

iPS 細胞を用いた希少免疫疾患の遺伝的診断

研究分担者 中畑 龍俊 京都大学iPS細胞研究所

研究要旨

希少な原発性免疫不全症候群(PID)症例の正確な診断を行うため、自己炎症性疾患の一種である CINCA 症候群患者さんから iPS 細胞を樹立し、表現型解析を行った。結果、従来報告がない NLRP3 遺伝子の体細胞モザイクを診断した。iPS 細胞を用いることにより、ある個人の単一細胞レベルでの病態生理を解析することが可能になると考えられた。

A. 研究目的

原発性免疫不全症候群(PID)の診断基準・重症度分類においては、正確な遺伝子診断を行い、患者さんの表現型との関連を厳密に明らかにすることが肝要である。しかし、PID においてはしばしば非常にまれな非典型例を経験し、このような症例の正確な診断は困難である。そこで、このような希少症例において、iPS 細胞を用いて正確な遺伝子診断と表現型相関を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

自己炎症性疾患である CINCA 症候群では、患者は NLRP3 遺伝子の機能獲得変異により生じる過剰な IL-1 β 産生により発疹・髄膜炎・関節炎などを伴う慢性の全身性炎症を呈する。しかし、約 10%の患者では NLRP3 の変異がみつからず、これらの患者では臨床的に CINCA 症候群の症状を来しながら、NLRP3 遺伝子に変異が見つからない場合があり、この場合の原因遺伝子は不明であった。そこで、NLRP3 変異を持たない CINCA 症候群患者さんから皮膚の細胞を頂き、それから疾患特異的 iPS 細胞を作製した。この疾患特異的 iPS 細胞をマクロファージへ分化誘導し、IL-1 β の産生量を確認した。

(倫理面への配慮)

- 1.患者の遺伝子情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”に沿って、京都大学倫理審査委員会の審査承認を受けているが、人権及び利益の保護について、十分配慮しながら実験を行う。
- 2.組み換えDNA実験については、“組み換えDNA実験指針”に基づき、研究計画が同指針に示されている基準に適合することを確認したうえで、計画の申請を京都大学に対して行い、

承認を受けた後、規定されている封じ込め手段を適切に行う。

3.疾患関連iPS細胞作製にあたり、“人を対象とする医学系研究に関する倫理指針”に基づいて、「ヒト疾患特異的iPS細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究」について、京都大学医学部倫理委員会の承認を頂いている。その内容を忠実に順守し、患者さんの同意・協力を得て行う。

C. 研究結果

興味深いことに、この患者さんでは、iPS細胞のクローンごとにIL-1 β の産生量が異なり、その表現型はクローンごとに「正常型(ATPがIL-1 β 分泌に必要)」と「疾患型(LPSのみでIL-1 β 分泌)」に分かれた(図1)。各々のiPS細胞クローンは1つの体細胞に由来することから、この患者さんは体の中に正常細胞と異常細胞をどちらも持っている、体細胞モザイクの状態ではないかと考えられた。しかし、NLRP3変異の体細胞モザイクは認められなかったため、病的な表現型のクローンのみが存在する遺伝子変異を検出するために、各々のクローンで、全エクソン解析法を用いてほぼ全ての遺伝子の変異を検出し、病的クローンと正常クローンの間で比較を行った。

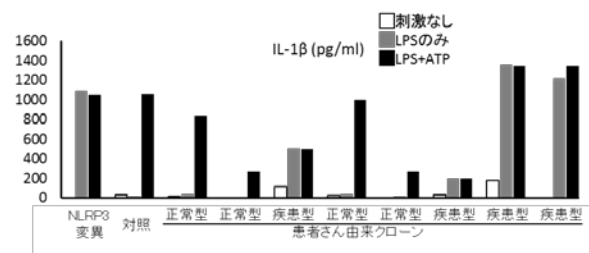


図1: NLRP3変異陰性患者さん由来iPS細胞の解析: iPS細胞クローンの表現型は疾患型(LPSのみでIL-1 β 産生)と正常型(LPS+ATPでIL-1 β 産生)に分かれる。

結果、病的クローンに共通に認められ、正常

クローンに認められなかった変異として、NLRC4遺伝子変異のみが同定された。このNLRC4遺伝子変異は、患者の血液細胞からも検出されたが、疾患を持たない日本人の遺伝子型データベースでは検出されず、患者さんに特異的な変異と考えられた。

以上より、この患者の病態にはNLRC4遺伝子変異が関与していると考えられたが、一方で、上記の手法で同定されなかった他の責任遺伝子変異が病的クローンに存在し、NLRC4は偶然見つかった無関係の遺伝子変異であるという可能性は否定できない。そこで、NLRC4遺伝子変異を持つiPS細胞クローンのNLRC4遺伝子

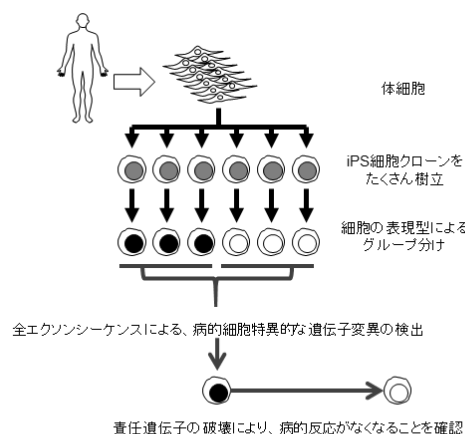


図2: NLRC4変異の体細胞モザイクの同定スキーム

をノックアウトし、IL-1 β 産生量が変化するかどうかが検証した。結果、ノックアウトクローンにおいては、priming signalのみによって産生されるIL-1 β の産生量は減少し、正常表現型に回復することを確認した(図2)。以上の結果より、NLRC4遺伝子の体細胞モザイク変異は、CINCA症候群の原因になりうるということが結論づけられた。

D. 考察

本研究における主たる意義は以下の3点である。1) 非常にまれな疾患において、iPS細胞の技術が実際の患者さんの正確な診断に不可欠な役割を果たしうること、およびiPS細胞由来の表現型を用いた前方視的遺伝子探索が、原因遺伝子の特定が困難な孤発性の患者さんの診断に有用であることが示された。2) CINCA症候群の新規原因遺伝子を同定したこと。NLRC4異常症の過去の報告では、より重症のマクロファージ活性化症候群を合併する症例と、より軽症の家族性寒冷自己炎症症候群の症例しか報告されていなかった。本研究により、NLRC4異常症が連続的な表現型を持っていることが示唆され、新たな疾患概念の構築の一助となることが期待される。3) 体細胞モザイクの新たな診断方法を提示したこと。体細胞モザイクは、しばしば構成的変異との区別が困難であり、また、変異細胞の割合が低い場合、通常の遺伝

子検査法では発見できないことがある。iPS細胞を用いて、一細胞レベルの解像度で表現型を解析することで、体細胞モザイクの診断や病態解析が進むことが期待されると同時に、正確な遺伝子診断により患者や家族への適切な遺伝カウンセリングが可能になるかもしれない。

E. 結論

多くのPIDでは原因遺伝子の同定と発症メカニズムの解析研究が急速に進んでおり、それに呼応して診断・治療法が改良されている。正確な遺伝的バックグラウンドの解析と、それがもたらす病態生理学的な意義を解明することは重要である。個々のiPS細胞クローンは単一の体細胞に由来するため、iPS細胞を用い、ゲノム編集技術や次世代シーケンスなどの新技術を組み合わせることで、ある個人の単一細胞レベルでの病態生理を解析することが可能になる。以上のように、疾患iPS細胞を用いることにより、PIDの病態解析、治療法開発などの可能性を広げることができれば、多くの患者さんへの診断治療法開発へ寄与できると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nodomi S, Umeda K, Saida S, Kinehara T, Hamabata T, Daifu T, Kato I, Hiramatsu H, Watanabe KI, Kuwahara Y, Iehara T, Adachi S, Konishi E, Nakahata T, Hosoi H, Heike T.: CD146 is a novel marker for highly tumorigenic cells and a potential therapeutic target in malignant rhabdoid tumor. *Oncogene*.35, 5317-5327, 2016 Oct 6. doi: 10.1038/onc.2016.72.
- 2) Sugimine Y, Niwa A, Matsubara H, Kobayashi K, Tabata Y, Heike T, Nakahata T, Saito MK.: A portable platform for stepwise hematopoiesis from human pluripotent stem cells within PET-reinforced collagen sponges. *Int J Hematol*. 2016 Dec;104(6):647-660. Epub 2016 Sep 6. Doi:10.1007/s12185-016-2088-x.
- 3) Mao B., Huang S, Lu X, Sun W, Zhou Y, Pan X, Yu J, Lai M, Chen B, Zhou Q, Mao S, Bian G, Zhou J, Nakahata T, Ma F.: Early development of definitive erythroblasts from human pluripotent stem cells defined by expression of glycophorin A/CD235a, CD34, and CD36. *Stem Cell Reports*, 2016 Nov 8;7(5):869-883. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.09.002. Epub 2016 Oct 6.
- 4) Morita M, Nishinaka Y, Kato I, Saida S, Hiramatsu H, Kamikubo Y, Heike T, Nakahata T, Adachi S.: Dasatinib induces autophagy in mice with Bcr-Abl-positive leukemia. *Int J Hematol*. 105:335-340, 2017.
- 5) Ohta R, Niwa A, Taniguchi Y, Suzuki NM, Toga J, Yagi E, Saiki N, Nishinaka-Arai Y, Okada C, Watanabe A, Nakahata T, Sekiguchi K, Saito MK.: Laminin-guided highly efficient endothelial commitment from human pluripotent stem cells. *Scientific Reports*. 2016 Nov 2; 6: 35680. doi:

- 10.1038/srep35680.
- 6) Kawasaki Y, Oda H, Ito J, Niwa A, Tanaka T, Hijikata A, Seki R, Nagahashi A, Osawa M, Asaka I, Watanabe A, Nishimata S, Shirai T, Kawashima H, Ohara O, Nakahata T, Nishikomori R, Heike T, Saito M.: Pluripotent cell-based phenotypic dissection identifies a high-frequency somatic NLRC4 mutation as a cause of autoinflammation. *Arthritis & Rheumatology* Doi: 10.1002/art.39960.
2. 学会発表
 - 1) Ameku T, Taura D, Sone M, Numata T, Toyoda T, Araokam T, Mae S, Watanabe A, Yamamoto T, Takahashi K, Sato Y, Asaka I, Yamada Y, Ubara Y, Muso E, Fukatsu A, Nakahata T, Mori Y, Koizumi A, Nakao K, Yamanaka S, Osafune K.: Identification of a novel risk factor for intracranial aneurysms in ADPKD using iPSC models (Oral) ISSCR 2016 Annual Meeting 2016/6/22-25 (25) Moscone West (San Francisco)
 - 2) Saiki N, Oshima K, Hirayama A, Soga T, Tomita M, Nakahata T, Saito M.K.: Multi-omics analysis for elucidating the potential role of intracellular bioenergetics and gene expression network on controlling the fate of hematopoietic progenitors using patient-specific iPSC cells (Poster) ISSCR 2016 Annual Meeting 2016/6/22-25 (23) Moscone West (San Francisco)
 - 3) Niwa A, Saito M.K, Nakahata T.: PSC-derived hematopoietic system to elucidate the cooperation between gene alterations and original cell lineages in leukemogenesis (Poster) ISSCR 2016 Annual Meeting 2016/6/22-25 (24) Moscone West (San Francisco)
 - 4) Nishinaka-Arai Y, Niwa A, Osawa M, Nakahata T, Saito M.K.: Establishment of compound screening system for treatment of Down syndrome-related transient abnormal myelopoiesis (Poster) ISSCR 2016 Annual Meeting 2016/6/22-25 (24) Moscone West (San Francisco)
 - 5) Kato I, Nishinaka-Arai Y, Nakamura M, Akarca A.U, Niwa A, Ozawa H, Yoshida K, Mori M, Wang D, Ueno H, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Miyano S, Gupta R, Umeda K, Watanabe K, Koh K, Adachi S, Heike T, Saito M.K, Sanada M, Ogawa S, Marafioti T, Watanabe A, Nakahata T, Enver T: -VEGFA- a new therapeutic target in CNS leukemia (Oral) 58th Annual Meeting of the American Society of Hematology 2016/12/3-6 (5) San Diego Convention Center (San Diego)
 - 6) Haruyama M, Yamaichi K, Niwa A, Saito M.K, Nakahata T: Hepatoma-Derived Growth Factor is a Novel Factor to Promote the Proliferation of Hematopoietic Stem Cells (Poster) 58th Annual Meeting of the American Society of Hematology 2016/12/3-6 (3) San Diego Convention Center (San Diego)
 - 7) Matsubara H, Niwa A, Nakahata T, Saito M.K: Induction of Natural Killer Cells from Human Pluripotent Stem Cells Under Chemically Defined Condition (Poster) 58th Annual Meeting of the American Society of Hematology 2016/12/3-6 (3) San Diego Convention Center (San Diego)
- 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