

201128036A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森尾 友宏

平成24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診断基準・診断方法の確立及び方法の開発に関する研究

### 目次

I.	班員・研究協力者名簿	5
II.	総括研究報告	9
	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）	17
	今井耕輔（防衛医科大学校医療情報部 現・東京医科歯科大学小児・周産期地域医療学講座）	23
	金兼弘和（富山大学附属病院小児科）	27
	松本 功（筑波大学人間総合科学研究科臨床免疫分野）	31
	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）	35
	小原 収（かずさDNA研究所）	39
	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）	43
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表	47
V.	研究成果の刊行物・別刷	55

## 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	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 寄附講座 小児周産期地域医療学講座	特任准教授
	金兼弘和	富山大学附属病院小児科	講師
	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
	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	准教授
	小原 收 竹森利忠	(財)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・免疫記憶研究グループ	副所長 グループディレクター
研究協力者	野々山恵章	防衛医科大学校小児科	教授
	佐藤弘樹	防衛医科大学校病院医療情報部	助教
	中川紀子	防衛医科大学校小児科	大学院生
	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
	梅田直人	筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床免疫学	大学院生
	加地友弘	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	研究員
	花見光江	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	テクニカルスタッフ
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)	大学院生	
事務局	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 〒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
	星川あき子		研究班事務

経理事務担当者	増田 晴彦 高橋 和之	国立大学法人東京医科歯科大学 学術国際部研究推進課 〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45 TEL:03-5803-5872・7162 FAX:03-5803-0179 E-mail:haruhiko.adm@cmn.tmd.ac.jp (k-takahashi.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  
准教授

研究要旨：

本年は昨年度までの奨励研究の成果を発展させ、1つの大きな目標であった CVID 亜群における責任遺伝子探索を行った。まずは既知疾患をスクリーニングした上で、今までに構築した臨床的・基礎的データベースをもとに、特徴的な症状・所見を示す亜群を抽出した。全エクソン解析によって候補遺伝子を抽出し、dbSNP や家族情報、web 上の遺伝子情報、タンパク情報を利用して、homozygous mutation, compound heterozygous mutation にしぼって同定作業に入った。またこれらの情報をもとに、自己免疫疾患、悪性腫瘍患者などとの関連について考察した。CVID は多岐にわたる疾患特に二次的な要因によって発生する免疫不全症を含んでおり、講演やインターネットを通じて同疾患の啓蒙を行うと共に、患者会との連絡・連携を強化することにより、支援活動の充実を図った。

研究分担者氏名

今井耕輔：東京医科歯科大学大学院医歯学  
総合研究科寄附講座 小児周産期  
地域医療学講座 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  
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

的・網羅的な検討を行い、(2)特徴的な亜群を抽出して、全エクソーム解析などを行うことにより根本原因を同定し、(3)自己免疫・腫瘍発生をRAS-MAPK系の観点から探索し、(4)根本原因に対するタンパク導入治療について基礎検討を行うとともに、(5)Webなどにての情報公開を充実させ、患者会との連携を強固なものとするを旨とした研究を行う。

本年は、CVID 亜群を根本原因に基づく確立した疾患概念として提示し、真の治療方法を探索しつつ、それらの成果を医療者、患者に情報公開する。

A. 研究目的

現在までに構築した約300名の患者データベースを元に、体系的基盤データを収集し、(1)CVID群について免疫系に関する体系

B. 研究方法

(1) CVIDの亜群解析 (今井、森尾、金兼、竹森)

防衛医科大学校にて集積した40名の

CVIDを対象として、T-cell receptor excision circles (TRECs), KRECs (Kappa-deleting recombination excision circles)のリアルタイムPCRでの解析、およびFACS解析を行い、臨床症状等との関係について検討した。また医科歯科大学においても97例のCVID患者を対象にTRECs, KRECsを測定した。また男性の一部の患者ではX連鎖リンパ増殖症候群(X-linked lymphoproliferative syndrome: XLP)類似疾患が混じているため、その診断及び解析も実施した。また、CVID患者と健常人におけるB細胞分化異常を探るために、naïve B細胞をソーティングし、その発現解析の準備を行った。

#### (2) 免疫エクソーム解析及び全エクソーム解析による責任遺伝子探索 (今井、森尾、小原)

低 $\gamma$ グロブリン血症や自己免疫疾患の家族歴があるCVID症例や、特徴的な合併症(ウイルス真菌感染、自己免疫疾患、低身長など)があるCVID症例について、次世代シーケンサーを用いて遺伝子解析を行った。具体的には、免疫関連・CVID候補として選定した遺伝子群について全Exon解析を行う方法と、全Exon解析を行う方法で、疾患責任遺伝子の同定を試みた。

#### (3) 自己免疫・腫瘍発生機構の探索 (田中、松本)

患者における自己免疫異常や腫瘍発生機構を、Ras-associated ALPS like disorder (RALD)をモデルとして、機能解析を行った。また自己免疫や腫瘍発生に関連する分子については(3)の全exon解析にて検討した。

#### (4) タンパク導入治療の基礎的検討 (田中、松本、森尾)

組換えタンパクを正常な構造を保ったまま、細胞のあるべき局在部位に導入することが可能であるかを、NADPH複合体細胞質成分が欠損する慢性肉芽腫症(CGD)やWASPタンパクを欠損する

Wiskott-Aldrich症候群(WAS)をモデルとして、タンパク導入による機能回復実験を

行った。具体的にはHph-1ヒト由来cell permeable peptide (CPP)をコードする配列に当該遺伝子をつなぎ、大腸菌の中で発現させ、機能欠損細胞に導入して、機能回復を検討した。

#### (5) 患者会との連携、情報公開 (田中、松本、森尾)

患者会との連絡をとり、また様々な雑誌への総説公開や、様々な機会での発表を通じてCVIDについての周知を図った。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、患者および家族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(家族)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。全エクソン解析を含む網羅的遺伝子解析についても倫理審査委員会の承認を得て実施した。

## C. 研究結果

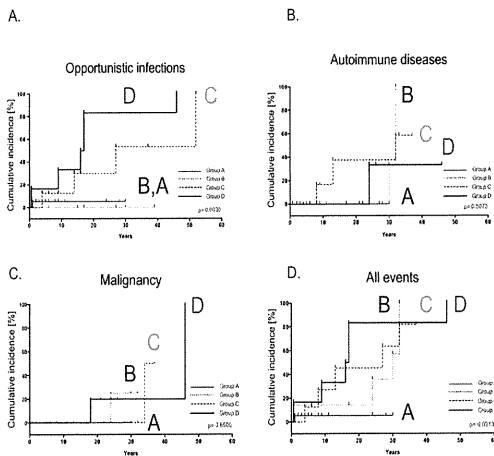
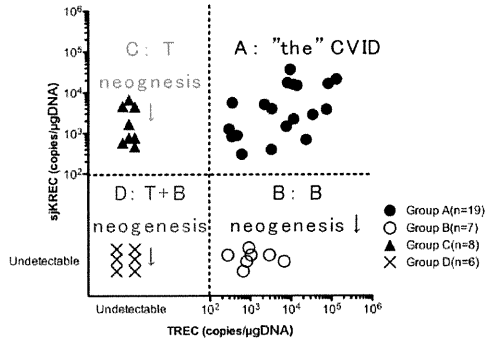
### (1) CVIDの亜群解析 (今井、森尾、金兼、竹森)

TREC, KRECの結果から、図のようにA群からD群(A群: TRECs正常・KRECs正常、B群: TRECs正常、KRECs低下、C群: TRECs低下、KRECs正常、D群: TRECs低下、KRECs低下)に群分けすると、CVID患者40例の検討では、A:B:C:D=19:7:8:6に分類された。

この中で、D群はいわゆる複合型免疫不全症に近い群と考えられる。臨床像との相関について、それぞれの群での合併症(日和見感染、自己免疫疾患、悪性腫瘍)の発生率について、経時的にも検討したが、A以外の群では有意に合併症頻度が高かった。



CVID classification using TREC and KREC quantification

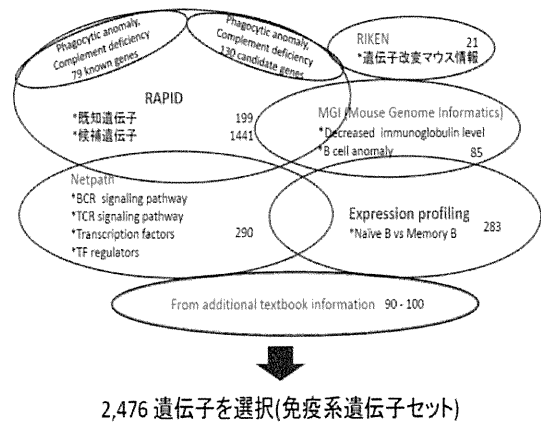


また、XLPの解析では2010年末までに20家系32例でSAP異常症同定された)。そのうち致死性伝染性単核症あるいは血球貪食性リンパ組織球症が18例(56%)、悪性リンパ腫を含むリンパ増殖症が7例(22%)、低γグロブリン血症が12例(38%)であり、重複例も少なからず認められた。低γグロブリン血症単独例は5例(16%)のみであったが、この症例はCVIDとしてpick upされていることが明らかになった。

Naïve B細胞については、健常者5名及びCVID症例5名でFACS sortingを行い、それぞれ1,000-10,000細胞を採取することができた。今後これらの細胞から得たRNAを用いてexpression profilingを行う予定である。

(2)免疫エクソーム解析及び全エクソーム解析による責任遺伝子探索(森尾、小原)

①8 検体において、免疫関連・CVID 候補遺伝子の Exon 解析を Roche 社 FLX を用いて解析した。免疫関連・CVID 候補遺伝子の選定に当たっては、RAPID (Resources for Asian Primary Immunodeficiencies)、MGI、RIKEN ノックアウトマウス情報、Netpath 二加えて、発現アレイ解析 (naïve B 細胞と memory B/plasma cell との発現解析)の結果を踏まえた 2476 個を選定した(下図)。



②5 検体では、全 Exon 解析を Illumina 社 GAIIx にて解析した。

疾患原因候補変異について、従来法にて塩基配列変異の確認を行う個所を一次抽出した。変異を確認したのち、家族の gDNA 解析を行い、患者特有の変異を二次抽出した。その結果 8 検体では hetero 異常候補がそれぞれ 3-6 遺伝子抽出された。一方全 Exon 解析においては、Homo あるいは compound hetero 候補がそれぞれ 20 程度抽出され、現在遺伝子塩基配列の確認を行っているところである(森尾、小原の研究分担報告参照)。

(3)自己免疫・腫瘍発生機構の探索(田中、松本)

主に内科医を中心として自己免疫疾患及び腫瘍性疾患の病態について解析を行った。総計で関節リウマチ 5 例、関節炎 8 例に認めており、これらの患者群においては各種シトルリン化自己抗体に関して検討を開始

した。また肝脾種に加えて血球減少を呈する患者群では Ras-MAPK 系の異常が認められる可能性があり、4, 5名の CVID 検体において、IL-2 除去後の apoptosis の低下や、Bim 発現などの検討を行った。その結果、今のところ Ras 系異常を示唆する症例はないが、今後数十名規模で確認する予定である。

#### (4) タンパク導入治療の基礎的検討 (田中、松本、森尾)

方法に記載したようにまず CGD においては p47, p67 を、WAS においては WASp を Hph-1 と連結した形で、大腸菌に発現させ、選別マーカーである 6xHis を利用して Ni-ビーズで回収した。Hph-1-p47, Hph-1-p67 は大量発現が可能であったが、Hph-1-WASp は不溶性分画に入り、培養温度、時間の改変や用いる大腸菌の strain の検討などにより、十分量のタンパク質が純度高く回収できることが明らかになった。

これらの組換えタンパクは CGD においては患者好中球に導入し、十分量のタンパク質が投与量依存的に細胞質内に発現することを明らかにした。その結果 CGD 好中球における活性酸素産生能は正常化した。今のところ CVID において欠損する細胞内タンパク質や核タンパク質は知られていないが、今後責任遺伝子が判明すればこの手法でタンパク治療が可能になる可能性がある。

#### (5) 患者会との連携、情報公開 (田中、松本、森尾)

内科において、CVID の診療は極めて稀であり、診療経験は乏しい。一方小児科医にとっては良く診療に当たる疾患であり、小児科からの内科への転科が進んでいない。また成人の CVID は診断が遅れている可能性が高いことも明らかになった。そこで本年は、日本小児科学会、日本血液学会などにおいて CVID についてのセミナーを開催した。また e 免疫などの Web site において、CVID 情報を提供すると共に、現在日本臨床免疫学会雑誌に、総説として CVID

update を脱稿し、様々な領域の医師に情報提供できる体制を作った。

また患者会であるすずらんのと定期的なメールなどを通して相談に応じており、また原発性免疫不全症の患者会であるつばさの会とは、定期相談会などで顔をあわせ discussion する機会を設けた。研究分担者はつばさの会の理事となり、これらの努力の結果患者会支援という形で、新たな協力体制を構築する予定になっている。

## D. 考察

CVID について、T細胞新生能、B細胞新生能をもとに4群に亜分類することで、合併症合併例を抽出することが可能となった。また CVID の中に XLP が埋もれていることが明らかになった。さらなる亜群解析の tool として、naïve B細胞での網羅的発現解析の結果が期待される。検体数も300に近くなり、十分解析に耐える数となっているので、これらと臨床症状、各種検査データとの詳細な関連については、統計学的にさらに詰めていく予定である。

これらの亜群分類の結果本年は8例の CVID 検体において2,476遺伝子解析が、5例において全 Exon 解析が行われた。結果の解釈や、問題となる遺伝子の抽出方法についても習熟し、今後疾患候補遺伝子がさらに絞られることにより、また新たに10名ほどの患者検体を解析することにより、責任遺伝子が明らかになる可能性が高い。

この結果をもとにタンパク導入による機能回復を試みることができたのも本年の大きな成果である。自己免疫疾患や悪性腫瘍発生の真の分子機構は明らかになっていないが、正常タンパクの導入や変異タンパクの導入により、免疫細胞機能解析もさらに容易になることが期待できる。

患者会との連携や Web や雑誌、講演会を通じての広報も活発に行われ、今後さらに CVID 検体が集積することが大いに期待される。

## E. 結論

CVID 患者の KRECs, TRECs を用いた分類が進み、さらに除外すべき疾患の明確化や、naïve B 細胞プロファイリングが加わって、臨床情報と共に、病態を反映する亜群分類が完成しつつある。これらの情報を元に網羅的かつ体系的な候補遺伝子探索が始まり、責任遺伝子同定が間近となった。自己免疫や腫瘍の発生については、タンパク導入によりその病態解析が容易になると共に、治療への道が開けつつある。これらの成果は様々な形で広報し、周知した。

## 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. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
各分担研究者参照
2. 実用新案登録  
各分担研究者参照
3. その他  
各分担研究者参照

### 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(CVID)として登録されている患者には、様々な一次性、二次性免疫不全症を含んでいる可能性がある。まず基礎的データ、臨床データの充実から、確実な CVID を抽出するとともに、明らかな亜群を選定した。その中で特徴的かつ家族検体が解析可能な5名において、責任遺伝子を明らかにする目的で全エクソン解析を実施し、候補遺伝子を絞り込んだ。また今後の機能回復実験や、治療への応用を考え、責任遺伝子産物を膜透過性ペプチドに結合させた組替えタンパクとして用意し、primary cells に導入する研究に着手し、既知疾患においてその有効性を明らかにした。患者会とは研究代表者として密に連絡をとり、小児科、内科、関連診療科を含んだ診療体制の構築に取り組んだ。これらの成果は講演や web を通じて公開した。

#### A. 研究目的

現在までに構築した約 300 名の患者データベースにさらに免疫学的データを充実させることにより疾患亜群を抽出し、その DNA 検体を用いた免疫関連遺伝子エクソン解析及び全エクソン解析によって原因遺伝子を明らかにすることを目的とした。また根本原因に対するタンパク導入治療について基礎検討を行うとともに、Web などにての情報公開を充実させ、患者会との連携を強固なものとするを旨とした研究を行った。

#### B. 研究方法

(1) CVIDの亜群に対する免疫関連遺伝子エクソン解析及び全エクソン解析による責任遺伝子探索

この研究は研究分担者である小原とともに実施した。担当者が亜群分類、患者の選定、及び核酸の抽出を行い、かずさDNA研究所にて高速塩基配列決定を行い、さらに

両者の協力で候補遺伝子を絞り込んだ。解析は以下の2つの手法を用いて行った。

#### A. 免疫関連遺伝子エクソン解析

まずRAPID情報、MGI、RefDICなどによって免疫疾患に関与する2,476分子群を抽出した(この際に好中球にのみ、あるいは純粋に補体にのみ関連する分子は対象外とした)。さらに小原らにより報告する手法を用いて、FLX-454によるlong read解析を行った。解析ではhomozygous mutation、compound heterozygote mutation、heterologous mutationで優性阻害を示すことが示唆されるものを抽出して、その遺伝子変異はSanger法を用いてcapillary sequencingした。さらにそれぞれについては家族検体を用いて遺伝子変異を確認するとともに、SNPである可能性の否定を行った。

#### B. 全エクソン解析

全エクソン解析は5名の患者で実施した。

その中で特徴的亜群として慢性活動性EBウイルス感染症を呈する2名、自己免疫疾患を呈するCVID3名において、チップ濃縮の上Illuminaを用いたshort read解析を行った。候補遺伝子の抽出はAと同様であるが、両アレルでの異常を認めるものを中心として解析を行った。

(2) タンパク導入治療の基礎的検討

組換えタンパクを正常な構造を保ったまま、細胞のあるべき局在部位に導入することが可能であるかを、NADPH 複合体細胞質成分が欠損する慢性肉芽腫症 (CGD) や WASp タンパクを欠損する Wiskott-Aldrich 症候群(WAS)をモデルとして、タンパク導入による機能回復実験を行った。具体的には Hph-1 ヒト由来 cell permeable peptide (CPP)をコードする配列に当該遺伝子をつなぎ、大腸菌の中で発現させ、機能欠損細胞に導入して、機能回復を検討した。

(3) 患者会との連携、情報公開

患者会との連絡をとり、また様々な雑誌への総説公開や、様々な機会での発表を通じて CVID についての周知を図った。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者および家族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(家族)個人情報保護について十分な配慮を行って行った。

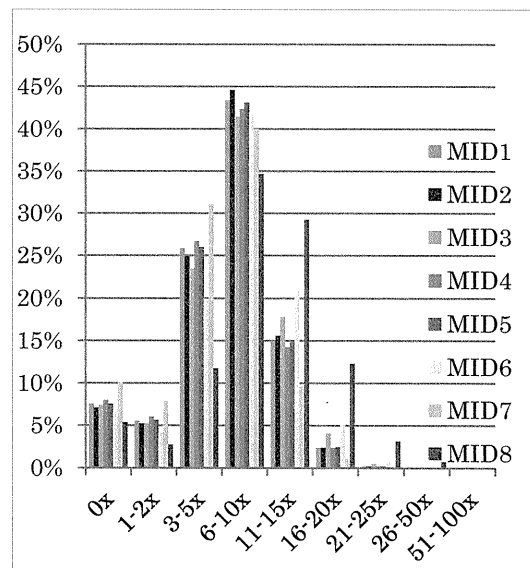
なお本研究は、東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会及び東京医科歯科大学医学部遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会による承認を得て行った。全エクソン解析を含む網羅的遺伝子解析についても倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

(1) CVIDの亜群に対する免疫関連遺伝子エクソン解析及び全エクソン解析による責任

遺伝子探索

8 検体において、免疫関連・CVID 候補遺伝子の Exon 解析を Roche 社 FLX を用いて解析した。免疫関連・CVID 候補遺伝子の選定に当たっては、方法にも記載した通りであるあ RAPID (Resources for Asian Primary Immunodeficiencies)、MGI、RIKEN ノックアウトマウス情報、RefDIC、Netpath に加えて、発現アレイ解析 (naïve B 細胞と memory B/plasma cell との発現解析)の結果を踏まえた 2476 個を選定した。下記に示すように、濃縮後のカバー率は 92%程度であり、平均 6-10 read 前後のデータを得た。



また、homozygous mutation、compound heterozygote、heterologous mutation は下の表のように抽出された。

Type of filter	1	2	3	4	5	6	7	8
Variants	3653	3711	3896	3642	3632	4080	3384	4586
Exonic(CDS)+SpliceSite(5PS)	1581	1643	1713	1574	1579	1794	1523	1984
Non-synonymous	671	691	730	665	703	737	635	801
Homozygous (頻度90%以上)	406	411	436	426	423	416	411	424
no SNP (dbSNP 135)	13	22	17	23	21	18	13	20
<b>Homozygous Private variants</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
Heterozygous (25%以上90%未満)	265	279	292	239	284	617	222	365
no SNP (dbSNP 135)	58	59	68	48	68	57	55	73
<b>Compound heterozygous variants</b>	<b>1組</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>

それらについてはまず、Sanger 法を用いてキャピラリーシークエンシングを行った。その結果 454 に特徴的な read error が明らかになった。また dbSNP により、登録された SNP を除外して候補遺伝子を集計したところ、患者間で同様の変異を認めるものが 100 以上抽出された。これらは健常人における解析から日本人特有の SNP であることが明らかになった。

変異が明らかになった遺伝子については家族検体における遺伝子解析を行い、1 名の患者では有力な候補となる遺伝子が同定されている。

全エクソン解析においては、さらに多数の変異が検出された。平均 read 数は 454 sequencing に比べて多いが、最低 10 read 行えたものを以後の解析に供した。Capture 率は 10 read を最低限とすると約 94%であった (以下にまとめを示す)。

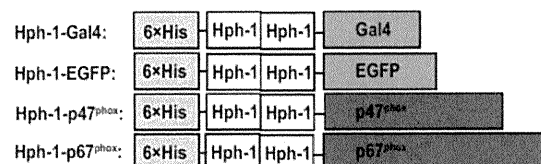
Depth	Sample2	3	4	5	6
>100	57.6	60.7	42.6	49.3	61.2
>10	94.4	94.4	93.2	93.5	94.2
>1	97.9	97.9	97.4	97.4	97.6

Long read と同様にここでも数百以上の日本人特有の SNP と思われる変異が検出された。この検討では homologous mutation, compound heterozygous mutation にしぼって候補遺伝子を抽出したが、下記に示すような数の遺伝子がリストアップされた。その後遺伝子情報や遺伝子の機能ドメイン、遺伝子機能などについて情報を収集し、それぞれに 40-50 の候補遺伝子を選定し、さらに short read 特有の sequencing error が判明し、それを除いた上で Sanger 法による塩基配列確認を行った。1 名においては既知遺伝子の稀な表現型として異常が同定できる可能性がある。

## (2) タンパク導入治療の基礎的検討(森尾)

まず細胞内タンパク質の異常が明らかな慢性肉芽腫(chronic granulomatous

disease: CGD)においては p47phox, p67phox の coding region を増幅し, cell permeable peptide (CPP)である Hph-1 につなげる形で plasmid に入れこみ, BL21DE 大腸菌株にて組換えタンパクを発現させた。



(図：作成したコンストラクト)

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS)においては、シグナル伝達から細胞骨格再構成に関わるタンパク質である WASp の異常によって発症する。その WASp を Hph-1 と連結した形で、大腸菌に発現させ、選別マーカーである 6xHis を利用して Ni-ビーズで回収した。

Hph-1-p47, Hph-1-p67 は大量発現が可能であったが、Hph-1-WASp は不溶性分画に入り、培養温度、時間の改変や用いる大腸菌の strain の検討などにより、十分量のタンパク質が純度高く回収できることが明らかになった。

これらの組換えタンパクは CGD においては患者好中球に導入し、十分量のタンパク質が投与量依存的に細胞質内に発現することを明らかにした。その結果 CGD 好中球における活性酸素産生能は正常化した。今のところ CVID において欠損する細胞内タンパク質や核タンパク質は知られていないが、今後責任遺伝子が判明すればこの手法でタンパク治療が可能になる可能性がある。

## (3) 患者会との連携、情報公開

内科において、CVID の診療は極めて稀であり、診療経験は乏しい。一方小児科医にとっては良く診療に当たる疾患であり、小児科からの内科への転科が進んでいない。また成人の CVID は診断が遅れている可能

性が高いことも明らかになった。そこで本年は、日本小児科学会、日本血液学会などにおいて CVID についてのセミナーを開催した。特に研究分担者である田中と連携をとることにより、大阪ではまた内科・小児科合同の免疫不全症・免疫異常症研究会が立ち上がり、第一回の研究会では、研究代表者が小児科・内科領域で問題になる免疫不全症についての講演を行い、さらに精神神経科や血液内科などを巻き込んだシステムの構築を開始した。さらに、e 免疫などの Web site において、CVID 情報を提供すると共に、現在日本臨床免疫学会雑誌に、総説として CVID update を脱稿し、様々な領域の医師に情報提供できる体制を作った。また患者会であるすずらんのと定期的なメールなどを通して相談に応じており、また原発性免疫不全症の患者会であるつばさの会とは、定期相談会などで顔をあわせ discussion する機会を設けた。研究分担者はつばさの会の理事となり、これらの努力の結果患者会支援という形で、新たな協力体制を構築する予定になっている。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, **Morio T**. Btk negatively regulates ROS production and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nature Immunol.* (in press), 2012.
2. Jang SH, Lim JW, **Morio T**, Kim H. Lycopene inhibits Helicobacter pylori-induced ATM/ATR-dependent DNA damage response in gastric epithelial AGS cells. *Free Radical Biol. Med.* 52:607-615, 2012.
3. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, **Morio T**, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan W, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* (in press), 2012.
4. Sato R, Iizumi S, Kim E-S, Honda F, Lee S-K, Adachi N, Koyama H, Mizutani S, **Morio T**. Impaired cell adhesion, apoptosis, and signaling in WASP-gene disrupted Nalm-6 pre-B cells and recovery of cell adhesion using a transducible form of WASp. *Int. J. Hematol.* (in press), 2012.
5. Uchida Y, Matsubara K, **Morio T**, Kasawaki Y, Iwata A, Yura K, Kamimura K, Nigami H, Fukawura T. Acute cerebellitis and concurrent encephalitis associated with parvovirus B19 infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* (in press), 2012.
6. Lee SW, Kim JH, Park MC, Park YB, Chae WJ, **Morio T**, Lee DH, Yang SH, Lee SK, Lee SK, Lee SK. Alleviation of rheumatoid arthritis by cell-transducible methotrexate upon transcutaneous delivery. *Biomaterials.* 33:1563-72, 2012.
7. Honda F, Hane Y, Toma T, Yachie A, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, **Morio T**. Transducible form of p47phox and p67phox compensate for defective NADPH oxidase activity in neutrophils of patients with chronic granulomatous disease.



- Biochem. Biophys. Res. Comm.* 417:162-168, 2012.
8. Nakamura K. Du L. Tunuguntla R. Fike F. Cavalieri S. **Morio T.** Mizutani S. Brusco A. Gatti RA. Functional characterization and targeted correction of ATM mutations identified in Japanese patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat.* 33:198-208, 2012.
  9. Uchida Y, Matsubara K, Wada T, Oishi K, **Morio T.**, Takada H, Iwata A, Yura K, Kamimura K, Nigami H, Fukuya T. Recurrent bacterial meningitis by three different pathogens in an isolated asplenic child. *J Infect Chemother.* 52:607-15, 2012.
  10. Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, **Morio T.**, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. *Plos Pathogens.* 7(10):e1002326. 2011.
  11. Kato K. Kojima Y. Kobayashi C. Mitsui K. Nakajima-Yamaguchi R. Kudo K. Yanai T. Yoshimi A. Nakao T. **Morio T.** Kasahara M. Koike K. Tsuchida M. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic granulomatous disease with inflammatory complications and severe infection. *Int J Hematol.* 94:479-82, 2011.
  12. Ishimura M. Takada H. Doi T. Imai K. Sasahara Y. Kanegane H. Nishikomori R. **Morio T.** Heike T. Kobayashi M. Ariga T. Tsuchiya S. Nonoyama S. Miyawaki T. Hara T. Nationwide Survey of Patients with Primary Immunodeficiency Diseases in Japan. *J Clin Immunol.* 31:968-76, 2011.
  13. Nakajima K. Hayashi M. Tanuma N. **Morio T.** An autopsy case of polymicrogyria and intracerebral calcification with death by intracerebral hemorrhage. *Neuropathology.* [Epub ahead of print] 2011.
  14. **Morio T.** Atsuta Y. Tomizawa D. Nagamura-Inoue T. Kato K. Ariga T. Kawa K. Koike K. Tsuchi H. Kajiwara M. Hara T. Kato S.: Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. *Br. J. Haematol.* 154:363-372, 2011.
  15. 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.* 138: 172-7, 2011.
  16. Takagi M. Shinoda K. Piao J. Mitsuiki N. Takagi M. Matsuda K. Muramatsu H. Doi 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.* 117:2887-90, 2011.

## 2. 学会発表

1. **Morio T.** Dissection of Common Variable immunodeficiency With Distinct Phenotype. **2011 Pediatric Academic Societies & Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting.** Denver, Colorado, USA. April 2011.
2. 森尾友宏：小児の免疫不全症と成人期の免疫不全症-診断と病態解析の Update-、第 1 回大阪免疫不全症セミナー、大阪、2012 年 2 月 10 日
3. 森尾友宏：原発性免疫不全症候群に対する造血幹細胞移植療法、第 3 回移植後キメリズム解析研究会、東京、2012 年 2 月 2 日
4. 森尾友宏：ウイルス特異的 T 細胞とその維持、第 18 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、埼玉、2011 年 10 月 21 日
5. 森尾友宏：分類不能型免疫不全症の病態解明へのアプローチ、第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会、東京、2011 年 9 月 17 日
6. 森尾友宏：免疫細胞療法における指針について、第 3 回造血器腫瘍免疫療法研究学術集会、大分、2011 年 8 月 20 日
7. 森尾友宏：原発性免疫不全症候群、第 114 回日本小児科学会学術集会 教育セミナー、東京、2011 年 8 月 12 日
8. 森尾友宏：T 細胞系免疫異常症における遺伝子診療、第 18 回日本遺伝子診療学会大会、第 35 回日本遺伝子カウンセリング学会学術集会、第 17 回日本家族性腫瘍学会学術集会、京都、2011 年 6 月 16 日～19 日

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 の新規亜群分類と  
原因遺伝子の探索

研究分担者	今井 耕輔	防衛医科大学校病院医療情報部 現 東京医科歯科大学小児・周産期地域医療 学講座 特任准教授
研究協力者	野々山 恵章	防衛医科大学校小児科 教授
	佐藤 弘樹	防衛医科大学校病院医療情報部 助教
	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、低 $\gamma$ グロブリン血症を呈する様々な原因遺伝子による疾患が含まれていると考えられ、大部分は原因不明であり、これまでも様々な亜群分類が試みられているが、簡便かつ予後に影響する合併症の予測に有用なものは未だ報告されていない。

