

骨髓非破壊的前処置にて造血幹細胞移植を施行した原発性免疫不全症6症例の検討

笹原 洋 二 (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)
久間木 悟 (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)
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)

研究要旨

これまで当科及び関連施設にて骨髓非破壊的前処置にて同種造血幹細胞移植を施行した、SCID 以外の原発性免疫不全症 6 症例の臨床経過につき検討した。疾患の内訳は、CGD (gp91-phox) 2 例、WAS1 例、LAD-I 型 1 例、HIGM-I 型 1 例、IPEX 症候群 1 例で、ドナー別では HLA 一致同胞ドナー 4 例と非血縁ドナー 2 例であった。前処置は Flu/CY/low-dose TBI を基本に選択した。IPEX 症候群を除く 5 例は免疫抑制剤の調整により混合キメラから最終的に完全キメラとなったが、同胞ドナー移植例で Rituximab 投与あるいは DLI+PBSC 輸注例を 1 例ずつ経験した。同胞ドナーの IPEX 症候群 1 例は混合キメラ状態が持続しているが、臨床症状の消失と末梢血中にドナーと同等数の Foxp3 陽性細胞を確認しており、今後も注意深い経過観察を予定している。全例で前処置関連合併症は軽微で、移植後 QOL は良好に保たれている。Flu/CY/low-dose TBI は比較的安全で有効な前処置法であったが、症例毎の混合キメラの克服と、L-PAM を含む前処置との比較検討が重要と考えられた。

A. 研究の目的

原発性免疫不全症の根治療法として、同種造血幹細胞移植は必要不可欠である。SCID 以外の拒絶能をもつ原発性免疫不全症に対する移植前処置法としては、これまでは骨髓破壊的前処置が主流であったが、近年骨髓非破壊的前処置 (RIC) による造血幹細胞移植 (RIST) の症例報告と総括的報告から、その有用性が認識されつつあるが、その具体的前処置法は様々で確立された方法はない (1,2)。本邦においても慢性肉芽腫症をはじめとして、RIST の有用性と問題点が検討され始めている状況にあり、良性疾患である原発性免疫不全症に対する RIST の有用性は今後更に認識されるべきと考えられる。今回我々は、当科および関連施設において RIST

により移植を施行した SCID 以外の原発性免疫不全症 6 症例の臨床経過につき検討し、今後の原発性免疫不全症に対する至適 RIST 方法の確立について検討する情報となることを目的とした。

B. 研究方法

当科および関連施設にて、RIST により同種骨髓移植を施行した 6 症例につき、その臨床経過についてまとめ、その有用性と問題点につき考察した。特に至適前処置法、ドナー別の問題点、混合キメラの克服、移植後 QOL、疾患毎の移植後経過の特徴について、検討を行った。

C. 研究結果

疾患の内訳は、CGD(gp91-phox)2例、WAS1例、LAD-I型1例、HIGM-I型1例、IPEX症候群1例で、ドナー別ではHLA一致同胞ドナー4例と非血縁ドナー2例であった。

前処置法はFludarabine(Flu) 30mg/m²x5days+Cyclophosphamide(CY) 60mg/kg x 2 days+low-dose TBI 3-4Gyを基本に選択した。GVHD予防法は血縁者間ではCyclosporine A+Short-term MTXを、非血縁者間ではFK506+short-term MTXを選択した。

IPEX症候群を除く5例は免疫抑制剤の調整により混合キメラから最終的に完全キメラとなった。しかしながら当初の2症例はいずれも同胞ドナー移植例であったが、1例目のTBIを施行しなかったCGD症例では、移植後PRCAの合併に対してRituximab投与を要した(3)。2例目のCY 750mg/m² x 4daysにて施行したHIGM-I型症例では混合キメラが持続し、次第にレシピエント優位となったため、ドナーリンパ球輸注(DLI)とその後の骨髓低形成に対して同一ドナーからの末梢血幹細胞(PBSC)輸注を要した。その後の3症例は、CYの増量およびlow-dose TBIの併用により、免疫抑制剤の調節のみで完全キメラを達成できた(4)。特にWAS症例は22歳での移植となったが、合併症なく順調に経過することができた。

同胞ドナーより骨髓移植を施行したIPEX症候群1例は、今回の前処置にて同胞間骨髓移植を施行したが、移植後1年間混合キメラ状態が持続している。しかしながら臨床症状は消失し、末梢血中にドナーと同等数のFoxp3陽性細胞を確認しており、IPEX症候群では混合キメラでの臨床症状の安定、制御性T細胞の選択的な発現の持続が観察され

た。今後も注意深い経過観察を予定している。全例生存中であり、これまでの骨髓破壊的前処置と比較し、前処置関連合併症は極めて軽微であった。また、移植後QOLは全症例で良好に保たれている。

D. 考察

今回検討した6症例においては、全例生存し、Flu/CY/low-dose TBIを基本とした前処置法は前処置関連合併症が軽微で、移植後QOLも良好に保たれていた。IPEX症候群を除く5例は免疫抑制剤の調整により混合キメラから最終的に完全キメラとなった。しかし当初の同胞間移植例2例では、前処置法が確立されない状況下であったため、混合キメラの克服に苦慮し、Rituximab投与あるいはDLI+PBSC輸注例を1例ずつ経験した。

疾患別では、WASに対してRISTの症例報告はあるが(5)、これまでRISTの移植は混合キメラによる自己免疫性疾患の合併に注意すべきとする報告や(6)、本邦症例の蓄積からBusulfan(Bu)/CYを基本として低年齢での骨髓破壊的前処置による移植が推奨されている(7)。今回我々の症例は、悪性リンパ腫に対する化学療法後ではあるが、22歳であっても、RISTによって比較的安全な移植を施行することができた。同胞ドナーより骨髓移植を施行したIPEX症候群1例は混合キメラ状態が持続しているが、臨床症状の消失と末梢血中にドナーと同等数のFoxp3陽性細胞を確認している。造血細胞全体のキメリズム比率に比し、Foxp3陽性細胞比率が多いことは、これまでの報告と同様であり(8)、臨床症状なく、通常的生活を送ることが可能となっている。Tregが欠損しているIPEX症候群における完全キメラ達成のためには、より強度を高めた、またはATGを含

む前処置の検討が必要かもしれない。混合キメラ状態での長期経過については今後も注意深い経過観察を予定している。

良性疾患である原発性免疫不全症の根治療法として、長期的 QOL の観点からも、RIST は理想的な方法であると考えられる。今回の 6 症例では、Flu/CY/low-dose TBI は比較的安全で有効な前処置法であったが、症例毎の混合キメラの克服と、L-PAM を含む他の前処置法との比較検討、稀少疾患での評価の方法が今後の重要課題と考えられた。

E. 結 語

- 1) SCID 以外の免疫不全症 6 症例に対して、Flu/CY/low-dose TBI による RIST を施行した。
- 2) 当初の 2 例 (CGD : TBI なし、HIGM-1:CY 750mg/m² x 4days) はいずれも同胞ドナー例で、免疫抑制剤中止後の混合キメラの持続に対して、Rituximab 投与、DLI+PBSC 輸注を 1 例ずつ要した。その後は CY の増量および low-dose TBI の併用により、免疫抑制剤の調節のみで完全キメラとなった。
- 3) IPEX 症候群では、移植後 1 年後でレシピエントタイプが優位 (約 90%) ながら、ドナーと同等の Foxp3 陽性細胞が継続して認められ、無症状で経過している。今後も長期的経過をフォロー予定である。Treg が欠損している IPEX 症候群における完全キメラ達成のためには、より強度を高めた、または ATG を含む前処置の検討が必要かもしれない。
- 4) 全例生存中であり、骨髄破壊的前処置と比較し前処置関連合併症は軽微であった。また、移植後 QOL は全例で良好である。
- 4) 現在各施設判断で RIST を施行している状況下において、今後の至適 RIST 法の確立

には、L-PAM を含む前処置との比較検討 (or Flu/L-PAM/low-dose TBI) と、稀少疾患に対する結果の評価法が課題と考えられた。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) 斉藤由佳、笹原洋二、新妻秀剛、久間木悟、土屋滋、他。
骨髄非破壊的前処置を用いた同胞間造血幹細胞移植を行なった高 IgM 症候群の一例
第 50 回日本小児血液学会 (平成 20 年 11 月 14-16 日)
- 2) 堀野智史、新妻秀剛、笹原洋二、土屋滋、他。
骨髄非破壊的前処置により骨髄移植を行った IPEX 症候群の 1 例
第 12 回東北 BMT 研究会 (平成 21 年 7 月 11 日)
- 3) 堀野智史、笹原洋二、新妻秀剛、土屋滋、他。
骨髄非破壊的前処置による骨髄移植を施行した IPEX 症候群の 1 例
第 51 回日本小児血液学会 (平成 21 年 11 月 27-29 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

参考文献

- 1) Noonmyeloablative stem cell transplantation for congenital immunodeficiencies. Amrolia P, Gaster HB, Veys P, et al. Blood 2000;96:1239-1246.
- 2) Improved survival after unrelated donor bone marrow transplantation in children with primary

immunodeficiency using a reduced-intensity conditioning regimen.

Rao K, Amrolia PJ, Gasper HB, Veys PA, et al. *Blood* 2005;105:879-885.

3) Fludarabine- and cyclophosphamide-based nonmyeloablative conditioning regimen for transplantation of chronic granulomatous disease: possible correlation with prolonged pure red cell aplasia.

Fujiwara T, Yamada M, Tsuchiya S, Sasaki T, et al.

Int. J. Hematol. 2004;79:293-297.

4) Successful nonmyeloablative bone marrow transplantation for leukocyte adhesion deficiency type I from an unrelated donor.

Tokunaga M, Miyamura K, Tsuchiya S, Kodera Y, et al.

Int. J. Hematol. 2007;86:91-95.

5) Non-myeloablative bone marrow transplantation in an adult with Wiskott-Aldrich syndrome.

Longhurst H, Taussig D, Helbert MR, et al.

British J. Hematol. 2002;116:497-499.

6) Long-term outcome following hematopoietic stem-cell transplantation in Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the European society for immunodeficiencies and European group for blood and marrow transplantation.

Ozsahin H, Cavazzana-Calvo M, Fisher A, et al. *Blood* 2008;111:439-445.

7) Outcome in patients with Wiskott-Aldrich syndrome following stem cell transplantation: an analysis of 57 patients in Japan.

Kobayashi R, Ariga T, Kato S, et al.

British J. Hematol. 2006;135:362-366.

8) Successful bone marrow transplantation for IPEX syndrome after reduced-intensity conditioning.

Rao A, Kamani N, Dalal J, Shenoy S, et al.

Blood 2007;109:383-385.

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

千葉 滋 (筑波大学大学院人間総合科学研究科)

研究要旨

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認できれば、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。

われわれはまず、ヒト造血幹細胞から Notch のリガンドを利用して T 細胞を誘導することを試みた。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。さらに、Delta4-Fc キメラ蛋白 (可溶性 Notch リガンドの一つ) と IL-15 を組み合わせることにより、CD56 を高発現し、かつ細胞障害活性の高い成熟 NK 細胞を効率よく産生できることを見出した。

A. 研究の目的

ヒト由来 iPS 細胞の培養により種々の免疫細胞を誘導できれば、免疫不全症患者の病態解明、新たな原因遺伝子同定、さらには治療法開発など、様々な応用が考えられる。このような技術開発に向けて、まず造血幹細胞を体外で培養して免疫細胞、特に T 細胞および NK 細胞を誘導する技術の確立をめざす。

B. 研究方法

インフォームドコンセントを得て提供された臍帯血から単核球を分離し、抗 CD34 抗体磁気ビーズを用いて CD34⁺ 細胞を分取した。

得られた CD34⁺ 細胞を、stem cell factor

(SCF)、flt-3 ligand (FL)、interleukin-15 (IL-15) を含む培養液中で、Delta4-Fc (可溶性 Notch リガンド) あるいはコントロール Fc をコーティングした培養皿あるいは何もコーティングしない培養皿で培養した。経時的に、総細胞数、および、未熟ないし機能的 NK 細胞の割合をフローサイトメトリー法および細胞障害性アッセイで解析した。

(本研究における倫理面への配慮)

本研究は出産後の産婦から提供された臍帯血を利用するため、臍帯血の提供を受けるに当たり、以下の内容を確認した。

(内容 1) 提供者の人権保護のため、対象者本人に研究の趣旨を理解してもらい、臍帯血の提供は本人の自由意志によつてのみ行われ

るものとする。提供を拒否した場合も何ら臨床的不利益を蒙らないことを保障する。説明同意文書の内容を本人に極力分かり易い言葉で説明し、説明同意文書2部を作製して本人に渡したうえで文書による同意を得る。説明同意文書に本人の自由意志で同意の署名がなされた後に、この文書の1部を本人に提供する。

提供者の個人を特定できる情報は、いかなる場所にも公表されない。学術会議および学術誌上での結果の発表が行われる場合でも、提供者個人を特定し得る情報は完全に守秘される。

