

Ⅲ 分担研究報告

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

小原 収

公益財団法人かずさ DNA 研究所ヒトゲノム研究部

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ら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た。次世代 DNA シーケンサーを活用して、低コストにこれらの遺伝子パネル解析を実施するパイプラインを確立し、その実運用を開始した。こうした既知遺伝子のターゲット分析に加えて、新規な原因遺伝子変異のより網羅的な解析のために、全エクソン解析と血球成分の全 polyA⁺ RNA 解析を次世代 DNA シーケンサーを用いて進めた。その結果、いくつかの症例でほぼ発症原因と思われる新規な遺伝子変異を同定した。

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、我が国の原発性免疫不全症発症の遺伝学的素因について探索する。結果として得られた遺伝学的形質と症状の両者を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最終的な目的とする。更に、この実現のために、遺伝学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もう一つの目的とする。

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を開発を行う。

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承認を得た。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、研究期間内では当研究班の 9 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えて、2014 年度においては 664 遺伝子原因遺伝子解析を行った(2013 年 12 月末現在)。しかし、各研究班施設への報告結果のまとめから、このような限られた数の遺伝子のターゲット解析ではこれまでと同様に最終診断に至れた割合は 30%を下回った。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順調に蓄積され、今年度の新規登録数は 500 件を超えた (2013 年 12

月末現在)。こうした遺伝子解析ニーズの増大と安定した遺伝子解析実現のために、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たパイプラインを構築した。これを利用して、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（ロシュ社、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を実現した。従来の基本的な方法であるキャピラリーDNA シーケンシング法と今回の次世代シーケンサーを用いた方法の精度を比較するために、両者でのべ 500kbp を超える配列データを取得・比較した。その結果、次世代シーケンサーによる方法が精度においても従来のキャピラリーシーケンシング法と同等もしくはそれ以上の性能を有していることを見出した。

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 HiSeq1500 及び 2000 を新規に調達）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 による解析も進め、エクソン領域の解析だけでは不十分な場合に備えた。これらの解析によって、複数の症例において疾患原因と考えられる候補変異の同定に至った。

D. 考察

- 1) 既知遺伝子からの従来法での遺伝子検査を継続し、ほぼ 30%程度の診断率で臨床情報と遺伝学的情報の両者のアーカイビングができた。
- 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、そのためのパネル遺伝子解析の運用を開始した。

- 3) 更に、次世代シーケンサーを使った網羅的な遺伝子探索アプローチにより、非典型的な症状を呈する症例の場合でも疾患原因にたどり着けることを実証した。この事は、今のパネル遺伝子解析の遺伝子数を拡大することで、更に疾患原因の確定診断率を向上されられることを示している。一方、全く機能未知の遺伝子に見られた疾患原因遺伝子候補を絞り込むためには機能的な情報などの補完情報は必須であり、実際の臨床症例からどのようにしてその類の情報を非侵襲に取得していくかの方法論開発が今後さらに重要性を増すであろう。

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の運用を開始し、一定の最終診断率の改善を実現した。
- 3) 他の厚生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進め、それにより複数の症例において原因変異もしくはその候補変異群の同定に至った。

G. 研究発表

(H22 年度は連携研究者、H23 年度より分担研究者)

1 論文発表

1. Saito Y, Kagami SI, Sanayama Y, Ikeda K, Suto A, Kashiwakuma D, Furuta S, Iwamoto I, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. AT-rich interactive domain-containing protein 5a functions as a negative regulator of ROR γ t-induced Th17 cell differentiation. *Arthritis Rheum.* 2013 [Epub ahead of print]

2. Nakagawa K, Gonzalez-Roca E, Souto A, Kawai T, Umebayashi H, Campistol JM, Cañellas J, Takei S, Kobayashi N, Callejas-Rubio JL, Ortego-Centeno N, Ruiz-Ortiz E, Rius F, Anton J, Iglesias E, Jimenez-Treviño S, Vargas C, Fernandez-Martin J, Calvo I, Hernández-Rodríguez J, Mendez M, Dordal MT, Basagaña M, Bujan S, Yashiro M, Kubota T, Koike R, Akuta N, Shimoyama K, Iwata N, Saito MK, Ohara O, Kambe N, Yasumi T, Izawa K, Kawai T, Heike T, Yagüe J, Nishikomori R, Aróstegui JI. Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis.* 2013 [Epub ahead of print]
3. Abe J, Nakamura K, Nishikomori R, Kato M, Mitsuiki N, Izawa K, Awaya T, Kawai T, Yasumi T, Toyoshima I, Hasegawa K, Ohshima Y, Hiragi T, Sasahara Y, Suzuki Y, Kikuchi M, Osaka H, Ohya T, Ninomiya S, Fujikawa S, Akasaka M, Iwata N, Kawakita A, Funatsuka M, Shintaku H, Ohara O, Ichinose H, Heike T. A nationwide survey of Aicardi-Goutieres syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study. *Rheumatology (Oxford).* 2013 [Epub ahead of print]
4. Rawat A, Singh S, Suri D, Gupta A, Saikia B, Minz RW, Sehgal S, Vaiphei K, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N, Ohara O, Chan KW, Lau YL. Chronic Granulomatous Disease: Two Decades of Experience From a Tertiary Care Centre in North West India. *J Clin Immunol.* 2013 [Epub ahead of print]
5. Higuchi Y, Shimizu J, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Takada H, Ishimura M, Hara T, Ohara O, Asagoe K, Kubo T. The identification of a novel splicing mutation in C1qB in a Japanese family with C1q deficiency: a case report. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2013 Oct 28;11(1):41.
6. Wada T, Sakakibara Y, Nishimura R, Toma T, Ueno Y, Horita S, Tanaka T, Nishi M, Kato K, Yasumi T, Ohara O, Yachie A. Down-regulation of CD5 expression on activated CD8(+) T cells in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with perforin gene mutations. *Hum Immunol.* 2013 Dec;74(12):1579-85.
7. Lee YW, Yang EA, Kang HJ, Yang X, Mitsuiki N, Ohara O, Miyawaki T, Kanegane H, Lee JH. Novel mutation of IL2RG gene in a Korean boy with X-linked severe combined immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2013;23(1):65-7.
8. Suzuki J, Kuwahara M, Tofukuji S, Imamura M, Kato F, Nakayama T, Ohara O, Yamashita M. A novel small compound SH-2251 suppresses Th2 cell-dependent airway inflammation through selective modulation of chromatin status at the Il5 gene locus. *PLoS One.* 2013 Apr 16;8(4):e61785.
9. 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 May;33(4):857-64.
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. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 May;131(5):1437-40.e5.
- 2 学会発表
1. 第七回日本免疫不全症研究会 「食道潰瘍を反復した1型高IgE症候群の1例」 山本崇裕、大西秀典、寺本貴秀、桑原秀次、久保田一生、大塚博樹、川本典生、加藤善一郎、深尾敏幸、谷内江昭宏、小原收 福岡 2014年1月25日
 2. 第七回日本免疫不全症研究会 「複合型免疫不全を呈したsLC46A1新規変異による先天性葉酸吸収不全症」 千田奈津子、山田雅文、有賀正、岸本健治、小林良二、小林邦彦、小原收 福岡 2014年1月25日
 3. かずさ DNA 研究所/産総研生命情報工学研究センター共催ワークショップ バイオインフォマティクスとゲノム医療 —その課題と将来展望— 「クリニカルゲノミクスの現状と課題」 小原收 東京 2013年11月
 4. The 5th LJI & IMS-RCAI Workshop “Post-GWAS genomic analyses: Mind and bridge the gaps” Ohara O Yokohama, October, 2013
 5. 第40回日本毒性学会学術年会 シンポジウム 毒性オミクス「生体システムダイナミクス理解のための統合ゲノミクス解析の将来展望」 小原收 千葉 2013年6月
 6. 第116回日本小児科学会学術集会 「ゲノミクスを基礎とした新しい病因探索法」分野別シンポジウム「原発性免疫不全症：新しい疾患、トピックス」小原收 広島 2013年4月
 7. 第58回日本人類遺伝学会「次世代シーケンシング技術とゲノミクス解析」シンポジウム：次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾患解析の現状と課題 小原收 仙台 2013年11月
 8. 第4回関東甲越免疫不全症研究会 「IgA単独欠損症として紹介され、TREC/KRECの結果からRAG1異常と同定しえた1例」 加藤環、釜江智佳子、本間健一、池川健、横須賀とも子、和田泰三、谷内江昭宏、西田直徳、金兼弘和、満生紀子、小原收、今井耕輔、森尾友宏、野々山恵章 2013年9月
 9. 第41回日本臨床免疫学会総会 「本邦におけるICF (Immunodeficiency with Centromeric instability and Facial anomalies) 症候群5例の検討」 藤環、釜江智佳子、満生紀子、小原明、林正俊、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 下関 2013年11月
 10. 日本人類遺伝学会第58回大会 「次世代シーケンサーを用いてICF (Immunodeficiency with centromeric instability and facial anomalies) 症候群と診断した2例」 釜江智佳子、満生紀子、小原明、林正俊、野口恵美子、本間健一、小原收、今井耕輔、久保田健夫、野々山恵章 仙台 2013年11月
 11. 第41回日本臨床免疫学会総会 「BTK変異をみとめたIgA単独欠損の解析 (IgA deficiency caused by the missense mutation in the BTK gene)」 満生紀子、今井耕輔、Xi YANG、金兼

- 弘和、小阪嘉之、高田英俊、水谷修紀、小原收、森尾友宏 下関 2013年11月
12. 15th International Congress of Immunology 2013 “Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ-deleting recombination excision circles” C. Kamae, N. Nakagawa, H. Sato, K. Honma, N. Mitsui, O. Ohara, H. Kanegane, T. Morio, K. Imai and S. Nonoyama, Milan, Italy, Aug, 2013
13. 3rd Sardinian Summer School “Post-GWAS animal models” Ohara O. Pula, Italy, September, 2013
14. 第34回日本炎症・再生医学会 “CINCA 症候群/NOMID 患者単球における、IL-1 β 分泌能の1細胞解析” 中川権史、志村七子、白崎善隆、山岸舞、井澤和司、西小森隆太、河合朋樹、八角高裕、平家俊男、小原收 京都、2013年7月
15. 第41回日本臨床免疫学会「Muckle-Wells 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異の検討」 中川権史、西小森隆太、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、河合利尚、梅林宏明、武井修治、小林法元、小原收、Eva Gonzalez-Roca、Juan I. Arostegui、平家俊男 下関、2013年11月27日
16. 第23回日本小児リウマチ学会 「一般検査データから見た家族性及び二次性血球貪食性リンパ球組織球症の特徴と病態の考察」 八角高裕、堀雅之、井澤和司、西小森隆太、小原收、平家俊男 大宮、2013年10月
17. 第23回日本小児リウマチ学会 “Muckle-Wells 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異の検討” 中川権史、西小森隆太、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、河合利尚、梅林宏明、武井修治、小林法元、小原收、Eva Gonzalez-Roca、Juan I. Arostegui、平家俊男 大宮、2013年10月
18. 第58回日本人類遺伝学会 「エクソンスキップに伴い、非典型的な表現型を呈した Filamin A 異常症の兄弟例」 小田紘嗣、西小森隆太、中川権史、日衛嶋栄太郎、井澤和司、河合朋樹、沼部博直、小原收、平家俊男 仙台 2013年11月
19. Nakagawa K, Shimura N, Shirasaki Y, Yamagishi M, Izawa K, Nishikomori R, Kawai T, Yasumi T, Heike T, Ohara O. Single cell fluorescent immunoassay of CINCA/NOMID. 7th international congress of FMA and AIDs, Lausanne, May 22, 2013.
20. Y. Shirasaki, M. Yamagishi, K. Izawa, K. Nakagawa, A. Nakahara, N. Suzuki, J. Mizuno, T. Sekiguchi, T. Heike, R. Nishikomori, S. Shoji, O. Ohara, " Real-time secretion analysis revealed correlation of IL-1 β release and loss of cell membrane integrity", MicroTAS 2013, pp.1686-1688, 27-31 Oct. 2013, Freiburg, Germany
- 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 538 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

本年度、PIDJ ネットワークを通して、531 例の原発性免疫不全症疑い症例が紹介された。これは、全国で 1 日に 1.45 例の新規原発性免疫不全症患者が発生していることを示しており、昨年度までの 1.5 倍となる。2013 年末現在、総計 2847 例が PIDJ データベースに登録されている。これは、人口 10 万人あたり、2.37 例であり、依然欧州諸国と比べ約半数にとどまっている。疾患分類別では、自己炎症疾患が 187 例 (34.8%) と最多であり、自己炎症疾患を含まない欧州免疫不全症学会疾患登録とは異なっている。次に多いのが抗体産生不全症であり、85 例 (15.8%) を占めていた。免疫不全症を呈する症候群が 63 例 (11.7%) と続き、分類不能例が 56 例 (10.4%)、貪食細胞異常症 53 例 (9.9%)、免疫調節異常症 37 例 (6.9%) 自然免疫不全 26 例 (4.8%)、複合免疫不全症 24 例 (4.5%) となっていた。

また、当科で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 25 年 (2013 年) 中に PIDJ に登録された症例について疫学的に検討した。

また、当科で紹介される患者については、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、遺伝子診断につなげ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で紹介のあった患者については、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。

C. 研究結果

本年度、PIDJ ネットワークを通して、531 例の原発性免疫不全症疑い症例が紹介された(図 1)。これは、全国で 1 日に 1.45 例の新規原発性免疫不全症患者が発生していることを示しており、昨年度の 1.5 倍となる。2013 年末現在、総計 2847 例が PIDJ データベースに登録されている。これは、人口 10 万人あたり、2.37 例であり、依然欧州諸国と比べ約半数にとどまっている。

疾患分類別では、自己炎症疾患が 187 例(34.8%)と最多であり、自己炎症疾患を含まない欧州免疫不全症学会疾患登録とは異なっている。次に多いのが抗体産生不全症であり、85 例(15.8%)を占めていた。免疫不全症を呈する症候群が 63 例(11.7%)と続き、分類不能例が 56 例(10.4%)、貪食細胞異常症 53 例(9.9%)、免疫調節異常症 37 例(6.9%)、自然免疫不全 26 例(4.8%)、複合免疫不全症 24 例(4.5%)となっていた(図 2)。

比較的複合免疫不全症が少ない結果となっているが、分類不能免疫不全症(CVID)の中に TREC 低値、すなわち T 細胞新生能の低い亜群があることが判明しており、また一部に自己炎症症状を呈する T 細胞機能不全症があることも分かっていることから、今後、紹介例全症例について、TREC 解析を行いスクリーニング検査とする予定である。自施設としては、全体の 30%にあたる 160 症例の検体を受け付け、10 カラー FACS および TREC、KREC 解析を行った。当科では、抗体産生不全症が 30%を占め、複合免疫不全 9%、免疫不全症を呈する症候群 20%を加え、全体の過半数を超える。その中から、Exome 解析により、本邦 1 例目の *LRBA* 異常症、および本邦初の 11 例の *PIK3CD* 異常症を同定した。候補遺伝子解析によっては、表に示すように 33 例(20.6%)の遺伝子診断が得られ、治療方針の決定に役立った。

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 1.45 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 2.37 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 1/2 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て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。特に当科で多くを占める抗体産生不全症での診断確定率は低い。今回当科での検討では 33 例が遺伝子診断に至った。その中には FACS を用いた原因遺伝子産物の同定が役に立った例も多いが、逆に FACS では正常に染まっていたものの、機能喪失と考えられるアミノ酸置換(ミスセンス変異)を持つ症例もあり、蛋白発現解析と遺伝子解析の両方の必要性、さらには phosflow などを用いた機能解析の必要性が示唆された。さらに、近年 deep intron の変異によるものや、片アリの欠失によるものも報告されており、今後、cDNA による変異解析や CNV(copy number variation)を効率よく見出すことができる方法の開発の必要も示唆された。また、より効率的な遺伝子解析方法として、次世代シーケンサーによるアンプリコンシーケンシングを用いた方法と疾患関連遺伝子の exon 部分のみを濃

縮するチップの利用も考慮されるべきと考えられた。

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。この方法と TREC、KREC 解析を組み合わせることにより、*STAT1* 異常症における重症度分類の検討、*STAT3* 異常症と *STAT3* 異常をもたない高 IgE 症候群の鑑別、さらには造血幹細胞移植後患者の免疫能の回復についての検討を行ったが、今後症例の集積を行い、これらの疾患についての予後の向上に寄与したい。

E. 結論

2013 年の PIDJ データベース登録患者 531 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. 研究発表

論文発表

1. 今井耕輔.原発性免疫不全症の最新国際分類 (2011).小児科 54:1491-1515,2013
2. 今井耕輔. 原発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.日本小児血液・がん学会雑誌 50:415-417,2013
3. 今井耕輔.自然免疫について.チャイルドヘルス.16:608-613,2013
4. 今井耕輔.第 15 章 原発性免疫不全. 標準免疫学 第三版 p392-p433,2013
5. Rawat A, Singh S, Suri D, Gupta A, Saikia B, Minz RW, Sehgal S, Vaiphei K, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsui N, Ohara O, Chan KW, Lau YL. Chronic Granulomatous Disease:

Two Decades of Experience From a Tertiary Care Centre in North West India. J Clin Immunol. (Epub ahead of print) 2013

学会発表

1. 今井耕輔,クリニカルゲノミクスへの期待 “遺伝性小児疾患である 原発性免疫不全症解析の見地から” かずさ DNA 研究所/産総研 生命情報工学研究センター共催 ワークショップ バイオインフォマティクスと ゲノム医療 —その課題と将来展望— 2013 年 11 月 20 日 東京
2. 本間健一,今井耕輔,加藤 環,釜江智佳子,金兼弘和,吉田健一,奥野友介,小川誠司,松村秀城,小島勢二,野々山恵章. Exome 解析による原発性免疫不全症原因遺伝子の探索.厚生労働省難治性疾患克服研究事業 原発性免疫不全症候群に関する調査研究班 平成 24 年度 班会議総会プログラム 2013 年 1 月 25 日東京

G. 知的所有権の出願・取得状況

特許取得

特になし

実用新案登録

特になし

その他

特になし

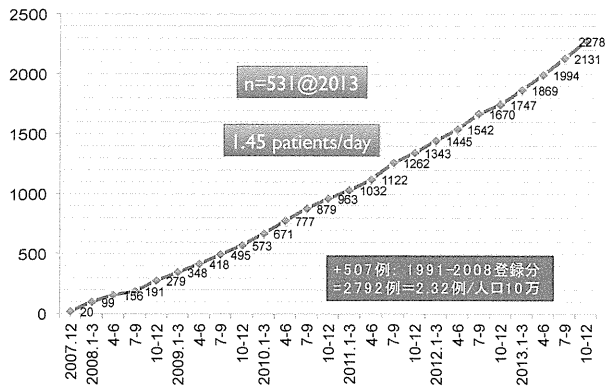
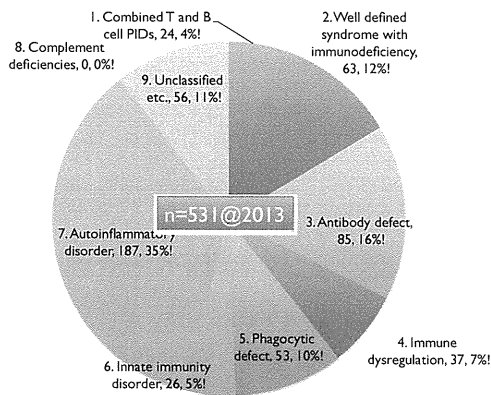


図 1 : PIDJ 登録患者の推移



IUIS分類2013

図 2 : 国際分類による PIDJ 登録患者の内訳

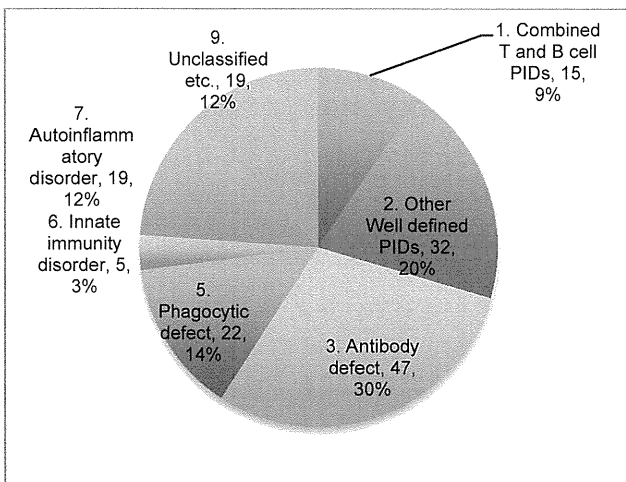


図 3 : 東京医科歯科大学小児科への紹介患者の内訳

BTK	3
CD40L	2
CHD7	1
CYBB	2
ELA2	1
NEMO	1
γ C	4
LIG4	1
MEFV	1
p67phox	1
CIAS1	1
RAG2	1
STAT1	2
STAT3	5
STAT5A	1
WAS	6

表 1: 東京医科歯科大学小児科への紹介患者における遺伝子確定診断の内訳

Sample ID; 2010SR002 (川口市立医療センター)
Assay date; 2014.01.30

PBMC

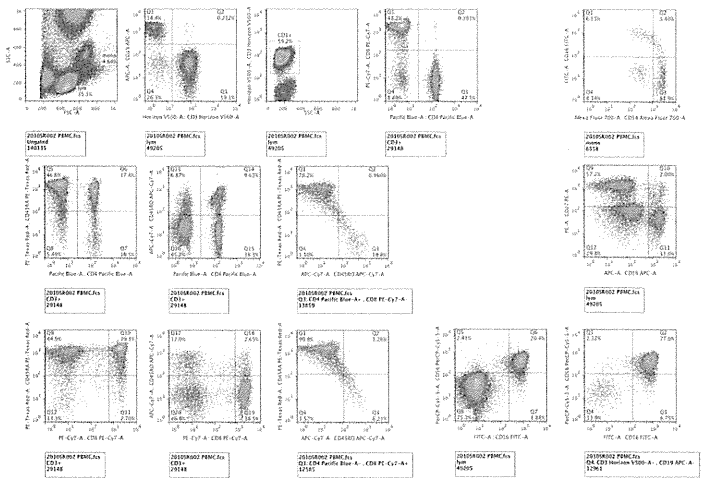


図 4: 10 カラー-FACS の 1 パネルの例

タンデムマスを用いたアデノシン・デアミナーゼ欠損症に対するマススクリーニングの確立

小野寺 雅史

国立成育医療研究センター研究所成育遺伝研究部

研究要旨

アデノシン・デアミナーゼ (ADA) は核酸代謝産物のデオキシアデノシンをデオキシイノシンに転換する核酸代謝酵素で、この酵素が欠損することで重症複合免疫不全症 (SCID) を発症する。ただ、遺伝子変異によっては微量ながらも ADA 活性を認め、この場合、通常の SCID スクリーニングで測定される環状 DNA (TREC) が検出することもある。本研究は新生児マススクリーニングで採取されたる紙血中の ADA 活性を測定するため、ろ紙血 1 パンチより 5mM 酢酸アンモニウムにてタンパク成分を抽出し、基質であるアデノシンと混合させた後一定時間反応させ、反応産物のイノシン量を質量分析装置 (LCMA-8030) で定量した。結果、健常人では一定時間内に反応産物のイノシンを検出したが、対照とした ADA 欠損症患者ではその反応産物を検出することができなかった。また、現時点でこれらを下回る健常人検体は見つかっていない。今後は測定時間等を短縮することで新生児スクリーニングとしての同系の導入を成育医療研究センター内で検討している。

A. 研究目的

原発性免疫不全症 (primary immunodeficiency、以下 PID と略す) は、免疫系に関与する分子の異常により発症し、細菌やカビ、ウイルスなどの病原体に対して易感染性を示す疾患群であり、その責任遺伝子は現在では 200 以上も同定される。特に T 細胞に異常のある重症複合免疫不全症 (severe combined immunodeficiency、以下 SCID と略す) はその診断に急を要し、1 歳までに根治的治療法である造血幹細胞移植を行わないとその生存率は極端に低下する。また、新生児早期に行われる生ワクチンの BCG やロタウイルスワクチンにより未診断患児が医原性感染症に罹患する危険性もあり、安全な予防接種の在り方を考えたときこの問題は重大である。このように PID 患者を発症前 (新生児早期) に診断することは極めて重要で、同時に、この診断法が確立できれば根治療法である造血幹細胞移植も重度の感染症の無い状態で行うことができ、患者の生命予後は大きく改善することが予想される。

現在、SCID の早期診断法としては PCR による TREC (T-cell receptor excision circles) 測定が行わ

れている。TREC は、T 細胞がその膜表面上に T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) を発現させるため TCR の可変領域である variable region (V)、diversity region (D)、joining (J) 遺伝子の再構成を行うが、その際に出現する環状 DNA のことで、TREC の存在は胸腺中の T 細胞新生を示している。すなわち、SCID 患者では T 細胞の新生が起らず TREC は検出できない。実際、この TREC 測定による新生児マススクリーニング (NBS) が米国ウィスコンシン州で行われ、20 万人の新生児のうち 5 名の SCID 患者を診断したと報告されている (J Allergy Clin Immunol. 124: 522-527, 2009)。ただ、SCID の一型である ADA 欠損症は、遺伝子変異により微量な ADA 活性を認めることがあり (delayed onset、late onset)、この場合、通常の検査で TREC を検出することもある。このため、ADA 欠損症に対する発症前診断に関しては TREC 測定とは別に直接患者検体を用いて ADA 活性を測定する必要がある。よって、本研究は ADA 欠損症に対する NBS の導入を視野に入れ、NBS で使用されるろ紙血を用いた ADA 活性の測定系を立ち上げる。

B. 研究方法

1. 乾燥ろ紙血の作成

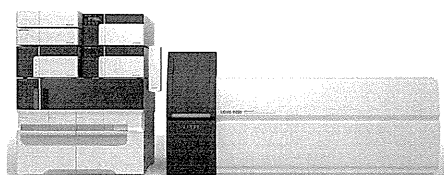
- 1) 同意が得られた健常人あるいは造血幹細胞遺伝子治療を受けた2名のADA欠損症患者より末梢血を採取し、NBS用のろ紙に添加する
- 2) 上記ろ紙血を4℃で測定時まで保存する。

2. ろ紙血からのサンプル調整

- 1) 1パンチの乾燥血 (Dried Blood Spot: DBS)
- 2) 溶質溶媒 5mM AcONH₄ を添加
- 3) Voltex/ Sonic 30分 on ice
- 4) 37℃で30分間反応
- 5) アセトニトリル添加
- 6) 遠心にて上清を回収
- 7) 乾燥
- 8) 5mM AcONH₄/ アセトニトリルで10倍希釈

3. LC/MS/MS 解析

- 1) HPLC: Prominence UFLC system
Column: Merck ZIC-HILIC
- 2) MS: LCMS-8030 Triple quadrupole mass spectrometer



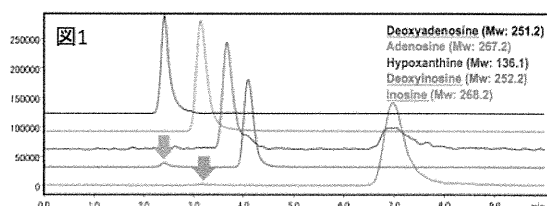
(倫理面への配慮)

これら一連の実験については施設内の倫理審査委員会の承認を受けている。また、得られたデータの管理に関しては連結可能匿名化し、個人情報保護法を遵守して行っている。

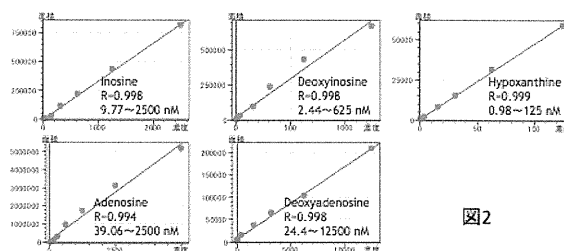
C. 研究結果

1. LC/MS/MS の定量性に関して

分析対象となる代謝産物は親水性が高いことから ZIC-HILIC カラムを用いた HILIC モードにて検討した。その結果、5 mM 酢酸アンモニウム、93%アセトニトリルの条件で目的成分は10分以内に溶出を完了した (図1)。

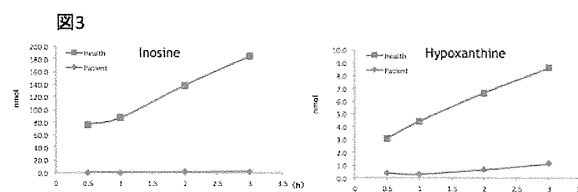


検出はエレクトロスプレーイオン化正負イオン切り換え測定とし、アデノシンは正イオンモード、それ以外は負イオンモードで行い、表示した濃度範囲で良好な直線性が得られた (図2)。



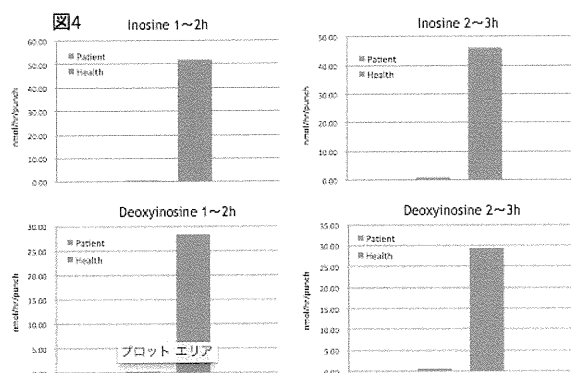
2. 代謝産物の測定に関して

LC/MS/MS 測定より実試料 (Health, Patient) について5成分の定量値を得た。サンプル1系列 (試



料に 1 mM adenosine を添加) について、濃度を 1 punch の絶対量に換算し、経過時間に対しプロットした (図3)。Health では測定時間内にイノシン、ヒポキサンチン量の増加が確認されが、Patient では量も少なく測定時間内の増加が認められなかった。サンプル2系列 (試料に 1 mM deoxyadenosine を添加) についても同様の傾向が確認された。

Inosine、doxyinosine について測定時間内の生成物の変化量を図 4 に示す。両代謝産物において 1～2 時間における変化量と 2～3 時間における変化量は、ほぼ同等の傾向を示した。患者検体は 3 時間の観察時間内でも両代謝産物の増加を認めなかった。



D. 考察

近年の次世代シーケンサーの台頭によりこれまで診断が叶わなかった多くの PID 患者の診断が可能となってきた。また、原因遺伝子に対する治療遺伝子をウイルスベクターにて患者造血幹細胞に導入し、再び、患者体内に投与する造血幹細胞遺伝子治療も多くの PID に対してその有効性を示すようになってきた。ただ、これら有効な治療はあくまでも診断が確定してからであり、その段階に至るまでには多くの患者は重篤な感染症を罹患し、それが原因で本来ある治療有効性を享受できない症例も多々ある。このことから、現在では如何にして発症前に疾患を診断するか（発症前診断）に重きが置かれ、米国ウィスコンシン州で示されたろ紙血を用いた TREC 測定による NBS の情報は極めて有用であり、我が国においても早々の導入が望まれる。ただ、SCID の中で酵素欠損から発症する ADA 欠損症はその臨床症状が遺伝子変異により多岐にわたり、変異のタイプによっては一定の T 細胞数を有し、これが原因で自己免疫反応 (Omenn 症候群) を発症することもあり、ADA

欠損症に対しては TREC 測定とは別の診断法が必要となる。

今回、NBS の導入を視野に入れ、NBS で使用されるろ紙血を用い ADA の代謝産物である inosine や deoxyinosine を測定することで ADA 活性を評価する系を検討した。その結果、健常人検体は観測時間内に一定の代謝産物を産生したが、ADA 患者検体でその産生を認めなかった。ことからこの系の確からしさは証明されたと言ってもよいが、ADA 活性に関するカットオフ値の情報が存在しないため、健常新生児（未熟児を含む）検体の測定範囲が不明で、時に false positive を生む危険性を否定はできない。よって、今後も数多くの健常人検体を測定することで健常人検体の活性値分布図を作成する必要がある。なお、これに関しては、現在成育医療研究センターにおいて NBS で使用された健常人ろ紙血を用いて ADA 活性を測定している。

今後は測定時間の短縮などより簡便な測定法を開発し、PID に対する NBS として TREC/KREC とともに本 ADA アッセイを行い、PID 患者の発症前診断に繋がたいと考えている。

E. 結論

LC/MS/MS によるプリン代謝産物一斉分析系を確立した。

健常人試料と患者試料を測定し、これら代謝産物の定量分析を行った。

健常人試料と患者試料に有意な差を認めたため、これら代謝成分を測定することで ADA 活性の評価は可能と思われた。

今後は測定時間を短縮することで NBS への導入を検討する。

なお、今回の研究は成育医療研究センター研究所 中島英規博士と共同研究である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Takeda K, Nakazawa Y, Komuro H, Yamamoto M, Shoji K, Morita K, Miyairi I, Katsuta T, Ohya Y, Ishiguro A, Onodera M: Augmentation of anti-tubercular therapy with interferon in a patient with dominant partial interferon. *Clinical Immunology* (in press).
2. Akagi K, Kawai T, Watanabe N, Yokoyama M, Arai K, Harayama S, Oana S, Onodera M: A case of macrophage activation syndrome developing in a patient with chronic granulomatous disease-associated colitis. *J Pediatr Hematol Oncol* (in press).
3. Kawai T, Watanabe N, Yokoyama M, Arai K, Oana S, Harayama S, Yasui K, Oh-ishi T, Onodera M: Thalidomide Attenuates Excessive Inflammation without Interrupting Lipopolysaccharide-driven inflammatory cytokine production in chronic granulomatous disease. *Clinical Immunology* 147: 122-128, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Whole exome sequence により本邦初の *RTEL1* 変異を同定した Hoyeraal-Hreidarsson 症候群

石村匡崇¹⁾、土居岳彦¹⁾、高田英俊¹⁾、瀧本智仁¹⁾、山元裕之¹⁾、吉田健一³⁾、小川誠司^{3) 4)}、
小島勢二⁵⁾、大賀正一^{1) 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) 九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学

3) 東京大学病院 Cancer Board

4) 京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学

5) 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学

研究要旨

患児は在胎 36 週、体重 1455g で出生した男児。体重増加不良と発達遅滞があり、頭部 MRI で小脳低形成を認めた。1 歳時に *E.coli* による敗血症罹患後より汎血球減少と低γグロブリン血症が進行した。骨髄は低形成髄で、Flow-FISH 法によりテロメア長の短縮を認め、先天性角化不全症の最重症型である Hoyeraal-Hreidarsson 症候群と診断した。先天性角化不全症は、これまでテロメア関連遺伝子変異により発症すると報告されているが、本症例では既知の原因遺伝子に変異は認めず、whole-exome sequence による原因遺伝子検索を行ったところ、*RTEL1* (Regulator of telomere elongation helicase 1) 遺伝子の複合ヘテロ遺伝子変異を同定した。*RTEL1* はテロメアの維持・複製、および DNA 二本鎖切断修復に関与しており、2013 年に先天性角化不全症の新規原因遺伝子として新たに報告された。本症例は本邦初の *RTEL1* 変異による Hoyeraal-Hreidarsson 症候群と考えられた。

A. 研究目的

Hoyeraal-Hreidarsson 症候群(HHS)は先天性骨髄不全症候群の 1 つであり、先天性角化不全症 (dyskeratosis congenita ; DC) の最重症型として知られる。乳児期早期に骨髄不全症を発症し、小頭症、小脳低形成、成長発達遅延、顔貌異常を認める遺伝性疾患である。これまでテロメア関連遺伝子の変異により発症すると報告されているが、まだ半数例では既知の遺伝子異常を認めず、未知の原因遺伝子が存在すると考えられる。われわれは、既知のテロメア関連遺伝子に異常を認めない HHS 男児例とその両親を対象とし、全 exon 解析(whole exome sequence)を行い、原因遺伝子探索を試みた。

B. 研究方法

[症例]

在胎 36 週 0 日、体重 1455g で出生した男児。体重増加不良と発達遅滞があり、頭部 MRI で小脳低形成を認めた。1 歳時に *Escherichia coli* による敗血症

罹患後より汎血球減少と低ガンマグロブリン血症が進行した。末梢血で B 細胞・NK 細胞数は著減していた。骨髄は低形成で、Flow-FISH 法によりテロメア長の短縮を認め、先天性角化不全症の最重症型である Hoyeraal-Hreidarsson 症候群と診断した。造血不全が進行し発熱が持続し緊急的に臍帯血移植を施行したが生着前に頭蓋内出血を発症し救命できなかった。

[遺伝子解析]

ご両親に遺伝子解析について説明を行い、同意を得て患者末梢血より DNA を抽出し、既知の原因遺伝子(*TERC*, *TERT*, *DKC1*, *NHP2*, *NOP10*, *TINF2*, *TCAB1*)および *APOLLOIKAROS* 遺伝子に対し、サンガー法による遺伝子解析を行った。

[whole exome sequence]

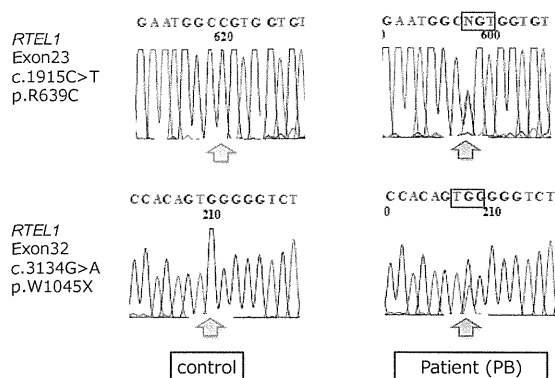
患児の毛髪および爪、また両親の末梢血より DNA を採取し、whole exome sequence を行った。

C. 研究結果

サンガー法で解析した遺伝子 (*TERC*, *TERT*, *DKC1*, *NHP2*, *NOP10*, *TINF2*, *TCAB1*, *APOLLO*, *IKAROS*) に変異を認めなかった。

Whole exome sequence では、in house SNP (正常検体でみられる SNV)、dbSNP131 で報告されている SNP、アミノ酸置換を伴わない synonymous な SNV、Mismatch 率 (SNV を call する read の割合) が 25%以下 (in/del では 10%) で信頼度が低い SNV を除外し、患者検体で 354 の SNV/SNP または in/del を同定した。これらのうち、常染色体劣性遺伝形式をとり、テロメア関連遺伝であるものは唯一 *RTEL1* (Regulator of telomere elongation helicase 1) 遺伝子であり、複合ヘテロ遺伝子変異 (c.1915C>T: p.Arg639Cys, c.3134G>A: p.Trp1045X) を認めた。サンガー法により確認し (図 1)、患児の両親は保因者であった。

図 1. 本症例で同定した *RTEL1* 遺伝子変異



c.1915C>T: p.Arg639Cys 変異に関して、SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) および Poly-phen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) による変異予想解析では、いずれも Damaging であり、同部位は種を越えて保存されている部位であった。

D. 考察とまとめ

RTEL1 はテロメアの維持・複製、および DNA 二本鎖切断修復に関与しており (Vannier JB, et al.

Cell 2012)、2013 年に先天性角化不全症の新規原因遺伝子として報告された (Ballew BJ et al. Hum Genet. 2013、Walne AJ. et al. Am J Hum Genet.2013、Le Guen T. et al, Hum Mol Genet.2013 など)。過去の報告ではほとんどが本症例と同様の常染色体劣性遺伝形式の HHS で表現型も類似していた (表 1)。一方で hetero 接合性変異の軽症 DC 例も報告されており、今後の症例蓄積が望まれる。HHS は骨髄不全、免疫不全が合併し予後不良の疾患である。迅速に診断し、造血幹細胞移植など適切な治療介入が必要である。

	本症例	既報告
性別	男	男:女=11:8
血族婚	-	1/12
IUGR	+	13/19
成長障害	+	13/19
小頭症	+	15/19
小脳低形成	+	16/19
発達遅滞	+	12/16
骨髄不全	+	19/19
免疫不全	+	13/18
口腔・消化器所見	+	7/19
皮膚所見	-	7/18
予後	死亡	死亡/生存=9/10

表 1. 既報告と本症例との比較

E. 研究危険情報

特になし

F. 知的財産の出願・登録状況

特になし

Exome 解析による原発性免疫不全症候群の原因遺伝子の同定と機能解析

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

Exome 解析により原発性免疫不全症候群の原因遺伝子同定を行い、その機能解析を行った。

Exome 解析により B 細胞、樹状細胞、NK 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た。さらに 国内 GATA2 欠損症を 14 例集積し臨床症状を検討し、患者由来 T 細胞の機能解析を行った。その結果 GATA2 は内因性に T 細胞の発生・分化に重要な役割を果たし、T 細胞機能不全の原因となっていることが判明した。

ICF 症候群は免疫不全、染色体異常、顔貌異常を三徴とする遺伝性疾患である。原因遺伝子は DNA のメチル化に関わる酵素をコードする *DNMT3B* および *ZBTB24* であることが確定している。原因不明の低ガンマグロブリン血症とされていた 5 症例で、Exome 解析により *DNMT3B* ないし *ZBTB24* の変異を見出し、染色体解析により ICF 症候群と確定した。すなわち三徴がそろわないため ICF 症候群と診断されず、原因不明の免疫不全症とされている患者がいることを示した。また ICF 症候群ではメモリー B 細胞が欠損していることを示した。

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、*FANCF* 遺伝子の Compound hetero 変異を同定した。*FANCF* 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。29 症例の Fanconi 貧血患者の免疫系の解析を行い、7 名で免疫系の異常を認めた。

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、悪性腫瘍や神経疾患を合併する原発性免疫不全症も存在する。そのため血液専門医や神経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、Exome 解析により

原因遺伝子を同定し、その機能解析を行うことで病態解明を行った。

B. 研究方法

PIDJ に登録された症例を対象とした。対象患者は、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞が欠損し、GATA2 異常と判明した患者 14 例、ICF 症候群と判明した 5 例 (タイプ 1: 3 例、タイプ 2: 2 例)、Fanconi 貧血 29 例である。原因遺伝子があきらかになっていない症例では、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。原因遺伝子の機能解析は、書く遺伝子の予想される機能をもとに、実験を組み立てた。

(倫理面への配慮)

データは匿名化して取り扱った。遺伝子解析、細胞分化実験などは、防衛医大倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

Exome 解析により樹状細胞欠損症で *GATA2* 変異が原因であることを見出した。さらに 国内 *GATA2* 欠損症を 14 例集積し検討した。水痘の重症化、サルモネラ感染の重症化、真菌感染、非定型抗酸菌感染がみられ、T 細胞免疫の低下が疑われた。患者骨髓血より CD34 陽性血液幹細胞を分取し、OP9-DL1 feeder cells 上で、IL-7、Flt3、SCF 添加して 29 から 36 日間培養し double negative T 細胞、double positive T 細胞へと in vitro で分化させた。健常者では double positive T 細胞へと分化したが、*GATA2* 欠損症患者骨髓由来 CD34 陽性細胞からは double negative T 細胞、double positive T 細胞ともに分化しなかった。

また、FACS 解析で thymic naive T 細胞の低下があり、T 細胞新生能を示す TREC も低下していた。

さらに IL4、IL17 産生能を検討したところ、著明に低下していた。さらに T 細胞を活性化すると *GATA2* が発現する事を見出した。

以上、*GATA2* は T 細胞の初期分化、胸腺から末梢への流出、サイトカイン産生細胞への機能的分化におそらく内因的に関与していることが示され、*GATA2* が T 細胞の発生・分化に重要な役割を果たしていると考えられた。

ICF 症候群は免疫不全、染色体異常、顔貌異常を三徴とする遺伝性疾患である。原因遺伝子は、患者の半数で DNA のメチル化に関わる酵素をコードする *DNMT3B* および *ZBTB24* であることが確定している。

原因不明の低ガンマグロブリン血症とされていた症例で、Exome 解析により *DNMT3B* の変異を認め、染色体解析により ICF 症候群に特徴的な染色体異常を認め、ICF 症候群と確定した。顔貌異常はなかった。すなわち三徴がそろわないため ICF 症候群と診

断されず、原因不明の免疫不全症とされている事を示した。

さらに ICF 症候群患者 5 症例を候補遺伝子解析により見出し、タイプ 1 の原因遺伝子 *DNMT3B*、タイプ 2 の原因遺伝子 *ZBTB24* の変異を見出し、染色体解析により ICF 症候群と確定した。FACS 解析で、ICF 症候群タイプ 2 でも、ICF 症候群タイプ 1 と同様に、CD37 陽性のメモリー B 細胞の完全欠損があることを見出した。

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 Fanconi 貧血のパターンをとった。モノユビキチンアッセイでは Fanconi 貧血に典型的なパターンを取った。なお *FANCE* 変異による Fanconi 貧血患者の確定診断は本邦初である。

そこで、Fanconi 貧血と診断されている 29 例について免疫学的解析を行った。その結果、6 名でリンパ球減少、2 名で B 細胞欠損、3 名で CD4/CD8 比の逆転を認めた。TREC/KREC 解析では、KREC のみ陰性者が 5 名、TREC/KREC ともに陰性者が 2 名存在した。

これまで *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、また免疫系の異常を解析した報告も無い。今回の解析で、Fanconi 貧血患者の一部で免疫不全を呈することが明らかになった。

D. 考察

原発性免疫不全症候群の原因遺伝子を同定することで、遺伝子解析による早期診断が可能になる。また、原因遺伝子の機能解析を行うことで病態解明につながり、より良い治療の開発につながる。本研究では新しく原発性免疫不全症患者の新規原因遺伝子として、Exome 解析により *GATA2* を同定した。ま

た原因不明の低ガンマグロブリン血症を呈する疾患が ICF 症候群や Fanconi 貧血であることを Exome 解析で明らかにした。

さらに、GATA2 欠損症、ICF 症候群、Fanconi 貧血について国内症例を集め、その免疫系の解析と、臨床症状をまとめた。

これらの結果をもとに、ガンマグロブリン定期補充療法の必要性、造血幹細胞移植の適応、バクタの予防内服の必要性などが判明し、より病態に即した治療を選択することが可能になった。

E. 結論

Exome 解析により、原発性免疫不全症患者の新規原因遺伝子の同定ができ、患者の病態解析、患者臨床データのまとめができた。それをもとに、より適した治療法の選択に有効であった。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

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.* 2013(in press)
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)

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 Summit. Berlin, Germany. July.2013.
3. Nonoyama S. Primary immunodeficiency electronic record (Pier) for the PID patients. Invited speaker. International Primary Immunodeficiency Congress. (Estoril, Portugal, November, 2013)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし