

201024003A

厚生労働科学研究費補助金  
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

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 原 寿郎

平成23年3月

厚生労働科学研究費補助金  
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

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 原 寿郎

平成23年3月

## 原発性免疫不全症候群に関する調査研究

### 目 次

I. 班員・協力者名簿 .....	3
II. 統括研究報告 .....	7
原 寿郎(九州大学院医学研究員成長発達医学分野教授)	
○参考資料 .....	21
III. 分担研究報告	
1. 原発性免疫不全症候群疫学調査二次調査結果重症複合免疫不全症と高IgE症候群に関して .....	53
石村 匡崇、土居 岳彦、高田 英俊、原 寿郎(九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)	
有賀 正(北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)	
土屋 滋(東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野)	
今井 耕輔、野々山恵章(防衛医科大学校小児科学講座)	
森尾 友宏(東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野)	
峯岸 克行(東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学)	
横田 俊平(横浜市立大学小児科)	
上松 一永(信州大学医学系研究科感染防御学講座)	
宮脇 利男(富山大学大学院医学薬学研究部小児科学)	
谷内江明宏(金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)	
小島 勢二(名古屋大学大学院医学系研究科小児科)	
平家 俊男(京都大学大学院医学研究院発生発達医学講座発達小児科学)	
小林 正夫(広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学)	
2. 高IgE症候群におけるアトピー性皮膚炎と高IgE血症の発症機構の検討 .....	59
峯岸 克行(東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学)	
3. IL-17産生T細胞(Th17)と制御性T細胞(Treg)の分化制御におけるTGF- $\beta$ -Smadシグナルの機能的意義 .....	62
瀧本 智仁、原 寿郎(九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)	
若林 裕、吉村 昭彦(慶応義塾大学医学部微生物学免疫学教室)	

4. X連鎖リンパ増殖症候群の臨床的、遺伝学的特徴 .....	66
金兼 弘和、Yang Xi、宮脇 利男（富山大学大学院医学薬学研究部小児科学）	
5. 原発性免疫不全症の病態解析 .....	69
森尾 友宏、満生 紀子、高木 正稔、水谷 修紀（東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野）	
6. TREC,KREC,FACSを用いたCommon variable immunodeficiencyの新規亜群分類 .....	74
釜江智佳子、本間 健一、中川 紀子、野々山恵章（防衛医科大学校小児科） 今井 耕輔（防衛医科大学校小児科医療情報部）	
7. T細胞におけるWASP蛋白分解機構の解析 .....	80
渡辺 祐子、笹原 洋二、久間木 悟、土居 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）	
8. RAG異常症における遺伝子変異と組換え活性の解析 .....	84
和田 泰三、浅井絵利香、東馬 智子、谷内江昭宏（金沢大学医薬保険研究域医学系小児科） 今井 耕輔、野々山恵章（防衛医科大学校小児科） 森尾 友宏（東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野） 蒲池 吉朗（名古屋大学大学院発育加齢医学講座小児科学） 小原 収（かずさDNA研究所ヒトゲノム研究部）	
9. Immunodysregulation,polyendocrinopathy,enteropathy, X-linked syndrome(IPEX)における消化管自己抗原の多様性 .....	88
小林 一郎、山崎 康博、竹崎俊一郎、大倉 有加、山田 雅文、有賀 正 （北海道大学大学院医学研究科小児科学分野）	
10. 新規自然免疫不全症同定に向けたTIRAP/Mal遺伝子変異/多型の構造生物学的機能解析 .....	93
大西 秀典、安 陽、松井 永子、加藤善一郎、金子 英雄、近藤 直美 （岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学）	
11. ヒトES/iPS細胞からの血球分化系の構築と、これを用いた先天性免疫不全症の病態解析 .....	97
中畑 龍俊（京都大学iPS細胞研究所 臨床応用研究部門 疾患再現研究分野）	
12. 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 .....	102
千葉 滋（筑波大学大学院人間総合科学研究科）	

13. CINCA症候群/NOMID主要原因としてのNLRP3体細胞モザイク .....	105
西小森隆太、田中 尚子、井澤 和司、八角 高裕、平家 俊男 (京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座発達小児科学)	
小原 收 (かずさDNA研究所) (理化学研究所横浜研究所免疫アレルギー科学総合研究センター)	
作間 未緒、森本 剛 (京都大学大学院医学研究科医学教育推進センター)	
斎藤 潤 (京都大学iPS細胞研究所)	
14. 家族性地中海熱MEFV exon3 variantsの検討 .....	110
上松 一永 (信州大学医学研究科感染防御学)	
15. 重症先天性好中球減少症に対する造血幹細胞移植 .....	113
唐川 修平、溝口 洋子、中村 和洋、小林 正夫 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学)	
16. 原発性免疫不全症に対する幹細胞移植の検討 .....	119
横田 俊平 (横浜市立大学医学部小児科)	
17. 免疫不全症のQOL調査、移植研究 .....	121
小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学)	
村松 秀城 (名古屋大学医学部附属病院小児科)	
18. 最近の慢性肉芽腫症の課題 .....	124
布井 博幸、水上 智之 (宮崎大学医学部小児科)	
<b>IV. 研究成果の刊行に関する一覧 .....</b>	<b>131</b>



# I 班員・協力者名簿

原發性免疫不全症候群調査研究班  
班 員 名 簿

	氏 名	施 設	職 名
主任研究者	原 寿 郎	九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野	教 授
分担研究者	宮 脇 利 男	富山大学大学院医学薬学研究部小児科学	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
	土 屋 滋	東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野	教 授
	野々山 恵 章	防衛医科大学校医学研究科小児科学	教 授
	森 尾 友 宏	東京医科歯科大学大学院発達病態小児科学分野	准 教 授
	上 松 一 永	信州大学大学院医学研究科移植免疫感染症学	准 教 授
	近 藤 直 実	岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学分野	教 授
	小 島 勢 二	名古屋大学大学院発育・加齢医学講座小児科学	教 授
	谷内江 昭 宏	金沢大学医薬保健研究域小児科講座	教 授
	中 畑 龍 俊	京都大学大学院医学研究科発達病態小児科学	教 授
	小 林 正 夫	広島大学大学院病態情報医科学講座小児科学	教 授
	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
	横 田 俊 平	横浜市立大学大学院医学研究科発生成育小児医療学	教 授
	峯 岸 克 行	東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学	准 教 授
千 葉 滋	筑波大学医学部血液内科	教 授	
平 家 俊 男	京都大学大学院医学研究科小児科学	教 授	
事 務 局	高 田 英 俊	九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 〒812-8582 福岡県福岡市馬出 3-1-1 TEL 092-642-5421 FAX 092-642-5435	准 教 授
経理事務担当者	藤 川 眞 一	九州大学医系学部等経理第一係 TEL 092-642-6006 FAX 092-642-6022 e-mail ijzkeiri1@jimu.kyushu-u.ac.jp	係 長

## 研究協力者名簿

	氏 名	施 設	職 名
研究協力者	竹 森 利 忠	理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター 免疫記憶研究グループ	グループディレクター
	石 川 文 彦	理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター ヒト疾患モデル研究ユニット	ユニットリーダー
	小 原 収	かずさ DNA 研究所ヒトゲノム応用研究部	部 長
	岩 田 力	東京家政大学家政学部/児童学科・児童教育学科	教 授
	赤 城 邦 彦	神奈川県立こども医療センター	母子保健室長
	大 石 勉	埼玉県立小児医療センター	保健発達部長
	久間木 悟	みやぎ県南中核病院小児科	内科系診療部長
	河 合 利 尚	国立成育医療研究センター成育遺伝部	室 長



## Ⅱ 総括研究報告

## 統括研究報告

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

主任研究者 原 寿郎

（九州大学大学院成長発達医学分野教授）

### 研究要旨

本調査研究班は、原発性免疫不全症候群の患者 QOL と医療水準の向上に貢献するため以下の研究を重点的に行った。

#### (1) 全国疫学調査結果の解析

2008 年度、国内 2,894 病院に対して行った原発性免疫不全症候群の全国疫学調査結果に関して、重症複合免疫不全症、高 IgE 症候群について詳細に検討し、新たな臨床所見、国内症例の特徴などを明らかにした。CGD は国内で 285 名が登録されているが、最近 15 年間で登録された 47 例の解析を行い、臨床像、治療法の内容を検討し、BCG 感染症についても検討を行った。

#### (2) Primary Immunodeficiency Database in Japan プロジェクトへの登録、遺伝子解析

国内の原発性免疫不全症患者の on line での登録、主治医からの診断治療に関する相談受付、遺伝子解析を、理化学研究所、かずさ DNA 研究所と共同で継続して行った。

#### (3) 責任遺伝子の同定や病態の解明

新たな疾患概念として Ras associated autoimmune lymphoproliferative syndrome を提唱し、その病態を解明した。高 IgE 症候群におけるアトピー性皮膚炎と高 IgE 血症の発症機構を解明した。原発性免疫不全症候群の病態解明の新たな方法として、ヒト ES/iPS 細胞からの血球分化を樹立した。TREC、KREC とリンパ球サブセットの解析を組み合わせることで CVID の亜群を詳細に分類できることを明らかにした。本邦における XLP の臨床的、遺伝学的特徴を明らかにした。CINCA 症候群では海外の症例でも我国と同様 NLRP3 体細胞モザイクが主要原因であることを明らかにした。

