

201024130A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

成人型分類不能型免疫不全症の **診断基準**

**診断方法の確立及び治療方法の開発に関する研究**

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森尾 友宏

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）

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

#### 目 次

I. 班員・研究協力者名簿	1
II. 総括研究報告	3
成人型分類不能型免疫不全症の実態把握、亜群特定に基づく診断基準策定及び 病態解明に関する研究	
森尾友宏（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野）	
III. 分担研究報告	
森尾友宏（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野）	9
今井耕輔（防衛医科大学校医療情報部）	15
金兼弘和（富山大学附属病院小児科）	20
松本 功（筑波大学人間総合科学研究科臨床免疫分野）	22
田中敏郎（大阪大学大学院医学系研究科呼吸器・免疫アレルギー内科学講座）	25
小原 牧（かずさ DNA 研究所）	30
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）	33
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	37

I 班員・研究協力者名簿

班員・研究協力者名簿

区分	氏名	所属等	職名
研究代表者	森尾友宏	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野	准教授
研究分担者	今井耕輔 金兼弘和 松本功 田中敏郎  小原収 竹森利忠	防衛医科大学校医療情報部 富山大学医学部小児科 筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床免疫学 大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科学講座 かずさDNA研究所 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	准教授 講師 准教授 准教授  副所長 グループディレクター
研究協力者	満生紀子  野々山恵章 佐藤弘樹 釜江智佳子 本間健一 中川紀子 宮脇利男 梅田直人 加地友弘  西尾知子	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生 発達病態学分野(かずさDNA研究所) 防衛医科大学校小児科 防衛医科大学校医療情報部 防衛医科大学校小児科 防衛医科大学校小児科 防衛医科大学校小児科 富山大学医学部小児科 筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床免疫学 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 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	大学院生  教授 助教 大学院生 大学院生 大学院生 教授 大学院生 研究員  テクニカルアシスタント
事務局	森尾友宏 松本耕一郎 辻彩子	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野 〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45 TEL&FAX:03-5803-5245 E-Mail:tmorio.ped@tmd.ac.jp	准教授 研究班事務 研究班事務
経理事務担当者	増田晴彦	〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45 東京医科歯科大学学術国際部研究推進課 TEL:03-5803-5872/FAX:03-5803-0179 E-mail:haruhiko.adm@cmn.tmd.ac.jp	

## Ⅱ 年次総括報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）  
総括研究報告書

成人型分類不能型免疫不全症の診断基準・診断方法の確立  
及び方法の開発に関する研究

研究代表者 森尾 友宏 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野  
准教授

**研究要旨：**

分類不能型免疫不全症（CVID）患者の詳細な臨床・基礎情報を収集し、世界的にも画期的なデータベースを構築すること、患者免疫担当細胞の機能異常を明らかにし、罹患しやすい病原体や、自己免疫疾患や腫瘍発症の危険因子を明らかにすること、責任遺伝子探索や病態解析を通じて、確立した疾患概念として整理し、診断法・標準治療を確立することを目的として研究が行われた。

その結果、(1) 免疫担当細胞の多重染色による解析、(2) KRECs, TRECs測定によるB細胞、T細胞新生能の解析、(3) 既知の遺伝子塩基配列決定及び、(4) 臨床的特徴及びデータの4つの観点から、CVIDがKRECs, TRECsにより大きく4群に分類されること、(1), (4)の特徴からさらに細かく亜群に分類されることが明らかになった。

この結果を元にして、最終的に約2500遺伝子のCVID候補遺伝子リストを作成した。多数の候補遺伝子については、迅速に遺伝子構造解析が実施できるように、目的ゲノム領域のみを濃縮してくるためのDNAマイクロアレイのプローブデザインを行い、候補遺伝子のタンパク質コード領域エクソンを網羅的に大規模シーケンシングによって解析する準備を完了した。機能的な観点から絞り込むアプローチに加えて、近親婚の疾患の家族歴を踏まえた遺伝学的方法での候補遺伝子領域選択もいくつかの症例に対して行い、その領域に含まれる遺伝子のタンパク質コード領域エクソンを網羅的に大規模シーケンシングによって解析する準備も完了し、実施に移行した。

引き続き多くの患者検体が集まるようになり、情報をWebに公開するべく、データの整理をおこなって、まず免疫不全症WebサイトへのCVID情報の提供を行った。今後さらにCVID患者向けの情報を追加して掲載すべく、資料の収集を終了した。現在の原発性免疫不全症患者会であるつばさの会と連携する形で、すずらんの会が立ち上がり、その設立を支援した。

## 研究分担者氏名

今井耕輔:防衛医科大学校医療情報部  
准教授

小原 収:かずさ DNA 研究所副所長

金兼弘和:富山大学医学部小児科講師

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グループディレクター

田中敏郎:大阪大学医学部呼吸器・免疫アレルギー内科准教授

松本 功:筑波大学大学院・人間総合科学研究科・臨床免疫学准教授

機能的データベース開発などが行われている。また自己免疫疾患や腫瘍発生研究においても成果を上げている(*PNAS*, 2007, 2009)。参加施設で診療する患者数も70名近い。この研究では、臨床免疫各領域の専門家と、基礎免疫研究者が集まり、基礎データを元に、質の高い臨床及び研究が行える体制であることが特徴である。現在のところ国内外において、CVID及びその合併症につき、本研究班が最も集中的かつ根本に迫る解析を行っている。

## A. 研究目的

分類不能型免疫不全症(CVID)は90%以上が原因未知で、治療法も確立していない。研究の1年目には、CVIDの全国調査を行い、患者数を把握し、表面抗原分析や、機能解析、遺伝子検索から亜群分類を試みると共に、疾患の診断基準案を策定した。

継続して行われる本研究ではCVID患者の詳細な臨床・基礎情報を収集し、世界的にも画期的なデータベースを構築する。患者免疫担当細胞の機能異常を明らかにし、根本的な異常を絞り込むとともに、罹患しやすい病原体や、自己免疫疾患や腫瘍発症の危険因子を明らかにする。責任遺伝子探索や病態解析を通じて、不明確であったCVIDを、確立した疾患概念として整理し、診断法・標準治療を確立することが目的である。さらに細胞透過性ペプチドを用いたタンパク治療など新規治療開発も目指す。

当班主任研究者・分担研究者により今までUNG欠損症(*Nat Immunol*, 2006)、CD19欠損症(*Genes Immun*, 2008)、ICOS欠損症(*J Immunol*, 2009)などが明らかになり、B細胞亜群遺伝子体系的解析(*J Exp Med*, 2008)や、

## B. 研究方法

(1) CVID患者免疫担当細胞の亜群・機能解析 (竹森、今井、森尾)

CVID患者免疫担当細胞を精製し、刺激しあるいは分化させ、その前後において、細胞表面・細胞内多抗原同時解析によるB細胞・T細胞・樹状細胞の亜群解析及び機能解析を行う。平成21年度に理研を中心に、標準的解析手技を確立したので、これを共有すると共に発展させ、防衛医科大学、東京医科歯科大学にても解析を行う。

(2) CVID患者亜群分類と簡便な診断方法の確立及び患者におけるFcμ鎖発現の解析 (金兼)

上記検査及び臨床所見を統合して、CVIDを3~4の亜群に分類し、具体的な検査方法を示した診断基準を明らかにする。この中で、FACSやLuminex法を用いた簡便な診断手技の確立を目指す。またCVIDの病態に関与する可能性のある、Fcμ鎖の発現についての基礎的検討を行う。

(3) CVID患者会設立支援、CVID情報サイトの開設 (田中、松本)

患者会の設立に尽力する。また、Webサ

イトを開設することにより、常時診断を受け付けられる体制を確立し、継続的な患者のrecruitを行う。CVIDはまた経過中の合併症が問題になり、200名以上の患者につき毎年フォローアップできる体系を構築する。

#### (4) 治療法開発を目指したCVIDの責任遺伝子探索 (小原、今井、森尾)

治療方法の確立には何よりも、その原因究明が重要である。申請者らが開発した機能的データベースや先端的遺伝子解析システムを用いてCVIDの責任遺伝子を絞り、探索を行う。ここでは最低100の候補遺伝子を体系的に解析するシステムを開発する。またSNPチップを用いた解析や、次世代シーケンサを用いた解析も実施あるいは準備を進める。

#### (5) CVIDにおける感染症、自己免疫疾患や悪性腫瘍発症機構の解明 (田中、松本)

CVID亜群で特徴的な感染症、自己免疫疾患、腫瘍につき、リスク群を同定すると共に、責任遺伝子や免疫担当細胞の異常を切り口にその発症機序を明らかにする。

### C. 研究結果

#### #1 分類不能型免疫不全症 (CVID) 免疫担当細胞の亜群・機能解析

CVID 免疫担当細胞については、2010年4月以降21名の新規患者があり、B/T/NK/TCRV $\beta$ 解析を行った。さらに、合計42名の検体にてDC subset, NKT細胞を測定した。CVID患者ではNKT細胞減少患者や、pDC欠損症が含まれることが明らかになった。

B細胞は、CD19-eFluor450, CD27-eFluor650, IgD-PE, CD24 -Alexa647, CD38-PECy7を用

いた細胞表面抗原の染色を行った。またMitotracker染色を加えて、記憶B細胞およびtransitionalB細胞分画の正確な同定を行った。その結果transitionalBが増加する群などを捕まえることができた。

また従来細胞内染色の手法が用いられていた制御性T細胞の同定をCD3, CD4, IL7 receptor, CD25の細胞表面染色で行う事を可能とし、また抗体産生に重要な濾胞ヘルパーT細胞の同定も、CD3, CD4, CXCR5, ICOS, PD1に対する多重染色を用いて確立した。

