

SCID パネルを用いた targeted resequencing による  
重症複合免疫不全症と毛細血管拡張性運動失調症の  
迅速遺伝子診断の臨床応用

おぐら ゆみ

小倉 友美

(成長発達臨床医学専攻)

防衛医科大学校

平成 30 年度

## 目次

第1章 緒言	1 頁
第2章 PID 及び AT 症例における TREC・KREC 解析	4 頁
第3章 PID 及び AT 症例における SCID パネルの targeted resequencing	9 頁
第4章 原因遺伝子が同定された SCID 症例の感染歴、治療及び予後	13 頁
第5章 考察	17 頁
第6章 結論	19 頁
謝辞	20 頁
単語・略語説明	21 頁
参考文献	24 頁
図表	28 頁

## 第1章 緒言

重症複合免疫不全症 (severe combined immunodeficiency: SCID) は T リンパ球の数や機能の著しい異常に加え、無又は低ガンマグロブリン血症を伴う原発性免疫不全症 (primary immunodeficiency: PID) である。生後早期より易感染性を示す重篤な遺伝子疾患であり、現在までに約 20 の原因遺伝子が同定されており、さらに SCID より軽症な複合免疫不全症 (combined immunodeficiency: CID) は 30 以上の原因遺伝子が同定されている<sup>1)</sup>。SCID は造血幹細胞移植 (Hematopoietic stem cell transplantation: HSCT) や、酵素補充療法、遺伝子治療などの治療を行わなければ生後 2 年以内に致死的となる<sup>2)</sup>。感染症を合併すると予後不良であるため、感染症罹患前の早期診断が重要である。また、SCID の原因遺伝子の中には放射線高感受性のものがあり、検査や治療法の選択のため、遺伝子診断をすることは重要である。

毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia: AT) は、歩行開始時に顕在化する進行性運動失調症、免疫不全症、高頻度の腫瘍発生、内分泌異常症、放射線高感受性、毛細血管拡張などを特徴とする、多臓器にわたる障害が進行性に認められる遺伝子疾患である。頻度は 4~10 万人に 1 人である。原因遺伝子は *ATM* であり、11 q 22.3 に位置する全長約 150Kbp で 66 個のエクソンよりなる巨大な遺伝子である。免疫異常の特徴として、 $CD3^+CD4^+$ T 細胞、 $CD20^+$ B 細胞、 $CD4^+CD45RA^+$ naïve T 細胞の減少がみられる。T-cell receptor excision circles (TREC) は全例で低下しており<sup>3)</sup>、T 細胞減少を反映している。低  $\gamma$  グロブリン血症、低 IgA 血症も認められ、呼吸器感染症などが重要な問題である。感染症の予防、がんの早期発見という観点から早期診断が必要である。

TREC は  $\alpha$  鎖の VDJ 遺伝子再構成の過程で生じる環状 DNA で、T 細胞分化・増

殖により複製されず、安定して存在するため、新生 T 細胞のマーカーとして利用可能である。既に当科では、リアルタイム PCR を用いて TREC の絶対定量を行い、SCID の新生児スクリーニング (newborn screening: NBS) として応用する方法を開発し報告した<sup>4)</sup>。また、kappa-deleting recombination excision circles (KREC) は  $\lambda$  鎖再構成あるいは  $\kappa$  鎖の allelic exclusion の過程で生じる環状 DNA で B 細胞分化・増殖により複製されず、安定して存在するため、新生 B 細胞のマーカーとして利用可能である。当科ではまた、KREC の絶対定量による B 細胞欠損症のスクリーニング法への応用の可能性について報告した<sup>5)</sup>。

2008 年より、アメリカ合衆国で TREC 解析を用いた SCID の NBS が始まり、ヨーロッパ、アジア諸国でもパイロットスタディが開始されている<sup>6-12)</sup>。また、TREC と KREC を同時に測定することにより、SCID の病型 ( $T^+B^-$ SCID と  $T^+B^+$ SCID) を分けることができ、分子学的診断のガイドとなる可能性があり<sup>13)</sup>、genomic DNA (gDNA) 検体しか得られない場合に有用と考えられる。

SCID 関連の原因遺伝子は 20 種類以上あり、従来のサンガー法では多くの労力を要し、時間もかかる。AT の原因遺伝子である *ATM* も巨大な遺伝子であり、同様の問題がある。SCID 及び AT を迅速に診断するため、当科では既に SCID 関連遺伝子及び *ATM* 遺伝子を含む SCID パネルを開発し、2014 年より臨床応用している<sup>14)</sup>。このような動きは PID や SCID の次世代シーケンサー (Next generation sequencer: NGS) を用いた targeted resequencing について国内外から報告されている<sup>12, 15-17)</sup>。

本研究ではまず初めに、臨床症状、血液検査、画像検査などから SCID もしくは関連疾患を疑われた症例、または AT 症例の検体について TREC・KREC を定量した。TREC・KREC 定量をもとに、PID を分類した。また SCID パネルの targeted resequencing を行い、原因遺伝子同定を試みた。更に、解析後の臨床経過を検

討した。

本研究はヒト検体を用いるため、防衛医科大学校倫理委員会の承認（受付番号1095、1189、1275「先天性免疫不全症の遺伝子解析研究」および、受付番号1143「原発性免疫不全症の早期診断法の確立に関する研究」）を得て実施した。また、国内および海外共同研究機関においては、それぞれの機関で倫理委員会の承認を得た。検体採取に際しては、対象者もしくはその保護者に研究内容を文書と口頭により説明し、署名同意を得た。

## 第2章 PID及びAT症例における TREC・KREC 解析

### 第1節 背景

当科では、これまでにリアルタイム PCR を用いた TREC の絶対定量を行い、SCID の NBS として応用する方法を開発した<sup>4)</sup>。また KREC の絶対定量による B 細胞欠損症のスクリーニング法への応用の可能性についても報告した<sup>5)</sup>。

SCID や関連疾患については、国によって定義が異なるが、概ね CD3<sup>+</sup>T 細胞数、リンパ球幼弱化試験、maternal T 細胞の存在等により SCID、Leaky SCID、Omenn 症候群などに分類される<sup>18)</sup>。さらに、B 細胞や NK 細胞の有無により、T<sup>-</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>-</sup>SCID、T<sup>-</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>+</sup>SCID、T<sup>-</sup>B<sup>-</sup>NK<sup>+</sup>SCID、T<sup>-</sup>B<sup>-</sup>NK<sup>-</sup>SCID に細分化される。これらは造血幹細胞からの分化段階に関連する遺伝子の異常により発症する<sup>19)</sup>ため、病型により、ある程度原因遺伝子の推定が可能である (図 1)。

今回、易感染性などの臨床症状と血液検査で T 細胞減少が認められ、画像検査で胸腺が描出されない等の SCID が疑われる PID の症例ならびに小脳失調や毛細血管拡張、 $\alpha$ フェトプロテインの上昇から AT と診断された症例が、遺伝子診断目的で当院に紹介された。

紹介元でリンパ球表面抗原解析やリンパ球幼弱化試験を行っていない症例はあったが、海外からは安定性のある gDNA が送られてきた。SCID の原因遺伝子を推定するために TREC・KREC 解析 (図 2) を行い、PID 症例を分類した。また、AT 症例についても TREC・KREC 値を調べた。

### 第2節 方法

#### (1) 症例

2014 年 12 月から 2018 年 5 月の間に SCID パネルの targeted resequencing を依頼された症例を登録した。これらは日本、インド、スイス、メキシコより紹介された症例で、臨床症状、リンパ球表面抗原解析、画像検査等の結果から

SCID もしくは AT が疑われた症例である。

## (2) 臨床情報

症例の紹介時に、診断時年齢、性別、感染歴、自己免疫疾患の有無、HSCT の有無、生死を報告された。また、白血球数、リンパ球数、血清免疫グロブリン値と、リンパ球表面抗原解析 (CD3、CD4、CD8、CD4/CD45RA、CD4/CD45RO、CD19、CD16/56)、エコーもしくは X 線上の胸腺所見等のデータが登録された。

## (3) 検体

共同研究機関からは血液または、血液よりあらかじめ抽出された gDNA が送付されてきた。血液検体は、200µl から QIAcube (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて gDNA を抽出した。gDNA 濃度は BioDrop µLite (BioDrop UK Ltd, Cambridge, UK) を用いて測定した。

## (4) TREC・KREC 解析

リアルタイム PCR は蛍光標識プローブ法 (いわゆる TaqMan プローブ法) で実施した。反応総量は 20 µl で、サンプル DNA を 1 µl とし、各組成の最終濃度は、2×EagleTaq Universal Master Mix (ROX) (Roche)、プライマーは各々 500 nM、TaqMan プローブは 250 nM とした。用いたプライマー配列とプローブ配列は以下の通りである。

TREC forward プライマー: 5' -CCATGCTGACACCTCTGGTT-3'

TREC reverse プライマー: 5' -TCGTGAGAACGGTGAATGAAG-3'

TREC プローブ: FAM-5' - CACGGTGATGCATAGGCACCTGC-3' -TAMRA<sup>20)</sup>

KREC forward プライマー: 5' - TCAGCGCCATTACGTTTCT -3'

KREC reverse プライマー: 5' - GTGAGGGACACGCAGCC-3'

KREC-プローブ: FAM-5' -CCAGCTCTTACCCTAGAGTTTCTGCACGG-3' -TAMRA<sup>21)</sup>

内因性コントロールである RNaseP は、反応総量 20 µl で、サンプル DNA 1 µl、TaqMan 2×EagleTaq Universal PCR Master Mix (ROX) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、TaqMan 20×RNaseP Primer-Probe (VIC<sup>TM</sup>dye) Mix (Applied

Biosystems, Waltham, USA) とした。

リアルタイム PCR は LightCycler®480 II リアルタイム PCR システム (Roche) を用い、96 ウェルプレートを使用し、50°C 2 分、95°C 10 分の初期ステップの後、45 サイクル (95°C 15 秒、60°C 1 分) で実施した。

TREC、KREC および RNaseP のコピー数は、プラスミド DNA の段階希釈系列の増幅曲線から作成される検量線をもとに算出した。リアルタイム PCR で得られた TREC、KREC および RNaseP の測定値は、1 µgDNA あたりの量に換算して最終定量値とし、100 copies/µg DNA 未満となった場合に検出感度未満とした。また、正常：≥1000 copies/µg DNA、低値：≥100, <1000copies/µg DNA とした。

#### (5) PID 症例の分類

TREC が感度未満かつ 2 歳未満の症例を SCID 疑い、TREC が感度未満かつ 2 歳以上、または TREC が低値の症例を CID、TREC が正常の症例をその他の PID として分類した。SCID 疑い症例のうち、KREC が低値から正常のものを T<sup>B</sup><sup>+</sup>SCID 疑い、KREC 感度未満のものを T<sup>B</sup><sup>-</sup>SCID 疑いとした。リンパ球表面抗原解析を行った例では、TREC・KREC による分類と比較した。

### 第 3 節 結果

#### (1) 症例

PID 104 例および AT 8 例の計 112 例である。

PID 症例は、男児 66 例 (63.5%)、女児 38 例 (36.5%) で、診断時の年齢は 2 歳未満が 71 例 (68.3%)、2 歳以上が 33 例 (31.7%) であった。感染歴が有る症例が 89 例 (85.6%)、無い症例が 5 例 (4.8%) であり、大部分の症例が感染症を契機として診断されていた。感染歴が無い症例は、血球貪食症候群 (hemophagocytic lymphohistiocytosis: HLH)、原因不明の血球減少、自己免疫疾患の診断を契機に PID と診断された症例であった。また、紹介時に既に HSCT を施行していた症例が 3 例あった。紹介時に生存していたのは 55 例 (52.9%)、



死亡していたのは 43 例 (41.3%) であり、死亡後に確定診断目的で紹介された例が比較的多く、これら死亡例のほとんどがインドの症例であった (表 1)。

AT 症例 8 例は男児が 3 例 (37.5%)、女児が 5 例 (62.5%) で、小脳失調が 7 例に、また、末梢血管拡張が 7 例に認められた (表 2)。

## (2) TREC・KREC 解析

PID 症例の TREC 解析では正常が 16 例 (15.4%)、低値が 12 例 (11.5%)、感度未満が 76 例 (73.1%) であった。一方、KREC 解析では正常が 64 例 (61.5%)、低値が 4 例 (3.9%)、感度未満が 36 例 (34.6%) であった (表 3)。

AT 症例は、TREC は全例で低値～感度未満であり、KREC は 7 例が正常で感度未満が 1 例であった (表 4)。

## (3) PID 症例の分類

PID 症例の内訳は、SCID 疑いが 47 例 (45.2%)、CID が 39 例 (37.5%)、その他の PID が 18 例 (17.3%) であった。さらに SCID 疑い症例を KREC の結果で分類したところ、 $T^+B^+$ SCID 疑いが 23 例、 $T^+B^-$ SCID 疑いが 24 例であった (図 3)。TREC が感度未満の症例では  $CD3^+T$  細胞減少あるいは  $CD45RA^+CD3^+T$  細胞減少を、KREC 感度未満の症例では  $CD19^+B$  細胞減少を認め、TREC・KREC とリンパ球表面抗原解析で乖離を認めなかった。

## 第 4 節 考察

対象が SCID パネルによる targeted resequencing を依頼された症例であったため、家族歴などから PID が疑われた症例はなく、感染症を契機に診断された例が多かった。

PID 症例において、リンパ球表面抗原解析を実施して SCID と診断し、病型を分類することは、原因遺伝子を推定したり、その後の検査や治療法を判断したりする上で非常に重要である。リンパ球表面解析には新鮮血もしくは単核球分離して保存した細胞が必要であるが、遠隔地からの紹介症例では、輸送が困難

であり、入手できないことがある。

一方、gDNA サンプルは室温でも性状が安定しており、輸送も簡便なため、入手が容易である。gDNA で解析可能な TREC・KREC を用いて病型を分類することは、このような症例において有用であると考えられた。当科の TREC・KREC 解析では、SCID 例の TREC は感度未満 (<100 copies/ $\mu$ l)<sup>4)</sup>、T<sup>B</sup>-SCID 例の KREC は感度未満 (<100 copies/ $\mu$ l)<sup>15)</sup> と報告しており、これに準じて分類した。

AT 症例は TREC による NBS でも見つかる例が存在するが、実際には感度未満から正常を示すものまで種々の値を示すものがあると報告されている<sup>15, 22, 23)</sup>。今回の症例では全て TREC は感度未満から低値 (<1000 copies/ $\mu$ l) であった。また、当科では過去に全例で KREC が感度未満であることを報告している<sup>15)</sup>が、今回の症例では8例中7例は正常であったことから、KREC も感度未満から正常まで種々の値を示すものがあると考えられる。

## 第5節 小括

TREC・KREC を用いて、PID 症例の分類を行うことが可能であった。

また AT 症例は全例で TREC が感度未満から低値であった。

### 第3章 PID及びAT症例におけるSCIDパネルのtargeted resequencing

#### 第1節 背景

SCID関連の原因遺伝子は20種類以上あり、従来のサンガー法による遺伝子解析は多くの労力を要し、時間もかかる。ATの原因遺伝子である*ATM*もエクソン数が66の巨大な遺伝子であり、同様である。この問題に答えるべく、当科では既に「SCIDパネル(表5)」を作製して、NGSを用いて、約2日間で解析する方法を開発し、2014年より臨床応用している<sup>14)</sup>。また、国内外からもNGSを用いたPIDやSCIDの網羅的なtargeted resequencingの結果が報告されており<sup>12,15-17)</sup>、国内のPIDの網羅的遺伝子解析では、結果報告までに3~6か月かかっているとされている。

そこで今回、PID及びAT症例において迅速遺伝子診断することを目的としてマルチプレックスPCR法とNGSを用いたtargeted resequencingを行った。また変異同定の一つとして、今回新たにコピー数多型(copy number variant)解析も行った。

#### 第2節 方法

##### (1) 症例

PID 104例、AT 8例およびSCID保因者疑い2例の計114例である。

##### (2) targeted resequencing

サンプルのgDNA 50 ng、カスタムデザインしたSCID関連遺伝子のプライマーセット「SCIDパネル(表5)」およびIon AmpliSeq™ Library Kit 2.0(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)を用いて、マルチプレックスPCR法でアンプリコンを作製し、各アンプリコンにバーコードをつけてライブラリーとした。次に、ライブラリーをIon One Touch2 system (Thermo Fisher Scientific)もしくはIon chef system(Thermo Fisher Scientific)を用いてエマルジョンPCR

及び濃縮を行い、NGSである Ion PGM™ System(Thermo Fisher Scientific)を使用してシーケンスを行った (図4)。

### (3) 変異解析

(2) で得たデータを Ion Reporter software(Thermo Fisher Scientific) にかけて解析し、一塩基多型 (single nucleotide variant: SNV)、small indel などの変異を得た。原因遺伝子候補の絞り込みは、1)MAF(Minor Allele Frequency)<0.01、2) アミノ酸変化を起こす非同義変異、もしくはスプライス変化を起こす変異、3) ホモ変異、コンパウンドヘテロ変異、ヘミ変異のいずれかであるものを選択した。また、この系で繰り返し検出される変異は inhouse SNP として、対象から除外した。残った変異に対して、TREC・KREC の結果を用いた SCID の分類を参考にして、変異の同定を試みた。さらに、コピー数多型(copy number variant: CNV) 解析 (図5) を行った。CNV 解析で得られた deletion に対して、確認のため PCR 及び電気泳動を行った。

これらから最終的に絞られた変異について、The Human Gene Mutation Database (HGMD) (Qiagen, Hilden, Germany) に病気の原因として登録のある変異であるか検索した。また、報告のない変異の場合には遺伝子変異機能予測ソフトである mutation at a glance<sup>24)</sup> および mutaton taster<sup>25)</sup> で、機能障害が予測される変異を病原変異とした。

## 第3節 結果

SCID 疑い 47 例中 34 例 (72.3%) で原因遺伝子を同定した。その内訳は、*IL2RG* 12 例、*ADA* 5 例、*RAG1* 5 例、*DCLRE1C* 5 例、*NEHJ1* 2 例、*IL7R* 2 例、*JAK3* 1 例、*LIG4* 1 例、*RAG2* 1 例であった (表6、図6)。

CID 疑い 39 例中、*IL2RG* 2 例及び *LIG4* 2 例の変異を同定した。その他の PID 症例で原因同定したのは、*STIM1* 1 例であった (表7)。

また、保因者疑い例は *DCLRE1C* exon1-3 両アリル欠失による SCID 症例の両親

であった。CNV 解析を行ったところ父母それぞれに *DCLRE1C* exon1-3 片アレル欠失を認めた (図 7)。

AT 症例では 8 例中 6 例で *ATM* の変異を同定した (表 8)。

#### 第 4 節 考察

SCID を含む PID に対して NGS を用いた解析で、20 例中 14 例で原因遺伝子を同定したとの報告がある<sup>16)</sup>。今回の解析では、SCID 疑い 47 例中 34 例 (72.3%) で原因遺伝子を同定できており、過去の報告と比較して遜色ない変異検出率と考えられる。

TREC・KREC 解析による病型から原因遺伝子の推定を行ったが、 $T^+B^-NK^-$ SCID で原因遺伝子が *IL2RG* と判明した例や、 $T^+B^+NK^+$ SCID で原因遺伝子が *ADA* と判明した例が存在した。このように、一般的な病型と異なる症例が一部で認められたことから、SCID パネルによる網羅的な解析が有用であると考えられた。

SCID より軽症な CID では 30 以上の原因遺伝子が報告されているが<sup>1)</sup>、TREC の結果が感度未満の CID と考えられる症例の中に、SCID の原因遺伝子が同定される症例があった。1 つは、*IL2RG* のアミノ酸置換のない synonymous 変異でスプライス異常を起こす変異であった。一部共通  $\gamma$  鎖の発現が残存し、CID の表現型を呈しているのではないかと考えられた。このような臨床像のみから原因遺伝子を疑うことは難しく、網羅的遺伝子解析が診断に有用であることが示唆された。また *LIG4* の変異が 2 例で同定された。*LIG4* 異常による SCID は成長障害、小頭症、特異な顔貌を認める  $T^+B^-NK^+$ SCID を呈するが、成人などの比較的高年齢の症例でも報告があり<sup>26)</sup>、上記のような症状を呈する CID では考慮が必要である。

TREC の結果が正常の PID 症例で *STIM1* の変異が同定されたものが 1 例あった。*STIM1* (stromal interaction molecules 1) は小胞体膜に存在する I 型膜貫通タンパク質で、小胞体内の  $Ca^{2+}$  の枯渇を感知して、細胞膜に存在する CRAC

(calcium release-activated calcium channel) チャンネルを活性化する。STIM1 の働きにより  $\text{Ca}^{2+}$  が持続的に流入することが、獲得免疫応答には必要不可欠である。STIM1 遺伝子の機能喪失型変異では、T 細胞、B 細胞、NK 細胞が正常に存在する  $\text{T}^+\text{B}^+\text{NK}^+\text{SCID}$  を示すが、T 細胞機能が悪いため、リンパ球幼弱化試験は低値を示す<sup>27)</sup>。リンパ球表面抗原解析で  $\text{CD3}^+\text{T}$  細胞数が正常で、TREC の結果が正常範囲であっても、臨床症状やリンパ球幼弱化試験などから SCID を疑うことが重要であると考えられた。

保因者疑い症例は本研究で診断した *DCLRE1C* exon1-3 の両アレル欠失による SCID 症例の両親であり、ともに片アレル欠失を検出できた。通常のサンガー法では片アレル欠失を検出できないため、このような症例には NGS によるコピー数解析は有用であった。

AT 症例では 8 例中 6 例で *ATM* 遺伝子の変異を同定した。*ATM* に変異がみられなかった症例のうち 1 例は末梢の毛細血管拡張は認めたが、小脳失調は認めず、診断が異なっている可能性がある。これまでに、AT では *ATM* 遺伝子のイントロンの変異が原因である症例が多数報告されている<sup>28)</sup>。今回の系ではエクソンとその周辺イントロン数塩基のみをみているため、変異を同定できていない可能性もある。

## 第 5 節 小括

NGS を用いた SCID パネルの targeted resequencing により、SCID 疑い 47 例中 34 例、CID 疑い 39 例中 4 例、AT 8 例中 6 例で原因遺伝子を同定することができた。また保因者の片アレル欠失も同定することができたことから、臨床診断における SCID パネルを用いた targeted resequencing の有用性が示された。

## 第4章 原因遺伝子が同定された SCID 症例の感染歴、治療及び予後

### 第1節 背景

TREC を用いた SCID の NBS が世界的に進められている<sup>6-12, 22, 29, 30)</sup>。特にアメリカでは、2016年に診断された SCID 症例のうち、90%は NBS から見つかっており、感染症もしくは家族歴から見つかったのは10%であった<sup>30)</sup>。アメリカ、カナダでは、2010～2014年に HSCT を受けた SCID、leaky SCID、Omenn 症候群など100例の移植後のうち、59%が NBS もしくは家族歴から診断されていた。移植後2年での全生存率は90%であったのに対し、活動性の感染症がみられた症例では81%に低下していた<sup>31)</sup>。

したがって、できるだけ早期に診断して感染が起きる前に治療を始めることが予後改善のために重要と考えられるため、わが国ではできるだけ早く導入されることが望まれる。

### 第2節 対象および方法

原因遺伝子が同定された SCID 34 症例について、感染歴の有無、「有」の場合には感染部位、原因微生物を調査した。また、国内の14症例について、診断後の治療法、HSCT 時の活動性感染症の有無や診断後の生存期間、現在の健康状態を追跡調査した。

### 第3節 結果

#### (1) 原因遺伝子が判明した SCID 34 症例の感染 (表9)

SCID 確定診断前の感染歴を有していたものが31例、感染歴のなかった症例が1例、感染歴不明が2例であった。感染歴を有した31例中、感染部位の内訳は、肺22例(71.0%)、皮膚10例(32.3%)、腸管8例(25.8%)、耳6例(19.4%)、口腔4例(12.9%)の順で多かった。皮膚の感染症は BCG 接種による潰瘍および

膿瘍が高頻度にみられた。

原因微生物の内訳はウイルスではサイトメガロウイルス (cytomegalovirus: CMV) 7 例 (22. 6%)、RS ウイルス (respiratory syncytial virus: RSV) 4 例 (12. 9%)、風疹ワクチン株 1 例 (3. 2%) の順であった。真菌では *Candida* 4 例 (12. 9%) で、深部感染症はなくいずれも口腔カンジダ症であった。そのほかには、*Pneumocystis jirovecii* による肺炎が 2 例 (6. 5%)、*Aspergillus* が 1 例であった。細菌では *Mycobacterium bovis* (BCG 株) が 3 例 (9. 7%)、*Enterococcus faecalis* 2 例 (6. 5%) および *E. coli* 1 例 (3. 2%) の順であった。さらに、感染の証拠は得られなかったが、ロタウイルスワクチン接種後の腸重積が 1 例で認められた。

## (2) 国内 SCID 14 症例の治療及び予後 (表 10)

治療及び予後経過の追える国内 SCID 症例 14 例中、11 例は HSCT を受け 9 例 (81. 8%) が生存、ADA-SCID の 2 症例は酵素補充療法を受け 1 例 (50. 0%) のみが生存していた。残り 1 症例は HSCT 待機中であった。

症例 S1 は HSCT 時に CMV による活動性感染症を認めたため、前処置なしで HLA1 座不一致の父からの末梢血幹細胞移植を行った。T 細胞のみ生着し、CMV は消失したが、移植後 1 年目に下痢と発熱が出現し、1 か月以上便からノロウイルスを排除することができなかった。フローサイトメトリー解析により TCRV $\beta$  の偏りのため T 細胞機能不全があることが判明したため、宿主の前処置後、同ドナーより再移植を行い、感染コントロールに成功して生存中の症例である。

症例 S12 は HSCT 前にニューモシスチス肺炎及び肺アスペルギルス症を呈していた。感染コントロールを待って HSCT を施行したが、移植後早期より感染が再燃し、呼吸器不全と多臓器不全で死亡した。

症例 S15 は診断時に肺、肝膿瘍および CMV 感染を呈しており、診断後すぐに酵素補充と感染治療を行ったが、コントロールできず、肺出血で死亡した。

症例 S23 は CMV 感染、肺アスペルギルス症、HLH を呈し、感染コントロール後



に HSCT を施行したが、HLH を再発し死亡した。

なお、海外の症例は、5 例を除き、インドから紹介された症例であった。原因遺伝子が確定できた 12 例のうち、紹介時に生存していた症例は 3 例のみであり、死亡が 5 例、生死不明 4 例で、確定診断後に根治治療が行えた症例はなかった。

#### 第 4 節 考察

今回解析した症例のほとんどが感染を契機に診断されており、いずれも重症かつ難治性であり、治療に難渋していた。SCID 症例におけるウイルス感染は CMV 感染が多く、生後早期から症状がみられた。CMV は母乳を介して新生児へと移行し感染する。統計によると日本人妊婦の CMV 抗体保有率は約 70%であり<sup>32)</sup>、CMV 既感染者のほとんどは母乳中に CMV を分泌する。正常新生児は感染しても症状を呈さないが、SCID 症例では重篤な症状を呈することがあるため、感染前に診断して母乳摂取を中止することが重要である。また、RSV についてはパリビズマブ（抗 RSV 抗体）投与により重症化を予防することが可能であり、国内では 24 月齢以下の PID を伴う児に対し保険適応もあるため、同様に感染前に診断してパリビズマブを投与するのがよい。今回の解析においても BCG や風疹ワクチンなどの生ワクチンによる感染が認められている。予防接種による感染に対しては、接種前に SCID と診断することにより接種しないことが唯一の予防策である。真菌では *Pneumocystis jirovecii* や *Candida*、*Aspergillus* などの感染は ST 合剤や抗真菌薬の投与で予防が可能である。以上のように SCID では一旦感染すると重症化するため、できるだけ早期に診断し、感染を予防することが重要である。

日本の現状では SCID のほとんどの症例が感染症を契機に見つかるため、まず感染をコントロールしてからでないと根治療法に進めない。その多くが感染に対する治療直後の HSCT となるため、HSCT 後に感染の再燃がみられる。このように、TREC 解析を用いた SCID の NBS を施行している国からの報告<sup>30)</sup>と比較し予

後が悪いのは、感染症の合併率が高いことが一因と考えられる。

## 第5節 結論

原因遺伝子が判明した SCID 34 例中 9 割以上に感染があり、これらの多くは TREC 解析を用いた SCID の NBS などの早期診断により予防し得たものと考えられた。

原因遺伝子を同定した国内の SCID 14 例では、感染をコントロールすることにより、適切な治療につなげることが可能であった。これら 14 症例中、今後移植予定の 1 例を含めた 11 例（78.6%）が生存している。

## 第5章 考察

今回の研究においては SCID を疑われて紹介された国内外の 104 例、SCID 保因者疑い 2 例、AT 8 例について、TREC・KREC 解析および SCID パネルの targeted resequencing を行った。日本では PID 症例を PIDJ (Primary Immunodeficiency Database in Japan) に登録し、専門施設への相談や解析依頼をすることが可能である。専門施設でリンパ球表面抗原解析などを行った後に、SCID を疑われた症例が当科に紹介された。症例の多くは重症または難治性の感染症を併発し、迅速な診断が必要とされた。targeted resequencing は最短 2 日で解析が可能であるため、診断後速やかに治療へつなげることが可能である。原因遺伝子が同定できた症例で、検査や治療法の選択において適切な判断が可能となり、対象となった 14 例中 13 例は HSCT や酵素補充療法などの根治療法へすすみ、残り 1 例も HSCT に向けた準備を行っているところである。

SCID では早期の感染予防対策が重要で、CMV、RSV などのウイルス感染、*Pneumocystis jirovecii* や *Candida*、*Aspergillus* などの真菌感染、*Enterococcus faecalis* や *E. coli* などの細菌感染に注意が必要である。これらはいずれも、感染前に SCID と確定診断できれば、対策が可能であり、早期の診断が重要と考えられた。また、ワクチンによる感染例も認められたことから、BCG や MR などの生ワクチンの接種時期以前に診断することが重要である。

海外の症例は、5 例を除き、インドから紹介された症例であった。インドでは、PID に対する認識や解析施設が不足しているために、診断が確定する前に死亡している症例がほとんどであった。今回の解析でも、原因遺伝子が確定できた 12 例のうち、紹介時に生存していた症例は 3 例のみであり、死亡が 5 例、生死不明 4 例であった。今回は、リンパ球表面抗原解析などの詳細な解析を行うことができなかつた症例でも、TREC・KREC 解析を行うことにより SCID の病型分類が可能であることを示した。PID は遺伝性疾患であるため、たとえ死亡例であつて

も確定診断しておくこと、次子への早期診断や治療にいかすことが可能となり、感染症発症前の対処という観点から有用であると考えられた。

今後の課題として、SCID 疑い症例のなかで SCID パネルの targeted resequencing により原因遺伝子を同定できなかった症例については、exome 解析および機能解析により、新規原因遺伝子等を同定する必要性が挙げられる。

## 第6章 結論

AT 症例 8 例、保因者 2 例を含む PID 症例 114 例について、TREC・KREC 解析及び NGS による SCID パネルの targeted resequencing を行った。

SCID 疑い 47 例中 34 例 (72.3%) で原因遺伝子を同定できた。迅速な原因遺伝子診断は、ひきつづく検査や治療法の選択に有用であり、国内症例では適切な治療につなげることが可能であった。感染例の原因病原体としては、CMV、RSV などのウイルス、*Pneumocystis jirovecii*、*Candida*、*Aspergillus* などの真菌、*Enterococcus faecalis*、*E. coli* などの細菌があった。また、ワクチン株による感染例も認められたことから、生ワクチン接種は危険であることが判明した。

CID 疑い症例 39 例中 4 例で原因遺伝子を同定したが、SCID の原因遺伝子として知られている *IL2RG* および *LIG4* に変異があることが判明した。

AT 症例 8 例中 6 例で *ATM* 遺伝子の変異を同定した。変異が同定できなかった症例においては、診断の相違や、イントロン変異などが可能性として考えられた。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究全般にわたりご指導を賜りました防衛医科大学学校小児科学講座 野々山 恵章 教授に深甚なる謝意を表します。また、研究のご指導賜りました先生方や貴重な症例をご紹介くださった先生方ならびに検体採取にご同意くださいました患者様と保護者の方々に深謝いたします。

自衛隊中央病院 釜江 智佳子 先生、加藤 環 先生  
防衛医科大学校 小児科 賀佐 希美子 様  
東京医科歯科大学 小児科 今井 耕輔 先生、金兼 弘和 先生  
国立成育医療研究センター研究所成育遺伝研究部 疾患遺伝子構造研究室  
内山 徹 先生  
大阪大学 小児科 宮村 能子 先生  
埼玉県立小児医療センター 血液腫瘍科 磯部 清孝 先生  
弘前大学 小児科 工藤 耕 先生  
島根大学 小児科 金井 理恵 先生  
岡山大学 小児血液腫瘍科 嶋田 明 先生  
静岡済生会総合病院 小児科 漆畑 伶 先生  
Oberärztin Immunologie Universitäts-Kinderspital Zürich

Dr. Seraina Prader

Postgraduate Institute of Medical Education and Research, Department of  
Pediatrics, Chandigarh, India Dr. Amit Rawat、Dr. Pandiarajan Vignesh

単語・略語説明

【アルファベット順】

#### AT (Ataxia telangiectasia、毛細血管拡張性運動失調症)

小児期早期から発症する小脳失調 (ataxia) と眼球や皮膚の毛細血管拡張 (telangiectasia)、免疫不全、易発がん性などを特徴とする常染色体劣性の遺伝病。原因遺伝子は *ATM* である。発症頻度は 4~10 万人に 1 人で、保因者は人口の 0.5~1%とされている。

#### CNV (copy number variant、コピー数多型)

通常 1 Kbp 以上にもおよぶ、大きなゲノム断片のコピー数のバリエーション。重複や欠失がある。アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーションにより検出することが可能である。

#### KREC (kappa-deleting recombination excision circles)

B 細胞の発生過程において、重鎖の有効な遺伝子再構成が起きると、次に  $\kappa$  鎖の再構成が始まる。その際、 $\kappa$  鎖の VJ 再構成が無効になると、その  $\kappa$  鎖を発現させないために  $\kappa$  鎖定常領域の  $C_{\kappa}$  を含む領域が染色体から切り出される。この切り出された環状 DNA が signal joint (sj)KREC である。一方、染色体内に残存した部分は coding joint (cj)KREC と呼ぶ。sjKREC は一度生成されると増幅せず、細胞分裂に伴い希釈されるため、B 細胞新生能を反映する。real-time PCR 法を用いて定量することが可能である。

#### NGS (Next generation sequencer、次世代シーケンサー)

DNA の塩基配列を決定する手法として、これまでのサンガー法と異なる手法で、格段に解析能力を上げることを可能とした方法。従来のサンガー法との違いは、

サンガー法では1~96のDNA断片を同時処理するのに対し、NGSでは数千万から数億のDNA断片に対して大量並列に処理することである。これにより解析のスピードは飛躍的に向上し、大きなゲノム領域を対象とする研究ができるようになった。またゲノムだけでなく、エピゲノム、トランスクリプトーム解析が可能である。

### **Omenn 症候群**

新生児・乳児期に網内系および皮膚の細胞浸潤と好酸球増多を呈する疾患であり、複合型免疫不全症を来すいくつかの疾患責任遺伝子産物の活性が残存している (hypomorphic) 変異によって生じる。全身の紅皮症が特徴で、母親由来のT細胞の生着はなく、 $CD3^+T$ 細胞数 $\geq 300/\mu l$ である。生後早期から日和見感染症に罹患し易く、慢性の下痢、成長障害を来す。

### **real-time PCR (real-time polymerase chain reaction、リアルタイム PCR)**

PCR増幅産物をリアルタイムにモニタリングする検査法。PCRにより1サイクル毎にDNAが2倍になっていく増幅の様子を蛍光により検出し、増幅曲線からDNA量を計算する。PCR像副産物の定量比較ができるのでqPCR(quantitative PCR)とも呼ばれる。

### **sanger sequence (サンガー法)**

DNAの塩基配列を決定する手法の一つ。DNA複製酵素であるDNAポリメラーゼを用いて末端が特定の塩基に対応するDNA断片を合成する方法で、現在では4種類の蛍光色素で標識したddNTP(ジデオキシヌクレオチド)を伸長反応に使用するダイターミネーター法が主流となっている。鋳型DNAに対して特異的に結合する一種類のプライマーからの伸長反応でランダムに取り込まれたダイター



ミネーターの蛍光色素の種類と DNA 断片の長さをキャピラリー電気泳動装置で検出することで塩基配列を決定する。

### **SCID (severe combined immunodeficiency、重症複合免疫不全症)**

SCID は T リンパ球の数や機能の著しい異常に加え、無又は低ガンマグロブリン血症を伴う原発性免疫不全症である。生後早期より易感染性を示す重篤な遺伝子異常症である。HSCT や、酵素補充療法、遺伝子治療などの治療を行わなければ生後 2 年以内に致死的となる。感染を併発すると予後不良となるため、感染前の早期診断が重要である。

米国の PIDTC (The Primary Immune Deficiency Treatment Consortium) の定義では、typical SCID は  $CD3^+T$  細胞数  $<300/\mu l$  または母親由来 T 細胞の生着、かつ PHA  $<$  正常下限の 10%、leaky SCID は 2 歳未満で  $CD3^+T$  細胞数  $<1000/\mu l$ 、2~4 歳で  $CD3^+T$  細胞数  $<800/\mu l$ 、4 歳以上で  $CD3^+T$  細胞数  $<600/\mu l$ 、かつ PHA が正常下限の 10~30% となっている。

### **targeted resequencing**

試料から目的の遺伝子領域を単離し、シーケンスすることにより、特定の目的領域に研究資源を集中して配列決定を行う方法。次世代シーケンシング技術の中で最も急速に成長しているアプリケーションの 1 つである。

### **TREC (T cell receptor excision circles)**

T 細胞受容体遺伝子再構成の過程で gDNA から切り出される環状 DNA。一度生成されると増幅せず、細胞分裂に伴い希釈されるため、T 細胞新生能を反映する。real-time PCR 法を用いて定量することが可能である。SCID に共通する新生 T 細胞数の低下という特徴を検出できる。TREC 解析を用いた SCID の NBS が全世界で進められている。

## 参考文献

1. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, et al. The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol.* 2018;38:129-43.
2. Buckley RH. The long quest for neonatal screening for severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:597-604.
3. Mallott J, Kwan A, Church J, Gonzalez ED, et al. Newborn screening for SCID identifies patients with ataxia telangiectasia. *J Clin Immunol.* 2013;33:540-9.
4. Morinishi Y, Imai K, Nakagawa N, et al. Identification of severe combined immunodeficiency by T-cell receptor excision circles quantification using neonatal Guthrie cards. *J Pediatr.* 2009;155:829-33.
5. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, et al. Quantification of kappa-deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128:223-5.
6. Routes JM, Grossman WJ, Verbsky J, et al. Statewide newborn screening for severe T-cell lymphopenia. *JAMA.* 2009;302:2465-70.
7. Adams SP, Rashid S, Premachandra T, et al. Screening of neonatal UK dried blood spots using a duplex TREC screening assay. *J Clin Immunol.* 2014;34:323-30.
8. Audrain M, Thomas C, Mirallie S, et al. Evaluation of the T-cell receptor excision circle assay performances for severe combined immunodeficiency neonatal screening on Guthrie cards in a French

- single centre study. Clin Immunol. 2014;150:137-9.
9. Somech R, Lev A, Simon AJ, Korn D, et al. Newborn screening for severe T and B cell immunodeficiency in Israel: a pilot study. Isr Med Assoc J. 2013;15:404-9.
  10. Chien YH, Chiang SC, Chang KL, et al. Incidence of severe combined immunodeficiency through newborn screening in a Chinese population. J Formos Med Assoc. 2015;114:12-6.
  11. Blom M, Pico KI, Sijne-van VM, et al. An evaluation of the TREC assay with regard to the integration of SCID screening into the Dutch newborn screening program. Clin Immunol. 2017;180:106-10.
  12. Al-Mousa H, Al-Dakheel G, Jabr A, et al. High incidence of severe combined immunodeficiency disease in Saudi Arabia detected through combined t cell receptor excision circle and next generation sequencing of newborn dried blood spots. Front Immunol. 2018;9:782.
  13. 加藤 環. 次世代シーケンサーを用いた原発性免疫不全症の迅速遺伝子診断法の確立と臨床応用. 博士学位論文. 2016 ; 38.
  14. Mallott J, Kwan A, Church J, et al. Newborn screening for SCID identifies patients with ataxia telangiectasia. J Clin Immunol. 2013;33:540-9.
  15. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, et al. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin k-deleting recombination excision circles. J Allergy Clin Immunol. 2013;131:1437-40.
  16. Yu H, Zhang VW, Stray PA, et al. Rapid molecular diagnostics of severe primary immunodeficiency determined by using targeted next-generation sequencing. J Allergy Clin Immunol. 2016;138:1142-51.
  17. Erman B, Bilic I, Hirschmugl T, et al. Investigation of genetic defects

- in severe combined immunodeficiency patients from Turkey by targeted sequencing. *Scand J Immunol.* 2017;85:227-34.
18. Shearer WT, Dunn E, Notarangelo LD, et al. Establishing diagnostic criteria for severe combined immunodeficiency disease (SCID), leaky SCID, and Omenn syndrome: the Primary Immune Deficiency Treatment Consortium experience. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:1092-8.
  19. Fischer A, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, et al. Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. *Immunol Rev.* 2005;203:98-109.
  20. Hazenberg MD, Otto SA, Cohen Stuart JW, et al. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med.* 2000;6:1036-42.
  21. van Zelm MC, Szczepanski T, Van Der Burg M, et al. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J Exp Med.* 2007;204:645-55.
  22. King JR, Hammarström L. Newborn screening for primary immunodeficiency diseases: history, current and future practice. *J Clin Immunol.* 2018;38:56-66.
  23. Borte S, von Döbeln U, Fasth A, et al. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood.* 2012;119:2552-5.
  24. Hijikata A, Raju R, Keerthikumar S, et al. Mutation @ A Glance: an integrative web application for analysing mutations from human genetic diseases. *DNA Res.* 2010;17:197-208.
  25. Schwar JM, Cooper DN, Schuelke M, et al. Mutation Taster 2: mutation

- prediction for the deep-sequencing age. *Nat Method.* 2014;11:361-2.
26. O' Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, et al. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell.* 2001;8:1175-85.
27. Picard Cl, McCarl CA, Papolos A, et al. *STIM1* mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. *N Engl J Med.* 2009;360:1971-80.
28. Sandoval N, Platzner M, Rosenthal A, et al. Characterization of *ATM* gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. *Hum Molec Genet.* 199;8:69-79.
29. Kwan A, Abraham RS, Currier R, Brower A, et al. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in 11 screening programs in the United States. *JAMA.* 2014;312:729-38.
30. Morna D, Jennifer P. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in the US: current status and approach to management. *Int J Neonatal Screen.* 2017;3:15.
31. Heimall J, Logan BR, Cowan MJ, et al. Immune reconstitution and survival of 100 SCID patients post-hematopoietic cell transplant: a PIDTC natural history study. *Blood.* 2017;130:2718-27.
32. 東 寛, 高梨 美乃子, 神前 昌敏ら. 1996年から2009年の間における妊婦のサイトメガロウイルス抗体保有率の推移について. *日本周産期・新生児医学雑誌.* 2010;46:1273-9.

表 1 PID 症例の内訳

臨床情報	症例数 N=104	(%)
<b>性別</b>		
男児	66	(63.5%)
女児	38	(36.5%)
<b>診断時年齢 (歳)</b>		
< 2	71	(68.3%)
≥ 2	33	(31.7%)
<b>感染歴</b>		
有	89	(85.6%)
無	5	(4.8%)
不明	10	(9.6%)
<b>紹介時の HSCT</b>		
有	3	(2.9%)
無	95	(91.3%)
不明	6	(5.8%)
<b>紹介時生死</b>		
生	55	(52.9%)
死	43	(41.3%)
不明	6	(5.8%)

HSCT : hematopoietic stem cell transplantation

表 2 AT 症例の内訳

臨床情報	症例数	
	N=8	(%)
<b>性別</b>		
男児	3	(37.5%)
女児	5	(62.5%)
<b>小脳失調 (ataxia)</b>		
有	7	(87.5%)
無	1	(12.5%)
<b>末梢血管拡張 (telangiectasia)</b>		
有	7	(87.5%)
無	1	(12.5%)
<b><math>\alpha</math>-fetoprotein</b>		
上昇	5	(62.5%)
不明	3	(37.5%)

表 3 PID 症例の TREC・KREC 結果

TREC・KREC 値	症例数 N=104	(%)
<b>TREC (copies/<math>\mu</math>gDNA)</b>		
正常 ( $\geq 10^3$ )	16	(15.4%)
低値 ( $\geq 10^2, < 10^3$ )	12	(11.5%)
感度未満 ( $< 10^2$ )	76	(73.1%)
<b>KREC (copies/<math>\mu</math>gDNA)</b>		
正常 ( $\geq 10^3$ )	64	(61.5%)
低値 ( $\geq 10^2, < 10^3$ )	4	(3.9%)
感度未満 ( $< 10^2$ )	36	(34.6%)



表 4 AT 症例の TREC・KREC 結果

TREC・KREC 値	症例数	
	N=8	(%)
<b>TREC (copies/<math>\mu</math>gDNA)</b>		
正常 ( $\geq 10^3$ )	0	(0%)
低値～感度未満 ( $< 10^3$ )	8	(100%)
<b>KREC (copies/<math>\mu</math>gDNA)</b>		
正常 ( $\geq 10^3$ )	7	(87.5%)
低値～感度未満 ( $< 10^3$ )	1	(12.5%)

表 5 SCID パネル

phenotype	genes
T <sup>-</sup> B <sup>+</sup> NK <sup>-</sup> SCID	<i>IL2RG, JAK3</i>
T <sup>-</sup> B <sup>+</sup> NK <sup>+</sup> SCID	<i>IL7R, CD3D, CD3E, CD247, PTPRC, CORO1A, FOXP1</i>
T <sup>-</sup> B <sup>-</sup> NK <sup>-</sup> SCID	<i>ADA, AK2</i>
T <sup>-</sup> B <sup>-</sup> NK <sup>+</sup> SCID	<i>LIG4, NHEJ1, PRLDC, RAG1, RAG2, DCLRE1C</i>
CID	<i>CD8A, ZAP70, MAGT1, LCK, CD3G, RMRP, PNP, STIM1, ORAI1, STAT5B, ATM, RAC2</i>

表6 SCID 疑い症例で判明した原因遺伝子変異

症例	病型	年齢 (月)	性別	TREC (copies/ $\mu$ l)	KREC (copies/ $\mu$ l)	原因 遺伝子	塩基変異	アミノ酸置換
S1	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup> NK <sup>-</sup>	2	M	ND	+	<i>IL2RG</i>	c. 865C>T	p. Arg289Ter
S2	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup>	3	M	ND	+	<i>IL2RG</i>	c. 627delC	p. L210Cfs*63
S3	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup> NK <sup>-</sup>	3	M	ND	$1.50 \times 10^3$	<i>IL2RG</i>	c. 391C>T	p. Gln131Ter
S4	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup> NK <sup>-</sup>	4	M	ND	$1.88 \times 10^5$	<i>IL2RG</i>	c. 116-1G>T	splice anomaly
S5	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup> NK <sup>-</sup>	4	M	ND	$3.71 \times 10^4$	<i>IL2RG</i>	c. 979G>A	p. Glu327Lys
S6	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup> NK <sup>-</sup>	5	M	ND	$8.32 \times 10^4$	<i>IL2RG</i>	c. 8_9insA	p. Pro4fs
S7	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup> NK <sup>-</sup>	5	M	ND	$8.41 \times 10^4$	<i>IL2RG</i>	c. 854G>A	p. Arg285Gln
S8	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup>	6	M	ND	$1.50 \times 10^5$	<i>IL2RG</i>	c. 282G>A,	splice anomaly
S9	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup> NK <sup>+</sup>	6	M	ND	$5.03 \times 10^4$	<i>IL2RG</i>	c. 594+5G>T	splice anomaly
S10	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup> NK <sup>-</sup>	6	M	ND	ND	<i>IL2RG</i>	c. 455T>C	p. Val152Ala
S11	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup>	9	M	ND	$4.60 \times 10^5$	<i>IL2RG</i>	c. 676C>T	p. Arg226Cys
S12	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup>	9	M	ND	+	<i>IL2RG</i>	c. 664C>T	p. Arg222Cys
S13	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup> NK <sup>-</sup>	2	F	ND	ND	<i>ADA</i>	c. 218+2T>G	splice anomaly
S14	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup> NK <sup>-</sup>	2.5	F	ND	ND	<i>ADA</i>	c. 845G>T	p. Arg282Leu
S15	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup> NK <sup>-</sup>	3	M	ND	ND	<i>ADA</i>	c. 218+2T>G, c. 632G>A	splice anomaly p. Arg211His
S16	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup> NK <sup>+</sup>	3	M	ND	$6.02 \times 10^3$	<i>ADA</i>	c. 466C>T	p. Arg156Cys
S17	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup>	4	M	ND	ND	<i>ADA</i>	exon2	deletion
S18	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup>	1.5	F	ND	ND	<i>RAG1</i>	c. 2923C>T	p. Arg975Trp
S19	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup>	4	M	ND	ND	<i>RAG1</i>	c. 2923C>T	p. Arg975Trp
S20	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup>	4	F	ND	ND	<i>RAG1</i>	c. 1211G>A	p. Arg404Gln

ND, not detectable

\*NK 細胞の有無はリンパ球表面抗原解析を施行している症例のみ記載

\*KREC +は他院で施行して正常のもの（正常値が異なるため、+で表記）

表6 SCID 疑い例で判明した原因遺伝子変異 (続き)

症例	病型	年齢 (月)	性別	TREC (copies/ $\mu$ l)	KREC (copies/ $\mu$ l)	原因 遺伝子	塩基変異	アミノ酸置換
S21	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup>	4	M	ND	ND	<i>RAG1</i>	c. 232C>T c. 2867T>C	p. Gln78Ter p. Ile956Thr
S22	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup>	4	M	ND	ND	<i>RAG1</i>	c. 2210G>A c. 2447G>A	p. Arg737His p. Gly816Glu
S23	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup> NK <sup>+</sup>	2	M	ND	ND	<i>DCLRE1C</i>	exon1-3	deletion
S24	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup> NK <sup>+</sup>	4	M	ND	ND	<i>DCLRE1C</i>	exon1-3	deletion
S25	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup> NK <sup>+</sup>	4.5	F	ND	ND	<i>DCLRE1C</i>	exon1-3	deletion
S26	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup> NK <sup>+</sup>	5	F	ND	ND	<i>DCLRE1C</i>	exon1-3	deletion
S27	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup> NK <sup>+</sup>	7	M	ND	ND	<i>DCLRE1C</i>	exon1-3	deletion
S28	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup> NK <sup>+</sup>	10	M	ND	ND	<i>NHEJ1</i>	c. 544_545delGA	p. Glu182fs
S29	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup> NK <sup>+</sup>	11	M	ND	$1.43 \times 10^4$	<i>NHEJ1</i>	c. 221_222delGT	p. Cys74fs
S30	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup>	9	F	ND	$1.0 \times 10^4$	<i>IL7R</i>	c. 616c>T, c. 617G>A	p. Arg206Ter, p. Arg206Gln
S31	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup>	19	M	ND	$1.8 \times 10^5$	<i>IL7R</i>	c. 616c>T, c. 617G>A	p. Arg206Ter, p. Arg206Gln
S32	T <sup>-</sup> B <sup>+</sup> NK <sup>-</sup>	6	F	ND	$2.5 \times 10^4$	<i>JAK3</i>	c. 421-10G>A, c. 1568G>A,	splice anomaly, p. Trp523Ter
S33	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup> NK <sup>+</sup>	12	F	ND	ND	<i>LIG4</i>	c. 232G>A, c. 827G>A	p. Glu78Lys, p. Gly276Asp
S34	T <sup>-</sup> B <sup>-</sup> NK <sup>+</sup>	5	F	ND	$1.8 \times 10^5$	<i>RAG2</i>	c. 734C>T, c. 1247G>T	p. Pro245Leu, p. Trp416Leu

ND, not detectable

\*NK 細胞の有無はリンパ球表面抗原解析を施行している症例のみ記載

表7 CID 疑い及びその他の PID 症例で判明した原因遺伝子変異

症例	臨床病型	年齢 (歳)	TREC (copies/ $\mu$ l)	KREC (copies/ $\mu$ l)	原因 遺伝子	塩基変異	アミノ酸置換
<b>CID</b>							
C1	呼吸器感染反復、 口腔内、肛門周囲潰瘍、 貧血、下痢	4	ND	$6.47 \times 10^3$	<i>IL2RG</i>	c. 982C>T	p. Arg328Ter
C2	汎発性疣贅、CID	16	ND	$1.30 \times 10^3$	<i>IL2RG</i>	c. 924G>A	splice anomaly
C3	IgG サブクラス欠損、 ITP、好中球減少	2	ND	ND	<i>LIG4</i>	c. 1341G>T, c. 1513_1514 insTC	p. Trp447Cys, p. Arg505fs
C4	不明	5	ND	ND	<i>LIG4</i>	c. 877C>T, c. 1345A>C	p. Arg293Ter, p. Lys449Gln
<b>その他の PID</b>							
P1	T 細胞減少、重症紅斑、 発達遅滞、眉毛消失	1.25	$5.65 \times 10^3$	$1.23 \times 10^5$	<i>STIM1</i>	c. 1285C>T	p. Arg429Cys

ND, not detectable

表 8 AT 例で判明した *ATM* 遺伝子の変異

症例	性別	年齢 (歳)	TREC (copies/ $\mu$ l)	KREC (copies/ $\mu$ l)	<i>ATM</i> 遺伝子	
					塩基変異	アミノ酸置換
A1	F	2	ND	$9.17 \times 10^4$	c. 6547G>T	p. Glu2183Ter
A2	M	3	ND	$1.75 \times 10^4$	c. 6547G>T	p. Glu2183Ter
A3	F	4	ND	$4.7 \times 10^4$	c. 6547G>T	p. Glu2183Ter
A4	M	6	ND	$1.88 \times 10^4$	c. 6219_6229del CTGCCATATTC	p. Cys2074fs
A5	F	7	ND	$8.35 \times 10^3$	c. 1339C>T, c. 8473C>T	p. Arg447Ter, p. Gln2825Ter
A6	F	9.5	$1.85 \times 10^3$	$3.82 \times 10^3$	c. 2838+2T>C, c. 3145_3146delTT	splice anomaly, p. Leu1049fs

ND, not detectable

\* 症例 1 と症例 3 は姉妹であり、同一の変異をもつ。

表 9 原因遺伝子が判明した SCID34 症例の感染

感染	症例数 N=34	(%)
<b>感染</b>		
有	31	(100%)
<b>感染部位</b>		
肺	22	(71.0%)
皮膚	10	(32.3%)
腸管	8	(25.8%)
中耳	6	(19.4%)
口腔	4	(12.9%)
血液	1	(3.2%)
脳	1	(3.2%)
肝	1	(3.2%)
網膜	1	(3.2%)
<b>原因微生物</b>		
CMV	7	(22.6%)
RSV	4	(12.9%)
風疹 (ワクチン株)	1	(3.2%)
<i>Candida</i>	4	(12.9%)
<i>P. jirovecii</i>	2	(6.5%)
<i>Aspergillus</i>	1	(3.2%)
<i>M. bovis</i>	3	(9.7%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	(6.5%)
<i>E. coli</i>	1	(3.2%)
不明	4	(12.9%)
無	1	
不明	2	

CMV, cytomegalovirus

RSV, RS ウイルス

表 1 0 国内 SCID 14 症例の治療及び予後

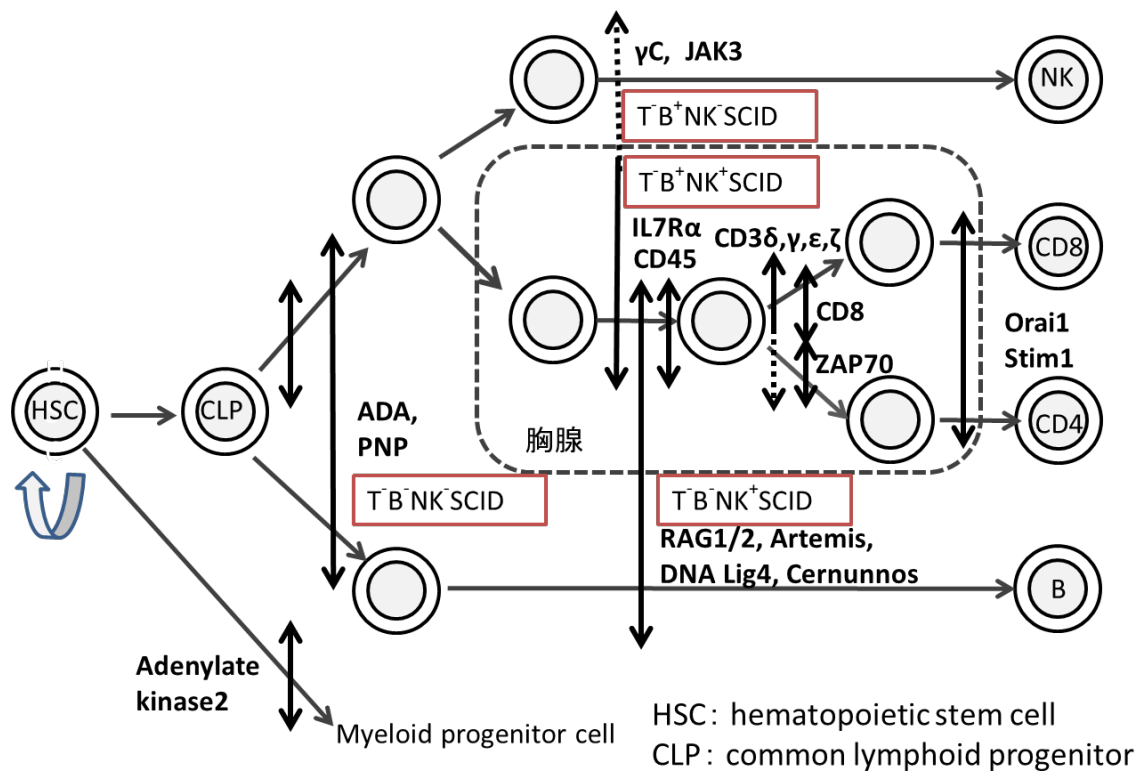
症例	原因 遺伝子	診断時 年齢 (月)	治療法	治療時の 活動性感染	診断後 観察期間 (月)	生死
S1	<i>IL2RG</i>	2	HSCT	CMV	20	生
S2	<i>IL2RG</i>	3	HSCT	無	29	生
S3	<i>IL2RG</i>	3	HSCT	RSV	4	生
S5	<i>IL2RG</i>	4	HSCT	無	20	生
S8	<i>IL2RG</i>	6	HSCT	無	43	生
S11	<i>IL2RG</i>	9	HSCT	無	38	生
S12	<i>IL2RG</i>	9	HSCT	無	3	死 (呼吸不全)
S13	<i>ADA</i>	2	酵素補充	無	29	生
S15	<i>ADA</i>	3	酵素補充	CMV、肝膿瘍、 肺膿瘍	3	死 (肺出血)
S21	<i>RAG1</i>	4	感染症、肝障害 治療中移植待ち	<i>P. jirovecii</i>	5	生
S23	<i>DCLRE1C</i>	2	HSCT	無	1	死 (生着不全)
S31	<i>IL7R</i>	19	HSCT	無	11	生
S32	<i>JAK3</i>	6	HSCT	無	34	生
S33	<i>LIG4</i>	12	HSCT	風疹 ワクチン株	35	生

CMV, cytomegalovirus

RSV, RS ウイルス

HSCT, hematopoietic stem cell transplantation



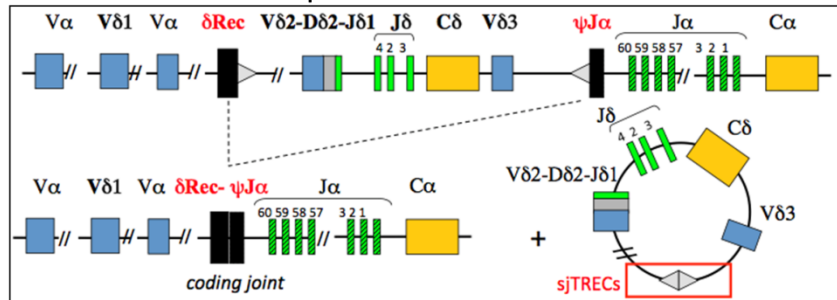


Fischer A, et al. *Immunological Reviews*, 2005<sup>19)</sup> より一部改変

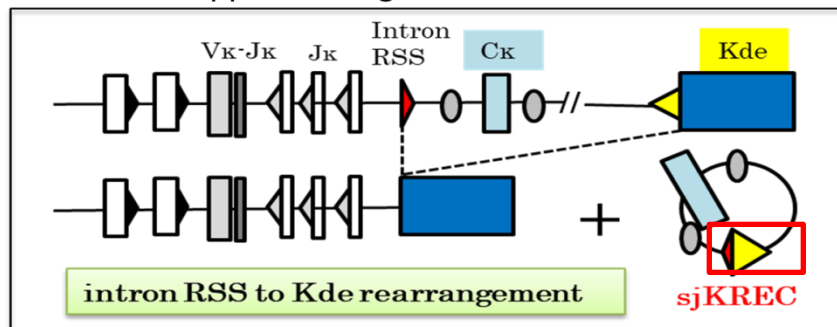
図1 SCID の分類と原因

SCID の原因分子を太字で示す。ブロックされている部位を太線で示す。

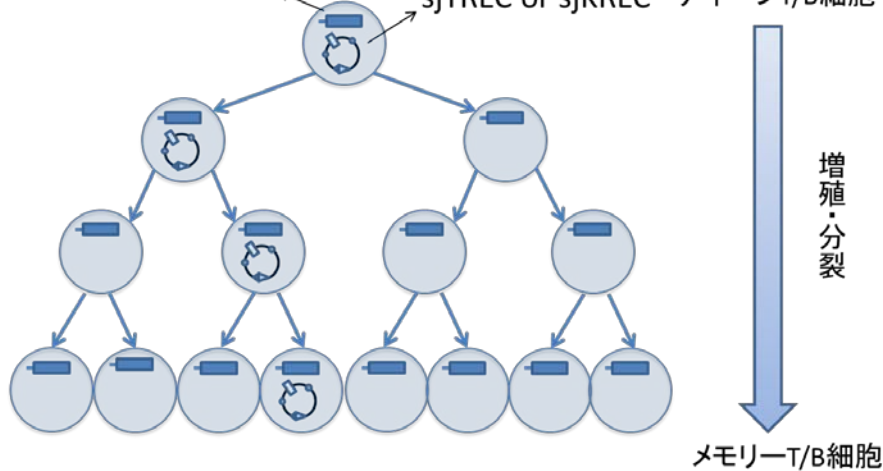
(A) TRECs (T-cell receptor excision circles)



(B) KRECs (kappa-deleting recombination excision circles)



(C) cjTREC or cjKREC sjTREC or sjKREC ナイーブT/B細胞



van Zelm MC, et al. *J Exp Med*, 2007<sup>21)</sup> より一部改変

図2 TREC および KREC の測定原理

(A) sjTREC は T cell receptor (TCR)  $\alpha$  鎖の VDJ 遺伝子再構成の過程で生じる環状 DNA、(B) sjKREC は  $\lambda$  鎖再構成あるいは  $\kappa$  鎖の allelic exclusion の過程で生じる環状 DNA である。赤枠は定量 PCR にかけている部分を示す。(C) sjTREC および sjKREC は一度生成されると増幅せず、細胞分裂に伴い希釈されるため、それぞれ T 細胞新生能、B 細胞新生能を反映する。

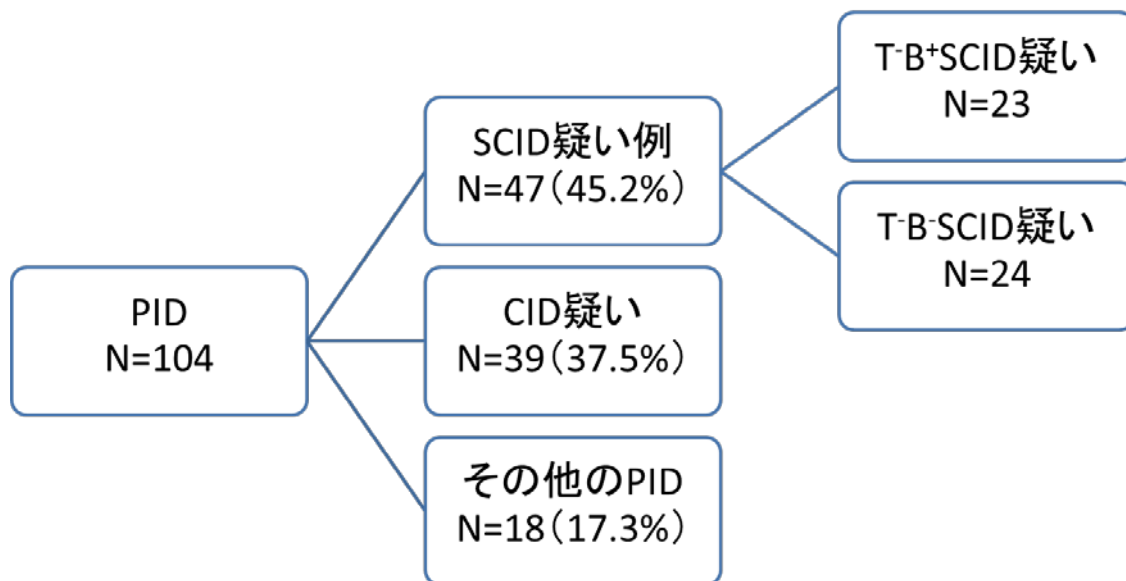


図3 PID症例の分類

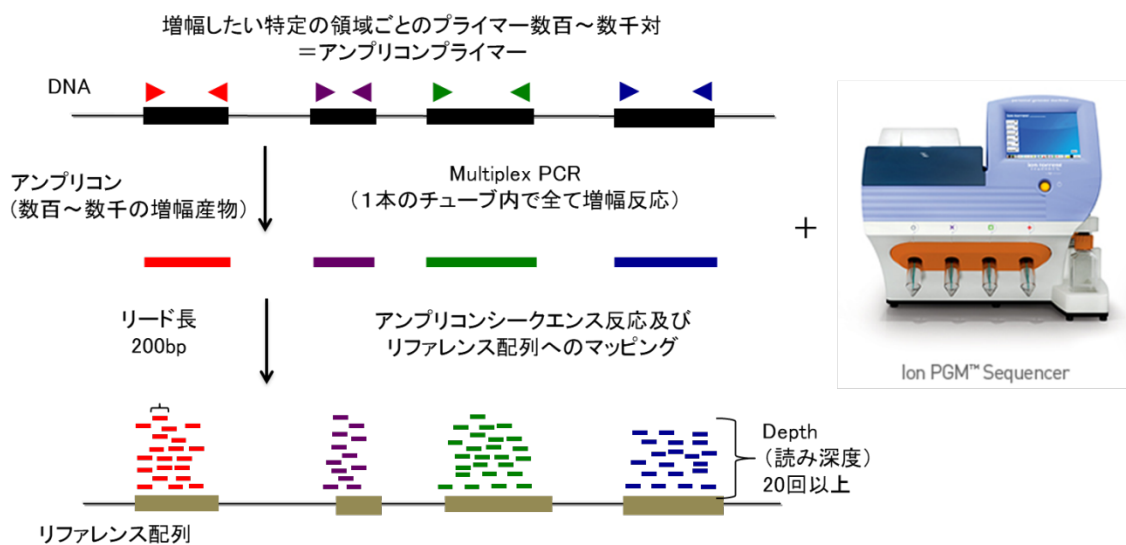
SCID 疑い：TREC が感度未満かつ2歳未満

CID 疑い：TREC が感度未満かつ2歳以上、またはTREC が低値

その他のPID：TREC が正常

T-B+SCID 疑い：SCID 疑い例のうち、KREC が低値から正常

T-B-SCID 疑い：SCID 疑い例のうち、KREC が感度未満



検体数により2日～1週間程度で解析

図4 Ion PGM™ System を用いたアンプリコンシーケンシング  
アンプリコンシーケンシングでは、増幅したい特定の領域ごとのプライマーを用いて、マルチプレックス PCR を行い、アンプリコンを作製し、各サンプルにバーコードを付けてライブラリーとする。Ion PGM™ System を用いて、シーケンシングを行い、リファレンス配列へのマッピングを行った。読み深度 20 回以上を正確性の指標とした。

(A) サンプル1 平均リード数 50

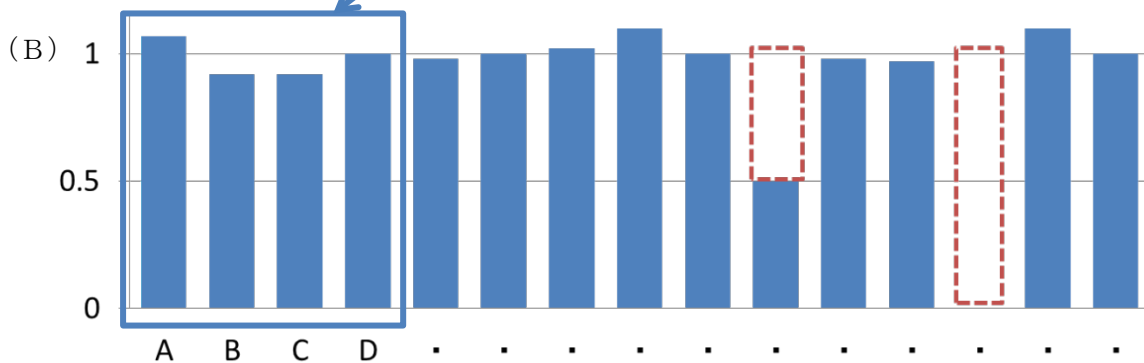
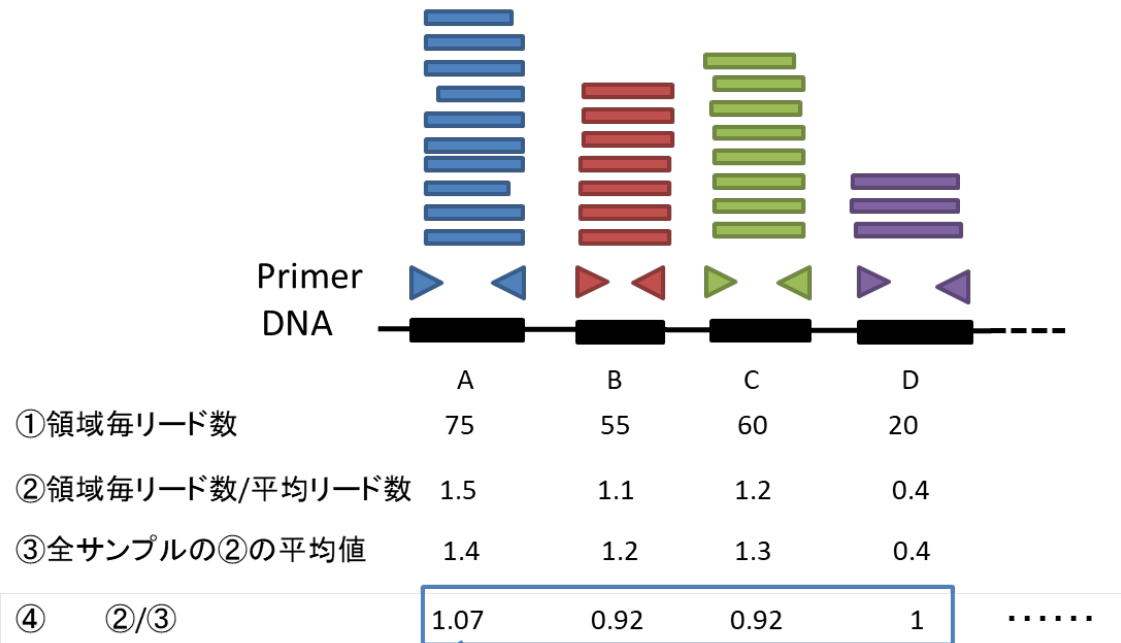


図5 CNV 解析

(A) PCR 法では、プライマー領域毎に増幅効率が異なる。目的サンプルの①領域毎リード数をそのサンプルの平均リード数で割り (②)、さらに同時に解析した全サンプルの②の平均値③を算出し、②/③で算出した値 (④) をグラフ化した (B)。正常であれば④が 1 前後となるが、片アレル欠失では 0.5 前後、両アレル欠失は 0 となる。

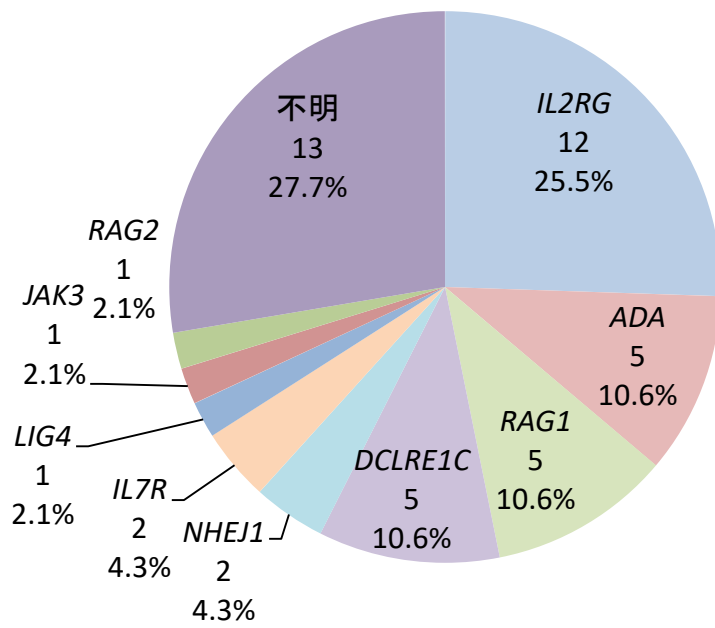


図6 SCID 疑い症例の原因遺伝子別の症例数と頻度 (N=47)

### SCID患者 (*DCLRE1C* exon 1-3 deletion) の両親

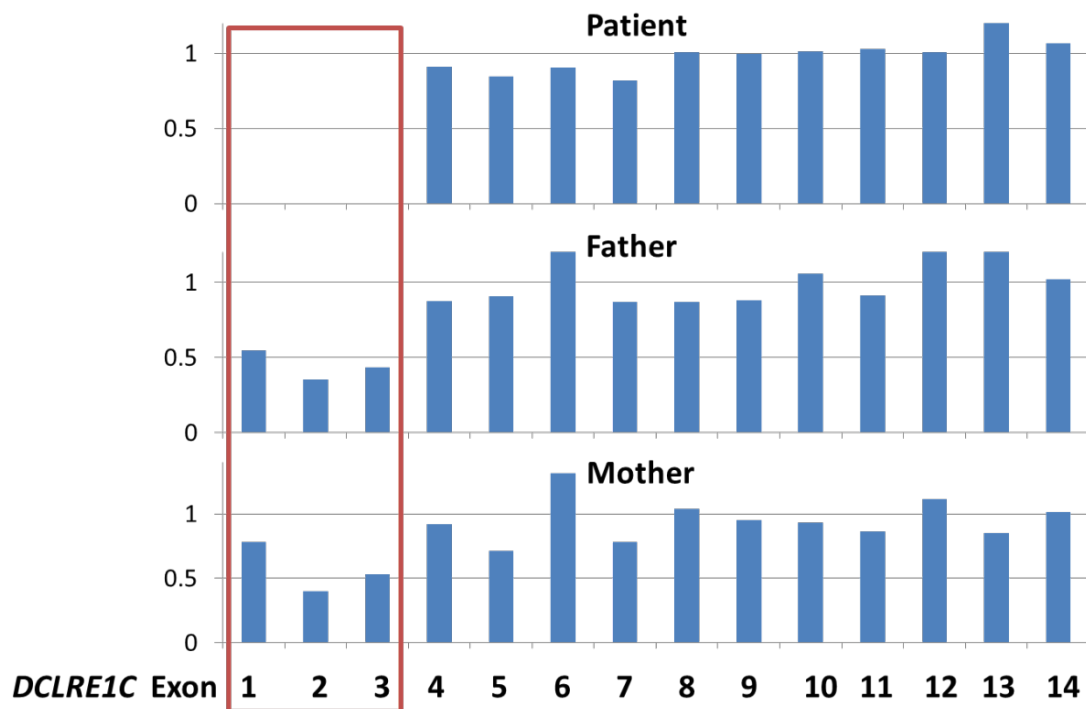


図7 SCID 保因者疑い例の CNV 解析

SCID 患者 *DCLRE1C* exon1-3 deletion とその両親の CNV 解析結果を示す。上段が患者、中段が父、下段が母であり、患者では exon1-3 の増幅がなく両アリの欠失、父、母は増幅の割合が約 0.5 であり、片アリの欠失である。