

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した。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なった。患児の末梢血由来ゲノム DNA から、Agilent 社の Sure Select 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した。得られたデータをエクソーム解析用に樹立したパイプラインにより解析し、アノテーションを実施した。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である可能性をバイオインフォマティクスにより検討した。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)、免疫系での当該遺伝子発現やその遺伝子機能等の bioinformatics 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した。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している。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、そのモデルマウスを用いて、病態解析、

治療法の開発等の検討に展開する。

[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者を対象としている。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候補変異体が存在せず、ほとんどがミスセンス変異体であったため必要になった。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。

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した。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DNA2本鎖切断を誘導し、相同組み換えによるノックインマウスを作成した。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した。さらに、IgG, IgA, IgM, IgE等各種クラスの免疫グロブリンの量を測定した。さらに、各種の原発性免疫不全症の症状と病態に応じたサイトカイン産生能、樹状細胞の抗原提示能、免疫した際の免疫異常の検討を行った。

【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に成功し、1系統ではヒトの免疫不全症と同様の症状が再現している。現在、その病態の解明と新規治療法の開発を実施している。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

原発性免疫不全症の病因解明から発展し、医学に大きなインパクトを与えた研究の代表としては、重症複合免疫不全症の原因遺伝子ヤヌス型キナーゼ JAK3 の機能喪失型の同定と、それを治療ターゲットとした JAK3 阻害剤の開発がある。この研究で開発された JAK3 阻害剤トファシチニブは、現在関節リウマチ、炎症性腸疾患等の治療に広く処方されている。本研究もこの新規原因遺伝子同定を契機として、新規治療法開発に繋げるよう研究を進展させたい。

【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

前述のとおり、本発見を免疫疾患の新規治療法開発に繋げるよう研究を進展させることが、今後の課題である。