

平成 29 年 9 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06186

研究課題名(和文) 分類不能型免疫不全症の病態解析

研究課題名(英文) Analysis of pathogenesis of common variable immunodeficiency

研究代表者

満生 紀子 (MITSUIKI, Noriko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30754915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：分類不能型免疫不全症は低ガンマグロブリン血症を示す原発性免疫不全症で、大半は原因が特定されていない疾患群である。本研究は新規責任遺伝子の同定、病態把握を目標とした。抗体産生異常を呈した重症複合免疫不全症、NFkB2変異例、低ガンマグロブリン血症を呈したFANCA変異例について検討し報告した。全エクソン解析を行った結果から新規の疾患責任の候補と考えうる遺伝子を抽出した。

研究成果の概要(英文)：Common variable immunodeficiency (CVID) is a heterogeneous form of primary immunodeficiency and characterized by antibody deficiency. Although a small subset of CVID patients has identified a monogenic cause of disease, most of CVID patients have not identified the causes. The aim of research is to identify new genes which cause CVID and to clarify the pathogenesis of CVID. We analyzed the following case: 1) X-linked severe combined immunodeficiency with dysgammaglobulinemia, 2) NFkB2 deficiency, 3) hypogammaglobulinemia due to FANCA mutation. Moreover, we picked up some candidate genes from our whole exome data.

研究分野：小児科学

キーワード：原発性免疫不全症 分類不能型免疫不全症

1. 研究開始当初の背景

分類不能型免疫不全症 (CVID: common variable immunodeficiency)は「抗体産生不全を主体とする疾患群」に分類され、低ガンマグロブリン血症を示す原発性免疫不全症であるが、大半は原因が特定されていない疾患群である。欧州免疫不全症学会では2歳以上で発症しIgGが年齢平均の-2SD以下かつIgMまたはIgAが著減し、同種血球凝集素の欠損やワクチンへの低反応を示すこと、また他の低ガンマグロブリン血症をきたす疾患を除外したものと定義している。細菌感染症が問題になるが、肉芽腫形成や消化器疾患、自己免疫疾患やリンパ増殖性疾患、気管支拡張症などの合併症も予後を悪化させる。(CVID総説:Rinsho Ketsueki. 2013; 54 (10): 1983-1991., Adv Immunol. 2011; 111: 47-107.)

基本的な病態は、B細胞の最終分化・メモリーB細胞や形質細胞への分化障害と考えられているが、T細胞・単球・樹状細胞機能障害も注目されるなど多様な疾患群である。家族内発症があるものは10~20%程度でほとんどが孤発例であり、単一遺伝子異常が同定できるのは10%程度である。CVIDは様々な病態を含んだ疾患群と考えられ、いまだ本質的な解明はなされていない。

国内ではPIDJ(免疫不全症データベース)ネットワークにより遺伝子解析が積極的に行われている。これまで東京医科歯科大学発生発達病態学分野においてCVID全国アンケート調査等含めて200名近い症例を検討してきた。この症例のうち171人の検討では、家族内発症が17人(9.9%)、合併症も脾腫・自己免疫疾患・細胞性免疫不全を示唆するウイルスや真菌感染の重症化など多様な疾患群であることが改めてわかり、先行研究として34症例に関して全エクソン解析を行ったところ、BTK、STAT1、LRBA、FANCAといった既知報告のある遺伝子変異を同定した。一方で新規責任遺伝子に関しては同定できず今後の課題となった。

2. 研究の目的

本研究ではCVIDの原因となる新規遺伝子を同定し機能解析を行って証明することを目指した。並行して、CVIDとして特殊な臨床病態を示す患者検体の検討から、CVIDや抗体産生異常症の原因として既に知られている遺伝子の機能についても研究をすすめていき新たな臨床像を示していくことも目的とした。本研究による新規遺伝子の探索研究によって、新たな遺伝子・分子が同定できれば、CVIDの病態の全体像を明らかにするとともに、CVIDの主病態であるメモリーB細胞への分化機序についても検討すること

ができる。また特殊な合併症をもつ症例について遺伝子を同定し機能を解析することは、悪性腫瘍、自己免疫疾患、EBV感染の機序などの解明につながる可能性がある。現在CVIDの治療は免疫グロブリン補充療法から、細胞性免疫不全を伴う場合は造血幹細胞移植までさまざまだが、CVIDの病態理解が深まれば、治療薬への期待とともに、合併症や重症度予測、治療開始の適切な時期にも示唆を与えることができると考える。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子解析

東京医科歯科大学発生発達病態学分野およびPIDJのネットワークによる原発性免疫不全症の遺伝子解析システムと共同で行った。これまでの全エクソン解析の結果に基づき、候補遺伝子の絞り込みを進めた。候補遺伝子の変異に関してはそれぞれプライマーを設計し変異確認を行い、疾患責任遺伝子の有力な候補をしばりこみ、機能解析を要すると考えられる分子を抽出する。免疫不全症の既知遺伝子において変異を認めた場合についても臨床症状の把握や免疫学的解析を検討した。

同時に、あらたに抗体産生不全や抗体産生異常症を呈する症例について、臨床経過をまとめ、さらに家族検体を収集した。DNAを抽出し、既知遺伝子数個の遺伝子解析または候補遺伝子の特定が困難または既知遺伝子変異をみとめない場合は患者および家族検体で全エクソン解析を行い、変異の検出をおこなった。

(2) 特定の症例における解析

NFKB2異常症の解析

低ガンマグロブリン血症、自己免疫疾患(特に脱毛症や副腎機能不全など)、EBVなど特殊なウイルスへの易感染性を呈する症例を中心に症例を抽出し、遺伝子解析を行った。細胞株を用いてウエスタンブロッティングによるタンパク発現を検討した。(NF B2変異文献: The American Journal of Human Genetics 93: 812-824, 2013.)

高 グロブリン血症を呈したX連鎖性重症複合免疫不全症(X-SCID: X-linked severe combined immunodeficiency)の症例検討末梢血においてFACSを行いリンパ球サブセットの解析および、IL-2R遺伝子の解析を行った。また経口ロタウイルスワクチンの接種後であったため、持続感染を疑い下記の方法で便中ウイルスの解析を行った。患者の便、経口ロタウイルスワクチン(Rotateq、Rotarix)よりRNAを抽出しcDNAを合成した。その後ロタウイルスNSP4をコードするgene10の配列解析を行った。患者便からRotateqと同様ウシロタウイルス由来の配列

が検出できるかどうかを検討した。(参考文献: N Engl J Med 2010; 362: 314-9)

4. 研究成果

(1) 抗体産生不全症の遺伝子解析から既知の免疫不全症に関わる遺伝子が抽出された。それぞれについて解析した。

EBV 関連疾患症例では抗体産生不全症の病態が前面にでて分類不能型免疫不全症に分類されている場合も多い。Exome 結果を検討したところ、NF B シグナル(NF B2 や NF B1 の変異症例やその他の新規遺伝子変異の可能性)や DNA 修復応答異常症(Fanconi 貧血を呈する FANCA の変異症例など)と関連がある可能性が示唆された。

FANCA 変異例

抗体産生不全、B 細胞低下、慢性活動性 EB ウイルス感染症を呈した症例について、全エクソン解析を行いその結果から、FANCA 遺伝子のフレームシフト変異(homo)が検出された。Fanconi 貧血は DNA 修復応答異常症として知られ血球系の異常や発がんのリスク等については知られていたが、抗体産生不全などの免疫学的異常を伴うことについてはあまり報告されていなかったため、本症例の臨床経過を報告することができた。

NFKB2 変異例

分類不能型免疫不全症として診断され自己免疫疾患を併発した 2 症例において、NFKB2 遺伝子にヘテロ変異(Leu688LeufsX7, R853X)を認めた。なお自己免疫疾患は副腎不全や 1 型糖尿病、感染症に関してはこれまでの報告では重視されていなかったウイルス感染症、特に EBV 感染症が問題となった症例を含んでいた。1 例は新規変異、アンキリンリピートドメインでのフレームシフト変異例だった。NF- B シグナルに関わる分子が EBV 関連疾患の病態に関わる可能性について今後検討していく必要があると考えられた。NF- B シグナル異常を検討するため予備実験を開始した。転写因子である NF B との結合をゲルシフト法で検出するためのプライマーの準備、NF B2 蛋白発現解析および下流のリン酸化シグナル異常を検出するための抗体(ReIB, p100/p52, p100 S866/870)を用いた健常人コントロール(末梢血単核球、活性化 T 細胞)での予備実験を行った。今後の検討課題は患者細胞株を用いてウエスタンブロットティングによる発現解析等である。

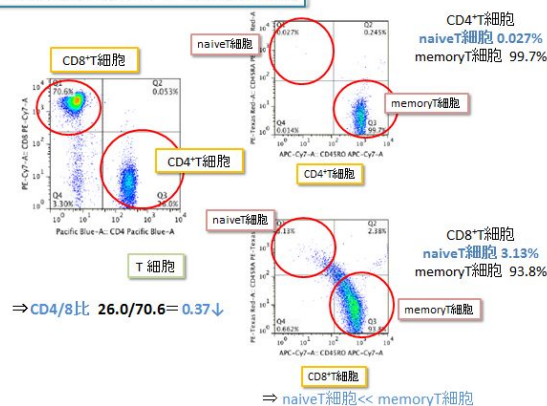
(2) 抗体産生異常症(高 IgG 血症)を呈した X-SCID の症例検討を行った。

【症例】9 か月 男児

生後 5 か月時に鼻汁、咳嗽あり受診し、IgG 3140 mg/dL と高値が指摘された。RSV による

間質性肺炎(KL-6 2005U/mL)に罹患し、ステロイド点滴・酸素を要した。高 IgG 血症(IgG 2910 mg/dL, IgA 18 mg/dL, IgM 27 mg/dL, IgE 3 IU/mL 未満)の原因検索のため、免疫学的な解析を行った。B 細胞 36%、T 細胞 59%、NK 細胞 1%であったが、フローサイトメトリーによる詳細なリンパ球サブセット解析では、ナイーブ B 細胞が減少し、複合免疫不全症を疑う結果であった。

ヒト免疫担当細胞サブセット解析結果:T細胞



その後の解析では、異性間 FISH(末梢血)で XX 13.4%(母由来)、リンパ球幼若化試験では PHA: 1700 cpm(20500-56800)、Con-A: 529 cpm(20300-65700)、TREC: < 1.0 × 10² / μg DNA で T 細胞の新生能がないという結果からも X-SCID に矛盾はなかった。X-SCID の責任遺伝子(α IL2RG)の解析にて、c. 676C>T/C、p. Arg226Cys/Arg の変異をみとめ確定診断となった。高 IgG を呈する X-SCID は稀であり研究会等で報告した。

さらに便中口タウイルスについて解析を行ったところ、患者便では Rotateq、ウシロタウイルス WC3 の NSP4 と同じ配列、Rotarix とは異なる配列であった。患者便検体からワクチン株が排泄されていることを示し、免疫不全症児への生ワクチンの危険性および新生児期のスクリーニング検査の重要性も報告した。

(3) 新規責任遺伝子の探索と機能解析について検討を行った。

抗体産生不全や抗体産生異常症を中心に家族検体で全エクソン解析を行った(東京医科歯科大学発生発達病態学教室において)。その結果から新規の疾患責任の候補と考えうる遺伝子を抽出し、機能解析について検討実験を開始した。具体的に検討を開始した分子について、まず患者におけるタンパク発現をウエスタンブロットティングにて検討すること、またそのうちの 1 分子は形質細胞分化に関わる分子であり非常に有力な疾患責任遺伝子の候補と考えられたため、健常人と患者の末梢血単核球や B 細胞を用いてクラススイッチや体細胞突然変異の検討を行うための準備を開始した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Sekinaka Y, Mitsuiki N, Imai K, Yabe M, Yabe H, Mitsui-Sekinaka K, Honma K, Takagi M, Arai A, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Muramatsu H, Seiji K, Hira A, Takata M, Ohara O, Ogawa S, Morio T, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency caused by FANCD1 mutations. *Journal of Clinical Immunology*. 査読有. 2017. in press.

2. Tsujita Y, Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Yeh T, Mitsuiki N, Asano T, Ohnishi H, Kato Z, Sekinaka Y, Zaha K, Kato T, Okano T, Takashima T, Kobayashi K, Kimura M, Kunitsu T, Maruo Y, Kanegane H, Takagi M, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Owaga S, Ohara O, Okada S, Kobayashi M, Morio T, Nonoyama S. PTEN mutation can cause Activated PI3 Kinase Delta Syndrome (APDS)-like immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 査読有. 2016. 12; 136: 1672-1680.

(DOI: 10.1016/j.jaci.2016.03.055)

3. 友田昂宏, 満生紀子, 岡野 翼, 田中(久保田)真理, 宮本智史, 木村俊介, 高木正稔, 今井耕輔, 梶原道子, 金兼弘和, 森尾友宏. ロタウイルスワクチン株の持続排泄を認めた重症複合免疫不全症の一例. *日本小児科学会雑誌*. 査読有. 2016.11; 120: 1643-1648.

(<http://www.jpeds.or.jp/journal/abstract/120-11.html>)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Okano T, Watanabe E, Takashima T, Nishikawa T, Kawano Y, Tomoda T, Tanaka-Kubota M, Miyamoto S, Yeh T, Yamashita M, Tanaka K, Mitsuiki N, Ohara O, Takagi M, Imai K, Kanegane H, Morio T. IGG1 Gammopathy in X-SCID Caused by Maternal T and B cell Engraftment. 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies 2016.09.23 Barcelona (Spain)

2. Kanako Mitsui-Sekinaka, Kohsuke Imai, Yuki Tsujita, Noriko Mitsuiki, Takaki Asano, Yujin Sekinaka, Hirokazu Kanegane, Kenichi Yoshida, Satoru Miyano, Seiji Kojima, Seishi Ogawa, Osamu Ohara,

Satoshi Okada, Masao Kobayashi, Masatoshi Takagi, Tomohiro Morio, Shigeaki Nonoyama. Activated PI3 Kinase Delta Syndrome (APDS)-like immunodeficiency caused by PTEN mutation.

17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies 2016.09.22 Brcelona (Spain)

3. Sekinaka Y, Mitsuiki N, Imai K, Yabe M, Mitsui-Sekinaka K, Honma K, Arai A, Yoshida K, Miyano S, Seiji K, Hira A, Takata M, Ohara O, Ogawa S, Morio T, Nonoyama S. Common Variable Immunodeficiency Caused by Fanc Mutations. 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies 2016.09.22 Brcelona (Spain)

4. Noriko Mitsuiki

A case of a 10-month-old boy with hypergammaglobulinemia. *Advances in Primary Immunodeficiency* 2016.3.7 Berks (UK)

5. 友田昂宏, 宮本智史, 久保田真理, 小野真太郎, 足洗美穂, 満生紀子, 高木正稔, 今井耕輔, 梶原道子, 金兼弘和, 森尾友宏. 経口ロタウイルスワクチン株の持続排泄を認めた X 連鎖重症複合免疫不全症の一例. 第 47 回小児感染症学会 2015.10.31 ザ・セレク トン福島(福島県, 福島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕(0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

満生 紀子 (MITSUIKI, Noriko)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 30754915