

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591161

研究課題名（和文） 食細胞異常症のヒト化マウス作製と病態解析・治療開発への応用

研究課題名（英文） Application of humanized mice to analyses and therapeutics of phagocytic disorders

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

研究成果の概要（和文）：

好中球エラスターゼ遺伝子変異を有する先天性好中球減少症（SCN）の骨髄細胞から CD34 陽性細胞を純化し、免疫不全マウス（NOD/SCID/ $c^{null}$ ）への異種間移植を施行した。移植後 8 週目にマウス骨髄を採取し、ヒト細胞（ヒト CD45 陽性細胞）の生着を確認し、患者血液・骨髄でみられる所見と一致していることを確認した。マウスから得たヒト細胞が病態解析に可能なヒト化マウスであることが明らかとなり、マウスからのヒト細胞を純化することで、SCN の病態解析や治療応用に利用できることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The use of genetically modified mice has led to significant advantages for the examination of in disease pathophysiology. In this study, CD34 cells purified from bone marrow in patients with severe congenital neutropenia were injected to NOD/SCID/ $c^{null}$  (NOG) mice intravenously. The human cells engrafted in mice showed the maturation arrest of myeloid cells as well as the absence of mature human neutrophils. These results suggest that the establishment of humanized mice may significantly contribute to analyses of pathophysiology and therapeutic approach in patients with SCN.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児血液学，ヒト化マウス

## 1. 研究開始当初の背景

食細胞異常症の一つである重症先天性好中球減少症（SCN）は好中球減少に伴う難治性重症感染症を反復する予後不良の疾患であ

る。近年、本症の責任遺伝子として好中球エラスターゼ遺伝子（*Ela2*），*HAXI*，*GFIL*，*WASP* など種々の遺伝子変異が同定され、本症が heterogenous な疾患群であることが明らか

とされてきた。我々は本邦での 22 症例の解析から 15 例の *ELA2* 変異例, 5 例の *HAXI* 変異例を同定し, 遺伝子型と表現型の違いを報告した (Ishikawa N, Kobayashi M et al, J. Med. Genetics, 2008, Matsubara K, Kobayashi M et al, Haematologica, 2007)。異なった遺伝子変異を原因としながらも共通の好中球減少を示すその病態を解明することは骨髄顆粒球系細胞分化の生理機構とその破綻に関係する多くの分子の関与を明らかにする上で非常に重要な課題である。遺伝子ノックアウトマウス, 変異ノックインマウスを用いたマウスモデルでの解析がヒト疾患モデルとして有用であるが, 骨髄顆粒球系細胞の関係した疾患群ではマウスで好中球減少症を再現することは不可能である。事実, *ELA2*, と *HAXI* のノックアウトマウス, 変異遺伝子導入マウスで好中球減少は認められない。

本研究では, 従来造血幹細胞の骨髄再構築能を免疫不全マウスで検討してきた技術を応用し, 本疾患群の解析にヒト化疾患モデルマウスを作製して病態解明と治療応用の開発を行うことを目的とする。すでに本研究では NOD/SCID/IL2Rg<sup>tm1.1</sup> (NOG) マウスを用いた予備研究から本疾患群の再現が可能であることを一部の患者骨髄細胞移植で確認しているため, 先天性好中球減少症ヒト化疾患モデルマウスの作製は可能と思われる。

## 2. 研究の目的

生体の感染防御システムの重要な役割を担っている食細胞の量的, 質的欠陥による食細胞異常症は (原発性) 免疫不全症の一つである。難治性感染症を反復する予後不良の疾患群であるため, 迅速かつ正確な診断, 病態解明, 適切な治療法の開発が必要である。本疾患群においては多くの責任遺伝子が同定されてきたが, 遺伝子異常から発症にいたる病態の分子基盤は明らかでないものも多い。特に骨髄顆粒球系細胞の分化過程と細胞機能はマウスとは異なっており, ノックアウトマウスなどの疾患モデルマウスでヒトの病態の再現が不可能である。本研究では食細胞異常症患者由来の骨髄幹細胞, 変異遺伝子導入臍帯血由来幹細胞を免疫不全マウスに骨髄移植を行い, 造血系の再構築によるヒト化疾患モデルマウスを作製する。特に従来から研究を行ってきた先天性好中球減少症を中心に, 作製ヒト化マウスからのヒト由来細胞を用いた病態解析, ヒト化マウスへの G-CSF 等の投与による治療反応性, 長期投与による骨髄異形成症候群・急性骨髄性白血病への移行の観察を行い, 本症の病態解析と治療への応

用を行う。同時に種々の食細胞異常症に発展応用することで, ヒト化マウスを用いた病態解明への新たな戦略としての基盤を築く。

## 3. 研究の方法

変異遺伝子を有する患者骨髄細胞の NOG マウスへの移植によるヒト化疾患モデルマウスの作製を行い, ヒト化マウスでのヒト細胞が疾患の表現型と同じであることを確認する。ヒト臍帯血由来造血幹細胞への患者由来変異遺伝子導入を行い, 同様に NOG マウスへの移植を施行し, 造血系の再構築から疾患特有の病態の表現型を確認することで, 患者細胞に依存することなくヒト化疾患モデルマウスを作製できることを検討する。作製したヒト化マウスからのヒト細胞を用いて, 骨髄顆粒球系細胞の増殖・分化過程と好中球エラスターゼの細胞内局在の変化を検討し, 好中球エラスターゼの細胞内局在異常と好中球減少との関連を解析, 疾患の病態解明の一助とする。さらに, 作製したヒト化疾患モデルマウスにヒト G-CSF 等の造血因子を長期間持続的投与し, 治療反応性, 副作用発現を観察することで, 安全な治療開発への応用を行う。

## 4. 研究成果

食細胞異常症の一つである先天性好中球減少症 (SCN) は, 種々の遺伝子異常を原因とする heterogenous な疾患群である。しかし, 遺伝子異常と骨髄顆粒球系細胞の分化・増殖障害の発症にいたる病態の分子基盤は明らかでない。SCN で最も多く認められている遺伝子異常は好中球エラスターゼ (NE) 遺伝子変異によるもので, 疾患の約 70% を占めている。本研究では NE 変異を有する SCN の病態解明を目的として, 疾患モデルのヒト化マウスを作製することで骨髄顆粒球系細胞の分化障害の解析を行った。SCN 患者の骨髄細胞から CD34 陽性細胞を純化し, 免疫不全マウス (NOD-Scid マウス) への異種間移植を施行した。移植後 8 週目にマウス骨髄を採取し, ヒト細胞 (ヒト CD45 陽性細胞) の生着を確認しヒト細胞を純化, DNA 抽出からダイレクトシーケンシングを行い, SCN 患者で同定されている遺伝子変異と全く同じ変異を確認した。次に, 骨髄顆粒球系細胞の分化過程を血液塗沫標本でのライト染色と, ヒト骨髄顆粒球系細胞に発現している抗原に対する免疫細胞で同定し, 前骨髄球から骨髄球での成熟障害が患者骨髄でみられる骨髄所見と一致していることを確認した。これらから, マウスに生着したヒト骨髄細胞の分化は患者の病態を的確に表現している可能性が示

唆されたので、移植マウス数を増やして、事実が普遍的なものであることを確認した。ヒト骨髄細胞の病的所見がマウス骨髄で反映される事実はSCN骨髄顆粒球系細胞の異常が、骨髄環境によるものではなく造血細胞自らに異常が存在していることを示すものであり、マウスから得たヒト細胞が病態解析に可能なヒト化マウスであることが明らかとなり、今後の研究の発展への応用出来ると考えられた。これらの結果から、マウス中ヒト細胞を純化して、in vitroでの解析を開始し、SCNで推測されている病態の解析を進行させている。

#### 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 19 件)

1. Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M: Identification of the integrin b3 L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis. *British Journal of Haematology*, 160: 521-529, 2013. (査読有)
2. Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K: Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia-derived pluripotent stem cells with heterozygous *ELANE* mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 3023-8, 2013. (査読有)
3. Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T: Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency. *Blood* 119: 5458-5466, 2012. (査読有)
4. Tsumura M, Okada S, Sakai H, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Kong XF, Abhyankar A, Heike T, Nakahata T, Nishikomori R, Al-Muhsen S, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Alzahrani M, Shehri MA, Elghazali G, Takihara Y, Kobayashi M: Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Human Mutation*, 33: 1377-1387, 2012. (査読有)
5. Zhang X, Inukai T, Hirose K, Akahane K, Kuroda I, Honna-Oshiro H, Kagami K, Goi K, Nakamura K, Kobayashi M, Endo M, Yagita H, Kurosawa H, Look TA, Honda H, Inaba T, Nakazawa S, Sugita K: Oncogenic fusion E2A-HLF sensitizes t(17:19)-positive acute lymphoblastic leukemia to TRAIL-mediated apoptosis by upregulating the expression of death receptors. *Leukemia* 26: 2843-93, 2012. (査読有)
6. Ohno N, Kobayashi M, Hayakawa S, Utsunomiya A, Karakawa S: Transmission of a maternal EDTA-dependent anticoagulant. *Platelets* 23: 399-400, 2012. (査読有)
7. Kajiume T, Sera Y, Kawahara Y, Matsumoto M, Fukazawa T, Imura T, Yuge L, Kobayashi M: Regulation of hematopoietic stem cells using transduction domain-fused polycomb. *Experimental Hematology* 40: 751-760, 2012. (査読有)
8. 溝口洋子, 鎌田綾, 三木瑞香, 谷博雄, 世羅康彦, 中村和洋, 小林正夫: Glanzmann thrombasthenia (GT) の遺伝子組み換え活性化型第Ⅶ因子製剤による止血効果 日本小児血液・がん学会雑誌 49: 61-66. 2012. (査読有)
9. 梶梅輝之, 浅野孝基, 世羅康彦, 小林正夫: 輸血後蕁麻疹発症前の末梢血一般検査所見 アレルギー 61:1086-1091, 2012. (査読有)
10. 溝口洋子, 津村弥来, 岡田 賢, 小林正夫: 慢性皮膚粘膜カンジダ症と機能獲得性 STAT1 変異。臨床免疫・アレルギー科 57: 437-443, 2012. (査読無)
11. Karakawa S, Okada S, Tsumura M, Mizoguchi Y, Ohno N, Yasunaga S, Ohtsubo

