

CRISPR/Cas システムを用いたヒト疾患モデルマウスの作製

泰江 章博 徳島大学大学院医歯薬総合研究科口腔顎顔面矯正学 講師

研究要旨：次世代シーケンサーを用いたエクソームシーケンシング法により、従来の手法、すなわち連鎖解析を経てサンガー法といった解析では困難であった疾患原因遺伝子候補の探索が容易にになった。この方法で新規疾患原因遺伝子が続々と同定されてきているが、一方、規模の小さい家系特に患者数が1名の場合では、遺伝子変異と疾患発症の因果関係が明確でない場合が多数存在する。この場合遺伝子変異がヒトと同様の表現型を呈することを示すことが出来れば、新規のヒト疾患原因遺伝子同定のみならず、治療法開発に利用できるモデル作出となり、ヒト疾患の病態解明や治療法開発へと繋がることも期待できる。

そこで、今回我々は、近年開発の進む CRISPR/Cas システムを利用し、疾患を有する家系から検出された変異部位の配列破壊をマウスで行うことで、ヒト疾患関連遺伝子変異の検討を行った。

A. 研究目的

近年の次世代シーケンサーを用いたエクソームシーケンシングにより、新規疾患原因遺伝子が続々と同定されてきている。その一方で過去に疾患関連変異と報告されたものが単なる多型と判明した事例もある。

ヒト疾患原因遺伝子のほとんどは点突然変異であるが、相同遺伝子のヘテロマウスでは表現型として現れないことが殆どであるため、新規変異が検出された場合、家系の規模によっては疾患関連変異か多型かの区別は非常に困難である。実際、我々も、多数歯欠損症を有する小さな家系から疾患関連変異か多型かの識別困難な変異を *Msx1* 遺伝子の3'末端領域に検出していた。

一方、我々は、TALENが報告された直後より、これを用いた標的配列破壊をマウスにて着手しており、CRISPR/Casシステ

ムも併せ、高効率に遺伝子破壊マウスを作製してきた。そこで、今回、CRISPR/Cas システムを用いて同領域を破壊することで、疾患関連変異としての検証を行った。

本研究では、ヒト疾患原因遺伝子変異を CRISPR/Cas システムを中心としたゲノム編集技術によりマウスに導入することで、ヒト疾患を再現するだけでなく、その病態解明や治療法開発への足掛かりとなるものである。

B. 研究方法

非症候性多数歯欠損症家系の唾液サンプルからゲノムDNAを抽出し、歯牙欠損症の原因遺伝子として同定されている *Msx1*、*Pax9*、*EDA*、*Wnt10a*の全てのエクソンのシーケンスをサンガー法にて行ったところ、*Msx1* 遺伝子のエクソン2にフレームシ

フト変異を検出した。マウスMsx1遺伝子配列中、変異検出部位近傍に標的配列を設定し、マウス1細胞期胚においてマイクロインジェクションにてCRISPR/Casシステムを適用した。胎生16.5日に帝王切開にて胚を摘出し、Msx1ノックインマウス様表現型の確認、ならびにゲノムDNAを抽出し、標的配列のシーケンスを行った。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会ならびに徳島大学動物実験委員会の承認を得ており、その指針に従って本研究を遂行した。

C. 研究結果

歯牙欠損症を有する家系に、原因遺伝子の1つとして同定されていたMsx1に過去に報告のないフレームシフト変異が3'末端領域に検出された。本変異はMsx1遺伝子最下流のMH6領域に影響をあたえるため、同領域の5'側にgRNA標的配列を設定し、マイクロインジェクション法によるCRISPR/Casシステムを適用し、胎生16.5日に帝王切開にて胚を摘出したところ、12胚中6胚で口蓋裂ならびに歯の発生異常を認めた。またゲノムDNAを抽出し、標的配列部位のシーケンスを行った結果、表現型の認められた胚で配列異常を検出した。

D. 考察

近年の次世代シーケンサーの活用により、連鎖解析の適応不可能な規模の家系にもかかわらず多くの疾患関連変異が報告されているが、機能解析の困難なものもあるため、その真偽が疑わしいものも多数存在する。今回、多数歯欠損症を呈す家系の疾患関連遺伝子を探索したところ、既知原因遺伝子であるMsx1にフレームシフト変異

が検出された。しかし、転写因子であるMsx1遺伝子変異の過去における報告は、全てDNA結合領域であるホメオドメイン内かその上流で、今回検出されたフレームシフト変異は3'末端近傍であった。そこで、疾患関連変異を検証するため、それにより機能を失うMsx1タンパク質中最もC末端に存在する機能領域であるMH6に影響を及ぼすようgRNAを設定し、CRISPR/Casシステムをマウス1細胞期にて適用した。結果、Msx1ノックアウトマウス同様、口蓋裂ならびに歯の発生異常を認め、シーケンスによりMH6領域に影響を及ぼす変異が導入されていることも確認され、患者より検出された変異は疾患関連変異であることが示唆された。

これは、疾患関連変異であることの証明のみならず、CRISPR/Casシステムを用いることで、*in vitro*での機能解析が困難な場合、*in vivo*にて検証可能であることを示している。

今後、高IgE症候群患者より検出される疾患関連変異の検証をノックインマウス作製と併せ行っていく予定である。

E. 結論

患者から検出された変異により影響を受けるMsx1のC末端領域をCRISPR/Casシステムにより破壊することでMsx1ノックアウトマウス様の表現型が得られ、疾患関連変異である可能性が高いことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Highly efficient targeted mutagenesis in one-cell mouse embryos mediated by the TALEN and CRISPR/Cas systems. *Sci Rep* 2014; 4:5705. doi: 10.1038/srep05705.

2. 学会発表

Highly efficient targeted mutagenesis in one-cell mouse embryos mediated by TALEN and CRISPR/Cas systems. The X meeting for Spanish Society for Developmental Biology (SEBD), Oct 13-15, 2014, Madrid, Spain. (poster)

CRISPR/Cas システムによる *Pax6* 遺伝子破壊マウスの解析. 第 37 回日本分子生物学会, 11 月 25-27 日, 2014, パシフィコ横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

高 IgE 症候群に対する CRISPR/Cas9 を利用した新規治療法の開発

峯岸 克行 徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター 教授

高 IgE 症候群は、STAT3 のドミナントネガティブ変異が原因で発症する原発性免疫不全症である。黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍・肺炎と血清 IgE 値の著しい高値、アトピー性皮膚炎を特徴とする。原因遺伝子が同定され早期の確定診断が可能になったが、治療法は対症療法に限られ、肺嚢胞へのアスペルギルス感染症により生活の質が低下し、肺出血や脳塞栓により若年で死亡する症例が存在する。

ゲノム編集技術により、免疫不全症患者の細胞に DNA 2 重鎖切断を導入し、相同組換えを効率的に誘導する修復型遺伝子治療の実用化の可能性が示唆されている。高 IgE 症候群は片アレルのミスセンス変異により発症し、そのほとんどで正常アレルと変異アレルに 1 塩基しか差異は存在しない。そこで高 IgE 症候群にゲノム編集技術を応用するためには、1 塩基置換を識別し変異型 STAT3 アレルのみを選択的に切断するゲノム編集技術が必要である。一方で、これまでの検討により CRISPR/Cas9 は 3 塩基までの塩基置換が存在しても DNA 2 重鎖切断は誘導できると報告されている。そこで本研究では、高 IgE 症候群患者の各種の STAT3 の 1 塩基置換を CRISPR/Cas9 が変異アレルを特異的に切断できるかどうかを検討した。その結果約 80% の症例において、CRISPR/Cas9 により特異的な 2 重鎖切断の誘導が可能であることが明らかになった。

研究要旨

C. 研究の目的

高 IgE 症候群は、アトピー性皮膚炎・血清 IgE の著しい高値を呈し、高頻度に黄色ブドウ球菌による皮膚と肺の感染症を合併する原発性免疫不全症である。その原因が STAT3 遺伝子のドミナントネガティブ (dominant negative; DN) 変異であることが近年明らかになった。しかし、STAT3-DN 変異がどのようなメカニズムで高 IgE 症候群の臨床症状を発症するかは現時点ではほとんど明らかにされておらず、そのため本症には、対症療法以外の治療法は存在しない。本研究では、STAT3-DN 変異により発症する高 IgE 症候群をゲノム編集とくに CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic

repeat/CRISPR associated 9) を利用して、新規の治療法を開発することを目的として研究を実施した。STAT3 変異が原因の高 IgE 症候群は片アレルのドミナントネガティブ変異が原因で発症する。90% 以上の症例において、1 塩基置換が原因であるため、これまでの報告では、2 塩基までの置換では off-target と認識されないことが多く 2 重鎖切断が誘発できない CRISPR/Cas9 が、高 IgE 症候群の原因遺伝子変異である 1 塩基置換を識別して 2 重鎖切断が誘導できるかを検討した。

B. 研究方法

CRISPR/Cas9 が 1 塩基置換を区別して正常 STAT3 アレルは切断せず、変異 STAT3 ア

レルのみに2重鎖切断を誘導できるかどうかを検討した。この目的で、CRISPR/Cas9による2重鎖切断を検出するレポーターアッセイを確立した。蛍光タンパク GFP (green fluorescence protein) の遺伝子を482bpの重複配列を持つ2つの領域に分割し、この間に正常または高IgE症候群の原因突然変異を有するSTAT3アレルを挿入したレポーターコンストラクトを作成した。分割された2つのGFP遺伝子間に2重鎖切断を誘導すると遺伝子の相同組換えに類似したsingle strand annealingによりGFPタンパクが発現し、その蛍光が検出できるようになる。このとき、陰性コントロールとしてはガイドRNAを発現せずCas9タンパクのみ発現するもの、陽性コントロールとしてはSTAT3アレルの変異と無関係に正常アレルも変異アレルも切断するガイドRNAを有するCRISPR/Cas9を用いた。変異アレルを特異的に切断するガイドRNAをGN_{20/19}-NGG; NGG=PAM; Protospacer adjacent motif)のCRISPRのガイドRNAの基本的設計方針に従って作成した。DsRed express 発現ベクターと一緒に遺伝子導入し、フローサイトメーターにより蛍光を検出して定量的検討を行った。

C. 研究結果

1. PAM配列による切断可能変異配列の制限に関する検討

現在ほとんどの研究者が使用しているCRISPR/Cas9は溶血性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 由来のもので、これによる2重鎖切断の誘導には、ゲノム上のPAM配列(NGGまたはNCC)がガイドRNAの直後に必要である。すなわちSTAT3の遺伝子変異の20bp以内にPAM配列が存在しないとその変異アレルを特異的に切断するCRISPR/

Cas9のガイドRNAを設計することは出来ない。高IgE症候群の変異には3個のホットスポットが存在し、その3カ所のアミノ変異が全体の症例の約3分の2を占める。3個のホットスポットは、エクソン13, 16, 21に存在し、この3個のエクソンで全体の変異の約60%、計30個を占める。このため、まずこの30個の遺伝子変異を検討対象とすることとした。30個の変異の内1個(T389I)の変異に関してはその近傍にPAM配列が存在せず、この変異に対するガイドRNAを設計することが不可能であった。今後の検討により自由度の高いPAM配列が選択可能なCas9タンパクの改良が望まれる。

2. 変異特異的ガイドRNAによる特異的2重鎖切断の誘導

正常と変異STAT3アレルを有するsplit GFPレポーターを利用して、変異アレル特異的2重鎖切断のレポーターアッセイを実施した。複数のガイドRNAが設計可能な場合には、これまでの報告に基づいて変異の位置がPAMの近傍になるようにガイドRNAを設計した。この変異特異的ガイドRNAを有するCRISPR/Cas9の2重鎖切断活性を正常STAT3アレルと変異STAT3アレルを有するsplit GFPレポーターで検討した。ガイドRNAを有さない陰性コントロールの2重鎖切断活性を0%、陽性コントロールの切断活性を100%とした。

この検討を30個のエクソン13, 16, 21に存在する高IgE症候群の原因遺伝子変異に対して行った。そのうちの5個で、効率的で特異的な切断があられた。今回の検討では効率的2重鎖切断は陽性コントロールの75%以上の活性と定義した。特異的2重鎖切断は正常アレルの切断効率に対し

て変異アレルの切断効率が4倍以上と定義した。残りのものでは、20個が切断活性は有するものと特異性が低く、残りの5個ではいずれのアレルに対しても切断活性が認められなかった。

3. 特異的2重鎖切断効率上昇のためのガイドRNAの設計の検討

1塩基置換を検出して2重鎖切断を特異的に誘導するガイドRNAの設計はランダムなガイドRNAの設計では困難であることが明らかになった。そこで、まず設計可能なガイドRNAをすべて作成し、その2重鎖切断活性をスクリーニングする方法を検討した。ホットスポット変異であるR382Qを特異的に切断するガイドRNAは6個設計することが可能であった。その全ての2重鎖切断活性を検討するとその1個のみにおいて変異アレルを特異的に切断することが可能になった。同様の方法で、8個のSTAT3の変異アレルが特異的に切断可能となった。

さらに、最近の報告でガイドRNAの長さを20merから18merまたは17merに短縮すると特異性が上昇するとの報告があった。そこで、20merで特異性が得られなかったものに対して、ガイドRNAの長さを短縮させると、特異性が向上することが明らかになった。

D. 考察

STAT3のドミナントネガティブ変異により発症する高IgE症候群は、そのほとんどが片アレルの1塩基置換により発症する点に特徴がある。肺嚢胞を合併した一部の患児は、アスペルギルスの感染症を合併し重篤な経過をとり、感染症の制御を目的にして骨髄移植が必要になる症例も存在し、新

規の治療法開発が必要である。そこで、CRISPR/Cas9によるゲノム編集により変異アレルを特異的にゲノム編集することを利用した新規治療法の樹立を試みた。その結果、多くの症例において疾患の原因となる1塩基置換を特異的に認識して2重鎖切断を導入することが可能であることが明らかになった。この治療法をより多くの症例に対して実現可能にしていくためには、特異性の向上、切断効率の向上、変異の近傍に適切なPAM配列が存在しない場合の対策が必要になることが明らかになったものの、約80%の症例に対して、CRISPR/Cas9により変異アレル特異的2重鎖切断の導入が可能であった。

H. 結論

STAT3のドミナントネガティブ変異により発症する高IgE症候群は、そのほとんどが片アレルの1塩基置換により発症する。肺嚢胞を合併した一部の患児は、アスペルギルスの感染症を合併し重篤な経過をとり、感染症の制御を目的にして骨髄移植が必要になる症例も存在する。本症の予後の改善を目的としてCRISPR/Cas9によるゲノム編集により変異アレルを特異的に破壊する方法の確立を試みた。その結果、大部分の症例において、疾患の原因となる1塩基置換を特異的に認識して2重鎖切断の導入が可能であることが明らかになった。今後は、2重鎖切断を遺伝子修復につなげていく研究が必要である。

I. 研究発表

1. 学会発表

1. Yoshiyuki Minegishi “Molecular pathogenesis of hyper IgE syndrome “ The

- third Bizan Immunology symposium Feb 13-14, 2014 Tokushima
2. Saito M, Karasuyama H, Minegishi Y, “A molecular mechanism underlying atopic dermatitis in hyper-IgE syndrome” American Academy of Allergy Asthma Immunology Feb28-March 4th, 2014, San Diego, USA
 3. Wada T, Saito M, Nishikawa Y, Minegishi Y Analysis of the mechanisms of the susceptibility to staphylococcus infection in a mouse model of Hyper-IgE syndrome. The 43rd Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology 2014. 12.10-12.12, Kyoto
 4. 第 10 回京都臨床アレルギー研究会 2014 年 2 月 19 日高 IgE 症候群の病因と病態の解明
 5. 第 21 回日本免疫毒性学会学術年会 2014.9.11 徳島文理大学・国際会議場 教育講演 高 IgE 症候群の病因と病態の解明
 6. 峯岸克行 ヒト遺伝性アレルギー疾患「高 IgE 症候群」の発症機構の解明とその制御 第 3 回 CREST 免疫機構領域シンポジウム 2014.10.8 東京医科歯科大学
 7. Specific DSB induction to *STAT3* mutations by CRISPR/Cas9. Minegishi S, Urabe K, F Inoue, Y Minegishi. Keystone symposium “Precision Genome Engineering and Synthetic Biology, Jan 11-16, 2015, Big Sky MN, USA
 8. Nishikawa Y, Minegishi Y Dysregulation of IgE homeostasis in hyper-IgE syndrome The third Bizan Immunology symposium Jan 29-30, 2015 Tokushima
2. 論文発表
1. Nishikawa Y, Nishijima H, Matsumoto M, Morimoto J, Hirota F, Takahashi S, Luche H, Fehling HJ, Mouri Y, Matsumoto M. Temporal Lineage Tracing of Aire-Expressing Cells Reveals a Requirement for Aire in Their Maturation Program. *J Immunol.* 192, 2585-2592, 2014,
 2. Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. Simple diagnosis of *STAT1* gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J Leukoc Biol.* 95, 667-676, 2014
 3. 峯岸克行 高 IgE 症候群の病態形成メカニズム 炎症と免疫 22, 18-62, 2014
 4. 峯岸克行 原発性免疫不全症の原因遺伝子探索の新展開 医学のあゆみ 第 1 土曜特集 ヒト免疫学の新機軸 252, 5-9, 2015
 5. 峯岸克行 高 IgE 症候群 臨床免疫アレルギー科 63, 251, 2015

H. 知的財産権の出願登録状況
該当なし

Ⅲ 学会等発表実績

委託業務題目 『高 IgE 症候群の病因・病態解明と新規治療法開発』

機関名 徳島大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表 題目、口頭・ポスタ ー発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会 等名）	発表した時 期	国内・国外の別
Molecular pathogenesis of hyper IgE syndrome 口頭発表	Minegishi Y	The third Bizan Immunology symposium, Tokushima, Japan	2014. 2. 14	国内
A molecular mechanism underlying atopic dermatitis in hyper-IgE syndrome ポスター発表	Saito M, Karasuyama H, Minegishi Y	American Academy of Allergy Asthma Immunology, San Diego, USA	2014. 2. 28	国外
Analysis of the mechanisms of the susceptibility to staphylococcus infection in a mouse model of Hyper-IgE syndrome. ポスター発表	Wada T, Saito M, Nishikawa Y, Minegishi Y	The 43 rd Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology, Kyoto, Japan	2014. 12. 12	国内
高 IgE 症候群の病因 と病態の解明 口頭発表	峯岸克行	第 10 回京都臨床ア レルギー研究会 京 都	2014. 2. 19	国内
高 IgE 症候群の病因 と病態の解明 口頭発表	峯岸克行	第 21 回日本免疫毒 性学会学術年会 徳 島	2014. 9. 11	国内
ヒト遺伝性アレルギー 疾患「高 IgE 症候 群」の発症機構の解明 とその制御 口頭発表	峯岸克行	第 3 回 CREST 免疫 機構領域シンポジウ ム 東京	2014. 10. 8	国内

Specific DSB induction to <i>STAT3</i> mutations by CRISPR/Cas9 ポスター発表	Minegishi S, Urabe K, Inoue F, Minegishi Y	Keystone symposium “Precision Genome Engineering and Synthetic Biology, Big Sky MN, USA	2015. 1. 13	国外
Dysregulation of IgE homeostasis in hyper-IgE syndrome 口頭発表	Nishikawa Y, Minegishi Y	The third Bizan Immunology symposium, Tokushima, Japan	2015. 1. 29	国内
Excessive Nitric Oxide production of CGD neutrophils induces the down-regulation of <i>NOS3</i> and <i>EDNI</i> expression in human endothelial cells	Akari N. Utsunomiya, M Tsumura, NOhno, M Miki, H Kawaguchi, K Nakamura and M Kobayashi	The 56 th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA	2014. 12. 9	国外
<i>STAT1</i> gain-of-function in patients with chronic mucocutaneous candidiasis can be detected by the excessive phosphorylation of STAT1 in peripheral blood monocytes	Y Mizoguchi, S Okada, M Tsumura, O Hirata, S Minegishi, Jean-Laurent Casanova, T Morio, M Kobayashi	The 56 th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA	2014. 12. 9	国外
Significant augmentation of regulatory T cells in early neonatal period	S Hayakawa, S Maeno, N Ohno, S Okada, Y Nishimura, M Hayashidani, M Kobayashi	16 th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Prague, Czech	2014. 10. 29	国外

Early elimination of Factor VIII inhibitor by ITI with high dose immunoglobulin in hemophilia A children	Y Mizoguchi, A Furue, I Chijimatsu, M Miki, K Tomioka, N Konishi, A Ono, H Kawaguchi, K Nakamura and M Kobayashi	WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA World Congress, Melbourne	2014. 5. 15	国外
Wiskott-Aldrich syndrome in a girl caused by heterozygous WASP mutation and extremely skewed X-chromosome inactivation: an association of non-random X-chromosome inactivation and uniparental isodisomy 6	Takada H, Takimoto T, Ishimura M, Urata M, Morio T, Hara T	16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Prague	2014. 10. 29	国外
Mutations in Bruton's tyrosine kinase impair IgA responses	Mitsuiki N, Yang X, Bartol S, Kosaka Y, Takada H, Imai K, Kanegane H, Mizutani S, Burg VD, Zeim MV, Ohara O, Morio T	16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Prague	2014. 10. 29	国外
Association between primary immunodeficiency diseases and vasculitis syndrome	Hara T, Ishimura M, Takada H, Kusuda Y, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H	16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Prague	2014. 10. 29	国外

Safety and tolerability of Hizentra in patients with primary immunodeficiency in Japan	Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Hara T, Rojavin M, Hu W, Hubsch A, Nonoyama S	16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Prague	2014. 10. 29	国外
Safety, Tolerability, and Efficacy of Hizentra in Japanese Patients with Primary Immunodeficiency over 48 Weeks	Imai K, Kanegane H, Yamada M, Takada H, Ariga T, Kobayashi M, Rojavin M, Bexon M, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T	American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, San Diego, USA	2014. 2. 28	国外
Health-related quality of life of Japanese patients with primary immunodeficiency diseases receiving IgPro20, a 20% liquid subcutaneous immunoglobulin (Hizentra)	Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Tsutani K, Igarashi A, Bexon M, Rojavin M, Kobayashi M, Lawo JP, Zbrozek A, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T	American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, San Diego, USA	2014. 2. 28	国外
An Early and Non-invasive Diagnostic Method for Histiocytic Necrotizing Lymphadenitis	Ishimura M, Mizuno Y, Takada H, Ohga S, Hara T	FISP/M, Fukuoka, Japan	2014. 8. 30	国内
ニューモシスチス肺炎を契機に X連鎖高IgM症候群と診断された生後5ヵ月男児例	荒畑 幸絵, 北澤 克彦, 本多 昭仁, 今井 耕輔, 小原 収	第46回日本小児感染症学会学術集会	2014. 10. 18	国内

Ras 関連 ALPS 様疾患 (RALD) 新規治療法開拓への展望	高木 正稔, 宮脇 零士, 小林千佳, 青木 由貴, 富澤 大輔, 今井 耕輔, 森尾 友宏, 水谷 修紀	第 117 回日本小児科学会学術集会	2014. 4. 11	国内
わが国の Fanconi 貧血患者における免疫学的検討	本間 健一, 満生 紀子, 釜江 智佳子, 今井 耕輔, 森尾 友宏, 金兼 弘和, 矢部 みはる, 村松 秀城, 小島 勢二, 野々山 恵章	第 117 回日本小児科学会学術集会	2014. 4. 11	国内
外胚葉形成不全を伴う免疫異常症 EDA-ID の兄妹例	山家 宏宣, 市川 由香里, 島裕子, 戸川 寛子, 辻 知見, 樋口 隆造, 野々山 恵章, 本間 健一, 釜江 智佳子, 今井 耕輔, 小原 収, 満生 紀子	第 117 回日本小児科学会学術集会	2014. 4. 11	国内
Wiskott-Aldrich syndrome に対する TPO 受容体作動薬の使用経験	小林千佳, 今井 耕輔, 松本和明, 青木由貴, 富澤大輔, 高木 正稔, 森尾友宏, 水谷修紀, 古市嘉行, 犬飼 岳史	第 117 回日本小児科学会学術集会	2014. 4. 11	国内

臍帯脱落遅延をみとめた原発性免疫不全症の2例	藤田基資、今井耕輔、小倉友美、佐藤一寿、辻田由喜、梶原伸介、子川和宏、野々山恵章	第117回日本小児科学会学術集会	2014. 4. 11	国内
ヒト遺伝性疾患の構造バイオインフォマティクス	土方敦司、小原收	第86回日本遺伝学学会	2014. 9. 19	国内
臨床研究のための疾患遺伝子解析パイプラインの構築	小原收	第56回日本人類遺伝学会	2014. 11. 20	国内
次世代シーケンサー(MiSeq)を用いた原発性免疫不全症の遺伝子解析	中山学、小田紘嗣、八角高裕、西小森隆太、平家俊男、小原收	第8回日本免疫不全症研究会学術集会	2015. 1. 24	国内
次世代シーケンサーを用いた原発性免疫不全症の迅速遺伝子診断法の確立	加藤環、釜江智佳子、野々山恵章、今井耕輔、小原收	第8回日本免疫不全症研究会学術集会	2015. 1. 24	国内
ドメイン単位での網羅的変異スクーニングによるタンパク質構造・機能ランドスケープの取得とそのミスセンス変異機能評価への応用	小原收、藤木亮次、土方敦司、岡田賢、小林正夫	第8回日本免疫不全症研究会学術集会	2015. 1. 24	国内
Highly efficient targeted mutagenesis in one-cell mouse embryos mediated by TALEN and CRISPR/Cas systems	Yasue A, Mitsui SN, Watanabe T, Sakuma T, Oyadomari S, Yamamoto T, Noji S, Mito T, Tanaka E.	The X meeting for Spanish Society for Developmental Biology (SEBD), Oct 13-15, 2014, Madrid, Spain	2014. 10. 13	国外
CRISPR/Cas システムによる <i>Pax6</i> 遺伝子破壊マウスの解析	泰江章博、田中栄二	第37回日本分子生物学会 横浜	2014. 11. 25	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した 時期	国内・国 外の別
Temporal Lineage Tracing of Aire-Expressing Cells Reveals a Requirement for Aire in Their Maturation Program	Nishikawa Y, Nishijima H, Matsumoto M, Morimoto J, Hirota F, Takahashi S, Luche H, Fehling HJ, Mouri Y, Matsumoto M	J Immunol. 192, 2585-2592	2014	国外
Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis	Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M	J Leukoc Biol. 95, 667-676	2014	国外
高 IgE 症候群の病態形成メカニズム	峯岸克行	炎症と免疫 22, 18-62	2014	国内
原発性免疫不全症の原因遺伝子探索の新展開	峯岸克行	医学のあゆみ 第1土曜特集 ヒト免疫学の新機軸 252, 5-9	2015	国内

高 IgE 症候群	峯岸克行	臨床免疫アレルギー科	2015	国内
Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis	Morishima T, Watanabe K, 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	Haematologica 99: 19-27	2014	国外
Compound heterozygosity in GPR56 with bilateral frontoparietal polymicrogyria	Fujii Y, Ishikawa N, Kobayashi Y, Kobayashi M, Kato M	Brain & Development 36: 528-31	2014	国外
Ictal electroencephalography and electromyography features in symptomatic infantile epileptic encephalopathy with late-onset spasms	Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Tajima G, Kobayashi M	Neuropediatrics 45: 36-41	2014	国外
A case of trisomy 18 with exacerbation of seizures triggered by administration of valproic acid	Kobayashi Y, Ishikawa N, Fujii Y, Nakamura K, Kobayashi M	Am J Med Genet A 164A: 285-6	2014	国外
Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis	Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S,	J Leukoc Biol. 95, 667-676	2014	国外

	Takahara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M			
Detection of <i>Mucor velutinosus</i> in a blood culture after autologous peripheral blood stem cell transplantation: a pediatric case report	Joichi Y, Chijimatsu I, Yarita K, Kamei K, Miki M, Onodera M, Harada M, Yokozaki M, Kobayashi M, Ohge H	Medical Mycology Journal 55: E43-48	2014	国外
A 2-year-old Japanese girl with TNF receptor-associated periodic syndrome: A case report of the youngest diagnosed proband in Japan	Yasumura J, Wago M, Okada S, Nishikomori R, Takei S, Kobayashi M	Modern Rheumatology	2014	国外
A pediatric case of peripheral polyneuropathy with IgM anti-GM1 antibody associated with a group A beta-hemolytic streptococcus infection	Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Samukawa M, Kusunoki S, Kobayashi M	Pediatric Neurology 51: 441-3	2014	国外
Increased interleukin-6 high-sensitivity C-reactive protein levels in pediatric epilepsy patients with frequent, refractory generalized motor seizures	Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Kobayashi M	Seizure 2014. 10.007	2015	国外
自己免疫性好中球減少症	小林正夫, 川口浩史	日本内科学会雑誌 103: 1639-1644	2014	国内

重症先天性好中球減少症の病態解析研究の進歩	溝口洋子, 小林正夫	血液内科 68: 676-81	2014	国内
小児血液疾患 よくわかる最新知見 好中球異常症の概要と診断の進め方	土居岳彦, 小林正夫	小児科 55: 1577-1583	2014	国内
IL-21 シグナルはナイーブB細胞を IL-2 感受性にして形質細胞に分化させる	岡田 賢, 小林正夫	血液内科 69: 405-409	2014	国内
同種骨髄移植が奏功した新規 ELANE 遺伝子変異を有する重症先天性好中球減少症	川口晃司, 内田佳子, 齋藤敦郎, 宮田憲二, 長谷川大一郎, 小坂嘉之, 岩田あや, 仁紙宏之, 小林正夫	臨床血液 55:2294-2299	2014	国内
Wiskott-Aldrich syndrome in a girl caused by heterozygous WASP mutation and extremely skewed X-chromosome inactivation: A novel association with maternal uniparental isodisomy 6	Takimoto T, Takada H, Ishimura M, Kirino M, Hata K, Ohara O, Morio T, Hara T	Neonatology 107, 185-190	2015	国外
Idiopathic disseminated bacillus Calmette-Guerin infection in three infants	Kido J, Mizukami T, Ohara O, Takada H, Yanai M	Pediatrics International (in press)	2015	国外
Kawasaki disease-specific molecules in the sera are linked to microbe-associated molecular patterns in the biofilms	Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H, Saito M, Tanaka T, Yamamura K, Sakai Y, Takada H, Miyamoto T, Mizuno Y, Ouchi K, Waki K, Hara T	PLoS One 9, e113054	2014	国外

Two Novel Gain-of-Function Mutations of STAT1 Responsible for Chroni Mucocutaneous Candidiasis Disease: Impaired Production of IL-17A and IL-22, and the Presence of anti-IL-17F Autoantibody	Yamazaki Y, Yamada M, Kawai T, Morio T, Onodera M, Ueki M, Watanabe N, Takada H, Takezaki S, Chida N, Kobayashi I, Ariga T:	J Immunol, 193, 4880-4887	2014	国外
Early progression of atherosclerosis in children with chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome	Yamamura K, Takada H, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Morihana E, Ohga S, Hara T	Rheumatology (Oxford), 53, 1783-7	2014	国外
Efficacy and safety of IgPro20, a subcutaneous immunoglobulin, in Japanese patients with primary immunodeficiency diseases	Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Hu W, Kobayashi M, Lawo JP, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T:	J Clin Immunol, 34, 204-11	2014	国外
Successful treatment of non-Hodgkin's lymphoma using R-CHOP in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome followed by a reduced-intensity stem cell transplant	Koga Y, Takada H, Suminoe A, Ohga S, Hara T	Pediatr Transplant, 18, E208-11	2014	国外
Hyper-IgE syndrome with a novel STAT3 mutation-a single center study from India	Saikia B, Suri D, Goel S, Rawat A, Minz RW, Gupta A, Sharma S, Ohara O,	Asian Pac J Allergy Immunol. 32,321-7	2014	国外

	Imai K, Nonoyama S, Sehgal S, Singh S			
Chronic Granulomatous Disease: Two Decades of Experience From a Tertiary Care Centre in North West India	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	J Clin Immunol 34,58-67	2014	国外
見逃しやすい免疫不全 ピンポイント小児医療 免疫系 overview 免疫 不全症との対応を含めて	今井 耕輔	小児内科 46:1454- 1458	2014	国内
Generating a transgenic mouse line stably expressing human MHC surface antigen from a HAC carrying multiple genomic BACs	Hasegawa Y, Ishikura T, Hasegawa T, Watanabe T, Suzuki J, Nakayama M, Okamura Y, Okazaki T, Koseki H, Ohara O, Ikeno M, Masumoto H	Chromosoma. 24: 107-18	2015	国外
Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations	Oda H, Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, Hijikata A, Nishikomori R, Funatsuka M, Ohshima Y, Sugawara Y, Yasumi T, Kato H,	Am J Hum Genet. 95(1):121-5	2014	国外