

201128042A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

細網異形成症の診断と治療に関する調査研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野々山 恵章

平成24(2012)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

細網異形成症の診断と治療に関する調査研究

目 次

I. 総括研究報告

細網異形成症の診断と治療に関する研究	1
野々山恵章 (防衛医科大学校小児科学講座)	
(資料) 細網異形成症診断基準	7
(資料) 細網異形成症治療指針	8

II. 分担研究報告

1. TRECs (T-cell receptor excision circles) を用いた細網異形成症の 新生児マススクリーニング法の開発	11
今井耕輔 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科小児・周産期地域医療学講座)	
2. 細網異形成症患者由来iPS細胞樹立およびそれを用いた 病態解析、診断、および治療法の開発	15
中畑龍俊 (京都大学iPS細胞研究所臨床応用研究部門・疾患再現研究分野)	
3. 細網異形成症の疫学調査、診断、治療法に関する研究	22
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)	
4. 細網異形成症の遺伝子診断と検体収集に関する調査研究	27
小原 収 (財団法人かずさDNA研究所)	
5. コロニーアッセイ、骨髄機能解析	31
小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科)	
6. テロメア制御異常による骨髄不全症の新規診断法の開発	34
山口博樹 (日本医科大学第三内科血液内科)	
7. 音受容に関するAdenylate Kinase-2 (AK2) の内耳における役割についての研究	38
塩谷彰浩 (防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座)	

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 40

Ⅳ. 研究成果の刊行に関する別冊 ----- 46

I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

細網異形成症の診断と治療に関する調査研究 平成 23 年度 総括研究報告書

研究代表者 野々山 恵章 (防衛医科大学校 小児科学講座)

研究要旨

細網異形成症の診断と治療法を確立し、患者の救命および長期予後を改善することを目的として、平成22年度の結果をもとにさらに発展させ以下の研究を行った。

<疫学調査>

インターネットを活用した中央診断システム PIDJ による疫学調査を行い、新規患者を見出した。患者検体を収集するシステムを確立した。

<診断方法確立、診断基準作製>

AK2モノクローナル抗体を作製した。ELISA, FACS を用いた迅速診断法の開発を行なった。テロメア長の短縮を測定する方法を確立した。原因遺伝子である AK2 の Western blot, 免疫蛍光染色, real time PCR, DNA 解析法による診断法を確立し、診断基準を作製した。

<スクリーニング法開発>

新生児乾燥濾紙血を用いた TREC_s および KREC の測定によるスクリーニング法を確立した。

<病態解析>

難聴、骨髄不全、免疫不全発症機序の解析を行うため、内耳細胞の免疫染色、難聴モデルモデルモットの内耳細胞の過酸化測定、骨髄不全患者のコロニー解析、テロメア解析、AK2 遺伝子解析を行なった。AK2 ノックアウトマウスを作製し、解析を行った。AK2 欠損によりなぜ分化障害が起きるか、生化学的解析を行った。

<患者由来 iPS 細胞作製>

患者由来の fibroblasts から iPS 細胞を作製した。これを用い、血液免疫系細胞への分化実験を行い、AK2 欠損によりもたらされる血球分化障害、特に好中球分化障害を in vitro で再現した。

さらに iPS 細胞を用いた遺伝子治療の基盤研究として、正常 AK2 を組み込んだレトロウイルスベクターを作製し、患者由来 iPS 細胞に導入し、in vitro で血液免疫系細胞の分化が正常化することを確認した。

<治療指針の作成>

造血幹細胞移植成績調査を行い、その結果をもとに、治療指針を作製した。

<患者会での啓発>

患者会のホームページを開設し、拡充した。患者会で説明会を行った。

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
小児・周産期地域医療学講座、准教授

中畑 龍俊

京都大学iPS細胞研究所、臨床応用研究部
門・疾患再現研究分野、副所長

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

小原 收

財団法人かずさDNA研究所、ヒトゲノム研究
部、副所長
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、グ
ループディレクター

小島 勢二

名古屋大学大学院医学系研究科小児科、教
授

山口 博樹

日本医科大学第三内科血液内科、講師

塩谷 彰浩

防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座、教授

A. 研究の目的

細網異形成症は骨髄系細胞、リンパ系細胞、内耳細胞など多系統の細胞分化障害を来す難病である。ほとんどが1歳以下に感染症で死亡する重篤な疾患であるが、早期診断を行えば造血幹細胞移植により根治できる疾患であり、早期診断、早期治療が患者の予後改善に重要である。新生児スクリーニングも有効である。将来的な遺伝子

治療の良い適応でもある。

本疾患は症状が多彩であるため、多くの患者が診断されず見逃されている。したがって、疫学的調査の重要な対象疾患となる。また、典型例では多系統の細胞分化障害を呈するが、一部の系統のみが障害される軽症例の存在も示唆される。

そこで、細網異形成症の診断基準、診断法、スクリーニング法の確立、至適造血幹細胞移植法の確立、iPS細胞を用いた病態解析と、遺伝子治療などの新規治療法開発基盤研究を行い、早期発見、早期治療により本疾患を根治し、もって患者に益することを目的とした。

B. 研究方法

今回の研究では、申請者が構築したインターネットを活した先天性免疫不全症の中央診断・登録・遺伝子解析システムPIDJ((Nature Immunology 2008, Nucleic Acid Res. 2009)を細網異形成症に応用して疫学調査、軽症例、非典型例を含めた実態把握を行った。

さらに、申請者が確立した、原因遺伝子AK2のポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法によるタンパク発現解析、遺伝子解析法により、確定診断を行った。T細胞新生能のマーカーであるTREGs測定による新生児スクリーニング法の導入、新規に作製したモノクローナル抗体を用いたFACS解析による迅速診断の開発を行った。

病態解析のため、患者血球系の免疫染色、コロニーアッセイの検討を行った。世界で初めてAK2ノックアウトマウスを作製したので、血液系、内耳細胞を含めた、全臓器の異常の解析を行った。

また、すでに樹立した細網異形成症患者由来fibroblastsから、iPS細胞を作製した。iPS細胞を血液幹細胞に分化させ、さらに血液幹細胞から各血液免疫系細胞の分化異常をin vitroで解析し

た。これにより分化実験が繰り返し、かつ条件を変えて行うことが可能になった。さらに新規作製したレトロウイルスベクターを用い、正常 AK2 遺伝子を患者由来 iPS 細胞に導入し、コロニーアッセイなどによりヒト免疫系・血液系の再構築評価を行い、遺伝子治療の基盤研究とした。

造血幹細胞移植による治療成績の国内および国際調査を行い、前年度に作製した治療ガイドラインの有効性の検証を行った。

(倫理面への配慮)

本研究については、先天性免疫不全症に関する遺伝子解析研究や TREC_s 解析、患者検体を用いる臨床研究などについて、所属する施設の倫理委員会の承認を得た。遺伝子解析、in vitro における患者由来の血液材料の使用については、患者ないし親権者に研究目的に使用することを文書で説明し、インフォームドコンセントを十分に得た上で研究を行った。動物実験は各施設の実験動物倫理委員会の策定規約に従って動物愛護を配慮して実施した。各実験施設の規約を遵守し、人畜共通感染症の発生、伝播を防止した。

C. 研究結果

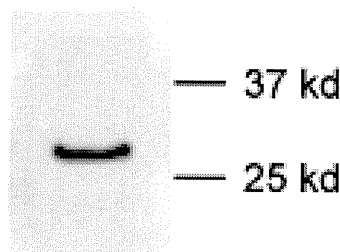
1. 診断法確立

1) AK2 タンパク異常解析

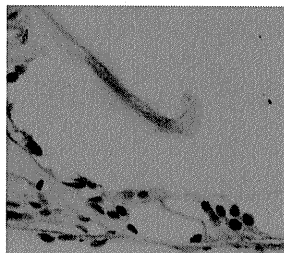
Western blot 法による AK2 タンパクの測定法を確立し、患者では AK2 タンパクが陰性であること、コントロールとして用いた AK1 は陽性であることを確認した。マウスを用いて内耳細胞で AK2 タンパクが発現していることを同様に確認した(図1)。また、免疫組織化学により有毛細胞およびらせん神経節細胞に存在することが示された(図 2-1, 2)。

抗 AK2 モノクローナル抗体を複数作製し、FACS 解析に適した抗体をスクリーニングした。

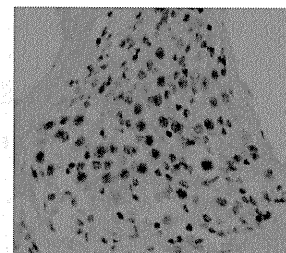
(図 1)



(図 2-1)



(図 2-2)



2) AK2 遺伝子解析

AK2 遺伝子診断法を確立した。患者細胞から RNA を抽出し cDNA に変換し、cDNA の AK2 遺伝子変異を解析した。さらに、病理標本、乾燥濾紙血、保存臍帯などから genomic DNA を抽出し、全ての exon の AK2 遺伝子をシーケンスし解析する方法も確立した。

血液・免疫・内耳細胞サブセットの AK2 遺伝子発現量を評価するために、リアルタイム PCR により mRNA 発現を定量的に測定する方法を確立した。

2. 診断基準作製

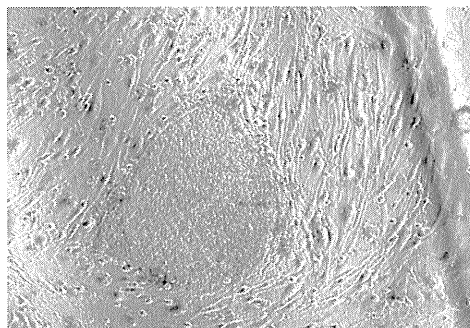
診断基準案を作製し一般に啓発した。(別掲)

3. 病態解明および新規治療開発

患者骨髄血液幹細胞を用い、コロニー解析を行い、骨髄系細胞の分化が障害されていること、単球系への分化は起きることを示した。

患者から Fibroblasts を作製し、これを用いて iPS 細胞を作製した。AK2 欠損により細胞自体がアポトーシスに陥りやすいことから、AK2 遺伝子を一過性に Fibroblasts に発現させる方法で、iPS 細胞樹立ができた(図 3)。

(図 3)



樹立した患者由来 iPSC 細胞を用い、血液幹細胞に分化させた上で、コロニーアッセイを行った。骨髄系細胞への分化は、患者で好中球減少が見られることと一致して、低下していた。特に、桿状球、顆粒球が減少し、分化障害が認められた。

患者由来 iPSC 細胞に AK2 遺伝子をレトロウイルスベクターで導入し、造血幹細胞に分化させ、分化障害が回復するか検討した。正常 AK2 導入により、骨髄球系の分化障害は改善した。

AK2 ノックアウトマウスを作製した。胎生致死であったため、ヒトとマウスで AK2 への細胞の生存の依存度、また各種組織における AK2 の依存度の違いが示された。なお、胎児造血は障害されていた。

なぜ AK2 欠損により T 細胞、好中球、内耳細胞の分化障害が起きるか、生化学的な異常を検討し、AK2 欠損によるエネルギー補充の欠損が分化障害、さらにはアポトーシスを起こしていると考えられた。

強大音暴露による難聴モデルモルモットを作製したところ、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の強い発現が見られた。したがって、内耳細胞の酸化ストレスによるアポトーシス誘導に AK2 が関与し、患者では内耳細胞障害および感音性難聴を起こしていると考えられた。

4. 治療指針の作製

細網異形成症を含む重症複合型免疫不全症

の造血幹細胞移植による予後調査を行い、移植成功例の検討を行った。その結果、前処置を軽減しても生着すること、非血縁臍帯血移植の成績が良いこと、感染症がコントロール出来ている状態で移植することで成績が良くなることが判明した。昨年度作製した治療指針案についてその検証を行った。(別掲)

5. 疫学調査など実態把握の方法の構築

1) PIDJ による疫学調査

先天性免疫不全症の中央診断登録データベースである PIDJ を利用し、新規症例を見出した。AK2 の遺伝子解析、western blot による AK2 タンパク低下により、確定診断した。骨髄移植後の根治した患者も見いだした。また、20年前に細網異形成症疑いとして新生児期に死亡した患者の病理標本から、患者家族から遺伝子解析の同意を得た上で遺伝子診断を行った。検体収集システムを構築した。

2) 先天性難聴、先天性骨髄不全の疫学調査

先天性難聴のデータベース、先天性骨髄不全のデータベースを利用し、AK2 変異の有無の解析を行ったが、今回の研究では見出されなかった。先天性骨髄不全では、テロメア長短縮の検索方法を確立した。

3) スクリーニング法の開発

T 細胞新生能のマーカーである TREC を新生児濾紙血で測定する方法及び B 細胞新生能のマーカーで KREC を確立した。実際に本症患者で TREC を測定し、測定感度以下であることを示し、本症を新生児スクリーニングできることを示した。

4) 新規原因遺伝子同定

AK2 正常の細網異形成症例を PIDJ 登録例か

から見出した。AK2 以外の新規原因遺伝子同定を次世代シーケンサーを用いた Exome 解析により行った。複数の候補が見出された。

5) 患者会での啓発

患者会ホームページを立ち上げた。勉強会を行い、患者啓発に努めた。日本の患者会が国際患者会である IPOPI の会員となることに尽力し、認定された。

D. 考察

1. 学術的意義

1) 病態解析の意義

細網異形成症原因遺伝子 AK2 の機能解析は、骨髄系細胞、免疫系細胞、内耳細胞の分化機構の解明につながり、学術的意義が大きい。遺伝子機能を解析することにより、多系統の細胞分化異常がなぜ AK2 という一分子でもたらされるのか解明され、細胞分化とアポトーシスの関連に新規知見をもたらし、基礎科学への貢献が大きい。

また、細網異形成症は、幹細胞から多系統への細胞の分化障害による疾患であるため、疾患特異的 iPS 細胞による病態解析と再生医療による治療に最も適した疾患である。本疾患の iPS 細胞による病態解析と新規遺伝子治療開発は学術的な意義が大きい。

2) 疫学解析の意義

PIDJ (Primary Immunodeficiency Database in Japan) は、インターネットを活用した免疫不全症の中央診断登録体制である。全国の一般医が、免疫不全症疑い症例の臨床症状、検査データを相談フォームに入力し専門医にコンサルトする。専門医は臨床データをもとに、送付検体を用い FACS 解析、遺伝子解析を行い、その結果から確定診断し、一般医にアドバイスをする。検体は

保存する。これにより患者登録、診断、専門医による助言、FACS 解析、検体保存が一挙に出来るシステムである。PIDJ は臨床医学と基礎医学、一般医と専門医を統合するシステムとして評価され、Nature Immunology に紹介された。PIDJ システムにより疫学調査し、本症の診断、治療、予後解析に有効活用できた。

2. 国際的意義

細網異形成症の治療として、患者 iPS 細胞に正常遺伝子を導入する治療法は、国際的に脚光を浴びている。しかし、細網異形成症からの iPS 細胞樹立は、アポトーシスに陥りやすいという問題があり、これまで成功していない。今回、患者 iPS 細胞化を実施できたこと、さらに血液免疫系細胞への分化実験を行い障害部位を同定できたこと、さらに正常 AK2 遺伝子を導入して正常分化が得られたことは、国際的な意義が大きい。

3. 社会的意義

細網異形成性症の診断基準、病態解明、スクリーニング法の開発、根治治療法の開発は、難病を新しい医学で診断治療することを社会に示すことになり、医学の発展が患者に還元されるという大きなインパクトを与える。患者会の期待も大きい。本疾患の社会的な認知も進む。特に、難病を新生児期にスクリーニングして早期診断し、造血幹細胞移植による早期治療で根治することが出来るため、難病の早期診断、早期治療の効果を示す事になり、社会的意義が大きい。

また、疾患特異的 iPS 細胞による病態解明法、遺伝子治療と再生医療を結びつける治療法は、新規な方法として、次世代医療のモデルとなり、社会的成果が大きい。

本研究で得られた成果をもとにして、他の難病に対する疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析、

遺伝子治療、再生医療への応用が期待できる。また、PIDJ というインターネットを用いた先天性免疫不全症の中央診断登録システムが成功している。他の難病に今回の成果を応用することで広く難病の診断・治療に貢献できる。

E. 結論

細網異形成症の原因遺伝子である AK2 のタンパク発現、遺伝子発現、遺伝子変異解析による確定診断法を確立できた。これにより診断指針を作製できた。また、PIDJ 登録システムを用いて、新規患者を見いだすことができた。患者由来 iPS 細胞を樹立し、血液免疫系細胞の分化異常と、正常 AK2 遺伝子導入による分化の正常化を示すことができた。将来的な iPS 細胞を用いた病態解析、遺伝子治療への応用の基礎的かつ重要なデータを示すことができた。また、患者の状況を把握し、これにより治療指針が作製できた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

巻末別紙参照。

2. 学会発表

巻末別紙参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特になし。

○ 参 考 资 料

細網異形成症診断基準

平成 22 年 2 月 1 日作成

I)-V) 全てを満たす場合に細網異形成症と診断する。

I) 臨床所見

易感染性を認めること。

感音性難聴を認めること。

II) 免疫・血液障害

a) 末梢血で好中球減少を認めること。単球は正常であること。

b) 末梢血単核球の FACS 解析で T 細胞および NK 細胞の減少を認めること。B 細胞数は正常であること。

c) 骨髄検査で骨髄系細胞の減少を認めること。単球系の減少は認めないこと。

d) コロニー解析で骨髄系細胞の分化障害を認めること。単球系細胞の分化障害は認めないこと。

III) 聴力障害

聴力検査で感音性難聴があること。

IV) AK2 タンパク異常解析

Western blot 等で AK2 タンパク発現低下を認めること。

V) AK2 遺伝子診断

遺伝子解析で AK2 変異を認めること。

細網異形成症治療指針

平成 23 年 12 月 1 日改訂

I) 感染症治療

本症は好中球減少、T 細胞減少、低 γ グロブリン血症があるため、重篤な感染症を起こしやすい。そのため、以下の様に感染症治療を十分に行う。また、細網異形成症を疑った場合は、無菌室入室、アイソレーター使用など無菌管理を行う。

1) 細菌感染症

骨髄移植後生着までの好中球減少期の発熱に対しては血液培養後直ちにセフェム系もしくはカルバペネム系抗生剤を投与する。血液培養にてグラム陽性球菌が検出された場合は症状に応じてバンコマイシンの投与も検討する。また ST 合剤の投与はニューモシスチス肺炎及び肺炎連鎖球菌感染予防のため投与する。

2) 真菌感染症

Candida 感染に対しては、micafungin、フルコナゾールを投与する。深在性 Aspergillus 症およびフルコナゾール耐性の Candida 症に対してはアムホテリシン B、イトラコナゾール、リポゾーマルアンホテリシン B、ボリコナゾール、等を適宜投与する。

発熱時は常に真菌感染症を疑い β -D グルカン、アスペルギルス抗原検査等を必要に応じて施行する。

3) ウイルス感染症

サイトメガロウイルス感染症に対しては定期的（毎週）な抗原血症もしくはウイルス血症の有無を検査し、陽性の場合にはガンシクロビルの投与を行う。本剤は副作用としての好中球減少に注意し、耐性出現の場合はフォスカビルの投与も考慮する。

