

機能獲得型変異である事が知られている Arg274 などの特定のアミノ酸残基の位置に対して、その残基を他の 19 種類のアミノ酸残基へ置換した変異体（飽和型アミノ酸変異体）を作製し、Ala 変換体と同様にルシフェラーゼによる転写因子活性を行った。

（倫理面への配慮）

本研究でのヒト解析検体は、それぞれの依頼元の研究分担者において適切に倫理的な対応がなされた後に、本研究分担者には匿名化された検体 ID のみが通知される枠組みで研究を実施した。本研究での遺伝子解析に関しては、すべての関係する機関でヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則った研究であることを倫理審査委員会で承認を受けた上で実施した。

C. 研究結果

今年度は、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。その結果は変異情報とそのアノテーション情報を付与した形で依頼元の当研究班の分担研究施設に送付し、その先の候補遺伝子変異の絞り込みと機能解析作業を共同して進めた。現在もまだ完全に絞り込みが完了していない症例も残されているが、原因変異が新規遺伝子に見いだされた症例や知られている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した症例などを明らかにしており、それらについては論文による報告を行った。

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 スキャン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てくれると同時に、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。この結果を受け、網羅的なアミノ酸置換型スキャンニングのためのオリゴ DNA のデザインと合成を進めた。

D. 考察

今年度の結果も含めて、遺伝子構造解析技術の進歩によって、新規な遺伝子が病原変異を有する実例が積み重なってきた。また、ある場合には、臨床症状から可能性を除外していた疾患関連遺伝子に変異があり、その結果が非典型的な症状を呈する実例も多く蓄積されてきている。しかし、この結果が本当に臨床的な有用性を獲得するためには、より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。こうした病態解明によってはじめて、治療・創薬対象となるべき作用点が同定されるからである。残念ながら、アミノ酸配列情報から一意的にタンパク質機能を予測する術を我々が未だ持たない以上、ゲノム科学にみられるハイスループット技術によって実験的に検証された情報の蓄積を進めるのが確実な解決策である。本研究で得られた結果は、臨床的に求められる確度でタンパク質変異の意味を迅速に理解するための方法の一つとして、今回提案した網羅的なアミノ酸残基置換変異体の機能解析は有用となる可能性が高い。

E. 結論

網羅的なゲノム構造解析によって、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、免疫不全症の原因として既知遺伝子が非典型的な症状を呈する症例も複数明らかにすることができた。

今後著しい速度で同定されてくる稀な個人に見られ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ニングが有用であることの原理検証実験を終える事ができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1: Hoshino A, Okuno Y, Migita M, Ban H, Yang X, Kiyokawa N, Adachi Y, Kojima S, **Ohara O**, Kanegane H. X-Linked Agammaglobulinemia Associated with B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Immunol*. 2015 Jan 16. [Epub ahead of print]
- 2: Mitsuiki N, Yang X, Bartol SJ, Grosserichter-Wagener C, Kosaka Y, Takada H, Imai K, Kanegane H, Mizutani S, van der Burg M, van Zelm MC, **Ohara O**, Morio T. Mutations in Bruton's tyrosine kinase impair IgA responses. *Int J Hematol*. 2015 Jan 15. [Epub ahead of print]
- 3: Matsushita H, Hosoi A, Ueha S, Abe J, Fujieda N, Tomura M, Maekawa R, Matsushima K, **Ohara O**, Kakimi K. Cytotoxic T Lymphocytes Block Tumor Growth Both by Lytic Activity and IFN γ -Dependent Cell-Cycle Arrest. *Cancer Immunol Res*. 2015 Jan;3(1):26-36.
- 4: Shimizu K, Sato Y, Shinga J, Watanabe T, Endo T, Asakura M, Yamasaki S, Kawahara K, Kinjo Y, Kitamura H, Watarai H, Ishii Y, Tsuji M, Taniguchi M, **Ohara O**, Fujii S. KLRG+ invariant natural killer T cells are long-lived effectors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014 Aug 26;111(34):12474-9.
- 5: Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Kashiwakuma D, Kagami S, Suzuki K, Takatori H, Tamachi T, Hirose K, Onodera A, Suzuki J, **Ohara O**, Yamashita M, Nakayama T, Nakajima H. Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR γ t induction as downstream targets of Stat3. *J Exp Med*. 2014 Aug 25;211(9):1857-74.
- 6: 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. Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations. *Am J Hum Genet*. 2014 Jul 3;95(1):121-5.
- 7: Koura U, Sakaki-Nakatsubo H, Otsubo K, Nomura K, Oshima K, **Ohara O**, Wada T, Yachie A, Imai K, Morio T, Miyawaki T, Kanegane H. Successful treatment of systemic cytomegalovirus infection in severe combined immunodeficiency using allogeneic bone marrow transplantation followed by adoptive immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2014;24(3):200-2.
- 8: Funato M, Uemura O, Ushijima K, Ohnishi H, Orii K, Kato Z, Yamakawa S, Nagai T, **Ohara O**, Kaneko H, Kondo N. A complement factor B mutation in a large kindred with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Clin Immunol*. 2014 Aug;34(6):691-5.
- 9: Motomura Y, Morita H, Moro K, Nakae S, Artis D, Endo TA, Kuroki Y, **Ohara O**, Koyasu S, Kubo M. Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation. *Immunity*. 2014 May 15;40(5):758-71.
- 10: Saito Y, Kagami S, Sanayama Y, Ikeda K, Suto A, Kashiwakuma D, Furuta S, Iwamoto I, Nonaka K, **Ohara O**, Nakajima H. AT-rich-interactive domain-containing protein 5A functions as a negative regulator of retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor γ t-induced Th17 cell differentiation. *Arthritis Rheumatol*. 2014 May;66(5):1185-94.
- 11: Kuwahara M, Suzuki J, Tofukuji S, Yamada T, Kanoh M, Matsumoto A, Maruyama S, Kometani K, Kurosaki T,

Ohara O, Nakayama T, Yamashita M. The Menin-Bach2 axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. *Nat Commun.* 2014 Apr 2;5:3555.

12: 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. 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. *Int J Hematol.* 2014 Jul;100(1):70-8.

2. 学会発表

1. Implementation of High-Volume Genomic Analyses by Microfluidics/microchip Technologies: Towards Integrative Medical Sciences for Preventive Medicine, **Ohara O**, ICEP2014 Toyama 2014年4月24日
2. What is "Next-Generation DNA Sequencing"for?,小原收、熊本大学「最先端研究セミナー(リエゾンラボ研究会)」2014年5月7日
3. ゲノミクスにおけるインベーションとイノベーション、小原收、第18回分子複合医薬研究会。2014年7月4日
4. IgG サブクラス欠損を示したI型高IgE症候群の1例 金子英雄、大西秀典、川本典生、加藤善一郎、船戸道徳、小田紘嗣、小原收、深尾敏幸 第8回日本免疫不全症研究会 2015年1月24日
5. 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年9月19日
6. 本邦におけるICF症候群7例の検討 釜江智佳子、加藤環、本間健一、小原收、

今井耕輔、久保田健夫、野々山恵章 日本小児科学会 2014年4月11日

7. 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年11月20日
8. 間質性肺野病変で発症しDermatopathic Lymphadenitisと診断された慢性肉芽腫症の男児例 鬼頭敏幸、山口悦郎、藤井公人、高橋恵美子、小田紘嗣、小原收、金兼弘和 第56回日本小児血液・がん学会学術集会・第12回日本小児がん看護学術集会 2014年11月28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

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

担当責任者 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)

研究要旨: 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がその責任分子である。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。またこのDNA損傷応答反応に関わる分子の異常でATに類似した症状を示す疾患が発症することが知られている。次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析のためのプラットフォームを開発している。臨床面では毛細血管拡張性運動失調症の免疫不全改善のための造血細胞移植療法を開発し、基礎研究としてiPS細胞を樹立し、その病態解明と、遺伝子治療に向けたベクターの構築をおこなっている。

A. 研究目的

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、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おらず、その現状を把握し、適切なプロトコルを確立する必要がある。また治療法のない難治疾患であり、基礎研究の推進による病態解明治療法開発が必須である。

B. 研究方法

毛細血管拡張性運動失調症クリニカルリサーチカンファレンスに参加し、世界中のAT診療にかかわる医師、研究者と情報交換を行い、ATに対する適切な造血細胞移植プロトコルを検討する。iPS細胞を樹立し、その細胞を用い病態解明を行うと同時に、遺伝子治療開発に向けたベクターの構築を行う。

(倫理面への配慮)

iPS細胞樹立に関しては東京医科歯科大学倫理員委員会の承認のもとiPS細胞研究計画を立案し承認を得て行われた。

C. 研究結果

世界的には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おらず、国によって移植への温度差があることが明らかとなった。しかしこれまで5例に対して移植が行われ、2例が長期生存を示していることが明らかとなった。これら2例のうち一例は悪性腫瘍合併例に対して行われた移植であり、悪性腫瘍の寛解を移植で得ている。いずれの症例の神経症状の悪化など危惧される症状の出現は認められなかった。

移植に用いられたプロトコルは①フルダラビン30mg/m²/日 ×5日間、シクロホスファミド20mg/kg 4日間、ATG 10mg/kg ×1日、20mg/kg ×3日間、②フルダラビン、30mg/m²/日×6日間、経口部ブスルファン0.5 mg/kg ×2/日間2日。(総量 2 mg/kg)、ATG-Fresenius 20 mg/kg 3日間であった。

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。

D. 考察

これまでほとんど検討されてこなかったATに対する造血細胞移植に向けて、一步を踏み出した。慎重な計画の下で、造血細胞移植を行っていくことで、患者のQOL向上に寄与できると考えられる。基礎研究開発による新規治療法開発は一步を踏み出したばかりであるが、遺伝子治療開発に向けた一步を踏み出したと考える、この系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応用可能と考える。

E. 結論

毛細血管拡張性運動失調症、新規治療法開発の一環として、造血細胞移植法、遺伝子治療法、iPS細胞を用いた創薬に関して検討を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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., and Takagi, M. (2014). Whole-exome sequence analysis of

ataxia telangiectasia-like phenotype. *Journal of the neurological sciences* 340, 86-90.

2. Nakayama, T., Sato, Y., Uematsu, M., Takagi, M., Hasegawa, S., Kumada, S., Kikuchi, A., Hino-Fukuyo, N., Sasahara, Y., Haginoya, K., and Kure, S. (2014). Myoclonic axial jerks for diagnosing atypical evolution of ataxia telangiectasia. *Brain & development*.
- #### 2. 学会発表
1. 金子節子, 高木正稔, 今井耕輔, 森尾友宏, 水谷修紀. 神経症状と免疫不全を呈した9症例に対する全エクソン解析. 第117回日本小児科学会学術集会 2014年4月11日-13日 名古屋
 2. 長谷川節子, 熊田聡子, 高木正稔, 白井育子, 高橋孝治, 野村敏大, 鹿島田彩子, 長谷川毅, 細川卓利, 植松貢, 富士根明雄, 菅原祐之, 林雅晴. 毛細血管拡張性運動失調症の神経症状に対する少量ベタメタゾン療法~第2報~. 第56回日本小児神経学会学術集会 2014年5月29日-31日 浜松
 3. Hasegawa S, Takagi M, Sunagawa Y, Imai K, Morio T, Mizutani S. CD40LG and SIL1 mutations associated with neurodegeneration and hypogammaglobulinemia. 第56回日本小児神経学会学術集会 2014年5月29日-31日 浜松
 4. Takagi M. Whole-exome sequence analysis of Ataxia-Telangiectasia like phenotype. Ataxia Telangiectasia Clinical Research Conference 2014 12th November-15th November 2014 Nijmegen, Holland

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

担当責任者	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
担当協力者	大西 秀典	岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学	
	木村 豪	岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学	
	堤 尚孝	京都大学大学院工学研究科生体分子機能化学講座	
	栞尾 豪人	京都大学大学院理学研究科生物物理学教室構造生理学分科	

研究要旨

IL-18 は IL-1 ファミリーに属する分子量約 18kDa のサイトカインタンパクであり、受容体 α 鎖及び β 鎖により認識されその生理作用を発現する。近年、血球貪食症候群、XIAP 欠損症、NLRC4 変異による自己炎症疾患、全身型若年性特発性関節炎等の免疫異常患者の血清中に極めて高濃度に検出されることが明らかとなっており、抗 IL-18 療法がこれらの疾患治療に有用な可能性が示唆されている。本研究では構造情報を基盤とした薬剤開発を目指している。現在までに我々は IL-18 及び受容体の結晶化タンパク立体構造解析に成功しており、さらに表面プラズモン解析、溶液 NMR 法、培養細胞を用いた活性実験により溶液中でのタンパク間相互作用の詳細な分析を行った。現在、得られた構造・機能情報を基に、virtual ligand screening を利用して IL-18 阻害機能を有する低分子スクリーニングを行っている。第一段階の候補分子選定には IL-18 受容体発現 HEK293 細胞を用いた NF- κ B 転写活性の測定が有用であった。

A. 研究目的

IL-1 superfamily に属するサイトカイン IL-1 及び IL-18 は、Toll 様受容体等の上流のシグナルがオンになることで、前駆体タンパク pro IL-1 及び pro IL-18 の発現が増加する。同時に NLRP3 の発現も増加し、NLRP3 はアダプター分子 ASC を介して Caspase-1 と高次複合体(インフラマソームと呼ばれる)を形成し、Caspase-1 を活性化する。Caspase-1 は pro IL-1 及び pro IL-18 を活性型 IL-1 及び IL-18 に変換し、種々の生理機能(免疫応答、炎症反応)を発現する。また IL-1 を制御する内因性分子として IL-1Ra、IL-18 を制御する内因性分子として IL-18BP が知られている。それ以外にも SOCS-1 等種々の機構により過剰炎症が制御されるシステムが生体内には存在する。

しかし、それらのバランスを崩す遺伝的要因、

環境要因がリウマチ性疾患や自己炎症疾患、アレルギー疾患といった種々の慢性炎症性疾患を引き起こすことになる。例えば、NLRP3 の遺伝子変異より NLRP3 が恒性的に活性化されると IL-1 β の過剰産生が起き、クリオピリン関連周期性発熱症候群(CAPS)を発症することがよく知られている。興味深い事に IL-18 も同時に過剰産生されているはずなのだが、その患者血球からのサイトカイン産生レベルは IL-1 β > IL-18 であり、このことは IL-1 β を制御することで CAPS の病勢を抑える事に成功していることから裏付けられる。

一方、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が間接的なものが多い。例えば多くの炎症性疾患(関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、多発性硬化症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎 等)で血清中の IL-18 が高濃度になること

が報告されており、また IL-18 プロモーター領域や IL-18R1 周辺の遺伝子多型が疾患と関連していることが報告されてきている。マウスレベルの研究では IL-18 阻害抗体が気管支喘息やアトピー性皮膚炎に対して有効という報告があり、アレルギー疾患に対しての抗 IL-18 療法の有用性が示唆されている。しかしいまだ実用化された抗 IL-18 薬は存在しない。

本研究では、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。

B. 研究方法

1. pGEX4T-1 plasmid に IL-18 をコードする遺伝子を導入し、大腸菌 BL21(DE3)にて GST fusion IL-18 を発現させ、アフィニティー精製、ゲル濾過精製を経て高純度の IL-18 タンパクを得た。

2. pFastBac1 plasmid に his tag を付加した IL-18R α 及び IL-18R β をコードする遺伝子を導入し、Bacmid を精製、SF9 細胞あるいは蚕に感染させ、培養上清中あるいは蚕体液中に IL-18R α 及び IL-18R β を発現させた。アフィニティー精製、ゲル濾過精製を経て高純度の受容体タンパクを得た。

3. IL-18, IL-18R α , IL-18R β 混合溶液をゲル濾過精製し、高純度の 3 者複合タンパクを得た。

4. 蒸気拡散法により 3 者複合タンパクを結晶化し、放射光実験施設を利用して X 線回折像を得る事で、構造解析を行った。

5. 得られた構造情報から推定される結合サイトについて、IL-18, IL-18R α , IL-18R β それぞれにアミノ酸置換を導入した発現 plasmid を作成した。

6. IL-18 変異型タンパクは BL21(DE3)で発現精製し、IL-18R α 及び IL-18R β 変異型タンパクはそれぞれ蚕を使用して発現精製した。

7. IL-18, IL-18R α , IL-18R β それぞれの野生型、変異型タンパクを使用して表面プラズモン解析によるタンパク間相互作用の検討を行った。

8. IL-18R β に変異導入した plasmid を IL-18 受容体発現 HEK293 細胞に transfect し、IL-18 刺激後の NF- κ B 転写活性を測定した。

9. 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。

10. X線小角散乱法により溶液中の複合体構造情報を得た。

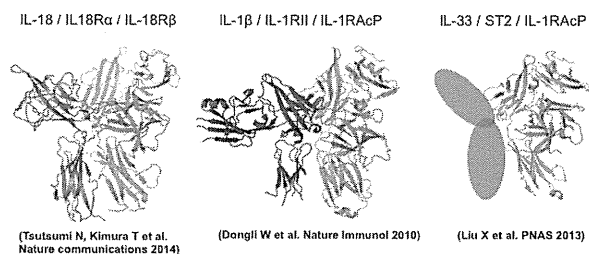
11. IL-18R α 構造の IL-18 Site1 結合部位を標的構造とし、virtual ligand screening にて 200 種類の候補低分子を選別した。

12. 得られた候補低分子を IL-18 受容体発現 HEK293 細胞の培養液に添加後 IL-18 及び IL-1 β 刺激後の NF- κ B 転写活性を測定した。また、候補低分子存在下で KG-1 細胞を IL-18 で刺激し、24 時間培養後に回収。培養上清中の IFN- γ を ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

1. 決定された IL-18-IL-18R α -IL-18R β の 3 者複合体構造は、2010 年に Wang らによって報告された IL-1 β -IL-1RII-IL-1RAcP の 3 者複合体構造の結合構成と類似していた (Wang D. et al., Nat Immunol. 2010) (図 1)。IL-18R α 、R β 共に 3 つの immunoglobulin domain から構成されており、それぞれを D1, D2, D3 とした。

図 1 The comparison of the previously solved ternary complex structure of IL-1 family members

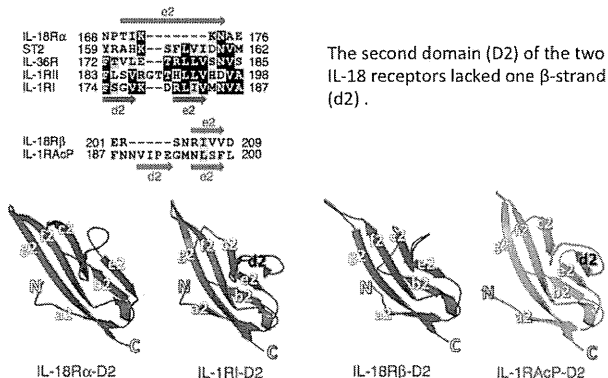


The overall structure of the IL-18/IL18R α /IL-18R β complex is similar to the IL-1/IL-1RII/IL-1RAcP and IL-33/ST2/IL-1RAcP complexes.

2. 得られた構造を参照すると、IL-18 表面の 2 箇所 (Site 1, Site 2 とした) で IL-18R α と結合し、IL-18 と IL-18R α の結合により形成される領域に IL-18R β が結合していた (IL-18 側を Site 3 とした)。また、IL-18R α 及び R β 共に D2 の β シートが 1 枚 (d2) IL-1R のものより少ないため、結果と

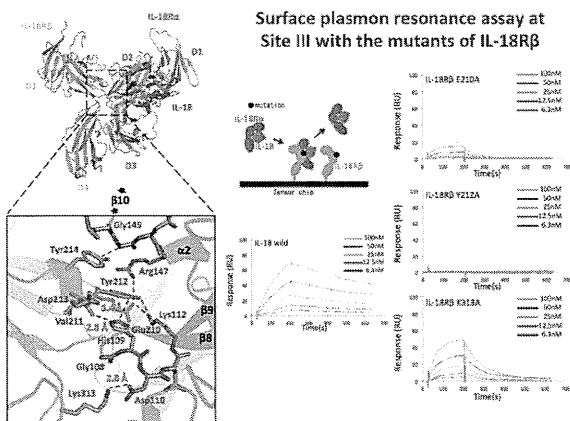
してIL-1とその受容体の結合とは詳細な結合様式が異なっていた(図2)。

図2 The structural difference between IL-1 and IL-18



3. この3箇所のSiteに位置し、タンパク間相互作用に関与すると推測されるアミノ酸残基群を置換したタンパクを使用して表面プラズモン解析を行ったところ、一部のアミノ酸置換で結合の欠損、その他で結合力の低下が観測された(図3)。

図3



4. 変異導入IL-18Rβを発現させたHEK293細胞を用いたNF-κB転写活性実験により、E210, Y212, K313が結合に関与する残基であることが裏付けられた。

5. 溶液NMR法による滴定実験の結果、chemical shiftが動いたIL-18残基は実験結果3, 4とほぼ一致していた。

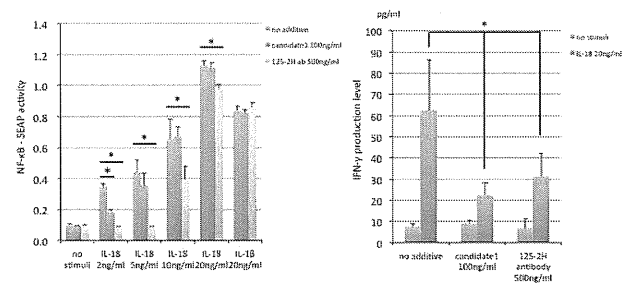
6. X線小角散乱法によりIL-18リガンド受容体3者複合体の溶液構造を観察したところ、結晶構造とほぼ一致していた。

