

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 細胞研究所臨床応用研究部門疾患再現研究分野

研究要旨

先天性免疫不全症の病因解明、病態解析のため、疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析系の構築に取り組んでいる。本年度は、血球分化系の改善として、従来より開発している二次元の無血清、フィーダー細胞を用いない血球分化法を拡張し、新たなスキュフォールドを用いた 3 次元培養法を確立した。PET 線維で補強したコラーゲンスポンジを基材として用いることにより、従来の血球系より長期間の培養が可能になり、またニッシュ細胞を 3 次元構築することが可能になった。この系で単球系細胞や顆粒球系細胞の大量培養が可能になると期待される。また、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。このうち、*LYST* 変異を持つ Chediak-東症候群（以下 CHS）2 例より iPS 細胞を樹立し、好中球へ分化させたところ、好中球が持つ顆粒は対照に比べ有意に大きく、病態再現を行えたと考えた。CHS ではまた、現在好中球への分化特性の解析を行っている。*AK2* 変異を持つ細網異形成症患者 2 例より iPS 細胞を樹立して解析を行ったところ、好中球の成熟障害と T 細胞分化不全を認め、血球分化不全の再現に成功した。

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死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。

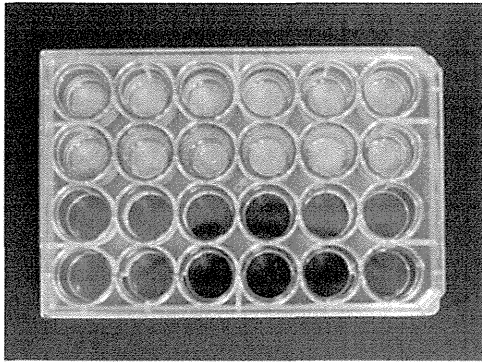
B.研究方法

①血球分化系開発

ヒト ES/iPS 細胞コロニーをコラーゲナーゼで解離し、非接着培養用に処理した培養皿で浮遊培養を行う。基礎培地としては主に臍帯血の *ex vivo* 増幅に用いられる無血清培地を用いる。サイトカインは主に ES/iPS 細胞の中胚葉分化に VEGF、造血分化に SCF, TPO, FL, IL3, EPO を使い、それらの濃度と投与期間を変えて検討した。3 次元スキュフォールドとして、PET 繊維補強コラーゲンスポンジ (PETcol-24W) を MedGEL CO., LTD から購入して使用した。

②疾患特異的 iPS 細胞の解析

前年度までに樹立した細網異形成症患者 2 例より樹立した iPS 細胞株及び CHS 患者 2 例より樹立した iPS 細胞株を血球分化させ、各種検討を行った。なお、血球前駆細胞および成熟骨髓球系細胞への分化については我々の血球分化系を、T 細胞への分化については OP9-DL1 系を用いた。



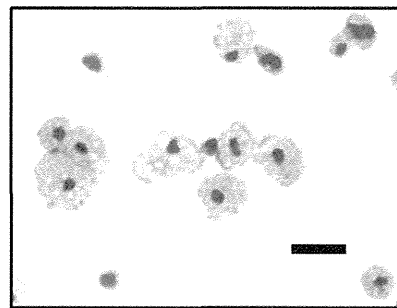
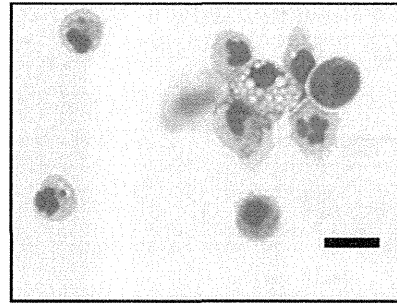
24穴プレートで培養中のCS

尚、iPS 細胞に関する本研究における患児の遺伝子情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”及び文部科学省研究振興局長通知に定める細則に沿って、京都大学医の倫理委員会の審査承認を受けている（実施責任者：中畑龍俊、当初承認日：平成 20 年 6 月 4 日、変更・追加承認日：平成 24 年 7 月 19 日）が、人権及び利益の保護について、十分配慮しながら実験を行った。患者からの疾患関連 iPS 細胞作製にあたり、「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作製とそれをを用いた疾患解析に関する研究」について、京都大学医の倫理委員会の承認を頂いている（実施責任者：中畑龍俊、当初承認日：平成 20 年 6 月 4 日、変更・追加承認日：平成 24 年 7 月 19 日）。

C.研究結果

①血球分化系開発

最初に、我々が以前に開発した二次元・マトリゲル上の血球分化系（以下 2D-MG 系）を応用して、CS 上の血球分化を行えるかを検討した。すると、従来の方法と同様に、Day 6 の flow cytometry では、KDR+CD34+の中胚葉系の血球前駆細胞と考えられる分画が生じていた。その割合は、クローン毎に様々であったが、2D-MG 法と同程度であった。



好中球様細胞(上)と 単球様細胞(下)

次に、上述の造血前駆細胞分画から各種血球細胞を得るために幾つかのサイトカインの組み合わせを用いて血球分化を行った。概ね day 20 頃からスポンジから浮遊細胞の出現が顕著になり、well の底に溜まっていく。これらの細胞は、スポンジを取り出して残りの培養上清を遠心することにより簡単かつ繰り返し回収することができる。得られた血球細胞の細胞表面マーカーと形態を観察すると、サイトカインカクテルの組み合わせにより、好中球系細胞、単球系細胞あるいは赤芽球系細胞を作り分けることが可能であった。

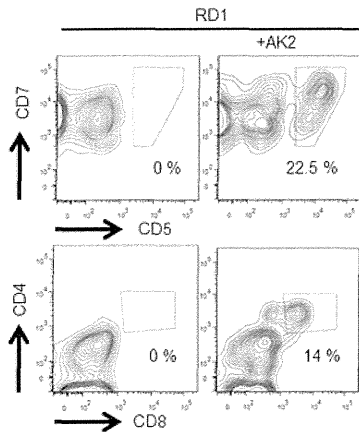
②疾患特異的 iPS 細胞の解析

細網異形成症患者由来 iPS 細胞の機能解析

昨年度までに樹立した細網異形成症患者由来の iPSC とその AK2 補充クローンについて、徳島大学の野間隆文先生のご協力を頂き、AK2 活性を測定した。

AK2 活性は、患者 iPS 細胞クローンで著明に低下しており、AK2 の補充により回復した。これにより、

AK2 の酵素活性が患者由来細胞では確かに低下していることが確認できた。

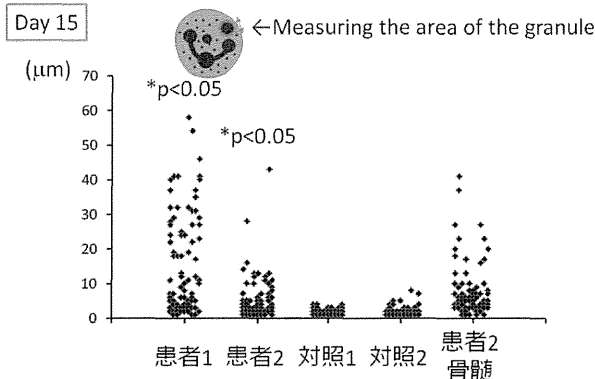


前年度までに検討した各種血球分化能の評価に加えて、T 細胞分化能の評価を行った。結果は上図の通りであり、患者 iPS 細胞由来クローンの T 細胞分化は発生の早い段階で阻害されており、CD34+CD7+CD5+の ProT1 細胞は出現するものの、CD34+CD7+CD5+ ProT2 細胞への移行が阻害されていることが明らかになった。この分化障害は、AK2 の補充により、改善した。

CHS 由来 iPS 細胞の機能解析

CHS 患者由来 iPS 細胞を好中球へ分化させ、MPO 陽性顆粒の大きさを比較した。下図の様に、患者由来 iPS 細胞より分化させた好中球では有意に細胞内顆粒が大きく、患者の病態の一部を再現し得たと考えられた。

各細胞が持つ最大の顆粒の面積を比較



D. 考察

このような 3 次元スキャフォールドを用いた多能性幹細胞からの血球分化系は過去に報告がない。この分化系は、従来の 2D-MG 系などに比べて長期間維持が可能であることや、ニッシュと血球系前駆細胞を一塊として可搬性のある基材上で誘導できることから、複数の CS を浮遊培養に持ち込むことにより大量の血球細胞を継続的に得ることが可能になるかもしれない。また、ニッシュと血球系前駆細胞を一塊として免疫不全マウスに移植するという応用も考えられる。

もちろん現時点ではニッシュの機能は不十分ではあるものの、今後改善を重ねて系を改良することにより、より有用な系が開発できるものと期待される。細網異形成症の原因分子である AK2 タンパクは、ミトコンドリア膜間隙に存在し、 $ATP-Mg^{2+} + AMP \rightleftharpoons ADP-Mg^{2+} + ADP$ という可逆性の反応を触媒するキナーゼであり、細胞内のエネルギー状態をモニタリング・調節しているとされる。さらに、AK2 タンパクはアポトーシスにも関連するという報告があり、このような重要な分子の異常細胞からの iPS 細胞樹立は予想以上に困難であった。しかし、レンチウイルスベクターにて AK2 を過剰発現させた後に、リプログラミング因子を導入することによって、世界で初めて細網異形成症患者由来の iPS 細胞樹立に成功した。

細網異形成症由来 T リンパ球の分化実験では、ヒト iPS 細胞を用いることにより、T 細胞免疫不全症の分化障害のステージの特定が可能であることが示された。従って、原発性免疫不全症の解析に置いて、iPS 細胞の有用性は高いものと考えられる。

CHS については、昨年度にも巨大顆粒の再現を報告したが、解析数を増やすことにより、統計学的な差異を明らかにし、定量的な評価が可能となった。

E. 結論

免疫不全疾患の解析や移植実験に有用な、新たな多能性幹細胞からの分化誘導系を開発することがで

きた。また、細網異形成症と CHS の iPS 細胞を用いた病態解析について、進展が見られた。

F.研究危険情報

なし。

G.研究発表

論文発表

1. Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T. Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica*. 99: 19-27, 2014
2. 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 a highly predictive factor for the development of AdV11-induced hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 48:737-739, 2013.
3. Saida S, Watanabe KI, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, 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*. ; 121(21):4377-87, 2013.
4. Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK: Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. *PLoS One*. 8: e59243, 2013
5. Tomizawa D., Akio Tawa A., MD/PhD, Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe K., Nakahata T., Adachi S.: Excess reduction of anthracyclines results in inferior event-free survival in core binding factor acute myeloid leukemia in children: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). *Int Hematol*. 98(5):578-88. 2013
6. Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, Morishima Y, Dohy H, Asano S, Ikeda Y, Nakahata T, Imamura M, Kawa K, Kato S, Tanimoto M, Kanda Y, Tanosaki R, Shiobara S, Kim SW, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R, Hamajima N, Fukushima M, Tamakoshi A; for the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A.: PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant*. [Epub ahead of print]
7. 斎藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞。再生医療 12(1):19-29,2013.
8. 中畑龍俊、岡野光夫、高橋政代：再生医療の現状と将来。HUMAN SCIENCE Vol.24 No.3:4-13, 2013年7月 ヒューマンサイエンス振興財団発行
9. 中畑龍俊：総論 疾患 iPS 細胞の樹立と臨床病態解析への応用。Medical Science Digest(MSD)

学会発表

1. 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞研究が切り開く未来の医療。日本学術会議公開学術講演会「未来社会を築く生命科学と医療のフロンティア」2013年8月3日 京都大学薬学部記念講堂
2. 中畑龍俊：教育講演、iPS 細胞の臨床応用。第55回日本小児血液・がん学会学術集会。2013年11月29日-12月1日(30日) ヒルトン福岡シーホーク
3. 中畑龍俊：基調講演、iPS 細胞を用いた今後の医療の可能性。日本製薬医学会第4回年次大会2013年7月19日 エーザイ株式会社本社5階ホール
4. 中畑龍俊：基調講演、iPS 細胞を活用した医療の可能性と倫理。第10回STSフォーラム「科学技術が拓く人間の未来」公開シンポジウム2013年10月5日 京都商工会議所ビル講堂
5. 横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男：罹患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の分子機構の解明。第34回日本炎症・再生医学会 2013年7月2-3日(ポスター) 国立京都国際会館
6. Hasegawa D., Hama A., Nozawa K., Salaguchi H., Yabe M., Ito E., Ito M., Kojima S., Nakahata T., Manabe A.: Hematological and morphological characteristics of inherited bone marrow failure syndromes(IBMFS). The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2013年10月11-13日(12日) さっぽろ芸文館
7. Suzuki N., Hira A., Niwa A., Matsuo K., Takata M., Yabe M., Nakahata T., Saito M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 11th Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). 7/12-7/15, Boston, MA, USA.
8. 中畑龍俊：特別講演、さい帯血造血幹細胞発見秘話と iPS 細胞ストックの臍帯血活用の未来像。さい帯血移植 1 万例突破記念事業「さらなる飛躍へのステップ」記念講演会 2013年9月28日 TKP 田町カンファレンスセンター
9. Saida S., Watanabe K., Sato-Otsubo A., Terui K., Yoshida K., Okuno Y., Toki T., Wang R., Shiraishi Y., Miyano S., Kato I., Umeda K., Hiramatsu H., Fujino H., Adachi S., Nakahata T., Ito E., Ogawa S., Heike T.: Xenograft model of TAM reveals the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology (第75回日本血液学会学術集会) 2013年10月11-13日(12日) さっぽろ芸文館,札幌
10. Honda Y., Tsuchida M., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 17 children with JMML who developed blast crisis. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology(第75回日本血液学会学術集会) 2013年10月11-13日(12日) 札幌市教育文化会館

【H.知的財産権の出願・登録状況】

特になし。

免疫不全症の QOL 調査、移植法開発

小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学

村松秀城 名古屋大学医学部附属病院小児科

研究要旨

先天性免疫不全症候群の原因遺伝子は非常に多岐に渡っており、これまでの、臨床的な特徴に着目し、特定の遺伝子だけを解析するアプローチでは診断が得られない症例が多数存在する。全エクソーム解析は全ての遺伝子を網羅的に解析する手法であり、より多くの症例において遺伝子診断を確定できる可能性がある。遺伝子診断が得られないまま治療を受けていた症例において全エクソーム解析を行い、*IL2RG* 遺伝子上の変異を同定した。これは全エクソーム解析の臨床的な有用性を示すものである。

A. 研究の目的

先天性免疫不全症候群は多様な原因遺伝子の変異によって発症する疾患群である。いくつかの候補遺伝子に着目した遺伝子検査が臨床検査として行われているが、遺伝子診断の得られない症例が多数存在する。全エクソーム解析は全ての遺伝子を網羅的に解析する手法であるが、これによって遺伝子診断を確定できる症例が増加する可能性がある。先天性免疫不全症候群の診断困難例で、全エクソーム解析によって遺伝子診断が得られた症例を提示する。

B. 研究方法

Agilent SureSelect V5、HiSeq 2000 を用いて、患児および両親の全エクソーム解析を行った。患児 T 細胞の染色体分析、および STAT5 のリン酸化を分析し、機能解析を行った。

(倫理面への配慮)

全エクソーム解析は、倫理委員会の承認が得られた臨床研究として書面に基づくインフォームドコンセントを得た上で、匿名化された状態で行った。

C. 研究結果

症例は 8 歳男児で、1 歳より反復性中耳炎・上気道炎、4 歳より反復性関節炎を繰り返した。低γグロブリン血症、リンパ球刺激試験低反応を認めた。

Common variable immunodeficiency としてその原

因遺伝子のいくつかを検索されたが、診断は確定されないまま、先天性免疫不全症として治療を受けていた。8 歳時に真菌感染症、サイトメガロウイルス感染症のコントロール不良となり、同種造血幹細胞移植目的で当院に転院となった。

原因遺伝子検索のため、本人および両親の全エクソーム解析を行ったところ、*IL2RG* 遺伝子の *de novo* ミスセンス変異 (c.172C>A, p.P58T) が検出された。この変異はサンガー法でも確認された (図 1)。他の免疫不全の原因となりうる遺伝子上に、病因と考えられる変異は検出されなかった。

IL2RG 遺伝子がコードする、CD132 の機能異常を確認するため、PHA/IL-2 刺激培養下の T 細胞において、STAT5 のリン酸化を検討したところ、患児 T 細胞においてはその減弱が確認された (図 2)。

図 1. サンガー法による *IL2RG* 変異の確認

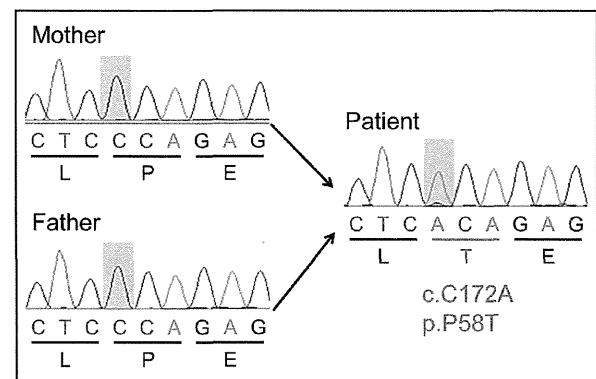
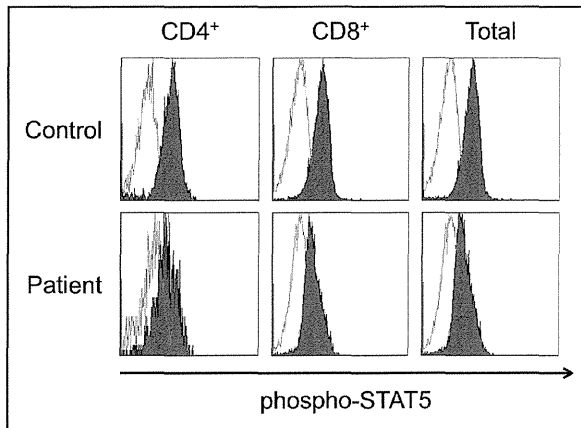


図 2. 患児 T 細胞の STAT5 リン酸化



D. 考察

従来の、臨床的な表現型から特定の遺伝子を狙って解析するアプローチでは遺伝子診断が得られない症例が、全エクソーム解析によって診断を確定できることが示唆される結果となった。先天性免疫不全症候群においては、遺伝子診断の決定が、予後の推定や、同種造血幹細胞移植における前処置の決定に直接的に関与する。全エクソーム解析を行うことで遺伝子診断を確定できる症例が増加すれば、臨床にも速やかにそのメリットが還元されることになる。

E. 結論

全エクソーム解析を用いて、先天性免疫不全症の診断困難症例の遺伝子診断を得ることができた。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M, Yabe M. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi

anemia patients. *Blood*. 2013 Oct 31;122(18):3206-3209.

- Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S and Hara T. B-cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using a minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol*. 2013 Sep;98(3):355-360.
- Okuno Y, Murakoshi A, Negita M, Akane K, Kojima S, Suzuki H. CD8+ CD122+ regulatory T cells contain clonally expanded cells with identical CDR3 sequences of the T-cell receptor beta-chain. *Immunology*. 2013 Jul;139(3):309-317.
- Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet*. 2013 Aug;45(8):937-941.
- Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 May;60(5):836-841.

2. 学会発表

(海外)

Kojima S. Clonal Evolution from Aplastic Anemia to Myelodysplastic Syndrome with Monosomy7. 7th International Congress on Shwachman-Diamond Syndrome. Nov. 3-6, 2013. Toronto, Canada.

(国内)

1. 小島勢二. 先天性血液疾患の病態研究に関する最近の進歩. 第 116 回日本小児科学会学術集会. 2013 年 4 月 19 日. 広島.
2. 坂口大俊、西尾信博、川島 希、王 稀楠、成田 敦、土居崎小夜子、村松秀城、濱 麻人、中西康詞、高橋義行、土田昌宏、小林良二、伊藤悦朗、矢部 普正、大賀正一、小原 明、長谷川大輔、真部 淳、伊藤雅文、小島勢二. Telomere length as a predictor for the immunosuppressive therapy in acquired aplastic anemia. 第 75 回日本血液学会学術集会. 2013 年 10 月 12 日. 札幌.
3. 王 希楠、村松秀城、坂口大俊、徐 銀燕、川島 希、成田 敦、土井崎小夜子、Olfat Ismael、中西康詞、濱 麻人、高橋義行、小島勢二 . GATA2 shows association with familial MDS, but not AA and JMML in Japanese children. 第 75 回日本血液学会学術集会. 2013 年 10 月 12 日. 札幌.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

高 IgE 症候群におけるアトピー性皮膚炎の発症機構の解明

峯岸 克行

徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター病態プロテオゲノム分野

研究要旨

高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎・血清 IgE の著しい高値と、黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍と肺炎を特徴とする原発性免疫不全症である。その主要な原因が STAT3 の遺伝子変異であることは明らかになったが、その病態形成機構には依然不明な点が多い。今回我々は、そのアトピー性皮膚炎の発症機構を解明する目的で、STAT3-DN を全身に発現する高 IgE 症候群のモデルマウスを用いて、アトピー性皮膚炎のモデルを作製した。ハプテン反復塗布により誘発する皮膚炎において、モデルマウスにおいて皮膚組織の肥厚、CD4 陽性 T 細胞と好酸球の皮膚炎局所への浸潤がより増強し、ハプテン特異的血清 IgE、Th1/Th2 サイトカインがより上昇した。卵白アルブミンの塗布による皮膚炎モデルにおいても同様の所見を認めた。これらの皮膚炎モデルは、高 IgE 症候群におけるアトピー性皮膚炎の発症機構の解明に有用である可能性が示唆された。

A. 研究の目的

高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎・血清 IgE の著しい高値を呈し、高頻度に黄色ブドウ球菌による皮膚と肺の感染症を合併する原発性免疫不全症である。その原因が *STAT3* 遺伝子のドミナントネガティブ(dominant negative; DN)変異であることが近年明らかになった。高 IgE 症候群では、そのほぼ全例でアトピー性皮膚炎と高 IgE 血症を発症する。すなわち、ヒトにおける STAT3 の機能低下はアトピー性皮膚炎と高 IgE 血症を引き起こす。しかし、STAT3-DN 変異がどのようなメカニズムでこれらのアトピー症状を発症するかは現時点では世界的にも全く明らかにされておらず、そのため本症のアトピーには、対症療法以外の治療法は存在しない。また、一般のアトピー性皮膚炎では、高頻度で黄色ブドウ球菌が常在しており、高 IgE 症候群のアトピー性皮膚炎発症と黄色ブドウ球菌感染症とに関連がある可能性がある。本研究では、STAT3-DN により発症するアトピー性皮膚炎の発症機構を解明し、その新規の治療法を開発することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

我々が樹立した STAT3-DN を全身に発現する高 IgE 症候群のモデルマウスを用いて、各種の皮膚炎誘発モデルの検討を行った。このモデルマウスにおいては、高 IgE 血症が自然に発症し、Th17 サイトカインの産生低下が見られ、黄色ブドウ球菌による皮膚感染症を自然発症し、アトピー性皮膚炎は SPF 環境下では自然発症しないことが明らかになっている。そのため、各種の誘発性皮膚炎の検討を行った。具体的には、1) ハプテン単回投与による皮膚炎モデル、2) ハプテン反復投与による皮膚炎モデル、3) 卵白アルブミン (ovalbumin; OVA)塗布による皮膚炎モデルの検討を行った。

ハプテン単回投与による皮膚炎では、day -6 にハプテンを剃毛したマウス腹部に塗布・感作し、day 0 に片側耳介にハプテンを、もう一方の耳介に溶媒のみを塗布、耳介腫脹を (ハプテンを塗布した耳介の厚さ) - (溶媒を塗布した耳介の厚さ) として測定した。ハプテン反復投与による皮膚炎モデルでは、day -6 にハプテンを腹部に塗布感作し、day 0 より隔日で 10 回耳介にハプテンを塗布した。卵白アルブミン塗布による皮膚炎モデルでは、マウスの背部を剃毛後、テープストリッピングにより上皮角層バ

リアを傷害し、OVA を塗布後ドレッシングを1週間継続、これを2週間あけて3回繰り返した。これらの炎症誘発操作後に皮膚よりコラゲナーゼ処理により皮膚局所の細胞を取り出し、その細胞表面形質を検討し、さらにその細胞のサイトカインやケモカイン産生を測定した。

C. 研究結果

1. ハプテン単回投与による皮膚炎モデルの検討

マウスをハプテンで感作し、片側耳介にハプテン塗布、対側耳介に溶媒を塗布し、1日後の耳介腫脹を測定すると、Stat3-DN マウスでは野生型マウスと比較してハプテン塗布側の耳介腫脹は軽度だった。この時の Stat3-DN マウスの皮膚局所においては、IFN γ の産生は同等であったが、IL-17 の産生が低下していた。このため、T 細胞の産生する Th17 サイトカインの低下が、耳介の腫脹の軽減を引き起こしている可能性が考えられた。このことは、STAT3 の遺伝子異常を有する高 IgE 症候群患児においては、接触性皮膚炎は発症しにくい可能性を示唆していると考えられた。

2. ハプテン反復投与による皮膚炎モデルの検討

マウスをハプテンで感作し、片側耳介にハプテンを対側耳介に溶媒を隔日で継続塗布すると、ハプテン塗布4回後までは Stat3-DN マウスで野生型マウスと比較して耳介腫脹は軽度だったが、それ以降では Stat3-DN マウスで野生型マウスより増強していた。組織学的には、角質、表皮には明らかな相違は認めなかったが、真皮への細胞浸潤が Stat3-DN マウスで増強していた。また、経皮水分蒸散量により評価した表皮バリア機能も Stat3-DN マウスでより低下していた。皮膚浸潤細胞を比較すると、Stat3-DN マウスにおいて、CD4 陽性 T 細胞、好酸球、好塩基球の皮膚炎局所への浸潤の増加と好中球の細胞浸潤の低下が認められた。これらの細胞の産生する Th1 と Th2 のいずれのサイトカインも増加していた。また、CXCL9, CXCL10 などの Th1 ケ

モカイン、CCX17, CCL22, CCL5 などの Th2 ケモカインが Stat3-DN マウスで増加していた。さらに、Stat3-DN マウスでは、抗原特異的血清 IgE 濃度の上昇も認められ、全体として Th2 型の皮膚炎が誘導されているものと考えられた。このモデルマウスで見られた細胞浸潤、表皮バリア機能の低下、サイトカイン、ケモカイン、免疫グロブリン産生のパターンはヒトのアトピー性皮膚炎とよく一致していた。

3. 卵白アルブミンの塗布による皮膚炎モデルの検討

テープによる表皮細胞の剥離後に卵白アルブミンをテガダーム保護下に1週間塗布、これを2週間間隔で3回繰り返す皮膚炎誘導モデル (epicutaneous OVA sensitization model) においても同様の検討を行った。このモデルにおいても、Stat3-DN マウスにおいて CD4 陽性 T 細胞、好酸球、好塩基球の皮膚炎局所への浸潤の増加、表皮バリア機能の低下、Th1 と Th2 のいずれのサイトカイン、CXCL9, CXCL10 などの Th1 ケモカイン、CCX17, CCL22, CCL5 などの Th2 ケモカインがいずれも増強・上昇していた。

D. 考察

STAT3 のドミナントネガティブ変異により発症する高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎と高 IgE 血症の合併が臨床的特徴であるが、その病態形成機構は不明で、治療法も対症療法に限られていた。今回の我々の検討により、高 IgE 症候群においては、ハプテン反復投与による皮膚炎モデルと卵白アルブミンの塗布による皮膚炎モデルがヒトのアトピー性皮膚炎と類似した病態を形成することが明らかになった。今後この皮膚炎モデルと各種の遺伝子改変マウスを用いて、その病態形成機構を明らかにしていく。

E. 結論

本研究により、高 IgE 症候群におけるアトピー性皮膚炎発症メカニズムを検討するために必要なモデル皮膚炎を確立した。今後、このモデルを用いて、各種の遺伝子改変マウス (T 細胞と B 細胞を欠損する Rag2 欠損マウス、B 細胞を欠損する μ MT マウス、高親和性 IgE レセプターを欠損する Fc ϵ RI 欠損マウス、マスト細胞を欠損する Kit^{w^{sh}/w^{sh}} マウス、好塩基球を欠損する Mcpt8-DTR マウス等) と Stat3-DN マウスを交配し、このマウスを用いて我々の確立した皮膚炎モデルの検討を行い、Stat3-DN とアトピー性皮膚炎の関係を明らかにする。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. Minegishi Y "A Molecular Mechanism of Hyper IgE Syndrome" The 2nd symposium of the University of Tokushima "Immune system development, deviation, and regulation" Nichia Medical Hall, Tokushima University, Tokushima, Jan 24-25, 2013
2. Minegishi Y "A Molecular Mechanism of Hyper IgE Syndrome" The 4th Japanese Society of Hematology "Dysfunction and Neoplasia of lymphocytes" Yamatoya Honten, Ehime, May 24-25, 2013
3. 峯岸克行 アレルギーを合併する免疫不全症 高 IgE 症候群の病因と病態 第 116 回日本小児科学会学術集会 2013 年 4 月 21 日 広島シンポジウム Primary immunodeficiency 2013 update; Current topics and new concepts
4. 峯岸克行 アトピー性皮膚炎を合併する免疫難病の病態解明 第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会 2013 年 12 月 1 日 金沢

2. 論文発表

1. Egawa M, Mukai K, Yoshikawa S, Iki M, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. Inflammatory monocytes recruited to allergen-exposed skin acquire an anti-inflammatory property via basophil-derived IL-4. *Immunity* 38, 570-580, 2013
2. Obata-Ninomiya K, Ishiwata K, Tsutsui H, Nei Y, Yoshikawa S, Kawano Y, Minegishi Y, Ohta N, Watanabe N, Kanuka H, Karasuyama H. The skin is an important bulwark of acquired immunity against intestinal helminthes. *J Exp Med* 210, 2583-2595, 2013
3. 峯岸克行 STAT3 の異常によるアトピー性皮膚炎の発症機序 臨床・免疫アレルギー科 59, 160-164, 2013
4. 峯岸克行 高 IgE 症候群の最近の話題 Medical Science Digest 39, 7-8, 2013
5. 峯岸克行 抗体産生不全症—B 細胞不全症 小児科診療 76 419-423, 2013
6. 峯岸克行 朝倉書店内科学 第 10 版 原発性免疫不全症 1371-1378 総編集 矢崎義男
7. 峯岸克行 Jak-Stat シグナルとアレルギー制御 実験医学 31, 113-117, 2013
8. 峯岸克行 高 IgE 症候群に見られる易感染性 化学療法の領域 29, 2429-2434, 2013
9. 峯岸克行 小児内科 高 IgE 症候群 45, 1146-1147, 2013

G. 知的財産権の出願登録状況

該当なし

STAT1 機能獲得性変異による CMCD 患者の迅速診断法の確立

岡田 賢、溝口洋子、津村弥来、平田 修、小林正夫

広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学

研究要旨

慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMCD) は、皮膚・爪・口腔粘膜・外性器を主病変とした、反復性または持続性の *C. albicans* 感染を臨床的特徴とする。2011 年に、*STAT1* の機能獲得性変異により CMCD が発症することが発見された。さらに後の検討で CMCD 患者の約 40-50% で同変異が同定されることが明らかとなるとともに、本邦でも多数の *STAT1* 機能獲得性変異による CMCD 患者が同定されている。

我々は本研究で、患者細胞を用いて迅速かつ鋭敏に *STAT1* の機能解析を行う手法を開発した。具体的には、i) IFN- γ 刺激後の *STAT1* リン酸化 (p*STAT1*) の解析、ii) IFN- γ 刺激で p*STAT1* を誘導、その後 staurosporine (protein kinase inhibitor) 処理下で *STAT1* 脱リン酸化を解析、上記 2 点をフローサイトメトリーで解析することで、*STAT1* 脱リン酸化障害を検討した。その結果、*STAT1* 機能解析に基づいた CMCD 患者の迅速診断法を確立した。

A. 研究目的

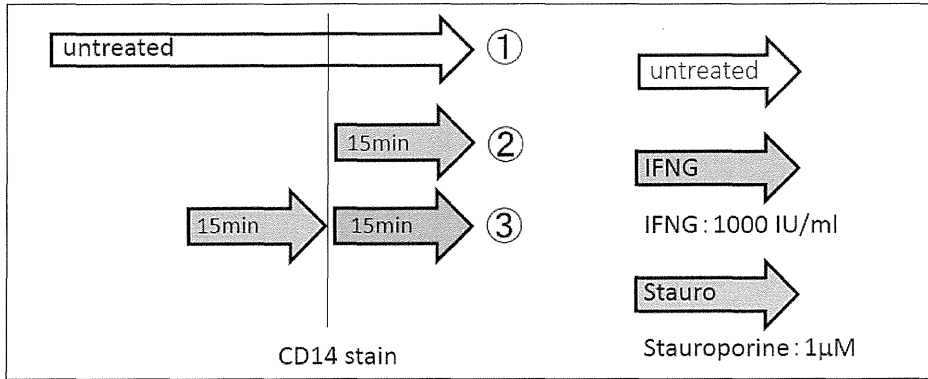
慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMCD) は、皮膚・爪・口腔粘膜・外性器を主病変とした、反復性または持続性の *C. albicans* 感染を臨床的特徴とする。2011 年に、*STAT1* の機能獲得性変異により CMCD が発症することが明らかとされ、その後の検討により欧米では CMCD 患者の約 40-50% で同変異が同定されることが明らかとなった。本邦においても、20 例以上の *STAT1* 機能獲得性変異を有する CMCD 患者が同定されている。

今回我々は、これらの患者の診断を容易にするため、フローサイトメトリーを用いた *STAT1* 機能獲得性変異の迅速診断法の確立を試みた。

B. 研究方法

STAT1 機能獲得性変異を有する CMCD 患者、*STAT1* 変異を持たない CMCD 患者、健常者を対象に、フローサイトメトリーによる解析を行った。これまでの検討で、*STAT1* 機能獲得性変異では、*STAT1* の脱リン酸化が障害されており、その結果として *STAT1* の過剰なリン酸化に至ることが明らかとなっていたため、*STAT1* の脱リン酸化障害に着目して検討を行った。

具体的には、末梢血単核球細胞を比重遠心法により分離した後に IFN- γ で刺激し、*STAT1* のリン酸化を促した。その後、staurosporine (protein kinase inhibitor) 処理を行い、*STAT1* の新たなリン酸化を阻害した状況下で、脱リン酸化を検討した (詳細は Fig. 1)。



The PBMCs were stimulated with or without 10^3 IU/ml of IFN- γ for 15min.
 The cells washed and incubated with or without 1μ M staurosporine for min.
 We investigated STAT1 phosphorylation by flow cytometer.

Staurosporine: The main biological activity of staurosporine is the inhibition of protein kinases through the prevention of ATP binding to the kinase.

Figure 1

C. 研究結果

1) *STAT1* 機能獲得性変異を有する患者の同定 (Figure 2)

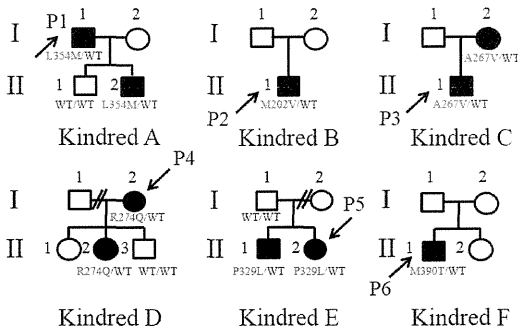


Figure 2

本邦の CMCD 患者 (15 症例, 10 家系) を対象に *STAT1* 全エクソンシーケンスによる遺伝子解析を行い、*STAT1* 変異を有する 10 症例 (6 家系) の同定を行った。同定した *STAT1* 変異のうち、そのうち、P329L, L354M, M390T は新規遺伝子変異であった。

2) 同定した変異の機能解析

STAT1 null fibrosarcoma cells (U3C) に、野生型ないしは変異型 *STAT1* を一過性に強制発現させ

機能解析を行った。機能解析は IFN- γ 刺激 (1000 U/ml, 8 hour) による GAS 転写活性を、レポーターアッセイにより測定した (Figure 3)。その結果 M390T を除く全ての変異は、機能獲得性変異であった。M390T 変異は、低濃度の IFN- γ 刺激 (10 U/ml) で GAS 転写活性亢進を顕著に認め、他の変異と同様に機能獲得性変異であった (data not shown)。

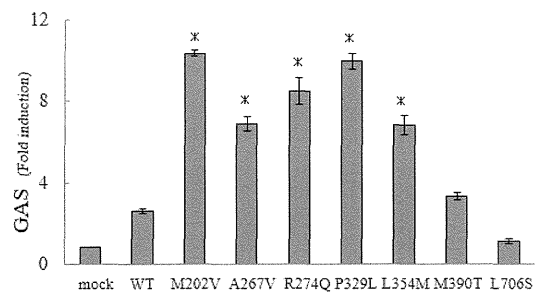


Figure 3

3) フローサイトメトリーによる *STAT1* 機能解析
 患者の末梢血単核球を分離し、Figure 1 の方法に従い IFN- γ , staurosporine で処理したのち、フローサイトメトリーで *STAT1* のリン酸化 (p*STAT1*) 状態を検討した。検討は、p*STAT1* を特に強く認める単球 (CD14 陽性細胞) に注目して行った。

Figure 4 に示すように、*STAT1* 機能獲得性変異を有する患者では、IFN- γ 刺激後の pSTAT1 の増強が認められた。STAT1 のリン酸化の増強は staurosporine 処理を行うことで強調され、この条件下で患者と対象との間に pSTAT1 の重複を認めなかった。

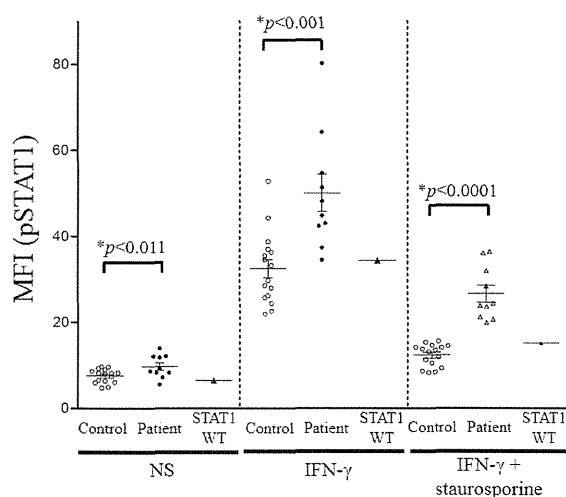


Figure 4

D. 考察

本邦における CMCD 患者 15 症例 (10 家系) の解析で、10 症例 (6 家系) において *STAT1* 機能獲得性変異を同定した。欧米において、CMCD 患者の 40-50% で *STAT1* 機能獲得性変異が同定されるが、本邦においても *STAT1* 異常は CMCD の重要な分子基盤になると考えられた。

STAT1 機能獲得性変異は、主に STAT1 の coiled coil domain (CCD), DNA-binding domain (DBD) に同定されるが、その他の機能ドメインでも、少数ながら変異が認められる。新規変異を認めた場合、確実な診断を行うためには機能解析を行うことが望ましく、特に変異好発部位以外で変異が同定された場合は機能解析が必須となる。機能解析は、GAS 転写活性を検討するレポーター解析が最も鋭敏かつ信頼性が高いが、遺伝子改変ベクターを用いた発現実験を行う必要があり非常に煩雑である。今回の検討で我々は、患者細胞を用いて迅速かつ鋭敏に機能解析を行う方法を開発した。さらに本解析手法は、同

定した *STAT1* 変異の機能解析に使用可能なだけでなく、CMCD 患者における *STAT1* 変異の有無のスクリーニングを目的とした迅速診断に使用可能であった (Mizoguchi Y, et al. J Leukoc Biol. 2013)。

E. 結論

IFN- γ , staurosporine 処理下で pSTAT1 をフローサイトメトリーで観察することで、STAT1 の機能解析が可能であった。本解析手法は、STAT1 の機能解析のみならず、*STAT1* 機能獲得性変異を有する CMCD 患者のスクリーニングに有用と考えられた。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 学会発表

Kobayashi M, Mizoguchi Y, Karakawa S, Okada S, Kawaguchi H, Nakamura K: Genetic characteristic of patients with severe congenital neutropenia in Japan. 27th International Congress of Pediatrics, August 24-29, Melbourne, Australia

2. 論文発表

- Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant V, Kong X, Crypwy S, Dupuis S, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M: Simple diagnosis of *STAT1* gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. Journal of Leukocyte Biology, 2013 (in press).
- Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M: Identification of the integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with

- anisocytosis. *British Journal of Haematology* 160: 521-9, 2013.
3. Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K: Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia-derived pluripotent stem cells with heterozygous *ELANE* mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 3023-8, 2013.
 4. Hirata O, Okada S, Tsumura M, Kagawa R, Miki M, Kawaguchi H, Nakamura K, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Takihara Y, Kobayashi M: Heterozygosity for the Y701C *STAT1* mutation in a multiplex kindred with multifocal osteomyelitis. *Haematologica* 98:1641-9, 2013.
 5. Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Tsumura M, Kobayashi M, Arkwright PD, Averbuch D, Engelhard D, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, Klein C, Holland SM, Uzel G, Casanova JL, Ma CS, Tangye SG: Naïve and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *Journal of Experimental Medicine* 210: 2739-53, 2013.
 6. Ives ML, Ma CS, Palendira U, Chan A, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright PD, Engelhard D, Averbuch D, Magdorf K, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, Tsumura M, Kobayashi M, Uzel G, Casanova JL, Tangye SG, Deenick EK: Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations underlying autosomal dominant hyper-IgE syndrome impair human CD8(+) T-cell memory formation and function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132: 400-11, 2013.
 7. Berglund LJ, Ma CS, Avery DT, Moens L, Deenick EK, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Wong M, Adelstein S, Arkwright PD, Fulcher DA, Ziegler JB, Smart JM, Kobayashi M, Casanova JL, Cook MC, Uzel G, Tangye SG: IL-21 signalling via STAT3 primes human naïve B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. *Blood* 122: 3940-50, 2013.
 8. Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito M, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica*, Epub ahead of print Aug 23, 2013.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし
- 参考文献
Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. Liu L, Okada S, et al. *J Exp Med*. 208: 1635-48, 2011
STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. van de Veerdonk FL,

Plantinga TS, et al. *N Engl J Med.* 365: 365:54-61, 2011

Chronic mucocutaneous candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the STAT1 DNA-binding domain. Takezaki S, Yamada M., et al. *J Immunol.* 189: 1521-6, 2012

原発性免疫不全症に関する調査研究

森尾友宏、高島健浩、満生紀子、中谷夏織
東京医科歯科大学大学院医発生発達病態学

研究要旨

PIDJ の解析担当施設として年間 200 件前後の相談を受け、解析(KRECs, TRECs, 10 color 12 parameter flow cytometry, 遺伝子解析)を行った。その中でも抗体産生不全やクラススイッチ異常を主体とする原発性免疫不全症については、in vitro class switch 系での病態解析やシグナル解析などを併用して病態をさらに深く解析すると共に、家系解析を含めた全エクソン解析を行って、いくつかの責任遺伝子を明らかにした。また治療に関しては造血細胞移植学会遺伝性疾患 WG と連携し、根治的治療を必要とする原発性免疫不全症に対する移植成績を検討した。また造血細胞移植後の免疫学的モニタリングとして、KRECs, TRECs を中心としたリンパ球新生能を評価し、レシピエント年齢がその回復に重要であることや、臍帯血移植には disadvantage がないことなどを明らかにした。

A. 研究目的

抗体産生不全を主体とする免疫不全症、中でも分類不能免疫不全症 (common variable immunodeficiency: CVID)、クラススイッチ異常症を中心に、その免疫学的特性や遺伝子異常を明らかにする。

重症の免疫不全症では造血細胞移植が必要である。そこで本年は、より良い移植方法の開発に向けて、免疫不全症を含む集団において、造血細胞移植後の B 細胞、T 細胞の回復に関係する因子を抽出し検討する。

B. 研究方法

1. CVID, class switch recombination (CSR) 異常症として、本学にコンサルトのあった症例について、以下の検討を行った。

1) B 細胞、T 細胞新生能の解析

sjKRECs, cjKRECs, sjTRECs を realtime PCR を用いて計測し、microgramDNA あたりのコピー数を算出した。

2) 10 color 12 parameter FACS 解析

CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD20, CD21, CD24, CD25, CD27,

CD31, CD38, CD45RA, CD45RO, CD56, CD123, CD127, TCR, TCR, HLADR, CXCR3, CXCR5, CCR6, CCR7, V24, V11 などに対する抗体を用いて、transitional B から形質細胞までの B 細胞分化段階、TfH, Th1, Th2, Th17, Th1/Th17, Treg, naïve, recent thymic emigrant, central memory, effector memory T 細胞, NK, NKT, mDC, pDC, activated mDC などの細胞集団を明らかにし、疾患ごとの特性を解析した。

3) 責任遺伝子解析

候補遺伝子解析を行い、同定されなかったものに対しては、一部でかずさ DNA 研究所や理化学研究所統合生命医科学センターとの共同研究の元で、全エクソン解析を行った。Illumina HiSeq2000 にて解析を行い、insertion, deletion, missense mutation, nonsense mutation をピックアップし、dbSNP137 及び日本人 SNP により filtering したのちに、家族の想定される遺伝形式におうじて heterologous mutation, homologous mutation, compound heterozygotic mutation をピックアップした。得られた候補遺伝子は Sanger 法にて塩基配列の確認を行った。

2. 日本造血細胞移植学会遺伝性疾患 WG と連携して、根治的治療を必要とする原発性免疫不全症に対する移植成績を検討する。また移植後 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月、24 ヶ月などの時点で KRECs, TRECs を解析し、年齢、疾患、前処置、移植ソース、免疫抑制薬の使用、などと KRECs, TRECs の関係を単変量解析及び多変量解析にて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では患者情報を扱うことに加えて、遺伝子診断においては遺伝子解析が必要になる。このため、各種指針やガイドラインに従い、十分な説明と同意の元に検討を行う。なお、遺伝子診断や KRECs, TRECs 解析、移植成績解析などについては東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会（及び遺伝子解析に関する倫理審査委員会）の承認を得ている。

C. 研究結果

1. CVID, CSR 異常症の病態探索

1-1,2. 免疫機能解析

本年度は 10 カラー解析手法を確立し、様々な疾患において特徴を検討した。例えば高 IgE 症候群における Th17 の減少や、ICOS 欠損症における Tfh の減少、後述の PIK3CD 異常症における transitional B の増加などがそれに当たる。1-3 に関することとして、責任遺伝子未知の疾患については KRECs, TRECs, 10 color FACS にてその特徴を profiling した。10 color FACS は 1mL 程度で実施が可能であり、蛍光色素の組み合わせを含め、ほぼ完成系に近づいた。

1-3. 抗体産生不全症における責任遺伝子探索

5 家系において全エクソン解析を行った。2 家系では常染色体劣性遺伝形式を、3 家系では常染色体優性 (AD) 遺伝形式を想定して解析を行った。その結果、常染色体劣性 (AR) 遺伝を疑う症例において LRBA の compound heterozygotic mutation を検出した。本症例は幼少時期より I 型糖尿病、特発性血小板減少性紫斑病などに罹患し、10 代になってから低ガンマグロブリン血症を呈し、その後も多発性硬

化症様疾患や炎症性腸疾患に罹患し、ステロイドと CyA の投与を必要としている。兄は血小板減少性紫斑病から以後低ガンマグロブリン血症となり、出血にて逝去していた (manuscript in preparation)。もう 1 例の AR 形式が疑われる症例、また AD を疑う家系においても 2-6 個の候補遺伝子に絞り込むことができた。

一方本年度に明らかになった PIK3CD 異常症 (E1021K 変異) は 6 症例明らかになった。IgG2 欠損症、反復性重症肺炎、リンパ組織腫脹などを呈する疾患群では、本疾患を疑う必要性がある。

2. 造血細胞移植における B, T 細胞新生能

原発性免疫不全症、血液系悪性腫瘍に対する造血細胞移植において、KRECs, TRECs を測定した。TRECs, KRECs の早期回復例では感染症が少ない傾向を認めたが、200 名弱の解析では power が不足 $p < 0.05-0.1$ 程度の有意差にとどまった。一方 KRECs, TRECs の回復については、レシピエントが若年であることが有利であり、ドナーの年齢は関係ないことが明らかになった。また臍帯血移植でも骨髓移植や末梢血幹細胞移植に劣らない KRECs, TRECs の回復が明らかになった (submitted for publication)。

D. 考察

全エクソン解析が比較的容易に行えるようになった現在、既知遺伝子の確実な rule out、数理的処理による責任遺伝子の絞り込み、免疫学的特性の解析及びデータベース化が重要である。その点で 10 color 解析および KRECs, TRECs データと臨床情報が揃っていることは必須と考えられる。さらに本年からは in vitro class switch assay や IgH の repertoire 解析、CDR3 length の解析などもセットアップし、クラススイッチ異常や体細胞超変異の異常、分化の異常などを sort out できるシステムを立ち上げつつある。一方候補遺伝子産物については、免疫細胞亜群ごとの発現や、会合分子の探索、分子の修飾や機能部位の同定など様々な検討が必要となっている。

そのための強制発現系も構築しつつあり、今後検証系を streamline 化したいと考えている。

移植成績に関しては、今後造血細胞移植学会の TRUMP data と連動して解析を行う予定であるが、今回の検討により臍帯血移植が B、T 回復に不利であることはなく、むしろ KRECs については早期回復が認められることが明らかになった。量的な回復に加えて、今後は質的な回復に絞り検討を進めたい。臍帯血移植の中でさらに免疫学的再構築が早い群とそうでない群を明らかにできれば、今後のより良い移植に向けて、戦略を立てることが可能になると期待する。

E. 結論

体系的な免疫機能解析系を構築し、様々な疾患において、その特徴を明らかにするとともに、原因未知の疾患については基盤となるデータを蓄積した。抗体産生不全を主とする疾患については、責任遺伝子同定、探索作業を行った。一部では遺伝学的確定診断に至り、また一部では候補遺伝子の抽出に至った。さらに B 細胞受容体の多様性に関する検査系の立ち上げに着手した。根治的治療法である造血細胞移植においては早期免疫学的回復に有利な因子について検討を行い、今後の質的検討につながる成果を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T. B-cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using a minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol.* 98:355-60, 2013.
2. Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe

F, Morio T, Teraoka H, Mizutani S. Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. *Cancer Sci.* 104:703-10, 2013.

3. Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, Haraguchi K, Moriuchi H, Oh-Ishi T, Kitoh T, Ohara O, Morio T, Yachie A. Rapid Detection of Intracellular p47phox and p67phox by Flow Cytometry; Useful Screening Tests for Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Immunol.* 33:857-64, 2013.
4. Shimizu M, Kanegane H, Wada T, Motoyoshi Y, Morio T, Candotti F, Yachie A. Aberrant glycosylation of IgA in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *J Allergy Clin Immunol.* 131:587-90, 2013.
5. Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer.* 60:836-41, 2013.
6. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammerstrom Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor and Ig kappa-deleting recombination excision circles. *J Allerg Clin Immunol.* 131:1437-40, 2013.
7. Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsuiki N, Ohara O, Komada Y. A novel Wiskott-Aldrich

syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* 290:164-8, 2013.

2. 学会発表

1. Morio T. Cord blood transplantation for primary immunodeficiency in Japan. AsiaCORD2013. Kobe, Japan. April 2013.
2. 森尾友宏：悪性腫瘍を合併する免疫不全症 第54回日本小児血液・がん学会学術集会、福岡、2013年11月29日 - 12月1日
3. 森尾友宏：免疫不全症候群から学ぶ human immunology、第41回日本臨床免疫学会総会、山口、2013年11月27日 - 29日
4. 森尾友宏：造血細胞移植後のウイルス感染症、第43回東海小児造血細胞移植研究会、名古屋、2013年11月12日
5. 森尾友宏：易感染性、自己免疫、悪性腫瘍の分子基盤としての原発性免疫不全症、平成25年度遺伝子病制御研究所研究集会、北海道、2013年10月25日
6. 森尾友宏：分類不能型免疫不全症（CVID）の多彩な病像と分子基盤、第75回日本血液学会学術集会、北海道、2013年10月11日 - 13日

G. 知的所有権の取得状況

特許取得

該当なし

実用新案登録

該当なし

その他

該当なし