EB ウイルス感染症に対しては rituximab の投与を考慮する。

単純ヘルペスウイルス（HSV）及び水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）に対してはアシクロビルの予防的及び治療的投与を行う。

4) G-CSF

好中球増加を期待して使用する。

5) 低ガンマグロブリン血症

静注様 γ グロブリン製剤の定期的投与を行う。

II) 造血幹細胞移植

本症は、造血幹細胞移植により根治が期待できる一方、施行しなかった場合生後1年以内に死亡する。

造血幹細胞移植の絶対適応である。診断が付き次第、早期に造血幹細胞移植を行う。

1) ドナーの選択

移植細胞源は、血縁 HLA 一致ドナーが存在する場合を除き、非血縁臍帯血とする。この理由は緊急を要するため、移植の準備に数ヶ月を要する骨髓バンクを介しての移植は適さないことと、国内重症複合型免疫不全症の造血幹細胞移植症例の集計で非血縁臍帯血移植の粗生存率が非血縁者間骨髓移植および血縁者間 HLA 不一致骨髓移植に比べて良好であったことである。

また HLA 不一致非血縁者間臍帯血移植においては生着不全や GVHD の頻度が高まることが予想されるため、血清学的に HLA-A, B, DR が 2 座不一致までに限りドナーとして選定することも認められる。

移植細胞数の最低数は $2 \times 10^5/\text{kg}$ とし、CD34 陽性細胞が多く含まれる臍帯血を選択する。ドナーの性別や血液型は問わない。

2) 移植前処置

感染症が顕著である場合は前処置を行わない。前処置を行う場合は、骨髓非破壊的前処置として実績のある (a), (b) いずれかを推奨する。

(a) フルダラビンとメルファランによる臍帯血移植前処置

day -7、-6、-5、-4、-3 : フルダラビン 1 時間点滴静注 25 mg/m²/日

day -4、-3 : メルファラン 30 分点滴静注 70 mg/m²/日

10Kg未満では、体表面積 1m²あたりの投与量 $\div 30 \times$ 体重 (kg) で計算する。

(b) フルダラビンとブスルファンによる臍帯血移植前処置

day -7、-6、-5、-4、-3、-2 : フルダラビン 1 時間点滴静注 30 mg/m²/日

day -3、-2 : ブスルファン 2 時間点滴静注 1mg/kg $\times 4$ /日

10Kg未満では、体表面積 1m²あたりの投与量÷30×体重 (kg) で計算する。

3) GVHD 予防

day -1 から	: タクロリムス	持続点滴静注	0.02 mg/kg/日
day 1	: メトトレキサート	静注	10 mg/m ² /日
day 3、6	: メトトレキサート	静注	7 mg/m ² /日

タクロリムス血中濃度は5-12ng/mLに維持し15ng/mLを超えないようにする。
なおタクロリムスは内服が可能となった時点で1日点滴量の3-5倍量を分2で内服とする。

またメトトレキサートについて、day 1においては一回最大10 mg/bodyとし、day 3、6においては一回最大7 mg/bodyとする。

III) 聴力障害

補聴器による聴覚障害の治療を行う。造血幹細胞移植により難聴が改善した症例が存在するため、移植後に定期的に聴力検査を行う。

Ⅱ 分 担 研 究 報 告

TRECs, KREC を用いた細網異形成症の 新生児マススクリーニング法の開発

今井 耕輔

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科小児・周産期地域医療学講座)

研究要旨

TRECs(T-cell receptor excision circles)は、T細胞の発生の過程で産生される環状 DNA であり、T 細胞新生能のマーカーとして用いる事が出来る。H21 年度は、新生児乾燥濾紙血中のTRECsを real-timePCR で定量することによる新生児マススクリーニング法を開発し、報告した。また、H22 年度は、B細胞の発生過程で産生される環状DNAである、KREC (Ig kappa chain recombination excision circles)を新生児乾燥濾紙血から抽出した DNA を用いて real-timePCR で定量することによるマススクリーニング法を開発し、報告した。今年度は、その両者を用い、さらに FACS 解析を組み合わせることで、国内、および海外から依頼を受けた免疫不全症患者で検討し、細胞異形成症の疑い例で AK2 遺伝子、および、他の候補遺伝子の探索を行った。

本スクリーニング法により、細網異形成症の早期発見が可能になり、早期診断・早期治療により患者の生命予後の改善につながると考えられる。

A. 研究目的

細網異形成症(Reticular dysgenesis, RD)は、T 細胞、NK 細胞、好中球減少、感音性難聴を主要症状とする重篤な疾患である。新生児期に T 細胞欠損をきたす主な疾患として、重症複合免疫不全症 (Severe combined immunodeficiency, 以下 SCID)があるが、細網異形成症は、T細胞欠損に好中球減少と難聴が加わった SCID の最重症型とも考えられる。なお、B細胞については、既報告の細網異形成症 13 例においては、0-556(正常 40-2000)と低下例、正常例のいずれも見られている。

