

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16884

研究課題名（和文）IKZFファミリーの協調的な転写制御の異常によるリンパ球分化障害の病態解明

研究課題名（英文）Investigation of lymphocyte differentiation defect caused by aberrant transcription programs in pathogenic IKZF variants.

研究代表者

山下 基 (Yamashita, Motoi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：70869122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では先天性免疫異常症の原因として同定されたAIOLOS（IKZF3）の2つのミスセンスバリエーションに対して、*in vitro*での機能解析や疾患原性バリエーションノックインマウスの免疫学的表現型解析、リンパ球でのトランスクリプトーム解析、患者リンパ球サブセット解析、患者リンパ球のトランスクリプトーム解析を通じて、これらのミスセンスバリエーションがどのような分子病態を介してAIOLOS異常症に見られるリンパ球分化障害を病態形成するのかを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的・社会的意義としては、AIOLOS異常症において機能喪失型のAIOLOSバリエーションが、AIOLOS自身の機能障害だけでなく他のIKZF分子（IKAROS）の機能障害を引き起こし、分子病態の一端を担うことを証明し、AIOLOS異常症の疾患概念の確立に寄与したことである。また、AIOLOS異常症以外の転写因子異常を原因とする先天性免疫異常症や単一遺伝子疾患においても同様の分子病態が存在しうる可能性を示唆した点も本研究の意義の一つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated two missense variants of AIOLOS (IKZF3), identified in the patients with inborn errors of immunity (IEI). We conducted *in vitro* functional assays, immunophenotyping and transcriptome analysis of knock-in mice harboring disease-causing variants, as well as lymphocyte subset analyses of the patient and transcriptome analyses of patient lymphocytes. Through these approaches, we elucidated the molecular pathogenesis by which these missense variants lead to lymphocyte differentiation defects observed in AIOLOS-associated IEI.

研究分野：先天性免疫異常症

キーワード：先天性免疫異常症 AIOLOS IKZF3 IKZF

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IKAROS zinc finger (IKZF)ファミリー分子は血球分化を司る転写因子ファミリーであり、ヒト疾患との関連においては造血器腫瘍で **IKZF** 分子の変異や発現異常が認められることが知られていた。また、**IKAROS** の生殖細胞系列におけるヘテロ接合性の機能喪失型バリエントが **B** 細胞欠損症や抗体産生不全症を主徴とする先天性免疫異常症をきたすことが知られていた。我々は **IKZF** ファミリー分子の **AIOLOS** の生殖細胞系列のヘテロ接合性の機能喪失型ミスセンスバリエント (**G159R**) を、**B** 細胞欠損症を呈した先天性免疫異常症の患者に同定し、その分子病態は **AIOLOS** の機能障害だけでなくヘテロ二量体形成を介した **IKAROS** の機能障害であることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

我々の先行研究において、**AIOLOS G159R** バリエントが **IKAROS** に対するヘテロ二量体を介した機能阻害効果をきたすように、**AIOLOS** 異常症の疾患原性バリエントも **IKAROS** などの他の **IKZF** 分子に対して優性阻害的に作用する可能性が示された。この分子病態が **IKZF** 分子の異常に伴う先天性免疫異常に共通する分子病態であるかどうか、**IKZF** ファミリー分子のヘテロ二量体の生理的機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

IKZF 分子において **DNA** 結合能が障害されたり、他の **IKZF** 分子に対して優性阻害的に作用するバリエントを、細胞株を用いて明らかにし、**IKZF** 変異分子のゲノム結合部位の解析や変異 **IKZF** 分子存在下での遺伝子発現変動を明らかにすることを計画した。

さらに同定した **IKZF** 機能障害バリエントと相同の変異を有するノックインマウスを作成し、その免疫学的表現系を解析すること、変異 **IKZF** 分子の二量体化ドメインを欠失させるような遺伝子編集を行って、このマウスモデルにおけるリンパ球分化異常が改善するのかを検証することを計画した。

