

題目

原発性免疫不全症における

T cell receptor and Ig kappa-deleting recombination
excision circles (TREC/KREC) 定量の意義について

か ま え ち か こ

釜 江 智 佳 子
(成長発達臨床医学 専攻)

防衛医科大学校

平成25年度

目 次

第 1 章 緒言	1 頁
第 2 章 重症複合免疫不全症患者の TREC/KREC 定量	4 頁
第 3 章 X連鎖性無ガンマグロブリン血症患者の TREC /KREC 定量	8 頁
第 4 章 DNA 修復異常症患者の TREC/KREC 定量	11 頁
第 5 章 TREC/KREC 定量を用いた分類不能型免疫不全症の新規病型分類	16 頁
第 6 章 結論	26 頁
謝辞	27 頁
単語・略語説明	29 頁
引用文献	31 頁
図表	37 頁

第1章 緒言

生体が自己と非自己を認識し、非自己を排除する機能を免疫という。ヒトの免疫系には自然免疫と獲得免疫がある。マクロファージやNK細胞、補体等の関与する自然免疫は即効性があるが免疫学的特異性は低い。一方、T細胞、B細胞が関与する獲得免疫は、初めての抗原に対する即効性はないが、免疫学的特異性があるため2回目以降の抗原暴露に対しては迅速かつ強力に対応できる。

獲得免疫に関わるT細胞において、T細胞受容体(T-cell receptor, 以下TCR)は2本のポリペプチド鎖から構成されており、 α 鎖と β 鎖(TCR $\alpha\beta$)、 γ 鎖と δ 鎖(TCR $\gamma\delta$)の2種に大別される。TCRがT細胞の胸腺内分化を経て多様なレパトリーを獲得するためには、TCR遺伝子の可変部領域における複数のVariable (V)、Diversity (D)、Joining (J)の各断片が、D-J、さらにV-D-Jと順次再構成されていく。これらの過程で、再構成遺伝子間のスキップされたゲノムDNAは断端同士で結合し、非機能的な環状DNAとしてゲノムDNAから切り出されるが、このような染色体外因子をTRECsと総称する¹⁻⁴⁾。多様な再構成の結果生じたTRECsも同様に多様となるが、その中で末梢血に高頻度に認められ定量に適したTRECsが、TCR $\alpha\beta$ の α 鎖をコードするTCRA遺伝子の再構成の過程で産生されることが知られている。染色体14q11上に位置するTCRA遺伝子では、その遺伝子内に δ 鎖をコードするTCRD遺伝子が混在する。このTCRDを除去する段階(TCRD deletion)を経てからTCRA遺伝子再構成が進み α 鎖が発現することになる。TCRD deletionの約7割は、 δ Rec 遺伝子と ϕ J α 遺伝子の再構成により達成されることから、この時に生じたsignal joint TREC (δ Rec- ϕ J α sjTRECs)の断端結合部には、共通する特異配列が高頻度に生じることになる(図1)。TRECsは環状DNAとして染色体外に存在し、胸腺内外のその後のT細胞の分化・増殖に伴って複製されず細胞死まで安定して保存されるため、増殖・分裂に伴って相対的に希釈される。特に、 δ Rec- ϕ J α sjTRECはTCRD deletionのほぼ最終段階で生じることから分化・増殖に伴う希釈の程度が少ない。また、TCR $\alpha\beta$ ⁺T細胞が末梢血T細胞の約9割を占めるため末梢血に高濃度に認められることになる。このsjTRECを定量することはT細胞新生能のマーカーとして有用である^{5, 6, 7)}。

一方獲得免疫のうち B 細胞は、骨髄で precursor B 細胞から分化し、まず免疫グロブリン(Immunoglobulin, Ig) 重鎖 (heavy chain, H 鎖)が VDJ 再構成を受ける。それが成功すると、軽鎖 (light chain, L 鎖) が VJ 再構成を受け、抗原特異的な B 細胞抗原受容体 (B cell receptor, BCR)を作る。L 鎖には κ 鎖と λ 鎖があるが、それぞれ父由来アリル、母由来アリルに 2 本ずつ存在する。まず、1 本目の κ 鎖で V 遺伝子と J 遺伝子の再構成を始め、自己反応性の配列の場合には機能的な配列になるまで複数回繰り返される。1 本目の κ 鎖遺伝子再構成で機能的な配列ができなかった場合、失敗した κ 鎖は C 鎖を含む領域である J κ -C κ intron recombination signal sequence (マウス : IRS1、ヒト : intronRSS)と kappa-deleting element (マウス : RS、ヒト : Kde)との間が切り出されるために不活化され (allelic exclusion)、対立鎖の κ 鎖の VJ 再構成が始まる。対立鎖の κ 鎖も機能的な配列ができなかった場合、不活化され (isotypic exclusion) 、 λ 鎖の再構成が始まる。L 鎖の VJ 再構成が成功した B 細胞はその後末梢血と二次リンパ組織に存在し、抗体産生を行う (図 2)。末梢には骨髄から放出された直後の transitional B 細胞、抗原未刺激の naïve B 細胞、抗原による刺激を受け体細胞突然変異により高親和性 IgM を迅速に産生することが可能な IgM memory B 細胞、さらに IgG, IgA, IgE にクラススイッチした class switched B 細胞などが存在する。末梢血 B 細胞の絶対数は骨髄からの放出、末梢での生存、抗原暴露後の成熟 B 細胞への成熟、抗原非依存性の増殖、記憶 B 細胞の残存といった因子により決まる。近年、allelic exclusion あるいは isotypic exclusion の際に切り出される kappa-deleting recombination excision circles (KREC) をリアルタイム PCR 法により相対定量し B 細胞の複製歴を測定する方法が報告された⁸⁾ (図 3)。KREC には染色体上に残る coding joint (cj)KREC と染色体から切り出され、2 重鎖環状 DNA として細胞内にある signal joint (sj) KREC がある。cjKREC は染色体内に存在するため、1 度形成されると、細胞分裂が生じて、娘細胞すべてに配列が残る。また Ig κ 陽性 B 細胞の約 30%と Ig λ 陽性 B 細胞のほぼ全てに cjKREC は認められる。一方、sjKREC は形成された以降の細胞分裂では娘細胞のどちらか一方にしか保存されないため sjTREC と同様に細胞分裂時に複製されず希釈されていく。このため、sjKREC を定量することは B 細胞新生能のマーカーとして有用である。

既に我々は、(sj) TREC をリアルタイム PCR により絶対定量を行うことで、重症

複合免疫不全症 (severe combined immunodeficiency, SCID) の新生児期マススクリーニング法として応用する方法を開発して報告してきた⁹⁾。更に、(sj)KREC を絶対定量することによる、B 細胞欠損症のマススクリーニング法への応用の可能性について報告してきた¹⁰⁾。

原発性免疫不全症 (primary immunodeficiency, PID) に含まれる疾患を示す (図 4)。本研究ではまず始めに、既知遺伝子変異を同定済みの SCID 患者、*BTK* 遺伝子異常症である X 連鎖性無ガンマグロブリン血症 (X-linked agammaglobulinemia, XLA) 患者、DNA 修復異常症である毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia, AT) 等の患者における TREC および KREC の定量 (以下 TREC/KREC 定量) を検討した。

次に原因遺伝子が未同定である分類不能型免疫不全症 (Common variable immunodeficiency, CVID) における TREC /KREC 定量を検討した。臨床的に CVID と診断された患者の TREC /KREC 定量を元に、CVID 患者の亜群分類を試みた。更に、リンパ球表面抗原分析、臨床経過と亜群分類の相関を検討した。その後、各亜群分類に分ける原因遺伝子解析を試み、一部の患者で原因遺伝子の同定を行い、各群の病態・病因解析を検討した。

なお、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 438 「先天性免疫不全症の遺伝子解析研究」 および、受付番号 566 「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。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 重症複合免疫不全症患者の TREC /KREC 定量

第1節 背景

T細胞産生障害に起因する末梢血T細胞数やリンパ球数の減少による重症複合免疫不全症 (Severe combined immunodeficiency, SCID) は原発性免疫不全症の中でも緊急を要する疾患であり、1歳までに根治療法である造血幹細胞移植を行わない限り致死的である¹¹⁾。既に我々は、TRECの絶対定量をすることを、SCIDの新生児期マススクリーニングとして応用する方法を開発し報告してきた⁹⁾。SCIDの中にはB細胞欠損を示さない病型 (B⁺SCID)およびB細胞欠損を示す病型 (B⁻SCID)がある。それぞれの原因遺伝子はB⁺SCIDでは *IL2RG* (interleukin 2 receptor, gamma)¹²⁾、*JAK3* (Janus kinase 3)^{13) 14)}などがあり、B⁻SCIDでは *RAG1* (recombination activating gene 1)、*RAG2* (recombination activating gene 2)¹⁵⁾、*DCLRE1C* (DNA cross-link repair 1C)、*LIG4* (ligase IV, DNA, ATP-dependent)¹⁶⁾、*ADA* (adenosine deaminase)¹⁷⁾などがある。そこでTRECに加え新たにKRECを測定し原因遺伝子との関係を検討した。

第2節 対象および方法

(1) 対象と検体採取

B⁺SCID患者として *IL2RG* 異常18例(新生児濾紙血1例、末梢血17例)、*JAK3* 異常2例(新生児濾紙血1例、末梢血1例)を入手した。B⁻SCID患者として *RAG1* 異常2例(新生児濾紙血1例、末梢血1例)、*RAG2* 異常1例(末梢血1例)、*DCLRE1C* 異常1例(末梢血1例)、*LIG4* 異常2例(新生児濾紙血1例、末梢血1例)、*ADA* 異常2例(末梢血2例)を入手した。全例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。

(2) gDNAの抽出

末梢血検体では、末梢血1検体当たり200 μlをサンプル量とし、QIAamp DNA Microキット (Qiagen, Germany) を用いてgDNAを抽出し、Gene Quant pro (GE

Healthcare)を用いて濃度を測定した。DNA 濃度 5 ng/ μ l 未満の検体は再度 DNA 抽出し 5 ng/ μ l 以上の DNA を得た。

濾紙血検体では、濾紙血検体採取後 1 日以上室温に放置し、十分に乾燥させた。濾紙血から直径 3 mm 大の円形に打ち抜いた紙片 3 枚を 1 サンプルとし、QIAamp DNA Micro キット (Qiagen, Germany) を用いて DNA を抽出し、Gene Quant pro (GE Healthcare)を用いて濃度測定を行った。DNA 濃度 5 ng/ μ l 以下の場合再抽出とした。

(3) 定量リアルタイム PCR による TREC /KREC 定量

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 μ l で、サンプル DNA を 1 μ l とし、各組成の最終濃度は、TaqMan 2 $\times$ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA)、プライマーは各々 500 nM、プローブは 250 nM TaqMan プローブとした。用いたプライマー配列、プローブ配列は次の通りである。 δ Rec プライマー; 5'-TCGTGAGAACGGTGAATGAAG-3', ψ 3 プライマー; 5'-CCATGCTGACACCTCTGGTT-3'¹⁸⁾, KREC-F プライマー; 5'-TCAGCGCCCATTTACGTTTCT-3', KREC-R プライマー; 5'-GTGAGGGACACGCAGCC-3'⁸⁾, TREC- プローブ; FAM-5'-CACGGTGATGCATAGGCACCTGC3'-TAMRA¹⁸⁾ KREC プローブ, FAM-5'-CCAGCTCTTACCCTAGAGTTTCTGCACGG-3'-TAMRA⁸⁾。内因性コントロールである RNaseP については、反応総量は 20 μ l で、反応組成はサンプル DNA 1 μ l、TaqMan 2 $\times$ Universal PCR Master Mix、TaqMan 20 $\times$ RNaseP Primer-Probe (VICTMdye) Mix (Applied Biosystems) とした。PCR は、7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用い、384 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、40 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。PCR で得られた TREC, KREC および RNaseP の測定値は、1 μ gDNA あたりに換算して最終定量値とし、100 copies/ μ g DNA 以下となった場合は検出感度以下とした。

(4) 統計学的解析

本研究を通し全ての統計解析は SAS Institute (CarySan Diego, California, USA)を使用した。2 群間比較は t 検定、3 群以上の比較は一元配置の分散分析 (one-way ANOVA) の後、Tukey の多重比較検定を用いた。 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

第 3 節 結果

全例内因性コントロールの RNaseP は検出可能だった。

全例の SCID 患者で既報通り TREC は陰性を示した⁹⁾。

KREC は、B⁺SCID 患者では $2.1 \pm 0.5 \times 10^4$ copies/ μ gDNA で、検出感度以下のものはなかった。B⁺SCID 患者の中では *IL2RG* 変異患者の KREC は $2.0 \pm 0.5 \times 10^4$ copies/ μ gDNA、*JAK3* 変異患者の KREC は $3.6 \pm 1.5 \times 10^4$ copies/ μ gDNA であり変異に伴う KREC 値の有意差は認めなかった ($p=0.3612$)。B⁻SCID 患者では KREC は全例で陰性を示した (図 5A)¹⁹⁾。更に、代表的な B⁺SCID 患者 (*IL2RG*) 及び B⁻SCID 患者 (*RAG1*) の B 細胞リンパ球サブセット解析を確認したところ、それぞれの B 細胞の割合は、B⁺SCID 患者で 92.25% /Lymph、B⁻SCID 患者で 0.4% /Lymph であり、いずれも KREC の結果と一致した (図 5B,C)。

第 4 節 考察

B 細胞が残存する B⁺SCID 患者としては、*IL2RG*、*JAK3*、*IL7R* 異常などが知られている¹¹⁾。*IL2RG* 遺伝子変異の患者は、IL-2、IL-7、IL-15 に共通する common γ 鎖の異常があり、common γ 鎖を使用する IL-7 の機能低下による T 細胞欠損、IL-15 の機能低下による NK 欠損を呈するが B 細胞は存在する。また下流分子である *JAK3* 欠損症も *IL2RG* 遺伝子変異の患者と同様の症状を呈すると知られている¹¹⁾。今回の検討結果では KREC は陽性であり、年齢を揃えた健常者の KREC と比較しても有意差は認めず ($p=0.6381$)、B 細胞新生能は正常と示された。この結果は、*IL2RG* 異常の SCID の B 細胞が IL-4 の存在下で IgE を産生するという報告とも一致し²⁰⁾、B⁺SCID 患者の B 細胞機能が正常である可能性が示唆された。

末梢血 B 細胞が T 細胞とともに欠損する B-SCID 患者の変異遺伝子としては、*RAG1*, *RAG2*, *DCLRE1C*, *LIG4*, *ADA* が知られている¹¹⁾。*RAG1*, *RAG2* 変異は VDJ 再構成の開始異常、*DCLRE1C*, *PRKDC*, *LIG4* 変異は DNA 損傷の修復傷害、*ADA* 欠損は毒性代謝物産生をそれぞれ引き起こす¹¹⁾。今回検討した B-SCID 患者の KREC は全例で検出感度以下であり、B 細胞新生能低下が示された。

第 5 節 結論

TREC/KREC 定量により、SCID 患者の中で B⁺SCID 患者、B-SCID 患者を簡便に区別することが可能であった。TREC/KREC 定量を用いた B⁺SCID パターン、B-SCID パターンを確立した。

第3章 X連鎖性無ガンマグロブリン血症患者の TREC /KREC 定量

第1節 背景

既に我々は、B細胞欠損症における KREC の絶対定量による、B細胞欠損症のマススクリーニング法への応用の可能性について報告してきた¹⁰⁾。*BTK* (Bruton's tyrosine kinase) 遺伝子異常症である X連鎖性無ガンマグロブリン血症 (X-linked agammaglobulinemia, XLA) 患者における新生児濾紙血・末梢血由来濾紙血中の KREC に加えて今回新たに TREC 定量を検討した。

第2節 対象および方法

(1) 対象および検体採取

B細胞欠損患者として *BTK* 異常患者 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。

新生児濾紙血は自治体に問い合わせ、7 例で入手できた。新生児濾紙血の入手できなかった残りの 23 例 (12.2 ± 2.7 歳 (5-34 歳))からは末梢血を入手し、第2章と同様の方法で末梢血由来濾紙血を作成し使用した。全例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。

(2) DNA 抽出およびリアルタイム PCR による TREC /KREC 定量

新生児濾紙血および末梢血由来濾紙血から第2章と同様の方法で DNA を抽出、濃度測定を行った。サンプル DNA は $1 \mu\text{l}$ とし TREC, KREC および RNaseP の定量リアルタイム PCR を行った。PCR で得られた TREC, KREC および RNaseP の測定値は、 $1 \mu\text{g}$ DNA あたりに換算して最終定量値とし、100 copies/ μg DNA 以下となった場合は検出感度以下とした。

(3) 定量結果の統計学的解析

統計解析は SAS Institute (CarySan Diego, California ,USA)を使用した。2 群間比較は t 検定、3 群以上の比較は一元配置の分散分析 (one-way ANOVA) の後、Tukey の多重比較検定を用いた。 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

第 3 節 結果

全例内因性コントロールの RNaseP は検出できた。

KREC は既報通り全例で陰性であった¹⁰⁾。TREC は、全例で検出可能であったが ($4.0 \pm 2.0 \times 10^4$ copies/ μ g DNA)、末梢血由来濾紙血に比べ新生児濾紙血で有意に高値を認めた (新生児濾紙血, $11.2 \pm 8.2 \times 10^4$ copies/ μ g DNA; 末梢血由来濾紙血, $1.8 \pm 0.7 \times 10^4$ copies/ μ g DNA, $p=0.3009$) (図 6)。

一方末梢血由来濾紙血由来の一部の症例では、TREC が 94 copies/ μ g DNA と検出感度下限の症例を認めた (図 6)。この患者の末梢血 CD3 陽性細胞は 1599 細胞/ μ l であった。リンパ球サブセット解析では、CD4⁺CD45RO⁺陽性のメモリー T 細胞は 27.6% /CD4⁺CD3⁺Lymph、Thymic ナイーブ T 細胞である CD45RA⁺CD31⁺CD4⁺T 細胞は 55.2% /CD4⁺CD3⁺Lymph であり、CD3 陽性細胞数、リンパ球サブセットいずれの結果からも T 細胞機能不全は否定的であった。

第 4 節 考察

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。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, $p=0.3009$)。末梢血由来濾紙血に比べ新生児濾紙血で高値を認めた事は、既に検討してきた健常コントロールにおける、同一検体の全血と全血由来濾紙血の比較結果にて、全血由来濾紙血の TREC が全血由来の TREC の 2 倍程度高値となる傾向と一致した (unpublished data)。一方末梢血由来濾紙血由来の一部の症例で TREC が検出感度下限の症例を認

めた (TREC, 94 copies/μg DNA) (図 6)。この患者の末梢血 CD3 陽性細胞は存在し (1599 細胞/μl)、CD4⁺CD45RO⁺陽性のメモリーT細胞の増多はなく、Thymic ナイーブ T 細胞も存在した。従って、リンパ球サブセット所見からは T 細胞機能不全は否定的であった。末梢血由来濾紙血での TREC 値の感度の問題が関わると考えられた¹⁰⁾。

第 5 節 結論

BTK 異常患者である XLA 患者では、TREC は全例で検出可能であり T 細胞の機能が正常と考えられた。KREC 値は、新生児濾紙血、末梢血由来濾紙血いずれも既報告通り検出感度以下であった¹⁰⁾。TREC/KREC 定量を用いて XLA パターンを確立することが可能であった。

第4章 DNA修復異常症患者の TREC /KREC 定量

第1節 背景

DNA 修復異常に伴う免疫不全症として、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)などが知られている。AT は進行性の小脳失調、眼球の毛細血管拡張、免疫不全などを特徴とする常染色体劣性の遺伝病である。ATLD は AT に類似した臨床経過を呈するが免疫不全は発症しないことが知られている。NBS は小頭症、鳥様顔貌、軽度の精神発達遅滞に加えて免疫不全を呈する。AT では 2 本鎖 DNA 障害修復に重要な遺伝子である *ATM* (ataxia telangiectasia-mutated) の変異が、ATLD では *Mre11A* (MRE11 meiotic recombination 11 homolog A) の変異が、NBS では *NBN* (nibrin) の変異が原因遺伝子として知られている。AT では B 細胞分化の障害があるために免疫グロブリンの産生異常を認め、低ガンマグロブリン血症を呈する。これらの遺伝子変異が同定されている DNA 修復異常を伴う原発性免疫不全症における TREC /KREC 定量を行い、病型分類に寄与可能であることを検討した。

第2節 対象および方法

(1) 対象と検体採取

AT 患者として *ATM* 異常 30 例(新生児濾紙血 3 例、末梢血 27 例)を入手した。また、NBS 患者として *NBN* 異常 6 例(末梢血 5 例、末梢血由来濾紙血 1 例)、ATLD 患者として *Mre11A* 異常 2 例(末梢血 2 例)の検体を入手した。全例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。

(2) DNA 抽出およびリアルタイム PCR による TREC /KREC 定量

末梢血検体から第2章と同様の方法で DNA を抽出、濃度測定を行った。また、新生児濾紙血および末梢血由来濾紙血から第2章と同様の方法で DNA を抽出、濃度測

定を行った。サンプル DNA は 1 μ l とし TREC、KREC および RNaseP の定量リアルタイム PCR を行った。PCR で得られた TREC, KREC および RNaseP の測定値は、1 μ g DNA あたりに換算して最終定量値とし、100 copies/ μ g DNA 以下となった場合は検出感度以下とした。

(3) 定量結果の統計学的解析

統計解析は SAS Institute (Cary San Diego, California, USA) を使用した。2 群間比較は t 検定、3 群以上の比較は一元配置の分散分析 (one-way ANOVA) の後、Tukey の多重比較検定を用いた。 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。

第 3 節 結果

AT 患者では、TREC は新生児濾紙血 3 名および末梢血の 4 名の計 7 検体で陽性であり、検出感度以下であった 23 検体は全て末梢血検体であった。新生児濾紙血 3 検体の TREC はいずれも陽性であったが、そのうち 2 名では小児期に (各々 7 歳、11 歳時) 末梢血検体を採取し TREC /KREC 定量を検討したところ、末梢血では検出感度以下へ移行していた (図 7)¹⁹⁾。AT 患者の末梢血検体における TREC 陽性群、TREC 陰性群の 2 群間では、年齢、グロブリン補充前のグロブリン値に有意な差は認めなかった (TREC 陽性群 : TREC 陰性群; 年齢, 12.0 ± 1.6 : 16.0 ± 5.2 歳, $p = 0.3780$; IgG, 830 ± 99 : 795 ± 104 mg/dl, $p = 0.8841$; IgA, 127 ± 43 : 207 ± 88 mg/dl, $p = 0.4625$; IgM, 547 ± 227 : 176 ± 32 mg/dl, $p = 0.5091$, グロブリン補充前のグロブリン値)。IgG が 500 mg/dl 未満の低値を示す 4 症例は全て TREC 陰性群である一方、1860 mg/dl と高値を示す症例も TREC 陰性群で認めた (図 8A)。IgA は低値例を両群で認めた一方、749 mg/dl と高値を示す例は TREC 陰性群であった (図 8B)。IgM は TREC 陽性群では全て正常範囲内であった一方、TREC 陰性群では 7 症例で IgM の正常上限値である 280 mg/dl 以上であり、更にそのうち 3 症例では 500 mg/dl 以上と極端に高値を示した (図 8C)。

TREC 陽性群、陰性群の 2 群間で遺伝子変異の差は認めず、同じ遺伝子変異であっても TREC が陽性を示す例、陰性を示す例を認めた。

KREC は全例で検出感度以下を示し、これは既報と同様であった (図 7)²¹⁾。

T 細胞数を検討できたのは 13 症例であり全例で T 細胞は存在し、TREC 陽性群、TREC 陰性群に有意差は認めなかった (TREC 陽性群 : TREC 陰性群; 750 ± 104 : 1150 ± 273 細胞/ μ l, $p=0.5599$)。メモリーT細胞を検討できた 8 症例のうち 7 症例で、メモリーT細胞が 60%以上と増多を認めた。7 症例のうち 1 症例では TREC が陽性を示しているがメモリーT細胞は 88.6%と著増した症例であった。

B 細胞数を検討できたのは 13 症例であり全例で B 細胞は 20 細胞/ μ l 以上と存在し、TREC 陽性群、TREC 陰性群に有意差は認めなかった。(TREC 陽性群 : TREC 陰性群; 56 ± 4 : 158 ± 40 , $p=0.3208$)。

NBS 患者では検討した 6 名の患者全てが同じ遺伝子変異を有していたが (p.Lys219fs)、2 例で TREC 陽性、4 例で TREC 陰性を示し、既報の NBS 患者の全例で TREC が陽性との結果とは異なった (図 7)²¹⁾。これら TREC 陽性群、TREC 陰性群間での年齢に有意な差は認めなかった (TREC 陽性群 : TREC 陰性群; 年齢, 16.5 ± 5.5 : 15.3 ± 3.4 歳, $p=0.8494$)。グロブリン値を検討したところ IgG、IgA は全例で -2SD 以下であったが (IgG, 274 ± 93 ; IgA, 20 ± 12 mg/dl)、TREC 陽性群、TREC 陰性群間では有意な差は認めなかった (TREC 陽性群 : TREC 陰性群; IgG, 75 ± 5 : 373 ± 109 mg/dl, $p=0.0724$; IgA, 14 ± 5 : 23 ± 19 mg/dl, $p=0.7583$) (図 8D, E)。IgM 値は TREC 陽性群で低値の傾向を認めた (TREC 陽性群 : TREC 陰性群; IgM, 6 ± 2 : 318 ± 217 mg/dl) (図 8F)。T 細胞数に有意差は認めず、全例で T 細胞数が存在した (TREC 陽性群 : TREC 陰性群; T 細胞数, 534 ± 192 : 546 ± 51 細胞/ μ l, $p=0.9372$)。B 細胞数は TREC 陽性群で TREC 陰性群より有意に高値を示したが、全例で B 細胞数は 20 以上であった (TREC 陽性群 : TREC 陰性; B 細胞数, 445 ± 7 : 27 ± 12 細胞/ μ l, $p<0.0001$)。NBS 患者では KREC は、AT 患者と同様全例で B 細胞数に関係無く検出感度以下であった。

興味深いことに、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 7)¹⁹⁾。この点は、ATLD 患者では免疫不全を呈さない事と一致した。グロブリン値も 2 例ともに正常範囲内であった (IgG, 948 ± 225 ; IgA, 287 ± 17 ; IgM, 58 ± 11 mg/dl)。

第4節 考察

ATは臨床症状としてIgG低値、IgA低値、IgM高値が報告されている²²⁾。今回の検討でも、IgG低値、IgA低値、IgM高値例が認められた。一方TRECが陽性となったAT患者のほとんどにおいて、IgG、IgA、IgMはいずれも正常範囲内を示した。AT患者において、TREC定量で正常を示しかつグロブリン値がほぼ正常値を示す群が抽出され、AT患者での亜群の存在の可能性が示唆された。

AT患者ではCD4⁺CD45RA⁺ナイーブT細胞およびCD31⁺CD4⁺ThymicナイーブB細胞がコントロール群に比較して有意に減少していたとの報告があり²³⁾、確かに本研究でもCD4⁺CD45RA⁺ナイーブT細胞が減少している点が一致した。

AT患者では全例で20細胞/μl以上のB細胞が存在するにも関わらずKRECは検出感度以下という結果であった。ATの原因遺伝子はATMで細胞周期のチェックポイント・DNA修復・アポトーシスに関与する蛋白をコードする。ATMに変異があると、B細胞・T細胞におけるV(D)J再構成時のDNA DSBが不安定になり、正常なV(D)J再構成・DNA修復の確率が低くなる。そのため、末梢に出てくる新生B細胞の数は減少する。しかし、1度できたB細胞はDNAが損傷されなければ生存可能なため、B細胞数はある程度維持される。それがB細胞新生能を反映するKRECが検出感度以下という結果に繋がったと考えられた。この結果は、AT患者ではCD19⁺CD27⁺IgD⁺ナイーブB細胞の割合が正常コントロールよりも低下するという報告とも一致した²³⁾。

AT患者のうち新生時濾紙血が検討出来た3例のKRECが陰性であったことより、AT患者の新生児マススクリーニングに新生児濾紙血を用いたKRECの測定が有用である可能性が示唆された。一方これら3人の新生児濾紙血ではTRECは陽性であったが、これは最近アメリカ合衆国のカリフォルニア州におけるSCIDの新生児スクリーニングの結果TRECが陰性を示した患者から2例のAT患者を同定出来たという報告とは異なる結果であった²⁴⁾。今後更なる症例数の検討が必要と考えられた。

NBS患者でも、AT患者と同様にB細胞数は存在するがKRECが検出感度以下という結果であった。NBNはATMと同様非相同組み替え末端結合修復(nonhomologous end-joining, NHEJ)経路で断端保護という重要な役割を果していることを考慮すると、ATMと同様にNHEJ経路が機能しないことによりB細胞新生

能の低下が起これと考えられた。また NBS 患者の骨髄では preB-II 細胞への分化障害と成熟 B 細胞の分裂回数増加すなわち KREC が低下すると報告もあり²⁵⁾、今回の KREC 低値という結果と一致した。

一方、*ATM*、*NBN*と同様に DNA 切断時断端保護の役割を持つ *Mre11A* の異常である ATLD 患者では、KREC は正常値を示した。この結果より、*Mre11A* が *ATM*、*NBN*と異なる役割をもつことが推察される。*Mre11A* 欠損単独では、*ATM* 障害に比べ V(D)J 再構成の障害度が軽度という報告もあり²⁶⁾、他の DSB 修復因子により代償され B 細胞新生・生存への関与が低い可能性がある。

以上より、DNA 修復異常に伴う免疫不全症における TREC/KREC 定量は、個々の T 細胞、B 細胞機能の評価・病態の把握だけでなく、原因疾患の絞り込み・原因究明にも有用と考えられた。

第 5 節 結論

DNA 修復異常に伴う免疫不全症においても、TREC/KREC 定量は有用であった。AT 患者および NBS 患者では、TREC は陽性、検出感度以下いずれも認めたが KREC は全例で検出感度以下であった。AT 患者の新生児濾紙血では、全例で TREC 陽性を示した。ATLD 患者では TREC/KREC はいずれも陽性を示した。AT/NBS パターンを確立することが可能であった。

第 5 章 TREC/KREC 定量を用いた分類不能型免疫不全症の新規病型分類¹⁹⁾

第 1 節 背景

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^{27, 28, 29)}。CVID の原因遺伝子としては *ICOS* (inducible costimulator)^{30-32, 33)}、*TACI* (transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor)^{34, 35, 36, 37)}、*CD19*³⁸⁾、*BAFF-R* (B-cell activating factor binding to its receptor)³⁹⁾、*CD81*⁴⁰⁾、*CD20*⁴¹⁾、*CD21*⁴²⁾、*LRBA* (lipopolysaccharide responsive beige-like anchor protein)⁴³⁾などが報告されているが、いずれの変異も稀であり報告によれば原因遺伝子の同定は CVID 患者の 3%に満たないと言われている²⁹⁾。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。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 CVID と誤って診断されることがある⁴⁴⁾。実際に CVID 患者 473 人のうち 29%で CD4⁺T 細胞数が減少していたという報告がある⁴⁵⁾。更に他の報告では、CVID 患者のうち 44% (11/25)で naïve T 細胞が減少していたという報告がある⁴⁶⁾。これらの報告から臨床的に CVID と診断された患者の一部に T 細胞機能不全を呈する亜群が存在する事が示唆される。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、悪性腫瘍が、一部の CVID 患者で発症する事とも一致する^{44, 47)}。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⁴⁸⁾その鑑別は困難である。臨床的に CVID と診断された患者から CID を区別する有用な新しいマーカーが必要である。

既に、第 2 章、第 3 章、第 4 章で原因遺伝子が同定された様々な原発性免疫不全症における TREC/KREC 定量を検討し、各病態を反映した TREC/KREC 定量パター

ンを確立してきた。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、新規亜病型分類を行った。フローサイトメトリー解析、臨床経過につき検討し、新規病型分類と臨床像との相関を検討した。その後、各新規病型分類に分ける原因遺伝子解析を試み、各群の病態・病因解析を検討した。

第 2 節 対象および方法

(1) 対象と検体採取および検体調整

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、18名の SCID 患者、14名の 2歳未満症例、10名の IgM 高値症例 (IgM>100 mg/dl)、26名の遺伝子変異同定患者 (*BTK* 異常症, n=10; 高 IgM 症候群, n=11; DiGeorge syndrome, n=2; *FOXP3* 異常症, n=1; *IKBKG* 異常症, n=1; 6p 欠失症候群, n=1) および 5名の薬剤性低ガンマグロブリン血症患者を除き、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。末梢血検体を採取し検討した。

40例全例で、TREC/KREC 定量、およびフローサイトメトリー解析を行った。日和見感染症、自己免疫疾患、悪性腫瘍の発症を臨床症状のイベントとして TREC/KREC 解析結果との相関を後方視的に検討した (表 1)。

両者の結果をもとに、病歴、臨床情報を加味して、解析候補遺伝子について検討しシーケンス解析を行った。

全例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。

(2) DNA 抽出およびリアルタイム PCR による TREC /KREC 定量

末梢血検体から第 2 章と同様の方法で DNA を抽出、濃度測定を行った。サンプル DNA は 1 μ l とし TREC, KREC および RNaseP の定量リアルタイム PCR を行った。PCR で得られた TREC, KREC および RNaseP の測定値は、1 μ g DNA あたりに換算して最終定量値とし、100 copies/ μ g DNA 以下となった場合は検出感度以下とした。

(3) フローサイトメトリー解析

IVIG 投与前に得た末梢血検体を用いて、フローサイトメトリーにより B 細胞、T 細胞の解析を行った (FACS Calibur, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ USA)。

Lysing Buffer (BD Biosciences) をプロトコール通り用いて末梢血検体を処理した。得られたリンパ球を 4°C で 20 分間、推奨される濃度で以下の抗体で染色した。すなわち tritest CD4-FITC /CD8-PE /CD3-PreCP (SK3, SK1, SK7; BD Biosciences), CD3-FITC (SK7; BD Biosciences), IgD-FITC (IA6-2; BD Biosciences), CD16-PE (B73.1; BD Biosciences), CD27-PE (1A4CD27; Beckman Coulter, California, USA), CD56-PECy5 (N901; Beckman Coulter), IgM-PECy5 (G20-127; BD Biosciences), CD45RO-APC (UCHL1; BD Biosciences), CD19-APC (J3-119; Beckman Coulter) を使用した。

細胞数の絶対量の計測、解析は Cell Quest (BD Biosciences)を使用した。

(4) 定量結果および臨床症状と TREC/KREC 解析結果との相関の統計学的解析

統計解析は SAS Institute (CarySan Diego, California ,USA)を使用した。2 群間比較は t 検定、3 群以上の比較は一元配置の分散分析 (one-way ANOVA) の後、Tukey の多重比較検定を用いた。群間の年齢、性別の検定にはピアソンのカイ 2 乗検定を用いた。各群間のイベント数の検定にはポワソン回帰分析を用いた。累積罹患率の検定にはログランク検定を用いた。 $p<0.05$ を統計学的有意差ありとした。

(5) 新規病型分類における原因遺伝子の同定

検討した 40 症例の CVID 患者を、新規病型分類群ごとに遺伝子変異の同定を試みた。一部の症例で、SNP アレイ解析、候補遺伝子領域の deep sequencing を行った。SNP アレイ解析、候補遺伝子解析を実施しても原因遺伝子変異の同定に至らなかった症例では、エクソーム解析を行った。エクソーム解析により同定された遺伝子変異は、サンガー法シーケンスを用いて同部位の変異の確認を行った。サンガー法シーケンスに用いたのは、3130xl ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems, California, USA) を、候補遺伝子領域の deep sequencing に用いたのは 454 シーケンシングシステム (Roche Diagnostics, Bazel, Switzerland)を、SNP アレイ解析

には CytoScan HD Array (Affimetrix, Santa Clara, CA, USA)を、エクソーム解析には HiSeq1000 (Illumina)および、HiSeq2000 (Illumina)を使用した。いずれも説明書の手順に準じて操作を行った。

第3節 結果

(1) TREC/KREC 定量を用いた新規病型分類および各群の患者特性

年齢は 18 ± 2 歳 (2~52 歳)であり、性別は男性 21 名、女性 19 名であった。血清グロブリン IgG は 370 ± 33 mg/dl (0~716 mg/dl, いずれも年齢正常値の-2SD 以下)、IgA は 30 ± 7 mg/dl (1~196 mg/dl)、IgM は 40 ± 6 mg/dl (2~213 mg/dl) であった (表 1)。

今回の対象患者を TREC/KREC の陽性または検出感度以下で分けると、TREC、KREC とともに正常の 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 DNA)(図 9) ¹⁹⁾。

各群の免疫グロブリン値に有意差は認めなかった (IgG; A 群, 340 ± 36 ; B 群, 296 ± 86 ; C 群, 424 ± 82 ; D 群, 473 ± 123 mg/dl、IgA 値; A 群, 18 ± 5 ; B 群, 27 ± 10 ; C 群, 36 ± 18 ; D 群, 61 ± 35 mg/dl; IgM 値; A 群, 41 ± 5 ; B 群, 27 ± 11 ; C 群, 33 ± 12 ; D 群, 33 ± 9 mg/dl, $p > 0.05$)。

(2) 各群におけるフローサイトメトリー解析

次に各 4 群におけるフローサイトメトリー結果の検討を行った。

T 細胞 (CD3 陽性細胞) 数は A 群に比較して、C 群では明らかな低下を認めたが他群間では有意差を認めなかった ($p < 0.05$; A 群, 1806 ± 204 ; B 群, 1665 ± 430 ; C 群, 517 ± 124 ; D 群, $1425 \pm 724 / \mu$ l; $p = 0.0019$)。抗原と反応する前のナイーブ T 細胞は、抗原と反応して増殖し機能的に成熟して CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺メモリーT 細胞となる。抗原と反応し増殖した T 細胞のうち 90%以上は、メモリーT 細胞に分化する前にアポトーシスにより死滅する。アポトーシスを逃れたメモリーT 細胞がリンパ組織中に

多数残存すると、他の抗原に反応すべき T 細胞の妨げとなる。この CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺メモリーT 細胞の割合を検討すると、A 群に比して TREC が陰性の C 群、D 群に加えて、KREC のみ陰性の B 群でも、有意に増加を認めた ($p<0.0001$; A 群, $37\pm4\%$; B 群, $67\pm5\%$ [$p=0.0006$]; C 群, $92\pm3\%$ [$p<0.0001$]; D 群, $83\pm6\%$ [$p<0.0001$]; 図 10)¹⁹⁾。更に、CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺メモリーT 細胞の割合は B 群に比較して C 群、D 群で有意な増加を認めた ($p=0.0115$)。これらの結果より、C 群、D 群では A 群に比較して CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ナイーブ T 細胞の割合が著明に減少しているとわかり、B 群では A 群に比較して減少はしているものの C 群、D 群ほどの減少はないということがわかった。この結果は、CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺メモリーT 細胞では TREC が低値を示すという報告と一致する結果であった。B 群、C 群、D 群の患者では、TREC、KREC のいずれかもしくは両者が低値を示す群であるが、これらの群の一部の患者では CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺メモリーT 細胞が正常の割合を示す例もあった。この結果の解離から、TREC/KREC はメモリーT 細胞とナイーブ T 細胞に加えて、患者の免疫学的状態の独立したマーカーであると言える。この解離の理由は不明であり、今後の検討課題である。

B 細胞 (CD19 陽性細胞) 数は B 群、D 群に比較して A 群で有意に高値を認めたが、いずれの群でも B 細胞は存在した ($p<0.05$; A 群, 269 ± 65 ; B 群, 35 ± 16 ; C 群, 60 ± 11 ; D 群, 29 ± 16 細胞/ μ l; $p=0.0001$)。CD27⁺B 細胞、IgD⁺CD27⁺B 細胞、IgD⁻CD27⁺B 細胞といったサブセットは各群で有意な差を認めなかった。更に、KREC の定量値を CD19⁺B 細胞の割合、CD27⁺B 細胞の割合で除し補正した KREC 値を元に各群の群分けを検討した。図 9 の群分けと変化は認めなかった。つまり、今回の分類が CD19⁺B 細胞の割合、CD27⁺B 細胞の割合とは独立していることが分かった。

TREC、KREC は年齢を経るにつれ減少すること、そして今回の対象患者の年齢が 2~52 歳と広範囲に及ぶことから、各群の年齢が分類に影響を与えるかどうかを検討した。TREC/KREC による分類は、年齢と性別とは独立した分類であった。各群の年齢分布は有意な差を認めなかった ($p>0.05$; A 群, 12.7 ± 2.3 [2-30]; B 群, 23.4 ± 4.2 [6-39]; C 群, 21.5 ± 6.1 [4-52]; D 群, 25.5 ± 4.4 [15-46] 歳)。また、男性/女性比にも有意な差を認めなかった (男性/女性; 全体, 21/19; A 群, 10/9; B 群, 2/5; C 群, 5/3; D 群, 4/2; $p=0.4916$)(表 1)。

(3) 病型分類および各群の臨床症状

次に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、悪性腫瘍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。更にD群、C群の10人年あたりのイベント数はA群に比較して有意に高かった (D群 vs A群, $p=0.0022$; C群 vs A群, $p=0.0092$; B群 vs A群, $p=0.0692$)。更に19歳以上の患者に限定して同様の検討を行ったが、同様にD群 (1.01 イベント数/10人年)で最も高く、その後C群 (0.56 イベント数/10人年)、B群 (0.32 イベント数/10人年)、A群 (0.06 イベント数/10人年)と低下した (D群 vs A群, $p=0.0074$; C群 vs A群, $p=0.0407$; B群 vs A群, $p=0.1492$) (図11)¹⁹⁾。

既にCOVID患者の様々な分類が、末梢血のB細胞のサブセットにより分ける方法として報告されているため^{49) 50) 51)}、今回の患者で過去の分類分けを元に分類を行い、10人年あたりのイベント数を分類毎の群間で検討した。いずれの分類においても、特定の群におけるイベント数の増加は認めなかった (図12)¹⁹⁾。

日和見感染症、自己免疫疾患、悪性腫瘍それぞれのイベント毎に、各群間の累積罹患 (cumulative incidence, C.I.)を比較検討した。日和見感染の累積罹患はA群に比較し、C群、D群で有意に増加を認めた (日和見感染, $p=0.0059$, 図13A)¹⁹⁾。自己免疫疾患、悪性腫瘍の累積罹患に関しては、B群、C群、D群では認めたがA群では認めなかった (自己免疫疾患, $p=0.5168$; 悪性腫瘍, $p=0.6900$; 図13B, 図13C)¹⁹⁾。全てのイベントの10歳時累積罹患および30歳時累積罹患をログランク検定にて検討したところ、群間で有意な差を認めた ($p=0.0313$, A群, 5.3% (10歳時) および 5.3% (30歳時); B群, 14.3% および 57.1%; C群, 27.1% および 63.5%; D群, 33.3% および 83.3%, 図13D)¹⁹⁾。死亡例はD群でのみ1例認め (*Pneumocystis jirovecii* pneumonia 感染)、幹細胞移植を避けられなかった症例もD群でのみ2例認め、いずれもEBウイルス関連リンパ増殖性疾患が原因であった。

(4) 新規病型分類群における原因遺伝子同定の試み

新規病型分類群毎に遺伝子変異の同定を試みたところ、A群では4名の患者で、B群では1名の患者で遺伝子変異を同定する事が可能であった。

A群で家族内発症のあるCVID患者に関しては(表1、P36, P37)、CVIDの既知遺伝子を候補遺伝子として検索を行い、*TACI* (transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor)の複合ヘテロ接合体変異を同定した。変異の一つはp.Gly76Cysであり、もう一つは、p.191IlefsX29であり、前者を父が、後者を母がそれぞれヘテロ接合体で持つ変異と確認できた。

A群で、近親婚家系(5親等)かつ同胞内発症を認めた症例(表1、P28)に関しては、当初CVIDの既知遺伝子(*TACI*, *BAFF-R*, *CD19*, *ICOS*, *SH2D1A*)等を候補遺伝子として検索を行ったがいずれも変異を認めなかった。双胎間ホモ接合領域に責任遺伝子領域を絞り込むストラテジーを考え、SNP (Single Nucleotide Polymorphism)アレイ解析を行ったところホモ接合領域を5,447,647塩基を同定することが可能であった。同定されたホモ接合領域をかずさDNA研究所にてdeep sequencingを行ったところ、患者で変異を認めた遺伝子は57遺伝子であった。そのうち、データベースSNPに登録のあるもの、単一遺伝子上に3個以上の変異を認める物を除いた21遺伝子について、両親、非罹患同胞および患者本人の変異の確認を行ったところ、患者のみホモ変異を認めた遺伝子が8個と同定でき、その中にICF (Immunodeficiency, Centromeric Instability, and Facial Anomalies) 症候群Type1⁵²⁾の原因遺伝子と知られている*DNMT3B* (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta)^{53) 54)} の新規変異 (H730P)を認めた。顔貌異常が軽度であったが、ICF症候群を疑い染色体脆弱試験を確認したところ、患者の50細胞中32細胞にて染色体脆弱性の証明ができICF症候群 Type1と診断した。

同じA群で、顔貌異常(眼間解離、鼻根平坦)、精神発達遅滞、カフェオレ斑を認める症例(表1、P32)に関して、候補遺伝子解析として*CARD11* (caspase recruitment domain family, member 11)、*PMS2* (postmeiotic segregation increased 2)の遺伝子を確認したがいずれも変異を認めなかった。エクソーム解析を行い両親、非罹患同胞の変異を比較検討した。更にSNPアレイ解析を併用して変異遺伝子の同定を試みたところ、本人がホモ変異を示す遺伝子として、ICF症候群のType2の原因遺伝子である*ZBTB24* (zinc finger and BTB domain containing 24) の既知変異c.1369C>T,

p.Arg457Xを認めた⁵⁵⁾。ICF症候群を疑い染色体脆弱試験を確認したところ、患者の30細胞中10細胞にて染色体脆弱性の証明ができICF症候群 Type2と診断した。

A群で認めた*TACI*、*DNMT3B*、*ZBTB24*遺伝子はいずれの変異もB細胞終末分化異常に関わる変異であり、TREC/KREC定量による新規病型分類結果と相関していると考えられた。更に、ICF症候群ではCD27⁺メモリーB細胞の低下が報告されているが⁵⁶⁾、今回検討したICF症候群患者のいずれのTypeでもメモリーB細胞の低下を確認できた (CD27⁺メモリーB細胞; DNMT3B, 0.27% / CD19⁺Lymph; ZBTB24, 2.7% / CD19⁺Lymph)。

B群で、経時的なTREC/KREC定量の推移により、進行性にTRECが減少し1年後にD群へ移行した1症例を見いだした。低ガンマグロブリン血症に加えて、てんかん、特発性血小板減少性紫斑病、早発閉経、低身長、カフェオレ斑、染色体異常を認め、DNA修復障害に関連する候補遺伝子である*LIG4* (ligase IV, DNA, ATP-dependent)、*PMS2* (postmeiotic segregation increased 2)、*BLM* (Bloom syndrome, RecQ helicase-like)を候補遺伝子解析として行ったがいずれも変異を認めなかった。エクソーム解析により371遺伝子の変異を同定した。データベースSNPに登録のあるもの、単一遺伝子上に3個以上の変異を認める遺伝子を除外し、免疫、血液分化に関連する遺伝子変異20遺伝子を見だし、その中からFanconi貧血の原因遺伝子である*FANCE* (Fanconi anemia, complementation group E) 遺伝子の複合ヘテロ接合体変異 (c.T419C, p.L140Pおよびc.648delC, p.V216fs)を同定できた。染色体断裂試験にて陽性となり、Fanconi貧血の診断に至った。

第4節 考察

TREC/KREC 定量を用いた病型分類は臨床経過に一致するとわかった。

D群では6名の患者を認めた。合併症は最も頻度が多く認め、1名は死亡、2名は造血幹細胞移植を避けられなかった。合併症の臨床症状から基づいて複合免疫不全症 (combined immunodeficiency, CID) と診断されるべき症例であり、CVID から CID として鑑別するのに TREC/KREC 定量が有用であった。TREC/KREC いずれも検出感度以下であったことは、T細胞分化およびB細胞分化いずれにおいてもV(D)J再構成が不良であることが関与していると考えられた。第2章で報告したB細胞の存

在しない重症複合免疫不全症 (B- Severe combined immunodeficiency, B⁻SCID) の原因遺伝子である *RAG1*, *RAG2*, *DCLRE1C*, *LIG4* 変異患者や、第 4 章で報告した毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia, AT) 患者や Nijmegen 染色体不安定症候群 (Nijmegen breakage syndrome, NBS) 患者も D 群患者と同様に TREC/KREC いずれも検出感度以下を示した。このことから、興味深い事に D 群の原因として未知の V(D)J 再構成に関わる遺伝子の関与が示唆された。D 群患者の治療としては、CID に似た経過を示す CVID のイベントフリー生存率が不良であるといく報告もあることから⁴⁸⁾、グロブリン定期補充のみでは不十分であり、造血幹細胞移植が推奨されるべきであった(表 2)。

A 群は、D 群とは対照的に TREC/KREC 定量がいずれも検出可能であった 19 名の患者を認めた。この群ではグロブリン定期補充のみで経過は良好であった。これらの患者では B 細胞の終末分化異常のみが侵されており T 細胞の機能不全がないことが経過良好であった理由として考えられ、A 群の患者こそが本来の CVID であると考えられた。実際に、この群から 2 名の *TACI* 変異、1 名ずつ *DNMT3B*、*ZBTB24* 遺伝子を同定することが可能であった。いずれの変異も B 細胞終末分化異常に関わる変異である点が TREC/KREC を用いた病型分類と関連した(表 2)。

C 群では 8 名の患者を認めた。日和見感染および悪性腫瘍のいずれも発症頻度が高く、TREC が検出感度以下を示すこの群では T 細胞の機能不全が存在すると考えられた。C 群の患者は、第 2 章で報告した B⁺SCID 患者と TREC/KREC 定量は同じパターンを示したが、欧州免疫不全症学会の SCID の診断基準は満たさない患者であった。更に、臨床症状およびリンパ球サブセット解析結果から、*IL2RG*, *JAK3*, *IL7R* 等の B⁺SCID 遺伝子のうち推測される物を各々確認したが、いずれも変異は認めなかった。しかし、今回の臨床症状の解析結果より、C 群にも CID 様の患者が含まれると考えられ、合併症を予防するためには SCID、CID に準じた治療選択をすることが望ましいと考えられた(表 2)。

B 群では 7 名の患者を認めた。日和見感染の発症は稀であったが、自己免疫疾患の発症をしばしば認めた。この群では、TREC が陽性である一方 KREC が検出感度以下であり、T 細胞と B 細胞のバランスが CVID 患者における自己免疫疾患の発症予防には重要という既報告と一致する結果であった⁴⁴⁾。興味深い事に、第 4 章で報告した AT 患者および、NBS 患者も B 群と同様に TREC 陽性、KREC 陰性を示す。更に、

CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ナイーブ T 細胞が B 群では減少している点も、AT 患者および NBS 患者と共通する点であった。このことから、B 群の一部では B 細胞の機能不全のみならず T 細胞の機能不全を呈する患者が存在し CID に準じた治療、管理が推奨されるべきである。実際に、経時的な TREC/KREC 定量の推移により、B 群から D 群へ移行した 1 症例で *FANCE* 遺伝子変異を見いだし Fanconi 貧血と診断した点も、TREC/KREC を用いた病型分類と相関する結果であった。一方残りの症例では B 細胞の機能不全のみを呈する患者と考えられ、グロブリン定期補充のみでも効果的に治療、管理が可能である症例と考えられた(表 2)。

近年 334 人の CVID 患者を対象とした大規模なコホート研究が報告され、合併症を一つ以上呈している CVID 患者では、合併症を認めない患者に比較しての全生存率が不良であることが報告された⁴⁷⁾。今回の解析結果からも、TREC、KREC の一方もしくはいずれもが検出感度以下となることが、CVID 患者の全生存率低下と相関する良好なマーカーであると示唆された。TREC、KREC を用いると臨床の重症度および各患者の病因を簡便に評価することが可能であり、CVID 患者から CID を区別するのに有効なマーカーであると考えられた。以上より、TREC/KREC 定量を用いた病型分類は CVID 患者の有効な治療方法を選択、決定するのに有用であった。

CVID 患者を対象とした genome-wide association による病因遺伝子の検討が報告されているが⁵⁷⁾、関連する遺伝子多型が多数報告される一方、CVID の新規病因遺伝子の同定には至っていない。今回の結果より、TREC/KREC 定量を用いた病型分類を利用することで、病因遺伝子の同定が容易になる可能性が示された。

第 5 節 結論

CVID 患者は TREC/KREC 定量により 4 群に分けられた。TREC/KREC 定量を用いた亜群分類は、CVID から CID を区別する有用なクリニカルマーカーと考えられた。TREC/KREC 定量を用いた新規病型分類は、各群の病因・病態解析にも有用と考えられた¹⁹⁾。

第6章 結論

TREC/KREC 定量を用いた病型分類は様々な原発性免疫不全において、その病態解析、病因解析に有用であった。特に分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency, CVID) において、TREC/KREC 定量により患者は4群に分けられた。TREC/KREC 定量を用いた病型分類は、CVID から複合免疫不全症 (Combined Immunodeficiency, CID) を区別する有用な臨床マーカーと考えられた。更に TREC/KREC 定量を用いた病型分類により、原因遺伝子の同定が可能となった。TREC/KREC 定量を用いた病型分類は病因・病態解析にも有用と考えられた¹⁹⁾。

謝辞

本稿を終えるにあたり、全般にわたりご指導を賜りました防衛医科大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、研究をご指導賜りました先生方、貴重な症例を御紹介くださった先生方、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

防衛医科大学校		埼玉医大 血液内科	中村裕一先生
小児科学講座	中川紀子先生	埼玉県立小児医療センター	
	賀佐希美子様	感染免疫アレルギー科	大石勉先生
	富田香織様	血液腫瘍科	内坂直樹先生
産科婦人科学講座	スタッフの皆様	深谷赤十字病院 内科	金佳虎先生
公衆衛生学講座	佐藤弘樹先生	神奈川県立こども医療センター 感染免疫科	
理化学研究所 横浜研究所			鹿間芳明先生
免疫・アレルギー科学総合研究センター		神奈川県立循環器病センター 呼吸器内科	
免疫ゲノミクス研究グループ	小原収先生		遠藤高広先生
北海道大学 小児科	山田雅文先生	青梅市立総合病院 呼吸器内科	富島裕先生
札幌医科大学 小児科	要藤裕孝先生	青梅市立総合病院 小児科	自見英子先生
旭川医科大学 小児科	吉田真先生		小野真由美先生
岩手医科大学 小児科	遠藤幹也先生	清瀬小児病院 呼吸器科	石立誠人先生
石巻赤十字病院 呼吸器内科	矢満田慎介先生	千葉大学大学院 小児病態学	富板美奈子先生
福島県立医大 小児科	陶山和秀先生	国保旭中央病院 小児科	荒畑幸絵先生
東北大学病院 小児科	笹原洋二先生	昭和大学藤が丘病院 小児科	山本将平先生
富山大学 小児科	宮脇利男先生	聖マリアンナ医科大学 小児科	近藤健介先生
	金兼弘和先生	静岡県立こども病院 感染免疫アレルギー科	
山梨県立中央病院 小児科	赤羽弘資先生		勝又元先生
山梨大学 遺伝医学講座	久保田健夫先生	愛知医科大学校医学部小児科	鬼頭敏幸先生
長野こども病院 血液腫瘍科	小林法元先生	滋賀医大 小児科	多賀崇先生
足利赤十字病院	島村泰史先生	京都大学 小児科	西小森隆太先生
東京医科大茨木医療センター	永瀬晃正先生	吉祥院こども診療所	今井博之先生
筑波大学遺伝医学講座	野口恵美子先生	公立那賀病院 小児科	山家宏宣先生
東京大学 小児科	高見沢勝先生	大阪大学	橋井佳子先生
東京医科歯科大学 小児科	今井耕輔先生	関西医科大学附属枚方病院小児科	野田幸弘先生
	森尾友宏先生	関西医大 小児科	蓮井正史先生
	満生紀子先生	兵庫県立塚口病院 小児科	芥川宏先生
東京女子医大 呼吸器内科	辻隆夫先生	兵庫医科大学 小児科	金田由美先生
東邦大学大森病院 小児科	小原明先生		大塚欣敏先生
NTT 東日本関東病院 血液内科	伊藤歩先生	兵庫県立こども病院 血液腫瘍科	小坂嘉之先生
済生会川口総合病院	相原真樹子先生	神鋼加古川病院 小児科	佐々木香織先生
日赤医療センター	竹田知洋先生	広島大学医学部 小児科	小林正夫先生
埼玉医大 小児科	三浦信之先生		中村和洋先生

	岡田賢先生
呉医療センター	宮河真一郎先生
浜田医療センター	堀大介先生
松山赤十字病院	
リウマチ膠原病センター	押領司健介先生
高知大学 小児科	前田明彦先生
産業医科大学 小児科	宮地良介先生
九州大学 小児科	高田英俊先生
熊本大学 小児科	浦辺智成先生
長崎大学原研 内科	今西大介先生
鹿児島県立大島病院	上野健太郎先生
宮崎大学 小児科	水上智之先生
	布井博幸先生
琉球大学	岡村隆行先生
豊見城中央病院 呼吸器科	松本強先生

Amrita Institute of Medical Sciences

Department of Pediatric Genetics

Dr. Sheela Nampoothiri

Department of Immunology, Erasmus MC,
University Medical Center, Rotterdam, The
Netherlands

Dr. Menno C. van Zelm

Hopital Necker Enfants-Malades

Dr. Anne Durandy

Karolinska University

Department of Laboratory Medicine

Dr. Qiang Pan-Hammarstrom

Kinderspital Zurich Dr. Janine Reichenbach
Postgraduate institute of medical education
and research, Department of Pediatrics

Dr. Surjit Singh

Dr. Deepti Suri

Dr. Amit Rawat

Mother and child health institute

Dr. Srdjan Pasic

Tehran University of Medical Sciences

Dr. Asghar Aghamohammadi

T cell receptor excision circles (TREC)

T 細胞受容体遺伝子再構成の過程でゲノム DNA から切り出される環状 DNA。一度生成されると、増殖せず、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。SCID では責任遺伝子ならびに表現型は異なるものの新生 T 細胞数の低下という共通した特徴を有するため、TREC の欠損あるいは減少を呈する。SCID の新生児マススクリーニングへの TREC 検査導入が期待されている。

kappa-deleting recombination excision circles (KREC)

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できると、次に κ 鎖の再編成が始まる。その際 κ 鎖の VJ 再構成が無効の場合、その κ 鎖を発現させないために κ 鎖定常領域の C_{κ} 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、染色体内に残存した部分が coding joint (cj)KREC である。sjKREC は形成された以降の細胞分裂では娘細胞のどちらか 1 方にしか保存されないため sjTREC と同様に細胞分裂時に複製されず希釈されていく。このため、sjKREC を定量することは B 細胞新生能のマーカーとして有用である。

対立遺伝子排除 (allelic exclusion)

一つの B 細胞では一種類の免疫グロブリンのみを産生させるため、対立遺伝子を不活化する仕組み。

Isotypic exclusion

一つの B 細胞では一種類の免疫グロブリンのみを産生させるため、 λ 鎖遺伝子が発現する際に κ 鎖遺伝子を不活化する仕組み。

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 サイクルごとに 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。

重症複合型免疫不全症 (severe combined immunodeficiency, SCID)

T 細胞の分化障害に伴う液性および細胞性の両免疫能の低下を特徴とし、著しい易感染性により乳児期早期に重症日和見感染症を発症する致死性の先天性免疫不全症。発症頻度は 5 万から 10 万人に 1 人。責任遺伝子として B 細胞の存在する *IL2RG*, *JAK3*, *IL7RA*, *CD45*, B 細胞も欠損している *RAG1*, *RAG2*, *Artemis*, *ADA*, *LIG4* などがある。

X 連鎖無 γ グロブリン血症 (X linked agammaglobulinemia, XLA)

先天性 B 細胞欠損症のうち最も多い疾患。責任遺伝子は *BTK*。B 細胞欠損症男性患者の 85~90% を占める。プレ B 細胞の分化が障害されるため、末梢血中 B 細胞は 2% 以下に減少している。

Ataxia telangiectasia (AT)

責任遺伝子は *ATM*。進行性免疫不全(T 細胞成熟異常)、進行性眼球運動失行、小脳性運動失調、言語障害、眼皮皮膚末梢血管拡張、放射線感受性、染色体不安定性、高発癌性(10-15% が白血病や悪性リンパ腫合併)、内分泌異常を呈する。100 万出生に 3 人の発症率。

ATM 蛋白は V(D)J 再構成中に 2 重鎖切断された DNA を安定化させ、正常な細胞周期チェックポイントの調節・DNA 修復に関わる。

ナイミーヘン症候群 (Nijmegen breakage syndrome, NBS)

責任遺伝子は *NBN(NBS1)*。低身長、小頭症、免疫不全(特に 2 歳未満では T・B ともに減少)、高発癌性、放射線感受性、染色体不安定性を示す。

NBN 蛋白は *ATM* 蛋白の活性化に必要で、2 重鎖切断された DNA の修復に関与。

Ataxia telangiectasia like disorder (ATLD)

責任遺伝子は *Mre11A*。AT と同様進行性に小脳性運動失調を呈するが、AT よりも遅発型でゆっくり進行する。

Mre11 蛋白は *NBN* 蛋白, *Rad50* 蛋白とともに *MRN* 複合体を形成し、2 重鎖切断された DNA の修復に関与。

分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency, CVID)

抗体産生不全と細菌感染症を主徴とする免疫不全症。B 細胞数は正常から低値で、免疫グロブリンの著明な減少を認める。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 の原因遺伝子の同定は患者の 3% に満たないと言われ、原因遺伝子として *ICOS* (inducible costimulator)、*TACI* (transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor)、*CD19*、*BAFF-R* (B-cell activating factor binding to its receptor)、*CD81*、*CD20*、*CD21*、*LRBA* (lipopolysaccharide responsive beige-like anchor protein) などが報告されている。

参考文献

- 1) Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*. 1998;396:690-5.
- 2) Fujimoto S, Yamagishi H. Isolation of an excision product of T-cell receptor alpha-chain gene rearrangements. *Nature*. 1987;327:242-3.
- 3) Okazaki K, Davis DD, Sakano H. T cell receptor beta gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell*. 1987;49:477-85.
- 4) Hazenberg MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, van Dongen JJ. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med (Berl)*. 2001;79:631-40.
- 5) Livak F, Schatz DG. T-cell receptor alpha locus V(D)J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol Cell Biol*. 1996;16:609-18.
- 6) de Villartay JP, Hockett RD, Coran D, Korsmeyer SJ, Cohen DI. Deletion of the human T-cell receptor delta-gene by a site-specific recombination. *Nature*. 1988;335:170-4.
- 7) Verschuren MC, Wolvers-Tettero IL, Breit TM, Noordzij J, van Wering ER, van Dongen JJ. Preferential rearrangements of the T cell receptor-delta-deleting elements in human T cells. *J Immunol*. 1997;158:1208-16.
- 8) van Zelm MC, Szczepanski T, Van Der Burg M, Van Dongen JJM. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204:645-55.
- 9) Morinishi Y, Imai K, Nakagawa N, Sato H, Horiuchi K, Ohtsuka Y, et al. Identification of severe combined immunodeficiency by T-cell receptor excision circles quantification using neonatal Guthrie cards. *The Journal of pediatrics*. [Controlled Clinical Trial]. 2009;155:829-33.

- 10) Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, et al. Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;128:223-5.e2.
- 11) Fischer A, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, Andre-Schmutz I, de Saint Basile G, de Villartay J-P, et al. Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. *Immunological reviews*. [Review]. 2005;203:98-109.
- 12) Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, Filipovich AH, Adelstein S, Modi WS, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell*. 1993;73:147-57.
- 13) Macchi P, Villa A, Giliani S, Sacco MG, Frattini A, Porta F, et al. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature*. 1995;377:65-8.
- 14) Russell SM, Tayebi N, Nakajima H, Riedy MC, Roberts JL, Aman MJ, et al. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science*. 1995;270:797-800.
- 15) Schwarz K, Gauss GH, Ludwig L, Pannicke U, Li Z, Lindner D, et al. RAG mutations in human B cell-negative SCID. *Science*. 1996;274:97-9.
- 16) O'Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, Dai Y, Stumm M, Kysela B, et al. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell*. 2001;8:1175-85.
- 17) Hershfield MS. Genotype is an important determinant of phenotype in adenosine deaminase deficiency. *Curr Opin Immunol*. 2003;15:571-7.
- 18) Hazenberg MD, Otto SA, Cohen Stuart JW, Verschuren MC, Borleffs JC, Boucher CA, 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.
- 19) Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, et al. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin kappa-deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;131:1437-40 e5.

- 20) Matthews DJ, Clark PA, Herbert J, Morgan G, Armitage RJ, Kinnon C, et al. Function of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma-chain in biologic responses of X-linked severe combined immunodeficient B cells to IL-2, IL-4, IL-13, and IL-15. *Blood*. 1995;85:38-42.
- 21) Borte S, von Döbeln U, Fasth A, Wang N, Janzi M, Winiarski J, et al. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood*. 2011;119:2552-5.
- 22) Noordzij JG, Wulffraat NM, Haraldsson A, Meyts I, van't Veer LJ, Hogervorst FB, et al. Ataxia-telangiectasia patients presenting with hyper-IgM syndrome. *Arch Dis Child*. 2009;94:448-9.
- 23) Exley AR, Buckenham S, Hodges E, Hallam R, Byrd P, Last J, et al. Premature ageing of the immune system underlies immunodeficiency in ataxia telangiectasia. *Clinical Immunology*. 2011;140:26-36.
- 24) Mallott J, Kwan A, Church J, Gonzalez-Espinosa D, Lorey F, Tang LF, et al. Newborn screening for SCID identifies patients with ataxia telangiectasia. *J Clin Immunol*. 2013;33:540-9.
- 25) van der Burg M, Pac M, Berkowska MA, Goryluk-Kozakiewicz B, Wakulinska A, Dembowska-Baginska B, et al. Loss of juxtaposition of RAG-induced immunoglobulin DNA ends is implicated in the precursor B-cell differentiation defect in NBS patients. *Blood*. 2010;115:4770-7.
- 26) Dinkelman M, Spehalski E, Stoneham T, Buis J, Wu Y, Sekiguchi JM, et al. Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16:808-13.
- 27) Park MA, Li JT, Hagan JB, Maddox DE, Abraham RS. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *Lancet*. [Review]. 2008;372:489-502.
- 28) Bonilla FA, Geha RS. Common variable immunodeficiency. *Pediatr Res*. 2009;65:13R-9R.
- 29) Salzer U, Warnatz K, Peter HH. Common variable immunodeficiency - an update. *Arthritis Res Ther*. 2012;14:223.

- 30) Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Drager R, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol.* 2003;4:261-8.
- 31) Takahashi N, Matsumoto K, Saito H, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, et al. Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients. *J Immunol.* 2009;182:5515-27.
- 32) Warnatz K, Bossaller L, Salzer U, Skrabl-Baumgartner A, Schwinger W, van der Burg M, et al. Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood.* 2006;107:3045-52.
- 33) Yong PF, Salzer U, Grimbacher B. The role of costimulation in antibody deficiencies: ICOS and common variable immunodeficiency. *Immunol Rev.* 2009;229:101-13.
- 34) Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, et al. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet.* 2005;37:829-34.
- 35) Castigli E, Wilson S, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, et al. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet.* 2007;39:430-1.
- 36) Castigli E, Geha RS. TACI, isotype switching, CVID and IgAD. *Immunol Res.* 2007;38:102-11.
- 37) Lee JJ, Jabara HH, Garibyan L, Rauter I, Sannikova T, Dillon SR, et al. The C104R mutant impairs the function of transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) through haploinsufficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126:1234-41 e2.
- 38) van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castano D, van Noesel CJ, van Tol MJ, et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med.* 2006;354:1901-12.
- 39) Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, Fischer B, Gutenberger S, Bohm J, et al. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:13945-50.

- 40) van Zelm MC, Smet J, Adams B, Mascart F, Schandene L, Janssen F, et al. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J Clin Invest.* 2010;120:1265-74.
- 41) Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IA, Dolman KM, et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest.* 2010;120:214-22.
- 42) Thiel J, Kimmig L, Salzer U, Grudzien M, Lebrecht D, Hagena T, et al. Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:801-10 e6.
- 43) Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarstrom Q, Herholz P, Trujillo-Vargas CM, Phadwal K, et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am J Hum Genet.* 2012;90:986-1001.
- 44) Yong PF, Thaventhiran JE, Grimbacher B. "A rose is a rose is a rose," but CVID is Not CVID common variable immune deficiency (CVID), what do we know in 2011? *Adv Immunol.* 2011;111:47-107.
- 45) Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH, Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood.* 2012;119:1650-7.
- 46) Moratto D, Gulino AV, Fontana S, Mori L, Pirovano S, Soresina A, et al. Combined decrease of defined B and T cell subsets in a group of common variable immunodeficiency patients. *Clin Immunol.* 2006;121:203-14.
- 47) Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood.* [Multicenter Study]. 2008;112:277-86.
- 48) Rizzi M, Neumann C, Fielding AK, Marks R, Goldacker S, Thaventhiran J, et al. Outcome of allogeneic stem cell transplantation in adults with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128:1371-4 e2.
- 49) Warnatz K, Denz A, Drager R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood.* 2002;99:1544-51.

- 50) Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol*. 2003;23:385-400.
- 51) Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2007;111:77-85.
- 52) Tiepolo L, Maraschio P, Gimelli G, Cuoco C, Gargani GF, Romano C. Multibranched chromosomes 1, 9, and 16 in a patient with combined IgA and IgE deficiency. *Hum Genet*. 1979;51:127-37.
- 53) Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*. 1999;402:187-91.
- 54) Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, et al. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:14412-7.
- 55) de Greef JC, Wang J, Balog J, den Dunnen JT, Frants RR, Straasheijm KR, et al. Mutations in ZBTB24 are associated with immunodeficiency, centromeric instability, and facial anomalies syndrome type 2. *Am J Hum Genet*. 2011;88:796-804.
- 56) Blanco-Betancourt CE, Moncla A, Milili M, Jiang YL, Viegas-Pequignot EM, Roquelaure B, et al. Defective B-cell-negative selection and terminal differentiation in the ICF syndrome. *Blood*. 2004;103:2683-90.
- 57) Orange JS, Glessner JT, Resnick E, Sullivan KE, Lucas M, Ferry B, et al. Genome-wide association identifies diverse causes of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:1360-7 e6.

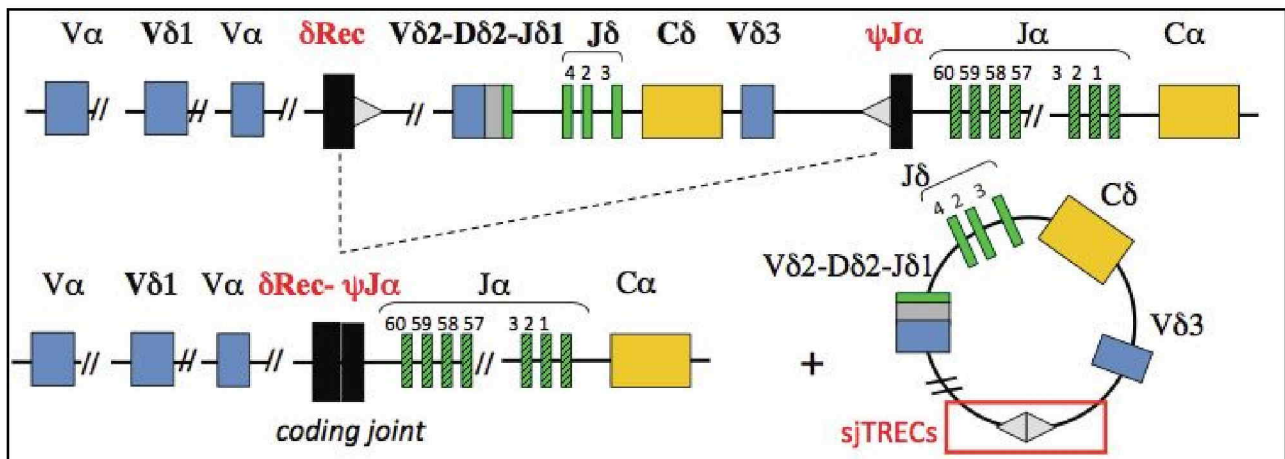


図1. TCRα鎖における遺伝子再構成とT-cell receptor excision circles (TREC) の産生

TCRα鎖 (TCRA) 遺伝子の中に位置するδ鎖をコードするTCRD遺伝子は、TCRA遺伝子再構成の過程でδRec-ψJa再構成により優先的に除去され、δRec-ψJa signal joint TREC (sjTREC) と呼ばれる非機能的な環状DNAとなる。さらに、Vα - Jaが再構成されるとδRec-ψJa coding joint TREC (cjTREC) が産生される。各々のTRECsは、結合部位に特異配列を有するためPCRにより定量可能であり、本研究ではsjTRECを測定、検討した。

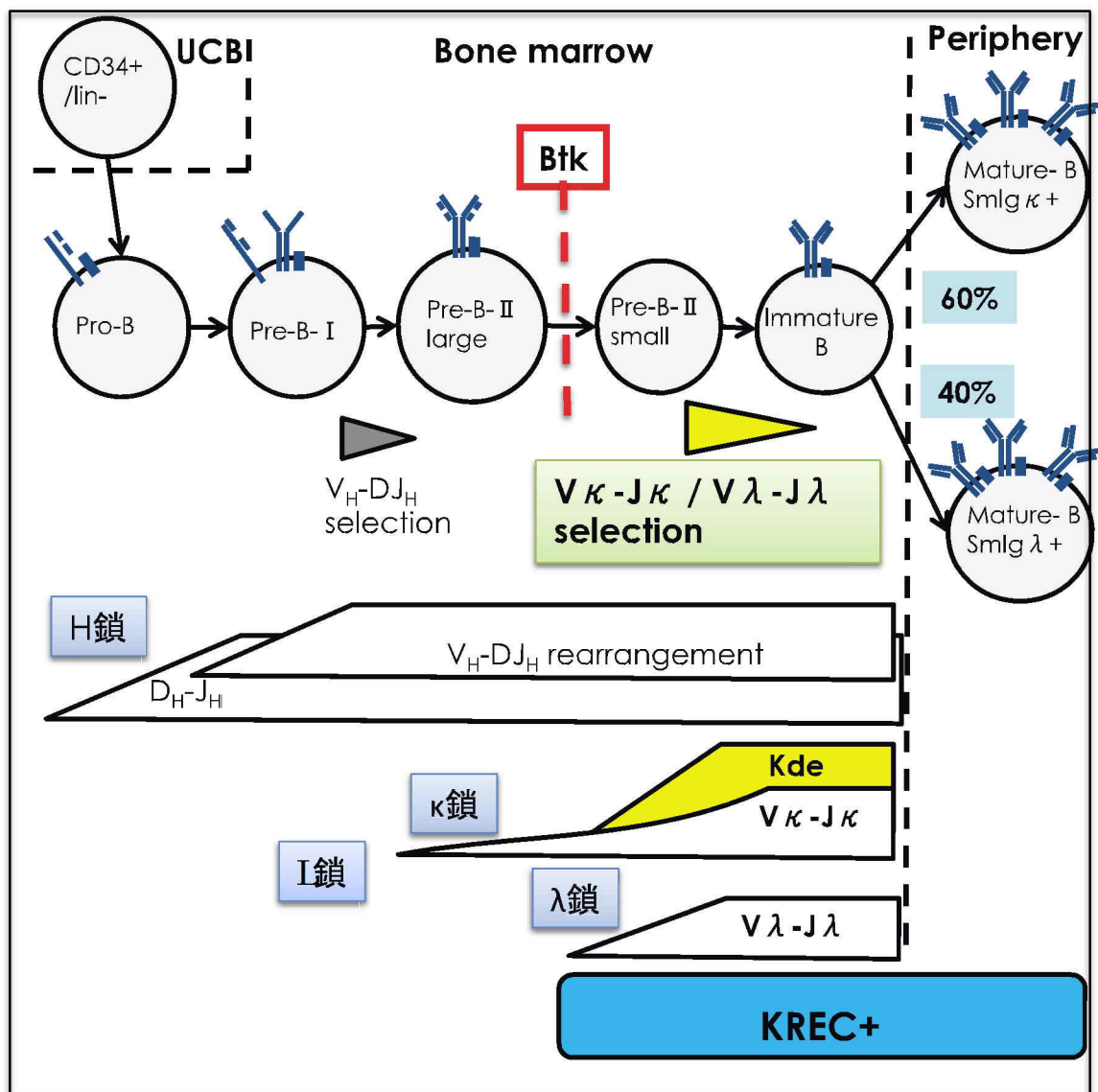


図2 健康者におけるB細胞の分化

(van Zelm, et al. J. Immunol. 175: 5912-5922, 2005より改変)

B細胞は骨髄または胎児肝臓で多能性幹細胞から、リンパ系前駆細胞、B前駆細胞を経てB細胞に分化し、末梢に出てくる。

XLAをはじめとするB細胞欠損症では、この骨髄内分化に必須の遺伝子に異常があるため末梢血中B細胞が減少し、ガンマグロブリン低値を示す。

骨髄内ではまず、H鎖遺伝子の再構成が起こり、その後Pre B細胞の段階でL鎖遺伝子の再構成が起こる。このL鎖再構成はκ鎖、λ鎖の順に起こる。KRECはλ鎖再構成時あるいはκ鎖のallelic exclusionの際形成される。

B細胞欠損症やB-SCIDではこのL鎖再構成の前で発生が止まるため、KRECが生成されない。

BTK, Bruton's tyrosine kinase

H鎖, heavy chain, 重鎖

L鎖, light chain, 軽鎖

Kde, kappa-deleting element

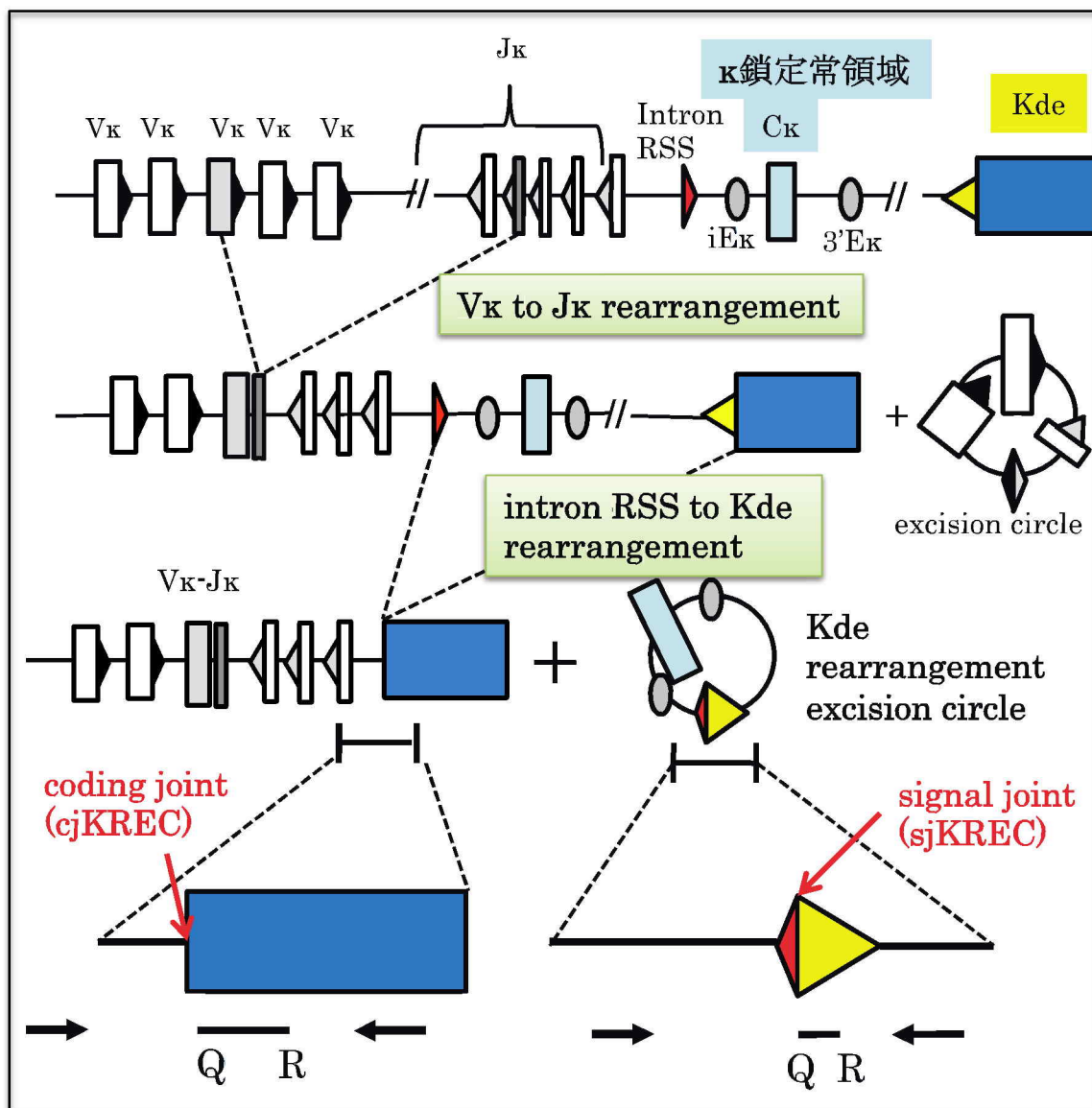


図3 B細胞成熟過程におけるκ鎖のkappa-deleting recombination excision circles (sjKREC) の産生

(van Zelm, et al. J Exp Med 204: 645-655, 2007より改変)

B細胞成熟過程においてH鎖が有効な遺伝子再構成ができると、次にκ鎖の再構成が始まる。κ鎖のVJ再構成が無効の場合、そのκ鎖を発現させないためにκ鎖定常領域 (C_κ) を含む領域が染色体から切り出される。この切り出されたものがsignal joint (sj)KREC、染色体内に残存した配列がcoding joint (cj)KRECである。

sjKRECは染色体外にあるため複製されず、細胞分裂を繰り返すと段階希釈されていく。また、再構成された染色体DNAにはcj KRECが形成され、これは分裂時複製されるため希釈されない。従ってcjKRECはB細胞の絶対数を反映し、一方sjKRECは新生B細胞の数を反映する。本研究ではsjKRECを測定、検討した。

Kde, kappa-deleting element

RSS, recombination signal sequence

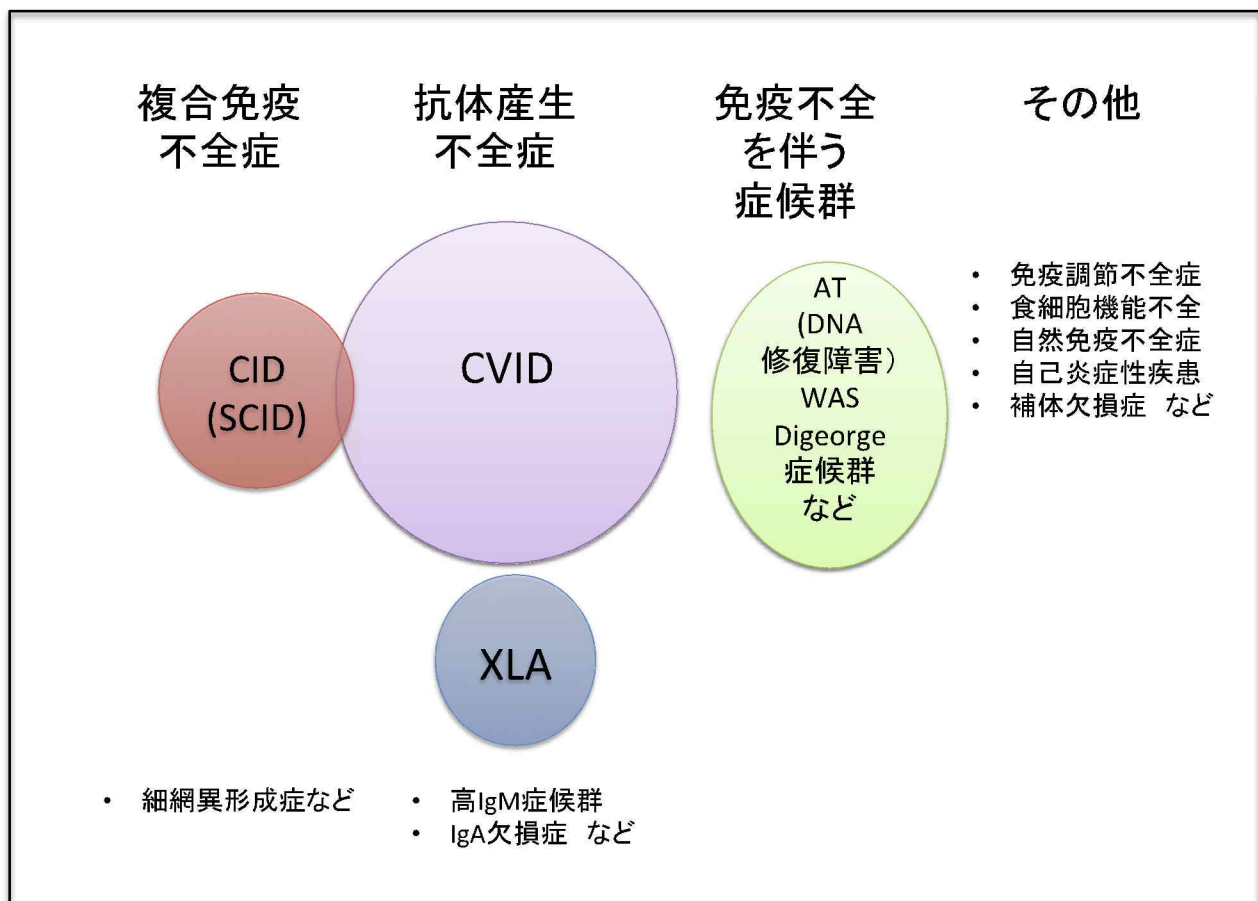


図4 原発性免疫不全症候群に含まれる疾患

原発性免疫不全症候群には、複合免疫不全症、抗体産生不全症、免疫不全伴う症候群などが含まれる。

複合免疫不全症の代表的な疾患として重症複合免疫不全症 (Severe combined immunodeficiency, SCID) および複合免疫不全症 (Combined Immunodeficiency, CID)、抗体産生不全症の代表的な疾患としてX連鎖性無ガンマグロブリン血症 (X-linked agammaglobulinemia, XLA)、分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency, CVID) がある。免疫不全を伴う症候群として毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia, AT)、Wiskott-Aldrich症候群 (Wiskott-Aldrich syndrome, WAS)、DiGeorge症候群などがある。

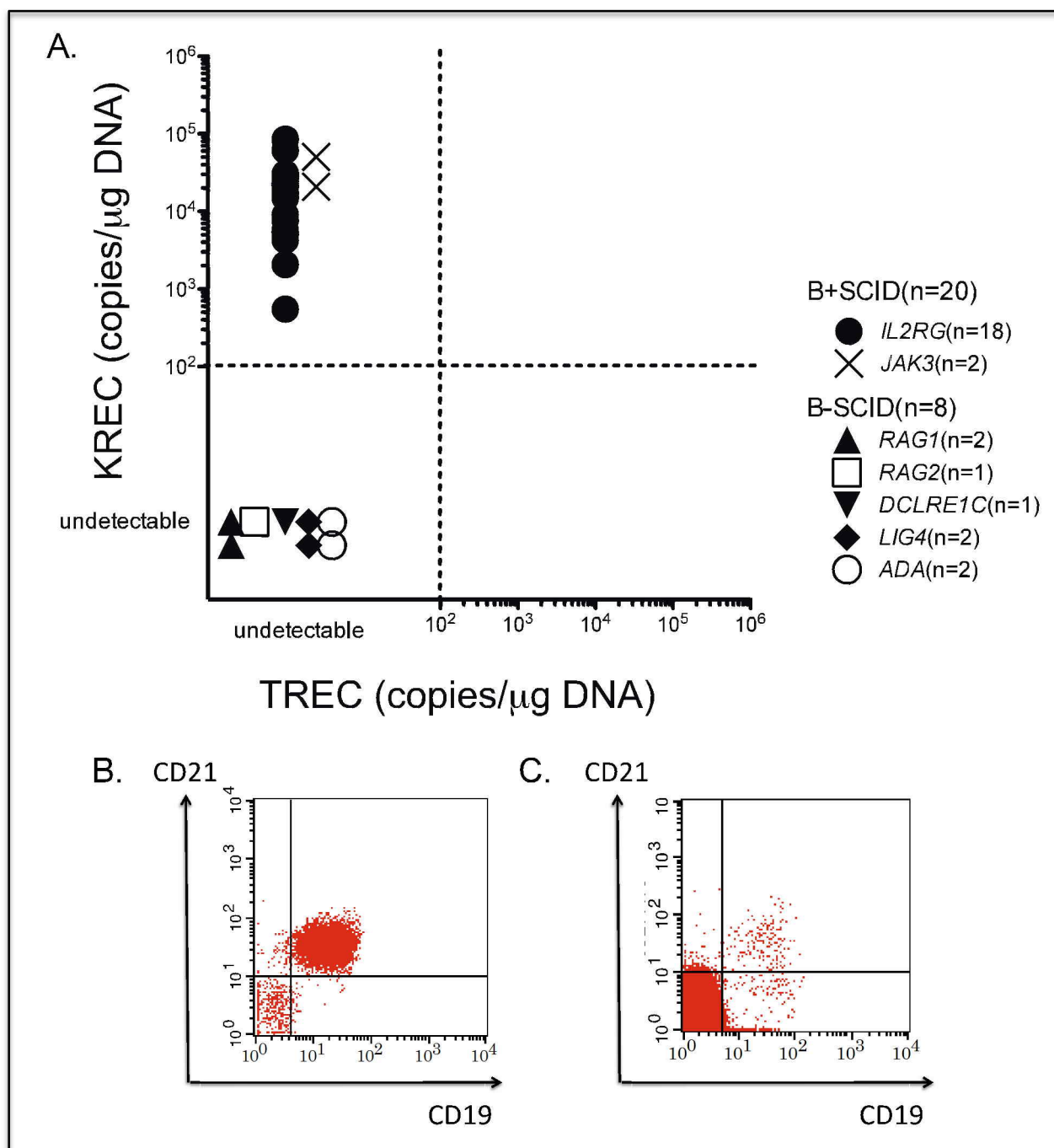


図5 重症複合免疫不全症 (Severe combined immunodeficiency, SCID) のTREC/KREC定量

A. 全例のSCIDで既報通りTRECは陰性を示した。

B+SCID (n=20) のKRECは $2.1 \pm 0.5 \times 10^4$ copies/μg DNAであり検出感度以下のものはなかった。B+SCID 内では*IL2RG*変異のKREC は $2.0 \pm 0.5 \times 10^4$ copies/μg DNA、*JAK3*変異のKREC は $3.6 \pm 1.5 \times 10^4$ copies/μg DNAであり変異に伴うKREC値の有意差は認めなかった ($p=0.3612$)。

B-SCID (n=8) のKRECは全例で陰性を示した。

B. 代表的なB+SCID患者 (*IL2RG*)のB細胞の割合は92.25% /Lymphであり、KRECの結果と一致した。

C. 代表的なB-SCID患者 (*RAG1*)のB細胞の割合は0.4% /Lymphであり、KRECの結果と一致した。

IL2RG, interleukin 2 receptor, gamma、*JAK3*, Janus kinase 3、*RAG1*, recombination activating gene 1
RAG2, recombination activating gene 2、*DCLRE1C*, DNA cross-link repair 1C、*LIG4*, ligase IV, DNA, ATP dependent、*ADA*, adenosine deaminase

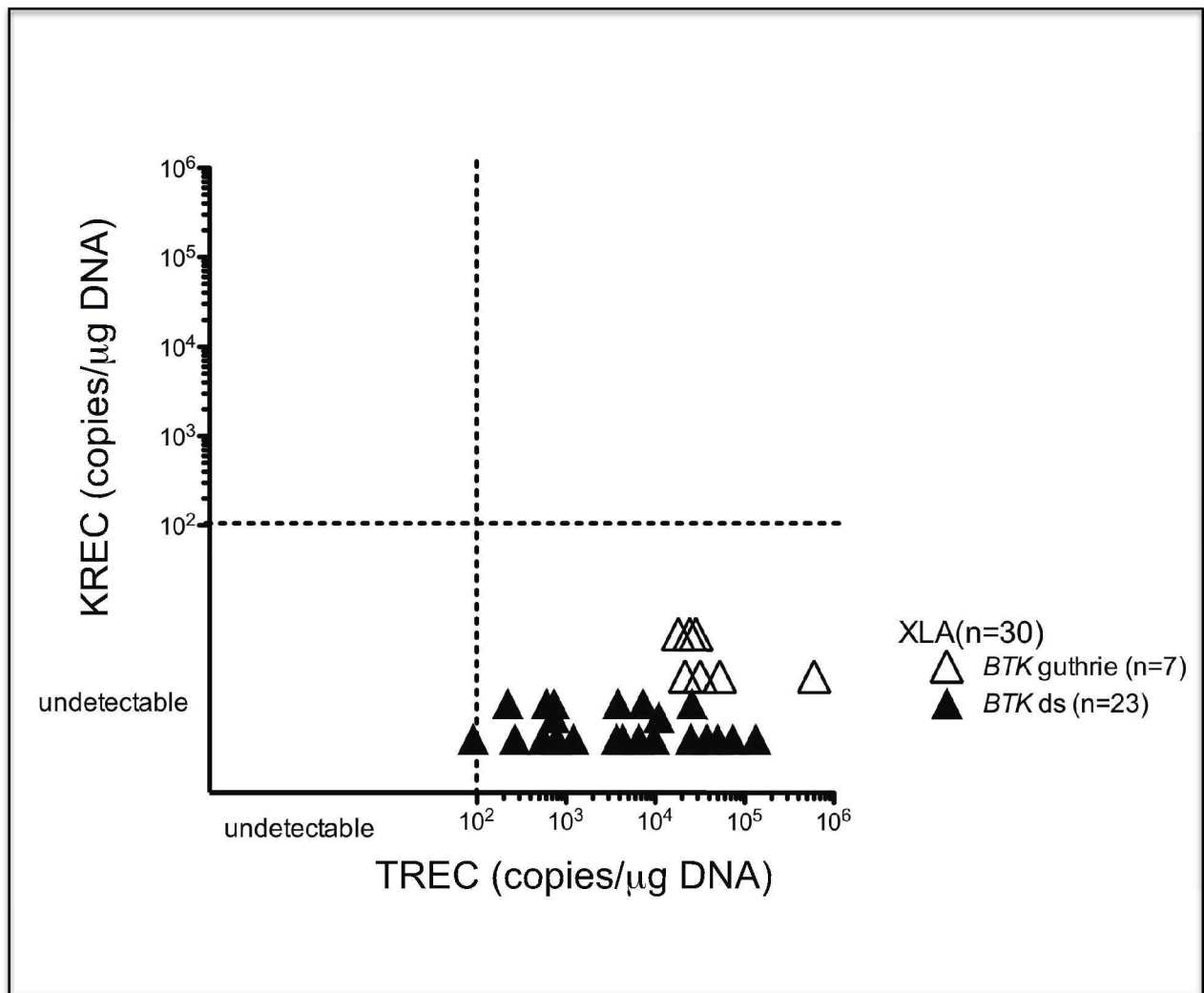


図6 X連鎖性無ガンマグロブリン血症 (X-linked agammaglobulinemia, XLA)のTREC/KREC定量

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。
TRECは全例で検出可能であった (新生児濾紙血, $11.2 \pm 8.2 \times 10^4$ copies/μg DNA;
末梢血由来濾紙血, $1.8 \pm 0.7 \times 10^4$ copies/μg DNA, $p=0.3009$)。一方末梢血由来濾紙
血由来の一部の症例では、TRECが94 copies/μg DNAと検出感度下限の症例を認めた。

BTK, Bruton's tyrosine kinase

BTK guthrie, 新生児濾紙血

BTK ds, 末梢血由来濾紙血

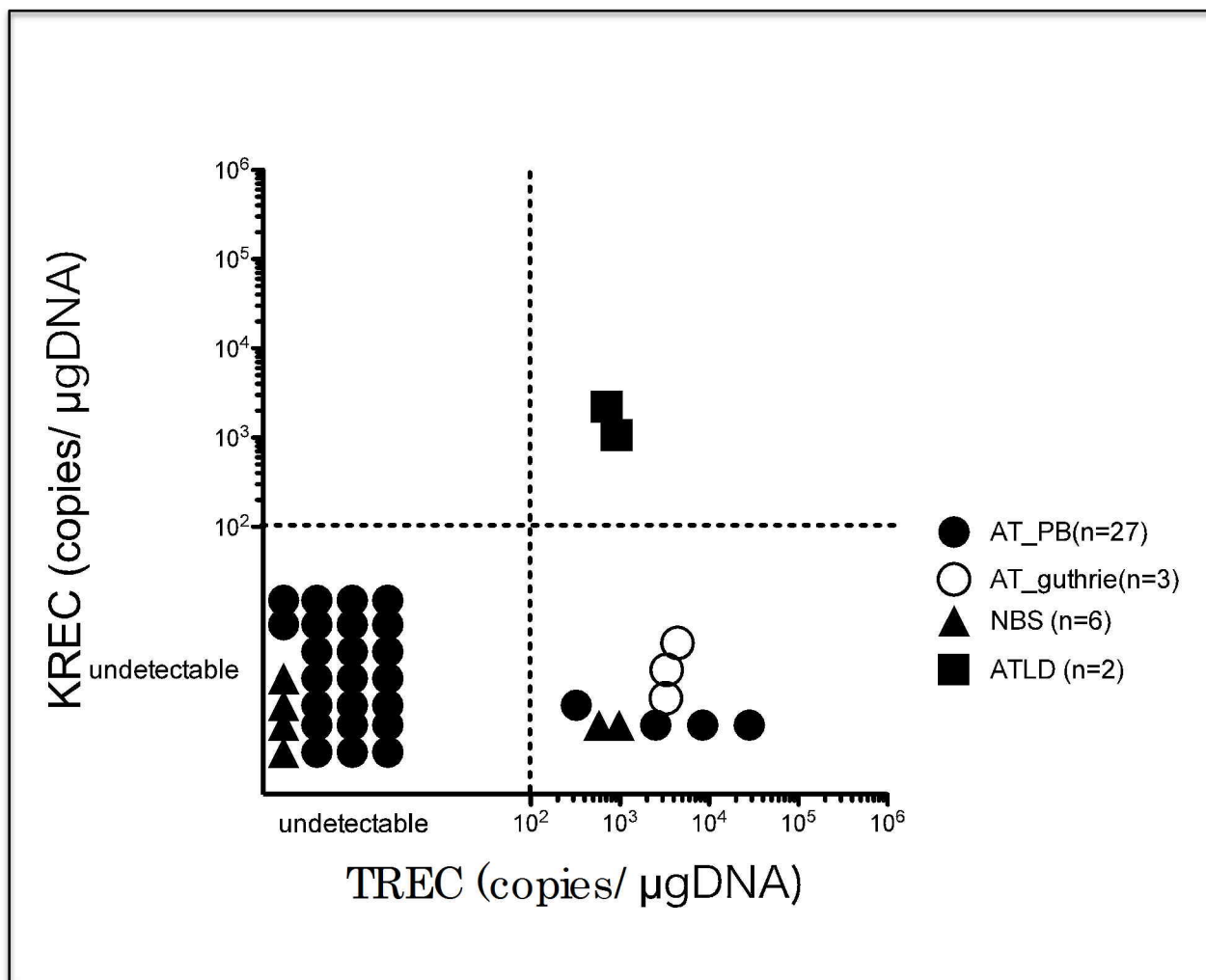


図7 DNA修復異常関連疾患患者のTREC /KREC定量

毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia, AT)患者では、TRECは新生児濾紙血3名および末梢血の4名の計7検体で陽性であり、検出感度以下であった23検体は全て末梢血検体であった。新生児濾紙血3検体のTRECはいずれも陽性であったが、そのうち2名では小児期に(各々7歳、11歳時)末梢血検体を採取しTREC / KREC定量を検討したところ、末梢血では検出感度以下へ移行していた。KRECは全例で検出感度以下であった。

Nijmegen染色体不安定症候群 (Nijmegen breakage syndrome, NBS)では2例でTREC陽性、4例でTREC陰性を示し、既報のNBS患者の全例でTRECが陽性との結果とは異なった。NBS患者でもAT患者と同様に全例でKRECは検出感度以下であった。毛細血管拡張性運動失調様症候群 (ataxia telangiectasia-like disorder , 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。

AT_PB,毛細血管拡張性運動失調症患者末梢血検体

AT_guthrie,毛細血管拡張性運動失調症患者新生児濾紙血検体

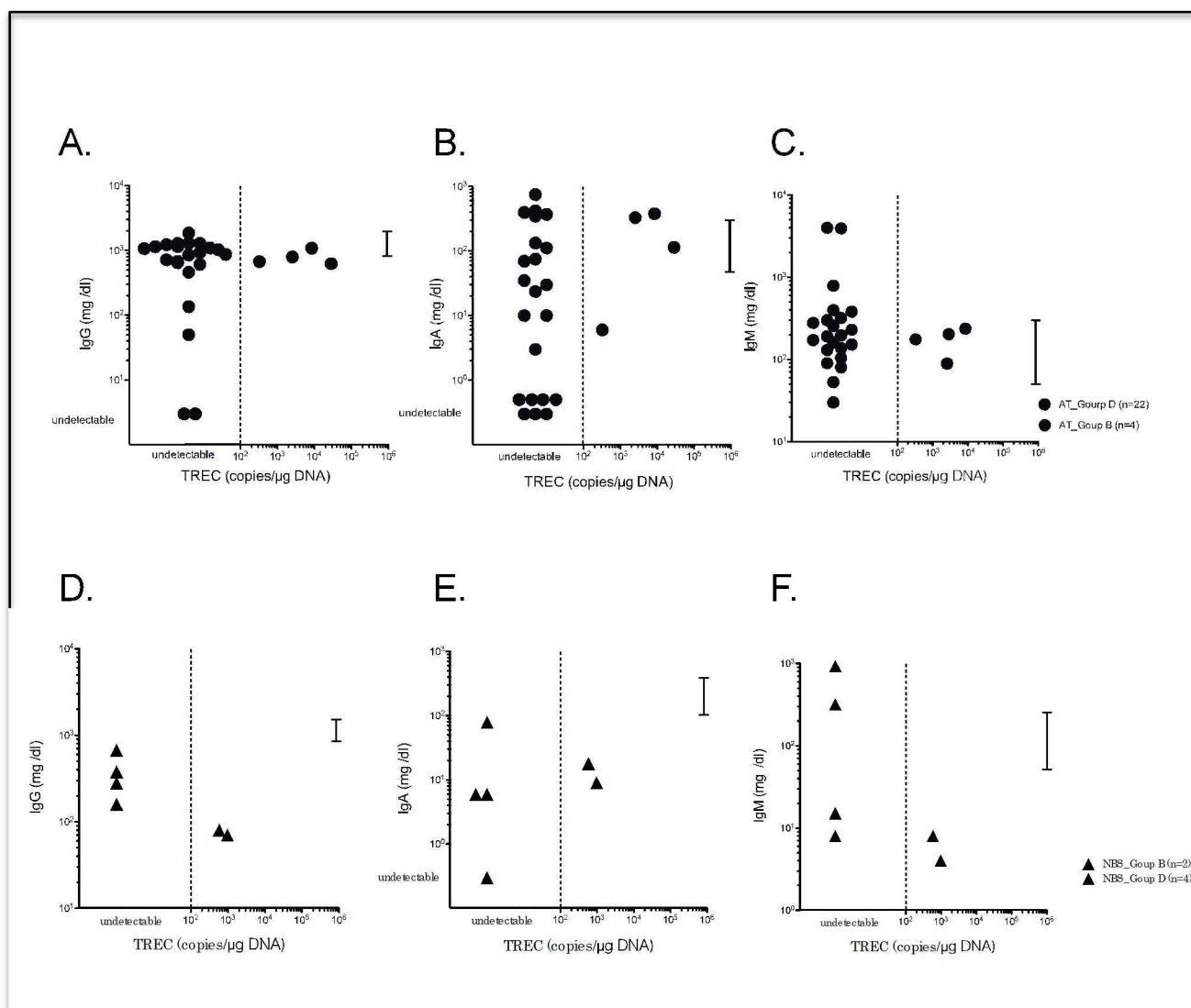


図8 毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia, AT) 患者およびNijmegen染色体不安定症候群 (Nijmegen breakage syndrome, NBS) 患者のグロブリン値

全例でグロブリン補充前のグロブリン値を検討した。AT患者の末梢血検体におけるグロブリン値は、TREC陽性群、TREC陰性群の2群間でグロブリン値に有意な差は認めなかった。

A. TREC陽性群：TREC陰性群; IgG, 830 ± 99 : 795 ± 104 mg/dl, $p=0.8841$

B. TREC陽性群：TREC陰性群; IgA, 127 ± 43 : 207 ± 88 mg/dl, $p=0.4625$

C. TREC陽性群：TREC陰性群; IgM, 547 ± 227 : 176 ± 32 mg/dl, $p=0.5091$

NBS患者の末梢血検体におけるグロブリン値は、IgG、IgAは全例で-2SD以下であったがTREC陽性群、TREC陰性群間では有意な差は認めなかった。

D. IgG全体, 274 ± 93 ; TREC陽性群, 75 ± 5 ; TREC陰性, 373 ± 109 mg/dl, $p=0.0724$

E. IgA全体, 20 ± 12 ; TREC陽性群, 14 ± 5 ; TREC陰性, 23 ± 19 mg/dl, $p=0.7583$

F. IgM値はTREC陽性群で低値の傾向を認めた (TREC陽性群, 6 ± 2 : TREC陰性群, 318 ± 217 mg/dl)

IgG normal range, 200-1600 ; IgA normal range, 100-400 ; IgM normal range, 50-280 mg/dl

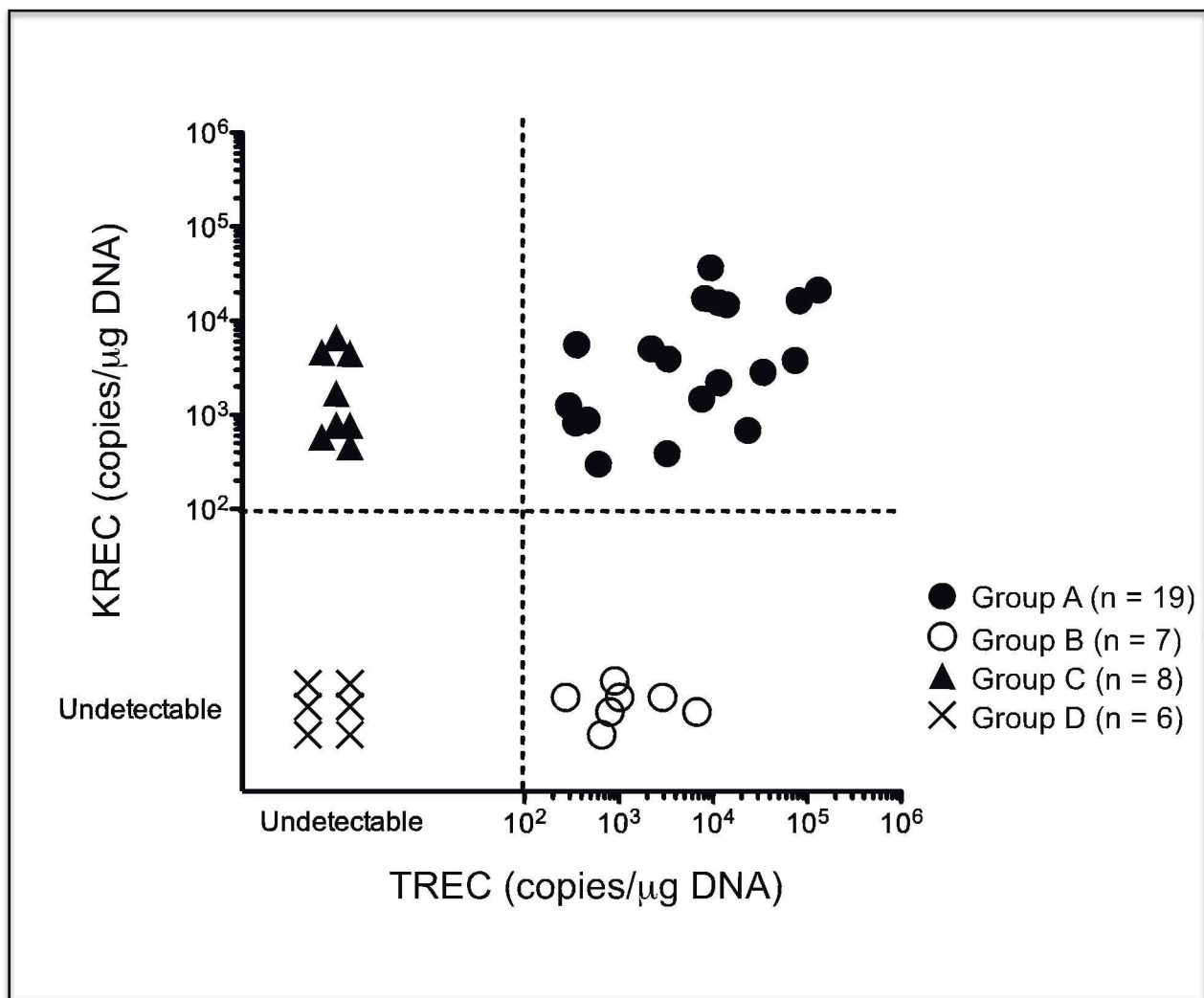


図9 TREC/KREC定量を用いた分類不能型免疫不全症 (common variable immunodeficiency, CVID) の新規病型分類

40名のCVID患者のTREC/KREC値を測定したところ、以下の4群に分かれた。
 A群 (TREC、KRECともに正常), 19例、B群(KRECのみ低下), 7例
 C群 (TRECのみ低下), 8例、D群 (TREC、KRECともに低下), 6例
 (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)
 Undetectable = < 100 copies/ μ g DNA。

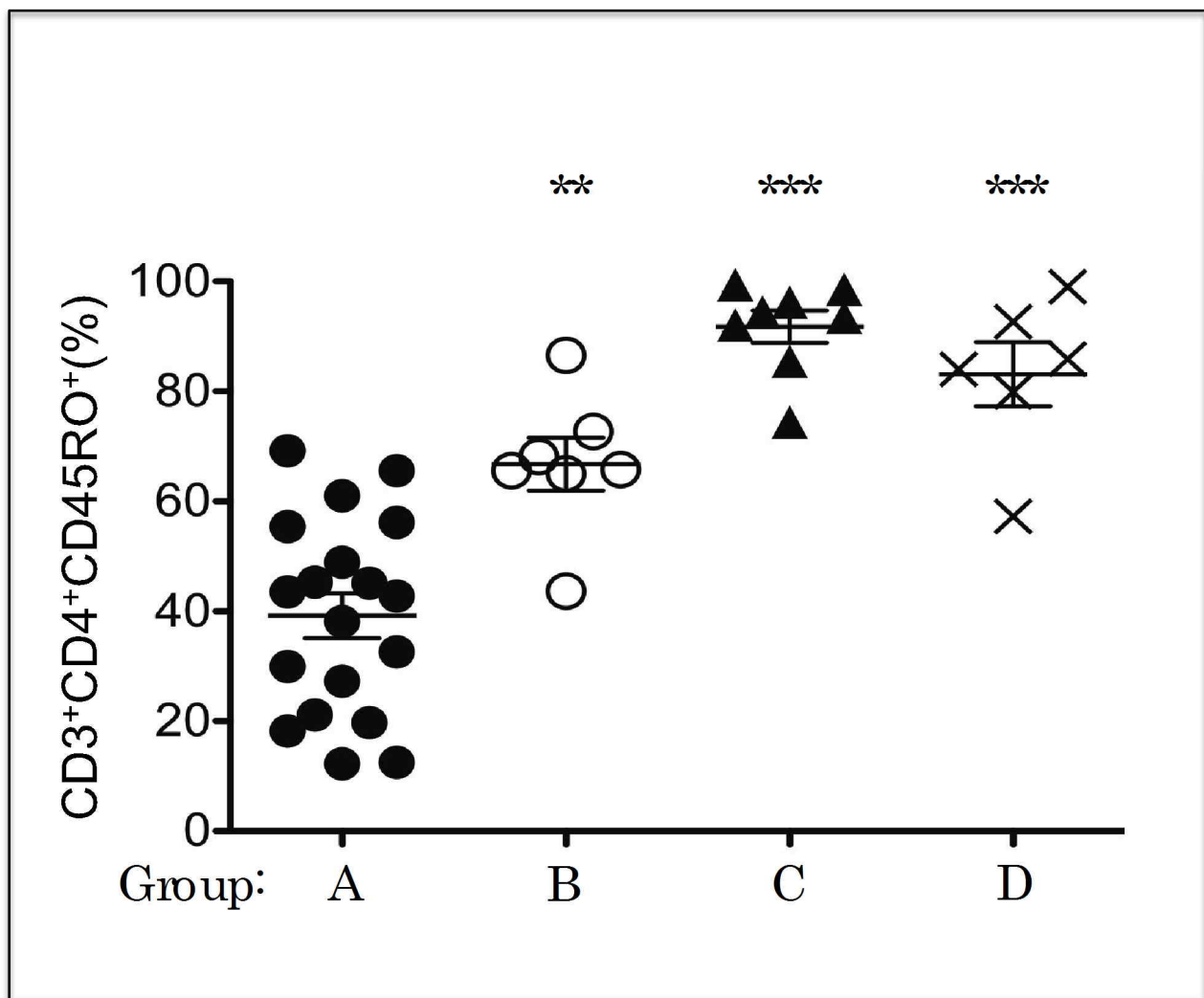


図10 CVID患者における、CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺メモリーT細胞の割合

A群に比してB群、C群、D群で割合の有意な増加を認めた (p<0.0001; A群, 37±4%; B群, 67±5% [p=0.0006]; C群, 92±3% [p<0.0001]; D群, 83±6% [p<0.0001])。更に、B群に比較してC群、D群でも有意な増加を認めた(p=0.0115)。**p<0.001, ***p<0.0001, 2群間比較はt検定を用いた。

CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺メモリーT細胞の正常値: 平均 (最小値-最大値), 小児期: 16 (11-65)%, 成人期: 63 (47-81)%

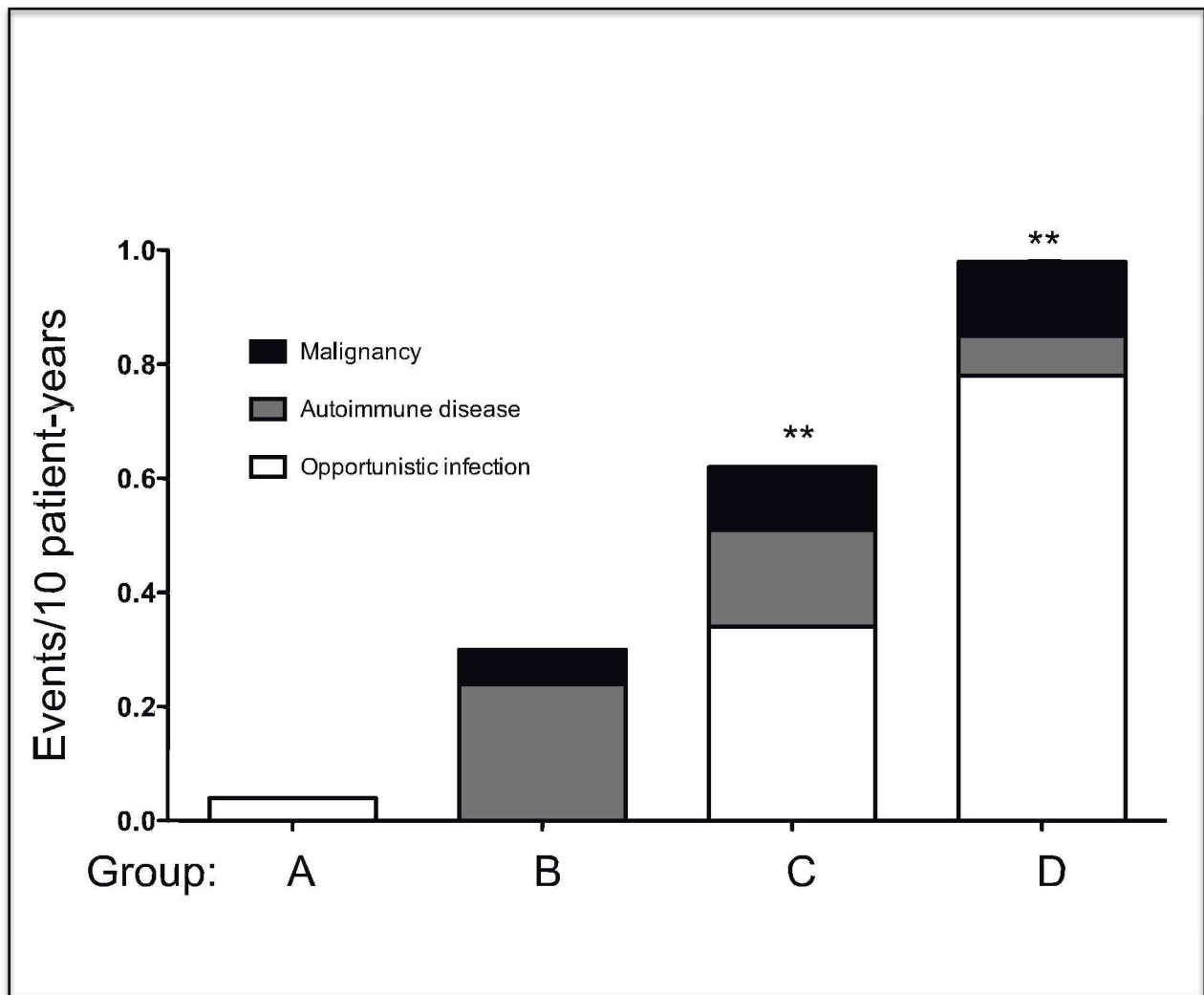


図11 各群の10人年あたりの累積イベント数（日和見感染症、自己免疫疾患、悪性腫瘍）

各群のイベント数（日和見感染症、自己免疫疾患、悪性腫瘍）の発症をイベントとして10人年あたりで比較を行った。イベント数は、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。更にD群、C群の10人年あたりのイベント数はA群に比較して有意に高かった (D群 vs A群, $p=0.0022$; C群 vs A群, $p=0.0092$; B群 vs A群, $p=0.0692$)。

** $p<0.001$, *** $p<0.0001$, ポワソン回帰分析を用いて検討した。

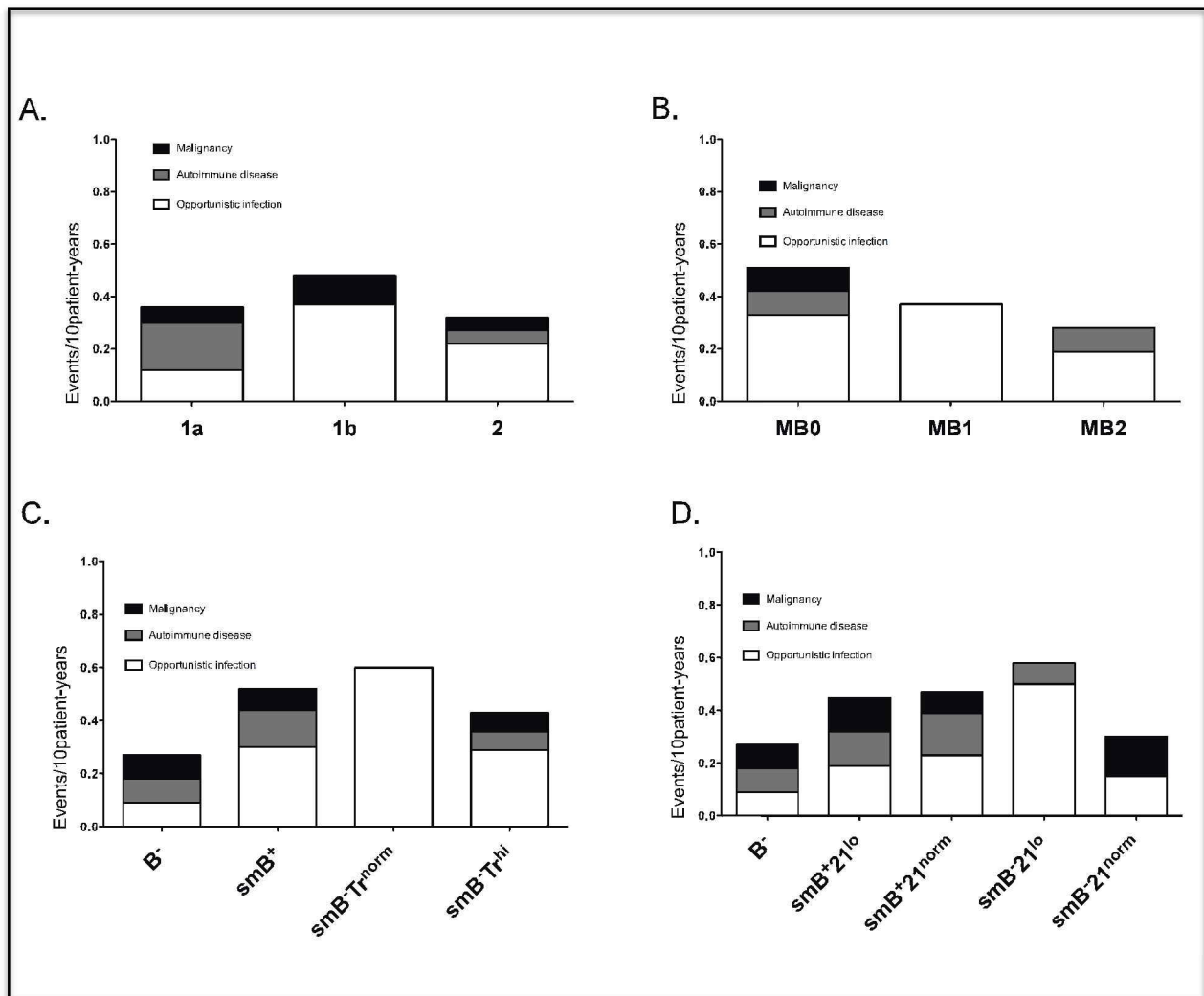


図12 既報のCVIDの分類に基づく群分けにおける、各群の10人年あたりの累積イベント数

合併症の累積イベント数を10人患者を以下の分類で分け、合併症の累積イベント数を10人年辺り検討比較した。

(A) フライブルグ分類, n=31, (B) パリ分類, n=34, (C) CD38^{hi}IgM^{hi} transitional B cellsによるユーロクラス分類 (EURO-trB), n=36, (D) CD21^{low} B cells によるユーロクラス分類 (EURO-CD21^{low} B), n=32

B細胞が<1%のためフライブルグ分類、パリ分類では5人を、データ不足により、フライブルグ分類で4人、パリ分類で1人、EURO-trB分類で4人、EURO-CD21^{low} Bで8人を除外した。

どの分類においても各群での累積イベント数の有意な増加を認めなかった。

フライブルグ分類, 1a: 0.36, 1b: 0.48, 2: 0.32 events (p value ; 1a vs. 2=0.898, 1b vs. 2=0.479, 1a vs. 1b=0.838)

パリ分類, MB0: 0.50, MB1: 0.37, MB2: 0.28 events (p value; MB0 vs. MB2=0.179, MB1 vs. MB2=0.654, MB0 vs. MB1=0.764)

EURO-tr B分類, B⁻: 0.27, smB⁺: 0.52, smB-Tr^{norm}: 0.60, smB-Tr^{hi}: 0.43 events

(p value; B⁻ vs. smB⁺=0.298, smB-Tr^{norm} vs. smB⁺=0.809, smB-Tr^{hi} vs. smB⁺=0.702, smB-Tr^{hi} vs. smB-Tr^{norm}=0.641, smB-Tr^{norm} vs. B⁻=0.329, smB-Tr^{hi} vs. B⁻=0.508)

EURO-CD21^{low} B分類, B⁻: 0.27, smB⁺21^{lo}: 0.45, smB⁺21^{norm}: 0.47, smB⁻21^{lo}: 0.58, smB⁻21^{norm}: 0.30 events

(p value; B⁻ vs. smB⁺21^{norm}=0.443, smB⁺21^{lo} vs. smB⁺21^{norm}=0.930, smB⁻21^{lo} vs. smB⁺21^{norm}=0.695, smB⁻21^{norm} vs. smB⁺21^{norm}=0.575, B⁻ vs. smB⁻21^{norm}=0.926, smB⁺21^{lo} vs. smB⁻21^{norm}=0.609, smB⁻21^{lo} vs. smB⁻21^{norm}=0.399, B⁻ vs. smB⁺21^{lo}=0.474, B⁻ vs. smB⁻21^{lo}=0.270, smB⁺21^{lo} vs. smB⁻21^{lo}=0.618), ポワソン回帰分析を用いて検討した。

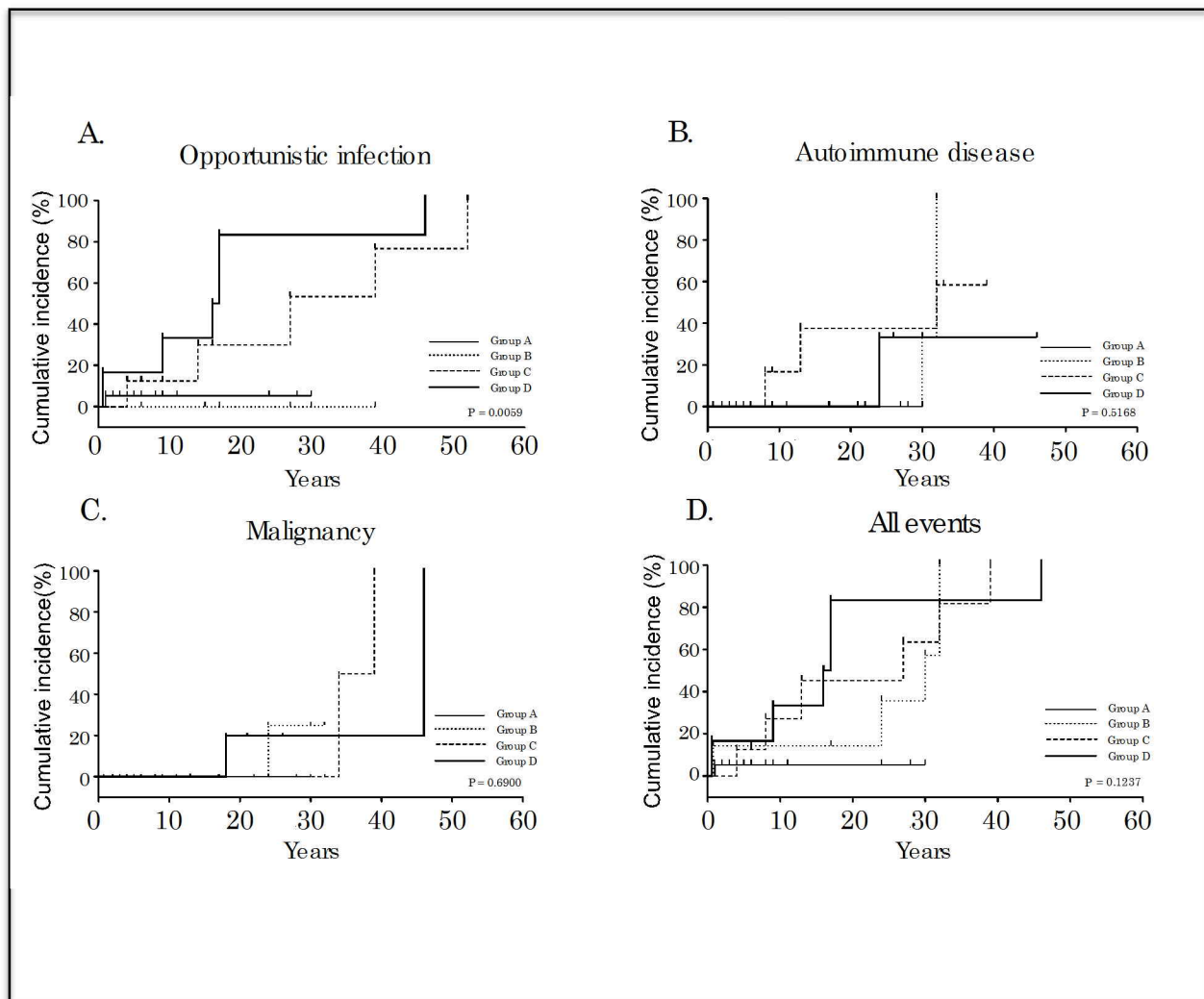


図13 各群間の累積罹患 (cumulative incidence, C.I.) のイベント毎の比較検討 (日和見感染症、自己免疫疾患、悪性腫瘍)

日和見感染症、自己免疫疾患、悪性腫瘍それぞれのイベント毎に、各群間の累積罹患 (cumulative incidence) を比較検討した。

A. 日和見感染の累積罹患はA群に比較し、C群、D群で有意に増加を認めた ($p=0.0059$)。

B. 自己免疫疾患の累積罹患、C. 悪性腫瘍の累積罹患

自己免疫疾患および悪性腫瘍は、B群、C群、D群では認めたがA群では認めなかった (自己免疫疾患, $p=0.5168$; 悪性腫瘍, $p=0.6900$)。

D. 全てのイベントの10歳時累積罹患および30歳時累積罹患は群間で有意な差を認めた ($p=0.0313$, A群, 5.3% (10歳時) および 5.3% (30歳時); B群, 14.3% および 57.1%; C群, 27.1% および 63.5%; D群, 33.3% および 83.3%)。

全ての検定はログランク検定にて解析した。

表 1

分類不能型免疫不全症 (Common variable immunodeficiency, CVID) 患者の概略

Patient no.	Group	Unique patient no.	年齢 (y)	性別	血清グロブリン量 (mg/dl)			WBC /μl	Lymph		CD3+ /μl	CD19+ /μl		CD27+CD19+ /μl	TREC (copies/μg DNA)	KRCC	RNaseP	合併症 (発症年齢)		顕性疾患	
					IgG	IgA	IgM		%WBC	/μl		%Lymph	/μl					%CD19+	自己免疫疾患 (24)		日和見感染
P1	D	529	24 M		NA	6	12	17100	4	684	83	568	3.0	21	5.20	1	0.000E+00	0.000E+00	4.860E+06	None	None
P2	D	604	21 M		632	47	16	6100	7	451	80	360	1.9	8	8.45	1	0.000E+00	0.000E+00	1.847E+05	EBウイルス感染 (16)	EBウイルス肺炎リンパ増殖性疾患 (18)
P3	D	664	46 NS		647	196	31	7000	80	5600	76	4263	1.7	94	4.76	4	0.000E+00	0.000E+00	3.460E+06	EBウイルス感染 (46)	EBウイルス肺炎リンパ増殖性疾患 (46)
P4	D	856	15 M		622	6	62	6200	21	1290	96	1243	0.5	7	2.00	0	0.000E+00	0.000E+00	5.440E+05	肺炎ヘルペス特発性 (17)	None
P5	D	914	21 F		462	52	42	4100	19	780	88	690	2.1	16	1.35	0	0.000E+00	0.000E+00	9.934E+05	慢性特発性EBウイルス感染 (17)	None
P6	D	1114	26 M		0	NA	NA	NA	NA	NA	62	NA	6.7	NA	0.55	NA	0.000E+00	0.000E+00	3.156E+05	カンジタ肺炎 (17)	None
P7	C	548	9 M		461	10	13	12430	26	3230	32	1030	1.1	37	4.82	2	0.000E+00	5.840E+02	3.860E+06	None	None
P8	C	704	33 F		716	56	83	14490	3	435	44	189	24.9	108	4.60	5	0.000E+00	6.670E+03	1.972E+06	肺結核菌ヘルペス (27)	子宮頸癌 (34)
P9	C	714	4 M		596	51	27	5400	13	713	85	605	9.1	65	38.00	25	0.000E+00	4.508E+03	2.346E+06	EBウイルス感染 (4)	None
P10	C	717	16 M		635	3	4	1800	25	446	63	281	19.8	88	1.13	1	0.000E+00	7.800E+02	1.597E+06	None	None
P11	C	969	39 F		206	8	6	4000	13	516	87	449	4.1	21	9.30	2	0.000E+00	7.740E+02	1.844E+05	EBウイルス感染 (39)	悪性リンパ腫 (39)
P12	C	1073	6 M		497	153	27	4530	21	951	90	853	4.3	41	42.97	18	0.000E+00	1.697E+03	3.218E+05	None	None
P13	C	1089	52 F		112	5	16	NA	NA	NA	95	NA	3.6	NA	30.19	NA	0.000E+00	4.634E+03	3.723E+05	カンジダアルビカンズ菌炎 (32)	None
P14	C	1120	15 M		166	2	89	6700	20	1340	55	732	4.5	60	0.9	1	0.000E+00	4.653E+02	5.092E+05	サイトメガロウイルス感染 (48)	None
P15	B	544	15 M		351	70	84	2400	43	1032	86	887	4.6	48	8.56	4	2.920E+03	0.000E+00	4.020E+05	自己免疫性溶血性貧血 (0.8)	None
P16	B	903	27 F		1	10	5	5360	22	1180	97	1142	0.3	3	9.02	0	0.000E+00	6.200E+05	3.044E+05	None	甲状腺腫 (24)
P17	B	987	6 M		560	1	20	14800	29	4218	96	4066	0.1	2	40.00	1	8.030E+02	0.000E+00	3.044E+05	None	None
P18	B	1058	39 F		431	58	2	5000	46	2280	95	2156	0.0	0	0.00	0	6.599E+02	0.000E+00	3.543E+05	全身性血小板減少性紫斑病 (32)	None
P19	B	1059	30 F		526	24	16	7010	20	1366	85	1162	8.1	111	87.94	98	2.732E+02	0.000E+00	3.245E+05	None	None
P20	B	1115	30 F		<100	<20	<10	4100	27.7	1135	88	1000	1.8	20	1.6	0	9.032E+02	0.000E+00	3.218E+05	None	None
P21	B	1118	17 F		101	<5	51	3300	43.6	1440	86	1243	4.2	60	4.6	3	1.017E+03	0.000E+00	3.951E+05	None	None
P22	A	606	24 M		244	6	18	3800	41	1558	96	1497	0.7	11	30.20	3	3.500E+02	8.170E+02	1.050E+06	None	None
P23	A	619	28 F		301	6	8	3700	33	1206	68	821	15.9	191	5.76	11	3.400E+04	2.840E+03	2.920E+06	None	None
P24	A	627	6 F		387	32	65	7500	26	1958	80	1561	3.4	67	30.09	20	4.620E+02	8.850E+02	9.970E+05	None	None
P25	A	660	5 M		300	20	70	9300	38	3543	76	2689	2.8	98	17.13	17	3.550E+03	3.930E+03	3.850E+06	None	None
P26	A	709	8 F		404	14	67	4800	47	2261	66	1484	23.4	529	4.90	26	8.220E+04	1.640E+04	2.566E+06	None	None
P27	A	713	6 M		461	NA	46	7190	59	4242	77	3265	12.3	520	25.00	130	1.316E+05	2.123E+04	2.671E+06	None	None
P28	A	716	24 F		336	10	10	7800	16	1248	54	677	29.4	367	0.27	1	1.390E+04	1.490E+04	2.633E+06	None	None
P29	A	734	30 M		531	33	41	5700	21	1214	59	717	22.5	273	5.64	15	2.920E+02	1.260E+03	2.870E+05	None	None
P30	A	780	11 F		102	10	21	9240	40	3724	84	3126	4.7	174	6.70	12	1.160E+04	1.560E+04	3.560E+06	None	None
P31	A	805	11 M		538	104	76	3100	47	1445	66	960	18.9	273	7.35	20	7.434E+04	3.798E+03	2.908E+06	None	None
P32	A	840	3 F		203	8	30	6640	45	3001	90	2707	7.5	224	3.25	7	8.188E+03	1.726E+04	6.627E+05	None	None
P33	A	873	5 M		249	11	45	4100	28	1132	89	1004	6.4	73	4.46	3	3.205E+03	3.890E+02	2.736E+05	None	None
P34	A	884	30 F		627	6	77	9700	25	2406	74	1780	10.0	241	56.61	136	2.330E+04	6.870E+02	1.500E+06	None	None
P35	A	885	22 F		548	6	16	6600	33	2145	89	1303	5.4	115	21.10	24	7.570E+03	1.473E+03	3.490E+04	None	None
P36	A	972	2 M		400	13	44	6050	47	2844	78	2215	12.2	347	61.79	214	2.270E+03	5.080E+03	4.970E+05	None	None
P37	A	1071	2 M		304	10	23	7540	63	4750	81	2407	26.8	1272	10.84	138	9.425E+03	3.675E+04	6.822E+05	None	None
P38	A	1090	5 M		150	4.5	54.3	9500	35	3325	87	2878	4.4	145	1.11	2	3.567E+02	5.583E+03	3.949E+05	None	None
P39	A	1117	9 M		50	<10	32	11500	21.3	2450	88	2163	7.0	172	0.8	1	1.151E+04	2.202E+03	5.032E+05	None	None
P40	A	1157	9 F		332	14	33	17300	3	519	88.37	459	4.17	22	6.55	1	6.066E+02	9.707E+01	4.771E+05	None	None

表 2 分類不能型免疫不全症 (Common variable immunodeficiency, CVID) の TREC/KREC 定量による分類のまとめ

	TREC 検出感度以下	TREC 正常
KREC 正常	C群 ・ 8名の患者 ・ T細胞機能不全を主体とする群 ・ D群より軽症の可能性 ・ CIDに準じた管理が必要 ・ SCID関連遺伝子が関与する可能性	A群 ・ 19名の患者 ・ B細胞終末分化異常を主体とする群 ・ ガンマグロブリン投与のみで経過良好 ・ TACI 遺伝子異常: 2名 ・ ICF症候群: 2名
KREC 異常低下	D群 ・ 6名の患者 ・ T細胞機能不全+B細胞機能不全を主体とする群 ・ 1名は死亡 (Pneumocystis jirovecii pneumonia) ・ 2名は幹細胞移植を施行 ・ CIDと診断するべき症例 ・ 造血幹細胞移植を考慮した管理が必要 ・ SCID関連遺伝子が関与する可能性	B群 ・ 7名の患者 ・ B細胞機能不全を主体とする群 ・ 日和見感染は稀に発症 ・ Fanconi貧血: 1名 ・ 進行性にTRECが減少した ・ 一部の例でナイーブT細胞の増多 ・ 一部の例でSCID関連遺伝子が関与する可能性