

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) GATA2 欠損症由来 iPS 細胞を用いた新規分化因子の同定  
(英語) Identification of novel differentiation factors using iPS cells derived from GATA2 deficiency

研究開発担当者 (日本語) 防衛医科大学校・教授・野々山恵章  
所属 役職 氏名： (英語) National Defense Medical College・Professor・Shigeaki Nonoyama

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (1) (日本語) ①GATA2 欠損患者における免疫担当細胞分化解析  
開発課題名： ②新規分化因子による分化正常化の検討  
(英語) ①Multi-parameter analysis on the immune cell differentiation in GATA2 deficiency  
②Study on the effect of novel differentiation-inducing factor on GATA2 deficient cells

研究開発分担者 (日本語) 東京医科歯科大学・教授・森尾友宏  
所属 役職 氏名： (英語) Tokyo Medical and Dental University・Professor・Tomohiro Morio

分担研究 (2) (日本語) ①GATA2 欠損患者での免疫担当細胞の FACS 解析  
開発課題名： ② 次世代シーケンサーによる免疫担当細胞の解析  
(英語) ①FACS analysis in the patient of GATA2 mutation  
②T and B cell receptor analysis using next generation sequencing

研究開発分担者 (日本語) 東京医科歯科大学・准教授・今井耕輔  
所属 役職 氏名： (英語) Tokyo Medical and Dental University・Associate professor・Kohsuke Imai

## II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者： 防衛医科大学校・小児科学講座・野々山恵章 総括研究報告を参照。

## III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 7 件、国際誌 8 件）

1. Coulter TI, Chandra A, Bacon CM, Babar J, Curtis J, Sreaton N, Goodlad JR, Farmer G, Steele CL, Leahy TR, Doffinger R, Baxendale H, Bernatoniene J, Edgar JD, Longhurst HJ, Ehl S, Speckmann C, Grimbacher B, Sediva A, Milota T, Faust SN, Williams AP, Hayman G, Kucuk ZY, Hague R, French P, Brooker R, Forsyth P, Herriot R, Cancrini C, Palma P, Ariganello P, Conlon N, Feighery C, Gavin PJ, Jones A, Imai K, Ibrahim MA, Markelj G, Abinun M, Rieux-Laucat F, Latour S, Pellier I, Fischer A, Touzot F, Casanova JL, Durandy A, Burns SO, Savic S, Kumararatne DS, Moshous D, Kracker S, Vanhaesebroeck B, Okkenhaug K, Picard C, Nejentsev S, Condliffe AM, Cant AJ. Clinical spectrum and features of activated phosphoinositide 3-kinase  $\delta$  syndrome: A large patient cohort study. *J Allergy Clin Immunol.* 2017, 139(2), 597-606.e4.
2. Ono S, Okano T, Hoshino A, Yanagimachi M, Hamamoto K, Nakazawa Y, Imamura T, Onuma M, Niizuma H, Sasahara Y, Tsujimoto H, Wada T, Kunisaki R, Takagi M, Imai K, Morio T, Kanegane H. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for XIAP Deficiency in Japan. *J. Clin. Immunol* 2017, 37(1), 85-91.
3. Kojima D, Muramatsu H, Okuno Y, Kataoka S, Murakami N, Tanahashi Y, Suzuki K, Kato T, Sekiya Y, Kawashima N, Narita A, Nishio N, Hama A, Imai K, Nonoyama S, Takahashi Y, Kojima S. Successful T-cell reconstitution after unrelated cord blood transplantation in a patient with complete DiGeorge syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2016, 138(5), 1471-1473.e4.
4. Singh S, Rawat A, Suri D, Gupta A, Garg R, Saikia B, Minz RW, Sehgal S, Chan KW, Lau YL, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N, Ohara O. X-linked agammaglobulinemia: Twenty years of single-center experience from North West India. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016, 117(4), 405-411.
5. Sato T, Okano T, Tanaka-Kubota M, Kimura S, Miyamoto S, Ono S, Yamashita M, Mitsuiki N, Takagi M, Imai K, Kajiwara M, Ebato T, Ogata S, Oda H, Ohara O, Kanegane H, Morio T. Novel compound heterozygous mutations in a Japanese girl with Janus kinase 3 deficiency. *Pediatr Int.* 2016, 58(10), 1076-1080
6. Tsujita Y, Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Yeh TW, Mitsuiki N, Asano T, Ohnishi H, Kato Sekinaka Y, Zaha K, Kato T, Okano T, Takashima T, Kobayashi K, Kimura M, Kunitsu T, Maruo Y, Kanegane H, Takagi M, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Ohara O, Okada S, Kobayashi M, Morio T, Nonoyama S. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause activated phosphatidylinositol 3-kinase  $\delta$  syndrome-like immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2016, 138(6), 1672-1680.e10.

7. Elkaim E, Neven B, Bruneau J, Mitsui-Sekinaka K, Stanislas A, Heurtier L, Lucas CL, Matthews H, Deau MC, Sharapova S, Curtis J, Reichenbach J, Glastre C, Parry DA, Arumugakani G, McDermott E, Kilic SS, Yamashita M, Moshous D, Lamrini H, Otremba B, Gennery A, Coulter T, Quinti I, Stephan JL, Lougaris V, Brodzski N, Barlogis V, Asano T, Galicier L, Boutboul D, Nonoyama S, Cant A, Imai K, Picard C, Nejentsev S, Molina TJ, Lenardo M, Savic S, Cavazzana M, Fischer A, Durandy A, Kracker S.. Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide 3-kinase  $\delta$  syndrome 2: A cohort study. *J Allergy Clin Immunol*. 2016, 138(1), 210-218.
8. Wada T, Toma T, Yasui M, Inoue M, Kawa K, Imai K, Morio T, Yachie A. Different Clinical Phenotypes in 2 Siblings With X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016, 26(1), 63-5.
9. 友田昂宏、満生紀子、岡野翼、田中（久保田）真理、宮本智史、木村俊介、高木正稔、今井耕輔、梶原道子、金兼弘和、森尾友宏. ロタウイルスワクチン株の持続排泄を認めた重症複合免疫不全症 日本小児科学会雑誌. 2016, 11(120), 1643-1648
10. 今井耕輔. B細胞シグナル伝達異常と原発性免疫不全症. 炎症と免疫 2016, 24(6), 67-75
11. 池上 雄亮, 吉田 さやか, 堀田 有希, 田口 真輝, 大仲 雅之, 鈴木 里香, 橋本 直樹, 山下 基, 岡野 翼, 高島 健浩, 星野 顕宏, 今井 耕輔, 金兼 弘和, 森尾 友宏.  $\gamma$ グロブリン皮下注射が有効であった分類不能型免疫不全症の1例 奈良県総合医療センター医学雑誌 2016. 20 巻 1号;103-106
12. 岡本 圭祐, 今井 耕輔 【血球の増加と減少】 白血球 リンパ球減少症 小児内科 2016. 48 巻 7号 974-978
13. 木脇祐子, 手束真理, 小林大輔, 阿部志保, 森尾友宏, 今井耕輔, 北川昌伸. パラインフルエンザウイルス3型(PIV3)感染を契機として肺胞蛋白症を発症した完全型DiGeorge症候群の1剖検例 病理と臨床. 2016, 34 (6), 631-636.
14. 金兼弘和, 高島健浩, 今井耕輔. 原発性免疫不全症における診断のすすめ方 モダンメディア別冊. 2016, 62 (4), 130-137.
15. 平本梨花, 大曾根眞也, 今村俊彦, 石田宏之, 高島健浩, 今井耕輔, 森尾友宏, 細井創. 臍帯血移植にて救命し得た、サイトメガトウイルス感染症合併重症複合型免疫不全症の一例 日本小児血液・がん学会雑誌. 2016, 52 (5), 449-453.

## (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 金兼弘和, 小野真太郎, 岡野翼, 星野顕宏, 柳町昌克, 浜本和子, 中沢洋三, 今井俊彦, 小沼正栄, 新妻秀剛, 笹原洋二, 辻本弘, 高木正俊, 今井耕輔, 森尾友宏. XIAP欠損症に対する造血幹細胞移植. 第39回日本造血細胞移植学会総会 2017.03.04 島根(口頭) 国内
2. 西村聡, 星野顕宏, 松本和明, 小野真太郎, 田中真理, 足洗美穂, 満生紀子, 宮村能子, 橋井佳子, 磯田健志, 柳町昌克, 梶原道子, 高木正稔, 今井耕輔, 金兼弘和, 森尾友宏. X連鎖性高IgM症候群に対する強度減弱前処理による造血細胞移植. 第39回日本造血細胞移植学会総会 2017.03.03 島根(ポスター) 国内

3. 高木正稔, 松本和明, 西村聡, 田中真理, 宮本智史, 星野顕宏, 柳町昌克, 満生紀子, 今井耕輔, 金兼弘和, 森尾友宏, 梶原道子, 石渡泰芳, 瀧川加奈子, 前つかさ, 安原真人, 青木由貴, 宮澤大輔.. 小児難治性血液腫瘍に対するクロファラビンおよびブスルファンを用いた前処置による血縁 HLA 半合致移植. 第 39 回日本造血細胞移植学会総会 2017.03.02 島根 (ポスター) 国内
4. 西村聡, 星野顕宏, 松本和明, 田中真理, 岡野翼, 和田泰三, 谷内江昭宏, 満生紀子, 柳町昌克, 梶原道子, 高木正稔, 今井耕輔, 金兼弘和, 森尾友宏 多彩な自己免疫疾患を合併した異型形質細胞による移植後リンパ増殖症の 1 例 (ポスター) 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会 2016.12.17 東京 国内
5. 宮本智史, 田中真理, 山下基, 岡野翼, 満生紀子, 柳町昌克, 今井耕輔, 高木正稔, 梶原道子, 金兼弘和, 森尾友宏, 特異な形態を呈した  $\gamma/\delta$  T 細胞性リンパ腫/白血病の一例 (ポスター) 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会 2016.12.17 東京 国内
6. 田中真理, 高木正稔, 西村聡, 宮本智史, 星野顕宏, 満生紀子, 柳町昌克, 今井耕輔, 金兼弘和, 森尾友宏, TCF3-PBX1(E2A-PBX1)融合遺伝子を認めた B リンパ芽球性リンパ腫の一例 (口頭) 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会 2016.12.17.東京 国内
7. 星野顕宏, 岡田賢, 吉田健一, 奥野友介, 津村弥来, 西村志帆, 坂田園子, 高木正稔, 今井耕輔, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 宮野悟, 小川誠司, 小島勢二, 野々山恵章, 森尾友宏, 金兼弘和, IKZF 1 体細胞変異による造血異常と自己免疫疾患(口頭) 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会、2016.12.16. 東京 国内
8. 松本和明, 西村聡, 星野顕宏, 田中真理, 山下基, 下村真毅, 北澤宏展, 渡邊健一郎, 森嘉生, 加藤環、野々山恵章, 小田紘嗣, 小原收, 満生紀子, 柳町昌克, 梶原道子, 今井耕輔, 高木正稔, 金兼弘和, 森尾友宏, 風疹ウイルスワクチン株の持続感染を契機に診断した LIG4 欠損症に対し、非血縁者間骨髄移植を施行した一例 (口頭) 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会 2016.12.15. 東京 国内
9. 外山大輔, 山本将平, 藤田祥央, 小金澤征也, 秋山康介, 星野顕宏, 吉田健一, 満生紀子, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 宮野悟, 小原收, 高木正稔, 今井耕輔, 金兼弘和, 小川誠司, 野々山恵章, 森尾友宏, 磯山恵一, IPEX 症候群に骨髄異形成症候群を合併した 15 歳男児例 (口頭) 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会 2016.12.15. 東京 国内
10. 松田裕介, 小泉瑛子, 村岡正裕, 白橋徹志郎, 梅暁子, 岡本浩之, 和田泰三, 東馬智子, 谷内江昭宏, 田中桂輔, 今井耕輔, 金兼弘和, 森尾友宏, 39 歳時に初めて診断に至った CD40L 欠損症の一例 (ポスター) 第 48 回日本小児感染症学会学術集会 2016.11.19 岡山 国内
11. 岡本圭祐, 田中絵里子, 岡野翼, 多田憲正, 今井耕輔, 金兼弘和, 森雅亮, 森尾友宏, 小児期発症サルコイドーシスの 4 例(口頭) 第 48 回日本小児感染症学会学術集会 2016.11.19 岡山 国内
12. Imai K. Hematopoietic stem cell transplantation for P`rimary. The 21st Congress of the Asian Pacific Society of Respirology (APSR 2016) 2016.11.11 THAILAND 国外
13. 加登翔太, 早川格, 半谷まゆみ, 関正史, 三谷友一, 今留謙一, 和田泰三, 澤田明久, 井上雅美, 今井耕輔, 樋渡光輝, 滝田順子. 臍帯血移植生着後に再燃を来した重症 EB ウイルス関連リンパ増殖性疾患の 1 例.(口頭)第 2 2 回小児血液・SCT 研究会 2016.10.28 東京 国内
14. 小林千佳, 満生紀子, 今井耕輔, 金兼弘和, 森尾友宏, 高木正稔. Genetic alteration of Myeloid/NK cell precursor acute leukemia.(ポスター) 第 78 回日本血液学会学術集会 2016.10.13 横浜 国内

15. Ono S, Okano T, Hoshino A, Yanagimachi M, Takagi M, Imai K, Morio T, Kanegane H. Hematopoietic stem cell transplantation for XIAP deficiency (ポスター) XLP-WAS 2016 Symposium-London 2016.09.26 London 国外
16. Imai K. Primary antibody deficiency in Japan: overview and P13K related disorders. (口頭) XLP-WAS 2016 Symposium-London 2016.09.26 London 国外
17. Kanegane H, Hoshino A, Takashima T, Yeh T-W, Okano T, Yamashita M, Imai K, Morio T. Selective dysregulation of Epstein Barr virus infection in hypomorphic ZAP70 mutation. (ポスター) XLP-WAS 2016 Symposium-London 2016.09.26 London 国外
18. Rojavin M, Kanegane H, Borte H, Imai K, Hubsch A, Jolles S. Analysis of Patient Treatment Satisfaction from Five Studies of HIZENTRA 20% Subcutaneous Immunoglobulin. (ポスター) 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiency (ESID) 2016.09.22 Barcelona, Spain 国外
19. Okano T, Watanabe E, Takashima T, Nishikawa T, Kawano Y, Tomoda T, Tanaka-Kubota M, Miyamoto S, Yeh T, Yamashita M, Tanaka K, Mitusiki N, Ohara O, Takagi M, Imai K, Kanegane H, Morio T. IGG1 Gammopathy in X-SCID Caused by Maternal T and B cell Engraftment. (口頭) 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiency (ESID) 2016.09.22 Barcelona, Spain 国外
20. Moriya K, Tanita K, Ohnishi H, Niizuma H, Rikiishi T, Nishikomori R, Ishige T, Imai K, Kanegane H, Sasahara Y, Arakawa H, Kure S, Morio T. T<sub>B</sub>-α S32 Mutations Underly Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency Manifestations and Correlation with Immunological Parameters. (ポスター) 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies 2016.09.23 Barcelona, Spain 国外
21. Jolles S, Rojavin M, Nelson Jr. R, Wasserman R.L, Borte M, Kanegane H, Imai K. Efficacy and Safety of HIZENTRA in Patients with Primary Immunodeficiency in Japan, Europe, and the US. (ポスター) 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies 2016.09.23 Barcelona, Spain 国外
22. Schwab C, Gabrysch A, Hoshino M, Slatter M, Hayakawa S, Schubert D, Klemann C, Frede N, Salzer U, Speckmann C, Freiburger T, Lorenz H.M, Hauck F, Klobuch S, Zeissig S, Leichtner A, Van de Veerdonk F, Elemnto O, Giulino-Roth L, Duckers G, Niehues T, Alsina L, Deya-Martinez A, Kanderiva V, Fronkova E, Price C, Patino V, Blumberg R, Yesim Kucuk Z, Seneviratne S, Kanariou M, Lougaris V, Albert M, Giese T, Litzman J, Ehl S, Okada S, Imai K, Dybedai I, Tasken K, Wolff D, Warnatz K, Hambleton S, Arkwright P, Cant A, Kanegane H, Grimbacher B. The Clinical Spectrum and Treatment Options of 82 Individuals with CTLA-4 Deficiency. (口頭) 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiency (ESID) 2016.09.22 Barcelona, Spain 国外
23. Hoshino A, Okada S, Yoshida K, Nishida N, Yamashita M, Okano T, Tsumura M, Nishimura S, Sakata S, Takagi M, Imai K, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Nonoyama S, Morio T, Kanegane H. Abnormal Hematopoiesis and Autoimmunity in Humans with Germline IKZF1 Mutations. (口頭) 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies 2016.09.22 Barcelona, Spain 国外

24. Sekinaka Y, Mitsuiki N, Imai K, Yabe M, Mitsui-Sekinaka K, Honma K, Arai A, Yoshida K, Miyano S, Seiji K, Hira A, Takata M, Ohara O, Ogawa S, Morio T, Nonoyama S. Common Variable Immunodeficiency Caused by Fanc Mutations. (口頭) 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies 2016.09.22 Brcelona, Spai 国外
25. L.A. Henderson, A.E. O'Connell, J.I. Chu, Y.N. Lee, S. Volpi, M. Armant, I.B. Barlan, A. Ozen, S. Baris, I.C. Hanson, J.M. Despotovic, A. Saitoh, T. Takachi, K. Imai, A. King, S. Arredondo, A. Galy, D.A. Williams, S.Y. Pai, L.D. Notarangelo. GENE THERAPY USING A SELF-INACTIVATING LENTIVIRAL VECTOR AMELIORATES T CELL RECEPTOR REPERTOIRE ABNORMALITIES IN PATIENTS WITH WISKOTT-ALDRICH SYNDROME. (ポスター) 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiency (ESID) 2016.09.22 Barcelona Spain 国外
26. T. Mizukami, M. Iwata-Okada, T. Nishimura, T. Kawai, M. Onodera, K. Imai, S. Nonoyama, O. Ohara, H. Nunoi. CLINICAL AND GENETIC PROFILES OF CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE IN JAPAN. (ポスター) 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies 2016.09.22 Barucelona Spain 国外
27. S. Singh, A. Rawat, D. Suri, A. Gupta, R. Garg, B. Saikia, R. Minz, S. Sehga, K. Chan, Y. Lau, C. Kamae, K. Honma, N. Nakagawa, K. Imai, S. Nonoyama, K. Oshima, N. Mitsuiki, O. Ohara. SPECTRUM OF BTK GENE MUTATIONS IN A SINGLE-CENTRE COHORT OF X-LINKED AGAMMAGLOBULINEMIA FROM NORTH INDIA. (ポスター) 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiency (ESID) 2016.09.22 Barcelona Spain 国外
28. Leiding J, Okada S, Shcherbina A, Abinun M, Pulsipher M, Hagin D, Linemans C, Sullivan K, Bunin N, Kilic S, De La Calle-Martin O, Roiman C, Aldave J.C, Iguchi A, Imai K, Ohkawa T, Gennery A, Slatter M, Ochs H, Mori T, Torgerson T. Hematopoietic Stem cell Transplantation in Patients with Gain of Function STAT1 Mutation. (ポスター) 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies 2016.09.22 Barcelona, Spain 国外
29. Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Tsujita Y, Mitsuiki N, Asano T, Sekinaka Y, Kanegane H, Yoshida K, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Ohara O, Okada S, Kobayashi M, Takagi M, Morio T, Nonoyama S. Activated P13 Kinase Delta Syndrome (APDS)-Like Immunodeficiency Caused by PTEN Mutation. (口頭) 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies 2016.09.22 Barcelona, Spain 国外
30. 慶野大, 横須賀とも子, 杉山正伸, 宮川直将, 浜之上聡, 岩崎史記, 檜佐香織, 鹿間芳明, 今川智之, 今井耕輔, 金兼弘和, 森尾友宏, 後藤裕明. CTLA4 ハプロ不全に対する移植後シクロフォスファミド併用 HLA1 アリル不一致非血縁者間骨髓移植. (口頭) 第7回関東甲越免疫不全症研究会 2016.09.18 東京 国内
31. 川原勇太, 森本哲, 熊谷秀規, 多賀直行, 岡野翼, 今井耕輔. MHC class II 欠損症 (CIITA 欠損症) の1例. (口頭) 第7回関東甲越免疫不全症研究会 2016.09.18 東京 国内
32. 今井耕輔. 原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植. (口頭) 第7回関東甲越免疫不全症研究会 2016.09.18 東京 国内

33. 足洗美穂,金兼弘和,今井耕輔,木村菜美子,陳菜穂,岡野翼,小野真太郎,田中真理,宮本智史,小林千佳,満生紀子,青木由貴,田中絵里子,高木正稔,森尾友宏. 低または無ガンマグロブリン血症 50 例に対する皮下注用人免疫グロブリン製剤導入. (口頭) 第 7 回関東甲越免疫不全症研究会 2016.09.18 東京 国内
34. 岡本圭祐,岡野翼,田中絵里子,今井耕輔,金兼弘和,森雅亮,和田泰三,森尾友宏. サルコイドーシスと診断されていた慢性肉芽腫症の一例. (口頭) 第 7 回関東甲越免疫不全症研究会 2016.09.18 東京 国内
35. 緒方昌平,江波戸孝輔,扇原義人,坂東由紀,石井正浩,竹内恵美子,上野浩生,吉田健一,小川誠司,村松秀樹,奥野友介,小島勢二,白石友一,千葉健一,宮野悟,田中洋子,林泰秀,今井耕輔,金兼弘和,森尾友宏. TNFAIP3 パプロ不全を認めた自己免疫性リンパ増殖症候群 1 男児例 (ポスター) 第 44 回日本臨床免疫学会総会 2016.09.08 東京 国内
36. 今井 耕輔. 皮膚所見から免疫不全症がわかるか? (口頭) 第 40 回日本皮膚科学会学術集会 2016.7.2 広島 国内
37. 今井 耕輔. 原発性免疫不全症の新生児スクリーニング:世界の動向と社会的意義. (口頭) 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.05.15 北海道 国内
38. 川田孝太,江波戸孝輔,扇原義人,坂東由紀,安藤寿,緒方昌平,石井正浩,金兼弘和,今井耕輔,森尾友宏. 炎症症状を示さず急激な呼吸不全を呈した JAK3 欠損症の 1 乳児例. (ポスター) 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.05.15 北海道 国内
39. 堀田有希,吉田さやか,田口真輝,大仲雅之,鈴木里香,橋本直樹,岡野翼,今井耕輔,金兼弘和,森尾友宏.  $\gamma$  グロブリン皮下投与により 2 年間良好な経過を得た X 連鎖型無  $\gamma$  グロブリン血症の一例. (ポスター) 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.05.15 北海道 国内
40. 今井耕輔. 放射線感受性高 IgM 症候群原因遺伝子の同定. (口頭) 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.05.14 北海道 国内
41. 扇原義人,坂東由紀,江波戸孝輔,緒方昌平,箕浦克則,今井耕輔,森尾友宏,北野悦子,北村肇,石井正浩. 繰り返す肺炎球菌感染症から診断された先天性補体成分 C2 欠損症例. (口頭) 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.05.14 北海道 国内
42. 小野真太郎,久保田真理,岡野翼,足洗美穂,宮本智史,満生紀子,今井耕輔,高木正稔,金兼弘和,森尾友宏. 造血幹細胞移植により改善した XIAP 欠損症関連炎症性腸疾患. (ポスター) 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.05.14 北海道 国内
43. 浅野孝基,岡田賢,津村弥来,小林正夫,葉姿文,今井耕輔,森尾友宏,関中佳奈子,辻田由喜,野々山恵章. Activated PI3K  $\delta$  syndrome における B 細胞での AKT の過剰リン酸化についての検討. (口頭) 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.05.14 北海道 国内
44. 星野頭宏,金兼弘和,高島健浩,森本哲,川原勇太,岡野翼,山下基,満生紀子,今井耕輔,森尾友宏. 部分的機能低下型 ZAP70 変異は EB ウイルスに対する免疫応答の異常をきたす. (口頭) 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.05.14 北海道 国内
45. 今井耕輔,上田耕一郎,谷内昇一郎,川原勇太,森本哲,野々山恵章. 本邦における WHIM 症候群 5 例の免疫学的検討. (口頭) 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.05.14 北海道 国内
46. 鎌田亜希子,石毛崇,八木久子,滝沢琢己,荒川浩一,河合朋樹,今井耕輔. IKBA 遺伝子異常による無汗性外胚葉形成不全症の一例. (口頭) 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.05.14 北海道 国内

47. 久保田真理,小野真太郎,岡野翼,足洗美穂,宮本智史,満生紀子,今井耕輔,高木正稔,金兼弘和,森尾友宏. 原発性免疫不全症を基礎疾患とする肺胞蛋白症に対する造血幹細胞移植. (口頭) 第119回日本小児科学会学術集会 2016.05.14 北海道 国内
48. Imai K. HYPER-IGM SYNDREOMS DUE TO CSR DEFECTS-HOW TO TREAT ACCORDING TO GENETIC SUBTYPES? (口頭) Asia Pacific Society For Immunodeficiencies 2016.04.27 Hong Kong 国外
49. Imai K. PIDJ AND PIER-PID DATABASE IN JAPAN FOR DOCTORS AND PATIENTS-HOW IT FACILITATES CARE AND RESEARCH?. (口頭) Asia Pacific Society For Immunodeficiencies 2016.04.27 Hong Kong 国外
50. Okano T, Imai K., Tsujita Y, Mitsuiki , Mitsui-Sekinaka K, Takashima T, Kanegane H, Nonoyama S. Broad Spectrum of Clinical Manifestations and Outcome of Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Japanese Patients with Activated P13KD Syndrome Type1. (口頭) ASPID Spring School 2016.05.01 HongKong 国外
51. 佐々木広和,高村聡人,川畑仁人,今井耕輔,森尾友宏,上阪等. 多発性筋炎・皮膚筋炎症例の末梢血リンパ球サブセット解析. (ポスター) 第113回日本内科学会 2016.04.15 東京 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

特になし

(4) 特許出願

なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) GATA2 欠損症由来 iPS 細胞を用いた新規分化因子の同定  
(英語) Identification of novel differentiation factors  
using iPS cells derived from GATA2 deficiency

研究開発担当者 (日本語) 防衛医科大学校・小児科学講座・教授・野々山 恵章  
所属 役職 氏名： (英語) National Defense Medical College, Professor, Shigeaki Nonoyama

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ①遺伝子導入実験  
開発課題名： ②ゲノム編集を用いた新規遺伝子治療開発の基礎実験  
(英語) ①Gene transduction  
②Development of new technology of gene therapy using genome editing

研究開発分担者 (日本語) 国立成育医療センター研究所・成育遺伝研究部・部長・小野寺 雅史  
所属 役職 氏名： (英語) NCCHD, Department of Human Genetics, Head, Masafumi Onodera

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：防衛医科大学校・小児科学講座・野々山 恵章 総括研究報告を参照。

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 4 件、国際誌 9 件)

[英文]

1. Ichida Y, Utsunomiya Y, Onodera M: Effect of the linkers between the zinc fingers in zinc finger protein 809 on gene silencing and nuclear localization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016; 471: 533-538.
2. Obayashi N, Arai K, Nakano N, Mizukami T, Kawai T, Yamamoto S, Shimizu H, Nunoi H, Shimizu T, Tang J, Onodera M: Leopard skin-like colonic mucosa: A novel endoscopic finding of chronic granulomatous disease-associated colitis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2016; 62: 56-59.
3. Ichida Y, Utsunomiya Y, Onodera M: The third to fifth zinc fingers play an essential role in the binding of ZFP809 to the MLV-derived PBS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016; 469: 490-494.
4. Tomono T, Hirai Y, Okada H, Adachi K, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, Okada T: Ultracentrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1). *Molecular Therapy Methods and clinical Development*. 2016; 3: 15058.
5. Nagaya M, Watanabe M, Kobayashi M, Nakano K, Arai Y, Asano Y, Takeishi T, Umeki I, Fukuda T, Yashima S, Takayanagi S, Watanabe N, Onodera M, Matsunari H, Umeyama K, Nagashima H. A transgenic-cloned pig model expressing non-fluorescent modified Plum. *Journal of Reproduction and Development*. 2016; 62(5); 511-520.
6. Kawano Y, Nakae J, Watanabe N, Kikuchi T, Tateya S, Tamori Y, Kaneko M, Abe T, Onodera M, Itoh H. Colonic Pro-Inflammatory Macrophages Cause Insulin Resistance in an Intestinal Ccl2/Ccr2-Dependent Manner. *Cell Metabolism*. 2016; 24: 295-310.
7. Okuno M, Kasahara Y, Onodera M, Takubo N, Okajima M, Suga S, Watanabe N, Suzuki J, Ayabe T, Urakami T, Kawamura T, Kikuchi N, Yokota I, Kikuchi T, Amemiya S, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Ogata T, Fukami M, Sugihara S. Nucleotide substitutions in CD101, the human homolog of a diabetes susceptibility gene in non-obese diabetic mouse, in patients with type 1 diabetes. *J Diabetes Investig* (doi: 10.1111/jdi.12586)
8. Naiki Y, Miyado M, Horikawa R, Katsumata N, Onodera M, Pang S, Ogata T, Fukami M. Extra-adrenal induction of Cyp21a1 ameliorates systemic steroid metabolism in a mouse model of congenital adrenal hyperplasia. *Endocrine Journal*. 2016; 63: 897-904.
9. Goto F, Uchiyama T, Nakazawa Y, Kawai T, Imai K, Onodera M. Persistent impairment of T cell regeneration in a patient with activated PI3K d syndrome. *J Clin Immunol*. (in press)

[和文]

1. 小野寺雅史 我が国の遺伝子治療実施に関する現状 *Pharmstage* 15: 29-35, 2016.
2. 小野寺雅史 遺伝性疾患に対する遺伝子治療 *BioIndustry* 32: 41-48, 2015.
3. 小野寺雅史 IPEX 症候群 *小児科診療* 79 suppl 205, 2016
4. 小野寺雅史 慢性肉芽腫症 *遺伝子医学 MOOK30* 141-145, 2016

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

[海外]

1. Kawai T, Okamura K, Yagita M, Goto F, Nakazawa Y, Uchiyama T, Nakabayashi K, Nunoi H, Harry Malech, Onodera M: A Gene Therapy Clinical Study of a Patient with X-linked Chronic Granulomatous Disease, The 19st Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, Washington DC. 2016.5.4-7

[国内]

1. 河合利尚、内山徹、後藤文洋、中澤裕美子、小須賀基通、和田友香、塚本桂子、伊藤裕司、奥山虎之、小野寺雅史. 乾燥ろ紙血を用いた原発性免疫不全症の新生児マススクリーニングパイロット研究、第119回小児科学会学術集会、2016/5/14、札幌
2. 水野貴基、前川貴伸、中嶋萌、永井章、後藤文洋、中澤裕美子、河合利尚、新関寛徳、小野寺雅史、窪田満第. インフリキシマブが奏功した汎発性膿疱性乾癬の一例、119 回小児科学会学術集会、2016/5/15、札幌
3. Takahashi S, Igarashi Y, Uchiyama T, Onodera M. Single cell-based vector tracing in the patients treated with stem cell gene therapy. 第22回日本遺伝子治療学会学術集会、2016/7/28、東京
4. 後藤文洋、長田香代、峰岸知子、諸田沙織、中島英規、奥山虎之、河合利尚、小野寺雅史、内山徹：重症複合免疫不全症（SCID）の新生児スクリーニング. 第43回日本マススクリーニング学会、2016年8月27日、札幌
5. 内山徹、五十嵐友香、渡辺信之、高橋シリラット、中澤裕美子、河合利尚、後藤文洋、山田雅文、有賀正、小野寺雅史. Selective pressure of vector-derived ADA in ADA-SCID patients treated with gene therapy. 第78回日本血液学会学術集会 2016/10/13-15、横浜
6. 後藤文洋、内山徹、河合利尚、小野寺雅史. 新規の ADA スプライシング変異を認めた重症複合免疫不全症の一例 第58回日本小児血液・がん学会学術集会 2016/12/15 東京

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 原発性免疫不全症の対する遺伝子治療について、小野寺雅史、一般公開フォーラム ,2017/1/18 東京

(4) 特許出願

特になし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) GATA2 欠損症由来 iPS 細胞を用いた新規分化因子の同定  
(英語) Identification of novel differentiation factors using iPS cells derived from GATA2 deficiency
- 研究開発担当者 (日本語) 防衛医科大学校・小児科学講座・教授・野々山 恵章  
所属 役職 氏名： (英語) National Defense Medical College, Professor, Shigeaki Nonoyama
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) ①RNA シークエンスによる mRNA プロファイリング解析  
開発課題名： ②バイオインフォマティクス解析による GATA2 欠損によって影響される遺伝子群の同定  
(英語) ① mRNA profiling by RNA sequencing  
② Identification of genes modulated by deletion of GATA2 by bioinformatics analysis
- 研究開発分担者 (日本語) 公益財団法人かずさ DNA 研究所・技術開発研究部・副所長・小原 収  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Technology Development, Kazusa DNA Research Institute

## II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：防衛医科大学校・小児科学講座・野々山 恵章 総括研究報告を参照。

## III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）  
該当なし
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表  
該当なし
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし
- (4) 特許出願  
該当なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) GATA2 欠損症由来 iPS 細胞を用いた新規分化因子の同定  
(英語) Identification of novel differentiation factors using iPS cells derived from GATA2 deficiency

研究開発担当者 (日本語) 防衛医科大学校・小児科学講座・教授・野々山 恵章  
所属 役職 氏名： (英語) National Defense Medical College, Professor, Shigeaki Nonoyama

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) ①DNA メチル化に基づく iPS 細胞の質的検定  
開発課題名： ②GATA2 欠損症における新規分化遺伝子領域の DNA メチル化変化の同定  
③GATA2 欠損症における新規分化遺伝子領域のヒストン修飾変化の同定  
(英語) ① Evaluation of iPS cells using DNA methylation  
②Identification of methylated genes on iPS cells derived from iPS cells  
③Identification of differential histone modification on iPS cells derived from GATA2 deficiency

研究開発分担者 (日本語) 山梨大学大学院総合研究部医学域社会医学講座・講師・三宅 邦夫  
所属 役職 氏名： (英語) University of Yamanashi, Senior Assistant Professor, Kunio Miyake

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：防衛医科大学校・小児科学講座・野々山 恵章 総括研究報告を参照。

野々山 恵章教授 (防衛医科大学校・小児科学講座)、今井 耕輔准教授 (東京医科歯科大学・小児周産期地域医療講座) らのグループとともに iPS 細胞における DNA メチル化による品質評価の測定法の確立と B 細胞分化過程においてダイナミックに変化する DNA メチル化領域を見出した。

造血幹細胞の分化過程において細胞特異的な遺伝子発現が行われており、その際に DNA のメチル化変化による遺伝子の発現調節が関与していると考えられる。したがって、分化への障害に関与する DNA のメチル化領域を同定することが必要である。今回は健常者の血液からナイーブ B 細胞、メモリー B 細胞

を分画した DNA サンプルを用いて DNA メチル化解析を行った。網羅的に DNA メチル化を解析する手法として、イルミナ社の Infinium HumanMethylation450 BeadChip を用いて 45 万か所の CpG メチル化を測定した。ナイーブ B 細胞と比較してメモリーB 細胞では全ゲノムレベルで低メチル化傾向を示していた。ナイーブ B 細胞で AVG beta>0.8 かつメモリーB 細胞で AVG beta<0.2 で抽出されてきた CpG は 461CpGs であったのに対し、ナイーブ B 細胞で AVG beta<0.2 かつメモリーB 細胞で AVG beta>0.8 で抽出されてきた CpG は 11CpGs のみであった。これらの結果からナイーブ B 細胞からメモリーB 細胞へ分化する過程において多数の遺伝子が脱メチル化していることが明らかになったことから、造血幹細胞分化過程において DNA のメチル化はダイナミックに調節されている可能性が考えられる。したがって今後は、GATA2 欠損 iPS 細胞由来造血幹細胞分化においてこれらの標的遺伝子の DNA メチル化の異常を明らかにしていく予定である。エピジェネティクス発現調節メカニズムにおいて DNA メチル化とともにヒストン修飾も中心的な働きを担っており、造血幹細胞分化過程においてもダイナミックに変化していることが考えられるが、今回の研究期間において実施することはできなかった。

網羅的 DNA メチル化解析により同定された標的の遺伝子領域について多検体での再現性の検証が必要になる。その際の解析手法として次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンス解析法と HPLC を用いた解析法を検討した。皮膚繊維芽細胞と健常者ヒト iPS 細胞を用いて、4 つの遺伝子領域 (*SP100*, *RAB25*, *UBE1L*, *SALL4*) のメチル化解析を行った。その結果どちらの解析法でも、*RAB25* と *SALL4* は皮膚繊維芽細胞で高メチル化、iPS 細胞で低メチル化し、一方で *SP100* と *UBE1L* は皮膚繊維芽細胞で低メチル化、iPS 細胞で高メチル化していることを測定することができた。次世代シーケンサーは多数の領域を多検体同時に解析することができ、カバレッジ数を増やすことにより定量的な解析も可能であり、HPLC 法は安価でハイスループットな解析が可能であることが明らかになった。今後、GATA2 欠損 iPS 細胞由来造血幹細胞分化過程における標的遺伝子の DNA メチル化解析では用途に応じた解析が可能であると考えられる。

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1 件、国際誌 2 件)

1. Andoh-Noda T, Akamatsu W, Miyake K, Kobayashi T, Ohyama M, Kurosawa H, Kubota T, Okano H. Differential X Chromosome Inactivation Patterns during the Propagation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. Keio J Med., 2017, in press.
2. Nguyen Quoc Vuong Tran, Kunio Miyake. Neurodevelopmental disorders and environmental toxicants: epigenetics as an underlying mechanism. International Journal of Genomics. 2017, in press.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

特になし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

特になし

(4) 特許出願

特になし

## 平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金

### (難治性疾患実用化研究事業) 成果報告書

平成 28 年 4 月 1 日 ≪27 医研開 3999 号≫ で交付決定のありました平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金 (難治性疾患実用化研究事業) の平成 28 年度における成果について、医療研究開発推進事業費補助金 (研究者用) 取扱要領第 18 条第 1 項の規定により、下記のとおり報告します。

#### I. 基本情報

事業名 : (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases

補助事業課題名 : (日本語) GATA2 欠損症由来 iPS 細胞を用いた新規分化因子の同定  
(英語) Identification of novel differentiation factors using iPS cells derived from GATA2 deficiency

補助事業担当者 (日本語) 防衛医科大学校・教授・野々山恵章  
所属 役職 氏名 : (英語) National Defense Medical College・Professor・Shigeaki Nonoyama

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ①GATA2 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  
分担課題名 : ②GATA2 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  
③分化因子異常による疾患の遺伝子診断、分化因子による治療法の開発  
(英語) ①Identification of novel hematopoietic stem cell differentiation factors using iPS cells derived from GATA2 deficiency  
②Identification of novel immune cell differentiation factors using iPS cells derived from GATA2 deficiency  
③Establishment of genetic diagnosis and treatment for the diseases caused by differentiation factor defect.

補助事業分担者 (日本語) 防衛医科大学校小児科学講座教授 野々山恵章  
所属 役職 氏名 : (英語) Professor and Chairman, Department of Pediatrics, National Defense Medical College, Shigeaki Nonoyama, M.D., Ph.D.

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### 和文

#### 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、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 細胞から血液前駆細胞、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、以下の研究を行った。

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、検定を通過した数クローンを以後の実験に用いた。なお、通常の検定に加え、独自の方法として網羅的全 DNA メチル化解析による方法を確立した。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を解析する方法を開発した。

ヒト iPS 細胞から CD34 陽性血液前駆細胞への分化法を確立した。この系を用いて iPS 細胞から血液前駆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 陽性血液前駆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 GATA2 変異を正常化した。GATA2 変異の正常化は DNA シークエンスで確認した。これにより、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+ヒト血液前駆細胞に分化させた。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 陽性血液前駆細胞に分化する事を示した。すなわち患者での GATA2 変異単独で、iPS 細胞から CD34 陽性血液前駆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 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 陽性血液前駆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 陽性血液前駆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 細胞からそれぞれ血液前駆細胞を分化させ、分化途上で発現する mRNA を全 RNA シークエンスで比較し、GATA2 変異により転写が異なる遺伝子群を同定した。全 RNA シークエンス解析法は、高い定量性をもって遺伝子発現解析を実施するために、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て用いた。RNA シークエンスに用いた細胞は、iPS 細胞から造血前駆細胞に分化させ、血液前駆細胞への各分化段階である CD34<sup>-</sup>、CD34<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>、CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>に sorting にて分取した細胞である。同定した遺伝子群は、GATA2 が転写し、iPS 細胞から造血前駆細胞、造血幹細胞への分化に必要な分子をコードすると考えられる。

以上、GATA2 欠損症由来 iPS 細胞を用いて血液前駆細胞、造血幹細胞への分化障害の解析に成果をあげた。

#### 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

血液前駆細胞から免疫系細胞分化を検討するために、T 細胞レセプターの多様性、骨髄血液前駆細胞から common lymphoid precursor、前駆樹状細胞への分化状態を解析する系を開発した。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 T 細胞の減少および TREC の低下で明らかにした。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を示した。さらに、in vitro で GATA2

異常患者由来 CD34 陽性骨髄血液前駆細胞からの T 細胞分化が障害されている事を明らかにした。このことから、T 細胞機能成熟に関わる分化因子を GATA2 が発現誘導していることが明らかになった。

### ③ 分化因子異常による疾患の遺伝子診断、分化因子による治療法の開発

GATA2 欠損症を遺伝子診断する手法を確立した。これにより国内の GATA2 欠損症患者 14 人を同定した。患者の血液系、免疫系の異常を臨床症状、臨床データから明らかにした。血液系では骨髄異形成症候群を発症する頻度が高いこと、T 細胞免疫異常による易感染性を呈する事、造血幹細胞移植による治療の適応である事を示した。

## 英文

### (1) Identification of novel hematopoietic stem cell differentiation factors using iPS cells derived from GATA2 deficiency

GATA2 deficiency is a disease that exhibits lack of dendritic cells, NK cells, B cells, and dysfunction of T cells. In order to identify new differentiation factors of hematopoietic progenitor cells and immune cells (T cells, dendritic cells, NK cells, B cells), the following study was conducted.

iPS cells derived from 2 patients with different mutations of GATA 2 deficiency were established. The quality of established iPS cells was examined. In addition to the usual test, a comprehensive whole DNA methylation analysis method was established as a novel method. Illumina's Infinium Human Methylation 450 BeadChip was used to analyze the methylation status of 450,000 places.

A differentiation method from human iPS cells to CD34 positive hematopoietic progenitor cells was established. It was found that iPS cells derived from GATA 2 deficiency are defective in the differentiation to CD34 positive hematopoietic progenitor cells in all clones of iPS cells derived from 2 patients, if compared to iPS cells derived from healthy donor.

Next, the GATA 2 mutation of patient-derived iPS cells was repaired by genome editing. We used the TALEN system for genome editing. In genome editing by TALEN, the introduction of mutation into non-target genes is low when compared with CRISPR/Cas9. Since introduction of mutation into other genes is not preferable, we corrected the GATA 2 mutation using the TALEN system. Correction of the GATA2 mutation was confirmed by DNA sequencing. As a result, except for the GATA 2 mutation, iPS cells with identical genome information were established.

The iPS cells with GATA2 mutation and iPS cells that the GATA2 mutation was corrected were differentiated into CD34 + human hematopoietic progenitor cells. iPS cells with GATA2 mutation showed impaired differentiation into CD34 positive blood progenitor cells. In contrast, iPS cells that the GATA2 mutation was corrected differentiated into CD34 positive hematopoietic progenitor cells similar as iPS cells derived from healthy donor. Since GATA 2 is a transcription factor, this result indicated that genes that were involved in the differentiation from iPS cells into CD34 positive hematopoietic progenitor cells failed to be transcribed because of this GATA 2 mutation. These genes are highly likely to encode a differentiation factors from iPS cells to CD34 positive blood progenitor cells.

Then, mRNA expressions were analyzed by RNA sequence, and genes that were

differently transcribed between differentiated cells with GATA2 mutation and cells that GATA2 mutation was corrected were identified. Cells used for RNA sequence included CD34<sup>-</sup> cells, CD34<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup> cells, CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> cells, CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells, which are in the differentiation stages of hematopoiesis. The identified gene group is thought to encode molecules necessary for the differentiation from iPS cells to hematopoietic progenitor cells.

## ② Identification of novel immune cell differentiation factors using iPS cells derived from GATA2 deficiency

To investigate the differentiation of immune cells from hematopoietic progenitor cells, we developed a system to analyze the diversity of T cell receptors, the common lymphoid precursor from bone marrow blood precursor cells, and the differentiation state into progenitor dendritic cells. In patients with GATA 2 deficiency, the decrease in T cell neogenesis was revealed by the reduction of thymic naïve T cells using the newly developed 10-color FACS analysis and the decrease of TREC copy numbers in the patients. In addition, IL-4 and IL17-producing was decreased in patients' T cells. Furthermore, it was revealed that T cell differentiations from CD34 positive myeloid progenitor cells derived from GATA2 deficient patients were impaired in vitro. These results revealed that GATA 2 is involved in the transcription of the differentiation factors responsible for functional T cell maturation.

## (3) Establishment of genetic diagnosis and treatment for the diseases caused by differentiation factor defect

We established genetic diagnosis method for GATA2 deficiency. Using this method, we identified 14 patients with GATA2 deficiency in Japan. Clinical symptoms and clinical data clarified abnormality of patient's blood and immune system. Myelodysplastic syndrome (MDS) and opportunistic infection caused by T cell defect are observed. From the data, it is indicated that hematopoietic stem cell transplantation is the treatment of choice.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 11 件)

1. Kato T, Crestani E, Kamae C, Honma K, Yokosuka T, Ikegawa T, Nishida N, Kanegane H, Wada T, Yachie A, Ohara O, Morio T, Notarangelo L.D, Imai K, Nonoyama S. RAG1 deficiency may present clinically as selective IgA deficiency. *J Clin Immunol*. 2015, 35:280-288.
2. Kreins A.Y, Ciancanelli M.J, Okada S, Kong X, Ramirez-Alejo N, Kilic S.S, Baghdadi J.E, Nonoyama S, Mahdavian S.A, Ailal F, Bousfi ha A, Mansouri D, Nievas E, Ma C.S, Rao G, Bernasconi A, Kuehn H.S, Niemela J, Stoddard J, Deveau P, Cobat A, Azbaoui S.E, Sabri A, Lim C.K, Sundin M, Avery D.T, Halwani R, Grant A.V, Boisson B, Bogunovic D, Itan Y, Moncada-Velez M, Martinez-Barricarte R, Migaud M, Deswarte C, Alsina L, Kotlarz D, Klein C, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Cormier-Daire V, Rose-John S, Picard C, Hammarstrom L, Puel A, Al-Muhsen S, Abel L, Chaussabel D, Rosenzweig S.D, Minegishi Y, Tangye S.G, Bustamante J, Casanova JL, and Boisson-Dupuis S. Human

- TYK2 deficiency: Mycobacterial and viral infections without hyper-IgE syndrome. *J Exp Med.* 2015, 212:1641-1662.
3. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD, Oksenhandler E, Puck JM, Sullivan KE, Tang ML, Franco JL, Boby Gaspar H. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol.* 2015, 35:696-726.
  4. Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Sato H, Tomizawa D, Kajiwara M, Nagasawa M, Morio T, Nonoyama S. Clinical features and hematopoietic stem cell transplantations for CD40 ligand deficiency in Japan. *J Allergy Clin Immunol.* 2015, 136:1018-1024.
  5. Cantaert T, Schickel JN, Nonoyama S, Durandy A, Meffre E. Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in Human B Cell Precursors Is Essential for Central B Cell Tolerance. *Immunity.* 2015, 43:884-95.
  6. Elkaim E, Neven B, Bruneau J, Mitsui-Sekinaka K, Stanislas A, Heurtier L, Lucas CL, Matthews H, Deau MC, Sharapova S, Curtis J, Reichenbach J, Glastre C, Parry DA, Arumugakani G, McDermott E, Kilic SS, Yamashita M, Moshous D, Lamrini H, Otremba B, Gennery A, Coulter T, Quinti I, Stephan JL, Lougaris V, Brodzski N, Barlogis V, Asano T, Galicier L, Boutboul D, Nonoyama S, Cant A, Imai K, Picard C, Nejentsev S, Molina TJ, Lenardo M, Savic S, Cavazzana M, Fischer A, Durandy A, Kracker S. Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide 3-kinase  $\delta$  syndrome 2: A cohort study. *J Allergy Clin Immunol.* 2016, 138:210-218.e9.
  7. Kojima D, Muramatsu H, Okuno Y, Kataoka S, Murakami N, Tanahashi Y, Suzuki K, Kato T, Sekiya Y, Kawashima N, Narita A, Nishio N, Hama A, Imai K, Nonoyama S, Takahashi Y, Kojima S. Successful T-cell reconstitution after unrelated cord blood transplantation in a patient with complete DiGeorge syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2016, 138:1471-1473.e4.
  8. Singh S, Rawat A, Suri D, Gupta A, Garg R, Saikia B, Minz RW, Sehgal S, Chan KW, Lau YL, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsuiki N, Ohara O. X-linked agammaglobulinemia: Twenty years of single-center experience from North West India. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016, 117:405-411.
  9. Tsujita Y, Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Yeh TW, Mitsuiki N, Asano T, Ohnishi H, Kato Z, Sekinaka Y, Zaha K, Kato T, Okano T, Takashima T, Kobayashi K, Kimura M, Kunitsu T, Maruo Y, Kanegane H, Takagi M, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Ohara O, Okada S, Kobayashi M, Morio T, Nonoyama S. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause activated phosphatidylinositol 3-kinase  $\delta$  syndrome-like immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2016, 138:1672-1680.e10.
  10. Cantaert T, Schickel J, Bannock, Ng Y, Massad C, Delmotte F, Yamakawa N, Glauzy S, Chamberlain N, Kinnunen T, Menard L, Lavoie A, Walter J, Notarangelo L, Bruneau J, Al-Herz W, Kilic S, Ochs H, Cunningham-Rundles C, Burg M, Kuijpers T, Kracker S, Kaneko H, Sekinaka Y, Nonoyama S, Durandy A, and Meffre E. Decreased somatic hypermutation induces an impaired peripheral B cell tolerance checkpoint. *J Clin Invest.* 2016, 126: 4289-4302.

11. Hoshino A, Okada S, Yoshida K, Nishida N, Okuno Y, Ueno H, Yamashita M, Okano T, Tsumura M, Nishimura S, Sakata S, Kobayashi M, Nakamura H, Kamizono J, Mitsui-Sekinaka K, Ichimura T, Ohga S, Nakazawa Y, Takagi M, Imai K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Nonoyama S, Morio T, Kanegane H. Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in humans with germline IKZF1 mutations. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 (in press)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表  
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 患者相談会, 日本免疫不全症研究会 (東京), 2017/1/21, 国内
2. 移植ガイドラインの掲載, PIDJ ホームページ, 2016/9, 国内

(4) 特許出願  
該当なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) GATA2 欠損症由来 iPS 細胞を用いた新規分化因子の同定  
(英語) Identification of novel differentiation factors using iPS cells derived from GATA2 deficiency
- 研究開発担当者 (日本語) 防衛医科大学校・小児科学講座・教授・野々山 恵章  
所属 役職 氏名： (英語) National Defense Medical College, Professor, Shigeaki Nonoyama
- 実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) ① TALEN プラスミドの設計及び作製  
開発課題名： ② iPS 細胞へのゲノム編集実験の技術指導  
(英語) ① Design and construction of TALEN expression vectors  
② leading of genome editing for iPS cells
- 研究開発分担者 (日本語) 広島大学大学院理学研究科・数理分子生命理学専攻・教授・山本 卓  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University, Professor, Takashi Yamamoto

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：防衛医科大学校・小児科学講座・野々山 恵章 総括研究報告を参照。

TALEN は、CRISPR/Cas9 と比較した場合、発現用プラスミド作製はやや困難であるものの特異性がより高く、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、同一のゲノムバックグラウンドを持つ iPS 細胞の mRNA 比較を行い、GATA2 により転写される新規分化因子を同定するという目的から、他遺伝子への変異導入は実験上好ましくないため、TALEN によるゲノム編集

が適している。本研究では、GATA2 変異をヒト iPS 細胞において修復するための高活性型 TALEN (Platinum TALEN) プラスミドを設計・作製した。ヒト GATA2 遺伝子の第 6 イントロンに 2 セットの Platinum TALEN ペアを設計し、SSA アッセイにより活性を評価した。この Platinum TALEN を用いて GATA2 欠損症患者由来 iPS 細胞の父系 GATA2 遺伝子第 6 エキソン内の変異を修復した。

また、短鎖 1 本鎖 DNA (ssODN) を用いた変異導入方法を検討した。すなわち、より簡便な短鎖 1 本鎖 DNA (ssODN) を鋳型とする修正方法を採用する目的で、ssODN を用いた 1 塩基置換について検討した。ssODN を用いた培養細胞でのノックイン効果をまず検討するため、大腸癌由来細胞 HCT116 細胞において HPRT1 遺伝子座を切断する CRISPR-Cas9 を利用した。その結果、1 塩基改変を示す細胞が検出され (10% 以下)、ssODN による改変も不可能ではないことが示された。

また、TALEN プラスミドを用いた GATA2 欠損症由来 iPS 細胞の遺伝子修復と、正常 iPS 細胞への GATA2 変異導入の技術指導を行った。

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 2 件)

1. Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakuma T, Yamamoto T, Toki T, Ito E, Yamamoto T, Kokubu C, Takeda J, Taniguchi H, Arahori H, Wada K, Kitabatake Y and Ozono K. Systematic Cellular Disease Models Reveal Synergistic Interaction of Trisomy 21 and GATA1 Mutations in Hematopoietic Abnormalities. Cell Rep. 2016, 15, 1228-41.
2. Ichianagi N, Fujimori K, Yano M, Ishihara-Fujisaki C, Sone T, Akiyama T, Okada Y, Akamatsu W, Matsumoto T, Ishikawa M, Nishimoto Y, Ishihara Y, Sakuma T, Yamamoto T, Tsuiji H, Suzuki N, Warita H, Aoki M and Okano H. Establishment of In Vitro FUS-Associated Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cell Reports, 6, 496-510, 2016.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当なし

#### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

ゲノム編集の基本原則と最近の研究動向, 山本 卓, 日本学術会議公開学術講演会「ゲノム編集技術の技術と将来展望」, 2016/8/19, 国内

#### (4) 特許出願

該当なし