

201324006B

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

平成23年度～平成25年度 総合研究報告書

研究代表者 原 寿郎

平成26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

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

平成23年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 原 寿郎

平成26年3月

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

目 次

I	総合研究報告書	3
	原 寿郎	
	九州大学大学院医学研究院成長発達医学 教授	
II	研究成果の刊行に関する一覧表	35
III	研究成果の刊行物	57

I 総合研究報告書

総合研究報告書

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

主任研究者 原 寿郎

（九州大学大学院医学研究院成長発達医学 教授）

研究要旨

原発性免疫不全症候群の診療レベルおよび患者 QOL の向上を目的として、以下の研究成果を得た。

原発性免疫不全症候群の全国疫学調査結果を解析し、内分泌疾患の合併が多いことを初めて明らかにし、液性免疫不全症の成人例の特徴、IRAK4 欠損症や先天性好中球減少症、C3 欠損症、STAT1 変異による慢性皮膚粘膜カンジダ症（CMCD）の臨床・遺伝学的特徴を解明した。

各疾患の迅速診断法の開発を展開し、新たに (1) p47phox 欠損型 CGD、(2) p67phox 欠損型 CGD、(3) FHL、(4) 高 IgE 症候群 Tyk2 欠損型、(5) CMCD、(6) IKBA 欠損症、(7) ADA 欠損症の迅速診断法を開発し、免疫担当細胞の 10 カラー解析法による免疫学的評価法を開発した。国内患者の遺伝子診断を行い 3 年間に約 800 検体の検査を行った。次世代シーケンサーを導入し、解析パネルを設定することで検査ニーズに対応できるよう効率化した。

On line 患者登録を継続し、主治医からの診療相談に専門的な情報提供を行い、生体試料の保存を行った。

原因不明の疾患については、エキソーム解析などの最新の技術を用いて解析し、*FANCD1* 遺伝子異常による液性免疫不全症、*GATA2* 欠損症、*PIK3CD* 異常症、*LRBA* 異常症、*RTEL1* 欠損症、*Aprataxin* 異常症、*IL2RG* 欠損症などを同定した。疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、Chediak-東症候群、*AK2* 欠損症の病態解析を行い、創薬スクリーニングの基盤を確立した。変異 *STAT3* ノックインマウスを作製し、高 IgE 症候群の病態解析を行い、骨や皮膚の病態を解明した。XLA 患者の好中球減少のメカニズム、CGD における炎症性腸疾患発症機序、女性の WAS や XLP 患者における X 染色体不活化異常の意義、*WASP* 変異の T 細胞機能への影響、C3 欠損症における遺伝子異常のタイプと臨床像の相関、*NLRP3* およびインフラマソームの異常による *IL-1β* 活性化機構などを明らかにした。

既に作成していた、X-SCID、*JAK3* 欠損症、WAS、CGD に対する造血幹細胞移植法を中心としたガイドラインの成績調査を継続し、新たに、高 IgM 症候群の治療ガイドライン、原発性免疫不全症に合併する BCG 感染症の治療ガイドラインを作成し公開した。

原発性免疫不全症候群患者の患者家族会と連携して、相談会や勉強会を開催し、ホームページに種々の情報提供を行った。患者家族会と共同で World PI Week（国際免疫不全症週間）に参加した。患者や家族向けに「患者・家族のための原発性免疫不全症候群疾患概説書」を作成し、患者家族、医療機関に配布し、ホームページにも掲載した。

分担研究者

宮脇 利男・富山大学大学院医学薬学研究部小児科学教授（平成 23～24 年度）
有賀 正・北海道大学大学院医学研究科小児科学教授
野々山恵章・防衛医科大学校医学研究科小児科学
森尾 友宏・東京医科歯科大学大学院発達病態小児科学准教授
上松 一永・信州大学大学院医学研究科移植免疫感染症学准教授（平成 23 年度）
近藤 直実・岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学教授（平成 23～24 年度）
小島 勢二・名古屋大学大学院発育・加齢医学講座小児科学教授
谷内江昭宏・金沢大学大学院医学系研究科血管発生発達病態学教授
平家 俊男・京都大学大学院医学研究科小児科学教授
小林 正夫・広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学教授
布井 博幸・宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学教授
横田 俊平・横浜市立大学大学院医学研究科発生成育小児医療学教授（平成 23～24 年度）
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教授
峯岸 克行・徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター病態プロテオゲノム分野教授
笹原 洋二・東北大学大学院医学系研究科小児病態学講師
河野 肇・帝京大学医学部内科学講座准教授
今井 耕輔・東京医科歯科大学大学院小児・周産期地域医療学准教授（平成 24～25 年度）
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（平成 24～25 年度）
小野寺雅史・国立成育医療センター研究所成育遺伝研究部部長（平成 24～25 年度）
金兼 弘和・富山大学大学院医学薬学研究部小児科学講師（平成 25 年度）
加藤善一郎・岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学臨床教授（平成 25 年度）

研究協力者

竹森 利忠・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記憶研究グループ グループディレクター
石川 文彦・理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センターヒト疾患モデル研究ユニットリーダー
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（平成 23 年度）
岩田 力・東京家政大学家政学部児童学科教授
赤城 邦彦・神奈川県立こども医療センター母子保健室長
大石 勉・埼玉県立小児医療センター保健発達部長
久間木 悟・仙台医療センター小児科
河合 利尚・国立成育医療センター研究所遺伝子診断治療研究室室長
小林 法元・信州大学医学部小児医学講座助教（平成 24～25 年度）

A. 研究目的

全国疫学調査データの平成 20～22 年度の解析で、我が国全体の原発性免疫不全症の頻度、個々の疾患の臨床像の特徴、合併症等を明らかにした。平成 23～25 年度は、患者や主治医の On line 登録を推進し、臨床経過を詳細に検討し、診断や治療における問題点、発がんや自己免疫疾患、内分泌疾患、生ワクチン接種による重症副反応などの合併症の予防法を検討した。QOL 調査を推進し、その結果を基に、日常生活指導等により合併症を予防し、患者 QOL を向上させる。

疾患の早期診断は重要な課題であり、多くの迅速診断法やスクリーニング法を開発してきた。乾燥濾紙血（ガスリー血）中の TREC_s 測定による重症複合型免疫不全症、KREC_s 測定による無 γ グロブリン血症の新生児スクリーニング法は極めて実用的であり、海外では実際に全新生児を対象として行われている地域もある。この新生児スクリーニングを実施できるよう整備していく。

病因・病態解析は新しい診断法、治療法の開発に必須である。全エクソン解析による新規責任遺伝子の同定や、iPS 細胞やヒト化マウスを用いた病態解析を継続する。造血幹細胞移植法を中心とした治療ガイドラインの成績調査を継続し、移植法の改良や適応拡大を検討する。他の疾患についても治療ガイドラインを作成する。新規治療法の開発では、遺伝子修復法、タンパク治療法、iPS 細胞を用いた遺伝子治療に関し基礎研究を行う。

重症複合免疫不全症に対する遺伝子治療は安全性、有効性が明らかになりつつあり、造血幹細胞移植が困難なドナーのいない患者、感染を合併した患者に対する治療として、遺伝子治療の臨床研究を推進するための準備を行う。

患者家族会と交流し患者家族への教育を行い、主治医との on line での相談受付や情報提供をこれまで同様継続する。患者用日常生活マニュアル、医療従事者用診断治療概説書の作成により患者 QOL や医療水準を向上させる。

B. 研究方法

本調査研究では、以下の重点目標を掲げ、国際的動向や国内でのこれまでの調査結果に基づいて、我が国の背景をふまえた研究を行い、患者・家族へ最善の治療の提供し、QOL の向上に寄与したい。

1. 疫学調査研究：全国疫学調査結果の解析を継続し、種々の観点から解析し、生活習慣や治療方針と治療成績や合併症との関連などを解析する。また各疾患の専門施設で全国規模の調査を行い、臨床像の特徴、遺伝的背景などについての解析を行う。またホームページによる患者二次登録を推進し、IT を活用したデータベースの構築を推進する。
2. 新規診断法、迅速診断法の開発：これまで各疾患の専門施設が病態の特徴を利用した簡易スクリーニング法を開発してきた。フローサイトメーター、定量的 PCR 法等を駆使し、蛋白機能の定量的評価法など新たな方法を開発して、迅速診断法をさらに開発する。TREC/KREC 測定による新生児マススクリーニングについては、実施後に予想される問題点などを再検討し、実際に応用できるように行政との調整を行う。
3. Primary Immunodeficiency Database in Japan (PIDJ) プロジェクトへの登録、遺伝子解析：遺伝子解析は、当班研究の班員施設を介して on line で遺伝子解析依頼を受け付け、理化学研究所およびかずさ DNA 研究所で行う。また、細胞の蛋白発現についての解析も理化学研究所で行う。多くの種類の遺伝子解析を、多数、迅速に行う必要があり、次世代シーケンサーなどを用いて、ニーズに対応できる新たな方法を確立していく。
4. 責任遺伝子、発症機構、病態の解明：これまで高 IgE 症候群や慢性皮膚粘膜カンジダ症などについて責任遺伝子を同定してきた。今後は、エキソーム解析や RNA Seq 法などを駆使した解析から新たな責任遺伝子を同定していく必要があると考えられる。その結果得られた候補遺伝子については、分子遺伝学的な解析に加えて、iPS 細胞やヒト化マウスの技術を取り入れた機能・病態解析を行う。

5. 治療ガイドラインの作成と新規治療法の改良・開発：これまで、重症複合免疫不全症、CGD、Wiskott-Aldrich 症候群、高 IgM 症候群に対する造血幹細胞移植ガイドライン、慢性肉芽腫症における BCG 感染症治療ガイドラインを作成しホームページに掲載した。このガイドラインの評価を継続して蓄積し、改良すべき点について継続的に検討を行う。これ以外の疾患についても、実際の診療上の具体的な問題について治療法や対策法を提示していく。造血幹細胞移植前後の合併症、特に、高感度の感染症迅速診断法についても、開発研究を行う。

遺伝子治療研究では、安全性の高い新規ベクターと iPS 細胞やヒト化マウス疾患モデルを用いて、その有効性や安全性を確認する。遺伝子治療については、海外でベクターの改良が進んでおり、国内外の情報を集め、具体的な実用化に向けた研究を継続する。

6. 患者 QOL 調査と患者家族や医療者への継続的情報提供体制：原発性免疫不全症候群の患者家族向け概説書を作製し既に配布し、またホームページにも掲載した。新たな情報があれば適宜修正する。診断基準、専門病院、遺伝子検査を行う施設、治療ガイドラインなどの情報についてもホームページに掲載し、最新の情報に更新する。患者家族会との講演会や相談会を実施する。Jeffrey Modell Foundationなどを参考に、患者家族への情報発信を目的とした World Primary Immunodeficiency Week に患者家族とともに参加するなど国際的な情報を基に、患者への情報提供に取り組む。

(倫理面への配慮)

本調査研究に必要とされる患者試料を得るにあたっては、各研究者の所属する機関の倫理委員会の承認を得ている。患者試料の採取にあたっては、遺伝子解析その他の医学研究に供する事、結果は本人が特定できるような形では公表しない事など、患者・代諾者の理解を求め、経緯を書面に残している。ES 細胞や iPS 細胞の取り扱いについては該当するガイド

ラインに沿い、試料提供者に十分な説明をした上で書面での同意を得て行う。

C. 研究結果

1. 疫学調査研究、QOL 調査

平成 20～22 年度の班研究で行った全国調査では、原発性免疫不全症候群の有病率、合併症などを明らかにしたが、データをさらに解析することで、今回以下の結果が得られた。個々の疾患においても全国調査を展開した。

① 原発性免疫不全症候群患者の内分疾患の合併

二次調査で報告された原発性免疫不全症患者 923 例のうち、内分疾患合併例は 49 例認められ、19 歳以下の若年者では、健常者と比較して、1 型糖尿病 78 倍、2 型糖尿病 35 倍、成長ホルモン分泌不全性低身長症 63 倍の罹患率であった。

② 液性免疫不全症の成人例の特徴

近年、液性免疫不全症の長期生存患者が増加している。成人患者の特徴を検討した結果、XLA では、気管支拡張症や難聴の合併が多かった。対照的に、CVID では悪性腫瘍、自己免疫疾患の合併が多く認められたが、小児期との差は明確ではなかった。CVID では 15 歳未満発症例が重篤な合併症を持つ傾向があった。これらの点は、合併症を予防し、患者 QOL を維持するために重要な情報であり、患者家族会などでも情報提供を行った。

③ IRAK4 欠損症の国内症例の特徴

開発した迅速診断法を用いて、国内の IRAK4 欠損症患者を集積し、5 家系、8 名の患者の臨床像や遺伝的背景を明らかにした。8 名中 4 名が、乳幼児期の invasive bacterial infection で死亡していた。肺炎球菌による化膿性髄膜炎の頻度が高かったが、緑膿菌による壊死性筋膜炎・敗血症での死亡例も確認され、早期診断の重要性が示唆された。多くの患者で臍帯脱落遅延がみられ、診断の参考になると考えられた。遺伝子変異は exon2 の変異がほとんどであり、founder effect と考えられた。

④ 先天性好中球減少症の国内患者の特徴

先天性好中球減少症患者の臨床及び遺伝的特徴について解析を行った結果、90%の患者が1歳前に診断されていることが判明し、初発時の臨床症状としては皮膚感染症が多い事が明らかになった。遺伝子解析では76%に *ELANE* 変異を、12%に *HAX1* 変異を認めた。G-CSF の定期投与は56%に行われていた。患者46名中4名がMDS/AMLに移行し、1名が造血幹細胞移植後のGVHDによって死亡していた。悪性転化前に移植が行われた12例は前例生存していた。

⑤ 補体C3欠損症

C3欠損症の全国集計を行い、その病態を解析した結果、新たな臨床像を示す症例を同定した。この遺伝子変異の性状と臨床像との新たな関連を明らかにした(参考資料1)。

⑥ 慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMCD)

STAT1 遺伝子の機能獲得型変異による慢性皮膚粘膜症 (CMCD) の国内患者181名(男性89名女性92名)の臨床像を調べた結果、カンジダ感染以外に、患者の83%に反復性中耳炎、副鼻腔炎、下気道感染、皮膚感染症などの細菌感染症を、44%で反復性のHSV感染症、重症水痘、帯状疱疹、CMV感染症、EBV感染症などのウイルス感染症を起こしていた。*Pneumocystis* 肺炎、*cryptococcus* 感染症を起こした例も認められた。さらに甲状腺機能異常や自己免疫性肝炎、1型糖尿病、乾癬、SLE、頭蓋内動脈瘤、気管支拡張症、血球貪食症候群、巨赤芽球性貧血などを合併しやすい傾向が認められた。遺伝子解析の結果では、*STAT1* の coiled-coiled domain の異常を66%に、DNA-binding domain の異常を29%に認めた。9%の患者は死亡しており、死亡時の平均年齢は30歳であった。血液検査では、リンパ球減少や、IgG2 や IgG4 低下が認められた症例もあった。*STAT1* の gain of function 変異では、CMCD以外に多彩な臨床像を呈していることが明らかになった。

疫学調査・QOL調査については、今後とも調査を継続し、合併症予防に重点をおいた解析を行う。

2. 迅速診断法の開発と遺伝子解析

これまでの迅速診断法に加えて、平成23年度以降、以下の迅速診断法を開発した。

- ① p47phox 欠損型 CGD (フローサイトメトリー法)
- ② p67phox 欠損型 CGD (フローサイトメトリー法)
(参考資料2)
- ③ 家族性血球貪食性リンパ組織球症
(Perform/Munc13-4/Syntaxin11/Munc18-2 の蛋白発現解析、NK細胞の脱顆粒能)
- ④ 高IgE症候群 Tyk2 欠損型 (phospho-flow 法)
- ⑤ *STAT1* の機能獲得型変異による慢性皮膚粘膜カンジダ症 (phospho-flow 法)
- ⑥ *IKBA* 遺伝子異常による外胚葉形成不全免疫不全症候群 (LPS 刺激後の単球内 TNF- α 産生能)
- ⑦ ADA 欠損による重症複合免疫不全症 (タンデムマス)

重症複合免疫不全症については、ろ紙血からの TREC 測定でスクリーニングが可能であることを実証した。このうち、ADA 欠損症については、TREC 検査で異常を認めない例があることが知られており、同様にろ紙血を用いたタンデムマスによる方法を新たに開発した(参考資料3)。方法は、ろ紙血から抽出した検体にアデノシンを加え、産生されるイノシン量をタンデムマスで測定し、その変換率(ADA 活性)を測定するものである。現在、この方法の実際の導入を成育医療センター内で検討している。

遺伝子解析による原発性免疫不全症の診断は、これまで通り、理研・かずさDNA研究所・JMFセンターが行い、2011年からの3年間に約800検体の遺伝子検査を行った(参考資料4)。次世代シーケンサーを取り入れ、多数の責任遺伝子が同定されている疾患については、解析のパネル化を進め、また、*NLR3* 遺伝子については遺伝子変異モザイクも同定可能なシステムを構築した(参考資料5)。フローサイトメーターによる免疫担当細胞の表面マーカー解析は、診断に極めて有効であり、今回、この解析を効率よく解析するため、10カラーによる解析法

を確立した。血液 1ml で、蛍光色素を組み合わせ、効率よく解析可能となった。

3. 責任遺伝子、発症機構、病態の解明

① iPS 細胞からの血球分化系の構築と、これを用いた先天性免疫不全症の病態解析

患者由来 iPS 細胞を作成し、より安定した分化系を樹立するため、フィーダーフリー、無血清の二次元培養法で細胞を培養し、血球系細胞へ分化させた。その結果、ヒト iPS 細胞から血球の発生過程を模倣する形で中胚葉分化、血液、血管内皮共通の母細胞であるヘマンジオブラストを経て、各種血液細胞が産生される系を構築することができた(参考資料 6)。PET 線維で補強したコラーゲンスポンジを基材として用いることにより、従来の血球系より長期間の培養が可能になり、またニッシュ細胞を 3 次元構築することが可能になった。この系で単球系細胞や顆粒球系細胞の大量培養が可能になると期待される。これらの方法を用いて、2 名の Chediak-東症候群患者由来の線維芽細胞からエピソーマルベクターを用いて iPS 細胞を樹立した。好中球・単球分化を行い細胞内の巨大顆粒を確認した。神経分化を行い巨大顆粒の検出を試みている。機能解析もを行い、最適な創薬スクリーニング系を確立することを目標としている。AK2 変異を持つ細網異形成症患者 2 例より iPS 細胞を樹立して解析を行ったところ、好中球の成熟障害と T 細胞分化不全を認め、血球分化不全の再現に成功した。また、iPS 細胞を用いた解析で、疾患に関連した特徴的なエネルギー代謝経路が明らかになり、ピルビン酸から TCA サイクルへの特徴的な流入パターンが認められ、AK2 欠損細胞では還元方向への流入が増加していた。Wiskott-Aldrich 症候群や機能獲得型 *STAT1* 異常による CMCD、RAS 関連自己免疫性リンパ増殖症候群などで疾患特異的 iPS 細胞を作成し、血球分化系、遺伝子治療法検討モデル、および *STAT1* 阻害薬や *RAS* 阻害薬開発の screening 系として研究中である。

② エキソーム解析等による原発性免疫不全症の原因探索(参考資料 7、8)

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* 遺伝子の複合ヘテロ変異を同定し、*FANCF* 変異により原発性免疫不全症候群である B 細胞欠損症を呈することを明らかにした。また、分類不能型免疫不全症(CVID)のエキソーム解析では、*BTK* 遺伝子変異、*STAT1* 遺伝子変異、Fanconi 貧血の責任遺伝子として知られる *FANCA* 遺伝子に変異を認め、既報告疾患の非典型例と考えられ、機能解析を行っている。

NKT 細胞欠損と高 IgM 血症・抗体産生不全を特徴とする常染色体優性遺伝形式の新規原発性免疫不全症候群 1 家系を解析し、exome 解析から原因遺伝子を同定した。現在、機能解析により病態を検索中である。また、樹状細胞欠損症では、exome 解析により *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 細胞機能の低下が疑われた。Thymic naive T 細胞/TREC の低下、IL-4、IL-17 産生低下など T 細胞機能が低下していることを確認した。さらに T 細胞を活性化すると *GATA2* が発現する事を見出し、*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。

分類不能型低ガンマグロブリン血症(CVID)の原因は多くは不明である。エキソーム解析等を用いた解析により、本邦 1 例目の *LRBA* 遺伝子異常症、および、10 例の *PIK3CD* 遺伝子異常症を同定した。

TREC、KREC がともに低下している IgA 単独欠損症を見出し、候補遺伝子クローニングにより重症複合型免疫不全症の原因遺伝子として知られている *RAG* 遺伝子変異が原因であることを確定した。患児の持つ変異 *RAG* 分子の活性を in vitro で測定したところ著明に低下していた。これまで *RAG* 遺伝子変異による IgA 単独欠損症の報告はなく、*RAG* 異常が IgA 単独欠損症を起こすことを明らかにした。

原因が不明であった Hoyeraal-Hreidarsson 症候群患者においてエキソーム解析を行ったところ *RTEL1* 遺伝子の複合ヘテロ遺伝子変異を同定した。*RTEL1* 遺伝子はテロメアの維持・複製、および DNA 二本鎖切断修復に関与しており、本症候群の病態が明らかになった。

Aprataxin 変異は眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早期発症型失調症を起こす。本疾患 8 例を検討し、CD4 陽性 T 細胞の減少、CD45RO 陽性細胞への偏倚などの免疫異常を見出した。*Aprataxin* は DNA の一重鎖損傷修復に関わるとされるが、二重鎖切断修復にも関与するとされ、T 細胞の発生異常に関わる可能性があることを示した。

これまでに報告のない臨床像を呈した先天性肺胞蛋白症の原因遺伝子を全エクソン解析によって探索し、原因と思える遺伝子における変異を 1 家系 3 症例にて検出した。ほぼ同じ臨床像をもつ別家系での検索でも同じ遺伝子の変異を検出し、現在その遺伝子変異の病態への関わりを解析中である。

特異顔貌と免疫不全(低γグロブリン血症、高 IgM 血症、EBV の持続感染とリンパ腫、NKT 細胞の欠損)を示す親子(母と娘 2 人)の原因遺伝子を全エクソン解析で探索し、病因と思われる遺伝子の変異を検出した。現在、その遺伝子と病態の関連を解析中である。

原因不明の重症複合免疫不全症患者について原因を解明するため本人および両親の全エクソーム解析を行ったところ、*IL2RG* 遺伝子の *de novo* ミスセンス変異が同定された(参考資料 9)。CD132 抗原の発現は正常であったが、PHA/IL-2 刺激 T 細胞の STAT5 リン酸化の低下を認めた。リンパ球サブセットごとの解析では、CD8 陽性 T 細胞の一部に正常アレルを有する細胞集団の存在が確認された。異性間染色体 FISH 法ではすべての T 細胞は男性核型を示しており、*maternal T cell engraftment* の可能性は否定され、本人の *reversion mosaicism* あるいは *somatic mosaicism* の存在が考えられた。

生後 4 ヶ月時に *pneumocystis* 肺炎、低γグロブリン血症などの SCID 様の複合免疫不全症例の原因を検索し、他の臨床像から先天性葉酸吸収不全症を疑い、その原因遺伝子 *SLC46A1* のユニークな新規変異を同定した(参考資料 10)。患者母由来の *SCL46A1* 遺伝子にはミスセンス変異(G189V)を認め、また父由来の *deep intronic mutation* (c.1166-285T>G)を認め、機能解析でも変異遺伝子によって蛋白発現が低下することを明らかにした。

③ 慢性皮膚粘膜カンジダ症の責任遺伝子の解明、*STAT1* 異常症の解析

慢性皮膚粘膜カンジダ症は、古くから知られている原発性免疫不全症の代表的疾患であり、その原因は不明であった。エキソーム解析により慢性皮膚粘膜カンジダ症の責任遺伝子が *STAT1* 遺伝子であることを明らかにした。慢性皮膚粘膜カンジダ症では、遺伝子変異により異常な蛋白の機能亢進が生じており、その結果 Th17 細胞の分化障害がおこるものと考えられる。さらに、これまで報告のない *STAT1* DNA-binding domain (DBD) にヘテロの新奇ミスセンス変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMC) 患者を明らかにした。CCD 変異例と同様に、脱リン酸化障害による機能獲得と、Th17 分化障害を有していた。*STAT1* DBD の G384 を含むポケット領域と CCD が結合し構造変化することが *STAT1* の脱リン酸化に重要であることが示唆されており、T385 もこの構造変化に重要であることが示唆された。

STAT1 遺伝子異常による MSMD についても今回解析を行った。優性遺伝型 MSMD 患者(2 家系 5 症例)において、新規 *STAT1* 遺伝子ヘテロ接合性変異 2102 A>G (Y701C)、2018 A>G (K673R) を同定し、機能解析を行った。SH2 ドメインに変異を認める K673R では、リン酸化能・核移行能の低下があり、TS ドメインに変異を認める Y701C は、Y701 リン酸化部位の変異であり完全にリン酸化が障害されていた。どちらの変異も共導入実験で IFN-α 刺激に対する ISRE 転写活性はほぼ正常であるものの、IFN-γ 刺激に伴う GAS 転写活性の優性阻害効果を

認めており、細胞内寄生菌への易感染性が示唆された。

④ TIR ドメインを有する TRAM の新規機能の解明

自然免疫に重要な役割を果たす MyD88 の機能を解析する過程で TRAM (TICAM2) の新たな機能を見いだした。In vitro の機能解析により TRAM は MyD88 を細胞膜へと誘導する sorting adaptor であることが判明した。また、IL-18 によるヘルパー I 型 T 細胞からの INF- γ 産生誘導に TRAM が強く関与していることが明らかとなった。TRAM 欠損では、自然免疫機能の低下だけでなく IL-18 の機能減損に起因した T 細胞や NK 細胞活性の低下によって、Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD) 様の症状がみられる可能性があると考えられる。

⑤ 高 IgE 症候群における骨異常症の発症機構の解析及び責任遺伝子 *STAT3* 変異体の解析

高 IgE 症候群の骨異常の発症機構を検討する目的で、*STAT3*-DN を全身に発現する高 IgE 症候群のモデルマウスを作製し、①骨芽細胞の機能低下による骨の機械的強度の低下と②骨芽細胞上の RANKL (receptor activator of NF- κ B Ligand) の発現低下と破骨細胞の分化障害を明らかにしてきた。責任遺伝子 *STAT3* 異常で生じる *STAT3* 変異蛋白の機能についてさらに解析し、各々の *STAT3* 変異体について、Y705 リン酸化、gp130 結合能、二量体化、局在、DNA 結合能ならびに transcription の検討を wild-type と比較した。多くの *STAT3* 変異体は、刺激後の局在に差異はみられたものの、gp130 との結合、リン酸化、二量体化には必ずしも影響を及ぼさなかった。しかしながら、DNA 結合能や transcriptional 活性が wild-type に比べ低下していた。IL-6/IL-10 などシグナル伝達系において、*STAT3* が関与するさまざまな過程で *STAT3* 変異は影響を与え、高 IgE 症候群の病態に関与していると考えられた。

また、このモデルマウスを用いて各種の皮膚炎を誘導した。ハプテン反復投与による Th2 細胞依存性

の皮膚炎の検討を行ったところ、感作 6 日後よりハプテンの耳への塗布を隔日で継続すると、感作 14 日後より、*Stat3*-DN マウスにおいて野生型マウスと比較して、皮膚の肥厚の増強、CD4 陽性 T 細胞と好酸球の皮膚炎局所への浸潤、Th2 サイトカイン・ケモカインの皮膚炎局所での上昇、ハプテン特異的血清 IgE の上昇、表皮のバリアー機能の低下が認められた。現在、このマウスを各種の遺伝子改変マウスと交配し、高 IgE 症候群におけるアトピー性皮膚炎の発症に関与する細胞・因子の検討を行っている。

⑥ XLA 患者の感染症罹患時の好中球減少のメカニズムの解明

XLA 患者では感染症を契機にして好中球減少を示すことがあるが、その原因は今まで不明であった。BTK が好中球の活性化を調節する鍵となる分子であることが初めて明らかにした (参考資料 11)。BTK 欠損好中球は様々な刺激に対して、過剰な活性酸素 (ROS) を産生し、ROS によりアポトーシスに至る。BTK 欠損好中球に組換え BTK タンパクを導入することにより ROS 産生やアポトーシスは正常化した。好中球からの ROS 産生には NADPH oxidase 複合体の活性化が必要であるが、その最初の活性化段階には Mal (MyD88-adaptor like protein) の膜移行 \rightarrow PI(3)キナーゼの活性化が重要である。今回の検討で、BTK は通常は細胞質内で Mal (MyD88-adaptor like protein) と会合していて、その膜移行を阻止していることが明らかになった。BTK が欠損すると Mal は膜に移動し、PI(3)K と会合し、そのために NADPH oxidase 複合体が活性化準備状態になっていた。Btk に欠陥があるとまた様々なチロシンキナーゼが活性化し、これらもまた Mal の膜移行に関与していることが明らかになった。

⑦ CGD における炎症性腸疾患発症機序

CGD 患者の腸管内細菌叢を調べたところ、CGD 関連腸炎の発症に伴い、*Bacteroides* および *Clostridium* IV、XIVa クラスターが優位に低下することを明らかにした。この変化は CGD 関連腸炎が発症する初期からみられ、臨床症状の改善とともに上

昇した。この細菌クラスターは下部消化管における制御性 T 細胞の誘導に不可欠であるため、CGD 関連腸炎の病態との関連が示唆された。また、腸内細菌叢を調べることで、CGD 関連腸炎のスクリーニング検査として臨床応用できる可能性が示唆された。

⑧ WAS の病態解析

WAS 女児例を国内で初めて同定した。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。Genome DNA の解析では、heterozygous な *WASP* ナンセンス変異を認めた。X 染色体上にコードされている Human androgen receptor 遺伝子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。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。

これまで *WASP* の機能解析の局在は細胞膜と細胞質が中心であったが、近年 T 細胞核内で *WASP* の有無が Th1/Th2 分化関連遺伝子群の転写調節を制御する事が報告されている。骨髓球系細胞株を用いて、野生型及び X 連鎖好中球減少症関連恒常的活性化変異 *WASP* の局在と細胞核内での機能を解析した。恒常的活性化変異 *WASP* はチロシンリン酸化が亢進し、より細胞核内へ局在した。ChIP 法にて *WASP* は DNA と共沈し、免疫沈降法にて p54nrb、RNA polymerase II と複合体を形成した。また microarray 法により *WASP* 活性化変異による骨髓球系細胞分化関連分子群の発現の差異が観察され、ChIP on chip 法にてこれら遺伝子群転写調節領域への *WASP* 結合親和性が異なることが示唆された。以上より、*WASP* は骨髓球系の細胞核内において遺伝子転写調節因子として機能することが示された。

T 細胞受容体シグナル伝達系における *WASP* 蛋白分解機構とその機能的意義を明らかにする目的で、ヒト T 細胞、293T 細胞、*WASP* 欠損および Cbl-b 欠損マウスの脾臓 T 細胞を用いて解析を行った。その結果、*WASP* 蛋白は TCR 刺激後、経時的に Ca 依存性蛋白分解酵素であるカルパインによる断片化と、

Cbl ファミリー (Cbl-b、c-Cbl) ユビキチンリガーゼと共沈してユビキチン化を受け、その後 26S プロテアソームによる分解を受けることが明らかとなった。また、野生型 T 細胞におけるカルパイン特異的阻害剤の添加と、Cbl-b 欠損マウス T 細胞においてアクチン重合化が有意に増加した。しかしながら、*WASP* 欠損マウス T 細胞においてはカルパイン阻害の効果は認めなかった。このことから、T 細胞における *WASP* 蛋白分解機構は、*WASP* が活性化された後に、カルパインによる断片化と Cbl ファミリーによるユビキチン化によって蛋白分解を受け、TCR シグナル伝達系においてアクチン重合化を機能的に負に制御していることが明らかとなった (参考資料 12)。

⑨ B 細胞、NK 細胞、樹状細胞欠損 を伴う新規原発性免疫不全症である *GATA2* 異常症の国内症例の同定と病態解析

先天性免疫不全症候群において、様々な造血障害が合併することが知られている。平成 21 年 2 月に開始された小児血液学会 AA/MDS 中央診断登録 500 例のうち、4 例で B(-)NK(-)の phenotype を有する免疫不全が合併した造血障害症例が登録された。うち 2 例で *GATA2* 遺伝子変異が認められた。

次に、PIDJ を介して紹介された患者 118 例のうち 4 例で Myeloid DC (mDC)、Plasmacytoid DC (pDC) がともに欠損している患者を見出した。2 例で Exome 解析を行い、*GATA2* 遺伝子異常が認められた。さらに国内 6 例の *GATA2* 異常症を同定した。TREC、T 細胞分画、サイトカイン産生を解析した結果、T 細胞機能の異常があることを初めて明らかにした。

同様の病態を呈した *IKZF1* 遺伝子異常による疾患患者を同定し、*NOTCH1* の somatic 変異を獲得した結果、T-ALL を発症したことを世界で初めて明らかにした。

⑩ C3 欠損症における遺伝子変異と臨床像の関連の検討

C3 欠損症は常染色体劣性遺伝形式をとる非常に稀な疾患である。本症は易感染性と免疫複合体病の

両者の病態が認められるとされているが、症状は一樣ではなく、その遺伝子型と表現型の関係も明らかではなかった。今回、3家系を含めた報告例27家系におけるC3欠損症の臨床像と遺伝子変異を解析した。その結果、臨床像は大きく1)重症感染症、2)SLEまたはSLE様症状、3)腎症状に分類された。また両アリの遺伝子変異が同定されている11家系の検討により、β鎖上およびα鎖のTEDドメインよりもN末端側に変異を有する症例は全て易感染性を主症状としているのに対し、α鎖上のTEDドメインないしそれよりもC末端側に変異を有する症例はSLE、SLE様症状ないし腎炎を主症状とすることが明らかとなり、遺伝子型と表現型に相関があることが示された。変異の種類はすべてナンセンス変異あるいはフレームシフト変異を来すものであることより、TEDドメインよりN末側の変異では蛋白発現の欠損につながるが、TEDドメインないしそれよりC末側の変異では変異C3蛋白は産生され、感染防御機能は残存しているものの自己免疫疾患の発症のリスクとなる可能性が示唆された(参考資料1)。

⑩ FHL 2型のCD8+T細胞におけるCD5発現の低下

家族性血球貪食性リンパ組織球症2型(FHL2)は、perforinの異常に起因する。細胞傷害活性の低下によりウイルス感染細胞等の除去が制限され、リンパ球やマクロファージの異常活性化と高サイトカイン血症が引き起こされる。今回、FHL2の4症例において、高サイトカイン血症が存在する急性期に、CD5発現が低下した異常な活性化CD8+T細胞が共通して存在することを見出した。同細胞の比率は、炎症の程度と相関し、生存例では治療とともに減少した。最近我々は、同様の細胞集団がEBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症において特徴的に認められ、それらがEBV感染CD8+T細胞であることを報告している。以上より、活性化CD8+T細胞のCD5発現低下は、血球貪食性リンパ組織球症でみられる制御不能な異常活性化と関連している可能性があると考えられた。

⑪ XLPの病態解析、および低ガンマグロブリン血症を呈する病態の検討

X連鎖リンパ増殖症候群(XLP)患者の遺伝子解析結果を基に、今回XIAP遺伝子のGlu349del変異を有する患者が低ガンマグロブリン血症を呈することを明らかにした。4例中3例にメモリーB細胞の減少を認め、CpG+CD40L刺激による免疫グロブリン産生能の低下を認めた。Glu349delを有する患者は他の変異を有するXIAP欠損症とは臨床的にも免疫学的にも異なると考えられ、Glu349delは日本人固有のX連鎖異常ガンマグロブリン血症の原因である可能性が示唆された。

この疾患は通常男性にしか発症しないが、X染色体不活化異常によって、女性にも発症することを初めて明らかにした。

XIAP欠損症の血清サイトカインを解析したところ、XIAP欠損症では、HLH急性期のIL-18値が、SAP欠損症、家族性HLH、EBウイルス関連HLHに比べ極めて高値を示した。治療によりIL-6などの他の炎症性サイトカインが沈静化したあとも、IL-18の高値は持続した。しかし、患児の末梢血単核球をLPSとATPにて刺激した際のIL-18産生は、正常対照と同程度であった。したがって、その機序は不明であるが、XIAP欠損症では持続性の血清IL-18高値とHLH罹患時におけるさらなる上昇が特徴であると考えられた。またIL-18の持続高値が反復性のHLHと関連している可能性が示唆された。

⑫ IL-10受容体異常症の同定

新生児期より肛門病変を呈し、乳児期発症の炎症性腸疾患とアレルギー症状を呈したIL-10受容体異常症を明らかにした。患児のIL-10受容体A遺伝子(IL10RA)にコンパウンドヘテロ変異を認め、各々父母由来であるミスセンス変異とナンセンス変異を認めた。

⑬ IL-1β活性化におけるNLRP3およびdipeptidyl peptidase 1(Cathepsin C)の役割

In vitroにおいては活性化IL-1βの分泌にはインフラマソームとcaspase1の活性化が必要不可欠で

ある。しかし、*in vivo* においては IL-1 β 依存性炎症の惹起に caspase1 の活性化は必ずしも必要ではないことが明らかになってきた。*in vitro* においては caspase-1 以外にも好中球セリンプロテアーゼが IL-1 β を切断し活性化を行う酵素活性を持っていることが知られていた。今回我々は、これら好中球セリンプロテアーゼの活性化を司る cathepsin C が *in vivo* において caspase-1 非依存性経路において重要な役割を果たしていることを発見した。

ASC を安定的に発現した HEK-293T 細胞に NLRP3 を transfect すると、用量依存的に ASC の細胞一極集中 (Speckle 形成) すなわちインフラマソーム形成が認められた。このシステムを用いてインフラマソーム形成制御の分子機構を詳細に明らかにし、病態解明、治療薬開発研究を行うことが可能である (参考資料 13、14)。

⑮ 免疫不全症における血清サイトカイン

免疫異常症患者では不明熱で発症する場合が多い。種々の疾患患者の 27 サイトカインパターンについて比較検討した。健康成人のサイトカインは平均値の 3 倍以内に分布した。心因性発熱患者では 26 種類のサイトカインがほぼ健常者平均の 5 倍~10 倍を示した。菊池病、悪性高熱症候群と若年性関節炎患者では他のサイトカインは健常者平均の 5 倍の範囲に収まったのに対し、各々 IP-10、IL-6、IL-6 と IL-18 が健常者平均の 50 倍~500 倍と非常に特徴的なサイトカインパターンを示した。一方、地中海熱や慢性肉芽腫症患者では、特徴的なサイトカインパターンは得られなかったが、サイトカインバランス (IL-6/IL-10 など) の異常が認められた。27 サイトカインパターンを見ると、不明熱患者の病態にかなり特異的なパターンを示す疾患があり、病態を考える上でも重要であると考えられた (参考資料 15)。

4. 治療ガイドラインの作成、臨床治療研究

既に作成していた、X-SCID、JAK3 欠損症、WAS、CGD、に対する造血幹細胞移植法を中心としたガイドラインの成績調査を継続し、新たに、高 IgM 症候

群の治療ガイドライン、原発性免疫不全症に合併する BCG 感染症の治療ガイドラインについて、各専門グループを中心に作成し、公開した。

SCID に対する造血幹細胞移植における前処置は、既報告より強度を弱めた前処置 (Flu 125 mg/m² + Melphalan 80 mg/m²) によって、5 例中 4 例で、3 年以上合併症なく生存し、IVIg も不要になったことが明らかになった。

造血細胞移植学会遺伝性疾患 WG と連動して、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した。特に当該施設では Flu/L-PAM による骨髄非破壊的前処置から Flu/BU (8 mg/kg) による前処置に移行し、データを蓄積しつつある。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 (参考資料 16)。

X 連鎖高 IgM 症候群 (XHIM) は CD40 ligand 変異による免疫不全症であり、T 細胞機能低下を合併することから造血幹細胞移植の適応であると考えられている。今回 56 例の XHIM の臨床データを集積し、その中で造血幹細胞移植を施行しえた 29 例を解析した。非移植群 (27 例) と比較して、移植群 (29 例) の生存率は有意に良好であった ($p=0.0231$)。29 例のうち移植後死亡は 4 例で、移植後 5 年の全生存率は 85.6%であった。5 歳以下での移植後生存率は 100%で、6 歳以上では 71.8%であった。5 歳以下で移植した場合 event free survival が 78.6%であるが、6 歳以上で移植した場合は 40%と低値であった。以上から、XHIM では 5 歳以下での早期の造血幹細胞移植が予後を改善するために望ましいと考えられた。

他の疾患についても、これまでの造血幹細胞移植成績を評価し、最適な造血幹細胞移植法や遺伝子治療について ESID など海外の情報を継続して収集した。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。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。

造血幹細胞移植後の高度免疫不全状態で発症する接合菌症は極めて予後不良である。これまで早期診断が困難であったが、これまでの接合菌特異的 PCR 法を改良し、きわめて鋭敏に検出・定量する方法を開発した。

原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植法は、近年成績が向上していることが海外からも報告されている。国内でも、2000 年以前と以降を分けて解析した結果、移植法の進歩とともに、同種造血幹細胞移植後の生存率は明らかに向上していることを確認した。

5. 新規治療法の改良・開発

安全性の高いベクターを用いた遺伝子治療研究を推進した。Helper-dependent adenovirus/adenovirus-associated virus hybrid vector を用いた方法で、異常のある遺伝子部位のみを遺伝子修復することが可能であることを示した（参考資料 17）。

蛋白導入による慢性肉芽腫症治療法の開発研究も推進した（参考資料 18）。

6. 生体試料収集

原発性免疫不全症候群の病因・病態の解明、新しい治療法の開発に向けた研究のため、患者の生体試料収集を行っており、理化学研究所への検体保存を継続している。

7. 患者家族や医療者への継続的情報提供、意見交換

原発性免疫不全症候群患者の患者家族会である PIDJ つばさの会と連携して、相談会や勉強会を開催し、ホームページでは種々の情報提供を行っている。平成 24 年 4 月に患者家族会と共同で World PI Week

（国際免疫不全症週間）に参加した。患者や家族向けに原発性免疫不全症を解説し、日常生活での注意点などを説明した「患者・家族のための原発性免疫不全症候群疾患概説書」を作成し、患者家族、医療機関に配布し、ホームページに掲載した。

D. 考察

原発性免疫不全症は、新たな疾患の解明、病態解明が急速に進歩している。多数の疾患からなる症候群であり、個々の病態の解明、診断・治療法の開発、合併症を回避するための指針作成など、今後とも研究を継続する必要がある。SCID のマスキングは海外では既に実施されており、我が国においても早急に実施されるべきであろう。

本研究の主な柱である、疫学調査研究、患者登録の継続および生体資料の収集保存、迅速診断法の開発と遺伝子解析、責任遺伝子・発症機構・病態の解明、治療ガイドラインの作成、新規治療法の改良・開発、患者家族や医療者への継続的情報提供、意見交換等については、当初の目標を達成したと考えている。

E. 結論

原発性免疫不全症候群患者の状態を把握し、より適切な治療を受け QOL を改善させるための今年度の目標を達成し、今後、さらなる情報発信、より良い診断・治療法の開発へ向けて貢献をしていく。

