

- 15) 今井耕輔, 臨床検査の意義と限界 T 細胞・B 細胞サブセット. 小児内科, (2012). 44, 645-648.
- 16) 今井耕輔, 【知っておきたい内科症候群】 膠原病・免疫・アレルギー《免疫不全症》 ウィスコット・アルドリッチ症候群. 内科, (2012). 109, 1501-1503.
2. 学会発表
- 1) Imai K. Screening for Primary Immunodeficiency Diseases using TREC and KREC. 第 17 回アジア太平洋小児アレルギー呼吸器免疫学会 (APAPARI 2012)(招待講演)、台北市、台湾、2012 年 10 月 20 日
- 2) Honma K, Imai K, Kamae C, Ishida H, Ito Y, Kojima S, Yokosuka T, Kanegane H, Morio T, Sasahara Y, Fujiwara T, Harigae H, Hashii Y, Ohara O, Nonoyama S. Clinical features and immunological abnormalities of GATA2 deficiency in JAPAN. 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. October 2012.
- 3) Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, MC van Zelm, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor recombination excision circles (TREC) and Ig kappa-deleting recombination excision circles (KREC). 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. October 2012.
- 4) Mitsuiki N, Oshima K, Imai K, Ohara O, Morio T, Mizutani S. Genetic analysis for 207 cases with primary immunodeficiency (PID) consulted to a single center through PID network in Japan (PIDJ) in 5 years (2007-2011). 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. October 2012.
- 5) 今井耕輔: 免疫不全症の遺伝子診断・治療の up-to-date. 第 74 回日本血液学会学術集会(教育講演)、京都、2012 年 10 月 21 日
- 6) 今井耕輔: 抗ウイルス薬使用の実際と今後の考え方. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会(シンポジウム1)、北九州、2012 年 11 月 25 日
- 7) 今井耕輔: ウイルスに対する感染防御機構. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会(教育セミナー)、北九州、2012 年 11 月 23 日
- 8) 今井耕輔: 先天性免疫不全症における遺伝学的検査の取り扱いと諸問題について. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会(イブニング・セッション 3)、横浜、2012 年 12 月 1 日

- 9) 山内建、磯田健志、大川哲平、手束真理、富澤大輔、高木正稔、今井耕輔、梶原道子、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀:高 IgM 症候群の臍帯血移植後に蔓延する骨髓球系分化障害に対してリメタゾン投与が奏功した一例、第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会、横浜、2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日
- 10) 手束真理、大川哲平、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、今井耕輔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀、今留謙一:EB ウイルス関連血球貧食症候群の治療終了後早期再燃に対し、同胞間骨髓移植を施行した一例、第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会、横浜、2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日
- 11) 遠藤明史、渡邊健、大川哲平、富澤大輔、今井耕輔、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀:Chromosomally integrated HHV-6 の病原性の解析、第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会、横浜、2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日
- 12) 長澤正之、大川哲平、遠藤明史、満生紀子、小野敏明、青木由貴、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、今井耕輔、梶原道子、森尾友宏、水谷修紀:トロンボモジュリン- α は早期の凝固関連移植合併症死を改善する、第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会、横浜、2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日
- 13) 佐藤裕子、加賀美武飛、鈴木徹臣、山口克彦、今井耕輔、森尾友宏、佐藤祐:皮膚症状、著明な好酸球増多を契機に診断された重症複合免疫不全症の 1 例、第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会、北九州、2012 年 11 月 24 日-11 月 25 日
- 14) 星野顕宏、金兼弘和、大嶋勇成、笠井正志、庄司康寛、寺井勝、今井耕輔、森尾友宏、宮脇利男:重症複合免疫不全症におけるニューモシスチス肺炎と気胸について、第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会、北九州、2012 年 11 月 24 日-11 月 25 日
- 15) 吉岡紀久子、安富素子、山田健太、林仁幸子、河北亜希子、大嶋勇成、和田泰三、森尾友宏、今井耕輔:BCG 感染症のための抗結核薬治療下で骨髓移植を施行した Wiskott-Aldrich 症候群の一例、第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会、北九州、2012 年 11 月 24 日-11 月 25 日
- 16) 釜江智佳子、満生紀子、小原明、野口恵美子、久保田健夫、小原収、今井耕輔、野々山恵章:次世代シーケンサーにより、原因遺伝子の同定に至った CVID の 1 例、第 3 回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2012 年 9 月 22 日
- 17) 手束真理、今井耕輔、高山かおる、佐藤祐子、満生紀子、大川哲平、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀:Omenn 症候群を呈した完全型 DiGeorge 症候群の 1 女児例、第 3 回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2012 年 9 月 22 日

18) 星野顕宏、金兼弘和、大嶋勇成、石垣景子、笠井正志、庄司康寛、吉田真、金田眞、寺井勝、今井耕輔、森尾友宏、宮脇利男：重症複合免疫不全症におけるニューモシスチス肺炎と気胸について、第3回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2012年9月22日

19) 満生紀子、大嶋宏一、今井耕輔、小原收、水谷修紀、森尾友宏：PIDJ ネットワークを介したPID患者の遺伝子解析（2007～2011年）、第3回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2012年9月22日

20) 大野香奈、松原知代、永田裕子、原聡、大日方 薫、今井耕輔、森尾友宏：呼吸器感染症反復し肺出血をきたした6歳男児、第3回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2012年9月22日

21) 井上祐三朗、西田直徳、Yang Xi、金兼弘和、今井耕輔、森尾友宏、富板美奈子、下条直樹、河野陽一：低 γ グロブリン血症を認めるが、血球貪食症候群の発症を認めない X連鎖リンパ増殖症候群 type2 の14歳児例（もしくは1家系）、第3回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2012年9月22日

22) 長澤耕男、井上祐三朗、菱木はるか、有馬孝泰、石和田稔彦、今井耕輔、森尾友宏、下条直樹、河野陽一：血球貪食症候群を繰り返す8ヶ月男児例、第3回関東甲越免疫不全症研究会、東京、2012年9月22日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

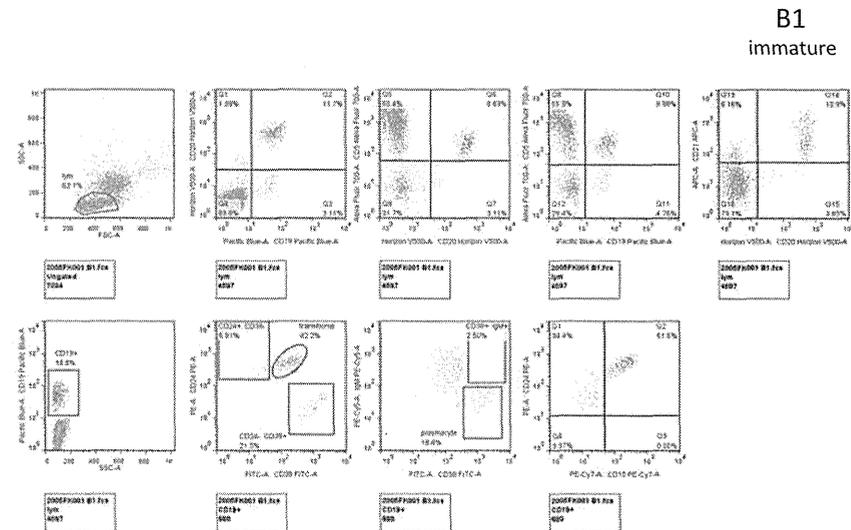
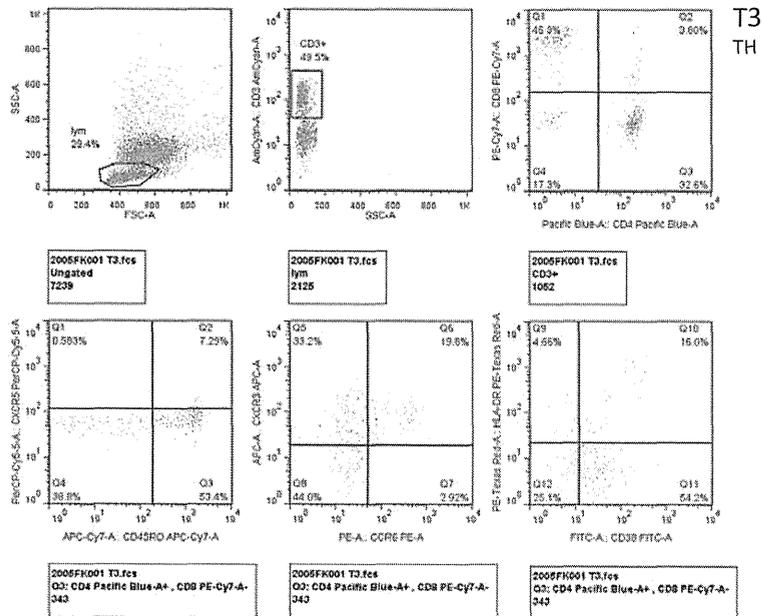
特になし。

2. 実用新案登録

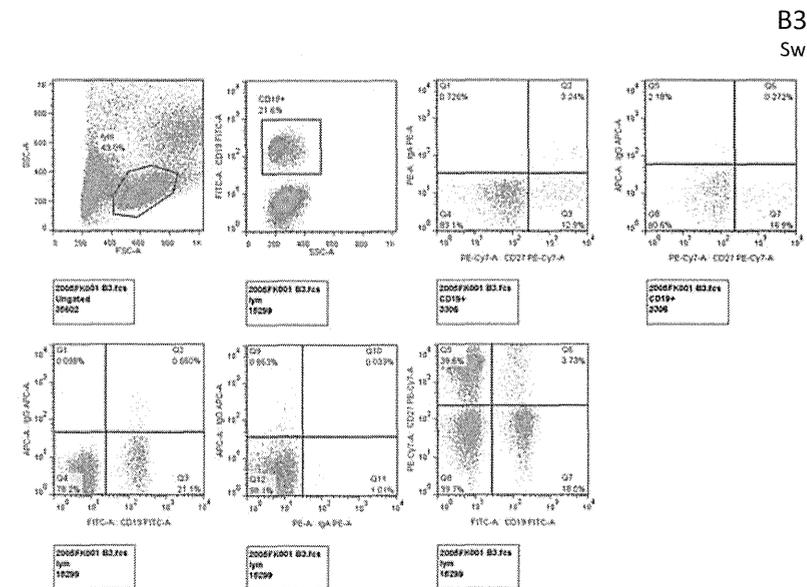
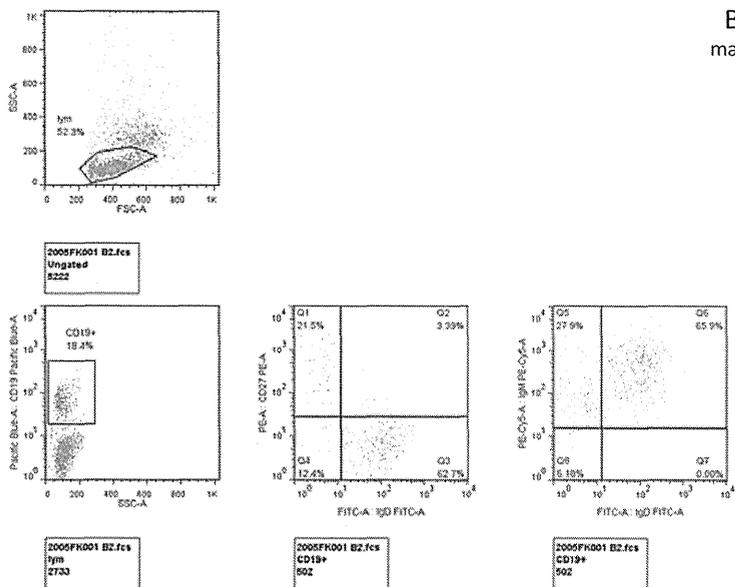
特になし。

3. その他

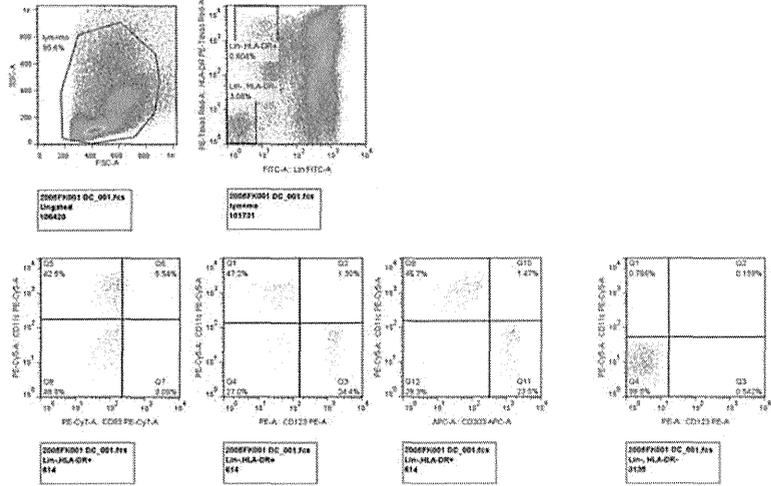
特になし。



21



DC



PiD カテゴリ	主病名	PiD患者ID	紹介医療機関
1. Combined T and B cell PiDs	移植後：X-linked SCID	2011AE001	松下記念病院・石鏡会田辺中央病院 京都府立医大小児科
	2. Well-defined syndrome with immunodeficiency	1975TA002	杏林大学医学部付属病院/東京医科歯科大学
	高IgE症候群	2012NR001	関西医科大学滝井病院
	高IgE症候群	1981KY002	名古屋市立大学大学院医学研究科
	移植後：WAS	2001MR001	水原郷病院>医科歯科大学小児科
	高IgE症候群	1972ST003	順天堂大学大学院
	ataxia telangiectasia like	2000UN001	千葉県こども病院
	CATCH22/胸腺無形成	201TFY001	横浜市立大学
	DiGeorge	2012SK002	千葉大学
3. Antibody defect	XLA	2012KE001	東京慈恵会医科大学葛飾医療センター
	高IgM症候群	1962MH001	市立福知山市民病院
	高IgM症候群	1992KR001	北海道大学
	CVID+リンパ節腫脹	1979HU001	東京医科歯科大学 血液内科
	CVID+MAC感染	2007GS001	浜松医大
	CVID+ITP	2007IK004	成田赤十字病院
	CVID+ITP	1961MA001	松山市民病院 駒込病院内科 東京医科歯科大学
	CVID+ITP	1990AH001	成田赤十字病院 東京医科歯科大学
	CVID	1954UY001	千葉大学大学院医学研究院
	CVID	1952KM001	がん感染症センター都立駒込病院
	CVID	2008KR003	前橋協立病院
	IgA欠損症+SLE	1999NS002	群馬大学医学部付属病院
	IgA欠損症+AIHA	1998NE001	神戸大学大学院
	分類不能型免疫不全症	1970KS001	虎の門病院
	CVID	2005FK001	順天堂大学浦安病院
4. Immune dysregulation	自己免疫性汎血球減少症	2011OS002	静岡県立こども病院
	血球貪食症候群	2010NH001	昭和大学藤が丘病院
6. Innate immunity disorder	CMCD(STAT1：糖尿病、慢性皮膚粘膜カンジダ)症	2008KA001	駿河台日本大学病院 東京医科歯科大学
	CMCD疑い	1995NK002	社会保険紀南病院
9. Unclassified etc.	血球減少	2012TF001	日本大学
0. non-PiD	非ホジキンリンパ腫、Rituximab投与後低アグロフリン血症、亜急性壊死性リンパ節炎(反復性)	1993KA001	社会保険神戸中央病院 明石市立市民病院
	B細胞欠損症疑い→正常	2012NS002	小児医療センター
	極低出生体重児、播種性カンジダ症、DIC	2012MK002	都立大塚病院
	髄膜炎	2001KM001	土浦協同病院

細網異形成症患者および重症先天性好中球減少症患者由来 iPS 細胞樹立およびそれを用いた病態解析

研究分担者 中畑 龍俊 (京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門)

研究分担者 大嶋 宏一 (京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門)

丹羽 明 (京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門)

斎藤 潤 (京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門)

森嶋 達也 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)

平家 俊男 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)

研究要旨

細網異形成症および重症先天性好中球減少症の根本治療は造血幹細胞移植であり、移植前の血球も著明に減少していることから、患者からの血液細胞での研究は非常に困難である。このため、患者由来 iPS 細胞樹立はこれらの疾患の病態解析にとって、非常に有望と考えられる。これまで、2 名の細網異形成症患者および 1 名の重症先天性好中球減少症患者から 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 細胞や正常原因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。これは患者骨髓所見と一致しており、両疾患の病態再現に成功したと考えられる。現在、両疾患の血球分化における各原因遺伝子である AK2 や HAX1 の役割を解明するための研究が進行中である。

A. 研究の目的

細網異形成症や重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞を樹立し、血球分化解析を行うことによって、両疾患の病態解析・解明を行う。

に分化させ、コロニーアッセイ、骨髓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、本疾患の血球分化障害が回復することを示す。

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

重症先天性好中球減少症患者由来の繊維芽細胞から iPS 細胞を作成し、これを好中球に分化させ、病態再現を行う。さら

に原因遺伝子である HAX1 遺伝子を導入し、本疾患の血球分化障害が回復することを示す。

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 (Oct, Klf, c-Myc, Sox4) 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。一方、重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞樹立は、4 因子 (Oct, Klf, c-Myc, Sox4) もしくは 3 因子 (Oct, Klf, Sox4) をレトロウイルスベクターで導入する方法を用いた。

2 名の細網異形成症患者 (RD-1 と RD-2 とする) および重症先天性好中球減少症患者由来の 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 および HAX1 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¹⁾。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トリーによる血球の表面マーカーを用いて行った。

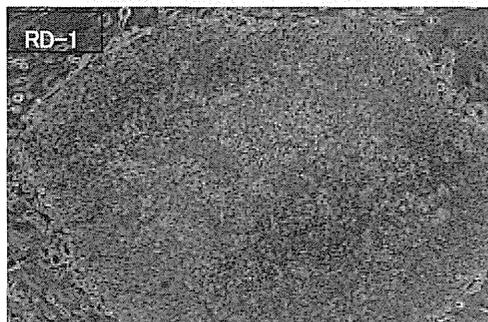
(倫理面への配慮)

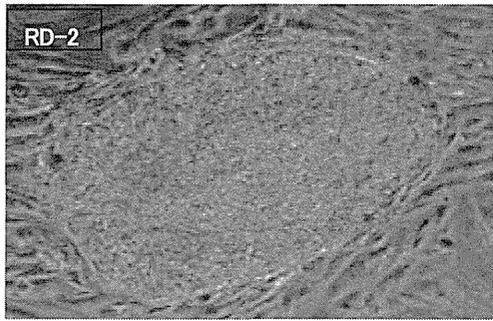
本研究は、疾患を有する患者さんから検体を頂き iPS 細胞を作成して行う研究であるため、患者さんの同意・協力を必要とする研究である。また、作成する iPS 細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必須であり、個人情報の取り扱いの配慮を必要とする研究である。この 2 点に対して、京都大学医学部医の倫理委員会に、ヒトを対象とした医学の研究および臨床応用実施申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究」およびヒト遺伝子解析申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の 2 申請を行った。その後、京都大学医学部医の倫理委員会での審査を頂き、平成 20 年 6 月 4 日付けで、実施に関して承認を頂いた。本研究においては、その内容を忠実に順守して行った。

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 遺伝子を上述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。

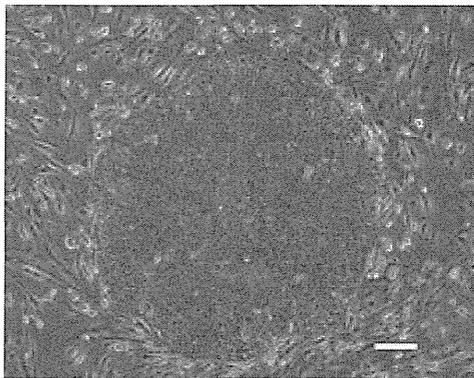




RD-1、RD-2 の両患者ともに、A、B、C の 3 クローンずつを以降の実験に使用した (RD-1_A, RD-1_B, RD-1_C および RD-2_A, RD-2_B, RD-2_C)。この中で、AとBは Cre recombinase 発現ベクター導入によって、AK2 遺伝子を除去した iPS 細胞であり、C は正常 AK2 遺伝子が強制発現されたままの iPS 細胞である。

重症先天性好中球減少症患者由来の iPS細胞樹立

1名の患者の繊維芽細胞に4因子(Oct, Klf, c-Myc, Sox4)もしくは3因子(Oct, Klf, Sox4)をレトロウイルスベクターで導入したところ、以下のようにiPS細胞を樹立することに成功した。

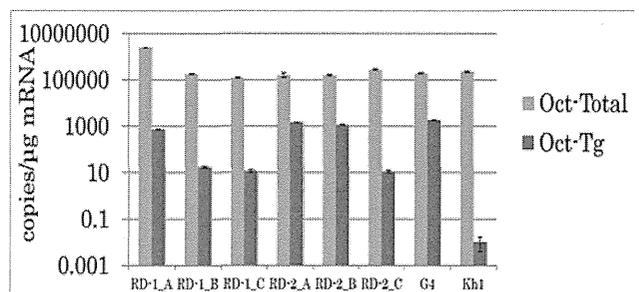


樹立に成功した患者由来のiPS細胞の品質評価

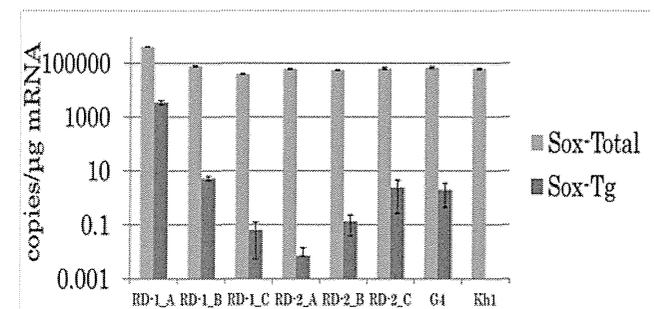
両疾患の患者由来の iPS 細胞を同様に評価したが、ここでは誌面の都合上、主には細網異形成症患者由来の iPS 細胞の結

果を示す。まず、下図のように、細網異形成症の両患者の 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。重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞でも同様であった。

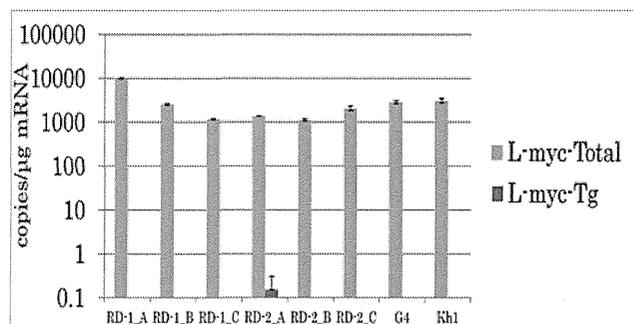
OCT3/4



SOX2

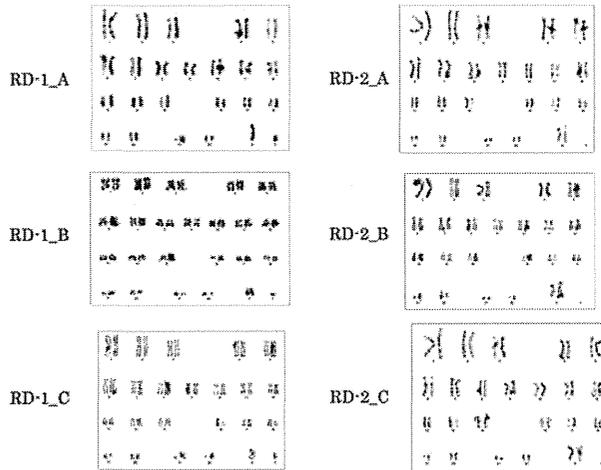


KLF



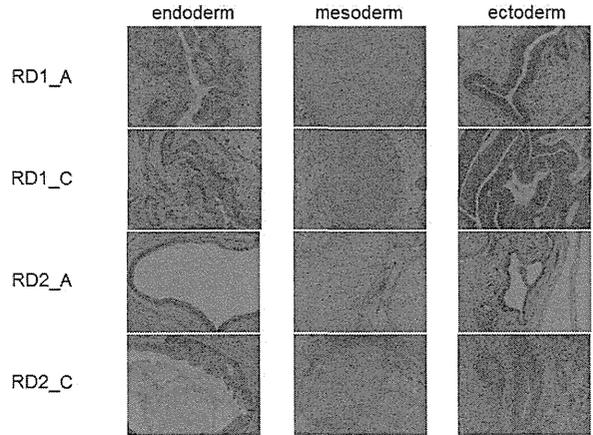
L-myc

次に、細網異形成症患者由来の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。重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞でも同様であった。



樹立した iPS 細胞の AK2 および HAX1 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、両疾患の患者由来の全てのクローンにて患者血球由来の DNA で認められたものと同様の変異を認めた。

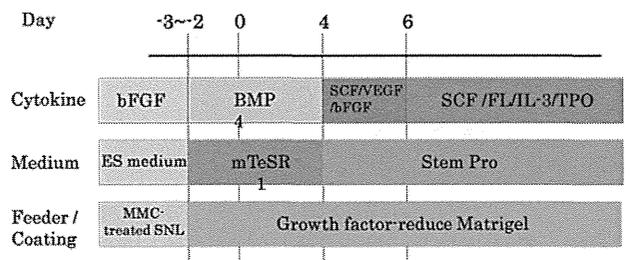
また、iPS 細胞の分化多能性を評価するために、免疫不全症マウス (NOG マウス) の皮下に iPS 細胞を移植した。その結果、全てのクローンにて 3 種類の胚葉からなる奇形腫が観察され、多能性を有することが示された。ここでは、細網異形成症患者由来 iPS 細胞の一部の結果を示す。



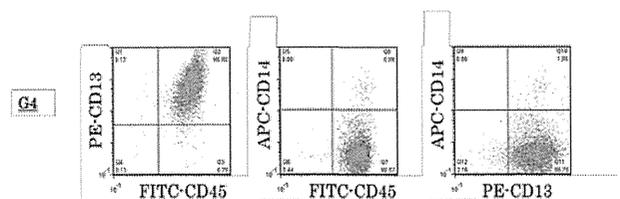
以上より、今回使用した全ての iPS 細胞のクローンの品質および多能性について、良好な結果を得ることができた。

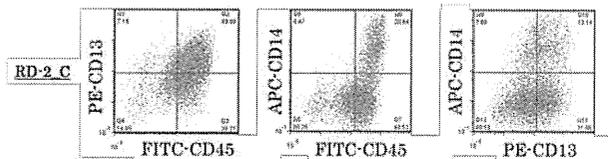
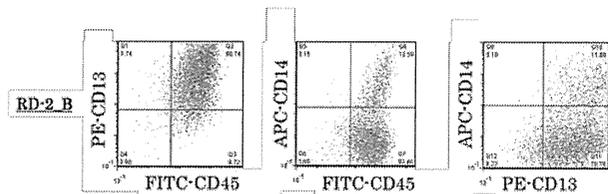
無血清培地を用いた iPS 細胞からの血球分化

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。



細網異形成症患者由来のクローンの血球分化開始 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。

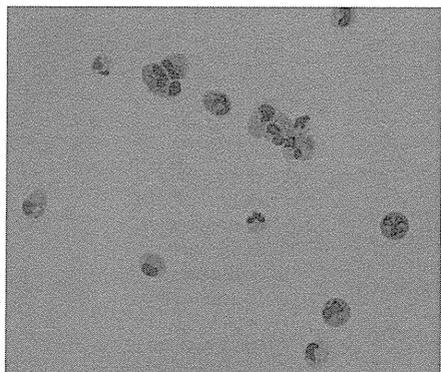




以上の結果から、正常コントロールであるG4、正常AK2を強制発現させたRD-2_Cと比較して、正常AK2タンパクを欠くRD-2_Bの血球表面マーカーに大きな差異は認められなかった。

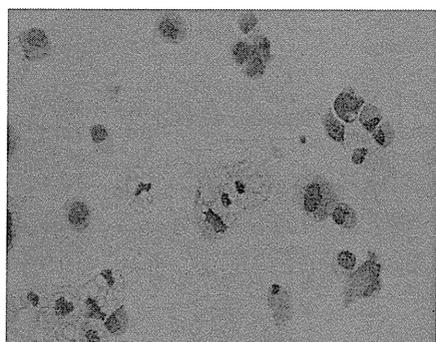
次に上記と同じクローンにおける、同時期のメイギムザ染色の結果を以下を示す。

G4



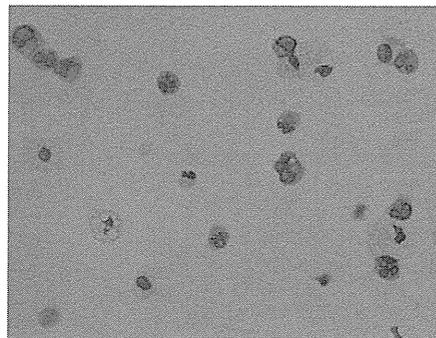
桿状核および分葉核を持つ成熟好中球が多数を占める。

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、細胞質が青い骨髓芽球のみで成熟好中球は認めない。

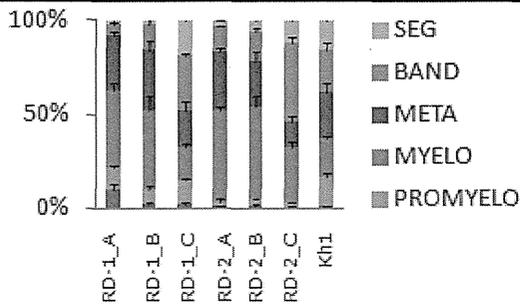
RD-2_C



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

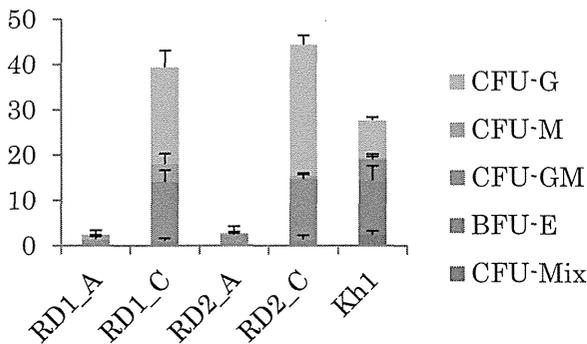
AK2の変異を有するiPS細胞由来の好中球の成熟障害を定量的に評価するため、RD-1およびRD-2の各クローンおよび正常コントロールとしてKh1-ES細胞由来の好中球(Kh1)を各成熟段階ごとにカウントした。結果としては、以下の表が示す通り、正常AK2タンパクを欠くRD-1_A、RD-1_B、RD-2_A、RD-2_Bは、Kh1や正常AK2を強制発現するRD-1_C、RD-2_Cと比較して、成熟好中球(SEG、BAND)の割合が明らかに少ないことを確認することができた。データは示していないが、重症先天性好中球減少症患者由来のiPS細胞も同様に分化実験を行ったところ、正常HAX1タンパクを欠くクローンでは著明な好中球の成熟障害を認めた。

AK2変異iPS由来の好中球における成熟障害



細網異形成症患者由来iPS細胞を用いたメチルセルロースコロニーアッセイ

細網異形成症患者由来のiPS細胞を血液前駆細胞に分化させ、コロニーアッセイを行った。正常AK2タンパクを欠くRD-1_AとRD-2_Aは、Kh1や正常AK2を強制発現するRD-1_C、RD-2_Cと比較して、血球分化能が明らかに低下していることを確認することができた。



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。一方で、重症先天性好中球減少症患者由来のiPS細胞樹立は従来法にて成功した。樹立された両疾患由来の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。

両疾患において、血球分化による病態再現することに成功した。両疾患ともに、正常コントロールや原因遺伝子の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、骨髄芽球が多くを占め、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髄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。このように全く異なる遺伝子が原因であるにも関わらず、同様の結果が示されたことは興味深い。一方で、両疾患の原因遺伝子であるAK2およびHAX1ともに、ミトコンドリアに局在して発現するとされているにも関わらず、iPS細胞樹立効率については著明な差異を認めた。このような両遺伝子の機能の違いに注目した病態解析も有用な可能性がある。

現在は、細網異形成症で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。先天性好中球減少症では、血球分化の過程でどのような現象が行っているか、例えばアポトーシスの評価などを行っている。

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および1名の先天性好中球減少症患者由来の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。細網異形成症では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、先天性好中球減少症でも病態解析について評価系の開発が進んでいる。次年度にはさらに踏み込んだ病態解析を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakai H, Okafuji I, Nishikomori R, Abe J, Izawa K, Kambe N, Yasumi T, Nakahata T, Heike T. The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation. *Int. Immunol.* 2012;24:5-15.
- 2) Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito M.K, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O. Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res.* 2012;19:143-152.
- 3) Hiejima E, Komatsu H, Takeda Y, Sogo T, Inui A, Okafuji I, Nishikomori R, Nakahata T, Fujisawa T. Acute liver failure in young children with systemic-onset juvenile idiopathic

arthritis without macrophage activation syndrome: Report of two cases. *J. Pediatr. Child Health.* 2012;48:122-5.

- 4) Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Mutara T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T. Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency. *Blood.* 2012;119:5458-66.
- 5) Tsumura M, Okada S, Sakai H, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Kong X, Abhyankar A, Heike T, Nakahata T, Nishikomori R, Al-Muhsen S, Boisson-Dupuis S, Casanova J, AlZahrani M, Shehri MA, ElGhazali G, Takihara Y, Kobayashi M. Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Human Mutation Human Mutation.* 2012;33:1377-87.
- 6) Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuse J.E, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ozawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito M.K. Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood* 2012;120:1299-308.
- 7) Kawai T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, Izawa K, Murakami T, Okamoto N, Mori Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yatie A,

Oomori K, Nakahata T, Heike T.
Multiple reversions of an IL2RG
mutation restore combined
immunodeficiency patient. J. Clin.
Immunol. 2012;32:690-7.

2. 学会発表

1. 中畑龍俊;特別講演:iPS細胞研究の今、その可能性と将来展望. 第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月20-22日(20日)福岡国際会議場 福岡市
2. 井澤和司、土方敦司、西小森隆太、小原収、田中尚子、河合朋樹、八角高裕、斎藤潤、中畑龍俊、平家俊男:次世代シーケンサーによるNLRP3 体制モザイクの診断. 第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月20-22日(21日)福岡国際会議場 福岡市
3. 石田宏之、今井耕輔、本間健一、田村真一、今村俊彦、斎藤潤、大嶋宏一、伊藤雅文、中畑龍俊、野々山恵章:白血球減少、骨髄異形成とリンパ浮腫を呈するGATA-2異常. 第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月20-22日(21日)福岡国際会議場 福岡市
4. Yanagimachi M, Niwa A, Tanaka T, Oshima K, Saito M Nakahata T: Differentiation of monocytic lineage cells from human iPS cells by using a serum and feeder free culture method. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
5. Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Tanaka T, Saida S, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Matsubara K, Adachi S, Nakahata T, Heike T: Induced pluripotent stem cell model of severe congenital neutropenia with HAX1 gene deficiency. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012,

Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.

6. Yokoyama K, Ikeya M, Nasu A, Tanaka T, Saito M, Umeda K, Nishikomori R, Nakahata T, Heike T, Toguchida J: Understanding the pathology of the arthropathy in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome by using iPS cells technology. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
7. Tanaka T, Saito MK., Takahashi K, Yamanaka S, Nakahata T: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan
8. 中畑龍俊:iPS細胞を用いた今後の医療の可能性. 第23回小児科血液セミナー-2012年7月19日 広島
9. 中畑龍俊;特別講演:小児患者におけるiPS細胞の応用. 第49回日本小児アレルギー学会 2012年9月15-16日(16日)大阪国際会議場
10. 中畑龍俊;特別講演:iPS細胞研究の進展. 第59回日本臨床検査医学会学術集会 2012年11月29日~12月2日(11/30)国立京都国際会館

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

血液免疫系細胞分化障害による疾患の診断と 治療に関する調査研究

研究分担者 小原 収 ((公財)かずさDNA 研究所副所長)

研究要旨

血液系・免疫系細胞の両者の分化に障害をきたすという特徴を持つ疾患の遺伝子同定、迅速な遺伝子診断法の確立、診断基準・治療ガイドライン作製、スクリーニングなどにより早期診断、病態解明、早期治療により疾患予後を改善することを目指して、本分担研究では遺伝子解析による新たな診断方法の開発と原因未知の血液免疫系細胞分化障害の遺伝的素因探索のための網羅的な遺伝子解析を実施した。

A. 研究の目的

血液系・免疫系細胞の両者の分化に障害をきたすという特徴を持つ、1)慢性好中球減少症、2)家族性血小板減少症(X連鎖血小板減少症、Wiskott-Aldrich 症候群、Epstein 症候群(MYH9 異常症))、3)細網異形成症、4)Emberger 症候群、5)慢性肉芽腫症、6)家族性血球貧食症候群、7)申請者らが見出した新規血液免疫系細胞分化障害である家族性樹状細胞欠損症を主たる対象とし、血液免疫系細胞分化障害による疾患の遺伝子同定、迅速な遺伝子診断法の確立、診断基準・治療ガイドライン作製、スクリーニングなどにより早期診断、病態解明、早期治療により疾患予後を改善することを目的とする。

B. 研究方法

・先天的免疫不全症臨床アーカイブ PIDJ (<http://pidj.rcai.riken.jp/index.html>) に登録されている血液系・免疫系分化障害

の症例について、それぞれの疾患の原因として知られている既知原因遺伝子内での変異の有無の検査を行う。

・血液免疫系細胞の分化異常に起因する疾患の遺伝子診断の効率化、高精度化を目指して、次世代シーケンサーによる遺伝子診断の実用化のためにマルチプレックスPCR法による遺伝子パネル分析の前処理プロセスの条件検討を行う。また、既知遺伝子に変異が見られない事の確認された症例については、網羅的なエクソンシーケンシングとRNAシーケンシングの併用により、疾患原因候補変異の検出を行う。

(倫理面への配慮)

当分担研究のために、かずさDNA研究所の倫理審査委員会において、既に承認を得ていた既知遺伝子の遺伝子検査だけでなく、全エクソンシーケンシングとRNAシーケンシングによる免疫不全症遺伝的原

因探索についても審査を受け、承認を得た。かずさ DNA 研究所では匿名化された情報のみを取り扱うが、遺伝情報へのアクセスは限られた作業者のみがアクセスできるように配慮した上で、更にセキュリティ確保されたシステムで運用した。

C. 研究結果

よく既知遺伝子が知られている血液・免疫系疾患の代表例として、重症複合免疫不全症 (Severe Combined ImmunoDeficiency, SCID) 解析のためのパネルに搭載するために遺伝子をリストアップしたところ、合計数が21遺伝子となった。これらのエクソンを含む PCR 増幅断片 (以下、アンプリコンと略) の個数は、300を超える。そのため、これまで他の遺伝子パネル (アンプリコン数、100以下) で想定してきた卓上型次世代シーケンサー (ロシュ社 GS Junior) では検体処理能力が不十分となることが判明した。そこで、現在市販されている他の2種類の卓上型次世代シーケンサーであるライフテクノロジーズ社の Ion torrent とイルミナ社の MiSeq などのより解析キャパシティの大きな解析系に移行することとした。そのため、これらの装置で用いられているショートリードでの解析に対応するために、短いアンプリコン用のプライマーデザインを再び行った。このプライマーデザイン、作成作業と並行して、マルチプレックスPCRで均等にコード領域を読み取るための PCR 条件の最適化を進行中である。

こうした既知遺伝子解析と並行して、厚生労働科学研究費補助金 (難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業 (難病関

係研究分野)) 「次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究」班と連携して、次世代シーケンサー (イルミナ社 HiSeq1000) を用いた網羅的な全エクソン解析を実施した。既に既知候補遺伝子の除外診断が終えられている家族検体を含む42検体について、全エクソン配列解析を実施した。現在、疾患に特異的な疾患原因候補変異をリストアップし、その絞り込みと実験的な探索を進行中である。更に、網羅的な全エクソン配列解析を補完する目的のために、RNAシーケンシングによって、どの程度の遺伝子の発現プロファイル情報と塩基配列情報が得られるかの確認を行った。今回は、白血球分画と単核球分画の違いを検討したが、両者ともにほぼ同数の遺伝子の発現を確認できることが分かった。厳密に言えば、単核球の方が白血球全体よりも10%程度多くの遺伝子発現を検出できる。RNAシーケンシングの結果を解析したところ、単核球分画のRNAシーケンシングによって既知の免疫不全症原因遺伝子の78% (227遺伝子中の177遺伝子) の塩基配列が検出されることを見出した。この結果は、RNAシーケンシングが遺伝子発現プロファイル情報だけでなく、多くの転写されている遺伝子の発現アレル配列情報も与えてくれる可能性を示しており、全エクソン配列解析を補完する能力を有することを示している。

D. 考察

既知遺伝子からの従来法での遺伝子検査は安定稼働の段階に入ったが、それによって確定診断できる割合はおおよそ30%程

度でしかなく、改善が必要である。今後の確定診断率の向上のためには、疾患毎の遺伝子パネル化による遺伝子検査の効率化が不可欠であり、特に次世代シーケンサーを活用して、網羅性を高く維持しつつ、低コストでの診断を可能とするパイプライン構築が必須である。そのためには、実際の塩基配列解析の前後を占める、本研究で行ったような均等化マルチプレックス PCR 法などのシーケンシング用鋳型の準備方法の改良と得られた塩基配列データ処理系の確立が強く求められる。こうして、既知遺伝子の変異による発症が除外された症例については、より網羅性の高い全エクソン配列解によるアプローチが有力である。しかし、本邦のように稀な遺伝性疾患のために家系例などが少ない場合、最終的な疾患原因変異の同定のためには遺伝子変異のもたらす機能情報が不可欠であり、ゲノム構造だけでなく、転写産物やタンパク質レベルでの網羅的解析の重要性も今後ますます増加すると考えられる。

E. 結論

1) 血液細胞に由来し、多くの候補遺伝子を含む SCID について、既知遺伝子を網羅的に解析するための均等化マルチプレックス PCR 法のためのプライマーデザインを行ったところ、現在の市販装置ではショートリードに依存したタイプの次世代シーケンサーの解析能力が必須であることが判明した。このアプローチの実用化のためには、そのための均等化マルチプレックス PCR 法の条件の最適化による処理の効率化が避けられない課題である。

2) 次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い、疾患原因変異の候補を得た。これらの疾患との関連性を見るために、白血球もしくは単核球分画からの RNA シーケンシングが有用な情報を提供してくれることを見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shirasaki Y, Yamagishi M, Shimura N, Hijikata A, Ohara O. Toward an understanding of immune cell sociology: real-time monitoring of cytokine secretion at the single-cell level. *IUBMB Life*. 2013;65:28-34.
- 2) Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsui N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 (in press)
- 3) Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsui N, Ohara O, Komada Y. A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 2013 (in press)
- 4) Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, Nunoi H, Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara O. A Dual Reporter

- Splicing Assay Using HaloTag-containing Proteins. *Curr Chem Genomics*. 2012 6:27-37.
- 5) Nakaoka H, Kanegane H, Taneichi H, Miya K, Yang X, Nomura K, Takezaki S, Yamada M, Ohara O, Kamae C, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Hershfield MS, Ariga T, Miyawaki T. Delayed onset adenosine deaminase deficiency associated with acute disseminated encephalomyelitis. *Int J Hematol*. 2012;95:692-6.
 - 6) Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito MK, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O. Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res*. 2012;19:143-52.
 - 7) Mizuno T, Sakai H, Nishikomori R, Oshima K, Ohara O, Hata I, Shigematsu Y, Ishige T, Tamura K, Arakawa H. Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Rheumatol Int*. 2012;32:3761-4.
- ## 2. 学会発表
- 1) 第3回関東甲越免疫不全症研究会「次世代シーケンサーにより、原因遺伝子の同定に至った CVID の1例」釜江智佳子、満生紀子、小原明、野口恵美子、久保田健夫、本間健一、小原收、今井耕輔、野々山恵章 東京、2012年9月22日
 - 2) 第3回関東甲越免疫不全症研究会「PIDJネットワークを介したPID患者の遺伝子解析(2007~2012年)」満生紀子、大嶋 宏一、今井 耕輔、小原收、森尾 友宏、水谷 修紀 東京、2012年9月22日
 - 3) 3. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “Genetic Analysis for 207 Cases with Primary Immunodeficiency (PID) Consulted to A Single Center through PID Network in Japan (PIDJ) in 5 Years (2007-2011)”. N. Mitsuiki, K. Oshima, K. Imai, O. Ohara, T. Morio, S. Mizutani, Florence, Italy, October 3-6 2012
 - 4) 4. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “Clinical features and immunological abnormalities of GATA2 deficiency in Japan.” K. Honma, K. Imai, C. Kamae, H. Ishida, Y. Ito, S. Kojima, T. Yokosuka, H. Kanegane, T. Morio, Y. Sasahara, T. Fujiwara, H. Harigae, Y. Hashii, O. Ohara, S. Nonoyama Florence, Italy, October 3-6 2012
 - 5) 5. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “GENETIC ANALYSIS OF AICARDI-GOUTIÈRES SYNDROME IN JAPAN” R. Nishikomori, J. Abe, K. Izawa, T. Kawai, T. Yasumi, N. Mitsuiki, O. Ohara, I. Toyoshima, K. Hasegawa, H. Ichinose, T. Heike. Florence, Italy, October 3-6 2012

- 6) 6. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “Chronic Mucocutaneous Candidiasis Caused by a Gain-of-Function Mutation in the STAT1 DNA-Binding Domain” Y. Yamazaki, M. Yamada, S. Takezaki, M. Kato, M.-J. Park, K. Maruyama, N. Chida, O. Ohara, I. Kobayashi, T. Ariga. Florence, Italy, October 3-6 2012
- 7) 7. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. “*NLRP3* somatic mosaicism can cause Muckle-Wells syndrome” K. Izawa, R. Nishikomori, H. Oda, K. Nakagawa, E. Hiejima, K. Yoshioka, J. Abe, T. Kawai, T. Yasumi, T. Heike, A. Hijikata, O. Ohara, M. Saito, T. Nakahata, T. Kawai, S. Takei. Florence, Italy, October 3-6 2012

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

小児造血不全症候群における GATA2 変異の検討

研究分担者 小島勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授)
研究協力者 村松秀城 (名古屋大学医学部附属病院小児科 助教)

研究要旨

2011年に家族性 MDS、MonoMAC 症候群の原因として初めて GATA2 遺伝子異常が報告された。その後、多くの GATA2 変異症例が報告されているが、特にヨーロッパのグループから、モノソミー7 及びトリソミー8 を有する症例を中心に、再生不良性貧血と鑑別が難しい RCC(Refractory cytopenia of childhood)症例で GATA2 異常症が高頻度に見出されることが報告されている。小児の造血不全症候群の中に、汎血球減少以外の臨床学的特徴に乏しい GATA2 異常症が含まれている可能性がある。日本人の小児再生不良性貧血患者 96 例において、GATA2 遺伝子変異について解析を行ったが変異は認められなかった。

A. 研究の目的

2011年に家族性 MDS、MonoMAC 症候群の原因として初めて GATA2 遺伝子異常が報告された。その後、多くの GATA2 変異症例が報告されているが、特にヨーロッパのグループから、モノソミー7 及びトリソミー8 を有する症例を中心に、再生不良性貧血と鑑別が難しい RCC (Refractory cytopenia of childhood) 症例で GATA2 異常症が高頻度に見出されることが報告されている。小児の造血不全症候群の中に、汎血球減少以外の臨床学的特徴に乏しい GATA2 異常症が含まれている可能性がある。

B. 研究方法

家族性 MDS の 3 家系 4 例の患者検体および、特発性再生不良性貧血と診断された 96 例において、イントロン 5 および全てのエ

クソンの GATA2 遺伝子変異解析を施行した。

(倫理面への配慮)

名古屋大学医学部倫理審査委員会の承認のもと、研究を実施した(稀少小児遺伝性血液疾患における原因遺伝子の探索研究 承認年月日 平成 24 年 9 月 6 日)。

C. 研究結果

1) 家族性 MDS 症例の GATA2 変異

3 家系 4 例の末梢血から genomic DNA を抽出し、GATA2 変異を同定した(図1)。