

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
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

「血液疾患 iPS細胞の機能解析と薬剤スクリーニング」

研究分担者 菅野 仁 東京女子医科大学 教授

## 研究要旨

解糖系酵素異常症のなかで最も頻度の高いピルビン酸キナーゼ(PK)異常症の日本人症例から iPS 細胞を樹立した。PK 異常症の最重症例では輸血依存性で造血幹細胞移植が必要となる場合があり、今後 iPS 細胞を利用した新規治療薬の開発が期待される。赤血球膜異常症の一型で、脾臓摘出が禁忌である遺伝性有口赤血球症 (Dehydrated Stomatocytosis) の一例について、*PIEZO1* 遺伝子変異を同定した。先天性溶血性貧血との鑑別がしばしば困難である先天性赤血球異形成貧血 (Congenital Dyserythropoietic Anemia) の一例に *KLF1* 遺伝子変異を同定した。これらの先天性貧血症に関しては現在赤血球輸血以外安全な治療法は無いため、今後樹立される iPS 細胞を用いた病態解明および新規治療薬の開発が期待される。

## A . 研究目的

先天性溶血性貧血は赤血球膜、赤血球酵素、ヘモグロビンの構造異常・機能障害により赤血球寿命の短縮を来す単一遺伝子病である。最重症例を対象に造血幹細胞移植術の実施例が報告されているが、安全な根治療法は未だ存在しない。対症療法として赤血球輸血および脾臓摘出術(脾摘)が実施されるが、病型により脾摘が有効でない場合や脾摘後に血栓症を発症する場合もある。今回我々は疾患特異的iPS細胞を利用した病態解明や新規治療薬の開発を進めるために、最近本学で診断した、1)ピルビン酸キナーゼ(PK)異常症、2)先天性赤血球異形成貧血(CDA)4型、3) 遺伝性有口赤血球症 (Hereditary Stomatocytosis) の三症例に関して、遺伝学的検査による確定診断を実施し、iPS細胞樹立を試みたので報告する。

## B . 研究方法

全国の医療機関において先天性溶血性貧血と診断された症例についてインフォームド・コンセントを取得の上、末梢血を得た。九州大学病院GMP準拠分子・細胞調製センター(KU-MCPC)においてiPS細胞の樹立を行った。

## C . 研究結果

### 【症例1】3歳、女児

家族歴では特記事項無し。正産期にて出生し、day2に高ビリルビン血症を認めたため二日間の光線療法を受けた。各種検査より、遺伝性球状赤血球症(HS)、自己免疫性溶血性貧血、発作性夜間血色素尿症やその他の骨髄不全症は否定出来た。慢性溶血が持続したため、赤血球酵素活性を測定したところ、赤血球PK活性が5.7IU/gHb(基準値：13.0-18.5)と低下しており、PK異常症と診断した。

### 【症例2】36歳、女性

家族歴は特記すべきことなし  
出生直後から貧血の精査目的で半年間入院した(詳細不明)。6歳時に赤血球輸血を受けた。その後、貧血の診断のため、いくつかの医療機関を受診したが、原因不明で経過観察を受けていた。  
2009年に他院で実施された骨髄標本では、2核から4核の小型異型赤芽球が散見されていた。  
当院受診時赤血球数 297万/ $\mu$ L、Hb 8.7g/dL、Ht 27.4%、MCV92、Retics2%、白血球数8000/ $\mu$ L、血小板数31.4万/ $\mu$ L、赤血球形態では大小不同を認めた。赤血球膜表面積の定量検査であるeosin 5'-male-imide(EMA)結合能は軽度低下していた。  
ヘモグロビン分画ではHbF 21.9%(基準値1.0%以下)と著増を認めたが、HbA2 2.7%(基準値2-3.5%)は基準値内であった。不安定ヘモグロビンの検出検

査であるイソプロパノール試験は陰性であった。赤血球酵素活性の検討では、表1の通り、網赤血球増加を反映して全体に高値を示していたが、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素(6PGD)、グルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px) アデニル酸キナーゼ(AK)活性の低下が認められた。

胎児型から成人型へのヘモグロビンスイッチングが障害されていること、赤血球酵素活性では網赤血球増加に伴う活性上昇以外に、複数の赤血球酵素活性低下が認められ、さらに赤血球膜骨格蛋白の異常で観察される赤血球EMA結合能の低下をも認めることから、複数の赤血球発現蛋白遺伝子の発現低下が示唆された。

本例は名古屋大学小児科学教室の小島勢二教授との共同研究として、先天性溶血性貧血および骨髄不全症病因遺伝子網羅のシーケンシングを行い、KLF遺伝子変異c.973G>A(p.E325K)を同定した。患者はこの変異に関してヘテロ接合体であった。

表1.赤血球酵素活性

	基準値	[症例2]
HK	1.08-1.46	3.17
GPI	57.2-70.3	101
PFK	14.1-20.0	14.9
ALD	2.62-6.30	8.89
TPI	1052-1567	2079
PGK	264-326	387
ENOL	3.89-6.30	18.8
PK	13.0-19.8	63.7
G6PD	7.61-9.81	11.2
6PGD	9.00-10.7	7.08
GSH-Px	37.2-51.4	31.1
AK	165-307	105
ADA	0.87-1.59	6.28
Ach-E	28.6-42.7	37.7
P5N (CMP)*	6.90-10.8	13.6
P5N (UMP)*	9.75-15.5	18.8

AGLT	30min<	30min<
GSH**	65.9-88.5	81.7
イソプロパノール試験	-	-
EMA 結合能***	46.6-57.5	44.9

赤は基準値より上昇、青は減少を示す

IU/gHb,\* μmolePi liberated/hr/gHb,\*\*mg/dl RBC,

\*\*\*mean channel fluorescence

### 【症例3】33歳、女性

家族歴では、特記することなし

1982年、36週で帝王切開により出生。生下時胎児腹水、肝脾腫を認めた。4~5歳時に感冒を契機に溶血発作を起こし輸血を受けた。

赤血球は大球性で、赤血球浸透圧抵抗亢進を認める他は専門医療機関で受けた赤血球酵素・ヘモグロビン・膜蛋白の解析では何れも異常を認めず、病型は未確定のまま成人になった。

24歳時に診断未確定のまま脾摘を受けた後、門脈血栓症を併発し、抗凝固療法を開始。26歳時に二次性鉄過剰症による糖尿病に対してインスリン治療、続いて除鉄療法が開始された。30歳時には、先天性赤血球異形成貧血(Congenital Dyserythropoietic Anemia)1型、2型の責任遺伝子であるCDAN1とSEC23Bの遺伝子検査を受けたが、異常を認めなかった。33歳時に当院受診。末梢血塗抹標本で有口赤血球が目立ち、胎児腹水の既往があること、MCVが大きくEMA結合能が高値で赤血球表面積の増大が指摘されたことなどから、遺伝性有口赤血球症の1型である、Dehydrated Stomatocytosis(DHSt)が疑われた。DHStの責任遺伝子PIEZO1の遺伝子検査を実施したところ、Exon51内に海外で既報告の遺伝子変異(c.7479-7484dupGGAGCT, p.E2496ELE)を認めため、DHStと確定診断出来た。

### D. 考察

先天性溶血性貧血の約70%を占める遺伝性球状赤血球症(HS)は脾摘によりほぼ溶血所見が消失するが、残りの病型に関しては未だ脾摘の適応について、症例毎の判断になっている。

PK異常症では脾摘が有効で平均2g/dL程度のHb増加を認めるが、貧血の病態の一部に無効造血の関与が明らかになっており、Hbレベルが改善しても二次性鉄過剰症によるQOL低下が著しい症例も存在する。

CDAは溶血性貧血と鑑別すべき疾患であり、従来骨髓所見によってのみ鑑別診断が可能であった。近年CDA1～4型に原因遺伝子が同定され、遺伝子レベルでの確定診断が可能となった。この疾患も無効造血疾患であり、脾摘の効果は無いと考えられる。遺伝性有口赤血球症は赤血球膜異常症の一種であるが、さらに数種のサブタイプがあり、なかでも今回の症例3の病歴が示すように、DHStは脾摘が禁忌とされており、静脈血栓症や鉄過剰症などの合併により、著しいQOL低下が生じる。

遺伝子解析技術の進歩により稀少遺伝子疾患の原因遺伝子が次々と明らかにされる中で、先天性溶血性貧血の病型診断においても効率よく遺伝子検査を行い、早期に診断を確定することが、適正な治療の選択と患者の予後改善に重要である。

当院では溶血性貧血の病型診断のため赤血球膜・酵素、ヘモグロビンの生化学的検査を行っているが、診断未確定の症例に対しては、溶血性貧血の原因候補遺伝子60種ほどについてTarget capture sequence法による網羅的検査を準備している。稀少遺伝子疾患の集約的検査について、全国の医療機関への周知も必要と考えられた。

## E . 結論

本研究により、PK異常症（症例1）のiPS細胞は樹立が成功しており、CDA（症例2）は現在樹立中、DHSt（症例3）についても近々樹立を開始する予定となっている。これらの疾患については、生化学的、生物学的な診断法に加えて、それぞれに対する病因遺伝子変異解析が確定診断のツールとして利用可能となってきた。

来年度以降はこれらの単一遺伝子疾患症例由来のiPS細胞由来の造血幹細胞～赤芽球を用いて、新規治療薬のスクリーニングが可能になると考えられる。

## F . 健康危険情報

総括研究報告書へ記載

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Viprakasit V, Ekwattanakit S, Riolveang S, Chalaow N, Fisher C, Lower K, Kanno H, Tachavanich K, Bejrachandra S, Saipin J, Juntharanyom M, Sanpakit K, Tanphaichitr VS, Songdej D, Babbs C, Gibbons RJ, Philipsen S, Higgins DR. Mutations in Kruppel-like factor 1 cause transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression. *Blood*. 2014;123:1586-1595.
- 2) 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; 289:14796-14811.
- 3) 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; 11:137.
- 4) 守屋友美、岡本好雄、小林博人、松田和樹、久保田友晶、緒方康貴、及川美幸、李舞香、木下明美、青木貴子、千野峰子、岡田真一、高源ゆみ、青木正弘、中林恭子、今野マユミ、槍澤大樹、小倉浩美、菅野 仁。ABO血液型不適合腎移植におけるアルブミン製剤の必要性。日本輸血細胞治療学会誌2014;60:521-526
- 5) Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Sato-Otubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E. Loss of function mutation in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2015;168:854-864.
- 6) 岡本好雄、槍澤大樹、小林博人、小倉浩美、菅野 仁。自己血漿製剤という観点から見たCART。日本アフェレシス学会雑誌 2014; 33:178-184
- 7) 菅野 仁。先天性溶血性貧血の病型および鑑別診

断法の進歩と今後の課題.日本小児血液・がん学会雑誌 2014;51:446-451

## 2. 学会発表

1)青木貴子、市東正幸、小倉浩美、高橋秀弘、岩井朝幸、濱端隆行、渡邊健一郎、常松健一郎、奥野友介、村松秀城、吉田健一、宮野悟、大賀正一、小川誠司、小島勢二、菅野 仁 病因未確定の先天性溶血性貧血に対する全エクソーム解析. 日本人類遺伝学会第59回大会(2014年11月20日)

2)尾上佳子、石谷健、内山智貴、青木貴子、市東正幸、川上和之、松井英雄、林和彦、斎藤加代子、菅野 仁 イリノテカンによる重症下痢症を予測するPGxバイオマーカーとしてのCYP2F1遺伝子多型.

日本人類遺伝学会第59回大会(2014年11月20日)

3)神尾英則、神尾孝子、尾上佳子、市東正幸、青木貴子、内山智貴、亀岡信悟、斎藤加代子、菅野 仁 テガフル・ウラシル投与による肝機能障害を予測する新規PGxバイオマーカーの探索. 日本人類遺伝学会第59回大会(2014年11月20日)

4)Utsugisawa T, Uchiyama T, Ogura H, Aoki T, Ohara A, Ishiguro A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Elevated red cell reduced glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. 56th ASH Annual Meeting & Exposition, Blood 2014; 124(21):1342(abstract). (2014年12月6日)

5)市東正幸、青木貴子、槍澤大樹、小倉浩美、大賀正一、岩井朝幸、末延聡一、伊藤悦朗、奥野友介、小島勢二、小川誠司、菅野 仁 原因不明先天性溶血性貧血症例の全エクソーム解析による膜骨格蛋白遺伝子変異の同定. 第76回日本血液学会学術集会(2014年10月31日)

6)菅野 仁、青木貴子、市東正幸、槍澤大樹、小倉浩美 わが国におけるG6PD異常症の現状. 第76回日本血液学会学術集会(2014年10月31日)

7)菅野 仁 新生児・乳児期に発症する先天性溶血性貧血の病因と診断. 第24回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会(2014年6月13日)

8)槍澤大樹、岡本好雄、松田和樹、久保田友晶、守屋友美、及川美幸、李舞香、木下明美、千野峰子、岡田真一、高源ゆみ、青木正弘、中林恭子、今野マユミ、小林博人、小倉浩美、菅野 仁 安全なCARTの運用と適応拡大への新たな試み. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会(2014年5月15日)

9) 岡本好雄、松田和樹、久保田友晶、守屋友美、及

川美幸、李舞香、木下明美、千野峰子、岡田真一、高源ゆみ、青木正弘、中林恭子、今野マユミ、槍澤大樹、小林博人、小倉浩美、菅野 仁 クリオプレシピレート製剤の院内調製と心臓血管外科手術への応用. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会(2014年5月15日)

10) 久保田友晶、松田和樹、守屋友美、及川美幸、李舞香、木下明美、千野峰子、岡田真一、高源ゆみ、青木正弘、中林恭子、岡本好雄、今野マユミ、槍澤大樹、小林博人、小倉浩美、菅野 仁 非溶血性輸血副作用発生状況と副作用報告回収率改善への取り組み. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会(2014年5月15日)

11) 松田和樹、久保田友晶、守屋友美、及川美幸、李舞香、木下明美、千野峰子、岡田真一、高源ゆみ、青木正弘、中林恭子、岡本好雄、今野マユミ、槍澤大樹、小林博人、小倉浩美、菅野 仁 当院における静注用免疫グロブリン(IVIG)の使用状況について. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会(2014年5月15日)

12)槍澤大樹、岡本好雄、菅野 仁 安全なCARTの運用と低温保存腹水を用いた適応拡大への新たな試み.第35回日本アフェレシス学会学術集会ワークショップ(2014年9月27日)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3.その他  
なし