

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
研究分担者 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 井澤 和司 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疾患であり、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、昨年度までに確立した次世代プロテオミクス技術と最新鋭質量分析器を用いた乾燥ろ紙血検体におけるPID責任蛋白質発現評価系を用い、健常新生児およびPID患者由来の検体を比較してPID新生児スクリーニング検査の実用化に向けた検討を行った。

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ー法による疾患責任蛋白質の発現解析が有用であることから、疾患責任蛋白質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。これまでの研究より、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型患者の検体において、責任分子であるmunc13-4蛋白の発現低下を検出可能であることを確認してきた。本年度の研究では、健常新生児およびPID

患者由来の多くの検体を解析し、蛋白発現解析によるPID新生児スクリーニングの実用化に向けた検討を行った。

B. 研究方法

健常新生児より採取され、実際に代謝性疾患スクリーニングに使用されたDBS検体（n=40）、さまざまなPID疾患患者から採取されたDBS検体（n=45）、および健常成人由来のDBS検体（n=9）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各種PID関連蛋白の発現を検討した。

（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、検体提供者、あるいは代諾者・親権者の同意を得て行われた。

C. 研究結果

まず、健常新生児由来DBS検体について網羅的な蛋白発現解析を行ったところ、 β -actin発現量を用いた標準化により、数多くのPID関連蛋白が半定量可能であり、その多くが正規分布する事を確認した。

続いて、各疾患責任蛋白の発現解析により患者の検出が可能であるかを検討したところ、FHLに関する検討では、昨年の報告通りFHL3型患者のDBS検体に於いて健常新

生児検体と比較してmunc13-4発現量が著しく低下していた。同様に、FHL5型患者ではSTXBP2蛋白発現が著減していたが、FHL2の責任蛋白であるperforinの発現量は患者検体において低下していなかった。この結果は、多くのFHL2患者ではperforinの機能的重合体形成が阻害されており、蛋白量そのものの低下は一般的ではないとする既報告と矛盾しないものであった。

白皮症を伴うFHL症候群の検討では、Hermansky-Pudlak症候群2型、およびChédiak-Higashi症候群患者検体において、責任蛋白発現の明確な低下は確認できなかった。

慢性肉芽腫症の検討では、p91-phox欠損症、p22-phox欠損症、p47-phox欠損症、何れの患者検体においても責任蛋白質の発現低下が確認された。その他の疾患では、Wiskott-Aldrich症候群、およびX連鎖性無ガンマグロブリン血症患者の検体において、それぞれWASP蛋白とBTK蛋白の発現低下が確認された。

この他、直接的な疾患責任蛋白ではないものの、CD3E蛋白発現低下でT細胞の減少、CD41a等の発現低下で血小板の減少を検出する事が可能である事が確認された。

D. 考察

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検体を用いた免疫関連蛋白質の半定量解析により数多くの疾患患者の発見が可能であることが確認された。この方法は、疾患責任蛋白発現低下を伴う他領域の先天性疾患スクリーニングにも容易に応用可能であり、今後、他疾患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に向けた基盤整備が進んだ。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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