

慢性肉芽腫症の遺伝子診断体制に関する研究

研究分担者 奥山虎之 国立成育医療研究センター臨床検査部長

研究要旨

小児の慢性肉芽腫症の遺伝子診断体制のあり方を検討した。遺伝子診断は、発症者の確定診断に有用であるが、その実施についてはインフォームドコンセントやインフォームドアセンおよび遺伝カウンセリングについての十分な配慮が必要である。

A. 研究目的

慢性肉芽腫症は、X連鎖劣性遺伝性疾患で主に小児期に発症する。遺伝子検査が、診断確定に有用であるが、その実施においては種々の配慮が必要になる。2011年2月に日本医学会は、「医療における遺伝学的検査ガイドライン」を発表した。本年度、日本小児科学会では日本医学会ガイドラインをもとに、小児を対象としたガイドラインの作成に着手した。この「小児科学会ガイドライン」は、まだ検討段階であるが、ガイドライン作成の議論をもとに、慢性肉芽腫症の遺伝子検査のような小児を対象とした遺伝学的検査施行時の倫理的配慮について検討する。

B. 研究方法

2011年2月に日本医学会から発表された遺伝学的検査・診断に関するガイドライン（医学会ガイドライン）をもとに、小児を対象とした遺伝学的検査の実施に当たって留意すべき課題を抽出する。それをもとに、慢性肉芽腫症の遺伝学的検査を含む診断体制を確立する。

（倫理面への配慮）

本研究では、特に倫理面での問題はない。

C. 研究結果

1. 医学会ガイドラインに記載された「小児の遺伝子検査」実施上の注意点について

すでに日本医学会ガイドラインでは、「未成年者など同意能力がない者を対象とする遺伝学的検査」という項目を設定して、主に以下の2項目について言及している。①小児に対して遺伝学的検査を行う場合は、代諾者へのインフォームドコンセントのほかにも可能な限り本人の了解（インフォームドアセン）をとることを考慮する。②成年期以降に発症する疾患の発症前診断については、原則として本人の同意のもとに行う。

2. 小児科学会として医学会ガイドラインを補完すべき内容について

医学会ガイドラインには、1. 同意能力のある年齢を具体的に定めていない、2. 小児期に両親等の代諾で実施された遺伝学的検査を成年期に達した本人に対して結果開示する際の基準が明確でない、などの問題がある。小児科学会ガイドラインでは、出来るだけ具体的にこれらについて言及すべきであろう。

3. 小児の慢性肉芽腫症の遺伝学的検査および遺伝カウンセリング実施上の留意点について

小児の慢性肉芽腫症の遺伝学的検査は、その診断において有用であるが、実施については以下の配慮を行うことを提唱する。

①検査の同意は、20歳未満であれば両親等代諾者から受けるが、加えて16歳以上の対象者につ

いては、本人からの署名による同意（インフォームドアセント）をとるように配慮する。

②小児期に両親等の代諾により実施された遺伝学的検査については、対象者が20歳以上になった場合に、結果開示の妥当性を検討する。開示の際には、適切な遺伝カウンセリングの提供も同時に考慮する。

D. 考察

慢性肉芽腫症は、X連鎖性劣性遺伝形式をとるため、患者の遺伝子変異が母親由来である場合と新生突然変異である場合を鑑別する方法としては、遺伝学的検査が最も信頼性が高い。また、両者の鑑別は、次子の再発率や出生前診断を考慮するうえで重要な情報となる。

最近、慢性肉芽腫症のような原発性免疫不全症候群に対する新生児マススクリーニングの必要性が指摘されている。重篤な感染症に罹患する前に、疾患を確定し治療に結びつけることは、患者の長期予後を改善させるために不可欠である。しかし、原発性免疫不全症候群は、単一遺伝子病でありスクリーニングであっても、診断確定に極めて近い状況であることを考慮すると、スクリーニング検査それ自身も遺伝学的検査として位置付ける必要がある。

医学会ガイドラインおよび今後公表される小児科学会ガイドラインに基づき適切に遺伝学的検査を実施する必要がある。

E. 結論

慢性肉芽腫症の遺伝学的検査は、確定診断等において有用であるが、その実施においてはインフォームドコンセントやインフォームドアセントの取得などの倫理的配慮が必要であり、必要に応じて遺伝カウンセリングを提供することにも留意する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(論文)

1) Oda E, Tanaka T, Migita O, et al: Newborn screening for Pompe disease in Japan. *Mol Genet Metab.*104:560-565,2011.

2) Shigeto S, Katafuchi T, Okada Y, et al. : Improved assay for differential diagnosis between Pompe disease and acid α -glucosidase pseudodeficiency on dried blood spots. *Mol Genet Metab.* 103:12-17,2011.

分担研究報告書

遺伝子治療臨床研究における臨床データの管理

分担研究者 瀧本 哲也

国立成育医療研究センター臨床研究センター臨床研究推進室長

研究要旨

国立成育医療研究センターで計画されている慢性肉芽腫症（chronic granulomatous disease; CGD）に対する遺伝子治療研究は現在、厚生科学審議会で審議を受けている段階である。遺伝子治療の実施に備えて、種々の面から想定されるデータ管理上の問題点を考察し、また研究計画書の記載内容の変更や、班会議等での議論をふまえたうえで、想定されるデータ管理上の問題点に対応できるように Case Report Form (CRF) を改訂した。特に、有害事象の早期のピックアップと、後日の検討のために、収集するデータ項目について、より詳細なものとした。遺伝子治療研究のように、きわめて高度な先進的医療については、実施に先立って慎重な対策を講じておくことが重要である。データ管理面においても、実際の遺伝子治療研究から得られる経験に基づいて、今後さらに改善していきたいと考えている。

A. 研究目的

国立成育医療研究センターで計画されている慢性肉芽腫症（chronic granulomatous disease; CGD）に対する遺伝子治療研究について、これまで遺伝子治療臨床研究実施計画書（以下、研究計画書）の作成支援、および Case Report Form (CRF) 作成を行ってきた。本研究については、研究計画書および付属書類について、当センターの遺伝子治療臨床研究審査委員会において承認され、現在、厚生科学審議会で審議を受けている段階である。もちろん実験的な要素を含む治療であるため、実施にあたっては慎重な配慮が要求される。このような観点から、遺伝子治療の実施に備えて、種々の面から想定されるデータ管理上の問題点をあらためて考察し、未然に適切な対応を行っておくことを本年度の研究目的とする。

