

200834018A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 原 寿郎

平成 21 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 原 寿郎

平成 21 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

目 次

I. 班員・研究協力者名簿	1
II. 総括研究報告	3
原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野教授)	
○参考資料	13
III. 分担研究報告	
1. 原発性免疫不全症登録原簿の保存について	91
岩田 力 (東京家政大学家政学部児童学科)	
2. TRECs (T-cell receptor excision circles) および KRECs (kappa-deleting recombination excision circles) を用いた T 細胞・B 細胞欠損症の新生児マススクリーニング法の開発	93
中川 紀子、辻 陽一郎、子川 和宏、野々山恵章 (防衛医科大学小児科)	
今井 耕輔 (防衛医科大学小児科・医療情報部)	
3. 好中球二次顆粒欠損症の臨床経過と簡易診断法の確立	97
重村 倫成、塩原 正明、上松 一永、小池 健一 (信州大学医学部小児医学講座)	
4. 原発性免疫不全症の病態解析	103
森尾 友宏、高木 正稔、水谷 修紀 (東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野)	
5. 本邦における原発性免疫不全症の遺伝子解析	108
小原 収 (かずさ DNA 研究所 ヒトゲノム研究部)	
大嶋 宏一 (独立行政法人 理化学研究所 横浜研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター免疫ゲノミクス研究グループ)	
6. 高 IgE 症候群に見られる黄色ブドウ球菌感染症の部位特異的発症機構の検討	111
峯岸 克行 (東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学)	
7. NOD2 遺伝子異常を伴った若年性サルコイドーシス/Blau 症候群の臨床像の検討	115
西小森隆太、岡藤 郁夫、酒井 秀政、八角 高裕、平家 俊男、中畑 龍俊 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)	

8. 隣接遺伝子欠失による難聴合併 X 連鎖無ガンマグロブリン血症の遺伝子解析	121
金兼 弘和、趙 美娜、二谷 武、宮脇 利男 (富山大学医学部小児科)	
山田 雅文、有賀 正 (北海道大学医学部小児科)	
大石 勉 (埼玉県立小児医療センター感染免疫アレルギー科)	
9. 欠失断端を決定した CYBB 遺伝子を含む隣接遺伝子症候群の 2 例	125
山田 雅文、川村 信明、有賀 正 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)	
大石 勉、荒井 孝 (埼玉県立小児医療センター)	
10. Omenn 症候群様症状を呈した非典型的 X 連鎖重症複合免疫不全症にみられた遺伝子変異の reversion	130
和田 泰三、東馬 智子、笠原 善仁、谷内江昭宏 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)	
11. 化膿性細菌感染に関与する Toll 様受容体の細胞内シグナル伝達機構の構造生物学的解析	134
大西 秀典、加藤善一郎、木村 豪、名田 匡利、徳見 哲司、近藤 直実	
(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)	
長屋聡一郎 (岐阜大学医学部附属病院高次救命治療センター)	
金子 英雄 (岐阜大学大学院医学系研究科地域医療医学センター)	
12. WASP の活性化及び蛋白分解機構の解析	138
笹原 洋二、渡辺 祐子、Looi Chung Yeng、久間木 悟、土屋 滋	
(東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学分野)	
13. B 細胞、NK 細胞、形質細胞様樹状細胞を欠損した新規免疫不全症	142
高田 英俊、石村 匡崇、原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)	
菊繁 吉謙、有信洋二郎 (九州大学病院遺伝子細胞療法部)	
赤司 浩一 (九州大学大学院医学研究院病態修復内科)	
土居 岳彦、石川 文彦 (理化学研究所ヒト疾患モデル研究ユニット)	
14. 新規の原発性免疫不全症と考えられる IgM メモリー B 細胞欠損症の 1 例	146
蒲池 吉朗、小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学)	
上松 一永 (信州大学医学部小児医学講座)	
15. 原発性免疫不全症モデルマウスの確立と応用	149
土居 岳彦、高田 英俊、原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)	
石川 文彦 (理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター ヒト疾患モデル研究ユニット)	
金兼 弘和、宮脇 利男 (富山大学医学部小児科)	
16. 造血幹細胞から免疫細胞への分化培養系確立に関する研究	153
千葉 滋 (筑波大学大学院人間総合科学研究科)	

17. 慢性肉芽腫症への造血幹細胞移植とドナー・リンパ球輸注 (DLI) の効果についての解析	155
布井 博幸、水上 智之 (宮崎大学小児科)	鈴木 信寛 (札幌医科大学小児科)
藤原 亨 (東北大学加齢医学研発達病態)	望月 一広 (福島県立医大小児科)
土田 昌宏 (茨城県立こども病院)	石和田稔彦 (千葉大学小児科)
村山 静子、小林 信一 (国立成育医療センター)	冠木 智之 (埼玉県立小児医療センター)
鹿間 芳明 (神奈川県立こども病院)	黒木 文子 (横浜市立大学小児科)
矢部 普正 (東海大学小児科)	渡辺千英子 (浜松医科大学小児科)
野村 恵子 (富山大学小児科)	森本 哲 (京都府医大小児科)
迫 正広 (大阪市立総合医療センター)	岸本 明子 (奈良県立医大小児科)
三木 瑞香、小林 正夫 (広島大学小児科)	寺岡いづみ、田内 久信 (愛媛大学小児科)
長谷川大一郎 (兵庫県立こども病院)	武市 京子 (愛媛県立中央病院)
足立 壮一、中畑 龍俊 (京都大学小児科)	
18. 重症先天性好中球減少症における造血幹細胞移植	160
中村 和洋、岡田 賢、小林 正夫 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学)	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧	165

I 班員・研究協力者名簿

原發性免疫不全症候群調査研究班
班 員 名 簿

	氏 名	施 設	職 名
主任研究者	原 寿 郎	九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野	教 授
分担研究者	宮 脇 利 男	富山大学大学院医学薬学研究部小児科学	教 授
	有 賀 正	北海道大学大学院医学研究科小児科学分野	教 授
	土 屋 滋	東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野	教 授
	野々山 恵 章	防衛医科大学校医学研究科小児科学	教 授
	森 尾 友 宏	東京医科歯科大学大学院発達病態小児科学分野	准 教 授
	上 松 一 永	信州大学大学院医学研究科移植免疫感染症学	准 教 授
	近 藤 直 実	岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学分野	教 授
	蒲 池 吉 朗	名古屋大学大学院発育・加齢医学講座小児科学	講 師
	谷内江 昭 宏	金沢大学医薬保健研究域小児科講座	教 授
	中 畑 龍 俊	京都大学大学院医学研究科発達病態小児科学	教 授
	小 林 正 夫	広島大学大学院病態情報医学講座小児科学	教 授
	布 井 博 幸	宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野	教 授
	岩 田 力	東京家政大学家政学部児童学科	教 授
	峯 岸 克 行	東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学	准 教 授
千 葉 滋	筑波大学医学部血液内科	教 授	
事 務 局	高 田 英 俊	九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 〒812-8582 福岡県福岡市馬出 3-1-1 TEL 092-642-5421 FAX 092-642-5435	特任准教授
經理事務担当者	藤 川 眞 一	九州大学医系学部等經理第一係 TEL 092-642-6006 FAX 092-642-6022 e-mail ijzkeiri@jimu.kyushu-u.ac.jp	係 長

研究協力者名簿

	氏名	施設	職名
研究協力者	竹森利忠	理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター 免疫記憶研究グループ	グループディレクター
	石川文彦	理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター ヒト疾患モデル研究ユニット	ユニットリーダー
	小原 収	かずさ DNA 研究所ヒトゲノム応用研究部	部長
	赤城邦彦	神奈川県立こども医療センター	母子保健室長
	大石 勉	埼玉県立小児医療センター	保健発達部長
	小林 信一	国立成育医療センター膠原病・感染症科	医員

II 年次總括報告

総括研究報告

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

主任研究者 原 寿郎

（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野教授）

研究要旨

本調査研究班は、原発性免疫不全症の患者 QOL と医療水準の向上に貢献するため以下の研究を重点的に行った。

（1）全国疫学調査の実施

平成 20 年度に全国疫学調査を行った。それにより各疾患の我が国における頻度、臨床像の特徴、予後などを明らかにする。ホームページによる患者二次登録を推進し、IT を活用したデータベース構築も進めている。

（2）迅速診断法の開発

平成 20 年度は、フローサイトメーターを用いた IRAK4、MyD88、UNC-93B1 遺伝子異常、AT、IPEX、好中球二次顆粒欠損症の迅速診断法を確立した。また Real time PCR 法を用いた TREC、KREC 測定による SCID、XLA のスクリーニング法の開発も行った。

（3）責任遺伝子の同定や病態の解明

前回解明された STAT3 や Tyk2 遺伝子に異常がみられない高 IgE 症候群で、第 3 の責任遺伝子を同定し解析中である。また多くの免疫不全症の病態解析を行い、XLA に関してはヒト化マウス疾患モデルを作成して解析を行った。

（4）治療ガイドラインの作成と新規治療法の開発

SCID および CGD の造血幹細胞移植ガイドラインの概要を作成したので、今後細部を検討しホームページに公開する。遺伝子治療研究では、より安全性の高いベクターを検討中で、今後ヒト化マウス疾患モデルを用いて、その有効性や安全性を確認する。Protein transduction domain を用いたタンパク治療につき基礎研究をおこなった。

（5）患者家族や医療者への継続的情報提供

診断基準や確定診断に必要な検査項目、専門病院、遺伝子検査を行う施設名や連絡先など新しい情報をホームページに掲載した。ホームページでは症例の相談を受け付けており、各疾患の専門家が主治医にむけて診断や治療のアドバイスをしている。日本免疫不全研究会を立ち上げ、担当医師への情報提供、意見交換のための体制を作った。全国疫学調査の際、主治医のメールアドレスの登録を進め、継続的に免疫不全症に関する最新の情報提供を行い、この疾患に対する医療水準を向上させたい。XLA 成人患者の QOL を検討するための詳細な調査票を作成し、現在調査中である。患者家族会との連携を深め、講演会や相談会を実施した。

分担研究者

- 宮脇 利男・富山大学大学院医学薬学研究部小児科学教授
有賀 正・北海道大学大学院医学系研究科小児科学分野教授
土屋 滋・東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学分野教授
野々山恵章・防衛医科大学校医学研究科小児科学教授
森尾 友宏・東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科発達病態小児科学准教授
上松 一永・信州大学大学院医学研究科移植免疫感染症学准教授
近藤 直実・岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学分野教授
蒲池 吉朗・名古屋大学大学院発育・加齢医学講座小児科学講師
谷内江昭宏・金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻病態検査学教授
中畑 龍俊・京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座発達小児科学教授
小林 正夫・広島大学大学院病態情報医科学講座小児科学教授
布井 博幸・宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野教授
岩田 力・東京家政大学家政学部児童学科教授
峯岸 克行・東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学准教授
千葉 滋・筑波大学医学部血液内科教授

研究協力者

- 竹森 利忠・理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター
免疫記憶研究グループグループディレクター
石川 文彦・理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター
ヒト疾患モデル研究ユニットユニットリーダー
小原 収・かずさDNA研究所ヒトゲノム応用研究部部長
赤城 邦彦・神奈川県立こども医療センター母子保健室長
大石 勉・埼玉県立小児医療センター保健発達部長
小林 信一・国立成育医療センター膠原病・感染症科医員

I. 研究の目的

本調査研究班は、原発性免疫不全症の患者 QOL と医療水準の向上に貢献するため努力している。原発性免疫不全症は 150 疾患以上となり、またキャリアオーバーによる成人例、成人での新たな発症例は十分把握されていない。本研究班の基礎となる各疾患の我が国における頻度、臨床像の特徴、予後、QOL などをこの 3 年で明らかにするため、全国調査を行い小児のみならず成人の原発性免疫不全症の全患者を把握する。その際患者のみならず、主治医も登録し医療者への継続的情報提供、意見交換の体制を作る。

早期に診断し小児期の重症感染を減少させることで患者 QOL を向上させるため、迅速診断法を開発し医療に応用する。また正確な診断や適切な治療の開発を行うため、引き続き責任遺伝子の同定や病態の解明を行う。

我が国の背景・特色をふまえたそれぞれの疾患に適合した治療ガイドラインを作成し治療法を改良していくために、造血幹細胞移植では、既に作成したプロトコールの成績を把握した上で移植法の改良や適応拡大、より安全性が高く成績のよい方法を具体化し公開する。またヒト化マウス疾患モデルを用いて、疾患モデルマウスを作成しより安全なベクターを用いた遺伝子治療法や再生治療法を開発していく。

II. 研究方法

本調査研究では、以下の重点目標を掲げ、国際的動向や国内での調査研究による我が国の背景をふまえた調査研究を行い、患者・家族へ最善の治療の提供、及び QOL の向上に寄与したい。

(1). 疫学調査研究：原発性免疫不全症候群の 2007 年の新分類に従い全疾患の全国一次調査（参考資料 I：一次調査票）を行う。今回の調査の特徴は、以前と異なり疾患の数が圧倒的に増加した点、小児からのキャリアオーバーの成人例と X 連鎖疾患のキャリアー女性が加齢に伴う X 染色体不活化の偏り (skewing) により発症する

患者も含める点である。理化学研究所と共同でホームページによる患者二次登録（参考資料 2：二次調査票）を推進し、IT を活用したデータベースを構築する。それにより各疾患の我が国における頻度、臨床像の特徴、予後などを明らかにする。

(2). 迅速診断法の開発と遺伝子解析：各研究者が原発性免疫不全症の診断において、遺伝子診断以外の簡易診断法や、遺伝子解析以前の簡易スクリーニング検査法などの迅速診断法開発を行う。遺伝子解析は各専門施設と理研・かずさ DNA 研究所・JMF センターが行う。

(3). 責任遺伝子、発症機構、病態の解明：責任遺伝子の同定や病態の解明は、正確な診断や適切な治療の開発につながるため、全分担研究者が症例の蓄積に努め責任遺伝子の同定を行う。今回はさらにヒト化マウス疾患モデルを用いて原発性免疫不全症の原因解明、病態解析を行う。

(4). 治療ガイドラインの作成と新規治療法の改良・開発：現在の治療法の中で、患者の生活スタイルに最も適合し負担の少ない治療法を提言し、主要免疫不全症について治療ガイドラインを作成する。造血幹細胞移植では、既に作成したプロトコールの成績調査、今後プロトコールが作成されるべき疾患で検討し、安全性の高い方法を具体化し公開する。遺伝子治療研究では、安全性の高いベクターの検討を行い、ヒト化マウス疾患モデルを用いて、その有効性及び安全性を確認する。

(5). 患者家族や医療者への継続的情報提供、意見交換の体制を作る：診断基準や確定診断に必要な検査項目、専門病院、遺伝子検査を行う施設名や連絡先、治療指針、造血幹細胞移植のガイドラインなど新しい情報をホームページに掲載する。担当医師への継続的情報提供、意見交換の体制を作る。患者家族会との連携を深め、講演会や相談会を実施し、日常生活マニュアル

を作成する。また、患者の QOL 調査票（参考資料 3：QOL 調査票）を用いて問題点を抽出し改善方法を検討する。

III. 研究結果と考察

(1) 全国疫学調査の実施

国内の原発性免疫不全症候群患者の頻度、臨床経過などを最新の国際的分類法にのっとり解析するために、国内の 2,894 施設（小児科 1,224 施設、内科 1670 施設）に対してアンケート調査を行った。一次アンケート調査により、原発性免疫不全症候群患者の数、およびその疾患名を調査した。現時点での回答率は小児科 44.4%、内科 18.7%であり、未回答の施設に対しては回答を依頼しているところである。これまでに重症複合免疫不全症 58 例、その他の複合免疫不全症 20 例、抗体産生不全症 421 例、など、合計で小児科 1,989 例、内科 164 例が集計されている。これらの施設を対象として二次調査を行い、合併症の有無を中心として詳細に調査する予定である。

既に PIDJ ホームページには原発性免疫不全症候群の多くの症例が登録されている（参考資料 4：ホームページによる患者登録状況）。アンケート調査で明らかになった患者数に関しては、今後 PIDJ への登録を働きかける。

(2) 迅速診断法の開発

平成 20 年度は、フローサイトメーター、real-time PCR 法を用いた迅速診断法を確立した。（参考資料 5：迅速診断法のまとめ）

1. TREC, KREC 測定による SCID, XLA などのスクリーニング法の開発

Real-time PCR 法による TRECs, KRECs 絶対定量法を確立した。健常新生児の TRECs, KRECs は全例測定可能であり、低値、検出感度以下になる例はなかった。T 細胞欠損症である SCID では、全例 TRECs は全例でごく低値ないし検出感度以下であった。XLA などの B 細胞欠損症では新生児期の cJKRECs, sJKRECs は全例検出感度以下だっ

た。B(-)SCID では cJKRECs, sJKRECs は検出感度以下、B(+)-SCID では cJKRECs, sJKRECs 正常であり、SCID の病型診断にも有用であった。TRECs, KRECs の同時測定により、SCID、無 γ グロブリン血症の新生児スクリーニングが可能であり、早期発見・早期診断・早期治療へと応用できると考えられた。

2. フローサイトメトリーによる好中球二次顆粒欠損症の簡易診断法の開発

好中球二次顆粒欠損症は、転写因子 C/EBP β の異常によって二次顆粒が欠損し、黄色ブドウ球菌などの化膿性感染症を反復する疾患である。フローサイトメトリーによる解析では、一次顆粒の defensin、二次顆粒の 18-kDa cationic antimicrobial protein (CAP18)、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)、lactoferrin の著明な発現低下を認めた細胞内の defensin などの検出が早期診断法としてきわめて有効と考えられた。

3. リン酸化 ATM 検出による

Ataxia-telangiectasia の診断

健常人、患者の EBV-LCL、活性化 T 細胞、末梢血単核球を用いて放射線照射、あるいは過酸化水素刺激し、細胞内リン酸化 ATM (pATM) を FACS にて解析したところ患者での無応答、保因者では健常人と患者の中間的な反応を示した。本方法は DNA 損傷修復機能まで検証している点が優れているが、他の DNA 修復異常症でも異常値の可能性はある。

(3) 責任遺伝子の同定や病態の解明

前回解明された STAT3 や Tyk2 遺伝子に異常がみられない高 IgE 症候群で、第 3 の責任遺伝子を同定し解析中である。新規の B 細胞、NK 細胞、形質細胞様樹状細胞を欠損した免疫不全症、IgM メモリー B 細胞が選択的に欠損している免疫不全症に加え、多くの免疫不全症の病態解析を行った。

1. 本邦における原発性免疫不全症の遺伝子解析

かずさ DNA 研究所では、プロジェクトの一員として、100 種類を超える免疫不全症関連遺伝子解析を行っている。2008 年 11 月末までに、212 サンプル、1074 遺伝子 (112 種類) の PID 関連遺伝子解析の DNA シーケンシングによる依頼を受けた。その結果、これまでに、ナンセンス変異 15 例、フレームシフト 13 例、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) 以外のミスセンス変異 85 例、スプライス位置から ±2bp 以内の変異 14 例、スプライス位置から ±20bp 以内の変異 71 例を明らかにすることができた。こうした経験を基にして、蓄積された症例情報の活用、より包括的な遺伝子診断法の確立、より効率的かつ正確な遺伝子診断のためのシステム作りを行う。

2. 高 IgE 症候群の病態解析

高 IgE 症候群は、黄色ブドウ球菌などの細胞外寄生菌による皮膚と肺の易感染性に難治性湿疹・血清 IgE 高値を合併する原発性免疫不全症である。昨年度、骨・歯牙の異常を合併する 1 型の高 IgE 症候群の主要な原因遺伝子が STAT3 であることを報告した。今回、STAT3 の分子異常がどのようなメカニズムで皮膚と肺に選択的な黄色ブドウ球菌感染症を引き起こすかを検討した。その結果、STAT3 に異常を有する高 IgE 症候群症例では、活性化した T 細胞からの Th17 サイトカインの産生が不良で、そのためケラチノサイトと気管支上皮細胞においてのみ、好中球をリクルートするケモカイン (CXCL8, CXCL1) と β -defensin2/3 の産生が不良であることを明らかにした。このことが高 IgE 症候群に特徴的な皮膚と肺の易感染性の発症に関与している可能性が示唆された。

3. NOD2 遺伝子異常を伴った若年性サルコイドーシスの臨床像の検討

若年性サルコイドーシス/Blau 症候群は皮疹、関節炎、ブドウ膜炎を三主徴とする主として 4 歳以下で発症する自己炎症症候群の 1 つである。近年、病因として NOD2 遺伝子異常との関連が明

らかにされた。今回 NOD2 遺伝子異常を認めた本邦 20 例の臨床的特徴をまとめるとともに、変異 NOD2 遺伝子による NF- κ B 活性化と臨床的重症度との相関について検討した。いずれも変異 NOD2 遺伝子はリガンド非依存的 NF- κ B 活性化能をもち、その病因としての重要性が確認された。皮膚症状として魚鱗癬様紅皮症型皮疹 + 苔癬様型皮疹が大部分で 25% に結節性紅斑型皮疹を認めた。関節症状は多関節型、眼症状は全眼型のブドウ膜炎が大部分であった。本邦に特徴的なこととして 55% に発熱を認め、全身型若年性特発性関節炎との鑑別が重要と考えられた。病因として重要であることが確認された変異 NOD2 遺伝子によるリガンド非依存的 NF- κ B 活性化能と臨床的重症度との相関の検討では、眼症状の予後因子として有効である可能性が示唆された。

4. 非典型的 X 連鎖重症複合免疫不全症にみられた遺伝子変異の reversion

γ c 鎖の異常による X 連鎖重症複合免疫不全症 (XSCID) は、T/NK 細胞の発生が障害されるため、T^BNK⁻ SCID となる。今回我々は、自己 T/NK 細胞が出現し Omenn 症候群様の症状を呈した非典型的 XSCID の症例において、第二変異による遺伝子変異の reversion を見出した。患児は IL2RG 遺伝子に変異 IVS1+5G>A を有し、スプライス異常により大部分の mRNA は早期翻訳停止となっていた。しかし一部に正常 mRNA も作られており、 γ c 鎖発現の低下した異常な T 細胞と NK 細胞が認められた。この異常 T 細胞の存在を背景に、患児では皮膚浸潤 CD8⁺ T 細胞に reversion が起こり、Omenn 症候群様症状を呈していた。Revertant では元の変異 IVS1+5G>A により生じる cryptic なスプライス部位の近傍に第二変異 IVS1+29G>A が出現したために、正常なスプライシングが回復していた。以上より、XSCID の臨床スペクトラムは幅広く、また reversion は病態を修飾する重要な因子となる得ることが示された。

5. 隣接遺伝子欠失による難聴合併X連鎖無ガンマグロブリン血症

X連鎖無ガンマグロブリン血症(XLA)では時に難聴を合併するが、多くは反復性中耳炎によるものである。まれに進行性の難聴とジストニア(Mohr-Tranebjaerg症候群; MTS)を合併することがある。XLAとMTSの原因遺伝子はそれぞれ*BTK*と*TIMMSA*であり、これらが隣接していることから隣接遺伝子欠失によりXLAとMTSを発症しうる。今回難聴と自閉症を合併した10歳のXLA患者の遺伝子解析を行ったところ、*BTK*の3'端と*TIMMSA*のみならず、さらにセントロメア側に存在する*TAF7L*と*DRP2*の欠失を伴い、約150kbの大欠失であった。切断点は5'端が*DRP2*の4.4kb上流、3'端が*BTK*のイントロン5に存在しており、わずかに3塩基の相同配列で組み換えを生じていた。従来組み換えはイントロン内のAlu配列などの繰り返し配列を利用して生じることが多いとされていたが、今回はAlu配列部位ではなく、しかも大欠失であったことより、新たなメカニズムによるものと推察される。

6. 欠失断端を決定した*CYBB*遺伝子を含む隣接遺伝子症候群

X連鎖性慢性肉芽腫症(X-CGD)は*CYBB*遺伝子異常に起因し、食細胞の殺菌能障害を特徴とする原発性免疫不全症である。そのほとんどは*CYBB*遺伝子内における変異によるが、複数の遺伝子に及ぶ欠失によりMcLeod症候群やOTC欠損症などを合併した例も報告されている。しかしその大部分は欠失断端が決定されておらず、詳細な欠失範囲や欠失機構は不明である。今回*CYBB*遺伝子を含む隣接遺伝子症候群(CGS)を呈した2例について、array CGH解析結果に基づきPCR法とDNA Walking法により遺伝子欠失断端を決定した。症例1は現在8歳の男児で、生後早期より重症のOTC欠損症症状が出現、乳児期からは感染症を繰り返すようになりCGDと診断されている。PCRにて*OTC*、*CYBB*、*XK*遺伝子がいずれも増幅されないことからCGSの可能性を考え、array CGH解析を行ったところ、これらの遺伝子を含む3.47Mbの欠失が認められた。PCR法によ

り断端領域を狭めた後に断端の両側からのPCRを行い、その産物のdirect sequenceにより断端を決定した。網膜色素変性症の責任遺伝子*RPGR*とX-linked mental retardationの責任遺伝子*TSPAN7*も欠失領域に含まれていた。症例2は現在24歳の男性。生後早期より感染を繰り返して1歳時にCGDと診断された。18歳時に本人と家族の希望で病型・遺伝子診断依頼があり当科で解析したところ、*CYBB*の全exonがPCRで増幅されず、完全欠損を疑った。Kell抗原も低下していたことからCGSを疑い、array CGHを施行したところ、*CYBB*、*XK*を含む約0.8Mbの欠失がみられた。テロメア側断端領域には染色体6や13とhomologyの高い領域が存在しており、PCR法のみでは断端領域を狭めるのが困難であったため、断端近傍のセントロメア側配列にprimerを設定しDNA Walking法を行った。これにより両側の断端位置とその間への36bpの挿入を決定しえた。この挿入配列は欠失領域中に存在するantisense配列と一致し、これが逆位で挿入されたと考えられた。症例1の断端近傍には特徴ある配列は存在しなかったが、症例2ではテロメア側断端を含む約31kb配列が、36bpの挿入部位を含んだ欠失領域のantisense配列と約96~99%のhomologyを有しており、LCRs間でのHRが欠失に関わった可能性がある。正確な断端の決定例の蓄積により、Xp21.1領域の欠失メカニズムを明らかにできる可能性があると考えられた。

7. WASPの活性化及び蛋白分解機構の解析

Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP)のミスセンス変異がWASP結合蛋白質(WIP)結合領域に集中しているが、その理由は解明されていなかった。今回、WIPノックアウトマウス及び患者T細胞の解析から、WASP-WIP複合体の形成がWASP蛋白質の安定化に重要であること、またWASP蛋白質分解機構としてCalpainとユビキチン化の関与が示唆された。

次に、恒常的活性化変異WASPによりX連鎖性好中球減少症とMDSの合併例が報告されているが、発症の分子機構は十分に解明されていない。

我々は活性化型 WASP 変異が Lck などのチロシンキナーゼで容易にリン酸化され、機能的にも podosome 形成を促進することを示した。Genechip を用いて活性化型変異 L270P WASP の影響を K562 細胞で調べると G-CSF 受容体を始めいくつか骨髄系細胞分化に関わる遺伝子発現の変化が観察され、WASP は細胞核内で遺伝子転写調節にも関わることが示された。

8. Toll 様受容体の細胞内シグナル伝達機構の構造生物学的解析

近年、IRAK4 欠損症に代表されるように Toll 様受容体 (TLR) シグナル伝達経路の破綻により小児期に発症する免疫不全例の報告が相次いでいる。2008 年に IRAK4 欠損症と類似の表現型を示し、特にグラム陽性菌群に易感染性を呈する MyD88 欠損症の存在が報告された。そこで、MyD88 欠損症の表現型発生メカニズムを解明するため、MyD88 のタンパク立体構造と相互作用機能解析を行った。MyD88 は構造上互いに離れた位置に存在する BB ループと α -ヘリックス E の 2 箇所、別のアダプター分子 Mal と直接相互作用する。MyD88 欠損症で同定された R196C 変異タンパクは、Mal との相互作用が減弱していた。これにより MyD88/Mal 経路以外の他に代替経路を持たない TLR2 経路が障害されると、特にグラム陽性菌に対する易感染性が顕在化してくるのではないかと考えられた。

(4) 治療ガイドラインの作成と新規治療法の開発

SCID および CGD、Wiskott-Aldrich 症候群の造血幹細胞移植ガイドラインの概要を作成したので、今後細部を検討しホームページに公開する。遺伝子治療研究では、より安全性の高いベクターを検討中で、今後ヒト化マウス疾患モデルを用いて、その有効性及び安全性を確認する。また Protein transduction domain を用いたタンパク治療につき基礎研究をおこなった。

1. 慢性肉芽腫症への造血幹細胞移植の解析

造血幹細胞移植 32 例についての移植時年齢、

移植時患者状態、幹細胞ソース、移植患者数、前処置法の推移、前処置法の違い、キメリズム、死亡例・拒絶例、予後についての解析結果を報告し、これを踏まえ、慢性肉芽腫症患者への CY+Flu 前処置による造血幹細胞移植 (RIST) ガイドライン案を提案した。しかし、CY+Flu 前処置には、今回の詳細な検討の結果、その半数 (7/14) で DLI が実施され、3 例では有効と考えられたが、一方で GVHD の増強、汎血球減少や、更に非血縁者間移植では難しいという問題があった。今回、DLI が必要にならない様な L-PAM を加えた新たな前処置法を提案した。

2. 重症先天性好中球減少症における造血幹細胞移植

重症先天性好中球減少症 (Severe Congenital Neutropenia, SCN) は慢性好中球減少、骨髄像での前骨髄球・骨髄球での成熟障害、生後早期よりの重症細菌感染症の反復を特徴とする難治性遺伝性疾患である。本症は G-CSF 投与により 95%以上の症例で好中球増加が認められ、感染予防が可能となっている。しかし、G-CSF 長期投与により、約 20%の症例で骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病への移行がみられ、重症感染症とともに生命予後に影響を与えている。根治療法は造血幹細胞移植であるが、前処置、移植時期等まとまった報告はなく明確な基準は示されていない。SCN 患者において骨髄非破壊的前処置を用いた同種骨髄移植 3 例 (血縁同胞 2 例、非血縁 1 例) の経験を紹介し、今後の本邦における移植症例の集積と本症における造血幹細胞移植の移植時期や前処置に関するガイドライン作成を考えていく。

3. 原発性免疫不全症モデルマウスの確立と応用

自然および獲得免疫能が欠失または高度に低下したマウスにヒト造血幹細胞を移入することにより、ヒトの免疫系を構築したマウスの作成が近年可能となっている。我々はこのヒト化マウスに XLA 患者骨髄由来 Linage^{CD34} 細胞を移植し、ヒト XLA の病態を再現するモデルマウス (XLA レシピエントマウス) の確立が可能か検

討した。移植後、正常造血幹細胞を移植した免疫系ヒト化マウスと比べて XLA レシビエントマウスでは著明な B 細胞分化障害および機能障害が起きていた。我々は今後この XLA レシビエントマウスを用いて遺伝子治療の有効性・安全性などについて検討を加える予定である。

4. 造血幹細胞から免疫細胞への分化培養系確立に関する研究

ヒト由来の造血幹細胞や iPS 細胞などから体外でリンパ球を誘導する技術を確立できれば、免疫不全症の病態解明や新たな原因遺伝子の同定、さらには治療法開発などへの応用が期待できる。幹細胞から T 細胞や NK 細胞を培養によって誘導することは技術的に困難であったが、Notch シグナルを付与するような培養環境を与えることにより T 細胞が誘導できることが、近年マウスの系で示された。

マウス造血幹細胞からの誘導は容易であったが、ヒト造血幹細胞からは、胸腺細胞の主体を占める CD4⁺CD8⁺ ダブルポジティブ T 細胞より未熟な段階までしか分化を誘導することができなかった。しかし、NK 細胞に関しては、Notch シグナルが必須であることを突き止めた他、NK 細胞誘導因子といわれる IL-15 の非存在下でも、Notch シグナル付与により細胞障害活性をもつ、機能的な NK 細胞に誘導されることを明らかにした。

5. Protein transduction domain (PTD) によるタンパク質の細胞内導入

野生型、変異型タンパクを Protein transduction domain(PTD)と連結させて細胞に導入するという手法を開発した。この方法は病態解析に始まり、将来的には治療に結びつく可能性があるものと考えられる。今までの諸外国の研究では WASP タンパクは不溶化画分に移行し、可溶化が困難とされてきたが、条件検討を重ねることにより、組換えタンパクの合成に成功した。これを用いて、WASP 遺伝子改変 NALM6 細胞に導入したところ、用量依存的な WASP の発現が認められた。さらに導入によって WASP 欠損細胞の機能は正常化した。

PTD については、WASP 組換えタンパク産生に成功し、また用量依存的な効率の良い導入、機能的な保完にも成功しており、今後は変異型の WASP の導入を考えたい。また将来的には臨床応用を視野に入れた検討を開始する価値があるものと考えている。

(5) 患者家族や医療者への継続的情報提供

原発性免疫不全症候群の 2007 年の国際新分類の日本語訳(参考資料 6)、ヨーロッパ免疫不全研究会の診断ガイドラインの日本語訳(参考資料 7)、原発性免疫不全を疑う 10 の徴候日本版(参考資料 8)、病原体からみた免疫異常(参考資料 9)を作成し全国主要医療機関に配布した。

診断基準や確定診断に必要な検査項目、専門病院、遺伝子検査を行う施設名や連絡先など新しい情報をホームページに掲載した。ホームページでは症例の相談を受け付けており、各疾患の専門家が主治医にむけて診断や治療のアドバイスをしている。日本免疫不全研究会(参考資料 10: プログラム)を班会議翌日に開催し、担当医師への情報提供、意見交換のための体制を作った。また本年度は理化学研究所と共催で 12 月 11-12 日に Symposium for PID in Asia(参考資料 11: プログラム)を横浜で開催し、アジアでの原発性免疫不全症候群の研究促進、情報交換に貢献した。全国疫学調査の際、主治医のメールアドレスの登録を進め、継続的に免疫不全症に関する最新の情報提供を行い、この疾患に対する医療水準を向上させる情報をえた。XLA 成人患者の QOL を検討するための詳細な調査票を作成し、現在調査中である。患者家族会との連携を深め、講演会や相談会を実施した。

IV. 研究危険情報

特になし。

V. 知的財産権の出願・登録状況

APPLICATION OF SYNOVIUM- DERIVED
MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) FOR
CARTILAGE OR MENISUCUS
REGENERATION (米国国際特許出願中
YCT-1301) 出願人: 関矢一郎、発明者: 宗田大、
森尾友宏、清水則夫、黒岩保幸

VI. 研究発表

巻末に記載のとおり。

○ 参 考 资 料

施設名 _____
 施設内免疫不全担当医師名 _____
 連絡先 e-mail _____
 電話 _____ FAX _____ 記入医師名 _____
 (免疫不全症に関する情報提供を行う予定ですので、免疫不全担当医師およびその連絡先等をご記入ください。)

平成 20 年 12 月 1 日時点で生存している患者を対象とします。症例数など以下の項目につきご記入ください。
 (既に PIDJ に登録いただいている症例は、その旨明記してください。)

I. 複合免疫不全症 (T および B 細胞免疫不全症)

重症複合免疫不全症 総数 (___ 例)

内訳 共通 γ 鎖欠損症 (___ 例) アデノシンデアミナーゼ欠損症 (___ 例)
 その他 (疾患名とそれぞれの症例数をご記入ください)

原因不明あるいは未検査 (___ 例)

重症複合免疫不全症を除く複合免疫不全症 総数 (___ 例)

内訳 Omenn 症候群 (___ 例)
 その他 (疾患名とそれぞれの症例数をご記入ください)

原因不明あるいは未検査 (___ 例)

II. 主として抗体不全を示すもの 総数 (___ 例)

内訳 Btk 欠損症 (Bruton 無ガンマグロブリン血症) (___ 例)
 分類不能型低ガンマグロブリン血症 (原因未解明のもの) (___ 例)
 選択的 IgA 欠損症 (___ 例)
 選択的 IgG サブクラス欠損症 (___ 例)
 その他

原因不明あるいは未検査 (___ 例)

III. その他のよく解析された免疫不全症 総数 (___ 例)

内訳 Wiskott-Aldrich 症候群 (___ 例) Hyper-IgE 症候群 (高 IgE 症候群) (___ 例)
 DiGeorge anomaly (___ 例) 慢性皮膚粘膜カンジダ症 (___ 例)
 その他 (疾患名とそれぞれの症例数をご記入ください)

原因不明あるいは未検査 (___ 例)

IV. 免疫調節障害 総数 (___ 例)

内訳 Chediak-Higashi 症候群 (___ 例) Perforin 欠損症 (___ 例)
 X 連鎖リンパ増殖症候群 (___ 例) 自己免疫性リンパ増殖症候群(ALPS) (___ 例)
 APECED, autoimmune polyendocrinopathy with candidiasis and ectodermal dystrophy (___ 例)
 IPEX, immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (___ 例)
 その他 (疾患名とそれぞれの症例数をご記入ください)

原因不明あるいは未検査 (___ 例)