

A. 研究目的

日本では多くの原発性免疫不全症患者が未診断、未登録のまま見過ごされている。日本の診断患者は1,395例（1.1例/10万人、2007年現在）である。一方、各国の10万人あたりの患者数（登録患者数）は、スペイン：6.5例（2,592例）、チェコ：5.5例（577例）、フランス：3.2例（1,953例）であり、日本より多い。この数字を単純に当てはめると、日本では、4,000例近くが把握されていないことになる。

また、原発性免疫不全症では、中央登録が重要である。すなわち、希少疾患なので集まることで初めて解明される病態がある。例えば、CD40L欠損症では原虫であるクリプトスポリジウムの持続性感染、その結果、肝不全を起こすことがヨーロッパの登録システムによる症例の集積により明らかになった。この結果、長期予後が不良であることも判明し、造血幹細胞移植の適応であることも示されている。

X-linked thrombocytopenia (XLT) は Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) の一亜型で、血小板減少のみが表現形として出現するとされていたが、多数例の解析により、頭蓋内出血が、WASと同様に多いこと、IgA腎症の合併があり、腎不全にいたる症例があること、骨髓異形成症候群 (MDS) 様の表現形をとることも示されている。これらのことから、XLTに対する造血幹細胞移植の必要性も議論されている。

以上のことから、現状の把握、病態の解析、診断方法の確立等のためのシステムが必要であると考えられる。

また、同様の表現型を持つ疾患をまとめて検索することができるため、これまで記載されていない独特の新規免疫不全症の発見に結びつく。さらに、こうした症例の登録システ

ムは臨床データを基礎的な遺伝子解析と結びつけられることから、免疫不全症新規原因遺伝子の発見にも有用であると考えられる。このように、ヒト免疫系のメカニズムの解明へつながる。

今回の研究では、2年前に構築された原発性免疫不全症の中央診断登録システムであるPIDJを介して、当科に紹介があった152例の結果を解析し、本システムの有用性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

対象

平成20年1月より、厚労省研究班会議、理化学研究所、かずさDNA研究所の共同研究として、PIDJプロジェクトが始まった (<http://pidj.rcai.riken.jp>)。当科は相談窓口の一つであり、開始から2年間で受けた紹介例を対象とした。

FACS解析

別表に示すモノクローナル抗体の組み合わせによりFACS解析を行った。

表: FACS解析

FITC	PE	PerCP/PE-Cy5	APC	
CD4/CD8/CD3			CD45RO	T細胞
CD45RA	CD31	CD4	CD3	
CD25	CD127	CD4	CD3	
α/β	γ/δ	CD8	CD3	
CD4	HLA-DR	CD8	CD3	
TCR Vα24	TCRVβ11		CD3	
CD3	CD16	CD56	CD19	NK細胞
CD21	CD38	IgM	CD19	B細胞
IgD	CD27	IgM	CD19	
CD5	CD20		CD19	
Igκ	Igλ		CD19	
CD19	CD24		CD38	

遺伝子解析

DNAに抽出後、かずさDNA研究所にDNAシーケンスを依頼した。

TREC/KREC 解析

血液検体から DNA を抽出し、real time PCR を用いた既報の方法で定量的に測定した。

C. 研究結果

症例の内訳

国内 75 例 (51 施設)、国外 77 例 (9 施設)、国内は、北海道から九州、沖縄まで全国にわたった。国外ではアメリカ・オーストラリア・スイス・韓国・イラン・ドイツ・インド・中国・トルコからの依頼があった。

症例の年齢は、平均 10.7 歳 (国内 9.0 歳、国外 13.1 歳) で、最高齢 56 歳 (国内 46 歳、国外 56 歳) であった。19 歳以上の症例は 24 例 (16%) あり、国内 15 例、国外 9 例であった。この中で、免疫不全として治療されていた患者は 15 名で、新規に診断依頼された患者が 9 名いた。

症例内訳を IUIS-PID 分類委員会 2007 の分類により分けた。T 細胞系と B 細胞系双方の異常を示す複合免疫不全症は全体では 10% で、18 歳以下では 12%、19 歳以上では 4% であった。主として抗体系の欠陥を示す疾患は全体では 56%、18 歳以下では 50%、18 歳以上では 96% を占めた。

検体種類・解析項目

検体の種類としては、116 例で末梢血を得られた。ガスリー血は 13 例、乾燥濾紙血は 14 例で得られた。

FACS 解析

FACS 解析は 112 例で施行し、90 例 (80%) で異常が認められた。

T 細胞異常を 58 例で認めた。T 細胞欠損が 8 例、CD4、CD8 異常が 20 例、CD45RO/CD45RA 異常が 15 例、NKT 異

常が 10 例、その他 Treg、 $\gamma\delta$ T 細胞異常などを認めた。

B 細胞異常を 84 例で認めた。B 細胞欠損を 26 例で、CD27+B 細胞異常を 27 例で認めた。

NK 細胞異常は 16 例で認めた。

In vitro で CaI+PMA で刺激した T 細胞の CD40L 発現を 11 例で解析し、5 例で発現低下を認めた。

クラススイッチ解析

17 例で、CD40 抗体と IL-4 刺激による IgE 産生、RNA 解析を行い、6 例でクラススイッチの誘導障害が認められた。

遺伝子解析

遺伝子解析は 88 例で施行し、34 例 (38%) で遺伝子変異同定がなされた。同定された遺伝子は、複合型免疫不全症の原因遺伝子として、C γ 3 例、JAK3 1 例、AK2 1 例、RAG1 1 例、CD40L 7 例、抗体系の欠陥を示す疾患の原因遺伝子として AICDA 3 例、BTK 7 例、その他の特徴ある免疫不全症として WAS 5 例、ATM 1 例、食細胞異常の原因遺伝子として CYBB 2 例、NCF1 1 例、自然免疫系異常の原因遺伝子として BIRC4 が 1 例であった。遺伝子の種類としては 13 遺伝子であった。19 歳以上で新規に変異が同定された患者が 4 例あり、その遺伝子は AICDA 3 例、CD40L 1 例であった。

TREC/KREC 解析

145 例で TREC、KREC 解析を行った。

TREC 低下を 42 例で認めた。KREC 低下を 36 例で認めた。TREC 低下 KREC 正常は 25 例、TREC 正常 KREC 低下は 19 例、TREC と KREC とともに正常は 84 例、

TREC と KREC とともに低下の症例は 17 例であった。

紹介時診断で抗体異常とされた患者 85 例のうち 25 例で TREC の低下を認めた。このうち、18 歳以下では、62 例中 11 例で、19 歳以上では 23 例中 14 例で TREC の低下を認めた。抗体異常の病名としては、B 細胞欠損、CVID、HIGM、低ガンマグロブリン血症、IgG サブクラス欠損として紹介されていた。

KREC 低下の患者のうち、sjKREC 低下 cjKREC 正常は 5 例、sjKREC 正常 cjKREC 低下は 1 例、sjKREC と cjKREC とともに低下した症例は 13 例存在した。

また、TREC 低下、sjKREC 低下、cjKREC 正常の群が、AT、CVID で認められた。

なお、FACS 解析で正常であった 22 例の中で、2 例が TREC、KREC とともに低下していた。

D. 考 察

2 年間で多数の新規免疫不全症の登録がなされ、FACS 解析、遺伝子解析により、確定診断に至った症例が 34 例あった。このように PIDJ 登録により確定診断が得られ、移植適応、感染対策、 γ -グロブリン補充などを含め、専門医からの適切な助言がえられていると考えられ、免疫不全症の診断と治療に、有効活用されていることが示された。

FACS 解析では、さまざまなパターンが見出された。T 細胞では、T 細胞欠損、CD4 陽性 T 細胞の減少、CD4 陽性 CD45R0 陽性メモリー T 細胞の増加およびナイーブ T 細胞の減少、その他 Treg 欠損などを認めた。B 細胞では B 細胞欠損、CD27⁺メモリー B 細胞減少を認めた。NK 細胞異常を認めた。NK 細胞欠損、NKT 細胞欠損も存在した。FACS 解析により特異な形質を示す症例の存

在が示された。

遺伝子解析により、依頼した 88 例のうち 34 例で診断が確定した。遺伝子診断システムが順調に進行していることが示された。また、遺伝子同定の確定率が高いことから、症状、検査所見から責任遺伝子の推定がある程度出来ることが示された。一方、遺伝子が未確定の免疫不全症も蓄積しており、その責任遺伝子の同定が新たな課題として浮上した。

また、TREC/KREC の解析により、抗体産生異常と臨床診断された症例で TREC 低下して T 細胞新生障害が考えられた症例が存在し、T 細胞新生の障害があることが判明した。進行性に T 細胞新生が減少しているのか、T 細胞新生障害が元々存在していたかについては、今後の経過、症例の蓄積が必要である。また、cjKREC と sjKREC を両方測定することで、B 細胞絶対数と B 細胞新生能の把握が出来るため、B 細胞障害の病態解析に役立つと考えられた。TREC 低下、sjKREC 低下、cjKREC 正常の特異なパターンをとる免疫不全症の 1 群が存在することも示された。これらのことは、TREC/KREC 解析が免疫不全症の病態を知る上で重要であると考えられる。

成人例の紹介が増加しており、新規診断された症例もあることから、成人のなかには診断されていない免疫不全症患者がいること、成人患者の適切な把握が重要であることが示唆された。

以上、原発性免疫不全症を適切に診断・治療するために PIDJ システムが有用であることが示された。

E. 結 論

PIDJ システムが構築されてから、新規に診断・登録される免疫不全症が増加した。FACS 解析、遺伝子解析、TREC/KREC 解

析などにより、病態の把握、助言、確定診断が順調に進んでいる。原発性免疫不全症患者の早期診断、適切な治療に活用され、QOL改善に貢献していると考えられた。また、こうしたデータベース構築により、新たな免疫不全症の一群の発見や、病態の理解に役立った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) Keerthikumar S, Raju R, Kandasamy K, Hijikata A, Ramabadran S, Balakrishnan L, Ahmed M, Rani S, Selvan L.D, Somanathan D.S, Ray S, Bhattacharjee M, Gollapudi S, Ramachandra YL, Bhadra S, Bhattacharyya C, Imai K, Nonoyama S, Kanegane H, Miyawaki T, Pandey A, Ohara O and Mohan S. RAPID: Resource of Asian Primary Immunodeficiency Diseases. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(Database issue):D863-7. Epub 2008 Oct 8.

2) Tsuboi S, Takada H, Hara T, Mochizuki N, Funyu T, Saitoh H, Terayama Y, Yamaya K, Ohyama C, Nonoyama S and Ochs H.D. FBP17 mediates a common molecular step in the formation of podosomes and phagocytic cups in macrophages. *J Biol Chem.* 2009 Mar 27;284(13):8548-56. Epub 2009 Jan 20.

3) Uchisaka N, Takahashi N, Sato M, Kikuchi A, Mochizuki S, Imai K, Nonoyama S, Ohara O, Watanabe F, Mizutani S, Hanada R and Morio T. Two brothers with ataxia-telangiectasia-like disorder with lung adenocarcinoma. *J Pediatr.* 2009 Sep;155(3):435-8.

4) Okuya M, Kurosawa H, Kubota T, Endoh K, Ogiwara A, Nonoyama S, Hagisawa S, Sato Y, Matsushita T, Fukushima K, Sugita K, Sato T and Arisaka O. Hematopoietic stem cell transplantation for X-linked thrombocytopenia from mild symptomatic carrier. *Bone Marrow Transplant.* 2009 Aug 17. [Epub ahead of print]

5) Hashii Y, Yoshida H, Kuroda S, Kusuki S, Sato E, Tokimasa S, Ohta H, Matsubara Y, Kinoshita S, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Ohara O and Ozono K. Hemophagocytosis after bone marrow transplantation for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency. *Pediatr Transplant.* 2009 Jul 31. [Epub ahead of print]

6) Morinishi Y, Imai K, Nakagawa N, Sato H, Horiuchi K, Ohtsuka Y, Kaneda Y, Taga T, Hisakawa H, Miyaji R, Endo M, Oh-Ishi T, Kamachi Y, Akahane K, Kobayashi C, Tsuchida M, Morio T, Sasahara Y, Kumaki S, Ishigaki K, Yoshida M, Urabe T, Kobayashi N, Okimoto Y, Reichenbach J, Hashii Y, Tsuji Y, Kogawa K, Yamaguchi S, Kanegane H, Miyawaki T, Yamada M, Ariga T and Nonoyama S. Identification of Severe Combined Immunodeficiency by T-Cell Receptor Excision Circles Quantification Using Neonatal Guthrie Cards. *J. Pediatr.* 2009 Dec;155(6):829-33. Epub 2009 Jul 22.

7) Takizawa Y, Miyazawa T, Nonoyama S, Goto Y and Itoh M. Edaravone inhibits DNA peroxidation and neuronal cell death in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy model rat. *Pediatr Res.* 2009 Jun;65(6):636-41.

8) Matsumoto H, Kajiwara S, Ogura Y, Asano T, Horikawa R and Nonoyama S. A case of glycogen

storage disease type Ib presenting with prolonged neonatal hypoglycaemia and minimal metabolic abnormalities. *Acta Paediatr.* 2009 Oct 19. [Epub ahead of print]

9) Matsuda K, Sakashita K, Taira C, Tanaka-Yanagisawa M, Yanagisawa R, Shiohara M, Kanegane H, Hasegawa D, Kawasaki K, Endo M, Yajima S, Sasaki S, Kato K, Koike K, Kikuchi A, Ogawa A, Watanabe A, Sotomatsu M, Nonoyama S and Koike K. Quantitative assessment of PTPN11 or RAS mutations at the neonatal period and during the clinical course in patients with juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2009 Oct 29. [Epub ahead of print]

10) Tanaka T, Kogawa K, Sasa H, Nonoyama S, Furuya K and Sato K. Rapid and simultaneous detection of 6 types of human herpes virus (herpes simplex virus, varicella-zoster virus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human herpes virus 6A/B, and human herpes virus 7) by multiplex PCR assay. *Biomed Res.* 2009 Oct;30(5):279-85.

11) International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies, Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Hammartröm L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck J, Roifman C, Seger R and Wedgwood J. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Dec;124(6):1161-78.

12) Albert M, Bittner T.C, Nonoyama S, Notarangelo L.D, Burns S, Imai K, Espanol T, Fasth A, Pellier I, Strauss G, Morio T, Gathmann B, Noordzij J.G, Fillat C, Hoenig M, Nathrath

M, Meindl A, Pagel P, Wintergerst U, Fischer A, Thrasher A, Belohradsky B.H, Ochs H.D. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome and treatment options. *Blood* (in press) 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

血小板を用いた家族性血球貪食症候群3型の新たな迅速診断法

八角 高 裕 (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)

村田 祐 樹 (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)

井澤 和 司 (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)

西小森 隆 太 (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)

平家 俊 男 (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)

中畑 龍 俊 (京都大学物質-細胞統合システム拠点iPS細胞センター)

研究要旨

家族性血球貪食症候群 (FHL) は、造血幹細胞移植を必要とする予後不良の疾患であり、早期診断による迅速な治療方針の決定が必要である。この内、FHL3 の原因分子として Munc13-4 が同定されており、これまで我々は、血小板蛋白を用いたウェスタンブロット法による FHL3 のスクリーニングを行ってきた。しかし、FHL の急性期は血小板輸血依存状態である事が多く、状態が安定するまで検査が行えない欠点があった。今回、フローサイトメトリーを用いて血小板中の Munc13-4 蛋白発現を評価する事に成功した。この方法は、血小板輸血依存状態でも Munc13-4 蛋白を欠損した異常血小板の検出が可能であり、FHL3 の迅速スクリーニング法として非常に有用である。

A. 研究の目的

血球貪食症候群 (HPS) は、発熱、汎血球減少、多臓器不全を主症状とし、組織球による血球貪食像を特徴とする重症疾患群であり、感染や膠原病などに続発する二次性的ものと、遺伝的素因による原発性の FHL とに大別される。HPS に占める FHL の頻度は高くはないが、根治療法として造血幹細胞移植を必用とするため、迅速な診断が必要であり、簡便なスクリーニング法の確立が望まれる。FHL3 の原因分子である Munc13-4 は血小板に多く発現しており、これまで我々は血小板蛋白を用いたウェスタンブロット法による FHL3 のスクリーニングを行ってきたが、HPS の急性期は頻回の血小板輸血を必要とする事が殆どである為、状態が安定化する迄検査が行えない欠点があった。この欠点を克服し、急性期にも簡便に行えるスクリーニン

グ法を確立するため、フローサイトメトリーを用いた診断法の開発を検討した。

B. 研究方法

Munc13-4 検出の為、Sf9 昆虫細胞を用いて作成した全長ヒト Munc13-4 蛋白を用いてウサギを免疫し、抗ヒト Munc13-4 ポリクローナル抗体を作成した。健常者並びに FHL 疑い患者の血小板並びに PBMC を採取し、ウェスタンブロット法並びにフローサイトメトリー法にて Munc13-4 蛋白の発現を検討した。Munc13-4 の発現低下が認められた患者に関しては遺伝子解析を行い、異常の有無を確認した。

(倫理面への配慮)

当大学倫理委員会の承認をうけた蛋白発現解析承諾書、並びに遺伝子解析承諾書にて

informed consent を取得後、FHL 疑い患者の解析を行った。

C. 研究結果

まず、正常人の EDTA 化末梢血を低速度で遠心して血小板を回収し、比重遠心法にて回収した PBMC と Munc13-4 の蛋白発現をウェスタンブロット法にて比較したところ、血小板により多くの Munc13-4 蛋白が発現されている事が確認された。

平成 21 年中に FHL を疑われ、蛋白発現解析依頼のあった患者検体について、血小板に於ける Munc13-4 蛋白の発現を検討したところ、ウェスタンブロット法にて欠損が疑われた 2 症例に於いて、フローサイトメトリー法によっても発現の低下が確認可能であり、両症例で UNC13D 遺伝子の異常が確認された。又、PBMC を用いてのフローサイトメトリー法も検討したが、非特異的結合が多く、血小板を用いる方法が優れていた。

更に、血小板輸血が解析に与える影響を調べるため、正常血小板と Munc13-4 欠損血小板を様々な比率で混合し、ウェスタンブロット法とフローサイトメトリー法の診断感度を比較した所、ウェスタンブロット法では 25% 程度の正常血小板の混入でも診断が困難となったのに対し、フローサイトメトリー法では、異常血小板の割合が 10% 以下でも十分に診断が可能であった。

最後に、PBMC を用いたウェスタンブロット法により、血小板輸血状態での FHL3 診断が可能であるかを検討した。比重遠心法で回収した PBMC への血小板の混入を検討するため、抗 α IIB 抗体を用いてウェスタンブロット解析したところ、相当量の混入が確認された (磁気ビーズを用いて回収した CD45 陽性分画には血小板の混入は認められなかった)。このため、正常血小板が輸血

された状態では、PBMC を用いてのウェスタンブロット解析も困難である事が予想され、実際、血小板輸血依存状態である急性期 FHL3 症例の 1 検体に付き、PBMC を用いてウェスタンブロット法による解析を試みたが、Munc13-4 の発現が疑陽性となり、正確な診断は困難であった。

D. 考察

HPS は、感染や膠原病などに続発する二次性のものと、遺伝的素因による原発性の FHL とに大別される。FHL の原因として、Perforin (FHL2)、Munc13-4 (FHL3)、Syntaxin11 (FHL4)、Munc18-2 (FHL5) の 4 分子が同定されており、NK 細胞や細胞障害性 T 細胞 (CTL) の機能障害を背景とした過剰な免疫反応が病態の中心と考えられている。FHL は、根治療法として造血幹細胞移植を必用とするため正確な診断が必要であるが、HPS に占める FHL の頻度はそれほど多くなく、全ての HPS 症例に遺伝子解析を行う事は非効率的である為、簡便なスクリーニング法の確立が望まれる。本邦に於いては、FHL2 のスクリーニングは NK 細胞に於ける Perforin 発現をフローサイトメトリーにて解析する方法で行われており、FHL3 と FHL4 に関しては、血小板を用いたウェスタンブロット法により Munc13-4 と STX11 の発現を解析する方法が行われてきた。FHL5 は最近報告されたばかりであり、現時点でスクリーニングは行われていない。

今回の研究では、フローサイトメトリーにより血小板 Munc13-4 蛋白発現を評価する系を確立し、これ迄のウェスタンブロット法による FHL3 迅速スクリーニングの弱点であった血小板輸血状態での解析を可能にした。しかし、同様の問題が STX11 のスクリーニングに関して残っており、FHL5 スクリー

