

201024003B

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20年度～平成22年度 総合研究報告書

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20年度～平成22年度 総合研究報告書

主任研究者 原 寿郎

平成23年3月

目 次

I. 総合研究報告書	3
原 寿郎（九州大学大学院成長発達医学分野教授 原発性免疫不全症候群に関する調査研究班 主任研究者）	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
III. 研究成果の刊行物・別冊	43

I 総合研究報告書

総合研究報告書

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

1. 原発性免疫不全症候群の診断基準・診断ガイドラインを 14 策定し、ホームページで公表した。原発性免疫不全症候群の国際新分類の日本語訳、診断ガイドライン、原発性免疫不全症候群を疑う 10 の徴候日本版、病原体からみた免疫異常を作成し全国主要医療機関に配布した。全国疫学調査により原発性免疫不全症候群の推計有病率は 2.7 人/人口 10 万人であること、さらに各県ごとの頻度の差異、個々の疾患における臨床像の特徴を明らかにした。二次調査では、感染症、悪性疾患、自己免疫関連疾患の合併の特徴、治療成績が明らかになった。
2. フローサイトメーターなどを用いて 20 の原発性免疫不全症候群の迅速診断法を確立・公開した。疾患の迅速スクリーニング法として非常に有用であるだけでなく、早期診断により迅速な治療方針の決定が可能となり、多額の医療費が削減できた。また乾燥濾紙血（ガスリー血）中の TRECs 測定による重症複合免疫不全症、KRECs 測定による無 γ グロブリン血症の新生児スクリーニング法を確立した。
3. KRAS 変異を血液細胞でのみ認める自己免疫性リンパ球増殖症 (ALPS) から新しい疾患概念 RAS associated ALPS like disease を提唱した。高 IgE 症候群などで臨床的特徴をもたらす病態を明らかにした。さらに iPS 細胞作製やヒト化マウス疾患モデルを用いて原発性免疫不全症候群の病態解析を行った。
4. 慢性肉芽腫症、Wiskott-Aldrich 症候群の安全な造血幹細胞移植法等のガイドラインを 2008 年に、重症複合免疫不全症のガイドラインを 2010 年に作成し、造血幹細胞移植の推奨施設もホームページに公開した。高 IgM 症候群、CD3 delta 欠損症、重症先天性好中球減少症の造血幹細胞移植法の検討も行った。
5. ヒト化マウスに患者骨髄由来 Linage⁻CD34⁺細胞を移植し、ヒトの疾患病態を再現するモデルマウスを作製した。今後このモデルマウスを用いて新規治療法の有効性・安全性などについて検討を加える予定である。遺伝子修復治療研究、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などを行っている。
6. わが国の成人 XLA 患者の生活の質 (QOL) 把握のため、成人 XLA 患者について解析した。
主治医のメールアドレスの登録を進め、継続的に免疫不全症に関する最新の情報提供を行い、この疾患に対する医療水準を向上させている。PIDJ プロジェクトをホームページ (<http://pidj.rcai.riken.jp/>) にオープンし継続している。

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
蒲池 吉朗・名古屋大学大学院発育・加齢医学講座小児科学講師（平成 20-21 年）
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（平成 22 年）
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
平家 俊男・京都大学大学院医学研究科小児科学教授（平成 22 年）
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
岩田 力・東京家政大学家政学部児童学科教授（平成 20-21 年）
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（平成 22 年）
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

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
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
小林 信一・国立成育医療センター膠原病・感染症科医員（平成 20-21 年）
河合 利尚・国立成育医療センター膠原病・感染症科医長（平成 22 年）
今川 智之・横浜市立大学付属病院小児科（平成 21 年）
岩田 力・東京家政大学家政学部児童学科（平成 22 年）
久間木 悟・みやぎ県南中核病院（平成 22 年）

A. 研究目的

本調査研究班の目的は、原発性免疫不全症候群の疫学調査、迅速で正確な診断法の開発や整備、病因・病態解析、治療ガイドラインの作成、既治療法の改善と新規治療法の開発などを介して原発性免疫不全症候群の患者QOLと医療水準を向上させることにある。近年の基礎免疫学や分子生物学の進歩により、これまで原因不明であった多くの原発性免疫不全症候群の責任遺伝子が解明され、新たな疾患も次々に明らかになっている。最新の International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies の国際分類に則して、国内の原発性免疫不全症候群患者を把握し、診療上の問題点を明らかにする必要がある。

原発性免疫不全症候群の診断では、理化学研究所やかずさ DNA 研究所と共同で、ホームページに専門医による相談窓口を設け、診断基準、遺伝子診断を含め診断に必要な手続きについても公開し、多くの実績をあげている。他方、原発性免疫不全症候群の中には、早期に治療しなければ救命出来ない場合もあり、迅速診断システムが重要な意義を持つ。できるだけ多くの疾患で、フローサイトメーターなどを用いた迅速診断システムを開発していく必要がある。疾患の病態を解明することは、治療法の開発にもつながることから重要なテーマである。ヒト iPS 細胞やヒト化マウスモデルなどを応用して、疾患の病態解明を進める。治療では、治療ガイドライン、特に根治療法としての造血幹細胞移植法のガイドラインの作成が求められている。新たな治療法の開発についても、ヒト化マウスモデルなどを応用した基礎研究を積み重ねる必要がある。

このような背景から、平成 20 年度から、研究体制を新たにし、3 年間に渡り、基礎研究者との協力関係も整備し、原発性免疫不全症候群の多岐にわたる解決すべき問題点に取り組んできた。重点目標としては、1) 疫学調査研究、2) 迅速診断法の開発、3) 原因・責任遺伝子・病態の解明、4) 治療法の改良・遺伝子治療研究、5) 患者の長期的 QOL の向上および患

者や主治医への情報提供活動を掲げ、患者・家族への診療レベルの向上、QOL の向上にさらに寄与することを目的とした。

B. 研究方法

1. **疫学調査研究**：難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル（第 2 版）に準じて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一次・二次調査を行う。また二次調査では特に合併症の有無に重点を置いて調査を行う。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も推進し、IT を活用したデータベースを構築する。

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候群の診断において、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研・かずさ DNA 研究所・JMF センターで行う。

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。全分担研究者が症例の蓄積に努め、基礎医学者や海外の研究者と協力しながら、原因の解明をはじめとした新たな研究成果の発信を我が国から行うよう努める。さらにヒト化マウス疾患モデルを用いて原発性免疫不全症候群の原因解明、病態解析を行う。

4. **治療ガイドラインの作成と新規治療法の改良・開発**：患者の生活の実態調査結果も考慮しながら、主要免疫不全症について、安全性の高い造血幹細胞移植ガイドラインを作成し公開する。遺伝子治療研究では、安全性の高いベクターの開発に向けて、ヒト化マウスモデルを応用して有効性とともを検証する。

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新しい情報をホームページに掲載する。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。患者の QOL 調査(1 部は自己筆記式質問票、もう 1 部は 36-item short form health survey, version2 (SF-36v2)で HR-QOL 評価)を行い、主治医調査票からの患者情報と合体させ問題点を抽出し改善方法を検討する。

(倫理面への配慮)

本調査研究に必要とされる患者試料を得るにあたっては、各研究者の所属する機関の倫理委員会の承認を得ている。患者試料の採取にあたっては、遺伝子解析その他の医学研究に供する事、結果は本人が特定できるような形では公表しない事など、患者・代諾者の理解を求め、経緯を書面に残している。ES 細胞や iPS 細胞の取り扱いについては該当するガイドラインに沿い、試料提供者に十分な説明をした上で書面で同意を得ている。

C. 研究結果

1. 基準の策定と全国疫学調査の実施

2008 年にまず重症複合免疫不全症、X-連鎖無 γ グロブリン血症、分類不能型免疫不全症、X-連鎖高 IgM 症候群、IgA 欠損症、Wiskott-Aldrich 症候群、毛細血管拡張性失調症、ナイミーヘン症候群、DiGeorge 症候群、X-連鎖リンパ増殖性症候群、慢性肉芽腫症、白血球接着不全症、WHIM 症候群、播種性 BCG 感染症の診断基準・診断ガイドラインを策定しホームページで公表した。同年に原発性免疫不全症候群の最新の国際的分類法・診断基準に従い全国疫学調査を行った。その際、原発性免疫不全症候群の国際新分類の日本語訳、ヨーロッパ免疫不全研究会の診断ガイドラインの日本語訳、原発性免疫不全症候群を疑う 10 の徴候日本版、病原体からみた免疫異常を作成し全国主要医療機関に配布した。

第一次調査で我が国全体の原発性免疫不全症候群の頻度、かつ各県ごとの頻度の差異、個々の疾患における臨床像の特徴を明らかにした。推計されるわが国における原発性免疫不全症候群患者数は 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、これまで報告された人数より多く存在すると推計された。疾患分類では、抗体産生不全症が 37.6%と最も高頻度で、特に内科からの報告は多くが抗体産生不全症であった。二次調査では重症複合免疫不全症、Wiskott-Aldrich 症候群、高 IgM 症候群、高 IgE 症候群の解析を行い、それぞれ感染症、悪性疾患、自己免疫関連疾患の合併の特徴、治療成績が明らかになった。そのうち、悪性腫瘍は 25 例に合併しており、悪性リンパ腫が最も多かった。自己免疫疾患関連では、炎症性腸疾患の合併が多く、川崎病の合併も 5 例で認められた。二次調査結果では、(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ところ、(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。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 名を解析可能であった。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。今後、他の疾患の二次調査結果についても解析結果を公開する。

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。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。

小児血液学会は平成21年2月より全国の再生不良性貧血、骨髄異形成症候群の中央診断を開始している。これを詳細に検討した結果、骨髄細胞に見られる形態異常をもとに、原発性免疫不全症候群が疑われる例が3.9%にみられた。その内訳はWiskott-Aldrich症候群1例、RAS-associated ALPS like diseases (RALD) 2例、B細胞NK細胞減少を伴う好中球減少症2例、免疫制御機構の異常が疑われる2系統以上の自己免疫性血球減少症6例であった。

このように、我が国における原発性免疫不全症候群の臨床像は、欧米と異なる面がみられ、早期診断の必要性、専門家による治療ガイドラインや合併症予防指針、日常生活指導指針などを提示する必要性

があると考えられる。

2. 診断法の開発

(1) フローサイトメーターを用いたX-SCID、JAK3(-)SCID、XLA、X-HIGM、WAS、FHL、XLP、IPEX、CGD、IFN- γ R1欠損症、IL-12R β 1欠損症、IRAK4欠損症、MyD88欠損症、UNC-93B1/TLR3欠損症、NEMO異常症、Ataxia-telangiectasia (AT)、好中球二次顆粒欠損症の迅速診断法を確立・公開した。AT患者のEBV-LCL、活性化T細胞、末梢血単核球を用いて放射線照射、あるいは過酸化水素刺激し、細胞内リン酸化ATM(pATM)をFACSにて解析する本法はDNA損傷修復機能まで検証している点が優れているが、他のDNA修復異常症でも異常値の可能性もある。また血小板を用いたフローサイトメーター法による家族性血球貪食症候群3型、単球を用いたCINCA症候群の新たな迅速診断法を開発した。疾患の迅速スクリーニング法として非常に有用であるだけでなく、早期診断により迅速な治療方針の決定が可能となり、多額の医療費が削減できた。

(2) TREC, KREC測定によるSCID, XLAなどの新生児スクリーニング法の開発(図2)

