

201324065B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

先天性免疫不全症候群の病態解明と予後改善に関する研究

平成24年度～平成25年度総合研究報告書

研究代表者 峯岸克行

平成26(2014)年3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

先天性免疫不全症候群の病態解明と予後改善に関する研究

平成24年度～平成25年度総合研究報告書

研究代表者 峯岸克行

平成26(2014)年3月

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業

先天性免疫不全症候群の病態解明と予後改善に関する研究

目次

I 総合研究報告・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	5
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教授）	
II 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・	23
III 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・	31

# I 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

総合研究報告書

先天性免疫不全症候群の病態解明と予後改善に関する研究

研究代表者 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教授）

## 研究要旨

先天性免疫不全症候群の病態解明と予後改善に関する研究班は、先天性免疫不全症の病態解明と予後改善を目的として以下の研究を行った。

### 1. 日本人高 IgE 症候群症例の臨床像の解明

日本人高 IgE 症候群の臨床的特徴を明らかにするために、全国疫学アンケート調査をおこなった。対象の総患者数は 46 名で、男女比は 25 : 20、年齢は 0 歳から 50 歳で中央値は 11 歳であった。責任遺伝子は、*STAT3* 遺伝子変異 20 例、*TYK2* 遺伝子変異 1 例、検索中・遺伝子変異なし 9 例であった。骨系統の異常は、*STAT3* 変異例のみで認められた。*STAT3* 変異の有無で細菌・真菌・細胞内寄生菌に有意差は認めなかったが、常染色体性劣性遺伝の高 IgE 症候群に多いとされる重篤なウイルス感染症が *STAT3* 変異例でもみられた。そのほかこれまでに報告されていない新規の臨床症状として、精神運動発達遅滞が 4 例、若年発症の脳梗塞が 1 例認められた。この臨床疫学調査を基にして、以下の高 IgE 症候群の診断基準と重症度分類を作成した。

### 高IgE症候群診断基準と重症度分類

（大症状）

- 1) 血清IgE値が2000 IU/ml以上の高IgE血症
- 2) 好酸球数800/mm<sup>3</sup>以上
- 3) 皮膚膿瘍に5回以上罹患
- 4) 肺炎に4回以上罹患
- 5) 肺嚢胞
- 6) 4本以上の乳歯の脱落遅延

7) 20度以上の脊椎側彎症

8) 3回以上の病的骨折

(小症状)

1) 血清IgE値が500 IU/ml以上の高IgE血症

2) 好酸球数700/mm<sup>3</sup>以上

3) 皮膚膿瘍に3回以上罹患

4) 肺炎に2回以上罹患

5) 気管支拡張症

6) 1本以上の乳歯の脱落遅延

7) 15度以上の脊椎側彎症

8) 1回以上の病的骨折

9) 特有の顔貌

10) 新生児期に発症するアトピー性皮膚炎

11) カンジダ感染症

12) 関節の過伸展

13) 悪性リンパ腫

#### 判定基準

大症状5項目以上、大症状4項目と小症状2項目以上、大症状3項目と小症状4項目以上、大症状2項目と小症状6項目以上、または大症状1項目と小症状8項目以上で高IgE症候群と診断する。

大症状8項目、大症状7項目と小症状2項目以上、大症状6項目と小症状4項目以上、大症状5項目と小症状6項目以上、大症状4項目と小症状8項目以上で重症に分類、それ以外で高IgE症候群と診断された症例を軽症に分類する。

## 2. 先天性免疫不全症候群の病態形成機構の解明

### (1) モデルマウスを利用した高 IgE 症候群の病態解明

高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎と血清 IgE の著しい高値に黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍と肺炎を合併する先天性免疫不全症である。STAT3 遺伝子のドミナントネガティブ (DN) 変異が原因で発症する 1 型の高 IgE 症候群では、骨粗鬆症、乳歯の脱落遅延などの骨病変の発症が特徴的である。高 IgE 症候群の病因は明らかになったが、その病態形成機構はほとんど明らかになっていない。そこで、我々は高 IgE 症候群の病態を検討するために、まずそのモデルマウスを作成し、アトピー性皮膚炎と骨異常の病態形成機構の検討を行った。アトピー性皮膚炎の発症メカニズムを検討するためにモデルマウスを用いてアトピー性皮膚炎モデルを作成する検討を行った。ハプテンを皮膚に直接反復塗布することにより誘導する皮膚炎において、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、ハプテン特異的血清 IgE、Th1/Th2 サイトカイン上昇を認めた。これは、ヒトのアトピー性皮膚炎と類似しており、このモデルは高 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と考えられた。

次に高 IgE 症候群に骨病変の発症機構を解明するために STAT3 遺伝子のドミナントネガティブ (DN) 変異を骨芽細胞特異的に発現するモデルマウスを作成し、その病態を検討した。骨芽細胞特異的に Stat3 変異体を発現するマウスにおいても、全身に Stat3 変異体を発現するマウスと同等の骨異常を認めたので、高 IgE 症候群の骨異常の主要な原因は骨芽細胞と考えられた。

### (2) 高IgE症候群における高IgE血症に関与する遺伝的要因の探索

高IgE症候群は、近年その原因としてSTAT3、TYK2の遺伝子変異が同定されたが、その臨床経過は様々であり、STAT3の遺伝子変異が全く同一でも重症型で若年で不幸な転帰をとる症例から、軽症型で比較的良好な予後の症例が存在する。そのため、STAT3以外の遺伝的要因の関与の可能性もある。また、しばしば高IgE症候群は重症アトピー性皮膚炎との鑑別は困難であり、両者に共通の遺伝的要因が存在する可能性も考えられる。本研究では高IgE症候群の高IgE血症の遺伝的要因を明らかにするとともに、アトピー性皮膚炎関連遺伝子群を同定することを目的として実施した。日本人のゲノムワイド関

連解析 (GWAS) により同定された8つのゲノムワイド水準 ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ) をみたく疾患関連領域について、重症アトピー性皮膚炎症例(血清IgE値 $> 10000$  IU/ml) 149例について関連解析を行った。その結果、2ヶ所の領域、GLB1-CCR4領域(rs6780220、 $P = 1.6 \times 10^{-4}$ )、IL1RL1-IL18R1-IL18RAP領域(rs13015714、 $P = 2.1 \times 10^{-4}$ )で強い関連を認めることが明らかになった。

### 3. 先天性免疫不全症候群の病因解明

#### 次世代シーケンシングによる高IgE症候群の病因と予後予測判定因子の発見

先天性免疫不全症候群の高IgE症候群に焦点を当て、この症候群の病因と予後予測因子を解明する。さらに、単一遺伝子の異常によって生じる多様な病態の発症機序を探り、骨粗鬆症、アトピー性皮膚炎、高IgE血症などの新規の診断法、治療法とケア、予後予測に結びつける。特に本研究では、高IgE血症の臨床検体の血球のゲノミクス解析により、各症例における遺伝的変異情報と血球での遺伝子発現動態を解析することを目的とする。本研究を実施するため、理化学研究所統合生命医科学研究センターに新たにイルミナ社HiSeq1000を導入し、ライブラリー構築の実験系から後のデータ解析までのバイオインフォマティクス系のパイプラインを構築した。更に、ヒト臨床検体を用いて、特に白血球分画、単核球分画、造血・免疫系分画細胞についてのRNAシーケンシングを実施し、臨床検体での解析のためのリファレンスとする発現プロファイルデータを蓄積した。特に、本研究では、RNAシーケンシングを全エクソンシーケンシングデータの補完のために使用する予定であるため、RNAシーケンシングデータからリファレンス配列との塩基置換を検出するための解析システムも立ち上げた。その実験結果から、同じ次世代シーケンシングのプラットフォームを用いても、RNAシーケンシングにおいては全エクソーム解析よりも多数の塩基置換が検出される事が明らかとなった。また、66例の臨床検体の全エクソン解析を実施し、全エクソン解析結果から各症例の候補変異の蓄積を進め、現在詳細なバイオインフォマティクス解析を実施している。

### 4. 先天性免疫不全症候群に対する予後改善に関する検討

重症複合免疫不全症は、代表的な先天性免疫不全症の1つで、生後早期に造血幹細胞移植を行うことができれば、その予後は良好である。出生当日に診断し移植前処置な



しで臍帯血移植を行ったCD3 $\delta$ 欠損症の2症例に対して、移植後の免疫学的再構築の長期的経過を検討した。移植は大きな合併症もなく成功し、直後よりT細胞数の増加も認められた。重症複合免疫不全症の中で頻度が高く同様のT-B+の病態をとるcommon $\gamma$ 鎖欠損症の場合と異なり、CD3 $\delta$ 欠損症患者では、前処置なしの造血幹細胞移植でも免疫グロブリン値は正常値を保ち、抗体産生能も正常に認められた。一方、長期的には、T細胞数やPHAに対するリンパ球幼若化反応は正常よりもやや低値で推移し、TRECも低値であった。現在それぞれ9歳、5歳で生存しており、QOLも良好である。前処置なしでの造血幹細胞移植でT細胞はドナー由来、B細胞がレシピエント由来でもレシピエントB細胞からの抗体産生能の回復が認められた。同じ表現型の重症複合免疫不全症でも、病因により適切な治療法が異なる可能性が示唆された。

#### 分担研究者

高田英俊・九州大学大学院医学研究院成長  
発達医学・小児科学分野准教授

小原 収・独立行政法人理化学研究所 統  
合生命医科学研究センター 免疫ゲノミク  
ス研究グループ グループリーダー

玉利真由美 独立行政法人理化学研究所統  
合生命医科学研究センター 呼吸器疾患研  
究チーム チームリーダー

#### 研究協力者

広田朝光 独立行政法人理化学研究所統合  
生命医科学研究センター 呼吸器疾患研究  
チーム研究員

## I. 研究の目的

先天性免疫不全症は、ヒト免疫系遺伝子の異常が原因で発症する疾患である。代表的な病型だけでも約40種存在する。その原因遺伝子として150個以上の遺伝子が同定されている。最近同一の先天性免疫不全症で同一の遺伝子異常があっても軽症例と重症例があり、予後の予測が困難であることが明らかになってきた。本研究では、先天性免疫不全症の詳細な検討を行い、その臨床症状、免疫能、遺伝子要因を検討することにより、予後因子を明らかにし、各症例に適切な個別化医療を提供する基盤を整備することを目的とする。その突破口として、研究代表者が原因遺伝子を最近発見した高IgE症候群を最初の対象とし、次に、先天性免疫不全症全体で同様の検討を行う。

高IgE症候群はSTAT3の遺伝子変異が原因で発症するが、その遺伝子変異にホットスポットが存在することが特徴である。すなわち全体の変異の約3分の2はSTAT3の3個のアミノ酸に集中しているため同じ変異を有している高IgE症候群症例を集積することが可能な点が本研究の有利な点で、これを利用して同じ変異を有する高IgE症候群に重症型と軽症型が存在することを見出した。この観察に基づき、重症例に対しては、造血幹細胞移植などの根治的療法を感染症による器質的変化が軽度で、前処置を

行って感染症が致死的にならない早期に実施する。一方で、軽症例では、保存的治療のみで長期のquality of life (QOL) に問題がなければ、保存的治療を継続する治療戦略が考えられる。

高IgE症候群は、希少で難治の先天性免疫不全症である。これまでアメリカ合衆国の国立衛生研究所 (NIH) を中心として研究が行われてきたため、アメリカ人での症状、特徴は明らかにされているが、日本人の高IgE症候群でも臨床症状が同一かどうか検討する必要がある。そこで、日本国内の高IgE症候群の臨床的特徴を解明する。

高IgE症候群の原因は、一部明らかにされているが、いまだ不明な症例も多数残されている。また、その病態形成機構はほとんど明らかにされていない。そこで、我々は原因不明の高IgE症候群の病因を追及し、その疾患モデルマウスを樹立してその病態を詳細に検討する。特に、高IgE症候群では、アトピー性皮膚炎や骨粗鬆症などの日本国民に高頻度で見られる疾患を合併するので、その病態の解明は臨床的重要性が高い。さらに、高IgE症候群と重症アトピーとの鑑別は困難で、高IgE症候群の詳細な臨床経過を全国調査し、正確な早期診断を可能にする診断基準を策定し、重症度分類を用意する。さらに、同じSTAT3の遺伝子変異を有する症例であっても、一部の症例においては早期か

ら肺の器質的疾患が進行し、20歳代で死亡する症例が多数存在する。一方で対症療法のみで肺の器質的病変が出現せず、良好な経過をとる症例もある。この予後不良群と予後良好群を臨床的、遺伝的、免疫学的方法で鑑別する方法を見出しことを目的として研究を展開する。また、病因の明らかでない高IgE症候群が多数残されているので、高IgE症候群の早期診断、早期治療開始の確立に重要であるので、それを目的とした研究を進展させる。

## II 研究方法

### 1 日本人高IgE症候群症例の臨床像の解明

全国の高IgE症候群症例を診療している施設にアンケート調査を行った。アンケート調査項目には、高IgE症候群症例の、年齢、性別、家族歴、血清IgE、IgG、IgA、IgM値、皮膚膿瘍・肺炎の罹患回数、好酸球数、新生児湿疹・カンジダ症・悪性リンパ腫罹患・細胞内寄生菌感染症の有無、肺の器質的変化（気管支拡張症、肺嚢胞）の有無、乳歯の脱落遅延の有無と本数、脊椎側弯症の有無と角度、病的骨折・特有の顔貌・中心線の異常・関節の過伸展の有無、鼻根間距離の拡大・高口蓋の有無、その他合併症を含める。さらに、これらの症状がどのような時期に出現したかを精査する。そのほか、気管支喘息、花粉症などのアレルギーの有無、各種のワクチン接種に対する副反応の有無や抗体価の上昇や治療経過を調査する。さらにそれ以外の自己免疫疾患、川崎病、神経疾患、血管系疾患の有無についても包括的に調査を行う。この調査を基にして、日本人の高IgE症候群の診断基準を策定する。

高 IgE 症候群の臨床像と各種所見の関連を検討

これまでの報告では、高 IgE 症候群の臨床像と STAT3 変異の種類には明確な関係は見られないとされていたが、最近の NIH のグループの報告では変異が DNA 結合領域に存在するものと、SH2 領域に存在するものでは臨床像が異なるとの報告がなされた。これまで日本人の高 IgE 症候群においては Genotype-Phenotype correlation の詳細な検討は行われていないので、高 IgE 症候群症例の STAT3 変異の部位や種類と臨床像の間に関連がないかを検討する。

高IgE症候群症例においては、STAT3の変異によりIL-6、IL-10、IL-21、IL-21などのサイトカインのシグナル伝達異常が起こり、これが高IgE症候群症例で見られる黄色ブドウ球菌感染症やアトピー性皮膚炎、高IgE血症に関与している可能性が示唆されている。そこで、高IgE症候群の重症度・予後とこれらのサイトカインシグナル伝達障害の程度の間に関連がないかどうかを検討する。

### 2 先天性免疫不全症候群の病態形成機構の解明

#### (a) モデルマウスを利用した高 IgE 症候群の病態解明

##### 疾患モデルマウスの樹立

高 IgE 症候群の病態形成機構を検討するために、STAT3-DN を発現するモデルマウス

の樹立を試みた。STAT3 の機能低下は Leukemia inhibitory factor (LIF) のシグナル伝達を障害して ES 細胞の生存と増殖に悪影響を及ぼす可能性があるため、野生型 STAT3 の cDNA とネオマイシン耐性遺伝子を loxP 配列ではさみ、その下流にヒトで見えられた  $\Delta V463$  の DN 変異を導入した exon 16 を配置することにより、コンディショナルに STAT3 変異体の発現ができるようにノックインコンストラクトを設計した。キメラマウスの germline transmission を確認し、このマウスを卵細胞特異的に Cre を発現する Zp3-Cre マウスの雌と交配し、全身に STAT3-DN を発現するモデルマウスを樹立した。このマウスにおいては、ヒトの高 IgE 血症と同様に、高 IgE 血症、Th17 サイトカインの産生障害などが見られることが予備的解析により明らかになっている。

#### アトピー性皮膚炎の発症機構の解明

この 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、アトピー性皮膚炎は SPF 環境下では自然発症しない。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と溶媒を、もう一方の耳介に溶媒のみを塗布、耳介腫脹を (ハプテンと溶媒を塗布した耳介の厚さ) - (溶媒のみ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 回片側耳介にハプテンを塗布した。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炎症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評価した。

#### 骨病変の発症機構の解明

モデルマウスを用いて、新生した骨に取り込まれる蛍光色素、カルセインを 96 時間間隔で 2 回投与し、骨の新生能を生体内で検討した。骨量は、X 線撮影とマイクロ CT によって、骨の機械的強度は、3 点曲げ試験で検討した。マウス生体内の破骨細胞分化は、Tartate resistant acid phosphatase (TRAP) 染色にて、試験管内の破骨細胞分化は、骨髄または脾臓中の破骨細胞前駆細胞を M-CSF と RANKL で刺激して誘導して TRAP 染色により検討した。

(b) 高 IgE 血症に関与する遺伝要因の探索

高IgE症候群の高IgE血症に関する遺伝要因の探索するために、関連解析を実施した。昨年度より重症アトピー性皮膚炎症例で、関連解析を行っているが、本年は症例数を増やし、これまで日本人のゲノムワイド関連解析(GWAS)により8つのゲノムワイド水準( $P < 5 \times 10^{-8}$ )をみたす疾患関連領域(IL1RL1-IL18R1-IL18RAP、MHC、OR10A3-NLRP10、GLB1-CCR4、CCDC80、CARD11、ZNF365-EGR2、CYP24A1-PFDN4)のSNPsについて、アトピー性皮膚炎で高IgE( $> 10000$  IU/ml)血症を伴う症例(149例)とコントロール(1474例)で関連解析を行なった。タイピングはTaqMan法およびInvader法により実施した。

### 3 先天性免疫不全症の病因解明

既知の原因遺伝子が正常である高IgE症候群症例において、次世代シーケンシング(whole exome sequencing)を行い、その新規原因遺伝子の検索を行った。イルミナ社のTruSeqエクソーム濃縮キットによりエクソームの濃縮を行った。1 $\mu$ gの患児の末梢血由来のDNAをコバリスM220にて断片化し、末端を平滑化、リン酸化、Aを付加後、アダプターを添加し、マルチプレックスの検討に対応した。これをイルミナ社HiSeq1000により塩基配列を決定した。平均カバレッジ50X以上、約90%以上の領域で10X以上のカバレッジが

得られている。その情報解析パイプラインを稼働させ、遺伝子変異情報を構築したローカルに稼働する情報解析ツールを介して共有する。公的に利用できる1塩基多様性情報(特に日本人健常者の1塩基多様性情報)と研究分担者が蓄積した日本人1塩基多様性情報の両者を統合し、それらと得られた高IgE血症疾患症例に見られた変異情報を比較することで、発症原因となる候補変異を絞り込む。

### 4. 先天性免疫不全症候群に対する予後改善に関する検討

重症複合免疫不全症の根治的療法として、造血幹細胞移植を実施した。患児は2例のCD3 $\delta$ 欠損症で、全処置無しHLA一致臍帯血で造血幹細胞移植を実施した。移植後、血清IgG、IgA、IgM、末梢血リンパ球サブセット、リンパ球機能解析、ワクチン接種後の特異抗体産生能等の検討を行った。B細胞の由来を検討するためのB細胞の純化には、末梢血単核球からB Cell Isolation Kit II (Miltenyi)を用い、キメリズム解析は異性間FISH法により行った。

### III 研究結果と考察

#### 1 日本人高 IgE 症候群症例の臨床像の解明

日本人高 IgE 症候群症例を臨床的に検討した。患者総数は 46 名で、男女比は 25 : 20、年齢は 0 歳から 50 歳で中央値は 11 歳であった。責任遺伝子の解析結果では、*STAT3* 遺伝子変異 20 例、*TYK2* 遺伝子変異 1 例、検索中・遺伝子変異なし 9 例、未施行 16 例であった。*STAT3* 遺伝子変異の有無で、細菌・真菌・細胞内寄生菌感染症の感染しやすさに関しては、統計学的に有意差を認めなかった。常染色体劣性遺伝形式をとる高 IgE 症候群で多いとされているウイルス感染症は、今回の調査では *TYK2* 遺伝子変異、*STAT3* 遺伝子変異患者いずれにも認められた。遺伝子変異のない高 IgE 症候群患者ではウイルス感染症は認められなかった。高 IgE 症候群では、繰り返す気道感染症の結果、気管支拡張症や肺嚢胞が起こることが知られている。今回、高 IgE 症候群患者の肺機能検査は以下の結果で、正常範囲内であった。

%VC:  $87.8 \pm 7.3\%$  (62~106%)

FEV1.0% :  $96.4 \pm 3.5\%$  (88~108%)

高 IgE 症候群患者の感染予防に関して調べたところ、ST 合剤の内服を毎日あるいは週三回内服している患者は 55%であった。合併症として、精神運動発達遅滞が 4 例、若年発症の脳梗塞が 1 例認められた。骨系統

の異常は、遺伝子解析が行われた症例では、*STAT3* 変異例のみで認められた。

以上の結果より、国内の高 IgE 症候群患者は海外の報告と同様に *STAT3* 遺伝子変異を有している患者が多かった。呼吸器合併症の予防は重要な課題であるが、肺機能検査が行われていた症例では、肺機能は比較的保たれていると考えられた。感染予防として ST 合剤を内服している患者の割合が少なかったため、今後の対策が必要であると考えられた。この臨床調査を基にして、高 IgE 症候群の診断基準と重症度分類を作成した。

#### 高IgE症候群診断基準と重症度分類

##### (大症状)

- 1) 血清IgE値が2000 IU/ml以上の高IgE血症
- 2) 好酸球数800/mm<sup>3</sup>以上
- 3) 皮膚膿瘍に5回以上罹患
- 4) 肺炎に4回以上罹患
- 5) 肺嚢胞
- 6) 4本以上の乳歯の脱落遅延
- 7) 20度以上の脊椎側彎症
- 8) 3回以上の病的骨折

##### (小症状)

- 1) 血清IgE値が500 IU/ml以上の高IgE血症
- 2) 好酸球数700/mm<sup>3</sup>以上
- 3) 皮膚膿瘍に3回以上罹患

- 4) 肺炎に2回以上罹患
- 5) 気管支拡張症
- 6) 1本以上の乳歯の脱落遅延
- 7) 15度以上の脊椎側彎症
- 8) 1回以上の病的骨折
- 9) 特有の顔貌
- 10) 新生児期に発症するアトピー性皮膚炎
- 11) カンジダ感染症
- 12) 関節の過伸展
- 13) 悪性リンパ腫

#### 判定基準

大症状5項目以上、大症状4項目と小症状2項目以上、大症状3項目と小症状4項目以上、大症状2項目と小症状6項目以上、または大症状1項目と小症状8項目以上で高IgE症候群と診断する。その中で、大症状8項目、大症状7項目と小症状2項目以上、大症状6項目と小症状4項目以上、大症状5項目と小症状6項目以上、大症状4項目と小症状8項目以上で重症に分類、それ以外で高IgE症候群と診断された症例を軽症に分類する。

## 2 先天性免疫不全症候群の病態形成機構の解明

### モデルマウスを利用した病態解明

#### アトピー性皮膚炎の病態解明

マウスをハプテンで感作し、片側耳介に

ハプテン塗布、対側耳介に溶媒のみを塗布し、1日後の耳介腫脹を測定すると、高IgE症候群のモデル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が軽度だった。この時のモデルマウスの皮膚局所においては、IFN $\gamma$ 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、接触性皮膚炎が発症しにくい可能性を示唆している。

そこで次に、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マウスでは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と比較して増強していた。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 (TEWL) 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、モデルマウスにおいて、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。

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  $\mu$ MT マウス、高親和性 IgE レセプターを欠損する Fc $\epsilon$ RI 欠損マウス、マスト細胞を欠損する Kit<sup>w-sh/w-sh</sup> マウス、好塩基球を欠失する Mcpt8-DTR マウス等) と Stat3-DN マウスを交配し、高 IgE 症候群における皮膚炎悪化の原因細胞を決定し、さらにその詳細な病態を解明していく。

### 骨病変の発症機構の解明

新生した骨に取り込まれる蛍光色素、カルセインを 96 時間間隔で 2 回投与し、骨の

新生能を生体内で検討した。高 IgE 症候群のモデルマウスにおいては骨新生能が低下していることが明らかとなった。In vitro においても頭蓋冠由来の骨芽細胞の分化能は低下していた。さらにこのマウスの大腿骨の機械的強度を検討すると STAT3-DN マウスにおいては、野生型マウスと比較して弱い外力で骨折し、ヒトと同様の臨床症状を呈することが明らかになった。

次に破骨細胞の検討を行った。STAT3-DN マウスの in vivo の破骨細胞数は野生型マウスと比較して顕著に減少していた。しかし in vitro の M-CSF と RANKL による破骨細胞分化を検討すると、STAT3-DN マウスの骨髄細胞は正常に破骨細胞分化した。そこで、活性型ビタミン D3 とプロスタグランジン E2 (PGE2) で刺激した骨芽細胞上での破骨細胞分化を共培養法により検討すると、STAT3-DN 由来の骨髄細胞は正常に破骨細胞に分化するが、STAT3-DN 由来の骨芽細胞は正常骨髄細胞の破骨細胞分化を誘導できないことが明らかとなった。さらに、STAT3-DN マウス骨芽細胞では活性型ビタミン D3 と PGE2 刺激後の RANKL の発現が低下していた。

これまでは STAT3 は炎症性の骨破壊には関与するが、ビタミン D3 や副甲状腺ホルモン (PTH) などの生理的骨吸収のシグナル伝達には STAT3 は関与しないと考えられていた。しかし今回我々は、これらの生理的骨吸

収誘導分子の作用にも STAT3 が重要な役割をは対していることを明らかにした。

STAT3分子異常により発症する高IgE症候群は、骨と歯牙の異常の合併に臨床的特徴がある。しかし、その原因は世界的にも不明であったが、今回の我々の検討により、高IgE症候群においては、STAT3の機能低下のために骨芽細胞の機能障害が見られること、骨芽細胞のRANKL発現が低下しているために破骨細胞分化が低下していることが明らかとなった。これらが、高IgE症候群において骨粗鬆症と病的骨折、さらには乳歯の脱落遅延の原因となっているものと考えられた。

### 高IgE血症に関与する遺伝的要因の探索

高IgE症候群はアトピー性皮膚炎、高IgE血症などのアレルギー病態を伴う先天性免疫不全症である。近年、その原因としてSTAT3の遺伝子変異が同定されたが、その臨床経過は非常に多様であり、さらなる遺伝的要因の関与が示唆されている。またしばしば高IgE症候群は重症アトピー性皮膚炎との鑑別が困難であり、両者に共通の遺伝的要因が存在する可能性がある。本研究は高IgE血症の遺伝的要因を詳細に明らかにするとともに、アトピー性皮膚炎に関連する遺伝子群を同定することを目的とする。日本人のゲノムワイド関連解析 (GWAS)

により同定された8つのゲノムワイド水準 ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ) をみたく疾患関連領域について、重症アトピー性皮膚炎症例 (血清IgE値  $> 10000 \text{ IU/ml}$ ) 149例について関連解析を行った。その結果、2ヶ所の領域、GLB1-CCR4領域 ( $r_{s6780220}$ ,  $P = 1.6 \times 10^{-4}$ )、IL1RL1-IL18R1-IL18RAP領域 ( $r_{s13015714}$ ,  $P = 2.1 \times 10^{-4}$ ) で強い関連を認めることが明らかになった。

### 3 先天性免疫不全症の病因解明

#### 次世代シーケンシングによる高IgE症候群の病因と予後予測判定因子の発見

高IgE血症の臨床検体の血球のゲノミクス解析により、各症例における遺伝的変異情報と血球での遺伝子発現動態を解析することを目的とした。本年度は、このための基盤整備として、次世代シーケンシングによる病態解析のアプローチとして主としてRNAシーケンシング解析を進め、その有効性を確認するとともに、ゲノム構造解析との比較の上でその問題点を抽出した。

理化学研究所統合生命医科学研究センターに新たにイルミナ社HiSeq1000を導入し、エクソームの濃縮、ライブラリー構築から後のデータ解析までのバイオインフォマティクスのパイプラインを構築した。更に、ヒト臨床検体を用いて、特に白血球分画、単核球分画、造血・免疫系分画細胞についての

RNA シーケンシングを実施し、臨床検体での解析のためのリファレンスとする発現プロフィールデータを蓄積した。特に、本研究では、RNA シーケンシングを全エクソンシーケンシングデータの補完のために使用する予定であるため、RNA シーケンシングデータからリファレンス配列との塩基置換を検出するための解析システムも立ち上げた。その実験結果から、同じ次世代シーケンシングのプラットフォームを用いても、RNA シーケンシングにおいては全エクソーム解析よりも多数の塩基置換が検出される事が明らかとなった。また、66 例の臨床検体の全エクソン解析を実施し、全エクソン解析結果から各症例の候補変異の蓄積を進め、現在詳細なバイオインフォマティクス解析を実施している。

#### 4 重症複合免疫不全症に対する予後改善に関する検討

2 名の CD3  $\delta$  欠損症患者において、前処置なしで、HLA 一致非血縁者間造血幹細胞移植を行った。造血幹細胞移植後易感染性は改善した。T 細胞機能回復が見られたが、T 細胞数および T 細胞機能上は、正常範囲以下であった。この原因としては、CD3  $\delta$  欠損症の場合、胸腺に残存するレシピエントの未熟 T 細胞が、ドナー T 細胞の分化を制限している可能性が考えられた。胸腺での T 細胞

新生能を示す T-cell receptor excision circles DNA 量を測定した結果、二名の患者ではいずれも検出感度以下であり、これを支持するものと考えられる。血清免疫グロブリン濃度および特異抗体産生能は、移植後に正常に認められた。B 細胞は 100% レシピエント由来であることより、CD3  $\delta$  欠損症で前処置なしで移植した場合、ドナー T 細胞とレシピエント B 細胞の相互作用によって抗体産生能が回復することが明らかになった。しかし、細胞性免疫能を完全に正常化させるためには、移植前処置が必要な可能性が示唆された。

## Ⅱ 研究成果の刊行に関する一覧表