

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09655

研究課題名(和文) X連鎖劣性遺伝性疾患女性患者由来iPS細胞を用いたX染色体不活化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of pathophysiology of skewed X-chromosome inactivation in female patients with X-linked recessive hereditary disease using iPS cells

研究代表者

高田 英俊 (Takada, Hidetoshi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70294931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々が同定した女性のXLA、WAS患者でみられたX染色体の不活化(XCI)異常のメカニズムをiPS細胞を用いて解明し、XCI異常を修正する薬剤開発を行う研究を行った。iPS細胞に2種類の蛍光を発する遺伝子を組み込む事によって、フローサイトメーターでXCIを評価する方法を開発し、薬剤スクリーニングに応用可能である事がわかった。HD-Ad.AAVベクターを用いて、片方のX染色体に致死的な遺伝子変異をsite-specificに導入する事ができ、薬剤スクリーニングに利用できた。X染色体不活化偏倚の原因を解明するために、全エクソン解析、XCI領域の解析を行い、現在全ゲノム解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：This study was to identify the mechanism of skewed X chromosome inactivation (XCI) which was observed in female XLA and WAS, and to search the drug to treat abnormal XIC. We established a gene transduction method to induce 2 genes which emit 2 different types of fluorescence into iPS cells. By using this system, we could identify the type of XCI by flowcytometer and we found that this system was useful in drug screening. We established the HD-AdAAV gene editing system in which we could induce fatal gene mutation at specific sites, which we found useful in drug-screening. To analyze the mechanism of XCI skewing, we performed whole exon sequencing and genetic analysis of XCI region. We are now working on whole-genome sequencing.

研究分野：小児科学

キーワード：X染色体不活化 iPS細胞 X連鎖劣性遺伝性疾患 X連鎖無ガンマグロブリン血症 Wiskott-Aldrich症候群

1. 研究開始当初の背景

我々は世界で初めて女性のX連鎖無ガンマグロブリン血症(XLA)患者を同定した。この患者では、X染色体の不活化(XCI)が母由来のX染色体のみに起こっていることが分かった。同様の現象を女性のWiskott-Aldrich症候群患者で明らかにした。

2. 研究の目的

XCI異常の起こるメカニズムをiPS細胞を用いて解明し、XCI異常の治療のための薬剤スクリーニングを行うことを研究の目的とした。

3. 研究の方法

末梢血からiPS細胞を樹立した。X染色体不活化の状態を簡単に評価することが可能とする方法として、2種類の傾向を発する遺伝子をベクターに搭載しiPS細胞に導入する方法を用いた。薬剤スクリーニングのためのコントロールとして、X染色体の特定の部位に致死的な遺伝子変異を導入し、その具体的な遺伝子導入法として、HD-Ad.AAVベクターを用いた。X染色体不活化偏倚の原因を解明するために、患者の染色体解析および全エクソン解析、X染色体不活化に関連する領域であるXCI領域の遺伝子解析を行った。これを踏まえてX染色体を含めた全遺伝子の全ゲノム解析を行っている。

4. 研究成果

iPS細胞に2種類の蛍光を発する遺伝子を組み込むことによって、簡単にフローサイトメーターでX染色体不活化を評価するシステムを開発した。これをX染色体不活化異常を修正する薬剤のスクリーニング法に応用する研究を行った。また、新たな治療法として、片方のX染色体に致死的な遺伝子変異をsite-specificに導入する方法を試みた。HD-Ad.AAVベクターを用いて、目的的部位に遺伝子変異を誘導することができた。その遺伝子導入効率を向上させるために、CRISPR-Cas9システムを導入し、組み換えCas9タンパクを使用したり、オフターゲット効果をなくすような薬剤を使用して、正確かつ高率に遺伝子導入を達成することができた。女性XLA患者および女性WAS患者のX染色体不活化偏倚の原因を解明するために、患者さんの染色体解析および全エクソンを解析を行ったが、細胞の生存に必要な遺伝子異常などは見られなかった。さらに、X染色体不活化に関連する領域であるXCI領域にも異常を認めなかった。これを踏まえてX染色体を含めた全遺伝子の全ゲノム解析を行った。

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 13 件)

1. Eguchi K, Ishimura M, Sonoda M, Ono H, Shiraishi A, Kanno S, Koga Y, Takada H, Ohga S. Nontuberculous mycobacteria-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in MonoMAC syndrome. *Pediatr Blood Cancer* Mar 1. 2018 in press.
2. Nanishi E, Nishio H, Takada H, Yamamura K, Fukazawa M, Furuno K, Mizuno Y, Saigo K, Kadoya R, Ohbuchi N, Onoe Y, Yamashita H, Nakayama H, Hara T, Ohno T, Takahashi Y, Hatae K, Harada T, Shimose T, Kishimoto J, Ohga S, Hara T. Clarithromycin Plus Intravenous Immunoglobulin Therapy Can Reduce the Relapse Rate of Kawasaki Disease: A Phase 2, Open-Label, Randomized Control Study. *J Am Heart Assoc* Jul 6 2018, pii: e005370
3. Yokota S, Imagawa T, Nishikomori R, Takada H, Abrams K, Lheritier K, Heike T, Hara T. Long-term safety and efficacy of canakinumab in cryopyrin-associated periodic syndrome: results from an open-label, phase III pivotal study in Japanese patients. *Clin Exp Rheumatol* Nov-Dec;35 Suppl 108(6) 2017, 19-26
4. Kanegane H, Hoshino A, Okano T, Yasumi T, Wada T, Takada H, Okada S, Yamashita M, Yeh TW, Nishikomori R, Takagi M, Imai K, Ochs HD, Morio T. Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Allergol Int* Jul 3. pii: S1323-8930(17) 2017, 30067-9
5. Murata K, Motomura Y, Tanaka T, Kanno S, Yano T, Onimaru M, Shimoyama A, Nishio H, Sakai Y, Oh-Hora M, Hara H, Fukase K, Takada H, Masuda S, Ohga S, Yamasaki S, Hara T. Calcineurin inhibitors exacerbate coronary arteritis via the MyD88 signalling pathway in murine model of Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* Oct;190(1) 2017, 54-67
6. Kagawa R, Fujiki R, Tsumura M, Sakata S, Nishimura S, Itan Y, Kong XF, Kato Z, Ohnishi H, Hirata O, Saito S, Ikeda M, El Baghdadi J, Bousfiha A, Fujiwara K, Oleastro M, Yancoski J, Perez L, Danielian S, Ailal F, Takada H, Hara T, Puel A, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Okada S, Kobayashi M. Alanine-scanning mutagenesis of human signal transducer and activator of transcription 1 to estimate loss- or

- gain-of-function variants. J Allergy Clin Immunol Jul;140(1) 2017, 232-241
7. Hori M, Yasumi T, Shimodera S, Shibata H, Hiejima E, Izawa K, Oda H, Ishimura M, Nakano N, Shirakawa R, Nishikomori R, Takada H, Horiuchi H, Ohara O, Ishii E, Heike T. CD57+ CTL degranulation assay provides sensitive and specific detection of FHL3 patients. J Clin Immunol 37 2017, 92-99
 8. Ueki M, Yamada M, Ito K, Tozawa Y, Morino S, Horikoshi Y, Takada H, Abdrabou SSMA, Takezaki S, Kobayashi I, Ariga T. A heterozygous dominant-negative mutation in the coiled-coil domain of STAT1 is the cause of autosomal-dominant mendelian susceptibility to Mycobacterial disease. J Clin Immunol 174 2017, 24-31
 9. Teranishi H, Ishimura M, Koga Y, Eguchi K, Sonoda M, Kobayashi T, Shiraiishi S, Nakashima K, Ikegami K, Aman M, Yamamoto H, Takada H, Ohga S. Activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome presenting with gut-associated T-cell lymphoproliferative disease. Rinsho Ketsueki 58(1) 2017, 20-25
 10. Yamada T, Kubota T, Yonezawa M, Nishio H, Kanno S, Yano T, Kobayashi D, Egashira N, Takada H, Hara T, Masuda S. Evaluation of teicoplanin trough values after the recommended loading dose in children with associated safety analysis. Pediatr Infect Dis J Apr;36(4) 2017, 398-400
 11. 高田英俊 原発性免疫不全成人症例診療の問題点 小児感染免疫 29 (2) 2017, 177-182
 12. 高田英俊 日本小児感染症学会推薦総説. 感染症と原発性免疫不全症 日本小児科学会雑誌 121 (10) 2017, 1654-1661
 13. 高田英俊 原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植 血液内科 75 (4) 2017, 522-528

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Takada H, Ishimura M, Ohga S, Hara T. Insufficient immune reconstitution after allogeneic cord blood transplantation without chemotherapy conditioning in patients with severe combined immunodeficiency caused by CD3 δ deficiency. 13th Asian Society for Pediatric Research (国際学会) 2017
2. Takada H, Ishimura M, Toshiro Hara. Insufficient immune reconstitution after allogeneic cord blood transplantation without chemotherapy

- conditioning in patients with severe combined immunodeficiency caused by CD3 δ deficiency. The 8th Japanese Society of Hematology International Symposium (国際学会) 2017
3. Yamamoto H, Takada H, Ishimura M, Ochiai M, Hara T, Ohga S. BTK gene targeting by homologous recombination using a helper-dependent adenovirus/adenovirus-associated virus hybrid vector and CRISPR/Cas9 system. The 8th Japanese Society of Hematology International Symposium (国際学会) 2017
 4. Takada H. Defects in innate immunity and acquired immunity in humans and immunoglobulin therapy. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. (招待講演) 2017
 5. 高田英俊 免疫不全症患者への予防接種 第 21 回日本ワクチン学会 (招待講演) 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔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
 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 英俊 (Takada Hidetoshi)
 九州大学・医学研究院・教授
 研究者番号： 70294931

(2) 研究分担者

石村 匡崇 (Ishimura Masataka)
九州大学・医学研究院・助手
研究者番号： 10448417

田中 珠美 (Tanaka Tamami)
九州大学・医学研究院・学術研究員
研究者番号： 60423547

(3) 連携研究者
該当なし

(4) 研究協力者
該当なし