

II 委託業務成果報告（業務項目）

Helper-dependent adenovirus/adenovirus-associated virus hybrid vector を用いた遺伝子修復療法の開発

高田英俊^{1,2}、山元裕之¹、石村匡崇¹、落合正行¹、楠原浩一³、中津可道⁴、續輝久⁴、
相澤絵美⁵、三谷幸之介⁵、Andre Liever⁶、原寿郎¹

¹九州大学大学院医学研究院成長発達医学 ²九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学

³産業医科大学小児科

⁴九州大学大学院基礎放射線医学(分子遺伝学)

⁵埼玉医科大学ゲノム医学研究センター

⁶ Division of Medical Genetics, Department of Medicine, University of Washington

研究要旨

X連鎖無ガンマグロブリン血症は、*BTK* 遺伝子変異により B 細胞の分化障害を来す原発性免疫不全症である。この疾患では、造血幹細胞の一部で変異遺伝子を修復することができれば、その細胞由来の B 細胞系細胞が増殖優位性を獲得するため、有効な治療になり得る。ヘルパー依存型アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクター (HD-Ad.AAV ベクター) は、造血幹細胞に感染性を示す Ad5/35 キメラベクターと、相同組み換えによる目的遺伝子座領域での targeting による修復をおこす AAV ベクターの両者の長所を備えている。我々は *BTK* 遺伝子の exon6-19 とその隣接遺伝子 *TIMM8A* を含むゲノム領域、および EGFP/ Hygromycin (Hyg) 耐性遺伝子を搭載した HD-Ad.AAV.*BTK* ベクターを作製した。このベクターをヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に感染させたところ、10%の細胞で一過性の GFP 発現を認めた。また、このベクターを感染させた臍帯血由来 CD34 陽性細胞から 755 個の Hyg 耐性赤芽球コロニーを得て、そのうち 4 個のコロニーで *BTK* 遺伝子座における相同組み換えを認めた。同様に感染させた CD34 陽性細胞から分化誘導した CD19 陽性細胞においても相同組み換えを検出した。本ベクターにより相同組み換えによる *BTK* 遺伝子の変異修復を行える可能性を示した。

A. 研究目的

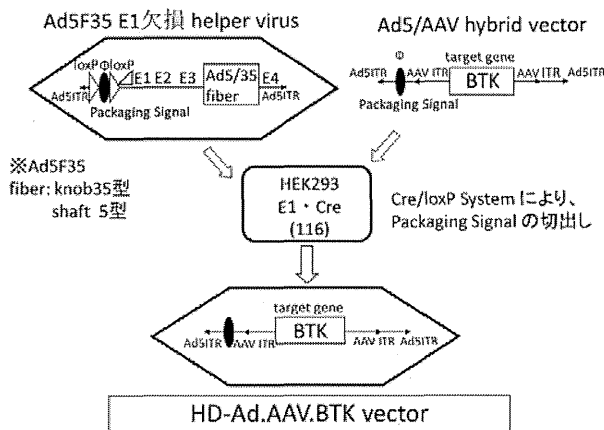
X連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) は、X 染色体長腕に位置する Bruton's tyrosine kinase (*BTK*) 遺伝子変異によって生じる B 細胞の分化障害が原因である。この疾患では、細菌性肺炎などの重症感染症を繰り返し、生涯にわたってガンマグロブリンを補充する必要がある。また合併症として消化器がんなどの悪性腫瘍や、進行性のウイルス性脳炎を起こすこともあることも重要な問題である。原発性免疫不全症に対する遺伝子治療が開発され、海外では改良されたベクターを用いた治療応用がなされてきているが、ベクター由来遺伝子の Random integration による発

がんが問題になっている。即ち遺伝子導入ではなく、変異した遺伝子部分を正常に修復する方法が望まれる。今回、造血幹細胞に感染性を示す Ad5/35 キメラベクターと、相同組み換えによる目的遺伝子の修復を起こすアデノ随伴ウイルスベクターとの両者の長所を備えているヘルパー依存型アデノ・アデノ随伴ウイルス (HD-Ad.AAV) ハイブリッドベクターを用いて、*BTK* 遺伝子の相同組み換えによる遺伝子修復の可能性について、臍帯血 CD34 陽性細胞をターゲットとして検討を行った。

B. 研究方法

ヘルパーウイルス、および Ad5/AAV ハイブリッドベクターはワシントン大学の Lieber 教授より供与を受けた。BTK 遺伝子の exon6-19 領域および GFP-Hyg 耐性遺伝子を搭載した HD-Ad. AAV. BTK ベクターを作製した (図 1)。

(図 1) HD-Ad. AAV. BTK Vector の作製方法



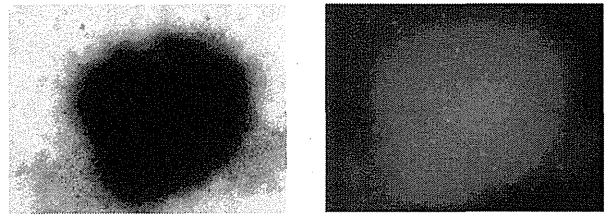
このベクターを男性 Pre-B ALL 由来細胞株である Nalm6 に MOI 4000 で感染させ、Single cell cloning により Hyg 耐性株を得た。得られたクローンを用いて、PCR および Southern blotting により相同組み換えを検出する方法を確立した。相同組み換えが確認された細胞は、BTK 蛋白を正常に発現していた (Data not shown)。

ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞にこのベクターを感染させ、相同組み換えがおこったクローン検出を、コロニーアッセイ法を用いて行った。平行して、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞にベクターを感染させた後、SCF, FLT3-L, IL-7 などのサイトカインおよびヒト間葉系幹細胞培養上清の存在下に B 細胞系細胞に分化させ、相同組み換えの頻度を検討した。

C. 研究結果

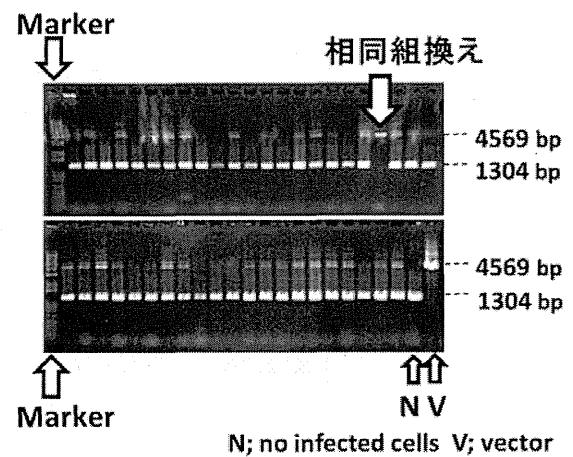
ヒト CD34 陽性細胞にベクターを感染させコロニー解析を行ったところ、出現するコロニーは BFU-E がほとんどであった。相同組み換えがおこったコロニーは、導入された GFP 遺伝子が発現していることが蛍光顕微鏡で確認された (図 2)。

(図 2) 相同組み換えが確認された BFU-E



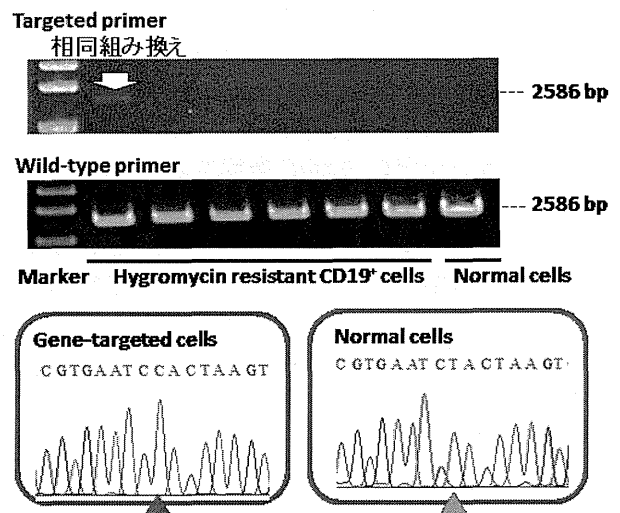
Hyg 耐性を示す BFU-E を対象として相同組み換え効率を検討した。15 回のアッセイで、CD34 陽性細胞総数 1.5×10^7 個の細胞へ感染させた結果、4 個の BFU-E で相同組み換えを確認した (図 3)。

(図 3) BFU-E における相同組み換えの確認



また、ヒト CD34 陽性細胞にベクターを感染させた後、B 細胞系細胞へ分化させた。15 回のアッセイで、CD34 陽性細胞総数 1.8×10^7 個の細胞へ感染させた結果、5 回のアッセイで相同組み換えを確認した (図 4)。

(図 4) CD19 陽性細胞における相同組み換え



D. 考察

近年、CRISPR/Cas9 システムやTALEN といった部位特異的ヌクレアーゼを用いた遺伝子改変が行われている。しかし、ヌクレアーゼによる遺伝子切断が必ずしも特異的な場所で起こらないこと、ドナーベクター由来の遺伝子自体を切断する可能性があることなどの問題点が指摘されている。この研究は遺伝子切断をしない方法で、造血幹細胞に対する遺伝子修復法開発に向けた研究であり、実際に、遺伝子相同組み換えが確認された。今後は、遺伝子相同組み換えの頻度をあげるための工夫が必要であると考えられる。

E. 結論

Helper-dependent adenovirus/ adeno-associated virus hybrid vector を用いて、B 細胞株 Nalm6 で Hyg 耐性株で相同組み換えを証明した。全ての相同組み換え株で BTK 蛋白発現を認めた。正常ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を用いてコロニーアッセイを行い、GFP 陽性 Hyg 耐性コロニーを得て、ベクターゲノムの Integration を証明した。同様に、ヒト CD34 陽性細胞にベクターを感染させた後 B 細胞系へ分化させた細胞でも相同組み換えを確認した。本ベクターにより、相同組み換えによる *BTK* 遺伝子の変異修復を行える可能性を示した。

F. 研究発表

1. Koga Y, Takada H, Suminoe A, Ohga S, Hara T. Successful treatment of non-Hodgkin's lymphoma using R-CHOP in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome followed by a reduced-intensity stem cell transplant. *Pediatr Transplant.* 2014 Sep;18(6):E208-11.
2. Early progression of atherosclerosis in children with chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome. Yamamura K, Takada H, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Morihana E, Ohga S, Hara T. *Rheumatology (Oxford).* 2014 Oct;53(10):1783-7.
3. Efficacy and safety of IgPro20, a

subcutaneous immunoglobulin, in Japanese patients with primary immunodeficiency diseases. 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. *J Clin Immunol.* 2014 Feb;34(2):204-11.

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

慢性皮膚粘膜カンジダ症をきたす STAT1 新奇変異の同定と病態解析

担当責任者	有賀 正	北海道大学大学院医学研究科 小児科学分野
担当協力者	山田 雅文	北海道大学大学院医学研究科 小児科学分野
	小林 一郎	北海道大学大学院医学研究科 小児科学分野
	竹崎俊一郎	北海道大学大学院医学研究科 小児科学分野
	植木 将弘	北海道大学大学院医学研究科 小児科学分野
	千田奈津子	北海道大学歯学研究科小児・障害者歯科学教室
	山崎 康博	北海道大学大学院医学研究科 小児科学分野

研究要旨: STAT1 のヘテロ機能獲得型変異が慢性皮膚粘膜カンジダ症をきたすことが報告され、これまでに STAT1 coiled-coil 領域に 21 アミノ酸変異, DNA 結合領域に 9 アミノ酸変異が報告されてきた。我々は以前 DNA 結合領域の変異を世界に先駆けて報告したが、今回さらに 3 名の患者に 2 つの新奇変異を Coiled-coil 領域, DNA 結合領域に同定し報告した。新奇変異も過去の報告と同様に STAT1 脱リン酸化障害をきたすことを示し、さらに変異と野生型 STAT1 がヘテロで存在する状況において、野生型 STAT1 の脱リン酸化障害も引き起こされることを見出した。これは変異と野生型 STAT1 の 2 量体構造の異常が脱リン酸化障害に関与していることを示唆する。脱リン酸化のメカニズムに関してはまだ不明な点が多く残されているが、より詳しく解明し特異的で安全性の高い創薬開発につなげたい。

A. 研究目的

慢性皮膚粘膜カンジダ症 (Chronic mucocutaneous candidiasis; CMC) は、皮膚・爪、口腔外陰部などの粘膜に、反復性・持続性のカンジダ感染を呈する原発性免疫不全症である。2011年、*STAT1*のヘテロミスセンス変異がCMCを引き起こす事が報告された(Liu et al. 2011 JEM, van de Veerdonk et al. 2011 NEJM)。この変異はSTAT1の脱リン酸化障害を生じる機能獲得型変異であり、これまで計30変異が報告され

ている。

STAT1変異によるCMC患者は通常抗真菌剤の予防内服で感染のコントロールがつき、予後もそれほど悪くない患者が多いが、中には感染コントロールに難渋する者や、脳血管障害や自己免疫疾患など感染症以外の症状に悩まされる患者も存在する。その場合根治治療として他の免疫不全症と同様に造血幹細胞移植が考えられるが、過去にSTAT1変異CMC患者で造血幹細胞移植を行った症例報告は1例あり、また国際会議などでも症例報

告が散見されるが、他の免疫不全症に比べて結果が思わしくないようである。

当科でも18歳女性のSTAT1変異CMC患者で繰り返す肺炎に悩まされ、また同じ変異を有する父が32歳で脳血管炎で死亡していることから、話し合いを重ねた末に造血幹細胞移植を行った。しかし残念ながら移植後3日目にシクロフォスファミドによるものと考えられる心筋炎のため死亡した。これまでのところSTAT1変異CMC患者の根治治療はまだ確立されていない。

我々は3例のCMC患者のSTAT1に2つの未報告ヘテロアミノ酸置換を認めたため、その機能解析を行った。またCMCをきたすSTAT1変異は脱リン酸化障害をきたすと報告されているが、そのメカニズムに関してはまだ不明な点が残されている。我々はそのメカニズムをさらに調べ、特異的で安全な治療法の開発につなげたいと考えた。

B. 研究方法

【患者背景】 これまでに報告のない*STAT1* c.832A>G/A (p.K278E) と、*STAT1* c.1151G>G/A (p.G384D)を、CMC患者2家系3症例に認めた。p.K278Eを有するP1は20歳女性で、1歳時より反復性鷲口瘡を発症し、18歳でカンジダ食道炎を発症した。CMCの家族歴はなく両親の*STAT1*に変異は認めなかった。p.G384Dを有するP2, P3は母子で、P2は35歳女性、乳児期より反復性鷲口瘡を発症し、19歳時にカンジダ食道炎による食道狭窄症を発症しバルーン拡張術を受けた。P3は5歳男児で、1歳時に反復性鷲口瘡を発症し爪カンジダ症も認めた。P3の父にCMCは認めなかった。

STAT1 の K278E,G384D は種間を超えてよく保存されたアミノ酸で、p.K278E, p.G384D はデータベース上、変異またはSNPとの報告はなかった。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断や責任遺伝子産物解析等にあたりは、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、患者への説明と同意の下に実施した。本研究については北海道大学医学部倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

EB ウィルス不死化細胞株(EB-LCL)のIFN γ 刺激によるIL-6産生量をCytometric Beads Arrayで調べたところ、健常者のものと比べて患者で高くSTAT1機能の亢進が示唆された。またEB-LCLのIFN γ またはIFN α 刺激でのリン酸化STAT1をウェスタンブロットで確認したところ健常者よりも患者で強く、それはHeLa細胞へのtransfection実験でも確認された。さらにSTAT1の脱リン酸化状態に関して評価するため、チロシンキナーゼ阻害剤であるstaurosporine処理を行ったところ、ウェスタンブロットで変異STAT1の脱リン酸化の遅延を認めた。以上よりSTAT1 p.K278Eと、p.G384DはCMCをきたす新奇変異であると考えられる。

これまでの報告では野生型STAT1と変異STAT1が共存する状況での野生型STAT1のリン酸化についての報告はなかった。それはSTAT1を欠損した細胞株にSTAT1をtransfectし評価を行っていたた

めである。我々は HeLa 細胞の内因性野生型 STAT1 と、transfect した STAT1 を区別するため STAT1 の C 端に GFP を結合させ、ウェスタンブロットで内因性野生型 STAT1 と、transfect した STAT1 を分離し評価した。変異 STAT1 を transfect した場合、内因性野生型 STAT1 のリン酸化も増強し、また脱リン酸化の遅延を来す事を発見した。

D. 考察

内因性野生型 STAT1 が変異 STAT1 からどのような影響を受け脱リン酸化障害をきたしたかは証明できていないが、IFNs 刺激により野生型と変異 STAT1 のヘテロダイマーが形成される事から、そのヘテロダイマーが脱リン酸化障害をきたした可能性が推測される。

STAT1 ダイマーは DNA に結合するパラレル構造と、チロシン残基が露出し脱リン酸化を受けやすいアンチパラレル構造をとると考えられている。我々のデータからは、CMC をきたす STAT1 変異はアンチパラレル構造をとりにくくなり脱リン酸化障害をきたす事が推定される。その場合、STAT1 ダイマー構造をアンチパラレル構造にしやすくする薬剤があれば、変異の影響を緩和し、疾患治療に役立つことが期待される。

E. 結論

p.K278E, p.G384D は STAT1 の脱リン酸化障害をきたす新奇変異である事を示した。変異 STAT1 は野生型 STAT1 に影響を与え野生型 STAT1 の脱リン酸化障害をきたすことを示した。

F. 研究発表

- 1) Horino S, Sasahara Y, Satoh M, Niizuma H, Kumaki S, Abukawa D, Satoh A, Imaizumi M, Kanegane H, Kamachi Y, Kobayashi I, Ariga T, Tsuchiya S, Kure S. Selective expansion of regulatory T cells in mixed chimera after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome. *Pediatr Transplant*. 2014.
- 2) Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Hu W, Kobayashi M, Lawo J-P, 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
- 3) 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*. 2014

- 4) Akimoto T, Cho K, Hayasaka I, Morioka K, Kaneshi Y, Furuta I, Yamada M, Ariga T, Minakami H. Hereditary interstitial lung diseases manifesting in early childhood in Japan. *Pediatr Research* 2014
- 5) 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.* 2014
- 6) Chida N, Kobayashi I, Takezaki S, Ueki M, Yamazaki Y, Garelli S, Scarpa R, Horikawa R, Yamada M, Betterle C, Notarangelo L, Ariga T. Disease specificity of anti-tryptophan hydroxylase-1 and anti AIE-75 autoantibodies in APECED and IPEX syndrome. *Clinical Immunology* 2014
- 7) Okura Y, Kawamura N, Okano M, Toita N, Takezak S, Yamada M, Kobayashi I, Ariga T. *Fusarium falciforme* infection in a patient with chronic granulomatous disease . *Pediatr Int* in press.
- 8) Okura Y, Yamada M, Kobayashi I, Kuribayashi F, Ariga T. Monocyte/macrophage-specific NADPH oxidase contributes to antimicrobial host defense in X-CGD. *J Clin Immunol* in press.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

「抗体産生不全症」の病態解明と新規治療法開発に関する研究

担当責任者	森尾友宏	東京医科歯科大学大学院・発生発達病態学分野
担当協力者	満生紀子	東京医科歯科大学大学院・発生発達病態学分野
	山下 基	東京医科歯科大学大学院・発生発達病態学分野
	遠藤英里	東京医科歯科大学大学院・発生発達病態学分野
	今井耕輔	東京医科歯科大学・茨城県小児周産期地域医療学講座
	高島健浩	愛媛大学医学部・小児科

研究要旨

分類不能型免疫不全症を代表とする抗体産生不全症の病態を解析し、また原発性免疫不全症に対する新しい補充療法や、造血細胞移植前処置の至適化について検討を加えた。その結果、BTKの新しい役割(IgAクラススイッチへの関与)が明らかになった。Jacobsen症候群検体を用いて11q23~テロメアに存在する抗体産生に重要な可能性のある遺伝子を明らかにした。免疫不全症に対する将来的な新しい治療法の有用性はin vitroで検証され、造血細胞移植については骨髄非破壊的前処置において工夫を加えて治療法を開始し、良好な成績を得た。

A. 研究目的

本研究では抗体産生不全症、特に分類不能免疫不全症(Common variable immunodeficiency: CVID)に焦点をあて、原因が不明なものに対しては、責任遺伝子探索及び候補責任遺伝子産物の機能解析を行い、病態を明らかにすることを目的とする。また一部で抗体産生不全を呈するが原因が明らかになっていない症候群において、抗体産生不全の原因を探索する新しい治療方法として、機能欠損型の異常に対しては、責任遺伝子産物をタンパク導入の形で補完することにより、一時的機能回復をはかる方策を模索することも目的とする。また現行の造血細胞移植が必要な重症型の免疫不全症に対しては、移植方法の至適化をはかることも目的として研究を進める。

B. 研究方法

1) 拡散抽出

DNA抽出キット(QIAGEN)を用いてPBMCからgenomic DNAを精製した。RNAはRNA抽出キット(QIAGEN)を用いて用意した。

2) 遺伝子解析

・既知遺伝子解析

既知遺伝子についてはSanger法により遺伝

子変異の有無を解析した。

・CGH法(comparative genomic hybridization)(Jacobsen症候群患者1名)

抽出したgenomic DNAを2μg利用して解析を実施した。約270万個のプローブを搭載したオリゴヌクレオチドSNPアレイを使用してゲノムコピー数とLoss of Heterozygosity(LOH)領域の解析を行い、染色体レベルの物理サイズで起きたコピー数の減少(loss)、過剰(gain)、増幅(amplification)を決定した。

・全エクソン解析(健常人およびJacobsen症候群患者1名)

PBMCから抽出したgenomic DNAを2μg用いて解析を実施した。エクソンの部分配列DNAプローブにハイブリダイズされたゲノム断片を抽出し、ライブラリーを作成し、HiSeq2000を用いて解析した。Varkeeperソフトウェアを用いて、アノテーションやmutation解析を行った。

・RNA-Seq

健常者と患者PBMCからtotal RNAを抽出し、100ngを使用して解析を実施し、エクソンの座標と発現量を算出した。発現量に関しては、2本のリードのペアを1本のフラグメントとしてカウントするペアエンドであるFPKM(Fragments per kilobase of exon per

million mapped sequence reads) によって算出され、遺伝子間やサンプル間での差がないように遺伝子の長さを 1000base、総リード数を 100 万として正規化した。

・ Real time PCR

健常者と患者の PBMC から抽出した RNA を SuperScript VILO (invitrogen) を用いて cDNA を合成し濃度を合わせて検討を行った。Taqman プローブを用いて、相対定量 ($\Delta\Delta Ct$ 法*) により解析を行った。コントロールとするハウスキーピング遺伝子は、Actin と 18S とした。結果は、健常者 (Ctrl) の発現量を 1.0 として、相対的な発現量で比較した。

なお全エクソン解析及びRNASeqはかずさDNA研究所の協力を得て実施した。

3) 責任遺伝子産物の機能解析

・ Flow cytometry

B細胞を精製し可溶性CD40Lで刺激後、NF- κ Bp65のリン酸化を抗NF- κ Bp65 (pS529)抗体で抗IgM抗体刺激後のPLC γ 2のリン酸化を抗PLC γ 2 (pY759)抗体を用い、Phosflowシステムで解析した。末梢血単核球(PBMCs)を抗IgM抗体で刺激しcalcium fluxを解析した。

・ CDR3長及び体細胞超変異解析

PBMCから得たcDNAをIGHVプライマーとIGHA/IGHGコンセンサスプライマーで増幅し、IgG/IgA転写産物を得てサブクローニングした。これらを用いてSHMとCDR3長をSanger sequencingにて測定を行った。

4) 膜透過性ペプチドを有する組換えタンパクの作成

Hph-1発現ベクターに目的のタンパクをコードする遺伝子を組み入れて、大腸菌発現ベクターを構築した。大腸菌で発現させたタンパクはHisタグを有しており、Nickelカラムにて精製した。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断や責任遺伝子産物解析等に当たっては、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) 抗体産生不全症の候補遺伝子の機能解析と病態解明

1-1) Dysgammaglobulinemiaの責任遺伝子の探索

症例は3歳男児で乳児期より急性中耳炎や気道感染の反復を認めた。10ヶ月時血清IgGとIgGサブクラスは正常で、IgM低値、IgA<4mg/dlであった。また風疹・麻疹特異抗体・kappa-deleting recombination excision circles(KRECs)は正常であった。

反復細菌感染に対し免疫グロブリン補充を開始したところ、その頻度が減少した。1歳時にはB細胞は14.2%(リンパ球)であったが、その比率は年齢と共に減少した。CD19+細胞はCD19+とCD19low+の2分画を示し、CD19low+の分画ではCD21lowであった。一方表面IgMはすべてのB細胞で高発現を示した。

Early onset CVIDとして全エクソン解析を行ったところ、BTK遺伝子にミスセンス変異を同定した(NM_000061.2:c.946A>G、NP_000052.1:p.Thr316Ala)。両親検体の同遺伝子解析からはde novo変異と確認した。

抗IgM抗体刺激後のcalcium fluxとPLC γ 2リン酸化はCD19low細胞でわずかに減弱していたがCD19+細胞では正常であった。CD19+細胞でのCD40L刺激後NF- κ B p65リン酸化は正常だった(Fig. 3d)。抗CD40抗体とIL-21刺激後B細胞はコントロールと同程度にIgGを産生したがIgA産生は減弱していた(Supplementary Fig. 4b)。BTK (T316A)変異をもつB細胞のIgG転写産物のSHM頻度は、IgA欠損症や健常コントロールよりもわずかだが有意に減少しBTK欠損患者6人と同様であった。IgA転写産物のSHM頻度はBTK欠損患者およびCD19欠損患者と同程度で、IgA欠損症や健常コントロールと比べ有意に障害されていた。CDR3長はIgA転写産物で有意に延長していたがIgG転写産物では有意差をみとめなかった。

1-2) Jacobsen症候群における抗体産生不全

Jacobsen症候群は、11番染色体長腕の端部欠失による染色体異常を伴う先天性異常症候群である。発育遅滞、精神運動遅滞、特徴的な顔異形、心疾患、血小板機能異常、汎血球減少等が多くの患者において共通して認められるが、一部の患者では抗体産生不全が認められる。欠損している11q23から末端にかけては、342の豊富な遺伝子が存在している領域であるが、免疫不全に関与する遺伝子については明らかになっていない。

そこで2名の低 γ グロブリン血症を示すJacobsen症候群患者(Pt 1)と1名の抗体価正常Jacobsen症候群患者(Pt2)の検体を用いて、CGH array,全エクソン解析(Pt1)、RNASeq (Pt 1, 2)を行った。その結果11q23以下の遺伝子に有意なmutationを認めず、健側片アレルの変異は認めないことが明らかになった。そのほかのlocusには、homozygous, compound heterozygous, heterozygous mutationが合計100以上検出された。またRNASeqにてPt1でPt2及び健常者に比して発現が低下する遺伝子を検討したところ10個が同定され、その中で5遺伝子はrealtime PCRでも発現が明らかに低下していることが明らかになった。

2) 遺伝子欠損に対する新規治療法の開発 細胞内タンパクが欠損する免疫不全症に

おいては、一時的にでもそのタンパク質を補充する手法が治療になると考えられる。その点で、cell permeable peptide(CPP)を有する組換えタンパクは、細胞内への導入効率がよく、タンパクも大量に産生及び精製可能で、治療に適した方策と思われる。ここではHph-1というヒト由来CPPをもつBTKタンパクを大腸菌にて発現させ精製して用いた。Hph-1-BTKは不溶性画分に移行しやすかったが、codon optimization, E coli strainの選択、低温誘導などの工夫により2-3L培養から100mg程度の純度の高いタンパクが得られるようになった。好中球や細胞株に導入した。その結果、BTKの発現はほぼ100%に認められ発現は24時間程度で、機能回復も認めることが証明された。本手法は以前ヒト好中球に用いその効果を報告したが、そのほかの細胞株やリンパ球にも導入可能であり、今後BTK T316AをもつB細胞への導入により、機能改変・機能回復につながるかを検証できればと考えている。

3) 造血細胞移植

自施設において造血細胞移植の適応となる免疫不全症11例に対して、非骨髄破壊的前処置についてはFlu/Buの統一プロトコールとした。Flu 30mg/m² x 6 daysに加えて、BUはAUCが60±5mg*h/Lとなるように調整して投与量を決定し、2日間投与した。生着は8例に認め、生着不全は3例、そのうち2例は再移植で生着した。現在10例が生存中である。

D. 考察

分類不能型免疫不全症を代表とする抗体産生不全症について、遺伝子レベルあるいは細胞レベルでその病態を解析した。BTK T316Aの解析からはこのmutationをもつ患者のみならずBTK欠損症全体に共通することとして、BTKの異常によりIgA transcriptがより強く障害されることが示唆された。このことはBTKがTGFbetaRやTACIシグナルに関与することを示唆するかもしれない。

Jacobsen症候群の解析からはその発現低下が病態に関与する可能性がある遺伝子を数個同定した。片アレル変異でも発現量が明らかに減少する遺伝子があり、健側アレルでの構成的変化、修飾が影響を与えている可能性があると思われる。

免疫不全症全般に対する治療法として現行の補充療法、造血細胞移植療法、遺伝子治療(現在限定的)に加えて、今後根治的治療の前に病勢を落ち着かせるためのタンパク導入治療も試みられる可能性があると思われる。実際にPNP欠損症に対するCPP-PNPの有用性はマウスにおいて示されている。

E. 結論

分類不能型免疫不全症を代表とする抗体産生不全症の病態を遺伝子レベル及び細胞レベルにて解析し、BTKの新しい役割、11q23

～テロメアに存在する抗体産生に重要な可能性のある遺伝子などを明らかにした。また免疫不全症に対する将来的な新しい治療法の有用性をin vitroで検証し、造血細胞移植については骨髄非破壊的前処置において工夫を加えて治療法を開始し、良好な成績を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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. *Int. J. Hematol.* 2015. (in press).
- Park T, Park S, Cho J, Moon J, Kim N, Park K, Seong RH, Lee S, **Morio T**, Bothwell AL, Lee S. ROR γ t-specific transcriptional interactomic inhibition suppresses autoimmunity associated with TH17 cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015. (in press).
- 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. *J Clin Immunol.* 2015. (in press).
- 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.
- 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.
- 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.
7. 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.
 8. 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.* **33**:1183-85, 2014.
 9. 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.
 10. 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, 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.
 11. Marciano BE, Huang CY, Joshi G, Rezaei N, Carvalho BC, Allwood Z, Ikinciogullari 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, Eلفeky 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.
 12. Hasegawa S, Imai K, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, **Morio T**, Mizutani S, Takagi M. Whole-exome sequence analysis of ataxia telangiectasia-like phenotype. *J Neurol Sci* **340**:86-90, 2014.
 13. 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.
 14. 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回茨城県小児科医学会学術講演会、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

G. 知的所有権の取得状況

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

原発性免疫不全症に対する骨髄非破壊的造血幹細胞移植法の開発

担当責任者	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
担当協力者	青木 由貴	東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野
	岡野 翼	東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野
	金兼 弘和	東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野
	森尾 友宏	東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野

研究要旨 当院にて原発性免疫不全症 (PID) に対して、Fludarabine(Flu)と Busulfan(Bu)による前処置を用いた造血幹細胞移植 (HSCT) を PID 患者 11 例 (3 ヶ月~12 歳) に対して行った。疾患は XSCID 3 例、ELA2-SCN 3 例、重症型 STAT1-CMCD 2 例、PIK3CD 異常症 1 例、NEMO 異常症 1 例、CD40L 異常症 1 例 (再移植例) で、非血縁臍帯血が 7 例、非血縁骨髄 2 例、血縁骨髄 2 例であった。Flu180mg/m²に加え、Bu 0.5mg/kg を前処置の 1 週間前に投与し、血中濃度を測定し、AUC が 60±5 mg*h/L(7 例)あるいは 30mg*h/L(4 例)となるように投与量を決定した。8 例が生着 (全例ドナー完全キメラ)、3 例が生着不全 (うち 2 例再移植で生着)、2 例が血球貪食症候群(HPS)合併した。骨髄抑制の程度及び期間は軽度であった。粘膜障害は軽症例が多く、VOD も mild1 例のみであった。11 症例中 1 例が死亡したが、他 10 例は生存しており、Flu+Bu を用いた前処置は骨髄抑制が軽度で、粘膜障害、VOD も軽症の傾向があり、小児 PID に対して BUCY に比べて、より安全に施行可能な前処置であると考えられた。

A. 研究目的

原発性免疫不全症の根治療法として骨髄破壊的前処置による造血幹細胞移植は確立してきているが、感染症の増悪を含む急性毒性や晩期合併症の問題のため、前処置法の軽減が近年模索されている。

2011 年に欧州骨髄移植学会・欧州免疫不全症学会(EBMT/ESID)先天性疾患作業部会(IEWP)から、4 種類の前処置が提案された。すべて Fludarabine (Flu: 150-180mg/sqm) を用いており、Busulfan (Bu: AUC 90mg*h/L ああるいは 60mg*h/L)、Melpharan (Mel: 140mg/sqm)、

あるいは Treosulfan (42g/sqm)を組み合わせているが、Treosulfan は日本で販売されていないこと、2010 年までに当科で行った Flu(125 or 150mg/sqm) +Mel (80-160mg/sqm)を用いた SCID の 6 例に対する臍帯血移植では、粘膜障害が強く、混合キメラが 4 例で見られ、2 例が死亡したことから、Mel を用いず、Bu を用いた前処置法を行い、その効果・副作用について検討することとした。

B. 研究方法

東京医科歯科大学小児科にて 2012 年 4 月～2014 年 6 月に Fludarabine(Flu)と Busulfan(Bu)による前処置を用いた造血幹細胞移植を施行した原発性免疫不全患者 11 例を対象とした。性別は、男児 9 名、女児 2 名。対象疾患は、重症複合免疫不全症 (SCID) *IL2RG* 3 例 (うち 1 例が Omenn 症候群)、X 連鎖性高 IgM 症候群 (CD40L 症候群) 1 例 (再移植例)、先天性好中球減少症 (*ELA2* 異常 SCN) 3 例、その他の免疫不全症 4 例 (*STAT1* 異常症 2 例、*PI3Kδ* 異常症 1 例、*NEMO* 異常症 1 例) であった。移植時年齢は 3 ヶ月～12 歳 (中央値:4 歳 6 か月)、SCID 3 例が 1 歳未満であった。

(倫理面への配慮)

本研究は後方視的研究であり、治療方針への介入はない。また匿名化を行い、患者特定に至らないように配慮した。なお、本前処置の使用を含む造血幹細胞移植については、移植前に十分な説明をし、代諾者 (両親) から文書による同意を得た。

C. 研究結果

移植ソースは、臍帯血が 7 例、骨髄が 4 例であり、骨髄のうち 2 人が血縁、ほかの 9 例は非血縁ドナーだった。臍帯血は 1 例を除き、7/8-5/8 座の遺伝子型ミスマッチで、骨髄は、同胞 1 例 (SCN)、非血縁 1 例 (*NEMO* 異常) がフルマッチで、1 座ミスマッチが 1 例、2 座ミスマッチが 1 例であった。移植前処置は Flu は day -9 から -6 に $45\text{mg}/\text{m}^2$ を投与した。Bu は試験投与として、移植約 1 週間前に $0.5\text{mg}/\text{kg}$ を投与し、6 ポイント採血を行い薬物動態解析を行い、合計 AUC が $60 \pm 5 \text{mg} \cdot \text{h}/\text{L}$ (7 例) あるいは $30\text{mg} \cdot \text{h}/\text{L}$ (4 例: SCID 3 例、*STAT1* 1 例) となるように投与量を決定した。なお、合計 AUC $60 \pm 5 \text{mg} \cdot \text{h}/\text{L}$ は、AUC $913 \text{uM} \cdot \text{min}$ 、CSS $700 \text{ng}/\text{ml}$ に相当する。ウサギ ATG (サイモグロブリン) を拒絶予防、GVHD 予防として、 $10\text{mg}/\text{kg}$ (1 例)、

$8\text{mg}/\text{kg}$ (4 例)、 $5\text{mg}/\text{kg}$ (2 例) 用いた。SCID の 3 例、同胞間骨髄移植の 1 例では ATG を用いなかった。本投与時の BU の平均 AUC は、 $66.4\text{mg} \cdot \text{h}/\text{L}$ (16 回法)、 $38.1 \text{mg} \cdot \text{h}/\text{L}$ (8 回法)、CSS_{av} は $705.3\text{ng}/\text{ml}$ (16 回法)、 $686.8\text{ng}/\text{ml}$ (8 回法) で安定していた。Bu は、添付文書上、年齢により、異なる投与量が設定されているが ($0.8\text{--}1.2\text{mg}/\text{kg}/\text{dose}$)、11 例中 3 例のみ添付文書上の用法用量通りの投与量であり ($0.8\text{--}1.2\text{mg}/\text{kg}/\text{dose}$)、4 例は少なく ($0.9\text{--}1.0\text{mg}/\text{kg}/\text{dose}$)、4 例は多い ($0.9\text{--}1.0\text{mg}/\text{kg}/\text{dose}$) 投与量を必要とした。

移植日の白血球数は中央値が $400/\mu\text{l}$ ($200\text{--}2500/\mu\text{l}$) であり、好中球数は中央値 $256/\mu\text{l}$ ($0\text{--}2300/\mu\text{l}$) とある程度保たれていたが、リンパ球数は $48/\mu\text{l}$ ($4\text{--}400/\mu\text{l}$)、1 例を除き $100/\mu\text{l}$ 以下) と十分に減少できていた。好中球 500 以下の期間の中央値は 11 日 ($0\text{--}49$ 日) であったが、8 例が 14 日以下であり、骨髄抑制の少ない前処置法であることが示唆された。11 例中 8 例は生着し、そのうち、7 例が完全ドナー型 ($>90\%$) であり、残りの 1 例も好中球は 100% 、リンパ球が 70% のキメラであった。3 例で二次性生着不全となったが、再移植、再々移植により 2 例で生着が得られた。合併症は様々なものがみられたが、生着症例では大きな感染症はなく、粘膜障害も軽度であったこともあり、多くの症例で GVHD も軽度であった。観察期間がまだ短期であるが、8 例でグロブリン補充を中止できており、2 例のみ継続中である。

観察期間は中央値 605 日 ($109\text{--}1002$ 日) で、*STAT1* 異常による重症慢性皮膚粘膜カンジダ症 1 例のみ血球貪食症候群、生着不全からアデノウイルス全身感染症で day109 に死亡したが、残り 10 例は全例生存している。

D. 考察

種々の原発性免疫不全症に対して、FluBu の前処置を用いて、3 年間で 11 例の

造血幹細胞移植を行い、10例が生着生存、という良好な結果を得た。周術期の感染性・非感染性の合併症が少ないこと、混合キメラが少ないことは、有効かつ安全な造血幹細胞移植を行う上で重要であり、当初の目的を達成することができた。Buの薬物動態解析を行うことで、添付文書通りでは必ずしも安全かつ十分な効果が得られなかった可能性もあり、今後、Bu血中濃度測定の保険適用、薬物動態解析の標準化、が望まれる。

一方問題点としては、3例で生着後の2次性生着不全が見られたことが上げられる。2例が骨髄、1例が臍帯血移植であり、HLAマッチ度は、7/8, 6/8, 5/8であった。基礎疾患は、ELA2, STAT1, PIK3CD異常で、いずれもT細胞機能が十分残存している病型であった。また、ATGは3例とも使用していた(5, 8, 8mg/kg) 今回の前処置は、骨髄非破壊的であるため、一旦生着したのは17,19,19日目であるが、二次性生着不全となったのは、25,32,34日目であり、移植後1ヶ月時までのドナーT細胞の回復が十分に得られ、レシピエント細胞の自己回復を押さえ込めるかどうか重要と考えられた。その意味で、こうした病型に対して、AUC60の骨髄非破壊的前処置ではなく、AUC90の骨髄破壊的前処置の選択(protocol A)、あるいは低線量全身(またはリンパ組織)放射線照射(2-3Gy TBI or TLI)や、T細胞のみを標的としたATG(ゼットブリン)を加えることが対策として考えられる。今回は、CD40L欠損、Wiskott-Aldrich症候群という頻度の高い基礎疾患が含まれてないが、こうした疾患に対して、FluBu16で十分かどうか、今後の検討が必要である。

長期合併症や、免疫系の回復、細胞系統ごとのキメリズムの評価について、継続して検討し、全国の施設とも情報を共有し、患者の予後改善に寄与することとしたい。

E. 結論

Flu+Bu±ATGを用いた前処置は骨髄抑制、粘膜障害、VODが軽度で、小児原発性免疫不全症に対してより安全に施行可能な前処置であると考えられるが、3例で生着不全を来しており、ATGの投与方法を含め検討の余地がある。長期合併症や、免疫系の回復、細胞系統ごとのキメリズムの評価について、継続して検討し、全国の施設とも情報を共有し、患者の予後改善に寄与することとしたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zahn A, Eranki AK, Patenaude AM, Methot SP, Fifield H, Cortizas EM, Foster P, Imai K, Durandy A, Larijani M, Verdun RE, Di Noia JM. Activation induced deaminase C-terminal domain links DNA breaks to end protection and repair during class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 118:E988-E997
- 2) Horiuchi K, Imai K, Mitsui-Sekinaka K, Yeh TW, Ochs HD, Durandy A, Nonoyama S. Analysis of somatic hypermutations in the IgM switch region in human B cells. *J Allergy Clin Immunol* (2014) 134:411-419.e1
- 3) 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. *Clin Infect Dis* (2014) 59:545-548.
- 4) 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) 56:510-514
- 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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. *J Clin Immunol* (2014) [Epub ahead of print]
2. 学会発表
 - 1) 今井耕輔. 原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植. 第10回PBC研究会. 東京, 2014年10月7日
 - 2) 今井耕輔. 皮下注用免疫グロブリン製剤ハイゼントラによる免疫グロブリン補充療法. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会. ランチョンセミナー. 岡山, 2014年11月28日
 - 3) 今井耕輔. 皮下注ガンマグロブリン療法について. 第5回関東甲越免疫不全症研究会. 東京, 2014年9月21日
 - 4) Imai K, Okawa T, Miyawaki R, Takashima T, Mitsuiki N, Aoki Y, Tomizawa D, Kajiwara M, Ozaki Y, Imai T, Wada T, Okada S, Morio T. Hematopoietic stem cell transplantations for severe chronic mucocutaneous candidiasis due to gain of function mutations in STAT1. ESID/EBMT Inborn Errors Working Party Conference. Munich, Germany. 2014.Oct.18
 - 5) Imai K, Tsujita Y, Mitsui-Sekinaka K, Mitsuiki N, 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 for immunodeficiencies, 2014.Oct.30.
 - 6) 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.May.3
 - 7) Imai K, Kanegane H, Yamada M, Takada H, Ariga T, Kobayashi M, Rojavin M, Bexon M, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T. Safety, Tolerability, and Efficacy of Hizentra In Japanese Patients With Primary Immunodeficiency

- Over 48 Weeks. 2014 Annual meeting of American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. San Diego. 2014.Mar.2
- 8) Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Igarashi A, Tsutani K, Bexon M, Rojavin M, Kobayashi M, Lawo JP, Zbrozek A, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T. Health-Related Quality Of Life Of Japanese Patients With Primary Immunodeficiency Diseases Receiving IgPro20, a 20% Liquid Subcutaneous Immunoglobulin (Hizentra). 2014 Annual meeting of American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. San Diego, 2014.Mar.2
- 9) 高木 正稔(東京医科歯科大学 大学院発生発達病態学), 宮脇 零士, 小林 千佳, 青木 由貴, 富澤 大輔, 今井 耕輔, 森尾 友宏, 水谷 修紀. Ras関連ALPS様疾患(RALD)新規治療法開拓への展望. 第117回日本小児科学会学術集会. 2014年4月11日
- 10) 小林千佳, 今井耕輔, 松本和明, 青木由貴, 富澤大輔, 高木正稔, 森尾友宏, 水谷修紀, 古市嘉行, 犬飼岳史. Wiskott-Aldrich syndromeに対するTPO受容体作動薬の使用経験. ITP研究会. 東京, 2014年5月2日
- 11) 宮本智史, 足洗美穂, 岡野翼, 小林千佳, 宮脇零士, 青木由貴, 富澤大輔, 高木正稔, 梶原道子, 今井耕輔, 森尾友宏. Fludarabine+Busulfanによる前処置を用いた重症先天性好中球減少症に対する造血幹細胞移植. 第22回食細胞機能異常症研究会. 東京, 2014年12月13日
- 12) 岡本浩之, 和田泰三, 村岡正裕, 榊原康久, 東馬智子, 谷内江昭宏, 宮本智史, 青木由貴, 富澤大輔, 今井耕輔, 森尾友宏. 再生不良性貧血移植後の汎血球減少において認められたCD177 (HNA-2) に対する抗好中球抗体. 第5回関東甲越免疫不全症研究会. 東京, 2014年9月21日
- 13) 小林千佳, 宮脇零士, 青木由貴, 富澤大輔, 今井耕輔, 高木正稔, 梶原道子, 森尾友宏, 水谷修紀. 重症先天性好中球減少症 (ELANE変異) に対して同種臍帯血移植を施行した2例. 第36回日本造血細胞移植学会総会. 沖縄, 2014年3月7日
- 14) 岡野翼, 奥津美夏, 宮脇零士, 高島健浩, 青木由貴, 富澤大輔, 高木正稔, 梶原道子, 今井耕輔, 水谷修紀, 森尾友宏. 非結核性抗酸菌感染後のNEMO異常症に対して非血縁者間骨髓移植を施行した1例. 第128回小児血液腫瘍免疫懇話会. 東京, 2014年5月23日
- 15) 岡野翼, 今井耕輔, 宮脇零士, 奥津美夏, 高島健浩, 青木由貴, 富澤大輔, 高木正稔, 梶原道子, 水谷修紀, 森尾友宏. 炎症性腸疾患とMycobacterium avium感染症を合併したNEMO異常症に対する非血縁者間骨髓移植. 第56回小児血液・がん学会. 岡山, 2014年11月28日
- G. 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。

22q11.2 欠損症候群の免疫学的評価の意義に関する研究

担当責任者 小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授
担当協力者 村松秀城 名古屋大学医学部医学系研究科小児科学 助教

研究要旨：22q11.2 欠失症候群における免疫不全は先天性心疾患とともに生命予後を左右する重篤な合併症であるが、症状が多岐に渡るため一部の高度の免疫機能低下を合併した症例が見落とされている可能性がある。今回、染色体 22q11.2 領域の欠失が証明された 26 症例を後方視的に検討した。免疫学的な評価が行われたのは 7 例 (27%) のみであり、異常を認めた 1 例は完全型 DiGeorge 症候群と診断され、臍帯血移植を施行し T 細胞数が回復し、長期生存が得られた。また、免疫学的な評価を行われていない症例の中で 1 例は CMV 肺炎で死亡した。22q11.2 欠失症候群における免疫不全は稀であるが、免疫学的なスクリーニングを徹底することが患者の予後を改善しうると考えられた。

A. 研究の目的

22q11.2 欠失症候群における免疫不全は先天性心疾患とともに生命予後を左右する重篤な合併症であり、免疫機能の評価は診療にあたって大変重要と考えられる。

22q11.2 欠失症候群における免疫不全の臨床症状、治療、転帰を評価した。

B. 研究方法

名古屋大学医学部附属病院小児科およびその協力施設 36 病院において 2008 年 1 月～2012 年 12 月の間に G 分染法または FISH 法にて染色体 22q11.2 領域の欠失が証明された症例を後方視的に検討した。

症例の報告があった施設に対してアンケート調査票を送付し、病歴、臨床症状、検査所見、治療、転帰などの情報を収集した。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の審査、承認後に実施した。

C. 研究結果

12 施設から全体で 26 症例 (男児 11 例、女児 15 例) の報告で診断日齢中央値 49 日であった。26 例のうち、臨床症状として、先天性心疾患 23 例 (88%)、症候性低 Ca 血症 13 例 (50%)、特異的顔貌 21 例 (81%)、胸腺低/無形成 11 例 (42%) を認めた。

19 例 (73%) の症例では免疫学的な評価を行われておらず、うち 1 例は CMV 肺炎で死亡した (図 1)。免疫学的な評価が行われていた 7 例 (27%) のうち、異常を認めた 1 例は完全型 DiGeorge 症候群と診断された。救命のため造血幹細胞移植を計画し、移植細胞源には血縁・非血縁骨髓提供者が得られず臍帯血移植を選択した。

移植前処置として Flu 30mg/m²/日×4 日間+LPAM 70mg/m²/日×2 日間を用いた。HLA 一致度は拒絶方向 2/8 アリル不一致、GVH 方向に 4/8 アリル不一致で、有核細胞数 1.9 ×10⁷/kg、CD34+細胞数 4×10⁵/kg であった。

移植後、発熱、炎症反応の上昇を認めた

が速やかに軽快した。14日に生着が確認できた。移植後日齢17でCD3陽性T細胞の出現が確認された(図2)。TREC数が移植後24日で陽性化し、その後も増加が確認された。T細胞受容体レパトア解析は、CD4陽性細胞、CD8陽性細胞ともに多様性が確認された(図4, 5)。移植6か月後にEvans症候群を合併したが、ガンマグロブリン大量投与、ステロイド投与で軽快している。

図1.

	症例数	死亡例
免疫学的 評価未実施	19	2
免疫学的 評価実施	7	0
	(うち異常1例)	

図2. 移植後のCD3⁺陽性細胞数の経過

移植後 日数	17日	60日	130日
CD3	1756/ μ L	3424/ μ L	2106/ μ L

図3. 移植後のTREC/KERCの経過

	Pre CBT	day24	day123	
	PB-MNC	PB-MNC	PB-MNC	$\alpha\beta$ T cell
TREC	ND	1.6 \times 10 ³	4.676 \times 10 ⁵	9.953 \times 10 ²
ciKREC	7.073 \times 10 ⁴	ND	9.211 \times 10 ⁴	ND
siKREC	2.055 \times 10 ⁴	ND	3.797 \times 10 ⁴	ND

CBT; cord blood transplantation, PB-MNC; peripheral blood mononuclear cell, ND; not detectd

図4. CD4⁺陽性細胞 TCR V β レパトア解析

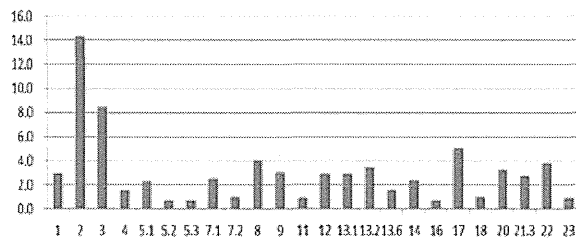
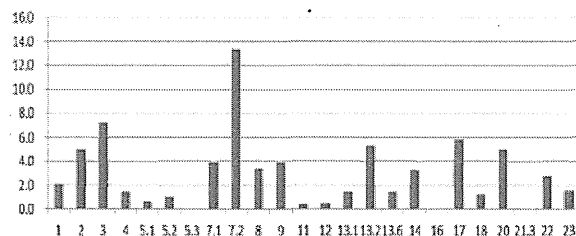


図5. CD8⁺陽性細胞 TCR V β レパトア解析



胞欠損を呈する完全型 DiGeorge 症候群は、稀ではあるものの生命に関わりうる合併症である。今回の後方視的検討により、現在の一般小児科診療のなかで22q11.2欠失症候群症例に対する免疫学的な評価が徹底されておらず、診断されないまま感染症で死亡する症例が存在することが確認された。

完全型 DiGeorge 症候群に対する標準的な治療は胸腺移植および骨髄移植であるが、胸腺移植は実際上、国内では実施が困難である。血縁・非血縁骨髄提供者が得られない症例では、臍帯血は考慮すべき移植幹細胞源であると考えられた。

E. 結論

22q11.2欠失症候群における完全なT細胞欠損を呈する完全型 DiGeorge 症候群を早期に発見するため、免疫学的なスクリーニングを徹底することを一般小児科医を対象に、広く啓蒙する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujita A, Ochi N, Fujimaki H, Muramatsu H, Takahashi Y, Natsume J, Kojima S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saito H, Matsumoto N, Miyake N. A novel WTX mutation in a female patient with osteopathia striata with cranial sclerosis and hepatoblastoma. *Am J Med Genet A*. 2014 Apr;164A(4):998-1002.
- 2) Hanada I, Terui K, Ikeda F, Toki T, Kanazaki R, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Inukai T, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Imaizumi M, Mitsui T, Hori H, Hara J, Horibe K, Nagai J, Goto H, Ito E. Gene alterations involving the CRLF2-JAK pathway