4. 研究成果

AIOLOS G159R バリエント

我々の同定した **AIOLOS G159R** バリエントによる **AIOLOS** 異常症の分子病態を明らかにするために **AIOLOS** を欠損させた **B** 細胞株に **AIOLOS G159R** バリエントを強制発現し、**AIOLOS G159R** バリエントのゲノムワイドな結合部位の解析を行った。**AIOLOS G159R** バリエントは **AIOLOS** の生理的な結合配列に対する結合能を欠く一方で、異常な配列への結合能増強を示した。また、二量体形成に必要であることが知られる **C** 末端側を欠いた **AIOLOS** バリエントを作成し、免疫共沈降によりこのバリエントは **IKAROS** との二量体化が障害されることを確認した。

これらの *in vitro* の知見をもとに、すでに免疫学的表現型解析の進んでいた **Aiolos G158R** マウス (**AIOLOS G159R** と相同のミスセンスバリエントをノックイン) に対して **Aiolos** の **C** 末端を欠損させる変異を遺伝子編集により導入したところ、**Aiolos G158R** マウスに見られた **B** 細胞分化異常などの免疫異常は改善した。

これらの結果は論文化し、生殖細胞系列における **AIOLOS** のミスセンスバリエントが先天性免疫異常症の原因となることを発表した (Yamashita M, Kuehn HS, Okuyama K, Okada S, Inoue Y, Mitsuiki N, et al. A variant in human **AIOLOS** impairs adaptive immunity by interfering with **IKAROS**. *Nat Immunol.* 2021;22(7):893–903.)

AIOLOS N160S バリエント

上記の **AIOLOS G159R** バリエントの同定後、メモリー **B** 細胞減少、重度の低免疫グロブリン血症、ニューモシスチス肺炎を特徴とする複合免疫不全症患者に、ヘテロ接合性の機能喪失型 **AIOLOS N160S** バリエントが同定された。この国際共同研究において、患者由来 **CD4⁺ T** 細胞のトランスクリプトーム解析を行い、患者 **CD4⁺ T** 細胞で健常コントロールと異なる特異な遺伝子発現パターンがあることが明らかとなった。この研究においては、**AIOLOS** 異常症の新たな臨床的特徴と患者リンパ球サブセットの特徴と機能不全を明らかとし、論文発表された (Kuehn HS, Chang J, Yamashita M, Niemela JE, Zou C, Okuyama K, et al. T and B cell abnormalities, pneumocystis pneumonia, and chronic lymphocytic leukemia associated with an **AIOLOS**

defect in patients. *J Exp Med.* 2021;218(12):e20211118.)

AIOLOS N160S バリエントと相同のミスセンスバリエントを有するノックインマウス (**Aiolos N159S**) を用いた分子病態の解析において、**Aiolos N159S** マウスはリンパ球におけるリンパ組織へのホーミングを担う **CD62L** をコードする **Sell** 遺伝子の発現低下があることが明らかとなった。**Aiolos N159S** ホモ接合性変異マウスの **B** 細胞に **Ikaros** を強制発現すると **CD62L** の発現が回復し、**Aiolos N159S** ノックインマウスにおいても **Ikaros** の機能が阻害されている可能性が示唆された。**Aiolos N159S** ノックインマウス由来の **T** 細胞、**B** 細胞のトランスクリプトーム解析を行い、リンパ球の移動や細胞間接着に関係する遺伝子群の発現低下が **Aiolos N159S** バリエントを有する **T** 細胞や **B** 細胞においてみられることを明らかにした。この研究は **Aiolos N159S** マウスにおけるリンパ球サブセット異常を明らかにするとともに **Sell** の発現制御を中心としたリンパ球ホーミングにおける **Aiolos**、**Ikaros** の役割を明らかにして論文発表された (**Chang J, Yamashita M, Padhi AK, Zhang KYJ, Taniuchi I. Impaired tissue homing by the Ikzf3N159S variant is mediated by interfering with Ikaros function. Front Immunol. 2023;14:1239779.**)

細菌性の反復性気道感染症、**B** 型肝炎ウイルスの持続性感染などの種々の感染症に罹患した免疫不全症患者において生殖細胞系列のヘテロ接合性 **AIOLOS N160S** バリエントが同定された。既報の **AIOLOS N160S** による **AIOLOS** 異常症とは異なる表現型を示しており、この患者の末梢血リンパ球サブセット解析を行い論文発表した (**Özdemir Ö, Dikici Ü, Yazar MH, Yamashita M, Morio T. A Rare AIOLOS N160S Variant Causing IEI in Human. J Clin Immunol. 2024;44(2):57.**)

その他

これらの研究成果は **AIOLOS** 異常症の疾患概念の確立に寄与し、**AIOLOS** 異常症や **IKZF** 分子関連の先天性免疫異常症の総説を執筆した (**Yamashita M, Morio T. Inborn errors of IKAROS and AIOLOS. Curr Opin Immunol. 2021;72:239–48.**、**Yamashita M, Morio T. AIOLOS Variants Causing Immunodeficiency in Human and Mice. Front Immunol. 2022;13:866582.**)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Chang Jingjie, Yamashita Motoi, Padhi Aditya K., Zhang Kam Y. J., Taniuchi Ichiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Impaired tissue homing by the Ikrzf3N159S variant is mediated by interfering with Ikaros function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1239779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.866582	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 Ozdemir Oner, Dikici Ummugulsum, Yasar Murat Hakki, Yamashita Motoi, Morio Tomohiro	4. 巻 44
2. 論文標題 A Rare AIOLOS N160S Variant Causing IEI in Human	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-021-00951-z	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 該当する

1. 著者名 Yamashita Motoi, Morio Tomohiro	4. 巻 13
2. 論文標題 AIOLOS Variants Causing Immunodeficiency in Human and Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 866582
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20211118	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 Yamashita, M., H.S. Kuehn, K. Okuyama, S. Okada, Y. Inoue, N. Mitsuiki, K. Imai, M. Takagi, H. Kanegane, M. Takeuchi, N. Shimojo, M. Tsumura, A.K. Padhi, K.Y.J. Zhang, B. Boisson, J.-L. Casanova, O. Ohara, S.D. Rosenzweig, I. Taniuchi, and T. Morio.	4. 巻 22
2. 論文標題 A variant in human AIOLOS impairs adaptive immunity by interfering with IKAROS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 893 ~ 903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.866582	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 該当する

1. 著者名 Kuehn Hye Sun, Chang Jingjie, Yamashita Motoi, Niemela Julie E., Zou Chengcheng, Okuyama Kazuki, Harada Junji, Stoddard Jennifer L., Nunes-Santos Cristiane J., Boast Brigitte, Baxter Ryan M., Hsieh Elena W.Y., Garofalo Mary, Fleisher Thomas A., Morio Tomohiro, Taniuchi Ichiro, Dutmer Cullen M., Rosenzweig Sergio D.	4. 巻 218
2. 論文標題 T and B cell abnormalities, pneumocystis pneumonia, and chronic lymphocytic leukemia associated with an AIOLOS defect in patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.coi.2021.06.010	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 該当する

1. 著者名 Yamashita Motoi, Morio Tomohiro	4. 巻 13
2. 論文標題 AIOLOS Variants Causing Immunodeficiency in Human and Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.866582	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 Yamashita Motoi, Morio Tomohiro	4. 巻 72
2. 論文標題 Inborn errors of IKAROS and AIOLOS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Immunology	6. 最初と最後の頁 239 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.coi.2021.06.010	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Motoi Yamashita
2. 発表標題 ALL predisposition or inborn errors of immunity?: Germline variants of IKAROS and AIOLOS.
3. 学会等名 第65回日本小児血液・がん学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山下基
2. 発表標題 リンパ球転写因子の異常による先天性免疫異常症 患者モデルマウスから迫る病態解明
3. 学会等名 第51回日本臨床免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023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	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
トルコ	Sakarya University	University of Health Sciences	