

造血幹細胞移植を行った重症複合免疫不全症17例の検討

蒲池 吉朗 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学講師)

田中 真己人 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学)

小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学教授)

柘植 郁哉 (藤田保健衛生大学医学部小児科助教授)

【研究要旨】

重症複合免疫不全症 (SCID) はT細胞、B細胞機能ともに重篤に障害されており、無治療では2歳までにほとんどが感染死してしまう予後不良の疾患であり、根治療法として造血幹細胞移植 (SCT) が行われてきた。当科では24年間にSCID17例に対してSCTを行ったので臨床経過につき検討した。生存例は17例中12例であった。移植時や移植後の重症感染症罹患、病型が移植成績に影響を与えると考えられた。免疫能の改善については、生存例12例全例で細胞性免疫能の改善が認められたが、液性免疫能の改善はHLA一致同胞をドナーとした6例と非血縁臍帯血の2例のみであった。HLA一致同胞以外をドナーとした移植における液性免疫能の改善のためには、今後移植ソースや患者の状態に応じた前処置の有無などにつき再検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

これまで重症複合免疫不全症 (SCID) に対して根治療法としておもに造血幹細胞移植 (SCT) が行われてきたが、日本における移植成績についてはTsujiらのSCID11例を含む原発性免疫不全症候群30例の報告 (BMT 37: 469, 2006) 以外まとまった成績の報告はこれまで見当たらない。当科では1981年に日本で初めてSCIDのSCTに成功して以来2005年までの24年間で17例のSCIDに対してSCTを行なったので、移植後の免疫能の改善、移植成績に影響を与える因子や問題点を明らかにして、今後の移植方法や成績の改善のための方策につき検討した。

B. 研究方法

1981年3月から2005年3月までの24年間に名古屋大学小児科にて造血幹細胞移植を行った17例を対象とし、性別、病型および原因遺伝子、家族歴、ワクチン歴、初発症状、移植方法、移植後経過につき検討した。原因遺伝子の検索は、患者末梢血リンパ球、EBウイルス形質転換細胞株またはパラフィン包埋切片からDNAまたはRNAを抽出し、

型どおり各遺伝子特異的プライマーを用いてPCRを行った後、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析については、ヒトゲノム解析の指針に基づき本人または代諾者に対して十分な説明と文書による同意を得て行なった。

C. 研究結果

表1に患者背景を示す。性別は男性13例、女性4例。病型および原因遺伝子はそれぞれB (+) SCID12例で γ^c 鎖異常8例 (47%)、JAK3異常3例 (18%)、不明1例 (6%)。B (-) SCID 4例でRAG1異常3例 (18%)、Artemis異常1例 (6%)。ADA欠損症1例 (6%) であった。家族歴は5例が伴性劣性遺伝と考えられた。血族結婚は1例で認められた。ワクチン歴はポリオが3例、BCGが2例で接種されていた。ポリオを接種された3例全例とも移植前後でポリオを発症することはなかったが、BCGを接種された2例のうち1例は移植後にBCG敗血症を発症し、治

患者	性別	病型	実親遺伝子	造血幹細胞移植		HLA	T細胞活性	GVHD予防
				移植年月日	年齢			
SCID2	男	B+	yc	1991.3	13	母	—	MTX
SCID3	女	B+	JAK3	1992.6	7	非血縁母	ID	—
SCID4	男	B+	yc	1993.2	8	非血縁母	1 locus-mis	—
SCID5	男	B-	Artemis	1995.9	9	父	haplo	RT-MsAb
SCID6	男	B+	JAK3	1998.4	8	父	haplo	RT-MsAb
				1998.9	12	母	haplo	RT-MsAb
SCID7	男	B+	yc	1999.9	5	兄	ID	—
SCID8	男	B+	yc	1999.9	11	母	ID	—
SCID11	男	B-	RAG1	1997.7	3	兄	ID	—
				1992.10	7	兄	ID	—
SCID19	男	B-	RAG1	1993.4	8	祖母	1 locus-mis	—
SCID22	男	B+	yc	1994.7	8	母(非母)	ID	—
SCID23	男	B+	yc	1998.9	6	非血縁母	1 locus-mis	—
SCID24	男	B+	yc	1999.11	9	母	haplo	CD34+
SCID25	女	ADA欠損	ADA	1999.11	5	兄	ID	—
SCID26	男	B+	yc	2003.2	4	非血縁母	1 locus-mis	—
SCID27	男	B+	RAG1	2003.11	13	非血縁母	1 locus-mis	—
SCID28	女	B+	JAK3	2004.3	7	非血縁母	1 locus-mis	—
SCID31	女	B+, NK+	unknown	2005.3	4	兄	ID	—

表 1. 造血幹細胞移植を行ったSCID自験例

移植時月齢(中央値):	8ヶ月 (3-13ヶ月)	
移植後観察期間(中央値):	32ヶ月 (0.3-295ヶ月)	
総移植回数:	19回 (1回15例, 2回2例)	
移植ソース:	骨髓血16例, 臍帯血3例	
前処置:	4例 (CY + TLI/BU + CY + ALG, Flu + CY + TBI, Flu + L-PAM)	
移植細胞:		
	有核細胞数 (x10 ⁷ /kg) 単核細胞数 (x10 ⁷ /kg) CD34陽性細胞数 (x10 ⁵ /kg)	
無処理(12)	13 (4.1~55)	
T細胞除去(3)		3.8 (1.6~4)
CD34陽性選択(1)		42
臍帯血(3)	7.5 (3.5~13)	2.6 (0.7~4.5)
移植時合併症		
母T細胞由来悪性リンパ腫		
-高IgG血症	1例	
CMV網膜炎, 気管支炎	1例	
脳炎(ウイルス性)	1例	
間質性肺炎	1例	

表 2. 移植方法 (1)

療により軽快した。初発症状は、体重減少と咳嗽、喘鳴、多呼吸などの呼吸器症状が各々 8 例 (47%) で、驚口瘡は 6 例 (35%) で認められた。他は発熱、下痢、皮膚感染症、中耳炎、嘔声などであった。また、家族歴より出生時診断され、無症状の例が 2 例あった。発症時期は、半数以上の 10 例 (59%) が生後 3 ヶ月未満であり、生後 6 ヶ月で発症した 1 例を除いてすべて 5 ヶ月未満で発症していた。

移植月齢は 3 から 13 ヶ月 (中央値 8 ヶ月)、移植後観察期間は 0.3 ヶ月から 295 ヶ月 (中央値 32 ヶ月)、移植回数は 19 回 (2 例で拒絶または生着遅延のため各々 2 回移植)、移植ソースは骨髓血 16 例、臍帯血 3 例。前処置は 4 例で行われた以外他の 15 例はすべて前処置なしで移植された。移植細胞は無処理骨髓細胞 12 例 (有核細胞数 4.1~55 × 10⁷/kg、中央値 13 × 10⁷/kg)、モノクローナル抗 T 抗体による T 細胞除去骨髓細胞 3 例 (単核細胞数 1.6~4 × 10⁷/kg、中央値 3.8 × 10⁷/kg)、CD34 陽性選択骨髓細胞 1 例 (42 × 10⁵/kg)、臍帯血 3 例 (有核細胞数 3.5~13 × 10⁷/kg、中央値 7.5 × 10⁷/kg、CD34 陽性細胞数 0.7~4.5 × 10⁵/kg、

HLA適合度				
血縁ドナー	13例			
DNA型一致	7	血清学的一致 1	ハプロ一致 4	血清学的1座不一致 1
非血縁ドナー	3例 (ハングドナー1例)	血清学的一致 1		血清学的1座不一致 2
臍帯血	3例 (全例血清学的1座不一致, DNA型 3~4/6)			
GVHD予防				
MTX	2	CSA	5	CSA+sMTX 7
				FK+sMTX 4
				なし 1

表 3. 移植方法 (2)

生存	生存		
	患者数	生存者数	生存率(%)
病型			
B(+)	12	9	75
B(-)	4	2	50
ADA	1	1	100
総数	17	12	70.6
死亡原因			
感染症(移植時または移植後)		4例	
慢性GVHD		1例	
その他の移植後合併症 (移植後10年以上経過観察中のB(+))SCID 5例)			
下肢のリンパ水腫		2/5(40%)	
疝気		1/5(20%)	

表 4. 移植後経過 (1)

中央値 2.6 × 10⁵/kg) であった (表 2)。ドナーは血縁ドナー 13 例 (DNA 型一致同胞 7 例、血清学的一致母親 1 例、ハプロ一致父または母 4 例、血清学的 1 座不一致祖母 1 例)、非血縁ドナー 3 例 (血清学的一致 1 例、血清学的 1 座不一致 2 例)、非血縁臍帯血 3 例 (全例血清学的 1 座不一致) であった。GVHD 予防は、MTX のみ 2 例、サイクロスポリン A (CSA) のみ 5 例、CSA+sMTX 7 例、FK506+sMTX 4 例、なし 1 例であった (表 3)。移植時合併症を抱えての移植は 4 例あり、間質性肺炎、脳炎、経胎盤移行母 T 細胞由来悪性リンパ腫と IgG monoclonal gammopathy、CMV 網膜炎および気管支炎が各々 1 例ずつであった (表 2)。

移植後経過は 17 例中 12 例が生残り、5 例が死亡した。死亡原因は、移植時合併症を抱えていた 4 例全例 (うち 1 例は移植後に CMV による間質性肺炎罹患) が感染症により、また移植後の慢性 GVHD によるものが 1 例であった (表 4)。病型別の生存者は B (+) SCID が 12 例中 9 例 (72.9%)、B (-) SCID が 4 例中 2 例 (50%)、ADA 1 例 (100%) であった (図 1)。移植後 10 年以上生存中の B (+) SCID 5 例における合併症を検討し

