

原発性免疫不全症に関する調査研究

森尾友宏、高島健浩、満生紀子、中谷夏織
東京医科歯科大学大学院医歯生発達病態学

研究要旨

PIDJ の解析担当施設として年間 200 件前後の相談を受け、解析(KRECs, TRECs, 10 color 12 parameter flow cytometry, 遺伝子解析)を行った。その中でも抗体産生不全やクラススイッチ異常を主体とする原発性免疫不全症については、in vitro class switch 系での病態解析やシグナル解析などを併用して病態をさらに深く解析すると共に、家系解析を含めた全エクソン解析を行って、いくつかの責任遺伝子を明らかにした。また治療に関しては造血細胞移植学会遺伝性疾患 WG と連携し、根治的治療を必要とする原発性免疫不全症に対する移植成績を検討した。また造血細胞移植後の免疫学的モニタリングとして、KRECs, TRECs を中心としたリンパ球新生能を評価し、レシピエント年齢がその回復に重要であることや、臍帯血移植には disadvantage がないことなどを明らかにした。

A . 研究目的

抗体産生不全を主体とする免疫不全症、中でも分類不能免疫不全症 (common variable immunodeficiency: CVID)、クラススイッチ異常症を中心に、その免疫学的特性や遺伝子異常を明らかにする。

重症の免疫不全症では造血細胞移植が必要である。そこで本年は、より良い移植方法の開発に向けて、免疫不全症を含む集団において、造血細胞移植後の B 細胞、T 細胞の回復に関係する因子を抽出し検討する。

B . 研究方法

1 . CVID, class switch recombination (CSR) 異常症として、本学にコンサルトのあった症例について、以下の検討を行った。

1) B 細胞、T 細胞新生能の解析

sjKRECs, cjKRECs, sjTRECs を realtime PCR を用いて計測し、microgramDNA あたりのコピー数を算出した。

2) 10 color 12 parameter FACS 解析

CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD20, CD21, CD24, CD25, CD27,

CD31, CD38, CD45RA, CD45RO, CD56, CD123, CD127, TCR, TCR, HLADR, CXCR3, CXCR5, CCR6, CCR7, V24, V11 などに対する抗体を用いて、transitional B から形質細胞までの B 細胞分化段階、Tfh, Th1, Th2, Th17, Th1/Th17, Treg, naïve, recent thymic emigrant, central memory, effector memory T 細胞, NK, NKT, mDC, pDC, activated mDC などの細胞集団を明らかにし、疾患ごとの特性を解析した。

3) 責任遺伝子解析

候補遺伝子解析を行い、同定されなかったものに対しては、一部でかずさ DNA 研究所や理化学研究所統合生命医科学センターとの共同研究の元で、全エクソン解析を行った。Illumina HiSeq2000 にて解析を行い、insertion, deletion, missense mutation, nonsense mutation をピックアップし、dbSNP137 及び日本人 SNP により filtering したのちに、家族の想定される遺伝形式におうじて heterologous mutation, homologous mutation, compound heterozygotic mutation をピックアップした。得られた候補遺伝子は Sanger 法にて塩基配列の確認を行った。

2. 日本造血細胞移植学会遺伝性疾患 WG と連携して、根治的治療を必要とする原発性免疫不全症に対する移植成績を検討する。また移植後 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月、24 ヶ月などの時点で KRECs, TRECs を解析し、年齢、疾患、前処置、移植ソース、免疫抑制薬の使用、などと KRECs, TRECs の関係を単変量解析及び多変量解析にて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では患者情報を扱うことに加えて、遺伝子診断においては遺伝子解析が必要になる。このため、各種指針やガイドラインに従い、十分な説明と同意の元に検討を行う。なお、遺伝子診断や KRECs, TRECs 解析、移植成績解析などについては東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会(及び遺伝子解析に関する倫理審査委員会)の承認を得ている。

C. 研究結果

1. CVID, CSR 異常症の病態探索

1-1,2. 免疫機能解析

本年度は 10 カラー解析手法を確立し、様々な疾患において特徴を検討した。例えば高 IgE 症候群における Th17 の減少や、ICOS 欠損症における Tfh の減少、後述の PIK3CD 異常症における transitional B の増加などがそれに当たる。1-3 に関することとして、責任遺伝子未知の疾患については KRECs, TRECs, 10 color FACS にてその特徴を profiling した。10 color FACS は 1mL 程度で実施が可能であり、蛍光色素の組み合わせを含め、ほぼ完成系に近づいた。

1-3. 抗体産生不全症における責任遺伝子探索

5 家系において全エクソン解析を行った。2 家系では常染色体劣性遺伝形式を、3 家系では常染色体優性(AD)遺伝形式を想定して解析を行った。その結果、常染色体劣性(AR)遺伝を疑う症例において LRBA の compound heterozygotic mutation を検出した。本症例は幼少時期より I 型糖尿病、特発性血小板減少性紫斑病などに罹患し、10 代になってから低ガンマグロブリン血症を呈し、その後も多発性硬

化症様疾患や炎症性腸疾患に罹患し、ステロイドと CyA の投与を必要としている。兄は血小板減少性紫斑病から以後低ガンマグロブリン血症となり、出血にて逝去していた(manuscript in preparation)。もう 1 例の AR 形式が疑われる症例、また AD を疑う家系においても 2-6 個の候補遺伝子に絞り込むことができた。

一方本年度に明らかになった PIK3CD 異常症(E1021K 変異)は 6 症例明らかになった。IgG2 欠損症、反復性重症肺炎、リンパ組織腫脹などを呈する疾患群では、本疾患を疑う必要性がある。

2. 造血細胞移植における B, T 細胞新生能

原発性免疫不全症、血液系悪性腫瘍に対する造血細胞移植において、KRECs, TRECs を測定した。TRECs, KRECs の早期回復例では感染症が少ない傾向を認めたが、200 名弱の解析では power が不足し $p < 0.05-0.1$ 程度の有意差にとどまった。一方 KRECs, TRECs の回復については、レシピエントが若年であることが有利であり、ドナーの年齢は関係ないことが明らかになった。また臍帯血移植でも骨髄移植や末梢血幹細胞移植に劣らない KRECs, TRECs の回復が明らかになった(submitted for publication)。

D. 考察

全エクソン解析が比較的容易に行えるようになった現在、既知遺伝子の確実な rule out、数理的処理による責任遺伝子の絞り込み、免疫学的特性の解析及びデータベース化が重要である。その点で 10 color 解析および KRECs, TRECs データと臨床情報が揃っていることは必須と考えられる。さらに本年からは in vitro class switch assay や IgH の repertoire 解析、CDR3 length の解析などもセットアップし、クラススイッチ異常や体細胞超変異の異常、分化の異常などを sort out できるシステムを立ち上げつつある。一方候補遺伝子産物については、免疫細胞亜群ごとの発現や、会合分子の探索、分子の修飾や機能部位の同定など様々な検討が必要となっている。

そのための強制発現系も構築しつつあり、今後検証系を streamline 化したいと考えている。

移植成績に関しては、今後造血細胞移植学会の TRUMP data と連動して解析を行う予定であるが、今回の検討により臍帯血移植が B、T 回復に不利であることはなく、むしろ KRECs については早期回復が認められることが明らかになった。量的な回復に加えて、今後は質的な回復に絞り検討を進めたい。臍帯血移植の中でさらに免疫学的再構築が早い群とそうでない群を明らかにできれば、今後のより良い移植に向けて、戦略を立てることが可能になると期待する。

E. 結論

体系的な免疫機能解析系を構築し、様々な疾患において、その特徴を明らかにするとともに、原因未知の疾患については基盤となるデータを蓄積した。抗体産生不全を主とする疾患については、責任遺伝子同定、探索作業を行った。一部では遺伝学的確定診断に至り、また一部では候補遺伝子の抽出に至った。さらに B 細胞受容体の多様性に関する検査系の立ち上げに着手した。根治的治療法である造血細胞移植においては早期免疫学的回復に有利な因子について検討を行い、今後の質的検討につながる成果を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T. B-cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using a minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol.* 98:355-60, 2013.
2. Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe

F, Morio T, Teraoka H, Mizutani S. Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. *Cancer Sci.* 104:703-10, 2013.

3. 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.* 33:857-64, 2013.
4. Shimizu M, Kanegane H, Wada T, Motoyoshi Y, Morio T, Candotti F, Yachie A. Aberrant glycosylation of IgA in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *J Allergy Clin Immunol.* 131:587-90, 2013.
5. Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer.* 60:836-41, 2013.
6. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsui N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammerstrom 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 Allerg Clin Immunol.* 131:1437-40, 2013.
7. Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsui N, Ohara O, Komada Y. A novel Wiskott-Aldrich

syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* 290:164-8, 2013.

2. 学会発表

1. Morio T. Cord blood transplantation for primary immunodeficiency in Japan. AsiaCORD2013. Kobe, Japan. April 2013.
2. 森尾友宏：悪性腫瘍を合併する免疫不全症 第54回日本小児血液・がん学会学術集会、福岡、2013年11月29日 12月1日
3. 森尾友宏：免疫不全症候群から学ぶ human immunology、第41回日本臨床免疫学会総会、山口、2013年11月27日 29日
4. 森尾友宏：造血細胞移植後のウイルス感染症、第43回東海小児造血細胞移植研究会、名古屋、2013年11月12日
5. 森尾友宏：易感染性、自己免疫、悪性腫瘍の分子基盤としての原発性免疫不全症、平成25年度遺伝子病制御研究所研究集会、北海道、2013年10月25日
6. 森尾友宏：分類不能型免疫不全症（CVID）の多彩な病像と分子基盤、第75回日本血液学会学術集会、北海道、2013年10月11日 13日

G. 知的所有権の取得状況

特許取得

該当なし

実用新案登録

該当なし

その他

該当なし