

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390213

研究課題名（和文） KREC/TRECによる先天性免疫不全症スクリーニング法開発と病態解析への応用

研究課題名（英文） Research for developing of a screening method for the congenital immunodeficiency by KREC/TREC to apply the method to the pathologic analysis

研究代表者

野々山 恵章 (Nonoyama Shigeaki)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授

研究者番号：40280961

研究成果の概要（和文）：新生児乾燥濾紙血の TREC (T cell receptor recombination circles) と KREC (Kappa-chain recombination excision circles) 測定で、SCID, AT, XLA などの先天性免疫不全症をスクリーニングできること、病態解析に有用であることを示した。また、分類不能型免疫不全症が TREC と KREC の陽性・陰性で 4 群に分けられること、4 群間で重症度が異なること、病態に即した治療法を選択できることを見出した。

研究成果の概要（英文）：We developed real-time PCR-based quantification of T cell receptor excision circles (TREC) and signal joint Ig kappa-deleting recombination excision circles (KREC). We demonstrated that TREC and KREC measurement can be used for mass screening of severe combined immunodeficiency (SCID) and B lymphocyte deficiency in neonates. We also found that TREC and KREC can be used for classifying clinically diagnosed CVID patients into four groups, and that the clinical manifestations, prognosis and outcome are significantly different in these groups, indicating TREC/KREC are good clinical markers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児免疫・アレルギー・膠原病学、免疫学、遺伝子、移植・再生医療、発生・分化、感染症

1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性免疫不全症新生児スクリーニング法の開発

ヒト先天性免疫不全症は、早期治療により予後が劇的に改善するため、早期診断が重要である。しかし、現状では重症感染症に罹患してから発見されることが多く予後不良となっている。

先天性免疫不全症である重症複合型免疫不全症 (Severe combined immunodeficiency, SCID) を、T 細胞の発生過程で産生される T cell receptor excision circles (TREC) を新生児期に採取される乾燥濾紙血 (ガスリー血) を用いてスクリーニングする方法を開発した。

一方、B 細胞の発生過程で産生される K chain

excision circles (KREC) を real time PCR で定量的に測定する方法で、B 細胞発生障害の代表的疾患である伴性劣性無 γ -グロブリン血症 (X-linked agammaglobulinemia, XLA) のスクリーニング法を確立されていなかった。

(2) TREC と KREC の同時測定系の確立

TREC と KREC を同時測定する方法がなく、省力化、効率化、コストの削減により、スクリーニングへの応用に貢献することが必要とされていた。

(3) 先天性免疫不全症の TREC, KREC による病態解明

先天性免疫不全症は、多くは T 細胞の発生異常、B 細胞の発生異常により起きる。病態を明らかにし、より良い治療法の選択のため、種々の先天性免疫不全症で TREC, KREC を応用することを想定していた。

2. 研究の目的

(1) ガスリー血 (新生児乾燥濾紙血) 中の KREC 測定による B 細胞欠損先天性免疫不全症の新生児スクリーニング法を確立する。これにより早期診断、早期治療を可能にし、予後を改善する。

(2) T 細胞欠損症のスクリーニング法として申請者が確立した TRECs 測定を KRECs 測定と同時測定する方法を確立する。

(3) T 細胞、B 細胞新生能の新しいマーカーである TREC と KREC の発現パターンを、先天性免疫不全症の病態解析および予後因子に応用する。また原因遺伝子の同定に役立たせる。

3. 研究の方法

(1) 先天性免疫不全症新生児スクリーニング法の開発

新生児期に全新生児で採取される微量の乾燥濾紙血 (ガスリー血) から DNA を抽出し、sjKREC, cjKREC に特異的なプライマーと TaqMan probe を用い、real time PCR 法で、定量的に測定した。コントロールとしては、RNaseP をおく。また、XLA と診断された患者から、同意の下に保存されているガスリー血の sjKREC と cjKREC を測定した。

