

原発性免疫不全症候群の診断基準・重症度分類および 診療ガイドラインの確立に関する研究

研究分担者 小原 收 かずさDNA研究所 副所長

研究要旨

原発性免疫不全症の遺伝学的検査が保険収載され、本事業並びに日本免疫不全・自己炎症学会の支援の下に、継続的な遺伝学的検査体制が稼働するに至っている。しかし、必ずしも遺伝学的検査による確定診断の成功率が必ずしも高くない本症候群において、より高精度かつ迅速な診断方法の必要性は更に増している。今年度は、これまでゲノム DNA の構造解析に依存していた遺伝子関連検査法を強力に補完するための手段として、オミックス検査の実現に向けた取り組みとしてその基盤データの蓄積に取り組んだ。

A. 研究目的

多様な臨床的な症状を呈する原発性免疫不全症の確定診断には、これまで遺伝子関連検査が重要な役割を果たしてきた。その流れに沿って、多様な臨床像を示す原発性免疫不全症の診断基準を確立する事を最終的な目的として、本分担者は原発性免疫不全症の既知原因遺伝子の遺伝子解析依頼を臨床研究として受け入れてきた。更に、平成28年度からは原発性免疫不全症の遺伝学的検査が保険収載されたことを受け、衛生検査所登録をうけて業として保険検査を実施する体制を整えてきた。しかし、こうした継続的な検査体制の確立は、次のステップとして多様な表現型を呈する免疫不全症の確定診断率を上げられる新しい検査手法の導入を要求している。本研究分担では、検査として近未来的に提供可能な段階にあり、かつ現在の遺伝学的検査の限界を補完しうる検査方法の候補として、オミックス解析の検査への導入に向けた基盤情報の蓄積に取り組んだ。

B. 研究方法

・ 倫理面への配慮

本研究は、それぞれの研究分担者施設において倫理審査承認を受けた計画に従って、患者からの臨床研究への同意の下に調製された検体を用いて実施した。本分担研究者は、解析試料提供施設で適切に同意が得られていることを確認した上で、健常者コントロールと疾患コントロール検体についてオミックス計測を実施した。なお、本研究では、次世代シーケンサーでの遺伝子発現解析も実施するが、読み取る領域を遺伝子の3'末端の約50塩基に限定することで、個人識別能を著しく低下させたデータとして解析した。タンパク質レベルの解析は、それぞれのタンパク質の量的計測データであるため、個人識別能はほとんどない。

・ オミックス計測方法

計測により個々の症例の状態を明らかにするために、低侵襲に得られる検体からどのようなオミックス情報が取得可能であるかを検討した。計測は、RNAプロファイルは次世代シーケンシングにより、タンパク質

プロファイリングは液体クロマトグラフィーと質量分析装置の組み合わせ (LC-MS) でデータ非依存的解析モードでの定量解析により実施した。検体は、将来的な検査での実用可能性を考慮して、末梢血単核球、ろ紙血 (全血) の両者の解析を試みた。

C. 研究結果

次世代シーケンサーについては研究分担者の施設に既設のものを利用したが、今年度はタンパク質プロファイルの網羅的取得に向けて、最新鋭の LC-MS 装置 (Q Exactive HF-X, Orbitrap Exploris 480: Thermo Fisher Scientific 社) を導入し、全体のシステムの高感度化とスループットの最適化を実現した (論文発表 3)。この結果、末梢血単核球では約 10,000 種類の遺伝子産物、ろ紙血でも約 3,000 種類程度の遺伝子産物の検出・同定が可能となった。この結果は、末梢血単核球を用いれば、タンパク質レベルで免疫不全症の原因として知られている遺伝子産物の 80% 近くが定量分析可能となった。同じく、末梢血単核球の RNA プロファイル解析では、免疫不全症の原因遺伝子の 90% 近くが検出されているので、この RNA とタンパク質の両者の網羅的解析で、免疫不全症の遺伝学的な素因の有無を細胞の状態変化として検出可能であることを確認した。

D. 考察

原発性免疫不全症の検査が保険収載されたことで、ゲノム構造解析からの検査体制は充実してきている。しかし、多様な臨床症状を呈する本疾患の分子表現型を診断目的に取得する手立てがなければ、確定診断に

至ることは未だに必ずしも容易ではない。本研究により、網羅的に分子表現型を収集できる末梢血単核球を用いたオミックス検査が、原発性免疫不全症の診断に多くの情報を提供できる可能性が示唆された。こうした計測システムのハイスループット化などについては、がん領域での診断でも同様のことが進行中であるため、その点は時間の問題で解消されると期待できる。しかし、むしろ現実的には、医療現場で末梢血単核球を精製し、その状態をフリーズして検査施設まで搬送するための方法など、検査の前後の作業が現実的な課題となるであろう。

E. 結論

最先端の LC-MS システムの導入により、これまで計測不可能であった高深度でのタンパク質プロファイルが取得可能であることを示せた。このタンパク質側の計測と RNA レベルでの計測、さらにはゲノム上の免疫不全の既知原因遺伝子の構造解析の組み合わせによって、より高い精度での免疫不全症の診断の実現可能性を示唆することができた。

F. 研究発表

- 論文発表
 - Tamura M, Satoh-Takayama N, Tsumura M, Sasaki T, Goda S, Kageyama T, Hayakawa S, Kimura S, Asano T, Nakayama M, Koseki H, **Ohara O**, Okada S, Ohno H, Kobayashi M. Human Gain-of-Function STAT1 Mutation disturbs IL-17 Immunity in Mice. *Int Immunol*. 2019 [Epub ahead of print]
 - Nishikomori R, Izawa K, Kambe N, **Ohara O**, Yasumi T. Low-frequency mosaicism in cryopyrin-associated periodic fever syndrome: mosaicism in systemic autoinflammatory diseases. *Int Immunol*. 2019 31(10):649-655.

3. Kawashima Y, Watanabe E, Umeyama T, Nakajima D, Hattori M, Honda K, **Ohara O**. Optimization of Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry for Deep and Highly Sensitive Proteomic Analysis. *Int J Mol Sci*. 2019 20(23).
 4. Tozawa Y, Abdrabou SSMA, Nogawa-Chida N, Nishiuchi R, Ishida T, Suzuki Y, Sano H, Kobayashi R, Kishimoto K, **Ohara O**, Imai K, Naruto T, Kobayashi K, Ariga T, Yamada M. A deep intronic mutation of c.1166-285 T>G in SLC46A1 is shared by our unrelated Japanese patients with hereditary folate malabsorption (HFM). *Clin Immunol*. 2019 208:108256.
 5. Hori T, Ohnishi H, Kadowaki T, Kawamoto N, Matsumoto H, **Ohara O**, Fukao T. Autosomal dominant Hashimoto's thyroiditis with a mutation in TNFAIP3. *Clin Pediatr Endocrinol*. 2019;28(3):91-96.
2. 学会発表
1. 中島大輔、川島祐介、柴田洋史、八角高裕、伊佐真彦、井澤和司、西小森隆太、**小原 收**、「膜タンパク質に着目した乾燥ろ紙血プロテオーム解析法の開発」、日本プロテオーム学会 2019 年大会、宮崎（国内）2019 年 7 月 25 日
 2. 川島 祐介、渡辺 栄一郎、梅山 大地、中島 大輔、服部 正平、本田賢也、**小原 收**、「DIA 分析技術を基盤とした高深度プロテオーム解析システムの構築とその応用」、日本プロテオーム学会 2019 年大会、宮崎（国内）2019 年 7 月 25 日
 3. 西村聡、成戸卓也、星野顕宏、天野敬史郎、岩本彰太郎、平山雅浩、Andrew Grigg、Julian J. Bosco、右田昌⁵、高木正稔、**小原收**、森尾友宏、Menno C. van Zelm、金兼弘和、「連鎖無ガンマグロブリン血症における白血病発症因子のゲノム解析」、日本免疫不
- 全・自己炎症学会学術総会 東京（国内）2020 年 2 月 16 日
4. 柴田 洋史、八角 高裕、西谷 真彦、宮本尚幸、本田 吉孝、田中 孝之、井澤 和司、川島 祐介、大西 秀典、石村 匡崇、今井耕輔、小野寺 雅史、**小原 收**、滝田順子、「原発性免疫不全症における、ろ紙血プロテオーム解析を用いた新生児マススクリーニングの可能性」、日本免疫不全・自己炎症学会学術総会 東京（国内）2019 年 2 月 16 日
 5. **小原 收**、「ゲノムファーストからオミックスファーストへ：ゲノム科学はこれからどこに向かうのか?」、質量分析フォーラム 2019、東京（国内）2019 年 8 月 2 日
 6. **小原 收**、「ゲノム科学からの免疫不全症研究への挑戦：「検査」と「研究」の間で」、第 10 回 Q-PID 九州地区免疫不全症研究会、福岡（国内）、2019 年 11 月 2 日
 7. **小原 收**、「オミックス検査学の潮流：ゲノムファーストからオミックスファーストへ」、第 66 回日本臨床検査医学会学術集会、岡山（国内）、2019 年 11 月 22 日
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし