

ノムアノテーションのためのデータ解析手順：

- 1) Cutadapt によるアダプター配列ならびに低クオリティー配列の除去
- 2) BWA による取得配列のマッピング（ヒトゲノムリファレンス配列ならびにウイルスベクター配列）
- 3) ペアエンド配列の片側がウイルスベクター配列に、逆側がヒトゲノム配列にマップされたリードの収集
- 4) Picard による PCR 重複率算出
- 5) 収集した配列がマップされるゲノム領域を GATK により決定。
- 6) 各ゲノム領域にマップされる配列を De novo アセンブル（ABYSS および Trinity を使用）
- 7) アセンブル配列のゲノム位置を Balt 解析により決定し、ベクター配列挿入部位を塩基レベルで決定
- 8) 各ベクター配列挿入部位のゲノムアノテーション（ANNOVAR など）

更にこれらのデータ解析工程をパイプライン化し、自動的にベクター配列挿入部位リストが作出されるシステムを構築した。

倫理面への配慮：

上記の方法に必要な遺伝子組換え実験は、国立成育医療研究センター研究所・組換え DNA 実験安全委員会の承認（承認番号 10-1）を得た上で、法令等を遵守し、十分な対策と措置を講じた上で実施した。

C. 研究成果

約 750 万断片の両端について 101bp のシーケンスを行うことで、各ライブラリについて 1.5 Gb 程度の配列データを得た。また、各リードをトリミング後、ヒトゲノムおよびベクター配列を含むリファレンスに対しマッピングし、高カバレッジ領域の探索、リードの向きを考慮した解析、さらには *de novo* アセンブリを

行うことで、それぞれ 100 塩基対程度、10 塩基対程度、1 塩基対の解像度で挿入部位を同定することができた（表 1）。マップされたリード数が 7 個以上という判定基準においては、HEK293SPA で一箇所、K562MFSG で 47 箇所のベクター挿入部位が同定された。同定された挿入部位の例を図 1 に示す。

挿入部位だけでなく、挿入部位のアノテーション、両 LTR が保存されているか否か、その部位を持つ細胞数の割合、HiSeq で処理されたデータ量、ベイトによりエンリッチされたリードの割合、PCR による重複リードの割合などの情報も得られるパイプラインを構築した。

D. 考察

慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療においては、対象である造血幹細胞集団の一部に遺伝子治療ベクターが安定的に挿入される。ベクター挿入部位が異なる細胞クローンが複数種類混在し、その比率が経時的に変動することが知られている。従って、ベクターのゲノム挿入部位解析においては、細胞集団中における複数のベクター挿入部位を同定しさらに個々の挿入部位の細胞集団内での存在比率を定量的に解析することが必要とされる。

本研究の手法を用いて二種類の遺伝子導入細胞株を解析したところ、設計したベイトとは若干異なる配列を持つものの近傍 DNA 断片が効率よく回収され、また内在性遺伝子 *SHH* に設計したコントロールベイト領域の解析から設計領域外の 500 塩基対にまでリードデータが得られることが分かった。更に、本研究で構築したソフトウェア・パイプラインを用いて、これら細胞株の染色体挿入部位をそれぞれ 1ヶ所および 47ヶ所同定した。後者においては細胞が heterogeneous な集団である可能性が考えられ、個々の挿入部位について得られたリード数から、population 比を大まかに類推できる可能性も示唆された。

E. 結論

DNA キャプチャー法と超並列シーケンシングを応用することで、ウイルスベクターの染色体への挿入部位を迅速かつ網羅的に同定するための実験系・データ解析系を完成させた。これにより、本研究事業で実施された慢性肉芽腫症遺伝子治療症例におけるベクター挿入部位の網羅的解析が実施可能となった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Complete genome sequence of the mitochondrial DNA of the sparkling enope squid, *Watasenia scintillans*. Hayashi K, Kawai YL, Yura K, Yoshida MA, Ogura A, Hata K, Nakabayashi K, Okamura K. *Mitochondrial DNA* 2014 Oct 20:1-2. [Epub ahead of print]
Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability.

Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, Umezawa A. *Sci Rep.* 2014 4:5421. 1. 2. 学会発表

Okamura K, Kawai T, Hayashi K, Hata K, Onodera M, and Nakabayashi K.

Rapid and comprehensive identification of vector integration sites for safe gene therapy.

日本分子生物学会第37回年会 2014年12月 横浜

林恵子、秦健一郎、中林一彦、岡村浩司
塩基配列伸長アセンブラの開発及びマウス3系統のトコンドリアゲノム配列の完全決定 日本分子生物学会第37回年会 2014年12月 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 : パイプラインによる配列データ解析結果集計

	HEK293SPA	K562MFGS
Cell type	HEK293	K562
Number of bases	1.63 Gb	1.53 Gb
Number of read pairs	8.08 M	7.59 M
Number of bases (trimmed)	1.52 Gb	1.41 Gb
Number of read pairs (trimmed)	7.56 M	7.59 M
PCR duplicates	9.6%	37.5%
Reads mapped to the vector	0.988%	2.895%
Reads mapped to the SHH gene	0.550%	1.152%
# of integration sites (> 7 reads)	1	49
#of integration sites (> 0 reads)	1695	4658



図 2 K562MFGS 細胞株で同定されたベクター挿入部位の一例 (*TMEM39B* 遺伝子下流)

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
分担研究報告書

造血幹細胞遺伝子治療におけるブスルファン血中濃度測定に関する研究

研究分担者 大森 栄 信州大学医学部附属病院 薬剤部 教授

研究要旨

現在、造血幹細胞遺伝子治療において遺伝子導入細胞が骨髓腔に生着するためには前処置が必要であり、その前処置薬としてブスルファンを使用するが多い。ただ、投与されたブスルファンの血中濃度には個人差が見られ、ブスルファンがもつ骨髓間隙創出能を発揮するためには患者に合った至適投与量を決定する必要がある。今年度は慢性肉芽腫症に対して行った造血幹細胞遺伝子治療において患者末梢血中のブスルファン濃度を測定し、ブスルファンが患者造血能に与える効果を検討した。

A. 研究目的

患者造血幹細胞を用いた遺伝子治療において治療遺伝子が導入された造血幹細胞が患者骨髓腔に生着するためには、何からの前処置が必要であり、現在、最も一般的に使用されている薬剤はブスルファンである。ただ、このブスルファンは小児においてその体内動態に個人差が大きく、適当な骨髓間隙を創出するための至適投与量を決定することは困難である。本研究では、現在、成育医療研究センターで行われている慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療において前処置として使用したブスルファンの血中濃度を測定し、同時に患者造血能に与える影響を検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 患者は慢性肉芽腫症の患者であり、体重60kgに対し、体重あたり約10mgのブスルファンが点滴静注にて投与された(0.8mg/kgを6時間おきに12回)。
2. ブスルファンの血中濃度は低速注入後に3~4点の血漿中濃度を測定し、1-コンパートメントモデルに式に当てはめ、薬物速度論的パラメータを算出した。算出したパ

ラメータを基に C_{ss} 濃度を得るため投与量の設定を行った。

なお、1次吸収のある one-compartment model 式は以下の通りである。

$$C_{ss,av} = \frac{AUC_{0-\infty}}{\tau}$$

$C_{ss,av}$: 平均定常状態濃度
 τ : 投与間隔
 $AUC_{0-\infty}$: 血漿中濃度時間曲線下面積

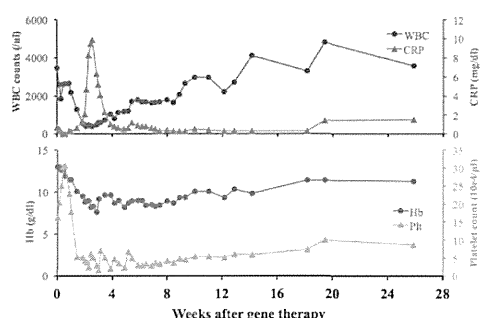
$$AUC_{0-\infty} = \frac{F \cdot D}{V_d \cdot k_{el}}$$

F : バイオアベイラビリティ
 D : 投与量
 V_d : 分布容積
 k_{el} : 消失速度定数

C. 研究結果

1. 遺伝子導入細胞投与前の4、3、2日目に体重あたり約10mgのブスルファンが点滴静注により患者に投与された。その方法は、1回あたりの投与量は0.8mg/kgであり、6時間おきに1日4回、合計12回(9.6mg/kg)の投与で行われた。結果、血漿中濃度時間曲線下面積(AUC)が1353.7 μ mol \times min/Lであり、定常状態平均血漿中濃度($C_{ss, av}$)は926.0ng/mLであった。
2. 投与後、1週間目から好中球、血小板が減少し、同時にHbが低下して貧血を認め、

3 週目から 4 週目に最低値を呈した。好中球が 500/ μ l を越えたのが 6 週目であり、好中球が 1000/ μ l を越えた 8 週目を目途の個室管理を解除した。血小板の減少は好中球の減少より遷延し、複数回の血小板輸注を必要とし、約 12 週目で 50,000/ μ l を越えた。なお、遺伝子導入細胞は 2 週目より患者末梢血中で確認でき、3 ヶ月を越えて患者体内の生存している。



D. 考察

アルキル化剤であるブスルファン (BU) は造血幹細胞移植においてシクロフォスファミド (CY) と併用で前処置として用いられ、ドナー細胞の生着はこの BU 濃度と相関するとされる。つまり、低濃度の BU では移植片は拒絶され、高濃度の BU では肝中心静脈閉塞症 (VOD) が頻発する。このため、最近ではこれら造血幹細胞移植において予め BU を投与し、至適濃度 (900~1350 μ mol*min/L) が得られる適切な投与方法が検討されている。また同様な理由から造血幹細胞遺伝子治療においても、最近では BU の血中濃度を測定することで高い遺伝子導入細胞の生着を求める動きがある。

今回、造血幹細胞遺伝子治療において使用したブスルファンの血中濃度を測定した。得られた AUC は 1353.7 μ mol*min/L であり、至適値のほぼ上限で、適切な骨髓抑制が認められた。同時、遺伝子導入細胞の生着も認められ、この投与量が適切であることが

示唆された。また、安全性の面からも軽度の脱毛を認めるのみで、VOD を含む重度の有害事象を認めていないことから、本遺伝子治療臨床研究で用いられる体重あたり 10mg の BU 投与は適切と考えられた。

E. 結論

- 慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療において前処置として使用した BU の血中濃度を one-compartment model 式で測定した
- 体重あたり 10mg の BU にて本患者においては至適血中濃度が得られ、遺伝子導入細胞の生着を見た
- BU の血中濃度測定は造血幹細胞遺伝子治療の安全性、有効性において重要な検査と思われた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

- Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Frank J.Gonzalez, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S: An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity. *Drug Metab Pharmacokinet.* 29(3): 237-243, 2014.
- Arai S, Matsui H, Ohki R, Miyazawa Y, Koike H, Hashita T, Katsuyama Y, Sekine Y, Nomura M, Shibata Y, Hatori M, Ito K, Yamamoto K, Ohmori S, Suzuki K: Suicide attempt with an overdose of sunitinib. *British Journal of Clinical Pharmacology.* 78(4): 933-935, 2014.
- Kondo Y, Iwao T, Yoshihashi S, Mimori K,

Ogihara R, Nagata K, Kurose K, Saito M, Takuro Niwa T, Suzuki T, Miyata N, Ohmori S, Nakamura K, Matsunaga T: Histone deacetylase inhibitor valproic acid promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *PLoS One*. 9: e104010, 2014.

4. Ishida K, Ohmori S, Kawamata M: Alkalized lidocaine in a tracheal tube with a tapered cuff suppresses hemodynamic changes and tube-induced emergent phenomena during extubation. *European Journal of Anaesthesiology*. 31:275,2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

TREC/KREC 測定の原因性免疫不全症 診断と治療への応用

研究分担者 野々山恵章 防衛医科大学校小児科講座 教授

研究要旨

TREC(T cell receptor recombination circles)とKREC (Kappa-chain recombination excision circles)は、それぞれT細胞新生、B細胞新生の良いマーカーである。TREC測定により、重症複合型免疫不全症(SCID)に代表されるT細胞欠損症の新生児スクリーニングが可能であることを示した。また、既知のSCID患者DNAを用い、アンプリコンPCRと次世代シーケンサーを組み合わせるとSCID原因29遺伝子を解析したところ、全例で原因遺伝子変異が同定できた。一方、KREC測定では、B細胞欠損症の新生児スクリーニングが可能であることを示した。TREC/KREC測定により新生児スクリーニングを行い、先天性免疫不全症を早期診断し、造血幹細胞移植による患者の根治やγグロブリン製剤の早期開始による適正な治療法で患者予後を改善することが可能であると考えられる。日本における本法による新生児スクリーニングの早期導入が望まれる。

A. 研究目的

原発性免疫不全症の中で最重症の疾患が、新生児期から T 細胞欠損をきたす重症複合免疫不全症 (Severe combined immunodeficiency, 以下 SCID)である。また、B 細胞欠損をきたす主な疾患として X 連鎖無ガンマグロブリン血症 (X-linked agammaglobulinemia, XLA)がある。

SCID は、著しい易感染性により乳児期早期に重症日和見感染症を発症する致死性の先天性免疫不全症である。造血幹細胞移植 (Hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) による免疫能再構築が標準的な根治療法であるが、HSCT 前に重症感染症を発症すると治療が困難になる。しかし、乳児期早期に HSCT が実施されれば生存率が 76~95%に達すると

され、格段に予後を改善できる。また、わが国では BCG 接種やロタウイルスワクチンが乳児期に行われており、重症 BCG 感染症や重症ロタウイルス感染症の発生も危惧され、早期発見が特に必要である。

B 細胞欠損症ではこれまで良い早期診断法がなく、ガンマグロブリン定期補充という確立した治療法があるにもかかわらず、診断の遅れにより気管支拡張症などの合併症やポリオワクチンの持続感染が問題となっている。

TRECs は T 細胞新生能を反映し、SCID では陰性となる。KRECs は B 細胞新生能を反映し X 連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) で陰性となる。

今回、我々は T 細胞欠損、B 細胞欠損を早期発見し、感染症発症前の早期治療に

結びつけるため、TREC_s, KREC_s 測定により新生児期にスクリーニングすることを目的として以下の研究を行った。

また、TREC_s による SCID スクリーニングはアメリカで開始され 300 万人の新生児の検査の結果、52 人の既知遺伝子の変異による SCID が見出されている。この中には DNA 損傷修復機能の低下している SCID と Ataxia Telangiectasia(AT)患者が含まれ、造血幹細胞移植を行う際に前処置方法が異なってくるため、遺伝子診断が必須である。そこで、SCID および AT の原因となる 29 遺伝子を、微量の DNA からアンプリコン PCR と次世代シーケンサーを用いて遺伝子診断する方法を開発したので報告する。

B. 研究方法

T 細胞欠損、B 細胞欠損を早期発見し、より低リスクの治療に結びつけるため、新生児期にスクリーニングする方法を確立することを目的として以下のことを行った。1) TREC_s と KREC_s の絶対定量法を開発。2) 新生児期の KREC_s を測定、基準値を作成。3) SCID、agammaglobulinemia 患者の TREC_s、KREC_s を測定。なお、本研究は、防衛医科大学校倫理委員会の承認済みであり、患者・家族・健常児からは十分な説明のもと、文書による同意を得ている。小児の採血は、医療上必要な採血時にごく少量を同時に採取した。

正期産新生児臍帯血、新生児濾紙血を採取した。また臍帯血より濾紙血を作成した。gDNA 濃度 5ng/ μ l 未満を除外し、臍帯血 87 例、臍帯血濾紙血 78 例、新生児濾紙血 60 例を検討した。健常者末梢血 53 例(男:女 25:28、年齢 23 \pm 36 歳(1 か月 ~ 55 歳)、gDNA 濃度 26.

3 \pm 19.7(11.5~59)ng/ μ l) も同様に検討した。

無 γ グロブリン患者は 12 例(男:女 10:2、年齢 新生児濾紙血~33 歳、gDNA 濃度 28.5 \pm 35.2(6.1~58.8)ng/ μ l) を解析した。

SCID 患者は 21 例。IL2RG 15 例(男:女 15:0、年齢 新生児濾紙血~1.6 歳、gDNA 濃度 25.1 \pm 34.6(5.4~73.5)ng/ μ l)、JAK3 2 例(女 1 例、性別不明 1 例、年齢 新生児濾紙血~6 か月、gDNA 濃度 8.7 \pm 3.8(5.9~13.0)ng/ μ l)、LIG4 2 例(男:女 1:1、年齢 2~4 歳、gDNA 濃度 11.7 \pm 10.6(7.9~15.4)ng/ μ l)、ADA 2 例(男:女 2:0、年齢 1 か月~3 か月、gDNA 濃度 5.9 \pm 0.2(5.8~6)ng/ μ l) を解析した。ガスリー血は、母由来 T 細胞生着の X-SCID1 例を含む 7 例で入手できた。

臍帯血や末梢血は EDTA 血として 100 μ l、ガスリー血は直径 6mm 大に punch-out した濾紙血 2 枚をサンプルとして、キットを用いて DNA を抽出した。DNA 濃度を測定した上で、TREC_s、cjKREC_s、sjKREC_s、内在性コントロールとして RNaseP を同時に定量し、コピー数を 1 μ gDNA あたりに換算、統計学的解析を加えた。DNA 濃度は 5ng/ μ l 以上を対象とした。

Real time PCR は、濃度の分かっている standard サンプルと未知サンプルを同じ条件で PCR し、各サイクルでの増幅を検出した。Standard の増幅曲線から標準曲線を引き、未知サンプルの濃度を求めた。

アンプリコン PCR と次世代シーケンサーは、重症複合免疫不全症 18 症例(原因遺伝子変異同定済みの 16 症例、原因遺伝子不明の 2 症例)とキャリア 2 例につき、29 遺伝子(ADA、AK2、ATM、CD247、CD3

δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD8 α 、COR01A、CRACM1、DCLRE1C、FOXP1、IL2R γ 、IL7R α 、JAK3、LCK、LIG4、MAGT1、NHEJ1、PNP、PRKDC、PTPRC、RAC2、RAG1、RAG2、RMRP、STAT5B、STIM1、ZAP70) を計 50ng の gDNA から multiplex PCR により 1 チューブ内で増幅後、Ion PGM で sequence を行った。

(倫理面への配慮)

データは匿名化して取り扱う。臨床研究、遺伝子解析、PIDJ への登録に関しては、本人ないし親権者からの同意書を得た。また、本研究は、小児感染症学会、防衛医大、理化学研究所、かずさ DNA 研究所で倫理委員会を通過している。

C. 結果

正常コントロール

健常新生児(在胎 38.8 \pm 3.0(35~41)週、出生体重 3076 \pm 972(1870~4195)g)の臍帯血 87 例を採取した。また臍帯血より濾紙血を作成した。gDNA 濃度 5ng/ μ l 未満を除外し、臍帯血 87 例、臍帯血濾紙血 78 例、新生児濾紙血 60 例を検討した。健常者末梢血 53 例(男:女 25:28、年齢 22 \pm 33 歳(1 か月~55 歳)、gDNA 濃度 26.3 \pm 19.8(11.5~59)ng/ μ l)も同様に検討した。

免疫不全症のない臍帯血、末梢血で検討すると内因性コントロールの RNaseP は年齢による差はなく、TRECs, cjkRECs および sjkRECs は ngDNA あたりと RNaseP あたりで正の相関が認められた。また、TRECs, cjkRECs、sjkRECs いずれも全例で検出できた。

cjkRECs は新生児期は 9.3 \pm 16.4copies/ngDNA と他の年齢層より低く、乳児期(2 歳未満)で 146 \pm 209copies/ngDNA と最も高値を示した。幼

児期以降は徐々に低下する傾向が認められた。同様に sjkRECs は新生児期は 2.0 \pm 3.1copies/ngDNA と他の年齢層より低く、乳児期(2 歳未満)で 24.7 \pm 32.5copies/ngDNA と最も高値を示した。幼児期以降は徐々に低下する傾向が認められた。

無 γ グロブリン血症患者

無 γ グロブリン血症患者は 12 例(男:女 10:2)。初回検査年齢 新生児濾紙血~33 歳。検体数 新生児濾紙血 4 例、末梢血 27 例。gDNA 濃度 25.5 \pm 29.4(5.1~58.8)ng/ μ l)の解析をした。内因性コントロールの RNaseP は健常者と同等であった。

TRECs はすべて年齢相応の正常値を示していた。

cjkRECs、sjkRECs は新生児濾紙血では全例検出感度以下だった。

2 歳未満において cjkRECs (1.0 \pm 1.8copies/ngDNA)、sjkRECs (0.73 \pm 1.71copies/ngDNA)は検出されたが、それぞれ健常者より有意に低値だった。2 歳以上ではほとんどが検出感度以下で、1 例のみ sjkREC が少量検出された(0.326copies/ngDNA)が、この症例も 1 カ月前と 1 カ月後の検体では検出感度以下だった。

SCID 患者

SCID 患者の新生児濾紙血では、全例で内在性 DNA 量コントロールとしての RNaseP は健常者と有意差なく、全例検出可能だった。TRECs は、maternal T 陽性例を含め全例ごく低値ないし検出感度以下であった。また、乾燥濾紙血が入手できた IL2R 欠損 SCID、JAK3 欠損 SCID では、

cjKRECs、sjKRECs は全例検出可能で健常者と有意な差は認めなかった。

SCID 患者の末梢血では、RNaseP は全例検出可能で健常者と有意差はなかった。TREC は、含め全例ごく低値ないし検出感度以下であった。cjKRECs、sjKRECs は IL2RG 欠損 SCID、JAK3 欠損 SCID では、全例検出可能で健常者と有意な差は認めなかった。LIG4 欠損 SCID、ADA 欠損 SCID では検出感度以下だった。

毛細血管拡張性運動失調症

毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia, AT), Nijmegen 染色体不安定症候群 (Nijmegen breakage syndrome, NBS) では全例で KREC が陰性であった。

アンプリコン PCR と次世代シーケンサーを組み合わせた迅速遺伝子診断法の確立

ATM を含む全遺伝子で 20×depth が 99.8% の精度を達成できた。ろ紙血由来の DNA での解析も可能であった。

重症複合免疫不全症 (SCID) 18 症例では、原因遺伝子が同定されている 16 症例全例及びサンガー法で同定できなかった患者 1 名で原因遺伝子を同定できた。キャリア 2 症例について本方法で変異が同定できた。残りの原因不明の SCID 1 例では既知遺伝子には変異は認められなかった。

D. 考察

TREC は新生 T 細胞のマーカーとされる。TREC を用いた SCID の新生児マススクリーニングはアメリカのほぼ全州、フランス、ノルウェーで開始され、ベルギー、イギリス、イタリア、台湾でパイロット研究が始められている。アメリカでは 300 万

人の新生児のうち、52 人で既知の遺伝子変異による SCID 患者を見出している。日本は 100 万出生であり、同じ頻度で発生するとすると、年間 17 人の既知遺伝子変異による SCID 患者が出生する。この既知遺伝子変異による SCID はアンプリコン PCR と次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析で診断ができる。また、造血幹細胞移植や遺伝子治療による治療により 90% 以上の根治が見込まれる。

さらに、既知遺伝子以外の T 細胞欠損症が、300 万人のうち、411 例見出されている。日本では年間 71 人が出生すると考えられる。この T 細胞欠損症の治療法はまだ確定していないが、今後検討が必要な課題である。

sjKRECs は新生 B 細胞の数を反映する。KRECs を測定することで B 細胞の新生能を評価することができる。KRECs 測定が B 細胞欠損症のスクリーニングに有効と考えられた。スウェーデンでは、TREC と KREC の同時測定により SCID 以外に、XLA などの B 細胞欠損症も見つけられている。

日本でも新生児スクリーニングにより早期発見し、早期治療により根治する事が可能であるので、この方法による原発性免疫不全症の新生児スクリーニングの導入が望まれる。

E. 結論

TRECs, KRECs の測定は、T 細胞・B 細胞欠損症の早期発見、早期診断、早期治療に有用であり、新生児スクリーニングの導入が必要であると考えられた。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Sato H, Tomizawa D, Kajiwara M, Nagasawa M, Morio T, Nonoyama S. Clinical features and hematopoietic stem cell transplantations for CD40 ligand deficiency in Japan. *J Allergy Clin Immunol.* 2015, in press.
- 2) Kato T, Crestani E, Kamae C, Honma K, Yokosuka T, Ikegawa T, Nishida N, Kanegane H, Wada T, Yachie A, Ohara O, Morio T, Notarangelo L.D, Imai K, Nonoyama S. RAG1 deficiency may present clinically as selective IgA deficiency. *J Clin Immunol.* 2015, in press.
- 3) Oshima K, Imai K, Albert M.H, Bittner T.C, Strauss G, Filipovich A.H, Morio T, Kapoor N, Dalal J, Schultz K.R, Casper J.T, Notarangelo L.D, Ochs H.D, Nonoyama S. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for X-Linked Thrombocytopenia With Mutations in the WAS gene. *J Clin Immunol.* 2015, in press.
- 4) Nakatani K, Imai K, Shigeno M, Sato H, Tezuka M, Okawa T, Mitsuiki N, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Nagasawa M, Kajiwara M, Yamamoto M, Arai A, Miura O, Kamae C, Nakagawa N, Honma K, Nonoyama S, Mizutani S, Morio T. Cord blood transplantation is associated with rapid B cell neogenesis compared with bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2014, 49;1155-1161.
- 5) 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 Allergy Clin Immunol.* 2014, 134:411-419.
- 6) Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A,

Franco JL, Boby Gaspar H, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD, Oksenhandler E, Picard C, Puck JM, Sullivan KE, Tang ML. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Front Immunol.* 2014, 5:1-33.

- 7) Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Hu W, Kobayashi M, Lawo JP, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T. Efficacy and Safety of IgPro20, a Subcutaneous Immunoglobulin, in Japanese Patients with Primary Immunodeficiency Diseases. *J Clin Immunol.* 2014, 34:204-211.

2. 学会発表

- 1) Takashima T, Tsujita Y, Yeh T.W, Mitsuiki N, Kanegane H, Kracker S, Durandy A, Nonoyama S, Morio T, Imai K. Clinical and immunological features of patients with Gain-of-Function PIK3CD mutations in Japan. 16th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies. 2014 Oct.29-Nov.1
- 2) Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Hara T, Rojavin M, Hu W, Hubsch A, Nonoyama S. Safety and tolerability of hizentra in patients with primary immunodeficiency in Japan, Europe, and US. 16th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies. 2014 Oct.29-Nov.1
- 3) Imai K, Tsujita Y, Mitsui K, Takashima T, Okano T, Aoki Y, Kimoto F, Inoue M, Iwasaki F, Kaneko T, Waragai T, Sano H, Kikuta A, Morio T, Nonoyama S. Hematopoietic stem cell transplantation for the patients with activated PI3K-DELTA syndrome. 16th Biennial Meeting of the European Society of

Immunodeficiencies. 2014
Oct. 29-Nov. 1

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

研究要旨

当科にPIDJを通して、紹介の来た症例は164症例であり、遺伝子治療の対象となるWiskott-Aldrich症候群（WAS）の患者を3例、X連鎖重症複合免疫不全症（XSCID）4例で遺伝子変異を同定した。WAS患者では、重症の年少児で1例を非血縁臍帯血移植を行い、カリニ肺炎合併XSCID2例を非血縁臍帯血移植、HLA1座不一致血縁者間骨髄移植で治療を行った。前者では、移植前にリンパ節腫脹、肝脾腫、発疹、も見られ、複数の病原体への感染も見られた。後者でも長期の治療にもかかわらず、ニューモシスチスが消えないまま骨髄移植をせざるを得なかったが、移植経過は比較的順調であった。こうした患者は、遺伝子治療の対象となると考えられる。また、かずさDNA研究所と新生児マススクリーニング方法、体制等について、意見交換を行った。来年度は、より多数例のTREC、KREC解析による新生児マススクリーニング技法の開発を行い、WASについても対象患者の絞り込みを行っていききたい。

A. 研究目的

現在、米英仏伊では、先天性免疫不全症、とくにX連鎖性重症複合免疫不全症（XSCID）およびWiskott-Aldrich症候群に対する造血幹細胞を用いた遺伝子治療の臨床試験が行われている。とくに、米国では、XSCIDをはじめとするSCIDを感染症罹患前に早期発見し、早期治療を行うため、新生児期ガスリー濾紙血からゲノムDNAを抽出し、T細胞受容体遺伝子再構成断片（TREC）を増幅し、定量する方法を用いた新生児マススクリーニングが試験運用を開始され、すでに24の州と地域で開始されており、昨年との比べ、5つの州で新たに開始された。さらに約300万人の新生児のスクリーニング結果が報告された（Kwan, JAMA, 2014）。SCID患者は52例同定され（58000人に1人）、10遺伝子はその原因として同定され、13例は遺伝子不明であった。

日本では、我々の研究グループで、TREC（Morinishi et al, J. Ped, 2009）を用いたT細胞欠損症のマススクリーニングに加え、免疫グロブリン κ 鎖遺伝子再構成断片（KREC）を用いたB細胞欠損症（Nakagawa et al, JACI, 2011）および毛細血管拡張性運動失調症（AT）のマススクリーニング、およびT細胞欠損症の病型診断が可能な方法を世界に先駆けて確立した（Kamae et al, JACI, 2013）。本研究では、この方法を用いて、本邦の先天性免疫不全症疑い患者の前方視的登録と遺伝子診断ネットワークであるPIDJに集積した検体のTREC、KRECによるスクリーニングを行うこと、および各自治体におけるパイロットスクリーニングを開始すること、さらに、スクリーニングで発見された患者の微量血液を用いたリンパ球亜分画診断法の確立を目的とした。合わせて、PIDJに登録された、遺伝子治療対象疾患患者の

確定診断と遺伝子治療の可能性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

PIDJを介して、当科に2014年に紹介を受けた患者について、かずさDNA研究所にて遺伝子診断を行った。また、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。本年度は、SCIDの原因遺伝子29遺伝子について、次世代シーケンサーを用いて同定する方法の開発を防衛医科大学小児科と共同で行った。

C. 研究結果

2014年には、164症例の検体を受けた。そのうち、 γ C（IL2RG遺伝子）異常を4例で、WAS遺伝子異常を3例で同定した。WAS患者では、重症の年少児1例で非血縁臍帯血移植を行い、カリニ肺炎合併XSCID2例を非血縁臍帯血移植HLA1座不一致血縁者間骨髄移植で治療を行った。前者では、移植前にリンパ節腫脹、肝脾腫、発疹、も見られ、複数の病原体への感染も見られた。後者でも長期の治療にもかかわらず、ニューモシスチスが消えないまま骨髄移植をせざるを得なかったが、移植経過は比較的順調であった。こうした患者は、早期に感染症前に発見することで、遺伝子治療の対象となると考えられる。

新生児マススクリーニングについては、千葉県について、かずさDNA研究所・千葉県立こども病院と方法、体制等について、意見交換を行った（図2）。TREC、KREC解析についても、当科に紹介された症例全例で検討した。新しく、Roche社から、TREC、KREC、

MSTNのマルチカラーによる定量キットが発売されたため、少数の検体で、従来法との比較を行い、良好な相関が得られたため、引き続き、多数例での検討を行うこととした。

D. 考察と結論

2014年に当科では164例の原発性免疫不全症疑い患者の紹介を受けた。その中で、遺伝子治療の対象疾患となり得る2疾患(XSCIDとWAS)については、7例を遺伝子診断した。新生児マススクリーニングによる患者リクルートを行い、確定診断のためのFACS解析方法も確立され、遺伝子解析も速やかに行うことが可能である体制を構築した。

来年度からは、出産の際に自費での検査を行うことで、実際に病院レベル、自治体レベルでのパイロットスクリーニングを行うべく、準備を行っていききたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

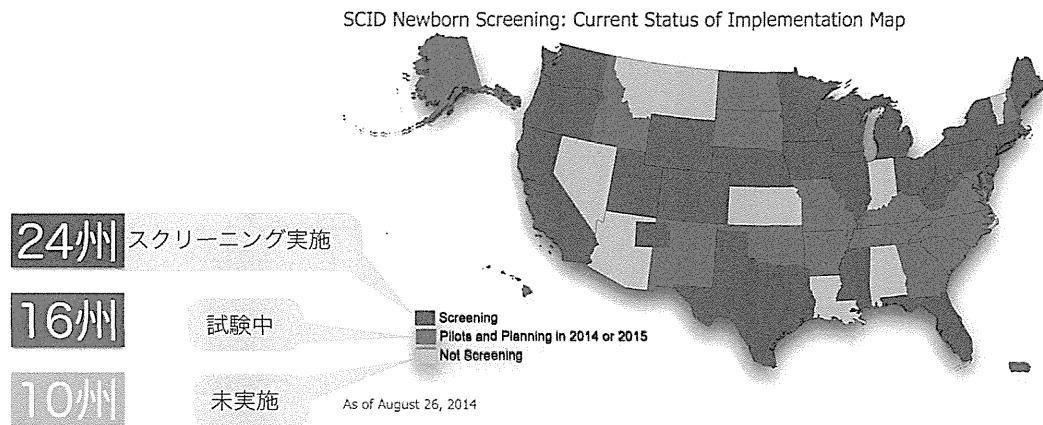
- 1) Nakatani K, Imai K, Shigeno M, Sato H, Tezuka M, Okawa T, Mitsui N, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Nagasawa M, Kajiwara M, Yamamoto M, Arai A, Miura O, Kamae C, Nakagawa N, Honma K, Nonoyama S, Mizutani S, Morio T. Cord blood transplantation is associated with rapid B-cell neogenesis compared with BM transplantation. *Bone Marrow Transplant.* (2014) 49:1155-61
- 2) Endo A, Watanabe K, Ohye T, Suzuki K, Matsubara T, Shimizu N, Kurahashi H, Yoshikawa T, Katano H, Inoue N, Imai K, Takagi M, Morio T, Mizutani S. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID. (2014) 59:545-8.
- 3) Hoshino A, Imai K, Ohshima Y, Yasutomi M, Kasai M, Terai M, Ishigaki K, Morio T, Miyawaki T, Kanegane H. Pneumothorax in patients with severe combined immunodeficiency. *Pediatr Int.* (2014) 56:510-4
- 4) Koura U, Sakaki-Nakatsubo H, Otsubo K, Nomura K, Oshima K, Ohara O, Wada T, Yachie A, Imai K, Morio T, Miyawaki T, Kanegane H. Successful treatment of systemic cytomegalovirus infection in severe combined immunodeficiency using allogeneic bone marrow transplantation followed by adoptive immunotherapy. *J Invest Allergol Clin Immunol.* (2014) 24:200-202.

- 5) 今井耕輔. 【見逃しやすい免疫不全】ピンポイント小児医療 免疫系 overview 免疫不全症との対応を含めて. *小児内科* (2014) 46:1454-14
- 6) 高島 健浩, 今井 耕輔, 森尾 友宏 【見逃しやすい免疫不全】ピンポイント小児医療 ヒト免疫担当細胞サブセット解析の標準化. *小児内科* (2014) 46:1539-1544
- 7) 本間 健一, 今井 耕輔, 野々山 恵章 【見逃しやすい免疫不全】ピンポイント小児医療 これからの原発性免疫不全症の新生児マススクリーニングについて. *小児内科* (2014) 46:1535-1538

2. 学会発表

- 1) Imai K, Horikoshi Y, Kato K, Yabe H, Nonoyama S, Morio T. Hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency in Japan: 1974-2010. 4th annual scientific workshop of primary immunodeficiency treatment consortium (PIDTC), Seattle, 2014年5月3日
- 2) Wada T, Toma T, Yasui M, Inoue M, Kawa K, Imai K, Morio T, Yachie A. Different leaky phenotype in two siblings with X-linked severe combined immunodeficiency. 16th Biennial Meeting of the European society for immunodeficiencies, Prague, Czech. 2014年10月31日
- 3) 岡野 翼、高島健浩、山下 基、宮本智史、青木由貴、富澤大輔、高木正稔、今井耕輔、和田泰三、谷内江昭宏、森尾友宏。アトピー性皮膚炎とミルクアレルギーを疑われ重症感染症を繰り返した乳児例。第5回関東甲越免疫不全症研究会 東京, 2014年9月21日
- 4) 遠藤 明史, 今井 耕輔, 高木 正稔, 森尾 友宏, 水谷 修紀, 片野 晴隆, 井上 直樹, 吉川 哲史. X連鎖重症複合免疫不全症患者の体内で再活性化したCIHHV-6. 日本小児感染症学会, 東京, 2014年10月

- F. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
特になし。
 2. 実用新案登録
特になし。
 3. その他
特になし。



Immune Deficiency Foundationホームページより

図1：米国におけるTRECを用いたT細胞欠損症の新生児マススクリーニングプログラムの導入状況。Screening：マススクリーニング実施中の州（24州と地域）、Pilots and planning in 2014 or 2015：2014-2015年中にマススクリーニング開始予定の州（16州と地域）、Not Screening：未実施の州（10州）

（IDF SCID Newborn Screeningサイトより、<http://idfscidnewbornscreening.org>）

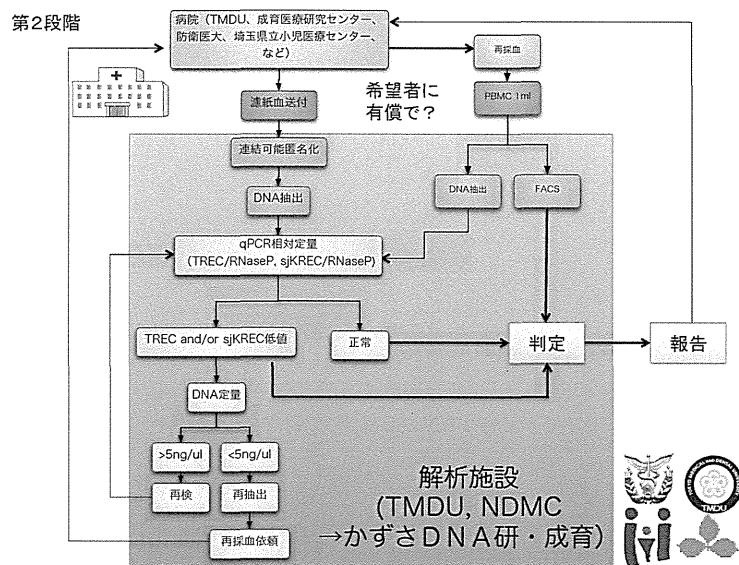


図2：千葉県・埼玉県などでの新生児マススクリーニング体制案

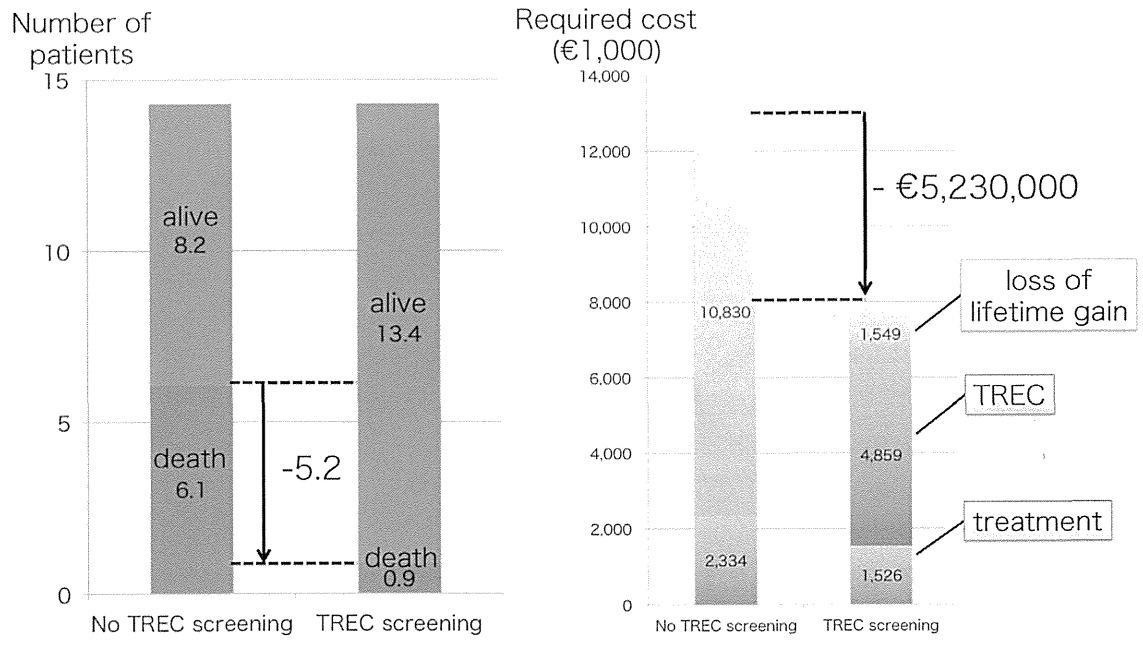


図3：TRECによる新生児スクリーニング導入に伴うコスト分析

遺伝子治療対象疾患のハイリスクスクリーニング法の確立とその臨床応用

研究分担者 奥山 虎之 国立成育医療研究センター臨床検査部 部長 ¹

研究協力者 小須賀基通 国立成育医療研究センター遺伝診療科 医長 ¹

研究要旨

先天代謝異常症のひとつであるライソゾーム病は遺伝子治療が有効な疾患である。ライソゾーム病に対する遺伝子治療で最大の治療効果を得るためには、発症前あるいは発症早期に治療を導入することが重要である。本研究では、乾燥ろ紙血検体を用いた簡易かつ迅速な診断法を開発し、ライソゾーム病のハイリスクスクリーニングに応用して、遺伝子治療法による早期治療を可能とすることを目的とする。ポンペ病とファブリー病を対象疾患として、それぞれの疾患の責任酵素である酸性グルコシダーゼ活性と α -ガラクトシダーゼ活性の乾燥ろ紙血検体を用いた測定法を確立し、ハイリスクスクリーニングに応用した。2014年1月から12月までに、ポンペ病とファブリー病ハイリスクスクリーニングをそれぞれ540検体と831検体に対して実施した。その結果、5例（0.09%）のポンペ病患者と17例の（2.0%）のファブリー病患者を診断した。乾燥ろ紙血を用いた酵素活性定量によるポンペ病とファブリー病のハイリスクスクリーニングは有効であり、早期発見による遺伝子治療の早期治療に寄与すると考えられる。

A. 研究目的

遺伝子治療の対象疾患として、先天代謝異常症が挙げられる。先天代謝異常症のひとつであるライソゾーム病は、すでに酵素補充療法や造血細胞移植による治療が実用化されているが、同時にその治療の限界も示されている。そのため、中枢神経症状への応用や治療効果の長期持続性が秀でている遺伝子治療はライソゾーム病に極めて有効と考えられ、すでに欧州を中心に遺伝子治療の臨床試験が実施されている。しかし、これらの疾患に対する遺伝子治療が最大限の治療効果を得るためには、治療を発症前あるいは発症早期に開始することが重要である。そのため、ライソゾーム病の発症前もしくは発症早期に診断を可能とする簡便で安価なスクリーニング法の開発が望まれている。本研究では、乾燥ろ紙血検体を用いたライソゾーム病の早期あるいは発症前診断を可能にするハイリスクスクリーニング法を確立し、臨床応用することを目的とする。

B. 研究方法

ポンペ病とファブリー病を対象疾患とした。ポンペ病は、ライソゾーム酵素のひとつである酸性グルコシダーゼの先天的欠損を原因とする常染色体劣性遺伝病であり、乳児型の心筋肥大や小児・成人期の近位筋の筋力低下、呼吸筋の障害で発症する。ファブリー病は、 α -ガラクトシダーゼの欠損により、四肢疼痛、腎障害、心筋肥厚、脳血管障害を呈するX連鎖劣性遺伝病である。両病とも酵素補充療法が有効であるが、隔週投与を一生継続しなければならない。

1. スクリーニング法の確立

採取や輸送が簡便で侵襲の少ない乾燥ろ紙微量血検体を用いて、ポンペ病の責任酵素である酸性グルコシダーゼの測定法とファブリー病の責任酵素である α -ガラクトシダーゼの測定法を確立した。

2. ポンペ病ハイリスクスクリーニング

原因不明の心筋肥大、筋力低下や高CK血症を呈

する患者の乾燥ろ紙微量血検体を用いて、ポンペ病のハイリスクスクリーニングを行う。活性低値を呈した症例については、ポンペ病と pseudodeficiency (偽欠損) の鑑別のため、GAA 遺伝子解析により診断する。

3. ファブリー病ハイリスクスクリーニング

原因不明の四肢疼痛や若年性・家族性の腎不全、脳血管障害を呈する患者の乾燥ろ紙微量血検体を用いてファブリー病のハイリスクスクリーニングを行った。活性低値を呈した症例もしくは女性患者の検体については、ファブリー病の確定診断のため、GLA 遺伝子解析により診断する。

C.研究結果

1. ポンペ病ハイリスクスクリーニング

2014年1月から12月末までに540件のポンペ病ハイリスクスクリーニングを行い、5例(0.9%)のポンペ病を診断した。また pseudodeficiency (偽欠損) を4例(0.7%)で認めた。

ポンペ病ハイリスクスクリーニング結果
(2014.1.1~2014.12.31)

	件数	頻度(%)
総検査数	540	
ポンペ病患者	5	0.9
pseudodeficiency	4	0.7

2. ファブリー病ハイリスクスクリーニング

2014年1月から12月末までに831件(男性693件、女性138件)のファブリー病ハイリスクスクリーニングを行い、男性10例(1.4%)のファブリー病患者を診断した。また女性保因者を7例(5.0%)認めた。全体では17例(2.0%)の診断数であった。

ファブリー病ハイリスクスクリーニング結果
(2014.1.1~2014.12.31)

	件数	頻度(%)
総検査数	831	
(男性)	693	
(女性)	138	
ファブリー病(男性)	10	1.4
ファブリー病(女性)	7	5.0
全体	17	2.0

D.考察

ポンペ病の診断は、従来、筋生検による病理学的診断や皮膚線維芽細胞を用いた酵素活性測定により診断されてきた。しかし、いずれの方法も侵襲を伴う検査であり、検査の適応が限られてきたため、非侵襲的な簡便な検査による診断が望まれてきた。今回、我々は、乾燥ろ紙血検体を用いた非侵襲的な検査でポンペ病ハイリスクスクリーニングをおこなった。またファブリー病の活性測定についても白血球中の酵素活性測定から、簡便な乾燥ろ紙血検体を用いた酵素活性測定が可能となった、これらの方法の確立により、検査に要する時間が短縮され、費用が削減できるため、医師がこれらの疾患が疑わしい症例を積極的に検査をするようになるため、ポンペ病やファブリー病の診断がより早期になると考えられる。同様の方法で、他のライソゾーム病の診断にも応用可能であり、我々は遺伝子治療などの治療が可能なライソゾーム病の診断法の確立を目指している。

E.結論

乾燥ろ紙血を用いた酵素活性定量によるハイリスクスクリーニングは、ポンペ病とファブリー病の早期発見に有用である。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

[論文]

CT and endoscopic evaluation of larynx and trachea in mucopolysaccharidoses.

Morimoto N, Kitamura M, Kosuga M, Okuyama T. Mol Genet Metab. 2014;112:154-159.

The natural history of MPS I: global perspectives from the MPS I Registry. Beck M, Arn P, Giugliani R, Muenzer J, Okuyama T, Taylor J, Fallet S. Genet Med. 2014 Mar 27.

The novel SLC02A1 heterozygous missense mutation p. E427K and nonsense mutation p. R603* in a female patient with pachydermoperiostosis with an atypical phenotype. Niizeki H, Shiohama A, Sasaki T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Takeshita M, Hirakiyama A, Okuyama T, Tanese K, Ishiko A, Amagai M, Kudoh J. Br J Dermatol. 2014;170:1187-1189.

Overcoming the barriers to diagnosis of Morquio A syndrome. Bhattacharya K, Balasubramaniam S, Choy Y, Fietz M, Fu A, Jin D, Kim OH, Kosuga M, Kwun Y, Inwood A, Lin HY, McGill J, Mendelsohn NJ, Okuyama T, Samion H, Tan A, Tanaka A, Thamkunanon V, Toh TH, Yang AD, Lin SP. Orphanet J Rare Dis. 2014 Nov 30;9(1):192.

The complete type of pachydermoperiostosis: A novel nonsense mutation p. E141* of the SLC02A1 gene. Niizeki H, Shiohama A, Sasaki T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Kosaki K, Ogo A, Yamada T, Miyasaka M, Matsuoka K, Hirakiyama A, Okuyama T, Matsuda M, Nakabayashi K, Tanese K, Ishiko A, Amagai M, Kudoh J. J Dermatol Sci. 2014;75:193-195.

[学会発表]

Kosuga M, Kumagai T, Tajika M, Miwa Y, Fujimaki K, Uemura S, Fukuda T, Sugie H, Okuyama T, Umeda Y. Effects of pre-symptomatic initiation of enzyme replacement therapy for infantile-onset Pompe disease : Comparison in two siblings. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. Innsbruck, Austria. 2014. 9. 4

Kosuga M, Tajika M, Miwa Y, Fujimaki K, Matsuoka T, Soga K, Uemura S, Fukuda T, Sugie H, Umeda Y, Okuyama T. Effects of pre-symptomatic initiation of enzyme replacement therapy for infantile-onset Pompe disease. American Society of Human Genetics 64th Annual Meeting. San Diego, USA. 2014. 10. 19

中島英規、前田堂子、鈴木恵美子、渡辺倫子、小須賀基通、奥山虎之、重松陽介、原田正平. 二次検査応用に向けた LC-MS による疾患マーカー分子分離分析系確立. 第 41 回日本マススクリーニング学会. 広島、2014. 8. 23

徐ジュヒョン、二階堂麻莉、小須賀基通、古城真秀子、田中あけみ、奥山虎之. 先天代謝異常症臨床情報バンク【mC-Bank】: ムコ多糖症における患者登録. 第 56 回先天代謝異常学会. 仙台、2014. 11. 13

中島英規、原田正平、石毛信之、穴澤昭、小須賀基通、藤本純一郎、山口清次、重松陽介、奥山虎之. 新生児マススクリーニングにおける LC-MS による二次検査法開発. 第 56 回先天代謝異常学会. 仙台、2014. 11. 14

熊谷淳之、奥山虎之、小須賀基通、藤直子、五十嵐仁美、開山麻美、二階堂麻莉. 日本人ムコ多糖症 I I 型患者 81 家系の遺伝子変異と表現型の相関について. 第 56 回先天代謝異常学会. 仙台、