今回我々は、当科に紹介のあった国内の CVID 患者 40 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 の亜群分類を昨年に引き続き試みた。

その結果、TREC 正常 sjKREC 正常(A 群：19 例、48%)、TREC 正常 sjKREC 低下 (B 群：7 例、18%)、TREC 低下 sjKREC 正常 (C 群：8 例、20%)、TREC 低下 sjKREC 低下 (D 群：6 例、15%) の 4 群に分類が可能であった。

D 群では、合併症頻度が有意に高く、早期に発症するため、早期の根治治療 (造血細胞移植) 介入により、予後の改善を図ることが可能であると考えられた。また、近親婚患者 2 例 (A 群 1 例、D 群 1 例) で、SNP チップと次世代シーケンサーを組み合わせた遺伝子解析を行い、それぞれ、9 遺伝子、4 遺伝子までホモの変異遺伝子を絞ることができた。現在、各亜群患者での解析を行っている。TREC、sjKREC を用いた CVID の亜分類により、希少な近親婚患者から得られた候補遺伝子解析を他の患者に対して効率よく探索することが可能であると考えられた。

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、悪性腫瘍等を合併する場合、予後が不良となることが報告されたが、原因遺伝子が明らかな例はごく少数であり、予後予測が困難であり、適切な治療法の選択が困難である。

昨年度は、T cell receptor recombination excision circles (TRECs)、signal joint Kappa chain recombination excision circles (sjKRECs)を用いて CVID が 4 群に亜群分類できることを明らかにし、FACS 解析とも相関があることを明らかにしたが、今年度は、臨床経過、特に合併症との相関について検討した。また、昨年度開始した、近親婚家系において、次世代シーケンサーによる解析を行った。

## 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)を除きたいわゆる”CVID” 40 例を対象として検討した。

40 例全例で、TREC,KREC 解析、および FACS 解析を行い、臨床症状との相関を検討した。

更に、2 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(Roche 454)にてシーケンスを行い、解析を行った。

## 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、sjKREC 陽性、陰性を組み合わせて 4 群に分けると、TREC 正常 sjKREC 正常(A 群: 19 例、48%)、TREC 正常 sjKREC 低下 (B 群: 7 例、18%)、TREC 低下 sjKREC 正常 (C 群: 8 例、20%)、TREC 低下 sjKREC 低下 (D 群: 6 例、15%) となった(図 1)。

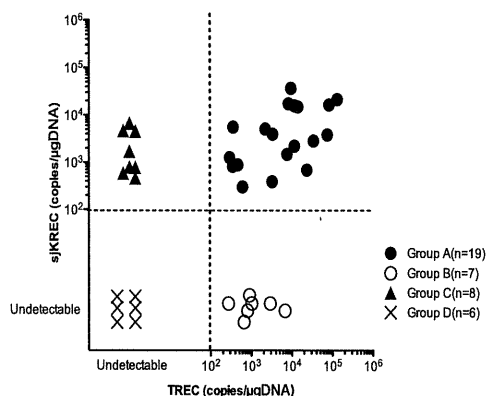


図 1 : CVID の亜群分類

### 2) CVID の亜群分類と臨床像との相関

日和見感染、自己免疫疾患、悪性腫瘍といった合併症が一つでもある群では、一つもない群に比べ、生存率が有意に低いことが Chapel らにより示されている(Chapel et al, Blood, 2008)。そこで、TREC、KREC を用いた亜群分類と合併症の頻度との相関について検討した。

健常人の T 細胞新生能は年齢に応じて低下することが知られているが、CVID では、より低下するとされている。そのため、4 群間の年齢差について検討したが、有意差は認められなかった(A:  $12.7 \pm 2.3$ , 2~30; B:  $23.4 \pm 4.2$ , 6~39, C:  $21.5 \pm 6.1$ , 4~52, D:  $25.5 \pm 4.4$ , 15~46 歳,  $p > 0.05$ )。しかし、合併症の頻度は、明らかに D 群で最も高く(0.98 イベント/10 年-患者)、C 群(0.63)、B 群(0.30)の順に低くなり、A 群(0.04)で最も低くなっていた(図 2)。また、その傾向は、経時的に見ても明らかであり、C,D 群では日和見感染を多く認め、D 群ではより若年で見られること、自己免疫疾患は C 群で最も早期に見られ、D 群、B 群でも累積発症率が 30%以上であること、悪性腫瘍も A 群以外の患者では認められることが明らかになった(図 3)。全体の合併症としても 4 群間で有意に差が見られ( $p = 0.0313$ )、10 年および 30 年での累積発症率は、A: