

201128036B

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～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 森尾 友宏

平成24年3月

序

分類不能型免疫不全症 (Common variable immunodeficiency: CVID) は、先天性免疫不全症の中で「抗体産生不全を主体とするもの」の範疇に分類されている。CVID は定義が難しい。その理由の第一として、様々な原因不明の免疫不全症がこの疾患群に取り込まれているためと思われる。CVID はその点で最初から、「除外診断」が必要な、疾患の定義が困難なものとして、概念が確立したように思われる。

CVID の問題点としてさらに、成人例が多いことがあげられる。典型的な CVID では 10 代以降に発症するとされているが、本邦において先天性免疫不全症の診療に当たる医師の大半は小児科医であり、CVID では特に小児科医、内科医の連携、小児科診療から内科診療への受け継ぎが重要である。CVID ではまた自己免疫疾患や消化器疾患、悪性腫瘍の頻度が高く、多診療科の関与が肝要である。特殊な専門疾患におけるそのような連携体制はしかし、未だに構築されていない。さらに、このように複雑な疾患群での病態解析や責任遺伝子探索においては、基礎免疫学者・基礎医学者の関与が重要である。その観点から、本研究班では免疫系診療部門の内科医 2 名と、基礎免疫学者 1 名、基礎系研究者の 1 名が加わっているのは大きな特徴である。

本研究班は平成 21 年度に、日本における患者数を把握し、そのデータを基礎・臨床の両方向から収集し、疾患の性格を明らかにする (様々な亜群を明らかにする) と共に、診断基準を策定することを目標として発足した。現実的な診断基準を提示できたものと考えている。引き続いて行われた平成 22 年度からの研究では、病態をさらに深く解析し、現場で利用可能になりつつあった次世代シーケンサーを用いて体系的遺伝子解析、網羅的遺伝子解析を行った。CVID では比較的稀な、家族歴のある症例を抽出して高速網羅的遺伝子塩基配列決定を実施することができたのは、多数の症例と検体の登録があったことである。疾患データベースは拡充し、その中から KRECs, TRECs を用いた T/B 新生能からの亜群分類に加え、免疫学のおよび臨床的特徴から特徴的な亜群を抽出することができた。ここからさらに疾患遺伝子の探索や、自己免疫疾患・悪性腫瘍などの合併症の発症機構について詳しく検討ができるようになると思われる。

一般的な治療については、全国調査から目標 IgG レベルが比較的低く設定されている症例も多いことがわかり、講演や総説などを通じて、IgG は最低 700mg/dL 以上、感染

症などの頻度に合わせてさらに増量が必要との情報を提供した。成人の免疫不全症の存在について注意喚起も行った。これらの広報活動によって毎年 20-30 名の CVID 患者の紹介や相談を受けるようになった。それとあわせて患者会設立支援や患者会との連携にも力をいれ、地域ごとに小児科・内科・それ以外の診療科の連携診療が行えるように、各地方で討論も行った。CVID 患者にとっては、就労の問題や、就労後の職業継続の問題は看過できないものであり、免疫不全症患者会であるつばさの会と連携して、最善の道を模索すべき時期である。将来的な治療については、既知の疾患についてタンパク導入による機能回復を試み、成功に至った。今後責任遺伝子が判明すれば、その遺伝子産物の細胞内局在や性状により、まず *in vitro* での治療模倣研究が行えるのではと考えている。

実際の診療の場に戻ると、この 2 年間で 30 代、40 代の CVID の方が数名旅立たれることを経験した。発症時からの丁寧なモニタリングやケア、適切な治療により、長く質の高い生活水準を保つことが必要である。また何よりも原因究明が急がれることを痛感している。

この冊子には 2 年間の本研究班の成果をまとめている。CVID のような疾患では、原因探索に加え、啓蒙活動、患者支援などにおいても、長期的に継続した研究や取り組みが必要である。この研究がその端緒となることを祈りつつ、今後の継続的展開をはかりたいと考えている。

