

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

小原 収

公益財団法人かずさ DNA 研究所ヒトゲノム研究部

研究要旨

原発性免疫不全症患者の遺伝学的原因の確定診断のために、当研究班の班会議施設からの依頼に従って、500 件以上の遺伝子検査を行った。更に、従来法の検討だけでは原因の特定に至れなかった検体に対する更なる解析を実現できるように、10 遺伝子程度を一度に解析するための疾患毎に分類した遺伝子疾患解析パネルを設定した。次世代 DNA シーケンサーを活用して、低コストにこれらの遺伝子パネル解析を実施するパイプラインを確立し、その実運用を開始した。こうした既知遺伝子のターゲット分析に加えて、新規な原因遺伝子変異のより網羅的な解析のために、全エクソン解析と血球成分の全 polyA⁺ RNA 解析を次世代 DNA シーケンサーを用いて進めた。その結果、いくつかの症例でほぼ発症原因と思われる新規な遺伝子変異を同定した。

A. 研究目的

本研究は、本邦での原発性免疫不全症 (PID) の臨床情報の蓄積を行うためのレジストリである PIDJ を改良・維持し、それに並行して、我が国の原発性免疫不全症発症の遺伝学的素因について探索する。結果として得られた遺伝学的形質と症状の両者を合わせてアーカイブングすることを通じて、より精度の高い診断と治療法選択に結びつけることを最終的な目的とする。更に、この実現のために、遺伝的素因を探索するための新規な方法論の開発と技術的整備を行う事をこの分担研究のもう一つの目的とする。

B. 研究方法

PIDJ 登録症例について、班会議施設からの依頼により、免疫不全症の原因として知られている既知原因遺伝子内での変異の有無の検査を行う。

こうした既知遺伝子に対しての遺伝子検査をより効率的に行うため、次世代シーケンサーを活用した高精度遺伝子解析法の開発を行う。

既知遺伝子の探索のみでは遺伝的な原因が決まらなかった検体について、次世代シーケンサーを用いた

より網羅性の高い解析を実施し、新規な遺伝子変異を同定するためのパイプラインを構築する。

(倫理面への配慮)

当分担研究のために、かずさ DNA 研究所の倫理審査委員会において、既知遺伝子の遺伝子検査だけでなく、全エクソンシーケンシングと RNA シーケンシングによる免疫不全症遺伝的原因探索についても承認を得た。こうした網羅的解析は、依頼施設での倫理審査での承認を受けていることが前提条件なため、研究期間内では当研究班の 9 施設からの検体を受け入れている。

C. 研究結果

今年度もこれまでと同様に、本研究班の各施設からの依頼に応じて、2014 年度においては 664 遺伝子原因遺伝子解析を行った(2013 年 12 月末現在)。しかし、各研究班施設への報告結果のまとめから、このような限られた数の遺伝子のターゲット解析ではこれまでと同様に最終診断に至れた割合は 30%を下回った。これと並行して、原発性免疫不全症の臨床アーカイブへの臨床情報の登録も順調に蓄積され、今年度の新規登録数は 500 件を超えた (2013 年 12

月末現在)。こうした遺伝子解析ニーズの増大と安定した遺伝子解析実現のために、我々のグループが近年開発に取り組んでいる次世代シーケンサーを用いた高精度遺伝子変異解析法を利用したパイプラインを構築した。これを利用して、各症候群に特徴的な既知原因遺伝子解析パネルを設定し、卓上型次世代シーケンサー(ロシュ社、GS Junior)を用いて一度に10遺伝子程度の配列解析を実現する解析パイプラインを実現した。従来の基本的な方法であるキャピラリーDNAシーケンシング法と今回の次世代シーケンサーを用いた方法の精度を比較するために、両者でのべ500kbpを超える配列データを取得・比較した。その結果、次世代シーケンサーによる方法が精度においても従来のキャピラリーシーケンシング法と同等もしくはそれ以上の性能を有していることを見出した。

更に、こうして既知遺伝子の変異の可能性が除外された症例について、厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野))「次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究」班と連携して、次世代シーケンサー(イルミナ社 HiSeq1500 及び 2000 を新規に調達)を用いた網羅的な全エクソン解析を実施した。更に、臨床検体の血球成分からの RNA Sequencing による解析も進め、エクソン領域の解析だけでは不十分な場合に備えた。これらの解析によって、複数の症例において疾患原因と考えられる候補変異の同定に至った。

D. 考察

- 1) 既知遺伝子からの従来法での遺伝子検査を継続し、ほぼ30%程度の診断率で臨床情報と遺伝学的情報の両者のアーカイビングができた。
- 2) 今後の確定診断率の向上のためには、疾患毎の遺伝子パネル化による遺伝子検査の効率化が不可欠で

