

201128088B

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22・23年度 総合研究報告書

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.	総合研究報告書 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.	分担研究報告書 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（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）	13 21 26 30 36
IV.	研究成果に関する刊行の一覧表	41
V.	別刷	43
VI.	毛細血管拡張性運動失調症ハンドブック	113

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	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：臨床に係る事業として①毛細血管拡張性小脳失調症(AT)の診断方法の確立を行った。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。②東京医科歯科大学を中心とした診療ネットワークの構築を行った。③ATに関する情報を集約したホームページによる情報提供を行った④ATの小脳失調改善を目的とした臨床試験を開始した。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。⑤ATに発症した悪性腫瘍の治療指針の作成を行った。⑥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。一方基礎研究として①ATにおける免疫不全症発症の機構と発がんのかかわりに関する研究、②運動失調発症機構の原因に関する研究を行った。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。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。運動失調発症に機構に関しては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。またAT患者由来iPS細胞を作成し、神経幹細胞へ分化誘導し更なる原因の検索を行っている。

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

A. 研究目的

この研究では毛細血管拡張性運動失調症(AT)患者を対象とした早期診断・早期診療を目指した簡易診断法や、AT患者の呼吸・嚥下・神経機能評価法を開発し、AT責任遺伝子産物ATMの新たな機能を探索することから、ATの診断・治療に還元するこ

とを目的とする。得られた結果は、新たな患者診療の手引きとして提供する。またAT患の小脳失調改善のための臨床試験を行い、その有効性を評価する。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。

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した。

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命的な感染症、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討した。

B. 研究方法

研究班を中心とした共同研究体制によって実施する。また原発性免疫不全症班とは連携により、情報や検体の共有を行った。

・基礎研究

1) AT における免疫の評価

AT における免疫不全症発症の機構を明らかにするためモデルマウスを用いリンパ球分化過程を検討した。

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) のプローブを作成し、FISH 法により染色体断裂、転座を検討した。

2) ATM の腫瘍発生防御機構における役割の検討

AT 患者での腫瘍発生は大きな問題であり、化学療法に対する副作用も顕著で予後も著しく不良である。ATM による腫瘍発生監視機構とその破綻を、分子、細胞、個体レベルで解析する。特に ATM 異常と小児腫瘍発生について重点的に解明を試みた。

3) AT における糖尿病発症機構の研究

るい瘦や耐糖能異常は AT 患者における問題の一つである。ATM の脂肪細胞の分化における役割や、ATM 欠損における耐糖能異常について、詳細な検討を行い、その基礎病態を検討した。

4) AT における運動失調の研究

① AT 剖検例脳の免疫組織染色による評価
AT 剖検例の小脳連続切片において、GAD、calbindin-D28K (CD)、parvalbumin (PV)、calretinin (CR) に対する免疫組織化学染色を行い、視察的に評価した。

② 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。

・基礎からの橋渡し研究

AT 簡易診断法の確立と検証

① High resolution melting curve 解析を用いた簡便な ATM の SNPs (一塩基多型) 同定方法を検討した。

② 本邦における比較的共通な遺伝子変異と考えられるものについて PCR-RFLP 法を検討した。

③ AT およびその類縁疾患診断のための DNA 損傷応答関連蛋白質のウエスタンブロット法による網羅的な評価方法を検討した。

ATM 遺伝子欠失の解析

④MLPA 法による ATM 遺伝子の欠失の検討
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。

・臨床研究

1) ATにおける呼吸器機能、嚥下機能、神経機能などの評価法の確立とその応用

ATでは進行性神経障害に伴い、様々な機能障害を呈するが、誤嚥を回避する気道・食道の機能、呼吸機能、神経・運動・高次脳機能の正確な評価は困難である。海外施設及び国外患者支援団体との共同体制の中で、神経専門医を中心に、情報を収集し、機能評価法を確立した。これをもとに実際のAT患者を評価し、その有用性を検討した。

2) ATに関する情報発信環境の整備

ホームページを作成し、医療者、患者家族への情報の発信を行った。

3) ATに関する診療中核施設の整備

ATに関する知識の豊富な医師を持つ施設を中核として専門性の高い連携体制を整える。また治療法の指針を作成した。

4) ATにおける神経症状改善のための少量ステロイド療法の臨床試験

少量のステロイドを投与し、神経症状の改善が認められるか、またその副次的影響がないか検討した。

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した。

5) AT患者会の設立

患者間の情報共有をめざし患者会の設立を促した。

(倫理面への配慮)

疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守した。実験上必要とされる遺伝子資料、動物の取り扱いは、「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書」に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律」を遵守し、また東京医科歯科大学内動物実験規則、組み換えDNA実験安全管理規則に準拠した。

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。

遺伝子変異解析に関しては「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、「小児期発症疾患の遺伝的素因解明に関する研究」として東京医科歯科大学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

・基礎研究

1) ATにおける免疫の評価

A-Tにおける発がん機構の解明に関し

ては白血病リンパ腫の発症頻度が高い点からリンパ球分化とがん遺伝子によるゲノム不安定性発症機構に注目し研究を行った。

マウス ES 細胞、およびマウス造血幹細胞を用いた検討から AT 責任遺伝子 ATM の機能が欠損することにより、T リンパ球分化が double negative 3a (DN3a) ステージで止まることを明らかにした。

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。

2) ATM の腫瘍発生防御機構における役割の検討

ハイドロキシウレアによる DNA 複製停止が起こった後、問題が解決されない時 Artemis 依存的に DNA2 重鎖切断が起こり、ATM-p53 を介した細胞死誘導機構が起こることを明らかにした。細胞が ATM 依存的に発がんを抑制する方法としての Artemis-ATM を発見したことにより、腫瘍発生抑制の一端を明らかにできたと考える。

3) AT における糖尿病発症機構の研究

ATM の機能が欠損することにより脂肪細胞の分化が障害され、その結果インスリン感受性に働くアディポネクチンが分泌されないため、AT 個体でインスリン抵抗性が生じ、その結果 2 型糖尿病が発症することが明らかとしたが、その分子生物学的機構として ATM がヒストンのアセチル化を介して脂肪細胞分化に必要な遺伝子 C/EBP α の発現を調節していることを明らかにした。

4) AT における運動失調の研究

glutamate decarboxylase とカルシウム結合蛋白に対する免疫組織化学染色により小脳変性での Purkinje 細胞障害の詳細を明らかにした。

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。抗酸化酵素である 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。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。

・ 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でない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。

・ 基礎からの橋渡し研究

AT簡易診断法の確立と検証

HRM 解析を用いた ATM SNPs 検出方法を確立した。80 検体を解析しアミノ酸置換を伴う ATM の SNP を 7 例から 8 個検出し。うち一つは報告のある rare SNP で残りは報告のない新規のものだった。

比較的共通な遺伝子変異と考えられる 7883del5、IVS+2 (T>A)をPCR-RFLP法を用いて簡便に診断できる検査系を確立した。

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。

ウェスタンブロット法を用いたDNA損傷応答関連タンパク質の網羅的解析を方法を確立した。この方法で少なくともATMの欠損は同定でき、DNA-PKやMre11、NBS1などにも応用可能であることが示唆された。

・ 臨床研究

1) ATに関する情報発信環境の整備

平成22年度研究でA-T患者の会の設立と患者の疾患に対する理解促進のため、ホームページの作成を行った。これを有意義にするために東京医科歯科大学、岐阜大学、都立神経病院を中心としたA-T診療基盤を整備し、後述する臨床試験実施体制を構築した。

また臨床医向け、家族向けのATについて理解を深める冊子をホームページの内容をまとめる形で行った。

2) ATにおける呼吸器機能、嚥下機能、神経機能などの評価法の確立とその応用

A-T患者のための適切なりハビリテーションプログラムを構築し、また神経障害に対する治療薬の効果を的確に評価するためには、神経症状の客観的評価基準が不可欠である。最近A-T診療に携わる各国の小児神経科医による国際委員会が発足し、患者の神経症状を半定量的に評価するスケールを作成した。本年度より本スケールを用いた国内患者の評価を開始した。またその評価方法は後述する、臨床試験に応用した。

3) ATにおける神経症状改善のための少量ステロイド療法の臨床試験

東京医科歯科大学治験等審査委員会、都立神経病院倫理委員会の承認を得て、AT患者の小脳失調改善を目指して少量のステロイドの有効性を検討する臨床試験「少量ベタメタゾンの毛細血管拡張性運動失調症に対する運動失調改善に関する研究」を開始した。現時点で患者2名をリクルートし、ベタ

メタゾンの投与を始めた。今後、前述した患者の神経症状を半定量的に評価するスケールを用いて有効性の評価、および副次的影響の評価を行った。

・少量ベタメタゾンをを用いた臨床試験

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 NEST	55.5	53.5	54	51.5

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確な変化を認めなかった。

4) 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 プロトコールをもとに 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。

5) AT患者会の設立

2010 年 5 月、九州 AT 家族とともに、関東甲信越地区の 2 家族を加えた Freeml サービスを利用しメーリングリスト ML(A-T ML)を立ち上げた。医療関係者として参加するとともに、2010 年 7 月九州の患者・家族を直接訪問し、打ち合わせを行った。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歓談した(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 患者診療を今後展開していくに必要な基礎研究、臨床面での土台を作ることができた。基礎研究では AT の主要症状である神経症状、免疫不全、糖尿病の発症要因、易発がん性の機構について分子生物学的に迫り、将来の治療法開につながる研究を行えた。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

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。また免疫不全がどの予様な機序によっておこってくるかを明らかにできた。従来から言われている T 細胞受容体 α 鎖の再構成の失敗によるリンパ球分化の障害以外にも T 細胞受容体 α 鎖の再構成の段階で障害があることが明らかとなった。これら発見からリンパ球分化と免疫不全との関連で DNA 障害応答機構にかかわる分子がどのように免疫を調整しているか、解明するための糸口を導きだしたと考えられる。

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、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 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 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。

また DNA 複製機構に安全な進行のための監視機構に Artemis と ATM が関与することを明らかにし、血液腫瘍細胞の制御用いられるヒドロキシウレアの作用機序を明らかにしたことは薬物の安全な投与を行ううえでより重要な情報を提供できると考える。

AT の診療を行っていく上でより正確な診断が非常に重要な位置を占めていることは間違いない。昨年度までの研究で診断の手引きを公開してきたが、より分子生物学的な方法で遺伝子診断を確実にしていく必要がある。ATM は遺伝子が非常に巨大で、現在まで遺伝子解析のための様々な試みがなされてきたが、いずれも一長一短であった。今回開発した HRM 法による診断方法は PCR のみで SNPs のスクリーニングができて、とより多数検体を一度に解析することができる。多数の検体の中から ATM の SNPs を比較的簡単に見つけだすことができ、易発がん性や放射線や抗がん剤に高感受性を示すヒトの中から ATM の SNPs を比較的簡便に見つけだし、放射線や抗がん剤に高感受性を示すヒトをあらかじめ同定しておくことで放射線療法や化学療法など治療を安全に行う上で非常に有用であると考えられる。現在までの研究で小脳失調を呈し、また免疫不全症の中から、A-T 類似の疾患で診断のつかない様々な例のあることがわかってきた。こういった疾患の中には比較的まれな ATLD や Seckel 症候群、Nijmegen 症候群、眼球運動失行を伴う失調症などが含まれる可能性がある。こういった疾患を一度にスクリーニングするシステムは現在までなかったが本研究で開発したウェスタンブロット法を用いた方法でナンセンス変異であれば同定できるのではないかと考えられる。今後の研究で症例を蓄積していきたい。

平成22年度の研究でA-Tに関する情報を発信するホームページを作成した。これらにより医療従事者、また患者家族の受ける利益は非常に大きいと考えられた。本年度は東京医科歯科大学、都立神経病院、岐阜大学を拠点とした診療基盤を整備し、AT患者が安心して受信できる環境ができたと考えられる。しかし実際は地方在住のA-T患者は神経症状のため遠方への受診は困難であることが考えられる。今後、地域でA-Tの診療に携わる医師をサポートする体制をホームページを中心に充実させていきたい。また本年度研究の大きな成果は免疫不全症に対する免疫グロブリン製剤の投与以外、治療法がなかったA-Tに対して神経症状の改善を期待した少量ステロイドの臨床試験を行えたことである。これには昨年までの研究で行ってきた神経症状評価のスコアリングシステムが重要な位置を占めることに間違いはなく、今後の研究でその有用性を明らかにしていきたい。

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。

また患者のサポートは医療関係者というよりは患者家族の献身的な介護によっている部分が非常に大きい。しかし、患者を抱える家族は一方で非常に大きな精神的、肉体的ストレスを持っていることは明らかである。患者会の設立による情報の共有は、こういったストレスの緩和に十分な影響を持つと考えられ、さらに患者会の発展を期待したい。

E. 結論

本研究を通して基礎研究、橋渡し研究、臨床研究をバランスよく行うことができ、AT患者のための医療レベルの底上げができたと考えられる。特に今年度より開始した臨床試験によりATの神経症状に対する新たな治療法開発に直結するデータを得る可能性が出てきた。

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
 5. Nagasawa M, Mitsuiki N, Ono T, Takagi M, Oda H, Yasuhara M, Mizutani S. Pharmacokinetic monitoring is still required for intravenous busulfan in SCT for small children. *Int J Hematol*. 2010. 91(4): 728-30.
 6. Kawagishi H, Mizutani S, Takagi M, Sugimoto M. ARF Suppresses Tumor Angiogenesis through Translational Control of VEGF mRNA. *Cancer Res*. 2010; 70(11): 4749-58.
 7. Oba D, Hayashi M, Minamitani M, Hamano S, Uchisaka N, Kikuchi A, Kishimoto H, Takagi M, Morio T, Mizutani S. Autopsy study of cerebellar degeneration in siblings with ataxia-telangiectasia-like disorder. *Acta Neuropathol*. 2010; 119(4): 513-20.
 8. Ichijima Y, Yoshioka K, Yoshioka Y, Shinohe K, Fujimori H, Unno J, Takagi M, Goto H, Inagaki M, Mizutani S, Teraoka H. DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PLoS One*. 2010 Jan 21; 5(1): e8821.
- ##### 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
 6. Takagi M, Uno H, Sugimoto M, Yasuda A, Mizutani S. ATM regulates adipocyte differentiation. ATW2010. USA. Los Angeles. Apr.11-14 2010.
 7. 佐藤正樹, 高木正稔, 朴 今花, 本田博章, 安田章夫, 水谷修紀. T 細胞リンパ腫と Atm ハプロ不全~BCRABL トランスジェニックマウスを用いた解析~. 第 52 回日本小児血液学会・第 26 回日本小児がん学会総会 2010 年 12 月 17-19 日 大阪
 8. 烏野初萌, 高木正稔, 杉本昌隆, 安田章夫, 水谷修紀. ATM regulate adipocyte differentiation. 第 33 回分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 9 日 神戸
 9. Takagi M, Uno H, Isoda T, Sugimoto M, Yasuda A, Mizutani S. ATM regulates cell differentiation. 第 33 回分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会 合同大会 ワークショップ 2010 年 12 月 9 日 神戸
 10. 佐藤正樹, 高木正稔, 朴 今花, 本田博章, 安田章夫, 水谷修紀. T 細胞リンパ腫と Atm ハプロ不全~BCRABL トランスジェニックマウスを用いた解析~. 第 33 回分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月 8 日神戸
 11. 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. Aug. 2010.
 12. 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 23-5 日 盛岡
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(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.分担研究報告書

「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(A-T)は毛細血管拡張性小脳失調症様疾患(ATLD)や眼球運動失行を伴う失調症(AOA1、AOA2)との鑑別が必要である。ATMの変異はナンセンス変異による蛋白質合成早期停止により、不安定になりその発現が見られないことが多い。ウェスタンブロット法を用いてこれら類縁疾患を効率的にスクリーニングする方法を開発した。毛細血管拡張小脳失調症(A-T)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。その機構としてリンパ球分化がCD4、CD82重陰性のTリンパ球分化の段階で遅滞することが明らかとなった。

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(CR) $\gamma\delta$ 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

毛細血管拡張性小脳失調症は、進行性の小脳失調、毛細血管拡張、免疫不全を特徴とする常染色体劣性の遺伝性疾患である。ほとんどのATMの変異はナンセンス変異による蛋白質合成早期停止により、不安定になりその発現が見られないので、蛋白質

発現量をウェスタンブロット法で検討することにより、診断を確定できる。また小脳失調を示す疾患は多数あり毛細血管拡張性小脳失調症様疾患(ATLD)や眼球運動失行を伴う失調症(AOA1、AOA2)との鑑別が必要となってくる。免疫不全がA-Tの特徴的な症状の一つであるがどのような機

序により免疫不全を発症するのか不明な点も多い。

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: 159-71)、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 (PNAS2007. 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: 1940-6)、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

末梢血を IL2 添加下-CD3 固相化フラスコを用いて増幅し、ウェスタンブロット法により、蛋白質発現量を検討した。

野生型および ATM ノックアウトマウスを用いて胸腺におけるリンパ球分化を表面抗原の発現によりフローサイトメトリーを用いて検討した。

・実験動物

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 を使い、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レ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 培養液を用いて 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-HSC 1 \times 10⁴⁻⁵ 個を α MEM、20% FBS、FLT3-L10ng/ml、SCF10ng/ml、IL710ng/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-L 5ng/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 $^{\circ}$ 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。プローブは 80 $^{\circ}$ C 10 分 で変性処理し on ice とし、プレパラートにアプライシカカバーガラスで完全に封じて 37 $^{\circ}$ C で over night インキュベーションを実施した。73 $^{\circ}$ C 0.4 x SSC 4 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)

本研究では診療施設、患者、あるいは保因者より情報提供を受け、問題点の抽出等の作業を行うため、患者(保因者)の人権擁護のために、情報管理などに十分の配慮を

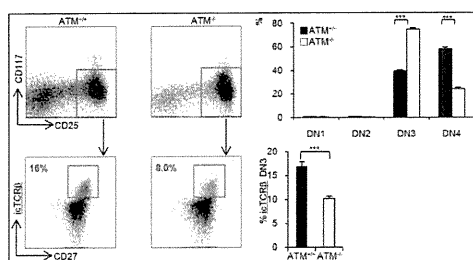
行った。これは基本的に臨床研究に関する倫理指針に準拠して進めた。小児及び成人が主な対象となるために、小児及び成人の両者に配慮した説明書、同意書を作成した。動物の取り扱いは、「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書」に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律」を遵守した。また東京医科歯科大学内動物実験規則、組み換え DNA 実験安全管理規則に準拠した。

C. 研究結果

一つの検体から網羅的に ATM、ATR、DNA-PK、Ku70/80、Mre11、NBS1、Rad50、XRCC4、LIG4、Aprataxin、Senataxin、XLF、Artemis 一度にスクリーニングする系を確立した。この方法を用いて 9 例の A-T 疑い症例を解析し 1 例の A-T を同定した。

A-T はその特徴として免疫不全を示すが、その機構としてリンパ球分化が CD4、CD8 2 重陽性 T リンパ球分化の段階で遅滞することが知られており、これは T 細胞受容体 α 鎖再構成の失敗に基づくものと推定されていた。本研究で ATM 欠損マウスでは CD4、CD8 2 重陰性の T リンパ球分化の段階においても分化が遅滞することが明らかとなり、この複合的な現象によってリンパ球減少が起こることが明らかとなった。遺伝性毛細血管拡張小脳失調症(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。

- 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 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 $ATM^{-/-}$ 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 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。

- 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 TCR β 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 TCR β 鎖再構成に異常が生じる 3 つが考えられた。 $ATM^{-/-}$ (CD45.2) の骨髓を WT マウス (CD45.1) に移植して、WT 胸腺内で T 細胞

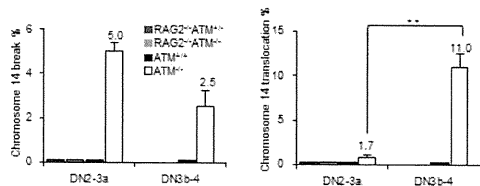
分化を再構築すると、 $ATM^{-/-}$ マウスと同様の DN3a-3b の移行不良が確認され $ATM^{-/-}$ 胸腺環境の影響は否定できた。 ATM の分化プログラムへの関与に関しては、 $ATM^{-/-}$ RAG2 $^{-/-}$ ダブルノックアウトマウスを作成して、抗 CD3e 抗体を投与すると、DN3 から DP 期まで分化できることから ATM が DN3a-3b の移行に転写因子、細胞内シグナルとして関与することはないことがわかった。また、DN3a-3b の移行不良検索として TCR β 再構成を DN2-3a-3b-DP と分化段階に応じて PCR 法により評価を行った。 $ATM^{-/-}$ 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、TCR β 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 γ H2AX 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 γ H2AX 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 γ H2AX 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 \rightarrow 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 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 (方法参照)。



すると TCR δ 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。TCR δ 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、TCR δ 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 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。

D. 考察

毛細血管拡張性小脳失調症の診断に有用なウェスタンブロット法を用いた解析方法を確立した。本方法は毛細血管拡張性小脳失調症類縁疾患の中から A-T を診断するのみならず、ATLD などの疾患の診断にも有用と考えられる。

A-T における免疫不全症はその生命予後を考えるうえでも重要な位置を占めている。現時点では B 細胞機能不全による抗体産生障害に対して免疫グロブリンの補充を行うのが唯一の治療法であるが、病因が明らかになることにより、治療法の開発に向けた展開が期待できる。

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。

・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、TCR β 、 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、 $\gamma\delta$ 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。

・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。TCR δ 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 を欠損していて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 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。(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

A-T およびその類縁疾患を効果的に同定する方法を開発した。また A-T における免疫不全症発症の要因を T 細胞主体に解析し明らかにした。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.