平成 24 年 3 月
研究代表者 森尾 友宏

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

目次

| | |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| I. 班員・研究協力者名簿 | 5 |
| II. 総合研究報告 | 9 |
| 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 | |
| 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. 総合分担研究報告 | |
| 1. 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 |
| 2. 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） | 27 |
| 3. 金兼弘和（富山大学附属病院小児科） | 33 |
| 4. 松本 功（筑波大学人間総合科学研究科臨床免疫分野） | 35 |
| 5. 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） | 39 |
| 6. 小原 牧（かずさ DNA 研究所） | 47 |
| 7. 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） | 53 |
| IV. 研究事業報告 | 59 |
| V. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 63 |
| VI. 学会発表に関する一覧 | 71 |
| VII. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況 | 79 |
| 別刷り | 83 |

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 | 防衛医科大学校病院 医療情報部 現・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 | 副部長・准教授 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 | (財) かずさ DNA 研究所 ヒトゲノム研究部 | 副所長 |
| | 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 |
| 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 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 医歯学総合研究科 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 星川あき子 | 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:ahosikawa.cct@tmd.ac.jp | |
| 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 年次総合報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）

総合研究報告書

研究要旨：

分類不能型免疫不全症(CVID)は抗体産生不全を主体とする疾患で、多くは10代以降に発症し、IgGに加えて、IgM、IgAのいずれかあるいは両者の有意な減少を認める。既知の免疫不全症を除外する必要がある、という点で診断は除外診断になっている。多岐にわたる疾患が含まれる疾患群であろうと推察される。

本研究班では、CVIDの実態を明らかにするために、本研究の前段階となる「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」において、全国の膠原病リウマチ内科、血液内科、アレルギー科、感染症科などの研修施設を中心にアンケート調査を行い、全国における実態を把握したが、平成23年度には最終的には約300名の登録が行われた。患者についてはその臨床像、検査データ、免疫学的データなどについてのデータベースを構築した。特に自己免疫疾患など内科特有な病態にも焦点を当てて情報を収集した。これらをもとに明確な亜群を策定する作業を行うとともに、除外診断という部分を残しながら、より明確に定義された診断基準を策定した。

これを引き継いで本研究では1年目に、さらに特に鑑別が問題となる免疫不全症の簡易スクリーニング法に着手した。既知疾患でCVIDに類似するもののflow cytometry解析、KREC、TRECによるB細胞欠損群、T細胞欠損群の排除なども取り入れた。さらに、multi-parameter flow cytometryによりT細胞亜群、B細胞亜群、DC細胞などの解析を取り入れ、さらにB細胞では末梢における分化がどこで停止しているかを明らかにした。またCVIDの候補となる遺伝子群を様々なdatabaseを駆使して抽出し、最終的に2,476遺伝子を「免疫関連遺伝子」とした。

これを元に2年目には「免疫関連遺伝子」をチップに固定して、患者DNA断片から対応する遺伝子を濃縮して、8名の主に遺伝歴のある患者検体においてlong readによる候補遺伝子解析を行った。その結果92%の領域での遺伝子解析が実施可能で、heterozygotic missense mutationをもち優性阻害を起こす可能性がある候補変異遺伝子を策定した。また特徴的な表現型を呈する5名ではwhole exome sequencingを行い、疾患遺伝子を探索するとともに、rare diseaseのrare phenotypeとみられる候補変異遺伝子を見いだした。

さらに今後疾患遺伝子の機能解析と治療展開を模索するために、Cell permeable peptideにタンパク質をコードする全長cDNAを組み込んだplasmidを構築して、モデル欠損細胞に導入(transduction)することにより、機能回復が認められることにつき、初めて検証に成功した。タンパク導入による機能解析と将来的な治療応用に繋がるものである。

患者会については前段階の研究にて立ち上げ支援に関与していたため、1年目からの立ち上げと支援に成功した。2年目に親組織とも言える原発性免疫不全症患者会（翼の会）とも連携し、つながりの輪を広げた。CVIDの情報は毎年何度か行われる地域の免疫不全小勉強会や学会のセミナーを利用して広報するとともに、内科の医師との討論により、地域ごとに連携できる、また地域と本研究班が連携できる体制を構築した。CVIDについてのawarenessも低かったが、Websiteにおける本疾患の紹介や、次々と明らかになる疾患についての解説の掲示により、広く一般にまた全国の医師に情報を公開した。その結果、年間50名以上の紹介を受けるようになった。

研究分担者

今井耕輔：防衛医科大学校病院医療情報部副部長・准教授
現・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

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

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(1) 成人型CVIDの全国での実態を把握すること、(2) 成人型CVIDの臨床データ、基礎データを集積しデータベースを構築すること (原発性免疫不全症調査研究班との連携)、(3)成人型CVIDの問題点を内科医の眼で抽出すること、(4) CVIDにおける体系的な免疫学的データを収集すること、特にflow cytometryやB/T新生能解析を用いて、(2)のデータベースと融合されること、(5) CVIDの簡易診断法、簡易除外診断法を確立すること、(6)本疾患において自己免疫疾患や悪性腫瘍が高頻度である原因を探索すること、(7) CVIDの責任遺伝子を解明すること、(8) 一般的なCVIDに対する治療法を提示し、また原因の判明したCVIDに対しては特異的な治療法を開発すること、(9)患者会を設立すること、(10)社会に対して情報発信すること、などを目的として、免疫学基礎医学者、臨床医 (小児科医、内科医) がチームを作り、研究にあたった。

B. 研究方法

(1) 成人型CVIDの全国実態把握 (金兼、森尾)

平成 21 年に研究分担者である田中、松本を中心として全国 1153 施設 (主として内科) にアンケートを送付し一次登録し、さらに症例情報のあるものには二次アンケートで詳細な臨床データを得た。本アンケートは、小児科領域で保有する小児科医に対するアンケート結果と統合し、全国で 200 名を超す CVID 患者の実態を把握するが、その後も各施設からの情報を得て拡充する。

(2) 成人型CVIDの臨床・基礎データの集積 (金兼、森尾)

臨床データを集積し補完すると共に、基礎データとしてIgG, IgA, IgM, IgE, 芽球化反応、NK活性、基本的FACS解析、遺伝子検査などのデータも収集し、データベースを構築する。(1)と同様に継続してデータを蓄積する。

(3) 成人型CVIDの問題点の把握 (田中、松本)

内科医が中心となり、自己免疫疾患や悪性腫瘍、消化管疾患、内分泌疾患など、疾患にまつわる問題点を把握する。

(4) CVIDにおける体系的な免疫学的データ収集 (今井、森尾、竹森)

4A) multicolor flow cytometryによるB細胞分化段階の同定 (Transitional, naïve, memory, extrafollicular, Plasmablast...) のB細胞分化過程の検索

4B) multicolor flow cytometryによるT, Th subsetの解析

4C) NKT, DC subsetの解析

4D) KRECs, TRECsの測定

(5) 診断基準の策定および簡易診断法、簡易除外診断法の確立 (金兼、森尾)

(1)~(4)により診断基準を策定する。また除外診断のために、X-linked agammaglobulinemiaに加えて、SAP欠損症などについてもflow cytometryにてscreeningできるよう系を確立する。

(6) 自己免疫疾患や悪性腫瘍の発生基盤探索 (田中、松本)

Expression profilingや、Th subset解析、

自己抗体などから合併症の分子基盤を探索する。

(7) CVID責任遺伝子探索 (今井、森尾、小原)

候補となる疾患を選定し、高速シーケンスを用いた塩基配列決定を行う。具体的には「8名 x 2500遺伝子(exon, exon-intron boundaries) x 2 run (long read by 454 FLX)システム」では、候補となる遺伝子を選定した上で解析を行い、5名 x 全エクソン (short read by Illumina)では全エクソーム塩基配列決定を行う。候補遺伝子はdbSNPなどと対応させ、Sanger法で塩基配列を確認の上、近親者データなどと対比させて絞り込みを行う。

(8) CVIDの治療法の提示と特異的治療の開発 (田中、松本、森尾)

CVIDにおける一般的な治療法についてのWeb公開を行う。また特異的治療については(7)と連動して、正常タンパク導入などの手法についての妥当性を検証する。責任遺伝子未同定段階では、モデル primary cellsを用いて検討を行う。

(9) 患者会の設立 (田中、松本、森尾)

CVID患者会設立に向けて準備を行い、原発性免疫不全症患者の会、つばさの会との有機的連携体制を構築する。

(10) 情報公開および発信 (田中、松本、森尾)

Webでの情報公開、学会や研究会における啓蒙活動、地域における免疫不全症研究会の設立などにより情報を発信し、さらに小児科・内科を含む多診療科連携体制の構築を模索する。

(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. 研究成果

(1) 成人型CVIDの全国実態把握 (金兼、森尾)

現時点で合計約300名の患者の存在が明らかになっているが、その数はほぼ年に20-30名のペースで増加している。現行のCVID ESID基準を用いると、平成21年度の段階では10%以下でのみCVIDの基準を満たしていることが明らかとなったが、「他疾患の除外」および、「特異抗体の測定」が基準を満たさない主な理由であった。他疾患の除外と肺炎球菌抗体の測定などで、現在ESID基準を満たす患者数は100名を越えている。

(2) 成人型CVIDの臨床・基礎データの集積 (松本、田中、森尾)

患者の臨床データを集積した。身体的特徴としては肝脾腫を呈する症例が比較的多い程度であり、皮疹(アトピー様、乾癬様、多型滲出性紅斑様など)、神経症状、発達遅滞などの合併も認められた。自己免疫疾患を合併するものは全体で19%、40歳以上で36%、悪性腫瘍の合併は全体で10%、40歳以上で19%であった。基礎データとしては、NK細胞活性低下を認める群や、T細胞増殖能低下を認める群もあったが、後者は稀であった。

(3) 成人型CVIDの問題点の把握 (田中、松本)

CVIDでは特に、合併症の問題がクローズアップされた。自己免疫疾患や腫瘍を合併する症例では一診療科では対応仕切れず、2、3診療科以上を併診する患者が大半であった。また外来点滴を受けられず入院ベースとなる症例や、十分な補充を受けていない症例が認められた。

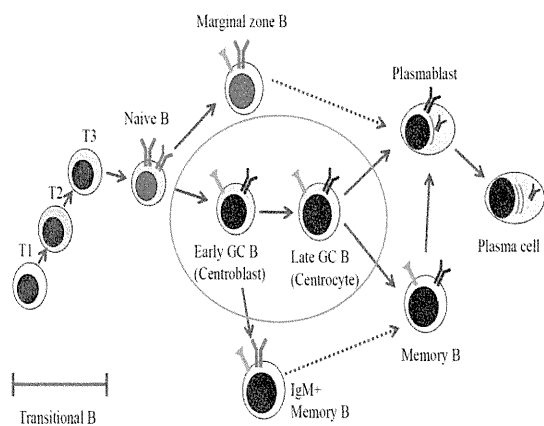
(4) CVIDにおける体系的な免疫学的データ収集 (今井、竹森、森尾)

4A) multicolor flow cytometryによるB細胞分化段階の同定(Transitional, naïve, memory, extrafollicular, Plasmablast...)

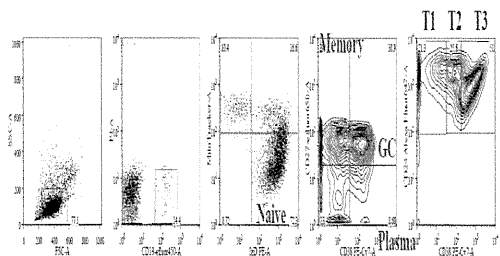
のB細胞分化過程の検索

下記の分化段階のB細胞を検討した。

B cell maturation in periphery



#1



| | | | | | | | |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|
| % lymphocyte | 1.51 | 2.40 | 0.59 | 0.59 | 0.51 | 0.61 | 1.22 |
| | 0.10 | 10.4 | 0.20 | 0.13 | | | |

共通してmemory Bの減少が認められ、またplasmablastsも減少していた。Transitional Bの割合は様々であった。

4B) multicolor flow cytometryによるT, Th subsetの解析

細胞内IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-22の染色により、Th1, Th2, Treg etc, Th17などの比率を算定した。またT subsetについてはMemory (central, effector)/Naive, Treg, NKT, double negative T, Vbeta repertoireなども算定した。ICOS欠損症ではすべてのhelper subsetの減少とmemoryの著しい減少を観察した。

4C) DC subsetの解析

DC subsetはLineage marker,

HLA-DR, CD123, CD303, CD11cを用いて検証した。実際にはpDCのみが低下するCVID, pDC/mDC/monocyte(およびB, NK細胞)がゼロとなる症例などを認めた。後者は研究期間中に多施設からの論文にてGATA2異常症であることが判明した(当研究班などで確認した)。しかしまだ原因がわからない症例が存在する。

4D) KRECs, TRECsの測定(今井、森尾)

今井、野々山らのアイデアによりCVIDをKRECs \downarrow TRECs \downarrow 、KRECs \rightarrow TREC \downarrow 、KRECs \downarrow TRECs \rightarrow 、KRECs \rightarrow TRECs \rightarrow の4群に分けることの意義が確立した。それぞれは予後や感染症の頻度とも関連があり、B細胞新生能、T細胞新生能が保たれている疾患群が最も予後が良く、真のCVID群と考えられる。

4その他) naive B/ memory B細胞の差異(健常人)およびnaive Bの健常人と患者での差異についての検討(竹森)

上記についてそれぞれの細胞集団を高純度で回収し、そのmRNA発現につきexpression profilingで検討し、発現差があったものに関しては定量的PCRで確認した。前者は完成し、後者は解析に足る細胞を収集しているところである。本結果は、免疫関連遺伝子策定の差異にも利用された。

(5) 簡易診断法、簡易除外診断法の確立(金兼)

SAP欠損症では金兼らによって抗SAP抗体を用いた細胞内染色 \rightarrow flow cytometry解析が可能になった。CVIDで除外できる疾患としてはその他に、CD19/CD20/CD21/CD81、ICOSなどがあり、またBTK, CD40Lも除外すべき疾患である。これらはすべてflow cytometryにて解析可能である。

(6) 自己免疫疾患や悪性腫瘍の発生基盤探索(田中、松本)

自己免疫疾患についてはTh subsetの偏りに着目して解析を行った。ICOS欠損症においてはTh effectorsとinhibitory T cells (TregおよびCTLA4発現T細胞)の両者の低下が認められた。またCVIDでは抗

体産生能がある程度保たれ、自己反応性B細胞クローンが存在する可能性も考えられる。抗シトルリン化ペプチド(CCP)抗体などが存在する可能性もあり検討を行った。結果として陽性者は1名のみで、その他リウマチ因子が陽性のCVID患者を1名認めた。

(7) CVID責任遺伝子探索 (今井、森尾、小原)

A. 免疫関連遺伝子エクソン解析

まず解析すべき遺伝子を選択した。そのために、RAPID情報、MGI、RefDIC、NetPathなどを用い、免疫疾患に関与する2,476分子を抽出した(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)。これを元に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の可能性を否定した。候補遺伝子については、他のCVID患者で検証し、また機能解析に進む予定である。

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CVID 3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と同様に、両アリルでの異常を認めるものを中心として解析を行った。1例において既知のrare diseaseが稀な表現型として発現している症例を見だし、その他の4例については家族検体での確認を行っている。

(8) CVIDの治療法の提示と特異的治療の開発 (田中、松本、森尾)

CVIDにおける一般的な治療法について、特に標的とすべきIgGレベルについて、様々な論文やセミナーの機会に提示した。また特異的治療については(7)と

連動して、正常タンパク導入などの手法についての妥当性を検証した。一例として、まず細胞内タンパク質の異常が明らかかな慢性肉芽腫(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 大腸菌株にて組替えタンパクを発現させた。組換えタンパク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。CVIDの疾患遺伝子が明らかになった際には、責任遺伝子未同定段階では、モデル primary cells を用いた検討を行う。

(9) 患者会の設立 (田中、松本、森尾)

原発性免疫不全症患者の会、つばさの会との有機的連携体制の構築にあたった。具体的には両患者会は既に活動を開始しており、前者を倣う形で成人領域を中心としたCVIDの会が動き始める予定である。

(10) 情報公開および発信 (田中、松本、森尾)