#### #2 CVID患者亜群分類と簡便な診断方法の確立及び患者におけるFc $\mu$ R鎖発現の解析

主にFACS法と、KRECs, TRECsを用いてB細胞欠損群、T細胞欠損群などを除外することができるようになった。その結果、TR EC, 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。

また、ナイーブB細胞ならびにTreg細胞は臍帯血と成人末梢血でFc $\mu$ Rの発現様式が異なることを示すデータを得て、CVID患者に応用する段階に至った。

#### #3 CVID患者会設立支援、CVID情報サイトの開設

患者会については原発性免疫不全症患者会であるつばさの会に加えて、地域においてすずらんの会が立ち上がり、成人CVIDの核となるような体制が整った。またWebサイトについては情報の集約を行い、まず免疫不全症サイトへのCVIDについての情報提供を行った。

#### #4 治療法開発を目指したCVIDの責任遺伝子探索

実際に CVID 候補遺伝子を網羅的に解析するために、実験的な根拠から可能性がある遺伝子などを更にリストに追加し、最終的に約 2500 遺伝子の CVID 候補遺伝子リストを作成した。そのリストを研究班内で検討し、最終的な候補遺伝子リストとして完成した。これらの多数の候補遺伝子について、迅速に遺伝子構造解析が実施できるように、目的ゲノム領域のみを濃縮してくるための DNA マイクロアレイ (Roche, NimbleGen シーケンスキャプチャー法) のためのプローブデザインを行い、候補遺伝子のタンパク質コード領域エクソンを網羅的に大規模シーケンシングによって解析する準備を完了した。こうした機能的な観点から絞り込むアプローチに加えて、近親婚の疾患の家族歴を踏まえた遺伝学的方法での候補遺伝子領域選択もいくつかの症例に対して行い、その領域に含まれる遺伝子のタンパク質コード領域エクソンを網羅的に大規模シーケンシングによって解析する準備も完了した。

実際には後者では、近親例 (KRECs, TRECs 正常 CVID) において、SNPchip を用いた homozygosity mapping による候補遺伝子領域解析を行い、該当する領域内遺伝子の exon 部分(周辺 intron を含み、5,447,647 bp=5.45Mbp) を濃縮する遺伝子チップを作成し、次世代シーケンサー(Roche454)にてシーケンスを行った。

#### #5 CVID における感染症、自己免疫疾患や悪性腫瘍発症機構の解明

CVID 患者で実際に自己免疫疾患を呈す

もののデータを体系的に集計し、それらを一群として遺伝子解析を行う準備を整えた。悪性腫瘍については、KRECs, TRECs 陰性群が含まれていることが明らかになった。それらについては DNA 損傷修復異常症が含まれている可能性が強く示唆される。また慢性活動性 EBV 感染症を呈する患者が 5 名であり、その中の 3 名では NKT 細胞の異常が認められた。

#### D. 考察

研究者が分担し、また共同して行ったさらなる免疫学的解析、分子生物学的解析により CVID の亜群策定が行われた。

その結果 B 細胞産生異常、T 細胞産生異常 (VDJ 再構成異常や分化異常) を除外することにより、KRECs, TRECs 正常の真の CVID とも言える群が存在し、その大半は記憶 B 細胞が欠如することが明らかになった。一方 KRECs 低値、TRECs 低値群も現時点では既知の遺伝子異常を認めていない。これらの中の家族歴がある症例に関しては 2,500 遺伝子の候補遺伝子を探索する targeted resequencing や、whole exome analysis、SNP chip からの濃縮→targeted resequencing などの検査が動き出しており、2011 年度には結果が明らかになる予定である。現時点では家族歴のある症例を中心に解析しているが、今後 CAEBV 合併例、神経症状を呈するもの、心疾患合併例などさらに亜群を細かく策定し検討する予定である。自己免疫疾患や悪性腫瘍の合併についても分子レベルでその機序が明らかになることが期待される。

また本研究の成果は患者会への情報提供や、Web での情報公開で社会に還元される

ことになる。

## E. 結論

今年度の研究により、CVIDについて様々なデータが集積した。特に KRECs, TRECs, 詳細な FACS 解析と、遺伝子解析による既知疾患の除外により、大まかに CVID は 4 群に分けられることが明らかになり、さらに特徴的な表現型を示す亜群が存在することが明らかになった。自己免疫疾患を呈する症例や悪性腫瘍を発症する症例には免疫学的に特徴のある群が存在することも明らかになった。これらの情報を元に 2,500 の候補遺伝子を策定して、次世代シーケンサによる遺伝子解析がおこなわれようとしている。社会的側面では患者会が立ち上がり、原発性免疫不全症患者会の連携が確立した。

今後臨床データ、免疫学的解析結果、候補遺伝子探索を統合する体制が整い、CVID の成因及び病態解明への道が拓けるものと考えている。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

巻末に記載の通り

### 2. 学会発表

各分担研究者学会発表 (G.2) 参照

## H. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

## その他の特記すべき事項：

KRECs, TRECs 測定系の開発に当たっては Erasmus 大学 Jacques J.M. van Dongen 教授に多大な支援をいただいた。ここに謝意を表したい。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
成人型分類不能型免疫不全症の診断基準・診断方法の確立及び方法の開発に関する研究  
平成22年度第一回班会議（研究代表者 森尾友宏）

平成 22 年 9 月 17 日（金） 14:30 – 17:30 東京医科歯科大学医学部附属病院 16 階小会議室

- 14:30-14:45 研究代表者挨拶  
森尾友宏（東京医科歯科大学大学院・発生発達病態学分野）
- 第一部 研究発表（座長：今井 耕輔）**
- 14:45-15:00 成人領域の免疫不全症  
田中敏郎（大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科学講座）
- 15:00 -15:15 健常人ならびに分類不能型免疫不全症患者のリンパ球亜群における Fcμ レセプター  
の発現  
金兼弘和、宮脇利男（富山大学医学部小児科）
- 15:15-15:30 CVID の病態における自己抗体の関連性  
松本 功（筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床免疫学）
- 15:30 -15:50 Linkage between cellular phenotype and clinical phenotype in CVID patients  
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）
- 15:50-16:00 **休 憩**
- 研究発表（座長：松本 功）**
- 16:00-16:20 TREC,KREC,FACS を用いた CVID 亜群分類の試み～臨床症状との相関について  
の検討  
今井耕輔（防衛医科大学校 医療情報部、同小児科）
- 16:20-16:40 分類不能型免疫不全症亜群分類 と原因探索へのアプローチ  
森尾友宏\*\*、峯岸志津子\*\*、満生紀子\*\*\*、（\*東京医科歯科大学大学院・発生  
発達病態学分野、\*\*同・細胞治療センター、\*\*\*かずさ DNA 研究所）
- 16:40-17:00 次世代シーケンサーを用いた免疫不全症原因遺伝子探索の現状  
小原収（かずさ DNA 研究所ヒトゲノム研究部、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ゲノミクス研究グループ）
- 第二部 総合討論**
- 17:00-17:30 分類不能型免疫不全症研究の方向性と社会発信

### III 分担研究報告

## 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）分担研究報告書

### 成人型分類不能型免疫不全症の診断基準・診断方法の確立 及び治療方法の開発に関する研究

研究代表者 森尾 友宏 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野  
研究分担者 満生 紀子 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野  
(かずさ DNA 研究所)

#### 研究要旨：

分類不能型免疫不全症(Common variable immunodeficiency : CVID) の実態調査により 200 名以上についての情報が集まり、継続的解析により 157 名において詳細な免疫学的検査データが集積した。さらに免疫担当細胞亜群の解析項目を充実させ、それらと臨床所見・検査データとあわせて、特徴的な亜群を明らかにした。免疫に関与する分子群につき体系的に遺伝子解析を行うシステムを作成し、試行として 8 名にて 2,500 遺伝子解析を行えるシステムを作成した。

#### A. 研究目的

分類不能型免疫不全症 (Common variable immunodeficiency : CVID) は頻度の高い原因不明の免疫不全症の一つであるが、その実態、病態、合併疾患の成立機序は未だに明らかになっていない。本研究では成人型 CVID の実態を把握、亜群分類し、本疾患の根治的治療法の開発を目指して、その病態・責任遺伝子を解明することを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1) CVID 患者免疫担当細胞の亜群・機能解析

昨年までに B 細胞サブセット (transitional B, naïve B, IgM memory, switched memory, plasmablasts, plasma cells)、T 細胞サブセット、TCRVβ レパートアについて網羅的な解析を実施した。本年はさらに、myeloid DC (mDC)、活性化 mDC、plasmacytoid DC (pDC)、NKT 細胞についても FACS にて同定した。

また Kappa deleting recombination excision circles (KRECs)、T-cell receptor excision circles (TRECs) を用いて、それぞれ B 細胞、T 細胞の新生能を検討した。

##### 2) 治療法開発を目指した CVID の責任遺伝子探索

まずかずさ DNA 研究所において、既知の CVID 責任遺伝子の検索を行った。その中に

はいわゆる CVID 遺伝子(BAFF-R, CD19, CD20, CD21, CD81, ICOS, TACI)以外に、SH2D1A, XIAP などの X 連鎖リンパ増殖症候群関連遺伝子や、複合型免疫不全症関連遺伝子についても検討を依頼した。

上記の遺伝子解析で異常を認めない症例については、発症年齢、臨床像・身体所見、KRECs/TRECs、サブセット解析、亜群を分類し、その中で家族歴のある症例について、GS FLX による 2,500 程度の候補遺伝子探索に向けた検討を開始した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、患者検体を用いて解析を行うものである。診療に役立つ情報が得られるが、採取量及び、採取時の苦痛には十分な配慮を行った。

また遺伝子解析については各種指針に則り、患者個人情報の保護について十分な配慮を行って行った。

なお本研究は、東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会及び東京医科歯科大学医学部遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会による承認を得て行った。全ゲノム解析を含む網羅的遺伝子解析についても、新たに倫理審査委員会の承認を得た。

#### C. 研究結果

##### 1) CVID 免疫担当細胞の亜群・機能解析

CVID 免疫担当細胞については、2010 年 4 月以降 21 名の新規患者があり、B/T/NK/TCRVβ解析を行った。さらに、合計 42 名の検体にて DC subset, NKT 細胞を測定した。

その結果、NKT 細胞が欠如あるいは著減するものが 6 例であった。また mDC が 0.1% 未満、pDC が 0.01% 未満のものがそれぞれ 6 例、10 例であった (図 1)。NKT 細胞が減少する疾患としては SH2D1A 欠損症や XIAP 欠損症などがあげられるが、該当する症例はなく、さらに SLAMF, 2B4 など介するシグナル系に關与する分子について検討を開始した。これらの患者において特徴的な臨床所見や検査データ、免疫学的データはないが、pDC が 0.01% 未満のケースでは、3 例にて NK 細胞増多を認めた。

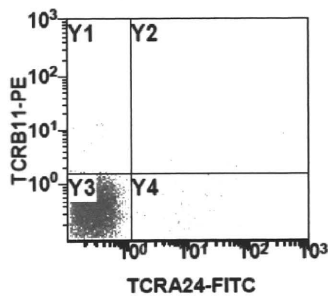


図 1 (NKT 細胞の著減を示す CVID 例: CD3 + gating で TCRVα24 + Vβ11+群がゼロ)

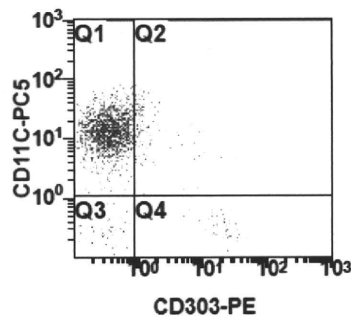
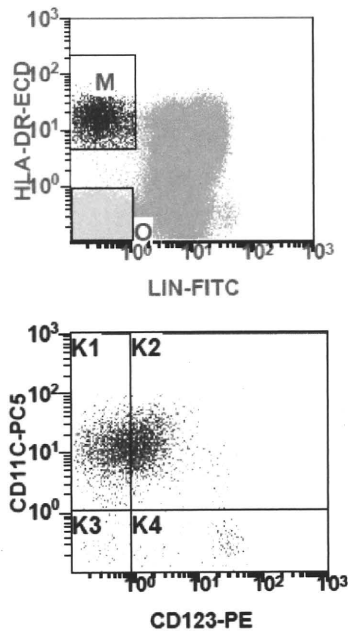


図 1 (pDC: Lin- HLADR+ CD123 + CD303+ CD11c-の著明な減少を伴う CVID 解析例)

## 2) CVID の病因解明

詳細なデータが集積した 157 名の CVID 患者の臨床所見、検査データ、免疫学的所見、B 細胞・T 細胞新生能から、亜群分類を試みた。

まず、B 細胞産生不全疑う症例 =  $B \leq 1\%$  は 39 名、T 細胞産生不全疑う症例: TRECs=0 は 20 名であり、TRECs=0 かつ  $B \leq 1\%$  はそのうち 5 名であった。検討できた中で B 細胞が 1% 以下の症例では、cjKRECs は 27 名で、sjKRECs は 20 例で著減あるいは検出不能であった。B 細胞が 1% 以上で TRECs が正常と確定できたものは 67 名であり、その中で易感染性・血球減少・自己免疫疾患の家族歴があるものは 13 名で、低  $\gamma$  グロブリン血症の家族内発症は 4 組であった。家族歴がある症例では大半が 10 歳未満発症という特徴がある。

そのほか、3SD 以上の低身長 4 例、精神発達遅滞 8 例、慢性活動性 EBV 感染症 5 例など特徴的な合併症を呈する場合もあり、それらとリンクする身体的特徴や検査データについて解析を開始した。

さらに責任遺伝子探索にむけて、全エクソーム解析(whole exome sequencing)の前に、10 症例程度において 2,500 遺伝子を re-sequencing するための準備を開始した。まず以下の戦略にて標的遺伝子の選定を行った。

(1) データベース:

\*RAPID(Resource of Asian Primary Immunodeficiency Diseases)

PID 既知遺伝子 199 個

PID 候補遺伝子 1441 個

複合型免疫不全症・抗体産生不全

食細胞系(94 個)・補体系(51 個)

\*Net path

BCR/TCR に関わる pathway

(シグナル伝達経路+酵素+物理的関連  
+転写制御に関連する群)

\*MGI(Mouse Gene Infomatics)

Decreased immunoglobulin level: 62 個

#SLE/DKC/ALPS/SCID

#B 細胞関連異常を示すマウス中心: 23 個

\*RIKEN の knock out mouse 情報: 21 個

(2) 非データベース抽出情報

\*B 細胞分化に関与する分子、細胞死・自己  
免疫疾患関連分子

\*発現アレイ解析 (記憶 B 細胞と naive B 細胞  
で発現の異なる遺伝子: expression  
profiling→定量的 PCR で確認された遺伝子  
+Pathway 解析により抽出される関連遺伝  
子

上記から 2,510 遺伝子を選定し、濃縮用  
チップとプライマーを策定した。

#### D. 考察

本年度の研究によりさらに 21 名の患者  
の紹介と新規データの蓄積があり、免疫担  
当細胞については T 細胞の minor subset や  
DC subset についても解析を進めた。

総計として昨年度の 90 名から飛躍して、  
157 名の詳細なデータが蓄積し、亜群分類  
及び責任遺伝子探索に進むことのできるだ  
けの基盤が整ったと言える。患者の紹介も  
コンスタントに受けており、当研究が CVID  
解析の入り口としての役割を果たし始めて  
いると考えている。

本疾患においては、原因が明らかになっ  
ていないという点が最も大きな問題である。  
CVID の責任遺伝子として、2010 年度に判  
明したものは CD20 欠損症のみであり、こ  
れから明らかになるべき部分が大きい。

今回の遺伝子探索戦略は、免疫系に関係  
する分子の体系的把握と、naive B 細胞と記  
憶 B 細胞の遺伝子発現の差 (記憶 B 細胞へ  
の分化障害という現象に基づく遺伝子候補)  
の検証から検査すべき遺伝子を決定してい  
るが、同定には最新 SNP 情報の利用や、機  
能的アプローチが重要である。後者に関し  
ては、当研究においてすでに詳細に免疫能  
が検証されており、責任遺伝子が同定され  
れば機能との関連を明らかにするための時

間も長くはないと予想される。一方、年長  
者の CVID は自己免疫により免疫系の異常  
が起きる可能性も示唆されており、その場  
合は違う戦略での解析が必要となる可能性  
がある。

今回までの解析により update された情報  
や、診断に有用な情報や検査可能機関につ  
いては、今後医療者や患者への情報公開を  
行いたいと考えている。

#### E. 結論

CVID の継続的な免疫学的・分子生物学的  
解析から、さらに詳細な免疫学的データが  
集積され、また 10 名前後の大きさでの亜群  
分類が一部完成した。今後の病態解明に向  
け、候補遺伝子を策定し、今後大規模遺伝  
子解析を行う準備が整った。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Imai K, Nonoyama S, **Morio T**, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patient. *Clin. Immunol.* 2011 Feb;13 8(2):172-7. Epub 2010
2. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, **Morio T**, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Like Disease With Somatic KRAS Mutation. *Blood* [Nov 9, Epub ahead of print], 2010
3. Shin MJ, Shim JH, Lee JY, Chae WJ, Lee HK, **Morio T**, Park JH, Chang EJ, Lee SK. Qualitative and quantitative differences in the intensity of Fas-mediated intracellular signals determine life and death in T cells. *Int J. Hematol.* 92:262-70, 2010 Seki M.
4. Kimura H, Mori A, Shimada A, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Agematsu K, **Morio**

5. **T.** Yachie A, Kato M. Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with Omenn syndrome. *Pediatr. Int.* 52:e196-9, 2010
  6. Inoue H, Takada H, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Takahashi N, **Morio T.** Kosaki K, Hara T. Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism. *Eur. J. Paediatr.* 169: 839-44, 2010.
  7. Okamoto K, Iwai Y, Ohhora M, Yamamoto M, **Morio T.** Aoki K, Ohya K, Jetten AM, Akira S, Muta T, Takayanagi H. I $\kappa$ B $\beta$  regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature.* 464: 1381-1385, 2010.
  8. Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, Imai K, Espanol T, Fasth A, Pellier I, Strauss G, **Morio T.** Gathmann B, Noordzij JG, Fillat C, Hoenig M, Nathrath M, Meindl A, Pagel P, Wintergerst U, Fischer A, Thrasher AJ, Belohradsky BH, Ochs HD. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood.* 115:3 231-3238, 2010.
  9. Oba D, Hayashi M, Minamitani M, Hamano S, Uchisaka N, Kikuchi A, Kishimoto H, Takagi M, **Morio T.** Mizutani S. Autopsy study of cerebellar degeneration in siblings with ataxia-telangiectasia-like disorder. 2010, *Acta Neuropathol.* 119: 513 -520, 2010.
2. 学会発表
1. **Morio T.** Btk Controls ROS Production and Apoptosis in Human Neutrophils. XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Isutanbul, Republic of Turkey. 2010年10月6日-9日
  2. **Morio T.** Terada N, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, Matsumoto K, Azuma M, Mizutani S. Impaired CD4 and CD8 Effector Function and Decreased Memory T-cell Populations in ICOS-deficient Patients. 14 th International Congress of Immunology 2010, Kobe, Japan. 2010年8月22日-27日
  3. Okamoto K, Iwai Y, Oh-hora M, Yamamoto M, **Morio T.** Jetten A M, Akira S, Muta T, Takayanag H. I $\kappa$ B $\delta$  is required for the transcriptional program in Th17 development. 14 th International Congress of Immunology 2010, Kobe, Japan 2010年8月22日-27日
  4. Shin M J, Shim J, Lee J, Chae W, Lee H, **Morio T.** Park J H, Chang E, Lee S. Functional analysis of Fas-mediated activation signaling pathways in T cells. 14 th International Congress of Immunology 2010, Kobe, Japan 2010年8月22日-27日
  5. Honda F, Ikeda Y, Takahashi N, Lee S, Mizutani S, **Morio T.** Btk controls ROS production and apoptosis in human neutrophil. 14 th International Congress of Immunology 2010 Kobe, Japan 2010年8月22日-27日
  6. **森尾友宏:** 造血細胞移植後の体系的免疫能評価法 第55回三重大学造血細胞移植カンファレンス 2011年2月4日, 三重
  7. **森尾友宏:** 血球系の減少を伴う免疫不全症第4回21世紀血液免疫研究会, 2010年11月18日, 東京
  8. **森尾友宏:** 造血細胞移植後のウイルスモニタリングと感染制御, 第11回血液細胞療法フォーラム, 2010年10月16日 大阪
  9. **森尾友宏:** “免疫不全症・免疫異常症の多様な姿-診療のABCから今後の展望まで” 山梨血液感染症セミナー, 2010年9月30日, 山梨
  10. **森尾友宏:** 原発性免疫不全症の診断と治療-そのABCと今後の展望-三重免疫

不全・感染症講演会, 2010年9月16日,  
三重

11. **森尾友宏**: 移植医療におけるウイルス感染症対策: 迅速検出法と治療戦略の現状と展望, 第35回群馬移植研究会, 2010年5月26日, 群馬
12. **森尾友宏**: 原発性免疫不全症に対する臍帯血移植とキメリズム解析, 第2回移植後キメリズム解析研究会 平成22年度厚生労働科学研究 医療技術実用化総合研究事業「HLA ミスマッチ造血細胞移植後の新規キメリズム解析法による臨床診断の有効性に関するエビデンス創出」(中内班), 2011年2月1日, 東京
13. 清水則夫、**森尾友宏**: 造血細胞移植後感染症の網羅的検査法の実用化に関する取り組み 平成22年度厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントのQOLを視野に入れた成績の向上に関する研究」班第2回班会議(谷口班) 2011年1月30日, 東京
14. **森尾友宏**: 臍帯血移植における免疫細胞治療平成22年度厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班第2回班会議(加藤班), 2011年1月30日, 東京
15. **森尾友宏**: 造血細胞移植後の免疫学的モニタリング, 平成22年度厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法: 基礎から臨床へ」班第2回班会議(池原班) 2011年1月29日, 東京
16. 高木正稔、満生紀子、Piao Jinhua、長澤正之、**森尾友宏**、篠田邦大、鷹尾 明、笠原善仁、小池健一、村松英城、小島勢二、水谷修紀: RAS associated ALPS like disease 平成22年度厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業「原発性免疫不全症候群に関する調査研究」班会議(原班), 2011年1月21日, 福岡
17. 満生紀子、**森尾友宏**、小原 収: かずさDNA研究所におけるPIDJ登録患者の遺伝子解析報告, 平成22年度厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業「原発性免疫不全症候群に関する調査研究」班会議(原班), 2011年1月21日, 福岡
18. **森尾友宏**、峯岸志津子、満生紀子 分類不能型免疫不全症亜群分類と原因探索へのアプローチ 平成22年度厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業「成人型分類不能型免疫不全症の実態把握、亜群特定に基づく診断基準策定及び病態解明に関する研究」班班会議(森尾班), 2010年9月17日, 東京
19. 清水則夫、渡邊健、**森尾友宏**: 造血細胞移植後感染症の網羅的検査法の実用化に関する取り組み 平成22年度厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントのQOLを視野に入れた成績の向上に関する研究」班第1回班会議(谷口班), 2010年7月4日, 愛知
20. **森尾友宏**: 臍帯血移植後の免疫能評価と免疫学的再構築促進手段について, 平成22年度厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班第1回班会議(加藤班), 2010年7月4日, 愛知
21. **森尾友宏**: 骨髄内造血細胞移植における免疫モニタリング, 平成22年度厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法: 基礎から臨床へ」班第1回班会議(池原班), 2010年7月3日, 愛知

22.大坪善数、徳富友紀、合田裕治、角至一郎、上玉利彰、中下誠郎、森内浩幸、**森尾友宏**：慢性活動性 EBV 感染症を合併する毛細血管拡張性小脳失調症の 1 幼児例，第 113 回日本小児科学会学術集会，2010 年 4 月 23 日～25 日，岩手

23.**森尾友宏**、富澤大輔、梶原道子、水谷修紀、熱田由子、加藤剛二、原寿郎、加藤俊一：日本における先天性免疫不全症に対する臍帯血移植成績．第 113 回日本小児科学会学術集会，2010 年 4 月 23 日～25 日，岩手

24.満生紀子、高木正稔、遠藤明史、小野敏明、梶原道子、長澤正之、**森尾友宏**、水谷修紀 リンパ節腫脹、肝脾腫、自己抗体を産生し、KRAS 体細胞変異をみとめた乳児例．第 113 回日本小児科学会学術集会，2010 年 4 月 23 日～25 日，岩手

25.篠原示和、峯岸克行、**森尾友宏**、斎藤博久、松本健治：非結核性好酸菌性副鼻腔

炎を合併した Tyk2 及び STAT3 正常の高 IgE 症候群の 1 例，第 113 回日本小児科学会学術集会．2010 年 4 月 23 日～25 日，岩手

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 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

#### その他の特記すべき事項：

KRECs, TRECs 測定系の開発に当たっては Erasmus 大学 Jacques J.M. van Dongen 教授に多大な支援をいただいた。ここに謝意を表したい。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

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

研究分担者	今井 耕輔	防衛医科大学校医療情報部	准教授
研究協力者	野々山 恵章	防衛医科大学校小児科	教授
	釜江 智佳子	防衛医科大学校小児科	大学院生
	本間 健一	防衛医科大学校小児科	大学院生
	中川 紀子	防衛医科大学校小児科	大学院生

研究要旨：

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。

今回我々は、当科に紹介のあった国内の 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、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 を組み合わせた結果、TREC、sjKREC ともに正常、sjKREC のみ陰性、TREC のみ陰性、TREC、sjKREC ともに陰性の 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。

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。

## A. 研究目的

Common variable immunodeficiency (CVID) は低  $\gamma$  グロブリン血症を呈する免疫不全症で、原発性免疫不全症の中ではもっとも多く認められる。自己免疫疾患、リンパ組織の増大、悪性腫瘍等を合併しやすいが、様々な疾患が含まれているため、適切な治療法の選択が困難である。

そこで、TREC, KREC 解析、および FACS 解析により新規分類を行い、患者病態に合わせた適切な治療法を選択できるようにすることを目的とした。

## B. 研究方法

2005-2010 年に当科に紹介のあった国内低  $\gamma$  グロブリン血症のうち、SCID, 乳児一過性低ガンマグロブリン血症、2 歳未満の例、HIGM(IgM>100), XLA(BTK 異常)を除いたいわゆる“CVID” 32 例を対象として検討した。32 例全例で、TREC, KREC 解析、および FACS 解析を行った。

両者の結果をもとに、病歴、臨床情報を加味して、解析候補遺伝子について検討し、理研を通じて、かずさ DNA 研究所でのシーケンス解析を行った。

更に、一例の近親婚患者では、SNPchip を用いた homozygosity mapping による候補遺伝子領域解析を行い、該当する領域内遺伝子の exon 部分(周辺 intron を含む)を濃縮する遺伝子チップを作成し、次世代シーケンサー(Roche454)にてシーケンスを行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、患者検体を用いて解析を行うものであり、採取量及び、採取時の苦痛には十分な配慮を行った。

また遺伝子解析については各種指針に則り、患者個人情報の保護について十分に配慮した。

なお本研究は、防衛医科大学倫理審査委員会による承認を得て行った。

## C. 研究結果

### 1) TREC, sjKREC による CVID の分類

今回の対象患者を TREC 陽性、陰性で分けると、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。更に sjKREC を組み合わせることで 4 群に分類することが可能で、TRECsjKREC 正常、sjKREC のみ低下、TREC のみ低下、そして TRECsjKREC のみ低下と 4 群になった。その割合は、sjKREC のみ低下群で 10%、TREC のみ低下群で 16%、TRECsjKREC 低下群で 13%となった。

### 2) FACS 解析との相関

次に各 4 群における FACS データの検討を行った。

まず、TREC、sjKREC、CD3 細胞数、CD19 細胞数の関係を示す。TREC 正常群では CD3 細胞数が正常値を示し、TREC 低下群では CD3 +細胞数が低下していた。

また sjKREC 正常群では CD19+細胞数は正常値を示し、sjKREC 低下群では CD19+細胞数が低下していた。

次に各群でのメモリー T 細胞を検討すると、TREC 陽性 KREC 陽性群、TREC 陽性 KREC 陰性群、TREC 陰性群の順でメモリー T 細胞の割合の増加を認めた。

CD4/CD8 比を検討すると、TREC、sjKREC 正常群に比較して、TREC のみ低下群で CD4/8 比の低下が認められた。また TREC 陰性群でも CD4/CD8 が正常の例が存在し