

2009 36 250A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

NEMO 異常症等難治性炎症性腸疾患の 実態調査と治療ガイドライン作成

平成 21 年度総括・分担研究報告書

平成 22 年（2010 年）3 月

研究代表者

小 野 寺 雅 史

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金
難病疾患克服研究事業
「NEMO 異常症等難治性炎症性腸疾患の実態調査に向けた研究」

目 次

I. 構成員名簿		3
II. 総括研究報告	研究代表者 小野寺雅史	... 5
III. 分担・協力研究報告		
1. NEMO 異常症の 1 例	小林 正夫	... 9
2. 外胚葉異形成免疫不全症に合併した炎症性腸疾患に対する TNF α 遮断療法	布井 博幸	... 14
3. 難治性炎症性腸疾患を合併した X-連鎖慢性肉芽腫症に対する臍帯血移植経験	有賀 正	... 18
4. 小児期炎症性腸疾患の実態と診療の動向	鍵本 聖一	... 22
5. 慢性肉芽腫症 (CGD) 腸炎の診断・治療のガイドライン	蓮井 正史	... 27
6. NEMO 異常症等難治性炎症性腸疾患の実態調査に向けた研究	小野寺雅史	... 29
7. データ解析及び保存	藤本純一郎	... 33
8. NEMO 異常症における遺伝子変異診断に関する研究	西小森隆太	... 35
9. 硫酸デキストラン誘発性炎症性腸疾患モデル動物の解析	荒谷 康昭	... 38
10. 臨床検体におけるガレクチンレベルの検討と臨床症状の相関について ～ガレクチン 9 を用いたマウス実験的腸炎に対する治療応用～	平島 光臣	... 41
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表		45
V. 班会議・第 17 回食細胞機能異常症研究会プログラム		55
VI. 添付資料：NEMO 異常症・慢性肉芽腫症の実態調査票		

I . 構成員名簿

平成21年度 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
NEMO異常症等難治性炎症性腸疾患の実態調査と治療ガイドライン作成
構 成 員 名 簿

氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者		
小野寺雅史	国立成育医療センター研究所 成育遺伝研究部	部 長
研究分担者		
布井 博幸	宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野	教 授
有賀 正	北海道大学大学院医学研究科小児科学分野	教 授
蓮井 正史	関西医科大学小児科	病院准教授
平島 光臣	香川大学医学部医学系研究科免疫病理学	教 授
小林 正夫	広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学	教 授
西小森隆太	京都大学大学院医学研究科発達小児科学	助 教
藤本純一郎	国立成育医療センター研究所	副 所 長
研究協力者		
鍵本 聖一	埼玉県立小児医療センター総合診療科	科長兼内科部長
荒谷 康昭	横浜市立大学国際総合科学研究院	教 授
	大学院国際総合科学研究科	
水上 智之	宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野	助 手
瀧本 哲也	国立成育医療センター研究所	室 長
	ラジオアイソトープ管理室	
河合 利尚	国立成育医療センター研究所	室 長
	遺伝子診断治療研究室	

Ⅱ．総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(難病疾患克服研究事業)
総括研究報告書

NEMO 異常症等難治性炎症性腸疾患の実態調査に向けた研究

主任研究者 小野寺雅史 国立成育医療センター研究所成育遺伝研究部部长

研究要旨

NF- κ B への必須なシグナル伝達分子である NEMO (NF- κ B essential modulator) は、2000 年、外胚葉形成不全を伴う免疫不全症の原因遺伝子として同定され、その約 2 割で炎症性腸疾患を併発する。現在、全世界で 100 名を超す NEMO 異常症の症例が報告されているが、我が国においては十余名を数えるのみである。このため、その病態は不明であり、治療方針等は確立されていない。本研究は NEMO 異常症ならびに同様の炎症性腸炎を呈する慢性肉芽腫症 (CGD) の実態調査を行うことで、その治療ガイドラインを策定することを目的としている。本年度は、1) NEMO 異常症ならびに CGD に関する臨床研究、2) 小児炎症性腸疾患の実態とその発症機序に関する基礎的研究、3) アンケート調査を含むデータ管理体制の構築、などを行った。今後は、これら研究を展開し、NEMO 異常症に対し有効で安全な治療法を確立していきたいと考えている。

分担研究者・所属機関・職名

布井 博幸

宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野・教授

有賀 正

北海道大学大学院医学研究科小児科学分野・教授

蓮井 正史

関西医科大学小児科・病院准教授

平島 光臣

香川大学医学部医学系研究科免疫病理学・教授

小林 正夫

広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学・教授

西小森隆太

京都大学大学院医学研究科発達小児科学・助教

藤本純一郎

国立成育医療センター研究所・副所長

その病態に関する研究ならびに同様の炎症性腸炎を呈する慢性肉芽腫症に関しての調査を行い、これら自然免疫疾患に伴う炎症性腸炎の治療ガイドラインを策定することを目的とする。

B. 研究方法と結果

1. NEMO 異常症と CGD に関する臨床報告

1) NEMO 異常症の臨床報告 1

12 歳男児。幼少期より重度の感染症を繰り返し、歯芽の欠損を認めたが、頭髮、爪、汗腺等の外胚葉異常は認めなかった。遺伝子検査で、*IKBK*G のエクソン 7 に splice mutation (769-1 G>C) を認め、FACS にて CD19⁺CD27⁺メモリー B 細胞の減少を認めた。肺炎球菌や麻疹に対する特異抗体は陰性であった(小林)。

