

## 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：岡田 賢（広島大学大学院医学系研究科）

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の発見とその病態解明を目的として研究を実施する。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ない、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、それぞれの遺伝形式を仮定し、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まず *in silico* 検討した。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、候補変異体が患児疾患の原因遺伝子であるかどうかを現在決定中である。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、広島大学で診療し、また情報を収集した原発性免疫不全症患者を対象とした。広島大学小児科は、西日本において最大級の原発性免疫不全症の症例を有しており、

症例のコンサルテーションを多数受けている。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西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、徳島大学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、各種レポーターアッセイ、ウエスタンブロッティング、定量 PCR 等の検査法にて野生型発現の効果と比較検討し、試験管内で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高い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 DNA 2 本鎖切断を誘導、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する。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する。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う予定である。

## 【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抽出することができた。さらに、候補遺伝子の試験管内機能解析により異常を有する変異体を見出した。この候補変異体を発現する疾患モデルマウスの F0 世代作成に成功し、現在免疫機能の解析を準備中である。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

次世代シーケンサーを用いたゲノム解析が可能になり、多くの原発性免疫不全症の原因遺伝子が明らかになったが、一方で原発性免疫不全症の病因を解明することは、全ゲノム情報があっても多くの場合で困難であることが明らかになった。本研究では広島大学小児科学、広島大学大学院と徳島大学先端酵素学研究所発生生物学分野と免疫アレルギー学分野が共同研究を実施することにより、この大きな課題の本質的な解決を目指している。原発性免疫不全症研究は、ヒトの免疫系に関する多くの画期的な知見を生み出しており、本研究においても、新規原因遺伝子同定を契機として、病態形成機構、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

Hyper-IgE syndrome, 2021 update

Minegishi Y. Allergol Int. 70:407-414, 2021]

Ogishi M,..., Minegishi Y. ... Boison-Dupuis S, Impaired IL-23-dependent induction of IFN- $\gamma$  underlies mycobacterial disease in patients with inherited TYK2 deficiency. J Exp Med, 219; e20220094, 2022

Minegishi Y., The signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) at the center of the causative gene network of hyper-IgE syndrome. Curr Opin Immunol 2023 (in press)

[3-2]学会発表

[3-3]成果資料等