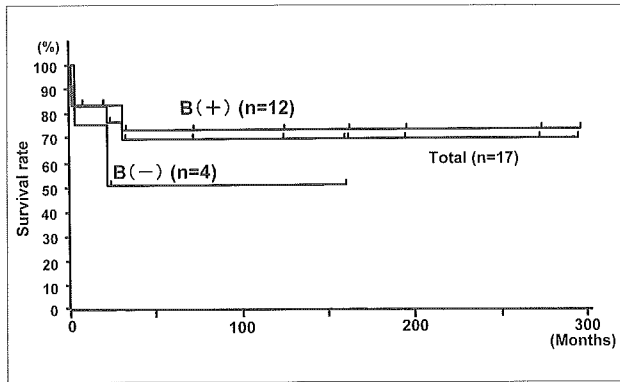


図1. 病型別生存率

たところ、下肢のリンパ水腫を2例に、そのうち1例は全身のヒトパピローマウイルス感染による疣贅も合併していた。急性GVHDは、grade IIまでがB(+) SCID 12例中3例(25%)に、grade IVがB(-) SCID 5例中1例(20%)に認められたが、全例コントロール可能であった。慢性GVHDは、B(+) SCID 11例中2例(18%)にextensive typeが認められ、B(-) SCIDでは3例中3例(100%)でextensive typeを認めた。(表4)

免疫学的再建は、移植後T細胞は生存例12例中11例でCD3陽性細胞数1000/ μ l以上となり、PHAに対する芽球化反応も12例中11例で20,000 cpm以上となった。移植後の免疫グロブリン補充療法の有無を検討したところ、HLA一致同胞ドナーからの移植では6例全例(うち前処置なし5例)で補充が不要となった。一方、HLA一致同胞ドナー以外からの移植では6例中、臍帯血移植を行った2例のみが補充が不要となった(表5)。

D. 考察

本研究では、当科にてSCTを行なったSCID 17例の臨床経過につき検討を行った。SCIDの初発症状につき検討したところ、約50%に体重減少と呼吸器症状を認めたが、重症感染症罹患以前に全例に共通するような特徴的な症状は認められなかった。初発症状の発症時期が3ヵ月以降の症例も30%存在し、これらのことが診断の遅れにつながり、SCID患児にとっては致命的となりうるBCG、ポリオ接種が行なわれる原因にもなっていると考えられた。また、重症感染症を合併したまま移植を

GVHD	acute (II~IV)	chronic
B(+)	3/12 (25%)	2/11 (18%)
B(-)	1/5 (20%)	3/3 (100%)
免疫能再構築		
T細胞		
CD3 \geq 1000/ μ l		11/12
mitogen response (PHA \geq 20000cpm)		11/12
B細胞		
ガンマグロブリン補充	なし	あり
ドナー:HLA一致兄弟	6	0
前処置	あり	1/1 0
	なし	5/5 0
ドナー:HLA一致兄弟以外	2	4
前処置	あり	1/1 0
	なし	1/5 4/5

表5. 移植後経過(2)

行った3例ではいずれも移植後感染症の改善なく死亡しており、重症感染症罹患前の無症状の時期にいかにも早くSCIDの診断を行うかが移植成績改善のためにも重要であると考えられた。最近、米国で出生時診断法として検討されており、本年度の班会議で今井らにより報告されたTREC測定によるSCIDのスクリーニングの有用性について今後わが国でも検討されるべきと考えられた。

移植方法については、SCIDは基本的には移植片拒絶能を欠いていることから、経胎盤移行した母T細胞を認めた2例とT細胞が20%存在し、PHA, ConAに対するリンパ球芽球化能が正常の10から50%認められたRAG-1異常症1例を除いて、移植ソース、病型およびドナータイプに係わらず、全例前処置を行わず移植した。母T細胞由来の悪性リンパ腫を発症し前処置を行なった1例を除いて拒絶は認められず、移植後の細胞性免疫能の改善も生存例12例では全例で認められた。以上のことは、どの病型のSCIDであっても、重症感染症罹患など全身状態が極めて不良で前処置が困難な場合には、前処置なしのSCTを行ない細胞性免疫能の改善を図ることが救命のための唯一の手段であると考えられた。免疫グロブリン補充(IVIG)の有無についての検討では、前処置なしHLA一致同胞ドナー5例の骨髄移植では全例IVIGが不要となったことから、HLA一致同胞ドナーからのSCTでは前処置なしの骨髄移植が第一選択と考えられた。HLA一致同胞ドナーが見つからない場合、今回の検討では非血縁臍帯血移植の3例(1例のみ骨髄非破壊的前処置施行)中2例で免疫グロブリン産生能の回復が認められたこ

と、および最近我が国ではSCIDに対して骨髄非破壊的前処置を用いた非血縁臍帯血移植により細胞性、液性免疫能とも再構築が可能であった症例の報告が増えており、非血縁臍帯血移植は有効な方法と考えられた。今後、本班会議SCIDワーキンググループによるSCIDの移植に関する全国2次アンケートの結果をもとに原因遺伝子や移植時合併症の有無などに考慮した更に安全で有効な臍帯血移植法につき検討する必要があると考えられた。

移植後の合併症についての検討では、移植後10年以上生存中の γ^c 鎖異常のSCID 5例につき検討したところ、下肢のリンパ水腫を2例に認めた。1年以上生存中の γ^c 鎖またはJAK3異常症3例のうち1例でも下肢の周囲径に左右差を認めた。文献的な報告はこれまで見当たらなかったが、 γ^c 鎖またはJAK3異常症では何らかの原因によりリンパ管の発生、構築が障害されており、SCTにより大量のリンパ球が体内で産生されることにより、リンパ流のうっ滞が生じ、下肢のリンパ水腫が起きることが推測された。下肢のリンパ水腫は γ^c 鎖またはJAK3異常症における新たな移植後合併症であることが示唆された。

E. 結 論

当科にてSCTを行ったSCID17例の臨床経過につき検討した。移植時や移植後の重症感染症罹患、病型が移植成績に影響を与えたと考えられた。ドナータイプに係わらず細胞性免疫能の改善は生存例12例全例で認められた。前処置なしの移植における液性免疫能の改善はHLA一致同胞ドナーでは全例認められたが、同胞ドナー以外では非血縁臍帯血移植の1例のみしか認められなかった。HLA一致同胞ドナーが見つからない場合、液性免疫能の改善のためには移植ソースや前処置法につき今後更に検討が必要と考えられた。これまで報告はないが、 γ^c 鎖またはJAK3異常を呈するSCIDにおける移植後の合併症として新たに下肢のリンパ水腫を認めた。

謝 辞

貴重な症例をご紹介頂きました下記施設の先生

方に深謝いたします。(敬称略)

尾鷲総合病院	加藤 孝、中尾宏太
和歌山赤十字病院	瓦野昌治
国立岡山病院	中村紳二
千葉大	河野陽一
鳥取県立厚生病院	松田 隆
鳥取大学	新沢 毅
国立岩国病院	山中良孝
岡山大学	小田 慈
南生協病院	前田敏子
関西医大	谷内昇一郎
福井赤十字病院	清原郁子
川崎医大	寺田喜平、中島美貴子
トヨタ記念病院	渡辺修大
名古屋市立緑市民病院	伊藤多美子
岡崎市民病院	祖父江文子、長井典子、鈴木基正

一部症例につき以下の先生方に遺伝子解析をして頂きました。深謝いたします。(敬称略)

北海道大学	有賀 正、崎山幸雄
東北大学	久間木悟、土屋 滋
金沢大学	谷内江昭宏
信州大学	上松一永

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

蒲池吉朗 原発性免疫不全症候群 血液疾患
ハンドブック 再生つばさの会一正基金 p77-
p81 2005

2. 学会発表

Yoshiro Kamachi, et al.
Successful bone marrow transplantation in
a patient with WHIM syndrome
Federation of Clinical Immunology Societies
5th Annual Meeting, Boston, May12-16, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

慢性肉芽腫症における骨髓非破壊的前処置を用いた 骨髓移植に関する研究

小林 正 夫 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学教授)

中 村 和 洋 (広島大学病院小児科助手)

【研究要旨】

3例の慢性肉芽腫症患者に対して骨髓非破壊的前処置を用いて骨髓移植を実施し、本疾患における本前処置法を用いた造血幹細胞移植療法の有効性、安全性が明らかとなった。

A. 研究目的

慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease, 以下CGDと略す) は食細胞における活性酸素産生障害が原因で、好中球殺菌能の低下または欠損症を示す免疫不全症であり、最も頻度の高い原発性免疫不全症の一つである。生後早期からの重症細菌もしくは真菌感染の反復を特徴とし、抗生剤、抗真菌剤投与とインターフェロン γ 治療によりある程度の感染予防は行えるものの、平均寿命は30歳前後と予後不良の疾患である。根治療法として遺伝子治療や造血幹細胞移植が期待されているが、前者は現時点では実用段階には至っておらず、後者はこれまで主に骨髓破壊的前処置を用いて実施されてきたが、反復感染症に伴った臓器障害や生着不全により、その治療成績は必ずしも満足できるものではない。近年、骨髓非破壊的前処置を用いた造血幹細胞移植が種々の疾患に導入されてきており、基礎疾患を合併することが多い本疾患においても移植成績の向上が期待される。今回、当科で3例のCGD患者に骨髓非破壊的の骨髓移植を実施し、安全性および有効性を検討することにより、CGDに対する最適な造血幹細胞移植療法の確立を目的とする。

B. 研究方法

対象症例はいずれも20代のgp91^{phox}欠損症の男児で、症例1はHLA完全一致同胞から、症例2はHLAハプロ一致同胞から、症例3はHLA表現型一致同胞から同種骨髓移植を実施した。全例、

肛門周囲膿瘍、肝膿瘍などの重症細菌感染症を反復し、特に症例3では抗生剤、抗真菌剤不応性の多発性脳膿瘍、多発性骨髓炎、難治性肛門周囲膿瘍(直腸瘻)を合併し全身状態不良であった。移植前処置には免疫抑制を主としたFludarabin、Cyclophosphamide、抗胸腺グロブリン、TBI(3Gy)を用いた。GVHD予防は短期MTXとtacrolimusかcyclosporinを使用した。症例2はHLAハプロ一致同胞からの移植であったため、ドナー血液中の患者細胞マイクロキメリズムを確認するとともに、CD3細胞除去骨髓細胞輸注とし、GVHD予防にはmycophenolate mofetilを併用した。移植後のキメラ状態は好中球gp91^{phox}の発現と好中球活性酸素産生能をFlow cytometryを用いて解析し、リンパ球系はVNTRを利用して解析した。好中球gp91^{phox}の発現解析などによりドナー細胞の割合が50%以下に低下した場合にはドナーリンパ球輸注(donor lymphocyte infusion、以下DLIと略す)を実施した。全例、文書で本人、家族の同意を得た後に移植を実施した。

C. 研究結果

3症例とも移植後すみやかな白血球回復と混合キメラ状態を確認することができた。症例1と症例3では混合キメラ状態が継続したため、それぞれ4回、2回のDLIを行い、移植後半年、1年後に完全キメラ状態を誘導することができた。症例3で移植時に認められた重症感染症は混合キメラ状態が確認された移植後1ヶ月より、すべての感

染症の治癒が認められた。3症例とも軽度のGVHD (Grade 1) を認めたのみで、重篤な移植関連毒性、移植後合併症は認められていない。移植後最低10ヶ月が経過した現在、3症例とも完全キメラ状態であるが、経時的なキメラ解析を行いながら経過観察中である。

D. 考 察

これらの結果から、CGDにおいてはFludarabin、Cyclophosphamide、抗胸腺グロブリン、低用量TBIによる強い免疫抑制に主眼をおいた骨髄非破壊的前処置により移植関連合併症を最小限とした造血幹細胞移植が可能と思われる。症例3のように重症感染症や臓器障害が認められる例でも前処置を軽減し、DLIを併用することにより、混合キメラか完全キメラの誘導が可能であり、全身状態の改善が期待される。また症例2のようにHLA完全一致ドナーが得られない例でも、キメリズム解析等の検索からより広く血縁者ドナーが利用できる可能性がある。

E. 結 論

以上より現段階ではCGDの根治療法として、HLA一致ドナーがいる場合には移植を考慮すべきである。反復感染症や臓器障害などの合併症が認められる症例においても、骨髄非破壊的前処置を用いることにより、安全かつ有効な造血幹細胞移植を実施することが可能であり、保存療法でコントロール不良のCGD症例では積極的な造血幹細胞移植療法の選択が望まれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

小野麻由子、藤田直人、浜本和子、水上智之、布井博幸、小林正夫：慢性肉芽腫症に対するHLA一致同胞からの骨髄非破壊的同種骨髄移植
日本小児血液学会雑誌 20:34-38, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞移植のまとめ

布井博幸 (宮崎大学医学部小児科教授)	矢部普正 (東海大学小児科)
水上智之 (宮崎大学小児科)	渡辺千英子 (浜松医科大学小児科)
鈴木信寛 (札幌医科大学小児科)	迫正広 (大阪市立総合医療センター)
藤原亨 (東北大学加齢医学研究達病態)	野村恵子 (富山大学小児科)
望月一広 (福島県立医大小児科)	岸本朋子 (奈良県立医大小児科)
土田昌宏 (茨城県立こども病院)	足立壮一 (京都大学小児科)
石和田稔彦 (千葉大学小児科)	中畑龍俊 (京都大学小児科)
村山静子 (国立成育医療センター)	三木瑞香 (広島大学小児科)
小林信一 (国立成育医療センター)	小林正夫 (広島大学小児科)
冠木智之 (埼玉県立小児医療センター)	寺岡いづみ (愛媛大学小児科)
鹿間芳明 (神奈川県立こども病院)	田内久信 (愛媛大学小児科)
黒木文子 (横浜市立大学小児科)	

【研究要旨】

慢性肉芽腫症の登録は250名を超え、種々の治療法も発達しているものの、全身の難治性肉芽腫症や敗血症などに依然悩まされている。日本では1992年に造血幹細胞移植が患者治療に用いられて以来、ここ4～5年急速に増えて、2005年には6例に移植が行われた。近年移植法の進歩により、Busulfan(BU)+Cyclophosphamide(CY)による前処置からFludarabine(Flu)+BU+TBI/ATGなどの前処置によるRIST (reduced-intensity stem cell transplantation) 法まで広がり、より状態の安定しない症例でも移植が可能となってきた。これまでに登録して頂いた28症例32移植について調査を行い、うち25症例26移植についての造血幹細胞移植の実情を解析出来た。移植ドナーは骨髄19例 (兄弟11例、バンク6例、母親2例)、末梢血幹細胞3例、臍帯血4例 (兄弟1例、バンク3例)であった。初期はBU+CY前処置の8例 (2例死亡) から始まり、最近ではCY+Flu前処置が11例 (死亡例無し) と多くなっている。その他の前処置法も症例の状態に即して採用されていた (7例中2例死亡、拒絶2例)。その結果、22例で骨髄移植が成功し、現在も生存されている。移植後死亡は6例であった。移植前に難治性感染が残存していた症例では17例中3例が死亡した。RIST法については半数でキメラ状態を改善すべく、Donor lymphocyte infusion (DLI) を施行されている。慢性肉芽腫症の骨髄移植についてはまだ工夫の必要があると思われた。

A. はじめに

慢性肉芽腫症は原発性免疫不全でも最も多い、難治性肉芽腫をきたす予後不良の疾患である。近年ミカファンギンやポリコナゾールなど抗真菌剤の進歩により、アムホテリシンBの時代と比較出来ないほど、治療が可能となってきている。しかし、一方でこれらの抗真菌剤でも十分な治癒効果が得られない症例もあり、根治療法としての骨髄

移植が期待されていた。

これまでの骨髄移植ではBU+CY±TBI/ATGが標準的前処置として用いられていたが、これらの前処置による晩期障害や不妊の問題や、難治性の肉芽腫を残した症例には移植の適応が制限されていた。その後骨髄移植技術の大幅な進歩により、Fludarabine (Flu) をベースにしたミニ移植 (Reduced-intensity stem cell transplantation:

RIST) が可能になったため、移植の適応も拡大し、これまで治療抵抗性の感染病巣を残し移植を断念していたような患者にも根治的治療として骨髄移植が試みられるようになった。

今回、日本でも1992年に慢性肉芽腫症患者へ骨髄移植が行われて以来15年間に登録された症例28例の移植前処置、および成績について多施設の先生方のご協力を得、欧米の Seger ら (1) と Mitchel ら (2) の報告と比較検討し、これからの移植に向けた中間報告としたい。

B. 方法

患者登録: 本研究は、食細胞機能異常症研究会に登録された造血幹細胞移植28症例について、宮崎大学医学部医の倫理委員会の承認を得、主治医に調査票を送付し、回答のあった25症例28移植例 (T021a,b, T015a) を対象とし、匿名化したのち解析した (表1)。T001, T004, T011についてはインフォームドコンセントが得られず、T015b, c, dについては生着に種々の要因が絡んでいたため解析から除外した。解析はSegerらの文献(1)に沿い、移植時点での活動性感染症や炎症の有無によって以下の3群 (Group 1: 移植時に難治性活動性感染を有していた群、Group 2: 移植時に活動性炎症や臓器障害を有していた群、Group 3: 移植時に明らかな感染症や炎症がなかった群) に分け解析した。

キメリズムの解析は各施設で全血14およびCD3

移植	年齢	ドナー	MNC 10 ⁸ /g	CD34 10 ⁶ /g	BU mg/kg	CY mg/kg	FLU mg/M ²	TBI or mg/M ²	ATO mg/kg	キメラ % ¹ 又M ²	DLI	転帰
T001	11	同胞										健常
T002	3	同胞妹(健康者)	骨髄	3.6	16	240				1		健常
T003	10	同胞兄	骨髄	1.9	16	160		TLI 7.5		1		健常
T004	9	同胞兄	骨髄									健常
T005	8	非血縁供養血	供養血	0.24	0.07	200		TAI 10	10	5		死亡
T006	5	同胞妹	PBSC	0.13	0.04	20	200	VP 800		1		死亡
T007	20	非血縁バンク	骨髄	3.1		120		TBI 12		1		健常
T008	5	同胞弟	供養血	1.3	0.4	16	200			45	4	死亡
T009	8	同胞弟	骨髄	5.4		120		TBI 12		1		健常
T010	6	同胞妹(健康者)フル	骨髄	2		200	150			60	5	DLI
T011	2	非血縁バンク	骨髄									死亡
T012	22	同胞弟	PBSC		5.4		120	150			2	健常
T013	12	同胞姉(健康者)	骨髄	2.1		16	200				4	健常
T014	21	同胞兄	骨髄	3.3		100	100	TBI 3		4		DLI
T015a	12	母親(母体)1歳一	PBSC	14.2	4	8		160		30	5	DLI
T016	13	非血縁バンク男性	骨髄	2.9		120	120	TLI 7		5		DLI
T017	4	非血縁バンク男性	骨髄	4.8		120	160	TBI 3		10	5	DLI
T018	4	母親(母体)フル	骨髄	0.33	1.48	16	200			10	0	DLI
T019	27	同胞弟フル	骨髄	5.9		80	160	TBI 7		5		健常
T020	10	非血縁バンク男性	骨髄	3.63	15.9	120	160	TBI 3		10	1	健常
T021a	2	母親3歳一	骨髄	5.7		120	150	LPAMI40		20	5	健常
T021b	2	非血縁バンク女性	供養血	0.66	0.11	8	160	TBI 2		1		健常
T022	28	同胞兄	骨髄	0.4	2.4	100	125	TBI 2		60	1	健常
T023	20	同胞兄フル	骨髄	4	4.5	75	125	TBI 2		45	4	DLI
T024	16	同胞妹(母体)フル	骨髄	3.6		16	200					健常
T025	4	非血縁バンク男性	骨髄	5.36		16	200					2
T026	15	同胞妹(健康者)	骨髄	3		120	160	TBI 3		5		DLI
T027	20	非血縁供養血	供養血	0.23	0.07	50	200	TBI4		1		健常
T028	14	非血縁バンク女性	骨髄	2.38	0.74	24	200			5	1	健常

表1 全患者リストと移植法

TBI or mg/M²の項ではVP16とL-PAMの薬容量も記載した。キメリズムについては0;生着せず、1;一貫して完全ドナー型、2;一貫してドナー優位、3;ほぼ平衡したキメラ状態、4;徐々にドナー型に移行、5;徐々にドナー細胞が減少・消失の状態を示す。

リンパ球7を用いた異性間FISH (11例)、FCM (5例)、STR (4例)、VNTR (2例)、遺伝子解析 (1例)、マイクロサテライトマーカー (1例)、などによる解析が多いが、統一した検査法でないため、比較が出来づらいが、同一施設では大まかに同じ検出法を取っておられたので、各施設が記載されたものを示した。

C. 結果

移植時点のリスクの解析 (表2):

先述の3群で比較すると、Group 1が17例中3例死亡、1例拒絶されていた。Group 2は全例生存していたが、Group 3では臍帯血幹細胞が移植された症例が死亡していた。

Group分類	患者数	健常	拒絶	死亡
1 難治性活動性感染群	17	13	1	3
2 活動性炎症や臓器障害を有する群	5	5	-	-
3 明らかな感染症や炎症がない群	3	2	-	1

表2 移植直前の感染炎症と移植結果

幹細胞ソースとドナーと結果の解析 (表3):

回答のあった25症例26移植についての結果である (表1)。骨髄移植の場合、HLA一致同胞と非血縁ドナーとでは移植法を考慮しても同等に良好な成績であった。末梢血幹細胞移植はまだ3例 (生着、拒絶、死亡) と数がすくなく、評価が難しい。臍帯血幹細胞を使用した症例で死亡者が多い (4例中2例) 傾向にあったが、最近成功例が2報あり、今後のドナーとしても期待されている。また移植時点での患者年齢は2~28歳と幅広かったが、とくに年齢による成績の差は見られなかった。

				健常	拒絶	死亡
BM	19	同種移植	HLA 完全一致	8	8	-
			不完全一致	3	3	-
			非血縁ドナー	6	6	-
			母親	2	-	1
PBSC	3			1	1	1
CBSC	4	同種移植	1	-	-	
		非血縁ドナー	3	2	-	

BM:骨髄幹細胞移植、PBSC:末梢血幹細胞移植、CBSC:臍帯血幹細胞移植

表3 幹細胞ドナーによる移植成績

前処置のレジメ (表4) :

現在のところBU+CYが8例、CY+Fluが11例と、この2つで全体の7割強を占めた。他の前処置例はまだ少なく、検討が加えにくかったので、この2群に絞って検討した。

BU+CYではBUを16mg/kg、CYが160~240mg/kgと、投与量は症例間でそれほど違いはなかった。移植8例中6例が生着(好中球数>500/ μ L)したが、うち2例は生着にもかかわらず感染死した。ほか2例が生着不全後の感染症で死亡された。生着までには11~35日(平均22.5日)要している。

CY+FluはCY(75~200mg/kg)、Flu(100~200mg/m²)と投与量に幅があり、放射線照射は11例中9例で、ATG(またはALG)は5例で併用されていた。ドナー、移植細胞の種類を問わず11例全例で生着し、生着まで6~24日(平均14.5日)と、BU+CYより短縮されていた。

表3のように、種々の前処置法が患者の状態を考えて行われている。

前処置レジメ	患者数	放射線照射	キメラ	健常	拒絶	死亡
BU+CY	8	-	4	4	-	-
		+ATG	3	1	-	2
		+Rx	1	1	-	-
BU+CY+VP16	1	-	1	-	-	1
BU+FLU	2	+ATG	1	-	1	-
		+Rx	1	1	-	-
CY+FLU	11	-	1	1	-	-
		+ATG	1	1	-	-
		+ATG +Rx	4	4	-	-
		+Rx	5	5	-	-
FLU+L-PAM	1	-	+Rx	1	-	1
CY	3	+ATG	+Rx	1	-	1
		-	+Rx	2	2	-

表4 前処置レジメと移植結果

キメリズムの解析 (図1)

図には、移植後の全血によるキメリズム検査でドナー型が5~90%の混合状態を示した11症例についてのみ挙げた。

8例でDLIが実施されているが、生着が誘導された症例T014、T023、末梢血中ドナー型骨髓球が混合キメラ症例で通常の日常生活を送っている症例T016や、効果が認められなかった症例T010、T015a、T018もある。まだデータが揃っていないが、逆にDLIによりGVHDが出現した症例T026

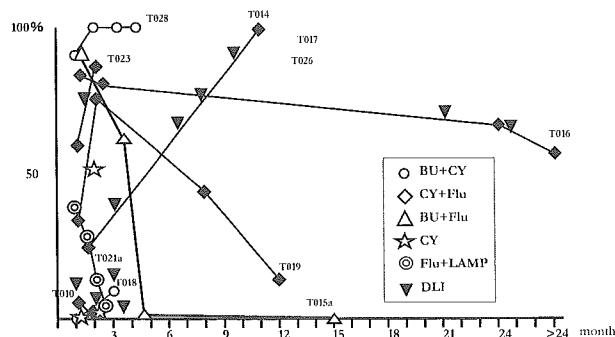


図1 キメリズム解析

や汎血球減少症をきたした症例T017も見られた。

キメラ状態でDLIを実施しなかった症例では、T028が自然に完全ドナー型になった。一方で、T019、T021aではドナー型細胞が減少~消失している。

死亡例の解析 (表5) :

現在までに28例中22例が生着、6例が移植後22~27日(平均44.6日)で死亡されている。死亡された6例のうち移植時点での活動性感染症の残存症例が5例、臍帯血幹細胞を移植ソースとした場合が3例と、多い傾向が見られた。前処置としては6例の死亡例中BU+CY処置が3例、Flu+VP16、CY+ATG処置が各々1例であった(不明1例)。6死亡例のうち4例が移植初期に生着不全となり、肉芽腫による頭蓋内出血、肺出血、肺真菌症による感染症で死亡されている(不明1例)。残る2例は生着したものの感染に伴う多臓器不全や、GVHD+TMAで死亡されていた。

患者	年齢	ドナーソース	前処置レジメ	GVHD予防	死亡病日	死因	生着・生着不全
05	8	CBSC	CY ATG	CyA MTX	+52	脳動脈流破裂(真菌性?)	生着不全
06	5	PBSC	BU CY VP16	CyA MTX	+77	aGVHD, TMA	生着
08	5	CBSC	BU CY ATG	CyA	+22	敗血症多臓器不全	生着
15	15	PBSC	FLU VP16 (4回目移植)	FK MTX	+25	肺肉芽腫からの出血	生着不全 15b,c,d
18	4	Mother BM	BU CY ATG	FK MTX	+47	真菌性肺炎	生着不全
11	3		移植後死				生着不全 ¹⁾

¹⁾小児感染免疫, 15:235-239, 2003

表5 死亡例まとめ

D. 考察

今回の調査から、移植を受けた慢性肉芽腫症患者の移植背景を見ると、感染症の鎮静化が得られずに活動性感染巣を抱えたまま移植を行った症例や、活動性感染症の残存または潜伏が予想された症例(Group 1、2)が多く見られた。欧州で実

施されたCGDに対する骨髄移植のリスク分類で欧州と日本を比較すると、Group 1に死亡・拒絶例が目立つ印象はあったが、他群と比較しても極端に多いものではなかった。これは後でも述べるように、Group 1でもCY+Fluプロトコールが多くの症例で採用されたことと関係があると考えられる。

ドナー選択については、HLA一致同胞骨髄と非血縁骨髄との間では著しい差がなく、ともに成績良好であった（表1）。欧米に比べて日本は単一民族の傾向が強いため、非血縁ドナーでも強い拒絶が起こらず、GVHDの反応も少ないと云われており（3、4、5）、慢性肉芽腫症の骨髄移植でも同様な結果と考えられた。末梢血幹細胞移植は3例で行われ、2例が生着し（うち1例死亡）、1例が拒絶されている。臍帯血幹細胞は4症例で行われ、2例（T021b, T027）で生着、2例が死亡（うち1例は生着不全）するなど成績は芳しくない。移植ソースとしての末梢血幹細胞移植と臍帯血幹細胞を用いるには、まだ十分な検討が必要と考えられる。

前処置レジメについては、活動性感染巣を残す症例の多くでRISTが採用されていた。BU+CYプロトコールによる移植後の晩期障害なども考慮すると、RIST法が採用されやすく、BU+CY法がこの様な症例では最近やや敬遠されている傾向がある。

BU+CY法では、2例が生着不全で、他の2例は生着にもかかわらず感染死されている。後者はいずれも臍帯血移植である。生着には平均22.5日要している。

CY+Fluは投与量に幅があり、放射線照射、ATG（またはALG）の併用されている例が多かった。骨髄の生着が肉芽腫組織の残存により拒絶されやすいと云うデータからも、患者の状態にあわせて使い分けられているようである。CY+Flu法ではドナー、移植細胞の種類を問わず全例で生着し、生着まで平均14.5日と、BU+CYより短縮されていた。しかし混合キメラの状態、ドナー型細胞への置換が充分行われないうちに、DLIが実施され、約半数以上（11例中8例）にのぼってい

る。骨髄幹細胞移植で基本的な前処置であるBU+CYも新しいRIST法でも、いずれも有力な前処置法と考えられる。

DLIについて、米国のMitchellら（2）は、RIST処置による末梢血幹細胞移植後、CD3⁺細胞でキメラ状態が60%を下ったら、GVHDが起こっていないことを確認後、 $2\sim 10 \times 10^6$ CD3⁺細胞/kgのDLIを30, 60, 90日に実施している。2例では14, 11ヶ月時に追加の 5×10^7 CD3⁺細胞/kg DLIを追加している。その結果、観察終了時点で6例の骨髄置換が完了している。そのうちDLIは9例に行われ、その結果6例が生着し（恐らく100%ドナー）、残る2例は58%, 33%となり生活上の支障はないようである。残る1例は拒絶され1例は移植前の状態に戻っている。初めから生着しなかった1例は死亡された。

今回の我々の調査でも、移植後の混合キメラ状態に対して、8例でDLIが実施されているが、生着が誘導された2症例、末梢血中ドナー型骨髄球が混合キメラ症例で通常の日常生活を送っている1症例、効果が認められなかった2症例と分かれる。逆にDLIによりGVHDが出現した1症例や汎血球減少症をきたした1症例も見られた。米国の結果と比べると生着率が低かった（米国で9例中6例、日本ではDLI施行した8例中2例、全体では28例中22例）。DLIを施行せずに様子を見られた3症例では、1例が自然に完全ドナー型に、また2症例がドナー型の消失という結果になった。DLIの副作用としてGVHDと血球減少症が知られている。実施に当たっては、適応や投与細胞、DLI後の維持目標など十分に検討すべきだと思われる。

移植後6例が死亡されたが、うち4例が生着不全、死因は肉芽腫による頭蓋内出血、肺出血や肺真菌症などであった。残る2人は生着確認されたが、GVHD+TMAと感染による多臓器不全であった。生着不全の原因として移植時点での潜在的感染巣の有無の精査と移植前の感染管理が重要である。臍帯血幹細胞をソースとした場合は、生着後の管理も必要である。

移植適応基準（時期・臓器障害など）の設定な

どは、まだ今回の解析では検討不十分である。しかし今後造血幹細胞移植の成功率を高めるためにも、将来的な遺伝子治療の適応基準を設定するためにも、全例登録し、データをもとにこれらの基準をつくる必要があると思われる。

F. 研究発表

A) 学会発表；なし

B) 発表誌名巻号・頁・発行年

1. Nishida S, Yoshida LS, Shimoyama T, Nuno H, Kobayashi T, Tsunawaki S. Fungal metabolite gliotoxin targets flavocytochrome b558 in the activation of the human neutrophil NADPH oxidase. *Infect Immun.* 2005 Jan;73 (1):235-44.
2. Hosoya M, Kawasaki Y, Katayose M, Sakuma H, Watanabe M, Igarashi E, Aoyama M, Nuno H, Suzuki H. Prognostic predictive values of serum cytochrome c, cytokines, and other laboratory measurements in acute encephalopathy with multiple organ failure. *Arch Dis Child.* 2006 Jan 27; [Epub ahead of print]
3. Sawada H, Yamaguchi H, Shimbara T, Toshinai K, Mondal MS, Date Y, Murakami N, Katafuchi T, Minamino N, Nuno H, Nakazato M. Central effects of calcitonin receptor-stimulating peptide-1 on energy homeostasis in rats. *Endocrinology.* 2006 Apr;147 (4):2043-50.
4. Hidaka F, Sawada H, Matsuyama M, Nuno H. A novel mutation of the PHKA2 gene in a patient with X-linked liver glycogenosis type 1. *Pediatr Int.* 2005 Dec;47 (6):687-90.

5. Mizuki K, Takeya R, Kuribayashi F, Nobuhisa I, Kohda D, Nuno H, Takeshige K, Sumimoto H. A region C-terminal to the proline-rich core of p47phox regulates activation of the phagocyte NADPH oxidase by interacting with the C-terminal SH3 domain of p67phox. *Arch Biochem Biophys.* 2005 Dec 15;444(2):185-94.
6. Hosoya M, Nuno H, Aoyama M, Kawasaki Y, Suzuki H. Cytochrome c and tumor necrosis factor-alpha values in serum and cerebrospinal fluid of patients with influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Infect Dis J.* 2005 May;24 (5):467-70.
7. Nuno H, Mercado MR, Mizukami T, Okajima K, Morishima T, Sakata H, Nakayama S, Mori S, Hayashi M, Mori H, Kagimoto S, Kanegasaki S, Watanabe K, Adachi N, Endo F. Apoptosis under hypercytokinemia is a possible pathogenesis in influenza-associated encephalopathy. *Pediatr Int.* 2005 Apr;47 (2):175-9.

参考文献

- 1) Seger RA, et al. *Blood* 100:4344, 2002
- 2) Mitchell E. Horwitz et al. *New Engl J Med* 344:881, 2001
- 3) Shiobara S et al. *Bone Marrow Transplant* 26:112, 2000
- 4) Collins R et al. *J Clin Oncol* 15:433,1997
- 5) Kolb HJ et al. *Blood* 86:2041,1995

共通 γ 鎖非依存性CD56^{bright} CD16⁻ NK細胞増殖／活性化により Omenn症候群様症状を呈したX-SCIDの同胞例

谷内江 昭 宏 (金沢大学医学部保健学科)
柴 田 文 恵 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)
和 田 泰 三 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)
東 馬 智 子 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)
笠 原 善 仁 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)
小 泉 晶 一 (金沢大学大学院医学系研究科小児科学)
佐 野 史 絵 (静岡県立こども病院)
木 村 光 明 (静岡県立こども病院)

【研究要旨】

活性化好酸球を主体とする末梢血白血球の増加、紅皮症様の全身皮膚の炎症、ならびに体重増加不良など、Omenn症候群類似の臨床像を示したX-SCID症例を経験した。家族歴ならびに遺伝子解析、末梢血リンパ球のCD132発現プロファイル、サイトカイン反応性などからは共通 γ 鎖欠損による典型的なX-SCIDであることが明らかにされた。患児末梢血中ではNK細胞が著しく増加、その半数はCD56^{bright} CD16⁻ 亜群であった。これらのNK細胞におけるNK抗原発現プロファイルには著しい異常は認められなかった。さらに、増加したNK細胞ならびに少量存在するCD4⁺ T細胞、B細胞のいずれも顆粒球において検出された*IL-2RG* 遺伝子変異と同一の、これまでに高頻度で報告されている変異を認めた。複数の遺伝子多型指標を用いた解析でも、これらの細胞亜群はいずれも顆粒球と同一のパターンを示した。これらの結果から、増殖しているNK細胞が 1) 母体由来である可能性、2) 遺伝子reversionが起こっている可能性、3) スプライス部位の変異など、特殊な*IL-2RG* 変異である可能性などは否定された。皮膚組織の検索では、炎症局所に単球ならびに樹状細胞、CD56^{bright} CD16⁻ 細胞が多数浸潤していた。特に、NK細胞と樹状細胞は真皮内に混じって集簇しており、これらの細胞の間に密接な相互作用があることが推測された。これらの結果は、NK細胞が樹状細胞との接触により共通 γ 鎖非依存性に活性化される、代替活性化経路を有することを示すと考えられた。

【研究目的】

共通 γ 鎖 (CD132) はリンパ系細胞に発現する多様なサイトカイン受容体の共通成分として重要な役割を果たすことが知られている。特に、IL-2、IL-4、IL-7、IL-15はT細胞およびNK細胞の分化・増殖に必須のサイトカインとされ、共通 γ 鎖の欠損ではX連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) が発症する¹⁾。したがって、X-SCID症例の末梢血中ではT細胞ならびにNK細胞が著しく減少、あ

るいは欠損するのが特徴であり、これが複合免疫不全症例においてX-SCIDを疑う根拠となる。一方、共通 γ 鎖遺伝子変異が確認されたX-SCIDにおいても末梢血中にNK細胞、T細胞が一定数認められる症例が報告されている^{2), 3)}。これらは、母体由来の細胞の経胎盤移入によるもの、あるいはスプライス部位の変異により少数の細胞に共通 γ 鎖の発現が認められる症例である。

一方、最近NK細胞の活性化に果たす樹状細胞

(DC)の役割が明らかにされつつあり、*in vitro*ではDCが直接NK細胞を活性化、その増殖を誘導することが示されている^{4)~6)}。特にNK細胞亜群のうちCD56^{bright} CD16⁻細胞はIL-2やIL-15などの共通γ鎖を介したシグナルではなく、DCが産生するIL-12により直接活性化されIFN-γ産生が誘導されるとの報告もある⁷⁾。

今回、X-SCID症例において末梢血ならびに皮膚におけるCD56^{bright} CD16⁻細胞の異常増殖を認めた症例を経験した。その特異な病態にDC-NK細胞の相互作用が重要であることが示唆され、この点に注目して解析した。

【対象ならびに方法】

1. 症 例

症例は当科検査依頼時6ヶ月の男児。主訴は紅皮症ならびに低ガンマグロブリン血症。母方男子に多くの「免疫不全」あるいは原因不明の乳幼児期死亡がある。特に、患児の異父兄は「Omenn症候群」の診断で骨髄移植を施行、経過不良のため死亡している(図1)。患児は3,190gにて出生、生下時には異常を認めていない。生後1ヶ月頃より全身性の湿疹が出現次第に増悪した。紹介医皮膚科にて重症アトピー性皮膚炎として経過観察されていた。生後6ヶ月時に咳嗽を主訴に小児科受診、この時紅皮症状態の全身皮膚病変に加え、体重増加不良、哺乳不良を認めたため入院。血液検査の結果、著明な好酸球主体の白血球増加と低ガンマグロブリン血症を認めた。このような臨床所見は、他医でOmenn症候群の診断を受けた兄においても同様に認められた(図2)。重症皮膚病

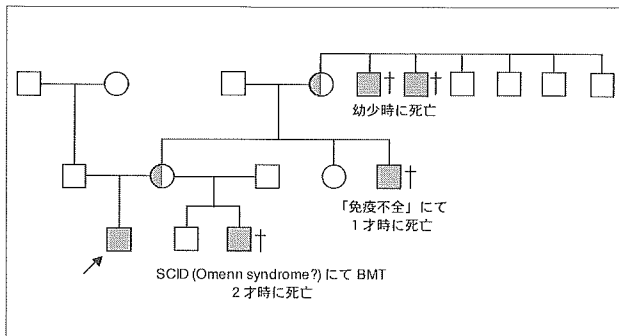


図1 家系図

本症例の家系図を示す。矢印が発端者である本症例。着色は免疫不全、あるいは乳幼児期死亡症例を示す。

変、全身状態不良、検査結果などよりOmenn症候群を疑われた。

2. 研究方法

リンパ球亜群による共通γ鎖はPE標識抗ヒトCD132抗体ならびに、FITC標識した各リンパ球亜群特異的

抗体を用いた2カラーフローサイトメトリーにより評価した。*In vitro*でのNK細胞ならびにT細胞活性化は、末梢血単核球をIL-2あるいはTSST-1添加により48時間培養し評価した。細胞表面のCD69抗原発現はフローサイトメトリー法により、培養上清中のIFN-γおよびIL-2はELISA法により定量した。末梢血リンパ球亜群の単離はmagnet beads法により施行した。各白血球亜群よりDNAを抽出、*IL2RG*遺伝子変異ならびにキメラ解析のための遺伝子多型部位の検索を施行した。*IL2RG*遺伝子塩基配列の解析は、ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により塩基配列を自動解析した。遺伝子多型の解析には一方を蛍光標識したCW2ならびにD9特異的プライマーを用いて多型部位を増幅、PCR産物のサイズをABI310により解析した。末梢血T細胞のTCRVβ repertoire解析はRPE・Cy5標識抗CD4、FITC標識抗CD8ならびにPE標識抗TCRVβ抗体を用いて3カラーフローサイトメトリーを施行、各T細胞亜群中のVβ repertoire分布を定量した。TCRVβ CDR3サイズ分布の解析(CDR3 spectratyping)は、magnet beads法により単離したCD4⁺T細胞ならびにCD8⁺T細胞より作成したcDNAを鋳型として使用した。25種類の5' TCRV特異的プライマーと蛍光標識3' TCRCプライマーを用いてPCR増幅、ABI310により解析した。

	兄	患者
皮疹	++++	++++
肝脾腫	肝脾腫	—
AST/ALT	280/284	30/15
WBC	14,000	24,700
Eo (%)	60	63*
CD4 ⁺ T (%)	10.3	11.8
CD8 ⁺ T (%)	6.5	<0.1
NK (%)	58	67.8
IgG	<173	9
IgM	31	13
IgA	<31	8
IgE	?	1.4

*好酸球は活性化抗原 CD69 を発現

図2 臨床データ

本症例ならびに「Omenn症候群」で死亡した異父兄の検査所見を示す。

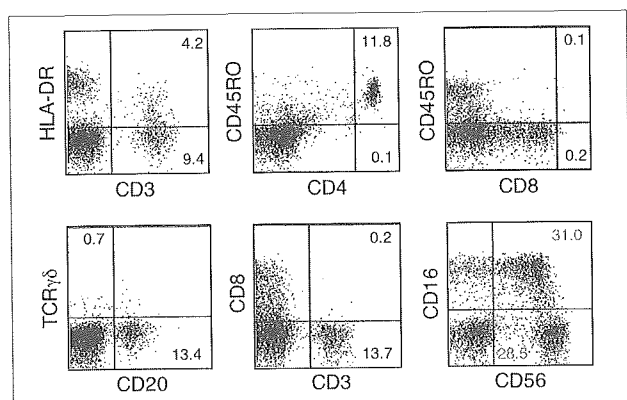


図3 末梢血リンパ球表面抗原

2カラーフローサイトメトリーによる表面抗原解析。数字は各4分画の構成比率(%)を示す。

【結果】

1. 末梢血リンパ球亜群ならびにTCR多様性解析

末梢血リンパ球の検索では、T細胞が10.9%と著明に減少していた。そのほとんどはCD45RO陽性CD4⁺T細胞(10.8%)であり、CD8⁺T細胞ならびにTCR $\gamma\delta$ 細胞は検出されなかった。B細胞はやや増加していた(20.9%)。CD56⁺NK細胞は著しく増加(64.3%)、その約半数(31.9%)はCD56^{bright}CD16⁻細胞であった(図3)。検出されたCD4⁺T細胞について、TCR構造の多様性をTCR V β repertoire分布とCDR3サイズ分布を指標に解析した。TCR V β repertoire分布は概ね正常であったが、CDR3サイズ分布は著しく偏りを示し、オリゴクローナルな活性化機序を反映していることが示唆された。

2. 共通 γ 鎖発現ならびにリンパ球活性化

単球ならびに各リンパ球亜群における共通 γ 鎖発現は抗CD132抗体を用いて評価した。患児では、解析対象とした全ての細胞集団においてCD132発現が著しく低下していた。両親の単核球はいずれもIL-2単独刺激によりCD56⁺NK細胞が活性化され強いCD69発現が誘導された。また、TSST-1刺激ではNK細胞、T細胞共にCD69抗原を発現、さらに培養上清中にはIFN- γ ならびにIL-2産生が確認された。一方、患児単核球を用いた場合には、IL-2、TSST-1いずれの刺激によってもこれらの細胞の活性化は誘導されなかった。

3. IL-2RG 遺伝子変異解析

患児顆粒球より抽出されたDNAを用いた解析

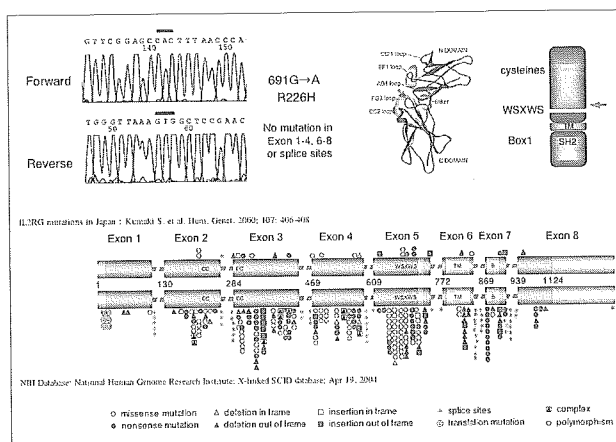


図4 IL2RG 遺伝子変異

Exon 5内の変異部位を示す。太線はtripletを示す。右上 γ 鎖鎖式図の矢印は推定される変異部位を示す。下図は本邦(上段)ならびにNIH database(下段)に報告されている変異の種類と部位を示す。

では、Exon 5内にミスセンス変異691G→Aが確認された。これによるR226Hのアミノ酸置換が生じる。他のexonならびにスプライス部位には変異を認めなかった。また、exon 5内の変異はこれまでもっとも多く報告されている変異の一つであり、共通 γ 鎖の発現が著しく低下することが推定された(図4)。

4. 各細胞亜群におけるIL-2RG遺伝子変異解析ならびに多型解析

患児リンパ球よりCD19⁺B細胞、CD4⁺T細胞ならびにCD56⁻NK細胞を単離、それぞれよりDNAを抽出、exon 5内の変異の有無を解析した。すべてのリンパ球亜群において、同一の変異が認められた。CW2解析では患児の細胞はすべて、母由来のピーク(122)および父由来のピーク(126)を同様に示した。D9の解析でも、母由来のピーク(127)および父由来のピーク(118)を同様に示した(図5)。これらの結果から、全ての細胞集団が本人のものであり母親由来でないこと、またIL2RG変異のreversionが起こっていないことが確認された。

5. 皮膚病理所見

採取された皮膚を細切し、浸潤するリンパ球の表面抗原を解析した。得られたリンパ球の多くはCD16⁻NK細胞であり、少数のCD4⁺T細胞が混

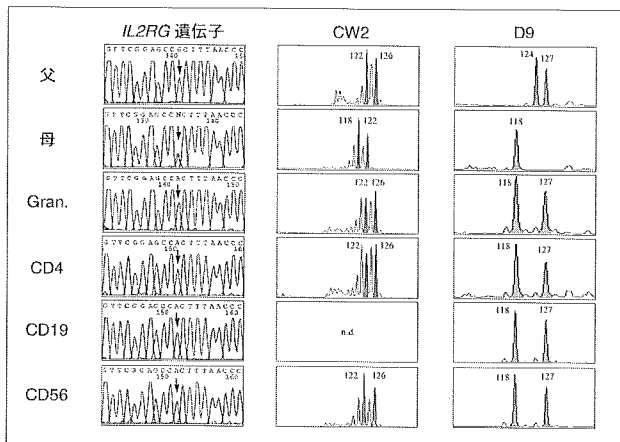


図5 キメラ解析

各細胞分画よりDNAを抽出、Exon 5内の変異部位を解析した(左)。さらにCW2(中央)およびD9(右)の遺伝子多型を比較した。

在していた。NK細胞にはCD25抗原発現が認められたが、CD4⁺ T細胞にはその発現が見られなかった(図6)。免疫染色による検討では、真皮上層、表皮下に多数のマクロファージが浸潤、真皮深層にはCD56⁺ NK細胞とCD1a陽性樹状細胞が多数混在して認められた。

【考察】

NK細胞の分化には多様なサイトカインが関与していることが知られており、特にその内多くのサイトカインの受容体の共通成分である共通γ鎖を欠損するX-SCIDでは末梢血中のNK細胞が欠損、あるいは著しく減少することが特徴とされる¹⁾。一方、マウスでは共通γ鎖をその受容体成分とするIL-2、IL-4、IL-7を欠損した場合でもNK細胞が正常数存在することが知られている。IL-15はNK細胞の増殖と細胞数の維持に重要であるとされているが、IL-15欠損マウスにおいても成熟NK細胞が少数存在することも報告されている⁸⁾。さらに、NK細胞がDCにより直接活性化されること、慢性炎症性疾患の局所ではCD56^{bright} NK細胞が活性化され集積することも知られている⁹⁾。これらの事実は、conventionalなNK細胞の分化、活性化機序とは別に、redundantな代替経路が存在する可能性を示唆している。特に、炎症局所におけるDCとNK細胞の直接細胞間相互作用が強いNK活性化シグナルを惹起し、NK細胞の増殖と炎症性サイトカイン産生を促す可能性

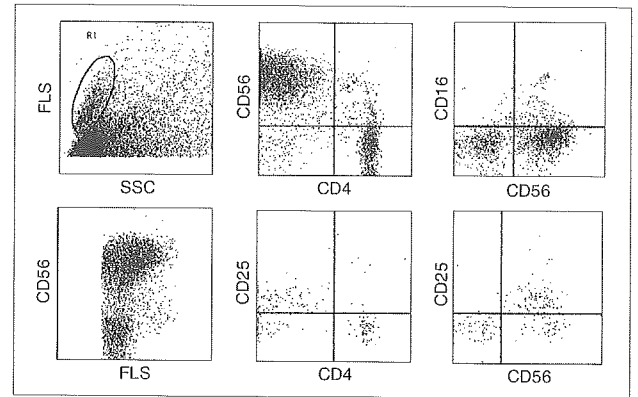


図6 皮膚浸潤細胞の解析

皮膚組織を細切し、浸潤している細胞の表面抗原発現を解析した。

がある。しかし、このような報告は全てマウスでの検討、あるいはヒトにおいては*In vitro*での検討に基づくものであり、実際に*In vivo*においてNK細胞が重要な共通γ鎖を介したシグナル非依存性に増殖、活性化する証拠はない。

今回検討したX-SCID症例は、典型的な共通γ鎖機能欠損を特徴とする症例であるが、末梢血ならびに皮膚組織においてNK細胞、特にCD56^{bright} NK細胞の異常増殖を認めた。このような異常なNK細胞増加の原因としては、おおよそ3つの可能性が候補として考えられる。1つは、既報にあるように、本症例のIL2RG遺伝子変異が希少なスプライス部位の変異であり、そのために機能的NK細胞の分化が起こったとする可能性である。しかし、本症例の変異はexon 5内の最も高頻度で見られる変異の一つであり、このような特殊なタイプの変異が要因となっている可能性は否定された。2つ目は、母体由来のT細胞、あるいはNK細胞が患児に移行し、活性化、増殖している可能性がある。これに関して、患児末梢血の各細胞分画を単離し、それぞれについてIL2RG変異、遺伝子多型部位の検索を施行した。結果に示した通り、全ての細胞分画において同一の変異が確認され、また遺伝子多型パターンも全て同一であった。これらの結果から、母体由来細胞の混入は否定された。同時に、第3の可能性、すなわちreversionによる変異の修復も否定された。したがって、本症例においては共通γ鎖の機能を欠損したままのNK細胞が何らかの機序で増殖・活性化していると推定された。

さらに、患者の皮膚の検索では浸潤リンパ球の多くがCD56^{bright} NK細胞であること、これらの細胞がCD25を発現、活性化されていることが示された。また免疫染色では、NK細胞がCD1a陽性DCと密に接触して集積していることが示された。これらの結果は、DC依存性のNK細胞活性化と増殖が皮膚の炎症部位を中心に起こっていること、末梢血におけるNK細胞の増加はこのような皮膚における病態を反映していることが強く示唆された。

以上の検討から、本症例で見られたOmenn症候群に類似した多彩な臨床症状、特に活性化好酸球の増加や、皮膚の特徴的な炎症はこれらのNK細胞とDCの相互作用がもたらした病態であると考えられた。患児の異父兄でも同様の臨床所見が認められたことから、類似した病態が起こっていた可能性が示唆される。したがって、何らかの共通する遺伝的背景を基盤にして、この同胞例では皮膚を中心とした局所での炎症、DC活性化が惹起され、同時にNK細胞の代替活性化機構が提供されていたことが示唆される。どのような遺伝的背景が存在していたのかについては今後の検討を待つ必要があるが、本症例はNK細胞が共通 γ 鎖非依存性に増殖することを示す最初の*in vivo*の証明となるものであり、NK細胞活性化機序について示唆に富む症例であると考えられた。

References

- 1) Kovanen PE, Leonard WJ : Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the γ c-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol. Rev.* 202:67-83, 2004
- 2) Kumaki S, Minegishi M, Ohashi Y, Hakozaki I, Tsuchiya S. et al : Characterization of the γ c chain among 27 unrelated Japanese patients with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID). *Hum. Genet.* 107: 406-408, 2000.
- 3) Ginn SL, Smyth C, Wong M, Bennetts B, Rowe PB, Alexander IE : A novel splice-site mutation in the common gamma chain (γ c) gene *IL2RG* results in X-linked severe combined immunodeficiency with an atypical NK⁺ phenotype. *Hum. Mut.* #706, 2004 Online.
- 4) Borg C, Jalil A, Laderach D, et al : NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood.* 104: 3267-3275, 2004.
- 5) Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E : Natural-killer cells and dendritic cells; "l'union fait la force". *Blood.* 106: 2252-2258, 2005.
- 6) Münz C, Ferlazzo G, de Cos MA, Goodman K, Young JW : Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells. *Blood.* 105: 266-273, 2005.
- 7) Romagnani C, Chiesa MD, Kohler S, et al : Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4⁺ T helper cells and CD4⁺ CD25⁻ T regulatory cells. *Eur. J. Immunol.* 35: 2452-2458, 2005.
- 8) Vosshenrich CAJ, Ranson T, Samson SI, et al : Roles for common cytokine receptor γ -chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *J. Immunol.* 174: 1213-1221, 2005.
- 9) Dalbeth N, Gundle R, Davies RJO, et al : CD56^{bright} NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J. Immunol.* 173: 6418-6426, 2004.

安全性を高めたX連鎖重症複合免疫不全症に対する遺伝子治療法の開発：自殺遺伝子の遺伝子治療への応用

内山 徹 (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)
久間木 悟 (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)
笹原 洋二 (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)
Du Wei (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)
佐藤 美季 (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)
土屋 滋 (東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野)

【研究要旨】

これまでにフランスおよびイギリスにおいて行われてきたX連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) に対する遺伝子治療では、その多くの症例で免疫系の再構築が得られ、有効性が確認された。しかしその後15例中3例で、レトロウイルスベクターの遺伝子挿入変異によるリンパ性白血病が発症した。今回我々は、万が一発癌した場合でも癌化した細胞を自殺遺伝子 Herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) で殺せるレトロウイルスベクターを開発した。まず、X-SCID患者から樹立したB細胞株にこのベクターを感染させ、遺伝子導入した γ c鎖の発現と機能を確認した。その後、抗ウイルス薬であるganciclovir (GCV) による処理を行い、 γ c鎖発現細胞が経時的消失することを確認した。現在動物モデルを使用してその有効性を検討中である。

A. 研究目的

X-SCIDは細胞性免疫と液性免疫の両方に欠陥を有する疾患であり、その責任遺伝子はサイトカイン受容体の共通サブユニットである共通 γ 鎖(γ c鎖)である¹⁾²⁾。根治的治療として骨髄移植が挙げられるが、HLA一致同胞が存在しない場合はその予後が必ずしも良好とはいえず、近年造血幹細胞を利用した遺伝子治療が行われるようになった。これまでにフランスとイギリスにおいてレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療が行われてきたが、多くの症例で免疫系の再構築が得られ、その有用性が証明された³⁾⁴⁾。しかしフランスで遺伝子治療を施行された患者10例中3例で、遺伝子治療後3年目にレトロウイルスベクターの遺伝子挿入変異による発癌(リンパ球性白血病)が報告され、 γ c鎖の導入部位が発癌遺伝子であるLMO2の転写開始部位であることが判明した⁵⁾。今回われわれは、白血病が発症した場合でも癌化

した細胞を抹消できるように、自殺遺伝子である Herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) を治療用の γ c鎖遺伝子と同時に組んだレトロウイルスベクターを開発した。このベクターを使用してX-SCID患者から樹立したB細胞株に遺伝子導入をおこないその有用性を検討した。

B. 研究方法

1) 遺伝子導入

マウス幹細胞ウイルス (Murine stem cell virus, MSCV) のLTRを有するレトロウイルスベクターを基盤として、ヒト γ c鎖およびHSVtk遺伝子を持つベクターpD- γ c/TKを作製し、X-SCID患者 (Patient1, Patient2) から樹立したB細胞株に遺伝子導入を行った。 γ c鎖の発現はモノクローナル抗体であるTUGh4による染色後、FACS Caliburにて確認した。また γ c鎖に直接

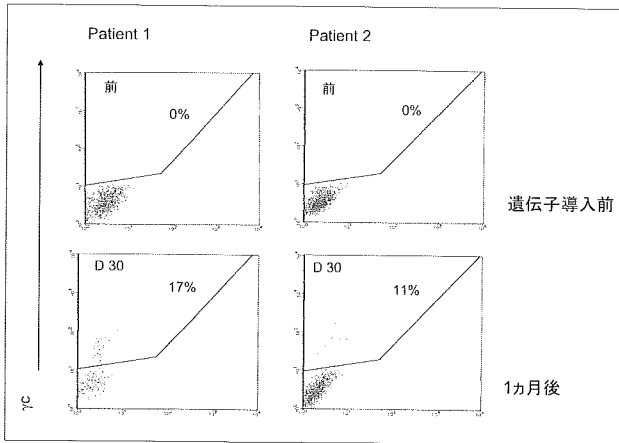


図1 遺伝子導入前および導入後の γ C鎖発現

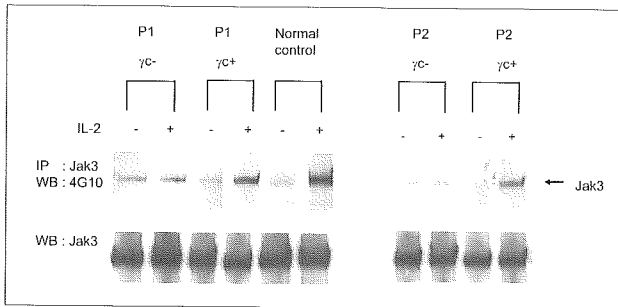


図2 遺伝子導入前および導入後のJak3分子のリン酸化
遺伝子導入前 (γ C-) と導入後 (γ C+) の細胞をIL-2により刺激し、抗Jak3抗体で免疫沈降した後で抗リン酸化抗体4G10でウェスタンブロットを行った。

会合する tyrosine kinase である Jak3 分子のリン酸化によりシグナル伝達を確認した。

2) ganciclovir (GCV) による処理

自殺遺伝子 HSVtk の効果を検討するため、遺伝子導入した B 細胞株を抗ウイルス薬である ganciclovir (GCV) を含む培地にて 14 日間培養した。GCV の濃度は 0.1、1.0、10、25、50、100 μ M とし、それぞれの濃度において γ C 鎖発現細胞が消失するかどうかを経時的に解析した。また、遺伝子が導入されていない細胞を同様の条件で培養することで、GCV の細胞毒性 (細胞の増殖・生存度への影響) についても検討した。

C. 研究結果

pD- γ C/TK を用い X-SCID 患者 (Patient1, Patient2) から樹立した B 細胞株に遺伝子導入を行った結果、患者細胞表面に γ C 鎖が発現し (patient1: 13%, patient 2: 8%)、さらに IL-2 刺激による Jak3 分子のリン酸化が認められ、導入した γ C 鎖によるサイトカインシグナルの伝達

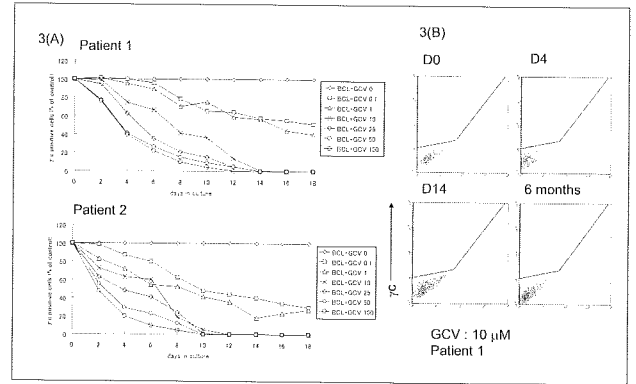


図3 ganciclovir処理による γ C鎖発現細胞の比率 (A) およびドットプロット (B)

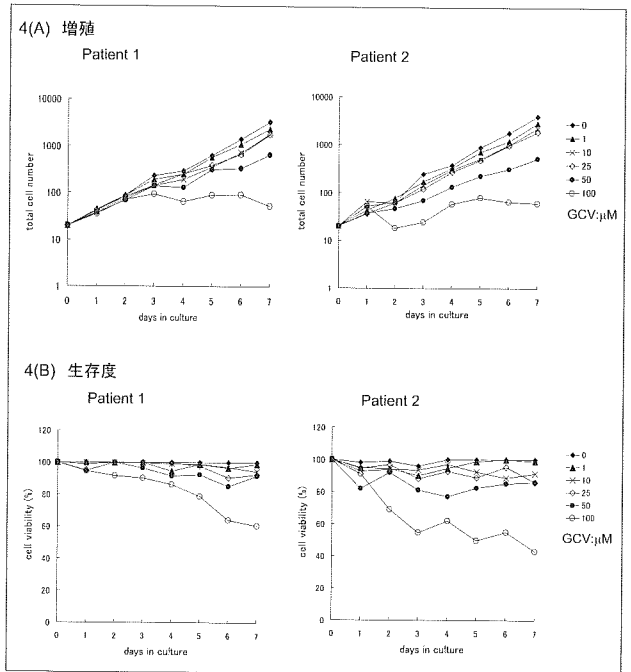


図4 ganciclovirによる細胞毒性の評価
遺伝子導入前の細胞をganciclovirの存在下で培養し、それぞれの濃度における増殖 (A) と生存度 (B) を検討した。

が確認された (図1、2)。

次に遺伝子導入細胞をGCVにより処理したところ、4日後より γ C鎖発現細胞の減少が認められ、14日目には10 μ M以上の濃度ですべての γ C鎖発現細胞が消失した。その後もGCV非存在下で培養を継続したが、 γ C鎖発現細胞が再出現することはなかった (図3)。

導入した γ C鎖の発現は6ヶ月以上安定して認められ、またGCVへの感受性も維持されていた。細胞毒性については、GCV濃度25 μ Mまでは細胞増殖、生存度への影響は認められなかった (図4)。

D. 考 察

以上の結果より、in vitroにおいてGCVは遺伝子非導入細胞に影響を与えない濃度（10および25 μ M）で γ c鎖発現細胞のみ選択的に殺すことが可能であった。一般にGCVの臨床使用時（5 mg/kg）の血中濃度は3~40 μ Mであり、今回の有効濃度は最高血中濃度以下であった。しかし、GCVへの感受性は細胞の種類によって異なり、ヒトリンパ球にHSVtkを導入したこれまでの報告では1 μ Mで効果が認められている⁹⁾ことから、遺伝子導入造血幹細胞から分化したリンパ球に対しては本実験で示した有効濃度より低濃度でも効果があると考えられる。

遺伝子治療に自殺遺伝子（HSVtk遺伝子）を組み込む際の最大の問題は、遺伝子の欠失またはサイレンシングによってその効果を失ってしまうことである。ただしHSVtk遺伝子の欠失に関しては、同一ベクター上で隣接する γ c鎖遺伝子も同時に欠失すると考えられ、挿入変異による癌化の可能性は低いと思われる。したがってHSVtk遺伝子のサイレンシングによるGCVへの感受性の低下がより重要となる。我々の実験においても、モロニーマウス白血病ウイルス（MoMLV）のLTRを使用したベクターではCpGメチレーションによると思われる発現量の減少が認められたため、本研究ではMSCVレトロウイルスベクターを使用した。また γ c鎖とHSVtkの発現量のばらつきを抑えるため、IRES配列を介して2つの遺伝子が同一のプロモーター（LTR）により発現されるようにした。その結果、長期間にわたる γ c鎖の安定した発現が認められ、同時にGCVへの感受性も維持された。

E. 結 論

今回我々は、挿入変異によって万が一発癌した場合でも癌化した細胞を自殺遺伝子HSVtkで殺せるレトロウイルスベクターを開発した。

このベクターを患者B細胞株へ遺伝子導入したところ、長期間にわたる γ c鎖の安定した発現および自殺遺伝子の効果が確認された。この結果はX-SCID患者に対するより安全な遺伝子治療とし

て自殺遺伝子の有用性を示唆すると考えられた。現在動物モデルを使用してin vivoにおけるその安全性および有効性を検討中である。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) Uchiyama T, Kumaki S, Ishikawa Y, Onodera M, Sato M, Du W, Sasahara Y, Tanaka N, Sugamura K, Tsuchiya S. Application of a suicide gene to X-SCID gene therapy. American Society of Gene Therapy 8th Annual Meeting, June 1-5, 2005
- 2) Uchiyama T, Kumaki S, Ishikawa Y, Onodera M, Sato M, Du W, Sasahara Y, Tanaka N, Sugamura K, Tsuchiya S. Application of a suicide gene to X-SCID gene therapy. Japan Society of Gene Therapy 11th Annual Meeting, July 2-30, 2005

2. 論文発表

- 1) Uchiyama T, Kumaki S, Fujiwara M, Nishida Y, Hakozaki I, Imai K, Du W, Yoshinari M, Tsuchiya S. A novel JAK3 mutation in a Japanese patient with severe combined immunodeficiency. *Pediatr. Int.* (2005) 47, 575-578.
- 2) Uchiyama T, Kumaki S, Ishikawa Y, Onodera M, Sato M, Du W, Sasahara Y, Tanaka N, Sugamura K, Tsuchiya S. Application of HSVtk suicide gene to X-SCID gene therapy: Ganciclovir offsets gene corrected X-SCID B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press.
- 3) Du W, Kumaki S, Uchiyama T, Yachie A, Looi Chung Yeng, Kawai S, Minegishi M, Ramesh N, Geha R S, Sasahara Y, Tsuchiya S. A second-site mutation in the initiation codon of WASP gene results in expansion of subsets of lymphocytes in an

Wiskott-Aldrich syndrome patient. Hum, Mut. in press.

4) Ishikawa Y, Tanaka N, Murakami K, Uchiyama T, Kumaki S, Tsuchiya S, Kugoh H, Oshimura M, Calo M P, Sugamura K. Phage ϕ C31 integrase-mediated genomic integration of the common cytokine receptor gamma chain in human T-cell lines J. Gene Med. in press.

(参考文献)

1. M. Noguchi, H. Yi, H.M. Rosenblatt, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. Cell 73 (1993) 147-157.
2. A. Fischer, F. Le Deist, S. Hacein-Bey-Abina, et al. Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. Immunological Reviews 203 (2005) 98-109.
3. M. Cavazzana-Calvo, S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID) -X1 disease. Science 288 (2000) 669-672.
4. H. B. Gaspar, K. L. Parsley, S. Howe, et al. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. Lancet 364 (2004) 2181-87.
5. S. Hacein-Bey-Abina, C. Von Kalle, M. Schmidt, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science 302 (2003) 415-419.
6. C. Bonini, G. Ferrari, S. Verzeletti, et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. Science 276 (1997) 1719-1724.