ニング法の確立とともに今後の課題である。又、明らかに家族性を認めながらも既知の分子に異常を認めないFHL 疑い症例も存在する為、NK 細胞やCTL の機能解析を含めた、新しい視点からの原因検索及びスクリーニング法の確立が望まれる。

E. 結 論

フローサイトメトリーを用いた血小板Munc13-4 蛋白発現解析法を開発した。従来行われて来た、血小板やPBMC 蛋白を用いたウェスタンブロット法と比較し、急性期の血小板輸血依存状態でもMunc13-4 欠損血小板の検出が可能である上、必要血液量も少なく、FHL3 のスクリーニング法として優れている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Watanabe M, Adachi S, Matsubara H, Imai T, Yui Y, Mizushima Y, Hiraumi Y, Watanabe K, Kamitsuji Y, Toyokuni S, Hosoi H, Sugimoto T, Toguchida J, Nakahata T: Induction of autophagy in malignant rhabdoid tumor cells by the histone deacetylase inhibitor FK228 through AIF translocation. *Int J Cancer*:124,55-67,2009

2. Matsubara H, Watanabe M, Imai T, Yui Y, Mizushima Y, Hiraumi Y, Kamitsuji Y, Watanabe K, Nishijo K, Toguchida J, Nakahata T, Adachi S.: Involvement of extracellular signal-regulated kinase activation in human osteosarcoma cell resistance to the histone deacetylase inhibitor FK228 [(1S,4S,7Z,10S,16E,21R)-7-ethylidene-4,21-bis(propan-2-yl)-2-oxa-12,13-dithia-

5,8,20,23-tetraazabicyclo[8.7.6]tricos-16-ene-3,6,9,19,22-pentone]. *J Pharmacol Exp Ther.* 328(3):839-48, 2009.

3. Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N, Kambe N, Fujisawa A, Yamazaki S, Saito M, Yoshioka T, Kawai T, Sakai H, Tanizaki H, Heike T, Miyachi Y, Nakahata T.: Role of the NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. *Arthritis Rheum.* 60(1):242-50 2009.

4. Niwa A, Umeda K, Awaya T, Yui Y, Matsubara H, Hiramatsu H, Watanabe KI, Adachi S, Itoh T, Uemoto S, Nakahata T: Successful autologous peripheral blood stem cell transplantation with a double-conditioning regimen for recurrent hepatoblastoma after liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 13(2): 259-262, 2009.

5. Hiraumi Y, Iwai-Kanai E, Baba S, Yui Y, Kamitsuji Y, Mizushima Y, Matsubara H, Watanabe M, Watanabe KI, Toyokuni S, Matsubara H, Nakahata T, Adachi S.: Granulocyte colony-stimulating factor protects cardiac mitochondria in the early phase of cardiac injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 296:H823-H832,2009.

6. Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada SI, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki YM, Takeda S, Heike T, Nakahata T.: Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J.* 23:1907-1919,2009.

7. Fukushima-Shintani M, Suzuki KI, Iwatsuki

- Y, Abe M, Sugasawa K, Hirayama F, Kawasaki T, Nakahata T.: AKR-501 (YM477) a novel orally-active thrombopoietin receptor agonist. *Eur J Haematol.* 82(4):247-254,2009.
8. Higashi A.Y., Ikawa T, Muramatsu M, Economides A.N., Niwa A, Okuda T, Murphy AJ., Rojas J, Heike T, Nakahata T, Kawamoto H, Kita T, Yanagita M.: Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreERT2. *J Immunol.* 182:5633-5640,2009.
9. Hasegawa D., Manabe A., Yagasaki H., Ohtsuka Y., Inoue M., Kikuchi A., Ohara A., Tsuchida M., Kojima S., Nakahata T.: Treatment of Childhood MDS Study Group Trial (MDS99). *Pediatr. Blood Cancer* 53:1011-1015,2009.
10. Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S: Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 459:712-716,2009.
11. Niwa A., Umeda K., Chang H., Saito M., Okita K., Takahashi K., Nakagawa M., Yamanaka S., Nakahata T., Heike T: Orderly Hematopoietic Development of Induced Pluripotent Stem Cells via Flk⁻¹ Hemoangiogenic Progenitors. *J. Cell. Physiol.* 221:367-377, 2009.
12. Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., Niwa A., Perizot C., Taffin C., Heike T., Valeyre D., Mathian A., Nakahata T., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M., Amoura Z., Gorochov G., Sakaguchi S.: Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30:899-911,2009.
13. Yokoo N., Baba S., Kaichi S., Niwa A., Mima T., Doi H., Yamanaka S., Nakahata T., Heike T.: The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 387(3):482-488,2009..
14. Kusunoki T, Morimoto T, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Fujii T, Nakahata T.: Changing Prevalence and Severity of Childhood Allergic Diseases in Kyoto, Japan, from 1996 to 2006. *Allergol Int.* 58(4): 543-548, 2009.
15. Kusunoki T, Morimoto T, Nishikomori R, Heike T, Fujii T, Nakahata T.: Allergic status of schoolchildren with food allergy to eggs, milk or wheat in infancy. *Pediatr Allergy Immunol.* 20(7):642-647,2009.
16. Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T, Nakahata T, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y: Selective infection of CD4⁺ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-infected humanized NOD/SCID/IL-2R γ ^{null} mice. *Virology* 394: 64-72,2009.
17. Suzuki N, Yumura-Yagi K, Yoshisa M, Hara J, Nishimura S, Kudoh T, Tawa A, Usami I, Tanizawa A, Hori H, Ito Y, Miyaji R, Oda M, Kato K, Hamamoto K, Osugi Y, Hashii Y,

Nakahata T, Horibe K: Outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with induction failure treated by the Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS) ALL F-protocol. *Pediatric Blood Cancer*. 54(1):71-78, 2010.

18. Kato I., Umeda K., Awaya T., Yui Y., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Watanabe K., Heike T., Adachi N., Endo H., Mizukami T., Nunoi H., Nakahata T., Adachi S.: Successful treatment of refractory donor lymphocyte infusion-induced immune-mediated pancytopenia by Rituximab. *Pediatr Blood Cancer*. 54: 329-331, 2010.

19. Sakai H, Ito S, Nishikomori R, Takaoka Y, Kawai T, Saito M, Okafuji I, Yasumi T, Heike T, Nakahata T. : A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene. *Rheumatology (Oxford)*. 49: 194-196, 2010.

20. Ueno H, Blanck JP, Sidney J , Zurawski SM, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski G, Nicewander D, Heike T, Nakahata T, Arai K, Arai N, Blankenship D, Sette A, Banchereau J: Circulating CD4+ T cells Specific for H5 Hemagglutinin in Healthy Subjects. *J. Infectious Diseases* in press

21. Mizuno Y., Chang H., Umeda K., Niwa A., Iwasa T., Awaya T., Fukada S., Hiroshi Yamamoto H., Yamanaka S., Nakahata T., Heike T.: Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J.* in press.

22. Yoshimoto M, Heike T, Chang H, Kanatsu-Shinohara M, Baba S, Varnau JT,

Shinohara T, Yoder MC, Nakahata T: Bone marrow engraftment but limited expansion of hematopoietic cells from multipotent germline stem cells derived from neonatal mouse testis. *Exp Hematol* in press

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

高IgE症候群における骨と歯牙の異常の発症機構の検討

峯 岸 克 行 (東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学)

研究要旨

高 IgE 症候群は、黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍と肺炎にアトピー性皮膚炎・血清 IgE 高値を合併する原発性免疫不全症である。最近我々は、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が STAT3 のドミナントネガティブ (DN) 変異であることを報告した。今回われわれは、STAT3 の分子異常がどのようなメカニズムで骨と歯牙の異常を引き起こすかを高 IgE 症候群のモデルマウスを作製して検討した。その結果、全身に STAT3-DN を発現すると①骨芽細胞の機能が低下し骨の機械的強度が低下すること、②骨芽細胞上の RANKL (Receptor activator of NF- κ B Ligand) の発現が低下しこのため破骨細胞の分化が障害されていることを明らかにした。これらが高 IgE 症候群に特徴的な骨と歯牙の異常の発症に関与している可能性が示唆された。

A. 研究の目的

1 型の高 IgE 症候群において、その原因遺伝子が STAT3 であることが明らかになったものの、STAT3 の分子異常がどのようなメカニズムで高 IgE 症候群の多彩な症状を引き起こしているかはほとんど明らかになっていない¹⁾。特に、STAT3 の異常により 1) なぜ高 IgE 血症とアトピー性皮膚炎を呈するか、2) どのようなメカニズムで骨と歯牙の異常が発症するかは残された重要な研究課題である²⁾。そこで今回我々は、STAT3 の分子異常がどのようなメカニズムで骨と歯牙の異常が発症するかを検討し、高 IgE 症候群の骨と歯牙の異常に対する有効な予防法、治療法を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

既に STAT3 の完全欠損ノックアウトマウスは作成されており、胎生 7.5 日までに致死であることが明らかにされている³⁾。この STAT3-DN のノックインマウスも STAT3

のノックアウトマウスと同様に胎生致死である可能性も考えられ、また STAT3 の機能異常は LIF のシグナル伝達を障害して ES 細胞の生存と増殖に悪影響を及ぼす可能性があるため、野生型 STAT3 の cDNA とネオマイシン耐性遺伝子を loxP 配列ではさみ、その下流にヒトで発見された Δ V463 の変異を導入した exon 16 を配置することにより、コンディショナルに STAT3 変異体の発現ができるようにノックインコンストラクトを設計した。キメラマウスの germline transmission を確認し、このマウスと卵細胞特異的に Cre を発現する ZP3-Cre マウスの雌とを交配し、全身に STAT3-DN を発現するヒト高 IgE 症候群のモデルマウスを作製した。このマウスにおいては、高 IgE 血症、Th17 サイトカインの産生障害などが見られることがこれまでの予備的解析により明らかになっている。

C. 研究結果

1. 高 IgE 症候群モデルマウスにおける骨

芽細胞機能の低下

カルセインは新生骨に取り込まれる蛍光色素である。これを96時間間隔で2回投与し、骨の新生能を生体内で検討するとSTAT3-DNマウスにおいては骨新生能が低下していることが明らかになった。さらに*in vitro*においても新生マウスの頭蓋冠由来細胞の骨芽細胞への分化能は低下していることが明らかになった。さらにマウスの大腿骨の機械的強度を検討するとSTAT3-DNマウスにおいては、正常マウスと比較して弱い外力で骨折することが明らかとなった。これらの高IgE症候群のモデルマウスの表現型はヒト高IgE症候群の骨塩量の低下、病的骨折などの表現型と良く一致していた。

2. 高IgE症候群モデルマウスにおける破骨細胞分化障害

STAT3-DNマウスの破骨細胞をTRAP (Tartate resistant acid phosphatase) 染色により検討すると、破骨細胞数はSTAT3-DNマウスにおいて顕著に減少していた。さらに、その結果として骨梁部の骨量が増加していた。下顎骨の歯牙の周囲においてもSTAT3-DNにおける骨量の増加は顕著であった。

次に、破骨細胞の試験管内分化を検討した。マウスの骨髄細胞をRANKLとM-CSFを添加して培養するとTRAP陽性の破骨細胞が得られるが、この反応はSTAT3-DN由来の骨髄細胞でも正常だった。そこで、マウスの骨芽細胞をビタミンD3とプロスタグランジンE2で刺激して、骨芽細胞上での破骨細胞分化を検討すると、STAT3-DN由来の骨髄細胞は正常に破骨細胞に分化するが、STAT3-DN由来の骨芽細胞は正常骨髄細胞の破骨細胞分化を誘導することが出来なかった。さらに、この共培養系に外因的にRANKLを添加すると、破骨細胞分化は回復

した。すなわち、STAT3-DNマウスの破骨細胞分化障害は骨芽細胞のRANKL発現障害が原因である可能性が示唆された。そこでSTAT3-DNマウスのRANKLの発現を検討したところ、RANKLの発現が低下していることが明らかになった。

D. 考 察

STAT3の分子異常により発症する高IgE症候群は、骨と歯牙の異常の合併に臨床的特徴があるが、その原因は世界的にも全く不明であった。今回の我々の検討により、高IgE症候群においては、1) STAT3の機能低下のために骨芽細胞の機能低下が見られること。2) さらに、骨芽細胞側のRANKL発現が低下しているために破骨細胞分化が低下していることが明らかとなった。これらが、高IgE症候群において骨粗鬆症と病的骨折、さらには乳歯の脱落遅延と独特の顔貌の発症関与している可能性が考えられた。高IgE症候群の病的骨折のコントロールには、骨芽細胞の機能を上げる治療法が、乳歯の脱落遅延と独特の顔貌の予防には破骨細胞の機能を上げる治療法が有効である可能性が示唆されたが、この両者のバランスを厳密にコントロールする必要があることには十分留意する必要があると考えられた。

E. 結 論

ヒトのSTAT3の異常により発症する高IgE症候群において、骨芽細胞の機能異常により骨新生能の低下と破骨細胞数の減少が起こっており、これが高IgE症候群に独特の骨粗鬆症、病的骨折、独特の顔貌、乳歯の脱落遅延の原因になっているものと考えられた。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. Minegishi Y, "Molecular basis of hyper-IgE syndrome." Keystone Symposium "Human immunology and immunodeficiencies", Beijing, China, May 12-16, 2009.

2. Minegishi Y, "Identification and elucidation of complex primary immunodeficiency; Hyper IgE Syndrome". The first joint symposium of Chinese society for immunology, Japanese society for immunology, and Korean society for immunologists in Immunology, Shanghai, China, Nov 6-8, 2009

2. 論文発表

1. Minegishi Y., Saito M., Nagasawa M., Takada H., Hara H., Tsuchiya S., Agematsu K., Yamada M., Kawamura N., Ariga T., Tsuge I., Karasuyama H.. Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J. Exp. Med.*, 1291-1301, 2009

2. Minegishi Y. Hyper-IgE syndrome. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 487-492, 2009

3. Minegishi Y., Karasuyama H. Defects in Jak-STAT-mediated cytokine signals cause hyper-IgE syndrome: Lessons from a primary immunodeficiency. *Int. Immunol.* 21, 105-112, 2009

H. 知的財産権の出願登録状況

該当なし

参考文献

1. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, et al.: Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 2007, 448:1058-1062.

2. Minegishi Y: Hyper-IgE syndrome. *Curr Opin Immunol* 2009, 21:487-492.

3. Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S: Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94:3801-3804.

わが国のIPEX症候群の臨床的・免疫学的検討

金 兼 弘 和 (富山大学大学院医学薬学研究部小児科学)

宮 脇 利 男 (富山大学大学院医学薬学研究部小児科学)

蒲 池 吉 朗 (名古屋大学大学院発育・加齢医学講座小児科学)

研究要旨

IPEX 症候群は、多発性内分泌異常、難治性下痢などの症状を呈し、乳幼児期に致死的となるきわめてまれな疾患である。今回わが国の IPEX 症候群患者の臨床的、免疫学特徴を明らかにした。わが国における 6 家系 7 名の IPEX 疑い患者について解析した。*FOXP3* 遺伝子変異は L76fsx53, A383T, F373V, K250-1, IVS1+2T>G であり、1 例では変異は同定されなかった。健常人では末梢血において $FOXP3^+CD4^+CD25^+T$ 細胞を約 5%認めるが、IPEX 患者では全例とも 1%以下に低下していた。また正常人では制御性 T 細胞 (Treg) は $CD127^{dim}CD4^+CD25^+T$ 細胞と考えられているが IPEX 症候群患者における $CD127^{dim}CD4^+CD25^+T$ 細胞は健常人由来の細胞と異なり、T 細胞の増殖抑制効果が弱く認められた。 $CD127^{dim}CD4^+CD25^+T$ 細胞の機能には *FOXP3* の発現が必須と考えられ、これらの細胞は Treg の前駆細胞である可能性が考えられる。

A. 研究の目的

IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) 症候群は免疫調節障害、1 型糖尿病、甲状腺機能低下症などの多発性内分泌異常、難治性下痢などの症状を呈し、乳児期に致死的経過となるきわめてまれな免疫不全症である。近年、その責任遺伝子として *FOXP3* が同定された^{1,2)}。*FOXP3* 遺伝子は forkhead family に属する転写因子であり、制御性 (regulatory) T 細胞 (Treg) の発生・分化を司るとされている^{3,4)}。今回、わが国の IPEX 症候群の臨床的・免疫学的特徴について明らかにする。

B. 研究方法

これまで IPEX 症候群と診断された患者ならびに臨床症状から IPEX 症候群が疑われる患者を全国から集めてその臨床的特徴を明ら

かとする。

フローサイトメトリーにて $CD4^+T$ 細胞における $FOXP3^+CD25^+T$ 細胞ならびに $CD127^{dim}CD25^+T$ 細胞の割合を測定する。健常人ならびに IPEX 症候群患者からフローサイトメトリーを用いたソーティング法にて $CD25^+CD127^{dim}CD4^+T$ 細胞 (Treg) ならびに $CD25^-CD127^+CD4^+T$ 細胞 (コントロール) を単離し、放射線照射単核細胞存在下で抗 CD3 抗体ならびに混合培養反応 (mixed lymphocyte reaction; MLR) 刺激によって培養し、³H-TdR の取り込み能を調べた。

IPEX 症候群患者の保因者において $CD25^+CD127^{dim}CD4^+T$ 細胞内の *FOXP3* の発現をフローサイトメトリーにて調べた。

C. 研究結果

わが国において 5 家系 6 例の IPEX 患者

が同定された。発症年齢は生後5日から6か月であった。いずれも-2SD以下の低身長を認め、特に症例1は-16.5SDと著明な低身長を認めた。1例のみ家族歴はなかったが、その他は家族歴を有していた。初発症状は甲状腺炎が1例、アトピー性皮膚炎が1例、胃腸炎が2例、糖尿病が2例であった。ネフローゼ症候群の合併が2例で認められた。治療はステロイドやタクロリムスなどの免疫抑制療法が主に行われ、うち2例では骨髄移植を受け、現段階では経過良好である。

FOXP3 遺伝子変異は L76fsx53, A383T, F373V, K250-1, IVS1+2T>G が認められ、うち L76fsx53, F373V, IVS1+2T>G は新奇変異である。

FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞は健常人では年齢を問わず5%程度認められるが、IPEX 症候群患者ではすべて1%以下に著減していた⁵⁾。

表1 わが国の IPEX 症候群における臨床的特徴

症例	1	2	3	4	5	6
発症年齢	5日	2か月	19日	2か月	4か月	6か月
現在年齢	19歳	10歳	18歳	7歳	5歳	26歳
身長	74.7cm (-16.5SD)	116.5cm (-3.7SD)	157.1cm (-2.4SD)	109cm (-2.6SD)	100cm (-2.2SD)	157.2cm (-2.3SD)
体重	9.15kg	26.2kg	44.6kg	21kg	14.7kg	48.95kg
家族歴	あり	あり	あり	なし	あり	あり
初発症状	自己免疫性 甲状腺炎	アトピー 哺乳不良	好酸性胃腸炎	自己免疫性腸炎	糖尿病	糖尿病
その他の 症状	溶血性貧血 腸炎 尿細管障害 骨粗しょう症	気管支喘息 副腎不全 アトピー	アトピー 全身脱毛	なし	ミルク アレルギー アトピー ネフローゼ	ネフローゼ 腸炎
治療	タクロリムス ステロイド	ステロイド吸入 ステロイド	セフェランチン 抗アレルギー薬 ステロイド外用	シクロスポリンA 免疫グロブリン 免疫抑制剤	シクロスポリンA ステロイド	スクロスポリンA ステロイド

症例2と3は同胞例、症例4と5は同種骨髄移植後

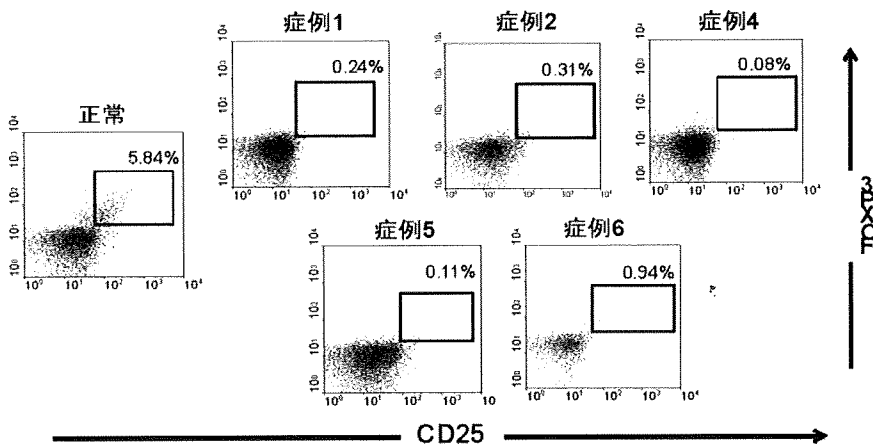


図1 IPEX 症候群患者における FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞

CD127^{dim}CD4⁺CD25⁺T 細胞を調べたところ、健常人では5%強存在するが、症例1および6では1%以下に著減していた。しかしながら症例2、4、5では健常人と同程度に存在していた。CD127^{dim}CD4⁺T 細胞における FOXP3 の発現を調べたところ、IPEX 症候群患者ではすべて著減していた。

