

- MA, Hsu P, Campbell DE, Stormon MO, Wong M, Adelstein S, Smart JM, Fulcher DA, Cook MC, Phan TG, Stepensky P, Boztug K, Kansu A, İkinçioğullari A, Baumann U, Beier R, Roscioli T, Ziegler JB, Gray P, Picard C, Grimbacher B, Warnatz K, Holland SM, Casanova JL, Uzel G, Tangye SG: Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 136: 993-1006, 2015.
- 4) Kobayashi M: Neutrophil disorders: diagnosis and hematopoietic stem cell transplantation. *Rinsho Ketsueki* 56: 2230-9, 2015.
 - 5) Okada S, Markle JG, Deenick EK, Mele F, Averbuch D, Lagos M, Alzahrani M, Al-Muhsen S, Halwani R, Ma CS, Wong N, Soudais C, Henderson LA, Marzouqa H, Shamma J, Gonzalez M, Martinez-Barricarte R, Okada C, Avery DT, Latorre D, Deswarte C, Jabot-Hanin F, Torrado E, Fountain J, Belkadi A, Itan Y, Boisson B, Migaud M, Arlehamn CS, Sette A, Breton S, McCluskey J, Rossjohn J, de Villartay JP, Moshous D, Hambleton S, Latour S, Arkwright PD, Picard C, Lantz O, Engelhard D, Kobayashi M, Abel L, Cooper AM, Notarangelo LD, Boisson-Dupuis S, Puel A, Sallusto F, Bustamante J, Tangye SG, Casanova JL: Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science* 349: 606-13, 2015.
 - 6) Kataoka S, Muramatsu H, Okuno Y, Hayashi Y, Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Kobayashi M, Sano C, Sato H, Oh-Iwa I, Ito M, Kojima D, Hama A, Takahashi Y, Kojima S: Extrapulmonary tuberculosis mimicking Mendelian susceptibility to mycobacterial disease in a patient with signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutation. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Aug 1. pii: S0091-6749(15)00881-7. doi: 10.1016/j.jaci.2015.06.028. [Epub ahead of print] No abstract available. PMID: 26242301
 - 7) Hirata O, Okada S, Tsumura M, Karakawa S, Matsumura I, Kimura Y, Maihara T, Yasunaga S, Takihara Y, Ohara O, Kobayashi M: Mosaicism of an ELANE mutation in an asymptomatic mother in a familial case of cyclic neutropenia. *J Clin Immunol* 35: 512-6, 2015.
 - 8) Wilson RP, Ives ML, Rao G, Lau A, Payne K, Kobayashi M, Arkwright PD, Peake J, Wong M, Adelstein S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Picard C, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Gray P, Stepensky P, Warnatz K, Freeman AF, Rossjohn J, McCluskey J, Holland SM, Casanova JL, Uzel G, Ma CS, Tangye SG, Deenick EK. STAT3 is a critical cell-intrinsic regulator of human unconventional T cell numbers and function. *J Exp Med* 212: 855-64, 2015.
 - 9) Yoshioka A, Ishii E, Ueno T, Usami I, Kobayashi M, Kobayashi R, Sotomatsu M, Shirahata A, Suzuki T, Taki M, Ishida Y, Matsushita T, Shima M, Nogami K, Sakai M, Kigasawa H, Fukutake K: The International Immune Tolerance Induction Study and its follow-up study on Japanese hemophilia A

patients with inhibitors. *Int J Hematol* 101: 362-8, 2015.

- 10) Nishikawa S, Toshima T, Kobayashi M: Perceived parenting mediates serotonin transporter gene (5-HTTLPR) and neural system function during facial recognition: A pilot study. *PLoS One* 10: e0134685, 2015.

2. 学会発表

- 1) Nishimura S, Tsumura M, Hirata O, Reiko Kagawa, Mizoguchi Y, Okada S, Kobayashi M: MSMD Patients with IFN- γ -STAT1 Signaling Defect Present Enhanced Osteoclastogenesis and Bone Resorption. The 57th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, Dec 5-8. 2015.
- 2) Saito S, Nishimura S, Tsumura M, Mizoguchi Y, Sakata S, Furue A, Kobayashi M: A comparison of myelopoiesis from induced pluripotent stem cells with a mutation in *ELANE* between cyclic neutropenia and severe congenital neutropenia. The 57th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, Dec 5-8. 2015.
- 3) Okada S, Markle J, Kobayashi M, Bustamante J, Casanova JL: Impairment of IL-17 immunity to *Candida* and IFN γ immunity to *Mycobacterium* in humans with bi-allelic *Rorc* mutations. The 57th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, Dec 5-8. 2015.
- 4) Nishimura S, Tomioka K, Mizoguchi Y, Karakawa K, Miki M, Kawaguchi K, Nakamura K, Kobayashi M: Successful retransplantation of bone marrow cells

following failure of initial engraftments in 4 SCN patients. The 12th Asian Society for Pediatric Research, Osaka, Japan, April 15-18, 2015.

- 5) Saito S, Mizoguchi Y, Furue A, Chijimatsu I, Miki M, Tomioka T, Konishi N, Ono A, Kawaguchi H, Nakamura K, Kobayashi M: Early elimination of FVIII inhibitor in congenital hemophilia A cases with inhibitors by immune tolerance induction with a high dose of immunoglobulin. The 12th Asian Society for Pediatric Research, Osaka, Japan, April 15-18, 2015.
- 6) 小林正夫：好中球異常症：診断と造血幹細胞移植. 第77回日本血液学会教育講演22 2015年10月18日 金沢.

F. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

九州における家族性血球貪食症候群(FHL)の現状

石村 匡崇¹⁾, 江口 克秀¹⁾, 園田 素史¹⁾, 白石 暁¹⁾,
興梠 雅彦³⁾, 松本 志郎³⁾, 橋本 邦生⁴⁾, 高田 英俊¹⁾²⁾

1)九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 2)九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学
3)熊本大学医学部小児科 4)長崎大学医学部小児科学教室

研究要旨

家族性血球貪食症候群(FHL)は Perforin や Perforin を含む細胞傷害顆粒放出機構の異常により発症する稀な原発性免疫不全症である。血球貪食性リンパ組織球症(HLH)を唯一の表現型とし、確定診断には蛋白発現解析、NK 細胞活性測定や遺伝子検査を必要とする。今回我々が診断に携わった九州内の FHL 症例を検討し報告する。2012 年 1 月から 2015 年 9 月で FHL と確定診断した症例は 7 例であった。病型は、FHL2 が 6 例、FHL3 が 1 例であった。FHL2 は全例生後 1 か月までに発症し、2 例は胎内発症であった。FHL3 の 1 例は 15 歳発症の late-onset であった。遺伝子変異の特徴として、FHL2 の 6 例中 4 例が PRF1 遺伝子に c.1090_1091delCT の変異を有しており、これまで本邦で多く報告されている変異を認めた。また、FHL2 の 1 例で Perforin 蛋白発現は認めるが機能異常を示す新規のミスセンス変異(*PRF1* c.311G>C, p.Arg104Pro)を同定した。蛋白発現解析のみでは診断に至らない症例もあり、診断に苦慮する症例では蛋白機能異常にも留意することが必要である。

A. 研究目的

家族性血球貪食症候群 (FHL) は Perforin や Perforin を含む細胞傷害顆粒放出機構の異常により発症する稀な原発性免疫不全症である。血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) を唯一の表現型とし、確定診断には蛋白発現解析、NK 細胞活性測定や遺伝子検査を必要とする。遺伝子変異により 1～5 型に分類されているが、本邦では 2 型 (Perforin 欠損症:*PRF1* 変異) が 1/3、3 型 (Munc13-4 欠損症:*UNC13D* 変異) が 1/3、5 型 (Munc18-2 欠損症) が数%を占めるとされている¹⁾。日本人に多い *PRF1* 遺伝子の変異として、c.1090_1091delCT が 62.5%、c.207delC が 37.5%に認められたと報告されている²⁾³⁾。特に *PRF1*

c.1090_1091delCT 変異をもつ症例の家系をたどると、西日本、特に九州に起源をもつ症例が大半であったと報告された³⁾。

FHL は、診断後に適切な治療を行った場合でも生存率は約 30%程度であり、造血幹細胞移植を行った症例も 10 年生存率は 65%と非常に致死率の高い疾患である⁴⁾⁵⁾。生存例においても神経学的後遺症 (発達遅滞、てんかん、脳萎縮、難聴) が約 30%の症例にみられ⁵⁾、FHL は早急に適切な診断、治療を必要とする原発性免疫不全症である。今回我々は、当院で診断、治療に関わった九州の FHL 症例を解析し、九州における FHL の現況をまとめることを目的とした。

B. 研究方法

当院で 2012 年 1 月から 2015 年 9 月に HLH-2004 改訂に基づき HLH と診断し、蛋白発現解析、NK 細胞活性、遺伝子解析により FHL と診断した 7 症例を対象とした。Perforin 蛋白発現は、細胞内染色によるフローサイトメトリーにより行った。また、Perforin/Munc13-4 蛋白解析 (Western blotting) は、京都大学小児科八角先生に施行していただいた。細胞 killing assay (^{51}Cr release assay) は c.311G>C, p.Arg104Pro 変異に関し、過去報告された方法と同様の方法で解析していただいた⁶⁾ (Dr. Ilia Voskoboinik, Killer Cell Biology Laboratory Cancer Immunology Research, Peter MacCallum Cancer Centre, Australia)。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析は当院の倫理委員会で承認を受け、説明の上書面で保護者に同意をえてから解析を行った。

C. 研究結果

FHL を 7 例同定し、FHL2 が 6 例、FHL3 は 1 例であった (表 1)。全例 NK 細胞傷害活性を認めなかった。診断時年齢中央値は 25 生日で、FHL2 は全例生後 1 カ月以内に発症していた。FHL3 の 1 例は 13 歳発症の Late onset であった。性別は男性 3 名、女性 4 名であった。生存例は 4 例で、造血幹細胞移植を受けた 4 例が全例生存していた。肝不全により生体肝移植を施行した 1 例は、肝臓移植後に HLH が再燃し、造血幹細胞移植前に死亡した。出身地は、福岡県が 4 例 (うち FHL2 が 3 例、FHL3 が 1 例) で、長崎県、熊本県、宮崎県が 1 例であった。

遺伝子変異に関しては、FHL2 の 6 例のうち 4 例で c.1090_1091delCT を有しており、そのうち 1 例はホモ接合性変異であった。また、c.207delC を 1 例同定した。c.311G>G,

p.Arg390X 変異は 2 例でみとめられ、1 例はホモ接合性変異であった。ホモ接合性変異の 2 例はいずれも血族婚は認めなかった。症例 2 は Perforin 蛋白発現をフローサイトメトリー、Western blotting いずれの方法でも認めたが、NK 細胞傷害活性は 0% であった。PRF1 の c.311G>C, p.Arg104Pro 変異での killing assay で、本変異で細胞傷害能を認めず (図 1)、症例 2 は Perforin 機能異常による FHL2 と最終診断した。

臨床経過に関しては、発症時に HLH と診断された症例は 2 例のみで、肝へモクロマトーシス疑いが 3 例、悪性疾患疑いが 2 例であった (表 2)。肝不全合併例は 4 例で、うち 1 例に生体肝移植が行われたが、生体肝移植例も含め 3 例が死亡した。造血幹細胞移植まで至った症例は全例生存し、Mixed Chimera でも再燃は認めていない。ただし、生存 4 例中 3 例に神経学的後遺症をきたしていた。

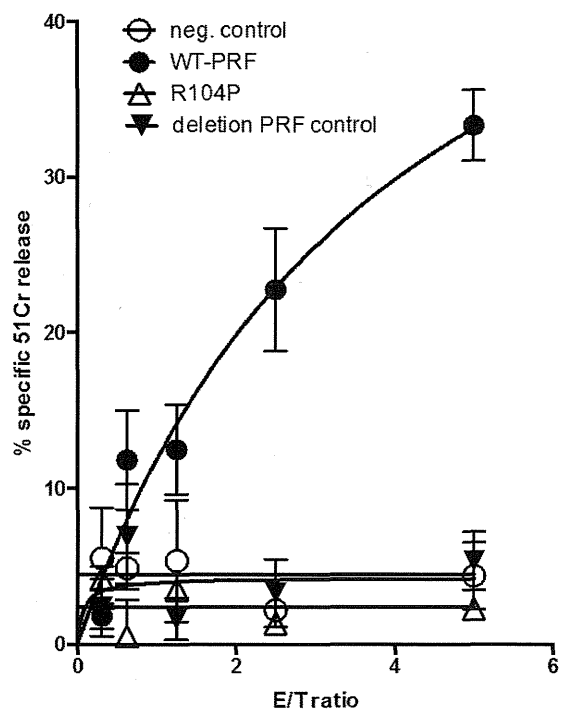


図 1. Killing assay (^{51}Cr release assay)

Perforin R104P 変異を一過性にマウス Prf1^{-/-}CTL に導入し、Jurkat T 細胞株を標的細胞として ^{51}Cr 放出による細胞傷害活性を評価した。

D. 考察とまとめ

九州では FHL2 が多くを占めており、これまでの報告と同様 *PRF1* c.1090_1091delCT 変異を有する症例を多く認めた。その他、既報告の c.207delC や c.311G>G, p.Arg390X を認め九州に FHL2 が多いのは founder effect があると考えられた。初期診断から FHL を疑われた症例は 2 症例しかなく、胎内発症あるいは新生児期発症の原因不明の肝不全では予後が悪いため FHL を早期に鑑別する必要があると考えられた。早期に診断し、臓器障害が進行する前に造血幹細胞移植まで至れば FHL は救命し得るが、生存例でも神経学的後遺症をきたしている症例が多く、早期診断法および治療法の改善が望まれる。

Perforin 機能異常症の FHL2 を同定し、Perforin 蛋白発現を認める症例でも FHL を否定できないことが示された。そのため、FHL 診断において NK 細胞傷害活性測定や CTL killing assay が有用であると考えられた。

参考文献

1. 八角高裕 医学のあゆみ 238(11): 1048-1052 2011
2. Ishii E. et al., Crit Rev Oncol Hematol 2005, 53(3):209-23.
3. Ueda I. et al., Br J Haematol. 2003, 121(3): 503-10.
4. Suzuki N. et al., J Pediatr 2009, 155(2): 235-8.
5. Ohga S. et al., Pediatr Blood Cancer 2010, 54(2): 299-306.
6. Voskoboinik I et al., Blood 2005, 15:105(12): 4700-6

E. 研究発表

1. Yamamoto H, Ishimura M, Ochiai M, Takada H, Kusuhara K, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Mitani K, Hara T: BTK gene targeting by homologous recombination

using a helper-dependent adenovirus/adenovirus hybrid vector. Gene Ther 2015 (Epub ahead of print)

2. Takimoto T, Takada H, Ishimura M, Kirino M, Hata K, Ohara O, Morio T, Hara T: Wiskott-Aldrich syndrome in a girl caused by heterozygous WASP mutation and extremely skewed X-chromosome inactivation: a novel association with maternal uniparental isodisomy 6. Neonatology 107(3):185-90, 2015.
3. Takada H, Ishimura M, Takimoto T, Kohagura T, Yoshikawa H, Imaizumi M, Shichijyou K, Shimabukuro Y, Kise T, Hyakuna N, Ohara Osamu, Nonoyama S, Hara T: Invasive bacterial infection in patients with interleukin-1 receptor-associated kinase 4 deficiency. Medicine (Baltimore) (in press)

F. 知的財産の出願・登録状況

特になし

	病型	出身地	遺伝子変異	蛋白	NK 細胞 傷害活性
1	FHL2	宮崎	<i>PRF1</i> 遺伝子 c.1090_1091delCT, c.1168C>T; p.Arg390X	Perforin 欠損	0%
2	FHL2	長崎	<i>PRF1</i> 遺伝子 c.1090_1091delCT, c.311G>C, p.Arg104Pro	Perforin 発現あり	0%
3	FHL2	熊本	<i>PRF1</i> 遺伝子 c.1168C>T; p.Arg390X (Homo)	Perforin 欠損	0%
4	FHL2	福岡	<i>PRF1</i> 遺伝子 c.207delC(Hetero)	Perforin 欠損	0%
5	FHL2	福岡	<i>PRF1</i> 遺伝子 c.1090_1091delCT, c.1288_1289insG	Perforin 欠損	0%
6	FHL2	福岡	<i>PRF1</i> 遺伝子 c.1090_1091delCT (Homo)	Perforin 欠損	0%
7	FHL3	福岡	<i>UNC13D</i> 遺伝子 c.1240C>T, p.Arg414Cys, c.1992+1G>A	Munc13-4 欠損	0%

表 1. FHL7 例の遺伝子・蛋白発現解析

	発症年齢	発症時診断	合併症	治療	転帰	治療後合併症
1	胎内	肝 ヘモクロマトーシス	肝不全	VP-16, DEX, CyA	死亡 (日齢 27)	-
2	胎内	肝 ヘモクロマトーシス	肝不全	VP-16, DEX, CyA, Lipo-DEX, HSCT	生存 (CC)	発達遅滞
3	日齢 24	HLH	なし	VP-16, DEX, CyA, HSCT(2 回)	生存 (CC)	なし
4	日齢 25	急性骨髄性白血病 (M7)	肝不全	VP-16, DEX CyA	死亡 (2 か月)	-
5	1 か月	HLH	頭蓋内出血	HLH-2004 HSCT	生存 (MC)	発達遅滞 症候性てんかん
6	1 か月	肝 ヘモクロマトーシス	肝不全	mPSL パルス, VP-16, DEX, 生体肝移植	死亡 (3 か月)	-
7	15 歳	末梢性 T 細胞性 リンパ腫	脳症	VP-16, DEX, CyA, it-MTX, HSCT	生存 (CC)	脳症後遺症 気管支拡張症

表 2. FHL7 例の臨床経過

CC: complete chimera, HSCT: 造血幹細胞移植, MC: mixed chimera,

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

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
研究協力者 河合 利尚 国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部 室長

(研究要旨) 原発性免疫不全症 (PID) の早期診断は、生命予後に影響する。そこで、新生児の乾燥ろ紙血を用いて、新生児PIDマススクリーニングのパイロット研究を開始した。当院で出生した正期産の新生児を対象に、日齢5にろ紙血を採取し、DNAを抽出してTREC値を測定した。

これまで、303例についてスクリーニングを実施し2例が異常値を示したが、PIDは否定的だった。結果は生後平均23.7±5.3日目に郵送で送付され、異常値を示した症例については速やかに電話連絡がなされ専門医による診療を受けた。本研究では、同意説明・取得から測定、結果送付、検査異常者への対応まで一連のシステムを単施設で構築した。今後、他施設の検体受入および外部施設への検査委託など、国内大規模スクリーニングを視野に入れた実施体制について検討を進める。

A. 研究目的

原発性免疫不全症 (PID) は、病原体に対して易感染性を示す疾患群である。このうち、重症複合免疫不全症 (SCID) は診断に急を要し、1歳までに根治的治療を行わないと生存率は極端に低下する。

また、昨今では生後6週から生ワクチンの接種が行われるようになり、未診断患児が病原性感染症を発症する可能性がある。安全な予防接種の在り方を考えたときこの問題は重大である。このように重症PID患者を感染症罹患前 (新生児早期) に診断することで、重症感染症の無い状態で根治的治療を行うことができ、患者の生命予後の改善が期待される。そこで、本研究ではPID患者の早期診断を可能にする新生児スクリーニング法の確立を目指し、当センターで出生した新生児から得られた乾燥ろ紙血による微量サンプルを用いて新生児PIDマススクリーニング実

施体制を検証した。

B. 研究方法

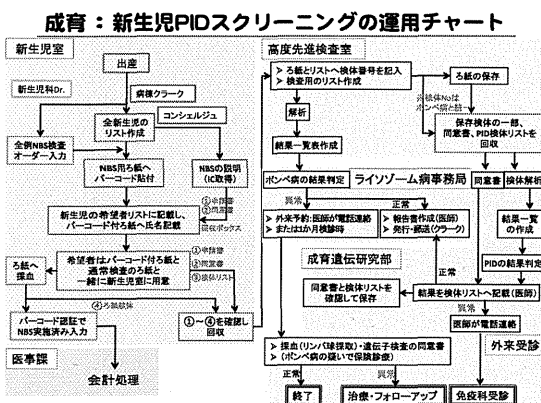
当センター倫理委員会で承認された実施計画『乾燥ろ紙血を用いた免疫不全症のスクリーニング法の開発』を遵守し研究を行った。国立成育医療研究センター病院で『血液ろ紙を用いた微量サンプルによるポンペ病診断の開発』臨床研究のスクリーニングに参加し、本研究について保護者のインフォームドコンセントを取得した新生児を対象とした。被験者は、在胎37週以降、2500g以上で出生した児 (新生児集中治療室の新生児を除く) で、乾燥ろ紙血からDNAを抽出し、定量PCR (Roche LightCycler 480システム) にてTRECとβアクチンのコピー数を測定した。なお、ろ紙血は、『血液ろ紙を用いた微量サンプルによるポンペ病診断の開発』臨床研究のために採取された乾燥ろ紙血の残検体を用いた。

結果報告書を全例に郵送し、異常値を示した症例は当センター免疫科を受診するよう電話連絡を行った。

C. 研究結果

1. 実施体制の構築

新生児PIDマスキングの実施にあたり、新生児科と産科の医師、病棟事務職、高度先進検査室スタッフと連携し、下図の運用チャートに従って体制を整備した。両親への説明は女性コンシェルジュ3名が担当し、大きな混乱はなかった。定量PCR解析は、技術者1名が行い、医師が測定結果を判定した。



2. 新生児PIDスクリーニングに対する両親の関心

当センターでは、通常、出生後5日目に退院となるため、出産後5日以内に本研究の説明を母親あるいは父親へ行った。

今回、本研究の参加予定者は331名だったが、体調不良、不在、授乳中などの理由で本研究の説明を十分に受けられず、28名が不参加となった。303名(91.5%)が本研究へ参加し、不参加の症例を含めて、検査に対して否定的な意見はなかった。

3. 解析結果

これまでの報告を参考に、TRECのカットオフ値を40 copies/spotとした。同時にβアクチ

ンを測定し、DNA抽出のコントロールとして用いた。その結果、TREC低値を示した検体は、303検体中2検体(0.6%)であった。この2症例は、免疫科外来で再検査とリンパ球サブセット解析を行い、SCIDを含む重症PIDは否定的であることが明らかとなった。

本研究ではPIDの早期診断を目的とすることから、出生日から解析結果送付までの期間について検討したところ、23.7±5.3日(平均日数±SD)であった。

4. 新生児PIDスクリーニング異常者の検討

本研究では、TRECの異常値が検出された場合、以下の手順で再検査を実施した。

- 1) 初回の定量PCRで異常値が検出された場合、初回パンチで抽出した残存DNAを用いて、再度、定量PCR解析。
- 2) 1)で異常値が検出された場合、保存ろ紙血を再パンチし、DNAを抽出して定量PCR解析。

今回、上記の1)、2)の再検査で異常値を示した症例は2例であった。このうち、1例は定量PCRのDuplication sampleの片方のみが検出感度以下であった。別の1例は、Duplication sampleの両方ともカットオフ値を下回っていた。この2例について、免疫科受診の際、再度、ろ紙血を採取しTRECを測定したところ、正常レベルであり、リンパ球サブセット解析や臨床症状の異常は認めなかった。

D. 考察

新生児マスキングの対象疾患の条件として、「発病前に見つかる病気であること」、「新生児の負担にならない検査であること」、「制度の高い検査方法であること」などが提唱されている。そのため、今後も医学

の進歩に伴い対象疾患の増加が推測される。重症PIDであるSCIDは、感染症に罹患せず早期診断されることで、根治療法の治療成績は飛躍的に改善する。さらに、本研究班をはじめとする専門医療機関がPID診療の拠点病院として全国で機能しており、診断後の医療体制も整備されている。また、本研究の調査から、本マススクリーニングは家族からも要望されていることが明らかとなった。そのため、新生児PIDマススクリーニングは、医学的、社会的に必要性の高い検査と考える。

本スクリーニングでは、TREC値のカットオフを40 copies/spotと設定した。Jet van der Spekらの報告 (J Clin Immunol. 2015) によると、13論文で新生児315万人のシステマティックレビューから、典型的なSCID患者では、TRECカットオフ値25 copies/ulで100%の診断率であった。しかし、毛細血管拡張性運動失調症やDiGeorge症候群、ADA欠損症など、他のT細胞減少症の疾患も網羅するために、TRECカットオフ値を100 copies/ulとした報告もあった。また、本研究では早産児や先天性疾患を合併した新生児を除外している。そのため、今後、全ての新生児に対してPIDマススクリーニングを実施するためには、さらなる解析アルゴリズムの検討が必要と考える。

E. 結論

本研究では、同意説明・取得から測定、結果送付、検査異常者への対応まで一連の新生児PIDマススクリーニング/診療システムを単施設で構築した。本マススクリーニングは、重症PIDスクリーニング検査として医学的に有用であり、社会的に要望の高い検査である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nakazawa Y, Kawai T, Uchiyama T, et al.: Effects of Enzyme Replacement Therapy on Immune Function in ADA Deficiency Patient. Clin Immunol. 2015 Dec;161(2):391-3.

2. 学会発表

Kawai T, Goto F, Nakazawa Y, et al.: A Gene Therapy Clinical Study of a Patient with Chronic Granulomatous Disease, JSGCT, 2015, Osaka

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

研究分担者 小原 収 かずさDNA研究所 副所長

研究要旨

臨床情報の蓄積と原発性免疫不全症の確定診断を進めるために、本研究班からの臨床情報蓄積と研究班員から依頼された確定診断に向けた遺伝子解析を継続して実施した。それらの結果を依頼研究班員にフィードバックし、それぞれの免疫不全症の診断基準の設定のための基盤情報の蓄積に貢献した。

A. 研究目的

多様な臨床的な症状を呈する原発性免疫不全症の確定診断には、遺伝子検査が必須である。今回、種々の原発性免疫不全症の診断基準を確定する事を最終的な目的として、各症例ごとの原発性免疫不全症の原因となることが分かっている既知遺伝子の遺伝子解析依頼を本研究班全体から受け入れ、その結果をフィードバックすることにより、確定診断の実現に資する情報を提供することを目的とする。

B. 研究方法

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。解析結果は本研究班分担研究者に報告し、その評価は各分担者が行う形で進めた。ABI3130/3730 キャピラリーシーケンサー(Life Technologies, Applied Biosystems®)での解析を基本とするが、本年度からはイルミナ MiSeq による各免疫不全疾患毎のパネル診断に大きく解析方法をシフトした。PCR に依拠したアンプリコンシーケンシングを基本として解析を進めた。

(倫理面への配慮)

本研究での解析検体は、それぞれの研究分担者施設において同意書へのサインなどをいただいております。本研究分担者には匿名化された検体IDのみが通知される。この遺伝子解析に関しては、すべての関係する機関でヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則った研究であることを倫理審査委員会で確認・承認を受けた上で実施した。

C. 研究結果

今年度は12月末の時点までに本研究班の分担研究者から520症例の解析依頼を受け、解析した遺伝子数は3000を越えた。このペースは昨年度の解析症例数の約2倍(年度単位として)となっており、本研究班において活発に確定診断に向けた取組みがなされている事が見受けられた。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ていた。表1に、今年度12月までの解析遺伝子とそれぞれの解析症例数のリストを示す。現時点では9種類の疾患パネルを解析依頼者の希望に応じて準備し、それらを運用した。

表1. 2015年4月から12月までの遺伝子解析依頼状況

遺伝子名	解析依頼回数	遺伝子名	解析依頼回数	遺伝子名	解析依頼回数	遺伝子名	解析依頼回数
ACPS	3	FAS	4	KRAS	3	PTPRC	3
ADA	3	FASLG	4	LCK	3	RAB27A	1
ADAR	3	FLG	1	LIG4	5	RAG1	4
AIRE	1	FLT3	1	LPIN2	4	RAG2	4
AK2	3	FOXM1	4	LRBA	7	RMRP	3
ATM	3	FOXP3	2	MAGT1	2	RNASEH2A	3
ATR	3	GATA2	4	MCM4	1	RNASEH2B	3
BLM	1	GFI1	4	MEFV	135	RNASEH2C	3
BTK	6	HAX1	5	MRE11A	1	RORC	1
BTNL2	1	HMOX1	120	MS4A1	6	SAMHD1	3
C2	1	ICOS	6	MVK	125	SH2D1A	30
C3	1	IFIH1	4	MYD88	3	SLURP1	1
C9	1	IFNGR1	6	NBN	1	STAT1	11
CARD11	1	IFNGR2	6	NCF1	3	STAT2	1
CARD9	1	IKBKG	12	NCF2	2	STAT3	18
CASP10	5	IKZF1	1	NFKB1	4	STAT5A	3
CASP8	3	IL10	2	NFKB2	6	STAT5B	2
CD19	6	IL10RA	2	NFKBIA	4	STX11	25
CD247	3	IL10RB	2	NHEJ1	3	STXBP2	26
CD27	5	IL12B	6	NIPAL4	1	TBK1	1
CD3D	3	IL12RB1	6	NLRC4	123	TBX1	1
CD3E	3	IL17F	2	NLRP12	124	TCF3	1
CD3G	3	IL17RA	2	NLRP3	129	TMEM173	2
CD40LG	4	IL17RC	1	NOD2	126	TNFRSF13B	6
CD81	6	IL1RN	120	NRAS	1	TNFRSF13C	6
CD8A	3	IL2RA	1	PGM3	1	TNFRSF1A	127
CECR1	10	IL2RB	1	PIK3CD	7	TRAF3IP2	2
CORO1A	3	IL2RG	18	PIK3R1	3	TREX1	3
CR2	6	IL7R	4	PLCG2	127	TRNT1	1
CTLA4	8	IRAK4	3	PNP	3	TYK2	11
CYBB	9	IRF8	9	PRF1	29	UNC13D	26
DCLRE1C	3	ISG15	7	PRKDC	3	WAS	18
DOCK8	10	ITK	24	PSMB8	123	WIPF1	8
ELANE	7	JAK3	10	PSTPIP1	122	XIAP	31
						ZAP70	3

D. 考察

比較的症候から原因遺伝子が明確に同定できる疾患と、遺伝的な素因を確定診断するのが困難な疾患が明確化してきた。遺伝的検査は現在の診断基準でも確定診断に至る必須の情報となっており、これらの解析情報の蓄積は重要である。その解析処理量も近年著しい向上を見せているので、今後より多くの候補既知遺伝子が網羅的な遺伝子解析によって同定されてくることにより、更に高効率に確定診断が実現できると期待できる。本研究では探索的な新規原因遺伝子探索は行わなかったが、そうした探索研究も医科学研究として活発に進められており、臨床的にその研究成果が活かされるのは間違いないと考えられる。

E. 結論

継続的な遺伝子解析を研究班内で実施する事により、たくさんの症例における遺伝子型と疾患表現型の関連データを蓄積できた。このデータを活用する事により、必ずしも疾患症状からだけでは原因の確定に至れない症例に対しても、遺伝学的な検査によってより高精度・高効率に確定診断できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saida S, Umeda K, Yasumi T, Matsumoto A, Kato I, Hiramatsu H, Ohara O, Heike T, Adachi S. Successful reduced-intensity stem cell transplantation for GATA2 deficiency before progression of advanced MDS. *Pediatr Transplant*. 2016 Jan 8. [Epub ahead of print]
- 2) Hayakawa S, Okada S, Tsumura M, Sakata S, Ueno Y, Imai K, Morio T, Ohara O, Chayama K, Kobayashi M. A Patient with CTLA-4 Haploinsufficiency Presenting Gastric Cancer. *J Clin Immunol*. 2016 Jan;36(1):28-32.
- 3) Hara Y, Kobayashi N, Maruyama Y, Motobayashi M, Shigemura T, Ohara O, Agematsu K, Koike K. Analysis of Mutations in the IL2RG Gene in 2 Asian Infants with X-linked Severe Combined Immunodeficiency. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2015;25(4):313-5.
- 4) Yasutomi M, Yoshioka K, Mibayashi A, Tanizawa A, Imai K, Ohara O, Ohshima Y. Successful Myeloablative Bone Marrow Transplantation in an Infant With Wiskott-Aldrich Syndrome and Bacillus Calmette-Guerin Infection. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 Nov;62(11):2052-3.
- 5) Kido J, Mizukami T, Ohara O, Takada H, Yanai M. Idiopathic disseminated bacillus Calmette-Guerin infection in three infants. *Pediatr Int*. 2015 Aug;57(4):750-3.
- 6) Hirata O, Okada S, Tsumura M, Karakawa S, Matsumura I, Kimura Y, Maihara T, Yasunaga S, Takihara Y, Ohara O, Kobayashi M. Mosaicism of an ELANE mutation in an asymptomatic mother in a familial case of cyclic neutropenia. *J Clin Immunol*. 2015 Jul;35(5):512-6.
- 7) 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 LD, Imai K, Nonoyama S. RAG1 deficiency may present clinically as selective IgA deficiency. *J Clin Immunol*. 2015 Apr;35(3):280-8.
- 8) Takimoto T, Takada H, Ishimura M, Kirino M, Hata K, Ohara O, Morio T, Hara T. Wiskott-Aldrich syndrome in a girl caused by heterozygous WASP mutation and extremely skewed X-chromosome inactivation: a novel association with maternal uniparental isodisomy. *Neonatology*. 2015;107(3):185-90.

2. 学会発表

- 1) 園田 素史、石村 匡崇、松岡 若利、山下 文也、江口 克秀、高田 英俊、小田 紘嗣、小原 収、重症 RSV 肺炎を契機に診断された色素失調症を伴う外胚葉形成不全免疫症の男児、第9回日本免疫不全症研究会、2016年1月23

- 日 東京
- 2) 戸澤 雄介、山田 雅文、Abdrabou Shima、植木 将弘、竹崎 俊一郎、小林 一郎、有賀 正、小田 紘嗣、小原 收、alopecia を伴う進行性 B 細胞欠損を呈した NFKB2 ヘテロ変異例、第 9 回 日本免疫不全症研究会、2016 年 1 月 23 日 東京
- 3) 早川 誠一、岡田 賢、土居 岳彦、小林 正夫、星野 顕宏、高木 正稔、今井 耕輔、朴 今花、金兼 弘和、山下 基、岡野 翼、森尾 友宏、村松 秀城、奥野 友介、小島 勢二、鹿間 芳明、加藤 環、小田 紘嗣、小原 收、林 泰秀、田中 洋子、宮野 悟、白石 友一、千葉 健一、宮野 悟、吉田 健一、上野 浩生、小川 誠司、CTLA-4 ハブプロ不全による原発性免疫不全症の 9 例、第 9 回 日本免疫不全症研究会、2016 年 1 月 23 日 東京
- 4) 關中 佳奈子、加藤 環、關中 悠仁、野々山 恵章、今井 耕輔、高島 健浩、大西 秀典、加藤 善一郎、岡本 典子、小原 收、軽度 T 細胞機能不全と NK 細胞数減少を呈し、エクソーム解析にて IL2RG 新規変異を同定した兄弟例、第 9 回 日本免疫不全症研究会、2016 年 1 月 23 日 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

資 料

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型免疫不全症(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 連鎖性遺伝形式をとる。

【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 を含む重症複合型免疫不全症の責任遺伝子の hypomorphic 変異による。

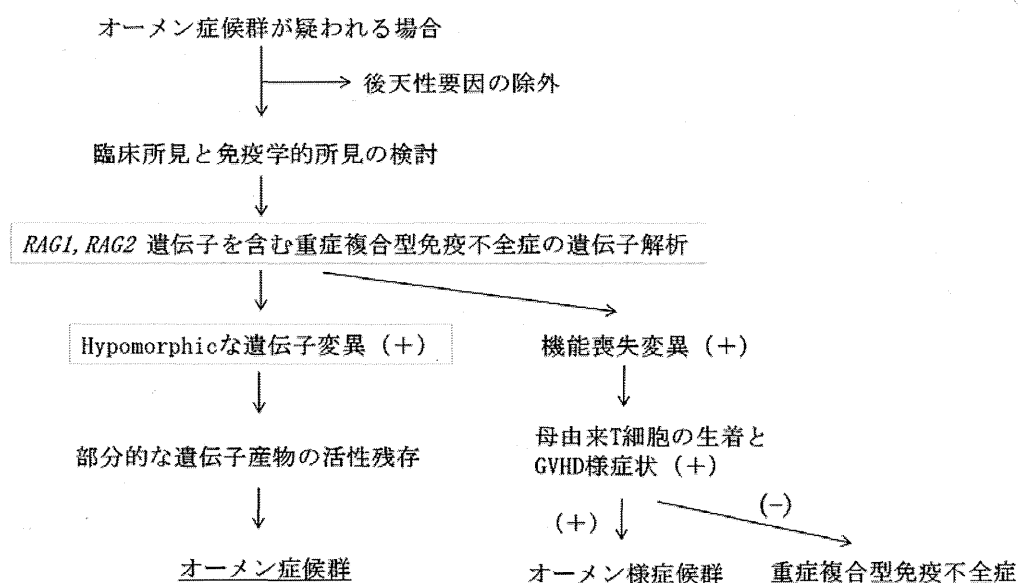
C. 補助条項

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型免疫不全症の 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型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型免疫不全症の責任遺伝子のhypomorphicな遺伝子変異と残存活性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.

疾患名(日本語)：プリンヌクレオシドホスホリラーゼ欠損症

疾患名(英語)： Purine nucleoside phosphorylase deficiency

OMIM 番号： 613179

	PNP deficiency
ICD9 分類	279.2
ICD10 分類	D81.5

疾患概要

プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) 欠損症は、プリン代謝酵素の PNP が先天的に欠損することで T 細胞を主体とする免疫不全症を呈する疾患であり、その原因遺伝子は *PNP* である。発症頻度は極めて稀で、これまでに 50 症例程度の報告があるのみである (国内では 1 報告)。年齢に伴い易感染性が顕著化し、進行性の神経障害や自己免疫性疾患を発症する。

【診断方法】

A. 臨床症状

1. 遺伝子変異にて症状、発症時期が異なる (4 ヶ月～6 歳)
2. 易感染性：T 細胞主体の免疫不全 日和見感染症 (細菌、ウイルス、真菌)
3. 神経症状：2/3 の患者に進行性神経障害を発症し、発達障害、筋痙性、運動失調、錐体路兆候を伴う不均衡症候群を呈する。
4. 自己免疫性疾患：1/3 の患者で様々な自己免疫症状を呈する。溶血性貧血、血小板減少、好中球減少、甲状腺炎、SLE、脳血管炎、硬化性胆管炎などがある。

B. 検査所見

1. T 細胞数 (CD3+、CD4+、CD8+) が著明に減少する。
2. B 細胞数 (CD19+) は比較的保たれる。
3. 免疫グロブリン値は正常、増加する場合が多い。
4. 血中・尿中尿酸値の低下する。
5. 代謝産物のプリンヌクレオシド、2'デオキシヌクレオシドが蓄積する。
6. *PNP* 遺伝子変異

C. 補助条項

1. 悪性リンパ腫等の悪性腫瘍の発生率が高い。
2. 骨髄異形成を呈することがある。

D. 診断の進め方 (フローチャート参照)

- ・易感染性、成長障害から T 細胞不全を疑う → リンパ球数、FCM、機能解析
- ・神経症状、血漿尿酸値の低下 → タンデムマススペクトロメーター (TMS)、プリンヌクレオチド等の異常値
- ・PNP 遺伝子解析 → 確定診断に至る

<PNP の診断フローチャート>

T 細胞不全を疑わせる易感染性 → cytometry にて T 細胞数の減少 → 血中、尿中尿酸値低値 → TMS にてプリンヌクレオチド等の異常値 → *PNP* 遺伝子診断

E. 診断基準

臨床症状と検査所見を満たし、*PNP* 遺伝子変異がある場合に *PNP* 欠損症と診断する。確定診断には、TMS にてプリンヌクレオチド等の異常値と *PNP* 遺伝子変異を同定する。*PNP* 欠損症は常染色体劣性遺伝形式をとる。

重症度分類：重症

根治療法としては HLA 一致造血幹細胞移植であり、移植により神経症状が改善することがある。酵素補充療法は現時点ではない。

文献

- 1) Giblett ER, Ammann AJ, Wara DW, Sandman R, Diamond LK. Nucleoside-phosphorylase deficiency in a child with severely defective T-cell immunity and normal B-cell immunity. *Lancet*. 1: 1010-1013, 1975.
- 2) Hershfield MS, Mitchell BS. Immunodeficiency diseases caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds), McGraw-Hill, New York 2001.
- 3) Tabarki B1, Yacoub M, Tlili K, Trabelsi A, Dogui M, Essoussi AS. Familial spastic paraplegia as the presenting manifestation in patients with purine nucleoside phosphorylase deficiency. *J Child Neurol*.18: 140-141, 2003.
- 4) Markert ML. Purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Immunodeficiency Rev* 3: 45-81, 1991.
- 5) Classen CF, Schulz AS, Sigl-Kraetzig M, Hoffmann GF, Simmonds HA, Fairbanks L, Debatin KM, Friedrich W. Successful HLA-identical bone marrow transplantation in a patient with *PNP* deficiency using busulfan and fludarabine for conditioning. *Bone Marrow Transplant* 28: 93-96, 2001.