

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08206

研究課題名（和文）SAMd9遺伝子変異が関与する造血異常と易感染性について

研究課題名（英文）Hematopoietic abnormalities and susceptibility to infection involving SAMD9 gene mutations

研究代表者

川崎 ゆり（KAWASAKI, Yuri）

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：70507079

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞増殖をSAMd9遺伝子の正常型と変異型で比較を行った。その結果、iPS細胞では正常型と変異型で有意差はなかった。しかし、iPS-ML細胞になると増殖は、正常型>ヘテロ接合体>変異型ホモ接合体の順で抑制された。これは、MIRAGE症候群の造血異常は、分化した段階で増殖が抑制されることを示唆するものである。

iPS-MP細胞をサイトカインの誘導因子で刺激し、サイトカイン濃度を測定した。その結果、健康人由来iPS-MP細胞とは異なり高値を示すサイトカインが、疾患特異的iPS-MP細胞で検出された。この高値を示したサイトカインの異常な産生は、SAMd9遺伝子変異が原因であることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞を応用し発展させた細胞に単球系の細胞株であるiPS-ML細胞と、マクロファージ様の細胞であるiPS-MP細胞がある。これらの細胞は遺伝子変異が原因で発症する患者から作製することができ、細胞レベルでの病態再現に役立つ。今回、これらの細胞をMIRAGE症候群の研究に適用し新たな知見を得た。MIRAGE症候群の患者は症状の重い小児であるため、患者から研究のために十分な量の血液を採取することは非常に困難である。また、治療の影響を受けている患者の血液細胞を用いた研究とは違い、治療の影響や患者の体内環境の影響を除外できるiPS-ML細胞およびiPS-MP細胞の研究への応用は非常に有用であった。

研究成果の概要（英文）：Cell proliferation was compared between wild-type and mutant of the SAMD9 gene. As a result, there was no significant difference between wild-type and mutant iPS cells. However, in iPS-ML cells, proliferation was more strongly suppressed in the order wild-type > heterozygous > mutant homozygous. This suggests that the hematopoietic abnormality of MIRAGE syndrome is due to the suppression of proliferation during hematopoietic differentiation stage.

The iPS-MP cells were stimulated with inducers of cytokines, and cytokine levels were measured. As a result, disease-specific iPS-MP cells showed higher levels of cytokines than healthy human-derived iPS-MP cells. The abnormal production of the elevated cytokines is suggested to be caused by the SAMD9 gene mutation.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：SAMd9 MIRAGE症候群 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

MIRAGE症候群は、先天性副腎低形成症の一病型であり、2016年に新たな疾患概念として報告された遺伝子疾患である。この疾患の原因遺伝子は、Sterile Alpha Motif Domain containing 9 (*SAMD9*) 遺伝子で、ヘテロ接合性変異により引き起こされる疾患であることは明らかにされているものの、MIRAGE症候群として研究がなされてきた期間はまだ短く、病因・病態のほとんどが不明のままである。

先天性副腎低形成症の患者の約30%は、生化学的な検査で特異的なパターンを示さなかったり、既知の責任遺伝子の変異が同定されなかったりと原因が不明であった。原因不明の患者のDNAを解析したところ、約半数で*SAMD9*と呼ばれる遺伝子に変異をもつことが明らかになった。この約半数の患者の臨床症状には、先天性副腎低形成症(Adrenal hypoplasia)以外にも、造血異常(Myelodysplasia) 易感染性(Infec<sup>ミラージュ</sup>tion) 成長障害(Restriction of growth) 性腺症状(Genital phenotypes) 消化器症状(Enteropathy)が共通して認められた。そこで、*SAMD9*遺伝子変異を原因とする新たな疾患として、2016年、6つの主症状の頭文字にちなみ「MIRAGE症候群」と呼ぶことが提唱された(Narumi, *Nature Genetics*, 2016)。単一遺伝子疾患にもかかわらず、多様な臨床症状を呈することから、*SAMD9*遺伝子の変異が病態に影響を及ぼすメカニズムは多岐にわたると考えられる。今回、臨床症状の中でも「造血異常」と「易感染性」を取り上げて研究を行った。血液細胞には、感染を防御する免疫細胞が含まれることから、この2つを関連付けて研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

MIRAGE症候群は、難治性疾患であり生命予後も不良である。このような疾患の感染症をコントロールすることは、重症化や合併症を防ぎ、治療を円滑に進める上で重要である。そこで、MIRAGE症候群で起こっている「造血異常」と「易感染性」の分子メカニズム解明の手がかりとなり、また、感染症の有効なコントロール法の確立に役立つ知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

研究に使用した細胞は、iPS細胞の中でも疾患特異的iPS細胞と呼ばれるある疾患をもつ患者由来の体細胞から作製したiPS細胞を用いた。MIRAGE症候群の疾患特異的iPS細胞は遺伝子変異を伴っているため、正常な遺伝子型と比較検討するにあたり、以下の～のiPS細胞を準備した上で研究を進めた。最初に、*SAMD9*遺伝子に変異をもつMIRAGE症候群の疾患特異的iPS細胞を作製した。次に、アイソジェニックコントロールとして、CRISPR-Cas9システムで変異遺伝子を修復した遺伝子修復iPS細胞を作製した。一方で、健常人由来iPS細胞を元に、正常型の*SAMD9*遺伝子を変異の遺伝子配列に変えたノックインiPS細胞をこれもCRISPR-Cas9システムで作製した。ノックインiPS細胞については、ヘテロ接合性で変異をもつものと、ホモ接合性で変異をもつものを作製した。

本研究の対象となる病態の原因を生み出している責任細胞は、免疫に関与する細胞であることから、～のiPS細胞は単球に分化させ、この段階で株化したiPS-ML細胞を作製した。更に、iPS-ML細胞は、マクロファージ様のiPS-MP細胞に分化誘導し、サイトカイン産生能の評価に用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 「造血異常」について(図1)

iPS細胞とiPS-ML細胞で増殖の程度を調べ、正常な遺伝子型をもつものと、変異の遺伝子型をもつもので比較を行った。その結果、未分化なiPS細胞の段階では、*SAMD9*遺伝子に変異があっても正常型と増殖の程度に有意な差はなかった(図1左)。しかし、単球系の細胞に分化が進んだiPS-ML細胞になると、その増殖は、正常型 > ヘテロ接合体 > 変異型ホモ接合体の順で抑制された(図1右)。これは、*SAMD9*遺伝子に変異があると細胞の増殖が抑制されるという報告と合致する。また、MIRAGE症候群の造血異常は、血球系の細胞に分化が進んだ段階で、増殖が抑制されることが一因になることが示唆される結果となった。

患者は症状の重い小児であることから、患者から研究のために十分な量の血液サンプルを採取することは非常に困難である。iPS-ML細胞で増殖抑制が確認できたことは、細胞レベルでMIRAGE症候群の病態を再現できたことになり、研究に有用な細胞であることが言える。今後は、iPS-ML細胞と、その元になったiPS細胞の特性、すなわち単球系以外の血液細胞にも分化できることを活かし、造血異常が起こる仕組みの詳細を追求したいと考えている。

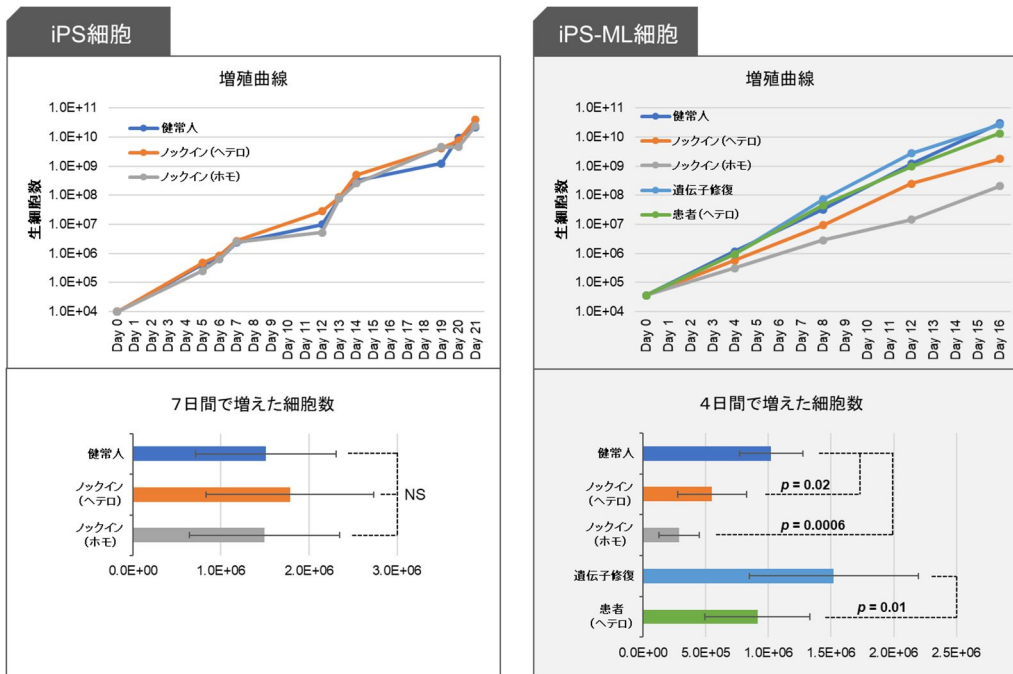


図1 iPS細胞およびiPS-ML細胞の増殖

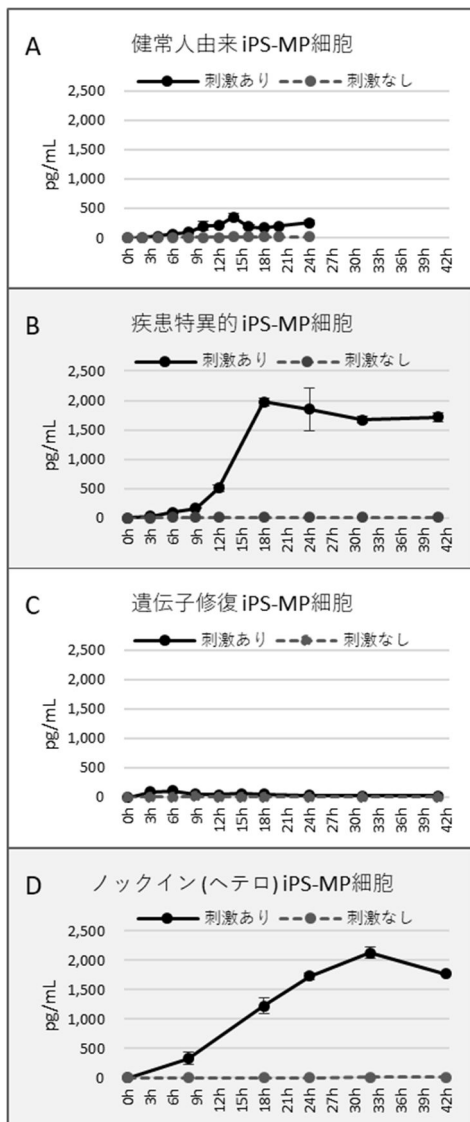


図2 炎症性サイトカイン産生量の経時的変化

(2) 「易感染性」について(図2)

感染防御につながる免疫応答について調べるため、iPS-MP細胞をサイトカインの誘導因子で刺激し、経時的に培養上清中のサイトカインの濃度を測定した。その結果、健康人由来iPS-MP細胞(図2A)とは、明らかに産生動態が異なり、高い値を示す炎症性サイトカインが、疾患特異的iPS-MP細胞(図2B)の培養上清で検出された(黒の実線)。この特殊な表現型は、遺伝子修復iPS-MP細胞(図2C)で観察できなくなり、ノックイン(ヘテロ)iPS-MP細胞(図2D)で再現されるといった結果を得た。高い値を示した炎症性サイトカインは、RT-qPCRの結果から、遺伝子発現においても疾患特異的iPS-MP細胞で上昇しており、それと共に*SAMD9*遺伝子の発現も疾患特異的iPS-MP細胞で高かった。実際、MIRAGE症候群の患者の中には、今回、疾患特異的iPS-MP細胞の培養上清で高値を示した炎症性サイトカインが、血清中から高い値で検出された患者もいた。患者は様々な治療を受けており、その影響から本来の高い値が隠されている可能性を考慮すると、この高い値を示した炎症性サイトカインの異常な産生は、*SAMD9*遺伝子変異が原因であることが示唆される。

*SAMD9*遺伝子変異が原因で、炎症性サイトカインの1つが異常に産生されるという報告はまだない。治療の影響を受けている患者の血液細胞を用いた研究とは違って、治療の影響や、患者の体内環境の影響を除外できるiPS-MP細胞も、iPS-ML細胞と同様、本研究には非常に有用であると言える。今後は、iPS-MP細胞を活用し、「なぜ異常な炎症性サイトカインの産生が起ってしまうのか?」そのメカニズムを突き止めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------