

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

研究分担者 小原 収 ((公財)かずさDNA研究所 副所長)

研究要旨

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、早期治療により疾患予後を改善することを目指して、本分担研究では次世代シーケンサーによるパネル遺伝子解析の実運用と原因未知の血液免疫系細胞分化障害の遺伝的素因探索のための網羅的な遺伝子解析を実施した。

A. 研究の目的

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)申請者ら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を主たる対象とし、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、早期治療により疾患予後を改善することを最終的な目的とする。

B. 研究方法

先天的免疫不全症臨床アーカイブ PIDJ (<http://pidj.rcai.riken.jp/index.html>) に登

録されている血液系・免疫系分化障害の症例について、それぞれの疾患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。

血液免疫系細胞の分化異常に起因する疾患の遺伝子診断の効率化、高精度化を目指して、次世代シーケンサーによる遺伝子診断の実用化のためにマルチプレックスPCR法による遺伝子パネル分析の前処理プロセスの条件検討を行う。また、既知遺伝子に変異が見られない事の確認された症例については、網羅的なエクソンシーケンシングとRNAシーケンシングの併用により、疾患原因候補変異の検出を行う。特に、後者については、厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業「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(研究代表者、松原洋一)と連携して研究を進めた。

(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。かずさDNA研究所では匿名化された情報のみを取り扱うが、遺伝情報へのアクセスは限られた作業者のみがアクセスできるシステムで運用した。

C. 研究結果

よく既知遺伝子が知られている血液・免疫系疾患の代表例として、分類不能型免疫不全症 (Common Variable Immunodeficiency, CVID) と重症複合免疫不全症 (Severe Combined Immunodeficiency, SCID) 解析のために、それぞれに対してパネルに搭載する遺伝子を以下のように決定した。

CVID		
遺伝子名	アンプリコン数	塩基配列長
ICOS	5	2186
TACI	6	2683
BAFFR	3	1338
CD19	11	4336
MS4A1	6	2233
CD21 (CR2)	31	9392
CD81	8	3227
PLCG2	32	11038
LRBA	61	24320
total	163	60753 base

SCID		
遺伝子名	アンプリコン数	塩基配列長
ADA	11	3553
CD8A	6	2492
NHEJ1	7	2491
COR01A	10	3457
CRACM1	5	1913
DCLRE1C	16	6224
FOXN1	10	3766
IL2RG	8	2848
IL7R	9	3308
JAK3	23	7722
LCK	12	3682
LIG4	10	4428
PNP	6	2256
PRKDC	84	30683
PTPRC	30	10374
RAG1	11	5062
RAG2	6	2659
STAT5A	18	6062
ZAP70	12	4388
RMRP	1	435
CD3G	6	1820
CD3D	5	1655
CD3E	7	2497
AK2	7	2362
CD247	8	2532
total	328	118669 base

総アンプリコン数が200以下のCVIDパネルについては、ロシュ社卓上次世代シーケンサーGS Juniorでのアンプリコンシーケンスのパイプラインを立ち上げ、実際の検

体の解析を進めた。SCID パネルについては、アンプリコン数が300を超えるため、同じロシュ社の卓上シーケンサーでは効率的な分析が困難なため、より処理量の大きなイルミナ社の MiSeq によるパネル診断系の構築を当研究班代表のグループとともに進めた。アンプリコンによる鋳型調製のマルチプレックス化がまだ不十分なために、SCID 症例の実検体の受け入れまでには至れなかったが、実験系として配列解析が可能であることは確認できた。

既に既知候補遺伝子の除外診断が終えられている家族検体を含む検体については、全エクソン配列解析と RNA Sequencing 解析を実施し、データ蓄積を進めた。その結果、いくつかの症例において疾患原因と思われる候補変異を同定できた。それらの多くは、疾患原因遺伝子として知られる遺伝子に生じた新規変異であり、その症状が非典型的なために除外診断の際に解析対象からもれていた遺伝子に見られる変異であった。それ以外の候補については、候補変異の機能的な評価もしくは同症状を示す他検体の解析を経ないで結論に至れないため、ノックインマウスの準備などによる機能解析に向けた準備を進めた。RNA Sequencing データも順調にデータ蓄積を進めることができたが、今年度解析した検体においては、遺伝子発現プロファイルから原因変異を推定できたケースはなかった。

D. 考察

卓上型次世代シーケンサーの導入により、安価にルーチンの確定診断目的の遺伝子解析が実現できたため、遺伝子パネルベースの解析が現実のものとなった。エ

クソーム解析の結果も、症状からの絞り込みを緩めることで、確定診断に至れる割合を確実に向上させられることが示されており、今後さらにその検査の経済性を評価しながら運用していくことが重要だと考える。網羅的なエクソーム解析の臨床的な有用性は実証されているものの、未だ遺伝的な疾患原因に至れる割合は劇的には高まっていない。今後、巨視的な疾患症状の把握だけでなく、分子レベルの症状の定量的な記載を実現することが重要であり、それをどうやって臨床現場で実現するかが課題であることが明確となった。

E. 結論

- 1) CVID パネル解析の実運用を開始し、SCID パネルについても解析の実現可能性は実証できた。
- 2) 次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い、複数の症例において疾患原因変異の候補を得た。確実な結論に至れるのは、既知疾患遺伝子での変異による非典型症状を呈した症例である場合が多く、次世代シーケンシングによる遺伝子診断の有用性が示せた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 33(4):857-864

- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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 Invest Allergol Clin Immunol*. 2013;23(1):65-7.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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-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 「食道潰瘍を反復した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ム解析」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 RAG 1 異常と同定しえた 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 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
- G. 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