

- リウマチ学会総会・学術集会 2011年7月 神戸
4. 萩原圭祐、森島淳仁、菱谷好洋、河合麻理、有光潤介、平野亨、嶋良仁、檜崎雅司、緒方篤、田中敏郎 トシリズマブ治療継続中のCastleman病患者に合併したIgG4関連疾患の一例 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会 2011年7月 神戸
 5. 田中敏郎 RA以外の疾患に対するIL-6阻害療法 日本臨床免疫学会会誌 2011年 34:271.
 6. Morishima A, Ogata A, Hirano T, Hishitani Y, Hagihara K, Shima Y, Narazaki M, **Tanaka T**, Kumanogoh A. Decreased HbA1C during humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, tocilizumab in rheumatoid arthritis with diabetes. **EULAR (The European League Against Rheumatism) meeting 2011**, 25-28 May 2011, London, UK.
 7. Hishitani Y, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Ogata A, **Tanaka T**, Kumanogoh A. Long-term tolerability of tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis. **ACR/ARHP 11 Scientific Meeting**. November 5-9, 2011, Chicago.
 8. **Tanaka T**, Kawai M, Hirano T, Hagihara K, Shima Y, Narazaki M, Ogata A, Kumanogoh A. Effect of enzymatically isoquercitrin, a flavonoid, on symptoms of Japanese cedar pollinosis. **XXII World Allergy Congress**. December 4-8, 2011, Cancun, Mexico.
 9. **Tanaka T**, Morishima A, Hishitani Y, Yoshida Y, Nakabayashi A, Ogawa M, Kawai M, Hirano T, Hagihara K, Shima Y, Narazaki M, Ogata A, Kishimoto T, Kumanogoh A. Clinical effects of tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody on patients with autoimmune and allergic diseases. **XXII World Allergy Congress**. December 4-8, 2011, Cancun, Mexico.
 10. 田中枝里子、平野亨、松下正人、大島至郎、田中敏郎、佐伯行彦 Th2サイトカイン優位のミクリツ病の1例—シェーグレン症候群との相違の可能性 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月 神戸
 11. 萩原圭祐、森島淳仁、河合麻理、桑原裕祐、有光潤介、石井泰子、平野亨、嶋良仁、檜崎雅司、緒方篤、田中敏郎 ステロイド抵抗性であったリウマチ性多発筋痛症患者にトシリズマブが奏効した一例 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月 神戸
 12. 萩原圭祐、有光潤介、森島淳仁、河合麻理、桑原裕祐、石井泰子、平野亨、嶋良仁、檜崎雅司、緒方篤、田中敏郎 肺高血圧を合併するリウマチ膠原病患者におけるロサルタン/HCTZ合剤の有用性の解析 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月 神戸
 13. 緒方篤、梅垣知子、森島淳仁、河合麻理、石井泰子、平野亨、萩原圭祐、嶋良仁、檜崎雅司、田中敏郎、川瀬一郎 乾癬性関節炎に対するTocilizumabの効果 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月 神戸
 14. 萩原圭祐、嶋良仁、森島淳仁、河合麻理、桑原裕祐、有光潤介、石井泰子、平野亨、檜崎雅司、緒方篤、田中敏郎 トシリズマブは再発性多発性軟骨炎の寛解維持に有効である—長期経過報告 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月 神戸

15. 萩原圭祐、森島淳仁、河合麻理、桑原裕祐、有光潤介、石井泰子、平野亨、嶋良仁、檜崎雅司、緒方篤、**田中敏郎** サイトカイン 病態・治療 サイトカイン網羅解析によるレイノー合併肺高血圧患者へのボセンタン多様性効果の検討 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月 神戸
16. 嶋良仁、桑原裕祐、河合麻理、平野亨、森島淳仁、石井泰子、有光潤介、萩原圭祐、檜崎雅司、緒方篤、**田中敏郎** MCTD・強皮症 ヒト化抗IL-6受容体抗体(トシリズマブ)による強皮症治療の試み 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月 神戸
17. 河合麻理、檜崎雅司、森島淳仁、桑原裕祐、石井泰子、平野亨、萩原圭祐、嶋良仁、緒方篤、川瀬一郎、**田中敏郎** 生物製剤 TCZ 効果 脾腫を伴った関節リウマチ患者ではトシリズマブの効果が減弱する 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月 神戸
18. 森島淳仁、緒方篤、萩原圭祐、河合麻理、桑原裕祐、有光潤介、石井泰子、平野亨、嶋良仁、檜崎雅司、**田中敏郎** 生物製剤 TCZ 評価検査 Tocilizumab のHbA1c改善効果について 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010年4月 神戸
19. **田中敏郎**、河合麻理、平野亨 「成人喘息の初期治療」フラボノイドによる喘息に対する補完代替療法 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 2010年5月 京都
20. 河合麻理、平野亨、小川真佐子、森島淳仁、桑原裕祐、石井泰子、有光潤介、萩原圭祐、檜崎雅司、嶋良仁、緒方篤、川瀬一郎、**田中敏郎** フラボノイドのスギ花粉症に対する有効性の検証 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 2010年5月 京都
21. 田中枝里子、平野亨、原田芳徳、片田圭宣、松下正人、大島至郎、**田中敏郎**、佐伯行彦 Th2優位の可能性を示唆したミクリツ病の一例—原発性シェーグレン症候群と比較検討 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 2010年5月 京都
22. Narazaki M, Kawai M, Morishima A, Kuwahara Y, Ishii T, Hirano T, Hagihara K, Shima Y, Ogata A, Kishimoto T, **Tanaka T** . Insufficient effect of tocilizumab on the patients with rheumatoid arthritis who have splenomegaly. **EULAR (The European League Against Rheumatism) meeting 2010**, 16-19 June 2010, Rome, Italy.
23. Ogata A, Kawai M, Morishima A, Ogawa M, Ishii T, Kuwahara Y, Hirano T, Nishida S, Hagihara K, Shima Y, Narazaki M, Yoshizaki K, **Tanaka T** , Kishimoto T. Clinical effects of tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody on patients with autoimmune and inflammatory diseases. **EULAR (The European League Against Rheumatism) meeting 2010**, 16-19 June 2010, Rome, Italy.
24. Hagihara K, Morishima A, Kawai M, Arimitsu J, Ishii T, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Ogata A, **Tanaka T** . Tocilizumab increases the population of CD4+ CD25+ CD127low regulatory T cells in patients with chronic inflammatory diseases. **EULAR (The European League Against Rheumatism) meeting 2010**, 16-19 June 2010, Rome, Italy.
25. Hagihara K, Murota H, Sakata Y, Morishima A, Kawai M, Arimitsu J,

- Ishii T, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Ogata A, **Tanaka T** . Analysis of effect of bosentan on Raynaud's phenomenon in connective tissue disease-related PAH patients using a Bio-Plex cytokine array. **EULAR (The European League Against Rheumatism) meeting 2010**, 16-19 June2010, Rome, Italy.
26. Ogata A, Mori M, Hashimoto S, Kawai M, Morishima A, Kuwahara Y, Ogawa M, Hirano T, Ishii T, Arimitsu J, Hagihara K, Shima Y, Narazaki M, Kishimoto T, **Tanaka T** . Tocilizumab does not inhibit interferon synthesis which is a key step of anti-mycobacterial host defences. **EULAR (The European League Against Rheumatism) meeting 2010**, 16-19 June2010, Rome, Italy.
27. Hagihara K, Murota H, Sakata Y, Morishima A, Kawai M, Ishii T, Arimitsu J, Hirano T, Shima Y, Narazaki M, Ogata A, **Tanaka T** . Analysis of effect of bosentan on Raynaud's phenomenon in connective tissue disease-related PAH patients using a Bio-Plex cytokine array. **4th International Congress of Immunology**, 22-27 August 2010, Kobe, Japan.
28. **Tanaka T** , Kawai M, Morishima A, Ogawa M, Ishii T, Kuwahara Y, Hirano T, Nishida S, Hagihara K, Shima Y, Narazaki M, Ogata A, Yoshizaki K, Kishimoto T. Clinical effects of tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody on patients with autoimmune and inflammatory diseases. **4th International Congress of Immunology**, 22-27 August 2010, Kobe, Japan.
29. Arimitsu J, Hagihara K, Otsuka S, Nakanishi M, Inoue T, Kishida Y, Ozaki K, Kageyama M, Nishida S, **Tanaka T** . Successful treatment for three patients with steroid refractory systemic lupus erythematoses by Ren-Shen-Tang. **The 7th World Congress Chinese Medicine 2010**, Oct 2010, Den Haag, The Netherlands.
30. Otsuka S, Arimitsu J, Hagihara K, Nakanishi M, Inoue T, Kishida Y, Ozaki K, Kageyama M, Nishida S, **Tanaka T** . Traditional herbal medicine including Gouqizi Fructus Lycii may affect cycle and genital bleeding quantity: a case report. **The 7th World Congress Chinese Medicine 2010**, Oct 2010, Den Haag, The Netherlands.
- H. 知的財産権の取得状況
- 1.特許取得
該当なし
 - 2.実用新案登録
該当なし
 - 3.その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

成人型分類不能型免疫不全症の実態把握、亜群特定に基づく診断基準策定及び
病態解明に関する研究

研究分担者 小原 收 かずさ DNA 研究所 副所長

研究要旨:

分類不能型免疫不全症の確定診断を可能とするために、その疾患発症原因となる可能性のある遺伝子解析とその網羅的な取り組みに向けた技術基盤整備を行った。具体的には、分類不能型免疫不全症疑い検体に対して既知原因遺伝子の構造解析を行ったが、それらの遺伝子群にはいずれも疾患原因と想定されるような変異は極めて稀な頻度でしか見いだせなかった。そこで、既知原因遺伝子に変異の見出されない分類不能型免疫不全症疑い検体に対して次世代シーケンサーによる遺伝子変異探索を行った。この際に、1) 家系分析から絞り込まれた領域に存在する遺伝子のタンパク質コーディングエクソン解析、2) バイオインフォマティクスにより絞り込んだ2476遺伝子のタンパク質コーディングエクソンとその周辺イントロンの配列解析、3) エキソーム解析、の3種類を実行し、それぞれの症例に特異的に見られる遺伝子変異をリスト化した。次世代シーケンシングによって得られた遺伝子変異は、それぞれ従来法のキャピラリーシーケンシングにより確認した。こうした確認された各症例のどの変異が原因遺伝子変異であるかを確定するため、候補変異を有する遺伝子についての機能情報の調査を行った。

A. 研究目的

分類不能型免疫不全症 (Common variable immunodeficiency; 以下 CVID と略) は頻度高く見られる原因不明の免疫不全症の一つであるが、その実態、病態、合併疾患の成立機序は未解明のままの部分が多い。そうした成人型の CVID の疾患概念の整理・疾患本態の解明を目指す本研究において、確定診断のための CVID 責任遺伝子の同定を最終的な目的として、昨年度に続いて系統的な疾患原因遺伝子変異探索を継続し、より網羅的な原因遺伝子探索システムを構築することを今年度の目的とした。

B. 研究方法

(1) CVID の疑いのある患者検体について、既知の CVID 責任遺伝子の構造解析を行なう。昨年に続いて BAFFR (TNFRSF13C), CD19, ICOS, SH2DIA, TACI (TNFRSF13B) を既知遺伝子として解析対象とただけでなく、今年度は新たな候補遺伝子として APRIL (TNFSF13), BAFF (TNFSF13B), BIRC4 (XIAP), ICOSL,

ITK1 も解析した。これらの遺伝子のタンパク質コードエクソン領域をその両端に存在するイントロン領域 (20 塩基以上) を酵素的増幅法 (PCR 法) で増幅するためのプライマー合成、ゲノム DNA からの増幅反応、増幅産物の DNA 塩基配列解析、得られた配列のデータベース中のリファレンス配列との比較を行った。この塩基配列比較においては、我々が開発した Mutation@A Glance (<http://rapid.rcai.riken.jp/mutation/>) を活用した。

(2) CVID 責任遺伝子と予想される遺伝子のタンパク質コード領域エクソンについて、次世代シーケンサーを用いて網羅的大規模なシーケンシングを行った。

一つは、近親婚家系で SNP アレイにより特定した LOH 領域内の全遺伝子、二つ目は、昨年度研究班内で検討して作製した CVID 候補遺伝子リストの 2476 遺伝子について、これらの遺伝子のエクソン領域情報を抽出して、それらを実験的に濃縮するためのプローブデザインを行った。研究班内で解析対象を決定し、実際のシーケンスと、その結果得られた配列

について mapping 等の解析を行った。三つ目は、全遺伝子のエクソン領域を抽出する市販のプローブ設計による液相濃縮系を用いて、より網羅的なシーケンシングを行った。解析対象は若年発症、家族内発症、特徴的合併症を持つ症例を抽出し、研究班内で最終決定した。

(倫理面への配慮)

臨床検体は共同研究者の施設で採取・調製され、匿名化された状態でのみ受け入れ、受け入れ時にそれぞれの施設で同意書へのサインが行われていることを確認した。今回の研究ではゲノム DNA の構造解析を含むため、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に従い、(財)かずさ DNA 研究所での倫理審査委員会による承認を得て行った。特に、平成23年度の網羅的なエクソン解析については、別途かずさ DNA 研究所での倫理審査委員会により審議された上で承認された。

C. 研究結果

本年度は、CVID 疑い検体に対して、候補の10種類の遺伝子に対して、のべ約500遺伝子の構造解析を行った。その結果、TACI(TNFRSF13B)においてのみ、アミノ酸変化を伴う既知の一塩基多型が検出されたものの、タンパク質機能に大きな影響を与えることが示唆されるような変異は他に見出されなかった。

そこで、こうした既知変異がない症例を選び、より網羅的な原因遺伝子変異探索に移行した。

家族例の LOH 領域に存在する全遺伝子のエクソン解析を Roche 社 FLX を用いて 4 症例の検体について行った。それぞれ領域内の解析対象となった遺伝子数は 2000-4000 個だった。シークエンスの結果、変異として検出された箇所は 800-1600 遺伝子、そのうちホモ異常(頻度 $\geq 90\%$)は 700-1200 個程度であった。さらに非同義置換で dbSNP 未報告という条件でフィルタリングすることにより約 15-50 個の遺伝子に絞られた。

次に、CVID 候補 2476 遺伝子エクソン解析を Roche 社 FLX を用いて 8 検体を行った。4 ランで総解析塩基数はおおよそ 1.7×10^9 塩基だっ

た。シークエンスの結果から、coding 領域とスプライシングサイトの変異を中心に、dbSNP134 登録を除いた変異箇所を抽出した。このフィルタリングにより各検体について、ホモ変異約 20 箇所、ヘテロ変異約 300 箇所、コンパウンドヘテロ変異 5 組前後が private variants として抽出された。主にホモ変異とコンパウンドヘテロ変異に注目し、変異箇所について従来法(キャピラリーシーケンシング)による配列確認を行った。確認の結果、Roche 社 FLX でのエラーは、文献で言われている通り、連続する同一塩基での読み間違いの頻度が高いことが分かった。確認した配列で固有の変異であった場合は、家族解析まで進めた。各検体あたり 5-20 箇所についておこなった結果、うち 1 症例は 3 遺伝子にまで絞り込まれた。

最期に、全ゲノム上のエクソン解析を Illumina 社 GAIIx を用いて 5 検体を行った。Depth >20 とすると 90%以上のカバー率だった。coding 領域と splice site、Non-synonymous、dbSNP135 登録や他検体との重複変異を除いたところ、1 検体あたりホモ変異約 40 箇所、ヘテロ変異約 350 箇所、コンパウンドヘテロ変異約 15 組にフィルタリングされた。現在従来法による配列確認を進めている。

D. 考察

1) 達成度について

当初予定していた研究課題はほぼ達成できた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

次世代シーケンサーによる疾患責任遺伝子探索は正に国際的な競争が激化している時期であり、それを活用して CVID の亜分類診断を可能とするための準備が整えられた。

3) 今後の展望について

CVID の全国調査結果、CVID 免疫担当細胞解析結果、CVID 合併病態解析結果の情報と得られた疾患原因遺伝子候補群のリストを組み合わせることで、今後の責任遺伝子同定への大きな進展が見込まれる。責任遺伝子同定には十分な症例数と疾患症例の血球細胞の機能情報が必須であるため、これらの統合化は極めて重要な役割を果たすと考えられる。

4) 研究内容の効率性について

異分野間が CVID をキーワードに連携するプロジェクトであるが、効率的に班研究は展開されていた。本年度の各種データ蓄積の成果を受けて、更に研究が加速されることが期待できる。

E. 結論

計画通り、大規模シーケンシングの実施による CVID 症例の原因遺伝子探索を実現した。それによって候補変異の絞り込みが進み、今後はその変異が実際に CVID の原因変異であることの証明を行うことが大きな課題である。こうして CVID の原因遺伝子の多様性が明らかにされることによって、初めて実際の診断に寄与できる CVID 責任遺伝子変異の同定が期待できる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okura Y, Yamada M, Kobayashi I, Santisteban I, Arredondo-Santisteban G, Kato Z, Iguchi A, Yoshida M, **Ohara O**, Nakagawa N, Imai K, Hershfield MS, Ariga T. ADA-SCID with 'WAZA-ARI' mutations that synergistically abolished ADA protein stability. *Br J Haematol.* **153**:675-6,2011.
2. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsuiki N, Oshima K, **Ohara O**, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol.* **128**:223-225.e2, 2011.
3. Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, **Ohara O**, Hara T. Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan. *J Clin Immunol.* **31**:309-14, 2011.
4. Ohta H, Miyashita E, Hirata I, Matsumura R, Yoshida H, Hashii Y, Higashiura T, Yasumi T, Murata Y, Heike T, Yang X, Kanegane H, **Ohara O**, Ozono K. Hematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning from a family haploidentical donor in an infant with familial hemophagocytic lymphohistocytosis. *Int J Hematol.* **94**:285-90, 2011.
5. Mizuno T, Sakai H, Nishikomori R, Oshima K, **Ohara O**, Hata I, Shigematsu Y, Ishige T, Tamura K, Arakawa H. Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Rheumatol Int.* [Epub ahead of print] 2011 Dec 11.
6. Tanaka N, Izawa K, Saito MK, Sakuma M, Oshima K, **Ohara O**, Nishikomori R, Morimoto T, Kambe N, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, de Saint Basile G, Neven B, van Gijn M, Frenkel J, Aróstegui JI, Yagüe J, Merino R, Ibañez M, Pontillo A, Takada H, Imagawa T, Kawai T, Yasumi T, Nakahata T, Heike T. High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in patients with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome: results of an International Multicenter Collaborative Study. *Arthritis Rheum.* **63**:3625-32, 2011.

7. Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa K, Sakai H, Abe J, Tanaka N, Kawai T, Oshima K, Saito M, Nishikomori R, **Ohara O**, Ishii E, Nakahata T, Horiuchi H, Heike T. Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood*. **118**:1225-30, 2011.
 8. Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, **Ohara O**, Hara T. Clinical and Host Genetic Characteristics of Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases in Japan. *J Clin Immunol*. **31**:309-14,2011.
 9. Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu H, Kamachi Y, **Ohara O**, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients. *Clin Immunol*. **138**:172-7,2010.
 10. Aghamohammadi A, Imai K, Moazzami K, Abolhassani H, Tabatabaeiyan M, Parvaneh N, Nasiri Kalmarzi R, Nakagawa N, Oshima K, **Ohara O**, Nonoyama S, Rezaei N. Ataxia-telangiectasia in a patient presenting with hyper-immunoglobulin M syndrome. *J Invest Allergol Clin Immunol*. **20**:442-445,2010.
 11. Tsuge I, Kondo Y, Nakajima Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, **Ohara O**, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Urisu A. Hyper IgM syndrome and complement Clq deficiency in an individual with systemic lupus erythematosus-like disease. *Clin Exp Rheumatol*. **28**:558-60,2010.
 12. Hijikata A, Raju R, Keerthikumar S, Ramabadran S, Balakrishnan L, Ramadoss SK, Pandey A, Mohan S, **Ohara O**. Mutation@A Glance: an integrative web application for analysing mutations from human genetic diseases. *DNA Res*. **17**:197-208, 2010.
2. 学会発表
 1. 本間健一、今井耕輔、釜江智佳子、中川紀子、野々山恵章、大嶋宏一、満生紀子、小原收、Sheela Nampothiri, Deepti Suri, Amit Rawat, Surjiti Singh 最近3年間にインドより当科へ紹介された原発性免疫不全症に対する検討 第四回日本免疫不全症研究会 2011年1月22日 九州大学
 2. Kumar Ramadoss S, Keerthikumar S, Raju R, Kandasamy K, Balakrishnan L, Dhevi Nagarajha Selvan L, Raja Sekhar N, Mohan S, Bhattacharjee M, Hijikata A, Imai K, Kanegane H, Miyawaki T, Nonoyama S, Pandey A, **Ohara O**, Mohan S. Resource of Asian Primary Immunodeficiency Diseases (RAPID) update: an open web-based integrated molecular database on primary immunodeficiencies. **9th European Conference on Computational Biology (ECCB10)** 2010年9月 Ghent, Belgium.
 3. Kumar Ramadoss S, Keerthikumar S, Raju R, Kandasamy K, Balakrishnan L, Dhevi Nagarajha Selvan L, Raja Sekhar N, Bhattacharjee M, Hijikata A, Imai K, Kanegane H, Miyawaki T, Nonoyama S, Pandey A, **Ohara O**, Mohan S. RAPID elucidation of autoimmune-mediated inflammatory disease regulatory mechanisms and depiction of signaling pathways in Primary Immunodeficiency Diseases. **XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID2010)** 2010年10月

Istanbul,Turkey.

4. **Ohara O.** Integration of New Technologies for Accurate and Rapid Molecular Diagnosis of Primary Immunodeficiencies. **PEDIATRIC ACADEMIC SOCIETIES and ASIAN SOCIETY FOR PEDIATRIC RESEARCH 2011 Joint Meeting (PAS/ASPR 2011 Joint Meeting)**
2011年5月 Denver,Colorado.
 5. 小原収 原発性免疫不全症研究の基盤整備 **遺伝医学合同学術集会 2011**
2011年6月 京都
 6. 釜江智佳子、本間健一、野々山恵章、今井耕輔、佐藤弘樹、満生紀子、小原収 **CVID の TREC,KREC による病型分類 第5回日本免疫不全症研究会 2012年1月 東京**
 7. 小原収 次世代シーケンシングの免疫疾患ゲノミクスにおける活用 **ゲノムコンファレンス 2011年6月 東京**
- H. 知的財産権の取得状況
- 1.特許取得
該当なし
 - 2.実用新案登録
該当なし
 - 3.その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

成人型分類不能型免疫不全症の診断基準・診断方法の確立及び

治療方法の開発に関する研究

研究分担者 竹森 利忠 理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター
免疫記憶研究グループ グループディレクター

研究要旨：

不均一な疾患である CVID の正確な診断基準と亜群の特定、および発症機序の理解を目指し、9のパラメーターを用いた新たな FACS 解析法を開発した。この技術を用い、CVID において(1)抗原感作前 B 細胞数の減少 (2)抗原感作前 B 細胞数は正常であるが、記憶 B 細胞／抗体産生前駆細胞数が減少、(3)抗原感作前 B 細胞数は正常、但し NK 細胞および制御性 T 細胞数が減少、の3群を分別した。さらに、CVID、特に記憶 B 細胞の減少を主徴とする疾患の発症の機序を明らかにすることを目標として、まず健常人の記憶 B 細胞に特異的に発現増強する遺伝子を同定した。これら遺伝子が患者記憶 B 細胞でどのように変動するかを明らかにすることが今後求められる。

A. 研究目的

成人型分類不能型免疫不全症の特徴を呈する免疫細胞動態と発現遺伝子を明確にし、現在不均一な疾患である CVID の診断基準と発症機序を明らかにする。

B. 研究方法

(1) 健常人、患者末梢血における免疫細胞の頻度の解析：CVID 患者および健常人末梢血由来の白血球をパーコール法を用いて濃縮した。得られた細胞を多重マーカーを用い FACS で解析した。T 細胞、B 細胞および記憶 B 細胞、抗体産生細胞に分画し、それぞれの頻度を測定した。(2) 細胞の精製と発現遺伝子の解析：記憶 B 細胞、抗体産生細胞および静止 B 細胞分画を FACS を用いて精製した。各分画細胞より RNA を分画し各細胞に発現する遺伝子の発現解析をマイクロアレイにより行なった。さらに陽性と判定され、発現が記憶 B 細胞で高い遺伝子を選択し QPCR により発現レベルの評価を行った。

C. 研究成果

(1) ヒト末梢血に置ける免疫系細胞の正確な同定技術の確立。

FSC/SSC および CD19, CD38, IgD, CD27 及び ABCB1 トランスポーター発現の有無を指標に記憶 B 細胞、抗体産生前駆細胞、成熟及び未成熟静止 B 細胞の正確な分画方法を確立した。また CD3, CD4, ICOS, CXCR5 及び PID-1 発現の有無を指標に抗体産生に重要な役割を果たす濾胞ヘルパー T 細胞の同定を、さらに細胞内の Foxp3 染色を用いずに CD3, CD4, CD25, IL7R の発現を指標に regulatory T cell (Treg) を同定する方法を確立した。

(2) CVID 患者に置ける免疫細胞の変動

健常人、患者検体末梢血における各免疫細胞の分画と頻度を確立した方法で解析した結果、CVID の各 50% が B 細胞数の減少、および減少を伴わない 2 群に分別された。B 細胞数の著明な減少を伴わない群の多くではクラススイッチを終了した記憶 B 細胞／抗体産生前駆細胞の減

少が認められ、この群での B 細胞分化成さらに少数の解析例ではあるが B 細胞異常以外に自己免疫、糖尿病、リンフォーマを併発する 3 例で、全白血球数は正常であるものの、末梢血中の NK 細胞および抑制性 T 細胞の減少が認められた。

(3) 記憶 B 細胞の減少例の確認

従来報告されている様に、FACS による新規解析方法を用い、CVID 患者において MT 染色陽性である CD27 陽性 CD38 陰性の記憶 B 細胞、CD27 陽性 CD38 陰性の plasma blast が健常人と比較して著明に減少する症例を確認した。これら両亜群の頻度の低下は連関し、現在解析数は少ないもののいずれか一方の減少のみを示す症例は認められていない。一方興味有る事に MT 染色陽性 transitional B 細胞分面の T3 の頻度少数の患者検体で著明に上昇していた。

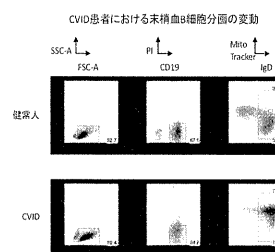
(4) ヒト記憶 B 細胞分面に発現増強する遺伝子の同定

記憶 B 細胞の減少を主徴とする成人型分類不能型免疫不全症(CVID)で病態発症責任遺伝子の探索を行なうことを目的とした。このため健常人の記憶 B 細胞および静止 B 細胞でそれぞれ特異的に発現増強する遺伝子を同定し、これら遺伝子の患者記憶 B 細胞、静止 B 細胞での発現の変動の有無を明らかにし、異常が認められる場合病態発症との相関を明らかにすることを目標とした。このため精製した健常人記憶 B 細胞で特異的に発現増強する 134 遺伝子をマイクロアレイにより同定し、さらに最終的に QPCR により 20 の遺伝子が記憶 B 細胞に発現増強する事を確認した。

(5) B 細胞数減少を伴う CVID 症例の解析

CVID 患者での記憶 B 細胞の減少が分化前の B 細胞での機能不全を反映する可能性を考慮し、健常人、患者末梢血由来の未成熟および成熟 B 細胞で発現する遺伝子のプロファイルの検討を開始した。図 1 は全白血球分面を減少する CVID 患者で未成熟静止細胞の増強と記憶 B 細胞

熟に関わる何らかの異常が推察された。抗体産生前駆細胞分面減少を併発する例を示す。



D. 考察

分類不能型免疫不全症多くは 10 歳以降に発症する低ガンマグロブリン血症で、同種血球凝集素、あるいはワクチンへの低反応を示す既知の免疫不全症ではない疾患と定義さる。

本研究ではまず病型の分類には CVID 患者における免疫学的なマーカーを用いた亜群の変動を正確に整理することが必要とされる。本研究では新たな FACS 技術を整備し、多くの免疫細胞亜集団を同時に正確に測定する技術を確認した。今後検討例を増加させることにより CVID における免疫学的な多様性と臨床的な多様性とのリンクが可能となることが期待される。

この解析方法の確立は、疾患発症での免疫細胞亜群での発現遺伝子探索にも有用である。本研究では特に記憶 B 細胞／抗体産生前駆細胞数を減少とする症例に注目し、患者細胞亜群に発現する遺伝子のレベルを健常人のそれと比較し、疾患の要因を推定することを目的に解析をおこなった。我々の解析で、健常人末梢血記憶 B 細胞で発現増強する遺伝子、すなわち細胞表面受容体、シグナル伝達因子、核内因子が同定された。記憶 B 細胞数の減少を主徴とする CVID 患者での記憶 B 細胞で発現異常を示す遺伝子が明らかにされれば、記憶 B 発達に関連する機序の一部が明らかにされる可能性がある。しかし、一方、本研究では記憶 B 細胞および抗体産生細胞前駆細胞が同時に減少す

る例が認められる。B細胞、T細胞免疫反応は抗原以外にサイトカイン、ケモカイン等の複数の刺激が関与し多段階のstepに対応した相互の反応で両者の細胞の最終的な成熟が達成される。従って、CVID患者における記憶B細胞および抗体産生細胞前駆細胞の減少する例においては、B細胞の免疫反応の異常とともに、T細胞の機能、さらには免疫細胞のhoming等のより広範なstepでの異常を考慮する必要がある、今後の課題となる。CVIDでの自己免疫の高い発症率についても新たな考察が必要である。マウスの解析ではtransitional B細胞分画のT3は自己反応性の結果死に行く細胞であるとのdataもあり、一部のCVID患者におけるこの分画の頻度の上昇は、自己免疫寛容における何らかの異常を示唆するのかもしれない。この観点から現行進行している患者に置ける未成熟B細胞の性状の解析は何らかの示唆を与えるかもしれない。

以上CVID患者亜群の分別において各免疫細胞分画を特徴づける発現遺伝子を同定し、健常人、患者検体間の比較によるCVIDでの遺伝子変動の同定から疾患の要因を推定すべく今後も解析を進めて行く。

E. 結論

正確に末梢血免疫細胞分画を同定する技術を確立した。この技術を用い、健常人末梢血由来記憶B細胞で発現増強する遺伝子を明らかにし、記憶B細胞数減少を主徴とするCVIDでの発現異常の有無の検討が可能となった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Fujii H, Ato M, Takahashi Y, Otake K, Hashimoto S, Kaji T, Tsunetsugu-Yokota Y, Fujita M, Adachi A, Nakayama T, Taniguchi M, Koyasu S, **Takemori T**.
HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in antigen-specific immune response in mice.
Int. Immunol. **23**:433-441, 2011.

