

201128088A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法確立と、
病態評価に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 水谷修紀

平成 24 (2012) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法確立と、病態評価に関する研究

目 次

I.	班員名簿	1
II.	総括研究報告 毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法確立と、病態評価に関する研究 水谷修紀（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野）	2
III.	分担研究報告 森尾友宏（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野） 高木正稔（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野） 熊田聡子（財団法人東京都医学研究機構東京都立神経病院 神経小児科） 林 雅晴（財団法人東京都医学総合研究所 脳発達・神経再生研究分野） 金子英雄（独立行政法人国立病院機構長良医療センター 臨床研究部）	9 15 18 21 25
IV.	研究成果に関する刊行の一覧表	29
V.	別刷	31

班員名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	水 谷 修 紀	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野	教 授
研究分担者	森 尾 友 宏	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野	准 教 授
	高 木 正 稔	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野	講 師
	熊 田 聡 子	財団法人東京都医学研究機構東京都立神経病院 神経小児科	医 長
	林 雅 晴	財団法人東京都医学総合研究所 脳発達・神経 再生研究分野	プロジェク トリーダー
	金 子 英 雄	独立行政法人国立病院機構長良医療センター 臨床研究部	臨床研究 部長

「毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法確立と、病態評価に関する研究」

研究代表者 水谷 修紀

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学分野・教授)

研究要旨:基礎研究は毛細血管拡張性小脳失調症(AT)における運動失調と免疫不全を中心に研究を行った。AT患者由来iPS細胞を作成し、神経幹細胞へ化誘導した。また病理学的検討から小脳皮質の顆粒細胞で脂質の酸化ストレスの亢進、大脳基底核でカテコールアミン合成系律速酵素の表出の障害が明らかとなった。ATM欠損T細胞分化において分化初期であるダブルネガティブ(DN)3a期から細胞内T細胞レセプター(TCR) $\gamma\delta$ 及びTCR β 発現が生じるDN3b期への移行不良がTCR再構成異常により起こることが明らかとなった。またこの分化障害に伴いATM欠損T細胞ではDN2-3aで染色体断裂が起こり、DN3b-4へ進むと染色体転座が起こることが明らかとなった。今回の解析により、ATM欠損T細胞のDN3a期は、Tリンパ球減少の早期の原因であり、染色体転座を生じる発がんの重要なヒットポイントであることが判明した。また臨床への還元が早期に可能な研究として、MLPA法を用いて、広範囲なATM遺伝子の欠失を同定する方法を確立した。ATMの遺伝子変異を検出する方法は確立されていたが、ゲノムの広範囲な欠失は判定が難しく、本方法が有用と考えられた。

臨床面ではATの神経症状に対するステロイド少量療法の長期的効果を検討する臨床研究を計画し、開始した。本年はAT患者2例を登録し、2例に治療を開始した。1例では開始後9ヶ月までの観察期間中、神経症状の改善は見られなかったが、症状の進行を緩和させる可能性や不随意運動を軽減させる可能性が示唆された。またATに発症した悪性腫瘍の治療指針の作成を行った。また日本でのA-T家族会設立に向けてA-Tメーリングリストに所属する3家族が研究者と初めて会合を持った。

森尾友宏・東京医科歯科大学 准教授
高木正稔・東京医科歯科大学 講師
熊田聡子・東京都立神経病院 医長
林 雅晴・東京都医学総合研究所
プロジェクトリーダー
金子英雄・国立病院機構長良医療センター
臨床研究部長

の症状に焦点を当てた研究に有用であるが、その神経症状はヒト患者と比較して軽症であり、研究モデルとしては不十分である。しかしヒトの神経細胞をin vivoにおいて研究対象とすることは、技術的および倫理的な観点から課題が多い。そこでAT患者の線維芽細胞からiPS細胞を神経系細胞に分化誘導し、その分化過程や誘導した神経細胞の機能を解析することで、乳児期後半から発症する神経症状の病態や有効な治療開発に大きく寄与することができると考えられる。またヒト検体を用いた病理学的検討は、iPS細胞を用いた基礎研究を行う上で重要な情報を提供できると考える。このような基礎的なアプローチと並行して、臨床試験による神経症状に対する標準的評価法確立と新規治療法開発を目指す。

A. 研究目的

ATにおける神経症状の病因の解明に向けた基礎研究、神経症状改善のための臨床試験を中心に、さらには免疫不全発症の病因についての基礎研究、ATに発症した悪性腫瘍の治療指針の作成を行った。

ATM欠損マウスは疾患研究のモデル動物として、ATの免疫不全や高発がん性など

AT は神経症状のみならず免疫不全症を特徴とし、T 及び B リンパ球減少からの重症感染症を発症し、また患者の 20-30% に白血病、悪性リンパ腫を発症し、これらが主な死因となる。しかし現在まで根本的な解決策がなく、免疫システム、発がん機構についての病態の解明は致死的な感染症、がんの予防及び治療において有力な情報となる。そこで我々は ATM ノックアウトマウスを用いて、詳細な解析がなされていない、T 細胞分化のダブルネガティブ期(DN1-4 期)に注目し、リンパ球減少とリンパ腫で見られる染色体転座の形成過程を検索することとした。また AT 患者は DNA 損傷応答の異常があるため、がん治療において DNA 切断が生じる抗がん剤、放射線療法を健常人と同様に用いると健常臓器の毒性が極めて強く生じること、また根治療法として強力な前処置が必要な造血幹細胞移植を行うこと自体が困難であることが挙げられる。そのため何らかの指針の策定が必要と考えられる。

B. 研究方法

・ iPS 細胞の作製と神経幹細胞への分化

AT 患者の皮膚線維芽細胞および正常人由来胎児肺線維芽細胞に、OCT3/4、SOX2、KLF4、c-Myc の 4 因子を導入して iPS 細胞を樹立した。iPS 細胞に Noggin と SB431542 を投与し、フィーダー細胞なしで 6 日間培養し、SOX1、SOX2、Nestin、Pax6 に対する免疫染色を行った。

・ 剖検例における神経病理の評価

剖検例から小脳と大脳基底核の連続切片を作成し免疫染色を行った。

・ 造血幹細胞を用いたリンパ球分化と染色体異常の解析

CD105 及び抗 Sca1 抗体を用い磁気ビーズによりポジティブセレクション法で造血幹細胞分画を回収し、20% ウシ胎児血清含有 α MEM、FLT3 リガンド、IL-7 をもちいてフィーダー細胞である OP9-DLL1 上で培養し、分化誘導を行った。BAC クローンより抽出した DNA をもとに TCR α / δ 5'側(Alexa488 緑)と TCR α / δ 3'側(Alexa647 青)のプロープを作成し、FISH 法により染色体断裂、転座を

