

201442043A

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等実用化研究事業

原発性免疫不全症候群の病態解明と
新規治療法開発への応用に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 野々山 恵章

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等実用化研究事業

原発性免疫不全症候群の病態解明と
新規治療法開発への応用に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 野々山 恵章

平成27(2015)年3月

本報告書は、厚生労働省の難治性疾患実用化研究事業による委託業務として、野々山恵章が実施した平成26年度「原発性免疫不全症候群の病態解明と新規治療法開発への応用に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等実用化研究事業

原発性免疫不全症候群の病態解明と
新規治療法開発への応用に関する研究

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

- 原発性免疫不全症候群の病態解明と新規治療法開発への応用に関する研究 ----- 1
野々山 恵章（防衛医科大学校小児科学講座）

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. Helper-dependent adenovirus/adeno-associated virus hybrid vectorを用いた
遺伝子修復療法の開発 ----- 15
原 寿郎（九州大学大学院医学研究院成長発達医学）
2. 慢性皮膚粘膜カンジダ症をきたすSTAT1新奇変異の同定と病態解析 ----- 18
有賀 正（北海道大学大学院医学研究科小児科学分野）
3. 「抗体産生不全症」の病態解明と新規治療法開発に関する研究 ----- 22
森尾 友宏（東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野）
4. 原発性免疫不全症に対する骨髄非破壊的造血幹細胞移植法の開発 ----- 27
今井 耕輔（東京医科歯科大学大学院小児・周産期地域医療学）
5. 22q11.2欠損症候群の免疫学的評価の意義に関する研究 ----- 32
小島 勢二（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学）
6. 新規C/EBP ϵ 変異を認めた好中球二次顆粒欠損症の病態解析と新規治療法開発
の可能性 ----- 38
谷内江 昭宏（金沢大学大学院医薬保健学総合研究科小児科）
7. 家族性血球貪食性リンパ組織球症のモデル細胞株作成と機能解析系の確立 ----- 42
平家 俊男（京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座発達小児科学）
8. 慢性皮膚粘膜カンジダ症患者におけるIL17RA遺伝子異常の同定とその解析 ----- 45
小林 正夫（広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科）
9. 慢性肉芽腫症の治療指針 -PEG-DAO酵素補充療法の可能性- ----- 49
布井 博幸（宮崎大学医学部生殖発達医学小児科学分野）

10.	細網異形成症患者由来iPS細胞を用いた病態解析 -----	51
	中畑 龍俊 (京都大学 iPS細胞研究所臨床応用研究部門)	
11.	高IgE症候群に対するCRISPR/Cas9を利用した新規治療法の開発 -----	57
	峯岸 克行 (徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター病態プロテオゲノム分野)	
12.	慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療の臨床研究 -----	61
	小野寺 雅史 (国立成育医療研究センター成育遺伝研究部)	
13.	XIAP欠損症に対する造血幹細胞移植に関する研究 -----	65
	金兼 弘和 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野)	
14.	恒常的活性化変異WASPによる先天性好中球減少症の分子病態解析 -----	68
	笹原 洋二 (東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座小児病態学分野)	
15.	原発性免疫不全症候群の遺伝子解析と疾患変異の機能解析に関する研究 -----	73
	小原 収 (かずさDNA研究所)	
16.	毛細血管拡張性運動失調症の病態解明と新規治療法開発への応用に関する研究 -----	77
	高木 正稔 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野)	
17.	IL-18リガンド受容体複合体タンパク立体構造情報を基盤とした抗IL-18薬の設計 に関する研究 -----	79
	加藤 善一郎 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)	
18.	小児炎症性疾患における血清マイクロRNA解析研究 -----	84
	石井 健 (医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト)	
19.	ICF (先天性免疫不全) 症候群の治療法開発のためのエピゲノム知見の獲得 -----	86
	久保田 健夫 (山梨大学医学部環境遺伝医学講座)	
20.	ゲノム編集を利用した哺乳類培養細胞での汎用的一塩基編集法の開発 -----	90
	山本 卓 (広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻分子遺伝学研究室)	
○	資 料 -----	93
	原発性免疫不全症合同班会議プログラム	
	学会における研究発表資料	
III.	学会等発表実績 -----	119
IV.	研究成果の刊行物・別刷 -----	139

I 委託業務成果報告（総括）

原発性免疫不全症の病態解明と新規治療法の開発に関する研究

業務主任者 野々山 恵章 防衛医科大学校小児科学講座 教授

研究要旨

原発性免疫不全症の疾患ごとの病態解明を行った。その際、ゲノム編集、次世代シーケンサーを用いた Exome 解析、網羅的な遺伝子変異体の機能解析、micro RNA 測定、全ゲノムメチル化解析、蛋白立体構造解析、疾患由来 iPS 細胞の樹立とその分化などの新規基礎医学技術も活用した。

得られた新規病態をもとに、遺伝子治療、新規薬剤の開発などの新規治療法の開発を行った。さらに、造血幹細胞移植の成績を検討し、より安全な移植法の検討も行った。以下に、研究成果を記載する。

ゲノム編集を利用した汎用的な一塩基編集法を確立するために、ターゲティングベクター中に組み込む最適な gRNA の結合サイトを Optimized CRISPR design する手法、TALEN を用いて HR により組み込んだ。薬剤選別によって、片アリルおよび両アリルにカセットを挿入した細胞株を得る手法を開発した。

次世代シーケンサーによる Exome 解析、網羅的な遺伝子変異体機能解析では、新規な遺伝子の変異による免疫不全症の発症原因を複数同定した。効率的に病原性の遺伝的素因を機能面から理解するために、網羅的アミノ酸置換スキニングが有用であることを示した。

血清マイクロ RNA 解析により原発性免疫不全症の診断、病態、治療のバイオマーカーになりうる事が示された。

網羅的エピゲノム解析を免疫不全症に応用する事で、メモリーB細胞が欠損する ICF 症候群の病態解明に迫った。

タンパク立体構造解析により得られた IL-18-IL-18R α -IL-18R β の 3 者複合体のタンパク立体構造情報を利用し、in Silico の薬剤候補シード化合物のスクリーニングが可能になり、免疫調整剤としての抗 IL-18 薬の開発に貢献した。

細網異形成症患者由来 iPS 細胞を用い、原因遺伝子 AK2 と、そのアイソエンザイムである AK1 には分化段階特異的にフィードバックループがあることが示された。

毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia (AT)由来 iPS 細胞を樹立し検討をした結果、ミトコンドリア膜電位の低下があることが明らかとなった。遺伝子治療開発に向けたベクターの構築をおこなった。PiggyBac transposon 型ベクターを基盤とし、PiggyBac transposase によりゲノムに組み込める形のベクターを作成した。

X連鎖性好中球減少症 (XLN) は WASP の常的活性化変異により発症するが、WASP は骨髓球系細胞の分化増殖に重要な遺伝子発現を調節する転写因子として機能すること、XLN を MDS と類似する病態と捉えられることが明らかとなった。

分類不能免疫不全症を Exome 解析し、Btk 異常が原因であるが B 細胞が存在する病態である症例を見出した。Jacobsen 症候群患者で低 γ グロブリン血症がある症例とない症例の Exome 解析と RNA seq を行い、5 遺伝子の違いがあることが判明した。

cell permeable peptide (CPP) を有する BTK を好中球、細胞株に投与し、BTK 変異により発症する X 連鎖無ガンマグロブリン血症 (XLA) の新規治療の開発の基礎データを得た。XLA の新規遺伝子治療の開発のために、Helper dependent adenovirus/ adeno associated virus hybrid vector を作製し、in vitro での効果を確認した。

好中球二次顆粒欠損症原因遺伝子 C/EBP ϵ について、変異型の転写活性化能、細胞内局在と DNA 結合能、蛋白質間相互作用を行い、病態を解析した。さらに、ヒストンのアセチル化酵素として知られる p300 が変異 C/EBP ϵ の転写活性を上げることを見出し、新規治療法の開発に繋がる所見を得た。

高 IgE 症候群が STAT3 遺伝子のドミナントネガティブ (dominant negative; DN) 変異である事を、近年明らかにした。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り、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。遺伝子修復による新規治療法の開発の基礎データとなった。

慢性肉芽腫症の新規治療として、炎症局所に集積性のある PEG 化した D-アミノ酸酸化酵素 (PEG-DAO) 製剤による治療について検討し、患者好中球内への活性酸素 (H_2O_2) の移行、CGD 患者好中球の St. aureus 殺菌能が回復することを明らかにした。また、造血幹細胞遺伝子治療を行い、遺伝子導入細胞は投与後 2 週間目より末梢血中でその存在を確認することができ、臨床的にも抗生剤に抵抗性を示すリンパ節膿瘍が改善した。

慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMC) において、STAT1 の新規変異 2 種同定し、その病態解析を行った結果、変異 STAT1 は野生型 STAT1 に影響を与え野生型 STAT1 の脱リン酸化障害をきたすことを示した。また、IL-17R α 変異による CMC 姉弟例例を見出し、IL17 α の細胞表面発現も低下していることを明らかにした。

家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL) 迅速診断としてフローサイトメトリー (FACS) を用いたスクリーニングを開発し、全症例で責任蛋白の発現低下が確認された。蛋白発現を安定化させるプロテオソーム阻害剤などが新規治療薬になり得ると考えられた。

22q11.2 欠損症候群の 26 症例の臨床症状、治療、転帰を評価した。その結果、19 例 (73%) の症例では免疫学的な評価が行われておらず、うち 1 例は CMV 肺炎で死亡した。免疫学的な評価が行われていた 7 例 (27%) のうち、異常を認めた 1 例は完全型 DiGeorge 症候群と診断された。救命のため臍帯血移植を行い、経過良好である。免疫学的なスクリーニングを徹底することを一般小児科医を対象に、広く啓蒙する必要があると考えられた。

XIAP 欠損症 5 例に対する造血幹細胞移植の経過を調査し、骨髄非破壊的前処置の選択と、移植前 HLH 寛解状態である点が移植成績を大きく改善する可能性が示された。

骨髄非破壊的前処置により造血幹細胞移植を行った 11 症例の解析を行った。11 例中 8 例は生着し、3 例で二次性生着不全となり、再移植、再々移植により 2 例で生着が得られた。STAT1 異常による重症慢性皮膚粘膜カンジダ症 1 例は生着不全から死亡したが、残り 10 例は全例生存している。Flu+Bu \pm ATG を用いた前処置は小児原発性免疫不全症に対して、より安全に施行可能な前処置であると考えられた。

業務主任者

野々山 恵章 防衛医科大学校医学教育部医学科小児科学講座 教授

担当責任者

原 寿郎 九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 教授

有賀 正 北海道大学大学院医学研究科小児科学分野 教授

森尾 友宏 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 教授

今井 耕輔 東京医科歯科大学大学院
小児・周産期地域医療学講座 寄付講座 准教授

小島 勢二 名古屋大学大学院医学系研究科小児科 教授

谷内江 昭宏 金沢大学医薬保健研究域医学系小児科 教授

平家 俊男 京都大学医学部小児科学講座 教授

小林 正夫 広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科 教授

布井 博幸 宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野 教授

中畑 龍俊 京都大学 iPS 細胞研究所
臨床応用研究部門疾患再現研究分野 特定拠点教授

峯岸 克行 徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター
病態プロテオゲノム分野 教授

小野寺 雅史 国立成育医療センター研究所成育遺伝研究部 部長

金兼 弘和 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 准教授

笹原 洋二 東北大学病院小児科 講師

小原 收 公益財団法人かずさ DNA 研究所ヒトゲノム研究部 副所長

高木 正稔 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 講師

加藤 善一郎 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 教授

石井 健 独立行政法人医薬基盤研究所
アジュバント開発プロジェクト プロジェクトリーダー

久保田 健夫 山梨大学環境遺伝医学講座 教授

山本 卓 広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻 教授

A. 研究目的

原発性免疫不全症候群の治療成績を向上させることを目的として、以下の研究を行った。

原発性免疫不全症の疾患ごとの病態解明を行った。その際、ゲノム編集、次世代シーケンサーを用いた Exome 解析、網羅的な遺伝子変異体の機能解析、micro RNA 測定、全ゲノムメチル化解析、蛋白立体構造解析、疾患由来 iPS 細胞の樹立とその分化などの新規基礎医学技術も活用した。

得られた新規病態をもとに、遺伝子治療、新規薬剤の開発などの新規治療法の開発を行った。さらに、造血幹細胞移植の成績を検討し、より安全な移植法の検討も行った。

B. 研究方法

A) 病態解明

a) 遺伝子機能解析および構造解析研究

原因遺伝子が判明したが、なぜ免疫不全を起こしているか明らかでない疾患が多数存在する。そこで、各疾患の研究者が、疾患由来細胞などを用い、シグナル伝達異常の解析、原因分子の立体構造解析や Pathway mapping などを行い、これまでの病態解析の蓄積のもと、病態を解明する。

b) iPS 細胞および RNA sequence を用いた病態解明

免疫系細胞の分化障害による原発性免疫不全症が多い。原因遺伝子は判明しているが、なぜ分化障害が出現するか明らかになっていない。そこで、患者由来 iPS 細胞を血液幹細胞に分化させ、それをもとに、さらに免疫細胞に分化させる。各分化段階で RNA シーケンスを行い、正常と比較し

発現が低下している分子を同定し、新規分化因子を同定する。

c) TREC/KREC および micro RNA 測定による予後評価

多くの免疫不全症は悪性腫瘍、自己免疫疾患を合併し、予後不良因子になっている。そこで、TREC/KREC, micro RNA を測定し、悪性腫瘍、自己免疫発症との相関を検討し、バイオマーカーとしての応用を検討する。

B) 新規原因遺伝子同定

PIDJ は 2008 年に申請者が設立した原発性免疫不全症の中央診断登録システムであり、これまでに約 3000 件生体試料の保存と臨床情報が登録されている。PIDJ の保存生体試料を利用し、臨床症状が類似している検体および健常家族検体について Exome 解析などの技術を活用し、新規原因遺伝子を同定する。

C) 創薬および新規治療の開発

1) 創薬

iPS 細胞からの分化系と RNA シーケンスを組み合わせる新規分化因子を同定する。

全ゲノムメチル化解析、メタボローム解析をもとにして候補化合物を絞り込み、化合物ライブラリーを用い分化・機能の正常化を指標にした新規化合物の探索を行う。

原因遺伝子の立体構造解析や pathway mapping のデータをもとに分子標的薬の探索を行う。以上のデータを創薬につなげる。

また、細網異形成症由来 iPS 細胞を用いた in vitro 分化系およびメタボローム解析から、好中球分化を正常化させる新規化合物を同定しているため、先天性好中球減少症でも効果を検討し、創薬に応用する。

その他の原発性免疫不全症についても、同様の手法で創薬をめざす。

原発性免疫不全症は単一遺伝子異常疾患なので遺伝子治療が有効である。そこで創薬としての遺伝子治療ベクターの導入・開発を行う。また、TALEN 系などを利用したゲノム編集による iPS 細胞の段階での遺伝子正常化を検討する。

2) 造血幹細胞移植

造血幹細胞移植治療は、原発性免疫不全症の根治療法であるが、感染症を抱えたままの移植となるため、困難である。そこで前処置を弱める移植法が望ましい。原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植法を改良し、ガイドラインを作成する。

(倫理面への配慮)

データは匿名化して取り扱った。遺伝子解析、細胞分化実験などは、防衛医大倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

ゲノム編集

哺乳類培養細胞にゲノム編集を利用した汎用的な一塩基編集法を開発することを目的とした。

改変したい周辺に相同組換え(HR)によって薬剤耐性遺伝子を挿入すると同時に一塩基改

変を加えた細胞株を樹立し、その後、テトラサイクリン誘導系によって薬剤耐性遺伝子を切り出し、マイクロホモロジー媒介末端結合(MMEJ)を利用して修復する方法の確立を目指す。そのため、ターゲティングベクターでは、薬剤耐性遺伝子および Cas9 ヌクレアーゼ、gRNA の発現カセットを連結し、このカセットの両側を約 500bp のホモロジーアームで挟む構造とした(ホモロジーアーム中に一塩基変異を導入)。本年は、ターゲティングベクターの構築および gRNA の最適化、MMEJ による修復効率の検討を行った。

ターゲティングベクター中に組み込む最適な gRNA の結合サイトを Optimized CRISPR design を用いて4種類設計した。4種類の標的配列に対してそれぞれの gRNA が切断活性を示すかどうかを SSA レポーターアッセイにより調べたところ、4種類すべてにおいて高い切断活性が確認された。このうち1つ gRNA を用いて、U6-gRNA-TRE3G-Cas9-hPGK-Teton3G-HSVTK-PURO をコアとして両側に gRNA のターゲットサイト、さらに外側に標的遺伝子との相同配列を付加したターゲティングベクターを作製した。

一方、最終段階においてターゲティングベクターの切り出し後の MMEJ が期待通りに正確に修復するかどうかを、分断した GFP 遺伝子に上記のカセットを組み込み、HCT116 細胞の AAVS 遺伝子座へ TALEN を用いて HR により組み込んだ。薬剤選別によって、片アレルおよび両アレルにカセットを挿入した細胞株を得ることができた。

次世代シーケンサーによるExome解析、網羅的な遺伝子変異体機能解析

既知遺伝子の変異の除外診断を終えた27検体について全エクソームシーケンスを実施した。変異のある遺伝子について、候補遺伝子変異の絞り込みと機能解析作業を進めた。新規な遺伝子の変異による免疫不全症の発症原因を複数同定した。また、免疫不全症遺伝子に見られた変異の非典型的な症状を呈することも明らかにした。

STAT1 遺伝子のコイルドコイル領域と DNA 結合ドメインのアミノ酸残基を1残基ずつ Ala に変換した Ala スキャニングによる結果は、既知の有害変異がなんらかの転写因子活性の変化を予測通りにもたらしている事を確認させると同時に、現在まで同定されていないミスセンス変異がこれらのドメインに導入された時にどのような症状がもたらされるかを予測するための重要な基盤情報として使えることが明らかとなった。更に、特定の位置のアミノ酸残基を野生型のもの以外の19種類のアミノ酸残基に変える事で、アミノ酸残基の位置だけでなく、アミノ酸残基の種類の違いによる機能予測情報も蓄積できることを明らかとした。

効率的に病原性の遺伝的素因を機能面から理解することが必要である。アミノ酸置換変異の機能同定を迅速に進めるための基盤として、網羅的アミノ酸置換スキャニングが有用であることを示した。

血清マイクロ RNA 解析

microRNA はゲノム上にコードされた短鎖の ncRNA で、標的とする messengerRNA(mRNA) の 3' 末端非翻訳領域に相補的に結合することにより、その遺伝子の発現・安定性を調節する。miRNA の調節機構は部位や時期特異的に発現する。

患者において、血清中の miRNA 量を経時的に、アレイ解析によって網羅的に測定する。マイクロ RNA のデータベースである miRBase に登録されている約 1700 (2012 年 4 月現在) のヒト miRNA すべてについて、本研究対象検体における発現を網羅的に解析した。

そして臨床情報と比較することによって、①病勢を反映するバイオマーカー、②治療反応性・重症化を予測するバイオマーカーバイオマーカーの検索を行った。その結果、血清の miRNA 解析により、疾患の診断、病態、治療のバイオマーカーになりうると考えられた。

網羅的エピゲノム解析

ICF 症候群は、DNA メチル化酵素の欠損によりゲノム DNA の低メチル化が生じ、疾患を発症すると理解されてきた。しかし、DNA メチル化酵素の異常がどのように免疫不全の発症に結びつくかはわかっていなかった。

bisulfite 処理した上で、網羅的 DNA メチル化解析アレイ(イルミナ社の 450K メチル化ビーズチップ)で解析した。このチップにはヒト全遺伝子のプロモーター周辺のゲノム領域が搭載されているものであった。得られたデータは専用のソフトウェアであるゲノムスタジオで解析した。

ナイーブ B 細胞は認められたがメモリー B 細胞は認められなかった。このことから、ICF 症候群の免疫病態がナイーブ B 細胞からメモリー B 細胞への分化過程の異常であることが判明した。

さらに、ナイーブ B 細胞では高メチル化を呈しメモリー B 細胞になると低メチル化になる顕著なメチル化変化を示す遺伝子が 190 種同定された。これらは、メモリー B 細胞への分化過程

で発現してくる遺伝子 (B 細胞成熟関連遺伝子) の候補であると考えられた。

健常者と ICF 患者のメモリーB 細胞間のメチル化比較解析からは、ICF 患者において顕著な低メチル化を示した遺伝子が836種 (1301 領域) が同定された。これらは、本来のメモリーB 細胞分化を阻止する作用を持っている遺伝子の候補と考えられた。

ICF 症候群の患者のリンパ球の解析の結果、本症の免疫不全病態がメモリーB 細胞分化の異常であることをつきとめた。またこの異常の背景に多数の遺伝子領域に DNA の低メチル化が存在することが判明した。さらに健常者のメモリーB 細胞分化の過程でも DNA のメチル化がダイナミックに変化することが判明した。

タンパク立体構造解析

IL-18 とヒトの疾患を結びつけるデータはすでに多くが発表されている。

IL-18-IL-18R α -IL-18R β の複合体分子構造を決定することで、新規抗 IL-18 薬設計のための基盤情報を獲得し、さらに種々の分子生物学的手法により IL-18 及び受容体の機能情報解析を行う。さらに得られた構造・機能情報を基に IL-18 阻害機能を有する低分子を見いだす事を目的とした。

重水素化安定同位体標識した IL-18 を精製、溶液 NMR 法を用いた受容体蛋白の滴定実験を行った。

X 線小角散乱法により溶液中の複合体構造情報を得た。

IL-18R α 構造の IL-18 Site1 結合部位を標的構造とし、virtual ligand screening にて 200 種類の候補低分子を選別した。IL-18 受容体発現 HEK293 細胞を用いた低分子スクリーニング実験で、複数の IL-18 阻害作用を有する分子

が同定された。スクリーニングで抑制効果が確認された低分子について、KG-1 細胞を用いた IFN- γ 産生能試験を行ったところ、IL-18 刺激による IFN- γ 産生の抑制が確認された。

今回決定された IL-18-IL-18R α -IL-18R β の 3 者複合体のタンパク立体構造情報を利用した in Silico の薬剤候補シード化合物のスクリーニングをさらに進め、抗 IL-18 薬の開発を進める。

細網異形成症患者由来 iPS 細胞を用いた病態解析

細網異形成症 (reticular dysgenesis: RD) は重症複合型免疫不全症 (SCID) の一種であり、最重症型の一つである。末梢血の T 細胞欠損と好中球減少症、胸腺と二次性リンパ器官の低形成、感音性難聴を特徴とし、致死的である。根治療法は造血幹細胞移植である。

Adenylate kinase 2 (AK2) 遺伝子に変異を認めるが、AK2 欠損がなぜ血球分化異常をきたすのか、ほとんどわかっていないが、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。

そこで、細網異形成症の iPS 細胞を樹立し、血球分化解析を行うことによって、AK2 と細胞質内に存在するアイソエンザイムである AK1 の分化段階特異的な制御を解析した。

HEK293T 細胞を用いた検討では、AK1 と AK2 の間にはフィードバックループが存在し、合わせてある一定の遺伝子量を保つように制御されていた。さらに、iPS 細胞を用いた分化実験においても、AK2 欠損細胞で分化段階特異的に AK1 の発現が上昇した。

以上の結果から、AK1とAK2の間にはフィードバックループが存在し、合わせてある一定の遺伝子量を保つように制御されていることが想定された。

毛細血管拡張性運動失調症

毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia (AT)は運動失調、免疫不全、毛細血管拡張を主徴とする疾患で、ATM が責任分子である。ATM は DNA 損傷応答反応において中心的な役割を持つ分子である。免疫不全症に基づく感染症や、悪性腫瘍が死因として重要な位置を占める。造血細胞移植がその治療法として考えられるが、AT に対する造血細胞移植は世界的にもコンセンサスを得ていない。難治疾患であり、基礎研究の推進による病態解明と治療法開発が必須である。

iPS 細胞を樹立し、その細胞を用い検討をした結果、AT 由来 iPS 細胞では野生型に比し、ミトコンドリア膜電位の低下があることが明らかとなった。

遺伝子治療開発に向けたベクターの構築をおこなった。PiggyBac transposon 型ベクターを基盤とし、PiggyBac transposase によりゲノムに組み込める形のベクターを作成した。CMV、PGK、ATM internal プロモーター由来のベクターを構築したが、発現量は CMV、PGK、ATM 部分プロモーターの順に高いものの細胞毒性の観点から、ATM 部分プロモーターが有用と考えられた。これら結果をさらに進展させ、ATM プロモーター全長、コード領域全長、3'非翻訳領域全長を組み込んだミニ遺伝子を持つベクターを作成した。

遺伝子治療を評価する意味で、樹立した iPS 細胞は有用と考えられる。樹立された iPS 細胞はこの他にも生存率を高める新規化合物のスクリーニングなどにも用いる。

恒常的活性化変異 WASP による先天性好中球減少症の分子病態解析

X 連鎖性好中球減少症 (XLN) は WASP の恒常的活性化変異により発症し、これまで 3 つの変異 (L270P, S272P, I294T) が報告されている。

WASP は細胞核内において転写因子として機能し、骨髄球系の分化増殖を制御していないかについて検討し、新規治療法開発の基盤とすることを目的とした。

WASP は核移行シグナルにより一部が細胞核内に局在し、L270P はより局在比率が高い傾向にあること、WASP は nuclear RNA-binding protein, 54kDa と RNA polymerase II と共沈し、DNA と共沈することから転写因子としての側面から発症機序を考察することが可能となった。WASP を発現していない骨髄球系細胞株を用いた実験により、G-CSFR と Runx1 は野生型 WASP によってのみ発現が増加し、L270P WASP では増加しないこと、WT と L270P WASP は DNA との結合部位は同じであったが、そのアフィニティーが異なっていたことから、WASP は骨髄球系細胞の分化増殖に重要な遺伝子発現を調節する転写因子として機能することが明らかとなった。

骨髄球系細胞における DNA メチル化、エピゲノム解析を更に進めることにより、X 連鎖性好中球減少症を MDS と類似する病態と捉え、エピゲノム分子病態を標的とした新規治療法が検討されうると考えられた。

「抗体産生不全症」の病態解明と新規治療法開発

抗体産生不全症、特に分類不能免疫不全症(Common variable immunodeficiency: CVID)に焦点をあて、原因が不明なものに対しては、

責任遺伝子探索及び候補責任遺伝子産物の機能解析を行い、病態を明らかにすることを目的とした。

3歳男児の Early onset CVID 患者で、全エクソン解析を行ったところ、BTK 遺伝子にミスセンス変異を同定した(NM_000061.2:c.946A>G、NP_000052.1:p.Thr316Ala)。両親検体の同遺伝子解析からは de novo 変異と確認した。B 細胞は 14.2%(リンパ球)であったが、その比率は年齢と共に減少した。CD19+細胞は CD19+と CD19low+の 2 分画を示し、CD19low +の分画では CD21low であった。抗 IgM 抗体刺激後の calcium flux と PLC γ 2 リン酸化は CD19low 細胞でわずかに減弱していたが CD19+細胞では正常であった。CD19+細胞での CD40L 刺激後 NF- κ B p65 リン酸化は正常だった(Fig. 3d)。抗 CD40 抗体と IL-21 刺激後 B 細胞はコントロールと同程度に IgG を産生したが IgA 産生は減弱していた。

低 γ グロブリン血症を示す Jacobsen 症候群患者(Pt 1)と1名の抗体価正常 Jacobsen 症候群患者(Pt2)の検体を用いて、CGH array,全エクソン解析(Pt1)、RNASeq (Pt 1, 2)を行った。その結果 11q23 以下の遺伝子に有意な mutation を認めず、健側片アリルの変異は認めないことが明らかになった。そのほかの locus には、homozygous, compound heterozygous, heterozygous mutation が合計 100 以上検出された。また RNASeq にて Pt1 で Pt2 及び健常者に比して発現が低下する遺伝子を検討したところ 10 個が同定され、その中で 5 遺伝子は realtime PCR でも発現が明らかに低下していることが明らかになった。

細胞内タンパクが欠損する免疫不全症においては、一時的にでもそのタンパク質を補充する手法が治療になると考えられる。その点で、

cell permeable peptide(CPP)を有する組換えタンパクは、細胞内への導入効率がよく、タンパクも大量に産生及び精製可能で、治療に適した方策と思われる。ここでは Hph-1 というヒト由来 CPP をもつ BTK タンパクを用いた。Hph-1-BTK を好中球や細胞株に導入した。その結果、BTK の発現はほぼ 100%に認められ発現は 24 時間程度で、機能回復も認めることが証明された。今後抗体産生不全を呈する BTK T316A 変異 B 細胞への導入により、機能改変・機能回復につながるかを検証する。

XLA の Helper dependent adenovirus/adenovirus hybrid vector を用いた遺伝子修復療法の開発

X 連鎖無ガンマグロブリン血症(XLA)は、X 染色体長腕に位置する Bruton's tyrosine kinase (BTK)遺伝子変異によって生じる B 細胞の分化障害が原因である。この疾患では、細菌性肺炎などの重症感染症を繰り返し、生涯にわたってガンマグロブリンを補充する必要がある。

海外では改良されたベクターを用いた治療応用がなされてきているが、ベクター由来遺伝子の Random integration による発がんが問題になっている。そこで、遺伝子導入ではなく、変異した遺伝子部分を正常に修復する方法が望まれる。今回、造血幹細胞に感染性を示す Ad5/35 キメラベクターと、相同組み換えによる目的遺伝子の修復を起こすアデノ随伴ウイルスベクターとの両者の長所を備えているヘルパー依存型アデノ・アデノ随伴ウイルス(HD-Ad.AAV)ハイブリッドベクターを用いて、BTK 遺伝子の相同組み換えによる遺伝子修復の可能性について、臍帯血 CD34 陽性細胞をターゲットとして検討を行った。

BTK 遺伝子の exon6-19 領域および GFP-Hyg 耐性遺伝子を搭載した HD-Ad.AAV.BTK ベクターを作製した

ヒト CD34 陽性細胞にベクターを感染させコロニー解析を行ったところ、出現するコロニーは BFU-E がほとんどであった。相同組み換えがおこったコロニーは、導入された GFP 遺伝子が発現していることが蛍光顕微鏡で確認された。

また、ヒト CD34 陽性細胞にベクターを感染させた後、B 細胞系細胞へ分化させた。15 回のアッセイで、CD34 陽性細胞総数 1.8×10^7 個の細胞へ感染させた結果、5 回のアッセイで相同組み換えを確認した

以上の結果から、本ベクターにより、相同組み換えによる BTK 遺伝子の変異修復を行えると考えられた。

好中球二次顆粒欠損症

好中球二次顆粒欠損症 (Neutrophil-specific granule deficiency; SGD) は、骨髄特異的転写因子 CCAAT/enhancer binding protein epsilon (C/EBP ϵ) の機能障害によりラクトフェリン等の好中球顆粒成分が欠損し、難治性の反復性化膿性病変をきたす原発性免疫不全症である。

今回、既報のフレームシフト変異とともに、C/EBP ϵ 遺伝子ロイシンジッパードメインにおける 6 塩基、2 アミノ酸残基の欠失変異 Δ RS について、機能解析として、各変異型の転写活性化能、細胞内局在と DNA 結合能、蛋白質間相互作用を行い、さらに新規治療法の開発に繋がる知見として、活性化因子による転写活性化能の回復を検討した。

フレームシフト変異では、変異 C/EBP ϵ が DNA と結合できないため、機能が欠損し、好中球の正常な分化・成熟を誘導できないことが示

された。一方、 Δ RS は細胞内局在と DNA 結合能が保たれているにも関わらず転写活性化能が低下していた。Gata1 との相互作用が認められないことから、 Δ RS では協働する転写因子や活性化因子との相互作用に異常が生じ、転写活性化能の低下が引き起こされると考えられた。

p300 はヒストンのアセチル化酵素として知られるが、ごく最近、C/EBP ϵ のリジン残基をアセチル化することで好中球の分化・成熟、二次顆粒蛋白の発現、DNA 結合能を活性化する co-activator として重要であることが報告されている。今回、p300 を Δ RS と共導入することで、 Δ RS の転写活性化能が回復することが判明した。SGD の新規治療法の開発に繋がる所見として有用である。

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

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) 変異であることを近年明らかにした。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、特に 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。

その結果、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り、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。この結果をもとに、2重鎖切断から遺伝子修復につなげる。

慢性肉芽腫症の新規治療 –PEG-DAO 酵素補充療法–

慢性肉芽腫症 (Chronic Granulomatous Disease; CGD)患者の新規治療として、炎症局所に集積性のある PEG 化した D-アミノ酸酸化酵素(PEG-DAO)製剤による治療について検討した。

PEG-DAOを用いた *in vitro* 好中球殺菌能の確認として、CGD 患者好中球でも PEG-DAO と D-alanine 存在下で、患者好中球が活性酸素反応性の DCFH 蛍光プローブを励起しているすなわち、患者好中球内への活性酸素 (H_2O_2) の移行が証明された。

また正常者および CGD 患者好中球を用いた *St.aureus* 殺菌力測定の結果、患者好中球での殺菌能が PEG-DAO 量依存的に回復していることが明らかになった。

慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療

慢性肉芽腫症の根治療法は造血幹細胞移植のみである。しかし、細菌や真菌感染が持続する場合、移植は困難である。また適当な移植ドナーが見つからない場合もあり、その予後は不良である。

今回、患者造血幹細胞にレトロウイルスベクターを用いて CYBB 遺伝子を導入する造血幹細胞遺伝子治療を行った。

遺伝子導入に関しては、患者末梢血より顆粒球コロニー刺激因子により動員された造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) が採取され、MFGSgp91

を用いてこれら造血幹細胞に遺伝子導入を行った。遺伝子導入効率は 78.4%であり、最終的に 3.6×10^8 個 (6.2×10^6 /kg) の遺伝子導入細胞を得ることができた。ブスルファンによる骨髄非破壊的前処置の後に、遺伝子導入細胞 (CD34 陽性細胞にして 6.2×10^6 /kg) を患者末梢静脈より点滴にて投与した。患者に投与した遺伝子導入細胞は投与後 2 週間目より末梢血中で、その存在を確認することができ、その結果、一部、抗生剤に抵抗性を示すリンパ節膿瘍が改善した。

慢性皮膚粘膜カンジダ症をきたすSTAT1新規変異の同定と病態解析

慢性皮膚粘膜カンジダ症 (Chronic mucocutaneous candidiasis; CMC) は、皮膚・爪、口腔外陰部などの粘膜に、反復性・持続性のカンジダ感染を呈する原発性免疫不全症である。これまでのところ STAT1 変異 CMC 患者の根治治療はまだ確立されていない。

2011 年、STAT1 のヘテロミスセンス変異が CMC を引き起こす事が報告された (Liu et al. 2011 JEM, van de Veerdonk et al. 2011 NEJM)。この変異は STAT1 の脱リン酸化障害を生じる機能獲得型変異であり、これまで計 30 変異が報告されている。

これまで未報告の STAT1 変異を2つ見出し、その機能解析を行った。

HeLa 細胞の内因性野生型 STAT1 と、transfect した STAT1 を区別するため STAT1 の C 端に GFP を結合させ、ウェスタンブロットで内因性野生型 STAT1 と、transfect した STAT1 を分離し評価した。変異 STAT1 を transfect した場合、内因性野生型 STAT1 のリン酸化も増強し、また脱リン酸化の遅延を来す事を発見した。

STAT1 ダイマーは DNA に結合する平行構造と、チロシン残基が露出し脱リン酸化を受けやすいアンチ平行構造をとると考えられている。CMC をきたす STAT1 変異はアンチ平行構造をとりにくくなり脱リン酸化障害をきたす事が推定される。そこで、STAT1 ダイマー構造をアンチ平行構造にしやすくする薬剤があれば、変異の影響を緩和し、疾患治療に役立つことと考えられた。

慢性皮膚粘膜カンジダ症患者における *IL17RA* 遺伝子異常の同定とその解析

2010 年に STAT1 機能獲得性変異が、IL-17 を産生する Th17 細胞の分化・増殖の障害を介して、CMCD を引き起こすことが報告された。本邦における CMCD 患者を対象に STAT1 の遺伝子解析を行い、半数以上の患者で STAT1 機能獲得性変異が同定されることを発見した。さらに末梢血単核球を IFN- γ 刺激し、反応性に起こる STAT1 のリン酸化をフローサイトメトリーで解析することで、STAT1 異常による CMCD 患者の迅速診断が可能であることを報告した (Mizoguchi Y, et al., J Leuk Biol, 2014)。

今回、過去の検討で STAT1 機能獲得性変異が同定されない患者の病態解明を目的に、エクソーム配列解析による責任遺伝子の探索を行った。その結果、IL-17R α 異常症の姉弟例を同定した。患者では、細胞表面における IL-17R α の発現が完全に障害されていた。

現在、患者線維芽細胞を用いた機能解析を行い、カンジダ・黄色ブドウ球菌に対する宿主感染防御における IL-17 の役割を検討中である。IL-17 は尋常性乾癬、関節症性乾癬の分子標的としても注目されており、抗 IL-17A モノクローナル抗体が国内で承認申請されている。IL-17R α 異常症の病態解明は、IL-17 抗体療

法が持つ潜在的な危険性を予見するためにも重要な研究である。

家族性血球貪食性リンパ組織球症新規治療薬の同定

家族性血球貪食性リンパ組織球症 (FHL) は、リンパ球の細胞傷害活性に関与する遺伝子の異常を背景として細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の過剰な活性化が起こり、サイトカインストームによる組織球の増殖と血球貪食像を病理学的特徴とする症候群である。速やかな炎症の鎮静化と造血幹細胞移植による根治療法が必要となるが、感染や膠原病に続発する二次性の血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) との鑑別は容易では無い。加えて、炎症のコントロールが不能な重症例も多く、新たな炎症抑制療法の開発が望まれる。

FHL の迅速診断としてフローサイトメトリー (FACS) を用いたスクリーニングを開発し、本邦 FHL 症例の殆どを占める FHL2/3 症例の迅速診断が可能となった。

FHL スクリーニングでは、全症例で責任蛋白の発現低下が確認された。この事実は、蛋白発現を安定化させる薬剤が新たな治療薬の候補と成り得る事を示唆しており、プロテオソーム阻害剤などが有力な候補になり得ると思われる。

FHL のモデル細胞株の作成と、それ用いた遺伝子変異の機能解析系の確立を目指した研究を行った。この細胞株は、細胞傷害活性を回復させる化合物のスクリーニングに応用が可能であり、新たな治療法の開発へと繋げる。

22q11.2 欠損症候群の免疫学的評価の意義

22q11.2 欠損症候群における免疫不全は先天性心疾患とともに生命予後を左右する重篤

な合併症であり、免疫機能の評価は診療にあたって大変重要と考えられる。

22q11.2 欠失症候群における免疫不全の臨床症状、治療、転帰を評価した。

12 施設から全体で 26 症例(男児 11 例、女児 15 例)の報告で診断日齢中央値 49 日であった。26 例のうち、臨床症状として、先天性心疾患 23 例(88%)、症候性低 Ca 血症 13 例(50%)、特異的顔貌 21 例(81%)、胸腺低/無形成 11 例(42%)を認めた。

19 例(73%)の症例では免疫学的な評価を行われておらず、うち 1 例は CMV 肺炎で死亡した(図1)。免疫学的な評価が行われていた 7 例(27%)のうち、異常を認めた 1 例は完全型 DiGeorge 症候群と診断された。救命のため造血幹細胞移植を計画し、移植細胞源には血縁・非血縁骨髄提供者が得られず臍帯血移植を選択した。移植後、14 日に生着が確認できた。移植後日齢 17 で CD3 陽性 T 細胞の出現が確認された。TREC 数が移植後 24 日で陽性化し、その後も増加が確認された。T 細胞受容体レパトア解析は、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞ともに多様性が確認された。

完全型 DiGeorge 症候群に対する標準的な治療は胸腺移植および骨髄移植であるが、胸腺移植は実際上、国内では実施が困難である。血縁・非血縁骨髄提供者が得られない症例では、臍帯血は考慮すべき移植幹細胞源であると考えられた。

今回の後方視的検討により、現在の一般小児科診療のなかで 22q11.2 欠失症候群症例に対する免疫学的な評価が徹底されておらず、診断されないまま感染症で死亡する症例が存在することが確認された。免疫学的なスクリーニングを徹底することを一般小児科医を対象に、広く啓蒙する必要があると考えられた。

XIAP欠損症に対する造血幹細胞移植

X連鎖リンパ増殖症候群(XLP)は男児にのみ発症する原発性免疫不全症で、特に EB ウイルスに対する免疫応答の低下と血球貪食性リンパ組織球症(HLH)を特徴とする。XLP1 型(SAP 欠損症)と同様に XLP2 型(XIAP 欠損症)の予後は不良であり、繰り返す HLH や感染症、XIAP 欠損症に特異的な炎症性腸疾患の合併のため、約半数が 20 歳以前に死亡すると報告されている。

XIAP 欠損症の唯一の根治的治療は造血幹細胞移植であるが、国際調査では移植合併症死が多いことが報告されており、適切な移植治療の確立が必要である。

そこで、国内での XIAP 欠損症移植例について移植成績や前処置・補助療法などについてアンケート調査を行い、適切な移植治療の適応や方法について検討した。

その結果、国内 XIAP 欠損症造血幹細胞移植例 5 例のうち、HLH 寛解状態で骨髄非破壊的前処置を施行された 4 例と、HLH 非寛解で先行治療としてエトポシドを追加されていた 1 例が生存し良好な生着を得ていた。高率な移植合併症死を避ける目的に、骨髄非破壊的前処置の選択と、移植前 HLH 寛解状態である点が移植成績を大きく改善する可能性が示された。

原発性免疫不全症に対する骨髄非破壊的造血幹細胞移植法の開発

原発性免疫不全症の根治療法として骨髄破壊的前処置による造血幹細胞移植は確立してきているが、感染症の増悪を含む急性毒性や晩期合併症の問題のため、前処置法の軽減が近年模索されている。

そこで、骨髄非破壊的前処置により造血幹細胞移植を行った症例の解析を行った。2012

年 4 月～2014 年 6 月に Fludarabine(Flu)と Busulfan(Bu)による前処置を用いた造血幹細胞移植を施行した原発性免疫不全患者 11 例を対象とした。ウサギ ATG(サイモグロブリン)を拒絶予防、GVHD 予防として、10mg/kg(1 例)、8mg/kg(4 例)、5mg/kg(2 例)用いた。

11 例中 8 例は生着し、そのうち、7 例が完全ドナー型(>90%)であり、残りの 1 例も好中球は 100%、リンパ球が 70%のキメラであった。3 例で二次性生着不全となったが、再移植、再々移植により 2 例で生着が得られた。合併症は様々なものがみられたが、生着症例では大きな感染症はなく、粘膜障害も軽度であったこともあり、多くの症例で GVHD も軽度であった。観察期間がまだ短期であるが、8 例でグロブリン補充を中止できており、2 例のみ継続中である。

観察期間は中央値 605 日(109~1002 日)で、STAT1異常による重症慢性皮膚粘膜カンジダ症 1 例のみ血球貪食症候群、生着不全からアデノウイルス全身感染症で day109 に死亡したが、残り 10 例は全例生存している。

Flu+Bu±ATG を用いた前処置は骨髄抑制、粘膜障害、VOD が軽度で、小児原発性免疫不全症に対してより安全に施行可能な前処置であると考えられた。

D. 考察

原発性免疫不全症は希少難病であるが、PIDJ データベースの活用、基礎と臨床の専門家による強力な共同研究により、Exome 解析による原因遺伝子同定、iPS 細胞の活用による病態解明や創薬、ゲノム編集による変異遺伝子の正常化、遺伝子治療ベクター開発、至適造血幹細胞移植法確立など、多岐にわたり内容を、様々な疾患で研究を進める事ができた。

E. 結論

原発性免疫不全症の病態解明、新規治療法の開発について、基礎医学者と臨床医学者の協力により、十分な成果が上げられた。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表
巻末参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

DNA 結合ドメインを含むポリペプチド、PCT 出願(PCT/JP2014/062518, 2014 年 5 月 9 日)

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし