

免疫疾患における T 細胞サブセットの機能異常とその修復法の開発に関する研究

研究分担者 森尾友宏 東京医科歯科大学大学院 発生発達病態学分野 教授
研究協力者 今井耕輔 東京医科歯科大学大学院 小児・周産期地域医療学寄附講座 准教授
高島健浩 愛媛大学大学院医学系研究科 小児医学講座 大学院生

研究要旨

本研究では免疫疾患における T 細胞サブセットの機能異常とその修復法を開発する目的で以下の研究を行った。

1) 原発性免疫不全症における 10 カラー-FACS を用いた免疫担当細胞亜群解析の確立

10 カラー-FACS により、少量の末梢血で従来の解析を越える免疫担当細胞亜群の解析を可能とすることを目的として研究を行った。約 1-2mL の血液検体を用いて naïve, memory, Th subsets, Treg, NKT, ab T/gd T, activated T などの亜群を簡便に検討可能なシステムを構築した。そのシステムを用いて、実際の免疫不全症検体を解析し、その有用性を検証した。

2) 次世代シーケンサーを用いたヒト T 細胞・B 細胞受容体遺伝子再構成および体細胞突然変異解析法の確立

次世代シーケンサーを用いた手法により、多検体同時に十分なリード数の TCR・BCR 配列の解析を可能とすることを目的として研究を行った。健常者および原因遺伝子の同定された PID 患者 (PIK3CD, LRBA, IL2RG, ATM, ICOS) の検体を用いて解析を行い、その実用性を検証した。また、自己免疫疾患のモデルとして、1 型 DM や ITP などの様々な自己免疫疾患合併した LRBA 欠損症患者の解析を行い、レパトアの偏りや体細胞突然変異の減少といった特徴的な異常を同定した。

A. 研究目的

原発性免疫不全症 (PID) とくに Common variable immunodeficiency (CVID) などの低ガンマグロブリン血症は、T 細胞の分化、機能障害を伴う複合免疫不全症 (CID) や免疫制御異常症が含まれる場合があり、その免疫担当細胞亜群解析は非常に重要である。本研究では 10 カラー-FACS により、少量の末梢血で従来の解析を越えるリンパ球分画の解析を可能とすることを目的として研究を行った。

一方で、CVID 患者では自己免疫疾患を合併するものが多いことが知られており、免疫担当細胞亜群の偏りや分化障害がその原因の一つとして考えられている。そのため、自己免疫疾患のモデルとして PID における TCR、BCR を解析することは有用であると考えられる。

一度に解析可能なリード数に制約があるなど、従来のキャピラリーシーケンスや FACS を用いた手法が抱える問題点を克服するため、本研究では次世代シーケンサー (NGS) を用いることにより、多検体同時に十分なリード数の解析を可能とすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1) 10 カラー-FACS を用いた免疫担当細胞亜群解析

健常者および PID 患者 (遺伝子変異同定例 23 例、CVID 患者 38 例) からインフォームド・コンセントをとり、EDTA 加末梢血を溶血後、モノクローナル抗体により染色を行い、LSR Fortessa (BD 社) を用いて FACS 解析を行った。また、その結果を抽出した DNA を用いた TRECs (T cell receptor recombination excision circles), KRECs (Ig kappa chain recombination excision circles) の定量と比較して検討した。

2) NGS を用いたヒト T 細胞・B 細胞受容体遺伝子再構成および体細胞突然変異解析

健常者および原因遺伝子の同定された PID 患者からインフォームド・コンセントをとり、EDTA 加末梢血を採取した。単核球分離後に RNA を抽出し、5'RACE 反応により cDNA を合成した後、IgH、TCRb の定常領域に特異的なプライマーを用いた PCR 反応により IgM、IgG、IgA、TCR の可変領域全長の cDNA を増幅した。これらの PCR 産物にアダプター配列を付加し、Miseq (illumina 社) を用いてシーケンスを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、本学医学部倫理委員会にて承認された研究計画に従い、説明書を被験者に説明の上同意を得た検体について、解析を行った。

C. 研究結果

1) 10 カラーFACS を用いた免疫担当細胞亜群解析

リンパ球分画を概観するための PBMC パネル (CD3/4/8/19/16/56/14/HLADR) T 細胞を詳細に解析する T1、T2、T3 パネル、B 細胞を詳細に解析する B1、B3 パネル、樹状細胞を見る DC パネルの 7 パネルを設定し、健常者、PID 患者で検討した。

原因遺伝子の同定された PID 患者としては、STAT1 6 例、Wiskott-Aldrich 症候群 4 例、STAT3 3 例、ATM 5 例、CD40L 2 例、ICOS 2 例、LRBA 1 例だった。また、CVID 患者は TREGs、KREGs の数値で 4 群に分ける方法 (Kamae *et al*, *J. Allerg. Clin. Immunol.* 2013) により、A 群 (TREGs、KREGs 正常例) 19 例、B 群 1 例 (TREGs 正常、KREGs 低下例) C 群 10 例 (TREGs 低下、KREGs 正常例) D 群 8 例 (TREGs、KREGs 低下例) に亜群分類した。

遺伝子変異が同定された患者の解析では、毛細血管拡張性運動失調症 (ATM) 患者で T 細胞数、recent thymic emigrants (RTE) の減少、ナイーブ B 細胞の減少が見られた。また、STAT3 患者と STAT1 患者で Th17 の減少が見られた。STAT1 患者で DNT の上昇が見られた。

CVID 患者では、TREGs が低下している C 群、D 群で RTE の減少が見られ、D 群ではさらに B 細胞数減少も見られ、pDC の減少と相対的な mDC の増加が見られた。A 群ではスイッチメモリー B 細胞の減少が顕著であった。

2) NGS を用いたヒト T 細胞・B 細胞受容体遺伝子再構成および体細胞突然変異解析

シーケンス結果から CDR3 領域長、D・J 領域の利用率、JUNCTION 領域における N-addition、Palindrome 配列、ならびに FR3 領域における体細胞突然変異の頻度およびパターンを検討した。

原因遺伝子の同定された PID 患者の内訳は、PIK3CD 2 例、LRBA 1 例、IL2RG 1 例、ATM 1 例、ICOS 1 例であった。

原因遺伝子の同定された PID 患者のうち、自己免疫疾患 (1 型 DM、ITP など) を合併した LRBA 欠損症患者では、B 細胞分画がリンパ球の 0.4% と少数であったが、BCR 配列についても十分解析可能であり、以下の特徴を認めた。TCRb、IgM、IgA で CDR3 領域長に偏りを認め、IgM、IgA の D 領域、J 領域の利用率に偏りを認めた。また、体細胞突然変異の頻度が低下しており、IgM で A>G、C>T 変異が、IgA で A>T、C>A 変異が増加していた。その他の PID 患者では IL2RG 患者で体細胞突然変異の頻度が低下していた、ATM 患者では JUNCTION 領域における N-addition の減少を認めた。

D. 考察

10 カラーFACS を用いた免疫担当細胞亜群解析では、抗体や蛍光の組み合わせ、コンペンセーションの取り方などに工夫が必要であったが、欧州での標準化プロトコール等を参考にしつつ、条件設定を行い、実際の免疫不全症患者で検討を行った。原因遺伝子の同定された患者では、おおむね既報の通りであったため、疑い患者が紹介されてきたときのスクリーニング方法として、有効であると考えられた。一方、原因不明の患者が含まれている CVID 患者でも、特徴的な分化異常を呈する患者が含まれていたため、今後、こうした患者に対して機能解析を行い、exome 解析の結果も組み合わせで原因遺伝子の同定につなげていきたい。

また、NGS を用いたヒト T 細胞・B 細胞受容体遺伝子再構成および体細胞突然変異解析では、複数の患者検体を同時に、TCR および BCR (IgM、IgG、IgA) についてシーケンスを行ったが、各 10 万リードのデータが得られ、従来法の問題点を克服することができた。その反面、データ量が膨大であるため、今後は効率的に解析を行うパイプラインの構築が必要であると考えられた。今後さらに他の遺伝子変異既知の患者で解析を重ね、有用性を検証した上で、HIGM、CVID を含む遺伝子変異未知の患者について検討し、病態解析の一助としていきたい。

E. 結論

10 カラーFACS により、少量の末梢血で詳細な免疫担当細胞亜群解析が可能なパネルを構築した。また、NGS を用いたヒト T 細胞・B 細胞受容体遺伝子再構成解析、体細胞突然変異解析の方法を構築した。実際に健常者や PID 患者の検体を用いてこれらの解析を行い、その実用性を検証した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Endo A, Watanabe K, Ohye T, Matsubara T, Shimizu N, Kurahashi H, Yoshikawa T, Katano H, Inoue N, Imai K, Takagi M, **Morio T**, Mizutani S. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID. *Clin. Infect. Dis.* **59**:545-8, 2014.
2. Nakatani K, Imai K, Shigeno M, Sato H, Tezuka M, Okawa T, Mitsuiki N, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Nagasawa M, Kajiwara M, Yamamoto M, Arai A, Miura O, Kamae C, Nakagawa N, Homma K, Nonoyama S, Mizutani S, **Morio T**. Cord

- blood transplantation is associated with rapid B cell neogenesis compared with bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **49**:1155-61, 2014.
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. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammerstrom Q, van Zelm M.C., **Morio T**, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ-deleting recombination excision circles. *J. Allerg. Clin. Immunol.* **131**:1437-40, 2013.
 5. 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.
 6. Nakamura K, Du L, Tunuguntla R, Fike F, Cavalieri S, **Morio T**, Mizutani S, Brusco A, Gatti RA. Functional characterization and targeted correction of ATM mutations identified in Japanese patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat.* **33**:198-208, 2012.
 7. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, **Morio T**. Btk negatively regulates ROS production and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nature Immunol.* **13**: 369-78, 2012.
- (著書・総説)
1. **森尾友宏**: 先天性免疫不全症の病態と思春期以降のマネジメント **血液内科** **65**:599-607, 2012.
 2. **森尾友宏**:【サイトカインのすべて(完全改訂版)】 サイトカイン投与およびサイトカイン抑制による治療 免疫不全症 **臨床免疫・アレルギー科** **57**:838-44, 2012.
 3. **森尾友宏**: 原発性免疫不全症における臨床遺伝学 T細胞系免疫異常症における遺伝子診療 **日本遺伝カウンセリング** **33**: 49-53, 2012.
 4. **森尾友宏**: 分類不能型免疫不全症 **日本臨床** **70**:2011-21, 2012.
 5. **森尾友宏**: 分類不能型免疫不全症 Update **日本臨床免疫学会雑誌** **35**:14-22, 2012.
 2. 学会発表
 1. Imai K, Tsujiita Y, Mitsui-Sekinaka K, Mitsuiki N, Takashima T, Okano T, Aoki Y, Kimoto F, Inoue M, Iwasaki F, Kaneko T, Waragai T, Sano H, Kikuta A, **Morio T**, Nonoyama S. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for the Patients with Activated P13K-Delta Syndrome. **16th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2014)**. Prague, Czech Republic. October 2014.
 2. Takashima T, Tsujita Y, Yeh T.W, Mitsuiki N, Kanegane H, Kracker S, Durandy A, Nonoyama S, **Morio T**, Imai K. Clinical and Immunological Features of Patients with Gain-of-Function PIK3CD Mutations in Japan. **16th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2014)**. Prague, Czech Republic. October 2014.
 3. Mitsuiki N, Yang X, Bartol S, Kosaka Y, Takada H, Imai K, Kanegane H, Mizutani S, Van der Burg M, Van Zelm M, Ohara O, **Morio T**. Mutations in Bruton's Tyrosine Kinase Impair Responses. **16th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2014)**. Prague, Czech Republic. October 2014.
 4. **Morio T**. Primary Immunodeficiencies due the Defect in Signaling Molecules. **2012 KSMCB Annual Meeting**. Seoul, Korea. October 2012.
 5. Mitsuiki N, Oshim K, Imai K, Ohara O, **Morio T**, Mizutani A. Genetic Analysis For 207 Cases With Primary Immunodeficiency (PID) Consulted to A Single Center Through PID Network in JAPAN (PIDJ) in 5 Years (2007-2011). **15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012)**. Florence, Italy. October 2012.
 6. **Morio T**. Btk is a critical gatekeeper of neutrophil responses. **Medical Immunology World Initiative (MIWI) projects**. Yokohama, Japan. May 2012.
 7. 岡野 翼、今井耕輔、宮脇零士、奥津美夏、高島健浩、青木由貴、富澤大輔、高木正稔、梶原道子、水谷修紀、**森尾友宏**: 炎症性腸疾患と Mycobacterium avium 感染症を合併した NEMO 異常症に対する非血縁者間骨髓移植、**第 56 回日本小児血液・がん学会 学術集会**、岡山、2014 年 11 月 29 日

8. 谷ヶ崎博、平井麻衣子、下澤克宜、金澤剛二、陳基明、高島健浩、今井耕輔、**森尾友宏**、高橋昌里：全腸性の粘膜下リンパ増殖性疾患と軽度の免疫異常を示す女兒に同定された PIK3CD 遺伝子の胚細胞性変異、**第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会**、岡山、2014 年 11 月 28 日
 9. 高島健浩、辻田由喜、今井耕輔、関中佳奈子、YehTsu-Wen、満生紀子、奥野友介、村松秀城、白石友一、千葉健一、田中洋子、宮野 悟、吉田健一、小川誠司、金兼弘和、小島勢二、小原 収、**森尾友宏**、野々山恵章：Activated PI3K- syndrome 患者の臨床的・免疫学的特徴、**第 42 回日本臨床免疫学会総会**、東京、2014 年 9 月 25 日
 10. 高島健浩、満生紀子、今井耕輔、水谷修紀、**森尾友宏**：STAT1 変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症 12 例の検討、**第 4 回関東甲越免疫不全症研究会**、東京、2013 年 9 月 22 日
 11. 星加将吾、加藤文代、角田達彦、久保充明、満生紀子、今井耕輔、**森尾友宏**、杉原茂孝：1 型糖尿病に低 グロブリン血症、血小板減少、多発性硬化症様病変を併発した LRBA 欠損症の 1 例、**第 4 回関東甲越免疫不全症研究会**、東京、2013 年 9 月 22 日
 12. 高島健浩、満生紀子、今井耕輔、水谷修紀、**森尾友宏**：STAT1 変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症 12 例の検討、**第 4 回関東甲越免疫不全症研究会**、東京、2013 年 9 月 22 日
 13. **森尾友宏**：細胞内寄生菌にたいする感染防御機構、**第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会**、北九州、2012 年 11 月 23 日
 14. **森尾友宏**：先天性免疫不全症および血液系腫瘍において診断の手がかりとなる皮膚病変と、診断への道筋、**第 36 回日本小児皮膚科学会学術大会**、前橋市、2012 年 7 月 15 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし