総 説

Wiskott-Aldrich 症候群の分子病態—最近の知見から—

笹原 洋二, 土屋 滋

Molecular pathogenesis of Wiskott-Aldrich syndrome

Yoji SASAHARA and Shigeru TSUCHIYA

*Department of Pediatric Oncology, Institute of Development, Aging and Cancer,
Tohoku University and Tohoku University Hospital*

(Received April 19, 2005)

summary

The Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is an X-linked primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the WAS protein (WASP). WASP is predominantly expressed in hematopoietic cells and regulates the reorganization of the actin cytoskeleton in response to various important cell stimuli including T cell receptor signaling. WASP is localized at the immunological synapses between T cells and antigen presenting cells, NK cells and target cells. Here we focus on recent basic and clinical research advances for WAS, which has given great insight into the relevance of WASP, its related molecules and its interacting proteins to basic cell biology, actin cytoskeleton, immunological defects and prediction of clinical outcome in WAS patients. In particular, we have reported the significance of WIP (WASP-interacting protein) for molecular regulation of WASP. In addition, we discuss recent basic approaches to gene therapy for WAS.

Key words—Wiskott-Aldrich syndrome; WASP; WASP-interacting protein; actin cytoskeleton; immunological synapse

抄 録

Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) は, WASP 遺伝子変異により発症する X 染色体連鎖性原発性免疫不全症である。WASP は主に造血細胞に発現しており, 様々な細胞刺激, 特に T 細胞受容体シグナル伝達系刺激に反応してアクチン細胞骨格系を司る分子であり, T 細胞-抗原提示細胞間や NK 細胞-標的細胞間の免疫学的シナプスに局在する分子である。近年の WAS の基礎的, 臨床的な研究の蓄積によって, WASP とその関連分子群, 結合分子群や, 細胞骨格系の制御, WAS 患者での免疫不全の病態や臨床的予後の予測に果たす役割についてより深く理解されるようになってきた。特に, 筆者らは WIP (WASP-interacting protein) が WASP の分子制御に重要な役割を果たすことを報告した。ここでは, これらの最近の知見を総説し, 加えて WAS に対する遺伝子治療の最近の基礎的研究の現況について概説する。

I. はじめに

Wiskott-Aldrich 症候群 (以下 WAS と略) は, サイズの減少を伴う血小板減少, 湿疹, 易感染性を 3 主徴とする X 染色体連鎖性劣性原発性免疫不全症である。その原因遺伝子は WASP であり¹⁾, 多くのシグナル伝達と細胞骨格系を制御する分子である²⁾。ここでは診断と分子病態, 治療に関する最近の知見につき概説する。

II. WAS の基本病因と臨床徴候

1. WAS の基本病因と重症度分類, 遺伝子型/表現型相関

Xp11.22 に存在する WASP 遺伝子は 12 エクソンよりなり, 501 個のアミノ酸をコードしている。図 1 にその 1 次構造と結合蛋白質群を示す。現在まで多くの遺伝子異常が報告されており, 変異は WASP のどこにも生じ得るが, N 末端の 1-4 エクソンに集中している点の特徴であり, その多くがミスセンス変異である (図 1)。同様の遺伝形式で免疫不全を伴わず血小板減少のみを呈する X 連鎖性

図1 WASP 遺伝子変異の分布

血小板減少症（X-linked thrombocytopenia, 以下 XLT と略）があり，治療抵抗性 ITP や他の血小板減少を伴う疾患群との鑑別が重要となる．また WASP の constitutively active mutation による X 連鎖性好中球減少症（X-linked neutropenia, 以下 XLN と略）も WASP 異常症であることが報告されている．ごく稀に，WAS は女兒にも発症したとの報告がある³⁾．また常染色体性の遺伝形式の症例の報告があるが原因遺伝子は不明である．

