

## 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）

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

原発性免疫不全症においては、免疫系に発現する遺伝子の先天異常により感染症に反復罹患し、持続感染、日和見感染等の慢性炎症を発症する。これまでに400個以上の原因遺伝子が同定されたが、現時点での最先端ゲノム解析による研究を実施しても、その半数以上が原因不明である。本研究では、これまでの各種解析によっても原因遺伝子変異を同定できていない原発性免疫不全症例の原因遺伝子を、変異体の *in silico*, *in vitro*, *in vivo* 機能解析を徳島大学と広島大学の2つの研究機関が共同で実施することにより解明することを目的とする。

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う。患児の末梢血単核球由来ゲノム 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。得られたデータをエクソーム用に樹立した解析パイプラインで解析し、アノテーションを実施する。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* 検討する。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 informatics 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。さらに、変異体の生体内機能を詳細に検討することより、候補変異体が疾患の原因遺伝子であるかどうかを検討する。

#### [1-2]研究の方法・経過

本研究においては、広島大学で診療、また情報

を収集した原発性免疫不全症患児を対象とする。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する。

候補変異体の情報を先端酵素学研究所・免疫アレルギー学分野の峯岸教授と共有する。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* 機能解析を実施する。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しなかったため、ミスセンス変異体の機能解析が必要となった。野生型 (wild type) と変異体遺伝子を発現ベクターにクローニングし、HEK293T 細胞、Jurkat 細胞等に導入、それらの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 等の検査法にて検討し、試験管内で機能異常を有する変異体を選択した。

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と割合、分化状態等をフローサイトメトリーにより検討した。さらに、IgG, IgA, IgM, IgE 等各種クラスの免疫グロブリンの量、IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3 等の各種サブク

ラスの定量を実施する。各種の抗原とアレルゲンを投与した際の免疫グロブリンのクラスとサブクラスの産生量を定量する。モデルマウスにアトピー性皮膚炎、細菌感染症等を誘導しその際の免疫応答を比較検討する。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、抗原提示能、などの検討を行う。

## 【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作出に成功した。現在上記の各種の免疫機能を解析することにより、当該変異体は当初の想定とやや異なる免疫異常を呈することが明らかになっている。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

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、この困難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 80:102264, 2023

[3-2]学会発表

[3-3]成果資料等