

## 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業)

# 血液免疫系細胞分化障害による疾患の 診断と治療に関する調査研究

## 平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 野々山 恵章 (防衛医科大学校 小児科学講座 教授)

### 研究要旨

血液免疫系分化障害による疾患の診断と治療について、以下の研究を実施した。

#### a) 疾患原因遺伝子同定

次世代シーケンサーによるExome解析などの新規技術を用いて血液免疫系分化障害を起こす疾患の原因遺伝子同定を行った。その結果GATA2、EVI1、DNMT3B、ZBTB24、FANCE、FANCA、ITGB3、CXCR4、RAG1、Aprataxin、PI3Kdelta、PTEN、RECQL4、PIF1、RTEL1、WRN、ATM、BLM、TEP1、TPP1、STAT1が疾患原因遺伝子であることを解明した。

#### b) 迅速遺伝子解析法の確立

アンプリコンPCRにより候補遺伝子を増幅抽出し、次世代シーケンサーによる解析と組み合わせる新規技術を確立し、重症複合型免疫不全症を起こす 27 遺伝子を迅速に遺伝子解析する方法を確立した。MYH9 異常症のスクリーニングのために、既知の変異の好発部位を網羅する直接シーケンス法の系を構築した。

#### c) RNAシーケンス法の活用

網羅的エクソンシーケンシングを補完する目的のためのRNAシーケンシングの補完性を検証し、全血の白血球分画のRNAシーケンシングによって既知の免疫不全症原因遺伝子の78% (227遺伝子中の177遺伝子) が検出されることを見出した。

#### d) 疾患由来iPS細胞の樹立と分化実験への応用

好中球減少とT細胞欠損を呈する疾患である細網異形成症患者由来の繊維芽細胞から、iPS細胞を作成した。樹立したiPS細胞の評価後、血液前駆細胞に分化させ、コロニーアッセイ、骨髄系細胞やリンパ球への分化アッセイ、アポトーシス解析などのin vitro 解析を行った。患者クローンでは著明な分化障害があることを示すことができた。さらに細網異形成症の原因遺伝子であるAK2遺伝子およびAK1遺伝子を導入し、本疾患の血球分化障害が回復できることを示した。

慢性先天性好中球減少症患者由来iPS細胞を樹立し、好中球分化にさせ、患者クローンは成熟好中球への分化が著明に障害されていることを示すことができた。

Wiskott-Aldrich症候群では血小板産生低下が見られる。そこで、患者由来iPS細胞を樹立し、巨核芽球への分化異常、血小板産生低下があることを示した。血小板増

加因子であるTPOを加えたが産生増加は見られなかった。

e) 疾患病態解析

B細胞分化障害による低グロブリン血症を呈する患者原因遺伝子が、Fanconi貧血の原因遺伝子であるFANCEであることを世界で初めて見出した。

単球・樹状細胞とB細胞が欠損する疾患の原因遺伝子がGATA2であることを見出し、国内14症例の臨床的な解析を行った。その結果、易感染性に加え、加齢に伴い白血病を発症することを見出した。T細胞にGATA2が発現し、T細胞機能分化にGATA2が重要な役割を果たすことも見出した。

PI3Kdeltaの機能獲得性変異がリンパ球機能障害を起こすことを見出した。国内9例を同定した。全員易感染性を呈し、悪性リンパ腫に進展した患者様も2人いた。病態解析により、AKT, mTORの活性化が本疾患の病態であり、mTOR抑制剤がリンパ腫への進展、免疫不全を改善しうる可能性を示した。

原因不明の低ガンマグロブリン血症とされていた5症例で、Exome解析によりDNMT3BないしZBTB24の変異を見出し、染色体解析によりICF症候群と確定した。すなわち三徴がそろわないためICF症候群と診断されず、原因不明の免疫不全症とされている事を示した。またメモリーB細胞への分化が完全に停止していることも明らかになった。

先天性角化不全症(DKC)で、ロスモンド・トムソン症候群、毛細血管拡張性運動失調症、Bloom症候群の原因遺伝子であるRECQL4、ATM、BLMのヘテロ変異が高率に認められ、DKCの病態への関与が考えられた。Hoyeraal-Hreidarsson症候群の児について、Exome解析を行い、RTEL1遺伝子のcompound heterozygous mutationを確認した。RTEL1はテロメアの維持・複製、およびDNA二本鎖切断修復に関与して骨髄不全を起こすことを示した。

常染色体優性遺伝形式をとる先天性血小板減少症家系、4世代、10名の全エクソンシーケンスを行い、ITGB3遺伝子のT2231C変異を原因遺伝子変異候補として同定した。L718P変異の機能解析から、インテグリンb3の細胞膜周辺領域のヘテロ接合性変異が機能獲得型変異としてインテグリンシグナル伝達経路の恒常的部分活性化とRhoAシグナルの抑制を示すことを明らかにした。

STAT1はtype I IFN(IFN- $\alpha$  /  $\beta$ )とtype II IFN(IFN- $\gamma$ )の両方のシグナル伝達に重要な転写因子であり、機能喪失型変異によって細胞内寄生菌に対して易感染性を示し、メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症(MSMD)の原因遺伝子である。3家系8例の常染色体優性遺伝型のヘテロ接合性変異例を同定した。すべての変異でIFN- $\gamma$ 刺激に対し、STAT1リン酸化低下、核内移行の軽度低下、DNA結合能障害、dominant negativeの転写活性異常が認められた。

f) 原発性免疫不全症のデータベースであるPIDJを、より網羅的、系統的に解析ができるようにバージョンアップを行った。

以上、次世代シーケンサーを用いたexome解析、iPS細胞による分化実験、アンブリコンPCRによる遺伝子解析、WEBベースの患者登録システムであるPIDJの活用などにより、血液免疫系の分化障害による疾患の病態解明、原因遺伝子同定に十分な成果を上げることが出来た。

## 研究分担者

### 川口 裕之

防衛医科大学学校小児科学講座、准教授

### 今井 耕輔

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科小児・周産期地域医療学講座、寄附講座准教授

### 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、特定拠点教授

### 小原 收

公益財団法人かずさDNA研究所、ヒトゲノム研究部、副所長  
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、グループディレクター

### 小島 勢二

名古屋大学大学院医学系研究科小児科、教授

### 山口 博樹

日本医科大学血液内科、講師

### 小林 正夫

広島大学大学院医歯薬保健学小児科学、教授

### 原 寿郎

九州大学大学院医学研究院成長発達医学小児科、教授

## A. 研究の目的

造血幹細胞から血液系細胞と免疫系細胞が分化成熟する。この血液免疫系細胞の分化障害により、様々な疾患が発症する。症状が多彩なため、診断が困難で、診断の遅れ、治療の遅れが起きている。これらの疾患は、血液免疫系細胞の分化に関与する遺伝子の障害が原因であり、原因遺伝子の同定は、遺伝子診断を可能にし早

期診断に貢献する。さらに遺伝子機能解析により病態を理解し、より適した治療法の開発につながる。

本研究では、血液免疫系細胞分化障害による疾患の遺伝子同定、迅速な遺伝子診断法の確立、診断基準・治療ガイドライン作成、スクリーニングなどにより早期診断、病態解明、病態に即した適切な早期治療を行い、疾患予後を改善することを目的とした。

## B. 研究方法

対象疾患は、血液系・免疫系細胞の両者の分化に障害をきたすという特徴を持つ、1)慢性好中球減少症、2)家族性血小板減少症(X連鎖血小板減少症、Wiskott-Aldrich症候群、Epstein症候群(MYH9異常症))、3)細網異形成症、4)Emberger症候群、5)慢性肉芽腫症、6)家族性血球貧食症候群、7)申請者が見出した新規血液免疫系細胞分化障害である家族性樹状細胞欠損症とした。4)、7)はGATA2変異が共通の原因であることが判明し、GATA2異常症とも呼ばれる。

さらに、研究途上で、ICF症候群タイプ1、タイプ2、Aprataxin異常症、Fanconi貧血、WHIM症候群、PI3K異常症、PTEN異常症、RAG1異常症、CD40L欠損症、STAT1異常症においても新規知見を見出したので、対象疾患として追加した。

疫学的にはこれらの疾患は国内に1,000例程度患者が存在する。

研究方法については、遺伝子診断については、既知遺伝子についてはアンプリコンPCRにより候補遺伝子を増幅抽出し、次世代シーケンサーによる解析と組み合わせる新規技術により迅速診断法を確立した。

新規遺伝子同定については、次世代シーケンサーによる Exome 解析、疾患由来 iPS 細胞による in vitro 分化系、RNA シーケンシング、全ゲノムメチル化解析、SNP array などの新規技術を用いた。例えば、Exome 解析で変異を認めた候補遺伝子について、各疾患由来 iPS 細胞に遺伝子導入し、血液免疫系幹細胞への正常分化を解析する手法で原因遺伝子を同定した。その際、申請者が構築した PIDJ 免疫不全症データベースに保存してある患者細胞、DNA、家族歴、臨床情報を活用した。

病態解析としては、遺伝子機能解析として、酵素活性、リン酸化、サイトカイン産生能、8 color FACS 解析、コロニーアッセイ、TREC/KREC 測定、染色体断裂試験、モノユビキチンアッセイなどで、血液系細胞と免疫系細胞をともに解析した。特に血液免疫系細胞の分化を検討する方法として、iPS 細胞からの好中球、単球、樹状細胞、T 細胞、B 細胞、N 細胞、血小板などの分化系を用いた。

治療法の開発として、造血幹細胞移植の必要性を決める目的で、患者予後解析を行った。その際、TREC/KREC のコピーナンバーも参考にした。また、TCR, BCR レパートワ解析、somatic hyper mutation 解析、クラススイッチ解析などを行い、T 細胞機能、B 細胞機能を解析し、グロブリン補充療法の必要性、抗ウイルス薬、バクタ、抗真菌薬、抗生剤の予防投与の必要性について検討した。

患者の臨床症状、検査所見、予後などを解析し、診断および治療法のガイドラインを作成した。

患者会との連携により、患者が求める難病対策を把握し、それに対応する研究が行なった。また研究成果を患者に周知した。

#### (倫理面への配慮)

原発性免疫不全症の早期診断法の確立に関する研究(実施責任者:野々山恵章、防衛医科大学校倫理委員会、平成21年7月27日承認)

先天性免疫不全症の遺伝子解析研究(実施責任者:野々山恵章、防衛医科大学校倫理委員会、平成21年12月11日承認)

先天性免疫不全症に対する造血幹細胞移植に関する検討(実施責任者:野々山恵章、防衛医科大学校倫理委員会、平成23年7月1日承認)

原発性免疫不全症の遺伝子解析(実施責任者:今井耕輔、東京医科歯科大学倫理委員会、平成20年6月24日承認)

小児期発症疾患の遺伝子素因解明に関する研究(実施責任者:今井耕輔、東京医科歯科大学倫理委員会、平成24年11月5日承認)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究(実施責任者:中畑龍俊、京都大学医の倫理委員会、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)

ヒト疾患特異的iPS細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究(実施責任者:中畑龍俊、京都大学医の倫理委員会、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)

網羅的な全エクソンシーケンシング研究(実施責任者:小原収、かずさDNA研究所倫理委員会、平成20年2月5日承認)

RNAシーケンシングを発現プロファイル解析および塩基配列解析研究(実施責任者:小原収、かずさDNA研究所倫理委員会、平成24年10月16日承認)

稀少小児遺伝性血液疾患における原因遺伝子の探索研究(実施責任者:小島勢二、

名古屋大学医学部倫理審査委員会、平成24年2月10日承認)

先天性骨髄不全症の遺伝子解析研究(実勢責任者:山口博樹、日本医科大学遺伝子倫理審査、平成24年3月7日承認)

原発性免疫不全症の遺伝子解析研究(実施責任者:原寿郎、九州大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委審査委員会、平成20年6月3日承認)

## C. 研究結果

### a) 原因遺伝子同定

原因不明の免疫不全症患者 74 例について、exome 解析を行い、その中から原因遺伝子と考えられる遺伝子変異について、キャピラリーシーケンスにより変異の確認を行った。候補原因遺伝子の iPS 細胞などを用いた機能解析や、候補遺伝子が既疾患の原因遺伝子であればその診断法を活用することにより、免疫不全症を起こす新しい原因遺伝子を 19 種類同定した。

明らかになった遺伝子は、FANCE、FANCA、GATA2、DNMT3B、ZBTB24、PI3Kdelta、PTEN、ITGB3、CXCR4、RAG1、Aprataxin、RECQL4、PIF1、RTEL1、WRN、ATM、BLM、TEP1、TPP1、STAT1 である。これらの遺伝子が血液系と免疫系に障害を持つ疾患の原因遺伝子であることを解明した。

### b) アンプリコン PCR による迅速遺伝子診断法の開発

700 種類のプライマーを 1 チューブに入れて PCR 増幅を行うアンプリコン PCR により候補遺伝子を複数増幅抽出し、次世代シーケンサーによる DNA 解析と組み合わせる新規技術を確立した。これにより、重症複合型免疫不全症を起こす 26 遺伝子を迅速

に遺伝子解析が可能になった。アンプリコン PCR 法と次世代シーケンサーを組み合わせた遺伝子解析が、遺伝子診断の迅速化に有効である事、MSMD、PI3K、CGD、骨髄不全症など他の疾患の遺伝子解析にも応用出来る事を示した。

MYH9 異常症のスクリーニングのために、既知の変異の好発部位を網羅する直接シーケンス法の系を構築した。

### c) RNA シーケンスの検証

網羅的エクソンシーケンシングを補完する目的のための RNA シーケンシングの補完性を検証し、全血の白血球分画の RNA シーケンシングによって既知の免疫不全症原因遺伝子の 78% (227 遺伝子中の 177 遺伝子) が検出されることを見出した。

分化障害が起きている GATA2 異常にゲノム編集を用いて正常化させ、各分化段階に分化させ発現誘導される RNA を、正常化していない iPS 細胞からの分化段階の細胞の RNA と比較する方法で、各分化段階における新規分化因子を同定している。GATA2 欠損症では mDC、pDC、マクロファージ、B 細胞、NK 細胞が欠損し、T 細胞の分化障害も認められる GATA2 欠損症由来 iPS 細胞は既に樹立し、各リニエージへの in vitro での分化方法は確立しているため、RNA シーケンスにより新規分化因子を同定し、新規治療に結びつけ、創薬に応用する。

### d) 疾患由来 iPS 細胞の樹立と分化実験

細網異形成症患者由来の繊維芽細胞から iPS 細胞を作製した。樹立した iPS 細胞の評価(トランスジーンサイレンシングの確認、未分化マーカーの確認、染色体検査、奇形腫アッセイ)が完了した。これを血液前

駆細胞に分化させ、コロニーアッセイ、骨髓系細胞やリンパ球への分化アッセイ、アポトーシス解析などの *in vitro* 解析を行った。患者クローンでは著明な分化障害があることを示すことができた。さらに細網異形成症の原因遺伝子である *AK2* 遺伝子を導入し、本疾患の血球分化障害が回復することを示した。さらに、メタボローム解析を行い、その結果から候補を絞り込み、*in vitro* で好中球の分化を正常化させる因子を発見した。これまでに他の疾患でも使用されていて安全な因子であるので、治療への応用が可能であると考えられた。

重症先天性好中球減少症の根本治療は造血幹細胞移植であるが、移植前の血球は減少していることから、患者からの血液細胞での研究は非常に困難である。このため、患者由来 *iPS* 細胞樹立は本疾患の病態解析にとって、非常に有望と考えられる。今回の研究で、*HAX1* 遺伝子変異による重症先天性好中球減少症患者から、*iPS* 細胞を樹立することに成功した。患者由来 *iPS* 細胞からの好中球への分化アッセイを行ったところ、正常 *ES/iPS* 細胞や正常原因遺伝子修復後の患者由来 *iPS* 細胞からの好中球と比較して、著明な好中球分化障害を認められた。これは患者骨髓所見と一致しており、本疾患の病態再現に成功した。

さらにこの実験系を活用し、*HAX1* 異常症で、好中球分化を促進する新規分化因子を探索した。その結果細網異形成症で好中球を分化させる因子が、*HAX1* 異常症でも好中球を正常に分化させることを見出し、治療薬として応用出来る可能性を示した。

*Wiskott-Aldrich* 症候群では血小板産生低下が見られる。そこで、患者由来 *iPS* 細胞を樹立し、血液幹細胞に分化させ、コロニー解析や血小板産生能について検討した

ところ、巨核芽球への分化異常、血小板産生低下が見られた。血小板増加因子である *TPO* を加えたが産生増加は見られず、新規分化因子を *RNA* シークエンスなどの手法で同定している。この分化因子が *T* 細胞などの免疫系細胞の分化を正常化するか検討中である。以上の結果から、*iPS* 細胞を用いた分化系は治療薬の開発に有用であると考えられた。

#### e) 疾患病態解析

新規に確定した原因遺伝子のうち代表的な疾患の病態は以下の通りである。

##### i) *FANCE* および *FANCA* 異常症

*B* 細胞分化障害による低グロブリン血症を呈する患者の原因遺伝子が、Exome 解析により、*Fanconi* 貧血の原因遺伝子である *FANCE* および *FANCA* であることを見出した。患者由来単核球を用い、染色体脆弱試験で *Fanconi* 貧血特有の結果を示した。さらに 28 例の *Fanconi* 貧血患者で *B* 細胞の新生能を見るマーカーである *KREC*、*T* 細胞新生能をみる *TREC* を解析したところ、5 例で *KREC* が陰性で 2 例で *TREC* が陰性であることが判明した。これにより、*Fanconi* 貧血では免疫不全を取ることがあることが明らかになった。すなわち、*FANCE* 異常および *FANCA* 異常が骨髓不全の症状を呈さず、*B* 細胞欠損と低グロブリン血症を示すことを、世界で初めて示した。したがって免疫不全症において *FANCA* 遺伝子群の異常を解析することが必要であることが判明した。

##### ii) *GATA2* 異常症

Exome 解析により単核球・樹状細胞と *B* 細胞が欠損する疾患の原因遺伝子が *GATA2* であることを見出し、*PIDJ* を介して集積され

た国内症例の解析から、国内 14 症例を見出した。その臨床的な解析を行った。その結果、T 細胞免疫不全による易感染性を呈すること、加齢に伴い白血病を発症することを明らかにした。thymic naive T 細胞/TREC の低下、IL4、IL17 産生低下など T 細胞免疫が低下していることを見出した。さらに T 細胞を活性化すると GATA2 が発現する事を見出し、GATA2 は単球・樹状細胞のみならず、T 細胞の発生・分化に重要な役割を果たしていると考えられた。

また、これまで家族性樹状細胞欠損症、Emberger 症候群と診断されていた疾患が GATA2 異常症として統一して診断できることを示した。

### iii) PI3K, PTEN

PI3Kdelta の機能獲得性変異がリンパ球機能障害を起こすことを見出した。国内 9 例を同定した。全員易感染性を呈し、悪性リンパ腫に進展した患者様も 2 人いた。5 人で造血幹細胞移植がなされて治癒し、3 人が移植を検討されていた。1 例は表現型が軽症であり、他の変異と異なっているため、Akt のリン酸化、mTOR のリン酸化の亢進が軽度である可能性があり、遺伝子変異と臨床症状の相関を検討している。

PTEN 欠損の患者を見出した。表現型が PI3Kdelta 異常と同じであった。PTEN は PI3K を抑制しているため、PTEN 欠損では、PI3Kdelta 機能が亢進することにより免疫不全を合併していると考えられた。実際に PI3K 下流の Akt の過剰リン酸化が認められ、mTOR を活性化していると考えられた。

こうした実験により、PTEN, PI3K, Akt, mTOR という一連の pathway の異常による疾患概念を提唱した。

また、病態解析により、mTOR の活性化が本疾患の病態であり、mTOR 抑制剤がリンパ腫への進展、免疫不全を改善しうる可能性を示した。

### iv) ICF 症候群

ICF 症候群は免疫不全、染色体異常、顔貌異常を三徴とする遺伝性疾患である。原因遺伝子は、患者の半数で DNA のメチル化に関わる酵素をコードする DNMT3B および ZBTB24 であることが確定している。本研究で、原因不明の低ガンマグロブリン血症とされていた 5 症例で、Exome 解析により DNMT3B ないし ZBTB24 の変異を見出し、染色体解析により ICF 症候群と確定した。すなわち三徴がそろわないため ICF 症候群と診断されず、原因不明の免疫不全症とされている事を示した。

ICF 症候群で免疫不全症が何故起きるかについては全く不明である。そこで、ICF 症候群において免疫不全症を起こす原因を明らかにする。本研究で ICF 症候群患者では、B 細胞がメモリー B 細胞のマーカーである CD27 が全く発現していないこと、抗体産生が不良であることを見出した。一方、B 細胞新生能のマーカーである KREC は正常であった。このことから ICF 症候群に見られる免疫不全は、B 細胞の抗体産生細胞、メモリー B 細胞への最終分化の障害であると考えられた。

### v) STAT1 異常症

メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症 (MSMD) は BCG や非結核性抗酸菌など弱毒抗酸菌に易感染性を呈することを特徴とする。IFN- レセプター (IFN- R) 1 欠損症、IFN- R2 欠損症、IL-12 欠損症、IL-12R 欠損症、STAT1 欠損症、NEMO 異

常症など種々の病因が包含されている。

STAT1 は type I IFN(IFN- $\beta$  /  $\gamma$ ) と type II IFN(IFN- $\gamma$ ) の両方のシグナル伝達に重要な転写因子であり、機能喪失型変異によって細胞内寄生菌に対して易感染性を示すことが知られている。本邦において 3 家系 7 例の常染色体優性遺伝型のヘテロ変異例を同定した。変異部位は SH2 domain が 1 例(K673R)、母と男児家系は tale segment domain(Y701C)、祖母、父、患児を含む 4 症例は coiled coil domain(G250E) でいずれも新規変異であった。いずれの症例においても臨床的には多発性骨髄炎を呈し、病理所見は非乾酪性肉芽腫であった。抗酸菌培養で陽性を示したのは 1 家系のみであった。すべての家系で末梢血単球のインターフェロン刺激によるリン酸化低下を認めた。STAT1 null osteosarcoma cell への STAT1 変異遺伝子の強制発現実験を行い、遺伝子変異を有する STAT1 のシグナル伝達を検討した。すべての変異で IFN- $\gamma$  刺激に対し、STAT1 リン酸化低下、核内移行の軽度低下、DNA 結合能障害、dominant negative の転写活性異常が認められた。

常染色体優性型の STAT1 異常症の報告は世界で 10 家系足らずであるが、この数年の遺伝子検査の進歩から本邦でも 3 家系を同定した。BCG 接種に対する過剰反応や多発性骨髄炎を呈する症例においては、STAT1 異常を含めた MSMD の診断が不可欠である。

#### vi) 骨髄不全症の遺伝子同定

既知の原因遺伝子に変異を認めず、テロメア長の短縮が確認された骨髄不全 16 症例を集積した。4 症例において、直接塩基決定法では原因遺伝子が同定できなかったが、次世代シーケンサーによって既知

の原因遺伝子として、RECQL4、PIF1、RTEL1、WRN、ATM、BLM の変異を同定することが出来た。

ATM については B 細胞新生能のマーカーである KREC が 22 例全例で検出感度以下(正常では 10,000 コピー)であることを見出し、新生児スクリーニングに応用可能であることを示した。また血清 IgM が 1,000 以上の高値をとる症例を 5 例見出し、KREC が検出感度以下であるとともに、T 細胞新生能のマーカーである TREC も検出感度以下(正常では 10,000 コピー)であることを見出した。免疫系の調節の異常を反映していると考えられ、臨床症状も重症であった。TREC、KREC が重症度判定のマーカーとなると考えられた。

vii) 先天性血小板減少症の遺伝子同定  
常染色体優性遺伝形式をとる先天性血小板減少症家系、4 世代、10 名が血小板減少と軽度の出血傾向を示した。疾患原因遺伝子を同定するために家系内患者 4 名のゲノム DNA を用いて全エクソンシーケンスを行った。4 名に共通する 90 のアミノ酸置換を伴う遺伝子変異の中から、ITGB3 遺伝子の T2231C 変異を原因遺伝子変異候補として同定した。L718P 変異の機能解析から、インテグリン b3 の細胞膜周辺領域のヘテロ接合性変異が機能獲得型変異としてインテグリンシグナル伝達経路の恒常的部分活性化と RhoA シグナルの抑制を示すことを明らかにした。インテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3(GP IIb/IIIa 複合体)はフィブリノゲン (Fg) とフォンウィルブランド因子 (VWF) の受容体で、そのリガンドとの結合は血栓形成の最終段階である血小板凝集に不可欠なシグナル伝達である。これらの機序が血小板機能異常と大小不同を伴った血小板減少に関与して

いることが示唆された。

#### f) PIDJのバージョンアップ

原発性免疫不全症のデータベースであるPIDJを、より網羅的、系統的に解析ができるようにバージョンアップを行った。必須入力項目の設定、全免疫不全症班会議施設が閲覧が可能になるように変更した。登録数は2792件に達し、平均で1日に1.5人の新規患者が登録されるようになった。

### D. 考察

原因遺伝子が既知の疾患については、アンプリコン PCR と次世代シーケンサーによる遺伝子診断法の確立により、迅速に確定診断ができるようになる。次世代シーケンサーによる deep sequence で診断が可能になるため、従来の DNA sequence に対し費用対効果が高く有用である。

遺伝子が未知の疾患(家族性樹状細胞欠損症など)については、原因遺伝子同定により遺伝子診断が可能になり、病態解明、新規治療法開発に貢献出来る。次世代シーケンサーによる Exome 解析で新規遺伝子を同定する方法は、従来法に比べ費用対効果が高く有用である。iPS 細胞からの血液免疫系細胞の分化系と、RNA sequence による分化段階で発現が更新する遺伝子を同定することで、新規分化因子が同定出来ると考えられる。

AK2 遺伝子変異による細網異形成症患者2名および HAX1 遺伝子変異による重症先天性好中球減少症患者1名から iPS 細胞を樹立することに成功した。細網異形成症では、原因遺伝子の導入により、血球分化が正常化し、これら難病の新しい治療法の開発につなげた。患者由来 iPS 細胞を原因遺伝子同定、病態解明に用いることが可能

になると考えられた。

以上の結果をもとに、診断および治療法のガイドラインを作成する。WEB 上での公開などにより、一般への疾患の周知をはかり、診断漏れを防ぐ。患者家族会と十分に連携し、ホームページを通じた Web ベースの情報交換により、患者が必要とする情報を周知する。これにより、稀少難病患者の予後改善に貢献できる。

申請者らが構築したデータベース PIDJ は、本研究の遂行に非常に有用であった。このデータベース構造を公開し、他のデータベース構築において活用されると、難病全体に関する貴重なデータベースになると考えられる。

### E. 結論

以上、血液免疫系分化障害による疾患群の診断、病態解明、治療について大きな成果を上げることが出来た。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

巻末別紙参照。

#### 2. 学会発表

巻末別紙参照。

### 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