

201442021A

厚生労働省科学研究委託費

難治性疾患等実用化研究事業

高 IgE 症候群の病因・病態解明と新規治療法開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 峯岸 克行

平成27(2015)年 3 月

厚生労働省科学研究委託費

難治性疾患等実用化研究事業

高 IgE 症候群の病因・病態解明と新規治療法開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 峯岸 克行

平成27(2015)年 3 月

本報告書は、厚生労働省の難治性疾患等実用化研究事業による委託業務として峯岸克行が実施した平成26年度「高IgE症候群の病因・病態解明と新規治療法開発」の成果をとりまとめたものです。

高 IgE 症候群の病因・病態解明と新規治療法開発

目次

I. 委託業務成果報告（総括）	7
高 IgE 症候群の病因・病態解明と新規治療法開発に関する研究 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. 委託業務成果報告（業務報告）	
1. 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	17
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	
2. STAT1 シグナルを介した破骨細胞の分化増殖と機能亢進	21
小林 正夫 広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学分野 教授	
3. 高 IgE 症候群に対する造血幹細胞移植の検討	27
高田英俊 九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学分野 教授	
4. 当科に紹介のあった高 IgE 症候群の臨床的・免疫学的検討	33
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 准教授	
5. 全エクソン塩基配列解析による高 IgE 症候群の病因解明	39
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	
6. ゲノム編集技術を用いたマウス 1 細胞期胚における遺伝子改変動物の作製	43
田中 栄二 徳島大学大学院医歯薬総合研究科口腔顎顔面矯正学 教授	
7. CRISPR/Cas システムを用いたヒト疾患モデルマウスの作製	47
泰江 章博 徳島大学大学院医歯薬総合研究科口腔顎顔面矯正学 講師	
8. 高 IgE 症候群に対する CRISPR/Cas9 を利用した新規治療法の開発	51
峯岸 克行 徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター 教授	
III 学会等発表実績	57
IV 研究成果の刊行物・別刷	71

I 委託業務成果報告（総括）

高 IgE 症候群の病因・病態解明と新規治療法開発

業務主任者 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

『高 IgE 症候群の病因・病態解明と新規治療法開発』班は、高 IgE 症候群の病因・病態解明と新規治療法開発を目的として以下の研究を行った。

(1) 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

高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎、血清 IgE の高値と、黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍・肺炎の合併を特徴とする原発性免疫不全症である。その主要な原因が STAT3 の遺伝子変異であることは明らかにされたが、その病態形成機構には不明である。我々は、高 IgE 症候群の病態形成機構を検討する目的で、STAT3-DN(dominant negative)変異体を全身に発現する高 IgE 症候群のモデルマウスを用いて、病態形成機構の検討を行っている。アトピー性皮膚炎に関しては、SPF 環境では、皮膚炎の自然発症は見られないため、各種の皮膚炎症モデルを検討した。この中で、ハプテン反復塗布により誘発する皮膚炎において、STAT3-DN モデルマウスでは野生型の対照と比較して、皮膚組織の肥厚、皮膚バリア機能低下、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 IgE 産生、Th2 サイトカイン産生が上昇していることを明らかにした。この病変部の所見はヒトのアトピー性皮膚炎に良く類似していた。この皮膚炎モデルを用いて、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を実施していく。

(2) STAT1 シグナルを介した破骨細胞の分化増殖と機能亢進

STAT3 と STAT1 シグナル伝達経路の異常による原発性免疫不全症は易感染性ととともに骨異常、骨髄炎などの共通した病変が存在する。STAT1 シグナル異常による MSMD (Mendelian susceptibility to mycobacterial disease)は INF- γ R1、INF- γ R2、STAT1 などのシグナル伝達に関与する分子の先天異常で、主として単球/マクロファージ系に異常が出現する。MSMD の 80%以上の患者で、多発性骨髄炎を合併し、当科で経験した症例もすべて骨髄炎とそれに伴った骨融解像が認められた。

破骨細胞は骨リモデリングにおいて骨吸収を行う多核の組織マクロファージであり、骨髄由来の単球系細胞の融合・分化で産生される。INF- γ は破骨細胞に対して抑制的に作用することが知られている。MSMD 患者に認められる骨融解の機序として INF- γ シグナル伝達に関与している可能性が考えられ、INF- γ シグナル伝達異常症の患者骨髄から誘導される破骨細胞の機能について検討を行った。MSMD 患者由来破骨細胞は健常人に比し INF- γ による抑制が弱く、そのため分化増殖の亢進・骨融解機能の過剰がみら

れ、骨のリモデリング異常を呈する可能性が示唆された。MSMD 患者の骨髄炎発症頻度が高いことの一要因である可能性が示唆された。

(3) 高IgE症候群に対する造血幹細胞移植の検討

高 IgE 症候群は、骨粗鬆症や関節過伸展、顔貌の異常、脊椎側弯症などを呈する多臓器疾患であることもあり、これまで造血幹細胞移植による治療はこれまで余り実施されていなかった。本症においては、黄色ブドウ球菌や真菌に対する易感染性は、Th17 細胞の機能低下が関与していることが明らかになっているので、造血幹細胞移植により高 IgE 症候群の易感染性は制御できる可能性がある。今回、巨大肺嚢胞を形成し嚢胞内にアスペルギルスによる菌球を認めた高 IgE 症候群症例に対して、骨髄非破壊的前処置を用いて HLA 完全一致の姉より末梢血幹細胞移植を実施しその治療効果を検討した。造血幹細胞後、患者は易感染性が消失し、肺嚢胞も軽快し、生活の質も著しく改善した。免疫学的な詳細な検討を行うと、骨髄の CD34 細胞は移植後もレシピエント由来であったが、末梢血 T 細胞や NK 細胞はほとんどがドナー由来となりスプリットキメリズムの状態安定して経過している。幹細胞移植後に Th17 細胞数の増加が認められた。今後、ドナー由来 T 細胞数が低下してくるかどうかを臨床的に重要と考えられ、免疫学的解析を含めて慎重に経過を観察していく。

(4) 当科に紹介のあった高IgE症候群の臨床的・免疫学的検討

2014 年に当科に PIDJ (Primary Immunodeficiency in Japan) ネットワークを通して、免疫不全症の疑いで紹介の来た症例は 164 症例であり、そのうち、高 IgE 症候群疑いの患者は、17 例であった。それにこれまでの症例を加えた 26 例のうち、STAT3 遺伝子変異を同定できたのは 10 例 (38%) であった。また、インド、チャンディガールの専門病院からも 60 例の免疫不全症疑い患者を受けたが、高 IgE 症候群疑いとされたのが 14 例であり、そのうち STAT3 異常を伴った例は 3 例であった。高 IgE 症候群の 3 主徴のうち、高 IgE 血症とアトピー性皮膚炎はしばしば合併すること、皮膚膿瘍は重症アトピー性皮膚炎患者ではしばしばみられるため、鑑別診断が困難である。我々は、NIH スコアをはじめ、臨床的、免疫学的検討を行い、STAT3 変異患者とそうでない疾患とを見分ける方法について検討した。STAT3 変異患者では、NIH スコアが 40 点を超える患者が 7 割を占め、肺合併症・骨格系合併症を伴い、CCR6+CXCR3-CD45RO+CD4+CD3+細胞 (Th17 細胞) およびメモリー B 細胞が減少していた。今後、STAT3 野生型患者の原因遺伝子の同定を進めていく。

(5) 全エクソン塩基配列解析による病因解明

高IgE症候群の病因解明には、それが遺伝的な素因によるものであるかどうかの確定診断が重要である。しかし、既にいくつかの遺伝子変異が高IgE症候群となる事が知られているが、それらの遺伝子には変異を見出せない高IgE症候群症例も未だ多数存在する。本研究では、既知遺伝子解析による除外診断を経た後の高IgE症候群症例に関し

て、全エクソーム解析を実施し、新たな高IgE症候群の原因遺伝子の探索を進める。今年度は、家族検体も含めて20検体の次世代シーケンシングによる解析を実施した。これらの結果を本研究班の業務主任者と共有し、その中から疾患原因変異についての絞り込み作業を実施中である。

(6) ゲノム編集技術を用いたマウス 1 細胞期胚における遺伝子改変動物の作製

近年の ZFN や TALEN、CRISPR/Cas システムといったゲノム編集技術の開発により、様々な種において遺伝子改変動物の作製が可能になってきた。マウスにおいて、従来の方法ではターゲティングベクター構築後、ES 細胞を用いた相同組換えを行い、スクリーニング後、キメラマウスを経てヘテロマウスを獲得するといった非常に煩雑で多大な労力を要していたが、ゲノム編集技術の台頭により、マウス受精卵における標的配列の破壊が可能となってきた。そこで、今回、マウス 1 細胞期胚において TALEN ならびに CRISPR/Cas システムを適用することで、遺伝子改変動物の作製を試みた。

対象遺伝子には、ノックアウトマウスが四肢欠損または無眼を示す表現型評価の容易な Fgf10 と Pax6 を選択した。いずれの手法においても F0 世代において標的配列の破壊が確認されたが、その破壊効率ならびに確認されたノックアウト様表現型は、TALEN に比較し CRISPR/Cas システムにおいて高率であった。また標的部位によっては、フレームシフトが生じない限り表現型が得られない場合もあり、タンパク質の機能ドメインも考慮した標的配列の設定が重要であることが示唆された。

(7) CRISPR/Cas システムを用いたヒト疾患モデルマウスの作製

次世代シーケンサーを用いたエクソームシーケンシング法により、従来の手法、すなわち連鎖解析を経てサングー法といった解析では困難であった疾患原因遺伝子候補の探索が容易になった。この方法で新規疾患原因遺伝子が続々と同定されてきているが、一方、規模の小さい家系、特に患者数が 1 名の場合では、遺伝子変異と疾患発症の因果関係が明確でない場合が多数存在する。この場合マウスにおける遺伝子変異がヒトと同様の表現型を呈することが判れば、新規のヒト疾患原因遺伝子同定の重要な証拠となる。さらに、このゲノム編集により作成されたモデル動物は、ヒト疾患の病態解明や治療法開発に利用することが出来る。そこで、今回我々は、近年開発の進む CRISPR/Cas システムを利用し、疾患を有する家系から検出した変異部位の配列破壊をマウスで行うことで、ヒト疾患原因遺伝子変異の検討を行った。

(8) 高 IgE 症候群に対する CRISPR/Cas9 を利用した新規治療法の開発

高 IgE 症候群は、STAT3 のドミナントネガティブ変異が原因で発症する原発性免疫不全症である。原因遺伝子が同定され早期の確定診断が可能になったが、治療法は対症療法に限られ、肺嚢胞へのアスペルギルス感染症により生活の質が低下し、肺出血や脳塞栓により若年で死亡する症例が存在する。

ゲノム編集技術により、免疫不全症患者の細胞に DNA 2 重鎖切断を導入し、相同組換

えを効率的に誘導する修復型遺伝子治療の実用化の可能性が示唆されている。高 IgE 症候群は片アレルのミスセンス変異により発症し、そのほとんどで正常アレルと変異アレルに 1 塩基しか差異は存在しない。そこで高 IgE 症候群にゲノム編集技術を応用するためには、1 塩基置換を識別し変異型 STAT3 アレルのみを選択的に切断するゲノム編集技術が必要である。これまでの報告により CRISPR/Cas9 は 3 塩基までの塩基置換が存在しても DNA 2 重鎖切断は誘導できるとの報告がみられる。そこで本研究では、高 IgE 症候群患児の各種の STAT3 の 1 塩基置換を CRISPR/Cas9 が変異アレルを特異的に切断できるかどうかを検討した。その結果 80%以上の症例において、CRISPR/Cas9 により特異的な 2 重鎖切断の誘導が可能であることが明らかになった。

業務項目の担当責任者氏名・所属機関・職名

小林正夫・広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学分野 教授

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 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 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

田中栄二・徳島大学大学院医歯薬総合研究科口腔顎顔面矯正学 教授

泰江章博・徳島大学大学院医歯薬総合研究科口腔顎顔面矯正学 講師

研究協力者

西川裕美子 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 助教

和田 剛 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 特任助教

齋藤雅子 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 特別研究員

高島健浩 愛媛大学大学院医学系研究科小児医学

A. 研究の目的

高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎・血清 IgE の著しい高値に、黄色ブドウ球菌による皮膚と肺の感染症を合併する原発性免疫不全症である。骨粗鬆症・骨髄炎などの異常の合併頻度も高い。その主要原因遺伝子変異が *STAT3* のドミナントネガティブ (dominant negative; DN) 変異であること最近我々が明らかにした。しかし、*STAT3*-DN 変異がどのようなメカニズムでこれらのアトピー症状・骨病変等を引き起こすかは全く明らかにされておらず、対症療法以外の治療法は

現時点では存在しない。本研究では、*STAT3*-DN により発症するアトピー性皮膚炎・骨粗鬆症・骨髄炎の発症機構を解明することを 1 つの目的として研究を行った。

高 IgE 症候群の約 3 分の 2 は *STAT3* の遺伝子異常が原因で発症するが残りの約 3 分の 1 は原因不明である。この原因遺伝子を明らかにする目的で *STAT3* 等の既知の原因遺伝子に変異が存在しない高 IgE 症候群患児の全エクソン塩基配列を決定し、病因候補遺伝子を抽出した。この候補遺伝子に対して、各種の機能解析を実施している。患児

において遺伝子発現が欠損している場合は、機能解析の1つの方法として CRISPR/Cas9 による遺伝子欠損マウスモデルを作成し、遺伝子の機能喪失変異体の表現型を検討している。

新規治療法に関しては、まずヒト高 IgE 症候群に対して造血幹細胞移植が有効であるかどうかの検討が必要である。造血幹細胞移植が有効であれば、CRISPR/Cas9 による修復型の遺伝子治療法を可能にするべく基礎的検討を進めていく。

B. 研究方法

高 IgE 症候群の病因検索に関しては、既知の原因遺伝子に変異がない事が確認された症例の検体に対して、次世代シーケンシングによる全エクソン解析を実施した。全エクソン配列の濃縮は、アジレント社の SureSelect Human All Exon V5 によるハイブリダイゼーションキャプチャー法で実施した。次世代シーケンシング用の DNA ライブラリーは、同じくアジレント社の SureSelect XT キットにより作製した。濃縮後のライブラリーは、イルミナ社の HiSeq1500 を用いて 100 塩基のペアエンドモードのランで解析した。得られたデータはヒトゲノムリファレンス配列(hg19)にマッピングし、独自に作製したアノテーションパイプラインによって一次データとしての vcf ファイルを作製した。

高 IgE 症候群の病態解明を目的として、STAT3-DN を全身に発現する高 IgE 症候群のモデルマウスを樹立した。アトピー性皮膚炎は SPF 環境下では自然発症しないため、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 1 日おきに 10 回耳

介にハプテンを塗布したその経過を観察した。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。また、骨病変に関して、患者末梢血より *in vitro* で破骨細胞を分化樹立し、その機能解析を行った。

ヒト高 IgE 症候群に対する造血幹細胞移植の有効性を検討する目的で、巨大肺嚢胞を形成しアスペルギルス感染症を合併した高 IgE 症候群患者に対して、骨髄非破壊的前処置を用いて HLA 完全一致の姉より末梢血幹細胞移植を行い、免疫学的再構築について検討を行った。

CRISPR/Cas9 による疾患モデルマウスを作成する目的で、*in vitro* transcription により guide RNA と Cas9 mRNA を合成後、マウス受精卵にマイクロインジェクションによる導入を行い、胎生 14.5~16.5 日において帝王切開を行うことでマウス胎児を摘出した。標的配列破壊の検証には四肢、眼の形成不全といった形態学的解析と、抽出したゲノム DNA を用い、NHEJ (Non-homologous end joining)の有無を T7 endnuclease アッセイとシーケンスにより検討した。

CRISPR/Cas9 を利用して修復型の遺伝子治療を実施する目的で、CRISPR/Cas9 が 1 塩基置換を区別できるかどうかを検討した。STAT3 の遺伝子変異は片アレルの変異で 90%以上のものが 1 塩基置換であるためこの検討を実施する必要がある。CRISPR/Cas9 による 2 重鎖切断を検出する GFP (green fluorescence protein) の split 遺伝子を作成し、2 つに分割した GFP の間に正常または変異 STAT3 アレルを挿入した。分割された 2 つの GFP 遺伝子間に 2 重鎖切断を誘導すると遺伝子の相同組換えにより

GFP タンパクが発現し、その蛍光が検出できるようになる。このとき、陰性コントロールとしてはガイド RNA を発現せず Cas9 タンパクのみ発現するもの、陽性コントロールとしては STAT3 アレルの変異と無関係に正常アレルも変異アレルも切断するガイド RNA を有する CRISPR/Cas9 を用いた。DsRed express 発現ベクターと一緒に遺伝子導入することにより、フローサイトメトリー法により 2 色の蛍光を検出して定量的に検討した。

倫理面への配慮

本研究でのヒト検体は、検体提供施設において適切に倫理的な対応がなされた後に、匿名化された検体 ID のみが通知される枠組みで実施した。本研究での遺伝子解析に関しては、すべての関係する機関でヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則った研究であることを倫理審査委員会で承認を受けた上で、更に研究実施場所である理化学研究所での倫理審査委員会の承認を得て行った。動物実験は、各大学の動物実験委員会の承認を得て、その指針に従って本研究を実施した。

C. 研究結果

高 IgE 症候群の新規原因遺伝子を同定する目的でこれまでに 83 例の全エクソーム解析を実施した。得られた読み取り配列をヒトゲノムリファレンス配列にマッピングした結果、SureSelect Human All Exon V5 のターゲット領域 50Mb に関して、5 回以上のリード数で 95%以上のターゲット領域がカバーされている事が確認できた。このマッピングデータから候補変異を検出し、それらにアノテーションを付ける作業を実施した。現在高 IgE 症候群の原因と考えられ

る候補変異の絞り込み作業とその機能解析を実施中である。

アトピー性皮膚炎の病態形成機構を明らかにする目的で、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。それ以後では 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、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、Stat3-DN 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減少が認められた。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類似していた。

破骨細胞の機能評価においては、TRAP staining による破骨細胞分化増殖能は、健常人では、IFN- γ 10 IU/mL の添加で破骨細胞形成が抑制されたが、IFN- γ R1 異常症患者では IFN- γ 50 IU/mL においても破骨細胞の形成抑制が認められなかった。Pit formation による骨融解能の検討では、健常人ならびに IFN- γ R1 異常症ともに、破骨細胞による象牙切片の融解像は確認され、IFN- γ の濃度依存的にその骨融解は減少し

ていった。健常者では、IFN- γ 1 IU/ml 添加で骨融解が抑制され、10 IU/ml ではほぼ完全に抑制された。IFN- γ R1 異常症では IFN- γ 濃度上昇で融解は抑制されたが、50 IU/ml でも融解が認められた。これらから、IFN- γ R1 異常症では IFN- γ 刺激による破骨細胞産生抑制とともにその機能抑制も低下していることが明らかとなった。以上の結果から、MSMD 患者由来破骨細胞は INF- γ による抑制が弱いために、分化増殖が亢進し、骨融解の過剰を呈している可能性が示唆された。MSMD 患者の骨髄炎発症頻度が高いことの一要因と考えられた。

STAT3 遺伝子変異による高 IgE 症候群に対して、HLA 一致血縁者間の末梢血幹細胞移植を実施した。高 IgE 症候群の STAT3 遺伝子変異は全身で発現しているが、全処置に関連する特別な副作用等は認めなかった。肺嚢胞のアスペルギルス感染症は軽快し、血液中の IL-17 産生細胞の増加を認めた。STAT3 変異による高 IgE 症候群に対する造血幹細胞移植の有用性が示唆された。

CRISPR/Cas9 のゲノム編集における有用性を評価する目的で、TALEN と CRISPR/Cas9 の比較を実施した。TALEN mRNA を核ならびに細胞質に導入した結果、核では 10~20%の胚において NHEJ (Non homologous end joining)を確認したものの、四肢欠損を示す胚は得られなかった。細胞質に導入した場合 NHEJ 率は 25~50%に上昇した。さらに約 10%に四肢発生の異常を認めた。次に CRISPR/Cas9 においては、90%以上の胚で NHEJ が確認され、四肢発生異常も 40~100%の胚で認められた。CRISPR/Cas9 システムのゲノム編集における優位性が示唆された。

正常と変異 STAT3 アレルを有する split GFP レポーターと変異特異的ガイド

RNA を有する CRISPR/Cas9 を用いて、その変異特異的 2 重鎖切断活性を比較検討した。

30 個の高 IgE 症候群の原因遺伝子変異に対して実施し、変異の近傍に PAM 配列が存在するものの約 90%で特異的切断の誘導に成功した。

D. 考察

高 IgE 症候群の新規原因遺伝子を見いだす目的で原因不明高 IgE 症候群患児の全エクソン解析を実施した。これまでに 6 個の遺伝子発現を欠損する変異を見いだした。

STAT3 のドミナントネガティブ変異が原因で発症する高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎をほぼ 100%の患者で合併する。しかし、その病態形成機構は不明で、治療法も対症療法に限られている。今回の我々の検討により、高 IgE 症候群においては、ハプテン反復投与による皮膚炎モデルがヒトのアトピー性皮膚炎と類似した病態を形成することが明らかになった。今後この皮膚炎モデルと各種の遺伝子改変マウスを用いて、その病態形成機構を明らかにしていく。

STAT3 のドミナントネガティブ変異により発症する高 IgE 症候群に対して造血幹細胞移植を実施した。その結果、特に強い副反応等は認めず、真菌等に対する易感染性の軽減を認めた。特に肺嚢胞を合併した一部の患児は、アスペルギルスの感染症を合併し重篤な経過をとり QOL が低下するため、感染症の制御を目的にして造血幹細胞移植の適応を慎重に検討する必要があると考えられる。高 IgE 症候群の病態解明と予後の改善を目的として CRISPR/Cas9 によるゲノム編集により、疾患モデル動物作成による遺伝子変異の生体内での機能解析と変異アレルを特異的に遺伝子修復型の遺伝子治療法の方法の確立を試みた。いずれにおいて

も CRISPR/Cas9 等の最近のゲノム編集技術の有用性が示された。

E. 結論

本研究により、高 IgE 症候群の新規原因遺伝子候補を複数同定し、現在その機能解析を行っている。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皮膚炎モデルを確立した。ヒトの高 IgE 症候群に対

して、造血幹細胞移植が有効であることを強く示唆するデータを得た。CRISPR/Cas9 により片アレルの 1 塩基置換という困難な遺伝子異常に対しても、特異的ゲノム編集が可能であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

Ⅱ 委託業務成果報告（業務報告）

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

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

高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎、血清 IgE の高値と、黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍・肺炎の合併を特徴とする原発性免疫不全症である。その主要な原因が STAT3 の遺伝子変異であることは明らかにされたが、その病態形成機構には不明である。我々は、高 IgE 症候群の病態形成機構を検討する目的で、STAT3-DN(dominant negative)変異体を全身に発現する高 IgE 症候群のモデルマウスを用いて、病態形成機構の検討を行った。アトピー性皮膚炎に関しては、各種の皮膚炎症モデルを検討し、ハプテン反復塗布により誘発する皮膚炎において、STAT3-DN モデルマウスでは野生型の対照と比較して、皮膚組織の肥厚、皮膚バリア機能低下、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 IgE 産生、Th2 サイトカイン産生が上昇しており、この病変部の所見はヒトのアトピー性皮膚炎に良く類似していた。この皮膚炎モデルを用いて、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している。

B. 研究の目的

高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎・血清 IgE の著しい高値に、高頻度で黄色ブドウ球菌による皮膚と肺の感染症を合併する原発性免疫不全症である。その主要原因遺伝子変異が *STAT3* のドミナントネガティブ (dominant negative; DN) であること最近我々が明らかにした。高 IgE 症候群では、その全例でアトピー性皮膚炎と著しい高 IgE 血症を発症する。言い換えると、ヒトにおける *STAT3* の機能低下はアトピー性皮膚炎と高 IgE 血症を引き起こすことになる。しかし、*STAT3*-DN 変異がどのようなメカニズムでこれらのアトピー症状を引き起こすかは全く明らかにされておらず、そのため本症のアトピーには、対症療法以外の治療法は現時点では存在しない。また、一般のアトピー

性皮膚炎では、高頻度で黄色ブドウ球菌が常在しており、高 IgE 症候群のアトピー性皮膚炎発症と黄色ブドウ球菌感染症とに関連がある可能性がある。本研究では、*STAT3*-DN により発症するアトピー性皮膚炎の発症機構を解明することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

我々が樹立した *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、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、高 IgE 血症が自然発症し、Th17 サイトカインの産生低下が見られ、黄色ブドウ球菌による皮膚感染症を自然発症するが、アトピー性皮膚炎は SPF 環境下では自然発症しないことが明らかにな

っている。そのため、誘発性皮膚炎の検討を行った。ハプテン単回投与による皮膚炎モデルと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 にハプテンをマウス腹部に塗布することにより感作し、day 0 に片側耳介にハプテンを、もう一方の耳介にハプテンの溶媒のみを塗布した。その後の耳介腫脹を(ハプテンと溶媒を塗布した耳介の厚さ) - (ハプテンの溶媒のみを塗布した耳介の厚さ) として経時的に測定した。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1日おきに10回耳介にハプテンを塗布したその経過を観察した。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。

C. 研究結果

1. ハプテン単回投与による皮膚炎モデルの検討

マウスをハプテン(oxazolone)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した。Stat3-DN 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 Stat3-DN マウスの皮膚局所においては、IFN γ 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 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が考えられた。

2. ハプテン反復投与による皮膚炎モデルの検討

マウスをハプテン(oxazolone)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。それ以後では 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、Stat3-DN 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減少が認められた。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た。これらを総合すると 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類似していた。

考察

STAT3 のドミナントネガティブ変異が原因で発症する高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎と高 IgE 血症の合併が臨床的特徴である。しかし、その病態形成機構は不明で、治療法も対症療法に限られている。今回の

我々の検討により、高 IgE 症候群においては、ハプテン反復投与による皮膚炎モデルがヒトのアトピー性皮膚炎と類似した病態を形成することが明らかになった。今後この皮膚炎モデルと各種の遺伝子改変マウスを用いて、その病態形成機構を明らかにしていく。

F. 結論

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と Stat3-DN マウスを交配し、このマウスを用いてこの皮膚炎モデルの検討を行い、Stat3-DN 遺伝子発現とアトピー性皮膚炎の関係を明らかにして行きたい。

G. 研究発表

1. 学会発表

1. Yoshiyuki Minegishi “Molecular pathogenesis of hyper IgE syndrome “ The third Bizan Immunology symposium Feb 13-14, 2014 Tokushima

2. Saito M, Karasuyama H, Minegishi Y, “A molecular mechanism underlying atopic dermatitis in hyper-IgE syndrome” American Academy of Allergy Asthma Immunology Feb28-March 4th, 2014, San Diego, USA

3. Wada T, Saito M, Nishikawa Y, Minegishi Y Analysis of the mechanisms of the susceptibility to staphylococcus infection in a mouse model of Hyper-IgE syndrome. The 43rd Annual Meeting of the

Japanese Society of Immunology 2014. 12.10-12.12, Kyoto

4. 峯岸克行 高 IgE 症候群の病因と病態の解明第 10 回京都臨床アレルギー研究会 2014 年 2 月 19 日 京都

5. 峯岸克行 高 IgE 症候群の病因と病態の解明第 21 回日本免疫毒性学会学術年会 2014.9.11 徳島文理大学・国際会議場 徳島

6. 峯岸克行 ヒト遺伝性アレルギー疾患「高 IgE 症候群」の発症機構の解明とその制御 第 3 回 CREST 免疫機構領域シンポジウム 2014.10.8 東京医科歯科大学 東京

7. Specific DSB induction to *STAT3* mutations by CRISPR/Cas9. Minegishi S, Urabe K, F Inoue, Y Minegishi. Keystone symposium “Precision Genome Engineering and Synthetic Biology, Jan 11-16, 2015, Big Sky MN, USA

8. Nishikawa Y, Minegishi Y Dysregulation of IgE homeostasis in hyper-IgE syndrome The third Bizan Immunology symposium Jan 29-30, 2015 Tokushima

2. 論文発表

1. Nishikawa Y, Nishijima H, Matsumoto M, Morimoto J, Hirota F, Takahashi S, Luche H, Fehling HJ, Mouri Y, Matsumoto M. Temporal Lineage Tracing of Aire-Expressing Cells Reveals a Requirement for Aire in Their

Maturation Program. *J Immunol.* 192, 2585-2592, 2014,

2. Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J Leukoc Biol.* 95, 667-676, 2014

3. 峯岸克行 高IgE症候群の病態形成メカニズム 炎症と免疫 22, 18-62, 2014

4. 峯岸克行 原発性免疫不全症の原因遺

伝子探索の新展開 医学のあゆみ 第1土曜特集 ヒト免疫学の新機軸 252, 5-9, 2015

5. 峯岸克行 高IgE症候群 臨床免疫アレルギー科 63, 251, 2015

H. 知的所有権の出願・取得状況

特許取得

特になし。

実用新案登録

特になし。

その他

特になし。

STAT1 シグナルを介した破骨細胞の分化増殖と機能亢進

小林 正夫 広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学分野

研究要旨： STAT3 または STAT1 シグナル伝達の異常による原発性免疫不全症は易感染性ととも骨異常、骨髄炎などの共通した病変が存在する。STAT1 シグナル異常による MSMD は INF- γ R1、INF- γ R2、STAT1 などのシグナル伝達に関与する分子の先天異常で、主として単球/マクロファージ系で異常が認められる。MSMD の 80%以上の患者で、多発性骨髄炎を合併することは臨床的特徴のひとつであり、当科で経験した症例もすべて骨髄炎とそれに伴った骨融解像が認められた。

破骨細胞は骨リモデリングにおいて骨吸収を行う多核の組織マクロファージであり、骨髄由来の単球系細胞の融合・分化で産生される。INF- γ は破骨細胞に対して抑制的に作用することが知られている。MSMD 患者に認められる骨融解の機序として INF- γ シグナル伝達に関与している可能性が考えられ、INF- γ シグナル伝達異常症の患者骨髄から誘導される破骨細胞の機能について検討を行った。MSMD 患者由来破骨細胞は健常人に比し INF- γ による抑制が弱く、分化増殖の亢進・骨融解機能の過剰がみられ、骨のリモデリング異常を呈する可能性が推測された。MSMD 患者の骨髄炎発症頻度が高いことの一要因の可能性が示唆された。患者破骨細胞では INF- γ による機能抑制が低下していることを明らかとし、本症での骨髄炎が高頻度に認められる特徴との関係が示唆された。

A. 研究目的

STAT3とSTAT1シグナル伝達経路の異常による原発性免疫不全症は易感染性ととも骨異常、骨髄炎などの共通した病変が存在する。我々は従来からメンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症（MSMD）のシグナル伝達分子の変異と病態解析を行ってきた。MSMDの80%以上の患者で、多発性骨髄炎を合併することは臨床的特徴のひとつである。破骨細胞は骨吸収を行う多核の組織マクロファージであり、骨髄由来の単球系細胞の分化、融合で産生され、INF- γ は破骨細胞に対して抑制的に作用する。MSMD患者に認められる骨融解の機序として、INF- γ シグナル伝達に関与している可

能性を考え、破骨細胞の分化増殖とその機能を解析した。INF- γ により制御を受ける破骨細胞内分子メカニズムとして、マウスでは骨髄単核細胞由来破骨細胞でTRAF6蛋白発現の低下が関与することが報告されている。破骨細胞形成に必要なRANKL刺激で、TRAF6を介したシグナルが下流に伝達されるが、INF- γ 添加によりTRAF6蛋白プロテアソーム系によるTRAF6蛋白質の急速な分解により破骨細胞形成に抑制がかかるとされる。ヒトでも同様な所見が認められるかどうか、INF- γ 刺激によるTRAF6蛋白の発現を検討した。

B. 研究方法

健常人ならびにMSMD患者由来骨髄単核球細胞をGM-CSF, IL-3, SCF存在下メチルセルロース中で単球・マクロファージ系前駆細胞に分化させた。その後, M-CSF, RANKL存在下10% FBS/ α -MEM中で破骨細胞に分化誘導させた。破骨細胞形成の際, 形成の抑制因子であるINF- γ で刺激し, 破骨細胞分化増殖能および骨融解能に対する影響を検討した。前者は4%パラホルムアルデヒド溶液で固定後、特異的マーカー酵素であるTRAP（酒石酸耐性酸性フォスファターゼ）酵素活性による細胞染色で同定した。後者は破骨細胞を象牙切片上で共培養しPit formationで観察検討した。さらに, INF- γ 刺激による破骨細胞内TRAF6の蛋白量の変化をウェスタンブロット法で検討した。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得ており、その指針に従って本研究を遂行した。

C. 研究結果

TRAP staining による破骨細胞分化増殖能は、健常者では、INF- γ 10 IU/mL の添加で破骨細胞形成が抑制されたが、INF- γ R1 異常症患者では INF- γ 50 IU/ mL においても破骨細胞の形成抑制が認められなかった。患者では破骨細胞の形成亢進の可能性が示唆された。

Pit formation による骨融解能の検討では、健常人ならびに INF- γ R1 異常症ともに、破骨細胞による象牙切片の融解像は確認され、INF- γ の濃度依存的にその骨融解は減少していった。健常者では、INF- γ 1 IU/ml 添加で骨融解が抑制され、10 IU/ml でほぼ完全に抑制された。INF- γ R1 異常症では INF- γ

濃度上昇で融解は抑制されたが、50 IU/ml でも融解が認められた。これらから、INF- γ R1 異常症では INF- γ 刺激による破骨細胞産生抑制とともにその機能抑制も低下していることが明らかとなった。

以上の結果から、MSMD 患者由来破骨細胞は INF- γ による抑制が弱いことから、分化増殖が亢進、骨融解機能の過剰によることから、骨のリモデリング異常を呈する可能性が推測された。MSMD 患者の骨髄炎発症頻度が高いことの一要因の可能性が示唆された。

破骨細胞のRANKL刺激によるシグナル伝達分子TRAF6は正常、患者由来破骨細胞のINF- γ 刺激に対し、発現の変化は認められなかった。ヒトにおいてはINF- γ 刺激による破骨細胞分化抑制、機能抑制には TRAF6以外のシグナル伝達系に関与している可能性が考えられた。

D. 考察

INF- γ シグナル伝達系異常によるMSMD患者由来の破骨細胞は健常者由来の破骨細胞と比較してINF- γ 刺激による破骨細胞形成ならびにその機能抑制が低下していることを明らかとした。これはMSMD患者に高頻度に認められる骨融解所見の原因と推測され、INF- γ シグナル伝達障害がMSMD患者の破骨細胞形成とその機能抑制を阻害し、破骨細胞の機能亢進を起こすことに基づいていることが推測された。INF- γ による破骨細胞形成抑制はTRAF6蛋白発現低下によることがマウスでは報告されているが、本研究でのヒトでは健常者、MSMD患者ともに、INF- γ 刺激によるTRAF6発現低下は認められなかったことから、他のシグナル伝達系の関与が推測された。今後、INF- γ によるMSMD患者の破骨細胞形成抑