

平成 30 年 4 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09642

研究課題名(和文)好中球二次顆粒欠損症の新規C/EBP 変異と好中球分化異常に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of a novel mutation in the C/EBPε gene and granulocytic differentiation in neutrophil-specific granule deficiency

研究代表者

和田 泰三 (Wada, Taizo)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：30313646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：好中球二次顆粒欠損症(SGD)は、転写因子C/EBP $\epsilon$ の異常により引き起こされる先天性免疫不全症である。我々は新規変異を有する世界第3例目のSGD成人例を報告した。本変異はロイシンジッパー領域に存在する2アミノ酸欠失のインフレーション変異であった。細胞内分布やDNA結合能は障害されないものの、他の転写因子との蛋白質間相互作用の減弱により転写活性化能が消失し、SGDを発症することが判明した。また患者好中球では、CD14などの単球マーカーが異常に発現していた。本研究によりC/EBP $\epsilon$ 遺伝子のロイシンジッパー領域の重要性、SGD発症の新たな分子メカニズムが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：Neutrophil-specific granule deficiency (SGD) is a primary immunodeficiency disease caused by mutations in a transcription factor, CCAAT/enhancer binding protein- $\epsilon$  (C/EBP $\epsilon$ ). We have identified a third case of genetically defined SGD. She had a novel homozygous 2-aa deletion in the leucine zipper domain of the C/EBP $\epsilon$  gene. The mutant maintained normal cellular localization and DNA-binding activity, but was defective in protein-protein interaction with other transcription factors, resulting in a loss of transcriptional activation. Her neutrophils showed aberrant expression of monocyte markers such as CD14. These results support the importance of the leucine zipper domain of C/EBP $\epsilon$  for its essential function, and indicate a novel molecular mechanism that leads to SGD in the patient.

研究分野：医歯薬学

キーワード：小児科学 先天性免疫不全症 好中球二次顆粒欠損症

## 1. 研究開始当初の背景

### 好中球二次 (特殊) 顆粒欠損症

(neutrophil-specific granule deficiency, SGD) は、成熟した好中球が本来有すべきラクトフェリンなどの二次顆粒が極めて低形成もしくは欠損し、化膿菌に対し易感染性を示す先天性免疫不全症である。皮膚や肺、中耳などに難治性の反復性化膿性病変をきたす。以前にラクトフェリン欠損症と呼ばれていた疾患と同義である。常染色体劣性遺伝形式をとる。責任遺伝子として、1999年に骨髓系細胞特異的な転写因子である C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein-) 遺伝子が同定された。C/EBP ファミリーの転写因子は6つのメンバーが知られており、いずれも C 末端側に存在するロイシンジッパー領域により二量体を形成して、特異的な DNA 配列に結合する。C/EBP は骨髓球から後骨髓球にかけて発現が高く、好中球の成熟あるいは機能制御に必須であると考えられている。SGD は極めてまれな疾患で、これまでに世界で 10 数例の報告があるが、C/EBP 遺伝子変異が確認された症例は 2 例にすぎなかった。我々は研究開始当初に、SGD の成人症例を見出し、C/EBP 新規変異を同定した (世界第 3 例目)。

## 2. 研究の目的

既報の C/EBP 変異を有する SGD の 2 症例では、いずれも機能喪失型で、ロイシンジッパー領域を含む C 末端側が欠損するフレームシフト変異が報告されている。今回の新規変異は、同じロイシンジッパー領域に存在するものの 6 塩基欠失 (2 アミノ酸欠失) のインフレーム変異であり、disease-causing の変異かどうかを検討した。また今回の症例は重篤な深部感染症に罹患せず経過しており、C/EBP の機能解析から新規変異と病態との関連を検討した。さらに本研究では、SGD の好中球や単球を用い、表面マーカー解析等を検討した。

## 3. 研究の方法

【対象】対象は、皮膚の反復性化膿性病変を契機に診断に至った成人女性である。1 歳頃から潰瘍化を伴う皮膚化膿性感染症を繰り返し、40 歳台から頻度が増え、また治療機転も約 1 か月以上と遷延していた。末梢血スミア、好中球機能異常を疑う治療遷延、家族歴から SGD が疑われた。

### 【方法】

#### (1) C/EBP 遺伝子解析:

末梢血や頬粘膜細胞より DNA や cDNA を作製した。ダイレクトシーケンシング法にて塩基配列を決定した。

#### (2) 免疫染色:

末梢血よりサイトスピン標本を作製し、ラクトフェリンやアルカリフォスファターゼといった二次顆粒に含まれる蛋白の発現を免疫染色にて評価した。コントロールとし

て、一次顆粒内に存在するペルオキシダーゼの発現を評価した。

#### (3) 分子生物学的解析:

各種ベクター (pCMV5-Flag-MalBP, pCAGIP-enhanced GFP, pCAGIP-Myc) に、PCR 法にて得られた正常もしくは変異型 C/EBP 遺伝子の翻訳領域を組み込み、発現ベクターを作製した。蛋白発現をウエスタンブロット法にて検討した。転写活性化能を評価するため、C/EBP の標的遺伝子の 1 つである G-CSF 受容体のプロモーター活性についてレポーターアッセイを行った。C/EBP と Gata1 蛋白などとの蛋白質間相互作用をプルダウンアッセイにて検討した。DNA 結合能の評価のため、変異 C/EBP が、ラクトフェリン遺伝子の C/EBP 結合領域を含むオリゴヌクレオチドに結合するか否かを検討した。

#### (4) フローサイトメトリー解析:

末梢血の各白血球分画の表面抗原の発現をフローサイトメトリーにて解析した。特に患者好中球と単球において、CD15・CD16b・CD66b などの好中球マーカー、CD14・CD16a などの単球マーカーなどを詳細に検討した。二次顆粒欠損により光顕上、好中球と好酸球を区別することは容易ではないため、両者を区別しうる表面マーカーを探索した。好中球の活性酸素産生能を DHR123 法にて検討した。

## 4. 研究成果

#### (1) SGD の新しい発症メカニズムの解析:

C/EBP 遺伝子のロイシンジッパー領域に認められた 6 塩基欠失 (2 アミノ酸欠失; RS) はホモ接合性に認められ、皮膚細胞からも検出されたことから、生殖細胞系列の変異と考えられた。

RS 変異は、培養細胞において安定的に発現すること、G-CSF 受容体のプロモーター活性を促進できないことが示された。さらに、

RS は、既報のフレームシフト変異と異なり、細胞内分布や DNA 結合能は正常に比べ大差ないものの、相互作用することで知られることが明らかにされた。以上より、RS は、2 アミノ酸が欠失するのみのインフレーム変異であるにもかかわらず、他の転写因子との蛋白質間相互作用の減弱により転写活性化能が消失し、SGD が引き起こされることが判明した。

これらの知見は、C/EBP 遺伝子のロイシンジッパー領域の重要性をあらためて示すと同時に、SGD 発症の新たな分子メカニズムを明らかにした点で重要な発見と考えられた (Wada T, et al. J Immunol 2015)。また、本症例の臨床的特徴として、フレームシフト変異を有した症例と異なり、重篤な深部感染症を認めずに 55 歳まで経過している点があげられたが、この発症機序と関連している可能性が考えられた。

## (2) SGD 好中球の特徴：

本症例の好中球においても、二次顆粒の欠損、Pelger-Huët 様の核異常が認められた。活性酸素産生能には大きな異常は認められなかった。フローサイトメトリーでの表面マーカー解析では、従来の報告通り、CD16 発現が低下していた。CD16 の 2 つのアイソフォーム CD16a と CD16b の発現について検討したところ、SGD 好中球では、通常的好中球に特異的に発現する CD16b は全く発現しておらず、発現している CD16 は CD16a と考えられた。通常、CD16a は単球や NK 細胞に発現し、感染などでその発現が増強するとされる。実際、患者がインフルエンザに罹患した際には、好中球における CD16 発現の増強が観察された。患者好中球では、通常は発現しない CD14 が発現していることと合わせ、SGD において好中球は分化異常に伴い、単球マーカーを異常発現することが明らかになった。

このため、SGD 患者では好中球と単球を区別することが光学顕微鏡上のみならず表面マーカー解析を用いても容易ではない。また、SGD の好中球は二次顆粒が欠損しているため、比重に変化が起き、通常の比重分離法で単核球と分離することもできない。さらにフローサイトメトリー上、SGD の好中球は側方散乱 (SSC) が低下しているため単球を避けるゲーティングが難しい。今後、条件が検討し、患者好中球および単球の分離が行われることが期待される。分離した好中球・単球が得られれば、遺伝子発現を網羅的に解析することが可能になり、本疾患における好中球・単球の分化異常の詳細がさらに明らかになることが期待される。

## 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 18 件)

1. Kanegane H, Hoshino A, Okano T, Yasumi T, Wada T, Takada H, Okada S, Yamashita M, Yeh TW, Nishikomori R, Takagi M, Imai K, Ochs HD, Morio T. Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Allergol Int.* 2018;67(1):43-54. doi: 10.1016/j.alit.2017.06.003. [査読有]
2. Wada T, Iwata Y, Kamikawa Y, Wada T, Yachie A. Peripheral blood plasmacytosis in severe fever with thrombocytopenia syndrome. *Jpn J Infect Dis.* 2017;70(4):470-471. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.575. [査読有]
3. Wada T, Toma T, Matsuda Y, Yachie A, Itami S, Taguchi YH, Murakami Y. Microarray analysis of circulating microRNAs in familial Mediterranean fever. *Mod Rheumatol.* 2017;27(6):1040-1046. doi: 10.1080/14397595.2017.1285845. [査読有]
4. Wada T, Miyamoto S, Okamoto H, Matsuda Y, Toma T, Imai K, Takagi M, Morio T, Yachie A. Prolonged neutropenia due to antihuman neutrophil antigen 2 (CD177) antibody after bone marrow transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;64(7). doi: 10.1002/pbc.26388. [査読有]
5. 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. doi: 10.1007/s10875-016-0348-4. [査読有]
6. Wada T, Matsuda Y, Toma T, Koizumi E, Okamoto H, Yachie A. Increased CD69 expression on peripheral eosinophils from patients with food protein-induced enterocolitis syndrome. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;170(3):201-205. doi: 10.1159/000448755. [査読有]
7. Leu H, Sugimoto N, Shimizu M, Toma T, Wada T, Ohta K, Yachie A. Tumor necrosis factor- $\alpha$  modifies the effects of Shiga toxin on glial cells. *Int Immunopharmacol.* 2016;38:139-143. doi: 10.1016/j.intimp.2016.05.022. [査読有]
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 Invest Allergol Clin Immunol.* 2016;26(1):63-65. [査読有]
9. Tasaki Y, Shimizu M, Inoue N, Mizuta M, Nakagishi Y, Wada T, Yachie A. Disruption of vascular endothelial homeostasis in systemic juvenile idiopathic arthritis-associated macrophage activation syndrome: The dynamic roles of angiopoietin-1 and -2. *Cytokine.* 2016;80:1-6. doi: 10.1016/j.cyto.2016.02.008. [査読有]
10. Wada T, Akagi T. Role of the leucine zipper domain of CCAAT/ enhancer binding protein-epsilon (C/EBP  $\epsilon$ ) in neutrophil-specific granule deficiency. *Crit Rev Immunol.* 2016;36(4):349-358. doi: 10.1615/CritRevImmunol.2017019385. [査読有]
11. Lin HT, Masaki H, Yamaguchi T, Wada T, Yachie A, Nishimura K, Ohtaka M,

- Nakanishi M, Nakauchi H, Otsu M. An assessment of the effects of ectopic gp91phox expression in XCGD iPSC-derived neutrophils. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2015;2:15046. doi: 10.1038/mtm.2015.46. [査読有]
12. Okuno Y, Hoshino A, Muramatsu H, Kawashima N, Wang X, Yoshida K, Wada T, Gunji M, Toma T, Kato T, Shiraishi Y, Iwata A, Hori T, Kitoh T, Chiba K, Tanaka H, Sanada M, Takahashi Y, Nonoyama S, Ito M, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanegane H. Late-onset combined immunodeficiency with a novel IL2RG mutation and probable revertant somatic mosaicism. *J Clin Immunol.* 2015;35(7):610-614. doi: 10.1007/s10875-015-0202-0. [査読有]
13. Sugimoto N, Leu H, Inoue N, Shimizu M, Toma T, Kuroda M, Saito T, Wada T, Yachie A. The critical role of lipopolysaccharide in the upregulation of aquaporin 4 in glial cells treated with Shiga toxin. *J Biomed Sci.* 2015;22:78. doi: 10.1186/s12929-015-0184-5. [査読有]
14. Wada T, Akagi T, Muraoka M, Toma T, Kaji K, Agematsu K, Koeffler HP, Yokota T, Yachie A. A novel in-frame deletion in the leucine zipper domain of C/EBP leads to neutrophil-specific granule deficiency. *J Immunol.* 2015;195(1):80-86. doi: 10.4049/jimmunol.1402222. [査読有]
15. Sakakibara Y, Wada T, Muraoka M, Matsuda Y, Toma T, Yachie A. Basophil activation by mosquito extracts in patients with hypersensitivity to mosquito bites. *Cancer Sci.* 2015;106(8):965-971. doi: 10.1111/cas.12696. [査読有]
16. Yang X, Hoshino A, Taga T, Kunitsu T, Ikeda Y, Yasumi T, Yoshida K, Wada T, Miyake K, Kubota T, Okuno Y, Muramatsu H, Adachi Y, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanegane H. A female patient with incomplete hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by a heterozygous XIAP mutation associated with non-random X-chromosome inactivation skewed towards the wild-type XIAP allele. *J Clin Immunol.* 2015;35(3):244-248. doi: 10.1007/s10875-015-0144-6. [査読有]
17. 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 LD, Imai K, Nonoyama S. RAG1 deficiency may present clinically as selective IgA deficiency. *J Clin Immunol.* 2015;35(3):280-288. doi: 10.1007/s10875-015-0146-4. [査読有]
18. Hashida Y, Wada T, Saito T, Ohta K, Kasahara Y, Yachie A. Early diagnosis of Danon disease: Flow cytometric detection of lysosome-associated membrane protein-2-negative leukocytes. *J Cardiol.* 2015;66(2):168-174. doi: 10.1016/j.jjcc.2014.09.011. [査読有]
- [学会発表](計 6件)
1. Wada T, Toma T, Miyazawa H, Koizumi E, Shirahashi T, Yachie A. Longitudinal analysis of circulating interleukin-18 in patients with familial Mediterranean fever carrying MEFV mutation in exon 10. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society. (2017.10.30, 石川県音楽堂, 金沢市)
2. Wada T, Toma T, Matsuda Y, Yachie A, Itami S, Taguchi Y-h, Murakami Y. Microarray analysis of microRNA expression in familial Mediterranean fever. 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. (2016.9.21, Centre Convencions Internacional de Barcelona, Barcelona, Spain)
3. 和田泰三, 松田裕介, 小泉瑛子, 村岡正裕, 東馬智子, 谷内江昭宏. 好中球二次顆粒欠損症における好酸球のフローサイトメトリーによる同定. 第119回日本小児科学会学術集会. (2016.5.13, ロイトン札幌, 札幌市)
4. 和田泰三. XIAP欠損症: 全身型若年性特発性関節炎との類似点. 第25回日本小児リウマチ学会総会・学術集会. (2015.10.9, 金沢歌劇座, 金沢市)
5. Wada T. Immunophenotypic aberrations in hemophagocytic lymphohistiocytosis. The 56th Spring Meeting of the Korean Society of Hematology. (2015.5.30, Grand Hilton Hotel, Seoul, Korea)
6. Wada T, Akagi T, Muraoka M, Toma T, Kaji K, Agematsu K, Koeffler HP, Yokota T, Yachie A. Aberrant expression of monocyte markers on granulocytes from patients with neutrophil-specific granule deficiency. The 11th Congress of Asian Society for Pediatric Research. (2015.4.18, 大阪国際会議場, 大阪市)
- [図書](計 0件)
- [産業財産権]
- 出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ped.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田 泰三(WADA, Taizo)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：30313646

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし