

201024136A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野々山 恵章

平成23(2011)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. 総括研究報告

細網異形成症の診断と治療に関する研究	1
野々山恵章（防衛医科大学校小児科学講座）	

II. 分担研究報告

1. TREC _s , KREC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	14
中畑龍俊（京都大学iPS細胞研究所臨床応用研究部門疾患再現研究分野）	
3. 細網異形成症の疫学調査、診断、治療法 に関する研究	24
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	29
小原 収（（財）かずさDNA研究所副所長）	
5. コロニーアッセイ、骨髄機能解析	33
小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学）	
6. テロメア制御異常による骨髄不全症の新規診断法の開発	36
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	41
塩谷彰浩（防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座）	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	47
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行に関する別冊	51
-------------------	----

I 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 22 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、平成21年度の結果をもとにさらに発展させ以下の研究を行った。

<疫学調査>

インターネットを活用した中央診断システム PIDJ による疫学調査を行った。

<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。

AK2モノクローナル抗体を作製した。ELISA, FACS を用いた迅速診断法の開発を試みた。

<スクリーニング法開発>

新生児乾燥濾紙血を用いた TREC_s および KREC 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、拡充した。患者会で説明会を行った。

<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。

また、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を作製し、解析を行った。

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、早期診断、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い適応にもなる。

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った。

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TREC_s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った。

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、細網異形成症患者由来fibroblastsを樹立した。ここからiPS細胞作製を行っている。

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。

作製したAK2ノックアウトマウスの胎生致死の原因、問題点を明らかにし、利用法を検討する。

造血幹細胞移植による治療成績の国内調査を行った。今後国際調査を行う。このデータをもとに治療法の確立を行った。

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。

抗AK2モノクローナル抗体を作製し、FACS解析に用いられるものをスクリーニングしたが、さらなる検討が必要と考えられた。

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

昨年度作製した診断基準案を一般に啓発した。(別掲)

3. 病態解明および新規治療開発

患者骨髄血液幹細胞を用い、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。患者 Fibroblasts から iPS 細胞樹立を様々な方法で目指している。細胞自体がアポトーシスに陥りやすいことが判明し、AK2 遺伝子を一過性に発現させることが有効であろうとの見通しをえたため、鋭意作製中である。

末梢血から iPS 細胞を樹立する方法を開発した。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。

AK2 ノックアウトマウスを作製した。胎生致死であったため、ヒトとマウスで AK2 への細胞の生存の依存度、また各種組織における AK2 の依存度の違いが示された。

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。昨年度作製した治療指針案についてその検証を行った。(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及びB細胞新生能のマーカーでKREC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、検体保存が一挙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22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、作製した抗 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。より FACS に適したモノクローナル抗体を再度作成する予定である。

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。特に、AK2 を一過性に発現させるシステムを活用した。また、末梢血から iPS 細胞を樹立する方法も開発したので、この方法を用いる。iPS 細胞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。

作製した AK2 ノックアウトマウスが胎生致死であったため、Fibroblasts からの細胞分化実験への利用や、Cre-LoxP システムによるノックアウトマウス作製を行う。

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 exome 解析を用いた 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、KREC、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。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

別紙参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Ⅱ 分 担 研 究 報 告

TRECs, KREC 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(T-cell receptor excision circles)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。昨年度は、新生児乾燥濾紙血中のTRECsをreal-timePCRで定量することによる新生児マススクリーニング法を開発し、報告した。今年度は、B細胞の発生過程で産生される環状DNAである、KREC(Ig kappa chain recombination excision circles)をreal-timePCRで定量することによるマススクリーニング法を開発した。必要血液量は100 μ 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。XLAなどのB細胞欠損症では、全例でKRECが検出感度以下であった。細網異形成症と同様、B細胞の存在する、あるいはB細胞の減少を示すSCID亜群で検討した結果、いずれも測定感度以下であり、細網異形成症においても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(Reticular dysgenesis, RD)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。なお、B細胞については、既報告の細網異形成症13例においては、0-556(正常40-2000)と低下例、正常例のいずれも見られている。

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。

昨年度は、新生児乾燥濾紙血中のTRECsをreal-timePCRで定量することによる新生児マススクリーニング法を開発し、報告した。今年度は、B細胞の発生過程で産生される環状DNAである、

KREC (Ig kappa chain recombination excision circles)を real-timePCR で定量することによるマスキング法を開発した。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、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

KREC 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) KREC の real time PCR 法による定量法を開発する。

2) 新生児期の KREC を測定し、基準値を作成する。

3) XLA, SCID 患者の KREC 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 $5\text{ng}/\mu\text{l}$ 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 ± 36 歳(1 か月~55 歳)、genomic DNA 濃度 $26.3\pm 19.7(11.5\sim 59)\text{ng}/\mu\text{l}$) も同様に検討した。

B 細胞欠損症患者として XLA 患者 37 例と遺伝子変異の確定していない B 細胞欠損症患者 6 例を対象とした。SCID 患者は B+SCID として *IL2RG* 異常 16 例(新生児濾

紙血 6 例、末梢血 14 例)、*JAK3* 異常 2 例(新生児濾紙血 2 例、末梢血 1 例)、*RAG1* 異常 1 例(末梢血)を入手した。B-SCID として *LIG4* 異常 2 例(末梢血 2 例)、*ADA* 異常 2 例(末梢血 2 例)、*RAG1* 異常 1 例(末梢血)を入手した。臍帯血や末梢血は EDTA 血として $100\mu\text{l}$ 、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、KREC 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 $1\mu\text{gDNA}$ あたりに換算、統計学的解析を加えた。DNA 濃度は $5\text{ng}/\mu\text{l}$ 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 $3076\pm 972(1870\sim 4195)\text{g}$)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 $5\text{ng}/\mu\text{l}$ 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 ± 33 歳(1 か月~55 歳)、gDNA 濃度 $26.3\pm 19.8(11.5\sim 59)\text{ng}/\mu\text{l}$) 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、KREC は ngDNA あたりと RNaseP あたりで正の相関が認め

られた。また、KREC は全例で検出できた。

2. B 細胞欠損患者

B 細胞欠損患者 8 例の新生児濾紙血および 26 例の末梢血乾燥濾紙血では、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、検出可能だったが、KREC は、全例検出感度以下であった。

3. 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、検出可能だった。B+SCID 19 例では KREC は、全例陽性で、健常者に比べ有意に高値だった。一方、B-SCID では、5 例全例感度以下の低値であった。

なお、今回の検討では、AK2 遺伝子異常を認める細網異形成症患者検体は入手できなかったため、検討できなかったが、好中球減少を伴う SCID 患者 3 名について検討した。いずれも、TREC、KREC とも感度以下の低値を示していた。

D. 考察

B 細胞の分化の際、免疫グロブリン軽鎖(light chain, L 鎖)のうち κ 鎖が VJ 再構成を受け、VDJ 再構成を受けた H 鎖とともに、抗原特異的な B 細胞抗原受容体(B cell receptor, BCR)を作る。自己反応性の BCR が生じた場合、あるいは、抗原を認識しない BCR が生じた場合には、定常領域を含む $J\kappa-C\kappa$ intron recombination signal sequence (マウス : IRS1、ヒト : intronRSS) と

kappa-deleting element (マウス : RS、ヒト : Kde) との間が切り出されることで不活化され (allelic exclusion)、対立遺伝子の κ 鎖で VJ 再構成が始まる。対立遺伝子の κ 鎖も機能的な配列ができなかった場合、不活化され (isotypic exclusion)、 λ 鎖の再構成が始まる。本家乳では、この際に切り出される環状 DNA である signal joint kappa-deleting recombination excision circles (KREC) をリアルタイム PCR 法により検出する方法を開発した (Nakagawa et al, 2011, JACI, in press)。KREC は B 細胞の分化・増殖時に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 B 細胞のマーカーとしてみなすことができる。実際、B 細胞が著減している B 細胞欠損症では KREC は検出感度以下の低値となっていた。また、B 細胞が存在する SCID (B+SCID) では、KREC 値は正常より高値を示した。B+SCID では、T 細胞が存在しないため、単位 DNA あたりの B 細胞の占める割合が上昇するため高値を示すことが考えられた。また、KREC が陽性であることから B+SCID の B 細胞は正常な骨髄内分化をして末梢へ放出されていることも分かった。一方、B-SCID では、B 細胞欠損症と同様、KREC は感度以下の低値を示していた。細網異形成症を含む SCID では、リンパ球減少が見られることが多く、こうした場合にも、TREC に KREC を組み合わせることにより、B+SCID、B-SCID、B 細胞欠損症を鑑別可能であり、新生児期の早期診断と予後の向上にきわめて有用であると考えられた。

E. 結論

KREC の測定は、TREC 定量と組み合わせることで、細網異形成症を含む T 細胞欠損症、B 細胞欠損症の早期発見、早期診断、鑑別診断、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) 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*. 2010.
- 2) Aghamohammadi A, Imai K, Moazzami K, Abolhassani H, Tabatabaeiyan M, Parvaneh N, Nasiri Kalmarzi R, Nakagawa N, Oshima K, Ohara O, Nonoyama S, Rezaei N. Ataxia-telangiectasia in a patient presenting with hyper-immunoglobulin M syndrome. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(5):442-5.
- 3) Tsuge I, Kondo Y, Nakajima Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Ohara O, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Urisu A. Hyper IgM syndrome and complement Clq deficiency in an individual with systemic lupus erythematosus-like disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28(4):558-60.
- 4) Zhao M, Kanegane H, Kobayashi C, Nakazawa Y, Ishii E, Kasai M, Terui K, Gocho Y, Imai K, Kiyasu J, Nonoyama S, Miyawaki T. Early and rapid detection of X-linked lymphoproliferative syndrome with SH2D1A mutations by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010.
- 5) 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*. 2010;14(8):E105-9.
- 6) Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsuiki N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of kappa-deleting recombination excision 1 circles in Guthrie 2 cards for the identification of early B-cell maturation defects. *JACI* 2011 (in press)

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 iPS 細胞研究所
臨床応用研究部門 疾患再現研究分野)

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、2 名の細網異形成症患者由来の繊維芽細胞を用いた AK2 遺伝子の RNA およびタンパクの発現解析、HEK293 細胞を用いた AK2 遺伝子のノックダウン実験系の確立、AK2 遺伝子がノックダウンされた HEK293 細胞安定株樹立、臍帯血を用いた T 細胞分化系を確立した。

細網異形成症患者由来の iPS 細胞樹立を様々な方法で試みているが、現時点では樹立できていない。また、AK2 ノックアウトマウス作成は終了したが、胎生致死であった。血球分化アッセイについては、正常 ES/iPS 細胞からの T リンパ球への分化アッセイを確立中である。その他、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 遺伝子修復ベクター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線維芽細胞から 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。また、患者由来 iPS 細胞に細網異形成症の原因遺伝子である AK2 遺伝子を導入し^{1,2)}、本疾患の血球分化障害が回復することを示す。さらに、ES 細胞、正常 iPS 細胞に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。

細網異形成症患者由来の iPS 細胞の樹立は、当研究所において標準的な方法であるレンチウイルスおよびレトロウイルスを用いた方法、ウイルス感染に脆弱な細胞に有効と考えられる細胞毒性を軽減したレトロウイルスのみを用いる方法、増殖が盛んでない細胞にも高い効率で感染できるセンダイウイルスベクターを用いた方法、ゲノム DNA に導入遺伝子が integrate されない Episomal vector を用いた方法の計 4 種類の方法を用いた。

2 名の細網異形成症患者 (RD-1 と RD-2 とする) 由来の線維芽細胞を用いて、両患者の AK1 および AK2 遺伝子の RNA およびタンパクの発現を、リアルタイム PCR およびウエスタンブロッティングで行った。また、HEK293 細胞を用いて、siRNA による AK1 および AK2 遺伝子のノックダウンを行い、

それぞれの遺伝子の時間経過ごとの挙動をリアルタイム PCR で評価した。さらに、AK2 に対する miRNA 発現レンチウイルスベクターにて AK2 遺伝子のノックダウン HEK293 細胞安定株を樹立した。

AK2 はミトコンドリア内、AK1 は細胞質に局在するなど、細網異形成症の解析の際には、細胞をミトコンドリアと細胞質に分画する必要がある。したがって、ショ糖溶液による細胞破碎、遠心分離によって分離を行った。

Agilent のヒト (Human Whole Genome) Ver.2.0 を用いてマイクロアレイ解析を行った。解析したのは、正常線維芽細胞と細網異形成症患者由来の線維芽細胞の比較、2 名の患者同士の比較、および正常 HEK293 細胞と AK2 を siRNA でノックダウン後 96hr の HEK293 細胞の比較である。

ES/iPS 細胞および臍帯血からの骨髄系細胞および赤芽球系細胞への分化はフィーダーおよび血清フリーで行い、T リンパ球への分化は OP9 および OP9-DLL1 ストロマ細胞を用いたシステムで行った。

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の作成は合成ペプチド抗原を用いる方法とリコンビナントタンパク質抗原を用いる 2 方策で進める。また、AK2 の null ノックアウトマウスの作成も行う。

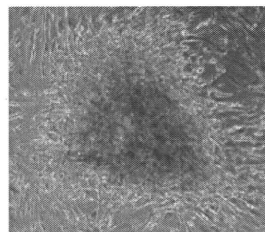
C. 研究結果

細網異形成症患者由来のiPS細胞樹立

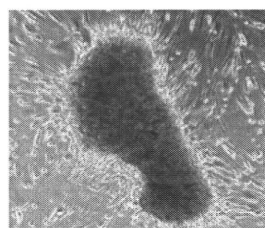
下図に各樹立方法ごとの、結果を示す。

樹立法	患者	RD-1	RD-2
レンチウイルスおよびレトロウイルスを用いた方法 (2 回施行)		最初のレンチウイルス感染後にほとんどの線維芽細胞が死滅し、残存細胞も増殖が停止してしまい、樹立できず。	最初のレンチウイルス感染後にほとんどの線維芽細胞が死滅し、残存細胞も増殖が停止してしまい、樹立できず。
レトロウイルスを用いた方法 (4 通りのウイルスカク)		下図のような異常なコロニーは出現したが、樹立できず。	下図のような異常なコロニーは出現したが、樹立できず。
センダイウイルスを用いた方法 (2 回施行)		感染後に 8 割以上の線維芽細胞が死滅し、樹立できず。	感染後の死滅は RD-1 ほどではなかったが、ほとんどの線維芽細胞の狭小化が顕著であり、樹立できず。
Episomal vector を用いた方法 (5 通りの導入条件にて)		下図のような異常なコロニーは出現したが、樹立できず。	下図のような異常なコロニーは出現したが、樹立できず。

レトロウイルスにて作成

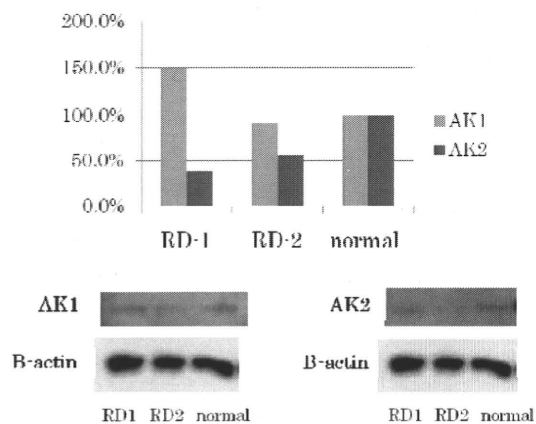


Episomal vectorn にて作成



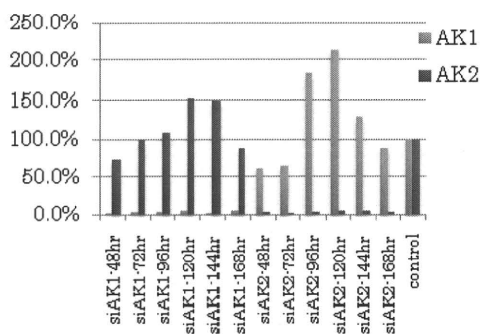
2名の細網異形成症患者由来の線維芽細胞を用いたAK1およびAK2遺伝子のRNAおよびタンパクの発現

下図のように両患者ともにAK2遺伝子の発現が正常人の50%ほどに低下しており、両患者の遺伝子変異がともに compound heterozygous 変異であることと矛盾しない。



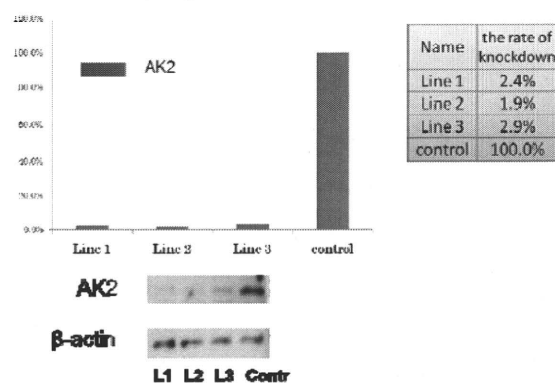
HEK293細胞におけるsiRNAによるAK1およびAK2遺伝子のノックダウン

下図のqPCRデータが示すようにHEK293細胞において、AK1およびAK2遺伝子の発現を強力にノックダウンすることができた。さらに、AK1をノックダウンした際には120時間後頃からAK2が、AK2をノックダウンした際には96時間後頃からAK1が急激に増加する現象を見出した。



miRNAによるAK2遺伝子のノックダウン HEK293細胞安定株樹立

AK2遺伝子に対する3種類のmiRNAを合成し、それらのノックダウン効率を評価後、最も優れたmiRNA発現レンチウイルスベクターを構築した。このレンチウイルスにより、下図のqPCRおよびウエスタンブロッティングが示すようなAK2遺伝子が強力にノックダウンされたHEK293細胞安定株を樹立することができた。



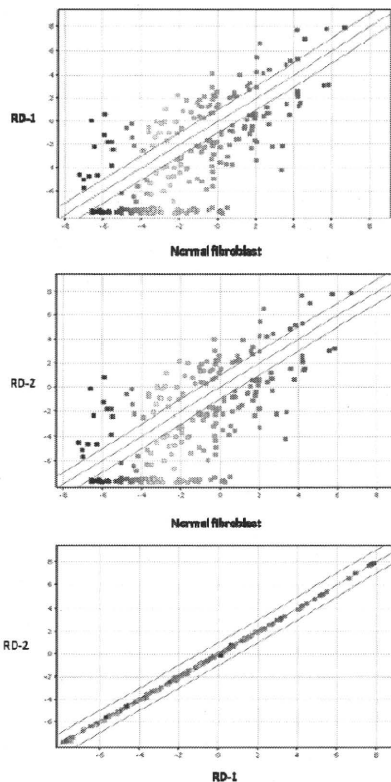
ミトコンドリアと細胞質の分画

まずはHEK293細胞のウエスタンブロッティングで評価を行い、ミトコンドリア分画ではCOX IVやAK2のバンドを認めるが、AK1のバンドは認めない条件を見出した。また、細胞質分画ではCOX IVやAK2のバンドを認めないが、AK1のバンドは認めるとい条件も見出した。ただし、ミトコンドリア分画では他の細胞内器官のバンドが一部出現するなどのコンタミネーションを認めため、さらに良好な条件を検討中である。さらに、血液細胞を用いて条件検討を施行している。

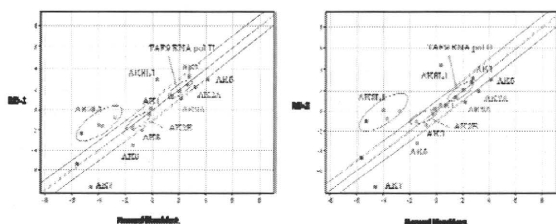
マイクロアレイの評価

正常線維芽細胞と細網異形成症患者由来の線維芽細胞の比較、および2名の患

者同士の比較で、以下のように発現に差が認められた遺伝子を多数認めた。また、患者間での差は全く認めなかった。

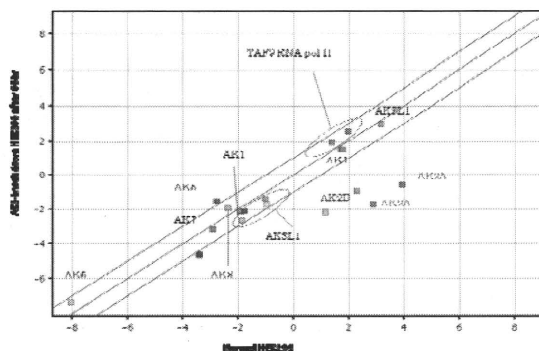


上図で示した遺伝子を Adenlyte kinase family に絞ると、下図のような結果となった。線維芽細胞においては AK2 の 2 つのトランスクリプトのうち AK2A の方が低下していた。また、患者の方で AK3L1 が上昇していた。



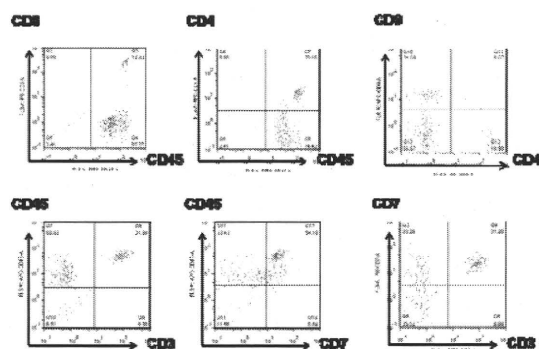
また、正常 HEK293 細胞と AK2 を siRNA でノックダウン後 96hr の HEK293 細胞の比較も行ったところ、下図のように AK2A と AK2B ともに発現が低下していた。線維芽細胞での検討結果とは異なり、AK3L1 の上

昇は認められず、AK5 がやや上昇していた。



正常人由来iPS細胞、ES細胞および臍帯血を用いた各血球系列細胞への分化アッセイのin vitro 解析

骨髄系細胞および赤芽球系細胞への分化はすでに可能であるが、Tリンパ球への分化系を OP9 および OP9-DLL1 ストローマ細胞を用いて確立しつつある。下図のように正常臍帯血由来の CD34 陽性細胞からは Tリンパ球の分化に成功した。



ただし、ES/iPS 細胞からは、CD7 陽性細胞までは分化させることに成功しているが、さらに分化した Tリンパ球を安定して得られていないことから、さらに分化系を洗練させつつある。