

平成 21 年 05 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390282

研究課題名（和文） 免疫不全症の遺伝子診断システムの構築と新規責任遺伝子の発見

研究課題名（英文） Establishment of genetic diagnosis system and identification of molecular origin for primary immunodeficiencies

研究代表者

峯岸 克行（MINEGISHI YOSHIYUKI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：10343154

研究成果の概要：高 IgE 症候群は、難治性のアトピー性皮膚炎、高 IgE 血症、細菌に対する易感染性を 3 主徴とする免疫不全症である。その原因遺伝子は、最近まで明らかにされていなかったが、2006 年我々が単純ヘルペスウイルス感染症と細胞内寄生細菌感染症を合併する高 IgE 症候群の 1 つの原因遺伝子 TYK2 を発見した。さらにこの発見を契機として、TYK2 欠損症で障害が見られたサイトカインシグナル伝達を詳細に検討することにより、古典的高 IgE 症候群の原因遺伝子が STAT3 であることを我々が世界に先駆けて発見した。以上の発見により高 IgE 症候群は、いくつかのサイトカインのシグナル伝達の異常が原因で発症する症候群である可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：臨床免疫学・アレルギー学・感染症学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：免疫不全症、サイトカイン、シグナル伝達、アレルギー、黄色ブドウ球菌

1. 研究開始当初の背景

原発性免疫不全症の 1 つである高 IgE 症候群は、慢性のアトピー性皮膚炎、高 IgE 血症、黄色ブドウ球菌に対する肺と皮膚の易感染性を 3 主徴とする疾患である。免疫系以外の症状を合併する 1 型のもは、特徴的な顔貌と全身の骨、歯牙の異常を呈し、症状が免疫系に限局する 2 型のもは、重症の単純ヘルペスウイルスなどのウイルス感染症に反復

罹患する。高 IgE 症候群は、第 1 例が 1966 年に報告され、比較的頻度が高くアレルギーや骨粗鬆症などの興味深い病態を呈することからその原因遺伝子検索が多く研究者によって行なわれたが、その原因は長らく明らかにされていなかった。このため、疾患の早期発見・早期治療開始が困難な状況であった。

2. 研究の目的

(1) 我々の発見した、TYK2 欠損症においては、各種のサイトカインに対するシグナル伝達障害が見られたことから、同様のサイトカインのシグナル伝達障害が1型の高IgE症候群においても存在するかどうかを検討した。さらに、これを契機としてその原因遺伝子の検索を行なった。

(2) 1型の高IgE症候群において、どのようなメカニズムで皮膚と肺に選択的に黄色ブドウ球菌感染症が発症するかを解明し、高IgE症候群での黄色ブドウ球菌感染症に対する有効な予防法、治療法を開発することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 正常コントロールまたは患児の末梢血より比重遠心法により単核球を分離し、これを、EBV (Epstein-Barr virus)単独または、IL-6の共存下に培養し、IgM産生をELISA法にて評価した。また末梢血単核球より、GM-CSF添加培養によりマクロファージを樹立し、IL-10に対する応答性を評価した。STAT3遺伝子の塩基配列はRT-PCR法と直接シーケンス法で決定した。STAT3変異体の機能評価は、STAT3ルシフェラーゼレポーター遺伝子と変異体との遺伝子導入により行なった。

(2) 正常コントロールまたは患児の単核球を、抗CD3抗体と抗CD28抗体の存在下で培養し、その上清中の各種サイトカインの濃度をELISA法で検討した。この上清をケラチノサイト、気管支上皮細胞、線維芽細胞、マクロファージに投与して、各種ケモカイン、β-デフェンシンの産生をELISA法、リアルタイムPCR法で検討した。さらに、この反応を抗IL-17抗体、抗IL-22抗体、抗β-デフェ

ンシン抗体を加えることで中和できるか否かを検討した。さらにT細胞の産生するTh17サイトカイン (IL-17, IL-17F, IL-22)、古典的炎症性サイトカイン (TNFα, IL-18, IFNγ)を各所の細胞に直接投与することにより、活性化T細胞の上清の機能がどのサイトカインによるものであることを検討した。

4. 研究成果

(1) 1型高IgE症候群においては、IL-6とIL-10のシグナル伝達が障害されていることを見出した。IL-6とIL-10に共通のシグナル伝達分子であるSTAT3の遺伝子解析により高IgE症候群に特異的に存在するSTAT3の突然変異を発見した。STAT3の突然変異は、症例の約80%で見られ、変異は全ての症例で、片アレルのミスセンス変異または小さなフレームシフトを伴わないデリーションだった。また、STAT3の突然変異は、DNA結合領域に集積しており、コドン382のアミノ酸置換とコドン463の1アミノ酸の欠失がホットスポットだった。STAT3変異体はサイトカインの刺激により正常にチロシンリン酸化されダイマーを形成したが、STAT3のターゲット配列に対する結合が正常の約4分の1に低下していた。突然変異を有するSTAT3はIL-6に反応してSTAT3-ルシフェラーゼレポーターを発現するヒト肝由来のHepG2細胞に発現させるとIL-6刺激によるルシフェラーゼ活性の誘導を抑制し、シグナル伝達に対してドミナントネガティブに働くことが証明された。

(2) 1型高IgE症候群において黄色ブドウ球菌感染症が皮膚と肺に特異的に発生する機序の検討

高IgE症候群の症例においては、コントロールと比較して古典的炎症性サイトカインTNFα, IL-18, IFNγの産生は正常であるもの

の、Th17 サイトカイン IL-17, IL-17F, IL-22 の産生は低下していることが明らかになった。そこで、正常コントロールまたは患児の単核球を抗 CD3/D28 抗体で活性化した上清をケラチノサイトに投与し、2日後の上清中のケモカインとβ-デフェンシン (BD) の産生を検討した。正常コントロールの上清は、CCL2, CXCL8, CXCL1, BD1, BD2, BD3 全ての産生を上昇させたが、高IgE 症候群の患児の上清は CCL2 と BD1 の産生を増加させたものの、CXCL8, CXCL1, BD2, BD3 の産生はほとんど増加しなかった。このことから、高IgE 症候群患児の活性化したT細胞の上清は、ケラチノサイトからの CXCL8, CXCL1, BD2, BD3 の発現を誘導する能力が特異的に欠損していることが明らかとなった。このメカニズムを検討するために、正常コントロールの活性化したT細胞上清に抗IL-17抗体と抗IL-22抗体を添加しその影響を検討したところ、ケラチノサイトからのCXCL8, CXCL1, BD2, BD3 の発現上昇はほぼ完全にブロックした。

上記の現象の細胞特異性を検討するために、正常コントロールまたは患児の単核球を抗CD3抗体と抗CD28抗体で活性化した上清を気管支上皮細胞、表皮線維芽細胞、血管内皮細胞、単球由来マクロファージに投与した。気管支上皮細胞においては、ケラチノサイトと同様に正常コントロール由来の活性化T細胞上清によってのみ、CXCL8, CXCL1, BD2, BD3 の発現上昇が見られたが、線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージにおいては、患者由来の活性化T細胞上清によっても、CXCL8, CXCL1 の産生上昇が見られた。

患児の活性化T細胞上清がケラチノサイトと気管支上皮細胞において特異的に CXCL8, CXCL1, BD2, BD3 の産生上昇を誘導できないことの原因が、Th17 サイトカインの産生

障害であることをより直接的に証明するために、各種のリコンビナント Th17 サイトカインと古典的炎症性サイトカインをケラチノサイト、気管支上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージに投与した。これまでに活性化T細胞の上清で得られた結果に一致して、ケラチノサイトと気管支上皮細胞においては、Th17 サイトカインが CXCL8, CXCL1, BD2, BD3 の産生に重要であり、線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージにおいては、Th17 サイトカインが存在しなくても、古典的炎症性サイトカインのみで CXCL8, CXCL1 の産生が十分に起こることが示された。

(1)と(2)の研究成果は、いずれも世界の研究者に先駆けるもので、(1)はNatureに(2)は、J. Exp. Med.に掲載された。

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25件)

1. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature*, 448, 1058-1062, 2007

査読有

2. Obata K, Mukai K, Tsujimura Y, Ishiwata K, Kawano Y, Minegishi Y, Watanabe N, Karasuyama H. Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood*. 110, 913-920, 2007 査読有

3. Minegishi Y, Saito M, Karasuyama H. Response: The hyper IgE syndrome and mutations in TYK2. *Immunity*. 26, 536, 2007

4. Kojima T, Obata K, Mukai K, Sato S, Takai T, Minegishi Y, and Karasuyama H, Mast Cells and Basophils Are Selectively Activated In Vitro and In Vivo through CD200R3 in an IgE-Independent Manner. *J Immunol.* 179, 7093-7100, 2007 査読有
5. Minegishi Y, Karasuyama H. Hyper IgE syndrome and Tyk2 deficiency. *Current Opinion in Allergy Clinical Immunol.*, 7, 506-509, 2007 査読有
6. 峯岸克行、烏山 一 高 IgE 症候群の原因遺伝子 Annual Review 免疫 2008 pp288-294, 2007 査読無
7. 峯岸克行 Tyk2 欠損と高 IgE 症候群 臨床免疫・アレルギー科 48, 547-552, 2007 査読無
8. 峯岸克行、烏山 一 重症アトピーを伴う難病の原因遺伝子をついに発見 Medical Bio 4, pp14-15, 2007 査読無
9. 峯岸克行 ことばのカルテ 151 先天性免疫不全 Medical Tribune 2007 査読無
10. Tsujimura Y, Obata K, Mukai K, Shindou H, Yoshida M, Nishikado IH, Kawano Y, Minegishi Y, Shimizu T Karasuyama H, Basophils play a pivotal role in IgG- but not IgE-mediated systemic anaphylaxis in contrast to mast cells. *Immunity* 28, 581-589, 2008 査読有
11. 峯岸克行 ついに明らかにされた高 IgE 症候群の原因遺伝子 医学のあゆみ 224, 237-238, 2008 査読無
12. 峯岸克行 烏山 一 アレルギー疾患関連遺伝子 感染・炎症・免疫 38, 24-31, 2008 査読無
13. 峯岸克行 ヒト先天性免疫不全症の原因と病態 細胞工学 27 602-606, 2008 査読無
14. 峯岸克行 高 IgE 症候群の遺伝学 アレルギー・免疫 15, 62-67, 2008 査読無
15. 峯岸克行 重症アトピー性皮膚炎を合併する免疫不全症の原因遺伝子同定 生体の科学 59, 296-301, 2008 査読無
16. 峯岸克行 高 IgE 症候群—ついに明らかにされたその原因遺伝子と病態 小児科臨床 61,1799-1803, 2008 査読無
17. 齋藤雅子・峯岸克行 高 IgE 症候群 アレルギー・免疫 15, 96-101, 2008 査読無
18. 峯岸克行 BTK 欠損を伴わない無ガンマグロブリン血症 小児内科 40, 1271-1274, 2008 査読無
19. 峯岸克行 高 IgE 症候群 小児内科 40, 1294-1296, 2008 査読無
20. 峯岸克行 烏山 一 STAT3 シグナルと免疫疾患 実験医学 26, 2432-2436, 2008 査読無
21. 峯岸克行 烏山 一 単一遺伝子異常により発症するアレルギー；高 IgE 症候群 小児科 49, 1766-1774, 2008 査読無

22. Minegishi Y., Karasuyama H., Genetic origins of hyper-IgE syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep.* 8, 386-391, 2008 査読有

23. Yoshikawa S, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. The skewed heavy-chain repertoire in peritoneal B-1 cells is predetermined by the selection via pre-B cell receptor during B cell ontogeny in the fetal liver. *Int Immunol.* 21, 43-52, 2009 査読有

24. Minegishi Y., Karasuyama H. Defects in Jak-STAT-mediated cytokine signals cause hyper-IgE syndrome: Lessons from a primary immunodeficiency. *Int. Immunol.* 21, 105-112, 2009. 査読有

25. Minegishi Y., Saito M., Nagasawa M., Takada H., Hara T., Tsuchiya S., Agematsu K., Yamada M., Kawamura N., Ariga T., Tsuge I., Karasuyama H. Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J. Exp. Med.* 206, 2009 (in press)
査読有

〔学会発表〕 (計19件)

1. Minegishi Y., Saito M., Nonoyama S. Karasuyama H.; Human Tyk2 deficiency reveals requisite roles of Tyk2 in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. Keystone Symposium “Jaks, STATs, and Immunity”, Steamboat springs, Colorado, USA, January 5-10, 2007.

2. Minegishi Y., Primary Immunodeficiency; Identification and elucidation of complex primary immunodeficiency, hyper-IgE syndrome, 9th FIMSA advanced immunology training course

and workshop, Jeju, Korea, Feb 1-4, 2007.

3. Minegishi Y. Molecular genetics and functional characterization of human hyper-IgE. JSI-RCAI workshop 2007 “Lessons learned from primary immunodeficiency”. RCAI, Yokohama, May 25 2007

4. Minegishi Y. Dominant negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. 37th annual meeting of Japanese Society for Immunology, Shinagawa, Nov. 22 2007

5. 峯岸克行、齋藤雅子、高田英俊、原寿郎、川村信明、有賀 正、土屋 滋、柘植郁哉、烏山 一 日本アレルギー学会秋季学術集会 高 IgE 症候群の原因遺伝子の検討 横浜 2007年11月2日

6. 峯岸克行、齋藤雅子、烏山 一 高 IgE 症候群の原因遺伝子 信州免疫アレルギー懇話会 松本 2007年10月5日

7. Minegishi Y., Saito M., Karasuyama H., “Signaling defects in hyper-IgE syndrome.” Keystone Symposium “Lymphocyte activation and signaling”, Snowbird, Utah, USA, February 3-8, 2008.

8. Minegishi Y., Saito M., Karasuyama H., “Molecular origin and signaling defect in hyper-IgE syndrome” Seminar in Pediatric Immunology, Hematology, and Rheumatology at the Hospital Necker-Enfants Malades Paris, France April 10, 2008

9. Minegishi Y., Saito M., Karasuyama H

European Society for Immunodeficiency
“Signaling defect due to the mutations in TYK2
and STAT3 resulting in hyper-IgE
syndrome”, 's-Hertogenbosch, Netherlands, Oct.
16-19, 2008

10. Minegishi Y., Saito M., Karasuyama H.
“STAT3 and cutaneous or lung hyper-IgE
syndrome”, Pierre Graber Lecture the Annual
meeting of French Society for Immunology, Paris,
Nov. 27th, 2008

11. Minegishi Y., Saito M., Karasuyama H.
“Molecular origin and pathogenesis of hyper-IgE
syndrome” Symposium for PID in Asia at
RIKEN Yokohama Institute, Dec. 11th, 2008

12. 峯岸克行 高 IgE 症候群の原因遺伝子と
病態解析 日本免疫不全症研究会 東京
2008 年 1 月 19 日

13. 峯岸克行 先天性免疫不全症の原因遺伝
子 第 9 回川野小児医学賞 受賞記念講演
川越 2008 年 3 月 1 日

14. 峯岸克行高 IgE 症候群の原因遺伝子 第
111 回日本小児科学会学術集会 教育講演
東京 2008 年 4 月 27 日

15. 峯岸克行 高 IgE 症候群の原因遺伝子同
定と Th17 細胞分化異常 第 4 回金沢大学十
全医学会 金沢 2008 年 7 月 26 日

16. 峯岸克行 高 IgE 症候群の原因遺伝子同
定と Th17 細胞分化異常 第 5 回宮崎アレ
ギー疾患研究会 宮崎 2008 年 7 月 31 日

17. 峯岸克行 高 IgE 症候群と Th17 細胞
第 10 回福岡小児感染免疫・血液カンファレ
ンス 福岡 2008 年 8 月 1 日

18. 峯岸克行 高 IgE 症候群の原因遺伝子と
易感染性の発症メカニズム第 40 回日本小児
感染症学会総会・学術集会 教育講演 名古
屋 2008 年 11 月 15 日

19. 峯岸克行 日本免疫学会 第 11 回日本
免疫学会賞受賞記念講演 原発性免疫不全
症の病因・病態の解明 第 38 回日本免疫学
会総会 京都 2008 年 12 月 2 日

(5) その他

(1) 2007 年 8 月 6 日、高 IgE 症候群の原因遺
伝子同定のニュースが、NHK テレビと朝日、
読売、毎日、日経、産経、東京などの各紙で
報道された。

(2) 日本免疫学会主催のアウトリーチ活動、
免疫ふしぎ未来 2008, 2009 において講師を
務めた。

6. 研究組織

(1) 研究代表者
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・
准教授 峯岸克行 10343154

(2) 研究分担者
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・
教授 烏山 一 60195013