

23 日、day21, day39 に行った末梢血 FISH 法によるキメリズムは 100% ドナー型を確認した。その後下痢・血便は認めず、腸炎も治癒したと考えられた。Day110 に退院し、移植後 2 年たった現在も 100% ドナー型を維持している(図 4)。

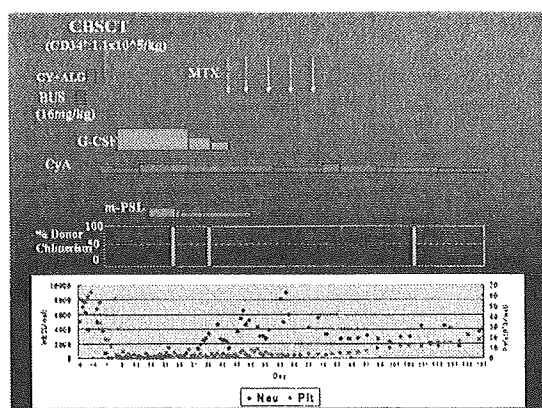


図 4

D. 考察

今回我々は CGD 腸炎のコントロールが困難となった X-CGD 症例に対して臍帯血移植を行い、腸炎の治癒に成功とドナー細胞の生着／完全キメラを維持することができた。CGD に対する移植ソースは同胞 HLA 一致ドナー、あるいは骨髄バンクの骨髄血が前提になっている。しかし、今回の経験から、臍帯血移植選択肢として加えるべきであると考えられた。難治性の CGD 関連腸炎はステロイドの使用などで一定の寛解は得られるが、ステロイド依存性となり長期の治療では感染症のリスクも見逃すことはできない。そのような症例に対しても臍帯血

移植が治療戦略の一つに加えられるべきだと思われる。

E. 結論

CGD 関連腸炎のコントロールに難渋した症例では臍帯血移植も前処置などの工夫で比較的有用な移植ソースとなりうる可能性があると考えられた。今後、症例の蓄積が待たれる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- Nakajima M, Yamada M, Yamaguchi K, Sakiyama Y, Oda A, Nelson DL, Yawaka Y, Ariga T. Possible application of flow cytometry for evaluation of the structure and functional status of WASP in peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Haematol* 87, 223-230, 2009
- Kida M, Fujioka H, Kosaka Y, Hayashi K, Sakiyama Y, Ariga T. The first confirmed case with C3 deficiency caused by compound heterozygous mutations in the *C3* gene; a new aspect of pathogenesis for C3 deficiency. *Blood Cell Mol. Dis.* 40. 410-413, 2008
- Maekawa K, Yamada M, Okura, Sato Y, Yamada Y, Nobuaki Kawamura N, Ariga T. X-linked agammaglobulinemia in a

10-year-old boy with a novel non-invariant splice-site mutation in *Btk* gene. Blood Cell Mol. Dis. in press.

有賀 正：アデノシンデアミナーゼ欠損症・プリンヌクレオチドホスホリラーゼ欠損症。小児内科増刊号 40 小児疾患診療のための病態生理 1 1318-1321, 2008

有賀 正：巻頭言 遺伝子治療の最近の動向：2008 年の ASGT と JSGT に参加して。北海道小児科医会会報 第24号 2-3, 2008

有賀 正：Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP). 日本臨床。広範囲血液・尿化学検査、免疫学検査 (1) 67, 505-507, 2009

有賀 正：原発性免疫不全症にみられる自己免疫病態。日本小児リウマチ学会雑誌 印刷中

有賀 正：原発性免疫不全症。遺伝子診療学：遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望。4。膠原病・アレルギー疾患に対する遺伝子治療。1) 原発性免疫不全症。印刷中。日本臨床

有賀 正；全身に見られる症候易感染症、今日の診断指針第六版 金澤一郎、永井良三、総編、医学書院、東京都 印刷中

有賀 正：原発性免疫不全症。今日の治療指針 2011 年度版。私は

こう治療している。印刷中 医学書院 東京都

2. 学会発表

有賀 正 Wiskott-Aldrich 症候群の診断・治療・トピックス。コーヒーブレイクセミナー I 第 60 回北日本小児科学会。9/14、2008、秋田

有賀 正 原発性免疫不全症に伴う自己免疫疾患。会長講演。第 18 回日本小児リウマチ学会。10/3-5、2008、札幌

有賀 正 Wiskott-Aldrich 症候群の病態・診断・治療・トピックス北海道免疫不全講演会 特別講演 (平成 21 年 7 月 24 日；札幌市)

有賀 正 原発性免疫不全症に対する遺伝子治療の現状と問題点教育講演 第 16 回日本遺伝子診療学会 (平成 21 年 7 月 31 日；札幌市)

有賀 正 日常診療と免疫不全症教育講演 第一回北海道男女共同参画会議 (平成 21 年 11 月 21 日；札幌市)

有賀 正 遺伝子治療について高校生メディカル講義 平成 21 年 12 月 5 日 札幌西高校

小児期炎症性腸疾患の実態と診療の動向

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部長

研究要旨：

NEMO 腸炎の対象として本邦小児の炎症性腸疾患の病像を自験例を中心に検討した。クローン病（CD）、潰瘍性大腸炎（UC）とも男女差を認めなかった。家族内発症はクローン病では 1 例（母親）、潰瘍性大腸炎では 2 例（父親、両親）であり、従来の報告より家族内発症が少なかった。免疫抑制療法である UC に対するシクロスポリン療法では 60%に短期的な緩解が得られたが、最終的に大腸切除至った者は 53%であり、その効果は短期的で、長期の緩解を得ることは困難であった。CD に対するインフリキシマブ 4 例に使用し、短期的には全例臨床的緩解に至ったが、永続的にものではなく、いずれも背景にある免疫学的異常の是正にまで効力を及ぼすことは困難と思われた。小児 IBD の治療の発展のためには、さらなる原疾患の免疫学的研究を要する。

A. 研究目的：

小児でも炎症性腸疾患（IBD）は増加傾向が顕著で、その対応が急がれている。一方、IBD は遺伝的素因¹⁾に加え、様々な 2 次的要因による炎症が腸管に惹起され、免疫調節の破たんがその一端を担うことが想起されている。NEMO 遺伝子異常は IBD 類似の腸炎を引き起こすことが知られており IBD との比較が重要であるが、その遺伝的、免疫学的背景は明らかではない。本研究では自験例を中心に、背景因子、病像、免疫抑制療法への反応について検討した。

B. 研究方法

自験例は潰瘍性大腸炎 41 例、クローン病 20 例であった。これらについて、年齢、性別、家族歴、重症度、罹患範囲、内視鏡像、治療への反応について検討した。自験例では重症 UC に対するシクロスポリン、白血球除去療法を検討し、手術、シクロスポリンの全国集計を行なった。一方、クローン病ではインフリキシマブの

使用例について検討した。一方、6 才未満発症の IBD について全国集計の結果も踏まえて検討した。

C. 結果

潰瘍性大腸炎：

- 1) 発症年齢：7 ヶ月～17 才、中央値 12 才
- 2) 性別：41 例中 24 例が女性であったが、有意ではなかった。
- 3) 家族歴：2 例（父親：UC、両親：UC）
- 4) 初発時重症度：全例が中等症以上であり、重症は 13 例で、成人での成績に比較して重症が多い傾向にあった。
- 5) 治療：大腸全摘に至った者が 8 例（19.5%）あり、白血球除去療法は 13 例に、シクロスポリン静注療法は施行、タクロリムス経口内服は 2 例に、アザチオプリン内服 例、6 MP 内服 1 例。
- 6) 予後：2 例の死亡（4.9%、大腸癌発症、多臓器不全）があった。手術後は 2 例に遷延性

の Pouchitis を認めたが、排便回数を除けば投薬も限定され、入院回数や食事、行動制限もとれて QOL の改善が認められた。手術に至らないものは緩解または軽症に経過しているが、14 例がステロイド依存症例であり、アザチオプリン（12 例）または 6MP（1 例）の内服を行っており、2 例では将来の大腸全摘が計画されている。

7) シクロスポリン (CsA) 静注療法の効果 (図 1)

日本小児 IBD 研究会参画施設を中心とした他施設研究で 25 例が集積され、平均年齢は 11.1 才、CsA 使用までの病期期間は平均 29 カ月であった。罹患範囲は 1 例を除き全結腸型で、劇症 6、重症 11、中等症 8 例であった。1 例を除き、2 週間以上のステロイド投与を行っており、劇症のため行ったものが 2、ステロイド抵抗例 17、ステロイドの副作用のため 2、QOL の低下によるものが 4 例であった。15 例（60%）で臨床的緩解が得られ、緩解が得られなかった 9 例のうち 8 例は大腸切除となった。しかし、一旦緩解に至った 15 例中 4 例はその後大腸切除を受けており、結局 CyA 投与例の 53% が手術に至っていた。経口 CaA で緩解を維持していた 1 例は大腸がんを発症し死亡した。

クローン病：

- 1) 発症年齢：2 週～16 才、中央値 13 才
- 2) 性別 21 例中男性が 11 例であった。
- 3) 家族歴が明らかであった者は母親が CD の 1 例のみ
- 4) 治療は栄養療法が主体であったが、薬物療法では 5ASA 製剤がほぼ前例に使用されており、CsA 2 例、インフリキシマブ使用 3 例、タクロリムス使用 1 例、手術 3 例、サリドマイドを 2 例に使用。
- 5) 予後：1 例が長期の栄養管理ののち死亡したが、他に死亡例はない。

6) インフリキシマブの影響：2002 年以前の発症 7 例では死亡 1、緩解に至らなかったり再燃を繰り返したりする例が多く、緩解維持が可能であったのは 1 例にであった。一方、2003 年以降ではインフリキシマブ使用は 4 例であり、全例一旦緩解に至ったが、うち緩解維持が出来た者は 1 例にとどまり、その他は Infusion reaction で投与中止に至った者 1、2 次無効（緩解維持のための間隔が短くなる）は 2 例にみとめられた。UC の小児例は成人と同様であるが、長期にステロイド剤を使用する治療は、成長、免疫機能、代謝に大きく影響するため、取り扱いに慎重に期しつつ、お行わなければならない。

D. 考案

小児 IBD においても遺伝、免疫の異常が指摘されており、これまでの報告では小児 IBD の家族発症は 5～30% に認められ、CD への関与が UC より強いとされ、また親子間に限れば片親では CD で 9.2%、UC で 6.2% の発症率であとためり、引き続き検討を要する。両親では IBD として 33% と高率に発症するとされている。クローン病の関連遺伝子である NOD2 の異常は本邦や東アジアでは認められず、欧米諸国との相違があることが知られているが、今回の検討ではそれぞれの関与は低かったものの、IBD 全体（62）3 例、4.9% が IBD を発症したことになり、本邦でも関与があるものと認められた。

UC に対するシクロスポリン治療は重症 UC について速やかかつ強力な効果を有することが知られている^{2,3)}が、全国集計では 60% の小児で緩解が得られており、それぞれ大腸切除が考慮される状況下で、差し迫った手術を回避するために有用であった、最終的に 53% が大腸切除に至っており、長期的な治癒効果や緩解維持効果は乏しいことが判明した。免疫異常によ

る炎症の抑制が病勢を抑える一方、効果は限定
であることが示されている。

クローン病に対する抗 TNF α 製剤であるイン
フリキシマブは、短期的には全例で緩解が得ら
れるという、著明な効果を示したが、Infusion
reaction 等の副反応が認められ、また、小児に
おいては次第に効力が薄れ、投与間隔の短縮や
等慮量の増大を余儀なくされることが認めら
れた。また、少数ではあるが、アザチオプリン
併用例での悪性リンパ腫の発症も報告され、併
用しないように強い勧告がなされている。

E. 結語

本邦小児の IBD は遺伝的素因を背景として、
起こる腸炎であり、男女差はなく、家族内発生
が 5% に認められた。UC, CD それぞれの代表
的な免疫抑制療法は短期的には有効であるが
長期的には病変を長期的な緩解や治癒に至る
例は多くなく、原疾患の背景にある免疫学的異
常の是正を得ることは困難であった。

F. 文献

1. McGred N and Cho JH Genetics of
Inflammatory Diseases. In Mamula P,
Markowitz JE and Baldassano RN eds.
Pediatric Inflammatory Bowel Disease.
Springer, 2008, pp.3-11
- 2.. Hyams J, Markowitz J, Lerer T, et al. The
natural history of corticosteroid therapy for
ulcerative colitis in children. Clin
Gastroenterol Hepatol 2006; 4:1118-1123
- 3.. Treem WR, Cohen J, Davis PM, et al.
Cyclosporine for the treatment of fulminant
ulcerative colitis in children. Immediate
response, long-term results, and impact on
surgery. Dis Colon Rectum 1995; 38:474-479
4. Castro M, Papadatou B, Ceriati E, et al. Role
of cyclosporin in preventing or delaying

colectomy in children with severe ulcerative
colitis. Langenbecks Arch Surg 2007;
392:161-164

G. 研究発表

1. 牛島高介, 内田恵一, 余田篤, 友政剛, 鍵
本聖一, 清水俊明, 田尻仁, 田原卓浩, 永
田智, 小林昭夫 本邦における小児期発症の
潰瘍性大腸炎の外科的治療の現状 日本小
児科学会雑誌 113:43-49, 2009
2. 鍵本聖一 【小児の便通異常 診断・治療・管
理の進歩】 下痢の薬物療法: 小児内科 41:
1697-1701, 2009
3. 田尻仁, 友政剛, 今野武津子ら 小児クロー
ン病に対するインフリキシマブ使用に関する
見解 日本小児科学会雑誌 113:1755-1757,
2009
4. 大場温子, 日根幸太郎, 後藤文洋, 友利久
哉, 荻野青空, 岩間達, 高野忠将, 関島俊
雄, 鍵本聖一 サイトメガロウイルスとヘリコバ
クターピロリ菌の感染を重複したメネトリエ病
の小児例: 埼玉県医学会雑誌
43:196-199, 2008
5. 鍵本聖一 【小児疾患診療のための病態生理】
消化器疾患 蛋白漏出性胃腸症: 小児内科
40:512-515, 2008

学会発表

1. 馬場洋介, 長田浩平, 岩間達, 関島俊雄,
鍵本聖一 Alagille 症候群患者の多彩な臨
床像と長期経過 日本小児栄養消化器肝臓
学会雑誌 23:87, 2009
2. 佐々木美香, 米沢俊一, 位田忍, 内田恵
一, 清水俊明, 鍵本聖一, 余田篤 本邦の
乳幼児期発症炎症性腸疾患(IBD)患者の臨
床的特長 多施設アンケート調査の報告(第

- 一報) 日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌
23:86,2009
3. 岩間達, 鍵本聖一, 馬場洋介 中等症及び重症潰瘍性大腸炎の緩解導入療法について 特にシクロスポリンと血球成分除去療法について 日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌 23:62,2009
 4. 鍵本聖一 炎症性腸疾患(IBD) 治療の進歩とQOL IBD 診療におけるQOL 日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌 23:45,2009
 5. 豊田茂, 河島尚志, 今野武津子, 香坂隆夫, 清水俊明, 米沢俊一, 鍵本聖一, 虻川大樹, 鎌形正一郎, 余田篤, 位田忍, 金子浩章, 望月貴博, 石丸由紀, 田尻仁, 友政剛 小児炎症性腸疾患におけるメサラジン(5-ASA)の使用実態 全国多施設調査 日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌 23: 16-23, 2009
 6. 岩間達, 森真理, 神岡哲治, 高野忠将, 関島俊雄, 鍵本聖一, 岸本宏志 栄養療法が奏効した乳児クローン病の1例: 日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌 23:50,2009
 7. Kagimoto S, Iwama I, Tajiri H, Kudo T, Abukawa D, Kaneko H, Tomomasa T, Nagata S, Yoden A, Kobayashi A. Outcome of Japanese pediatric patients having ulcerative colitis who were treated with cyclosporine A: A survey of the Japanese Society for Pediatric Inflammatory Bowel Disease. 10th Meeting of Asia Pan Pacific Pediatric Society of Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Seoul, Sep. 22-26, 2009

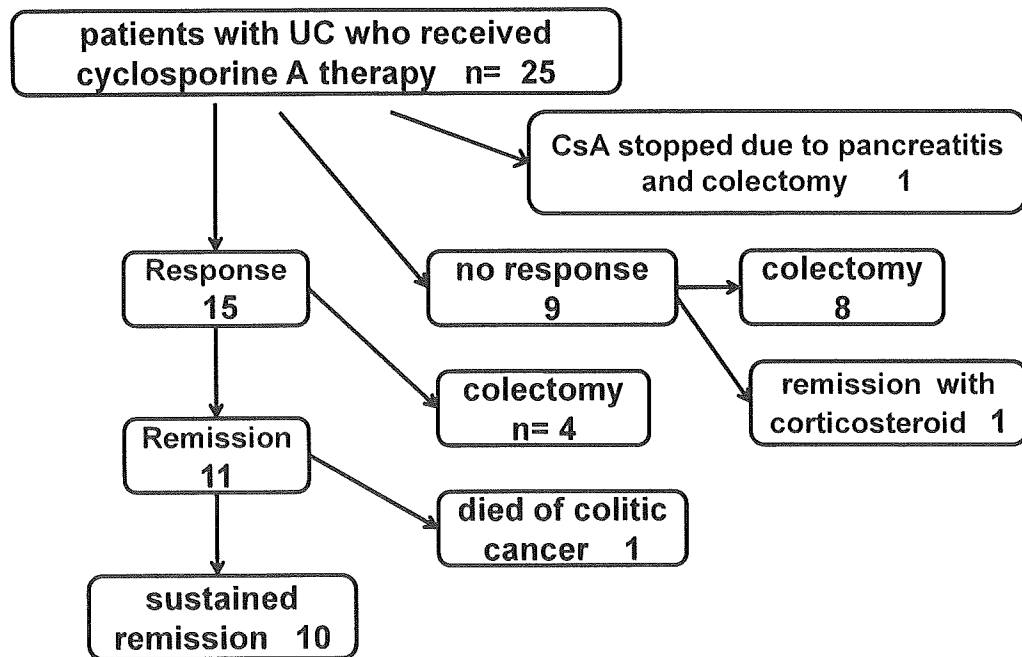


図 1 シクロスポリン使用例の予後

厚生労働科学研究費補助金
分担研究報告書

慢性肉芽腫症（CGD）腸炎の診断・治療のガイドライン作成

研究分担者 蓮井正史 関西医科大学小児科講師

研究要旨

慢性肉芽腫症患者の30-40%に合併するCGD腸炎の診断・治療については明確なコンセンサスが得られていない。

平成21年度に実施したアンケート結果を基に頻度、症状、検査所見、治療を集計し22年度は実際の診断・治療のガイドラインを作成する。

A. 研究目的

慢性肉芽腫症（chronic granulomatous disease:以下CGDと略す）は本邦の先天性免疫不全症候群の中で最も頻度の高い疾患である。好中球の殺菌機構に障害をきたすため出生後から細菌、真菌による重篤な感染症を繰り返す予後不良の疾患である。1980年代からST合剤の予防内服が実施され、生命予後は格段に改善された。しかし、腸炎（下痢、腹痛）がCGDの30～40%にみられ体重増加不良、成長障害をきたす場合も多くCGD 腸炎と呼ばれている。原因は不明であり、大腸内視鏡検査では潰瘍性大腸炎に類似した粘膜浮腫、易出血性、血管透見像の不良を呈する。その実態は周知されておらず漫然と抗菌薬を投与されている症例も多く、診断・治療について明確なコンセンサスも得られていない。

本邦でのCGD 腸炎の実態（頻度、症状、検査所見、治療）を明らかにし、治療ガイドラインを作成することを目的とする。

B. 研究方法

全国のCGD患者の主治医にアンケートを実施する。患者の通院先は以前に実施したアンケートなどの資料より把握している（Pediatric International 41:589-593, 1999）
（倫理面への配慮）

個人情報保護には十分配慮し、患者が特定できないようにイニシャルで記録し、データ処理も特定のコンピュータのみに保存し、外部に一切持ち出さない。

C. 研究結果

昨年、全国のCGD患者を診療している医療機関に1次アンケートを送付した。現在、より詳細な2次アンケートを送付する予定である。

D. 考察

2次アンケートの集計によりCGD腸炎の頻度、症状（好発年齢、CGDの遺伝形式による重症度など）その実態が明らかになると思われる。また現在、各施設が個々に実施しているCGD腸炎の診断・治療を統一する。

E. 結論

CGD腸炎の病態を明らかにし診断・治療を確立することはCGD患者の生命予後をさらに改善させる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaneko K, Tanaka S, Hasui M, Nozu K, Krol RP, Ijima K, Sugimoto K, Takemura T. A family with X-linked benign familial hematuria. Pediatric Nephrology 2010;25:545-548
- 2) Kaneko K, Hasui M, Hata A, Hata D, Nozu K. Focal segmental glomerulosclerosis in a boy with Dent-2 disease. Pediatric Nephrology 2010;25:781-782
- 3) Noda R, Takaya J, Hasui M, Araki K, Kaneko. Severe concurrent lung infection caused by legionella and mycoplasma in a 3-year-old patient with Down syndrome and tuberous sclerosis. Pediatrics

International 2009;51:413-414.

- 4) Kaneko K, Hasui M, Hatae K, So H, Katafuchi R. Change in C1q deposition in C1q nephrology. Pediatrics Nephrology 2009;24:1775
- 5) Hatano Y, Taniuchi S, Masuda M, Tsuji S, Ito T, Hasui M, Kobayashi Y, Kaneko K. Phagocytosis of heat-killed Staphylococcus aureus by eosinophils: Comparison with neutrophils. APMIS 2009;117:115-123
- 6) Iharada A, Kaneko K, Tsuji S, Hasui M, Kanda S, Nishiyama T. Increased nitric oxide production by T-and B-cells in idiopathic nephritic syndrome. Pediatric Nephrology 2009;24:1033-1038
- 7) Kaneko K, Taniguchi N, Tanabe Y, Nakano T, Hasui M, Nozu K. Oxidative imbalance in idiopathic renal hypouricemia. Pediatric Nephrology 2009;24:869-871

2. 学会発表

- 1) 縦隔肉芽腫を認めた慢性肉芽腫の1症例 ;
蓮井正史、辻章志、谷内昇一郎、金子一成 :
第41回日本小児感染症学会
- 2) CGDの初回感染症とST合剤の開始時期 ;
蓮井正史、辻章志、谷内昇一郎、金子一成 :
第17回食細胞機能異常症研究会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

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 異常症等難治性炎症性腸疾患の実態調査に向けた研究

研究分担者 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

研究要旨

NEMO は NF- κ B の上流に位置するシグナル伝達分子で、当遺伝子の異常により外胚葉異常や易感染性、難治性炎症性腸炎など多彩な臨床症状を呈する。ただ、臨床症状が多彩な上、同遺伝子の同定が 2000 年に入ってからであることから、いまだ確定診断に至った症例は十数例で、その実態は不明のままである。本研究では、1) 全国医療機関へのハガキによる一次アンケートの実施、2) 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、3) 詳細な実態調査に向けた二次調査票の作成、4) 当センター倫理委員会への二次調査の承認申請、4) 当センター内にデータ管理部門の設置等を行い、NEMO 異常症の実態を明らかにし、同時に、同様の炎症性腸炎を呈する慢性肉芽腫症の治療方針と比較検討することで NEMO 異常症に対する有効な治療法を確立し、治療ガイドラインの策定に役立てる。

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) 遺伝子異常がその主体をなす。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である。

本研究では、NEMO 異常症など外胚葉形成不全免疫不全症の調査を全国規模で行い、その実態を明らかにするとともに、同様の炎症性腸炎症状を呈する慢性肉芽腫症 (CGD) の実態調査を併行して行うことで自然免疫異常による腸炎の発症機序を明らかにし、その結果を踏まえた NEMO 異常症に対する「治療ガイドライン」を策定する。

B. 研究方法と結果

1) 一次アンケートの実施

インターネット等で選出した全国の小児医療機関 1196 施設にハガキによる一次アンケートを送付し、うち 612 施設よりアンケートに対する回答を得た。また、45 施設では NEMO 異常症あるいはそれに類似する症例を有しており、詳細な病態や臨床経過を把握する実態調査実施の了承を得た。

2) 症例の掘り起こし作業

広く NEMO 異常症に対する実態調査を行うため、主に小児免疫不全症を専門とする医師・研究者に個別で症例の掘り起こしを依頼し、上記、一次アンケートと合わせて、現在、確定診断に至った NEMO 異常症は 17 症例、慢性肉芽腫症は 40～50 症例であり、実態調査の準備を進めている。

3) 倫理委員会への申請

上記、確定診断に至っている NEMO 異常症ならびに CGD 腸炎の対する詳細な実態調査を行うために、平成 22 年 1 月 4 日付けで国立成育医療センター内に

ある倫理審査委員会に必要書類を提出し、同年3月10日にその実施に関する承認を得た。現在、同承認を基に分担研究者が所属する研究機関から実態調査に対する承認を得る準備を進めており、全ての倫理委員会にても承認が得られた段階で実態調査を開始する。

4) 当研究で得られたデータ管理

一次アンケートならびに今後行われる実態調査より得られるデータの管理・解析に向け、国立成育医療センター内に専属の担当者を置き、これらデータの管理・解析を進めている。

C. 考察

今回の一次アンケート等の結果から、現在、NEMO 異常症と確定診断に至っている症例以外にも複数の NEMO 異常症を疑わせる症例が存在することがわかった。NEMO 異常症は X 連鎖型の遺伝型式をとり、女児での発症は極めて稀であるが、一方の X 染色体 (Xq28) の NEMO 遺伝子が完全に欠失した女児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、NEMO が NF- κ B の上流遺伝子であることから、interleukin-1 receptor (IL-1)、IL-18、Toll like receptor (TRL)、TNF receptor family (TNFR、CD40、EDAR、RANK)、VEGF receptor III などのシグナルに影響を与え、臨床症状は多彩となる。このようなことから NEMO 異常症の診断は困難であるが、ただ、最近になって NEMO 遺伝子が同定され、今後は疑わしい症例に対する遺伝子診断を進めることで、より多くの NEMO 異常症を診断できると考えている。

NEMO 異常症に対する治療としては感染症に対するものと炎症性腸炎に対するものに分けられるが、いずれにおいても有効な治療法が確定しておらず、その選択に苦慮する。例えば、免疫不全による易感染性に対しては造血幹細胞移植、炎症性腸炎に対しては抗 TNF α 抗体の使用などがあるが、治療自体の副作用の問題もあり、今後も治療経験を積み重ねる

ことが重要であり、本研究がその一翼を担えば有効な治療ガイドラインの策定に向け、確かに一歩にあると確信している。

D. 結論

全国の NEMO 異常症の実態調査に向け、一次アンケートを含め患者の掘り起こしを行い、これら患者に対する詳細な実態調査を行うことでその病態を把握し、治療ガイドラインの策定を進めている。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyamoto N, Tanaka R, Shimura H, et al: Phosphodiesterase III inhibition promotes differentiation and survival of oligodendrocyte progenitors and enhances regeneration of ischemic white matter lesions in the adult mammalian brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 299-310, 2010.
- 2) Tamase A, Muraguchi T, Naka K, et al: Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17163-17168, 2009.
- 3) Sanada M, Suzuki T, Shih LY, et al: Gain-of-function of mutated c-Cbl tumour suppressor associated with myeloid neoplasms with 11q UPD. *Nature* 460: 904-908, 2009.
- 4) Okabe M, Otsu M, Ahn DH, et al: Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood* 114: 1764-1767, 2009.
- 5) Miyamoto N, Tanaka R, Zhang N et al: Crucial role for pCREB signaling in the differentiation and survival of neural progenitors under chronic cerebral

- hypoperfusion. *Neuroscience* 162: 525-536, 2009.
- 6) Horiuchi Y, Onodera M, Miyagawa Y, Sato B, Onda K, Katagiri YU, Okita H, Okada M, Otsu M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Kuratsuji T, Kiyokawa N.: Kinetics and effect of integrin expression in human CD34+ cells during MLV-derived retroviral transduction using a recombinant fibronectin for stem cell gene therapy. *Hum Gene Ther* 20: 777-783, 2009.
 - 7) Sogo T, Kawahara M, Ueda H, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Nagamune T : T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. *Cytokine* 46: 127-136, 2009.
 - 8) 小野寺雅史 造血幹細胞を標的とした遺伝子治療の開発 ゲノム医学 3943-46, 2009.
 - 9) 小野寺雅史 小児における遺伝子治療 小児科50 828-833,2009.
- degree of functional correction in granulocytes after gene therapy for X-CGD. XVIIth Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Hannover, Germany, 2009. 11.20-25.
- 4) Tadokoro K, Azuma N, Onodera M. A reciprocal regulation between PAX2 and PAX6. The 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, 2009.12.9-12.
 - 5) 小野寺雅史, How do we advance stem cell gene therapy in Japan? 第14回日本遺伝子治療学会総会,札幌,2008年6月12-14日.
 - 6) 小野寺雅史, 原発性免疫不全症に対する遺伝子治療, 第7回遺伝子治療シンポジウム, 大阪, 2009年1月30日.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. 学会発表

