

令和元年6月14日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05356

研究課題名(和文) エクソーム解析による原発性免疫不全症の病因の解明

研究課題名(英文) Exome analysis identified a molecular origin of primary immunodeficiency

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：原発性免疫不全症は先天性の免疫系遺伝子の変異により免疫不全、アレルギー、発がん等の症状を呈する。その1つ高IgE症候群の原因がSTAT3遺伝子のドミナントネガティブ変異であることを、我々が世界で最初に明らかにしたが、原因不明の高IgE症候群症例が約30%残されている。そこで、我々は、100例のSTAT3等の疾患原因遺伝子に異常を有さない高IgE症候群のエクソーム解析を実施し、詳細なin silico, in vitro, in vivoの解析を実施することにより、新規の原因遺伝子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高IgE症候群は、単一遺伝子の異常により黄色ブドウ球菌感染症、骨粗鬆症、アトピー性皮膚炎、高IgE血症などの臨床的に重要で頻度の高い疾患を呈する。そのため、高IgE症候群の新規原因遺伝子の同定は、高IgE症候群の早期診断、予後の予測、治療法選択に貢献するだけでなく、黄色ブドウ球菌感染症、骨粗鬆症・アトピー性皮膚炎などの一般的な疾患の新規診断法、治療法・予防法の発見に結び付く可能性があるため、高IgE症候群新規原因遺伝子の発見は、学術的意義・社会的意義共に大きい。

研究成果の概要(英文)：Human primary immunodeficiency is characterized by immunodeficiency, allergy, and cancer, which is caused by a mutation in a gene expressed in immune systems. We identified hyper-IgE syndrome is caused by dominant negative mutations of the STAT3 gene. We still do not know the molecular origins of 30 percent of hyper-IgE syndrome patients. To identify a novel molecular origin of hyper-IgE syndrome, we performed exome analysis of 100 hyper-IgE patients without mutations in the known molecular origins of hyper-IgE syndrome. We extensively performed in silico, in vitro, and in vivo analysis and identified novel causing gene of hyper-IgE syndrome.

研究分野：小児科学

キーワード：免疫不全症 アレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原発性免疫不全症は、免疫系に発現する遺伝子の先天異常が原因で発症する疾患で、各種の感染症に対する易感染性を中心症状とし、免疫調節の異常によるアレルギー・自己免疫疾患、免疫学的監視機構障害による発癌を高頻度に合併する。遺伝子改変マウスを用いた研究が、免疫系遺伝子の生体内機能を明らかにしてきたように、ヒト原発性免疫不全症は“Experiment of Nature”としてヒト免疫系遺伝子の生体内機能解明に大きな貢献を果たしてきた。最近のゲノム解析技術の進歩により、全エクソンシーケンス法が可能になり、これを原発性免疫不全症の患児に適用することにより、その新規の原因遺伝子を同定することを目的とした本研究を実施した。

2. 研究の目的

高 IgE 症候群は、ほぼ全例でアトピー性皮膚炎・血清 IgE 高値を呈し、高頻度に黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍と肺炎に罹患し、骨粗鬆症や易骨折性などの骨異常を合併する原発性免疫不全症である。高 IgE 症候群は、アトピー、黄色ブドウ球菌感染症、骨粗鬆症など臨床的に重要な疾患と同様の臨床症状を単一遺伝子異常により発症する。その原因は 40 年以上にわたり世界的にも全く明らかにされていなかったが、我々がその主要な原因が STAT3 遺伝子のドミナントネガティブ変異であることを世界に先駆けて明らかにした (Minegishi *et al.*, *Nature*, 2007)。その後の研究により高 IgE 症候群の約 3 分の 2 は STAT3-DN 変異により発症することが明らかにされたが (Holland *et al.*, *New Engl J Med* 2007)、残りの約 3 分の 1 に関してはその原因はほとんど明らかにされていない。高 IgE 症候群にはいくつかの病型が存在し、いわゆる 1 型のもは、アトピー・黄色ブドウ球菌感染症に加えて、骨・軟部組織の異常を合併しその主要な原因は STAT3-DN である。2 型はアトピー・黄色ブドウ球菌感染症に加えて単純ヘルペスによるウイルス感染症を発症するが骨・軟部組織の異常は合併せず、その原因には TYK2 欠損 (Minegishi *et al.*, *Immunity*, 2006) DOCK8 欠損 (Zhang *et al.*, *New Engl J Med* 2009)、PGM3 欠損 (Zhang *et al.*, *JACI* 2014) がある。さらに、実際に高 IgE 症候群患児の遺伝子診断を実施してみるとアトピーと高 IgE 血症に易感染性を合併する高 IgE 症候群の周辺の症例が多数存在することが明らかになった。この中には非典型的な臨床症状を呈する Omen 症候群、Netherton 症候群、Wiskott-Aldrich 症候群、複合型免疫不全症等が含まれる。我々は、高 IgE 症候群 1 型の主要な原因遺伝子 STAT3 を発見し、さらに原因不明の高 IgE 症候群の新規原因遺伝子を見出すために、約 100 例の高 IgE 症候群患児の DNA、cDNA 末梢血単核球等の患者由来検体を蓄積した。本研究ではこのサンプルを用いて全エクソンシーケンス法により、高 IgE 症候群とその周辺の原因遺伝子不全症の新規原因遺伝子を同定することを目的とした。

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 (Tyrosine kinase 2)、DOCK8 (Dedicator of cytokinesis 8)、PGM3 (Phosphoglucosyltransferase 3) 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行う。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をフィルタリングした。

4. 研究成果

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 個のステップから構成される。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、日本人を対象にした 1000 人ゲノムプロジェクトである Human Genetic Variation Browser (HGVD) と世界最大規模の遺伝子多型データベース 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。

患児の末梢血由来のゲノム DNA を Agilent 社の SureSelect Human を用いてエクソン領域を濃縮し、HiSeq1500 で次世代シーケンスを実施した。マッピングと品質管理を実施したところ、すべての症例で depth が 20 以上の領域が全エクソンの 95% 以上に及んだ。変異検出を Genome Analysis Toolkit で行い、1 名の高 IgE 症候群症例当たり約 30000 個の遺伝子変異を見出した。

この variants に対して、詳細な in silico 解析を実施し、約 3000 個の候補遺伝子変異を見出した。これを in vitro の機能解析を実施した。具体的には、遺伝子の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、クローニングし機能解析を実施した。この in vitro 機能解析で異常であったものをゲノム編集によりマウスの in vivo に導入し 4 系統のマウスを得た。そのうちの 1 系統で高 IgE 症候群患児と同様の高 IgE 血症を認め、新規の原因遺伝子であると判定した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. 峯岸克行 原発性免疫不全症のモデル動物 峯岸克行 炎症と免疫 25, 62-65, 2017 年 5 月号 査読無し
2. 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 査読無し
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 査読無し

4. 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, Sebne 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, Ikinçioğullari 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. *J Exp Med* 213(8) 1589-1608 2016 doi: 10.1084/jem.20151467 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 西川裕美子 和田 剛 峯岸克行 高 IgE 症候群モデルマウス由来濾胞性 T 細胞の抗体応答調節能の解析 2018 年 6 月 30 日 第 17 回 四国免疫フォーラム 徳島大学
2. Wada T, Nishikawa Y, Minegishi Y. Exacerbation of oxazolone-induced atopic dermatitis in a mouse model of hyper-IgE syndrome. The 46th annual meeting of the Japanese society for immunology. 2017.12.12-12.14 Sendai
3. 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. The 45th annual meeting of the Japanese society for immunology (Ginowan) 2017.12.03-2017.12.5
4. 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 (Ginowan) 2017/12/03-12/5, 国内
5. 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

〔図書〕(計 1件)

1. 峯岸克行 朝倉書店 内科学第11版 原発性免疫不全症候群 分担
2017年4月14日発行 ISBN 978-4-521-74486-5

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。