。次に、この分画の割合からこれらの保因者を、I 群 <10%, 10% ≤ II 群 <30%, III 群 ≥30%の 3 群に分類した。I 群には exon 7 の nonsense mutation の 1 例と exon 3 から exon 7 に及ぶ欠損の 1 例、II 群には exon 1 及び exon 3 の missense mutation の計 3 例と exon 1 及び exon 9 の 1 塩基欠損の各 1 例、III 群に

は missense mutation の 2 例が含まれた。このように、遺伝子変異から予想される WASP 分子の障害が大きいと考えられる症例では単球の WASP 陰性細胞分画の割合は少なく、反対にこの障害が小さいと考えられる症例では多い傾向にあった。これは遺伝子変異をもつ X 染色体側が不活化した細胞と正常の X 染色体側が不活化した細胞との増殖、生存の差による二次的な X 染色体不活化パターンの偏りを反映したものと考えられ、WASP は単球においても重要な役割を担っていると考えられた。しかし、exon 1 での 1 塩基欠損により WASP がほぼ完全に欠損する遺伝子変異をもった保因者と、この保因者より骨髄移植を受けた患者は II 群に含まれたことから、単球においては WASP 遺伝子変異による分子障害だけでなく他の因子もこの偏りに影響しうると推測された。一方、リンパ球での検討では missense mutation の 2 名を除いて WASP 陰性細胞分画を認めなかった。また、この細胞分画を認めた 2 例においても単球での割合よりも有意に少なかった。従って、リンパ球においては WASP はその増殖、生存に極めて重要な役割を担っており、WASP 分子障害の程度が厳密に X 染色体不活化パターンの偏りを規定していると考えられた。これらの結果より WASP 分子の細胞増殖における重要性が、血液細胞の種類によって異なることが示唆された。WAS の保因者では血液幹細胞レベルで既に X 染色体不活化に偏りを認めるとの報告があるが、今回の研究結果は、この偏りが幹細胞レベルで完成するのではなく、各血球系統に分化するにつれさらに進行する可能性を示している。公開発表に際し、副査の小池教授から、血小板異常の詳細、WASP の機能、WASP 発現細胞、遺伝子解析よりもまず FCM 解析を行う意義、WASP ノックアウトマウスの臨床像について質問があった。次いで主査の今村教授から、保因者の単球とリンパ球における WASP 陰性細胞分画の割合に差が生じた理由、この割合から臨床的重症度予想が可能か、血小板減少や T、B 細胞機能異常の背景などについて質問があった。次いで副査の小林教授から幹細胞からの分化過程で X 染色体不活化の偏りの進行をみた報告の有無についての質問があった。申請者はいずれの質問に対しても実験結果や他の研究者からの報告を引用し、妥当な回答を行った。

この論文は FCM を用いた WAS 保因者診断が可能であることを明らかにし、同時に WAS 保因者での X 染色体不活化の偏りが幹細胞レベルですでに完成しているという従来の概念に対し、血球系による相違を明らかにし、この偏りが分化に伴いさらに進行することを示唆した点で高く評価される。今後フローサイトメトリーによる WAS 患者、保因者の迅速診断法が普及することにより、全世界的な WAS 患者の予後の改善が期待され、また各血球系細胞の増殖、生存に WASP がどのように関与しているかについての研究が進展する契機になるものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。