

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591561

研究課題名(和文) B細胞、NK細胞、樹状細胞欠損を伴う原発性免疫不全症の病態解析と原因遺伝子の同定

研究課題名(英文) Analysis of pathophysiology and identification of the causative gene(s) of primary immunodeficiency with B, NK, dendritic cell deficiency

研究代表者

今井 耕輔 (IMAI, KOHSUKE)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：90332626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：170例あまりの抗体産生不全症患者の中から、B、NK細胞、樹状細胞(DC)欠損を伴う原発性免疫不全症患者を見出し、14例のGATA2欠損症を見出した。これらの患者について、初期からサイトカイン産生に至るまでのT細胞分化異常も伴っていることを見出した(投稿中)。このうち2例からiPS細胞を樹立した。iPS細胞樹立については、健常人と同程度の効率であったが、造血幹細胞への誘導効率は不良であり、骨髄由来CD34+造血幹細胞からの分化誘導実験を裏付ける結果であった。現在、単球、M ϕ 、DCへの誘導実験を行い、各段階における転写因子発現等について、検討中である。

研究成果の概要(英文)：We identified 14 cases of GATA2 deficiency among B, NK, dendritic cell deficiency with hypogammaglobulinemia. We found that they have the defect of T cell differentiation from early to late phase (in submission). We developed induced pluripotent stem cells (iPSCs) from 2 cases of GATA2 deficiency. The efficiency of the establishment of iPSCs were the same as healthy controls. However induction efficiency from iPSCs into hematopoietic stem cells (HSCs) was poor in GATA2 deficiency, which is consistent with the previous finding that differentiation efficiency from the bone marrow derived CD34+ HSCs was poor. In vitro induction experiment into monocyte, macrophage and dendritic cells from iPSCs and the expression of transfer factors during the induction is ongoing.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：原発性免疫不全症 樹状細胞分化 B細胞分化 NK細胞分化 GATA2 骨髄異形成症候群 ナイーブT細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は、一般臨床医からの紹介情報をもとにした原発性免疫不全症患者の前方視的データベース PIDJ を開発し、700 例を超える原発性免疫不全症患者データを得たが、集積した 170 例あまりの低ガンマグロブリン血症患者の中に、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞(DC)を欠損している患者群を発見した。研究開始当初までに、B 細胞単独欠損症、あるいは、NK 細胞欠損に T 細胞欠損を伴った重症複合免疫不全症は報告されていたが、B 細胞欠損に NK 細胞欠損を伴う例は報告されていなかった。

2. 研究の目的

B,NK,DC 欠損を伴う新規原発性免疫不全症の病態解析を行い、原因遺伝子の同定を図ることにより、ヒトにおける B 細胞、NK 細胞および樹状細胞の分化に関わる必須の遺伝子の同定を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) B、NK、樹状細胞欠損症患者の病態解析を行う。

B,NK 細胞欠損症患者について、樹状細胞、単球の有無、T 細胞各分画についての検討を行う。

患者細胞株(活性化 T 細胞株、骨髄または皮膚由来線維芽細胞株、iPS 細胞株)の樹立を行う。

iPS 細胞からの CD34+血液幹細胞、樹状細胞および B 細胞、NK 細胞の誘導と患者での分化障害についての解析を行う。

次項で同定した原因遺伝子の導入により、各細胞の分化障害が回復するかどうかを検討する。

(2) 原因遺伝子の同定を行う。

SNPchip を用いた homozygosity mapping による、候補ゲノム領域の同定を行う。

exome 解析(既知の全遺伝子のエクソン周辺領域の遺伝子解析)を用いた原因遺伝子の同定を行う。

4. 研究成果

(1) B、NK、樹状細胞欠損症患者の原因遺伝子の同定と病態解析

B、NK、樹状細胞欠損症患者 2 例で SNPchip を用いた homozygosity mapping による候補ゲノム領域の同定を行い、平行して exome 解析を行ったが、同様の表現型を示す症例の報告が相次ぎ、その原因遺伝子が GATA2 であることが報告された。このため、当該 2 症例についても GATA2 遺伝子について検討し、それぞれ de novo の変異を同定した。さらに、同様の B、NK、DC 欠損患者および骨髄異形成症患者計 14 例で GATA2 遺伝子異常を同定した。

GATA2 変異患者の T 細胞について検討した。CD4 陽性細胞比率は低下しており、

CD45RA+31+4+胸腺ナイーブ T 細胞が減少し、CD45RA+31-4+中枢性ナイーブ T 細胞が増加していた。これを反映し、T 細胞新生能を反映する TREC の低下を認めた。また、活性化 CD4+T 細胞における IL-4、IL-17 産生はそれぞれ低下していた。

患者から得られた骨髄をサイトカインで刺激し、血球分化について検討した。赤芽球系、骨髄球系への分化については、正常もしくはそれ以上のコロニー形成が見られた。一方、GM コロニーや単球コロニーについては、有意に低下しており、in vivo の状態を反映していると考えられた。また、リンパ球系への分化を試みたが、リンパ球コロニー解析用培地では、正常に比べ形成が不良であり、GATA2 が造血幹細胞からリンパ球、単球、DC への分化に必須の因子であり、変異遺伝子がドミナントネガティブ効果がある可能性が示唆された。

GATA2 変異患者については、活性化 T 細胞株、骨髄由来間葉系幹細胞株を樹立し、保存した。最初の 2 例については、骨髄由来間葉系幹細胞および皮膚由来線維芽細胞株からの iPSC 細胞樹立を開始した。iPS 細胞樹立については、健常人と同程度の効率であったが、造血幹細胞への誘導効率不良であり、骨髄由来 CD34+造血幹細胞からの分化誘導実験を裏付ける結果であった。現在、単球、M、DC への誘導実験を行い、各段階における転写因子発現等について、検討中である。

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 29 件、以下 2-5 以外全て査読あり)

1. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin -deleting recombination excision circles. J Allergy Clin Immunol. 2013;131(5):1437-40
2. 本間健一, 今井耕輔, 金兼弘和, 野々山恵章, MonoMAC 症候群(GATA2 異常症). 臨床免疫・アレルギー科 4:439-446, 2013
3. 今井耕輔, 新生児スクリーニングによる原発性免疫不全症の診断. 小児科臨床 (2013), 66:1025-1032
4. 今井耕輔, TREC, KREC による原発性免疫不全症のスクリーニング. 小児内科 (2013), 45:1148-1151
5. 今井耕輔, 免疫グロブリンクラススイッチ異常症(高 IgM 症候群). 日本臨床 別冊 (2013), 22:237-241
6. Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe

- N, Nakadate H, Kanazawa T, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer* 2013; 60: 836-41
7. Machida S, Tomizawa D, Tamaichi H, Okawa T, Endo A, Imai K, Nagasawa M, Morio T, Mizutani S, Takagi M. Successful Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Patient With Ataxia Telangiectasia Using Rituximab. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013; 35: 482-5.
 8. Kanegane H, Taneichi H, Nomura K, Wada T, Yachie A, Imai K, Ariga T, Santisteban I, Hershfield MS, Miyawaki T. Successful bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Transplant* 2013; 17: E29-E32
 9. Ishida H, Imai K, Honma K, Tamura S, Imamura T, Ito M, Nonoyama S. GATA-2 anomaly and clinical phenotype of a sporadic case of lymphedema, dendritic cell, monocyte, B- and NK-cell (DCML) deficiency, and myelodysplasia. *Eur J Pediatr* 2012; 171: 1273-6
 10. Izawa, K., Hijikata A., Tanaka, N., Kawai, T., Saito, K.M., Goldbach-Mansky, R., Aksentijevich, I., Yasumi, T., Nakahata, T., Heike, T., Nishikomori, R. & Ohara, O. Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with > 99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res* 2012; 19: 143-152
 11. Takagi, S., Saito, Y., Hijikata A., anaka S, Watanabe T, Hasegawa T, Mochizuki S, Kunisawa J, Kiyono H, Koseki H, Ohara O, Saito T, Taniguchi S, Shultz LD, Ishikawa F. Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. *Blood* 2012; 119: 2768-2777
 12. Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsuiki N, Ohara O, Komada Y. A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic Purpura. *Eur J Haematol* 2012; 90: 164-8
 13. Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, Nunoi H, Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara O. A Dual Reporter Splicing Assay Using HaloTag-containing Proteins. *Curr Chem Genomics* 2012; 6: 27-37
 14. Yang X, Kanegane H, Nishida N, Imamura T, Hamamoto K, Miyashita R, Imai K, Nonoyama S, Sanayama K, Yamaide A, Kato F, Nagai K, Ishii E, van Zelm MC, Latour S, Zhao XD, Miyawaki T. Clinical and genetic characteristics of XIAP deficiency in Japan. *J Clin Immunol* 2012; 32 :411-20
 15. Suri D, Singh S, Rawat A, Gupta A, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N, Ohara O, Bilhou-Nabera C. Clinical profile and genetic basis of Wiskott-Aldrich syndrome at Chandigarh, North India. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2012; 30: 71-8
 16. Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T. Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 77: 628-34
 17. Nakaoka H, Kanegane H, Taneichi H, Miya K, Yang X, Nomura K, Takezaki S, Yamada M, Ohara O, Kamae C, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Hershfield MS, Ariga T, Miyawaki T. Delayed onset adenosine deaminase deficiency associated with acute disseminated encephalomyelitis. *Int J Hematol* 2012; 95: 692-6
 18. Kawai T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, Izawa K, Murakami T, Okamoto S, Mori Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Ohmori K, Nakahata T, Heike T. Multiple reversions of an IL2RG mutation restore T cell function in an X-linked severe combined immunodeficiency patient. *J Clin Immunol*. 2012; 32: 690-7
 19. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsuiki N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarstrom L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 223-225.e2
 20. Takagi, H., Fukaya, T., Eizumi, K., Sato, Y., Sato, K., Shibazaki, A., Otsuka, H., Hijikata A., Watanabe, T.,

- Ohara, O., Kaisho, T. & Malissen, B. Plasmacytoid dendritic cells are crucial for the initiation of inflammation and T cell immunity in vivo. *Immunity* 2011; 35: 958-71
21. Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T, Saito MK. A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS One* 2011; 6:e22261
 22. Okura Y, Yamada M, Kobayashi I, Santisteban I, Arredondo-Santisteban G, Kato Z, Iguchi A, Yoshida M, Ohara O, Nakagawa N, Imai K, Hershfield MS, Ariga T. ADA-SCID with 'WAZA-ARI' mutations that synergistically abolished ADA protein stability. *Br J Haematol* 2011; 153: 675-676
 23. Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu H, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients. *Clin Immunol* 2011; 138: 172-177
 24. Hijikata A., Yura K., Noguti T. & Go M. Revisiting gap locations in amino acid sequence alignments and a proposal for a method to improve them by introducing solvent accessibility. *Proteins* 2011; 79:1868-77
 25. Motomura Y., Kitamura H., Hijikata A., Matsunaga, Y., Matsumoto, K., Inoue, H., Atarashi, K., Hori, S., Watarai, H., Zhu, J., Taniguchi, M. & Kubo, M. The transcription factor E4BP4 regulates the production of IL-10 and IL-13 in CD4(+) T cells. *Nat Immunol* 2011; 12:450-9
 26. Masuya H, Makita Y, Kobayashi N, Nishikata K, Yoshida Y, Mochizuki Y, Doi K, Takatsuki T, Waki K, Tanaka N, Ishii M, Matsushima A, Takahashi S, Hijikata A, Kozaki K, Furuichi T, Kawaji H, Wakana S, Nakamura Y, Yoshiki A, Murata T, Fukami-Kobayashi K, Mohan S, Ohara O, Hayashizaki Y, Mizoguchi R, Obata Y, Toyoda T. The RIKEN integrated database of mammals. *Nucleic Acids Res* 2011; D861-70
 27. Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa K, Sakai H, Abe J, Tanaka N, Kawai T, Oshima K, Saito M, Nishikomori R, Ohara O, Ishii E, Nakahata T, Horiuchi H, Heike T. Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood* 2011; 118: 1225-1230
 28. Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Oshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T. Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan. *J Clin Immunol* 2011; 31: 309-314
 29. Mizuno T, Sakai H, Nishikomori R, Oshima K, Ohara O, Hata I, Shigematsu Y, Ishige T, Tamura K, Arakawa H. Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 3625-3632
- 〔学会発表〕(計 15 件)
1. 加藤 環, 釜江智佳子, 満生紀子, 小原 明, 林 正俊, 野口恵美子, 久保田健夫, 本間健一, 小原 収, 今井耕輔, 野々山恵章
本邦における ICF(Immunodeficiency with Centromeric instability and Facial anomalies)症候群 5 例の検討. 第 41 回本臨床免疫学会総会. 2013 年 11 月 27 日~2013 年 11 月 29 日. 下関(海峡メッセ下関)
 2. 今井耕輔, 新規高 IgM 症候群と病因探索について. 第 116 回日本小児科学会学術集会. 分野別シンポジウム 13-3. 2013 年 4 月 19 日~2013 年 4 月 21 日. 広島(広島国際会議場)
 3. 今井耕輔, 先天性免疫不全症における遺伝子診断法. 第 116 回日本小児科学会学術集会. 総合シンポジウム 5. 2013 年 4 月 19 日~2013 年 4 月 21 日. 広島(広島国際会議場)
 4. 本間健一, 今井耕輔, 加藤環, 釜江智佳子, 野々山恵章, 本邦における GATA2 異常症の臨床症状, 免疫学的異常に関する検討. 第 116 回日本小児科学会学術集会. 2013 年 4 月 19 日~2013 年 4 月 21 日. 広島(広島国際会議場)
 5. 加藤 環, 釜江智佳子, 本間健一, 池川 健, 横須賀とも子, 和田泰三, 谷内江昭宏, 西田直徳, 金兼弘和, 満生紀子, 小原 収, 今井耕輔, 森尾友宏, 野々山恵章. IgA 単独欠損症として紹介され, TREC/KREC の結果から RAG1 異常と同等しえた 1 例. 第 116 回日本小児科学会学術集会. 2013 年 4 月 19 日~2013 年 4 月 21 日. 広島(広島国際会議場)
 6. 釜江智佳子, 中川紀子, 本間健一, 佐藤弘樹, 今井耕輔, 野々山恵章. 分類不能型免疫不全症(CVID)の TREC/KREC による病型分類. 第 116 回日本小児科学会学術集会. 2013 年 4 月 19 日~2013 年 4 月 21 日. 広島(広島国際会議場)
 7. 今井耕輔, 国内 SCID140 症例の造血幹細胞移植成績について. 第 6 回日本免疫不全症研究会 2013 年 01 月 26 日品川

8. 今井耕輔, 先天性免疫不全症における遺伝学的検査の取り扱いと諸問題について. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会(イブニング・セッション 3) 2012 年 12 月 01 日横浜
9. 今井耕輔, 抗ウイルス薬使用の実際と今後の考え方. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会(シンポジウム 1) 2012 年 11 月 25 日北九州
10. 今井耕輔, ウイルスに対する感染防御機構. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会(教育セミナー) 2012 年 11 月 23 日北九州
11. 今井耕輔, 免疫不全症の遺伝子診断・治療の up-to-date(教育講演) 第 74 回日本血液学会学術集会 2012 年 10 月 21 日京都
12. Imai K. Screening for Primary Immunodeficiency Diseases using TREC and KREC. Symposium (1)Primary immunodeficiency. East Meets West. The Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiriology & Immunology 2012 (APAPARI 2012) (招待講演). 2012 年 10 月 20 日~2012 年 10 月 20 日 Taipei, Taiwan
13. Honma K, Imai K, Kamae C, Ishida H, Ito Y, Kojima S, Yokosuka T, Kanegane H, Morio T, Sasahara Y, Fujiwara T, Harigae H, Hashii Y, Ohara O, Nonoyama S. Clinical features and immunological abnormalities of GATA2 deficiency in JAPAN. 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012) 2012 年 10 月 05 日 Florence, Italy
14. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, MC van Zelm, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor recombination excision circles (TREC) and Ig kappa-deleting recombination excision circles (KREC). 5th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). 2012 年 10 月 05 日 Florence, Italy
15. Mitsuiki N, Oshima K, Imai K, Ohara O, Morio T, Mizutani S. Genetic analysis for 207 cases with primary immunodeficiency (PID) consulted to a single center through PID network in Japan (PIDJ) in 5 years (2007-2011). 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012) 2012 年 10 月 05 日 Florence, Italy

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
PIDJ ホームページ
<http://pidj.rcai.riken.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 耕輔 (Imai, Kohsuke)

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授

研究者番号：9 0 3 3 2 6 2 6

(2) 研究分担者

大嶋 宏一 (Oshima, Koichi)

京都大学・iPS細胞研究所 特定研究員

研究者番号：6 0 5 2 5 3 7 7

土方 敦司 (Hijikata, Atsushi)

独立行政法人理化学研究所・免疫ゲノミクス研究グループリサーチアソシエイト

研究者番号：8 0 4 1 5 2 7 3

(3) 連携研究者

()

研究者番号：