

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 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、片アリル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ス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

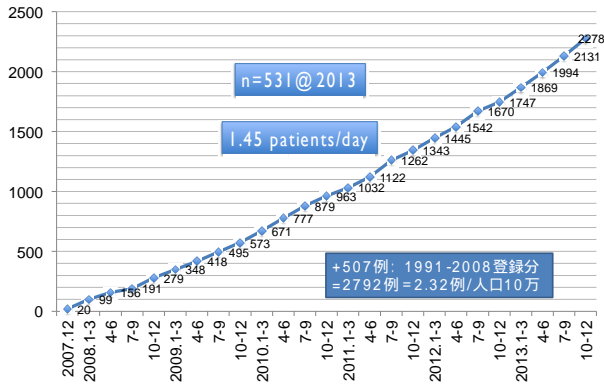
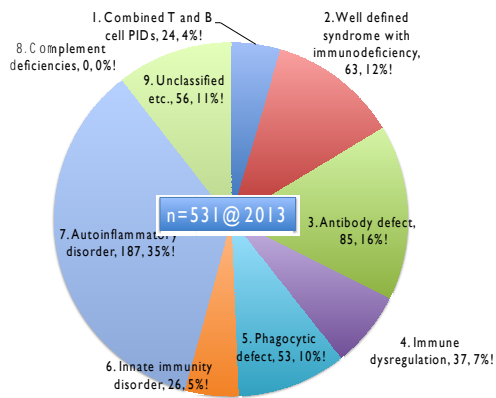


図 1 : PIDJ 登録患者の推移



IUIS分類2013

図 2 : 国際分類による PIDJ 登録患者の内訳

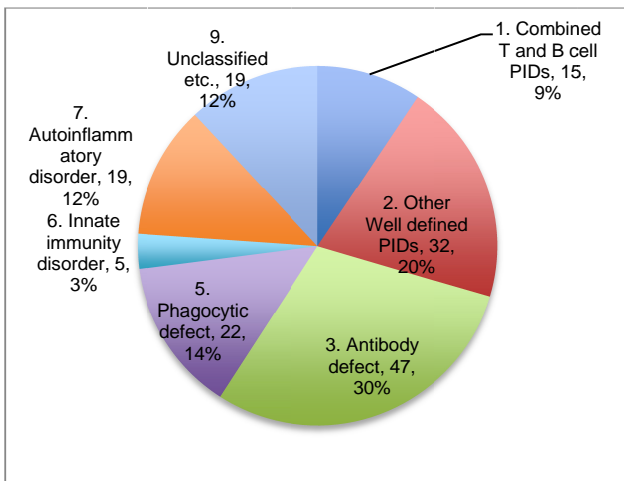


図 3 : 東京医科歯科大学小児科への紹介患者の内訳

BTK	3
CD40L	2
CHD7	1
CYBB	2
ELA2	1
NEMO	1
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

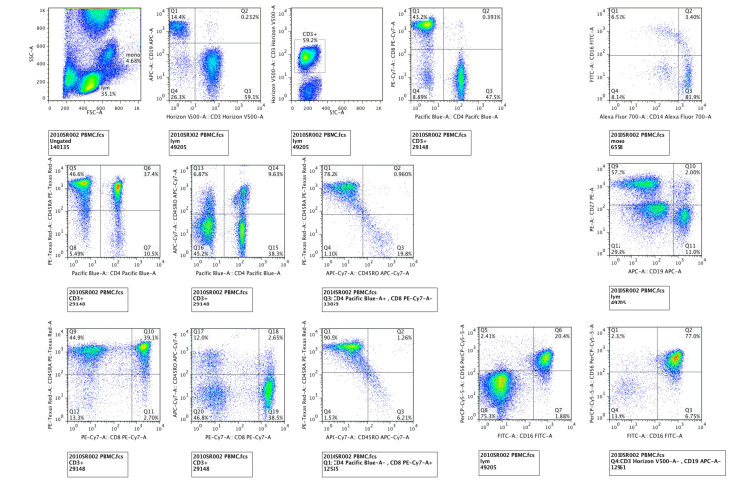


図 4:10 カラー-FACS の 1 パネルの例