細網異形成症は、著しい易感染性により乳児期早期に重症日和見感染症を発症する致死性の先天性免疫不全症である。造血幹細胞移植 (Hematopoietic stem cell transplantation, 以下 HSCT) による免疫能再構築が標準的な根治療法であるが、HSCT 前に重症感染症を発症すると治

療が困難になる。しかし、乳児期早期に HSCT が実施されれば、SCID における調査と同様とすると、生存率が 76~95%に達するとされ予後を改善できる。

一昨年度、昨年度に、新生児乾燥濾紙血中の TRECs および KRECs を real-timePCR で定量することによる新生児マススクリーニング法を開発し、報告した。本年度は、日本原発性免疫不全症ネットワーク (Primary immunodeficiency in Japan: PIDJ ネットワーク)を通じて、全国から紹介された低 γ グロブリン血症患者について、TREC,KREC を用いたスクリーニングを行い、同時にフローサイトメトリー解析を行い、細網異形成症患者の早期発見法、早期治療法の検討を行った。

B. 研究方法

全国から紹介された低 γ グロブリン血症患者に対して、昨年までに開発した TRECs, KRECs 定量

を行い、さらにフローサイトメトリー (FACS) 解析を行い、細網異形成症患者の早期発見法について検討した。

2011 年は、全国から、PIDJ を通して 130 検体の免疫不全症患者検体を受け付けた。うち、複合免疫不全症が 8 例あり、2 例は IL2RG 欠損症 (XSCID)、1 例が RAG1 欠損症、1 例が ADA 欠損症であり、残り 4 例が原因不明例であった。また、抗体産生不全を伴う低 γ グロブリン血症患者は 64 例で、6 例が BTK 欠損症 (XLA)、5 例が CD40L 欠損 (XHIGM)、1 例が Foxp3 異常症 (IPEX)、3 例が IgA 欠損症、39 例が原因不明のいわゆる CVID であった。また、免疫調節異常を 2 例に、単球あるいは好中球減少を伴う患者を 6 例認め、うち 3 例は GATA2 異常症で、3 例が原因不明であった。なお、はっきりとした難聴の病歴を持った患者はいなかった。

末梢血は EDTA 血として 100 μ l、ガスリー血は直径 6mm 大に punch-out した濾紙血 2 枚をサンプルとして、キットを用いて DNA を抽出した。DNA 濃度を測定した上で、KREC と内在性コントロールとして RNaseP を同時に定量し、コピー数を 1 μ gDNA あたりに換算、統計学的解析を加えた。DNA 濃度は 5ng/ μ l 以上を対象とした。

Real time PCR は、濃度の分かっている standard サンプルと未知サンプルを同じ条件で PCR し、各サイクルでの増幅を検出した。Standard の増幅曲線から標準曲線を引き、未知サンプルの濃度を求めた。

(倫理面への配慮)

本研究は、防衛医科大学校倫理委員会の承認済みであり、患者・家族・健常児からは十分な説明のもと、文書による同意を得ている。小児の採血は、医療上必要な採血時にごく少量を同時に採取した。

C. 研究結果

RD は、T 細胞減少を伴う低 γ グロブリン血症と好中球減少を主徴とするため、その軽症例は、T 細胞減少患者 (TREC_s 低下例) および好中球減少例の中に見られると考えられた。

方法にあげたように、複合免疫不全、抗体産生不全、免疫調節異常、食細胞減少症から原因不明の患者 48 例が抽出された (別表参照)。うち、TREC 低下例 (<50 コピー/ μ gDNA) は 6 例で認め、5 例では sjKREC も低下していた (<50 コピー/ μ gDNA)。

FACS 解析は 3 例 (UPN1126, 1184, 1195) で施行可能であった。3 例とも、CD45RO+CD4+メモリー T 細胞が 88-100% と著増しており、新生 T 細胞の枯渇を反映していると考えられた。また、2 例では、CD19 < 2% であり、sjKREC 低下と関連した。1 例では CD19 は 36.7% と保たれていたが、CD27+メモリー B 細胞が 97% と著増しており、新生 B 細胞の減少を反映していると考えられた。NK 細胞は 3 例中 2 例で欠損しており、広範囲のリンパ球造血の異常があると考えられた。

現在、これらの患者で AK2 遺伝子の解析を行っている。

D. 考察

今回の検討で、低 γ グロブリン血症等を含む候補患者から、TREC 低下例が 6 例抽出された。当初の臨床診断が複合免疫不全の例が 3 例だが、抗体産生不全 2 例、免疫調節異常症 1 例が含まれた。FACS 施行可能な例では全例ナイーブ T 細胞の欠損が観察され、残りの 3 例は genomic DNA のみ、あるいは濾紙血しか入手できなかったにも関わらず、TREC 低下から新生 T 細胞減少症であることがわかり、TREC_s 検査の有用性が示された。

さらに 5 例の患者では、sjKREC_s の低下がみられ、B 細胞新生能の低下が疑われた。これらの症

例では、T の減少、B の減少が見られているものの、検討できた 3 例中 2 例では NK の減少も見られており、典型的な T-B-の SCID の遺伝子は考えにくい。そのため、*RAG1*、*RAG2* の変異については検討していない。一方、進行性の T、B の減少症は、*LIG4* 遺伝子、セルヌノス遺伝子 (*XLFI/NHEJ1*) 異常でみられることもあるため、両遺伝子を 3 例で検討したが、異常を認めなかった。さらに 1 例 (NY1195M) では、*DCLRE1C*、*PRKDC*、*GATA2* のシークエンスも行っているが、いずれも今のところ、遺伝子異常は同定されていない。*AK2* 遺伝子について、これらの患者で検討中である。また、exome 解析も可能となったため、原因不明の患者では、順次 exome 解析を行っている。

E. 結論

TRECs、KRECs の測定は、細網異形成症を含む T 細胞欠損症、B 細胞欠損症の早期発見、早期診断、鑑別診断、早期治療に有用であり、新生児スクリーニングにも応用が可能であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsuiki N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of kappa-deleting recombination excision 1 circles in Guthrie 2 cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol*, 2011; 128:223–225.e2.

2. Okura Y, Yamada M, Kobayashi I,

Santisteban I, Arredondo-Santisteban G, Kato Z, Iguchi A, Yoshida M, Ohara O, Nakagawa N, Imai K, Hershfield M.S, Ariga T. ADA-SCID with 'WAZA-ARI' mutations that synergistically abolished ADA protein stability. *Br J Haematol*, 2011; 153: 675–676.

3. Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu H, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients. *Clin Immunol*, 2011; 138: 172-177.

4. Zhao M, Kanegane H, Kobayashi C, Nakazawa Y, Ishii E, Kasai M, Terui K, Gocho Y, Imai K, Kiyasu J, Nonoyama S, Miyawaki T. Early and rapid detection of X-linked lymphoproliferative syndrome with SH2D1A mutations by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, 2011; 80: 8-13.

5. Yang X, Kanegane H, Nishida N, Imamura T, Hamamoto K, Miyashita R, Imai K, Nonoyama S, Sanayama K, Yamaide A, Kato F, Nagai K, Ishii E, van Zelm MC, Latour S, Zhao X-D, and Miyawaki T. Clinical and Genetic Characteristics of XIAP Deficiency in Japan. *J Clin Immunol*, 2012 (in press).

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定含む。)

