

13. Takahashi N. Matsukoto K. Saito H. Nanki T. Miyasaka N. Kobata T. Azuma M. Lee S-K. Mizutani S. **Morio T.**: Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T-cell populations in ICOS deficient patients. *Immunol.* **182**:5515-5527, 2009.

14. Yoshida H. Kusuki S. Hashii Y. Ohta H. **Morio T.** Ozono K.: *Ex vivo*-expanded donor CD4 T lymphocyte infusion against relapsing neuroblastoma: A transient Graft-versus-Tumor effect. *Pediatr Blood Cancer* **52**:895-897, 2009

2. 学会発表

1. 森尾友宏、大山 敦、峯岸志津子、高木正稔、水谷修紀：細胞加工過程におけるDNA損傷反応の検出、平成21年度厚生労働科学研究 再生医療実用化研究推進事業 「再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究」班 第2回班会議（森尾班）

2. Tomohiro Morio : Infusion of Ex-vivo Expanded Donor T-Lymphocytes for Intractable Infections and Leukemia. 第32回日本造血細胞移植学会シンポジウム「Cell Therapy for Intractable Infections and Malignant Diseases」2010年2月19日～20日、浜松

3. Tomohiro Morio: Common variable immunodeficiency (CVID): Molecular basis of immune dysfunction The 2nd Symposium

for PID in Asia February 4 - 5, 2010 Kazusa Academia Hall

4. 森尾友宏：分類不能型免疫不全症の全国調査と亜群同定。第3回日本免疫不全症研究会 2010年1月31日、東京

5. 森尾友宏、渡辺信和、高橋聡、中内啓光：HLA-Flow法による SCID-臍帯血ミニ移植後のキメリズム解析 厚生労働省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班 平成21年度班会議2010年1月29日 東京

6. 梶原道子、森尾友宏：ex vivo 増殖臍帯血 T 細胞 輸注療法臨床試験プロトコール 厚生労働科学研究免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班平成21年度第二回班会議、2010年1月30日、東京

7. 清水則夫、森尾友宏：平成21年度厚生労働科学研究（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントのQOLを視野に入れた成績の向上に関する研究」研究代表者 谷口修一、2010年1月31日 東京

8. 清河信敬、恩田恵子、今留謙一、矢島美佐子、中村宏紀、片桐洋子、森尾友宏、藤本純一郎、藤原成悦：ドナーリンパ球輸注を目的とした臍帯血由来活性化CD4細胞の性状解析、第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月2日～4日、

大阪

9. 森尾友宏、水谷修紀：Basic to Clinical: Artemis/Cernunos/Lig4 deficiency、第 51 回日本小児血液学会、2009 年 11 月 27 日～29 日、東京

10. 満生紀子、遠藤明史、小野敏明、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：当科における原発性免疫不全症に対する骨髄非破壊的前処置による移植の検討、第 51 回日本小児血液学会 2009 年 11 月 27 日～29 日、東京

11. 遠藤明史、満生紀子、小野敏明、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：RIST にて臍帯血移植後、TMA、血球貪食症候群を発症し死亡した X 連鎖重症複合型免疫不全症の 1 例、第 51 回日本小児血液学会、2009 年 11 月 27 日～29 日、東京

12. 森尾友宏：ex vivo 増殖臍帯血 T 細胞輸注療法の臨床研究、政策創薬総合研究事業平成 21 年度「臍帯血 DLI の実用化と細胞治療製剤の医薬品化へ向けてのトランスレーショナルリサーチ」（研究代表者 藤原成悦）、2009 年 10 月 20 日、東京

13. 満生紀子、大川哲平、高橋考治、遠藤明史、青木由貴、小野敏明、落合央、峯岸志津子、高木正稔、梶原道子、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：RIST による非血縁臍帯血移植を施行した SCID3 例、小児 H-SCT 研究会、2009 年 10 月 9 日、東京

14. 森尾友宏、松本耕一郎、落合央、峯岸

志津子、清水則夫：891 検体の T 細胞調製におけるウイルス解析、平成 21 年度厚生労働科学研究 再生医療実用化研究推進事業 「再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究」班 第 1 回班会議（森尾班）

15. 森尾友宏、大山敦、峯岸志津子：培養細胞における DNA 損傷修復反応の検出、平成 21 年度厚生労働科学研究 再生医療実用化研究推進事業 「再生医療・細胞医療製剤に汎用可能な新規微量高感度品質管理・安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究」班 第 1 回班会議（森尾班）

16. 長澤正之、小野敏明、遠藤明史、青木由貴、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、梶原道子、森尾友宏、水谷修紀：当科における同種造血幹細胞移植(1995-2007 年)の検討、第 112 回日本小児科学会学術総会、2009 年 4 月 17 日～19 日、奈良

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

APPLICATION OF
SYNOVIUM-DERIVED
MESENCHYMAL STEM CELLS
(MSCs) FOR CARTILAGE OR
MENISCUS 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

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

成人型分類不能型免疫不全症の実態把握、亜群特定に基づく診断基準策定及び
病態解明に関する研究

Common Variable Immunodeficiency の TREC/KREC を用いた新しい亜群分類の提唱

研究分担者 今井耕輔 防衛医科大学校医療情報部 准教授

研究要旨:

今年度は、末梢血中の TREC, sjKREC, cjKREC の検討により、CVID と臨床診断されている患者が、3 群に分かれることが明らかになった。今後、さらに検討を加え、原因遺伝子の同定につなげたい。

A. 研究目的

Common Variable Immunodeficiency は、日本語では「分類不能型免疫不全症」と訳されてきたが、これは、発生数が多く(Common)、多彩な臨床症状を取る(Variable)、分類不能な疾患であるということで、1970年代に暫定的につけられた名称がそのまま持続しているものである。

近年、CVID の病態が明らかになってきたこと、一部では原因遺伝子(ICOS, TACI, BAFFR, CD19, CD81)も判明していること、CVID と暫定的に診断されている中に複合免疫不全症(CID)、免疫グロブリンクラススイッチ異常症(高IgM症候群)、伴性劣性リンパ増殖性症候群(XLP)などの疾患が含まれやすいことが知られてきたこと、「分類不能型」の暫定診断のために正確な診断と適切な治療が妨げられている可能性があることから、適切な和訳が必要であると考えられる。

現在、CVID は、「成熟Bリンパ球、特に記憶B細胞、および抗体産生細胞である形質細胞への分化障害による低ガンマグロブリン血症のため、易感染性を呈する先天性免疫不全症候群である」と考えられている。すなわち、B前駆細胞等の障害による末梢血Bリンパ球の減少を伴わず(B細胞欠損症の除外)、免疫グロブリンクラススイッチ障害を伴わない(免疫グロブリンク

ラススイッチ異常症の除外)疾患であると考えられている。

これまで、CVID には、様々な原因を持った疾患が含まれており、その分類が試みられてきた。臨床症状を用いたもの(脾腫の有無、自己免疫疾患合併の有無など)、in vitro での刺激実験の結果を用いたもの、および、フローサイトメトリー解析を用いたもの(EuroClass)がその代表的なものである。

今回我々は、T cell receptor recombination excision circles (TREC)の定量、および、coding joint Kappa chain recombination excision circles (cjKREC)の定量、signal joint KRECの定量を用いて、CVID の亜群分類を試みた。TREC は、T細胞受容体(TCR) α 鎖の遺伝子再構成の際に生成される TCR δ 鎖領域を含んだ環状DNAであり、細胞分裂の際複製されないため、その定量は、T細胞の新生能を反映すると考えられている(図1)。さらに、van Zelm、van Dongenらは、allelic exclusionあるいは λ 鎖生成時に、免疫グロブリン(Ig) κ 鎖が不活化される際に生成される Ig κ 鎖の定常領域を含む環状DNAである sjKREC と、ゲノム側に残った領域である cjKREC を定量することで、末梢血中、骨髄中あるいはリンパ節中のB細胞の分裂回数を定量する方法を報告した(図

2)。我々はこの方法を応用して、末梢血由来の DNA 中の sjKREC を定量することで、B 細胞の新生能を評価し、cjKREC を定量することで、B 細胞の絶対数の評価が可能であると考え、健康人を用いた検討でこれを証明した(論文準備中)。更に、TREC、KREC ともその生成には、DNA 切断および修復をとまなっている。DNA 切断には、RAG1/RAG2 が用いられており、修復には、non-homologous end joining (NHEJ) 機構 (DNAPKcs, Ku70/80, LIG4, XRCC4, Cernunnos) が用いられているため、TREC、KREC の低値は、この DNA 切断修復機構の障害を反映している可能性もある。本研究では、CVID 患者で、TREC、sjKREC、cjKREC を定量し、亜群分類とすることを試みたので、報告する。

B. 研究方法

低 IgG 血症を呈する免疫不全症患者 41 例(国内紹介例 27 例、イランからの紹介例 13 例、インドからの紹介例 1 例)を解析対象とした。

症例の年齢別内訳は、図 3 の通りである。また、国内症例およびインドからの症例の免疫グロブリン値は図 4 の通りである。全例 IgG は正常値以下(<800mg/dl)であり、IgA も正常値以下(<100mg/dl)であった。IgM については、正常範囲内(>50mg/dl)の症例が 12 例であり、低値の症例が 16 例であった。イランからの症例の免疫グロブリン値は、IgG: 0-470, IgA 0-60, Ig< 0-47mg/dl であった。

各症例の末梢血からゲノム DNA を抽出し、Taqman プローブを使ったリアルタイム PCR 法を用いて、TREC、および、cjKREC、sjKREC の定量を行った。TREC の定量は、我々が報告した方法に従い行い、cjKREC、sjKREC の定量については、van Zelm らの報告したプライマー、プローブを用い、プラスミドを用いて標準曲線を作成し、ゲノム DNA 量あたりのコピー数として、算出した。内部コントロールとして、RNaseP 領域の定量を特異的プライマー、プローブを用いて算出した。

(倫理面への配慮)

患者からは、臨床研究に関するガイドラインおよびゲノム解析研究に関するガイドラインに従い、書面を用いたインフォームドコンセントを得た上で、検体を採取した。なお、本研究は、防衛医科大学校倫理委員会にて、承認済である。

C. 研究結果

・CVID 患者末梢血 TREC 定量

CVID 患者 41 例の末梢血由来 DNA を用いて、TREC 定量を行ったところ、17 例で TREC が検出感度以下(10 コピー/ μ gDNA)の低値を示した。24 例は、正常範囲内であった(図 5)。

・CVID 患者末梢血 KREC 定量

次に、CVID 患者 41 例の末梢血由来 DNA を用いて、sjKREC、cjKREC の定量を行った。sjKREC は、TREC 正常であった 24 例では正常範囲であった(図 6)。一方、TREC が感度以下であった 17 例は、sjKREC が感度以下である 6 例と、正常である 10 例に分けられた(1 例は検体が得られず)。さらに、sjKREC 低値を示した 6 例中 4 例は cjKREC も感度以下であった。2 例は、cjKREC が正常であり、B 細胞新生能の低下が疑われた(図 7)。

D. 考察

今回の研究によって、“CVID”という臨床診断を受けている症例が大きく 3 群に分かれることが明らかになった(図 8)。すなわち、まず、TREC 陽性群と TREC 陰性群である。TREC 陰性群は、更に KREC により分類される。sjKREC 陰性で、B 細胞の新生能が低下していると考えられる群は 6 例あり、全体の 14.6% を占める。この群のうち 4 例は cjKREC も陰性であり、B 細胞減少もきたしていると考えられる。また、2 例は、cjKREC がまだ正常範囲内にあるが、この 6 例は、T 細胞新生能、B 細胞新生能が低下しており、進行性の複合免疫不全症であると考えられる。また、TREC 陰性だが、sjKREC、cjKREC ともに正常な群は、T 細胞の新生能低下はあるものの、B 細胞の新生能低下を伴っていないため、T 細胞異常による抗体産生不全の可能性が考えられる。一方、TREC 陽性群 24 例は (58.5%)、全例 sjKREC にも cjKREC にも異常がなかった。

考えることができ、現在考えられている CVID はこちらに入ると考えられる。

今後、フローサイトメトリー解析の結果との相関や、臨床データとの相関について解析し、細胞免疫学的な検討を加え、原因遺伝子の同定につなげたいと考えている。

E. 結論

末梢血中の TREC, sjKREC, cjKREC の検討により、CVID と臨床診断されている患者が、3 群に分かれることが明らかになった。今後、さらに検討を加え、原因遺伝子の同定につなげたい。

F: 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, Nonoyama S. Identification of severe combined immunodeficiency by T-cell receptor excision circles quantification using neonatal Guthrie cards. *J Pediatr.* **155**(6):829-33. 2009.

2. 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, Ozono K. Hemophagocytosis after bone marrow transplantation for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency. *Pediatr*

Transplant. 2009.

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

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

5. Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, **Imai K**, Espanol T, Fasth A, Pellier I, Strauss G, Morio T, Gathmann B, Noordzij JG, Fillat C, Hoenig M, Nathrath M, Meindl A, Pagel P, Wintergerst U, Fischer A, Thrasher AJ, Belohradsky BH, Ochs HD. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood.* 2010.

6. 森西洋一, 今井耕輔. 【免疫不全症候群と遺伝子異常】 免疫不全症の臨床検査 TREC_s 測定による重症複合免疫不全症のマススクリーニング. 臨床検査. [解説/特集]. 2009;53(5):553-9.

7. 本間健一, 辻陽一郎, 今井耕輔, 子川和宏, 野々山恵章. 骨髓非破壊的前処置にて血縁者間臍帯血移植を施行し、生着が得られた重症再生不良性貧血の1例. 日本小児血液学会雑誌. [原著論文/症例報告];23(1):43-6.2009.

8. 富澤大輔, 今井耕輔. 【免疫不全症候群と遺伝子異常】 各疾患の遺伝子異常, 診断と治療 伴性高IgM症候群(CD40 ligand 欠損症). 臨床検査. [解説/特集].;53(5):575-9.2009.

9. 今井耕輔, スジャータ・モハン, 小原收. 【免疫不全症候群と遺伝子異常】 免疫不全症候群の遺伝子診断の中央化とデータベース. 臨床検査. [解説/特集];53(5):533-40.2009.

10. 今井耕輔. わが国の小児科医・研究者によって新たに提唱・発見された疾患、疾患概念、原因の究明された疾患 高IgM症候群(Uracil DNA glycosylase 異常による). 小児内科. [解説];41(6):942-9.2009.

2.国内学会発表

1. **K. Imai**, S. Nonoyama.: PIDJ 2008-2009、Symposium for PID in Asia、2010年2月4日、千葉

3.国際学会発表

1. **K. Imai**, S. Nonoyama, K. Oshima, H. Kanegane, T. Miyawaki, O. Ohara, T. Takemori, and T. Hara.:Primary Immunodeficiency Database Network in Japan. Human Immunology and Immunodeficiencies Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. 2009年5月28日、北京、中華人民共和国

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特願

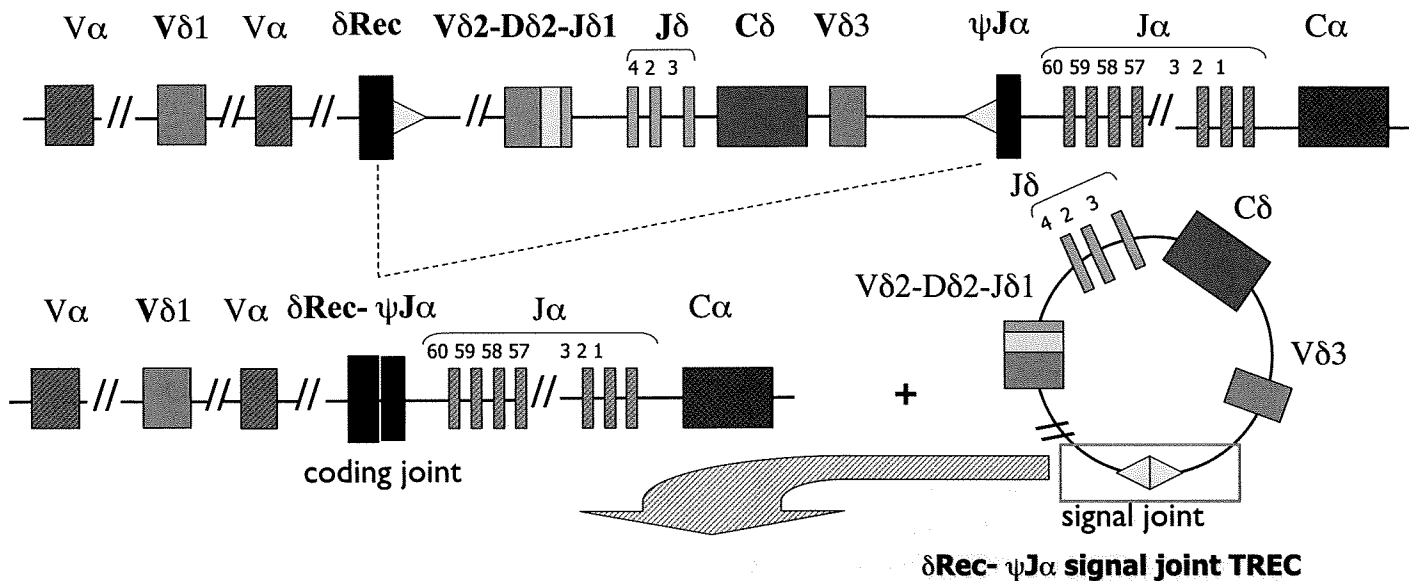
該当なし

2. 実用新案登録

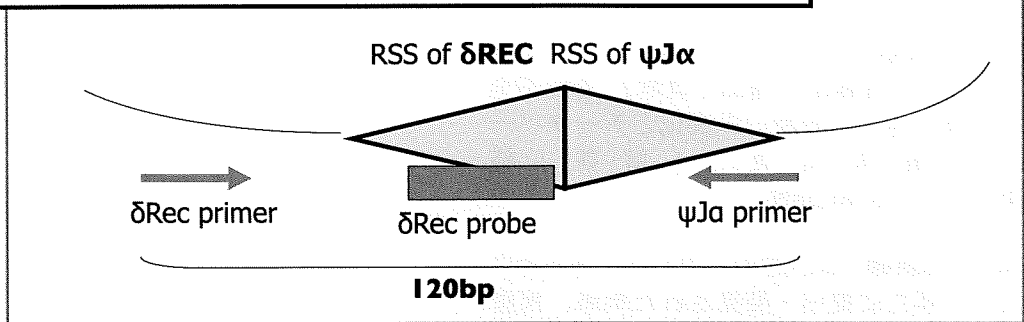
該当なし

3. その他

該当なし



TREC: TaqMan real-time quantitative PCR



☒1: TREC

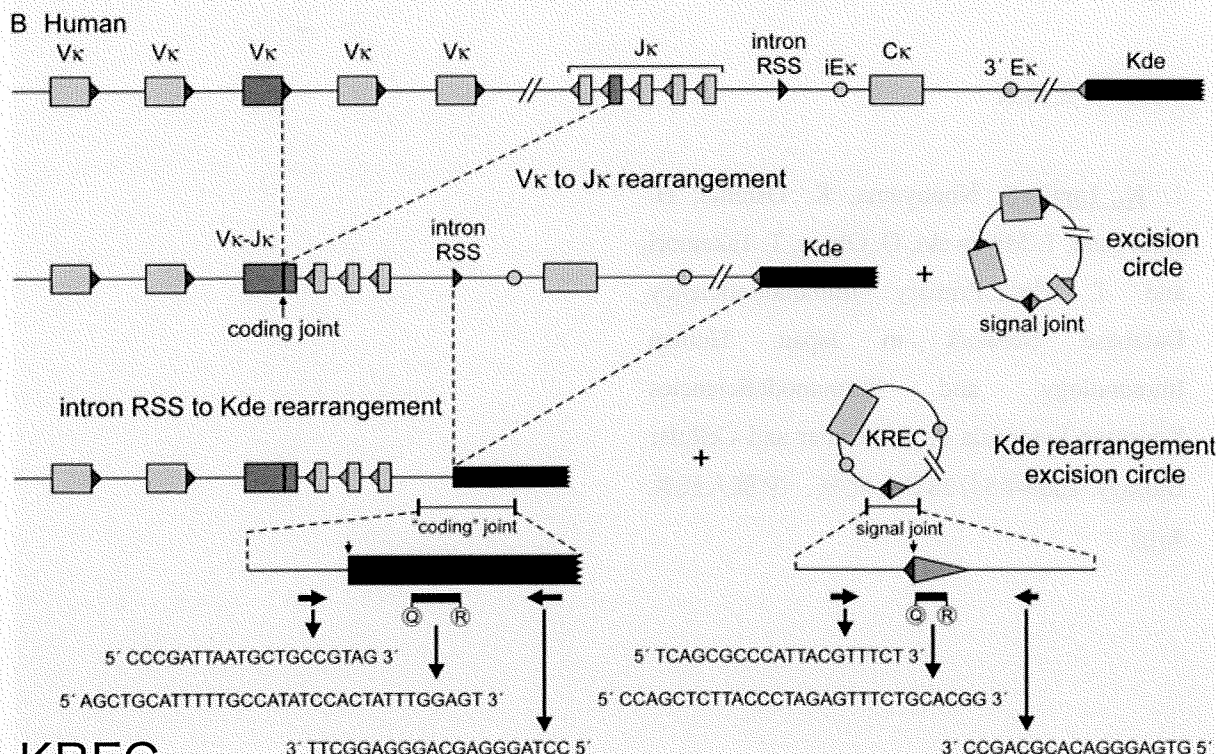
2010年3月11日木曜日

cjKREC ≡ Total B cells

sjKREC ≡ "TREC in B cells" = B cell neogenesis

van Dongen: RQ-PCR (cj/sj ratio) as a marker for proliferation

Our method: quantitative PCR with plasmid (copies/ugDNA or copies/RNaseP)

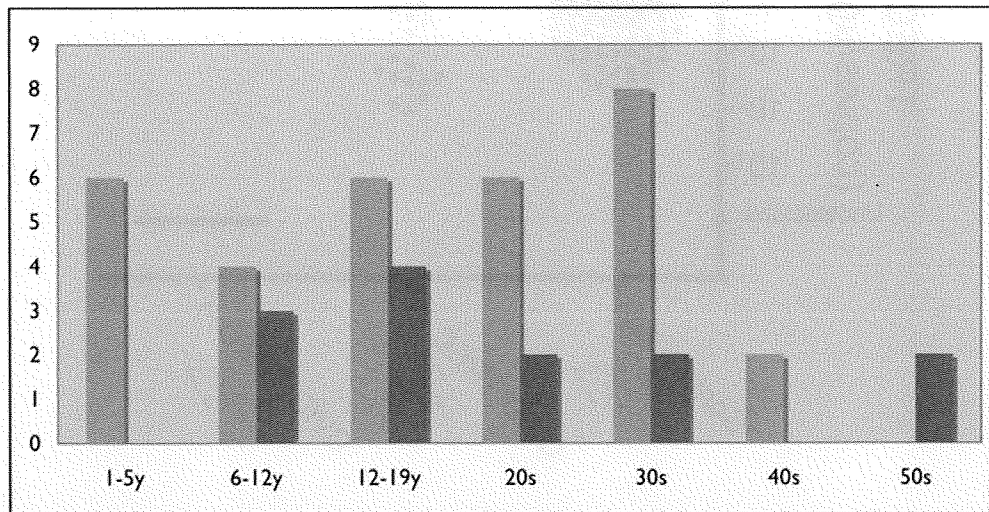


☒2: KREC

2010年3月11日木曜日

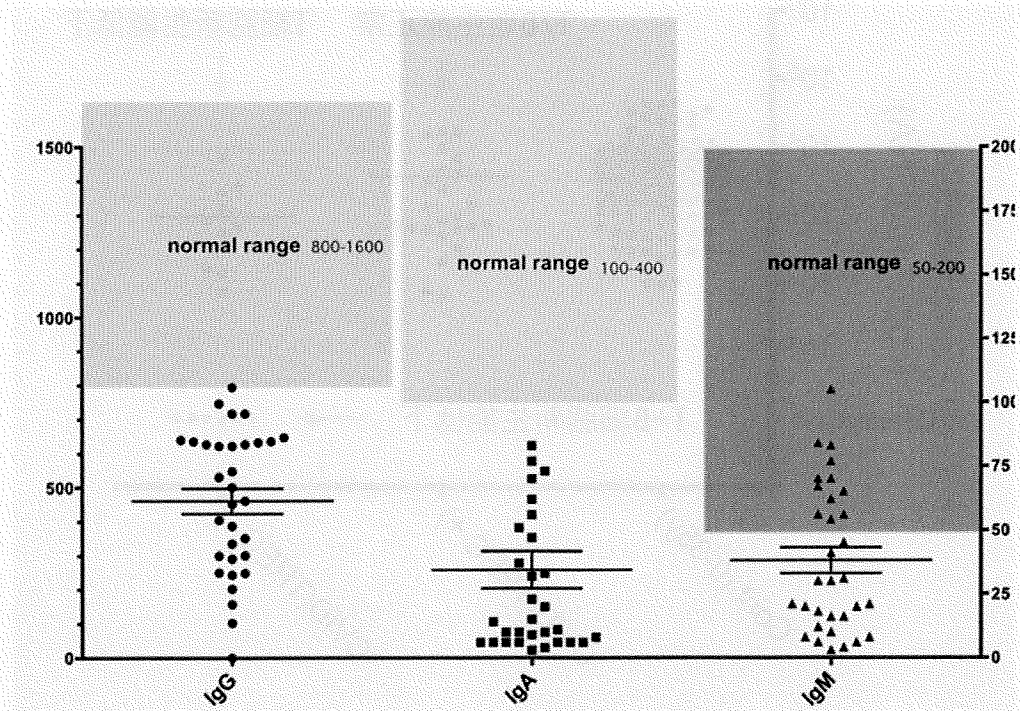
図3: 自験”CVID”症例の年齢分布

- ・ 低IgG血症を呈する免疫不全症患者 41例
- ・ 日本：27例、インド1例、イラン13例



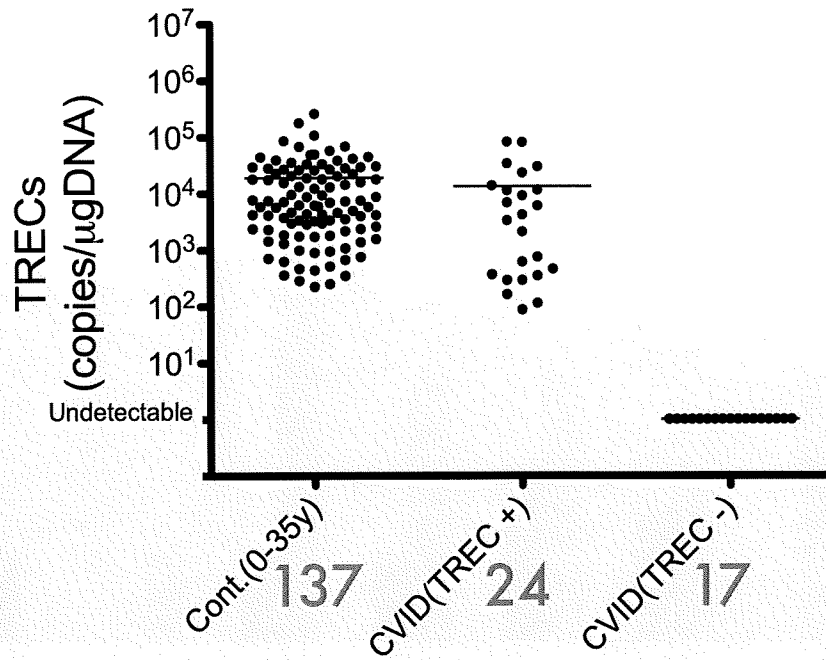
2010年3月11日木曜日

図4: 自験例のIg値



2010年3月11日木曜日

図5: CVID患者のTRECs値



T細胞新生能低下 → 複合免疫不全

図6: CVID患者のsjKRECs値

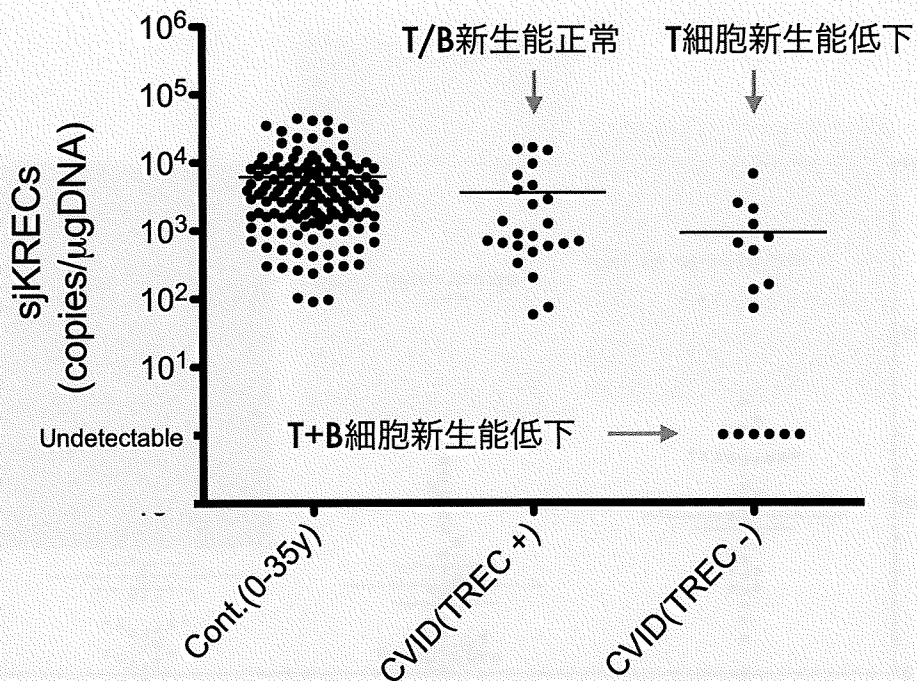
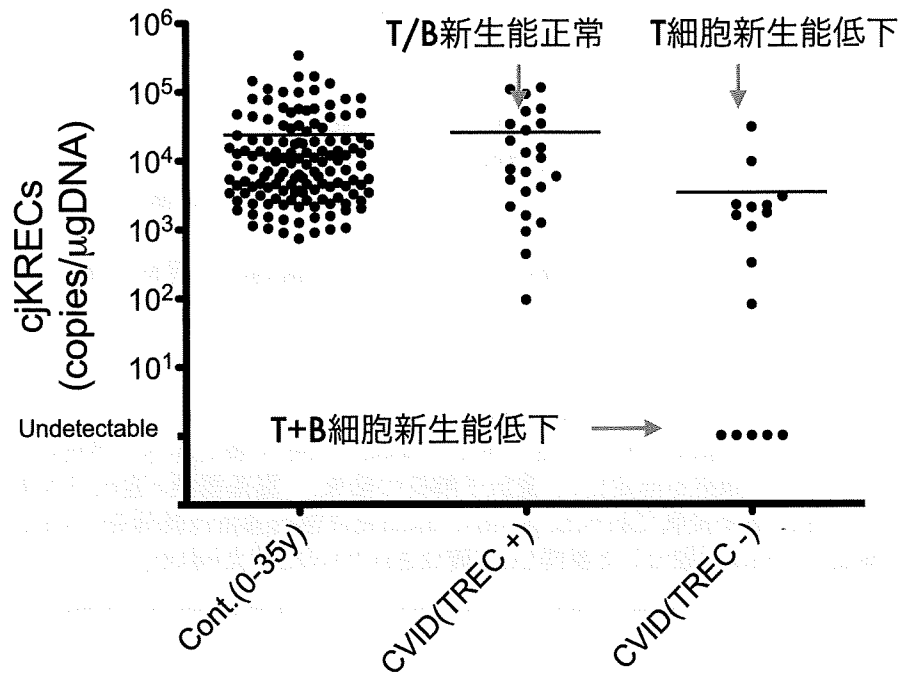
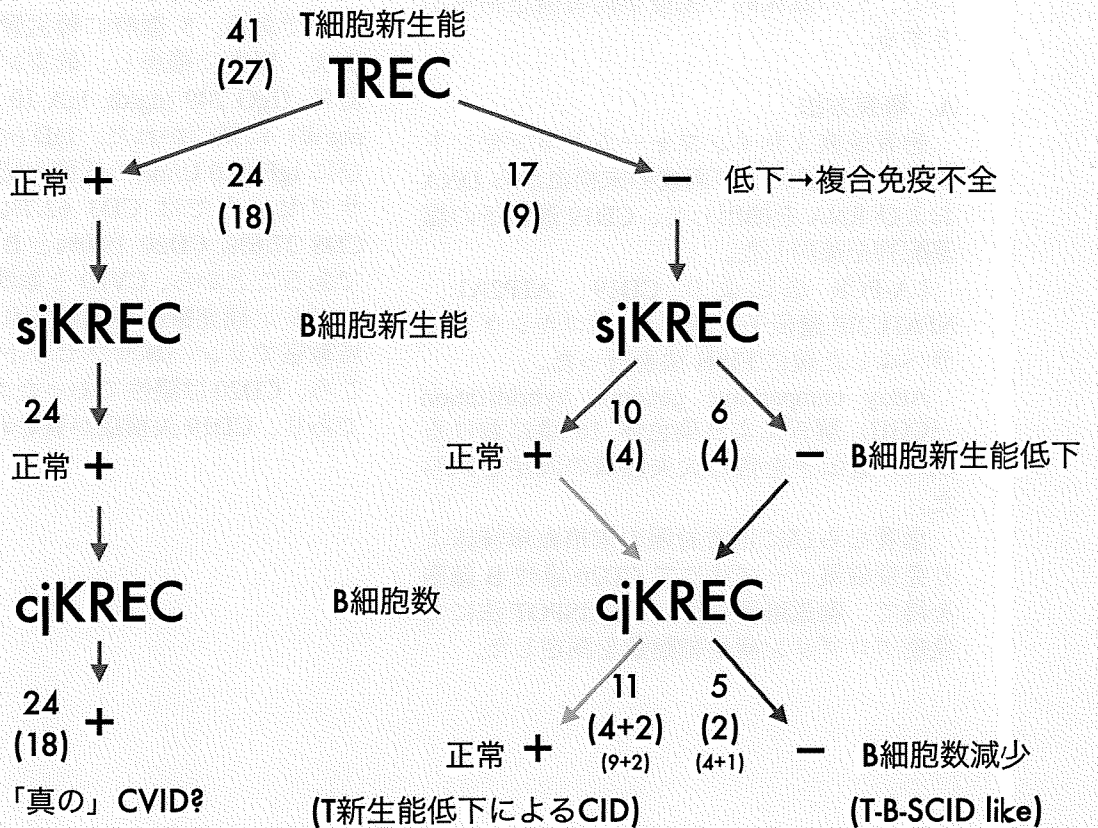


図7: CVID患者のcjKRECs値



2010年3月11日木曜日

図8: 自験CVID患者のまとめ



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

成人型分類不能型免疫不全症の実態把握、亜群特定に基づく診断基準策定及び
病態解明に関する研究
CD19 欠損症における臨床的・免疫学的特徴

研究分担者 金兼弘和 富山大学附属病院小児科 講師

研究要旨:

分類不能型免疫不全症(CVID)の責任遺伝子として最近 ICOS、TACI、BAFF-R、CD19 遺伝子が同定され、それらは CVID の原因の約 10%を占めるとされる。今回 8 歳の日本人男児において世界で 3 家系(4 例)目となる CD19 欠損症を同定した。遺伝子解析の結果、1 塩基置換と遺伝子欠失による複合ヘテロ接合体であり、いずれも新奇変異であった。In vitro による免疫学的異常は既報告の CD19 欠損症と同様であり、CD19 欠損症は CVID の独立した亜群として確立されたものと考えられる。

研究目的

分類不能型免疫不全症(CVID)は反復性細菌感染症、低ガンマグロブリン血症、正常～減少した B 細胞数を特徴とする症候群であり、雑多な原因から成ると考えられている。最近 CVID の責任遺伝子として ICOS、TACI、BAFF-R、CD19 遺伝子が同定され、それらは CVID の原因の約 10%を占める。今回 8 歳の日本人男児において世界で 3 家系目となる CD19 欠損症を同定したので、その臨床的・免疫学的特徴を明らかにする。

A. 研究方法

患者家族よりインフォームドコンセントを得て、患者および両親の末梢血から DNA および RNA を抽出して、CD19 遺伝子の塩基配列を検討した。

LA-PCR 法により CD19、ATP2A1、NFATC2IP 遺伝子を増幅し、ジゴキシゲンでラベルした後に FISH 法を行った。

Array comparative genomic hybridization (CGH) 解析により染色体 16 番における CD19 遺伝子を含む欠失領域の同定を試みた。

患者ならびに正常対照の末梢血単核球より免疫磁気ビーズ法にて CD20 陽性 B 細胞を得て、刺激培養を行い、ELISPOT 法にて免疫グロブリン産生細胞数を測定した。

純化した B 細胞より得られた cDNA の V_H5-C 領域を増幅し、somatic hypermutation を評価した。

患者単核球に EB ウイルス (EBV) を感染させて、不死化 B 細胞株を樹立した。

B. 研究結果 D. 考察

1) 症例報告

症例は非近親婚の両親から生まれた 8 歳男児である。5 歳時に腎盂腎炎、急性気管支炎、胃炎に罹患し、低ガンマグロブリン血症 (IgG 249 mg/dl, IgA 10 mg/dl, IgM 18 mg/dl) に気づかれた。IgD (<0.6 mg/dl)ならびに IgE (9.0 U/ml)の低値も認め、リンパ球サブセットでは CD3 62.7%, CD4 37.6%, CD8 27.6%, CD20 19.0%と B 細胞数が正常であることから、CVID と診断され、免疫グロブリン補充療法が開始された。8 歳時に当教室でリンパ球サブセットを再検したところ、CD20 は陽性であったが、CD19 陰性であり、CD19 欠損症が疑われた。

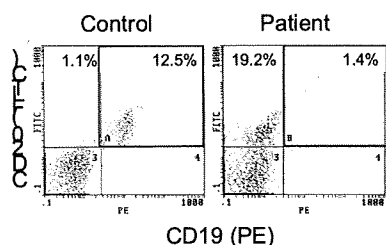


図1 フローサイトメトリーによる末梢血 B 細胞数の測定

2) CD19 遺伝子解析

CD19 遺伝子の各エクソンとその近傍を PCR にて増幅して、ダイレクトシーケンスを行ったところ、イントロン5に1塩基置換 (IVS5-1G>T) が同定された。cDNA の解析ではエクソン6のスキップが認められ、フレームシフトによるストップコドンが生じていた。これまで報告されている2家系の CD19 欠損症 (972insA、1384delGA) とは異なる新奇変異例であった。

両親の遺伝子解析を行ったところ、母親では片アレルに患者と同じ遺伝子変異を有し、保因者と同定されたが、父親では変異が同定されなかった。そこで CD19 遺伝子の FISH を行ったところ、患者では CD19 遺伝子の欠失が認められた。CD19 遺伝子近傍の ATP2A1 および NFATC2IP 遺伝子についても欠失を認めた。

そこで array CGH 解析を行ったところ、患者では父親由来の片アレルで CD19 遺伝子を含む少なくとも 219kb の欠失が認められた。

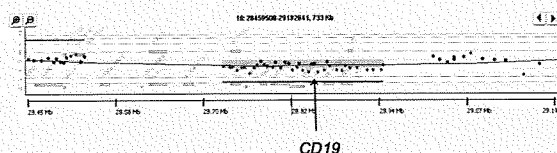


図2 16番染色体における array CGH 解析
父親由来のアレルでは CD19 遺伝子を含む少なくとも 219kb の欠失が認められた。

3) 免疫学的解析

In vitro における免疫グロブリン産生能を調べたところ、患者では正常に比べてすべてのクラスの免疫グロブリン産生能の低下を認めた。

末梢血 B 細胞におけるナイーブ・メモリ

一分画を調べたところ、患者では正常に比べて CD27 陽性のメモリー B 細胞が減少していた。また B 細胞における somatic hypermutation の頻度を調べたところ、13 クローン中6クローンで somatic hypermutation が認められた。

患者 B 細胞から EBV で不死化した B 細胞株において3種類の抗 CD19 モノクローナル抗体を用いてその発現を調べたが、CD19 抗原の発現は認められなかった。

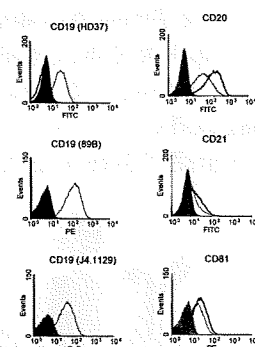


図3 EBV で不死化した B 細胞株における表面マーカー解析

影部分は陰性コントロール、単線は正常対照、太線は患者を示す。

・評価

1) 達成度について

わが国初、世界で3家系目の CD19 欠損症を同定し、その臨床的・免疫学的特徴を明らかにした。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

自験例の同定によって CD19 欠損症は3家系 (4例) となり、CD19 欠損症は症例数として少ないものの CVID のひとつの亜群を形成することが明らかとなった。

3) 今後の展望について

患者 B 細胞と同じ表面形質を有する B 細胞株を樹立することができたので、この細胞株を用いた基礎的研究の進歩が期待される。

4) 研究内容の効率性について

前方視的研究として抗 CD19 および CD20 モノクローナル抗体を用いた B 細胞数の算定がスクリーニングとして有用と思われる。

E. 結論

世界で3家系(4例)目となるCD19欠損症を同定した。1塩基置換と遺伝子欠失による複合ヘテロ接合体であり、いずれも新奇変異であった。In vitroによる免疫学的異常はすでに報告されているCD19欠損症と同様であり、CD19欠損症は独立したCVIDの亜群として確立されたものと考えられる。

最近、CD19複合体のコンポーネントであるCD81の欠損症も同定され、CD19欠損症と臨床的・免疫学的特徴は類似している。したがって、CD19複合体欠損症として新たなCVID亜群を形成するものと思われ、CD19やCD81以外のコンポーネントの欠損による免疫不全症が存在する可能性がある。

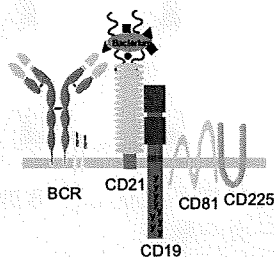


図4 CD19複合体とB細胞シグナル

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表	26件
原著論文による発表	4件
それ以外(レビューなど)の発表	7件

そのうち本研究に関する主なもの

- ・論文発表 なし
- ・学会発表

1. Kanegane H., Zelm M.C.V., Agematsu K., Sekiguchi T., Arai T., Oishi T., and Miyawaki T.: Clinical and immunological characteristics of CD19 deficiency.、第71回日本血液学会、2009年10月23日-25日、京都。

2) 海外

口頭発表	2件
------	----

原著論文による発表 11件
それ以外(レビューなど)の発表
0件

そのうち本研究に関する主なもの

- ・論文発表 なし
- ・学会発表 なし

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特願

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

成人型分類不能型免疫不全症の実態把握、亜群特定に基づく診断基準策定及び
病態解明に関する研究

研究分担者 松本 功 筑波大学人間総合科学研究科臨床免疫 准教授

研究要旨:

分類不能型免疫不全症(Common variable immunodeficiency:CVID)は、2歳以上(多くは10代以降)に発症する低ガンマグロブリン(2クラス以上)血症で、同種血球凝集素、あるいはワクチンへの低反応を示し、既知の免疫不全症ではない疾患」と定義されている。CVID患者の実態を調査し、現在不均一な疾患であるCVIDの発症機序からの亜群特定を試み、診断基準や新たな治療法の開発を目指す。CVIDは、感染症とともに、自己免疫疾患(特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性溶血性貧血、他)や腫瘍性疾患を合併することが多く、本研究ではそれらの病態を探索していくことを目的とした。

今回のアンケート調査から、CVIDの人数、症状などが明らかになった。自己免疫疾患は9.7%で、悪性腫瘍は19.0%で認められた。

A. 研究目的

分類不能型免疫不全症(CVID)はIUISでは抗体産生不全に分類されている。その明確な診断基準はなく、ヨーロッパ免疫不全症研究会(ESID)では以下の基準が提唱されている。

確実例:

①低IgG血症(2SD以下)及びIgMあるいはIgAが低値(2SD以下):いずれも年齢を考慮

②2歳以降の発症

③同種血球凝集素反応の欠如、あるいはワクチンへの低反応

④既知免疫不全症、低ガンマグロブリン血症をきたす疾患ではない

疑い例:

①IgG, IgMあるいはIgAのうち最低1つが低値(2SD以下):いずれも年齢を考慮

②~④は同じ

日本における実態は未だに把握されておらず、今回内科領域を中心とした全国調査から、その実態を把握することとした。

またCVIDにおける自己免疫疾患病態解明を目的とした。

B. 研究方法

1次アンケートにて年齢、診断、自己免疫症状、悪性腫瘍頻度などについての情報を収集した。

(下記にアンケート送付先を記載)

日本血液学会 487 施設
 日本感染症学会 227 施設
 日本リウマチ学会 458 施設
 合計 1159 施設(重複削除後)

2次アンケートにて合併症について：脾腫：エコー・触診、消化器症状、関節炎、感染症（詳細）、合併症と感染症の関連や検査データについて：ツ反、ワクチン接種歴と抗体価、血液型（表及び裏試験）、自己抗体（抗核抗体、RF、その他）、リンパ球サブセット、HLAを確認し、疾患亜群の症状や免疫学的データと連動するようにした。

C. 研究結果

#一次アンケート：

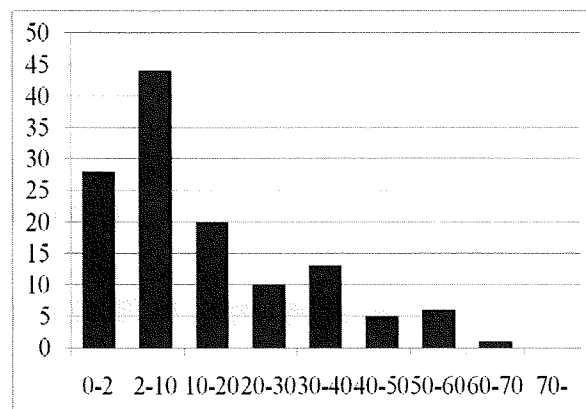
410 施設より回答。71名の登録があった。

#二次アンケート：

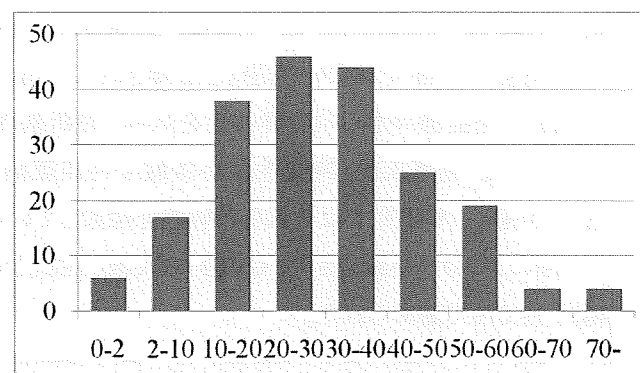
43 施設中 33 施設から回答 71 名中、56 名の二次情報を得た。これらの結果は厚生労働省原発性免疫不全症班実施した小児科を中心としたアンケート結果を得て、補完する形で使用した。

診断時の年齢、現在の年齢は以下の通りであった。

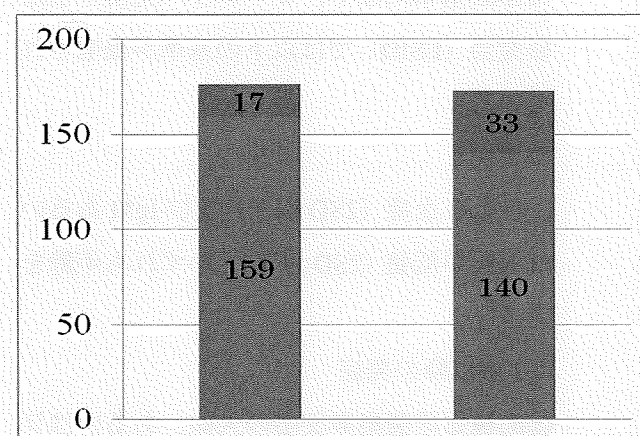
発症年齢



現在の年齢



また自己免疫疾患及び悪性腫瘍の合併頻度は以下の通りであった。



自己免疫疾患 悪性腫瘍

一方 40 歳以上に絞るとその頻度は自己免疫疾患 22.4%、悪性腫瘍 36.7%となった。

D. 考察 E. 結論

今回初めて CVID 特に成人を標的とした解析が行われた。

CVID における自己免疫症状の詳細な報告経過はなく、疾患亜群の症状や免疫学的データと連動し、今後の方針を決定していく。アンケート結果の報告状況は良好と考えられ、自己免疫症状の詳細に踏み込みたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Sugihara M, Hayashi T, Chino Y, **Matsumoto I**, Ito S, Sumida T. Inhibition of transforming growth factor- β signaling attenuates IL-18 plus IL-2-induced interstitial lung disease in mice. *Clin. Exp. Immunol.* in press
2. Umeda N, Ito S, Hayashi T, Goto D, **Matsumoto I**, Sumida T. A patient with rheumatoid arthritis who had a normal delivery under etanercept treatment. *Intern. Med* in press
3. Iwanami K, **Matsumoto I**, Yoshiga Y, Inoue A, Kondo Y, Yamamoto K, Tanaka Y, Minami R, Hayashi T, Goto D, Ito S, Nishimura Y, Sumida T. Altered peptide ligands inhibit arthritis induced by glucose-6-phosphate isomerase peptide.

Arthritis Res Ther. 11:R167, 2009.

4. Ito I, Kawasaki A, Ito S, Kondo Y, Sugihara M, Horikoshi M, Hayashi T, Goto D, **Matsumoto I**, Tsutsumi A, Takasaki Y, Hashimoto H, Matsuta K, Sumida T, Tsuchiya N. Replication of association between *FAM167A(C8orf13)-BLK* region and rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis.* in press.
5. Inoue A, **Matsumoto I**, Tanaka Y, Iwanami K, Kanamori A, Ochiai N, Goto D, Ito S, Sumida T. Tumor necrosis factor alpha-induced adipose-related protein expression in experimental arthritis and in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 11:R118, 2009.
6. Wang Y, Ito S, Chino Y, Goto D, **Matsumoto I**, Murata H, Tsutsumi A, Hayashi T, Uchida K, Usui J, Yamagata K, Sumida T. Laser Microdissection-based Analysis of Cytokine Balance in the Kidneys of Patients with Lupus Nephritis. *Clin. Exp. Immunol.* in press.
7. Segawa S, Goto D, Yoshiga Y, Hayashi T, **Matsumoto I**, Ito S, Sumida T. Low levels of soluble CD1d protein alters NKT cell function in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med.* 24: 481-486, 2009.

8. Kawaguchi Y, Nakamura Y, **Matsumoto I**, Nishimagi E, Kamatani N, Satoh T, Kuwana M, Sumida T, Hara M. Muscarinic-3 acetylcholine receptor autoantibody in patients with systemic sclerosis: contribution to severe gastrointestinal tract dysmotility *Ann Rheum Dis*. **68**:710-714,2009.
9. Tsutsumi A, Kobayashi T, Ito S, Goto D, **Matsumoto I**, Yoshie H, Sumida T. Mannose binding lectin gene polymorphisms and the severity of chronic periodontitis. *Jap.J.Clin.Immunol* **32**:48-52,2009.
10. Horikoshi M, Ito S, Ishikawa M, Umeda N, Kondo Y, Tsuboi H, Hayashi T, Goto D, **Matsumoto I**, Sumida T. Efficacy of mizoribine pulse therapy in patients with rheumatoid arthritis who show reduced or insufficient response to infliximab. *Mod Rheumatol* **19**:229-234, 2009.
11. Suzuki T, Ito S, Handa S, Kose K, Okamoto Y, Minami M, Hayashi T, Goto D, **Matsumoto I**, Sumida T. A new low-field extremity magnetic resonance imaging and proposed compact MRI score- Evaluation of anti-tumor necrosis factor biologics on rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* **19**:358-365, 2009.
12. Kondo Y, Ito S, Ohi Y, Satou H, Hiraoka T, Tsuboi H, Sugihara M, Hayashi T, Goto D, **Matsumoto I**, Sumida T. A case of atypical Cogan's Syndrome with aortitis. *Intern. Med* **48**:1093-1097,2009.
13. Wakamatsu E, **Matsumoto I**, Yoshiga Y, Hayashi T, Goto D, Ito S, Sumida T. Altered peptide ligands regulate type II collagen-induced arthritis in mice. *Mod Rheumatol* **19**:366-371, 2009.
14. Tanaka-Watanabe Y, **Matsumoto I**, Iwanami K, Inoue A, Goto D, Ito S, Tsutsumi A, Sumida T. B cell play crucial role as antigen presenting cells and collaborating with inflammatory cytokines in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *Clin Exp Immunol*. **155**: 285-294, 2009.
15. Ito I, Kawasaki A, Ito S, Hayashi T, Goto D, **Matsumoto I**, Tsutsumi A, Hom G, Graham RR, Takasaki Y, Hashimoto H, Ohashi J, Behrens TW, Sumida T, Tsuchiya N. Replication of the Association between C8orf13-BLK Region and Systemic Lupus Erythematosus in a Japanese Population. *Arthritis Rheum*. **60**:553-558, 2009.

著書

1. 松本功 免疫グロブリン・補体・免疫複合体 リウマチ・膠原病内科 クリニカ

- ルスタンダード 2009 in press.
2. 松本功 関節炎における自己抗体の病的意義 最新医学 in press.
 3. 松本功 生物学的製剤の開始を考慮するときの留意事項 日本内科学会雑誌 98:2518-2523, 2009.
 4. 松本功 新規関節リウマチ治療薬開発における動物モデルの有用性 リウマチ科 42: 574-581, 2009.
 5. 松本功 抗 GPI 抗体は関節リウマチの病態に関与しているか? 分子リウマチ治療 2(3) 105-109, 2009.
 6. 松本功、岩波慶一 GPI 誘導性関節炎における IL-6/IL-17 の役割 *Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology* 3:82-86, 2009.
 7. 井上明日香、松本功、岩波慶一、田中陽子、住田孝之 TNF α 依存性関節炎モデル (GPI 誘導性関節炎) における TNF α -induced adipose related protein (TIARP) 日本臨床免疫学会雑誌 32:15-19, 2009.
 8. 松本功、岩波慶一 自己免疫性関節炎における IL-6/IL-17 の役割 リウマチ科 41:96-103, 2009.

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許
特願 2008-022714 号 “関節炎誘発ペプチド”
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

成人型分類不能型免疫不全症の実態把握、亜群特定に基づく診断基準策定及び
病態解明に関する研究

伴性無ガンマグロブリン血症に合併した関節リウマチ症例からの考察に関する研究

研究分担者 田中敏郎 大阪大学大学院医学系研究科呼吸器・免疫アレルギー内科学講座 准教授

研究協力者 嶋 良仁 大阪大学大学院医学系研究科呼吸器・免疫アレルギー内科学講座 助教

研究要旨:

本研究班では、成人の分類不能型免疫不全症の病像調査を通じて、合併した自己免疫疾患の病態を探索することにより、自己免疫疾患の発症機序の究明や新たな治療法の開発を目指し、現在、詳細な2次調査を実施している。関節リウマチに対しては、その発症に B 細胞が関与することから、抗 CD20 抗体 (rituximab や ocrelizumab) が生物学的治療薬の一つとして期待されている。伴性無ガンマグロブリン血症に関節リウマチを合併した症例から、関節リウマチの発症病態の heterogeneity、今後の成人の分類不能型免疫不全症に伴う自己免疫疾患の病態の究明に関して考察した。

A. 研究目的

本研究班では、成人型分類不能型免疫不全症の患者数・病像調査を通じて、疾患の実態把握を行い、さらに免疫学的、分子生物学的検討から、疾患概念の整理・疾患本態の解明を目指している。分担研究者は、成人型分類不能型免疫不全症に合併する自己免疫疾患の病像とともに病態解析により、自己免疫疾患の原因究明とともに発症機序を踏まえた新たな治療法の開発を目的としている。現在、新たに登録された56名の分類不能型免疫不全症患者の病像に関して、2次調査中にある。本研究を進める上で、参

考となる症例（伴性無ガンマグロブリン血症に関節リウマチを合併）を経験し、今後の研究の展開に役立てたい。

B. 症例

36歳男性

診断名：伴性無ガンマグロブリン血症

家族歴：3人兄弟で、第2人も伴性無ガンマグロブリン血症

主訴：多発性関節炎

現病歴及び臨床経過：幼少時期より肺炎、中耳炎、副鼻腔炎を繰り返し、伴性無ガンマグロブリン血症と診断され、以後定期的