

- and recurrent gene deletions in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014 Nov;53(11):902-910.
- 3) Hasegawa D, Chen X, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics and treatment outcome in 65 cases with refractory cytopenia of childhood defined according to the WHO 2008 classification. *Br J Haematol*. 2014 Sep;166(5):758-766.
 - 4) Hasegawa S, Imai K, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Morio T, Mizutani S, Takagi M. Whole-exome sequence analysis of ataxia telangiectasia-like phenotype. *J Neurol Sci*. 2014 May 15;340(1-2):86-90.
 - 5) Honda Y, Tsuchida M, Zaike Y, Masunaga A, Yoshimi A, Kojima S, Ito M, Kikuchi A, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukaemia who developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Paediatric Haematology/Oncology. *Br J Haematol*. 2014 Jun;165(5):682-687.
 - 6) Hyakuna N, Muramatsu H, Higa T, Chinen Y, Wang X, Kojima S. Germline mutation of CBL is associated with moyamoya disease in a child with juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome-like disorder. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Oct 4. doi: 10.1002/pbc.25271. [Epub ahead of print]
 - 7) Ismael O, Shimada A, Elmahdi S, Elshazley M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada M, Yamashita Y, Horide K, Kojima S. RUNX1 mutation associated with clonal evolution in relapsed pediatric acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22). *Int J Hematol*. 2014 Feb;99(2):169-174.
 - 8) Jeong DC, Chung NG, Cho B, Zou Y, Ruan M, Takahashi Y, Muramatsu H, Ohara A, Kosaka Y, Yang W, Kim HK, Zhu X, Kojima S. Long-term outcome after immunosuppressive therapy with horse or rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia in children. *Haematologica*. 2014 Apr;99(4):664-671.
 - 9) Kato M, Imamura T, Manabe A, Hashii Y, Koh K, Sato A, Takahashi H, Hori H, Taki T, Inoue M, Hayashi Y, Horibe K, Tsuchida M, Kojima S, Oda M, Ohara A. Prognostic impact of gained chromosomes in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia: a collaborative retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group and Japan Association of Childhood Leukaemia Study. *Br J Haematol*. 2014 Jul;166(2):295-298.
 - 10) Kawashima N, Ito Y, Sekiya Y, Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Choreito formula for BK virus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Oct 23. pii: S1083-8791(14)00657-0. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.10.018. [Epub ahead of print]
 - 11) Kawashima N, Narita A, Wang X, Xu Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Kojima S. Aldehyde dehydrogenase-2 polymorphism contributes to the progression of bone marrow failure in children with idiopathic aplastic anaemia. *Br J*

- Haematol. 2014 Sep 11.
- 12) Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Kudo K, Yoshida N, Watanabe K, Muramatsu H, Takahashi Y, Inoue M, Koh K, Inagaki J, Okamoto Y, Sakamaki H, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Kojima S. Bloodstream infection after stem cell transplantation in children with idiopathic aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Aug;20(8):1145-1149.
 - 13) 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*. 2014 Apr;95(4):667-676.
 - 14) Ohye T, Inagaki H, Ihira M, Higashimoto Y, Kato K, Oikawa J, Yagasaki H, Niizuma T, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T, Kurahashi H. Dual roles for the telomeric repeats in chromosomally integrated human herpesvirus-6. *Sci Rep*. 2014 4:4559.
 - 15) Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, Kawashima N, Wang X, Narita A, Doisaki S, Xu Y, Muramatsu H, Yoshida N, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Nakamura K, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Japan Childhood Aplastic Anemia Study G. Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*. 2014 Aug;99(8):1312-1316.
 - 16) Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kimura H, Kojima S. Long-term parvovirus B19 infections with genetic drift after cord blood transplantation complicated by persistent CD4+ lymphocytopenia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2014 Jan;36(1):e65-68.
 - 17) Ueda S, Sakata N, Muramatsu H, Sakaguchi H, Wang X, Xu Y, Kojima S, Yamaguchi T, Higa T, Takemura T. Clinical course of juvenile myelomonocytic leukemia in the blast crisis phase treated by acute myeloid leukemia-oriented chemotherapy and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2014 Jul 22.
 - 18) Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo 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 mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2014 Nov 25. doi: 10.1111/bjh.13229. [Epub ahead of print]
 - 19) Yagasaki H, Shichino H, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Ohga S, Hamamoto K, Ohtsuka Y, Shimada H, Inoue M, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Immunosuppressive therapy with horse anti-thymocyte globulin and cyclosporine as treatment for fulminant aplastic anemia in children. *Ann Hematol*. 2014 May;93(5):747-752.
 - 20) Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe KI, Kudo K, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K,

Suzuki R, Ohara A, Kojima S. First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor vs. immunosuppressive therapy. *Haematologica*. 2014 Sep 5.

2. 学会発表

- 1) Takahashi Y. Hematopoietic stem cell transplantation from an alternative donor for childhood aplastic anemia: HLA haploidentical family donor vs HLA mismatched unrelated donor. 40th Annual Meeting of the EBMT. Apr. 9, 2014. Milano, Italia.
- 2) Hama A. Central Review of morphology in childhood aplastic anemia and myelodysplastic syndrome in Japan-summary of 1,000 cases. 25th Annual Meeting of the International BFM Study Group. Clarion Congress Hotel Apr. 26, 2014. Czech, Praha.
- 3) Kojima S. Role of rATG in treatment of AA. Educational Meeting : Role of Immunosuppressive therapy in treatment of Aplastic Anemia. Parkroyal on Pickering, Singapore. Apr. 26, 2014. Singapore.
- 4) Takahashi Y. ANR COLOGNE 2014 May.13, 2014. Cologne, Germany.
- 5) Kojima S. Expert Meeting at Wuhan Union Hospital Jul.15, 2014. Wuhan, China.
- 6) Kojima S. Expert Meeting at Wharton International Hotel. Jul.16, 2014. Wharton, China.
- 7) Kojima S. Hematology Expert Meeting Jul.18, 2014. Guangzhou, China.
- 8) Kojima S. South China Hematology Summit Jul.19, 2014. Guangzhou, China.
- 9) Kojima S. Aplastic Anemia : Therapeutic updated in HSCT. 2013 International Forum on Bone Marrow Failure. Aug.16, 2013. Tianjin, China.
- 10) Muramatsu H, Takahashi Y, Nishikawa E, Sekiya Y, Kawashima N, Okuno Y, Narita A, Doisaki S, Irie M, Hama A, Kojima S. CD20-negative Epstein-Barr Virus-Associated Post-transplant Lymphoproliferative Disease. The 19th congress of APBMT. Oct.16, 2014. Hangzhou, China.
- 11) Yamaguchi H., Sakaguchi H, Yoshida K, Yabe M, Yabe H, Okuno Y, Muramatsu H, Yui S, Inokuchi, K, Ito E, Ogawa S, Kojima S. The Clinical and Genetic Features of Dyskeratosis Congenita, Cryptic Dyskeratosis Congenita, and Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome in Japan. 56th ASH Annual Meeting. Dec.6 2014. San Francisco, USA.
- 12) Hasegawa D, Hirabayashi S, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Manabe A. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Refractory Cytopenia of Childhood. 56th ASH Annual Meeting. Dec.6 2014. San Francisco, USA.
- 13) Hama A, Atsushi M, Hasegawa D, Nozawa K, Okuno Y, Irie, M, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Central Morphology Review of Childhood Bone Marrow Failure in Japan. 56th ASH Annual Meeting. Dec.6 2014. San Francisco, USA
- 14) Patel B, Huang D, Thota S, Przychodzen P, Sakaguchi H, Kojima S, Ogawa S, Sekeres M A, Makishima H, Jaroslaw P. Maciejewski. Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) Can be Categorized By Ancestral Mutational Events. 56th ASH Annual Meeting. Dec.6 2014. San Francisco, USA
- 15) Utsugisawa T, Uchiyama T, Ogura H,

- Aoki T, Isao Hamaguchi I, Ishiguro A, Ohara 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. Dec.6 2014. San Francisco, USA.
- 16) Yoshida N, Yabe H, Kudo K, Kobayashi R, Yabe M, Inoue M, Miki M, Sakamaki H, Kato K, Kawa K, Suzuki R, Watanabe K, Kojima S. Outcomes of Stem Cell Transplantation with Fludarabine and Melphalan Conditioning for Children with Acquired Bone Marrow Failure: A Nationwide Retrospective Study. 56th ASH Annual Meeting. Dec.7 2014. San Francisco, USA.
- 17) Okuno U, Atsushi N, Muramatsu H, Yoshida K, Hama A, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Sakaguchi H, Doisaki S, Takahashi Y, Shiraishi, Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Whole-Exome Sequencing Reveals a Paucity of Somatic Gene Mutations in Aplastic Anemia and Refractory Cytopenia of Childhood. 56th ASH Annual Meeting. Dec.8 2014. San Francisco, USA.
- 18) Narita A, Sekiya Y, Sakaguchi H, Nishio N, Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida N, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Doisaki S, MD1*, Kamei M, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Predicting Response to Immunosuppressive Therapy By the Combination of Minor Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones and Lymphocyte Telomere Length in Children with Aplastic Anemia. 56th ASH Annual Meeting. Dec.8 2014. San Francisco, USA.
- 19) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Doisaki S, Hama A, Wang X, Narita A, Kawashima N, Xu Y, Sakaguchi H, Takahashi Y, Sanada M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Diagnostic Efficacy of Whole-Exome Sequencing in 250 Patients with Congenital Bone Marrow Failure. 56th ASH Annual Meeting. Dec.8 2014. San Francisco, USA.
- 20) Kawashima N, Okuno Y, Sekiya Y, Wang X, Xu Y, Narita, Doisaki S, Kamei M, Muramatsu H, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Generation of Cell Lines Harboring SETBP1 Mutations By the Crispr/Cas9 System. 56th ASH Annual Meeting. Dec.8 2014. San Francisco, USA.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

村岡正裕¹⁾、和田泰三¹⁾、榊原康久¹⁾、東馬智子¹⁾、谷内江昭宏¹⁾、赤木紀之²⁾、横田崇²⁾

- 1) 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科小児科
- 2) 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科再生分子医学

研究要旨

好中球二次顆粒欠損症 (SGD) は、骨髄特異的転写因子 C/EBP ϵ の機能障害から好中球の二次顆粒などが欠損し、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。本疾患の報告数は極めて少なく、遺伝子変異と表現型の関連など病態の詳細は未だ不明である。最近我々は、世界で3例目となる C/EBP ϵ 変異による SGD 症例を見出し、ロイシンジッパードメインにおける6塩基の新規欠失変異を同定した (Δ RS)。今回、既報の2症例におけるフレームシフト変異とともに、この Δ RS について機能解析を行った。 Δ RS は転写活性化能が低下していたが、DNA 結合能は正常で、細胞内における局在も保たれていた。 Δ RS では Gata1 との結合能が低下していたことから、蛋白質相互作用の異常により転写活性化能が低下し、SGD となる機序が推察された。また、C/EBP ϵ と結合する転写因子 p300 を共発現させると、変異 C/EBP ϵ の転写活性化能が回復する可能性を見出しており、新規治療法の開発に繋がる所見として解析を進めている。

A. 研究の目的

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。常染色体劣性遺伝形式をとる。本疾患の報告数は極めて少なく、遺伝子変異と表現型の関連など、病態の詳細は未だ不明である。最近我々は、皮膚の反復性化膿性病変などの臨床経過を契機として診断に至った SGD の1例を経験した。

C/EBP ϵ 遺伝子を検索したところ、ロイシンジッパードメインにおける6塩基、蛋白質として2アミノ酸残基の新規欠失変異を

同定した (Δ RS)。本症例は、C/EBP ϵ 変異による SGD としては世界で3例目となる。今回、既報の2症例におけるフレームシフト変異とともに、この Δ RS について機能解析を行い、さらに新規治療法の開発に繋がる知見を探索した。

B. 研究方法

1) 症例

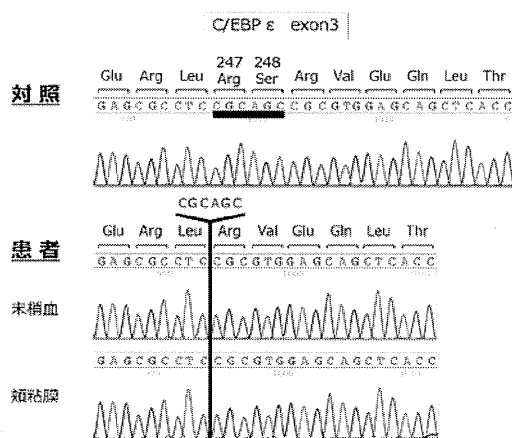
55歳女性。1歳頃より体幹・頭皮に皮下膿瘍様の皮膚感染症を繰り返し認めていた。皮膚科や血液内科などに通院していたが、確定診断には至らず、CMMLやMDS、壊疽性膿皮症に類似した病態として経過をみられていた。54歳時に重症中耳炎のため3週間入院したことや、これまでの経過、また2人の兄が幼少期に死亡したという家族歴等

を契機として免疫不全症が疑われ、当科に紹介受診となった。

当科受診時、右背部に鶏卵大の壊死苔を伴う壊疽性膿皮症様の発赤があり、体幹、四肢には羊皮紙様の癬痕が多発していた。末梢血のサイトスピン標本にて好中球顆粒蛋白の免疫染色を施行したところ、一次顆粒成分であるペルオキシダーゼは陽性であった。しかし、二次顆粒成分であるラクトフェリンや、分泌顆粒成分である内因性アルカリフォスファターゼは全く染色されなかった。

末梢血、および頬粘膜より DNA を抽出し、C/EBP ϵ 遺伝子のシーケンス解析を行ったところ、ロイシンジッパードメインに新規の変異である 6 塩基欠失、アミノ酸として 2 アミノ酸残基の欠失 (Δ RS) をホモ接合性に認めた (図 1)。以上より SGD と診断した。

