

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04874

研究課題名(和文) ゲノム修復とiPS細胞技術を併用した先天性食細胞異常症に対する遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a gene therapy for congenital phagocyte disorder using both genome editing and iPS cell technology

研究代表者

小池 健一 (Koike, Kenichi)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：40143979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：重症先天性好中球減少症由来iPS細胞の遺伝子編集実験と並行し、若年性骨髄単球性白血病患者(JMML)由来のiPS細胞を用いて遺伝子編集実験を行った。JMML患者からはPTPN11遺伝子変異を有するiPS細胞と野生型遺伝子のiPS細胞が樹立され、変異iPS細胞の方が明らかに高いCD34陽性細胞産生能を示した。ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いた相同組換えにより、変異iPS細胞におけるPTPN11変異の修復と野生型iPS細胞へのPTPN11変異の導入を行った。その結果、PTPN11変異を有するiPSCはOSBP2変異も共存していたが、PTPN11変異自体が造血異常に寄与していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：In parallel with genetic editing experiments of iPS cells established from a patient with ELANE-mutated severe congenital neutropenia, we performed genetic editing experiments on iPS cells derived from a patient with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). Both iPS cells with PTPN11 gene mutation and those with wild type of PTPN11 gene were established from a JMML patient. Mutant iPS cells possessed significantly higher ability to generate CD34 positive cells. In addition, whole-exome sequencing and Sanger sequencing revealed that JMML iPSCs with PTPN11 mutation possessed OSBP2 mutation, while JMML iPSCs with no PTPN11 mutation did not carry OSBP2 mutation. By homologous recombination using zinc finger nuclease, we corrected PTPN11 mutation in iPSCs with both PTPN11 mutation and OSBP2 mutation, and transduced PTPN11 mutation into JMML iPSCs with wild type of the two genes. The results suggest that PTPN11 mutation itself contributes to leukemogenesis of this patient.

研究分野：小児科学(血液腫瘍学)

キーワード：iPS細胞 ゲノム修飾 先天性好中球減少症 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

重症先天性好中球減少症 (SCN) 患者の末梢血 T 細胞のゲノムを改変し、induced pluripotent stem (iPS)細胞を樹立し、大量の造血幹細胞を誘導する方法を確立する。本来の遺伝子座位でのゲノム改変により遺伝子変異の確実な修復が可能なジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) と iPS 細胞技術を組み合わせることにより、安全性の高い遺伝子治療を開発する。

2. 研究の目的

1) SCN 患者の末梢血 T 細胞から樹立した iPS 細胞と *ELANE* 遺伝子変異を修復した iPS 細胞における造血幹細胞-好中球分化を比較する。
2) *G-CSF* 投与による最も重要な問題は骨髄異形成症候群 (MDS) 急性骨髄性白血病 (AML) への移行である。このため、本研究ではさらに *G-CSF receptor (G-CSFR)* 変異 +/- *RUNX1* 変異を SCN-iPS 細胞に導入し、CD34 陽性細胞の増殖分化能を正常 iPS 細胞と比較し、MDS・AML の発症メカニズムを解析する。

3. 研究の方法

1) SCN 患者の末梢血 T 細胞から樹立した iPS 細胞の造血幹細胞-好中球分化能を検討する。
2) *G-CSF receptor (G-CSFR)* 変異 +/- *RUNX1* 変異を SCN-iPS 細胞に導入する。
3) 上記の遺伝子編集実験と並行して、小児の MDS/MPN の中で最も多い病型で、SCN よりも CD34 陽性細胞増殖能が高い若年性骨髄単球性白血病 (JMML) 由来 iPS 細胞を用いて、ZFN による *PTPN11* 変異の正常遺伝子型へ修復し、修復・非修復 iPS 細胞の造血幹細胞産生能を比較する。

4. 研究成果

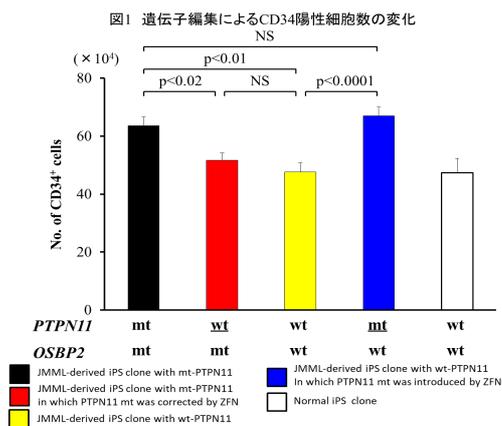
1) *ELANE* c.607G>C 変異を有する重症先天性好中球減少症 (SCN) 患者の末梢血 T 細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の cDNA をセンダイウイルスにより transfect し、iPS 細胞を作製した。

2) *ELANE*, *G-CSFR*, *RUNX1* 各遺伝子の変異を含む領域に特異的な ZFN 切断部位を同定した。その後、各遺伝子について、ZFN 切断部位を挟んで上流・下流にそれぞれ約 800bp の配列 (ホモロジーアーム) をサブクローニングし、両側のホモロジーアーム内に、mutagenesis 法を用いて 2 か所ずつ塩基置換を行った。さらに、ピューロマイシン耐性遺伝子配列を挿入し、鋳型となるドナープラスミドを作製した。

3) *PTPN11* 変異を有する JMML 由来 iPS 細胞関連の研究結果

SCN-iPS 細胞の遺伝子編集実験と並行しながら遺伝子編集の効果を判定しやすい JMML 患者由来の iPS 細胞を用いて実験を行った。*PTPN11c.G226A* 変異を有する患者からは *PTPN11* 変異を有する iPS 細胞と野生型 *PTPN11* 遺伝子を有する iPS 細胞が樹立されたが、ヒト胚性幹細胞に特異的な種々のマーカーの発現や 3 胚葉分化能に差は認められなかった。マウス AGM-S3 間質細胞上で BMP4、VEGF および SCF/TPO を添加した培養系で CD34 陽性細胞数と CD34 陽性 CD45 陽性細胞数を比較したところ、*PTPN11* 変異遺伝子を持つ iPS 細胞の方が明らかに高値を示した。JMML 患者から樹立された野生型 *PTPN11* 遺伝子を有する 2 つの iPSC クローンの造血分化能は、健常者から樹立された iPSC クローンと同程度であった。次に、*PTPN11* 変異遺伝子を持つ JMML 患者由来の iPSC の全エクソームシーケン

スを行ったところ、細胞増殖と生存に必須と報告されている *OSBP2c.C389T* 変異が認められた。*PTPN11* 変異を有する JMML iPSC はこの *OSBP2* 変異を有し、*PTPN11* 変異を持たない JMML iPSC の *OSBP2* 遺伝子は野生型であった。そこで、ZFN を用いた相同組換えアプローチにより、*PTPN11* 変異の修復と導入を行った。この実験に先立ち、上皮細胞由来の A549 細胞株を用いて ZFN による特異的配列置換の有無を検証した結果、目的通りのゲノム編集ができることを確認した。*PTPN11* 遺伝子と *OSBP2* 遺伝子の両者に変異を持つ iPSC において *PTPN11* 変異を修復したところ、2 つの遺伝子が野生型の JMML iPSC と同レベルまで CD34 陽性細胞産生は減少した。一方、2 つの遺伝子が野生型の JMML iPSC へ *PTPN11* 変異を導入したところ、CD34 陽性細胞産生は増加し、*PTPN11* 遺伝子と *OSBP2* 遺伝子の両者に変異を持つ iPSC に匹敵するレベルに達した(図1)。



これらの結果から、1) JMML 患者から *PTPN11* 変異 (+) iPSC と *PTPN11* 変異 (-) iPSC の両者が作製されたことは、iPS が本症患者における異常クローンと正常なクローンを分離するための有力なツールであること、2) *PTPN11* 変異を有する iPSC は *OSBP2* 変異も有していたが、*PTPN11* 変異が本例の白血病細胞増殖に大きく寄与する遺伝子異常であることが示された。

3) ZFN 法を用いて、SCN 患者由来 iPSC 細胞における *ELANE* 遺伝子変異の修正と、*G-CSFR* 変異+/-*RUNX1* 変異の導入実験を現在進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計28件)

Kurata, T, Matsuda K, Koike K, 他4名7番目. Panobinostat inhibits the proliferation of CD34⁺CD38⁻ cells under stimulation of hematopoietic growth factors on AGM-S3 cells in juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Blood & Cancer*, in press. 査読有り

Tamura A, Uemura S, Nakazawa Y, Koike K, 他12名14番目. Co-occurrence of hypertrophic cardiomyopathy and juvenile myelomonocytic leukemia in a neonate with Noonan syndrome, leading to premature death. *Clin Case Rep.*, in press. 査読有り

Tanaka M, Kamata T, Koike K, Nakazawa Y, 他5名9番目. Increasing Risk of Disturbed Root Development in Permanent Teeth in Childhood Cancer Survivors Undergoing Cancer Treatment at Older Age. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2017 39:e150-4. doi: 10.1097/MPH. 0000000000000788. 査読有り

Watanabe T, Kurata T, Koike K, Nakazawa Y, 他5名9番目. Dramatic Reduction in Tumor Size During 5 Months of Pazopanib Therapy in Combination With Ifosfamide, Carboplatin, and Etoposide in an Early Infant With Progressive Soft Tissue Sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol*.

201739:154-6. doi: 10.1097/MPH.0000000000000628. 査読有り

Chen L, Al-Kzayer LF, Liu T, Kobayashi N, Nakazawa Y, Koike K. IFR4/MUM1-positive lymphoma in Waldeyer ring with co-expression of CD5 and CD10. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 64:311-4. doi: 10.1002/pbc.26236. 査読有り

Kanamitsu K, Shimada A, Nakazawa Y, Koike K, 他 10 名 6 番目 Pediatric intestinal Behçet disease complicated by myeloid malignancies. *Int J Hematol*. 2017 105:377-82. doi: 10.1007/s12185-016-2127-7. 査読有り

Uyen TN, Sakashita K, Al-Kzayer LF, Nakazawa Y, Kurata T, Koike K. Aberrant methylation of protocadherin 17 and its prognostic value in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 64. e26259-65 doi: 10.1002/pbc.26259. 査読有り

Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Koike K, Kojima S, 他 26 名 24 番目 Clinical Utility of Next-generation Sequencing for Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. *Genet Med*. 2017 19:796-802. doi: 10.1038/gim.2016.197. 査読有り

Morita D, Hirabayashi K, Koike K, Nakazawa Y, 他 6 名 10 番目. Viral load and ganciclovir (GCV) concentration in cerebrospinal fluid of patients successfully treated with GCV or valGCV for human herpesvirus 6 encephalitis/myelitis following umbilical cord blood transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2016 18: 773-776. doi: 10.1111/tid.12579. 査読有

り

Shigemura T, Koike K, Nakazawa Y, 他 4 名 6 番目. Gangrenous appendicitis in a patient with severe congenital neutropenia. *Pediatr Int*. 2016 58:1093-1094. doi: 10.1111/ped.13091. 査読有り

Hirabayashi K, Kurata T, Koike K, Nakazawa Y, 他 7 名 10 番目. Loss of mismatched HLA on the leukemic blasts of patients with relapsed lymphoid malignancies following bone marrow transplantation from related donors with hla class ii mismatches in the graft versus host direction. *Pediatr Blood Cancer*. 2016 63:709-11. doi:10.1002/pbc.25819. 査読有り

Nakazawa Y, Matsuda K, Kurata T, Sueki A, Tanaka M, Sakashita K, Imai C, Wilson MH, Koike K. Anti-proliferative effects of T cells expressing a ligand-based chimeric antigen receptor against CD116 on CD34(+) cells of juvenile myelomonocytic leukemia. *J Hematol Oncol*. 2016 9:27. doi: 10.1186/s13045-016-0256-3. 査読有り

Al-Kzayer LF, Keizer P, Abdurraheem FT, Sano K, Kamata M, Sakashita K, Habbaba LA, Koike K. Rapidly progressive Kaposi's Sarcoma in an Iraqi boy received valproic acid: a case report and review of literature. *BMC Pediatr*. 2016 16:111. doi: 10.1186/s12887-016-0653-3. 査読有り

Yanagisawa R, Nakazawa Y, Sakashita K, Saito S, Tanaka M, Shiohara M, Shimodaira S, Koike K. Intrathecal donor lymphocyte infusion for isolated leukemia relapse in

the central nervous system following allogeneic stem cell transplantation: a case report and literature review. *Int J Hematol.* 2016 103:107-11. doi: 10.1007/s12185-015-1902-1. 査読有り

Sakashita K, Matsuda K, Koike K Diagnosis and treatment of juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Int.* 2016 58: 681-90. doi: 10.1111/ped.13068. 査読有り

Al-Kzayer LF, Sakashita K, Koike K, 他 14 名 17 番目. Analysis of KRAS and NRAS gene mutations in Arab Asian children with acute leukemia: High frequency of RAS mutations in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2015 62:2157-61. doi: 10.1002/pbc.25683. 査読有り

Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Koike K, Ito E, 他 27 名 24 番目. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol.* 2015;168:854-64. 査読有り

Shigemura T, Nakazawa Y, Koike K, Agematsu K, 他 8 名 10 番目. Subcutaneous abscess due to the basidiomycete *Phellinus mori* in a patient with chronic granulomatous disease. *Infection.* 2015 43:371-5. doi: 10.1007/s15010-015-0724-7. 査読有り

Shigemura T, Nakazawa Y, Hirabayashi K, Kobayashi N, Sakashita K, Agematsu K, Koike K. Dramatic improvement in the multifocal positron emission tomography findings of a young adult with chronic granulomatous disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Immunol.* 2015

35:84-6. doi: 10.1007/s10875-014-0113-5. 査読有り

〔学会発表〕(計9件)

重村倫成、小森一寿、盛田大介、平林耕一、倉田敬、齋藤章治、田中美幸、柳沢龍、坂下一夫、中沢洋三 臍帯血移植後の輸血関連サイトメガロウイルス血症の検討 第40回日本造血細胞移植学会総会 2018年

Shigemura T, Kobayashi N, Kobayashi K, Agematsu K. A novel heterozygous C243Y A20/TNFAIP3 gene mutation is responsible for chronic inflammation in autosomal dominant Behcet's disease. 第60回小児リウマチ学会総会・学術集会 2017年

Shigemura T, Motobayashi M, Kurata T, Nakazawa Y, Kobayashi N, Agematsu K, Koike K. Severe Combined Immunodeficiency associated with acute myeloid leukemia. European Society for Immunodeficiencies (ESID) 17th Biennial Meeting, September, 2016.

Nakano T, Morita D, Matsuda K, Ohnota H, Hongo K, Koike K, Nakazawa Y Development of T cells redirected to GM-CSF receptor with a ligand-based CAR for myeloid neoplasmas. 第78回日本血液学会 2016年

重村倫成、竹内勇介、塩入崇弘、野田俊輔、小林法元、上松一永、小池健一 A20/TNFAIP3 遺伝子変異を認めた家族性ベージェット病の1家系 第25回小児リウマチ学会総会・学術集会 2015年

重村倫成、本林光雄、竹内勇介、倉田敬、田中美幸、中沢洋三、小林法元、稲葉雄二、上松一永、小池健一 臍帯血移植早期にサイトメガロウイルス脳室脳炎を発症したX連鎖重症複合免疫不全症の1例 第6回東海信州

免疫不全研究会 2015 年

Hirabayashi S, Hasegawa D, Shuo T, Muramatsu H, Sakashita K, Kojima S, Koike K, Manabe A Long-term persistence of somatic heterozygous CBL mutation in JMML. 7th International Symposium on Myelodysplastic syndromes and Bone Marrow Failure, 2015.

倉田敬、小池健一、他 JMML の CD34 陽性細胞増殖に対する panibinostat と azacytidine の in vitro 効果 第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会 2015 年

平林真介、小池健一、他 体細胞ヘテロ CBL 変異が長期に残存した JMML 第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会 2015 年
〔図書〕(計 3 件)

小池健一 医学書院 肝造血、胎生期造血、血球分化・成熟、造血細胞、他。医学大辞典 第 3 版 印刷中

小池健一 医学書院 小児の貧血 『今日の診断指針』第 7 版 2015 年 87-9.

中沢洋三、小池健一 エルゼビア・ジャパン 小児の組織球増殖疾患 ネルソン小児科学第 19 版日本語版 2015 年 2057-61.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小池 健一 (KOIKE Kenichi)
信州大学・医学部・特任教授
研究者番号：40143979

(2)研究分担者

中沢 洋三 (NAKAZAWA Yozo)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号：60397312

重村 倫成 (SHIGEMURA Tomonari)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：70623916