検討した。

・ ATM 遺伝子欠失の解析

MLPA 法はファルコバイオシステムズ、SALSA®ATM P041、042 のキットを用いた。

・ 少量ベタメタゾンを用いた臨床試験

ベタメタゾン 0.02mg/kg/日、1 日 1 回内服。14 日間投薬、14 日間休薬のサイクルを、4 年間の投薬期間中繰り返す。治療効果判定と副作用の監視を目的として、治療開始前及び開始後 3 ヶ月毎に、神経学的所見の評価と採血検査を施行した。神経学的評価は次の 2 つの評価尺度 (Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA)、A-T neuroexamination scale toolkit (AT NEST)) を用いて半定量的に行う。治療開始前及び開始後 1 年毎には、神経学的検査(頭部 MRI・脳波・筋電図・嚥下検査・知能検査)と、さらに詳細な副作用の評価(網羅的ウイルス探索・内分泌負荷試験・骨量検査・眼科検診)を行う。またステロイド投与による酸化ストレスの変化を検討するため、1 年毎に尿中酸化ストレスマーカーを測定する。

(倫理面への配慮)

iPS 細胞の樹立はヒト iPS 細胞又はヒト組織幹細胞からの生殖細胞の作成を行う研究に関する指針に準拠し、東京医科歯科大学倫理委員会の承認を得て行われ、研究に用いた細胞は、公的細胞バンクから入手可能なものを使用した。

剖検脳を用いた神経病理学的解析は、財団法人東京都医学総合研究所の倫理委員会の承認を得て行われた。

遺伝子組換えマウスを用いた動物実験は東京医科歯科大学組換え DNA 実験計画、動物実験計画委員会の承認を得て行われた。

遺伝子変異に関しては「先天性免疫不全症の原因遺伝子同定および病態形成機序の解明」として、岐阜大学医学研究等倫理委員会の承認を得た。

臨床試験は厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針あるいは疫学研究に関する倫理指針を遵守して実施した。被験者の選定においては人権保護の観点から適否を慎重に検討し、施行においては被験者の安全性を

最重視し、研究実施計画は、東京医科歯科大学、東京都立神経病院治験等審査委員会の審査を受け、承認を得た。

C. 研究結果

・ iPS 細胞の作製と神経幹細胞への分化

AT 患者の皮膚線維芽細胞および正常人由来胎児肺線維芽細胞を用いて iPS 細胞を作製した。AT iPS 細胞、正常 iPS 細胞の両方とも、神経幹細胞へ分化誘導を行うことができた。分化誘導後の免疫染色では、神経幹細胞のマーカーである SOX1、SOX2、Nestin、Pax6 の発現が認められた。

分化誘導後の細胞の形態は、顕微鏡観察下で明らかな違いを認めなかったが、AT iPS 細胞から分化誘導した細胞の方が、継代時の細胞死が多かった。網羅的遺伝子解析では、分化誘導前の iPS 細胞と誘導後の細胞は、神経系遺伝子についてのクラスタリングが可能であり、神経系への誘導が出来ていることを確認した。

・ 剖検例における神経病理の評価

酸化ストレスマーカーの免疫染色では、19 歳女性例の小脳皮質で一部の顆粒細胞胞体が脂質酸化ストレスマーカーの 4-HNE で濃染していた。一方、31 歳男性の小脳皮質、両例の小脳歯状核、さらには両例の大脳基底核+視床に陽性所見を認めなかった。酸化酵素である Cu/ZnSOD・MnSOD に対する免疫染色では、両例ともに、小脳皮質の残存 Purkinje 細胞、小脳分子層・白質のグリア細胞に、対照と同様な陽性所見が確認された。

大脳基底核、視床では、A-T2 剖検例(19 歳女性、31 歳男性)ともに MAP2 陽性の神経細胞が保たれ、GFAP 陽性アストロサイトと CD68 陽性ミクログリアの増加を認めなかった。tyrosine hydroxylase (TH)染色では、19 歳女性例の線条体の神経線維・neuropil とレンズ核束、視床下部室傍核の神経細胞において、他染色では構造が保たれているにもかかわらず、染色性が低下していた。介在神経指標のカルシウム結合蛋白と dopamine receptor 2、投射神経マーカー calcineurin α 、淡蒼球内節・外節の substance P・methionine-enkephalin の表出は、いずれも対照同様で、比較的保たれていた。さ

らに 3 種類のリン酸化蛋白の免疫染色では異常な凝集体を同定できなかった。

・ 造血幹細胞を用いたリンパ球分化と染色体異常の解析

我々の解析から胸腺内に占める Lineage 陰性分画すなわち DN 期の比率は、優位に ATM 欠損マウスで高い傾向が得られた。さらに、ATM 欠損マウスでは DN3 期に有意に細胞が集積し DN4 への移行が不良であることがわかった。DN3 期をさらに、CD27、細胞内 TCR β 及び $\gamma\delta$ の発現で、DN3a、3b の分化について評価すると DN3b 分画が ATM 欠損マウスで優位に低く分化障害が検出された。これらの結果から、ATM 欠損マウスでは TCR β 及び TCR $\gamma\delta$ 再構成を必要とする DN3a \rightarrow DN3b で移行不良を生じることが判明した。これら現象は造血幹細胞を用いた *in vitro* の実験系でも再現された。

ATM 欠損マウスに発症するリンパ腫で見られる TCR δ 鎖(14 番染色体)の切断と染色体転座の形成に注目して分化段階の細胞を DN2-3a と DN3b-4 に分け異常の検出を試みた。マウスの各 DN 期の細胞は細胞数が少なくソーティングを実施しても十分な分裂期標本が得られないため、OP9-DLL1 との共培養系で DN2-3a と DN3b-4 分裂期標本を作成した。すると TCR δ 鎖の切断を ATM 欠損の DN2-DN3a 細胞の 5%に認め始め、DN3b-4 でも 2.5%と切断された状態のまま分化する細胞が検出された。TCR δ 鎖に切断点を有する 14 番染色体の転座の形成は ATM 欠損の DN2-DN3a 細胞の 1.8%と一部に認め始め、DN3b-4 移行で 10%の頻度となることが判明した。この切断は、RAG2 欠損 ATM 欠損マウスでは認めず、RAG 依存性に生じていることが判明し、染色体転座の主要な形成期は DN3a から DN3b の移行期であることが判明した。

さらに、TCR δ 鎖切断後、ATM 欠損マウスに発症するリンパ腫で高頻度に認める、12 番染色体と 14 番染色体の転座形成をもつ細胞、同時に 14 番染色体の異数性(倍加)が生じ、動原体が 2 つ確認できる異常(Dicentric: ダイセントリック)により TCR α 鎖の 5'端が増幅し、リンパ腫発症に近づく細胞も確認できた。

・ATM 遺伝子欠失の解析

遺伝子解析を行った AT 患者中、片方のアレルの ATM 遺伝子変異しか検出できない症例が 10 症例中 5 症例存在していた。片方のアレルに、大きな欠失または重複が存在する場合検出できないという問題がある。臨床的には AT と考えられる 1 症例につき、MLPA 法を用いて、ATM 遺伝子の欠失、重複の解析を行った。MLPA 法により、ATM の全 63 エクソンを解析した。その結果、患者、その父、母とも全エクソンが検出され、本患者、父、母ともに ATM の遺伝子欠失または重複は存在しないと考えられた。本方法により ATM 遺伝子全エクソンの状況を的確に判定できることが明らかとなった。

・少量ベタメタゾンを用いた臨床試験

治療を開始した 11 歳男児における現在まで 9 ヶ月の経過は下記の通りである。

神経症状に対する改善効果

2 つの神経学的評価スケールの得点は下表のように推移した。

	治療開始前	治療開始後		
		3ヶ月	6ヶ月	9ヶ月
SARA	22	21.5	21.5	23.5
AT	55.5	53.5	54	51.5
NEST				

AT NEST の項目別検討及びビデオによる所見の比較では、小脳失調の中で、体幹及び歩行失調の重症度が経過中増悪している。これに対して、頸部・体幹・上肢に見られる不随意運動(ミオクローヌス)の頻度には減少傾向があり、これは特に投薬期間中に明らかであった。眼球運動障害、構音障害、筋力、末梢神経障害には明らかな変化を認めなかった。

・AT に発症した悪性腫瘍の治療指針の作成

St. Jude children's Research Hospital で臨床試験が進行中の AT-01 プロトコルをもとに AT に発症した悪性腫瘍の化学療法による治療指針を作成した。

・AT 患者家族の会の設立

2011 年の夏休みを利用して、A-T メーリ

ングリストに所属する 3 家族(患者、両親または母親、同胞)が、それぞれ長崎県、東京都(島部)、群馬県から東京ディズニーランドに集合し、8 月 27 日、サンルートプラザ東京のレストランにおいて研究者を含め懇談した(いずれも初対面)。同集まりにおいて、「A-T 患者家族の会」の名称として「シェアザハート(Share the Heart)」が提案され、今後、メーリングリストで議論を深めることとした。

D. 考察

AT iPS 細胞と正常 iPS 細胞の両方とも神経幹細胞の誘導に成功したことから、ATM は神経幹細胞までの分化誘導には関与しないことが示唆された。一方で、AT iPS 細胞由来の神経幹細胞においては、継代初期は細胞死の割合が多く、ATM 機能との関連が考えられるが、継代が進むと細胞死に差は認められない。A-T 患者では、小脳失調の他に、ミオクローヌスやジストニアなどの不随意運動が出現する。一般に不随意運動に関与すると考えられる基底核や中脳黒質の異常についての剖検報告は多くはないが存在し、本研究班でも、剖検脳の大脳基底核において通常染色標本を用いて検討されてきたが、有意の変化を見出すことはできなかった。今回、2 剖検例中の 1 例において、基底核機能で重要な役割をなすドーパミンを含むカテコールアミン合成系の律速酵素である TH の表出が、他染色で構造が保たれているにもかかわらず、障害されていた。このような TH 染色性低下は、瀬川病など大脳基底核に神経細胞脱落を認めないジストニアで認められ、A-T 患者にみられる不随意運動も大脳基底核の機能異常と関連している可能性が示唆された。一方、小脳皮質とは異なり、酸化ストレスの亢進、リン酸化蛋白の凝集は認められず、TH 染色性低下の原因は不明だった。酸化ストレス研究と同様に、今後、剖検例を増やして検討を進める必要性が示唆された。近年、これまでは線維連絡がないと考えられていた、基底核と小脳のシナプス経路の存在も明らかになっており、小脳プルキンエ細胞のみならず、ドーパミンニューロンの検討も病態解明に有用である可能性が考えられる。神経幹細胞から、更にニューロンへの分化

誘導を行い、検討を進める必要があると考えられた。

時間軸の一点のみであるマウス DN 期の T 細胞解析だけでなく、*in vitro* での時間軸の比較検討を行い DNA 損傷応答機構の中核である ATM を欠損した T 細胞分化では DN3a から DN3b 期に分化段階での移行不良を見出すことができた。従来報告のある DP から SP 期だけでなく、DN3a から 3b の段階で明らかな分化障害が検出され、この間に、リンパ腫の原因にもつながる、TCR δ 鎖切断をきっかけとした 14 番染色体転座が生じやすいとを証明した。

また、 $\gamma\delta$ T 細胞についても同様に分化障害があることがわかり、早期 T 細胞分化の $\gamma\delta$ 鎖再構成不良の影響が出ていることが考えられる。このことから、DN3a から 3b 移行不良の原因は、TCR β 鎖及び $\gamma\delta$ 鎖の再構成不良であることがわかる。このことから、ATM 欠損では T リンパ球減少の原因が、DP-SP の移行不良以前である、DN3a からの移行不良も影響していたことが明らかである。

また、発がんに関する検討では、ATM のリンパ腫のほとんどで TCR δ 鎖を切断点とする染色体転座が報告され、TCR α 上流の増幅と 12 番染色体の片側に 90% BCL11b が欠失することが報告されていた。TCR の E α 鎖欠損マウスでも本染色体転座が検出されるため、TCR α 鎖の再構成以前のイベントであることが考えられていた。我々は、*in vitro* の検討から分化障害の見られた DN3a から DN3b のタイミングで染色体転座が起こることを証明した。加えて分裂期細胞では 14 番染色体の切断後、異数性、Dicentric などさまざまな染色体異常を生じることが確認できた。本研究は、ATM 欠損細胞の DN3a 期に、リンパ球減少症の原因である分化障害と合わせて、染色体異常が生じることを直接的に示しており、DNA 損傷応答機構の中核である ATM を欠損した T 細胞分化の重要なモデルとなりうる。我々が開発した本実験法は、将来の患者治療前の新薬の有効性評価に有用と考えている。また、TCR を切断点とする染色体転座を有する T 細胞性急性リンパ性白血病の転座形成メカニズムの検討にも寄与すると考えている。

AT は、進行性小脳失調に加え、眼球運動

障害、構音・嚥下障害、不随意運動症、末梢神経障害など、多様な神経症状を生じる。これらは、免疫不全症や高発がん性以上に、AT 患者の生活の質を低下させ、生命予後を悪化させるので、治療法の開発が待たれている。2008-10 年にかけて、イタリアの Pignata らのグループが、AT の小脳失調に対するベタメサゾン少量療法の有効性を報告した。これは、AT 患者 6 例に対して、ベタメサゾン 0.01mg/kg/日及び 0.03mg/kg/日をそれぞれ 20 日間投与し、投与前、投与終了直後、投与終了 20 日後の小脳失調の重症度を SARA を用いて比較したものである。両投与量いずれにおいても、投与終了直後には SARA の改善が認められた。ただし、投与終了 20 日後には SARA の再増悪傾向が示され、効果が一時的である可能性が示唆された。今回我々は、同治療の長期効果の評価を目的に臨床研究を開始した。評価尺度として SARA に加え AT NEST を採用し、小脳失調以外の神経症状に対する効果も検討した。また、長期投与の安全性を検討するため、副作用の詳細な調査を行っている。