健常人ならびに IPEX 症候群患者（症例2、4、5）からソーティング法にて得られた Treg 細胞およびコントロール細胞を抗

CD3 抗体ならびに MLR 刺激で培養して、³H-TdR の取り込み能を調べたところ、健常人の Treg 細胞は T 細胞の増殖を完全に抑制するが、IPEX 症候群患者由来の Treg 細胞はその抑制効果が有意に弱かった。

白抜きはコントロール細胞のみ、斜線はコントロール細胞添加、黒塗りは Treg 細胞添加を示す。コントロール細胞のみにおける ³H-TdR の取り込み能を 100%として表す。CD25⁺CD127⁺CD4⁺T 細胞における

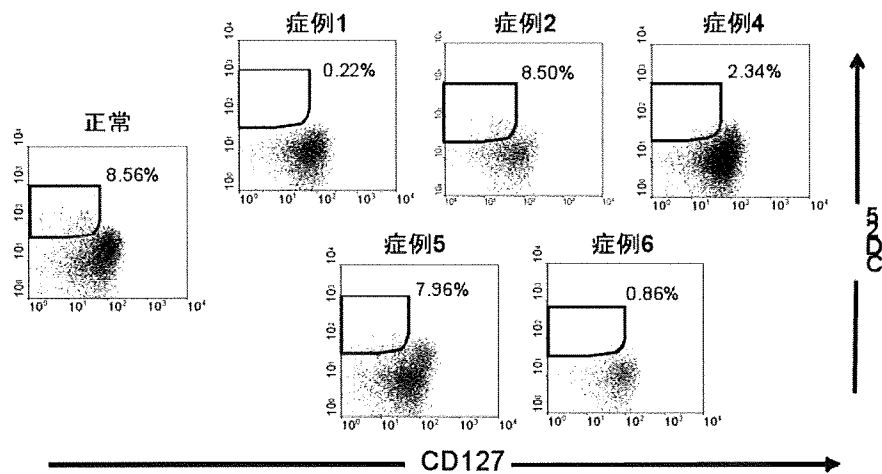


図2 IPEX 症候群患者における CD127^{dim}CD4⁺CD25⁺T 細胞

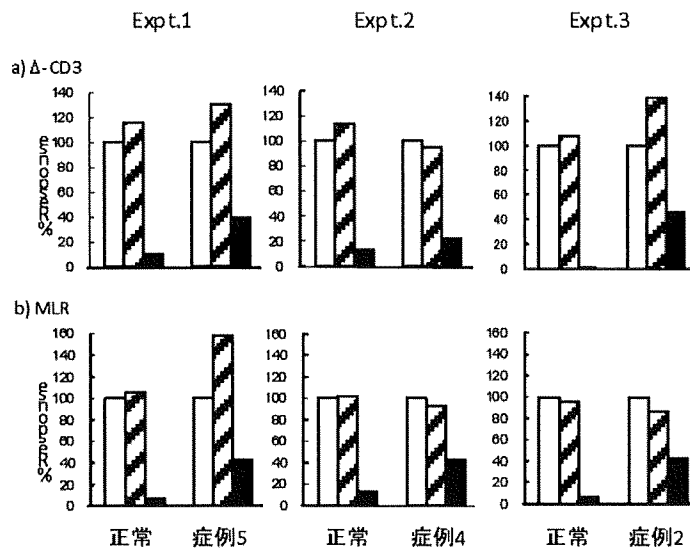


図3 Treg 細胞による T 細胞増殖抑制効果

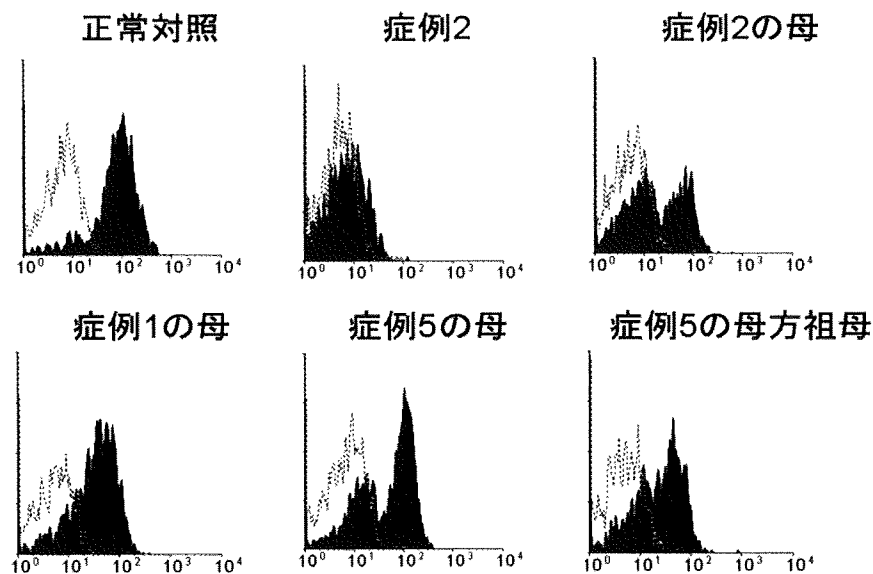


図4 CD25⁺CD127⁺CD4⁺T細胞におけるFOXP3の発現

FOXP3の発現は症例2の母、症例5の母および母方祖母において2峰性のパターンを示したが、症例1の母では明らかな2峰性のパターンは示さなかった。

症例4と5は同種骨髄移植が施行されたので、移植後のTreg細胞の再構成についても評価することができた。CD127^{dim}CD4⁺CD25⁺T細胞は移植後早期から認められ、むしろ増加していた。FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺T細胞は移植後早期には認められなかったが、晩期になってようやく認められるようになった。

D. 考察

ヒトT細胞とされているCD127^{dim}CD4⁺CD25⁺T細胞はIPEX症候群患者においては必ずしも欠損しているわけではなかった。IPEX症候群患者由来のCD127^{dim}CD4⁺CD25⁺T細胞は健常人由来のものに比べてT細胞の増殖抑制効果が弱く認められた。保因者において

はCD127^{dim}CD4⁺CD25⁺T細胞におけるFOXP3の発現が2峰性を示した。これらことからCD127^{dim}CD4⁺CD25⁺T細胞の機能にはFOXP3分子の発現が必要と考えられ、この細胞集団はTregの前駆細胞である可能性が考えられる。

E. 結論

わが国において5家系6例のIPEX症候群が同定され、すべての患者においてFOXP3⁺CD4⁺CD25⁺T細胞は1%以下に著減しており、IPEX症候群患者のスクリーニング検査として有用と思われる。

骨髄移植後においてCD127^{dim}CD4⁺CD25⁺T細胞は一過性に増加するが、FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺T細胞は回復に時間を要すると思われる。

謝辞

貴重な患者情報ならびに検体をいただきました小林一郎(北見赤十字病院)、今泉益栄(宮城県こども病院)、笹原洋二(東北大学)、早

川 晶 (神戸大学)、伊藤秀一 (国立成育医療センター) の諸先生に深謝いたします。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 金兼弘和：ワークショップ1 ヒト免疫病における Th17 細胞と Treg 細胞「IPEX 症候群とヒト Treg 細胞」第 37 回日本臨床免疫学会、2009、11、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

参考文献

1) Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27:18-20, 2001.

2) Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21, 2001.

3) Hori S, Nomura S, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061, 2003.

4) Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:3330-3336, 2003.

5) Fuchizawa T, Adachi Y, Ito Y, Higashiyama

H, Kanegane H, Futatani T, et al. Developmental changes of FOXP3-expressing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and their impairment in patients with *FOXP3* gene mutations. *Clin Immunol* 125:237-246, 2007.

我が国におけるMSMDの臨床像，遺伝学的背景の特徴

高田英俊	(九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
保科隆之	(九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
石村匡崇	(九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
土居岳彦	(九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
原寿郎	(九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
大嶋宏一	(理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター 免疫ゲノミクス研究グループ)
小原收	(かずさDNA研究所ヒトゲノム研究部)
金澤崇	(群馬大学大学院医学系研究科小児科学)
荒川浩一	(群馬大学大学院医学系研究科小児科学)
西小森隆太	(京都大学大学院医学研究科発達小児科学)
河合朋樹	(京都大学大学院医学研究科発達小児科学)
中畑龍俊	(京都大学物質-細胞統合システム拠点iPS細胞センター)
岡田賢	(広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学)
小林正夫	(広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学)

研究要旨

IFNGR1, *IFNGR2*, *IL12B*, *IL12RB1*, *STAT1* 及び *NEMO* 遺伝子異常などによって細胞内寄生菌に対する易感染性が起こり Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD) と呼ばれている。我が国における MSMD の臨床像や患者の遺伝的背景を解明するため、今回、平成 11 年から平成 21 年の十年間に重症の細胞内寄生菌感染症をおこした 49 名の患者を対象として、その臨床像を解析した。その結果、起炎菌は BCG 感染症が最も多く、BCG 骨髄炎が最も多かった。サルモネラやリステリア感染症は見られなかった。BCG 接種から発症までの期間（中央値）は 11 か月（5～46 か月）であった。5 家系 6 名の患者は優性遺伝型部分 IFN- γ R1 欠損症であった。1 例（男性）に *NEMO* 遺伝子変異を認め、この患者は外胚葉形成不全症の症状は明確ではなかった。すべての優性遺伝型部分 IFN- γ R1 欠損症で、単球での IFN- γ R1 の過剰発現がみられ、*NEMO* 遺伝子変異を認めた患者では、LPS 刺激による単球内 TNF- α 産生能が低下していた。我が国においては優性遺伝型部分 IFN- γ R1 欠損症が MSMD のなかで最も多いと考えられ、その臨床像や遺伝的背景は欧米と異なる事が明らかになった。

A. 研究の目的

重症複合免疫不全症，慢性肉芽腫症，DiGeorge 症候群，AIDS などの，T 細胞機能異常を伴う免疫不全症患者では，播種性 BCG 感染症や非定型抗酸菌感染症に罹患しやすく，重症化しやすいことが知られている。しかし，これらの免疫不全症がないにもかかわらず，抗酸菌や *Salmonella* などの，いわゆる細胞内寄生性細菌感染症が重症化することがある。家族性がみられ，両親の血族結婚の頻度が高く Mendelian susceptibility to mycobacterial disease (MSMD: MIM209950) と呼ばれる。近年，これらの一部は，IFN- γ レセプター (IFN- γ R) 1 欠損症，IFN- γ R2 欠損症，IL-12 欠損症，IL-12R 欠損症，STAT1 欠損症，NEMO 異常症等，IL-12/IFN- γ 経路の異常を中心とした新たな原発性免疫不全症であることが明らかとなった [1-7]。我が国では欧米と比較して結核感染症が多く，BCG Tokyo 株をワクチンに使用しており，欧米とは異なる環境である。しかし我が国における MSMD の実態は明らかではないことから，今回，国内の MSMD の臨床像，遺伝的背景について検討した。

B. 研究方法

平成 11 から平成 21 年の間に MSMD と診断された 49 名の患者（男性 31 名，女性 18 名，34 病院）を対象とした。MSMD の診断は，繰り返す，あるいは血行性に播種した細胞内寄生性細菌 (BCG，非定型抗酸菌 (NTM)，結核菌，サルモネラ，リステリア等) 感染症を起こした場合とした。血液から DNA と cDNA を抽出し，IFNGR1，IFNGR2，IL12B，IL12RB1，STAT1，IKBKG 遺伝子の塩基配列を決定し，遺伝子変異の有無を解析した。遺伝子解析は，か

さ DNA 研究所と九州大学大学院医学研究院 成長発達医学で行った。この研究は九州大学倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

MSMD の臨床像の解析

起炎菌の種類について検討したところ，BCG が最も多く，NTM，結核菌も見られたが，*Salmonella* や *Listeria* 感染症はなかった (図 1 左)。次に感染症の種類・部位について検討した。関節炎/骨髄炎が最も多く，リンパ節炎，皮下膿瘍も比較的多くみられた (図 1 右)。最も頻度の高かった BCG 感染症について検討したところ，やはり関節炎/骨髄炎が最も多く，リンパ節炎や皮下膿瘍等が見られた (図 2 左)。BCG 接種から BCG 感染症発症までの期間をみると，リンパ節や皮下膿瘍は BCG 接種後比較的早期に発症しているのに対して，関節炎/骨髄炎では，BCG 接種後 5 カ月から 46 カ月で発症しており，BCG 接種から発症までの期間が長い傾向が見られた (図 2 右)。

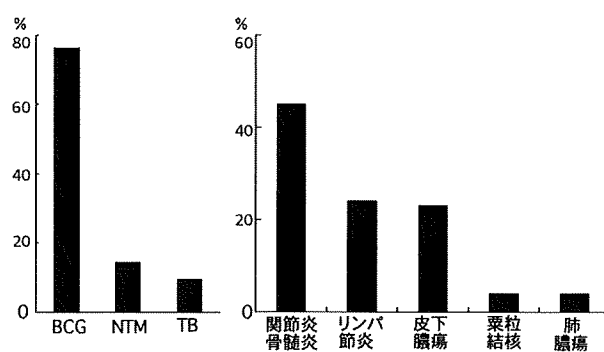


図 1. 起炎菌と感染症の種類・部位

NTM: non-tuberculous mycobacterium

TB: 結核菌