

201231125A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業

血液免疫系細胞分化障害による疾患の
診断と治療に関する調査研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野々山 恵章

平成25(2013)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

血液免疫系細胞分化障害による疾患の
診断と治療に関する調査研究

目 次

I. 総括研究報告

- 血液免疫系細胞分化障害による疾患の診断と治療に関する調査研究 ----- 1
野々山恵章 (防衛医科大学校小児科学講座)

II. 分担研究報告

1. MYH9異常症 ----- 10
川口裕之 (防衛医科大学校小児科学講座)
2. 血液免疫系細胞分化障害による疾患の診断と治療に関する調査研究 ----- 13
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)
3. 網膜異形成症患者および重症先天性好中球減少症患者由来iPS細胞樹立
およびそれを用いた病態解析 --- 23
中畑 龍俊 (京都大学iPS細胞研究所臨床応用研究部門)
4. 血液免疫系細胞分化障害による疾患の診断と治療に関する調査研究 ----- 31
小原 收 (公益財団法人かずさDNA研究所)
5. 小児造血不全症候群におけるGATA2変異の検討 ----- 36
小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学)
6. 常染色体優性遺伝形式を示す血小板減少症家系におけるインテグリン β 3 L718P変異の同定
小林 正夫 (広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学) ----- 40
7. X染色体不活化異常により発症したWiskott-Aldrich症候群 ----- 46
原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
8. 血液免疫系細胞分化障害による疾患の診断と治療に関する調査研究 ----- 51
山口 博樹 (日本医科大学血液内科 講師)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 55

IV. 研究成果の刊行に関する別冊 ----- 59

I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業)

血液免疫系細胞分化障害による疾患の 診断と治療に関する調査研究

平成 24 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 小児科学講座 教授)

研究要旨

血液免疫系分化障害による疾患の診断と治療について、以下の研究を実施した。

- a) 原因遺伝子同定について、次世代シーケンサーによるExome解析と細胞分析装置(Luminex)などによる機能解析実験、iPS細胞、ヒト化マウスなどの新規技術を用いる分化実験により解析した。その結果、本疾患群で、GATA2、IKAROS、DNAMTB3、ZBTB24、FANCEなどが、疾患原因遺伝子であることを解明した。代表的な遺伝子を以下に示す。

B細胞分化障害による低 γ グロブリン血症を呈する患者原因遺伝子が、Fanconi貧血の原因遺伝子であるFANCEであることを世界で初めて見出した。

単球・樹状細胞とB細胞が欠損する疾患の原因遺伝子がGATA2であることを見出し、国内11症例の臨床的な解析を行った。その結果、易感染性に加え、加齢に伴い白血病を発症することを見出した。T細胞にGATA2が発現し、T細胞機能分化にGATA2が重要な役割を果たすことも見出した。

B細胞分化障害と樹状細胞欠損が起きる患者で、再生不良性貧血を起こすと報告されている分子の変異を見出した。さらに当該分子と複合体を形成する分子群の変異によっても樹状細胞とB細胞が欠損し、これらの分子がGATA2発現に関わっていることも見出した。すなわち、GATA2関連疾患を見出しその原因遺伝子群を同定した。

先天性角化不全症(DKC)で、ロスモンド・トムソン症候群、毛細血管拡張性運動失調症、Bloom症候群の原因遺伝子であるRECQL4、ATM、BLMのヘテロ変異が高率に認められ、DKCの病態への関与が考えられた。

常染色体優性遺伝形式をとる先天性血小板減少症家系、4世代、10名の全エクソンシーケンスを行い、ITGB3遺伝子のT2231C変異を原因遺伝子変異候補として同定した。L718P変異の機能解析から、インテグリン β 3の細胞膜周辺領域のヘテロ接合性変異が機能獲得型変異としてインテグリンシグナル伝達経路の恒常的部分活性化とRhoAシグナルの抑制を示すことを明らかにした。

- b) アンプリコンPCRにより候補遺伝子を増幅抽出し、次世代シーケンサーによる解析と組み合わせる新規技術を確立し、重症複合型免疫不全症を起こす26遺伝子を迅速に遺伝子解析する方法を確立した。
- c) 網羅的エクソンシーケンシングを補完する目的のためのRNAシーケンシングの補完性を検証し、全血の白血球分画のRNAシーケンシングによって既知の免疫不全症原因遺伝子の78% (227遺伝子中の177遺伝子) が検出されることを見出した。
- d) 好中球減少とT細胞欠損を呈する疾患である細網異形成症患者由来の繊維芽細胞から、iPS細胞を作成した。樹立したiPS細胞の評価(トランスジーンサイレンシングの確認、未分化マーカーの確認、染色体検査、奇形腫アッセイ)が完了した。これを血液前駆細胞に分化させ、コロニーアッセイ、骨髄系細胞やリンパ球への分化アッセイ、アポトーシス解析などのin vitro 解析を行った。患者クローンでは著明な分化障害があることを示すことができた。さらに細網異形成症の原因遺伝子であるAK2遺伝子を導入し、本疾患の血球分化障害が回復することを示した。
- e) 慢性先天性好中球減少症患者由来iPS細胞を樹立し、好中球分化にさせ、患者クローンでは成熟好中球への分化が著明に障害されていることを示すことができた。
- f) 既知の原因遺伝子に変異を認めず、テロメア長の短縮が確認された骨髄不全16症例を集積した。
- g) MYH9 異常症のスクリーニングのために、既知の変異の好発部位を網羅する直接シーケンス法の系を構築した。
- h) 女性のWiskott-Aldrich症候群例がX染色体不活化の偏倚により発症していることを解明した。
- i) 血液免疫系細胞分化障害を示す疾患のスクリーニングを行うために、3レーザー10カラーFACS診断法を開発した。
- j) 原発性免疫不全症のデータベースであるPIDJを、より網羅的、系統的に解析ができるようにのバージョンアップを行った。

以上、血液免疫系の分化障害による疾患の病態解明、原因遺伝子同定に、次世代シーケンサーを用いたexome解析、iPS細胞による分化実験、アンプリコンPCRによる遺伝子解析、WEBベースの患者登録システムであるPIDJの活用などにより、十分な成果を上げることが出来た。

研究分担者

川口 裕之

防衛医科大学小児科学講座、准教授

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

小原 收

公益財団法人かずさ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

日本医科大学血液内科、講師

小林 正夫

広島大学大学院医歯薬保健学小児科学、教授

原 寿郎

九州大学大学院医学研究院成長発達医学小児科、教授

遺伝子診断、原因遺伝子の同定は疾患の診療と治療に重要である。そこで、血液免疫系細胞分化障害による疾患の遺伝子同定、迅速な遺伝子診断法の確立、診断基準・治療ガイドライン作成、スクリーニングなどにより早期診断、病態解明、早期治療により疾患予後を改善することを目的とする。

対象疾患は、血液系・免疫系細胞の両者の分化に障害をきたすという特徴を持つ、1)慢性好中球減少症、2)家族性血小板減少症(X連鎖血小板減少症、

Wiskott-Aldrich症候群、Epstein症候群(MYH9異常症)、3)細網異形成症、4)Emberger症候群、5)慢性肉芽腫症、6)家族性血球貧食症候群、7)申請者が見出した新規血液免疫系細胞分化障害である家族性樹状細胞欠損症とする。4)、7)はGATA2変異が共通の原因であることが判明し、GATA2異常症とも呼ばれる。

遺伝子診断については、既知遺伝子についてはアンプリコンPCRにより候補遺伝子を増幅抽出し、次世代シーケンサーによる解析と組み合わせる新規技術により迅速診断法を確立する。

未知遺伝子については、次世代シーケンサーによるExome解析とiPS細胞などの新規技術を用いる分化実験により、原因遺伝子を同定する。すなわち、Exome解析で変異を認めた候補遺伝子について、各疾患由来iPS細胞に遺伝子導入し、血液免疫系幹細胞への正常分化を解析する手法で原因遺伝子を同定する。その際、申請者が構築したPIDJ免疫不全症データベースに保存してある患者細胞、DNA、家族歴、臨床情報を活用する。本研究内容での使用は、文書による同意を得る。

患者家族会と十分に連携し、ホームページを通じたWebベースの情報交換により、

A. 研究の目的

造血幹細胞からの血液免疫系細胞の分化障害により、様々な疾患が発症する。分化に参与する遺伝子の障害が原因であり、

患者が必要とする研究を行い、結果として得られた情報を周知する。

診断および治療法のガイドラインを作成する。

上記研究により、稀少難病の適切な治療が可能になり、難病患者の予後改善に貢献する。患者会との連携により、患者が求める難病対策を知ることができ、それに対応する研究が行える。また研究成果を患者に周知することができる。これらの成果は難病対策行政政策に活用できる。

以上、血液免疫系細胞分化障害による疾患の迅速な遺伝子診断法、新規遺伝子同定などにより早期診断を行い、患者由来血液免疫系細胞、疾患由来iPS細胞樹立と血液免疫系細胞への分化実験などを用いて病態を解明し、早期治療により予後を改善することを目的とする。

B. 研究方法

1) 迅速な遺伝子診断法の確立

既存のデータベースを活用し、臨床情報などから既知遺伝子の異常が予想される場合は、疾患DNAをアンプリコンPCRにより数10個までの候補遺伝子の全エクソンを同時に1チューブ内、1反応で増幅し、増幅された候補遺伝子を次世代シーケンサーを用いて100-1,000回のdeep sequenceを行う。すなわち次世代シーケンサーにより遺伝子診断を行う。この方法に依れば、これまでの候補遺伝子の各ExonごとにPCRを行い、キャピラリーDNAシーケンスを行う方法に比べ、遺伝子診断に要する時間が大幅に短縮できる。この手法を応用すれば、例えばモザイク遺伝子変異であっても、1,000回程度のdeep sequenceを行えば、十分診断できる。なお、場合により、RNAシーケンスにより、遺伝発現の解析、スプライス異常の解

析も行う。また、キャピラリーDNAシーケンサーによる確認も行う。このアンプリコンPCRと次世代シーケンサーを組み合わせた迅速な遺伝子解析法を確立する。

2) 原因遺伝子同定

Exome解析を行い、変異の見出された遺伝子について家系分析、機能解析などにより、原因遺伝子を同定し、in vitroでの細胞分化障害実験などで、患者の病態を解明する。

Exome解析で変異を認めた候補遺伝子について、各疾患由来iPS細胞に遺伝子導入し、血液免疫系幹細胞への正常分化を解析する手法も用いる。

AK2異常による細網異形成症由来iPS細胞を用い、T細胞、NK細胞、好中球、赤血球で分化障害があることを示す。同様に、HAX1遺伝子異常による先天性好中球減少症患者由来iPS細胞で好中球分化異常をin vitroで再現する。これにより病態解明につなげる。

こうした実験では、申請者が構築したPIDJ免疫不全症データベースに保存してある患者細胞、DNA、家族歴、臨床情報を利用する。貴重なデータがすでに集積されていて非常に有効である。

3) 患者会疾患ホームページの整備、患者勉強会、医療相談会の開催

患者団体と密接な連携を取っており、これまでも勉強会、医療相談会などを開催する。患者会ホームページ立ち上げにも協力した。これを生かし、患者の求める難病対策研究を行うとともに、Webなどを用いた迅速な疾患情報伝達、患者・医師の相互交流を引き続き行う。患者会代表と共に、国際

的な免疫不全症患者会に参加し、今後の患者会での疾患理解に貢献する。

(倫理面への配慮)

原発性免疫不全症の早期診断法の確立に関する研究(実施責任者:野々山恵章、防衛医科大学校倫理委員会、平成21年7月27日承認)

先天性免疫不全症の遺伝子解析研究(実施責任者:野々山恵章、防衛医科大学校倫理委員会、平成21年12月11日承認)

先天性免疫不全症に対する造血幹細胞移植に関する検討(実施責任者:野々山恵章、防衛医科大学校倫理委員会、平成23年7月1日承認)

原発性免疫不全症の遺伝子解析(実施責任者:今井耕輔、東京医科歯科大学倫理委員会、平成20年6月24日承認)

小児期発症疾患の遺伝子素因解明に関する研究(実施責任者:今井耕輔、東京医科歯科大学倫理委員会、平成24年11月5日承認)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究(実施責任者:中畑龍俊、京都大学医の倫理委員会、当初承認日:平成20年6月4日、変更・追加承認日:平成24年7月19日)

ヒト疾患特異的iPS細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究(実施責任者:中畑龍俊、京都大学医の倫理委員会、当初承認日:平成20年6月4日、変更・追加承認日:平成24年7月19日)。

網羅的な全エクソンシーケンシング研究(実施責任者:小原収、かずさDNA研究所倫理委員会、平成20年2月5日承認)

RNAシーケンシングを発現プロファイル解析および塩基配列解析研究(実施責任者:小原収、かずさDNA研究所倫理委員会、

平成24年10月16日承認)

稀少小児遺伝性血液疾患における原因遺伝子の探索研究(実施責任者:小島勢二、名古屋大学医学部倫理審査委員会、平成24年年2月10日承認)

先天性骨髄不全症の遺伝子解析研究(実施責任者:山口博樹、日本医科大学遺伝子倫理審査、平成24年3月7日承認)

原発性免疫不全症の遺伝子解析研究(実施責任者:原寿郎、九州大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委審査委員会、平成20年6月3日承認)

C. 研究結果

a) 原因遺伝子同定

原因不明の高IgM症候群患者、分類不能型免疫不全症患者37例について、exome解析を行い、その中から原因遺伝子と考えられる遺伝子変異について、キャピラリーシーケンスにより変異の確認を行った。すなわち、次世代シーケンサーによるExome解析、iPS細胞などの新規技術を用いる分化実験により、GATA2, IKAROS、DNAMTB3、ZBTB24、FANCE、ITGB3などの遺伝子で変異を見出し、これらの遺伝子が血液系と免疫系に障害を持つ疾患の原因遺伝子であることを解明した。

B細胞分化障害による低 γ グロブリン血症を呈する患者の原因遺伝子が、Fanconi貧血の原因遺伝子であるFANCEであることを見出した。患者由来単核球を用い、染色体脆弱試験でFanconi貧血特有の結果を示した。これにより、FANCE異常が骨髄不全の症状を呈さず、B細胞欠損とその結果による低 γ グロブリン血症を示すことを、世界で始めて示した。

単球・樹状細胞とB細胞が欠損する疾患の原因遺伝子がGATA2であることを見出し、

国内 11 症例の臨床的な解析を行った。その結果、易感染性に加え、加齢に伴い白血病を発症することを明らかにした。さらに、T細胞が活性化によりGATA2を発現すること、サイトカイン産生などのT細胞機能分化にGATA2が重要な役割を果たすことを見出した。GATA2とT細胞機能成熟の関係を明らかにした初めてのデータである。

再生不良性貧血を起こすと報告されている分子の変異により、B細胞分化障害と樹状細胞欠損が起きる事を見出した。さらに当該分子と複合体を形成する分子の変異により樹状細胞とB細胞が欠損し、これらの分子がGATA2発現に関わっていることも見出した。すなわち、GATA2関連疾患を見出しその原因遺伝子群を同定した。

先天性角化不全症(DKC)におけるテロメア関連遺伝子変異は診断に重要である。次世代シーケンサーによる遺伝子変異検索は、正確で効率的にDKCの既知の原因遺伝子変異を同定することができた。また新規遺伝子変異の探索では、ロスモンド・トムソン症候群、毛細血管拡張性運動失調症、Bloom症候群の原因遺伝子であるRECQL4、ATM、BLMのヘテロ変異が高率に認められ、DKCの病態への関与が考えられた。

常染色体優性遺伝形式をとる先天性血小板減少症家系、4世代、10名が血小板減少と軽度の出血傾向を示した。疾患原因遺伝子を同定するために家系内患者4名のゲノムDNAを用いて全エクソンシーケンスを行った。4名に共通する90のアミノ酸置換を伴う遺伝子変異の中から、ITGB3遺伝子のT2231C変異を原因遺伝子変異候補として同定した。L718P変異の機能解析から、インテグリンb3の細胞膜周辺領域のヘテロ接合性変異が機能獲得型変異としてイ

ンテグリンシグナル伝達経路の恒常的部分活性化とRhoAシグナルの抑制を示すことを明らかにした。インテグリン α IIb β 3(GPIIb/IIIa複合体)はフィブリノゲン(Fg)とフォンウィルブランド因子(VWF)の受容体で、そのリガンドとの結合は血栓形成の最終段階である血小板凝集に不可欠なシグナル伝達である。これらの機序が血小板機能異常と大小不同を伴った血小板減少に関与していることが示唆された。

b) アンプリコン PCR による迅速遺伝子診断法の開発

アンプリコン PCR により候補遺伝子を増幅抽出し、次世代シーケンサーによる解析と組み合わせる新規技術を確立し、重症複合型免疫不全症を起こす26遺伝子を迅速に遺伝子解析する方法を確立した。具体的には重症複合型免疫不全症の原因遺伝子を、700種類のプライマーを1チューブに入れてPCR増幅を行うアンプリコンPCR法と次世代シーケンサーを組み合わせた遺伝子解析が、遺伝子診断の迅速化に有効である事を示した。

c) RNA シーケンスの検証

網羅的エクソンシーケンシングを補完する目的のためのRNAシーケンシングの補完性を検証し、全血の白血球分画のRNAシーケンシングによって既知の免疫不全症原因遺伝子の78%(227遺伝子中の177遺伝子)が検出されることを見出した。

d) 細網異形成症由来 iPS 細胞の樹立と分化実験

細網異形成症患者由来の繊維芽細胞からiPS細胞を作成した。樹立したiPS細胞の評価(トランスジーンサイレンシングの確

認、未分化マーカーの確認、染色体検査、奇形腫アッセイ)が完了した。これを血液前駆細胞に分化させ、コロニーアッセイ、骨髄系細胞やリンパ球への分化アッセイ、アポトーシス解析などの *in vitro* 解析を行った。患者クローンでは著明な分化障害があることを示すことができた。さらに細網異形成症の原因遺伝子である *AK2* 遺伝子を導入し、本疾患の血球分化障害が回復することを示した。

e) 重症先天性好中球減少症由来 iPS 細胞樹立と分化実験

重症先天性好中球減少症の根本治療は造血幹細胞移植であるが、移植前の血球は減少していることから、患者からの血液細胞での研究は非常に困難である。このため、患者由来 iPS 細胞樹立は本疾患の病態解析にとって、非常に有望と考えられる。今回の研究で、*HAX1* 遺伝子変異による重症先天性好中球減少症患者から、iPS 細胞を樹立することに成功した。患者由来 iPS 細胞からの好中球への分化アッセイを行ったところ、正常 ES/iPS 細胞や正常原因遺伝子修復後の患者由来 iPS 細胞からの好中球と比較して、著明な好中球分化障害を認めた。これは患者骨髄所見と一致しており、本疾患の病態再現に成功した。

f) 骨髄不全症の遺伝子解析

既知の原因遺伝子に変異を認めず、テロメア長の短縮が確認された骨髄不全16症例を集積した。4症例において、直接塩基決定法では原因遺伝子が同定できなかったが、次世代シーケンサーによって既知の原因遺伝子として、*RECQL4*、*ATM*、*BLM* の変異を同定することが出来た。

g) MYH9 異常症スクリーニング法開発

血小板減少を呈する MYH9 異常症のスクリーニングのために、既知の変異の好発部位を網羅する直接シーケンス法の系を構築した。また MYH9 分子が T 細胞機能と関連していることを示した。

h) 女性の Wiskott-Aldrich 症候群発症機序の解析

Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) は、X 染色体上に code された WASP 遺伝子の変異によって通常男児に発症する。近年、常染色体劣性遺伝形式をとる WASP-interacting protein (WIP) 欠損による WAS が報告されたが極めてまれである。今回の研究で、WAS 女児例を明らかにした。患児は超低出生体重児として出生し、生下時より血小板減少が持続した。生後 4 か月時に内視鏡検査で分類不能型腸炎を確認したことから WAS を疑い、WASP 欠損を確認した。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。他方、genome DNA の解析では、heterozygous な WASP ナンセンス変異を認めた。WIP 遺伝子に異常は認めなかった。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。X 染色体不活化異常によって発症した女性 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。

i) 10 カラーFACS 法による血液免疫系細胞分化の解析

血液免疫系細胞分化障害を示す疾患のスクリーニングを行うために、3 レーザー10 カラーFACS 診断法の開発を行い、従来13～18チューブが必要であった末梢血リンパ球分画解析が、7チューブで済むようになり、より少量の血液での解析が可能になった。2012.8月-11月に免疫不全症患者24検体の検討を行った。

○研究目的の達成度

当初計画したほとんどの疾患の解析について、最新の技術を各研究分担者同士が十分に連携することにより、十分に成果を得た。結果的に、GATA2、IKAROS、DNAMTB3、ZBTB24、FANCEなどの遺伝子が、血液免疫系に障害を来す疾患の原因遺伝子である事を示すことが出来た。これらの遺伝子の機能解析により、病態解析ができた。病態解明により、より適切な治療法の選択につなげることが出来た。

次世代シーケンサーによるExome解析、700種類のプライマーを1チューブに入れ、同時にPCRを行うアンプリコンPCR法と次世代シーケンサーによる遺伝子解析が遺伝子診断の迅速化に有効である事、RNAシーケンスによる分化因子の同定、疾患由来iPS細胞による分化実験と疾患の再現などの手法が極めて効果的である事が判明した。

また、患者データベースであるPIDJが非常に有効に活用であった。

D. 考察

原因遺伝子が既知の疾患については、アンプリコン PCR と次世代シーケンサー

による遺伝子診断法の確立により、迅速に確定診断ができるようになる。次世代シーケンサーによる deep sequence で診断が可能になるため、従来の DNA sequence に対し費用対効果が高く有用である。

遺伝子が未知の疾患(家族性樹状細胞欠損症)については、原因遺伝子同定により遺伝子診断が可能になり、病態解明、新規治療法開発に貢献出来る。次世代シーケンサーによるExome解析で新規遺伝子を同定する方法は、従来法に比べ費用対効果が高く有用である。iPS細胞からの血液免疫系細胞の分化系と、RNA sequence による分化段階で発現が更新する遺伝子を同定することで、新規分化因子が同定出来ると考えられる。

AK2 遺伝子変異による細網異形成症患者2名および HAX1 遺伝子変異による重症先天性好中球減少症患者1名から iPS 細胞を樹立することに成功した。細網異形成症では、原因遺伝子の導入により、血球分化が正常化し、これら難病の新しい治療法の開発につなげた。患者由来 iPS 細胞を原因遺伝子同定、病態解明に用いることが可能になると考えられた。

以上の結果をもとに、診断および治療法のガイドラインを作成する。WEB 上での公開などにより、一般への疾患の周知をはかり、診断漏れを防ぐ。患者家族会と十分に連携し、ホームページを通じた Web ベースの情報交換により、患者が必要とする情報を周知する。これにより、稀少難病患者の予後改善に貢献できる。

申請者らが構築したデータベース PIDJ は、本研究の遂行に非常に有用であった。このデータベース構造を公開し、他のデータベース構築において活用されると、難病全体に関する貴重なデータベースになると

考えられる。

E. 結論

以上、血液免疫系分化障害による疾患群の診断、病態解明、治療について大きな成果を上げることが出来た。診断ガイドラインの作製、新規治療の開発を行い、本疾患群の問題点の解決をめざす。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 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。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

Ⅱ 分 担 研 究 報 告

MYH9 異常症

研究分担者 川口 裕之 (防衛医科大学校小児科学講座准教授)

研究協力者 國島 伸二 (国立病院機構 名古屋医療センター
臨床研究センター高度診断研究部)

研究要旨

先天性血小板減少症には、造血に関係する体細胞の異常が想定される。従って、これらの疾患では血小板減少症以外にヒトの自然免疫もしくは獲得免疫に関係する異常が併存する可能性があり、事実臨床的にもしくは動物実験等において免疫異常が証明される場合がある。今回、血小板減少症を示した症例について、免疫細胞の精査を行った。この結果、検討した範囲でいくつかの免疫担当細胞の数的・機能的異常を認めた。今後は、より多くの症例についての検討を行なう必要があると考えられた。

A. 研究の目的

MYH9 異常症をはじめとする先天性血小板減少症には、造血に関係する体細胞の異常が想定される。造血系細胞の先天異常症においては複数の系列の異常を合併することがしばしばあり、免疫担当細胞と巨核球系細胞の量的・機能的な病的状態が合併する場合も想定される。たとえば原発性免疫不全症の Wiscott-Aldrich 症候群は、T 細胞反応低下、Th1 細胞への分化障害、NK 活性低下、免疫グロブリン IgM 低下、特異抗体産生能低下、好中球・単球遊走能低下を示す伴性劣性遺伝形式の遺伝性疾患であるが、血小板減少症がほぼ前例で見られる。一方、造血障害によるメカニズムとは別の機序による血小板減少症と免疫不全の合併も存在する。MYH9 異常症は先天性血小板減少症に腎障害や聴覚器障

害を伴う状染色体優性遺伝形式の遺伝性疾患であるが、最近マウスにおいて T 細胞活性化の障害があることが報告されている。これは、細胞骨格を構成する非筋ミオシン重鎖 IIA (NMMHC-IIA) 蛋白の異常が、血小板の形態のみではなく、T 細胞と抗原提示細胞の免疫学的シナプス (immunological synapse) の安定性を損なう結果、T 細胞の活性化が損なわれる。

上記の事情により、血小板減少症を示すに対して免疫学的な異常の有無について精査を行い今後の研究における基礎的な情報を得ることを目的として、今回の研究を計画した。

B. 研究方法

防衛医科大学校小児科で診療を受けた血小板減少症の症例のうちで、明らかな免

疫性血小板減少症（特発性血小板減少症紫斑病）ではない症例について、文書による同意を得た後に、末梢血単核球を比重遠心法により分離してベクトン・ディッキンソン社製の FACSCalibur™ フローサイトメーターを使用して細胞の表面抗原の分析を行なった。また、同じく同意が得られた症例について末梢血単核球から DNA を抽出し、TREC (T cell receptor recombination circles)と KREC (Kappa-chain recombination excision circles) について real time PCR による定量を行なった。

(倫理面への配慮)

課題「血小板減少症における MYH9 異常症のスクリーニング」につき防衛医科大学校倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

明らかな免疫性血小板減少症（特発性血小板減少症紫斑病）が否定された 5 症例について、上記の方法により検討し、別表の様な結果を得た。この結果、

- 1) 症例 1 では、CD4/CD8 比の低下、胸腺ナイーブ細胞の減少、CD4/CD8 陽性細胞の増加、T 細胞の減少、ナイーブ B 細胞の減少、TREC の低値が認められた。
- 2) 症例 3 では、NK 細胞の減少、pDC/mDC の減少、TREC の低値が認められた。
- 3) 症例 4 では、CSR B 細胞の減少、ナイーブ B 細胞の増加、メモリー B 細胞の減少、TREC の低値が認められた。
- 4) 症例 5 では、NK 細胞の減少が認められた。
- 5) 以上の内で明らかな原発性免疫不全症を合併しているのは症例 4 のみであった

<別表>

	Surface marker	Case1	Case2	Case3	Case4	Case5	Gate
T cell	CD3	48.80	55.81	43.48	61.20	76.74	%Lym
Helper T cell	CD4	31.76	64.52	48.17	46.00	43.47	%CD3Lym
Cytotoxic T cell	CD8	54.05	28.14	38.57	46.70	34.23	%CD3Lym
	CD4/CD8	0.59	2.21	1.24	0.99	1.27	
Memory T cell	CD4+CD45RO	71.17	12.99	29.48	28.90	23.88	%CD4CD3Lym
Thymic naive T cell	CD45RA+CD31+	5.52	62.68	52.49	61.80	65.31	%CD4CD3Lym
Central naive T cell	CD45RA+CD31-	14.78	26.59	11.57	5.51	10.48	%CD4CD3Lym
Treg	CD25+CD127 ⁻ ±	11.22	13.18	5.92	7.28	11.16	%CD4CD3Lym
ALPS criteria (DNT)	CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD3 ⁺ αβT ⁺	3.10	1.09	1.03	0.90	1.48	%CD3TCRαβ
γδT cell	γδT	1.30	4.43	9.50	8.50	20.44	%CD3
NKT cell	CD3+TCRV24α+TCRV11β+	0.01	0.02	0.02	0.03	0.02	%CD3
B cell	CD19	38.41	33.03	52.65	32.60	16.79	%Lym
Transitional B cell	CD38+IgM ⁺ high	4.47	0.86	2.75	2.80	1.83	%CD19Lym
Plasma cell	CD38+IgM ⁻ high	0.30	1.04	0.13	0.13	0.87	%CD19Lym
pre-B2 cell (CSR B)	CD19+IgD ⁻ IgM ⁻	2.45	2.69	7.22	0.15	11.46	%CD19Lym
Naive B cell	CD19+CD27 ⁺ IgD ⁺	80.55	91.21	87.65	97.30	74.86	%CD19Lym
Memory B cell	CD27 ⁺	15.90	8.64	9.98	2.10	22.15	%CD19Lym
IgM memory B cell	CD19+CD27 ⁺ IgD ⁺	7.58	1.89	4.14	1.79	11.84	%CD19Lym
Switched memory B cell	CD19+CD27 ⁺ IgD ⁻	8.32	4.74	6.41	0.29	10.40	%CD19Lym
	IgK	49.71	55.27	54.53	44.60	53.69	%CD19Lym
	IgL	11.43	38.30	42.30	44.10	43.71	%CD19Lym
	KL positive	7.43	1.68	0.20	0.30	0.34	%CD19Lym
	CD38 ⁻ CD24 ⁺⁺	14.08	12.66	13.30	6.00	15.35	%CD19Lym
	CD38 ⁺ CD24 ⁺	68.88	59.25	79.86	10.20	76.84	%CD19Lym
	CD38 ⁺ CD24 ⁺⁺	6.59	18.23	3.67	69.90	1.75	%CD19Lym
NK cell	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	1.48	5.45	1.14	1.41	1.98	%Lym
pDC	Lin ⁻ HLADR ⁺ CD123 ⁺	0.22	0.21	0.02	0.23	0.13	%WBC
mDC	Lin ⁻ HLADR ⁺ CD11c ⁺	1.08	0.21	0.02	0.23	0.47	%WBC
	TREC	0.00	-	139.70	51.00	-	
Lymphocyte turnover/proliferation marker	cjKREC	59300.00	-	11770.00	7800.00	-	
	sjKREC	2606.00	-	2570.00	39000.00	-	

D. 考察

1) 達成度について

今回免疫学的な評価を行なうことができた 5 例での検討で、血小板減少症の中には何らかの免疫異常を合併している症例が存在することが判明した。しかし、これらの異常が感染等何らかの原因により生じた二次的な変化である可能性については検討を要する。このためには、同じ症例について、異なる時期のサンプルについての検討が必要であると考えられる。

E. 結論

(1) 先天性血小板減少症には、精査した場合に免疫不全の合併を見出すことのできる症例が存在する。

(2) 上記の免疫不全が原発性免疫不全かどうかについては、検討を要する。

(3)上記の免疫不全は血小板減少症の種類により障害されている免疫細胞の帰属と障害の程度が異なることが予想される。

(4)以上について今後症例を蓄積して知見の集積に努めることが望ましい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uyeda T, Echizenya T, Eto S, Otani K, Sato T, Takahashi T, Ito E, Yonesaka S, Kunishima S. Adams-Oliver Syndrome and familial MYH9 mutation. *Pediatr Int.* 54:407-9, 2012.
- 2) Hao J, Kunishima S, Guo X, Hu R, Gao W. A large family with MYH9 disorder caused by E1841K mutation, suffering from serious kidney and hearing impairment and cataracts. *Ann Hematol.* 91:1147-8, 2012.
- 3) Kitamura K, Kunishima S, Tahara M, Ogiwara S, Dobata N, Dobata T, Sugihara A, Nakashima T, Sasaki Y, Nagumo K, Kubota M, Kinugawa Y, Ieko M, Kumaki S. Transient hemiparesis in a 14-year-old boy with MYH9 disorders. *Int J Hematol.* 96:376-9, 2012.
- 4) Kunishima S, Tomii T, Kudo K, Saito H. G to T transversion at the first nucleotide of exon 26 of the MYH9 gene results in a novel missense mutation and abnormal splicing in platelets. *Eur J Med*

Genet. 55:763-5, 2012.

- 5) Murayama S, Akiyama M, Namba H, Wada Y, Ida H, Kunishima S. Familial cases with MYH9 disorders caused by MYH9 S96L mutation. *Pediatr Int.* 55:102-4, 2013.
- 6) Takagi M, Piao J, Kawaguchi H, Imai C, Ogawa A, Watanabe A, Akiyama K, Kobayashi C, Mori M, Ko K, Mizutani S. Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous regression of JMML. *Leukemia.* (in press) 2013.

2. 学会発表

- 1) 今回の研究の成果の一部は第55回日本小児血液・がん学会学術集会(2013年11月、場所未定)で報告する予定である。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

血液免疫系細胞分化障害による疾患の 診断と治療に関する調査研究班

- 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)
- 研究協力者 森尾 友宏 (東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科
発生発達病態学)
- 満生 紀子 (東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科
発生発達病態学)
- 寺田 尚美 (東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センター)

研究要旨

1. 血液免疫系細胞分化障害を示す疾患のスクリーニングを行うために、3レーザー10カラーFACS診断法の開発を行い、従来13~18チューブが必要であった末梢血リンパ球分画解析が、7チューブで済むようになり、より少量の血液での解析が可能になった。2012.8月-11月に免疫不全症患者24検体の検討を行った。
2. 原因不明の高IgM症候群患者、分類不能型免疫不全症患者37例について、exome解析を行い、その中から原因遺伝子と考えられる遺伝子変異について、キャピラリーシーケンスにより変異の確認を行った。

A. 研究の目的

低ガンマグロブリン血症とそれに伴う易感染性を伴う高IgM症候群(HIGM)、分類不能型抗体産生不全症(CVID)はどちらも、B細胞の最終分化段階の異常であり、自己免疫疾患、悪性腫瘍の合併を高率に合併する。高IgM症候群の3/4の症例は、CD40LあるいはAID遺伝子異常によるものであるが、残り1/4の患者については原因不明である。また、CVIDでは、5-10%の患者で遺伝子異常が同定されるが、重症複合免疫不全症(SCID)あるいは免疫調節異

常症の原因遺伝子の hypomorphic mutation であることもあり、これらを効率よく、的確に、診断することは患者の治療方針をたて、予後を向上させる上で不可欠である。そこで、本研究では、従来行ってきた4カラーFACSを発展させ、10カラーFACSでのリンパ球分画解析法を開発することを目的とした。また、一部の患者ではすでに exome 解析を行っているが、これらの患者について、キャピラリーシーケンスを用いて validation を行い、複数の患者で既知遺伝子の同定に至った。

B. 研究方法

1. 血液免疫系細胞分化障害を示す疾患のスクリーニングを行うために、3レーザー10カラーFACS診断法の開発を行った。FACS解析にはBD LSRFortessa セルアナライザー(ベクトンディッキンソン社)を用い、モノクローナル抗体としては、BD社、ベックマン・コールター社、バイオレジェンド社、ミルテニーバイオテック社のものを用いた。
2. 原因不明のHIGM, CVID患者について、exome解析を行い、その中から原因遺伝子と考えられる遺伝子変異について、キャピラリーシーケンスにより変異の確認を行った。

なお、患者検体に関しては、施設内倫理委員会承認済みの研究計画に基づいた説明書を用い患者および保護者に説明し、同意を得たものについて行った。

C. 研究結果

1. 3レーザー10カラーFACSにより、従来13~18チューブが必要であった末梢血リンパ球分画解析が、7チューブで済むようになり、より少量の血液での解析が可能になった(別図)。2012.8月-2013.2月に免疫不全症(疑い例も含む)患者33検体の検討を行った。現在、遺伝子解析結果、T細胞新生能(TREC)、B細胞新生能(KREC)との相関について検討中である。
2. 原因不明の高IgM症候群患者、分類不能型免疫不全症患者37症例について、exome解析を行った。そのうち、3例で既知原因遺伝子(BTK, FANCA, STAT1)の変異を認めた。3

症例とも、それまでの報告と異なる臨床像を呈しており、exome解析の遺伝子診断における有用性が明らかになった。残りの34症例について、共通する変異(日本人特有の非病的変異と考えられる)の除外、候補遺伝子の絞り込みとキャピラリーシーケンスによる再評価、機能解析について、今後検討する予定である。

D. 考察

小児患者においては、採血が困難なことも多く、また患者負担の観点からも検体量は極力少ないことが望ましい。今回の我々の研究により、10カラーによるリンパ球分化解析方法が確立され、健常者および33症例の様々なタイプの免疫不全症患者における解析を行った。これらの患者については、FACSでの解析情報をもとにして、候補遺伝子解析を行っており、次年度に向けて、その結果が期待される。

一方、候補遺伝子では正確な遺伝子診断に至らない例が少なからず存在する。こうした例に対して、全遺伝子のエクソン領域周辺の遺伝子解析が安価で行えるようになってきたため、37症例について解析を行った。この中から3例の患者について、既知遺伝子の同定に至った。BTK欠損患者については、B細胞数が正常に存在し、IgGも存在した。このため、IgA単独欠損症として紹介された例である。遺伝子解析により、*de novo*変異であることがわかり、さらに多民族での既報告がある変異であった。その例でも軽症の表現型をとることが記載されており、その機能解析について現在行っている。FANCAは小奇形を伴う先天性骨髄不全症候群であるファンconi貧血の最も頻度の高

い原因遺伝子であるが、今回の患者は成人例であり、白血球減少以外には、貧血・血小板減少が軽度であり、奇形も見られなかった。低ガンマグロブリン血症とEBウイルスの持続感染から慢性活動性EBウイルス感染症と診断され、骨髄移植にて完治しているが、遺伝子診断により、今後も上皮系がんの発症に注意が必要であり、不要な放射線撮影、照射、紫外線照射を避けることで合併症を防ぐことができると考えられる。STAT1は慢性皮膚粘膜カンジダ症の原因遺伝子として2011年に報告されたが、本症例は、それ以外に低ガンマグロブリン血症、日和見感染症、自己免疫疾患を合併した重症例であり、臍帯血移植にて救命した後、原因遺伝子が同定された。これにより、STAT1異常症の疾患スペクトラムの広がりが明らかになり、有意義であった。残る34例の患者もそれぞれ、特徴的な臨床症状検査所見を呈しており、今後解析を継続していきたい。

E. 結論

新たな診断方法の開発を行い、次世代シーケンサーを活用した研究により、一部の患者の遺伝子診断を行うことができた。今後、これらの方法を活用し、さらに多数の患者の疾患遺伝子の同定に努め、病態の理解と新たな治療法の開発に生かしていきたい。

F. 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*.2013(in press)

- 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*.2013 (in press)
- 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*. 2012;6:27-37.
- 4) 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 M.C, Latour S, Zhao X, Miyawaki T. Clinical and genetic characteristics of XIAP deficiency in Japan. *J Clin Immunol*. 2012;32:411-20.
- 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*, 2012;171:1273-6.
- 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*. 2012;30:71-8.
- 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)*.2012;77: 628-34.
- 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 M.S, Ariga T, Miyawaki T. Delayed onset adenosine deaminase deficiency associated with acute disseminated encephalomyelitis. *Int J Hematol*. 2012;95:692-6.
- 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*. 2012;54:543-6.
- 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*. 2012;32:690-7.
- 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*. 2013;17:29-32.
- 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* (2012).58, 446-466
- 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*,(2012). 53, 1865-1873.
- 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りますが、大丈夫ですか. *小児科診療*, (2012). 11, 2045-2048.