#### (4) 治療ガイドラインの作成と新規治療法の開発

CGD、Wiskott-Aldrich 症候群の造血幹細胞移植ガイドラインに加えて重症複合免疫不全症の造血幹細胞移植ガイドラインを作成しホームページに公開した。さらに重症先天性好中球減少症、Chediak-Higashi 症候群、高 IgE 症候群に対する造血幹細胞移植の成績、問題点を解析した。高 IgM 症候群、重症先天性好中球減少症などについても造血幹細胞移植ガイドラインを作成中である。HD-Ad. AAV ハイブリッドベクターによる BTK 遺伝子修復に成功し、今後ヒト化マウスで効果と安全性を確認していく。

#### (5) 患者家族や医療者への継続的情報提供

患者や主治医の登録は継続してオンラインで行っており、原発性免疫不全症候群に関する最新の情報を研究会、ホームページなどで医師、患者家族に提供している。また患者家族会との連携を深め、講演会・相談会を実施した。

#### 分担研究者

宮脇 利男・富山大学大学院医学薬学研究部小児科学教授  
有賀 正・北海道大学大学院医学系研究科小児科学分野教授  
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教授  
野々山恵章・防衛医科大学校医学研究科小児科学教授  
森尾 友宏・東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発達病態小児科学准教授  
上松 一永・信州大学大学院医学研究科移植免疫感染症学准教授  
近藤 直実・岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学分野教授  
小島 勢二・名古屋大学大学院発育・加齢医学講座小児科学教授  
谷内江昭宏・金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻病態検査学教授  
中畑 龍俊・京都大学物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター教授  
小林 正夫・広島大学大学院病態情報医科学講座小児科学教授  
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  
横田 俊平・横浜市立大学大学院医学研究科発生成育小児医療学教授  
峯岸 克行・東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学准教授  
千葉 滋・筑波大学医学部血液内科教授  
平家 俊男・京都大学大学院医学研究科小児科学教授

#### 研究協力者

竹森 利忠・理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター  
免疫記憶研究グループグループディレクター  
石川 文彦・理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター  
ヒト疾患モデル研究ユニットユニットリーダー  
小原 収・かずさ DNA 研究所ヒトゲノム応用研究部部長  
岩田 力・東京家政大学家政学部児童学科教授  
赤城 邦彦・神奈川県立こども医療センター母子保健室長  
大石 勉・埼玉県立小児医療センター保健発達部長  
久間木 悟・みやぎ県南中核病院内科系診療部長  
河合 利尚・国立成育医療センター研究所遺伝子診断治療研究室室長

## I. 研究の目的

本調査研究班は、迅速で正確な診断、病因・病態解析、治療ガイドラインの作成、治療法の改良、新規治療法の開発、患者や主治医への情報提供を介して原発性免疫不全症患者 QOL と医療水準の向上に貢献することを目的としている。原発性免疫不全症は多数の疾患からなり、それぞれが比較的稀であるため、専門の医師が不足し適切な医療を受けられない場合がある。診断には遺伝子診断を要する事が多く、造血幹細胞移植やガンマグロブリン補充など、疾患やその重症度によって治療法が異なる。早期に正確に診断することが長期的 QOL のためにも極めて重要であり、そのため当研究班では **Flow cytometer** などを用いた種々の迅速診断法を開発してきた。さらに重症複合免疫不全症に対しては、緊急的に造血幹細胞移植を行う必要があるため、新生児期のマススクリーニング法を開発し、その実施に向けて調整中である。

本症候群は希少疾患であり、国内での患者や主治医を登録し、各疾患の全体像を把握し、診断治療に関する情報を発信していくことが重要であると考えている。症例の診断や治療に関して、**on line** で相談を主治医から受けるシステムを作り、さらに理化学研究所やかずさ DNA 研究所と共同で、診断に必要な遺伝子検査の体制を整備した。また、各疾患の疫学・臨床像を正確に把握するために、2008 年に原発性免疫不全症候群に関する全国疫

学調査を行い、疾患ごとに国内症例の頻度や臨床像の特色について詳細な解析を継続している。

また正確な診断や適切な治療の開発を行うため、引き続き責任遺伝子の同定や病態の解明に関する研究を行っている。生体試料を収集・保存し、病態解析のために有効に活用できるように整備し、ヒト化マウスや iPS 細胞からの細胞分化などの方法を積極的に活用し、病態解析を行い、その知見を基にした新たな治療法の確立をめざす。原発性免疫不全症の治療に関しては、国内外でのこれまでの成績を整理し、我が国の背景・特色をふまえ、それぞれの疾患に適合した治療ガイドラインを作成し、治療法を改良し公開していく。特に造血幹細胞移植法に関しては、その適応、安全性、有効性などを考慮した、最適な造血幹細胞移植ガイドライン作成をめざす。ヒト化マウス疾患モデルを活用し、有効性、安全性の評価を行いながら、より良い遺伝子治療法や遺伝子修復法、再生治療法を開発する。

## II. 研究方法

本調査研究では、以下の重点目標を掲げ、国際的動向や国内でのこれまでの調査結果に基づいて、我が国の背景をふまえた研究を行い、患者・家族へ最善の治療の提供、及び QOL の向上に寄与したい。

(1). 疫学調査研究：原発性免疫不全症候群の 2007 年の新分類に従い全疾

患の全国疫学調査を行った。質問紙法により一次調査を行い、一次調査で患者ありとの回答施設に対し、各患者に対し、合併症に重点をおいて二次調査を行った。特に（重症）複合免疫不全症・Btk欠損症を含むB細胞欠損症・分類不能型免疫不全症（CVID）・高IgM症候群・Wiskott-Aldrich症候群・高IgE症候群・好中球減少症・MSMD・自己炎症性症候群（TRAPS・HIDS・CAPS・EOS・FMF）に対しては調査特異項目を設定した二次調査を行った。その結果、原発性免疫不全症候群の全体像が明らかとなり、現在、その二次調査を基に、国内患者の疫学的特徴や臨床像の特徴について解析を継続している。今回は重症複合免疫不全症と高IgE症候群に関する臨床像を詳細に明らかにした。

これと並行して、理化学研究所と共同でPIDJホームページによる患者二次登録を推進している。主治医からの診断・治療法に関する相談、遺伝子解析の依頼にも対応するこの登録方法は、世界的に類をみない日本独自の方法であり、海外からも注目されている*Nature Immunology* 9, 1005 - 1007 (2008)。また、海外からの相談や診断の依頼についても対応可能である。

(2). 迅速診断法の開発と遺伝子解析：各研究者が原発性免疫不全症の診断において、遺伝子診断以外の簡易診断法や、遺伝子解析以前の簡易スクリーニング検査法などの迅速診断法開発を行う。遺伝子解析は各専門施設と

理化学研究所・かずさDNA研究所で行う。

(3). 責任遺伝子、発症機構、病態の解明：責任遺伝子の同定や病態の解明は、正確な診断や適切な治療の開発につながるため、全分担研究者が症例の蓄積に努め責任遺伝子の同定を行っている。今回はさらにiPS細胞やヒト化マウス疾患モデルを用いて原発性免疫不全症の原因解明、病態解析研究を展開した。

(4). 治療ガイドラインの作成と新規治療法の改良・開発：疾患の種類、重症度に応じて、最も適切な治療法をガイドラインとして提示したい。特に議論の多い造血幹細胞移植法に関しては、重症複合免疫不全症、CGD、Wiskott-Aldrich症候群についてガイドラインを作成し、ホームページに掲載した。今後、高IgM症候群や先天性好中球減少症についても海外の状況を検討し、国内での造血幹細胞実施例を詳細に検討した上でガイドラインを作成する。遺伝子治療研究では、安全性の高いベクターの検討を行い、ヒト化マウス疾患モデルを用いて、その有効性や安全性を確認する。

(5) 患者QOL調査と患者家族や医療者への継続的情報提供、意見交換の体制を作る：診断基準や確定診断に必要な検査項目、専門病院、遺伝子検査を行う施設名や連絡先、治療指針、造血幹細胞移植のガイドラインなどの情報



をホームページに掲載している (<http://pidj.rcai.riken.jp/index.html>)。担当医師への継続的情報提供、意見交換の体制を作る。患者家族会との連携を深め、講演会や相談会を実施する。XLA 成人患者の QOL 調査を行ったが、今後は他の疾患、特に造血幹細胞移植後の QOL 調査などを行う。

### Ⅲ. 研究結果と考察

#### (1) 全国調査の解析結果

##### 1. (重症) 複合免疫不全症と高 IgE 症候群

2008 年度国内の原発性免疫不全症候群患者の頻度、臨床経過などを国際的分類法に則って解析した。わが国における PID 患者数は 3500 人 (95%信頼区間: 2800 人~4200 人)、推計有病率は 2.7 人/人口 10 万人対であり、欧米とほぼ同じである。合併症では、悪性疾患が 25 例、自己免疫関連疾患が 93 例報告され、患者管理の重要性が明らかになった。今回、(重症) 複合免疫不全症と高 IgE 症候群について詳細に解析した。(重症) 複合免疫不全症は 71 例登録され、男性 51 例、女性 20 例であった。死亡例が 4 例報告され、うち 1 例は造血幹細胞移植前に感染症で、3 例は移植後に死亡していた。遺伝子変異に関しては 65 例で検索が行われ、60 例で変異が同定されており、*IL2RG* 変異が 42 例と最も多くを占めた。*IL7RA* 変異は見られなかった点は欧米からの報告と異なる。初発時感染症は *Pneumocystis* 肺炎が最も多く 17 例みられた。その他に細菌性肺

炎、敗血症、BCG 感染症など重篤な疾患が多く報告され、早期診断や新生児スクリーニングの必要性が明らかになった。TREC 測定による新生児スクリーニングの方法を確立し、実際の応用にむけて準備中である。造血幹細胞移植は 60 例で施行されていた。移植源は非血縁臍帯血が 33 例と最も多く、血縁骨髄が 24 例であり、血縁からの移植が多い欧米とは対照的な結果である。移植前処置を施行した例が 33 例、前処置せず移植した例が 25 例であった。安全な前処置で B 細胞機能を回復させる目的で、近年ではフルダラビンを中心とした骨髄非破壊的移植が多く行われていた。合併症では悪性腫瘍 2 例、自己免疫疾患 2 例、精神運動発達遅滞が 5 例認められた。

高 IgE 症候群は 2 次調査で 45 名を解析した。男性 25 名女性 20 名で、年齢中央値は 11 歳 (0 歳~50 歳) であった。遺伝子変異は 30 例で検索され、うち 20 例 (43%) で *STAT3* 変異が、1 例 (2%) で *TYK2* 変異がみられ、9 例では変異が見出されなかった。*STAT3* 変異例のみ易骨折、乳歯脱落遅延、側彎、関節過進展といった骨関節系の異常が認められた。感染症に関しては肺炎、皮下膿瘍、中耳炎、副鼻腔炎、リンパ節炎が多く報告された。重篤なウイルス感染症 (ヘルペス脳炎 1 例、重症水痘 1 例) が *STAT3* 変異例でみられた。呼吸機能検査は 5 例のみの解析だが、%VC が  $87.8 \pm 7.3\%$  (62~106%)、FEV1.0% が  $96.4 \pm 3.5\%$  (88~108%) と保たれていた。繰り返す

感染に関連すると考えられる肺嚢胞は5例、気管支拡張症は2例、難聴は1例であった。今回の調査では精神運動発達遅滞が言語の遅れを含め4例、若年発症の脳梗塞が1例報告された。

## 2. CGD

CGDは国内で285名が登録されている。今回この15年間でCGDとして登録された47症例の解析を行い、最近の傾向を解析した。幼少期からCGD患者では真菌、抗酸菌感染が認められ、乳幼児への生活環境への配慮や新しい抗真菌薬を含めたガイドラインの必要性が明らかとなった。また、最近、活性酸素が炎症抑制因子としての作用を有することも知られるようになった。非感染性の腸炎症状がCGDの初発症状となることもあり、炎症抑性が必要である例が少なからず認められる事が明らかになった。BCG接種による重症BCG感染症もCGDの重要な問題であり、CGD患者に対してBCG接種は禁忌である。重症BCG感染症がおこる患者に対してどのような治療が最適か、治療ガイドラインの作成を進め、公開する。

### (2) Primary Immunodeficiency Database in Japan (PIDJ) プロジェクトへの登録、遺伝子解析

国内の原発性免疫不全症患者の現状把握、病態の解析、診断治療方法の確立等の必要性から、厚労省研究班会議、理化学研究所、かずさDNA研究所の共同研究として、2008年1月にPIDJプロジェクトが開始された。このプロジェクトでの遺伝子診断を目的とし

た解析総遺伝子は127種類、2010年11月までで、PIDJ登録患者は540人で、のべ2084個の遺伝子解析を行った(参考資料1)。

### (3) 責任遺伝子の同定や病態の解明

#### 1. ヒトES/iPS細胞からの血球分化系の構築と、これを用いた先天性免疫不全症の病態解析

iPS細胞は京都大学の山中らによって見出された多能性幹細胞で、皮膚や血球などから樹立することができ、様々な体細胞に分化させることができる。患者iPS細胞を血球細胞や罹患臓器の細胞に分化させて解析することにより、疾患の病態解明や創薬に向けた手がかりとなりうる。今回、OP9フィーダー細胞を用いた血球分化系を用いて単球マクロファージ系への分化条件化で培養し、貪食能・殺菌能・サイトカイン産生能などの機能評価を行ったところ、これらの機能が認められ、単球マクロファージを分化させることに成功した。CINCA症候群患者のiPS細胞を樹立し、同様にマクロファージへと分化させると、過剰なIL-1 $\beta$ の産生が認められ、病態を再現することに成功した。さらに、より安定した分化系を構築するため、フィーダーフリーの二次元培養での血球分化システムを開発中である。

また、造血幹細胞から肥満細胞への分化過程に関する研究を行い、免疫不全症への関連に関する研究を継続している。

#### 2. Ras associated autoimmune

## lymphoproliferative syndrome (ALPS) like disease (RALD)の解明

自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、抗核抗体陽性、リンパ節腫大、肝脾腫などを呈する疾患の原因が、K-ras 変異によることを明らかにし、RALD の概念を提唱した。3名のRALD患者ではB細胞が増加しており、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive T細胞の増加は認めなかった。Fas 刺激に対するアポトーシス抵抗性は認めなかったが、T細胞を固相化CD3抗体とIL-2で増殖させ、その後IL-2を除いて誘導されるアポトーシスに対する抵抗性を有し、Bimの発現誘導が低下していた。K-Rasの遺伝子解析を行ったところ、3例とも13番目のアミノ酸置換が認められ、active mutantであると想定された。

### 3. 高IgE症候群の病態解析: アトピー性皮膚炎と高IgE血症の発症機構の解明

STAT3のドミナントネガティブ変異が高IgE症候群の主要な原因であることを当研究班の峯岸らは報告した。今回さらにSTAT3の分子異常がどのようなメカニズムでアトピー性皮膚炎と高IgE血症を引き起こすかを検討した。高IgE症候群の樹状細胞はIL-10のシグナル伝達が障害されており、樹状細胞上の抑制分子、PD-L1, PD-L2, ILT-3, ILT-4の発現が低下していることを明らかにした。それにより誘導性制御性T細胞(induced regulatory T cell; iTreg cell)の分化が低下しており、iTregによるT細胞

に対する増殖抑性、サイトカイン産生抑制が障害されていた。このiTreg細胞の誘導障害が、高IgE症候群に特徴的なアトピー性皮膚炎と高IgE血症の発症に関与しているものと考えられる。

### 4. IL-17産生T細胞(Th17)と制御性T細胞(Treg)の分化制御におけるTGF-β-Smadシグナルの機能的意義

Th17細胞の分化は、高IgE症候群患者で明らかに低下しており、その病態に強く関連している。また、Tregは種々の自己免疫疾患を起こすIPEX症候群で欠損している。Th17細胞やTregの分化過程については不明な点が多い。今回、T細胞特異的Smad2欠損マウスを作成し、TregやTh17細胞の分化においてTGF-β-Smadシグナルが重要な役割をすることを明らかにした。胸腺由来Foxp3発現制御性T細胞(nTreg)は自己反応性T細胞受容体を発現し自己の免疫寛容に重要と考えられているが、このnTregにおいてSmadシグナルが欠損するとnTregは容易にFoxp3発現を失いIFN-γ産生細胞に変化した。高IgE症候群やIPEX症候群の病態にTGF-β-Smadシグナルが重要な役割をしていることが明らかになった。

### 5. TREC, KREC, FACSを用いたCommon variable immunodeficiencyの新規亜群分類

Common variable immunodeficiency (CVID)の大部分は原因不明であり、様々な亜群分類が試みられている。今回、国内のCVID患者32例について、

T cell receptor recombination excision circles (TREC)、および signal joint Kappa chain recombination excision circles (sjKREC) の定量と、FACS を用いたリンパ球サブセット解析を組み合わせて、CVID の亜群分類を試みた。TREC 陽性が 22 人、TREC 陰性が 10 人の 2 群に分けることができた。sjKREC が測定できた 31 例では、TREC、sjKREC とともに正常が 19 例、sjKREC のみ陰性が 3 例、TREC のみ陰性が 5 例、TREC、sjKREC とともに陰性が 4 例の 4 群に分類された。

FACS 解析との関連では、sjKREC 陰性群では全例で B 細胞の低下を認めた。TREC 陰性群ではメモリー B 細胞が全例で低下していた。また TREC 陰性群でも CD4/CD8 が正常の例が存在したが、CD4 陽性細胞が CD45RO 陽性に偏倚していた症例が多かった。TREC、sjKREC 正常の 1 兄弟例で、TACI の複合ヘテロ変異 (c.571\_572insA; c.226G>T) を認めた。また、TREC、sjKREC とともに低下した群に XIAP 変異例を見いだした。TREC、sjKREC とともに陰性の群は、臨床的に易感染性が強く、重症例が多く認められた。TREC、sjKREC、FACS 解析の組み合わせにより、CVID が大きく 4 群に分けられ、臨床像も異なることが示された。

#### 6. T 細胞における WASP 蛋白分解機構の解析

Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) 蛋白は、WASP 結合蛋白 (WIP) と複合体を形成して T 細胞受容

体レセプター (T cell receptor; TCR) シグナル伝達系の下流に位置し、WIP は WASP 蛋白質の安定化に重要な役割を果たす。しかし、この TCR シグナル下での WASP 蛋白分解機構の詳細は不明であった。今回、TCR 刺激下における WASP 蛋白が、カルシウム依存性蛋白分解酵素カルパインとユビキチン化により分解された後にプロテアゾームで処理されることを証明し、このユビキチン化には TCR の negative regulator である c-Cbl 蛋白と Cbl-b 蛋白が E3 ユビキチンリガーゼとして関与し、WASP 蛋白のユビキチン化およびその安定性の一部を制御することを発見した。さらに WASP 蛋白の安定性に対して、恒常的活性化変異による構造変化やチロシンリン酸化よりも WASP-WIP 結合がより重要な役割を果たすことを明らかにした。これらの結果は、WAS 患者における T 細胞免疫不全の分子病態、遺伝子治療後の WASP 蛋白質発現調節機構に対する重要な示唆を与えるものである。

#### 7. RAG 異常症における遺伝子変異と組換え活性の解析

RAG (recombination activating gene) は V(D)J 組換えに必須であり、その異常は様々な免疫不全症を引き起こす。今回、Omenn 症候群 3 例、TCR- $\gamma\delta^+$  T 細胞の増加、自己免疫性疾患とサイトメガロウイルス感染症を合わせ持つ免疫不全症 1 例、非典型的重症複合免疫不全症 1 例の計 5 例の RAG 異常症を見出し、遺伝子変異の同定ならびに機能解析を行っ

た。遺伝子解析では、RAG1 もしくは RAG2 遺伝子に、新規変異 6 個を含む変異 8 個を同定した。ほとんどの変異は、機能的に重要とされるコア領域内に存在していた。V(D)J 組換え活性の解析では、約半分の活性を示す変異も存在したが、それぞれの患児における全体としての RAG 活性は有意に低下しており、RAG 異常症の病態とよく合致していた。また、非コア領域に存在する RAG2 の新規変異 Met443Ile が組換え活性の低下を示したことから、同部位が V(D)J 組換えに重要であることが明らかにされた。多彩な病型をとり得る RAG 異常症では、遺伝子解析とともに機能解析を行うことが診断や病態解明に重要であることが示された。

#### 8. 新規自然免疫不全症同定に向けた TIRAP/Mal 遺伝子変異/多型

侵襲性肺炎球菌感染症等を呈する免疫不全の責任遺伝子として IRAK4、MyD88 等自然免疫関連分子の異常が報告されている。本研究では Toll 様受容体シグナルの下流で、これらの分子と複合体を形成する Mal を標的とした遺伝子解析、変異分子の *in vitro* 機能実験を行った。303 名の日本人を対象に、Mal の翻訳領域の遺伝子解析を行ったところ、8 種類の一塩基多型(SNP) が同定され、そのうち 4 種類は既報の無い新規 SNP であった。また 3 種類は頻度の少ない non synonymous SNP であり、HEK293 細胞及び THP1 細胞にお

いて機能損失型バリエーションであることが確認できた。本解析で同定された機能損失型バリエーションはいずれもヘテロ接合性に同定されている。臨床症状としてはいずれの症例も明らかな易感染性はみられないが、IRAK4 欠損症と類似の臨床像を呈する症例中に、ホモ接合性あるいは複合ヘテロ接合性の遺伝子型を有する免疫不全症例が同定される可能性がある。

#### 9. 我が国の X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) の臨床的、遺伝学的特徴

2005 年から 2009 年において国内で XLP を疑われた 24 例の SAP 蛋白の発現を調べたところ、6 例において CD8<sup>+</sup>T 細胞ならびに CD56<sup>+</sup>NK 細胞のいずれにおいても SAP 蛋白の発現低下を認め、遺伝子解析にて *SH2D1A* 変異が同定され、XLP タイプ 1 と診断された。うち 4 例は速やかに骨髄移植を行うことで救命することができた。これまでの症例と合わせて 20 家系 32 例の XLP タイプ 1 が診断された。その臨床的特徴は致死的伝染性単核症が 16 例 (50%)、悪性リンパ腫が 6 例 (19%)、異常ガンマグロブリン血症が 12 例 (38%) であり、Seemyer らが報告した XLP registry と平均発症年齢、生存率も含めて同様であった。

また XLP タイプ 2 も 4 家系 6 例が同定された。

#### 10. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX)における消化管自己抗原の多様性



Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) は制御性 T 細胞の発生・分化に不可欠な転写因子 FOXP3 遺伝子の変異によって起こる原発性免疫不全症の一つであり、自己免疫性腸症を始めとする多彩な自己免疫疾患やアレルギーを特徴とする。我々は既に IPEX に合併する自己免疫性腸症に関連する腸管上皮細胞の自己抗原 AIE-75 を同定してきた。しかし、一部の症例では免疫組織学的に明らかに抗腸管上皮細胞抗体があるにも関わらず抗 AIE-75 抗体が低値の例があり、他の自己抗原が存在することを示唆する。

今回、新たな自己抗原の同定を試み、まず小腸抽出物を抗原としたウェスタンブロット法で 95 kDa および 28 kDa の自己抗原の存在を確認した。そこで 95 kDa と強く反応し、AIE-75 との反応の弱い血清を用いて、ヒト十二指腸由来  $\lambda$ gt11 発現ライブラリーをスクリーニングし、actin-binding protein の一つである villin を同定した。遺伝子組換えを用いて作製した GST-villin を抗原としてウェスタンブロット法で検討すると、IPEX 5 例中 4 例で陽性であった。また、28 kDa 抗原との反応性は IPEX 様症候群 1 例と IPEX 3 例で認められた。

28 kDa 抗原を同定できれば、IPEX ないし IPEX 様症候群における主要な腸管自己抗原が遺伝子組換えで作製可能となり、これを用いて定量的に自己抗体の測定を行うことが可能とな

る。IPEX は既に造血幹細胞移植によって治癒しうる疾患であり、早期発見・早期診断が重要である。こうした自己抗体測定系の確立は難治性下痢症において FOXP3 遺伝子解析前のスクリーニングに有用と考えられる。

#### 11. CINCA 症候群/NOMID 主要病因としての NLRP3 体細胞モザイク

CINCA 症候群/NOMID では約 60% の患者で NLRP3 遺伝子に変異が同定されるが、それ以外の患者の病因は不明であった。当研究班の平家らは、体細胞モザイクを有する本邦

CINCA/NOMID 症例 4 例を報告したが、症例数が少ないこと、本邦のみでの研究であったことより、その意義づけ、臨床像には不明な点が多かった。今回、海外 CINCA/NOMID 主要研究施設 (4 カ国) の国際協力のもと、NLRP3 変異陰性 CINCA/NOMID 症例で体細胞モザイクを検討した。NLRP3 変異陰性 CINCA/NOMID 患者およびその家族の DNA 検体の提供を受けサブクローニングによるシーケンス解析をおこなった。26 症例の患者のうち 18 症例に体細胞モザイクを同定した。頻度は 4.3~35.8% (mean $\pm$ SD:12.1 $\pm$ 7.9%) であった。In vitro 機能解析にて、同定された遺伝子異常の疾患関連性を確認した。NLRP3 体細胞モザイクは CINCA/NOMID の主要原因の 1 つであり、その診断には NLRP3 遺伝子体細胞モザイクの検討が重要であると考えられた。

#### 12. 本邦における家族性地中海熱 MEFV exon 3 variants の検討

家族性地中海熱 (FMF) の典型例においては、発熱、腹膜炎、胸膜炎、関節炎 (股関節、膝関節、足関節)、心外膜炎を伴い、38 度以上の発熱が 12 時間から 3 日持続することが特徴的である。しかし Incomplete type (不全型、非典型例) では、診断・治療に難渋する。今回 FMF incomplete type の臨床像、遺伝的背景を検討した。発熱持続期間は比較的長く、随伴症状として激しい腹痛や胸背部痛の合併が少なかった。関節炎 (骨髄炎)、難治性嘔吐、皮疹、筋痛などの TRAPS にみられる症状、PFAPA 様症状、など多彩な随伴症状を呈し、MEFV 遺伝子 exon3 の同一アレルに、P369S、R408Q 変異をヘテロ接合体で認めた。また、この約半数で exon2 の E148Q 変異が同じアレルにみられた。コルヒチンは有効だが、増量が必要な場合があった。一部で副腎皮質ホルモン薬とボルタレンが有効であった。FMF の不全型と診断するためには他の自己炎症性疾患の遺伝子多型の検索が必要である。

#### (4) 治療ガイドライン作成と新規治療法の開発

CGD、Wiskott-Aldrich 症候群の造血幹細胞移植ガイドラインの概要を作成し、ホームページに公開し、さらに今回、X-SCID に対する造血幹細胞移植に関するガイドラインを作成し、ホームページに公開した。重症先天性好中球減少症、高 IgM 症候群に関しても、国内外の造血幹細胞移植の成績を基に議論し、造血幹細胞移植ガイドラインを作成し、公開する予定である。今

回、複数の研究協力者から、これらの疾患に対する造血幹細胞移植の成績、問題点が提示された。

#### 1. 重症先天性好中球減少症に対する造血幹細胞移植

重症先天性好中球減少症 (SCN) は重症細菌感染症を反復する難治性遺伝性疾患であるが、G-CSF 投与により 95% 以上の症例で感染予防が可能となった。しかし長期投与により約 20% の症例で MDS/AML への移行がみられ、重症感染症とともに生命予後に影響を与えている。現在のところ MDS/AML 進展前の骨髄移植における前処置、移植時期等について明確な基準は示されていない。治療関連毒性軽減による移植成績の向上を目的に、MDS/AML 進展前の SCN 症例 5 例に fludarabine を用いた中等度骨髄破壊的前処置による骨髄移植を実施した。G-CSF に反応不良である症例、G-CSF の長期投与が必要な症例、重症感染症を反復する症例では、MDS/AML 進展前に中等度骨髄破壊的前処置による骨髄移植を行うことが有用であると考えられた。適切な移植時期、前処置法の選択については本邦症例を集積し、ガイドライン作成にむけて議論する必要がある。

#### 2. CGD、Chediak-Higashi 症候群、高 IgE 症候群に対する造血幹細胞移植

横浜市立大学では 2000 年から 2010 年までの 10 年間に 9 例 (男 7 名、女 3 名) の原発性免疫不全患者に対して造血幹細胞移植が施行された。原発性免疫不全症の内訳は、CGD 7 例、