いくつかのWeb siteを活用してCVIDについての情報を発信した。また地域における免疫不全症研究会や、学会などにおいてCVIDに関する情報を発信した。さらに関東地区や大阪地区では、小児科・内科を含む多診療科連携体制の構築をめざし、合同の研究会を開催しCVID診療の問題点や解決策についての討論を行った。現在日本臨床免疫学会雑誌に、総説としてCVID updateを脱稿しており、様々な領域の医師に情報提供できる体制を作りつつある。

D. 考察

CVIDに関する研究は、原発性免疫不全症調査研究班の中で、小規模レベルで対応するには限界があり、本研究班が立ち上がることにより、全国調査、患者データベースの確立、詳細な免疫学的データの収集、責任遺伝子探索、患者会設立支

援、Web情報公開などが行われるに至った。本疾患は特に成人に多く、診療における問題や、専門医師の不足などの問題が浮き彫りにされた。本研究において把握された250名以上の患者に加え、その10倍の症例が存在するものと予想している。

CVIDはその範疇に含まれる疾患の種類は多岐にわたっており、疾患内での分類が極めて重要である。その点で臨床、検査、基礎データ、遺伝子解析が統合し、これからが真の意味でのCVID研究が実を結ぶ時期と考えている。責任遺伝子探索においては、10名以上の患者の解析において、また現在進行中の18名の患者の検討が加わって、問題となる遺伝子の抽出方法についても習熟したが、今後の課題として「より効率が良く、信頼性の高い篩い分け方法」が必須である。インフラとして、日本人SNPデータベースの集積と公開が必要であるとともに、複数因子が関わる疾患や遺伝子の後成的変化による疾患の同定に備えて、今後新規技術を遅滞なく導入していくことが重要である。

班研究としては治療法の開発にまで踏み込めなかったが、基礎的検討としてタンパク導入による機能回復を試みることができたのは収穫であった。免疫不全症の責任遺伝子産物が転写因子、細胞質成分などの場合には現実的な方策となる可能性がある。

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。タンパク導入手法の応用としては、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CVID患者への情報提供についてもWeb公開のみならず、顔

が見える形のつながりが必要と考えている。小児科ー内科ーその他の基幹科の連携に加えて、患者や家族が加わり、真の意味での連携を模索したいと考えている。

E. 結論

CVIDの全国調査から、さらに臨床データ、検査データ、免疫学的データ、遺伝子解析結果が統合され、全国の患者が把握されると共に、質の高いデータベースが構築できた。原因探索が進み、候補遺伝子が絞り込まれ、今後の研究の継続により、責任遺伝子が複数以上同定されることが期待される。責任遺伝子が同定されればタンパク導入の形で治療を試みる体制は固まっている。本研究では、Web公開、様々な地域でのセミナー活動、総説執筆などによりCVIDの情報公開につとめ、本研究班がCVID患者解析の受け皿となった。真の研究はこれからであり、さらに機能の解析、治療法の開発、様々な疾患への応用が模索すべき時期である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
巻末に記載の通り
2. 学会発表
巻末に記載の通り

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
巻末に記載の通り
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

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：

本研究の前段階である平成21年採択課題では、分類不能型免疫不全症(Common variable immunodeficiency: CVID)の実態を調査し、診断における問題点を明らかにするとともに、その病態解析を行うために、CVIDの全国調査を行い、CVID患者の血液検体を用いて、B細胞亜群解析、T細胞亜群解析、既知の遺伝子解析を行った。その結果、CVIDにおいては比較的早期から発症している症例があること、大半で記憶B細胞及び形質芽細胞の減少が認められること、T細胞増殖能は正常であること、54%でT細胞受容体β鎖のレパートアに偏りがあること、ICOS, TACI, BAFF-R, CD19など既知の遺伝子異常症はほとんど認められないことなどが明らかになった。これらの情報を元に、CVIDの診断基準を策定した。

上記の基盤を元に1年目には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。本年には患者会の設立を支援し、またCVIDについての積極的な啓蒙活動を開始した。

2年目には基礎的データ、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換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

本研究では成人型CVIDの実態を把握し、疾患概念を整理・亜群分類し、本疾患の病態及び本態を解明することを目的とした。そのために、成人領域を中心としてアンケート調査を行った。さらにCVIDからの血液検体を用いて免疫学的解析を実施し、病態を解析した。それをもとにCVIDの日本版診断基準を策定することを目的とした。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。本研究ではさらに、高速シーケンシング法、expression profiling、immunophenotypingなどを用いて、特徴的な亜群の責任遺伝子を解明することを目的とした。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ことを目指した。

B. 研究方法

1) CVID 全国調査

平成 21 年には研究分担者の田中、松本が中心となって、全国 1153 施設に一次アンケートを送付し、回答のあった症例について一次登録とした。さらに二次アンケートを送付し、得られた回答から二次情報を収集した。その中で、免疫学的解析及び検査データについて集積を行った。これを基盤として、平成 22 年度以降も新たに CVID 患者の紹介を受け、データベースを充実させる。

2) CVID 患者の免疫能解析

解析依頼、解析希望のあった症例について、検体を収集し 10 以上のパネルを用いてリンパ球表面抗原分析を行う。実際には EDTA-2Na 採血から得た血液に各種抗体を加え反応させた後、赤血球を融解し、EPICS-XL あるいは FACS Calibur にて 3/4 パラメータ解析を行う。また一部の患者においては T 細胞からのサイトカイン産生を検討する。また、研究代表者、分担者施設にてフォローする患者においても、詳細な免疫学的パラメータを収集する。

3) CVID 診断基準の策定

1), 2) より具体的な CVID の診断基準を策定する。

4) CVID 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する。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む。解析は以下の 2 つの手法を用いて行う。

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分子を抽出する（実際には 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

を行う。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 する。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う。

B. 全エクソン解析

全エクソン解析は 5 名の患者で実施する。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 CVID 3 名において、チップ濃縮の上 Illumina を用いた short read 解析を行う。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う。

5) 治療への応用：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う。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、機能回復を検討する。

6) 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る。

(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 全国調査からのデータベース構築

現時点において合計約 300 名の CVID 患者データベースの構築が行われた。ヨーロッパ免疫不全症研究会(European Society of Immunodeficiency: ESID)の診断基準を満たす患者は 10%以下であったが、「他の疾患の除外」と「特異抗体の低下の証明」が不十分で、前者は既知遺伝子解析を行うことにより、後者では肺炎球菌抗体を測定することにより、100 名以上の患者が基準を満たすようになった。

身体的特徴としては肝脾腫を呈する症例が比較的多い程度であり、皮疹（アトピー様、乾癬様、多型滲出性紅斑様など）、神経症状、発達遅滞などの合併も認めた。自己免疫疾患を合併するものは全体で 19%、40 歳以上で 36%、悪性腫瘍の合併は全体で 10%、40 歳以上で 19%であった。自己免疫疾患として最も多いのは、自己免疫性溶血性貧血や血小板減少症であるが、関節リウマチ、炎症性腸疾患、多発筋炎など様々な疾患を認めた。悪性腫瘍ではリンパ系悪性腫瘍が多いが、甲状腺腫瘍、子宮頸癌、消化器系腫瘍も散見された。

2) CVID 患者の免疫能解析

班員の属する東京医科歯科大学、防衛医科大学でフォローする 59 名の CVID 患者及び、アンケートから免疫能検査を希望する 30 名をあわせた 89 名において、B 細胞サブセット、T 細胞サブセット解析、Vbeta repertoire 解析を行った。一部の患者においてはサイトカイン産生能や候補責任遺伝子解析 (ICOS, TACI, BAFF-R, SH2DIA, CD19) を実施した。

16 名で B 細胞数が <1% 以下であり、こ

れらの患者では Kappa deleting recombination excision circles (KRECs) の低下を認めるものもあり、B 細胞欠損グループであることが予想される

(KRECs, TRECs による分類については研究分担者今井らの報告書を参照)。一方ほぼ全例でスイッチ記憶 B 細胞の減少および形質芽細胞の減少が認められた。さらに詳細な解析では、Marginal zone B 細胞は正常群と低下群の 2 群があること、Transitional B 細胞の増加する 1 群があることなどが判明している。T 細胞ではほぼ全例で T 細胞増殖能は正常であったが、一方 T 細胞レセプター Vβ の偏りが 54% にて認められた。T 細胞サブセットにおいては一定の異常は認めなかったが、memory T が減少しているものがあつた。インターフェロン γ、IL-4, IL-10, IL-17, IL-22 産生能は最終的に 50 名程度での解析が終了し、ICOS 欠損症などでその産生低下が認められた。

さらに NKT 細胞や、plasmacytoid DC、myeloid DC について検討を加え、特徴的な亜群にの存在について模索した。本研究の実施中に B, NK, 単球, DC 欠損 (GATA2 欠損症) が明らかになり、本分担研究の中で行った解析対象者にも 3 名の同様の症候群患者が存在することが判明した。

3) CVID 診断基準の確立

1), 2) の結果を踏まえて、この稿の最後に示すような診断基準を策定した。本診断基準は Web 公開された。平成 22 年度以降、最新データを含めた小改訂を行った。

4) 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。濃縮後のカバー率は 92%であり、平均 6-10 read 前後のデータを得た。また、homozygous mutation は 3-14、compound heterozygote は 1-6、heterologous mutation は 10 前後の頻度で検出され、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。Long read と同様にここでも数百以上の日本人特有の SNP と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。

5) 治療法への展開：タンパク導入治療の基礎的検討

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 大腸菌株にて組替えタンパクを発現させた。

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。

6) 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。まず、原発性免疫不全症班患者の会である「つばさの会」と連携しながら、特に成人例を中心に、「すずらんの会」の立ち上げを支援し、実際に平成 22 年度内に立ち上がった。

また、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。

D. 考察

本分担研究は1年ごとのステップを踏み、着実に成果を上げた。まず全国の患者数把握から臨床データおよび検体を収集し、それらの体系的免疫能解析から、世界的にも誇るべきdatabaseが構築された。実際に代表者、分担者の施設で診療する症例が多かったことと、分担者である内科医の呼びかけなど、様々な要因がプラスになって働いたものと思われる。これを元に診断基準を策定したが、共通項はまとめられるものの、実際にデータを眺めると、B細胞欠損に近いグループ、重症複合型免疫不全症に近いグループ、DNA損傷応答異常が疑われるグループ、特徴的な感染症が問題となるグループなど10以上の亜群に切り分けできる可能性が示唆された。実際にCVIDはヘテロな集団で、単一遺伝子異常に加えて、複数以上の要因により発症する群も存在すると思われる。

その中から、loss of heterozygosity mapping、免疫関連遺伝子濃縮塩基配列決定、全エクソン解析などから実際に責任遺伝子を同定する作業が開始している。その中ではlong read, short readの長所と弱点が判明した。1つは家族検体が絶対的に必要とされる点に留意すべきである。また新たな遺伝子変異が数多く見いだされ、患者間、家族などでも共通して認められることから、健常者でも解析したところ、日本人特有のSNPsが最低数百個のレベルで明らかになった。従って、SNPデータベースの構築は、これらの解析の

インフラとして、データの集積と公開が必要である。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10-20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。

これらの結果をもとにさらに機能解析を想定して、遺伝子導入に加えて、primary cellsでのタンパク導入手法も確立した。これによって機能回復や機能低下を誘導することが可能である。さらには免疫不全症の責任遺伝子産物が転写因子、細胞質成分などの場合には、タンパク導入治療が、現実的な方策となる可能性がある。

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、また全国各地において小児科、内科の連携体制が構築されつつある。今回の研究の展開として、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

3年の研究の第一段階として、全国のCVID患者数を小児科、内科領域の両者を含める形で把握し、さらにB, T細胞サブセット解析、Th亜群解析、DC解析、KREC, TREC測定から、臨床データ、基礎データの両者が充実した。その中から診断基準策定が行われた。

CVIDの原因探索戦略が定まり、最終年には高速遺伝子塩基配列決定が行われた。その中で候補遺伝子が絞り込まれるとともに、同定が間近いものも出始めている。機能解析手段あるいは、治療手段としてのタンパク導入手法も確立している。

地道な努力によって原因が解明されようとしているが、本当の研究はこれからであり、さらに機能の解析、治療法の開発、様々な疾患への応用が模索すべき時期である。

F. 健康危険情報

該当なし