

既知疾患候補遺伝子の構造解析を進め、そのデータ蓄積を推進する。その作業が適切に行えるように、標準手順書を作成し、それに従ったデータ蓄積を進めた。

(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審査を受け、承認を得た。なお、本分担研究で実際に扱う情報はすべて匿名化されているかずさ DNA 研究所では連結不可能な情報ではあるが、その取扱いにおいては関係者のみがアクセスできるようにセキュリティー管理を施した情報システム内で運用した。

C. 研究結果

既存の原発性免疫不全症臨床アーカイブの PIDJ に検査項目の追加、患者情報の一括更新、情報登録時の担当医師への通知機能、感染歴・検査歴の更新などの機能強化をデザインし、理化学研究所の PIDJ 運用チームとともにそれらの改修し、実際の運用を開始した。更に、遺伝子解析を担っているかずさDNA研究所側の遺伝子解析結果データベースで、PIDJ での ID 番号とリンクした形で遺伝子検査結果テーブルを生成するシステムの実際の運用を継続し、更に担当施設がその結果を閲覧して確定診断に至ったかどうかの判定結果を付与するシステムを運用した。この間に、PIDJ に付随するデータベースのセキュリティー上の

脆弱性を解消するために、各ソフトウェアや OS のアップデートを行い、高いセキュリティーを維持した。今年度は、PIDJ への登録件数は年間で500件を突破し、登録数の堅実な増加が続いている。

本研究班の共同研究者からの依頼に基づいて既知遺伝子の変異解析を継続的にを行い、本研究班が取り扱う対象血液疾患の臨床像と原因遺伝子変異との間の関係性についての知見を集積した。特に、今年度は卓上型次世代シーケンサーによる疾患別のパネル診断も導入し、その結果閲覧も可能なようにデータダウンロードシステムを構築・運用した。

D. 考察

1) PIDJ の登録は、遺伝子検査と連結させることで症例登録を推進するシステムとなっている。そのため、一旦登録されて遺伝子検査が終わってしまうと、臨床情報のアップデートが滞ってしまう傾向が見られた。これらの問題も、臨床専門医、主治医の皆さんへの呼びかけで大きく改善できた。それによって、当初の目的であった造血幹細胞移植法評価の基礎となる臨床アーカイブ構築という当初の課題をほぼ達成した。

2) これまで、かずさ DNA 研究所で行われていた遺伝子解析の結果は、1 症例当たり1-5遺伝子に対するものであった。しかし、次世代シーケンサーによる確定検査システムの導入により、10遺伝子前後のパネル診断を導入できたことは、今後の原因遺伝子の同定効率の上昇につながるものと期待する。さらに、より

網羅性の大きなパネルの実現により、コストと効率の最適化を図っていくことが必要であろう。

E. 結論

- 1) 理化学研究所の PIDJ 運用チームと連携し、免疫不全症臨床アーカイブ PIDJ を改良、維持することにより、着実に原発性免疫不全症における造血幹細胞移植法評価を行うために基礎データの蓄積が達成できた。
- 2) 次世代シーケンシングによる網羅的な解析だけでなく、ターゲット分析によるパネル遺伝子解析の導入に対応する遺伝子解析結果閲覧システムを構築できたので、今後より高効率で遺伝的な原因を調べつつ最適な移植法を選択していく見通しがたった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 N [Epub ahead of print]
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) 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 Invest Allergol Clin Immunol*. 2013;23(1):65-7.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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-deleting recombination excision circles. *J*

Allergy Clin Immunol. 2013
May;131(5):1437-40.e5.

クス解析の将来展望」小原收 千葉
2013年6月

2. 学会発表

(海外)

1) 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. Mitsuiki, O. Ohara, H. Kanegane, T. Morio, K. Imai and S. Nonoyama, Milan, Italy, Aug, 2013.

2) 3rd Sardinian Summer School “Post-GWAS animal models” Ohara O. Pula, Italy, September, 2013.

(国内)

3) 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

4) 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

5) 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

6) The 5th LJI & IMS-RCAI Workshop “Post-GWAS genomic analyses: Mind and bridge the gaps” Ohara O Yokohama, October, 2013

7) 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

8) 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

9) 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

10) 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異常と同等しえた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

11) 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

12) 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

13) 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

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 □
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

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

原発性免疫不全症の造血幹細胞移植における骨髄由来 間葉系幹細胞(MSC)を用いた GVHD 治療法の開発

研究分担者 小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授
研究協力者 村松秀城 名古屋大学医学部附属病院小児科 助教

研究要旨

近年、骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)が強力な免疫抑制作用を有することが判明し、欧米では、ステロイド抵抗性 GVHD 患者に投与し、良好な成績が報告されている。今回、我々は、血縁者間同種骨髄移植後、ドナー由来のキメリズム低下に対し、ドナーリンパ球輸注療法を施行後、ステロイド抵抗性 GVHD を来たし、骨髄由来 MSC 輸注療法を施行した慢性肉芽腫症の1例を報告する。本症例を含め、ステロイド抵抗性の重症 GVHD (腸管 GVHD2 例、肝 GVHD1 例)に対する間葉系幹細胞輸注療法を3例に実施し、その安全性と有効性を確認した。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植後の重症 GVHD (Graft versus host disease)に対する標準治療はステロイド療法であるが、ステロイド不応性の症例に対する標準治療は確立されておらず、その生命予後は非常に不良である。また、重症 GVHD の発症を完全に予測することはできず、安全な同種移植を確立する上で重症 GVHD に対する有効な治療法確立は大きな問題である。近年、強力な免疫抑制機能を有する間葉系幹細胞(MSC; mesenchymal stem cell) 輸注療法の難治性 GVHD に対する有効性が報告されている。悪性疾患ではない原発性免疫不全症に対する同種造血幹細胞移植の安全性を向上させるために、間葉系幹細胞輸注療法の開発を行った。

B. 研究方法

慢性肉芽腫症 1 例を含む、ステロイドが無効であった重症 GVHD3 例(腸管

GVHD2 例・肝 GVHD1 例)に対して、院内のセルプロセッシングセンターで調製した骨髄由来間葉系幹細胞輸注を行った。

(倫理面への配慮)

名古屋大学医学部倫理委員会の承認のもと、患者および患者保護者の同意を取得して治療を行った。

C. 研究結果

1) MSC の調製:

ドナーの血液から血液成分分離装置を用いて濃厚血小板(PC)10 単位(約 200ml)を採取した。採取後、直ちに-80℃で凍結した。翌日、凍結した濃厚血小板を解凍して培養に用いる血小板融解産物(Platelet lysate)を調製した。続いて、移植ドナーから MSC 培養用の骨髄液 30ml を採取し、単核球を分離した。骨髄単核球を Platelet lysate を添加した培養液を用いて GMP 基準に準拠した名古屋大学医学部セルプロ

セッシングセンターにて3週間培養することにより、十分量の MSC を調製した(図 1、2)。

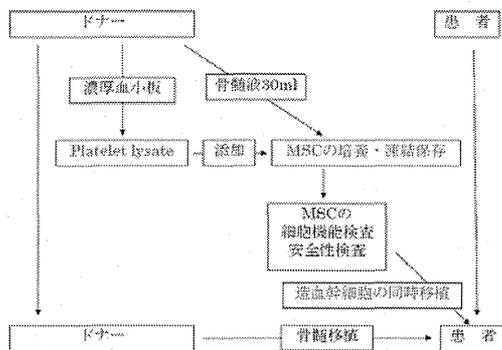


図 1. MSC 投与までの流れ

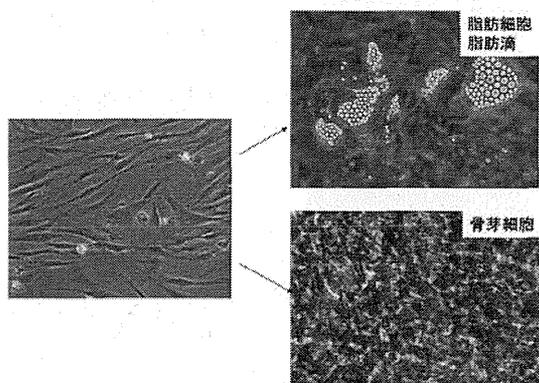


図 2. 培養 MSC の分化能の確認

2) 慢性肉芽腫症の 1 例

25 歳男性。乳児期に肺炎を反復したため A 大学病院にて慢性肉芽腫症と診断され、後日、CYBB 遺伝子変異 (p.His209Arg) が確認された。成長につれて重症感染症は減少したが、2001 年にアスペルギルス肺炎で長期入院、2012 年 12 月には多発肝膿瘍で入院治療を要した。今回 HLA 一致の姉からの造血幹細胞移植目的に当院紹介となった。移植後、混合キメラ状態となったため、ドナーリンパ球輸注を施行したところキメリズム

の回復とともに GVHD 症状が出現した。大量の下痢症状を伴い、メチルプレドニゾロンおよび抗 TNF α 抗体は無効であった。抗 CD25 抗体投与後下痢量の減少傾向を認め、骨髓由来間葉系幹細胞の輸注後さらに下痢量の改善を認めた(図 3)。

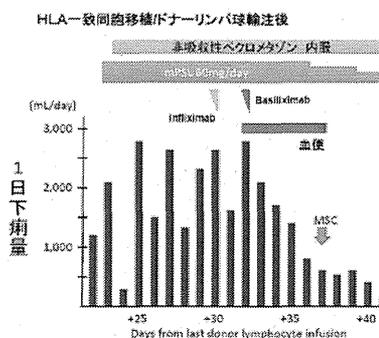


図 3. 慢性肉芽腫症症例の GVHD 経過

本症例に加えて 2 例のステロイド抵抗性の重症 GVHD (腸管 GVHD1 例、肝 GVHD1 例) に対する間葉系幹細胞輸注療法を実施した。全例で著効し、長期生存が得られている。

D. 考察

難治性 GVHD に対するヒト由来血小板融解産物を用いた骨髓由来 MSC 輸注療法は安全かつ有効である。悪性疾患ではない原発性免疫不全症に対する同種造血幹細胞移植の安全性を向上させるために、MSC 輸注療法は必須の治療法であると考えられる。

E. 結論

慢性肉芽腫症症例を含んだ、ステロイド抵抗性の重症 GVHD (腸管 GVHD2 例、肝 GVHD1 例) に対する間葉系幹細胞輸注療法

法を3例に実施し、その安全性と有効性を確認した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M, Yabe M. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood*. 2013 Oct 31;122(18):3206-3209.
- 2) Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet*. 2013 Mar 7;92(3):431-438.
- 3) Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Saunthararajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2013 Aug;45(8):942-946.
- 4) Nomura K, Hoshino A, Miyawaki T, Hama A, Kojima S, Kanegane H. Neutropenia and myeloid dysplasia in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 May;60(5):885-886.
- 5) Okuno Y, Murakoshi A, Negita M, Akane K, Kojima S, Suzuki H. CD8+ CD122+ regulatory T cells contain clonally expanded cells with identical CDR3 sequences of the T-cell receptor beta-chain. *Immunology*. 2013 Jul;139(3):309-317.
- 6) Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet*. 2013 Aug;45(8):937-941.
- 7) Takahashi Y, Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R, Ito E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe K, Ohga S, Kojima S, Japan Childhood Aplastic Anemia Study G. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. *Blood*. 2013 Jan 31;121(5):862-863.
- 8) Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet*. 2013 Nov;45(11):1293-1299.

- 9) 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*. 2013 May;60(5):836-841.

2. 学会発表

(海外)

- 1) Kojima S. Aplastic Anemia : Therapeutic updated in HSCT. 2013 International Forum on Bone Marrow Failure. Aug.16, 2013. Tianjin, China.
- 2) Kojima S. Clonal Evolution from Aplastic Anemia to Myelodysplastic Syndrome with Monosomy7. 7th International Congress on Shwachman-Diamond Syndrome. Nov. 3-6, 2013. Toronto, Canada.

(国内)

- 1) 小島勢二. 先天性血液疾患の病態研究に関する最近の進歩. 第116回日本小児科学会学術集会. 2013年4月19日. 広島.
- 2) 坂口 大俊、西尾 信博、川島 希、王 希楠、成田 敦、土居崎 小夜子、村松 秀城、濱 麻人、中西 康詞、高橋 義行、土田 昌宏、小林 良二、伊藤 悦朗、矢部 普正、大賀 正一、小原 明、長谷川 大輔、真部 淳、伊藤 雅文、小島 勢二. *Telomere length as a predictor for the immunosuppressive therapy in acquired aplastic anemia*. 第75回日本血液学会学術集会. 2013年10月12日. 札幌.
- 3) 王 希楠、村松 秀城、坂口 大俊、徐 銀燕、川島 希、成田 敦、土井崎 小夜子、Olfat Ismael、中西 康詞、濱 麻人、高橋 義行、小島 勢二. *GATA2 shows association with familial MDS, but not*

AA and JMML in Japanese children. 第75回日本血液学会学術集会. 2013年10月12日. 札幌.

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

重症複合免疫不全症に対する造血幹細胞移植

研究分担者 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

当科で、出生当日に診断し移植前処置なしで臍帯血移植を行った CD3 δ 欠損症の同胞 2 名に対して、移植後の免疫学的再構築の長期的経過を調べた。移植は大きな移植合併症もなく、T 細胞が増加も認められた。共通 γ 鎖欠損症の場合と異なり、CD3 δ 欠損症患者では、前処置なしでの造血幹細胞移植でも免疫グロブリン値は正常を保ち、抗体産生能も認められた。他方、長期的には、T 細胞数や PHA に対するリンパ球幼若化反応は正常よりもやや低値を推移し、TREC も低値であった。現在それぞれ 9 歳、5 歳で生存しており、QOL も良い。

A. 研究目的

重症複合免疫不全症は、乳児期に感染症でほとんどの患者が死亡する重症の原発性免疫不全症候群であり、造血幹細胞移植や遺伝子治療による免疫学的再構築を緊急に行う必要がある。しかし、患者が診断された時点で既に重症感染症を起こしている場合も多く、また病型によって最適な移植方法も異なると考えられ、病型や病像に応じた最適な移植方法が確立されていない。

CD3 δ 欠損症は、胸腺内での T 細胞分化が障害されるタイプの重症複合免疫不全症であり、重症複合免疫不全症の中で最も頻度が高い共通 γ 鎖欠損症と異なり、胸腺の大きさが保たれ、胸腺内には未熟な T 細胞が存在していることが特徴である。また B 細胞や NK 細胞自体には機能的には異常を認めない。これらの特徴から、CD3 δ 鎖欠損症に対する至適な造血幹細胞移植法は、共通 γ 鎖欠損症とは異なる可能性が高いと考えられる。今回我々は、

家族歴から出生当日に CD3 δ 欠損症と診断し、前処置なしで造血幹細胞移植を行った兄弟の、免疫学的再構築の長期的な経過を調べた。

B. 研究方法

造血幹細胞移植後、定期的に、末梢血リンパ球サブセット解析、リンパ球機能解析、ワクチン接種後の特異抗体産生能を行った。B 細胞の純化には、末梢血 MNC から B Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotech) を用いた。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析に関しては、九州大学ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理委審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

患者の臨床像、経過は以下の通りである。

患者1: 両親に血族結婚なし。姉が乳児期早期に重症複合免疫不全症と診断され、造血幹細胞移植を受けたが、サイトメガロウイルスによる肺炎、脳炎にて死亡した。その後の遺伝子解析から、CD3 δ 欠損症と診断された。

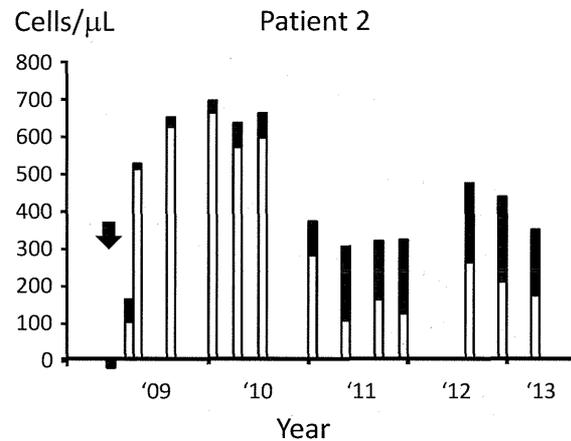
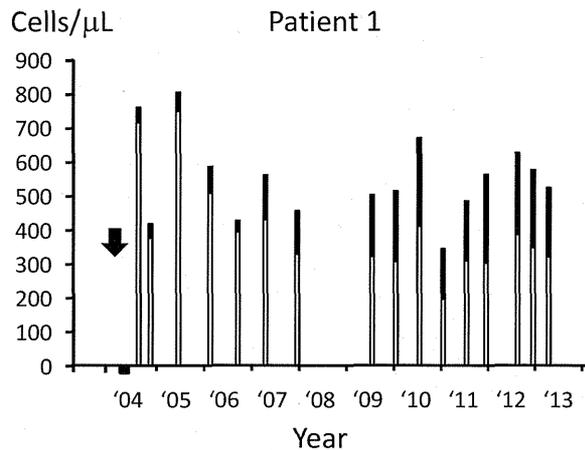
患児は0生日時に、末梢血 T 細胞が欠損していたため重症複合免疫不全症と診断され、遺伝子検査にて CD3 δ 欠損症であることが判明した。可能な限り無菌的に管理し、30 生日時に、HLA 一致非血縁者間臍帯血移植を行った。前処置は施行しなかった。

患者2: 患者1の弟。同様に0生日時に、末梢血 T 細胞が欠損していたため重症複合免疫不全症と診断され、遺伝子検査にて CD3 δ 欠損症であることが判明した。可能な限り無菌的に管理し、25 生日時に、HLA 一致非血縁者間臍帯血移植を行った。前処置は施行しなかった。

1. 末梢血 T 細胞数の数値

図 1 に示すように、T 細胞の回復は、いずれの患者においても移植後早期に認められ、移植後早期は CD4 陽性 T 細胞が優位を占めていたが、数年の経過により CD8 陽性 T 細胞の割合が増加した。T 細胞数が増加してきた以降、易感染性は認められなかった。しかし、全体的には、いずれの時点においても、T 細胞は健常者よりも定値で推移していた。

図 1. 臍帯血移植後の T 細胞数の推移

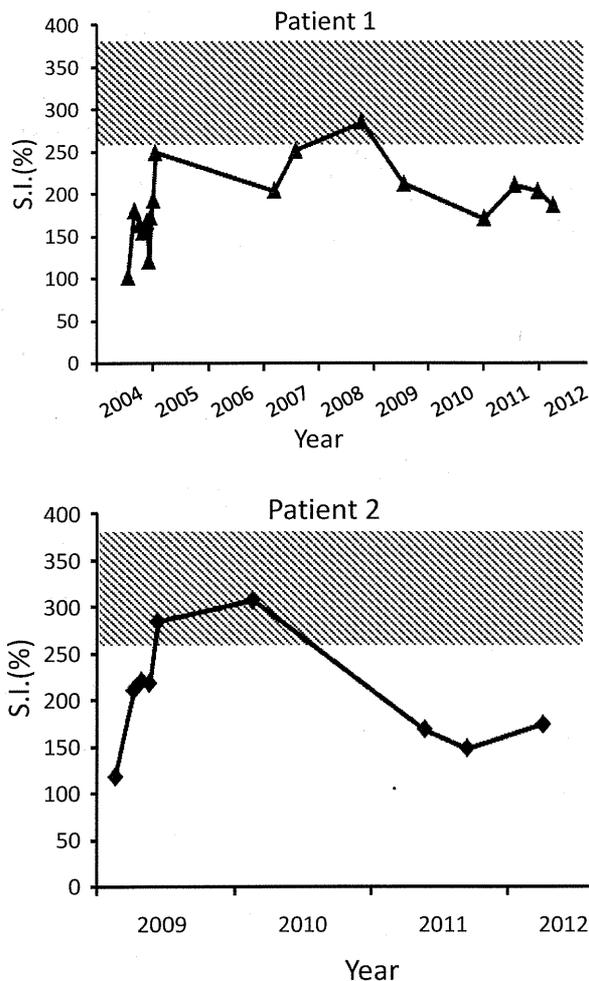


CD3 δ 欠損症患者 2 名の、臍帯血移植後の T 細胞数の経過。矢印は臍帯血移植施行を示す。Open bar は CD4 陽性 T 細胞を、closed bar は CD8 陽性 T 細胞を示す。

2. 臍帯血移植後の T 細胞機能の推移

末梢血 T 細胞の機能を評価するために、末梢血単核球 (MNC) の phytohemagglutinin (PHA) に対する増殖能を継時的に調べたところ、造血幹細胞移植後、一時的に正常化することもあったが、その後、定値をとった。(図 2)。

図2. 臍帯血移植後の PHA に対する反応性の推移



CD3 δ 欠損症患者 2 名の、臍帯血移植後の末梢血 MNC の PHA に対する増殖能の推移。Shaded area は正常値を示す。

3. 血清免疫グロブリン値の推移

臍帯血移植後、IgA、IgM の産生が認められるようになり(図 3)、いずれの患者においても、ガンマグロブリンの補充は不要となった(図 4)。

4. 特異抗体産生能の推移

臍帯血移植後、インフルエンザワクチン接種を行い、特異抗体産生能を評価した

結果、いずれの患者においても、特異抗体産生能が認められるようになった。(図 5)。

図3. 血清 IgA と IgM の推移

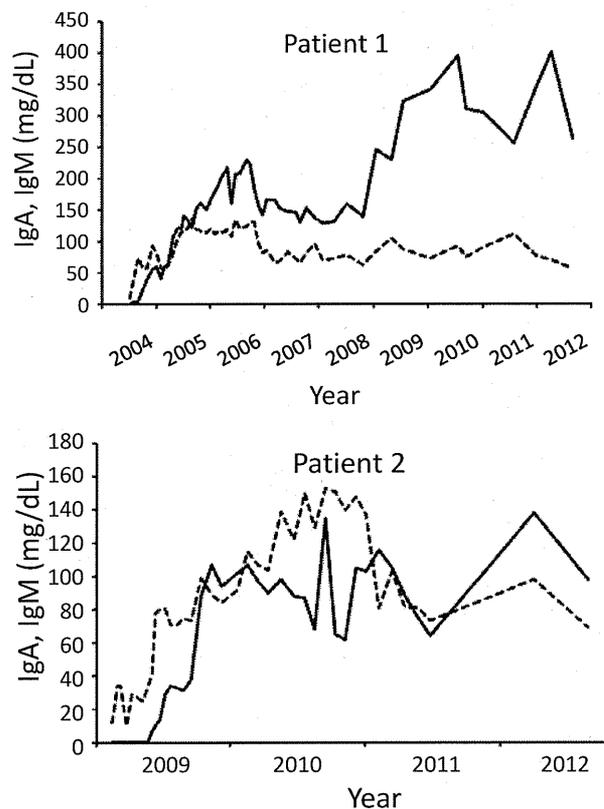
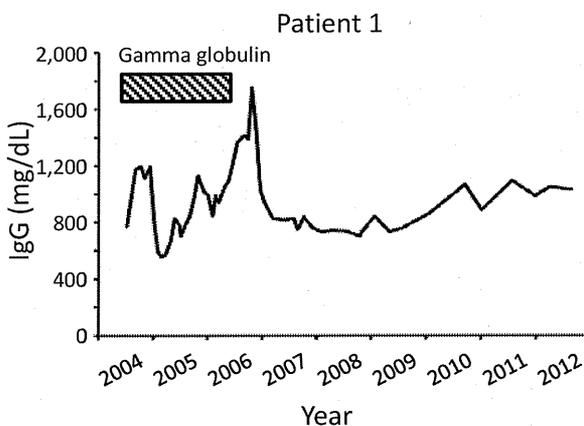
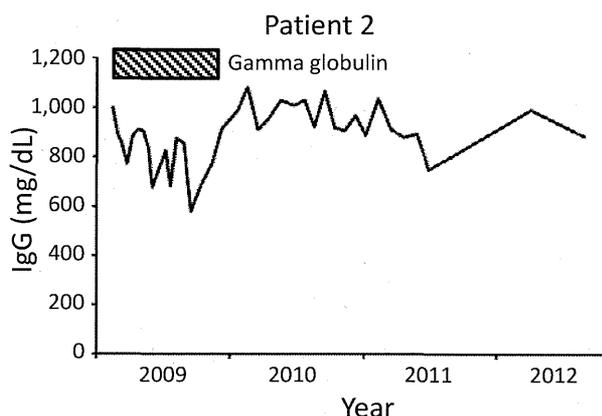


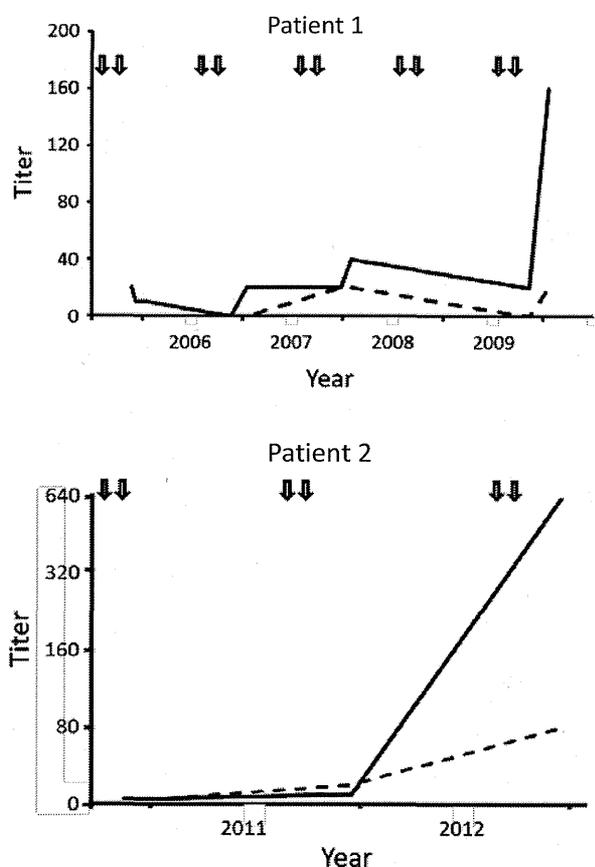
図4. 血清 IgG の推移





Shaded bar は、gamma globulin を補充していた期間を示す。

図 5. 特異抗体産生能



矢印はインフルエンザワクチン接種を示す。

D. 考察

2名の CD3 δ 欠損症患者において、前処置なしで、HLA 一致非血縁者間造血幹細胞移植を行い、その長期的な免疫能について評価を行った。造血幹細胞移植後易感染性はなかった。T 細胞の回復が見られたが、T 細胞数および T 細胞機能上も、正常範囲以下で推移していた。この原因としては、CD3 δ 欠損症の場合、胸腺においてレシピエントの未熟 T 細胞が残存しており、ドナー T 細胞の分化が制限されてしまうことが考えられた。胸腺での T 細胞診性能を示す T-cell receptor excision circles DNA 量を測定した結果、二名の患者ではいずれも検出感度以下であり、これを支持するものと考えられる (Data not shown)。

血清免疫グロブリン濃度および特異抗体産生能は、臍帯血移植後に正常に認められることが確認された。前処置なしの移植では、B 細胞はレシピエント由来であると推測されるが、症例 2 でその点を確認するため、マイクロビーズを用いて B 細胞を純化し (99%以上)、異性間 FISH 法で解析した結果、B 細胞は 100%レシピエント由来であることを確認した。CD3 δ 欠損症で前処置なしで移植した場合、ドナー T 細胞とレシピエント B 細胞の相互作用によって抗体産生能が回復することが確認された。

E. 結論

CD3 δ 欠損症患者 2 名において、前処置なしでの HLA 一致臍帯血移植を行い、現在まで易感染性はなく、QOL も良い状態である。前処置内でも抗体産生能を回復させることができた。細胞性免疫能を正常

化させるためには、移植前処置が必要かもしれない。

F. 健康危険情報

なし

G. 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 minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol.* 98: 355-60, 2013.
- 2) 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.* 11(1): 41, 2013.

2. 学会発表

(海外)

- 1) Hara T, Ishimura M, Tahada H: Autoimmune diseases in patients with primary immunodeficiency diseases. The 2nd International Congress on Controversies in Rheumatology and Autoimmunity, Apr 4-6, 2013, Budapest, Hungary.
- 2) Yamamura K, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Takada H, Ohga S, Hara T: Early progression of atherosclerosis in children with cryopyrin-associated periodic syndrome. May 9-12, 2013, Sarawak, Malaysia.

(国内)

- 1) Takimoto T, Ishimura M, Takada H, Morio T, Ohga S, Hara T: A Japanese female case of Wiskott-Aldrich syndrome with skewed X-chromosome inactivation. The 4th JSH International Symposium, May 24-25, 2013, Ehime, Japan.

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

食細胞異常症における効果的造血幹細胞移植

研究分担者

小林 正夫 広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科 教授

研究協力者

溝口洋子, 唐川修平, 岡田賢, 三木瑞香, 川口浩史
広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科

研究要旨

慢性肉芽腫症(chronic granulomatous disease, CGD), 重症先天性好中球減少症(severe congenital neutropenia, SCN)は代表的食細胞異常であり, 難治性細菌, 真菌感染症を反復する予後不良の疾患である。現段階での根治療法は造血幹細胞移植である。広島大学病院小児科では2002年からCGD: 24症例, SCN: 8症例の造血幹細胞移植(全て骨髄移植)を施行した。前処置の基本はfludarabine, cyclophosphamide, melpharan, ATG, TBI (3 Gy)を用いた骨髄非破壊的前処置であるが, 個々の症例の臓器障害や感染症の有無, 全身状態等で投与薬剤とその量を適宜調整した。CGDでは全例生着したが, 混合キメラ症例はDLIを適宜追加した。生存20例はKarnofsky performance status 90%以上で通学, 社会復帰している。死亡4例は18歳, 30代2名, 40代で, 死亡原因はDLI後のGVHDで2例, 生着遅延で1例, 移植後の感染症であった。16歳未満の11例は全例移植関連合併症等なく生存していることから, 低年齢での移植が有利と考えられた。SCNは1例で拒絶を認めたが, 再移植で根治。血縁者間移植の2例が混合キメラではあるが, 全例がKarnofsky performance status 90%以上で生存している。晩期障害の低減を含めた移植適応と移植時期について, さらなる症例の集積と長期フォローアップの検討が必要である。

A. 研究目的

慢性肉芽腫症(chronic granulomatous disease, CGD), 重症先天性好中球減少症(severe congenital neutropenia, SCN)は代表的食細胞異常症であり, 難治性細菌, 真菌感染症を反復する予後不良の疾患である。両疾患ともに根治療法は造血幹細胞移植と遺伝子治療であるが, 後者についての

治療法は十分には確立されていない。造血幹細胞移植に関しても, 造血細胞源, 移植適応とその時期, 適切な前処置等解決すべき多くの問題点が残されている。本研究では, 両疾患に対して広島大学病院小児科で施行した骨髄移植症例について検討を行った。

B. 研究方法

【CGD】2002年から2013年までに当科で24例の骨髄移植を施行した。年齢は3歳から40歳まで男児でgp91phox遺伝子異常が23例、gp47欠損が1例であった。活動性感染症を有した状況での移植が18例、消化管病変を有した症例が5例、臨床的には活動性感染症を認めない症例が6例であった。

【SCN】2004年から2013年までに当科で8例の骨髄移植を施行した。2歳から17歳で、男児5例、女児3例であった。第一回目の移植で拒絶された3症例の再移植が含まれている。遺伝子検査では未同定の1例を除き、7例が好中球エラスターゼ遺伝子ELANE変異例であった。

【造血細胞源と移植前処置】臍帯血移植では両疾患ともに拒絶の頻度が高いため、すべての症例で骨髄を造血細胞源とした。両疾患ともに、反復性の感染症既往から持続的な臓器障害や移植時の感染症合併の有無、骨髄非破壊的前処置(RIC)での生着不全の可能性と、一方で、非腫瘍性疾患であることから最小限の晩期障害、特に妊孕性の保持は重要である。これらの点を考慮して前処置の基本はfludarabine, cyclophosphamide, melpharan, ATG, TBI(3 Gy)を用いたRIC選択したが、個々の症例の臓器障害や感染症の有無、全身状態等で投与薬剤とその量を適宜調整した。

(倫理面への配慮)

本研究は、広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会での承認を得た。

C. 研究結果と考察

CGDでは全例が生着した。1例で生着遅延(移植後43日目)を認めたが、あとの症例はすべて24日以内にドナー細胞の生着を確認した。そのまま安定した完全キメラを維持した症例が1例、徐々に混合キメラ状態に移行した症例が7例ありDLIを追加した。DLI施行症例はすべて完全キメラに復したが、2例は重度のGVHDを合併し、それぞれ移植後1年半、2年で死亡した。生着遅延の1例は移植後20日に肺炎から呼吸不全となり移植後50日、生着後1週間で死亡した。移植後8か月で重症感染症からDICとなり頭蓋内出血で死亡。25例中4例が死亡したが、死亡例はすべて成人例であった(18歳, 33歳, 35歳, 40歳)。残りの20例はすべてKarnofsky performance status 90%以上で生存し、社会生活に復帰している。全体の生存率は84%、16歳未満(11例)は100%、16歳以上(13例)が74%であった。

CGDの移植時期においては、若年者が臓器障害の少ないこと、移植関連合併症が少ない点から安全性の面では望ましいと思われる。現行の前処置による晩期障害、特に妊孕性等の問題についての長期フォローアップが必要である。この点が解決されれば、今後の方向性を示すことが可能となるであろう。

SCNは8例中1例で拒絶があったが再移植で完全キメラとなった。その他の7例はすべて生着、血縁者間の2例が安定混合キメラ、6例は完全キメラで生存している。DLI施行例は2例で、1例がGrade IIIのGVHDとなったが、免疫抑制剤で軽快した。生存率は100%であり、全ての症例が

Karnofsky performance status 90%以上で社会生活をおくっている。

SCN においては再移植症例 3 例を含め、現行の前処置ではほぼ完全キメラを誘導できる点から今後の症例集積と、長期フォローアップでの晩期障害(妊孕性等)の検討が重要である。

D. 結論

代表的食細胞異常症である CGD25 例、SCN8 例に対する広島大学病院での骨髄移植成績を示した。CGD においては低年齢(16 歳未満)での移植成績は 100%、SCN も 100%であった。晩期障害の低減を含めた移植適応と移植時期について、さらなる症例の集積と長期フォローアップの検討が必要である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant V, Kong X, Crypwy S, Dupuis S, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M: Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Journal of Leukocyte Biology*, 2013 (in press).
- 2) Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M: Identification of the integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant

thrombocytopenia with anisocytosis. *British Journal of Haematology* 160: 521-9, 2013.

- 3) Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K: Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia-derived pluripotent stem cells with heterozygous ELANE mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 3023-8, 2013.
- 4) Hirata O, Okada S, Tsumura M, Kagawa R, Miki M, Kawaguchi H, Nakamura K, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Takihara Y, Kobayashi M: Heterozygosity for the Y701C STAT1 mutation in a multiplex kindred with multifocal osteomyelitis. *Haematologica* 98:1641-9, 2013.
- 5) Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Tsumura M, Kobayashi M, Arkwright PD, Averbuch D, Engelhard D, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, Klein C, Holland SM, Uzel G, Casanova JL, Ma CS, Tangye SG: Naïve and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *Journal of Experimental Medicine* 210: 2739-53, 2013.
- 6) Ives ML, Ma CS, Palendira U, Chan A, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright PD, Engelhard D, Averbuch D, Magdorf K, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, Tsumura M, Kobayashi M, Uzel G,

Casanova JL, Tangye SG, Deenick EK: Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations underlying autosomal dominant hyper-IgE syndrome impair human CD8(+) T-cell memory formation and function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132: 400-11, 2013.

7) Berglund LJ, Ma CS, Avery DT, Moens L, Deenick EK, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Wong M, Adelstein S, Arkwright PD, Fulcher DA, Ziegler JB, Smart JM, Kobayashi M, Casanova JL, Cook MC, Uzel G, Tangye SG: IL-21 signalling via STAT3 primes human naïve B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. *Blood* 122: 3940-50, 2013.

8) Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito M, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica*, Epub ahead of print Aug 23, 2013.

2. 学会発表

(海外)

1) Masao Kobayashi, Yoko Mizoguchi, Shuhei Karakawa, Satoshi Okada, Hiroshi Kawaguchi, Kazuhiro Nakamura: Genetic characteristic of patients with severe congenital neutropenia in Japan. 27th International Congress of Pediatrics, August 24-29, 2013, Melbourne, Australia.

G. 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

WAS に対する造血幹細胞移植法の確立に関する研究

研究分担者 有賀 正 北海道大学医学部医学研究科小児科学分野 教授
研究分担者 山田 雅文 北海道大学病院 講師
井口 晶裕 北海道大学病院 助教

研究要旨

Wiskott-Aldrich 症候群および X 連鎖血小板減少症の日本での移植全例調査を行い今後のより適切な移植治療法を確立することを目的とし、両疾患に対する日本造血細胞移植学会の TRUMP データを取得するとともに TRUMP には存在しないデータの二次調査を行うこととした。二次調査項目は、キメリズム、血小板数、自己免疫疾患と慢性 GVHD の有無、現段階でのガンマグロブリン補充の有無、および移植前と移植後の IgE 値などであり二次調査案を策定し日本造血細胞移植学会の遺伝性疾患 WG による研究として学会に申請した。移植調査と併行し、治療関連毒性の軽減と完全キメラを誘導するために、Wiskott-Aldrich 症候群を含む原発性免疫不全症(PID)の移植に独自の取り組みを開始している。

A. 研究目的

日本造血細胞移植学会の遺伝性疾患 working group による研究と協力して、Wiskott-Aldrich 症候群および X 連鎖血小板減少症における日本で実施された移植状況の全例調査・把握を行い、今後のより適切な移植治療を確立することを目的とする。

このため、移植調査と併行して治療関連毒性の軽減を目指しながらも完全なドナー型のキメリズムを誘導するために、Wiskott-Aldrich 症候群を含む原発性免疫不全症(PID)の移植において独自の取り組みを行う。症例を蓄積し多数例で検討を行う。

B. 研究方法

(1) 研究の種類・デザイン

全例調査:後向き観察研究

独自研究:前向き介入研究

(2) 研究・調査項目

全例調査:対象患者について、以下の項目の調査を行う。

- ① 患者情報(年齢、性別、診断、治療内容、検査結果、画像診断結果、遺伝子解析結果、感染症、HLA)
- ② 前処置と移植片対宿主病(GVHD) 予防法
- ③ 移植ソースとその HLA
- ④ 移植合併症
- ⑤ 晩期障害と予後(自己免疫疾患、慢性 GVHD の有無、ガンマグロブリン補充の有無、キメリズムなどの二次調査項目を含む)

対象患者:以下のWASの移植約100症例

- ① 日本人患者
- ② 日本人ドナーから造血幹細胞移植を行った患者
- ③ 日本の施設で造血幹細胞移植を行った患者

独自研究:対象患者について以下の取り組みを行う。

- ① 多分割の全身放射線照射(TBI)
- ② 性腺遮蔽を用いたTBI
- ③ アルキル化剤はメルファランの積極的投与
- ④ MTX や CY などによる移植直後の免疫抑制の強化
- ⑤ 移植ソースは骨髄を第一選択とする

対象患者

- ① 日本人患者
- ② 北海道大学病院小児科で造血幹細胞移植を行う患者

(倫理面への配慮)

Wiskott-Aldrich 症候群および X 連鎖血小板減少症に対する造血細胞移植に関する研究」について、東京医科歯科大学の IRB および北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得ている。(承認は H26 年 1 月 15 日)。

C. 研究結果

(1)Wiskott-Aldrich 症候群および X 連鎖血小板減少症に対する日本の全造血細胞移植について、日本造血細胞移植学会の TRUMP データ取得申請しデータを取得した。今後不足のデータを二次調査

のうえ取得し移植データの解析を行う予定である。

(2)上記(1)の目的を達成するため、キメリズム、血小板数、自己免疫疾患と慢性 GVHD の有無、現段階でのガンマグロブリン補充の有無、および移植前と移植後の IgE 値などについて各移植施設に二次調査を行う予定で二次調査案を策定し学会に調査を申請した。

以下は北海道大学病院小児科での造血幹細胞植での取り組みの成果。

(3)は 1 回 1.5Gy と 1 回の放射線量を減じた多分割 TBI を用いた骨髄非破壊的前処置(RIC)での造血幹細胞移植を慢性肉芽腫症の 1 歳男児に行い、完全キメラを達成した。

(4)北海道大学病院小児科では移植直後の免疫抑制を 7 日目からのステロイドから 1,3 日目の MTX に変更した臍帯血移植を行っているが、MTX に変更後は全例生着を得ている。

(5)北海道大学病院小児科では PID 患者の造血幹細胞移植の移植前処置に積極的にメルファランを導入している。

(6)北海道大学病院小児科では PID 患者の造血幹細胞移植では全例骨髄を移植ソースとしている。

D. 考察

Wiskott-Aldrich 症候群および X 連鎖血小板減少症は、難治性湿疹、血小板減少、

および免疫不全を主症状とする難治性疾患である。

現在は造血幹細胞移植が唯一の根治的治療法であるが、移植後に混合キメラ状態となることが自己免疫疾患のハイリスクと考えられており、これまで多くの症例で、アルキル化剤による大量化学療法や全身放射線照射などの骨髄破壊的前処置による移植が行われてきた。しかし骨髄破壊的前処置は成長障害、性腺機能障害、および二次ガンなどの晩期障害が問題となっており、悪性疾患でない本疾患においては、治療関連毒性をより軽減した安全で有効な移植前処置および移植ソースを確立することが重要な課題と考えられる。海外と日本の移植を比較しても、HLA (Human Leukocyte Antigen; ヒト白血球抗原) の一致度や移植ソースなどと移植片対宿主病(GVHD)の発症頻度など合併症の発症については必ずしも同一の結果が得られていない。

このため日本でのこれまでの本疾患に対する移植の全例把握を行い、今後のより適切な移植治療の確立を目指すことは極めて意義深く、本疾患における造血幹細胞移植の成績向上に寄与するものと考えられる。

また我々は治療関連毒性の軽減を目指しながらも完全ドナー型のキメリズムを誘導するために、Wiskott-Aldrich 症候群を含む原発性免疫不全症の移植において独自の取り組みを行っている。

RIC ではあるが多分割照射や性腺遮蔽を用いた全身放射線照射の併用、より性腺障害の少ないアルキル化剤への変更、移

植直後の免疫抑制の強化、骨髄を移植ソースの第一選択とすることなどの取り組みであり、一定の成果を挙げているが、今後症例を蓄積し多数例で検討を行う予定である。

E. 結論

本研究による全例調査で、Wiskott-Aldrich 症候群および X 連鎖血小板減少症に対する造血細胞移植において、完全キメラが得られしかも晩期障害がより少ない移植方法の確立が期待される。

治療関連毒性を軽減し、しかも完全キメラを目指す取り組みを推進し、Wiskott-Aldrich 症候群を含む PID の移植のより安全で有効な移植方法を今後症例を蓄積し多数例で検討し確立することが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanegane H, Taneichi T, Nomura K, Wada T, Yachie A, Imai K, Ariga T, Santisteban I, Hershfield MS, Miyawaki T. Successful bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Transplant.* 17, E29-E32, 2013.
- 2) Ichikawa M, Arai Y, Haruta M, Furukawa S, Ariga T, Kajii T, Kaneko Y. Meiosis error and subsequent genetic and epigenetic alterations invoke the malignant transformation of germ cell tumor. *Gene,*