

Kong, 2012.

10. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 (CVB3) as a Novel Oncolytic Virotherapy Agent against Non Small Cell Lung Cancer. 第 52 回日本肺癌学会 総会, 大阪, 2011

11. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Meiko Yamada, Takafumi Nakamura, Nosaki Kaname, Urata Yasuo, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 is an Oncolytic Virus Active Against Non-Small Cell Lung Cancer, 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸, 2012

12. Hiroyuki Inoue, Akira Sakamoto, Keisuke Yasunari, Shohei Miyamoto, Yumiko Matsumura, Kaname Nosaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Novel engineered oncolytic Edmonston strain of measles virus elicits remarkable oncolytic activity against non-small cell lung cancer stem cells. 第 18 回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012

13. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 is an immunostimulatory oncolytic virus active against lung adenocarcinoma. 第 18 回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012

14. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. 非小細胞肺癌に対するコクサッキーウイルス B3 を用いた新規腫瘍溶解性ウイルス療法, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌, 2012

15. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Yosuke Yokota, Ayumi Watanabe, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. TLR7 ligand Imiquimod enhances GM-CSF-induced immunological antitumor effect. 第 4 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 金沢, 2012

16. Ayumi Watanabe, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Keisuke Okita, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Shinya Yamanaka and Kenzaburo Tani. Novel cancer immunotherapy using induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012

17. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto,

Ayumi Watanabe, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Plasmacytoid DCs are involved in an antitumor immunity induced by GM-CSF gene-transduced tumor cells. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012

18. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Shohei Miyamoto, Yumiko Matsumura, Kaname Nosaki, Akira Sakamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Novel engineered oncolytic measles virus shows oncolytic activity against non-small cell lung cancer stem cells. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012

19. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Immunostimulatory coxsackievirus B3 as a potent oncolytic agent against non-small cell lung carcinoma. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012

20. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Kaname Nosaki, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. 肺癌幹細胞を標的とした新規遺伝子改変麻疹腫瘍溶解性ウイルス療法. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2013

21. Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. A novel cancer cell vaccine using induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF elicits substantial antitumor immunity in a syngeneic mouse model. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013

22. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Dual microRNA-regulated oncolytic coxsackievirus B3 infection displays antitumor activity with attenuated pathogenicity in mice. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013

23. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Combination use of TLR7 ligand with GM-CSF gene-transduced tumor vaccines provides substantial antitumor immunity against poorly immunogenic mouse lung cancer cells. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene

and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013

24. Miyako Sagara, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Chika Sakamoto, Yuki Nakano, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. CVB3 infection elicits potent oncolytic activity against lung cancer stem cells. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013

25. Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. Gene expression profiling identifies plasmacytoid dendritic cells as positive regulators in GM-CSF-induced antitumor immunity. The 4th Japanese Society of Hematology International Symposium 2013, Matsuyama, Japan, May 24-25, 2013

26. Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Vaccination with irradiated induced pluripotent stem cells genetically engineered to secrete GM-CSF provides substantial antitumor immunity in immunocompetent syngeneic mouse models. 第 19 回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013

27. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. Plasmacytoid dendritic cells play an essential role in GM-CSF-induced antitumor immunity. 第 19 回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013

28. Miyako Sagara, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Chika Sakamoto, Yuki Nakano, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Differential susceptibility of cancer stem cells and cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition to oncolysis by CVB3 infection. 第 19 回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013

29. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Infection with dual microRNA-targeted coxsackievirus B3 abrogates its pathogenicity retaining oncolytic activity. 第 19 回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013

30. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Beibei Wang, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Infection with Echovirus 4 elicits potent oncolytic activity against cisplatin-resistant esophageal carcinoma. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013

31. Miyako Sagara, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Chika Sakamoto, Yuki Nakano, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. CVB3 infection displays different oncolytic activities against cancer stem cells and cancer cells undergoing EMT. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013

32. Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Therapeutic vaccine with GM-CSF gene-transduced cancer stem cells inhibits tumor growth and metastasis of breast cancer. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013

33. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. MicroRNA-targeted coxsackievirus B3 infection markedly reduces its pathogenicity retaining oncolytic activity. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013

34. Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Vaccination with irradiated induced pluripotent stem cells elicits substantial antitumor immunity. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013

35. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. TLR7 ligand overcomes therapeutic resistance to GM-CSF-gene transduced tumor vaccination. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013

36. Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, and Kenzaburo Tani. Therapeutic vaccine with GM-CSF gene-transduced cancer stem cells inhibits tumor growth and metastasis of breast cancer. The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium, Recent Advances in Stem Cell Biology 2013. Fukuoka, Japan, November 4-6, 2013

37. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. MicroRNA-regulated coxsackievirus B3 abrogates its pathogenicity retaining oncolytic activity. The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium, Recent Advances in Stem Cell Biology 2013. Fukuoka, Japan, November 4-6, 2013

38. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. MicroRNA-targeted coxsackievirus B3 infection markedly reduces its toxicity without losing its original oncolytic activity. Therapeutics Discovery Symposium Asia Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic Reprogramming Asia-2013 Meeting On 'RNA Regulation to Delivery, Programming to Pluripotency & Therapeutics'. Tokyo, Japan, November 25-26, 2013

39. Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Takafumi Hiramoto, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Vaccination with irradiated induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF confers potent T cells-mediated antitumor immunity. The 53th ASH Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA, December 10-13, 2013

40. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Yumiko Matsumura, Atsushi Takahashi, Ayumi Watanabe, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. TLR7 ligand potentiates GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. The 53th ASH Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA, December 10-13, 2013

41. 高木香津子、濱田雄行、伊藤智子、芳原智恵子、小山義之、谷憲三朗、那波明宏。卵巣がんに対するコンドロイチン硫酸およびポリエチレンイミンによる多重コーティングを施行したオンコリティックアデノウイルスの遺伝子治療。第 55 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会。2013 年 12 月 13-15 日、京都。

42. 高木香津子、濱田雄行、伊藤智子、芳原智恵子、小山義之、谷憲三朗、那波明宏。midkine プロモーター導入オンコリティックアデノウイルスによるコンドロイチン硫酸ポリマー多重加工人工皮膜を用いた卵巣癌に対する抗腫瘍効果。第 35 回日本バイオマテリアル学会大会。2013 年 11 月 25-26 日。東京。

43. 高木香津子、濱田雄行、伊藤智子、芳原智恵子、小山義之、谷憲三朗、那波明宏。卵巣癌に対するコンドロイチン硫酸を用いたオンコリティックアデノウイルスのポリマー多重加工による抗腫瘍効果。日本癌学会学術総会。2013 年 10 月 3-5 日。東京。

44. 高木香津子、濱田雄行、伊藤智子、芳原智恵子、小山義之、谷憲三朗、那波明宏。ポリマー多重加工処理によるオンコリティックウイルスの電子顕微鏡による評価。第 19 回日本遺伝子治療学会学術総会。2013 年 6 月 4-6 日。岡山。

45. Hamada, K., Takagi, K., Tani, K., Nawa, A. 特

別シンポジウム-5「がん治療」Cancer gene therapy with oncolytic adenovirus by cell and polymer processing. 第 19 回日本遺伝子治療学会学術総会。2013 年 6 月 4-6 日。岡山。

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

① Title: Common marmoset embryonic stem cell lines
Filed: September 11, 2004.
Our Reference No.: 39888-0003PR

② 発明名称：新規腫瘍溶解性ウイルス
・ 整理番号 QP120013
・ 国際特許分類 A61K 35/76
・ 代表発明者 井上博之
・ 発明者 谷憲三朗、宮本将平、王 倍倍
・ 出願日：2013-04-19
・ 出願番号：PCT/JP2013/061686

③ 発明名称：遺伝子組換えコクサッキーウイルス
・ 整理番号 QP130008-US
・ 代表発明者 谷憲三朗
・ 発明者：谷憲三朗、井上博之、宮本 将平
・ 出願日：2013/4/17
・ 出願番号：61/812943

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特になし

分担研究報告書

原発性免疫不全症候群の疾患特異的iPS細胞を用いた原因・病態解析

分担研究者 原 寿郎 九州大学大学院医学研究院成長発達医学 教授

研究要旨

X染色体不活化異常を基盤として発症した Bruton 無ガンマグロブリン血症 (XLA) 患者、および Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) 患者由来の iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞を長期培養し、X染色体不活化の解除が見られるかどうか確認した結果、健常者由来の iPS 細胞では X染色体不活化の解除が認められたが、患者由来の iPS 細胞では認められなかった。この2名の患者の X染色体不活化異常の原因を同定するために、患者末梢血を用いたエキソーム解析、RNA Seq 法による解析を行い、解析を続けている。樹立した iPS 細胞を用いた創薬研究の基盤を確立することができた。

分担研究者

原寿郎 九州大学大学院医学研究院・教授

A. 研究目的

Bruton 無ガンマグロブリン血症 (XLA)、Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) は、原発性免疫不全症の代表的疾患であり、X連鎖劣性遺伝子形式をとる。それぞれ BTK 遺伝子異常、WASP 遺伝子異常が原因である。XLA は、ガンマグロブリン補充療法を受けていても感染症がおこりやすく、また悪性腫瘍の合併頻度も高い。WAS は、血小板減少、難治性湿疹、易感染性によって生活の質が低下し、造血幹細胞移植療法以外では、長期的には悪性腫瘍や自己免疫疾患を高率に合併する。いずれも、高い QOL を確保し、長期生存を得るためには、新たな治療戦略が必要である。

これらの2疾患は通常男性にしか発症しないが、我々は、世界で初めて女性 XLA 患者、および世界的に極めて稀である女性 WAS 患者を同定し、いずれも、X染色体不活化異常が発症に寄与していることを明らかにした。健常女性の X染色体の1つはランダムに不活化されているが、女性 iPS 細胞では、長期的に培養することで X染色体不活化の解除がおこることが明らかにされている。iPS 細胞の X染色体不活化をコントロールすることができれば、女性 XLA 患者、女性 WAS 患者のみならず、X連鎖劣性遺伝性疾患の新たな治療法に応用できる可能性がある。

健常女性、およびこれらの2名の患者由来の iPS 細胞を樹立し、X染色体不活化機構に関わる分子機構を明らかにし、X染色体不活化を解除・コントロールする薬剤を同定することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

X染色体不活化異常によって発症した、XLA 患者および WAS 患者、および健常女性から、iPS 細胞を樹立した。樹立の方法は、センダイウイルスを用いて Oct3/4、c-Myc、Klf4、Sox2 の4遺伝子を末梢血由来の Tリンパ球に組み込み、iPS 細胞へと再プログラムした。

X染色体不活化の評価は、X染色体多条の HUMARA 遺伝子の繰り返し多型を含む領域を、メチル化感受性制限酵素を用いて切断し、PCR 法を用いて増幅する方法を用いた

(倫理面への配慮)。研究を行うに当たり、九州大学倫理委員会の指針に基づき、承認を得て informed consent を取得の上で解析を行った。

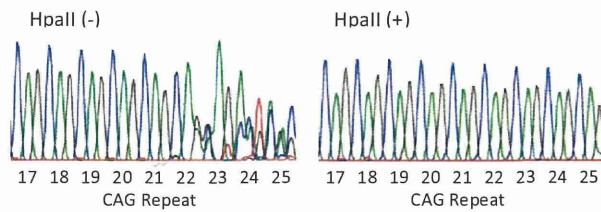
C. 研究結果

樹立した iPS 細胞は、Nanog、Oct3/4 などのマーカー上の特徴を有していることを確認した。

樹立した iPS 細胞を長期間培養し、X染色体不活化の状態を継時的に調べた。樹立した早期の XLA 患者由来 iPS 細胞では、X染色体不活化は、non-random な不活化であり、患者母由来の X染色体が不活化していた。この iPS 細胞を長期に培養した結果 (Passage 19)、X染色体不活化の解除は認められなかった (図)。

他方、X染色体不活化異常を起こしたメカニズムを解析するために、女性 XLA 患者および女性 WAS 患者末梢血のエキソーム解析、および RNA Seq 解析を行った。これまで原因となる遺伝子変異は同定できてい

図 Passage 19 における X 染色体不活化



ないが、解析を継続する。

D. 考察

予想通り、X 染色体不活化異常によって発症した XLA 患者 iPS 細胞では、X 染色体不活化異常が確認され、長期的な培養でも不活化の解除は起こらなかった。このことは、X 染色体不活化の偏りが、確率論的な機序で起こったとする考えを否定するものである。これを基盤として、X 染色体不活化を解除・制御する創薬研究を行う。同時に、X 染色体不活化機構の解明研究を継続する。

E. 結論

X 染色体不活化異常によって発症した、XLA 患者および WAS 患者、および健康女性から、iPS 細胞を樹立した。X 染色体不活化異常によって発症した XLA 患者 iPS 細胞では、X 染色体不活化異常が確認され、長期的な培養でも不活化の解除は起こらなかった。女性 XLA 患者および女性 WAS 患者末梢血のエキソーム解析、および RNA Seq 解析を行った。これまで原因となる遺伝子変異は同定できていないが、今後とも解析を進める。これを基盤として、X 染色体不活化を解除・制御する創薬研究を行う。同時に、X 染色体不活化機構の解明研究を継続する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T:

B cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID.

Int J Hematol. 98: 355-60, 2013

2) Ishimura M, Yamamoto H, Mizuno Y, Takada H, Goto M, Doi T, Hoshina T, Ohga S, Ohshima K, Hara T:

A non-invasive diagnosis of histiocytic necrotizing lymphadenitis by means of gene expression profile analysis of peripheral blood mononuclear cells.

J Clin Immunol. 33(5): 1018-26, 2013

3) Imagawa T, Nishikomori R, Takada H, Takeshita S, Patel N, Kim D, Lheritier K, Heike T, Hara T, Yokota S: Safety and efficacy of canakinumab in Japanese patients with phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndrome as established in the first open-label, phase-3 pivotal study (24-week results).

Clin Exp Rheumatol. 31: 302-9, 2013

4) 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 ClqB in a Japanese family with Clq deficiency: a case report.

Pediatr Rheumatol Online J. 11(1): 41, 2013

2. 学会発表

5) Hara T, Ishimura M, Tahada H:

Autoimmune diseases in patients with primary immunodeficiency diseases. The 2nd International Congress on Controversies in Rheumatology and Autoimmunity, Apr 4-6, 2013, Budapest, Hungary

6) Hara T:

Innate immunity and infection in the newborn. The 9th Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 9-12, 2013, Kuching, Sarawak, Malaysia

7) Hara T, Ishimura M, Yamamoto H, Mizuno Y, Takada H, Ohshima K: A Non-invasive Diagnosis of Histiocytic Necrotizing Lymphadenitis.

Frontiers in Immunology Research 2013 International Conference, Jul 1-4, 2013, Monte Carlo, Monaco

8) Takimoto T, Ishimura M, Takada H, Morio T, Ohga S, Hara T: A Japanese female case of Wiskott-Aldrich syndrome with skewed X-chromosome inactivation.

The 4th JSH International Symposium, May 24-25, 2013, Ehime, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

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）
分担研究報告書

iPS細胞を活用した血液・免疫系難病に対する革新的治療薬の開発

分担研究者 杉山 大介 九州大学大学院医学研究院 准教授

研究要旨

平成26年度の患者検体使用に向けて、倫理審査委員会へ書類を提出した。また、質量分析装置を応用して、グロビタンパク質を解析する技術の開発を試みた。ヒト細胞を用いて解析に有効なペプチドをスクリーニングした。

分担研究者

杉山 大介 九州大学大学院・准教授

A.研究目的

- ①iPS細胞作製に向けて、難病の遺伝性血液疾患（サラセミア）の皮膚繊維芽細胞の情報収集を行う。
- ②分化誘導後のヒト患者iPS細胞由来赤血球の品質を解析するための基盤技術を開発する。

B.研究方法

質量分析装置を応用して、赤血球系細胞の酸素運搬を司るグロビタンパク質を解析する技術を開発する。具体的には、alpha-, beta-, delta-, epsilon-, gamma-, mu-, theta-, zeta-globinを認識するペプチドをデザインし、ヒト細胞において質量分析装置を用いてグロビタンピングの技術を開発する。

(倫理面への配慮)

タイのマヒドン大学サラセミアリサーチセンターよりサラセミア患者サンプルの提供を受けるにあたり、倫理委員会に提出する書類の打合せが終了した。また、九州大学内倫理委員会の承認を得た（資料添付）。

C.研究結果

- ①マヒドン大学サラセミアリサーチセンターはサラセミア研究が盛んであり、膨大なサラセミア

患者サンプルを保有する。マヒドン大学サラセミアリサーチセンターの Saovaros Svasti 博士は、分担研究者研究室を訪問したことがあり、サラセミアの皮膚繊維芽細胞に関する情報を提供して頂

いた。平成25年7月のマヒドン大学サラセミアリサーチセンターへの訪問時（研究分担者グループ・杉山および井上）及び、平成26年3月の Saovaros Svasti 博士の来日時に面談を行い、サラセミア患者サンプルの提供に関して口頭で同意を得た。

②以下の表のように、alpha-, beta-, delta-, epsilon-, gamma-, mu-, theta-, zeta-globinを認識するペプチドをデザインした。

Symbol	Description	PID	Pep seq
HBA1	hemoglobin, alpha 1;hemoglobi	TB23	[MT3]-FLASVST
;HBA2	n, alpha 2	9262	VLTSK[MT3]
HBB	hemoglobin, beta	TB25 2412	[MT3]-GTFATLS ELHC[CAM]DK[MT3]
HBD	hemoglobin, delta	TB53 2763	[MT3]-LLGNVL VC[CAM]VLAR
HBD	hemoglobin, delta	TB53 3133	[MT3]-GTFSQLS ELHC[CAM]DK[MT3]

HBE1	hemoglobin, epsilon 1	TB41 2708	[MT3]-AAVTSL WSK[MT3]
HBG1	hemoglobin, gamma A	TB11 0344	[MT3]-VLTSLG DATK[MT3]
HBG1;H BG2	hemoglobin, gamma A;hemoglobi n, gamma G	TB11 0550	[MT3]-EFTPEVQ ASWQK[MT3]
HBM	hemoglobin, mu	TB53 2757	[MT3]-LFTVYPS TK[MT3]
HBQ1	hemoglobin, theta 1	TB12 5559	[MT3]-TYFSLH DLSPGSSQVR
HBZ	hemoglobin, zeta	TB46 7098	[MT3]-FLSVVSS VLTEK[MT3]
HBZ	hemoglobin, zeta	TB46 7032	[MT3]-SIDDIGG ALSK[MT3]
Symbol	Description		Pep seq

ヒト臍帯血、ヒト成体末梢血、K562 赤白血病細胞を用いて、質量分析装置で解析し、有望なペプチドのスクリーニングを行った。さらにクロマトクロマトグラフィーの形状精査を行い、ペプチドの最終候補を上記の通り、11 個選出した。

D. 考察

①平成 25 年度は、マヒドン大学サラセミアリサーチセンターを訪問し、サラセミアの皮膚繊維芽細胞に関する情報を効率よく収集した。次年度に向けたサラセミア患者サンプル入手に関する基盤を整備した。

②これまでグロビタンパク質の定性・定量は困難であり、遺伝子発現解析が主として行われた。グロビタンパク質を解析するため、様々なグロビンを認識する認識するペプチドをデザインし、有望なペプチドのスクリーニングを行った。今後本法を応用し、ヒト iPS 細胞から分化誘導した赤血球系細胞の品質を解析する基盤技術の開発が見込める。

E. 結論

①平成 25 年度は、マヒドン大学サラセミアリサーチセンターを訪問し、サラセミアの皮膚繊維芽細胞に関する情報を効率よく収集した。
②質量分析装置を応用して、グロビタンパク質を解析する技術の開発を試みた。ヒト細胞を用いて解析に有効なペプチドをスクリーニングした。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

