

学位論文
Doctor's Thesis

インターロイキン 12 受容体 β 1 鎖欠損による非定型抗酸菌感受性亢進
(Susceptibility to atypical mycobacterium is increased due to missense
mutation of the interleukin-12 receptor β 1 chain-encoding gene)

榮 達智

Tatsunori Sakai

指導教官

満屋 裕明 教授

熊本大学大学院医学研究科

脳免疫統合科学系免疫病態学講座

2002 年 3 月

学位論文

Doctor's Thesis

論文名：インターロイキン 12 受容体 β 1 鎖欠損による
非定型抗酸菌感受性亢進
Susceptibility to atypical mycobacterium is
increased due to missense mutation of the
interleukin-12 receptor β 1 chain-encoding
gene

著者名： 榮 達智 Tatsunori Sakai

指導教官名：脳免疫統合科学系

免疫病態学講座教授 満屋 裕明

審査委員名：免疫識別学講座担当教授 西村 泰治

病理学第二講座担当教授 竹屋 元裕

腫瘍医学講座担当教授 佐谷 秀行

小児科学講座担当教授 遠藤 文夫

2002 年 3 月

目次

| | page |
|--|------|
| 1) 要旨 | 4 |
| 2) 発表論文リスト | 6 |
| 3) 謝辞 | 8 |
| 4) 略語一覧 | 9 |
| 5) 研究の背景と目的 | |
| 5)-1 はじめに | 10 |
| 5)-2 播種性抗酸菌感染症の原因 | 10 |
| 5)-3 抗酸菌感染症と遺伝的背景 | 12 |
| 5)-4 動物実験に見る抗酸菌感受性 | 12 |
| 5)-5 サイトカインによる抗酸菌制御 | 13 |
| 5)-6 本研究の目的 | 15 |
| 6) 実験方法 | |
| 6)-1 患者 | 16 |
| 6)-2 実験に使用した細胞及び細胞株 | 16 |
| 6)-3 細胞膜表面受容体蛋白発現の解析 | 16 |
| 6)-4 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) | 17 |
| 6)-5 IL-12R β 1 鎖及び β 2 鎖の塩基配列決定 | 18 |
| 6)-6 IL-12R β 1 遺伝子導入実験 | 19 |
| 6)-7 ノーザン法 | 19 |
| 6)-8 ウェスタン法 | 19 |
| 6)-9 免疫染色法 | 20 |
| 6)-10 統計処理 | 20 |
| 7) 実験結果 | |
| 7)-1 患者 PHA 刺激末梢血単核細胞の IFN γ | |

| | | |
|------|--|----|
| | 産生低下 | 21 |
| 7)-2 | 患者 PHA 刺激末梢血単核細胞膜表面の IL-12R β 1 鎖発現の欠如 | 21 |
| 7)-3 | IL-12R β 1 遺伝子変異の検出と家系調査 | 22 |
| 7)-4 | IL-12R β 1 遺伝子導入実験 | 23 |
| 7)-5 | IL-12R β 1 遺伝子 mRNA レベルの発現 | 23 |
| 7)-6 | IL-12R β 1 鎖蛋白の検出 | 24 |
| 7)-7 | IL-12R β 1 遺伝子多型の同定 | 25 |
| 8) | 考察 | |
| 8)-1 | IL-12R からのシグナル伝達 | 27 |
| 8)-2 | IL-12R 欠損の Th1/Th2 分化に対する影響 | 28 |
| 8)-3 | これまでの報告症例 | 29 |
| 8)-4 | IL-12R β 1 鎖欠損症の臨床像と近縁疾患 | 29 |
| 8)-5 | 701C>T 点変異の生じた機序と R213W 変異 の IL-12R β 1 鎖蛋白への影響 | 30 |
| 8)-6 | residual IFN γ の由来 | 31 |
| 8)-7 | IL-12R β 1 遺伝子多型と抗酸菌感受性 | 32 |
| 8)-8 | 治療に関する考察 | 32 |
| 9) | 結語 | 33 |
| 10) | 図表とその説明 | 34 |
| 11) | 参考文献 | 49 |

1) 要旨

【背景・目的】免疫機構に対する分子生物学的解析が進み、従来、原因不明であった免疫不全症の病因が分子レベルで解明されてきた。細胞内寄生性細菌に対する感染防御機構では、ノックアウトマウスを中心とした動物実験で IL-12/IFN γ 制御系の重要性が明らかになってきた。抗酸菌感受性には遺伝的背景の関与が考えられており、本研究では、この制御系におけるキーコンポーネントの一つである IL-12R β 1 鎖の遺伝子多型が抗酸菌感受性に及ぼす影響を検討した。また元来、弱毒性である非定型抗酸菌の全身播種は細胞内寄生性細菌に対する免疫応答異常のメルクマールとして注目されている。そこで、我々の経験した全身播種性非定型抗酸菌症患者における IL-12/IFN γ 制御系の異常の有無を調べた。

【方法】1. 健常人、結核症患者、非定型抗酸菌症患者の IL-12R β 1 鎖 cDNA 配列を検討し、遺伝子多型の有無並びに、その多型の抗酸菌感受性への影響を調べた。2. 全身播種性非定型抗酸菌症患者の末梢血単核細胞 (PBMC) を採取し、PHA 刺激し、培養上清中のサイトカイン測定、PHA-PBMC 細胞表面の IL-12R β 1 鎖、IFN γ R1 鎖の発現を検討した。IL-12R β 1 鎖については塩基配列の決定、変異型と野生型の遺伝子の導入実験を行い、さらに mRNA レベルと蛋白レベルの発現をそれぞれノーザン法、ウエスタン法で確認した。

【結果】IL-12R β 1 鎖 cDNA 上に 6 個の遺伝子多型を同定し、この多型の抗酸菌感受性に与える影響を調べたが、健常人、結核症患者、非定型抗酸菌症患者各群間で統計上、有意差はなかった。解析した播種性非定型抗酸菌感染症 1 例では PHA-PBMC 培養上清中の IFN γ 産生低下が見られ (健常人コントロール 833 ± 289 pg/ml、患者 40.7 pg/ml)、IL-12/IFN γ 制御系の各因子の発現を検討したところ、上流に位置するサイトカイン IL-12 の受容体 β 1 鎖が発現していないことが確認された。本患者では IL-12R β 1 遺伝子の 701 番目のシトシンがチミンに変異しており、アルギニンからトリプトファンへのアミノ酸

置換を伴うミスセンス変異であった。遺伝子導入実験の結果、この変異型クローン導入細胞では mRNA レベルの発現はあるが、蛋白発現は認められなかった。

【考察】 同定した IL-12R β 1 鎖の遺伝子多型は三群間で有意な集積性は認められず、抗酸菌感受性に影響しないことが示唆された。また、播種性非定型抗酸菌症患者の解析から、IL-12R β 1 鎖遺伝子のミスセンス変異により、mRNA レベルでは発現があるものの、蛋白レベルでは発現がなく、 β 1 鎖と β 2 鎖の 2 つのコンポーネントからなる高親和性 IL-12 受容体が欠損していることが明らかとなった。このため T 細胞由来の IFN γ の産生が著しく低下しマクロファージの活性化が障害されるため、抗酸菌をはじめとした細胞内寄生性細菌感受性が亢進し免疫不全となっていると考えられる。今回同定した変異は、I 型サイトカインレセプターの保存された配列 (WSXWS motif) と関連する RXR motif の部分にあり、蛋白の folding の際不安定となり早期に分解されるものと考えられた。

2) 発表論文リスト

学位論文の参考となる発表論文

1. Tatsunori Sakai, Masao Matsuoka, Manabu Aoki, Kisato Nosaka, and Hiroaki Mitsuya

Missense mutation of the interleukin-12 receptor β 1 chain-encoding gene is associated with impaired immunity against *Mycobacterium avium complex* infection.

Blood 97: 2688–2694, 2001

過去の論文リスト

1. Kisato Nosaka, Michiyuki Maeda, Sadahiro Tamiya, Tatsunori Sakai, Hiroaki Mitsuya, and Masao Matsuoka

Increasing Methylation of the *CDKN2A* Gene Is Associated with the Progression of Adult T-Cell Leukemia.

Cancer Res 60: 1043–1048, 2000

2. Jun-ichirou Yasunaga, Tatsunori Sakai, Kisato Nosaka, Ken-ichiro Etoh, Sadahiro Tamiya, Shin Koga, Shuji Mita, Makoto Uchino, Hiroaki Mitsuya, and Masao Matsuoka

Impaired production of naive T lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals: its implications in the immunodeficient state.

Blood 97: 3177–3183, 2001

3. Kisato Nosaka, Takeshi Miyamoto, Tatsunori Sakai, Hiroaki Mitsuya, Toshio Suda, and Masao Matsuoka

Mechanism of hypercalcemia in adult T-cell leukemia:

Overexpression of RANK ligand on adult T-cell leukemia cells.

Blood 99: 634-40, 2002

4. 榮達智, 松岡雅雄. IL-12 受容体 β 1 鎖欠損症

Annual Review 免疫 2001 (矢田純一, 奥村康, 佐藤昇志編), pp. 350-

357, 中外医学社, 2000

3) 謝辞

本研究において、ご指導いただきました、熊本大学医学部内科学第二講座（免疫病態学）教授、満屋裕明先生、京都大学ウイルス研究所教授、松岡雅雄先生、貴重な御助言をいただきました熊本大学医学部小児科学（現宮崎医科大学小児科学教授）、布井博幸先生、熊本大学医学部内科学第二講座（現米国国立癌研究所研究員）、田宮貞広先生、さらに共同研究者の野坂生郷先生、青木学先生に厚く深謝いたします。

4) 略語一覽

AIDS : aquired immunodeficiency syndrome

BCG : *bacille Calmette Guérin*

CD4 : cluster of differentiation 4

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

FITC : fluorescein isothiocyanate

γ c: common γ chain

HIV-I : human immunodeficiency virus type I

HTLV-I : human T cell leukemia virus type I

IL-2, 12 : interleukin-2, 12

IL-12R : interleukin-12 receptor

IFN : interferon

Jak2: Janus kinase 2

MAC : *Mycobacterium avium complex*

mRNA : messenger RNA

NK cell: natural killer cell

Nramp1: natural resistance-associated macrophage protein 1

PBMC: peripheral blood mononuclear cell

PCR : polymerase chain reaction

PHA : phytohemagglutinin

PHA-PBMC: PHA-stimulated PBMC

RT-PCR : reverse transcription coupled with polymerase chain reaction

SCID: severe combined immunodeficiency

STAT: signal transducers and activators of transcription

Th1/ Th2 : type I helper T cell/ type II helper T cell

Tyk2: protein tyrosine kinase 2

5) 研究の背景と目的

5)-1 はじめに

血液免疫疾患研究は臨床と実験室レベルでの研究の密接な連携の上に大きな発展を遂げてきた。実際に、ベッドサイドから得られた臨床的、重要な知見は分子免疫学の発展、理解に大きく寄与しているし、逆に、基礎研究、動物実験で得られたノックアウトマウスでの病態解析は、ヒトにおける同様の所見を呈する患者の原因分子特定の大きな手がかりとなっており、免疫における臨床研究と基礎研究は、相互に触発されつつ、まさにダイナミックな発展を遂げつつある。

臨床側に目を向けてみると、現在では数種類のサイトカインが、治療薬として応用されており、このことも、免疫学の発展なしにはなしえなかったことである。さらに近年、免疫機構に対する分子生物学的解析が急速に進み、従来は原因不明であった免疫不全症の病因が分子レベルで語られるようになった。元来、弱毒性と考えられている *bacille Calmette-Guérin* (BCG) や *Mycobacterium avium complex* (MAC) などの抗酸菌の非典型的な全身播種は、細胞内寄生性細菌に対する免疫応答異常のメルクマールとして注目され、積極的な分子病態の解析が行われている。一方、これら抗酸菌感受性の研究の着実な進歩とは対照的に、この数年、日本国内で見られた再興感染症の最たる例は、結核症の再増加である。社会の認知度が上がり、幸いにも減少傾向に転じているが、多剤耐性結核菌の出現など危惧すべき要因も依然として存在する。本研究がサイトカインの併用療法のような新しいストラテジーの開発など、抗酸菌感染症治療の新たな展開に役立つよう願ってやまない。

5)-2 播種性抗酸菌感染症の原因

最初に非結核性抗酸菌の全身播種を報告したのは、1907年の Koch と Rabinowitsch と言われている。1940年代に結核菌と非定型抗酸菌の鑑別法が確立してから、National Jewish Hospital and Research Center で経験した13例、さらに個々の症例の報告が20例以上と、多くの非典型的な播種性非定型抗酸菌症が報告されている(1)。

1980年代に入り、目立ってきたのは後天性免疫不全症候群 acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) 患者における非定型抗酸菌症である(2)。この疾患は、非加熱血液製剤、性交渉及び薬物の濫用に伴い後天的に感染したウイルス Human immunodeficiency virus type-I (HIV-I) により生じ、病期の進行に伴って CD4 陽性 T 細胞絶対数の著しい減少をきたし、細胞性免疫応答の破綻を見る。

他にも、免疫機能低下による易感染状態を引き起こす誘因として、ステロイド療法中、悪性腫瘍に対する化学療法後状態、血液疾患、糖尿病、全身性ループスエリテマトーシスなどがあり、実際、これらの疾患を原因とする播種性非定型抗酸菌感染症の報告が存在する(1)。しかし、これらの基礎疾患を持たない患者が、免疫機能の未熟さが要因の一つと考えられるような3歳未満の幼児のみならず、成人例においても確認された(1)。この論文でも指摘していたように、当時は認知されていない一群の細胞性免疫の低下を伴う症候群を基礎に有している可能性が考えられており、その分子機構の解明が待たれていた。

疾患単位としては確立していても、近年になって初めて責任遺伝子が同定された Ataxia telangiectasia (3) や Nijmegen breakage syndrome (4, 5) などの免疫疾患の例もあるように、遺伝的な原因による疾患の解析は、最近の分子生物学的手法の発展によるところが大きい。数年前から、これら細胞性機能の特異的低下をきたす患者の遺伝子解析が始まっている。

5)-3 抗酸菌感染症と遺伝的背景

結核菌を含めた抗酸菌感染と病気の進展には、社会的要因（栄養状態や衛生面）が関与しているのは疑う余地もなく、長年、これらの感染症流行の大きな要因として信じられてきた。しかし、マウスの抗酸菌感受性に影響する因子として Bcg 遺伝子が想定され (6)、さらにその遺伝子 Bcg/Nramp が 1 番染色体上にクローニングされるに至り、遺伝的な要因が証明される形となった (7-9)。このヒトホモログが 2 番染色体長腕に存在する事や (7、10)、あるいは人種による結核症の発症ならびに臨床経過に差があるように (11)、ヒトにおいても感受性が遺伝的な要因で決定されていると考えられている。

5)-4 動物実験に見る抗酸菌感受性

1990 年代を中心に、抗酸菌感受性を示す実験動物モデルの解析が行われた。その多くは遺伝子欠損マウスである。

まず、1993 年に、Interferon- γ (IFN γ) 欠損マウス (12)、IFN γ -receptor 欠損マウス (13) で、マクロファージ活性化の欠如、nitric oxide などの抗菌物質の産生低下、major histocompatibility complex (MHC) class II antigen の発現低下が報告され、これらのマウスは抗酸菌感受性であることが証明された。

マウスの系統の違いによる感受性の差も検討され、DBA/2 マウスでは抗酸菌抵抗性であるが、BALB/c マウスでは感受性であることが示された (6)。さらに、この 2 系統のマウスに BCG を接種し、リンパ節での肉芽腫形成とその経過を追った実験があるが、DBA/2 では数も少なく小さいが、BALB/c では多くの大きな肉芽腫が形成された。BALB/c マウスにおいては DBA/2 マウスに比べ IL-12 p40 サブユニットの mRNA レベルでの発現低下があり、これ

が抗酸菌感受性の差につながることを示唆された (14)。後に、IL-12 p40 遺伝子を欠損したマウスが作成され (15)、IL-12 p40 が欠損すると、IFN γ 産生は完全欠損ではないが、80%以上低下することが示された。そして、わずかに残存する IFN γ の分泌は NK cell に依存しないことも示された。同様に、IL-12 p35 遺伝子欠損マウスでも、IFN γ 産生低下が報告された (16)。

IL-12R に関しては、1995 年 Chua らがマウスの IL-12R β 鎖 (現在の β 1鎖) をクローニングし (17)、その後、欠損マウスも作成された (18)。IL-12R β 1鎖欠損マウスでは低親和性の IL-12R しか形成されず、IL-12 刺激に対する脾細胞の増殖、IFN γ 産生、NK 細胞の細胞傷害活性の低下が示された。

さらに、IL-12 と IL-12R が結合した後 JAK 系キナーゼの活性化を介して STAT4 がリン酸化され、二量体化して核内に移行し遺伝子の転写活性化などの機能を発揮するが、この STAT4 に関しても欠損マウスが作成されている (19, 20)。このマウスモデルでは、IL-12 が有する生理活性が失われ、また、Th2 細胞機能の相対的な増強が証明された。これらの報告では、抗酸菌感受性についての考察はなされていないが、IL-12 の活性が失われることにより抗酸菌感染に高感受性であることが推定できる。

以上のような報告が 1993 年から 1998 年にかけて次々となされ、動物実験レベルにおいては IL-12/IFN γ 系の各分子の発見、機能解析、シグナル伝達経路についての知見が着々と明らかになっている。

5)-5 サイトカインによる抗酸菌制御：IL-12 と IFN γ (図 1)

IL-12 (p70) は、p35 と p40 の 2 つのサブユニットからなるヘテロ二量体の蛋白である (21)。p35 は IL-6 や好中球コロニー刺激因子 (G-CSF) と相同性を持ち、p40 は IL-6 レセプターの α サブユニットと相同性を持っている (22)。IL-12 は主に活性化単球や B 細胞によって産生され (21)、マイトージェンあ

るいは抗原刺激による T 細胞増殖の誘導、T 細胞や NK 細胞の細胞傷害活性の増強を含め、多くの免疫制御活性を担っている。特に IL-12 はヘルパー T 細胞サブセット (Th1/Th2) のバランスの制御を行い、Th0 細胞から Th1 細胞への分化を誘導する。

ヒト IL-12R は 1994 年 Chua らによって発現クローニング法で同定された (23)。後に 2 つの β 型サイトカインレセプターサブユニットからなることが証明され、それぞれ IL-12R β 1 及び IL-12R β 2 と命名された (24)。

IL-12R β 1 鎖は約 100kD の I 型膜貫通蛋白であり、662 アミノ酸からなる。91 アミノ酸の短い細胞内領域に Box1、Box2 サイトカインレセプターモチーフを持つが、リン酸化されうるチロシン残基は存在しない (23)。PHA 刺激 T 細胞上には少なくとも、低親和性 ($K_d=2\sim 6\text{nM}$)、中親和性 ($K_d=50\sim 200\text{nM}$)、高親和性 ($K_d=5\sim 20\text{pM}$) の 3 種類の受容体が存在しているが (23)、IL-12R β 1 鎖のみを COS 細胞に強制発現させた場合、低親和性の結合しか生じない。しかし、後に述べる IL-12R β 2 と共発現すると、pM オーダーの高親和性の結合が生じる。発現の制御に関しては、抗 CD3 モノクローナル抗体で刺激した末梢血単核細胞を用いた実験系において、IL-2、IL-7、及び IL-15 は β 1 鎖の発現を誘導し、IL-4、IL-10、TGF- β で発現が低下すると報告されている (25)。

IL-12R β 2 サブユニットは約 130kD の I 型膜貫通糖蛋白であり、862 アミノ酸からなる。そして、216 アミノ酸からなる長い細胞内領域に 3 個のチロシン残基を持ち、シグナル伝達の役割を担うと考えられている (24)。さらに、 β 1 鎖は Th1 と Th2 とともに発現されているのに対して、 β 2 鎖は Th1 分化細胞にのみ発現されている (26、27)。よって、Th1/Th2 バランスにおける鍵となる分子であることが示唆されている。

IFN γ は、Th1 細胞や NK 細胞から産生され、マクロファージや NK 細胞の活性化あるいは Th1 細胞上の IL-12R β 2 鎖の発現増加やマクロファージからの IL-12 分泌亢進を通じて Th1 細胞を誘導する。

5)-6 本研究の目的

以上のように、動物実験により抗酸菌に対する防御機構がかなり明らかになりヒトにおいても抗酸菌感染症における遺伝的な要因の関与が示唆されている。特に非典型的な重篤化の経過をたどる患者においては、何らかの遺伝学的な異常を有していることが想定されており、その解析を行うことにより、今まで原因不明とされてきた抗酸菌に対する特異的な免疫不全症候群の再分類を行うとともに、分子機構と免疫不全状態の成立との関連について明らかにすることを目的とする。

6) 実験方法

6)-1 患者

31歳男性、持続する全身性リンパ節腫脹（図2）を主訴とする播種性非定型抗酸菌（*M. avium complex*）感染症患者。診断は、腫脹リンパ節生検検体及び胃液の培養により確定した。抗 HIV 抗体は陰性であった。また、antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 活性、NK 細胞活性は正常レベルであった。

6)-2 実験に使用した細胞及び細胞株

上記患者及び健常人から、抗凝固剤としてヘパリンを使用して末梢血液を採取、密度勾配遠心法で末梢血単核細胞を分離した。さらに、PHA 5 µg/ml を添加した培養液（RPMI 1640 に 10%の牛胎児血清を混入）中で3日間培養し、PHA 刺激末梢血単核細胞（PHA-PBMC）を得た。

また、患者 PHA-PBMC と、細胞死を誘導できる線量である 120 Gy の X 線照射を行った Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) 産生性細胞株 MT-2 を共培養し、患者由来の T 細胞株 TS-1 を樹立し実験に用いた (28)。なお、この細胞株はインターロイキン-2 (IL-2) 依存性であり、培養液 1ml 当たり IL-2 100 単位を培養液中に添加し継代を行った。

他、後述する遺伝子導入実験のために、ヒト胎児腎細胞由来の細胞株 HEK293 細胞を使用した。

6)-3 細胞膜表面受容体蛋白発現の解析

細胞表面の IL-12R β 1 鎖及び IFN γ R1 鎖の発現は、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。検体細胞 1x10⁶ 個を抗 IL-12R β 1 モノクローナル抗体 (TOS clone) 1 μ g あるいは抗 IFN γ R1 抗体と一次抗体反応を行い、引き続き、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス IgG 抗体で二次抗体反応を行った。フローサイトメトリー解析は XL-MCL (Beckman Coulter) を使用した。

6)-4 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

TRIZOL (Gibco BRL) を用いて total RNA を抽出し、さらに、Superscript Preamplification System II (Life Technologies)を用いて、cDNA を合成した。この際プライマーとして oligo dT を用いた。その後、表 1 (上段) に示したプライマーで PCR を施行した。以下に、その条件を示す。

反応液組成

1x PCR buffer
1.5 mM MgCl₂
0.2 μ M each primer
0.1 mM each dNTP
2U LA Taq polymerase
3 μ l reverse transcriptase reaction mixture

反応条件

95° C 3 min. 1 cycle
95° C 60 sec.
64° C 60 sec.

72° C 120 sec. 35 cycles

72° C 4 min. 1 cycle

なお、増幅特異性を上げるためホットスタート法を用い、PCR 反応は Robocycler Gradient 40 (Stratagene)を使用した。

caucasian genome の PCR は以下の条件で行った。

反応液組成

1x PCR buffer

1.5 mM MgCl₂

0.2 μM each primer

0.1 mM each dNTP

2U Taq polymerase

200ng genomic DNA

反応条件

94° C 3 min. 1 cycle

94° C 20 sec.

55° C 20 sec.

72° C 20 sec. 35 cycles

72° C 4 min. 1 cycle

6)-5 IL-12Rβ1 鎖及びβ2 鎖の塩基配列決定

RT-PCR 産物を鋳型として、蛍光標識を併用したダイデオキシ法で伸長反応を行い、オートシーケンサーを使用して蛍光を検出し塩基配列を決定した。

その際使用したプライマーを表 1（下段）に示す。

6)-6 IL-12R β 1 遺伝子導入実験

HEK293 細胞に、健常人由来の IL-12R β 1_{wt}、あるいは患者由来の IL-12R β 1_{R213W}、を組み込んだ発現ベクター pCEP4 (Invitrogen) を Superfect transfect reagent (Qiagen) を用いてトランスフェクトした。培地は DMEM (10%の牛胎児血清を混入) を使用し、hygromycin B で selection を行った。コントロールとしては、pCEP4 ベクターのみをトランスフェクトした HEK293 を作成した。

6)-7 ノーザン法

IL-12R β 1 鎖の転写産物の発現はノーザン法で検討した。各細胞株、PHA-PBMC から total RNA を抽出し、それぞれ 10 μ g を 1.2%のアガロース-ホルムアルデヒドゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレンにトランスファーした。その後、 $[^{32}\text{P}]$ -dCTP で標識した全長の IL-12R β 1 鎖 cDNA プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、 -70°C で X線フィルムに暴露し、現像することで検出した。

6)-8 ウェスタン法

各細胞を RIPA buffer で溶解し、沈殿物を遠心除去する事で、細胞溶解抽出液を得た。この検体を SDS-7.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、メンブレンにトランスファーした。5%スキムミルクを含む Tris-buffered saline (TBS) でブロッキングを行った後、抗 IL-12R β 1 ポリクローナル抗体

(Genzyme/Tecne : 細胞外ドメインを認識、あるいは Santa Cruz Biotechnology : C 末端を認識) で一次抗体反応を行い、洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗免疫グロブリン抗体で二次抗体反応を行った。検出には ECL-plus (Amersham Pharmacia Biotech)を使用した。

6)-9 免疫染色法

野生型あるいは変異型 IL-12R β 1 鎖遺伝子導入した HEK293 細胞での IL-12R β 1 鎖発現及び細胞での局在を見るため、免疫染色を施行した。スライドガラス上で細胞を培養した後、95%エタノールで5分間固定し、乾燥後-20°C で保存した。常温に戻した後、1:10 抗 IL-12R β 1 ポリクローナル抗体 (Genzyme/Tecne) で30分間一次抗体反応、洗浄後、FITC 標識抗ヤギ免疫グロブリン抗体で30分間二次抗体反応を行い乾燥し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

6)-10 統計処理

6)-5 で観察された IL-12R β 1 鎖 cDNA 上の遺伝子多型が、抗酸菌感染症に関係するかを調べるため、Fisher's exact probability test を行った。

7) 実験結果

7)-1 患者 PHA 刺激末梢血単核細胞の IFN γ 産生低下

患者リンパ節標本において (図 2)、組織球系細胞胞体内に無数の抗酸菌が増殖しており、マクロファージ系細胞の抗酸菌処理能低下の可能性が示唆された。そこで、このマクロファージ活性化に重要な役割を持っている IFN γ 制御系に異常があるかどうかを確かめるために、健常人コントロール (n=3) と患者から PBMC を分離し、細胞密度を合わせて PHA で 3 日間刺激し、その培養上清中の IFN γ 産生量を測定した。健常人由来細胞では、 833 ± 289 pg/ml の IFN γ が検出されたのに対し、患者由来細胞では、40.7 pg/ml しか産生されなかった。

7)-2 患者 PHA 刺激末梢血単核細胞膜表面の IL-12R β 1 鎖発現の欠如

患者 PBMC からの IFN γ 産生が低下していることが確認されたため、次に IFN γ の産生を調節する上流の因子として、前項と同様に処理した PBMC の培養上清中の IL-12 の産生量を見た。その結果、健常人 3 例のうち 1 例のみ 1.63 pg/ml の IL-12 を検出したが、他はすべて検出限界 (0.78 pg/ml) 以下であり、健常人との有意な差としてとらえることはできなかった。

つぎに、モノクローナル抗体を用いて、PHA で刺激した PBMC 細胞表面の IL-12R のコンポーネントである β 1 鎖の発現をみた (図 3)。図 3-B に見られるように健常人由来の PHA-PBMC 表面には IL-12R β 1 発現が認められた。しかし、患者由来の PHA-PBMC (図 3-A) や患者由来の HTLV-I transformed T cell line TS-1_{HTLV-I} (図 3-C) では、細胞表面の発現が全く認められなかった。樹立細胞株では、HTLV-I の影響により IL-12R β 1 鎖の発現が抑制されて

いないかを確認するため、健常人 (n=3) から採取した PBMC を用いて同様に T 細胞株を樹立したが、健常人由来の PHA-PBMC と同レベルの IL-12R β 1 鎖の発現が見られた (図 4)。従って、患者由来細胞株で見られた発現の完全欠損は HTLV-I の影響ではないと考えられた。

IL-12R β 2 鎖に関しては、モノクローナル抗体が入手できないため、RT-PCR を行ったところ患者 PHA-PBMC での発現が確認された。

IFN γ 受容体の異常の可能性も考え、IFN γ R1 を認識するモノクローナル抗体を用いて、T 細胞表面の発現を確認した。図 3-D, E に見られるように同レベルの発現が見られた。

7)-3 IL-12R β 1 遺伝子変異の検出と家系調査

IL-12R β 1 鎖の欠損がどのような機序で生じているかを見るため、PCR 産物を用いて直接シーケンシングを行い、塩基配列を決定した。図 5-A に見られるように、701 番目 (ヌクレオチド番号は、GenBank accession number U03187 を参照した) の塩基が C (シトシン) から T (チミン) に変異を起こしていることが明らかとなった (701C>T と表記する)。また、これはゲノム DNA レベルでも変異していることも確認した。この変異はアミノ酸変異を伴うミスセンス変異であり、213 番目のアミノ酸がアルギニン (コドン CGG) からトリプトファン (TGG) に置換されるものであった (R213W と表記する)。IL-12R は 2 つの蛋白からなり β 2 鎖の異常が β 1 鎖の発現異常につながる可能性も考え、前項で得られた β 2 鎖の RT-PCR 産物を直接シーケンシングし塩基配列を確認したが変異は認められなかった。

健常人 32 人、結核症患者 19 人、非定型抗酸菌症患者 6 人の IL-12R β 1 鎖の塩基配列を調べてもこの変異は認められず、非常にまれな変異であることが考えられた。この患者の両親は従兄弟婚であり、同部位の変異について家系調

査を行った。この結果図 5-B に示したように、両親はヘテロの保因者であり、妹は、両方とも正常なアレルを受け継いでいることが分かった。このヘテロ保因者である父親の PHA-PBMC 表面の IL-12R β 1 鎖の発現は健常人のレベルと同等であった。

7)-4 IL-12R β 1 遺伝子導入実験

遺伝子変異 701C>T は、アミノ酸置換 R213W を伴うミスセンス変異であったが、この変異が直接、細胞表面上の IL-12R β 1 鎖の発現異常に関連するのかわ確認するために、報告された野生型の塩基配列 (IL-12R β 1_{wt}) を含む発現ベクターと、患者由来の 701C>T 置換を持つ塩基配列 (IL-12R β 1_{R213W}) を含む発現ベクター、および発現ベクターのみをそれぞれ HEK293 細胞株に遺伝子導入を行い、実際に発現異常を呈するかを調べた。その結果、IL-12R β 1_{wt} を導入した細胞では細胞表面に発現が認められたのに対し (図 6-A)、IL-12R β 1_{R213W} を導入した細胞では膜表面の発現は認められなかった。IL-12R β 1_{R213W} が正しく遺伝子導入されていることはノーザン法で確認した mRNA の発現において IL-12R β 1_{wt} 導入細胞 (図 7-lane 2) と IL-12R β 1_{R213W} 導入細胞 (図 7-lane 3) で同等レベル検出されたことにより明らかである。なお、発現ベクターのみを導入した HEK293 細胞では IL-12R β 1 遺伝子の mRNA の発現は見られず (図 7-lane 1)、また ウェスタン法によっても IL-12R β 1 蛋白の発現は認めなかった (図 8-A lane 3 及び図 8-B lane3)。

7)-5 IL-12R β 1 遺伝子 mRNA レベルの発現

遺伝子変異 701C>T を持つ転写産物は検出できるのかを見るため、ノーザン法を用いて mRNA レベルでの発現を見た。健常人由来の PHA-PBMC での

発現量(図 7-lane 5)と比べると非常に低レベルではあるが、患者の PHA-PBMC でも、明らかにバンドが認められ(図 7-lane 4)、この転写産物の存在が確認された。さらに発現の有無を確実にするために、患者由来の PBMC から HTLV-I transformed T cell line TS-1 を樹立し、この細胞株では十分量の 701C>T を持つ転写産物が発現していることを明らかにした(図 7-lane6)。以上より、転写レベルにおける異常により発現異常が生じているのではないことが確認された。

7)-6 IL-12R β 1 鎖蛋白の検出(ウエスタン法、免疫染色)

患者では IL-12R β 1 鎖の細胞表面発現は阻害されているが、IL-12R β 2 鎖と結合することにより初めて表面発現が可能となる事も考えられる。この場合、細胞抽出液を用いてウエスタン法を行えば、細胞内の IL-12R β 1 鎖の蓄積の有無を確認できると考え、エピトープの異なる二種類の抗体を使用して、蛋白発現の有無を調べた。図 8 で分かるように、IL-12R β 1_{wt} を導入した細胞(図 8-A lane 1、および図 8-B lane 1)、および健康人 PHA-PBMC(図 8-A lane 5、および図 8-B lane 6)では IL-12R β 1 鎖の蛋白レベルでの発現が確認できるが、IL-12R β 1_{R213W} を導入した細胞(図 8-A lane 2、および図 8-B lane 2)や TS-1 細胞株(図 8-A lane 4、および図 8-B lane 4)、患者 PHA-PBMC(図 8-B lane5)では検出できなかった。

細胞での IL-12R β 1 鎖の局在を調べるため、上記の抗体を用いて免疫組織染色も行った。IL-12R β 1_{wt} を導入した細胞(図 9-A)では、細胞膜に一致して強い蛍光が検出された。一方、IL-12R β 1_{R213W} を導入した細胞(図 9-B)では、細胞膜上および細胞質内ともに蛍光は検出されなかった。

これらの結果より、IL-12R β 1_{R213W} を導入した細胞内では IL-12R β 1 鎖タンパク質自体の欠損が明らかとなり、転写後の異常により IL-12R β 1 鎖蛋白が

検出されないことが示された。

7)-7 IL-12R β 1 遺伝子多型の同定

IL-4R α サブユニットの遺伝子多型が機能獲得の方向に作用し、アトピーと関連するとする報告がある (29)。実験の背景で述べたように、抗酸菌感受性には遺伝的な要因の関与が考えられており、抗酸菌感染防御において IL-12R β 1 鎖の遺伝子多型が IL-12/IFN γ 制御系の機能に変調をきたし、抗酸菌感受性に影響する可能性がある。この仮説を検証するため、健常人 32 人、結核症患者 19 人、非定型抗酸菌症患者 6 人の PHA-PBMC 由来の cDNA を用いて RT-PCR を行い、直接シーケンシングで塩基配列を調べた (表 2)。705A>G (Q214R)、1158T>C (M365T)、1196G>C (G378R)、1376C>T (H438Y)、1637G>A (A525T)、1845G>A (G594E) の 6 個のアミノ酸の置換を伴う遺伝子多型を同定する事ができた。Fisher's exact probability test で、各遺伝子多型の抗酸菌感受性との関連を検討したが、有意差はなかった。それぞれ 1 人の結核症患者に見られた 1376C>T (H438Y) と 1845G>A (G594E) は、viable PHA-PBMC 検体が得られなかったため細胞表面の IL-12R β 1 鎖発現を確認することはできなかった。

これらの遺伝子多型の中で注目すべきは 705A>G (Q214R) であり、これは患者に見られた R213W と隣り合ったアミノ酸残基である。また、以前の報告で、Q214R 置換が IL-12R β 1 鎖欠損の原因となる事が示されている。そこで、Q214R を持つ健常人 2 例の PBMC を PHA 刺激し、IL-12R β 1 鎖の発現と培養上清中の IFN γ 量を測定した。図 10 に示すように、PHA-PBMC 細胞表面に十分発現されており、しかも Q214R を持たない健常人の結果 (図 3-B) と同等レベルの発現があった。さらに上清中の IFN γ を測定しても、それぞれ >1000pg/ml、3180pg/ml と前述の健常人レベル (833 \pm 289 pg/ml) の産生

が見られた。

さらに、この遺伝子多型 705A>G (Q214R)が日本人に特有のものであるかを見るため、コーカシアンのゲノムを用いてこの近傍の配列を PCR で増幅し、直接シーケンシングで塩基配列を調べた。結果、33 人の検体のうち 705A>G (Q214R)は 10 人に検出され (うち両アレルで見られたのが 4 人、一方のアレルで見られたのが 6 人)、人種を越えて認められる遺伝子多型であることが分かった。

8) 考察

8)-1 IL-12R からのシグナル伝達 (図 11)

PHA 刺激後のヒト PBMC に IL-12 を添加すると、Jak2 や Tyk2 を含めた細胞質内タンパク質のチロシン残基がリン酸化される (30)。上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF) の細胞外ドメインと IL-12R β 1 と β 2 それぞれの細胞内ドメインとのキメラを作成し、BaF 細胞に発現させた後 EGF 刺激を行う実験系において、Jak2 は β 2 受容体コンポーネントと、Tyk2 は β 1 受容体コンポーネントとそれぞれ関係している事が明らかとなっている (31)。さらに、IL-12 刺激によって、signal transducer and transcription (STAT) 3 と 4 がリン酸化される (32)。特に STAT4 のリン酸化は IL-12 のシグナル伝達に極めて特異的であり、前述したようにこの分子のノックアウトマウスでは、IL-12 の生物活性の大部分が障害されることが分かっている (19、20)。STAT4 は pYLPSNID (pY はリン酸化チロシン) のアミノ酸配列を認識結合するが (33)、この配列は β 2 コンポーネントの 800 番目周辺のアミノ酸に見られる。結合のために必要なコアモチーフは G-pY-L ともいわれる (34)。これらのことは、 β 2 コンポーネントがシグナル伝達に非常に重要な役割を果たしていることを裏付けていると考えられる。活性化された STAT4 はホモダイマーを形成し核内に移行して、発現調節領域の特定の塩基配列を認識して結合し、遺伝子の転写を制御する。例えば、interferon regulating factor (IRF-1) の上流には STAT 結合部位が存在し、発現調節される (35)。また、IFN γ のプロモーターに対しても T 細胞受容体からのシグナルと協同して IL-12 からのシグナルが発現誘導する事も報告された (36)。

IL-12R β 1 鎖欠損症においては高親和性レセプターが発現していない。そのうえ、Tyk2 の結合の足場が失われ、効率的な STAT4 の活性化が行われず、

IFN γ を始めとした STAT4 により誘導される遺伝子の転写亢進が行われなため、IL-12 独自の生物活性並びに IFN γ を介したマクロファージ活性化などの免疫制御が失われ、抗酸菌を含めた細胞内寄生性病原体の排除ができなくなるものと考えられる。

8)-2 IL-12R 欠損の Th1/Th2 分化に対する影響

IL-12 は細胞性免疫の調節、維持に必要な Th1 細胞の分化に重要な役割を果たす多機能のサイトカインである (21)。本症患者は、非定型抗酸菌をはじめとして、サルモネラなど細胞内寄生性細菌に対する感受性が特異的に高くなっている (37-41)。また、これまでの報告で本症患者が重症のウイルス感染症や若年での悪性疾患を発症したとする報告はない。この特異性については、少なくとも 3 つの可能性が考えられる。第一に、IL-12R β 2 鎖がより Th1 分化に関係しており、この β 2 鎖の発現のみで Th1 誘導に十分である可能性がある。しかしこの仮説は、IL-12R β 1 鎖の発現が IFN γ 産生に重要である観察結果に矛盾する。第二に、IFN γ 以外のインターフェロン (IFN α / β など) あるいは、残存している少量の IFN γ 誘導で、細胞内寄生性細菌以外に対する防御能獲得には十分である可能性。第三に、抗酸菌以外の病原体からの防御に十分な Th1 細胞が IL-12 に依存しない経路で作られる可能性である。IFN γ R 欠損症患者においては、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルスなどによる重症感染の報告がされており (42)、2 番目の可能性が、最も考えられるのではないかと推測される。

動物実験の結果 IL-12 を含めた Th1 型のサイトカインや STAT4 の欠損により、Th2 表現型の増強が認められている (15、20)。しかし、本症例では、Th2 の増強を思わせる臨床病態あるいは検査所見は認められていない。また、この経路の欠損症患者合計 19 人中に重度のアトピー患者は見られず、血清 IgE

値も多くの症例で正常だったことが報告されている (43)。このことは、アトピーや他のアレルギー疾患患者の病態、免疫療法のストラテジーの確立において重要な示唆を与える可能性があり、ヒトの Th1/Th2 分化のメカニズムは今後、更なる検討が必要と考えられる。

8)-3 これまでの報告症例

IL-12R β 1 鎖欠損症は、文献的には我々の報告と前後して 6 例の報告がある (37、38、44-46)。その変異部位と変異の型を図 12 にまとめた。ほとんどが細胞外ドメインのナンセンス変異による欠損であることが分かる。我々の報告後、R213W 置換患者が他に 2 人 (兄妹) 報告されており (45)、この部位は mutational hotspot である可能性が示唆される。Q214R のアミノ酸置換による欠損症の報告 (38) もあるが、今回我々が示したように、この置換は人種の枠を越えて存在する遺伝子多型に起因して生じるものであり、蛋白発現上も機能上も障害されてはいないことが分かった。

8)-4 IL-12R β 1 鎖欠損症の臨床像と近縁疾患

本疾患患者は抗酸菌を含め、細胞内寄生体には弱病原性微生物に対しても感受性を示す。しかし、他の一般細菌、ウイルス、真菌等には健常人と同様抵抗性を示す。これは、IL-12/IFN γ 制御系が特に細胞内病原体の処理に特異的であることを示すと考えられた。MAC 感染症の場合には重症化し、全身播種が見られる。しかし、IFN γ R 欠損症と比べ、少量であるが残存する IFN γ の効果により、発症年齢も比較的遅く成人発症例も見られ、また、経過も緩徐な傾向がある。

近縁疾患として、近年 IL-12/IFN γ 経路のサイトカイン、レセプターの欠

損症が報告されている。IL-12 欠損症が数例報告されているが (47-49)、IL-12R β 1 鎖欠損症同様経過は緩徐である。一方、IFN γ R1 と R2 の欠損症 (50) は IFN γ の生物活性がなくなるため、幼少期に重篤な抗酸菌感染症を起こし致命的である。なお、R1 鎖欠損には、完全欠損 (51-55) と部分欠損 (56) があり、後者はミスセンス変異によりリガンドとの親和性が著しく低下したものである。また、*IFNGR1* 遺伝子の一方のアレルが 4 塩基欠失し、細胞内領域の大部分を欠失したレセプターの高発現により IFN γ への反応性が低下した患者が 12 家系報告されている (57) (表 3)。

8)-5 701C>T 点変異の生じた機序と R213W 変異の IL-12R β 1 鎖蛋白への影響

今回示した 701C>T の変異は、CG dinucleotide の部位に存在する。この CG dinucleotide は、すべてのトランジション型の変異の中の約 3 分の 1 を占めている高変異部位と言われている (58)。すなわち、CG nucleotide のシトシン (C) は、しばしばメチル化を受けており、この結果生じる 5-メチルシトシンは自然に脱アミノ化が生じ、チミン(T)に変換される事がある。この変異が遺伝子上に固定された結果生じたと考えられる。実際、p53 を含め多くの遺伝子で CG 部位のメチル化が遺伝子変異に関与していると考えられている (59-61)。

では、この変異によって生じた 1 アミノ酸の置換がどのようにして IL-12R β 1 鎖蛋白欠損に繋がるのかを文献的に考察した。IL-12R β 1 鎖は、タイプ I のサイトカイン受容体に属する。このグループの受容体の特徴は N 末端側に 4 つのシステイン残基が存在し、C 末端側には WS box (トリプトファン-セリン-x-トリプトファン-セリン WSXWS) よりなるアミノ酸配列モチーフが存在する (62)。このモチーフは、R (K)XR (K)モチーフと相互作用する事が知られている (63)。具体的には、同じ I 型サイトカイン受容体に属する成長ホル

モンレセプター、プロラクチンレセプターやエリスロポイエチンレセプターなどで、両モチーフの側鎖同士が相互作用している事が示されている。さらに、WS box は、蛋白の folding や細胞膜表面へのレセプターの輸送に関与すると考えられている (63)。また、IL-2R、IL-4R、IL-7R などで見出される common γ chain (γ_c)蛋白も I 型サイトカイン受容体に属し、両モチーフを有している。この γ_c 欠損症は severe combined immune deficiency (SCID) の形質を示すが、この 10% が RXR モチーフのアルギニン残基に遺伝子変異を持つ (64、65)。進化の過程でも IL-12R β 1 鎖のこの部位に相当するアルギニン残基は保存されておりヒトだけでなく、マウスやアカゲザルでもこの残基を有している。

これらから考察すると、IL-12R β 1 鎖の R213W は、RXR モチーフの一部が、アミノ酸置換されることにより、タンパク質の folding が障害され、極めて早期にペプチドが分解され IL-12R β 1 鎖欠損に至ったのではないかと思われる。

8)-6 residual IFN γ の由来

IL-12R β 1 鎖欠損症患者では IFN γ 産生量は低下しているが、完全欠損ではない (37、38、46)。IL-12 はこの IFN γ の誘導に中心的役割を果たしているため、患者では残存する IFN γ は、どの細胞由来でまたどのような機序で産生されるのかを知ることは、病態を理解する上で重要である。

IL-12R β 2 鎖のみでは、IL-12 による STAT4 の活性化には不十分であるが、IFN α /IFN α R の結合が STAT4 を活性化できることが実験的に示された (66)。また、IL-12/STAT4 非依存性 IFN γ 産生経路として mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の関与が示された (66)。8)-2 Th1/Th2 分化への影響の項で論じた残存 Th1 反応は、これらを介していると考えられる。

8)-7 IL-12R β 1 遺伝子多型と抗酸菌感受性

今回、我々は IL-12R β 1 鎖 cDNA 上に 6 個の遺伝子多型を同定した。5 個は細胞外ドメイン、1 個は細胞内ドメインに存在した。これらは、現在までに認知されている重要なモチーフには属していなかった。また、健常人、結核症患者、非定型抗酸菌症患者間で分布に偏りは認められず、この遺伝子多型は抗酸菌感受性に影響しないと考えられた。ただし、1376C>T、1845G>A は、PBMC 検体が得られず、IL-12R β 1 鎖の欠損の有無は蛋白レベルでは解析できていない。

8)-8 治療に関する考察

臨床面では、治療法に関する考察は不可欠であるが、まだ症例も少なく、十分な検討は不可能と思われる。現時点においては、抗生物質の併用療法のみで抗酸菌排除に成功した例 (37、38) や IFN γ の補充療法の併用が奏功したとの報告 (38) がある程度である。しかし、動物実験で示されているように、感受性検査の結果、効果が期待できる抗生物質との併用で、病原体排除効果が最大となる (67)。すなわち、抗酸菌の全身播種など非典型的な病態であれば、まず、可能な限りの遺伝子検索を行い、適切なサイトカイン補充療法などを初期から併用する必要があると思われる。また、non-ablative bone marrow transplantation や遺伝子治療など、根治的な治療法を模索する必要があると考える (68)。

9) 結語

今回の我々の研究により、ヒトにおいて IL-12/IFN γ 制御系の細胞内寄生性細菌の感染防御における重要性が確認され、IL-12R β 1 鎖のミスセンス変異で蛋白の folding が障害され、IL-12R β 1 鎖欠損症を生じ、さらに、重篤な抗酸菌感染症を生じることが明らかになった。抗酸菌感染症は淘汰圧としては十分な力を持っているため、数十年前までは今回のような遺伝子異常を持つ個体は幼年期に重篤な感染を機に絶命していたと考えられる。しかし、現在ではこれら病原体への暴露機会の減少、治療法の確立によって、遺伝的な因子による抗酸菌高感受性の成人が一般集団の中に増える傾向にある可能性も否めない。この現状の中、非典型的な経過をたどる症例は積極的に遺伝的因子の探索を行い、適切な治療法の確立を急ぐ必要があると考えられる。

10) 図表とその説明

表1 本実験で使用したプライマー

| PCR primers | |
|----------------------------|--|
| human IL-12Rβ1 | 5'-TGAACCTCGCAGGTGGCAGA-3' (sense, nucleotides 7-26) 5'-TCGGGCGAGTCACTCACCT-3' (antisense, nucleotides 2070-2089) |
| human IL-12Rβ1 (genome) | 5'-AATGTGGCCAGGAATTCCA-3' (sense) 5'-CCTGTTCTGTACTCAGAGT-3' (antisense) |
| human IL-12Rβ2 | 5'-GGCGACA CGTGG AAGAATAC-3' (sense, nucleotides 594-613) 5'-AGAGATGACAGCTGCTGGAG-3' (antisense, nucleotides 3303-3322) |
| sequencing primers | |
| human IL-12Rβ1 | 5'-TGAACCTCGCAGGTGGCAGA-3' (sense, nucleotides 7-26) 5'-GATAACCAGTTGGTGTCTGA-3' (sense, nucleotides 551-570) 5'-CGCAGTCGCCCAACTTCCAT-3' (antisense, nucleotides 604-623) 5'-GCTACAACGTGGCTGTCTCAT-3' (sense, nucleotides 1001-1020) 5'-ATGCAATACGTCATGCTCTG-3' (antisense, nucleotides 1151-1170) 5'-CACCTGTCCCGGCGTCTAA-3' (sense, nucleotides 1180-1499) 5'-CTGTTTGTGTCTTCATCTC-3' (antisense, nucleotides 1521-1540) 5'-TCGGGCGAGTCACTCACCT-3' (antisense, nucleotide 2070-2089) |
| human IL-12Rβ2 | 5'-GGCGACA CGTGG AAGAATAC-3' (sense, nucleotides 594-613) 5'-GTCTGCAAAC TGGCTGTAT-3' (sense, nucleotides 938-957) 5'-TAAGTGGGTGTCTCGTCTC-3' (antisense, nucleotides 1080-1099) 5'-GCAGGCTCTGGAATATGGTT-3' (sense, nucleotides 1431-1450) 5'-GTGCTTCAATGATTCATC-3' (antisense, nucleotides 1564-1583) 5'-GAGGGCATGGACAACATTCT-3' (sense, nucleotides 1934-1953) 5'-ATTGTAGGGTCGACTCCGTA-3' (antisense, nucleotides 2061-2080) 5'-CGAGTGACATATGTCTGTG-3' (sense, nucleotides 2411-2430) 5'-GCTGGAAGTAATGCGTTGAG-3' (antisense, nucleotides 2563-2582) 5'-AGCTGAGAGCAGACAAC TGG-3' (sense, nucleotides 2911-2930) 5'-AGAGATGACAGCTGCTGGAG-3' (antisense, nucleotides 3303-3322) |

ヌクレオチド番号は、IL-12Rβ1鎖はGenBank accession No. U03187、
IL-12Rβ2鎖はNo. U64198を参照した。

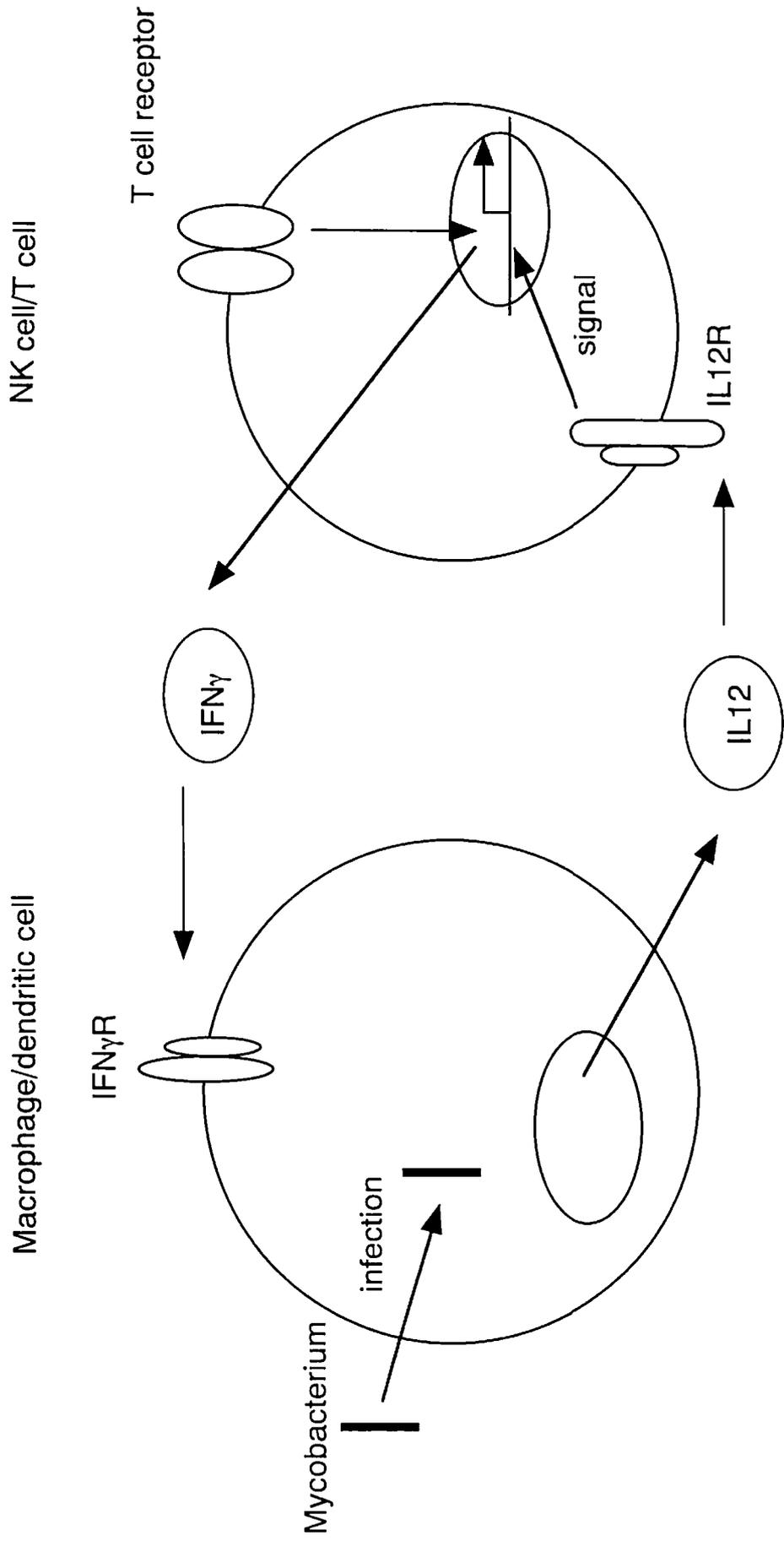
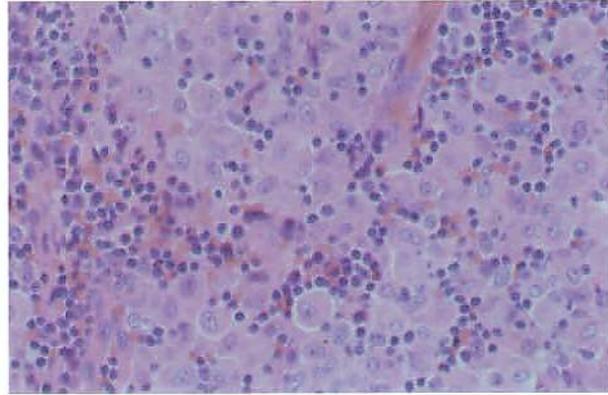
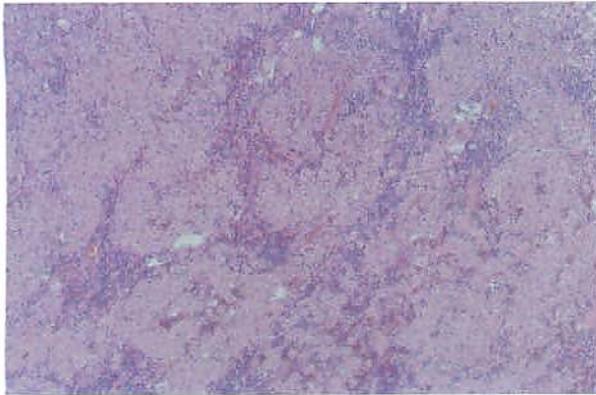


図1 IL-12/IFN γ 制御系

細胞内寄生性細菌が感染すると、感染マクロファージからIL-12が分泌され、T細胞上の $\beta 1$ 鎖及び $\beta 2$ 鎖の2つのコンポーネントからなるIL-12Rに結合する。このシグナルが核内に伝達され、IFN γ などの遺伝子の転写活性化を誘導する。T細胞から分泌されたIFN γ は、レセプターに結合しマクロファージを活性化する。

A



B

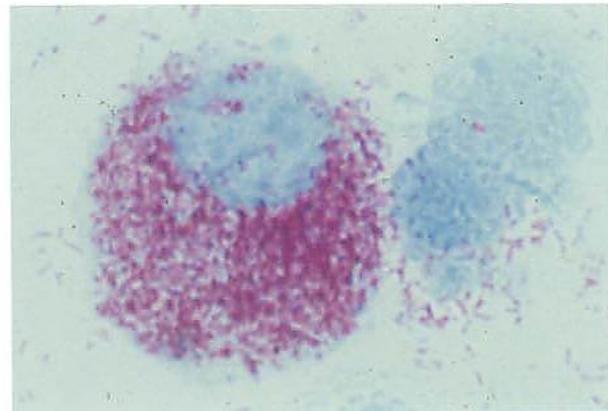
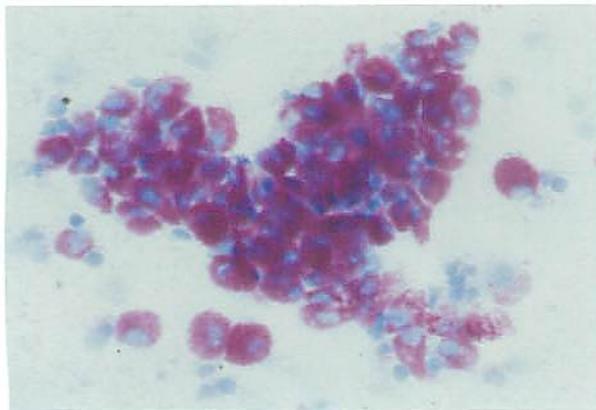


図2 播種性非定型抗酸菌症患者のリンパ節標本

(A) リンパ節生検組織のHE染色像。弱拡大（左）で見ると多数の肉芽腫が形成されており、その主な構成細胞成分は組織球系であった（右）。(B) リンパ節スタンプ標本のZiehl-Neelsen染色像。組織球胞体内に無数の抗酸菌が増殖している。弱拡大（左）、および強拡大（右）。

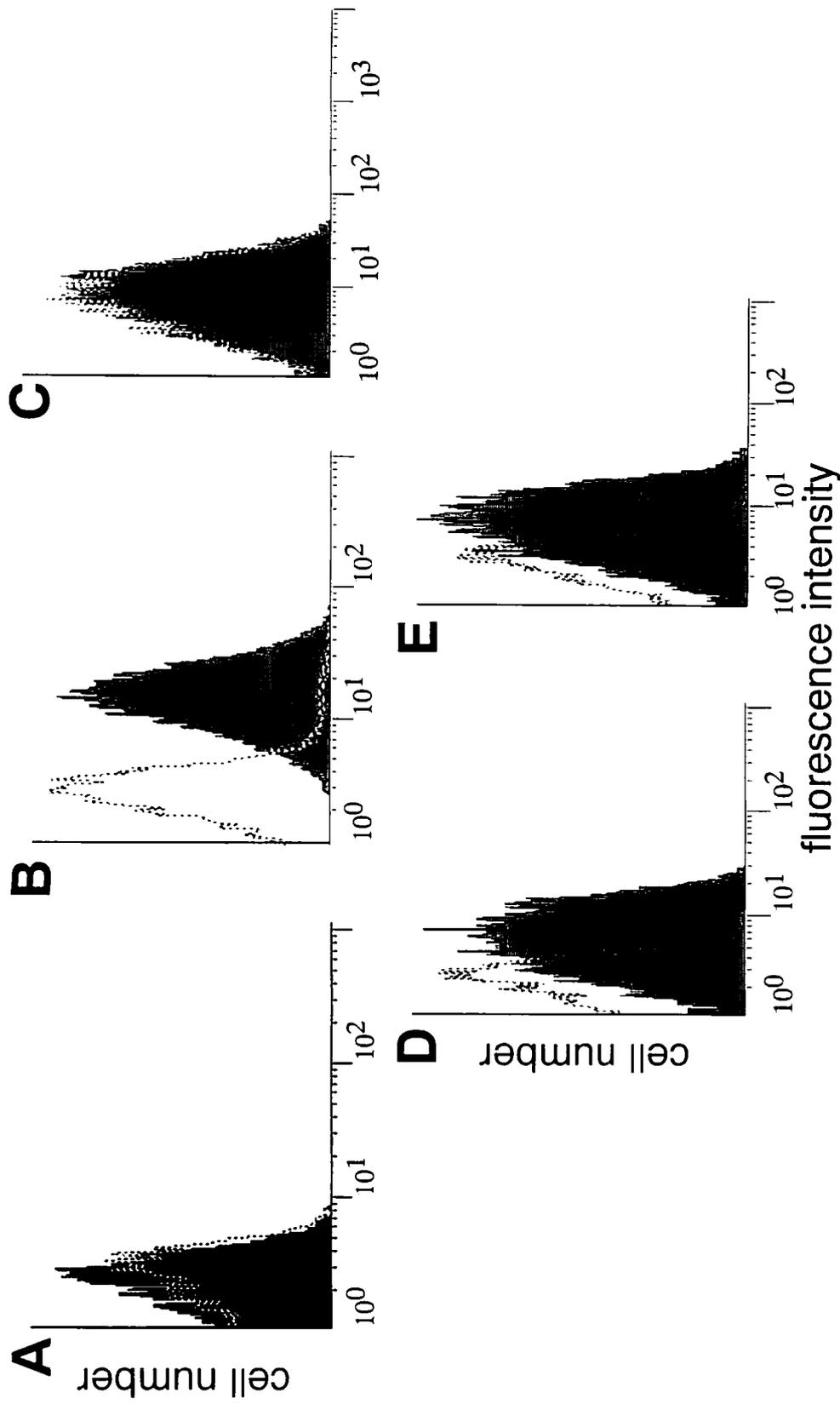


図3 IL-12Rβ1鎖およびIFNγR1の細胞表面発現

(A-C) 患者PHA-PBMC (A)、健康人PHA-PBMC (B)、TS-1細胞株 (患者由来HTLV-I感染細胞株) (C) の細胞表面IL-12Rβ1鎖発現。一次抗体に、モノクローナルIL-12Rβ1鎖抗体 (gray) あるいはコントロール抗体 (0.5β点線)、二次抗体にFITCラベルした抗マウスIgGを用い、フローサイトメトリーで検出した。(D-E) 患者PHA-PBMC (D)、健康人PHA-PBMC (E) を一次抗体に抗IFNγR1抗体を用いて同様に処理し、フローサイトメトリーで検出した。

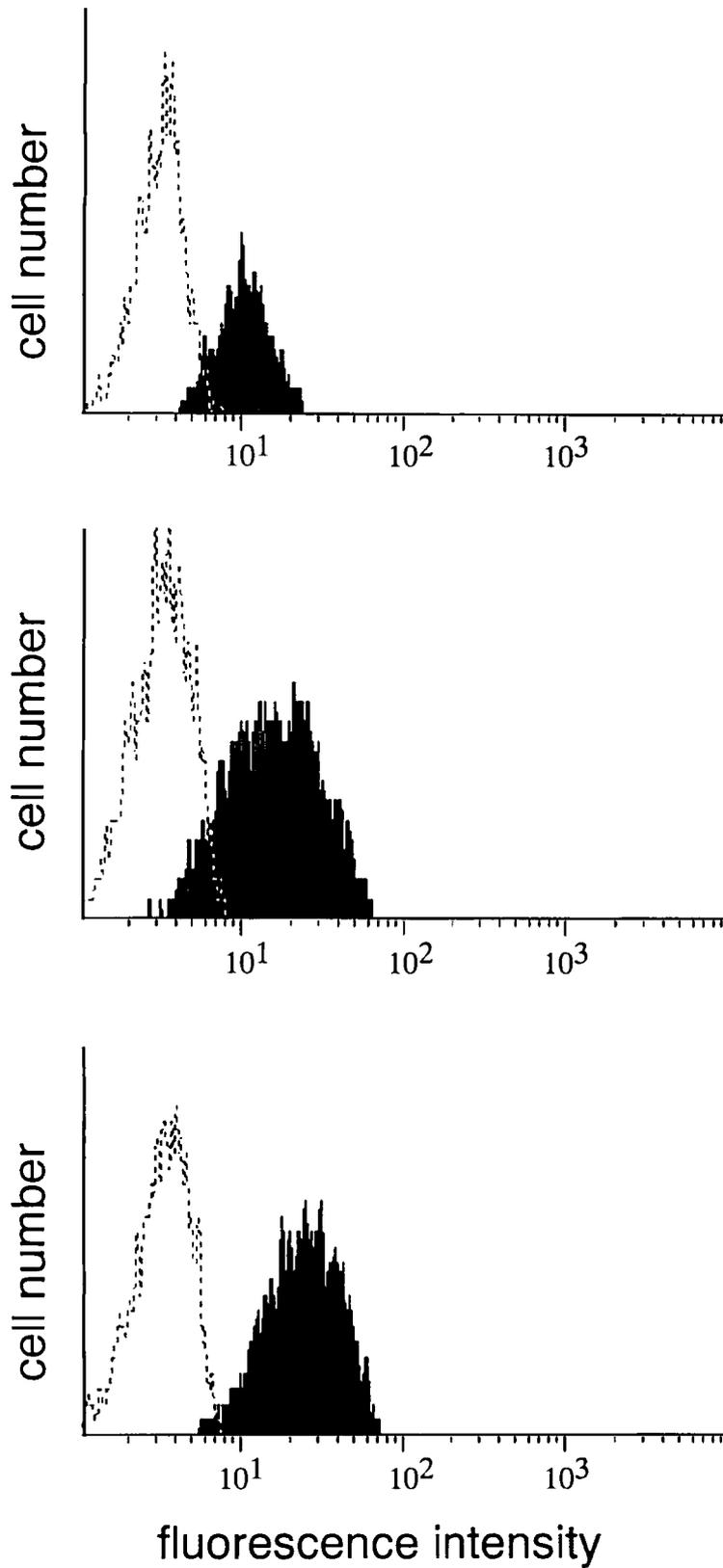


図4 HTLV-I transformed T cell lines 細胞表面のIL-12R β 1鎖発現

健全人から樹立したT細胞株で細胞表面のIL-12R β 1鎖の発現を、図3と同様にしてフローサイトメトリーで調べた。これらの細胞株では、IL-12R β 1鎖の十分な発現が見られた。

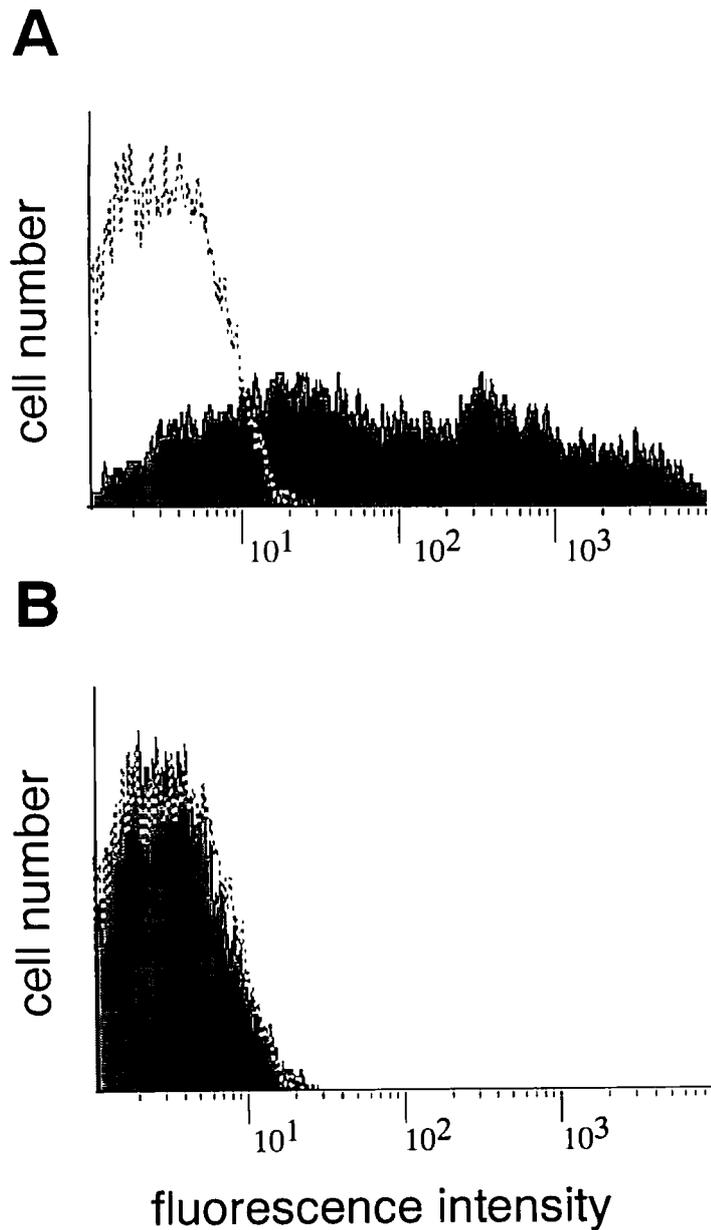


図6 遺伝子導入HEKC293細胞表面のIL-12R β 1鎖の発現

野生型IL-12R β 1鎖を導入したHEKC293細胞 (A) とR213W変異型IL-12R β 1鎖を導入したHEKC293細胞 (B) の細胞表面発現を図3と同様にフローサイトメトリーで調べた。野生型では発現が見られるが、変異型では細胞表面発現が認められない。点線は、コントロールとしてベクターのみを導入したHEKC293細胞を同様に処理した。

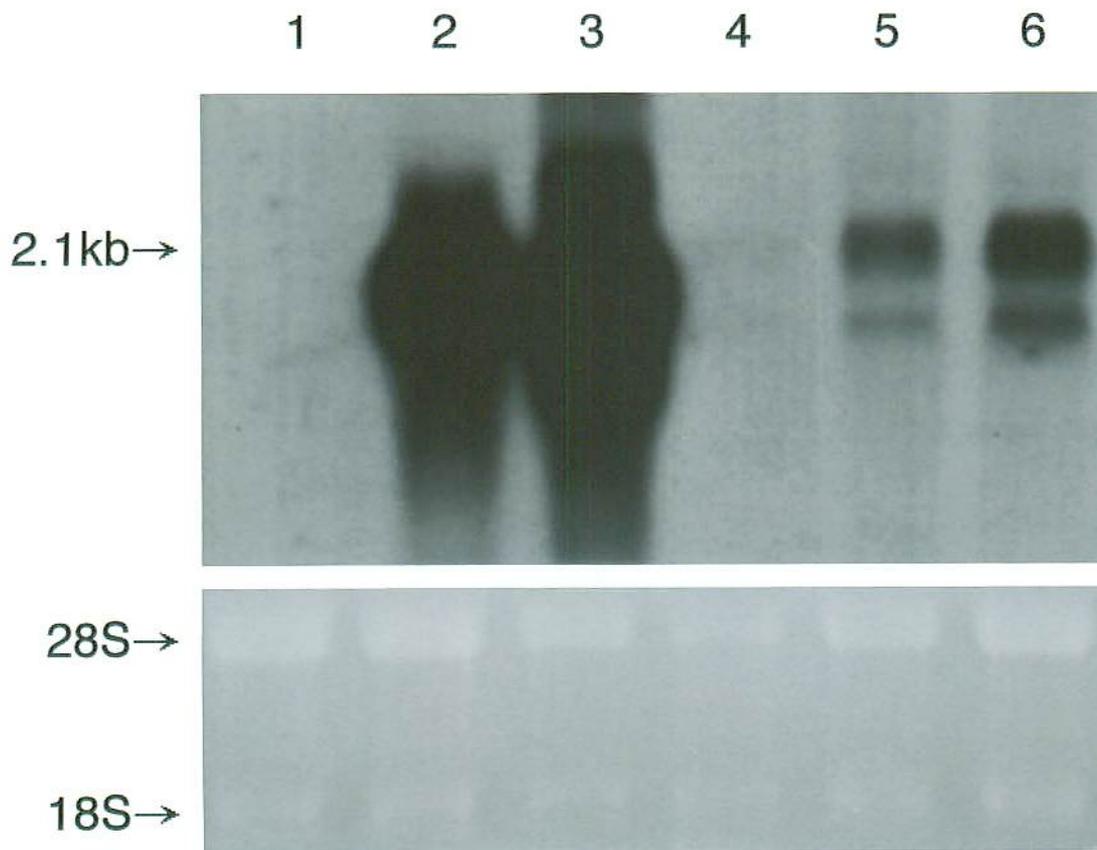


図7 ノーザン法によるIL-12R β 1鎖転写産物の検出

IL-12R β 1鎖全長のプローブを用いてノーザン法を行い、IL-12R β 1鎖の転写産物が存在するか調べた。レーン1 ベクターのみを遺伝子導入したHEKC293細胞、レーン2 野生型のIL-12R β 1鎖を遺伝子導入したHEKC293細胞、レーン3 変異型 (R213W) のIL-12R β 1鎖を遺伝子導入したHEKC293細胞、レーン4 患者由来のPHA-PBMC、レーン5 健康人由来のPHA-PBMC、レーン6 TS-1細胞株。下段は、各レーンおよそ等量のRNAを使用していることを見るため、ゲルをエチジウムブロマイド染色し、28Sと18S RNAを示した。

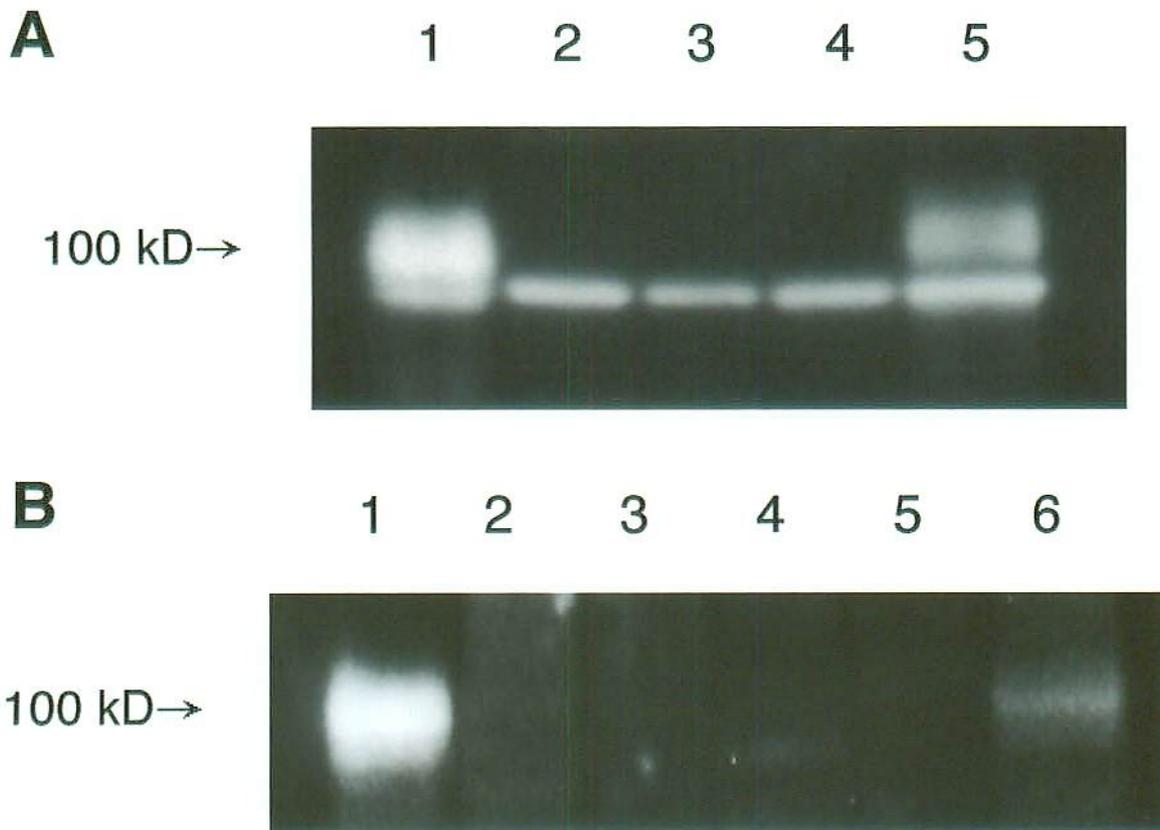


図8 IL-12R β 1鎖のウエスタン法解析

(A) IL-12R β 1鎖のC末端を認識する抗体を用いて、ウエスタン法でIL-12R β 1鎖蛋白の発現を調べた。レーン1 野生型IL-12R β 1鎖を遺伝子導入したHEKC293細胞、レーン2 R213W変異を持つIL-12R β 1鎖を遺伝子導入したHEKC293細胞、レーン3 ベクターのみを導入したHEKC293細胞、レーン4 TS-1細胞株、レーン5 健常人PHA-PBMC。下に見えるバンドは非特異的バンド。(B) 細胞外ドメインを認識する抗体を用いて、同様にウエスタン法でIL-12R β 1鎖蛋白を見た。レーン1 野生型IL-12R β 1鎖を遺伝子導入したHEKC293細胞、レーン2 R213W変異を持つIL-12R β 1鎖を遺伝子導入したHEKC293細胞、レーン3 ベクターのみを導入したHEKC293細胞、レーン4 TS-1細胞株、レーン5 患者PHA-PBMC、レーン6 健常人PHA-PBMC。

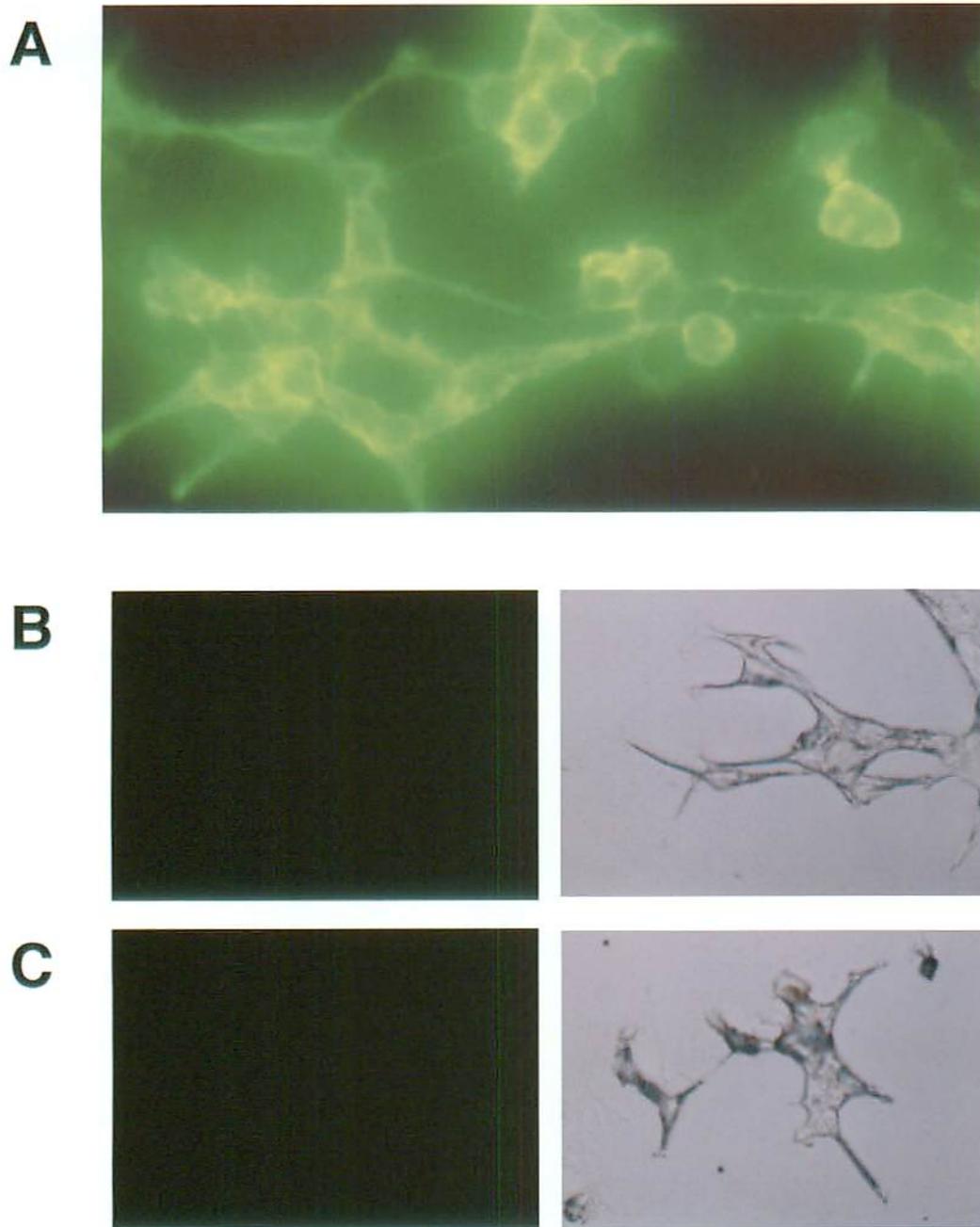


図9 各遺伝子導入細胞の免疫染色像

一次抗体としてIL-12R β 1鎖の細胞外ドメインを認識する抗体を使用し、二次抗体にFITCラベルした抗ヤギIgGを用いて、蛍光顕微鏡で観察した。(A) 野生型のIL-12R β 1鎖を導入したHEK293細胞。細胞膜にIL-12R β 1鎖が強発現している。(B-C) 同条件で撮影したR213W変異を持つIL-12R β 1鎖を導入したHEK293細胞 (B) とベクターのみを導入したHEK293細胞 (C)。右に光学顕微鏡で観察したそれぞれの細胞を示す。

表2 日本人におけるIL-12Rβ1鎖遺伝子の遺伝子多型

| | 705A>G (Q214R) | 1158T>C (M365T) | 1196G>C (G378R) | 1376C>T (H438Y) | 1637G>A (A525T) | 1845G>A (G594E) |
|-----------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 健常人 | 13 / 13 / 6 | 20 / 6 / 6 | 13 / 14 / 5 | 32 / 0 / 0 | 31 / 1 / 0 | 32 / 0 / 0 |
| 結核症患者 | 12 / 3 / 4 | 11 / 4 / 4 | 11 / 5 / 3 | 18 / 1 / 0 | 18 / 1 / 0 | 18 / 1 / 0 |
| 非定型抗酸菌症患者 | 3 / 3 / 0 | 4 / 2 / 0 | 2 / 4 / 0 | 6 / 0 / 0 | 5 / 1 / 0 | 6 / 0 / 0 |

IL-12Rβ1鎖をコードする1989bp全長における遺伝子多型を同定した。アミノ酸置換を伴うもののみを示す。
数字は野生型—野生型／野生型—変異型／変異型—変異型を表す。

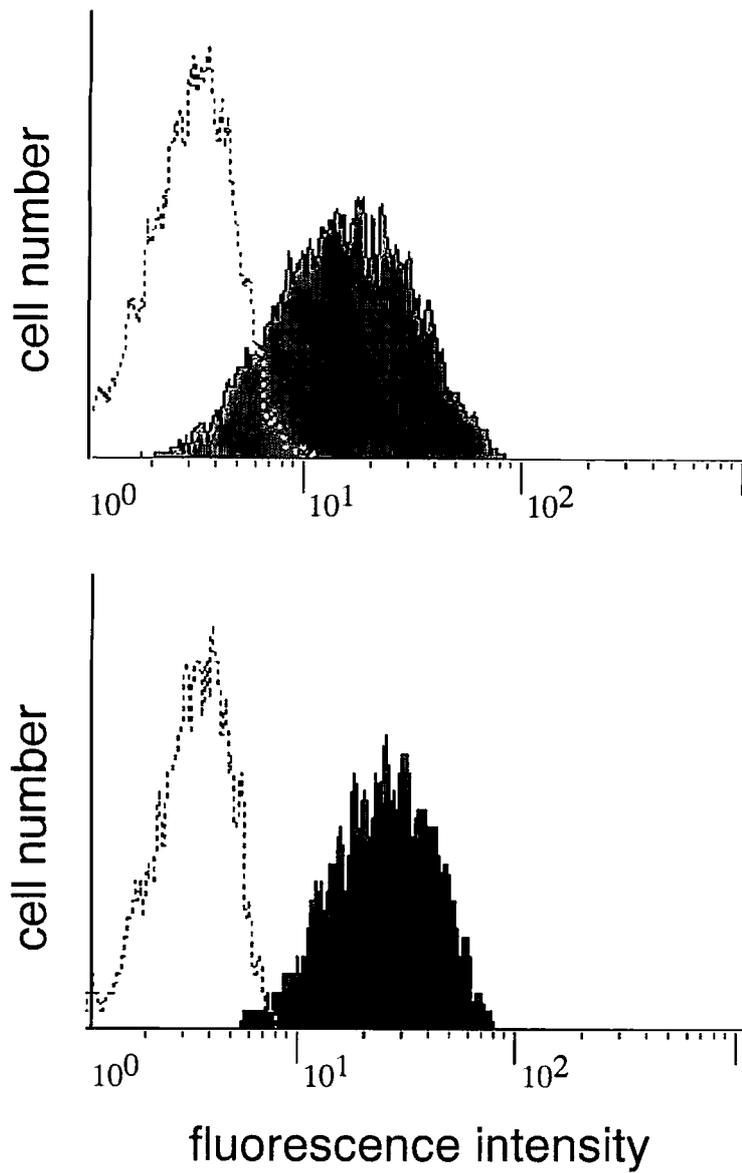


図10 Q214Rアミノ酸置換を持つ個体由来のPHA-PBMC表面のIL-12R β 1鎖発現
 2例ともQ214R置換を持つが、他の健常人と同レベルの細胞表面IL-12R β 1鎖が検
 出できる。

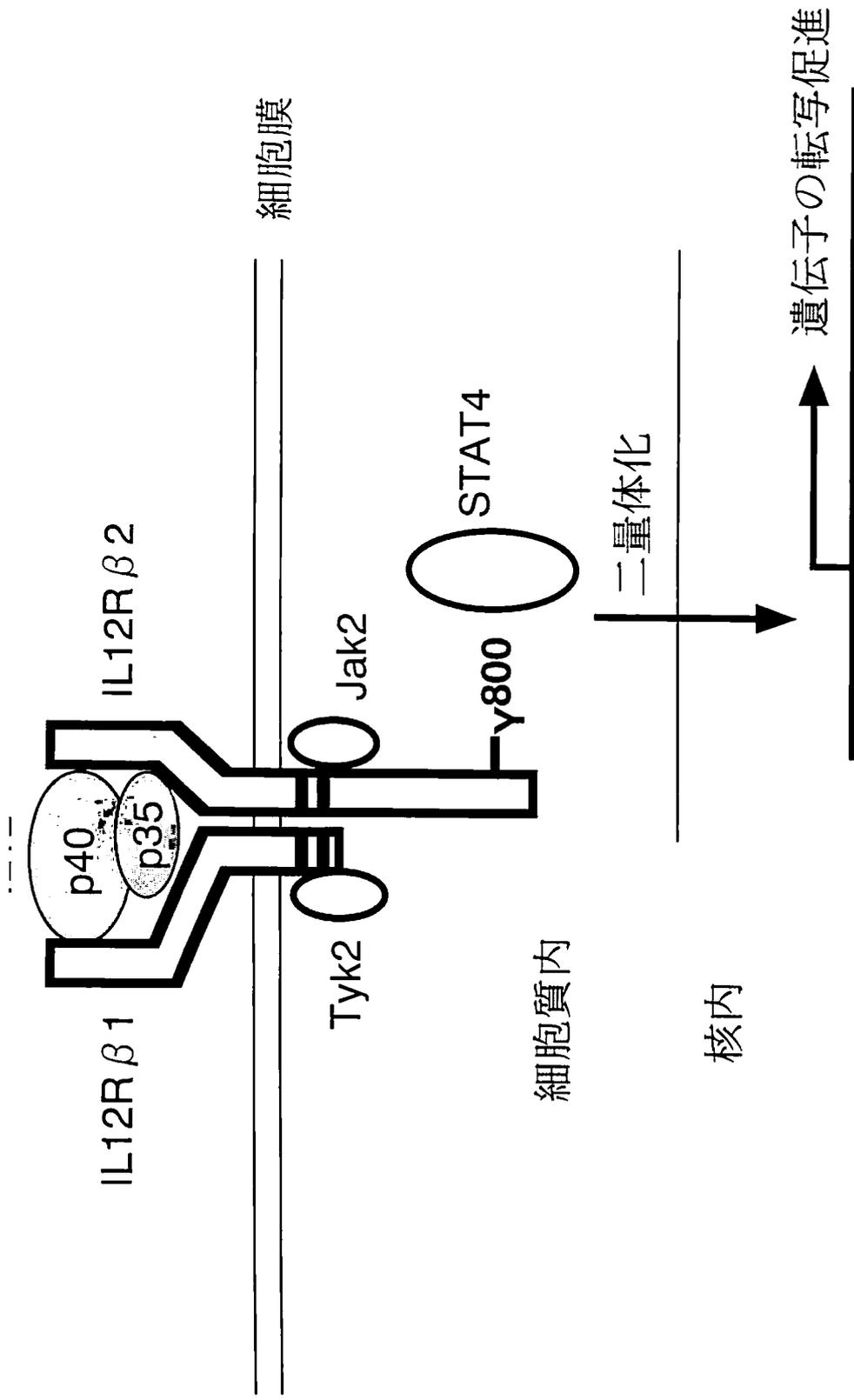


図11 IL-12Rのシグナル伝達経路

IL-12とIL-12Rが結合するとTyk2およびJak2のリン酸化が生じる。その後、STAT4がβ2鎖に結合しリン酸化される。リン酸化されたSTAT4は二量体を形成し核内に移行、IL-12 response elementに結合し、遺伝子の転写を活性化する。Tyk:protein-tyrosine kinase 2、JAK2: Janus kinase 2、STAT: signal transducers and activators of transcription

表3 IL-12/IFN γ 制御系の異常症例

| 欠損症 | 患者 (起源) | 抗酸菌感染症 | | | 遺伝子・アミノ酸変異 | 患者数 | 文献 |
|-------------------------------|-------------|--------|-----|-----|-------------------|-----|--------|
| | | BCG | Tbc | NTM | | | |
| IL-12R β 1 | Morocco | + | | | 913A>T (K305X) | 1 | 38 |
| | Turkey | + | | | 783+1G→C | 1 | 38 |
| | Turkey | + | | | 94C>T (Q32X) | 1 | 37 |
| | Netherlands | | | + | 1126C>T (Q376X) | 1 | 37 |
| | Netherlands | | | + | del 409-549 | 1 | 37 |
| | Japan | | | + | 701C>T (R213W) | 1 | 46 |
| | Morocco | | | + | 701C>T (R213W) | 2 | 45 |
| | Turkey | | + | | (R173P) | 1 | 44 |
| IL-12 p40 | Pakistan | + | | | del 4.4kb | 1 | 47 |
| | unknown | | | + | unknown | 3 | 49 |
| | unknown | | | | unknown | 1 | 48 |
| IFN γ R1 (complete) | Malta | | | + | 116S>X | 4 | 52 |
| | Tunisia | + | | | 131 delC | 1 | 51 |
| | Italy | + | + | | 107ins4; 200+1G→A | 4 | 53, 54 |
| | Pakistan | | | + | unknown | 3 | 55 |
| IFNGR1 α (hetero) | Ireland | | | + | 818del4 | 3 | 57 |
| | Ireland | + | + | | 818del4 | 2 | 57 |
| | Germany | + | + | | 818del4 | 4 | 57 |
| IFN γ R1 (partial) | Portugal | + | + | | 87I>T | 2 | 56 |
| IFN γ R2 | England | | | + | del 278-279 | 1 | 50 |

Italy, Morocco, Sweden, England, USA, Scotlandにも散発例あり

BCG: *Bacille Calmette Guerin*, Tbc: *Mycobacterium tuberculosis*,

NTM: nontuberculous mycobacterium

11) 参考文献

1. Horsburgh CR, Jr., Mason UG, 3rd, Farhi DC, Iseman MD. Disseminated infection with *Mycobacterium avium-intracellulare*. A report of 13 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1985;64:36-48
2. Horsburgh CR, Jr., Selik RM. The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Am Rev Respir Dis*. 1989;139:4-7
3. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*. 1995;268:1749-1753
4. Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR, 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell*. 1998;93:477-486
5. Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanova E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell*. 1998;93:467-476
6. Gros P, Skamene E, Forget A. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J Immunol*. 1981;127:2417-2421
7. Schurr E, Buschman E, Malo D, Gros P, Skamene E. Immunogenetics of mycobacterial infections: mouse-human homologies. *J Infect Dis*. 1990;161:634-639
8. Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell*. 1993;73:469-485
9. Malo D, Vidal SM, Hu J, Skamene E, Gros P. High-resolution linkage

map in the vicinity of the host resistance locus Bcg. *Genomics*. 1993;16:655-663

10. Cellier M, Govoni G, Vidal S, Kwan T, Groulx N, Liu J, Sanchez F, Skamene E, Schurr E, Gros P. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med*. 1994;180:1741-1752
11. Stead WW. Genetics and resistance to tuberculosis. Could resistance be enhanced by genetic engineering? *Ann Intern Med*. 1992;116:937-941
12. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- γ genes. *Science*. 1993;259:1739-1742
13. Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune response in mice that lack the interferon- γ receptor. *Science*. 1993;259:1742-1745
14. Kobayashi K, Yamazaki J, Kasama T, Katsura T, Kasahara K, Wolf SF, Shimamura T. Interleukin (IL)-12 deficiency in susceptible mice infected with *Mycobacterium avium* and amelioration of established infection by IL-12 replacement therapy. *J Infect Dis*. 1996;174:564-573
15. Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faherty DA, Gately MK. IL-12-deficient mice are defective in IFN γ production and type 1 cytokine responses. *Immunity*. 1996;4:471-481
16. Mattner F, Magram J, Ferrante J, Launois P, Di Padova K, Behin R, Gately MK, Louis JA, Alber G. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *Eur J Immunol*. 1996;26:1553-1559
17. Chua AO, Wilkinson VL, Presky DH, Gubler U. Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor- β component. *J Immunol*. 1995;155:4286-4294
18. Wu C, Ferrante J, Gately MK, Magram J. Characterization of IL-12

receptor $\beta 1$ chain (IL-12R $\beta 1$)-deficient mice: IL-12R $\beta 1$ is an essential component of the functional mouse IL-12 receptor. *J Immunol.* 1997;159:1658-1665

19. Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature.* 1996;382:171-174

20. Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature.* 1996;382:174-177

21. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood.* 1994;84:4008-4027

22. Gearing DP, Cosman D. Homology of the p40 subunit of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) with the extracellular domain of the interleukin-6 receptor. *Cell.* 1991;66:9-10

23. Chua AO, Chizzonite R, Desai BB, Truitt TP, Nunes P, Minetti LJ, Warriar RR, Presky DH, Levine JF, Gately MK, et al. Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J Immunol.* 1994;153:128-136

24. Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, Gately MK, Gubler U. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two β -type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:14002-14007

25. Wu C, Warriar RR, Wang X, Presky DH, Gately MK. Regulation of interleukin-12 receptor $\beta 1$ chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Immunol.* 1997;27:147-154

26. Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F. Selective expression of an interleukin-12 receptor

- component by human T helper 1 cells. *J Exp Med*. 1997;185:825-831
27. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R β 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med*. 1997;185:817-824
28. Mitsuya H, Guo HG, Cossman J, Megson M, Reitz MS, Jr., Broder S. Functional properties of antigen-specific T cells infected by human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV-1). *Science*. 1984;225:1484-1486
29. Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the α subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med*. 1997;337:1720-1725
30. Bacon CM, McVicar DW, Ortaldo JR, Rees RC, O'Shea JJ, Johnston JA. Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *J Exp Med*. 1995;181:399-404
31. Zou J, Presky DH, Wu CY, Gubler U. Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits β 1 and β 2 and JAK kinases. *J Biol Chem*. 1997;272:6073-6077
32. Bacon CM, Petricoin EF, 3rd, Ortaldo JR, Rees RC, Lerner AC, Johnston JA, O'Shea JJ. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:7307-7311
33. Naeger LK, McKinney J, Salvekar A, Hoey T. Identification of a STAT4 binding site in the interleukin-12 receptor required for signaling. *J Biol Chem*. 1999;274:1875-1878
34. Yao BB, Niu P, Surowy CS, Faltynek CR. Direct interaction of STAT4 with the IL-12 receptor. *Arch Biochem Biophys*. 1999;368:147-155
35. Galon J, Sudarshan C, Ito S, Finbloom D, O'Shea JJ. IL-12 induces IFN regulating factor-1 (IRF-1) gene expression in human NK and T cells. *J Immunol*. 1999;162:7256-7262
36. Zhang F, Nakamura T, Aune TM. TCR and IL-12 receptor signals

cooperate to activate an individual response element in the IFN- γ promoter in effector Th cells. *J Immunol.* 1999;163:728-735

37. de Jong R, Altare F, Haagen IA, Elferink DG, Boer T, van Breda Vriesman PJ, Kabel PJ, Draaisma JM, van Dissel JT, Kroon FP, Casanova JL, Ottenhoff TH. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science.* 1998;280:1435-1438

38. Altare F, Durandy A, Lammas D, Emile JF, Lamhamedi S, Le Deist F, Drysdale P, Jouanguy E, Doffinger R, Bernaudin F, Jeppsson O, Gollob JA, Meinel E, Segal AW, Fischer A, Kumararatne D, Casanova JL. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science.* 1998;280:1432-1435

39. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:495-521

40. Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med.* 1997;186:39-45

41. Ottenhoff TH, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today.* 1998;19:491-494

42. Dorman SE, Uzel G, Roesler J, Bradley JS, Bastian J, Billman G, King S, Filie A, Schermerhorn J, Holland SM. Viral infections in interferon- γ receptor deficiency. *J Pediatr.* 1999;135:640-643

43. Lammas DA, Casanova JL, Kumararatne DS. Clinical consequences of defects in the IL-12-dependent interferon- γ (IFN- γ) pathway. *Clin Exp Immunol.* 2000;121:417-425

44. Aksu G, Tirpan C, Cavusoglu C, Soydan S, Altare F, Casanova JL, Kutukculer N. *Mycobacterium fortuitum-chelonae complex* infection in a child with complete interleukin-12 receptor β 1 deficiency. *Pediatr Infect Dis J.* 2001;20:551-553

45. Altare F, Ensser A, Breiman A, Reichenbach J, Baghdadi JE, Fischer A, Emile JF, Gaillard JL, Meinel E, Casanova JL. Interleukin-12 receptor β 1 deficiency in a patient with abdominal tuberculosis. *J Infect Dis*. 2001;184:231-236
46. Sakai T, Matsuoka M, Aoki M, Nosaka K, Mitsuya H. Missense mutation of the interleukin-12 receptor β 1 chain-encoding gene is associated with impaired immunity against *Mycobacterium avium* complex infection. *Blood*. 2001;97:2688-2694
47. Altare F, Lammas D, Revy P, Jouanguy E, Doffinger R, Lamhamedi S, Drysdale P, Scheel-Toellner D, Girdlestone J, Darbyshire P, Wadhwa M, Dockrell H, Salmon M, Fischer A, Durandy A, Casanova JL, Kumararatne DS. Inherited interleukin 12 deficiency in a child with *bacille Calmette-Guérin* and *Salmonella enteritidis* disseminated infection. *J Clin Invest*. 1998;102:2035-2040
48. Haraguchi S, Day NK, Nelson RP, Jr., Emmanuel P, Duplantier JE, Christodoulou CS, Good RA. Interleukin 12 deficiency associated with recurrent infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:13125-13129
49. Frucht DM, Holland SM. Defective monocyte costimulation for IFN- γ production in familial disseminated *Mycobacterium avium* complex infection: abnormal IL-12 regulation. *J Immunol*. 1996;157:411-416
50. Dorman SE, Holland SM. Mutation in the signal-transducing chain of the interferon- γ receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Invest*. 1998;101:2364-2369
51. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, Levin M, Blanche S, Seboun E, Fischer A, Casanova JL. Interferon- γ -receptor deficiency in an infant with fatal *bacille Calmette-Guérin* infection. *N Engl J Med*. 1996;335:1956-1961
52. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, Levin M. A mutation in the interferon- γ -receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med*. 1996;335:1941-1949
53. Pierre-Audigier C, Jouanguy E, Lamhamedi S, Altare F, Raugier J,

Vincent V, Canioni D, Emile JF, Fischer A, Blanche S, Gaillard JL, Casanova JL. Fatal disseminated *Mycobacterium smegmatis* infection in a child with inherited interferon γ receptor deficiency. Clin Infect Dis. 1997;24:982-984

54. Altare F, Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Fondaneche MC, Fizame C, Ribierre F, Merlin G, Dembic Z, Schreiber R, Lisowska-Groszpiere B, Fischer A, Seboun E, Casanova JL. A causative relationship between mutant IFN γ R1 alleles and impaired cellular response to IFN γ in a compound heterozygous child. Am J Hum Genet. 1998;62:723-726

55. Holland SM, Dorman SE, Kwon A, Pitha-Rowe IF, Frucht DM, Gerstberger SM, Noel GJ, Vesterhus P, Brown MR, Fleisher TA. Abnormal regulation of interferon- γ , interleukin-12, and tumor necrosis factor- α in human interferon- γ receptor 1 deficiency. J Infect Dis. 1998;178:1095-1104

56. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F, Fondaneche MC, Tuerlinckx D, Blanche S, Emile JF, Gaillard JL, Schreiber R, Levin M, Fischer A, Hivroz C, Casanova JL. Partial interferon- γ receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid *bacillus Calmette-Guerin* infection and a sibling with clinical tuberculosis. J Clin Invest. 1997;100:2658-2664

57. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, Dorman SE, Fondaneche MC, Dupuis S, Doffinger R, Altare F, Girdlestone J, Emile JF, Ducoulombier H, Edgar D, Clarke J, Oxelius VA, Brai M, Novelli V, Heyne K, Fischer A, Holland SM, Kumararatne DS, Schreiber RD, Casanova JL. A human *IFNGR1* small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. Nat Genet. 1999;21:370-378

58. Jones PA, Rideout WM, 3rd, Shen JC, Spruck CH, Tsai YC. Methylation, mutation and cancer. Bioessays. 1992;14:33-36

59. Tornaletti S, Pfeifer GP. Complete and tissue-independent methylation of CpG sites in the p53 gene: implications for mutations in human cancers. Oncogene. 1995;10:1493-1499

60. Cooper DN, Krawczak M. The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. Hum Genet. 1990;85:55-74

61. Rideout WM, 3rd, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science*. 1990;249:1288-1290
62. Miyazaki T, Maruyama M, Yamada G, Hatakeyama M, Taniguchi T. The integrity of the conserved 'WS motif' common to IL-2 and other cytokine receptors is essential for ligand binding and signal transduction. *EMBO J*. 1991;10:3191-3197
63. Livnah O, Stura EA, Johnson DL, Middleton SA, Mulcahy LS, Wrighton NC, Dower WJ, Jolliffe LK, Wilson IA. Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science*. 1996;273:464-471
64. Uribe L, Weinberg KI. X-linked SCID and other defects of cytokine pathways. *Semin Hematol*. 1998;35:299-309
65. Puck JM. IL2RGbase: a database of γ c-chain defects causing human X-SCID. *Immunol Today*. 1996;17:507-511
66. Verhagen CE, de Boer T, Smits HH, Verreck FA, Wierenga EA, Kurimoto M, Lammas DA, Kumararatne DS, Sanal O, Kroon FP, van Dissel JT, Sinigaglia F, Ottenhoff TH. Residual type 1 immunity in patients genetically deficient for interleukin 12 receptor β 1 (IL-12R β 1): evidence for an IL-12R β 1-independent pathway of IL-12 responsiveness in human T cells. *J Exp Med*. 2000;192:517-528
67. Doherty TM, Sher A. IL-12 promotes drug-induced clearance of *Mycobacterium avium* infection in mice. *J Immunol*. 1998;160:5428-5435
68. Amrolia P, Gaspar HB, Hassan A, Webb D, Jones A, Sturt N, Mieli-Vergani G, Pagliuca A, Mufti G, Hadzic N, Davies G, Veys P. Nonmyeloablative stem cell transplantation for congenital immunodeficiencies. *Blood*. 2000;96:1239-1246