

主論文の要旨

Application of extensively targeted next-generation sequencing for the diagnosis of primary immunodeficiencies

〔 原発性免疫不全症に対する次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子診断法の確立 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

小島 大英

【緒言】

原発性免疫不全症は、病原体の排除に必要な免疫系に、先天的な機能異常がある疾患の総称である。原発性免疫不全症の原因となる遺伝子は、300種類以上報告されている。加えて、遺伝子変異には、それぞれの遺伝子の点突然変異にとどまらず、DiGeorge症候群のように広範な染色体の欠失も含まれる。最重症型である重症複合免疫不全症の患児は、出生後早期から感染を繰り返し、治療が奏功しなければ、乳児期に死亡する予後不良な疾患である。

原発性免疫不全症の治療は、抗菌薬の予防的内服やガンマグロブリンの定期補充のほか、根本的に免疫能の再建を図る目的で造血幹細胞移植（骨髄移植、臍帯血移植、末梢血幹細胞移植）が行われる。重症複合免疫不全症においては、生後早期に診断され造血幹細胞移植を受けた症例は、治療が遅れた症例と比較して生命予後が大幅に向上することが報告されている。X連鎖無ガンマグロブリン血症などの無ガンマグロブリン血症の患者においても、早期からのガンマグロブリンの定期補充により、気管支拡張症等の合併症の予防が可能である。すなわち、原発性免疫不全症は、生後早期に正確な診断を行い、速やかに治療介入を開始することで、予後や生活の質の向上が期待される疾患群である。

原発性免疫不全症に対する信頼性の高い遺伝子診断は、適切な管理を行うのに、非常に重要であるが、これまで日常診療において、迅速で正確な遺伝子診断を行うことは困難であり、臨床症状や検査所見に基づいて想定される遺伝子異常を、一遺伝子ずつ個別にサングー法で解析を行っていた。しかし、非典型的な臨床像をとる症例では、その臨床診断自体が困難であるうえに、原因遺伝子が多数想定される疾患では、迅速な遺伝子診断は不可能であった。また、これまでに次世代シーケンサーを用いた原発性免疫不全症の遺伝子解析の報告があるが、原因遺伝子の網羅が不十分であった。

本研究では、次世代シーケンサーを用いて、原発性免疫不全症の網羅的な遺伝子診断法を確立することを目的とした。

【対象及び方法】

名古屋大学医学部附属病院小児科を受診した原発性免疫不全症が疑われる患児 97例を対象に遺伝子解析を行った。原発性免疫不全症候群および関連疾患の原因となる349遺伝子を網羅するキャプチャーベイトを作成した。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領域の遺伝子を含めた（図A）。

タンパク質コーティング領域であるエクソンと隣接するイントロン10塩基を解析対象とし、標的とした領域の99.3%がカバーされた55877個（2Mb）のプローブを設計した。

標的領域のDNAを濃縮した後、次世代シーケンサーにより配列を読み取り、リファレンス配列と異なるバリエーションを検出した。SNPデータベースを用いて common

SNPs を除去した後に、病原性の文献報告があるミスセンス変異と、ナンセンス変異やフレームシフト変異などの遺伝子を不活化する変異に絞り込んだ。各疾患の遺伝形式に基づいて、遺伝子診断を確立した。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を行った。

【結果】

対象とした遺伝子の配列の 99.1% の領域で、十分な検出感度で解析することが可能であった (図 B)。従来の方法で遺伝子診断が確定していた 38 例の全例について、正確に遺伝子変異を検出した。一方、遺伝子診断が確定していなかった症例では、*PIK3CD*、*XIAP* (2 症例)、*RTEL1*、*TERT*、*TYK2* 遺伝子の病的意義のある変異が検出され、またコピー数解析により、1 例で 22q11.2 領域の欠損症が検出され (図 C)、全体で 59 例のうち 8 例 (14%) について新たに遺伝子診断が可能であった (表 1)。これらの新たに検出された変異は、サンガー法または Fluorescence in situ hybridization 法により確認された (図 D)。

【考察】

今回開発された新規診断法は、原発性免疫不全症における迅速な遺伝子診断と適切な治療法の選択に有用と考えられた。以前に報告された研究では、原発性免疫不全症の原因となる 170 遺伝子が含まれているが、今回の我々のシステムは原発性免疫不全症の原因となる 107 遺伝子が追加され、さらに先天性骨髄不全症 30 遺伝子と、コピー数解析の性能を向上させるため、染色体 22q11.2 領域上に存在する 45 遺伝子が加えられ、従来の研究に比べ遺伝子診断率の向上が示された。

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うる。また、本邦でも導入が始まりつつあ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精密検査として本診断法を用い、早期に造血幹細胞移植を行うことで、患児の生命予後や生活の質の向上に寄与すると期待される。

【結語】

原発性免疫不全症患者の次世代シーケンサーを用いた効果的な遺伝子診断システムの確立に成功した。