

**厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業**

**血液免疫系細胞分化障害による疾患の  
診断と治療に関する調査研究**

**平成25年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 野々山 恵章**

**平成26(2014)年3月**

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業

血液免疫系細胞分化障害による疾患の  
診断と治療に関する調査研究

目 次

・ 総括研究報告

- 血液免疫系細胞分化障害による疾患の診断と治療に関する調査研究 ----- 1  
野々山恵章（防衛医科大学校小児科学講座）

・ 分担研究報告

1. MYH9異常症 ----- 10  
川口裕之（防衛医科大学校小児科学講座）
2. 血液免疫系細胞分化障害による疾患の診断と治療に関する調査研究 ----- 16  
今井 耕輔（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科小児・周産期地域医療学講座）
3. 細網異形成症患者および重症先天性好中球減少症患者由来iPS細胞樹立  
およびそれを用いた病態解析--- 25  
中畑 龍俊（京都大学iPS細胞研究所臨床応用研究部門）
4. 血液免疫系細胞分化障害による疾患の診断と治療に関する調査研究----- 30  
小原 収（公益財団法人かずさDNA研究所）
5. コロニーアッセイ、骨髄機能解析、移植治療開発----- 35  
小島 勢二（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学）
6. マイコバクテリア易感染症（MSMD）を呈する機能喪失型STAT1異常症 ----- 39  
小林 正夫（広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学）
7. 全エキソーム解析によって解明した  
Hoyeraal-Hreidarsson症候群の責任遺伝子：RTEL1----- 43  
原 寿郎（九州大学大学院医学研究院成長発達医学）
8. 血液免疫系細胞分化障害による疾患の診断と治療に関する調査研究 ----- 46  
山口 博樹（日本医科大学血液内科 講師）
- ・ 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 50
- ・ 研究成果の刊行に関する別冊 ----- 55

## 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業)

# 血液免疫系細胞分化障害による疾患の 診断と治療に関する調査研究

## 平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 野々山 恵章 (防衛医科大学校 小児科学講座 教授)

### 研究要旨

血液免疫系分化障害による疾患の診断と治療について、以下の研究を実施した。

#### a) 疾患原因遺伝子同定

次世代シーケンサーによるExome解析などの新規技術を用いて血液免疫系分化障害を起こす疾患の原因遺伝子同定を行った。その結果GATA2、EVI1、DNMT3B、ZBTB24、FANCE、FANCA、ITGB3、CXCR4、RAG1、Aprataxin、PI3Kdelta、PTEN、RECQL4、PIF1、RTEL1、WRN、ATM、BLM、TEP1、TPP1、STAT1が疾患原因遺伝子であることを解明した。

#### b) 迅速遺伝子解析法の確立

アンプリコンPCRにより候補遺伝子を増幅抽出し、次世代シーケンサーによる解析と組み合わせる新規技術を確立し、重症複合型免疫不全症を起こす 27 遺伝子を迅速に遺伝子解析する方法を確立した。MYH9 異常症のスクリーニングのために、既知の変異の好発部位を網羅する直接シーケンス法の系を構築した。

#### c) RNAシーケンス法の活用

網羅的エクソンシーケンシングを補完する目的のためのRNAシーケンシングの補完性を検証し、全血の白血球分画のRNAシーケンシングによって既知の免疫不全症原因遺伝子の78% (227遺伝子中の177遺伝子) が検出されることを見出した。

#### d) 疾患由来iPS細胞の樹立と分化実験への応用

好中球減少とT細胞欠損を呈する疾患である細網異形成症患者由来の繊維芽細胞から、iPS細胞を作成した。樹立したiPS細胞の評価後、血液前駆細胞に分化させ、コロニーアッセイ、骨髄系細胞やリンパ球への分化アッセイ、アポトーシス解析などのin vitro 解析を行った。患者クローンでは著明な分化障害があることを示すことができた。さらに細網異形成症の原因遺伝子であるAK2遺伝子およびAK1遺伝子を導入し、本疾患の血球分化障害が回復できることを示した。

慢性先天性好中球減少症患者由来iPS細胞を樹立し、好中球分化にさせ、患者クローンでは成熟好中球への分化が著明に障害されていることを示すことができた。

Wiskott-Aldrich症候群では血小板産生低下が見られる。そこで、患者由来iPS細胞を樹立し、巨核芽球への分化異常、血小板産生低下があることを示した。血小板増

加因子であるTPOを加えたが産生増加は見られなかった。

e) 疾患病態解析

B細胞分化障害による低グロブリン血症を呈する患者原因遺伝子が、Fanconi貧血の原因遺伝子であるFANCEであることを世界で初めて見出した。

単球・樹状細胞とB細胞が欠損する疾患の原因遺伝子がGATA2であることを見出し、国内14症例の臨床的な解析を行った。その結果、易感染性に加え、加齢に伴い白血病を発症することを見出した。T細胞にGATA2が発現し、T細胞機能分化にGATA2が重要な役割を果たすことも見出した。

PI3Kdeltaの機能獲得性変異がリンパ球機能障害を起こすことを見出した。国内9例を同定した。全員易感染性を呈し、悪性リンパ腫に進展した患者様も2人いた。病態解析により、AKT, mTORの活性化が本疾患の病態であり、mTOR抑制剤がリンパ腫への進展、免疫不全を改善しうる可能性を示した。

原因不明の低ガンマグロブリン血症とされていた5症例で、Exome解析によりDNMT3BないしZBTB24の変異を見出し、染色体解析によりICF症候群と確定した。すなわち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事を示した。またメモリーB細胞への分化が完全に停止していることも明らかになった。

先天性角化不全症(DKC)で、ロスモンド・トムソン症候群、毛細血管拡張性運動失調症、Bloom症候群の原因遺伝子であるRECQL4、ATM、BLMのヘテロ変異が高率に認められ、DKCの病態への関与が考えられた。Hoyeraal-Hreidarsson症候群の児について、Exome解析を行い、RTEL1遺伝子のcompound heterozygous mutationを確認した。RTEL1はテロメアの維持・複製、およびDNA二本鎖切断修復に関与して骨髄不全を起こすことを示した。

常染色体優性遺伝形式をとる先天性血小板減少症家系、4世代、10名の全エクソンシーケンスを行い、ITGB3遺伝子のT2231C変異を原因遺伝子変異候補として同定した。L718P変異の機能解析から、インテグリンb3の細胞膜周辺領域のヘテロ接合性変異が機能獲得型変異としてインテグリンシグナル伝達経路の恒常的部分活性化とRhoAシグナルの抑制を示すことを明らかにした。

STAT1はtype I IFN(IFN- $\beta$  /  $\gamma$ )とtype II IFN(IFN- $\gamma$ )の両方のシグナル伝達に重要な転写因子であり、機能喪失型変異によって細胞内寄生菌に対して易感染性を示し、メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症(MSMD)の原因遺伝子である。3家系8例の常染色体優性遺伝型のヘテロ接合性変異例を同定した。すべての変異でIFN- $\gamma$ 刺激に対し、STAT1リン酸化低下、核内移行の軽度低下、DNA結合能障害、dominant negativeの転写活性異常が認められた。

f) 原発性免疫不全症のデータベースであるPIDJを、より網羅的、系統的に解析ができるようにバージョンアップを行った。

以上、次世代シーケンサーを用いたexome解析、iPS細胞による分化実験、アンブリコンPCRによる遺伝子解析、WEBベースの患者登録システムであるPIDJの活用などにより、血液免疫系の分化障害による疾患の病態解明、原因遺伝子同定に十分な成果を上げることが出来た。

## 研究分担者

### 川口 裕之

防衛医科大学学校小児科学講座、准教授

### 今井 耕輔

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科小児・周産期地域医療学講座、寄附講座准教授

### 中畑 龍俊

京都大学iPS細胞研究所、臨床応用研究部門・疾患再現研究分野、特定拠点教授

### 小原 收

公益財団法人かずさDNA研究所、ヒトゲノム研究部、副所長  
理化学研究所、免疫・アレルギー科学総合研究センター、免疫ゲノミクス研究グループ、グループディレクター

### 小島 勢二

名古屋大学大学院医学系研究科小児科、教授

### 山口 博樹

日本医科大学血液内科、講師

### 小林 正夫

広島大学大学院医歯薬保健学小児科学、教授

### 原 寿郎

九州大学大学院医学研究院成長発達医学小児科、教授

## A. 研究の目的

造血幹細胞から血液系細胞と免疫系細胞が分化成熟する。この血液免疫系細胞の分化障害により、様々な疾患が発症する。症状が多彩なため、診断が困難で、診断の遅れ、治療の遅れが起きている。これらの疾患は、血液免疫系細胞の分化に関与する遺伝子の障害が原因であり、原因遺伝子の同定は、遺伝子診断を可能にし早

期診断に貢献する。さらに遺伝子機能解析により病態を理解し、より適した治療法の開発につながる。

本研究では、血液免疫系細胞分化障害による疾患の遺伝子同定、迅速な遺伝子診断法の確立、診断基準・治療ガイドライン作成、スクリーニングなどにより早期診断、病態解明、病態に即した適切な早期治療を行い、疾患予後を改善することを目的とした。

## B. 研究方法

対象疾患は、血液系・免疫系細胞の両者の分化に障害をきたすという特徴を持つ、1)慢性好中球減少症、2)家族性血小板減少症(X連鎖血小板減少症、Wiskott-Aldrich症候群、Epstein症候群(MYH9異常症))、3)細網異形成症、4)Emberger症候群、5)慢性肉芽腫症、6)家族性血球貧食症候群、7)申請者が見出した新規血液免疫系細胞分化障害である家族性樹状細胞欠損症とした。4)、7)はGATA2変異が共通の原因であることが判明し、GATA2異常症とも呼ばれる。

さらに、研究途上で、ICF症候群タイプ1、タイプ2、Aprataxin異常症、Fanconi貧血、WHIM症候群、PI3K異常症、PTEN異常症、RAG1異常症、CD40L欠損症、STAT1異常症においても新規知見を見出したので、対象疾患として追加した。

疫学的にはこれらの疾患は国内に1,000例程度患者が存在する。

研究方法については、遺伝子診断については、既知遺伝子についてはアンプリコンPCRにより候補遺伝子を増幅抽出し、次世代シーケンサーによる解析と組み合わせる新規技術により迅速診断法を確立した。

新規遺伝子同定については、次世代シーケンサーによる Exome 解析、疾患由来 iPS 細胞による in vitro 分化系、RNA シーケンシング、全ゲノムメチル化解析、SNP array などの新規技術を用いた。例えば、Exome 解析で変異を認められた候補遺伝子について、各疾患由来 iPS 細胞に遺伝子導入し、血液免疫系幹細胞への正常分化を解析する手法で原因遺伝子を同定した。その際、申請者が構築した PIDJ 免疫不全症データベースに保存してある患者細胞、DNA、家族歴、臨床情報を活用した。

病態解析としては、遺伝子機能解析として、酵素活性、リン酸化、サイトカイン産生能、8 color FACS 解析、コロニーアッセイ、TREC/KREC 測定、染色体断裂試験、モノクビキチンアッセイなどで、血液系細胞と免疫系細胞をともに解析した。特に血液免疫系細胞の分化を検討する方法として、iPS 細胞からの好中球、単球、樹状細胞、T 細胞、B 細胞、N 細胞、血小板などの分化系を用いた。

治療法の開発として、造血幹細胞移植の必要性を決める目的で、患者予後解析を行った。その際、TREC/KREC のコピーナンバーも参考にした。また、TCR, BCR レパートワ解析、somatic hyper mutation 解析、クラススイッチ解析などを行い、T 細胞機能、B 細胞機能を解析し、グロブリン補充療法の必要性、抗ウイルス薬、バクタ、抗真菌薬、抗生剤の予防投与の必要性について検討した。

患者の臨床症状、検査所見、予後などを解析し、診断および治療法のガイドラインを作成した。

患者会との連携により、患者が求める難病対策を把握し、それに対応する研究が行なった。また研究成果を患者に周知した。

### (倫理面への配慮)

原発性免疫不全症の早期診断法の確立に関する研究(実施責任者:野々山恵章、防衛医科大学校倫理委員会、平成21年7月27日承認)

先天性免疫不全症の遺伝子解析研究(実施責任者:野々山恵章、防衛医科大学校倫理委員会、平成21年12月11日承認)

先天性免疫不全症に対する造血幹細胞移植に関する検討(実施責任者:野々山恵章、防衛医科大学校倫理委員会、平成23年7月1日承認)

原発性免疫不全症の遺伝子解析(実施責任者:今井耕輔、東京医科歯科大学倫理委員会、平成20年6月24日承認)

小児期発症疾患の遺伝子素因解明に関する研究(実施責任者:今井耕輔、東京医科歯科大学倫理委員会、平成24年11月5日承認)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究(実施責任者:中畑龍俊、京都大学医の倫理委員会、当初承認日:平成20年6月4日、変更・追加承認日:平成24年7月19日)

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(実施責任者:中畑龍俊、京都大学医の倫理委員会、当初承認日:平成20年6月4日、変更・追加承認日:平成24年7月19日)

網羅的な全エクソンシーケンシング研究(実施責任者:小原収、かずさDNA研究所倫理委員会、平成20年2月5日承認)

RNAシーケンシングを発現プロファイル解析および塩基配列解析研究(実施責任者:小原収、かずさDNA研究所倫理委員会、平成24年10月16日承認)

稀少小児遺伝性血液疾患における原因遺伝子の探索研究(実施責任者:小島勢二、

名古屋大学医学部倫理審査委員会、平成24年2月10日承認)

先天性骨髄不全症の遺伝子解析研究(実勢責任者:山口博樹、日本医科大学遺伝子倫理審査、平成24年3月7日承認)

原発性免疫不全症の遺伝子解析研究(実施責任者:原寿郎、九州大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委審査委員会、平成20年6月3日承認)

## C. 研究結果

### a) 原因遺伝子同定

原因不明の免疫不全症患者 74 例について、exome 解析を行い、その中から原因遺伝子と考えられる遺伝子変異について、キャピラリーシーケンスにより変異の確認を行った。候補原因遺伝子の iPS 細胞などを用いた機能解析や、候補遺伝子が既疾患の原因遺伝子であればその診断法を活用することにより、免疫不全症を起こす新しい原因遺伝子を 19 種類同定した。

明らかになった遺伝子は、FANCE、FANCA、GATA2、DNMT3B、ZBTB24、PI3Kdelta、PTEN、ITGB3、CXCR4、RAG1、Aprataxin、RECQL4、PIF1、RTEL1、WRN、ATM、BLM、TEP1、TPP1、STAT1 である。これらの遺伝子が血液系と免疫系に障害を持つ疾患の原因遺伝子であることを解明した。

### b) アンプリコン PCR による迅速遺伝子診断法の開発

700 種類のプライマーを 1 チューブに入れて PCR 増幅を行うアンプリコン PCR により候補遺伝子を複数増幅抽出し、次世代シーケンサーによる DNA 解析と組み合わせる新規技術を確立した。これにより、重症複合型免疫不全症を起こす 26 遺伝子を迅速

に遺伝子解析が可能になった。アンプリコン PCR 法と次世代シーケンサーを組み合わせた遺伝子解析が、遺伝子診断の迅速化に有効である事、MSMD、PI3K、CGD、骨髄不全症など他の疾患の遺伝子解析にも応用出来る事を示した。

MYH9 異常症のスクリーニングのために、既知の変異の好発部位を網羅する直接シーケンス法の系を構築した。

### c) RNA シーケンスの検証

網羅的エクソンシーケンシングを補完する目的のための RNA シーケンシングの補完性を検証し、全血の白血球分画の RNA シーケンシングによって既知の免疫不全症原因遺伝子の 78% (227 遺伝子中の 177 遺伝子) が検出されることを見出した。

分化障害が起きている GATA2 異常にゲノム編集を用いて正常化させ、各分化段階に分化させ発現誘導される RNA を、正常化していない iPS 細胞からの分化段階の細胞の RNA と比較する方法で、各分化段階における新規分化因子を同定している。GATA2 欠損症では mDC、pDC、マクロファージ、B 細胞、NK 細胞が欠損し、T 細胞の分化障害も認められる GATA2 欠損症由来 iPS 細胞は既に樹立し、各リニエージへの in vitro での分化方法は確立しているため、RNA シーケンスにより新規分化因子を同定し、新規治療に結びつけ、創薬に応用する。

### d) 疾患由来 iPS 細胞の樹立と分化実験

細網異形成症患者由来の繊維芽細胞から iPS 細胞を作製した。樹立した iPS 細胞の評価(トランスジーンサイレンシングの確認、未分化マーカーの確認、染色体検査、奇形腫アッセイ)が完了した。これを血液前

駆細胞に分化させ、コロニーアッセイ、骨髓系細胞やリンパ球への分化アッセイ、アポトーシス解析などの in vitro 解析を行った。患者クローンでは著明な分化障害があることを示すことができた。さらに細網異形成症の原因遺伝子である AK2 遺伝子を導入し、本疾患の血球分化障害が回復することを示した。さらに、メタボローム解析を行い、その結果から候補を絞り込み、in vitro で好中球の分化を正常化させる因子を発見した。これまでに他の疾患でも使用されていて安全な因子であるので、治療への応用が可能であると考えられた。

重症先天性好中球減少症の根本治療は造血幹細胞移植であるが、移植前の血球は減少していることから、患者からの血液細胞での研究は非常に困難である。このため、患者由来 iPS 細胞樹立は本疾患の病態解析にとって、非常に有望と考えられる。今回の研究で、HAX1 遺伝子変異による重症先天性好中球減少症患者から、iPS 細胞を樹立することに成功した。患者由来 iPS 細胞からの好中球への分化アッセイを行ったところ、正常 ES/iPS 細胞や正常原因遺伝子修復後の患者由来 iPS 細胞からの好中球と比較して、著明な好中球分化障害を認められた。これは患者骨髓所見と一致しており、本疾患の病態再現に成功した。

さらにこの実験系を活用し、HAX1 異常症で、好中球分化を促進する新規分化因子を探索した。その結果細網異形成症で好中球を分化させる因子が、HAX1 異常症でも好中球を正常に分化させることを見出し、治療薬として応用出来る可能性を示した。

Wiskott-Aldrich 症候群では血小板産生低下が見られる。そこで、患者由来 iPS 細胞を樹立し、血液幹細胞に分化させ、コロニー解析や血小板産生能について検討した

ところ、巨核芽球への分化異常、血小板産生低下が見られた。血小板増加因子である TPO を加えたが産生増加は見られず、新規分化因子を RNA シークエンスなどの手法で同定している。この分化因子が T 細胞などの免疫系細胞の分化を正常化するか検討中である。以上の結果から、iPS 細胞を用いた分化系は治療薬の開発に有用であると考えられた。

#### e) 疾患病態解析

新規に確定した原因遺伝子のうち代表的な疾患の病態は以下の通りである。

##### i) FANCE および FANCA 異常症

B 細胞分化障害による低 グロブリン血症を呈する患者の原因遺伝子が、Exome 解析により、Fanconi 貧血の原因遺伝子である FANCE および FANCA であることを見出した。患者由来単核球を用い、染色体脆弱試験で Fanconi 貧血特有の結果を示した。さらに 28 例の Fanconi 貧血患者で B 細胞の新生能を見るマーカーである KREC、T 細胞新生能をみる TREC を解析したところ、5 例で KREC が陰性で 2 例で TREC が陰性であることが判明した。これにより、Fanconi 貧血では免疫不全を取ることがあることが明らかになった。すなわち、FANCE 異常および FANCA 異常が骨髄不全の症状を呈さず、B 細胞欠損と低 グロブリン血症を示すことを、世界で初めて示した。したがって免疫不全症において FANCA 遺伝子群の異常を解析することが必要であることが判明した。

##### ii) GATA2 異常症

Exome 解析により単核球・樹状細胞と B 細胞が欠損する疾患の原因遺伝子が GATA2 であることを見出し、PIDJ を介して集積され



た国内症例の解析から、国内 14 症例を見出した。その臨床的な解析を行った。その結果、T 細胞免疫不全による易感染性を呈すること、加齢に伴い白血病を発症することを明らかにした。thymic naive T 細胞/TREC の低下、IL4、IL17 産生低下など T 細胞免疫が低下していることを見出した。さらに T 細胞を活性化すると GATA2 が発現する事を見出し、GATA2 は単球・樹状細胞のみならず、T 細胞の発生・分化に重要な役割を果たしていると考えられた。

また、これまで家族性樹状細胞欠損症、Emberger 症候群と診断されていた疾患が GATA2 異常症として統一して診断できることを示した。

### iii) PI3K, PTEN

PI3Kdelta の機能獲得性変異がリンパ球機能障害を起こすことを見出した。国内 9 例を同定した。全員易感染性を呈し、悪性リンパ腫に進展した患者様も 2 人いた。5 人で造血幹細胞移植がなされて治癒し、3 人が移植を検討されていた。1 例は表現型が軽症であり、他の変異と異なっているため、Akt のリン酸化、mTOR のリン酸化の亢進が軽度である可能性があり、遺伝子変異と臨床症状の相関を検討している。

PTEN 欠損の患者を見出した。表現型が PI3Kdelta 異常と同じであった。PTEN は PI3K を抑制しているため、PTEN 欠損では、PI3Kdelta 機能が亢進することにより免疫不全を合併していると考えられた。実際に PI3K 下流の Akt の過剰リン酸化が認められ、mTOR を活性化していると考えられた。

こうした実験により、PTEN, PI3K, Akt, mTOR という一連の pathway の異常による疾患概念を提唱した。

また、病態解析により、mTOR の活性化が本疾患の病態であり、mTOR 抑制剤がリンパ腫への進展、免疫不全を改善しうる可能性を示した。

### iv) ICF 症候群

ICF 症候群は免疫不全、染色体異常、顔貌異常を三徴とする遺伝性疾患である。原因遺伝子は、患者の半数で DNA のメチル化に関わる酵素をコードする DNMT3B および ZBTB24 であることが確定している。本研究で、原因不明の低ガンマグロブリン血症とされていた 5 症例で、Exome 解析により DNMT3B ないし ZBTB24 の変異を見出し、染色体解析により ICF 症候群と確定した。すなわち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事を示した。

ICF 症候群で免疫不全症が何故起きるかについては全く不明である。そこで、ICF 症候群において免疫不全症を起こす原因を明らかにする。本研究で ICF 症候群患者では、B 細胞がメモリー B 細胞のマーカーである CD27 が全く発現していないこと、抗体産生が不良であることを見出した。一方、B 細胞新生能のマーカーである KREC は正常であった。このことから ICF 症候群に見られる免疫不全は、B 細胞の抗体産生細胞、メモリー B 細胞への最終分化の障害であると考えられた。

### v) STAT1 異常症

メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症 (MSMD) は BCG や非結核性抗酸菌など弱毒抗酸菌に易感染性を呈することを特徴とする。IFN- レセプター (IFN- R) 1 欠損症、IFN- R2 欠損症、IL-12 欠損症、IL-12R 欠損症、STAT1 欠損症、NEMO 異

常症など種々の病因が包含されている。

STAT1 は type I IFN(IFN- $\alpha$  /  $\beta$ ) と type II IFN(IFN- $\gamma$ ) の両方のシグナル伝達に重要な転写因子であり、機能喪失型変異によって細胞内寄生菌に対して易感染性を示すことが知られている。本邦において 3 家系 7 例の常染色体優性遺伝型のヘテロ変異例を同定した。変異部位は SH2 domain が 1 例(K673R)、母と男児家系は tale segment domain(Y701C)、祖母、父、患児を含む 4 症例は coiled coil domain(G250E) でいずれも新規変異であった。いずれの症例においても臨床的には多発性骨髄炎を呈し、病理所見は非乾酪性肉芽腫であった。抗酸菌培養で陽性を示したのは 1 家系のみであった。すべての家系で末梢血単球のインターフェロン刺激によるリン酸化低下を認めた。

STAT1 null osteosarcoma cell への *STAT1* 変異遺伝子の強制発現実験を行い、遺伝子変異を有する STAT1 のシグナル伝達を検討した。すべての変異で IFN- $\gamma$  刺激に対し、STAT1 リン酸化低下、核内移行の軽度低下、DNA 結合能障害、dominant negative の転写活性異常が認められた。

常染色体優性型の STAT1 異常症の報告は世界で 10 家系足らずであるが、この数年の遺伝子検査の進歩から本邦でも 3 家系を同定した。BCG 接種に対する過剰反応や多発性骨髄炎を呈する症例においては、STAT1 異常を含めた MSMD の診断が不可欠である。

#### vi) 骨髄不全症の遺伝子同定

既知の原因遺伝子に変異を認めず、テロメア長の短縮が確認された骨髄不全 16 症例を集積した。4 症例において、直接塩基決定法では原因遺伝子が同定できなかったが、次世代シーケンサーによって既知

の原因遺伝子として、RECQL4、PIF1、RTEL1、WRN、ATM、BLM の変異を同定することが出来た。

ATM については B 細胞新生能のマーカーである KREC が 22 例全例で検出感度以下(正常では 10,000 コピー)であることを見出し、新生児スクリーニングに応用可能であることを示した。また血清 IgM が 1,000 以上の高値をとる症例を 5 例見出し、KREC が検出感度以下であるとともに、T 細胞新生能のマーカーである TREC も検出感度以下(正常では 10,000 コピー)であることを見出した。免疫系の調節の異常を反映していると考えられ、臨床症状も重症であった。TREC、KREC が重症度判定のマーカーとなると考えられた。

#### vii) 先天性血小板減少症の遺伝子同定

常染色体優性遺伝形式をとる先天性血小板減少症家系、4 世代、10 名が血小板減少と軽度の出血傾向を示した。疾患原因遺伝子を同定するために家系内患者 4 名のゲノム DNA を用いて全エクソンシーケンスを行った。4 名に共通する 90 のアミノ酸置換を伴う遺伝子変異の中から、ITGB3 遺伝子の T2231C 変異を原因遺伝子変異候補として同定した。L718P 変異の機能解析から、インテグリン b3 の細胞膜周辺領域のヘテロ接合性変異が機能獲得型変異としてインテグリンシグナル伝達経路の恒常的部分活性化と RhoA シグナルの抑制を示すことを明らかにした。インテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3(GP IIb/IIIa 複合体)はフィブリノゲン (Fg) とフォンウィルブランド因子 (VWF) の受容体で、そのリガンドとの結合は血栓形成の最終段階である血小板凝集に不可欠なシグナル伝達である。これらの機序が血小板機能異常と大小不同を伴った血小板減少に関与して

いることが示唆された。

#### f) PIDJのバージョンアップ

原発性免疫不全症のデータベースであるPIDJを、より網羅的、系統的に解析ができるようにのバージョンアップを行った。必須入力項目の設定、全免疫不全症班会議施設が閲覧が可能になるように変更した。登録数は2792件に達し、平均で1日に1.5人の新規患者が登録されるようになった。

#### D. 考察

原因遺伝子が既知の疾患については、アンプリコン PCR と次世代シーケンサーによる遺伝子診断法の確立により、迅速に確定診断ができるようになる。次世代シーケンサーによる deep sequence で診断が可能になるため、従来の DNA sequence に対し費用対効果が高く有用である。

遺伝子が未知の疾患(家族性樹状細胞欠損症など)については、原因遺伝子同定により遺伝子診断が可能になり、病態解明、新規治療法開発に貢献出来る。次世代シーケンサーによる Exome 解析で新規遺伝子を同定する方法は、従来法に比べ費用対効果が高く有用である。iPS 細胞からの血液免疫系細胞の分化系と、RNA sequence による分化段階で発現が更新する遺伝子を同定することで、新規分化因子が同定出来ると考えられる。

AK2 遺伝子変異による細網異形成症患者2名および HAX1 遺伝子変異による重症先天性好中球減少症患者1名から iPS 細胞を樹立することに成功した。細網異形成症では、原因遺伝子の導入により、血球分化が正常化し、これら難病の新しい治療法の開発につなげた。患者由来 iPS 細胞を原因遺伝子同定、病態解明に用いることが可能

になると考えられた。

以上の結果をもとに、診断および治療法のガイドラインを作成する。WEB 上での公開などにより、一般への疾患の周知をはかり、診断漏れを防ぐ。患者家族会と十分に連携し、ホームページを通じた Web ベースの情報交換により、患者が必要とする情報を周知する。これにより、稀少難病患者の予後改善に貢献できる。

申請者らが構築したデータベース PIDJ は、本研究の遂行に非常に有用であった。このデータベース構造を公開し、他のデータベース構築において活用されると、難病全体に関する貴重なデータベースになると考えられる。

#### E. 結論

以上、血液免疫系分化障害による疾患群の診断、病態解明、治療について大きな成果を上げることが出来た。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

巻末別紙参照。

##### 2. 学会発表

巻末別紙参照。

#### H. 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

## MYH9 異常症

研究分担者 川口 裕之 (防衛医科大学校小児科学講座准教授)

研究協力者 國島 伸二 (国立病院機構 名古屋医療センター  
臨床研究センター高度診断研究部)

### 研究要旨

先天性血小板減少症には免疫異常を合併する場合があるが、その全体像は現時点では把握されていない。先天性血小板減少症の免疫異常を検討する前提として、先天性血小板減少症の診断を適切に行なう必要があるが、今回最新技術である「ターゲットシーケンス」により効率的に先天性血小板減少症の診断を可能とする系を作製し臨床応用する作業を行なった。現在ターゲットシーケンスの条件設定の作業を行なっている。また、血小板減少症を示す症例について経時的にリンパ球機能を評価し、臨床症状との相関を検討した。

### A. 研究の目的

昨年度は MYH9 異常症における免疫異常を解析するとともに、MYH9 異常症の診断を大学の研究室で診断するための系を作製したが、この結果を勘案して先天性血小板減少症を網羅的に診断するシステムの構築が必要と考えられ、「ターゲットシーケンス」を導入する方針とした。

ターゲットシーケンスとは、目的領域のゲノムを PCR により増幅し、次世代シーケンサーを用いてディープシーケンスを行なうことにより、増幅された領域の変異解析を効率よく迅速に行うことが可能な塩基配列決定法である。複数の疾患関連遺伝子の体細胞変異を同時に高解像度で評価することができ、また複数の検体を同時に解析することも可能である為、臨床検体のスクリーニングに適している。この方法により、

(a) MYH9 遺伝子の全エクソンの塩基配列の決定が可能となり (b) 先天性血小板減少症の全エクソンの塩基配列が同時に評価できるため、既知の先天性血小板減少症であれば、診断が一回の操作で可能となることが期待される。

さらに昨年度の研究を敷衍して血小板減少症を示す 1 例について経時的にリンパ球機能を評価し、血小板減少症との関連を精査した。

### B. 研究方法

防衛医科大学校小児科で診療を受けている血小板減少症の症例に対して、文書による同意を得た後に、末梢血単核球を比重遠心法により分離して常法により DNA を抽出する。この DNA に対して、MYH9 異常症において変異が報告されている部位に

ついて PCR (polymerase chain reaction) を用いて DNA 断片を増幅し、常法によりダイレクトシーケンスを行って塩基配列を決定することにより変異の有無を検討した。また、同じ患者 DNA を使用してライフテクノロジーズ社の半導体シーケンサ Ion Torrent PGM を使用することにより一回の処理で同時に複数の領域の塩基配列決定を行なう。

また、昨年と同様にベクトン・ディッキンソン社製の FACSCalibur™ フローサイトメーターを使用して細胞の表面抗原の分析を行なった。並行して末梢血単核球から DNA を抽出し、TREC (T cell receptor recombination circles) と KREC (Kappa-chain recombination excision circles) について real time PCR による定量を行なう。

#### (倫理面への配慮)

患者に対する倫理的面での配慮として、すべての調査研究はヘルシンキ宣言 (1964 年世界医師会において策定、2000 年改訂) を遵守して行われた。すなわち、新たに検体を採取する必要のある被験者には、研究の目的・危険性・研究に伴う利益と不利益を説明した上で、書面で同意を得、同意の撤回が可能であることについても説明した。死亡例を含む後方視的な検討においては、各施設から匿名化された情報のみを収集し、各研究分担者は症例の個人情報把握できないようにした。上記の処置により、研究対象者に対する不利益は発生しなかったと考えられた。また、研究方法の特性上、研究による危険性は存在しない。

## C. 研究結果

### (i) MYH9 異常症の遺伝子診断

昨年度に確立した MYH9 異常症の診断の系を実際に血小板減少症の 4 症例についてこれを応用した。この結果、この 4 例には MYH9 遺伝子の既知の変異は検出されなかった。これは、(i) これらの症例が MYH9 異常症ではない (ii) これらの症例は MYH9 異常症であるが、今回検討した領域の外に変異が存在するの何れかによると考えられた。この二つの問題を同時に解決する為に、「ターゲットシーケンス」を導入する方針とした。この方法が確立すれば、(i)' MYH9 遺伝子の既知変異以外の部分の変異の有無も網羅的に評価できる (ii)' MYH9 遺伝子以外の既知の先天性血小板減少症の原因遺伝子の変異も網羅的に評価できる点で臨床に寄与する情報が多いと考えられた。

### (ii) 先天性血小板減少症の遺伝子診断システムの構築

上述したターゲットシーケンスの対象とした先天性血小板減少症の遺伝子 (33 遺伝子、700 exon) を表に示す。これらは、pubmed において “congenital thrombocytopenia” もしくは “familial thrombocytopenia” をキーワードとして検索した文献によった。現在これらの遺伝子の各 exon について Ion ampliseq designer でカスタムパネルをデザインし、塩基配列の決定の為に最適な条件の設定について検討を行っている。

【表 1】今回診断システムに組み込んだ先天性血小板減少症

今回診断システムに組み込んだ 33 遺伝子を示した。Exon 数の合計は 700 である。

遺伝子		染色体上の位置	Exon 数	病名	略号
MYH9	Myosin, Heavy Chain 9	22q13.1	67	MYH-related disease	MHA, SBS, FTNS, EPTS
GPIba	Glycoprotein Iba	17pter-p12	2	Bernard-Soulier syndrome	BSS
GPIbβ	Glycoprotein Ibβ	22q11.2	2	Bernard-Soulier syndrome	BSS
GPIX	Glycoprotein IX	3q21.3	3	Bernard-Soulier syndrome	BSS
ACTN1	Actinin, Alpha 1	14q24.1	36	(Autosomal dominant macrothrombocytopenia)	
FLI-1	Friend Leukemia Virus Integration 1	11q24.3	16	Paris-Trousseau type thrombocytopenia, Jacobsen's syndrome	TCPT
FLNA	Filamin A	Xq28	67	(X-linked dominant thrombocytopenia)	
GATA1	GATA Binding Protein 1	Xp11.23	6	X-linked thrombocytopenia and dyserythropoiesis with or without anemia	XLTT
ITGA2B	Integrins alpha 2B	17q21.32	35	Glanzmann thrombasthenia	
ITGB3	Integrins beta 3	17q21.32	14	Glanzmann thrombasthenia	
NBEAL2	Neurobeachin-Like 2	3p21.31	81	Gray platelet syndrome	GPS
TUBB1	Tubulin beta-1	20q13.32	3	(Autosomal dominant macrothrombocytopenia)	
VWF	Von Willebrand Factor	12p13.3	61	Montreal platelet syndrome	MPS
ABCG5	ATP-Binding Cassette, Sub-Family G (WHITE), Member 5	2p21	13	Thrombocytopenia associated with sitosterolaemia	
ABCG8	ATP-Binding Cassette, Sub-Family G (WHITE), Member 8	2p21	13	Thrombocytopenia associated with sitosterolaemia	
MYL9	Myosin Light Chain 9	20q11.23	4		
c-MPL	Myeloproliferative Leukemia Virus Oncogene	1p34.2	11	Amegakaryocytic thrombocytopenia	CAMT
RBM8A	RNA Binding Motif Protein 8A	1q21.1	6	Thrombocytopenia with absent radii	TAR
RUNX1	Runt-Related Transcription Factor 1	21q22.3	19	Familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia	FDP/AML
ANKRD26	Ankyrin Repeat Domain 26	10p12.1	31	ANKRD26-related thrombocytopenia	
HOXA11	Homeobox A11	7p15.2	2	Amegakaryocytic thrombocytopenia with radio-ulnar synostosis	CTRUS
CYCS	Cytochrome C	7p21.2	3	(Autosomal dominant nonsyndromic thrombocytopenia)	
WAS	Wiskott-Aldrich Syndrome	Xp11.23	19	Wiskott-Aldrich syndrome, X-linked thrombocytopenia	WAS, XLT
WIPF1	WAS/WASL Interacting Protein Family, Member 1	2q31.2	6	Wiskott-Aldrich syndrome 2, XLT	WAS2, XLT
CBL	Cbl Proto-Oncogene	11q23.3	14	Familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia	FDP/AML
ACBD5	Acyl-coenzyme A binding domain containing protein 5	10p12.1	22	(Autosomal dominant inherited thrombocytopenia)	
MASTL	Microtubule associated serine threonine like kinase	10p12.1	19	(Autosomal dominant inherited thrombocytopenia)	
SBF2	SET Binding Factor 2	11p15.4	40	Charcot-Marie Tooth Disease type4B2	
ETS-1	V-Ets Avian Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog 1	11q23.3	11	Paris-Trousseau type thrombocytopenia, Jacobsen's syndrome	
COMT	Catechol-O-methyltransferase	22q11.21	17	22q11 deletion syndrome (which includes velo-cardio-facial (VCF) syndrome) and DiGeorge syndrome (DGS)	
TBX1	Testis-Specific T-Box Protein	22q11.21	10	22q11 deletion syndrome (which includes velo-cardio-facial (VCF) syndrome) and DiGeorge syndrome (DGS)	
MECOM	MDS1 And EVI1 Complex Locus	3q26.2	31	Deletion of the 3q26 (region including the EVI1 and MDS1 genes )	
PTPN11	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 11	12q24.1	16	Amegakaryocytic thrombocytopenia in Noonan syndrome	

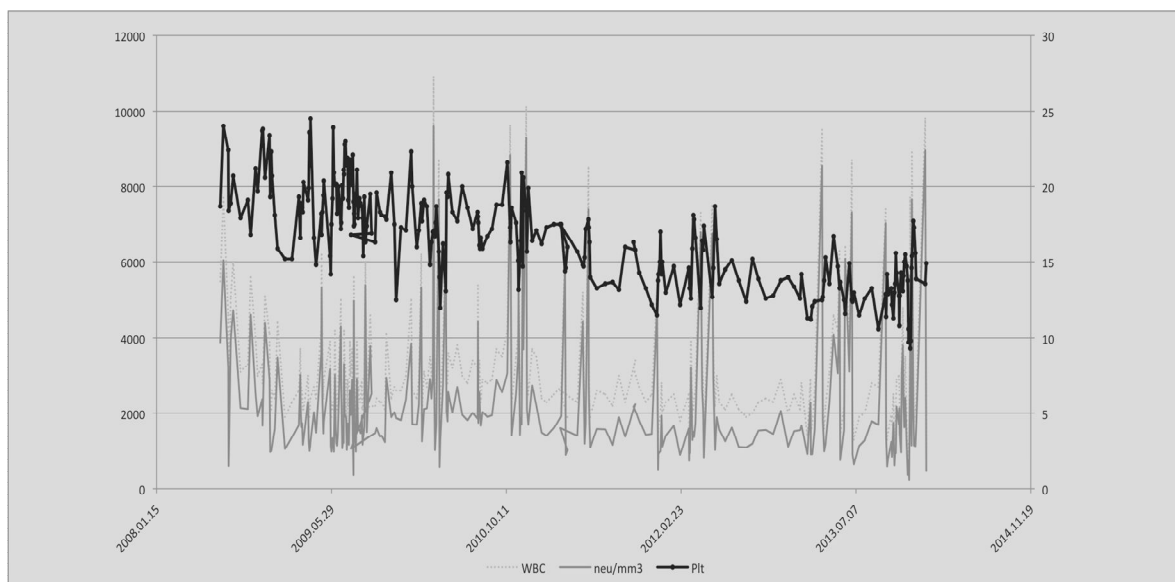
(iii) 血小板減少症の症例のリンパ球機能についての経時的評価

昨年度の研究で、同じ症例の血小板数・免疫機能の評価を時系列で比較する必要性を指摘した。今回、基礎疾患として原発性免疫不全症があり、免疫性血小板減少症（特発性血小板減少症紫斑病）が否定された一症例について、経時的にリンパ球機能と血小板数の相関を検討し、表2・図の様な結果を得た。この結果より、免疫不全症の進行と血小板減少症の進行が相関している可能性を指摘することができる。この症例については全エクソン解析により疾患責任遺伝子の候補遺伝子を特定する作業が進行中であり、近い将来免疫不全症と血小板減少症の関係について新たな知見が得られると見込まれる。

【表2】症例の免疫細胞の分布の経時的変化

	Surface marker	2009.6	2012.2	2013.11	Gate
T cell	CD3	87.17	48.60	62.25	%Lym
Helper T cell	CD4	43.83	46.03	30.80	%CD3Lym
Cytotoxic T cell	CD8	35.15	46.35	27.44	%CD3Lym
	CD4/CD8	1.25	0.99	1.12	
Memory T cell	CD4+CD45RO	0.03	28.91	25.29	%CD4CD3Lym
Thymic naive T cell	CD45RA+CD31+	69.05	61.76	52.45	%CD4CD3Lym
Central naive T cell	CD45RA+CD31-	7.56	5.51	7.78	%CD4CD3Lym
Treg	CD25+CD127-±	0.00	7.28	8.93	%CD4CD3Lym
ALPS criteria (DNT)	CD4-CD8-CD3+αβT+		0.90	1.57	%CD3TCRαβ
γδT cell	γδT	13.08	3.28	15.11	%CD3
NKT cell	CD3+TCRV2α+TCRV1β+	0.05	0.09	0.10	%CD3
B cell	CD19	3.98	28.34	11.13	%Lym
Transitional B cell	CD38+IgM+high			0.83	%CD19Lym
Plasma cell	CD38+IgM-high			0.56	%CD19Lym
pre-B2 cell (CSR B)	CD19+IgD-IgM-			0.68	%CD19Lym
Naïve B cell	CD19+CD27-IgD+	81.72	97.28	97.70	%CD19Lym
Memory B cell	CD19+CD27+	14.28	1.94	2.27	%CD19Lym
IgM memory B cell	CD19+CD27+IgD+	8.57	1.79	1.64	%CD19Lym
Switched memory B cell	CD19+CD27+IgD-	5.71	11.79	0.63	%CD19Lym
	IgK	46.49	44.57	43.46	%CD19Lym
	IgL	44.97	44.05	45.54	%CD19Lym
	KL positive	2.09	0.27	0.05	%CD19Lym
	CD38-CD24++	22.03	6.02	4.23	%CD19Lym
	CD38+CD24+	37.37	10.19	81.74	%CD19Lym
	CD38+CD24++	39.31	69.91	10.08	%CD19Lym
NK cell	CD3-CD16+CD56+	0.88	4.31	31.94	%Lym
pDC	Lin-HLADR+CD123+		0.23	0.16	%WBC
mDC	Lin-HLADR+CD11c+		0.29	0.21	%WBC
	TREC	0	0	0	
Lymphocyte turnover/proliferation marker	cjKREC	3.19E+03	3.80E+03	2.91E+04	
	sjKREC	5.30E+03	2.90E+04	1.39E+04	

【図】 症例の血小板数（黒実線）、全白血球数（灰色点線）、好中球数（灰色実線）の経時的変化





## D. 考察

- (i) *MYH9* 異常症の診断の系は、ある程度の研究設備のある大学等の医療機関・研究機関で実際の診断に供することが可能であると思われる。今後、既に診断が確定している症例の検体を用いて validation を行う必要がある。
- (ii) 現在開発中の先天性血小板減少症の診断システムは、実際に応用された場合 (a) 誤診による不適切な治療を受けるリスクを抑制し (b) 疾患に応じた長期的予後の予測の精度が改善すると考えられる。現在技術的な条件設定について検討を行っているが、数か月以内には実際に稼働させることができる見通しである。
- (iii) 血小板減少症は (a) 骨髄不全 (b) 免疫性 (c) 細胞骨格・細胞接着因子の異常による疾患 の三つのサブグループに分類することができ、それぞれが免疫担当細胞の機能の異常と関連することが報告されている。この場合、疾患によっては病勢の変化に伴って、血小板数や免疫不全の重症度に変化が起きることが予想される。今回、免疫不全症の基礎疾患がある血小板異常症の症例について、免疫担当細胞の分布・リンパ球機能 (TREC/KREC) の経時的変化を検討することにより、血小板減少症が免疫不全の進行に伴って悪化する様子を観察することができた。従って、先天性血小板減少症の少なくとも一部には、免疫不全症を合併し、免疫不全症と血小板減少症が時間とともに進行する例が存

在する例があることを確認することができた。

## E. 結論

- (1) *MYH9* 異常症の簡便な診断の系を完成した。
- (2) 先天性血小板減少症の網羅的な診断が可能な系の開発を進めている。
- (3) 血小板減少症の一部には、免疫不全の進行とともに血小板減少症の進行を示す例が存在することを確認した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet.* 3;7:451-458, 2013.
- 2) Noris P, Favier R, Alessi MC, Geddis AE, Kunishima S, Heller PG, Giordano P, Niederhoffer K, Bussel JB, Podda M, Vianelli N, Kersseboom R, Pecci A, Gnam C, Marconi C, Auvrignon A, Cohen W, Yu JC, Iguchi A, Imahiyerobo AM, Boehlen F, Ghalloussi D, De Rocco D, Magini P, Civaschi E, Biino G, Seri M, Savoia A, Balduini CL, Marconi C, Auvrignon A, Cohen W, Yu JC, Iguchi A, Imahiyerobo AM, Boehlen F, Ghalloussi D, De Rocco D, Magini P, Civaschi E, Biino G, Seri M, Savoia A, Balduini CL. ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood.* 122;11:1987-1989, 2013.



- 3) Takagi M, Piao J, Kawaguchi H, Imai C, Ogawa A, Watanabe A, Akiyama K, Kobayashi C, Mori M, Ko K, Mizutani S. Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous regression of JMML. *Lukemia*. 27;9:1926-1928, 2013.
- 4) Miyauchi J, Kawaguchi H. Fetal liver stromal cells support blast growth in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome through GM-CSF. *Journal of Cellular Biochemistry*. (in press)

## 2. 学会発表

今回の研究の成果の一部は第76回日本血液学会学術集会(2014年10月、大阪)、第57回日本小児血液・がん学会学術集会(2014年11月、岡山)で報告する予定である。

## 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

## 血液免疫系細胞分化障害による疾患の 診断と治療に関する調査研究

研究分担者 今井 耕輔 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科  
小児・周産期地域医療学講座 寄附講座准教授)

研究協力者 森尾友宏、満生紀子、高島健浩、葉姿汶、田中桂輔  
(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学)

### 研究要旨

血液免疫系細胞分化障害による疾患として、特に B リンパ球の終末分化である、免疫グロブリンクラススイッチ機構の異常症である高 IgM 症候群、原因病態が不明である IgA 欠損症、局所免疫にかかわる Th17 細胞の分化障害を伴う STAT1 異常症(慢性皮膚粘膜カンジダ症)、STAT3 異常症(高 IgE 症候群)を中心に解析を行い、早期の治療介入で予後の改善が見込めると考えられた。

### A. 研究の目的

原発性免疫不全症は、獲得免疫、自然免疫に関わる遺伝子の胚細胞性変異により、免疫系のみならず血液系などの細胞の分化障害あるいは機能障害により、易感染性だけでなく免疫調節異常を来す疾患の総称である。原発性免疫不全症患者の原因遺伝子を明らかにし、その病態を明らかにすることにより、その分子の免疫系・血液系などのヒト生体における働きが明らかになる。本研究では、特に B リンパ球の終末分化である、免疫グロブリンクラススイッチ機構の異常症である高 IgM 症候群、原因病態が不明である IgA 欠損症、局所免疫にかかわる Th17 細胞の分化障害を伴う STAT1 異常症(慢性皮膚粘膜カンジダ症)、STAT3 異常症(高 IgE 症候群)の原因遺伝子の探索および病態解析、さらに診断と治療に関する調査を行った。

### B. 研究方法

全国の医師から紹介を受け、専門医が遺伝子解析を含む病態解析を行い、その診断、治療に関するアドバイスを行う PIDJ (Primary immunodeficiency) ネットワークを通して紹介された患者の解析を通して、その臨床的特徴について収集し、10 カラー FACS を用いた表面抗原分析、T 細胞新生能を調べる TREC(T 細胞受容体遺伝子再構成産物)、KREC(免疫グロブリン鎖遺伝子再構成産物)の測定を行い、疾患の特徴を明らかにした。また、原因を同定するべく、かずさ DNA 研究所において候補遺伝子解析を行い、それにより原因が明らかにならなかった患者については、次世代シーケンサーを用いた Exome 解析を用い、原因遺伝子を明らかにすることとした。

なお、本研究は本学の倫理委員会により承認を得て各種研究倫理指針に準拠して行われた。研究に際しては、患者に対して

最小限の負担になるように配慮を行うと共に、研究内容、患者への利益・不利益、個人情報管理などを含め、担当施設、担当医を通じて十分な説明を行い、同意を得たものに関して検討した。患者氏名は情報管理者のもと、連結可能匿名化されて管理された。

### C. 研究結果

2013年には、本学に160例の原発性免疫不全症疑い患者が紹介された(図1)。原則的には全例に対して、10カラーFACSを用いた表面抗原分析解析を行い、TREC、KREC定量を行い、候補疾患の鑑別、病態の解明に役立てることとした。

今年 Angulo et al.(Science)、Lucas et al.(Nat Immunol)により高IgM症候群の新しい原因遺伝子として、*PIK3CD* 遺伝子(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta)の機能獲得変異が報告された。この疾患は、反復気道感染症、低グロブリン血症、高IgM血症、特異抗体産生不全を伴い、肝脾腫、リンパ節腫脹を呈する疾患である。共同研究先のネッケル小児病院(フランス、パリ)で解析を行った139例中、8例に同様の変異を認め、1例は本邦の症例であった。そこで、当科および防衛医科大学小児科との共同研究で行ったExome解析をした62例を検討したところ、4例の*PIK3CD* 遺伝子変異患者を同定した。また、当科86例、防衛医大69例の抗体産生不全症患者から、5例の*PIK3CD* 遺伝子変異患者を同定した。患者はいずれもリンパ組織腫脹を伴っていたが(表2)、発症年齢、随伴症状、さらに、IgG、IgAが正常あるいは高値の患者もあり(図2)、本疾患の多様性、および診断の困難さを示していた。今後は、自己免疫性リンパ増殖性疾患(ALPS)あるいはX連鎖性

リンパ増殖性疾患(XLP)を疑われた例の中に、*PIK3CD* 遺伝子異常患者が含まれていないかどうかについて、検討が必要である。そこで、FACSを用いた迅速診断法の確立を目指し、PI3KDの活性化に伴いリン酸化が亢進するとされるAKTについて、解析方法を確立した(図3)。これにより、スクリーニング検査として、有用であることが示唆された。*PIK3CD* 遺伝子異常を伴う患者の中には、悪性リンパ腫を発症する例、気管支拡張症を呈する例、日和見感染症を来す例があり、移植症例も5例に上ることが明らかになり、早期の治療介入で予後の改善が見込めると考えられた。

IgA欠損症は、原因不明の疾患であり、北欧では多くの患者が無症状であることが報告されているが、国内の症例の中には様々な合併症も併発している重症例も存在している。現在PIDJには29例の登録があり、当科および防衛医大でそのうち20例の患者について、解析を行っている。その中で、BTKのミスセンス変異を示す患者を一例発見し、その細胞免疫学的異常、およびB細胞受容体の配列解析を行い、現在投稿中である(Mitsuiki, et al)。もう一例は、TREC、sjKRECの低下を伴い、B細胞欠損とCD4+T細胞がCD45RO+のメモリー細胞に偏倚した症例であり、候補遺伝子検索の結果、*RAG1* 遺伝子異常であることが判明した(Kato et al, in submission)。

乳児期早期に自己免疫疾患を呈し、成人期にかかってB細胞欠損を呈し、低グロブリン血症を来した1患者の家系で、Exome解析の結果、*LRBA* 遺伝子の複合ヘテロ変異を見出した。これは、本邦第1例であり、複合ヘテロ変異患者は世界で初めてである。この患者の病態解析を現在行っている。

STAT1 の機能獲得型変異により、Th17 細胞の分化異常などの免疫異常により、慢性皮膚粘膜カンジダ症を来することが最近報告された。当科に紹介された 15 例を解析したところ、重症度にばらつきがあり、軽微な表在性真菌感染症のみの症例から、獲得免疫系の異常も伴い日和見感染を来したり、造血障害や自己免疫疾患を呈する重症例もいることが明らかになった。そこで、臨床症状と T 細胞新生能、B 細胞新生能をもとに 4 段階の重症度分類を作成した。一部の重症例では骨髄移植などの造血幹細胞移植が必要であることも明らかになった(表 3)。

高 IgE 症候群 1 型は、STAT3 のドミナントネガティブ変異による、Th17 細胞の分化異常とアトピー性皮膚炎、および骨格異常を主な病態とする疾患である。当科には、これまで 26 例の高 IgE 症候群疑い患者が紹介され、そのうち STAT3 変異を認めたのは 10 例である(38.5%)。高 IgE 症候群の臨床的重症度を測る上で広く用いられている NIH スコアで見ると、STAT3 変異患者と変異を認めなかった患者とは、差がない。ただ、細分化すると、カンジダ感染症、肺炎の反復、乳歯脱落遅延、骨折が、重症アトピー性皮膚炎患者との鑑別点となりうることを明らかにした。CXCR3+CCR6-CD161+を用いた Th17 分画、および IgD/CD27 を用いたメモリー B 細胞分画をみることで、STAT3 異常症を見出すことが容易になることが明らかになった。

#### D. 考察

原発性免疫不全症の原因遺伝子の一つとして新たに報告された PI3K 鎖の機能獲得型変異が本邦でも 10 例で認められた。その中では、既報告にない新規変異も発見されたが、今後その機能解析が必要

である。また、PI3K 鎖の機能亢進が T 細胞の活性化誘導細胞死を過剰にし、そのため進行性のリンパ球減少を来す点は既報告で明らかにされているが、B 細胞における影響はあまり明らかではない。今後は、同定された患者検体を用いた解析を行っていききたい。治療についても半数の 5 例で造血幹細胞移植を行われていた。その中で早期の拒絶、2 次生着不全を末梢血幹細胞投与でしのいだ例、T 細胞の生着が遅れた例、移植 2 年後に突然死した例がみられた。移植適応の検討と同時に、移植方法についても今後検討が必要である。

IgA 欠損症、分類不能免疫不全症の原因遺伝子はほとんど明らかになっていないが、Exome 解析の進歩により少しずつ分かってきている。今回は既知の遺伝子異常の特殊な表現型が明らかになったが、今後は新規の原因遺伝子の同定、病態解析が必要となる。

STAT1 機能獲得型変異患者は臨床的には様々な重症度を示し、その治療の選択には難渋するが、TREC、KREC の結果を交えた重症度スコア化により、獲得免疫系症状が明らかである場合、造血幹細胞移植を積極的に検討することを提案したい。しかし、当科で施行した 2 例中、1 例については、致死的なマクロファージ活性化症候群により、拒絶を受け、多臓器不全により不幸な転帰をたどった。今後、本疾患に対する造血幹細胞移植法の改善を行っていききたい。

湿疹、皮膚膿瘍を来す高 IgE 症候群患者の中での、STAT3 異常患者の特徴について検討したが、真菌感染や肺炎、骨格系の異常が、特異度の高い症状として明らかになり、一部の免疫細胞の増減も特徴として考えられた。今後は NIH スコアを改変した形での診断基準の策定や治療法の最適化についての検討が必要である。

## E. 結論

今年度の検討で、多くの血液免疫分化異常症の病態、臨床像が明らかになった。これらの結果を受け、よりよい治療法の改善につなげ、患者のQOLの向上につなげていきたい。また、原因不明の患者はまだ多数存在する。次世代シーケンサーを組み合わせた解析を引き続き行い、その原因遺伝子の同定、病態の解明を行ってきたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 今井耕輔.免疫グロブリンクラススイッチ異常症(高IgM症候群). 日本臨床 別冊 (2013)237-241
- 2) 高木 正稔, 今井 耕輔, 森尾 友宏, 水谷 修紀.原発性免疫不全症候群関連の免疫性血小板減少症. Rinsho Ketsueki. (2013) 54.357-64
- 3) Machida S, Tomizawa D, Tamaichi H, Okawa T, Endo A, Imai K, Nagasawa M, Morio T, Mizutani S, Takagi M. Successful Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Patient With Ataxia Telangiectasia Using Rituximab. J Pediatr Hematol Oncol. (2013).35.482-5

### 2. 学会発表

- 1) 今井耕輔.新規高IgM症候群と病因探索について. 第116回日本小児科学会学術集会.分野別シンポジウム13-3.2013年4月21日,広島
- 2) 加藤 環,釜江智佳子,本間健一,池川健,横須賀とも子,和田泰三,谷内江昭宏,西田直徳,金兼弘和,満生紀子,小原 収,今井耕輔,森尾友宏,野々山恵章. IgA 単独欠損症として紹介され、TREC/KRECの結果からRAG1異常と

同定しえた1例. 第4回関東甲越免疫不全症研究会.2013年9月22日,東京

- 3) 満生紀子,今井耕輔, Xi YANG, 金兼弘和, 小阪嘉之, 高田英俊, 水谷修紀, 小原 収, 森尾友宏, BTK 変異をみとめたIgA 単独欠損の解析.第41回本臨床免疫学会総会.2013年11月27日, 下関
- 4) 加藤 環,釜江智佳子,満生紀子,小原明,林 正俊,野口恵美子,久保田健夫,本間健一,小原 収,今井耕輔,野々山恵章. 本邦におけるICF(Immunodeficiency with Centromeric instability and Facial anomalies)症候群5例の検討. 第41回本臨床免疫学会総会. 2013年11月27日,下関
- 5) 高島健浩, 満生紀子, 今井耕輔, 水谷修紀, 峯岸克行, 森尾友宏. 高IgE症候群患者の臨床的・免疫学的検討. 第7回日本免疫不全症研究会. 2014年1月25日, 福岡
- 6) 高島健浩, 満生紀子, 今井耕輔, 水谷修紀, 森尾友宏. STAT1変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症12例の検討. 第4回関東甲越免疫不全症研究会. 2013年9月22日, 東京

## 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

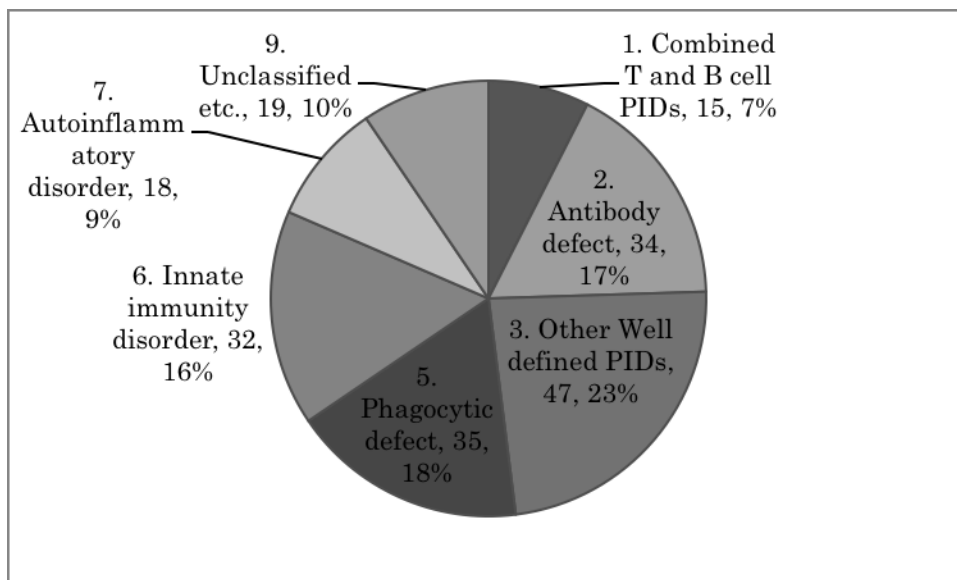


図 1: 2013 年の紹介患者 160 例の内訳

patients	P1	P2
<b>Year of birth</b>	1986	1990
<b>Age of onset</b>	2 yrs	5 months
<b>Main clinical features</b>	Recurrent LRT infections, liver damage, HMG, SMG, lymphadenopathy	Recurrent LRT infections bronchiectasis, chronic diarrhea, failure to thrive HMG, SMG
<b>Cytopenia</b>		Neutropenia
<b>Main biological features</b>	Lymphopenia 2 yrs IgM g/l (N) 4.25 (0.58-1.53) IgG g/l (N) 5.7 (3.35-8.96) IgA g/l (N) 0.65 (0.27-1.22) subclasses g/l IgG1 (N) 3.71 (>3) IgG2 (N) 1.5 (>0.30) IgG3 (N) 0.64 (>0.12) IgG4 (N) 0.3 (>0.04)	Lymphopenia 5 yrs 4.5 (0.54-1.55) <1.9 (5.49-11.54) 0.82 (0.41-1.57)
<b>Malignancies</b>	High grade DLBCL of biliary tract (EBV-, Bcl-6+; age 8yrs); High grade DLBCL of the colon (EBV-, Bcl-6-; stage IVB; age 19yrs)	Hodgkin lymphoma stage III
<b>treatment</b>	IVIg from 3yrs on Chemotherapy, rituximab	IVIg from 7 yrs on Chemotherapy, radiotherapy (11 yrs)
<b>outcome</b>	Died from large bowel perforation and bleeding post chemotherapy	In remission, alive

表1-1: *PIK3CD* 遺伝子異常に悪性リンパ腫を合併した 2 例 (Kracker et al, J Allergy and Clin Immunol. in press)

patients	P3	P4	P5	P6	P7 (sister of P2)	P8
Year of birth	2006	1991	1992	1998	1984	1999
Age of onset	2 yrs	8 yrs	5yrs	4 yrs	8 yrs	2 yrs
Main clinical features	Recurrent LRT infections, chronic diarrhea, SMG	Recurrent LRT infections , chronic diarrhea HMG, polyadenopathy macro crania	Recurrent LRT infections , chronic diarrhea, SMG, HMG, polyadenopathy	Recurrent LRT infections , Bronchiectasis	Recurrent LRT infections ,	Recurrent LRT infections, Bacterial pneumonia, chronic diarrhea SMG, HMG, polyadenopathy
Cytopenia	Thrombocytopenia		Neutropenia, AIHA, Thrombocytopenia		Neutropenia	Neutropenia
Immunological features	Lymphopenia		Lymphopenia	Lymphopenia	Lymphopenia	Lymphopenia
age	2yrs 9m	4 yrs	5 yrs	4 yrs	8 yrs	2 yrs 8m
IgM g/l (N)	3.9 (0.58-1.53)	7.23 (0.54-1.55)	1.18 (0.54-1.55)	2.65 (0.5-2.0)	2.28 (0.54-1.55)	1.57 (0.58-1.53)
IgG g/l (N)	0.12 (3.35-8.96)	4.77 (5.49-11.54)	3.98 (5.49-11.54)	9.7 (5.49-11.54)	8.98 (5.49-11.54)	1.30 (3.35-8.96)
IgA g/l (N)	<0.06 (0.27-1.22)	0.7 (0.41-1.57)	N.D. (0.41-1.57)	0.51 (0.4-2.0)	0.30 (0.41-1.57)	<0.1 (0.27-1.22)
subclasses g/l						
IgG1 (N)	0.08 (>3)	3.56 (>4)		8.88 (>4)		
IgG2 (N)	0.06 (>0.30)	1.61 (>0.40)		0.1 (>0.40)		
IgG3 (N)	0.02 (>0.12)	0.89 (>0.16)		0.11 (>0.16)		
IgG4 (N)	0.001 (0-2.10)	<0.075 (0-2.10)		<0.01 (>0.04)		
treatment	IVIgG from 3 yrs	HSCT at 8 yrs, IVIgG from 8 yrs	IVIgG from 6 years, Splenectomy, HSCT at 13 yrs	SCIgG from 4 yrs	IVIgG from 19 yrs	IVIgG from 3 yrs
outcome	alive	alive	dead (septic shock, multi organ failure, 14 yrs)	alive	alive	alive

表1-2: *PIK3CD* 遺伝子異常を呈した6例 (P5 が本邦の症例) (Kracker et al, J Allergy and Clin Immunol. in press)

case	Age at Diagnosis	Age at transplant	cytopenia	polyadenopathy	SMG,HMG	Infections	Others
1992ST003	5	13	pancytopenia	+	+	Recurrent LRT	splenectomy
1994MT001	2	17	lymphopenia, thrombocytopenia	+	+	Recurrent LRT	middle ear cholesteatoma,
1996IT003	6	16	lymphopenia, thrombocytopenia	+	+	Recurrent LRT	bronchiectasis, Nephrotic
1998FK002	3	11	lymphopenia	-	+	Recurrent LRT	hemorrhage
2004KH001	0.75	8	-	+	-	Recurrent LRT	macro crania, mild mental retardation
1989KG001	3	-	-	+	+	Recurrent LRT	EBV-BLPD
2000FU001	8	-	lymphopenia	+	-	Recurrent LRT	malakoplakia of the colon, Listeria
2001SY001	0.75	-	-	+	+	Recurrent LRT	hemorrhage
2003YT001	2	-	-	+	+	Recurrent LRT	MALT lymphoma s/o, E525A, mother
2005FK001	3	-	lymphopenia, thrombocytopenia	+	-	Recurrent LRT	-

表2: *PIK3CD* 遺伝子異常を呈した本邦の10例

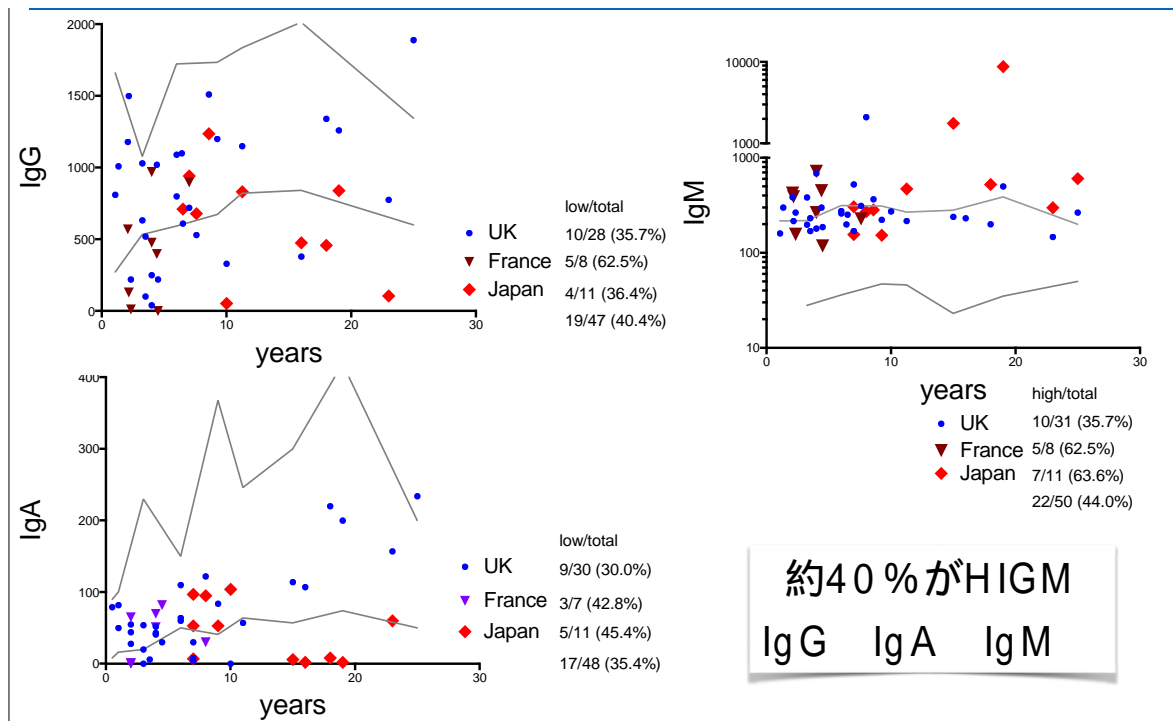


図2: *PIK3CD* 遺伝子異常患者における免疫グロブリン値

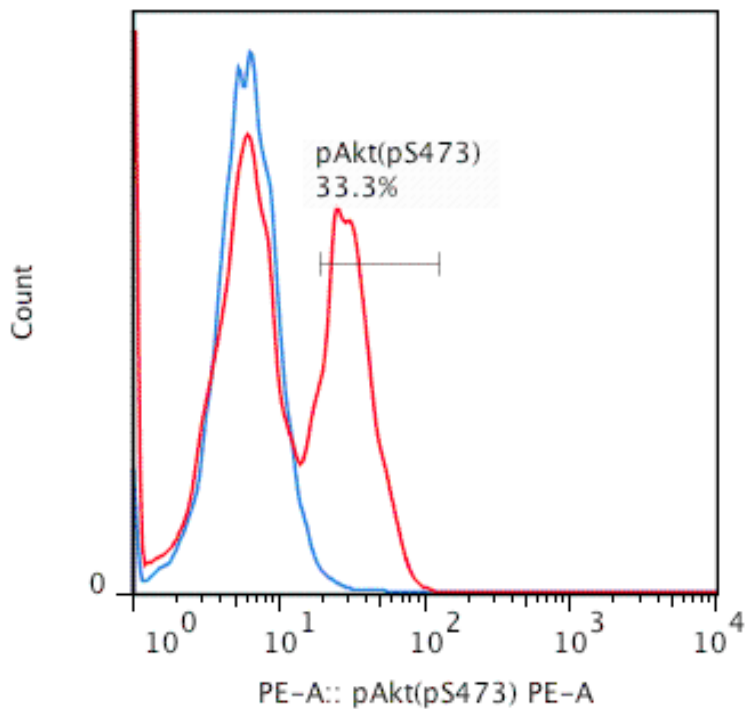


図3: PMA 刺激後の AKT のリン酸化の FACS 解析(S473)



## STAT1-GOF scoring system

Score	CMC	Viral Infection	Autoimmune disease, Lymphopenia, or Hypogammaglobulinemia	Other complication
1	+	-	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	+	-
4	+	+	+	+

Score	Molecular Defect	Coiled-coil domain	DNA-binding domain	Mean age
1	Innate immunity	4	-	15 (0~40)
2		1	2	22 (2~33)
3	Innate + acquired immunity	2	3	18( 0~43)
4	Innate + acquired immunity + visceral organ	3	-	15 (7~28)

STAT1-GOF Score	TREC/KREC Group			
	A群 TREC+/KREC+	B群 TREC+/KREC-	C群 TREC-/KREC+	D群 TREC-/KREC-
1	2			
2	2	1		
3	2		1	2
4		1	1	1

表3: STAT1 機能獲得型変異の臨床スコアと TREC, KREC との関係

# PIK3CD-GOFにおけるTREC/KREC

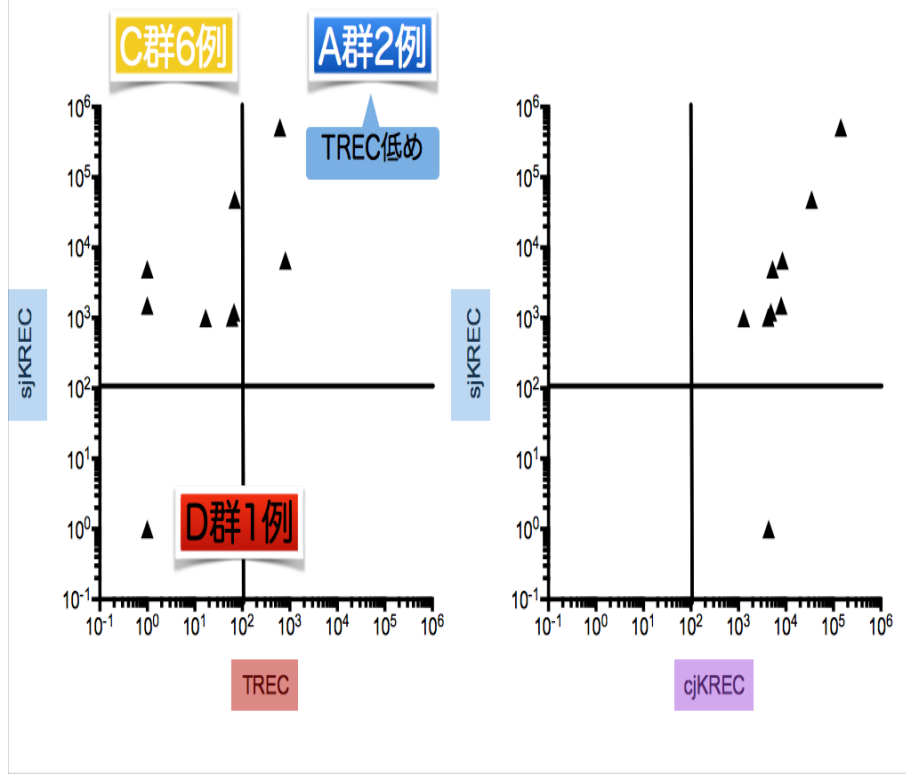


図 3: PIK3CD 遺伝子異常患者における TREC, sjKREC 値

## 細網異形成症患者および重症先天性好中球減少症患者由来 iPS 細胞樹立およびそれを用いた病態解析

研究分担者 中畑 龍俊(京都大学 iPS 細胞研究所 特定拠点教授)  
研究協力者 丹羽 明 (京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門)  
齋藤 潤 (京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門)  
森嶋 達也(京都大学大学院医学研究科発達小児科学)  
平家 俊男(京都大学大学院医学研究科発達小児科学)

### 研究要旨

細網異形成症および重症先天性好中球減少症はともに重症の好中球成熟障害を伴う免疫不全症であり、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および HAX1 変異をともなう1名の重症先天性好中球減少症患者から iPS 細胞を樹立することに成功した。患者由来 iPS 細胞からの好中球への分化アッセイを行ったところ、正常 ES/iPS 細胞や正常原因遺伝子修復後の患者由来 iPS 細胞からの好中球と比較して、著明な好中球分化障害を認めた。細網異形成症については、T 細胞分化欠損も確認された。引き続き、両疾患の病態を解明するための研究を進めていく予定である。

### A. 研究の目的

細網異形成症および重症先天性好中球減少症はともに重症の好中球成熟障害を伴う免疫不全症であり、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。本研究では、細網異形成症や重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞を樹立し、血球分化解析を行うことによって、両疾患の病態解析・解明を行うことを目的とする。

### B. 研究方法

平成 24 年度までに樹立した細網異形成症患者及び重症先天性好中球減少症患者由来の線維芽細胞から iPS 細胞を作製し、これを血液前駆細胞に分化させ、コロニー

アッセイ、骨髄系細胞やリンパ球への分化アッセイ、アポトーシス解析などの in vitro 解析を行う。さらに細網異形成症の原因遺伝子である AK2 遺伝子または重症先天性好中球減少症の原因遺伝子である HAX1 をそれぞれの患者由来 iPS 細胞へを導入し、本疾患の血球分化障害が回復するかどうか検討する。

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。一方、重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞樹立は、4 因子 (Oct, Klf, c-Myc, Sox4) もしくは 3 因子 (Oct, Klf, Sox4) をレトロウイルスベクターで導入する方法を用いた。

2 名の細網異形成症患者 (RD-1 と RD-2 とする) および重症先天性好中球減少症患者由来の 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 および HAX1 遺伝子の変異の確認、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。血球分化の評価は、メイギムザ

染色による血球の形態の確認とフローサイトメトリーによる血球の表面マーカーを用いて行った。

(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 細胞を作製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、作製する 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 細胞の作製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20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。

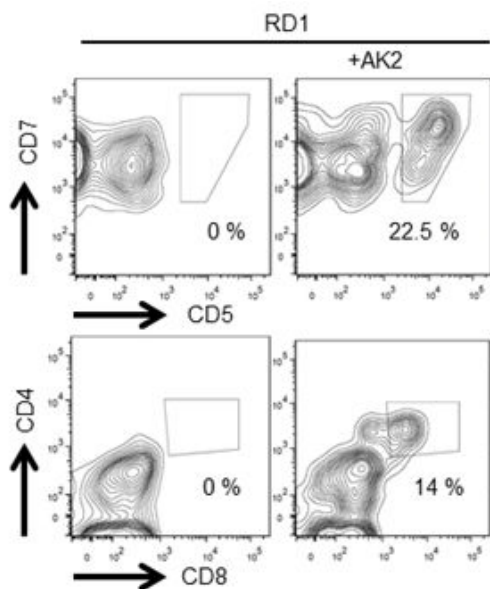
## C. 研究結果

### 細網異形成症患者由来 iPS 細胞の機能解析

昨年度までに樹立した細網異形成症患者由来の iPSC とその AK2 補充クローンについて、徳島大学の野間隆文先生のご協力を頂き、AK2 活性を測定した。

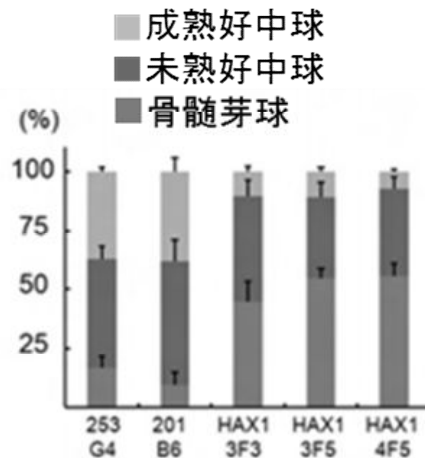
AK2 活性は、患者 iPS 細胞クローンで著明に低下しており、AK2 の補充により回復した。これにより、AK2 の酵素活性が患者由来細胞では確かに低下していることが確認できた。

前年度までに検討した各種血球分化能の評価に加えて、T 細胞分化能の評価を行った。結果は下図の通りであり、患者 iPS 細胞由来クローンの T 細胞分化は発生の早い段階で阻害されており、CD34+CD7+CD5+の ProT1 細胞は出現するものの、CD34+CD7+CD5+ ProT2 細胞への移行が阻害されていることが明らかになった。この分化障害は、AK2 の補充により、改善した。



### 重症先天性好中球減少症患者由来 iPS 細胞の機能解析

京都大学小児科平家俊男先生との共同研究により、昨年度までに樹立した SCN 患者 iPS 細胞を血球へ分化させたところ、成熟好中球への分化が阻害されていた(右上図)。



SCN 患者由来 iPS 細胞から分化させた好中球は、ラクトフェリン、ゲラチナーゼ、好中球エラスターゼの発現が有意に低下していた。また、未熟血球細胞のコロニー形成能が有意に低かった。

これらの血球分化異常は、HAX1 遺伝子を強制発現することにより回復した。

### D. 考察

細網異形成症の原因分子である AK2 タンパクは、ミトコンドリア膜間隙に存在し、 $ATP-Mg^{2+} + AMP \rightarrow ADP-Mg^{2+} + ADP$  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。さらに、AK2 タンパクはアポトーシスにも関連するという報告があり、このような重要な分子の異常細胞からの iPS 細胞樹立は予想以上に困難であった。しかし、レンチウイルスベクターにて AK2 を過剰発現させた後に、リプログラミング因子を導入することによって、世界で初めて細網異形成症患者由来の iPS 細胞樹立に成功した。一方で、重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞樹立は従来法にて成功した。樹立された両疾患由

来の iPS 細胞は品質としても問題はなく、維持培養も容易に行えている。

両疾患において、血球分化による病態再現をすることに成功した。両疾患ともに、正常コントロールや原因遺伝子の強制発現クローンに比べて、明らかに好中球分化が障害されていた。具体的には患者 iPS 細胞由来の血液像では、骨髄芽球が多くを占め、成熟好中球は認めなかった。これは、実際の患者の移植前骨髄像と所見が一致しており、病態再現に成功したと考えられる。このように全く異なる遺伝子が原因であるにも関わらず、同様の結果が示されたことは興味深い。

細網異形成症由来 T リンパ球の分化実験では、ヒト iPS 細胞を用いることにより、T 細胞免疫不全症の分化障害のステージの特定が可能であることが示された。従って、原発性免疫不全症の解析に置いて、iPS 細胞の有用性は高いものと考えられる。

## E. 結論

上記結果で示したように、2 名の細網異形成症患者および 1 名の先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞からの血球分化系において、病態の再現に成功した。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. 2013 Aug.23. doi:10.3324/haematol.2013.083873 in press

- 2) Saida S, Watanabe KI, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T.: Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood.*; 121(21):4377-87, 2013. May 23; doi:10.1182/blood-2012-12-474387.
- 3) Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK: Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. *PLoS ONE.* 4/3/ 2013; 8(4): e59243. doi:10.1371/journal.pone.0059243
- 4) Tomizawa D., Tawa A., Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe K., Nakahata T., Adachi S.: Appropriate dose modification in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia; a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). *Int. Hematol.* 2013 Nov;98(5):578-88. doi: 10.1007/s12185-013-1429-2.
- 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 leukemia who

developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology (JSPHO). Brit. J. Haematol. In press.

- 6) 齋藤潤、中畑龍俊:疾患特異的 iPS 細胞. 再生医療 12(1):19-29,2013.

## 2. 学会発表

- 1) 中畑龍俊:特別講演、iPS 細胞研究が切り開く未来の医療. 日本学術会議公開学術講演会「未来社会を築く生命科学と医療のフロンティア」2013年8月3日 京都大学薬学部記念講堂
- 2) 中畑龍俊:特別講演、iPS 細胞の小児医療への応用. 第38回東日本小児科学会 2013年11月23日 大宮ソニックスシティ(さいたま市)
- 3) 中畑龍俊:教育講演、iPS 細胞の臨床応用. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会. 2013年11月29日-12月1日(30日) ヒルトン福岡シーホーク
- 4) 中畑龍俊:基調講演、iPS 細胞を用いた今後の医療の可能性. 日本製薬医学会第4回年次大会 2013年7月19日 エーザイ株式会社本社5階ホール(塩野義製薬)
- 5) 中畑龍俊:基調講演、iPS 細胞を活用した医療の可能性と倫理. 第10回STSフォーラム「科学技術が拓く人間の未来」公開シンポジウム 2013年10月5日 京都商工会議所ビル講堂
- 6) 横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男:罹患患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の分子機構の解明. 第34回日本炎症・再生医学会 2013年7月2-3日(ポスター) 国立京都国際会館
- 7) Hasegawa D., Hama A., Nozawa K., Salaguchi H., Yabe M., Ito E., Ito M., Kojima S., Nakahata T., Manabe A.: Hematological and morphological characteristics of inherited bone

marrow failure syndromes(IBMFS). The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2013年10月11-13日(12日) さっぽろ芸文館

- 8) Suzuki N., Hira A., Niwa A., Matsuo K., Takata M., Yabe M., Nakahata T., Saito M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 11th Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). 7/12-7/15, Boston, MA, USA.
- 9) Honda Y., Tsuchida M., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 17 children with JMML who developed blast crisis. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology(第75回日本血液学会学術集会) 2013年10月11-13日(12日)札幌市教育分化会館
- 10) 中畑龍俊:iPS 細胞による疾患モデル樹立と創薬への展望. 日経バイオテクプロフェッショナルセミナー「次の10年間 iPS 細胞実用化をリードする iPS 細胞創薬の現状と課題」2013年6月19日 コクヨホール(東京) 日経 BP

## 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

## 血液免疫系細胞分化障害による疾患の 診断と治療に関する調査研究

研究分担者 小原 収 ((公財)かずさDNA研究所 副所長)

### 研究要旨

血液系・免疫系細胞の両者の分化に障害をきたすという特徴を持つ疾患の遺伝子同定、迅速な遺伝子診断法の確立、診断基準・治療ガイドライン作成、スクリーニングなどにより早期診断、病態解明、早期治療により疾患予後を改善することを目指して、本分担研究では次世代シーケンサーによるパネル遺伝子解析の実運用と原因未知の血液免疫系細胞分化障害の遺伝的素因探索のための網羅的な遺伝子解析を実施した。

### A. 研究の目的

血液系・免疫系細胞の両者の分化に障害をきたすという特徴を持つ、1)慢性好中球減少症、2)家族性血小板減少症(X連鎖血小板減少症、Wiskott-Aldrich症候群、Epstein症候群(MYH9異常症))、3)細網異形成症、4)Emberger症候群、5)慢性肉芽腫症、6)家族性血球貧食症候群、7)申請者らが見出した新規血液免疫系細胞分化障害である家族性樹状細胞欠損症を主たる対象とし、血液免疫系細胞分化障害による疾患の遺伝子同定、迅速な遺伝子診断法の確立、診断基準・治療ガイドライン作成、スクリーニングなどにより早期診断、病態解明、早期治療により疾患予後を改善することを最終的な目的とする。

### B. 研究方法

先天的免疫不全症臨床アーカイブ PIDJ (<http://pidj.rcai.riken.jp/index.html>) に登

録されている血液系・免疫系分化障害の症例について、それぞれの疾患の原因として知られている既知原因遺伝子内での変異の有無の検査を行う。

血液免疫系細胞の分化異常に起因する疾患の遺伝子診断の効率化、高精度化を目指して、次世代シーケンサーによる遺伝子診断の実用化のためにマルチプレックスPCR法による遺伝子パネル分析の前処理プロセスの条件検討を行う。また、既知遺伝子に変異が見られない事の確認された症例については、網羅的なエクソンシーケンシングとRNAシーケンシングの併用により、疾患原因候補変異の検出を行う。特に、後者については、厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業「次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究」班(研究代表者、松原洋一)と連携して研究を進めた。



(倫理面への配慮)

当分担研究のために、かずさDNA研究所の倫理審査委員会において、既知遺伝子の遺伝子検査だけでなく、全エクソンシーケンシングとRNAシーケンシングによる免疫不全症遺伝的原因探索についても承認を得た。かずさDNA研究所では匿名化された情報のみを取り扱うが、遺伝情報へのアクセスは限られた作業者のみがアクセスできるシステムで運用した。

### C. 研究結果

よく既知遺伝子が知られている血液・免疫系疾患の代表例として、分類不能型免疫不全症 (Common Variable Immunodeficiency, CVID) と重症複合免疫不全症 (Severe Combined Immunodeficiency, SCID) 解析のために、それぞれに対してパネルに搭載する遺伝子を以下のように決定した。

CVID		
遺伝子名	アンプリコン数	塩基配列長
ICOS	5	2186
TAC1	6	2683
BAFFR	3	1338
CD19	11	4336
MS4A1	6	2233
CD21 (CR2)	31	9392
CD81	8	3227
PLCG2	32	11038
LRBA	61	24320
total	163	60753 base

SCID		
遺伝子名	アンプリコン数	塩基配列長
ADA	11	3553
CD8A	6	2492
NHEJ1	7	2491
CORO1A	10	3457
CRACM1	5	1913
DCLRE1C	16	6224
FOXP1	10	3766
IL2RG	8	2848
IL7R	9	3308
JAK3	23	7722
LCK	12	3682
LIG4	10	4428
PNP	6	2256
PRKDC	84	30683
PTPRC	30	10374
RAG1	11	5062
RAG2	6	2659
STAT5A	18	6062
ZAP70	12	4388
RMRP	1	435
CD3G	6	1820
CD3D	5	1655
CD3E	7	2497
AK2	7	2362
CD247	8	2532
total	328	118669 base

総アンプリコン数が200以下のCVIDパネルについては、ロシュ社卓上次世代シーケンサーGS Juniorでのアンプリコンシーケンスのパイプラインを立ち上げ、実際の検

体の解析を進めた。SCID パネルについては、アンプリコン数が300を超えるため、同じロシュ社の卓上シーケンサーでは効率的な分析が困難なため、より処理量の大きなイルミナ社の MiSeq によるパネル診断系の構築を当研究班代表のグループとともに進めた。アンプリコンによる鋳型調製のマルチプレックス化がまだ不十分なために、SCID 症例の実検体の受け入れまでには至れなかったが、実験系として配列解析が可能であることは確認できた。

既に既知候補遺伝子の除外診断が終えられている家族検体を含む検体については、全エクソン配列解析と RNA Sequencing 解析を実施し、データ蓄積を進めた。その結果、いくつかの症例において疾患原因と思われる候補変異を同定できた。それらの多くは、疾患原因遺伝子として知られる遺伝子に生じた新規変異であり、その症状が非典型的なために除外診断の際に解析対象からもれていた遺伝子に見られる変異であった。それ以外の候補については、候補変異の機能的な評価もしくは同症状を示す他検体の解析を経ないで結論に至れないため、ノックインマウスの準備などによる機能解析に向けた準備を進めた。RNA Sequencing データも順調にデータ蓄積を進めることができたが、今年度解析した検体においては、遺伝子発現プロファイルから原因変異を推定できたケースはなかった。

## D. 考察

卓上型次世代シーケンサーの導入により、安価にルーチンの確定診断目的の遺伝子解析が実現できたため、遺伝子パネルベースの解析が現実のものとなった。エ

クソーム解析の結果も、症状からの絞り込みを緩めることで、確定診断に至れる割合を確実に向上させられることが示されており、今後さらにその検査の経済性を評価しながら運用していくことが重要だと考える。網羅的なエクソーム解析の臨床的な有用性は実証されているものの、未だ遺伝的な疾患原因に至れる割合は劇的には高まっていない。今後、巨視的な疾患症状の把握だけでなく、分子レベルの症状の定量的な記載を実現することが重要であり、それをどうやって臨床現場で実現するかが課題であることが明確となった。

## E. 結論

- 1) CVID パネル解析の実運用を開始し、SCID パネルについても解析の実現可能性は実証できた。
- 2) 次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い、複数の症例において疾患原因変異の候補を得た。確実な結論に至れるのは、既知疾患遺伝子での変異による非典型症状を呈した症例である場合が多く、次世代シーケンシングによる遺伝子診断の有用性が示せた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Rawat A, Singh S, Suri D, Gupta A, Saikia B, Minz RW, Sehgal S, Vaiphei K, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N, Ohara O, Chan KW, Lau YL. Chronic Granulomatous Disease: Two Decades of Experience From a Tertiary Care Centre in North West India. *J Clin Immunol.* 2013 33(4):857-864

- 2) Higuchi Y, Shimizu J, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Takada H, Ishimura M, Hara T, Ohara O, Asagoe K, Kubo T. The identification of a novel splicing mutation in C1qB in a Japanese family with C1q deficiency: a case report. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2013 Oct 28;11(1):41.
- 3) Wada T, Sakakibara Y, Nishimura R, Toma T, Ueno Y, Horita S, Tanaka T, Nishi M, Kato K, Yasumi T, Ohara O, Yachie A. Down-regulation of CD5 expression on activated CD8(+) T cells in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with perforin gene mutations. *Hum Immunol*. 2013 Dec;74(12):1579-85.
- 4) Lee YW, Yang EA, Kang HJ, Yang X, Mitsuiki N, Ohara O, Miyawaki T, Kanegane H, Lee JH. Novel mutation of IL2RG gene in a Korean boy with X-linked severe combined immunodeficiency. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2013;23(1):65-7.
- 5) Suzuki J, Kuwahara M, Tofukuji S, Imamura M, Kato F, Nakayama T, Ohara O, Yamashita M. A novel small compound SH-2251 suppresses Th2 cell-dependent airway inflammation through selective modulation of chromatin status at the Il5 gene locus. *PLoS One*. 2013 Apr 16;8(4):e61785.
- 6) Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, Haraguchi K, Moriuchi H, Oh-Ishi T, Kitoh T, Ohara O, Morio T, Yachie A. Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry; useful screening tests for chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol*. 2013 May;33(4):857-64.
- 7) Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin-deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 May;131(5):1437-40.e5.

## 2. 学会発表

- 1) 第七回日本免疫不全症研究会 「食道潰瘍を反復した1型高IgE症候群の1例」 山本崇裕、大西秀典、寺本貴秀、桑原秀次、久保田一生、大塚博樹、川本典生、加藤善一郎、深尾敏幸、谷内江昭宏、小原收 福岡 2014年1月25日
- 2) 第七回日本免疫不全症研究会 「複合型免疫不全を呈したsLC46A1新規変異による先天性葉酸吸収不全症」 千田奈津子、山田雅文、有賀正、岸本健治、小林良二、小林邦彦、小原收 福岡 2014年1月25日
- 3) かずさ DNA 研究所/産総研生命情報工学研究センター共催ワークショップ バイオインフォマティクスとゲノム医療 - その課題と将来展望 「クリニカルゲノミクスの現状と課題」 小原收 東京 2013年11月
- 4) The 5th LJI & IMS-RCAI Workshop “Post-GWAS genomic analyses: Mind and bridge the gaps” Ohara O Yokohama, October, 2013
- 5) 第40回日本毒性学会学術年会 シンポジウム 毒性オミクス「生体システムダイナミクス理解のための統合ゲノミクス解析の将来展望」小原收 千葉 2013年6月
- 6) 第116回日本小児科学会学術集会 “「ゲノミクスを基礎とした新しい病因探索法」分野別シンポジウム「原発性免疫不全症：新しい疾患、トピ

- ックス」”小原收 広島 2013 年 4 月
- 7) 第 58 回日本人類遺伝学会「次世代シーケンシング技術とゲノム解析」シンポジウム：次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾患解析の現状と課題 小原收 仙台 2013 年 11 月
  - 8) 第 4 回関東甲越免疫不全症研究会 “IgA 単独欠損症として紹介され、TREC/KREC の結果から RAG 1 異常と同定しえた 1 例” 加藤環、釜江智佳子、本間健一、池川健、横須賀とも子、和田泰三、谷内江昭宏、西田直徳、金兼弘和、満生紀子、小原收、今井耕輔、森尾友宏、野々山恵章 2013 年 9 月
  - 9) 第 41 回日本臨床免疫学会総会 「本邦における ICF (Immunodeficiency with Centromeric instability and Facial anomalies) 症候群 5 例の検討」 藤環、釜江智佳子、満生紀子、小原明、林正俊、野口恵美子、久保田健夫、本間健一、小原收、今井耕輔、野々山恵章 下関 2013 年 11 月
  - 10) 日本人類遺伝学会第 58 回大会 「次世代シーケンサーを用いて ICF (Immunodeficiency with centromeric instability and facial anomalies) 症候群と診断した 2 例」 釜江智佳子、満生紀子、小原明、林正俊、野口恵美子、本間健一、小原收、今井耕輔、久保田健夫、野々山恵章 2013 年 11 月
  - 11) 第 41 回日本臨床免疫学会総会 「BTK 変異をみとめた IgA 単独欠損の解析 (IgA deficiency caused by the missense mutation in the BTK gene)」 満生紀子、今井耕輔、Xi YANG、金兼弘和、小阪嘉之、高田英俊、水谷修紀、小原收、森尾友宏 下関 2013 年 11 月
  - 12) 15th International Congress of Immunology 2013 “Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin  $\kappa$ -deleting recombination excision circles” C. Kamae, N. Nakagawa, H. Sato, K. Honma, N. Mitsuiki, O. Ohara, H. Kanegane, T. Morio, K. Imai and S. Nonoyama, Milan, Italy, Aug, 2013
  - 13) 3rd Sardinian Summer School “Post-GWAS animal models” Ohara O. Pula, Italy, September, 2013
  - 14) 第 34 回日本炎症・再生医学会 “CINCA 症候群/NOMID 患者単球における、IL-1 $\beta$ 分泌能の 1 細胞解析” 中川権史、志村七子、白崎善隆、山岸舞、井澤和司、西小森隆太、河合朋樹、八角高裕、平家俊男、小原收 京都、2013 年 7 月
  - 15) 第 41 回日本臨床免疫学会 「Muckle-Wells 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異の検討」 中川権史、西小森隆太、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、河合利尚、梅林宏明、武井修治、小林法元、小原收、Eva Gonzalez- Roca、Juan I. Arostegui、平家俊男 下関 2013 年 11 月 27 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

## コクローアッセイ、骨髄機能解析、移植治療開発

研究分担者 小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授)  
研究協力者 村松 秀城 (名古屋大学医学部附属病院小児科 助教)

### 研究要旨

GATA2 は生体内の造血機能に重要な役割を果たしている転写因子である。近年、家族性 MDS/AML、MonoMAC 症候群、DCML 欠損症、Emberger 症候群など、様々な疾患群で GATA2 遺伝子異常が共通して同定された。小児血液疾患における GATA2 異常症の果たす役割を明らかにする目的で、家族性 MDS3 家系 4 例、AML75 例、再生不良性貧血 75 例、若年性骨髄単球性白血病 96 例において GATA2 異常症を検索した。家族性 MDS4 例全例および AML2 例(3%)に GATA2 遺伝子変異が同定されたが、再生不良性貧血および若年性骨髄単球性白血病症例では GATA2 遺伝子変異は認められなかった。

### A. 研究の目的

GATA2 は生体内の造血機能に重要な役割を果たしている転写因子である。近年、家族性 MDS/AML、MonoMAC 症候群、DCML 欠損症、Emberger 症候群など、様々な疾患群で GATA2 遺伝子異常が共通して同定された。小児血液疾患における GATA2 異常症の果たす役割を明らかにするため、GATA2 遺伝子変異を検索した。

### B. 研究方法

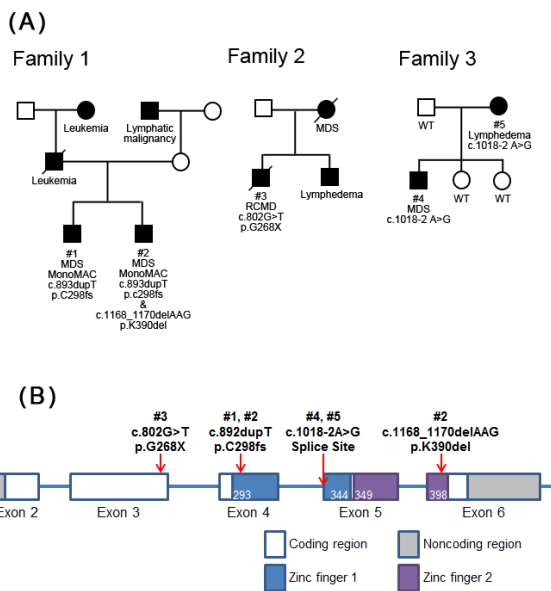
家族性 MDS3 家系 4 例、AML75 例、再生不良性貧血 75 例、若年性骨髄単球性白血病 96 例の骨髄ないし末梢血単核球から genomic DNA を抽出し、サンガーシーケンシング法で GATA2 の全エクソンおよびイントロン 5 の塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得た研究計画のもと、患者家族の同意を得た。

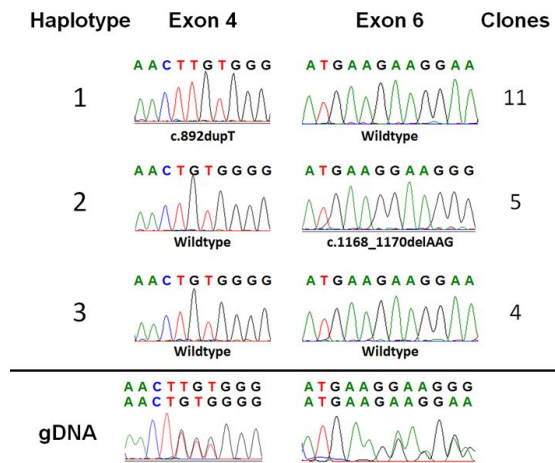
### C. 研究結果

家族性 MDS4 例全例および AML2 例(3%)に GATA2 遺伝子変異が同定されたが、再生不良性貧血および若年性骨髄単球性白血病症例では GATA2 遺伝子変異は認められなかった。家族性 MDS3 家系の家系図および変異部位について、図1にまとめた。Family1 に属する患者#2 では、同一家系の他の罹患者と共通の germline GATA2 変異に加えて、MDS 発症時の検体から somatic GATA2 変異が同定された。



**図 1. 家族性 MDS 3 家系の(A)家系図および (B) GATA2 変異部位**

患者#2 の germlineGATA2 変異(エクソン 4 の c.892dupT) および somatic GATA2 変異 (エクソン 6 の c.1168\_1170delAAG) が同一アレルに存在するか、対立アレルに存在するか検討するため、両変異を含む PCR アンプリコンを増幅し、TA クローニング法による解析を行った。20 クローンピックアップし、塩基配列を決定した。エクソン 4 の変異のみが検出されたクローンが 11 個、エクソン 6 の変異のみが検出されたクローンが 5 個、両方とも正常配列であったクローンが 4 個であった(図 2)。この結果から、これら 2 つの変異は対立アレルに存在すると考えられた。



**図 2. TA クローニング法による患者#2 の GATA2 変異解析**

## D. 考察

germlineGATA2 変異に加えて、MDS 発症時に対立アレルに somatic GATA2 変異を獲得した家族性 MDS 症例を同定した。GATA2 遺伝子変異は、MDS クローンの腫瘍化進展にも関与していることが考えられた。また、若年性骨髄単球性白血病および再生不良性貧血では変異例を認めず、GATA2 異常症がこれらの病状を示す可能性は低いことが考えられた。

## E. 結論

小児血液疾患における GATA2 遺伝子異常について解析を行った。家族性 MDS では高率に変異が検出された一方、若年性骨髄単球性白血病および再生不良性貧血では変異例は認められなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M, Yabe

- M. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood*. 2013 Oct 31;122(18):3206-3209.
- 2) Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet*. 2013 Mar 7;92(3):431-438.
  - 3) Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Sauntharajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2013 Aug;45(8):942-946.
  - 4) Nomura K, Hoshino A, Miyawaki T, Hama A, Kojima S, Kanegane H. Neutropenia and myeloid dysplasia in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 May;60(5):885-886.
  - 5) Okuno Y, Murakoshi A, Negita M, Akane K, Kojima S, Suzuki H. CD8+ CD122+ regulatory T cells contain clonally expanded cells with identical CDR3 sequences of the T-cell receptor beta-chain. *Immunology*. 2013 Jul;139(3):309-317.
  - 6) Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet*. 2013 Aug;45(8):937-941.
  - 7) Takahashi Y, Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R, Ito E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe K, Ohga S, Kojima S, Japan Childhood Aplastic Anemia Study G. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. *Blood*. 2013 Jan 31;121(5):862-863.
  - 8) Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanazaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet*. 2013 Nov;45(11):1293-1299.
  - 9) Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S.

Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 May;60(5):836-841.

## 2. 学会発表

- 1) Kojima S. Aplastic Anemia : Therapeutic updated in HSCT. 2013 International Forum on Bone Marrow Failure. Aug.16, 2013. Tianjin, China.
- 2) Kojima S. Clonal Evolution from Aplastic Anemia to Myelodysplastic Syndrome with Monosomy7. 7th International Congress on Shwachman-Diamond Syndrome. Nov. 3-6, 2013. Toronto, Canada.
- 3) 小島勢二. 先天性血液疾患の病態研究に関する最近の進歩. 第 116 回日本小児科学会学術集会. 2013 年 4 月 19 日. 広島.
- 4) 坂口 大俊、西尾 信博、川島 希、王 希楠、成田 敦、土居崎 小夜子、村松 秀城、濱 麻人、中西 康詞、高橋 義行、土田 昌宏、小林 良二、伊藤 悦朗、矢部 普正、大賀 正一、小原 明、長谷川 大輔、真部 淳、伊藤 雅文、小島 勢二. Telomere length as a predictor for the immunosuppressive therapy in acquired aplastic anemia. 第 75 回日本血液学会学術集会. 2013 年 10 月 12 日. 札幌.
- 5) 王 希楠、村松 秀城、坂口 大俊、徐 銀燕、川島 希、成田 敦、土井崎 小夜子、Olfat Ismael、中西 康詞、濱 麻人、高橋 義行、小島 勢二. GATA2 shows association with familial MDS, but not AA and JMML in Japanese children. 第 75 回日本血液学会学術集会. 2013 年 10 月 12 日. 札幌.

## 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



## マイコバクテリア易感染症(MSMD)を呈する機能喪失型 STAT1 異常症

研究分担者 小林 正夫 (広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授)  
研究協力者 津村弥来、溝口洋子、平田修、岡田賢

### 研究要旨

メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症(MSMD)は BCG や非結核性抗酸菌など弱毒抗酸菌に易感染性を呈することを特徴とする。IFN- $\gamma$  レセプター(IFN- $\gamma$  R)1 欠損症、IFN- $\gamma$  R2 欠損症、IL-12 欠損症、IL-12R 欠損症、STAT1 欠損症、NEMO 異常症など種々の病因が包含されている。STAT1 は type I IFN(IFN- $\alpha/\beta$ )と type II IFN(IFN- $\gamma$ )の両方のシグナル伝達に重要な転写因子であり、機能喪失型変異によって細胞内寄生菌に対して易感染性を示すことが知られている。我々は本邦において3家系8例の常染色体優性遺伝型のヘテロ接合性変異例を同定した。変異部位は SH2 domain が1例(K673R)、母と男児家系は tale segment domain(Y701C)、祖母、父、患児を含む4症例は coiled coil domain(G250E)でいずれも新規変異であった。いずれの症例においても臨床的には多発性骨髄炎を呈し、病理所見は非乾酪性肉芽腫であった。抗酸菌培養で陽性を示したのは1家系のみであった。すべての家系で末梢血単球のインターフェロン刺激によるリン酸化低下を認めた。STAT1 null osteosarcoma cell への STAT1 変異遺伝子の強制発現実験を行い、遺伝子変異を有する STAT1 のシグナル伝達を検討した。すべての変異で IFN- $\gamma$  刺激に対し、STAT1 リン酸化低下、核内移行の軽度低下、DNA 結合能障害、dominant negative の転写活性異常が認められた。常染色体優性型の STAT1 異常症の報告は世界で10家系足らずであるが、この数年の遺伝子検査の進歩から本邦でも3家系を同定した。BCG 接種に対する過剰反応や多発性骨髄炎を呈する症例においては、STAT1 異常を含めた MSMD の診断が不可欠である。

### A. 研究の目的

メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症(MSMD)は BCG や非結核性抗酸菌など弱毒抗酸菌に易感染性を呈することを特徴とする原発性免疫不全症である。IFN- $\gamma$  レセプター(IFN- $\gamma$  R)1 欠損症、IFN- $\gamma$  R2 欠損症、IL-12 欠損症、IL-12R 欠損症、

STAT1 欠損症、NEMO 異常症など種々の病因が包含されている。STAT1 は type I IFN(IFN- $\alpha/\beta$ )と type II IFN(IFN- $\gamma$ )の両方のシグナル伝達に重要な転写因子であり、機能喪失型変異によって細胞内寄生菌に対して易感染性を示すことが知られている。常染色体性優性遺伝を呈するヘテロ接

合性変異の報告例は 10 例あまりである。我々は本邦第一例を診断後、3 家系の常染色体優性遺伝型の STAT1 ヘテロ接合性変異例を同定したので、機能解析を含めて報告する。

## B. 研究方法

【症例 1】9 歳男児。6 歳時に左肘部の腫脹から骨髄炎を診断。生検にて非乾酪性肉芽腫症を認めた。STAT1 の SH2 ドメインの変異 (K673R) を同定。

【症例 2, 3】3 歳男児。背部痛と炎症所見の持続から多発性の骨病変を認めた。生検で非乾酪性肉芽腫を認めた。STAT1 の TS セグメントのリン酸化部位の変異 (Y701C) を同定した。患児の母親も 18 歳時に骨髄炎を指摘され、抗菌薬治療を受けていた。骨病変の精査から、頸椎、腰椎の変形と圧迫骨折を認めた。児と同じ変異を同定した。

【症例 4-8】2 歳男児。跛行を主訴として、左踵骨の骨破壊を認めた。生検にて非乾酪性肉芽腫と BCG 菌を同定した。STAT1 の Coiled coil ドメインに変異 (G250E) を同定した。父親が皮膚結核の既往と多発性骨髄炎あり、児と同じ変異を同定。父方祖母も 13 歳時に皮膚結核 (BCG 菌)。腰椎の変形を認め、同じ変異を同定。患児の従兄弟、叔父も骨髄炎既往と同じ変異が同定された。すべて優性遺伝形式と考えられた。

図 3 家系の STAT1 変異部位



(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. D. 研究結果と考察

3 家系で STAT1 の変異部位が異なっていたため、STAT1 のリン酸化、核内移行、DNA 結合能ならびに転写活性を検討した。すべての症例において、IFN 刺激によるリン酸化はわずかに残存、核内移行は軽度障害、DNA 結合はほぼ消失、転写活性は Dominant-negative 効果で減少していた。変異部位による大きな差は認められなかった。一方、IFN- による刺激では、転写活性に影響はなかった。これらの結果は患者の臨床症状が主として細胞内寄生菌に対する易感染性であり、ウイルス感染には易感染を示していないことと一致していた。興味ある臨床症状はすべての症例が骨病変 (慢性骨髄炎) を呈していることである。MSMD の原因である IL-12 欠損症、IL-12R 欠損症、NEMO 異常症で、骨髄炎を合併する頻度は極めて少ないのに対し、IFN- レセプター (IFN- R) 1 欠損症、IFN- R2 欠損症、STAT1 異常症での骨髄炎の合併は高率である。本邦症例の臨床的検討においても STAT1 異常はほぼ全例で骨髄炎を呈していることから、IFN-STAT1 シグナル伝達経路が骨髄炎発症に多大に関与していることが推測される。破骨細胞の活性化にこのシグナル伝達経路が重要であることは骨病変との関係を裏付けるものかもしれない。今後、葉克細胞の増殖と機能を検討する予定である。また STAT1 では機能獲得型変異で慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMCD) を発症することが明

らかとされている。MSMDとCMCDで、変異部位の偏りはあるものの、どのドメインでも機能喪失型と機能獲得型変異が存在している。STAT1の機能と変異、表現型の違いを明らかにする必要があると思われる。

## E. 結論

本邦でSTAT1異常症3家系8症例を同定した。STAT1変異部位は3家系で異なっていたが、機能解析の結果はほぼ同様であった。臨床的にはすべての症例で慢性骨髓炎を合併していた。稀少な食細胞異常症を明らかとすることが出来た。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant V, Kong X, Crypwy S, Dupuis S, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M: Simple diagnosis of *STAT1* gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Journal of Leukocyte Biology*, 2013 (in press).
- 2) Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M: Identification of the integrin  $\beta 3$  L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis. *British Journal of Haematology* 160: 521-9, 2013.
- 3) Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H,

Kobayashi M, Tsuji K: Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia-derived pluripotent stem cells with heterozygous *ELANE* mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 3023-8, 2013.

- 4) Hirata O, Okada S, Tsumura M, Kagawa R, Miki M, Kawaguchi H, Nakamura K, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Takihara Y, Kobayashi M: Heterozygosity for the Y701C *STAT1* mutation in a multiplex kindred with multifocal osteomyelitis. *Haematologica* 98:1641-9, 2013.
- 5) Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Tsumura M, Kobayashi M, Arkwright PD, Averbuch D, Engelhard D, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, Klein C, Holland SM, Uzel G, Casanova JL, Ma CS, Tangye SG: Naïve and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *Journal of Experimental Medicine* 210: 2739-53, 2013.
- 6) Ives ML, Ma CS, Palendira U, Chan A, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright PD, Engelhard D, Averbuch D, Magdorf K, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, Tsumura M, Kobayashi M, Uzel G, Casanova JL, Tangye SG, Deenick EK: Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations underlying autosomal dominant hyper-IgE syndrome impair human CD8(+) T-cell memory formation and function.

Journal of Allergy and Clinical Immunology, 132: 400-11, 2013.

- 7) Berglund LJ, Ma CS, Avery DT, Moens L, Deenick EK, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Wong M, Adelstein S, Arkwright PD, Fulcher DA, Ziegler JB, Smart JM, Kobayashi M, Casanova JL, Cook MC, Uzel G, Tangye SG: IL-21 signalling via STAT3 primes human naïve B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. Blood 122: 3940-50, 2013.
- 8) Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito M, 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, Epub ahead of print Aug 23, 2013.

## 2. 学会発表

- 1) Kobayashi M, Mizoguchi Y, Karakawa S, Okada S, Kawaguchi H, Nakamura K: Genetic characteristic of patients with severe congenital neutropenia in Japan. 27th International Congress of Pediatrics, August 24-29, Melbourne, Australia

## 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

## 全エキソーム解析によって解明した Hoyeraal-Hreidarsson 症候群の責任遺伝子: *RTEL1*

研究分担者 原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学 教授)

### 研究要旨

先天性角化不全症は、これまでテロメア関連遺伝子変異により発症すると報告されている。原因不明であった Hoyeraal-Hreidarsson 症候群の児について、その原因を解明するためエキソーム解析を行ったところ、*RTEL1* 遺伝子の compound heterozygous mutation を確認した。*RTEL1* はテロメアの維持・複製、および DNA 二本鎖切断修復に関与しており、2013 年に先天性角化不全症の新規原因遺伝子として新たに報告された。本症例は本邦初の *RTEL1* 変異による Hoyeraal-Hreidarsson 症候群と考えられた。

### A. 研究の目的

Hoyeraal-Hreidarsson 症候群(HHS)は先天性骨髄不全症候群の1つであり、先天性角化不全症(dyskeratosis congenita; DC)の最重症型である。乳児期早期に骨髄不全症を発症し、小頭症、小脳低形成、成長発達遅延、顔貌異常を呈する。これまでテロメア関連遺伝子の変異により発症すると報告されているが、まだ半数例では既知の遺伝子異常を認めず、未知の原因遺伝子が存在すると考えられる。我々は、既知のテロメア関連遺伝子に異常を認めないHHS男児例とその両親を対象とし、全 exon 解析(whole exome sequence)を行い、原因遺伝子探索を行った。

### B. 研究方法

[症例] 在胎 36 週 0 日、体重 1455g で出生した男児。体重増加不良と発達遅滞があり、頭部 MRI で小脳低形成を認めた。1 歳時に *Escherichia coli* による敗血症罹患後

より汎血球減少と低ガンマグロブリン血症が進行した。末梢血で B 細胞・NK 細胞数は著減していた。骨髄は低形成で、Flow-FISH 法によりテロメア長の短縮を認め、先天性角化不全症の最重症型である Hoyeraal-Hreidarsson 症候群と診断した。造血不全が進行し発熱が持続し緊急的に臍帯血移植を施行したが救命できなかった。

#### [遺伝子解析]

ご両親に遺伝子解析について説明を行い、同意を得て患者末梢血より DNA を抽出し、既知の原因遺伝子(*TERC*, *TERT*, *DKC1*, *NHP2*, *NOP10*, *TINF2*, *TCAB1*)および *APOLLO/IKAROS* 遺伝子に対し、サンガー法による遺伝子解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学病院倫理委員会により承認(承認番号:488-00)されており、患者およびご両親に対する研究解析に関し、書

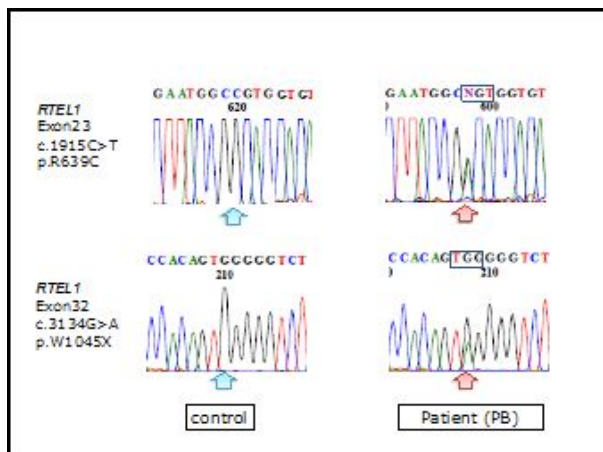
面により両親に説明し、同意を得た。匿名化を行い個人情報保護に配慮した。

### C. 研究結果

サンガー法で解析した遺伝子 (*TERC*, *TERT*, *DKC1*, *NHP2*, *NOP10*, *TINF2*, *TCAB1*, *APOLLO*, *IKAROS*) に変異を認めなかった。

Whole exome sequence では、in house SNP (正常検体で見られる SNV)、dbSNP131 で報告されている SNP、アミノ酸置換を伴わない synonymous な SNV、Mismatch 率 (SNV を call する read の割合) が 25% 以下 (in/del では 10%) で信頼度が低い SNV を除外し、患者検体で 354 の SNV/SNP または in/del を同定した。これらのうち、常染色体劣性遺伝形式をとり、テロメア関連遺伝子であるものは唯一 *RTEL1* (Regulator of telomere elongation helicase 1) 遺伝子であり、複合ヘテロ遺伝子変異 (c.1915C>T: p.Arg639Cys, c.3134G>A: p.Trp1045X) を認めた。サンガー法により確認し(図 1)、患児の両親は保因者であった。

図 1. 本症例で同定した *RTEL1* 遺伝子変異



c.1915C>T: p.Arg639Cys 変異に関して、SIFT(<http://sift.jcvi.org/>) および

Poly-phen-2

(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

による変異予想解析では、いずれも Damaging であり、同部位は種を越えて保存されている部位であった。

### D. 考察

*RTEL1* はテロメアの維持・複製、および DNA 二本鎖切断修復に関与しており<sup>1</sup>、2013 年に先天性角化不全症の新規原因遺伝子として報告された<sup>2-4</sup>) Le Guen T. et al, Hum Mol Genet.2013)。過去の報告ではほとんどが本症例と同様の常染色体劣性遺伝形式の HHS で表現型も類似していた(表 1)。一方で hetero 接合性変異の軽症 DC 例も報告されており、今後の症例蓄積が望まれる。

表 1. 既報告と本症例との比較

	本症例	既報告
性別	男	男:女=11:8
血族婚	-	1/12
IUGR	+	13/19
成長障害	+	13/19
小頭症	+	15/19
小脳低形成	+	16/19
発達遅滞	+	12/16
骨髄不全	+	19/19
免疫不全	+	13/18
口腔・消化器所見	+	7/19
皮膚所見	-	7/18
予後	死亡	死亡/生存=9/10

### E. 結論

全エキソーム解析によって、国内で最初となる *RTEL1* 遺伝子変異による Hoyerlaal-Hreidarsson 症候群患者を同定した。

## 参考文献

1. Vannier JB, Pavicic-Kaltenbrunner V, Petalcorin MI, Ding H, Boulton SJ. RTEL1 dismantles T loops and counteracts telomeric G4-DNA to maintain telomere integrity. *Cell*. 149: 795-806, 2012
2. Ballew BJ, et al. Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita. *Hum Genet*. 132: 473-80, 2013
3. Walne AJ, Vulliamy T, Kirwan M, Plagnol V, Dokal I. Constitutional mutations in RTEL1 cause severe dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet*. 92: 448-53, 2013
4. Le Guen T, et al. Human RTEL1 deficiency causes Hoyeraal-Hreidarsson syndrome with short telomeres and genome instability. *Hum Mol Genet*. 22: 3239-49, 2013

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T: B cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol*. 98: 355-60, 2013
- 2) Imagawa T, Nishikomori R, Takada H, Takeshita S, Patel N, Kim D, Lheritier K, Heike T, Hara T, Yokota S: Safety and efficacy of canakinumab in Japanese patients with phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndrome as established in the first open-label, phase-3 pivotal study (24-week results). *Clin Exp Rheumatol*. 31: 302-9, 2013
- 3) Yokota S, Nishikomori R, Takada H, Kikuchi M, Nozawa T, Kanetaka T, Kizawa T, Miyamae T, Mori M, Heike T, Hara T, Imagawa T: Guidance on the use of canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome

in Japan. *Mod Rheumatol*. 23: 425-9, 2013

- 4) Higuchi Y, Shimizu J, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Takada H, Ishimura M, Hara T, Ohara O, Asagoe K, Kubo T: The identification of a novel splicing mutation in C1qB in a Japanese family with C1q deficiency: a case report. *Pediatr Rheumatol Online J*. 11(1): 41, 2013

## 2. 学会発表

- 1) Hara T, Ishimura M, Tahada H: Autoimmune diseases in patients with primary immunodeficiency diseases. The 2nd International Congress on Controversies in Rheumatology and Autoimmunity, Apr 4-6, 2013, Budapest, Hungary
- 2) Hara T: Innate immunity and infection in the newborn. The 9th Congress of Asian Society for Pediatric Research, May 9-12, 2013, Kuching, Sarawak, Malaysia
- 3) Yamamura K, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Takada H, Ohga S, Hara T: Early progression of atherosclerosis in children with cryopyrin-associated periodic syndrome. May 9-12, 2013, Sarawak, Malaysia
- 4) Takimoto T, Ishimura M, Takada H, Morio T, Ohga S, Hara T: A Japanese female case of Wiskott-Aldrich syndrome with skewed X-chromosome inactivation. The 4th JSH International Symposium, May 24-25, 2013, Ehime, Japan

## 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

## 血液免疫系細胞分化障害による疾患の 診断と治療に関する調査研究

研究分担者 山口 博樹 (日本医科大学 血液内科 講師)

### 研究要旨

先天性角化不全症(Dyskeratosis congenita: DKC)の約 40%の症例は原因遺伝子変異が同定されていない。我々は次世代シーケンサーを用いてDKCや不全型DKCにおける新規の原因遺伝子変異の探索を行った。現在既知の遺伝子変異を認めないHoyeraal-Hreidarsson syndrome 1 症例、DKC4 症例、不全型DKC13 症例に対して検討を行った。DNAヘリカーゼ遺伝子群では *RTEL1* 変異などが、テロメラーゼ複合体遺伝子群では *TEP1* 変異が、Shelterin 複合体遺伝子群では *ACD(TPP1)*変異が新規の原因遺伝子変異の候補として発見された。今後これらの遺伝子変異の機能解析を行う予定である。

### A. 研究の目的

先天性角化不全症(Dyskeratosis congenita: DKC)は網状色素沈着、爪の萎縮、舌の粘膜白斑症などといった特徴的身体的所見を伴う先天性の骨髄不全症(Bone marrow failure: BMF)である。10歳前後までに約80%以上の症例にこれらの特徴的身体的所見が付随しBMFを発症する。また約8%の症例に皮膚、上咽頭、消化管の扁平上皮癌や腺癌などの悪性腫瘍や、急性白血病などの造血器腫瘍の発生が認められる。遺伝型式はX連鎖劣性遺伝が35%、常染色体優性遺伝が5%、常染色体劣勢遺伝が数%に認められるが、残りの約60%近くが型式不明である。DKCの約60%の症例において原因遺伝子が同定され、テロメラーゼ複合体を構成する遺伝子群である、

*DKC1*、*telomerase RNA component (TERC)*、*telomerase reverse transcriptase (TERT)*などや、Shelterin複合体を構成する蛋白である *TRF-interacting nuclear protein (TINF2)*に変異が認められている。

テロメラーゼ複合体は細胞分裂によるテロメアの短縮化に対しテロメアの複製、安定の役割をもち、Shelterin複合体はテロメアの先端部位の特異的な構造形成や保護などを行っている。DKCはこれらの遺伝子の変異によりテロメアが短縮化し、その結果造血幹細胞などの増殖能に障害が起き上記の症候が形成されると考えられている。

これまでに我々はDKCの原因遺伝子である上述のテロメア制御遺伝子の変異が、一部の再生不良性貧血(aplastic anemia: AA)や骨髄異形成症候群(myelodysplastic



syndrome: MDS)に認められ、特徴的所見を伴わず緩徐に発症する不全型 DKC の存在が明らかにした (Lancet 2003;362:1628, Blood 2003;102:916, N Engl J Med. 2005 352: 1413)。不全型 DKC は臨床的に AA や MDS と診断され、効果が得られない免疫抑制療法 (immunosuppressive therapy: IST)が行われることがある。以上より BMF の臨床診断において不全型 DKC を鑑別することは重要である。

現在のところ DKC や不全型 DKC の診断基準は定まっておらず、臨床的には上述の特徴的所見を伴う BMF、テロメア長の短縮、テロメア関連遺伝子の変異の同定によって診断を下している。しかしテロメア関連遺伝子の変異の同定に関しては原因遺伝子だけでも 7 種類存在し、その変異も一塩基変異から大欠失変異や片アレル欠失まで多彩で従来のサンガ法による変異のスクリーニングは効率的ではない。また約 40%の症例は原因遺伝子が同定されていないことも問題である。

近年次世代高速シーケンサーが登場し、これまでのサンガ法による直接塩基決定法よりより早く効率的に塩基配列の決定が可能となった。本研究は原因遺伝子が同定されていない症例に関して、次世代シーケンサーを用いて全 exon シーケンスを行い、新規原因遺伝子変異を同定することを目標としている。

## B. 研究方法

研究対象は、原因遺伝子が同定されていない特徴的所見を伴う Hoyeraal-Hreidarsson syndrome(HHS)症例、

DKC 症例、もしくはテロメア長の短縮が認められた不全型 DKC 症例。目標症例数は 20 症例。

これらの症例に対して *DKC1*, *TERC*, *TERT*, *NOP10*, *NHP2*, *TINF2*, *TCAB1* といった既知の遺伝子変異のスクリーニングを日本医科大学生命科学センターの ABI Ion PGM™ シークエンサーもしくは、従来の direct sequence 法にて遺伝子解析を行う。

新規遺伝子変異の探索は、上記のスクリーニングにおいて変異が同定出来なかった症例に対して、東京大学医学部附属病院・キャンサーボードの次世代シーケンサー-Illumina 社 GAI, GAIx, HiSeq2000 を用いて全 exon シーケンスを行う(2013 年 7 月より京都大学腫瘍生物学講座)。新規遺伝子が同定された場合は、そのバリデーションや機能解析を日本医科大学生命科学センターにて行う。

(倫理面への配慮)

本研究は当施設遺伝子倫理審査委員会において承認が得られており以下の配慮を予定している。生命倫理上の配慮に関しては、患者、及び健康ボランティアの人権、利益の保護について文書にて十分説明をしたうえで同意を得る。また研究への協力に同意した後であってもその同意を取り消すことができること、更に本研究への同意が得られない場合においても今後の治療などにはなんら不利益を被らないことを説明する。個人情報漏洩に対する取り組みとして研究組織とは別に個人情報管理者をおき連結可能匿名化をはかったうえで解析をおこなう。同意が撤回された場合は、検体、診療情報、遺伝情報はすべて匿名化

されたまま焼却により破棄する。得られた結果は学会や論文として発表するが個人情報が出ることはない。遺伝子結果の開示を研究対象者が要求する場合は、倫理的問題を考慮し遺伝子カウンセリングを施行し、結果の告知は臨床遺伝専門医(遺伝カウンセラー)により行う。

## C. 研究結果

### 次世代高速シーケンサーを用いた新規遺伝子変異の探索

既知の遺伝子変異がサンガ法や次世代高速シーケンサーにて同定されなかった症例に関して現在新規の遺伝子変異の探索を行っている。現時点では表1に示す新規遺伝子変異の候補が抽出されている。

#### 1. DNAヘリカーゼ遺伝子群の変異

DNAヘリカーゼ遺伝子である *WRN* 変異を1症例に、*RECQL4* 変異を3症例に、*PIF1* 変異を2症例に、*BLM* 変異を2症例に、*RTEL1* 変異を3症例に認めた。*RTEL1* 変異の2症例(症例14, 15)は、母に *RTEL1* 102+1G>A のヘテロ変異が認められ、症例においては102+1G>AとF709Lの両アレルに変異があると考えた。その他の変異はすべてヘテロ変異であった。しかし症例6に関してはヘテロの *BLM* 変異と *PIF1* 変異を、症例11に関してはヘテロの *WRN* 変異と *RECQL4* 変異を認めている。

#### 2. テロメラーゼ複合体遺伝子群の変異

テロメラーゼ複合体遺伝子群のひとつである *TEP1* 変異を2症例に認めた。1症例はnonsense mutationで1症例はframeshift mutationであった。

#### 3. Shelterin複合体遺伝子群の変異

Shelterin複合体遺伝子群のひとつである *ACD(TPP1)* に変異を認めた。変異部位はShelterin複合体を形成しDKCの原因遺伝子変異である *TINF2* との結合ドメインであった。

#### 4. その他

毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子でDNA損傷修復反応の重要な機能を有する *ATM* のヘテロ変異を1症例に、顔面の奇形、免疫不全、網状皮斑、低身長を症候とする *FILS syndrome* の原因遺伝子として同定されたDNAポリメラーゼの機能をもつ *POLE* のヘテロ変異を1症例に認めた。

表1 次世代高速シーケンサーによって抽出された新規遺伝子変異候補

	Clinical Daiganosis	Mutation 1	Mutation 2	Mutation 3
1	HHS	<i>PIF1</i> P109S		
2	DKC			
3	DKC	<i>ACD</i> F461L	<i>RECQL4</i> G1105R	
4	DKC			
5	DKC			
6	cryptic DKC	<i>BLM</i> G1129R	<i>PIF1</i> P109S	<i>ATM</i> V1260M
7	cryptic DKC	<i>BLM</i> L716F		
8	cryptic DKC			
9	cryptic DKC	<i>TEP1</i> W1079fs		
10	cryptic DKC			
11	cryptic DKC	<i>WRN</i> 3139-1G>C	<i>RECQL4</i> T465M	
12	cryptic DKC		<i>RECQL4</i> A72V	
13	cryptic DKC	<i>TEP1</i> R1237X		
14	cryptic DKC	<i>RTEL1</i> 102+1G>A	<i>RTEL1</i> F709L	
15	cryptic DKC	<i>RTEL1</i> 102+1G>A	<i>RTEL1</i> F709L	
16	cryptic DKC	<i>POLE</i> R266X		
17	cryptic DKC			
18	cryptic DKC	<i>RTEL1</i> V643G		

#### D. 考察

次世代高速シーケンサーによる新規遺伝子変異探索は、DNAヘリカーゼ遺伝子群、テロメラーゼ複合体遺伝子群、Shelterin複合体遺伝子群に新規の遺伝子変異の候補が発見された。

その中でも DNA ヘリカーゼ遺伝子群の *RTEL1* 変異は、我々と同様に次世代シーケンサーを用いた新規遺伝子変異探索によって2013年にいくつかのグループからDKCの重症型であるHHSの原因遺伝子として報告がなされたばかりである。これらの報告では *RTEL1* 変異は常染色体劣性遺伝形式のHHS症候群の原因遺伝子と考えられている。今回の我々が発見した2症例(症例14、15)に関しては102+1G>AとF709Lの両アレルに変異があり原因遺伝子の可能性が高い。しかしこれまでの *RTEL1* 変異を認めた症例の大多数はDKCの重症型であるHHSであるのに対して、今回我々が発見した症例14、15はともに不全型DKCの臨床像を示している。現時点では明らかになっていないが、*RTEL1* の変異部位による機能差が臨床像の違いに関与をしている可能性があり今後の機能解析の結果が待たれるところである。

また9/18症例(50%)にDNAヘリカーゼ遺伝子群の変異が認められ、症例6や11に関しては異なるDNAヘリカーゼ遺伝子群のヘテロ変異を2つ認めている。これらがDKCの病態にどのように関与をしているのかは明らかではないが、大変興味深い結果であると考えられる。

新規の原因遺伝子として有望と考えられるテロメラーゼ複合体遺伝子群の *TEP1* 変異、Shelterin複合体遺伝子群の *ACD(TPP1)* 変異が発見された。今後機能解析を行い原因遺伝子変異として確定をする予定である。

## E. 結論

現在既知の遺伝子変異を認めないHHS、DKC、や不全型DKCに対して次世代高速シーケンサーを用いて新規遺伝子変異探索を行い、DNAヘリカーゼ遺伝子群、テロメラーゼ複合体遺伝子群、Shelterin複合体遺伝子群に新規の遺伝子変異の候補を発見した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fukuhara A, Tanino Y, Ishii T, Inokoshi Y, Saito K, Fukuhara N, Sato S, Saito J, Ishida T, Yamaguchi H, Munakata M. Pulmonary fibrosis in dyskeratosis congenita with TINF2 gene mutation. *Eur Respir J.* 2013; 42: 1757–1759.
- 2) 山口博樹. テロメア病. *血液フロンティア.* 2013; 23(6): 816-820.

### 2. 学会発表

なし

## 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

雑誌 (英文)

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S.	ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia.	Am J Hum Genet	3(7)	431-438	2013
Noris P, Favier R, Alessi MC, Geddis AE, Kunishima S, Heller PG, Giordano P, Niederhoffer K, Bussel JB, Podda M, Vianelli N, Kersseboom R, Pecci A, Gnam C, Marconi C, Auvrignon A, Cohen W, Yu JC, Iguchi A, Imahiyerobo AM, Boehlen F, Ghalloussi D, De Rocco D, Magini P, Civaschi E, Biino G, Seri M, Savoia A, Balduini CL.	ANKRD26-related thrombocytopenia and myeloid malignancies.	Blood	122(11)	1987-1989	2013
Takagi M, Piao J, Kawaguchi H, Imai C, Ogawa A, Watanabe A, Akiyama K, Kobayashi C, Mori M, Ko K, Mizutani S.	Autoimmunity and persistent RAS-mutated clones long after the spontaneous regression of JMML	Leukemia	27(9)	1926-1928	2013
Saida S, Watanabe KI, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T.	Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome.	Blood.	121(21)	4377-4387	2013
Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK.	Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions.	PLoS ONE.	8(4)	e59243	2013
Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Saito A.M, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Kiyokawa N, Isoyama K, Mizutani S, Hara J, Horibe K, Nakahata T, Adachi S.	Appropriate dose modification in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group.	Int. Hematol.	98(5)	578-588	2013
Rawat A, Singh S, Suri D, Gupta A, Saikia B, Minz RW, Sehgal S, Vaiphei K, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N, Ohara O, Chan KW, Lau YL.	Chronic Granulomatous Disease: Two Decades of Experience From a Tertiary Care Centre in North West India.	J Clin Immunol.	33(4)	857-864	2013
Higuchi Y, Shimizu J, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Takada H, Ishimura M, Hara T, Ohara O, Asagoe K, Kubo T.	The identification of a novel splicing mutation in C1qB in a Japanese family with C1q deficiency: a case report.	Pediatr Rheumatol Online J.	11(1)	41	2013
Wada T, Sakakibara Y, Nishimura R, Toma T, Ueno Y, Horita S, Tanaka T, Nishi M, Kato K, Yasumi T, Ohara O, Yachie A.	Down-regulation of CD5 expression on activated CD8(+) T cells in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with perforin gene mutations.	Hum Immunol.	74(12)	1579-1585	2013
Lee YW, Yang EA, Kang HJ, Yang X, Mitsuiki N, Ohara O, Miyawaki T, Kanegane H, Lee JH.	Novel mutation of IL2RG gene in a Korean boy with X-linked severe combined immunodeficiency.	J Investig Allergol Clin Immunol.	23(1)	65-67	2013

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Suzuki J, Kuwahara M, Tofukuji S, Imamura M, Kato F, Nakayama T, Ohara O, Yamashita M.	A novel small compound SH-2251 suppresses Th2 cell-dependent airway inflammation through selective modulation of chromatin status at the Il5 gene locus.	PLoS One.	16(8)	e61785	2013
Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, Haraguchi K, Moriuchi H, Oh-Ishi T, Kitoh T, Ohara O, Morio T, Yachie A.	Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry; useful screening tests for chronic granulomatous disease.	J Clin Immunol.	33(4)	857-864	2013
Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S.	Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ-deleting recombination excision circles.	J Allergy Clin Immunol.	131(5)	1437-1440	2013
Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S.	Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia	Nat Genet	45(8)	937-941	2013
Takahashi Y, Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R, Ito E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe K, Ohga S, Kojima S.	Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia	Blood	121(5)	862-863	2013
Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S.	Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia	Pediatr Blood Cancer	60(5)	836-841	2013
Fukuhara A, Tanino Y, Ishii T, Inokoshi Y, Saito K, Fukuhara N, Sato S, Saito J, Ishida T, Yamaguchi H, Munakata M.	Pulmonary fibrosis in dyskeratosis congenita with TINF2 gene mutation	Eur Respir J	42	1757-1759	2013
Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Tsumura M, Kobayashi M, Arkwright PD, Averbuch D, Engelhard D, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, Klein C, Holland SM, Uzel G, Casanova JL, Ma CS, Tangye SG.	Naïve and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells.	J Exp Med.	210	2739-2753	2013
Berglund LJ, Ma CS, Avery DT, Moens L, Deenick EK, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Wong M, Adelstein S, Arkwright PD, Fulcher DA, Ziegler JB, Smart JM, Kobayashi M, Casanova JL, Cook MC, Uzel G, Tangye SG.	IL-21 signalling via STAT3 primes human naïve B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts.	Blood	122	3940-3950	2013

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Ives ML, Ma CS, Palendira U, Chan A, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright PD, Engelhard D, Averbuch D, Magdorf K, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, Frnch MA, Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, Tsumura M, Kobayashi M, Uzel G, Casanova JL, Tangye SG, Deenick EK.	Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations underlying autosomal dominant hyper-IgE syndrome impair human CD8(+) T-cell memory formation and function.	J Allergy Clin Immunol.	132	400-411	2013
Hirata O, Okada S, Tsumura M, Kagawa R, Miki M, Kawaguchi H, Nakamura K, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Takihara Y, Kobayashi M.	Heterozygosity for the Y701C <i>STAT1</i> mutation in a multiplex kindred with multifocal osteomyelitis.	Haematologica	98	1641-1649	2013
Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K.	Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia-derived pluripotent stem cells with heterozygous <i>ELANE</i> mutation.	Proc Natl Acad Sci USA	110	3023-3028	2013
Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M.	Identification of the integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis.	Br J Haematol.	160	521-529	2013
Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T.	B cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID.	Int J Hematol	98	355-360	2013
Ishimura M, Yamamoto H, Mizuno Y, Takada H, Goto M, Doi T, Hoshina T, Ohga S, Ohshima K, Hara T.	A non-invasive diagnosis of histiocytic necrotizing lymphadenitis by means of gene expression profile analysis of peripheral blood mononuclear cells.	J Clin Immunol.	33(5)	1018-1026	2013
Imagawa T, Nishikomori R, Takada H, Takeshita S, Patel N, Kim D, Lheritier K, Heike T, Hara T, Yokota S.	Safety and efficacy of canakinumab in Japanese patients with phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndrome as established in the first open-label, phase-3 pivotal study (24-week results).	Clin Exp Rheumatol.	31	302-309	2013
Yokota S, Nishikomori R, Takada H, Kikuchi M, Nozawa T, Kanetaka T, Kizawa T, Miyamae T, Mori M, Heike T, Hara T, Imagawa T.	Guidance on the use of canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome in Japan	Mod Rheumatol	23	425-429	2013
Ninomiya T, Takada H, Nagatomo Y, Nanishi E, Nagata H, Yamamura K, Doi T, Ikeda I, Hara T.	Development of Kawasaki disease in a patient with PFAPA	Pediatrics International	55(6)	801-802	2013
Fukazawa M, Hoshina T, Nanishi E, Nishio H, Doi T, Ohga S, Hara T.	Neonatal hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with a vertical transmission of coxsackievirus B1	J Infect Chemother	19(6)	1210-1213	2013
Higuchi Y, Shimizu J, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Takada H, Ishimura M, Hara T, Ohara O, Asagoe K, Kubo T.	The identification of a novel splicing mutation in C1qB in a Japanese family with C1q deficiency: a case report.	Pediatr Rheumatol Online J.	11(1)	41	2013
Obinata K, Lee T, Niizuma T, Kinoshita K, Shimizu T, Hoshina T, Sasaki Y, Hara T.	Two cases of partial dominant interferon- $\gamma$ receptor 1 deficiency that presented with different clinical courses of bacille Calmette-Guérin multiple osteomyelitis.	J Infect Chemother.	19	757-60	2013

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
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
Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito M, 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
Miyauchi J, Kawaguchi H.	Fetal liver stromal cells support blast growth in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome through GM-CSF	Journal of Cellular Biochemistry	in press		
Machida S, Tomizawa D, Tamaichi H, Okawa T, Endo A, Imai K, Nagasawa M, Morio T, Mizutani S, Takagi M.	Successful Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Patient With Ataxia Telangiectasia Using Rituximab	J Pediatr Hematol Oncol	in press		
Shiba N, Funato M, Ohki K, Park MJ, Mizushima Y, Adachi S, Kobayashi M, Kinoshita A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y.	Mutations of the GATA2 and CEBPA genes in paediatric acute myeloid leukaemia.	Br J Haematol.	in press		
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, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant V, Kong X, Crypwy S, Dupuis S, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M.	Simple diagnosis of <i>STAT1</i> gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis.	J Leukoc Biol.	in press		
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 leukemia who developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology (JSPHO).	Brit. J. Haematol.	in press		

## 雑誌（和文）

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
斎藤潤、中畑龍俊	疾患特異的 iPS 細胞	再生医療	12(1)	19-29	2013
山口博樹	テロメア病	血液フロンティア	23(6)	816-820	2013
中村和洋, 小林正夫	新生児同種免疫性好中球減少症	臨床免疫・アレルギー科	60	78-82	2013
波多野 修一, 駒澤克孝, 西村 真一郎, 藤江 篤志, 大野 令央義, 川口 浩史, 小林 正夫, 高尾 信一	マイコプラズマ感染症検査法の検討 マイコプラズマ抗原迅速診断キットの有用性について	小児科臨床	66	2105-2115	2013
下村 麻衣子, 千々松 郁枝, 浅野 孝基, 古江 綾, 三木 瑞香, 川口 浩史, 中村 和洋, 小林 正夫	慢性肉芽腫症における消化管病変	広島医学	66	473-474	2013
高坂 卓馬, 秀 道広, 小林 正夫	Omenn 症候群の 1 例	西日本皮膚科	75	269	2013
唐川 修平, 中村 和洋, 小林 正夫	【クローズアップ 新しい子どもの病気】血液腫瘍疾患 新しい診断技術で診断可能となった疾患 好中球減少症 遺伝子変異と抗好中球抗体	小児内科	45	1131-1133	2013
三木 瑞香, 小林 正夫	【クローズアップ 負荷試験の実際 2013】血液系機能検査 好中球減少症の負荷試験	小児内科	45	989-991	2013
平田 修, 小林 正夫	【血液症候群(第 2 版)-その他の血液疾患を含めて-】リンパ球の異常 リンパ球機能異常と類縁疾患 原発性免疫不全症候群 単独 IgG サブクラス欠損症	日本臨床別冊血液症候群 第 2 版 II		250-253	2013
早川 誠一, 小林 正夫	【血液症候群(第 2 版)-その他の血液疾患を含めて-】リンパ球の異常 リンパ球機能異常と類縁疾患 原発性免疫不全症候群 IgM 単独(選択的)欠損症	日本臨床別冊血液症候群 第 2 版 II		246-249	2013
平田 修, 小林 正夫	【血液症候群(第 2 版)-その他の血液疾患を含めて-】リンパ球の異常 リンパ球機能異常と類縁疾患 原発性免疫不全症候群 選択的 IgA 欠損症	日本臨床別冊血液症候群 第 2 版 II		242-245	2013
平田 修, 中村 和洋, 小林 正夫	【血液症候群(第 2 版)-その他の血液疾患を含めて-】白血球(顆粒球)の異常(悪性腫瘍を除く) 好中球の異常 好中球減少症 周期性好中球減少症	日本臨床別冊血液症候群 第 2 版 II		57-60	2013
唐川 修平, 中村 和洋, 小林 正夫	【血液症候群(第 2 版)-その他の血液疾患を含めて-】白血球(顆粒球)の異常(悪性腫瘍を除く) 好中球の異常 好中球減少症 自己免疫性好中球減少症	日本臨床別冊血液症候群 第 2 版 II		54-56	2013



発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
溝口 洋子, 中村 和洋, 小林 正夫	【血液症候群(第2版)-その他の血液疾患を含めて-】白血球(顆粒球)の異常(悪性腫瘍を除く) 好中球の異常 好中球減少症 同種免疫性好中球減少症	日本臨床別冊血液症候群 第2版II		50-53	2013
唐川 修平, 小林 正夫	【知っておきたい最新の免疫不全症分類-診断から治療まで】治療 原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植	小児科診療	76	476-480	2013
宮地 隆史, 丸山 博文, 小林 正夫, 松本 昌泰	【クローズアップ 呼吸管理】<在宅呼吸ケア> 在宅人工呼吸器装着者の災害時対策	小児内科	45	116-120	2013
今井 耕輔	免疫グロブリンクラススイッチ異常症(高IgM症候群)	日本臨床	別冊	237-241	2013
高木 正稔, 今井 耕輔, 森尾 友宏, 水谷 修紀	原発性免疫不全症候群関連の免疫性血小板減少症	Rinsho Ketsueki	54	357-364	2013
原 寿郎	2.幹細胞異常と内科系疾患、現状と展望 1)造血幹細胞の異常:先天性免疫不全症	日本内科学会雑誌	102(9)	2255-2261	2013
原 寿郎	小児感染・免疫疾患の発症におけるヒト-環境相互作用	小児感染免疫	25(1)	41-53	2013
原 寿郎	シリーズ小児医療第6回 原発性免疫不全症研究:最新の進歩	あいみっく	34(3)	50-5	2013
原 寿郎	こどもの発熱の原因とその対処法	ふたば	77	18-24	2013
戸田 尚子, 原 寿郎	2.疾患と栄養 先天性免疫不全症と低栄養	臨床栄養		印刷中	2014

## 書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	ページ	出版年
原 寿郎	第1章:血液系疾患の医療 ニーズ 第3節 原発性免疫不全症候群		希少疾患 / 難病の 診断・治療と製品開発	(株)技術 情報協会	東京	593-610	2013
原 寿郎	免疫疾患	原 寿郎/高 橋孝雄/細 井 創	標準小児科学 第8 版	医学書院	東京	258-279	2014
原 寿郎	原発性免疫不全症候群 Primary immunodeficiency syndrome	福井次矢/ 高木 誠/小 室一成	今日の治療指針 2014年版 - 私はこ う治療している	医学書院	東京	1270-127 1	2014