今回治療を開始した第 1 例では、9 ヶ月の観察期間中、2 つの評価尺度の得点は軽度ながら悪化した。項目別評価では、小脳失調の中の体幹及び歩行失調に悪化傾向が強かった。悪化の程度が AT の自然経過と比較して軽度と言えるのか、すなわち、ステロイド投与が進行性疾患である AT の症状増悪を緩和させるのかについては、さらに長期間の検討が必要である。一方、投薬期間中には不随意運動の減少が見られた。AT 患者に見られる不随意運動は、振戦、舞踏運動、ミオクローヌス、バリスム、ジストニア、チックなど種々に表現され、その本態及び発現機序は未だ明らかでない。本例に見られた不随意運動は皮質下(大脳基底核や脳幹)由来のミオクローヌスと推定される。ステロイドが皮質下の興奮性にどのように作用するのか、これが AT の神経学的予後を改善させるのか、についても今後の検討が必要である。AT 患者へのステロイド長期投与にあたっては、免疫及び内分泌機能などに対する副作用に十分な注意が必要である。本例では今までの経過中に明らかな副作用を認めていないが、今後さらに長期の安全性を確認していく。

E. 結論

AT 患者由来 iPS 細胞を作成し神経幹細胞へと分化誘導を行うことに成功した。

AT における不随意運動の発症を病理学的な側面から検討しドーパミンを含むカテコールアミン合成系の律速酵素である tyrosine hydroxirase の表出が、他染色で構造が保たれているにもかかわらず、障害されていることを明らかにした。今後 iPS 細胞を用いた分化誘導実験を行いこの現象を検証する。

AT における免疫不全症発症の原因の一端を明らかにした。また高発がん性の原因がリンパ球分化不全と密接な関係にあることを明らかにした。

ATM 遺伝子欠失を同定する方法を確立した。

神経症状改善を目的とした少量ステロイド臨床試験を開始した。小脳失調の改善は明らかにはならなかったが、不随意運動の減少が観察された。また大きな副作用は観察されなかった。

AT に発症した悪性腫瘍の化学療法による治療指針を作成した。

「A-T 患者家族の会」の名称として「シェアザハート(Share the Heart)」が提案され、今後、メーリングリストで議論を深めることとした。

F. 健康危惧情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Honda F, Hane Y, Toma T, Yachie A, Kim ES, Lee SK, 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. *BBRC*. 2012 Jan 6; 417(1): 162-8.

2. 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 Jan; 33(1): 198-208.

3. Atsumi Y, Fujimori H, Fukuda H, Inase A, Shinohe K, Yoshioka Y, Shikanai M, Ichijima Y, Unno J, Mizutani S, Tsuchiya N, Hippo Y, Nakagama H, Masutani M, Teraoka H, Yoshioka K. Onset of quiescence following p53 mediated down-regulation of H2AX in normal cells. *PLoS One*. 2011 6(8): e23432.

4. 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(10): 2887-90

2. 学会発表

1. T-Cell Development Failure At beta-Selection Checkpoint and TCR alpha/delta Locus Break Formation Associated with Chromosome 14 Translocation in Ataxia-Telangiectasia Mutated Deficient Mice. Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. the 53rd ASH(The American Society of Hematology) Annual Meeting and Exposition (Oral). San Diego, CA. Dec. 12, 2011.
2. 遺伝性毛細血管拡張性小脳失調症の Double Negative 期における T リンパ球分化異常と発がんメカニズムの関係
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. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会 口演. 2011 年 11 月 25 日 群馬
3. ATM 欠損 T 細胞分化における T 細胞受容体遺伝子転座をもつ白血病リンパ腫

の発症機構. 磯田健志, 高木正稔, 河本宏, 水谷修紀. 平成 23 年度第 2 回 JPLSG 全体会議・合同班会議 口演. 2011 年 11 月 4 日 名古屋

4. T-cell development failure in Ataxia Telangiectasia (AT). Isoda T, Takagi T, Piao J, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. 第 73 回日本血液学会学術集会 口演. 2011 年 10 月 16 日 名古屋

5. 毛細血管拡張性小脳失調症 (Ataxia Telangiectasia)における T 細胞分化異常の解析. 磯田健志, 高木正稔, 森尾友宏, 水谷修紀. 第 39 回日本臨床免疫学会総会 MWS ワークショップ 口演. 2011 年 9 月 15 日 新宿

H. 知的所有権の取得状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ. 分担研究報告

「毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法確立と、病態評価に関する研究」

研究分担者 森尾 友宏

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学分野・准教授)

研究要旨：毛細血管拡張性小脳失調症(AT) の臨床上的問題点として、T 細胞、B 細胞低下を伴うリンパ球減少症からの重症感染症、及び白血病リンパ腫の発症することが挙げられる。これらは主たる死因となることが知られている。リンパ球減少と発がんメカニズムの解明は、患者治療および癌の発症予防に重要である。我々は、ATM 欠損 T 細胞の分化段階の初期にリンパ球減少症、及び発がんの原因が存在するかは明らかでないことに注目し、ATM 欠損マウスの早期 T 細胞分化に注目し解析を実施した。

ATM 欠損 T 細胞分化においてダブルネガティブ(DN)3a 期から細胞内 T 細胞レセプター(TCR) $\gamma\delta$ 及び TCR β 発現が生じる DN3b 期への移行不良を *in vivo* 及び *in vitro* において確認した。移行不良の原因は、TCR 再構成異常であることが判明した。さらに、ATM リンパ腫でみられる 14 番染色体転座を分化段階に応じて検出する *in-vitro* 培養系を確立した。これにより DN2-3a の分裂期では、転座は一部検出されるが、DN3b-4 の段階では 14 番染色体転座を約 10%に検出され、DN3a の VDJ 組換え時に染色体転座を生じていることが考えられた。今回の我々の解析により、ATM 欠損 T 細胞の DN3a 期は、T リンパ球減少の早期の原因であり、ATM に特徴的な 14 番染色体転座を生じる発癌の重要なヒットポイントであることが判明した。

我々の実験系は、患者治療を目指した新薬の有効性判定に有用であり、ATM 欠損を持たない T 細胞性急性リンパ性白血病患者において TCR 遺伝子関連の染色体転座形成メカニズムの解明にも寄与すると考えている。

A. 研究目的

遺伝性毛細血管拡張性小脳失調症(以下 AT) は T 及び B リンパ球減少からの重症感染症、患者の 20%に発症する白血病、悪性リンパ腫(主に T 細胞系) を特徴とし、これらが主な死因となり根本的な解決策が見出されていない。その理由として、AT 患者では DNA 損傷応答の異常があるため、がん治療において DNA 切断が生じる抗がん剤、放射線療法を健常人と同様に用いると健常臓器の毒性が極めて強く生じること、また根治療法として強力な前処置が必要な造血幹細胞移植を行うこと自体が困難であることが挙げられる。

AT 患者における免疫システム、発癌機構についての解明は、致死的な感染症、がんの予防及び治療において有力な情報となる。

ヒトでの解析は、胸腺内の状況を観察することができず、これまでマウスを用いた解析がなされてきた。ATM ノックアウトマウスでは、T リンパ球減少症と T 細胞性リンパ腫が必発し、6 か月までにリンパ腫で死亡する。

T 細胞分化は胸腺内で始まり、CD4、CD8 の発現を認めないダブルネガティブ double negative (DN) phase は、DN1-2-3-4 と進み、それぞれ表面抗原で分化段階を示すことができる。成熟した T リンパ球の形成には分化段階で T 細胞レセプターの遺伝子再構成を成功させる必要がある。TCR γ 及び δ 鎖の再構成は、DN2 期から一部生じ始め、DN3a が主となる。TCR β 鎖は、主には DN3a で再構成され、細胞内 TCR β 陽性、CD27 陽性の DN3b 分画となり分化が進む。ATM 欠損マ

ウスの解析では、DP から SP への分化が障害されており(*Cell* 1996. 86:159-171)、その理由としては、T 細胞分化に必要な T 細胞レセプター(TCR) α 鎖の再構成異常があるためとされている(*PNAS*2007. 104: 6323-8, *Blood*. 2007. 109: 1887-96)。このことは、TCR 遺伝子再構成の際に、生じた Coding End (CE) DNA の切断に ATM が欠損するとうまく再結合ができないことが機序として示されてきた(*Nature*. 2006. 442: 466-70, *JEM*. 2007 204: 1371-81)。また、ATM 欠損マウスでは、DP の表面抗原を示すリンパ腫が発症しやすく、多くのリンパ腫が、TCR α/δ 鎖とその他の遺伝子の転座を有することが知られていたが(*Blood*. 1996. 87: 423-38, *Blood*. 2000. 96: 1940-64)、正確には δ 鎖の切断であることが判明した。このことは T 細胞分化の早期に発がんへの異常が生じていることを意味している(*JEM*. 2010. 207: 1369-80)。

そこで我々は ATM ノックアウトマウスを用いて、詳細な解析がなされていない、T 細胞分化のダブルネガティブ期(DN1-4 期)に注目し、リンパ球減少とリンパ腫で見られる染色体転座の形成過程を検索することとした。

B. 研究方法

C57BL6 : ATM^{+/+}マウスを掛け合わせて、WT, ATM^{+/+}、ATM^{-/-}マウスを作成した。Balb/C : RAG2^{-/-}と C57BL6 : ATM^{+/+}を掛け合わせて、C57BL6 バックグラウンドのダブルノックアウトマウスを作成した。C57BL6 : CD45.1 congenic mouse は骨髄移植実験に使用した。これらのマウスは、東京医科歯科大学内の SPF 環境下で飼育を行った。

・フローサイトメトリー及びソーティング

細胞の解析、ソーティングには、BD Aria2 を用い、解析には、FACS DIVA ソフトウェアを用いた。

・細胞周期解析

EdU 法を用いて DN 期、DP 期をソーティング後にフローサイトメトリーで細胞周期解析を実施した。

・アポトーシス解析

アポトーシス解析には、BD の 7AAD 及

び AnnexinV を使用した。

・造血幹細胞の回収

ミルテニー社の抗 CD105 抗体及び抗 Sca1 抗体を用いて磁器ビーズによりポジティブセクション法で造血幹細胞分画を回収した。

・In-vitro 分化誘導

OP9-DLL1 は、 α MEM powder、20%FBS、P/S 培養液を用い 37°C CO₂ インキュベーター内で培養を行った。LTR-HSC1 $\times 10^4$ を α MEM、20%FBS、FLT3-L5ng/ml, IL7 1ng/ml で培養し、DP 期まで分化誘導を行った。細胞の継代は、day6、day10、day14、day18 と day6 以降は中 3 日で実施した。また実験により NAC を 100 μ M、1mM 加えて実施した。

・抗 CD3 ϵ 抗体投与実験

ATM^{-/-}RAG2^{-/-}ダブルノックアウトマウスの腹腔内に抗 CD3 ϵ 抗体 150 μ g を投与して、5 日目にフローサイトメトリーで解析した。

・DN 期 FISH 法

実際の分化誘導は、目的別にサイトカイン濃度を調節して実施した。DN3a までの細胞を回収目的とする時には、MACS でソーティングした LTR-HSC1 $\times 10^4$ を α MEM、20% FBS、FLT3-L10ng/ml, SCF10ng/ml, IL7 10ng/ml で培養した。DN3b-DN4 期の細胞は、サイトカイン濃度を α MEM、20% FBS、FLT3-L5ng/ml、IL7 1ng/ml に減量して培養を継続し回収した。分裂期細胞の作成には、上記培養細胞にコルセミドを 25ng/ml になるように加えて 2 時間培養、DN3a 期までの細胞は、そのまま低張液処理、DN3b-4 期の細胞は、コルセミド処理後、抗体染色後 Aria2 でソーティングし低張液処理を実施した。

分裂期細胞をプレパラートに作成後、65°C 1 分 30 秒 denaturation 後、エタノールシリーズで標本の準備を行った。プローブは、12 番染色体 (緑) と 14 番染色体 (赤) を Applied Spectral Imaging より購入した。また、Molecular probe (Invitrogen 社) を用いて、BAC クローンより抽出した DNA をもとに TCR α/δ 5' 側 (Alexa488 緑) と TCR α/δ 3' 側 (Alexa647 青) のプローブを作成した。プロ

ープは 80°C10 分で変性処理し on ice とし、プレパラートにアプライシカバーガラスで完全に封じて 37°C で over night インキュベーションを実施した。73°C0.4 x SSC4 分 30 秒、4 x SSC/0.1% Tween-20 で 2 分間洗浄し DAPI 及び退職防止剤を加えてカバーガラスをかけて封をして、Olympus 社 FV10i で観察を実施した。

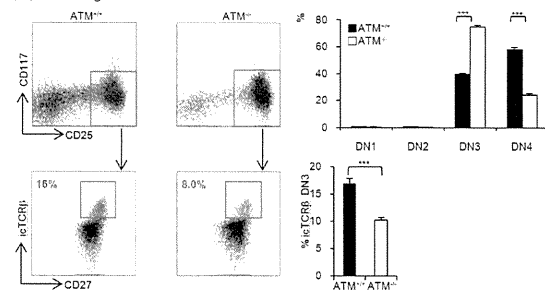
(倫理面への配慮)

東京医科歯科大学内にて組み換え実験計画書、動物実験計画書を提出し承認を得た。(プロトコルナンバー0120228B)

C. 研究結果

① ATM マウスの DN 期 T 細胞分化は DN3a から DN3b への移行不良が見られる

これまでの報告で DN 期の比率は変わらないとする報告があるが、我々の解析では胸腺内に占める Lineage 陰性分画すなわち DN 期の比率は、優位に ATM^{-/-} マウスで高い傾向が得られた。さらに、ATM^{-/-} では DN3 期に有意に細胞が集積し DN4 への移行が不良であることがわかった。DN3 期をさらに、CD27、細胞内 TCRβ 及び γδ の発現で、DN3a,3b の分化について評価すると DN3b 分画が ATM^{-/-} で優位に低く分化障害が検出された。これらの結果から、ATM^{-/-} マウスでは TCRβ 及び TCRγδ 再構成を必要とする DN3a→DN3b で移行不良を生じることが判明した。



② In vitro の分化誘導系で、造血幹細胞及び DN3a 細胞を分化誘導させても、DN3a から DN3b の分化障害が検出される

ATM^{-/-} では DN3a から 3b の移行不良が、時間軸の観点でも WT と比較し分化障害が検出されるか WT 及び ATM^{-/-} 造血幹細胞を OP9-DLL1 上で分化誘導実験を実施した。ATM^{-/-} 造血幹細胞からの分化は DN3 から 4 への移行が再現され、DN3a から 3b の移行

不良も確認できた。

さらに WT, ATM^{-/-} の DN3a を OP9-DLL1 上で分化誘導させると、ATM^{-/-} は WT と比較し DP への移行が不良であることがわかりマウスでみられた DN3a から 3b の移行が確認できた。

③ DN3a から DN3b 移行不良の原因は TCRβ 再構成不良が原因である。

DN3a から 3b の移行不良の原因として、ATM^{-/-} 胸腺環境の影響、ATM 自身が分化シグナルとして機能する、ATM^{-/-} により TCRβ 鎖再構成に異常が生じる 3 つが考えられた。ATM^{-/-} (CD45.2) の骨髄を WT マウス (CD45.1) に移植して、WT 胸腺内で T 細胞分化を再構築すると、ATM^{-/-} マウスと同様の DN3a-3b の移行不良が確認され ATM^{-/-} 胸腺環境の影響は否定できた。ATM の分化プログラムへの関与に関しては、ATM^{-/-} RAG2^{-/-} ダブルノックアウトマウスを作成して、抗 CD3e 抗体を投与すると、DN3 から DP 期まで分化できることから ATM が DN3a-3b の移行に転写因子、細胞内シグナルとして関与することはないことがわかった。また、DN3a-3b の移行不良検索として TCRβ 再構成を DN2-3a-3b-DP と分化段階に応じて PCR 法により評価を行った。ATM^{-/-} では、Vb12-J1、Vb15-J1、Vb16-J1 と特定の組み合わせで再構成が不良であることがわかり、このことが DN3a-3b 移行不良の主な原因であることが判明した。

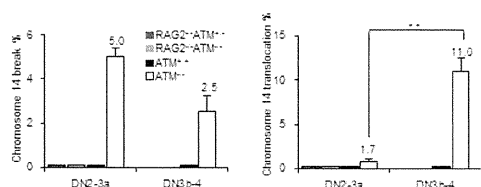
④ ATM^{-/-} では DN2-3 から DNA 二重鎖切断が検出され始め、DN4 期にも持ち越される

これまでの結果から、TCRβ 鎖再構成のタイミングである DN3 では DNA 二重鎖切断後の修復がうまくいかない細胞が多く存在する可能性を考え、T 細胞各分化段階での γH2AX 陽性細胞 (DNA 二重鎖切断のマーカー) の割合をフローサイトメトリーで解析した。ATM^{-/-} の DN2 から γH2AX の細胞割合が増え DN3 でもこの傾向は確認できた。

また DN3 を通過した DN4 の細胞でも γH2AX 陽性細胞割合は高く、DNA 二重鎖切断を抱えたまま分化が進行している可能性が考えられた。

⑤ DN3a→DN3b 移行不良時に 14 番染色体転座が検出される

これまでの結果を考えると ATM^{-/-}の DN3a-3b 期の移行不良時に発癌のイベントが生じやすいことが推測される。ATM^{-/-}リンパ腫で見られる TCRδ 鎖(14 番染色体)の切断と染色体転座の形成に注目して分化段階の細胞を DN2-3a と DN3b-4 に分け異常の検出を試みた。マウスの各 DN 期の細胞は細胞数が少なくソーティングを実施しても十分な me 分裂期標本が得られないため、OP9-DLL1 との共培養系で DN2-3a と DN3b-4 分裂期標本を作成した(方法参照)。すると TCRδ 鎖の切断を ATM^{-/-}の DN2-DN3a 細胞の 5%に認め始め、DN3b-4 でも 2.5%と切断された状態のまま分化する細胞が検出された。



TCRδ 鎖に切断点を有する 14 番染色体の転座の形成は ATM^{-/-}の DN2-DN3a 細胞の 1.8% と一部に認め始め、DN3b-4 移行で 10%の頻度となることが判明した。この切断は、RAG2^{-/-}ATM^{-/-}マウスでは認めず、RAG 依存性に生じていることが判明し、染色体転座の主要な形成期は DN3a から DN3b の移行期であることが判明した。

さらに、TCRδ 鎖切断後、ATM^{-/-}リンパ腫で高頻度に認める、12 番染色体と 14 番染色体の転座形成をもつ細胞、同時に 14 番染色体の異数性(倍加)が生じ、動原体が 2 つ確認できる異常(Dicentric: ダイセントリック)により TCRα 鎖の 5'端が増幅し、リンパ腫発症に近づく細胞も確認できた。

D. 考察

時間軸の一点のみであるマウス DN 期の T 細胞解析だけでなく、in vitro での時間軸の比較検討を行い DNA 損傷応答機構の中核である ATM を欠損した T 細胞分化では DN3a から DN3b 期に分化段階での移行不良を見出すことができた。従来報告のある DP から SP 期だけでなく、DN3a から 3b の段階で明らかな分化障害が検出され、この間

に、リンパ腫の原因にもつながる、TCRδ 鎖切断をきっかけとした 14 番染色体転座が生じやすいとを証明した。

・ DN3a から 3b の移行不良はリンパ球減少症の第一段階の原因である

今回の我々の解析では、DN 期の中で細かく解析すると DN3 期に明らかな集積がありこの段階に表現系としても検出可能な分化障害があることがわかった。また、DN3a から 3b への移行不良の原因としては、TCRβ、γ、δ 鎖再構成異常以外の原因が隠れている可能性が疑われ、ATM 欠損胸腺ストローマの影響、ATM 自体が DN3a から DP にかけての分化誘導シグナルに関与するかの検討を必要とした。DP ステージから SP ステージへの分化不良に対して胸腺ストローマは影響しないことが報告されているが、DN 期についてはこの報告のなかでは検討はされていない(*Blood* 2004 104; 572-8)。この点について、我々の解析では DN 期でも ATM 欠損の胸腺ストローマが影響していないことを確認できた。OP9-DLL1 での分化誘導系もストローマが同じで分化障害が検出されており、このことも ATM 欠損 T 細胞自体の影響で分化障害が生じていることがわかる。また、γδT 細胞についても同様に分化障害があることがわかり、早期 T 細胞分化の gd 鎖再構成不良の影響が出ていることが考えられる。このことから、DN3a から 3b 移行不良の原因は、TCRβ 鎖及び γδ 鎖の再構成不良であることがわかる。このことから、ATM 欠損では T リンパ球減少の原因が、DP-SP の移行不良以前である、DN3a からの移行不良も影響していたことが明らかである。

・ DN1 から DN3a までの分化に ATM は関係するか?

DN1 から DN3a にかけての分化は、in-vivo 及び in-vitro でも DN3 にきれいに集積しており、明らかな分化不良、異常集積は検出されなかった。TCRγδ 鎖及び γ 鎖は、β 鎖の再構成前より生じることが知られている。これらの再構成不良があっても β 鎖の再構成が生じる DN3a までは分化し、β 鎖の再構成を試みることが考えられる。したがって、DN1 から DN3a までは ATM を欠損してい

もそれだけで分化障害が生じることは認められないと考えられる。このことは、過去の解析で明らかでなかった RAG2^{-/-}ATM^{-/-}の DN 期のプロファイルをみても DN1,2 に異常集積を認めることはないことからこの段階の分化プログラムに影響することもないと考えられる。

・ In vitro で TCR δ 鎖再構成の始まる DN2-3a のタイミングで、染色体 14 番の切断、DN3b-4 で染色体転座を検出される

また、発癌に関する検討では、ATM のリンパ腫のほとんどで TCR δ 鎖を切断点とする染色体転座が報告され、TCRV α 上流の増幅と 12 番染色体の片側に 90%BCL11b が欠失することが報告されていた。TCR の Ea 鎖欠損マウスでも本染色体転座が検出されるため、TCR α 鎖の再構成以前のイベントであることが考えられていた。(JEM. 2010. 207: 1369-80)我々は、細胞数確保が困難で分裂期標本作成が難しい DN 期について、in vitro の検討を実施することで分化障害の見られた DN3a から DN3b のタイミングで染色体転座が起こることを証明した。加えて分裂期細胞では 14 番染色体の切断後、異数性、Dicentric などさまざまな染色体異常を生じることが確認できた。本研究は、ATM 欠損細胞の DN3a 期に、リンパ球減少症の原因である分化障害と合わせて、染色体異常が生じることを直接的に示しており、DNA 損傷応答機構の中核である ATM を欠損した T 細胞分化の重要なモデルとなりうる。

我々が開発した本実験法は、将来の患者治療前の新薬の有効性評価に有用と考えている。また、TCR 遺伝子を切断点とする染色体転座を有する T 細胞性急性リンパ性白血病の転座形成メカニズムの検討にも寄与すると考えている。

E. 結論

ATM 欠損 T 細胞分化は、DN3a から 3b の移行不良を TCR δ 及び β 鎖の再構成不良により生じ、リンパ球減少の原因と、染色体転座形成のきっかけとなることが判明した。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Honda F, Hane Y, Toma T, Yachie A, Kim ES, Lee SK, 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. *BBRC*. 2012 Jan 6; 417(1): 162-8.
2. 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 Jan; 33(1): 198-208
3. 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*. 2011 117(10): 2887-90
4. 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 Feb; 33(5): 1563-72
5. 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 Pathog*. 2011 Oct; 7(10): e1002326.
6. 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 Nov; 94(5): 479-82.

7. 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 Dec; 31(6): 968-76.
8. Nakajima K, Hayashi M, Tanuma N, Morio T. An autopsy case of polymicrogyria and intracerebral calcification with death by intracerebral hemorrhage. *Neuropathology*. 2012 Apr; 32(2): 207-10
9. 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. Japanese Cord Blood Bank Network. *Br J Haematol*. 2011 154(3): 363-72.
10. 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(2): 172-7.

2. 学会発表

1. T-Cell Development Failure At beta-Selection Checkpoint and TCR alpha/delta Locus Break Formation Associated with Chromosome 14 Translocation in Ataxia-Telangiectasia Mutated Deficient Mice. Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. the 53rd ASH(The American Society of Hematology) Annual Meeting and Exposition (Oral). San Diego. CA. Dec. 12, 2011

2. 遺伝性毛細血管拡張性小脳失調症の Double Negative 期における T リンパ球分化異常と発がんメカニズムの関係
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. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会 口演. 2011 年 11 月 25 日 群馬
 3. T-cell development failure in Ataxia Telangiectasia (AT). Isoda T, Takagi T, Piao J, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. 第 73 回日本血液学会学術集会 口演. 2011 年 10 月 16 日 名古屋
 4. 毛細血管拡張性小脳失調症 (Ataxia Telangiectasia) における T 細胞分化異常の解析. 磯田健志, 高木正稔, 森尾友宏, 水谷修紀. 第 39 回日本臨床免疫学会総会 MWS ワークショップ 口演. 2011 年 9 月 15 日 新宿
- H. 知的所有権の取得状況
(予定を含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

「毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法確立と、病態評価に関する研究」

研究分担者 高木 正稔

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学分野・講師)

研究要旨：毛細血管拡張性小脳失調症(AT)の神経症状発症メカニズム解明、及び新規治療開発を目的に、AT患者由来 iPS 細胞から神経幹細胞を分化誘導した。正常 iPS 細胞および、AT iPS 細胞の双方から誘導した細胞において、網羅的遺伝子発現解析で、未分化マーカーが発現低下し、神経系マーカーの発現上昇を認めた。また、神経幹細胞の各種マーカーが陽性となっていることを確認した。

A. 研究目的

毛細血管拡張性運動失調症(AT)における、進行性運動失調、不随意運動、眼球運動障害などの神経症状の病態を解明するとともに、新規治療に結びつく新たな知見を得ることが目的である。

AT の原因遺伝子 ATM をノックダウンした ATM 欠損マウスは疾患研究のモデル動物として、AT の免疫不全や高発がん性などの症状に焦点を当てた研究に有用であるが、その神経症状はヒト患者と比較して軽症、もしくはほとんど認められず、研究モデルとしては不十分である。

ヒトの神経細胞を研究で使用することは、技術的および倫理的な観点から課題が多い。AT患者の線維芽細胞から樹立した iPS 細胞を神経系細胞に分化誘導し、その分化過程や誘導した神経細胞の機能を解析することで、乳児期後半から発症する病態のメカニズムや有効な治療開発に大きく寄与することができると思われる。

B. 研究方法

AT 患者の皮膚線維芽細胞に、OCT3/4、SOX2、KLF4、c-Myc の 4 因子を導入して樹立した AT iPS 細胞と、正常対照として健康な胎児肺線維芽細胞から樹立した MRC5 iPS 細胞を用いた。(細胞は国立成育医療研究センター生殖細胞治療研究部より提供)

iPS 細胞に、bone morphogenic protein (BMP) inhibitor である Noggin と、TGFβ/activin/nodal シグナル経路を阻害する低分子化合物である SB431542 を投与し、feeder 細胞なしで 6 日間培養し、(Chambers et al. nature biotech 2009; vol27:275-80)神経幹細胞のマーカーである SOX1、SOX2、Nestin、Pax6 に対する免疫染色と RT-PCR を行った。

AT iPS 細胞と MRC5 iPS 細胞、及び各々から誘導した神経幹細胞について、網羅的遺伝子発現解析を行った。

(倫理面への配慮)

iPS 細胞の樹立に用いた患者線維芽細胞は、細胞バンクから得たものである。

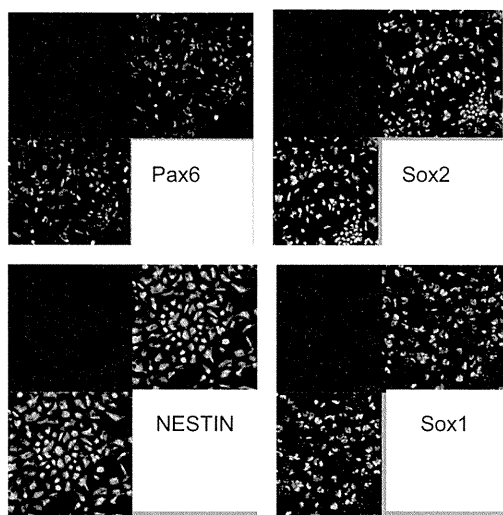
C. 研究結果

AT iPS 細胞、MRC5 iPS 細胞の両方とも、分化誘導後の免疫染色では、神経幹細胞のマーカーである SOX1、SOX2、Nestin、Pax6 が認められた。

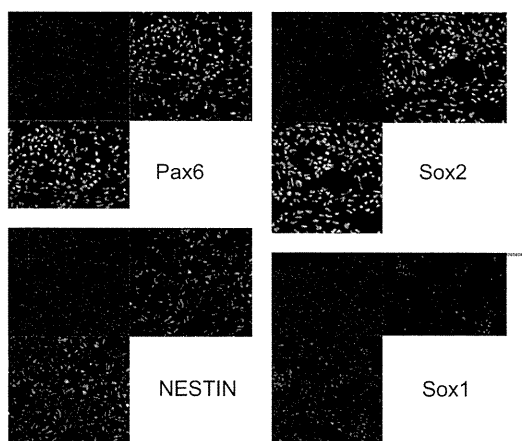
分化誘導後の細胞の形態は、顕微鏡観察下で明らかな違いを認めなかったが、AT iPS 細胞から分化誘導した細胞の方が、継代時の細胞死が多かった。

網羅的遺伝子解析では、分化誘導前の iPS 細胞と誘導後の細胞は、神経系遺伝子についてのクラスタリングが可能であり、神経系への誘導が出来ていることを確認した。

図1 分化誘導した神経幹細胞の免疫染色



(A) MRC5 iPS 細胞から誘導したもの



(B) AT iPS 細胞から誘導したもの

(上段左は DAPI、上段右はマーカー、下段左は merge)

いずれも、SOX1、SOX2、Pax6 は核が染色され、Nestin は細胞質が染色されている。

D. 考察

AT iPS 細胞と MRC5 iPS 細胞の両方とも神経幹細胞の誘導に成功したことから、ATM は神経幹細胞までの分化誘導には関与しないことが示唆された。一方で、AT iPS 細胞由来の神経幹細胞においては、継代初期は細胞死の割合が多く、ATM 機能との関連が考えられるが、継代が進むと細胞死に差は認められない。

A-T 患者では、小脳失調の他に、ミオク

ローヌスやジストニアなどの不随意運動が出現する。一般に不随意運動に関与すると考えられる基底核や中脳黒質の異常についての剖検報告は多くはないが存在し(Koepp et al. *Movement Disorders* 1994; vol9: 455-9)、本研究班でも基底核におけるドーパミン神経の指標である tyrosine hydroxylase (TH) の染色性が低下している結果が得られている。

近年、これまでは線維連絡がないと考えられていた、基底核と小脳のシナプス経路の存在も明らかになっており、小脳プルキンエ細胞のみならず、ドーパミンニューロンの検討も病態解明に有用である可能性が考えられる。神経幹細胞から、更にニューロンへの分化誘導を行い、検討を進める必要があると考えられた。

E. 結論

AT 患者由来 iPS 細胞から神経幹細胞を分化誘導した。今後、患者の神経変性の機序を明らかにするため、更なる分化誘導実験が必要である。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Honda F, Hane Y, Toma T, Yachie A, Kim ES, Lee SK, 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. *BBRC*. 2012 Jan 6; 417(1): 162-8.
- 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(10): 2887-90.
- Takagi K, Kawaguchi Y, Kawamoto M, Ota Y, Tochimoto A, Gono T, Katsumata Y, MD, Takagi M, Hara M, Yamanaka H. Activation of the Activin A-ALK-Smad Pathway in Systemic Sclerosis. *J Autoimmunity*. 2011 36(3-4): 181-8.

2. 学会発表

1. T-Cell Development Failure At beta-Selection Checkpoint and TCR alpha/delta Locus Break Formation Associated with Chromosome 14 Translocation in Ataxia-Telangiectasia Mutated Deficient Mice. Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. the 53rd ASH(The American Society of Hematology) Annual Meeting and Exposition (Oral). San Diego, CA. Dec. 12, 2011.

2. 遺伝性毛細血管拡張性小脳失調症の Double Negative 期における T リンパ球分化異常と発がんメカニズムの関係
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. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会 口演. 2011 年 11 月 25 日 群馬

3. ATM 欠損 T 細胞分化における T 細胞受容体遺伝子転座をもつ白血病リンパ腫の発症機構. 磯田健志, 高木正稔, 河本宏, 水谷修紀. 平成 23 年度第 2 回 JPLSG 全体会議・合同班会議 口演. 2011 年 11 月 4 日 名古屋

4. 毛細血管拡張性小脳失調症 (Ataxia Telangiectasia) における T 細胞分化異常の解析. 磯田健志, 高木正稔, 森尾友宏, 水谷修紀. 第 39 回日本臨床免疫学会総会 MWS ワークショップ 口演. 2011 年 9 月 15 日 新宿

H. 知的所有権の取得状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし