

原発性免疫不全症候群の網羅的迅速遺伝子診断システムの開発

村松秀城

名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学

【研究の背景】

原発性免疫不全症候群は、先天的な要因による免疫系構成要素の欠損または機能不全を持つ疾患の総称である。国内の有病率は人口十万人あたり 2.7 人と推定されている。一般的に幼少期より感染症に繰り返し罹患し、日和見感染症が重症化する。一部の病型では、悪性腫瘍や自己免疫性疾患などの合併もみられる。

病因、病型は極めて多彩であり、現在までに 230 種類以上の疾患の報告があり、原因となる遺伝子は現時点で約 300 種類あり、さらに毎年新規原因遺伝子の報告がある。臨床症状も多彩であるため、診断はしばしば困難を極める¹⁾。

治療は、抗菌薬の予防的内服や γ グロブリンの補充、骨髄移植や近年では遺伝子治療による免疫再建が行われている。生後早期に正確な遺伝子診断を行うことにより、感染症を予防し、原発性免疫不全症候群患者の予後や QOL の向上を図ることができる。

現在、免疫不全症の遺伝子診断は、臨床症状、検査所見より、異常のある遺伝子変異を想定して、個別にサンガー法で解析を行う方法が主流である。この方法では、典型例以外では、診断に大変な時間と労力を要している。しかし、近年の次世代シークエンサー技術の進歩により、多数の原因遺伝子を同時に解析する網羅的遺伝子解析が可能になった²⁾。

【目的】

本研究の目的は、原発性免疫不全症候群症例検体について、次世代シークエンサーを用いたターゲットキャップチャ解析で、既知の原発性免疫不全症候群の原因となる遺伝子異常を網羅的に解析することである。

また近年、世界的に原発性免疫不全症候群に対する早期診断のために新生児マススクリーニングが広がりを見せており、マススクリーニング陽性例に対する迅速で正確な診断法が求められている。将来的には迅速な遺伝子診断法とマススクリーニングを組み合わせ、生後早期に正確な遺伝子診断を行うことにより、患者の予後と QOL の向上を図ることが期待できる。

【方 法】

名古屋大学医学部附属病院小児科において、本研究参加の同意が得られた患者の末梢血由来のゲノム DNA を、連結可能匿名化後に、既知の原因遺伝子の探索を行った。既存の検体についても、個人情報を保護した上で、遺伝子解析に用いた。網羅的な遺伝子解析を行うために、次世代シークエンサー (Illumina 社 HiSeq2500)、および標的の遺伝子の塩基配列を濃縮するサンプル調製システムを用いて、原発性免疫不全症および関連疾患の原因となる 349 遺伝子および染色体コピー数解析が可能な網羅的遺伝子解析パイプライン(免疫不全ターゲットシーケンス)を開発した。パネルの遺伝子は、国際免疫学会連合、欧州免疫不全症学会、アジア原発性免疫不全症データベースに記載された遺伝子に加え、原発性免疫不全症と類似の症状を示す先天性骨髄不全症の原因遺伝子や DiGeorge 症候群に関連する染色体 22q11.2 領域の遺伝子も含めた。さらに並行して、遺伝子コピー数の解析を行い、遺伝子・染色体の部分欠失も検索した。

【結 果】

名古屋大学医学部付属病院を受診した原発性免疫不全症が疑われる患児 97 例が本システムを用いて遺伝子解析を行われた。対象とした遺伝子の配列の 99.1% の領域は、coverage が 20 回以上であり、十分な検出感度で解析することが可能であった。97 例のうち、従来のサンガーフラスなどの方法で遺伝子診断されていた 38 例を解析したところ、すべての症例で従来の解析方法と一致する遺伝子変異が検出された。一方、遺伝子診断が得られていなかった免疫不全症の 59 例のうち、8 例（14%）で新たに遺伝子診断が可能であった。新たに診断された症例の原因遺伝子は、*PIK3CD*（2 例）、*XIAP*（2 例）、*RTEL1*、*TERT*、*TYK2*、染色体 22q11.2 領域（各 1 例）であった。

【考 察】

今回開発された次世代シーケンサーを用いた診断法は、原発性免疫不全症における網羅的な遺伝子診断に有用であった。同様の診断方法は、これまでに Nijman らが報告しているが、解析の対象とした遺伝子数は 170 遺伝子で coverage が 20 回以上の領域は 93.8% であり、従来の方法で診断されていた遺伝子変異の検出率は 91% であった³⁾。本研究では、coverage を増加させたことで、遺伝子変異の検出率が改善したと考えられる。

また、本診断法は、今後、わが国で導入が予定されている重症複合免疫不全症に対する新生児マス・スクリーニング陽性例の確認検査に用いるなど、幅広い応用も期待される⁴⁾。重症複合免疫不全症は原発性免疫不全症の中でも最重症の疾患で、原因遺伝子が 16 種類報告されているが、今回の遺伝子パネルにすべて含まれており、本診断システムを用いることで迅速な遺伝子診断が可能である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

原発性免疫不全症が疑われた場合、最初に行うスクリーニング検査として免疫不全ターゲットシーケンスを使用することで、より迅速な診断や適切な治療法の選択が可能となり、患児の生命予後や生活の質の向上に寄与すると考えられる。さらに、重症複合免疫不全症に対する新生児マススクリーニングに対する確認検査にも応用が可能である。

【参考・引用文献】

- 1 Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Front Immunol* 2014;5:162.
- 2 Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 2009;461:272-6.
- 3 Nijman IJ, van Montfrans JM, Hoogstraat M, Boes ML, van de Corput L, Renner ED, et al. Targeted next-generation sequencing: a novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:529-34.
- 4 小島 大英、杉山 裕一朗、村松 秀城、近藤 大貴、安井 正宏、木戸 真二、佐藤 義朗、早川昌弘、小島 勢二. TREC 定量による重症複合免疫不全症の新生児マススクリーニング. *日本小児科学会雑誌* 2016;120:1462-7.