

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670484

研究課題名(和文) ICF症候群のB細胞最終分化障害に関わる遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of the genes critical for B cell terminal differentiation in ICF syndrome.

研究代表者

野々山 恵章 (Nonoyama, Shigeaki)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・教授)

研究者番号：40280961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ICF症候群とは、免疫の異常を特徴とし、DNAメチル化異常を原因とする遺伝病である。その免疫の異常は、抗体を産生するB細胞が成熟できないことが原因である。そこで、ICF症候群患者のB細胞と、健常者のB細胞のメチル化の状態等を比較した。その結果、劇的に差異を示す遺伝子群を明らかにすることが出来た。また、健常者の未熟B細胞及び成熟B細胞のメチル化についても検討し差異を明確に認めた。上記各メチル化解析と同時に抽出したRNAを用いてRNA解析を行いその発現の程度のデータを得た。これらの結果を合わせ、B細胞の成熟に関係している遺伝子を絞り込むことが出来た。

研究成果の概要(英文)：ICF syndrome is characterized by immunodeficiency and a genetic disorder caused by aberrant DNA methylation. Its immunodeficiency is known to be derived from disability of B cells maturation.

So, we have tried to compare the methylation status of B cells of ICF syndrome patients and healthy controls. As a result, it was possible to clarify the group of genes dramatically shows the difference. Also, we have tried to compare the methylation status of immature B cells and mature B cells in healthy controls. As a result the difference has become to be also clear. We have also tried to do RNA analysis. As a result the extent of gene expression has become also clear.

By combining these results of three analyses, we succeeded to narrow down genes that are closely responsible for the maturation of B cells.

研究分野：免疫

キーワード：小児免疫 アレルギー 膠原病学

1. 研究開始当初の背景

ICF 症候群 (Immunodeficiency, Centromeric instability, Facial anomalies) は免疫不全、染色体異常、顔貌異常を三徴とする遺伝性疾患である。原因遺伝子は、患者の半数で DNA のメチル化に関わる酵素をコードする DNMT3B であることが確定している。

しかし、免疫不全症が何故起きるのかについては全く不明である。そこで、ICF 症候群において免疫不全症を起こす原因を明らかにする。申請者は ICF 症候群において B 細胞が、メモリー B 細胞のマーカーである CD27 が完全に発現していないこと、抗体産生も不良であることを見出した。一方、B 細胞新生能のマーカーである KREC は正常であった。このことから ICF 症候群に見られる免疫不全は、B 細胞の抗体産生細胞、メモリー B 細胞への最終分化の障害であると考えられる。

2. 研究の目的

- a) ICF 症候群におけるナイーブ B 細胞からメモリー B 細胞への最終分化障害に関わる遺伝子を同定する。
- b) ICF 症候群の原因遺伝子 DNMT3B は DNA のメチル化を起こす遺伝子であり、その変異により B 細胞の最終分化に関わる遺伝子の発現が障害されていると考えられる。そこで、全ゲノムメチル化アレイを用い、患者でメチル化異常が起きている領域、特に転写に関わる領域を同定する。
- c) 全 RNA sequence により、患者で転写が低下ないし過剰に発現している mRNA を同定する。
- d) b), c) の結果を合わせ、ICF 症候群で転写異常が起きている遺伝子群を決め、遺伝子機能解析により B 細胞最終分化に関与する新規遺伝子を同定する。
- e) B 細胞の最終分化の障害によって起きる分類不能型免疫不全症(CVID)患者 DNA で、同定された遺伝子の変異を解析し、CVID の新規原因遺伝子の解明をめざす。

3. 研究の方法

- a) ICF 症候群患者由来 B 細胞の全ゲノムメチル化アレイ解析：ICF 症候群患者 B 細胞由来 DNA で全ゲノムメチル化解析を行い、メチル化異常の領域を特定した。
- b) ICF 症候群患者由来 B 細胞の RNA sequence 解析：ICF 症候群患者 B 細胞の RNA で全 RNA シークエンスを行い、発現低下している mRNA 同定を行った。
- c) B 細胞の抗体産生細胞分化に関わる遺伝子の同定：同定された遺伝子をヒトナイーブ B 細胞に遺伝子導入し抗体産生細胞への分化を検討した。
- d) 分類不能型免疫不全症(CVID)新規原因遺伝子の同定：CVID 患者で、同定された遺伝子の変異がないか次世代シーケンサーを用いて検討した。

4. 研究成果

ICF 症候群では DNA メチル化異常があり、そのために B 細胞の抗体産生細胞への分化に重要な役割を果たす遺伝子の発現異常があり、B 細胞が抗体産生細胞に分化成熟できず、低グロブリン血症になっていると考えられる。そこで、この抗体産生細胞への分化に重要な役割を果たす遺伝子を同定する目的で、ICF 症候群患者由来 B 細胞の全ゲノムメチル化アレイ解析を行い、以下の点が明らかになった。

- 1) 正常者と患者の比較では、ICF 症候群タイプ 1 とタイプ 2 の患者に劇的にメチル化差異を示す遺伝子が同定できた。
- 2) 保因者は正常者に近いメチル化結果であった。
- 3) 正常者のナイーブ B 細胞からメモリー B 細胞への分化過程の遺伝群のメチル化変化が明確に認められた。
- 4) ZBTB24 変異による患者と健常者との比較から、ZBTB24 遺伝子にも DNMT3B と同様なメチル化活性があることが判明した。また、ICF 症候群患者由来 B 細胞の全 mRNA sequence 解析を行い、前述の全ゲノムメチル化アレイ解析で回収した B 細胞から、同時に RNA を抽出し、これを全 mRNA sequence し、発現が低下ないし亢進している遺伝子のデータを得た。さらに、ICF 症候群タイプ 1 と同様にタイプ 2 でも CD27 陽性のメモリー B 細胞が完全に欠損していることを明らかにした。

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 23 件)

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 κ-deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol*. 2013, 131:1437-1440.
2. Kakiuchi S, Nonoyama S, Wakamatsu H, Kogawa K, Wang L, Kinoshita-Yamaguchi H, Takayama-Ito M, Lim CK, Inoue N, Mizuguchi M, Igarashi T, Saijo M. Neonatal herpes encephalitis caused by a virologically confirmed acyclovir resistant herpes simplex virus type 1. *J. Clin. Microbiol*. 2013, 51:356-9.

3. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KLHL3-Mediated Ubiquitination of WNK4 Causes Human Hypertension. *Cell Reports*. 2013, 3:858-868.
4. Bousfiha AA, Jeddane L, Ailal F, Al Herz W, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Fischer A, Franco JL, Geha RS, Hammarström L, Nonoyama S, Ochs HD, Roifman CM, Seger R, Tang ML, Puck JM, Chapel H, Notarangelo LD, Casanova JL. A phenotypic approach for IUIS PID classification and diagnosis: guidelines for clinicians at the bedside. *J Clin Immunol*. 2013, 33:1078-1087.
5. Osawa M, Ogura Y, Isobe K, Uchida S, Nonoyama S and Kawaguchi H. CUL3 gene analysis enables early intervention for pediatric pseudohypoaldosteronism type II in infancy. *Pediatr Nephrol*. 2013, 28:1881-1884.
6. Kato T, Matsumoto H, Chida A, Wakamatsu H, Nonoyama S. Maternal mosaicism of an ANKH mutation in a family with craniofacial dysplasia. *Pediatrics international*. 2013, 55:254-256.
7. Isobe K, Mori T, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Kumagai N, Kamada F, Morimoto T, Hayashi M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for urinary thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (NCC) measurement. *Am J Physiology Renal Physiology*. 2013, 305:1374-1381.
8. Chida A, Shintani M, Wakamatsu H, Tsutsumi Y, Iizuka Y, Kawaguchi N, Furutani Y, Inai K, Nonoyama S, Nakanishi T. ACVRL1 Gene Variant in a Patient with Vein of Galen Aneurysmal Malformation. *J Pediatr Genet*. 2013, 2:181-189.
9. Chida A, Sato H, Shintani M, Nakayama T, Kawamura Y, Furutani Y, Inai K, Saji T, Matsuoka R, Nonoyama S, Nakanishi T. Soluble ST2 and N-terminal pro-brain natriuretic peptide combination. Useful biomarker for predicting outcome of childhood pulmonary arterial hypertension. *Circ J*. 2014, 78:436-442.
10. Kojima R, Ohno T, Iikura M, Niki T, Hirashima M, Iwaya K, Tsuda H, Nonoyama S, Matsuda A, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. Galectin-9 enhances cytokine secretion, but suppresses survival and degranulation, in human mast cell line. *PLoS One*. 2014, 9:1:e86106. (DOI: 10.1371/journal.pone.0086106)
11. Chida A, Shintani M, Matsushita Y, Sato H, Eitoku T, Nakayama T, Furutani Y, Hayama E, Kawamura Y, Inai K, Ohtsuki S, Saji T, Nonoyama S, Nakanishi T. Mutations of NOTCH3 in childhood pulmonary arterial hypertension. *Mol Genet Med*. 2014, 2:229-239.
12. Horiuchi K, Imai K, Mitsui-Sekinaka K, Yeh ZW, Ochs HD, Durandy A, Nonoyama S. Analysis of somatic hypermutation in the IgM switch region in human B cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2014, 134:411-419.
13. Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Hu W, Kobayashi M, Lawo JP, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T. Efficacy and Safety of IgPro20, a Subcutaneous Immunoglobulin, in Japanese Patients with Primary Immunodeficiency Diseases. *J Clin Immunol*. 2014, 34:204-211.
14. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Bony Gaspar H, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD,
15. Oksenhandler E, Picard C, Puck JM, Sullivan KE, Tang ML. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Front Immunol*. 2014, 5:162.
16. Rawat A, Singh S, Suri D, Gupta A, Saikia B, Minz RW, Sehgal S, Vaiphei

- K, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N, Ohara O, Chan KW, Lau YL. Chronic Granulomatous Disease: Two Decades of Experience From a Tertiary Care Centre in North West India. *J Clin Immunol*. 2014, 34:58-67.
17. Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Sato H, Tomizawa D, Kajiwara M, Nagasawa M, Morio T, Nonoyama S. Clinical features and hematopoietic stem cell transplantations for CD40 ligand deficiency in Japan. *J Allergy Clin Immunol*. 2015, in press.
18. Kato T, Crestani E, Kamae C, Honma K, Yokosuka T, Ikegawa T, Nishida N, Kanegane H, Wada T, Yachie A, Ohara O, Morio T, Notarangelo L.D, Imai K, Nonoyama S. RAG1 deficiency may present clinically as selective IgA deficiency. *J Clin Immunol*. 2015, in press.
19. Oshima K, Imai K, Albert M.H, Bittner T.C, Strauss G, Filipovich A.H, Morio T, Kapoor N, Dalal J, Schultz K.R, Casper J.T, Notarangelo L.D, Ochs H.D, Nonoyama S. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for X-Linked Thrombocytopenia With Mutations in the WAS gene. *J Clin Immunol*. 2015, in press.
20. Nakatani K, Imai K, Shigeno M, Sato H, Tezuka M, Okawa T, Mitsuiki N, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Nagasawa M, Kajiwara M, Yamamoto M, Arai A, Miura O, Kamae C, Nakagawa N, Honma K, Nonoyama S, Mizutani S, Morio T. Cord blood transplantation is associated with rapid B cell neogenesis compared with bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2014, 49:1155-1161.
21. Horiuchi K, Imai K, Mitsui-Sekinaka K, Yeh ZW, Ochs HD, Durandy A, Nonoyama S. Analysis of somatic hypermutation in the IgM switch region in human B cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2014, 134:411-419.
22. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Boby Gaspar H, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD, Oksenhandler E, Picard C, Puck JM, Sullivan KE, Tang ML. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Front Immunol*. 2014, 5:1-33.
23. Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Hu W, Kobayashi M, Lawo JP, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T. Efficacy and Safety of IgPro20, a Subcutaneous Immunoglobulin, in Japanese Patients with Primary Immunodeficiency Diseases. *J Clin Immunol*. 2014, 34:204-211.
- 〔学会発表〕(計 1 件)
釜江智佳子、加藤環、本間健一、小原收、今井耕輔、久保田健夫、野々山恵章 . 本邦における ICF 症候群 5 例の検討 . 日本小児科学会 . 2014 年 4 月 11 日 . 名古屋 .
- 〔図書〕(計 0 件)
なし
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
なし
- 取得状況 (計 0 件)
なし
- 〔その他〕
ホームページ等
なし
- 6 . 研究組織
(1) 研究代表者
野々山 恵章 (Nonoyama, Shigeaki)
防衛医科大学小児科学講座・教授
研究者番号 : 40280961