B. 研究方法

研究計画書の記載内容の変更や、班会議等での議論をふまえ、想定されるデータ管理上の問題点に対応できるように現存の CRF を改訂する。

（倫理面への配慮）

遺伝子治療は、遺伝子治療臨床研究に関する指針を遵守して実施される。取り扱う患者データには、遺伝子解析結果なども含まれるため、データセンターでも指針に従った臨床データ管理を行う。すなわち組織的安全管理措置（国立成育医療研究センターの保有個人情報管理規定など）のもとで、人的安全管理措置（データ管理業務担当者との個人情報非開示契約の締結、個人情報の取扱いにかかわる教育など）、物理的安全管理措置（二重ロックのデータセンター内イントラネット、入退室管理、無停電装置設置など）、技術的安全管理措置（システムのファイアウォールによる保護、ユーザー認証、不正ソフトウェア対策、データの定期的バックアップなど）を講じる。

C. 研究結果

項目別に議論となった点と対応策について述べる。

【症例登録】

症例登録は、遺伝子治療臨床研究適応判定委員会によって実施可能と判定された後に、再度、被験者（代諾者）に説明を行い、文書による同意を得て行うという手順である。遺伝子治療のような先進医療においては、担当

医師以外の第三者(移植コーディネータ)が同席し、被験者が本遺伝子治療臨床研究に関する疑問点などについて気兼ねなく質問できるような環境を確保したうえで同意を取得することが必要と考えられた。このため、同席した臨床コーディネータの氏名等の記載を必須とした。

【登録票】

HLA が一致した年少のきょうだい等では体重などの理由で移植ドナーになりえない場合がある。これに伴う研究計画書の記載変更に伴って、登録票中の選択規準「造血幹細胞に際し、DNA typing で5/6以上のHLA一致ドナーがないこと」に加えて、「有核細胞数として体重あたり 2×10^7 個 (CD34 陽性細胞として 1.5×10^5 個) 以上の移植ドナーがない」ことを追記した。

【被験者情報】

登録票中の適格規準・除外規準において「問題がない」と確認されている項目(アレルギーの有無、performance status、左室駆出率、安静時の動脈酸素飽和度 (SpO₂)、AST、ALT、体表面積補正クレアチニン・クリアランス (Ccr)、随時/食後 2 時間後の血糖値)については、適格性判定や後日の検討においてきわめて重要なデータとなると考えられるため、「被験者情報」の中で具体的なデータを記録しておくこととした。

【治療経過 CRF】

1) 計画書に記載された「治療中の観察項目」及び「臨床検査項目」は有効性や有害事象判定に必要な項目を含んでいる。これらの項目についても、CRF では全ての項目について、具体的な数値を収集することによって、正確なデータを記録するべきと考えられた。このため、「ベースライン」、「G-CSF」、「前処置」、「遺伝子導入細胞投与日」、「投与後 1 日」～「投与後 7 日」、「投与後 2 週」～「投与後 8 週」の各 CRF 中に、内科診察項目と一般検査項目についての記載欄を設けた。

2) 「G-CSF」の CRF は現在 1 種類であり、幹細胞採取前後のバイタルサインの変化の記録が主体となっている。しかし G-CSF 投与開始後 5、6 日目からは血液分

離装置を用いた CD34 陽性細胞採取が行われる。これについての CRF を別に作成するかどうかを検討されたが、CRF はこのままとし、採取の有無とそれによる有害事象の有無の記入欄を追加することとした。

3) 「前処置」の CRF に、ブスルファン投与に伴う急性の有害事象の記載欄を追加した。特に頻度が高い有害事象である悪心・嘔吐、肝機能障害、けいれんについては、グレードを具体的に記し、選択する方式とした。グレード分けは、抗がん剤であることに鑑み、Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) ver 4.0 に従った。

4) 「遺伝子導入細胞投与日」の CRF に、導入された細胞のロット記入欄を追加した。

5) 画像検査、好中球活性酸素産生能検査、gp91-phox 発現検査、導入遺伝子コピー数、複製ウイルス (RCR) 検査などの特殊な検査は、必須ではあるが頻繁に行われるものではない。そのためこれらの検査項目については、計画書に記載されたスケジュールに該当する時期の CRF に、実施の有無と日付のみを記載するように変更し、具体的な所見については、別に作成した用紙に記入する形に徹底することとした。

【有効性評価】

遺伝子治療の有効性評価をより多方面から行えるようデータを収集する、という観点から CRF を変更した。すなわち、現在は遺伝子導入細胞の遺伝子導入効率、および感染症/CGD 症状の変化についての記載欄のみがあるが、これに難治性感染症の改善、末梢血中に遺伝子導入細胞の確認あるいは好中球活性酸素産生能の上昇に関する項目を追加し、より具体的な情報を収集することとした。

【安全性評価/有害事象報告】

有効性評価と同じく、安全性評価についても収集データを充実させる方向で CRF の見直しを行った。

有害事象の程度は軽度、中等度、重度の 3 段階で分類される。研究計画書では、重症度の定義は、「医薬品などの副作用の重篤度分類基準について」に準拠して総合的に評価するとのみ記載されており、また報告義務の基準も必ずしも明確とは言えない。そこで、重篤度

分類基準のグレード1～3をそれぞれ軽度、中等度、重度に該当するものとし、グレード3の有害事象および「治験中に得られる安全性情報の取り扱いについて」に記載された有害事象があれば報告を行うこととした。これにあわせて、CRFも薬物有害反応判定基準項目をグレードで記載できるように改めた。さらに併用療法のCRFに、併用薬や併用療法による有害事象の記載欄を設けた。

また、被験者に重篤な有害事象が発生した場合には、総括責任者は実施施設長および厚生労働大臣にも報告すると研究計画書の記載が変更された。これをふまえて、有害事象ごとに、このような緊急報告の必要性の有無についてのチェック欄を設け、「有」と判断された場合にはただちに総括責任者に届け出る手順とした。

【症例の中止基準】

症例の中止判定基準が、①被験者又は代諾者からの離脱の申し出、②観察期間中の経過観察が不可能、③観察期間中の造血幹細胞移植施行、④治療の継続が困難と判断、という4つに変更された。これをふまえて、新たに治療中止届を作成した。

D. 考察

CGDは重篤な感染症を反復し、諸臓器に肉芽腫性病変を形成する先天性免疫不全症で、これまで造血幹細胞移植が唯一の根治的治療とされてきた。しかし、全身状態不良、適当なドナーが不在などの理由で造血幹細胞移植の適応とならない例も存在する。現在、国立成育医療研究センターで計画されている遺伝子治療の確立によって、CGD患者の治療選択肢はさらに広がっていくものと期待される。しかしながら、遺伝子治療は、標的細胞への遺伝子導入や遺伝子導入細胞輸注前後の管理など実験的な要素や特殊な医療技術を含む先進医療であるため、その有効性と安全性については慎重に評価される必要がある。現在、遺伝子治療実施に向けての手順は最終段階にあるが、これと並行して、実際に患者に適用される前にできる限り安全性を確保するための努力も継続して行われている。今回のデータ管理面からの見直しも、この方針に沿って実施され

たものである。

特にCRFは、先進的な医療の場合、各種の審査の資料にもなることも考慮し、遺伝子治療についての同意確認、適格性、治療中の有効性、有害事象データのより具体的な把握、有害事象発生時や治療中止規準該当時の迅速な対処などに主眼を置いて改訂を実施した。具体的には、有害事象の判断と早期のピックアップを図り、また後日の検討を容易にするために、収集するデータ項目について、より詳細なものとした。これによって増加するCRF記載の負担を軽減するため、特殊な検査や画像所見の記載欄などについて簡略化も行った。

有害事象の迅速な報告については、CRF作成当初から考慮していたが、今回の改訂によって一層、総括責任者からの緊急報告が行いやすくなったと考えている。

もちろん、今回の改訂でもなお、ベクターのウイルスの病原性発現や癌化、不妊などの長期的な有害事象の記録については不十分である。これについては、研究期間終了後も含めたフォローアップとして、別途考慮せざるを得ないと思われる。

遺伝子治療研究のように、きわめて高度で先進的な臨床試験については、データ管理面においても今回の作業のように、実施に先立って慎重な対策を講じておくことが重要であるが、今後はさらに、実際の遺伝子治療研究から得られる経験に基づいて一層の改善を図りたいと考えている。

E. 結論

国立成育医療研究センターで計画されている慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療研究の臨床データ収集のためのCRFを、同意確認、適格性、有効性判定、および特に有害事象の判断と早期の報告に重点を置いて改訂した。先進医療においては、このような検討によって、患者に適用される前にできる限り安全性を確保する方策を講じることが重要と考えられる。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表等
なし
2. 学会発表等
なし

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（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
分担研究報告書

乳児期早期に重篤な感染症を発症した X 連鎖性慢性肉芽腫症の兄弟例

研究分担者 有賀 正 北海道大学大学院医学研究科小児科学分野教授

研究協力者 山崎 康博 北海道大学大学院医学研究科大学院生

研究要旨

乳児期にアスペルギルス肺炎、新生児期に多発性肝膿瘍を発症した X 連鎖性慢性肉芽腫症 (X-CGD) 兄弟例を経験した。兄は救命できず、弟は感染症の制御を経て造血幹細胞移植待機中である。まれではあるが、CGD では新生児期・乳児期に重篤な感染症を発症すること念頭におくべきである。新生児・乳児期 CGD における重症感染症の治療において、好中球活性酸素産生を回復させるリスクの低い治療法の必要性を痛感した。また、造血幹細胞移植では前処置の副作用がしやすい乳児期の CGD 症例に対し、遺伝子治療が適応となるか、考慮する時期が来ているのかもしれない。

A. 研究目的

慢性肉芽腫症 (CGD) は食細胞の活性酸素産生機構の遺伝的欠陥のために細菌、真菌に対して易感染性を示す原発性免疫不全症であるが、新生児期・乳児期に重篤な感染症を発症することは比較的まれである。我々は兄が乳児期にアスペルギルス肺炎を発症し、弟が新生児期に多発性肝膿瘍を発症した兄弟例を経験した。その治療経験から今後の CGD 治療戦略について考察した。

B. 研究方法

症例：兄は生後 7 ヶ月時にアスペルギルス肺炎を発症し近医総合病院で治療を受けた。当院での好中球活性酸素産生能試験と遺伝子検査にて X 連鎖性 CGD であることが判明し、抗真菌剤が投与されたが改善しなかった。生後 10 ヶ月時に当院に転院となり、強力な抗菌剤治療、抗真菌治療、ステロイド、γインターフェロン治療を施行し、一時小康状態となったが、アスペルギルス感染は改善せず 1 歳 1 ヶ月時に呼吸不全のため死亡した。弟は生後 10 日に発熱し、家族歴があることから近医総合病院にて全身造影 CT が施行され多発肝膿瘍と診断された。血液培養は陰性で、便培養にて *Serratia marcescens* が検出され起因为菌と考えた。速やかに抗菌剤が投与され解熱したが、膿瘍の縮小は緩徐で、炎症反応の陰性化も数ヶ月を要した。遺伝子検査にて兄と同じ X 連鎖性 CGD と判明した。静注抗菌剤治療は 4 ヶ月間施行し、その後内服の

抗生剤治療を続けている。現在は造血幹細胞移植を予定しているが、前処置の副作用の軽減を考慮して 1 歳位をめどに待機している。

C. 研究結果

兄は現在行いうる濃厚治療でもアスペルギルス肺炎を克服できず死亡した。リスクの高い造血幹細胞移植の実施は不可能だった。遺伝子治療・NADPH 酵素補充療法など、感染症をかかえたまま好中球活性酸素を回復させ、免疫不全状態を改善する治療の臨床適応が待たれる。また弟は生後 10 日という非常に早い年齢で多発性の肝膿瘍を発症した。長期間の抗生剤投与でなんとか感染症は制御できたが、重症感染症を今後も発症する可能性があり、早期の移植が望まれている。しかし、移植の前処置の副作用が乳幼児では強い可能性のため、現在 1 歳を目指して移植待機の状態である。

D. 考察

CGD 患者は免疫不全状態にあるが、新生児期・乳児期では一般的に生活環境が清潔であることなどから、重篤な感染症を発症することは比較的まれである。しかし、今回新生児・乳児期重症感染症を呈した X-CGD 兄弟症例を経験した。2008 年の UK・アイルランドからの報告では 145 例の CGD 患者においてアスペルギルス肺炎の発症年齢の中央値は 14.2 歳で範囲は 1 歳 2 ヶ月から 54 歳であった。2011 年のフランスの報告では 159 例の CGD 患

