

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15529

研究課題名(和文)新規高IgE症候群の病態の解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathophysiology of novel hyper-IgE syndrome

研究代表者

峯岸 克行(MINEGISHI, Yoshiyuki)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・教授

研究者番号：10343154

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)：高IgE症候群は、重症のアトピー性皮膚炎、著しい高IgE血症、黄色ブドウ球菌感染症、骨粗鬆症を合併する難病である。生後早期から肺の器質的病変が進行し、特に肺嚢胞へのアスペルギルス感染症を契機として20歳代で死亡する症例が多い。その主要な病因がSTAT3遺伝子のドミナントネガティブ変異であることを我々が世界に先駆けて明らかにしたが、原因遺伝子が明らかでない遺伝性高IgE症候群が多数存在する。そこで本研究では、既知の原因遺伝子に変異を有さない約100例の高IgE症候群に対して、次世代シーケンサーによるエクソーム解析を実施して、新規の原因遺伝子を発見した。

研究成果の概要(英文)：Hyper IgE syndrome is primary immunodeficiency disorder, which complicates severe atopic dermatitis, marked hyper IgE-emia, Staphylococcus aureus infection, and osteoporosis. In many cases, pulmonary lesions progress from the early postnatal day, culminating to in the Aspergillus infections to pulmonary cysts. We revealed that its major etiology is dominant negative mutation of the STAT3 gene. Still, there are many genetic patients with hyper IgE syndromes in which causal genes are unidentified. Thus, in this study, we analyzed with the next generation sequencer approximately 100 cases and found new causative variants.

研究分野：小児科学

キーワード：免疫不全症

### 1. 研究開始当初の背景

高 IgE 症候群は、重症のアトピー性皮膚炎、著しい高 IgE 血症、黄色ブドウ球菌感染症、骨粗鬆症を合併する難病である。生後早期から肺の器質的病変が進行し、特に肺嚢胞へのアスペルギルス感染症を契機として 20 歳代で死亡する症例が多い。その主要な病因が STAT3 遺伝子のドミナントネガティブ(DN)変異であることを我々が世界に先駆けて明らかにしたが、原因遺伝子が明らかでない遺伝性高 IgE 症候群が多数存在し、原因遺伝子が明らかにされた高 IgE 症候群においてもその病態形成機構は不明で、そのため対症療法以外の治療法は存在しない。

### 2. 研究の目的

高 IgE 症候群は、単一遺伝子の異常により、重症のアトピー性皮膚炎、正常人の 100 倍から 1 万倍にも及ぶ高 IgE 血症、黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍と肺炎、骨粗鬆症など発症する遺伝性の疾病である。その主要な病因が STAT3 遺伝子のドミナントネガティブ(DN)変異であることを我々が世界に先駆けて明らかにしたが、STAT3 等の既知の原因遺伝子に変異を有さない遺伝性高 IgE 症候群が多数残されている。そこで、本研究では、原因不明の高 IgE 症候群の新規原因遺伝子を同定し、その病態を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

高 IgE 症候群の新規の原因遺伝子を同定するために、高 IgE 症候群の臨床症状を呈しながら、これまでに報告されている高 IgE 症候群の原因遺伝子、STAT3, TYK2, DOCK8, PGM3 に異常のない高 IgE 症候群のゲノム DNA を用いて、全エクソンシーケンスを実施した。全エクソンシーケンス法のデータ解析はマッピング、データの品

質管理、変異検出、アノテーション、原因変異の探索の 5 個のステップにより実施した。マッピングは次世代シーケンサー HiSeq1500 から出力されたデータファイルを参照ゲノム配列と対照して位置決めする作業で、参照ゲノム配列は UCSC Genome Database から入手し、Burrows-Wheeler Aligner を用いて行なった。データの品質管理は、マッピング前の各リード単位の品質管理とマッピング後のエクソン対象領域における読みの深度(depth)により評価した。変異の検出は dbSNP138 との比較により Genome Analysis Toolkit により行った。アノテーションは ANNOVAR により実施し、遺伝子変異の頻度情報は、Human Genetic Variation Browser (HGVD) と Exome Aggregation Consortium Data Set(EXAC) より得た。原因遺伝子の探索は、遺伝形式を仮定し、それぞれの仮説と一致したホモ、ヘテロ、コンパウンドヘテロの変異を抽出したのち、それが原因遺伝子変異かどうかをバイオインフォマティクスにより詳細に検討した。

得られた候補遺伝子に対して、その遺伝子の免疫系での発現、これまでに明らかにされているその遺伝子機能、遺伝子変異部位に存在する機能ドメイン、遺伝子多型頻度等のデータベース情報を利用して候補遺伝子変異の機能解析の優先順位を決定した。この優先順位に従い、野生型と変異型を正常人と患児の末梢血単核球由来 cDNA より RT-PCR 法により増幅、クローニングして、遺伝子機能解析を実施し、機能異常のある遺伝子変異を見出した。

### 4. 研究成果

これまでに原因遺伝子が不明であった高 IgE 症候群の新規原因遺伝子の探索を工

クソーム解析により実施した。1例の症例において、新規の原因遺伝子のコンパウンドヘテロの遺伝子変異を認めた。そのため個の遺伝産物のタンパク発現は欠損していることがウエスタンブロットングで明らかになった。この発現欠損が本症の患児の疾患発症の原因であることを証明するために、当該遺伝子のノックアウトマウスをCRISPER/Cas9によるゲノム編集法で作成した。Off target 効果の影響を排除するために、異なる2種のガイドRNAを設計し、CRISPER/Cas9とともにマウスの受精卵にマイクロインジェクションし、ノックアウトマウスを作成した。このマウスにおいては、患児と同様に高IgE血症と皮膚炎の増悪を認めた。以上より、当該遺伝子が本症の原因であると考えられた。

#### 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 4 件)

(1) 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, Ikincioğullari 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 co-operate to regulate the differentiation of human CD4+T cells into distinct effector subsets.

Cindy S Ma et al., *J Exp Med* 213

1589-1608 2016 doi:

10.1084/jem.20151467 (査読有)

(2) Minakawa S, Tanaka H, Kaneko T, Matsuzaki Y, Kono M, Akiyama M, Minegishi Y, Sawamura D. Hyper-IgE syndrome with a novel mutation of the STAT3 gene. *Clin Exp Dermatol* 41 687-689 2016 doi: 10.1111/ced.12865

(査読有)

(3) 峯岸克行 IgE 産生とその調節 アレルギー・免疫 IgE update 23(12) 40-45 2016 (査読無)

(4) 峯岸克行 小児内科 慢性疾患児の一生を診る 3. 高 IgE 症候群 48 (10) 1652-1654 2016

(査読無)

[学会発表](計 3 件)

Wada T, Nishikawa Y, Minegishi Y "Basophil promote oxazolone-induced atopic dermatitis in mouse model of hyper-IgE syndrome." The 45th annual meeting of the Japanese society for immunology. Dec 4, 2016 (沖縄コンベンションセンター・宜野湾市・沖縄県)

Nishikawa Y, Wada T, Minegishi Y "Dysregulated IgE response in a mouse model of hyper-IgE syndrome attributed to B cell-intrinsic abnormality caused by Stat3 mutation." The 45th annual meeting of the Japanese society for immunology. Dec 4, 2016 (沖縄コンベンションセンター・宜野湾市・沖縄県)

Minegishi Y, "Molecular pathogenesis of hyper-IgE syndrome." The 26th Hot Spring Harbor International Symposium Trans-Omics: New Approaches in Biology and Medicine. Nov. 3, 2016 (九州大学・福岡市・福岡県)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

峯岸 克行 (MINEGISHI, Yoshiyuki)  
徳島大学・先端酵素学研究所・教授  
研究者番号: 10343154