H. 知的財産権の取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

IV. 研究事業報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

成人型分類不能型免疫不全症の診断基準・診断方法の確立及び方法の開発に関する研究

平成22年度第一回班会議（研究代表者 森尾友宏）

平成22年9月17日（金）14:30 - 17:30

東京医科歯科大学医学部附属病院 16階小会議室

14:30-14:45

研究代表者挨拶

森尾友宏（東京医科歯科大学・院・発生発達病態学分野）

第一部

研究発表（座長：今井 耕輔）

14:45-15:00

成人領域の免疫不全症

田中敏郎（大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科学講座）

15:00 -15:15

健常人ならびに分類不能型免疫不全症患者のリンパ球亜群におけるFc μ レセプターの発現

金兼弘和、宮脇利男（富山大学医学部小児科）

15:15-15:30

CVIDの病態における自己抗体の関連性

松本 功（筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床免疫学）

15:30 -15:50

Linkage between cellular phenotype and clinical phenotype in CVID patients

竹森利忠（理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター免疫記憶研究グループ）

15:50-16:00

休憩

研究発表（座長：松本 功）

16:00-16:20

TREC, KREC, FACS を用いた CVID 亜群分類の試み～臨床症状との相関についての検討

今井耕輔（防衛医科大学校 医療情報部、同小児科）

16:20-16:40

分類不能型免疫不全症亜群分類 と原因探索へのアプローチ

森尾友宏***、峯岸志津子**、満生紀子*、（*東京医科歯科大学・院・発生発達病態学分野、**同・細胞治療センター、***かずさ DNA 研究所）

16:40-17:00

次世代シーケンサーを用いた免疫不全症原因遺伝子探索の現状

小原収（かずさ DNA 研究所ヒトゲノム研究部、理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター免疫ゲノミクス研究グループ）

第二部

総合討論

17:00-17:30

分類不能型免疫不全症研究の方向性と社会発信

V. 研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Honda F, Kano H, <u>Kanegane H</u> , Nonoyama S, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, <u>Morio T</u> .	Btk negatively regulates ROS production and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils.	<i>Nature Immunol.</i>	13	369-378	2012
Sato R, Iizumi S, Kim E-S, Honda F, Lee S-K, Adachi N, Koyama H, Mizutani S, <u>Morio T</u> .	Impaired cell adhesion, apoptosis, and signaling in WASP-gene disrupted Nalm-6 pre-B cells and recovery of cell adhesion using a transducible form of WASp.	<i>Int. J. Hematol.</i>	95	299-310	2012
Uchida Y, Matsubara K, Wada T, Oishi K, <u>Morio T</u> , Takada H, Iwata A, Yura K, Kamimura K, Nigami H, Fukuya T.	Recurrent bacterial meningitis by three different pathogens in an isolated asplenic child.	<i>J Infect Chemother.</i>		Epub ahead of print	2012
Yang X, <u>Kanegane H</u> , Nishida N, Imamura T, Hamamoto K, Miyashita R, <u>Imai K</u> , Nonoyama S, Sanayama K, Yamaide A, Kato K, Nagai K, Ishii E, van Zelm MC, Latour S, Zhao XD, Miyawaki T.	Clinical and genetic characteristics of XIAP deficiency in Japan.	<i>J Clin Immunol.</i>		Epub ahead of print	2012
Honda F, Hane Y, Toma T, Yachie A, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, <u>Morio T</u> .	Transducible form of p47phox and p67phox compensate for defective NADPH oxidase activity in neutrophils of patients with chronic granulomatous disease.	<i>Biochem. Biophys. Res. Comm.</i>	417	162-8	2012
Kondo Y, Iizuka M, Wakamatsu E, Yao Z, Tahara M, Tsuboi H, Sugihara M, Hayashi T, Yoh K, Takahiashi S, <u>Matsumoto I</u> , Sumida T.	Overexpression of T-bet gene regulates murine autoimmune arthritis.	<i>Arthritis Rheum.</i>	64	162-72	2012
<u>Tanaka T</u> , Narazaki M, Kishimoto T.	Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor.	<i>Annu Rev Pharmacol Toxicol.</i>	52	199-219	2012
<u>森尾友宏</u>	分類不能型免疫不全症 Update	<i>Jpn.J.Clin.Immunol.</i>	31	14-22	2012

Nakagawa N, <u>Imai K</u> , <u>Kanegane H</u> , Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsui N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S.	Quantification of kappa-deleting recombination excision 1 circles in Guthrie 2 cards for the identification of early B-cell maturation defects.	<i>J Allergy Clin Immunol.</i>	128	223-225	2011
Arai T, Zhao M, <u>Kanegane H</u> , van Zelm MC, Futatani T, Yamada M, Ariga T, Ochs HD, Miyawaki T, Oh-Ishi T	Genetic analysis of contiguous X-chromosome deletion syndrome encompassing the BTK and TIMM8A genes.	<i>J Hum Genet.</i>	56	577-82	2011
Fujioka T, Kawashima H, Nishimata S, Ioi H, Takekuma K, Hoshika A, <u>Kanegane H</u> , Miyawaki T	Atypical case of X-linked agammaglobulinemia diagnosed at 45 years of age.	<i>Pediatr Int.</i>	53	611-2	2011
Ishimura M. Takada H. Doi T. <u>Imai K</u> . Sasahara Y. <u>Kanegane H</u> . Nishikomori R. <u>Morio T</u> . Heike T. Kobayashi M. Ariga T. Tsuchiya S. Nonoyama S. Miyawaki T. Hara T.	Nationwide Survey of Patients with Primary Immunodeficiency Diseases in Japan.	<i>J Clin Immunol.</i>	31	968-76	2011
<u>Morio T</u> . Atsuta Y. Tomizawa D. Nagamura-Inoue T. Kato K. Ariga T. Kawa K. Koike K. Tauchi H. Kajiwara M. Hara T. Kato S.	Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan.	<i>Br. J. Haematol.</i>	154	363-72	2011
Asai E. Wada T. Sakakibara Y. Toga A. Toma T. Shimizu T. <u>Imai K</u> . Nonoyama S. <u>Morio T</u> . Kamachi Y. <u>Ohara O</u> . Yachie A.	Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patient.	<i>Clin. Immunol.</i>	138	172-7	2011

Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S.	Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Like Disease With Somatic KRAS Mutation.	<i>Blood.</i>	117	2887-90	2011
Zhao M, Kanegane H, Kobayashi C, Nakazawa Y, Ishii E, Kasai M, Terui K, Gocho Y, Imai K, Kiyasu J, Nonoyama S, Miyawaki T.	Early and rapid detection of X-linked lymphoproliferative syndrome with SH2D1A mutations by flow cytometry.	<i>Cytometry B Clin Cytom.</i>	80	8-13.	2011
Booth C, Gilmour KC, Veys P, Gennery AR, Slatter MA, Chapel H, Heath PT, Steward CG, Smith O, O'Meara A, Kerrigan H, Mahlaoui N, Cavazzana-Calvo M, Fischer A, Moshous D, Blanche S, Pachlopnik-Schmid J, Latour S, de Saint-Basile G, Albert M, Notheis G, Rieber N, Strahm B, Ritterbusch H, Lankester A, Hartwig NG, Meyts I, Plebani A, Soresina A, Finocchi A, Pignata C, Cirillo E, Bonanomi S, Peters C, Kalwak K, Pasic S, Sedlacek P, Jazbec J, Kanegane H, Nichols KE, Hanson IC, Kapoor N, Haddad E, Cowan M, Choo S, Smart J, Arkwright PD, Gaspar HB.	X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on the manifestations, management, and outcome of the disease.	<i>Blood.</i>	117	53-62	2011
Pachlopnik Schmid J, Canioni D, Moshous D, Touzot F, Mahlaoui N, Hauck F, Kanegane H, Lopez Granados E, Mejstrikova E, Pellier I, Galicier L, Galambrun C, Barlogis V, Bordigoni	Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP-deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP-deficiency).	<i>Blood.</i>	117	1522-9	2011

P, Fourmaintraux A, Hamidou M, Dabadie A, Le Deist F, Haerynck F, Ouachée-Chardin M, Rohrllich P, Stephan JL, Lenoir C, Rigaud S, Lambert N, Milili M, Schiff C, Chapel H, Picard C, de Saint Basile G, Blanche S, Fischer A, Latour S.					
<u>森尾友宏</u>	分類不能型免疫不全症	炎症と免疫	19	17-22	2011
<u>金兼弘和</u> 、 <u>大坪慶輔</u> 、 <u>宮脇利男</u>	制御性 T 細胞に異常を有する原発性免疫不全症	炎症と免疫	19	210-216	2011
<u>金兼弘和</u>	X 連鎖リンパ増殖症候群－SAP 欠損症と XIAP 欠損症	医学のあゆみ	238	1058-1064	2011
<u>松本功</u>	トップランナーに聞く 関節リウマチの発症メカニズム解明とその制御機構を追い求めて	最新医学	131	2575-2579	2011
Hijikata A, Raju R, Keerthikumar S, Ramabadran S, Balakrishnan L, Ramadoss SK, Pandey A, Mohan S, Ohara O.	Mutation@A Glance: an integrative web application for analysing mutations from human genetic diseases.	<i>DNA Res.</i>	17	197-208	2010
<u>金兼弘和</u> 、 <u>宮脇利男</u>	先天性免疫不全症における低ガンマグロブリン血症	血液フロンティア	20	1983-1989	2010

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
水谷修紀 高木正稔 森尾友宏	RALD : ALPS と JIMML の 交差点に ある新た な疾患	高久史磨 小澤敬也 坂田洋一 金倉 讓 小島勢二 編	ALD Annual Review 2012	中外医学 社	東京	2012	131-139
森尾友宏	リウマチ ・膠原病薬 免疫抑制 薬 γグロブリン 抗真菌薬 発疹	水谷修紀 監修 土井庄三 郎編	年齢と体 重ですぐ わかえる !小児の 治療薬の 選び方使 い方	羊土社	東京	2011	85-96 279 368
森尾友宏	オーメン 症候群 イヴェマ ルク症候 群 ディ・ジョ ージ症候 群	福井次矢 辻省次編	症候群ハ ンドブッ ク	中山書店	東京	2011	630 645 646
金兼弘和	簡易感染 免疫不全	五十嵐隆 石井栄三 郎編	小児科ピ クシス 24「症状 別検査の 選び方・ 進め方」	中山書店	東京	2011	112-5
金兼弘和	先天性免 疫不全症	日本血液 学会編	血液専門 医テキスト	南江堂	東京	2011	340-3

VI. 学会発表に関する一覧