

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09640

研究課題名(和文) 高IgM症候群の原因遺伝子同定によるヒト免疫グロブリンクラススイッチ機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of human immunoglobulin class switch recombination mechanism by the identification of causative gene for hyper-IgM syndrome

研究代表者

今井 耕輔 (IMAI, Kohsuke)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授

研究者番号：90332626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高IgM症候群(HIGM) 4型を含む抗体産生不全症に対する全エクソン解析の結果、20遺伝子の異常症を明らかにした。T細胞新生能を示すTREC低下群から、活性化PI3K 症候群(APDS)1型患者22例を同定した。移行B細胞・濾胞T細胞・形質芽細胞の増加、CD4ヘルパーT細胞の減少が特徴であり、診断に有用であること、長期無イベント生存率が39.6%と不良であり、造血幹細胞移植が有効であることを示した。血清のIgG2低下が90%に見られ、試験管内でもIgG2の産生異常を確かめたが、活性化したPI3K がIgG2クラススイッチを阻害する機構については、今後の検討課題である。

研究成果の概要(英文)：Whole exome sequencing of primary antibody deficiency including hyper-IgM syndrome (HIGM) type 4 revealed the mutations in 20 genes. Twenty-two patients with activated PI3K syndrome (APDS) type 1 were identified from the low-TREC group. Increased transitional B cells / follicular T cells / plasmablasts and decreased CD4 helper T cells were useful for diagnosis. Long-term event-free survival was poor, but hematopoietic stem cell transplantation was effective. Low serum IgG2 was observed in 90%, and IgG2 class switch recombination was impaired in vitro. How activated PI3K inhibits IgG2 class switch will be analyzed in the future.

研究分野：原発性免疫不全症

キーワード：原発性免疫不全症 免疫グロブリンクラススイッチ 抗体産生不全症

1. 研究開始当初の背景

ヒト IgCSR の機構は、その異常を示す疾患である HIGM の原因遺伝子の同定により、説明が進んできている。申請者らは、T 細胞上の CD40L が B 細胞上の CD40 に結合し、シチジンデアミナーゼである AID を誘導し、ゲノム上の Ig スイッチ (S) 領域のシチジンをウリジンに変換することで、塩基除去修復系 (UNG など) (Nat Immunol, 2003)、ミスマッチ修復系 (MMR: PMS2, MSH6 など) (JEM, 2008; J Immunol, 2012) を作動させ、その修復過程で遠方にある別のクラス (たとえば IgE) の S 領域と結合し、IgM の定常領域を切り取ることで、IgCSR が成立することを、それぞれの遺伝子異常患者を発見することにより明らかにしてきた。さらに AID の C 末が欠損した場合、dominant negative 効果により、ヘテロ変異でも、IgCSR 障害を来すことから、C 末に結合する蛋白が、IgCSR 時の DNA 損傷修復に関わることを発見した (Clin Immunol, 2005)。HIGM4 の中でメモリー B 細胞が減少している一群では、放射線感受性が高く、 μ -S 接合部に microhomology を利用していることから、非同相末端修復 (NHEJ) 障害を来していることも見出している (JEM, 2007; PNAS, 2010)。また、S 領域の体細胞突然変異を解析することにより、IgCSR 障害の有無とその機構を明らかにすることができることを見出した (PNAS, 2010; JACI, 2014)。一方、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を多数例に行うことで、いくつかの原因遺伝子候補を見出していた。

2. 研究の目的

今回の研究では、原発性免疫不全症である高 IgM 症候群 (HIGM) の病態解明、および原因遺伝子の同定とその機能解析により、ヒト免疫グロブリンクラススイッチ再構成 (IgCSR) 機構を解明することを目的とした。HIGM の中で 4 型 (HIGM4: OMIM608184) は、申請者らが 2003 年に提唱した疾患群であり、B 細胞特異的な IgCSR 障害を来す疾患である (Imai, J Clin Invest, 2003)。今回の研究では、すでに行った国内 HIGM 症例の次世代シーケンサー (NGS) による全エクソン解析の結果を用いた原因遺伝子の同定と、NGS によるアンプリコンシーケンシング技術を使った B 細胞受容体、T 細胞受容体のレパトア、体細胞突然変異 (SHM) 解析、生化学的、免疫学的機能解析を通じ、ヒト IgCSR 機構の解明を行うこととした。

3. 研究の方法

患者および両親のトリオ全エクソン解析により、原因遺伝子の同定を行う。原因と考えられる遺伝子変異が同定された場合、mRNA レベル、蛋白レベルでの変異の影響について検討し、蛋白の機能異常について、生化学的、免疫学的方法により解析する。さらに、細胞株などを用い、原因遺伝子を導入することによる機能回復実験を行う。またすでに同定さ

れている PI3K 経路、NF κ B 経路、については、シグナル伝達異常についての検討を行う。免疫グロブリン遺伝子、T 細胞受容体のゲノム解析についても、Taqman 法による定量 PCR、NGS を用いたアンプリコンシーケンシングを行う。10 カラー FACS を用い、T 細胞、B 細胞の亜分画の異常の有無についても検討する。

4. 研究成果

(1) 全エクソンシーケンシングによる HIGM4 原因遺伝子の同定: 20 遺伝子の異常症については、14 本の論文にまとめて報告しており、さらに投稿後修正中、投稿準備中である。それ以外の未同定の患者については、家系分析を加え、同定を試みた。新たに B 細胞欠損と円盤状ループスを伴う症例で、新規遺伝子を発見し、興味深い複数の新規遺伝子を同定しており、その蛋白発現、機能異常についても検討中である。

(2) TREC 陰性 HIGM4 である APDS の臨床的解析:

APDS1 型 23 例の解析を行い、IgG2 の低下が 90% に見られ、IgA, IgG3, G4 については、半数の症例で低下していた。約半数で、HIGM の表現型を呈していた。移行 B 細胞・濾胞 T 細胞・形質芽細胞の増加、CD4 ヘルパー T 細胞の減少が特徴であることを同定し、これら細胞分画を含む詳細なリンパ球分画の解析は APDS の早期診断に有効であることを明らかにした。長期無イベント生存率 (造血幹細胞移植を要するような重篤な感染症・リンパ増殖症を発症せずに生存した確率) が 30 歳時点で 39.6% と、およそ 6 割の患者が非常に重篤な経過を辿ることが明らかになった。特に重篤な 9 例に対して造血幹細胞移植が施行され、感染やリンパ増殖症・腸炎が全ての症例で改善し、7 例が移植後生存していたが、およそ 9 割の移植において移植関連合併症が問題となり、また 4 割の移植において移植細胞の拒絶・生着不全を発症していた。これらは APDS に対する造血幹細胞移植療法に特徴的な問題点であり、今後さらに本疾患に最適化した移植療法の開発が望まれる (Okano T, JACI, 2018)。

(3) HIGM4 の病態解析: 定量 PCR による germline, functional, circle transcript の評価法の検討: in vitro CSR を検討する際、特に、APDS のようなシグナル伝達異常の際、どこが阻害され、クラススイッチが阻害されているかをみるためにも、germline, functional, circle transcript について、刺激サイトカイン毎、各 Ig クラス毎に検討が必要である。APDS1 患者では、sCD40L+IL10, IL21 刺激時の AID 転写の低下、IgG2, G4 の胚細胞型転写 (GLT)、機能型転写 (FT) の誘導低下が見られた。ただ、IgG1/2, IgA1/2 の環状転写 (CT) は、配列の相同性が高いため、定量 PCR での検討では、分別することができなかった。

また、TREC_s 低値を示した APDS 患者 2 例で、

V(D)J 領域の配列解析、IgV-SHM の変異塩基解析を NGS により行ったが、健常者との大きな違いは認めなかった。

(4) APRIL 遺伝子異常症の同定: IgA クラススイッチ異常を伴う抗体産生不全症患者で APRIL 遺伝子異常を世界ではじめて同定した。遺伝子変異により、細胞内の mRNA も検出されず、細胞内の APRIL 蛋白も検出されず、血漿中の可溶性 APRIL も検出されず、完全欠損症と考えられた。本患者では、IgA 欠損に加え、IgM 低下を伴っており、形質細胞欠損も伴っているため、BCMA を介した形質細胞分化障害によるものと考えられた。詳細な解析は今後行っていく予定である。

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](計 20 件)

Okano T, Imai K, Morio T. (2 番目) 他 53 名. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Progressive Combined Immunodeficiency and Lymphoproliferation in Activated PI3K <delta> Syndrome Type 1. J Allergy Clin Immunol. 2018, 査読有 doi: 10.1016/j.jaci.2018.04.032.

Nakagawa R, Imai K, Morio T. (4 番目) 他 5 名 Type 1 diabetes mellitus associated with activated phosphatidylinositol 3-kinase delta syndrome, type 2. J Diabetes. 10(5):421-422. 2018, 査読有 doi: 10.1111/1753-0407.12638.

Okano T, Imai K, Morio T. (12 番目) 他 13 名 Droplet Digital PCR-Based Chimerism Analysis for Primary Immunodeficiency Diseases. J Clin Immunol. 38(3):300-306. 2018 査読有 doi: 10.1007/s10875-018-0497-8.

Asano T, Imai K, Kobayashi M. (11 番目) 他 14 名 Enhanced AKT Phosphorylation of Circulating B Cells in Patients With Activated PI3K Syndrome. Front Immunol, 5;9:568. 2018 査読有 doi: 10.3389/fimmu.2018.00568.

Kadowaki T, Imai K, Kanegane H. (13 番目) 他 19 名 Haploinsufficiency of A20 causes autoinflammatory and autoimmune disorders. J Allergy Clin Immunol. 141(4):1485-1488. 2018 査読有 doi: 10.1016/j.jaci.2017.10.039.

Kaneko R, Imai K, Isoyama K. (8 番目) 他 8 名 Wiskott-Aldrich syndrome that was initially diagnosed as immune thrombocytopenic purpura secondary to a cytomegalovirus infection. SAGE Open Med Case Rep. 9;6:2050313X17753788. 2018. 査読有 doi: 10.1177/2050313X17753788.

Slack J, Imai K, Gennery AR; Inborn Errors Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation; European Society for Immunodeficiencies, Stem Cell Transplant for Immunodeficiencies in Europe (SCETIDE), the Center for International Blood and Marrow Transplant Research,; Primary Immunodeficiency Treatment Consortium.(25 番目) 他 50 名 Outcome of Hematopoietic Cell Transplantation for DNA-Double Strand Breakage Repair Disorders. J Allergy Clin Immunol. 141(1):322-328.e10. 2018 査読有 doi: 10.1016/j.jaci.2017.02.036.

Okano T, Imai K, Morio T. (14 番目) 他 15 名 Maternal T and B cell engraftment in two cases of X-linked severe combined immunodeficiency with IgG1 gammopathy. Clin Immunol. 183:112-120. 2017 査読有 doi: 10.1016/j.clim.2017.08.003.

Hoshino A, Imai K, Kanegane H. (20 番目) 他 26 名. Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in human subjects with germline IKZF1 mutations J Allergy Clin Immunol. 140(1):223-231. 2017. 査読有 doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.029.

Takagi M, Imai K, Morio T. (22 番目) 他 22 名. Haploinsufficiency of TNFAIP3 (A20) by germline mutation is involved in autoimmune lymphoproliferative syndrome. J Allergy Clin Immunol. 139(6):1914-1922. 2017. 査読有 doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.038.

Sekinaka Y, Imai K, Nonoyama S. (3 番目) 他 19 名. Common Variable Immunodeficiency Caused by FANCMutations. J Clin Immunol. 37(5):434-444. 2017. 査読有 doi: 10.1007/s10875-017-0396-4.

Takashima T, Imai K, Morio T. (11 番目) 他 10 名. Multicolor Flow Cytometry for the Diagnosis of Primary Immunodeficiency Diseases. J Clin Immunol. 37(5):486-495. 2017. 査読有 doi: 10.1007/s10875-017-0405-7.

Coulter TL, Imai K, Cant AJ. (37 番目) 他 55 名. Clinical spectrum and features of activated phosphoinositide 3-kinase syndrome: A large patient cohort study. J Allergy Clin Immunol. 139(2):597-606.e4. 2017. 査読有 doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.021.

Goto F, Imai K, Onodera M. (4 番目)

他3名. Persistent Impairment of T-Cell Regeneration in a Patient with Activated PI3K Syndrome. *J Clin Immunol.* 37(4):347-350. 2017. 査読有 doi: 10.1007/s10875-017-0393-7. Tsujita Y, Imai K, Nonoyama S. (3 番目) 他29名. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause activated phosphatidylinositol 3-kinase syndrome-like immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 138(6):1672-1680.e10. 2016. 査読有 doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.055. Elkaim E, Imai K, Kracker S. (4 番目) 他40名. Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide 3-kinase syndrome 2: A cohort study. *J Allergy Clin Immunol.* 138(1):210-218. e9. 2016. 査読有 doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.022. Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Nonoyama S. (2 番目) 他5名. Clinical features and hematopoietic stem cell transplantations for CD40 ligand deficiency in Japan. *J Allergy Clin Immunol.* 136(4):1018-1024. 2015. 査読有 doi: 10.1016/j.jaci.2015.02.020. Kato T, Imai K, Nonoyama S. (14 番目) 他12名. RAG1 deficiency may present clinically as selective IgA deficiency. *J Clin Immunol.* 35, 280-288. 2015. 査読有 doi: 10.1007/s10875-015-0146-4. Wehr C, Imai K, Rizzi M. (25 番目) 他38名. Multicenter experience in hematopoietic stem cell transplantation for serious complications of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 135(4):988-997.e6. 2015. 査読有 doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.029. Mitsuiki N, Imai K, Morio T. (7 番目) 他10名. Mutations in Bruton's tyrosine kinase impair IgA responses. *Int J Hematol.* 101(3): 305-313. 2015. 査読有 doi: 10.1007/s12185-015-1732-1.

[学会発表](計 24 件)

Yeh TW, Okano T, Okamoto K, Yamashta M, Takashima T, Mitsuiki N, Okada S, Kaneganwe H, Imai K, Morio T. APRIL deficiency as a cause of common variable immunodeficiency The 2nd APSID Scientific Congress. 2018.05.04 Okamoto K, Shigemizu D, Okano T, Yeh TW, Takashima T, Yamashita M, Ono S, Mitsuiki N, Takagi M, Mori M, Kanegane

H, Tsunoda T, Imai K, Morio T. Gwhole exome sequence analysis using the known and candidate genes for primary immunodeficiency diseases. The 2nd APSID Scientific Congress. 2018.05.04 今井耕輔, 免疫不全の新生児マススクリーニング(招待講演)第121回日本小児科学会学術集会. 2018.04.20 本間あおい, 金兼弘和, 廣木遙, 岡野翼, 谷田けい, 今井耕輔, 高木正稔, 渡辺昭充, 渡部誠一, 森尾友宏. IgA および IgG サブクラス欠損症としてフォローされていた ICF 症候群の姉妹例 第121回日本小児科学会学術集会. 2018.4.20.

小倉 友美, 加藤 環, Rawat Amit, 釜江 智佳子, 今井 耕輔, 野々山 恵章, 重症複合免疫不全症及び毛細血管拡張性運動失調症の迅速遺伝子診断. 第121回日本小児科学会学術集会. 2018.4.20. 廣木遙, 岡野翼, 今井耕輔, 井上真依子, 宮本智史, 井上健斗, 星野顕宏, 柳町昌克, 高木正稔, 梶原道子, 金兼弘和, 森尾友宏. 活性化 PI3K 症候群 1 型に対する HLA 一致非血縁者間骨髄移植 第40回日本造血細胞移植学会総会 2018.02.02

西村聡, 青木由貴, 石渡泰芳, 松本和明, 廣木遙, 小野真太郎, 岡野翼, 宮本智史, 足洗美穂, 星野顕宏, 田中真理, 宮脇零士, 小林千佳, 手束真理, 大川哲平, 満生紀子, 遠藤明史, 小野敏明, 磯田健志, 宮澤大輔, 長澤正之, 水谷修紀, 安原真人, 梶原道子, 柳町昌克, 高木正稔, 金兼弘和, 今井耕輔, 森尾友宏. 原発性免疫不全症に対する FlUbu と FlUme1 による前処置法に比較検討 第40回日本造血細胞移植学会総会 2018.02.02

蒸野寿紀, 田村志宣, 山下友佑, 三嶋博之, 南弘一, 月野隆一, 鈴木啓之, 吉浦孝一郎, 今井耕輔, 森尾友宏, 園木孝志, Evans 症候群および低ガンマグロブリン血症を発症した歌舞伎症候群の一例 第1回日本免疫不全・自己炎症学会総会学術集会 2018.01.20

田村志宣, 春谷勇平, 小畑裕史, 山下友佑, 蒸野寿紀, 細井裕樹, 村田祥吾, 西川彰則, 吉浦孝一郎, 今井耕輔, 森尾友宏, 園木孝志, Successful cord blood transplantation in a patient with adult-onset common variable immunodeficiency 第1回日本免疫不全・自己炎症学会総会学術集会 2018.01.20

山下基, 満生紀子, 岡田賢, 井上裕三朗, 中世古知昭, Aditya K. Padhi, Kam Y Zhang, 小原收, 今井耕輔, 高木正稔, 金兼弘和, 谷内一郎, 森尾友宏. IKZF3 ヘテロ結合型ミスセンス変異による B 細

- 胞欠損症 第1回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会 2018.01.20
高木正稔, 小川淳, 今井耕輔, 金兼弘和, 森尾友宏. 生殖細胞 PAX5 変異による家族性急性リンパ性白血病発症患者における免疫機能の評価 第1回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会 2018.01.20
- 座波清誉, 加藤環, 今井耕輔, 森尾友宏, 上田耕一郎, 谷内昇一郎, 川原勇太, 森本哲, 樋渡光輝, 片岡伸介, 村松秀城, 大杉夕子, 野々山恵章, WHIM 症候群 8 例の臨床的特徴、免疫学的解析について 第1回日本免疫不全・自己炎症学会総会学術集会 2018.01.21
- 吉本優里, 山中純子, 末永祐太, 田中瑞恵, 瓜生英子, 平井理央, 佐藤典子, 星野顕宏, 今井耕輔, 金兼弘和, 七野浩之. リンパ節腫大を契機に見つかった CTLA4 ハプロ不全症 第59回日本小児血液・がん学会学術集会 2017.11.11
今井耕輔. SCID 重症複合免疫不全症、その新生児マススクリーニングと治療 第59回日本小児血液・がん学会学術集会 2017.11.10
- 今井耕輔. 原発性免疫不全症・自己炎症性疾患において考慮すべき遺伝医療の特性と課題 第59回日本小児血液・がん学会学術集会 2017.11.09
- 加納友環, 森口直彦, 葉姿汶, 岡野翼, 金兼弘和, 今井耕輔, 森尾友宏. 反復する単純ヘルペスウイルス感染、爪白癩癬、脱毛を特徴とする NF-kB2 欠損症 (CVID10) の1例 第49回日本小児感染症学会学術集会 2017.10.21
- Imai K. Newborn Screening of PID in japan APSID 2017 Autumn School 2017.10.10
- 今井耕輔, 寺田尚美, 森尾友宏. スペクトル型セルアナライザーを用いた ヒト免疫細胞分化状態診断法の検討 第45回日本臨床免疫学会 2017.09.28
- 今井耕輔. 機能獲得型変異による慢性炎症と免疫不全症. 第45回日本臨床免疫学会 2017.09.29
- 谷田けい, 岡野翼, 葉姿汶, 星野顕宏, 柳町昌克, 高木正稔, 今井耕輔, 白石暁, 石村匡崇, 高田英俊, 大賀正一, 大島孝一, Christoph Klein, 金兼弘和, 森尾友宏. 全エクソーム解析で同定された非典型的 X 連鎖重症複合免疫不全症の成人例. 第8回関東甲越免疫不全症研究会 2017.9.23
- 21 今井耕輔, Kabuki 症候群における免疫不全症, 第8回関東甲越免疫不全症研究会 2017.9.23
- 22 Kadowaki T, Ohnishi H, Kanegane H, Kawamoto N, Hori T, Nishimura K, Kobayashi C, Shigemura T, Ogata S, Inoue Y, Kawai T, Hiejima E, Takagi M, Imai K, Nishikomori R, Ito S, Heiki T, Ohara O, Morio T, Fukao T. A Nation-wide Survey of Haploinsufficiency of A20 Reveals the Frequent Coincidence of Autoimmunity in Japan. ESID 2017. 2017.09.13
- 23 Okano T, Imai K, Mitui-Sekinaka K, Yeh T.W, Takashima T, Kanegane H, Nonoyama S, Morio T. Combined Immunodeficiency and Progressive Lymphoproliferative Diseases of Activated P13K Syndrome Rescued by Hematopoietic Stem Cell Transplantation. ESID 2017 2017.09.12.
- 24 Imai K. HSCT for PID:over 30years of experience in japan. Asia Pacific Society for Immunodeficiencies APSID 2017 summer school. 2017.5.31.
- 〔図書〕(計 6 件)
- 原発性免疫不全症候群診療の手引き 診断と治療社 2017.4
- ・岡野翼, 今井耕輔 X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) p10-13
 - ・岡本圭祐, 今井耕輔 その他の複合免疫不全症 (CID) p20-24
 - ・今井耕輔 分類不能型免疫不全症 (CVID) p62-64
 - ・関中佳奈子, 今井耕輔 高 I g M 症候群 p65-68
- 小児科ケースカンファレンス 小児科診療 80 巻増刊 診断と治療社 2017.4
今井耕輔 Wiskott-Aldrich 症候群 p138-142
- 遺伝学的検査・診断・遺伝カウンセリングの上手な進めかた 診断と治療社 2016.9 今井耕輔 原発性免疫不全症 p107-110
- 新領域別症候群シリーズ No36 免疫症候群 (第2版) 2016.3 日本臨牀社
- ・岡野翼, 今井耕輔, 金兼弘和 γ c 欠損症 (X 連鎖重症複合免疫不全症) p16-19
 - ・山下基, 今井耕輔, 金兼弘和 JAK3 欠損症 p20-24
 - ・大川哲平, 今井耕輔 CD3 欠損症 p87-89
 - ・岡本圭祐, 今井耕輔, 金兼弘和 Omenn 症候群 p175-178
 - ・岡本圭祐, 今井耕輔 DOCK2 欠損症 p76-79
 - ・岡本圭祐, 今井耕輔 Coronin-1A 欠損症 p43-47
 - ・岡本圭祐, 今井耕輔 CD3 欠損症 p39-42
 - ・田中桂輔, 今井耕輔 CD45 欠損症 p29-32
 - ・田中桂輔, 今井耕輔 CD3 欠損症 p33-35
 - ・田中桂輔, 今井耕輔 CD3 epsilon 欠損症 p36-38
- 今井耕輔 造血因子とサイトカイン. 小

児血液・腫瘍学.診療と治療社.2015.11;
6-10
今井耕輔. iPS細胞を用いた難病研究－
臨床病態解明と創薬に向けた研究の最
新知見(第4章)血液・免疫疾患 原発
性免疫不全症 遺伝子医学 MOOK.
2015.02; (27): 152-157.

〔産業財産権〕該当なし

〔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

今井 耕輔 (IMAI, Kohsuke)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・寄附講座准教授

研究者番号：90332626