

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 収 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して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、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) 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、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/μL 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 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ツハマン・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バクテリア易感染症、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のも、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