

ろ紙血を用いた重症複合免疫不全症の新生児スクリーニングの実施

研究分担者 小野寺 雅史 国立成育医療研究センター研究所成育遺伝研究部
研究協力者 内山 徹 国立成育医療研究センター研究所成育遺伝研究部

研究要旨

原発性免疫不全症は、免疫系の異常により生後より病原体に対して易感染性を示す疾患群である。中でも重症複合免疫不全症（SCID）は根治的治療である造血幹細胞移植を行なわないと、生後1歳までに死亡する重篤な疾患である。重症感染症罹患前の診断は、患者の生命予後を大きく改善することが示されており、本研究では、原発性免疫不全症患者の新生児スクリーニング法の確立を目標とする。

A. 研究目的

重症複合免疫不全症（severe combined immunodeficiency: SCID）は、T細胞の分化障害を中心に、B細胞やNK細胞の異常を伴う疾患である。生下時からの重症感染（ウイルス、細菌、真菌）により、根治的治療である造血幹細胞移植を行わない場合には致死的となり、また診断時に感染症を呈した場合には、移植を行った場合でも移植に関わる費用の増大や、移植成績そのものも大きく下がってしまう。さらに、BCGや経口ロタワクチンは、患児に重篤なワクチン感染症を引き起こすこともあり、これらの理由から出生後早期のSCID患者の発見は、患者の予後だけでなく、医療費の削減の面でも重要とされている。

T細胞受容体の再構成によって産生されるTREC（T cell receptor excision circles）は、T細胞の新生能を示しており、ろ紙血による測定が可能である。ろ紙血のTRECの測定によるSCIDスクリーニングは、現在米国のほぼすべての州で実施されており、その有効性が報告されている。本研究では、国内でのSCIDスクリーニングの普及に向けて、当センター出生児を対象にろ紙血による新生児SCIDスクリーニング法の確立とその正確性の評価を行った。

B. 研究方法

当センターにて出生し、両親より同意を得た正常体重出生児を対象に、以下の方法によって、

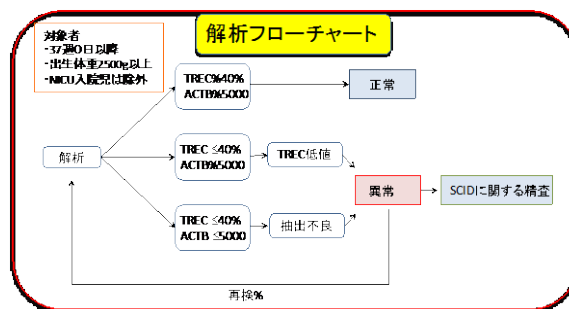
TRECを測定し、評価を行った。

①ろ紙血からのDNA抽出

出生児に採取したろ紙血から直径3.3mmのパンチを打ち抜く。パンチを洗浄の後、総量20μlにDNAを溶出する。

②定量PCRによる測定

抽出したDNAを用いて定量PCRを行う。TRECと内因性コントロールであるβアクチンをそれぞれプライマー/プローブにより増幅する。同時にコントロールプラスミドによる検量線を作成し、絶対定量によって判定を行う。3.3mmパンチが3μlの血液に相当するとして、1μlあたりのTREC、βアクチンを算出する。TRECのカットオフ値は40copies/μlとし、βアクチンは5000copies/μlより少ない場合には、抽出もしくは増幅不良と判断した（図）。



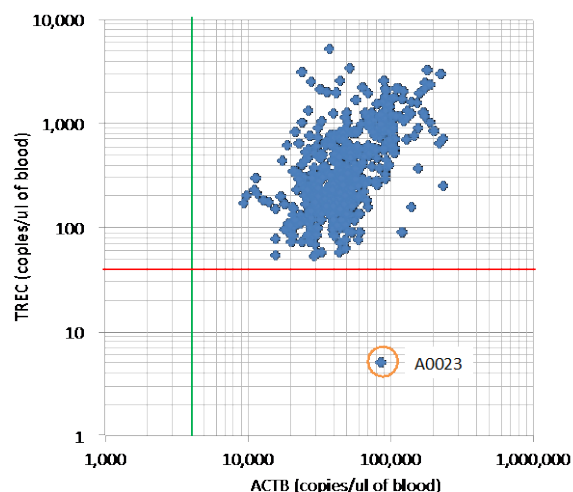
（倫理面への配慮）

本研究は、当センター倫理委員会にて承認を受

けて実施した。また、検体は匿名化を行い、対応表を別に保管し個人情報の保護に務めた。

C. 研究結果

平成28年度3月より開始し、同年12月までに合計519検体の解析を行った。（図）



1例で5copies/μlとTRECが低く、再検でも25copies/μlと同様に低値を示し、陽性と判断した。その後の精査の結果、測定時のリンパ球数の減少が明らかであり、1ヶ月後の検査結果ではリンパ球の上昇とともにTRECの回復が認められた。以上から、一過性のリンパ球減少症と診断された（表）。

	TREC	Actin	リンパ球数
1回目 (出生時)	5	87000	900
2回目 (出生時)	25	75677	
再検 (1ヶ月時)	339	22367	2700

TREC, Actin: copies/μl
リンパ球数: /μl

D. 考察

T細胞受容体（TCR）のα鎖の可変領域は、variable region（V）とjoining region（J）の二領域から構成される。同一遺伝子上にTCRδ鎖があり、TCRα鎖の再構成の際にこの配列が環状DNAとして切り出され、その接合部をsignal joint TREC（sjTREC）として検出が可能である。SCID患者では、TRECが低下することが知られており、2008年から米国のウィスコンシン州にて新生児ろ紙血を利用したSCIDのパイロットスクリーニングが開始された。現在では米国の

ほぼすべての州で実施もしくは導入開始予定となっている。2014年の11の州におけるスクリーニングの報告では、300万人の出生児に対してスクリーニングが行われ、SCID 52症例が発見されている（文献）。その頻度はおよそ58000人に一人であり、これまでの推定罹患率と一致している。欧州においても多くの国で導入が進んでおり、2015年の報告では、SCID患者への移植を行った場合、3ヶ月未満での移植とそれ以降の場合では、おおよそ1000万円の医療費の増額があり、さらに患者の生涯生産量などを含めた場合には、スクリーニングがコスト面でも十分に見合うことが報告された（文献）。国内においても、SCID患者のハイリスクスクリーニングとして、TRECの有用性は以前から報告されていたものの、残念ながら新生児スクリーニングとしての導入はなされていなかった。

今回の我々の研究では、陽性例を1例認めたが、同時に行った臨床血液検査でも明らかなリンパ球減少を認めた。フローサイトメトリーによるリンパ球解析では、SCIDでは通常認めないRTE（Recent thymic emigrant）T細胞を認めたため、経過観察として1ヶ月後に再検したところ、リンパ球の上昇とともにTRECの回復を認め、一過性のリンパ球減少症と判断した。

この症例はSCIDではなかったものの、TREC低値はリンパ球数の低下を反映しており、本スクリーニング法の正確性が示されたと考えられる。また、過去のSCID症例のろ紙血を用いた解析では、いずれもTREC値は0copies/μlであり、今回確立した系でのSCID症例の特定も可能と考えられた。今回の研究により、解析系の確かさを確認することができ、今後はより大規模でのスクリーニングの実施を行っていく予定である。

E. 結論

- ①今回我々は、ろ紙血によるTRECの測定によるSCIDスクリーニング法を確立した。
- ②スクリーニング陽性例を1例検出した。臨床検査においてもリンパ球減少を認め、1か月後の再検ではリンパ球増加とともにTRECの回復を認めた。ろ紙血におけるTREC値はリンパ球の推移を反映していることが明らかになった。
- ③今後は規模を拡大して、継続していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ichida Y, Utsunomiya Y, Onodera M: Effect of the linkers between the zinc fingers in zinc finger protein 809 on gene silencing and nuclear localization. **BBRC** 471: 533-538, 2016.
- 2) Obayashi N, Arai K, Nakano N, Mizukami T, Kawai T, Yamamoto S, Shimizu H, Nunoi H, Shimizu T, Tang J, Onodera M: Leopard skin-like colonic mucosa: A novel endoscopic finding of chronic granulomatous disease-associated colitis. **J. Pediatr Gastroenterol Nutr** 62: 56-59, 2016.
- 3) Ichida Y, Utsunomiya Y, Onodera M: The third to fifth zinc fingers play an essential role in the binding of ZFP809 to the MLV-derived PBS. **BBRC** 469: 490-494, 2016.
- 4) Tomono T, Hirai Y, Okada H, Adachi K, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, Okada T: Ultracentrifugation-free large-scale chromatography-mediated purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1). **Mol Ther Methods Clin Dev** 3: 15058, 2016.
- 5) Nagaya M, Watanabe M, Kobayashi M, Nakano K, Arai Y, Asano Y, Takeishi T, Umeki I, Fukuda T, Yashima S, Takayanagi S, Watanabe N, Onodera M, Matsunari H, Umeyama K, Nagashima H. A transgenic-cloned pig model expressing non-fluorescent modified Plum. **J Reprod Dev** Jul 11, 2016.
- 6) Kawano Y, Nakae J, Watanabe N, Kikuchi T, Tateya S, Tamori Y, Kaneko M, Abe T, Onodera M, Itoh H. Colonic Pro-inflammatory Macrophages Cause Insulin Resistance in an Intestinal Ccl2/Ccr2-Dependent Manner. **Cell Metab** 24: 295-310, 2016.
- 7) Okuno M, Kasahara Y, Onodera M, Takubo N, Okajima M, Suga S, Watanabe N, Suzuki J, Ayabe T, Urakami T, Kawamura T, Kikuchi N, Yokota I, Kikuchi T, Amemiya S, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Ogata T, Fukami M, Sugihara S. Nucleotide substitutions in CD101, the human homolog of a diabetes susceptibility gene in non-obese diabetic mouse, in patients with type 1 diabetes. **J Diabetes Investig** (in press)
- 8) Naiki Y, Miyado M, Horikawa R, Katsumata N, Onodera M, Pang S, Ogata T, Fukami M. Extra-adrenal induction of Cyp21a1 ameliorates systemic steroid metabolism in a mouse model of congenital adrenal hyperplasia. **Endocr J** 63: 897-904, 2016.
- 9) 小野寺雅史 我が国の遺伝子治療実施に関する現状 Pharmstage 15: 29-35, 2016.
- 10) 小野寺雅史 遺伝性疾患に対する遺伝子治療 BioIndustry 32: 41-48, 2015.
- 11) 小野寺 雅史 IPEX 症候群 小児科診療 79 suppl 205, 2016

- 12) 小野寺 雅史 慢性肉芽腫症 遺伝子医学 MOOK30 141-145, 2016

2. 学会発表

- 1) Kawai T, Okamura K, Yagita M, Goto F, Nakazawa Y, Uchiyama T, Nakabayashi K, Nunoi H, Harry Malech, Onodera M: A Gene Therapy Clinical Study of a Patient with X-linked Chronic Granulomatous Disease, The 19st Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, US
- 2) 河合利尚、内山徹、後藤文洋、中澤裕美子、小須賀基通、和田友香、塚本桂子、伊藤裕司、奥山虎之、小野寺雅史 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パイロット研究 第119回小児科学会学術集会 (2016年5月14日 札幌)
- 3) 水野貴基、前川貴伸、中嶋萌、永井章、後藤文洋、中澤裕美子、河合利尚、新関寛徳、小野寺雅史、窪田満第 インフリキシマブが奏功した汎発性膿疱性乾癬の一例 119回小児科学会学術集会 (2016年5月15日 札幌)
- 4) 第22回日本遺伝子治療学会学術集会 (平成28年7月28~30日、大阪) にて(Takahashi S, Igarashi Y, Uchiyama T, Onodera M: Single cell-based vector tracing in the patients treated with stem cell gene therapy)の口演発表を行った
- 5) 後藤文洋、長田香代、峰岸知子、諸田沙織、中島英規、奥山虎之、河合利尚、小野寺雅史、内山徹: 重症複合免疫不全症 (SCID) の新生児スクリーニング 第43回日本マススクリーニング学会 (2016年8月27日、札幌)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他