

学位論文題名

Mixed chimera status of 12 patients with Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) after hematopoietic stem cell transplantation: evaluation by flow cytometric analysis of intracellular WAS protein expression.

(血液幹細胞移植後の Wiskott-Aldrich syndrom (WAS) 患者

12症例における混合キメラ状態の検討：

Flow Cytometry による細胞内 WAS タンパク発現検索による評価)

学位論文内容の要旨

(目的) Wiskott-Aldrich Syndrome (以下 WAS) はX染色体連鎖劣性遺伝の原発性免疫不全症で、その病因は actin の調節/シグナル関連タンパク質と考えられている WAS タンパク分子 (以下 WASP) の異常である。WAS は臨床的に易感染性、サイズの減少を伴う血小板減少、難治性湿疹が特徴で、頭蓋内出血、重症感染症、悪性腫瘍の発生などで致死的となる疾患である。現在のところ血液幹細胞移植以外に WAS の根治療法はない。しかし、血液幹細胞移植による成績は一定ではなく、治療後ドナー細胞とレシピエント細胞が混合キメラ (MC) となり、その状態が持続する患者も報告されている。我々は Flow cytometry (FCM) を用いて細胞質内の WASP 発現を解析する系を確立し、この系を用いて WAS の診断、WAS 保因者の診断、体内で変異が解消した細胞群を有する WAS 症例などを報告してきた。本研究ではこの系を、血液幹細胞移植後の WAS 症例における病態解析へ応用する事を試みた。さらにその結果から、WASP が血液細胞リネージごとの分化・増殖・存続に対して、生体内でどのような役割を果たしているか考察した。

(方法) 臨床的、遺伝子学的に WAS と診断され、1995年7月から2001年6月にかけて5施設にて血液幹細胞移植を受けた WAS 患者 12 症例を対象とした。FCM による WASP 発現の解析は Ficoll-Hypaque 比重遠心分離法により採取した対象患者の末梢血単核球 (PBMNC) に対して行った。PBMNC を細胞表面 CD マーカー CD4/8/20/56 にてそれぞれ染色し、これを fix and permeabilize した後、細胞質内の WASP を染色する二重染色を行った。染色した細胞を FCM にて解析し、各リネージごとにドナー/レシピエント細胞の比率を経時的に検討して MC を評価した。なお CD4/8 陽性細胞に関しては CD45RA/RO 染色も行い、三重染色にて検討した。PBMNC 以外の細胞の MC の評価は、末梢血顆粒球では分離後 DNA を抽出して sequencing による変異アレルと正常アレルの比率から、骨髓細胞では FISH 法 (donor が女性の場合) により、血小板はサイズのヒストグラムと数から推測した。また、移植前後の血清 IgM、IgE レベルの変化を検索し、MC との関連について検討した。

(結果) 移植後の WAS 症例を FCM にて解析した結果、個々の細胞がドナー由来 (WASP<sup>bright</sup>) かレシピエント由来 (WASP<sup>dim</sup>) が容易に判別でき、リネージごとに MC の有無が判定できた。対象患者 12

名中、血液幹細胞移植後に MC を認めたのは 6 症例であった。MC の有無と他因子との関連を検索したが、変異の種類、患者年齢、血液幹細胞移植の条件（移植細胞数、ドナーのタイプ、前処置方法など）、移植後の GVHD の有無などには明かな相関は認められなかった。しかし、移植後早期にドナーの CD56 陽性細胞が生着を示した症例では、MC とならない傾向にあった。

MC を認めた 6 症例は経時的な検討において様々なパターンを呈していたが、リンパ球よりも単球の方がレシピエント優位の MC である傾向が共通していた。さらに、顆粒球、骨髄細胞でのキメラ状態を検討したところ、単球の動向と一致する傾向であった。患者の移植後の血小板数、血小板サイズの改善度は単球、顆粒球、骨髄細胞におけるドナー細胞の比率とほぼ相関していた。MC を認めた 6 症例の内、3 症例において T 細胞でのナイーブ/メモリー細胞の比率を CD45RA/RO 染色での三重染色にて検討した。その結果、WASP<sup>bright</sup> (ドナー) 細胞と異なり、WASP<sup>dim</sup> (レシピエント) 細胞は移植後一年以上経っても多くはナイーブ細胞で、メモリー細胞の占める割合は少数であった。またこの傾向は CD4 陽性細胞の方に強く認めた。