2) NEMO 異常症の臨床報告 2

11 歳男児。生後 2 ヶ月目より水痘、髄膜炎、難治性下痢を発症し、4 歳頃より閉塞性細気管支炎、5 歳頃より多関節炎を認め、PSL、CyA、MTX を投与されていた。遺伝子検査で *IKBK*G 遺伝子の変異 (G505C, A169P) が同定された。難治性炎症性腸炎に関しては、複数の薬剤が抵抗性を示し、最終的に抗 TNF α 抗体製剤(インフリキシマブ)投与にて緩解を見た(布井)。

3) CGD 腸炎の造血幹細胞移植例

9 歳男児。生後 6 ヶ月目より化膿性リンパ節炎、10 ヶ月目より肛門周囲膿瘍、肝膿瘍を認め、遺伝子解析より、*CYBB* のイントロン 5 への一塩基挿入に

A. 研究目的

外胚葉形成不全免疫不全症は、NF- κ B シグナル低下により発症する難治性疾患で、X 連鎖型の遺伝形式をとる NEMO (NF- κ B essential modulator) 異常症がその主体をなす。臨床症状として、歯芽の形成不全や粗な毛髪などの外胚葉異常、自然免疫系の異常を主体とする易感染性ならびに難治性の炎症性腸炎などが上げられるが、その実態は報告例が少ないこともあり不明のままである。

本研究では、NEMO 異常症の実態調査を始め、

よる splice mutation と診断された。治療は抗菌剤と INF- γ であったが、39°C の発熱と血性水様便を呈し入院した。ステロイド増量にて経過を観察したが、アスペルギルス等と思われる肺炎を起こし、コントロール不可能とのことで一座不一致の臍帯血移植を行った。結果、前処置中に炎症性腸炎は軽快し、移植後のキメリズムは 100% ドナータイプで、腸炎等の臨床症状も安定している(有賀)。

2. 炎症性腸炎の実態とガイドラインの作成

1) 本邦における小児炎症性腸炎の実態調査

小児のクローン病(CD)、潰瘍性大腸炎(UC)に関して、我が国の実態調査を行ったところ、両疾患において男女差や家族内発症を認めなかった。CDに関して抗TNF α 抗体製剤(インフリキシマブ)の使用は 4 例で、その効果は短期間であった。UCでCyAを使用した症例のうち60%はその効果が短期間で、最終的には大腸切除等に至り、長期の緩解は得られなかった(鍵本)。

2) 治療ガイドラインの作成

NEMO 異常症、CGD 腸炎に対する治療ガイドラインの作成に向け、全国医療機関へのハガキによるアンケート調査、免疫不全関連医療機関における症例の掘り起こしの依頼、詳細な実態調査に向けた二次調査票の作成等を行った。一次アンケート調査では、1196 施設中 612 施設より回答を得、掘り起こし作業と合わせて、我が国において NEMO 異常症は 17 症例、CGD 腸炎は 40~50 症例と判断した(蓮井、小野寺)。

3) データ管理とデータベース作成

ハガキによる一次アンケート調査ならびに詳細な実態を解析する二次調査票を作成した。データ管理に関しては、国立成育医療センター内の臨床研究センターに担当者を配置し、支援部門として対応した。また、データベースの作成に関しては、小児がんの検体保存システムと類似のシステムの構築の準備を行った(藤本)

3. 遺伝子機能解析と病態解析

1) NEMO 異常症の遺伝子変異機能解析

NEMO 欠損ラット由来線維芽細胞株N1を用い、変異 NEMO 遺伝子の機能を解析する complementation assay 系を樹立した。これら細胞を LPS にて刺激した後、ルシフェラーゼレポーターにて NF- κ B 活性を測定したところ、既存の NEMO 変異遺伝子では正常遺伝子の 3~11%低下していた。このことから、本 assay が NEMO 遺伝

子異常の機能アッセイとして利用できることが分かった(西小森)。

2) 硫酸デキストラン誘発炎症性腸疾患モデル

NEMO 異常症ならびに CGD 腸炎の病態を解析するため、硫酸デキストランにより誘発される炎症性腸炎モデルマウスを作製した。8~14 日目間、2%硫酸デキストラン水を自由飲水させたマウスの腸管組織には、好中球とマクロファージが多数集積し、これら細胞がマトロプロテアーゼ(MMP-9)を多量に産出していることがわかった。また、炎症誘発に関わる食細胞由来活性酸素の影響を個体レベルで調べるため、CYBB 遺伝子欠損マウスの病態を調べたところ、正常マウスより症状が悪化していることが分かった(荒谷)。

3) ガレクチン 9 を用いたマウス実験的腸炎

ガレクチン 9 は感染症などのマスター制御因子として機能することが報告され、NEMO 異常症など炎症性腸炎を発症する疾患の病態と血漿ガラクトシン 9 値の相関を検討する。同時に病理組織を用いた解析も行う(平島)

C. 考 察

NEMO 異常症の原因遺伝子は inhibitor of kappa B kinase γ (IKBK γ)であり、一般に X 連鎖型の遺伝型式をとり、女兒での発症は極めて稀である。ただ、一方の NEMO 遺伝子が完全に欠失した女兒では優性遺伝として色素失調症(Bloch-Sulzberger 症候群)を発症する。また、IKBK γ が NF- κ B の上流遺伝子であることから、NEMO 異常により NF- κ B シグナルが障害され、様々な臨床症状を呈する。このため NEMO 異常症の診断は困難で、我が国ではいまだ 10 余名の患者診断にしか至っていない。

本研究では、全国の 1196 の小児関連医療機関にハガキによるアンケート調査を行い、612 施設より回答を得た。その結果、外胚葉異常があるがいまだ診断に至っていない症例が多数あることが判明した。また、難治性腸炎も伴っている症例も存在することから、より詳細な調査を進めることで本邦の NEMO 異常症の実態が明らかになると思われる。

NEMO 異常症の特徴的な臨床症状として、難治性の炎症性腸炎が上げられる。NEMO 異常症を含め自然免疫異常により発症する炎症性腸炎の発症機序には不明な点が多いが、現在、その発症原因として T 細胞を含めた免疫系の関与が示唆されている。NEMO 欠損マウスを用いた実験から TNF の関与が示唆され、また、患者例において

も復帰変異(revertant)による免疫能の獲得が報告されており、これら免疫能を獲得した T、B、NK 細胞が炎症性サイトカインを分泌している可能性がある。実際、難治性炎症性腸炎を呈した NEMO 異常症患者に対する抗 TNF α 抗体の著効は NEMO 異常症に TNF が大きく関与していることが推察できる。

慢性肉芽腫症は、NEMO 異常症と同様、自然免疫異常に分類される免疫不全症であるが、NEMO 異常症に類似する炎症性腸炎を発症する。これら難治性腸炎に対する治療法としてメサラミンのようなアミノサリチル酸やステロイドが考えられるが、免疫不全に対するステロイドの投与は感染症を増悪する可能性があり、その治療の選択は苦慮する。その発症機序は、NEMO 異常症同様、不明な点が多いが、その発症機序は単に腸管における感染症の遷延が原因ではなく、T 細胞を含めた獲得両免疫系も関与していると考えられおり、特に、IDO-キヌレリン系が関与する DC-T 細胞系の異常が原因と示唆されている。今後はマウスモデル等を用いた詳細な解析にてその病因が明らかにされ、その結果、新たな治療法が生み出される可能性がある。今後も NEMO 異常症、CGD 腸炎の治療経験を積み重ね、その臨床結果と基礎データを組み合わせることで有効な治療法が確立できるものと信じている。

D. 結 論

NEMO 異常症の実態解明ならびにその有効な治療法の確立に向け、以下のような研究を行った。

1. NEMO 異常症と CGD に関する臨床報告
2. 我が国の炎症性腸炎の実態調査と治療ガイドラインの作成に向けた準備
3. NEMO 異常症の遺伝子機能解析とその病態解析

今後は全国の NEMO 異常症と CGD 腸炎の実態調査を行い、そのデータを集積することで NEMO 異常症を含む自然免疫異常による炎症性腸炎の治療のガイドラインを作成したと考えている。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

研究成果刊行一覧表を参照

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ. 分担・協力研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難病疾患克服研究事業）

分担研究報告書

NEMO 異常症の 1 例

研究分担者 小林 正夫

広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学 教授

研究要旨

X 連鎖性外胚葉形成不全免疫不全症候群 (XL-EDA-ID、NEMO 異常症) は皮膚、汗腺、歯などの外胚葉異常に免疫不全を合併するまれな疾患であり、NF- κ B の活性に重要な役割を担う NEMO に異常が認められる。本研究で我々は、XL-EDA-ID の患者において *IKBKG* のイントロン 6 の領域にヘミ接合性新規遺伝子変異 769-1 G>C (IVS6-1 G>C) を同定した。本変異は、splice-acceptor site に存在し、患者では splicing に異常があることが予想された。患者は肺炎球菌による重症感染を反復していたが、肺炎球菌に対する特異的抗体の産生は認められなかった。その他麻疹、ムンプス、ポリオに対する特異的抗体の産生は認められなかった。また患者ではメモリー B 細胞の低下が認められた。今後免疫異常に関する詳細な機能解析をおこない、NEMO 異常症の幅広い臨床症状の一端を明らかにする必要がある。

研究協力者

唐川 修平

溝口 洋子

岡田 賢

広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学

れるが、個々の症例によってその程度が異なっている。

われわれは、歯牙に異常を認め肺炎球菌感染を繰り返した患者に対し遺伝的解析を行い、XL-EDA-ID と診断した。本研究では、この患者における免疫学的特徴を解明することを目的とする。

A. 研究目的

X 連鎖性外胚葉形成不全免疫不全症候群 (XL-EDA-ID) は、歯牙欠損、錐体状歯、粗な頭髮、発汗低下などの外胚葉形成不全と免疫不全を呈するまれな疾患である。本症の原因として、NF- κ B の活性に重要な役割を演じている NEMO タンパクの責任遺伝子である *IKBKG* に異常があることが判明している。この疾患の免疫学的特徴として、免疫グロブリンの低下、特異的抗体産生不全、NK 細胞活性の低下などが認めら

B. 研究方法

1) 症例

症例は 12 歳の男児で、幼少期より化膿性髄膜炎 3 回、急性膵炎 2 回、化膿性膝関節炎、骨髓炎、蜂窩織炎など重症細菌性感染を繰り返し発症していた。これらの起因菌の多くは肺炎球菌であった。また麻疹ワクチン接種後にもかかわらず麻疹に罹患した。軽度の知能低下 (IQ 93) を呈していた。身

体所見としては、永久歯が7本欠損しており一部が錐体状歯であったが、頭髮、爪、汗腺などに異常は認めなかった。解析においては、本人および家族よりインフォームドコンセントを得た。

2) シーケンス

患者末梢血より cDNA を抽出し、*IKBK*G をシーケンスした。cDNA の解析でエクソン7における *splicing* の異常が疑われたため、患者末梢血より DNA を抽出し、エクソン7とその近傍のイントロンをシーケンスした。

