

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

細網異形成症患者は診断後速やかに造血幹細胞移植が行われ、患者からの血液細胞での研究はほぼ不可能であるため、患者由来 iPS 細胞樹立は非常に有望と考えられる。これまで、様々な方法を用いたが細網異形成症患者からの iPS 細胞樹立は困難であった。しかし、樹立前に本疾患の原因遺伝子である正常 AK2 遺伝子を患者由来の繊維芽細胞に導入したところ、2 名の細網異形成症患者から世界で初めて iPS 細胞を樹立することに成功した。これらの iPS 細胞は核型正常で、トランスジーンもサイレンシングされており、免疫不全症マウスへの奇形腫作成能も確認することができた。

患者由来 iPS 細胞からの好中球への分化アッセイを行ったところ、正常 ES/iPS 細胞や正常 AK2 遺伝子修復後の患者由来 iPS 細胞からの好中球と比較して、著明な好中球分化障害を認めた。これは患者骨髄所見と一致しており、本疾患の病態再現に成功したと考えられる。現在、血球分化における AK2 の役割、血球分化とエネルギー代謝の関連を解明するための研究が進行中である。

A. 研究目的

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。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^{1,2)}、本疾患の血球分化障害が回復するかどうかを検討する。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析する。

細網異形成症患者由来の iPS 細胞の樹立は、標準的手法である 4 因子 (Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2) をレトロウイルスベクターやセンダイウイルスベクターで導入する方法では樹立不能であったため、繊維芽細胞の段階で正常 AK2 遺伝子をレンチウイルスベクターで導入後に、iPS 細胞の樹立を行った。この際、iPS 細胞からの血球分化実験などの際に、導入した AK2 遺伝子を除去できるように、AK2 遺伝子を loxP サイトで挟んだ。

2 名の細網異形成症患者 (RD-1 と RD-2 とする) 由来の iPS 細胞を樹立後、iPS 細胞としての品質を評価するために、染色体検査、AK2 遺伝子の変異の確認、トランスジーンサイレンシングの確認、および免疫不全症マウスを用いた奇形腫作成能等の評価を行った。

iPS細胞からの血球分化は、当研究室で開発された、動物由来の不確定要素を含まない無血清培地を用いて、中胚葉前駆細胞を経て造血細胞を産生する培養法を用いた³⁾。血球分化の評価は、メイギムザ染色による血球の形態の確認とフローサイトメリーによる血球の表面マーカーを用いて行った。

AK2タンパクの各ドメインに、2患者の変異を含む複数の変異をレンチウイルスベクターにて iPS細胞に導入し、血球分化への影響および血球における AK2 タンパクの局在を免疫染色にて評価するためのベクターを作成した。

(倫理面への配慮)

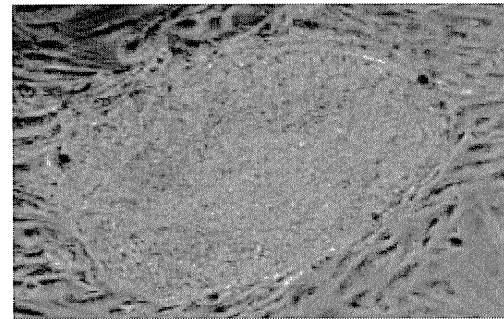
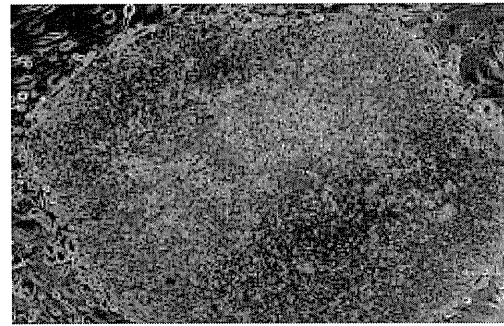
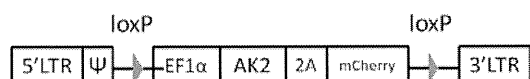
患児の遺伝子情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”及び文部科学省研究振興局長通知に定める細則に沿って、京都大学倫理審査委員会の審査承認を受けているが、人権及び利益の保護について、十分配慮しながら実験を行った。

疾患関連 iPS 細胞作製にあたり、「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究」について、京都大学医学部倫理委員会の承認を得て上で、その内容を忠実に順守し、患者さんの同意・協力を得て行った。

C. 研究結果

細網異形成症患者由来の iPS 細胞樹立

繊維芽細胞の段階で正常 AK2 遺伝子を以下のようなレンチウイルスベクターで導入した後に、iPS 細胞の樹立を行った。その結果、以下のように 2 名の細網異形成症患者から、iPS 細胞を樹立することに成功した。

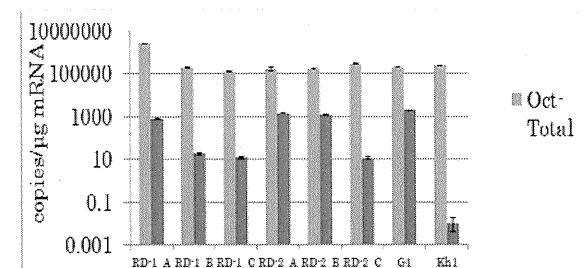


RD-1、RD-2 の両患者ともに、A、B、C の 3 クローンずつを以降の実験に使用した (RD-1_A, RD-1_B, RD-1_C および RD-2_A, RD-2_B, RD-2_C)。この中で、A と B は Cre recombinase 発現ベクター導入によって、AK2 遺伝子を除去した iPS 細胞であり、C は正常 AK2 遺伝子が強制発現されたままの iPS 細胞である。

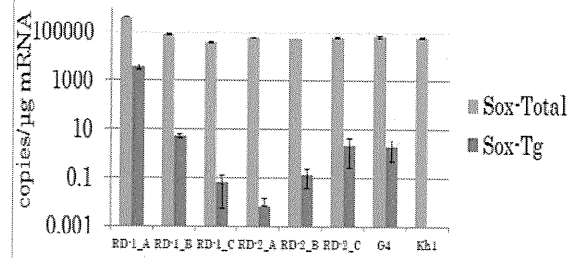
樹立に成功した細網異形成症患者由来の iPS 細胞の品質評価

下図のように、両患者の iPS 細胞の各クローンの主なトランスジーンの評価結果を示す。G4 は正常コントロールの iPS 細胞であり、Kh1 は同じく正常コントロールの ES 細胞である。どのクローンでもコントロールと同様にトランスジーンサイレンシングが認められた。

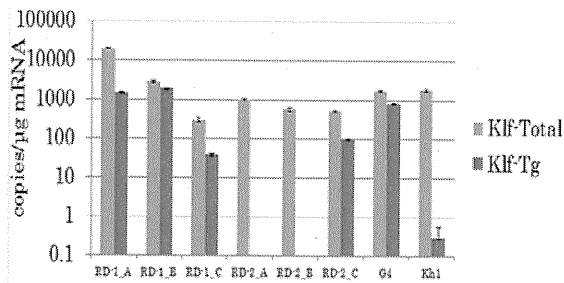
OCT3/4



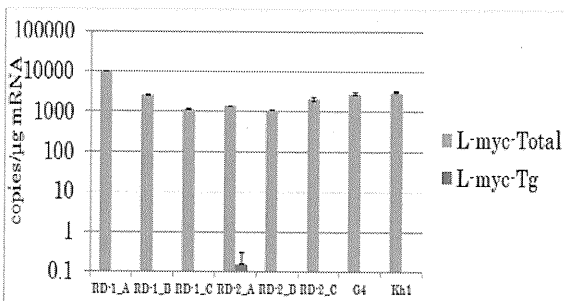
SOX2



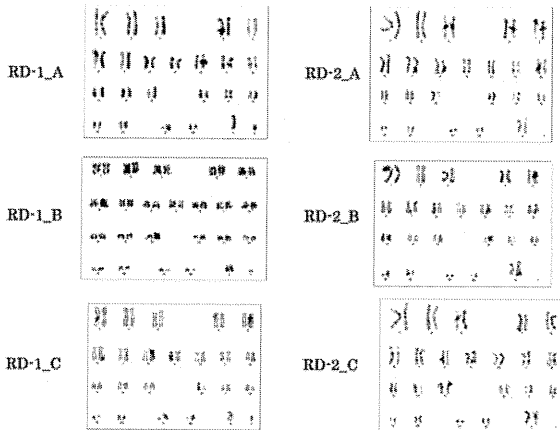
KLF



L-myc



全てのクローンの染色体検査は以下のように、正常の核型であった。



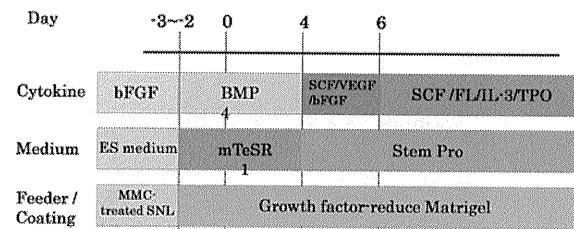
樹立した iPS 細胞の AK2 遺伝子変異の確認のために、全クローンから DNA 抽出を行い、DNA シーケンスを行った。その結果、全てのクローンにて移植前の患者血球由来の DNA で認められたものと同様の変異を認めた。アミノ酸変異としては、RD-1 では G47R と R137X、RD-2 では R103Q と R137X である。

また、iPS 細胞の分化多能性を評価するために、免疫不全症マウス (NOG マウス) の皮下に iPS 細胞を移植した。その結果、全てのクローンにて 3 種類の胚葉からなる奇形腫が観察され、多能性を有することが示された。

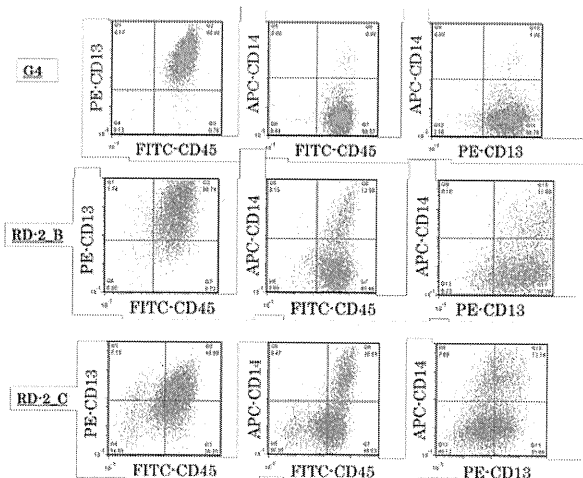
以上より、今回使用した全ての iPS 細胞のクローンの品質および多能性について、良好な結果を得ることができた。

無血清培地を用いた iPS 細胞からの血球分化

血球分化系の概要は以下の図の通り。血球分化開始 6 日目からは、好中球分化を誘導するためのサイトカインの組み合わせとした。



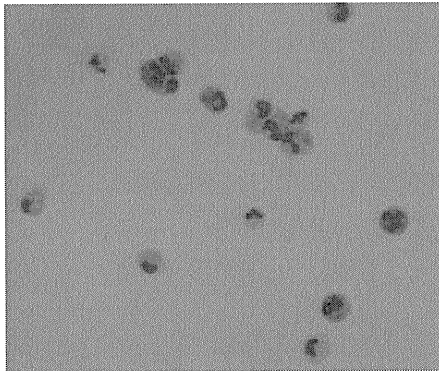
血球分化開始 20 日前後のフローサイトメリーによる血球表面マーカーの結果を以下に示す。



以上の結果から、正常コントロールである G4、正常 AK2 を強制発現させた RD-2_C と比較して、正常 AK2 タンパクを欠く RD-2_B の血球表面マーカーに大きな差異は認められなかった。

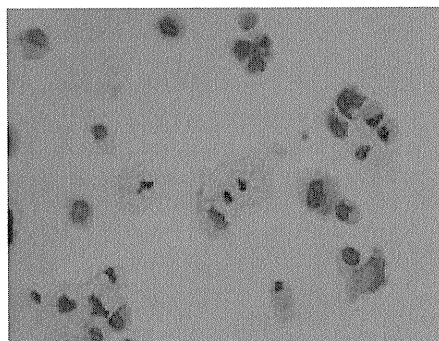
次に上記と同じクローンにおける、同時期のメイギムザ染色の結果を以下を示す。

G4



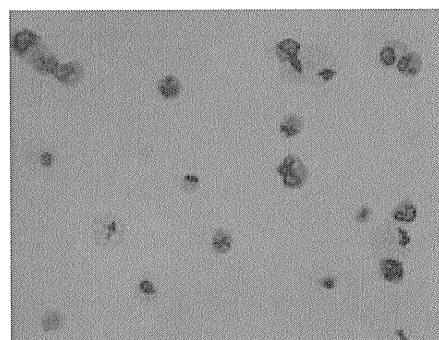
桿状核および分葉核を持つ成熟好中球が多数を占める。

RD-2_B



マクロファージが比較的多く認められたが、それ以外は大型で、細胞質が青い骨髄芽球のみで成熟好中球は認めない。

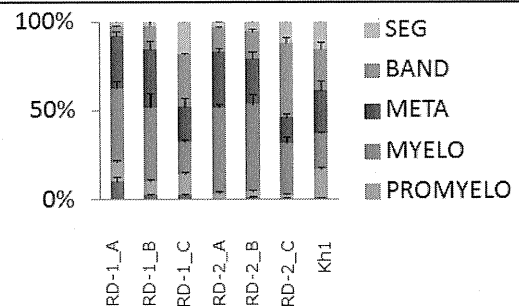
RD-2_C



マクロファージ以外は、RD-2_B と同様に骨髄芽球を認めるが、桿状核および分葉核を持つ成熟好中球も散見される。

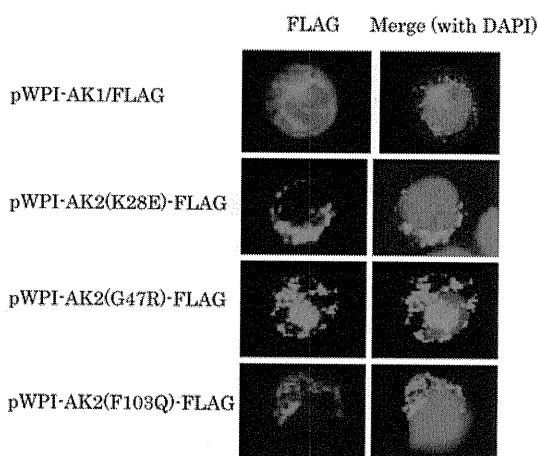
AK2 の変異を有する iPS 細胞由来の好中球の成熟障害を定量的に評価するため、RD-1 および RD-2 の各クローンおよび正常コントロールとして Kh1-ES 細胞由来の好中球 (Kh1) を各成熟段階ごとにカウントした。結果としては、以下の表が示す通り、正常 AK2 タンパクを欠く RD-1_A、RD-1_B、RD-2_A、RD-2_B は、Kh1 や正常 AK2 を強制発現する RD-1_C、RD-2_C と比較して、成熟好中球 (SEG、BAND) の割合が明らかに少ないことを確認することができた。

AK2 変異 iPS 細胞由来の好中球における成熟障害



AK2 変異体導入による各ドメインの解析

2 患者の変異を含む複数の AK2 変異を患者 iPS 細胞に導入し、血球分化への影響および血球における AK2 タンパクの局在を評価するため、レンチウイルスベクターにを作成した。現在、iPS 細胞への導入後、血球分化を開始するところであるが、その前に HEK293 細胞にてベクターの機能を評価した。下図に今回作成した変異導入ベクターの一部を示す。今回、導入した AK2 変異体の局在は HEK293 細胞においては、正常 AK2 タンパクと際はなかった。また、AK1 については予想された通り、細胞質全体に分布していた。



D. 考察

細網異形成症の原因分子である AK2 タンパクは、ミトコンドリア膜間隙に存在し、 $ATP-Mg^{2+} + AMP \rightleftharpoons ADP-Mg^{2+} + ADP$ という可逆性の反応を触媒するキナーゼであり、細胞内のエネルギー状態をモニタリング・調節しているとされる。さらに、AK2 タンパクはアポトーシスにも関連するという報告があり⁴⁾、このような重要な分子の異常細胞からの iPS 細胞樹立は予想以上に困難であった。しかし、レンチウイルスベクターにて AK2 を過剰発現させた後に、リプログラミング因子を導入することによって、世界で初めて細網異形成症患者由来の iPS 細胞樹立に成功した。樹立された iPS 細胞は品質としても問題はなく、維持培養も容易に行えている。

血球分化による病態再現前に、loxP サイトで挟まれた正常 AK2 配列は、iPS 細胞樹立後に除去することにも成功しており、AK2 を欠いた iPS 細胞での血球分化実験も開始している。結果として、血球分化 20 日目ほどで評価したところ、正常コントロールや AK2 強制発現クローンに比べて、明らかに好中球分化が障害されていた。具体的には患者 iPS 細胞由来の血液像では、骨髓芽球が多くを占め、成熟好中

球は認めなかった。これは、実際の患者の移植前骨髓像と所見が一致しており、病態再現に成功したと考えられる。

現在は、血球分化におけるエネルギー代謝を評価する系を構築中であり、これによって、AK2 の有無で血球分化におけるエネルギー代謝がどのように変化するか、また、どのような影響を与えるかを検証することができる。また、T リンパ球分化実験も行っており、好中球分化だけでなく、リンパ球分化においても病態が再現できるかどうか、検討中である。

E. 結論

上記結果で示したように、2 名の細網異形成症患者由来の iPS 細胞樹立に成功した。そして、それらを用いた好中球分化系において、病態再現をすることにも成功した。血球分化におけるエネルギー代謝等の評価系は順調に確立しつつあり、次年度には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. 研究発表

1. 論文発表

- 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.* 2011, 226(5):1283-1291.
- Heike T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, Nakahata T. Autoinflammatory diseases-a new entity of inflammation. *Inflamm Regen.* 2011, 31:125-136.
- Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T, Saito M.:

- A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS ONE*. 2011, 6:e22261.
4. Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa K, Sakai H, Abe J, Tanaka N, Kawai T, Oshima K, Saito M, Nishikomori R, Ohara O, Ishii E, Nakahata T, Horiuchi H, Heike T. Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc 13-4 protein. *Blood*. 2011, 118: 1225-1230.
 5. Yahata N, Asai M, Kitaoka S, Takahashi K, Asaka I, Hioki H, Kaneko T, Maruyama K, Saido T.C, Nakahata T, Asada T, Yamanaka S, Iwata N, Inoue H. Anti-Ab Drug Screening Platform Using Human iPS Cell-Derived Neurons for the Treatment of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*. 2011, 6:e25788.
 6. Tanaka N, Nishikomori R, Saito M, Izawa K, Sakuma M, Morimoto T, Kambe N, Watanabe S, Oshima K, Ohara O, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Arostegui J.I, Yague Jm Joost F, van Gijn M.E, SaintBasile G, Pontillo A, Kawai T, Yasumi T, Nakahata T, Horiuchi H, Heike T. High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome patients; the results of an international multicenter collaborative study. *Arthritis Rheum*. 2011, 63:3625-3632.
 7. 中畑龍俊:疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子治療・個別化医療. *小児科* 52 (12):1743-1749, 2011.
 8. 中畑龍俊:再生医療の進歩(Ⅱ再生医療の進歩). *小児科診療* 75(1):57-63, 2012.
2. 学会発表
 1. 中畑龍俊:特別講演:iPS細胞を用いた今後の医療. 第60回日本医学検査学会 2011年6月5日 東京国際フォーラム
 2. 中畑龍俊:iPS細胞を用いた今後の医療. 第60回日本医学検査学会(市民公開講座) 2011年6月6日 東京国際フォーラム
 3. 中畑龍俊:教育講演:疾患特異的 iPS 細胞を用いた今後の医療. 第28回日本医学会総会 2011年9月17-18日(18日) 東京国際展示場
 4. 栗屋智就、加藤竹雄、柴田実、中畑龍俊、平家俊男:ヒトES/iPS細胞から骨格筋への分化誘導と筋疾患への応用. 第114回日本小児科学会学術集会 2011年8月12-14日(13日)(口演) グランドプリンスホテル新高輪(東京)
 5. 田中孝之、斎藤潤、西小森隆太、平家俊男、中畑龍俊:患者特異的 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群細胞モザイクでの病態の再現と解析. 第114回日本小児科学会学術集会 2011年8月12-14日(14日)(口演) グランドプリンスホテル新高輪(東京)

6. 酒井秀政、岡藤郁夫、西小森隆太、阿部純也、八角高裕、中畑龍俊、平家俊男：Langhans 型巨細胞の形成には CD40-CD40L シグナルが必須である。第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 12-14 日 (13 日) (ポスター) グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
7. 田中尚子、井澤和司、斎藤潤、作間未織、大嶋宏一、小原収、西小森隆太、森本剛、中畑龍俊、平家俊男：NLRP3 体細胞モザイクは CINCA 症候群の 25% 以上に認められる。第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 12-14 日 (13 日) (ポスター) グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
8. Tatsutoshi Nakahata: Keynote Lecture: Various clinical applications of human induced pluripotent stem cells. 2011 International Symposium on Recent Advances in Pluripotent Stem Cells & 7th Annual Meeting of Taiwan Society for Stem Cell Research, 2011 年 10 月 1-2 日 (1 日) Taipei Medical University, Taipei, Taiwan.
9. Miyuki Tsumura, Satoshi Okada, Hidetoshi Sakai, Ryuta Nishikomori, Shin'ichiro Yasunaga, Motoaki Ohtsubo, Toshio Heike, Tatsutoshi Nakahata, Yoshihiro Takihara, Masao Kobayashi: Identification of a novel type of AD-STAT1 deficiency with mutations in the SH2 domain. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月 14-16 日 (15 日) 名古屋国際会議場
10. 中畑龍俊：特別講演：小児疾患における iPS 細胞の応用。第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会 2011 年 11 月 25~27 日 (25 日) ベイシア文化ホール (前橋市)
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
特になし。

参考文献

1. Pannicke U, Hönig 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. Niwa A, Heike T, Umeda K, et al. A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS One.* 2011, 6(7):e22261.
4. Lee HJ, Pyo JO, Oh Y, et al. AK2 activates a novel apoptotic pathway through formation of a complex with FADD and caspase-10. *Nat Cell Biol.* 2007, (11):1303-10.

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分野)

満生 紀子 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野)

高木 正稔 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野)

水谷 修紀 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野)

研究要旨

細網異形成症は極めて稀な疾患であるが、骨髄不全症候群や、汎血球減少(あるいは骨髄異形成症)を呈する免疫不全症の中に、不全型が同定される可能性がある。本年度は上記に相当する疾患 16 症例において、候補 2,476 遺伝子解析あるいは、全エクソン解析を行った。AK2 あるいは関連候補遺伝子の異常は同定されず、不全型についても極めて少ない可能性が示唆された。

A. 研究目的

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が、近年明らかになりつつあるB細胞、NK細胞、単球、樹状細胞欠損症や、全系統の細胞が減少する先天性角化不全症などの骨髄不全症候群の中に、本疾患が埋もれている可能性がある。

今年度は、原発性免疫不全症の網羅的・体系的責任遺伝子解析を行い、細網異形成症あるいは類似疾患患者の同定を試みた。

B. 研究方法

1) 解析対象検体は、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)、及び分類不能型免疫不全症候群(Common variable immunodeficiency:CVID+汎血球減少症)とした。

2) 各患者から遺伝子解析の同意を取得した後、末梢血単核球から核酸を抽出した。

3) 一部の患者では固相化 CD3 抗体と IL-2 にて T 細胞を増殖培養し、タンパクを抽出して、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 congenital: 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。

4) さらに、8 名の患者においては責任遺伝子同定のため、骨髄不全症候群候補遺伝子(TINF2,TERC, DKC1, SNM1B)および細網異形成症責任遺伝子(AK2)を含む、免疫関連 2,476 遺伝子を選別、検体 DNA を当該遺伝子の各エクソンに対応するオリゴヌクレオチドチップで濃縮した後に、Roche 454 sequencerを用いて、解析を行った。

5) 8名の患者においては、Illumina HiSeq2000を用いて、全エクソン解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者検体を用いて解析を行っている。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払った。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に配慮した。本研究(候補遺伝子探索及び全エクソン解析)は、医学部倫理審査委員会の承認をえて行われた。

C. 研究結果

1) BMFSの中に、近年責任遺伝子が同定されたMonoMAC症候群が含まれることが明らかになった。一部の患者ではGATA2遺伝子の変異が同定されたが、GATA2に異常のない患者も3名以上存在することが明らかになった。

2)上記患者のうち同様の表現型を呈する2名について全エクソン解析を行い、共通の責任遺伝子異常を探索した。真の責任遺伝子にはまだ時間を必要とする。

3)その他のBMFS, CID, CVIDにおいても2,476遺伝子解析及び全エクソン解析を行った。1名においてDNA損傷修復異常関連遺伝子の両アリルでの変異が同定されたが、AK2遺伝子には異常を認めなかった。

4)本年Westernblot法により異常分子が同定された症例はなかった。

D. 考察

近年骨髓異形成症と免疫不全症をつなぐ疾患群が次々と明らかになっている。GATA2異常症

やIRF8欠損症はその1例であるが、未だに原因が不明な、骨髓不全症候群、免疫不全症+汎血球減少の症例も数多い。

一方細網異形成症は生後まもなくより重篤な症状を呈する疾患であり、本年そのような症例の発生あるいは紹介はなかった。今回の検討では、主に細網異形成症variantを探す作業となったが16名の患者の解析からもAK2異常症は同定されず、1歳を超える症例の中には、いわゆる非典型的細網異形成症患者は少ない可能性がある。

また一方、今後の全エクソン解析などからAK2類似あるいは関連遺伝子の異常が同定される可能性があると考えている。

E. 結論

骨髓不全症候群、血球減少を伴う複合型免疫不全症あるいは分類不能型免疫不全症において、網羅的体系的遺伝子検査を行ったが、AK2異常は同定されなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, Morio T. Btk negatively regulates ROS production and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nature Immunol.* 2012(in press)

2. Jang SH, Lim JW, Morio T, Kim H. Lycopene inhibits *Helicobacter pylori*-induced ATM/ATR-dependent DNA damage response in gastric epithelial AGS cells. *Free Radical Biol. Med.* 2012, 52:607-615.

3. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T,

- Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan W, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond–Blackfan anemia. *Blood*. 2012(in press)
4. Sato R, Iizumi S, Kim E-S, Honda F, Lee S-K, Adachi N, Koyama H, Mizutani S, Morio T. Impaired cell adhesion, apoptosis, and signaling in WASP-gene disrupted Nalm-6 pre-B cells and recovery of cell adhesion using a transducible form of WASp. *Int J Hematol*. 2012(in press)
 5. Uchida Y, Matsubara K, Morio T, Kasawaki Y, Iwata A, Yura K, Kamimura K, Nigami H, Fukawara T. Acute cerebellitis and concurrent encephalitis associated with parvovirus B19 infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2012(in press)
 6. Lee SW, Kim JH, Park MC, Park YB, Chae WJ, Morio T, Lee DH, Yang SH, Lee SK, Lee SK, Lee SK. Alleviation of rheumatoid arthritis by cell-transducible methotrexate upon transcutaneous delivery. *Biomaterials*. 2012, 33:1563-72.
 7. Honda F, Hane Y, Toma T, Yachie A, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, Morio T. Transducible form of p47phox and p67phox compensate for defective NADPH oxidase activity in neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *Biochem Biophys Res Comm*. 2012, 417:162-168.
 8. Nakamura K, Du L, Tunuguntla R, Fike F, Cavalieri S, Morio T, Mizutani S, Brusco A, Gatti RA. Functional characterization and targeted correction of ATM mutations identified in Japanese patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat*. 2012, 33:198-208.
 9. Uchida Y, Matsubara K, Wada T, Oishi K, Morio T, Takada H, Iwata A, Yura K, Kamimura K, Nigami H, Fukuya T. Recurrent bacterial meningitis by three different pathogens in an isolated asplenic child. *J Infect Chemother*. 2012(in press)
 10. Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. *Plos Pathogens*. 2011, 7:e1002326.
 11. Kato K, Kojima Y, Kobayashi C, Mitsui K, Nakajima-Yamaguchi R, Kudo K, Yanai T, Yoshimi A, Nakao T, Morio T, Kasahara M, Koike K, Tsuchida M. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic granulomatous disease with inflammatory complications and severe infection. *Int J Hematol*. 2011, 94:479-82.
 12. Ishimura M, Takada H, Doi T, Imai K,

- Sasahara Y, Kanegane H, Nishikomori R, Morio T, Heike T, Kobayashi M, Ariga T, Tsuchiya S, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T. Nationwide Survey of Patients with Primary Immunodeficiency Diseases in Japan. *J Clin Immunol.* 2011, 31:968-76.
13. Morio T, Atsuta Y, Tomizawa D, Nagamura-Inoue T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara T, Kato S. Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. *Br J Haematol.* 2011, 154:363-372.
14. 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.* 2011, 138:172-7.
15. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki 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.* 2011, 117:2887-90.
16. 水谷修紀、高木正稔、森尾友宏. RALD : ALPSとJIMMLの交差点にある新たな疾患. *ALD Annual Review*, p131-139, 2012.
17. 森尾友宏: オーメン症候群、イヴェマルク症候群、ディ・ジョージ症候群. 症候群ハンドブック. p630, p645, p646, 2011.
2. 学会発表
1. Morio T. Dissection of Common Variable immunodeficiency With Distinct Phenotype. 2011 Pediatric Academic Societies & Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting Denver, Colorado, USA. 2011.4.30-5.3.
2. 大川哲平、遠藤明史、富澤大輔、今井耕輔、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀. IKBA 遺伝子異常(外胚葉形成不全免疫不全症)に対し非血縁者間骨髄移植を施行した1例. 第5回日本免疫不全症研究会, 東京, 2012年1月21日
3. 磯田健志、高木正稔、森尾友宏、水谷修紀、河本宏. ATM欠損早期T細胞分化におけるリンパ球分化異常と発がんへの分岐点を可視化. 第5回日本免疫不全症研究会, 東京, 2012年1月21日
4. 力石健、北沢博、森尾友宏、峯岸正好、笹原洋二、土谷滋: 悪性リンパ腫を合併した成人期 Wiskott-Aldrich 症候群患者に対する骨髄非破壊的前処置による造血細胞移植の経験. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋、2011年11月25日-27日
5. 磯田健志、高木正稔、朴今花、増田喬子、伊川友活、東みゆき、森尾友宏、河本宏、水谷修紀: 遺伝性毛細血管拡張性小脳失調症の Double Negative 期における Tリンパ球分化以上と発がんメカニズムの関係. 第53回

- 日本小児血液・がん学会学術集会、前橋、2011年11月25日-27日
6. 町田静香、富澤大輔、高木正稔、金子節子、金親あや乃、原田浩之、大川哲平、遠藤明史、梶原道子、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：毛細血管拡張性運動失調症の女兒に発症した diffuse large B-cell lymphoma に対する rituximab 併用化学療法の実験、第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋、2011年11月25日-27日
7. 東良紘、長谷川俊史、平野玲史、橘高節明、森尾友宏、市山高志：肺膿瘍をきたした高 IgE 症候群の 1 男児、第 43 回日本小児感染症学会総会・学術集会、第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋、2011年11月25日-27日
8. 東良紘、長谷川俊史、平野玲史、橘高節明、森尾友宏、市山高志：肺膿瘍をきたした高 IgE 症候群の 1 男児例、第 43 回日本小児感染症学会総会・学術集会、岡山、2011年10月29日-30日
9. 田中沙季、松原知代、三浦真梨子、田中登、鈴木恭子、大日方薫、清水俊明、森尾友宏：血球貧食症候群を呈した重症複合型免疫不全症の乳児例、第 43 回日本小児感染症学会総会・学術集会、岡山、2011年10月29日-30日
10. 渡辺恵理、渡辺信和、森尾友宏、安部泰子、原寿郎、中内啓光：重症複合免疫不全症に対する前処置軽減臍帯血移植後の混合キメリズム病態の解析、第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14日-16日
11. 森尾友宏：分類不能型免疫不全症の病態解明へのアプローチ、第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会、東京、2011年9月17日
12. 磯田健志、高木正稔、森尾友宏、水谷修紀：毛細血管拡張性小脳失調症 (AtaxiaTelangiectasia) における細胞分化異常の解析、第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会、東京、2011年9月15日
13. 高木正稔、篠田邦大、朴今花、満生紀子、森真理、松田和之、村松秀城、土居崎小夜子、長澤正之、森尾友宏、笠原善仁、小池健一、小島勢二、高尾明、Oliveira Joao B、水谷修紀：RAS associated ALPS like disease(RALD)の提唱、第 114 回日本小児科学会学術集会 教育セミナー、東京、2011年8月12日
14. 森尾友宏：T 細胞系免疫異常症における遺伝子診療、第 18 回日本遺伝子診療学会大会、第 35 回日本遺伝子カウンセリング学会学術集会、第 17 回日本家族性腫瘍学会学術集会、京都、平成 23 年 6 月 16 日～19 日
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
特になし。

細網異形成症の遺伝子診断と検体収集に関する調査研究

小原 収 ((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更に進め、Web 登録制の遺伝子解析リクエストシステムを実際に運用するまでに至った。本疾患のような稀な症例を発掘するためには、このようなシステムによって広範な検体収集を実現することが不可欠であり、臨床医の方が細網異形成症疑い患者を広く探索できるようにアーカイブ化できたことは今後の研究に大きく貢献するものと期待される。今年度も、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を試みたが、検体の保管期間が30年近く経ったものであったため、遺伝子解析まで至れなかった。近年こうしたパラフィン包埋切片からの検体での遺伝子解析の必要性が広く認識されてきており、今後の一つの大きな技術的課題であることが顕在化した。

A. 研究目的

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。パラフィン切片からの DNA 抽

出検体についても、同様な方法で解析を試みた。更に、より広範に検体収集を実現するために、セキュリティを担保したネットワーク上で匿名化状態での Web ベースでの検体解析依頼システムを構築した。同時に、遺伝子解析の進捗状況や解析結果もセキュリティを担保した同システムから閲覧可能とするシステムを構築し、システム上のバグ解消などを進めた。

(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、重症複合免疫不全症疑いの5検体に対しての遺伝子構造解析を行った。しかし、これらも AK2 変異に原因を求めざるを得ないような臨床像ではなく、残念ながら細網異形成症に該当するような症例を見いだせなかった。そこで、昨年度も検討したように、長期間保管されていたパラフィンブロックから抽出したDNAによる遺伝子解析を試みたが、この検体もパラフィン切片化されたのが約30年前の検体であった。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のDNAはやはり極端に断片化されていることが観察され(平均サイズ、200-400bp)、実際のPCRによるエクソン増幅は成功しなかったことから、保管中のDNA塩基の修飾が生じている可能性も高いと考えられる。

こうした本疾患の稀少性の高さから、今回の細網異形成症の確定診断の実現に向けて重要なのは、こうした稀少症例を見逃すことなく発見してくる症例登録と遺伝子検査体制にあると考えた。そこで、昨年試験的に作製したセキュリティを担保したインターネット上の遺伝子解析依頼システムを更に改良し、そのシステムを介した遺伝子解析の実働を開始した。それによって細網異形成症疑いの検体を広く収集し、蓄積されたデータから積極的に本症例を探索することができるように、厚生労働省難治性疾患克服事業「原発性免疫不全症候群に関する調査研究班」の免疫不全症専門施設と連携を組み、更に理化学研究所の免疫不全症臨床アーカイブ PIDJ とともに連携しながら、登録・遺伝子解析システムの運用を推し進めた(図1)。

図1 遺伝子解析依頼システムと遺伝子解析管理システム

A. 解析依頼システム入力画面

解析の申し込み
 下記のフォームに必要事項を入力してください。
 依頼施設の情報
 施設名 北海道大学小児科
 医師名
 備考
 ご依頼ユーザー 登録がありません。
 検体情報の入力
 患者ID ※必須 ここに患者IDをご記入ください。
 申請受付日 ※必須 ここに受付日をご記入ください。
 前送依頼番号 依頼番号があればご記入ください。
 検体の種類 ※必須 DNA
 ファイル検査
 備考
 同意書 取得済みです
 検体情報の入力(オプション)
 緊急依頼 ※無 ◎有
 「有」の場合は緊急の度合いをご記入ください。
 mRNA検査 単回発現の確認 ※無 ◎有
 「有」の場合は結果についてご記入ください。
 遺伝子配列に関する特記事項
 「特定のエクソンのみ」「遺伝子変異登録システムのアレラムソフトウェア」「実験室等から検めてほしい」「1、2ヶ月の単位で結果を持つことが可能」などございましたらご記入ください。

B. 遺伝子解析進捗画面

2003NH001	LPIN2	19	未設定	未実施	SEQ	2012-01-20
1984MY003	TNFRSF13B (TACI)	5	未設定	未実施	SEQ	2012-01-12
2008HA001	NBN	16	未設定	未実施	SEQ	2012-01-11
1985TK001	TNFRSF13C (BAFFR)	3	未設定	未実施	SEQ	2012-01-05
1985TK001	TACI	5	未設定	未実施	SEQ	2012-01-05
1985TK001	ICOS	5	未設定	未実施	SEQ	2012-01-05
2009JR001	CYBB	13	未設定	未実施	SEQ	2012-01-05

D. 考察

1) 達成度について

想定以上の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、その代りに研究班内外からのより広範な臨床検体収集のための体制構築をほぼ達成できた。

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国際的な競争が激化しているが、それを臨床研究に結び付けるためには、特に稀少疾患においては検体収集体制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、今回それに加えて遺伝子検査依頼のアーカイビング

システムが実働を開始したことは、今後の希少疾患原因遺伝子変異探索全般にも貢献するだけでなく、将来の国際連携の基盤となるものと期待できる。

3) 今後の展望について

我が国における細網異形成症症例が複数見出すことができれば、それ以降の遺伝子解析については近年大幅な解析能力の拡大が実現できているので、新しい原因遺伝子変異の存在を明らかにできる可能性は高い。今後は、国際的な連携の上でこうした希少疾患症例の蓄積を進めることが大きなカギを握ると考えられる。

E. 結論

細網異形成症症例の蓄積が想像以上に困難であったため、主としてこの希少症例を収集して行くためのシステム構築に注力する結果となった。その結果、細網異形成症だけでなく、広く原発性免疫不全症解析に応用できる遺伝子解析依頼・遺伝子解析進捗管理システムを構築し、実際にそのシステムを稼働することに至れたことは、今後の希少疾患研究に貢献するものと考えられる。また、こうした希少疾患では、保管されているパラフィン切片も貴重な検体とせざるを得ないため、長期保存後の検体からも酵素的に特定のDNA領域を安定に増幅できるような技術開発の重要性が顕在化した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Okura Y, Yamada M, Kobayashi I, Santisteban I, Arredondo-Santisteban G, Kato Z, Iguchi A, Yoshida M, Ohara O, Nakagawa N, Imai K, Hershfield MS, Ariga T. ADA-SCID with 'WAZA-ARI' mutations that

synergistically abolished ADA protein stability. *Br J Haematol.* 2011, 153(5):675-6.

2. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsui 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 κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol.* 2011, 128(1):223-225.e2.
 3. 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, 31(3):309-14.
 4. Ohta H, Miyashita E, Hirata I, Matsumura R, Yoshida H, Hashii Y, Higashiura T, Yasumi T, Murata Y, Heike T, Yang X, Kanegane H, Ohara O, Ozono K. Hematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning from a family haploidentical donor in an infant with familial hemophagocytic lymphohistocytosis. *Int J Hematol.* 2011, 94(3):285-90.
- ### 2. 学会発表
1. Ohara O. Integration of New Technologies for Accurate and Rapid Molecular Diagnosis of Primary Immunodeficiencies PEDIATRIC

ACADEMIC SOCIETIES and ASIAN
SOCIETY FOR PEDIATRIC RESEARCH
2011 Joint Meeting (PAS/ASPR 2011 Joint
Meeting)2011年5月 (Denver,Colorado)

2. 小原 收 原発性免疫不全症研究の基盤整備 遺伝医学合同学術集会 2011 2011年6月 (京都)
3. 釜江智佳子、本間健一、野々山恵章、今井耕輔、佐藤弘樹、満生紀子、小原收 CVIDのTREC,KRECによる病型分類 第5回日本免疫不全症研究会 2012年1月(東京)
4. 小原 收 次世代シーケンシングの免疫疾患ゲノミクスにおける活用 ゲノムコンファレンス 2011年6月(東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む)

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

細網異形成症 (RD) 確定診断例に対して、HLA 一致同胞をドナーとして同種造血幹細胞移植を施行した。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た。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る造血障害は、生着後の再燃を認めていない。現在、移植後 6 年が経過したが移植前より認める難聴以外の合併症はなく、ガンマグロブリンの補充も不要である。

A. 研究目的

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 (Nat Genet. 2009;41(1):101-5, 106-11)。AK2 遺伝子異常が証明された症例に対する同種造血幹細胞移植成功例の報告はいまだ少ない。

B. 研究方法

HLA 一致同胞間骨髓移植後 6 年経過した本症の 1 例について、血液学的、免疫学的解析をおこなった。

(倫理面への配慮)

解析にあたっては、保護者への説明のうえ、文

書による同意を得た。

C. 研究結果

症例は日齢 5 の女兒。リンパ球・好中球ともに著減した SCID 表現型で発症したが、2008 年に同定された RD の原因遺伝子 AK2 解析により同遺伝子の複合ヘテロ変異 (R103Q, R137X) が認められ、本児は RD と確定診断された。

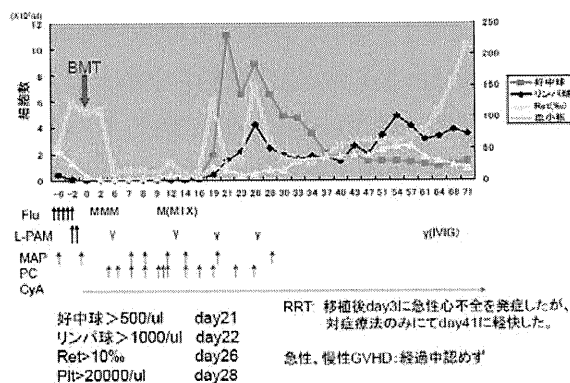
HLA 一致の兄がいたため兄妹間の同種骨髓移植を行った (生後 4 ヶ月)。本症例では母由来 CD8 細胞が存在したため、Fludarabine (total: 125 mg/m²)、L-PAM (total: 80 mg/m²) による前処置を行なった。GVHD 予防は CyA+sMTX を用いた。輸注有核細胞数は 1.87x10⁸/kg、輸注 CD34 陽性細胞数は 3.91x10⁶/kg であった。

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 ヶ月経過 (1 歳 9 ヶ月) 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。

現在、移植後6年が経過したが、難聴以外の合併症は認められず、ガンマグロブリンの補充は不要のまま問題なく日常生活を送っている。

図1.移植後経過



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。生後早期に診断し、速やかに同種造血幹細胞移植を行うことで安全に骨髄移植が可能であると考えられた。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Horikoshi Y, Hama A, Muramatsu H, Yoshida N, Yagasaki H, Kudo K, Horibe K, Kato K, Kojima S. Total body irradiation and melphalan as a conditioning regimen for children with hematological malignancies

undergoing transplantation with stem cells from HLA-identical related donors. *Pediatr Transplant.* 2011, 15:642-649.

2. Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Hama A, Muramatsu H, Doisaki S, Horibe K, Kato K, Kojima S. Prognostic factors for outcomes of pediatric patients with refractory or relapsed acute leukemia undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011, 17:516-523.
3. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, 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.* 2011, 117:2887-2890.
4. Shima H, Tokuyama M, Tanizawa A, Tono C, Hamamoto K, Muramatsu H, Watanabe A, Hotta N, Ito M, Kurosawa H, Kato K, Tsurusawa M, Horibe K, Shimada H. Distinct impact of imatinib on growth at prepubertal and pubertal ages of children with chronic myeloid leukemia. *J Pediatr.* 2011, 159:676-681.
5. Sakaguchi H, Takahashi Y, Watanabe N, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kudo K, Kojima S. Incidence, clinical features, and risk factors of idiopathic pneumonia syndrome following hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatr Blood Cancer.* 2011. [Epub ahead of print]
6. Nishio N, Takahashi Y, Tanaka M, Xu Y, Yoshida N, Sakaguchi H, Doisaki S, Hama A, Muramatsu H, Shimada A, Kojima S.

- Aberrant phosphorylation of STAT5 by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in infant cytomegalovirus infection mimicking juvenile myelomonocytic leukemia. *Leuk Res.* 2011, 35:1261-1264.
7. Nishio N, Takahashi Y, Ohashi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kojima S. Reduced-intensity conditioning for alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in patients with dyskeratosis congenita. *Pediatr Transplant.* 2011, 15:161-166.
 8. Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Nishio N, Hama A, Shimada A, Ito M, Kojima S. Autoimmune-like hepatitis following unrelated BMT successfully treated with rituximab. *Bone marrow transplantation.* 2011. [Epub ahead of print]
 9. Muramatsu H, Takahashi Y, Shimoyama Y, Doisaki S, Nishio N, Ito Y, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Ito M, Kojima S. CD20-negative Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disease refractory to rituximab in a patient with severe aplastic anemia. *Int J Hematol.* 2011, 93:779-781.
 10. Muramatsu H, Takahashi Y, Sakaguchi H, Shimada A, Nishio N, Hama A, Doisaki S, Yagasaki H, Matsumoto K, Kato K, Kojima S. Excellent outcomes of children with CML treated with imatinib mesylate compared to that in pre-imatinib era. *Int J Hematol.* 2011, 93:186-191.
 11. Kamio T, Ito E, Ohara A, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikuta A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica.* 2011, 96:814-819.
 12. Ismael O, Shimada A, Hama A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Yoshida N, Ito M, Takahashi Y, Akita N, Sunami S, Ohtsuka Y, Asada Y, Fujisaki H, Kojima S. Mutations profile of polycythemia vera and essential thrombocythemia among Japanese children. *Pediatr Blood Cancer.* 2011. [Epub ahead of print]
 13. Hama A, Muramatsu H, Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, Jasek M, O'Keefe C, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Shimada A, Watanabe N, Kato K, Kiyoi H, Naoe T, Kojima S, Maciejewski JP. Molecular lesions in childhood and adult acute megakaryoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2012, 156(3):316-325.
 14. 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.* 2011, 138:172-177.
2. 学会発表
特になし。
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
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

先天性角化不全症(DKC)や不全型 DKC の診断は、テロメア長の短縮化を検索することが有用である。テロメア長の短縮化の検索法として Real time PCR 法の有用性を検討した。Real time PCR 法は、Southern blotting 法や Flow FISH 法と同様にテロメア長の短縮を検索することが可能であった。検索に必要な DNA 量は、Southern blotting 法や Flow FISH 法に比べ約 1/5~1/10 であり BMF 症例の臨床検査としては有用であった。

A. 研究目的

先天性角化不全症(Dyskeratosis congenita: DKC)は網状色素沈着、爪の萎縮、舌の粘膜白斑症などといった特徴的身体的所見を伴う先天性の骨髄不全症(Bone marrow failure: BMF)である。10歳前後までに約 80%以上の症例にこれらの特徴的的身体所見が付随し BMF を発症する。また約 8%の症例に皮膚、上咽頭、消化管の扁平上皮癌や腺癌などの悪性腫瘍や、急性白血病などの造血器腫瘍の発生が認められる。遺伝型式は X 連鎖劣性遺伝が 35%、常染色体優性遺伝が 5%、常染色体劣勢遺伝が数%に認められるが、残りの約 60%近くが型式不明である。DKC の約 60%の症例において原因遺伝子が同定され、テロメラーゼ複合体を構成する遺伝子群である、DKC1、telomerase RNA component (TERC)、telomerase reverse transcriptase (TERT)などや、Shelterin 複合体を構成する蛋白である TRF-interacting nuclear protein (TINF2)に変異が認められている。

テロメラーゼ複合体は細胞分裂によるテロメアの短縮化に対しテロメアの複製、安定の役割をもち、Shelterin 複合体はテロメアの先端部位の特異的な構造形成や保護などを行っている。DKC はこ

れらの遺伝子の変異によりテロメアが短縮化し、その結果造血幹細胞などの増殖能に障害が起き上記の症候が形成されると考えられている。

これまでに我々は 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、一部の再生不良性貧血(aplastic anemia: AA)や骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome: MDS)に認められ、特徴的的身体所見を伴わず緩徐に発症する不全型 DKC(cDKC)の存在が明らかにした(Lancet 2003;362:1628, Blood 2003;102:916, N Engl J Med. 2005 352: 1413)。不全型 DKC は臨床的に AA や MDS と診断され、効果が得られない免疫抑制療法(immunosuppressive therapy: IST)が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。

DKC や不全型の DKC をスクリーニング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