乾燥濾紙血(ガスリー血)中のTREC_s測定による重症複合免疫不全症、KREC_s測定による無 γ グロブリン血症の新生児スクリーニング法を確立した。T細胞欠損症であるSCIDでは、TREC_sは全例でごく低値ないし検出感度以下であった。XLAなどのB細胞欠損症では新生児期のcJKREC_s、sjKREC_sは全例検出感度以下だった。B(-)SCIDではcJKREC_s、sjKREC_sは検出感度以下、B(+)-SCIDではcJKREC_s、sjKREC_s正常であり、SCIDの病型診断にも有用であった。TREC_s、KREC_sの同時測定により、SCID、無 γ グロブリン血症の新生児スクリーニングが可能であり、早期発見・早期診断・早期治療へと応用できる。今後、実験的に一部の地域でTREC_sやKREC_s測定による新生児スクリーニング法を実施し、その問題点、有用性を検証する。

3. 遺伝子の同定や病態の解明

理研、かざさDNA研究所におけるPIDJ登録患者の遺伝子解析は、今年度は全施設から依頼があり、新規遺伝子も随時解析を始めている。現在までの3年間(2010年10月現在)で遺伝子数127種類、解析検体618名、のべ2084遺伝子を解析し、既知及びフレームシフト等が検出された症例(家族診断含む)は194例であった。今後、臨床症状や他検査所見等からの亜群分類と、亜群に基づいた既知遺伝子解析、さらには新規原因遺伝子探索が必要になると考えられる。次世代DNAシーケンシングなどの新しい遺伝子構造解析方法も視野に入れたアプローチを検討中である。

責任遺伝子の同定や病態解析に関しては以下の研究成果を得た。

(1) ヒト化マウスモデルの樹立

実験動物を用いた研究はin vivoでの解析が可能でありこれまでの医学の発展に大きく寄与してきた。その反面、ヒトと実験動物との間に多くの相違点があることも分かり、ヒト疾患の病態解明に限界がある。この問題を解決するため、今回XLAのヒト化マウスモデルを作成した。5名のXLA患者骨髄よりLinage⁻CD34⁺細胞をcell sorterで純化し、新生仔NOD/SCID/IL2rg knock outマウスに移植した(XLAレシピエントマウス)。対照として、正常臍帯血よりLinage⁻CD34⁺細胞を分離し同様に新生仔NOD/SCID/IL2rg knock outマウスに移植した(正常ヒト化マウス)。移植から5ヶ月以降に骨髄、脾臓および末梢血における各免疫細胞およびB細胞分化についてフローサイトメトリーで解析を行った。その結果、2次リンパ組織である脾臓において、XLAレシピエントマウスは正常ヒト化マウスと比較してCD19⁺B細胞の頻度が低下していた。一方で他の免疫細胞サブセットであるCD3⁺T細胞やCD33⁺単球・顆粒球はXLAレシピエントマウスおよび正常ヒト化マウスいずれにも存在していた。正常ヒト化マウスの脾臓では、CD20陽性B細胞が多く、IgM⁺IgD⁺の成熟したB細胞が増加していたが、XLAレシピエント

マウスでは大多数がCD10⁺IgM⁻IgD⁻のProB細胞およびPreB細胞でありB細胞分化の障害が顕著にみられた。XLAレシピエントマウスおよび正常ヒト化マウスより血清を採取しIgMおよびIgGを測定したところ、XLAレシピエントマウスでは著明な免疫グロブリン産生能の低下を認めた。一方、正常ヒト化マウスの脾臓B細胞をCD40抗体やIL-4、IL-21などサイトカインで刺激を行ったところB細胞の増殖とIgG産生細胞へのクラススイッチが見られた。

以上のことから、マウス内でヒトのB細胞分化を再現することが可能であり、さらに、XLAのヒト化マウスモデルを作成する事が出来ることが証明された。

(2) 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候群の病態解析

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。原発性免疫不全症候群の病態をiPS細胞を用いて解析することを目的として、今回、CIAS1遺伝子異常の体細胞モザイクを有するCINCA/NOMID患者からiPS細胞を作成し、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を産生させ、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た。iPS細胞から誘導されたCINCA症候群患者由来の単球マクロファージでは過剰なIL-1βの産生が認められ、病態再現に成功したことが確認された。これらの細胞を用いて検討した結果、CIAS1遺伝子異常を有する細胞から、遺伝子異常のない細胞に対して炎症を惹起させる液性因子が作用していることが判明し、体細胞モザイクでCINCA症候群が発症する原因であることが解明された。今後、種々の疾患に応用し、病態解明を進める。

(3) 高IgE症候群

峯岸らは、黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍と肺炎、アトピー性皮膚炎、血清IgE高値、骨・歯牙

の異常を合併する1型の高IgE症候群の主要な原因がSTAT3のドミナントネガティブ(DN)変異であることを明らかにした(2007年Nature)。さらにSTAT3に異常を有する高IgE症候群患者では、活性化したT細胞からのTh17サイトカインの産生が不良で、そのためケラチノサイトと気管支上皮細胞においてのみ、好中球をリクルートするケモカイン(CXCL8, CXCL1)と β -defensin2/3の産生が不良であることを明らかにした。このことが高IgE症候群に特徴的な皮膚と肺の易感染性の発症に関与しているものと考えられる。また高IgE症候群のモデルマウスであるSTAT3-DN発現マウスを解析すると、①骨芽細胞の機能が低下し骨の機械的強度が低下すること、②骨芽細胞上のRANKL(Receptor activator of NF- κ B Ligand)の発現が低下しこのため破骨細胞の分化が障害されていることを明らかにした。これらが高IgE症候群に特徴的な骨と歯牙の異常の発症に関与しているものと考えられる。次に、高IgE症候群の樹状細胞では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た。そのため、誘導性の制御性T細胞(induced regulatory T cell; iTreg cell)の分化誘導が低下しており、T細胞の増殖抑制、サイトカインの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可能性が示唆された。

(4)RAS associated ALPS like disease

今回、新規疾患概念として、RAS associated ALPS like diseaseを明らかにした。3例のJMMLあるいはMDS様の身体所見、検査所見を呈し、またEvans症候群様の身体所見、検査所見(自己免疫性溶血性貧血、ITP、抗核抗体陽性)を示す症例につき解析を行ったところ、患者ではB細胞が増加しており、一方、DNT細胞の増加は認めなかった。また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で培養し、IL-2を除いて培養した場合にはアポトーシスに抵抗し、Bimの誘導が低下していた。以上より、N-Ras異常に近い状態と考えて、K-Rasの遺伝子解析を行ったところ、3例共に13番目のアミノ酸にて置換が認められ、active mutantであると想定された。

(5)IPEX症候群

IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked)症候群は免疫調節障害、1型糖尿病、甲状腺機能低下症などの多発性内分泌異常、自己免疫性腸症による難治性下痢などの症状を呈し、乳児期に致死的経過となるきわめてまれな免疫不全症である。近年、その責任遺伝子としてFOXP3が同定された。FOXP3遺伝子はforkhead familyに属する転写因子であり、制御性(regulatory)T細胞(Treg)の発生・分化を司るとされている。

今回、わが国のIPEX症候群患者6家系7名の臨床的、免疫学特徴を明らかにした。FOXP3遺伝子変異はL76fsx53, A383T, F373V, K250-1, IVS1+2T>Gであり、1例では変異は同定されなかった。健常人では末梢血においてFOXP3⁺CD4⁺CD25⁺T細胞を約5%認めるが、IPEX患者では全例とも1%以下に低下していた。また正常人では制御性T細胞(Treg)はCD127^{dim}CD4⁺CD25⁺T細胞と考えられているがIPEX症候群患者におけるCD127^{dim}CD4⁺CD25⁺T細胞は健常人由来の細胞と異なり、T細胞の増殖抑制効果が弱く認められた。CD127^{dim}CD4⁺CD25⁺T細胞の機能にはFOXP3の発現が必須と考えられ、これらの細胞はTregの前駆細胞である可能性が考えられた。

次に、IPEX症候群の自己免疫性腸症の発症機序に関する検討を行った。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を同定してきたが、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。こうした自己抗原の同定するため、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 λ 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。

今後 28 kDa 抗原を同定することで、IPEX ないし IPEX 様症候群における主要な腸管自己抗原を遺伝子組換えで作製できることとなり、免疫組織学的方法を用いずに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。

(6) XLP

X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) は EB ウイルス (EBV) 感染に対する異常な免疫応答を特徴とする原発性免疫不全症候群であるが、致死性的伝染性単核症 (60%)、悪性リンパ腫 (30%)、異常ガンマグロブリン血症 (30%) と多彩な臨床像をとるため、家族歴がない場合には臨床診断が困難であるが、しばしば致死性的経過をとるため、早期の診断が望まれる。2005 年から 2009 年に EBV 関連血球貪食性組織球症などより XLP を疑われた 24 例の SAP 蛋白の発現を調べたところ、うち 6 例において CD8⁺T 細胞ならびに CD56⁺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性的伝染性単核症が 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。

(7) MSMD

IFNGR1, *IFNGR2*, *IL12B*, *IL12RB1*, *STAT1* 及び *NEMO* 遺伝子異常などによって細胞内寄生菌に対する易感染性がおこり Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD) と呼ばれている。我が国における MSMD の臨床像や患者の遺伝的背景を解明するため、今回、平成 11 年から平成 21 年の十年間に重症の細胞内寄生菌感染症をおこした 49 名の患者を対象として、その臨床像を解析した。その結果、起炎菌は BCG 感染症が最も多く、BCG 骨髄炎が最も多かった。サルモネラやリステリア感染症は見られなかった。BCG 接種から発症までの期間 (中央値) は 11 か月 (5~46 か月) であった。5 家系 6 名の患者は優性遺伝型部分 IFN- γ R1 欠損症であった。1 例 (男性) に *NEMO* 遺伝子変異を認め、この患者は外胚葉形成不全症の症状は明確ではなかった。すべての優性遺伝型部分 IFN- γ R1 欠損症で、単球での IFN- γ R1 の過剰発現がみられ、*NEMO* 遺伝子変異を認めた患者では、LPS 刺激による単球内 TNF- α 産生能が低下していた。我が国においては優性遺伝型部分 IFN- γ R1 欠損症が MSMD のなかで最も多いと考えられ、その臨床像や遺伝的背景は欧米と異なる事が明らかになった。

(8) XLA

X 連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) では時に難聴を合併するが、多くは反復性中耳炎によるものである。まれに進行性の難聴とジストニア (Mohr-Tranebjaerg 症候群; MTS) を合併することがある。XLA と MTS の原因遺伝子はそれぞれ *BTK* と *TIMMSA* であり、これらが隣接していることから隣接遺伝子欠失により XLA と MTS を発症しうる。今回難聴と自閉症を合併した 10 歳の XLA 患者の遺伝子解析を行ったところ、*BTK* の 3' 端と *TIMMSA* のみならず、さらにセントロメア側に存在する *TAF7L* と *DRP2* の欠失を伴い、約 150kb の大欠失であった。切断点は 5' 端が *DRP2* の 4.4kb 上流、3' 端が *BTK* のイントロン 5 に存在しており、わずかに 3 塩基の相同配列で組み換

えを生じていた。従来組み換えはイントロン内の Alu 配列などの繰り返し配列を利用して生じることが多いとされていたが、今回は Alu 配列部位ではなく、しかも大欠失であったことより、新たなメカニズムによるものと推察される。

次に、今回、XLA の患者において、病理学的に器質化肺炎を呈する難治性の胸膜炎を発症した患者の病変部からの遺伝子解析により *Helicobacter equorum* を世界で初めてヒトから検出した。さらに、in situ hybridization でも *Helicobacter equorum* の発現を確認した。この持続感染に伴う高エンドトキシン血症にもかかわらず、エンドトキシンショックは誘導されなかった。BTK タンパクの異常により TLRs のシグナル伝達系が障害されているため、患者はエンドトキシンに低感受性である可能性が考えられた。

(9) CVID

Common variable immunodeficiency (CVID) は定義があいまいであり、雑多な疾患が含まれている。そ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。その結果、TREC 陽性が 22 人、TREC 陰性が 10 人となり 2 群に分けることができた。sjKREC も測定できた 31 例では、TREC、sjKREC 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 ともに陰性が 4 例の 4 群に分類できた。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。しかし CD45RO 偏倚が認められない症例もいた。TREC、sjKREC 正常の 1 兄弟例で、TAC1 の複合ヘテロ変異 (c. 571_572insA; c. 226G>T) を認めた。また、TREC、sjKREC ともに低下した群に XIAP 変異例を見い

だした。TREC、sjKREC とも陰性の群は、臨床的に易感染性が強く、重症例が多く認められた。

以上の結果から、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。

次に、ICOS 欠損症姉弟例において T 細胞サブセット解析を行ったところ、CD4+CD45RO+細胞の著減、特に CCR7-CD62L-群の effector memory 群の著減が明らかになった。また記憶 T 細胞の減少は CD4 細胞に留まらず、CD8T 細胞においても同様の現象が観察された。さらに末梢血 CD4T 細胞を精製し、CD3/CD28 刺激を行ったところ、IFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-17 の産生が不良であることが明らかになった。PMA/Ionophore 刺激後の細胞内サイトカイン染色でも同様の結果が得られ、患者では T 細胞シグナル異常ではなく、Effector 細胞の polarization に問題があることが示唆された。さらに ICOS が欠損した状態では、IL-10 産生制御性 T 細胞が減少しているのみならず、CTLA-4 の誘導も不良であることが明らかになった。

(10) 重症複合免疫不全症

重症複合免疫不全症の中で最も頻度の高い X 連鎖重症複合免疫不全症 (XSCID) は、サイトカインレセプターである γ C 鎖の異常に起因し、T 細胞と NK 細胞の発生が障害されることが特徴である。 γ C 鎖の異常による X 連鎖重症複合免疫不全症 (XSCID) は、T/NK 細胞の発生が障害されるため、T^BNK⁻ SCID となる。今回、自己 T/NK 細胞が出現し Omenn 症候群様の症状を呈した非典型的 XSCID の症例において、第二変異による遺伝子変異の reversion を見出した。症例は 5 ヶ月男児。患児は IL2RG 遺伝子に変異 IVS1+5G>A を有し、スプライス異常により大部分の mRNA は早期翻訳停止となっていた。しかし一部に正常 mRNA も作られており、 γ C 鎖発現の低下した異常な T 細胞と NK 細胞が認められた。この異常 T 細胞の存在を背景に、患児では皮膚浸潤 CD8⁺T 細胞に reversion が起こり、Omenn 症候群様症状を呈していた。Revertant では元の変異 IVS1+5G>A により生じる cryptic なスプライス部位の近傍に第二変異 IVS1+29G>A が出現したため

に、正常なスプライシングが回復していた。以上より、XSCIDの臨床スペクトラムは幅広く、また reversion は病態を修飾する重要な因子となる得ることが示された。

(11) Omenn 症候群、RAG 異常症

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。今回我々は、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。以上より、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。

(12) ADA 欠損症

ADA 欠損症は常染色体劣性遺伝疾患で重症複合免疫不全症 (SCID) の約 15% を占める。ADA 欠損症の多くは SCID を呈するが、臨床的重症度は ADA 遺伝子変異の種類に基づく ADA 残存活性から、SCID、delayed onset、late onset、partial deficiency の 4 群に分けられる。Partial deficiency の変異の研究から ADA 活性は正常の 1% あれば正常免疫能を維持できるとされている。重症の ADA 欠損症の 1 ヶ月男児において父親由来の 2 つのミスセンス変異 (G239S, R34S) と母親由来のナンセンス変異 (Q119X) の計 3 つの変異を同定した。G239S は "partial deficiency" の変異である。一方、R34S は新規変異であった。ADA 遺伝

子を欠失させた大腸菌 S03834 株を用いて、G239S、R34S の変異を有するヒト ADA 遺伝子 cDNA を組み込んだクローンを作成し ADA 残存活性を測定した。それぞれ 2.2%、56.4% であり R34S も "partial deficiency" の変異であることが推測された。更に G239S, R34S の 2 つの変異を有するクローンでは ADA 残存活性が 0.008% と著明に低下することが示された。蛋白の立体構造解析によって、G239S は疎水性コア形成に関係する部位の変異であり、R34S はヘリックス間の水素結合に関係していると予測された。これら二つの "partial deficiency" 変異が ADA 遺伝子の同一アレル上に存在して相乗的に作用することによって、ADA 活性部位の重大な構造的変化を生じて劇的な活性低下をもたらした可能性が示唆された。

(13) Wiskott-Aldrich syndrome

Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) のミスセンス変異が WASP 結合蛋白質 (WIP) 結合領域に集中しているが、その理由は解明されていなかった。今回、WIP ノックアウトマウス及び患者 T 細胞の解析から、WASP-WIP 複合体の形成が WASP 蛋白質の安定化に重要であること、また WASP 蛋白質分解機構として Calpain とユビキチン化の関与が示唆された。次に、恒常的活性化変異 WASP により X 連鎖性好中球減少症と MDS の合併例が報告されているが、発症の分子機構は十分に解明されていない。我々は活性化型 WASP 変異が Lck などのチロシンキナーゼで容易にリン酸化され、機能的にも podosome 形成を促進することを示した。Genechip を用いて活性化型変異 L270P WASP の影響を K562 細胞で調べると G-CSF 受容体を始めいくつか骨髄系細胞分化に関わる遺伝子発現の変化が観察され、WASP は細胞核内で遺伝子転写調節にも関わることを示された。

