

ライソゾーム病の遺伝子変異に関する研究

研究分担者 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター センター長 大橋 十也

研究要旨

ファブリー病(FD)はX連鎖性劣性のライソゾーム病でありその責任遺伝子は α ガラクトシダーゼ(GLA)である。将来のマススクリーニング陽性例に対して遺伝子解析による確定診断は、重要である。今回 GLA 遺伝子変異が未同定の FD 家系の遺伝子解析を詳細に行なった所 intron 上に新規変異を同定し、本変異を持つ FD 家系症候性女性ヘテロ接合と無症状未診断女性の確定診断に至った。

A. 研究目的

ファブリー病の責任遺伝子(GLA遺伝子)はX染色体上に存在する。将来のマススクリーニング陽性例に対して遺伝子解析による確定診断は、重要である。我々は現在まで約250例のファブリー病の遺伝子解析を行いエクソン部、エクソン・イントロン接合部のシーケンスにて9割以上の症例で遺伝子変異が見つかったが判明しない例もあった。今回その様な例を対象に、イントロン部、ならびにcDNAの解析を行った。

B. 研究方法

FD家系のgenomic DNAを用いたダイレクトシーケンスによる遺伝子解析と白血球GLA酵素活性測定を行った。同一家系よりの患者検体:FD男性患者2名、症候性女性ヘテロ接合3名、無症状未診断女性2名及び健常対照群

(倫理面への配慮)

患者検体の採取・解析は慈恵大学の倫理委員会で審査・承認された後行った。

C. 研究結果

GLA 遺伝子解析の結果、2名のFD男性患者(5.1, 10.4)はGLA 遺伝子 intron3 に点突然変異(G>C)が存在していた。ファブリー症状を認める女性(101, 120, 421)では同個所にG/Cヘテロのシグナルが検出された。ファブリー症状のない女性(396, 497)は対象群(169, 281)と同様のシグナルであった。(カッコ:GLA活性 単位 nmol/mg/hr、正常値 170-281)

D. 考察

GLA 遺伝子解析結果により、FD 男性患者は

intron3 に変異(G>C)を持つ事が分かった。本変異は新規遺伝子変異であり、データベース解析においてSNPsではない変異であった。またこの変異は exon 上に存在しない事から、本変異はGLA 遺伝子にスプライシング異常を誘発させる可能性があると考えられた。そこで現在GLA cDNA 解析を検討中であり、既にスプライシング異常を示唆するデータを得ている。

症状のある女性ではG/C2つのシグナルが得られた為、変異GLA遺伝子のヘテロ接合という診断に至った。更に未診断女性は遺伝子変異無しの診断となった。酵素活性で女性ヘテロ接合を診断するのは困難であった。これはファブリー病を酵素活性でスクリーニングするときの問題点になる。

E. 結論

GLAの遺伝子解析と酵素活性解析はFD病女性ヘテロ接合の診断に有用である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE, Brown JR, Ohashi T. Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type II mice. Mol Genet Metab. 111; 139-146, 2013,
2) Sato T, Ikeda M, Yotsumoto S, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Fukuda T, Ohashi T, Suda T, Ohteki T. Novel interferon-based

pre-transplantation conditioning in the
treatment of a congenital metabolic disorder.
Blood 12; 3267-3273, 2013.

2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む。）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

ライソゾーム病の遺伝子治療に関する研究

研究分担者：衛藤 義勝 財団法人脳神経疾患研究所先端医療研究センター センター長

研究要旨

ライソゾーム病の遺伝子治療・細胞治療の実施とその支援体制の整備に関して、ライソゾーム病の遺伝子治療を進めていくための患者のスクリーニング、特に、NCL、酸性リパーゼ欠損症、ムコ多糖 IV、VI 型の濾紙血でのスクリーニング法の確立、又細胞治療の為のファブリ病からの iPS 細胞の作成と応用、又実際に遺伝子治療を進めるための遺伝子治療体制の基盤作りに関して検討した。

共同研究者：

高村歩美¹⁾、藤崎美和¹⁾、大樂武範²⁾、岩本武夫²⁾

1. 財団法人脳神経疾患研究所先端医療研究センター

2. 東京慈恵会医科大学共用研究施設

共同研究者：

樋口 孝³⁾、河越しほ³⁾、小林博司⁴⁾、大橋十也⁴⁾

3. 東京慈恵会医科大学遺伝病研究講座

4. 東京慈恵会医科大学遺伝子治療部

A. 研究目的

① 遺伝子治療をするためには対象となる患者を集積することが重要である。其の為の患者スクリーニングを簡便な濾紙血法で Lysosomal Acid Lipase (LAL) 欠損症、NCL、MPS IV、VI 型の開発を行った。

②ライソゾーム病の細胞治療、特にファブリ病でのセンダイウイルスベクター用い、iPS 細胞を作成し、将来の細胞治療を目指した。③ライソゾーム病の遺伝子治療体制整備の為に国際ネットワーク作成の整備事業を開催した。

B. 研究方法

① LAL 欠損症、MPS IV、VI 型、NCL の患者濾紙血（何れも当研究所での倫理委員会で承認）を用いて蛍光人口基質を用いて乾燥濾紙血の酵素活性を測定した。それぞれの疾患のスクリーニングにおいて、健常人（成人）40～80 名の酵素活性値を測定、正規分布を示すことを確認し、患者が少ない疾患（MPS）については 95% 基準範囲の下限値を Cut-off 値に設定した。Cut-off 値を下回った患者は再度測定を行い、その平均値が Cut-off 値以下であった場合を陽性とし、白血球での酵素活性測定あるいは遺伝子解析にて確定診断を行った。

②ファブリー病の患者皮膚繊維芽細胞を用いて山中 3 又は 4 因子をレトロウイルス或いはセンダイウイルスベクターに組み込み高橋、或いは西村らの方法に従い各々 iPS 細胞を作成した。

（何れも倫理委員会に提出承認済）

③遺伝病遺伝子治療体制の整備に関して、第 4 回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラムの組織を用いて主任研究者小野寺雅史、並びに大橋十也班員と協力して我が国のライソゾーム病遺伝子治療体制の確立を目指して進めている。

C. 研究成果

①ムコ多糖症 I V 型、V I 型での酵素分布は下記の通りである。

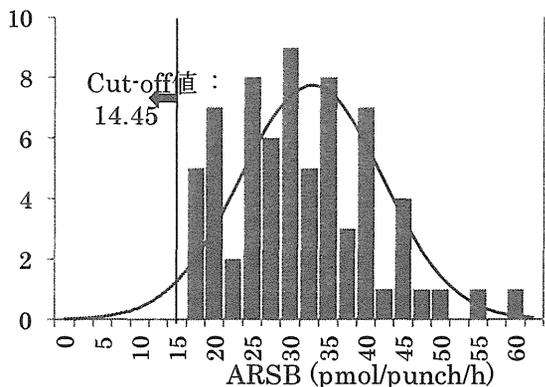


図1. ムコ多糖VI型の濾紙血での酵素活性(ARSB)の分布

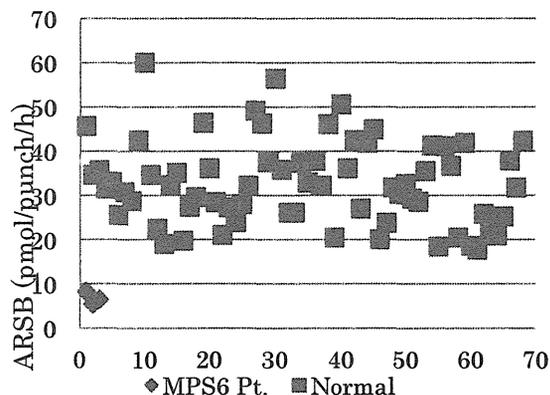


図2. 健常人および MPSVI 型患者の乾燥濾紙血の酵素(ARSB)活性値

図3

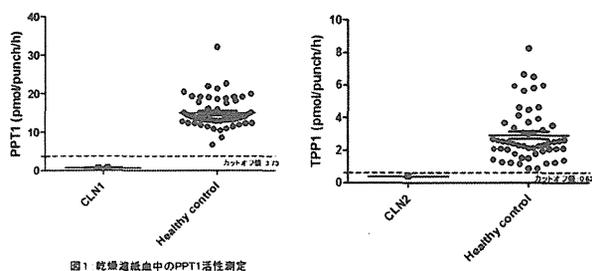


図1 乾燥濾紙血中のPPT1活性測定

図2 乾燥濾紙血中のTPP1活性測定

NCL 患者での濾紙血酵素活性の測定法の開発 図3 は NCL I, II 型患者の濾紙血での酵素測定結果

②ファブリ病患者での iPS 細胞作製に成功し、細胞内に多量の蓄積 GL 3 を認めた。



ファブリ病 iPS 細胞での蓄積物

③国際遺伝病遺伝子治療ネットワークの構築

現在以下の組織でライソゾーム病遺伝子治療ネットワークの構築を進めている。

国立成育医療研究センター
小野寺雅史班長、奥山虎之班員

タカラバイオ(ベクター作成)

慈恵医大/財団法人脳神経研究所(大橋班員、衛藤班員)

海外支援体制—フランス(アウブルグ教授ら)、イタリア(ナルチニ教授ら)

遺伝子治療サポート企業(ブルーバードバイオ他)

この体制を整備するネットワークを構築中

D. 考察

①濾紙血での遺伝子治療候補疾患、特に MPS VI 型の診断は有用であることを明らかにした。又同様に NCL (セロイドリポフスシノーシス) I, II 型の診断は我が国では当研究所のみが診断可能となり、今後の遺伝子治療候補の疾患であり、米国でも AAV ベクターを用いて遺伝子治療を 10 名以上の患者で進められており、我が国でも患者診断により将来の遺伝子治療を準備するためにも診断体制の充実は有用である。

②ファブリ病 iPS 細胞作製は将来の患者臓器移植体制に向けての基礎研究に繋がる。すでにファブリ病の iPS 細胞は障害が認められるので、酵素補充して標的細胞に分化することが重要であることが示唆された。

③我が国の遺伝病、特にライソゾーム病の遺伝子治療体制の整備は極めて重要であり、現在特にフランス、イタリアの遺伝子治療グループと交流し、我が国でも実現の道を開く努力を始めた。

E. 結論

遺伝病特にライソゾーム病を中心に遺伝子、細胞治療体制の構築をめざし、①遺伝子治療候補疾患、特に MS VI, NCL, Fabry 病の診断法の確立②iPS 細胞特にファブリ病での作成をめざした。③我が国でもライソゾーム病での遺伝子治療体制構築のための組織体制の整備を進める。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

【論文発表】

1. 原著論文

1) Takamura A, Sakai N, Shinpoo M, Noguchi A, Takahashi T, Matsuda S, Yamamoto M, Narita A, Ohno K, Ohashi T, Ida H, Eto Y. : The useful preliminary diagnosis of Niemann-Pick disease type C by filipin test in blood smear. Mol Genet Metab. 2013 Nov;110(3):401-4. Epub 2013 Aug 17.

2) Dairaku T., Iwamoto T, Minami M, Endo M, Ohashi T. Y. Eto. : A practical fluorometric assay method to measure lysosomal acid lipase activity in dried blood spots for the screening of cholesteryl ester storage disease and Wolman disease. Mol Genet Metab. Available online 16 November 2013

3) Kawagoe S, Higuchi T, Otaka M, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Okano HJ, Nakanishi M, Eto Y. Morphological features of iPS cells generated from Fabry disease skin fibroblasts using Sendai virus vector (SeVdp). Mol Genet Metab. 2013 Aug;109(4):386-9.

4) Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y.

Crawford BE, Brown JR, Ohashi T. Mol Genet Metab. 2013 in press

【学会発表】

1) M Fujisaki, J Matsumoto, A Takamura, T Higuchi, M Furujo, S Kawagoe, H Kobayashi, H Ida, Y Shimada, T Ohashi, T Dairaku, Y Eto Enzymatic Diagnosis of Maroteaux-Lamy disease (MP VI) in dried Blood Spots on Filter Paper The 54th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), Gifu, Japan, 2012 November 15th – 17th

2) M Fujisaki, A Takamura, T Dairaku, T Ohashi, H Ida, Y Eto : Enzymatic screening in dried blood spots and gene analysis of Mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA) in Japanese, 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Barcelona, Spain, 2013 September 3rd – 6th

3) Fujisaki M., Takamura A. , Dairaku T. , Ohashi T., Ida H., Eto Y.:

Enzymatic screening using dried blood spots and gene analysis of Mucopolysaccharidosis IVA (MPS IVA) in Japanese The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), Chiba, Japan, 2013 November 27th – 29th

4) Takamura A, Fujisaki M, Ida H., Ohashi, T. Eto Y.: Abnormal Intracellular Membrane Traffic in Juvenile Neural Ceroid Lipofuscinosis, Novel CLN1 Mutated Cases. 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD) and the 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD), November 27-29, 2013, Chiba, Japan

5) 高村歩美, 藤崎美和, 井田博幸, 大橋十也, 衛藤義勝: PPT1 遺伝子変異による若年型神経セロイドリポフスチン症の発症機構の解明. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 2013 年

- 6) Takamura A., Sakai T., Shinpo M., Yamamoto M., Narita A., Ohno K/, Ohashi, T. Ida H., Eto Y. The Useful Preliminary Diagnosis of Niemann-Pick Disease type C by Filipin Test in Blood Smear
12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIEM), September 3-6, 2013, Barcelona, Spain
- 7) 高村歩美, 酒井規夫, 新寶理子, 山本真也, 成田綾, 大野耕作, 井田博幸, 衛藤義勝: The useful preliminary diagnostic procedure of Niemann-Pick disease type C— Filipin test in blood smear —ニーマン・ピック病C型シンポジウム— 診断と治療—, 2013年4月27日, 東京
- 8) 高村歩美, 衛藤義勝, 藤崎美和, 若林太一, 井田博幸, 萩野谷和裕, 山本真也, 成田綾, 大野耕作 若年型ニーマン・ピック病 C 型 (NPC1) 3例に対する Miglustat の治療効果
第54回日本先天代謝異常学会総会, 2012年11月15-17日, 岐阜
- 9) 衛藤義勝: ファブリ病の最近の進歩、ファブリ病患者会、大阪 2013, 2,18
- 11) 衛藤義勝、Niemann-Pick C病の診断、治療に関して、NPC病シンポジウム、東京、2013.4.27
- 12) 衛藤義勝: ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症 日本小児科学会講演、広島 2013. 4.18
- 13) 衛藤義勝: Immunity of inborn error of metabolism, Asian Society of Pediatric Research, Kuching, Malaysia, 2013.5.10
- 14) 衛藤義勝: ニーマンピックC病の診断と治療に関して、第55回日本小児神経学会 大分 2013.5.31
- 15) 衛藤義勝: Applications of iPS Cell Technology for the Pathogenesis and Possible Treatment of LSD、International Fabry disease symposium, Hong Kong, June 6, 2013
- 16). 衛藤義勝 ファブリ病最新の進歩、ファブリ病研究会、札幌, 2013.10.5
- 17) 衛藤義勝: 先天性ムコ多糖症の進歩、久留米小児科医会、2013.10.11
- 18) 衛藤義勝: ゴーシェ病最近の進歩、中国小児内分泌代謝学会アモイ市、福建省 2013.10.23-24
- 19) 衛藤義勝: Lysosomal acid lipase deficiency, アジア小児肝臓消化器学会—ツ橋会館, 東京, 2013.11.1
- 20) 衛藤義勝: ファブリ病 UpDate, 東北ファブリ病患者会 仙台, 2013.11.3
- 21) 衛藤義勝、Novel Strategies of the Treatment for Lysosomal Storage disease, Korean Human Genetic Seminar, Seoul, 韓国, 2013, 11,14-16
- 22) 衛藤義勝: New Strategies of the Treatment of Lysosomal Storage disease, 13th Asia LSD symposium, Nov.26, 2013
- 23). 衛藤義勝: Future of clinical and research prospects in inborn error of metabolism, 第3回アジア先天代謝学会、舞浜、東京, 2013.11.27-29
- H. 知的財産権の出願、登録状況
特になし。

遺伝子・細胞治療のための分子生物学的解析

研究分担者 中林一彦 国立成育医療研究センター研究所 周産期病態研究部

研究要旨

本研究における分子生物学的解析を担当し、本年度は①ベクター挿入部位解析系の確立、②疾患責任変異の迅速な同定システムの構築、に着手した。①については MFGSgp91 挿入細胞株をモデルとして、SureSelect DNA キャプチャー法でベクター挿入部位濃縮ライブラリーを作製しシーケンスデータを得た。②については Ion AmpliSeq プロトコールを導入し、重度複合免疫不全症の既知原因遺伝子 28 個を対象としたカスタムリシーケンスを開始できる体制を整えた。

A. 研究目的

①ベクター挿入部位同定解析系の構築：

レトロウイルスベクターは細胞における安定的な発現が期待できるベクター系として、遺伝子治療や iPS 細胞誘導などの目的に使用されている。レトロウイルスは一本鎖 RNA をゲノムとするウイルスであり、ウイルス感染細胞では、RNA ゲノムから逆転写された DNA が宿主細胞ゲノムに組み込まれる。例えば、レトロウイルスの一種であるマウス白血病ウイルス (MoMLV: Moloney murine leukemia virus) を特別な細胞の中でのみ増殖できるように改変したもの（ウイルス自己増殖能を欠失したもの）がベクター系に利用されている。レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において、ベクターのゲノム挿入部位を網羅的に同定することは、遺伝子導入された細胞の性質の解析だけでなく、安全性評価等の実用面においても重要な課題である。

本研究事業で実施される慢性肉芽腫瘍症例に対する遺伝子治療の効果や安全性を評価するにあたり、ベクター挿入部位の網羅的解析が有効な手段であると考えられる。本年度は、全ゲノム DNA から任意の配列を選択的に濃縮できる DNA:RNA ハイブリッドキャプチャー法によるベクター挿入部位同定法の確立に着手した。

②カスタムリシーケンスによる迅速な疾患変異同定系の確立

遺伝子治療の妥当性・必要性を評価する

には対象疾患患者における疾患責任変異の同定が必須であるが、候補遺伝子数が多い場合は従来のサンガーシーケンス法では迅速な疾患変異同定が難しい場合がある。そこで次世代シーケンサーを用いたカスタムリシーケンシングによる迅速な疾患変異同定系の確立を目指す。

B. 研究方法

①ベクター挿入部位同定解析系の構築：

解析対象予定の遺伝子治療ベクターで実際に使用されている二種類のウイルス LTR 配列ならびに Sonic hedgehog (SHH) 遺伝子コーディングエクソン配列を対象としたカスタム SureSelect ベイトライブラリーを作製した。

使用するゲノム DNA の濃度は picogreen 定量キット (Invitrogen) により定量し、1-3 ug をゲノムライブラリー作製に供した。アジレント社 SureSelect^{XT} キットを用いてエクソームライブラリーを作製した (図 1)。DNA ライブラリーの評価 (サイズ確認・濃度推定) にはアジレント社 バイオアナライザーを用いた。エクソーム濃縮ライブラリーの定量にはアジレント社 QPCR NGS ライブラリ定量キットならびに Kapa Biosystems 社 Library Quantification キットを用いた。ABI HT7500 を用いて定量 PCR データを取得した。

イルミナ社 HiSeq1500 を用いたペアエンド法 (100bp x2) で配列データを取得した。シーケンシング試薬には TruSeq SBS

Kit v3-HS キットを用いた。

②カスタムリシーケンシングによる迅速な疾患変異同定系の確立

LifeTech 社・Ion-AmpliSeq システムを採用し、重症複合免疫不全症(SCID)の既知の原因遺伝子 28 個を対象としたカスタムアンプリコンをデザインした。

倫理面への配慮：

上記の方法に必要な遺伝子組換え実験は、国立成育医療研究センター研究所・組換え DNA 実験安全委員会の承認(承認番号 10-1)を得た上で、法令等を遵守し、十分な対策と措置を講じた上で実施した。

C. 研究成果

①. ウイルスベクター-LTR 配列を標的としたカスタム SureSelect ベイトライブラリーのデザイン

ウイルスベクターの LTR 配列を標的とするベイトライブラリーをデザインした。汎用性を考慮し、以下の二種類のウイルス LTR 配列を標的とした。

myeloproliferative sarcoma virus

(MPSV)-LTR_配列：444 bp

Moloney murine leukemia virus long terminal

repeat (MoMLV)-LTR 配列：589 bp

これらはいずれもマウスに感染するウイルスとして同定されたもので、ヒトゲノムにはこれら LTR と高い相同性を示す配列は含まれていないことを確認した。

RNA ベイト長は 120bp で、隣接するベイト同士が 60bp の冗長部分を持つようにベイトを配置した。MSPV-LTR に対して 12 個、MoMLV-LTR に対して 17 個の RNA ベイトを設定した(図 2)。なお、これらの二つの LTR の塩基配列相同性は 92%程度であり、インフォマティックス解析により両配列を明確に区別できることを確認している。

図 3 に LTR 配列に対するベイトによりキャプチャーされると予想されるゲノム DNA 断片を示した(ライブラリー作製時のゲノ

ム DNA 断片長が 300bp の場合と 1000bp の場合)。

また内在性コントロールとして *SHH* 遺伝子のコーディングエクソン配列を対象とする RNA ベイト 21 個も加えた(これらのベイトにより *SHH* エクソン領域が効率的に濃縮されることを既に確認している)。この遺伝子の細胞当りのコピー数は通常は 2 コピーであることが予想されることから、データ標準化のための基準として使用できると考えられる。

ベクター挿入部位同定系の確立のための解析対象として、MFGSgp91 ウイルスベクターがゲノムに挿入されていることが既に明らかな下記の二種類の細胞を研究代表者である小野寺博士より入手した。

- HEK293SPA

(パッケージング細胞・挿入部位多数)

- K562MFGS

(MFGSgp91 導入細胞・挿入部位少数)

ゲノム DNA を抽出し、濃縮ライブラリーを作製し、各ライブラリーについて 100Mb 程度のシーケンス (100bp x2) を取得した。

②カスタムリシーケンシングによる迅速な疾患変異同定系の確立

一反応あたり、10 ng のゲノム DNA を鋳型としたマルチプレックス PCR を行い (1 サンプルにつきプライマープール 1 と 2 の二反応)、増幅産物についてプライマー部分の消化反応を行った。ライフテック社の標準プロトコール(図 4)を改変し、イルミナ社シーケンサー用のアダプターおよびインデックス配列を付加した。予想通りのインサートサイズのライブラリーが出来たことが確認できた。

D. 考察

①ベクター挿入部位同定解析系の構築：

これまでの全遺伝子ならびに部分的遺伝子群を対象としたエクソーム解析において、SureSelect 方式の DNA キャプチャー法で、標的ゲノム部位を特異的に濃縮

できることが確認された。SureSelect のカスタムベイトライブラリーでは任意の配列を対象とするデザインが可能であることから、遺伝子治療ベクターに汎用される2種類のウイルスLTR配列を対象とするベイトライブラリーをデザインした。

カスタムデザインしたベイトライブラリーを用いて標的配列濃縮を行い、ライブラリー作製とシーケンスデータ取得に成功したので、データ解析に着手している。

慢性肉芽腫瘍における遺伝子治療対象である造血幹細胞集団の一部に遺伝子治療ベクターが安定的に挿入される。ベクター挿入部位が異なる細胞クローンが複数種類混在し、その比率が経時的に変動することが知られている。従って、ベクターのゲノム挿入部位解析においては、細胞集団中における複数のベクター挿入部位を同定し、さらに個々の挿入部位の細胞集団内での存在比率を定量的に解析することが必要とされる。本研究デザインに於いては今のところ相対的定量は可能と思われるが、絶対的定量の実現には更なる工夫・改良が必要であると思われる。

②カスタムリシーケンシングによる迅速な疾患変異同定系の確立

本施設での次世代シーケンシングプラットフォームはイルミナ社シーケンサーであるが、特定遺伝子群を対象としたカスタムリシーケンシングにはカスタムデザインが容易で、50 遺伝子程度の規模であれば最も低コストでライブラリーが作成できるライフテック社 IonAmpliSeq システムを採用した。ライフテック社プロトコルを改変し、イルミナ社シーケンサーでのデータ取得を可能とすることに成功した。

本研究における SCID を対象としたカスタムキットではコントロール検体を用いてライブラリー作製がうまくいくことを確認し、実際の疾患検体を受け取り次第、

解析を開始できる体制を整えた。他の疾患遺伝子群を対象とした IonAmpliSeq カスタムキットで取得したデータの解析より、平均で 1000 倍程度の読み取り深度を得れば、標的エクソンの 95%以上について精度の高いバリエーションデータを取得できることが判明しており、この方法の有効性が既に確認できている。

E. 結論

エクソーム解析に使用されている選択的 DNA キャプチャー技術を応用することで効率的な遺伝子治療ベクター挿入部位解析を開始する体制を整えた。また重度複合免疫不全症の既知原因遺伝子 28 個を対象としたカスタムリシーケンスを開始できる体制を整えた。いずれの方法でも実験系評価用のサンプルについてのシーケンスデータを取得済みであり、来年度前半にデータ解析系の構築が完了する見込みである。

G. 研究発表

- 1) De novo Frameshift Mutation in Fibroblast Growth Factor 8 in a Male Patient with Gonadotropin Deficiency. Suzuki E, Yatsuga S, Igarashi M, Miyado M, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Umezawa A, Yamada G, Ogata T, Fukami M. *Horm Res Paediatr*. 2013 Nov 20. [Epub ahead of print]
- 2) Somatic CTNNB1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Kosaki K. *Am J Med Genet A*. 2014 Jan 23. [Epub ahead of print]
- 3) 右田王介, 中林一彦, 秦健一郎 特集 遺伝子検査による早期診断 次世代シーケンサーとは *周産期医学* V o 1.44 No. 2 2014(印刷中)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

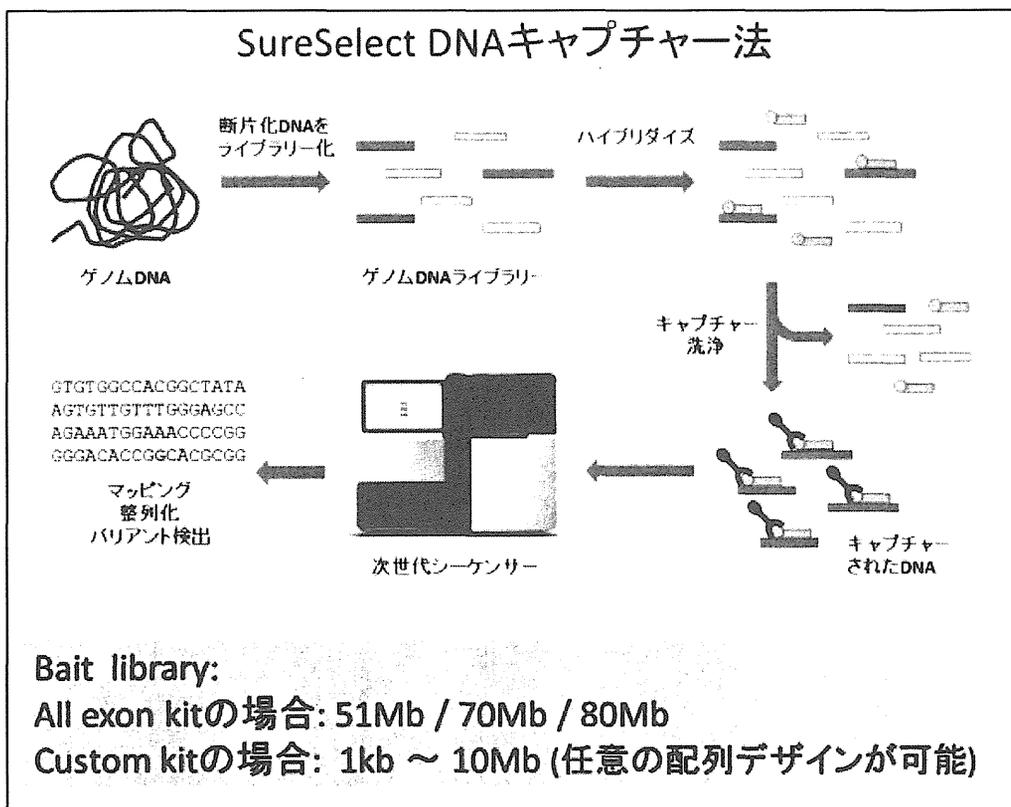


図 1

カスタムキットデザイン

MSPV-LTR (444 bp)	12 probes
MoMLV-LTR (589 bp)	17 probes
SHH coding配列	21 probes

プローブ長120 bp (60 bp重複)

解析予定サンプル

MFGSgp91ウイルスベクターのゲノム挿入が既知な細胞

- HEK293SPA (パッケージング細胞・挿入部位多数)
- K562MFGS (MFGSgp91導入細胞・挿入部位少数)

図 2

LTR配列をbaitとしたキャプチャーデザイン

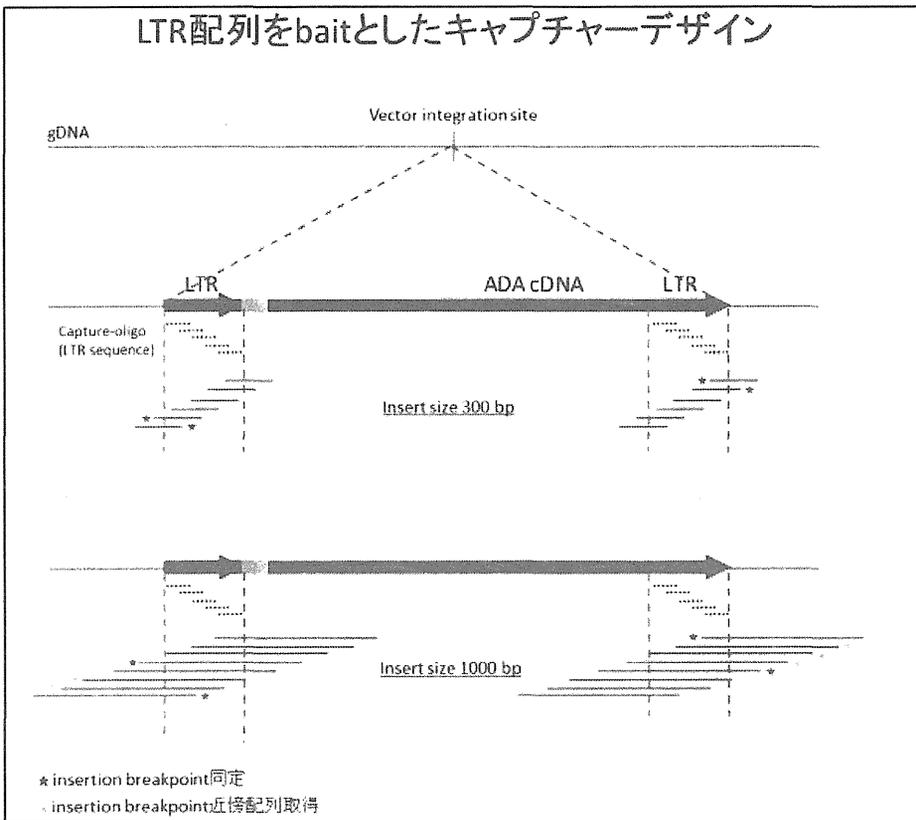
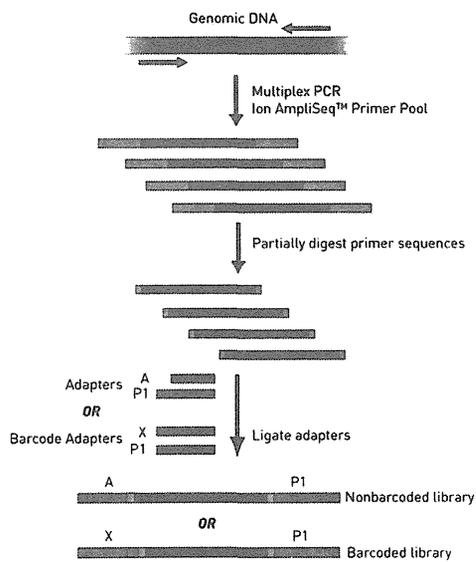


図 3

Ion-AmpliSeq (LifeTech 社)

SCID原因遺伝子



- | | |
|---------|--------|
| ADA | ORAI1 |
| AK2 | PNP |
| CD247 | PRKDC |
| CD3D | PTPRC |
| CD3E | RAG1 |
| CD3G | RAG2 |
| CIITA | RFX5 |
| DCLRE1C | RFXANK |
| IKZF1 | RFXAP |
| IL2RG | STIM1 |
| IL7R | TAP1 |
| JAK3 | TAP2 |
| LIG4 | TAPBP |
| NHEJ1 | ZAP70 |

(28 genes)

図 4

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
分担研究報告書

造血未熟細胞移植時に使用する薬物血中濃度モニタリングに関する研究

研究分担者 大森 栄 信州大学医学部附属病院 薬剤部 教授

研究要旨

造血幹細胞移植は慢性肉芽腫症を初め多くの疾患で行われてきている。その前処置薬として用いられるブスルファンは血中濃度のコントロールが困難な薬物の一つであり、適正な投与量設定が移植の成否にかかわる場合も多い。今回小児への投与が予定されていることから、小児における適切なブスルファン薬物血中濃度モニタリング実施に向けて、測定法、解析法ならびに体内動態パラメータの検討を行った。

A. 研究目的

造血幹細胞移植時の前処置薬として用いられているブスルファンは、小児においてその体内動態に個人差が大きく、そのコントロールの可否が移植の成否を左右する。また、再移植のリスクが大きいため、確実な治療を施すことが肝要である。本研究では、小児におけるブスルファンの投与量を適切に設定する事を目的とした。

B. 研究方法

ブスルファン血中濃度測定法と薬物体内動態解析法を確立すると共に、小児の臨床例を用いて体内動態パラメータの算出を行い、そのパラメータをもとに薬物投与量を設定し、その妥当性を検証した。

C. 研究結果

当院の試料を元に高速液体クロマトグラフィー法により Peris らの方法¹⁾を若干改良し当院における血中濃度の定量法を確立した。確立

した方法を用いて、造血幹細胞移植患者に対して薬物血中濃度モニタリングを実施した。解析の結果業務上適正な投与量であることを確認した。

D. 考察

今回、血中濃度測定法を確立すること成功した。また、治療薬物濃度モニタリング、解析を行いその妥当性を確認した。

E. 結論

ブスルファンの結集濃度のモニタリングを適正に行うことが出来ることが示された。

参考文献

1) Peris J-E, Latorre J-A, Castel V, Verdeguer A, Esteve S and T-rres-Molina F: Determination of busulfan in human plasma using high-performandce liquid chromatography with pre-column derivaridation and fluorescence detection., J Chromatography B, 730, 33-40

(1999).

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsunaga T, Maruyama M, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y, Ohmori S: Mechanism of CYP3A induction by glucocorticoids in human fetal liver cells. *Drug Metab Pharmacokin*, 27, 653-657, 2012.
- 2) Maruyama J, Matsunaga T, Yamaori S, Sakamoto S, Kamada N, Nakamura K, Kikuchi S, Ohmori S: Differentiation of monkey embryonic stem cells to hepatocytes by feeder-free dispersion culture and expression analysis of cytochrome P450 enzymes responsible for drug metabolism. *Biol Pharm Bull*, 36(2), 292-298, 2013.
- 3) Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kumagai T, Kondo Y, Matsunaga T, Ohmori S, Nagata K: Hepatocyte nuclear factor 6 activates the transcription of CYP3A4 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab Pharmacokin*, 28, 250-259, 2013.
- 4) Jiang R, Yamaori S, Ohmori S, Yamamoto I, Watanabe K: Cannabidiol is a potent inhibitor of the catalytic activity of cytochrome P450 2C19. *Drug Metab Pharmacokin*, 2013.
- 5) Kusafuka Y, Kurita H, Sakurai S, Suzuki S, Nakanishi Y, Katsuyama Y, Ohmori S: Effect of single dose extended-release oral azithromycin

on anticoagulation status in arfarinized patients.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 115, 148-151, 2013.

- 6) Tanaka N, Horiuchi A, Nakayama Y, Katsuyama Y, Isobe M, Aoyama T, Tanaka E, Ohmori S: Safety and effectiveness of low-dose propofol esophagogastroduodenoscopy in Child A and B cirrhotic patients. *Dig Dis Sci*, 58, 1383-1389, 2013.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
分担研究報告書

先天性免疫不全症の新生児スクリーニングの開発

研究分担者 野々山恵章 防衛医科大学校小児科学講座 教授

研究要旨

TREC (T cell receptor recombination circles) と KREC (Kappa-chain recombination excision circles) は、それぞれ T 細胞新生、B 細胞新生の良いマーカーである。新生児乾燥濾紙血の TREC/KREC を測定した結果、健常新生児では全員で TREC/KREC がともに陽性、T 細胞欠損患者では TREC が陰性、B 細胞欠損患者では KREC が陰性であった。すなわち、TREC/KREC 測定による免疫不全症新生児スクリーニング法が可能であることを示した。先天性免疫不全症を早期診断し、造血幹細胞移植による患者の根治や γ -グロブリン製剤の早期開始による適正な治療法で患者予後を改善することが可能であると考えられる。日本における本法による新生児スクリーニングの早期導入が望まれる。

A. 研究目的

原発性免疫不全症には多くの病型があるが、新生児期に T 細胞欠損をきたす主な疾患として、重症複合免疫不全症 (Severe combined immunodeficiency, 以下 SCID)、B 細胞欠損をきたす主な疾患として B 細胞欠損症 (agammaglobulinemia) がある。SCID は、著しい易感染性により乳児期早期に重症日和見感染症を発症する致死性の先天性免疫不全症である。造血幹細胞移植 (Hematopoietic stem cell transplantation, 以下 HSCT) による免疫能再構築が標準的な根治療法であるが、HSCT 前に重症感染症を発症すると治療が困難になる。しかし、乳児期早期に HSCT が実施されれば生存率が 76~95% に達するとされ、格段に予後を改善できる。とりわけわが国では、BCG 早期接種の容

認により重症 BCG 感染症の発生も危惧され、早期発見が特に必要である。

B 細胞欠損症ではこれまで良い早期診断法がなく、ガンマグロブリン定期補充という確立した治療法があるにもかかわらず、診断の遅れにより気管支拡張症などの合併症やポリオワクチンの持続感染が問題となる。

SCID のうち DNA 複製に関わる ADA の欠損では T、B、NK 細胞すべてが欠損する。抗原レセプター遺伝子の再編成に関わる RAG1/2、LIG4 の欠損では T、B 細胞が欠損する。Common γ 鎖異常では T 細胞の欠損を示す。

Agammaglobulinemia では pre B 細胞から B 細胞への分化に必須の遺伝子である Btk 欠損では pre B-I 細胞は存在するが、pre B-II 細胞が存在しない。

TREC は DP 細胞が SP 細胞になる直前に

生成されるため、SCID では陰性となると考えられる。KREC は pre B 細胞の最後に生成されるため、Btk, ADA, RAG1/2、LIG4 では陰性となると考えられる。

今回、我々は T 細胞欠損、B 細胞欠損を早期発見し、感染症発症前の早期治療に結びつけるため、TRECS, KRECs 測定により新生児期にスクリーニングすることを目的として以下の研究を行ったので報告する。

B. 研究方法

T 細胞欠損、B 細胞欠損を早期発見し、より低リスクの治療に結びつけるため、新生児期にスクリーニングする方法を確立することを目的として以下のことを行った。1) TRECs と KRECs の絶対定量法を開発。2) 新生児期の KRECs を測定、基準値を作成。3) SCID、agammaglobulinemia 患者の TRECs, KRECs を測定。なお、本研究は、防衛医科大学校倫理委員会の承認済みであり、患者・家族・健常児からは十分な説明のもと、文書による同意を得ている。小児の採血は、医療上必要な採血時にごく少量を同時に採取した。

正期産新生児臍帯血、新生児濾紙血を採取した。また臍帯血より濾紙血を作成した。gDNA 濃度 $5\text{ng}/\mu\text{l}$ 未満を除外し、臍帯血 87 例、臍帯血濾紙血 78 例、新生児濾紙血 60 例を検討した。健常者末梢血 53 例 (男:女 25:28、年齢 23 ± 36 歳 (1 か月~55 歳)、gDNA 濃度 26.3 ± 19.7 ($11.5\sim 59$) $\text{ng}/\mu\text{l}$) も同様に検討した。

無 γ グロブリン患者は 12 例 (男:女

10:2、年齢 新生児濾紙血~33 歳、gDNA 濃度 28.5 ± 35.2 ($6.1\sim 58.8$) $\text{ng}/\mu\text{l}$) を解析した。

SCID 患者は 21 例。IL2RG 15 例 (男:女 15:0、年齢 新生児濾紙血~1.6 歳、gDNA 濃度 25.1 ± 34.6 ($5.4\sim 73.5$) $\text{ng}/\mu\text{l}$)、JAK3 2 例 (女 1 例、性別不明 1 例、年齢 新生児濾紙血~6 か月、gDNA 濃度 8.7 ± 3.8 ($5.9\sim 13.0$) $\text{ng}/\mu\text{l}$)、LIG4 2 例 (男:女 1:1、年齢 2~4 歳、gDNA 濃度 11.7 ± 10.6 ($7.9\sim 15.4$) $\text{ng}/\mu\text{l}$)、ADA 2 例 (男:女 2:0、年齢 1 か月~3 か月、gDNA 濃度 5.9 ± 0.2 ($5.8\sim 6$) $\text{ng}/\mu\text{l}$) を解析した。ガスリー血は、母由来 T 細胞生着の X-SCID1 例を含む 7 例で入手できた。

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

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

(倫理面への配慮)

データは匿名化して取り扱う。臨床研究、遺伝子解析、PIDJ への登録に関しては、本人ないし親権者からの同意書を得た。また、本研究は、小児感染症学会、

防衛医大、理化学研究所、かずさ DNA 研究所で倫理委員会を通っている。

C. 結果

正常コントロール

健常新生児(在胎 38.8 ± 3.0 (35~41) 週、出生体重 3076 ± 972 (1870~4195) g) の臍帯血 87 例を採取した。また臍帯血より濾紙血を作成した。gDNA 濃度 $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 未満を除外し、臍帯血 87 例、臍帯血濾紙血 78 例、新生児濾紙血 60 例を検討した。健常者末梢血 53 例 (男:女 25:28、年齢 22 ± 33 歳 (1 か月~55 歳)、gDNA 濃度 26.3 ± 19.8 (11.5~59) $\text{ng}/\mu\text{l}$) も同様に検討した。

免疫不全症のない臍帯血、末梢血で検討すると内因性コントロールの RNaseP は年齢による差はなく、TRECs, cJKRECs および sjKRECs は ngDNA あたりと RNaseP あたりで正の相関が認められた。また、TRECs, cJKRECs, sjKRECs いずれも全例で検出できた。

cJKRECs は新生児期は 9.3 ± 16.4 copies/ngDNA と他の年齢層より低く、乳児期 (2 歳未満) で 146 ± 209 copies/ngDNA と最も高値を示した。幼児期以降は徐々に低下する傾向が認められた。同様に sjKRECs は新生児期は 2.0 ± 3.1 copies/ngDNA と他の年齢層より低く、乳児期 (2 歳未満) で 24.7 ± 32.5 copies/ngDNA と最も高値を示した。幼児期以降は徐々に低下する傾向が認められた。

無 γ グロブリン血症患者

無 γ グロブリン血症患者は 12 例 (男:女 10:2。初回検査年齢 新生児濾紙血~33 歳。検体数 新生児濾紙血 4 例、末梢血 27 例。gDNA 濃度 25.5 ± 29.4 (5.1~58.8) $\text{ng}/\mu\text{l}$) の解析をした。内因性コントロールの RNaseP は健常者と同等であった。

TRECs はすべて年齢相応の正常値を示していた。

cJKRECs、sjKRECs は新生児濾紙血では全例検出感度以下だった。

2 歳未満において cJKRECs (1.0 ± 1.8 copies/ngDNA)、sjKRECs (0.73 ± 1.71 copies/ngDNA) は検出されたが、それぞれ健常者より有意に低値だった。2 歳以上ではほとんどが検出感度以下で、1 例のみ sjKREC が少量検出された (0.326 copies/ngDNA) が、この症例も 1 カ月前と 1 カ月後の検体では検出感度以下だった。

SCID 患者

SCID 患者の新生児濾紙血では、全例で内在性 DNA 量コントロールとしての RNaseP は健常者と有意差なく、全例検出可能だった。TRECs は、maternal T 陽性例を含め全例ごく低値ないし検出感度以下であった。また、乾燥濾紙血が入手できた IL2R 欠損 SCID、JAK3 欠損 SCID では、cJKRECs、sjKRECs は全例検出可能で健常者と有意な差は認めなかった。

SCID 患者の末梢血では、RNaseP は全例検出可能で健常者と有意差はなかった。TRECs は、含め全例ごく低値ないし検出感度以下であった。cJKRECs、sjKRECs は IL2RG 欠損 SCID、JAK3 欠損

SCID では、全例検出可能で健常者と有意な差は認めなかった。LIG4 欠損 SCID、ADA 欠損 SCID では検出感度以下だった。

毛細血管拡張性運動失調症

毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia, AT), Nijmegen 染色体不安定症候群 (Nijmegen breakage syndrome, NBS) では全例で KREC が陰性であった。

D. 考察

T細胞は胸腺内でまず β 鎖の再編成が起こり、preTCR α 鎖と β 鎖が発現する。その後、 α 鎖の再編成が起こり、この時に α 鎖遺伝子の中に位置する δ 鎖が切り出され、TREC が形成される。測定する TREC は、T 細胞胸腺内分化、すなわち T-cell receptor の遺伝子再編成の過程で、 α 遺伝子内に位置する δ 遺伝子が除去される結果、環状 DNA として切り出される。TRECs は T 細胞の分化・増殖により複製されることなく、細胞死するまで安定して存在するため、新生 T 細胞のマーカーとされる。これまでに TREC を用いた SCID の新生児マススクリーニングや移植後の T 細胞機能評価、フォローアップについて報告があるが、今回の結果からも、乾燥濾紙血を用いた TREC 定量法 SCID の新生児マススクリーニングに有効であると考えられた。

B 細胞の成熟過程においてまず、H 鎖遺伝子の再編成が起こり、その後 Pre B 細胞の段階で L 鎖遺伝子の再編成が起こる。この L 鎖再編成は κ 鎖、 λ 鎖の順に起こる。 λ 鎖再編成時あるいは κ 鎖

の allelic exclusion の際、KREC が形成される。 λ 鎖再編成時あるいは κ 鎖の allelic exclusion の際、 κ 鎖が染色体 DNA から切り出され、環状 DNA である sj (signal joint) KRECs が形成され細胞内ではあるが染色体外に放出される。

Heavy 鎖が有効な遺伝子再構成ができると、次に κ 鎖の再編成が始まる。 κ 鎖の VJ 再編成が無効の場合、その κ 鎖を発現させないために κ 鎖定常領域の $C\kappa$ を含む領域が染色体から切り出される。この切り出されたものが signal joint KREC、染色体内に残存した配列が coding joint KREC である。sjKRECs は染色体外にあるため複製されず、細胞分裂を繰り返すと段階希釈されていく。また、再構成された染色体 DNA には cj (coding joint) KRECs が形成され、これは分裂時複製されるため希釈されない。cjKRECs は B 細胞の約 50% に存在することになり、一方 sjKRECs は新生 B 細胞の数を反映することになる。KRECs を測定することで B 細胞の絶対数と新生能を同時に評価することができる。これまで B 細胞欠損症の有効なスクリーニング法について報告はないが、今回の検討で、KRECs 測定が B 細胞欠損症のスクリーニングに有効と考えられた。

なお、原因は不明であるが、毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia, AT), Nijmegen 染色体不安定症候群 (Nijmegen breakage syndrome, NBS) では全例で KREC が陰性であることを初めて見出した。AT, NBS の新生児スクリーニングにも用いられると考えられた。

アメリカ、イギリス、スウェーデン、台湾などで、TREC を用いた SCID の新生児スクリーニングが行われすでに 20 人以上の患者が見出され、造血幹細胞移植、遺伝子治療により治癒している。スウェーデンでは、KREC の同時測定により XLA などの B 細胞欠損症も同時に見つけるパイロットスタディが昨年から行われている。日本でも新生児スクリーニングにより早期発見し、早期治療により根治する事が可能であるので、この方法による原発性免疫不全症の新生児スクリーニングの導入が望まれる。

E. 結論

TRECs, KRECs の測定は、T 細胞・B 細胞欠損症の早期発見、早期診断、早期治療に有用であり、新生児スクリーニングの導入が必要であると考えられた。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 131:1437-1440, 2013.
- 2) 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.* 51:356-359, 2013.

- 3) Kojima R, Fujiwara T, Matsuda A, Narita M, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Factors Associated with Steroid Phobia in Caregivers of Children with Atopic Dermatitis. *Pediatr Dermatol.*, 30:29-35, 2013.
 - 4) Kojima R, Matsuda A, Nomura I, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Salivary Cortisol Response to Stress in Young Children with Atopic Dermatitis. *Pediatr Dermatol.* 30:17-22, 2013.
 - 5) Bousfiha A, Jeddane L, Ailal F, Al-Herz, Conley M.E., Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Fischer A, Franco J.L., Geha R.S., Hammarström L, Nonoyama S, Ochs H.D., Roifman C, Seger R, Tang M.L.K., Puck J.M., Chapel H, Notarangelo L.D., Casanova J.L. A Phenotypic Approach for IUIS PID Classification and Diagnosis: Guidelines for Clinicians at the Bedside. *J Clin Immunol.* 33:1078-1087, 2013.
 - 6) Kojima R, Ohno T, Iikura M, Niki T, Hirashima M, Iwaya K, Tsuda H, Nonoyama S, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. Galectin-9 enhances cytokine secretion, but suppresses survival and degranulation, in human mast cell line. *PLoS One.* 9:e86106, 2014.
 - 7) Horiuchi K, Imai K, Mitsui-Sekinaka K, Yeh ZW, Ochs HD, Durandy A, Nonoyama S. Analysis of somatic hypermutation in the IgM switch region in human B cells. *J Clin Allergy Immunol.* (in press)
- ### 2. 学会発表
- 1) Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin kappa deleting recombination excision circles. ICI 2013(International Congress of Immunology). Milano,Italy.Aug. 2013.
 - 2) Nonoyama S. KRECS assay for detecting Bcell deficiencies and other Primary Immunodeficiencies. Jeffery Modell Centers Sumimit. Berlin, Germany. July 2013.

- 3) Nonoyama S. Primary immunodeficiency electronic record (Pier) for the PID patients. Invited speaker. International Primary Immunodeficiency Congress. Estoril, Portugal, Nov. 2013

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

PIDJを介した遺伝子治療対象疾患患者に対する遺伝子診断法と
スクリーニング方法に関する研究

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 寄附講座准教授

研究要旨

当科にPIDJを通して、紹介の来た症例は160症例であり、遺伝子治療の対象となるWiskott-Aldrich症候群（WAS）の疑い患者が10例、重症複合免疫不全症8例が紹介された。うち、6例がWASP遺伝子変異を伴っており、4例がIL2RG遺伝子変異を伴っていた。特にWAS患者では、2例がバングラデシュ人、パキスタン人であり、日本人1例と合わせてHLA一致骨髄、臍帯血バンクに適合ドナーを得られなかったため、こうした患者に関しては遺伝子治療の対象となると考えられた。また、東京都予防医学協会と新生児マススクリーニング方法、体制等について意見交換を行った。10カラーFACSを用い、全血250-500 μ lで、T細胞分化、B細胞分化、NK細胞分化、単球の有無を解析可能な方法を確立し、新生児スクリーニングで見られる陽性患者の二次検査が可能となった。来年度は、より多数例のTREC、KREC解析による新生児マススクリーニング技法の開発を行い、WASについても対象患者の絞り込みを行っていききたい。

A. 研究目的

現在、米英仏伊では、先天性免疫不全症、とくにX連鎖性重症複合免疫不全症（XSCID）およびWiskott-Aldrich症候群（WAS）に対する造血幹細胞を用いた遺伝子治療の臨床試験が行われている。とくに、米国では、XSCIDをはじめとするSCIDを感染症罹患前に早期発見し、早期治療を行うため、新生児期ガスリー濾紙血からゲノムDNAを抽出し、T細胞受容体遺伝子再構成断片（TREC）を増幅し、定量する方法を用いた新生児マススクリーニングが試験運用を開始され、すでに19の州と地域で開始されており、約300万人の新生児がスクリーニングを受けている（図1）。カリフォルニア州だけで2年間に約100万人の新生児（日本での1年間の出生数に相当）がスクリーニングを受け、50例がT細胞減少症と診断された（0.005%）。そのうち、15例（66250人に1人）が造血幹細胞あるいは胸腺移植が必要な病態であった（Kwan A et al, JACI, 2013）。

日本では、我々の研究グループで、TREC（Morinishi et al, J. Ped, 2009）を用いたT細胞欠損症のマススクリーニングに加え、免疫グロブリン κ 鎖遺伝子再構成断片（KREC）を用いたB細胞欠損症（Nakagawa et al, JACI, 2011）および毛細血管拡張性運

動失調症（AT）のマススクリーニング、およびT細胞欠損症の病型診断が可能なる方法を世界に先駆けて確立した（Kamae et al, JACI, 2013）。

本研究では、この方法を用いて、本邦の先天性免疫不全症疑い患者の前方視的登録と遺伝子診断ネットワークであるPIDJに集積した検体のTREC、KRECによるスクリーニングを行うこと、および各自自治体におけるパイロットスクリーニングを開始すること、さらに、スクリーニングで発見された患者の微量血液を用いたリンパ球亜分画診断法の確立を目的とした。合わせて、PIDJに登録された、遺伝子治療対象疾患患者の確定診断と遺伝子治療の可能性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

PIDJを介して、当科に2013年に紹介を受けた患者について、かずさDNA研究所にて遺伝子診断を行った。また、BD LSR Fortessa セルアナライザーを用いたFACS解析およびT細胞受容体遺伝子再構成断片（TREC）、免疫グロブリン κ 遺伝子再構成断片（KREC）によるスクリーニングを行い、候補遺伝子解析に利用した。