

200936190A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

細網異形成症の診断と治療に関する調査研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野々山 恵章

平成22年3月

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

細網異形成症の診断と治療に関する調査研究

目 次

I. 班員・研究協力者名簿	1
II. 総括研究報告	
細網異形成症の診断と治療に関する研究	3
野々山恵章（防衛医科大学校小児科学講座）	
III. 分担研究報告	
1. TRECs (T-cell receptor excision circles)を用いた細網異形成症の 新生児マススクリーニング法の開発	9
今井耕輔（防衛医科大学校病院医療情報部）	
2. 細網異形成症患者由来 i P S 細胞樹立およびそれを用いた 病態解析、診断、および治療法の開発	13
中畑龍俊（京都大学物質—細胞統合システム拠点iPS細胞研究センター）	
3. 細網異形成症の疫学調査、診断、治療法 に関する研究	19
森尾友宏（東京医科歯科大学大学院発達病態学分野）	
4. 細網異形成症の診断と治療に関する調査研究	23
小原 収（（財）かずさDNA研究所）	
5. 骨髄非破壊的造血細胞移植にて救命し得た細胞異形成症の1例	27
蒲池吉朗（名古屋大学医学部小児科）	
6. 骨髄不全症におけるテロメア長短縮化症例を検索することの重要性	31
山口博樹（日本医科大学血液内科）	
7. 音受容に関するAdenylate Kinase-2(AK2)の中耳における役割についての研究	35
塩谷彰浩（防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座）	

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 41

V. 研究成果の刊行に関する別冊 ----- 45

# I 班員・研究協力者名簿

細網異形成症の診断と治療に関する調査研究班  
班 員 名 簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	野々山恵章	防衛医科大学校医学研究科小児科学講座	教授
研究分担者	今井 耕輔	防衛医科大学校病院医療情報部	准教授
	中畑 龍俊	京都大学物質—細胞統合システム拠点iPS細胞研究センター	副センター長、 特定拠点教授
	森尾 友宏	東京医科歯科大学大学院発達病態 小児科学分野	准教授
	小原 収	財団法人かずさ DNA 研究所 生物物理学	部長
		理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター 免疫ゲノミクス研究グループ	ディレクター
	蒲池 吉朗	名古屋大学医学部附属病院	講師
	山口 博樹	日本医科大学病態制御腫瘍内科学 血液内科学	講師
塩谷 彰浩	防衛医科大学校医学研究科 耳鼻咽喉科学講座	教授	
事務局	野々山恵章 寒河江恵美	防衛医科大学校医学研究科小児科学講座 〒359-8513 埼玉県所沢市並木3丁目2番地 TEL: 04-2995-1621 FAX: 04-2996-5204 E-mail: pedsec01@ndmc.ac.jp	教授 教授秘書
経理事務担当者	坂本なぎさ	防衛医科大学校教務部教務課 TEL: 04-2995-1211(内線 2315) FAX: 04-2995-0638 E-mail: ins022@ndmc.ac.jp	



## II 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

## 細網異形成症の診断と治療に関する調査研究 平成 21 年度 総括研究報告書

主任研究者 野々山 恵章  
(防衛医科大学校 小児科学講座)

### 研究要旨

細網異形成症の診断と治療法を確立し、患者の救命および長期予後を改善することを目的として以下の研究を行った。

#### <疫学調査>

PIDJ による疫学調査を行い、新規患者を確定した。

#### <診断方法確立、診断基準作製>

原因遺伝子である AK2 の Westernblot, 免疫蛍光染色, real time PCR, DNA 解析法による診断法を確立し、診断基準を作製した。

#### <スクリーニング法開発>

新生児乾燥濾紙血を用いた TRECs の測定によるスクリーニング法を確立した。

#### <治療指針の作成>

造血幹細胞移植成績調査を行い、その結果をもとに、治療指針を作製した。

#### <患者会での啓発>

患者会のホームページを開設した。

#### <患者由来 iPS 細胞作製>

患者由来の fibroblasts を樹立し、iPS 細胞作製の準備が完了した。これを用い、病態解明・治療への応用を行う。具体的には、iPS 細胞を用いた遺伝子治療法を開発する目的で、AK2 レンチウイルスベクターを作製した。

#### <病態解析>

難聴、骨髄不全、免疫不全発症機序の解析を行うため、内耳細胞の免疫染色、骨髄不全患者のコロニー解析、テロメア解析、AK2 遺伝子解析を行なった。AK2 ノックアウトマウスの作製を開始した。

## A. 研究の目的

細網異形成症は骨髄系細胞、リンパ系細胞、内耳細胞など多系統の細胞分化障害を来す難病である。ほとんどが1歳以下に感染症で死亡する重篤な疾患であるが、早期診断を行えば造血幹細胞移植により根治できる疾患であり、早期治療、早期治療が患者の予後改善に重要である。新生児スクリーニングも有効で、将来的な遺伝子治療の良好な適応にもなる。

本疾患は症状が多彩であるため、多くの患者が診断されず見逃されている。したがって、疫学的調査の重要な対象疾患となる。また、典型例では多系統の細胞分化障害を呈するが、一部の系統のみが障害される軽症例の存在も示唆される。

そこで、細網異形成症の診断基準、診断法、スクリーニング法の確立、至適造血幹細胞移植法の確立、iPS細胞を用いた遺伝子治療などの新規治療法の開発を行い、早期発見、早期治療により本疾患を根治し、もって患者に益することを目的とする。

## B. 研究方法

今回の研究では、申請者が構築したインターネットを活した先天性免疫不全症の中央診断・登録・遺伝子解析システムPIDJ((Nature Immunology 2008, Nucleic Acid Res. 2009)を細網異形成症に応用して疫学調査、軽症例、非典型例を含めた実態把握を行う。

さらに、申請者が確立した、原因遺伝子AK2のタンパク発現解析、遺伝子解析法により、確定診断を行う。T細胞新生能のマーカーであるTRECs測定による新生児スクリ

ーニング法、作製中のモノクローナル抗体を用いたFACS解析などによる迅速診断の開発を行う。

また、細網異形成症は幹細胞から多系統への細胞の分化障害による疾患であるため、iPS細胞による病態解析と遺伝子治療に最も適した疾患である。そこで、すでに樹立した細網異形成症患者由来fibroblastsから、iPS細胞作製を行う。新規作製したレンチウイルスベクターを用い、正常AK2遺伝子をiPS細胞に導入し、iPS細胞から血液前駆細胞に分化させ、コロニーアッセイ、NOGマウスを用いたヒト免疫系・血液系の再構築評価システムにより、AK2障害による血液分化障害の解析および遺伝子治療の開発を行う。作製中のAK2ノックアウトマウスをモデルとして、血液細胞分化障害、難聴の解析を行う。

造血幹細胞移植による治療成績の国内および国際調査を行い、治療法の確立を行う。

## C. 研究結果

### 1. 診断法確立

#### 1) AK2タンパク異常解析

Westren blot法によるAK2タンパクの測定法を確立し、患者ではAK2タンパクが陰性であること、コントロールとして用いたAK1は陽性であることを確認した。

#### 2) AK2遺伝子解析

AK2遺伝子診断法を確立した。患者細胞からRNAを抽出しcDNAに変換し、cDNAのAK2遺伝子変異を解析する方法を確立した。



また、病理標本、乾燥濾紙血、保存臍帯などから genomic DNA を抽出し、全ての exon の AK2 遺伝子をシーケンスし解析する方法を確立した。

血液・免疫・内耳細胞サブセットの AK2 遺伝子発現を評価するために、リアルタイム PCR により mRNA 発現を定量的に測定する方法を確立した。

## 2. 診断基準作製

診断基準案を作製した。(別掲)

## 3. 病態解明および新規治療開発

コロニー解析を行い、骨髄系細胞の分化が障害されていること、単球系への分化は起きることを示した。

患者から Fibroblasts を作製した。これを用いて iPS 細胞作製する事について患者家族の同意を得た。ヒト疾患特異的 iPS 細胞を1ヵ月で作成する方法、iPS 細胞から造血前駆細胞へ分化させる方法、この造血前駆細胞を免疫不全 NOG マウスに移入して成熟血液・免疫系細胞へ分化させる方法を確立した。

患者由来 iPS 細胞に AK2 遺伝子を導入し、造血幹細胞に分化させ患者に戻す新規治療を確立するために、AK2 遺伝子をクローニングした。遺伝子導入に用いるレンチウイルスベクターを作製した。

## 4. 治療指針の作成

細網異形成症を含む重症複合型免疫不全症の造血幹細胞移植による予後調査を行い、その結果、前処置を軽減しても生着すること、非血縁臍帯血移植の成績が良い

こと、感染症がコントロール出来ている状態で移植することで成績が良くなることが判明した。その結果をもとに、治療指針案を作製した。(別掲)

## 5. 疫学調査など実態把握の方法の構築

### 1) PIDJ による疫学調査

先天性免疫不全症の中央診断登録データベースである PIDJ を利用し、新規症例を見出した。遺伝子診断、AK2 western blot によるタンパク低下、AK2 遺伝子異常により、確定診断した。骨髄移植後の根治した患者も見いだした。また、20年前に細網異形成症疑いとして新生児期に死亡した患者の病理標本から遺伝子診断を行った。

### 2) 先天性難聴、先天性骨髄不全の疫学調査

先天性難聴のデータベース、先天性骨髄不全のデータベースを利用し、AK2 変異の有無の解析を開始した。

### 3) スクリーニング法の開発

T 細胞新生能のマーカーである TREC を新生児濾紙血で測定する方法を確立した。実際に本症患者で TREC を測定し、測定感度以下であることを示し、本症を新生児スクリーニングできることを示した。

### 4) 新規原因遺伝子同定

AK2 正常の細網異形成症例を PIDJ 登録例から見出した。AK2 以外の新規原因遺伝子同定を開始した。

## 5) 患者会での啓発

患者会ホームページを立ち上げた。勉強会を行い、患者啓発に努めた。日本の患者会が国際患者会である IPOPI の会員となることに尽力し、認定された。

## D. 考案

### 1. 学術的意義

#### 1) 病態解析の意義

細網異形成症原因遺伝子 AK2 の機能解析は、骨髄系細胞、免疫系細胞、内耳細胞の分化機構の解明につながり、学術的意義が大きい。遺伝子機能を解析することにより、多系統の細胞分化異常がなぜ AK2 という一分子でもたらされるのか解明され、細胞分化とアポトーシスの関連に新規知見をもたらし、基礎科学への貢献が大きい。

また、細網異形成症は、幹細胞から多系統への細胞の分化障害による疾患であるため、疾患特異的 iPS 細胞による病態解析と再生医療による治療に最も適した疾患である。本疾患の iPS 細胞による病態解析、新規治療開発に結びつけた研究は学術的な意義が大きい。

#### 2) 疫学解析の意義

PIDJ (Primary Immunodeficiency Database in Japan) は、インターネットを活用した免疫不全症の中央診断登録体制である。全国の一般医が、免疫不全症疑い症例の臨床症状、検査データを相談フォームに入力し専門医にコンサルトする。専門医は臨床データをもとに、送付検体を用い FACS 解析、遺伝子解析を行い、その

結果から確定診断し、一般医にアドバイスをする。検体は保存する。これにより患者登録、診断、専門医による助言、FACS 解析、検体保存が一举に出来るシステムである。

PIDJ は、臨床医学と基礎医学、一般医と専門医を統合するシステムとして、Nature Immunology に紹介された。PIDJ システムにより疫学調査し、本症の診断、治療、予後解析に有効活用できるので、有意義である。

### 2. 国際的意義

細網異形成症の治療として、患者 iPS 細胞に正常遺伝子を導入する治療法は、国際的に脚光を浴びている。しかし、遺伝子治療と患者 iPS 細胞化を、ともに出来る研究室はほとんど無く、国際的な意義が大きい。

### 3. 社会的意義

細網異形成性症の診断基準、病態解明、スクリーニング法の開発、根治治療法の開発は、難病を新しい医学で診断治療することを社会に示すことになり、医学の発展が患者に還元されるという大きなインパクトを与える。患者会の期待も大きい。本疾患の社会的な認知も進む。特に、難病を新生児期にスクリーニングして早期診断し、造血幹細胞移植による早期治療で根治することが出来るため、難病の早期診断、早期治療の効果を示す事になり、社会的意義が大きい。

また、疾患特異的 iPS 細胞による病態解明法、遺伝子治療と再生医療を結びつける治療法は、新規な方法として、次世代医療のモデルとなり、社会的成果が大きい。

#### 4. 今後の課題

平成21年度に得られた成果をもとに、以下の研究を行う。これにより、診断・病態解析・より良い治療の確立を行う。

##### 1) 迅速診断法の確立

Western blot, DNA sequence はやや時間がかかるため、作製中の抗 AK2 モノクローナル抗体を用いた ELISA, FACS 解析による迅速診断法を開発する。

##### 2) 中央登録診断システムによる新規患者同定

免疫不全症、先天性難聴、先天性骨髄不全のデータベースに登録された患者の AK2 タンパク異常、AK2 遺伝子異常を引き続き行う。

また、細網異形成症に焦点をあてた、骨髄形態観察、骨髄幹細胞を用いたコロニー解析、AK2 タンパク解析、AK2 遺伝子解析による中央登録診断システムを構築したので、広く周知して本疾患の見逃し例を少なくする。

##### 3) 免疫・血液系異常の病態解析

患者由来 iPS 細胞作製の準備が出来たので、実際に作製する。これを血液前駆細胞に分化させ、コロニーアッセイ、リンパ球分化アッセイ、アポトーシス解析、リンパ球各サブセット、骨髄系細胞、単球系細胞の各 lineage ごとのテロメア長測定などの in vitro 解析により、発生障害の病態を解明する。

また、iPS 細胞より分化させた血液前駆細胞を NOG マウスに移入する系が確立した

ので、これを用いて、ヒト細網異形成症のマウスモデルを作製し、感染実験、臓器障害実験、遺伝子導入実験を行い、vivo に近い状況での病態解析を行う。

さらに iPS 細胞に AK2 遺伝子を導入し、これらの障害が回復することを示す。変異遺伝子を導入して、骨髄系、リンパ系の分化を検討し、遺伝子変異と表現形との関連を解明する。

作製中の AK2 ノックアウトマウスも用いて、同様の解析を行う。

##### 4) 難聴の病態解明

難聴の病態解明のために、骨髄移植により生存しているが難聴が続いている患者の ABR, OAE, 蝸電図、ASSR などによる聴覚・平衡障害の解析を行う。内耳細胞が AK2 を発現していることを Western blot, 免疫蛍光染色で確認したので、さらに難聴の原因が内耳血管条のアポトーシスによるという仮説を、難聴モデルマウス、AK2 ノックアウトマウスを用いて証明する。iPS 細胞から内耳細胞発生を誘導し AK2 発現の有無による分化障害を検討する。

##### 5) 造血幹細胞移植推奨案の実施

現時点での根治療法である造血幹細胞移植の推奨案をまとめた。すなわち臍帯血をドナーソースとして、前処置を骨髄非破壊的処置とした。この推奨案を実施し、その結果をまとめる。

##### 6) iPS 細胞を用いた遺伝子治療法開発

患者由来 iPS 細胞に、既に作製したレンチウイルスベクターにより AK2 遺伝子を導

入し、その後血液前駆細胞に分化させ、患者に戻す再生医療の開発に着手する。これにより適合ドナーがない、GVHD 発症などの移植治療における問題を解決できる。

#### 7) 新規遺伝子同定

AK2 正常の大家系の細網異形成症が存在する。その原因遺伝子同定を次世代シーケンサーと CGH アレイを用いた Whole genome sequence により行う。実際、最近 GFi 分子がマウスの解析により細網異形成性症の新たな原因遺伝子である可能性が示唆されている。

#### 8) スクリーニングの実施

内分泌代謝疾患のスクリーニングとして、新生児期に全新生児から採取される新生児乾燥濾紙血を用い、TREC を測定することにより、本症は新生児期にスクリーニングし確定診断することが出来る。早期診断、早期治療により予後が劇的に改善するため、スクリーニングに適した疾患である。本症の新生児スクリーニングを実現する。

#### 9) 他の難病への応用

本研究で得られる成果をもとにして、他の難病に対する疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析、遺伝子治療、再生医療への応用が期待できる。

また、PIDJ というインターネットを用いた先天性免疫不全症の中央診断登録システムが成功しているので、他の難病にその手法を公開し、応用してもらい、広く難病の診断・治療に貢献する。

#### E. 結論

短期間であったが、タンパク発現、遺伝子発現、遺伝子変異解析による確定診断法を確立できた。これにより診断指針を作製できた。また、PIDJ 登録システムを用いて、新規患者を見いだすことが出来た。患者造血幹細胞のコロニーアッセイによる、分化障害を検討することが出来た。骨髄移植により根治できた患者を見いだすことが出来た。これにより治療指針が作製できた。iPS 細胞の作製準備が整った。以上、予想以上の目標達成が出来た。

#### F. 研究危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

特になし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

別紙参照。

### Ⅲ 分 担 研 究 報 告

# TRECs (T-cell receptor excision circles)を用いた 細網異形成症の新生児マススクリーニング法の開発

今井 耕輔 (防衛医科大学校 医療情報部)

## 研究要旨

TRECs はT細胞の発生の過程で産生される環状 DNA であり、T 細胞新生能のマーカーとして用いる事が出来る。今回の研究では、real-time PCR 法による TRECs(T-cell receptor excision circles)の定量法を確立した。必要血液量は 100  $\mu$ l であり、新生児乾燥濾紙血からも測定可能であった。健常新生児を含む年齢別の正常値を確定した。健常児全てで検出可能であり、cut off 値を確定した。T 細胞欠損症である SCID では、全例 TRECs は全例でごく低値ないし検出感度以下であった。細網異形成症で検討した結果、測定感度以下であり、新生児スクリーニングに用いることができると考えられた。本スクリーニング法により、細網異形成症の早期発見が可能になり、早期診断・早期治療により患者の生命予後の改善につながると考えられる。

## A. 研究目的

細網異形成症は、T細胞、NK 細胞、好中球減少、感音性難聴を主要症状とする重篤な疾患である。新生児期に T 細胞欠損をきたす主な疾患として、重症複合免疫不全症(Severe combined immunodeficiency, 以下 SCID )があるが、細網異形成症は、T細胞欠損に好中球減少と難聴が加わった SCID の最重症型とも考えられる。

細網異形成症は、著しい易感染性により乳児期早期に重症日和見感染症を発症する致死性の先天性免疫不全症である。造血幹細胞移植 (Hematopoietic stem cell transplantation, 以下 HSCT)による免疫能再構築が標準的な根治療法であるが、HSCT 前に重症感染症を発症すると治療が困難になる。しかし、乳児期早期に HSCT が実施されれば、SCID における調査と同様とすると、生存率が 76~95%に達するとされ予後を改善できる。

今回、我々は細網異形成症を早期発見し、感染症発症前の早期治療に結びつけるため、TRECs 測定により新生児期にスクリーニングすることを目的として以下の研究を行ったので報告する。

## B. 研究方法

TRECs 測定を確立し、細網異形成症の新生児期スクリーニングに応用するため、以下の研究を行った。

- 1) TRECs の real time PCR 法による定量法を開発する。
- 2) 新生児期の TRECs を測定し、基準値を作成する。
- 3) SCID および細網異形成症患者の TRECs を測定する。

なお、本研究は、防衛医科大学校倫理委員会の承認済みであり、患者・家族・健常児からは十分な説明のもと、文書による同意を得ている。小児の採血は、医療上必



要な採血時にごく少量を同時に採取した。

正期産新生児臍帯血、新生児濾紙血を採取した。また臍帯血より濾紙血を作成した。genomic DNA 濃度 5ng/ $\mu$ l 未満を除外し、臍帯血 87 例、臍帯血濾紙血 78 例、新生児濾紙血 60 例を検討した。健常者末梢血 53 例(男:女 25:28、年齢 23 $\pm$ 36 歳(1 か月 $\sim$ 55 歳)、genomic DNA 濃度 26.3 $\pm$ 19.7(11.5 $\sim$ 59)ng/ $\mu$ l)も同様に検討した。

SCID 患者は 21 例を測定した。このうち細網異形成症は 2 例で測定した。臍帯血や末梢血は EDTA 血として 100ul、ガスリー血は直径 6mm 大に punch-out した濾紙血 2 枚をサンプルとして、キットを用いて DNA を抽出した。DNA 濃度を測定した上で、TREC<sub>s</sub> と内在性コントロールとして RNaseP を同時に定量し、コピー数を 1ugDNA あたりに換算、統計学的解析を加えた。DNA 濃度は 5ng/ $\mu$ l 以上を対象とした。

Real time PCR は、濃度の分かっている standard サンプルと未知サンプルを同じ条件で PCR し、各サイクルでの増幅を検出した。Standard の増幅曲線から標準曲線を引き、未知サンプルの濃度を求めた。

## C. 研究結果

### 1. 正常コントロール

健常新生児(在胎 38.8 $\pm$ 3.0(35 $\sim$ 41)週、出生体重 3076 $\pm$ 972(1870 $\sim$ 4195)g)の臍帯血 87 例を採取した。また臍帯血より濾紙血を作成した。gDNA 濃度 5ng/ $\mu$ l 未満を除外し、臍帯血 87 例、臍帯血濾紙血 78 例、新生児濾紙血 60 例を検討した。健常者末梢血 53 例(男:女 25:28、年齢 22 $\pm$ 33 歳(1 か月 $\sim$ 55 歳)、gDNA 濃度 26.3 $\pm$ 19.8(11.5 $\sim$ 59)ng/ $\mu$ l)も同様に検討した。

免疫不全症のない臍帯血、末梢血で検討すると内因性コントロールの RNaseP は年齢による差はなく、TREC<sub>s</sub> は ngDNA あたりと RNaseP あたりで正の相関が認められた。また、TREC<sub>s</sub> は全例で検出できた。

### 2. SCID 患者

SCID 患者の新生児濾紙血では、全例で内在性 DNA 量コントロールとしての RNaseP は健常者と有意差なく、全例検出可能だった。TREC<sub>s</sub> は、maternal T 陽性例を含め全例ごく低値ないし検出感度以下であった。

SCID 患者の末梢血では、RNaseP は全例検出可能で健常者と有意差はなかった。TREC<sub>s</sub> は、全例ごく低値ないし検出感度以下であった。

### 3. 細網異形成症患者

AK2異常が確認された細網異形成症患者 2 症例の末梢血で TREC<sub>s</sub> を測定した。その結果、2 例とも検出感度以下であった。

## D. 考察

T 細胞は胸腺内でまず  $\beta$  鎖の再編成が起こり、preTCR $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖が発現する。その後、 $\alpha$  鎖の再編成が起こり、この時に  $\alpha$  鎖遺伝子の中に位置する  $\delta$  鎖が切り出され、TREC が形成される。測定する TREC は、T 細胞胸腺内分化、すなわち T-cell receptor の遺伝子再編成の過程で、 $\alpha$  遺伝子内に位置する  $\delta$  遺伝子が除去される結果、環状 DNA として切り出される。TREC<sub>s</sub> は T 細胞の分化・増殖により複製されることなく、細胞死するまで安定して存在するため、新生 T 細胞のマーカーとされる。これまでに TREC を用いた SCID の新生児マススクリーニングや移植後の T 細胞機能

評価、フォローアップについて報告があるが、今回の結果からも、乾燥濾紙血を用いた TREC 定量法は SCID および細網異形成症の新生児マススクリーニングに有効であると考えられた。

#### E. 結論

TRECs の測定は、細網異形成症を含む T 細胞欠損症の早期発見、早期診断、早期治療に有用であり、新生児スクリーニングに応用可能であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

- 1) Hashii Y, Yoshida H, Kuroda S, Kusuki S, Sato E, Tokimasa S, Ohta H, Matsubara Y, Kinoshita S, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Ohara O, Ozono K. Hemophagocytosis after bone marrow transplantation for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency. *Pediatr Transplant.* 2009, in press.
- 2) Morinishi Y, Imai K, Nakagawa N, Sato H, Horiuchi K, Ohtsuka Y, Kaneda Y, Taga T, Hisakawa H, Miyaji R, Endo M, Oh-Ishi T, Kamachi Y, Akahane K, Kobayashi C, Tsuchida M, Morio T, Sasahara Y, Kumaki S, Ishigaki K, Yoshida M, Urabe T, Kobayashi N, Okimoto Y, Reichenbach J, Hashii Y, Tsuji Y, Kogawa K, Yamaguchi S, Kanegane H, Miyawaki T, Yamada M, Ariga T, Nonoyama S. Identification of

Severe Combined Immunodeficiency by T-Cell Receptor Excision Circles Quantification Using Neonatal Guthrie Cards. *J. Pediatr.* 2009, 155(6):829-33.

- 3) Keerthikumar S, Raju R, Kandasamy K, Hijikata A, Ramabadran S, Balakrishnan L, Ahmed M, Rani S, Selvan LD, Somanathan DS, Ray S, Bhattacharjee M, Gollapudi S, Ramachandra YL, Bhadra S, Bhattacharyya C, Imai K, Nonoyama S, Kanegane H, Miyawaki T, Pandey A, Ohara O, Mohan S. RAPID: Resource of Asian Primary Immunodeficiency Diseases. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37(Data base issue D863-7.)
- 4) Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, Imai K, Espanol T, Fasth A, Pellier I, Strauss G, Morio T, Gathmann B, Noordzij JG, Fillat C, Hoenig M, Nathrath M, Meindl A, Pagel P, Wintergerst U, Fischer A, Thrasher AJ, Belohradsky BH, Ochs HD. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome and treatment options. *Blood.* 2009, in press.
- 5) Keerthikumar S, Bhadra S, Kandasamy K, Raju R, Ramachandra YL, Bhattacharyya C, Imai K, Ohara O, Mohan S, Pandey A. Prediction of Candidate Primary Immunodeficiency Disease Genes Using a Support Vector

Machine Learning Approach. DNA Res.  
2009, 16(6):345-51.

- 6) Uchisaka N, Takahashi N, Sato M,  
Kikuchi A, Mochizuki S, Imai K,  
Nonoyama S, Ohara O, Watanabe F,  
Mizutani S, Hanada R, Morio T. Two  
brothers with ataxia-telangiectasia  
-like disorder with lung  
adenocarcinoma. J. Pediatrics. 2009,  
155;435-8.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

# 細網異形成症患者由来 iPS 細胞樹立およびそれを用いた病態解析、診断、および治療法の開発

中畑 龍俊

(京都大学 物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター  
医療応用技術開発部門 疾患解析学分野)

## 研究要旨

細網異形成症の早期診断法や新規治療法を開発するために、ES 細胞や患者由来の iPS 細胞を用いた病態解析を進めている。これまでに、細網異形成症の原因遺伝子である AK2 遺伝子の cDNA 作成、免疫染色、ウェスタンブロットティングおよびリアルタイム PCR の条件検討は完了し、それらを用いた解析は可能となった。また、iPS 細胞完成後の血球分化アッセイに必要なコロニーアッセイおよび骨髄系細胞への分化は可能となっており、T リンパ球への分化アッセイを確立中である。その他、siRNA や miRNA による ES 細胞および臍帯血を用いた血球分化アッセイの確立、フローサイトメリー用の AK2 タンパクに対するモノクローナル抗体作成、AK2 ノックアウトマウス作成も進行中であり、順調に研究計画が進行中である。

## A. 研究の目的

iPS 細胞や ES 細胞を用いた細網異形成症の病態解析を詳細に行うことによって、早期診断法や新規治療法を開発する。

## B. 研究方法

細網異形成症患者由来の繊維芽細胞から iPS 細胞を作成し、これを血液前駆細胞に分化させ、コロニーアッセイ、骨髄系細胞やリンパ球への分化アッセイ、アポトーシス解析などの *in vitro* 解析を行う。同様にして、内耳細胞発生についても検討する。さらに細網異形成症の原因遺伝子である AK2 遺伝子を導入し<sup>1,2)</sup>、本疾患の血球分化障害が回復することを示す。変異遺伝子を導入して、骨髄系、リンパ系、内耳細胞の分化を検討し、遺伝子変異と表現形との関連を解明する。iPS 細胞完成前には、正

常人の ES 細胞や臍帯血を用いて、上記のアッセイ系を確立する。この際に機能評価に必要となる AK2 の免疫染色、ウェスタンブロットティング、およびリアルタイム PCR を確立する。また、siRNA (small interfering RNA) や miRNA (micro-RNA) を用いて、正常人の ES 細胞や臍帯血の mRNA を破壊することによって AK2 遺伝子の発現を抑制し、上記アッセイ系を行う。さらに、病態解析に非常に有用となりうる、フローサイトメリー用の AK2 タンパクに対するモノクローナル抗体を作成する。

また、iPS 細胞より分化させた血液前駆細胞を免疫不全症マウスに移入することにより、ヒト細網異形成症のマウスモデルを複製し、これを用いて、感染実験、臓器障害実験、遺伝子導入実験を行い、*vivo* に近

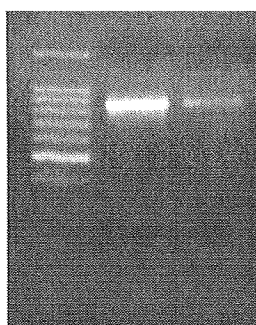
い状況での病態解析を行う。さらに、AK2 ノックアウトマウスの作成も行う。

## C. 研究結果

### 1. AK1 および AK2 の cDNA 作成

下図のように、AK2-A および AK2-B の cDNA を PCR によって作成後、プラスミド DNA を用いてクローニングした。

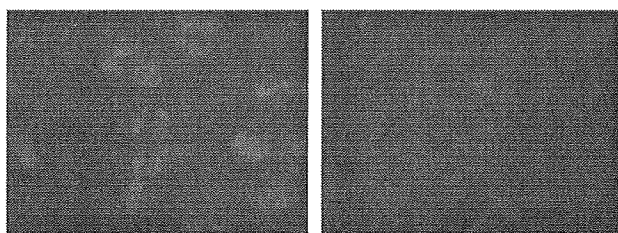
(AK2 には A および B の 2 種類のスプライズバリエントが存在する。)さらに、別のアイソザイムである AK1 もクローニングした。



AK2-A AK2-B

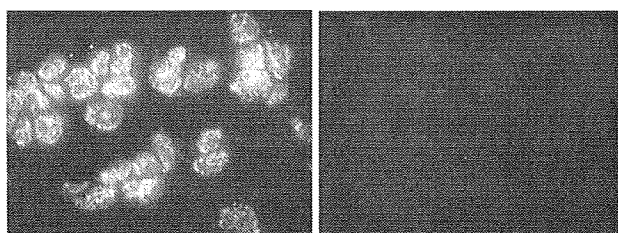
### 2. AK1 および AK2 の免疫染色

正常繊維芽細胞にて、AK1 および AK2 に対する複数種の抗体を使用し、免疫染色を行い、最適な条件検討を行った。



Immunofluorescence analysis of AK1 in normal fibroblasts (AK1 antibody: sc-28785)

Immunofluorescence analysis of AK2 in normal fibroblasts (AK2 antibody: 11014-1-AP)



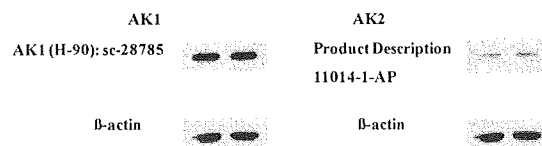
Immunofluorescence analysis of AK1 in normal fibroblasts (AK1 antibody: 11014-1-AP)

Immunofluorescence analysis of AK2 in normal fibroblasts (AK2 antibody: sc-28785)

上図のように、AK1、AK2 ともに良好な染色条件を決定することができた。AK1、AK2 ともに細胞内局在のため、染色前に 0.1% triton X-PBS 処理を 15 分間行い、一次抗体は 1/80 量、二次抗体は rabbit IgG conjugated with FITC を 1/100 使用した。

### 3. AK1 および AK2 のウエスタンブロッティング

正常繊維芽細胞にて、AK1 および AK2 に対する複数種の抗体を使用し、ウエスタンブロッティングを行い、最適な条件検討を行った。



上図のように、AK1、AK2 ともに良好な検出条件を決定することができた。AK1 および AK2 の一次抗体はそれぞれ 1/500 量と 1/1500 量、二次抗体は rabbit IgG 抗体を 1/3000 量使用した。

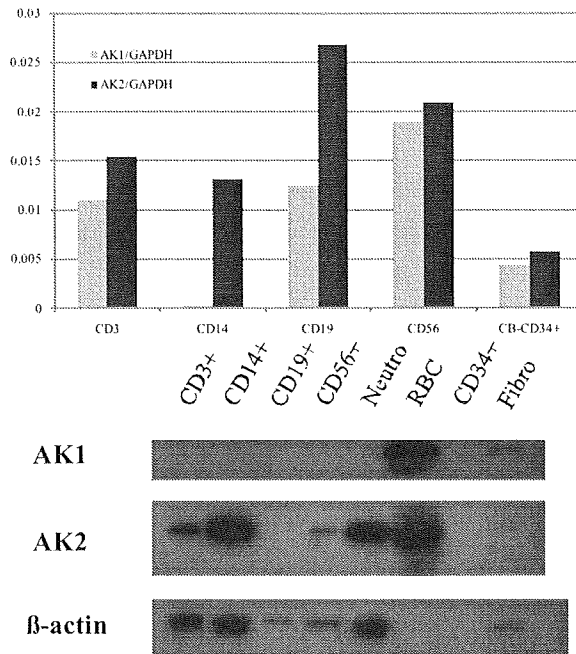
### 4. AK1 および AK2 のリアルタイム PCR

正常繊維芽細胞から RNA 抽出および RT-PCR を行い、AK1 および AK2 に対するリアルタイム PCR の最適な条件検討を行い、良好な条件を決定することができた。

### 5. 末梢血の各系統ごとの AK1 および AK2 の遺伝子発現およびタンパク発現の評価

正常人の末梢血をソーティングし、下図のように血球の各系統別に AK1 および

AK2 の遺伝子およびタンパク発現を確認した。



#### 6. 正常人由来 iPS 細胞、ES 細胞および臍帯血を用いたコロニーアッセイ、骨髄系細胞やリンパ球への分化アッセイ等の in vitro 解析

細網異形成症患者由来の iPS 細胞完成後の血球分化アッセイを行うための条件検討を行い、現在までにいずれの細胞からもコロニーアッセイおよび骨髄系細胞への分化が可能となっている。また、T リンパ球への分化アッセイを確立中である。

#### 7. siRNA や miRNA による正常人由来 ES 細胞および臍帯血を用いた血球分化アッセイ

siRNA および miRNA とともに RNA 配列のデザインおよび合成は終了した。また、miRNA をレンチウイルスベクターに挿入する作業中である。

#### 8. フローサイトメリー用の AK2 タンパクに対するモノクローナル抗体作成

合成ペプチド抗原を用いる方法とリンコンビナントタンパク質抗原を用いる方法の 2 種類で抗体作成を進めている。現在、ペプチド抗原およびリコンビナント抗原の作成中である。

#### 9. AK2 ノックアウトマウス作成

AK2 の null ノックアウトマウス作成のためのターゲティングベクターの設計および構築は終了した。現在、相同組換え ES 細胞の作成中である。

#### D. 考察

現在、細網異形成症患者由来 iPS 細胞を作成するために、2 人の患者由来の繊維芽細胞を増殖中である。ただし、皮膚由来の繊維芽細胞ではなく、骨髄由来の細胞であるためか、やや増殖が遅いのが問題点である。培養条件の検討および凍結保存した検体の使用を検討中である。

正常人の末梢血の各系統ごとの AK1 および AK2 の遺伝子発現およびタンパク発現の評価については、既報告と若干異なるパターンを示しており、再実験等の再評価を予定している。

さらに、iPS 細胞からの T リンパ球への分化はこれまで報告が無いため、この分化アッセイの確立は世界的に見ても有用なものとなりうる。また、本疾患の血球分化障害のメカニズムを解明することによって、ヒトにおける血球分化の真相に迫れる可能性があると考えている。