次に、WASP の TCR シグナル下での WASP 蛋白質分解機構の詳細について検討した。今回 TCR 刺激下における WASP 蛋白が、カルシウム依存性蛋白質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及びその安定性の一部を制御することを発見した。また、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新しい洞察を提供するものである。

(14) 慢性肉芽腫症

X 連鎖性慢性肉芽腫症 (X-CGD) は *CYBB* 遺伝子異常に起因し、食細胞の殺菌能障害を特徴とする原発性免疫不全症候群である。そのほとんどは *CYBB* 遺伝子内における変異によるが、複数の遺伝子に及ぶ欠失により McLeod 症候群や OTC 欠損症などを合併した例も報告されている。しかしその大部分は欠失断端が決定されておらず、詳細な欠失範囲や欠失機構は不明である。今回 *CYBB* 遺伝子を含む隣接遺伝子症候群 (CGS) を呈した 2 例について、array CGH 解析結果に基づき PCR 法と DNA Walking 法により遺伝子欠失断端を決定した。大きな欠損や複数の遺伝子に及ぶ欠失の原因として low-copy repeats (LCR) とよばれる 10~400 kb の homology の高い配列同士での homologous recombination (HR) によって生じたと考えられる例が Williams 症候群や neurofibromatosis など報告されている。症例によってはテロメア側断端を含む約 31 kb 配列が、36 bp の挿入部位を含んだ欠失領域の antisense 配列と約 96~99 % の homology を有しており、LCRs 間での HR が欠失に関わる可能性がある。同一部位を断端とする例や同一の遺伝子欠失範囲をもった例の報告はみられなかった。正確な断端の決定例の蓄積により、Xp21.1 領域の欠失メカニズムを明らかにできる可能性があると考えられた。

(15) Schwachman-Diamond syndrome

低身長、脾臓の著明な脂肪浸潤と脾実質萎縮、脾外分泌不全、膝関節骨端軟骨の石灰化、好中球減少症などを呈した患者について、SBDS 遺伝子検査を行

った結果、Shwachman-Diamond Syndrome (SDS) と診断した。末梢血好中球の fMLP に対する Taxiscan による走化能解析を行い、velocity も directionality も低下していたこと、および、fMLP 低濃度 (10^{-10} - 10^{-9} M) での directionality の異常がコントロールに対して顕著であり、SBDS 蛋白が velocity も directionality にも関わる PI3 kinase や SHIP1 などのシグナル伝達機構に関与し、走化能異常をきたしているのではないかと考えられた。

(16) 外胚葉形成不全免疫不全症候群

X 連鎖性外胚葉形成不全免疫不全症候群

(XL-EDA-ID) は皮膚、汗腺、歯などの外胚葉の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。

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 を同定した。本変異は、splice-acceptor site に存在し、患者ではスプライス異常があることが予想された。

mRNA の検討では、異常なスプライシングを受けた NEMO mRNA と、正常な NEMO mRNA の両方が検出された。この WT と mutant の比率は採血する日によって変動がみられた。患者白血球では炎症性サイトカイン産生の低下、メモリー B 細胞の低下、麻疹ウイルスに対する反応性の低下と抗体産生不全が認められた。これらの検査結果から、本症例は NEMO の量的異常により XL-EDA-ID を発症したことが推測された。

(17) IRAK4、MyD88 欠損症

近年、IRAK4 欠損症に代表されるように Toll 様受容体 (TLR) シグナル伝達経路の破綻により小児期に発症する免疫不全例の報告が相次いでいる。2008 年に IRAK4 欠損症と類似の表現型を示し、特にグラム陽性菌群に易感染性を呈する MyD88 欠損症の存在が報告された。そこで、MyD88 欠損症の表現型発生メカニズムを解明するため、MyD88 のタンパク立体構造と相互作用機能解析を行った。MyD88 は構造上互いに離れた位置に存在する BB ループと α ヘリックス E の 2 箇所で、別のアダプター分子 Mal と直接相互作用する。MyD88 欠損症で同定された R196C 変異タンパクは、

Mal との相互作用が減弱していた。これにより MyD88/Mal 経路以外の他に代替経路を持たない TLR2 経路が障害されると、特にグラム陽性菌に対する易感染性が顕在化してくるのではないかと考えられた。

次に、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推測される。

(18) B 細胞、NK 細胞、形質細胞様樹状細胞を欠損した新規原発性免疫不全症候群

リンパ球系細胞への分化障害による新規原発性免疫不全症候群を明らかにした。患者 (女兒) は生後 4 か月時にニューモシテリス肺炎にて入院した。患児のリンパ節は欠損しており、IgG、IgM、IgA はいずれも検出感度以下で、末梢血の B 細胞及び NK 細胞の欠損を認めた。また、骨髄系樹状細胞 myeloid dendritic cells (mDC) は正常に認められたが、形質細胞様樹状細胞 plasmacytoid dendritic cells (pDC) は完全に欠損していた。T 細胞数は正常であり、抗 CD3/CD28 抗体や PHA に対する増殖反応は正常だった。骨髄では CD19⁺細胞および CD10⁺細胞は完全に欠損しており、さらに最も未分化なリンパ球系細胞と考えられる CD127⁺CD34⁺細胞が欠損していた。pDC の前駆細胞と考えられる CD123⁺CD38⁺CD34⁺細胞も欠損していた。末梢血単核球の poly:IC、ODN type A 刺激に対する IL-6 産生能や、Mumps 生ワクチン刺激による IFN- γ 産生能は著しく低下していた。新生仔

NOD/scid/IL2ryK0 マウスに患者骨髄 CD34⁺細胞を移植したところ患者の表現系が再現された。

(19) IgM メモリー B 細胞を欠損する新規原発性免疫不全症候群

生後 12 ヶ月からインフルエンザ桿菌による肺炎を反復し、3 歳 5 ヶ月時に肺炎球菌性髄膜炎にて入院した男児において、免疫学的精査を行ったところ、血清 IgM と IgM メモリー B 細胞の選択的欠損を見いだした。これまでの報告では、選択的 IgM 欠損症では荚膜多糖体を有する細菌に対する易感染性は著明ではないことなど、本児の肺炎球菌、インフルエンザ桿菌に対する易感染性は IgM メモリー B 細胞の選択的欠損が重要な役割を果たしていると考えられた。新規の原発性免疫不全症候群の可能性が示唆された。

(20) CINCA 症候群、CAPS

Chronic infantile neurological cutaneous and articular (CINCA) 症候群/NOIMD (Neonatal onset multisystem inflammatory disease) は NLRP3 インフラマゾームの異常活性化による IL-1 β 過剰産生に伴い全身炎症を生じる自己炎症疾患である。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。我々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クエンス解析をおこなった。26 症例の患者の内 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。19 例の患者家族に体細胞モザイクは同定されなかった。また *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。以上より CINCA/NOMID 診断には NLRP3 体細胞モザイクの検討が不可欠であり、CINCA/NOMID の主要原因の 1 つと考えられた。

また新たに、岐阜地区で CIAS1 遺伝子変異を有する 5 症例を確認した。このうち 2 症例は軽症型の家族性寒冷自己炎症性症候群 (FCAS) の表現型を示し、サイトカインプロファイルの解析から CINCA 症候群、Muckle-Wells 症候群 (MWS) 症例と異なり血清 IL-18 は上昇しないが、患者末梢血単核球分画 (PBMCs) からの LPS 刺激後の IL-18 産生が上昇することが示された。

(21) 家族性地中海熱、

本邦における 105 例の家族性地中海熱患者の臨床的検討では、地中海地方に比し、腹痛、関節痛、皮疹の合併が少なく、胸背部痛が多い傾向がみられた。また、確定診断に 10 年以上を有し、患者 QOL が著しく損なわれている例が多くみられた。治療薬コルヒチンがほぼ全例で著効しており、諸外国の使用量の半量で有効であった。家族性地中海熱責任遺伝子 *MEFV* の本邦初の M680I 変異家系を今年度みいだした。また、心筋炎を反復し手術を繰り返している患児を本症と診断し、コルヒチン治療を行うことができた。遺伝子解析では、E148Q/M694I 変異が多いことが判明したが、ヘテロ接合の M694I 変異のみおよび E148Q のみを有する症例の検討が必要と考えられた。今回検討した典型的な家族性地中海熱患者以外に、作成した診断基準の必須項目を満たさない発熱期間が長く、特異的な *MEFV* 遺伝子変異 (P369S, R408G variants) を有する症例を多数に認めた。本患者の治療は今後重要な課題と考えられ、パイリン関連周期熱症候群として臨床検査所見をまとめる必要がある。

次に、家族性地中海熱の非典型例の特徴について検討した。家族性地中海熱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が、典型的な FMF 以外に、incomplete type (不全型、非典型例) があり、診断・治療に難渋することが多い。非典型例は、発熱持続期間が比較的長く、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。

次に、家族性地中海熱症例で特異な変異 c. 910G>A をホモ接合体性に認める 2 症例について、*MEFV* 遺伝子発現ならびに蛋白発現の特徴を検討した。本変異は exon2 の最終塩基の変異で、主として exon 2 が skipping するスプライス異常が生じることが mRNA ならびに蛋白レベルで確認された。さらに、exon 2 を欠損した *MEFV* 遺伝子を導入した細胞では、pyrin 蛋白の発現低下や分布異常が起こる可能性が示唆された。これらの結果より、すでに報告されている、ミスセンス変異以外にも pyrin 蛋白発現量の低下や異常蛋白発現による炎症制御異常が惹起されることが明らかになった。

(22) 若年性サルコイドーシス

若年性サルコイドーシス/Blau 症候群は皮疹、関節炎、ブドウ膜炎を三主徴とする主として 4 歳以下で発症する自己炎症症候群の 1 つである。近年、病因として NOD2 遺伝子異常との関連が明らかにされた。今回 NOD2 遺伝子異常を認めた本邦 20 例の臨床的特徴をまとめるとともに、変異 NOD2 遺伝子による NF- κ B 活性化と臨床的重症度との相関について検討した。いずれも変異 NOD2 遺伝子はリガンド非依存的 NF- κ B 活性化能をもち、その病因としての重要性が確認された。皮膚症状として魚鱗癬様紅皮症型皮疹 + 苔癬様型皮疹が大部分で 25% に結節性紅斑型皮疹を認めた。関節症状は多関節型、眼症状は全眼型のブドウ膜炎が大部分であった。本邦に特徴的なこととして 55% に発熱を認め、全身型若年性特発性関節炎との鑑別が重要と考えられた。病因として重要であることが確認された変異 NOD2 遺伝子によるリガンド非依存的 NF- κ B 活性化能と臨床的重症度との相関の検討では、眼症状の予後因子として有効である可能性が示唆された。

4. 治療法の改良と遺伝子治療の開発研究

(1) 造血幹細胞移植治療ガイドライン作成と移植推奨施設の提示

慢性肉芽腫症と Wiskott-Aldrich 症候群の造血幹細胞移植法のガイドラインを 2008 年に、重症複合免疫不全症のガイドラインを 2010 年に作成し、造血幹細胞移植の推奨施設もホームページに公開した

(http://pidj.rcai.riken.jp/medical_guideline.html)。また、SCID に対する造血幹細胞移植に関しては、患者家族や主治医に対する情報として、移植症例数や専門性を考慮した移植推奨施設を提示した。

IgM 症候群、CD3 delta 欠損症、重症先天性好中球減少症、Chediak-Higashi 症候群、高 IgE 症候群の造血幹細胞移植法の検討も行った。これらの疾患についても今後可能な限りガイドラインを作成し、公開する。

a) B-SCID に対する造血幹細胞移植

X-SCID や JAK3 欠損症においては、前処置なしで造血幹細胞移植を行う事も可能であるが、結果として抗体産生能が回復しないことがほとんどである。この点を解決するため、骨髄非破壊的前処置による造血幹細胞移植法を提示している。前処置の種類については、最善の方法を模索するため、FLU+L-PAM を用いる方法と、FLU+BU を用いる方法の両者を記載している。ただし、HLA 完全一致の同胞ドナーからの移植の場合は、前処置なしで移植しても抗体産生能が回復するケースが多いため、前処置はしないこととしている。また、前処置の安全性を考慮し、生後 3 か月以内に移植する場合、重症の合併症がある場合などには前処置は控えるべきである旨記載している。

b) 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。今回、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の前処置による骨髄移植を実施し、その有効性について検討を行った。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の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、今後、この疾患に対する造血幹細胞移植ガイドラインの作成に向けて検討を行う。

5. 新規治療法の開発

ヒト化マウスに XLA および IPEX 患者骨髄由来 Linage⁻CD34⁺細胞を移植し、ヒト XLA および IPEX の病態を再現するモデルマウスを作製した。今後このモデルマウスを用いて新規治療法の有効性・安全性などについて検討を加える予定である。

(1) 遺伝子治療研究

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候群である。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抗体産生能を回復できる可能性がある。我々は *BTK* 遺伝子とその隣接遺伝子を含む 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 選択によって遺伝子導入された細胞をクローニングした。Hyg 耐性株を 0.6%の頻度で得て、相同組換えを 0.07%の頻度で証明した。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。造血幹細胞での更なる検討を行い今後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。

(2) 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

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が確立できれば、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。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。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。

また、造血幹細胞から肥満細胞への分化に関する研究を行い、可溶性 Notch リガンドを加えて培養することにより、短時間に大多数の細胞が肥満細胞に分化することを確認した。また、この培養では選択的に粘膜型肥満細胞が産生されることも明らかにした。肥満細胞による生体防御機構には未だ不明な点が多いが、その一端を解明した本研究成果は、免疫不全症の病態解明に一定の寄与をすると考えられる。

6. QOL 調査

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。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。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。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。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%) 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。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。今回の調査により慢性肺疾患を有する XLA 患者では本人が喫煙していた頻度が高率であったことから、早期から本人に禁煙指導する必要がある。

(7) 患者家族や医療者への継続的情報提供

診断基準、迅速診断を行っている施設、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など新しい情報をホームページに掲載した。PIDJ ホームページでは症例の相談を受け付けており、各疾患の専門家が主治医にむけて診断や治療のアドバイスをしている。日本免疫不全研究会を班会議翌日に開催し、担当医師への情報提供、意見交換を行っている。また理化学研究所と共催で第 2 回 Symposium for PID in Asia を開催し、アジアでの原発性免疫不全症候群の研究促進、情報交換に貢献した。全国疫学調査の際、主治医のメールアドレスの登録を進め、継続的に免疫不全症に関する最新の情報提供を行い、この疾患に対する医療水準を向

上させている。患者家族会との連携を深め、講演会や相談会を実施した。

Primary Immunodeficiency Database in Japan (PIDJ) プロジェクト

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月からPIDJ プロジェクトをホームページ (<http://pidj.rcai.riken.jp/>) にオープンした。そこで専門的な意見交換が可能となり多くの新規免疫不全症が確定診断できた。また、感染症対策、移植適応を含め、治療法について随時アドバイスを行った。原発性免疫不全症候群の診断と治療について需要が大きいことが判明し、PIDJプロジェクトの枠組みが有効に活用されていることが示された。

D. 考察

原発性免疫不全症候群患者の医療水準、QOL を向上させるため、疾患の早期診断、治療ガイドラインの作成、病因病態解明による診断治療法改善にむけた研究を継続し、患者のオンライン登録、新たな病因・病態の解明、早期診断法の確立、診断方法や適切な治療法の提示、患者主治医への情報提供などを行ってきた。オンラインでの患者登録や主治医から専門医への相談受付の実施、理化学研究所やかずさDNA研究所との協力による遺伝子診断などにより、疾患の診断は早期に確実になされるようになってきた。今後とも新たな疾患原因の解明、病態の解明、現時点で早期診断法がない疾患に対する早期診断法の樹立、新たな治療法の確立などを積み重ねていく必要があると考えられる。今回新たに樹立した、重症複合免疫不全症や抗体不全症に対するスクリーニング方法を実践することにより、スクリーニング精度を詳細に確認する予定である。これにより、造血幹細胞移植をしなければ乳児期に死亡してしまう重症複合免疫不全症患者を新生児期に把握することができ、移植成績は飛躍的に向上するものと期待される。抗体不全症についても、患者の診断が遅れ合併症をき

たすことを回避できる点で、大きな成果を得るものと期待できる。

E. 結論

原発性免疫不全症候群患者の状態を把握し、より適切な治療を受け QOL を改善させるための今年度の目標を達成し、今後、さらなる情報発信、より良い診断・治療法の開発へ向けて貢献をしていく。

F. 研究発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得出願

1. 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. METHOD FOR PRODUCING MAST CELLS FROM PLURIPOTENT STEM CELLS
国際出願日：2010年9月8日
国際出願番号：PCT/JP2010/065893