

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16924

研究課題名（和文）遺伝子診断困難な原発性免疫不全症に対する罹患細胞RNAに着目した診断法の構築

研究課題名（英文）Establishment of RNA-based diagnostic method for inborn errors of immunity

研究代表者

本田 吉孝（Yoshitaka, Honda）

京都大学・高等研究院・特定助教

研究者番号：00869381

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）：1）国際共同研究に参加し，ReIA異常症が優性阻害効果により自己免疫・自己炎症性病態を呈するという新規病態解明に関する報告に貢献した。2）未診断の炎症性疾患をもつ小児において，RNA発現解析を用いた炎症誘導経路に基づく病態分類により，診断率の向上や個別化治療につながる可能性を示し，論文報告した。3）非血球組織を用いたRNA解析で，血球系に発現しない遺伝子の発現を非侵襲的に解析できることを確認した。4）次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断が困難なNEMO異常症遺伝子診断において，従来の問題点を解決し，かつ極めて簡便・短時間に実施可能な新規遺伝子診断法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児発熱性疾患・先天免疫異常症において，RNA発現に着目した病型分類が診断効率向上や個別化医療に役立つ可能性を報告するとともに，ReIA異常症という疾患の新たな病態を明らかにした。また，血液をもちいたRNA診断法では対応が困難な遺伝子の発現を比較的低侵襲に解析できる可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：1) I have participated in an international joint research program and contributed to a paper which reports a novel pathological mechanism of ReIA abnormalities due to dominant-negative effects. 2) In children with undiagnosed inflammatory diseases, we demonstrated the possibility of improving diagnosis rates and providing individualized treatment by classifying the patients based on the inflammation pathway using RNA expression analysis. 3) We have confirmed that RNA analysis using non-hematological tissue, such as hair follicle, was effective and non-invasive approach to analyze the expression of inborn errors of immunity-associated genes that are not expressed in blood cells. 4) We have developed a new simple and quick diagnostic method for NEMO deficiency, the diagnosis of which is difficult by next-generation sequencing method.

研究分野：先天免疫異常症

キーワード：先天免疫異常症 遺伝子診断 病態解析

1. 研究開始当初の背景

先天免疫異常症は免疫に関連する遺伝子の異常により発症する。近年、次世代シーケンサー等のゲノム解析技術の進歩により、その責任遺伝子は次々と同定され、2017年時点で354の責任遺伝子が報告されている。複数の遺伝子が類似した臨床表現型を呈する場合も多く、臨床現場での責任遺伝子絞り込みにおいては、次世代シーケンサーを用いた多数の候補遺伝子のハイスループット解析が主流となってきている。しかし、従来の遺伝子解析では検出できない、ゲノムの欠失・重複といった構造異常や、深部イントロン変異、低頻度体細胞モザイクといった遺伝子異常により発症する症例もしばしば存在し、こうした症例は従来のゲノムを標的とした遺伝子診断法での診断は困難である。研究代表者は従来の遺伝子診断法で診断が困難であった症例の原因解明に、mRNAなどを用いた診断法が有用であったことを論文報告しており、こうした従来の遺伝子診断法で診断が困難な症例の診断率向上のための包括的な遺伝子診断法として、罹患細胞のmRNAを標的とした診断方法の構築を計画した。

2. 研究の目的

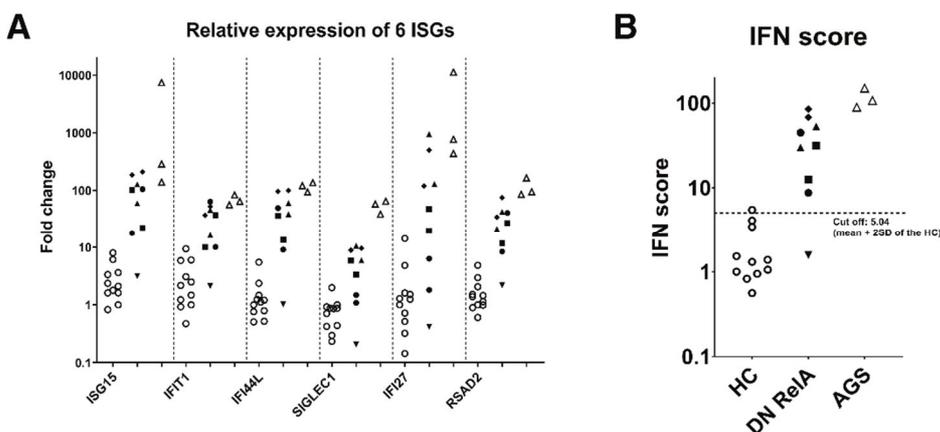
血球細胞・非血球細胞を用いた mRNA の発現などに着目した解析で、小児先天免疫異常症や炎症性疾患の診断法向上や個別化医療の可能性について検討する。

3. 研究の方法

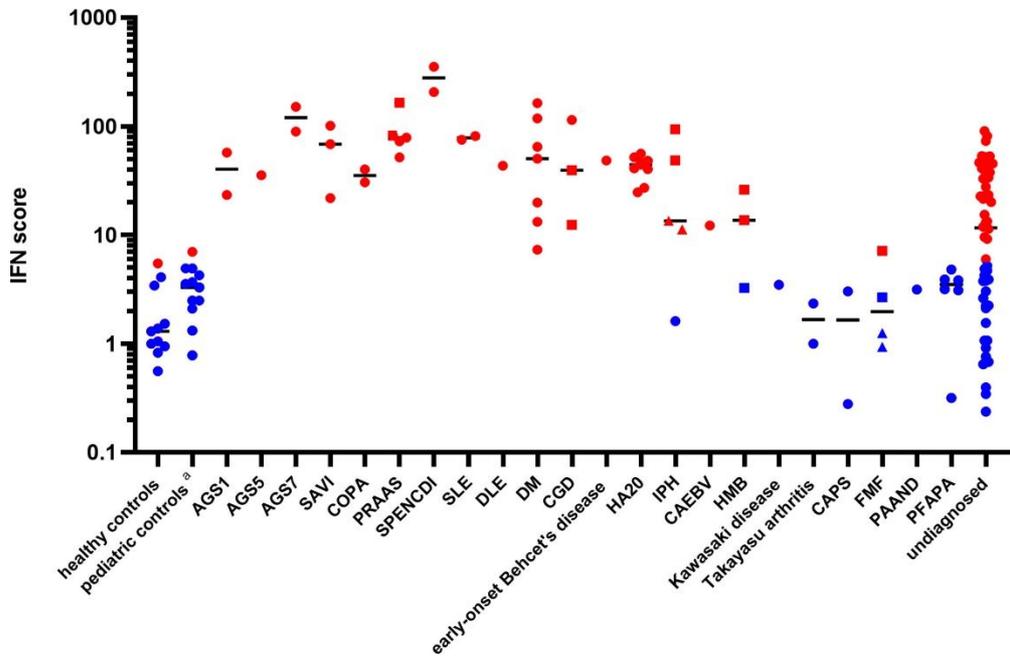
- 1) PAX gene RNA 採血管を用いた血球系における RNA 発現解析に基づく病型分類 (特に炎症誘導経路の推定) が、診断率向上に寄与するか、個別化治療への応用が可能かどうかを検討する。
- 2) 非血球系細胞由来の RNA を用いて、血球系に発現しない遺伝子の発現解析を行うことができるかを検証する。

4. 研究成果

1) 国際共同研究に参加し、RelA 異常症が優性阻害効果により、pDC や単球系の細胞における I 型インターフェロン産生亢進を介して自己免疫・自己炎症性病態を呈するという新規病態解明に関する報告に関わった。特に、RNA 発現解析による I 型インターフェロン産生亢進が病態の特徴であることの解明に本研究が大きく貢献した (A: I 型インターフェロンにより誘導される複数の遺伝子発現が RelA 異常症において亢進している。B: I 型インターフェロン応答の亢進を示唆する数値である IFN score が RelA 異常症において有意に亢進している)



2) 未診断の炎症性疾患をもつ小児において、RNA 発現解析を用いた炎症誘導経路に基づく病態分類により、診断率の向上や個別化治療につながる可能性を示し、論文報告した (図: 種々の炎症性疾患において、I 型インターフェロン経路の亢進がみられる。) I 型インターフェロン経路の亢進がみられる症例は、皮膚症状などを含めた特徴的な臨床像を呈し、一部の症例に関しては同経路の阻害剤である JAK 阻害剤がその治療法として有効であることが示唆され、RNA 発現解析から病態形成に関わるシグナル経路を明らかにすることで、診断率向上や個別化医療への応用が期待できることが示された。

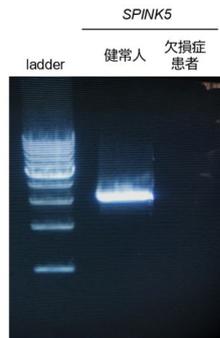


3) 非血球組織を用いた RNA 解析で、血球系に発現しない遺伝子の発現を非侵襲的に解析できることを確認した。

血球系に発現しない遺伝子のRNA解析は通常の血液検体を用いた解析は困難である。

比較的低侵襲に採取できる非血球系細胞を用いて、血球系に非発現の遺伝子発現を解析することが可能である。

例えば、皮膚に発現する遺伝子発現を侵襲度の高い皮膚生検を行わずに遺伝子発現解析が可能であることが示された。



4) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断が困難な NEMO 異常症遺伝子診断において、従来の問題点を解決し、かつ極めて簡便・短時間に実施可能な新規遺伝子診断法を開発した(論文投稿準備中)

従来のNEMO異常症診断法の利点と問題点

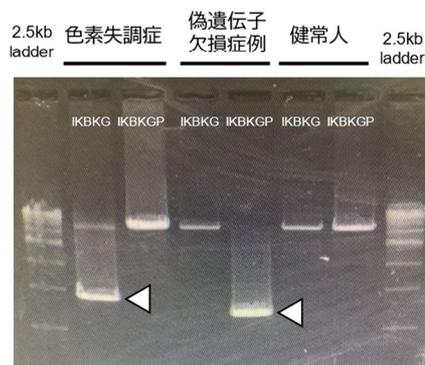
診断法	問題点
Long range PCR	反応時間に長時間を要する(7-8時間) Primer設計の問題からExon4-10の欠失は検出できない
Multiplex PCR	Exon4-10の大欠失しか検出できない 偽遺伝子に欠失があっても陽性となる Primer設計の問題からしばしば非特異的増幅がみられる
Specific PCR	Exon4-10の大欠失を標的としている Primer設計の問題からしばしば非特異的増幅がみられる

【新規遺伝子診断法開発】

- ・高速PCR酵素を使用
- ・PCR反応時間は1時間程度と短縮
- ・上記全ての診断法を補完する

次世代シーケンサーでは区別困難な色素失調症・偽遺伝子欠失症例も迅速に判別可能。

IKBK G: NEMO遺伝子
IKBK GP: 偽遺伝子



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Moriya Kunihiko, Nakano Tomohiro, Honda Yoshitaka, et al.	4. 巻 220
2. 論文標題 Human RELA dominant-negative mutations underlie type I interferonopathy with autoinflammation and autoimmunity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20212276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20212276	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 Miyamoto Takayuki, Honda Yoshitaka, Izawa Kazushi, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Assessment of type I interferon signatures in undifferentiated inflammatory diseases: A Japanese multicenter experience	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 905960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.905960	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

〔学会発表〕 計0件

〔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		
米国	Rockefeller University		