WAS の免疫学的異常としての低 IgM 血症と高 IgE 血症を多くの症例で認めたが、移植後、ほとんどの患者において血清 IgM の増加と、血清 IgE の低下を認めた。移植後に MC を認めた症例の中で、ほとんどの T 細胞は WASP<sup>bright</sup> (ドナー) 細胞、ほとんどの B 細胞と単球は WASP<sup>dim</sup> (レシピエント) 細胞である特筆すべき一例を認めたが、その症例においても低 IgM 血症の改善を認めた。

(考察) FCM を利用することにより、本研究では従来の方法に比し、簡便にしかも詳細に WAS 症例における血液幹細胞移植後の MC の有無を検索することが出来た。また、検出感度の違いに基づく差のためか、今回検出した MC は血液幹細胞移植後に WAS で認めた従来<sup>1</sup>の報告 (30%) よりも高頻度 (50%; 6/12) であった。この方法は、WAS の血液幹細胞移植後の経時的評価に極めて有用であると考えられる。

移植直後にドナー CD56 陽性細胞が他の CD 陽性細胞より多く認められる症例が MC とならない傾向を示したのは、WAS 特異的ではなく血液幹細胞移植一般でも報告されており、CD56 陽性細胞は移植されたドナーの細胞が生着しやすい環境造りに関与している事が推測される。MC を認めた症例において、リンパ球におけるドナー/レシピエント比率が単球・骨髄系細胞のそれよりも高かった。このことは、それぞれのリネージの未分化血液細胞が生体内で分化、増殖する際の WASP への依存度がリンパ系細胞と単球・骨髄系細胞では差があることを示唆する。また、MC を認めた症例では、移植後レシピエント由来の T 細胞がナイーブ細胞のまま維持され、メモリータイプの細胞は少数のまま維持された。このことはメモリー T 細胞の存続にも WASP が関与していることを示唆する。

移植後に MC を認めた症例の中で、T 細胞がドナー由来で B 細胞と単球がレシピエント由来である症例の低 IgM 血症の推移を見たところ、この症例においても低 IgM 血症は改善されていた。この事象は、WAS に認める低 IgM 血症の原因が T 細胞にあることを示唆する。

本研究は血液幹細胞移植後の WAS 患者に対し、FCM を用いてドナー細胞の生着状態をより詳細に検索する事によって、容易に移植後の病態の解析が可能であることを示した。また、本研究により WASP が血液細胞リネージごとの分化・増殖・存続に対して、生体内でどのような役割を果たしているかについての重要な示唆が得られた。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦  
副 査 教 授 小 池 隆 夫  
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

Mixed chimera status of 12 patients with Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) after hematopoietic stem cell transplantation: evaluation by flow cytometric analysis of intracellular WAS protein expression.

(血液幹細胞移植後の Wiskott-Aldrich syndrom (WAS) 患者

12症例における混合キメラ状態の検討：

Flow Cytometry による細胞内 WAS タンパク発現検索による評価)

Wiskott-Aldrich Syndrome (以下 WAS) は X 染色体連鎖劣性遺伝の原発性免疫不全症で、その病因は actin の調節/シグナル関連タンパク質と考えられている WAS タンパク分子 (以下 WASP) の異常である。WAS は頭蓋内出血、重症感染症、悪性腫瘍の発生などで致死的となる疾患である。現在のところ血液幹細胞移植以外に WAS の根治療法はない。申請者は Flow cytometry (FCM) を用いて細胞質内の WASP 発現を解析する系を確立し、この系を用いて血液幹細胞移植後の WAS 症例における病態解析へ応用する事を試みた。さらにその結果から、WASP が血液細胞リネージごとの分化・増殖・存続に対して、生体内でどのような役割を果たしているか考察した。

臨床的、遺伝子学的に WAS と診断され、1995 年 7 月から 2001 年 6 月にかけて 5 施設にて血液幹細胞移植を受けた WAS 患者 12 症例を対象とした。FCM による WASP 発現の解析は対象患者の末梢血単核球 (PBMNC) に対して行った。

移植後の WAS 症例を FCM にて解析した結果、個々の細胞がドナー由来かレシピエント由来かが容易に判別でき、リネージごとに MC の有無が判定できた。対象患者 12 名中、血液幹細胞移植後に MC を認めたのは 6 症例であった。MC の有無と他因子との関連を検索したが、変異の種類、患者年齢、血液幹細胞移植の条件、移植後の GVHD の有無などには明かな相関は認められなかった。

MC を認めた 6 症例は経時的な検討において様々なパターンを呈していたが、リンパ球よりも単球の方がレシピエント優位の MC である傾向が共通していた。さらに、顆粒球、骨髄細胞でのキメラ状態を検討したところ、単球の動向と一致する傾向であった。患者の移植後の血小板数、血小板サイズの改善度は単球、顆粒球、骨髄細胞におけるドナー細胞の比率とほぼ相関していた。MC を認めた 6 症例の内、3 症例において T 細胞でのナイーブ/メモリー細胞の比率を CD45RA/RO 染色での三重染色にて検討した。その結果、ドナー細胞と異なり、レシピエント細胞は移植後一年以上経っても多くはナイーブ細胞で、メモリー細胞の占める

割合は少数であった。

WAS の免疫学的異常としての低 IgM 血症を多くの症例で認めたが、移植後、ほとんどの患者において血清 IgM の増加を認めた。移植後に MC を認めた症例の中で、ほとんどの T 細胞は WASP 陽性（ドナー）細胞、ほとんどの B 細胞と単球は WASP 陰性（レシピエント）細胞である特筆すべき一例を認めたが、その症例においても低 IgM 血症の改善を認めた。

以上から FCM を利用することにより、従来の方法に比し簡便にしかも詳細に WAS 症例における血液幹細胞移植後の MC の有無を検索することが出来た。また、検出感度の違いに基づく差のためか、今回検出した MC は血液幹細胞移植後に WAS で認めた従来（30%）よりも高頻度（50% ; 6/12）であった。この方法は、WAS の血液幹細胞移植後の経時的評価に極めて有用であると考えられる。

MC を認めた症例において、リンパ球におけるドナー／レシピエント比率が単球・骨髄系細胞のそれよりも高かった。このことは、それぞれのリネージの未分化血液細胞が生体内で分化、増殖する際の WASP への依存度がリンパ系細胞と単球・骨髄系細胞では差があることを示唆する。また、MC を認めた症例では、移植後レシピエント由来の T 細胞がナイーブ細胞のまま維持され、メモリータイプの細胞は少数のまま維持された。このことはメモリー T 細胞の存続にも WASP が関与していることを示唆する。

移植後に MC を認めた症例の中で、T 細胞がドナー由来で B 細胞と単球がレシピエント由来である症例の低 IgM 血症の推移を見たところ、この症例においても低 IgM 血症は改善されていた。この事象は、WAS に認める低 IgM 血症の原因が T 細胞にあることを示唆する。

本研究は血液幹細胞移植後の WAS 患者に対し、FCM を用いてドナー細胞の生着状態をより詳細に検索する事によって、容易に移植後の病態の解析が可能であることを示した。また、本研究により WASP が血液細胞リネージごとの分化・増殖・存続に対して、生体内でどのような役割を果たしているかについての重要な示唆が得られた。

公開発表に際し、副査の小池隆夫教授より混合キメラ状態での臨床的な免疫能の改善とキメラ率との関係についての質問、次いで副査の加藤紘之教授より FCM による解析結果の臨床への応用とその有用性についての質問があった。また主査の小林邦彦教授よりリンパ球と単球で混合キメラに差が生じたことと WASP の役割との関係についての質問があったが、いずれの質問に対しても、申請者は誠意ある妥当な回答をした。

本研究は血液幹細胞移植後の WAS 患者に対し、新しい FCM を用いた解析法でその血球再建状態や経過追跡を簡便でより詳細に行う事を可能にした。また、WASP が血液細胞リネージごとの分化・増殖・存続に対して、生体内でどのような役割を果たしているかについての重要な示唆を与え、今後のこの方面の研究発展が期待される。

審査員一同協議の結果、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者は博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。