

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

主任研究者名 内山徹

(所属施設) 国立成育医療研究センター

(所属・職名) 成育遺伝研究部 室長

(研究成果の要約) 重症複合免疫不全症 (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。生後早期より致死的な重症感染症を呈することから、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。今回我々は、①フローサイトメトリー解析、②TREC (T cell receptor excision circles) の定量、③ADA 酵素活性の測定、④ターゲットリシーケンスによる網羅的遺伝子解析を用いた SCID の迅速診断系を確立し、さらにこれらによる迅速診断を基に、⑤造血幹細胞移植の実施体制の確立を行った。本年度は 1 名の患者が X 連鎖重症複合免疫不全症と診断され、速やかに造血幹細胞移植を実施することができた。

1. 研究目的

重症複合免疫不全症 (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。良好な生命予後を得るためには、感染症発症前の生後早期 (3 ヶ月未満) の造血幹細胞移植が必要である。欧米ではすでに出生時の SCID スクリーニングが実施されその効果を認めているが、未だ国内では大規模な開始には至っておらず、さらに発見から遺伝子診断、移植の実施までに要する時間の問題から重症感染に罹患してしまう患者が多い。本研究では、当センターにおける高度な解析設備や医療技術に基づき、SCID に対する早期発見から造血幹細胞移植までの一連の診療システムを構築することで治療成績の向上をはかり、SCID 診療の重要性を明らかにすることを目的とする。

2. 研究組織

研究者

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

(1) フローサイトメトリー解析および TREC による T 細胞新生能の評価

末梢血から単核球分画を分離し、フローサイトメトリー (FCM) によるリンパ球解析を実施する。また、胸腺において T 細胞が分化する際に産生される環状 DNA の TREC (T cell receptor excision

circles)は、T細胞の新生能の指標であり、末梢血またはろ紙血検体から抽出したDNAを用いてリアルタイムPCRを用いてTRECの定量を行う。

(イ) 当センターおよび関連病院において易感染性が疑われる患者約400件に対してFCMによるリンパ球解析を実施した。その中で、わずかでもT細胞の低下が認められた患者126名に関して、TRECの測定によるT細胞新生能の評価を行った。2名でT細胞の完全欠損(図1)を特定し、ADA酵素活性及びターゲットリシーケンスによる遺伝子解析を実施した。

図1 FCM解析でのCD3+Tの欠損

(ロ) 申請者らが、センター病院の出生児を対象に実施している新生児SCIDスクリーニングにおいて1名の陽性例があり、FCM解析およびTRECの定量を実施した。T細胞新生の低下を認めたことからADA酵素活性、NGSによる遺伝子解析を行ったが以上はなく、その後の経過から一過性のリンパ球減少症と判明した

(ハ) 前年度(2016年度)に申請者らが診断および酵素補充療法を行ったADA欠損症の2家系に関して、次子の出生時に、同疾患の罹患の有無に関して、FCMおよびTREC解析を実施した。いずれも異常はなく、その後の遺伝子検査で共に保因者と判明した。

(2) ADA酵素活性の測定

患者の末梢血単核球またはろ紙血サンプルを酵素源として、ADAの基質であるアデノシンまたはデオキシアデノシンを

酵素反応させ、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装置にて測定することでADA酵素活性を定量する。

(イ) FCMおよびTREC解析にてT細胞の欠損が認められた2名、新生児SCIDスクリーニングにて陽性であった1名に関して、出生時のろ紙血および末梢血検体におけるADA活性を測定した。ADA活性はいずれも正常であり、ADA欠損症は否定的であった。

(ロ) ADA欠損症の2家系に関して、次子の出生時のADA活性を測定したところ、ADA活性の低下は認めなかった。

(ハ) その他、関連病院でのFCM解析などからADA欠損症が疑われた2名に関してADA活性の測定依頼を受け実施した。1名でADA活性の低下を認め、16歳の症例であることからlate-onsetの可能性も疑われ、現在遺伝子解析中である。

(3) ターゲットリシーケンスによるSCID候補遺伝子の解析

(イ) システムの確立

SCIDの49遺伝子に関して、ターゲットリシーケンスによる解析系を確立した。既知のSCID検体(*IL2RG*: X連鎖重症複合免疫不全症3件、*ADA*: ADA欠損症4件、*JAK3*: *Jak3*欠損症1件、*CD40LG*: 高IgM症候群2件、*PIK3KCD*: 活性化PIK36症候群4件)を利用した予備解析では、これらの変異を特定することができた。それ以外の遺伝子に関して、現在患者細胞株を利用した評価を順次行う予定である。

(ロ) 解析の実施

新規のカスタムパネルの作製には数カ月を要することから、本年度は SCID が疑われた患者に対して、申請者がすでに確立している 28 遺伝子のターゲットリシーケンスにて対応した。

(a) T 細胞欠損 2 名に関しては、1 名 (生後 2 か月) で IL2RG の細胞内ドメインに変異を認め、X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) と診断した。もう 1 名 (1 歳) については、重度の肝不全であり、生命予後を優先し遺伝子解析と同時に肝移植が施行された。変異は認めず、現在エクソーム解析中である。肝移植後に若干の T 細胞上昇を認めたが、3 カ月後から再び低下し始めたため、leaky SCID などの可能性も考え、造血幹細胞移植も考慮に入れ経過観察中である。SCID スクリーニングにおける陽性例においても NGS による解析を実施したが変異を認めず、また 1 カ月より徐々に T 細胞の上昇を認めたことから一過性リンパ球減少症と診断した。

(b) ADA 欠損症の次子の出生時に ADA 遺伝子の解析を実施し、母由来の変異を持つ保因者と診断した。

(c) 関連病院から ADA 活性の測定依頼があった患者のうち、ADA 活性の低下を認めた 1 名について、現在遺伝子解析を実施中である (図 2 別途記載)。

(4) 患者管理と造血幹細胞移植の実施

(1)～(3)の検査のいずれかで SCID が積極的に疑われた時点で、抗菌薬による治療を開始する。同時に造血幹細胞移植の準備 (ドナー検索) を開始し、遺伝子検査により責任遺伝子の同定ができた時点で、前処置化学療法を検討し移植を実

施する。

X-SCID と診断した症例は、病床の問題から他施設にて初回の移植を行った。重度の感染症を罹患していたため、前処置を行わず HLA1 座不一致の父親をドナーとして移植を行い、ドナー T 細胞の生着と一時的な感染症の改善が認められた。しかし、8 ヶ月後より慢性のノロウイルス感染に罹患し、当センターにて再度 FCM による解析を行ったところ、感染にも関わらず生着した T 細胞が活性化しておらず、また T 細胞受容体のレパトア解析では強い偏りを認めたことから (図 4)、生着している T 細胞が感染に対して機能していないと判断した。感染コントロールを目的としたドナーリンパ球輸注に引き続き、父親からの造血幹細胞移植を実施した。残存した異常 T 細胞は自己応答性などが無いことから、ATG の投与は行わず、フルダラビン+ブスルファンによる前処置により実施した。生着後より下痢や消化管出血が改善し、レパトアの正常化 (図 3) とともにノロウイルスが消失した。

(5) まとめ

今年度は、SCID の確定診断が 1 名 (昨年度は 3 名) であったが、5 万人に 1 人という頻度から考えると年度ごとの症例数の変動は想定され、また、解析検体数自体は昨年度の 1.5-2 倍であることから来年度は SCID 患者が増加する可能性も高い。すでに ADA 活性に関しては、関連学会での発表により解析の依頼が増加しており、また、今回ターゲットリシーケンスを確立したことで今後の遺伝子解析の

件数も多くなると予想される。今年度の実施において SCID 疑い患者の解析に要する時間は、FCM および TREC の測定に 2-3 日、ADA 活性測定 1 週間、ターゲットリシーケンス 2 週間程度であった。患者の発症時期が予見できないため、この体制を常時維持する必要があるが、当センターにおいて 1 カ月程度で確定診断の実施と造血幹細胞の準備を開始できる体制を構築することができた。一方で、NGS などのコスト面を考慮した場合、FCM および TREC の測定によって、その後の検査（遺伝子解析）を必要とする症例をいかに絞り込めるかが重要と考えられた。X-SCID 症例患者では、初回移植の際のドナー細胞の生着を認めていたものの、FCM 解析などで生着した T 細胞の機能不全が判明し、感染症の重症化前に速やかに再移植へ踏み切ることができた。来年度も引き続き、迅速な診断が治療効果に直結する症例を報告できることを目標に開発を行う予定である。

患者の個人情報の取り扱いは、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。

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なら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。患者及び家族に文書と口頭による十分な説明を行い、文書による同意を取得した上で行う。

図 1 FCM 解析における T 細胞欠損症例

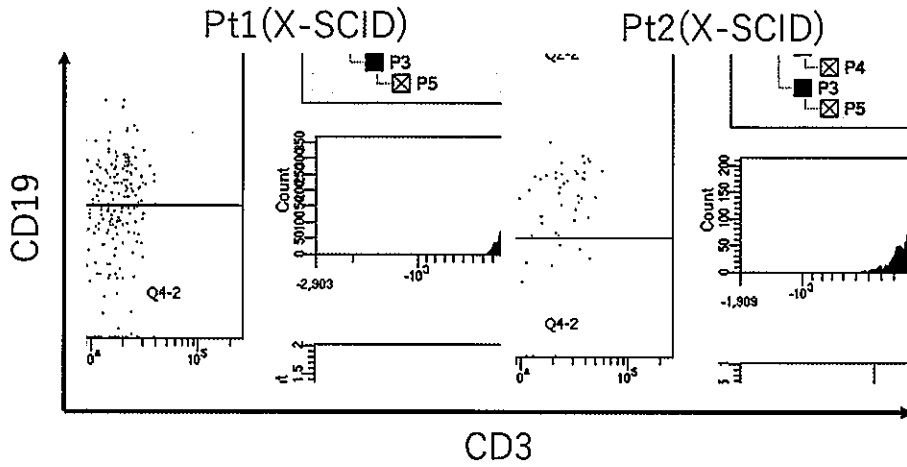


図2 解析の結果

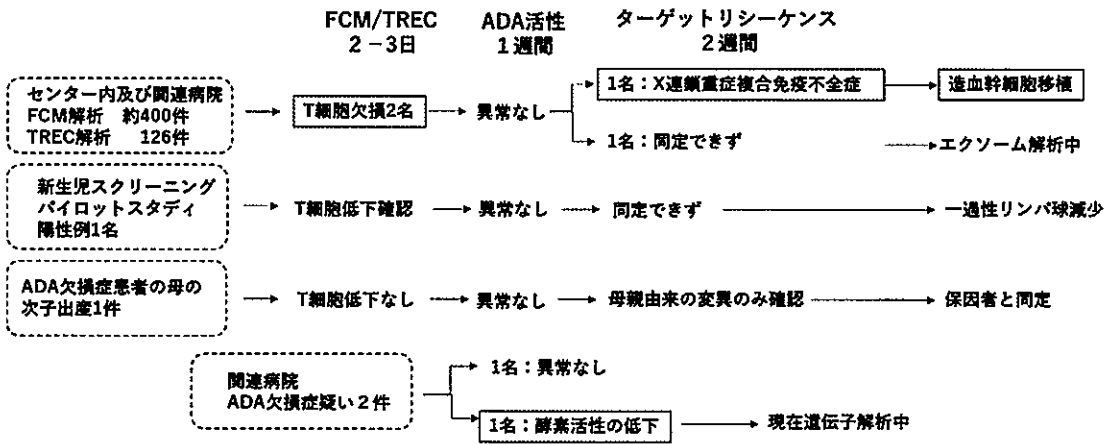
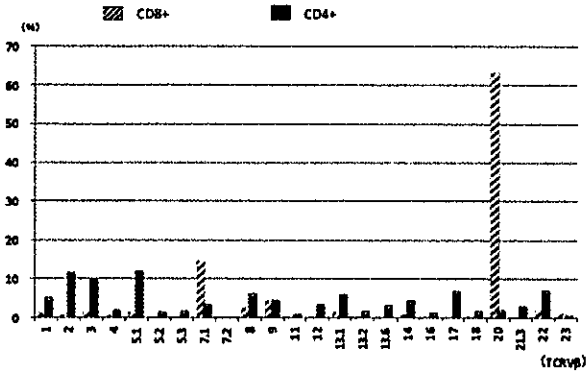


図3 TCR レパトアの変化

初回移植後



2回目移植後

