

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04233

研究課題名(和文) PIP3関連分子異常による原発性免疫不全症の病態解明と新規原因遺伝子同定

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenesis and identification of novel causative gene of primary immunodeficiency due to PIP3-related molecular abnormality.

研究代表者

野々山 恵章 (Nonoyama, Shigeaki)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・小児科学・教授)

研究者番号：40280961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：原発性免疫不全症であるActivated Pi3K syndrome(APDS)の迅速診断法を開発した。多数患者を診断し細胞性免疫不全の存在を示した。新規原因遺伝子PTENを同定した。造血幹細胞移植の成績をまとめた。デジタルPCRを用いてPI3K変異を解析し移植後生着状況を解析した。APDS患者T細胞におけるFOXO1のリン酸化亢進を見出した。PI3K活性化シグナルでFOXO1のリン酸化が亢進し、核外移行することで転写活性が抑制され、免疫関連遺伝子の発現低下により免疫不全症が発症すると考えた。APDS患者B細胞でERKのリン酸化亢進を見出し、リンパ節腫脹の原因と考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性免疫不全症であるActivated Pi3K syndrome(APDS)の新規遺伝子を同定した。迅速診断法を開発した。多数患者を解析し細胞性免疫不全があることを見出した。造血幹細胞移植の成績をまとめた。細胞内シグナル異常を解析しAPDSの大きな問題である免疫不全およびリンパ節腫脹の原因を解明した。難病であるAPDSの診断法、病態解明および適切な治療法の確立に貢献した。

研究成果の概要(英文)：We developed a rapid diagnostic method for Activated Pi3K syndrome (APDS), a primary immunodeficiency disease. Using this method, large numbers of APDS patients were diagnosed and analysed. We found the presence of cellular immunodeficiency in APDS patients. A novel causative gene, PTEN, was identified. The results of hematopoietic stem cell transplantation were summarized. Post-transplant engraftments were evaluated by analyzing the PI3K mutation using digital PCR.

Increased phosphorylation of FOXO1 was found in T cells of APDS patients. After phosphorylation by PI3K activation signal, FOXO1 translocates to extra-nucleus, and the transcriptional activity is suppressed. It was considered that immunodeficiency is caused by the decreased expression of immune-related genes transcribed by FOXO1. ERK phosphorylation was found to be enhanced in APDS patient B cells. The increased phosphorylation of ERK was considered to be the cause of lymphadenopathy in APDS.

研究分野：小児科学

キーワード：小児免疫 アレルギー 膠原病学

1. 研究開始当初の背景

PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate) の過剰発現により下流のAKT, mTOR, S6の過剰リン酸化が起こり、その結果、免疫不全症APDS (Activated PI3K-Delta syndrome)を起こす事が報告された(*Science*,342:866,2013, *Nat Immunol*, 15:88,2014)。原因遺伝子はPI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) のサブユニット p110 (遺伝子*PIK3CD*) と、p85 (遺伝子*PIK3R1*) である。PIP3のヒト免疫不全発症における役割を解明する内容であり、世界的に注目されている研究領域であった。しかし、APDSは新規に見出された疾患であるため、その実態、病態、診断法、治療法に関して不明点が多く残されていた。そのため本研究を実施することとした。

2. 研究の目的

APDS について以下の点を明らかにすることを目的として研究を行った。

- 1) APDS 患者の実態
- 2) APDS 患者で免疫不全が起きる機構
- 3) APDS 患者でリンパ節腫脹が起きる機構
- 4) APDS 新規原因遺伝子の同定
- 5) APDS 治療の確立

3. 研究の方法

1) APDSの実態解明

FACSによりAKTのリン酸化を迅速かつ簡便に測定する方法を開発した。また、原因遺伝子*PIK3CD*, *PIK3R1*, *PTEN*を次世代シーケンサーで網羅的に解析する方法を確立した。これを利用し多数の新規APDS患者を見出し、臨床像や検査データを解析して国内APDS患者の実態を把握した。

2) APDSで免疫不全が起きる機構の解明

APDS 患者で免疫不全が発症する機序を解明する目的で、microRNA 解析の結果から、FOXO1 に着目して解析した。方法としては、APDS 患者Tリンパ球を用いFOXO1 のリン酸化を解析した。

3) APDS 患者でリンパ節腫脹が起きる機構

APDS 患者で臨床的に問題となるリンパ節腫脹の原因を明らかにするために、APDS 患者Bリンパ球におけるERKリン酸化を解析した。

4) 新規APDS原因遺伝子の同定

APDSの表現型を取るが、*PIK3CD*, *PIK3R1*遺伝子が正常である患者群が存在した。AKTの過剰リン酸化も起きていた。この患者群は、新規APDS原因遺伝子に変異があると考えられた。患者および家族のDNAを用い全ゲノムExome解析を行い、原因遺伝子PTENを同定した。

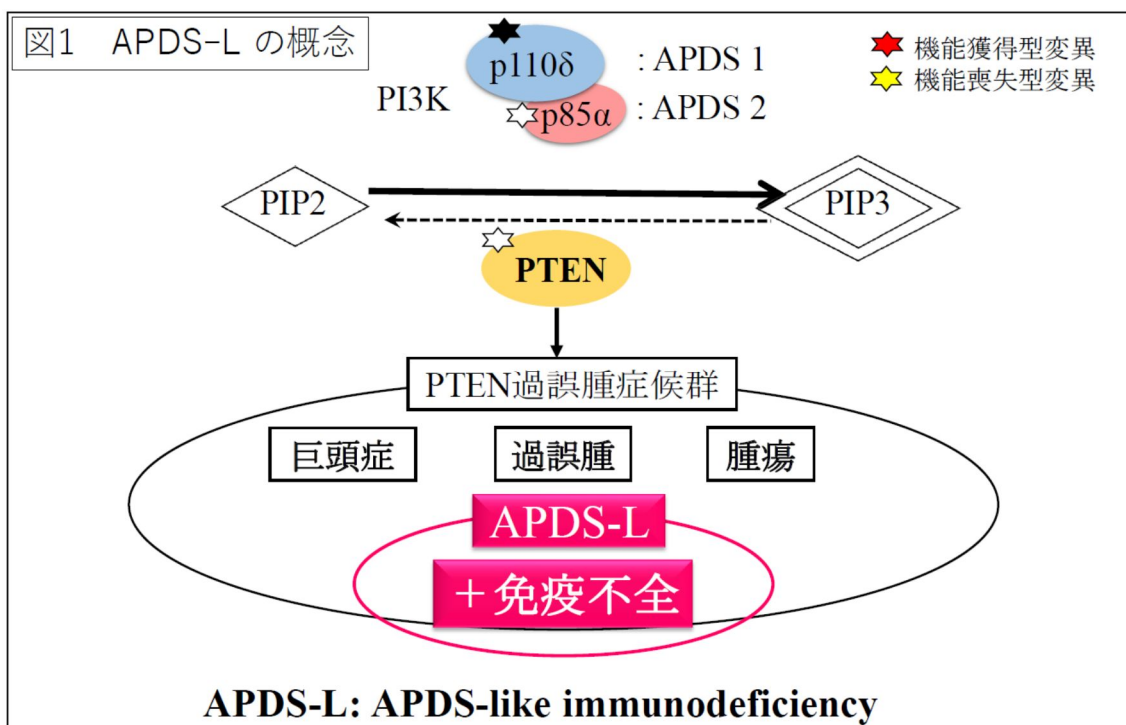
5) APDS治療法の確立

APDS は重篤な免疫不全症であり、治療法が確立していない。国内患者の造血幹細胞移植を含めた治療の実態、治療成績を調査し、至適治療法の確立を目指した。

4. 研究成果

1) APDSの実態解明

迅速診断法、次世代シーケンス法などを用いて、新規APDS患者35症例を見出した。これまで原因不明の分類不能型免疫不全症とされていた症例についてもAPDSと確定診断が出来た。臨床像や検査データを解析したところ、液性免疫不全に加え細胞性免疫不全を合併していることが判明した。また免疫不全、リンパ節腫脹が主要症状であるが、症例により重症度や臨床症状の発現の仕方は多彩である事も明らかになった。APDSにはAPDS-1、APDS-2、APDS-Lがある事も示した(図1)

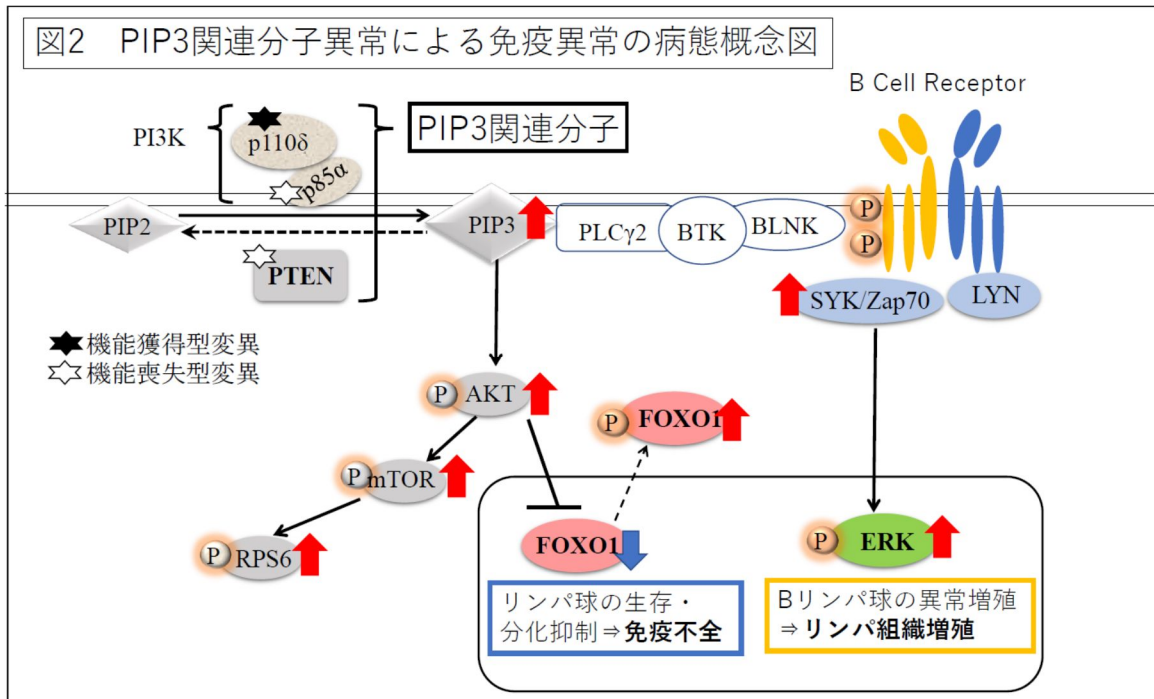


2) APDSで免疫不全が起きる機構の解明

APDS 患者リンパ球の解析で、FOXO1 のリン酸化亢進を認めた。FOXO1 は転写因子で、PI3K-AKT 活性化シグナルによってリン酸化され核外移行することで、その転写活性が抑制される。FOXO1 が転写する Bim、FasL、TRAIL、BAD、p27Kip1、p130 などは、免疫担当細胞の生存、分化、増殖、細胞周期に関わる分子である。このことから、PI3K-AKT による活性化シグナルで転写因子 FOXO1 のリン酸化亢進とそれに伴う転写活性低下が起こり、FOXO1 下流の様々な免疫関連遺伝子の発現が低下して免疫不全症が発症すると考えられた(図2)。

3) APDS 患者でリンパ節腫脹が起きる機構

APDS 患者由来 B リンパ球における ERK リン酸化を解析した結果、APDS の全タイプでリン酸化亢進が認められた。一方、PTEN 遺伝子変異があるがリンパ節腫脹がない Cowden 症候群患者の解析では ERK のリン酸化亢進は認められなかった。ERK は細胞増殖に関わる分子であり、この ERK のリン酸化亢進は、APDS 患者で見られるリンパ組織増殖や、B 細胞性リンパ腫の発症に関与していると考えられた (図 2)。



4) 新規APDS原因遺伝子の同定

APDSの表現型を取るが、*PIK3CD*遺伝子*PIK3R1*遺伝子が正常である患者群でExome解析を行い、*PTEN*遺伝子が原因遺伝子であることを明らかにし、APDS-Lと命名した。

5) APDS治療法の確立

APDS 患者の臨床経過を解析し、免疫不全症による重症感染症、難治性感染症と、リンパ節腫脹による圧迫症状が臨床的に問題となることが明らかになった。症例によっては造血幹細胞移植が行われており、治療の選択肢となることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Dezfouli M, Bergstrom S, Skattum L, Abolhassani H, Nonoyama S, Schwenk JM, Nilsson P, Hammarstrom L, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Newborn Screening for Presymptomatic Diagnosis of Complement and Phagocyte Deficiencies.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.00455.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Umeda K, Imai K, Yanagimachi M, Yabe H, Hashii Y, Atsuta Y, Morio T, et al.	4. 巻 111
2. 論文標題 Impact of graft-versus-host disease on the clinical outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for non-malignant diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 869-876
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-020-02839-4.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okano T, Imai K, Tsujita Y, Mitsui N, Yoshida K, Kamae C, Honma K, Mitsui-Sekinaka K, Sekinaka Y, Kato T, Nonoyama S, Morio T, et al.	4. 巻 143
2. 論文標題 Hematopoietic stem cell transplantation for progressive combined immunodeficiency and lymphoproliferation in patients with activated phosphatidylinositol-3-OH kinase syndrome type 1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 266-275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2018.04.032.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mitsui-Sekinaka K, Sekinaka Y, Ogura Y, Honda M, Ohyama R, Oyama C, Isobe K, Mori M, Arakawa Y, Koh K, Hanada R, Nonoyama S, Kawaguchi H.	4. 巻 59
2. 論文標題 A pediatric case of acute megakaryocytic leukemia with double chimeric transcripts of CBFA2T3-GLIS2 and DHH-RHEBL1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leuk Lymphoma.	6. 最初と最後の頁 151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10428194.2017.1387901.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsujiya Y, Imai K, Honma K, Kamae C, Horiuchi T, Nonoyama S.	4. 巻 38
2. 論文標題 A severe anaphylactic reaction associated with IgM-class anti-human IgG antibodies in a hyper-IgM syndrome type 2 patient.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 144-148.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-017-0466-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horikoshi Y, Umeda K, Imai K, Yabe H, Sasahara Y, Watanabe K, Ozawa Y, Hashii Y, Kurosawa H, Nonoyama S, Morio T.	4. 巻 40
2. 論文標題 Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for leukocyte adhesion deficiency.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pediatr Hematol Oncol.	6. 最初と最後の頁 137-140.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000001028.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oshima K, Saiki N, Tanaka M, Imamura H, Niwa A, Tanimura A, Nagahashi A, Hirayama A, Okita K, Hotta A, Kitayama S, Osawa M, Kaneko S, Watanabe A, Asaka I, Fujibuchi W, Imai K, Yabe H, Kamachi Y, Hara J, Kojima S, Tomita M, Soga T, Noma T, Nonoyama S, Nakahata T, Saito M.	4. 巻 497
2. 論文標題 Human AK2 links intracellular bioenergetic redistribution to the fate of hematopoietic progenitors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 719-725.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.02.139.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Asano T, Okada S, Tsumura M, Yeh T, Mitsui-Sekinaka K, Tsujita Y, Ichinose Y, Shimada A, Hashimoto K, Wada T, Imai K, Ohara O, Morio T, Nonoyama S, Kobayashi M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Enhanced AKT phosphorylation of circulating B cells in patients with activated PI3K syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.00568.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okano T, Tsujita Y, Kanegane H, Mitsui-Sekinaka K, Tanita K, Miyamoto S, Yeh T, Yamashita M, Terada N, Ogura Y, Takagi M, Imai K, Nonoyama S, Morio T.	4. 巻 38
2. 論文標題 Droplet digital PCR-based chimerism analysis for primary immunodeficiency diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 300-306.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-018-0497-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamae C, Imai K, Kato T, Okano T, Honma K, Nakagawa N, Yeh TW, Noguchi E, Ohara A, Shigemura T, Takahashi H, Takakura S, Hayashi M, Honma A, Watanabe S, Shigemori T, Ohara O, Sasaki H, Kubota T, Morio T, Kanegane H, Nonoyama S.	4. 巻 38
2. 論文標題 Clinical and immunological characterization of ICF syndrome in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 927-937.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-018-0559-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Coulter TI, Chandra A, Imai K, et al.	4. 巻 139
2. 論文標題 Clinical spectrum and features of activated phosphoinositide 3-kinase syndrome: A large patient cohort study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 597 ~ 606.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2016.06.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sekinaka Y, Mitsuiki N, Imai K, Ogawa S, Morio T, Nonoyama S, et al.	4. 巻 37
2. 論文標題 Common variable immunodeficiency caused by FANC mutations.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 434-444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-017-0396-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hoshino A, Okada S, Yoshida K, Nonoyama S, Morio T, Kanegane H, et al.	4. 巻 140
2. 論文標題 Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in humans with germline IKZF1 mutations.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 223-231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2016.09.029.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeshita S, Kanai T, Kawamura Y, Yoshida Y, Nonoyama S.	4. 巻 12
2. 論文標題 A comparison of the predictive validity of the combination of the neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio and other risk scoring systems for intravenous immunoglobulin (ivig)-resistance in Kawasaki disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0176957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0176957.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tamura S, Maeda T, Misawa K, Kawana A, Matsumoto H, Nonoyama S, et al.	4. 巻 141
2. 論文標題 Development of a highly resolved loop-mediated isothermal amplification method to detect the N526K ftsI mutation of β -lactamase-negative ampicillin-resistant Haemophilus influenzae.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Microbiol Methods.	6. 最初と最後の頁 108-114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mimet.2017.08.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中村 康子, 白石 暁, 大西 秀典, 堀越 泰雄, 斎藤 潤, 野々山 恵章
2. 発表標題 患者iPS細胞由来神経細胞を用いたChédiak-Higashi症候群の病態解析
3. 学会等名 第123回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 友田昂宏, 岡野翼, 森田俊平, 金兼弘和, 今井耕輔, 森尾友宏, ほか
2. 発表標題 活性化PI3K-delta症候群5例に対する造血細胞移植経験
3. 学会等名 第3回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本 浩, 萩原 秀俊, 植松 賢司, 座波 清誉, 中村 康子, 野々山 恵章.
2. 発表標題 原因不明の先天性疾患に対する網羅的遺伝子検査の有用性
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maho Hatano, Takahiro Tomoda, Tsubasa Okano, Kohsuke Imai, Tomohiro Morio, et al.
2. 発表標題 非血縁者間骨髄移植後早期にバンコマイシン自然耐性腸球菌性髄膜炎に罹患した活性型P13K 症候群2型の1例
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 關中佳奈子
2. 発表標題 MIRAGE症候群患者10例の臨床的特徴と免疫学的解析
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 關中佳奈子, 辻田由喜, 關中悠仁, 加藤環, 座波清誉, 今井耕輔, 野々山恵章.
2. 発表標題 PIP3 関連分子異常による免疫不全症の病態 ~ 活性化 PI3K 症候群 (APDS) とその類縁疾患 ~
3. 学会等名 第1回日本免疫不全・自己炎症学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今井 耕輔 (Imai Kohsuke) (90332626)	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 (12602)	