- 1) Sugiyama D., Kulkeaw K and Mizuochi C. "TGF-beta-1 up-regulates extra-cellular matrix production in mouse hepatoblasts." *Mech Dev.* 130(2-3), 195-206, 2013
- 2) Inoue T, Tani K and Sugiyama D. "Mesodermal and hematopoietic differentiation from ES and iPS cells." *Stem Cell Rev.* 9(4), 422-34, 2013
- 3) Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai MI, and Sugiyama D. "Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells." *Stem Cell Res Ther.*, 4(3):71,2013
- 4) Swain A, Inoue T, Tan KS, Nakanishi Y, and Sugiyama D. "Intrinsic and Extrinsic Regulation of Mammalian Hematopoiesis in the Fetal Liver." *HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY*, In press, 2014
- 5) Tomoko Inoue, Kasem Kulkeaw, Kanitta Muennu, Yuka Tanaka, Yoichi Nakanishi, and Daisuke Sugiyama. The herbal drug ninjin'yoeito accelerates myelopoiesis but not erythropoiesis in vitro. *Genes to Cells.* 2014. (in press)

2.学会発表

1) Inoue T and Sugiyama D. “Identification of ACVR2B as a novel erythrocyte marker and analysis of its function” 第1回赤血球研究会、札幌、2013年10月、口頭発表

2) Tan KS, Inoue T, Lim WF, Mizuochi C, Kulkeaw K, Preedagasamzin S, Tanaka Y, Lai MI and Sugiyama D. “Spleen Niche Cells Accelerate Erythropoiesis through SCF and IGF-1 Secretion in Mouse Embryo.” 第75回日本血液学会、札幌、2013年10月、口頭発表

3) Kulkeaw K, Pongpair O, Inoue T, Srinoun K, Yanagi C, Horio Y, Yenchitsomanus P, and Sugiyama D. “Dppa3 accelerates erythroid differentiation accompanied with globin synthesis in the mouse fetal liver.” 第7回武田科学振興財団薬科学シンポジウム、大阪 2014年1月

4) Inoue T, Kulkeaw K, Kanitta S, Tan KS, Tanaka Y, Kojima N, Nakanishi Y and Sugiyama D. “Clarification of molecular mechanisms on erythropoiesis and its clinical application.” JSPS 日本ベトナム二国間交流プログラム、ハノイ、2014年2月、口頭発表

5) 杉山大介

創造的次世代医療実現化を担うAROの構築

第2回トランスレーショナルリサーチシンポジウム、福岡、2014年3月8日

口頭発表（特別講演）

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得

2.実用新案登録

3.その他

特記事項なし。

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）
分担研究報告書

iPS 細胞を活用した血液・免疫系難病に対する革新的治療薬の開発

分担研究者 菅野 仁 東京女子医科大学 教授

研究要旨

赤血球ピルビン酸キナーゼ（PK）活性低下によって発症する PK 異常症は我が国の先天性溶血性貧血の病因として遺伝性球状赤血球症（HS）、グルコース-6-リン酸脱水素酵素（G6PD）異常症について頻度の高い疾患である。HS の重症例が摘脾術によってほぼ臨床的に治癒するのに対し、G6PD 異常症や PK 異常症などの赤血球酵素異常症では前者が摘脾術を施行した後も急性溶血発作のリスクが回避出来ないこと、後者は輸血依存例が多く、無効造血を伴うことから二次性鉄過剰症に陥りやすいことから、患者 QOL は著しく低下することが多い。今回我々は赤血球 PK 活性低下により、PK 異常症が疑われるものヒト *PKLR* 遺伝子に変異を同定出来なかった重症先天性溶血性貧血 8 症例についてその病因を検討した結果、赤血球特異的な転写因子である *KLF1* 遺伝子の変異を同定した。全例とも変異 *KLF1* の複合ヘテロ接合体であった。*KLF1* 異常症の臨床像は新生児期重症早発黄疸および赤血球輸血を必要とする新生児溶血性疾患であり、半数以上がその後赤血球輸血依存性の重症慢性溶血性貧血を呈した。上記の赤血球酵素異常症に加えて、*KLF* 異常症も iPS 細胞を用いた新規治療法開発の対象とすべきと考えられた。

分担研究者

菅野 仁 東京女子医科大学 教授

A. 研究目的

我々は一般臨床検査にて診断を確定することが困難な溶血性貧血症例を対象としたスクリーニング検査を実施している。2004 から 2010 年に全国の医療機関から依頼を受けて解析を実施した 244 症例の最終診断は G6PD 異常症（25.4%）、HS（16.8%）、サラセミア（5.7%）、PK 異常症（4.5%）の順で頻度が高いことが明らかになっている。G6PD 異常症やサラセミアでは両親・祖先が外国人である症例が半数程度を占めるのに対し、HS と PK 異常症は両親共に日本人であることが特徴的である。

赤血球 PK 活性低下による先天性溶血性貧血は、1961 年 Valentine, Tanaka & Miwa によって発見された。現在、解糖系のなかでは最も頻度の高い酵素異常症であり、わが国においても 150 家系以上が診断されている。遺伝子検査結果により、病因は酵素の質的異常、すなわち基質との親和性やアロステリック活性化が障害された変異酵素の産生による場合が殆どで、ごく一部が赤血球内 PK タンパク量の低下を来すような量的な異常があることが遺伝子レベルで明らかにされた。いずれの場合も赤血球内 ATP 低下を来した後、網内系でマクロファージに認識、貪食される血管外溶血が起こる。

解糖系はすべての細胞に備わる基本的な糖代謝経路であるが、本症は赤血球/肝臓型アイソザイム（PKLR）遺伝子のみが冒される。肝臓では解糖系の抑制があってもミトコンドリアにおける酸化リン酸化反応での ATP 産生があり、肝機能障害を認めることはない。従って、本症での解糖系障害は核や細胞小器官の無い赤血球でのみ寿命の短縮、すなわち溶血性貧血という形で症状

が現れる。

遺伝形式は常染色体劣性遺伝であり、両親から変異を受け継いだ場合に臨床症状を呈する。わが国においては 20% の症例は発端者の両親に血族結婚を認めるホモ接合で、残りの 80% は両親から異なる変異を受け継いだ複合ヘテロ接合である。ヘテロ接合は通常血液学的には正常であるが、稀に軽度の貧血を呈する例や新生児黄疸の重症化例が認められる。変異酵素は熱に対する不安定性、キネティクス

の変化や電気泳動上の易動度変化などより構造遺伝子変異によると考えられていたが、遺伝子解析結果から同定された変異はその 70% がミスセンス変異、次に頻度の高い変異は異常スプライシングの 11% であり、小さな欠失・挿入によるフレームシフト変異が 8%、ナンセンス変異は 6%、数個以内のコードンの欠失・挿入 4%、大きな遺伝子内欠失 2% (3/158)、プロモーター変異が 1% である。

このように PK 異常症の遺伝子変異は極めて多彩であり、地域により特定の変異が同定される G6PD 異常症とは対照的であることが明らかとなっている。

HS や G6PD 異常症と異なり、PK 異常症では無効造血が認められることにより、二次性鉄過剰症を合併する例があり、重症例では摘脾術を実施しても HS ほどの臨床的寛解は得られない。造血幹細胞移植はバセンジ (Basenji) 犬やマウスなどのモデル動物のみならず、ヒトでも国内外で数例実施例が報告されたが、生着不全、感染や GVHD などの合併症発症リスクを鑑みると治療の第一選択とはなり得ていない。

今回、著明な HbF の増加、赤血球 PK 活性の低下を伴う先天性溶血性貧血 8 症例について

て病因解析を行ない、PKLR 遺伝子の赤血球転写調節因子である KLF1 の遺伝子解析を実施した。

B. 研究方法

免疫学的機序による先天性溶血性貧血が否定されたタイ人 8 症例について、以下の検査方法を用いて赤血球寿命短縮の原因を解析した。

- 1) Eosin 5' -maleimide(EMA)結合能
- 2) 赤血球酵素活性測定
- 3) Hb 分画および等電点電気泳動
- 4) サラセミア遺伝子検査 (Gap PCR)
- 5) KLF1 遺伝子解析 (倫理面への配慮)

個人データは生体試料を採取した共同研究機関であるタイ Mahidol 大学医学部小児科学教室において、検体研究実施者以外には知られないように匿名化し、個人データの管理・保護に務めた。また、倫理審査委員会で承認された研究計画書に基づき作成された説明文書・同意文書を用いて同意を得た提供者のみを対象とした。

C. 研究結果

原因不明の先天性溶血性貧血症例についてその病因を検討した結果、8 例に赤血球特異的な転写因子である、KLF1 遺伝子の変異を同定した。全例、変異 KLF1 の複合ヘテロ接合体であった。新生児期重症黄疸にて光線療法の既往があり、1 歳時までに赤血球輸血が必要であり、8 例のうち 5 例はその後赤血球輸血依存性の重症慢性溶血を認めた。初診時の血液所見を表 1 に示す。赤血球形態はサラセミア様の小球性低色素性貧血であった。赤血球像は多彩であり、著しい hypochromasia、大小不同を伴う poikilocytosis、標的赤血球、破碎赤血球などが観察された。

表 1 8 例の血液所見と Hb 分画

Pt #	Hb (g/dl)	MCV (fl)	MCH (pg)	Ret (%)	HbF (%)	HbA ₂ (%)
1	3.0	80.1	28.1	6.0	16.2	3.1
2	5.9	65.9	21.4	5.0	16.6	3.0
3	5.2	74.0	21.0	11.0	ND	ND
4	6.5	70.6	21.7	10.0	5.5	7.3
5	3.4	81.0	24.8	10.0	29.0	4.6
6	6.6	71.0	22.3	10.1	49.8	2.4
7	5.7	67.0	21.2	11.0	54.6	2.2
8	5.4	75.0	24.7	10.0	19.0	10.0

赤血球酵素活性のスクリーニングではピルビン酸キナーゼ (PK) 活性の低下を全例で認めたが、翻訳領域およびエクソン-イントロン接合部分の遺伝子変異は同定し得なかった。等電点電気泳動および異常バンドから抽出したヘモグロビンの質量分析では、Hb Bart's (γ4) および Hb Portland I (ζ2γ2) を認めた。グロビン遺伝子解析では HbF の増加を説明する β サラセミア遺伝子型を保有する個体は一例も無く、また γ グロビン発現異常を説明出来るシス制

御領域の変異も同定し得なかった。

β グロビンおよび赤血球型 PK に同時に発現異常が存在する事実より、両遺伝子に共通のトランス活性化因子である転写因子 KLF1 の発現低下を疑い、その構造遺伝子である KLF1 の変異解析を実施したところ、表 2 に示すような結果を得た。

表 2 同定した KLF1 遺伝子変異、アミノ酸置換

Pt#	Allele 1	Allele 2
1	R331W	G335R
2	G176RfsX179	R301H
3	-154C/T	A298P
4	Q58X	A298P
5	G176RfsX179	A298P
6	G176RfsX179	A298P
7	G176RfsX179	A298P
8	G176RfsX179	A298P

D. 考察

KLF1 遺伝子多型が赤血球内 HbF 量を増加させる HPFH (hereditary persistence of fetal hemoglobin) と関連することは既に明らかになっていた。一方 KLF1 の 2 つめの zinc finger におけるミスセンス変異 (E325K) はヘテロ接合体マウスが CDA (congenital dyserythropoietic anemia) 様の表現型を示すことも最近明らかになった。今回の検討結果から、KLF1 遺伝子変異は胎芽～胎児型グロビンの出現および β グロビン発現低下、赤血球型 PK 活性の低下という二つの遺伝子異常による赤血球寿命の短縮を来とし、重症先天性溶血性貧血を惹起することが明らかになった。

KLF1 異常症の臨床像は新生児期重症早発黄疸および赤血球輸血を必要とする新生児溶血性疾患であり、半数以上がその後赤血球輸血依存性の重症慢性溶血性貧血を呈した。重症 PK 異常症に加えて、KLF1 異常症も iPS 細胞を用いた新規治療法開発の対象とすべきと考えられ、現在患者 iPS 細胞の樹立を準備中である。

E. 結論

摘脾術により QOL の改善が期待できない先天性溶血性貧血の一病型として、新たに KLF1 異常症を同定した。

F. 健康危険情報

該当なし

G.研究発表 論文発表

1. Hikosaka K, Ikutani M, Shito M, Kazuma K, Gulshan M, Nagai Y, Takatsu K, Konno K, Tobe K, Kanno H, Nakagawa T. Deficiency of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 3 (Nmnat3) causes hemolytic anemia by altering the glycolytic flow in mature erythrocytes. *J Biol Chem.* 2014 Apr 16. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24739386.
2. Kobayashi Y, Hatta Y, Ishiwatari Y, Kanno H, Takei M. Human parvovirus B19-induced aplastic crisis in an adult patient with hereditary spherocytosis: a case report and review of the literature. *BMC Res Notes.* 2014;7:137. doi: 10.1186/1756-0500-7-137. PubMed PMID: 24618088;
3. Viprakasit V, Ekwattanakit S, Riolueang S, Chalaow N, Fisher C, Lower K, Kanno H, Tachavanich K, Bejrachandra S, Saipin J, Juntharaniyom M, Sanpakit K, Tanphaichitr VS, Songdej D, Babbs C, Gibbons RJ, Philipsen S, Higgs DR. Mutations in Kruppel-like factor 1 cause transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression. *Blood.* 2014;123:1586-1595. doi: 10.1182/blood-2013-09-526087. Epub 2014 Jan 17. PubMed PMID: 24443441.
4. Tsuzuki S, Akahira-Azuma M, Kaneshige M, Shoya K, Hosokawa S, Kanno H, Matsushita T. A Japanese neonatal case of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency presenting as severe jaundice and hemolytic anemia without apparent trigger. *Springerplus.* 2013;2:434. doi: 10.1186/2193-1801-2-434. eCollection 2013. PubMed PMID: 24052930
5. Akizawa Y, Kanno H, Kawamichi Y, Matsuda Y, Ohta H, Fujii H, Matsui H, Saito K. Enhanced expression of myogenic differentiation factors and skeletal muscle proteins in human amnion-derived cells via the forced expression of MYOD1. *Brain Dev.* 2013 Apr;35(4):349-55. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.012. Epub 2012 Jun 20. PubMed PMID: 22727434.3)
6. 菅野 仁. 非免疫性溶血性貧血を対象とした診断システムの構築. *臨床検査 医学書院* 327-335,2014
7. 菅野 仁. ピリミジン 5'-ヌクレオチダーゼ異常症. *日本臨床別冊血液症候群第2版 I*, 311-313, 2013
8. 菅野 仁. アデニル酸キナーゼ異常症. *日本臨床別冊血液症候群第2版 I*, 308-310, 2013
9. 菅野 仁. アデノシンデアミナーゼ過剰産生症.

日本臨床別冊血液症候群第2版 I, 306-307, 2013

10. 菅野 仁. アルドラーゼ A 異常症. *日本臨床別冊血液症候群第2版 I*, 278-281, 2013
11. 菅野 仁. ヘキソキナーゼ異常症. *日本臨床別冊血液症候群第2版 I*, 274-277, 2013
12. 菅野 仁. 三炭糖リン酸イソメラーゼ異常症. *日本臨床別冊血液症候群第2版 I*, 271-273, 2013

2.学会発表

1. 古賀 木綿子, 野口 磨依子, 大園 秀一, 中川 慎一郎, 上田 耕一郎, 稲田 浩子, 松石 豊次郎, 財津 亜友子, 横地 一興, 大賀 正一, 菅野 仁, 伊藤 悦郎. 心不全を伴う危急的貧血で発症した Diamond-Blackfan 貧血の乳児例. 第116回日本小児科学会学術集会(平成25年4月19-21日)日本小児科学会雑誌 117:1346, 2013
2. 羽賀洋一, 三井一賢, 小嶋靖子, 佐藤真理, 松裏裕行, 関根孝司, 館野昭彦, 菅野 仁, 小原 明, 佐地 勉. アスコルビン酸とリボフラビンとの併用療法が有効であった遺伝性メトヘモグロビン血症. 第116回日本小児科学会学術集会(平成25年4月19-21日)日本小児科学会雑誌 117:431, 2013
3. 菅野 仁. 先天性溶血性貧血およびダイアモンド・ブラックファン貧血の診断法の進歩. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会. 教育セッション3 赤血球系疾患(平成25年11月29日)

G.知的財産権の出願・登録状況 該当なし

H.知的所有権の取得状況(予定を含む)

- 1.特許取得
該当なし
- 2.実用新案登録
該当なし
- 3.その他
該当なし

発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）造血障害における免疫分子病態の解明

研究分担者：花岡 伸佳（和歌山県立医科大学医学部血液内科学講座・准教授）

研究要旨

造血障害は日本人 PNH 患者の主死因であり、造血障害の発生には免疫機序の関与が想定されている。我々は、NKG2D 免疫が造血障害を誘導する有力な分子病態と捉えており、これまでに PNH や特発性造血障害を共有する再生不良性貧血患者血球膜上の NKG2D リガンド（ULBPs, MICs）発現およびこのリガンドを標的とする自己リンパ球傷害を見出した。本研究では、病態解明を促進する解析試料の量的確保を目指した PNH 患者由来の iPS 細胞樹立に必要な対象患者の選定や環境整備を進めた。

研究分担者

花岡 伸佳（和歌山県立医科大学・准教授）

A. 研究目的

PNH は溶血、血栓症、造血障害を主病態とする。好発年齢は特になく、男女差も認めない。iPS 細胞は末梢血球、骨髄細胞、体細胞など様々な細胞より樹立できる。そのため造血障害発生モデルの作成には、最適な患者の選定が重要と考え、患者情報（病状、造血障害の程度、治療内容、症状など）の収集とその解析を目的とした。

B. 研究方法

和歌山県立医科大学附属病院に定期通院している 5 名の PNH 患者を対象とし、患者カルテやアンケート調査より情報を収集した。また、PNH クローン量を DAF（decay accelerating factor, CD55）と CD59、顆粒球（CD15 陽性細胞）膜上の NKG2D リガンド発現を NKG2D リガンド（ULBP1, ULBP2, ULBP3, MICA/B）と CD15 の単クローン抗体を用いた 2 カラーフローサイトメトリー法で評価した。

（倫理面への配慮）

iPS 樹立にあたり、学内ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会への研究概要説明と承認を得る手続きを行った。今後、iPS 研究はこの承認された同意書をもとに参加者の同意（インフォームドコンセント）を得て実施する。本研究は PNH 患者登録研究に対する学内疫学研究に関する倫理審査委員会での承認および参加者の同意を得て実施した。

C. 研究結果

PNH 5 名（男 2 名/女 3 名、平均年齢 48.4 歳、平均罹患期間 14.8 年）の病型は、

図 1. 患者背景

	Age (yo)	Sex	Duration (yr)	IS	Transfusion (単位/mo)
PNH1	32	M	6	x	x
PNH2	67	F	2	x	x
AA-PNH1	74	F	25	CyA	x
AA-PNH2	21	M	8	CyA, ATG→x	x
AA-PNH3	48	F	33	PSL→x	1

IS, immunosuppressant; CyA, ciclosporin; ATG, anti-thymocyteglobulin; x, not applicable

古典的 PNH 2 名、再生不良性貧血-PNH 症候群（AA-PNH）3 名であった（図 1）。

図 2. 造血障害, 溶血, PNH クローン量

	WBC (/ul)	Hb (g/dl)	PLT (x104/ul)	Ret (x104/ul)	L DH (IU/L)	PNH RBC (%)
PNH1	3900	9.6	13.6	17.3	1280	19
PNH2	4140	9.4	20	14.4	1017	36
AA-PNH1	7400	8	9.2	9.1	1050	59
AA-PNH2	3550	9.8	5.1	9.4	730	30
AA-PNH3	2920	7.3	14.1	6.1	176	2

AA-PNH3 以外は血管内容血が顕著であった (図 2)。血栓症の既往は認めなかった (data not shown)。造血障害を併発し (図 2)、さらに、顆粒球膜上の NKG2D リガンドを検出できたのは (図 3)、AA-PNH1 と AA-PNH2 の 2 名であった。造血障害の程度はいずれも軽症 (grade 1) であった。

図 3. 顆粒球膜上の NKG2D リガンド発現

	ULBP1	ULBP2	ULBP3	MICA/B
PNH1	-	-	-	-
PNH2	-	-	-	+
AA-PNH1	+	+	+	±
AA-PNH2	+	-	+	-
AA-PNH3	-	-	-	-

D. 考察

NKG2D リガンド膜発現細胞は自己リンパ球により速やかに傷害される。そのため、リガンド発現を血球膜上に検出した 2 名は、現在も血球傷害免疫機序が発動していることが示唆された。今後さらに年齢、性別、免疫抑制剤使用の有無など iPS 細胞作成に最適な条件を探る必要がある。

E. 結論

iPS 細胞樹立による PNH 造血障害モデル作成には、造血障害を有し免疫機序の関与が支持される AA-PNH1 または AA-PNH2 が良い候補患者と考えられた。

F. 健康危険情報

「該当なし」

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimanuki M, Sonoki T, Hosoi H, Watanuki J, Murata S, Mushino T, Kuriyama K, Tamura S, Hatanaka K, Hanaoka N, Nakakuma H: Acute Leukemia Showing t(8;22)(p11;q11), Myelodysplasia, CD13/CD33/CD19 Expression and Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangement. *Acuta Haematologica* 129:238-242, 2013

2) Shimanuki M, Sonoki T, Hosoi H, Watanuki J, Murata S, Kawakami K, Matsuoka H, Hanaoka N, Nakakuma H: Molecular Cloning of IGλ Rearrangements using Long Distance Inverse-PCR (LDI-PCR). *Eur J Haematol* 90:59-67, 2013

3) Hanaoka N, Murakami Y, Nagata M, Horikawa K, Nagakura S, Yonemura Y, Murata S, Sonoki T, Nakakuma H: Occupancy of whole blood cells by a single PIGA-mutant clone with HMGA2 amplification in a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria patient having blood cells with NKG2D ligands. *Br J Haematol* 160:114-6, 2013

4) Kurimoto M, Matsuoka H, Hanaoka N, Uneda S, Murayama T, Sonoki T, Nakakuma H: Pretreatment of leukemic cells with low-dose decitabine markedly enhances the cytotoxicity of gemtuzumab ozogamicin. *Leukemia* 27:233-258, 2013

2. 学会発表

「該当なし」

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

「該当なし」

2. 実用新案登録

「該当なし」

3. その他

「該当なし」

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
菅野 仁	非免疫性溶血性貧血を対象とした診断システムの構築	山田 俊幸	臨床検査	医学書院	東京	2014	327-335
菅野 仁	ピリミジン5'-ヌクレオチダーゼ異常症	田村 和夫	日本臨床別冊血液症候群	日本臨床社	大阪	2013	311-313
菅野 仁	アデニル酸キナーゼ異常症	田村 和夫	日本臨床別冊血液症候群	日本臨床社	大阪	2013	308-310
菅野 仁	アデノシンデアミナーゼ過剰産生症	田村 和夫	日本臨床別冊血液症候群	日本臨床社	大阪	2013	306-307
菅野 仁	アルドラーゼA異常症	田村 和夫	日本臨床別冊血液症候群	日本臨床社	大阪	2013	278-281
菅野 仁	ヘキソキナーゼ異常症	田村 和夫	日本臨床別冊血液症候群	日本臨床社	大阪	2013	274-277
菅野 仁	三炭糖リン酸イソメラゼ異常症	田村 和夫	日本臨床別冊血液症候群	日本臨床社	大阪	2013	271-273

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inoue-Yokoo T., <u>Tani K.</u> , Sugiyama D.	Mesodermal and hematopoietic differentiation from ES and iPS cells.	Stem Cell Rev.	9	422-434	2013
Liao J., Marumoto T., Yamaguchi S., Okano S., Takeda N., Sakamoto C., Kawano H., Nii T., Miyamoto S., Nagai Y., Okada M., Inoue H., Kawahara K., Suzuki A., Miura Y., <u>Tani K.</u>	Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells.	Mol Ther.	21	1242-12450	2013
Kurita R., Suda N., Sudo K., Miharada K., Hiroshima T., Miyoshi H., <u>Tani K.</u> , Nakamura Y.	Establishment of immortalized human erythroid progenitor cell lines able to produce enucleated red blood cells.	PLoS ONE	8	E59890	2013

Hiramoto T., Ebihara Y., Mizoguchi Y., Nakamura K., Yamauchi K., Ueno K., Nariai N., Mochizuki S., Yamamoto S., Nagasaki M., Furukawa Y., Tani K., Nakauchi H., Kobayashi M., Tsuji K.	Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells.	Proc Natl Acad Sci USA	110	3023-3028	2013
Inoue H., Tani K.	Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments.	Cell Death and Differentiation	21	39-49	2014
Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T.	B cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID.	Int J Hematol	98	355-360	2013
Ishimura M, Yamamoto H, Mizuno Y, Takada H, Goto M, Doi T, Hoshina T, Ohga S, Ohshima K, Hara T.	A non-invasive diagnosis of histiocytic necrotizing lymphadenitis by means of gene expression profile analysis of peripheral blood mononuclear cells.	J Clin Immunol	33	1018-1026	2013
Imagawa T, Nishikomori R, Takada H, Takeshita S, Patel N, Kim D, Lheritier K, Heike T, Hara T, Yokota S.	Safety and efficacy of canakinumab in Japanese patients with phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndrome as established in the first open-label, phase-3 pivotal study (24-week results).	Clin Exp Rheumatol.	31	302-309	2013
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.	11	41	2013

Tsuzuki S, Akahira-Azuma M, Kaneshige M, Shiga K, Hosokawa S, Kanno H, Matsushita T.	A Japanese neonatal case of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency presenting as severe jaundice and hemolytic anemia without apparent trigger.	Springerplus.	2	434	2013
Akizawa Y, Kanno H, Kawamichi Y, Matsuda Y, Ohta H, Fujii H, Matsui H, Saito K.	Enhanced expression of myogenic differentiation factors and skeletal muscle proteins in human amnion-derived cells via the forced expression of MYOD1.	Brain Dev.	35	349-355	2013
Shimanuki M, Sonoki T, Hosoi H, Watanuki J, Murata S, Mushino T, Kuriyama K, Tamura S, Hatanaka K, Hanaoka N, Nakakuma H	Acute Leukemia Showing t(8;22)(p11;q11), Myelodysplasia, CD13/CD33/CD19 Expression and Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangement.	Acuta Haematologica	129	238-242	2013
Shimanuki M, Sonoki T, Hosoi H, Watanuki J, Murata S, Kawakami K, Matsuoka H, Hanaoka N, Nakakuma H	Molecular Cloning of IGA Rearrangements using Long Distance Inverse-PCR (LDI-PCR).	Eur J Haematol	90	59-67	2013
Hanaoka N, Murakami Y, Nagata M, Horikawa K, Nagakura S, Yonemura Y, Murata S, Sonoki T, Nakakuma H	Occupancy of whole blood cells by a single PIGA-mutant clone with HMGA2 amplification in a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria patient having blood cells with NKG2D ligands.	Br J Haematol	160	114-116	2013
Kurimoto M, Matsuoka H, Hanaoka N, Uneda S, Murayama T, Sonoki T, Nakakuma H	Pretreatment of leukemic cells with low-dose decitabine markedly enhances the cytotoxicity of gentuzumab ozogamicin.	Leukemia	27	233-258	2013
Sugiyama D, Kulkeaw K and Mizuochi C.	TGF-beta-1 up-regulates extra-cellular matrix production in mouse hepatoblasts.	Mech Dev.	130	195-206	2013

Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai ML, and <u>Sugiyama D.</u>	Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells.	Stem Cell Res Ther.	4	71	2013
Hikosaka K, Ikutani M, Shito M, Kazuma K, Gulshan M, Nagai Y, Takatsu K, Konno K, Tobe K, <u>Kanno H</u> , Nakagawa T.	Deficiency of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 3 (Nmnat3) causes hemolytic anemia by altering the glycolytic flow in mature erythrocytes.	J Biol Chem.			2014
Kobayashi Y, Hattai Y, Ishiwatari Y, <u>Kanno H</u> , Takei M.	Human parvovirus B19-induced aplastic crisis in an adult patient with hereditary spherocytosis: a case report and review of the literature.	BMC Res Notes.	7		2014
Viprakasit Ekwattanakit Riolveang Chalaow N, Fisher C, Lower K, <u>Kanno H</u> , Tachavanich K, Bejrachandra Saipin Juntharaniyom M, Sanpakit K, Tanphaichitr VS, Songdej D, Babbs C, Gibbons RJ, Philipsen S, Higgs DR.	Mutations in Kruppel-like factor 1 cause transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression.	Blood	123	1586-1595	2014
Swain A, Inoue T, Tan KS, Nakanishi Y, and <u>Sugiyama D.</u>	Intrinsic and Extrinsic Regulation of Mammalian Hematopoiesis in the Fetal Liver.	HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY	-	in press	2014
Inoue, T. Kulkeaw, K. Muennu, K. Tanaka, Y. Nakanishi, Y. and <u>Sugiyama, D.</u>	The herbal drug ninjin'yoeito accelerates myelopoiesis but not erythropoiesis in vitro.	Genes to Cells.	-	in press	2014

Yamaguchi S., Marumoto T., Nii T., Kawano H., Liao J., Nagai Y., Okada M., Takahashi A., Inoue H., Sasaki E., Fujii H., Okano S., Ebise H., Sato T., Suyama M., Okano H., Miura Y., Tani K.	Characterization of common marmoset dysgerminoma like tumor induced by lentiviral expression of reprogramming factors.	Cancer Sci.	105	402-408	2014
Nii T., Marumoto T., Kawano H., Yamaguchi S., Liao J., Okada M., Sasaki E., Miura Y., Tani K.	Analysis of essential pathways for self-renewal in common marmoset embryonic stem cells.	FEBS Open Bio	-	in press	2014
Narusawa M., Inoue H., Sakamoto C., Matsumura Y., Takahashi A., Inoue T., Watanabe, Miyamoto S., Miura M., Hijikata Y., Tanaka Y., Inoue M., Takayama K., Okazaki T., Hasegawa M., Nakanishi Y., and Tani K.	TLR7 ligand augments GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells.	Cancer Immunology Research	-	In press	2014

今月の特集 1 検査で切り込む溶血性貧血

非免疫性溶血性貧血を対象とした診断システムの構築

菅野 仁

臨 床 検 査

第 58 卷 第 3 号 別刷

2014 年 3 月 15 日 発行

医学書院

非免疫性溶血性貧血を対象とした 診断システムの構築

Recent progress in laboratory diagnosis of non-immune hemolytic anemia

かの の ひとし
菅野 仁¹⁾

[臨床検査 58 : 327-335, 2014]

Point

- 直接抗グロブリン試験(DAT), 赤血球表面マーカー検査(CD55/CD59), 赤血球表面 IgG 分子数測定検査による免疫性溶血性貧血を否定する.
- 家族歴の聴取, 赤血球像の観察を実施する.
- 溶血性貧血の診断基準に基づき, 貧血と黄疸を伴うが溶血を主因としないほかの疾患として, 特に骨髄異形成症候群(MDS)と先天性赤血球異形成貧血(CDA)については骨髄像を検討する.
- 赤血球 EMA 結合能検査は, 赤血球膜異常症の診断に必須の項目である.
- 今後は網羅的で迅速な遺伝子検査の導入が不可欠となる.

Keywords

赤血球酵素異常症, 不安定ヘモグロビン症(UHD), 遺伝性球状赤血球症(HS)

はじめに

筆者らは, 一般臨床検査にて診断を確定することが困難な溶血性貧血症例を対象とした特殊検査, 特に赤血球酵素異常症に関する遺伝学的検査を実施している. 赤血球酵素異常症は解糖系, ペントースリン酸経路, グルタチオン生合成・還元系, ヌクレオチド代謝系などの酵素遺伝子変異によって生じる先天性溶血性貧血の一型である.

筆者らが主として対象としている赤血球酵素異常症は, 赤血球膜骨格蛋白の異常によって生じる遺伝性球状赤血球症(hereditary spherocytosis; HS)などの膜異常症とは異なり, 通常赤血球形態には大小不同などの非特異的異常以外認められな

いことから, 先天性非球状赤血球性溶血性貧血(congenital non-spherocytic hemolytic anemia; CNSHA)と称されている. このCNSHAのなかには赤血球酵素異常症以外に不安定ヘモグロビン症(unstable hemoglobin disease; UHD)が含まれ, さらに溶血性貧血以外の鑑別疾患として骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome; MDS)や先天性赤血球異形成貧血(congenital dyserythropoietic anemia; CDA)などが挙げられる.

本稿では, 依頼元の各医療機関や臨床検査センターで赤血球形態異常を指摘されず, “非球状性”

1) 東京女子医科大学 輸血・細胞プロセッシング科 〒162-8666 東京都新宿区河田町 8-1