

Petasites japonicus (Fuki) components.
Journal of Natural Medicines, in
printing 2015

2. 総説

- 1) Shigeyoshi Fujiwara, Hiroshi Kimura,
Ken-ichi Imadome, Ayako Arai, Eiichi
Kodama, Tomohiro Morio, Norio
Shimizu, Hiroshi Wakiguchi. Current
Studies on Chronic Active Epstein-Barr
virus Infection in Japan. *Pediatrics
International*, **54**: 159-166, 2014

3. 学会発表

- 1) Zhe Li, Karen Kirby, Bruno Marchand,
Michailidis Eleftherios, Eiichi Kodama,

Hiroaki Mitsuya, Michael Parniak,
Stefan Sarafianos. Structural Basis of
Inhibition and Resistance Mechanism to
EFdA, a Highly Potent NRTI. The
annual Conference on Retroviruses and
Opportunistic Infections, Seattle,
Washington, Feb. 23-26, 2015

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

該当なし

厚生労働科学研究委託費
(難治性疾患実用化研究事業)
分担研究報告書

慢性活動性 EB ウイルス感染症とその類縁疾患に対する多様な
同種造血幹細胞ソースごとの移植の最適化に関する研究

研究分担者 氏名：澤田明久

所属：大阪府立母子保健総合医療センター 職名：血液・腫瘍科，副部長

研究要旨

本疾患に対する治療として，当センターでは3ステップからなる戦略（原病の鎮静，抑制，根絶）をとりつつ，ほとんどの症例で根治療法としての同種造血幹細胞移植（HSCT）を必要としている．当センターでは安全で後遺障害の少ない減強度前処置（RIC）に取り組んでいる．多様な移植ソースに応じた適切な移植計画を探索し，高い生着率と良好な原病コントロールが得られつつある．

A. 研究目的

本疾患に対する古典的な同種造血幹細胞移植（HSCT）は，骨髄破壊的前処置（MAC）を用い，HLA 一致同胞をドナーとした骨髄移植である．しかし MAC は深刻な晩期合併症をもたらし，また近年の少子化に伴い HLA 一致同胞のドナーは得難くなってきている．

我々は晩期合併症の軽減のため減強度前処置（RIC）をいち早く導入した．ドナーとして様々な代替ソースを求め，それぞれに最適化した RIC を探索する．

B. 研究方法

本疾患に対する当センターでは3ステップからなる治療戦略をとる．すなわち，免疫化学療法を施行して原病を鎮静化し，多剤併用化学療法により原病のコントロールを試み，同種 HSCT により原病の根絶と造血・免疫能の再構築を図っている．なお現病が NK タイプの場合，本人と家族の血液または唾液を採取し，本研究班の主任研究者のもとで網羅的な素因検索を施行する．

減強度前処置（RIC）のプラットフォームは ATG (anti-thymocyte globulin) 1.25 mg/kg x 2 days, fludarabine 30 mg/m²/d x 6d, L-PAM 70 mg/m²/d x 2d, etoposide 100 mg/m²/d x 2-3d であり，放射線照射は全廃している．当センターでは様々なソースごとに移植計画の最適化を探索している．

（倫理面への配慮：研究試料の採取にあたっては当センター倫理委員会で承認を受けた研究計画書にのっとり説明し，文書による同意を得ている．造血幹細胞移植の施行にあたっては当センターで承認された書面を用いて説明し，文書による同意を得ている．）

C. 研究結果

2014 年の症例は 4 例．うち 3 例は治療初期より当センターで治療を開始し，残る 1 例は化学療法に抵抗性で血球貪食症候群（HPS）のフレアを発症しての転入であった．前者の 3 例では，骨髄バンクからの非血縁者間骨髄移植（BMT），HLA 不一致血縁者

からの造血幹細胞を純化 (TCR α β と CD19 の除去) した末梢血管細胞移植 (PBSCT), 臍帯血バンクからの非血縁者間臍帯血移植 (CBT) が 1 例ずつであり, 全例が無病生存中である. 後者の 1 例は緊急移植として HLA 部分一致血縁者から PBSCT を施行し, 一旦は奏効したが, 原病の後遺症と推定される致死的経過を辿った.

CBT はかつて生着不全が多く, プラットフォームのままの RIC では生着率が 57.1%(4/7) であった. その後は L-PAM 1 回を前処置に先行投与することで生着率が 100%となっており, 本年の 1 例も無事に生着を果たした.

D. 考察

造血幹細胞を純化した移植を本年度も 1 例施行し, 原病のコントロールを得た. 前処置の ATG が少量かつ前処置の早い段階で投与されることで生着できたと考える. EBV のコントロールに本来必要とされる細胞傷害性 T リンパ球を除去した移植で, ドナー細胞が生着し, かつ原病がコントロールできる機序は今後の解明を待たねばならない.

E. 結論

多様な移植ソースに応じた適切な移植計画 (前処置など) を探索し, 高い生着率と良好な原病コントロールが得られつつある.

F. 健康危険情報

なし.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 澤田明久, 井上雅美. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の病態と治療. 日本造血細胞移植学会誌 3: 1-11, 2014.

2. Sawada A, Inoue M, Koyama-Sato M, Kondo O, Yamada K, Shimizu M, Isaka K, Kimoto T, Kikuchi H, Tokimasa S, Yasui M, Kawa K. Umbilical cord blood as an alternative source of reduced-intensity hematopoietic stem cell transplantation for chronic Epstein-Barr virus-associated T or natural killer cell lymphoproliferative diseases. Biol Blood Marrow Transplant 20: 214-221, 2014.

2. 学会発表

1. 澤田明久, 井上雅美, 佐藤真穂, 近藤 統, 眞弓あずさ, 井坂華奈子, 樋口紘平, 清水真理子, 安井昌博, 河 敬世. 慢性活動性 EB ウイルス感染症: 成人および小児における同種造血幹細胞移植成績の比較. 第 36 回日本造血細胞移植学会. 沖縄. 2014 年 3 月 7-9 日.
2. Azusa Mayumi, Akihisa Sawada, Maho Sato, Mariko Shimizu, Aya Ioi, Kohei Higuchi, Osamu Kondo, Masahiro Yasui, Keisei Kawa, Masami Inoue. Favorable impact of intensified conditioning regimen on the engraftment of cord blood transplantation for chronic Epstein-Barr virus-associated T or Natural Killer cell lymphoproliferative diseases. The 19th congress of the Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation. Hangzhou, China. 16th-19th/Oct/2014.

H. 知的所有権の取得状況

なし

EB ウイルス感染細胞の増殖機構解析と治療の標的分子探索に関する研究

分担研究者：清水 則夫

（東京医科歯科大学 准教授）

研究要旨 慢性活動性 EBV 感染症 (Chronic active Epstein-Barr virus infection: CAEBV) は、末梢血中の EBV ゲノム量の高値を特徴とする疾患で、多彩な病態を示す予後不良の疾患である。我々の先行研究により、CAEBV 患者の EBV 感染細胞では ALDH1, p53, surviving, EZH2 遺伝子が過剰発現されていることが示されている。本研究では、CAEBV 患者から樹立した細胞を含め EBV 関連疾患から樹立された EBV 陽性 T/NK 細胞株を用い、これら遺伝子の過剰発現のもたらす細胞への影響を評価した。その結果、EZH2 の発現抑制はアポトーシスの増加と生細胞率の低下を引き起こすことが示され、EZH2 が新しい治療標的となることが示唆された。

A. 研究目的

慢性活動性 EBV 感染症 (Chronic active Epstein-Barr virus infection: CAEBV) は、慢性あるいは反復して伝染性単核球症様の症状が続き、抗 EBV 抗体の異常パターンと末梢血中の EBV ゲノム量の高値を特徴とする疾患である。症状は蚊刺過敏症、種痘様水疱症、T 細胞性リンパ腫、NK 細胞リンパ腫など多彩な病態を示し、併発する障害臓器も多岐にわたり、適切に治療しないと患者のほとんどは数年から十数年の経過でリンパ腫・臓器不全・血球貪食症候群などにより死亡する予後不良の疾患である。EBV 感染症研究会から示された CAEBV の診断指針によれば、血中抗体化の高値とともに末梢血から $10^{2.5}$ copies/ μ gDNA 以上の EBV ゲノムが検出されることが一つの目安となる。EBV 感染細胞は T 細胞 ($\alpha\beta$ T 細胞および $\gamma\delta$ T 細胞) あ

るいは NK 細胞であり、いずれもほとんどの場合モノクローナル (一部はオリゴクローナル) な細胞増殖のパターンを示す。

CAEBV 患者の治療には、抗ウイルス剤や抗がん剤投与が行われているが、これらの薬剤療法では根治は望めないことが明らかになっており、造血幹細胞が現在のところ唯一の根治治療法となっている。CAEBV を含む EBV 陽性 T/NK 細胞による増多症 (LPD) の臨床病理学的分類法が我が国の CAEBV 研究グループから提案されている (Ohoshima et al. Pathol. Int. 2008) が、その提案によれば CAEBV は以下の 4 つのカテゴリーに分類されている。A1: 多様な細胞種の LPD で細胞のクローン性増殖が認められないタイプ、A2: 多様な細胞種の LPD であり、細胞のクローン性増殖が認められるタイプ、A3: 単一細胞種

のLPD (T cell またはNK cell リンパ腫・白血病)で細胞のクローン性増殖が認められるタイプ、B: 単一細胞種のLPD (T cell またはNK cell リンパ腫・白血病) 細胞のクローン性増殖が認められ、劇症に経過するタイプ。その後、4th Asian Hematopathology Workshopでも同様なレポートが発表された。共同研究者らにより行われたこれまでの研究では、16名のCAEBV患者を先の4つのカテゴリーに分類し、EBV感染細胞の遺伝子発現プロファイリング解析を実施した結果、p53 (16例中11例:69%), surviving (16例中10例:63%), EZH2 (14例中11例:79%)が過剰発現していることが明らかとなっている。我々は、これまでにEBV-T/NK LPD患者から多くのEBV陽性T/NK細胞を樹立している。本研究では、CAEBV患者から樹立した細胞を含めEBV関連疾患患者から樹立されたEBV陽性T/NK細胞株を用い、これら遺伝子の過剰発現のもたらすEBV感染細胞への影響を評価することを目的に研究を行った。

B: 研究方法

1. 細胞株と培養

CAEBV患者由来細胞株 (KAI-3, SNK1, SNK10, SNT 13, 15, 16)、鼻性T/NKリンパ腫患者由来細胞株 (NK-92, HANK-1, NK-YS, SNK6, SNT8)を使用した。培養液はArtemis2 (日本テクノサービス)+700U/ml IL-2を用いた。

2. RNA抽出 miRNeasy mini kit (Qiagen GmbH, Germany)を用いてTotal RNAを抽出した。

3. 細胞株のDZNep処理

対数増殖期の細胞株を様々な濃度のヒストンメチル化酵素阻害剤のDZNep (3-deazaneplanocin A)で処理した。処理した細胞をPBSで洗浄・超音

波処理・遠心して得たペレットを溶解した。

4. ウェスタンブロット法によるタンパク質検出 SDS-PAGEにより分離したタンパク質をPVDF膜に写し取り、EZH2抗体 (Cell Signaling Tech. Inc., MA, USA)あるいは β -Actin抗体 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA)と反応させたのちにHRP結合2次抗体と反応させ化学発光法により検出した (chemiluminescence (GE Healthcare, Uppsala, Sweden))。0.1%DMSO処理細胞を溶媒コントロールとして使用した。

5. アポトーシス細胞の検出

アポトーシスによる死細胞は、Annexin-V-APCとpropidium iodide (PI)を使用した方法により検出した。DZNepあるいは0.1%DMSO処理細胞処理72時間後に細胞を回収し、細胞をAnnexin-V-APCで染色し (APC Annexin-V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen, CA, USA))、フローサイトメーターでアポトーシス細胞を検出した。

6. ALDHの測定

細胞株に発現するALDH (Aldehyde dehydrogenase)の酵素活性をALDEFLUORキット (Stem Cell Technologies, Durham, NC)で測定した。陰性コントロールには特異的ALDH阻害剤であるDEAB (diethylamino-benzaldehyde)で処理した細胞を用い、細胞をALDHの基質を含むALDEFLUORアッセイバッファーに懸濁し、細胞内の蛍光量をフローサイトメーターで測定した。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮が必要と考えられる研究は行わなかった。

C: 結果

1. DZNep 処理による EZH2 の抑制

EBV 感染細胞の遺伝子発現プロファイリング解析を実施した結果から、CAEBV 患者由来細胞株は EZH2 が過剰発現しているとの結果が得られているため、EZH2 が EBV 感染細胞の生存に影響している可能性がある。EZH2 はヒストンメチル化阻害剤 DZNep 処理により抑制されるとの報告があるため、細胞株を DZNep で処理し細胞の生存率を測定した。その結果、DZNep 処理により効果的にまた量依存的に KAI3, SNK10, SNT15, SNT16 の EZH2 量が減少することが示された。また、図 1 に示すように細胞の生細胞率が DZNep の添加量依存的に減少し、フローサイトメーター解析によりアポトーシス細胞 (Annexin-V-APC 陽性細胞) が増加することが明らかとなった。

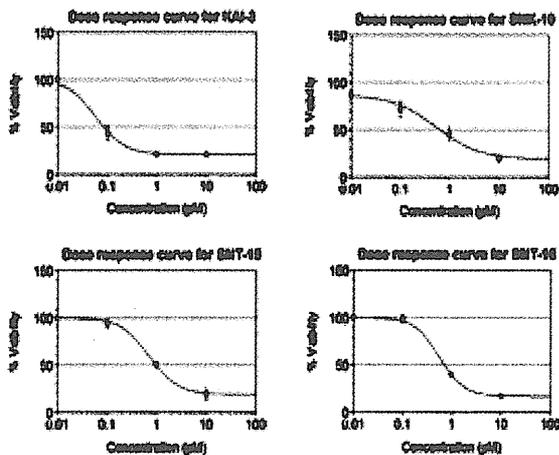


図 1. 細胞株 (KAI3, SNK10, SNT15, SNT16) を DZNep で処理することにより、その添加量依存的にすべての細胞株の生細胞率が減少した。

2. EBV 陽性細胞の遺伝子発現プロファイリングの結果から CAEBV 患者から樹立した細胞は鼻性 T/NK 細胞リンパ腫患者から樹立した細胞よりも幹細胞に似た性質を持つことが示されているため、細胞株の ALDH 活性を

比較した。その結果、鼻性 T/NK 細胞リンパ腫細胞 (NK-YS, NK-92, HANK-1, SNK1, SNK6, SNT-8) に比べ CAEBV 細胞 (KAI-3, SNK10, SNT-13, SNT-15, SNT-16) の ALDH 活性が有意に高かった (2.4% 対 8.2%)。

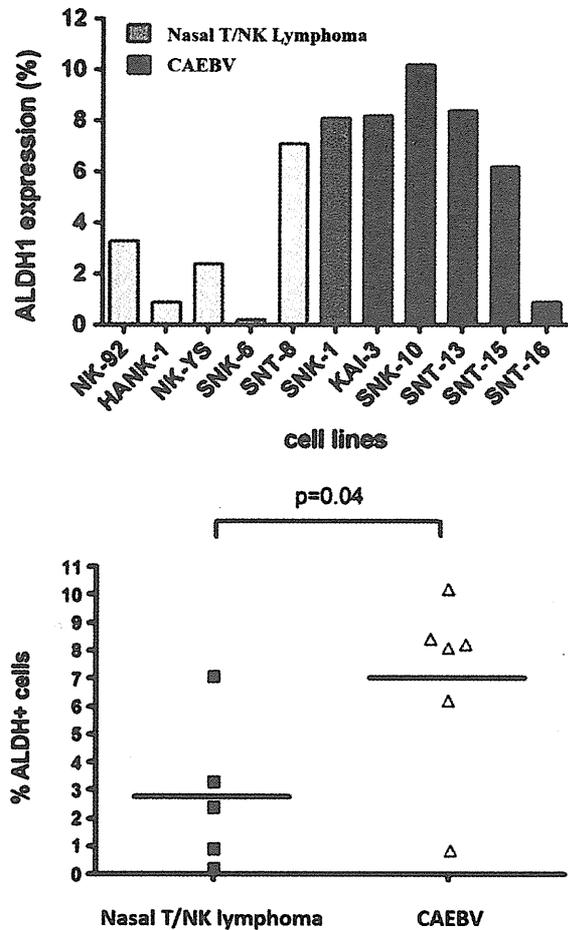


図 2. 細胞株の ALDH 活性を比較: 鼻性 T/NK 細胞リンパ腫細胞に比べ CAEBV 細胞の ALDH 活性が有意に高い (発現細胞の割合の中央値は 8.15% vs. 2.4% $p=0.04$)

D: 考察

細胞内アルデヒド分解酵素の 1 つである Aldehyde dehydrogenase (ALDH)1 は様々な組織由来の幹細胞マーカーとして報告されているが、近年種々のがんにおいてがん幹細胞マーカーとなりうることを報告されている。がん幹細胞とは、腫瘍内に存在し自己複製能と腫瘍を構成する様々な系統のがん細胞を生み出す能力を持つ細胞と定義され、抗

がん剤や放射線療法に対する抵抗性やがんの再発・転移に関与すると考えられている。遺伝子発現プロファイリング解析により、CAEBV 細胞は ALDH1 遺伝子を過剰発現しがん幹細胞的な性質を持つことが示されていたが、本研究により CAEBV 細胞株は鼻性 T/NK 細胞株よりも ALDH1 陽性細胞の割合が有意に高く、より幹細胞的な性質を持つことが確認され、治療戦略を考える上で、そのがん幹細胞的な性質を持つことが重要な示唆を与える。一方、遺伝子発現プロファイリング解析によりヒストンメチル化酵素の一つである EZH2 の過剰発現が示唆されていた。EZH2 は遺伝子発現調節タンパク質複合体(ポリコムタンパク質)の一員として遺伝子発現調整に関与していることが知られているが、EZH2 はヒストン H3 コアタンパク質の 27 番目のリジンをメチル化し遺伝子の転写を抑制する活性を持つことが知られていたが、様々ながんで EZH2 発現が亢進しており、患者の予後と発現量が相関するとの報告が多数ある。本研究では、CAEBV 細胞株における EZH2 の発現が実際に亢進していること、および EZH2 阻害剤である DZNep 処理により細胞の生存率が添加量依存的に低下することが確認され、EZH2 が CAEBV 細胞の生存に重要な働きをしていること、および治療の標的になりうることを示唆された。今後 CAEBV 患者末梢血から分離した EBV 陽性 T/NK 細胞を使用した検証実験を行う予定である。

E: 結論

我々の先行研究により、CAEBV 患者の EBV 感染細胞では ALDH1, p53, surviving, EZH2 遺伝子が過剰発現されていることが示されているが、CAEBV を含め EBV 関連疾患から樹立された EBV 陽性 T/NK 細胞株を用い、これら

遺伝子の過剰発現のもたらす細胞への影響を評価した。その結果、EZH2 の発現抑制はアポトーシスの増加と生細胞率の低下を引き起こすことが示され、EZH2 が新しい治療標的となることが示唆された。また、CAEBV 細胞は ALDH1 陽性でがん幹細胞的な性質を持つことが示めされたことは、今後の治療薬開発戦略を立てる上で重要な示唆を提供する。

F: 健康危険情報

なし

G: 研究発表

論文発表

1. Ng SB, Ohshima K, Selvarajan V, Huang G, Choo SN, Miyoshi H, Shimizu N, Reghunathan R, Chua HC, Yeoh AE, Quah TC, Koh LP, Tan PL, Chng WJ. EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder in children and young adults has similar molecular signature to extranodal nasal NK/T-cell lymphoma but shows distinctive stem cell-like phenotype. *Luek Lymphoma* 10:1-27, 2014
2. Yoshimori M, Imadome K, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A. CD137 Expression Is Induced by Epstein-Barr Virus Infection through LMP1 in T or NK Cells and Mediates Survival Promoting Signals. *PLoS One* 9:e112564, 2014.
3. Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, Shimizu N. Detection of herpes viruses by multiplex and real-time polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute lung injury or acute

respiratory distress syndrome. *Respiration* 87:279-286, 2014.

4. Yagasaki H, Shichino H, Shimizu N, Ohye T, Kurahashi H, Yoshikawa T, Takahashi S.

Nine-year follow-up in a child with chromosomal integration of human herpesvirus 6 transmitted from an unrelated donor through the Japan Marrow Donor Program. *Transpl Infect Dis.* 17(1):160-1. 2015.

5. Endo A, Watanabe K, Ohya T, 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. *Clin.Infect.Dis.* 59:545-548, 2014.

6. Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama E, Morio T, Shimizu N, Wakiguchi H. Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatr.Int.* 56:159-66, 2014.

7. 関矢一郎、清水則夫、森尾友宏、宗田大、滑膜間葉系幹細胞を用いる軟骨再生医療の手順。日本整形外科学会雑誌 88:212-215, 2014

8. 木村秀樹、池 裕明、岡正朗、鈴木弘行、谷憲三朗、徳久剛史、中面哲也、森尾友宏、山口佳之、阿曾沼元博、河上裕、紀ノ岡正博、澤芳樹、清水則夫 免疫細胞療法細胞培養ガイドライン 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 45:411-433, 2014

著書

清水則夫、渡邊 健、高橋秀行、外丸靖浩、森尾友宏 再生医療等細胞製剤の品質評価法：ウイルス・マイコプラズマ試験 紀ノ岡

正博監修 再生医療の細胞培養技術と産業展開 シーエムシー出版 p51-62、2014

国内学会発表

1. 廣瀬千紘、坂下千瑞子、山本正英、今留謙一、富田誠、藤原成悦、森尾友宏、清水則夫、三浦修、新井文子 成人 EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症に対する同種造血幹細胞移植成績の後方視的解析 造血幹細胞移植学会 平成 27 年 3 月 (神戸市)

2. 渡邊 健、島田ひかり、湯之前雄太、外丸靖浩、関矢一郎、森尾友宏、清水則夫、岸本加恵、前田忠郎、澤田昌典 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞を利用した再生医療の安全性確保：ウイルススパイク試験 日本再生医療学会 平成 27 年 3 月 (横浜市)

3. 外丸靖浩、渡邊 健、太田洋子、小島尚美、関矢一郎、森尾友宏、清水則夫 再生医療の微生物安全性検査：ウイルス・マイコプラズマ同時検出系の開発 日本再生医療学会 平成 27 年 3 月 (横浜市)

国際学会発表

1. Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S.

Applications of mouse models of EBV-associated diseases for the evaluation of novel therapies. The 16th International symposium on Epstein Barr Virus & Associated Diseases. 16-19 July, 2014 Brisbane

2. Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Preclinical studies of novel therapies for Epstein-Barr virus-associated diseases in humanized mouse models.

The 39th Annual International Herpesvirus Workshop. 19-23 July, 2014. Kobe

H：知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
「慢性活動性 EB ウイルス感染症とその類縁疾患に対する革新的治療薬を実現するための
独創的開発基盤」

分担研究報告書

慢性活動性EBウイルス感染症の病態解明を通じた治療法の開発に関する研究

研究分担者 森尾友宏 東京医科歯科大学大学院 発生発達病態学分野
研究協力者 高島健浩 愛媛大学大学院医学系研究科 小児医学講座
山下 基 東京医科歯科大学大学院 発生発達病態学分野

研究要旨

慢性活動性 EB ウイルス(EBV)感染症あるいは EB ウイルス関連リンパ腫においては何らかの遺伝子異常が想定されているものの、その同定には至っていない。今回の研究では同疾患を呈した免疫不全症患者及びその家族検体を用いて全エクソン解析を行った。3 家系で行った検討の結果、1 家系では NFκB2 変異が同定され、もう 1 家系では血球系の分化に関与する転写因子においての変異が同定された。患者はいずれも複合型免疫不全症に近い分類不能免疫不全症を基礎疾患として有しており、今後さらに同様の症例の蓄積について検討を進める予定である。

A. 研究目的

慢性活動性 EB ウイルス感染症(以下 CAEBV)や家族性 EBV 関連リンパ腫においては、なんらかの遺伝的背景があること(加えて環境要因により発症すること)が予想されているが、明らかな遺伝形式を示す家族例が極めて少ないことと、疾患数も限られていることなどから、未だに責任遺伝子同定には至っていない。一方近年、EBV 感染症に脆弱性を示す疾患として、SH2D1A, XIAP, ITK, MAGT1, CD27 などの欠損症が明らかになりつつあり、これらの疾患で共通する免疫異常も同定されはじめている。

本年度は CAEBV や家族性 EBV 関連リンパ腫の責任遺伝子、関連遺伝子を同定することを目的として、研究を進めた。

B. 研究方法

1. 検体

CAEBV を合併する原発性免疫不全症患者を対象とした。患者本人および、できるだけ情報が得られるように両親兄弟姉妹検体を集積した。検体としては唾液あるいは血液を用いた。唾液は Oragene に採取して核酸を抽出し、血液

は EDTA-2Na 2-5mL から QIAGEN DNA extraction kit を用いて核酸を抽出した。

2. 免疫学的解析

患者に対しては Fortessa を用いて 10 color 12 parameter 解析を行い、患者に特異な免疫異常についての情報を取得した。

3. 全エクソン解析

常法を用いて全エクソン領域を capture して library を作成し、Illumina HiSeq 1000 あるいは 2000 を用いて、塩基配列情報を得た。No call rate (read depth <10)は 5%未満であり、SNV を抽出して non-synonymous mutation, Indel 情報を獲得し、公開されている SNP database (dbSNP および日本版)にリストアップされていないものにつきリストを作成した。血縁者の情報からさらに疾患関連遺伝子を絞り込んだ。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断や責任遺伝子産物解析、機能解析にあたっては、各種臨床研究指針や遺伝子解析に関わる指針を遵守して、患者および家族への説明と同意の下に実施した。本研究についてはまた、東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会

及び、遺伝子解析に関わる倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1. 今回は具体的には2名の分類不能免疫不全症(common variable immunodeficiency: CVID)、1名の家族性EBV関連リンパ腫患者を中心として検討を行った。詳しく解析が行えた1名のCVID(CAEBV-CVID1)では2005年にCD4, CD8各群にCD3/CD28刺激を加え、expression profilingを行ったが、原因同定には至っていない。免疫不全症に加えて、EBV陽性Hodkinリンパ腫を発症した。EBVには持続感染しており、リンパ球減少が続き、肺炎を反復し最終的に逝去された。もう1名のCAEBV-CVID2については解析を継続しているところである。EBV関連リンパ腫家系では、母親と子供(移植後生存)検体と、その家族検体を中心として検索を行った。

2. 免疫学的検査においてはCAEBV-CVID1ではリンパ球数全体の減少が著明であり100-200/mm³にて推移した。B細胞における記憶B細胞分画は減少しており、CD4細胞各亜群の減少を認めた。CAEBV-CVID2においては同様にCD27+記憶B細胞の減少を認めた。NKT細胞は減少していた。一方家族性リンパ腫症例では、詳細なリンパ球亜群解析で認められるのはB細胞欠損のみであり、またIgG, A, Mは正常であった。

3. CAEBV-CVID1およびEBV関連リンパ腫において全エクソン解析をおこなったところ、前者ではNFκB2遺伝子異常が、後者では血球系の分化に関与する転写因子においての変異が同定された。後者はautosomal dominant traitでありそのほか7-8の候補遺伝子が存在する。

D. 考察

過去の症例においてはFanconi貧血の責任遺伝子が同定された経緯がある。この症例ではCAEBVが前面にでるものの、軽度の低身長や軽度の汎血球減少を認め、表現型とも矛盾しなかった。免疫不全症におけるCAEBVリスクは算定されていないが、おそらくは健常人に比しては高いものと予想される。

一方今回CAEBV-CVID1において判明した遺伝子異常については、分類不能免疫不全症の新

しい責任遺伝子として知られており、今後CAEBVとの関連について詰めていく必要がある。直接的に特にEBVに関する脆弱性を示すか、あるいはヘルペス属や他のウイルスにも共通する免疫異常なのかは今後詰めていく必要がある。

家族性EBV関連リンパ腫については、今後腫瘍発生との関連につきiPS細胞、knock inシステム等において解析が必要である。

免疫不全症を背景としたCAEBV、EBV関連リンパ腫の分子的背景を探ることにより病態解明につながり、また発症機序を明らかにすることによって、新しい治療法の開発や、リスク群の抽出、また発症・進展予防等にもつながるものと期待している。

E. 結論

免疫不全症を背景として発症したCAEBVおよび家族性EBV関連リンパ腫の免疫学的解析から、非特異的な免疫異常が存在することが示された。家系も含めた全エクソン解析により、1例では既知のCVID責任遺伝子が同定され、1例は検討中、もう1例のリンパ腫症例では候補遺伝子の抽出に至っている。今後の同様の症例の蓄積、および機能解析から、革新的治療法の開発につながる可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mitsuiki N, Yang X, Bartol S.J.W, Grosserichter-Wagener C, Kosaka Y, Takada H, Imai K, Kanegane H, Mizuani S, van der Burg M, van Zelm M.C., Ohara O, and **Morio T**. Mutations in Bruton's tyrosine kinase impair IgA responses. (in press) *Int. J. Hematol.* 2015.
2. Oshima K, Imai K, Albert MH, Bittner TC, Strauss G, Filipovich AH, **Morio T**, Kapoor N, Dalal J, Schultz KR, Casper JT, Notarangelo LD, Ochs HD, Nonoyama S. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for X-Linked Thrombocytopenia With Mutations in the WAS gene. (in press) *J Clin Immunol.* 2015.
3. Yamazaki Y, Yamada M, Kawai T, **Morio T**,

- Onodera M, Ueki M, Watanabe N, Takada H, Takezaki S, Chida N, Kobayashi I, Ariga T. Two Novel Gain-of-Function Mutations of STAT1 Responsible for Chronic Mucocutaneous Candidiasis Disease: Impaired Production of IL-17A and IL-22, and the Presence of Anti-IL-17F Autoantibody. *J Immunol.* **193**:4880-7, 2014.
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 Investig Allergol Clin Immunol.* **24**:200-2, 2014.
 5. Mori M, **Morio T**, Ito S, Morimoto A, Ota S, Mizuta K, Iwata T, Hara T, Saji T. Risks and prevention of severe RS virus infection among children with immunodeficiency and Down's syndrome. *J Infect Chemother.* **20**:455-9, 2014.
 6. Matsubara Y, Chiba T, Kashimada K, **Morio T**, Takada S, Mizutani S, Asahara H. Transcription activator-like effector nuclease-mediated transduction of exogenous gene into *IL2RG* locus. *Scientific Reports.* **4**:5043, 2014.
 7. Mori M, Onodera M, Morimoto A, Kosaka Y, **Morio T**, Notario GF, Sharma S, Saji T. Palivizumab Use in Japanese Infants and Children with Immunocompromised Conditions. *Pediatr Infect. Dis. J.* **33**:1183-5, 2014.
 8. Endo A, Watanabe K, Ohye T, 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. *Clin. Infect. Dis.* **59**:545-8, 2014.
 9. 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, Homma 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.* **49**:1155-61, 2014.
 10. Marciano BE, Huang CY, Joshi G, Rezaei N, Carvalho BC, Allwood Z, Ikinogullari A, Reda SM, Gennery A, Thon V, Espinosa-Rosales F, Al-Herz W, Porras O, Shcherbina A, Szaflarska A, Kiliç S, Franco JL, Gómez Raccio AC, Roxo P Jr, Esteves I, Galal N, Grumach AS, Al-Tamemi S, Yildiran A, Orellana JC, Yamada M, **Morio T**, Liberatore D, Ohtsuka Y, Lau YL, Nishikomori R, Torres-Lozano C, Mazzucchelli JT, Vilela MM, Tavares FS, Cunha L, Pinto JA, Espinosa-Padilla SE, Hernandez-Nieto L, Elfeky RA, Ariga T, Toshio H, Dogu F, Cipe F, Formankova R, Nuñez-Nuñez ME, Bezrodnik L, Marques JG, Pereira MI, Listello V, Slatter MA, Nademi Z, Kowalczyk D, Fleisher TA, Davies G, Neven B, Rosenzweig SD. BCG vaccination in patients with severe combined immunodeficiency: Complications, risks, and vaccination policies. *J Allergy Clin Immunol.* **133**:1134-41, 2014.
 11. Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama E, **Morio T**, Shimizu N, Wakiguchi H: Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatr Int.* **56**:159-66, 2014.
 12. 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.* **56**:510-4, 2014.
2. 学会発表
 1. 森尾友宏：免疫不全症・異常症におけるリンパ球亜群解析、ヒューマンイムノロジー

フォーラム、京都、2014年12月13日

2. 森尾友宏：感染防御におけるサイトカインの働き、第46回日本小児感染症学会総会・学術集会（教育講演）、東京、2014年10月18日
3. 森尾友宏：感染症の制御を目指した病原体と宿主へのアプローチ：過去から未来へ、平成26年度第6回茨城県小児科医会学術講演会、土浦、2014年10月16日
4. 森尾友宏：原発性免疫不全症からみる Common Disease: 病態解析及び治療の最近の進歩、第42回日本臨床免疫学会総会、東京、2014年9月25日
5. 森尾友宏：免疫応答の遮断により惹起される感染症：背景の理解から臨床へ、第6回

KOCS 小児リウマチ研究会（招待講演）、博多、2014年5月31日

6. 森尾友宏：Overview2 ヒトリンパ球解析の現状と展望、日本リウマチ学会総会（シンポジウム(ヒト免疫とリウマチ性疾患)）、東京、2014年4月26日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

CAEBV および類縁疾患の病態解明：蚊刺過敏症を中心にして

研究分担者氏名；谷内江昭宏 所属；金沢大学医薬保健研究域医学系小児科 職名；教授

研究要旨

EBV 関連リンパ増殖性疾患の中でも蚊刺過敏症は特異な臨床像と病態を示す。しかし、その発症機序や分子病態については不明の点が多く、有効な早期治療介入や造血幹細胞移植などの根本治療を行うタイミング決定は難しい。本研究では、蚊刺過敏症診断のための、リンパ球表面抗原解析、好塩基球活性化試験ならびに蚊抗原刺激による IFN- γ 産生などの検査指標の有用性を検討した。蚊刺過敏症 5 例の検討では、いずれも蚊特異 IgE 抗体価の異常高値、好塩基球活性化試験陽性など、蚊抗原に対する即時型アレルギーの存在が示された。同時に、末梢血リンパ球解析では HLA-DR 抗原を強く発現する NK 細胞の増殖が例外なく認められた。EBV 抗原の存在を EBER-1 ISH 法で確認すると、活性化 NK 細胞への選択的 EBV 感染が確認された。患者 T 細胞を蚊抗原で刺激することにより、培養上清中への IFN- γ 産生が誘導された。これらの結果より、蚊刺過敏症患者においては IgE を介した即時型アレルギー、T 細胞を介した炎症性サイトカイン産生、さらに NK 細胞活性化による強い組織傷害など、多様な炎症病態が関与していることが明らかとされた。以上、蚊刺過敏症の多様な早期診断指標と、早期治療介入標的が明らかにされた。

A. 研究の目的

EBV 関連リンパ増殖性疾患の中でも蚊刺過敏症は予後不良であること、治療介入の時期決定が困難であることが特徴である。ごく一部に自然寛解する症例があること、早期には蚊刺時以外の症状がほとんどないことなどから、造血幹細胞移植などの強い副作用を伴う治療に踏み切ることが容易ではない。一方で治療時期を逸すると、不可逆的な臓器傷害が進行し、蚊刺過敏症の早期診断と分子病態の解明、早期治療介入のためのあらたな標的分子を見出すことが重要である。本研究では典型的な臨床像を示す蚊過敏症症例を対象に、多様な観点からその分子病態を解析した。

B. 対象と方法

対象：蚊刺による発熱、水疱・壊死・瘢痕

形成を伴う強い皮膚病変、肝機能障害を示す、臨床的に典型的と考えられる蚊刺過敏症 5 例を対象とした。

方法：蚊抗原特異的 IgE は ELISA 法により定量した。蚊抗原は、ヒトスジシマカならびにアカイエカ虫体を購入し、粗抗原を作成した。粗抗原を用いて ELISA プレートを作成、過去に経験した症例の血清を陽性標準液として用いて特異 IgE 抗体の判定量を施行した。好塩基球活性化試験では、蚊粗抗原を用いて末梢血全血を刺激培養した。40 分間の培養後、赤血球を溶解し白血球成分を洗浄、PE 標識 CD63 抗体ならびに FITC 標識 CD203c 抗体で染色し、FCM にて解析した。NK 細胞の活性化は、CD56 ならびに HLA-DR を指標に FCM 法により解析した。NK 細胞への選択的 EBV 感染は、IMag beads 法により NK 細胞を単離、サイトスピン標本を作成した後、EBER-1 in situ hybridization

法により評価した。蚊抗原特異的 T 細胞活性化は、末梢血単核球を蚊抗原にて刺激後し上清中のサイトカインを定量した。

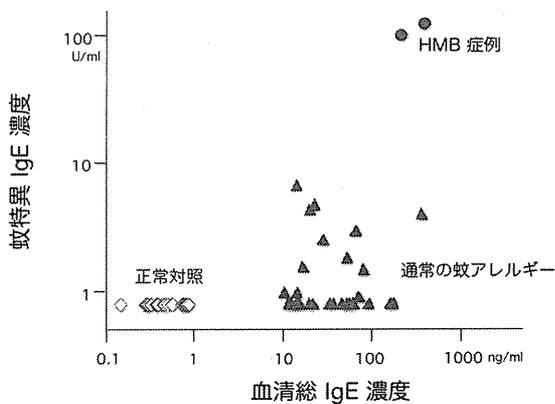
これらの研究計画は金沢大学倫理委員会の審査による承認を受けている。

C. 研究結果

1) 蚊特異 IgE と総 IgE (図 1)

正常対象では蚊特異抗原と反応する IgE は全く検出されなかった。蚊刺で局所腫脹のみと認める症例では低いレベルの蚊特異 IgE が検出された。これらの患者では血清総 IgE 値は高値を示した。一方、蚊刺過敏症の 2 例では総 IgE 値と同時に、蚊特異 IgE 値も著明な高値を示した (図 1)。

図 1. 蚊特異 IgE と血清総 IgE 濃度の比較



2) 好塩基球活性化試験

好塩基球表面の CD203c 発現の増強と顆粒膜蛋白である CD63 発現の出現を 2 カラー FCM 法により評価した (図 2)。これらのプロフィールはコルヒチン治療が奏功すると、次第に正常化した (図 3)。典型例では、ヒトスジシマカあるいはアカイエカ抗原に反応し CD63 抗原を発現、CD203c 抗原発現の増強が観察された。対象とした 5 例ではいずれかの抗原に必ず反応することが確認された (図 3)。

図 2. 好塩基球活性化試験

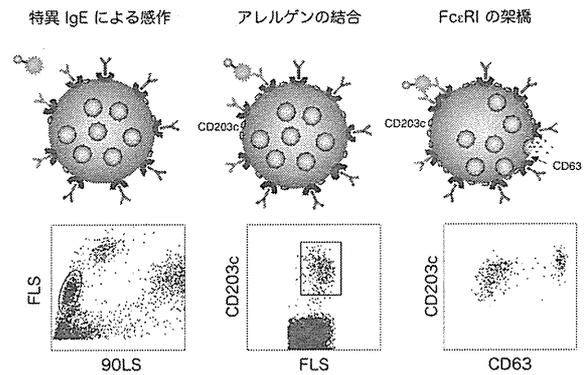
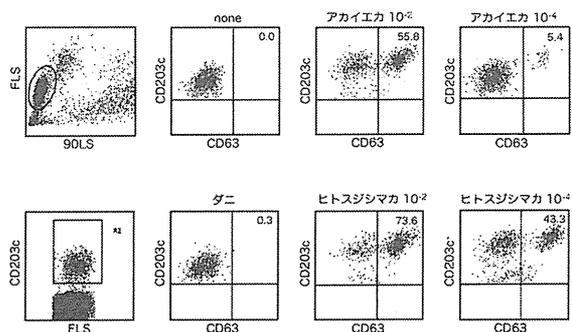
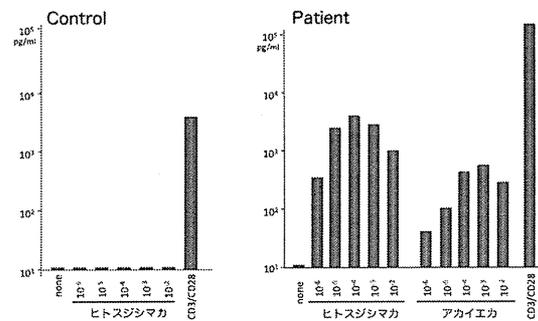


図 3. 蚊抗原刺激による好塩基球活性化



次に、末梢血単核球を蚊抗原で刺激し、上清中のサイトカイン産生を検討した。患者 T 細胞は蚊抗原に反応して強く活性化され、培養上清中に IFN- γ 産生が確認された。

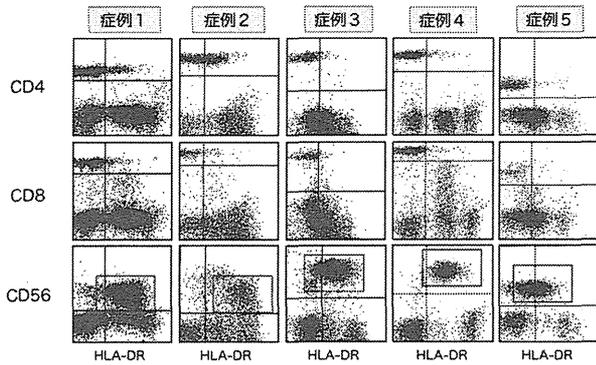
図 4. 蚊抗原刺激による IFN-g 産生誘導



NK 細胞の選択的活性化と増殖を HLA-DR 抗原を指標に FCM 法により検討した。全ての症例で NK 細胞分加画の異常増加と、HLA-DR 抗原の強い発現増強が観察された。一方、CD4⁺T 細胞や CD8⁺T 細胞の活性化は

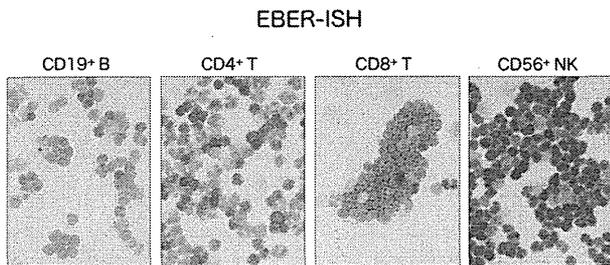
ほとんど観察されなかった（図5）。

図5. NK細胞の活性化と増殖



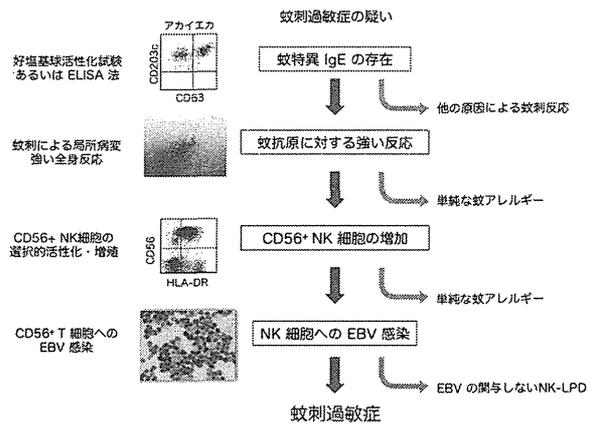
末梢血リンパ球をIMagビーズ法に単離、サイトスピン標本を作成、EBER-1 in situ hybridization法を施行し、EBV感染の有無を検討した。NK細胞のほとんどでEBER-1発現が認められ、EBV感染が確認された。一方、それ以外のリンパ球亜群ではEBV感染は確認できなかった。図6に代表的な症例の結果を示すが、全ての症例で同様の結果が得られた。

図6. リンパ球亜群におけるEBER-1 ISH



以上の検討をもとに、臨床的に蚊刺過敏症が疑われる症例についての早期診断フローチャートの作成を試みたものが図7である。

図7. 蚊刺過敏症診断フローチャート



D. 考察

EBV関連リンパ増殖症としての蚊刺過敏症はまれな疾患であるが、蚊刺に対して局所反応を示す例はしばしば観察される。臨床的にこれらの症例を的確に鑑別し、予後不良疾患である蚊刺過敏症を早期に診断することは重要である。早期には蚊刺を避けることにより症状の進展を遅延させることが可能であり、進行期には時期を間違えずに造血幹細胞移植に踏み切る判断ができる。特徴的な臨床像に加え、蚊抗原特異的なIgEの存在、即時型アレルギー、T細胞活性化、NKの選択的増殖・活性化など、病態に関連した多様な指標が示された。これらの指標は早期診断の指標となるのみでなく、病態進展の指標ともなり、適切な治療選択の基盤となると考えられた。

E. 結論

蚊刺過敏症の診断指標として、多様な検査所見が示された。いずれも疾患の本質に関わるものであり、今後の革新的治療法開発のための基盤となる知見である。

F. 健康危険情報

特になし

1. 論文発表

1. Wada T, Kanegane H, Ohta K, Katoh F, Imamura T, Nakazawa Y, Miyashita R, Hara

J, Hamamoto K, Yang X, Filipovich AH, Marsh RA, Yachie A. Sustained elevation of serum interleukin-18 and its association with hemophagocytic lymphohistiocytosis in XIAP deficiency. *Cytokine*. 2014;65:74-8.

2. 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;74:1579-85.
3. Watanabe Y, Sasahara Y, Satoh M, Looi CY, Katayama S, Suzuki T, Suzuki N, Ouchi M, Horino S, Moriya K, Nanjyo Y, Onuma M, Kitazawa H, Irie M, Niizuma H, Uchiyama T, Rikiishi T, Kumaki S, Minegishi M, Wada T, Yachie A, Tsuchiya S, Kure S. A case series of CAEBV of children and young adults treated with reduced-intensity conditioning and allogeneic bone marrow transplantation: a single-center study. *Eur J Haematol*. 2013;91:242-8.
4. Wada T, Muraoka M, Yokoyama T, Toma T, Kanegane H, Yachie A. Cytokine profiles in children with primary Epstein-Barr virus infection. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60:E46-8.

2.学会発表

1. 榊原康久、村岡正裕、和田泰三、東馬智子、谷内江昭宏. 蚊刺過敏症症例に

おける蚊特異的 IgE の検出：好塩基球活性化試験を用いた解析. 第46回日本小児感染症学会 東京. 2014年10月18日

2. 和田泰三、金兼弘和、太田和秀、谷内江昭宏. XIAP欠損症における血清IL-18の持続高値. 第117回日本小児科学会名古屋. 2014年4月11日

H. 知的所有権の取得状況

特になし

CAEBV 原因遺伝子の同定を目的とする全エクソン配列解析

研究分担者 藤原成悦 国立成育医療研究センター研究所・母児感染研究部・部長

共同研究者 今留謙一 国立成育医療研究センター研究所 母児感染研究部
新井文子 東京医科歯科大学大学院 血液内科
大賀正一 山口大学大学院 小児科学
澤田明久 大阪府立母子保健総合医療センター 血液・腫瘍科

研究要旨 慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症 (CAEBV) の発症の背景には微細な免疫不全が存在し、そのために、抗原性の強いウイルス蛋白質を発現しない EBV 感染 T 及び NK 細胞が免疫監視機構から逃れていると推測される。本分担研究はこのような微細な免疫不全に関わる遺伝子を全エクソン配列決定により同定することを目的とする。現在までに患者 8 名およびその家族 19 名、合計 27 名の唾液由来 DNA のエクソーム解析を終了した。1 名の患者において homozygous に認められた稀少な variation が、Sanger 法によるスクリーニングによりさらに 2 名の患者において homozygous に検出された。この variation の homozygote の野生型 homozygote に対するオッズ比は 5.58 (95% confidence interval=1.58-20.5) と算定された。また、他の患者からは分類不能型原発性免疫不全症の原因遺伝子の heterozygous 或いは homozygous な変異が検出された。

A. 研究目的

慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症 (CAEBV) は、EBV 感染 T あるいは NK 細胞の全身性の増殖を病態の特徴とする。しかし、増殖している細胞は明らかな形態的異型性を示すことが少なく、モノクローナルな増殖を呈する患者に対して特に治療を行わない場合でも、数年間全く進行しない場合がある。これらの所見から CAEBV は、特にその初期においては、腫瘍性疾患とは区別されるべきと考えられる。CAEBV の診断指針によれば、明らかな免疫不全を呈す

る場合は診断から除外される。しかし、詳細な免疫能解析により、CAEBV 患者では T 細胞や NK 細胞の機能低下を示唆する所見が得られている。EBV 感染 T および NK 細胞においては、T 細胞に対して免疫原性の強い EBNA3, EBNA2 などのウイルス蛋白質が発現されないため、軽度の免疫不全状態でも免疫監視機構から逃れることがありうると考えられる。特に LMP2 特異的な細胞傷害性 T 細胞が存在しないという知見は、この蛋白質が EBV 感染 T/NK 細胞が発現する数少ない T 細胞抗原であることを考える

と重要であると考えられる。サイトメガロウイルスに対する細胞免疫能も低下しているという報告もあり、本症が免疫不全を下地として発症する可能性は高いと考えられる。CAEBV が日本、韓国、中国北部など東アジアにほぼ限局的に発生することは、発症に遺伝的素因が関わることを強く示唆している。近年、原発性免疫不全症の原因遺伝子探索が進展し、新たな原因遺伝子が次々に同定されているが、EBV など特定のウイルスに対して特に易感染性を示す免疫不全症も多く報告されている。最近になり、分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency (CVID)) の患者 199 名のうち 4 名が CAEBV と区別できない臨床像を呈することが報告され、遺伝子の異常による免疫不全が本疾患の発症につながることが確実となった。従って、CVID との合併症例以外の CAEBV 患者においても、何らかの遺伝子異常により限局的な免疫不全状態となり、EBV 感染 T 細胞・NK 細胞の増殖が許容されることが強く疑われる。以上よりエクソーム解析による原因遺伝子或いは背景遺伝子の解明を計画した。

B. 研究方法

1. CAEBV 患者

CAEBV の診断は EB ウイルス感染症研究会が策定した診断指針によった。患者 8 名とその家族 19 名の合計 27 名から提供を受けた DNA を用いてエクソーム解析を行った。また、エクソーム解析により見出された候補遺伝子について、他の CAEBV 患者においてサンガー法による解析を行った。

2. DNA 採取

CAEBV においては EBV 感染 T あるいは NK 細胞がモノクローナルあるいはオ

リゴクローナルに増殖しており、末梢血中にはこのような感染細胞が多数含まれている。これらの細胞は多数回の分裂を経ているためすでに体細胞変異を蓄積している可能性が高い。体細胞変異の存在は発症の根本的原因となる germ line あるいは de novo 変異 (variation) の検出を困難にすると考えられたため、本研究では唾液から Oragene DNA 採取キットを用いて抽出した DNA を用いた。また、継続的な DNA 使用を可能とするため末梢血から EBV によるリンパ芽球様細胞株を樹立した。

3. 全エクソン配列解析

全エクソン領域のライブラリー作成には Agilent 社 SureSelect Human All Exon V4 キットを用いた。エクソン部分の配列解析は illumina 社 HiSeq 1000 を用いた。得られた配列データをアラインメントプログラム BWA によりヒトゲノム配列 hg19 上に位置づけ、Genome analysis toolkit (GATK) などにより 1,000 ゲノムプロジェクト、dbSNP、HapMap、in house database などのデータと照合し変異を検出した。検出される変異については、SIFT や PolyPhen 2 等のプログラムによりその変異が蛋白質機能に与える影響を推定した。

(倫理面への配慮)

全エクソン配列解析は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則って行われた。研究計画書は国立成育医療研究センターおよび DNA 採取機関の倫理委員会による審査を受け承認されている。患者本人あるいは保護者に対して本研究に関する十分な説明を文書と口頭で行い、自由意思による同意書への署名を得ることによりインフォームドコンセントを取得した。試料、DNA 配列データお

よび臨床情報は匿名化され、患者の個人情報情報は厳重に管理された。血液の提供を受ける場合は、通常の診療に必要なとされる採血の際に余分に血液を採取することにより針刺しによる苦痛の軽減を図った。

C. 研究結果

これまでに CAEBV 患者 8 名およびその家族 19 名、合計 27 名の唾液 DNA のエクソーム解析を終了した。1 名の患者において homozygous に認められた希少な variation が、Sanger 法によるスクリーニングでさらに 2 名の患者において homozygous に検出された。この variation の homozygote の野生型 homozygote に対するオッズ比は 5.58 (95% confidence interval=1.58-20.5) と算定された。

一人の患者では、*TNFRSF13C* 遺伝子の heterozygous な variation が認められた。この variation は sift score=0.51、Polyphen2 スコア=0.891 で、蛋白質機能に影響を与える可能性が高いと考えられた。1,000 ゲノムデータベースにおける頻度は 0.05 であった。本遺伝子については heterozygous な変異でも分類不能型免疫不全症を発症したという報告があり興味深い。また別の患者において *LRBA* 遺伝子の homozygous な variation が見出された。*LRBA* 遺伝子も分類不能型免疫不全症原因遺伝子の 1 つとして報告されている。しかし、1,000 ゲノムにおけるこの variation の頻度は 0.15 とされており、CAEBV の頻度との整合性は考えにくい。またこの患者においては、*TNFRSF13B* 遺伝子の 1,000 ゲノムデータベースに記載のない variation が heterozygous で見出された。本遺伝子も分類不能型免疫不全症原因遺伝子の 1 つであり、heterozygous な変異でも発症することが報告されている。

D. 考察

CAEBV 患者 3 名で見つかった希少 variation は、本疾患の原因あるいは背景遺伝子の有力な候補と考えられる。現在この variation の機能的解析を行っている。CAEBV は、発症年齢と進行のスピード、合併症の有無とその種類等に関してきわめて多様性に富むため、患者により異なる原因遺伝子が存在することも十分考えられる。この variation が 3 名の患者において原因遺伝子となる可能性があると考えられる。

上記の variation 以外には複数の患者で共通して見出された変異 (variation) はみつかっていない。しかし、*TNFRSF13C*、*LRBA*、*TNFRSF13B* など分類不能型免疫不全症の原因となる遺伝子の variation が複数検出されたことは、分類不能型免疫不全症患者の中には CAEBV と区別できない臨床像を示す例が複数存在するという報告を考えるときわめて興味深い。

E. 結論

患者 8 名およびその家族 19 名、合計 27 名の唾液由来 DNA のエクソーム解析を終了した。1 名の患者において homozygous に認められた希少な variation が、Sanger 法によるスクリーニングでさらに 2 名の患者において homozygous に検出された。この variation の homozygote の野生型 homozygote に対するオッズ比は 5.58 (95% confidence interval=1.58-20.5) と算定された。また、他の患者からは分類不能型原発性免疫不全症の原因遺伝子の heterozygous あるいは homozygous な変異が検出された。

F. 健康危機情報

該当なし。