XLA は ProB 細胞から PreB 細胞への分化異常である。そこで、XLA の KREC によるスクリーニングが可能であるか検討した。

(2) TREC と KREC の同時測定系の確立

TREC, と KREs は、real time PCR の条件が同じであるため、プライマーと TaqMan probe を変更するだけで、同じプレートで同時に測

定できる。今回の研究では、同じウェル内でマルチプレックス測定が出来るように検討した。

(3) 先天性免疫不全症の TREC, KREC による病態解明

TREC は T 細胞レセプターの再構成、KREC は B 細胞レセプターの再構成時に形成されるため、発生異常の病態を解明するために、TREC, KREC の測定は重要な意義を持つ。そこで、様々な先天性免疫不全症において TREC, KREC を測定し、病態を解析した。

また、原因遺伝子の同定を TREC/KREC の測定結果と Exome 解析を合わせ、行った。遺伝子解析にあたっては、小児に対しては保護者、成人に対しては本人へ説明の上同意を得た。

4. 研究成果

(1) 先天性免疫不全症新生児スクリーニング法の開発

B 細胞欠損患者として BTK 異常 30 例を対象とした。BTK 異常患者 30 例の解析検討時の年齢は 9.4 ± 1.6 歳 (0-34 歳) であり、性別は全例男性であった。全例内因性コントロールの RNaseP は検出できた。KREC は B 細胞欠損症である XLA 患者で、新生児濾紙血、末梢血由来濾紙血いずれでも検出感度以下であった。TREC は全例で検出可能であった (BTK 新生児濾紙血, $11.2 \pm 8.2 \times 10^4$ copies/ μ g DNA, BTK 末梢血由来濾紙血, $1.8 \pm 0.7 \times 10^4$ copies/ μ g DNA, $p=0.3009$)。以上から、B 細胞欠損症の新生児スクリーニングが、新生児期に採取される乾燥濾紙血での KREC 測定で可能であることが判明した。(図 1)

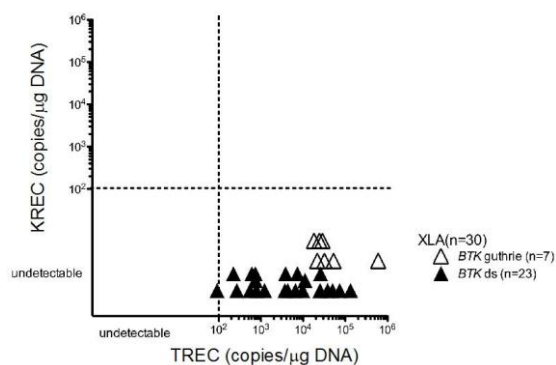


図 1 X 連鎖性無ガンマグロブリン血症 (X-linked agammaglobulinemia, XLA) の TREC/KREC 定量

KREC は新生児濾紙血、末梢血由来濾紙血いずれでも検出感度以下であった。

(2) TREC と KREC の同時測定系の確立

TREC と KREC の同時測定は、PCR 条件が同じであったため、問題なく確立できた。同時測定系が可能になったため、効率よく多数の検体の測定が行えるようになった。

(3) 先天性免疫不全症の TREC, KREC による病態解明

①分類不能型免疫不全症の新規病型分類

分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency, CVID) は 10,000 人から 100,000 人に 1 人が発症し、原発性免疫不全症の中で最も頻度が高い疾患の一つである。CVID は低ガンマグロブリン血症と反復する細菌感染症を主徴とする免疫不全症であり、元来は抗体産生不全を呈した B 細胞機能の異常を主体とする疾患として報告された。しかし B 細胞に加え T 細胞の異常も呈する複合免疫不全症 (Combined Immunodeficiency, CID) が混在する。この事は、CID でしばしば見られる症状である日和見感染、自己免疫疾患、悪性疾患が、一部の CVID 患者で発症する事とも一致する。CVID と臨床的に診断される患者の中には様々な疾患が含まれているため、適切な治療法の選択が困難であるが、グロブリン定期補充 (Intravenous Immunoglobulin, IVIG) で良好な経過を示す例が多数である一方、複合免疫不全症 (combined immunodeficiency, CID) の経過をたどる例がありその鑑別は重要である。そこで、臨床的に CVID と診断され原因が不明である CVID 患者を対象に TREC/KREC 定量を行い、新規病型分類を行った。

