

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253063

研究課題名(和文) ヒト免疫系の制御機構解明を目指した小児免疫不全症の分子病態研究

研究課題名(英文) Genetics of immunodeficient syndrome to elucidate the human immune system

研究代表者

安友 康二 (YASUTOMO, Koji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：30333511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、小児免疫疾患の病態を解明する事を目的とし、これまで遺伝的要因が明確な家族性免疫疾患の家系およびそのサンプルを収集し、全ゲノム解析研究を実施してきた。2種類の家族性免疫不全症(家族性血球貪食症候群と特定の微生物に対する選択的免疫不全症)の原因遺伝子を連鎖解析および超高速DNAシーケンサーを用いたエクソーム解析により同定することに成功した。また、それぞれについて、人と同じ変異を持つマウスを樹立することにも成功した。マウスを用いた解析の結果、選択的免疫不全症については、人と同じ病態を再現することができたことから、今後、このマウスを用いてメカニズムの解析を計画している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to elucidate the molecular basis of immune-mediated disorders and have evaluated the genetic basis of inherited immunodeficient patients by using linkage study, homozygosity mapping and exome resequencing. We succeeded to identify the causative genes of two types of immunodeficiency syndrome and established mice that have same mutations to human patients. We identified the causative mutation in selective immunodeficient syndrome and established the knock-in mice. The knock-in mice showed similar defect in the protection against staphylococcus aureus. We are now assessing the molecular mechanism of this defect by using this knock-in mice.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫不全 遺伝解析 細菌感染

1. 研究開始当初の背景

免疫疾患は複数遺伝子の発現・機能異常に感染症などの環境要因が加わって発症する多因子疾患と考えられている。そのため、その遺伝的素因を明らかにすることは困難を極める。しかし、単一遺伝子の異常で発症する疾患については、近年の超高速 DNA シークエンサーの発展により、少ない家系数であったとしても、原因遺伝子変異を見いだすことが可能になりつつある。また、従来の単一遺伝性疾患の原因遺伝子同定研究の成果は、単一遺伝性疾患の病態を解明するだけではなく、生体制御の基本原則の発見や多因子疾患の病態解明にも大きなインパクトを与えてきた。

小児期に発症する自己免疫疾患あるいは免疫不全症に代表される慢性的なリンパ球の過剰活性化あるいは機能不全に起因する疾患群は、難治的で慢性の経過を辿ることから、その病態を明らかにし、疾患特異的な治療法を開発することは急務の課題である。申請者らは、小児免疫疾患の病態を解明する事を目的とし、これまで遺伝的要因が明確な家族性自己免疫疾患および免疫不全疾患の家系およびそのサンプルを収集し、原因遺伝子の同定からヒト免疫系の恒常性維持に重要な役割を担う分子経路を明らかにするとともに、動物モデルを用いて各遺伝子の機能的意義を明らかにしてきた(Nature Genetics 2001, Ann Rheum Dis 2007, Nature Immunol 2008, J Clin Invest 2011)。

2. 研究の目的

以上の研究背景から、今回の提案では、原因不明であった2種類の家族性免疫不全症の原因遺伝子を連鎖解析、ホモ接合体マッピングおよび超高速 DNA シークエンサーを用いたエクソーム解析により同定(1疾患については同定済み;未発表)し、免疫疾患の発症に決定的な役割を担う原因遺伝子および分子ネットワークを解明することを目標とする。

小児遺伝性免疫不全症の原因遺伝子を同定することを目指した本研究の成功は、疾病の発症に決定的な役割を担う分子の同定と同義であり、ヒト免疫システムの基本原理あるいは破綻機構の解明に大きなインパクトをもたらすと思われる。その知見は、2つの免疫不全症の治療法の開発にも結びつくとともに、他のヒト免疫疾患の原因解明にも大きく寄与しうると期待できる。

3. 研究の方法

- (1) 家族性血球貪食症候群(FHL)の新たな原因遺伝子(FHL6)の機能を解明するために、変異 FHL6 を持つノックインマウスを樹立(既に樹立済み)して、FHL6 の機能を解明する。さらに、FHL6 の細胞内における機能的意義について明らかにする。
- (2) 特定の微生物に対する免疫応答のみが欠落した免疫不全症の候補遺伝子の中から、原因遺伝子変異を、家系内健常同胞サンプルを追加して選別する。同定した遺伝子機能について、遺伝子改変マウスを明らかにするとともに、微生物の認識様式についても明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 家族性血球貪食症候群(FHL)

FHL の原因変異として同定した遺伝子のノックイン(FHL6)マウスを樹立したところ、FHL6 マウスでは、著明な造血不全を呈することが明らかになった。造血としては、リンパ球、赤血球の低下が顕著であった。

骨髄象を観察したところ、マクロファージによる血球貪食像は一部観察することができたが、それほど顕著な貪食像は観察することができなかった。

マウスに CpG を投与すると血球貪食像が増加することが知られていることから、FHL6 マウスに CpG を投与して骨髄像を検討した。しかし、マウスの造血自体が障害されていることから、貪食像の増加は観察することがで

きなかった。

以上から、FHL6 は血球貪食症候群の原因変異と考えられるものの、FHL6 マウスでは造血自体に障害があることからその病態を観察することができないと考えられた。その問題点を克服するためには、マクロファージのみで FHL6 変異を持つマウスを作製することが必要であると考えられる。

(2)特定の病原体に対する選択的な免疫不全症候群

麻疹ウイルスおよびブドウ球菌に対して選択的な免疫不全を来す家系例を用いたゲノム解析研究を実施し、その候補変異として 6 種類の変異を同定した。その 6 種類の遺伝子について、機能から候補を絞り込むことができなかったことから、同変異を持つノックインマウスを 6 種類樹立した。

ノックインマウスを樹立後に、バージョンアップしたゲノムデータベースを用いて、再度ゲノム解析を実施したところ、6 種類の変異のうち、4 種類については機能的に変化を持たない変異であると推測されたことから、残った二種類の変異についての解析をすすめた。

一種類のマウスについては、匹数を確保することができたことから黄色ブドウ球菌に対する感染抵抗性を検討した。その結果、まだ実験回数はすくないことから確実なデータではないが、ノックインマウスで感染抵抗性が減弱しているという結果が得られた。

しかし、この実験は感染後 3 日後に、皮下に移入した黄色ブドウ球菌の菌数と膿瘍のサイズをみるという研究手法である。今後は、感染後 7~10 日後に抗体産生についても検討する必要がある。もう一種類のマウスについては、匹数を増やしている段階である。

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〕(計 6 件)

- (1) Furukawa T, Ishifune C, Tuskumo SI, Hozumi K, Maekawa Y, Matsui N, Kaji R, Yasutomo K. Transmission of survival signals through Delta-like 1 on activated CD4+ T cells. *Sci Rep* 6:33692 (2016) (査読あり)
- (2) Okamura K, Kitamura A, Sasaki Y, Chung DH, Kagami S, Iwai K, Yasutomo K. Survival of mature T cells depends on signalling through HOIP. *Sci Rep* 6:36135 (2016) (査読あり)
- (3) Kurihara T, Arimochi H, Bhuyan ZA, Ishifune C, Tsumura H, Ito M, Ito Y, Kitamura A, Maekawa Y, Yasutomo K. CD98 heavy chain Is a potent positive regulator of CD4+ T cell proliferation and interferon- γ production in vivo. *PLoS One* 10:e0139692 (2015) (査読あり)

(4) 安友康二

新たな家族性自己炎症性疾患の責任遺伝子の同定
臨床免疫アレルギー科 63 巻 5 号
Page436-440 (2015) (査読なし)

(5) 安友康二

【自然免疫による炎症制御機構】NLRC4 と自己炎症性症候群(解説/特集) 炎症と免疫 (0918-8371)24 巻 1 号
Page24-28(2015) (査読なし)

(6) 安友康二

新たに発見された自己炎症性疾患の原因遺伝子(解説) 感染・炎症・免疫 (0387-1010)45 巻 3 号 Page185-192(2015) (査読なし)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
該当無し

〔その他〕

ホームページ等

<http://immunology.hosp.med.tokushima-u.ac.jp/immunology/system/top/>

6．研究組織

(1)研究代表者

安友 康二 (YASUTOMO, Koji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：30333511