7. IL-18Rβ D1は構造上リガンドとの結合には全く関与しない位置に存在している。このためIL-18RβのD1欠失型を発現させたHEK293細胞を用いたNF-κB転写活性実験を行ったところ、IL-18リガンド刺激によるNF-κB活性の上昇には、D1は全く関与していないことが判明した。

8. 昆虫細胞で発現させた蛋白は糖鎖修飾を受けるが、このうちAsn297部分から伸張する糖鎖がIL-18との相互作用を補強していることが判明した。

9. 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(図4)。

図4 The preliminary data of the in vitro assay for anti-IL-18 screening



D. 考察

最近、NLRP3と分子構造及び機能上非常に相同性の高いNLRC4変異によりマクロファージ活性化症候群(MAS)を引き起こす新規自己炎症性疾患(NLRC4-MAS)が報告された(Canna SW. et al., Nat Genet. 2014)。NLRC4変異によりNLRP3変異同様にNLRC4のASC及びCaspase-1との高次複合体形成が恒性的に活性化されIL-1β及びIL-18が過剰産生される。NLRC4-MAS患者では血清中のIL-18が非常に高濃度で検出され、NLRC4変異細胞ではIL-18が恒常的に過剰産生されることが報告された。IL-1阻害療法が部分的に有効であるが、血清IL-18を低下させる効果は得られず、病勢は不安定と報告されている。症例報告を見る限りNLRC4-MASの臨床症状

は、MAS に病態転換しうる重症の全身型若年性特発性関節炎(sJIA)に極めて類似している。

MAS や血球貪食性リンパ組織球症(HLH)では、一般的なリウマチ性疾患や炎症性腸疾患等と比較して著しく高レベルの IL-18 産生が起きている事が知られている。薬剤やウイルス感染、sJIA、SLE、悪性腫瘍等に起因して発症するいわゆる二次性の HLH は、明らかな発症要因は未だ不明であるが、遺伝子異常により発症する原発性 HLH では病因が明らかにされており、Perforin 遺伝子の異常等で細胞傷害性 T 細胞(CTL)や NK 細胞の機能低下が起き、CTL 自身や抗原提示細胞のアポトーシス誘導ができなくなり、サイトカインストームが発生することになる。IL-18 は NK 細胞を活性化させるサイトカインであるが、IL-18 の恒常的な過剰状態はダウンレギュレーションにより NK 細胞活性が低下した状態を作りうる。すなわちなんらかの要因で IL-18 の超過剰状態が維持されると、原発性 HLH と同様の血球貪食発症、MAS 発症準備状態を形成すると考えられる。

従って抗 IL-18 療法の最も有望な対象疾患は原発性 HLH、XIAP 欠損症、NLRC4-MAS 及び sJIA である。リコンビナント IL-1 製剤アナキンラも当初関節リウマチ治療薬として開発された経緯があるが、関節リウマチに対しては期待された程の臨床的効果が得られず、あまり重要視されていなかった。しかし、CAPS の病態解明が進んだことにより、CAPS をはじめとする自己炎症性疾患群に著効することが明らかとなり、はじめて抗 IL-1 療法が脚光を浴びるようになっていった。本研究では、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、引き続き抗 IL-18 薬の開発を進める予定である。

E. 結論

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基に IL-18 阻害低分子を見いだした。抗 IL-18 薬は、免疫調節障害や自己炎症性疾患に対する新たな治療戦略のひとつとして期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsutsumi N, Kimura T, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Yamamoto T, Zuo X, Maenaka K, Park EY, Kondo N, Shirakawa M, Tochio H, Kato Z. The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18. *Nat Commun*. 2014 Dec 15;5:5340.

2. Kimura T, Tsutsumi N, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Kondo N, Shirakawa M, Kato Z, Tochio H. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human IL-18 and its extracellular complexes. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2014 Oct;70(Pt 10):1351-6.

3. Funato M, Uemura O, Ushijima K, Ohnishi H, Orii K, Kato Z, Yamakawa S, Nagai T, Ohara O, Kaneko H, Kondo N. A complement factor B mutation in a large kindred with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Clin Immunol*. 2014 Aug;34(6):691-5.

4. 大西秀典、加藤善一郎. 細胞内寄生菌に脆弱性を示す免疫不全症 (MSMD など). *小児内科*. 2014.

2. 学会発表

1. 木村豪、堤尚孝、有田恭平、有吉眞理子、大西秀典、白川昌宏、近藤直実、朽尾豪人、加藤善一郎. アレルギー、自己免疫、自己炎症疾患治療薬開発に向けた IL-18 複合体の構造解析. 第 117 回日本小児科学会学術集会 (2014/4/11)

2. Hidenori Ohnishi, Naotaka Tsutsumi, Takeshi Kimura, Naomi Kondo, Masahiro Shirakawa, Hidehito Tochio, and Zenichiro Kato. Structural basis for the receptor recognitions of interleukin-18. 東アジア・アレルギーシンポジウム 2014 (第 26 回日本アレルギー学会春期臨床大会) (2014/5/11)

3. 大西秀典、川本典生、深尾敏幸、加藤善一郎、岸本由佳、小谷野薫、川本昌平. 免疫

不全症を伴う先天性色素失調症の 1 女児例.
第 46 回日本小児感染症学会 (2014/10/18)

4. 木村豪、堤尚孝、有田恭平、有吉眞理子、
大西秀典、白川昌宏、近藤直実、朽尾豪人、
加藤善一郎. アレルギー、自己免疫、自己炎
症疾患治療薬開発に向けた IL-18 受容体高
次複合体の構造解析. 第 51 回日本小児ア
レルギー学会 (2014/11/9)

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

小児炎症性疾患における血清マイクロRNA解析研究

担当責任者 石井 健

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

研究要旨: microRNA(以下miRNAと略称する)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など、多様性をもつことが知られている。

近年、miRNAが血清中に安定して存在することが知られ、癌・循環器疾患・神経系疾患などの領域において、実質臓器と比べてアクセスしやすい血清を用いた、疾患活動性のマーカーや診断に寄与するマーカーとして研究が精力的に試みられている。自己免疫疾患・炎症性疾患においても成人においては報告例がみられるが、小児での特に炎症性疾患のmiRNAについての解析はまだ進んでいないのが現状である。

本研究では、横浜市立大学附属病院小児科にかかりつけの若年性特発性関節炎(Juvenile idiopathic arthritis, 以下JIAと略称する)をはじめとする炎症性疾患患児の血清miRNAを網羅的に解析し、臨床所見・データとの相関関係に焦点を当てて解析する。特に、難治例と奏功例との比較を行うことによって、重症化しやすい病態のマーカーの探索を行うほか、同一症例における活動期と寛解期との比較によって、病勢を反映するマーカーの探索も行い、同疾患の診断・治療に貢献することを目的とする。

A. 研究目的

本研究は、JIAをはじめとする小児炎症性疾患患者において、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。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い、診療に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

本研究に用いる臨床資料としては、研究対象者の性別・年齢・疾患名・診断に至った臨床所見及び検査所見・治療内容及びその効果評価に至った臨床所見及び検査所見・合併症・併

用薬・既往歴および転帰を用いる。

本研究に参加同意を得られた患者において、採取された血清中のmiRNA量を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[4]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する。測定法は、本研究機関において次世代シーケンサーによる測定を行うほか、東レ株式会社に対し、検体からのRNAの抽出及び同社の3D-Gene®miRNAオリゴチップ[5]を用いたmiRNAの測定を委託する。

(倫理面への配慮)

1. 研究の倫理的実施

1) 法規制等の遵守

本研究は、「ヘルシンキ宣言」及び「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」(平成9年厚生労働省令第28号)及びその関連通知を遵守して実施する。

2) 倫理委員会

本研究の実施に先立ち、本研究臨床施設、本研究解析施設の長により選択された適切な倫理委員会は、本研究の倫理的及び科学的妥当性を審査する。本研究は、これらの倫理委員会の承認を得た後に実施する。研究代表者はこれらの医療機関の長と合意し、各倫理委員会の意見に基づきこれらの機関の長が承認した実施計画書、説明文書及び同意書を用いて本研究を実施する。

2. 研究実施計画書の遵守, 変更及び改訂

1) 研究実施計画書の遵守

研究者は、各施設において承認された本研究計画書を遵守して本研究を実施する。本研究計画書が改訂された場合においても同様である。

C. 研究結果

SJIA の患者検体を30例、コントロールの健常児を約30例の血清の miRNA 解析を開始した。

D. 考察

現在データの解析を進めている段階であるが、非常に興味深いデータが出てきており平成27年度中に論文発表を目指したい。

E. 結論

血清の miRNA 解析により、疾患の診断、病態、治療のそれぞれ少なくともいずれかのバイ

オマーカーになりうると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

担当責任者 久保田健夫 山梨大学医学部環境遺伝医学講座 教授

研究要旨

ICF 症候群は、DNA メチル化酵素 (DNMT3B) の遺伝子変異を原因とする、免疫グロブリン低下 (immunoglobulin deficiency)、染色体セントロメア不安定性 (centromeric instability)、特異顔貌 (facial anomalies) を主徴とする先天性免疫不全症候群である。われわれは次世代シーケンサー解析により、原発性免疫不全症候群患者の中に DNMT3B 変異と染色体セントロメア不安定性を有するが特異顔貌はみられない患者を見いだした。これらの患者の末梢血リンパ球を FACS ソーティングした結果、メモリーB細胞を認められないこと、ナイーブB細胞からメモリーB細胞への分化に異常があることを見いだした。さらに網羅的エピゲノム解析で、患者と健常者のナイーブB細胞のメチル化が大きく異なること、正常者でナイーブB細胞がメモリーB細胞に分化する際にメチル化がダイナミックに変化することが判明した。以上より、DNMT3B 変異患者は特異顔貌が必須でないこと、したがって本症は遺伝科医だけでなく免疫不全の担当医が診断する疾患であること、DNMT3B 酵素による遺伝子のメチル化はリンパ球の正常分化に必須であることが示唆された。またエピゲノム修飾は可逆性を有する変化であることから、薬物やゲノム修復手法によって治療することが原理的に可能であり、本研究の知見は将来の治療法開発の礎になると考えられた。

A. 研究目的

ICF 症候群は、Immunodeficiency (免疫不全)、Centromere instability (染色体セントロメアの脆弱性)、Facial Anomaly (特異顔貌) という3主徴の頭文字をとって命名された常染色体劣性遺伝病である。原因がエピジェネティックな遺伝子の発現調節に関わるDNAメチル化酵素 DNMT3B の遺伝子変異であることが判明している (Type1 ICF 症候群)。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。

一方、2011年に原発性免疫不全症候群の国内患者登録データベースである PIDJ (Primary Immunodeficiency Database in Japan) が設立され、登録患者を対象に次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子変異解析 (Exome 解析) を行った結果、DNMT3B や近年同定された第2の ICF 症候群 (Type2) の遺伝

子 *ZBTB24* の変異を有する患者が見いだされた。

このことにより、従来、顔貌や染色体の脆弱性を基準に遺伝の専門医により診断されてきた本症が、免疫不全を基準に免疫の専門医によっても診断できることが示唆された。同時に、非常にまれ(世界で30例程度)とされてきた本症患者が免疫学の専門医により多数、診断される時代の到来が予見された。

以上をふまえ、本研究の目的は、これまで不明であった「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」を明らかにし、最近、急速に開発が進んでいるエピゲノム蛋白質を標的とする化合物とマッチングさせた治療薬の探索やゲノム編集技法を用いた領域特異的エピゲノム修復治療法と結びつけられるような礎的知見を獲得することである。

B. 研究方法

解析対象は、PIDJの登録症例のうち Exome解析で *DNMT3B* 変異をホモで有することが明らかにされた ICF 症候群 (Type I) 患者3名 (30歳女性、15歳女兒、13歳男児) を対象とした。また対照として *DNMT3B* 変異をヘテロで有する患者の両親 (2名) と健常者7名であった。

また解析材料は、上記の合計12名それぞれのリンパ球より FACS sorting により採取した未分化分画 (ナイーブ B 細胞) と成熟分画 (メモリー B 細胞) であった。

上記のホモ患者3名、ヘテロ親2名、健常者7名それぞれのナイーブ B 細胞を混合したサンプル、ならびに、ヘテロ親2名、健常者7名それぞれのメモリー B 細胞を混合したサンプルを、buisulfite 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。

(倫理面への配慮)

データは匿名化して取り扱った。遺伝子解析や細胞分化実験では共同研究機関である防衛医大倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

ICF症候群は、名称の通り、免疫不全、染色体異常、顔貌異常を3徴とする遺伝性疾患と理解されて来た。しかし、今回われわれが本症候群の原因遺伝子 *DNMT3B* に変異を認められた患者は3徴がそろっておらず原因不明の低ガンマグロブリン血症とされていた症例であった。変異同定後、染色体の脆弱性試験により特徴的な所見はみられたが、顔貌は日典型的であった。このことから三徴がそろわないため ICF 症候群と診断されず、原因不明の免疫不全症とされている *DNMT3B* 変異患者が多数存在しうることが示唆された。

また *DNMT3B* 変異をホモで有する患者3名はナイーブ 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。逆に、メモリー B 細胞分化過程で高メチル化となる遺伝子は 43 種 (103 領域) と少なかった。

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。一方、その逆に患者の方が高メチル化を呈する遺伝子は234種(246領域)と少なかった。

D. 考察

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。その中で、染色体セントロメアのサテライト配列に低メチル化が生ずると染色体構造が脆弱となり、染色体標本作製時に段裂像を呈することが判明していた。しかしながら、低メチル化がどのような過程を経て主症状である免疫不全を生じさせるかは明らかでなかった。

本研究は、染色体所見から遺伝専門医が患者を見いだした従来の診断ルートではなく、免疫不全の専門医が原因不明の免疫不全患者から本症を診断したことに意義がある。これにより遺伝学者では達成できなかった免疫病態の解明への研究に初めて免疫不全の専門家がメスをいれたものであった。

具体的には、これまでのサンプルが全血であったのに対し、FACSソーティングにより、B細胞を各分画に分けた。

その結果、まず、本症の患者はメモリーB細胞をもっていないことが明らかとなった。

そこで、患者のナイーブB細胞において低メチル化により過剰発現している遺伝子がメモリーB細胞分化を妨げていると考えそのような遺伝子の同定を行った。その結果、800を超える

多数の遺伝子が顕著な低メチル化に陥っていることがわかった。

同時に、健常者における生理的なメモリーB細胞分化の過程で大きくメチル化が低下していく分化後に発現していく候補の遺伝子も多数存在するが判明した。

以上より、ICF症候群の免疫不全の病態はBリンパ球の成熟異常があり、この基盤にDNAのメチル化低下によることが判明し、これによって遺伝子の異常発現が生じていることが示唆された。さらに健常者においても、その血球分化の過程で、DNAのメチル化はダイナミックな変化を生じていることが判明し、これにより分化に係る遺伝子発現変化が生じていることが示唆された。

今後は、これらの知見に基づいて、リンパ球分化を阻止している遺伝子を特定し、この遺伝子を対象にしたゲノム修復手法を用いたメチル化強化修復治療法の開発や、グローバルなメチル化強化を図る薬剤のスクリーニングを実施して、本症の治療法の開発に繋げていく予定である。

E. 結論

DNAメチル化酵素欠損を原因とする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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Chapter: Current Understanding of Epigenomics and Epigenetics in Neurodevelopmental Disorders. In "Epigenomics and Epigenetics". Intech (Open Access Publisher), 2014, ISBN 978-953-51-1363-8, edited by Christopher J. Payne.
- 2) Kubota T, Hirasawa T, Miyake K. Chapter 24: Mental disorders and Transgenerational Epigenetic Inheritance. In "Transgenerational Epigenetics: Evidence and Debate". Elsevier (Academic Press), pp. 343-354, 2014, ISBN 978-0-12-455944-3, edited by Trygve Tollefsbol.
- 3) Kubota T, Miyake K, Hariya M, Mochizuki K. Epigenetics as a basis for diagnosis of neurodevelopmental disorders: challenges and opportunities. *Expert Rev Mol Diagn* 14:685-697, 2014.
- 4) Hariya N, Miyake K, Kubota T, Goda T, Mochizuki K. Putative PPAR target genes express highly in skeletal muscle of insulin-resistant MetS model SHR/NDmc-cp rats. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo) (in press).
- 5) Maeyama H, Hirasawa T, Tahara Y, Obata C, Kasai H, Moriishi K, Mochizuki K, Kubota T. Maternal restraint stress during pregnancy in mice induces 11 β -HSD1-associated metabolic changes in the livers of the offspring. *J DOHaD* (in press).
- 6) Kubota T, Miyake K, Hariya M, Mochizuki K. Understanding the epigenetics of neurodevelopmental disorders and DOHaD. *J DOHaD*

(in press).

2. 学会発表

- 1) Kubota T. Epigenetics as a basis for diagnosis and treatment of Neurodevelopmental Disorders. Epigenomics & Metabolomics Symposia-2014 (Harvard Medical School, Boston, USA), 2014.8.25.
- 2) Nguyen NA, Miyake K, Kubota T. Change of neuronal gene expression by administration of various anti-depressant in primary neocortical neurons. The American society of Human Genetics 64nd Annual Meeting (San Diego), 2014.10.19.
- 3) Miyake K, Yamada Y, Yotani T, Kubota T. Clinical application of an anion exchange HPLC column that distinguishes DNA methylation status. The American society of Human Genetics 64nd Annual Meeting (San Diego), 2014.10.20

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

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

担当責任者 山本 卓 広島大学大学院理学研究科 教授

研究要旨

本研究では、疾患原因遺伝子の解析や創薬スクリーニングに必要な疾患モデル細胞作製を効率化する目的で、TALENおよびCRISPR/Cas9を利用したワンステップでのゲノム編集による一塩基編集法の開発を行った。

A. 研究の目的

近年、次世代シーケンス解析によって、疾患原因の候補となるSNPsがリストアップされてきているが、それらのSNPsの機能を解析する効率的な方法は開発されていない。そこで本研究では、疾患研究や創薬スクリーニングに必要な疾患モデル細胞を効率的に作製するため、哺乳類培養細胞にお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する。

B. 研究方法

これまで培養細胞での一塩基改変は、2段階のトランスフェクションを必要とする煩雑な方法が中心である。そこで本研究では、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。

C. 研究結果

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-HS VTK-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こ

とができた。現在、ランダム挿入された細胞株のネガティブ選別を行うと同時に、Cas9 の発現誘導によってMMEJを介した修復によってGFP 蛍光が観察できるかどうかを検討している。

D. 考察

ゲノム編集ツールによる DNA 二本鎖切断の多くが MMEJ で修復されることが近年報告されている。この方法は、簡便であり一塩基編集に利用できることが証明できれば意義深く、効率等を詳細に調べ、システムの最適化を行なう必要がある。

E. 結論

本研究によって、MMEJ を利用したワンステップでの一塩基編集法に必要なターゲティングベクターの構築を行なった。今後、MMEJ での正確な修復の効率および改変した細胞の選抜方法などを検討していく計画である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watabnabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S and Hotta A. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*, 4: 143-154, 2015
- 2) Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T and Suzuki K. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donorDNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nature*

Communications, 5: 5560, 2014.

- 3) Ochiai H, Sugawara T, Sakuma T and Yamamoto T. Stochastic promoter activation affects Nanog expression variability in mouse embryonic stem cells. *Scientific Reports*, 4: 7125, 2014.
- 4) Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K and Yamamoto T. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Scientific Reports*, 4: 5400, 2014.
- 5) Tokumasu D, Sakuma T, Hayashi Y, Hosoi S, Hiyama E and Yamamoto T. FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions. *Genes Cells*, 19: 419-431, 2014.

2. 学会発表

(海外)

- 1) Sakuma T, Suzuki KI, Yamamoto T, Genome editing using Platinum TALENs, FASEB Science Research Conference, Nassau, Bahamas, 2014.6.22-27.

(国内)

- 1) 山本 卓、ゲノム編集を利用した培養細胞や動物での標的遺伝子改変「肝免疫ウイルスフロンティア」、東京、2014.4.5
- 2) Yamamoto T, Genome editing using Platinum TALENs, The 66th Annual Meeting of the Japanese Society of Cell Biology, Nara, 2014.6.11
- 3) 山本 卓、ゲノム編集を利用した培養細胞や動物での遺伝子改変「がん研究分野の特性を踏まえた支援活動公開シンポジウム」、2014.8.21
- 4) Yamamoto T, Genome editing in cultured cells and animals using TALENs, JARI&ISEV Japan 6th

Annual meeting,, Hiroshima, 2014.8.30

- 5) 山本 卓、ゲノム編集技術を利用した培養細胞や動物での遺伝子改変、京都大学ウイルス研潮流セミナー、京都、2014.9.3
- 6) 山本 卓、高活性型 TALEN(Platinum TALEN)を利用した動物でのゲノム編集、NBRP シンポジウム「ツメガエルを用いた機能ゲノム科学研究」、仙台、2014.9.12
- 7) 8)Yamamoto T, Genome editing in cultured cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas、「ゲノム工学とイメージングサイエンスに基づく生命システム研究の新展開」、京都、2014.10.29

F. 知的財産権の出願・登録状況

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)

資 料