3) フローサイトメトリー

CD19⁺CD27⁺メモリーB細胞の測定を行った。

C. 研究結果

1) 血液免疫学的検査

白血球数とその分類、またリンパ球分画に異常はなく、IgGなどの免疫グロブリンや補体にも異常は認めなかった(表1)。IgG2およびIgG4は軽度低下していた。肺炎球菌特異的抗体および麻疹抗体はそれぞれ感染の既往があるにもかかわらず陰性であった。さらにワクチン接種の既往にもかかわらずポリオ、ムンプス、日本脳炎の特異抗体は産生されていなかった。しかし風疹、サイトメガロ、EB、水痘帯状疱疹ウイルスなどに対する抗体は正常に上昇していた。PHA幼若化試験は正常であったがNK細胞活性は6%と低下していた。

2) シーケンス

DNA解析により、エクソン7の *splice-acceptor site* にヘミ接合性の新規遺伝子変異769-1 G>Cを同定した(図1)。cDNAの解析にて、本変異により *splicing*

に異常がおこると考えられた(図2)。

3) フローサイトメトリー

患者においてCD19⁺CD27⁺メモリーB細胞の減少がみられた。(図3)

D. 考察

XL-EDA-IDを発症した *IKBK*G の *splice-site mutation* の報告はいまのところ2例認める。1例は家族発症で変異は768+5 G>Aであり、exon4-6の欠失のため胎生致死や乳児期早期の死亡をおこしている。もう1例は1056-1 G>Aであり、WTのNEMOも存在し、外胚葉形成不全がなく、免疫不全のみ呈していた。このように *IKBK*G の変異の場所や種類により疾患の表現型が大きく異なることがXL-EDA-IDの特徴といえる。自験例では exon7 の *splice-acceptor site* の *mutation* によりさまざまなタイプの *mutant mRNA* が産生されNEMOタンパクの低下にいたったのではないかと推測された。

XL-EDA-IDに自己免疫性疾患が合併する割合は約25%であり、そのうち80%が炎症性腸疾患である。自験例では幸いにも炎症性腸疾患の合併は現時点では認めていないが、慎重な経過観察が必要と思われる。

自験例の免疫学的特徴として、肺炎球菌に対して易感染性であること、また麻疹の予防接種を受けた後に麻疹に罹患し、さらに麻疹に罹患したにも関わらず、麻疹特異的抗体の産生が認められなかったことがあげられる。しかし風疹特異的抗体の産生は正常に認められた。病原体に特異的な抗体産生不全が生じる理由は明らかでないが、メモリーB細胞の低下や病原特異的抗体産生におけるNEMOの関与が推測される。

今後、より詳細な解析を行う予定である。

E. 結論

XL·EDA·ID の新規遺伝子変異を同定した。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 学会発表

A novel splicing mutation of NEMO with X-linked ectodermal dysplasia with immunodeficiency. Karakawa S, Okada S, Tumura M, Mizoguchi Y, Kawai T, Nishikomori R, Yasunaga S, Takihara Y, Kobayashi M: 51st American Society of Hematology Annual Meeting, December 5-8, 2009

Effective hematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning for patients with chronic granulomatous disease. Mizoguchi Y, Miki M, Kajiume T, Nakamura K, Kawaguchi H, Sato T, Kobayashi M: 51st American Society of Hematology Annual Meeting, December 5-8, 2009

Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Reduced Intensity Regimens in Patients with Severe Congenital Neutropenia without Malignant Transformation. Kobayashi Y, Nakamura K, Sato T, Kobayashi M: 51st American Society of Hematology Annual Meeting, December 5-8, 2009
新規 NEMO 遺伝子変異を認めた外胚葉形

成不全免疫不全症候群の解析

唐川修平 岡田賢 溝口洋子 津村弥来
小林正夫 河合朋樹 西小森隆太

第 71 回日本血液学会学術集会 2009 年 10 月 23-25 日

2. 論文発表

Nakamura K, Miki M, Karakawa S, Sato T, Kobayashi M: Deficiency of regulatory T cells in children with autoimmune neutropenia. British Journal of Haematology, 145: 642-647, 2009.

Miki M, Ono A, Kawamura A, Miyagawa S, Onodera R, Kurita E, Hiraoka A, Hidaka F, Mizukami T, Nunoi H, Kobayashi M: Successful bone marrow transplantation in a patient with chronic granulomatous disease complicated by serious infections using nonmyeloablative conditioning. Pediatrics International 51: 838-841, 2009.

Hara K, Kajiume T, Kondo T, Sera Y, Kawaguchi H, Kobayashi M: Respiratory complications after haematopoietic stem cell transplantation in a patient with chronic granulomatous disease. Transfusion Medicine 19: 105-108, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

参考文献

Doffinger R, Smahi A, Bessia C, et al. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by

impaired NF-kappaB signaling. *Nat Genet.* 2001;27:277-285.

Fusco F, Pescatore A, Bal E, et al. Alterations of the IKBKG locus and diseases: an update and a report of 13 novel mutations. *Hum Mutat.* 2008;29:595-604.

Orange JS, Levy O, Brodeur SR, et al. Human nuclear factor kappa B essential modulator mutation can result in immunodeficiency without ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:650-656.

Orstavik KH, Kristiansen M, Knudsen GP, et al. Novel splicing mutation in the NEMO (IKK-gamma) gene with severe immunodeficiency and heterogeneity of X-chromosome inactivation. *Am J Med Genet A.* 2006;140:31-39.

Eric P. Hansen, Linda Monaco-Shawver et al. Hypomorphic NEMO mutation database and reconstitution system identifies phenotypic and immunologic diversity. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122:1169-1177

图 1 DNA analysis

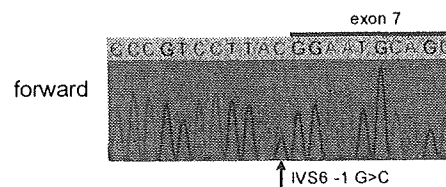


图 2 cDNA analysis

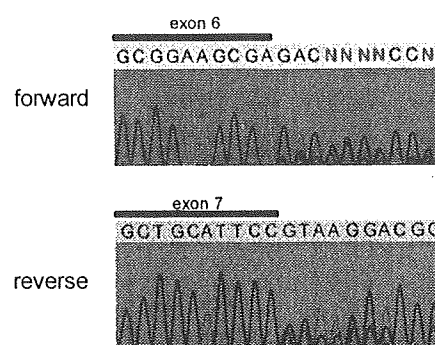


图 3 memory B cells

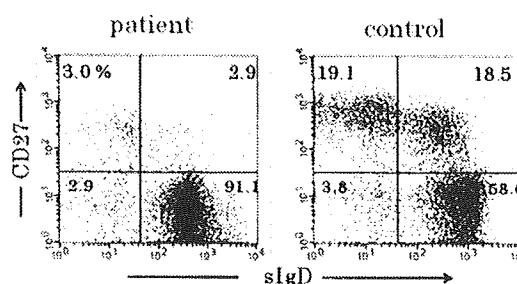


表 1 laboratory date

<u>leukocyte fraction</u>			<u>immunobiochemistry</u>			<u>specific antibody</u>		
WBC	5390	/ml	IgG	966	mg/dl	S. pneumonia	negative	(negative)
neut	19	%	IgA	292	mg/dl	Measles (HI)	< 8	(< 8)
Ly	69	%	IgM	76	mg/dl	Rubella IgG (EIA)	> 128	(< 2)
Mo	4	%	IgE	54	mg/dl	VZV IgG (FA)	40	(< 10)
Eo	7	%	IgG1	566	(423 - 1080)	Mumps	< 2	(< 2)
<u>lymphocyte fraction</u>			IgG2	242	(265 - 931)	JEV (CF)	< 4	(< 4)
CD3	72	%	IgG3	32	(5 - 121)	CMV IgG (CF)	20	(< 4)
CD19	5	%	IgG4	< 3	(4 - 108)	EBV VCA IgG	20	(< 10)
CD16/56	21	%	CH50	31.2	U/ml	VCA IgM	< 10	(< 10)
CD3/4	52	%	C3	97	mg/dl	EBNA	< 10	(< 10)
CD3/8	26	%	C4	19	mg/dl	Polio type 1,2,3	< 4	(< 4)
<u>NK cell activity</u>			6 % (15 - 40)			VZV: varicella-zoster virus		
<u>Lymphocyte transformation test</u>			positive			JEV: Japan encephalitis virus		

外胚葉異形成免疫不全症に合併した炎症性腸疾患に対する TNF α 遮断療法

研究分担者 布井 博幸 (宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野 教授)
研究協力者 水上 智之 (宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野)
田原 良博 (宮崎大学医学部内科学講座消化器血液学分野)
西小森 隆太 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)
仲瀬 裕志 (京都大学大学院医学研究科消化器内科学)

研究要旨

NEMO 変異により発症する外胚葉異形成免疫不全症では、約 2 割に炎症性腸疾患を合併する。副腎皮質ステロイド、免疫抑制剤併用にて十分改善が得られない炎症性腸疾患を合併した外胚葉異形成免疫不全症の 11 歳男児に対して、抗 TNF α 抗体製剤(インフリキシマブ)を投与したところ、症状および内視鏡所見の改善が得られ、TNF α 遮断療法は本病態に有効と考えられた。

A. 研究目的

外胚葉異形成免疫不全症 (Anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency: EDA-ID) は、歯牙欠損、粗な頭髮、発汗減少など外胚葉異形成所見と、免疫不全症候群を呈するまれな遺伝性疾患である。*IKBKG* 遺伝子にコードされている NEMO (Nuclear factor kappa-B essential modulator) は I κ B キナーゼ (IKK) 複合体構成蛋白であり、細胞膜表面の Toll 様受容体 (TLR) や IL-1 受容体、IL-18 受容体、TNF 受容体、CD40 受容体など様々な受容体からのシグナル伝達に関わる。NEMO 変異により I κ B リン酸化、そして NF κ B 活性化が阻害されるため、LPS や TNF α に対する反応性低下、B 細胞クラススイッチ異常が起こり、患者に高 IgM 症候群様の低ガンマグロブリン血症や莢膜保有菌、抗酸菌、細胞内寄生菌などに対する易感染性が起こるとされている。

患者の約 2 割は炎症性腸疾患を合併し、難治性下痢や成長障害を伴う[1]。炎症性腸疾患は抗生剤不応性で、副腎皮質ステロイドやメサラミンで改善することが報告されているが[1, 2]、われわれは副腎皮質ステロイドと

免疫抑制剤の併用療法でも軽快しない EDA-ID 症例を経験した。そこで Nenci らが示した、腸管上皮特異的に NEMO 遺伝子欠損を導入したマウス (NEMO^{IEC-KO}) に自然発症した炎症性腸疾患に対する TNF α 遮断療法の有用性に基いて[3]、抗 TNF α 抗体製剤のインフリキシマブを投与したところ、症状および大腸内視鏡所見の改善、併用薬の減量・中止効果を得ることができた。EDA-ID 患者にインフリキシマブを投与したのは未だ世界的にも報告がなく、臨床効果を確認できた貴重な症例である。今回文献的考察、免疫学的解析を加えて報告する。

B. 研究方法

【症例】 11 歳男児。

【主訴】 腹痛、頻回の下痢

【現病歴】 在胎 41 週 6 日出生。生直後より白血球増多 (3 万/ μ L) を指摘された。生後 2 ヶ月で水痘、生後 3 ヶ月で PRSP 髄膜炎、生後 5 ヶ月で帯状疱疹、難治性下痢あり。IFN γ 産生能低下を伴う細胞性免疫不全症として加療を受けていたが、以後も腸炎、肺炎などを反復

した。

4歳より器質化肺炎を伴う閉塞性細気管支炎(BOOP), 血管炎様紅斑, 5歳より高熱, 多関節炎を認め, プレドニゾロン, シクロスポリン(CyA), メソトレキセート(MTX)併用療法を行い, 症状軽快していた。症状, 経過より EDA-ID が疑われ, *IKBKG* 遺伝子変異同定(G505C, A169P)により, 診断確定した(京都大学小児科 西小森隆太先生による)。

8歳より間欠的腹痛, 頻回下痢, 痔瘻, 血管炎様紅斑が出現, ステロイドパルス療法にて一時軽快したが, その後も症状持続したため, 9歳で精査加療目的入院となる。

【家族歴】母が保因者

【入院時現症】身長 102.1cm(-5.8SD), 体重 19.4kg, 体温 36.9度, 血圧 120/70mmHg. 両下腿伸側に径7~8mmの有痛性褐色斑あり。咽頭発赤なし。頸部, 胸部, 腹部は異常なし。排便7~11回/日。

【検査結果】表1参照。

【大腸内視鏡】S状結腸に縦走傾向の潰瘍性病変あり。S状結腸~下行結腸移行部に炎症性ポリープ様病変あり。その中枢側は高度狭窄(図1)。

【生検組織病理】粘膜固有層の浮腫, 充血あり。びまん性の形質細胞浸潤と少数の好酸球を認めるが, 好中球は明らかでない。肉芽腫なし。陰窩炎なし。(図2)

【経過】大腸内視鏡で縦走潰瘍所見得られたことより Crohn 病合併と判断した。ステロイド, CyA, MTX 併用療法が無効で, 胸椎圧迫骨折所見が認められたため, 抗 TNF α 抗体製剤(インフリキシマブ)投与を検討した。

【解析方法】

患者末梢血リンパ球ポピュレーション: 抗 CD3, CD4, CD8, CD19 抗体(Becton Dickinson), 抗 HLA-DR 抗体(eBioscience)を用いて, FACScalibur, CellQuest (Becton Dickinson)で解析した

細胞内サイトカイン染色: 患者全血を Brefeldin A (Sigma) 存在下に ionomycin (Sigma) と phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma) で, 37°C で 4 時間刺激したのち解析した。染色には Cytofix/Cytoperm kit (Becton Dickinson) と, 抗 CD4, CD8, TNF α 抗体

(Becton Dickinson), 抗 IL-17A 抗体(eBioscience)を用いた。

生検病理組織の免疫染色は, 宮崎大学医学部附属病院病理部に依頼した。

【倫理面への配慮】インフリキシマブ投与については, 「外胚葉異形成免疫不全症に伴ったクローン病に対するインフリキシマブ療法」で宮崎大学医の倫理委員会に申請し承認を受けた後, 患者および家族に対して事前に十分な説明を行い, 文書にて同意を得た。

C. 結果

インフリキシマブ開始前の患者末梢血リンパ球では, T 細胞は CD8T 優位で, $\gamma\delta$ T 細胞(15.2%)割合の増加を認めた。活性化 T 細胞(CD3+/HLADR+)も 15.6%と増加していた。細胞内サイトカイン染色では, TNF α +CD4T が 72.59%(成人炎症性腸疾患患者: 40~70%)と高値であった(図3)。

患者大腸粘膜組織の免疫染色では, 粘膜固有層に CD79a 陽性細胞を多数, 次いで CD68, CD3(CD4 と CD8 は優位性なし)を認めたが, CD20 陽性細胞はほとんど認められなかった。T 細胞は一部粘膜上皮内への侵入が認められた(図2)。

インフリキシマブ 5mg/kg を 0, 2, 6 週に投与したところ, 6 週(3 回目)直前で TNF α +CD4T が 26.73%, TNF α +CD8T が 23.13%と, TNF α 陽性 T 細胞が大幅に減少した。以降 TNF α 陽性 T 細胞割合は漸増傾向を示した(図4)。

大腸内視鏡では, 3 回目(6 週)投与後に粘膜縦走潰瘍の改善, 粘膜発赤の軽減が認められた。腹痛の軽減および便回数減少も得られた。開始 14 ヶ月後にはポリープ病変と狭窄は残存するが, 粘膜発赤はほぼ消失した(図5)。

5 回目投与直前に *Campylobacter jejuni* 血流感染を伴う肺炎を併発したが, 他に重篤な副作用は認められず。ステロイドおよびシクロスポリン中止後も, 7~8 週毎のインフリキシマブ投与によって症状コントロールできている。

D. 考察

EDA-ID の 25%は腸炎や関節炎などの炎症性病態を伴うとされており、その大半では炎症性腸疾患が認められる[1]. 国内でも内視鏡所見によって Crohn 病や Behcet 病合併と診断された EDA-ID 症例がある.

一般に炎症性腸疾患小児では、腸組織に肉芽腫や深部陰窩炎、リンパ球優位の膿瘍などを認める[2]. しかし本患者では、形質細胞主体の単核球浸潤を認め、好中球浸潤はほとんど認めず、一般的な Crohn 病や潰瘍性大腸炎の組織とも異なっていた. 一方 E391X 変異の例では高度の好中球浸潤、表層陰窩炎、表層潰瘍、粘膜固有層の浮腫など急性炎症所見で[2], L153R も好中球優位の炎症である[4]. NEMO^{IEC-KO} マウスの腸炎でも、好中球、樹状細胞浸潤が先行し最終的に CD4T 細胞が浸潤する[3]ため、本患者はこれらとも異なっている. 本患者はステロイド、CyA、MTX 併用療法中の組織であり、E391X、L153R はステロイド、免疫抑制剤投与前の組織所見であることを考慮すると、治療状況の差異が組織所見に影響した可能性は否定できない.

2007 年に Nenci らは、NEMO^{IEC-KO} マウスでは炎症性腸疾患を自然発症するが、TNF α 受容体とのダブルノックアウトマウスでは発症抑制されることより、本病態に TNF α が関与することを示した[3]. 本患者の末梢血 TNF α 陽性 T 細胞がインフリキシマブによって著減し、症状も改善したことは、患者でも病態に TNF α と TNF α 陽性 T 細胞が強く関与したことを示唆する. インフリキシマブ作用機序の一つは TNF α 産生細胞の傷害であり、Crohn 病では投与後に大腸 TNF α 陽性細胞の減少が観察される[5]. 本患者でも局所組織で同様に推移するか検討中である.

NEMO^{IEC-KO} マウスでは、腸上皮バリアは腸内細菌感染により破綻し、粘膜下の正常免疫細胞により炎症が惹起されと考えられているが、EDA-ID では白血球機能も損なわれ LPS に対する反応も著減している. 腸炎発症機序を説明するには、変異 NEMO の残存活性や、復帰変異(reversion)による免疫能獲得が考えられる. Nishikomori らは EDA-ID 症例の T, B, NK 細胞に reversion 細胞を確認し、reversion 細胞のサイトカイン産生能が増加していることを示した[6]. 本患者でも末梢

血中に reversion を起こした T 細胞が検出されている(西小森先生の解析による). 実際に腸炎局所で発症に関与しているのか検討を進めている.

今回 EDA-ID による難治性炎症性腸疾患に対してインフリキシマブを使用した. EDA-ID は細胞内寄生菌や抗酸菌に対する易感染性があり[1], TNF α 遮断によりこれが増悪する危険性がある. 本病態に対するインフリキシマブ投与は、その適応があるか症例ごとに十分慎重に判断すべきと考えられた.

E. 結論

EDA-ID に合併した難治性炎症性腸疾患に対して、抗 TNF α 製剤を投与したところ、症状および内視鏡所見の改善が得られ、本療法は有効であった.

参考文献

1. Hanson EP, et al. Hypomorphic nuclear factor-kappaB essential modulator mutation database and reconstitution system identifies phenotypic and immunologic diversity. *J Allergy Clin Immunol.* **122**:1169-77. 2008
2. Cheng LE, et al. Persistent systemic inflammation and atypical enterocolitis in patients with NEMO syndrome. *Clin Immunol.* **132**: 124-31. 2009
3. Nenci A, et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature.* **446**:557-61. 2007
4. Pai SY, et al. Allogeneic transplantation successfully corrects immune defects, but not susceptibility to colitis, in a patient with nuclear factor-kappaB essential modulator deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* **122**: 1113-18. 2008
5. Baert FJ, et al. Tumor necrosis factor α antibody (Infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology.* **116**: 22-28. 1999
6. Nishikomori R, et al. X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human

T-cell development and/or survival. Blood.
103:4565-72. 2004

G. 研究発表 <2009 年度論文>

1. Successful treatment of refractory donor lymphocyte infusion-induced immune-mediated pancytopenia with rituximab. Kato I, Umeda K, Awaya T, Yui Y, Niwa A, Fujino H, Matsubara H, Watanabe K, Heike T, Adachi N, Endo F, Mizukami T, Nunoi H, Nakahata T, Adachi S. Pediatr Blood Cancer. 2010;54(2):329-31.
2. Cytomegalovirus infection mimicking juvenile myelomonocytic leukemia showing hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony stimulating factor. Moritake H, Ikeda T, Manabe A, Kamimura S, Nunoi H. Pediatr Blood Cancer. 2009 ;53(7):1324-6.
3. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome and avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children. Kawachi S, Luong ST, Shigematsu M, Furuya H, Phung TT, Phan PH, Nunoi H, Nguyen LT, Suzuki K. J Infect Dis. 2009;200(4):510-5.

H. 知的財産圏の出現・登録状況、参考文献
なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

難治性炎症性腸疾患を合併した X-連鎖慢性肉芽腫症に対する臍帯血移植経験

研究分担者 有賀 正*、研究協力者 竹崎俊一郎**

北海道大学大学院医学研究科小児科学分野（*教授、**大学院生）

研究要旨

X-連鎖慢性肉芽腫症（X-CGD）で難治性の CGD 関連腸炎を合併した症例に対し、その根治的治療として臍帯血移植を実施した。完全キメラとなるとともに難治であった CGD 関連腸炎の治癒にも成功した。難治性の CGD 関連腸炎を合併した 症例の治療戦略の一つに臍帯血移植も選択肢の一つとなると思われた。

A. 研究目的

慢性肉芽腫症 (CGD) は、NADPH oxidase の障害に伴い引き起こされる食細胞機能不全症である。抗菌剤の進歩や IFN- γ 療法などによってある程度感染症のコントロールは可能となったが、CGD 関連腸炎を合併しステロイド薬を使用せざるをえない症例では、易感染性も懸念されるため十分な免疫抑制が困難である。そのため早期に根治療法を行う必要がある。現在、CGD の根治療法として造血幹細胞移植の成功例が報告されている。しかし CGD に対する造血幹細胞移植の成績は、他疾患に比べ劣っている。さらに移植ソースは同胞 HLA 一致ドナーの骨髓血が前提になっており、至適ドナーが限られてしまうなどの問題点が残っている。今回我々は難治性腸炎を合併した X-CGD 症例に対して至適ドナーが存在しなかつ

たため、非血縁者間臍帯血移植を行い、ナンジセイ CGD 腸炎の治療戦略として臍帯血移植が適するかどうかを検討した。

B. 研究方法

＜症例＞

9 歳男児。

家族歴は母 X-CGD キャリア、同胞 X-CGD。6 ヶ月時に化膿性リンパ節炎・10 ヶ月時に肛門周囲膿瘍・肝膿瘍を認めた。Dihydrorhodamine-123 を用いた FACS 解析にて活性酸素産生能の明らかな低下、また 7D5 抗体を用いた gp91phox の発現低下を認めた（図 1）。CYBB の遺伝子検索にてイントロン 5 の一塩基の変異を認め、スプライス変異を伴った X-CGD と診断した。その後はイトリゾール®、バクタ®の予防内服と IFN- γ の皮下注を行い、重症感染症を認めず経過した。6 歳時、39 度の発熱・血性水様

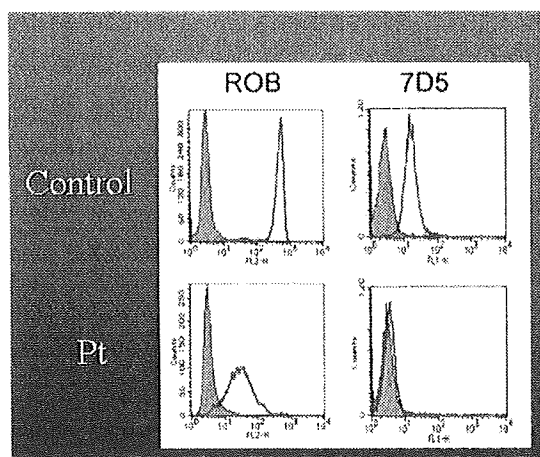


図 1

便が持続したため当科へ入院した。血液検査では WBC 7500/mcl (Neutro 58%, Lympho 27%), CRP 6.1、下部消化管内視鏡検査では横行結腸から回盲部にかけて縦配列を伴う腸管粘膜の敷石状の浮腫像を認めた (図 2)。

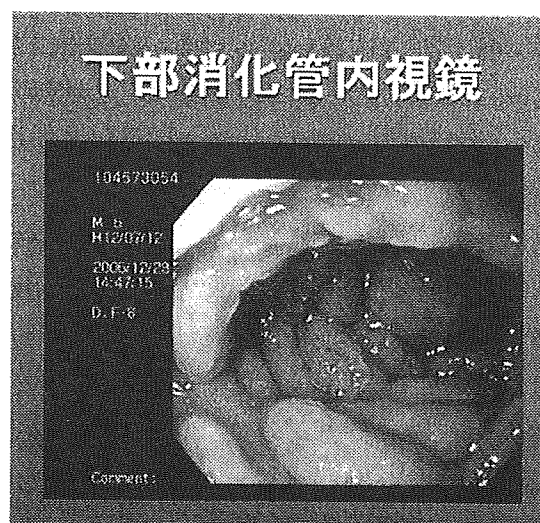


図 2

病理組織像は、HE 染色で多数の非乾酪性の肉芽腫像、リンパ球の浸潤、粘膜固有層の浮腫を認めた (図 3)。CGD 関連腸炎と診断し、ステロイド治療を開始したが、ステロイドの減量

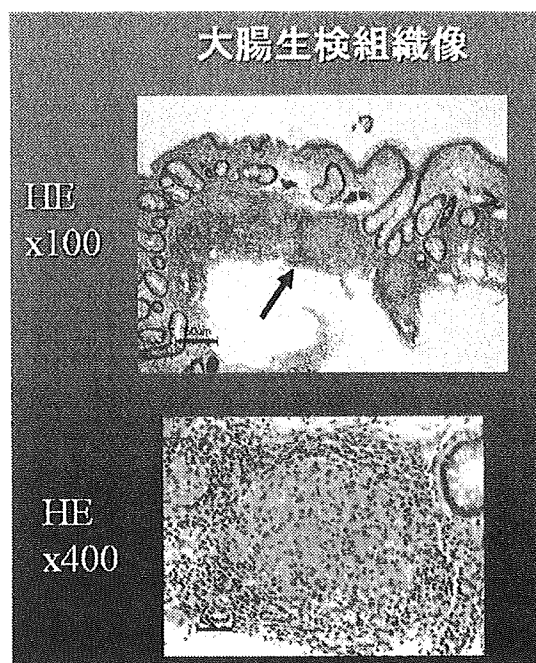


図 3

とともに発熱を認めステロイド薬からの離脱が困難であった。さらにアスペルギルスによると思われる肺炎像を認め、免疫抑制療法の継続が困難と判断し、造血幹細胞移植を行うこととした。しかし至適なドナーが存在しなかったため、1-locus mismatch の非血縁者間臍帯血移植を選択した。

C. 結果

前処置は感染・炎症が存在していたため RIST も考慮したが、生着不全を来とし、再移植をするリスクを考えて骨髓破壊的な BUS(16mg/kg)+CY+ALG、GVHD 予防は CsA+m-PSL とした。輸注 CD34 陽性細胞数は $1.1 \times 10^5/\text{kg}$ であった。GVHD によると思われる下痢(1500ml/day)を一過性に認めたが、MTX の投与で改善した。生着は