

だろう。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。

E. 結論

細網異形成症患者の血球分化異常における、AK1とAK2の関係を解析した。今後、さらに踏み込んだ病態解析を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morishima T, Watanabe KI, 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(1):19-27. 2014.
- 2) Daifu T., Kato I., Kozuki K., Umeda K., Hiramatsu H., Watanabe K., Kamiya I., Taki T., Nakahata T., Heike T., Adachi S.: The clinical utility of genetic testing for t(8;16)(p11;p13) in congenital acute myeloid leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 36(5):e325-7. 2014.
- 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 .
- 4) 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 1 leukemia who

developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology (JSPHO). *Br J Haematol.* 165(5):682-7. 2014.

- 5) 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: Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica* 99:1312-6. 2014.
- 6) Ochi K., Takayama N., Hirose S., Nakahata T., Nakauchi H., Eto K.: Multicolor staining of globin subtypes reveals impaired globin switching during erythropoiesis in human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 3(7):792-800. 2014.
- 7) Sakashita K., Kato I., Daifu T., Saida S., Hiramatsu H., Nishinaka Y., Ebihara Y., Feng M., Matsuda K., Saito S., Hirabayashi K., Kurata T., Le U., Nakazawa Y., Tsuji K., Heike T., Nakahata T., Koike K.: In vitro expansion of CD34+CD38- cells under stimulation with hematopoietic growth factors on AGM-S3 cells in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 08/2014; DOI: 10.1038/leu.2014.239
- 8) Fukuta M., Nakai Y., Kirino K., Nakagawa M., Sekiguchi K., Nagata S., Matsumoto Y., Yamamoto T., Umeda K., Heike T., Okumura N., Koizumi N., Sato T., Nakahata T., Saito M., Otsuka T., Kinoshita S., Ueno M., Ikeya M., Toguchida J.: Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media.. *PLOS ONE* Published: December 02, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0112291

- 9) Moriwaki K., Manabe A., Taketani T., Kikuchi A., Nakahata T., Hayashi Y.: Cytogetics and clinical features of pediatric myelodysplastic syndrome in Japan. *Int. J. Hematol.* 100:478-484,2014.
- 10) Suzuki N., Niwa A., Yabe M., Hira A., Okada C., Amano N., Watanabe A., Watanabe K., Heike T., Takata M., Nakahata T., Saito M.: Pluripotent cell models of Fanconi anemia identify the early pathological defect in human hemoangiogenic progenitors. *Stem Cells Translational Medicine* in press.
- 11) 中畑龍俊：iPS細胞からHTSに耐える疾患モデル評価系の構築。(特別インタビュー) 国際医薬品情報通巻第1026号：25-27 2015.

2. 学会発表

- 1) 中畑龍俊：特別講演、iPS細胞を用いた小児医療の将来。第50回中部日本小児科学会 2014年8月10日 信州大学医学部附属病院
- 2) 中畑龍俊：特別講演、臍帯血中の造血幹細胞発見秘話と最近のiPS細胞研究。第38回日本血液事業学会総会 2014年29-31日(29日) 広島国際会議場
- 3) Niwa Akira, Nakahata Tatsutoshi, Saito Megumu: Efficient and less labor-intensive methods for inducing vascular endothelial cells from human pluripotent stem cells. *ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center (CANADA)* June 18-21,2014(6/18, poster)
- 4) Iki Takehiro, Tanaka Michihiro, Saito Megumu, Fijibuchi Wataru, Nakahata Tatsutoshi: Microarray analyses cochlea-derived otospheres reveal putative transcription factors which regulate characters of the otospheres. *ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center (CANADA)* June 18-21,2014(6/20, poster)
- 5) Suzuki Naoya, Samata Bumpei, Habu Toshiyuki, Watanabe Akira, Nakahata Tatsutoshi, Takahashi Jun, Saito Megumu: Impaired neuronal maturation on seckel syndrome is caused by loss of self-organization and centrosome integrity during early neuronal development. *ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver Convention Center(CANADA)* June 18-21,2014(6/20, poster)
- 6) Norihiro Nishimoto, Miho Murakami, Mari Ito, Yukari Saito, Megumu Saito, Akira Niwa, Tatsutoshi Nakahata: Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Rheumatoid Arthritis (RA) Patients Reproduce CD14 (+) CD15 (+) Abnormal Myeloid Cells Observed in Bone Marrow of Severe RA Patients. *The American College of Rheumatology (ACR) and the Association of Rheumatology Health Professionals (ARHP) annual meeting 2014* November 14 - 19, 2014, Boston Convention and Exhibition Center (USA), 口演
- 7) Daisuke Hasegawa, Shinsuke Hirabayashi, Shizuka Watanabe, Yuji Zaike, Masahiro Tsuchida, Atsuko Masunaga, Ayami Yoshimi, Asahito Hama, Seiji Kojima, Masafumi Ito, Tatsutoshi Nakahata, Atsushi Manabe: Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Refractory Cytopenia of Childhood. *56th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY*, December 6-9, 2014, San Francisco (poster).
- 8) 横山宏司、西小森隆太、納富誠司郎、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、池谷真、小原収、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男：患者由来iPS細胞を用いたCINCA症候群における関節症病態の解析。第35回日本炎症・再生医学会 2014年7月1-4日(2日) 万国津梁館(沖縄) ポスター発表
- 9) 桐野浩輔、尾崎富美子、丹羽明、中畑龍俊、齋藤潤、平家勇司：末梢血Natural Killer細胞を用いた人口多能性幹細胞の樹立。第35回日本炎症・再生医学会 2014年7

月1-4日(2日) 万国津梁館(沖縄) ポスター発表

- 10) 王茂治、丹羽明、齋藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞を用いた Chediak-東症候群の病態解析. 第35回日本炎症・再生医学会 2014年7月1-4日(2日) 万国津梁館(沖縄) ポスター発表
- 11) 伊藤真理、村上美帆、丹羽明、齋藤潤、中畑龍俊、西本憲弘：疾患 iPS 細胞を用いた破骨細胞分化系の構築と分化能の検討. 第1回日本骨免疫会議 2014年7月1-4日(1日) 万国津梁館(沖縄) ポスター発表
- 12) 中畑龍俊：アカデミアの立場から(テーマ：日本から発信するレギュラトリーサイエンス). 第4回レギュラトリーサイエンス学会学術大会ーレギュラトリーサイエンスの世界展開 2014年9月5-6日(6日) 一橋大学一橋講堂
- 13) Shigeharu Oh, Akira Niwa, Megumu K. Saito, Tatsutoshi Nakahata: Modeling Chediak-Higashi Syndrome using patient's specific iPS cells. (一般口演) 第76回日本血液学会学術集会 2014年10月31日-11月2日(31日) 大阪国際会議場

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

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

研究要旨

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肺炎・皮膚膿瘍と血清 IgE の著しい高値、アトピー性皮膚炎の合併を特徴とする。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、現時点での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。

ゲノム編集技術の進歩により、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高まってきた。高 IgE 症候群は片アレルのミスセンス変異により発症し、その多くは正常アレルと変異アレルに 1 塩基しか差異が存在しない。そこでこの高 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。そこで本研究では、高 IgE 症候群患者の様々な STAT3 の 1 塩基置換を CRISPR/Cas9 が変異アレル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。

A. 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否かを検討した。

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となった。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あるのが明らかになった。

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となったものの、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。

E. 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。

F. 研究発表

1. 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 2015 (印刷中)
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 東京医科歯科大学大講堂

2. 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*

G. 知的財産権の出願登録状況

該当なし

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

担当責任者 小野寺雅史 国立成育医療研究センター 成育遺伝研究部部长

研究要旨

慢性肉芽腫症は食細胞の活性酸素産生障害により細菌や真菌感染が持続する疾患で、その根治療法は造血幹細胞移植のみである。ただ、適当な移植ドナーが見つからない場合、その予後は不良である。今回、我々は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。患者は頸部や肺野に治療抵抗性の多発性膿瘍を有する X 連鎖慢性肉芽腫症の男性で、末梢血由来の造血幹細胞に CYBB 遺伝子を導入し、体重あたり 6.7×10^6 個の遺伝子導入細胞を投与した。結果、投与後 2 週目より末梢血中に遺伝子導入細胞の存在を確認した。今回の臨床経過を含めて慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療の現状について報告する。

A. 研究目的

原発性免疫不全症のひとつである慢性肉芽腫症(chronic granulomatous disease: CGD)は、NADPH オキシダーゼ産生酵素の異常により活性酸素が産生されず、細菌や真菌(カビ)の殺菌が障害される疾患である。NADPH オキシダーゼ産生酵素の構成タンパク質である gp91^{phox} に異常ある X 連鎖慢性肉芽腫症(X-linked chronic granulomatous disease: X-CGD)がその約 80%を占める。患者は、幼少期から重症感染症に加え、不完全な殺菌による細菌・真菌の残存があり、これに対し過剰な炎症性サイトカインが放出されることで、腸管や肝臓、肺などに肉芽腫を形成する。根治療法は HLA 適合ドナーからの造血幹細胞移植であるが、HLA が不一致の場合には治療成績は悪く、また、たとえ適当なドナーが存在したとしても重度な感染症罹患により適切な前処置が行えず、移植自体が行えない場合もある。

このため、このような造血幹細胞移植が行えない X-CGD 患者に対し、患者末梢血より採取した造血幹細胞(CD34 陽性細胞)にレトロウイルスベクターを用いて正常 CYBB

遺伝子(gp91^{phox}をコードする)を導入し、再び、患者に投与する造血幹細胞遺伝子治療が欧米を中心に行われ、一定の治療成績を上げている。ただ、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療では、白血病の発症という重大な有害事象も報告され、その実施に際しては症例ごとに患者の risk and benefit balance を十分に検討する必要がある。本研究では、当センターがこれまで行ってきた X-CGD に対する遺伝子治療臨床研究と CGD 遺伝治療の現状を報告する。

B. 研究方法

今回の X-CGD に対する遺伝子治療臨床研究は平成 23 年 2 月 24 日付けで、当センター遺伝子治療臨床研究審査委員会で承認された(院内 IRB)。その後、国の審査としては平成 24 年 3 月 28 日の厚生科学審議会技術部会にて了承され、平成 24 年 6 月 14 日付けで厚生労働大臣より承認された。患者選定に関しては、適当判定基準ならびに除外基準より 20 代の造血幹細胞移植ドナー不在 X-CGD 患者が被験者として選択され、平成 26 年 3 月 10 日に一次同意が取得され、4 月 3 日の遺伝子

治療臨床研究評価判定委員会の承認の下、5月29日に最終的な同意が得られた。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が行われた。ブスルファンによる骨髄非破壊的前処置の後に、7月22日に遺伝子導入細胞（CD34陽性細胞にして $6.2 \times 10^6/\text{kg}$ ）が患者末梢静脈より点滴にて投与された。

（倫理面への配慮）

遺伝子治療臨床研究に関しては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（平成16年2月19日）、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」（平成14年3月27日、平成16年12月28日全部改正、平成20年12月1日一部改正）に従い必要書類が作成され、国立成育医療センター内の「遺伝子治療臨床研究審査委員会」や関連政府機関で審査を受けた後、厚生労働大臣からの承認を得た後に開始された。

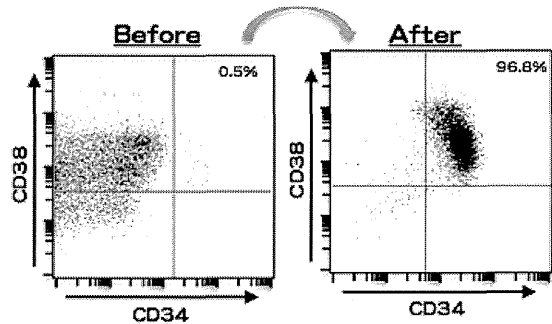
実施計画書作成に必要な前臨床試験の一部では、臍帯血から採取した造血幹細胞を用いるが、この一連の実験については、すでに施設内の倫理審査委員会および臍帯血バンクの倫理審査委員会の承認を受けている。今回の研究における挿入部位同定は、一部、患者の遺伝子情報を解析する可能性もあることから、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて行い、得られたデータの管理に関しては連結可能匿名化し、個人情報保護法を遵守して行った。