あり、自己炎症、分類不能型免疫不全症などについて、そのためのパネル遺伝子解析の運用を開始した。

- 3) 更に、次世代シーケンサーを使った網羅的な遺伝子探索アプローチにより、非典型的な症状を呈する症例の場合でも疾患原因にたどり着けることを実証した。この事は、今のパネル遺伝子解析の遺伝子数を拡大することで、更に疾患原因の確定診断率を向上されられることを示している。一方、全く機能未知の遺伝子に見られた疾患原因遺伝子候補を絞り込むためには機能的な情報などの補完情報は必須であり、実際の臨床症例からどのようにしてその類の情報を非侵襲に取得していくかの方法論開発が今後さらに重要性を増すであろう。

E. 結論

- 1) 今年度も、本研究班の班会議施設の依頼に応じて、免疫不全症原因遺伝子の遺伝子検査を実施し、その結果を担当施設に滞りなく報告した。
- 2) 効率的な遺伝子検査のために、疾患毎の遺伝子解析パネルの運用を開始し、一定の最終診断率の改善を実現した。
- 3) 他の厚労省研究班と連携して、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子構造、発現プロファイル解析を進め、それにより複数の症例において原因変異もしくはその候補変異群の同定に至った。

G. 研究発表

(H22年度は連携研究者、H23年度より分担研究者)

1 論文発表

1. Saito Y, Kagami SI, Sanayama Y, Ikeda K, Suto A, Kashiwakuma D, Furuta S, Iwamoto I, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. AT-rich interactive domain-containing protein 5a functions as a negative regulator of ROR γ t-induced Th17 cell differentiation. *Arthritis Rheum.* 2013 [Epub ahead of print]

2. Nakagawa K, Gonzalez-Roca E, Souto A, Kawai T, Umebayashi H, Campistol JM, Cañellas J, Takei S, Kobayashi N, Callejas-Rubio JL, Ortego-Centeno N, Ruiz-Ortiz E, Rius F, Anton J, Iglesias E, Jimenez-Treviño S, Vargas C, Fernandez-Martin J, Calvo I, Hernández-Rodríguez J, Mendez M, Dordal MT, Basagaña M, Bujan S, Yashiro M, Kubota T, Koike R, Akuta N, Shimoyama K, Iwata N, Saito MK, Ohara O, Kambe N, Yasumi T, Izawa K, Kawai T, Heike T, Yagüe J, Nishikomori R, Aróstegui JI. Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis*. 2013 [Epub ahead of print]
3. Abe J, Nakamura K, Nishikomori R, Kato M, Mitsuiki N, Izawa K, Awaya T, Kawai T, Yasumi T, Toyoshima I, Hasegawa K, Ohshima Y, Hiragi T, Sasahara Y, Suzuki Y, Kikuchi M, Osaka H, Ohya T, Ninomiya S, Fujikawa S, Akasaka M, Iwata N, Kawakita A, Funatsuka M, Shintaku H, Ohara O, Ichinose H, Heike T. A nationwide survey of Aicardi-Goutieres syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 [Epub ahead of print]
4. Rawat A, Singh S, Suri D, Gupta A, Saikia B, Minz RW, Sehgal S, Vaiphei K, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N, Ohara O, Chan KW, Lau YL. Chronic Granulomatous Disease: Two Decades of Experience From a Tertiary Care Centre in North West India. *J Clin Immunol*. 2013 [Epub ahead of print]
5. Higuchi Y, Shimizu J, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Takada H, Ishimura M, Hara T, Ohara O, Asagoe K, Kubo T. The identification of a novel splicing mutation in C1qB in a Japanese family with C1q deficiency: a case report. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2013 Oct 28;11(1):41.
6. Wada T, Sakakibara Y, Nishimura R, Toma T, Ueno Y, Horita S, Tanaka T, Nishi M, Kato K, Yasumi T, Ohara O, Yachie A. Down-regulation of CD5 expression on activated CD8(+) T cells in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with perforin gene mutations. *Hum Immunol*. 2013 Dec;74(12):1579-85.
7. Lee YW, Yang EA, Kang HJ, Yang X, Mitsuiki N, Ohara O, Miyawaki T, Kanegane H, Lee JH. Novel mutation of IL2RG gene in a Korean boy with X-linked severe combined immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23(1):65-7.
8. Suzuki J, Kuwahara M, Tofukuji S, Imamura M, Kato F, Nakayama T, Ohara O, Yamashita M. A novel small compound SH-2251 suppresses Th2 cell-dependent airway inflammation through selective modulation of chromatin status at the Il5 gene locus. *PLoS One*. 2013 Apr 16;8(4):e61785.
9. 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.* 2013 May;33(4):857-64.

10. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin δ -deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 May;131(5):1437-40.e5.

2 学会発表

1. 第七回日本免疫不全症研究会 「食道潰瘍を回復した1型高IgE症候群の1例」 山本崇裕、大西秀典、寺本貴秀、桑原秀次、久保田一生、大塚博樹、川本典生、加藤善一郎、深尾敏幸、谷内江昭宏、小原收 福岡 2014年1月25日
2. 第七回日本免疫不全症研究会 「複合型免疫不全を呈したsLC46A1新規変異による先天性葉酸吸収不全症」 千田奈津子、山田雅文、有賀正、岸本健治、小林良二、小林邦彦、小原收 福岡 2014年1月25日
3. かずさ DNA 研究所/産総研生命情報工学研究センター共催ワークショップ バイオインフォマティクスとゲノム医療 - その課題と将来展望 「クリニカルゲノミクスの現状と課題」 小原收 東京 2013年11月
4. The 5th LJI & IMS-RCAI Workshop “Post-GWAS genomic analyses: Mind and bridge the gaps” Ohara O Yokohama, October, 2013
5. 第40回日本毒性学会学術年会 シンポジウム「毒性オミクス」生体システムダイナミクス理解の

ための統合ゲノミクス解析の将来展望」 小原收 千葉 2013年6月

6. 第116回日本小児科学会学術集会 「ゲノミクスを基礎とした新しい病因探索法」分野別シンポジウム「原発性免疫不全症：新しい疾患、トピックス」小原收 広島 2013年4月
7. 第58回日本人類遺伝学会「次世代シーケンシング技術とゲノミクス解析」シンポジウム：次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾患解析の現状と課題 小原收 仙台 2013年11月
8. 第4回関東甲越免疫不全症研究会 「IgA 単独欠損症として紹介され、TREC/KREC の結果から RAG1 異常と同等しえた1例」 加藤環、釜江智佳子、本間健一、池川健、横須賀とも子、和田泰三、谷内江昭宏、西田直徳、金兼弘和、満生紀子、小原收、今井耕輔、森尾友宏、野々山恵章 2013年9月
9. 第41回日本臨床免疫学会総会 「本邦における ICF (Immunodeficiency with Centromeric instability and Facial anomalies)症候群5例の検討」 藤環、釜江智佳子、満生紀子、小原明、林正俊、野口恵美子、久保田健夫、本間健一、小原收、今井耕輔、野々山恵章 下関 2013年11月
10. 日本人類遺伝学会第58回大会 「次世代シーケンサーを用いて ICF(Immunodeficiency with centromeric instability and facial anomalies)症候群と診断した2例」 釜江智佳子、満生紀子、小原明、林正俊、野口恵美子、本間健一、小原收、今井耕輔、久保田健夫、野々山恵章 仙台 2013年11月
11. 第41回日本臨床免疫学会総会 「BTK 変異をみとめた IgA 単独欠損の解析 (IgA deficiency caused by the missense mutation in the BTK gene)」 満生紀子、今井耕輔、Xi YANG、金兼

- 弘和、小阪嘉之、高田英俊、水谷修紀、小原收、森尾友宏 下関 2013年11月
12. 15th International Congress of Immunology 2013 “Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles” C. Kamae, N. Nakagawa, H. Sato, K. Honma, N. Mitsuiki, O. Ohara, H. Kanegane, T. Morio, K. Imai and S. Nonoyama, Milan, Italy, Aug,2013
13. 3rd Sardinian Summer School “Post-GWAS animal models” Ohara O. Pula, Italy, September, 2013
14. 第34回日本炎症・再生医学会 “CINCA 症候群/NOMID 患者単球における、IL-1 β 分泌能の1細胞解析” 中川権史、志村七子、白崎善隆、山岸舞、井澤和司、西小森隆太、河合朋樹、八角高裕、平家俊男、小原收 京都、2013年7月
15. 第41回日本臨床免疫学会「Muckle-Wells 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異の検討」中川権史、西小森隆太、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、河合利尚、梅林宏明、武井修治、小林法元、小原收、Eva Gonzalez-Roca、Juan I. Arostegui、平家俊男下関、2013年11月27日
16. 第23回日本小児リウマチ学会 「一般検査データから見た家族性及び二次性血球貪食性リンパ球組織球症の特徴と病態の考察」 八角高裕、堀雅之、井澤和司、西小森隆太、小原收、平家俊男 大宮、2013年10月
17. 第23回日本小児リウマチ学会 “Muckle-Wells 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異の検討” 中川権史、西小森隆太、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、河合利尚、梅林宏明、武井修治、小林法元、小原收、Eva Gonzalez-Roca、Juan I. Arostegui、平家俊男 大宮、2013年10月
18. 第58回日本人類遺伝学会 「エクソンスキップに伴い、非典型的な表現型を呈した Filamin A 異常症の兄弟例」 小田紘嗣、西小森隆太、中川権史、日衛嶋栄太郎、井澤和司、河合朋樹、沼部博直、小原收、平家俊男 仙台 2013年11月
19. Nakagawa K, Shimura N, Shirasaki Y, Yamagishi M, Izawa K, Nishikomori R, Kawai T, Yasumi T, Heike T, Ohara O. Single cell fluorescent immunoassay of CINCA/NOMID. 7th international congress of FMA and AIDs, Lausanne, May 22, 2013.
20. Y. Shirasaki, M. Yamagishi, K. Izawa, K. Nakagawa, A. Nakahara, N. Suzuki, J. Mizuno, T. Sekiguchi, T. Heike, R. Nishikomori, S. Shoji, O. Ohara, " Real-time secretion analysis revealed correlation of IL-1beta release and loss of cell membrane integrity", MicroTAS 2013, pp.1686-1688, 27-31 Oct. 2013, Freiburg, Germany

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定も含む）
なし