

201231019A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

平成24年度総括・分担研究報告書

研究代表者 原 寿郎

平成25年3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

平成24年度総括・分担研究報告書

研究代表者 原 寿郎

平成25年3月

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

目 次

I	班員・研究協力者名簿	3
II	総括研究報告	7
	原 寿郎（九州大学大学院医学研究院成長発達医学教授）	
III	分担研究報告	
1.	原発性免疫不全症の年齢による特徴～XLA と CVID を中心に～	19
	石村匡崇 ¹⁾ 、高田英俊 ¹⁾ 、瀧本智仁 ¹⁾ 、土居岳彦 ¹⁾ 、今井耕輔 ^{2) 4)} 、金兼弘和 ³⁾ 、森尾友宏 ⁴⁾ 、 野々山恵章 ⁵⁾ 、宮脇利男 ³⁾ 、原 寿郎 ¹⁾	
	1) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学	
	2) 東京医科歯科大学大学院小児・周産期地域医療学	
	3) 富山大学大学院医学薬学研究部小児科学	
	4) 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学	
	5) 防衛医科大学校医学研究科小児科学	
2.	重症先天性好中球減少症の臨床及び遺伝的特徴に関する全国調査	25
	溝口洋子 ¹⁾ 、岡田 賢 ²⁾ 、唐川修平 ¹⁾ 、高田英俊 ³⁾ 、原 寿郎 ³⁾ 、小林正夫 ¹⁾	
	1) 広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学	
	2) 広島大学病院小児科	
	3) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学	
3.	フローサイトメトリーによる p47phox/p67phox 解析と慢性肉芽腫症の病型診断	29
	和田泰三、村岡正裕、東馬智子、谷内江昭宏 金沢大学医薬保健研究域医学系小児科	
4.	蛍光プローブを用いた好中球活性酸素産生能測定法の比較	34
	布井博幸 ¹⁾ 、井上義雄 ²⁾ 、末松 茂 ²⁾ 、岡田俊明 ²⁾ 、津田雅弘 ²⁾ 、奥山虎之 ³⁾ 、西村豊樹 ¹⁾ 、水上智之 ⁴⁾	
	1) 宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学	
	2) 株式会社エスアールエル	
	3) 成育医療センター検査部	
	4) 国立病院機構熊本再春荘病院小児科	

5. 家族性血球貪食性リンパ組織球症の診断と病態に関する研究 38
八角高裕¹⁾、堀 雅之¹⁾、井澤和司¹⁾、西小森隆太¹⁾、小原 収^{2) 3)}、平家俊男¹⁾
1) 京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座発達小児科学
2) 公益財団法人かずさDNA研究所
3) 理化学研究所横浜研究所免疫アレルギー科学総合研究センター

6. STAT 分子のチロシンリン酸化検出による高 IgE 症候群の迅速診断法の開発 42
峯岸克行
徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター病態プロテオゲノム

7. 免疫不全症遺伝子解析状況報告及び新規解析パイプライン構築状況について 45
小原 収
公益財団法人かずさ DNA 研究所

8. PIDJ データベースに今年度登録された原発性免疫不全症患者 431 例の疫学的解析および 10 カラー FACS を用いたリンパ球表面抗原分析法の開発について 50
今井耕輔
東京医科歯科大学大学院小児・周産期地域医療学講座

9. Exome 解析による原発性免疫不全症原因遺伝子の探索 57
野々山恵章
防衛医科大学校医学研究科小児科学

10. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた先天性免疫不全症の病態解析 61
中畑龍俊
京都大学 iPS 細胞研究所

11. X 染色体不活化異常により発症した Wiskott-Aldrich 症候群の女児例 66
瀧本智仁¹⁾、高田英俊¹⁾、石村匡崇¹⁾、土居岳彦¹⁾、森尾友宏²⁾、原 寿郎¹⁾
1) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学
2) 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学

12. 機能獲得型の *de novo* 新奇変異を *STAT1* の DNA-binding domain に認めた慢性皮膚粘膜カンジダ症の病態解析 73
竹崎俊一郎¹⁾、山田雅文¹⁾、加藤政彦²⁾、朴 明子³⁾、丸山健一⁴⁾、山崎康博¹⁾、千田奈津子⁵⁾、小原 収⁶⁾、小林一郎¹⁾、有賀 正¹⁾
1) 北海道大学大学院医学研究科小児科学
2) 群馬県立小児医療センターアレルギー感染免疫呼吸器科
3) 群馬県立小児医療センター血液腫瘍科
4) 群馬県立小児医療センター腎臓内科
5) 北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座小児障害者歯科学
6) 公益財団法人かずさ DNA 研究所
13. 原発性免疫不全症の病態解析 78
森尾友宏、満生紀子、高木正稔、水谷修紀
東京医科歯科大学大学院発生発達病態学
14. Hypomorphic *XIAP* 変異による X 連鎖低ガンマグロブリン血症における免疫学的特徴 . . . 83
西田直徳¹⁾、Yang Xi¹⁾、金兼弘和²⁾、宮脇利男¹⁾
1) 富山大学大学院医学薬学研究部小児科学
2) 富山大学附属病院小児科
15. X 連鎖リンパ増殖症候群 (X-linked lymphoproliferative syndrome: XLP) type 1 の 1 家系 . 86
横田俊平
横浜市立大学医学研究科小児科学
16. 免疫不全症の QOL 調査、移植研究 89
小島勢二¹⁾、村松秀城²⁾
1) 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学
2) 名古屋大学医学部附属病院小児科
17. WASP と IL-10 受容体遺伝子変異を認めた乳児期発症炎症性腸疾患 2 症例の臨床的検討 . . . 93
笹原洋二
東北大学大学院医学系研究科小児病態学
18. TIR ドメイン含有アダプター分子 TRAM の新規機能の解明 97
近藤直実、大西秀典、加藤善一郎、川本典生、木村 豪、久保田一生、山本崇裕
岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学

19. 死細胞に対する急性好中球性炎症反応における Mincl、補体、ATP の関与 102

河野 肇¹⁾、柳田たみ子¹⁾、高山真希¹⁾、菊地弘敏¹⁾、Kenneth L Rock²⁾、Zubin Patel²⁾

1) 帝京大学医学部内科学講座

2) UMass Med School

参考資料

IV 研究成果の刊行に関する一覧 135

I 班員・研究協力者名簿

原発性免疫不全症候群に関する調査研究班 班員・研究協力者名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	原 寿郎	九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野	教 授
研究分担者	宮脇 利男	富山大学大学院医学薬学研究部小児科学	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
	野々山恵章	防衛医科大学校医学研究科小児科学	教 授
	森尾 友宏	東京医科歯科大学大学院発達病態小児科学分野	准教授
	今井 耕輔	東京医科歯科大学大学院小児・周産期地域医療学	寄付講座准教授
	近藤 直実	岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学分野	教 授
	小島 勢二	名古屋大学大学院発育・加齢医学講座小児科学	教 授
	谷内江昭宏	金沢大学大学院医学系研究科血管発生発達病態学	教 授
	平家 俊男	京都大学大学院医学研究科小児科学	教 授
	小林 正夫	広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学	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
	横田 俊平	横浜市立大学大学院医学研究科発生成育小児医療学	教 授
	中畑 龍俊	京都大学iPS細胞研究所	特定拠点教授
	峯岸 克行	徳島大学疾患プロテオーム研究センター病態プロテオーム分野	教 授
	笹原 洋二	東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野	講 師
	河野 肇	帝京大学医学部内科	准教授
小原 収	公益財団法人かずさDNA研究所ヒトゲノム研究部門生物物理学	副所長	
研究協力者	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
	石川 文彦	理化学研究所免疫アレルギー-科学総合研究センターヒト疾患モデル研究ユニット	ユニットリーダー
	岩田 力	東京家政大学家政学部児童学科	教 授
	赤城 邦彦	神奈川県立こども医療センター	母子保健室長
	大石 勉	埼玉県立小児医療センター	保健発達部長
	久間木 悟	手稲溪仁会病院小児科	主任医長
	河合 利尚	国立成育医療センター研究所遺伝子診断治療研究室	室 長
	小林 法元	信州大学医学部小児医学講座	助 教
事務局	高田 英俊	九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1 T E L 092-642-5421, F A X 092-642-5435 e-mail takadah@pediatr.med.kyushu-u.ac.jp	准教授
経理事務担当者	弓場 秀和	九州大学医系学部等財務課経理第一係 〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1 T E L 092-642-6006, F A X 092-642-6022 e-mail ijzkeiril@jimu.kyushu-u.ac.jp	係 長

Ⅱ 総括研究報告

総括研究報告

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

研究代表者 原 寿郎

（九州大学大学院成長発達医学分野教授）

研究要旨

本調査研究班は、原発性免疫不全症候群の患者 QOL と医療水準の向上に貢献するため以下の研究を重点的に行った。

(1) 全国調査

平成 20 年度に行った原発性免疫不全症候群の全国疫学調査結果より、今回、原発性免疫不全症候群成人患者の臨床像を明らかにした。また先天性好中球減少症の全国調査により、国内患者の臨床像、遺伝的背景を初めて明らかにした。

(2) 新規診断法、迅速診断法の開発

TYK2 欠損や SH2 領域の遺伝子変異による STAT3-DN 高 IgE 症候群の迅速診断法を樹立した。また、これまで開発してきた FHL の迅速診断結果を用いて国内症例 17 例の FHL 患者の臨床像の特徴を明らかにした。

(3) Primary Immunodeficiency Database in Japan プロジェクトへの登録、遺伝子解析

国内の原発性免疫不全症候群患者の on line での登録、主治医からの診断治療に関する相談受付、遺伝子解析を、理化学研究所、かずさ DNA 研究所と共同で継続している。

(4) 責任遺伝子の同定や病態の解明

成人発症 B 細胞単独欠損症、CVID、および NKT 細胞欠損と高 IgM 血症・抗体産生不全を特徴とする常染色体優性遺伝形式の新規原発性免疫不全症候群の責任遺伝子を解明した。女性 WAS の発症機構、新生児期から炎症性腸疾患をおこす IL10RA 欠損症の特徴、慢性皮膚粘膜カンジダ症の変異 STAT1 蛋白の機能異常の特徴、IKZF1 遺伝子異常による B・NK 細胞欠損患者の T 細胞性白血病発症メカニズム、TRAM 欠損による自然免疫不全症のおこる分子遺伝学的機序などを明らかにした。

(5) 治療ガイドラインの作成と新規治療法の開発

重症先天性好中球減少症の造血幹細胞移植ガイドラインを作成中である。重症複合免疫不全症に対して Flu+LPAM の前処置で、液性免疫不全症を残さずに安全に移植できることを明らかにした。NEMO 欠損症の難治性腸炎に対して抗 TNF- α 抗体が有効であることを明らかにした。

(6) 患者家族や医療者への継続的情報提供

患者向け概説書を作成し医療機関に配布し、ホームページ上に公開した。患者や主治医の登録は継続して on line で行い、最新の情報を研究会、ホームページなどで医師、患者家族に提供している。また患者家族会との連携を深め、講演会・相談会を実施した。

分担研究者

宮脇 利男・富山大学大学院医学薬学研究部小児科学教授
有賀 正・北海道大学大学院医学研究科小児科学分野教授
野々山恵章・防衛医科大学校医学研究科小児科学教授
森尾 友宏・東京医科歯科大学大学院発達病態小児科学分野准教授
今井 耕輔・東京医科歯科大学大学院小児・周産期地域医療学准教授
近藤 直実・岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学分野教授
小島 勢二・名古屋大学大学院発育・加齢医学講座小児科学教授
谷内江昭宏・金沢大学大学院医学系研究科血管発生発達病態学教授
平家 俊男・京都大学大学院医学研究科小児科学教授
小林 正夫・広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学教授
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
横田 俊平・横浜市立大学大学院医学研究科発生成育小児医療学教授
中畑 龍俊・京都大学 iPS 細胞研究所教授
峯岸 克行・徳島大学疾患プロテオーム研究センター病態プロテオーム分野教授
笹原 洋二・東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野講師
河野 肇・帝京大学医学部内科講師
小原 収・公益財団法人かずさ DNA 研究所ヒトゲノム研究部門生物物理学副所長

研究協力者

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
石川 文彦・理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センターヒト疾患モデル研究ユニットユニットリーダー
岩田 力・東京家政大学家政学部児童学科教授
赤城 邦彦・神奈川県立こども医療センター母子保健室長
大石 勉・埼玉県立小児医療センター保健発達部長
久間木 悟・手稲溪仁会病院小児科主任医長
河合 利尚・国立成育医療センター研究所遺伝子診断治療研究室室長
小林 法元・信州大学医学部小児医学講座助教

I. 研究の目的

原発性免疫不全症候群には多くの疾患が含まれ、専門医が不足し適切な医療を受けられない場合がある。本研究班は、on lineでの患者登録などによる患者実態の把握、診断や治療に関する患者や主治医からの相談に対する専門的アドバイスを含む情報提供、診断スクリーニング法の開発や遺伝子解析システムの整備、最新の分子遺伝学的・免疫学的手法を駆使した病因・病態解析、治療ガイドラインの作成、治療法の改良、遺伝子治療を含めた新規治療法の開発、等を介して原発性免疫不全症候群患者 QOL と医療水準の向上に貢献することを目的としている。

平成 20 年度に行った全国疫学調査については、臨床経過を詳細に検討し、診断や治療における問題点、発がんや自己免疫疾患、内分泌疾患、生ワクチン接種による重症副反応などの合併症の予防法を検討する。これらの結果を基に、日常生活指導等により合併症を予防し、QOL を向上させる。

原発性免疫不全症候群は、患者の長期的予後や QOL のためにも早期診断が重要であり、多くの疾患で各々の疾患の病態を基盤とした迅速診断が可能となるよう研究を継続する。また乾燥濾紙血（ガスリー血）中の TREC_s 測定による重症複合型免疫不全症、KREC_s 測定による無γグロブリン血症の新生児スクリーニング法は極めて実用的であり、海外では実際に全新生児を対象として行われている地域もある。平成 24 年度以降、具体的に一部の地域でこの新生児スクリーニングを実施できるよう整備していく。

原因や病態を解明することは、本研究の重要なテーマである。エキソーム解析では技術的な進歩を背景として、解析精度が上昇しており、積極的に活用していく。分子遺伝学的解析に加えてヒト化マウスを用いて、候補遺伝子の機能的な解析を *in vivo* で行う。ヒトの疾患から明らかになったことを基として、そのノックイン

マウスやヒト化マウスを作成し、病態解明に活用する。また、iPS 細胞を作成して病態解析を行い、治療への応用に向けた研究を行うとともに、病態を基盤とした創薬研究を行う。

造血幹細胞移植については、既に作成した 4 疾患の造血幹細胞移植治療ガイドラインの成績調査を継続し、移植法の改良や適応拡大を検討する。他の疾患についても治療ガイドラインを作成し公開していく。

新規治療法の開発では、遺伝子修復法、タンパク治療法、iPS 細胞を用いた遺伝子治療に関し基礎研究を行う。重症複合免疫不全症への遺伝子治療は安全性、有効性が明らかになりつつあり、造血幹細胞移植が困難なドナーのいない患者、感染を合併した患者に対する治療として、ボストン小児病院 David Williams 教授に協力を依頼し、遺伝子治療の臨床研究を推進するための準備を行う。

患者家族会と交流し患者家族への教育を行い、主治医との on line での相談受付や情報提供をこれまで同様継続する。患者向け日常生活マニュアル、医療従事者用診断治療概説書の作成により患者 QOL や医療水準を向上させる。患者への情報提供の新たな方法の確立にも取り組む。

II. 研究方法

本調査研究では、以下の重点目標を掲げ、国際的動向や国内でのこれまでの調査結果に基づいて、我が国の背景をふまえた研究を行い、患者・家族へ最善の治療の提供し、QOL の向上に寄与したい。

(1). 疫学調査研究:平成 20-23 年度に行った全国疫学調査結果の解析を継続し、種々の観点から解析し、生活習慣や治療方針と治療成績や合併症との関連などを解析する。予防接種の副反応例も抽出し解析する。またホームページによる患者二次登録を推進し、IT を活用したデータベースの構築を推進する。

(2). **新規診断法、迅速診断法の開発**：これまで各疾患の専門施設が病態の特徴を利用した簡易スクリーニング法を開発してきた。フローサイトメーター、定量的 PCR 法などを駆使して迅速診断法をさらに開発する。TREC/KREC 測定による新生児マススクリーニングについては、実施後に予想される問題点などを再検討し、実際に応用できるように行政との調整を行う。

(3). **Primary Immunodeficiency Database in Japan (PIDJ) プロジェクトへの登録、遺伝子解析**：遺伝子解析は、当班研究の班員施設を介して on line で遺伝子解析依頼を受け付け、理化学研究所およびかずさ DNA 研究所で行う。また、細胞の蛋白発現についての解析も理化学研究所で行う。

(4). **責任遺伝子、発症機構、病態の解明**：これまで高 IgE 症候群や慢性皮膚粘膜カンジダ症などについて責任遺伝子を同定してきた。今後は、エキソーム解析や RNA Seq 法などを駆使した解析から新たな責任遺伝子を同定していく必要があると考えられる。その結果得られた候補遺伝子については、分子遺伝学的な解析に加えて、iPS 細胞やヒト化マウスの技術を取り入れた機能・病態解析を行う。

(5). **治療ガイドラインの作成と新規治療法の改良・開発**：これまで、重症複合免疫不全症、CGD、Wiskott- Aldrich 症候群、高 IgM 症候群に対する造血幹細胞移植ガイドライン、慢性肉芽腫症における BCG 感染症治療ガイドラインを作成しホームページに掲載した。これ以外にも原発性免疫不全症候群の実際の診療上の具体的な問題についても治療法や対策法を提示していく。

遺伝子治療研究では、安全性の高い新規ベクターと iPS 細胞やヒト化マウス疾患モデルを用いて、その有効性や安全性を確認する。タンパク治療法に関しても基礎研究を行う。遺伝子治療については、海外でベクターの改良が進んで

おり、国内外の情報を集め、具体的な実用化に向けた研究を継続する。

(6). **患者 QOL 調査と患者家族や医療者への継続的情報提供体制**：原発性免疫不全症候群の患者家族向け概説書を作製し配布する。診断基準、専門病院、遺伝子検査を行う施設、治療ガイドラインなどの情報をホームページに掲載し、最新の情報に更新する。患者家族会との講演会や相談会を実施する。Jeffrey Modell Foundationなどを参考に、患者家族への情報発信を目的とした World Primary Immunodeficiency Week に患者家族とともに参加するなど国際的な情報を基に、患者への情報提供の新たな方法の確立に取り組む。

III. 研究結果と考察

(1). 全国疫学調査の解析結果

近年、原発性免疫不全症候群の予後は改善し成人例も増加しており、2008 年の疫学調査では成人例(20 歳以上)は 263 名(28.4%)が報告された。これまで成人例に関する報告はわずかしかない。今回、疫学調査結果より成人例の追加解析を行い、特に成人例の多い X 連鎖無ガンマグロブリン血症(XLA)と分類不能型免疫不全症(CVID)を中心に解析した。成人と小児例を比較すると、XLA では成人例で気管支拡張症・難聴の合併が多くみられたが、CVID では悪性疾患、自己免疫疾患、気管支拡張症などの重篤な合併症の差はみられなかった。一方 CVID では 15 歳未満での発症例が重篤な合併症を持つ傾向にあったが、15 歳未満発症例では罹病期間が長く、合併症との関連が示唆された。QOL や予後に関わる気管支拡張症は XLA(11/133 例)と比べ CVID(20/92 例)で合併が多く($p=0.0038$)、罹患率は高率であった(CVID:0.016/年, XLA:0.007/年)。CVID では XLA と比べ診断から気管支拡張症発症までの期間が短く($p=0.04$)、抗体不全以外の免疫異常や診断の遅れが背景にあると考

えられた。

重症先天性好中球減少症 (SCN) に関して、全国より情報を収集した 46 人の SCN 症例について臨床像および遺伝的特徴を解析した。90%の患者が 1 歳前に診断されていた。初発時の臨床症状としては皮膚感染症が最も多く、診断後の罹患感染症で最多だったのは細菌性肺炎及び皮膚感染症であった。46 人中 29 人に行われた遺伝子解析では 76%に *ELANE* 変異を、12%に *HAX1* 変異を認めた。治療として G-CSF 製剤の定期投与を行っている例は全体の 56%であり、感染時のみ使用している例が 22%であった。46 人中 4 人が経過中 MDS (myelodysplastic syndrome)/AML (acute myeloid leukemia) に移行し、全例造血幹細胞移植が行われ、3 名は無病生存中である。治療抵抗性感染症の合併例もしくは G-CSF 製剤の長期投与を受けた 12 例 (26%) において、悪性転化前に造血幹細胞移植が行われており、全例生存していた。今後さらなる症例を蓄積し、移植適応症例の選別や移植前処置の確立が望まれた。

(2). 新規診断法、迅速診断法の開発

慢性肉芽腫症 (CGD) の迅速診断には、好中球の放出する活性酸素を正確に測定する方法が必要である。DCF-DA や DHR-123 といった蛍光プローブが使用されていたが、実際には、DCF-DA を用いた測定で、誤った結果がでることが経験されていた。今回、血液を溶血させる前に DCF-DA を加えると、蛍光強度が低下することを明らかにした。DHR-123 を用いた迅速診断法が安定した結果が得られることが確認された。

p47phox ならびに p67phox 欠損型 CGD の迅速診断法を確立した。これまで、gp91phox および p22phox 欠損型慢性肉芽腫症では、7D5 抗体を用いたフローサイトメトリー解析が欠損蛋白の同定に有用であるが、p47phox ならびに p67phox 欠損型 CGD では、比較的煩雑な Western blot 法を用いる必要があった。フローサイトメタ解

析で、p47phox 欠損型 CGD 患者の単球と B 細胞では、p67phox の発現は保たれていたが、p47phox 発現はほとんど認められなかった。一方、p67phox 欠損型では、p47phox の発現は認められたが、p67phox の発現は著しく減弱していた。

家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FLH) の責任分子である Perforin/ Munc13-4/ Syntaxin11/ Munc18-2 の蛋白発現解析と NK 細胞の脱顆粒機能評価を用いて HLH 症例に対する FHL の迅速診断を行い、これまで FHL2 患者 8 例と FHL3 患者 10 例を診断した。NK 活性や NK 脱顆粒機能は、急性期には二次性 HLH 症例でも一時的に低下している事が多い事が判明した。発病初期では、FHL 症例では全例が (好中球)/(リンパ球) 比が 1 以下であり、sIL-2R の上昇に比して ferritin 値は比較的低値に留まる事が明らかとなり、これはリンパ球の過剰活性化を基本病態とする FHL の特徴を反映しているものと思われた。FHL を含めた FHL 症例の治療方針の決定に参考となるものと考えられた。

高 IgE 症候群の原因として *STAT3* 遺伝子異常と *TYK2* 遺伝子異常をこれまで明らかにしてきた。今回、TYK2 欠損症の迅速診断法を開発した。TYK2 欠損症患者 CD4 陽性 T 細胞では、IL-6 刺激に対する STAT1 と STAT3 のチロシンリン酸化が障害されており、フローサイトメーターで迅速に検出できることが明らかになった。DNA 結合領域に変異を有する STAT3-DN 高 IgE 症候群においては、IL-6 や IL-10 刺激後の STAT1 と STAT3 のチロシンリン酸化は正常であったが、SH2 領域に変異を有する STAT3-DN 高 IgE 症候群においては、IL-6 や IL-10 刺激による STAT1 のチロシンリン酸化は正常であったが、STAT3 のチロシンリン酸化は著しく障害されていた。さらに TYK2 欠損症と異なり、IL-15、IL-21、IL-27 刺激によるチロシンリン酸化も著しく障害されていた。これらの結果は、高 IgE 症候群の迅速診断、病型分類の方法として有用であると考えら

れる。

(3). Primary Immunodeficiency Database in Japan (PIDJ) プロジェクトへの登録、遺伝子解析

患者登録はPIDJのネットワークを用いて行っており、診断に必要な遺伝子解析や生体試料の保存を理化学研究所、かずさDNA研究所と共同して行っており、全国から多数の症例が集積され、平成20年度から平成24年11月までに1747例が登録されている(参考資料1)。細胞表面マーカーの解析については、10カラーFACS解析を開発し、各T細胞亜分画、B細胞亜分画の迅速な解析を可能にした。

臨床情報から原因遺伝子の特定が難しい症例については、複数遺伝子の同時検査が強く求められており、それによる確定診断率の向上が強く望まれる。10遺伝子程度を一度に解析するために、次世代シーケンサーを用いた高精度遺伝子変異解析法を利用して、各症候群に特徴的な既知原因遺伝子解析パネルを設定し、卓上型次世代シーケンサー(ロシユ社、GS Junior)を用いた解析パイプライン化を進めた。即ちMSMD、自己炎症性疾患、CVID、SCIDの責任遺伝子パネルを設定し、それらの遺伝子群(およそ100-200 PCR増幅産物の解析)を効率的に構造解析するための次世代シーケンシングを用いた方法を導入した。

(4). 責任遺伝子の同定や病態の解明

1. ヒトiPS細胞からの血球分化系れを用いた原発性免疫不全症候群の病態解析、創薬研究

Chediak-東症候群(以下CHS)は血球の機能不全に伴う易感染性、細胞内巨大顆粒、眼皮膚型白皮症、神経変性等を特徴とする原発性免疫不全症候群であり、本邦の生存者は10例と稀である。責任遺伝子であるLYST(Lysosomal trafficking regulator)はリソソーム形成や細胞内小胞間輸送に関連することが知られており、70%のCHS患者がその変異を持つ。感染症や、血

球貪食症候群により生命を脅かされ、平均寿命は5歳前後とされ、唯一の根治療法は骨髄移植である。しかし、骨髄移植は飛躍的に生命予後を改善させるが、20歳前後より発症する神経症状とそれに伴う死亡を予防できないことが近年明らかになり、病態解明と創薬が必要とされている。今回我々は2名のCHS患者由来の繊維芽細胞からエピソーマルベクターを用いてiPS細胞を樹立した。好中球・単球分化を行い細胞内の巨大顆粒を確認した。神経分化を行い巨大顆粒の検出を試みている。機能解析も行い、最適な創薬スクリーニング系を確立することを目標としている。

2. エキソーム解析等による責任遺伝子の同定

理化学研究所、かずさDNA研究所では、責任遺伝子の同定に向けた方法として、エキソーム解析と並行して、血球成分の全RNA解析を次世代シーケンサーを用いて開始した。

昨年度はエキソーム解析によって慢性皮膚粘膜カンジダ症(CMC)の責任遺伝子STAT1(signal transducer and activator of transcription-1)を同定し、この疾患がSTAT1のgain-of-functionによるものであることを明らかにした。今年度も原因が解明されていない原発性免疫不全症候群に対してエキソーム解析を行い、成人発症のB細胞単独欠損症患者において、Fanconi貧血の疾患原因遺伝子であるFANCE遺伝子のcompound hetero変異を同定し、FANCE変異により原発性免疫不全症候群であるB細胞欠損症を呈することが明らかにした。また、分類不能型免疫不全症(CVID)のエキソーム解析では、BTK遺伝子変異、STAT1遺伝子変異、Fanconi貧血の責任遺伝子として知られるFANCA遺伝子に変異を認め、既報告疾患の非典型例と考えられ、機能解析をおこなっている。さらに、NKT細胞欠損と高IgM血症・抗体産生不全を特徴とする常染色体優性遺伝形式の新規原発性免疫不全症候群1家系を解析し、exome解析から原因遺伝子を同定した。

X連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) 患者の遺伝子解析結果を基に、今回 *XIAP* 遺伝子の Glu349del 変異を有する患者が低ガンマグロブリン血症を呈することを明らかにした。4例中3例にメモリーB細胞の減少を認め、CpG+CD40L 刺激による免疫グロブリン産生能の低下を認めた。Glu349del を有する患者は他の変異を有する *XIAP* 欠損症とは臨床的にも免疫学的にも異なると考えられ、Glu349del は日本人固有の X連鎖異常ガンマグロブリン血症の原因である可能性が示唆された。

3. 女性 Wiskott-Aldrich 症候群の発症メカニズムの解析

WAS 女児例を国内で初めて同定した。cDNA 解析では、*WASP* 遺伝子にナンセンス変異を認め、正常 *WASP* 遺伝子の発現を認めなかった。Genome DNA の解析では、heterozygous な *WASP* ナンセンス変異を認めた。Human androgen receptor gene の繰り返し配列多型を利用して X染色体不活化を解析したところ、血液・頬粘膜・爪のいずれにおいても父親由来の X染色体が完全に不活化していた。女性 WAS は本邦初であり、海外の報告を含めても2例目である。正常細胞は *WASP* 欠損細胞と比較して増殖優位性があるため女性には WAS は発症しにくいとされている。患児は X染色体不活化のほぼ完全な skewing により発症したものと考えられた。

4. IL-10 受容体異常症の同定

新生児期より肛門病変を呈し、乳児期発症の炎症性腸疾患とアレルギー症状を呈した IL-10 受容体異常症を明らかにした。患児の IL-10 受容体 A 遺伝子 (*IL10RA*) にコンパウンドヘテロ変異を認め、各々父母由来であるミスセンス変異とナンセンス変異を認めた。乳児期発症の炎症性腸疾患は臨床的に確定診断が困難な場合があり、治療方針の決定に苦慮する場合が多い。今後、IL-10 受容体異常症を含めた乳児期発症炎症性腸疾患の網羅的遺伝子診断系と病態解析

系の確立を進める。

5. 機能獲得型の de novo 新規変異を STAT1 の DNA-binding domain に認めた慢性皮膚粘膜カンジダ症の病態解析

これまで報告のない STAT1 DNA-binding domain (DBD) にヘテロの新規ミスセンス変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMC) 患者を明らかにした。CCD 変異例と同様に、脱リン酸化障害による機能獲得と、Th17 分化障害を有していた。STAT1 DBD の G384 を含むポケット領域と CCD が結合し構造変化することが STAT1 の脱リン酸化に重要であることが示唆されており、T385 もこの構造変化に重要であることが示唆される。STAT1 機能獲得が Th17 分化障害を来す詳細なメカニズムは不明だが、STAT1 を介する IFN- γ 、IFN- α 、IL27 シグナルの増強が関連している可能性が考えられる。

6. T細胞性白血病を発症した原発性免疫不全症候群における *IKZF1* 遺伝子変異の同定

IKZF1 変異マウスの表現型に酷似する、*IKZF1* germline 変異を有する B・NK細胞欠損の原発性免疫不全症候群の児が、*NOTCH1* somatic 変異を獲得し13歳時に T-ALL を発症した。*IKZF1* の DNA 結合 ZF 内に点変異を持つ変異マウス (IKAROS-Plastic) は、B・NK細胞欠損の免疫不全から脾腫を伴う preleukemic phase を経て、T細胞性白血病を発症し、その白血化には *NOTCH1* somatic 変異獲得を高頻度に伴うことが報告されている。本児は、*IKZF1* 変異マウスにおける T細胞白血化の病態を反映した世界初の臨床例である。

7. TIR ドメイン含有アダプター分子 TRAM の新規機能の解明

自然免疫に重要な役割を果たす MyD88 の機能を解析する過程で TRAM (TICAM2 とも呼ばれる) の新たな機能を見いだした。*In vitro* の機能解析により TRAM は MyD88 を細胞膜へと誘導する sorting adaptor であることが判明した。また、

IL-18 によるヘルパーI型 T 細胞からの INF- γ 産生誘導に TRAM が強く関与していることが明らかとなった。TRAM 欠損では、自然免疫機能の低下だけでなく IL-18 の機能減損に起因した T 細胞や NK 細胞活性の低下によって、Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD) 様の症状がみられる可能性があると考えられる。

8. 死細胞に対する急性好中球性炎症反応における Minc1、ATP の関与に関する研究

in vivo において細胞死、特に necrosis は炎症を引き起こす。この反応は、死細胞から炎症性の分子が漏れ出して自然免疫細胞が反応することによると考えられており、そのような炎症惹起性分子は DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) と呼ばれている。DAMPs としての候補として挙げられている分子があるものの、in vivo においての働きについては明らかとなっていないことが多い。本研究では DAMPs 候補として挙げられている 3 分子(補体 C3、ATP と P2X7、Minc1(Clec4e))についてその in vivo での死細胞 に対する炎症への関与を検討した。C3 欠失マウスでは炎症初期反応は減弱しているか、その後は野生型と同等であった。それに対して、P2X7 欠失マウス、Minc1 欠失マウスでは炎症の反応は炎症初期でも極期でも野生型と同等であった。

(5). 治療ガイドライン作成と新規治療法の開発

高 IgM 症候群の治療ガイドライン、原発性免疫不全症候群に合併する BCG 感染症の治療ガイドラインを作成し、ホームページに公開した。

X-SCID 患者に対する骨髄移植では HLA 一致同胞ドナーが存在すれば、前処置なしでも造血細胞が生着する。それ以外は、前処置を施行しないと免疫グロブリン補充療法 (IVIG) が生涯必要となることが多い。一方、骨髄破壊的前処置

は感染症の悪化や臓器障害が問題となる。近年、骨髄非破壊的前処置 (RIC) が施行されるようになったが、B 細胞機能回復に必要な最小強度の前処置はまだわかっていない。本研究では HLA 一致同胞がいない X-SCID 患者 5 例に対し、既報告より強度を弱めた前処置 (fludarabine 125mg/m²+melphalan 80mg/m²) 後に非血縁者間臍帯血移植 (UCBT) を施行した。その結果、5 例中 4 例で 3 年以上合併症なく生存し、IVIG も必要なくなった。1 例は重症 GVHD と敗血症で移植 1 年半後に死亡した。上記前処置は UCBT と組み合わせることで B 細胞機能を回復できる最小強度の前処置の一つであると考えられた。

NEMO 欠損症で gene reversion により体細胞モザイクをきたし、難治性腸炎を併発した症例で、抗 TNF- α 抗体が著明な症状改善を示したことを明らかにした。

慢性肉芽腫症の治療に関して、遺伝子治療の試みを国立成育医療研究センター研究所・成育遺伝研究部 小野寺雅史 (代表) と取り組み、今年度その許可が厚労省からおり、その実施体制が整いつつある。遺伝子治療に代わる治療法としては、PEG 化 DAO (D-amino acid oxidase) を用いた in vitro 実験を行い、その酵素補充療法の可能性を示した。

(6). 患者 QOL 調査と患者家族や医療者への継続的情報提供

造血幹細胞移植後の患者 QOL に関する研究を準備中である。診断基準、迅速診断を行っている施設、確定診断に必要な検査項目、専門病院、遺伝子検査を行う施設名や連絡先などの情報をホームページに掲載している。PIDJ ホームページでは症例の相談を受け付けており、各疾患の専門家が主治医にむけて診断や治療のアドバイスをしている。原発性免疫不全症候群の医師向け、患者向けの概説書の作成し、医療機関に配布した。またホームページ上でも公開している。

(<http://pidj.rcai.riken.jp/>)

日本免疫不全研究会（参考資料 2：プログラム）を班会議翌日に開催し、担当医師への情報提供、意見交換を行っている。全国疫学調査の際、主治医のメールアドレスの登録を進め、継続的に免疫不全症に関する最新の情報提供を行い、この疾患に対する医療水準を向上させている。患者家族会であるPIDJつばさの会との連携を深め、講演会や相談会を実施した。

(<http://npo-pidtsubasa.org/>)

平成24年4月に患者家族会と共同でWorldPI Week（国際免疫不全症週間）に参加した。

IV. 研究危険情報

特になし。

V. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

VI. 研究発表

巻末に記載のとおり。

Ⅲ 分担研究報告

原発性免疫不全症の年齢による特徴～XLA と CVID を中心に～

石村匡崇¹⁾、高田英俊¹⁾、瀧本智仁¹⁾、土居岳彦¹⁾、今井耕輔^{2) 4)}、金兼弘和³⁾、森尾友宏⁴⁾、
野々山恵章⁵⁾、宮脇利男³⁾、原 寿郎¹⁾

- 1) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学
- 2) 東京医科歯科大学大学院小児・周産期地域医療学
- 3) 富山大学大学院医学薬学研究部小児科学
- 4) 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学
- 5) 防衛医科大学校医学研究科小児科学

研究要旨

近年、原発性免疫不全症の予後の改善に伴い成人例が増加しており、2008年の疫学調査では成人例（20歳以上）は263名（28.4%）が報告された。これまで成人例に関する報告はわずかしかなく、疫学調査結果より成人例の追加解析を行い、特に成人例の多いX連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA）と分類不能型免疫不全症（CVID）を中心に解析した。成人と小児例を比較すると、XLAでは成人例で気管支拡張症・難聴の合併が多くみられたが、CVIDでは悪性疾患、自己免疫疾患、気管支拡張症などの重篤な合併症の差はみられなかった。一方CVIDでは15歳未満での発症例が重篤な合併症を持つ傾向にあったが、15歳未満発症例では罹病期間が長く、合併症との関連が示唆された。QOLや予後にかかわる気管支拡張症はXLA（11/133例）と比べCVID（20/92例）で合併が多く（ $p=0.0038$ ）、罹患率は高率であった（CVID:0.016/年、XLA:0.007/年）。CVIDではXLAと比べ診断から気管支拡張症発症までの期間が短く（ $p=0.04$ ）、抗体不全以外の免疫異常や診断の遅れが背景にあると考えられた。

A. 研究目的

診断技術と治療の進歩により、原発性免疫不全症（PID）の予後は大きく向上し、現在成人のPID症例が増加してきている。2008年に行った我が国の疫学調査では成人例（20歳以上）は263名（28.4%）が報告された。これまで成人例、年齢に注目したPID研究の報告はわずかしかなく、PID患者のQOLの向上のために、今回年齢、発症年齢に焦点をあて解析を行った。特に成人例の多いX連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA）と分類不能型免疫不全症（CVID）を中心に解析した。

B. 研究方法

2008年に施行しPID全国疫学調査結果より、成人例、15歳以上発症例を解析した。乳幼児期にほとんどが発症するXLA（ $n=138$ ）に関しては年齢別に、成人発症の多いCVID（ $n=92$ ）に関しては年齢別および発症年齢別に群を分けて合併症の解析を行った。合併症の記載のない例（XLA:5例、CVID1例）は合併症の解析からは除外した。

統計解析に関しては、JMP version 9.0 for MAC（SAS Institute Inc.）を用い、 χ^2 検定、student t-検定またはWelch t-検定を行なった。