

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293250

研究課題名(和文) 先天性免疫不全症由来iPS細胞を用いた新規免疫系細胞分化因子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel differentiation factors in immune system using iPS cells derived from primary immunodeficiencies.

研究代表者

野々山 恵章 (NONOYAMA, Shigeaki)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・その他部局等・教授)

研究者番号：40280961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：先天性免疫不全症である細網異形成症、GATA2欠損症、Wiskott-Aldrich症候群、Chediak-東症候群の患者由来iPS細胞を樹立した。これらの疾患由来iPS細胞の分化障害を、*in vitro* 分化系を用いて検討した。その結果、細網異形成症では血液前駆細胞の代謝障害があること、GATA2欠損症では造血幹細胞への分化障害があること、Wiskott-Aldrich症候群では血小板への分化障害があることを明らかにした。また、iPS細胞の遺伝子変異をゲノム編集により正常化して分化が正常化させ、RNA Seq.を行いmRNA発現が異なる遺伝子群を見出し、分化因子の同定に向けた実績をあげた。

研究成果の概要(英文)：iPS cells derived from patients with primary immunodeficiencies were established including GATA 2 deficiency, Wiskott-Aldrich syndrome, Chediak-Higashi syndrome, and Reticular Dysgenesis. Differentiation defects of iPS cells derived from the diseases were examined using an *in vitro* differentiation system. It was found that GATA 2 deficiency has impaired differentiation into hematopoietic progenitor cells, Wiskott-Aldrich syndrome has impaired differentiation into platelets, and Reticular Dysgenesis has impaired metabolism in hematopoietic progenitor cells. The causative gene mutations were corrected in iPS cells by genome editing, and RNA sequence was performed during differentiation process. A group of genes differently expressed were found. This result gives important clues for identification of differentiation factors.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 発生・分化 移植・再生医療 細胞・組織 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ヒト先天性免疫不全症(PID)では様々な種類の血液免疫系細胞の完全欠損がある。原因遺伝子の機能から分化障害によると想定される疾患群がある。全 Exome 解析により、PID の原因遺伝子が同定されてきた。しかし、原因遺伝子の機能欠損が、なぜ免疫細胞の分化異常を起こすかについては、分化因子の発現障害が想定されているが、いまだ明らかでない。PID は単一遺伝子異常で起きていて、かつ疾患ごとに分化障害を起こしている細胞が明確であるので、分化因子同定に最も適している。

そこで、疾患由来 iPS 細胞を樹立し、in vitro 分化系を用いて解析することで、分化因子同定に大きな貢献ができると考え、本研究を行った。

2. 研究の目的

先天性免疫不全症で欠損している血液免疫系細胞の分化障害の病態を解析し、新規分化因子を同定する事を目的とする。

3. 研究の方法

- 1) 血液免疫系細胞の欠損がある先天性免疫不全症患者から疾患由来 iPS 細胞を樹立する。
- 2) 疾患由来 iPS 細胞から血液前駆細胞、さらに各系統の血液免疫系細胞に in vitro で分化させる。樹立した iPS 細胞で原因遺伝子の変異をゲノム編集で正常化し、分化の正常を検討する。
- 3) 2)で分化させた細胞から、分化途上の細胞を分取し、RNA sequence・メタボローム解析・メチローム解析を行う。疾患由来 iPS 細胞から分化させた群と、正常 iPS 細胞およびゲノム編集により原因遺伝子を正常化した iPS 細胞から分化させた群を比較し、発現が変化している分子を同定する。

4. 研究成果

先天性免疫不全症患者由来 iPS 細胞を、細網異形成症、GATA2 欠損症、Wiskott-Aldrich 症候群、Chediak-東症候群で樹立した。

iPS 細胞から、血液前駆細胞、血液免疫系細胞への分化系を確立した。iPS 細胞から血液前駆細胞への分化は、10T1/2 フィーダー細胞と VEGF を用いる確立した方法で行った。造血幹細胞から T 細胞への分化は、10T1/2 と OP9 フィーダー細胞とサイトカインカクテルと培養する方法で行った。樹状細胞には、SCF, FL3, M-CSF, TPO などを加えた培養に続き、

GM-CSF, TNF- α , LPS などを加えた培養を行って分化させた。好中球には、SCF, IL-3, TPO, FL3 などを加えた培養により分化させた。巨核球、血小板は、TPO, SCF などを加えて培養することで分化させた。

