

制の詳細な機序を検討する必要があると思われる。

E. 結論

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。患者破骨細胞では IFN- 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica* 99: 19-27, 2014.

Fujii Y, Ishikawa N, Kobayashi Y, Kobayashi M, Kato M: Compound heterozygosity in GPR56 with bilateral frontoparietal polymicrogyria. *Brain & Development* 36: 528-31, 2014.

Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Tajima G, Kobayashi M: Ictal electroencephalography and electromyography features in symptomatic infantile epileptic encephalopathy with late-onset spasms.

Neuropediatrics 45: 36-41, 2014.

Kobayashi Y, Ishikawa N, Fujii Y, Nakamura K, Kobayashi M: A case of trisomy 18 with exacerbation of seizures triggered by administration of valproic acid. *Am J Med Genet A* 164A: 285-6, 2014.

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 Leukocyte Biology* 95: 667-676, 2014.

Joichi Y, Chijimatsu I, Yarita K, Kamei K, Miki M, Onodera M, Harada M, Yokozaki M, Kobayashi M, Ohge H: Detection of *Mucor velutinosus* in a blood culture after autologous peripheral blood stem cell transplantation: a pediatric case report. *Medical Mycology Journal* 55: E43-48, 2014.

Yasumura J, Wago M, Okada S, Nishikomori R, Takei S, Kobayashi M: A 2-year-old Japanese girl with TNF receptor-associated periodic syndrome: A case report of the youngest diagnosed proband in Japan. *Modern Rheumatology* 2014.

Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Samukawa M, Kusunoki S, Kobayashi M: A pediatric case of peripheral polyneuropathy with IgM anti-GM1 antibody associated with a group a beta-hemolytic streptococcus infection. *Pediatric Neurology* 51: 441-3, 2014.

Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Kobayashi M: Increased interleukin-6 high-sensitivity C-reactive protein levels in pediatric epilepsy patients with frequent, refractory generalized motor seizures. *Seizure* 2014. 10.007. (Epub ahead of print)

小林正夫, 川口浩史: 自己免疫性好中球減少症 日本内科学会雑誌 103: 1639-1644, 2014.

溝口洋子, 小林正夫: 重症先天性好中球減少症の病態解析研究の進歩 血液内科 68: 676-81, 2014.

土居岳彦, 小林正夫: 小児血液疾患 よくわかる最新知見 好中球異常症の概要と診断の進め方 小児科 55: 1577-1583, 2014.

岡田 賢, 小林正夫: IL-21 シグナルはナイーブB細胞を IL-2 感受性にして形質細胞に分化させる 血液内科 69: 405-409, 2014.

川口晃司, 内田佳子, 齋藤敦郎, 宮田憲二, 長谷川大一郎, 小坂嘉之, 岩田あや, 仁紙宏之, 小林正夫: 同種骨髄移植が奏功した新規 ELANE 遺伝子変異を有する重症先

天性好中球減少症 臨床血液 55:2294-2299, 2014.

2. 学会発表

Akari N. Utsunomiya, M Tsumura, NOhno, M Miki, H Kawaguchi, K Nakamura and M Kobayashi: Excessive Nitric Oxide production of CGD neutrophils induces the down-regulation of *NOS3* and *EDNI* expression in human endothelial cells. The 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, Dec 6 - 9, 2014

Y Mizoguchi, S Okada, M Tsumura, O Hirata, S Minegishi, Jean-Laurent Casanova, T Morio, M Kobayashi: *STAT1* gain-of-function in patients with chronic mucocutaneous candidiasis can be detected by the excessive phosphorylation of STAT1 in peripheral blood monocytes. The 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, Dec 6 - 9, 2014

S Hayakawa, S Maeno, N Ohno, S Okada, Y Nishimura, M Hayashidani, M Kobayashi: Significant augmentation of regulatory T cells in early neonatal period. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Prague, Czech, Oct 29 to Nov 1, 2014.

Y Mizoguchi, A Furue, I Chijimatsu, M Miki, K Tomioka, N Konishi, A Ono, H Kawaguchi, K Nakamura and M Kobayashi: Early elimination of Factor VIII

inhibitor by ITI with high dose immunoglobulin in hemophilia A children. WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2014 World Congress, Melbourne, May 11-15, 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

高IgE症候群に対する造血幹細胞移植の検討

高田英俊 九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学 教授

研究要旨

高IgE症候群は、易感染性、難治性湿疹、高IgE血症を3主徴とする原発性免疫不全症である。高IgE症候群に対する造血幹細胞移植法は確立していない。今回我々は、巨大肺嚢胞を形成した高IgE症候群（STAT3遺伝子異常による）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。患者は易感染性がなくなり、肺嚢胞も軽快し、QOLも著しく改善した。骨髄でのキメリズムが低値であったが、末梢血T細胞やNK細胞はほとんどがドナー由来となりsplit chimerismで安定した。Th17細胞数も上昇した。今後、T細胞のキメリズムが低下してくるかどうか重要な問題であると考えられ、免疫学的解析を含めて慎重に経過をみていく方針である。

A. 研究目的

高IgE症候群は、ブドウ球菌やカンジダを中心とした易感染性、難治性湿疹、高IgE血症を3主徴とする原発性免疫不全症である。その原因としてこれまで、STAT3、TYK2、DOCK8遺伝子異常が報告されている。ほとんどはSTAT3遺伝子異常によっておこり、その場合、次第に肺嚢胞が形成され、多発・拡大し、呼吸不全を呈し、死亡の原因となる。また感染症のコントロールが困難な場合や、悪性リンパ腫が合併することもあり、治療にも関わらず、病勢が進行することも少なくない。従って、高IgE症候群では、これらの重大な合併症が進行しないよう治療・管理する必要がある。その選択肢として、造血幹細胞移植が考えられるが、これまで報告されている移植成績は良いとは言えない。

今回我々は、巨大肺嚢胞を形成した高IgE症候群（STAT3遺伝子異常による）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。

B. 研究方法

1. 患者の経過

患者：29歳女性

10歳時に高IgE症候群と診断された。

15歳時に気管支拡張症を合併。

23歳時に非定型抗酸菌症と診断され、治療。

28歳時に肺嚢胞形成が確認され、その後多発し、拡大してきた。巨大嚢胞を摘出するため、左上葉切除術を受けた。その後も肺嚢胞や感染症のコントロールが困難であり、造血幹細胞移植の適応と判断した。

2. 免疫学的評価

末梢血および骨髄細胞をフローサイトメーターで細胞表面マーカーを解析した。

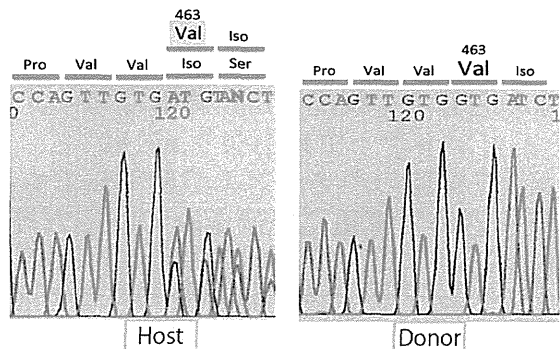
キメリズム解析は、ドナーとレシピエントが同性であったため、STR-PCR法（short tandem repeat-PCR法）を用いて解析した。T-cell receptor excision circles（TREC）の解析は定量的PCR法を用いて行

った。

C. 研究結果

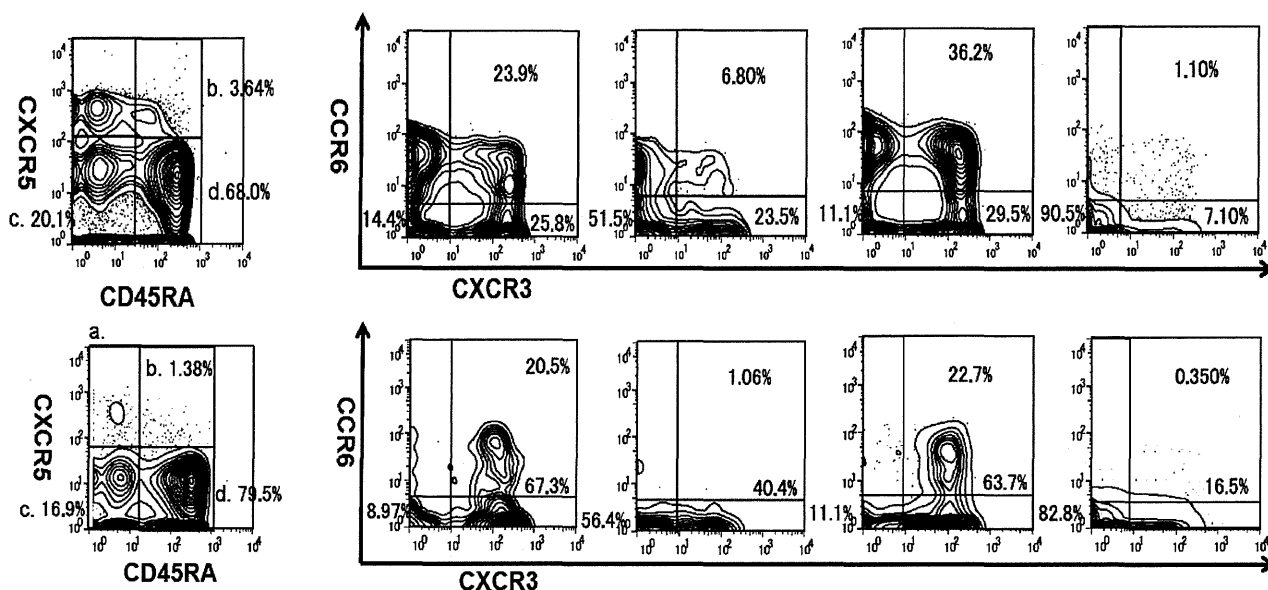
患者の高 IgE 症候群の原因である、STAT3 遺伝子変異部位と、ドナーである姉の同部位を図 1 に示す。

図 1. 患者 (Host) およびドナー (Donor) の STAT3 遺伝子解析結果



また、患者では、Th17 細胞に相当する CD4+CCR6+CXCR3-細胞と Tfh 細胞に相当する CD4+CXCR5+細胞が著しく減少していた (図 2)。

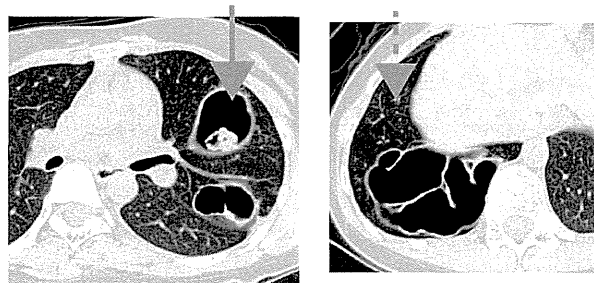
図 2. 患者末梢血リンパ球表面マーカー解析の結果



移植前の患者の胸部 CT 所見を図 3. に示

す。両側肺に嚢胞形成が認められ、アスペルギルスによる菌球を形成している部分も確認された。さらに非定型抗酸菌による粒状影も両側に認められた。

図 3. 患者胸部 CT 所見



姉をドナーとして、FLU (30mg/m²) + CY (25mg/kg) + ATG (1.25mg/kg) を前処置として末梢血幹細胞移植 (輸注細胞数 CD34 陽性細胞 3.54x10⁶/kg) を行った。GVHD 予防は CyA+ short term MTX を選択した。

移植後 10 日目に生着が確認でき、その後、白血球数は増加した。血清 IgE 値は次第に低下し、正常化した。経度の GVHD が認められたがステロイド外用で軽快した。

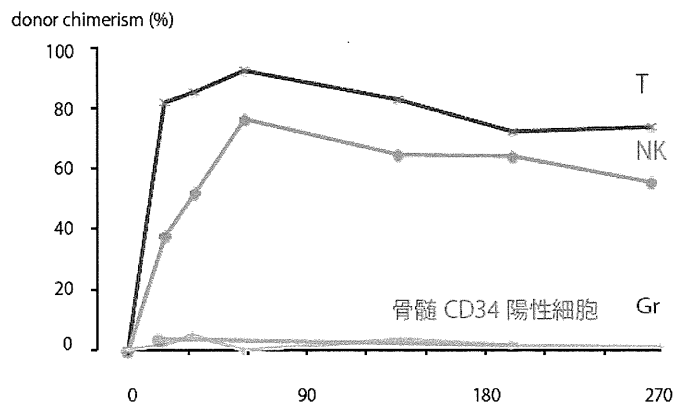
他方、キメリズムを解析すると (図

4)、T 細胞のキメリズムは高い値を維持していたが次第にやや低下傾向がみられ、80%前後で維持されている。NK 細胞も同様

な経過である。

しかし、顆粒球はレシピエント由来であり、Split chimerismの状態であることが確認された。骨髄のCD34陽性細胞のキメリズムを調べると、やはりレシピエント由来であることが確認された。

図4. 各細胞分画におけるキメリズム解析



移植後のTh17、Tfh細胞および血清IgE値は回復傾向が確認された(図5)。移植後のTRECの発現量は比較的保たれていた(図6)。

図5. 移植後のTh17、Tfh細胞および血清IgE値の経過

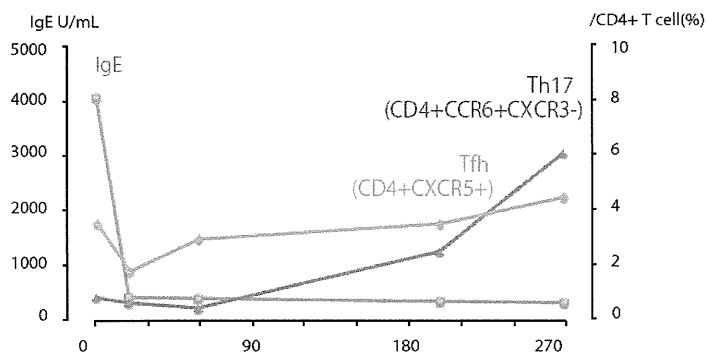
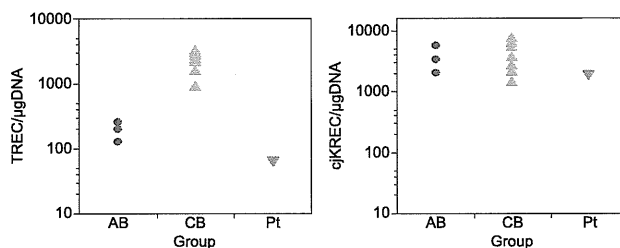


図6. 造血幹細胞移植6か月後のTREC、KREC値

D. 考察

高IgE症候群に対する造血幹細胞移植法は確立していない。本症例では、骨髄でのキメリズムが低値であったが、末梢血T細胞やNK細胞はほとんどがドナー由来であった。Th17細胞数も上昇していた。患者は易感染性がなくなり、肺嚢胞も軽快し、



AB: adult PB control, CB: cord blood control, Pt: Patient

QOLも良い状態である。このようなsplit chimerismで状態が安定している報告はこれまでない。

今後、T細胞のキメリズムが低下してくるかどうかの問題であるが、重要な問題であると考えられ、免疫学的解析を含めて慎重に経過をみていく方針である。

E. 結論

STAT3遺伝子変異による高IgE症候群に対して、HLA一致血縁者間末梢血幹細胞移植を行った。患者の臨床経過は良好であるが、Split chimerismの状態であり、経過を観察する必要がある。

G. 研究発表

学会

1. Takada H, Takimoto T, Ishimura M, Urata M, Morio T, Hara T: Wiskott-Aldrich syndrome in a girl caused by heterozygous WASP mutation and

- extremely skewed X-chromosome inactivation: an association of non-random X-chromosome inactivation and uniparental isodisomy 6. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Oct 29-Nov 1, 2014 Prague
2. Mitsuiki N, Yang X, Bartol S, Kosaka Y, Takada H, Imai K, Kanegane H, Mizutani S, Burg VD, Zeim MV, Ohara O, Morio T: Mutations in Bruton's tyrosine kinase impair IgA responses. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Oct 29-Nov 1, 2014 Prague
 3. Hara T, Ishimura M, Takada H, Kusuda Y, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H: Association between primary immunodeficiency diseases and vasculitis syndrome. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Oct 29-Nov 1, 2014 Prague
 4. Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Hara T, Rojavin M, Hu W, Hubsch A, Nonoyama S: Safety and tolerability of Hizentra in patients with primary immunodeficiency in Japan, Europe, and the US. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Oct 29-Nov 1, 2014 Prague
 5. Imai K, Kanegane H, Yamada M, Takada H, Ariga T, Kobayashi M, Rojavin M, Bexon M, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T: Safety, Tolerability, and Efficacy of Hizentra in Japanese Patients with Primary Immunodeficiency over 48 Weeks. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. February 28-March 4, 2014 San Diego
 6. Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Tsutani K, Igarashi A, Bexon M, Rojavin M, Kobayashi M, Lawo JP, Zbrozek A, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T: Health-related quality of life of Japanese patients with primary immunodeficiency diseases receiving IgPro20, a 20% liquid subcutaneous immunoglobulin (Hizentra). American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. February 28-March 4, 2014 San Diego
 7. Ishimura M, Mizuno Y, Takada H, Ohga S, Hara T: An Early and Non-invasive Diagnostic Method for Histiocytic Necrotizing Lymphadenitis. FISP/M. August 30, 2014 Fukuoka
- 論文
1. Takimoto T, Takada H, Ishimura M, Kirino M, Hata K, Ohara O, Morio T, Hara T: Wiskott-Aldrich syndrome in a girl caused by heterozygous WASP mutation and extremely skewed X-chromosome inactivation: A novel association with maternal uniparental isodisomy 6. *Neonatology* 2015;107(3):185-90.

2. Kido J, Mizukami T, Ohara O, Takada H, Yanai M: Idiopathic disseminated bacillus Calmette-Guerin infection in three infants. *Pediatrics International* in press
 3. Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H, Saito M, Tanaka T, Yamamura K, Sakai Y, Takada H, Miyamoto T, Mizuno Y, Ouchi K, Waki K, Hara T: Kawasaki disease-specific molecules in the sera are linked to microbe-associated molecular patterns in the biofilms. *PLoS One*. 2014 Nov 20;9(11) :e113054
 4. Yamazaki Y, Yamada M, Kawai T, Morio T, Onodera M, Ueki M, Watanabe N, Takada H, Takezaki S, Chida N, Kobayashi I, Ariga T: Two Novel Gain-of-Function Mutations of STAT1 Responsible for Chroni Mucocutaneous Candidiasis Disease: Impaired Production of IL-17A and IL-22, and the Presence of anti-IL-17F Autoantibody. *J Immunol*. 2014 Nov 15;193(10):4880-7
 5. Yamamura K, Takada H, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Morihana E, Ohga S, Hara T: Early progression of atherosclerosis in children with chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Oct;53(10):1783-7
 6. Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Hu W, Kobayashi M, Lawo JP, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T: Efficacy and safety of IgPro20, a subcutaneous immunoglobulin, in Japanese patients with primary immunodeficiency diseases. *J Clin Immunol*. 2014 Feb;34(2):204-11
 7. Koga Y, Takada H, Suminoe A, Ohga S, Hara T: Successful treatment of non-Hodgkin's lymphoma using R-CHOP in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome followed by a reduced-intensity stem cell transplant. *Pediatr Transplant*. 2014 Sep;18(6):E208-11
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

当科で紹介のあった高 IgE 症候群の臨床的・免疫学的検討

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

研究協力者：高島健浩 愛媛大学大学院医学系研究科小児医学

研究要旨

2014年に当科にPIDJ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行う予定である。

研究目的

2014年に当科にPIDJ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、鑑別が困難である。本研究では、STAT3遺伝子変異の場所、原因不明群とSTAT3異常群の臨床症状、検査所見、臨床スコア、ならびに、multi color FACSによるリンパ球亜群解析の結果について検討を行い、効果的な診断法の確立、HIESに特徴的な病態についての検討を目的とした。

研究方法

PIDJ を介して、当科に 2014 年に紹介を受けた患者 164 症例のうち、高 IgE 症候群が疑われる患者、およびインドチャンディガーから紹介を受けた高 IgE 症候群疑い患者 14 例について、かずさ DNA 研究所にて STAT3 遺伝子解析を行った。また、BD LSR Fortessa セルアナライザーを用いた FACS 解析を行った。患者からはインフォームドコンセントをとって、解析を行った。

研究結果

STAT3 異常症が 10 例（男性 7 例、女性 3 例、紹介時年齢 0 歳 7 ヶ月～46 歳）であり、STAT3 異常を認めなかった HIES 疑い患者が 16 例（男性 10 例、女性 6 例、紹介時年齢 1 歳～54 歳）であった。STAT3 変異は図 1 に示すように、DNA-binding domain に 6 例、SH2 ドメインに 2 例、transactivation domain に 1 例の全て片アリのミスセンス変異を認めた。まず、NIH スコア (Grimbacher, 1999, *Am. J. Hum. Genet*) について、両群で比較をした。診断的とされる 40 点以上を示した例が、STAT3 変異患者で 7 例 (70%)、STAT3 野生型患者で 6 例 (37.5%) で見られた。一方、STAT3 変異患者でも 2 例は 20 点前後の例もあり、臨床スコアだけでの診断は見逃

しにつながると考えられた。臨床症状をそれぞれ比較すると、皮膚症状は 2 群で大きな差がないが、湿疹は STAT3 野生型の方がむしろ重症例が多く、爪カンジダは STAT3 変異型で多く見られ、感染頻度は差がなかった (図 2A)。呼吸器合併症は STAT3 変異患者で明らかに多く、鑑別に有用と考えられた。STAT3 野生型にも少数例肺嚢胞、肺膿瘍、反復性肺炎例があり、こうした例は、原因不明の高 IgE 症候群ではないかと考えられた (図 2B)。骨格系異常も STAT3 野生型 2 例で、特徴的顔貌、幅広い鼻梁、乳歯脱落遅延、骨折が見られたが、大部分の症例では認めなかった。STAT3 変異型では、乳歯脱落遅延、骨折が比較的高率に認められたが、1/3 程度の症例であり、全例で見られるものではないことがわかった (図 2C)。検査所見では白血球数、その分画、Ig 値、簡単な FACS 解析 (T, CD4/8, naive vs memory, B) は両群に差がなく、健常者とも同程度であった (図 2D)。

詳細な FACS 解析では、少数例での検討ではあるが、Th17 細胞とされる CCR6+CXCR3⁺T 細胞分画が STAT3 変異患者では明らかに減少していた。また、健常者に比べるとメモリー B 細胞、特に IgM メモリー B 細胞、スイッチメモリー B 細胞の減少が見られており、易感染性に寄与している可能性が示唆された。T 細胞新生能をみる TREC、B 細胞新生能をみる KREC 定量では、KREC は全例正常であり、STAT3 変異型では、2 例の正常下限例

を除き、TREC は正常であった。STAT3 野生型の中には TREC 感度以下例が 4 例含まれており、こうした例は、T 細胞新生能異常による T 細胞の分化異常から来る IgE 高値、皮疹等である可能性もあると考えられた。

インドからの症例は 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 例であり、その解析結果を報告した。NIH スコアは 1 例で 25 点であったが、残りは 40 点以上を呈していた。これらの患者では PMA+CaI 刺激後の IL-17 産生が悪かった。

考察と結論

臨床的に HIES が疑われた患者 26 例のうち 10 例において STAT3 遺伝子の変異を同定した。STAT3 遺伝子変異を持たない患者との間で NIH スコアに有意差は認めなかったが、STAT3 遺伝子の変異を有する患者では肺炎の反復、カンジダ感染症、乳歯脱落遅延、病的骨折の頻度が高い傾向を認めた。しかし、現状の NIH スコアのみで類縁疾患を見分けるためには、感度、特異度的に問題があり、より病態に直結した検査所見（細胞学的解析）等を加えることが必要であると考えられる。すでに、Th17 細胞の減少については刺激後 IL17 産生細胞を細胞内サイトカインを測定する方法でみて、STAT3 変異患者では減少していることが報告されている (Milner,2008,Nature:de

Beaucoudrey,2008,JEM;Ma,2008,JEM;Renner,2008,JACI;Minegishi,2009,JEM)。今回の研究では、細胞表面のケモカインマーカー発現がヘルパー T 細胞分画と相関することを利用して、Th17 細胞とされる、CCR6+CXCR3-CD45RO+CD4+CD3+T 細胞が、STAT3 変異患者と STAT3 野生型患者との間で差があるかどうかを検討したが、細胞内染色法に比べてより簡便であり、STAT3 変異患者をアトピー性皮膚炎症状を呈する他の疾患患者と鑑別をする際に有用であると考えられた。例えば、Wiskott-Aldrich 症候群では、高 IgE 症候群と同様、高 IgE 血症、アトピー様皮膚炎、免疫不全症（易感染性）が見られるが、Th17 細胞はむしろ増加している(未発表データ)。

FACS 解析では HIES 患者全般において memory B 細胞が減少しており、易感染性に寄与している可能性が示唆された。

今後は、今回の研究で得られた、STAT3 野生型で、STAT3 類似の表現型を持つ患者について、その原因遺伝子同定に向け、研究を続けたいと考える。

研究発表

論文発表

Saikia B, Suri D, Goel S, Rawat A, Minz RW, Gupta A, Sharma S, Ohara O, Imai K, Nonoyama S, Sehgal S, Singh S. Hyper-IgE syndrome with a novel STAT3

mutation-a single center study from India. Asian Pac J Allergy Immunol. (2014) 32,321-7.

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 (2014) 34,58-67

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 (2014) 95: 667-676

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 IgA responses. 16th Biennial Meeting of the European society for immunodeficiencies ,

2014.10.30

今井 耕輔. 【見逃しやすい免疫不全】ピンポイント小児医療 免疫系 overview 免疫不全症との対応を含めて. 小児内科(2014)46:1454-1458
学会発表

荒畑 幸絵, 北澤 克彦, 本多 昭仁, 今井 耕輔, 小原 收. ニューモシスチス肺炎を契機に X 連鎖高 IgM 症候群と診断された生後 5 ヶ月男児例. 第 46 回日本小児感染症学会学術集会. 2014 年 10 月 18 日

高木 正稔, 宮脇 零士, 小林 千佳, 青木 由貴, 富澤 大輔, 今井 耕輔, 森尾 友宏, 水谷 修紀. Ras 関連 ALPS 様疾患(RALD)新規治療法開拓への展望. 第 117 回日本小児科学会学術集会. 2014 年 4 月 11 日

本間 健一, 満生 紀子, 釜江 智佳子, 今井 耕輔, 森尾 友宏, 金兼 弘和, 矢部 みはる, 村松 秀城, 小島 勢二, 野々山 恵章. わが国の Fanconi 貧血患者における免疫学的検討. 第 117 回日本小児科学会学術集会. 2014 年 4 月 11 日

山家 宏宣, 市川 由香里, 島 裕子, 戸川 寛子, 辻 知見, 樋口 隆造, 野々山 恵章, 本間 健一, 釜江 智佳子, 今井 耕輔, 小原 收, 満生 紀子. 外胚葉形成不全を伴う免疫異常症 EDA-ID の兄妹例. 第 117 回日本小児科学会学術集会. 2014 年 4 月 11 日

小林千佳、今井耕輔、松本和明、青木由貴、富澤大輔、高木正稔、森尾友宏、水谷修紀、古市嘉行、犬飼岳史.
Wiskott-Aldrich syndrome に対する TPO 受容体作動薬の使用経験. 第 117 回日本小児科学会学術集会.2014 年 4 月 11 日

藤田基資、今井耕輔、小倉友美、佐藤一寿、辻田由喜、梶原伸介、子川和宏、野々山恵章. 臍帯脱落遅延をみ

とめた原発性免疫不全症の 2 例. 第 117 回日本小児科学会学術集会.2014 年 4 月 11 日

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。

全エクソン塩基配列解析による高 IgE 症候群の病因解明

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

統合ゲノミクス研究グループディレクター

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極めて重要である。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症例も未だ多く存在する。本分担研究では、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研究代表と共有し、その中から疾患原因変異についての絞り込み作業を継続中である。

A. 研究目的

疾患症状から 1 型、2 型に分類されている高 IgE 症候群において、確定診断には遺伝子解析が用いられる。本研究班の業務主任者らの努力により、高 IgE 症候群の原因遺伝子として *Stat3* と *Tyk2* が既に同定されたが、未だ遺伝的な原因の同定できていない遺伝性の高 IgE 症候群症例が多数残されている。本分担研究では、近年進歩の著しい次世代シーケンシング技術を活用して、既知遺伝子変異が見られない本邦の症例に対して全エクソーム解析を実施することにより、現在未知の新しい原因遺伝子変異の同定に挑むものである。一方、次世代シーケンシングによる遺伝子変異検出技術の革新に比べ、最終的な遺伝子変異の同定から遺伝子産物の機能変化を迅速に検知するかが決定的に重要なプロセスであるにも関わらず、

見出されたミスセンス変異の機能的解釈のための基盤確立は大きく立ち遅れている。この問題を解決するための一つの新しいアプローチの原理検証実験として、飽和型変異スキャンニングによって *Stat3* 遺伝子のコイルドコイルドメイン内のどのようなアミノ酸変異がどのような機能的なインパクトを有するかを網羅的に調べ、ミスセンス変異が及ぼす影響の鳥瞰図を作製する方法の創出を目指す。

B. 研究方法

まず、本邦における既知遺伝子に変異の見られない高 IgE 症候群症例を同定するために、既知遺伝子として知られている *Tyk2* と *Stat3* のタンパク質コード領域とそのスプライシングサイト周辺配列をアンプリコンキャピラリーシーケンシングにより解析

した。この解析は、厚生労働科学研究委託費、難治性疾患等実用化研究事業の「原発性免疫不全症候群の病態解明と新規治療法開発への応用に関する」研究班と連携して行った。

そうした既知遺伝子変異がない事が確認された症例検体を本研究班の業務主任者のグループから預かり、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 (Varkeeper) によって一次データとしての vcf ファイルを作製した。

Stat3 のコイルドコイルドメインへの飽和的変異スキニングのためのオリゴマーデザインとその合成は、アジレント社の QuikChange HT Protein Engineering System の方法に従って行った。

倫理面への配慮

本研究でのヒト解析検体は、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、本研究分担者には匿名化された検体 ID のみが通知される枠組みで研究を実施した。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。

C. 研究結果

今年度の原発性免疫不全症研班での高 IgE 症候群の除外診断として、Stat3 解析 29 件、Tyk2 解析 8 件を解析した。これにより原因変異が確定診断できたのは、現時点では Stat3 解析からの 4 症例のみに留まった。

本研究班業務主任者のグループから、既知遺伝子に変異の見られない症例 12 検体、原因変異絞り込みのための家族検体 8 検体を預かり、これらの検体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を確認した。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行った。これらの作業が完了した段階で、業務主任者のグループとデータ共有を開始し、疾患原因と考えられる候補変異の絞り込み作業を現在継続中である。

こうした次世代シーケンシングの結果、大量の稀な個人多型情報が取得可能となるが、その中からタンパク質機能に影響を与える変異を特定する事は未だバイオインフォマティクスだけからでは困難である。そこで、本分担研究では全エクソン配列解析における大きな克服すべき課題である見いだされた変異の機能評価のための基盤を与えるための新しいアプローチとして、網羅的な変異スキニングによって疾患原因遺伝子のどの部分へのどのような変異が分子機能に影響するかを探索するための基盤構築にも取り組んだ。今年度は Stat3 タンパク質のコイルドコイルドメインを対象と

し、このドメイン内の全てのアミノ酸残基を一か所ずつ20種類のアミノ酸に置換した変異体を作製するための人為的突然変異導入用のオリゴマーのデザインを行い、その調製までを終えた。

D. 考察

本分担研究者は原発性免疫不全症研究班と連携して広く免疫不全症の既知遺伝子変異の解析を行っているが、高 IgE 症候群も既知遺伝子の解析だけでは確定診断に至れるケースがまだ少ないのが実情である。寄せられた症例が本当に遺伝性であるかどうかという問題も存在するものの、未だ同定されていない新規な高 IgE 症候群の原因遺伝子が存在する可能性は十分にあると考えられる。全エクソン解析はこうした遺伝性疾患における原因探索に有効であることが既に実証されているアプローチではあるが、経験的な原因遺伝子変異の同定率は 30-40%と言われており、疾患変異がタンパク質コード領域やスプライシングサイト周辺の塩基置換でないケースも今後は視野に入れておく必要がある。今後、多数の疾患原因候補変異を一つずつ吟味し、可能性のあるものについて機能的な解析を進めて疾患関連性を確認していく計画である。

しかし、このように全エクソン解析で見出されるミスセンス変異が生体機能に無害なものなのかどうかを迅速に見極められなければ、いつまでも疾患原因が特定できないことになってしまう。この目的には、これまでは進化的なアミノ酸残基の保存性に重きをおいたバイオインフォマティクスツールを用いるか、個々の変異に対して細胞生物学的な機能解析を行うかのいずれかの方法が取られてきた。今回の研究では、既に *Stat1* で先行実験を進めている飽和型変異

スキニング法によって網羅的にミスセンス変異と分子機能の関係を探るアプローチを、高 IgE 症候群の原因遺伝子として知られている *Stat3* に対して拡大展開することを計画した。これによって得られる構造機能相関の鳥瞰図は、今後の遺伝子構造情報を臨床的なアウトカムに結び付けるために重要な貢献をすると期待できる。

E. 結論

新規な高 IgE 症候群の原因遺伝子変異を見出すために、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンス解析を行った。更に、網羅的な変異スキニング実験を *Stat3* コイルドコイルドメインで実施するための準備を完了し、全エクソンシーケンス解析から疾患原因遺伝子変異を同定するための新しい基盤構築を進めた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Saikia B, Suri D, Goel S, Rawat A, Minz RW, Gupta A, Sharma S, Ohara O, Imai K, Nonoyama S, Sehgal S, Singh S. Hyper-IgE syndrome with a novel STAT3 mutation-a single center study from India. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2014 Dec;32(4):321-7.

2: Hasegawa Y, Ishikura T, Hasegawa T, Watanabe T, Suzuki J, Nakayama M, Okamura Y, Okazaki T, Koseki H, Ohara O, Ikeno M, Masumoto H. Generating a transgenic mouse line stably expressing human MHC surface antigen from a HAC carrying multiple genomic BACs. *Chromosoma.* 2015 Mar;124(1):107-18.

3: Oda H, Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, Hijikata A, Nishikomori R, Funatsuka M, Ohshima Y, Sugawara Y, Yasumi T, Kato H, Shirai T, Ohara O, Fujita T, Heike T. Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations. *Am J Hum Genet.* 2014 Jul 3;95(1):121-5.

4: Motomura Y, Morita H, Moro K, Nakae S, Artis D, Endo TA, Kuroki Y, Ohara O, Koyasu S, Kubo M. Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation. *Immunity.* 2014 May 15;40(5):758-71.

5: 小原 收、遺伝子構造解析の現状とデータ解析アプローチ、小児内科 2014 46(10): 1545-1549.

2. 学会発表

1. ヒト遺伝性疾患の構造バイオインフォマティクス、土方敦司、小原收、第 86 回日本遺伝学学会、2014 年 9 月 19 日

2. 臨床研究のための疾患遺伝子解析

パイプラインの構築、小原收 第 56 回日本人類遺伝学会、2014 年 11 月 20 日

3. 次世代シーケンサー (MiSeq) を用いた原発性免疫不全症の遺伝子解析、中山学、小田紘嗣、八角高裕、西小森隆太、平家俊男、小原收、第 8 回日本免疫不全症研究会学術集会、2015 年 1 月 24 日

4. 次世代シーケンサーを用いた原発性免疫不全症の迅速遺伝子診断法の確立、加藤環、釜江智佳子、野々山恵章、今井耕輔、小原收、第 8 回日本免疫不全症研究会学術集会、2015 年 1 月 24 日

5. ドメイン単位での網羅的変異スキヤニングによるタンパク質構造・機能ランドスケープの取得とそのミスセンス変異機能評価への応用、小原收、藤木亮次、土方敦司、岡田賢、小林正夫、第 8 回日本免疫不全症研究会学術集会、2015 年 1 月 24 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

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

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

研究要旨： 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、実に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や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 システムにおいてかなり顕著であった。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。

A. 研究目的

遺伝子機能の生態における解析は生命科学を深く理解する上で重要であることから、これまで様々な種において遺伝子改変動物が作製されてきた。マウスは ES 細胞を用いることで、逆遺伝学的手法により遺伝子破壊可能な数少ないモデル動物であったが、ターゲティングベクターの構築から相同組換えを含めると、遺伝子会へ h マウスの作製には多大な時間、費用そして労力を要する。近年開発されたゲノム編集技術（ZFN、TALEN、CRISPR/Cas システム）は、ES 細胞フリーで DNA 配列の操作が可能な革命的技術である。

本研究では、これまで煩雑だった遺伝子改変マウス作製を、TALEN ならびに

CRISPR/Cas システムを用いることで、費用・時間の大幅削減と手技の超簡便化を図るものである。

B. 研究方法

対象遺伝子としては、ノックアウトマウスが四肢欠損や無眼を示す表現型評価の容易な Fgf10 と Pax6 を選択し、それぞれ複数の標的配列を設定後、gRNA 用コンストラクトを作製した。TALEN コンストラクトは Transposagen 社に Fgf10 遺伝子のみ合成を依頼した。

In vitro transcription により TALEN の場合は TALEN mRNA、CRISPR/Cas システムでは gRNA と Cas9 mRNA を合成・精製後、マウス

受精卵の核ならびに細胞質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のみならず、抽出したゲノム DNA を用い、NHEJ (Non-homologous end joining) の有無を Cel-I アッセイにて判定し、シーケンスによる確認も併せて行った。また、胎生期の解析のみならず、導入変異の生殖細胞系列への伝達確認のため F1 世代を作製した。

(倫理面への配慮)

徳島大学動物実験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

Fgf10 遺伝子を標的とする 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 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/Cas システムを Fgf10 遺伝子に対して適用したところ、90% 以上の胚で NHEJ が確認され、四肢発生異常は 40~100% の胚で認められた。Pax6 遺伝子に対して CRISPR/Cas システムを適用した場合にも、ほぼ同様の効率で眼の発生異常を認めた。

また、TALEN、CRISPR/Cas システムのいずれの手法による導入変異も F1 世代で確認され、生殖細胞系列への伝達を示された。

D. 考察

TALENならびにCRISPR/Casシステムをマウス1細胞期胚にマイクロインジェクション法にて適用することで、F0世代において効率的な標的配列破壊を行うことができたが、その効率はTALENと比較しCRISPR/Casシステ

ムにおいて非常に高効率であった。一方、オフターゲットの検索は行っておらず、今後の課題として挙げられる

標的配列はFgf10、Pax6両遺伝子とも複数設定したが、Pax6のエクソン-イントロン境界部に設定したものでは、NHEJ率は同程度なものの、無眼を示す胚は少ない傾向にあった。またFgf10遺伝子においても遺伝子機能に重要ではない領域に標的配列を設定した場合、たとえ両アレルに変異が生じていても、フレームシフトが起こらない場合は四肢発身に異常を来さなかった。これらのことは、標的配列の選択に非常に重要な意義を与えたと考えられる。

今後、これらの結果を踏まえ、高IgE症候群関連遺伝子のノックアウトマウスを作製していく予定である。

E. 結論

マウス 1 細胞期胚における TALEN ならびに CRISPR/Cas システムを用いた遺伝子改変マウスの作製が高効率で作動することが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Highly efficient targeted mutagenesis in one-cell mouse embryos mediated by the TALEN and CRISPR/Cas systems. *Scientific Reports* 2014; 4:5705. doi: 10.1038/srep05705.

2. 学会発表

Highly efficient targeted mutagenesis in one-cell mouse embryos mediated by TALEN and CRISPR/Cas systems. The X meeting for Spanish Society for Developmental Biology (SEBD), Oct 13-15, 2014, Madrid, Spain.

CRISPR/Cas システムによる Pax6 遺伝子破壊マウスの解析. 第 37 回日本分子生物学

会, 11月25-27日, 2014, パシフィコ横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし