

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670501

研究課題名(和文) iPS細胞とヒト疾患モデルマウスを用いたSTAT1シグナル異常症の病態解析

研究課題名(英文) Analysis of abnormal STAT1 disorders using disease-specific iPS cells.

研究代表者

小林 正夫 (Kobayashi, Masao)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：00162016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子STAT1異常症には機能喪失型と機能獲得型の両方の変異が存在し、それぞれ異なった表現型を示す。本研究は両者から疾患特異的iPS細胞を樹立し、iPS細胞を造血系から単球へ分化させて機能解析を試みた。分化単球ではIFN γ 刺激でSTAT1分子のリン酸化異常を確認することは可能であったが、転写活性の変化までの結果を導くことは現段階では不可能であった。患者細胞とiPS細胞での分化した細胞で十分に病態を反映できるのか、細胞分化技術を含めて検討が必要である。今後、疾患特異的iPS細胞の病態解明への応用を確立していく予定である。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated the establishment of the disease-specific iPS cells from patients with STAT1 abnormalities which consist of loss of function (LOF) and gain of function (GOF). Monocytes were differentiated derived from STAT1-LOF iPS cells presented the abnormal phosphorylation of STAT1 in response to IFN γ . However, the change of transcriptional activity was not observed in monocytes derived from iPS cells. Osteoclasts were differentiated from bone marrow cells in patients with STAT1-LOF. The number and the activity of osteoclasts in STAT1-LOF patients were prominent, resulting in the excessive bone absorption in patients. Similar abnormality was confirmed by monocytes derived from iPS cells. These results suggest that the disease-specific iPS cells from patients with STAT1 abnormalities may be useful for the analysis of pathogenesis of STAT1-LOF and STAT1-GOF.

研究分野：小児科学，血液学，免疫学

キーワード：STAT1 iPS細胞 単球機能 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

STAT1 異常症には機能喪失型と機能獲得型変異があり、異なった表現型を示すことから、遺伝子検査とともに病態解析が極めて重要である。しかし、食細胞、免疫系細胞や組織、骨組織等、患者さんから入手できる生体資料に限りがある場合や、組織や細胞が入手出来ない臓器の場合には病態解析が不可能である。

2. 研究の目的

本研究では疾患特異的 iPS 細胞の樹立と免疫不全マウスを用いたヒト化疾患モデルマウスを作製、*in vitro*、*in vivo* において、疾患のなるべく生体に近いレベルでの解析を可能とし、病態解析を行う。

3. 研究の方法

- ・疾患特異的 iPS 細胞の樹立と造血細胞系、特に単球・マクロファージへの分化
- ・分化した細胞と患者から得られた機能解析との比較
- ・ヒト化モデルマウスの作製と解析

4. 研究成果

分化単球では IFN 刺激で STAT1 分子のリン酸化異常を確認することは可能であったが、転写活性の変化までの結果を導くことは現段階では不可能であった。患者細胞と iPS 細胞での分化した細胞で十分に病態を反映できるのか、細胞分化技術を含めて検討が必要である。今後、疾患特異的 iPS 細胞の病態解明への応用を確立していく予定である。また、患者骨髄細胞からの破骨細胞への分化を行い、機能喪失型での骨髄炎発症の機構の検討を行い、破骨細胞産生の亢進とその機能亢進を明らかにすることが出来、一部 iPS 細胞からの分化でも同様な所見を書くに出来ている。破骨細胞への分化と機能解析も可能と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 25 件)

1. Hayakawa S, Okada S, Tsumura M, Sakata S, Ueno Y, Imai K, Morio T, Ohara O, Chayama K, Kobayashi M: A patient with CTLA-4 haploinsufficiency presenting gastric cancer. *Journal of Clinical Immunology* 36: 28-32, 2016. (査読有り)

2. Okada S, Markle JG, Deenick EK, Mele F, Averbuch D, Lagos M, Alzahrani M, Al-Muhsen S, Halwani R, Ma CS, Wong N,

Soudais C, Henderson LA, Marzouqa H, Shamma J, Gonzalez M, Martinez-Barricarte R, Okada C, Avery DT, Latorre D, Deswarte C, Jabot-Hanin F, Torrado E, Fountain J, Belkadi A, Itan Y, Boisson S, Migaud M, Arlehamn CS, Sette A, Breton S, McCluskey J, Rossjohn J, de Villartay JP, Moshous D, Hambleton S, Latour S, Arkwright PD, Picard C, Lantz O, Engelhard D, Kobayashi M, Abel L, Cooper AM, Notarangelo LD, Boisson-Dupuis S, Puel A, Sallusto F, Bustamante J, Tangye SG, Casanova JL: Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science* 349: 606-13, 2015. (査読有り)

3. Wilson RP, Ives ML, Rao G, Lau A, Payne K, Kobayashi M, Arkwright PD, Peake J, Wong M, Adelstein S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Picard C, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Gray P, Stepensky P, Warnatz K, Freeman AF, Rossjohn J, McCluskey J, Holland SM, Casanova JL, Uzel G, Ma CS, Tangye SG, Deenick EK: STAT3 is a critical cell intrinsic regulator of human unconventional T cell numbers and function. *Journal of Experimental Medicine* 212: 855-64, 2015. (査読有り)

4. Yoshioka A, Ishii E, Ueno T, Usami I, Kobayashi M, Kobayashi R, Sotomatsu M, Shirahata A, Suzuki T, Taki M, Ishida Y, Matsushita T, Shima M, Nogami K, Sakai M, Kigasawa H, Hikutake K: The International Immune Tolerance Induction Study and its follow-up study on Japanese hemophilia A patients with inhibitors. *International Journal of Hematology* 101: 362-8, 2015. (査読有り)

5. Hirata O, Okada S, Tsumura M, Karakawa S, Matsumura I, Kimura Y, Maihara T, Yasunaga S, Takihara Y, Ohara O, Kobayashi M: Mosaicism of an ELANE mutation in an asymptomatic mother in a familial case of cyclic neutropenia. *Journal of Clinical Immunology* 35: 512-6, 2015. (査読有り)

6. 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, Baghdadi JE, Nonoyama S, Minegishi Y, Mahdvi 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, Ikinogullari A, Baumann U, Beier R, Roscioli T, Ziegler JB, Gray P, Picard C, Grimbacher B, Warnatz K, Holland SM, Casanova JL, Uzel G, Tangye S: Monogenic mutations differentially impact the quantity and quality of T follicular helper cells in human primary immunodeficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136: 993-1006, 2015. (査読有り)

7. Morishima T, Watanabe K, 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: 19-27, 2014. (査読有り)

8. 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, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M: Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Journal of Leukocyte Biology* 95: 667-676, 2014. (査読有り)

他 17 件

[学会発表](計 35 件)

1. Nishimura S, Tsumura M, Hirata O, Reiko Kagawa, Mizoguchi Y, Okada S, Kobayashi M: MSMD Patients with IFN- γ -STAT1 Signaling Defect Present Enhanced Osteoclastogenesis and Bone Resorption. The 57th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, USA, Dec 5-8. 2015.

2. Saito S, Nishimura S, Tsumura M, Mizoguchi Y, Sakata S, Furue A, Kobayashi M: A comparison of myelopoiesis from induced pluripotent stem cells with a mutation in *ELANE* between cyclic neutropenia and severe congenital neutropenia. The 57th American Society of

Hematology Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, USA, Dec 5-8. 2015.

3. Okada S, Markle J, Kobayashi M, Bustamante J, Casanova JL: Impairment of IL-17 immunity to *Candida* and IFN immunity to *Mycobacterium* in humans with bi-allelic *Rorc* mutations. The 57th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, USA, Dec 5-8. 2015.

4. Akari N, Utsunomiya, Miyuki Tsumura, Norioki Ohno, Mizuka Miki, Hiroshi Kawaguchi, Kazuhiro Nakamura and Masao Kobayashi: Excessive Nitric Oxide production of CGD neutrophils induces the down-regulation of *NOS3* and *EDN1* expression in human endothelial cells. The 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, USA, Dec 6 - 9, 2014

5. Yoko Mizoguchi, Satoshi Okada, Miyuki Tsumura, Osamu Hirata, Shizuko Minegishi, Jean-Laurent Casanova, Tomohiro Morio, Masao Kobayashi: *STAT1* gain-of-function in patients with chronic mucocutaneous candidiasis can be detected by the excessive phosphorylation of STAT1 in peripheral blood monocytes. The 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, USA, Dec 6 - 9, 2014

6. Seiich Hayakawa, Seiko Maeno, Norioki Ohno, Satoshi Okada, Yutaka Nishimura, Michiko Hayashidani, Masao Kobayashi: Significant augmentation of regulatory T cells in early neonatal period. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Prague, Czech, Oct 29 to Nov 1, 2014.

7. Yoko Mizoguchi, Aya Furue, Ikue Chijimatsu, Mizuka Miki, Keita Tomioka, Nakao Konishi, Atsushi Ono, Hiroshi Kawaguchi, Kazuhiro Nakamura and Masao Kobayashi: Early elimination of Factor VIII inhibitor by ITI with high dose immunoglobulin in hemophilia A children. WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA, 2014 World Congress, Melbourne, Australia, May 11-15, 2014.

他 28 件

〔図書〕(計 2 件)

1. 小林正夫 血球の形態・機能 白血球 (pp.18-20), 白血球の異常 好中球減少症 (pp. 395-399) 小児血液・腫瘍学 日本小児血液・がん学会編集 2015年10月 診断と治療社

2. 小林正夫 白血球機能異常症 (pp. 403-406) 原発性(先天性)免疫不全症(pp. 417-420)

カラーテキスト 血液病学 第2版 木崎昌弘 編著 中外医学社 2013年12月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 正夫 (Kobayashi Masao)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号: 00162016

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: