

プロテオミクスを用いた原発性免疫不全症の新生児スクリーニング法開発の試み

研究分担者 平家 俊男 京都大学大学院医学研究科発達小児科学講座
 研究協力者 八角 高裕 京都大学大学院医学研究科発達小児科学講座
 研究協力者 柴田 洋史 京都大学大学院医学研究科発達小児科学講座

研究要旨

原発性免疫不全症候群（PID）は、単一遺伝子の異常により重篤な感染性や難治性の炎症病態などを引き起こす予後不良の疾患である。重症例ほど乳児期早期に発症して急激な経過を辿り診断確定時点で既に手遅れである場合も多く、予後の改善には発症前の診断が不可欠である。本研究では、次世代プロテオミクス技術と最新鋭の質量分析器を用いて乾燥ろ紙血検体における PID 責任蛋白質の発現を評価する系を確立し、新しい新生児 PID スクリーニング法の開発に向けた基礎検討を行った。

A. 研究目的

原発性免疫不全症候群（PID）は、単一遺伝子の異常により、重篤な感染性や難治性の炎症病態を来す疾患である。感染症や炎症の治療に加え、根治療法として造血細胞移植が行われているが、重症例ほど乳幼児期に発症して急激な経過をとり、手遅れとなる場合が多い。PID 患者の予後改善には発症前診断が不可欠であり、その実現には新生児スクリーニング法の確立が必要である。既に、乾燥ろ紙血（DBS）検体を用いた重症複合型免疫不全症スクリーニングが欧米で実用化されているが、その手法は T 細胞新生能力の低下を検出するものであり、T 細胞の減少しない他疾患への応用は不可能である。

PIDの迅速診断法としてフローサイトメトリ法による疾患責任蛋白質の発現解析が有用である事より、疾患責任蛋白の発現解析を用いたPIDスクリーニング法が有力視される。昨年までの研究で、最新の質量分析機器を用いたDIAプロテオミクス解析により、DBS検体から多数のPID関連蛋白の検出が可能であり、家族性血球貪食性リンパ組織球症（FHL）3型患者の検体に於いて、責任分子であるmunc13-4蛋白の発現低下を検出可能である事を報告した。

本年度の研究では、新生時期に採取され実際に先天性代謝異常症スクリーニングに使用された検体を用い、新たなPID新生児スクリーニングの実用化に向けた基礎検討を行う事を目的とした。

B. 研究方法

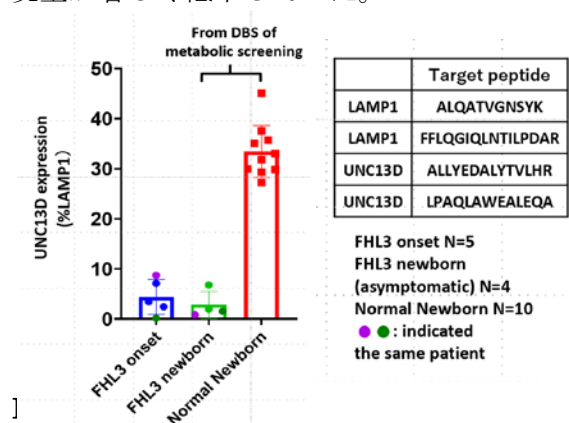
当科で診断したFHL3型症例について、診断確定時に採取したDBS検体（n=5）と、代謝性疾患のスクリーニング用に新生時期に採取された発症前DBS検体（n=4）、及び、健常新生児由来の代謝性疾患スクリーニング用DBS検体（n=10）を入手し、不溶性分画を濃縮した後に質量分析器を用いてmunc13-4蛋白とリソソーム関連蛋白であるLAMP1との発現比率を検討した。

（倫理面への配慮）

この研究は患者の遺伝子解析を含んだ研究であり、京都大学医の倫理委員会の承認を受けて行われた。

C. 研究結果

FHL3患者由来のDBS検体では、診断時（発症後）及び新生時期（発症前）の何れに於いても、健常新生児検体と比較してmunc13-4発現量が著しく低下していた。



最新鋭の質量分析機器とプロテオミクス解析技術を用いることで、DBS 検体に於ける munc13-4 蛋白の半定量解析が可能であり、実際に新生児期に採取された患者検体を用いて FHL3 型の新生児スクリーニングが可能である事を確認した。質量分析法による DBS 検体を用いた蛋白発現解析では、他の PID 疾患責任蛋白発現の定量的評価も可能であり、包括的な新生児スクリーニング法の確立に向けた準備が整ったと考える。今後、他疾患の責任蛋白についても検討を行う予定である。

E. 結論

質量分析法による DBS 検体を用いた PID 新生児スクリーニング法の確立のための基盤が構築された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Shiba T, Tanaka T, Ida H, Watanabe M, Nakaseko H, Osawa M, Shibata H, Izawa K, Yasumi T, Kawasaki Y, Saito MK, Takita J, Heike T, Nishikomori R. Functional evaluation of the pathological significance of MEFV variants using induced pluripotent stem cell-derived macrophages. J Allergy Clin Immunol. 144:1438-1441. 2019

2. 学会発表

1) 柴田洋史、八角高裕、他. 原発性免疫不全症における、ろ紙血プロテオーム解析を用いた新生児マススクリーニングの可能性 第3回日本免疫不全・自己炎症学会学術集会

G. 知的財産権の出願・登録状況

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