M, Kawai T, Nishikomori R, Sakaguchi T, Takihara Y, Kobayashi M: Decreased Expression in Nuclear Factor- $\kappa$ B Essential Modulator Due to a Novel Splice-Site Mutation Causes X-linked Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology* 31:762-77, 2011. (査読有)

12. Liu L, Okada S, Kong XF, Kreins AY, Cypowyj S, Abhyankar A, Toubiana J, Itan Y, Audry M, Nitschke P, Masson C, Toth B, Flatot J, Migaud M, Chrabieh M, Kochetkov T, Bolze A, Borghesi A, Toulon A, Hiller J, Eyerich S, Eyerich K, Gulácsy V, Chernyshova L, Chernyshov V, Bondarenko A, María Cortés Grimaldo R, Blancas-Galicia L, Madrigal Beas IM, Roesler J, Magdorf K, Engelhard D, Thumerelle C, Burgel PR, Hoernes M, Drexel B, Seger R, Kusuma T, Jansson AF, Sawalle-Belohradsky J, Belohradsky B, Jouanguy E, Bustamante J, Bué M, Karin N, Wildbaum G, Bodemer C, Lortholary O, Fischer A, Blanche S, Al-Muhsen S, Reichenbach J, Kobayashi M, Rosales FE, Lozano CT, Kilic SS, Oleastro M, Etzioni A, Traidl-Hoffmann C, Renner ED, Abel L, Picard C, Maródi L, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL: Gain of function of human STAT1 mutations impair IL17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *Journal of Experimental Medicine* 208: 1635-48, 2011. (査読有)

13. Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusahara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T: Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan. *Journal of Clinical Immunology* 31: 309-14, 2011. (査読有)

14. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsuiki N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S: Quantification of  $\kappa$ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *Journal of Allergy & Clinical*

*Immunology* 128:223-225. e2, 2011. (査読有)

15. Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Ori S, Tsumura M, Okada S, Ohta T, Kiyoshi Ohtani, Kobayashi M, Takihara Y: Hoxb4 transduction down-regulates Geminin protein, providing hematopoietic stem and progenitor cells with proliferation potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(50):21529-34, 2010. (査読有)

16. Shirao K, Okada S, Tajima G, Tsumura M, Hara K, Yasunaga S, Ohtsubo M, Hata I, Sakura N, Shigematsu Y, Takihara Y, Kobayashi M: Molecular pathogenesis of a novel mutation, G108D, in short-chain acyl-CoA dehydrogenase identified in subjects with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Human Genetics* 127:619-28, 2010. (査読有)

17. Kihara H, Ohno N, Karakawa W, Mizoguchi Y, Fukuhara R, Hayashidani M, Nomura S, Nakamura K, Kobayashi M: Significance of immature platelet fraction and CD-41-positive cells at birth in early onset neonatal thrombocytopenia. *International Journal of Hematology* 91: 245-251, 2010. (査読有)

18. Okada S, Nakamura K, Kobayashi M: Hematological malignancies in congenital neutropenia. *Rinsho Ketsueki* 51: 553-558, 2010. (査読有)

19. 溝口洋子, 岡田 賢, 小林正夫: 血液疾患における病態解析研究の進歩: 先天性好中球減少症発症機構解明の進展 血液・腫瘍科 60(2): 118-124, 2010. (査読無)

[学会発表] (計 11 件)

1. Osamu Hirata, Miyuki Tsumura, Yoko Mizoguchi, Satoshi Okada, Shizuko Minegishi, Tomohiro Morio, Masao Kobayashi: Gain-of-function mutations of *STAT1* in Japanese patients with CMCD: European Society for Immunodeficiency. Florence, Italy, October 7-10, 2012.

2. Yoshiyuki Kobayashi, Hiroataka Matsui, Akinori Kanai, Miyuki Tsumura, Satoshi Okada, Mizuka Miki, Kazuhiro Nakamura, Shinji Kunishima, Toshiya Inaba and Masao

Kobayashi: Identification of integrin b3 L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant macrothrombocytopenia. American Society of Hematology. Atlanta, GA, December 8-11, 2012.

3. Rie Onodera, Kazuhiro Nakamura, Kikuyo Taniguchi, Emi Kurita, Asako Hiraoka, Kaduta Yasui, Nobuki Matsuyama, Fumiya Hirayama, and Masao Kobayashi: A Nobel Method using Extracted Human Neutrophil Antigens from HNA gene-transfected cell lines for Detection of Antibodies against Human Neutrophil Antigens. American Society of Hematology. Atlanta, GA, December 8-11, 2012.

4. Mizoguchi Y, Nakamura K, Karakawa S, Okada S, Kawaguchi H, Kobayashi M: Clinical and genetic characteristics of patients with severe congenital neutropenia in Japan. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, December 10-13, 2011

5. Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Mochizuki S, Yamamoto S, Matsuzaka E, Hanada S, Ohnishi R, Tani K, Eto K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K: Suppressed Neutrophil Development in Hematopoiesis of Induced Pluripotent Stem Cells Derived From a Severe Congenital Neutropenia Patient with ELA2 Mutation. 53<sup>rd</sup> American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, CA, December 10-13, 2011.

6. Hanada I, Terui K, Toki T, Kudo K, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Sugita K, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Ito E: JAK2 mutations and CRLF2 rearrangements in Down Syndrome-Associated Acute Lymphoblastic Leukemia in Japan. 53<sup>rd</sup> American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, CA, December 10-13, 2011.

7. 岡田 賢, 小林正夫, Luyan Liu, Xiao-Fei Kong, Alexandra Y. Kreins, Sophie Cypowyj, Laurent Abel, Capucine Picard, Stéphanie Boisson-Dupuis, Anne Puel, Jean-Laurent Casanova: 常染色体優性遺伝を呈する慢性皮膚粘膜カンジダ症の責任遺伝子の発見

-STAT1 機能獲得性変異による慢性皮膚粘膜カンジダ症- 第39回日本臨床免疫学会総会 2011年9月15-17日 東京

8. Tsumura M, Okada S, Sakai H, Nishikomori R, Yasunaga S, Ohtsubo M, Heike T, Nakahata T, Takihara Y, Kobayashi M: Identification of a novel type of AD-STAT1 deficiency with mutations in the SH2 domain 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14-16日 名古屋

9. Ohno N, Kajiume T, Hayakawa S, Kobayashi Y, Ytsunomiya A, Kobayashi M: Umbilical cord blood-derived stem cells cultured under low oxygen tension enhance the migration and homing efficacy through the increased expression of CXCR4. 52nd American Society of Hematology Annual Meeting, December 4-7, 2010., Orlando FL USA

10. Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Sakai H, Nishikomori R, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Heike T, Nakahata T, Takahara Y, Kobayashi M: A Novel mutation K673R in STAT1 impaired the STAT1 signal transduction in a dominant-negative manner identified in a Japanese boy. 52nd American Society of Hematology Annual Meeting, December 4-7, 2010. , Orlando FL USA

11. Karakawa S, Okada S, Tsumura M, Yasunaga S, Ohtsubo M, Kawai T, Nishikomori R, Takihara Y, Kobayashi M: Decreased expression in NF- $\kappa$ B essential modulator due to a novel splice-site mutation causes ectodermal dysplasia with immunodeficiency. 52nd American Society of Hematology Annual Meeting, December 4-7, 2010. , Orlando FL USA

[図書] (計5件)

1. 平田 修, 小林正夫: 小児の発熱 A to Z 診断・治療の Tips と Pitfalls 原 寿郎編 免疫不全症: 貪食細胞の数・機能の異常 pp.178-184, 診断と治療社 東京, 2012.

2. ナースの小児科学 佐地勉, 竹内義博, 原寿郎 編 中外医学社 東京 2011.  
三木 瑞香, 小林正夫 「出血傾向」 pp.161-162

3. ナースの小児科学 佐地勉, 竹内義博,  
原寿郎 編 中外医学社 東京 2011.  
中村和洋, 小林正夫 「出血性疾患」 pp.  
412-415

4. 小林正夫: 好中球減少症 今日の小児治  
療指針 第 15 版 pp. 515-516, 医学書院,  
東京 2011.

5. 岡田賢, 小林正夫: 骨髄不全症候群とリ  
ボゾームの異常. Annual Review 2010  
pp. 41-49, 中外医学社 東京, 2010.

#### 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

梶梅輝之 (Kajiume Teruyuki)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助  
教

研究者番号 : 40278924

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :