

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名： GATA2 欠損症由来 iPS 細胞を用いた新規分化因子の同定
2. 研究開発代表者： 野々山 恵章（防衛医科大学校 小児科学講座）
3. 研究開発の成果

### ① GATA2 欠損症由来 iPS 細胞を用いた新規造血幹細胞分化因子同定

GATA2 欠損症は、造血幹細胞分化障害、樹状細胞、NK 細胞、B 細胞の完全欠損、T 細胞機能低下を呈する疾患である。iPS 細胞から造血幹細胞、免疫担当細胞（T 細胞、樹状細胞、NK 細胞、B 細胞）の新規分化因子を同定する目的で、以下の研究を行い成果を得た。

変異の異なる GATA2 欠損症 2 患者由来の iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞の品質を検定した。通常の検定に加え、独自の方法として網羅的全 DNA メチル化解析を確立した。すなわちイルミナ社の Infinium HumanMethylation450 BeadChip により 45 万カ所のメチル化状態の解析を行った。樹立した iPS 細胞の品質は全ての方法で保証された。

ヒト iPS 細胞から CD34 陽性造血幹細胞への分化法を確立した。この系を用いて iPS 細胞から造血幹細胞への分化を検討したところ、正常 iPS 細胞と比較して GATA2 欠損症由来 iPS 細胞は、2 患者由来 iPS 細胞の全てのクローンで、CD34 陽性造血幹細胞への分化が低下していることを見出した。

次に、ゲノム編集により患者由来 iPS 細胞の GATA2 変異を修復した。ゲノム編集は、TALEN の系を用いた。TALEN によるゲノム編集は、CRISPR/Cas9 と比較した場合、ゲノム編集における目的外遺伝子への変異導入が格段に低い。本研究では他遺伝子への変異導入は実験上好ましくないため、TALEN の系を用いた。すなわち、GATA2 変異以外は、ゲノム情報が全く同一の iPS 細胞を作製した。

作製した GATA2 変異 iPS 細胞と GATA2 変異修復細胞を、CD34+ヒト造血幹細胞に分化させた。その結果、GATA2 変異を修復した iPS 細胞は、正常 iPS 細胞と同様に CD34 陽性造血幹細胞に分化する事を示した。すなわち GATA2 変異のみで iPS 細胞が、CD34 陽性造血幹細胞への分化が低下する事を明らかにした。GATA2 は転写因子であるため、この結果は、GATA2 変異により何らかの遺伝子が転写されず、その結果 iPS 細胞から CD34 陽性造血幹細胞への分化が障害されたと考えられる。この遺伝子は、iPS 細胞から CD34 陽性造血幹細胞への分化因子をコードしている可能性が高い。

そこで、GATA2 欠損症由来 iPS 細胞と GATA2 変異を修復した iPS 細胞からそれぞれ造血幹細胞を分化させ、分化途上で発現する mRNA を全 RNA シークエンスで比較し、GATA2 変異により転写されない遺伝子群を同定する。そのために、全 RNA シークエンス解析法を用いるが、高い定量性をもって遺伝子発現解析を実施できるように分子バーコード法による高精度の解析パイプラインを新たに構築した。

RNA sequence で同定された遺伝子群を、遺伝子導入効率を上げたレンチウイルスベクターを用いて GATA2 変異 iPS 細胞に導入し、CD34 陽性造血幹細胞への分化正常化を指標として、新規造血幹細胞分化因子を同定する。

### ② GATA2 欠損症由来 iPS 細胞を用いた新規免疫系細胞分化因子同定

GATA2 欠損症患者では、T 細胞新生能が低下している事を、新規に開発した 10 カラーFACS 解析を用いた thymic naïve 細胞の低下および TREC の低下で示した。また患者 T 細胞では、IL4, IL17 産生能が低下し、機能的分化も障害されている事も示した。さらに、in vitro で GATA2 異常患者由来 CD34 陽性骨髓造血幹細胞からの T 細胞分化が障害されている事を示した。そこで、CD34 陽性造血幹細胞から T 細胞への分化の系を用い、GATA2 により転写され、T 細胞の分化、機能的成熟、さらには樹状細胞、B 細胞、NK 細胞分化に関わる因子を、同様の方法で同定する。