

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07847

研究課題名（和文）ゲノム編集技術を用いた先天性好中球減少症の病態解析と治療開発

研究課題名（英文）Gene editing for the study of severe congenital neutropenia

研究代表者

小林 正夫（Kobayashi, Masao）

広島大学・医系科学研究科（医）・名誉教授

研究者番号：00162016

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：先天性好中球減少症（SCN）は種々の遺伝子異常で発症する多様な疾患群であり、責任遺伝子と病態との関係の詳細が明らかでない。最も頻度の高い好中球エラスターゼ遺伝子変異SCNの病態解明を、患者由来のiPS細胞の樹立後、骨髄顆粒球系細胞への分化誘導を行い、前骨髄球での早期アポトーシス細胞の増加を明らかとした。患者骨髄での成熟障害に一致する所見であった。遺伝子編集から、好中球エラスターゼをノックアウトすることで、正常人由来iPSと同様に、好中球への分化が認められたことから、変異エラスターゼが骨髄顆粒球系細胞の増殖分化を阻害することが、本症の病因として重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性好中球減少症は病因、治療法が確立されていない遺伝性希少疾患である。現段階における唯一の根治療法は造血幹細胞移植であるが、疾患の病因を解明することで、新規治療法の開発が可能となる。本研究は、患者さんの骨髄細胞から樹立した疾患特異的iPS細胞を樹立し、遺伝子編集技術を応用してその病因解析と治療法開発を目的とした。患者さんからの骨髄細胞を用いた研究には限界があり、疾患特異的iPS細胞の樹立と利用は研究範囲の拡大に繋がる。また、遺伝子編集技術は根治療法の開発の可能性ももたらすことから、本研究の手法は多くの遺伝性疾患の病因解析、治療開発に有用な研究手段であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Severe congenital neutropenia (SCN) consists of several gene mutations. In this study, iPS cells were established from SCN patients with neutrophil elastase (ELANE) gene mutation. The iPS-SCN differentiated into myeloid cell showed the increase of early apoptotic cells, suggesting the maturation arrest of promyelocytes-myelocytes of bone marrow in SCN patients. When ELANE was knocked-out by gene editing technique, normal neutrophil maturation was observed in iPS-SCN as well as in normal iPS. These results suggest that abnormal ELANE in myeloid cells may play an important role in disturbing the proliferation and maturation of myeloid cells to neutrophils.

研究分野：小児血液

キーワード：好中球減少症 iPS細胞 遺伝子編集 好中球エラスターゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食細胞異常の先天性好中球減少症 (SCN) は種々の遺伝子異常で発症する多様な疾患群であり、責任遺伝子と病態との関係の詳細が明らかでない。最も頻度の高い好中球エラスターゼ遺伝子 (*ELANE*) 変異が同定される SCN においても、*ELANE* 変異が骨髄系細胞の成熟障害にいたる機序は不明である。患者さんからの骨髄検体だけでは十分な解析が不可能であることも研究が進まない一因であるため、患者骨髄細胞から、疾患特異的 iPS 細胞 (SCN-iPS) を樹立し、iPS 細胞からの造血系、骨髄顆粒球系、好中球分化への培養技術を導入し、正常人から樹立した iPS 細胞 (正常 iPS) との比較検討から病態解析を施行している。本研究では樹立 iPS 細胞に対して、ゲノム編集技術を導入することで、疾患の病態モデルを iPS 細胞から作成し、SCN 患者骨髄細胞で認められている知見と同様な結果を得ることが可能となれば、*in vitro*での解析が急速に進展すると考えている。ゲノム編集技術の iPS 細胞への導入は、本対象疾患のみならず、遺伝性 (先天性) 血液、免疫系疾患の病態解析に発展させることが可能となり、応用範囲の広い研究技法である。

2. 研究の目的

ゲノム編集技術と疾患特異的 iPS 細胞を利用し、疾患責任遺伝子を正常 iPS に導入することで、疾患の病態モデルを iPS 細胞から作成し、病因、病態解析を進めることである。同定されている遺伝子変異と病態との関係を *in vitro*で証明し、SCN では主として骨髄前駆細胞レベルでの成熟障害が好中球減少の本質と考えられているので、骨髄顆粒球系細胞の増殖・分化の培養から、病態の反映を試みる。同時に、健常人由来と患者由来 iPS での差異を明らかとし、細胞死 (細胞寿命) に関する検討を行う。従来の患者骨髄細胞からではサンプル採取に限界があり、網羅的解析が不可能であったので、正常 iPS、患者 iPS、変異導入 iPS 細胞を比較することが可能となる。

また、iPS 細胞を利用したゲノム編集技術の導入と確立から、ゲノム編集の標的細胞を造血幹細胞レベルで実現することである。先天性骨髄不全症、ならびに原発性免疫不全症では造血幹細胞移植が根治療法として利用されているが、造血幹細胞レベルでのゲノム編集が可能となると、造血幹細胞移植に代わる根治療法として、新しい遺伝子修復技術を用いた、新規自家細胞移植療法に発展させることが可能になると考えられる。

3. 研究の方法

上記の研究遂行にあたっての具体的研究方法は以下に示す。すべて樹立されている正常 iPS ならびに SCN-iPS を利用する。

iPS 細胞の造血系、骨髄顆粒球系、好中球系への *in vitro*での培養系の確立:すでに培養系に必要なサイトカインあるいは feeder 細胞の必要性は検討済みであり、安定した培養系を樹立することである。

正常 iPS に対して患者由来 *ELANE* 変異をゲノム編集し、導入:ゲノム編集は Crisper-cas9 系と TALEN 系で試みており、同時に SCN-iPS に対しても修復ゲノムの導入を行う。

上記で編集された iPS 細胞での骨髄顆粒球系細胞の増殖分化能と好中球産生能を詳細に検討する。変異導入正常 iPS 細胞からの、患者骨髄で認められている成熟障害の再現とゲノム編集で修正された SCN-iPS での正常に近い好中球産生を確認する。

変異導入正常 iPS 細胞からの骨髄顆粒球系前駆細胞を FACSaria でソーティング、enrich、

RNA sequence にて、遺伝子発現を網羅的に解析し、標的遺伝子あるいは分子を抽出する。これらの標的分子と好中球エラスターゼとの関係を検討し、増殖分化能、細胞生存に必須な分子の絞り込みと、これらの分子の好中球産生に対する役割を検討する。

正常骨髄 CD34 陽性細胞に対してゲノム編集での変異遺伝子導入と患者由来骨髄 CD34 陽性細胞に対してゲノム編集での遺伝子修復を行う。両者の細胞を *in vitro* での骨髄顆粒球系細胞の増殖分化、好中球産生を検討することで、SCN の病態の再現と、SCN での成熟障害の改善を検証する。

4. 研究成果

正常人ならびに先天性好中球減少症患者の骨髄細胞から、iPS 細胞を樹立し、造血幹細胞から骨髄顆粒球系細胞への分化の検討を行った。各種サイトカインと feeder 細胞の有無を検討し、骨髄顆粒球系細胞の各分化段階における細胞を FACS Aria でソートを行い、細胞表面分子マーカーを解析することで、健常人と患者由来 iPS 細胞での比較検討をした。成熟障害を示す、患者由来 iPS 細胞では分化が不十分であることと細胞表面分子の発現に差が認められた。

骨髄顆粒球系分化段階における細胞群における細胞死の検討を行った。細胞死マーカーである Annexin V と PI 染色から各分化段階にある細胞を FACS にてソート後染色を行い、その頻度を比較した。SCN 由来骨髄顆粒球系前駆細胞では正常人と比較して有意に早期アポトーシス細胞の割合が増加していた。この事実は、患者骨髄で認められる前骨髄球と骨髄球間での成熟障害に一致した所見であることから、SCN の病態の一部が骨髄顆粒球系細胞、特に前骨髄球の細胞寿命の短縮に起因していることが推測された。同時に、iPS 細胞からの細胞分化、培養系において、患者骨髄所見の反映が可能であることが明らかとなり、SCN 患者由来の iPS 細胞を疾患特異的 iPS 細胞として種々の面で利用できる可能性が示唆された。

次に、SCN 由来 iPS 細胞をゲノム編集技術から、*ELANE* を完全にノックアウトした細胞を作製し、上記と同様な解析を行ったところ、患者由来細胞において、正常人由来細胞とほぼ同等な増殖分化が認められた。また正常人由来細胞においても *ELANE* ノックアウトにより、好中球減少が認められない事実が報告されており、*ELANE* 変異 SCN における好中球減少の原因として、変異好中球エラスターゼが異常な蛋白分解を促進し、早期細胞死を誘導している可能性が示唆された。現在、変異好中球エラスターゼの標的となる蛋白とその分解機序の解明に取り組んでいる。これらの結果から、患者骨髄細胞の分化、細胞寿命に必須の蛋白が変異エラスターゼによる過剰分解された結果、細胞死が促進される可能性が推測されることから、骨髄顆粒球系細胞分化に必須の蛋白同定が可能となるであろう。この蛋白同定は骨髄顆粒球系細胞の増殖分化に利用でき、好中球減少症の治療薬開発に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura-Utsunomiya A, Tsumura M, Okada S, Kawaguchi H, Kobayashi M	4. 巻 15
2. 論文標題 Downregulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and endothelin-1 (ET-1) in a co-culture system with human stimulated X-linked CGD neutrophils.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0230665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tamura M, Satoh-Takayama N, Tsumura M, Sasaki T, Goda S, Kageyama T, Hayakawa S, Kimura S, Asano T, Nakayama M, Koseki H, Ohara O, Okada S, Ohno H, Kobayashi M	4. 巻 32
2. 論文標題 Human gain-of-function STAT1 mutation disturbs IL-18 immunity in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 259-272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kajiume T, Kobayashi M	4. 巻 4
2. 論文標題 Human granulocytes undergo cell death via autophagy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death Discov	6. 最初と最後の頁 111-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-018-0131-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okada S, Asano T, Moriya K, Boisson-Dupuis S, Kobayashi M, Casanova JL, Puel A	4. 巻 40
2. 論文標題 Human STAT1 Gain-of-Function Heterozygous Mutations: Chronic Mucocutaneous Candidiasis and Type I Interferonopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1065-1081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10875-020-00847-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yanagimachi M, Kato K, Iguchi A, Sasaki K, Kiyotani C, Koh K, Koike T, Sano H, Shigemura T, Muramatsu H, Okada K, Inoue M, Tabuchi K, Nishimura T, Mizukami T, Nuno H, Imai K, Kobayashi M, Morio T	4. 巻 11
2. 論文標題 Hematopoietic Cell Transplantation for Chronic Granulomatous Disease in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontier Immunology	6. 最初と最後の頁 1617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.01617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Risa Matsumura, Shiho Nishimura, Yoko Mizoguchi, Mizuka Miki, Maki Taniguchi, Maiko Shimomura, Shuhei Karakawa, Shinji Mochizuki, Takehiko Doi, Hiroshi Kawaguchi, and Masao Kobayashi
2. 発表標題 Successful Bone Marrow Transplantation Using an Immunomyelosuppressive Conditioning in Patients with Severe Congenital Neutropenia: The Results of a Single-Institute.
3. 学会等名 The 61st Annual Meeting and Exposition of American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小林正夫 (一部執筆)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 1817-1819
3. 書名 新臨床内科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	津村 弥来 (Tsumura Miyuki) (80646274)	広島大学・医系科学研究科(医)・研究員 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------