

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：29-4

課題名：重症複合免疫不全症への早期診断および治療体制の構築に関する研究

主任研究者 (所属施設) 国立成育医療研究センター研究所
(所属・職名 氏名) 成育遺伝研究部 疾患遺伝子構図研究室・室長 内山徹

(研究成果の要約) 重症複合免疫不全症は (SCID) は、T 細胞の欠損を中心として B 細胞、NK 細胞の異常を伴う。生後早期より致死的な重症感染症を発症し、救命には迅速な診断と造血幹細胞移植の実施が必須である。本研究では引き続き、①フローサイトメトリー (FCM) によるリンパ球解析、②TREC (T cell receptor excision circles) の定量、③ADA 活性の測定、④網羅的遺伝子解析による迅速診断法を確立し、さらにこれらにより診断された SCID 患者に対して、最適な造血幹細胞移植が実施できるよう、⑤造血幹細胞移植の実施体制の確立を行った。2名の SCID 患者を同定した。1名は関連病院にて1歳以降に症状が進行した delayed-onset SCID の女児であり、移植を行ったものの肺病変の進行により亡くなった。もう1名は日齢3で Omenn 症候群にて発見された男児であり、迅速な診断と造血幹細胞移植によって救命することができた。

1. 研究目的

重症複合免疫不全症 (Severe combined immunodeficiency: SCID) は T 細胞の欠損を中心として、B 細胞、NK 細胞の異常を伴う疾患である。出生後からの急速に感染症が進行し、根治的治療である造血幹細胞移植を実施しない場合には、1歳以降の生存は難しい。また移植時の感染症の罹患はその成績を大きく低下させることから、感染症発症前 (生後3か月未満) の発見と診断が重要である。このような背景から欧米では新生児スクリーニングが実施され、SCID は出生時に発見・診断される疾患となりつつある。一方で、未だ日本においては大規模なスクリーニングが開始されておらず、重症感染症をきっかけに発見される場合がほとんどである。本研究では、SCID 患者の予後の向上と共に早期発見の重要性を発信することを目的として、早期診断と迅速な造血幹細胞移植の実施に向けた診療システム確立を行う。さらに、確立した方法を用いて、2019年度4月より関東4都県 (東京、埼玉、千葉、神奈川) にて開始した中規模 SCID スクリーニングにおける陽性患者のフォローアップを実施する。

2. 研究組織

研究者	所属施設
内山徹	国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部
小野寺雅史	国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部
加藤元博	国立成育医療研究センター 小児がんセンター 移植・細胞治療科
中島英規	国立成育医療研究センター マスクリーニング研究室

3. 研究成果

本年度も以下の方法によって、SCID が疑われた患者の診断および治療を実施した。

(1) 方法

(イ) 解析方法

A) フローサイトメトリー (FCM) によるリンパ球解析

免疫能の低下が疑われる患者に対して、FCM によるリンパ球プロファイル解析を実施する。解析の内容はこれまでに報告している (小児科臨床 76:387, 2013)。

B) TREC (T cell receptor excision circles) の測定による T 細胞新生能の評価

胸腺において T 細胞が分化する際に、環状 DNA の TREC が産生される。T 細胞の新生の評価に有用であり、T 細胞の欠損が疑われる患者に対して、末梢血およびろ紙血

における TREC をリアルタイム PCR によって測定する。

C) アデノシンデアミナーゼ (ADA) 活性の測定

患者の末梢血単核球またはろ紙血を酵素源として ADA の気質であるアデノシンまたはデオキシアデノシンに対して酵素反応を行う。酵素反応後の生成物であるイノシン、デオキシイノシン、ヒポキサンチンを質量分析によって定量し、ADA 活性を測定する。

D) 次世代シーケンサー (NGS) による SCID 候補遺伝子解析

SCID の原因である 49 遺伝子に関して、ターゲットリシーケンスによる解析を実施する。既知の SCID 検体 (IL2RG : X 連鎖重症複合免疫不全症 3 例、ADA : ADA 欠損症 4 例、JAK3 : JAK3 欠損症 1 例、CD40LG : X 連鎖高 IgM 症候群 2 例) を利用した予備解析で、変異の同定が可能であった。2019 年度は、かずさ DNA 研究所において保険診療による遺伝子解析が可能となり、日程的な問題がある場合に限り、申請者らのシステムにて解析を行う方針とした。

(ロ) 造血幹細胞移植の実施

SCID が強く疑われる患者に対して、速やかな感染からの隔離、抗菌薬 (抗生剤、抗真菌剤) の予防投与を実施する。同時に、HLA の検索を開始し、造血幹細胞移植の準備を開始する。患者の免疫能 (T 細胞の残存、自己応答性の有無) を評価し、適切な前処置化学療法や移植片対宿主病 (GVHD) の予防法を決定する。

(2) 結果

(イ) 解析実施状況 (図 1)

A) 易感染性を示す患者の解析 : FCM 解析によって T 細胞の低下を認めた 11 例に関して、TREC 解析を実施し、その結果、2 名の患者で TREC の欠損を認め SCID と診断した。1 名は 1 歳 8 ヶ月での発症であることから delayed-onset SCID の病型であった。ADA 欠損症が強く疑われ、ADA 活性を測定したが、酵素活性の低下は無く、ADA 欠損症は否定的であった。ターゲットリシーケンスの結果、FOXP1 遺伝子にヘテロ接合性変異を認めた。もう一名は日齢 3 より Omenn 症候群を発症したことで発見されたが、ターゲットリシーケンスでは原因遺伝子は不明

であった。

B) スクリーニング患者 : 関東 4 都県 (東京、埼玉、千葉、神奈川) で実施している新生児 SCID スクリーニング (17606 件) の結果、陽性となった 12 例に対して精査を行なった。FCM 解析、TREC 解析いずれも SCID は否定的であった。

C) ADA 欠損症患者家系の第 3 子 : 2016 年に当センターにて診断、治療を行なった ADA 欠損症患者の家系において第 3 子の出産があり、出生児に対して ADA 欠損症のスクリーニングを行なった。ADA 遺伝子の解析では、片アレルに母親 (保因者) 由来の変異を認めたが、もう一方のアレルに変異を認めなかった。ADA 活性の低下もなく、遺伝子解析の結果と合わせて保因者との診断となった。

D) 他地域でのスクリーニング陽性患者 : 他地域での SCID スクリーニングにて TREC 低値を指摘され、その後ターゲットリシーケンスにて ADA 遺伝子にレアバリエントを認めた患者に関して ADA 酵素活性を測定した。ADA 活性は存在しており、ADA 欠損症は否定的であった。

(ロ) 造血幹細胞移植の実施

SCID と診断された 2 名に対して造血幹細胞移植を実施した。1 名は関連病院において、もう 1 名は当センターにて実施された。A) 2 歳 3 ヶ月女児 : 生後より体重増加不良を認めたものの、感染症の既往は無かった。1 歳 8 カ月より気道感染を繰り返し、2 歳 1 ヶ月より間質性肺炎とそれに伴う呼吸障害を認めた。TREC 解析では 0 copy/ μ g DNA と T 細胞の欠損を認め SCID と診断された。発症時期から delayed-onset SCID として ADA 欠損症が疑われた。ろ紙血を用いた ADA 酵素活性の解析では、健常人と同レベルの活性を認め、ADA 欠損症は否定的であった。遺伝子解析にて、FOXP1 遺伝子にヘテロ接合性変異を認めた。姉が HLA 一致であることから、前処置を行わずに造血幹細胞移植を実施したが、診断時にサイトメガロウイルス (CMV) 感染による多臓器不全を呈しており、移植後 1 ヶ月に死亡した。その後、出生時のろ紙血を用いて TREC 解析を実施したところ、同様に検出感度未満であった。

B) 日齢3男児：出生時より全身の紅皮症と魚鱗癬が出現したことから近医に入院となった。FCM解析ではB細胞の欠損を認め、またT細胞はわずかに存在するものの、ほぼ全てがメモリーT細胞であり、ナイーブ分画の欠損を認めた。TCRVβレパトア解析では、CD8+T細胞において著しい偏りを認めた。TRECは健常人の1/100程度であることから、SCIDに伴うOmenn症候群と診断した。速やかに隔離と抗菌薬の投与による重症感染症の予防を開始したが、その後T細胞の活性化に伴い皮膚初見の悪化と血便を伴う下痢が出現したことから(図2)、シクロスポリンによる免疫抑制を開始した。ターゲットリシーケンスでは原因遺伝子を同定することができなかったが、放射線感受性SCIDの可能性を否定できなかった。またドナーとして姉がHLA一致であったが、自己応答性のT細胞が残存することから、フルダラビン+ブスルファン+ATGによる前処置を用いて造血幹細胞移植を実施した。移植後はGVHDの発症もなく、速やかに(day+12)生着を得ることができた。

日齢3の男児は、出生後のOmenn症候群の発症によって重症感染症の罹患前にSCIDと診断することができた。一方で、2歳3ヶ月の女児は、臨床症状はdelayed-onsetの病型であったが、出生時の

ろ紙血においてもTRECの欠損を認めたことから、新生児スクリーニングが実施されていた場合には、早期の診断が可能であったと考えられた。今年度経験した2例の治療成績からも、SCIDを無症状の段階で発見することの重要性が再認識され、日本における新生児スクリーニングの導入を必要性が示された。

4. 研究内容の倫理面への配慮

SCIDの診断・治療の研究を行うにあたって、当センター倫理委員会が承認した研究計画「免疫機能異常症における遺伝的要因の探索」「先天性免疫不全症の診断並びに病態解析に関する研究」「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」に基づいて行う。患者および家族に文書と口頭による同意を取得した上で行う。患者の個人情報への取り扱いは、匿名化を行ったうえで対応表は別途保管し、その保護に努める。患者検体(血液、ろ紙血)の利用に関しては「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成26年12月22日告示)」に、また、遺伝子解析に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する指針」に準拠してそれぞれ実施する。

図1 2019年度の解析状況

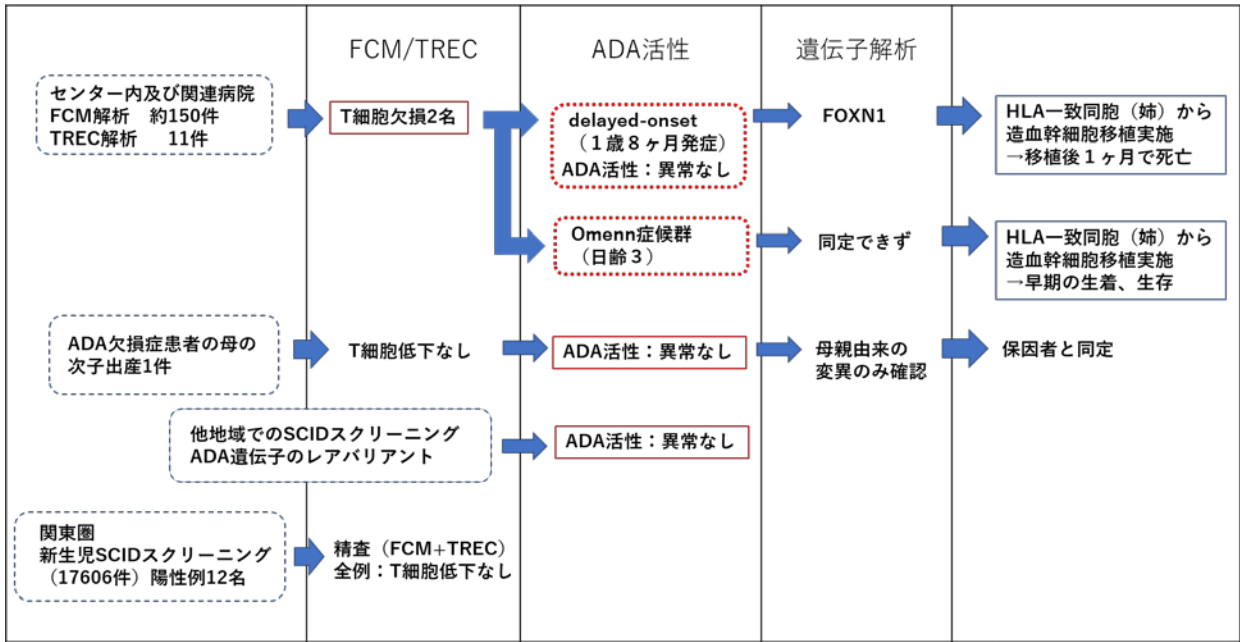


図2 Omenn 症候群の免疫解析

