

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591363

研究課題名（和文） ヒトリンパ球系細胞の分化過程に関する研究

研究課題名（英文） The molecular mechanism of human lymphopoiesis

研究代表者

高田 英俊（TAKADA HIDETOSHI）

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70294931

研究成果の概要（和文）：B細胞、NK細胞、形質細胞様樹状細胞を欠損した新規原発性免疫不全症に関して、ヒト化マウス内で病態を再現し、新たなリンパ球系細胞の分化過程を明らかにするとともに、その病態や免疫学的特徴を明らかにした。血球分化に関連する既知の遺伝子や、マイクロアレイ解析で抽出した遺伝子を解析したがこれらの候補遺伝子には異常を認めず、さらに2名の患者およびその家族のエキソーム解析を行ったが、責任遺伝子の同定には至っていない。

研究成果の概要（英文）：We clarified a new pathway of lymphoid differentiation, which was suggested by a novel primary immunodeficiency, by making humanized mice recapitulating the disease. To elucidate the responsible gene which encodes the key molecule in the development of B cells, NK cells and plasmacytoid dendritic cells, we analyzed genes which are reported to play important roles in lymphoid development. Although we further performed exome analysis of 2 patients with this disease, we have not determined the cause of this disease, yet.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：小児科学、免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：原発性免疫不全症候群、リンパ球分化、エキソーム解析

1. 研究開始当初の背景

これまで、リンパ球の分化過程は、造血幹細胞から、骨髄球系・赤芽球系共通前駆細胞（Common myelo-erythroid progenitors, CMEP）と、リンパ球系共通前駆細胞（Common lymphoid progenitors, CLP）とに分岐し、その後CLPからT細胞、B細胞、NK細胞が分

化すると考えられていた。またリンパ球系細胞と推測されている形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid dendritic cells, pDC）がどのように分化するかは解明されていない。我々は、ニューモシスティス肺炎を発症した乳児が、免疫グロブリンを欠損し、さらに、末梢血中のB細胞、NK細胞、pDCを欠損して

いる新規の原発性免疫不全症候群であることを明らかにした。患者骨髄を解析した結果、Common lymphoid progenitors と考えられている Lin⁺CD34⁺CD38⁺CD10⁺ 細胞を欠損しているにも関わらず、T 細胞は全く正常に分化しており、T 細胞機能も正常であった。即ち、各リンパ球系細胞の分化過程は、T 細胞系への分化と、それ以外のリンパ球系細胞へ分化する分岐点が存在する可能性、あるいはT細胞およびそれ以外の細胞の分化に必要な何らかの分子学的メカニズムが存在すると考えられ、リンパ球系細胞の分化において、新たな分子遺伝学的な機序の存在を示唆するものである。

2. 研究の目的

今回、この新規原発性免疫不全症候群の病態、即ちリンパ球の分化障害を解明することにより、未だ解明されていないリンパ球系細胞分化の新たなプロセス、即ちT細胞、B細胞、NK細胞、pDCなどの分化過程における分子機構を明らかにすることが、本研究の目的である。また、この新たな原発性免疫不全症候群を契機として、ヒトにおけるpDCの生体防御における意義を明らかにすることも重要な目的の1つである。

3. 研究の方法

(1) ヒト化マウスの作成

NOD/SCID/IL2R⁻・KOに患者骨髄由来CD34陽性細胞を投与し、リンパ球系細胞が再構築される8週以降にマウスを解析した。

(2) マイクロアレイを用いた遺伝子発現の特徴を基にした解析

CD34陽性細胞や骨髄系樹状細胞を純化し、患者と健常者とで発現量の異なる遺伝子を同定し、それらの塩基配列を決定した。

(3) 病態解析

pDCが欠損する病態を解明するために、種々のウイルスやToll-like receptor ligandで刺激し、その反応性、特にサイトカイン産生能を患者健常者間で比較した。

(4) Exome 解析

この疾患の責任遺伝子の同定に向けて、患者や家族からDNAを抽出し、次世代シーケンサーにてExome解析を行った。

4. 研究成果

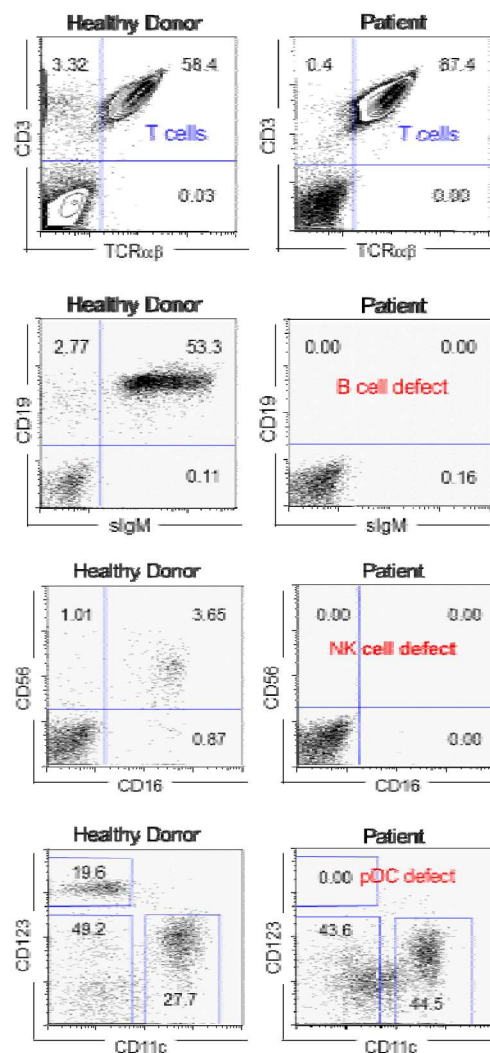
(1) B細胞、NK細胞、pDCが欠損する新規原発性免疫不全症患者の病態・末梢血/骨髄細胞の特徴

B細胞、NK細胞、形質細胞様樹状細胞を欠損した新規原発性免疫不全症を初めて明らかにした。患者は持続する咳嗽で発症し、ニューモシスティス肺炎が初発症状であった。理学的所見の特徴として、口蓋扁桃、全身の

リンパ節は欠損していた。IgG、IgA、IgMいずれも検出感度以下であった。末梢血好中球、単球、好酸球数は正常であった。

末梢血リンパ球サブセット解析の結果、CD3陽性細胞が95.3%とほとんどを占め、CD19陽性細胞、CD56/CD16陽性細胞は0.0%と欠損していた(図1)。NK細胞活性も5.6%Lysis(20.8-40.8)と欠損していた。

図1

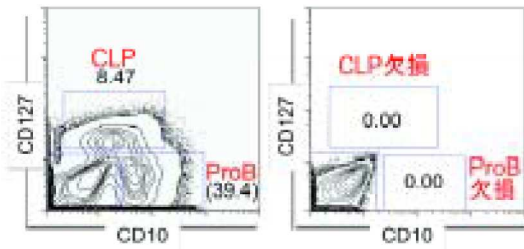


PHAに対する増殖反応は、519 S.I.(254-388)と正常であった。ST合剤投与によりニューモシスティス肺炎は治癒した。

末梢血の血球成分の分化異常に関して詳細に検討する目的で、末梢血DCをフローサイトメーターで検討したところ、pDCが欠損し、Myeloid DC (mDC)のみが認められることが判明した。

骨髄におけるリンパ球系細胞の分化に関してフローサイトメーターによる解析を行ったところCommon lymphoid progenitorとProB細胞が完全に欠損していた。(図2)

次に、末梢血中に T 細胞は正常に含まれて

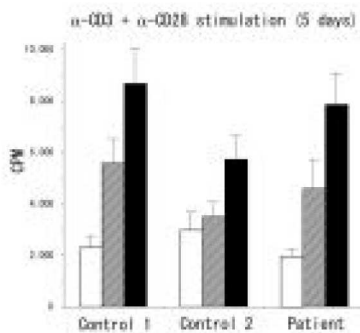


いたことから T 細胞の機能解析を行った。

図 2

末梢血単核球を抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体で 5 日間刺激した後、³H thymidine uptake を検討した結果、T 細胞の増殖能は正常であった (図 3)。

図 3



アロ抗原に対する反応性も正常に認められた。

(2) pDC 欠損の機能的解析

pDC の欠損による生体防御能の特徴を明らかにするために、患者末梢血単核球の各種のリガンドやウイルスに対する反応性を検討した結果、poly(I:C) (TLR3 ligand)、CpG ODN typeA (TLR9 ligand) に対する IL-6 産生能がそれぞれ低下していた。また Mumps ウイルス刺激後の IFN- γ 産生能も低下していた (Data not shown)。

(3) ヒト化マウスモデルの作製とその解析

この患者のリンパ球分化能が内因性に生涯されていることを明確にするために、患者骨髓由来 CD34 陽性細胞を NOD/SCID/IL2rgKO マウスに移植し、マウス内でのヒトリンパ球系細胞の分化を検討した。この患者由来 CD34 陽性細胞を移植したヒト化マウスでは、CD19 陽性細胞、pDC、NK 細胞、B 細胞が欠損していることを確認した (図 4)。このことによって、患者にみられる B 細胞、NK 細胞、pDC の欠損は、患者造血幹細胞自体に内在する分化能の障害によっておこっていることが確認された。

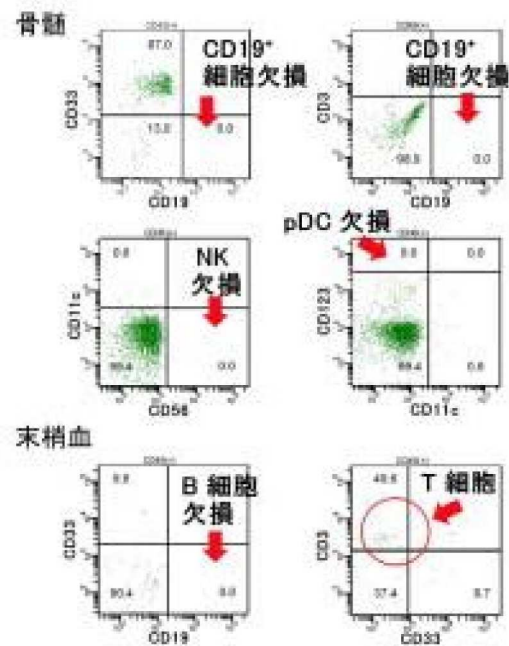
(4) 責任遺伝子の候補遺伝子のデータベースからの検討

まず血球分化に関連する遺伝子である IKAROS、BCL11A、EBF1、PU.1、E2A、FLT3、FLT3L およびこれらの分子と関連・結合する分子の遺伝子の塩基配列を決定したが異常を認めなかった。GATA2 遺伝子についても検討を行ったが異常を認めなかった。

(5) 患者 CD34 陽性細胞のマイクロアレイ解析による遺伝子発現の特徴の解析

患者骨髓細胞から CD34 陽性細胞を純化し、マイクロアレイ法にて、健常者骨髓 CD34 陽性細胞と遺伝子発現の違いを網羅的に検討した。発現の低下している遺伝子についてその機能上の特徴から責任遺伝子の可能性について検討を行ったが、候補としてリストアップした遺伝子には遺伝子変異は認められなかった (Data not shown)。

図 4



(6) エキソーム解析

同様の臨床像を呈した他の 1 名を同定したため、患者 2 名およびその家族の末梢血から DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いてエキソーム解析を行った。エキソーム解析は理化学研究所と共同で行った。

1 例目は Roche 社の方法を用いて解析を行った。23,079 の遺伝子変異から、イントロン部位、UTR 部位、synonymous 変異を除いた結果 9,309 の変異が候補として残った。さらに dbSNP135 の data base から SNP 変異を除いた結果 823 の変異が残った。日本人ゲノム

NA18943 を参考に解析し、最終的に 823 の候補遺伝子が残った。他の 1 例については Illumina の方法で解析した。90,674 の変異が認められ、同様な手法で絞り込んだ結果、最終的に 542 の候補遺伝子が残った。これらの中から分子機能を考慮して一部を選択し、塩基配列を決定したが、家族や健常者にも認められる変異であった。また 2 名の患者で共通して変異が認められた遺伝子は SIRPA のみであったが、この遺伝子の塩基配列を決定したところ、健常者や無症状の両親においても遺伝子変異が認められ、責任遺伝子とは考えられなかった。

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 28 件)

1. Minegishi Y, ---Takada H (4 番目), 他 10 名. Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *J Exp Med* 206: 1291-301, 2009
2. Tsuboi S, Takada H, 他 9 名. FBP17 Mediates a Common Molecular Step in the Formation of Podosomes and Phagocytic Cups in Macrophages. *J Biol Chem* 284: 8548-56, 2009
3. Yamaguchi K, ---Takada H (4 番目), 他 4 名. Lack of association between E148Q MEFV variant and Kawasaki disease. *Hum Immunol* 70: 468-71, 2009
4. 高田英俊、原寿郎: 自然免疫異常による免疫不全症. *臨床検査* 53: 615-620, 2009
5. 高田英俊、他 7 名: B 細胞、NK 細胞、形質細胞様樹状細胞欠損症. *臨床免疫・アレルギー科* 52: 339-343, 2009
6. 高田英俊、他 7 名: B 細胞、NK 細胞、plasmacytoid dendritic cells が欠損した新規原発性免疫不全症候群. 厚生労働省原発性免疫不全症候群に関する調査研究平成 20 年度総括・分担研究報告書 142-145, 2009
7. 高田英俊、他 7 名: 原発性免疫不全症モデルマウスの確立と応用. 厚生労働省原発性免疫不全症候群に関する調査研究平成 20 年度総括・分担研究報告書 149-152, 2009
8. Ikeda K, --- Takada H (8 番目), 他 8 名. Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 160: 246-55, 2010
9. Picard C, ---Takada H (9 番目), 他 56 名. Clinical Features and Outcome of Patients With IRAK-4 and MyD88 Deficiency. *Medicine (Baltimore)* 89: 403-425, 2010
10. Takada H, 他 5 名. NEMO mutation as a cause of familial occurrence of Behcet's disease in female patients. *Clin Genet* 78: 575-579, 2010
11. 高田英俊. PAPA syndrome, DIRA 等他の自己炎症性疾患. *医学のあゆみ* 235: 1185-1190, 2010
12. 石村匡崇、土居岳彦、高田英俊、原寿郎: 2008 年原発性免疫不全症全国疫学調査結果報告. 厚生労働省原発性免疫不全症に関する調査研究 平成 21 年度研究報告書 45-49, 2010
13. 高田英俊、他 13 名: 我が国における MSMD の臨床像、遺伝学的背景の特徴. 厚生労働省原発性免疫不全症に関する調査研究平成 21 年度研究報告書 71-75, 2010
14. 石村匡崇---高田英俊 (6 番目)、他 11 名: ヘルパー依存型アデノ・アデノ随伴ウイルスハイブリッドベクターを用いた相同組換えによる BTK 遺伝子修復研究. 厚生労働省原発性免疫不全症に関する調査研究平成 21 年度研究報告書 120-123, 2010
15. 蒲池吉朗、金兼弘和、宮脇利男、高田英俊、原 寿郎: 成人 X 連鎖無ガンマグロブリン血症患者の生活の質 (QOL) についての検討. 厚生労働省原発性免疫不全症に関する調査研究 平成 21 年度研究報告書 124-131, 2010
16. Hoshina T, Takada H, 他 7 名. Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan. 31: 309-14, 2011
17. Saito M, Nagasawa M, Takada H, 他 10 名. Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 208:235-49, 2011
18. Marcus N, Takada H, 他 13 名. Hematopoietic stem cell transplantation for CD3 δ deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 128:1050-57, 2011
19. Nakagawa N, ---Takada H (10 番目), 他 22 名. Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol*. 128:223-225, 2011
20. Tanaka N, ---Takada H (21 番目), 他 24 名. High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome patients: The results of an

- international multicenter collaborative study. *Arthritis Rheum.* 63: 3625-32, 2011
21. Rahman P, ---Takada H (10 番目), 他 10 名. Silencer of Death Domains (SODD) Inhibits Skeletal Muscle and Kidney Enriched Inositol 5-Phosphatase (SKIP) and Regulates Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/Akt Signaling to the Actin Cytoskeleton. *J Biol Chem.* 286:29758-70, 2011
 22. Ohga S, ---Takada H (5 番目), 他 10 名. Clonal origin of Epstein-Barr virus (EBV)-infected T/NK-cell subpopulations in EBV-positive T/NK-cell lymphoproliferative disorders of childhood. *J Clin Virol.* 51:31-7, 2011
 23. Ishimura M, Takada H, 他 13 名. Nationwide Survey of Patients with Primary Immunodeficiency Diseases in Japan. *J Clin Immuno.* 31: 968-76, 2011
 24. Eljaafari FM, Takada H, 他 4 名. Potent induction of IFN- γ production from cord blood NK cells by the stimulation with single-stranded RNA. *J Clin Immunol.* 31:728-35, 2011
 25. 高田英俊: 原発性免疫不全. *小児内科* 43, 269, 2011
 26. 高田英俊: IRAK4 欠損症と感染症. *小児感染免疫* 23, 81-87, 2011
 27. 石村匡崇, 山元裕之, 落合正行, 高田英俊, 原 寿郎. 相同組換えによる遺伝子修復型の遺伝子治療法の開発. *炎症と免疫* 19:228-233, 2011
 28. 石村匡崇, 土居岳彦, 高田英俊, 他 14 名. 原発性免疫不全症候群疫学調査二次調査結果 重症複合免疫不全症と高 IgE 症候群に関して. 厚生労働省原発性免疫不全症に関する調査研究 平成 22 年度研究報告書 53-58, 2011
- [学会発表] (計 23 件)
1. Hara T, Takada H, Ishimura M, Imai K, Nonoyama S, Ariga T, Tsuchiya S, Morio T, Kamachi Y, Yachie A, Nunoi H, Kobayashi M, Nakahata T, Kanegane H, and Miyawaki T: Rapid diagnostic system of primary immunodeficiency diseases in Japan. The 5th Congress of Asian Society for Pediatric Research. May 21-24, 2009. Hangzhou, China.
 2. Takada H, Inoue H, Ishimura M, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Kosaki K, Hara T: Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing characteristic triad of DiGeorge syndrome including hypoparathyroidism. The 5th Congress of Asian Society for Pediatric Research. May 21-24, 2009. Hangzhou, China.
 3. Takada H, Kikushige Y, Arinobu Y, Doi T, Ishimura M, Ishikawa F, Akashi K, Hara T: Novel primary immunodeficiency syndrome with a developmental defect of B cells, NK cells and plasmacytoid dendritic cells. The 5th Congress of Asian Society for Pediatric Research. May 21-24, 2009. Hangzhou, China.
 4. Doi T, Takada H, Hirokazu H, Toshio M, Ishikawa F, Hara T: Development of human B cells in NOD/SCID/IL2rg knock-out mice and the application of the xenotransplant model in studying X-linked agammaglobulinemia. The 5th Congress of Asian Society for Pediatric Research. May 21-24, 2009. Hangzhou, China.
 5. Doi T, Takada H, Hirokazu H, Toshio M, Tomizawa M, Saito Y, Shultz LD, Hara T, Ishikawa F: Creating a model for studying human X-linked agammaglobulinemia (XLA) using NOD/SCID/IL2rgnull mice. The 7th congress of International Society for Stem Cell Research. July 8-11, 2009. Barcelona, Spain.
 6. Takada H, Ishimura M, Doi T, Hara T: Clinical and Host Genetic Characteristics of Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease in Japan. 第 39 回日本免疫学会 2009 年 12 月 2-4 日大阪
 7. 高田英俊: CAPS の診断と治療. 第 112 回日本小児科学会-分野別シンポジウム. 2009 年 4 月 17-19 日 奈良
 8. 高田英俊, 石村匡崇, 原寿郎: B 細胞, NK 細胞, plasmacytoid dendritic cells が欠損した新規免疫不全症候群. 第 112 回日本小児科学会 2009 年 4 月 17-19 日 奈良
 9. 土居岳彦, 高田英俊, 金兼弘和, 宮脇利男, 原寿郎: ヒト化マウスにおけるヒト B 細胞解析と新規 XLA マウスモデル確率への応用. 第 112 回日本小児科学会 2009 年 4 月 17-19 日 奈良
 10. 高田英俊, 保科隆之, 大嶋宏一, 金澤 崇, 楠原浩一, 小原収, 原寿郎: Mendelian susceptibility to Mycobacterial Disease の我が国における臨床像と遺伝的背景. 第 37 回日本臨床免疫学会 2009 年 11 月 13-15 日 東京
 11. 高田英俊, 菊繁吉謙, 有信洋二郎, 土井

- 岳彦、石村匡崇、石川文彦、赤司浩一、原寿郎：B細胞、NK細胞、plasmacytoid dendritic cellsが欠損した新規原発性免疫不全症候群。厚生労働省原発性免疫不全症候群に関する調査研究班 平成20年度班会議 2009年1月30日 東京
12. 土居岳彦、高田英俊、金兼弘和、宮脇利男、石川文彦、原寿郎：原発性免疫不全症モデルマウスの確立と応用。厚生労働省原発性免疫不全症候群に関する調査研究班平成20年度班会議 2009年1月30日 東京
13. Takada H, Ishimura M, Doi T, Kanegane H, Miyawaki T, Toshiro Hara: Nation-wide survey of patients with primary immunodeficiency diseases in Japan: 2008 - The clinical characteristics of X-linked agammaglobulinemia and common variable immunodeficiency. The 14th International Congress of Immunology (ICI 2010). August 22-27, 2010, Kobe, Japan
14. Doi T, Takada H, Kanegane H, Tomizawa M, Saito Y, Miyawaki T, Watanabe T, Ohara O, Ishii E, Shultz LD., Hara T, Ishikawa F: Normal and Pathological Development of Human B Cells in NOD/SCID/IL2rgnull Mice Transplanted with Normal and BTK Gene-Mutated Human HSCs. The 14th International Congress of Immunology (ICI 2010). August 22-27, 2010, Kobe, Japan
15. Takada H, Hoshina T, Ishimura M, Doi T, Hara T. Clinical and Host Genetic Characteristics of Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease in Japan. 6th Asian Society for Pediatric Research. April 15-18, Taipei, Taiwan
16. 高田英俊、金澤 崇、保科隆之、石村匡崇、土居岳彦、大賀正一、河合朋樹、西小森 隆太、荒川浩一、中畑龍俊、原 寿郎。新規 NEMO 遺伝子異常による Mendelian susceptibility to mycobacterial infection. 第113回日本小児科学会学術集会 2010年4月23-25日 盛岡
17. 高田英俊：感染成立、維持のための宿主側因子-IRAK4欠損症と感染症-. 第42回日本小児感染症学会・学術集会シンポジウム 2010年11月27-28日 仙台
18. 石村匡崇、土居岳彦、高田英俊、原寿郎：2008年度原発性免疫不全症候群全国疫学調査結果報告。厚生労働省原発性免疫不全症候群に関する調査研究班平成21年度班会議 2010年1月29日 東京
19. Imagawa T, Nishikomori R, Takada H, N. Patel, R. Preiss, Heike T, Hara T, Yokota S: Safety and efficacy of canakinumab for 19 Japanese patients with CIASI-associated periodic fever syndrome (CAPS). EULAR 2011 May 25-28, 2011 London UK.
20. Takada H, Doi T, Ishimura M, Hara T: Potent induction of IFN-gamma production from cord blood NK cells by the stimulation with single-stranded RNA. 第40回日本免疫学会 2011年11月27-29日 千葉.
21. Ishimura M, Mizuno Y, Takada H, Doi T, Ohga S, Hara T: Diagnostic usefulness of the expression levels of interferon-stimulated genes in histiocytic necrotizing lymphadenitis. 第40回日本免疫学会 2011年11月27-29日 千葉
22. 高田英俊、Mohamed Eljaafari Fairuz、田中珠美、土居岳彦、大賀正一、原 寿郎：臍帯血NK細胞は成人末梢血NK細胞よりもTLR-8刺激によるIFN-gamma産生能が高い。第39回日本臨床免疫学会 2011.9.15-17 東京
23. 高田英俊、Mohamed Eljaafari Fairuz、田中珠美、土居岳彦、大賀正一、原 寿郎：臍帯血NK細胞は成人末梢血NK細胞よりもTLR-8刺激によるIFN-gamma産生能が高い。第43回日本小児感染症学会 2011.10.28-29 岡山
- [図書] (計0件)
- [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 該当なし
6. 研究組織
- (1)研究代表者
高田 英俊 (TAKADA HIDETOSHI)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：70294931
- (2)研究分担者
土居 岳彦 (DOI TAKEHIKO)
九州大学・大学病院・特任助教
研究者番号：20572100
- 田中 珠美 (TANAKA TAMAMI)
九州大学・大学院医学研究院・学術研究員
研究者番号：60423564