者で同肺炎の発症年齢中央値は6.5歳で、範囲は3歳から11歳であった。また肝膿瘍に関しては2002年の22例の報告では発症年齢中央値は14歳で範囲は2から31歳、2008年の94例の報告ではそれぞれ14.3歳、3ヶ月から38歳であった。本症例の様に兄が生後7ヶ月にアスペルギルス肺炎を発症し、弟が生後10日に多発性肝膿瘍を発症するのはCGDにおいてもまれであり、本兄弟症例の早期発症には何らかの原因が想定される。CGD症例が感染症を発症すると、抗生剤治療のみでは改善に難渋し、特に乳児では感染の制御に活性酸素酸性能障害を改善する必要性を痛感する場合がある。現在、上記の目的のために施行可能な方法としては造血幹細胞移植が挙げられるが、活動性感染症を持つ症例への実施は強力な前処置のため現実的には困難であり、リスクの少ない他の選択肢；遺伝子治療などの早期実現が望まれる。弟は重症感染症のリスクが今後も大きいと考えられ、移植の適応が考えられている。慢性肉芽腫症の過去の造血幹細胞移植ではLow dose TBI (Total Body Irradiation) (3-4 Gy)を加えた前処置実施が完全ドナーの誘導に望ましいとされている。しかしTBIによる副作用：知能低下、発達の遅れ、学習障害などの神経障害、不妊など晩期合併症は、年齢が低いほどそのリスクが高いと言われており、乳児期CGDに造血幹細胞移植を行う場合の大きな障壁となっている。上記の理由で、弟は1歳ぐらいまで造血幹細胞移植を待機している。このように造血幹細胞移植が実施しにくい乳児期において遺伝子治療が適応となるかどうかも今後考慮する余地があるかもしれない。

E. 結論

新生児期・乳児期に重篤な感染症を発症したCGD患者を経験し、その治療において好中球活性酸素産生を回復させる治療法の必要性を痛感した。また乳児CGDにおいても安全で合併症の軽微な根治療法の開発が望まれる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

有賀 正：免疫不全：主に細菌感染症を繰り返す免疫不全 小児内科。特集：小児感染症：なぜ繰り返す、なぜ治らない。印刷中

Saito M , Nagasawa M, Takada H, Hara T,

Tsuchiya S, Agematsu K , Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Nonoyama S, Karasuyama H, Minegishi Y. Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. J Exp Med. 208: 235-249, 2011

Morio T, Atsuta Y, Tomizawa D, Nagamura-Inoue T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara T, Kato S; for the Japanese Cord Blood Bank Network. Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. Br J Haematol 154, 363-372, 2011.

2. 学会発表

山崎康博、有賀 正他 第4回日本免疫不全症研究会 乳児期にAspergillus肺炎を発症し死亡したX連鎖性慢性肉芽腫症の一例 平成23年1月22日 福岡市

山崎康博、有賀 正他 第19回食細胞機能異常症研究会 新生児期に多発性肝膿瘍を発症したX連鎖性慢性肉芽腫症の1例 平成23年12月3日 東京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

慢性肉芽腫症患者の遺伝子解析報告

主任研究者 布井 博幸（宮崎大学医学部小児科教授）

研究協力者 水上智之 小原めぐみ 宮崎大学小児科

研究要旨 gp91^{phox}は慢性肉芽腫症の最も多い病因蛋白であり、活性酸素を産生する酵素の中心をなす膜蛋白質である。この原因遺伝子CYBB(gp91^{phox})が分かって約20年が経って、日本および世界の患者の統計について1200例以上の遺伝子解析結果が報告された。今回世界のCGD関連遺伝子変異についてまとめ、日本の変異と比較検討した。世界ではナンセンス変異が最も多く、次いで欠失変異、ほぼ同数でスプライス、ミスセンスと続いているが、日本ではナンセンス変異とミスセンス変異が多く、欠失変異、スプライス変異の順になっている。世界と共通した変異として、ナンセンス変異で、c.676C>T(57名)、c.271C>T(24名)、スプライス変異でc.252G>A(44名)が多かった。欠失変異では共通した変異はない。ミスセンス変異ではしばしば活性酸素産生能またはgp91+/-が報告されているが、日本では見落とされているのかもしれない。遺伝子治療や骨髄移植の適応を考える際に予後との関係で詳細な検討が必要である。

A. はじめに

慢性肉芽腫症患者は原発性免疫不全症候群の登録患者中で約18%を占める。その中でも病型別ではX連鎖性のgp91^{phox}欠損型が75%を占め最多である。

今回Roos博士らと共同で行った世界1267家系1415患者のgp91^{phox}変異の集計(1)を報告したので、国内の変異と比較検討し、Genotype phenotype 相関について考察を加えた。

B. 研究方法

Roos D 博士らの集計報告に基づき、gp91^{phox}欠損型患者の変異の部位と変異の種類を世界と日本と比較し(表1)、gp91+ (表2)とgp91- (表3;世界)(表4;日本)の患者についてまとめた。また、各々ナンセンス変異(図1)、欠失変異(図2)、スプライス変異となるイントロン変異と欠失・挿入変異を持つ例(図3)ミスセンス変異(図4)、挿入変異(図5)、を別々

に表記した。

ここには我々が把握している日本の166名のgp91^{phox}異常症例のうち、遺伝子解析が終了しているgp91^{phox}欠損患者82例が含まれており、我々の症例の詳細と比較した。

C. 結果

世界では、ナンセンス変異(図1)が最も頻度が高く、日本でも15家系27患者と最も多かった。世界で頻度の高い同一変異としてはc.217C>T(25名)、c.271C>T(24名)、c.388C>T(41名)、c.469C>T(26名)、c.676C>T(57名)、c.736C>T(7名)、c.868C>T(38名)であり、日本で高頻度の変異はc.676C>T(5)、c.271C>T(3)と世界と共通している。

欠失変異(図2)は日本では11家系12患者と3番目に多いが、世界では、第2の高頻度である。同一変異は少なく、各々の変異の患者数は5名程度である。

スプライス変異 (図 3) は、日本で 9 家系 15 患者で、4 番目に多い変異だが、世界ではミスセンス変異とほぼ同程度の頻度である。120 変異 247 家系と同一変異も多い。最多の同一変異は c. 252G>A で、世界で 44 例、日本では 7 例報告されている。その他の同一変異は exon2 (c. 141+1G>A, >T) が 5 例と、exon9 (c. 1150-1151+2del) が 9 例で、他の同一変異はいずれも 5 例程度である。

ミスセンス変異 (図 4) は日本で 16 家系 19 患者と 2 番目に頻度が高い。世界でも欠失変異に続いて 3 番目に多く、145 変異 246 患者が報告されている。同一変異数は多いが、各々の変異の患者数は 10 名程度である。ミスセンス変異では一部に gp91^{phox} 陽性者が見られ、診断の際に苦慮することがある (表 2, 3, 4)。

挿入変異 (図 5) は日本では 6 家系 7 患者であり、世界的に見ても、頻度は低い。

その他プロモータ変異が日本で 1 例、フランスで 1 例報告がある。(2)

D. 考察

Roos らの報告している gp91^{pho} を正常発現している患者 (gp91⁺) は 28 症例 (一部フレームシフトを伴う欠失を含む日本の) で、ほとんどがミスセンス変異 (24 症例) であった。日本では del/ins の一例のみであった (表 2)。

しかし、世界の gp91^{phox} 発現が低下している患者 (gp91⁻) ではナンセンス変異 2 名 (1 変異)、スプライス変異 63 名 9 家族 (8 変異)、ミスセンス変異 80 名 57 家族 (33 変異)、欠失変異 14 名 13 家族 (8 変異)、挿入変異 3 名 (3 変異)、プロモータ変異 2 名 2 家族 (2 変異) で、ミスセンス変異が大部分をしめている (表 3)。日本の CGD 患者について、7D5 モノクローナル抗体で gp91^{phox} がコントロールの 4% 以上陽性であり gp91 の発現が低下している症例 (pg91⁻) は、21 名 (29%) で、ナンセンス変異

8 名 (3 変異)、スプライス変異 8 名 (3 変異)、ミスセンス変異 1 名 (1 変異)、欠失変異 2 名 (2 変異)、挿入変異 2 名 (2 変異)、プロモータ変異 1 名 (1 変異) と多技に渡っていた (表 4)。

日本のナンセンス変異では 3 種類の同一変異 (c. 271C>T (R91X) 3 家系、c. 676C>T (R226X) 6 症例 5 家系、c. 1339G>T (E467X) 1 家系) が調べられているが、世界では c. 1399A>G (E467X) のみで、c. 271C>T (R91X)、c. 676C>T (R226X) の変異が、世界の統計に反映されていない。確かに、gp91^{phox} の機能ドメインを欠くことになり、理論的には考え辛いが、7D5 抗体で調べる限り有意な蛍光ピークのシフトが認められる。

日本でミスセンス変異の患者で 1 名 (c. 1399G>T, E467X) のみ gp91⁻ と診断されている。世界ではミスセンス変異 (80 名 57 家族 33 変異) が多く確認されていることから、見逃されている可能性がある。同一変異の症例について日本でも確認する必要がある。ミスセンス変異での活性酸素産生能については記載されていないので、はっきりしたことは分からないが、Kuhns DB らが詳細な検討を行い、残存活性酸素産生活性があると死亡率は優位に低い。残存 ROS 産生活性はミスセンス変異 (His 部位を除く) がほとんどであり、309 塩基から N 末の部位に多く、C 末には活性が残っていないと報告している (4)。骨髄移植や遺伝子治療の適応にも関わっており、事前に十分な精査が必要だと考えている。

スプライス異常 (図) については、c. 252C>A 変異が世界で 44 例、日本では 7 例が診断されている。この症例はインターフェロン γ に反応し、投与後 2-3 週間で、gp91^{phox} を 20-30% 発現するため、軽症型であると、我々も報告している (3)。ところが、外国ではそのような記載が無く、国際協力によって、もっと詳細な検討が必要だと思われる。

参考文献：

1. Roos D, et al., Blood Cells Mol Dis. 15;45(3):246-65, 2010.
2. Stasia MJ, et al., J Infect Dis. 5;188(10):1593-604, 2003.
3. Ishibashi F, et al., Blood. 15;98(2):436-41, 2001.
4. Kuhns DB, et al., N Engl J Med. 30;363(27):2600-10, 2010.

G. 研究発表

- 1) Moritake H, Hidaka F, Kamimura S, Kojima H, Shimonodan H, Nunoi H. Concomitant transient erythroblastopenia of childhood with neonatal hepatitis. *Pediatr Int.* 2012 Feb;54(1):147-50.
- 2) Mizukami T, Obara M, Nishikomori R, Kawai T, Tahara Y, Sameshima N, Marutsuka K, Nakase H, Kimura N, Heike T, Nunoi H. Successful Treatment with Infliximab for Inflammatory Colitis in a Patient with X-linked Anhidrotic Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2012 Feb;32(1):39-49.
- 3) Fujimoto S, Watts RA, Kobayashi S, Suzuki K, Jayne DR, Scott DG, Hashimoto H, Nunoi H. Comparison of the epidemiology of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis between Japan and the U.K. *Rheumatology.* 50(10):1916-20, 2011.
- 4) Kawachi S, Matsushita T, Sato T, Nunoi H, Noguchi H, Ota S, Kanemoto N, Nakatani K, Nishiguchi T, Yuge A, Imamura H, Kitajima H, Narahara K, Suzuki K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. Multicenter prospective evaluation of a novel rapid immunochromatographic diagnostic kit

specifically detecting influenza A H1N1 2009 virus. *J Clin Virol.* 51(1):68-72, 2011.

- 5) Phung TT, Luong ST, Kawachi S, Nunoi H, Nguyen LT, Nakayama T, Suzuki K. Interleukin 12 and myeloperoxidase (MPO) in Vietnamese children with acute respiratory distress syndrome due to Avian influenza (H5N1) infection. *J Infect.* 62(1):104-6, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1： 世界と日本のCYBB遺伝子変異

変異	世界の統計		日本の統計(-2006)	
	家系数	変異数	家系数	患者数
ナンセンス	377(29%)	96(14.1%)	15(25.4%)	27(32.9%)
欠失	281(22.2%)	242(35.6%)	11(18.6%)	12(14.6%)
スプライス	247(19.5%)	120(17.6%)	9(15.2%)	15(18.3%)
ミスセンス	246(19.4%)	145(21.3%)	16(27.1%)	19(23.1%)
挿入	89(7%)	54(7.9%)	6(10.1%)	7(8.5%)
欠失+挿入	19(1.5%)	19(2.8%)	2(3.4%)	2(2.4%)
プロモータ	8(0.6%)	5(0.7%)		
	1267	681	59	82

表2 gp91+症例

	Mutation	Amino acid change	#
c.160A>G	Missense	p.Arg54Gly	1(1)
c.161G>T	Missense	p.Arg54Met	2(2)
c.162G>C	Missense	p.Arg54Ser	1(1)
c.164C>A	Missense	p.Ala55Asp	
c.170C>A	Missense	p.Ala57Glu	2(2)
c.907C>T	Missense	p.His303Tyr	1(1)
c.[907C>A;911C>G]	Missense	p.[His303Asn; Pro304Arg]	1(2)
c.1013A>G	Missense	p.His338Arg	2(4)
c.1016C>A	Missense	p.Pro339His X91+/-	11(13)
c.1022C>A	Missense	p.Thr341Lys	1(1)
c.1105T>C	Missense	p.Cys369Arg	1(1)
c.1222G>C	Missense	p.Gly408Arg	1(1)
c.1223G>A	Missense	p.Gly408Glu	3(4)
c.1234G>C	Missense	p.Gly412Arg	1(2)
c.1244C>A	Missense	p.Pro415His	3(5)
c.1244C>T	Missense	p.Pro415Leu	3(3)
c.1441A>C	Missense	p.Thr481Pro	1(1)
c.1498G>T	Missense	p.Asp500Tyr	2(3)
c.1499A>G	Missense	p.Asp500Gly	1(1)
c.1500T>G	Missense	p.Asp500Glu	1(1)
c.1514T>G	Missense	p.Leu505Arg	3(3)
c.1609T>C	Missense	p.Cys537Arg	2(2)
c.1637T>C	Missense	p.Leu546Pro	1(1)
c.1702G>A	Missense	p.Glu568Lys	1(1)
c.1462-2A>Gc	Splice site	partial del exon 12	
		p.Ala488_Glu497del	3(4)
c.1462-2A>Cc	Splice site	(partial) del exon 12?	
		p.Ala488_Glu497del?	1(1)
c.1488_1490delTGA	Deletion	p.Asp496del	1(1)
c.1521_1525delAAAGA/ins CATCTGGG	Deletion/insertion	p.Gln507_Thr509del/insHisIleTrpAla	* 1(1)

: Kindred (patients)a

* : Japan

表3 :gp91-症例

	Mutation	Amino acid change	#	
	c.-69A>C	Promoter	NA	1(2)
	c.-67T>C	Promoter	NA	2(4)
	c.1399G>T	Nonsense	p.Glu467X	1(2)
	c.2T>A	Missense	p.Met1Lys; startcodon lost	1(1)
	c.2T>G	Missense	p.Met1Arg; startcodon lost	1(1)
	c.54G>C	Missense	p.Trp18Cys	1(1)
	c.121T>G	Missense	p.Tyr41Asp	1(1)
	c.134T>G	Missense	p.Leu45Arg	1(1)
	c.158C>A	Missense	p.Ala53Asp	1(1)
	c.167C>T	Missense	p.Pro56Leu	2(3)
	c.176G>T	Missense	p.Cys59Phe	1(1)
	c.301C>T	Missense	p.His101Tyr	1(1)
	c.320T>G	Missense	p.Met107Arg	2(2)
	c.389G>T	Missense	p.Arg130Leu + partial outsplicing exon 5	1(1)
	c.466G>A	Missense	p.Ala156Thr	3(3)
	c.578C>T	Missense	p.Ser193Phe	2(2)
	c.625C>T	Missense	p.His209Tyr	5(5)
	c.730T>C	Missense	p.Cys244Arg	2(2)
	c.730T>G	Missense	p.Cys244Gly	1(1)
	c.731G>C	Missense	p.Cys244Ser	1(1)
	c.731G>A	Missense	p.Cys244Tyr	1(1)
	c.897G>C /Splice site?	Missense	p.Lys299Asn	1(1)
	c.925G>A	Missense	p.Glu309Lys	9(15)
	c.965G>A	Missense	p.Gly322Glu	1(1)
	c.973A>T	Missense	p.Ile325Phe	1(1)
	c.1012C>T	Missense	p.His338Tyr	7(7)
	c.1016C>A	Missense	p.Pro339His	11(13)
	c.1022C>T	Missense	p.Thr341Ile	1(1)
	c.1061A>G	Missense	p.His354Arg	1(2)
	c.1076G>C	Missense	p.Gly359Ala	1(1)
	c.1166G>C	Missense	p.Gly389Ala	1(1)
	c.1421T>G	Missense	p.Leu474Arg	1(1)
	c.1484A>C	Missense	p.His495Pro	1(2)
	c.1498G>A	Missense	p.Asp500Asn	1(3)
	c.1514T>C	Missense	p.Leu505Pro	1(2)
	c.1637T>G	Missense	p.Leu546Arg	1(1)
	c.45+6T>Cc	Splice site	del. exon 1?p.Met1_Ile15del?	1(2)

c.252G>A (3' end of exon 3)c	Splice site	del. exon 3/p.Ser48_Ala84del	44(53)
c.482A>G (3' end of exon 5)c	Splice site	multiple splice products	1(2)
c.483+5G>Ac	Splice site	del exon 5?	1(2)
c.484-3C>Ac	Splice site	del exon 6/p.Asn162ThrfsX15	1(2)
c.1152-11T>Gc	Splice site	del exon 10/ins10 into exon 10>/pAla488PhefsX12	1(2)
c.1314+4_+5AG>GCc	Splice site	del exon 10/p.Ile385SerfsX63	1(1)
c.1585_1586+9del11c	Splice site	del 17 from 3' exon 12/p.Ala524TyrfsX11	1(1)
c.105delT	Deletion	p.Pro36HisfsX25	1(1)
c.394_406del13	Deletion	p.Asn132LeufsX4	1(1)
c.5561_569delATTAATTAT	Deletion	p.Leu188_Ile190del	1(1)
c.646_648delTTC	Deletion	p.Phe216del	3(3)
c.943_945delAAG	Deletion	p.Lys315del	3(4)
c.1265_1273delTCAGTCTGG	Deletion	p.Ser422_Trp424del	1(1)
c.1598_1600delGAG	Deletion	p.Gly533del	2(2)
c.1600_1614del15	Deletion	p.Val534_Gly538del	1(1)
c.573_581dupTTCCTCCAC	Insertion	p.Thr191_Ser193dup	1(1)
c.583_588dupAAAACC	Insertion	p.Lys195_Thr196	1(1)
c.1694dupT	Insertion	p.Asn566GlnfsX28	1(1)

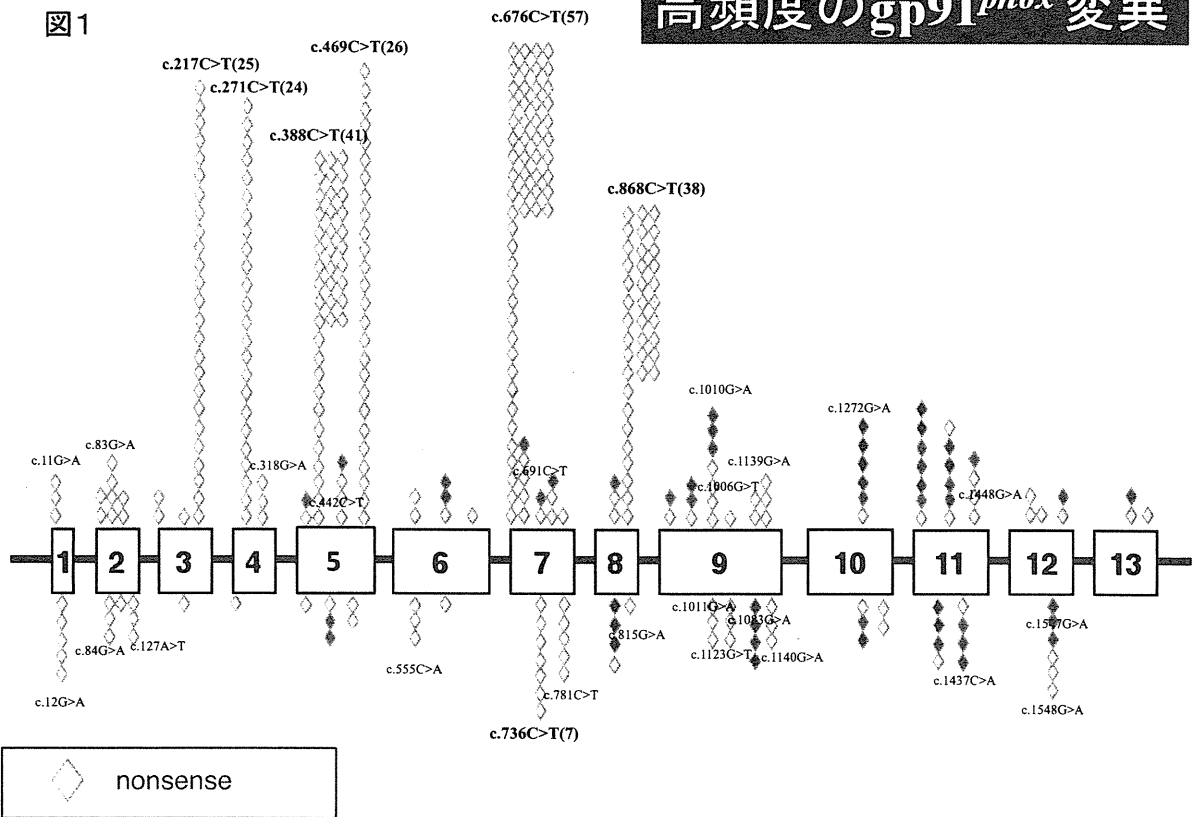
#: Kindred (patients)a

表4:gp91phox陽性者

	番号	変異の種類	変異部位	変異核酸	変異アミノ酸	7D5 (%)	DHR (%)
1	252	Splice異常	Intron2	-12 c>t		7.5	7.6
2	56	Splice異常	Exon 3	G252A	A84A	20	6
3	57	Splice異常	Exon 3	G252A	A84A	17	11
4	98	Splice異常	Exon 3	G252A	A84A	23	0
5	176	Splice異常	Exon 3	G252A	A84A	33	0.68
6	246	Splice異常	Exon 3	G252A	A84A	5	0
7	75	Splice異常	Intron 7	+2 t>c		6.6	4
8	111	Splice異常	Exon 12	-2 a>g		14	1
9	256	Nonsense	Exon 4	C271T	R91X	50	
10	261	Nonsense	Exon 4	C271T	R91X	9.8	0
11	177	Nonsense	Exon 7	C676T	R226X	8.4	0
12	232	Nonsense	Exon 7	C676T	R226X	18	0
13	257	Nonsense	Exon 7	C676T	R226X	3.3	1.8
14	267	Nonsense	Exon 7	C676T	R226X	43	1.9
15	25	Nonsense	Exon 11	G1399T	E467X	14	0
16	215	Nonsense	Exon 11	G1399T	E467X	36	
17	235	Missense	Exon 6	A665G	H222R	6.5	2
18	234	Insertion	Exon 1	ins G after 6 G	frameshift	21	1
19	253	Insertion	Exon 6	583_588 dup AAAACC	ins KT after 196T	32.6	7.5
20	271	Deletion	Exon 5	394_406 del AATAATTCTGATC	frameshift	12	12.1
21	250	Deletion	Exon 10	1265_1274 del CAGTCTGGT	del 422_424 SVW	11	12

高頻度のgp91^{phox}変異

図1



高頻度のgp91^{phox}変異

図2

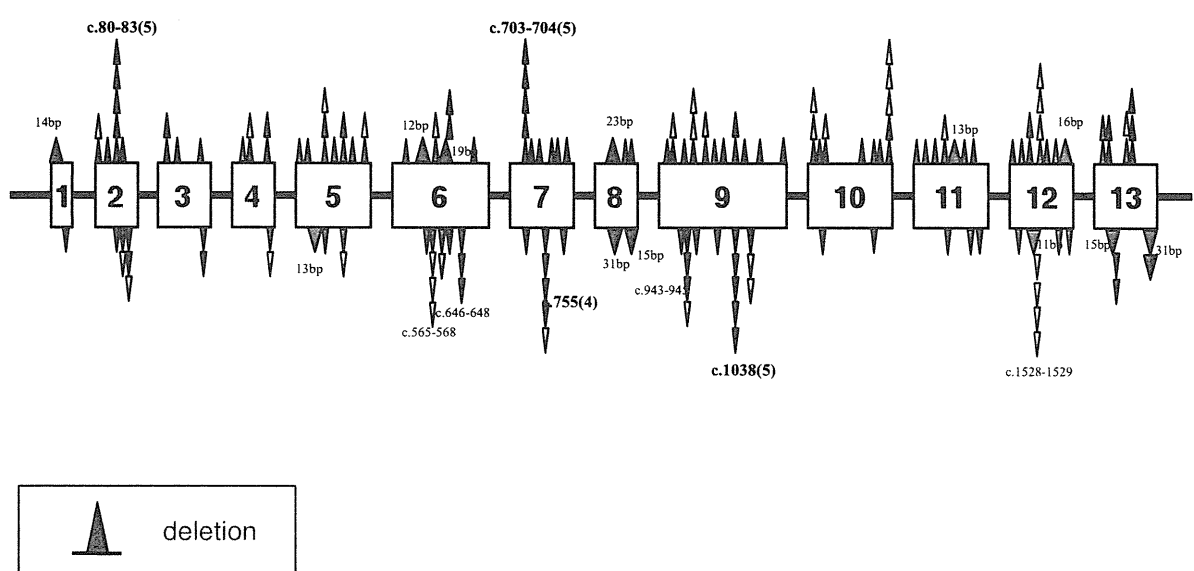
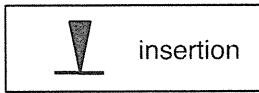
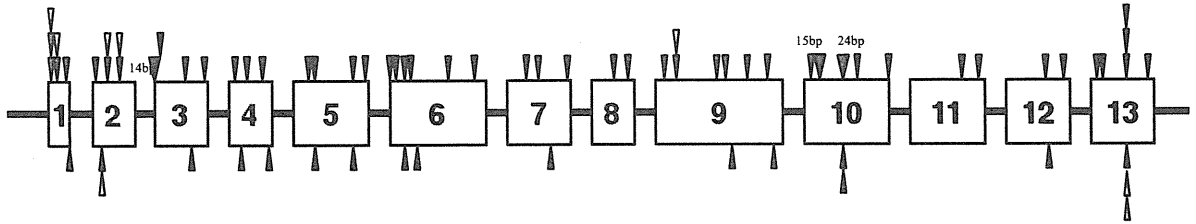


図5

高頻度のgp91^{phox} 変異



非ウイルスベクターによる in vivo 遺伝子導入の評価系

研究分担者 久米晃啓 自治医科大学准教授

研究要旨

挿入発癌リスク低減のため、部位特異的遺伝子導入法確立を目指している。Rep 蛋白は染色体上で安全と考えられる AAVS1 領域への組み込み活性をもつが、従来の目的遺伝子プラス Rep 遺伝子の co-transfection では効率や安全性に限界があった。現在、目的遺伝子と蛋白を同時に細胞に導入しうる非ウイルスベクターが開発されつつあり、その応用のため in vivo 遺伝子導入の評価系を構築した。

A. 研究目的

遺伝子・細胞治療の実施においては急性毒性とともに染色体挿入発癌のリスク低減が重要視される。非ウイルスベクターは精度の高い安全管理が可能であるが、遺伝子導入効率が高くなかったため臨床応用が遅れていた。近年、非ウイルスベクターの改良が進んで遺伝子導入効率が改善するとともに、DNA と同時に RNA や蛋白も同一標的細胞に導入できるものも開発されつつある。これを利用すれば、染色体上の安全な部位に遺伝子を組み込む機能を備えた挿入発癌リスクの無いベクターも開発可能である。そこで、このような非ウイルスベクターの遺伝子導入効率を in vivo で比較できる系を構築する必要がある。一方、非ウイルスベクターDNA 中の細菌由来配列が宿主の自然免疫系を刺激して遺伝子導入細胞を排除する懸念が指摘されており、これを回避するために開発されたミニサークルDNA が注目されている。本課題で確立した in vivo 遺伝子導入評価系を用いてその有用性を検討した。

B. 研究方法

1. ホタル由来ルシフェラーゼ遺伝子 (Luc) のコドンに適正化した人工遺伝子 (Luc2) とヒカリコメツキムシ由来のルシフェラーゼ遺伝子 (Eluc) を、それぞれサイトメガロウイルスプロモータ (CMV) または CAG プロモータ (CAG) でドライブする発現ベクターを計 4 種構築した (p3CMV-Luc2、p3CMV-Eluc、

p3CAG-Luc2、p3CAG-Eluc)。これらを用いてヒト腎由来 HEK293 細胞とヒト肝癌由来 Huh7 細胞にリポフェクションし、ルシフェラーゼの活性をプレートリーダーで測定した。

2. 上記プラスミド各 50 μ g を用いて hydrodynamics-based transfection 法にて Balb/c-nu/nu マウスに遺伝子導入した翌日、生体イメージング装置 (IVIS) で画像解析した後、動物を屠殺して摘出肝のルシフェラーゼ活性を測定した。

3. Luc を搭載したミニサークル DNA (MC07.CMV-luc) と対照用プラスミド (pCMV-luc) はミニサークルDNA の開発元から購入した。これらの発現ベクター各 10 μ g を用いてマウスに hydrodynamics-based transfection 施行後、IVIS でルシフェラーゼ遺伝子発現を観察・定量した。

C. 研究結果

1. 培養細胞におけるベクターの比較： リポフェクション 2 日後のルシフェラーゼ活性は、ホタル由来 Luc2 に比べコメツキムシ由来

	HEK293	Huh7
p3CMV-Luc2	14.3 \pm 0.5	4.7 \pm 0.5
p3CMV-Eluc	95.6 \pm 1.8	22.9 \pm 5.7
p3CAG-Luc2	13.4 \pm 0.7	5.7 \pm 0.1
p3CAG-Eluc	89.7 \pm 9.8	49.8 \pm 12.6

Elucの方が5-10倍強かった。CMVとCAGのプロモータ活性はほぼ同等だった(表1)。