2005-2011 年に当科に紹介のあった国内低ガンマグロブリン血症患者 113 名のうち、名の IgM 高値症例 (IgM>100 mg/dl)、26 名の遺欧州免疫不全症学会の CVID 診断基準を満たしたいわゆる”CVID” 40 例を対象とした。TREC、KREC ともに正常の A 群が 19 例、KREC のみ低下の B 群が 7 例、TREC のみ低下の C 群が 8 例、そして TREC、KREC ともに低下の D 群が 6 例 という 4 群に分けられた (A 群; TREC, $2.2 \pm 0.8 \times 10^4$ copies/ μ g DNA、KREC, $8.0 \pm 2.3 \times 10^3$ copies/ μ g DNA; B 群; TREC, $1.9 \pm 0.9 \times 10^3$ copies/ μ g DNA; C 群; KREC, $2.5 \pm 0.8 \times 10^3$ copies/ μ g)。 (図 2)

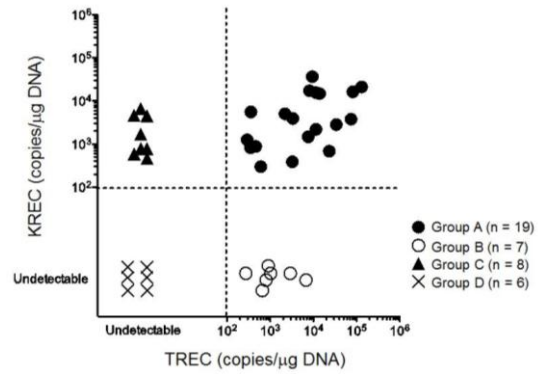


図 2 TREC/KREC定量を用いた分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency, CVID) の新規病型分類

②CVID 患者の重症度及び予後と TREC/KREC による分類との相関

各群の臨床像について検討した。全ての患者は解析時にグロブリン補充療法を施行していた。各群の臨床症状を、日和見感染症、自己免疫疾患、悪性疾患の発症をイベントとして、患者一人一人の観察期間を反映させた観察人年を 10 人年あたりとして、検討した。10 人年あたりのイベントは、D 群 (0.98 イベント数/10 人年) で最も高く、その後 C 群 (0.63 イベント数/10 人年)、B 群 (0.30 イベント数/10 人年)、A 群 (0.04 イベント数/10 人年) と低下した。 (図 3)

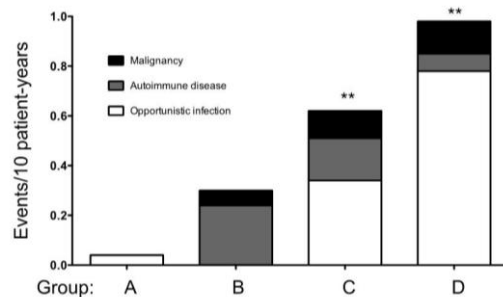


図 3 各群の 10 人年あたりの累積イベント数 (日和見感染症、自己免疫疾患、悪性疾患)

③毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia, AT)、毛細血管拡張性運動失調様症候群 (ataxia telangiectasia-like disorder, ATLD)、Nijmegen 染色体不安定症候群 (Nijmegen breakage syndrome, NBS) における TREC, KREC の結果

毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia, AT)、Nijmegen 染色体不安定症候群 (Nijmegen breakage syndrome, NBS)、毛細血管拡張性運動失調様症候群 (ataxia telangiectasia-like disorder,

ATLD)で TREC/KREC を測定した。

AT は ATM 異常 30 例(新生児濾紙血 3 例、末梢血 27 例)を入手した。AT 患者では、TREC は 7 検体で陽性であり、23 検体は検出感度以下であった。KREC は全例で検出感度以下であった。B 細胞数を検討できた 13 症例全例で B 細胞は 20 細胞/ μ l 以上と存在した。

NBS 患者では検討した 6 名の患者のうち、2 例で TREC 陽性、4 例で TREC 陰性を示した。KREC は、AT 患者と同様全例で B 細胞が存在するにも関わらず検出感度以下であった。ATLD 患者では AT 患者、NBS 患者と異なり 2 例とも TREC、KREC は検出可能であった。(図 4)

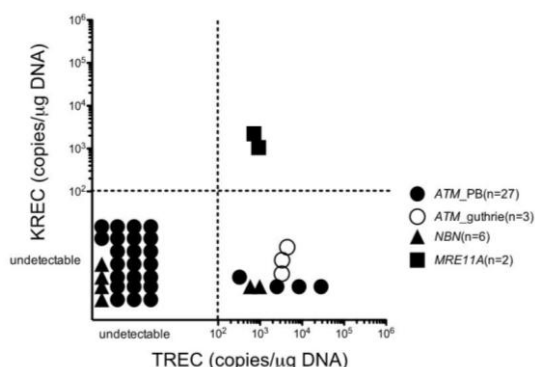


図 4 ATM, NBS, Mre11 患者の TREC /KREC 定量

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 51 件)

1. Kakiuchi S, Nonoyama S, Wakamatsu H, Kogawa K, Wang L, Kinoshita-Yamaguchi H, Takayama-Ito M, Lim CK, Inoue N, Mizuguchi M, Igarashi T, Saijo M. Neonatal herpes encephalitis caused by a virologically confirmed acyclovir resistant herpes simplex virus type 1. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51:356-9. doi: 10.1128/JCM.02247-12.

2. Ma CS, Avery DT, Chan A, Batten M, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright PD, Minegishi Y, Nonoyama S, French MA, Choo S, Peake J, Wong M, Cook MC, Fulcher DA, Casanova JL, Deenick EK, Tangye SG. Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. *Blood.* 2012, 26:119:3997-4008. doi: 10.1182/blood-2011-11-392985.

3. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim ES, Lee SK, Takagi M, Mizutani S,

Morio T. The kinase Btk negatively regulates the production of reactive oxygen species and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nat Immunol.* 2012, 26:13:369-378. doi: 10.1038/ni.2234.

4. Ishida H, Imai K, Homma K, Tamura S, Imamura T, Itoh M, Nonoyama S. GATA-2 anomaly and clinical phenotype of a sporadic case of lymphedema, dendritic cell, monocyte, B- and NK-cell (DCML) deficiency, and myelodysplasia. *Eur J Pediatr.* 2012, 171:1273-1276. doi: 10.1007/s00431-012-1715-7.

5. Takayuki Tanaka, Kazutoshi Takahashi, Mayu Yamane, Shota Tomida, Saori Nakamura, Koichi Oshima, Akira Niwa, Ryuta Nishikomori, Naotomo Kambe, Hideki Hara, Masao Mitsuyama, Nobuhiro Morone, John E. Heuser, Takuya Yamamoto, Akira Watanabe, Akiko Sato-Otsubo, Seishi Ogawa, Isao Asaka, Toshio Heike, Shinya Yamanaka, Tatsutoshi Nakahata, Megumu K. Saito. Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood.* 2012, 9:120(6):1299-308. doi: 10.1007/s00431-012-1715-7.

6. Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Nonoyama S, Karasuyama H, Minegishi Y. Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2011, 208:235-249. doi:10.1084/jem.20100799.

7. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsuiki N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarstrom Q, Hammarstrom L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol.* 2011, 128:223-225. doi: 10.1016/j.jaci.2011.01.052.

8. Ishimura M, Takada H, Doi T, Imai K, Sasahara Y, Kanegane H, Nishikomori R,

Morio T, Heike T, Kobayashi M, Ariga T, Tsuchiya S, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T. Nationwide Survey of Patients with Primary Immunodeficiency Diseases in Japan. *J Clin Immunol*. 2011 31:968-76. doi: 10.1007/s10875-011-9594-7.

9. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Fischer A, Franco JL, Geha RS, Hammarström L, Nonoyama S, Notarangelo LD, Ochs HD, Puck JM, Roifman C, Seger R, Tang MLK. Primary Immunodeficiency Diseases: an update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Front Immun*. 2011, 2:54. doi: 10.3389/fimmu.2011.00054.

10. Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu H, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients. *Clin Immunol*. 2011, 138:172-7. doi: 10.1016/j.clim.2010.11.005.

11. Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa K, Sakai H, Abe J, Tanaka N, Kawai T, Oshima K, Saito M, Nishikomori R, Ohara O, Ishii E, Nakahata T, Horiuchi H, Heike T. Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood*. Aug. 4, 2011;118(5):1225-30. doi: 10.1182/blood-2011-01-329540.

12. Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T, Saito MK. A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS One*. Jul. 2011; 6(7):e22261. doi: 10.1371/journal.pone.0022261.

13. Okura Y, Yamada M, Kobayashi I, Santisteban I, Arredondo-Santisteban G, Kato Z, Iguchi A, Yoshida M, Ohara O, Nakagawa N, Imai K, Hershfield MS, Ariga T. ADA-SCID with 'WAZA-ARI' mutations that synergistically abolished ADA protein stability. *Br J Haematol*. 2011, 153(5):675-6. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08640.x.

14. Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, Imai K, Espanol T, Fasth A, Pellier I, Strauss G, Morio T, Gathmann B, Noordzij JG, Fillat C, Hoenig M, Nathrath M, Meindl A, Pagel P, Wintergerst U, Fischer A, Thrasher AJ, Belohradsky BH, Ochs HD. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome and treatment options. *Blood*, 2010, 115:3231-3238. doi: 10.1182/blood-2009-09-239087.

[学会発表] (計4件)

1. 第3回関東甲越免疫不全症研究会「次世代シーケンサーにより、原因遺伝子の同定に至った CVID の1例」釜江智佳子、満生紀子、小原明、野口恵美子、久保田健夫、本間健一、小原收、今井耕輔、野々山恵章 東京、2012年9月22日

2. Honma K, Imai K, Kamae C, Ishida H, Ito Y, Kojima S, Yokosuka T, Kanegane H, Morio T, Sasahara Y, Fujiwara T, Harigae H, Hashii Y, Ohara O, Nonoyama S. Clinical features and immunological abnormalities of GATA2 deficiency in JAPAN. 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. October. 2012.

3. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, MC van Zelm, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor recombination excision circles (TREC) and Ig kappa-deleting recombination excision circles (KREC). 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. October. 2012.

4. Mitsuiki N, Oshima K, Imai K, Ohara O, Morio T, Mizutani S. Genetic analysis for 207 cases with primary immunodeficiency (PID) consulted to a single center through PID network in Japan (PIDJ) in 5 years (2007-2011). 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. October. 2012.

[その他]

ホームページ等

<http://pidj.rcai.riken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野々山 恵章 (Nonoyama Shigeaki)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門
課程・教授
研究者番号： 40280961

(2) 研究分担者

小原 収 (Ohara Osamu)
公益財団法人かずさDNA研究所・ヒト
ゲノム研究部・副所長
研究者番号： 20370926

大嶋 宏一 (Oshima Koichi)
京都大学・学内共同利用施設等・研究員
研究者番号： 60525377

今井 耕輔 (Imai Kohsuke)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究
科・准教授
研究者番号： 90332626