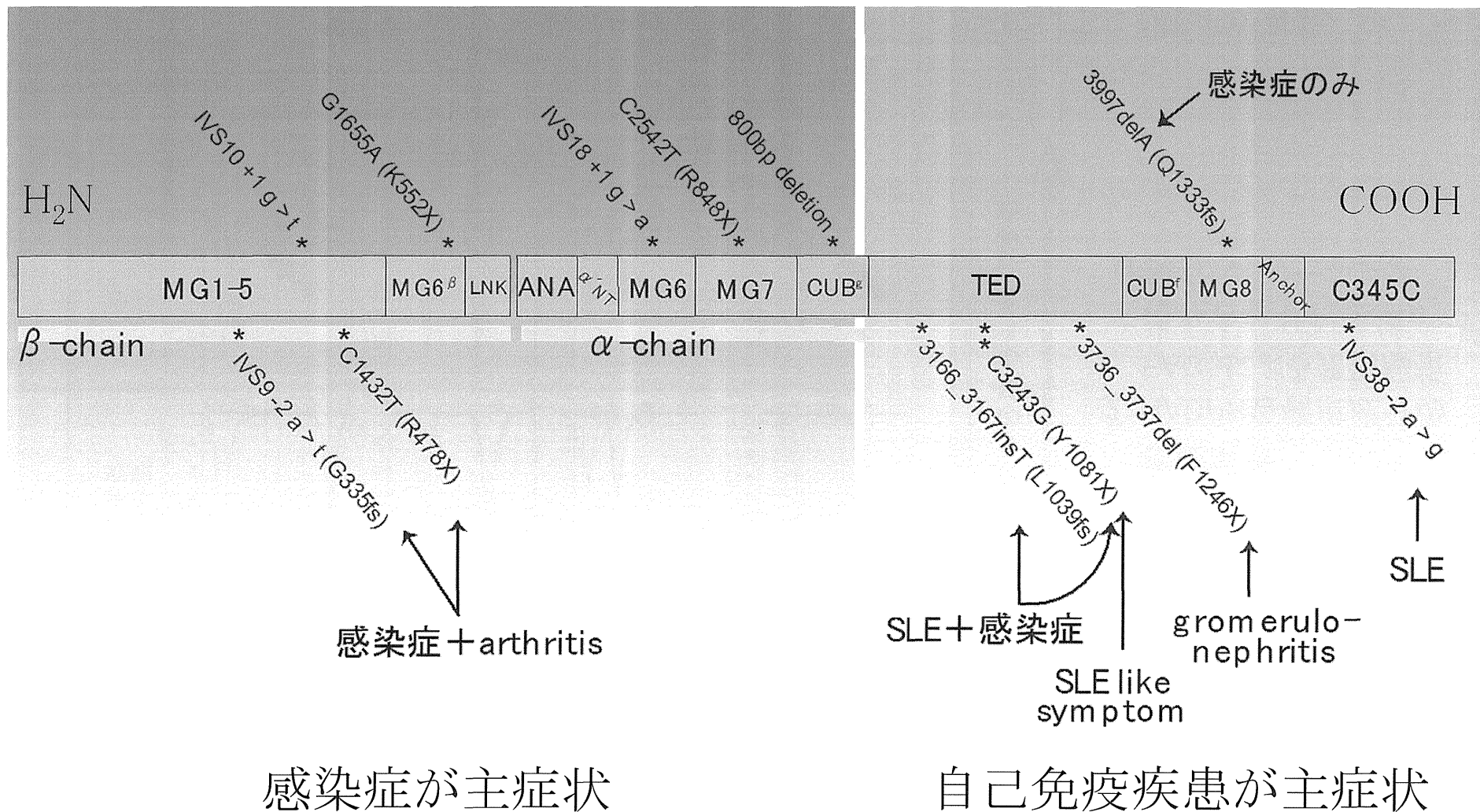
F. 研究発表

別紙に記載

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

C3欠損症： 遺伝子型と臨床像の相関

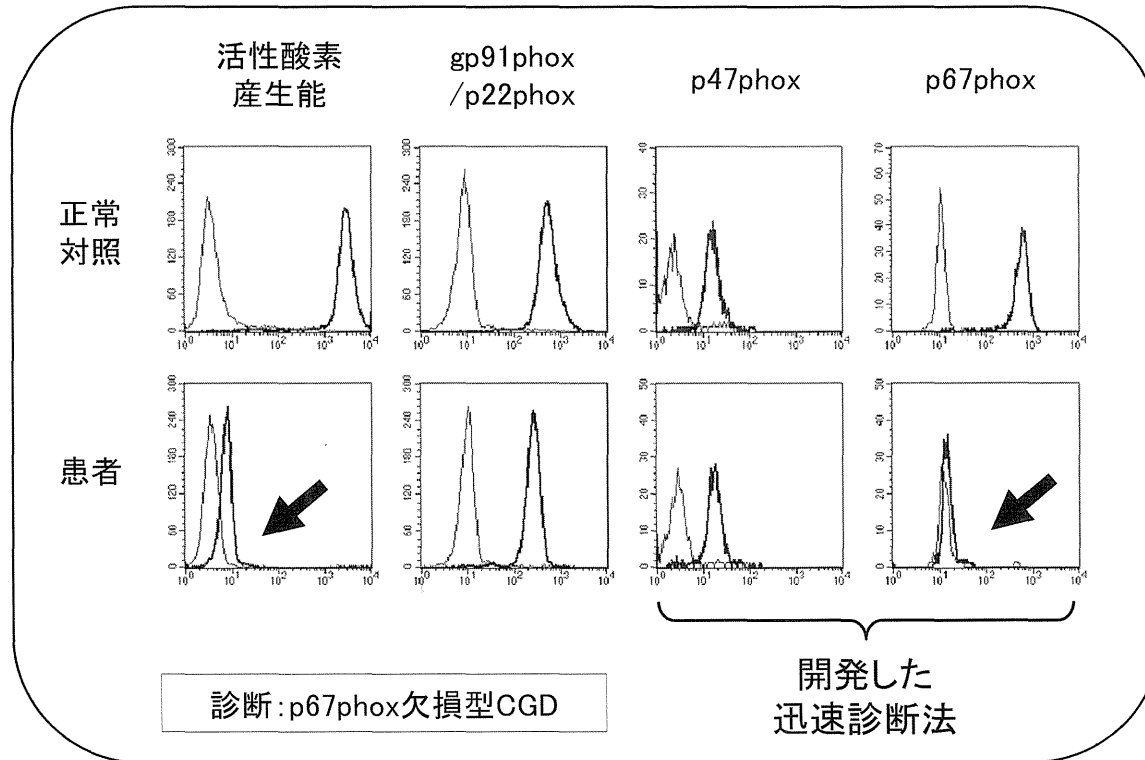


感染症が主症状

自己免疫疾患が主症状

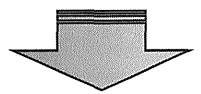
慢性肉芽腫症 (CGD) の迅速診断法の確立

CGDスクリーニングパネル



採血したその日のうちに診断

- ① 活性酸素産生能による機能解析
- ② NADPH各構成成分のFACSによる発現解析を組み合わせた迅速かつ確実なスクリーニング

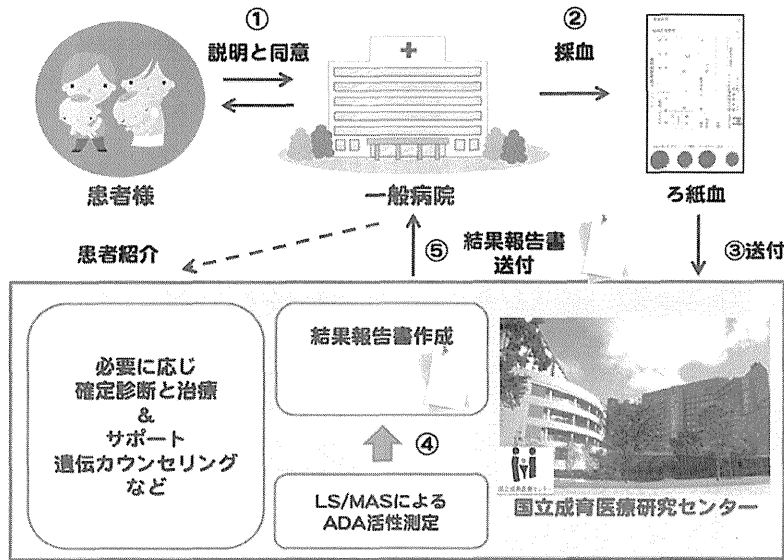


- 候補遺伝子の絞り込み
- 時間・労力・コストの削減

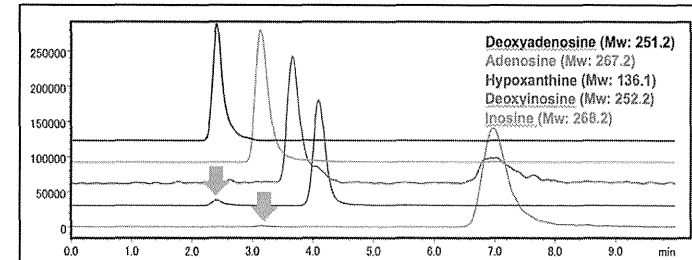
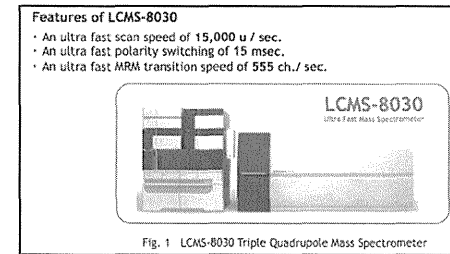
遺伝子解析による
確定診断

- さらに以下にも応用が可能
- ✓ 遺伝子型と表現型の関連の解析
 - ✓ 造血幹細胞移植後のキメラズム解析
 - ✓ 遺伝子治療後の発現解析

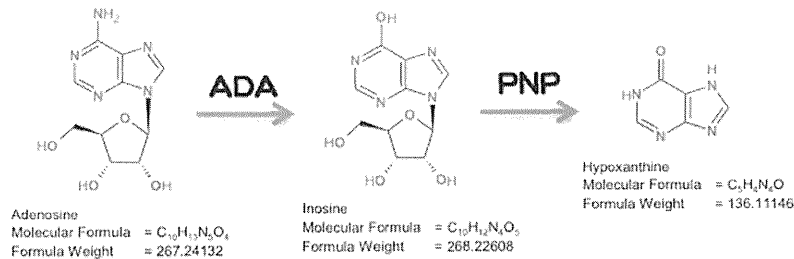
1. マス・スクリーニングの概要



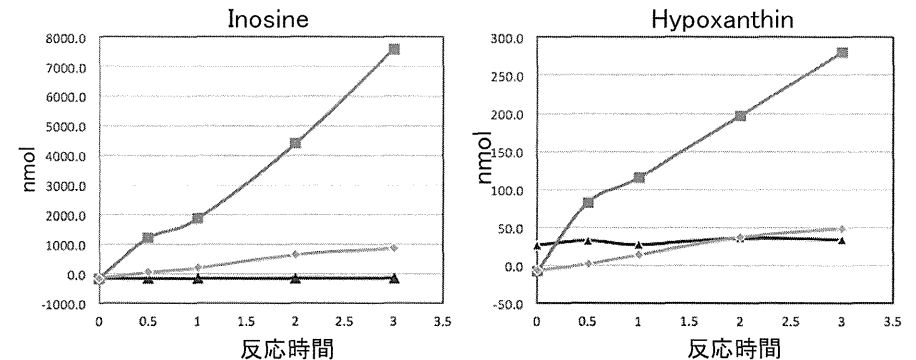
2. LC/MASと標品を用いた系の確からしさ



3. ADAの核酸代謝反応



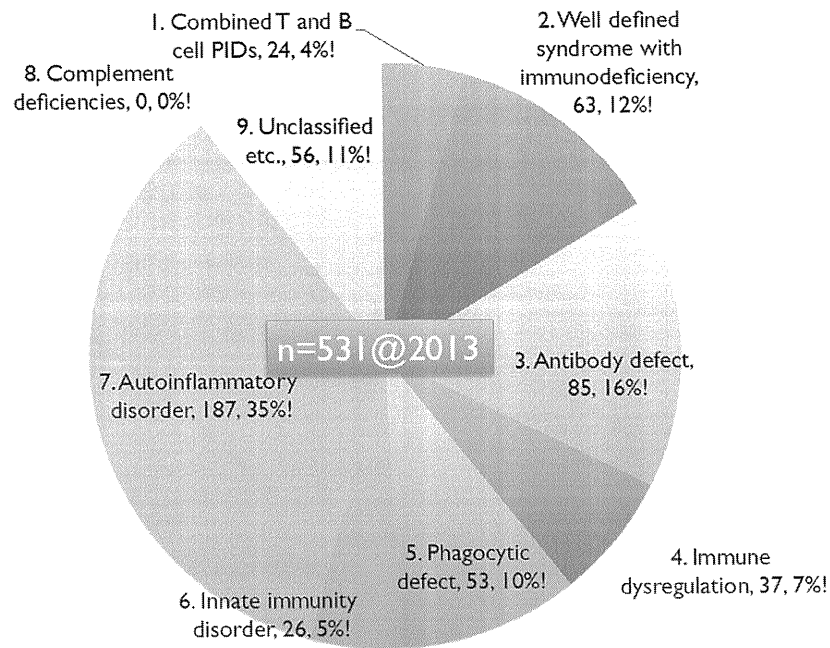
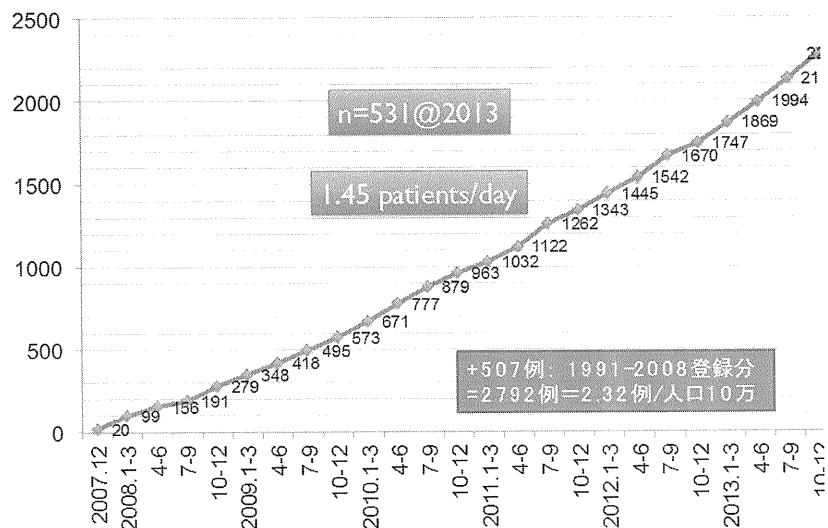
4. 患者検体を用いた解析



- 同意の下、3mm大のろ紙血よりADA活性を測定。結果報告書を送付し、陽性の場合は確定診断を行う
- LCMS-8030と標品を用いた信頼度検定。LS/MASによる核酸代謝産物の分離が可能
- AdenosineはADAによりInosineに、InosineはPNPによりHypoxanthinに変換される
- 健常人(赤)ではInosine/Hypoxanthinの増加を認めるが、患者(黒、茶)ではその増加を認めない



Primary Immunodeficiency Database in Japan



IUIS分類2013

- 2013年に531例の原発性免疫不全症患者の紹介があり、総数で2847例の登録が得られた。
- 1日1.5例の新規患者が日本国内で発生していることになる。
- 内訳では、自己炎症疾患が最多であり、抗体産生不全症、免疫不全症を呈する症候群が続いていた。
- 遺伝子診断に至った例は20%前後であり、引き続き、原因遺伝子の同定、他の診断法の開発が必要である。