

Screening. Annual Meeting Primary Immune Deficiency Disease North American Conference. (Chicago, USA, May 17-20, 2012)

4. S Nonoyama: Resources for Teaching Primary Immune Deficiency. Annual Meeting Primary Immune Deficiency Disease North American Conference. (Chicago, USA, May 17-20, 2012)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

疾患特異的 iPS 細胞を用いた先天性免疫不全症の病態解析

中畑龍俊

京都大学 iPS 細胞研究所

研究要旨

先天性免疫不全症の病因解明、病態解析のため、血球分化系を構築した。ヒト iPS 細胞から血球の発生過程を模倣する形で中胚葉分化、血液、血管内皮共通の母細胞であるへマンジオブラストを経て各種血液細胞が産生される系を構築できた。さらに従来の OP9 フィーダー細胞を用いた血球分化系を改良し、無血清、フィーダー細胞を用いない培養法を確立した。分化させた単球、マクロファージ、樹状細胞は、貪食能、抗原提示能、機能的なサイトカイン産生などを認め、患者の病態解析に使用できる可能性が示唆された。各種免疫不全症の疾患 iPS 細胞を樹立し、疾患の病態解析を開始した。Chédiak-東症候群（以下 CHS）では巨大顆粒を持つ好中球が患者 iPS 細胞から産生された。

A. 研究の目的

先天性免疫不全症は、易感染性を呈し、適切な診療を行わなければ致命的になりうる疾患であるが、早期の介入により予後の改善が期待できる。しかし、病因や発症のメカニズムが判明していない患者が多数存在し、これらの患者の病態解明が行えれば臨床的な貢献は大きいと考えられる。そこで我々は、先天性免疫不全症の iPS 細胞を用いた解析を行い、病態解明を行うことを目的としている。iPS 細胞は京都大学の山中らによって見出された多能性幹細胞で、皮膚や血球などから樹立することができ、様々な体細胞に分化させることができる。患者 iPS 細胞を各種免疫担当細胞に分化させ、その分化過程や形成された細胞の機能を正常人 iPS 細胞由来の細胞と比較、解析することにより、先天性免疫不全症の病態解明や創薬に向けた手がかりを目指す。

B. 研究方法

免疫不全症の iPS 細胞を用いた解析のためには、まず適切な血球分化系を構築する必要があるため、この課題に取り組んでいる。iPS 細胞からへマンジオブラストを経て安定した血球分化系とするためフィーダーフリー、無血清の二次元培養法について検討した。

各種先天性免疫不全症患者皮膚生検材料より iPS 細胞の樹立を試みた。

C. 研究結果

従来報告してきた OP9 フィーダー細胞との共培養系に代わる方法としてより安定した分化系を構築するため、フィーダーフリー、無血清の二次元培養で血球を分化させる系を開発した。ヒト iPS 細胞から血球の発生過程を模倣する形で中胚葉分化、血液、血管内皮共通の母細胞であるへマンジオブラストを経て各種血液細胞が産生される系を構築できた。形成された好中球は遊走能、貪食能、殺菌能とも正常人末梢血中の好中球とほぼ同じ能力を持っていることが明らかとなった。自然免疫異常の解析に重要な単球、マクロファージ、樹状細胞を誘導する系を確立した。それぞれ貪食能、抗原提示能、機能的なサイトカイン産生などを認め、患者の病態

解析に使用できる可能性が示唆された。

今回我々は2名のCHS患者由来の繊維芽細胞からエピソーマルベクターを用いてiPS細胞を樹立した。好中球・単球分化を行い細胞内の巨大顆粒を確認した。神経分化を行い巨大顆粒の検出を試みている。

D. 考察

以上のように血球分化系とその評価に成功している。さらに、自然免疫異常の解析に重要な単球、マクロファージ、樹状細胞を機能を持った細胞として誘導することが可能となった。

CHSは血球の機能不全に伴う易感染性、細胞内巨大顆粒、眼皮膚型白皮症、神経変性等を特徴とする原発性免疫不全症であり、本邦の生存者は10例と稀である。責任遺伝子である*LYST*(Lysosomal trafficking regulator)はリソソーム形成や細胞内小胞間輸送に関連することが知られており、70%のCHS患者がその変異を持つ。感染症や、血球貪食症候群により生命を脅かされ、平均寿命は5歳前後とされている。血球貪食症候群は反復する事が知られており、唯一の根治療法は骨髄移植である。骨髄移植は飛躍的に生命予後を改善させるが、20歳前後より発症する神経症状とそれに伴う死亡を予防できないことが近年明らかになり(Tardieu, et. al., Blood, 2005)、病態解明と創薬が必要とされている。

今回患者iPS細胞から産生される好中球の多くが巨大顆粒を保有していることから患者病態の一部が再現できたと考えられる。

現在患者iPS細胞由来の単粒の機能解析やiPS細胞由来の神経細胞の解析を開始している。これらの手法を用いて、本症に対する新たな治療法の確立を目指している。

今後、各種先天性免疫不全症患者のiPS細胞の解析を進めていきたい。

E. 結論

研究は順調に進捗している。今後はT細胞の適切な分化を支持する系なども開発したいと考えている。また、他施設と連携して様々な先天性免疫不全症患者の疾患iPS細胞の樹立及び解析を進めていきたい。

F. 研究危険情報

なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Sakai H, Okafuji I, Nishikomori R, Abe J, Izawa K, Kambe N, Yasumi T, Nakahata T, Heike T: The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation. *Int Immunol.* 24(1):5-15, 2012
2. Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito M.K, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O: Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res* 19(2):143-52, 2012
3. Hiejima E, Komatsu H, Takeda Y, Sogo T, Inui A, Okafuji I, Nishikomori R, Nakahata T, Fujisawa T: Acute liver failure in young children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis without macrophage activation syndrome: Report of two cases. *J Pediatr Child Health* 48(3):E122-5, 2012
4. Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Mutara T,

- Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T: Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency. *Blood* 119(23):5458-66, 2012
5. Tsumura M, Okada S, Sakai H, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Kong X, Abhyankar A, Heike T, Nakahata T, Nishikomori R, Al-Muhsen S, Boisson-Dupuis S, Casanova J, AlZahrani M, Shehri MA, ElGhazali G, Takihara Y, Kobayashi M: Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Human Mutation* 33(9):1377-87, 2012
 6. Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuse J.E, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ozawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito M.K: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood* 120(6):1299-308, 2012
 7. Kawai T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, Izawa K, Murakami T, Okamoto N, Mori Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yatie A, Oomori K, Nakahata T, Heike T: Multiple reversions of an IL2RG mutation restore combined immunodeficiency patient. *J Clin Immunol* 32(4): 690-7, 2012
 8. Morishima T, Nomura A, Saida S, Watanabe K, Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Heike T, Nakahata T, Adachi S: Pediatric idiopathic TTP diagnosed with decreased ADAMTS13 activity. *Pediatr Int* 54(3):422-3, 2012
 9. Nakazawa Y, Saito S, Yanagisawa R, Suzuki T, Toshiro Ito T, Ishida F, Muramatsu H, Matsumoto K, Kato K, Ishida H, Umeda K, Souichi Adachi S, Nakahata T, Koike K: Recipient seropositivity for adenovirus type 11 is highly predictive of the development of hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* (in press)
 10. Saida S, Watanabe K, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang RN, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T: Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood* (in press)
 11. Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein W.K, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H: Modeling

- Alzheimer's disease using iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* (in press)
12. 中畑龍俊：総論 再生医療の進歩（II 再生医療の進歩）。小児科診療（Vol. 75 No. 1）57-63, 2012年1月（特集 最先端医療の進歩—臓器移植・再生医療・遺伝子治療）
 13. 中畑龍俊：白血病治療の進歩と今後の展望。日本小児血液・がん学会雑誌（第49巻1・2号、2012）
 14. 中畑龍俊、丹羽明：幹細胞増幅、第10章 内科疾患と再生医療、カラー版内科学、門脇孝、永井良三（総編集）、p447-450, 2012, 西村書店、東京
 15. 斎藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞、再生医療（Vol. 12 No. 1）、19-32、2013
- 2) 学会発表
1. 中畑龍俊；特別講演：iPS 細胞研究の今、その可能性と将来展望。第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月20-22日（20日）福岡
 2. 井澤和司、土方敦司、西小森隆太、小原収、田中尚子、河合朋樹、八角高裕、斎藤潤、中畑龍俊、平家俊男：次世代シーケンサーによる NLRP3 体制モザイクの診断。第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月20-22日（21日）福岡
 3. 石田宏之、今井耕輔、本間健一、田村真一、今村俊彦、斎藤潤、大嶋宏一、伊藤雅文、中畑龍俊、野々山恵章：白血球減少、骨髓異形成とリンパ浮腫を呈する GATA-2 異常。第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月20-22日（21日）福岡
 4. Yanagimachi M, Niwa A, Tanaka T Oshima K, Saito M Nakahata T: Differentiation of monocytic lineage cells from human iPS cells by using a serum and feeder free culture method. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan
 5. Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Tanaka T, Saida S, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Matsubara K, Adachi S, Nakahata T, Heike T: Induced pluripotent stem cell model of severe congenital neutropenia with HAX1 gene deficiency. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan
 6. Yokoyama K, Ikeya M, Nasu A, Tanaka T, Saito M, Umeda K, Nishikomori R, Nakahata T, Heike T, Toguchida J: Understanding the pathology of the arthropathy in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome by using iPS cells technology. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan
 7. Tanaka T, Saito MK., Takahashi K, Yamanaka S, Nakahata T: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
 8. Niwa, Akira, Saito, Megumu, Oshima, Koich, Yanagimachi, Masakatsu, Tanaka, Takayuki, Kato, Itaru, Nakahata, Tatsutoshi: Human ESC/iPSC-Derived

- mesenchymal stroma can support hematopoietic progenitors. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
9. Manabe A, Kikuchi A, Kojima S, Tsuchida M, Hayashi Y, Koike K, Ohara A, Ishii E, Komada Y, Nakahata T: Long-term follow-up of more than 545 children with myelodysplastic syndrome (MDS) and myeloproliferative neoplasms(MPN). VI International Symposium on Myelodysplastic Syndromes and Bone Marrow Failures in Childhood, Nov 7-9, 2012, Prague
 10. Honda Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Kojima S, Ito M, Kikuchi A, Nakahata T, Manabe A: Clinic characteristics of 23 children with juvenile myelomonocytic leukemia who developed blast crisis: MDS Committee of LSPHO. VI International Symposium on Myelodysplastic Syndromes and Bone Marrow Failures in Childhood, Nov 7-9, 2012, Prague
 11. Hasegawa D, Chen X-j, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaika Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A: Treatment outcome of 67 cases with refractory cytopenia of childhood(RCC): A Propective Registration Through The Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology(JSPHO). VI International Symposium on Myelodysplastic Syndromes and Bone Marrow Failures in Childhood, Nov 7-9, 2012, Prague
 12. 中畑龍俊：iPS 細胞を用いた今後の医療の可能性、第 23 回小児科血液セミナー、2012 年 7 月 19 日
 13. 中畑龍俊;特別講演：小児患者における iPS 細胞の応用、第 49 回日本小児アレルギー学会 2012 年 9 月 15-16 日 (16 日) 大阪
 14. 中畑龍俊;特別講演：iPS 細胞研究の進展、第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 2012 年 11 月 29 日-12 月 2 日 (11/30) 京都
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

X染色体不活化異常により発症したWiskott-Aldrich症候群の女児例

瀧本智仁¹⁾、高田英俊¹⁾、石村匡崇¹⁾、土居岳彦¹⁾、森尾友宏²⁾、原 寿郎¹⁾

1) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学、2) 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学

研究要旨

Wiskott-Aldrich症候群 (WAS) は、X染色体上にcodeされた *WASP* 遺伝子の変異によって通常男児に発症する。近年、常染色体劣性遺伝形式をとるWASP-interacting protein (WIP) 欠損によるWASが報告されたが極めてまれである。今回我々はWAS女児例を明らかにした。患児は超低出生体重児として出生し、生下時より血小板減少が持続した。生後4か月時に内視鏡検査で分類不能型腸炎を確認したことからWASを疑い、WASP欠損を確認した。cDNA解析では、*WASP* 遺伝子にナンセンス変異を認め、正常WASP遺伝子の発現を認めなかった。他方、genome DNAの解析では、heterozygousなWASPナンセンス変異を認めた。WIP遺伝子に異常は認めなかった。Human androgen receptor geneの繰り返し配列多型を利用してX染色体不活化を解析したところ、血液・頬粘膜・爪のいずれにおいても父親由来のX染色体が完全に不活化していた。X染色体不活化異常によって発症した女性WASは本邦初であり、海外の報告を含めても2例目である。正常細胞はWASP欠損細胞と比較して増殖優位性があるため女性にはWASは発症しにくいとされている。患児はX染色体不活化のほぼ完全なskewingにより発症したものと考えられた。

A. 研究目的

Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) は、サイズの減少を伴う血小板減少、湿疹、易感染性を3主徴とし、通常男児に発症するX染色体連鎖性劣性原発性免疫不全症である。責任遺伝子としては、Xp11.22 に局在する Wiskott Aldrich syndrome protein (*WASP*) 遺伝子が以前より知られているが、2012年にWASP-interacting protein (WIP) をコードする *WIPF1* 遺伝子 (2q31.1) の複合ヘテロ接合体変異によって発症したWAS女児例が報告された¹⁾。元来、*WASP* 遺伝子異常によって発症するWASは、正常細胞のWASP欠損細胞に対する増殖優位性の観点から女性に発症する可能性は低いものと考えられ

ていた。しかし、今回我々は *WASP* 遺伝子変異に伴って発症したWASの女児例を経験した。本症例では、血液細胞中のWASPの発現はほぼ完全に欠損しており、女児におけるWAS発症のメカニズムについて検討した。

B. 症例

生後6か月の女児。家族歴に特記事項なし。在胎29週2日、出生体重641g (small for gestational age)、Apgar 6/7点 (1分値/5分値) で出生し、前医NICUへ入院。生下時より血小板数 $1-3 \times 10^4/\mu\text{L}$ の血小板減少を認め、骨髓巨核数も減少していた。TORCH症候群などの感染症は否定的で、血小板輸血、大量免疫グ

ロブリン療法、デキサメサゾン投与などを施行されたが改善はみられなかった。先天性血小板減少症の精査加療目的に生後2か月時に当科に紹介入院した。血小板減少は徐々に増悪を認め(5,000 - 15,000/ μ L)、適宜血小板輸血を施行したが、血小板数によらず血便を認めるようになった。消化管造影検査で腸回転異常症を認め、

修復術を施行したが血便は改善なく、下部消化管内視鏡検査及び病理検査で分類不能型腸炎と診断した。血小板減少と炎症性腸疾患を認めたことから WAS を疑い、フローサイトメトリ法・Western blot 法により末梢血単核球において WASP 欠損を確認したことから同症と診断した (Figure 1)。

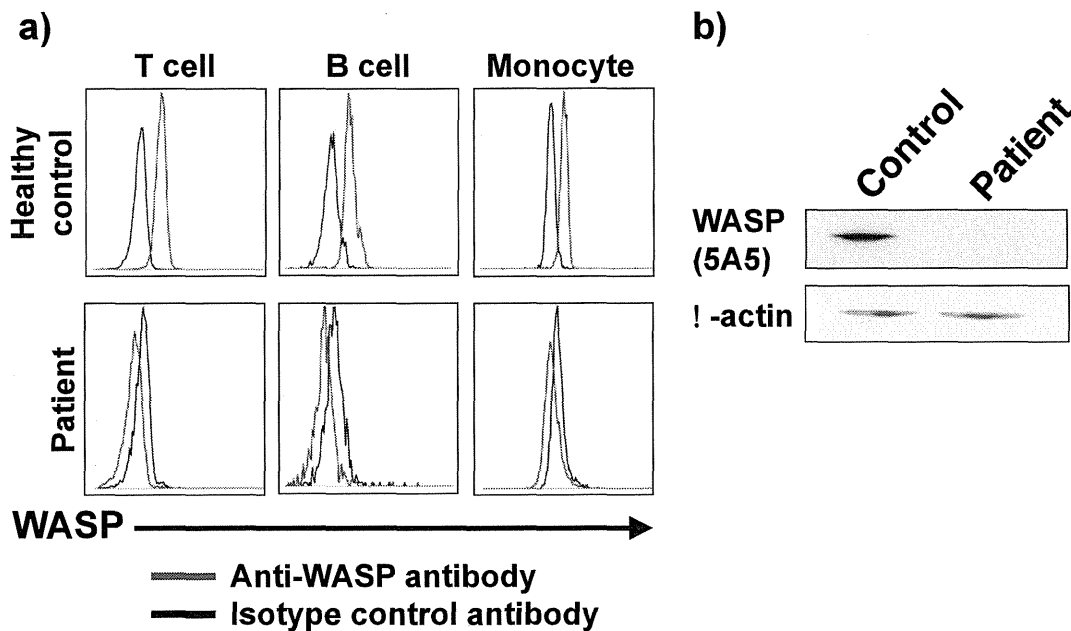


Figure 1. 患者、健常コントロールの末梢血単核球を用いたa) flow cytometry法と b) Western blot法によるWASP発現解析

cDNA 塩基配列解析では、*WIPF1* 遺伝子に変異はなく、*WASP* 遺伝子 exon 10 の 10 塩基欠失によるフレームシフト変異 (c.1276_1285 del_GCCCTGGTG (exon 10); p.Ala426GlyfsX15) を確認した (Figure 2, 3)。父に *WASP* 遺伝子の変異は認めず、母はキャリアであった。また、genomic DNA 塩基配列解析では、患者は *WASP* 遺

伝子に関して、上記異常アリルと父由来の正常アリルのヘテロ接合体であった。WAS の確定診断後、分類不能型腸炎に対してメサラジン、ステロイド投与を開始し寛解を得た (現在、ステロイドは中止)。腸炎の改善後は血小板数は $2-4 \times 10^4 / \mu$ L で安定しており、現在は非血縁者間造血幹細胞移植を検討している。

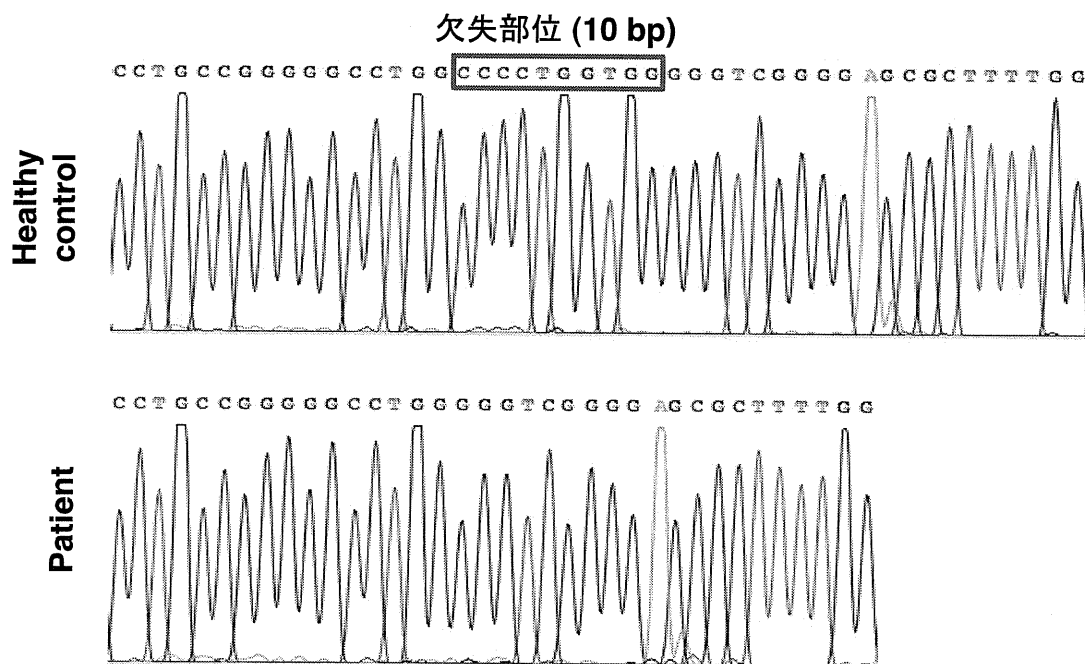


Figure 2. 患者、健常コントロールの末梢血単核球を用いたcDNA sequence解析

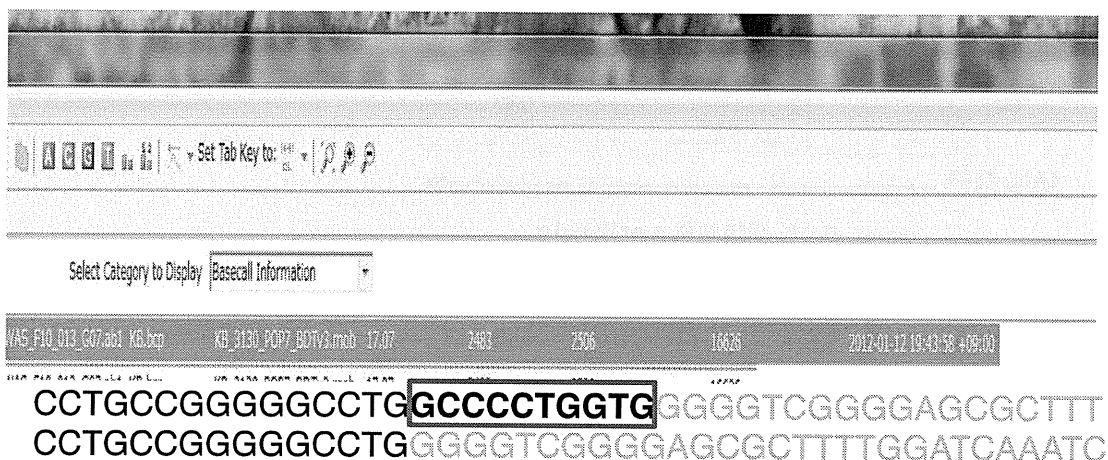


Figure 3. 患者末梢血単核球を用いたgenomic DNA sequence解析

C. 研究結果

患者は、母と同様に変異 *WASP* 遺伝子のヘテロ接合体であったが、母には血小板減少などの *WAS* の所見は認めず、発症したのは患者のみであった。*WASP* 遺伝子のヘテロ変異体を有す母と患者において、後者のみに *WAS* を発症した原因について検証した。伴性劣性遺伝形式をとる *WAS* が女性に発症する原因としては、① 変異 *WASP* 遺

伝子のホモ接合体²⁾、② *WIPF1* 遺伝子のホモ接合体¹⁾、③ 変異 *WASP* 遺伝子のヘテロ接合体における X 染色体の不活性化異常³⁾ の 3 つの病態が挙げられる。前述したように、本症例では *WIPF1* 遺伝子の異常はなく、exon 10 の 10 塩基欠失により生じたフレームシフト変異を有す母由来の変異 *WASP* 遺伝子と父由来の正常 *WASP* 遺

伝子のヘテロ接合体であったことから、WAS を発症したメカニズムとして③が推測された。

X 染色体の不活性化異常は、X 染色体に局在する human androgen receptor (*HUMARA*) 遺伝子上の CAG 繰り返し配列多型を利用して解析した (*HUMARA* clonality assay)。メチル化特異的制限酵素である *Hpa*II により、メチル化されていない *HUMARA* 遺伝子は切断され、PCR による増幅が不可能となる (Figure 4a)。一般に、女性は X 染色体がランダムに不活性化されていることから 2 種類の大きさの PCR 産物を検出するが、X

染色体の不活性化に偏りが生じると片親に由来する PCR 産物のバンドが強く検出され、この信号強度の差異により X 染色体の不活性化パターンを判別することが可能となる。本症例においては *WASP* の発現は蛋白レベルではほぼ欠損しており、同所見を支持するように患者末梢血を用いた *HUMARA* clonality assay では、父由来の *HUMARA* 遺伝子領域のみが PCR により増幅した (Figure 4b)。

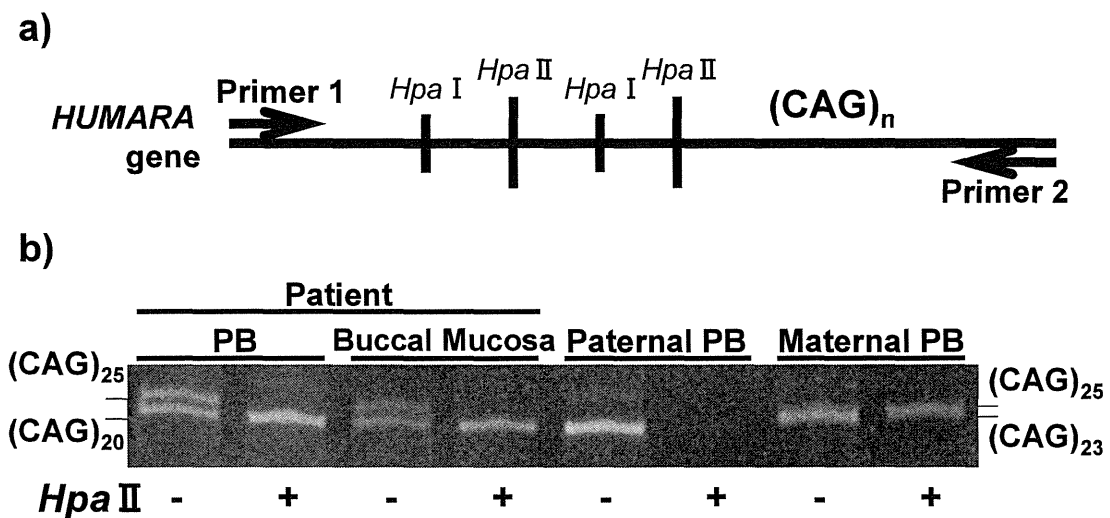


Figure 4. *HUMARA* 遺伝子を用いた X 染色体不活性化パターンの解析

同結果は、頬粘膜や爪より抽出した genomic DNA においても観察された。更に、患者末梢血や頬粘膜細胞を用いた *HUMARA* 遺伝子の genomic DNA 塩基配列解析では、*Hpa*II 処理後に検出可能であった塩基配列は父由来の染色体のみであった。以上のことから、本患者においては生殖細胞レベルで極めて高度な X 染色体不活性化の偏りが生じていることを明らかとなった。この結果、父由来の正常 *WASP* 遺伝子の発現がほぼ完全に欠損した為、変異 *WASP* 遺伝子のヘテロ接合体であるにもかかわらず WAS を発症したと考えられた。

D. 結論、考察

変異 *WASP* 遺伝子のヘテロ接合にも関わらず WAS を発症した女兒例を経験した。本症例においては、何らかの原因により生殖細胞レベルで生じた X 染色体の不活性化異常が原因となり、WAS を発症したと考えられた。現在までに WAS の女兒例は 3 例報告されており、X 染色体の不活性化異常に伴い発症した症例は 1 例³⁾のみであった。加齢や発がんに関連して X 染色体の不活性化パターンに偏りが生じることは以前より知られているが⁴⁾、本症例のように生下時より

極めて高度な偏りが生じることは稀である。X染色体の不活性化は胎生初期に無作為に決定される現象であり、本症例のように生殖細胞レベルで生じたと考えられるX染色体不活性化の異常においては、WASとは独立した何らかの遺伝的要因が背景に存在するものと推測される。今までに、血友病⁵⁾やX連鎖性無 γ グロブリン血症⁶⁾などの伴性劣性遺伝性疾患でも、X染色体不活性化の異常により女性キャリアに発症した報告は複数みられ、血友病Aが複数の同胞女性キャリアに発症した家族例⁷⁾のようにX染色体不活性化に関与する遺伝的異常を示唆する報告も散見される。これら症例の多くは未だ原因が明らかとなっていないが、X染色体不活性化に関与するX-inactive specific transcript (*XIST*) 遺伝子のプロモーター領域の変異によってX染色体の不活性化に偏りが生じ、女性キャリアに発症したの家族例も報告⁸⁾されており、X染色体不活性化のメカニズムや疾患との関連性が徐々に明らかとなりつつある。本症例でみられたX染色体の不活性化異常の原因を明らかにすることは、家族診断や遺伝相談などの臨床的側面とX染色体の不活性化メカニズムの解明という基礎的側面の双方において重要な情報をもたらすと考える。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

G. 研究発表

1. Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama

S, Hara T: Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 77: 628-634, 2012

2. Obinata K, Lee T, Niizuma T, Kinoshita K, Shimizu T, Hoshina T, Sasaki Y, Hara T: Two cases of partial dominant interferon- γ receptor 1 deficiency that presented with different clinical courses of bacille Calmette-Guérin multiple osteomyelitis. *J Infect Chemother.* (in press)
3. Kusuhara K, Hoshina T, Saito M, Ishimura M, Inoue H, Horiuchi T, Sato T, Hara T: Successful treatment of a patient with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome using a half-dose of etanercept. *Pediatr Int.* 54: 552-555, 2012
4. Hoshina T, Kusuhara K, Saito M, Mizuno Y, Hara T: NKRP1A+ $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cells are preferentially induced in patients with Salmonella infection. *Hum Immunol.* 73: 623-628, 2012
5. Yamamura K, Ihara K, Ikeda K, Nagata H, Mizuno Y, Hara T: Histo-blood group gene polymorphisms as potential genetic modifiers of the development of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease. *Int J Immunogenet.* 39(2): 119-125, 2012
6. Onoyama S, Ihara K, Yamaguchi Y, Ikeda K, Yamaguchi K, Yamamura K, Hoshina T, Mizuno Y, Hara T: Genetic susceptibility to Kawasaki disease: analysis of pattern recognition receptor genes. *Hum Immunol.* 73: 654-660, 2012

7. Yamamura K, Joo K, Ohga S, Nagata H, Ikeda K, Muneuchi J, Watanabe M, Hara T: Thrombocytosis in asplenia syndrome with congenital heart disease: a previously unrecognized risk factor for thromboembolism. *Int J Cardiol.* 2012 (in press)
8. Shiraishi A, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Takimoto T, Takada H, Miyamoto T, Abe Y, Hara T: Treatment choice of immunotherapy or further chemotherapy for Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 59: 265-270, 2012
9. Imagawa T, Takei S, Umebayashi H, Yamaguchi K, Itoh Y, Kawai T, Iwata N, Murata T, Okafuji I, Miyoshi M, Onoe Y, Kawano Y, Kinjo N, Mori M, Mozaffarian N, Kupper H, Santra S, Patel G, Kawai S, Yokota S: Efficacy, pharmacokinetics, and safety of adalimumab in pediatric patients with juvenile idiopathic arthritis in Japan. *Clin Rheumatol.* 31: 1713-1721, 2012
10. Yokota S, Nishikomori R, Takada H, Kikuchi M, Nozawa T, Kanetaka T, Kizawa T, Miyamae T, Mori M, Heike T, Hara T, Imagawa T: Guidance on the use of canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome in Japan. *Mod Rheumatol.* (in press)
11. Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusuhara K, Hara T: Differential transmission and postnatal outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Development Pathol.* 15: 151-155, 2012
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
なし
- 参考文献
- 1) Lanzi G, Moratto D, Vairo D, Masneri S, Delmonte O, Paganini T, Parolini S, Tabellini G, Mazza C, Savoldi G, Montin D, Martino S, Tovo P, Pessach IM, Massaad MJ, Ramesh N, Porta F, Plebani A, Notarangelo LD, Geha RS, Giliani S. A novel primary human immunodeficiency due to deficiency in the WASP-interacting protein WIP. *J Exp Med* 209(1):29-34, 2012
 - 2) Proust A, Guillet B, Pellier I, Rachieru P, Hoarau C, Claeysens S, Léonard C, Charrier S, Vainchenker W, Tchernia G, Delaunay J. Recurrent V75M mutation within the Wiskott-Aldrich syndrome protein: description of a homozygous female patient. *Eur J Haematol* 75(1):54-9, 2005
 - 3) Parolini O, Rasmann G, Haas OA, Pawlowsky J, Gadner H, Knapp W, Holter W. X-linked Wiskott-Aldrich syndrome in a girl. *N Engl J Med.* 29;338(5):291-5, 1998
 - 4) Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y, et al. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood* 88:59-65, 1996
 - 5) Ørstavik KH, Ørstavik RE, Schwartz M. Skewed X chromosome inactivation in a female with haemophilia B and in her

non-carrier daughter: a genetic influence on X chromosome inactivation? *J Med Genet* 36:865-6, 1999

6) Takada H, Kanegane H, Nomura A, Yamamoto K, Ihara K, Takahashi Y, Tsukada S, Miyawaki T, Hara T. Female agammaglobulinemia due to the Bruton tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X-chromosome inactivation. *Blood*. 103(1):185-7, 2004

7) Biccocchi MP, Migeon BR, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Boeri E, et al. Familial nonrandom inactivation linked to the X inactivation centre in heterozygotes manifesting haemophilia A. *Eur J Hum Genet* 13:635-40, 2005

8) Plenge RM, Hendrich BD, Schwartz C, Arena JF, Naumova A, Sapienza C, et al. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X chromosome inactivation. *Nat Genet* 17:353-6, 1997

機能獲得型の *de novo* 新奇変異を *STAT1* の DNA-binding domain に認めた慢性皮膚粘膜カンジダ症の病態解析

竹崎俊一郎¹⁾、山田雅文¹⁾、加藤政彦²⁾、朴 明子³⁾、丸山健一⁴⁾、山崎康博¹⁾、千田奈津子⁵⁾、
小原 収⁶⁾、小林一郎¹⁾、有賀 正¹⁾

- 1) 北海道大学大学院医学研究科小児科学
- 2) 群馬県立小児医療センターアレルギー感染免疫呼吸器科
- 3) 群馬県立小児医療センター血液腫瘍科
- 4) 群馬県立小児医療センター腎臓内科
- 5) 北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座小児障害者歯科学
- 6) 公益財団法人かずさDNA研究所

研究趣旨

慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMC) は、皮膚粘膜に難治性のカンジダ感染症を特徴とする一群の原発性免疫不全症であり、近年その原因が徐々に解明されてきている。その中でも、2011年に報告された *STAT1* の coiled-coil domain (CCD) に限局した機能獲得型変異が CMC の原因の多くを占めると考えられる。我々は血縁関係のない CMC 2 患者において、今までに報告のない *STAT1* DNA-binding domain (DBD) にヘテロの新規ミスセンス変異 T385M を検出した。そして、この 2 例は CCD 変異例と同様に、脱リン酸化障害による機能獲得と、Th17 分化障害を有していることを明らかにした。*STAT1* DBD の G384 を含むポケット領域と CCD が結合し構造変化することが *STAT1* の脱リン酸化に重要であることが示唆されており、T385 もこの構造変化に重要であることが示唆される。*STAT1* 機能獲得が Th17 分化障害を来す詳細なメカニズムは不明だが、*STAT1* を介する IFN- α , IFN- γ , IL27 シグナルの増強が関連している可能性が考えられる。

A. 研究目的

【背景と目的】慢性皮膚粘膜カンジダ症 (chronic mucocutaneous candidiasis; CMC) は皮膚・粘膜に反復性のカンジダ感染症を呈する一群の原発性免疫不全症である¹⁾。CMC は遺伝形式が単一でないことから複数の原因によって構成されている疾患と考えられてきたが、CMC の原因と病態についてはほとんど解明されていなかった。最近 Th17 細胞や自然免疫系のパターン認識レセプターの発見を契機に、皮膚粘膜の真菌感染防御機構が飛躍的に解明されてきた。さらに網羅的な遺伝子解析方法の開発も加わり、CMC の原因と病態が徐々に明らかになってきた。2011年、常染色体優性遺伝形式をとる CMC

や孤発例の CMC が coiled-coil domain (CCD) に限局した機能獲得型 *STAT1* 変異によることが報告され^{2) 3)}、現在ではこれが CMC 全体の 70-80%程度を占めると考えられている⁴⁾。今回我々は CMC の責任遺伝子が特定されていない 3 患者の解析を行い、責任遺伝子の特定とその発症メカニズムを解明することを目的とした。

B. 研究方法

【対象】それぞれ血縁のない別家系の 3 患者を対象とした。(患者 1) 12 歳男性。2 歳時に反復性の鷲口浴瘡を認め、CMC と診断された。3 歳時より肺炎球菌による反復性の肺炎・中耳炎を発症し、5 歳時に

気管支拡張症を認めた。(患者2) 14歳男性。6歳頃より反復性の驚口瘡を認めCMCと診断された。7歳時に気管支拡張症、肺炎球菌による反復性の肺炎を認めた。13歳時より血球貪食性リンパ組織球症、Evans症候群を発症した。14歳時に血球貪食性リンパ組織球症を再度発症し、さらに原因不明の肺高血圧症によって死亡した。(患者3) 15歳女性。出生1か月時に重度の臀部の皮膚カンジダ症、食道カンジダ症を認め、CMCと診断された。反復性の細菌感染症や気管支拡張症は発症していない。父も出生後よりCMCを発症し、20歳過ぎよりI型糖尿病・分類不能型免疫不全症・耐性ブドウ球菌による膿胸を発症した。31歳時に脳血管炎による脳梗塞で死亡した。患者2は解析を始めて間もなく死亡したため遺伝子解析のみ可能であった。

【方法】CMCの既知の責任遺伝子(*AIRE*, *CARD9*, *CD25*, *Dectin-1*, *IL17F*, *IL17RA*, *STAT1*)のダイレクトシーケンス解析を行った。*CARD9*に1塩基置換を認めた患者1については、家族のシーケンス解析とDectin1-CARD9シグナル系を介したIL6産生をELISAで確認した。*STAT1*に未報告のヘテロの1塩基置換を認めた患者1、2については、同部位のクローニングによる確認、患者家族と健常者108名の解析を行った。*STAT1*の機能をみるために、IFN・刺激による単球由来マクロファージ、不死化B細胞株(EBV-LCL)のIP10産生をCytometric Bead Arrayで測定した。*STAT1*のリン酸化状態の解析はEBV-LCLをIFN- γ 、IFN- α 、IL27のいずれかで刺激した後、核内蛋白を抽出してSDS-PAGEで展開し、リン酸化STAT1特異抗体でウエスタンブロット解析を行った。*STAT1*の過剰リン酸化のメカニズムを特定するために、リン酸化を阻害するプロテインキナーゼ阻害剤(staurosporine)と脱リン酸化を阻害するフォスファターゼ阻害剤(pervanadate)を用いてウエスタンブロット解析を行った。Th17、Th1分画については、末梢血単核球をPMA、ionomycinで刺激した後に、CD4⁺IL17A⁺細胞、CD4⁺IFN- γ ⁺細胞をflow cytometryで評価した。

C. 研究結果

ダイレクトシーケンス解析では患者1の*CARD9*に未報告のヘテロの1塩基置換を認めた。*CARD9*欠損症は常染色体劣性遺伝であること、健常である患者1の父に同一の塩基置換を認めること、また患者1のDectin1-CARD9シグナル系を介したIL6産生は正常であることから疾患関連性は否定された(図1)。

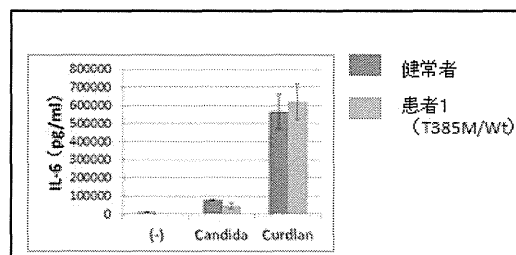


図1 健常者と患者1のDectin-CARD9 signaling pathwayを介したIL6産生の解析。

さらに患者1、2の*STAT1*のDNA-Binding domain (DBD)にヘテロの1塩基置換を認めた(c.1153C>T, p.T385M)(図2)。

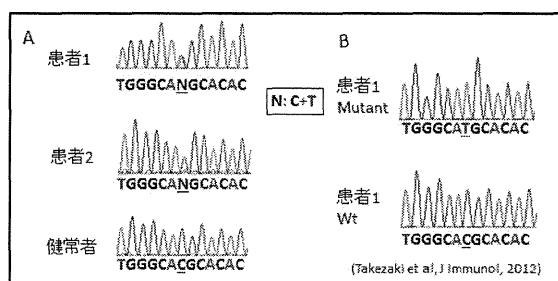


図2 患者1、2でみられた*STAT1* T385Mのダイレクトシーケンス解析。

(A)患者1、2、健常者の*STAT1* exon14のダイレクトシーケンス解析結果。

(B)患者1の*STAT1* exon14のPCR産物のTAクローニングのシーケンス解析結果。

患者1の家族や健常者108人には同一の塩基置換は確認されず、T385Mは*de novo*変異であることが示された。またT385は種を超えて保存されており(図3)、健常者108名には同一の変異は認めなかった。

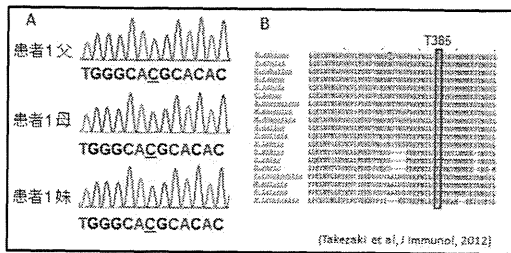


図3 患者1の家族における *STAT1* exon14 のダイレクトシーケンス解析結果(A)と様々な生物種でみた *STAT1* T385 アミノ酸保存性の解析(B)。

以上より T385M が *de novo* の新規ミスセンス変異であることが強く示唆された。一方患者3では *STAT1* に既報の機能獲得型ミスセンス変異 (c. 821G>A, p. R274Q) を CCD に認めた。

次に T385M 変異の機能解析を行った。IFN・刺激による患者・健常者由来の単球由来マクロファージ、EBV-LCL の IP10 産生は、患者1と患者3では健常者に比べてともに亢進しており、*STAT1* の機能が亢進していることが示唆された (図4)。

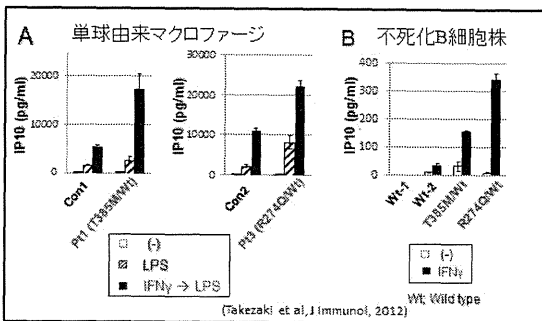


図4 IFN・刺激による単球由来マクロファージ(A), EBV-LCL (B)の *STAT1* を介した IP10 産生。

また *STAT1* のリン酸化は、IFN- γ 、IFN- α 、IL27 いずれの刺激でも患者1、3ともに亢進していることが確認された (図5)。

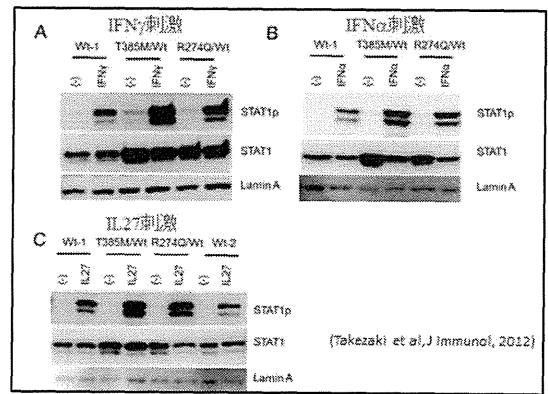


図5 核内 *STAT1* のリン酸化状態の解析。健常者(Wt), T385M, R274Q患者由来のEBV-LCLに(A) IFN- γ , (B) IFN- α , (C) IL27で30分間刺激し、核内蛋白を抽出した。LaminAはローディングコントロールとして用いた。

リン酸化亢進の原因は脱リン酸化障害とリン酸化の亢進が考えられる。そこで staurosporine, pervanadate 処理した検体を用いたウエスタンブロット解析によって、リン酸化亢進の原因が脱リン酸化障害であることが明らかになった (図6)。

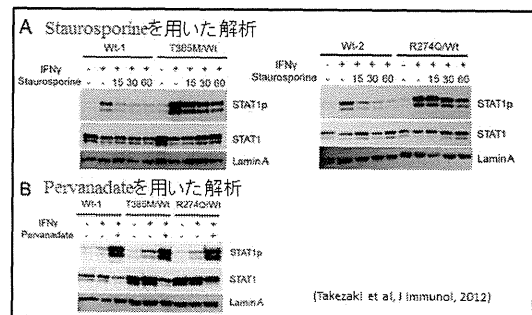


図6 staurosporine, pervanadate 処理による *STAT1* のリン酸化状態の解析。

(A) IFN- γ で刺激後 staurosporine を添加し、リン酸化を中断した。staurosporine 添加直前、添加後15、30、60分後のリン酸化状態を追跡した。

(B) 脱リン酸化を阻害するために pervanadate を添加した後に、IFN- γ で刺激した。

STAT1 機能獲得型変異を有する CMC 患者では Th17 細胞が減少していると報告されている。患者1、3の Th1 細胞は健常者と有意差が認められなかった (p=0.76) のに対し、Th17 細胞は健常者に比べ有意

に減少していた ($p=0.039$)。患者 3 (0.7%) に比べ患者 1 (0.2%) の方がより Th17 細胞が減少していた (図 7)。

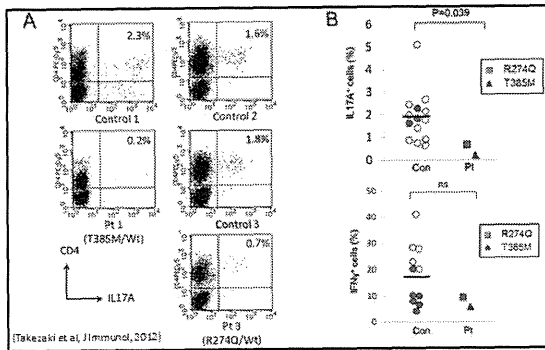


図 7 IL17A, IFN- γ 産生細胞の flow cytometry を用いた解析。

(A) Flow cytometry を用いた Th17 細胞の同定。枠内の%は CD4⁺細胞数に対する Th17 細胞数の比率。健康者と CMC 2 患者 (T385M/Wt, R274Q/Wt) を対象とした。

(B) 健康者 14 名と CMC 2 患者 (T385M/Wt, R274Q/Wt) の CD4 陽性細胞数に対する Th17 細胞数の比率の比較 (上)、健康者 11 名と CMC 2 患者の CD4 陽性細胞数に対する Th1 細胞数の比率の比較 (下)。横線は健康者の割合の平均値を示している。有意差検定は Mann-whitney の U test を用いた。

D. 考察

今回、本研究で新たに検出した STAT1 DBD の T385M 変異は、既報の STAT1 CCD の R274Q 変異と同様に STAT1 の脱リン酸化障害によって機能獲得をきたすことが示された。DNA との結合に重要な DNA binding domain 変異がなぜ coiled coil domain 変異と同様に脱リン酸化障害をきたすのかについては、Chen⁵⁾ や Mao⁶⁾ らが立体構造解析を用いて、CCD と DBD の T385 を含む特定のアミノ酸が結合することによって parallel から anti-parallel 構造へ変化し、脱リン酸化がおきやすくなると推測している。実際 Mertens⁷⁾ らは DBD の G384 に変異を作成した解析によって、STAT1 の脱リン酸化障害を生じたと報告している (図 8)。

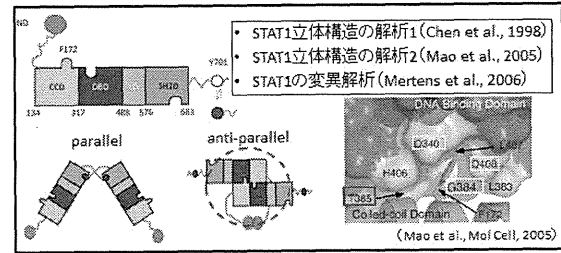


図 8 STAT1 の脱リン酸化における構造変化のモデル。Mertens らは四角で囲った塩基のうち G340, G384, Q408 に変異を作成して脱リン酸化障害を証明した。

新規変異 T385M を有する STAT1 は、G384 の場合と同様に anti-parallel 構造がとれないために脱リン酸化障害を生じる可能性を考えた。

また過剰な STAT1 のリン酸化によってなぜ Th17 分化が障害されるかについては、IFN- γ 、IFN- α 、IL27 は STAT1 を介して Th17 分化を抑制することが報告されており^{5), 8)~13)}、STAT1 の機能獲得によって、Th17 分化が障害される可能性が考えられる。しかし、Th17 分化障害を来す詳細なメカニズムは不明である。

E. 結論

今まで機能獲得型変異として未報告であった STAT1 の DBD に世界で初めて新規のミスセンス変異を特定し、CCD の変異と同様に STAT1 の脱リン酸化障害による機能獲得をきたすことを明らかにした。患者の治療方針決定のためにも、CMC のさらなる病態の解明が必要である。

なお本内容は参考文献¹⁴⁾に報告した。

参考文献

- 1) Kirkpatrick, C.H. (1994). Chronic mucocutaneous candidiasis. *J Am Acad Dermatol*. 31: S14-17.
- 2) Liu, L., Okada, S., Kong, X.F., Kreins, A.Y., Cypowyj, S., Abhyankar, A., Toubiana, J., Itan, Y., Audry, M., Nitschke, P., et al. (2011). Gain-of-function human STAT1 mutations

- impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med.* 208: 1635-1648.
- 3) van de Veerdonk, F.L., Plantinga, T.S., Hoischen, A., Smeekens, S.P., Joosten, L.A., Gilissen, C., Arts, P., Rosentul, D.C., Carmichael, A.J., Smits-van der Graaf, C.A., et al. (2011). STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med.* 365: 54-61.
- 4) Lilic, D. (2012). Unravelling fungal immunity through primary immune deficiencies. *Curr Opin Microbiol.* 15: 420-426.
- 5) Chen, M., Chen, G., Nie, H., Zhang, X., Niu, X., Zang, Y.C., Skinner, S.M., Zhang, J.Z., Killian, J.M., Hong, J. (2009). Regulatory effects of IFN-beta on production of osteopontin and IL-17 by CD4+ T Cells in MS. *Eur J Immunol.* 39: 2525-36.
- 6) Mao, X., Ren, Z., Parker, G.N., Sondermann, H., Pastorello, M.A., Wang, W., McMurray, J.S., Demeler, B., Darnell, J.E. Jr., Chen, X. (2005). Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol Cell.* 18: 761-71.
- 7) Mertens, C., Zhong, M., Krishnaraj, R., Zou, W., Chen, X., Darnell, J.E. Jr. (2006). Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev.* 20: 3372-3381.
- 8) Feng, G., Gao, W., Strom, T.B., Oukka, M., Francis, R.S., Wood, K.J., Bushell, A. (2008). Exogenous IFN-gamma ex vivo shapes the alloreactive T-cell repertoire by inhibition of Th17 responses and generation of functional Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 38: 2512-27.
- 9) Villarino, A.V., Gallo, E., Abbas, A.K. (2010). STAT1-activating cytokines limit Th17 responses through both T-bet-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 185: 6461-6471.
- 10) Ramgolam, V.S., Sha, Y., Jin, J., Zhang, X., Markovic-Plese, S. (2009). IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation. *J Immunol.* 183: 5418-5427.
- 11) Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N.M., Danilenko, D.M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F.J., Ghilardi, N. (2006). Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol.* 7: 929-36.
- 12) Yoshimura, T., Takeda, A., Hamano, S., Miyazaki, Y., Kinjyo, I., Ishibashi, T., Yoshimura, A., Yoshida, H. (2006). Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol.* 177: 5377-85.
- 13) Diveu, C., McGeachy, M.J., Boniface, K., Stumhofer, J.S., Sathe, M., Joyce-Shaikh, B., Chen, Y., Tato, C.M., McClanahan, T.K., de Waal Malefyt, R., et al. (2009). IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol.* 182: 5748-5756.
- 14) Takezaki, S., Yamada, M., Kato, M., Park, M.J., Maruyama, K., Yamazaki, Y., Chida, N., Ohara, O., Kobayashi, I., Ariga, T. (2012). Chronic mucocutaneous candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the STAT1 DNA-binding domain. *J Immunol.* 189: 1521-1526.

原発性免疫不全症の病態解析

森尾友宏、満生紀子、高木正稔、水谷修紀

東京医科歯科大学大学院発生発達病態学

研究要旨

原発性免疫不全症における診断手順を確立するために、「10 color 表面抗原分析による免疫担当細胞亜群解析、B/T 細胞新生能→遺伝子解析」の解析手順を作成し、実践した。これらの検索の中で原因が未知のもので、かつ特有の症状やデータを呈するものについては、全エクソン解析によってその原因を探索した。その結果いくつかの relatively common immunodeficiency が rare phenotype を示す形で、原因が明らかになった。BTK の好中球機能に関する検証については、会合分子である MAL の人為的操作からその priming への影響を探索した。

A. 研究目的

- 1) 原発性免疫不全症候群調査研究班が主体となるコンサルテーションシステムから紹介をうけた、重症複合型免疫不全症、抗体産生不全を主体とする免疫不全症、Wiskott-Aldrich 症候群などの免疫不全症における適切な診断・機能解析系を確立する。
- 2) 体系的責任遺伝子探索から原発性免疫不全症の責任遺伝子を明らかにし、病態解析を行う。
- 3) BTK 異常症などにおける好中球機能解析を元に、好中球活性化の鍵となる分子についてその刺激後動態を解析し、好中球過剰活性化制御方法を模索する。

B. 研究方法

- 1) PIDJ ネットワークを通じて相談のあった患者について、スクリーニングとして以下の検討を行った。

A: 多色フローサイトメータ解析

基本データ: B, T (TCR $\alpha\beta/\gamma\delta$), CD4/CD8, NK サブセット

T 細胞: naïve, memory (central memory, effector memory), double negative T, Treg, Th1, Th2, Th17, NKT

B 細胞: transitional B (T1, T2, T3), naïve

B, IgM memory, switched memory (IgG+ memory B, IgA+ memory B), plasmablasts, plasma cells
DC: pDC, mDC, activated mDC

B: B 細胞・T 細胞新生能 (sjKRECs, cjKRECs, sjTRECs)

C: 遺伝子解析 (かずさ DNA 研究所)

- 2) 分類不能型免疫不全症を中心とした抗体産生不全症における責任遺伝子探索。

特徴的な表現型あるいはデータを示す症例を中心に、HiSeq2000 を用いた全エクソン解析を行い、non-synonymous mutation の pick up から SNP の除外、Sanger 法による確認などを経て、homozygous mutation 及び compound heterozytocity を示す mutation を中心に探索を行った (RCAI 竹森利忠先生、かずさ DNA 研究所小原収先生との共同研究)。

- 3) X 連鎖無 γ グロブリン血症 (X-linked agammaglobulinemia: XLA) 患者の好中球での ROS 産生亢進、アポトーシス異常を明らかにした後、BTK と会合する MAL を中心として、その局在を制御して、priming への影響を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者検体を用いて解析を行う。実際には診療に役立つ情報が得られるが、採取量及び、採取時の苦痛には十分な配慮を行う。

また遺伝子解析については各種指針に則り、患者個人情報の保護について十分な配慮を行う。本研究は医学部倫理審査委員会の承認をえて行われたものである。

C. 研究結果

1) PIDJ を通じた免疫不全症患者コンサルテーション

PIDJ website を通じてコンサルテーションを受けた約 100 名の免疫不全症患者 (XLA, SCID, WAS, DGS, CVID, CMCD, HIE など) において、10 parameter FACS, KRECs, TRECs を行い、さらに候補遺伝子解析を実施した。通常の B, T 欠損/減少に加え、CD31+CD45RA+CD4+ recent thymic emigrant の評価により T 細胞性免疫不全症を、V α 24+V β 11+CD3+ NKT 細胞の評価により XLP などを、pDC/mDC などにより樹状細胞欠損症を、switched memory B, plasmablast の減少や transitional B の増加などにより分類不能型免疫不全症を鑑別として層別化した。さらに KRECs, TRECs 解析により複合型免疫不全症、B 細胞減少を主体とする免疫不全症、T 細胞新生能低下を呈する免疫不全症などの区別を行った。これらから探索遺伝子候補を策定し、かずさ DNA 研究所にて遺伝子解析を行った。

2) 分類不能型免疫不全症の責任遺伝子探索

かずさ DNA 研究所との共同研究の中で、32 名の抗体産生不全を主体とする免疫不全症患者において全エクソン解析を行った。特徴的所見のあるものに加え、家族歴のあるもの、KRECs/TRECs から KRECs 低値 TRECs 正常、あるいは KRECs/TRECs 正常例などを切り口として、解析症例を選定した。coding region, splicing site における non-synonymous mutation に焦点を絞り、dbSNP135 を用いたフィルター後候補遺伝子をピックアップし、さらにサンガー法にて塩基配列を確認した。既知の責任遺伝子変異により稀な表現型 (CVID) を呈したのものとしては、

FANCA の homozygous mutation、STAT1 の gain of function mutation (慢性皮膚粘膜カンジダ症における異常)、BTK 変異などが明らかになった。未知の責任遺伝子については家族およびその他の CVID 患者において遺伝子解析を行い、さらに絞り込みを進めている。また一部の患者ではさらなる機能解析や器官特異的機能異常探索のために、iPS 細胞の作製に着手しはじめた (医科学研究所大津真博士との共同研究)。

3) BTK 欠損症における好中球減少症の病態解明

前年度に引き続き BTK 欠損症では、MAL の膜移行が好中球を priming 状態とし、易被刺激性を獲得して、過剰な ROS 産生と軽微な刺激でのアポトーシスを誘導することを生化学的に明らかにした。さらに野生型 MAL、膜移行型 MAL、膜停滞型 MAL に protein transduction domain を結合させた組換えタンパクを作成し、好中球に導入することにより、MAL による活性化制御について探索を進めた。

D. 考察

免疫不全症患者の適切な診断に向けての基礎的パラメータ取得の基盤を整えることができた。10 color 解析により Th1, Th2, Th17 や、IgM memory や IgG+/IgA+ memory などの詳細な B 細胞サブセットの情報が得られるが、それをどのように診断や病態解析に生かしていくかは今後の課題である。いずれにせよ既知遺伝子検査による診断率は 30%前後にとどまっており、分類不能型免疫不全症で特に低い。この問題に対して全エクソン解析による候補遺伝子探索を実施したが、既知遺伝子の稀な表現型がいくつかピックアップされた。常染色体劣性遺伝を想定した解析を行ってきたが、今後は両親や同胞の検体を解析することにより、さらにその精度を上げると共に、常染色体優性遺伝あるいは孤発例を捕まえる戦略も必要になるとと思われる。

KRECs, TRECs に関しては移植後のフォローア