特になし。

(別表) 原因不明のPID患者48例の内訳

IUIS分類	疾患名	initial	UPN	sex	PIDJ_ID	TREC	sjKREC	cjKREC	CD3	CD4	CD8	CD45RO	CD19	CD27	NK	NKT	γ δ T
1. Combined T and B cell PIDs	SCID like	TY	1136	M	2011TY001	2655	909.8	4486	78.4	78.3	19.5	15.4	18.1	8.98	1.34	0.01	0.72
1. Combined T and B cell PIDs	SCID like	NIT	1184	M	NIT1184M	45.01	89.87	709.8	85.68	45.58	30.83	96.27	0.01	0	0		
1. Combined T and B cell PIDs	SCID like (Pancytopenia, BCG株による皮膚結核、肺結核)	NY	1195	M	2010NY001	0	0	0	4.74	25	25	100	1.77	34.29	0.11	0	22.22
1. Combined T and B cell PIDs	SCID(T-B-NK+)	YEH	1175	M	YEH1175M	0	0	0									
2. Antibody defect	CVID	MT	660	M	2002MT001												
2. Antibody defect	CVID	FM	716	F	1984FM001				80.98	60.9	27.4	54.14	6.36	35.54	7.99	0.06	10.58
2. Antibody defect	CVID	OT	717	M	1991OT001	282.5	193.1	2867	83.54	32.99	58.54	32.85	6.74	1.27	6.39	0	2.35
2. Antibody defect	CVID	HM	840	F	2005HM002												
2. Antibody defect	CVID	HM	840	F	2005HM002												
2. Antibody defect	CVID	HM	840	F	2005HM002												
2. Antibody defect	CVID	HM	840	F	2005HM002												
2. Antibody defect	CVID	AC	969	F	1972AC001	100.2	918.5	10410	55.14	24.38	69.61	93.55	30.75	4.81	7.08	0	0.33
2. Antibody defect	CVID	KY	1118	F													
2. Antibody defect	CVID	MH	1125	M	2009MH001	5962	3303	10030	72.95	65.19	26.98	11.93	24.58	6.91	3.78	0.05	6.8
2. Antibody defect	CVID	ARS	1140	M	ARS1140M	1515	0	0									
2. Antibody defect	CVID	SUR	1142	M	SUR1142M	531.2	1261	7195									
2. Antibody defect	CVID	OI	1161	F	2010OI001	1420	1173	7950	82.88	60.27	38.27	25.94	13.03	1.41	2.3	0.01	0.37
2. Antibody defect	CVID	SUM	1183	M	SUM1183M	6863	4427	38570	95.23	36.31	51.71	59.91	0.06	0	0		
2. Antibody defect	CVID	MT	1201	M	2000MT002	976.2	2547	10010	72.94	41.1	46.22	23.03	12.78	32.44	11.9	0.01	11.2
2. Antibody defect	CVID	YM	1202	F	2005YM001	2771	2148	17910	83.9	67.3	29.6	12.1	3.78	6.93	11.2	0.03	2.12
2. Antibody defect	CVID	MK	1203	F	2011MK001	4694	5930	20340	66.92	76.55	18.64	9.15	14.68	4.46	14.57	0.08	4.66
2. Antibody defect	CVID	MH	1207	M		3309	7889	34690	61.51	73.11	22.03	7.76	20.89	3.38	12.78	0.03	5.86
2. Antibody defect	CVID (B cell deficiency)	TS	1074	M	2004TS001												
2. Antibody defect	CVID (Good症候群、hypogammagamma)	DT	1200	M	1948DT001	810.3	0	0	97.41	31.69	61.86	47.01	0.01	50	1	0.01	7.2
2. Antibody defect	CVID (IgGサブクラス欠損)	HH	1156	M	1961HH001	86.29	265.7	4839									
2. Antibody defect	CVID with B cell deficiency, epilepsy	YK	1058	F	1970YK001	323.1	0	0	91.74	56.93	40.3	89.97	0.04	0	6.85	0.01	2.5
2. Antibody defect	CVID-A	TA	780	F	1997TA001												
2. Antibody defect	CVID-A	SK	1188	M	1962SK001	238.3	551.5	8965	60.81	50.6	43.2	73	24.85	38	15.6	0.07	2.86
2. Antibody defect	CVID, neutropenia, short telomere length, microcephaly, MDS+RAEB2	FS	1100	M	2009FS001												
2. Antibody defect	CVID,間質性肺炎,肺門部リンパ節腫脹,皮膚疹	YT	1157	F	2002YT002	606.6	97.07	1850									
2. Antibody defect	CVID,先天性赤芽球瘰	AH	1193	M	1997AH001	0	0	0									
2. Antibody defect	CVID	FK	1189	M	2009FK001	25650	5505	29860	74.93	52.69	41.6	13.49	20.71	4.16	3.01	0.04	6.64
2. Antibody defect	CVID (兄弟例?)	SK	1204	M	2010SK004	373.2	8865	39880	58.7	44.7	47.1	27.8	30.9	4.28	6.93	0.02	8.47
2. Antibody defect	CVID+6p-症候群	MR	1063	M	2009MR001												
2. Antibody defect	CVID+神経芽細胞腫	KM	1180	M	2011KM001	13930	7452	32650	68.26	73.63	21.08	11.01	24.92	3.65	3.97	0.07	5.09
2. Antibody defect	CVID+白血球減少	OY	1159	M	2010OY001	1977	9231	19830									
2. Antibody defect	CVID+反復性肛門周囲膿瘍	MT	1194	M		3628	18040	35630	64.33	69.76	26.28	9.22	28.15	2.46	4.66	0.05	4.12
2. Antibody defect	HIGMx	MY	588	M	MY588M/199	145.2	349.5	1771									
2. Antibody defect	HIGMx	MT	1126	F	1994MT001	0	0	4355	57.09	11.88	86	88	36.71	97.21	1.99	0	2.3
2. Antibody defect	HIGMx	MT	1126	F	1994MT001												
2. Antibody defect	HIGMx	ABD	1173	M	ABD1173M	4284	1903	8958									
2. Antibody defect	HIGMx	MKB	1121	M	MKB1121M	1985	0	1589	92.8	84.5	13.9	71.8	5.3	3.5	0.4	0.01	0.7
2. Antibody defect	XLA susp	UA	1198	M	2011UA001	527.6	0	244.1	68.64	73.88	22.54	28.84	0.22	34.95	20.93	0.02	1.75
4. Immune dysregulation	dysgammaglobulinemia,肝脾腫,血小板減少,自己抗体(ANA160倍,抗dsDNA抗体陽性,抗Sm/SS-A/SS-B抗体陽性,C4低値)	IR	1158	M	2010IR002	0	3693	19870									
4. Immune dysregulation	血球貪食性リンパ組織球症	KK	1192	M	2011KK001	1897	584.2	1327									
5. Phagocytic defect	DC欠損,単球欠損,真菌感染症	TY	1199	M	2010TY002	513.8	303.8	2548	91.39	60.36	38.53	49.24	6.31	8.76	0.9	0.03	0.4
5. Phagocytic defect	MDS-AML	SS	1208	M	2009SS01												
5. Phagocytic defect	MDS(RCMD), AIHA	SI	1196	M	2000SI001	927.9	879.1	11570	76	53.7	34.5	36.5	19.4	9.4	0.26	0.01	4.93