

- Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito MK: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood* 120(6): 1299-308, 2012
4. Kawai T, Nishikomori R, Heike T: Diagnosis and treatment in anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Allergol Int* 61(2): 207-17, 2012
 5. Tsumura M, Okada S, Sakai H, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Kong XF, Abhyankar A, Heike T, Nakahata T, Nishikomori R, Al-Muhsen S, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Alzahrani M, Shehri MA, Elghazali G, Takihara Y, Kobayashi M: Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Hum Mutat.* 33(9): 1377-87, 2012
 6. Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T: Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Blood* 119(23): 5458-66, 2012
 7. Kawai T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, Izawa K, Murakami T, Okamoto S, Mori Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Ohmori K, Nakahata T, Heike T: Multiple reversions of an IL2RG mutation restore T cell function in an X-linked severe combined immunodeficiency patient. *J Clin Immunol* 32(4): 690-7, 2012
 8. Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito MK, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O: Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res* 19(2): 143-52, 2012
 9. 横田俊平, 西小森隆太, 高田英俊, 菊地雅子, 野澤智, 金高太一, 木澤敏毅, 宮前多佳子, 森雅亮, 平家俊男, 原寿郎, 今川智之: クリオピリン関連周期性発熱症候群に対する生物学的製剤治療の手引き(2012)カナキヌマブ(総説). *日本小児科学会雑誌* 116(9) P1337-1341, 2012
 10. 平家俊男: 発熱をキーワードにした小児血液免疫疾患診療の新展開(解説). *大阪小児科医会会報* 162号 P6-9, 2012
 11. 西小森隆太, 井澤和司, 平家俊男: 【クローズアップ感染症】PFAPA以外の周期性発熱症候群についての知見(解説/特集). *小児内科* 44(7) P1221-1226, 2012
 12. 西小森隆太, 井澤和司, 平家俊男: 原発性免疫不全症における臨床遺伝学 日本における自己炎症疾患の遺伝子診断について(解説). *日本遺伝カウンセリング学会誌* 33(1) P63-68, 2012
- 2) 学会発表
 1. 阿部純也, 西小森隆太, 井澤和司, 栗屋智就, 河合朋樹, 加藤竹雄, 八角高裕, 満生紀子,

- 小原收、一瀬宏、平家俊男：本邦におけるAicardi-Goutières 症候群/Familial chilblain lupusの遺伝子解析. 第115回日本小児科学会
2. 日衛嶋栄太郎、八角高裕、窪田博仁、西小森隆太、仲瀬裕志、平家俊男：全身型若年性関節炎の経過中にEBVによる胃潰瘍・腸炎を合併した小児例. 第115回日本小児科学会
3. 井澤和司、西小森隆太、田中尚子、河合朋樹、八角高裕、平家俊男、土方敦司、小原收、斎藤潤、中畑龍俊：次世代シーケンサーによる*NLRP3*体細胞モザイクの診断. 第115回日本小児科学会学術集会
4. Izawa K, Nishikomori R, Abe J, Kawai T, Yasumi T, Heike T, Saito M, Nakahata T, Hijikata A, Ohara O: Rapid detection of *NLRP3* somatic mosaicism in CINCA syndrome using next-generation sequencing. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会
5. 井澤和司、西小森隆太、吉岡耕平、平家俊男、斎藤潤、中畑龍俊：CINCA症候群における*NLRP3*体細胞モザイク変異. 第33回炎症再生学会
6. 平家俊男：発熱をキーワードにした小児免疫血液疾患診療の新展開. 第21回札幌臨床免疫アレルギーの集い
7. Izawa K, Hijikata A, Nishikomori R, Ohara O, Yoshioka K, Abe J, Tanaka N, Saito M, Kawai T, Takei S, Kobayashi H, Yasumi T, Nakahata T, Heike T: *NLRP3* somatic mosaicism can cause Muckle-Wellssyndrome. The 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies
8. Nishikomori R, Abe J, Izawa K, Kawai T, Yasumi T, Mitsuiki N, Ohara O, Toyoshima I, Hasegawa K, Ichinose H, Heike T: Genetic analysis of Aicardi-Goutières syndrome in Japan. The 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies
9. 平家俊男：原発性免疫不全の早期診断法の確立. 第44回日本小児感染症学会総会学術集会
- H. 知的財産権の出願・登録状況
無し

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

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

研究要旨

高IgE症候群は、黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍・肺炎にアトピー性皮膚炎・血清IgE高値を合併する原発性免疫不全症である。骨異常を特徴とする1型の高IgE症候群の主要な原因がSTAT3のドミナントネガティブ(DN)変異で、骨異常を合併しない2型の高IgE症候群の一部の原因としてJAKファミリーチロシンキナーゼのTYK2の機能喪失(loss of function; LOF)型の変異があることを我々が本研究班において明らかにしている。しかし現時点でも、原因不明の高IgE症候群症例が多数存在し、その病態には不明な点が多い。さらに、診断にはSTAT3・TYK2の塩基配列決定以外の簡便な方法が存在せず、塩基配列の決定には多くのコストと労力が必要である。そこで本研究では、サイトカイン刺激前後のフローサイトメトリーによるSTATタンパクのチロシンリン酸化を検討することにより、高IgE症候群の病型・病態分類を行い、簡便で迅速な診断法開発を行った。

A. 研究の目的

獲得免疫応答に中心的な役割を果たすT細胞は、ナイーブCD4陽性T細胞から、樹状細胞と各種のサイトカインのシグナルにより教育され、細胞内病原体の排除に関与するTH1細胞、寄生虫の排除に関与するTH2細胞、細胞外病原体の排除に関与するTH17細胞とTFH細胞に分化する。この際にシグナル伝達と転写因子の役割を果たすそれぞれSTAT4, STAT6, STAT3がチロシンリン酸化され細胞質から核にシグナルを伝達し、それぞれの細胞系譜の分化制御に重要な役割を果たす。高IgE症候群は、黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍・肺炎にアトピー性皮膚炎・血清IgE高値を合併する原発性免疫不全症である。その原因がSTAT3のドミナントネガティブ(DN)変異やTYK2の機能喪失型の変異であることが、以前の我々の研究成果により明らかにされている。しかし、原因不明の高IgE症候群症例が多数存在し、その病態には不明な点が多く、診断にはSTAT3・TYK2の塩基配列決定以外に簡便な方法

が存在しない。そこで、フローサイトメトリーによるSTATタンパクのチロシンリン酸化を検討することにより、高IgE症候群の病型分類・病態解明と簡便で迅速な診断法の開発を試みた。

B. 研究方法

ヘパリン採血した患児の末梢血より、比重遠心法により単核球を分離した。これをIL-6, IL-10, IL-15, IL-21, IL-27, IFN- β などの各種サイトカインで刺激し、固定後、膜透過処理を行いチロシンリン酸化特異的(pY-)STAT1, STAT3, Stat4, Stat5などの抗体で染色し、これをフローサイトメトリーで解析した(Phosflow法)。

C. 研究結果

1. TYK2欠損症におけるSTAT分子のチロシンリン酸化の検討

これまでの研究により、TYK2欠損症においては、IL-6やIL-10のシグナル伝達障害があるこ

とがウエスタンブロッティング法により明らかになっている。今回の Phosflow 法による検討においては、IL-6 や IL-10 刺激後、部分的な STAT1 と STAT3 のチロシンリン酸化の障害が存在することが明らかになった。この時 TYK2 に依存しない IL-15 に対する STAT3 と STAT5 のリン酸化は正常であることから、TYK2 欠損に特異的なサイトカインシグナル伝達障害が存在することが明らかになった。Phosflow 法により、ウエスタンブロッティングの場合と比較して、必要な細胞数が著しく減少し、診断確定までの所要時間を大幅に短縮することが出来た。

2. DNA 結合領域に変異を有する STAT3-DN 高 IgE 症候群における STAT 分子のチロシンリン酸化の検討

これまでの研究により、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 のシグナル伝達には障害がみられないことが従来の方法による検討で明らかになっている。末梢血単核球の Phosflow 法による検討でも、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 に対する STAT1 と STAT3 のチロシンリン酸化の正常人と同等で、これまでの結果が再確認された。

3. SH2 領域に変異を有する STAT3-DN 高 IgE 症候群における STAT 分子のチロシンリン酸化の検討

SH2 領域に変異を有する STAT3-DN 高 IgE 症候群における STAT 分子のチロシンリン酸化を同様に検討した。IL-6, IL-10, IL-21, IL-27 などの刺激に対して、STAT1 のチロシンリン酸化は正常コントロールとの間に差異を認めなかったが、STAT3 のチロシンリン酸化は顕著に障害されていた。STAT1 と STAT3 の両者にチロシンリン酸化に障害のみられる TYK2 欠損症と比較すると TYK2 に依存してリン酸化される IL-6 と

IL-10 に対するチロシンリン酸化だけでなく、TYK2 に依存しない IL-15, IL-21, IL-27 に対しても STAT3 のみのチロシンリン酸化の障害が見られる点が特徴的であった。この所見は非常に顕著で、迅速診断法として有用であると考えられた。

D. 考察

TYK2 欠損症の末梢血単核球においては、IL-6 と IL-10 に対するチロシンリン酸化の障害は存在したが、比較的軽度であった。これは、IL-6 による抗体産生上昇がはっきりと障害されていることと併せて考えると、IL-6 に対するチロシンリン酸化には高い閾値が存在するものと考えられた。IL-15 や IL-21 に対する STAT3 のチロシンリン酸化障害は見られず、これまでの報告の TYK2 の機能とよく一致していた。一方で、SH2 領域に変異を有する STAT3-DN 高 IgE 症候群においては、検討したすべてのサイトカインに対して STAT3 のチロシンリン酸化の特異的障害が認められ、診断的意義が高いと考えられた。以上より、Phosflow 法は TYK2 欠損症と SH2 領域に変異を有する STAT3-DN 高 IgE 症候群の迅速診断に有用であることが明らかになった。さらに、原因不明の高 IgE 症候群の病型分類にも有用である可能性が示唆された。

E. 結論

ヒトの JAKファミリーキナーゼと STAT 分子の異常により発症する高 IgE 症候群において、フローサイトメトリーによる STAT タンパクのチロシンリン酸化を Phosflow 法により検討することで、高 IgE 症候群の迅速診断が可能になった。この診断法は高 IgE 症候群の全体の約 1/3 に有用であるので、これ以外の症例に対してもサイトカインのシグナル伝達をチロシンリン酸化以外の方法で評価することにより、診断法の適応範囲を広げていきたい。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Ma CS, Avery DT, Chan A, Batten M, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright PD, Kreins AY, Averbuch D, Engelhard D, Magdorf K, Kilic SS, Minegishi Y, Nonoyama S, French MA, Choo S, Smart JM, Peake J, Wong M, Gray P, Cook MC, Fulcher DA, Casanova JL, Deenick EK, Tangye SG: Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. *Blood* 119: 3997-4008, 2012
2. Ogawa H, Mukai K, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H: Th2-inducing cytokines IL-4 and IL-33 synergistically elicit the expression of transmembrane TNF- α on macrophages through the autocrine action of IL-6. *Biochem Biophys Res Commun.* 420: 114-8, 2012
3. Minegishi Y, Saito M: Cutaneous Manifestations of Hyper IgE Syndrome. *Allergol Int.* 61: 191-6, 2012
4. 峯岸克行 高IgE症候群 知っておきたい内科症候群 109, 1495-1496, 2012
5. 峯岸克行 高IgM症候群 知っておきたい内科症候群 109, 1497-1498, 2012
6. 峯岸克行 高IgE症候群と感染症 化学療法の領域 27, 80-84, 2012
7. 峯岸克行 日本医事新報 高IgE症候群の原因遺伝子解析の現況と臨床応用の可能性 4610, 2012
8. 峯岸克行 高IgE症候群により発症するアトピー性皮膚炎 臨床・免疫アレルギー科 58, 667-670, 2012
9. 峯岸克行 STAT3の異常によるアトピー性皮膚炎の発症機序 臨床・免疫アレルギー科 59, 2013 (印刷中)

2) 学会発表

1. Minegishi Y "Molecular Pathogenesis of Hyper IgE Syndrome" The 4th international symposium of Immunological Self, Kyoto, Jan 27-28, 2012
2. Minegishi Y "Molecular Mechanisms of Hyper IgE Syndrome International symposium "New Horizons in the Immune System", Tokushima, Feb 9-10, 2012
3. Minegishi Y "Molecular Mechanisms of Hyper IgE Syndrome" Spring Conference of the Korean Association of Immunologists, Seoul, Korea, April 13, 2012
4. Minegishi Y "Molecular Mechanisms of Hyper IgE Syndrome" Brain Korea 21 Project for Functional Foods and Nutrigenomics at Yonsei university, Seoul, Korea, April 13, 2012
5. Minegishi Y "Molecular Mechanisms of Hyper IgE Syndrome" Immune System and Primary immunodeficiency at RCI May 22, 2012
6. Minegishi Y, "Hyper-IgE syndrome" 15th biennial meeting of European Society for Immunodeficiency, Florence, Italy, Oct. 3-6, 2012

H. 知的財産権の出願登録状況

該当なし

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

小原 収

公益財団法人かずさ DNA 研究所

研究要旨

原発性免疫不全症患者の遺伝学的原因の確定診断のために、当研究班の班会議施設からの依頼に従って、500 件以上の遺伝子検査を行った。更に、従来法の検討だけでは原因の特定に至れなかった検体に対する更なる解析を実現できるように、10 遺伝子程度を一度に解析するための疾患毎に分類した遺伝子疾患解析パネルを設定し、次世代 DNA シーケンサーを活用して、低コストに遺伝子解析を実現する検討を始めた。これらは既知遺伝子内での原因遺伝子探索法であるが、それに加えて、新規な原因遺伝子変異のより網羅的な解析のために、全エクソン解析と並行して、血球成分の全 RNA 解析を次世代 DNA シーケンサーを用いて開始した。

A. 研究目的

本研究は、本邦での原発性免疫不全症 (PID) の臨床情報の蓄積を行うためのレジストリである PIDJ を改良・維持し、それに並行して、それらの将来の遺伝的原因の検査を行い、その結果も合わせてアーカイビングすることを通じて、より精度の高い診断と治療法選択に結びつけることを目的とする。更に、この実現のために、遺伝的素因を探求するための新規な方法論の開発と技術的整備を行う事をこの分担研究の目的とする。

B. 研究方法

- ・ PIDJ 登録症例について、班会議施設からの依頼により、免疫不全症の原因として知られている既知原因遺伝子内での変異の有無の検査を行う。
- ・ こうした既知遺伝子に対しての遺伝子検査をより効率的に行うため、次世代シーケンサーを活用した高精度遺伝子解析法の開発を行う。
- ・ 既知遺伝子の探索のみでは遺伝的な原因が

決まらなかった検体について、次世代シーケンサーを用いたより網羅性の高い解析を実施し、新規な遺伝子変異を同定するためのパイプラインを構築する。

(倫理面への配慮)

当分担研究のために、かずさ DNA 研究所の倫理審査委員会において、既知遺伝子の遺伝子検査だけでなく、全エクソンシーケンシングと RNA シーケンシングによる免疫不全症遺伝的原因探索についても審査を受け、既に承認を得ている。こうした網羅的解析は、依頼施設での倫理審査での承認を受けていることが前提条件なため、現時点では当研究班の 4 施設からの検体を受け入れている。

C. 研究結果

今年度もこれまでと同様に、本研究班の各施設からの依頼に応じて、238 検体の免疫不全症疑い症例において 506 遺伝子に対しての原因遺伝子変異探索を行った (2012 年 12 月末現在)。各研究班施設への報告結果のまとめから、66 症例 (全症例の 28%) で遺伝子検査によって確定

診断に至ることができたことが判明した。これと並行して、原発性免疫不全症の臨床アーカイブへの臨床情報の登録も蓄積され、今年度の新規登録数は320件に達した(2012年12月末現在)。こうした臨床ネットワークの拡充により遺伝子検査依頼数は依然として増加の傾向を示しており、そのニーズに応えるために、より効率的な遺伝子変異探索システムの構築が急務となった。また、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。そこで、従来法での人的・時間的負担を大きく軽減しつつ遺伝子解析能力を拡大するための方策として、我々のグループが近年開発に取り組んでいる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)を用いて一度に10遺伝子程度の配列解析を実現する解析パイプライン化の検討を進めた。更に、こうして既知遺伝子の変異の可能性が除外された症例について、厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野))「次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究」班と連携して、次世代シーケンサー(イルミナ社 HiSeq1000)を用いた網羅的な全エクソン解析を実施した。更に、臨床検体の血球成分からのRNA Sequencingによる解析の予備検討を行った。

D. 考察

- 1) 既知遺伝子からの従来法での遺伝子検査は、量的にもほぼ落ち着き、またそれによる確定診断できる割合もおよそ30%に落ち着いてきた。
- 2) 今後の確定診断率の向上のためには、疾患毎の遺伝子パネル化による遺伝子検査の効率化

が不可欠であり、自己炎症、分類不能型免疫不全症などについて、そのためのパネル設定が完了した。

3) 更に、次世代シーケンサーを使ったアプローチにより、未知の遺伝子的素因に辿り着ける頻度が一定の上昇を見る事が実証された。しかし、それでも機能的な情報などの確定診断のための補完情報は必須であり、そのための方法論開発が重要であろう。

E. 結論

- 1) 今年度も、本研究班の班会議施設の依頼に応じて、免疫不全症原因遺伝子の遺伝子検査を実施し、その結果を担当施設に滞りなく報告した。
- 2) 効率的な遺伝子検査のために、疾患毎の遺伝子解析パネルを設定し、それによるルーチン検査の実施のための準備を開始した。
- 3) 他の厚労省研究班と連携して、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子構造、発現プロファイル解析を開始し、そのデータ解析のためのパイプラインの構築を進めた。

G. 研究発表

- 1) 論文発表
 1. Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, Haraguchi K, Moriuchi H, Oh-Ishi T, Kitoh T, Ohara O, Morio T, Yachie A: Rapid Detection of Intracellular p47phox and p67phox by Flow Cytometry; Useful Screening Tests for Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Immunol* 2013 (Epub ahead of print)
 2. Shirasaki Y, Yamagishi M, Shimura N, Hijikata A, Ohara O: Toward an understanding of immune cell sociology: real-time monitoring of cytokine secretion at the single-cell level. *IUBMB Life* 65 (1): 28-34, 2013
 3. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S,

- Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S: Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ-deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol* 2012 (Epub ahead of print)
4. Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsuiki N, Ohara O, Komada Y: A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2012 (Epub ahead of print)
 5. Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, Nunoi H, Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara O: A Dual Reporter Splicing Assay Using HaloTag-containing Proteins. *Curr Chem Genomics*. 6: 27-37, 2012
 6. Kaji T, Ishige A, Hikida M, Taka J, Hijikata A, Kubo M, Nagashima T, Takahashi Y, Kurosaki T, Okada M, Ohara O, Rajewsky K, Takemori T: Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *J Exp Med* 209 (11): 2079-97, 2012
 7. Hori T, Ohnishi H, Teramoto T, Tsubouchi K, Naiki T, Hirose Y, Ohara O, Seishima M, Kaneko H, Fukao T, Kondo N: Autosomal-Dominant Chronic Mucocutaneous Candidiasis with STAT1-Mutation can be Complicated with Chronic Active Hepatitis and Hypothyroidism. *J Clin Immunol* 32 (6): 1213-20, 2012
 8. Takezaki S, Yamada M, Kato M, Park MJ, Maruyama K, Yamazaki Y, Chida N, Ohara O, Kobayashi I, Ariga T: Chronic mucocutaneous candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the STAT1 DNA-binding domain. *J Immunol* 189(3): 1521-6, 2012
 9. Suri D, Singh S, Rawat A, Gupta A, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N, Ohara O, Bilhou-Nabera C, Proust A, Ahluwalia J, Dogra S, Saikia B, Minz RW, Sehgal S. Clinical profile and genetic basis of Wiskott-Aldrich syndrome at Chandigarh, North India. *Asian Pac J Allergy Immunol* 30(1): 71-8, 2012
 10. Mohammadzadeh I, Yeganeh M, Aghamohammadi A, Parvaneh N, Behniafard N, Abolhassani H, Tabassomi F, Hemmat M, Kanegane H, Miyawaki T, Ohara O, Rezaei N: Severe primary antibody deficiency due to a novel mutation of mu heavy chain. *J Investig Allergol Clin Immunol* 22(1): 78-9, 2012
 11. Nakaoka H, Kanegane H, Taneichi H, Miya K, Yang X, Nomura K, Takezaki S, Yamada M, Ohara O, Kamae C, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Hershfield MS, Ariga T, Miyawaki T: Delayed onset adenosine deaminase deficiency associated with acute disseminated encephalomyelitis. *Int J Hematol* 95(6): 692-6, 2012
 12. Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito MK, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O: Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res* 19(2): 143-52, 2012
 13. Mizuno T, Sakai H, Nishikomori R, Oshima K, Ohara O, Hata I, Shigematsu Y, Ishige T, Tamura K, Arakawa H: Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic

- fever syndrome. *Rheumatol Int* 32(12): 3761-4, 2012
- 2) 学会発表
1. 釜江智佳子、満生紀子、小原明、野口恵美子、久保田健夫、本間健一、小原收、今井耕輔、野々山恵章：次世代シーケンサーにより、原因遺伝子の同定に至ったCVIDの1例。第3回関東甲越免疫不全症研究会 2012年9月22日、東京
 2. 満生紀子、大嶋宏一、今井耕輔、小原 收、森尾友宏、水谷修紀：PIDJネットワークを介したPID患者の遺伝子解析(2007~2012年) 第3回関東甲越免疫不全症研究会 2012年9月22日、東京
 3. N Mitsuiki, K Oshima, K Imai, O Ohara, T Morio, S Mizutani: Genetic Analysis for 207 Cases with Primary Immunodeficiency (PID) Consulted to A Single Center through PID Network in Japan (PIDJ) in 5 Years (2007-2011). 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Oct 3-6 2012 Florence, Italy
 4. K Honma, K Imai, C Kamae, H Ishida, Y Ito, S Kojima, T Yokosuka, H Kanegane, T Morio, Y Sasahara, T Fujiwara, H Harigae, Y Hashii, O Ohara, S Nonoyama: Clinical features and immunological abnormalities of GATA2 deficiency in Japan. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Oct 3-6 2012 Florence, Italy
 5. R Nishikomori, J Abe, K Izawa, T Kawai, T Yasumi, N Mitsuiki, O Ohara, I Toyoshima, K Hasegawa, H Ichinose, T Heike: GENETIC ANALYSIS OF AICARDI-GOUTIÈRES SYNDROME IN JAPAN. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Oct 3-6, 2012 Florence, Italy
 6. Y Yamazaki, M Yamada, S Takezaki, M Kato, M-J Park, K Maruyama, N Chida, O Ohara, I Kobayashi, T Ariga: Chronic Mucocutaneous Candidiasis Caused by a Gain-of-Function Mutation in the STAT1 DNA-Binding Domain. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Oct 3-6, 2012 Florence, Italy
 7. T Wada, M Muraoka, T Toma, T Shigemura, K Agematsu, H Moriuchi, O Ohara, T Morio, A Yachie: Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry in patients with chronic granulomatous disease. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Oct 3-6, 2012 Florence, Italy
 8. K Izawa, R Nishikomori, H Oda, K Nakagawa, E Hiejima, K Yoshioka, J Abe, T Kawai, T Yasumi, T Heike, A Hijikata, O Ohara, M Saito, T Nakahata, T Kawai, S Takei: *NLRP3* somatic mosaicism can cause Muckle-Wells syndrome. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Oct 3-6, 2012 Florence, Italy
 9. K Oshima, A Niwa, K Imai, S Nakamura, Y Jindai, T Tanaka, M Yanagimachi, O Ohara, H Yabe, S Kojima, T Nakahata, S Nonoyama, M.K. Saito: Induced Pluripotent Stem Cells derived from patients with Reticular Dysgenesis. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Oct 3-6, 2012 Florence, Italy
 10. 大西秀典、船戸道典、近藤直美、小原收、上村治：新規B因子昨日獲得型変異を有する非典型的溶血性尿毒症症候群の1家系 第6

回日本免疫不全症研究会 2013 年 1 月 26 日、
東京

11. 白崎善隆、志村七子、山岸舞、井澤和司、
中川権史、西小森隆太、平家俊男、小原収：
単一細胞免疫アッセイによる NLRP3 体細胞
モザイクの機能的解析の試み. 第 6 回日本
免疫不全症研究会 2013 年 1 月 26 日、東京

H. 知的所有権の出願・取得状況

(予定も含む)

なし

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

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

研究要旨

PIDJ データベースに登録された症例の集計を行った。2012 年には、431 例が登録され、前年の 399 例に比べ 8%増加した。184 施設からの登録があった。男性 254 例 (59%)、女性 177 例 (41%)、生存例 412 例 (96%)、死亡例 11 例であった。自己免疫疾患の合併が 8.5%、リンパ組織 (リンパ節、肝臓、脾臓、扁桃) 腫脹を 16.5%、合併症合併例を 28.3%で認めた。カテゴリ別では、自己炎症性疾患が 37%、抗体産生不全が 16%、食食細胞異常が 10%、免疫不全を伴う症候群が 10%、自然免疫不全が 6%、複合免疫不全症が 5%、免疫異常症が 5%、補体異常症が 1%であった。PIDJ プロジェクト開始以来 5 年を経過しており、現在、登録患者の生命予後、遺伝子診断の結果について確認中である。

また、当科に紹介される患者について、10 カラーフローサイトメトリー (FACS) による表面抗原分析により効果的に診断する方法について開発した。

A. 研究目的

平成 18 年度から、厚生労働省原発性免疫不全症候群に関する調査研究班 (以下、研究班) は、基礎免疫学研究施設である理化学研究所免疫アレルギー科学総合センター (以下、RCAI)、ゲノム解析施設であるかずさ DNA 研究所と共同研究を開始し、臨床情報の中央化、臨床検体解析/保存の中央化、遺伝子解析の中央化、を通し、臨床診断、治療のみならず、基礎免疫学へも貢献する枠組みを開始した。そのハブとなるシステムが、PIDJ (Primary Immunodeficiency Database in Japan) である。今年度の研究では、平成 24 年中に PIDJ に登録された症例について疫学的に検討し、合わせて全登録例について追跡調査を行うことで、患者の予後調査を行った。また、当科に紹介される患者について、10 カラーフローサイトメトリー (FACS) による表面抗

原分析により効果的に診断する方法について開発し、患者検体を解析することを目的とした。

B. 研究方法

全国の一般病院の医師が免疫不全症を疑い、専門医の解析、アドバイスを得たい場合、患者の同意取得後、臨床情報情報を PIDJ データベースに登録する。患者 ID は匿名化されており、個人情報保護されている。研究班では、登録された情報をもとに、疫学解析を行った。また、主治医から病態解析、遺伝子解析の依頼があった場合、主治医が指定した研究班施設にて、患者同意取得後、検体解析を行った。得られた DNA は理化学研究所に送付し、一部保存の後、かずさ DNA 研究所にて DNA 構造解析 (シーケンス) を行った。結果については、研究班施設に報告し、病原性の有無等を勘案の後に、主治医施設へ報告している。東京医科歯科大学小児科に紹

介のあった患者については、FACS 解析を行った (BD LSRFortessa セルアナライザー)。

C. 研究結果

PIDJ データベースに登録された症例の集計を行った (図 1)。

2012 年には、431 例が登録され、前年の 399 例に比べ 8%増加した。184 の施設からの登録があり、研究班担当施設としては、図 2 に示すように、東京医科歯科大学 116 例 (27%)、京都大学 103 例 (24%) であり、全体の半数を占めていた。それに、15-30 例の 6 施設 (東北大、九州大、岐阜大、富山大、防衛医大、北海道大)、15 例以下の 5 施設 (信州大、広島大、金沢大、宮崎大、名古屋大) が続いていた。症例の内訳は、男性 254 例 (59%)、女性 177 例 (41%)、生存例 412 例 (96%)、死亡例 11 例であった。自己免疫疾患の合併が 8.5%、リンパ組織 (リンパ節、肝臓、脾臓、扁桃) 腫脹を 16.5%、合併症合併例を 28.3% で認めた。

国際分類によるカテゴリ別では、自己炎症性疾患が 158 例 (37%) で最も多く、抗体産生不全が 71 例 (16%)、免疫不全を伴う症候群が 45 例 (10%)、貪食細胞異常が 41 例 (10%)、自然免疫不全が 24 例 (6%)、複合免疫不全症が 21 例 (5%)、免疫異常症が 22 例 (5%)、補体異常症が 5 例 (1%) であった (図 3)。

2007 年 12 月からの正式開始後、総登録例は 1747 例となり、1991 年から 2008 年登録のうち電子化した 507 例を加え、2254 例となった。

PIDJ プロジェクト開始以来 5 年を経過しており、現在、主治医に対し、登録患者の生命予後、遺伝子診断の結果について確認中である。

また、当科に紹介がある患者については、従来 4 カラーによる FACS 解析を行い、詳細な T 細胞分画、B 細胞分画の検討を行っていたが、20 種類の抗体の組み合わせが必要であり、体格の小さい小児からの採血からの解析が困難であ

った。今年度、上半期に 10 カラー FACS の条件設定を行い図 4 に示す組み合わせで FACS 解析を 24 例で行った (2012. 8-11)。高 IgE 症候群 3 例、高 IgM 症候群 2 例、CVID 8 例などで検討を行った。図 6 は、その 1 例であるが、これにより少量のサンプルで、これまで検討できていなかったヘルパー T 細胞分画や、各免疫グロブリンのクラスの検討が可能になった。今後もこうした検討により、病態解析を行っていく予定である。

D. 考察

PIDJ ネットワークを通じた症例の紹介および登録は 5 年間恒常的に増加しており、全国で少なくとも 1 日 1 例の免疫不全症 (疑い例を含む) 患者が発生していることが明らかになった。もちろん、このネットワークでカバーされている症例は国内発生症例の一部であると考えられる。諸外国での登録数からは、たとえばフランスでは人口 10 万人あたり 4.4 例であり、日本での現在の登録数は人口 10 万人あたり 1.76 例であるため、他の諸外国 (ノルウェー、スペイン、イスラエル、アイルランド、オーストラリアなど) と比べ 1/3 程度の登録数である。今後も国民への周知活動を通して、早期診断、早期治療による患者の予後改善に努めるべきであると考えられる。さらに前述の諸外国のデータは自己炎症性疾患を含んでいないものが多く、日本では 1/3 を自己炎症性疾患 (疑い) が占めているため、さらに古典的な免疫不全症が見逃されていると考えられる。今後、遺伝子解析結果と結びつけ、現在行っている予後調査と組み合わせ、日本における原発性免疫不全症の疫学について検討したい。

遺伝子解析を行う際、現在では必ずしも診断確定率が高くはない (平均約 30% 前後)。そのため、10 カラーを用い、少量サンプルから解析可能である FACS 解析法の開発を行った。これにより、今後、各 T 細胞亜分画、B 細胞亜分画の

異常患者について、絞り出し、検討を行うことが可能となった。今年度の解析患者、および来年度に向けて、同様の方法で症例を増やし解析したい。

E. 結論

2012年のPIDJデータベース登録患者431例について、各病型の頻度等について解析を行った。自己炎症性疾患、抗体産生不全で全体の半数を占めており、こうした疾患での確定診断のための解析法の確立が必要であると考えられた。

その一つとして、10カラーFACSによる末梢血リンパ球の詳細な解析法を開発し、抗体産生不全症を中心に解析を行った。今後症例数を増やして検討したい。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol*. 2012
2. Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsuiki N, Ohara O, Komada Y. A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 2012
3. Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, Nunoi H, Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara O, A Dual Reporter Splicing Assay Using HaloTag-containing Proteins. *Curr Chem Genomics* 6: 27-37, 2012
4. Yang X, Kanegane N, Nishida T, Imamura T, Hamamoto K, Miyashita R, Imai K, Nonoyama S, Sanayama K, Yamaide A, Kato F, Nagai K, Ishii E, van Zelm, MC, Latou S, Zhao XD, Miyawaki T. Clinical and genetic characteristics of XIAP deficiency in Japan. *J Clin Immunol* 32: 411-20, 2012
5. Ishida H, Imai K, Honma K, Tamura S, Imamura T, Ito M, Nonoyama S. GATA-2 anomaly and clinical phenotype of a sporadic case of lymphedema, dendritic cell, monocyte, B- and NK-cell (DCML) deficiency, and myelodysplasia. *Eur J Pediatr* 171:1273-6, 2012
6. Suri, D, Singh S, Rawat A, Gupta A, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N, Ohara O, Bilhou-Nabera C, Proust A, Ahluwalia J, Dogra S, Saikia B, Minz R.W, Sehgal S. Clinical profile and genetic basis of Wiskott-Aldrich syndrome at Chandigarh, North India. *Asian Pac J Allergy Immunol* 30:71-8, 2012
7. Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T. Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan. *Clin Endocrinol (Oxf)* 77: 628-34, 2012
8. Nakaoka H, Yang X, Nomura K, Takezaki S, Yamada M, Ohara O, Kamae C, Imai K,

- Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Hershfield M.S, Ariga T, Miyawaki T. Delayed onset adenosine deaminase deficiency associated with acute disseminated encephalomyelitis. *Int J Hematol* 95: 692-6, 2012
9. Kobayashi D, Kogawa K, Imai K, Tanaka T, Sada A, Nonoyama S. Hyper-eosinophilia in granular acute B-cell lymphoblastic leukemia with myeloid antigen expression. *Pediatr Int* 54: 543-6, 2012
10. Kawai T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, Izawa K, Murakami T, Okamoto S, Mori Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Ohmori K, Nakahata T, Heike T. Multiple reversions of an IL2RG mutation restore T cell function in an X-linked severe combined immunodeficiency patient. *J Clin Immunol* 32: 690-7, 2012
11. Kanegane H, Taneichi H, Nomura K, Wada T, Yachie A, Imai K, Ariga T, Santisteban I, Hershfield M.S, Miyawaki T. Successful bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Transplant* 2012
12. 今井 耕輔:原発性免疫不全症の最新国際分類. *臨床免疫・アレルギー科* 58:446-466, 2012
13. 今井耕輔:原発性免疫不全症の遺伝子診断・治療. *臨床血液* 53:1865-73, 2012
14. 今井耕輔:特集 乳幼児健診 Q&A VII. 歯科 Q 口の中にミルクのかすのようなものがいつもあるのですが、大丈夫ですか. *小児科診療* 11:2045-8, 2012
15. 今井耕輔:臨床検査の意義と限界 T細胞・B細胞サブセット. *小児内科* 44: 645-648, 2012
16. 今井耕輔:【知っておきたい内科症候群】膠原病・免疫・アレルギー《免疫不全症》 ウィスコット・アルドリッチ症候群. *内科* 109:1501-3, 2012
- 2) 学会発表
1. Imai K. Screening for Primary Immunodeficiency Diseases using TREC and KREC. 第17回アジア太平洋小児アレルギー呼吸器免疫学会 (APAPARI 2012) (招待講演)、台北市、台湾、2012年10月20日
2. Honma K, Imai K, Kamae C, Ishida H, Ito Y, Kojima S, Yokosuka T, Kanegane H, Morio T, Sasahara Y, Fujiwara T, Harigae H, Hashii Y, Ohara O, Nonoyama S. Clinical features and immunological abnormalities of GATA2 deficiency in JAPAN. 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. October 2012.
3. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, MC van Zelm, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor recombination excision circles (TREC) and Ig kappa-deleting recombination excision circles (KREC). 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. October 2012.
4. Mitsuiki N, Oshima K, Imai K, Ohara O,

- Morio T, Mizutani S. Genetic analysis for 207 cases with primary immunodeficiency (PID) consulted to a single center through PID network in Japan (PIDJ) in 5 years (2007-2011). 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. October 2012.
5. 今井耕輔：免疫不全症の遺伝子診断・治療の up-to-date. 第 74 回日本血液学会学術集会 (教育講演)、京都、2012 年 10 月 21 日
 6. 今井耕輔：抗ウイルス薬使用の実際と今後の考え方. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会 (シンポジウム 1)、北九州、2012 年 11 月 25 日
 7. 今井耕輔：ウイルスに対する感染防御機構. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会 (教育セミナー)、北九州、2012 年 11 月 23 日
 8. 今井耕輔：先天性免疫不全症における遺伝学的検査の取り扱いと諸問題について. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 (イブニング・セッション 3)、横浜、2012 年 12 月 1 日
 9. 山内建、磯田健志、大川哲平、手束真理、富澤大輔、高木正稔、今井耕輔、梶原道子、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：高 IgM 症候群の臍帯血移植後に蔓延する骨髓球系分化障害に対してリメタゾン投与が奏功した一例、第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会、横浜、2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日
 10. 手束真理、大川哲平、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、今井耕輔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀、今留謙一：EB ウイルス関連血球貧食症候群の治療終了後早期再燃に対し、同胞間骨髓移植を施行した一例、第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会、横浜、2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日
 11. 遠藤明史、渡邊健、大川哲平、富澤大輔、今井耕輔、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：Chromosomally integrated HHV-6 の病原性の解析、第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会、横浜、2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日
 12. 長澤正之、大川哲平、遠藤明史、満生紀子、小野敏明、青木由貴、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、今井耕輔、梶原道子、森尾友宏、水谷修紀：トロンボモジュリン- α は早期の凝固関連移植合併症死を改善する、第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会、横浜、2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日
 13. 佐藤裕子、加賀美武飛、鈴木徹臣、山口克彦、今井耕輔、森尾友宏、佐藤祐：皮膚症状、著明な好酸球増多を契機に診断された重症複合免疫不全症の 1 例、第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会、北九州、2012 年 11 月 24 日-11 月 25 日
 14. 星野顕宏、金兼弘和、大嶋勇成、笠井正志、庄司康寛、寺井勝、今井耕輔、森尾友宏、宮脇利男：重症複合免疫不全症におけるニューモシスチス肺炎と気胸について、第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会、北九州、2012 年 11 月 24 日-11 月 25 日
 15. 吉岡紀久子、安富素子、山田健太、林仁幸子、河北亜希子、大嶋勇成、和田泰三、森尾友宏、今井耕輔：BCG 感染症のための抗結核薬治療下で骨髓移植を施行した Wiskott-Aldrich 症候群の一例、第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会、北九州、2012 年 11 月 24 日-11 月 25 日
 16. 釜江智佳子、満生紀子、小原明、野口恵美

子、久保田健夫、小原収、今井耕輔、野々山恵章：次世代シーケンサーにより、原因遺伝子の同定に至った CVID の 1 例、第 3 回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2012 年 9 月 22 日

孝泰、石和田稔彦、今井耕輔、森尾友宏、下条直樹、河野陽一：血球貪食症候群を繰り返す 8 ヶ月男児例、第 3 回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2012 年 9 月 22 日

17. 手束真理、今井耕輔、高山かおる、佐藤祐子、満生紀子、大川哲平、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：Omenn 症候群を呈した完全型 DiGeorge 症候群の 1 女児例、第 3 回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2012 年 9 月 22 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

18. 星野顕宏、金兼弘和、大嶋勇成、石垣景子、笠井正志、庄司康寛、吉田真、金田眞、寺井勝、今井耕輔、森尾友宏、宮脇利男：重症複合免疫不全症におけるニューモシスチス肺炎と気胸について、第 3 回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2012 年 9 月 22 日

19. 満生紀子、大嶋宏一、今井耕輔、小原 収、水谷修紀、森尾友宏：PIDJ ネットワークを介した PID 患者の遺伝子解析(2007～2011 年)、第 3 回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2012 年 9 月 22 日

20. 大野香奈、松原知代、永田裕子、原 聡、大日方 薫、今井耕輔、森尾友宏：呼吸器感染症反復し肺出血をきたした 6 歳男児、第 3 回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2012 年 9 月 22 日

21. 井上祐三朗、西田直徳、Yang Xi、金兼弘和、今井耕輔、森尾友宏、富板美奈子、下条直樹、河野陽一：低 γ グロブリン血症を認めるが、血球貪食症候群の発症を認めない X 連鎖リンパ増殖症候群 type2 の 14 歳児例（もしくは 1 家系）、第 3 回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2012 年 9 月 22 日

22. 長澤耕男、井上祐三朗、菱木はるか、有馬

Exome 解析による原発性免疫不全症原因遺伝子の探索

野々山恵章

防衛医科大学校医学研究科小児科学

研究要旨

原発性免疫不全症候群の患者の中には、骨髄異形成症候群や白血病、悪性腫瘍を合併する患者が存在し、遺伝性血液疾患との鑑別のため血液専門医との専門分野を超えた協力がより重要となってきた。そこで、原発性免疫不全症として紹介された症例で、骨髄不全を伴う患者や悪性腫瘍の合併を伴う患者を中心に、Exome 解析による原因遺伝子同定を開始した。

その結果、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 変異を同定した。*FANCE* 変異の確定診断は本邦初であった。また、本患者では現時点では Fanconi 貧血で特徴的な骨髄不全や悪性腫瘍の合併はなく、従来の報告とは異なる表現型であった。

このような患者群が、未診断の原発性免疫不全症患者に含まれていることが予想され、今後の研究の継続による疾患原因遺伝子同定により、診断、病態解明、適切な治療法による予後の改善を可能とすると考えられた。

A. 研究目的

原発性免疫不全症候群の国内患者登録データベースである PIDJ (Primary Immunodeficiency Database in Japan) 設立後、一般小児科および内科医への周知が進み、登録患者数の増加、疾患原因遺伝子の同定が進んでいる。登録患者の中には、骨髄異形成症候群や白血病、悪性腫瘍を合併する原発性免疫不全症も存在する。遺伝性血液疾患との鑑別のため血液専門医との専門分野を超えた協力がより重要となってきた。

そこで、2011 年度より厚生労働省の” 稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究班” における” 分類不能血液疾患班” との共同研究として、PIDJ を通じて原発性免疫不全症として紹介された症例で、骨髄不全を伴う患者や悪性腫瘍の合併を伴う患者を中心に、Exome 解析による原因遺伝子同定を開始した。

B. 研究方法

PIDJ に登録され、未だ原因不明の症例を対象とした。対象患者は、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞に骨髄異形成症候群を合併した *GATA2* 欠損症類縁疾患が 13 例、PID に悪性腫瘍を合併した症例が 4 例、B 細胞欠損症が 8 例、細胞分化異常を含む PID が 12 例、免疫不全症を伴う外胚葉形成不全が 3 例とした。これらの患者家族から文書による同意を得て、末梢血から DNA を抽出し、次世代シーケンスによる Exome 解析を行ったのち、候補遺伝子についてサンガー・シーケンス法による validation を行った。

(倫理面への配慮)

データは匿名化して取り扱う。

C. 研究結果

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 変異を同定した。FANCE の機能異常を確認するため、染色体断裂試験を行ったところ、MMC, DEB, CY, BU, BLM 全てにおいて exchange を多く含む著明な断裂を認め Fonconi 貧血のパターンをとった。FANCE 変異による Fanconi 貧血患者の確定診断は本邦初であった。

また、FANCE を含めた Fanconi 貧血の疾患原因遺伝子変異により、B 細胞の単独欠損を認めたとする報告はなく、従来との異なる表現型であった。

D. 考察

本患者では現時点では骨髄不全や悪性腫瘍の合併はなく、FANCE 変異により原発性免疫不全症である B 細胞欠損症を呈することが明らかになった。B 細胞欠損症患者として、ガンマグロブリン補充療法を行っているが、今後 Fanconi 貧血で報告されている悪性腫瘍の合併も考えられる。根治療法としての造血幹細胞移植も治療の選択肢となる。

この患者では骨髄不全の症状は明らかでなく、B 細胞欠損による低γグロブリン血症が前面にでていた。これまで、Fanconi 貧血の患者で B 細胞が低下しているという報告が散見されている。このことから、FANCE の B 細胞発生分化において何らかの役割を果たしていると考えられた。

E. 結論

未診断の原発性免疫不全症患者に FANCE 遺伝子やその他の血液疾患の原因遺伝子異常による患者が含まれていることが予想され、今後の研究の継続による疾患原因遺伝子同定により、診断、病態解明、適切な治療法による予後の改善を可能とすると考えられた。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. 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, Zelm M, Latour S, Zhao X, Miyawaki T: Clinical and genetic characteristics of XIAP deficiency in Japan. *J Clin Immunol.* 32: 411-20, 2012
2. Ma CS, Avery DT, Chan A, Batten M, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright PD, Minegishi Y, Nonoyama S, French MA, Choo S, Peake J, Wong M, Cook MC, Fulcher DA, Casanova JL, Deenick EK, Tangye SG: Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. *Blood.* 119: 3997-4008, 2012
3. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim ES, Lee SK, Takagi M, Mizutani S, Morio T: The kinase Btk negatively regulates the production of reactive oxygen species and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nat Immunol.* 13: 369-78, 2012
4. Ishida H, Imai K, Homma K, Tamura S, Imamura T, Itoh M, Nonoyama S: GATA-2 anomaly and clinical phenotype of a sporadic case of lymphedema, dendritic cell, monocyte, B- and NK-cell (DCML) deficiency, and myelodysplasia. *Eur J Pediatr.* 171: 1273-6, 2012
5. Suri D, Singh S, Rawat A, Gupta A, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N,

- Ohara O, Bilhou-Nabera C, Proust A, Ahluwalia J, Dogra S, Saikia B, Walker Minz R, Sehgal S: Clinical profile and genetic basis of Wiskott-Aldrich syndrome at Chandigarh, north India. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 30: 71-8, 2012
6. Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T: Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan. *Clin Endocrinol.* 2012 (in press)
 7. Kawai T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, Izawa K, Murakami T, Okamoto S, Mori Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Ohmori K, Nakahata T, Heike T: Multiple reversions of an IL2RG mutation restore T cell function in an X-linked severe combined immunodeficiency patient. *J Clin Immunol.* 32: 690-7, 2012
 8. Nakaoka H, Kanegane H, Taneichi H, Miya K, Yang X, Nomura K, Takezaki S, Yamada M, Ohara O, Kamae C, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Hershfield MS, Ariga T, Miyawaki T: Delayed onset adenosine deaminase deficiency associated with acute disseminated encephalomyelitis. *Int J Hematol.* 95: 692-6, 2012
 9. Kakiuchi S, Nonoyama S, Wakamatsu H, Kogawa K, Wang L, Kinoshita-Yamaguchi H, Takayama-Ito M, Lim CK, Inoue N, Mizuguchi M, Igarashi T, Saijo M: Neonatal herpes encephalitis caused by a virologically confirmed acyclovir resistant herpes simplex virus type 1. *J. Clin. Microbiol.* 51: 356-9, 2013
 10. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S: Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor and Ig kappa-deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 (in press)
 11. Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, Nunoi H, Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara O: A dual reporter splicing assay using HaloTag-containing proteins. *Curr Chem Genomics.* 2012 (in press)
- 2) 学会発表
1. K Honma, K Imai, C Kamae, H Ishida, Y Ito, S Kojima, T Yokosuka, H Kanegane, T Morio, Y Sasahara, T Fujiwara, H Harigae, Y Hashii, O Ohara, S Nonoyama: Clinical feature and Immunological abnormality of GATA2 mutation in Japan. The 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. (Florence Italy, Oct.3-6, 2012)
 2. C Kamae, N Nakagawa, H Sato, K Honma, N Mitsuiki, O Ohara, H Kanegane, S Pasic, Q Pan-Hammarström, M.C.van Zelm, T Morio, K Imai, S Nonoyama: Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor recombination excision circles (TREC) and IG Kappa-deleting recombination excision circles (KREC). The 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. (Florence Italy, Oct.3-6, 2012)
 3. S Nonoyama: Complexities of Newborn