遺伝子型/表現型（重症度）の関連性として，リンパ球における WASP 蛋白質の発現の有無が相関し⁴⁾，重症例は WASP 蛋白が発現しておらず，nonsense 変異，frameshift を伴う挿入，欠失，large deletion が多い．XLT を含む軽症例は WASP 蛋白は発現している例が多く，missense 変異，splice 変異例が多い．血小板での WASP 蛋白の発現は全例検出感度以下であり，WASP 異常症のほぼ全例が血小板減少を伴うことと相関する．免疫不全の程度は多様であり，表 1A のようなクラス（重症度）分類が提唱されている．また，WASP 発現パターンからのグループ化の報告があり，これもリンパ球における WASP 蛋白質の発現パターンが基礎になっている⁵⁾（表 1B）．

2. 臨床徴候—症候および検査所見

1) 血小板減少

ほぼ全例で見られ，出生直後から見られることが多く，初発症状の約 8 割を占める．血便，皮下出血

が多いが，頭蓋内出血も 20% と ITP より明らかに高頻度である．サイズの減少を伴い，平均血小板容積は 3.8–5.0fl（正常 7.1–10.5fl）と報告されているが，目視で確認すべきである．

2) 易感染性

上記理由から易感染性の程度は症例により異なる．XLT を除き，古典的 WAS は乳幼児期から中耳炎，肺炎，副鼻腔炎，皮膚感染症，髄膜炎などを反復する．起炎菌としては肺炎球菌やブドウ球菌が多く，真菌感染ではカンジダ，アスペルギルスが，原虫ではカリニ肺炎が少数で見られる．ウイルス感染では，ヘルペス属ウイルス感染症（HSV, VZV, CMV, EBV）が多いのが特徴である．

T 細胞の mitogen への反応性は低下例が 26% で，正常例は 46% である．NK 活性は半数で正常だが，低下例が多いとの報告もある⁶⁾．免疫グロブリンは従来から，IgG 正常，IgM 低下，IgA 上昇，IgE 上昇とされるが，症例や年齢，感染の合併により異なる．抗多糖類抗体，同種血球凝集素価などの特異抗体産生は低下する．補体価は正常とされるが，好中球および単球の遊走能は低下する例が多い．

3) 湿疹

湿疹の原因についてはまだ推測の域を出ないが，T 細胞からのサイトカイン分泌異常やマスト細胞の異常が示唆される．

4) 自己免疫疾患

古典的 WAS の約 40% に見られ，自己免疫性溶血性貧血，血管炎，腎炎（IgA 腎症など），関節炎，

表 1 (A) Wiskott-Aldrich 症候群の重症度分類と (B) WASP 発現レベルからのグループ化 (Shcherbina ら⁵⁾ 1999 より引用一部改変)

A	
クラス 1 (XLT)	血小板減少のみ
クラス 2 (XLT)	血小板減少+軽症一過性の湿疹±軽症感染症
クラス 3 (WAS)	血小板減少+持続性の湿疹 and/or 反復性感染症
クラス 4 (WAS)	血小板減少+持続性難治性湿疹+反復性重症感染症
クラス 5 (WAS)	血小板減少+湿疹 and/or 反復性感染症+自己免疫疾患あるいは悪性腫瘍の合併
B	
Group A	WASP 蛋白発現は末梢血単核球で低発現, EBV-LCLs で高発現. WASP mRNA 発現はほぼ正常. --- WASP はより蛋白分解を受けやすい, WIP 結合領域のミスセンス変異が多い, XLT を含む軽症例が多い.
Group B	WASP 蛋白発現は末梢血単核球, EBV-LCLs 共に低発現. WASP mRNA も蛋白と同程度に低発現. --- 中等症が多い.
Group C	WASP 蛋白発現は T 細胞で陽性, B 細胞や EBV-LCLs では陰性. --- 重症度は多様, B 細胞性リンパ腫の合併が多い.
Group D	WASP 蛋白発現は末梢血単核球, EBV-LCLs 共に陰性. --- 重症例が多い.

炎症性腸疾患の合併が報告されている。興味深いことに, WASP ノックアウトマウスでは CD4 陽性 T 細胞浸潤を伴う腸炎の所見が認められている⁷⁾。

5) 悪性腫瘍

ほとんどが悪性リンパ腫であるが, 脳腫瘍の報告もある。EBV 関連を含む B 細胞性腫瘍が多いのが特徴的である。クラス 3 以上の古典的 WAS での合併率は 13% とされる。

III. 確定診断とその方法

1. WASP 遺伝子異常の同定

臨床徴候の多様性から, 確定診断には WASP 遺伝子異常を同定することが必須である。現在, フローサイトメトリーによる細胞内 WASP 蛋白検出が, 末梢血単核球 (リンパ球, 単球, NK 細胞) に行う方法が確立しており, もっとも迅速であり, スクリーニングとして有用である。当研究室で確立したモノクローナル抗体と方法で⁸⁾, 三菱化学 BCL への委託検査が可能である (図 2)。この方法により, 各血球画分での WASP 発現が確認でき, また経過中の WASP 蛋白発現の推移や reversion の症例の検索にも有用である。Western blot 法による WASP 蛋白発現の検討も有用である。WASP 蛋白発現がないか減少している例に対して末梢血を用いて WASP 遺伝子の変異解析を行う (国内では東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野, 防衛医科大学小児科, 東京医科歯科大学小児科, 北海道大学小

---三菱化学BCLに検査委託可能

図 2 WASP 蛋白質発現のフローサイトメトリー法による迅速診断

児科にて問い合わせ可能)。また保因者診断も技術的にほぼ可能である。

男児の乳児期からの血小板減少症をみた場合, 血小板サイズ, WASP の異常をスクリーニングする必要がある。特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) や他の先天性血小板減少症との鑑別が必要になるが, 逆に治療抵抗性 ITP 症例のなかに WASP 異常症としての XLT が存在する可能性もある。

IV. 治療と長期予後

1. 根治療法および支持療法

根治的治療としては造血幹細胞移植が行われる。WASP 異常症の重症度は様々であるため、どの症例でいつ、どの造血幹細胞で行うかという点が問題になる。WASP 蛋白発現を認めず、感染を繰り返す症例では早期に移植を考慮すべきである。血小板減少が主体で WASP 蛋白発現がある症例でも、重篤な出血、自己免疫疾患、悪性腫瘍、腎炎を合併することがあり、今後の症例蓄積が治療方針決定に重要である⁴⁾。5歳以下の症例は約80%の移植後長期生存率であるが、5歳以上で特に非血縁者間移植は合併症、EBV 関連疾患などにより成功率が低くなる点に留意すべきである⁹⁾。最近は臍帯血移植の成功例も報告されている¹⁰⁾。

血小板減少に対して摘脾が有効である場合が多い。大部分の症例で血小板増加が得られるが、経過とともに減少することもある。古典的 WAS 症例には、感染症のリスクが増加することを考慮しなければならないが、血小板減少を主体とする症例では選択肢となる。γグロブリン大量療法やステロイド剤は通常効果に乏しい⁴⁾。血小板輸血は、重大出血、手術時はやむを得ないが、血小板不応性に至る例もある。重大出血の頻度は ITP と比較し有意に高いと考えられる。

湿疹は治療に難渋するが、一般的なアトピー性皮膚炎治療に準じた治療を行い、食物アレルギーが明らかであれば除去食を考慮する。筆者らは FK506 軟膏が対症的に有効であった症例も経験している。

感染対策としては前述の如く化膿菌、ヘルペス属ウイルス群、真菌が多いため、通常の免疫不全症、日和見宿主に準じ、ST 合剤、抗真菌剤、抗ウイルス剤投与を考慮する。γグロブリンの定期的補充は通常必要ないが、IgG<500 mg/dl の例や重症感染時には考慮する。ヘルペス属ウイルス感染症のリスクが高いため、EBV と CMV のモニタリングも重要である。

2. 長期予後

免疫不全合併例の平均長期生存年齢は11歳とされる。感染症、出血、悪性腫瘍が主な死因であり、10歳までの死因のほとんどは感染症と出血である。XLT での平均生存年数は14年、最高齢は61歳であった⁴⁾。しかし XLT でも重篤出血、IgA 腎症か

らの腎不全、悪性腫瘍の合併が含まれ、予後予測には更なる症例蓄積が必要である。

3. 遺伝子治療の最近の基礎的知見

近年、WASP ノックアウトマウスを用いた遺伝子治療の基礎研究、患者末梢血 T 細胞への WASP 遺伝子導入などが報告されている。WASP ノックアウトマウス造血幹細胞にレトロウイルスベクターにて正常 WASP を導入し、マウス表現形の改善を得た報告がある¹¹⁾。また、患者末梢血 T 細胞にレトロウイルスベクターにて、また最近ではレンチウイルスベクターを用いて WASP 遺伝子を導入し、T 細胞機能の改善を得たとの報告が出ている¹²⁾。しかし、遺伝子治療によって血小板数の回復が達成できるかは臨床的に重要であるものの未だ報告がなく、今後技術的にも細心の工夫が必要かもしれない。年長児症例で血小板減少のみで経過し、移植を施行していない場合があり、以降の悪性腫瘍や他の合併症のリスクが高いことを考慮すると重要な点と思われる。年長児の造血幹細胞移植の成績が劣る現状の中で、近い将来に遺伝子治療が治療法の選択肢になりうることを期待する。

V. 分子病態に関する最近の知見

免疫担当細胞において受容体型シグナル伝達系の刺激により supramolecular activation clusters (SMACs) が形成され、細胞骨格系が変化し、最終的に免疫機能を発揮する過程において WASP は関わっていると考えられる。特に T 細胞受容体 (TCR) シグナル伝達系刺激後のアクチン重合化やサイトカイン分泌に重要な役割を果たしている。現在まで WASP の機能や結合蛋白質に関して数多くの報告がなされており²⁾、その中の WIP (WASP-interacting protein) は我々の共同研究者によりクローニングされた WASP 結合蛋白質である¹³⁾。

図3に、WASP, WIP の1次構造とその結合分子群、図4に TCR 活性化後の WASP-WIP 複合体の3次構造の変化と結合分子群との関係について図示した。機能的に重要なものとして、WASP の C 末に結合する Arp2/3 複合体はアクチン重合化の始点となる。他に、プロリンリッチ (Pro-rich) 領域と結合する SH3 ドメインを有する蛋白質群 (Nck など) は後述の WASP のリクルートと活性化に関与する。G 蛋白質結合領域 (GBD) と結合する Cdc42 は WASP 蛋白質の3次構造を autoinhibitory

図3 WASP, WIP の1次構造と結合蛋白質群

図4 活性化シグナル下での WASP の3次構造の変化と結合蛋白質との相互作用

から active form へ変換して活性化に導き¹⁴⁾, また, N 末の WH1 領域と結合する WIP はリクルート機構に関与すると共に, Cdc42 による WASP 活性化を負に調節することが知られている. WAS 患者の T 細胞にて, TCR 刺激後のアクチン重合化と IL-2 産生は有意に低下しており, 同様の結果が WASP 及び WIP ノックアウトマウス^{7,15)} にも報告されており, WASP-WIP 複合体は TCR と細胞骨格系, T 細胞活性化をつなぐ重要な分子と言える.

Immunological synapse (免疫シナプス) は, T 細胞-抗原提示細胞間または NK 細胞-標的細胞間において, SMACs とよばれる分子群及びアクチン細胞骨格系により構成される免疫担当細胞間相互作用の構造的, 機能的な概念であり, 近年多くの研究結果が報告されている¹⁶⁾. Lipid rafts clustering が免疫シナプス形成に必要であり, TCR, co-stimulatory

ry および integrin が免疫シナプス形成に重要なシグナル伝達系であり, 細胞骨格系は免疫シナプスの構造と機能の維持に不可欠である. 図 5 に WASP と F-actin の免疫シナプスでの共局在と, WASP の免疫シナプスへのリクルートとその後の活性化のモデル図を示す^{17,18)}. TCR 上流の分子群や WIP, SH3 ドメインをもつアダプター分子を介して, WASP は T 細胞-抗原提示細胞間の免疫シナプスへリクルートされるが, 総じてその機構は, いくつかの redundancy をもって制御されていると考えられる. その後, WASP のリクルートとは異なるメカニズム, つまり Cdc42, SH3 ドメインや WIP リン酸化などを介して活性化され, Arp2/3 複合体からのアクチン重合化を制御することが明らかになった. 最近筆者と共同研究者は, WASP 活性化後の, WASP 蛋白分解のメカニズムを解明し, なぜ

図5 (A) WASP と F-actin の免疫シナプスへの共局在と (B) その分子機構のモデル図 (Sasahara ら¹⁷⁾ 2002 より引用一部改変)

WASP ミスセンス変異が WIP 結合領域に集中しているかを説明する論拠を得、現在投稿中である。

WAS の病態は現在まで単一の細胞の lineage で論じられてきたように思われる。しかし、個体 (in vivo) では感染後などにおいて免疫細胞間相互作用は極めて重要であり、免疫シナプスの概念は、WAS における抗原提示後の T 細胞機能不全をより具体的に理解する手がかりになった。また NK 細胞機能不全と NK 細胞-標的細胞間シナプスでの WASP の局在⁶⁾は、WAS 患者で重症ヘルペスウイルス (特に EB ウイルス感染症) や EB ウイルス関連悪性リンパ腫の合併頻度が有意に高いことを説明する上でも興味深い。また、マクロファージの食細胞機能は低下しており、免疫担当細胞の走化因子やケモカインに対する遊走能が低下している。これは Cdc42-WASP による細胞骨格系の変化に異常があるためと考えられる。

血小板においては、血小板刺激後のアクチン細胞骨格系制御の異常がサイズ低下と関連していると推測されるが、詳細は未だ明らかでない。血小板減少については、血小板産生の異常の報告があると共に、患者で脾摘が有効であるという点から、血小板破壊の亢進は十分に考えられる。Phosphatidylserine および protease である calpain の関与も示され

ている。

VI. おわりに

WASP 遺伝子の発見¹⁾以来 10 年の間に多くの知見が集積されてきており、この稿で全てを網羅できないが、多様な免疫不全の病態を示す WAS にはまだ未解決な点も多い。最近、WASP 遺伝子変異、特にミスセンス変異が WIP 結合領域に集中しており、変異により WASP-WIP 複合体が解離していることが示された¹⁹⁾。これをもとに WAS の遺伝子型/表現型をつなぐ研究の試みが進行中である。また、WASP および WIP ノックアウトマウス^{7,15)}の表現型が類似していることから、WAS の臨床経過があるにもかかわらず WASP 遺伝子変異が同定できない症例を対象に常染色体性 WAS としての WIP 欠損症のスクリーニングが筆者らにより進行中であり (表 2)、対象症例があれば御一報頂ければ幸いである。

本稿は東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野研究員一同、Division of Immunology, Children's Hospital Boston and Department of Pediatrics, Harvard Medical School, Dr. Raif S. Geha, Dr. Narayanaswamy Ramesh らの御協力、御指導によ

表2 WIP 欠損症のスクリーニングとその対象症例

スクリーニングの根拠として, 1. WASP と WIP ノックアウトマウスの表現形が類似している点. 2. WIP は WASP と複合体を形成しており, WIP は WASP 蛋白質の安定性に重要な役割を果たしている点. 3. WIP 遺伝子はヒトでは常染色体上にコードされている点. ↓ 男児, 女児を含めて, --- WAS 様の臨床所見が認められるが, --- WASP 遺伝子変異が同定できない, --- WASP 蛋白質の発現が有意に低下している, 症例を対象に, WIP 欠損症としてのスクリーニングを施行中. 常染色体性-または Type 2-WAS ?
--

るものであり, 改めて感謝致します.

文 献

- 1) Derry J. M. J, Ochs H. D, Francke U. : Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* **78** : 635-644, 1994.
- 2) Thrasher A. D. : WASP in immune-system organization and function. *Nature Rev.* **2** : 635-646, 2002.
- 3) Lutskiy M. I., Sasahara Y., Remold-O'Donnell E. : Wiskott-Aldrich syndrome in a female. *Blood* **100** : 2763-2768, 2002.
- 4) Imai K., Morio T., Nonoyama S., et al. : Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood* **103** : 456-464, 2004.
- 5) Shcherbina A, Rosen F. S., Remold-O'Donnell E. : WASP levels in platelets and lymphocytes of Wiskott-Aldrich syndrome protein correlate with cell dysfunction. *J. Immunol.* **163** : 6314-6320, 1999.
- 6) Orange J. S., Sasahara Y., Strominger J. L., et al. : Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunological synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** : 11351-11356, 2002.
- 7) Snapper S. B., Rosen F. S., Alt F. W., et al. : Wiskott-Aldrich syndrome protein—deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity* **9** : 81-91, 1998.
- 8) Kawai S., Sasahara Y., Tsuchiya S., et al. : Flow cytometric demonstration of intracytoplasmic Wiskott-Aldrich syndrome protein in peripheral lymphocyte subpopulations. *J. Immunol. Methods* **260** : 195-205, 2002.
- 9) Ozsahin H., le Deist F., Fischer A., et al. : Bone marrow transplantation in 26 patients with Wiskott-Aldrich syndrome from a single center. *J. Pediatr.* **129** : 238-244, 1996.
- 10) Knust A. P., Steffen M., Wall D. A., et al. : Umbilical cord blood transplantation in Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Pediatr.* **142** : 519-523, 2003.
- 11) Klein C., Nguyen D., Snapper S. B., et al. : Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome: rescue of T-cell signaling and amelioration of colitis upon transplantation of retrovirally transduced hematopoietic stem cells in mice. *Blood* **101** : 2159-2166, 2003.
- 12) Dupré L., Trifari S., Roncarolo M., et al. : Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients leads to functional correction. *Mol. Therapy* **10** : 903-915, 2004.
- 13) Ramesh N., Anton I. M., Geha R. S., et al. : WIP, a protein associated with Wiskott-Aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** : 14671-14676, 1997.
- 14) Kim A. S., Kakalis L. T., Rosen M. K., et al. : Autoinhibition And activation mechanisms of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* **404** : 151-158, 2000.
- 15) Anton I. M., de la Fuente M., Geha R. S., et al. : WIP deficiency reveals a differential role for WIP and the actin cytoskeleton in T and B cell activation. *Immunity* **16** : 193-204, 2002.
- 16) Bromley S. K., Burack W. R., Dustin M. L., et al. : The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* **19** : 375-396, 2001.
- 17) Sasahara Y., Rachid R., Geha R. S., et al. : Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of activation following TCR ligation. *Mol. Cell* **10** : 1269-1281,

- 2002.
- 18) Cannon J. L., Labno C. M., Burkhardt J. K., et al. : WASP recruitment to T cell : APC contact site occurs independently of Cdc42 activation. *Immunity* **15** : 249–259, 2001.
- 19) Volkman B. K., Prehoda K. E., Lim W. A., et al. : Structure of the N-WASP EVH1 domain-WIP complex : insight into the molecular basis of Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* **111** : 565–576, 2002.