

最小限の負担になるように配慮を行うと共に、研究内容、患者への利益・不利益、個人情報管理などを含め、担当施設、担当医を通じて十分な説明を行い、同意を得たものに関して検討した。患者氏名は情報管理者のもと、連結可能匿名化されて管理された。

### C. 研究結果

2013年には、本学に160例の原発性免疫不全症疑い患者が紹介された(図1)。原則的には全例に対して、10カラーFACSを用いた表面抗原分析解析を行い、TREC、KREC定量を行い、候補疾患の鑑別、病態の解明に役立てることとした。

今年 Angulo et al.(Science)、Lucas et al.(Nat Immunol)により高IgM症候群の新しい原因遺伝子として、*PIK3CD* 遺伝子(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta)の機能獲得変異が報告された。この疾患は、反復気道感染症、低 $\gamma$ グロブリン血症、高IgM血症、特異抗体産生不全を伴い、肝脾腫、リンパ節腫脹を呈する疾患である。共同研究先のネッケル小児病院(フランス、パリ)で解析を行った139例中、8例に同様の変異を認め、1例は本邦の症例であった。そこで、当科および防衛医科大学小児科との共同研究で行ったExome解析をした62例を検討したところ、4例の*PIK3CD* 遺伝子変異患者を同定した。また、当科86例、防衛医大69例の抗体産生不全症患者から、5例の*PIK3CD* 遺伝子変異患者を同定した。患者はいずれもリンパ組織腫脹を伴っていたが(表2)、発症年齢、随伴症状、さらに、IgG、IgAが正常あるいは高値の患者もあり(図2)、本疾患の多様性、および診断の困難さを示していた。今後は、自己免疫性リンパ増殖性疾患(ALPS)あるいはX連鎖性

リンパ増殖性疾患(XLP)を疑われた例の中に、*PIK3CD* 遺伝子異常患者が含まれていないかどうかについて、検討が必要である。そこで、FACSを用いた迅速診断法の確立を目指し、PI3KDの活性化に伴いリン酸化が亢進するとされるAKTについて、解析方法を確立した(図3)。これにより、スクリーニング検査として、有用であることが示唆された。*PIK3CD* 遺伝子異常を伴う患者の中には、悪性リンパ腫を発症する例、気管支拡張症を呈する例、日和見感染症を来す例があり、移植症例も5例に上ることが明らかになり、早期の治療介入で予後の改善が見込めると考えられた。

IgA欠損症は、原因不明の疾患であり、北欧では多くの患者が無症状であることが報告されているが、国内の症例の中には様々な合併症も併発している重症例も存在している。現在PIDJには29例の登録があり、当科および防衛医大でそのうち20例の患者について、解析を行っている。その中で、BTKのミスセンス変異を示す患者を一例発見し、その細胞免疫学的異常、およびB細胞受容体の配列解析を行い、現在投稿中である(Mitsuiki, et al)。もう一例は、TREC、sjkRECの低下を伴い、B細胞欠損とCD4+T細胞がCD45RO+のメモリー細胞に偏倚した症例であり、候補遺伝子検索の結果、RAG1遺伝子異常であることが判明した(Kato et al, in submission)。

乳児期早期に自己免疫疾患を呈し、成人期にかかってB細胞欠損を呈し、低 $\gamma$ グロブリン血症を来した1患者の家系で、Exome解析の結果、LRBA遺伝子の複合ヘテロ変異を見出した。これは、本邦第1例であり、複合ヘテロ変異患者は世界で初めてである。この患者の病態解析を現在行っている。

STAT1 の機能獲得型変異により、Th17 細胞の分化異常などの免疫異常により、慢性皮膚粘膜カンジダ症を来すことが最近報告された。当科に紹介された 15 例を解析したところ、重症度にばらつきがあり、軽微な表在性真菌感染症のみの症例から、獲得免疫系の異常も伴い日和見感染を来したり、造血障害や自己免疫疾患を呈する重症例もいることが明らかになった。そこで、臨床症状と T 細胞新生能、B 細胞新生能をもとに 4 段階の重症度分類を作成した。一部の重症例では骨髄移植などの造血幹細胞移植が必要であることも明らかになった(表 3)。

高 IgE 症候群 1 型は、STAT3 のドミナントネガティブ変異による、Th17 細胞の分化異常とアトピー性皮膚炎、および骨格異常を主な病態とする疾患である。当科には、これまで 26 例の高 IgE 症候群疑い患者が紹介され、そのうち STAT3 変異を認めたのは 10 例である(38.5%)。高 IgE 症候群の臨床的重症度を測る上で広く用いられている NIH スコアで見ると、STAT3 変異患者と変異を認めなかった患者とは、差がない。ただ、細分化すると、カンジダ感染症、肺炎の反復、乳歯脱落遅延、骨折が、重症アトピー性皮膚炎患者との鑑別点となりうることを明らかにした。CXCR3+CCR6-CD161+を用いた Th17 分画、および IgD/CD27 を用いたメモリー B 細胞分画をみることで、STAT3 異常症を見出すことが容易になることが明らかになった。

#### D. 考察

原発性免疫不全症の原因遺伝子の一つとして新たに報告された PI3K  $\delta$  鎖の機能獲得型変異が本邦でも 10 例で認められた。その中では、既報告にない新規変異も発見されたが、今後その機能解析が必要

である。また、PI3K  $\delta$  鎖の機能亢進が T 細胞の活性化誘導細胞死を過剰にし、そのため進行性のリンパ球減少を来す点は既報告で明らかにされているが、B 細胞における影響はあまり明らかではない。今後は、同定された患者検体を用いた解析を行っていきたい。治療についても半数の 5 例で造血幹細胞移植を行われていた。その中で早期の拒絶、2 次生着不全を末梢血幹細胞投与でしのいだ例、T 細胞の生着が遅れた例、移植 2 年後に突然死した例がみられた。移植適応の検討と同時に、移植方法についても今後検討が必要である。

