

(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

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 疾患遺伝子構造研究室 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。我々は、これまでに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。1名の患者がFCM解析、TREC解析からT細胞の完全欠損を認め、原因遺伝子未同定のSCIDとして、造血幹細胞移植を行った。また、前年度に造血幹細胞移植を実施したX連鎖重症複合免疫不全症患者1名に対して、免疫再構築の異常から再移植を実施し、免疫能の正常化が得られた。

### 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 (生後3か月未満) の造血幹細胞移植が必要である。すでに欧米では出生時の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、日本においては未だスクリーニングが実施されておらず、重症感染症が発見の契機となる場合がほとんどである。本研究では、SCIDの早期発見の重要性を国内に発信するため、当センターの高度な解析技術を用いた早期診断と迅速な造血幹細胞移植の実施によって治療成績の向上を図ることを目的とする。さらに、2019年度より申請者らが開始する関東 (東京、神奈川、千葉、埼玉) でのSCIDスクリーニングにおいもて、本開発によるSCID診療システムの有用性を検討する予定である。

### 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

本年度の研究では、以下の方法によってSCIDが疑われた患者の解析から治療までを実施した

(1) フローサイトメトリー (FCM) およびTREC (T cell receptor excision circles) 測定によるT細胞新生能の評価、アデノシンデアミナーゼ (ADA) 活性の測定  
イ) 末梢血から単核球を分離し、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。胸腺から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る。FCM解析でT細胞の低下が疑われた症例に対して、末梢血またはろ紙血におけるTRECを測定する。さらにSCIDが強く疑われた症例に対して、単核球もしくはろ紙血中のADA活性を測定する。  
ロ) 2018年度は、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398例に対して、FCMによるリンパ球解析を実施した。さらに、T細胞の低下が認められた37例に対してTRECの測定を行った。1例で

T細胞の完全欠損を認め、ADA 酵素活性およ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。

ハ) 2016年度に申請者らが診断および酵素補充療法を実施した ADA 欠損症家系に、第二子の出生があり、FCM 解析、TREC 測定、ADA 活性の測定を実施した。

二) 関連病院からの ADA 欠損症が疑われる患者 3 名に対して、ADA 活性の測定を行った。

ホ) 申請者らが、当センターにて実施している新生児 SCID スクリーニングにおいて、陽性患者 3 名を対象に FCM 解析、TREC 測定を実施した。

## (2) 次世代シーケンサー (NGS) による SCID 候補遺伝子解析

イ) システムの確立 : 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 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、変異を同定することが可能だった。

ロ) FCM 解析、TREC 測定、ADA 活性測定などの結果から SCID の可能性が疑われた症例に関して、遺伝子解析を行った。

## (3) 解析結果 (図 1 参照)

イ) 8 か月の男児 : 生後 3 か月より ARDS を発症し、その後溶血性貧血と IgG 高値を認めたことから、免疫異常を疑い解析を行った。FCM 解析では、RTE-T 細胞が無く、同じく TREC も 0 コピー/ $\mu\text{g}$  DNA であったことから、SCID が強く疑われた。ターゲットリシーケンスでは原因となる遺伝子の同定はされなかったが、感染の悪化が懸念され、緊急移植の方針となった。

ロ) 3 か月男児 : 2 か月時より上気道炎症状とともに発熱を認め、胸部レントゲンでのスリガラス状の陰影、KL-6 の上昇、喀痰 PCR の結果からニューモシスチス肺炎と診断された。ウイルス PCR では CMV も検出され、臨床経過から SCID が強く疑われた。FCM 解析では T 細胞は存在し、また TREC も正常値であったことから典型的 SCID は否定的であった。

ハ) ADA 欠損症家系の第二子 : 出生後に直

ちに FCM 解析、TREC および ADA 活性の測定を行った。いずれも正常範囲であり、ADA 欠損症は否定的であった。遺伝子解析にて母方の変異をヘテロで認め、保因者と診断した。

二) ADA 欠損症疑い症例 : 国内の施設から ADA 欠損症が疑われた 3 名の解析依頼を受け実施した。1 例目は ADA 活性がやや低いものの、ADA1 遺伝子に変異は無く、自己炎症所見が強いことから ADA2 遺伝子を検索したところ、ADA2 欠損症と診断された。2 例目は 3 か月の女児で、新生児スクリーニングにて TREC の低値が指摘され、遺伝子解析にて ADA 遺伝子に、ヘテロで変異を認めた。ADA 活性は正常であり、また片アレルのみの変異であることから ADA 欠損症は否定的と考えられた。3 例目は、2 歳 3 か月の女児で、1 歳 8 か月頃から気道感染を繰り返し、その後 CMV 血症や肝不全を呈した。FCM 解析では、T 細胞、B 細胞が低値で、発症が遅いことから delayed-onset の ADA 欠損症が疑われたが、ADA 活性は正常であり、遺伝子解析にて FOXP1 の変異が同定された。

ホ) 3 か月男児 ; 出生後より感染症状と重度の血小板減少を認め、FCM および TREC の測定では T 細胞の新生能の低下を認めた。Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) を疑い、WAS タンパクの細胞内染色を行ったところ、欠損を認め、さらに、遺伝子解析にて WAS 遺伝子に変異を認めたことから WAS の診断となった。

ヘ) 新生児スクリーニング陽性例 : 新生児スクリーニングで陽性を示した 3 例は、1 カ月健診で TREC の上昇を認め、いずれも一過性リンパ球減少症と診断された。

## (4) 患者管理と造血幹細胞移植の実施

イ) 遺伝子検索にて原因遺伝子が同定できなかった 8 か月男児は、その後 CMV 感染を発症し、状態の悪化が予想されたことから造血幹細胞移植が必要と考えられた。当センターでは病床の関係から早期の移植が不可能であり、関連施設での造血幹細胞移植を実施した。

ロ) WAS の男児例は、診断と同時に細菌感染および真菌感染予防のため ST 合剤およびイトラコナゾールの内服を開始した。ま

た、ウイルス検索にて CMV が出現したことから、バルガンシクロビルの内服を開始した。その後、状態は安定し、7 カ月時に HLA 一致非血縁ドナーからの造血幹細胞移植を行った。

ハ) 2017 年度に診断した X 連鎖重症複合免疫不全症の男児は、重症 CMV 感染から前処置を行わずに父親からの造血幹細胞移植を行った。その後 CMV は消失したものの、1 年後に TCR レパトアの極度な偏りとともに、慢性ノロウイルス感染症を発症した。再度の造血幹細胞移植が必要と考え、Flu (180mg/m<sup>2</sup>)、BU (Target AUC 45mg/L\*hr) の前処置によって再度父親をドナーとして造血幹細胞移植を実施した。GradeIV の GVHD と、慢性ノロウイルス感染による消化管出血を呈し、ステロイドおよび間葉系幹細胞 (テムセル) の使用で改善を認めた。また移植後 1 年を経過して、TCR レパトアも正常化し、感染症状も消失した (図 2)。

#### 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。