- 1) Kinetics and defect of integrin expression on human CD34+ cells during MLV-derived retroviral transduction with a recombinant fibronectin for stem cell gene therapy. Kinetics and defect of integrin expression on human CD34+ cells during MLV-derived retroviral transduction with a recombinant fibronectin for stem cell gene therapy. 第15回日本遺伝子治療学会, 吹田, 2009.7.9-11
- 2) Takeuchi Y, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H. Preclinical studies to improve the efficacy of stem cell gene therapy for X-CGD. XVth Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy. 2009. 9.11-12.
- 3) Takeuchi Y, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H. A threshold in expression levels of gp91phox transgene limits the

一次アンケートの内容と結果(1)

[illegible]

恒泰

面裏

＜アンケート方法と結果＞

1. インターネットにて全国の主な小児科を有する公立病院及び総合病院を選択
2. はがきによる一次調査を10月末に発送し、約1ヶ月間を回答期間とした。
3. 1196医療機関に発送し、612施設より回答を得、何らかの症例を有する45施設より2次調査の承諾を得た。
4. 現在、各地方別に回収率を解析中

研究要旨

炎症性腸炎を引き起こす NEMO (the nuclear factor kappa B essential modulator) 異常症や慢性肉芽腫等を対象として全国実態調査、遺伝子診断ならびに検体保存を推進することを目的とする。本年度は、予備調査票作成支援ならびにデータベース作成支援を行った。

A. 研究目的

炎症性腸炎を引き起こす難治性疾患の実態調査ならびに遺伝子検査を行い、我が国における実態を把握し、治療ガイドラインを作成する。

成育医療臨床研究センターが担当することを決めた。実務担当者としてデータマネジメント部門の責任者である瀧本哲也を定めて実務レベルの検討に入った。

B. 研究方法

1) 調査票作成支援

一次調査および二次調査に係る調査票ならびに計画書の作成を支援した。

2) データベース作成支援

成育医療臨床研究センターの支援部門が対応することとし打合せを行った。

3) 検体保存システム準備

小児がんの検体保存システムと類似のシステムを構築する準備を行った。

3) 検体保存システム準備

小児がんについては臨床研究グループと連携して中央診断システムと余剰検体保存システムを国立成育医療センター研究所内に構築済みである。本研究における検体保存も小児がんのシステムを活用する計画を立てた。このシステムの特徴は、データベース機能とそれに連動した匿名化番号発行機能と匿名化番号シール印刷機能を持つものである。本年度は、このシステムの中に NEMO 異常症用の検体保存用データベースドラフトを作成した。

C. 研究結果

1) 調査票作成支援

一次調査票作成について意見を述べた。また、より詳細な情報を収集する二次調査については、主任研究者と合同で研究計画書を作成し、国立成育医療センターの倫理委員会に申請し承認を受けた。

2) データベース作成支援

一次調査結果ならびに今後収集する二次調査結果のパソコン入力とデータベース構築については、国立成育医療センター内に設置されている

D. 考察

NEMO 異常症や慢性肉芽腫症など、炎症性腸炎を引き起こす難治性希少疾患に関する調査研究は国立成育医療センターの使命のひとつであり、体系的な情報収集と保存ならびにそれらの活用システムの整備が求められている。

本研究では、研究で得られた患者情報や検体情報をデータベース化し活用するためのシステム作りを担当した。この研究を推進するに当たり、長期的な展望に立ったうえでシステム作りができるよう、施設内に設置されている成育医療臨床

研究センターの業務として担当することを決めた。

来年度以降に遺伝子配列解析研究が予定されているが、その際に余った検体の保管について本年度から準備を進めた。すでに稼働している小児がん余剰検体保存システムと類似のものを構築することを決め準備に入ることができた。来年度以降の検体受け入れ準備が整ったといえる。

E. 結論

調査票・研究計画書作成支援を行い、患者情報データベース作成の実務打合せに入った。また、検体受け入れ態勢が整った。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働省科学研究費補助金（難病疾患克服研究事業）

分担研究報告書

NEMO 異常症における遺伝子変異診断に関する研究

研究分担者 西小森隆太

研究協力者 河合朋樹 平家俊男

京都大学大学院医学研究科発達小児科学

研究要旨 NEMO 異常症は外胚葉形成不全症に種々の免疫不全症を合併する原発性免疫不全症である。全世界では 100 例ほどの報告が知られているが、本邦においては NEMO 異常症の調査が行われたことはなく、また本邦独特の新規変異が報告されている。今回、診断に不可欠な NEMO 異常の機能評価系を構築した。NEMO 欠損細胞株を用い、異常 NEMO 遺伝子による complementation assay で、LPS に反応する NF- κ B 活性化をルシフェラーゼレポーターにより測定した。既報告 NEMO 変異では正常 NEMO 遺伝子の 3-11% に低下し、また臨床的に NEMO 異常症と診断された新規 NEMO 変異においても 0-18% と低下していた。以上より本 complementation assay 系により NEMO 異常症の診断において必要不可欠な機能評価系が得られた。

A. 研究目的

NEMO 異常症は粗な頭髪、歯牙異常、発汗低下などの外胚葉形成不全症に抗体産生系の異常、食細胞系の異常、NK 活性低下などの種々の免疫不全症を合併する原発性免疫不全症である。これまで日本では、1 例報告がなされてきたが、日本における NEMO 異常症の実態はまだ把握されていないのが現状である。

また NEMO 異常症の遺伝子変異部位はホットスポットといわれる場所がなく、主としてミスセンス変異によって発症する。これまで変異 NEMO 遺伝子の機能評価が困難で、遺伝学的な検討、これまでの既報告症例の変異をもとに診断していた。

今回、変異 NEMO 遺伝子の機能評価系を構築し

て、同定された NEMO 変異が責任変異であるか評価可能にし、より正確な NEMO 異常症の診断を行う。

B. 研究方法

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）に基づいて、京都大学倫理委員会に承認を得たプロコールに則り、患者よりインフォームドコンセントを得て、NEMO 遺伝子解析を行った。

変異 NEMO 遺伝子の機能評価系として、NEMO 欠損細胞を用いて、変異 NEMO 遺伝子を強制発現させる再構成系を確立し、正常 NEMO 遺伝子に対してどの程度 NEMO 活性が低下しているかにより診断する。

具体的には NEMO 欠損ラット線維細胞株 N1 (東京医科歯科大学山岡昇司先生より入手) に変異 (もしくは正常) NEMO 遺伝子発現プラスミド、NF- κ B レポータープラスミド、内部コントロールプラスミドをトランスフェクションしたあと、12 時間後に LPS 刺激を加え、さらに 4 時間後細胞を回収し、NF- κ B レポーター活性をダブルルシフェラーゼ活性を用いて測定した。NEMO 活性は以下の式を用いて正常 NEMO 遺伝子に対する比で表した。

$$\text{NEMO 活性} = (\text{異常 NEMO 活性-mock}) / (\text{WT NEMO 活性-mock}) \times 100$$

C. 研究結果

当科で診断に関わってきた NEMO 異常症で既報告例 3 例 (R175P、L227P、1167insC)、新規ミスセンス変異 (D311E、R182P、A169P) の発現プラスミドを作成し、上記再構成系を用いて正常 NEMO 遺伝子に対する LPS による NF- κ B 活性化の程度を検討した (図 1)。既知報告変異においては全てにおいて、約 3-11% に低下しており、また新規変異による異常 NEMO 遺伝子においても約 0-18% に低下しており、NEMO 遺伝子変異の機能解析系として有用であることが分かった。

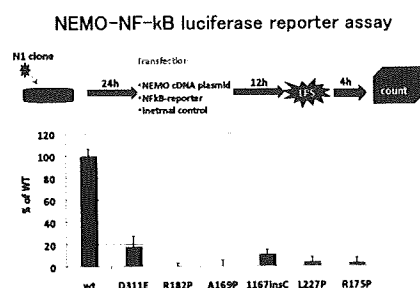


図 1 異常 NEMO 遺伝子による NF- κ B 活性化

D. 考察

これまで NEMO 活性は Fusco らにより NEMO 陰性マウス B 細胞株を用い、強制発現系による complementation assay により活性の評価が行われた。今回我々は NEMO 陰性ラット線維芽細胞株 N1 を用いて、NEMO 活性を測定することに成功した。これを用いて新規変異が見つかった際、機能的に異常かどうかの検討が可能となり、責任遺伝子異常と言えるかどうかの検討が可能となった。これにより NEMO 異常症の病態を調査する上で必須である正確な診断が可能となった。

NEMO 異常症はこれまで全世界で約 100 症例報告されており、その遺伝子型と臨床病型 (外胚葉形成不全、免疫グロブリン異常、抗酸菌感染症、生命予後等) との相関が指摘されている。今後、刺激系、これまでと違う NEMO 欠損細胞を用いることにより、NEMO 遺伝型と臨床病型の相関を検討できる系の作成が望まれる。

E. 結論

NEMO 欠損細胞に異常 NEMO 遺伝子を強制発現させる系を用いて、診断において必要不可欠な NEMO 異常症における遺伝子異常の機能的な評価系を構築した。

G. 研究発表

1. 論文発表

I. Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N, Kambe N, Fujisawa A, Yamazaki S, Saito M, Yoshioka T, Kawai T, Sakai H, Tanizaki H, Heike T, Miyachi Y, Nakahata T. Role of the NOD2 genotype in the clinical phenotype of

Blau syndrome and early-onset sarcoidosis.
 Arthritis Rheum. 60:242-250, 2009

2. Okada S, Konishi N, Tsumura M, Shirao K, Yasunaga S, Sakai H, Nishikomori R, Takiyama Y, Kobayashi M. Cardiac infiltration in early-onset sarcoidosis associated with a novel heterozygous mutation, G481D, in CARD15. Rheumatology (Oxford). 48:706-707, 2009

3. Nakamura Y, Kambe N, Saito M, Nishikomori R, Kim YG, Murakami M, Nunez G, Matsue H. Mast cells mediate neutrophil recruitment and vascular leakage through the NLRP3 inflammasome in histamine-independent urticaria. J Exp Med. 206:1037-1046, 2009

4. Kusunoki T, Morimoto T, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Fujii T, Nakahata T. Changing prevalence and severity of childhood allergic diseases in Kyoto, Japan, from 1996 to 2006. Allergol Int. 58:543-548, 2009

5. Kusunoki T, Morimoto T, Nishikomori R, Heike T, Fujii T, Nakahata T. Allergic status of schoolchildren with food allergy to eggs, milk or wheat in infancy. Pediatr Allergy Immunol. 20:642-647, 2009

6. Kawabata H, Murakami M, Nishikomori R, Saito M, Takaoka Y, Nanao K, Maezawa M. A Japanese case of familial Mediterranean fever with a MEFV gene mutation. Hokkaido Igaku Zasshi. 84:419-422, 2009

2. 学会発表

1. 非典型的な発症を示した色素失調症の 1 例 河合朋樹、西小森隆太、酒井秀政、田中

尚子、村田祐樹、斎藤潤、八角高裕、平家俊男、中畑龍俊、中村麗亜、平林優

第 2 2 回近畿小児科学会，兵庫，2009

H. 知的財産権の出願・登録状況
 （予定を含む。）

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

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

研究協力者： 荒谷康昭 横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科・教授

研究要旨：

硫酸デキストランで誘発される炎症性腸疾患の患部には好中球とマクロファージが多量に集積し、これらがメタロプロテアーゼ (MMP-9) を多量に産生していることが判明した。また、炎症誘発における食細胞由来の活性酸素の影響を個体レベルで知るために、gp91^{phox} ノックアウトマウス (CGD マウス) の病態も解析した。

A. 研究目的

好中球は全白血球の約 7 割を占め、種々の活性酸素を放出し、病原微生物に対する感染防御において重要な役割を担っている。しかし、時にその活性酸素が過剰産生されると正常組織にも障害を与える可能性がある。炎症性腸疾患において、炎症を起こした大腸患部には、好中球の顕著な浸潤が認められ、さらに活性酸素量が増加しているともいわれていることから、潰瘍性大腸炎の発症には好中球由来の活性酸素も関与している可能性が高い。活性化した好中球は、食細胞 NADPH オキシダーゼにより酸素からスーパーオキシド($\cdot\text{O}_2$)を、次いで自発的にあるいはスーパーオキシドジスムターゼによりスーパーオキシドから過酸化水素(H_2O_2)を、さらにミエロペルオキシダーゼ (MPO) により過酸化水素と塩素イオン(Cl^-)から次亜塩素酸(HOCl)を産生する。本研究では、食細胞 NADPH オキシダーゼ欠損マウス (CGD マウス) を用いて、炎症性腸疾患にお

ける好中球から産生される活性酸素の関与も検討した。

B. 研究方法

野生型 C57BL/6 マウス (日本 SLC から購入) および CGD マウスは、8~10 週令のマウスを使用した。飼育管理は、公立大学法人横浜市立大学動物実験指針に準じた。

Dextran sulfate sodium (DSS) をオートクレーブ滅菌した純水に溶解し、2% DSS 溶液を調製し、マウスに自由飲水させ大腸炎を誘発させた。8 日間後および 14 日後にマウスを頸椎脱臼で安楽死させ、大腸下部をホルマリン固定したのち薄切し、H&E 染色または Alcian blue 染色を行った。免疫染色のためには凍結切片を作成し、抗 Gr-1 モノクローナル抗体、抗 F4/80 モノクローナル抗体を用いて好中球とマクロファージをそれぞれ同定した。また、抗 Matrix metalloproteinase (MMP) -9 抗体でも染色した。

(倫理面への配慮)

実験動物は動物の保護及び管理に関する法律に準じて扱い、必要最小限の動物を使用した。やむを得ず動物を殺す際には、頸椎脱臼法で安楽死させた。

C. 研究結果

ヒトの大腸炎の活動期には、好中球が陰窩(腺管)上皮細胞間に浸潤、集簇して陰窩膿瘍を形成したり、腺管上皮細胞の粘液や杯細胞数が激減する。そこで、DSS を投与したマウス大腸の炎症細胞の浸潤および組織の形態変化をH&E染色像で、また、杯細胞の減少をAlcian blue 染色により解析した。野性型マウスにおいて、DSS 投与開始後 8 日目では、炎症細胞の浸潤も杯細胞の減少もほとんど認められなかったが、14 日目になると、中程度の炎症細胞の浸潤と腺管の形態変化が観察され、杯細胞数も対照群の半分程度に減少している個体が多く観察された。

好中球はMMP-9を産生し、そのMMP-9が様々な炎症性疾患において重要な役割を担っていることが知られている。そこで、大腸炎患部に好中球やマクロファージが集積しているかどうか、また集積した炎症細胞がMMP-9を産生しているかどうかを検討した。DSS 投与開始後 14 日目の大腸を好中球の表面抗原であるGr-1の抗体で染色したところ、大腸腺付近にGr-1陽性細胞が、浸潤していることが確認された。さらに、MMP-9の産生も検出できた。Gr-1染色像とMMP-9染色像を重ね合わせた結果、大腸腺付近のGr-1陽性細胞のほとんどが

MMP-9陽性であった(図1)。以上の結果から、大腸腺付近に浸潤してきた好中球がMMP-9を産生していることが明らかになった。

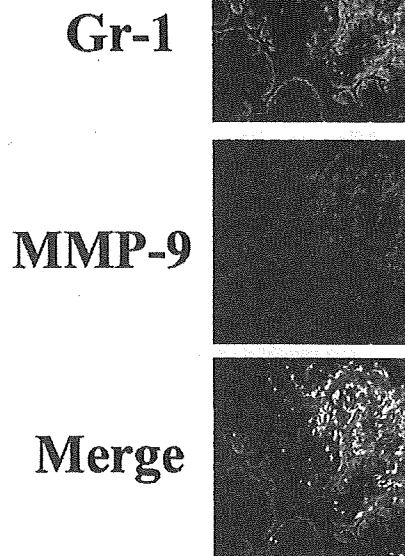


図1 DSS 投与 14 日目の野性型マウス大腸患部に集積した好中球(Gr-1 陽性)と MMP-9 産生

一方、マクロファージもMMP-9を産生していることが知られている。そこで、大腸炎患部にマクロファージが集積しているかどうか、そしてそのマクロファージがMMP-9を産生しているかどうかについても解析した。DSS 投与開始後 14 日目の大腸をマクロファージの表面抗原であるF4-80の抗体で染色したところ、大腸腺付近にF4-80陽性細胞浸潤していることが確認された。またMMP-9陽性細胞数もF4-80陽性細胞数と同様の増加傾向を示し、大腸腺付近に蓄積しているMMP-9の一部は、マクロファージ由来であることが、染色像を