図 1. C/EBP ϵ 遺伝子解析

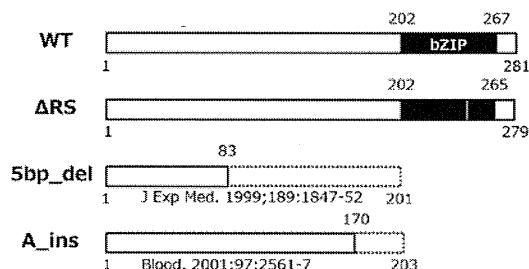


2) 方法

正常型 (WT) と変異型の C/EBP ϵ 発現ベクターを作製した (図 2)。変異型は、 Δ RS と既報の 2 つのフレームシフト変異 (5bp_del、A_ins) の計 3 種類とした。各変異配列は、正常 C/EBP ϵ 遺伝子からオーバーラップ PCR 法にて作製した。Gata1 や p300 の発現ベクターも作製し、必要に応じ MBP-Flag タグまたは Myc タグを付した。これらの発現ベクターを Lipofectamine 2000

を用いて培養細胞 (HEK293、NIH3T3) に導入した。培養 48 時間後、細胞溶解液を調製し、転写活性化能や細胞内局在、DNA 結合能、蛋白質間相互作用について解析した。

図 2. 各変異型の比較

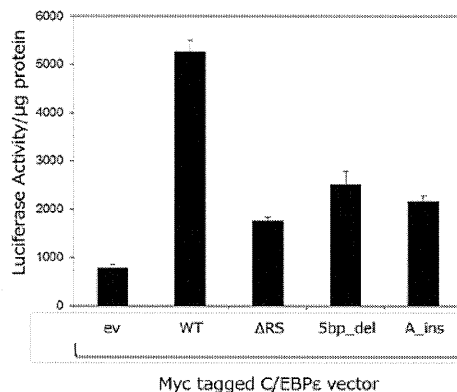


C. 研究結果

1) 各変異型の転写活性化能

C/EBP ϵ が G-CSF 受容体プロモーターの刺激活性を有していることを利用し、レポーターアッセイを行った。G-CSF 受容体とルシフェラーゼの融合遺伝子、正常もしくは変異 C/EBP ϵ 遺伝子をそれぞれ発現するベクターを HEK293 細胞に共導入し解析した。また、同じサンプルを用いて Western blot を行い、各々の蛋白質レベルの発現を解析した。 Δ RS を含めた変異型では、C/EBP ϵ 蛋白の発現を認めるものの、WT に比してルシフェラーゼ活性が低下していることが示された (図 3)。

図 3. 各変異型の転写活性化能



さらに、NIH3T3 細胞において、C/EBP ϵ を導入・発現させると B9、NGAL、ラクトフェリンといった好中球特異的顆粒蛋白の

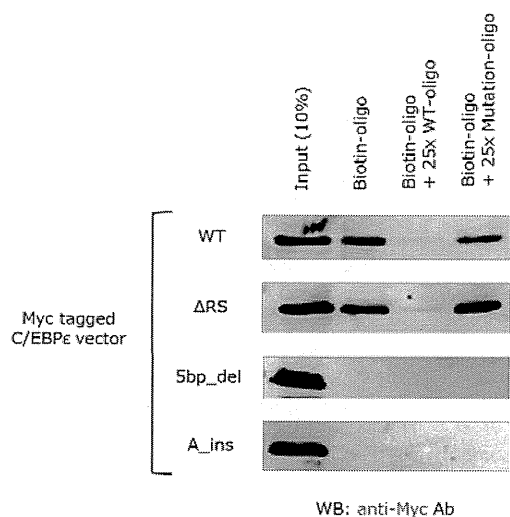
mRNA 発現が誘導されることを利用し、各変異型の転写活性化能を評価した。RT-PCR 法により検討したところ、 Δ RS を含めた変異型は顆粒蛋白の mRNA 発現誘導を認めなかった。以上の結果から、各変異型の転写活性化能が低下していることが確認された。

2) 細胞内局在と DNA 結合能

各変異型における転写活性化能低下の機序を探るため、C/EBP ϵ 遺伝子と GFP の融合遺伝子を作製、NIH3T3 細胞に導入し、細胞内局在を検討した。既報の変異である 5bp_del と A_ins では、変異 C/EBP ϵ が核および細胞質に分布する異常を示したのに対し、 Δ RS は正常型と同様に、核に局在していた。

次に DNA 結合能を検討した。各々の C/EBP ϵ 発現ベクターを導入した HEK293 細胞から細胞溶解液を作製し、C/EBP 結合部位を有するオリゴヌクレオチドと反応させた。その後、ストレプトアビジンアガロースにより pulldown し、Western blot にて DNA 結合能を評価した。非特異的な結合を否定するため、変異オリゴヌクレオチドを添加したサンプルを含めて検討した。5bp_del と A_ins では DNA 結合能が欠損しているのに対して、 Δ RS は DNA 結合能が保たれていた (図 4)。

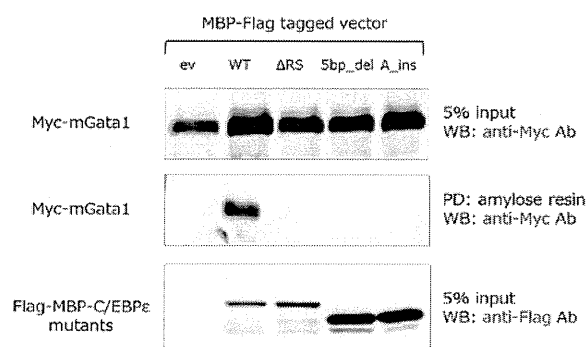
図 4. DNA 結合能



3) 蛋白質間相互作用

蛋白質間相互作用を検討するために、C/EBP ϵ の転写活性化能を促進する転写因子 Gata1 の発現ベクターと C/EBP ϵ 発現ベクターを HEK293 細胞に共導入した。Gata1、C/EBP ϵ には、それぞれ Myc タグ、MBP-Flag タグを付した。細胞溶解液に Amylose Resin を反応させ pulldown し、Western blot にて蛋白質間相互作用を評価した。 Δ RS を含めた変異型では Gata1 の pulldown サンプルではバンドを確認できず、相互作用は認められなかった (図 5)。

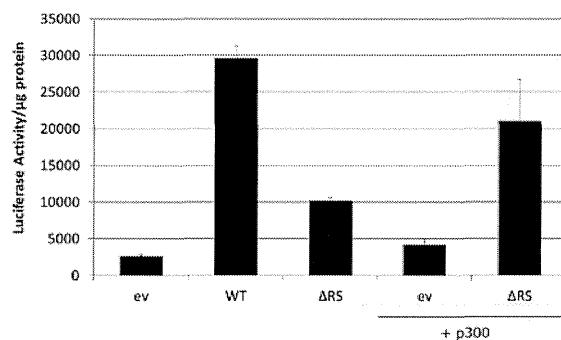
図 5. Gata1 との蛋白質間相互作用



4) 活性化因子による転写活性化能の回復

C/EBP ϵ の活性化因子の発現を増強することで、 Δ RS の転写活性化能が回復するかどうかを検討した。アセチル化酵素の一種である p300 の発現ベクターを C/EBP ϵ 発現ベクターとともに HEK293 細胞に共導入し、レポーターアッセイを行った。 Δ RS では、p300 が共導入されると、その転写活性化能が約 2 倍となり、WT に比べ低いものの、転写活性化能の回復が認められた (図 6)。

図 6. p300 による転写活性化能の回復



D. 考察

Δ RS は、C/EBP ϵ 遺伝子のロイシンジックドメインにおけるインフレーション変異であることが特徴である。本研究では、 Δ RS が C/EBP ϵ の転写活性化能の低下を引き起こす機序、また、変異 C/EBP ϵ の機能を回復させる因子について検討した。

既報の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。本研究により、C/EBP ϵ 遺伝子異常が SGD を引き起こす新たなメカニズムが明らかにされた。

さらに、我々は C/EBP ϵ と協働する転写因子や活性化因子の発現を増強することで、変異 C/EBP ϵ の転写活性化能を回復させる可能性を見出した。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り、今後さらなる検討が必要と考えられた。

E. 結論

Δ RS における転写因子としての機能低下は、DNA 結合能の異常ではなく、蛋白相互作用の異常によるものと推察された。また、C/EBP ϵ の活性化因子である p300 が Δ RS の転写活性化能を回復する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 村岡正裕, 和田泰三, 東馬智子ら. 皮膚の反復性化膿性病変を契機として診断に至った好中球二次顆粒欠損症の 1 例. 第 7 回日本免疫不全研究会. 2014 年 1 月 25 日. 福岡

2) 村岡正裕. 皮膚の反復性化膿性病変を契機として診断に至った好中球二次顆粒欠損症の 1 例. 第 3 回小児免疫不全セミナー. 2014 年 2 月 7 日. 金沢

3) 村岡正裕, 榊原康久, 和田泰三ら. 好中球二次顆粒欠損症における新規 C/EBP ϵ 変異の機能解析. 第 22 回食細胞異常研究会. 2014 年 12 月 13 日. 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

八角 高 裕 (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)
柴田 洋 史 (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)
西小森 隆 太 (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)
小原 収 (かずさDNA研究所)
(理化学研究所横浜研究所免疫アレルギー科学総合研究センター)
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)

研究要旨

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上、病的意義の不明な遺伝子変異に対して機能評価を行う系も存在していない。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。今年度の研究では、現在当教室で行っている FHL スクリーニングの有効性を評価すると共に、FHL モデル細胞株の作成と、それを用いた遺伝子変異の機能解析系確立を目指した研究を行った。

診断解析を行った 68 症例中、FHL2:4 例と FHL3:6 例を確認した。FHL 全症例で責任蛋白の発現低下が認められ、全ての FHL3 症例では CD57 陽性 CTL の脱顆粒機能が低下していた。遺伝子検査の結果、スクリーニングで診断された以外の FHL 症例は確認されず、現状スクリーニングの高い感度と特異度が確認された。

FHL モデル細胞株の作成に関しては、ヒト CTL 細胞株 (TALL-104) をもとに、TALEN もしくは CRISPR/Cas9 による二重鎖切断+ターゲティングベクターの共導入による UNC13D 遺伝子ノックアウトと薬剤耐性ユニットの組み込みにより、FHL3 モデル細胞株樹立を行っている。細胞株樹立後は、遺伝子変異の機能解析と病態解明に加え、喪失機能を回復させる薬剤のスクリーニングへの応用を予定している。

A. 研究目的

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。

我々の教室では、これまで FHL の迅速診断に取り組んできた。フローサイトメトリー (FACS) を用いたスクリーニングにより、本邦 FHL 症例の殆どを占める FHL2/3 症例の迅速診断が可能

となったが、その有効性の評価は十分に検討されていない。又、病的意義の不明な遺伝子変異に対し、その機能解析を行う系が存在していない。

以上を背景として、本研究では現在当科にて行っている FHL スクリーニングの有効性を評価すると共に、FHL のモデル細胞株の作成と、それを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がる事が期待される。

B. 研究方法

①患者検体の解析：

2013年8月以降、当科に解析依頼のあったHLH

症例に対し、NK 細胞及び CTL の脱顆粒機能解析・NK 細胞内の Perforin 発現解析・血小板内の Munc13-4/Syntaxin11/Munc18-2 発現解析によるスクリーニングを行った。加えて、全症例に対して (PRF1/UNC13D/STX11/STXBP2/SH2D1A/BIRC4/ITK) の遺伝子解析を行い、その有効性を評価した。

②FHL3 モデル細胞株の作成：

CTL細胞株 (TALL-104) をもとに、TALENもしくはCRISPR/Cas9による二重鎖切断+ターゲティングベクターの共導入によるUNC13D遺伝子ノックアウトと薬剤耐性ユニットの組み込みを行った。

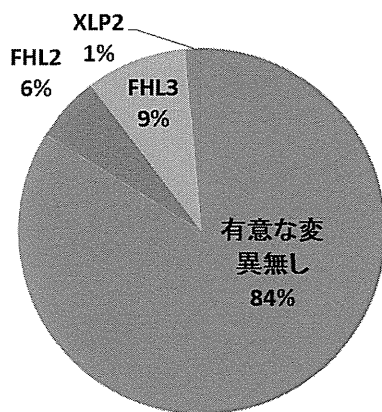
(倫理面への配慮)

研究を行うに当たり、京都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

①患者検体の解析：

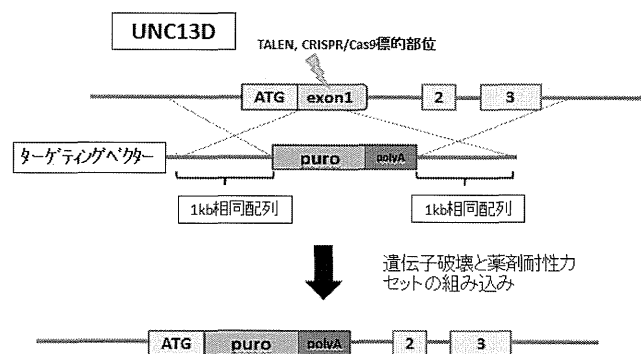
解析を行った 68 症例中、スクリーニング検査により FHL2:4 例と FHL3:6 例を確認した。FHL 全症例で責任蛋白の発現低下が認められ、FHL3 症例では CD57 陽性 CTL の脱顆粒機能が低下していた。遺伝子検査では追加の症例は確認されず、現状 FHL スクリーニング検査の高い有用性が確認された。



	遺伝子変異		蛋白発現		脱顆粒能
	1st allele	2nd allele	FACS	Western blot	FACS
FHL2					
1	c.1090_1091delCT	c.1288_1289insG	低下	N/A	正常
2	c.1090_1091delCT	c.1A>G	低下	N/A	正常
3	c.1349C>T	c.374T>C	低下	N/A	正常
4	c.50delT	c.50delT	低下	N/A	N/A
FHL3					
1	c.118-308C>T	c.118-308C>T	低下	低下	低下
2	c.2381delT	c.322-1G>A	低下	低下	低下
3	c.754-1G>C	c.1596+1G>C	低下	低下	低下
4	c.118-308C>T	c.1596+1G>C	低下	低下	低下
5	c.118-308C>T	c.1596+1G>C	低下	低下	低下
6	c.247C>T	c.1596+1G>C	低下	低下	低下

②FHL3モデル細胞株の作成：

CTL細胞株 (TALL-104) をもとに、UNC13D exon 1 の開始コドン近傍の下流に platinum TALEN 及び CRISPR/Cas9 の標的部を設定し、それぞれ設計・発現ベクター作成を行った。同時にターゲティングベクターとして同標的部位の両側 1kbs の相同配列を持つピューロマイシン耐性遺伝子ユニットのコンストラクトを作成した。Electroporation法により遺伝子共導入を行い、二重鎖切断+ターゲティングベクターの共導入による UNC13D 遺伝子ノックアウトと薬剤耐性ユニットの組み込みを行った。



D. 考察

今回の研究により、現状のFHLスクリーニングの高い有用性が確認され、急性期HLH症例に対する治療選択に大きく寄与するものと思われる。又、新たな遺伝子改変技術を用いてFHLモデル細胞株の樹立に取り組んでおり、今後は確立した細胞株を用いた疾患病態解明と新たな治療法の揮発に取り組む方針である。今回の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、この現象はこれまでの報告を裏付けるものであった。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。

E. 結論

現在の FHL スクリーニングの高い有用性が確認され、早期診断の問題はほぼ解決された。今後 FHL モデル細胞株の確立を通じ、病態解明と共に、新たな治療薬の開発へと繋げたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) BCG vaccination in patients with severe combined immunodeficiency: complications, risks, and vaccination policies. Marciano BE, Huang CY, Joshi

G, Rezaei N, Carvalho BC, Allwood Z, Ikinciogullari A, Reda SM, Gennery A, Thon V, Espinosa-Rosales F, Al-Herz W, Porras O, Shcherbina A, Szaflarska A, Kiliç Ş, Franco JL, Gómez Raccio AC, Roxo P Jr, Esteves I, Galal N, Grumach AS, Al-Tamemi S, Yildiran A, Orellana JC, Yamada M, Morio T, Liberatore D, Ohtsuka Y, Lau YL, Nishikomori R, Torres-Lozano C, Mazzucchelli JT, Vilela MM, Tavares FS, Cunha L, Pinto JA, Espinosa-Padilla SE, Hernandez-Nieto L, Elfeky RA, Ariga T, Toshio H, Dogu F, Cipe F, Formankova R, Nuñez-Nuñez ME, Bezrodnik L, Marques JG, Pereira MI, Listello V, Slatter MA, Nademi Z, Kowalczyk D, Fleisher TA, Davies G, Neven B, Rosenzweig SD. *J Allergy Clin Immunol.* 133:1134-41. 2014

- 2) Real-time single-cell imaging of protein secretion. Shirasaki Y, Yamagishi M, Suzuki N, Izawa K, Nakahara A, Mizuno J, Shoji S, Heike T, Harada Y, Nishikomori R, Ohara O. *Sci Rep.* 4:4736. 2014
- 3) 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, Shirai T, Ohara O, Fujita T, Heike T. *Am J Hum Genet.* 95:121-5. 2014
- 4) Munc13-4 deficiency with CD5 downregulation on activated CD8+ T cells. Wada T, Yasumi T, Toma T, Hori M, Maeda S, Umeda K, Heike T, Adachi S, Usami I, Yachie A. *Pediatr Int.* 56:605-8. 2014
- 5) Enhanced chondrogenesis of iPS cells from neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase-1-independent cAMP/PKA/CREB pathway. Yokoyama K, Ikeya M, Umeda K, Oda H, Nodomi S, Nasu A, Matsumoto Y, Izawa K, Horigome K, Kusaka T, Tanaka T, Saito MK, Yasumi T, Nishikomori R, Ohara O, Nakayama N, Nakahata T, Heike T, Toguchida J. *Arthritis Rheumatol.* 67:302-314. 2015

2. 学会発表

- 1) 当科における FHL(家族性血球貪食性リンパ組織球症)スクリーニングの現状 堀雅之、八角高裕、西小森隆太、平家俊男 第 117 回日本小児科学会学術集会

- 2) 自己炎症性疾患における診療研究の新展開 “炎症”と小児発熱性疾患 疾患特異的 iPS 細胞を用いた CINCA/NOMID における骨幹端家系性の機序解明 西小森隆太、横山宏司、梅田雄嗣、池谷真、中川権史、納富誠司郎、八角高裕、田中孝之、斎藤潤、小田紘嗣、小原収、中山直樹、戸口田淳也、平家俊男 第 117 回日本小児科学会学術集会
- 3) エクソンスキップに伴い非典型的な表現型を呈した Filamin A 異常症の兄弟例 小田紘嗣、河合朋樹、中川権史、日衛嶋栄太郎、井澤和司、西小森隆太、小原収、沼部博直、平家俊男 第 117 回日本小児科学会学術集会
- 4) IBD 患者では有意な Mucosal associated invariant T 細胞の減少、アポトーシスの亢進が認められる 日衛嶋栄太郎、河合朋樹、仲瀬裕志、鶴山竜昭、森本剛、八角高裕、松浦稔、吉野琢哉、池内浩基、久松理一、河田健二、酒井義治、千葉勉、西小森隆太、平家俊男 第 51 回日本消化器免疫学会総会
- 5) 特徴的な臨床症状から NFKB2 遺伝子変異を同定した早発型 CVID の一例 本田吉孝、下寺佐栄子、大音泰介、田中孝之、河合朋樹、八角高裕、西小森隆太、平家俊男 第 8 回日本免疫不全症研究会学術集会

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

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

担当責任者 小林 正夫 (広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授)
津村 弥来, 浅野 孝基, 溝口 洋子, 岡田 賢

研究要旨:慢性皮膚粘膜カンジダ症(Chronic Mucocutaneous Candidiasis Diseases:CMCD)は、爪、皮膚、粘膜を中心に、慢性・反復性にカンジダ感染を呈する原発性免疫不全症である。2010年にSTAT1機能獲得性変異によりCMCDが発症することが報告されたことから、我々は本邦における患者の網羅的な解析を行った。その結果、本邦では半数以上のCMCD患者がSTAT1機能獲得性変異に基づき発症することを同定するとともに、フローサイトメトリーを用いた迅速診断法を確立した。STAT1機能獲得性変異以外にもIL-17シグナル伝達に関与する*IL17F*、*IL17RA*、*ACT1*の異常でCMCDが発症することが知られているが、これらの遺伝子異常を有する患者は、世界で数例ずつ認めるのみの稀少疾患である。我々は、STAT1正常のCMCD患者を対象にエクソーム配列解析を行い、IL-17R α 異常症の姉弟例を同定に成功した。患者は、R86X変異をホモ接合性変異に有しており、患者由来末梢血単核球は、細胞表面におけるIL-17R α 発現が欠損していた。患者の臨床症状を検討したところ、姉弟はともに口腔粘膜カンジダ症を呈するほか、夏季に顔面を中心とした皮疹を繰り返していた。皮疹は抗生剤内服、アクアチム塗布に反応したことから、真菌感染でなく、細菌感染が原因と考えられた。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の役割を検討している。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、現在抗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抗体療法の易真菌感染性の可能性を示唆する、潜在的危険性の予見にも重要な知見をもたらすと考えている。

A. 研究目的

慢性皮膚粘膜カンジダ症(Chronic Mucocutaneous Candidiasis Diseases:CMCD)は、爪、皮膚、粘膜を中心に、慢性・反復性にカンジダ感染を呈する原発性免疫不全症である。過去の研究で、カンジダに対する宿主感染防御にIL-17が重要な役割を果たすことが明らかとなっており、IL-17の産生障害・作用障害がCMCDの発症分子基盤となると考えられている。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。我々の研究室では、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)。STAT1 機能獲得性変異以外にも *IL17F*, *IL17RA*, *ACT1* の異常で CMCD が発症することが知られているが、これらの遺伝子異常を有する患者は、それぞれ世界で数例認めるのみの稀少疾患であり、十分な病態解析はなされていない。

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 異常症の姉弟例に同定に至った。IL-17R α 異常症は世界で 1 例を認めるのみの稀少疾患であり、変異 *IL17RA* の機能解析を含めた病態解析を行った。

B. 研究方法と症例

【症例 1】

9 歳女児。幼少期から難治性口腔カンジダ症を認めていた。また、前額部から鼻根部を中心に季節性に増悪する紅斑丘疹を認めていた。皮疹は抗生剤内服、抗菌薬塗布に反応したことから、真菌感染でなく、細菌感染が原因と考えられた。血液検査では特記すべき所見は認めず、免疫グロブリン値も正常であった。エクソーム配列解析により *IL17RA* の新規ホモ接合変異 (R66X/R66X) が同定され、診断に至った。

【症例 2】

7 歳男児で、症例 1 の弟。両血管右室起始症にて外科手術歴あり。幼少期からの軟治性口腔カンジダ症、季節性に悪化する難治性皮疹を呈していた。血液検査で異常所見認めず、免疫グロブリン値も正常であった。エクソーム配列解析で症例 1 と同一の変異が同定され診断に至った。血族結婚はなく、両親はヘテロ接合性保因者であるこ

とが確認された。

【研究方法】

Flow cytometry による解析と直接シーケンス法による *STAT1* 遺伝子解析を行い、臨床的に頻度が高い *STAT1* 異常症患者を除外した。次に、*STAT1* 正常の CMCD 患者を対象にエクソーム配列解析にて責任遺伝子の探索を行った。同定した遺伝子異常は、直接シーケンス法により確認した。機能解析は、フローサイトメトリー、qPCR、WB で行った。

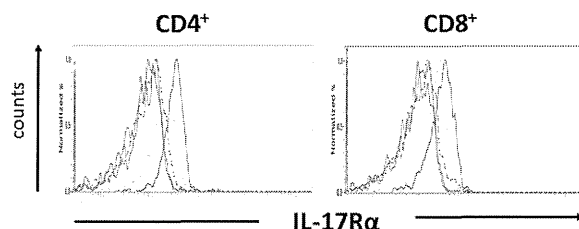
(倫理面への配慮)

本研究は、広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会での承認を得た。

C. 研究結果と考察

STAT1 正常の姉弟例の CMCD 症例で、IL-17R α の責任遺伝子である *IL17RA* のホモ接合性変異 (R86X) を同定した。患者末梢血から mRNA を抽出後、cDNA を作成し遺伝子の発現を検討したところ、*IL17RA* は正常と当程度の発現を認めた。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。これらの所見から、同定された変異は disease causing mutation と考えた。

図. 細胞表面における IL-17R α 発現解析 (FACS)



患者 (赤) で IL-17R α の発現が欠損していた。ヘテロ接合性変異を有する父親 (黄色) は、健常者 (青) と患者の中間的な IL-17R α 発現を示した。黒点線は isotype control

D. 結論

本邦で初の IL-17R α 異常症の姉弟例を

同定した。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 の役割を検討している。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と考えている。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica* 99: 19-27, 2014.
- 2) Fujii Y, Ishikawa N, Kobayashi Y, Kobayashi M, Kato M: Compound heterozygosity in GPR56 with bilateral frontoparietal polymicrogyria. *Brain & Development* 36: 528-31, 2014.
- 3) Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Tajima G, Kobayashi M: Ictal electroencephalography and electromyography features in symptomatic infantile epileptic encephalopathy with late-onset spasms. *Neuropediatrics* 45: 36-41, 2014.
- 4) Kobayashi Y, Ishikawa N, Fujii Y, Nakamura K, Kobayashi M: A case of trisomy 18 with exacerbation of seizures triggered by administration of valproic acid. *Am J Med Genet A* 164A: 285-6, 2014.
- 5) 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. *Journal of Leukocyte Biology* 95: 667-676, 2014.
- 6) Joichi Y, Chijimatsu I, Yarita K, Kamei K, Miki M, Onodera M, Harada M, Yokozaki M, Kobayashi M, Ohge H: Detection of *Mucor velutinosus* in a blood culture after autologous peripheral blood stem cell transplantation: a pediatric case report. *Medical Mycology Journal* 55: E43-48, 2014.
- 7) Yasumura J, Wago M, Okada S, Nishikomori R, Takei S, Kobayashi M: A 2-year-old Japanese girl with TNF receptor-associated periodic syndrome: A case report of the youngest diagnosed proband in Japan. *Modern Rheumatology* 2014.
- 8) Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Samukawa M, Kusunoki S, Kobayashi M: A pediatric case of peripheral polyneuropathy with IgM anti-GM1 antibody associated with a group A beta-hemolytic streptococcus infection. *Pediatric Neurology* 51: 441-3, 2014. Doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2014.03.019. Epub 2014 Mar 27.
- 9) Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Kobayashi M: Increased interleukin-6 high-sensitivity C-reactive protein levels in pediatric epilepsy patients with frequent, refractory generalized motor seizures. *Seizure* 2014. 10.007. (Epub ahead of print)
- 10) 小林正夫, 川口浩史: 自己免疫性好中球減少症 日本内科学会雑誌 103: 1639-1644, 2014.
- 11) 溝口洋子, 小林正夫: 重症先天性好中球減少症の病態解析研究の進歩 血液内科 68: 676-81, 2014.
- 12) 土居岳彦, 小林正夫: 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 小児科 55: 1577-1583, 2014.

- 13) 岡田 賢, 小林正夫: 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 血液内科 69: 405-409, 2014.
- 14) 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: 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 臨床血液 55:2294-2299, 2014.

F. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

2. 学会発表

- 1) Akari N. Utsunomiya, Miyuki Tsumura, Norioki Ohno, Mizuka Miki, Hiroshi Kawaguchi, Kazuhiro Nakamura and Masao Kobayashi: Excessive Nitric Oxide production of CGD neutrophils induces the down-regulation of *NOS3* and *EDNI* expression in human endothelial cells. The 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, Dec 6 - 9, 2014
- 2) Yoko Mizoguchi, Satoshi Okada, Miyuki Tsumura, Osamu Hirata, Shizuko Minegishi, Jean-Laurent Casanova, Tomohiro Morio, Masao Kobayashi: *STAT1* gain-of-function in patients with chronic mucocutaneous candidiasis can be detected by the excessive phosphorylation of STAT1 in peripheral blood monocytes. The 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, Dec 6 - 9, 2014
- 3) Seich Hayakawa, Seiko Maeno, Norioki Ohno, Satoshi Okada, Yutaka Nishimura, Michiko Hayashidani, Masao Kobayashi: Significant augmentation of regulatory T cells in early neonatal period. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Prague, Czech, Oct 29 to Nov 1, 2014.
- 4) Yoko Mizoguchi, Aya Furue, Ikue Chijimatsu, Mizuka Miki, Keita Tomioka, Nakao Konishi, Atsushi Ono, Hiroshi Kawaguchi, Kazuhiro Nakamura and Masao Kobayashi: Early elimination of Factor VIII inhibitor by ITI with high dose immunoglobulin in hemophilia A children. WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2014 World

慢性肉芽腫症の治療指針 -PEG-DAO 酵素補充療法の可能性-

担当責任者 布井 博幸 宮崎大学医学部生殖発達医学小児科学分野 教授
担当協力者 前田 浩 崇城大学 DDS 研究所 特任教授

研究要旨

慢性肉芽腫症(Chronic Granulomatous Disease; CGD)は、食細胞の活性酸素産生能低下により、食細胞殺菌能が低下する疾患である。深部臓器感染症に罹患し、肉芽腫形成を主体とした臨床症状を示す。これまでの色々な治療法が試みられたが、我々は肺動脈を囲み外科的にも切除が難しい肺肉芽腫症にステロイドと H₂O₂ 局所注入により肉芽腫縮小効果を示した患者を経験した。炎症局所で H₂O₂ の産生が可能な PEG-DAO による酵素補充療法の可能性も報告した。

A. 研究目的

日本における慢性肉芽腫症(Chronic Granulomatous Disease; CGD)患者の治療は、これまで 1) 細胞内寄生菌に対しても細胞内で殺菌能を示す ST 合剤の内服予防内服、2) 真菌感染に対してイトラコナゾール、ミカファンギン、ボリコナゾールなどの新薬、3) 免疫補助剤としてインターフェロン γ 予防皮下注、4) 過剰炎症症候群に対し、ステロイド、サリドマイドや IL-1 に対するアナキンラ療法などが試みられている。また 5) 骨髄移植とその前処置法が発達し、造血幹細胞を用いた遺伝子治療や、iPS を用いた遺伝子編集なども試みられている。

今回は肉芽腫組織に H₂O₂ 局所注入した症例の経験し、これに代わる方法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) 製剤による治療の可能性を示した。

B. 研究方法

1) 症例 3 歳 男児
妊娠 39 週 0 日で周産期異常なく出生。生後 40 日難治性の右下肺野に限局する肺炎が出現した。生後 3 ヶ月、好中球活性酸素産生能低下を認め、慢性肉芽腫症 (CYBB c.742insA, 2471lu>fs) と診断された。3 歳時右背側肺野に肺動脈を巻き込む肉芽腫が出現、肺切除もできず、治療に難渋していた。図 1 のように、この症例に、肉芽腫の縮小効果を考えステロイドのまた腎障害を予防する意味でもアンフォテリシンの局所注入療法を 8 ヶ月間行った。ある程

度の縮小効果は得られたが、外科での肺切除は不可能ということで、20mM H₂O₂ 溶液を調剤してもらい、インフュージョン・ポンプを用いて 0.5-1ml 局所注入を 1 1 回安全に実施した。

2) H₂O₂ 濃度の設定：マウスに H₂O₂ を経鼻投与し、その刺激性が出ない濃度 (20mM) を決定した。1ml の 20mM H₂O₂ 使用で約 0.25ml の微量な O₂ ガスが発生すると予測され、危険はないものと考えられた。

3) PEG-DAO 作成：詳しくは *Experimental Biology and Medicine* 2012; 237: 703-708 に記載しているので参照していただきたい。簡略に述べると豚 DAO cDNA を pET3c plasmid に組み込み BL21 (DE3) で形質転換後、IPTG 添加にてタンパク発現を誘導し、遠心分離、硫酸分画、蛋白精製後、サクシンアミド活性化 PEG と反応させ、限外濾過後、未反応物質を除いたものを使用した。

(倫理面への配慮)

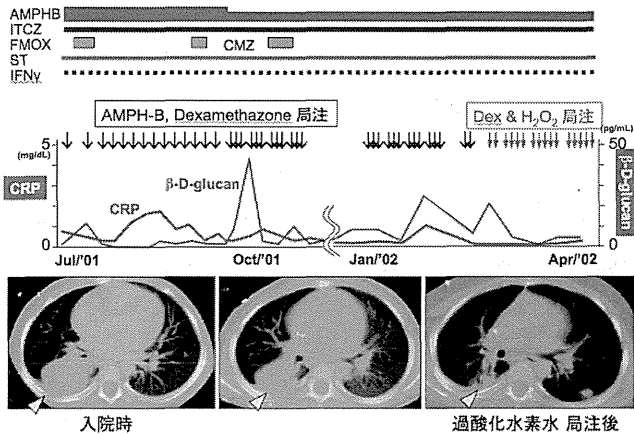
倫理規定に沿って患者家族より同意を得て、カテーテル肉芽腫内に留置し、インフュージョン・ポンプを用いて、20mM H₂O₂ を 0.5-1.0ml 直接肉芽腫へ局所注入した。患者好中球を用いた in vitro 実験も倫理審査を受け行っている。

C. 研究結果

図 1 に示したように、AMPH-B, Dexamethazone の局所注入のみでは十分な肉芽腫の縮小効果

が得られなかったが、Dexamethazone と H₂O₂ の 1 1 回の局所注入により、肉芽腫の縮小効果が得られ、外科的摘出が可能になった。

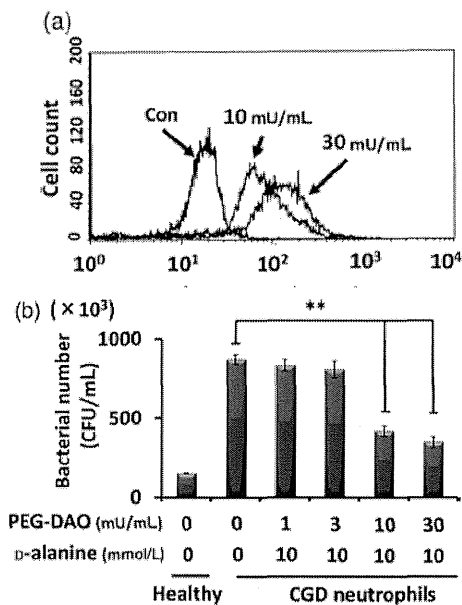
図 1 臨床経過



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 (H₂O₂) の移行が証明された (図 2 a)。

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 (図 2 b)。

図 2 : PEG-DAO の *in vitro* 実験



D. 結論

CGD患者へのH₂O₂の局所注入は安全に実施され、ある程度の肉芽腫縮小効果を確認できた。PEG-DAOによる *in vitro* の実験でもその殺菌効果が確認できた。今後PEG-DAOの安全性や効果についての動物などを使った *in vivo* 基礎的検討が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Proposed strategy for the use of high-dose chemotherapy with stem cell rescue and intrathecal topotecan without whole-brain irradiation for infantile classic medulloblastoma. Yamada A, Moritake H, Kamimura S, Yamashita S, Takeshima H, **Nunoi H**. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Dec; 61(12): 2316-8.

2) Clinical characteristics and genetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a Japanese retrospective study by the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group. Moritake H, Kamimura S, **Nunoi H**, Nakayama H, Suminoe A, Inada H, Inagaki J, Yanai F, Okamoto Y, Shinkoda Y, Shimomura M, Itonaga N, Hotta N, Hidaka Y, Ohara O, Yanagimachi M, Nakajima N, Okamura J, Kawano Y. *Int J Hematol*. 2014 Jul;100(1):70-8.

3) Nephrotic syndrome complicated by idiopathic central diabetes insipidus. Konomoto T, Tanaka E, Imamura H, Orita M, Sawada H, **Nunoi H**. *Pediatr Nephrol*. 2014 May;29(5):927-30.

2. 学会発表

1) Unknown fever and cytokine profiles. Hiroyuki Nunoi, Toyoki Nishimura, Erina Taniguchi. 12th innate immunity and cytokine conference in San Diego, USA, 2014/1/31

2) 溶血性尿毒症症候群におけるチトクロームCの検討. 田中悦子, 此元隆雄, 今村秀明, 織田真悠子, 中原彰彦, 布井博幸. *日本小児腎臓病学会雑誌* 27(suppl): 106-106, 2014.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

細網異形成症患者由来 iPS 細胞を用いた病態解析

中畑龍俊(京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門)
丹羽明(京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門)
斎藤潤(京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門)
大嶋宏一(コロンビア大学)

研究要旨

細網異形成症はともに重症複合型免疫不全症に好中球成熟障害を伴う極めて重症の免疫不全症であり、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由来 iPS 細胞を用いて、アインザイムである AK1 遺伝子の役割を検討した。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るように思われた。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 の発現が上昇することが確認された。今後、このフィードバック機構のメカニズムなどについて、さらに検討を進めたい。

A. 研究の目的

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。SCID のうち2%以下を占めるとされる。通常常染色体劣性遺伝形式をとる。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、自然免疫欠損、液性・細胞性獲得免疫欠損を特徴とし、生後数日以内に致死性の敗血症を併発して死亡する。根治

療法は造血幹細胞移植であり、生存例では進行性の感音性難聴を合併する。一部の患者で Adenylate kinase 2 (AK2)遺伝子に変異を認める。しかし、AK2 欠損がなぜ血球分化異常をきたすのか、そのメカニズムはほとんどわかっていない。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。血球分化異常をきたす理由として、血球以外ではほかの Adenylate kinase のアイソエンザイムなどが冗長的に働き、AK2 欠損による機能障害を回避しているのではないかという仮説がある。そこで、本研究では、細網異形成症の iPS 細胞を用いて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することとした。

B. 研究方法

HEK293T 細胞を用いた解析

HEK293T 細胞に AK1 または AK2 の shRNA を導入し、経時的に細胞を回収した。サンプルより RNA を抽出し、AK1 及び AK2 の発現量を qPCR 法にて測定した。それぞれの遺伝子の発現量は、shRNA 導入前の値を 1 として相対値で示した。

細網異形成症患者由来 iPS 細胞の機能解析

平成 26 年度までに樹立した細網異形成症患者由来 iPS 細胞より分化実験を行った。細網異形成症の原因遺伝子である AK2 遺伝子をそれぞれの患者由来 iPS 細胞へ導入し、対照とした。

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。2 名の細網異形成症患者 (RD-1 と RD-2 とする) 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 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。各段階の細胞をセルソーターにより分取し、qPCR 法により、AK1、AK2 遺伝子の発現量を検討した。なお、血球前駆細胞を KDR+CD34+、骨髄球系細胞を CD13+CD14-、単球系細胞を CD14+ として分取した。

(倫理面への配慮)

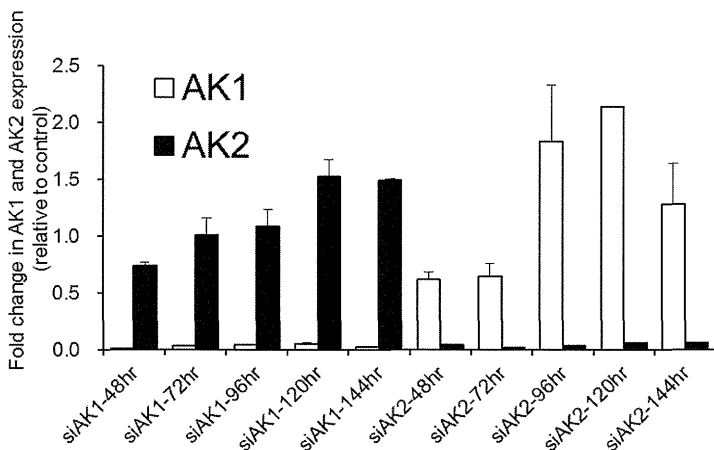
本研究は、疾患を有する患者さんから検体を頂き iPS 細胞を作成して行う研究であるため、患者さんの同意・協力を必要とする研究である。また、作成する iPS 細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必須であり、個人情報の取り扱いの配慮を必要とする研究である。この 2 点に対して、京都大学医学部医の倫理委員会に、ヒトを対象とした医学の研究および臨床応用実施申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究」およびヒト遺伝子解析申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の 2 申請を行った。その後、京都大学医学部医の倫理委員会での審査を頂き、平成 2

0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

HEK293T 細胞を用いた解析

HEK293T 細胞において、AK1 と AK2 の acute knockdown を行い、それぞれの発現量を継続的に観察した。Knock down により、それぞれの遺伝子は、極めて効率よく発現が抑制された。一方で、AK1 を抑制した際には AK2 が、AK2 を抑制した際には AK1 がそれぞれ上昇し、120 時間後にそれぞれ約 1.5 倍、約 2 倍に達した。



細網異形成症患者由来 iPS 細胞の機能解析

次に、細網異形成症患者由来の iPS 細胞とその AK2 補充クローンを血球分化させ、分化ステージ毎の AK1・AK2 の発現を観察した。AK2 補充クローンでは、AK2 の発現は高値を示したが、iPS 細胞の段階では、AK1 の発現に差はなかった。興味深いことに、患者 iPS 細胞では、骨髄球系への分化により、AK1 の発現が対照群に比べて上昇した。この傾向は神経細胞や血球前駆細胞では著明ではなく、分化障害のない単球系細胞では認められなかった。

D. 考察

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るように思われる。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 の発現が上昇することが確認された。これは、AK2 欠損状態では、AK1 の需要が分化段階特異的に高まることを示唆しているが、AK1 の発現量と細胞内の分布は、分化を回復させるほど十分なものではないの

