

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15528

研究課題名(和文) ROR T欠損症患者における播種性BCG感染症の発症機序の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the treatment by investigating the mechanism of disseminated BCG in patients with RORγT deficiency

研究代表者

岡田 賢 (Okada, Satoshi)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・講師

研究者番号：80457241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症、ないしは慢性皮膚粘膜カンジダ症患者に対して全エクソーム配列解析を行い、ROR T異常症の2家系を同定した。患者はROR TをコードするRORC遺伝子のホモ接合型変異(V24F, R165X)を有していた。Tリンパ芽細胞株であるJurkat細胞を用いたROR Tの強制発現実験で、野生型ROR Tを導入した細胞でのみIL17A mRNAが誘導され、両変異は機能喪失型変異と判断した。並行して、誘導型のconditional-Rorc<sup>-/-</sup>マウスを作製し検証作業を行っている。検証作業が終了次第、M. bovis BCGによる感染実験を行う予定である

研究成果の概要(英文)：We performed whole exome analysis in patients with Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases (MSMD) and/or Chronic Mucocutaneous Candidiasis (CMC). Through this study, we succeeded to identify two familial cases with ROR T deficiency. Two novel homozygous mutations in RORC, encoding ROR T, were identified. These two mutations introduced Jurkat cells, an immortalized line of human T lymphocyte cells, failed to upregulate IL17A mRNA, whereas WT RORC introduced cells upregulated them. We thus concluded that identified mutations were loss-of-function or severely hypomorphic. We are planning to pursue molecular mechanism of this disorder by investigating the patients' cells, together with collecting detail clinical records. Simultaneously, we have tried to generate inducible conditional-Rorc knockout mouse. We are now investigating generated mouse whether the genetic elimination is obtained by the plpC injection.

研究分野：感染免疫学

キーワード：ROR T RORC MSMD CMD マイコバクテリア易感染症 BCG 慢性皮膚粘膜カンジダ症 原発性免疫不全症

## 1. 研究開始当初の背景

Th17細胞はヘルパーT細胞のサブセットの一つで、インターロイキン 17(IL-17)や IL-22 の産生を介して自己免疫疾患や炎症性腸疾患の発症に関与する。申請者らは、Th17 細胞のマスター転写因子である ROR $\gamma$ T (責任遺伝子: RORC) を欠損した患者が、慢性皮膚粘膜カンジダ感染症と、播種性 BCG 感染症を呈することを発見した (Okada S, et al. Science, 2015)。患者の解析で、リンパ球における抗原特異的な IFN- $\gamma$  産生障害が播種性 BCG 感染症に関与すると考えられ、IFN- $\gamma$  治療が有効な可能性が示唆された。

RORC<sup>-/-</sup>患者における播種性 BCG 感染症は重篤かつ難治で、抗酸菌症治療薬でコントロールできず致命的経過をたどる症例も存在する。一方で、患者末梢血リンパ球における IFN- $\gamma$  産生低下は比較的軽度で、IFN- $\gamma$  産生障害のみで播種性 BCG 感染症を一元的に説明するのは困難と考えられた。

## 2. 研究の目的

### 1) ROR $\gamma$ T 異常症患者の病態解明

ROR $\gamma$ T 異常症患者の病態を明らかにするとともに、ヒトの宿主免疫における ROR $\gamma$ T の役割を解明することを目的とする。

### 2) 播種性 BCG 感染症に対する表在リンパ節の役割の解明

ROR $\gamma$ T は末梢リンパ節の発生に重要であることが知られており、RORC<sup>-/-</sup>患者は腋窩リンパ節などの表在リンパ節が欠損している。BCG 接種を受けた健常児の約 1%で腋窩リンパ節腫脹を認め、表在リンパ節が BCG 接種後の局所免疫に重要と考えられるが、その役割を実験的に検証した報告はない。RORC<sup>-/-</sup>患者における表在リンパ節の欠損が、播種性 BCG 感染症の発症に関与するという可能性を検証する。

## 3. 研究の方法

ROR $\gamma$ T 異常症は、世界で 3 家系が同定されているのみの稀少疾患である。本症はその希少性から、疫学、予後、合併症、治療法など不明な部分が多い。我々は、本症の病態を明らかとするためには、多数例の ROR $\gamma$ T 異常症患者の調査が必須と考えている。そこで、慢性皮膚粘膜カンジダ感染症、ないしはメンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症 (MSMD) を発症した患者を対象に全エクソーム解析を行い、ROR $\gamma$ T 異常症の他症例の同定を試みる。さらに、同定した ROR $\gamma$ T 異常症患者の詳細な検討を行い、本症の病態を明らかとする。

RORC<sup>-/-</sup>患者における表在リンパ節の欠損が、播種性 BCG 感染症の発症に関与するという作業仮説を立てて研究に取り組む。

Rorc<sup>-/-</sup>マウスは表在リンパ節を欠如する事が知られている。本研究で、ポリイノシン-ポリシチジン (pIpC) 投与により血液細胞特異的に Rorc を欠損させた conditional-Rorc<sup>-/-</sup>マウスを作製する。作製したノックアウトマウスでは、表在リンパ節が正常に発生すると予想される。その検証を行う。表在リンパ節の存在が確認された場合、経皮的に BCG 接種を行い、表在リンパ節が播種性 BCG 感染症の発症抑制に重要であることを明らかとする。

## 4. 研究成果

慢性皮膚粘膜感染症、ないしは MSMD 患者に対して全エクソーム解析を行い、ROR $\gamma$ T 異常症の新規症例の同定を試みた。国際共同研究にて約 400 例の MSMD 患者に対して全エクソーム配列解析を行った結果、ROR $\gamma$ T 異常症の 2 家系の同定に成功した。今回同定した 2 家系はともに ROR $\gamma$ T をコードする RORC 遺伝子のホモ接合型変異を有しており、1 家系では V24F ホモ接合型変異が、もう 1 家系では R165X ホモ接合型変異が同定されている。T リンパ芽細胞株である Jurkat 細胞に、野生型 ROR $\gamma$ T、V24F 変異体、ないしは R165X 変異体を一過性に強制発現させたところ、野生型 ROR $\gamma$ T を導入した細胞では IL17A mRNA の誘導が認められたのに対して、V24F 変異体、R165X 変異体を導入した細胞では IL17A mRNA の誘導を認めず、両変異は機能喪失型変異と判断した。患者細胞で、抗酸菌感染に対する IFN- $\gamma$  産生障害を認め、MSMD 発症の分子基盤と考えた。以上の結果について現在論文作成中である。

患者における網羅的遺伝子解析と並行して、Rorytlf マウスと Mx1-Cre マウスを交配させ、誘導型の conditional-Rorc<sup>-/-</sup>マウスを作製した。現在、作製したマウスの検証作業を行っている。具体的には、生後 4 週齢で pIpC の腹腔内投与により Cre リコンビナーゼを誘導し、血液細胞特異的に Rorc 遺伝子をノックアウトできているかの検証作業を行うとともに、それらのマウスの表現型の検討を行っている。これらの検証作業が終了次第、M. bovis BCG (東京株) の懸濁液を足蹠に皮下接種を行う予定である。

## 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 (代表論文を抜粋)] (計 20 件)

1. Zhang SY, Clark NE, Freije CA, Pauwels E, Taggart AJ, Okada S, Mandel H, Garcia P, Ciancanelli MJ, Biran A, Lafaille FG, Tsumura M, Cobat A, Luo J, Volpi S, Zimmer B, Sakata S, Dinis A, Ohara O,

- Garcia Reino EJ, Dobbs K, Hasek M, Holloway SP, McCammon K, Hussong SA, DeRosa N, Van Skike CE, Katolik A, Lorenzo L, Hyodo M, Faria E, Halwani R, Fukuhara R, Smith GA, Galvan V, Damha MJ, Al-Muhsen S, Itan Y, Boeke JD, Notarangelo LD, Studer L, Kobayashi M, Diogo L, Fairbrother WG, Abel L, Rosenberg BR, Hart PJ, Etzioni A, Casanova JL. Inborn errors of RNA lariat metabolism in humans with viral infections of the brainstem. *Cell*. 172(5): 952-965.e18, 2018 ( 査読有り )
2. Leiding JW, **Okada S (co-first author)**, Hagin D, Abinun M, Shcherbina A, Balashov DN, Kim VHD, Ovidia A, Guthery SL, Pulsipher M, Lilic D, Devlin LA, Christie S, Depner M, Fuchs S, van Royen-Kerkhof A, Lindemans C, Petrovic A, Sullivan KE, Bunin N, Kilic SS, Arpaci F, Calle-Martin O, Martinez-Martinez L, Aldave JC, Kobayashi M, Ohkawa T, Imai K, Iguchi A, Roifman CM, Gennery AR, Slatter M, Ochs HD, Morio T, Torgerson TR. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with Gain of Function STAT1 Mutation. *J Allergy Clin Immunol*. 141(2): 704-717.e5, 2018 ( 査読有り )
  3. Kanegane H, Hoshino A, Okano T, Yasumi T, Wada T, Takada H, **Okada S**, Yamashita M, Yeh TW, Nishikomori R, Takagi M, Imai K, Ochs HD, Morio T. Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Allergol Int*. 67(1): 43-54, 2018 ( 査読有り )
  4. Kagawa R, Fujiki R, Tsumura M, Sakata S, Nishimura S, Itan Y, Kong XF, Kato Z, Ohnishi H, Hirata O, Saito S, Ikeda M, Baghdadi JE, Bousfiha A, Fujiwara K, Oleastro, Yancoski J, Perez L, Danielian S, Ailal F, Takada H, Hara T, Puel A, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, **Okada S (corresponding author)**, Kobayashi M. Alanine-scanning mutagenesis of human STAT1 to estimate loss- or gain-of-function variants. *J Allergy Clin Immunol*. 140(1): 232-41, 2017 ( 査読有り )
  5. Hoshino A, **Okada S (co-first author)**, Yoshida K, Nishida N, Okuno Y, Ueno H, Yamashita M, Okano T, Tsumura M, Nishimura S, Sakata S, Kobayashi M, Nakamura H, Kamizono J, Mitsui-Sekinaka K, Ichimura T, Ohga S, Nakazawa Y, Takagi M, Imai K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Nonoyama S, Morio T, Kanegane H. Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in humans with germline IKZF1 mutations. *J Allergy Clin Immunol*. 140(1): 223-31, 2017 ( 査読有り )
  6. Fujiki R, Hijikata A, Shirai T, **Okada S**, Kobayashi M, Ohara O. Molecular Mechanism and Structural Basis of Gain of Function of STAT1 Caused by Pathogenic R274Q Mutation. *J Biol Chem*. 292(15): 6240-54, 2017 ( 査読有り )
  7. Sakata S, **Okada S (corresponding author)**, Aoyama K, Hara K, Tani C, Kagawa R, Nakamura-Utsunomiya A, Miyagawa S, Ogata T, Mizuno H, Kobayashi M. Individual Clinically Diagnosed with CHARGE syndrome but with a Mutation in KMT2D, a Gene Associated with Kabuki syndrome: A Case Report. *Front Genet*. 8: 210, 2017 ( 査読有り )
  8. Onodera R, Kurita E, Taniguchi K, Karakawa S, **Okada S**, Kihara H, Fujii T, Kobayashi M. Anti-Human Neutrophil Antigen-1a, -1b, and -2 Antibodies in Neonates and Children with Immune Neutropenias Analyzed by Extracted Granulocyte Antigen Immunofluorescence Assay. *Transfusion* 57(11): 2586-94, 2017 ( 査読有り )
  9. Utsumi T, **Okada S**, Izawa K, Honda Y, Nishimura G, Nishikomori R, Okano R, Kobayashi M. A Case with Spondyloenchondrodysplasia Treated with Growth Hormone. *Front Endocrinol*. 8: 157, 2017 ( 査読有り )
  10. Hiyama TY, Utsunomiya AN, Matsumoto M, Fujikawa A, Lin CH, Hara K, Kagawa R, **Okada S**, Kobayashi M, Mayumi I, Anzo M, Cho H, Takayasu S, Nigawara T, Daimon M, Sato T, Terui K, Ito E, Noda M. Adipsic Hypernatremia without Hypothalamic Lesions Accompanied by Autoantibodies to Subfornical Organ. *Brain Pathol*. 27(3): 323-31, 2017 ( 査読有り )
  11. Eslami N, Tavakol M, Mesdaghi M, Gharegozlou M, Casanova JL, Puel A, **Okada S**, Arshi S, Bemanian MH, Fallahpour M, Molatefi R, Seif F, Zoghi S, Rezaei N, Nabavi M. A gain-of-function mutation of STAT1: A novel genetic factor contributing to chronic mucocutaneous candidiasis. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 64(2): 191-201, 2017 ( 査読有り )

12. Toubiana J, **Okada S (equal contribution)**, Hiller J, Oleastro M, Lagos Gomez M, Aldave Becerra JC, Ouachée-Charadin M, Fouyssac F, Girisha KM, Etzioni A, Van Montfrans J, Camcioglu Y, Kerns LA, Belohradsky B, Blanche S, Bousfiha A, Rodriguez-Gallego C, Meyts I, Kisand K, Reichenbach J, Renner ED, Rosenzweig S, Grimbacher B, van de Veerdonk FL, Traidl-Hoffmann C, Picard C, Marodi L, Morio T, Kobayashi M, Lilic D, Milner JD, Holland S, Casanova JL, Puel A. Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype: an international survey of 276 patients from 169 kindreds. *Blood*. 127(25): 3154-64, 2016 ( 査読有り )
13. Lévy R, **Okada S**, Béziat V, Moriya K, Liu C, Chai LY, Migaud M, Hauck F, Al Ali A, Cyrus C, Vatte C, Patiroglu T, Unal E, Ferneiny M, Hyakuna N, Nepesov S, Oleastro M, Ikinciogullari A, Dogu F, Asano T, Ohara O, Yun L, Della Mina E, Bronnimann D, Itan Y, Gothe F, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Tahuil N, Aytekin C, Salhi A, Al Muhsen S, Kobayashi M, Toubiana J, Abel L, Li X, Camcioglu Y, Celmeli F, Klein C, AlKhater SA, Casanova JL, Puel A. Genetic, immunological, and clinical features of patients with bacterial and fungal infections due to inherited IL-17RA deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(51): E8277-E8285, 2016 ( 査読有り )
14. Ma CS, Wong N, Rao G, Nguyen A, Avery DT, Payne K, Torpy J, O'Young P, Deenick E, Bustamante J, Puel A, **Okada S**, Kobayashi M, Martinez-Barricarte R, Elliott M, Sebnem Kilic S, El Baghdadi J, Minegishi Y, Bousfiha A, Robertson N, Hambleton S, Arkwright PD, French M, Blincoe AK, Hsu P, Campbell DE, Stormon MO, Wong M, Adelstein S, Fulcher DA, Cook MC, Stepensky P, Boztug K, Beier R, Ikinciogullari A, Ziegler JB, Gray P, Picard C, Boisson-Dupuis S, Phan TG, Grimbacher B, Warnatz K, Holland SM, Uzel G, Casanova JL, Tangye SG. Unique and shared signaling pathways cooperate to regulate the differentiation of human CD4+ T cells into distinct effector subsets. *J Exp Med*. 213(8): 1589-1608, 2016 ( 査読有り )
15. Tsujita Y, Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Yeh TW, Mitsui 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, Ogawa S, Ohara O, **Okada S**, Kobayashi M, Morio T, Nonoyama S. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause activated phosphatidylinositol 3-kinase  $\delta$  syndrome-like immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 138(6): 1672-1680.e10, 2016 ( 査読有り )
16. **Okada S**, Puel A, Casanova JL, Kobayashi M. Chronic mucocutaneous candidiasis disease associated with inborn errors of IL-17 immunity. *Clin Transl Immunology*. 5(12): e114, 2016 ( 査読有り )
17. Yasumura J, Wago M, **Okada S**, Nishikomori R, Takei S, Kobayashi M. A 2-year-old Japanese girl with TNF receptor-associated periodic syndrome: A case report of the youngest diagnosed proband in Japan. *Mod Rheumatol*. 26(5): 798-801, 2016 ( 査読有り )
18. Hara K, Tajima G, **Okada S**, Tsumura M, Kagawa R, Shirao K, Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Hata I, Sakura N, Shigematsu Y, Takihara Y, Kobayashi M. Significance of ACADM mutations identified through newborn screening of MCAD deficiency in Japan. *Mol Genet Metab*. 118(1): 9-14, 2016 ( 査読有り )
19. Tajima G, Hara K, Tsumura M, Kagawa R, **Okada S**, Sakura N, Hata I, Shigematsu Y, Kobayashi M. Screening of MCAD deficiency in Japan: 16years' experience of enzymatic and genetic evaluation. *Mol Genet Metab*. 119(4): 322-328, 2016 ( 査読有り )
20. **岡田 賢**. 慢性皮膚粘膜カンジダ症. 日本臨床免疫学会会誌 40: 109-117, 2017 ( 査読無し )

[学会発表](計 7 件)

[口演(筆頭のみ)]

- 岡田 賢**, Jennifer W. Leiding, Troy R. Torgerson, 今井耕輔, 井口晶裕, 有賀 正, 小林正夫. STAT1 機能獲得型変異による原発性免疫不全症患者に対する造血幹細胞移植の有効性と問題点の検討. 第 40 回 日本造血細胞移植学会総会. 札幌. 2018/2/2. 口演
- 岡田 賢**. STAT1 機能獲得型変異による

原発性免疫不全症. 第 1 回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会. 東京. 2018/1/20. ワークショップ

3. **Satoshi Okada**, Janet Markle, Anne Puel, Masao Kobayashi, Jean-Laurent Casanova. Primary immunodeficiency associate with functional defect of ROR $\gamma$ T. The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Yokohama. 2016/12/1. Symposium

[ポスター(筆頭のみ)]

1. **Satoshi Okada**, Ryoji Fujiki, Reiko Kagawa, Miyuki Tsumura, Xiaofei Kong, Sonoko Sakata, Shiho Nishimura, Zenichiro Kato, Hidenori Ohnishi, Yuval Itan, Stéphanie Boisson-Dupuis, Jacinta Bustamante, Jean-Laurent Casanova, Osamu Ohara, and Masao Kobayashi. Alanine-scanning mutagenesis of human STAT1 to estimate the loss- or gain-of-function nature of variants. 17th Biennial Meeting of the European Society for immunodeficiencies. Barcelona. 2016/9/22. Poster
2. **Satoshi Okada**, Reiko Kagawa, Ryoji Fujiki, Zenichiro Kato, Hidenori Ohnishi, Stéphanie Boisson-Dupuis, Jacinta Bustamante, Jean-Laurent Casanova, Osamu Ohara, and Masao Kobayashi. Loss-of-function and dominant negative STAT1 coiled-coil domain mutations in MSMD. Congress of Asia Pacific Society for Immunodeficiencies. Hong Kong. 2016/4/30. Poster
3. **岡田 賢**, 津村 弥来, 西村志帆, 坂田園子, 香川礼子, Julie Toubiana, Anne Puel, Jean-Laurent Casanova, 小林正夫. International survey of clinical manifestations of patients with STAT1 gain-of-function mutations. 第 78 回 日本血液学会. 横浜. 2016/10/13. ポスター
4. **岡田 賢**, 津村 弥来, 西村志帆, 坂田園子, Julie Toubiana, Anne Puel, Jean-Laurent Casanova, 小林正夫. STAT1 機能獲得型変異を有する原発性免疫不全症患者の臨床症状の国際調査. 第 44 回 日本臨床免疫学会. 東京. 2016/9/9. ポスター

[図書](計 3 件)

1. **岡田 賢**, 津村 弥来, 小林正夫. ROR T 機能欠損による原発性免疫不全症. 臨床免疫・アレルギー科 67: 147-153, 2017
2. **岡田 賢**. メンデル遺伝型マイコバクテ

リア易感染症 (MSMD). 原発性免疫不全症候群 診療の手引き. 106-110, 2017

3. **岡田 賢**. 慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMCD). 原発性免疫不全症候群 診療の手引き. 111-115, 2017

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

1. 【研究成果】まれな原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植の有効性と問題点を解明(2017年6月9日)  
<https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/40053>
2. 【研究成果】原発性免疫不全症の新しい原因遺伝子を同定 - PTEN 遺伝子変異による免疫不全症の発見 - (2016年8月24日)  
<https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/36363>
3. 【研究成果】STAT1 遺伝子変異の病的意義を高精度に予測するツールとして、網羅的アラニンスキャンニングを用いた参照データベースを確立(2016年12月21日)  
<https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/36849>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 賢 (OKADA SATOSHI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・講師  
研究者番号: 80457241

(2) 研究分担者

津村 弥来 (TSUMURA MIYUKI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・研究員  
研究者番号: 80646274

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

浅野 孝基 (ASANO TAKAKI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・大学院生

早川 誠一 (HAYAKAWA SEIICHI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・大学院生