(内容2) 提供者である産婦・新生児に危険が生じることはなく、臍帯血採取に当たり身体的不快もない。また、娩出後の胎盤に接続している臍帯から血液を採取するが、実際に産婦はこの光景を見ることにはならないため、直接的精神的不快もない。

C. 研究結果

ヒト臍帯血由来 CD34⁺ 細胞を、IL-15 が存在しない条件で Delta4-Fc をコーティングした培養皿で培養することにより、細胞障害活性を持つ NK 細胞が産生された (図1)。さらに、IL-15 を加えることにより、CD56 の発現が高くなり、細胞障害性タンパクの発現も増加した (図2)。

以上から、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を Delta4-Fc と IL-15 を用いて培養することにより、高い細胞障害活性をもつ NK 細胞を産生し得ることが明らかになった。

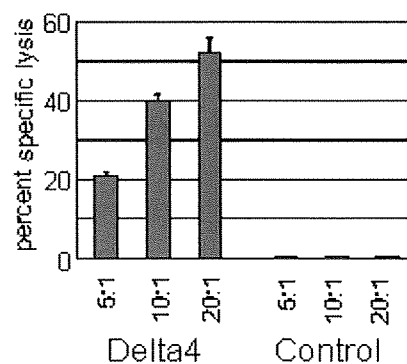


図1：細胞障害活性。ヒト臍帯血由来 CD34⁺ 細胞を SCF、FL、IL-6、IL-7 を含む培養液中で、Delta4-Fc あるいはコントロール Fc をコーティングした培養皿で3週間培養し、細胞障害性試験を行った。Delta4-Fc をコーティングした培養皿で培養した場合のみ、培養細胞は細胞障害活性を示した。

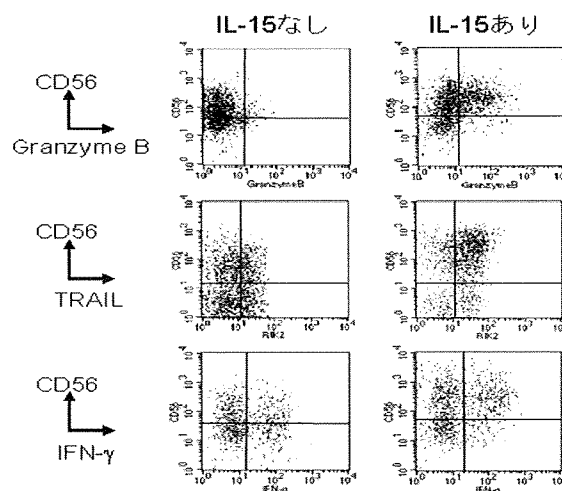


図2：細胞障害性タンパク発現。ヒト臍帯血由来 CD34⁺ 細胞を SCF、FL、IL-6、IL-7 の存在下、Delta4-Fc をコーティングした培養皿で4週間培養した後の細胞障害性タンパク発現。IL-15の有無で、CD56の発現と細胞障害性タンパクの発現を比較した。IL-15を加えることにより、CD56の発現強度は高くなり、また細胞障害性タンパクの発現も亢進した。

D. 考察

ヒト臍帯血造血幹細胞から効率よく、しかも細胞障害活性の高いNK細胞を誘導する方法を明らかにした。iPS細胞からのNK細胞誘導も同様に行えるかを検討すべきである。

E. 結 論

ヒト造血幹細胞からNK細胞を効率よく誘導することができた。Notch シグナルとIL-15を組み合わせることで、より細胞障害活性の高いNK細胞が産生された。

F. 研究発表

(1) 論文発表

1. Haraguchi K, Suzuki T, Koyama N, Kumano K, Nakahara F, Matsumoto A, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Masuda S, Takahashi T, Kamijo A, Takahashi K, Takanashi M, Okuyama Y, Yasutomo K, Sakano S, Yagita H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Notch Activation Induces the Generation of Functional NK Cells from Human Cord Blood CD34-Positive Cells Devoid of IL-15. *J Immunol* 182(10):6168-78, 2009
2. Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Higashi K, Takato T, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. *Blood* 113(26):6584-92, 2009
3. 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(7247):712-716, 2009

(2) 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

ヘルパー依存型アデノ・アデノ随伴ウイルス (HD-Ad.AAV) ハイブリッドベクターを用いた相同組換えによる BTK遺伝子修復研究

石 村 匡 崇 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
落 合 正 行 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
山 元 裕 之 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
古 和 温 子 (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)
高 田 英 俊 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
楠 原 浩 一 (産業医科大学小児科)
中 津 可 道 (九州大学大学院基礎放射線医学(分子遺伝学))
續 輝 久 (九州大学大学院基礎放射線医学(分子遺伝学))
相 澤 絵 美 (埼玉医科大学ゲノム医学研究センター)
三 谷 幸之介 (埼玉医科大学ゲノム医学研究センター)
原 寿 郎 (九州大学大学院成長発達医学(小児科))

研究要旨

伴性劣性無ガンマグロブリン血症 (XLA) は、*BTK* 遺伝子変異により B 細胞系の分化障害を来す原発性免疫不全症である。本疾患では造血幹細胞の一部で変異遺伝子を修復し、かつそれが増殖優位性を獲得できれば分化障害を回復できる可能性がある。我々は *BTK* 遺伝子の exon 6 ~ 19 とその隣接遺伝子 TIMM8A を含む genome 領域、および EGFP・Hygromycin (Hyg) 耐性遺伝子を搭載したヘルパー依存型アデノ・アデノ随伴ウイルス (HD-Ad.AAV) ハイブリッドベクターを作製した。同ベクターをヒト男性 preB-ALL 細胞株である Nalm6 に感染させ Hyg による Single cell cloning を行った。Hyg 耐性株 61 株 (0.63%) を得て、7 株 (0.073%) で相同組換えを証明した。全ての相同組換え株で *BTK* 蛋白発現を認めた。同ベクターをヒト臍帯血 CD34 陽性細胞に感染させ 10% 程度の一過性 GFP 陽性細胞を認めた。本ベクターにより相同組換えによる *BTK* 遺伝子の変異修復を行える可能性を示した。今後、造血幹細胞での更なる検討を行う予定である。

A. 研究の目的

伴性劣性無ガンマグロブリン血症 (XLA) は、X 染色体に存在する Bruton's Tyrosin Kinase (*BTK*) 遺伝子の変異により B 細胞系の分化障害を来す原発性免疫不全症であ

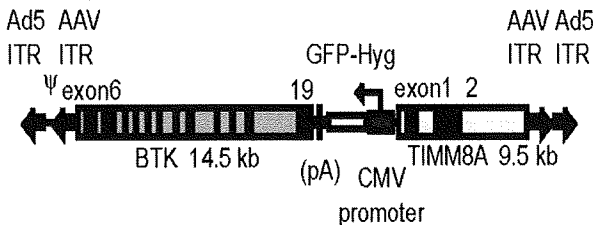
る。本疾患では、造血幹細胞の一部で変異遺伝子を修復し、かつそれが増殖優位性を獲得できれば、分化障害を回復できる可能性がある。これまでレトロウイルスベクターを用いた原発性免疫不全症に対する遺伝子治療は多

く報告されているが、Random integration による発癌が特に問題となっている。ヘルパー依存型アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクター (HD-Ad.AAVベクター) は、造血幹細胞に感染性を示す Ad5/35 キメラベクターと、相同組換えによる目的遺伝子座領域でのターゲティングによる修復をおこす AAVベクターの両者の長所を備えている。我々は *BTK* 遺伝子を搭載した Ad.AAV. *BTK* ベクターを作製し本ベクターによる *BTK* 遺伝子修復研究を行った。

B. 研究方法

BTK 遺伝子の exon6 ~ exon19 領域、隣接遺伝子である *TIMM8A* の全遺伝子および GFP-Hyg 耐性遺伝子を搭載した HD-Ad.AAV. *BTK* ベクターを作製した (図 1)。

Ad. *BTK* (6-19)-CMV-GFP Hyg-*TIMM8A* (28.3kb)



【図 1】 HD-Ad.AAV. *BTK* ベクターの構造

同ベクターを男性 pre-B ALL 由来細胞株である Nalm6 に MOI4000 で感染させ、Single cell cloning により Hyg 耐性株を得た。同株で PCR および Southern blotting により相同組換えおよび蛋白発現の解析を行った。

また、正常ヒト臍帯血より CD34 陽性細胞を磁気ビーズ法により分離し、同ベクターを感染させ colony assay 法により Hyg 耐性 colony を得て解析した。

C. 研究結果

MOI4000 で感染させた Nalm6 から、61 株 (6.3×10^{-3}) の Hyg 耐性株を得た。PCR 法により Screening を行い、Southern blotting により 7 株 (7.3×10^{-4}) で相同組換えを証明した (図 2)。

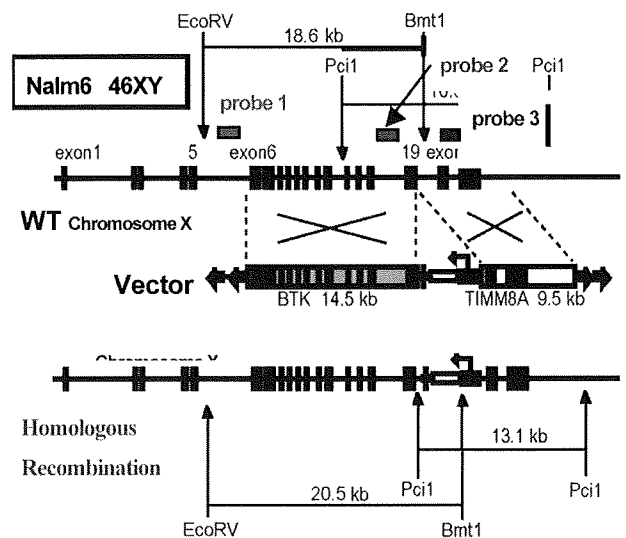


図 2a. Southern blotting 概略

ヒト X 染色体長腕上の *BTK* 遺伝子座領域およびその近傍の模式図。Southern blotting での *BTK* のエクソン 6-19 領域の検出は、Bmt1 と EcoRV で切断し、Probe 1 及び 2 を用いた。*TIMM8A* 領域の検出は Pci1 で切断し、Probe 3 を用いた。

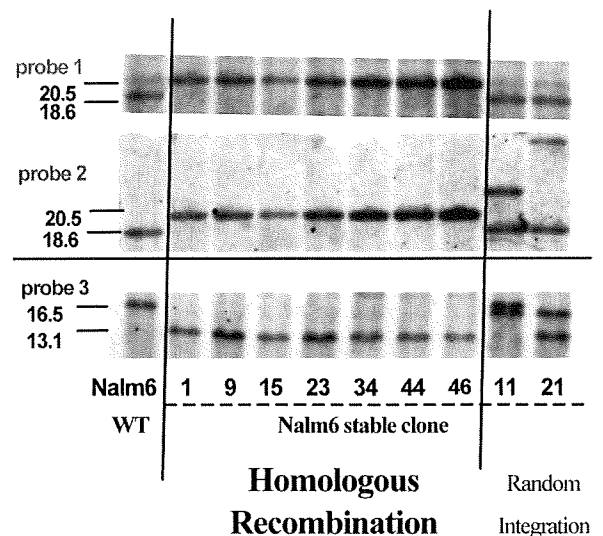
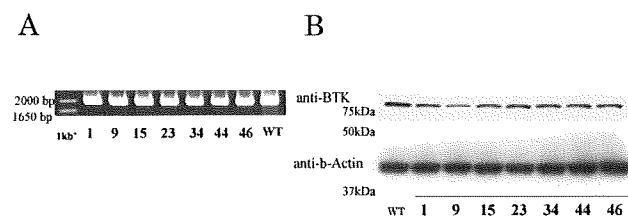


図 2b. Southern blotting 結果

b. Southern blotting の結果。左のレーンから野生型 (WT)、PCR で Homologous recombination の候補となったサンプル (# 1、9、15、23、34、44、46)、Random integration の候補となったサンプル (# 11、21)。

BTK 翻訳領域の mRNA は野生 (WT) 株と同等であった (図 3A)。接合部の Sequence を行い、ウイルスベクター由来のゲノム配列が挿入されていないこと、また翻訳領域の cDNA 解析で exon skip や splicing error がないことを確認した。Western blotting により相同組換え株で WT 株と同等の BTK 蛋白発現を証明した (図 3B)。



【図 3】 Nalm6 細胞での相同組み換えによる BTK 遺伝子・蛋白発現解析

A. 相同組み換えによる BTK 遺伝子の Targeting が確認されたサンプルの、BTK 遺伝子翻訳領域の RT-PCR。左のレーンから 1 kb + マーカー、Homologous recombination が確認されたサンプル (# 1、9、15、23、34、44、46)、野生型 (WT)。

B. BTK 蛋白の Western blotting。左のレーンから野生型 (WT)、相同組換えと確認されたサンプル。上段が抗 BTK 抗体 (77 kDa)、下段が抗 β -actin 抗体 (42 kDa)。

正常男性ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に本ベクターを感染させ、Colony assay を行い、Hygromycin 耐性 GFP 陽性のコロニーを確認し、PCR によりベクターゲノムの Integration を証明した。

D. 考察

本研究では HD-Ad.AAV ベクターを用いて B 細胞株 Nalm6 で Hyg 耐性株を得て、*BTK* 遺伝子座の相同組換えを証明した。ベクター由来のゲノム配列の組込みはなく、正常の mRNA 発現および BTK 蛋白発現をみると、本ベクターが相同組換えにより *BTK* 遺伝子の変異修復を行える可能性を示した。遺伝子治療のためには造血幹細胞での遺伝子修復が必要であるため、我々は正常男性ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用いてコロニーアッセイを行い、ベクターゲノムの Integration を証明した。Nalm6 については、Homologous recombination の頻度が高いことが報告されており、その頻度は他の細胞株と比べても高いことが知られているが、一方で CD34 陽性細胞における HD-Ad.AAV ベクターでの相同組換え効率の報告はない。ヒト ES 細胞では *HPRT* 遺伝子座を搭載した HD-Ad.AAV ベクターによるターゲティング効率が 2.7×10^{-6} と報告されており、本ベクターの造血幹細胞での Targeting 効率解析のため、今後さらなる検討が必要である。

E. 結論

B 細胞株 Nalm6 で Hyg 耐性株 61 株 (6.3×10^{-3}) を得て、7 株 (7.3×10^{-4}) で相同組換えを証明した。全ての相同組換え株で BTK 蛋白発現を認めた。正常ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を用いて Colony assay を行い、GFP 陽性 Hyg 耐性 colony を得て、Vector ゲノムの Integration を証明した。本ベクターにより、相同組換えによる *BTK* 遺伝子の変異修復を行える可能性を示した。今後、造血幹細胞での更なる検討を行う予定である。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 知的財産の出願・登録状況

特になし。

謝 辞：

Washington 大学 Andre Rebier 教授
(ヘルパーウイルスおよびベクタープラスミ
ドを供与していただきました)

成人X連鎖無ガンマグロブリン血症患者の生活の質(QOL)についての検討

蒲池吉朗 (名古屋大学大学院発育・加齢医学講座小児科学)
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)
高田英俊 (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)

研究要旨

わが国の成人 XLA 患者の生活の質 (QOL) 把握のため、成人患者 25 名における社会経済的状況、社会生活に対する疾患の影響度、治療状況、健康関連 QOL(HR-QOL)、合併症、遺伝に関する知識などについて解析した。今回の対象患者においては、比較的良好な社会生活、治療コンプライアンスを保っていると思われたが、1 名が長期入院中のため無職となっていた。HR-QOL の解析では 20 ~ 29 歳の日本人健康成人男性と比較して身体的、精神的健康度ともに低下していた。慢性肺疾患などの慢性感染症の合併、疾患に対する知識や情報の不足などが認められ、QOL 低下の原因の一部となっている可能性が示唆された。今回の検討から、XLA は成人患者の身体的、精神的両面に影響を及ぼしており、身体的な治療のみならず、精神的ケア、疾患に対する患者理解度の向上、家族も含めた生活指導など総合的な治療アプローチが今後必要と考えられた。

A. 研究の目的

X 連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) 患者においては、静注用インタクトガンマグロブリン製剤の使用による重症細菌感染症罹患頻度の著減とともに成人期以降の長期生存が可能となってきた。

このため、成人 XLA 患者の生活の質 (QOL) を把握することは、患者の今後の治療方法や生活指導を検討するうえで非常に重要である。しかしながら、これまでわが国における成人 XLA 患者の QOL についてまとまった報告はないため、わが国の成人 XLA 患者について社会経済的状況、社会生活に対する疾患の影響度、治療状況、健康に関連した生活の質 (HR-QOL)、合併症、遺伝に関する知識などについて明らかにするために本研究

を行った。

B. 研究方法

対象患者は 1989 年 5 月 1 日以前に出生した 20 歳以上の男性で XLA 診断基準 (Conley, ME et al, 1999) を満たす者とした。富山大学および九州大学から提供された成人 XLA 患者リストから、主治医と連絡が可能であった 31 施設、45 名の患者を対象とした。主治医 31 名に調査票と患者アンケート用紙を郵送して主治医 16 名 (52%)、患者 26 名 (58%) から回答を得た。患者 26 名中 1 名は、XLA 診断基準を満たさなかったため解析対象者から除外した。調査の内容は、主治医調査票から患者基本情報 (年齢、身長、体重、家族歴など)、BTK 変異、治療

(IVIG療法、併用薬剤)、感染症罹患歴、合併症、呼吸機能などについて尋ねた。患者調査票は2部からなり、1部は自己筆記式質問票で、就職・就学、家族・結婚、遺伝、治療状況、自覚症状・合併症、嗜好・趣味などについての情報を得た。もう1部は36-item short form health survey, version2 (SF-36v2)でHR-QOL評価のために用いた。本研究は、名古屋大学医学部倫理委員会の承認(承認番号699)を得て行った。

C. 研究結果

1. 就労・就学状況

対象患者25名中17名が社会人(30.4歳:23歳~40歳(平均年齢:範囲、以下同様の記述)で、8名が学生(22.4歳:21~30歳)であった。社会人16名中1名は長期入院のため無職であったが、15名は就労しており、雇用形態は、正社員12名、派遣とパートが各1名、自営が2名であり、職種も多様であった(表1)。平成20年度民

間給与実態統計調査(国税庁)による男性の年収との比較では、年収800万円以上の患者はおらず、200万から500万円の患者が約60%を占めていた(表1)。学生は、8名のうち7名が大学、1名は大学院にそれぞれ在籍しており、休学中や退学した者はいなかった。部活、サークル活動も3名が参加していた。

2. 進路選択における疾患の影響度

就職、進学時において疾患を持っていることがどの程度影響したかについて尋ねたところ、社会人では6名(35%)が多少、またはかなり、または非常に影響したと答えたが、学生では全員がまったく影響しなかったか、ほんの少し影響したと答え、多少以上影響した者はいなかった(図1(a))。就職先、進学先への病名告知については、社会人では11名(65%)が告知しており、告知した者で、告知したことが良くなかったと答えた者はいなかったが、告知しなかった6名中2名が

社会人:17名/25名 平均年齢 30.4歳(中央値29.5歳 範囲23-40歳)

最終学歴



*H12. 国勢調査における15歳以上男子の最終卒業学校の割合
中等教育卒40.1% 高等教育卒26.8%

無職:1名(以前就労、現在入院中)

就職:16名(勤労年数:平均4年4カ月(中央値4年11カ月 範囲3カ月-18年5カ月))

所得(税込年収):

| | 200万円未満 | 200万円~500万円 | 500万円~750万円 | 750万円以上 |
|-----------------------------|---------------|----------------|----------------------|-------------------|
| XLA患者 | 11.8% (2名) | 58.0% (10名) | 29.4% (5名) | 0% (0名) |
| 国税庁 平成20年分民間給与実態統計調査(男性) | 10.0% | 47.5% | 28.0% (500~800万円) | 14.7% (800万円-) |

職種:

事務系 7名(一般事務職3名、システムエンジニア2名、研究/開発2名)
非事務系 9名(運送業3名、調理師1名、店員1名、配管工1名、現場作業1名、工場労働1名、営業1名)

雇用形態:

正社員12名 自営2名 パート1名 派遣1名

表1 わが国の成人XLA患者の就労状況

告知しなかったことは良くなかったと答えた(図1(b))。一方、学生では6名(75%)が告知しており、告知しなかった2名も合わせて、告知したかしなかったかにかかわらず全員が良くなかったと答えた者はいなかった(図1(c))。

3. 治療・症状・合併症

IVIIGのための定期通院が可能かどうかの問いには、24名中23名が可能、1名が不可能と答えた。医師調査票から得られた通院頻度は、4週間に1回が10名、3週間に1回が3名、2週間に1回が3名、不定期が

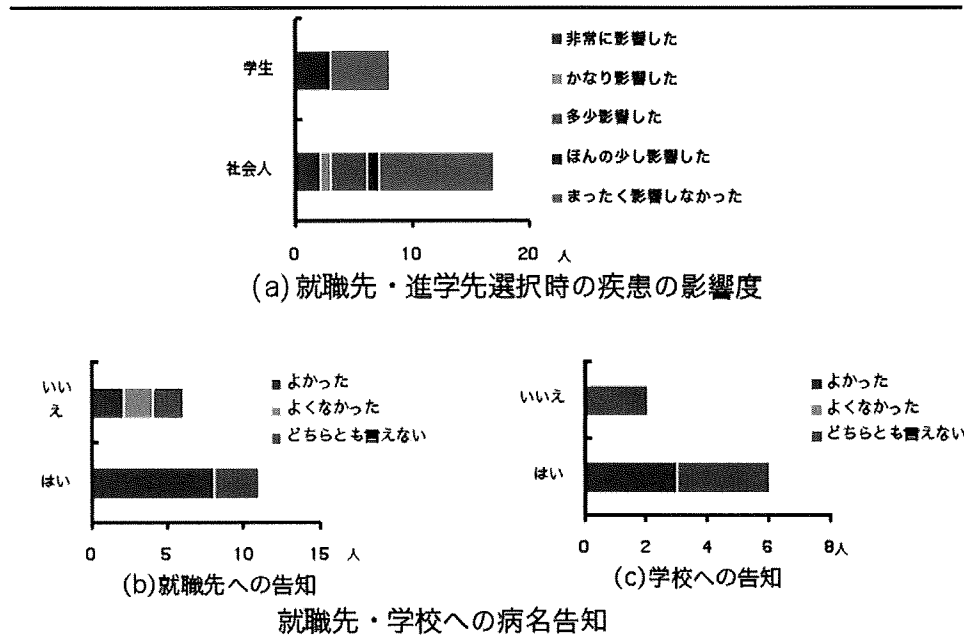


図1 進路決定時の疾患の影響度と病名告知

- ❖ IVIGのための定期通院：可23名 不可1名
- ❖ 通院頻度： 1回/4週 10名、1/3週 3名、1/2週 3名、不定期 2名
- ❖ 片道通院時間： 平均45分 (中央値 30分、範囲 5分-2時間)
- ❖ 院内滞在時間： 平均3.6時間 (中央値 3.5時間、範囲 1.5-6時間)
- ❖ 受診1回の治療費：平均5600円 (中央値 5400円、範囲 0-23100円)
- ❖ 受診1回の総費用：平均6100円 (中央値 7100円、範囲 500-24000円)
(治療費+交通費、食費など)
- ❖ 過去1年間の欠勤・欠席率

| 欠勤・欠席率 | 社会人 | 学生 |
|------------|--------------------|--------------|
| 0% | 5名 | 4名 |
| 0%超25%未満 | 11名 (体調不良、風邪、入院2名) | 3名 (体調不良、風邪) |
| 25%以上50%未満 | 0名 | 1名 (入院) |
- ❖ 過去1年間の救急外来受診

| | | | |
|----|-----|----|----|
| なし | 18名 | あり | 6名 |
|----|-----|----|----|

 - (平均受診回数： 2.2回 (範囲1-5回))
 - (受診理由： 発熱、呼吸困難、眼瞼腫脹、肺炎、関節炎)

表2 XLA患者の治療状況

2名であった。片道の通院時間は平均45分で、院内滞在時間は平均3.6時間であった。1回の治療にかかる総費用は平均6100円であった(表2)。過去1年間の欠勤、欠席率は社会人ではまったく欠勤しなかった者は5名(31%)で、学生では4名(50%)であった(表2)。過去1年間に救急外来を受診した者は、6名(25%)で平均受診回数は2.2回であった。受診理由は、発熱、呼吸困難、眼瞼腫脹、肺炎、関節炎であった(表2)。

過去1年間の他科受診は、15名(62.5%)が受診していた。そのうち定期受診は3名(20%)、突発的な受診が9名(60%)、定期受診と突発的な受診の両方が3名(20%)と突発的な受診者が多かった。受診科目も皮膚科、耳鼻科、眼科、整形外科が各3名ずつで、呼吸器内科2名、内科、循環器内科、漢方内科、呼吸器外科、泌尿器科、歯科が各1名ずつと多岐にわたっていた。また、過去1年間に入院した者は3名(13%)で、入院となった疾患名はそれぞれ肺炎、肺嚢胞、皮膚化膿

症であった。

過去1年間に認められた自覚症状のうち、1年間に50%以上の日数症状を認めた患者の割合が多かったのは膿性鼻漏(46%)、湿性咳嗽(32%)、眼脂(23%)であった(図2)。

XLAにおいては慢性肺疾患(CLD)の合併がしばしば認められるため、CLD合併に関与する因子の有無につき、医師調査票を元に検討した。解析可能な17名中、CLD合併ありが4名(24%)、なしが13名(76%)であった。これら2群において有意差を認めた因子は呼吸機能であった。CLD合併あり群4名では、全員が%努力肺活量または1秒率のどちらかに低下を認めたが、合併なし群13名のうち呼吸機能について記入のあった5名では全員%努力肺活量と1秒率とも異常を認めなかった。有意差は認められなかったが、合併あり群では4名中3名で本人または同居人が喫煙していたが、合併なし群では本人または同居人が喫煙していたのは11名中4名であった(表3)。

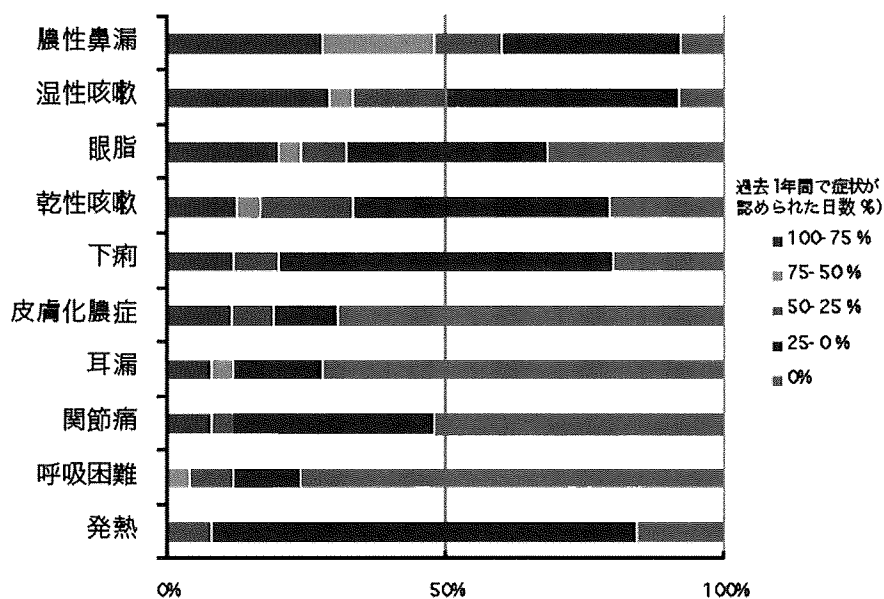


図2 過去1年間にみられた各症状の発生頻度別人数 (%)

| | 合併あり(4名) | 合併なし(13名) | |
|---|---------------|---------------|-------------|
| 現在の年齢 | 28.5歳 | 25.8歳 | |
| 臨床診断時年齢 | | | |
| 全例 | 7.9 (0.5-26) | 5.1 (0.17-29) | |
| 成人後診断例除く | 1.8 (0.5-3) | 3.1 (0.17-7) | |
| IVIIG開始年齢 | | | |
| 全例 | 7.9 (0.5-26) | 5.1 (0.25-29) | |
| 不定期受診例除く | 1.8 (0.5-3) | 3.5 (0.25-7) | |
| 血清IgGトラフ値 (過去1年) | | | |
| 全例 | 499 (384-700) | 443 (167-636) | |
| 不定期受診例除く | 499 (384-700) | 462 (250-636) | |
| 定期内服抗生物質 (3ヵ月以上継続) | 2/4 | 5/11 | |
| IVIIG開始後に入院あり | 4/4 | 8/10 | |
| 最後の入院原因が肺炎 | 3/4 | 2/10 | |
| 呼吸機能低下あり (%V _G または1秒率のどちらかが異常値) | 4/4 | 0/5 | $P < 0.008$ |
| 喫煙 | | | |
| 本人が吸う | 2/4 | 1/11 | |
| 同居者が吸う | 3/4 | 3/11 | |
| どちらかが吸う | 3/4 | 4/11 | |

表 3 慢性肺疾患の合併に影響を及ぼす因子

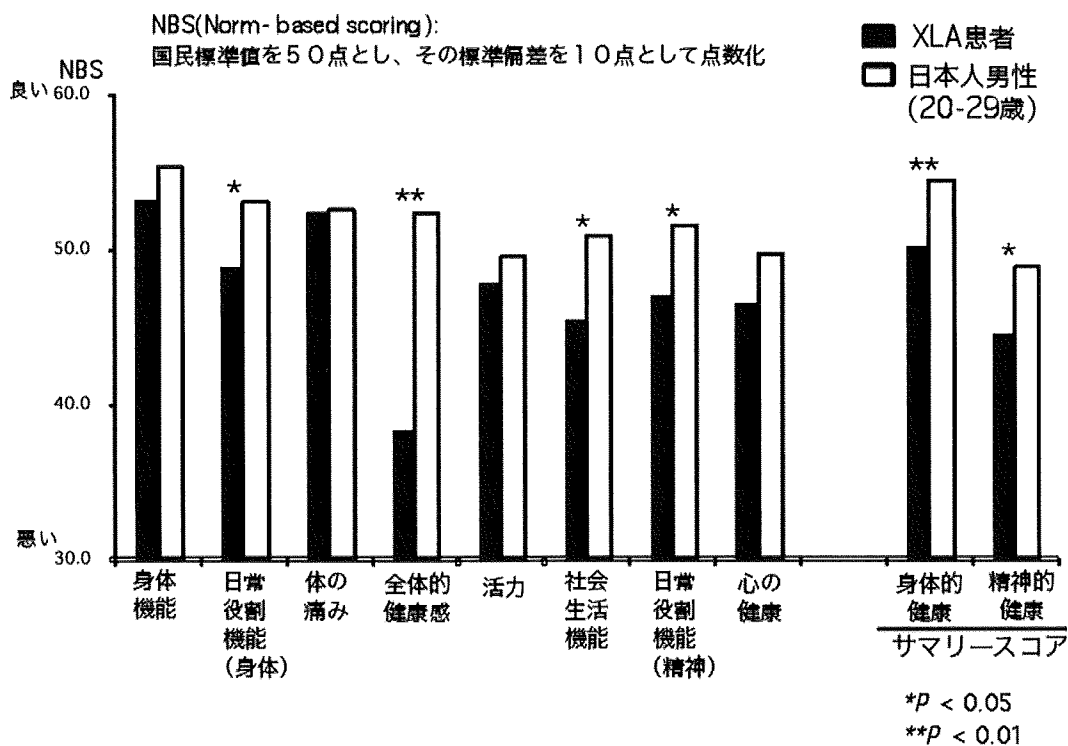


図 3 XLA 患者と日本人健康成人男性 (20-29 歳) との HR-QOL の比較

4. HR-QOL の評価

対象患者の包括的 HR-QOL について SF36v2 を用いて評価した。SF36v2 は、身体機能、身体的日常役割機能、体の痛み、全体的健康感、活力、社会生活機能、精神的日常役割機能、心の健康の 8 つの健康概念を検討するため 36 の質問項目が設定されている。結果は、8 つの健康概念尺度それぞれとそのサマリー尺度である身体的健康度と精神的健康度を点数化して示される。対象患者では、身体的日常役割機能 ($P < 0.05$)、全体的健康感 ($P < 0.01$)、社会生活機能 ($P < 0.05$)、精神的日常役割機能 ($P < 0.05$) の 4 つの尺度とその上位尺度である身体的健康度 ($P < 0.01$) と精神的健康度 ($P < 0.05$) がともに、20 ~ 29 歳の日本人健康成人男性と比較して低下していた (図 3)。

5. 遺伝に関する知識

対象患者 25 名中 8 名 (32%) が既婚者で、8 名中 5 名が子供をもうけていた。子供がいる 5 名中 4 名が遺伝に対する不安があると答えた。正確な遺伝に関する知識を持っているかどうかにつき 25 名全員について検討した。XLA が遺伝する疾患であることは 25 名中 23 名は知っていたが、2 名が知らないと答えた。知っていると答えた 23 名に遺伝に

対する理解度を尋ねたところ、完全に理解している、またはかなり理解していると答えた者が 11 名 (48%) であった。Winkelstein JA らの米国の成人 XLA 患者 25 名の遺伝知識に関する解析と比較するため同じ質問 (息子が患者となる確率、息子が保因者となる確率、娘が患者となる確率、娘が保因者となる確率についての五者択一問題) を行ったところ、息子が患者となる確率、息子が保因者となる確率、娘が患者となる確率については米国患者と比べて有意に正答率が低かった (表 4)。

D. 考 察

今回の調査結果から、わが国における成人 XLA 患者の QOL が詳細に明らかとなった。今回の調査対象患者群では、社会経済的状況と治療状況については比較的良好で疾患の影響度も比較的小さいと考えられた。しかしながら、対象患者の中には成人後脊髄炎に罹患してから初めて XLA と診断され、現在も人工呼吸管理中で著しい QOL の低下を認める患者が 1 名存在した。今回の調査では、生存中の患者のみを対象としており、また、患者は調査票記入と郵送という手間と時間を要する作業に対して取り組むことのできた患者と思われ、成人後も比較的健康状態の良い患

| | 息子が患者となる確率は | 息子が保因者となる確率は | 娘が患者となる確率は | 娘が保因者となる確率は |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| 米国患者の正答率 (Winkelstein, JA et al. 2008) | 96% (24/25) | 96% (24/25) | 96% (24/25) | 72% (18/25) |
| 本研究対象患者の 正答率 | 70%* (16/23) | 52%* (12/23) | 61%* (14/23) | 52% (12/23) |

【各質問とも 5 つの選択肢 (0, 25, 50, 75, 100%) から正解を 1 つ選ぶ】

* $P < 0.01$

表 4 XLA 患者における遺伝リスクの理解度

者が偏って選択された可能性も考えられた。それにもかかわらず、SF-36v2を用いたHR-QOLの解析では、対照群とした20～29歳の日本人健康成人男性と較べると、患者群では8項目の下位評価尺度中4項目と上位尺度である身体的健康度と精神的健康度ともに有意に低下していた。下位尺度のうちとくに全体的健康感は著明に低下しており、これは「健康状態が良くなり、徐々に悪くなっていく」と感じている患者が多いことを示している。このことは、筆記式患者質問票の自由記載意見において多様な不安を訴える患者が多いこと(データ未提示)を反映する結果であるかもしれない。また、1年のうち半年以上有する自覚症状としては、膿性鼻漏が約50%の患者で、湿性咳嗽が約30%の患者で認められ、これらの気道症状も身体的、精神的QOLの低下に関与している可能性が考えられた。

XLAの長期生存例ではしばしばCLDの合併が認められる。今回の患者群におけるCLD合併の検討結果からは、CLD合併群では合併なし群と比べて有意に呼吸機能の低下が認められた。スクリーニングとして呼吸機能検査の有用性が示唆される結果であったが、医師調査票から解析可能であった17名中9名しか呼吸機能検査はなされておらず、今後、呼吸機能検査の活用につき一般医への啓蒙も必要と考えられた。また、CLD合併患者4名中3名が本人または同居者が喫煙すると答えており、喫煙はCLDの悪化因子であるため患者のみならず家族も含めた日常生活指導も診断後早期から考慮する必要があると考えられた。

既婚患者では子どもへの遺伝に関する不安が認められるため、患者全員のXLAに関する遺伝知識について検討したところ、25名中2名は遺伝に関する説明を受けておらず、

説明を受けていた23名も正確な遺伝知識を持っているものは5名(22%(データ未提示))と少数であった。大部分の患者で疾患に関する説明や情報の提供をくり返し行う必要があると考えられた。

E. 結 論

XLAは身体的、精神的両面において成人患者の日常生活に影響を及ぼしており、QOL改善のためには身体的な治療のみならず、精神的ケア、疾患に対する患者理解度の向上、家族も含めた生活指導など総合的な治療アプローチが必要と考えられた。

謝 辞

本研究に参加していただきました患者の皆様とNPO法人PIDつばさの会、ならびに貴重な患者情報をいただきました、上村明(岩見沢市立総合病院内科)、阿南正(熊本大学医学部附属病院小児科)、笹原洋二、土屋滋(東北大学病院小児科)、貫和敏博(同呼吸器内科)、大津寧(久留米大学医学部小児科学)、大嶋勇成(福井大学医学部附属病院小児科)、住田裕(りんくう総合医療センター市立泉佐野病院小児科)、和田泰三、関秀俊、谷内江昭宏(金沢大学附属病院小児科)、村上功啓(富山赤十字病院小児科)、関野高弘(関野小児科内科クリニック)、石黒精(帝京大学医学部附属溝口病院小児科)、有里敬代(国立病院機構南九州病院神経内科)、平木雅久(滝川市立病院小児科)、松山健(公立福生病院小児科)、富板美奈子(千葉大学医学部附属病院小児科)、松岡宏(松岡こどもクリニック)、今井耕輔、野々山恵章(防衛医科大学校病院小児科)、河村信明、山田雅文、有賀正(北海道大学病院小児科)、田中敏郎(大阪大学医学部附属病院呼吸器・免疫アレルギー内科)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

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

IV 研究成果の刊行に関する一覧