

図 2. BCG 感染症の種類・部位, BCG 接種から BCG 感染症までの期間

我が国の MSMD の遺伝的背景

MSMD 患者末梢血から DNA と cDNA を抽出し, IFNGR1, IFNGR2, IL12B, IL12RB1, STAT1, IKBKG 遺伝子を PCR 法で増幅し, direct sequencing にて塩基配列を決定し遺伝子異常の有無を検討した。その結果, 6 家系 7 名に遺伝子変異を認めた (表 1)。5 家系 6 名は, IFNGR1 の部分欠損症であり, 1 例は IKBKG 遺伝子の異常であった。IFNGR 1 欠損症は, 細胞内ドメインあるいは細胞膜ドメインに相当する部位の遺伝

表 1. 遺伝子変異を認めた MSMD 患者

症例	性	診断年齢	発症年齢	感染症	遺伝子変異
1	男	1y9m	8m	BCG リンパ節炎 BCG 骨髄炎 (多発)	IFNGR 1818del4
2	男	41y	36y	TB リンパ節炎 (2回) NTM 骨髄炎 (多発)	IFNGR 1818del4
3	男	2y	2y	BCG 骨髄炎 (多発)	IFNGR 1818del4
4	女	1y7m	10m	BCG リンパ節炎、皮膚炎 BCG 骨髄炎 (多発)	IFNGR 1811del4
5	男	19y	4m	BCG 皮膚炎、リンパ節炎 BCG 骨髄炎 (多発) NTM 皮下膿瘍 NTM 骨髄炎	IFNGR 1G832T
6	女	12y	6m	BCG リンパ節炎 NTM 骨髄炎 (多発)	IFNGR 1774del4
7	男	10y	10m	TB リンパ節炎 NTM 肺炎 NTM リンパ節炎 (多発) 敗血症、肺炎 (4回) リンパ節炎 (2回)	NEMO Q43C

症例 2 は症例 1 の父。

子変異によって, truncated な蛋白が³つくられ, dominant negative に働くタイプの変異であった (図 3 上段)。この遺伝子変異では, IFN- γ R1 の細胞内 recycling motif も欠損するため, 細胞表面に IFN- γ R1 が³過剰発現すると考えられており, 実際にフローサイトメーターで解析した結果, IFN- γ R1 の過剰発現が確認された (図 3 下段)。

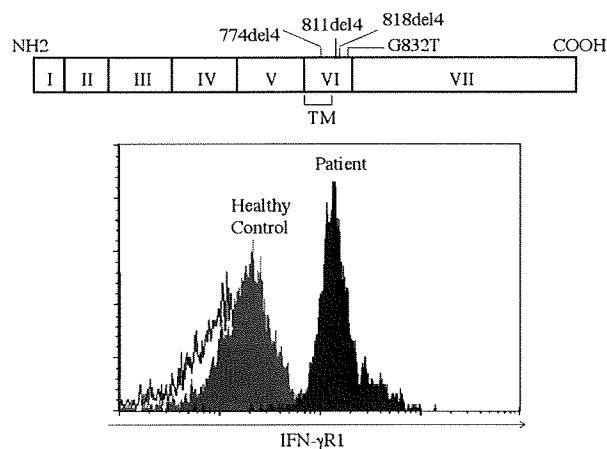


図 3. IFNGR1 遺伝子変異とそれによる細胞表面の IFN- γ R1 分子の過剰発現。

上段: 遺伝子変異の部位。TM: 細胞内ドメイン。
下段: 患者単球での IFN- γ R1 の過剰発現

NEMO 遺伝子変異を認めた患者では, 外胚葉形成不全症の臨床像は明確ではなかった。しかし, 右上第 2, 第 5, 右下第 5, 左上第 2, 左下第 5 歯の歯胚の欠損を認めた (図 4 上段)。NEMO 遺伝子の異常は新規の変異であり (図 4 中段), NEMO 欠損細胞に変異 NEMO 遺伝子を導入しても LPS 刺激後の NF κ B の活性化がおこらないことをルシフェラーゼアッセイで確認した (図 4 下段)。



943G→C(315Glu→Gln)

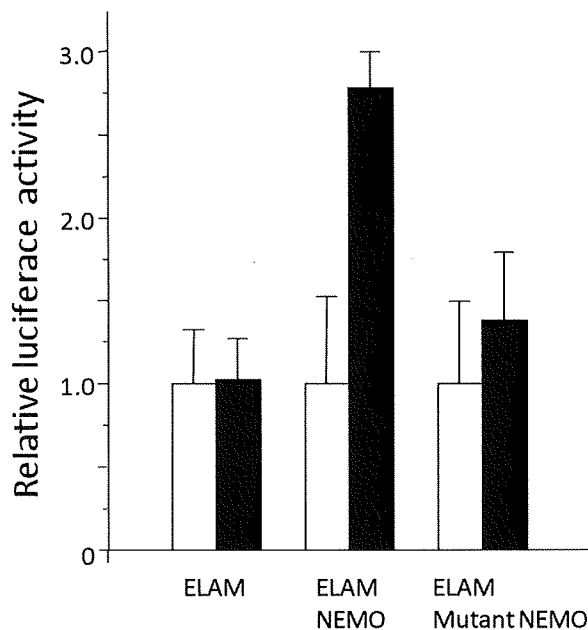
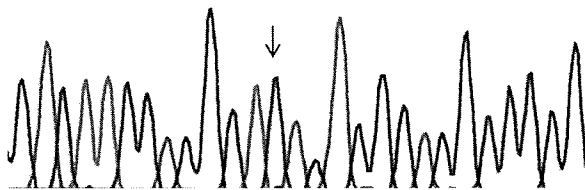


図4. NEMO 遺伝子異常による MSMD。

上段：X線上で、患児の右上第2、第5、右下第5、左上第2、左下第5歯の歯胚の欠損を認める（左上）。中段：cDNAからの遺伝子解析結果。矢印の部位に新規遺伝子変異を認めた。下段：NEMO欠損細胞に野生型、変異型のNEMO遺伝子を導入し、LPS刺激前後のNF- κ B依存性（ELAM）のルシフェラーゼ活性を測定（右）。

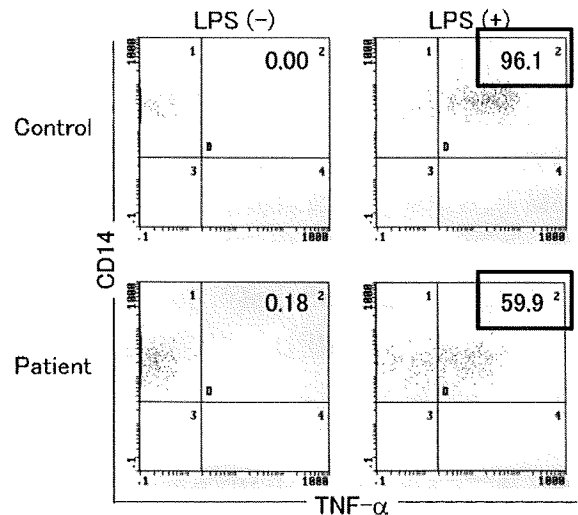
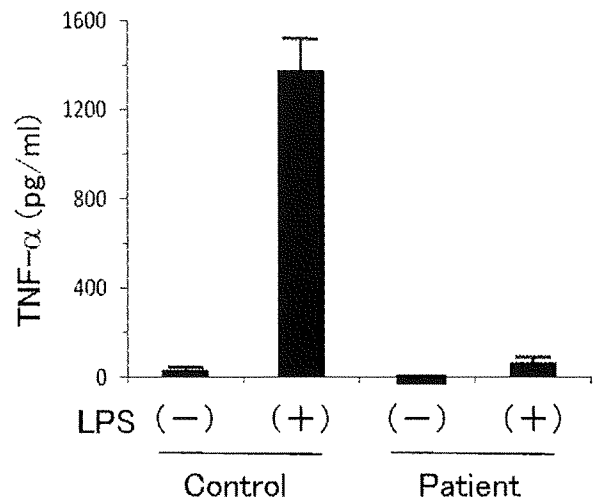


図5. LPS刺激後のTNF- α 産生能。

上段：24時間培養後の培養上清中のTNF- α 濃度。

下段：全血を4時間刺激後、単球内のTNF- α をフローサイトメーターで測定。

また末梢血を24時間LPSで刺激すると、患者ではTNF- α の産生が欠損しており、NF- κ B経路の異常が確認された。この結果を基に、末梢血全血をLPSで4時間刺激した後、単球内のTNF- α を染色したところ、TNF- α 産生能は著しく障害されていた。この方法は短時間での解析が可能であり、迅速診断に有効であると考えられた。

D. 考 察

今回の調査で、我が国の MSMD の特徴として、臨床上、男女比 1.7 と男性に多い傾向があり、フランスから男女比が 1:1 であると報告されているものと対照的であった。また、Salmonella 感染症が見られなかったことが欧米からの報告と異なっている。さらに、フランスからの報告では、播種性 BCG 感染症の約半数が死亡しているが [2, 3]、今回の検討では死亡例は見られなかった。国内症例の BCG 感染症の予後が良い理由の一つには、国内で使用されている BCG Tokyo 172 株が他の BCG と比較して弱毒株であることがあげられよう。

これらの臨床像での特徴に加えて、遺伝子異常を認めた症例の 7 例中 6 例が IFNGR1 遺伝子の異常であり、IL12RB1 が最も多い欧米と明らかな違いが認められた。他方、MSMD 患者の多くは既知の遺伝子異常は認められず、まだ解明されていない遺伝的原因が存在する可能性が高い。

E. 結 論

我が国における MSMD の臨床像および遺伝的背景は欧米と異なることが明らかになった。フローサイトメーターを用いて、単球の IFN- γ R1 の発現や、LPS 刺激による細胞内 TNF- α 産生能を検討することは、この疾患の迅速診断に有効である。

参考文献

1. Levin M, Newport MJ, D'Souza S, et al. Familial disseminated atypical mycobacterial infection in childhood: a human mycobacterial susceptibility gene? Lancet 1995; 345:79-83.
2. Casanova JL and Jouanguy E. Immunological conditions of children with BCG disseminated

infection. Lancet 1995; 346:581.

3. Casanova JL, Blanche S, Emile JF, et al. Idiopathic disseminated bacillus Calmette-Guerin infection: A French national retrospective study. Pediatrics 1996; 98:774-8.
4. Fucht DM and Holland SM. Defective monocyte costimulation for IFN- γ production in familial disseminated Mycobacterium avium complex infection: Abnormal IL-12 regulation. J Immunol 1996; 157:411-6.
5. Casanova JL and Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: The human model. Annu Rev Immunol 2002; 20:581-620.
6. Altrare F, Jouanguy E, Lamhamedi S, et al. Mendelian susceptibility to mycobacterial infection in man. Curr Opin Immunol 1998; 10:413-7.
7. Filipe-Santos O, Bustamante J, Haverkamp MH, et al. X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production. J Exp Med 2006; 203:1745-59.

本邦における家族性地中海熱の特徴と今後の課題

上 松 一 永 (信州大学医学研究科感染防御学)
山 崎 和 子 (信州大学医学研究科感染防御学)
土 屋 彩 子 (信州大学医学部第三内科)
矢 崎 正 英 (信州大学医学部第三内科)
小 原 取 (かずさDNA研究所ヒトゲノム研究部)

研究要旨

本邦における 105 例の家族性地中海熱患者の臨床的検討では、地中海地方に比し、腹痛、関節痛、皮疹の合併が少なく、胸背部痛が多い傾向がみられた。また、確定診断に 10 年以上を有し、患者 QOL が著しく損なわれている例が多くみられた。治療薬 コルヒチンがほぼ全例で著効しており、諸外国の使用量の半量で有効であった。家族性地中海熱責任遺伝子 *MEFV* の本邦初の M680I 変異家系を今年度みいだした。また、心筋炎を反復し手術を繰り返している患児を本症と診断し、コルヒチン治療を行うことができた。遺伝子解析では、E148Q/M694I 変異が多いことが判明したが、ヘテロ接合の M694I 変異のみおよび E148Q のみを有する症例の検討が必要と考えられた。今回検討した典型的な家族性地中海熱患者以外に、作成した診断基準の必須項目を満たさない発熱期間が長く、特異的な *MEFV* 遺伝子変異 (P369S, R408G variants) を有する症例を多数に認めた。本患者の治療は今後重要な課題と考えられ、パイリン関連周期熱症候群として臨床検査所見をまとめる必要がある。

A. 研究の目的

家族性地中海熱 (Familial Mediterranean fever: FMF) の典型的な臨床所見は、月に 1 回ほどの発熱を繰り返す。発熱期間は数日以内で、発熱に伴って激しい腹痛か胸痛を訴える。発熱時には、CRP は 10mg/ml 以上と高値になり、発作間欠期にはその値は正常化する。家族性地中海熱では炎症の繰り返えられる発作によって、患者 QOL は著しく阻害されている。本研究では、これまでに集積した家族性地中海熱の臨床像を把握し、遺伝子診断のための責任遺伝子解析結果を検討、患者 QOL 向上のために早期確定診断法を確立することを目的とした。また、診断のために本年度作成した診断基準を満たさない家族

性地中海熱患者についても検討を加えた。

B. 研究方法

1. 論文発表 46 例、アンケート 5 例、信州大学関連 54 例を対象とした。FMF 患者の臨床像、検査所見、遺伝子解析結果、治療、予後について検討した。
2. 2009 年度に見出された本邦初の変異を有する家系の解析と心膜炎の反復によって頻回の手術を余儀なくされた本症患児をまとめた。
3. 責任遺伝子 *MEFV* 遺伝子解析においていくつかの問題点が浮かび上がり、今後の課題として検討した。
4. 典型的家族性地中海熱診断基準を作成し

たが、典型例の必須項目を満たさないパイリン関連の一連の患者群を検討した。

(倫理面への配慮)

家族性地中海熱の責任遺伝子 *MEFV* 遺伝子解析には、信州大学医学部の倫理委員会の承諾を得ており、検体の取り扱いなどについては委員会の指針に従っている。

C. 研究結果

1. 臨床像の検討

2008年度までの報告(文献;Tsuchiya et al. J rheumatology 2009)に今年度の症例を加えた合計105人について検討した。

論文報告例は(46例)、アンケート5例、信州大学にて経過観察中の患者数(54例)であり、総患者数は105例であった。男女比は男性41名、女性64名であった。発症年齢は10歳未満が23名(24.7%)、10歳~19歳38.7%、20歳~29歳24.7%、30歳以上11.8%であり、地中海地方の患者に比べて発症年齢が遅い傾向があった。臨床症状としては、発熱(98.9%)、胸膜炎による胸痛(59.1%)、腹膜炎による腹痛(53.7%)、関節炎(23.6%)、丹毒様紅斑(8.6%)が認められ、1例に反復性の心膜炎がみられた。アミロイドーシスの合併は4例であった。コルヒチン投与量は比較的少量(成人平均0.5mg/kg/日)で発作予防に有効であった。確定診断に10年以上を有し、中には無効な免疫抑制薬の大量投与によってQOLが著しく阻害されている例が21例中10人いることが判明した。*MEFV* 遺伝子変異の特徴としては、major mutationのうちM694Iの頻度が高く(67.7%)、M680Iが1名(1.0%)でM694V、V726Aはみられなかった。M694I/M694I(5.3%)、M694Iのみ(16.1%)、M694I/E148Q(25.8%)、

M694I/E148Q-L110P(17.2%)であった。

本邦のFMFの特徴としては、追加症例を加味しても最終的に、Tsuchiyaらの報告と差異はなく、地中海地方の症例に比較して症状が軽く、コルヒチン投与量が少量でも有効であった。発症年齢が遅く、成人発症例が多く存在していた。*MEFV* 遺伝子変異の特徴はM694I/E148Qの複合ヘテロ接合体での発症が多く、E148QにL110Pを伴う傾向があった。

2. 本年度の特異な症例

先天性心疾患の手術後から発熱に伴って心外膜炎を繰り返していた2歳11か月女児を本症と診断した。心臓手術後7か月頃から3日間ほど続く発熱、炎症マーカー上昇に伴い、心嚢液貯留を繰り返した。約1か月毎に発熱に伴って心嚢液貯留を繰り返すため、本症を疑い、特徴的な呼吸から家族性地中海熱と診断した。遺伝子解析ではE148Qヘテロ接合のみ認めた。診断的治療としてコルヒチン投与を開始後、発作の頻度は減少し、特に最近では発作は消失している。

MEFV 遺伝子変異のホットスポットであるM680I変異は、地中海沿岸では高頻度に認められるが本邦では見いだされていなかった。本変異を有する7歳男児をみいだした(文献;Oshima et al.)。父親はヘテロM680I変異、母親はヘテロL110P-E148Qがあり、患者はL110P-E148Q/M680I変異がみられた。地中海方症例で指摘さえているように比較的臨床症状は軽い傾向があり、コルヒチン内服後は症状の発現はみられていない。

3. *MEFV* 遺伝子変異の問題点

詳細な家族性地中海熱の責任遺伝子解析から、正常人の約23%が有するE148Q変異にM694I変異がヘテロ接合すると本症が発症することが統計学的に判明した。しかしながら、なぜSNPと考えられるE148Q変異

がM694Iに接合する発症するかは不明である。また、ヘテロ接合のM694I変異のみの例が16.1%に認め、優性遺伝なのかどうかの検討が今後必要と考えられた。また、典型的な家族性地中海熱と診断した症例の中にE148Q変異のみを有する患者がE148Q保因者の割合に比し明らかに多いことから、これらの変異による発症についても今後解析する必要があると考えられた。

4. 診断基準を満たさないパイリン関連周期性熱症候群

診断基準の重要な項目として、発熱持続時間が3日以内を必須項目としたが、発熱持続期間が長く漿膜炎を伴わない家族性地中海熱に類似した患者群の存在が判明した。今回の統計には含めていないが調査過程で合計20例以上散見された。コルヒチンが奏功する傾向があり、MEFV遺伝子変異としてこれまでポリモルフィズムと考えられていたP369S-R408Q/wtが検出された。パイリン関連周期性症候群として新たな範疇に入る可能性があり、臨床症状の詳細な解析と症例の蓄積が重要である。

D. 考察

本邦の家族性地中海熱患者では確定診断までに時間がかかることが多かったが、本症の啓発によって早期に診断されるようになってきた。治療薬コルヒチンは副作用として消化器症状を呈するが、投与量を調節することによって発現を防ぐことができる。MEFVの変異は、本邦においては諸外国と異なりM694I, E148Qがほとんどを占めるがこれは民族に由来するものと考えられる。ヘテロ接合M694Iなど優性遺伝様に見える家系があるが、他のアレルに何かしらの異常があるのかどうか判明していない。

初めてM680I変異を有する家系がみいだ

され諸外国に多い本変異も国内に存在することが確認された。繰り返す心筋炎患者はE148Q/wtであり、発症原因がパイリンによるものかどうかは不明であるが、診断基準からは家族性地中海熱に合致した。コルヒチンが著効したことから患者QOLの向上をはかれた。

診断基準を満たさない発熱期間の長い例は、診断上は家族性地中海熱とは診断できない例があるが、パイリン関連周期性発熱そして新たな範疇に入る可能性がある。しかしながら、一部はコルヒチンが有効なため家族性地中海熱に準じて治療をしていく必要がある。

E. 結論

家族性地中海熱は、副腎皮質ステロイド薬などの薬剤は無効で、特効薬ともいえるコルヒチンがほぼ全例で著効するため、炎症発作を抑えて患者QOLを向上させるためには、早期診断と早期のコルヒチン治療が不可欠である。これまでに診断に10年以上を有し苦しい日々の生活を余儀なくした患者がみられたが、最近では本症の啓発によって診断は早まっている。しかしながら、診断されずに無効な治療を受けている例があり、非典型例も存在するため、本研究の推進が今後も重要と思われる。また、早期確定診断のための責任遺伝子解析結果においてパイリン遺伝子変異の疑問点が明らかになったが、残された問題も多く、今後のさらなる進展が必要と思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

上松一永：【最新・自己免疫疾患 Update 研究と治療の最前線】自己免疫疾患の病因疾患ゲノム解析 自己炎症症候群と遺伝子異

常 医学のあゆみ 230; 620-625, 2009.

山下りか, 佐藤友紀, 本蔵賢治, 高橋通規, 海瀬和郎, 山崎和子, 上松一永: 診断までに 8 年間に要した家族性地中海熱の 1 例. 日本内科学会雑誌 98; 1114-1116, 2009.

山崎和子, 山崎崇志, 増本純也, 鈴木彩子, 矢崎正英, 上松一永: 注目される新しい病態・疾患概念と臨床検査 血液疾患編 自己炎症疾患としての家族性地中海熱. 臨床病理 57; 371-381, 2009.

山崎和子, 上松一永: 小児疾患における臨床遺伝学の進歩】話題の疾患遺伝子 自己炎症疾患 小児科 50; 1152-1157, 2009.

Kazuko Yamazaki, Takashi Yamazaki, Shinsuke Taki, Kensuke Miyake, Takuma Hayashi, Hans D. Ochs and Kazunaga Agematsu. Potentiation of TLR9 responses for human naïve B-cell growth through RP105 signaling. *Clinical Immunology* in press.

Koichi Oshima, Kazuko Yamazaki, Yoichi Nakajima, Akari Kobayashi, Tomochika Kato, Osamu Ohara, Kazunaga Agematsu. A case of Familial Mediterranean fever associated with compound heterozygosity for the pyrin variant L110P-E148Q/M680I in Japan. *Modern Rheumatology* in press.

Sakurai Y, Komatsu K, Agematsu K, Matsuoka M. DNA double strand break repair enzymes function at multiple steps in retroviral infection. *Retrovirology*. 6:114, 2009.

Shigemura T, Agematsu K, Yamazaki T, Eriko

K, Yasuda G, Nishimura K, Koike K.. Femoral osteomyelitis due to *Cladophialophora arxii* in a patient with chronic granulomatous disease. *Infection* 37:469-73, 2009.

Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, Nakamura A, Yamazaki K, Agematsu K, Matsuda M, Ikeda S. Clinical and genetic features of familial Mediterranean fever in Japan. *J Rheumatol*. 36:1671-6, 2009.

Junya Masumoto, Takashi Yamazaki, Koichi Ohta, and Kazunaga Agematsu. Interleukin- 1β suppression in Nod2-defect Blau syndrome. *Arthritis Rheum* 60:2544-5, 2009.

Minegishi Y, Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, 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*. 206:1291-301, 2009.

Sekiguchi Y, Ichikawa M, Takamoto M, Sugane K, Honjo T, Agematsu K. Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein are not involved in the severity of chronic non-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology Letters* 122:145-9, 2009.

Nagumo H, Abe J, Kano H, Yamazaki K, Yamazaki T, Kobayashi N, Koike K, Sugane K, Saito H, Agematsu K Distinct response in maintenance for human naïve and memory B cells via TCL1/Akt and IL-21 receptor pathways. *Cellular Immunology* 256:56-63, 2009

Kobayashi S, Haruo N, Sugane K, Ochs HD, Agematsu K. Interleukin-21 stimulates B-cell immunoglobulin E synthesis in human beings concomitantly with activation-induced cytidine deaminase expression and differentiation into plasma cells. Hum Immunol. 70; 35-40, 2009.

2. 学会発表

1. 上松 一永：自己炎症疾患の診断のポイントと治療．第2回静岡小児膠原病・自己炎症性疾患研究会 静岡 2009年9月

2. 上松 一永：本邦における家族性地中海熱の特徴．第2回自己炎症性疾患研究会 東京 2009年8月

3. 上松 一永：自己炎症疾患の病態・診断・治療について．第18回札幌臨床免疫アレルギーの集い 札幌 2009年7月

4. 上松 一永：小児発熱疾患の診かた；自己炎症疾患を中心に．第15回熊本小児感染症治療研究会 熊本 2009年5月

5. 上松 一永：自己炎症疾患．都筑区小児研究会 横浜 2009年2月

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

当科で経験したCIAS1遺伝子異常症5例の分子生物学的解析 (特にIL-18の関与について)

大 西 秀 典 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
寺 本 貴 英 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
加 藤 善一郎 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
木 村 豪 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
金 子 英 雄 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
近 藤 直 実 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)

研究要旨

Cryopyrin 関連周期性症候群 (CAPS) は、CIAS1 遺伝子の機能獲得型変異を原因とする自己炎症性症候群の 1 疾患である。本年度に岐阜地区で CIAS1 遺伝子変異を有する 5 症例を経験した。5 症例のうち 4 症例は変異 Cryopyrin 発現実験にて NF- κ B の上昇が確認され CAPS と確定診断された。このうち 2 症例は軽症型の家族性寒冷自己炎症性症候群 (FCAS) の表現型を示し、サイトカインプロファイルの解析から CINCA 症候群、Muckle-Wells 症候群 (MWS) 症例と異なり血清 IL-18 は上昇しないが、患者末梢血単核球分画 (PBMCs) からの LPS 刺激後の IL-18 産生が上昇することが示された。CAPS の診断には遺伝子診断のみならず、変異タンパクの活性実験、サイトカインプロファイルの検討が重要であることが示唆された。

A. 研究の目的

CIAS1 遺伝子異常によって発症する Cryopyrin 関連周期性症候群 (CAPS) の国内報告例が増加してきている。約半数の CAPS 症例で、明らかに CAPS の臨床症状を示すが CIAS1 遺伝子に変異が認められないことがあることが報告されているが、一方、CIAS1 に遺伝子異常があるが、臨床症状が揃わず診断確定できない場合も存在する。本研究では、岐阜地区で同定された CIAS1 遺伝子変異について、変異 Cryopyrin 発現実験ベクターを構築し、NF- κ B 活性を調べた。同時に、CAPS 早期診断の指標としてサイトカインプロファイル (特に IL-18) が利用できないか検討した。

B. 研究方法

1. 患者末梢血から genome DNA を抽出し、CIAS1 遺伝子の塩基配列を解読した。
2. 患者血清 IL-1 β 、IL-18、TNF- α を ELISA 法で測定した。
3. 患者末梢血単核球 (PBMCs) を 1×10^6 /ml の濃度で培養し、LPS (10、100ng/ml) を添加し、24 時間後に回収した培養上清中の IL-1 β 、IL-18、TNF- α を ELISA 法で測定した。
4. HEK293T 細胞に pcDNA3.1+_ASC-myc と pcDNA3.1+_Cryopyrin-FLAG 野生型及び変異型を一過性共発現させ、Dual Luciferase Assay 法で、NF- κ B の reporter gene 活性を測定した。

表1 CIAS1異常症例のプロファイル

症例	初診時年齢	発症時期 (推定)	性別	診断	Genotype (CIAS1)	中枢神経症状		皮膚症状	関節症状	その他
						髄膜炎	精神発達遅滞	非掻痒性蕁麻疹	関節炎	感音性難聴
症例1	4ヵ月	3ヵ月	女性	FCAS	1687T>A	-	-	+	-	-
					Y563N					
症例2	34歳	幼児期	男性	FCAS	1687T>A	-	-	+	+	-
					Y563N					
症例3	14歳	11ヵ月	男性	CINCA	2062G>A, 2425G>A	+	-	+	+	-
					E688K, G809S					
症例4	52歳	33歳頃	女性	MWS	2062G>A	-	-	+	+	+
					E688K					
症例5	4歳	3歳	女性	type VII JIA	1132G>A	-	-	+	+	-
					E378K					

C. 研究結果

1. 研究対象の症例

【症例 1、2】生後 4 ヶ月女児。顔面、四肢に非掻痒性の膨疹が反復出現。34 歳の父も同様の症状を呈しており、CIAS1 遺伝子に Y563N 変異を認め、FCAS と診断。【症例 3】14 歳男児。乳児期発症の慢性無菌性髄膜炎を合併した MCTD として加療されていた。CIAS1 遺伝子に E688K、G809S 変異が同定され CINCA/NOMID 症候群と診断。【症例 4】52 歳女性。症例 3 の母。関節リウマチと診断され加療されていた。19 年前より進行性の感音性難聴があり、CIAS1 遺伝子に E688K 変異を認め MWS と診断。【症例 5】4 歳女児。2 週間以上の持続する弛張熱と、強い多関節痛がみられた (MMP3>800)。リウマトイド因子陰性。好中球浸潤を伴う非掻痒性紅斑も反復出現する。CIAS1 遺伝子に E378K 変異を認め、臨床症状から MWS が疑われたが、CAPS としての診断確定に至らず、現在のところ ILAR の JIA 分類の第 7 病型 (分類不能な関節炎) として MAP 療法を開始している。

2. 調査した 5 症例において CIAS1 遺伝子上に国内で報告例の無い変異 E378K (症例 5)、Y563N (症例 1、2)、E688K (症例 3、4)、G809S (症例 3) が同定された (表 1)。

3. CIAS1 異常症の血清及び PBMCs 培養上清の IL-1 β 、IL-18、TNF- α について検討したところ、IL-1 β 、TNF- α は血清中ではほとんど検出できないか、軽度上昇している程度であった。IL-18 は健常者も含め全例測定可能であり、特に CINCA や MWS 症例では強く増加していた。一方、FCAS 症例では血清 IL-18 の増加は認められなかった (図 1)。

4. CINCA、MWS 症例及び分類不能型 JIA 症例では無刺激培養での IL-1 β の増加が認められたが、健常者や FCAS 症例では認められなかった (図 2)。一方、FCAS 症例の PBMCs を LPS 刺激下で 24 時間培養後の培養上清中 IL-1 β 及び IL-18 は、健常者群より増加が認められた。TNF- α は健常者群との差は認められなかった (図 3)。

5. 変異 Cryopyrin による NF- κ B 活性を調べたところ、Y563N、E688K は著明な上昇を認めたが、E378K、G809S では野生型と有意差は認めなかった (図 4)。

D. 考察

CAPS が疑われる患者の CIAS1 遺伝子に国内で報告例の無い変異 Y563N、E688K を同定した。E378K、G809S は活性増強に影響しない変異であった。CIAS1 異常症の

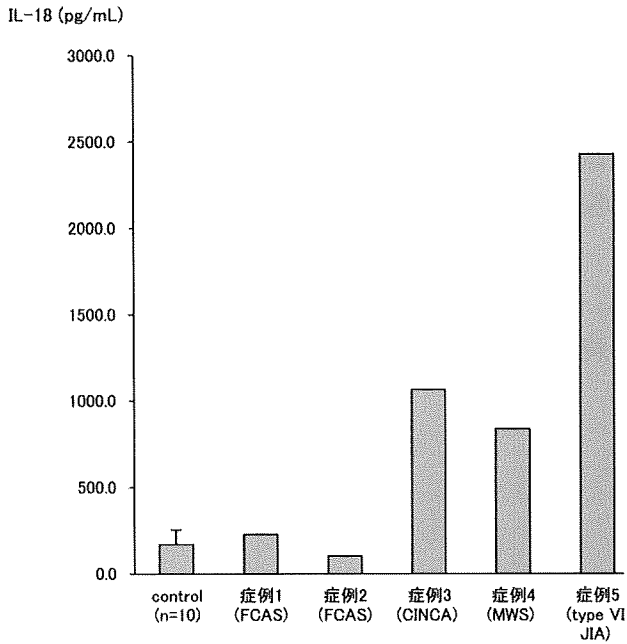


図1 CIAS1異常症例の血清IL-18値

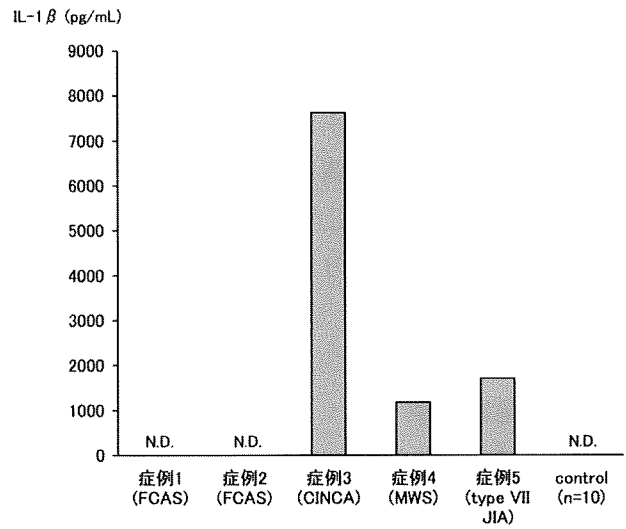


図2 CIAS1異常症例のPBMCs無刺激培養上清中のIL-1β

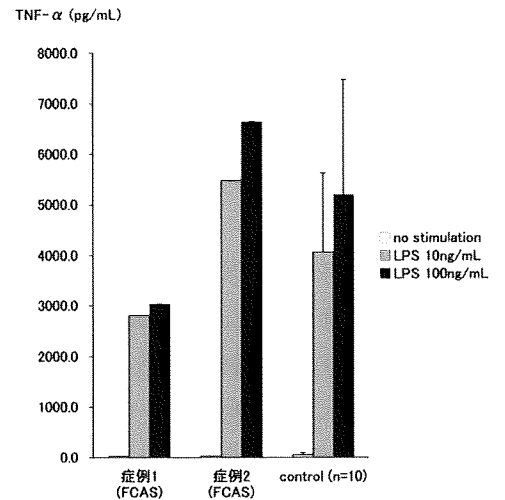
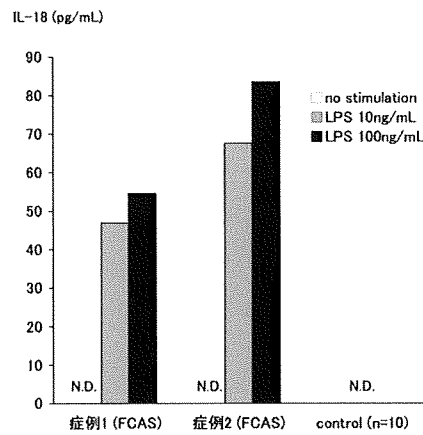
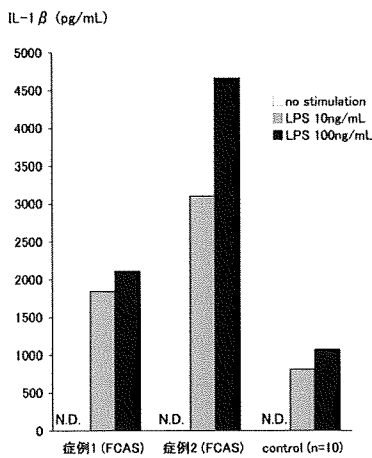


図3 FCAS症例のPBMCs培養上清中サイトカイン

血清及びPBMCs培養上清のIL-1β、IL-18について検討したところ、IL-1βは血清中では検出できないことが多いが、IL-18は検出しやすいサイトカインであり、特にCINCAやMWS症例では強く増加していた。一方、FCAS症例では血清IL-18の増加は認めら

れず、またPBMCsの無刺激培養でIL-1βの増加は認められなかったが、LPS刺激下で24時間培養後のIL-1β及びIL-18は健常者群より増加が認められた。

E. 結 論

患者で同定された変異 Cryopyrin の発現実験による NF- κ B の活性実験は診断確定のために重要である。また血清 IL-18 測定と PBMCs からの LPS 刺激による IL-1 β 及び IL-18 産生の検討は CAPS の軽症型とされる FCAS の診断スクリーニングに有用と思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling.

Hidenori Ohnishi, Hidehito Tochio, Zenichiro Kato, Kenji Orii, Ailian Li, Takeshi Kimura, Hidekazu Hiroaki, Naomi Kondo, and Masahiro Shirakawa. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jun 23;106(25):10260-5.

2. 大西秀典、加藤善一郎、寺本貴英、船戸道徳、金子英雄、深尾敏幸、近藤直実．自然免疫の分子機構に基づいた自己炎症性症候群の診断へのアプローチ．アレルギー，第 58 巻第 11 号，(2009)，1502-1512.

3. 近藤直実、大西秀典、加藤善一郎、松井永子、木村豪、徳見哲司、森田秀行、金子英雄、寺本貴英．免疫不全とアレルギー－特に、自然免疫系の分子のタンパク構造生物学的視点から－．日本小児アレルギー学会誌，第 23 巻 2 号，(2009)，203-211.

4. 徳見哲司、大西秀典、金子英雄、加藤善一郎、近藤直実．自然免疫系の障害による原発性免疫不全症の最近の動向．アレルギー，第 58 巻第 1 号，(2009)，19-28.

5. 近藤直実、大西秀典、徳見哲司、金子英雄、加藤善一郎．感染症・免疫異常の臨床遺伝学．小児科臨床，第 1 号，(2009)，77-82，

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

特異な変異を同定したADA欠損症の1例

大 倉 有 加 (北海道大学大学院医学研究科小児科)
竹 崎 俊一郎 (北海道大学大学院医学研究科小児科)
山 田 雅 文 (北海道大学大学院医学研究科小児科)
川 村 信 明 (北海道大学大学院医学研究科小児科)
吉 田 真 (旭川医科大学大学院医学系研究科小児科)
今 井 耕 輔 (防衛医科大学校小児科)
中 川 紀 子 (防衛医科大学校小児科)
小 原 收 (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)
加 藤 善一郎 (岐阜大学大学院医学研究科小児科)
Michael S. Hershfield (Duke University Medical Center)
有 賀 正 (北海道大学大学院医学研究科小児科)

研究要旨

ADA 欠損症は常染色体劣性遺伝疾患で重症複合免疫不全症 (SCID) の約 15% を占める。ADA 欠損症の多くは SCID を呈するが、臨床的重症度は ADA 遺伝子変異の種類に基づく ADA 残存活性から、“SCID”、“delayed onset”、“late onset”、“partial deficiency” の 4 群に分けられる。Partial deficiency の変異の研究から ADA 活性は正常の 1% あれば正常免疫能を維持できるとされている。

今回、重症の ADA 欠損症の 1 ヶ月男児において父親由来の 2 つのミスセンス変異 (G239S, R34S) と母親由来のナンセンス変異 (Q119X) の計 3 つの変異を同定した。G239S は我々が過去に経験した “partial deficiency” の変異である。一方、R34S は新規変異であった。ADA 遺伝子を欠失させた大腸菌 SØ3834 株を用いて、G239S、R34S の変異を有するヒト ADA 遺伝子 cDNA を組み込んだクローンを作成し ADA 残存活性を測定した。それぞれ 2.2%、56.4% であり R34S も “partial deficiency” の変異であることが推測された。更に G239S、R34S の 2 つの変異を有するクローンでは ADA 残存活性が 0.008% と著明に低下することが示された。蛋白の立体構造解析によって、G239S は疎水性コア形成に関係する部位の変異であり、R34S はヘリックス間の水素結合に関係していると予測された。これら二つの “partial deficiency” 変異が ADA 遺伝子の同一アレル上に存在して相乗的に作用することによって、ADA 活性部位の重大な構造的変化を生じて劇的な活性低下をもたらした可能性が示唆された。

A. 研究の目的

ADA 欠損症は常染色体劣性遺伝疾患であり、これまでに 70 種類以上の ADA 遺伝子変異が同定されているが、変異の違いによる酵素障害の程度により臨床的重症度が異なることが知られている。今回、重症の ADA 欠損症の 1 ヶ月男児の遺伝子解析を施行した結果、父親由来の 2 つのミスセンス変異 (G239S, R34S) と母親由来のナンセンス変異 (Q119X) の計 3 つの変異を同定した。これらの変異の組合せによって SCID を呈する機序について検討することを目的として、分子生物学的に機能的、構造的解析を施行した。

B. 研究方法

1. 症例 T.K. (男児)

在胎 37 週 6 日、2,660g で正常経膈分娩で近医にて出生した。両親は血族結婚ではなかった。第 1 子が免疫不全症疑いにより生後 4 ヶ月で死亡していた家族歴があったため出生後早期に血液検査を施行し、WBC 12,700/ μ l (neu 75%, lym 22%), CD3 53.0%, CD4 24.4%, CD8 29.8%であったため経過観察となった。1 ヶ月健診時の体重は 3,100g (+20g/日)であった。その後哺乳力低下を認め、日令 39 に近医に入院となった。血液検査上、WBC 7,500/ μ l (lym 1.2%) とリンパ球数の減少を認めたため、日令 40 に旭川医科大学病院小児科に紹介入院となった。入院時の血液検査では WBC 6,250/ μ l (neu 85%, lym 2.1%) と著明なリンパ球数減少を認め、フローサイトメトリー検査では CD3 76%, CD4 35%, CD8 37%, CD19 2%であった。SCID が疑われたため、遺伝子解析など施行して (結果後述) ADA 欠損症と診断した。臍帯血バンクに登録し造血幹細胞移植の準備を進めていたが、

経過中肺炎が原因と考えられる呼吸状態の悪化を認めた。日令 87 に臍帯血による造血幹細胞移植を施行したが、呼吸不全が進行して移植から 22 日後に永眠された。

2. 診断の確定

日令 43 の患者末梢血から抽出した DNA を用いてリアルタイム PCR により T-cell receptor excision circles (TRECs) を定量した。さらに患者と両親の末梢血よりゲノム DNA を抽出し T-B-SCID 関連遺伝子の DNA シーケンシングを施行した。

3. ADA 点変異クローンの機能解析

ADA 遺伝子を欠失させた大腸菌 SØ3834 株を用いて、G239S、R34S、G239S + R34S の変異を有するヒト ADA 遺伝子 cDNA を組み込み ADA 残存活性を測定した。

4. ADA 変異蛋白の構造解析

コンピュータープログラムを用いてヒト ADA 蛋白の立体構造モデルを構築し、G239S、R34S のアミノ酸変化による立体構造上の変化を評価した。

C. 研究結果

1. 患者の発症時 (日令 43) の TRECs 値は検出感度以下であり (表 1)、SCID が強く疑われた。

	TRECs (copies/ μ gDNA)	RNaseP (copies/ μ gDNA)
日令43末梢血	<10	2.0 \times 10 ⁶
正常control (0-1才)	5.8 \pm 0.7 \times 10 ³	2.2 \pm 0.2 \times 10 ⁶

表 1

2. ADA 遺伝子解析結果を図 1 に示す。患者では 2 つのミスセンス変異 (G239S, R34S) とナンセンス変異 (Q119X) の計 3 つの変異を同定した。G239S は以前我々が

経験した“partial deficiency”の変異であり、R34Sは新規変異であった。両親の解析において、2つのミスセンス変異は父親由来、ナンセンス変異は母親由来であることがわかった。

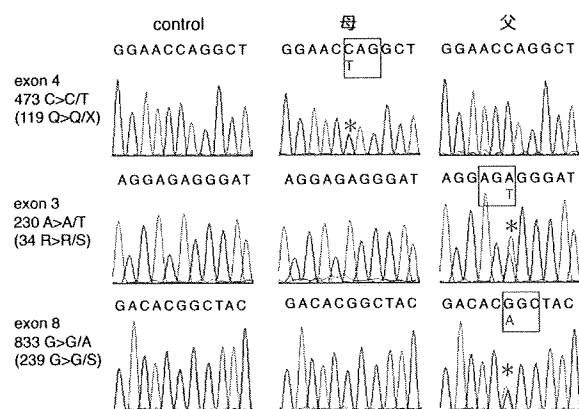


図 1

3. 遺伝子変異による ADA 残存活性 (*E.coli* SØ3834 による発現実験) を表 2 に示す。G239, R34S の ADA 残存活性はそれぞれ wild type の 2.2% , 56.4% であり、R34S も “partial deficiency” の変異であると考えられた。G239S と R34S が同時に存在する場合は、残存活性は 0.008% と著明に低下した。

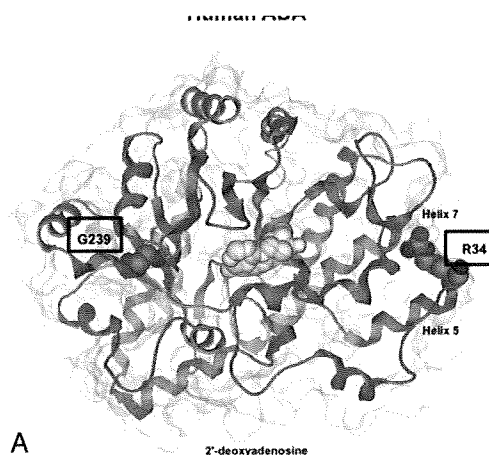
Mutations	ADA activity expressed percent of WT
G239S	2.2
R34S	56.4
R34S+G239S	0.008

P value		
R34S	vs	WT 0.014
G239S	vs	WT 0.006
R34S+G239S	vs	R34S 0.002
R34S+G239S	vs	G239S 0.017
R34S	vs	G239S 0.002

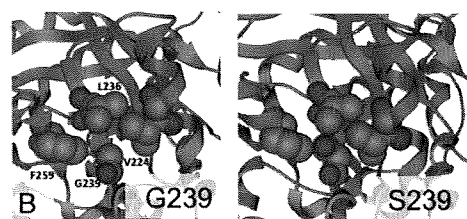
表 2

4. ADA 蛋白の立体構造解析結果 (全体像) を図 2A に示す。G239S は疎水性コア形成に関係する部位の変異であり親水性の側鎖が入ることでコア形成を阻害する可能性が考え

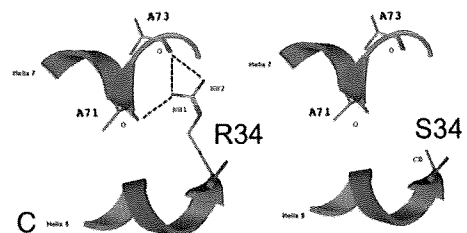
られた (図 2B)。一方 R34S はヘリックス 5 上に存在し、水素結合の消失により基質結合部のゲートに関与しているヘリックス 7 の基部に影響を与え活性中心への基質の取り込み・保持などに影響を与える可能性が考えられた (図 2C)。



A



B



C

図 2

D. 考 察

ADA 欠損症の臨床的重症度は ADA 変異の種類に基づく ADA 残存活性から分類されており、出生後早期より高度のリンパ球減少を認める “SCID”、急速に臨床的悪化が進行して 10 才までに診断される “delayed

onset”、臨床的悪化が緩徐で10才以降に診断される“late onset”、正常免疫能を有する“partial deficiency”の4群に分けられる。Partial deficiencyの変異の研究からADA活性は正常の1%あれば正常免疫能を維持できるとされている¹。

本症例は生後1ヶ月で発症した重症ADA欠損症であり、ADA遺伝子解析により2つのミスセンス変異(G239S, R34S)とナンセンス変異(Q119X)の計3つの変異を同定した。両親の解析により2つのミスセンス変異は父親由来であり、ナンセンス変異は母親由来であることがわかった。G239Sは以前我々が経験した“partial deficiency”の変異であるが²、R34Sは新規変異であった。大腸菌SØ3834株を用いてG239S, R34Sの変異を有するアリのADA残存活性を測定した結果、R34Sも“partial deficiency”であることがわかった。さらに、G239S, R34Sの両変異を同一アリに有する(complex alleleを形成)場合には、残存活性が“SCID”相当の著明な低下を示した。一方、ADA変異蛋白の立体構造解析の結果、両変異はそれぞれ立体構造上重要な残基上に位置しており、両変異が同時に存在することで構造上の変化がさらに増強される可能性が推測された。以上の結果より、G239S, R34Sによるcomplex alleleの形成が相乗的に作用して、ADA活性の劇的な低下をもたらした可能性が示唆された。

本症例と同様に重症ADA欠損症でcomplex allele(Y97C, L106V)を形成し、その相乗効果によるADA残存活性の著明な低下を示唆する報告は過去に1例確認できた³。Complex alleleの形成に関しては、21-水酸化酵素欠損症(21-OHD)^{4, 5}、Gaucher病⁶、cystic fibrosis^{7, 8}、致死型軟骨無形成症⁹など常染色体劣性遺伝疾患だけ

でなく常染色体優性遺伝疾患でも報告があり、いずれも症状との関連性が示唆されている。特に21-OHD症例ではミスセンス変異の組み合わせの種類によって、臨床症状への相乗効果が認められたとも述べている。

ADA欠損症の重症度は遺伝子変異の種類によるADA残存活性から説明されているが、複数の変異が存在する場合にはそれらの相互作用も考慮する必要があると考えられた。

E. 結論

特異な変異を有するADA欠損症を経験した。単独では軽症となる2つの変異が並存することでADA蛋白の重大な構造変化を生じて、ADA活性の劇的な低下をもたらした可能性が示唆された。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文作成中。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

参考文献

1. Hershfield MS. Genotype is an important determinant of phenotype in adenosine deaminase deficiency. *Curr Opin Immunol*. 2003; 15: 571-7.
2. Ariga T, Oda N, Sanstisaban I *et al*. Molecular basis for paradoxical carriers of adenosine deaminase (ADA) deficiency that show extremely low levels of ADA activity in peripheral blood cells without immunodeficiency. *J Immunol*. 2001; 166: 1698-702.

3. Jiang C, Hong R, Horowitz SD, Kong X, Hirschhorn R. An adenosine deaminase (ADA) allele contains two newly identified deleterious mutations (Y97C and L106V) that interact to abolish enzyme activity. *Hum Mol Genet.* 1997; 6: 2271-8.
4. Menassa R, Tardy V, Despert F *et al.* p.H62L, a rare mutation of the CYP21 gene identified in two forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93: 1901-8.
5. Nikoshkov A, Lajic S, Holst M, Wedell A, Luthman H. Synergistic effect of partially inactivating mutations in steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 194-9.
6. Latham T, Grabowski GA, Theophilus BD, Smith FI. Complex alleles of the acid beta-glucosidase gene in Gaucher disease. *Am J Hum Genet.* 1990; 47: 79-86.
7. Dork T, Wulbrand U, Richter T *et al.* Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Genet.* 1991; 87: 441-6.
8. Tummler B, Stanke F, Bronsveld I, Veeze H, Ballmann M. Transient correction of the basic defect in sweat glands in an individual with cystic fibrosis carrying the complex CFTR allele F508del-R553Q. *Thorax.* 2009; 64: 179-80.
9. Pannier S, Martinovic J, Heuertz S *et al.* Thanatophoric dysplasia caused by double missense FGFR3 mutations. *Am J Med Genet A.* 2009; 149A: 1296-301.

X連鎖無ガンマグロブリン血症にみられた高エンドトキシン血症を伴った慢性胸膜炎の病態解析

金子 英雄 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
船戸 道徳 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
久保田 一生 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
大西 秀典 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
寺本 貴英 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
加藤 善一郎 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
深尾 敏幸 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
大楠 清文 (岐阜大学大学院医学系研究科病原体制御学)
近藤 直実 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)

研究要旨

X連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) は B 細胞の初期分化が障害されることにより、末梢の B 細胞数の著しい低下とすべてのクラスの免疫グロブリンの減少を示す遺伝性の免疫不全症である。今回、XLA の患者において、病理学的に器質化肺炎を呈する難治性の胸膜炎を経験した。病変部の組織の遺伝子解析により *Helicobacter equorum* を世界で初めてヒトから検出した。さらに、in situ hybridization でも *Helicobacter equorum* の発現を確認した。この持続感染に伴う高エンドトキシン血症にもかかわらず、エンドトキシンショックは誘導されなかった。BTK タンパクの異常により TLRs のシグナル伝達系が障害されているため、患者はエンドトキシンに低感受性である可能性が考えられた。

A. 研究の目的

XLA は B 細胞分化に必須の BTK タンパクの異常により、成熟 B 細胞が欠損することから、無ガンマグロブリン血症、易感染を示す。今回、我々は成人 XLA 患者において、難治性の胸膜炎とそれに伴う高エンドトキシン血症を経験した。この病態につき解析すると共に、本患者がエンドトキシンに対して低感受性である機構につき考察した。

B. 研究方法

患者末梢血から genome DNA を抽出し、btk 遺伝子の塩基配列を解読した。

患者末梢血単核球 (PBMCs) を 1×10^6 /ml の濃度で培養し、LPS (100ng/ml), Pam3CSK4 (100ng/ml), poly(I:C) (50 μ g/ml) を添加し、24 時間後に回収した培養上清中の TNF- α を ELISA 法で測定した。

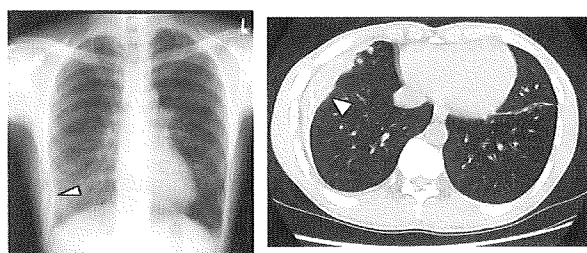
Helicobacter equorum 特異的 cRNA を作製し、これをプローブとして、切除した胸膜病変を用いて in situ hybridization を行った。

C. 研究結果

症例は 35 歳の男性。主訴は微熱、倦怠感、右側胸部の違和感。生後半年に当院で XLA

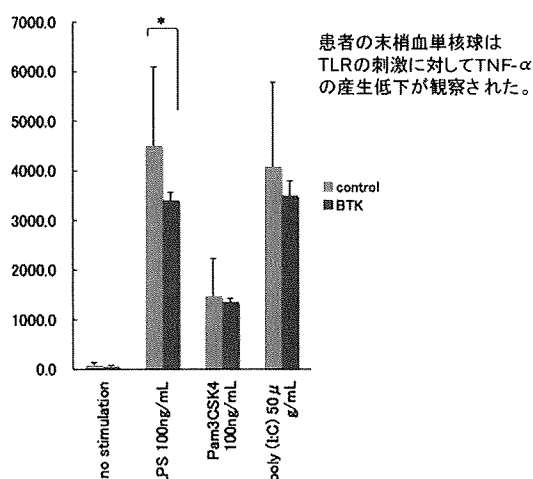
と診断 (btk 遺伝子の解析で L111R を認めた)。以後、定期的に γ グロブリンの補充を行っていた。高校時代には右側胸膜炎に罹患し排液ドレナージ等で治療を施行。

現病歴は平成 18 年 12 月頃から月に数回の高熱と右側胸部の違和感、倦怠感が出現。血液検査では白血球はほぼ正常範囲も CRP は 1-13mg/dl を示し、胸部レントゲンおよび胸部 CT 検査で右胸膜の石灰化を伴う限局性の肥厚所見を認めた (図 1)。

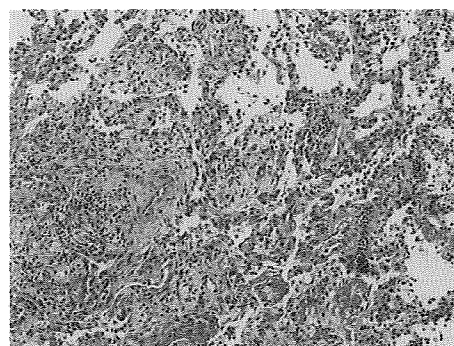


慢性胸膜炎の診断で、多種の抗生物質による治療を行ったがパニペネム/ベタミプロン (以下、PAPM/BP) のみが奏功したため、最近は PAPM/BP による治療にて月に 1-2 回の入退院を繰り返していた。今回、入院時の身体所見は右胸部のラ音を聴取する以外に特記すべきことはなく、血液検査所見は WBC 7760/ μ l (N70.5%、L16.9%)、CRP 5.03mg/dl、IgG 776mg/dl、IgA < 5mg/dl、IgM < 5mg/dl、エンドトキシン 131pg/ml であった。患者の末梢血単核球は、コントロールと比較し、TNF- α の産生が低下していた (図 2)。

本症例の TNF-alpha の産生低下



入院後、経皮的に胸膜炎の病変部の生検を行い、血腫を伴う器質化肺炎の所見を得たが、明らかな細菌は観察されなかった (図 3)。



また、この組織検体の通常の培養、さらには結核菌 PCR 等もすべて陰性であった。病原体を明らかにするため、さらにこの組織検体を用いて、細菌に共通な 16SrRNA の Broad-range PCR を行い、増幅された rRNA の可変領域の DNA の解析を行ったところ、*Helicobacter equorum* を検出した。さらに、摘出した胸膜病変を *Helicobacter equorum* 特異的 cRNA をプローブとして in situ hybridization を行ったところ、陽性のシグナルが認められた。当初から PAPM/BP 投与を行っていたが、中止にて容易に発熱等の症状の出現および CRP の上昇を認めたため、PAPM/BP 大量投与 (1日 2-8g) を 8ヶ

月間にわたり行い、症状の改善を得た。

D. 考 察

XLA などの抗体産生不全症で、最もよく観察される症状は、副鼻腔炎、肺炎などの呼吸器感染症である。日和見感染もよく観察される。本症例では、頻回に発熱、CRP 上昇と、持続的な高エンドトキシン血症を認めた。通常の培養では結核菌も含めて検出することができなかったため、胸膜病変を外科的に摘出し、病理像と Broad-range PCR を行った。今までヒトでの感染の報告がなかった *Helicobacter equorum* の遺伝子を検出し、さらに、in situ hybridization により、胸膜病変に陽性のシグナルを検出した。組織像は器質化肺炎の像を示したが³、*Helicobacter equorum* の持続感染による器質化肺炎の可能性が考えられた。また、本症例では持続的に高エンドトキシン血症が認められたが³、エンドトキシンショックは認められなかった。BTK タンパクは TLRs の下流に存在する Mal などのリン酸化を介して、TLRs のシグナル伝達に関与していると考えられる。本症例では、BTK の異常により TLRs のシグナル伝達が障害され、TNF- α などの炎症性サイトカインの産生低下により、エンドトキシンに低感受性である可能性が考えられた (図 4)。

E. 結 論

XLA における慢性胸膜炎の 1 例を経験した。病理像は器質化肺炎の像を呈した。この組織から Broad-range PCR による遺伝子解析により *Helicobacter equorum* を検出した。本症例で高エンドトキシン血症が持続しているのに、エンドトキシンショックが誘導されないのは、TLRs のシグナル伝達系が³、BTK の異常により、障害されている可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. Various expression patterns of alpha1 and alpha2 genes in IgA deficiency.

Suzuki H, Kaneko H, Fukao T, Jin R, Kawamoto N, Asano T, Matsui E, Kasahara K, Kondo N.

Allergol Int. 2009 Mar;58(1):111-7.

2. Kaneko H, Suzuki H, Kondo N.

IgA subclass and IgA deficiency Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2009 Jun;32(3):142-8.

Review. Japanese.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

