

201510030A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等政策研究事業

原発性免疫不全症候群の診断基準・重症度分類
および診療ガイドラインの確立に関する研究

平成27年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野々山 恵章

平成28(2016)年3月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等政策研究事業

原発性免疫不全症候群の診断基準・重症度分類
および診療ガイドラインの確立に関する研究

目 次

I. 総括研究報告

原発性免疫不全症候群の診断基準・重症度分類および診療ガイドラインの確立 に関する研究	1
野々山 恵章 (防衛医科大学校小児科学講座)	

II. 分担研究報告

1. 複合免疫不全症について

Omenn症候群の診断基準作成に関する研究	9
笹原 洋二 (東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学分野)	
プリンヌクレオチド・ホスホリラーゼ欠損症の診断ガイドライン	13
小野寺 雅史 (国立成育医療研究センター成育遺伝研究部)	
CD8欠損症の診断基準の作成について	17
有賀 正 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)	
ZAP70欠損症の診断基準の作成	20
森尾 友宏 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野)	

2. 免疫不全を伴う特徴的な症候群について

DiGeorge症候群の診断基準の作成	22
小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学)	

3. 原発性食細胞機能不全症および欠損症について

白血球接着不全症の診断基準	25
布井 博幸 (宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科科学分野)	
シュワッハマン・ダイヤモンド症候群の診断基準案作成	28
中畑 龍俊 (京都大学 iPS細胞研究所臨床応用研究部門)	
ミエロペルオキシダーゼ欠損症の診断基準の作成について	31
谷内江 昭宏 (金沢大学大学院医薬保健学総合研究科小児科)	
メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症の診断基準の作成	34
峯岸 克行 (徳島大学疾患プロテオーム研究センター病態プロテオーム分野)	
「その他の白血球機能異常症」の診断基準作成について	39
平家 俊男 (京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座発達小児科学)	

4.	自然免疫異常について	
	自然免疫不全症の診断基準の作成 -----	41
	高田 英俊 (九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学)	
	その他の自然免疫不全症の診断基準・診断フローチャートの策定に関する研究 --	44
	加藤 善一郎 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)	
5.	先天性補体欠損症について	
	先天性補体欠損症ならびに「遺伝性血管性浮腫」の診断基準の作成について -----	46
	堀内 孝彦 (九州大学病院別府病院免疫・血液・代謝内科)	
6.	診断基準に関するその他の研究報告	
	原発性免疫不全症「ICF症候群」の原因遺伝子の同定 -----	48
	高田 英俊 (九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学)	
	PTEN異常による免疫不全症について -----	52
	野々山 恵章 (防衛医科大学校小児科学講座)	
	フローサイトメトリーを用いたAPDSの診断 -----	53
	小林 正夫 (広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学)	
	九州における家族性血球貪食症候群(FHL)の現状 -----	58
	高田 英俊 (九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学)	
	乾燥ろ紙血を用いた原発性免疫不全症の新生児マススクリーニング臨床研究 ----	62
	小野寺 雅史 (国立成育医療研究センター成育遺伝研究部)	
	原発性免疫不全症候群の診断基準・重症度分類および診療ガイドライン の確立に関する研究 -----	65
	小原 収 (かずさDNA研究所)	
○	資 料 -----	69
III.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	156
IV.	研究成果の刊行に関する別冊 -----	160

I 總括研究報告

原発性免疫不全症候群の診断基準・重症度分類 および診療ガイドラインの確立に関する研究

研究代表者 野々山 恵章 防衛医科大学校小児科学講座 教授

研究要旨

原発性免疫不全症は希少でありかつ300種類程度あるため、適切な診断や診療のためには、専門医による診断基準・重症度分類および診療ガイドラインの作成が必要であり、これにより患者QOL向上や重症度にあった難病支援が可能になると考えられる。本研究では、迅速で正確な診断基準・重症度分類および診療ガイドラインの作成を行い、患者QOLの向上と厚生労働省政策への貢献を果たす事を目的とした。平成27年度は、国際免疫学会による大分類から代表的な疾患を選び、平成26年度に作成した22疾患以外の36疾患を対象とした。方法としては、疾患を専門家により成り立つ作業グループに割り振り、診断基準案、可能であれば重症度分類案、診断フローチャート案、診療ガイドライン案を作成した。作成方法は、論文検索、国際的な診断基準を参考にした。作成した案を班会議で発表し、研究代表者および研究分担者全員による議論の上、必要があれば修正後、作成された案を承認した。さらに、承認した案について、日本小児科学会小児慢性疾患委員会構成員である日本免疫不全症研究会で承認を得た。

さらに、新規に原因遺伝子が同定されたPTEN欠損症、ICF type 3, ICF type 4の診断法、APDSのFACSを用いた新規迅速診断法、FHLの現状調査と診断法の確立などの成果を得た。

研究代表者

野々山 恵章 防衛医科大学校医学教育部医学科小児科学講座 教授

研究分担者

高田 英俊 九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学 教授

有賀 正 北海道大学大学院医学研究科小児科学分野 教授

森尾 友宏 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
発生発達病態学分野 教授

小島 勢二 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授

谷内江 昭宏 金沢大学医薬保健研究域医学系小児科 教授

平家 俊男 京都大学医学部小児科学講座 教授

小林 正夫 広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学 教授

布井 博幸 宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野 教授

中畑 龍俊 京都大学 iPS 細胞研究所
臨床応用研究部門疾患再現研究分野 特定拠点教授

峯岸 克行 徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター
病態プロテオゲノム分野 教授

小野寺 雅史 国立成育医療センター研究所成育遺伝研究部 部長

笹原 洋二 東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野 准教授

小原 收 公益財団法人かずさ DNA 研究所 副所長

加藤 善一郎 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 教授

研究協力者

堀内 孝彦 九州大学病院別府病院
免疫・血液・代謝内科／循環・呼吸・老年病内科 教授

金兼 弘和 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
発生発達病態学分野 准教授

今井 耕輔 東京医科歯科大学大学院
小児・周産期地域医療学講座寄付講座 准教授

高木 正稔 東京医科歯科大学大学院
小児・周産期地域医療学講座寄付講座 准教授

A. 研究目的

原発性免疫不全症は希少であり、且つ、300種類程度あるため、適切な診断や診療が困難であり、専門医による診断基準・重症度分類および診療ガイドラインの作成は、患者 QOL 向上や重症度にあった難病支援に必要である。本研究では、迅速で正確な診断基準・重症度分類および診療ガイドラインの作成を行い、患者 QOL の向上と厚生労働省政策への貢献を果たす事を目的とした。

B. 研究方法

国際免疫学会 (International Union of Immunological Societies, IUIS) により大きく9種に分けられた分類 (IUIS 分類) を網羅するように各大分類から難病に指定されている疾患を中心に代表的な疾患を選び、かつ平成26年に作成した22疾患を除き、36疾患を対象として、診断基準案、重症度分類案、診断フローチャート案、診療ガイドライン案を作成した。方法としては、大分類ごとに、専門家により成り立つ作業グループを作成し、診断基準案、重症度分類案、診断フローチャート案、診療ガイドライン案を作成した。それを各作業グループが全体班会議で発表し、研究代表者および研究分担者全員による議論の上、必要があれば修正後、診断基準などを承認した。

作業グループによる診断基準案、重症度分類、診断フローチャート、診療ガイドラインの作成方法は、論文検索、国際的な診断基準を参考にした。さらに本研究班で新規に構築したデータベースの活用、新規に開発した FACS による迅速診断法、アンプリコン PCR・次世代シーケンサーなどを活用した既知原因遺伝子の迅速遺伝子診断法開発、診断に応用出来る機能解析法の開発、新規原因遺伝子同定などにより行った。データベースとしては Primary Immunodeficiency Database in Japan (PIDJ) を2009年に構築し、患者臨床情報、FACS

解析、遺伝子解析、細胞や DNA 保存を行い、既に4,091人が登録されている。これらのデータをもとに診断基準、重症度分類、診療ガイドラインを作成した。

さらに、新規に同定された免疫不全症である PTEN 欠損症、APDS, ICF type 3, type4 の診断法の確立を FACS、遺伝子解析を活用して行った。また、TREC 測定を用いた新生児スクリーニングのパイロットスタディ、九州地区の FHL の診断とその解析も行った。

(倫理面への配慮)

データは匿名化して取り扱った。遺伝子解析、細胞分化実験などは、各施設の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. 複合免疫不全症

複合免疫不全症は T 細胞系、B 細胞系両者の機能不全による疾患の総称で、2015 年 IUIS 免疫不全症分類では、複合免疫不全症として50疾患、そのうち重症複合免疫不全症として16疾患が掲載されている。

平成26年度に、X-SCID、ADA 欠損症の診断基準などを作成した。今年度は、オーメン (Omenn) 症候群、プリンヌクレオチド・ホスホリラーゼ欠損症、CD8 欠損症、ZAP70 欠損症の診断基準、診断フローチャート、重症度分類を作成した。方法としては、複合免疫不全症の臨床診断基準案を、米国における重症複合免疫不全症の診断基準 (Shearer et al. J Allergy Clin Immunol. 2013)、欧州における複合免疫不全症・重症複合免疫不全症の診断基準 (<http://esid.org/Working-Parties/Registry/Diagnosis-criteria>) を参考にし、さらに、過去の論文や我々の施設の経験を加え、日本の実情に合うようにした。

オーメン (Omenn) 症候群は、新生児・乳児期に網内系および皮膚の細胞浸潤と好酸球増多を呈する疾患であり重症複合免疫不全症 (SCID) を来すいくつかの疾患責任遺伝子産物の活性が残存している

(hypomorphic) 変異によって発症する疾患である。RAG1、RAG2、Artemis、IL2RG、IL7RA、ADA、DNA ligase IV、RMRP、AK2 の hypomorphic 変異による。ただし、DiGeorge 症候群に関連して発症する症例や、原因の特定できない症例もある。本症候群は臨床所見の多様性があるため、しばしば早期確定診断が困難な場合がある。そこで、本症候群の疾患概要をまとめ、診断方法とその進め方が明確となるような診断基準とフローチャート、および重症度分類を作成した。

プリンヌクレオチド・ホスホリラーゼ (PNP) はプリン代謝酵素で、PNP が欠損すると細胞内に deoxyGuanosine triphosphate (dGTP) が蓄積し、この dGTP が RNA から DNA への変換に重要な ribonucleotide reductase を著しく傷害するため、患者は T 細胞不全を主体とする免疫不全を呈する。また、2/3 の患者で進行性神経症を発症し、1/3 の患者で様々な自己免疫性疾患を呈する。検査上の特徴として T 細胞は減少するが、B 細胞数は比較的保たれ、高度の低尿酸血症を呈する。診断は、T 細胞不全による臨床症状と血中・尿中尿酸値の低下にて本疾患を疑い、タンデムマススペクトロメーターにてプリンヌクレオチド等の異常値を確認し、最終的に PNP 遺伝子解析にて確定診断に至る。PNP は T 細胞不全を主体とする免疫不全症、低尿酸血症等により比較的困難なく診断が可能な疾患である。しかし、プリンヌクレオチド等を測定する TMS は一般的ではないため、新生児スクリーニングの導入を含め、これらプリンヌクレオチドを測定する体制を整えることが必要と思われる。また、本疾患は、ADA 欠損症同様、先天代謝異常症の範疇に入り、進行性の神経症を併発することから、治療法である造血幹細胞移植を如何に早く行うかが肝要である。その意味でも、ろ紙血を用いた新生児マススクリーニングの導入はこれら問題点を解決する可能性があり、TREC により SCID のスクリーニングに加え、ADA 欠損症、PNP 欠損症を含めた先天代謝異常症に対する新生児スクリーニングの早期導入が必要と考えられた。

CD8 欠損症は CD8 α サブユニットをコードする遺伝子 *CD8A* の異常によって CD8 発現が欠損し、細菌感染やウイルス感染を反復する原発性免疫不全症である。検査上の特徴は CD8 陽性細胞の完全欠損、CD4 陽性細胞正常、CD4-CD8⁻(DN) $\alpha\beta$ T 細胞増多である。成人期に呼吸機能不全で死亡するものから軽症、無症状まで重症度は様々である。診断基準としては、CD4 陽性細胞数が正常で CD8 陽性細胞が完全欠損し、CD8A 遺伝子に既報の Gly111Ser 変異がある場合に CD8 欠損症と診断する。CD8 陽性細胞が部分欠損の場合は、CD8 陽性細胞が部分欠損する *ZAP70*、*TAP1*、*TAP2*、*TAPBP*、*B2M* などの責任遺伝子も解析することが必要である。診断フローチャートも作成したが、重症度分類は症例が少なく、現時点での作成は困難であり、今後の症例の蓄積が必要である。

2. 免疫不全を伴う特徴的な症候群

免疫不全症を伴う特徴的な症候群として、45 疾患が IUIS 分類に掲載されている。平成 26 年度に Wiskott-Aldrich 症候群、毛細血管拡張性小脳失調症、ナイミーヘン染色体不安定症候群、Bloom 症候群、ICF 症候群、PMS2 異常症、RIDDLE 症候群、Schimke 病、ネザートン症候群、DiGeorge 症候群、高 IgE 症候群、肝中心静脈閉鎖症を伴う免疫不全症、先天性角化異常症について、診断基準、診断フローチャート、重症度について作成し、一部診療ガイドライン案も作成した。

平成 27 年度は、DiGeorge 症候群を対象とした。

DiGeorge 症候群は、胚形成初期における第 3 および第 4 咽頭嚢の異常形態発生が原因であり、胸腺低形成による易感染性、副甲状腺低形成による低 Ca 血症、特異的顔貌と先天性心疾患を伴う症候群である。胸腺低形成 (DiGeorge 症候群、22q11.2 欠失症候群) に関してこれまでに得られている臨床知見、文献知見、欧州免疫不全症学会 (ESID) における診断基準を参考にして、以下の通り診断基準を作成した。

CD3 陽性 T 細胞数の低下、胸腺無形成、低 Ca 血症、先天性心疾患を伴うものを DiGeorge 症候群と診断する。

また、完全型 DiGeorge 症候群と部分型 DiGeorge 症候群の診断基準も別個に作成した。例えば、CD3 陽性 T 細胞数が $50/\mu\text{L}$ 未満かつ胸腺無形成、低 Ca 血症、先天性心疾患を認める場合は、完全型 DiGeorge 症候群とした。

また、染色体 22q11.2 の欠損があっても DiGeorge 症候群の基準を満たさない症例があること、10p13-14、18q21.33、4q21.3-q25 領域の欠損または *CHD7* 遺伝子変異により DiGeorge 症候群を発症することがあることも注意すべきである。

なお、22q11.2 欠失症候群は症状が多彩であるため、DiGeorge 症候群の定義を満たす高度の免疫機能低下が見落とされている症例もあり、免疫学的なスクリーニングの周知が重要であると考えられた。

3. 液性免疫不全を主とする疾患

液性免疫不全症は中耳炎、肺炎、副鼻腔炎、下痢、敗血症などの反復性細菌感染症を契機に血清免疫グロブリン値の測定を行い、いずれかが低値であった場合に診断される。34 疾患が IUIS 分類に掲載されている。

平成 26 年度に、主な液性免疫不全症である X 連鎖無ガンマグロブリン血症、分類不能型免疫不全症、高 IgM 症候群、IgG サブクラス、選択的 IgA 欠損症、特異抗体産生不全症、乳児一過性低ガンマグロブリン血症について診断基準・重症度分類および診療ガイドラインの作成を行った。

平成 27 年度は、我々が新規に見出した PTEN 欠損症の診断基準作成、および最近報告された activated PI3K δ syndrome (APDS) の FACS による迅速診断法の確立を行った。

4. 免疫調節障害

免疫調節障害は、原発性免疫不全症のうち、過剰な全身性炎症や自己免疫疾患の合併が

病態の中心となる疾患群である。チェディアック・東症候群 (CHS) のほか、X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) や自己免疫性リンパ増殖症候群 (ALPS)、家族性血球貪食症候群 (Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL)) が代表的疾患である。免疫調節障害は、細胞障害活性の異常に伴うリンパ球の過剰活性化、アポトーシスの障害によるリンパ球の過剰増殖、自己反応性リンパ球の除去や制御不全等により引き起こされると考えられている。37 疾患が IUIS 分類に掲載されている。

平成 26 年度は CHS、XLP1、XLP2、ALPS の診断基準の作成を行った。

平成 27 年度は、FHL の九州における疾患調査を行い、それに基づき、遺伝子診断、蛋白発現、診断法の確立を行った。FHL は予後不良であり、早期診断し臓器障害が進行する前に造血幹細胞移植する必要がある。診断法の確立は大きな意義があると考えられる。

5. 原発性食細胞機能不全症および数的欠損症

原発性食細胞機能不全症および欠損症は、30 疾患が IUIS 分類に掲載されている。

平成 26 年度は機能不全の代表的な疾患である慢性肉芽腫症について検討した。

平成 27 年度は、機能異常として、食細胞の遊走に関わる接着因子欠損症 (Leukocyte adhesion molecule deficiency, LAD) 1 型、2 型、3 型、好中球産生不全をきたすシュワッハマン・ダイヤモンド症候群、細胞内酵素欠損による殺菌能低下を示すミエロペルオキシダーゼ欠損症、GATA2 欠損症、CRF 異常症、数的欠損症である先天性好中球減少症、周期性好中球減少症について、診断基準・重症度分類および診療ガイドラインの作成を行った。

6. 自然免疫不全症

2015 年の IUIS 分類では、自然免疫不全症には、33 疾患が掲載されている。

平成26年度には、免疫不全を伴う無汗性外胚葉形成異常症、IRAK4 欠損症、慢性皮膚粘膜カンジダ症の3疾患について診断基準、診断フローチャート、重症度について作成した。

平成27年度は、メンデル遺伝型マイコプラズマ菌易感染症、MyD88 欠損症、家族性単純ヘルペス脳炎、常染色体劣性遺伝 STAT1 欠損症、STAT2 欠損症、IRF7 欠損症、CD16 欠損症、MCM4 欠損症、疣贅状表皮発育異常症、WHIM 症候群、トリパノソーマ症、孤立性無脾症の12疾患診断基準・重症度分類および診療ガイドラインの作成を行った。

これらの疾患の診断は臨床像や臨床検査所見のみでは困難なことが少なくない。また、早期診断が患者の予後や QOL に影響することも知られている。免疫学的病態を基盤とした迅速診断・スクリーニング検査、遺伝子検査を組み合わせることで診断することが重要である。

7. 先天性補体欠損症

補体は30余りの分子によって構成されており、1) 前期反応成分、2) 後期反応成分、3) 補体制御因子ならびに補体受容体に分類される。1) と2) は直接補体活性化のカスケードに関わる分子群である。先天性の欠損によって細菌へ易感染性になるとともに1) では自己免疫疾患を併発する場合がある。一方、3) の欠損症はそれぞれの分子の機能不全に起因した病態を呈し、遺伝性血管性浮腫、非典型的溶血性尿毒症症候群、加齢黄斑変性、発作性夜間血色素尿症など多岐にわたる疾患を招来する。

こうした疾患の診断のためにタンパクレベル、遺伝子レベルで解析する方法の確立が必要である。そして、診断法を確立し、全国レベルの患者レジストリーを進める予定である。

8. TREC 測定による新生児スクリーニング法および迅速診断法の確立

現在、欧米では重症複合型免疫不全症 (SCID) に対する新生児マススクリーニングの導入が進められている。そこで、新生児マススクリーニングの本邦での導入の可否を検討した。

すなわち、単一施設ではあるがパイロットスタディとして303例の新生児の TREC を測定したところ、2例で異常値を示した。このことから、TREC 測定系は定量的に大量検体を測定することが可能であることが示された。

今後、TREC 測定による SCID の新生児マススクリーニングの国内への導入体制について検討を進める。これにより、新生児期での免疫不全症の迅速な診断が可能になる。

9. PIDJ データベースに今年度登録された原発性免疫不全症患者 714 例の疫学的解析

平成18年度から、厚生労働省原発性免疫不全症候群に関する調査研究班（以下、研究班）は、基礎免疫学研究施設である理化学研究所免疫アレルギー科学総合センター（以下、RCAI）、ゲノム解析施設であるかずさ DNA 研究所と共同研究を開始し、臨床情報の中央化、臨床検体解析／保存の中央化、遺伝子解析の中央化、を通し、臨床診断、治療のみならず、基礎免疫学へも貢献する枠組みを開始した。そのハブとなるシステムが、PIDJ (Primary Immunodeficiency Database in Japan) である。

今年度の研究では、平成27年(2015年)中にPIDJに登録された症例について疫学的に検討した。登録症例は毎年増加しているが、平成27年は714症例が新規に登録された。これは、1日に1-2例が新規に登録されたことになる。しかしながら、2015年末で、総計4091例がPIDJデータベースに登録されているが、人口10万人あたり、3.4例であり、依然欧州諸国と比べ約半数にとどまっている。まだ診断されていない症例、見逃されている症例がいることを示している。

疾患分類別割合では、自己炎症性疾患が

40%と最多である。次に多いのが免疫調節異常症12%であり、急激に増えている。以下、免疫不全症を呈する特徴的な症候群11%、抗体産生不全9%、貪食細胞異常症9%と続き、複合免疫不全症3%、自然免疫不全症3%、補体欠損症3%であった。

ヨーロッパのデータベースであるESIDでは、19,366人が2014年までに登録され、抗体産生不全は56.66%と最も多く、ほとんどを占めている。次いで免疫不全を伴う特徴的な症候群は13.91%、食細胞異常は8.73%、T細胞障害は7.47%であった。

このように、ESIDとPIDJでの登録疾患の割合が異なっている事が明らかになった。この理由として、以下の点が考えられる。

1)登録数が予想される患者数より少ない事から、免疫不全症登録事業であるPIDJが医師に広く知られてなくて、疾患を診断治療しても未登録例がある可能性がある。

2)登録への積極性が医師により異なる事も考えられる。自己炎症疾患、食細胞異常は医師が登録に熱心であり、最も多く登録されていたため、ESIDと比較して多い割合であった事が考えられる。

3)免疫不全症という疾患が見逃されている可能性、場合によっては見逃されて死亡している症例がある可能性が考えられる。

こうしたことから、作成した原発性免疫不全症診断基準を公開して見逃し症例を減らすこと、診断した場合はPIDJに登録することを継続的に周知することが重要であると考えられる。

また、比較的複合免疫不全症が少ない結果となっているが、分類不能免疫不全症(CVID)の中にTREC低値、すなわちT細胞新生能の低い亜群があることが判明しており、また一部に自己炎症症状を呈するT細胞機能不全症があることも分かっていることから、今後、紹介例全症例について、TREC解析を行いスクリーニング検査とする予定である。

また、全体の中で成人例が38%(1578例)を占めている。内科からの紹介も多く

あり、成人期への移行症例および成人期での診断症例の存在からも、今後内科での取組が重要となると考えられる。

候補遺伝子解析は、約30%の同定率であり、ほぼ一定している。同定に至った例は、FACSを用いた原因遺伝子産物の解析が役に立った例も多く、X連鎖性のPIDが多いのも特徴である。FACSでは正常に染まっていたものの、機能喪失と考えられるアミノ酸置換(ミスセンス変異)を持つ症例もあり、蛋白発現解析と遺伝子解析の両方の必要性、さらにはphosflowなどを用いた機能解析の必要性が示唆された。今年度も、アミノ酸の置換を伴わない新規変異によるスプライス異常を伴ったXSCIDを発見した(2014MK001)。

今後、cDNAによる変異解析やCNV(copy number variation)を効率よく見出すことができる方法の開発の必要も示唆された。また、より効率的な遺伝子解析方法として、次世代シーケンサーによるアンプリコンシーケンスを用いた方法をSCID症例について、防衛医大小児科との共同研究により検討し、有効性が確認できた。疾患関連遺伝子のexon部分のみを濃縮するチップの利用も検討中である。

10. 原発性免疫不全症遺伝子診断の検討

原発性免疫不全症の原因となる事が既知である遺伝子に対して、その遺伝子がタンパク質をコードするエクソンとそのエクソン・イントロン境界配列をDNAシーケンシング法により解析した。ABI3130/3730キャピラリーシーケンサー(Life Technologies, Applied Biosystems®)での解析、次世代シーケンサー(Roche, GS Junior; Illumina, MiSeq)を用いたパネル診断での対応も行った。

今年度は12月末の時点で本研究班の研究分担者から520症例の解析依頼を受け、解析した述べ遺伝子数は3,000を越えた。このペースはこれまでの解析症例数を大きく上回った。この作業効率向上には次世代シ

ーケンサーシステムの導入が大きく貢献した。

D. 考察

大分類ごとに専門家により成り立つ作業グループを作成し、大分類の中の代表的な疾患について、診断基準案、可能であれば重症度分類案、診断フローチャート案、診療ガイドライン案を作成した。それを各作業グループが全体班会議で発表し、主任研究者および研究分担者全員による議論の上、必要があれば修正後、診断基準などを承認できた。

診断基準、重症度分類、診断フローチャート、診療ガイドラインの案の作成は、論文検索による情報収集および国際的な診断基準を参考にした。さらに本研究班で構築したデータベース、新規に開発した FACS による迅速診断法、アンプリコン PCR・次世代シーケンサーを活用した既知原因遺伝子の迅速遺伝子診断法開発、診断に応用出来る機能解析法の開発、新規原因遺伝子同定などを活用した。具体的には、新規に原因遺伝子が同定された PTEN 欠損症、ICF type 3, ICF type 4 の診断法、APDS の FACS を用いた新規迅速診断法、FHL の現状調査と診断法の確立などの成果を利用できた。

このように作成し、研究班で承認した案を、日本免疫不全症研究会等関連諸学会により認証を得た。

作成した診断基準・重症度分類および診療ガイドラインを、難病情報センターや各学会のホームページでの公開、学会講演会、一般医への印刷物の配布などで周知する予定である。

また診断基準策定と並行して、臨床所見、検査データ、免疫学的データをもとにして、遺伝子診断ができる体制も整えた。また小児慢性特定疾患や難病として指定されている疾患で代表的なものについては申請の手引きの作成も目指した。

今後は、300ある原発性免疫不全症の診断基準、診断フローチャート、および重症度分類を作成する。また、診療ガイドラインは

一部の疾患でしか作成できなかったもので、最新の全国調査の結果や、国際的な動向も踏まえ、少なくとも代表的な疾患については作成する事を目標とする。

E. 結論

国際免疫学会により9種に分けられた大分類から代表的な疾患を選び、計36疾患について、診断基準を作成し、一部の疾患では重症度分類、診断フローチャート、診療ガイドラインも作成できた。新規診断法も確立できた。患者診断に大きく役立つ成果が得られた。患者 QOL の向上、難病医療の向上、厚生労働政策への貢献を果たす事が出来た。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表、および学会発表
巻末参照。

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

Ⅱ 分 担 研 究 報 告

複合免疫不全症
Omenn症候群の診断基準作成に関する研究

研究分担者 笹原洋二

東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学分野 准教授

研究要旨

オーメン (Omenn) 症候群は、新生児・乳児期に網内系および皮膚の細胞浸潤と好酸球増多を呈する疾患であり、RAG1 あるいは RAG2 遺伝子異常を含む重症複合免疫不全症 (SCID) を来すいくつかの疾患責任遺伝子産物の活性が残存している (hypomorphic) 変異によって発症する疾患である。RAG1、RAG2、Artemis、IL2RG、IL7RA、ADA、DNA ligase IV、RMRP、AK2 の hypomorphic 変異によるが、DiGeorge 症候群に関連して発症する症例や、原因の特定できない症例もある。遺伝形式は責任遺伝子の種類により常染色体劣性遺伝形式か X 連鎖遺伝形式をとる。

本症候群は臨床所見の多様性があるため、しばしば早期確定診断が困難な場合がある。今回我々は、本症候群の疾患概要をまとめ、診断方法とその進め方が明確となるような診断基準とフローチャート、および重症度分類を作成した。

A. 研究目的

複合免疫不全症の一つである Omenn 症候群は稀な疾患であり、確定診断のための指標が必要である。今回我々は、Omenn 症候群の疾患概要、診断方法をフローチャートを含めてまとめ、適切な診断のための指標とすること、および重症度分類を行うことを研究目的とした。

B. 研究方法

これまでの研究報告から、各疾患の疾患概要、診断方法、重症度分類を含めてまとめた。診断基準の作成に当たっては、これまでの総説的文献と知見をまとめた上で、臨床症状と検査所見を満たし、診断フローチャートの提示を含めて行った。

(倫理面への配慮)

臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年厚生労働省告示第 415 号) を遵守して行った。

C. 研究結果

Omenn 症候群について、疾患概要、診断方法、重症度分類を作成した。診断方法として臨床症状、検査所見、補助条項、診断の進め方とフローチャート、診断基準について、別紙図表にまとめた。

疾患名 (日本語) : オーメン (Omenn) 症候群

疾患名 (英語) : Omenn syndrome

OMIM 番号: 603554

	RAG1 deficiency	RAG2 deficiency
ICD9 分類	279.2	D81.1
ICD10 分類	279.2	D81.1

疾患概要

オーメン (Omenn) 症候群は、新生児・乳児期に網内系および皮膚の細胞浸潤と好酸球増多を呈する疾患であり、RAG1 あるいは RAG2 遺伝子異常を含む重症複合免疫不全症 (SCID) を来すいくつかの疾患責任遺伝子産物の活性が残存している (hypomorphic) 変異によって発症する疾患である。RAG1、RAG2、Artemis、IL2RG、IL7RA、ADA、DNA ligase IV、RMRP、AK2 の hypomorphic 変異

によるが、DiGeorge 症候群に関連して発症する症例や、原因の特定できない症例もある。遺伝形式は責任遺伝子の種類により常染色体劣性遺伝形式あるいは X 連鎖遺伝形式をとる。

【診断方法】

A. 臨床症状

1. 皮膚症状

生後間もなくからみられる湿疹様皮膚病変で、重症アトピー性皮膚炎に類似する。紅皮症を呈する。細胞浸潤に伴う症状である。

2. リンパ節腫脹

著明なリンパ節腫脹がみられる。細胞浸潤に伴う症状である。

3. 肝脾腫

細胞浸潤に伴う症状である。

4. 易感染性

通常生後数ヶ月以内に T 細胞機能不全の症状として、日和見感染を含む様々な重症感染症を発症する。慢性下痢、肺炎、体重増加不良などを呈する。

B. 検査所見

1. 末梢血 T 細胞は存在し(300/ μ l 以上)、T 細胞はオリゴクローナルな分化・増殖を呈する。
2. 末梢血 B 細胞数は低下する。血清 IgG、IgA、IgM 値は低下する。
3. 好酸球数は増加し、総 IgE 値は高値を示す。
4. RAG1、RAG2 を含む重症複合免疫不全症の責任遺伝子の hypomorphic 変異による。

C. 補助条項

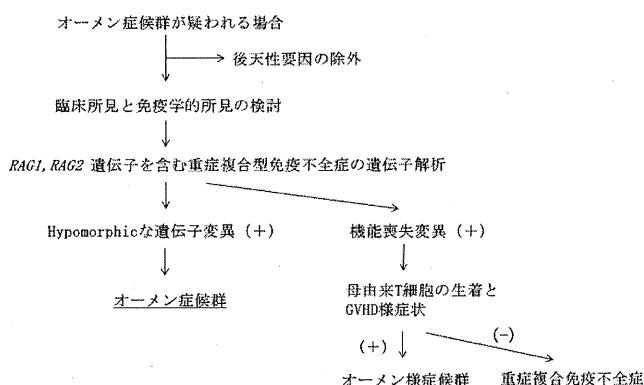
1. 本症候群では、T 細胞機能不全にともなう SCID 様の病態と、残存する T 細胞のオリゴクローナルな増殖・浸潤による病態を示す。T 細胞分化ないし機能不全は制御性 T 細胞も分化障害も含み、また胸腺髄質上皮細胞の発育障害をもたらす。その結果免疫寛容破綻にともなう自己反応性 T 細胞の増殖・活性化を来し、種々の自己免疫疾患を生じる。また Th2 細胞分化への偏位により残存 B 細胞による IgE 産生増加と好酸球増加がみられる。
2. T 細胞クローナリティーの検討には、T 細胞受容体 (TCR) レパトア解析が有用である。
3. TREC/KREC 測定も病態の検討に有用である。
4. 重症複合型免疫不全症に母親由来 T 細胞が児に生着し、移植片対宿主病 (GVHD) 様症状をとともなう場合は、いわゆるオーメン様

(Omenn-like) 症候群の臨床像を呈する。

D. 診断の進め方 (フローチャート参照)

臨床所見に多様性を認めるため、本症候群が疑われる場合、後天性要因の除外を行った後、臨床所見と免疫学的所見の検討を行い、最終的に複数の重症複合免疫不全症の hypomorphic な遺伝子変異を同定する。残存活性がない場合は、母由来 T 細胞の有無を検討し、オーメン様症候群あるいは重症複合免疫不全症の鑑別診断を行う。

<オーメン症候群の診断フローチャート>



E. 診断基準

臨床症状と免疫学的検査所見を満たし、RAG1 あるいは RAG2 遺伝子を含む上記重症複合免疫不全症の責任遺伝子の hypomorphic な遺伝子変異を認める場合にオーメン症候群と診断する。

重症度分類：重症

通常生後数ヶ月以内に日和見感染を含む様々な重症感染症を発症するため、継続的な感染症及び合併症に対する予防と治療を行う。副腎皮質ステロイド剤やシクロスポリン A などの免疫抑制剤の効果は一時的である。唯一の根治療法としては同種造血幹細胞移植があり、早期に施行されなかった場合の予後は不良である。

文献

- 1) Omenn GS. Familial reticuloendotheliosis with eosinophilia. N Engl J Med 1965; 273: 427-432.
- 2) Villa A, Santagata S, Bozzi F, et al. Partial V(D)J recombination activity leads to Omenn syndrome. Cell 1998; 93: 885-896.
- 3) Villa A, Sobacchi C, Notarangelo LD, et al. V(D)J recombination defects in lymphocytes due to RAG mutations: severe immunodeficiency with a spectrum of clinical presentations. Blood 2001; 97: 81-88.
- 4) Wada T, Toma T, Okamoto H, et al. Oligoclonal expansion of T lymphocytes with multiple second-site mutations leads

to Omenn syndrome in a patient with RAG1-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood* 2005; 106: 2099-2101.

- 5) Wong SY, Roth DB. Murine models of Omenn syndrome. *J Clin Invest* 2007; 117: 1213-1216.
- 6) de Villartay JP, Lim A, Al-Mousa H, et al. A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection. *J Clin Invest* 2005; 115: 3291-3299.
- 7) Avila EM, Uzel G, Hsu A, et al. Highly variable clinical phenotypes of hypomorphic RAG1 mutations. *Pediatrics* 2010; 126: e1248-1252.
- 8) Cassani B, Poliani PL, Marrella V, et al. Homeostatic expansion of autoreactive immunoglobulin-secreting cells in the Rag2 mouse model of Omenn syndrome. *J Exp Med* 2010; 207:1525-1540.
- 9) Wada T, Takei K, Kudo M, et al. Characterization of immune function and analysis of RAG gene mutations in Omenn syndrome and related disorders. *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 148-155.
- 10) Schandene L, Ferster A, Mascart-Lemone F, et al. T helper type 2-like cells and therapeutic effects of interferon-gamma in combined immunodeficiency with hypereosinophilia (Omenn's syndrome). *Eur J Immunol* 1993; 23: 56-60.
- 11) Markert ML, Alexieff MJ, Li J, et al. Complete DiGeorge syndrome: Development of rash, lymphadenopathy, and oligoclonal T cells in 5 cases. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 734-741.
- 12) Giliani S, Bonfim C, de Saint Basile G, et al. Omenn syndrome in an infant with IL7RA gene mutation. *J Pediatr* 2006; 148: 272-274.
- 13) Shibata F, Toma T, Wada T, et al. Skin infiltration of CD56bright CD16⁺ natural killer cells in a case of X-SCID with Omenn syndrome-like manifestations. *Eur J Haematol* 2007; 79: 81-85.
- 14) Roifman CM, Zhang J, Atkinson A, et al. Adenosine deaminase deficiency can present with features of Omenn syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121: 1056-1058.

D. 考察

Omenn 症候群について、その疾患概要、診断方法および重症度分類をまとめ、適切な診断のための指標となったと考える。

E. 結論

Omenn 症候群について、疾患概要、診断方法（臨床症状、検査所見、補助条項、診断の進め方とフローチャート、診断基準）、重症度分類、文献についてまとめた。

これにより、適切な診断のための指標とすることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakayama T, Sato Y, Uematsu M, Takagi M, Hasegawa S, Kumada S, Kikuchi A, Hino-Hukuyo N, Sasahara Y, Haginoya K, Kure S. Myoclonic axial jerks for diagnosing atypical evolution of ataxia telangiectasia. *Brain Dev.*, 37(3):362-365, 2015.
- 2) Ouchi-Uchiyama M, Sasahara Y, Kikuchi A, Goi K, Nakane T, Ikeno M, Noguchi Y, Uike N, Miyajima Y, Matsubara K, Koh K, Sugita K, Imaizumi M, Kure S. Analyses of genetic and clinical parameters for screening patients with inherited thrombocytopenia with small or normal-sized platelets. *Pediatr. Blood Cancer*, 62(12):2082-2088, 2015.
- 3) Sasahara Y. The WASP-WIP complex in the molecular pathogenesis of Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr. Int.*, 2015 in press.
- 4) 笹原洋二. 総説:ITP と鑑別が必要な小型・正常大の血小板を有する遺伝性血小板減少症. *日本小児血液・がん学会雑誌* 52(3):311-316, 2015.

2. 学会発表

- 1) Yoji Sasahara. Invited lecture: Hematopoietic stem cell transplantation for primary immunodeficiency and inborn errors of metabolism: a Japanese multicenter study. (口演). The Pediatric Hematology and Oncology Precision Therapy Forum, 2015 National CME Program in China, Shanghai, China. November 6th, 2015.
- 2) 笹原洋二. 特別講演:ITP と鑑別が必要な先天性血小板減少症・免疫不全症 (口演). 第1回山形血液研究会 (山形)、2015年9月25日.
- 3) 笹原洋二. 教育講演:原発性免疫不全症の分子病態から考察する細胞外寄生菌に対する生体防御機構 (口演). 第47回日本小児感染症学会 (福島)、2015年10月31日.
- 4) 笹原洋二. 招待講演:ITP と鑑別が必要な小型・正常大の血小板を有する先天性血小板減少症 (口演). 第23回

日本小児 ITP 研究会（甲府）、2015 年
11 月 27 日.

- 5) 笹原洋二、内山芽里、今泉益栄、呉
繁夫 . Plenary session
(English):Analyses of genetic and
clinical parameters for screening patients
with inherited thrombocytopenia with
small or normal-sized platelets. (口演) .
第 57 回日本小児血液・がん学会学術集
会（甲府）、2015 年 11 月 28 日.
- 6) 笹原洋二. ランチョンセミナー:小児
がんと免疫不全症を繋ぐ症例とその
分子病態 (口演) . 第 57 回日本小児
血液・がん学会学術集会（甲府）、2015
年 11 月 29 日.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

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。

複合免疫不全症
プリンヌクレオチド・ホスホリラーゼ欠損症の診断ガイドライン

研究分担者 小野寺雅史 国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部部長

研究要旨

プリンヌクレオチド・ホスホリラーゼ (PNP) はプリン代謝酵素で、PNP が欠損すると細胞内に deoxyGuanosine triphosphate (dGTP) が蓄積し、この dGTP が RNA から DNA への変換に重要な ribonucleotide reductase を著しく傷害するため、患者は T 細胞不全を主体とする免疫不全を呈する。また、2/3 の患者で進行性神経症を発症し、1/3 の患者で様々な自己免疫性疾患を呈する。検査上の特徴として T 細胞は減少するが、B 細胞数は比較的保たれ、高度の低尿酸血症を呈する。診断は、T 細胞不全による臨床症状と血中・尿中尿酸値の低下にて本疾患を疑い、タンデムマススペクトロメーターにてプリンヌクレオチド等の異常値を確認し、最終的に PNP 遺伝子解析にて確定診断に至る。なお、予後は不良であり、造血幹細胞移植が唯一の根治療法である。

A. 研究目的

核酸代謝酵素のプリンヌクレオチド・ホスホリラーゼ (PNP) は細胞障害等の際に生じる核酸を再利用するサルベージ経路において必須の酵素で、この経路において PNP は deoxyadenosine、adenosine を deoxyinosine、inosine に、deoxyguanosine と guanosine を guanine に変換する。PNP が欠損すると細胞内に deoxyguanosine、guanosine が蓄積し、これらがリン酸化を受けることで deoxyguanosine triphosphate (dGTP) に変換され、RNA から DNA への変換を促す ribonucleotide reductase を強く抑制する。その結果、患者の胸腺細胞や未熟 T 細胞は障害を受け、T 細胞を主体とする免疫不全症を呈する。一方、B 細胞は T 細胞ほど障害を受けず、B 細胞数は比較的保たれる。

今回、PNP 欠損症に対する診断のガイドライン作成のため文献的調査を行い、また、PNP 欠損症診断のためのスクリーニング法開発についても検討した。

B. 研究方法

1. PNP 欠損症に関する疫学調査 : PubMed 等にて PNP 欠損症を検索した。

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

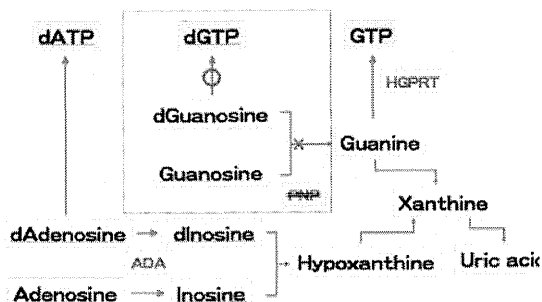
2. PNP 欠損症のスクリーニング法
 - (1) 上記ろ紙血を 4℃で測定時まで保存する。
 - (2) ろ紙血からのサンプル調整
 - 1) 1 パンチの乾燥血 (Dried Blood Spot: DBS)
 - 2) 溶質溶媒 5mM AcONH₄ を添加
 - 3) Voltex/ Sonic 30 分 on ice
 - 4) 37℃で 30 分間反応
 - 5) アセトニトリル添加
 - 6) 遠心にて上清を回収
 - 7) 乾燥
 - 8) 5mM AcONH₄/ アセトニトリルで 10 倍希釈
 - (3) LC/MS/MS 解析
 - 1) HPLC; Prominence UFLC system Column; Merck ZIC-HILIC)
 - 2) MS; LCMS-8030 Triple quadrupole mass spectrometer

(倫理面への配慮)

施設内の倫理審査委員会の承認を得、データは連結可能匿名化し、個人情報保護法を遵守する。

C. 研究結果

1. PNP 欠損症の病態



PNP が欠損すると細胞内に deoxyguanosine、guanosine が蓄積し、これらがリン酸化を受けることで deoxyguanosine triphosphate (dGTP) に変換される。この dGTP は RNA から DNA への変換を促す ribonucleotide reductase を強く抑制することから、T 細胞を主体とする免疫不全症を呈する。

2. PNP 欠損症の概要

別表 1 参照

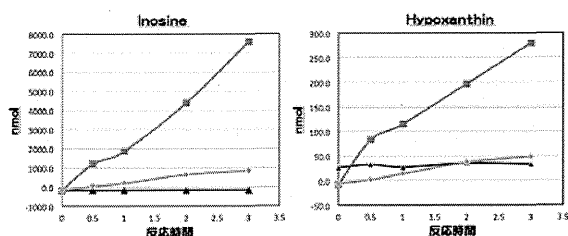
3. 診断ガイドラン

- (1) 易感染性等にて T 細胞不全を疑い、リンパ球数、FCM、リンパ球機能解析を行う。
- (2) 上記に加え、神経症状、尿酸値の低下があれば、TMS にてプリンヌクレオチド等の異常値を確認する。
- (3) 最終的には PNP 遺伝子解析にて確定診断に至る

4. スクリーニング法

ろ紙血より得られた検体に基質として adenosine と inosine を加え、その後、産生される inosine、hypoxanthin の量を TMS で調べた。

(赤：健常人、黒と茶は ADA 欠損症患者)。



健常人は反応時間と共に inosine 及び Hypoxanthin 量が増え、ADA 欠損症患者ではいずれのヌクレオシドの増加を認めない。

PNP 患者の場合、ADA 活性は保たれているので、Inosine の増加は認めるが、Hypoxanthin の低値のままである、

D. 考察

PNP 欠損症は極めて稀な疾患で、国内ではこれまでに 1 例が報告されているのみである。ただ、症状は T 細胞不全を主体とする重症免疫不全症 (SCID) であり、また、尿酸値の低値は診断価値が高いため、診断に至る経緯はさほど難しくはない。ただ、TMS での測定は一般的ではないため、その後、確定診断に時間が要する可能性はある。

また、本疾患は、ADA 欠損症同様、先天代謝異常症の範疇に入り、進行性の神経症を併発することから、治療法である造血幹細胞移植を如何に早く行うかが肝要である。その意味でも、ろ紙血を用いた新生児マススクリーニングの導入はこれら問題点を解決する可能性があり、TREC のより SCID のスクリーニングに加え、ADA 欠損症、PNP 欠損症を含めた先天代謝異常症に対する新生児スクリーニングの早期導入が必要と考える

E. 結論

- PNP 欠損症の診断ガイドランを提示した。
- PNP は極めて稀な疾患であるが、T 細胞不全を主体とする免疫不全症、低尿酸血症等により比較的困難なく診断が可能な疾患と思われる。
- ただ、プリンヌクレオチド等を測定する TMS は一般的ではないため、新生児スクリーニングの導入を含め、これらプリンヌクレオチドを測定する体制を整えることが必要と思われる。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Nakazawa Y, Kawai T, Uchiyama T et al: Effects of enzyme replacement therapy on immune function in ADA deficiency patient.

Clin Immunol 161: 391-393, 2015.

2. Kawai T, Arai K, Harayama S, et al: Severe and Rapid Progression in Very Early-Onset Chronic Granulomatous Disease-Associated Colitis. *J Clin Immunol* 35: 583-588, 2015.
3. Takeuchi Y, Takeuchi E, Ishida T et al: Curative haploidentical BMT in a murine model of X-linked chronic granulomatous disease. *Int J Hematol* 102: 111-120, 2015.
4. Otsu M, Yamada M, Nakajima S et al: Treatment Outcomes in Two Japanese Adenosine Deaminase-Deficiency Patients Treated by Stem Cell Gene Therapy with No Cytoreductive Conditioning. *J Clin Immunol* 35: 384-398, 2015.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

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。