IgA 欠損症、分類不能免疫不全症の原因遺伝子はほとんど明らかになっていないが、Exome 解析の進歩により少しずつ分かってきている。今回は既知の遺伝子異常の特殊な表現型が明らかになったが、今後は新規の原因遺伝子の同定、病態解析が必要となる。

STAT1 機能獲得型変異患者は臨床的には様々な重症度を示し、その治療の選択には難渋するが、TREC、KREC の結果を交えた重症度スコア化により、獲得免疫系症状が明らかである場合、造血幹細胞移植を積極的に検討することを提案したい。しかし、当科で施行した 2 例中、1 例については、致死的なマクロファージ活性化症候群により、拒絶を受け、多臓器不全により不幸な転帰をたどった。今後、本疾患に対する造血幹細胞移植法の改善を行っていきたい。

湿疹、皮膚膿瘍を来す高 IgE 症候群患者の中での、STAT3 異常患者の特徴について検討したが、真菌感染や肺炎、骨格系の異常が、特異度の高い症状として明らかになり、一部の免疫細胞の増減も特徴として考えられた。今後は NIH スコアを改変した形での診断基準の策定や治療法の最適化についての検討が必要である。

## E. 結論

今年度の検討で、多くの血液免疫分化異常症の病態、臨床像が明らかになった。これらの結果を受け、よりよい治療法の改善につなげ、患者の QOL の向上につなげていきたい。また、原因不明の患者はまだ多数存在する。次世代シーケンサーを組み合わせた解析を引き続き行い、その原因遺伝子の同定、病態の解明を行っていきたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 今井耕輔. 免疫グロブリンクラススイッチ異常症(高 IgM 症候群). 日本臨床 別冊 (2013)237-241
- 2) 高木 正稔, 今井 耕輔, 森尾 友宏, 水谷 修紀. 原発性免疫不全症候群関連の免疫性血小板減少症. Rinsho Ketsueki. (2013) 54.357-64
- 3) Machida S, Tomizawa D, Tamaichi H, Okawa T, Endo A, Imai K, Nagasawa M, Morio T, Mizutani S, Takagi M. Successful Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Patient With Ataxia Telangiectasia Using Rituximab. J Pediatr Hematol Oncol. (2013).35.482-5

### 2. 学会発表

- 1) 今井耕輔. 新規高 IgM 症候群と病因探索について. 第 116 回日本小児科学会学術集会. 分野別シンポジウム 13-3. 2013 年 4 月 21 日, 広島
- 2) 加藤 環, 釜江智佳子, 本間健一, 池川健, 横須賀とも子, 和田泰三, 谷内江昭宏, 西田直徳, 金兼弘和, 満生紀子, 小原 収, 今井耕輔, 森尾友宏, 野々山恵章. IgA 単独欠損症として紹介され、TREC/KREC の結果から RAG1 異常と

同定しえた 1 例. 第 4 回関東甲越免疫不全症研究会. 2013 年 9 月 22 日, 東京

- 3) 満生紀子, 今井耕輔, Xi YANG, 金兼弘和, 小阪嘉之, 高田英俊, 水谷修紀, 小原 収, 森尾友宏, BTK 変異をみとめた IgA 単独欠損の解析. 第 41 回本臨床免疫学会総会. 2013 年 11 月 27 日, 下関
- 4) 加藤 環, 釜江智佳子, 満生紀子, 小原明, 林 正俊, 野口恵美子, 久保田健夫, 本間健一, 小原 収, 今井耕輔, 野々山恵章. 本邦における ICF(Immunodeficiency with Centromeric instability and Facial anomalies)症候群 5 例の検討. 第 41 回本臨床免疫学会総会. 2013 年 11 月 27 日, 下関
- 5) 高島健浩, 満生紀子, 今井耕輔, 水谷修紀, 峯岸克行, 森尾友宏. 高 IgE 症候群患者の臨床的・免疫学的検討. 第 7 回日本免疫不全症研究会. 2014 年 1 月 25 日, 福岡
- 6) 高島健浩, 満生紀子, 今井耕輔, 水谷修紀, 森尾友宏. STAT1 変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症 12 例の検討. 第 4 回関東甲越免疫不全症研究会. 2013 年 9 月 22 日, 東京

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

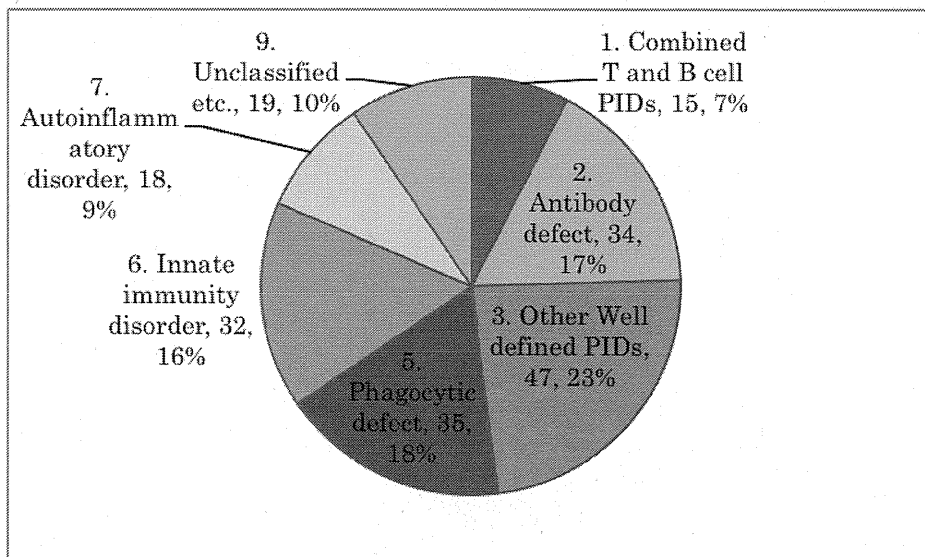


図 1:2013 年の紹介患者 160 例の内訳

patients	P1	P2
<b>Year of birth</b>	1986	1990
<b>Age of onset</b>	2 yrs	5 months
<b>Main clinical features</b>	Recurrent LRT infections, liver damage, HMG, SMG, lymphadenopathy	Recurrent LRT infections bronchiectasis, chronic diarrhea, failure to thrive HMG, SMG
<b>Cytopenia</b>		Neutropenia
<b>Main biological features</b>	Lymphopenia	Lymphopenia
age	2 yrs	5 yrs
IgM g/l (N)	4.25 (0.58-1.53)	4.5 (0.54-1.55)
IgG g/l (N)	5.7 (3.35-8.96)	<1.9 (5.49-11.54)
IgA g/l (N)	0.65 (0.27-1.22)	0.82 (0.41-1.57)
subclasses g/l		
IgG1 (N)	3.71 (>3)	
IgG2 (N)	1.5 (>0.30)	
IgG3 (N)	0.64 (>0.12)	
IgG4 (N)	0.3 (>0.04)	
<b>Malignancies</b>	High grade DLBCL of biliary tract (EBV-, Bcl-6+; age 8yrs); High grade DLBCL of the colon (EBV-, Bcl-6-; stage IVB; age 19yrs)	Hodgkin lymphoma stage III
<b>treatment</b>	IVIg from 3yrs on Chemotherapy, rituximab	IVIg from 7 yrs on Chemotherapy, radiotherapy [11 yrs]
<b>outcome</b>	Died from large bowel perforation and bleeding post chemotherapy	In remission, alive

表1-1: *PIK3CD* 遺伝子異常に悪性リンパ腫を合併した 2 例 (Kracker et al, J Allergy and Clin Immunol. in press)

patients	P3	P4	P5	P6	P7 (sister of P2)	P8
<b>Year of birth</b>	2006	1991	1992	1998	1984	1999
<b>Age of onset</b>	2 yrs	8 yrs	5yrs	4 yrs	8 yrs	2 yrs
<b>Main clinical features</b>	Recurrent LRT infections, chronic diarrhea, SMG	Recurrent LRT infections, chronic diarrhea HMG, polyadenopathy macro crania	Recurrent LRT infections, chronic diarrhea, SMG, HMG, polyadenopathy	Recurrent LRT infections, Bronchiectasis	Recurrent LRT infections,	Recurrent LRT infections, Bacterial pneumonia, chronic diarrhea SMG, HMG, polyadenopathy
<b>Cytopenia</b>	Thrombocytopenia		Neutropenia, AIIA, Thrombocytopenia		Neutropenia	Neutropenia
<b>Immunological features</b>	lymphopenia		lymphopenia	lymphopenia	lymphopenia	lymphopenia
age	2yrs 9m	4 yrs	5 yrs	4 yrs	8 yrs	2 yrs 8m
IgM g/l (N)	3.9 (0.58-1.53)	7.23 (0.54-1.55)	1.18 (0.54-1.55)	2.65 (0.5-2.0)	2.28 (0.54-1.55)	1.57 (0.58-1.53)
IgG g/l (N)	0.12 (3.35-8.96)	4.77 (5.49-11.54)	3.98 (5.49-11.54)	9.7 (5.49-11.54)	8.98 (5.49-11.54)	1.30 (3.35-8.96)
IgA g/l (N)	<0.06 (0.27-1.22)	0.7 (0.41-1.57)	N.D. (0.41-1.57)	0.51 (0.4-2.0)	0.30 (0.41-1.57)	<0.1 (0.27-1.22)
subclasses g/l						
IgG1 (N)	0.08 (>3)	3.56 (>4)		8.88 (>4)		
IgG2 (N)	0.06 (>0.30)	1.61 (>0.40)		0.1 (>0.40)		
IgG3 (N)	0.02 (>0.12)	0.89 (>0.16)		0.11 (>0.16)		
IgG4 (N)	0.001 (0-2.10)	<0.075 (0-2.10)		<0.01 (>0.04)		
<b>treatment</b>	IVIgG from 3 yrs	HSCT at 8 yrs, IVIgG from 8 yrs	IVIgG from 6 years, Splenectomy, HSCT at 13 yrs	SCIgG from 4 yrs	IVIgG from 19 yrs	IVIgG from 3 yrs
<b>outcome</b>	alive	alive	dead (septic shock, multi organ failure, 14 yrs)	alive	alive	alive

表1-2: *PIK3CD* 遺伝子異常を呈した6例 (P5 が本邦の症例) (Kracker et al, J Allergy and Clin Immunol. in press)

case	Age at Diagnosis	Age at transplant	cytopenia	polyadenopathy	SMG,HMG	Infections	Others
1992ST003	5	13	pancytopenia	+	+	Recurrent LRT	splenectomy
1994MT001	2	17	lymphopenia, thrombocytopenia	+	+	Recurrent LRT	middle ear cholesteatoma,
1996IT003	6	16	lymphopenia, thrombocytopenia	+	+	Recurrent LRT	bronchiectasis, Nephrotic
1998FK002	3	11	lymphopenia	-	+	Recurrent LRT	hemorrhage
2004KH001	0.75	8	-	+	-	Recurrent LRT	macro crania, mild mental retardation
1989KG001	3	-	-	+	+	Recurrent LRT	EBV-BLPD
2000FU001	8	-	lymphopenia	+	-	Recurrent LRT	malakoplakia of the colon, Listeria
2001SY001	0.75	-	-	+	+	Recurrent LRT	hemorrhage
2003YT001	2	-	-	+	+	Recurrent LRT	MALT lymphoma s/o, E525A, mother
2005FK001	3	-	lymphopenia, thrombocytopenia	+	-	Recurrent LRT	-

表2: *PIK3CD* 遺伝子異常を呈した本邦の 10 例

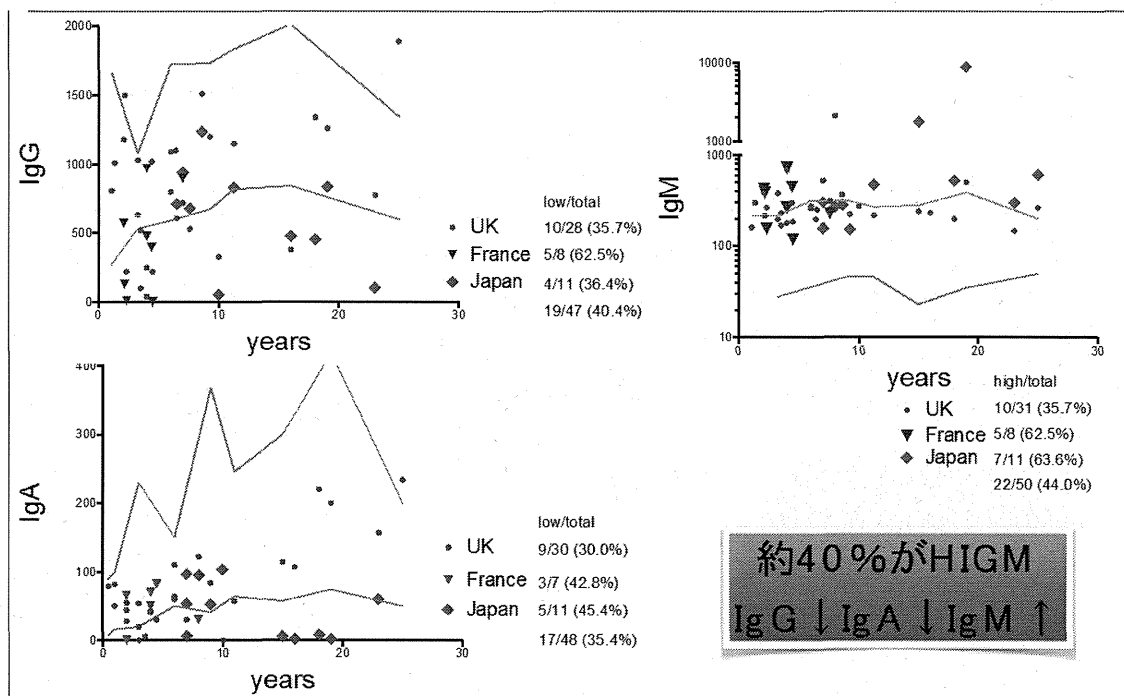


図2: *PIK3CD* 遺伝子異常患者における免疫グロブリン値

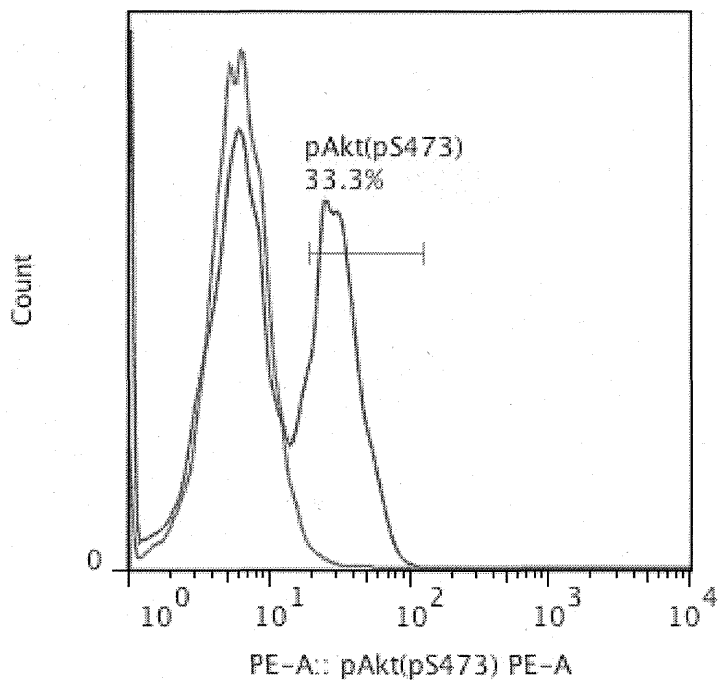


図3: PMA 刺激後の AKT のリン酸化の FACS 解析(S473)

## STAT1-GOF scoring system

Score	CMC	Viral Infection	Autoimmune disease, Lymphopenia, or Hypogammaglobulinemia	Other complication
1	+	-	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	+	-
4	+	+	+	+

Score	Molecular Defect	Coiled-coil domain	DNA-binding domain	Mean age
1	Innate immunity	4	-	15 (0~40)
2		1	2	22 (2~33)
3	Innate + acquired immunity	2	3	18( 0~43)
4	Innate + acquired immunity + visceral organ	3	-	15 (7~28)

STAT1-GOF Score	TREC/KREC Group			
	A群 TREC+/KREC+	B群 TREC+/KREC-	C群 TREC-/KREC+	D群 TREC-/KREC-
1	2			
2	2	1		
3	2		1	2
4		1	1	1

表3:STAT1 機能獲得型変異の臨床スコアと TREC,KREC との関係

# PIK3CD-GOFにおけるTREC/KREC

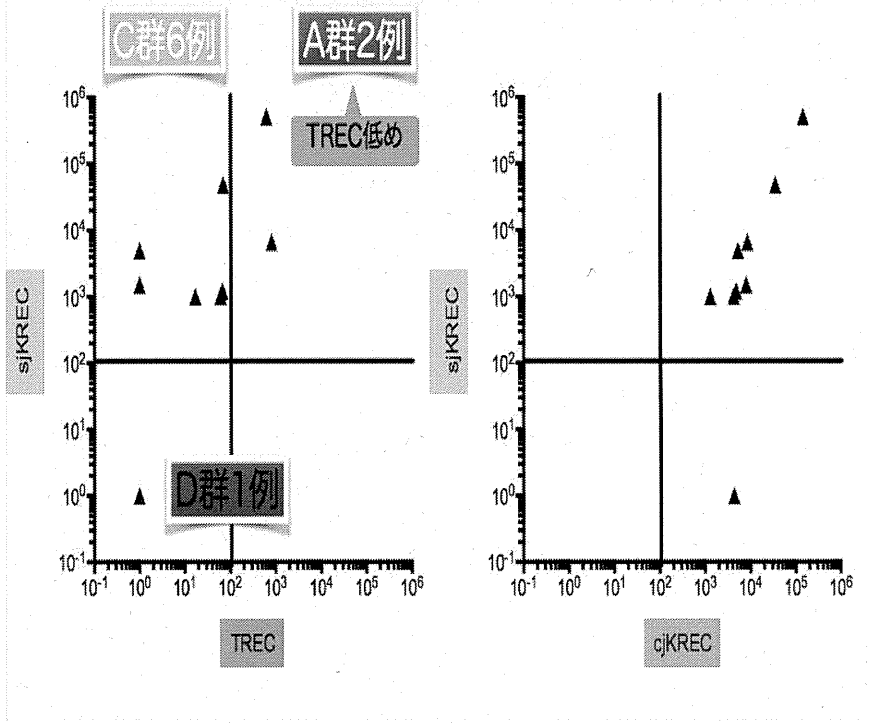


図 3: PIK3CD 遺伝子異常患者における TREC, sjKREC 値



## 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 特定拠点教授)  
研究協力者 丹羽 明 (京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門)  
齋藤 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はともに重症の好中球成熟障害を伴う免疫不全症であり、患者は易感染性を示す。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、患者から血液細胞を採取し、病態解析を行うこと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。我々は本研究において、AK2 変異を伴う 2 名の細網異形成症患者および HAX1 変異をともなう 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。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。細網異形成症については、T 細胞分化欠損も確認された。引き続き、両疾患の病態を解明するための研究を進めていく予定である。

### A. 研究の目的

細網異形成症および重症先天性好中球減少症はともに重症の好中球成熟障害を伴う免疫不全症であり、患者は易感染性を示す。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、患者から血液細胞を採取し、病態解析を行うこと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。本研究では、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・解明を行うことを目的とする。

### B. 研究方法

平成 24 年度までに樹立した細網異形成症患者及び重症先天性好中球減少症患者由来の線維芽細胞から iPS 細胞を作製し、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 遺伝子または重症先天性好中球減少症の原因遺伝子である HAX1 をそれぞれの患者由来 iPS 細胞へを導入し、本疾患の血球分化障害が回復するかどうか検討する。

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 (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、線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。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 細胞を作製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、作製する 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 細胞の作製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。

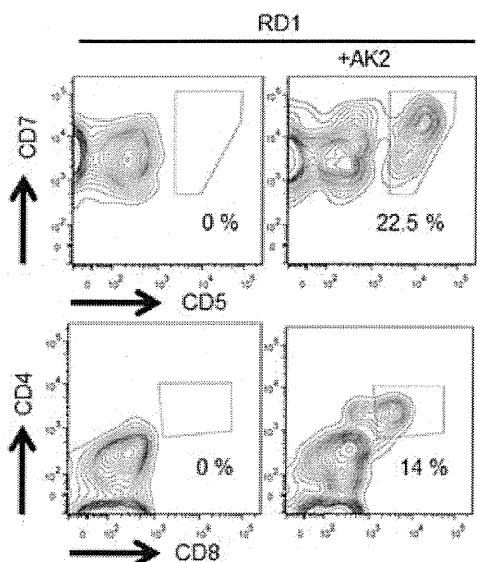
### C. 研究結果

#### 細網異形成症患者由来 iPS 細胞の機能解析

昨年度までに樹立した細網異形成症患者由来の iPSC とその AK2 補充クローンについて、徳島大学の野間隆文先生のご協力を頂き、AK2 活性を測定した。

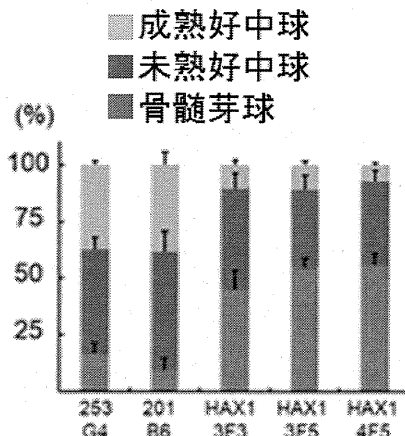
AK2 活性は、患者 iPS 細胞クローンで著明に低下しており、AK2 の補充により回復した。これにより、AK2 の酵素活性が患者由来細胞では確かに低下していることが確認できた。

前年度までに検討した各種血球分化能の評価に加えて、T 細胞分化能の評価を行った。結果は下図の通りであり、患者 iPS 細胞由来クローンの T 細胞分化は発生の早い段階で阻害されており、CD34+CD7+CD5+の ProT1 細胞は出現するものの、CD34+CD7+CD5+ ProT2 細胞への移行が阻害されていることが明らかになった。この分化障害は、AK2 の補充により、改善した。



#### 重症先天性好中球減少症患者由来 iPS 細胞の機能解析

京都大学小児科平家俊男先生との共同研究により、昨年度までに樹立した SCN 患者 iPS 細胞を血球へ分化させたところ、成熟好中球への分化が阻害されていた(右上図)。



SCN 患者由来 iPS 細胞から分化させた好中球は、ラクトフェリン、セラチナーゼ、好中球エラスターゼの発現が有意に低下していた。また、未熟血球細胞のコロニー形成能が有意に低かった。

これらの血球分化異常は、HAX1 遺伝子を強制発現することにより回復した。

#### 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、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を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。

細網異形成症由来 T リンパ球の分化実験では、ヒトiPS細胞を用いることにより、T細胞免疫不全症の分化障害のステージの特定が可能であることが示された。従って、原発性免疫不全症の解析に置いて、iPS細胞の有用性は高いものと考えられる。

## 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細胞からの血球分化系において、病態の再現に成功した。今後、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) Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T. Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis.

Haematologica. 2013 Aug.23. doi:10.3324/haematol.2013.083873 in press

2) Saida S, Watanabe KI, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T.: Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood.*; 121(21):4377-87, 2013. May 23; doi:10.1182/blood-2012-12-474387.

3) Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK: Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. *PLoS ONE.* 4/3/ 2013; 8(4): e59243. doi:10.1371/journal.pone.0059243

4) Tomizawa D., Tawa A., Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe K., Nakahata T., Adachi S.: Appropriate dose modification in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia; a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). *Int. Hematol.* 2013 Nov;98(5):578-88. doi: 10.1007/s12185-013-1429-2.

5) Honda Y., Tsuchida M., Zaïke Y., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukemia who

developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology (JSPHO). Brit. J. Haematol. In press.

- 6) 齋藤潤、中畑龍俊:疾患特異的iPS細胞. 再生医療 12(1):19-29,2013.

## 2. 学会発表

- 1) 中畑龍俊:特別講演、iPS細胞研究が切り開く未来の医療. 日本学術会議公開学術講演会「未来社会を築く生命科学と医療のフロンティア」2013年8月3日 京都大学薬学部記念講堂
- 2) 中畑龍俊:特別講演、iPS細胞の小児医療への応用. 第38回東日本小児科学会 2013年11月23日 大宮ソニックスシティ(さいたま市)
- 3) 中畑龍俊:教育講演、iPS細胞の臨床応用. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会. 2013年11月29日-12月1日(30日) ヒルトン福岡シーホーク
- 4) 中畑龍俊:基調講演、iPS細胞を用いた今後の医療の可能性. 日本製薬医学会第4回年次大会 2013年7月19日 エーザイ株式会社本社5階ホール(塩野義製薬)
- 5) 中畑龍俊:基調講演、iPS細胞を活用した医療の可能性と倫理. 第10回STSフォーラム「科学技術が拓く人間の未来」公開シンポジウム 2013年10月5日 京都商工会議所ビル講堂
- 6) 横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男:罹患者由来iPS細胞を用いたCINCA症候群における関節病態の分子機構の解明. 第34回日本炎症・再生医学学会 2013年7月2-3日(ポスター) 国立京都国際会館
- 7) Hasegawa D., Hama A., Nozawa K., Salaguchi H., Yabe M., Ito E., Ito M., Kojima S., Nakahata T., Manabe A.: Hematological and morphological characteristics of inherited bone

marrow failure syndromes(IBMFS). The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2013年10月11-13日(12日) さっぽろ芸文館

- 8) Suzuki N., Hira A., Niwa A., Matsuo K., Takata M., Yabe M., Nakahata T., Saito M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 11th Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). 7/12-7/15, Boston, MA, USA.
- 9) Honda Y., Tsuchida M., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 17 children with JMML who developed blast crisis. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology(第75回日本血液学会学術集会) 2013年10月11-13日(12日)札幌市教育分工会館
- 10) 中畑龍俊:iPS細胞による疾患モデル樹立と創薬への展望. 日経バイオテクプロフェッショナルセミナー「次の10年間 iPS細胞実用化をリードするiPS細胞創薬の現状と課題」2013年6月19日 コクヨホール(東京) 日経BP

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

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 收 ((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成、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、本分担研究では次世代シーケンサーによるパネル遺伝子解析の実運用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成、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最終的な目的とする。

### 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。特に、後者については、厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業「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(研究代表者、松原洋一)と連携して研究を進めた。

(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、分類不能型免疫不全症 (Common Variable Immunodeficiency, CVID) と重症複合免疫不全症 (Severe Combined Immunodeficiency, SCID) 解析のために、それぞれに対してパネルに搭載する遺伝子を以下のように決定した。

CVID		
遺伝子名	アンプリコン数	塩基配列長
ICOS	5	2186
TACI	6	2683
BAFFR	3	1338
CD19	11	4336
MS4A1	6	2233
CD21 (CR2)	31	9392
CD81	8	3227
PLCG2	32	11038
LRBA	61	24320
total	163	60753 base

SCID		
遺伝子名	アンプリコン数	塩基配列長
ADA	11	3553
CD8A	6	2492
NHEJ1	7	2491
CORO1A	10	3457
CRACM1	5	1913
DCLRE1C	16	6224
FOXP1	10	3766
IL2RG	8	2848
IL7R	9	3308
JAK3	23	7722
LCK	12	3682
LIG4	10	4428
PNP	6	2256
PRKDC	84	30683
PTPRC	30	10374
RAG1	11	5062
RAG2	6	2659
STAT5A	18	6062
ZAP70	12	4388
RMRP	1	435
CD3G	6	1820
CD3D	5	1655
CD3E	7	2497
AK2	7	2362
CD247	8	2532
total	328	118669 base

総アンプリコン数が200以下の CVID パネルについては、ロシュ社卓上次世代シーケンサーGS Junior でのアンプリコンシーケンスのパイプラインを立ち上げ、実際の検

体の解析を進めた。SCID パネルについては、アンプリコン数が300を超えるため、同じロシュ社の卓上シーケンサーでは効率的な分析が困難なため、より処理量の大きなイルミナ社の MiSeq によるパネル診断系の構築を当研究班代表のグループとともに進めた。アンプリコンによる鋳型調製のマルチプレックス化がまだ不十分なために、SCID 症例の実検体の受け入れまでには至れなかったが、実験系として配列解析が可能であることは確認できた。

既に既知候補遺伝子の除外診断が終了されている家族検体を含む検体については、全エクソン配列解析と RNA Sequencing 解析を実施し、データ蓄積を進めた。その結果、いくつかの症例において疾患原因と思われる候補変異を同定できた。それらの多くは、疾患原因遺伝子として知られる遺伝子に生じた新規変異であり、その症状が非典型的なために除外診断の際に解析対象からもれていた遺伝子に見られる変異であった。それ以外の候補については、候補変異の機能的な評価もしくは同症状を示す他検体の解析を経ないで結論に至れないため、ノックインマウスの準備などによる機能解析に向けた準備を進めた。RNA Sequencing データも順調にデータ蓄積を進めることができたが、今年度解析した検体においては、遺伝子発現プロファイルから原因変異を推定できたケースはなかった。

#### D. 考察

卓上型次世代シーケンサーの導入により、安価にルーチンの確定診断目的の遺伝子解析が実現できたため、遺伝子パネルベースの解析が現実のものとなった。エ

クソーム解析の結果も、症状からの絞り込みを緩めることで、確定診断に至れる割合を確実に向上させられることが示されており、今後さらにその検査の経済性を評価しながら運用していくことが重要だと考える。網羅的なエクソーム解析の臨床的な有用性は実証されているものの、未だ遺伝的な疾患原因に至れる割合は劇的には高まっていない。今後、巨視的な疾患症状の把握だけでなく、分子レベルの症状の定量的な記載を実現することが重要であり、それをどうやって臨床現場で実現するかが課題であることが明確となった。

#### E. 結論

- 1) CVID パネル解析の実運用を開始し、SCID パネルについても解析の実現可能性は実証できた。
- 2) 次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い、複数の症例において疾患原因変異の候補を得た。確実な結論に至れるのは、既知疾患遺伝子での変異による非典型症状を呈した症例である場合が多く、次世代シーケンシングによる遺伝子診断の有用性が示せた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Rawat A, Singh S, Suri D, Gupta A, Saikia B, Minz RW, Sehgal S, Vaiphei K, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N, Ohara O, Chan KW, Lau YL. Chronic Granulomatous Disease: Two Decades of Experience From a Tertiary Care Centre in North West India. *J Clin Immunol.* 2013 33(4):857-864



- 2) Higuchi Y, Shimizu J, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Takada H, Ishimura M, Hara T, Ohara O, Asagoe K, Kubo T. The identification of a novel splicing mutation in C1qB in a Japanese family with C1q deficiency: a case report. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2013 Oct 28;11(1):41.
- 3) Wada T, Sakakibara Y, Nishimura R, Toma T, Ueno Y, Horita S, Tanaka T, Nishi M, Kato K, Yasumi T, Ohara O, Yachie A. Down-regulation of CD5 expression on activated CD8(+) T cells in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with perforin gene mutations. *Hum Immunol*. 2013 Dec;74(12):1579-85.
- 4) Lee YW, Yang EA, Kang HJ, Yang X, Mitsuiki N, Ohara O, Miyawaki T, Kanegane H, Lee JH. Novel mutation of IL2RG gene in a Korean boy with X-linked severe combined immunodeficiency. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2013;23(1):65-7.
- 5) Suzuki J, Kuwahara M, Tofukuji S, Imamura M, Kato F, Nakayama T, Ohara O, Yamashita M. A novel small compound SH-2251 suppresses Th2 cell-dependent airway inflammation through selective modulation of chromatin status at the Il5 gene locus. *PLoS One*. 2013 Apr 16;8(4):e61785.
- 6) Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, Haraguchi K, Moriuchi H, Oh-Ishi T, Kitoh T, Ohara O, Morio T, Yachie A. Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry; useful screening tests for chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol*. 2013 May;33(4):857-64.
- 7) Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki 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-deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 May;131(5):1437-40.e5.
- ## 2. 学会発表
- 1) 第七回日本免疫不全症研究会 「食道潰瘍を反復した1型高IgE症候群の1例」 山本崇裕、大西秀典、寺本貴秀、桑原秀次、久保田一生、大塚博樹、川本典生、加藤善一郎、深尾敏幸、谷内江昭宏、小原收 福岡 2014年1月25日
- 2) 第七回日本免疫不全症研究会 「複合型免疫不全を呈したsLC46A1新規変異による先天性葉酸吸収不全症」 千田奈津子、山田雅文、有賀正、岸本健治、小林良二、小林邦彦、小原收 福岡 2014年1月25日
- 3) かずさDNA研究所/産総研生命情報工学研究センター共催ワークショップ バイオインフォマティクスとゲノム医療 —その課題と将来展望— 「クリニカルゲノミクスの現状と課題」 小原收 東京 2013年11月
- 4) The 5th LJI & IMS-RCAI Workshop “Post-GWAS genomic analyses: Mind and bridge the gaps” Ohara O Yokohama, October, 2013
- 5) 第40回日本毒性学会学術年会 シンポジウム 毒性オミクス「生体システムダイナミクス理解のための統合ゲノミクス解析の将来展望」 小原收 千葉 2013年6月
- 6) 第116回日本小児科学会学術集会 “「ゲノミクスを基礎とした新しい病因探索法」分野別シンポジウム「原発性免疫不全症：新しい疾患、トピ

- ックス」”小原收 広島 2013年4月
- 7) 第58回日本人類遺伝学会「次世代シーケンシング技術とゲノミクス解析」シンポジウム：次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾患解析の現状と課題 小原收 仙台 2013年11月
  - 8) 第4回関東甲越免疫不全症研究会 “IgA 単独欠損症として紹介され、TREC/KREC の結果から RAG 1 異常と同定しえた1例” 加藤環、釜江智佳子、本間健一、池川健、横須賀とも子、和田泰三、谷内江昭宏、西田直徳、金兼弘和、満生紀子、小原收、今井耕輔、森尾友宏、野々山恵章 2013年9月
  - 9) 第41回日本臨床免疫学会総会 「本邦における ICF (Immunodeficiency with Centromeric instability and Facial anomalies) 症候群5例の検討」 藤環、釜江智佳子、満生紀子、小原明、林正俊、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 下関 2013年11月
  - 10) 日本人類遺伝学会第58回大会 「次世代シーケンサーを用いて ICF (Immunodeficiency with centromeric instability and facial anomalies) 症候群と診断した2例」 釜江智佳子、満生紀子、小原明、林正俊、野口恵美子、本間健一、小原收、今井耕輔、久保田健夫、野々山恵章 2013年11月
  - 11) 第41回日本臨床免疫学会総会 「BTK 変異をみとめた IgA 単独欠損の解析 (IgA deficiency caused by the missense mutation in the BTK gene)」 満生紀子、今井耕輔、Xi YANG、金兼弘和、小阪嘉之、高田英俊、水谷修紀、小原收、森尾友宏 下関 2013年11月
  - 12) 15th International Congress of Immunology 2013 “Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin  $\kappa$ -deleting recombination excision circles” C. Kamae, N. Nakagawa, H. Sato, K. Honma, N. Mitsuiki, O. Ohara, H. Kanegane, T. Morio, K. Imai and S. Nonoyama, Milan, Italy, Aug, 2013
  - 13) 3rd Sardinian Summer School “Post-GWAS animal models” Ohara O. Pula, Italy, September, 2013
  - 14) 第34回日本炎症・再生医学会 “CINCA 症候群/NOMID 患者単球における、IL-1 産生能の1細胞解析” 中川権史、志村七子、白崎善隆、山岸舞、井澤和司、西小森隆太、河合朋樹、八角高裕、平家俊男、小原收 京都、2013年7月
  - 15) 第41回日本臨床免疫学会 「Muckle-Wells 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異の検討」 中川権史、西小森隆太、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、河合利尚、梅林宏明、武井修治、小林法元、小原收、Eva Gonzalez- Roca、Juan I. Arostegui、平家俊男 下関 2013年11月27日
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

## コロニーアッセイ、骨髄機能解析、移植治療開発

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

GATA2 は生体内の造血機能に重要な役割を果たしている転写因子である。近年、家族性MDS/AML、MonoMAC症候群、DCML欠損症、Emberger症候群など、様々な疾患群でGATA2遺伝子異常が共通して同定された。小児血液疾患におけるGATA2異常症の果たす役割を明らかにする目的で、家族性MDS3家系4例、AML75例、再生不良性貧血75例、若年性骨髄単球性白血病96例においてGATA2異常症を検索した。家族性MDS4例全例およびAML2例(3%)にGATA2遺伝子変異が同定されたが、再生不良性貧血および若年性骨髄単球性白血病症例ではGATA2遺伝子変異は認められなかった。

### A. 研究の目的

GATA2 は生体内の造血機能に重要な役割を果たしている転写因子である。近年、家族性MDS/AML、MonoMAC症候群、DCML欠損症、Emberger症候群など、様々な疾患群でGATA2遺伝子異常が共通して同定された。小児血液疾患におけるGATA2異常症の果たす役割を明らかにするため、GATA2遺伝子変異を検索した。

### B. 研究方法

家族性MDS3家系4例、AML75例、再生不良性貧血75例、若年性骨髄単球性白血病96例の骨髄ないし末梢血単核球からgenomic DNAを抽出し、サンガーシーケンシング法でGATA2の全エクソンおよびイントロン5の塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得た研究計画のもと、患者家族の同意を得た。

### C. 研究結果

家族性MDS4例全例およびAML2例(3%)にGATA2遺伝子変異が同定されたが、再生不良性貧血および若年性骨髄単球性白血病症例ではGATA2遺伝子変異は認められなかった。家族性MDS3家系の家系図および変異部位について、図1にまとめた。Family1に属する患者#2では、同一家系の他の罹患者と共通のgermline GATA2変異に加えて、MDS発症時の検体からsomatic GATA2変異が同定された。

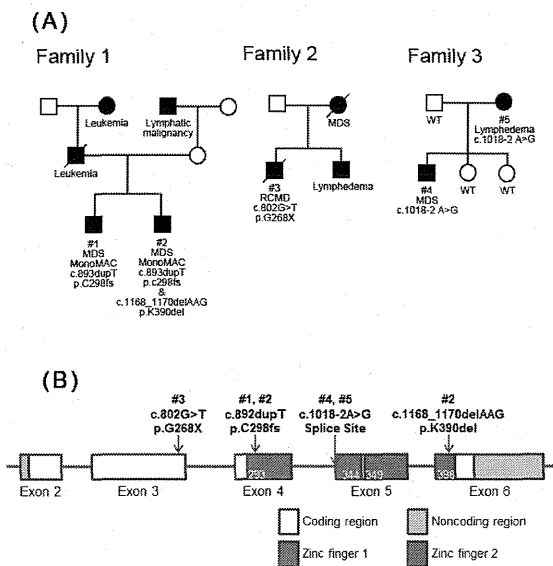


図 1. 家族性 MDS 3 家系の(A)家系図および (B) GATA2 変異部位

患者#2 の germlineGATA2 変異(エクソン 4 の c.892dupT) および somatic GATA2 変異(エクソン 6 の c.1168\_1170delAAG) が同一アレルに存在するか、対立アレルに存在するか検討するため、両変異を含む PCR アンプリコンを増幅し、TA クローニング法による解析を行った。20 クローンをピックアップし、塩基配列を決定した。エクソン 4 の変異のみが検出されたクローンが 11 個、エクソン 6 の変異のみが検出されたクローンが 5 個、両方とも正常配列であったクローンが 4 個であった(図 2)。この結果から、これら 2 つの変異は対立アレルに存在すると考えられた。

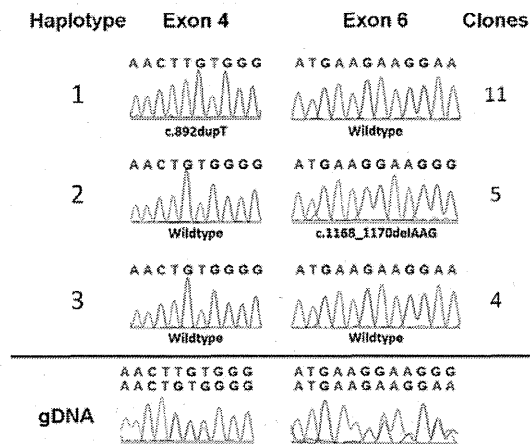


図 2. TA クローニング法による患者#2 の GATA2 変異解析

#### D. 考察

germlineGATA2 変異に加えて、MDS 発症時に対立アレルに somatic GATA2 変異を獲得した家族性 MDS 症例を同定した。GATA2 遺伝子変異は、MDS クローンの腫瘍化進展にも関与していることが考えられた。また、若年性骨髄単球性白血病および再生不良性貧血では変異例を認めず、GATA2 異常症がこれらの病状を示す可能性は低いことが考えられた。

#### E. 結論

小児血液疾患における GATA2 遺伝子異常について解析を行った。家族性 MDS では高率に変異が検出された一方、若年性骨髄単球性白血病および再生不良性貧血では変異例は認められなかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M, Yabe