

令和 6 年 6 月 23 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：2022～2023

課題番号：22K20905

研究課題名（和文）先天性免疫異常症未診断例の全エクソーム解析による新規原因遺伝子同定と発症機構解明

研究課題名（英文）Detection of novel causative genes and elucidation of the pathomechanisms of undiagnosed cases of inborn errors of immunity by whole exome sequencing analysis

研究代表者

高田 紗奈美（Takada, Sanami）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・プロジェクト助教

研究者番号：60733904

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）：先天性免疫異常症は、遺伝子の変異により生まれながらに免疫機構が異常を起こす稀少な疾患の総称で、原因遺伝子同定による早期の診断・治療が望まれる。しかし、既知の遺伝子に変異がない、未診断の先天性免疫異常症は数多く存在し、原因遺伝子の解明が強く望まれる。本研究では、先天性免疫異常症の新規症例8例、全エクソームシーケンシング再解析症例121例を収集した。新規症例の全エクソームシーケンシング解析を行い、新規原因候補遺伝子Xの変異を同定した。疾患が引き起こされるメカニズム解析を行い、Xの患者変異による機能異常を見出した。再解析症例はデータの収集に時間を要したため、詳細な解析は今後の課題として引き続き継続する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで診断のついていなかった先天性免疫異常症患者の新たな原因遺伝子を同定し機能解析を行ったことは、免疫異常症のメカニズムの解明や、ヒトが病原体から身を守る免疫機構の解明に大きく寄与すると考えられた。また今後は、まだ診断がついていないが同じ原因遺伝子変異をもつ他の患者の診断や、将来的な治療法開発へとつながる成果であり、患者への還元につながり社会に貢献する研究成果であった。

研究成果の概要（英文）：Inborn errors of immunity are rare diseases causing defects of immune systems by specific gene variants. It is required to detect the causing genes for early diagnosis and proper treatments. Still, a lot of cases of inborn errors of immunity remain undiagnosed, who requires detection of their causing genes. In this study, we collected new 8 cases of inborn errors of immunity for analysis of whole exome sequencing and 121 cases for re-analysis. By whole exome sequencing analysis of new cases, we identified a variant of novel candidate causing gene. We studied the pathomechanism of the defect of immune system of the gene variant, which revealed the function abnormality of the gene variant carried by the patient.

研究分野：臨床免疫

キーワード：先天性免疫異常症 全エクソーム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性免疫異常症は、遺伝子の異常により生まれながらに免疫機構が異常を起こす稀少難病疾患の総称で、自然免疫異常による自己炎症性疾患や、獲得免疫異常による原発性免疫不全症が含まれる。発熱や感染症を繰り返し、重症例は死に至るため、原因遺伝子同定による早期の診断・治療が必要である。そのため、既知の遺伝子に異常がない、未診断の先天性免疫異常症における原因遺伝子の解明は喫緊の課題である。未診断の先天性免疫異常症は、いまだヒトの免疫機構の全ては明らかでないことを示唆し、疾患の研究を通じて免疫機構を解明する大きな手がかりとなる。

一般に遺伝性疾患の原因遺伝子同定には、タンパク質をコードする領域を網羅的に解読する全エクソーム解析が普及している。しかし、全エクソーム解析で原因遺伝子同定に至る例は30-40%にとどまる。いまだ未診断症例が多く存在し、先天性免疫異常症も例外ではない。

ヒトの免疫機構に関わる遺伝子の数は約2000個と言われているが、現在、同定されている先天性免疫異常症の原因遺伝子は約450個 (Tangye, et al. J Clin Immunol. 2021) で、未同定の疾患原因遺伝子が多くあることが示唆される。

全エクソーム解析では、出力される数千個のバリエーションから、疾患の原因となる遺伝子バリエーションを正しく抽出するアプローチが肝要だが、遺伝子の機能が未知の場合、正しく病原性を評価し抽出するのは容易ではない。一方で過去の未診断症例の全エクソームデータの再解析により新たな疾患原因遺伝子が同定されることが報告されており (Wenger, et al. Genet Med. 2017) 一般集団におけるバリエーション頻度や病的バリエーションのデータベースを随時アップデートし再解析することが重要である。これに対し申請者の所属研究部では、単一遺伝子疾患解析に特化し、最新のデータベースで候補遺伝子の絞り込みと病原性を評価する専門性の高い技術を樹立し、他分野の単一遺伝子疾患で新規原因遺伝子を多数同定した実績で世界をリードしている (MN1: Miyake, et al. Am J Hum Genet. 2020, ACKR3: Whiteman, et al. Hum Mol Genet. 2019, 他、50個以上の新規疾患原因遺伝子を同定)。

2. 研究の目的

本研究は、未診断の先天性免疫異常症例の新規原因遺伝子同定と、その発症メカニズム解明およびその遺伝子が原因となる新しい先天性免疫異常症の疾患概念の確立を目的とする。原因遺伝子の同定と機能解析により新しい疾患概念を確立し、診断法・治療法開発につなげ、早期診断・治療を可能にし、患者に還元する。さらに、先天性免疫異常症は、貴重な疾患モデルとして、疾患の研究を通じてヒトの免疫機構を解明する大きな手がかりとなり未知の免疫機構の解明に寄与することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 先天性免疫異常症の未診断例の全エクソーム再解析により、新規原因遺伝子を抽出する症例、臨床情報、全エクソームデータの収集

研究協力施設で全エクソーム解析を行ったが原因遺伝子が未同定の症例の臨床情報と全エクソームデータを収集する。新規症例は随時追加する。

全エクソームデータの解析

候補遺伝子バリエーションの抽出を行い、病原性を評価する。そのバリエーションが患者の症状を説明できるかについて、随時臨床医と検討する。

(2) 同定された新規遺伝子に応じた分子生物学的解析により、発症メカニズムを解明する。

具体的には、同定された分子の特性に応じて、患者血液検体、細胞株等を用いた目的遺伝子の機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 表1のように症例およびデータを収集した。

表1. 未診断の先天性免疫異常症の収集

	症例数	臨床データ	全エクソームシーケンス	全エクソームシーケンスの解析	原因遺伝子の同定	新規遺伝子の同定	原因遺伝子の機能解析
新規症例	8例	収集済み	新たにシーケンス	済み	1例	1例	1例
再解析症例	121例	収集済み	既存データを収集	未			

新規原因遺伝子候補を同定したことから、その機能解析を中心に研究をすすめた。

(2) 今回新たに全エクソームシーケンスおよびその解析を行った症例の中で、気道感染症を繰り返す小児の兄妹例より責任候補遺伝子 X のバリエーションを同定した。我々が解析をすすめるなかで、X のバリエーションにより免疫不全症が起こると 2 報報告されたが、X の免疫機構に関わる機能は解析がされていなかった。今回の症例では気道感染がメインであること、X は小胞体で働き粘液産生に関わるという報告が 1 報あることから、X が気道の粘液産生に関わり、X の機能異常により気道粘膜防御機構が破綻することにより発症するのではないかと考えた。

そこで我々は遺伝子 X の野生型および患者変異型の強制発現ベクターを作成した。HEK293T 細胞に強制発現した結果、患者変異型 X は、野生型ではみられない異常な二量体を形成していることが確認され、機能異常がみられる可能性が大きく示唆された(図 1)。さらにこの二量体は還元剤を加えると消失することを見出した。そこで、リコンビナントタンパク質を作成しクロマトグラフィー解析でも還元下で消失する異常な多量体を認めることを明らかにした。このことから、患者が有する X の変異によって、ジスルフィド結合を介する異常な多量体が X の機能異常を引き起こしていると考えられた。この結果は、X が新たな先天性免疫異常症を引き起こす原因遺伝子であることを示唆する重要な所見であり、現在論文投稿中である。X の免疫学的な解析は今後の課題と考えられた。

ウェスタンブロッティング

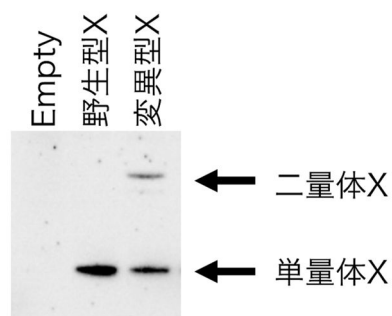


図 1. V5 タグ付き遺伝子 X を強制発現した HEK293T 細胞から抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析 (抗 V5 抗体)。患者変異型では異常な二量体形成がみられた。未発表データ。

再解析症例については、全エクソームシーケンスデータと臨床症状データの収集に時間を要したため、詳細な解析は今後の課題として引き続き継続する。

全エクソーム解析は広く普及しているが、解析で出力される数千個のバリエーション(ヒトゲノム参照配列と異なる塩基配列)から疾患の原因遺伝子バリエーションを正しく抽出する工程で、単一遺伝子疾患解析に専門的な知識と絞り込み技術が肝要となる。今回、先天性免疫異常症の全エクソーム解析において、所属研究部で樹立された、単一遺伝子疾患の原因遺伝子解析で世界をリードし、他分野の疾患で新規原因遺伝子を多数同定した実績のある解析プラットフォーム・遺伝学的アプローチを用いたところ、新規原因遺伝子候補を 1 つ同定した。過去の解析で原因遺伝子が同定されなかった再解析症例について、今回の解析パイプラインおよび抽出方法を用いることで原因が同定されるのかは非常に興味深く、引き続きプロジェクトを続けていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takada Sanami, Silva Sebastião, Zamorano Ivonne, Pérez Andrea, Iwabuchi Chisato, Miyake Noriko	4. 巻 105
2. 論文標題 Human phenotype caused by biallelic KDM4B frameshift variant	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Genetics	6. 最初と最後の頁 72 ~ 76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cge.14409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	西小森 隆太 (Nishikomori Ryuta)		
研究協力者	八角 高裕 (Yasumi Takahiro)		
研究協力者	井澤 和司 (Izawa Kazushi)		
研究協力者	神戸 直智 (Kambe Naotomo)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
チリ	Hospital de Puerto Montt	Universidad San Sebastian	Instituto Nacional del Torax	他1機関