

201128048A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

外胚葉形成不全免疫不全症の実態調査と
治療ガイドラインの作成

平成23年度総括・分担研究報告書

平成24年(2012年)3月

研究代表者

小野寺雅史

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

外胚葉形成不全免疫不全症の実態調査と
治療ガイドラインの作成

平成23年度総括・分担研究報告書

平成24年（2012年）3月

研究代表者

小野寺雅史

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

外胚葉形成不全免疫不全症の実態調査と治療ガイドラインの作成に関する研究

目 次

■平成 23 年度総括・分担報告書

I.総括研究報告書	研究代表者	小野寺雅史	… 3
II.分担・協力研究報告			
1. NEMO 異常症等難治性炎症性腸疾患の実態調査に向けた研究		小野寺雅史	… 7
2. 外胚葉形成不全免疫不全症候群 (XL-EDA-ID) の解析		小林 正夫	… 10
3. 慢性肉芽腫症：食細胞の殺菌能と炎症制御の異常：症例・トピックスからの考察		有賀 正	… 16
4. 慢性肉芽腫症腸炎 (CGD colitis) 3 例の経過		布井 博幸	… 19
5. 慢性肉芽腫症に合併する腸炎についてのアンケート調査研究		瀧本 哲也	… 25
6. 外胚葉形成不全免疫不全症の実態調査と治療ガイドラインの作成		西小森隆太	… 31
7. CGD 腸炎の早期診断		蓮井 正史	… 35
8. 臨床検体におけるガレクチンレベルの検討と臨床症状について ～ガレクチン 9 を用いたマウス実験的腸炎に対する治療応用～		平島 光臣	… 37
9. 小児腸管炎症におけるガレクチン 9 の動向に関する研究		鍵本 聖一	… 40
10. gp91 ^{phox} 欠損マウスの硫酸デキストラン誘発性大腸炎の解析		荒谷 康博	… 45
III. 班会議・第 19 回食細胞機能異常症研究会プログラム			… 49
IV. 添付資料：NEMO 異常症・CGD 腸炎の実態調査票			… 53
V. 研究成果の刊行に関する一覧表			… 81

平成 23 年度

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難病疾患克服研究事業）
総括研究報告書

外胚葉形成不全免疫不全症の実態調査と治療ガイドラインの作成に関する研究

研究代表者 小野寺雅史 国立成育医療センター研究所成育遺伝研究部部長

研究要旨

外胚葉形成不全免疫不全症（EDA-ID）は歯芽欠損など外胚葉の形成不全に加え、易感染性を示す免疫不全症であり、その多くは X 連鎖劣性遺伝形式をとる NF- κ B essential modulator（NEMO）異常症である。本班では、昨年、我が国の NEMO 異常症 12 名の詳細な実態を行い、その半数で炎症性腸炎が合併することを報告した。

本年度は、比較的症例数の多い同様の自然免疫異常により発症する慢性肉芽腫症（CGD）にて炎症性腸炎を合併した症例を詳細に解析した。その結果、CGD 腸炎では臨床症状が明らかになる前から腸管細菌叢や腸管組織に変化をきたしていることが示され、特にこれら症状発症には単球における活性酸素産生能が関与することが明らかになった。また、腸炎を誘発する薬剤に対して早期に、過剰に反応することから、これら疾患では恒常的に免疫系が活性化されている可能性が示唆された。今後は経時的な便細菌叢の解析やガラクトチン 9 のような血清マーカーを用いて臨床症状発症前から内視鏡検査を行い、組織障害が比較的軽微の段階でのメサラジンやステロイドなどの治療開始が望まれる。

分担研究者・所属機関・職名

小林 正夫
広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学・教授
有賀 正
北海道大学大学院医学研究科小児科学分野・教授
布井 博幸
宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野・教授
瀧本哲也
国立成育医療センター研究所・室長
西小森隆太
京都大学大学院医学研究科発達小児科学・准教授
蓮井 正史
関西医科大学小児科・病院准教授
平島 光臣
香川大学医学部医学系研究科免疫病理学・教授

研究協力者・所属機関・職名

鍵本 聖一
埼玉県立小児医療センター総合診療部・部長
荒谷 康昭
横浜市立大学大学院生命システム科学研究科・教授
水上 智之
宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野・助手
河合 利尚
国立成育医療センター研究所成育遺伝研究部・室長

A. 研究目的

外胚葉形成不全免疫不全症（EDA-ID）は歯芽欠損、粗な頭髪、発汗低下などの外胚葉形成不全に加え、結核等の抗酸菌感染症、ニューモシスチス肺炎、ヘルペス脳炎、サイトメガロウイルス感染症など易感染性を呈する免疫不全症である。この EDA-ID は X 連鎖劣性遺伝形式をとる NF- κ B essential modulator（NEMO）異常症と常染色体優性遺伝形式をとる I κ B 異常症とに分けられるが、その大半は前者の NEMO 異常症にて発症する。昨年、本班では我が国の NEMO 異常症 12 名の詳細な実態を行い、その半数で炎症性腸炎が合併することを報告した。本年度は、比較的症例数の多い同様の自然免疫異常により発症する慢性肉芽腫症にて炎症性腸炎を合併した症例を、臨床経過や基礎的研究ならびに全国アンケート調査により得られた回答に基づいて詳細に解析し、その病態を明らかにすることで EDA-ID 等自然免疫異常により発症する炎症性腸炎への有効な治療法を確立することを目指した。

B. 研究方法と結果

1. 病態と臨床症状
 - 1) 早期 CGD 腸炎の肉眼的所見と病理所見
臨床的に軽微な消化器症状しか呈していない

CGD 患者に対して大腸ファイバー (CF) を施行した。症例は 21 歳、24 歳とその兄弟の 19 歳の男性であり、病型は全て gp91phox 欠損型の CGD である。CF で回腸末端に血管透見不良な粘膜域やびらんが見られ、盲腸から直腸にかけてはアフタが多発していた。病理所見では、アフタ部分の粘膜下層を中心に表層近傍に至るリンパ濾胞様の炎症細胞集簇を認め、瀰漫性に泡沫状マクロファージ (foamy macrophage) の浸潤も認めた。2 例ではこれらにマクロファージに暗褐色から暗緑色の色素沈着が認め、3 名とも CGD 腸炎と診断した。治療としてはステロイドとメサラジンで治療を使用し、全例で腸炎所見は消失した。臨床症状が軽微な場合でも、腸管組織には何らかの障害をきたしている場合があり、CF 等による早期診断の必要性が示唆された (布井)。

2) CGD の残存活性酸素量と臨床症状の関連

- ・ 炎症性腸炎を合併したスプライス変異による CGD 例では微量な活性酸素産生能を好中球に認めたが、単球からの活性酸素産生を認めなかった。
- ・ de novo 変異による CGD の 2 症例では 1% 程度の活性酸素産生細胞を認めたが、易感染性ととも一例は肉芽腫形成、他方は軽い炎症性腸炎を認めた。
- ・ 好中球では 1% 程度、単球では 10% 程度ほどしか活性酸素産生細胞がないものでも何ら症状を呈しない保因者がいた。
- ・ 成人になっても重篤な感染症、炎症性腸炎を示さない、単球のみに活性酸素産生能を認める X-CGD 患者いた。

以上のことから、炎症性腸炎あるいは肉芽腫形成に関して単球からの活性酸素が重要であり、また、その発現量に一定の閾値があることが示された (有賀)。

3) CGD 腸疾患における腸内細菌叢の検討

近年、一部炎症性腸炎において、その発症機序に腸内細菌の関与が指摘されていることから、CGD 患者の腸内細菌叢を解析することで CGD 腸炎との関連性を検討した。方法は腸炎既往者 6 例、腸炎非既往者例 6 例、罹患例 3 例、対照 (患児の母親) 8 例であり、予防投薬以外の抗生剤非使用中の便中細菌 DNA を制限酵素で消化し、16S リボゾーム DNA の多型 (T-RFLP) にて腸内細菌を同定した。

- ・ キャリアー (母親) と健常人に相違はなし

- ・ 既往、非既往例に相違は無かったが、罹患例ではその腸内細菌種は減少していた。
- ・ 罹患症例における腸内細菌の種類は治療後の増加の傾向を示した。

以上のことから、臨床症状が軽微でも腸内細菌叢に変化が認められることから、便中細菌の T-RFLP を用いた多型解析は炎症性腸炎の早期診断および治療効果の判定に役立つものと思われる (小野寺)

4) CGD マウスの硫酸デキストラン誘発性大腸炎の解析

CGD 腸炎の発症機構を解明することを目的に、デキストラン硫酸塩誘発性大腸炎の重篤度を、食細胞 NADPH-oxidase (gp91-phox) 欠損マウス (CGD マウス) と野生型マウスとで比較した。その結果、大腸への炎症細胞の集簇、杯細胞の消失、大腸上皮の剥離ともに CGD マウスの方が早期に観察された。集簇した炎症細胞の少なくとも一部は好中球とマクロファージであった。大腸炎患部の KC, MIP-2, TNF- α の産生量は CGD マウスの方が高値を示した。以上から、CGD マウスの方が早期に大腸炎が進行することが明らかになった。現在、L-Kynurenine 投与による治療の有効性を解析中である (荒谷)

2. 病態と変異遺伝子

1) NEMO 遺伝子異常と病態の関連

NEMO 患者において *IKBKG* のイントロン 6 の領域にヘミ接合性新規遺伝子変異 769-1 G > C を同定した。本遺伝子変異は、splice-acceptor site に依存し、患者白血球において異常なスプライスを受けた NEMO mRNA と正常 NEMO mRNA の両方が検出された。患者白血球における NEMO 蛋白質の発現低下、炎症性サイトカインの産生低下、メモリー B 細胞数の減少、麻疹ウイルスに対する反応性の低下と抗体産生不全をきたしたことから、NEMO 蛋白質の発現低下による外胚葉形成不全免疫不全症を発症したと考えられた (小林)。

2) NEMO 異常症における体細胞モザイシズム

外胚葉形成不全免疫不全症は NEMO 遺伝子異常により発症し、炎症性腸疾患などの多彩な合併症を伴う。今回調査した国内 NEMO 遺伝子異常患者 10 人のうち 9 人に NEMO 異常体細胞モザイク (正常 NEMO 遺伝子発現細胞との混在) の存在を発見した。このことは炎症性腸疾患との関連が考えられ、さらなる調査中を行

っている (西小森)。

3. 病態とガレクチン9

1) ガレクチン9の概要

ガレクチン9 (Galectin-9: Gal-9) 投与は種々疾患モデルに治療効果を示すが、その機構には投与 Gal-9 のみならず Gal-9 を発現・産生する macrophage や T 細胞が重要であることを明らかにした。また、共同研究により血漿 Gal-9 が炎症性腸炎のバイオ・マーカーとして利用できる知見が得られてきた (平島)。

2) 小児炎症性腸炎におけるガレクチン9

ガレクチン9 と小児炎症性腸炎との関連を検討した。クローン病、ベーチェット病ではガレクチン9 が高値を示し、病状の沈静化に伴い低下傾向を示した。白血球数や CRP、好酸球との関連は認められなかった。潰瘍性大腸炎ではガレクチン9 は低値であり、食物アレルギーでは高値であった。今後、ガレクチン9 の診断、病態解析、治療への応用が期待される (鍵本)。

4. CGD 腸炎についての実態調査

CGD 腸炎に関して研究班で作成したアンケート調査票を全国医療機関に送付し、詳細な臨床情報を収集した。アンケートの回答が得られた CGD 36 例 (男 34 例、女 2 例) 中、腸炎を発症したのが 25 例 (男 23 例、女 2 例) で、その発症年齢は 1 歳 5 ヶ月～39 歳 9 ヶ月 (生存者の中央値 4 歳 8 ヶ月) であった。一例において発達障害が見られたが身体的発育は年齢相当な症例が主であった。内視鏡を行ったのが 20 症例で、その症状として粘膜浮腫、血管透見像、易出血性、微小出血斑、糜爛、潰瘍形成、隆起性病変 (肉芽腫形成) であった。病理学所見として、肉芽腫形成、炎症性細胞 (マクロファージ、リンパ球、単球、好中球) 浸潤、陰窩膿瘍、杯細胞の減少が見られた。治療に関しては、メサラジン、ステロイド、プロバイオティクス、サラゾスルファピリジンなどであり、抗 TNF α 抗体 (レミケード) を使用した例は無かった。幹細胞移植を行った症例は 10 名で、うち寛解したのは 6 名 (60%) であり、長期生存率に関しては、炎症性腸炎合併の有無による違いは認められなかった (腸炎非合併 85.7 \pm 13.2% vs 腸炎合併 85.9 \pm 9.9%) (瀧本)。

C. 考 察

現在、EDA-ID は X 連鎖劣性遺伝形式をとる NEMO 異常症と常染色体優性遺伝子形式をとる I κ B 異常症に分けられるが、その大半は前者の NEMO 異常症によって発症する。事実、昨年行った全国 1196 医療施設よりハガキによる一次アンケートと小児免疫不全を専門とする医師・研究者に対する個別の掘り起こし作業にて得られた 14 例の EDA-ID は全て NEMO 異常症であり、I κ B 異常症は確認できなかった (うち 2 名の女性は NEMO 遺伝子の一アレルに欠損がある色素失調症 Bloch-Sulzberger 症候群と考えられた)。ただ、EDA-ID 自体が比較的新しい疾患であるため、今後も継続して調査を進めることで、NEMO 異常症以外の EDA-ID が存在する可能性は十分にある。

これら男子例 12 名による実態調査から、その半数の 6 名で炎症性腸炎を発症していることがわかった。近年、腸管の恒常性維持に自然免疫系が関与していることが示されているので、今年度は同様の自然免疫異常にて発症する慢性肉芽腫症 (CGD) の実態調査を行い、その中で炎症性腸炎を合併した症例を特に詳細に解析した。それによると、解析可能であった 36 症例 (男性 34 名、女性 2 名) のうち CGD 腸炎を発症したのは 25 症例 (男性 23 名、女性 2 名) であり、発症時期は 1 歳 5 ヶ月～39 歳 9 ヶ月 (中央値 4 歳 8 ヶ月) で、その転帰は生存 31 症例 (腸炎例 22 症例)、死亡 5 症例 (腸炎 3 症例) であった。興味深いことに消化管症状や治療による低身長等の身体的発育障害をきたした症例は少なかった。臨床症状としては発熱、下痢が最も多く、その他に腹痛、体重増加不良、食思不振などがあり、内視鏡的には粘膜浮腫や糜爛などが多く、狭窄等を伴う隆起性病変 (肉芽腫形成) などは少なかった。検査所見では白血球の増多や CRP、赤沈の上昇などがあるが特徴的に検査所見は乏しかった。治療としては、メサラジン、ステロイド、プロバイオティクスなどが多く、免疫抑制剤のシクロスポリンやミゾリビン、イムランなどを使用した症例は少なかった。また、他の炎症性腸炎で用いられる抗 TNF α 抗体 (レミケード) を使用した例は無かった。造血幹細胞移植を行った症例は 10 症例であるが、これは感染症を同時に発症している症例が含まれるので、炎症性腸炎のみ対して行われているものではない。

ただ、臨床的に腸炎を呈していない症例において内視鏡的にはすでに何らかの肉眼的所見および病理学的所見を示す病態を発症しているこ

とや便中の腸内細菌叢に変化を示すことから考えて、今回のアンケート調査で得られた回答は比較的病状が進行した状態での所見と考えられ、実際はほとんどの症例で消化管になんからの障害を期待していることが示唆される。

その病態に関しては、CGD モデルマウスにおいてデキストラン硫酸塩による誘発性大腸炎の発症が早期であり、また、重篤であったことから CGD 腸炎においては恒常的な免疫系の活性が基礎にあり、何らかのストレスに反応して重度の障害をきたす可能性があるようである。また、同じ食細胞でも好中球がもつ活性酸素能より単球が持つ活性酸素能の方が病態の発生抑制に重要であることは興味深い。今後は、腸管の病理検査における浸潤細胞を詳細に解析することで、浸潤する細胞の種類と炎症の程度の違いが見えてくる可能性がある。

細胞接着に関わるレクチンのガレクチン9はアレルギーや炎症などの際に好酸球の遊走能を促進する分子で、特に免疫細胞や肺、消化器系の組織に分布され、特に活性化T細胞や癌細胞のアポトーシス誘導を誘導する興味深い分子である。今回の研究で、クローン病やベーチェット病でガレクチン9が高値を示し、病状の沈静化に伴い低下傾向を示したことや潰瘍性大腸炎ではガレクチン9は低値であり、食物アレルギーでは高値であったことから、今後、炎症性腸炎のバイオ・マーカーとして利用できる可能性が示唆された。

今回の研究によって、CGD 腸炎の病態の明らかになった。このような実態調査は類を見ず、極めて貴重な情報を提供すると思われ、これら研究結果を集積・解析することで、今後も EDA-ID の診断、治療に関して有用な情報を提供していきたい。

D. 結論

EDA-ID (NEMO 異常症) の実態解明ならびにその有効な治療法の確立に向け、以下のような研究を行った。

1. CGD 腸炎の病態を臨床症状から、腸内細菌叢から、また、活性酸素を産生する細胞から種類から解析した。
2. NEMO 異常の病態と変異遺伝子の関連を検討した。
3. 血漿ガレクチン9値と炎症性腸炎との関連を検討した。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

研究成果刊行一覧表を参照

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅱ． 分担・協力研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難病疾患克服研究事業）
分担研究報告書

NEMO 異常症等難治性炎症性腸疾患の実態調査に向けた研究

研究分担者 小野寺 雅史
国立成育医療センター研究所 成育遺伝研究部 部長

研究要旨

自然免疫異常である外胚葉形成不全免疫不全症（EDA-ID）は NF- κ B のシグナル異常により発症し、その原因として NF- κ B essential modulator (NEMO) の遺伝子異常がその主体をなす。その臨床症状として外胚葉の形成異常や易感染性を呈するが、その半数で難治性の炎症性腸炎を発症する。一方、同じ自然免疫不全症の慢性肉芽腫症（CGD）もその半数で炎症性腸炎を発症することから、本研究では、昨年と今年度に行った NEMO 異常症および CGD に対する全国アンケート調査調査を基に、両疾患における炎症性腸炎の類似点やその相違点を比較・検討する。

A. 研究目的

外胚葉形成不全免疫不全症（anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency: EDA-ID）は歯芽欠損、粗な頭髪、発汗低下などの外胚葉形成不全と結核等の抗酸菌感染症、ニューモシスチス肺炎、ヘルペス脳炎、サイトメガロ感染症などを発症しやすい免疫不全症で、その半数で難治性の炎症性腸炎を発症することが知られている。この EDA-ID は X 連鎖劣性遺伝形式をとる NF- κ B essential modulator (NEMO) 異常症と常染色体優性遺伝形式をとる I κ B 異常症とに分けられるが、その大半は前者の NEMO 異常症で発症する。

本研究では、昨年度 EDA-ID 患者実態調査を行い、全国 12 名の NEMO 異常症患者の実態を明らかにし、その半数で炎症性腸炎を発症していることを報告した。また、本年度は同様の自然免疫不全により発症する慢性肉芽腫症（CGD）患者 36 名の実態調査を行い、そのうち 25 名で炎症性腸炎を合併していることを明らかにした。ここでは、本研究で明らかにした NEMO 異常症と CGD に合併した炎症性腸炎を類似点および相違点を比較・検討し、治療ガイドラインの作成に役立つ。

B. 研究方法

1) 調査対象症例に関して

NEMO 異常症に関しては、全国 1196 の医療機関に対し EDA-ID 患者の診療有無に関するハガキによる一次アンケート調査を行い、回答が得られた 612 施設及び小児免疫不全症を専門とする医師への掘り起こし作業にて最終的に NEMO 異常症と診断した男性患者 12 名の実態調査票を入手した。そのうち、何らかの炎症性腸炎を発症したと考えられた 6 症例を対象とした。

CGD に関しても上記方法にて、36 名の患者情報が入手でき（男性 34 名、女性 2 名）、そのうち、何らかの炎症性腸炎を発症したと考えられた 25 症例（男性 23 名、女性 2 名）を対象とした。

2) 倫理面への配慮

上記、確定診断に至っている EDA-ID ならびに CGD 腸炎の対する実態調査を行うために、平成 22 年 1 月 4 日付けで国立成育医療センター内にある倫理審査委員会に必要書類を提出し、同年 3 月 10 日に実施に関する承認を得た。また、各分担研究者に対しても所属する研究機関からの実態調査に対する承認を得ている。

3) 当研究で得られたデータ管理

一次及び二次調査により得られたデータの解析・管理に関しては、国立成育医療研究センター内で分担研究者の瀧本が責任をもって行っている。

C. 結果

1. 症例数、腸炎発症年齢

NEMO 異常症で 6 例 (50%)、CGD で 25 例 (70%) であり、発症率は CGD の方が高かった。ただ、腸炎発症年齢に関しては、NEMO 異常症で 3 歳 9 ヶ月 (1 歳～9 歳 3 ヶ月)、CGD (1 歳 5 ヶ月～39 歳 9 ヶ月) で 4 歳 8 ヶ月と大差はなかった。

2. 臨床症状

NEMO 異常症では食思不振 (100%)、腹痛 (83%)、体重増加不良 (67%)、発熱 (50%)、下痢 (50%) などがあり、CGD では下痢 (76%)、発熱 (68%)、腹痛 (60%)、体重増加不良 (57%)、食思不振 (35%) と症状に若干の違いを認め、NEMO では腹痛、CGD では下痢が特徴的と考えられた。

3. 内視鏡所見

NEMO 異常症では、潰瘍形成 (100%)、偽ポリポーシス (67%) などがあり、CGD では粘膜浮腫 (60%)、びらん (50%)、潰瘍形成 (40%) などを認め、NEMO では潰瘍形成が、CGD では粘膜浮腫やびらんが特徴的と考えられた。

4. 病理所見

NEMO 異常症では、炎症性細胞の浸潤 (100%)、陰窩膿瘍 (17%)、杯細胞の減少 (17%) などがあり、CGD では炎症性細胞の浸潤 (100%)、肉芽腫形成 (80%) などを認め、CGD では肉芽腫形成が特徴的と考えられた。

5. 治療

NEMO 異常症では、ステロイド (5)、メサラジン (4)、抗 TNF α 抗体 (2)、アザチオプリンやサラゾスピリンなどの使用例があり、CGD ではステロイド (10)、メサラ

ジン (18)、サラゾスピリンなどの使用例があった。治療例において NEMO 異常症の抗 TNF α 抗体の有効性が特徴的であった。

D. 考案

NEMO 異常症における炎症性腸炎と CGD 腸炎の比較であるが、発症年齢はその中央値で 3 歳 9 ヶ月と 4 歳 8 ヶ月であり、その臨床症状も同様なものが多かった。また、CGD 腸炎の特徴とされる肉芽腫形成による狭窄などは見られたものの内視鏡・病理所見的にはこれら両疾患に差違を認めなかった。特に、CGD において比較的早い段階から内視鏡を施行した例では、軽度の浮腫やアフタ、びらんが主であることから、CGD 腸炎においても病初期においては同様の病態を示している可能性が示唆された。治療に関しては、ステロイドやメサラジンが主であり、一部、免疫抑制剤の使用された例もあるが大方同様の薬剤で治療されていた。ただ、NEMO 腸炎では TNF α 抗体 (レミケード) を用いた例で著効を認めしたが、CGD においては NEMO 異常症より免疫系低下が強いため、時に TNF α 抗体の使用が重篤な感染症を誘発することがあり、我が国においては使用経験がなかった。逆に、CGD 腸炎では造血幹細胞移植を行う場合があるが、NEMO 異常症では症例数も少ないこともあるが、その数は稀であった。

D. 結論

全国の NEMO 異常症ならびに CGD 腸炎に関する実態調査を行い、炎症性腸炎発症例の比較・検討を行った。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Namba T, Mochizuki H, Suzuki R, Onodera M, Yamaguchi M, Namiki H, Shioda S, Seki T: Time-lapse imaging reveals symmetric division of GFAP-expressing progenitors for expansion of postnatal dentate granule neurons. *PLoS ONE* 6: e25303, 2011.
 - 2) Kawahara M, Chen J, Sogo T, Teng J, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Ueda H, Nagamune T: Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using antibody/ c-Mpl chimera. *Cytokine* 55: 402-408, 2011.
 - 3) Maeyama Y, Otsu M, Kubo S, Yamano T, Iimura Y, Onodera M, Kondo S, Sakiyama Y, Ariga T: Intracellular estrogen receptor-binding fragment associated antigen 9 exerts in vivo tumor promoting effects via its coiled-coil region. *Int J Oncology* 39: 41-49, 2011.
 - 4) Fujisawa Y, Nabekura T, Kawachi Y, Otsuka F, Onodera M: Enforced ROR(γ)t expression in haematopoietic stem cells increases regulatory T cell number, which reduces immunoreactivity and attenuates hypersensitivity in vivo. *Asian Pac J Allergy Immunol* 29: 86-93, 2011.
 - 5) Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayam N, Eto K, Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, S Hidehiko: Heterozygous *ITGA2B* R995W mutation inducing a constitutive activation of the α IIb β 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood* 117: 5479-5484, 2011.
 - 6) Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, Baba N, Ueda T, Matsuda S, Takeuchi K, Onodera M, Nakanuma Y, Yamato M, Yamamoto M, Hyodo I, Shoda J: Potent *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Activity of Sorafenib Against Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma Cells. *J Gastroenterol* 46: 779-789, 2011.
 - 7) Kawai T, Kusakabe H, Seki A, Kobayashi S, Onodera M: Osteomyelitis due to triethoprim/sulfamethoxazole-resistant *Edwardsiella tarda* infection in a patient with X-linked chronic granulomatous disease. *Infection* 39: 171-173, 2011
2. 学会発表
- 1) 小野寺雅史, How do we advance stem cell gene therapy in Japan? 第14回日本遺伝子治療学会総会, 札幌, 2008年6月12-14日.
 - 2) 小野寺雅史, 原発性免疫不全症に対する遺伝子治療, 第7回遺伝子治療シンポジウム, 大阪, 2009年1月30日.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（難病疾患克服研究事業）

分担研究報告書

外胚葉形成不全免疫不全症候群（XL-EDA-ID）の解析

研究分担者 小林 正夫（広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学）

研究協力者 唐川 修平（広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学）

岡田 賢（広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学）

研究要旨 X連鎖性外胚葉形成不全免疫不全症候群（XL-EDA-ID）は皮膚，汗腺，歯などの外胚葉の異常に免疫不全を合併するまれな疾患であり，NF- κ B の活性に重要な役割を担う NEMO に異常が認められる。XL-EDA-ID の患者において *IKBK*G のイントロン 6 の領域にヘミ接合性新規遺伝子変異 769-1 G>C を同定した。本変異は，splice-acceptor site に存在し，患者ではスプライス異常があることが予想された。mRNA の検討では，異常なスプライシングを受けた NEMO mRNA と，正常な NEMO mRNA の両方が検出された。患者白血球における NEMO 蛋白の発現低下，炎症性サイトカイン産生低下，メモリーB細胞の低下，麻疹ウイルスに対する反応性の低下と抗体産生不全が認められたことから，NEMO 蛋白の発現量低下により XL-EDA-ID を発症したことが推測された。

A. 研究目的

X連鎖性外胚葉形成不全免疫不全症候群（XL-EDA-ID）は，歯牙欠損，錐体状歯，粗な頭髪，発汗低下などの外胚葉形成不全と免疫不全を呈するまれな疾患である。本症の原因として，NF- κ B の活性に重要な役割を演じている NEMO の責任遺伝子である *IKBK*G に異常があることが判明している。

本研究では，*IKBK*G に新規遺伝子変異を認めた XL-EDA-ID 患者の解析を行い，本新規遺伝子異常の機能的異常を明らかにすることから，XL-EDA-ID の病態解明を目的とする。

B. 研究方法

1) 症例

症例は12歳の男児で，幼少期より化膿性髄膜炎3回，急性膀胱炎2回，化膿性膝関節炎，骨髄炎，蜂窩織炎など重症細菌性感染を繰り返し発症していた。これらの起因菌の多くは肺炎球菌であった。また麻疹ワクチン接種後にもかかわらず麻疹に罹患した。軽度の知能低下（IQ93）を呈していた。永久歯が7本欠損しており一部が錐体状歯であったが，頭髪，爪，汗腺などに異常は認めなかった。

白血球数やその分画またリンパ球分画に異常はなく，IgGなどの免疫グロブリンや

補体にも異常は認めなかった。IgG2 および IgG4 は軽度低下していた。肺炎球菌特異的抗体および麻疹抗体はそれぞれ感染の既往があるにもかかわらず陰性であった。さらにワクチン接種の既往にもかかわらずポリオ、ムンプス、日本脳炎の特異抗体は産生されていなかった。しかし風疹、サイトメガロ、EB、水痘帯状疱疹ウイルスなどに対する抗体は正常に上昇していた。PHA 幼若化試験は正常であったがNK細胞活性は6%と低下していた。

2) シークエンス

患者末梢血より cDNA を抽出し、*IKBK*G をシークエンスした。cDNA の解析でエクソン 7 におけるスプライシングの異常が疑われたため、患者末梢血より DNA を抽出し、エクソン 7 とその近傍のイントロンをシークエンスした。さらにエクソン 5 と 8 にプライマーを設定し cDNA を PCR で増幅後 pGEM easy Vector に導入しシークエンスした。

3) フローサイトメトリー

細胞内 NEMO タンパクおよび CD19⁺CD27⁺メモリーB細胞の測定を行った。さらに CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) で染色したリンパ球を measles lysate とともに培養し、細胞分裂回数を測定することで、麻疹に対するリンパ球の反応性を解析した。

4) サイトカイン産生能

患者末梢血から CD3 陽性細胞および CD14 陽性細胞をビーズ法にて純化し、それぞれ IFN- γ および IL-12 刺激で 48 時間培養後、それぞれの上清の TNF- α 、IFN- γ を Luminex で測定した。

5) 倫理面への配慮

本研究は患者検体を用いて解析を施行す

るので、検体採取時の苦痛には十分な配慮を行う。また、遺伝子解析については各種指針に則り、患者個人情報保護について十分な配慮を行う。本研究は広島大学倫理審査委員会の承認を得て行われたものである。

C. 研究結果

1) シークエンス

DNA 解析により、エクソン 7 のスプライスアクセプターサイトにヘミ接合性の新規遺伝子変異 769-1 G>C を同定した (図 1)。cDNA の解析にて、本変異によりスプライシングに異常がおこると考えられた (図 2)。同変異が mRNA に及ぼす影響を調べるため、PCR で増幅した cDNA をベクターに導入しシークエンスをした。解析した 24 クローンのうち 7 クローン (30%) は WT NEMO mRNA であり、17 クローンは種々の異常スプライシング由来の mutant NEMO mRNA であった (図 3)。この比率は同じ検体を PHA および IL-2 で 4 日間刺激した後におこなった解析では大きな変化はなかったが、異なる日に採血を行った検体および感染合併時に採血した検体では大きく変化し、WT の比率は 5-30% の間で変化していた。これらの結果から、患者では mutant NEMO mRNA だけでなく WT NEMO mRNA が存在しており、その比率は一定ではないことが示された。

2) フローサイトメトリー

患者において CD27⁺メモリーB細胞の減少がみられた。また CD3, 4, 8, 19, 14, 56 陽性細胞における細胞内 NEMO タンパクの発現低下を認めた。また CFSE assay によると患者の CD4⁺T 細胞の麻疹に対する分裂能は低下していたが、風疹に対しては保たれ

ていた。(図4)。

3) サイトカイン産生能

患者 CD3⁺細胞および CD14⁺細胞はそれぞれ TNF- α および IFN- γ の産生能が低下していた。

D. 考察

自験例では少ないながらも WT NEMO mRNA が存在することが確認された。XL-EDA-ID は *IKBK*G 遺伝子の変異部位によってその表現型が異なることが明らかになっている。自験例は splicing の異常により mutant NEMO が産生されるが、一部は leakage through splice-site mutation によって WT NEMO が産生されると考えられた。XL-EDA-ID を発症した *IKBK*G の splice-site mutation の報告はいまのところ2例認める。1例は家族発症で変異は 768+5 G>A であり、exon4-6 の欠失のため胎生致死や乳児期早期の死亡をおこしている。もう1例は 1056-1 G>A であり、自験例と同様に WT の NEMO も存在している。興味深いことにその症例では明らかな外胚葉形成不全がなく、免疫不全のみ呈していた。我々の検討結果から、本症例は NEMO の量的低下により XL-EDA-ID を発症していることが推測され興味深い症例と考えられた。

自験例では T リンパ球の IL-12 刺激による IFN- γ 産生能および単球の IFN- γ 刺激による TNF- α 産生能がともに低下していた。これは MSMD の末梢血単核球を用いた検討結果に類似していた。自験例では臨床症状として mycobacterium のような細胞内寄生菌に対する易感染性は呈していないが、XL-EDA-ID の約4割で Mycobacterium の感

染歴を有することが知られており、注意深い観察が必要と考えられた。

自験例では麻疹の予防接種を受けた後に麻疹に罹患していた。さらに、麻疹に罹患したにも関わらず、麻疹特異的抗体の産生が認められなかった。しかし風疹特異的抗体の産生は正常に認められた。そのため、患者では麻疹に対する特異的な免疫反応の異常が存在すると考えられた。今回の CFSE assay では、CD4⁺T 細胞の麻疹に対する反応性の低下が示されたが、この所見は麻疹に対する抗体産生障害の一側面を示していると考えられた。

E. 結論

EDA-ID の新規遺伝子変異を同定した。NEMO の量的な低下により EDA-ID を発症していると推測された。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 学会発表

Mizoguchi Y, Nakamura K, Karakawa S, Okada S, Kawaguchi H, Kobayashi M: Clinical and genetic characteristics of patients with severe congenital neutropenia in Japan. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, December 10-13, 2011

Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Mochizuki S, Yamamoto S, Matsuzaka E, Hanada S, Ohnishi R, Tani K, Eto K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K:

Suppressed Neutrophil Development in Hematopoiesis of Induced Pluripotent Stem Cells Derived From a Severe Congenital Neutropenia Patient with ELA2 Mutation. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, CA, December 10-13, 2011.

Hanada I, Terui K, Toki T, Kudo K, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Sugita K, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Ito E: JAK2 mutations and CRLF2 rearrangements in Down Syndrome-Associated Acute Lymphoblastic Leukemia in Japan. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, CA, December 10-13, 2011.

岡田 賢, 小林正夫, Luyan Liu, Xiao-Fei Kong, Alexandra Y. Kreins, Sophie Cypowyj, Laurent Abel, Capucine Picard, Stéphanie Boisson-Dupuis, Anne Puel, Jean-Laurent Casanova: 常染色体優性遺伝を呈する慢性皮膚粘膜カンジダ症の責任遺伝子の発見 -STAT1 機能獲得性変異による慢性皮膚粘膜カンジダ症- 第 39 回日本臨床免疫学会総会 2011 年 9 月 15-17 日

Tsumura M, Okada S, Sakai H, Nishikomori R, Yasunaga S, Ohtsubo M, Heike T, Nakahata T, Takihara Y, Kobayashi M: Identification of a novel type of AD-STAT1 deficiency with mutations in the SH2 domain 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月 14-16 日

2. 論文発表

Karakawa S, Okada S, Tsumura M, Mizoguchi Y, Ohno N, Yasunaga S, Ohtsubo M, Kawai T, Nishikomori R, Sakaguchi T, Takihara Y, Kobayashi M: Decreased Expression in Nuclear Factor- κ B Essential Modulator Due to a Novel Splice-Site Mutation Causes X-linked Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 31:762-772, 2011

Liu L, Okada S, Kong XF, Kreins AY, Cypowyj S, Abhyankar A, Toubiana J, Itan Y, Audry M, Nitschke P, Masson C, Toth B, Flatot J, Migaud M, Chrabieh M, Kochetkov T, Bolze A, Borghesi A, Toulon A, Hiller J, Eyerich S, Eyerich K, Gulácsy V, Chernyshova L, Chernyshov V, Bondarenko A, Grimaldo RM, Blancas-Galicia L, Beas IM, Roesler J, Magdorf K, Engelhard D, Thumerelle C, Burgel PR, Hoernes M, Drexel B, Seger R, Kusuma T, Jansson AF, Sawalle-Belohradsky J, Belohradsky B, Jouanguy E, Bustamante J, Bué M, Karin N, Wildbaum G, Bodemer C, Lortholary O, Fischer A, Blanche S, Al-Muhsen S, Reichenbach J, Kobayashi M, Rosales FE, Lozano CT, Kilic SS, Oleastro M, Etzioni A, Traidl-Hoffmann C, Renner ED, Abel L, Picard C, Maródi L, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL: Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med.* 208:1635-48, 2011

Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhashi K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T: Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan. *J Clin Immunol.* 31:309-14, 2011.

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 κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol.* 128:223-225. e2, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

参考文献

Doffinger R, Smahi A, Bessia C, et al. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF- κ B signaling. *Nat Genet.* 2001;27:277-285.

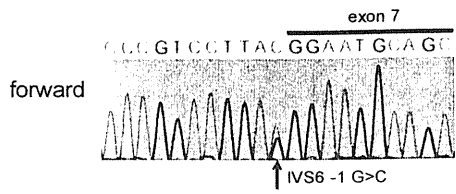
Fusco F, Pescatore A, Bal E, et al. Alterations of the IKBKG locus and diseases: an update and a report of 13 novel mutations. *Hum Mutat.* 2008;29:595-604.

Orange JS, Levy O, Brodeur SR, et al. Human nuclear factor kappa B essential modulator mutation can result in immunodeficiency without ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114:650-656.

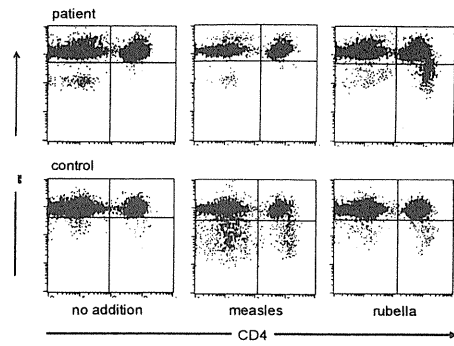
Nishikomori R, Akutagawa H, Maruyama K, et al. X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human T-cell development and/or survival. *Blood.* 2004;103:4565-4572.

Orstavik KH, Kristiansen M, Knudsen GP, et al. Novel splicing mutation in the NEMO (IKK- γ) gene with severe immunodeficiency and heterogeneity of X-chromosome inactivation. *Am J Med Genet A.* 2006;140:31-39.

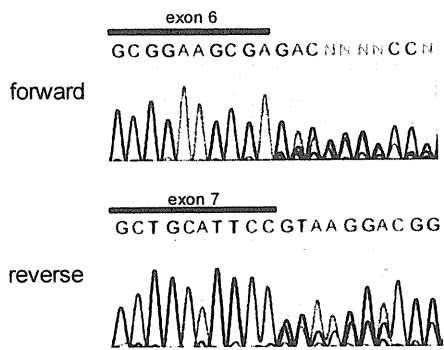
Eric P. Hansen, Linda Monaco-Shawver et al. Hypomorphic NEMO mutation database and reconstitution system identifies phenotypic and immunologic diversity. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122:1169-1177



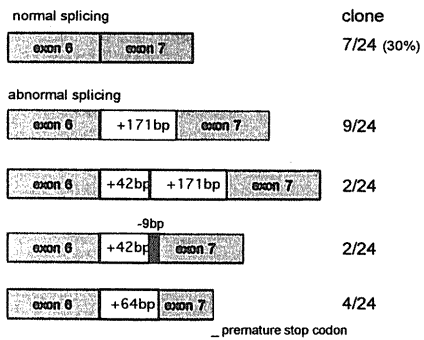
☒ 1



☒ 4



☒ 2



☒ 3

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

慢性肉芽腫症：食細胞の殺菌能と炎症制御の異常：症例・トピックスからの考察

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

研究要旨

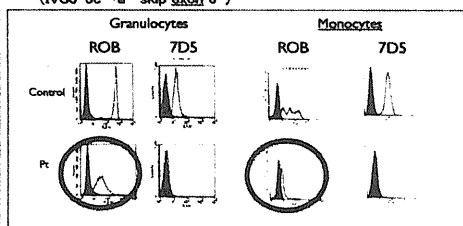
慢性肉芽腫症患者には、易感染性と炎症制御の異常の両面が存在する。どのような活性酸素の産生機構異常が炎症制御に関連するか、経験した症例と関連する論文から考察した。

1. 研究目的

昨年報告したスプライスの異常の X-CGD 症例は重症の炎症性腸炎を呈したが、好中球における活性酸素の産生をわずかに認めた症例であった。この症例では、単球の活性酸素の産生は好中球で認めた様に微量な産生を認めなかったため、炎症の制御には単球における活性酸素の重要性の可能性が示唆された。このため、殺菌作用だけではなく、炎症の制御にも食細胞による活性酸素産生が不可欠であるが、実際には CGD 症例ごとの臨床像は多様である。そこで、炎症性腸炎と活性酸素の産生機構異常に焦点を絞り、以下の点について考察した。

症例：9歳 男児

生後8ヶ月 頸部リンパ節炎
10ヶ月 肛門周囲膿瘍、肝膿瘍に罹患。強力な抗菌治療で治療。
→ 精密の結果 X-CGD と診断した。
(IVS5-3c→a skip exon 6)



以後、抗菌剤の予防内服・IFN- γ 投与などにより比較的良好に経過。
活性酸素産生：好中球は微量の産生、単球は欠如

2. 研究方法

- 1) 炎症制御に重要な活性酸素の産生：
 - ・活性酸素の産生部位 細胞内 v.s. 細胞外
- 2) 産生する食細胞の種類：
 - ・好中球 v.s. 単球 v.s. マクロファージ

3) 量的な必要性：

殺菌作用 v.s. 炎症の制御

3. 研究結果

1) p40-phox 欠損による新たな病型の報告

Blood, 114: 3309-3315, 2009 に炎症性腸炎を呈した幼児が報告され、解析の結果、NADPH-oxidases 構成蛋白の一つである p40-phox の欠陥が病因とされた。CGD の新たな病型として注目されたが、本症例では易感染性は明瞭ではなく、重症の炎症性腸炎が主症状である。食細胞の活性酸素産生能を検索した所、細胞内の活性酸素産生能が異常であり、細胞外での活性酸素は正常である事が判明した。この事から、細胞内の活性酸素産生が炎症の制御に重要である事が示唆される。

2) モザイク状態を呈した X-CGD 症例からの考察

以下の 2 症例を経験した。

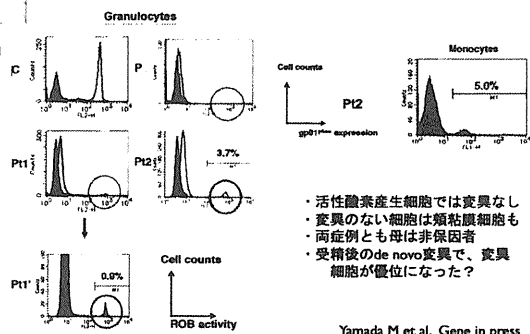
症例 1。1 歳ころより化膿性リンパ節炎、肛門周囲膿瘍を繰り返し、X-CGD と診断。7 歳時に誤って、BCG 接種を受け、INH の予防内服を 6 ヶ月実施。12 歳時、肝膿瘍発症。内科的治療に抵抗、外科的介入で治療。組織にて肉芽腫の形成あり。

症例 2。BCG 接種後のリンパ節炎で X-CGD と診断。2 歳時に遷延性の下痢と肝機能障害を呈し、ステロイドに反応した。

2 症例に共通したものとして母親は非保因者である事が示唆された。

活性酸素産生状況を検索した所、少数であるが2症例ともに正常量の活性酸素を産生する細胞群が検出された。その細胞は患者本人の細胞であり、病的変異が検出されなかった。

2症例ともにROB産生細胞を少数認めた



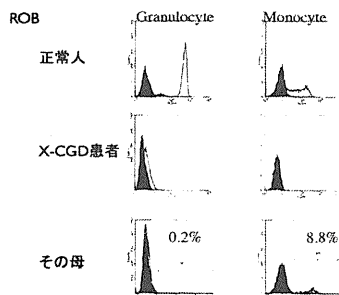
両患者の頬粘膜での検索でもごく少量であるが、変異を持たない細胞がある事、また、両症例の母が何れも非保因者である事から、これらの症例では受精後に一部の細胞群に病的変異が *de novo* で生じ、何らかの理由でその変異を持った細胞が優位となったと推測した。2症例にも易感染性だけでなく、炎症制御異常も認めた。この事から、感染が防御できない程度の正常細胞の割合では炎症の制御も正常にできない事が示唆された。

3) 偏った X 染色体不活化を呈した保因者の検出。

ある X-CGD 症例の母を検査した所、保因者で活性酸素産生能を有する細胞が極めて少ない事が示された。以下に示す様に活性酸素産生細胞の割合は好中球では 0.2%、単球では 8.8%であった。この母は臨床的には全く正常であり、易感染性を示さず、炎症の制御も正常であった。

偏ったX染色体不活化保因者の経験

易感染性や、炎症性腸疾患等の既往なし
活性酸素産生陽性細胞の比率は変動したが、
単球は常に5%以上



正常な細胞が 5%以上であれば CGD としての症状は示さない事がこれまでの研究で示されてきている。この保因者の検査から、炎症制御には単球の活性酸素産生が重要である事が示唆された。昨年の炎症性腸炎を合併した X-CGD 症例で、単球の活性酸素がほとんどなかった機序の仮説を支持する事例と考えられる。

4) CYBB 変異が原因の MSMD 症例の報告

MSMD (Mendelian susceptibility to mycobacterial disease)を呈し、その病因が *CYBB* 遺伝子変異に起因する 2 家系 7 症例が *Nature Immunol.* 12, 213-222, 2011 に報告された。MSMD は通常の細菌感染に対する易感染性はなく、抗酸菌に特異的に易感染性を示す病態である。これらの症例に炎症の制御異常が存在したかどうかの記載はないが、特徴的病態として活性酸素の産生が好中球、単球ではほぼ正常であり、単球を *in vitro* でマクロファージに分化させると活性酸素産生が欠如する事が示された。この症例に炎症の制御異常がないとすると、マクロファージに活性酸素障害があっても炎症の制御が正常におこる事が示唆される。これらの症例といわゆる非典型 CGD との本質的な差異は今後の課題である。