C. 研究結果

1. 患者造血幹細胞採取に関して

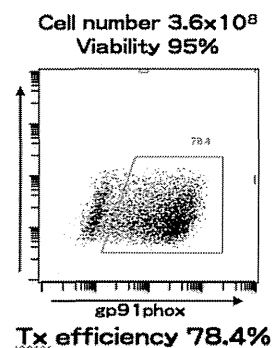
被験者に対し体重あたり $10\mu\text{g}$ の顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）を5日間、1日1回皮下投与し、day5とday6に血球分離装置にて末梢血単核球を採取したところ 4.89×10^{10} 個の細胞を得ることができた。次に、これら細胞をCliniMACS（Miltenyi Biotec社）を用いてCD34陽性細胞を分離したところそ

の純度は96.8%であり、総細胞数は 1.6×10^8 個であった。



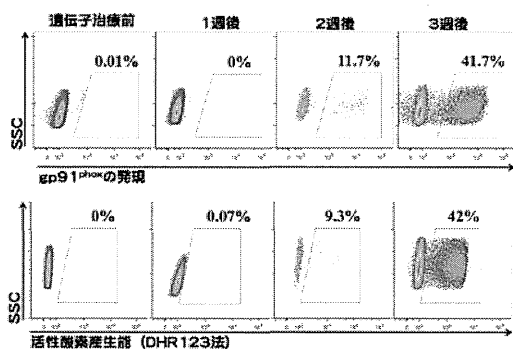
2. CYBB 遺伝子導入に関して

使用した培地は1%HSA/X-VIVO 10であり、サイトカインとしてstem cell factor (SCF、100ng/ml)、thrombopoietin (TPO、100ng/ml)、FLT3-L(100ng/ml)、interleukin-3(IL-3、10ng/ml)を加えた。CD34陽性細胞を $1.0 \sim 5.0 \times 10^5/\text{ml}$ で調製し、5%CO₂の条件で48時間培養した後、レトロウイルスベクター上清MFGSgp91に浮遊させ、組換えヒトフィブロネクチンCH-296 RetroNectin®（タカラバイオ）を固層化したRetroNectin®固相化培養バッグに移し、2時間遠心操作にてCYBB遺伝子をCD34陽性細胞に導入した。そして、これら遺伝子操作を3回行ったところ、遺伝子導入効率は78.4%であり、最終的に 3.6×10^8 個($6.2 \times 10^6/\text{kg}$)の遺伝子導入細胞を得ることができた。



3. 患者投与に関して

体重あたり10mgのブスルファンを投与したX-CGD患者に対し上記遺伝子導入細胞を投与した。



結果、2 週目より患者末梢血中に遺伝子導入細胞を認め、現在までその遺伝子導入細胞の存在を少ないながらも FACS にて確認している。

4. 慢性肉芽腫症遺伝子治療の現状

CGD に対する遺伝子治療は ADA 欠損症同様、遺伝子治療開始早期から行われてきたが、CGD の場合、異常好中球が生体内に多数存在し、遺伝子導入細胞のための骨髄間隙がなく、また、遺伝子導入細胞が非遺伝子導入細胞より効率良く増殖する能力（増殖優位性）が無いことから他の免疫不全症と比べて遺伝子治療の有効性は発揮しにくかった。ただ、2000 年に入りドイツらのグループが比較的強力な前処置（体重あたりブスルファン 10mg）と強い promoter 活性を有するレトロウイルスベクター（SFV）を使用して遺伝子治療を行ったところ、抗生剤に抵抗性を示す肝膿瘍や肺膿瘍等の重度の感染症が治癒した。ただ、治療効果が劇的である反面、promoter 活性の強さは造血系にも影響を与え、治療を受けた 4 名全てにおいて造血系異常を発症した。一方、通常のレトロウイルスベクター（MLV）を用い、3 名の患者に対して遺伝子治療を行った米国では 2 名の患者において肝膿瘍や肺膿瘍の治癒を見た。ただ、長期にわたっては遺伝子導入細胞の低比率（0.1%程度）が報告されている。なお、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療もイギリスにおいて 1 症例行われたが、その治療効果は確認されていない。

D. 考察

CGD は造血幹細胞移植のみならず造血幹

細胞遺伝子治療においても困難な疾患とされ、その理由としては、1. CGD の機能異常が食細胞にあり、移植に関与する T 細胞/B 細胞が正常に機能しているため、他の原発性免疫不全症のような比較的緩徐な前処置では遺伝子導入細胞の生着が難しいこと、一方で、2. 食細胞数は健常人と同等であり、造血幹細胞が骨髄腔に生着するために骨髄間隙（niche）が少ないこと、3. 遺伝子導入細胞が非遺伝子導入細胞に対して持つ増殖優位性が造血幹細胞レベルでないこと、4. 治療時に重篤な感染症を有している場合が多く、マクロファージの活性化や炎症性サイトカインに産生亢進による拒絶傾向が強いことが上げられる。事実、これまでに比較的強力な前処置を行っても（体重あたり 8~10mg のブスルファン）、長期わたる高い導入遺伝子の維持は困難で、現時点では通常の抗生剤治療では改善しない重篤な感染症（肺や肝脾膿瘍など）に対して短期的治療効果を目指した遺伝子治療という考えかたもある。

今回、我々は米国国立衛生研究所（NIH）の HL.Malech 博士との共同研究としてマウスレトロウイルスベクター MFGSgp91 を用いた遺伝子治療臨床研究を行った。これまでのところ患者に重篤な副作用はなく、また、少ないながら患者末梢血中に遺伝子導入細胞を確認しており、特に、これら細胞は PMA の刺激により健常人と同等の活性酸素を産生することができる。事実、これまで抗生剤等に抵抗性を示してきた頸部リンパ節膿瘍や肺膿瘍が時間の経過と共に改善している傾向もある（短期的治療効果）。ただ、米国の症例のように今後はこの遺伝子導入細胞がどの程度の割合で維持できるが最大懸念であり、その大小が今後の患者の感染症罹患率の頻度につながる（長期的治療効果）。また、ドイツやスイスで行われた遺伝子治療において造血系異常（骨髄異形成症候群）を発症したとの報告もあることから遺伝子導入細胞の腫瘍化も同様に懸念され、今後も注意深く患者の臨床経過を観察していく必要がある。

E. 結論

- ・ 患者末梢血由来 CD34 陽性細胞を用いた遺伝子治療臨床研究を行った。
- ・ 遺伝子導入法に関しては閉鎖系回路を用い、患者大量造血幹細胞に効率良く、安全に治療遺伝子を導入することができた。
- ・ 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。
- ・ 今後は長期わたり臨床症状ならびに遺伝子導入細胞の推移を注意深く確認していく。

F. 研究発表

1. Yamazaki Y, Yamada M, Kawai T, Morio T, Onodera M, Ueki M, Watanabe N, Takada H, Takezaki S, Chida N, Kobayashi I, Ariga T: Two novel gain-of-function mutations of *STAT1* responsible for chronic mucocutaneous candidiasis disease: Impaired production of IL-17A and IL-22, and the Presence of anti-IL-17F autoantibody. *J. Immunology* 193: 4880-4887, 2014.
2. Kawai T, Watanabe N, Yokoyama M, Nakazawa Y, Goto F, Uchiyama T, Higuchi M, Maekawa T, Tamura E, Nagasaka S, Hojo M, Onodera M: Interstitial lung disease with multiple microgranulomas in chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol* 34: 933-940, 2014.
3. Mori M, Onodera M, Morimoto A, Kosaka Y, Morio T, Notario GF, Sharma S, Saji T: Palivizumab use in Japanese infants and children with immunocompromised conditions. *Pediatr Infect Dis J* 33: 1183-1185, 2014.
4. Shigeta T, Sakamoto S, Uchida H, Sasaki K, Hamano K, Kanazawa H, Fukuda A, Kawai T, Onodera M, Nakazawa A, Kasahara M: Basiliximab treatment for steroid-resistant rejection in pediatric patients with acute liver failure after liver transplantation. *Pediatrics Transplantation* 18: 860-867, 2014.
5. Katsuya Y, Hojo M, Kawai S, Kawai T, Onodera M, Sugiyama H: Chronic granulomatous disease with pulmonary mass-like opacities secondary to hypersensitivity pneumonitis. *J Med Case Rep* 8: 242, 2014.
6. Lai CY, Yamazaki S, Okabe M, Suzuki S, Maeyama Y, Iimura Y, Onodera M, Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M, Otsu M, Nakauchi H: Stage-specific roles for Cxcr4 signaling in murine hematopoietic stem/progenitor cells in the process of bone marrow repopulation. *Stem Cells* 32: 1929-1942, 2014.
7. Onuki K, Sugiyama H, Ishige K, Kawamoto T, Ota T, Ariizumi S, Yamato M, Kadota S, Takeuchi K, Ishikawa A, Onodera M, Onizawa K, Yamamoto M, Miyoshi E, Shoda J: Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. *J Gastroenterol* 49:702-714, 2014.
8. Akagi K, Kawai T, Watanabe N, Yokoyama M, Arai K, Harayama S, Oana S, Onodera M: A case of macrophage activation syndrome developing in a patient with chronic granulomatous disease-associated colitis. *J Pediatr Hematol Oncol* 36: e169-172, 2014.
9. Takeda K, Nakazawa Y, Komuro H, Yamamoto M, Shoji K, Morita K, Miyairi I, Katsuta T, Ohya Y, Ishiguro A, Onodera M: Augmentation of antitubercular therapy with IFN γ in a patient with dominant partial IFN γ receptor 1 deficiency. *Clinical Immunology*. 151: 25-28, 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

XIAP 欠損症に対する造血幹細胞移植に関する研究

担当責任者	金兼 弘和	東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野
	岡野 翼	東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野
	星野 顕宏	東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野
	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
	森尾 友宏	東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野

研究要旨

XIAP 欠損症は X 連鎖リンパ増殖症候群 2 型(XLP2)であり、EB ウイルスに対する特異的免疫応答の低下や血球貪食性リンパ組織球症(HLH)・炎症性腸疾患を合併し予後不良である。唯一の根治的治療は造血幹細胞移植であるが、国際調査において移植関連死が多いことが報告されており、本疾患に対する適切な移植治療法の確立が望まれる。本研究では国内の XIAP 欠損症に対する移植例 5 例に対してアンケート調査を行った。5 例中、骨髄非破壊的前処置を施行された 4 例が生存し、1 例死亡例は HLH 非寛解例で比較的強度の高い前処置が選択されていた。国際調査の報告も踏まえ、本疾患に対しては移植前に HLH が寛解状態であること、さらに骨髄非破壊的前処置が選択されることが移植成績に関連している可能性が示された。また腸炎合併例 2 例について移植後に腸炎の改善を認め、活動性腸炎に対しても造血幹細胞移植が有効である可能性が示された。

A. 研究目的

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望まれている。

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することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

本邦の XIAP 欠損症のうち造血幹細胞移植を施行されていた 5 例に対して、各主治医を対象にアンケート調査を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は後方視的研究であり治療方針への介入はない。また匿名化を行い、患者特定に至らないように配慮する。

C. 研究結果

対象は5例で、うち3例がHLHで発症、2例が炎症性腸疾患で発症していた。HLHで発症した3例のうち2例が活動性HLHのためより早期(1-2歳)に造血幹細胞移植適応と判断されていた。その他3例は生物学的製剤(トシリズマブ・インフリキシマブ)や免疫抑制剤の多剤併用療法にも抵抗性の難治性炎症性腸疾患に対して、より年長時期(7-13歳)に造血幹細胞移植の方針とされていた。

移植ソースは臍帯血が3例、非血縁骨髄が2例であり、全例7/8座以上HLA適合と良好なドナー条件であった。移植前処置として4例が骨髄非破壊的前処置(フルダラビン 150-180mg/m²、メルファラン 70-140mg/m²またはシクロフォスファミド 120mg/kg、全身放射線照射 TBI 3-4Gy)を選択され、1例が比較的強度の高い前処置(フルダラビン 125mg/m²、メルファラン 80mg/m²、シクロフォスファミド 140mg/kg、TBI 6Gy)が選択されていた。

移植成績は1例がHLH・生着症候群・急性呼吸窮迫症候群のため死亡、生存の4例についてはドナーキメラリズム>95%と良好な生着を認めた。GVHD予防として全例がタクロリムスを、また4例で移植後メソトレキセート療法が併用され、1例がⅢ度GVHDを発症しメチルプレドニゾンが追加されていた。その他死亡例を除く3例はⅠ度と軽度のGVHDを認めた。

活動性腸炎を合併していた2例については移植後に腸炎症状の改善を認めた。また5例中3例で移植後HLHの発症が見られ、死亡例を除く2例ではエトポシドが奏効していた。

D. 考察

国際調査の結果、XIAP欠損症に対する造血幹細胞移植では肝中心静脈閉塞症や肺出血・感染症などによる合併症死が多く、一部、骨髄非破壊的前処置が選択され、HLH寛解状態である症例の移植成績が良好であることが示されている。本研究においても唯一の死亡例が比較的強度の高い前処置であり、さらにHLH非寛解例であったことは先の報告と矛盾しない結果と考える。

移植前及び移植後HLHは本疾患の造血幹細胞移植において特に注意が必要な病態である。HLH非寛解での移植を行った2例のうち生存例では、エトポシド先行投与後に移植前処置を開始していた。また移植後HLHを合併し生存した2例では同様にエトポシドが奏効していた。

骨髄非破壊的前処置が選択され、HLH寛解状態での移植成績は良好であった。エトポシドの投与方法を含め、より適切な移植治療法についてより症例を蓄積して検討を続ける必要がある。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aguilar C, Lenoir C, Lambert N, Bègue B, Brousse N, Canioni D, Berrebi D, Roy M, Gérard S, Chapel H,

- Schwerd T, Siproudhis L, Schäppi M, Al-Ahmari A, Mori M, Yamaide A, Galicier L, Neven B, Routes J, Uhlig HH, Koletzko S, Patel S, Kanegane H, Picard C, Fischer A, Bensussan NC, Ruemmele F, Hugot JP, Latour S. Characterization of Crohn disease in X-linked inhibitor of apoptosis-deficient male patients and female symptomatic carriers. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134(5):1131-1141.e9.
- 2) Wada T, Kanegane H, Ohta K, Katoh F, Imamura T, Nakazawa Y, Miyashita R, Hara J, Hamamoto K, Yang X, Filipovich AH, Marsh RA, Yachie A. Sustained elevation of serum interleukin-18 and its association with hemophagocytic lymphohistiocytosis in XIAP deficiency *Cytokine* 2014;65(1):74-8.
- 3) Yabal M, Müller N, Adler H, Knies N, Groß CJ, Damgaard RB, Kanegane H, Ringelhan M, Kaufmann T, Heikenwälder M, Strasser A, Groß O, Ruland J, Peschel C, Gyrd-Hansen M, Jost PJ. XIAP Restricts TNF- and RIP3-Dependent Cell Death and Inflammasome Activation. *Cell Rep* 2014;7(6):1796-808.
2. 学会発表
- 1) Kanegane H. Whole exome sequencing reveals atypical phenotype of X-linked lymphoproliferative syndrome. A symposium for researchers and clinicians on XLP WAS. 2014 Nov 3-4. London, U.K.
- 2) Nishida N, Yang X, Hoshino A, Kanegane H. Inflammatory bowel disease in Japanese patients with xiap deficiency. 16th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies. 2014 Oct.29-Nov.1, Prague, Czech.
- 3) Kanegane H. XLP (X-Linked Lymphoproliferative Syndrome) and EB-Virus infection. PAS/ASPR Joint Meeting. 2014 May 3-6, Vancouver, Canada.
- 4) Yang X, Kunitsu T, Ikeda Y, Taga T, Wada T, Yachie A, Yasumi T, Heike T, Kanegane H. Female patient with X-linked lymphoproliferative syndrome type 2 caused by extremely skewed inactivation of X-chromosome. PAS/ASPR Joint Meeting. 2014 May 3-6, Vancouver, Canada.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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

担当責任者

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

担当協力者

Chung Yeng Looi 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
久間 木悟 国立病院機構仙台医療センター小児科

研究要旨

先天性好中球減少症の原因遺伝子の一つとして、恒常的活性化変異WASPによるX連鎖性好中球減少症(X-linked neutropenia:XLN)がある。これまでcytokinesisの異常に対して骨髄球系細胞がより強い影響を受けることにより骨髄球系分化異常を生じることが主要病態と報告されてきた。今回我々は、恒常的活性化変異WASPは3次元構造の変化により強いチロシンリン酸化を受け、アクチン重合化を亢進させること、細胞核内にも局在してRNAポリメラーゼと複合体を形成し転写活性調節因子として機能することを報告した。これにより骨髄球系細胞株においてRUNX1やG-CSFRなどの骨髄球系細胞の増殖分化に重要な標的遺伝子の転写を制御していることを見出した。これらの病態解析はエピゲノムやDNAメチル化を考慮したXLNの新規治療法や変異特異的遺伝子修復の開発の基盤になると考えられる。

A. 研究の目的

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。A. Thrasherらは、細胞分裂過程での異常が主病因であり、骨髄球系細胞がその異常に感受性が高いために、骨髄球系細胞分化に異常をきたす機序を報告しているが、XLNの分子病態はまだ不明な点がある。今回我々は、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。

B. 研究方法

X連鎖性好中球減少症(XLN)の原因として奉公されている3つのWASP変異(L270P, S272P, I294T)の発現ベクターを作成し、Cos7細胞および骨髄球系細胞核で内因性WASPを発現していないK562細胞株に遺伝子導入した。分子生物学的手法により、恒常的活性化WASPの機能を野生型WASPと比較して検討した。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守して行った。

C. 研究結果

図1にこれまでの報告からまとめた活性化シグナル後のWASPの3次元構造変化について示す。

図1: 活性化シグナルによるWASPの3次元構造の変化

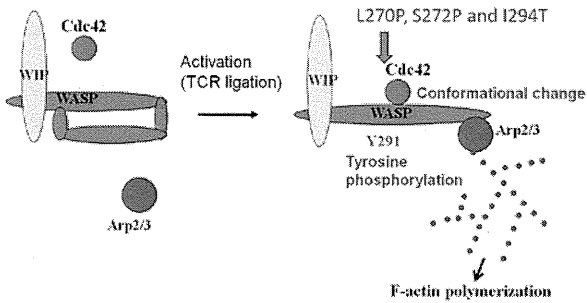
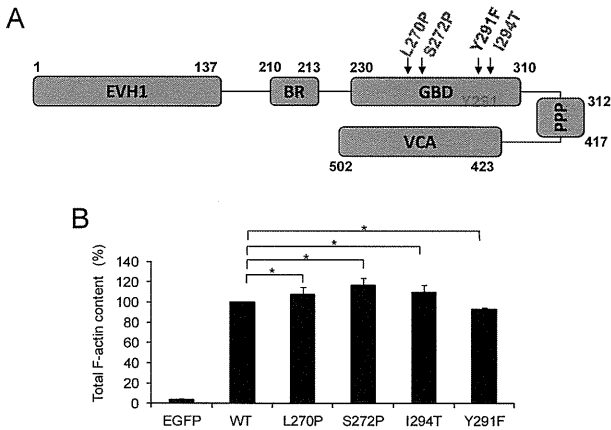


図2に、今回の研究目的に作成したWTおよび恒常的活性化変異WASP、チロシンリン酸化部位変異WASPの発現ベクターを示す。

図2: 恒常的活性化変異WASPはCos7細胞においてWTよりも高いアクチン重合化活性をもつ



恒常的活性化変異WASPをCos7細胞に発現させたところ、アクチン重合化はWTと比較して優位に上昇していた。また、Srcキナーゼと共発現させたところ、WASPチロシンリン酸化レベルが優位に増加していた(図3)。

図3: 恒常的活性化変異WASPはCos7細胞においてWTよりもSrcキナーゼにより強いチロシンリン酸化を受ける

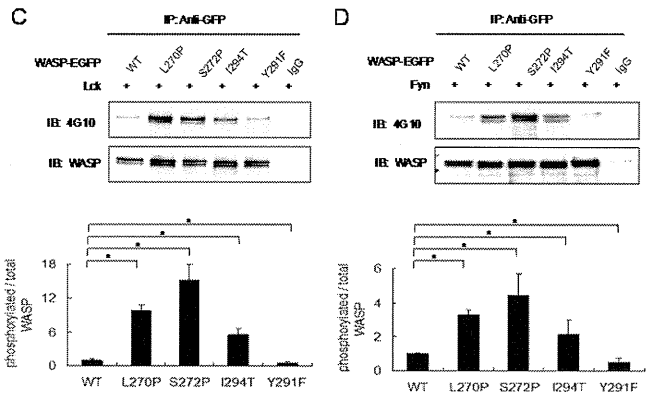


図4では、WASPはG蛋白結合部位付近に核移行シグナルをもち、恒常的活性化変異WASPはCos7細胞においてWTよりも細胞核への局在比率が高い傾向があることを示す。WASPはWT,L270PともにCos7細胞においてRNA polymerase II (RNAPII) および nuclear RNA-binding protein, 54kDa (p54nrb)と共沈、共局在することを確認した(図5)。

図4: WASPはG蛋白結合部位付近に核移行シグナルをもち、恒常的活性化変異WASPはCos7細胞においてWTよりも細胞核への局在比率が高い傾向がある

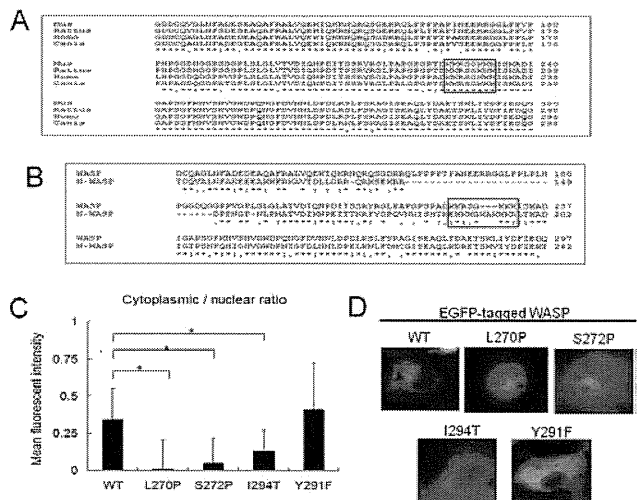
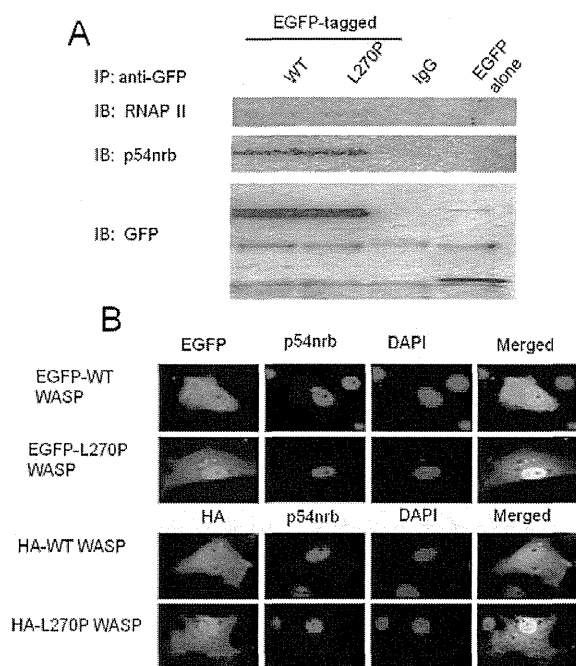
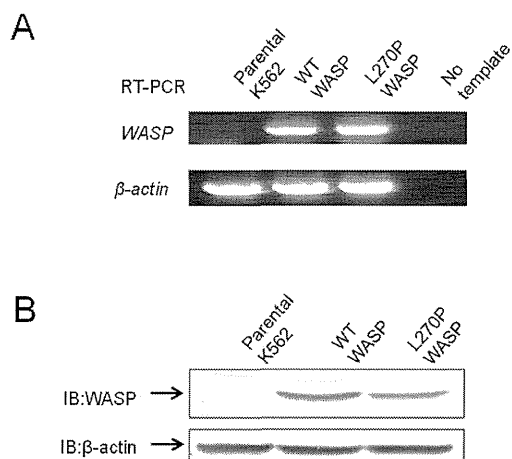


図5: WASP は WT, L270P ともに Cos7 細胞において RNAPII および p54nrb と共沈、共局在する



これらの発現ベクターを、内因性 WASP が発現していない骨髓球系細胞株 K562 に恒常的に発現させた(図 6)。

図6: WASP を発現しない骨髓球系細胞株 K562 への WASP WT および L270P の遺伝子導入と恒常的発現細胞株の作成



これらの K562 恒常的発現細胞株において WASP の一部は細胞核内に局在し、DNA と共

沈すること(図 7)、発現アレイ解析によって WT および L270PWASP 間に多種の遺伝子発現の相違があること(図 8)を見出した。

図7: K562 恒常的発現細胞株において WASP の一部は細胞核内に局在し、DNA と共沈する

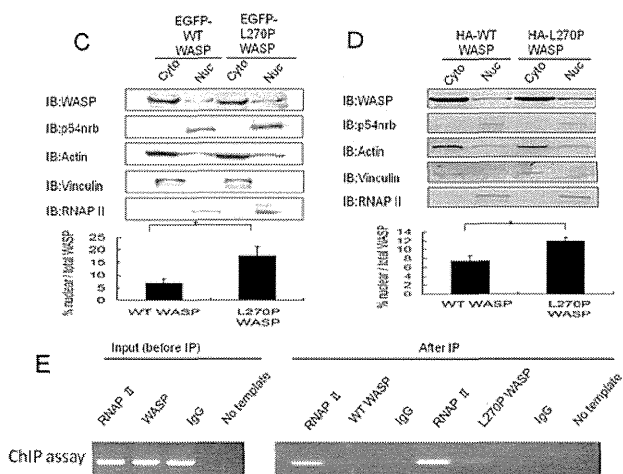
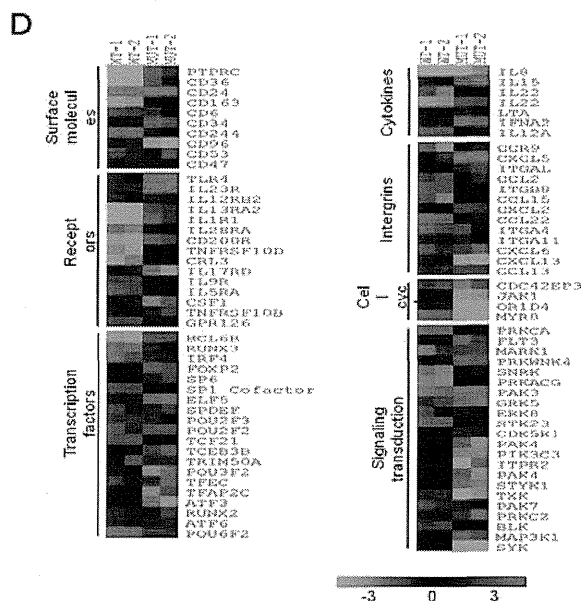


図8: 発現アレイ解析による、WT と L270P WASP 間の多種の遺伝子発現の相違



特に、G-CSF 受容体と RUNX1 発現量は WT WASP によってのみ増加すること(図 9)、ChIP on chip 解析により WT と L270P WASP

は同じ DNA 結合様式であるが、結合アフィニティーが異なることを明らかにした(図 10)。

図9: G-CSF 受容体と RUNX1 発現量は WT WASP によってのみ増加する

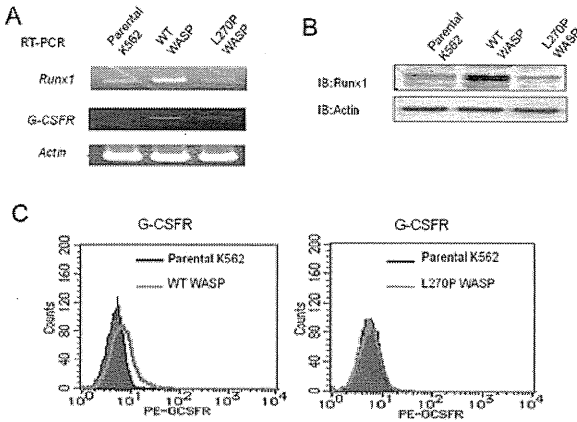
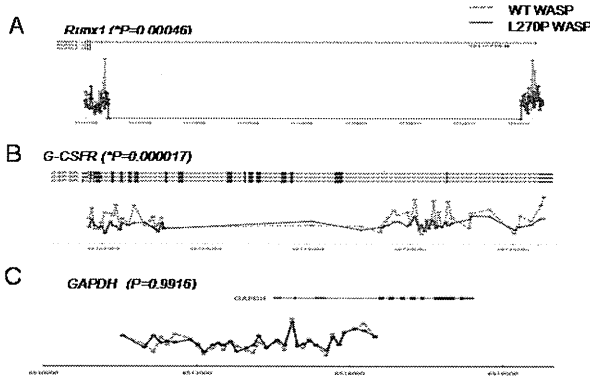


図 10: ChIP on chip 解析により WT と L270P WASP は同じ DNA 結合様式であるが、結合アフィニティーが異なる



D. 考察

これまで X 連鎖性好中球減少症は WASP 遺伝子の恒常的活性化変異により発症し、細胞分裂過程での異常が主病因であり、骨髄球系細胞がその異常に感受性が高いために、骨髄球系細胞分化に異常をきたすことが発症機序として考えられていた。今回我々は、細胞株を用いた実験から、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。

