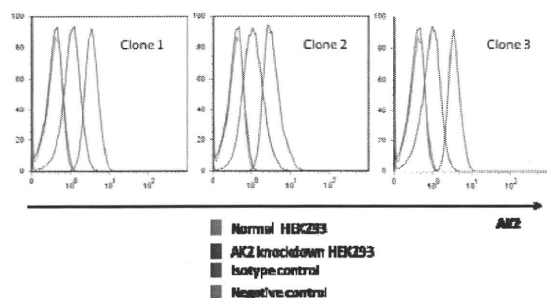


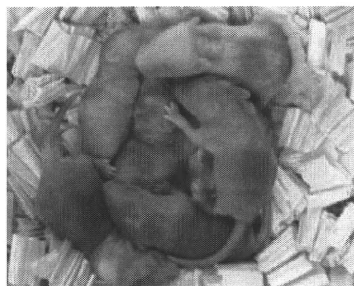
フローサイトメトリー用のAK2タンパクに対するモノクローナル抗体作成

下図のようにペプチド抗原を用いた方法で作成した抗体の1回目の評価をHEK293細胞を用いて行った。結果として、比較的良好な抗体を見出したが、単クローン化後の2回目の評価では良好な結果が得られず、現在、リンコンビナントタンパク質抗原を用いる方法で抗体作成を進めている。



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を用いて、相同組換え ES 細胞を樹立後、下図のようなキメラマウスを得ることができた。その後、Germline にのった F1 マウス(ヘテロ変異マウス)も多数得ることができたため、ホモマウス作成を試みた。結果としては胎生致死であり、妊娠 14 日目の胎盤内に胎児を確認することができなかったため、胎児の解析も不可能であった。凍結胚を作製後、保存した。



5 日齢のキメラマウス

D. 考察

細網異形成症患者由来の iPS 細胞の樹立は、疾患に関連する原因と考えられるウイルス感染やリプログラミングの際に発生する強いストレスに対する脆弱性のために樹立が非常に困難であった。現在、iPS 細胞樹立前に AK2 遺伝子を修復するためのレンチウイルスベクターを構築中であり、iPS 樹立後には Cre/loxP システムや tet 発現誘導システムで AK2 を制御可能とする予定である。

HEK293 細胞での検討であるが、AK1 または AK2 遺伝子を siRNA を用いてノックダウンすると、前者では AK2 が、後者では AK1 が 96-120 間後に補い合うかのような挙動を示した。しかし、マイクロアレイの結果とは異なることから、今後、Adenylate kinase family 以外の分子も含めて、各分子の挙動を詳細に調べる必要がある。また、タンパクレベルで各分子の細胞内での局在を調べ、さらに血液細胞でも同様の挙動を示すかを確かめる予定である。最近、AK2 タンパクの unfolded protein response (UPR) 反応が障害されることが細網異形成症における血球分化異常をきたすのではないかと、という報告もなされているので³⁾、この部分の検討も進める予定である。

ES/iPS 細胞からの T リンパ球への分化はこれまでの報告のような十分な分化が認められていないため、さらに改良を加える必要がある。

AK2 ノックアウトマウスは残念ながら胎生致死であったが、ヒトでは患者が生存していることから致死ではない。このマウスとヒトでの phenotype の差に注目して解析すれ

ば、AK2 の役割について新規の知見を得ることができるかもしれない。

E. 結論

上記結果で示したように、患者由来の iPS 細胞樹立後の病態解析の系は順調に確立しつつあり、次年度には AK2 遺伝子修復ベクターを用いて iPS 細胞を樹立し、これを用いた詳細な病態解析を行い、早期診断法や新規治療法の開発を行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato I., Umeda K., Awaya T., Yui Y., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Watanabe K., Heike T., Adachi N., Endo H., Mizukami T., Nunoi H., Nakahata T., Adachi S.: Successful treatment of refractory donor lymphocyte infusion-induced immune-mediated pancytopenia by Rituximab. *Pediatr Blood Cancer*. 54: 329-331, 2010.
- 2) Sakai H, Ito S, Nishikomori R, Takaoka Y, Kawai T, Saito M, Okafuji I, Yasumi T, Heike T, Nakahata T. : A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene. *Rheumatology (Oxford)*. 49: 194-196, 2010.
- 3) Kubota M., Adachi S., Usami I., Okada M., Kitou T., Shiota M., Taniguchi Y., Tanizawa A., Nanbu M., Hamahata K., Fujino H., Matsubara K., Wakazono Y., Nakahata T.: Characterization of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in Japanese children: a retrospective multi-center study. *Int. J. Hematol.* 91:252-257,2010.
- 4) Takeuchi M., Kimura S., Kuroda J., Ashihara E., Kawatani M., Osada H., Umezawa K., Yasui E. Imoto M., Tsuruo T., Yokota A., Tanaka R., NagaoR., Nakahata T., Fujiyama Y., Maekawa T.: Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl+ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in a hypoxic environment. *Cell Death Diff*. 17:1211-1220, 2010.
- 5) Mizuno Y., Chang H., Umeda K., Niwa A., IwasaT., Awaya T., Fukada S., Hiroshi Yamamoto H., Yamanaka S., Nakahata T., Heike T.: Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J.* 24:2245-2253, 2010.
- 6) Kuroda Y., Kitada M., Wakao S., Nishikawa K., Tanimura Y., Makinoshima H., Goda M., Akashi H., Inutsuka A., Niwa A., Nabeshima Y., Nakahata T., Nabeshima Y., Fujiyoshi Y., Dezawa M.: Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell

- populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:8639-8643, 2010.
- 7) Matsuda K., Taira C., Sakashita K., Saito S., Yanagisawa MT., Yanagisawa R., Yozo Nakazawa Y., Shiohara M., Fukushima K., Oda M., Honda T., Nakahata T., Koike K.: Long-term survival after non-intensive chemotherapy in some juvenile myelomonocytic leukemia patients with CBL mutations, and the possible presence of normal individuals with the mutations. Blood 115:5429-5431, 2010.
 - 8) Matsuse D., Kitada M., Kohama M., Nishikawa K., Makinoshima H., Wakao S., Fujiyoshi Y., Heike T., Nakahata T., Akutsu H., Umezawa A., Harigae H., Kita J., Dezawa M.: Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 69:973-985, 2010.
 - 9) Kumada T., Yamanaka Y., Kitano A., Shibata M., Awaya T., Kato T., Okawa K., Abe T., Oshima N., Nakahata T., Heike T.: Ttyh1, a Ca²⁺-binding protein localized to the endoplasmic reticulum, is required for early embryonic development. Develop. Dynam. 239:2233-2245, 2010.
 - 10) Kaichi S., Hasegawa K., Takaya T., Yokoo N., Mima T., Kawamura T., Morimoto T., Baba S., Doi H., Yamanaka S., Nakahata T., Heike T.: Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice. Cardiovascular Res. 88: 314-323, 2010
 - 11) Kusunoki T, Morimoto T, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Fujii T, Nakahata T.: The effect of past food avoidance due to allergic symptoms on the growth of children at school age. Allergology International. 59: 369-374, 2010
 - 12) Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Adachi S., Suemori H., Nakahata T., Heike T: Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. J. Cell. Physiol. in press.
 - 13) 中畑龍俊:造血因子と臨床応用. 臨床検査(第54巻第6号)623-629, 2010.
 - 14) 中畑龍俊:iPS細胞と遺伝性疾患(特集 臨床遺伝学の進歩と日常診療. 遺伝性疾患の新しい治療と今後期待される治療研究) 日本医師会雑誌 139(3):632-634, 2010.

2. 学会発表

- 1) 中畑龍俊:iPS細胞を用いた今後の医療. 第47回日本小児神経学会近畿地方会、特別講演、2010年2月13日 ピアザ淡海 大津市
- 2) 中畑龍俊:疾患特異的iPS細胞を用いた今後の医療. 第16回西日本小児がんセミナー、特別講演、2010年2月27日 リーガロイヤルホテル大阪 大阪市
- 3) 中畑龍俊:疾患特異的iPS細胞を用いた今後の医療. 第12回外科分子細胞治療研究会、特別講演、2010年4月8日 名古屋国際会議場 名古屋市
- 4) 中畑龍俊:iPS細胞を用いた今後の医療. 第55回日本輸血・細胞治療学会中国四国支部例会 2010年9月11日 米子コンベンションセンター
- 5) 中畑龍俊:小児における再生医療の展望. 第113回日本小児科学会学術集会、教育講演、2010年4月23-25日(23日) 盛岡市民文化ホール
- 6) 中畑龍俊:Various clinical applications of human induced pluripotent stem cells(iPS cells). 第16回日本遺伝子治療学会学術集会、教育講演、2010年7月1-3日(3日) 栃木県総合文化センター(宇都宮市)
- 7) 中畑龍俊:再生医療とレチノイド(1.iPS細胞). 第21回日本レチノイド研究会学術集会、教育講演、2010年11月13-14日(14日) 大阪医科大学(看護専門学校講堂)
- 8) 中畑龍俊:iPS細胞の臨床展開. 第31回日本臨床薬理学会年会、教育講演、2010年12月1-3日(1日) 国立京都国際会館(京都大学医学部附属病院薬剤部)
- 9) 中畑龍俊、伊藤守:再生医療の基礎研究に有用なヒト化動物. 第57回日本実験動物学会総会 シンポジウム3(テーマ:再生医療の幕を開く動物実験) 5月12-14日(14日)、京都テルサ
- 10) 矢部普正、小原明、大賀正一、小林良二、土田昌宏、中畑龍俊、別所文雄、麦島秀雄、小島勢二:小児再生不良性貧血に対する代替ドナー移植前処置の検討;Thymoglobulin in Childhood Aplastic Anemia: The Dose of Thymoglobulin. 第32回日本造血細胞移植学会総会 2010年2月19-20日(20日) アクトシティ浜松
- 11) 丹羽明、齋藤潤、加藤格、大嶋宏一、百瀬大、高橋和利、末盛博文、中辻憲夫、山中伸弥、平家俊男、中畑龍俊:ヒトES/iPS細胞からの試験管内造血系を用いた分化過程の解析. 第9回日本再生医療学会総会 2010年3月18-19日(19日) 広島国際会議場 広島市
- 12) 中畑龍俊:疾患特異的iPS細胞を用いた今後の医療. 第47回日本臨床分子

- 医学会学術集会 2010年4月10-11日(11日) 東京国際フォーラム 東京都
- 13) 中畑龍俊:iPS細胞と疾患モデル細胞。(ミニシンポジウム1:血液免疫関連疾患とiPS細胞) 第31回日本炎症・再生医学会 2010年8月5-6日(5日) 京王プラザホテル(東京)
- 14) 西小森隆太、田中尚子、井澤和司、酒井秀政、村田祐樹、横山宏司、阿部純也、田中孝之、斎藤潤、河合朋樹、八角高裕、中畑龍俊、平家俊男:抗IL-1療法(ワークショップ2:サイトカインを標的とした病態制御の可能性) 第31回日本炎症・再生医学会 2010年8月5-6日(5日) 京王プラザホテル(東京)
- 15) 丹羽明、斎藤潤、加藤格、大嶋宏一、末盛博文、平家俊男、中畑龍俊:ヒトES/iPS細胞からのin vitro二次元無血清造血誘導における、分化過程の経時的解析(ポスター) 第31回日本炎症・再生医学会 2010年8月5-6日 京王プラザホテル(東京)
- 16) Tatsuya Morishima, Ken-Ichiro Watanabe, Akira Niwa, Hisanori Fujino, Souichi Adachi, Tatsutoshi Nakahata: Neutrophil differentiation from human induced pluripotent stem(iPS) cells for disease investigation. (口演) 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜
- 17) Akira Niwa, Toshio Heike, Katsutsugu Umeda, Koichi Ohima, Itaru Kato, Hirofumi Suemori, Megumu Saito, Tatsutoshi Nakahata: Tracing the developmental route from human ESC/iPSCs to blood via mesoderm in Serum-free 2D culture. (口演) 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜
- 18) Miyuki Tsumura, Satoshi Okada, Hidemasa Sakai, Ryuta Nishikomori, Yoko Mizoguchi, Shin'ichiro Yasunaga, Motoaki Ohtsubo, Toshio Heike, Tatsutoshi Nakahata, Yoshihiro Takihara, Masao Kobayashi: Identification of novel mutation in STAT1 and molecular pathogenesis of MSMD. (口演) 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜

知的財産権の出願・登録状況

特になし。

参考文献

- 1) Pannicke U, Höning M, Hess I, Friesen C, et al. Reticular dysgenesis (aleukocytosis) is caused by mutations in the gene encoding mitochondrial adenylate kinase 2. *Nat Genet.* 2009 Jan;41(1):101-5
- 2) Lagresle-Peyrou C, Six EM, Picard C, et al. Human adenylate kinase 2 deficiency causes a profound hematopoietic defect associated with

sensorineural deafness. Nat Genet.
2009 Jan;41(1):106-11.

- 3) Burkart A, Shi X, Chouinard M,
Corvera S. Adenylate kinase 2 links
mitochondrial energy metabolism to the
induction of the unfolded protein
response. J Biol Chem. 2010 Sep 27.
[Epub ahead of print]

細網異形成症の疫学調査、診断、治療法に関する研究

森尾 友宏 (東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学)

満生 紀子 (東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学)

高木 正稔 (東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学)

水谷 修紀 (東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学)

研究要旨

細網異形成症は極めて稀な疾患であるが、骨髄不全症候群の中で感音性難聴などの特徴的な症状を呈する症例において、診断に至る症可能性がある。本年度は、骨髄不全症候群や汎血球減少を示す複合型免疫不全症として診断が確定していない症例について、簡易に骨髄不全症候群関連タンパク、DNA 損傷修復関連タンパク及び責任遺伝子を解析するシステムを立ち上げた。

A. 研究の目的

細網異形成症は、リンパ球分化障害、骨髄系細胞分化障害、感音性難聴を呈する難病である。多系統の細胞の分化障害により発症することが特色である。本疾患は原発性免疫不全症、骨髄不全症候群の中でも極めて稀な疾患であり、その病態の解析と共に、他疾患を的確にかつ迅速に診断するスクリーニング方法の開発も重要である。本年度の研究では、細網異形成症の鑑別診断法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

1) 小児期の骨髄不全症候群(Bone marrow failure syndrome: BMFS)、複合型免疫不全症(Combined immunodeficiency: CID+汎血球減少症)で診断未確定症例につき、末梢血から固相化 CD3 抗体と IL-2にてT細胞を増殖培養し、解析検体を用意する。培養 T 細胞からはタンパクを抽出し、DNA 損傷修復に関連するタンパク

(DNA-PKcs, Ku70, Ku80, ATM, ATR, LIGIV, XRCC4, NHEJ1, Mre11, Rad50, NBS1, HSP70)、先天性角化異常症(Dyskeratosis congenita: DKC)関連タンパク(Telomerase, SNM1B:Apollo)、AK2 に対する抗体(Abcam)を用いて Western blot を行った。

2) DKC に関しては、テロメア長の測定のために、Telomere-Flow 法(Telomere PNA Kit/FITC: DAKO)を用いて、コントロール細胞との比較で Relative telomere length を測定し、年齢における標準値と比較した。Fanconi 貧血や Bloom 症候群の鑑別のためには、MMC 感受性や Sister chromatid exchange (SCE)を他施設に依頼した。

3) 骨髄不全症候群候補遺伝子(TINF2,TERC, DKC1, SNM1B)の解析を行うべくプライマーを作成する。AK2 についても遺伝子解析を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者検体を用いて解析を行う。実際には診療に役立つ情報が得られるが、採取量及び、採取時の苦痛には十分な配慮を行う。また遺伝子解析については各種指針に則り、患者個人情報の保護について十分な配慮を行う。本研究は医学部倫理審査委員会の承認をえて行われたものである。

C. 研究結果

1) BMFS 及び CID (DNA 損傷修復異常症疑い+汎血球減少症)からの T 細胞培養

DKC 疑い患者 4 名、DNA 損傷修復異常症患者 5 名の解析を行った。これらの患者から T 細胞を培養し、全例にて T 細胞の増幅がえられたが、9 名の内 3 名 (DKC 疑い 1 名、CID 2 名)において、100 倍程度までの増幅に留まった(通常は 1,000~10,000 倍に増殖可能)。

2) タンパク質の抽出と Western blot

DNA 切断修復に関連するタンパクについては、健常人検体を用いて、すべて発現が確認された。AK2 や Telomerase、SNM1B も検出可能である。今回の検出では、XRCC4 と Ku70 の発現が再現性をもって低い検体があり、患者では神経変性も伴うことから新規遺伝子異常として解析を継続している。AK2 の発現が低下する症例はなかった。

3) 核酸の抽出及び保存

全例において核酸を抽出し保存した。

4) Telomere Flow 解析

2 例において Telomere 長の短縮を認めた。共に汎血球減少を示したが、DKC 関連タンパクや AK2 発現は正常であった。1 例は Hoyeraal-Hreidarsson syndrome(HHS)様の症状を呈した。

5) 骨髄不全症候群遺伝子解析

LIGIV, NHEJ1, Mre11, Rad50, NBS1, HSP70, TINF2(既知の報告より、exon6 のみ),TERC, DNMT1B, AK2 の genomic sequencing のセットアップが完了し、また DKC1, DNMT1B については cDNA による解析が行えるようになった。AK2 異常は認めなかった。HHS 様の症状を呈する患者では既知の DKC 遺伝子変異を認めず、DNMT1B の cDNA サイズや遺伝子配列も正常であった。

D. 考察

骨髄不全症候群での非典型例や複合型免疫不全症候群で汎血球減少を示す症例の中でも、責任遺伝子が確定している症例は少ない。今回の解析でも責任遺伝子の同定に至った症例はなく、染色体異常から診断が確定したものが 1 例あるのみである(遺伝子異常は未確定)。これらの疾患群に AK2 遺伝子異常が含まれている可能性も考えられるが、細網異形成症は極めて稀な疾患であり、今後さらに大規模な検討が必要である。また、典型的な症状、身体所見及び検査異常を示す患者は少なく、今後は骨髄所見や免疫不全症といった切り口だけではなく、難聴+血液異常といった入り口から検討する可能性も必要かもしれない。

E. 結論

骨髄不全症候群、血球減少を伴う複合型免疫不全症、DNA 損傷修復異常症、AK2 異常症の両者を診断できるシステムを開発した。細網内皮症患者は細胞異形成症患者の診断に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patient. Clin. Immunol. (in press), 2010.
- 2) Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsui N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Like Disease With Somatic KRAS Mutation. Blood [Nov 9, Epub ahead of print], 2010.
- 3) Seki M, Kimura H, Mori A, Shimada A, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Agematsu K, Morio T, Yachie A, Kato M. Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with

Omenn syndrome. Pediatr. Int. 52:e196-9, 2010.

- 4) Shin MJ, Shim JH, Lee JY, Chae WJ, Lee HK, Morio T, Park JH, Chang EJ, Lee SK. Qualitative and quantitative differences in the intensity of Fas-mediated intracellular signals determine life and death in T cells. Int J. Hematol. 92:262-70, 2010.
 - 5) Okamoto K, Iwai Y, Ohhora M, Yamamoto M, Morio T, Aoki K, Ohya K, Jetten AM, Akira S, Muta T, Takayanagi H. I κ B \cdot regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. Nature. 464: 1381-1385, 2010.
 - 6) 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. 115:3231-3238, 2010.
- ### 2. 学会発表
- #### 国外
- 1) Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K,

- Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. The 52nd ASH Annual Meeting, Orlando, Florida, USA. December 2010.
- 2) Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Istanbul, Republic of Turkey. October 2010.
- 3) Morio T. Btk Controls ROS Production and Apoptosis in Human Neutrophils. XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Istanbul, Republic of Turkey. October 2010.
- 4) Morio T, Terada N, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, Matsumoto K, Azuma M, Mizutani S. PP-102-32 - Impaired CD4 and CD8 Effector Function and Decreased Memory T-cell Populations in ICOS-deficient Patients. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. August 2010.
- 5) Okamoto K, Iwai Y, Oh-hora M, Yamamoto M, Morio T, Jetten A M, Akira S, Muta T, Takayanag H. WS/PP-014-02 - I κ B ζ is required for the transcriptional program in Th17 development. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. August 2010.
- 6) Shin M J, Shim J, Lee J, Chae W, Lee H, Morio T, Park J H, Chang E, Lee S. PP-059-37 - Functional analysis of Fas-mediated activation signaling pathways in T cells. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. August 2010.
- 7) Honda F, Ikeda Y, Takahashi N, Lee S, Mizutani S, Morio T. WS/PP-034-04 - Btk controls ROS production and apoptosis in human neutrophil. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. August 2010.

国内

- 1) 森尾友宏: 原発性免疫不全症に対する臍帯血移植とキメリズム解析、第2回移植簿キメリズム解析研究会 平成22年度厚生労働科学研究 医療技術実用化総合研究事業「HLA ミスマッチ造血細胞移植後の新規キメリズム解析法による臨床診断の有効性に関するエビ伝す創出」(研究代表者: 中内啓光) 2011年2月1日、東京

- 2) 森尾友宏:造血細胞移植後の免疫学的モニタリング、平成 22 年度厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法:基礎から臨床へ」班第 2 回班会議(研究代表者:池原進)、2011 年 1 月 29 日、東京
- 3) 高木正稔、満生紀子、Piao Jinhua、長澤正之、森尾友宏、篠田邦大、鷹尾明、笠原善仁、小池健一、村松英城、小島勢二、水谷修紀:RAS associated ALPS like disease、平成 22 年度厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業「原発性免疫不全症候群に関する調査研究」班会議(研究代表者:原寿郎)、2011 年 1 月 21 日、福岡
- 4) 満生紀子、森尾友宏、小原 收:かずさ DNA 研究所における PIDJ 登録患者の遺伝子解析報告、平成 22 年度厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業「原発性免疫不全症候群に関する調査研究」班会議(研究代表者:原寿郎)、2011 年 1 月 21 日、福岡
- 5) 森尾友宏、峯岸志津子、満生紀子:分類不能型免疫不全症亜群分類 と原因探索へのアプローチ、平成 22 年度厚生労働科学研究 難治性疾患克服事業「成人型分類不能型免疫不全症の実態把握、亜群特定に基づく診断基準策定及び病態解明に関する研究」班会議(研究代表者:森尾友宏)、2010 年 9 月 17 日、東京
- 6) 森尾友宏、富澤大輔、梶原道子、水谷修紀、熱田由子、加藤剛二、原寿郎、加藤俊一:日本における先天性免疫不全症に対する臍帯血移植成績、第 113 回日本小児科学会学術集会、2010 年 4 月 23 日～25 日、岩手

知的財産権の出願・登録状況

特になし。

細網異形成症の診断と治療に関する調査研究

小原 收 ((財)かずさDNA 研究所副所長)

研究要旨

細網異形成症の確定診断を可能とするために、その疾患発症原因となる可能性のある遺伝子解析とそのための情報基盤整備を行った。本疾患のような稀な症例を発掘するためには、広範な疑い症例を解析していく必要がある。そのために、系統的に遺伝子解析が研究班内で実現できるように、臨床検体遺伝子解析依頼のための Web ベースの登録システムを新たに立ち上げた。更に、新規患者の発見が困難なことが予想されるため、残存するパラフィン包埋組織切片から回収したDNA検体での遺伝子構造解析も試みた。

A. 研究の目的

細網異形成症は、リンパ球分化障害、骨髄系細胞分化障害、感音性難聴を呈する難病である。多系統の細胞の分化障害により発症することが特色である。本症患者の予後の改善と根治をめざし、医療水準向上に貢献するため、分担研究として細網異形成症の原因遺伝子を同定する事を最終的な目的として研究を進める。本年度は、我が国における細網異形成症疑いの患者検体をより広範に研究班で収集するためのシステムを Web ベースで構築すると共に、出現頻度が極めて低いと予想される本疾患についての解析が効率的に進められるように、残存する組織切片からの遺伝子検査の可能性についても検討する。

B. 研究方法

細網異形成症の疑いのある患者検体について、既知の細網異形成症責任遺伝子として近年同定された Adenylate kinase 2 (以下 AK2 と略)などの構造解析を行った。

具体的には、これらの遺伝子のタンパク質コードエクソン領域をその両端に存在するイントロン領域(20塩基以上)を酵素的増幅法(PCR 法)で増幅するためのプライマー合成、ゲノムDNAからの増幅反応、増幅産物のDNA塩基配列解析、得られた配列のデータベース中のリファレンス配列との比較を行った。

研究班内での遺伝子解析依頼などが確実に間違いなく行われるように、Web ベースでの検体解析依頼システムを構築し、試験運用を行う。

(倫理面への配慮)

臨床検体は共同研究者の施設で採取・調製され、匿名化された状態でのみ受け入れ、受け入れ時にそれぞれの施設で同意書へのサインが行われていることを確認した。今回の研究ではゲノムDNAの構造解析を含むため、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)

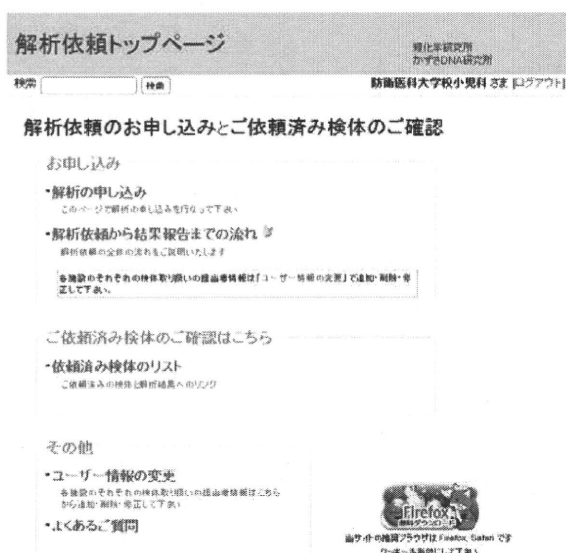
に従い、(財)かずさ DNA 研究所での倫理審査委員会による承認を得て行った。

C. 研究結果

本年度は、広く重症複合免疫不全症疑い検体(9検体、通算13検体)に対しての遺伝子構造解析を行った。しかし、AK2 変異に原因を求めざるを得ないような症例は残念ながら未だ見いだせていない。そこで、更に広範な臨床検体からの遺伝子検査を実現するために、パラフィンブロックからの DNA 抽出とそれに続く遺伝子解析を試みた。しかしながら、現時点で長期間保存されていたパラフィンブロック組織片から高品質のゲノム DNA の回収は成功しなかった。

研究班内での臨床検体の授受とそれに引き続く遺伝子解析依頼の履歴を残し、正確に解析依頼と検体受け取りを実現することは、今回の細網異形成症の確定診断の実現に向けて重要と考え、新たな Web ベースのシステムを構築し、その試験運用を終えた(図1:解析依頼 Web サイトのトップページスクリーンショット)。

図1



D. 考察

1) 達成度について

今年度に予定していた研究課題は、検体の入手困難さのために解析検体数的には満足いくものではなかったが、その代りにパラフィンブロック検体からの遺伝子構造解析の検討や研究班内のより広範な臨床検体収集のための基盤をほぼ達成できた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

次世代シーケンサーによる疾患責任遺伝子探索は正に国際的な競争が激化している時期ではあるが、それを臨床研究に結び付けるためには、特に希少疾患においては検体収集システムの確立が必須である。既に我が国では免疫不全症研究のための臨床アーカイブとしてPIDJが立ち上げられているが、今回臨床検体と遺伝子検査依頼のアーカイビングシステムが構築されたことは、今後の希少疾患原因遺伝子変異探索全般にも貢献するものと期待できる。

3) 今後の展望について

次年度以降、今年度我々が立ちあげた臨床検体・遺伝子検査依頼アーカイブを活用して、より広範な臨床検体収集に努める。更に、パラフィンブロック検体などからも再現してDNA分析ができるように技術的課題をクリアし、もっと効率的な細網異形成症原因遺伝子探索が実現されることを目指す。

E. 結論

今年度、細網異形成症責任遺伝子探索の準備としての重症複合免疫不全症疑い

検体の遺伝子検査は順調に進捗した。しかしながら、細網異形成症の病態の多様性のためか、現在既知の AK2 遺伝子の変異も含め、今年度の検体でも既知遺伝群に疾患関連性の変異は見いだせなかった。細網異形成症の症例数が限定されることから、AK2 以外の原因遺伝子探索には、より広範な臨床検体の収集と網羅的な遺伝子解析が必要だと考えられる。そのための方法論と情報基盤は準備されつつあるので、新たな細網異形成症原因遺伝子変異の探索がより効率化されると期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusahara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T. Clinical and Host Genetic Characteristics of Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases in Japan. *J Clin Immunol*. 2011 Jan 8. [Epub ahead of print]
- 2) Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu H, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients. *Clin Immunol*. 2010 Dec 3. [Epub ahead of print]
- 3) 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):442-445.
- 4) 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 C1q deficiency in an individual with systemic lupus erythematosus-like disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2010 28(4):558-60.
- 5) Hijikata A, Raju R, Keerthikumar S, Ramabadran S, Balakrishnan L, Ramadoss SK, Pandey A, Mohan S, Ohara O. Mutation@A Glance: an integrative web application for analysing mutations from human genetic diseases. *DNA Res*. 2010 Jun;17(3):197-208.

2. 学会発表

- 1) 本間健一、今井耕輔、釜江智佳子、中川紀子、野々山恵章、大嶋宏一、満生紀子、小原收、Sheela Nampothiri, Deepti Suri, Amit Rawat, Surjiti Singh 最近3年間にインドより当科へ紹介された原発性免疫不全症に対する検討

第四回日本免疫不全症研究会 2011
年 1月22日 九州大学

- 2) Kumar Ramadoss S, Keerthikumar S,
Raju R, Kandasamy K, Balakrishnan L,
Dhevi Nagarajha Selvan L, Raja Sekhar
N, Mohan S, Bhattacharjee M, Hijikata
A, Imai K, Kanegane H, Miyawaki T,
Nonoyama S, Pandey A, Ohara
O, Mohan S. Resource of Asian Primary
Immunodeficiency Diseases (RAPID)
update: an open web-based integrated
molecular database on primary
immunodeficiencies 9th European
Conference on Computational Biology
(ECCB10) 2010年9月 Ghent,
Belgium

- 3) Kumar Ramadoss S, Keerthikumar S,
Raju R, Kandasamy K, Balakrishnan L,
Dhevi Nagarajha Selvan L, Raja Sekhar
N, Bhattacharjee M, Hijikata A, Imai K,
Kanegane H, Miyawaki T, Nonoyama S,
Pandey A, Ohara O, Mohan S.
RAPID elucidation of
autoimmune-mediated inflammatory
disease regulatory mechanisms and
depiction of signaling pathways in
Primary Immunodeficiency Diseases
XIVth meeting of the European Society
for Immunodeficiencies (ESID2010)
2010年10月 Istanbul, Turkey

知的財産権の出願・登録状況

特になし。

コロニーアッセイ、骨髓機能解析

小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学)
村松 秀城 (名古屋大学医学部附属病院小児科)

研究要旨

AK2の複合ヘテロ変異(R103Q, R137X)を有し、母由来CD8陽性細胞を末梢血中に認められたRD確定診断例において、血球減少のメカニズムについて検討を行った。コロニーアッセイにより、単核球全体では抑制される骨髓系の造血能は、CD34陽性細胞に純化することで回復し、CD8陽性細胞を添加することで再び抑制された。本症例における造血障害は、母由来CD8陽性細胞による免疫学的な機序によるものと考えられた。

A. 研究の目的

細網異形成症 (RD)は新生児期の重症感染症により発症するリンパ球及び好中球ともに著減しているSCIDの極型として1959年にDe VaalとSeyneheveにより報告され、その頻度はSCIDの中でも2%以下で、難聴を伴う非常に希な疾患である。RDの原因遺伝子は長らく不明であったが、2008年11月にフランスとドイツの2つのグループがミトコンドリアのエネルギー代謝に関与しているAdenylate Kinase 2 (AK2)が原因遺伝子であることを報告しているが (Nat Genet. 2009;41(1):101-5, 106-11)、リンパ球および好中球減少のメカニズムは不明である。

B. 研究方法

自験例5歳女児において、血球減少のメカニズムについて検討を行った。血液学的・免疫学的解析にあたり、保護者への説明の上、同意を得た。

表1 免疫学的検査

末梢血リンパ球表面マーカー					
CD2 ⁺	18.54%	CD8 ⁺ DR ⁺	17.22%	CD16 ⁺	14.16%
CD3 ⁺	9.86%	CD8 ⁺ CD45RO ⁺	8.30%	CD19 ⁺ CD20 ⁺	25.1%
CD4 ⁺	0.23%	CD8 ⁺ TCRαβ ⁺	12.46%		
CD8 ⁺	13.92%	CD8 ⁺ TCRγδ ⁺	0.30%		

リンパ球芽球化能					
	(-)	PHA	ConA	PWM	SAC
Count (cpm)	540.0	488.5	598.0	836.5	896.0
S.I.	-	0.9	1.1	1.5	1.7

- TREC: <10 copy/μg DNA
- in vitro免疫グロブリン産生: 認めず
- NK細胞活性 (E/T 20:1): 20% (control 18~40%)
- 胸部CT: 胸腺低形成

C. 研究結果

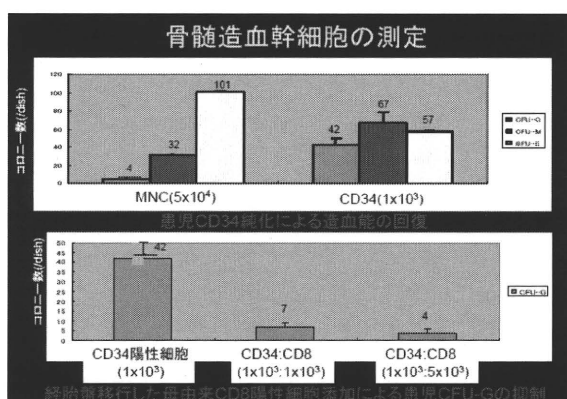
症例は日齢5の女児。入院時検査所見では、末梢血白血球 200/μl (好中球 17/μl、リンパ球 140/μl)と著減し、血小板 8.2万/μl、CRP1.4以外特記すべきことはなかった。骨髓は低形成で顆粒球系細胞はほとんど認めなかった。末梢血T細胞は著減し、そのほとんどが活性化したメモリーCD8陽性細胞であった。B細胞は増加、NK細胞は正常範囲内であった。リンパ球芽球化能は、PHA、ConA、PWM、SACに対してS.Iは各々0.9、1.1、1.5、1.7と著減していた。T cell Receptor Excision Circle(TREC)は10copy/ugDNA以下であ

った。in vitro 免疫グロブリン産生も認められなかった(表1)。

患児末梢血リンパ球中 CD4 陽性細胞はほとんど認められなかったが、CD8 陽性細胞が 14% 存在し、ほとんどが HLA-DR+, CD45RO+ であったことから、経胎盤移行した母 CD8 陽性細胞の存在を疑った。患児末梢血リンパ球のキメリズム解析を行ったところ、患児 CD8 細胞は母親由来、B 細胞と NK 細胞は患児由来と考えられた。2008 年に同定された RD の原因遺伝子 AK2 解析を依頼したところ、複合ヘテロ変異(R103Q, R137X)が認められ、本児は RD と確定診断された。

コロニーアッセイにより、単核球全体では抑制される骨髄系の造血能は、CD34 陽性細胞に純化することで回復し、CD8 陽性細胞を添加することで再び抑制されることが示された(図1)。以上より、本 RD 症例における造血障害は、母由来 CD8 陽性細胞による免疫学的な機序によるものと考えられた。

図 1 母親由来 CD8 細胞の造血抑制能解析(コロニーアッセイ)



経過:HLA 一致の兄がいたため兄妹間の同種骨髄移植を行った(生後4ヵ月)。本

症例では母由来 CD8 細胞が存在したため、Fludarabine (total: 125 mg/m²), L-PAM (total: 80 mg/m²)による前処置を行なった。ガンマグロブリン補充は Day206 以降中止したが、IgG 1000mg/dl以上を維持しており、PHA・ConA に対する芽球化能は Day40 には各々 26094cpm, 19679cpm となり、Day62 には CD3 陽性細胞 1500/μl となり、免疫学的再建は順調であった。しかしながら、移植後1年6ヵ月経過(1歳9ヵ月)頃に母より難聴の訴えがあり、意味のある発語もなかったため(2歳3ヵ月)、聴性脳幹反応(ABR)を行ったところ RD に高頻度に合併する両側感音性難聴を認めた。

D. 考察

RD は非常にまれな疾患ではあるが、新生児期の好中球減少症のうち、リンパ球減少と ABR 検査にて感音性難聴を伴うならば、鑑別診断として RD を考慮すべきであると考えられる。コロニーアッセイによる解析により、RD に合併する好中球減少症が母由来 CD8 陽性細胞による免疫学的な機序による造血障害であることが示された。

E. 結論

本邦初の RD における造血幹細胞移植成功例を報告した。新生児期 RD の造血障害は母由来 CD8 陽性細胞による免疫学的な機序によるものであると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Apr 15;115(15):3158-61.
- 2) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang R, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Sugita K, Ito E. Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica*. 2010 Aug;95(8):1293-9.
- 3) Sugimoto Y, Muramatsu H, Makishima H, Prince C, Jankowska AM, Yoshida N, Xu Y, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, Maciejewski JP. Spectrum of molecular defects in juvenile myelomonocytic leukaemia includes ASXL1 mutations. *Br J Haematol*. 2010 Jul;150(1):83-7.
- 4) Kanezaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang R, Shimada A, Hama A, Kanegane H, Kawakami K, Endo M, Hasegawa D, Kogawa K, Adachi S,

Ikeda Y, Iwamoto S, Taga T, Kosaka Y, Kojima S, Hayashi Y, Ito E. Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood*. 2010 116:4631-4638.

- 5) Nishio N, Kojima S. Recent progress in dyskeratosis congenita. *Int J Hematol*. 2010 Oct;92(3):419-24. Epub 2010 Oct 1.

2. 学会発表

特になし

知的財産権の出願・登録状況

特になし。

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

山口 博樹 (日本医科大学血液内科)

研究要旨

Dyskeratosis congenita (DKC) は特徴的身体所見が付随する遺伝性の骨髄不全症 (BMF) である。近年成人になって特徴的身体所見を伴わず緩徐に発症する不全型 DKC の存在が明らかになった。DKC や不全型 DKC をより効率的に診断するために以下の研究を行った。本邦の 142 人の BMF において TINF2 遺伝子変異を検索すると、2 人の重症再生不良性貧血 (AA) (1.4%) に TINF2 遺伝子変異が認められた。また不全型 DKC の新たなスクリーニング法としてテロメラーゼ活性の有用性を検討した。テロメラーゼ複合体遺伝子変異を有する不全型 DKC 3 例のテロメラーゼ活性は、正常コントロールと比較して有意差をもって低下していた。また 15 人の AA では免疫抑制療法 (IST) に不応性の 2 症例にテロメラーゼ活性の低下が認められた。テロメラーゼ活性の測定は、不全型 DKC や IST に不応性の AA のスクリーニングに有用かもしれない。

A. 研究の目的

再生不良性貧血 (aplastic anemia: AA) は造血幹細胞の減少に基づく骨髄機能低下によって発症する骨髄不全症 (BMF) の一つである。BMF にはその他にも骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome: MDS) や、Dyskeratosis congenita (DKC) などの遺伝性 BMF が含まれる。典型的な AA は免疫機序を介した病態により発症し免疫抑制療法 (immunosuppressive therapy: IST) が有効である。また臨床的に MDS と診断された中にも IST が有効な症例が認められることがある。

染色体 3' 末端のテロメアに局在するテロメラーゼ複合体や Shelterin 複合体は、テロメア配列を伸長、補修、構造形成の保護をすることでテロメアを介した細胞分裂能および染色体の安定性を維持している。DKC は特徴的身体所見が付随する遺伝性の骨髄不全症 (BMF) で、テロメラーゼ複合体や

Shelterin 複合体を構成するテロメア制御遺伝子の異常によって発症する。近年 DKC の原因遺伝子である上述のテロメア制御遺伝子の変異が、一部の AA や MDS に認められ、特徴的身体所見を伴わず緩徐に発症する不全型の DKC の存在が明らかになった。不全型の DKC は臨床的に AA や MDS と診断され、効果が得られない IST を行われることがある。以上より BMF の臨床診断において不全型 DKC を鑑別することは重要である。

不全型の DKC を鑑別する方法として遺伝子変異検索が考えられる。しかしテロメア関連遺伝子変異の検索は煩雑で、実際の臨床でのスクリーニングには不向きである。この理由として、①約 1/3 の DKC は原因遺伝子が不明であり、既知の遺伝子変異検索では不完全である。②対象となる遺伝子が多く、また遺伝子変異に hot spot がないためこれらの遺伝子の全長を検索しなくて

はならない。③発見された塩基変異がテロメア長制御に影響をあたえる否かは機能解析を行わなければならない。などが考えられた。

不全型 DKC 症例のスクリーニングとしては、テロメア長の短縮化を検索することが実用的であると考えられている。しかしテロメア制御遺伝子の変異を認めているにもかかわらずテロメア長が正常範囲内の症例も少なからず存在する。このことは、テロメア長を測定している細胞が、いわゆる「残存した細胞」であり、DKC 症例の造血細胞の中でもテロメア長が維持されている細胞の可能性もある。また DKC の発症には加齢と世代促進が必要であるが、対象となる症例が小児であった場合はテロメア制御遺伝子の変異を認めてもテロメア長の短縮化が軽度の可能性もある。そこでこうした症例をより鋭敏にスクリーニングする検査としてテロメラーゼ活性の測定は有用ではないかと考えられた。加齢や世代促進によるテロメア長の短縮が軽度であったとしても、テロメア制御遺伝子の変異があればテロメラーゼ活性の低下は明らかであると予想する。また近年性ステロイドホルモンであるアンドロゲンがリンパ球や造血幹細胞のテロメラーゼ活性を亢進させ細胞増殖活性を高めることが報告された。DKC や不全型 DKC に対して性ステロイドホルモンが有効な可能性があり検証が必要である。

本研究はDKCや不全型DKCをより効率的に診断するために、①本邦の BMF 症例の中に DKC の原因遺伝子として同定された TINF2 遺伝子変異を有する不全型 DKC が存在するかを検索した。②テロメア長測定と同様にテロメラーゼ活性の測定が、

DKC や不全型 DKC のスクリーニングに有用かを検討した。③性ステロイドホルモンにて加療をしている DKC、不全型 DKC、IST に不応性の AA において、治療によるテロメラーゼ活性の改善が得られているかを確認する。などの研究を行った。

B. 研究方法

本邦の BMF 症例の中に DKC の原因遺伝子として同定された TINF2 遺伝子変異を有する不全型 DKC が存在するかの検索に関しては、臨床的に AA、MDS の不応性貧血(RA)と診断された 142 症例。Shelterin 複合体遺伝子である TINF2 遺伝子に関して direct sequence 法にて遺伝子配列を決定し変異を検索した。また Southern blot 法にてテロメア長を測定し、age-match 正常コントロールと比較することでテロメアの短縮化の検討を行った。

テロメラーゼ活性の測定の有用性の検証に関しては、不全型 DKC3 例、AA15 例に対して、TRAP assay にてテロメラーゼ活性を測定し解析を行った。また性ステロイドホルモン治療によるテロメラーゼ活性の改善の検証には、DKC、不全型 DKC、IST に不応性の AA の各 1 例において、Metenolone acetate (プリモボラン)による治療前と、治療 3 カ月後における臨床データとテロメラーゼ活性を比較した。

C. 研究結果

1. TINF2 遺伝子変異を有する不全型 DKC の検索

本邦の 142 人の BMF において TINF2 遺伝子変異を検索すると、2 人の免疫抑制療法が無効であった重症 AA(1.4%)に TINF2