

## 研究題目 原発性免疫不全症の新規原因遺伝子の解明

### 研究組織

研究代表者：今井 耕輔（東京医科歯科大学）  
共同研究者：竹本 龍也（徳島大学先端酵素学研究所）  
研究分担者：峯岸 克行（徳島大学先端酵素学研究所）

### 【1】研究の概要

#### [1-1]本研究の目的・概要

原発性免疫不全症の新規原因遺伝子を発見することを目的として研究を実施する。これまでに報告されている既知の原因遺伝子に異常のない原発性免疫不全症例を対象として次世代シーケンサーによるエクソーム解析を行う。患児の末梢血由来ゲノムDNAから、Agilent社のSureSelect Humanを用いてエクソン領域を濃縮し、エクソーム解析を実施する。得られたデータを既に確立されたパイプラインにより解析し、アノテーションを実施する。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である可能性をバイオインフォーマティクスにより検討する。具体的には、それぞれの候補遺伝子に対して、正常人集団中での多型頻度(MAF; minor allele frequency)、免疫系での発現やその遺伝子機能等のデータベース情報を利用して候補遺伝子変異に優先順位をつけ、優先順位の高い候補遺伝子変異体を、試験管内の機能解析を実施する。この検討で異常が見られた変異体を発現するモデルマウスを作成し、生体内の候補変異体の機能解析により、各候補変異体が患児の原因遺伝子であるかどうかを決定する。本研究成果により、原発性免疫不全症の新規原因遺伝子が同定することができ、さらに、そのモデルマウスが用意されているので、治療法の開発等の検討をすぐに開始することができる。

#### [1-2]研究の方法・経過

本研究においては、東京医科歯科大学で診療する原発性免疫不全症患児を対象としている。東

京医科歯科大学小児科は、日本において最大規模の原発性免疫不全症の症例を有しており、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析に関しても日本で最大規模の実績を有している。その研究資源を利用して本研究を実施する。東京医科歯科大学においてエクソーム解析を実施して、アノテーション、候補変異体の優先順位付けを実施した。

候補変異体の情報を徳島大学先端酵素学研究所・免疫アレルギー学分野の峯岸教授と共有した。その情報を基にして、免疫アレルギー学分野において候補変異体の *in vitro* 機能解析を実施した。候補遺伝子変異体は、その遺伝子変異の影響が明らかなナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシング変異等に有力な子お穂が存在せず、ほとんどがミスセンス変異体であったので必要であった。候補遺伝子変異体と野生型遺伝子を哺乳類の発現ベクターにクローニングした。HEK293T細胞、Jurkat細胞等に導入し、変異体発現の影響をフローサイトメトリー、レポーターアッセイ、ウエスタンブロットティング、定量PCR等の各種検査法にて野生型発現の効果と比較検討し、試験管内で実際に機能異常を有する変異体を選択した。これにより、原発性免疫不全症の原因である可能性が最も高い2個の候補変異体を決定した。いずれの変異体においても、当該遺伝子の候補変異体は1個のみで、その患児と同様な表現型を有する他の患児は見いだせなかった。

徳島大学先端酵素学研究所・発生生物学分野の竹本教授の研究室において選択した2個の候補変異体のCRISPR/Cas9を利用してモデルマウスを作成中である。具体的には、マウ

スの受精卵に Cas9 タンパク質、ガイド RNA 等をエレクトロポレーションし、外来 DNA の部位特異的な DNA 2 本鎖切断誘導し、ノックアウトまたはノックインマウスを作成した。これまでに 1 系統の F0 マウスの樹立が完了、C57BL/6 マウスと交配して、産仔を得ており間もなくマウスの免疫能の解析が可能になる。もう 1 系統は、1 回目の Cas9 タンパク質とガイド RNA の遺伝子導入では、予定したノックインマウスが得られなかったため、再度マウス作成を実施している。

得られたマウスの胸腺、骨髄、脾臓、リンパ節等の各種免疫臓器における T 細胞、B 細胞、NK 細胞、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、樹状細胞、自然リンパ球等の各種細胞の数、分化状態をフローサイトメトリー等により検討する予定である。さらに、IgG, IgA, IgM, IgE 等各種サブクラスの免疫グロブリンの量を測定し、各種の原発性免疫不全症に応じたサイトカイン産生能、好中球貪食能、殺菌能、樹状細胞の抗原提示能等を詳細に検討する。

## 【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

これまでの研究により、原発性免疫不全症患者のゲノム DNA を用いてエクソーム解析、アノテーション、バイオインフォマティクス解析を実施することにより、新規原因遺伝子の候補遺伝子を見出すことができた。さらに、候補遺伝子の試験管内機能解析により原因遺伝子の探索は新たな段階へと進展し、機能解析で異常を有する 2 個の変異体を見出した。さらに、この候補変異体を発現する 2 系統の疾患モデルマウスの作成を開始し、1 系統では既にマウスモデルの作成に成功している。来年度これらのマウスの表現型を詳細に解析し、新規の原因遺伝子を発見する。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

東京医科歯科大学小児科学教室では、日本国内で最先端の原発性免疫不全症研究を行っている。この研究と候補変異体の機能解析が特異的な徳島大学先端酵素学研究所免疫アレルギー学分野と、ゲノム編集による疾患モデルマウス

作成を専門とする徳島大学・先端酵素学研究所・発生物学分野が共同研究することにより、この 3 つの研究室の強みを組み合わせた共同研究により、世界最先端の研究成果を上げることが可能と考える。

波及効果、発展性として、原発性免疫不全症の研究は、JAK3 変異が原因で発症する原発性免疫不全症である重症複合免疫不全症の発見が、JAK3 阻害剤の開発から関節リウマチ等に対する新規治療薬トファシチニブの開発に結びついたように、本研究も新規治療法開発に繋がる可能性がある。

## 【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表  
未発表

[3-2] 学会発表  
未発表

[3-3] 成果資料等  
なし

## 【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

ゲノム編集により既に作成された疾患モデルマウスの表現型の解析を早急に実施したい。さらに、1 回目の遺伝子導入では、作成できなかったゲノム編集モデルマウスの作成を急ぎたい。また、新規のゲノム編集マウスが作成できれば、変異体を *in silico* と *in vitro* でどのように選択すれば、求める表現型の出現するマウスの作成効率が上昇する可能性が考えられるので、特に *in silico* のパラメーターを検討し、新規原因遺伝子発見の効率を上昇させる。