疾患由来 iPS 細胞と in vitro 分化系を用い、分化障害を検討した。その結果、細網異形成症では iPS 細胞から分化させた血液前駆細胞の代謝障害があること、GATA2 欠損症では iPS 細胞から造血幹細胞への分化障害があること、Wiskott-Aldrich 症候群では iPS 細胞から血小板への分化障害があることを示した。

また、ヒト GATA2 欠損症由来 iPS 細胞の GATA2 遺伝子変異を TALEN のシステムを用いたゲノム編集により正常化すると、iPS 細胞からの造血前駆細胞への分化が正常化した。GATA2 変異のある iPS 細胞と、変異を修復した iPS 細胞を造血前駆細胞に分化させた。細胞を分化段階に応じて、CD34-群、CD34+CD43-群、CD34+CD43+CD45-群、CD34+CD42+CD45+群にそれぞれ分取した。分取した細胞を用いて RNA Seq. を行い、GATA2 変異のあるなしで mRNA 発現が異なる遺伝子群を同定した。これにより、GATA2 が転写する分化因子の同定における重要なデータを得た。

以上、先天性免疫不全症由来 iPS 細胞を用い、血液免疫系細胞の分化障害の病態解明および分化因子の同定に成果をあげた。

5. 主な発表論文等

1. Hoshino A, Okada S, Yoshida K, Nishida N, Okuno Y, Ueno H, Yamashita M, Okano T, Tsumura M, Nishimura S, Sakata S, Kobayashi M, Nakamura H, Kamizono J, Mitsui-Sekinaka K, Ichimura T, Ohga S, Nakazawa Y, Takagi M, Imai K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Nonoyama S, Morio T, Kanegane H, Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in humans with germline IKZF1 mutations. **J Allergy Clin Immunol**. 2017 (in press).

2. Cantaert T, Schickel J, Bannock, Ng Y, Massad C, Delmotte F, Yamakawa N, Glauzy S, Chamberlain N, Kinnunen T, Menard L, Lavoie A, Walter J, Notarangelo L, Bruneau J, Al-Herz W, Kilic S, Ochs H, Cunningham-Rundles C, Burg M, Kuijpers T, Kracker S, Kaneko H, Sekinaka Y, Nonoyama S, Durandy A, and Meffre E.

Decreased somatic hypermutation induces an impaired peripheral B cell tolerance checkpoint. *J Clin Invest.* 2016, 126: 4289-4302.

3. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, Espinosa Rosales FJ, Hammarström L, Nonoyama S, Quinti I, Routes JM, Tang ML, Warnatz K. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016, 4:38-59.

4. Tsujita Y, Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Yeh TW, Mitsuiki N, Asano T, Ohnishi H, Kato Z, Sekinaka Y, Zaha K, Kato T, Okano T, Takashima T, Kobayashi K, Kimura M, Kunitsu T, Maruo Y, Kanegane H, Takagi M, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Ohara O, Okada S, Kobayashi M, Morio T, Nonoyama S. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause activated phosphatidylinositol 3-kinase δ syndrome-like immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2016, 138:1672-1680.e10.

5. Oshima K, Imai K, Albert M.H, Bittner T.C, Strauss G, Filipovich A.H, Morio T, Kapoor N, Dalal J, Schultz K.R, Casper J.T, Notarangelo L.D, Ochs H.D, Nonoyama S. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for X-Linked Thrombocytopenia With Mutations in the WAS gene. *J Clin Immunol.* 2015, 35:15-21.

6. Kato T, Crestani E, Kamae C, Honma K, Yokosuka T, Ikegawa T, Nishida N, Kanegane H, Wada T, Yachie A, Ohara O, Morio T, Notarangelo L.D, Imai K, Nonoyama S. RAG1 deficiency may present clinically as selective IgA deficiency. *J Clin Immunol.* 2015, 35:280-288.

7. Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Sato H, Tomizawa D, Kajiwaru M, Nagasawa M, Morio T, Nonoyama S. Clinical features and hematopoietic stem cell transplantations for CD40 ligand deficiency in Japan. *J*

Allergy Clin Immunol. 2015, 136:1018-1024.

8. Ma CS, Wong N, Rao G, Avery DT, Torpy J, Hambridge T, Bustamante J, Okada S, Stoddard JL, Deenick EK, Pelham SJ, Payne K, Boisson-Dupuis S, Puel A, Kobayashi M, Arkwright PD, Kilic SS, El Baghdadi J, Nonoyama S, Minegishi Y, Mahdavian SA, Mansouri D, Bousfiha A, Blincoe AK, French MA, Hsu P, Campbell DE, Stormon MO, Wong M, Adelstein S, Smart JM, Fulcher DA, Cook MC, Phan TG, Stepensky P, Boztug K, Kansu A, İkinçioğullari A, Baumann U, Beier R, Roscioli T, Ziegler JB, Gray P, Picard C, Grimbacher B, Warnatz K, Holland SM, Casanova JL, Uzel G, Tangye SG. Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2015, 136:993-1006.

9. Kreins A.Y, Ciancanelli M.J, Okada S, Kong X, Ramirez-Alejo N, Kilic S.S, Baghdadi J.E, Nonoyama S, Mahdavian S.A, Ailal F, Bousfiha A, Mansouri D, Nievas E, Ma C.S, Rao G, Bernasconi A, Kuehn H.S, Niemela J, Stoddard J, Deveau P, Cobat A, Azbaoui S.E, Sabri A, Lim C.K, Sundin M, Avery D.T, Halwani R, Grant A.V, Boisson B, Bogunovic D, Itan Y, Moncada-Velez M, Martinez-Barricarte R, Migaud M, Deswarte C, Alsina L, Kotlarz D, Klein C, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Cormier-Daire V, Rose-John S, Picard C, Hammarstrom L, Puel A, Al-Muhsen S, Abel L, Chaussabel D, Rosenzweig S.D, Minegishi Y, Tangye S.G, Bustamante J, Casanova JL, and Boisson-Dupuis S. Human TYK2 deficiency: Mycobacterial and viral infections without hyper-IgE syndrome. *J Exp Med.* 2015, 212:1641-1662.

10. Cantaert T, Schickel JN, Bannock JM, Ng YS, Massad C, Oe T, Wu R, Lavoie A, Walter JE, Notarangelo LD, Al-Herz W, Kilic SS, Ochs HD, Nonoyama S, Durandy A, Meffre E. Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in Human B Cell

Precursors Is Essential for Central B Cell Tolerance. **Immunity**. 2015, 17:43:884-95.

11. 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, Mitsui 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**. 2014, 34:58-67.

12. Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Hu W, Kobayashi M, Lawo JP, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T. Efficacy and Safety of IgPro20, a Subcutaneous Immunoglobulin, in Japanese Patients with Primary Immunodeficiency Diseases. **J Clin Immunol**. 2014, 34:204-211.

13. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Bobby Gaspar H, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD, Oksenhandler E, Picard C, Puck JM, Sullivan KE, Tang ML. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. **Front Immunol**. 2014, 5:162.

14. Horiuchi K, Imai K, Mitsui-Sekinaka K, Yeh ZW, Ochs HD, Durandy A, Nonoyama S. Analysis of somatic hypermutation in the IgM switch region in human B cells. **J Allergy Clin Immunol**. 2014, 134:411-419.

15. Nakatani K, Imai K, Shigeno M, Sato H, Tezuka M, Okawa T, Mitsui N, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Nagasawa M, Kajiwara M, Yamamoto M, Arai A, Miura O, Kamae C, Nakagawa N, Honma K, Nonoyama S, Mizutani S, Morio T. Cord blood transplantation is associated with rapid B cell neogenesis compared with bone marrow transplantation. **Bone Marrow**

Transplant. 2014, 49:1155-1161.

16. Saikia B, Suri D, Goel S, Rawat A, Minz RW, Gupta A, Sharma S, Ohara O, Imai K, Nonoyama S, Sehgal S, Singh S. Hyper-IgE syndrome with a novel STAT3 mutation-a single center study from India. **Asian Pac J Allergy Immunol**. 2014, 32:321-327.

17. Routes J, Abinun M, Al-Herz W, Bustamante J, Condino-Neto A, Morena M, Etzioni A, Gambineri E, Haddad E, Kobrynski L, Deist FL, Nonoyama S, Oliveira JB, Perez E, Picard C, Rezaei N, Sleasman J, Torgerson T. The Early Diagnosis of Congenital Immunodeficiencies. **J Clin Immunol**. 2014, 34:398-424.

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

免疫不全症データベース(PIDJ)

URL : <http://pidj.rcai.riken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野々山 恵章 (NONOYAMA, Shigeaki)
防衛医科大学校小児科学講座・教授
研究者番号 : 40280961

(2) 研究分担者

今井 耕輔 (IMAI Kousuke)
東京医科歯科大学大学院小児・周産期地域
医療学講座寄付講座・准教授
研究者番号 : 90332626