E. 結論

1. 全ての恒常的活性化変異 WASP(L270P, S272P and I294T) は、WT および Y291F と比較し、Src キナーゼにより強いチロシン酸化を受け、アクチン重合化活性が上昇した。
2. WASP は 一部が細胞核内に局在し、L270P は局在比率が高い傾向にあった。
3. WASP は nuclear RNA-binding protein, 54kDa と RNA polymerase II と共沈し、DNA と共沈した。
4. G-CSFR と Runx1 は野生型 WASP によってのみ発現が増加し、L270P WASP では増加しなかった。
5. ChIP on chip 解析では、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。
6. WASP は骨髄球系細胞においても転写因子として機能した。

今後は、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Horino S, Sasahara Y, Satoh M, Niizuma H, Kumaki S, Tsuchiya S, Kure S, et al. Selective expansion of regulatory T cells in mixed chimera after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome. *Pediatr Transplant* 188(1):e25-30, 2014.
- 2) Looi CY, Sasahara Y, Watanabe Y, Uchiyama T, Kumaki S, Kure S, Tsuchiya S, et al. Open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells. *Int Immunol* 26(6): 341-352, 2014.
- 3) Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Onishi Y, Sasahara Y, Harigae H, et al. Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in a patient with germline GATA-2 mutation evolving into myelodysplasia and acute leukaemia. *Ann Hematol* 93(9):1515-1522, 2014.
- 4) Ramesh N, Massaad MJ, Kumar L, Suresh K, Sasahara Y, Anton I, Bhasin M, Geha RS, et al. Binding of WASP/N-WASP interacting protein WIP to actin regulates focal adhesion assembly and adhesion. *Mol Cell Biol* 34(14):2600-2610, 2014.
- 5) 笹原洋二. 総説 先天性血小板減少症の診断と分子病態. *小児科* Vol.55 No.01: 105-114, 2014.
- 6) 笹原洋二. 一般ウイルス感染症に易感染性を示す免疫不全症. *小児内科* Vol.46 No.10 : 1475-1481, 2014.
- 7) 笹原洋二. 総説:免疫不全症に対する造血幹細胞移植. *日本小児血液・がん学会雑誌* Vol.51 No.03: 244 -250, 2014.

2. 学会発表

(海外)

- 1) Sasahara Y, Watanabe Y, Kure S,

Massaad MJ, Ramesh N, Geha RS.

T cell receptor ligation causes Wiskott-Aldrich syndrome protein degradation and F-actin assembly downregulation in T cells. (ポスター)

16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Prague, 2014年10月29日-11月1日.

(国内)

- 1) 森谷邦彦, 片山紗乙莉, 入江正寛, 小沼正栄, 内山徹, 力石健, 笹原洋二, 呉繁夫
ステロイド依存性自己炎症症候群と分類不能型免疫不全症に対し RIST を施行した乳児例 (口頭). 第 117 回日本小児科学会学術集会 (名古屋)、2014 年 4 月 11 日-13 日.
- 2) 小沼正栄, 森谷邦彦, 渡辺祐子, 南條由佳, 新妻秀剛, 力石健, 笹原洋二. 東北大学小児科における過去 10 年間の同種造血幹細胞移植症例の検討 (ポスター). 第 56 回日本小児血液・がん学会 (岡山)、2014 年 11 月 28 日-30 日.
- 3) Uchiyama M, Sasahara Y, Kure S. Mutation analysis of congenital thrombocytopenia with small or normal-sized platelets differentially diagnosed from ITP. (口頭、Plenary Session). 第 56 回日本小児血液・がん学会 (岡山)、2014 年 11 月 28 日-30 日.
- 4) 笹原洋二. 教育講演: ITP と鑑別が必要な血小板疾患 (口頭). 第 56 回日本小児血液・がん学会 (岡山)、2014 年 11 月 28 日-30 日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

担当責任者 小原 収 かずさDNA研究所 副所長

研究要旨

症状から予測される既知疾患原因遺伝子における変異が除外された症例について、網羅的な遺伝子解析を行うことで新規な疾患原因遺伝子を探索し、それにより原発性免疫不全症の病態解明を進めた。更に、今後の大きな問題である遺伝子変異とタンパク質機能の間の関係を明らかとし、それによって疾患発症機構の理解とその制御を目指すために、網羅的な変異導入によりタンパク質のアミノ酸配列と機能の間の鳥瞰図を得るアプローチの有効性についてSTAT1遺伝子を例にとり検証した。

A. 研究目的

多様な臨床的な症状を呈する原発性免疫不全症は、遺伝的な要因を探索することが決め手となる。既に200種類を超える免疫不全症の原因遺伝子が知られているが、症状から予測される原因遺伝子に変異が見られない症例も多く残されている。こうした症例については、網羅的に遺伝子のタンパク質コード領域の配列解析を行うアプローチが有効であることが一般的に知られている。そこで、本研究では、当研究班分担者との連携によって、複数の症例での網羅的な遺伝子解析を進めて新規な遺伝的要因を同定することを目的とした。更に、見出された変異が疾患発症と関係するかどうかを見極める事が次の大きな課題である考え、遺伝子型から迅速にその変異の有害性を評価できる系を構築し、将来的な疾患遺伝子産物の構造・機能相関の鳥瞰図を創出する基盤整備を進めることを第二の目的とした。

B. 研究方法

当研究班からの依頼に基づき、原発性免

疫不全症の原因となる事が既知である遺伝子に変異がない事を確認後の症例に対して、タンパク質コード領域を含む全エクソン解析を次世代シーケンサー（イルミナ社、HiSeq1500/2000）とハイブリダイゼーションによりターゲット領域の濃縮を組み合わせることで実施した。得られた結果は、ヒトゲノム上にマッピング後、公開されているヒトゲノムリファレンス配列との違いをリスト化したファイルとして出力し、それに公的データベース上の様々な多型情報などを付与した形で、依頼元の当研究班研究分担者にフィードバックした。必要に応じて、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析も実施し、分子レベルでの疾患状態の知見も収集した。

網羅的な遺伝子変異体の機能解析のために、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に変換した変異体の発現プラスミドを作製し、内在性のSTAT1活性が低いU3C細胞においてルシフェラーゼ活性測定による定量的な転写因子活性を実施した。更に、