

## フローサイトメトリーを用いた APDS の診断

研究分担者 小林 正夫(広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学)

**研究要旨:** 近年、Class I PI3 キナーゼ (PI3K) に属する触媒サブユニット p110 (責任遺伝子 *PIK3CD*)、調節サブユニット p85 (責任遺伝子 *PIK3R1*) の各遺伝子変異による新しい原発性免疫不全症として、APDS/APDS2 (以下 APDSs) が報告された。APDSs は反復性気道感染、リンパ節過形成、抗体産生不全、EBV/ CMV に対する易感染性といった同様の臨床症状を特徴とする。

APDSs では PI3K-AKT-mTOR シグナル経路の過剰な活性化が病態に関与する。フローサイトメトリーを用いた末梢血リンパ球解析では、患者末梢血 B 細胞 (CD19+) は定常状態において健常者に比して AKT のリン酸化が有意に亢進していたが、p110 阻害薬処理後では患者と健常者の間にリン酸化の差は認められなかった。末梢血 T 細胞 (CD3+)、NK 細胞 (CD16+CD56+)、単球 (CD14+) では定常状態、p110 阻害薬処理後のいずれの状態でもリン酸化の差は明らかではなかった。さらに、APDSs において特徴的な transitional B 細胞の増加に着目し、CD19+CD10+ immature B 細胞における AKT のリン酸化を解析することでさらに正確な患者の層別化が可能となることが明らかとなった。

本結果から、患者末梢血 B 細胞を用いた AKT の過剰リン酸化を同定することで、APDSs の迅速診断が可能となると考えられた。本疾患は近年報告された新しい免疫不全症であり、CVID や高 IgM 症候群と診断されている患者の中に未診断例が潜在している可能性が高いと考えられる。それらの早期診断は早期治療介入に繋がるだけでなく、未だ原因が不明である APDSs が免疫不全を引き起こす分子基盤の解明にも寄与する可能性もある。

### A. 研究目的

APDS (activated PI3K syndrome) は、反復呼吸感染、進行性気道障害、リンパ球減少、抗体産生不全、EBV・CMV に対する易感染性を特徴とする原発性免疫不全症である。Class I PI3 キナーゼに属する触媒サブユニット p110 (責任遺伝子 *PIK3CD*) の機能獲得型変異により発症し、2013 年に発見されて以降、既に 40 症例以上の APDS 患者が本邦で同定されている。さらに、APDS に類似した原発性免疫不全症 (APDS2) が、p110 と 2 量体を形成する調節サブユニット p85 (責任遺伝子 *PIK3R1*) のヘテロ接合性変異で発症することが報

告され、本邦では現在 5 例の患者が同定されている。また、PI3K-AKT シグナル経路における脱リン酸化酵素である PTEN (責任遺伝子 *PTEN*) の機能喪失型変異による PTEN 異常症も APDS の類縁疾患と考えられている。

APDS/APDS2 は、臨床症状の類似性から高 IgM 症候群や分類不能型免疫不全症 (CVID) と診断されることも多く、誤診例、潜在的な未診断症例が多数存在すると考えられる。APDS/APDS2 患者の適切な診断を目的に、フローサイトメトリーを用いた迅速診断法の確立を試みる。

## B . 研究方法

APDSsではPI3Kが過剰に活性化され下流の分子であるAKTが過剰に活性化されることが知られている。APDSs患者、健常者、CVID患者(disease control)由来末梢血単核球における細胞内AKTのリン酸化をフローサイトメトリーを用いて検討した。CD3陽性T細胞、CD19陽性B細胞、CD16陽性CD56陽性NK細胞、CD14陽性単球、各細胞群における検討を行った。AKTのリン酸化は、定常状態とp110阻害薬処理後の2条件で比較検討を行った。

## C . 研究結果と考察

図1(右上)にAPDS2患者における各細胞群におけるAKTのリン酸化解析の結果を示す。患者CD19陽性B細胞での検討では、定常状態で健常者に比してAKTのリン酸化が優位に亢進しているのに対して、阻害薬処理後では健常者と比してリン酸化の差を認めなかった。disease controlとして行ったCVID患者のCD19陽性B細胞を用いた検討では健常者と同様にAKTのリン酸化亢進は認めなかった。その他の細胞分画における検討では、健常者と患者におけるAKTのリン酸化の差異は認めなかった。

図2にAPDS2患者4例のCD19陽性B細胞を用いたフローサイトメトリーでのAKTリン酸化解析結果を示す。患者末梢血CD19陽性細胞は定常状態においてAKTのリン酸化が健常者に比して有意に亢進するが、阻害薬処理後には患者と健常者のリン酸化の差は認めなくなることが示された。ここから定常状態と阻害薬処理後のMFIの差(MFI)が重要であると考えられた。

図2: APDS2におけるAKTリン酸化解析結果のまとめ

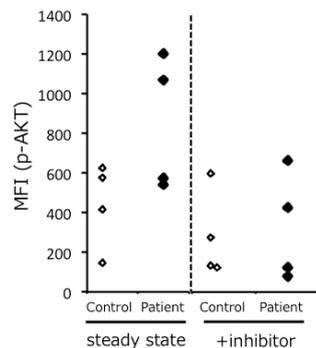


図1: 各細胞分画におけるAKTリン酸化の比較

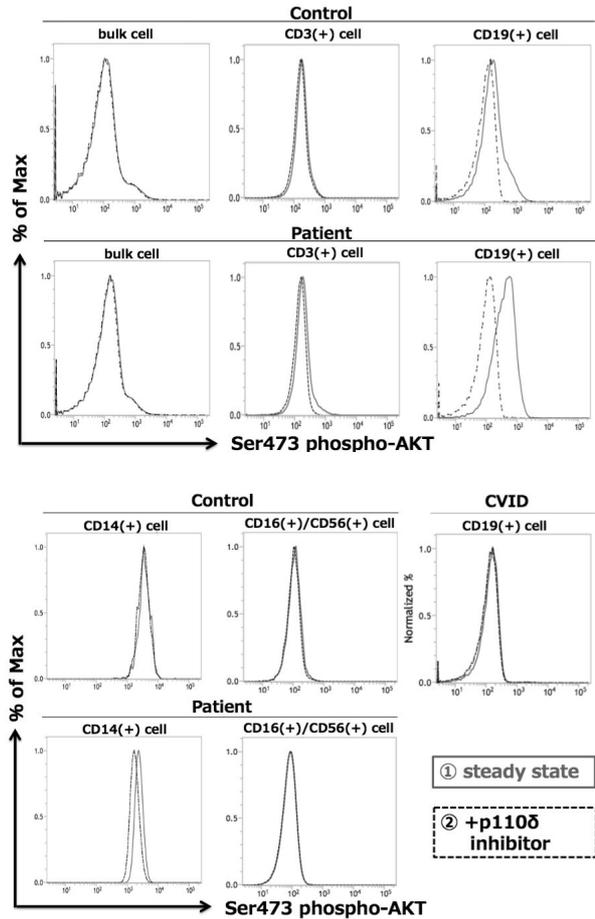
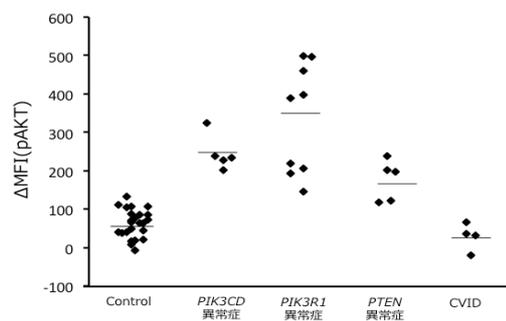


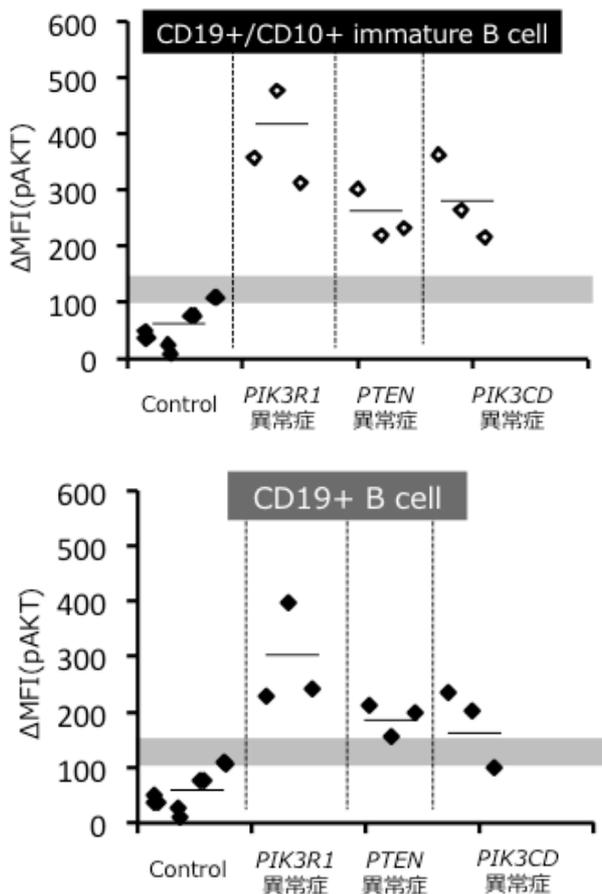
図3にPI3K異常症(APDS(4例)、APDS2(4例)、PTEN異常症(4例))におけるAKTリン酸化のMFIを用いた検討のまとめを示す。患者では健常者、CVID患者に比してMFIが有意に高いことが示された。ここからフローサイトメトリーを用いてCD19陽性B細胞にてAKTリン酸化解析を行うことでAPDSsの診断が可能となると考えられた。

図3: PI3K異常症におけるAKTリン酸化のまとめ



しかし、一部偽陰性となる例も認められたことから、より精度を高め、さらなる層別化が可能となるか検討した。そこで APDSs では transitional B 細胞が増加するという特徴に着目し、CD19 陽性 CD10 陽性 immature B 細胞分画 (transitional B 細胞に相当) CD19 陽性 CD10 陰性 mature B 細胞分画における AKT リン酸化の比較検討を行った。結果を図 4 に示す。CD19 陽性 CD10 陽性 immature B 細胞分画では、その他の分画に比して患者において顕著に AKT のリン酸化が亢進することが示された。CD10 を用いた解析を行うことで、前述法で偽陰性となる患者についても正しく層別化できることが示され、より精度の高い診断が可能となると考えられた。

図 4 : CD10 を用いた AKT リン酸化解析



## D . 結論

APDS は、CD19 陽性 B 細胞における AKT のリン

酸化をフローサイトメトリーで検討することから診断が可能となる。本方法を用いることで、新規発症症例の診断が可能となると同時に、CVID や高 IgM 症候群などの中に現在潜在している患者のスクリーニングが可能となる。また、APDS の免疫学的特徴に着目した検討を行うことでさらに精度の高い診断が可能となる。

また本方法に関し今後さらなる解析をすすめることで、APDS の分子病態のさらなる解明に繋がることも期待される。

## E . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hayakawa S, Okada S, Tsumura M, Sakata S, Ueno Y, Imai K, Morio T, Ohara O, Chayama K, Kobayashi M: A patient with CTLA-4 haploinsufficiency presenting gastric cancer. *J Clin Immunol* 36: 28-32, 2016.
- 2) Narita A, Muramatsu H, Sekiya Y, Okuno Y, Sakaguchi H, Nishio N, Yoshida N, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Doisaki S, Hama A, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Kobayashi M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and telomere length predicts response to immunosuppressive therapy in pediatric aplastic anemia. *Haematologica* 100: 1546-52, 2015.
- 3) Ma CS, Wong N, Rao G, Avery DT, Torpy J, Hambridge T, Bustamante J, Okada S, Stoddard JL, Deenick EK, Pelham SJ, Payne K, Boisson-Dupuis S, Puel A, Kobayashi M, Arkwright PD, Kilic SS, El Baghdadi J, Nonoyama S, Minegishi Y, Mahdavian SA, Mansouri D, Bousfiha A, Blincoe AK, French

- MA, Hsu P, Campbell DE, Stormon MO, Wong M, Adelstein S, Smart JM, Fulcher DA, Cook MC, Phan TG, Stepensky P, Boztug K, Kansu A, İkinçioğullari A, Baumann U, Beier R, Roscioli T, Ziegler JB, Gray P, Picard C, Grimbacher B, Warnatz K, Holland SM, Casanova JL, Uzel G, Tangye SG: Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 136: 993-1006, 2015.
- 4) Kobayashi M: Neutrophil disorders: diagnosis and hematopoietic stem cell transplantation. *Rinsho Ketsueki* 56: 2230-9, 2015.
  - 5) Okada S, Markle JG, Deenick EK, Mele F, Averbuch D, Lagos M, Alzahrani M, Al-Muhsen S, Halwani R, Ma CS, Wong N, Soudais C, Henderson LA, Marzouqa H, Shamma J, Gonzalez M, Martinez-Barricarte R, Okada C, Avery DT, Latorre D, Deswarte C, Jabot-Hanin F, Torrado E, Fountain J, Belkadi A, Itan Y, Boisson B, Migaud M, Arlehamn CS, Sette A, Breton S, McCluskey J, Rossjohn J, de Villartay JP, Moshous D, Hambleton S, Latour S, Arkwright PD, Picard C, Lantz O, Engelhard D, Kobayashi M, Abel L, Cooper AM, Notarangelo LD, Boisson-Dupuis S, Puel A, Sallusto F, Bustamante J, Tangye SG, Casanova JL: Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science* 349: 606-13, 2015.
  - 6) Kataoka S, Muramatsu H, Okuno Y, Hayashi Y, Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Kobayashi M, Sano C, Sato H, Oh-Iwa I, Ito M, Kojima D, Hama A, Takahashi Y, Kojima S: Extrapulmonary tuberculosis mimicking Mendelian susceptibility to mycobacterial disease in a patient with signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutation. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Aug 1. pii: S0091-6749(15)00881-7. doi: 10.1016/j.jaci.2015.06.028. [Epub ahead of print] No abstract available. PMID: 26242301
  - 7) Hirata O, Okada S, Tsumura M, Karakawa S, Matsumura I, Kimura Y, Maihara T, Yasunaga S, Takihara Y, Ohara O, Kobayashi M: Mosaicism of an ELANE mutation in an asymptomatic mother in a familial case of cyclic neutropenia. *J Clin Immunol* 35: 512-6, 2015.
  - 8) Wilson RP, Ives ML, Rao G, Lau A, Payne K, Kobayashi M, Arkwright PD, Peake J, Wong M, Adelstein S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Picard C, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Gray P, Stepensky P, Warnatz K, Freeman AF, Rossjohn J, McCluskey J, Holland SM, Casanova JL, Uzel G, Ma CS, Tangye SG, Deenick EK. STAT3 is a critical cell-intrinsic regulator of human unconventional T cell numbers and function. *J Exp Med* 212: 855-64, 2015.
  - 9) Yoshioka A, Ishii E, Ueno T, Usami I, Kobayashi M, Kobayashi R, Sotomatsu M, Shirahata A, Suzuki T, Taki M, Ishida Y, Matsushita T, Shima M, Nogami K, Sakai M, Kigasawa H, Fukutake K: The International Immune Tolerance Induction Study and its follow-up study on Japanese hemophilia A

patients with inhibitors. *Int J Hematol* 101: 362-8, 2015.

- 10) Nishikawa S, Toshima T, Kobayashi M: Perceived parenting mediates serotonin transporter gene (5-HTTLPR) and neural system function during facial recognition: A pilot study. *PLoS One* 10: e0134685, 2015.

## 2. 学会発表

- 1) Nishimura S, Tsumura M, Hirata O, Reiko Kagawa, Mizoguchi Y, Okada S, Kobayashi M: MSMD Patients with IFN- $\gamma$ -STAT1 Signaling Defect Present Enhanced Osteoclastogenesis and Bone Resorption. The 57<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, Dec 5–8. 2015.
- 2) Saito S, Nishimura S, Tsumura M, Mizoguchi Y, Sakata S, Furue A, Kobayashi M: A comparison of myelopoiesis from induced pluripotent stem cells with a mutation in *ELANE* between cyclic neutropenia and severe congenital neutropenia. The 57<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, Dec 5–8. 2015.
- 3) Okada S, Markle J, Kobayashi M, Bustamante J, Casanova JL: Impairment of IL-17 immunity to *Candida* and IFN immunity to *Mycobacterium* in humans with bi-allelic *Rorc* mutations. The 57<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, Dec 5–8. 2015.
- 4) Nishimura S, Tomioka K, Mizoguchi Y, Karakawa K, Miki M, Kawaguchi K, Nakamura K, Kobayashi M: Successful retransplantation of bone marrow cells

following failure of initial engraftments in 4 SCN patients. The 12th Asian Society for Pediatric Research, Osaka, Japan, April 15-18, 2015.

- 5) Saito S, Mizoguchi Y, Furue A, Chijimatsu I, Miki M, Tomioka T, Konishi N, Ono A, Kawaguchi H, Nakamura K, Kobayashi M: Early elimination of FVIII inhibitor in congenital hemophilia A cases with inhibitors by immune tolerance induction with a high dose of immunoglobulin. The 12th Asian Society for Pediatric Research, Osaka, Japan, April 15-18, 2015.
- 6) 小林正夫: 好中球異常症：診断と造血幹細胞移植. 第77回日本血液学会教育講演22 2015年10月18日 金沢.

## F . 知的財産権の出願・登録状況 特になし