

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09671

研究課題名(和文)慢性肉芽腫症における遺伝子変異の除去による治療法の開発

研究課題名(英文)Development for the treatment of chronic granulomatous disease

研究代表者

栗林 太(Kuribayashi, Futoshi)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：60251443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：好中球NADPHoxidaseを構成するgp91phox遺伝子に変異があると慢性肉芽腫症(CGD)になり、患者は細菌や真菌の感染症に罹患しやすくなる。CGDの診断は申請者等が作成したモノクローナル抗体(7D5)により行ってきた。この抗体は、gp91phoxを細胞外から認識する抗体であり、非常に便利ではあったが、エピトープ(gp91phox上の抗原)は不明のままであった。本課題において、申請者等はこの7D5の抗原を決定した。このことにより丸ごとのエクソンが存在しないgp91phoxやイントロンの一部が組み込まれたgp91phoxの検出が確実に became。

研究成果の概要(英文)：Chronic granulomatous disease (CGD) is an inherited disorder caused by a mutation in the gene encoding gp91phox. The phagocytes of CGD patients lack the ability to produce superoxide anion (O_2^-) by the NADPH oxidase complex enzyme. CGD patients are susceptible to severe infections. Cyt b, the catalytic center of the NADPH oxidase, consists of two subunits gp91phox and p22phox. It has been suggested that the extracellular region of gp91phox is necessary and sufficient to form the epitope for monoclonal antibody (mAb) 7D5. To further elucidate 7D5 epitope on human gp91phox, we constructed chimeric DNA expressed human and mouse gp91phox recombinant protein. The fusion proteins were immunostained for 7D5. The 143ELGDRQNES151 region was found to reside at the extracellular surface on human gp91phox and represents an important epitope for the interaction with 7D5. In particular, amino acid R147 is a unique epitope for membrane-associated Cyt b 7D5.

研究分野：生物化学

キーワード：慢性肉芽腫症 活性酸素 NADPH oxidase 好中球

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまで慢性肉芽腫症 (CGD) の診断と治療に携わり、好酸球正常型 CGD を初めて発見し (Kuribayashi et al., *BBRC* 1995)、NADPH オキシダーゼ蛋白質複合体の活性化における構造変化や結合様式を明らかにしてきた (Kuribayashi et al., *EMBO* 2002,)。また、これまでの科学研究費に基づく研究により、好中球 NADPH oxidase 活性化機構を明らかにした (Sakamoto et al., *J Biochem.* 2006, Kuribayashi F et al., *Genes to Cells* 2008)。更に NADPH oxidase から産生される極微量の活性酸素の測定方法を著すことができた (Yamazaki et al., *Trop Med Health.* 2011)。これらの新規事項の公表を通して生命科学と小児科学の進歩に寄与してきた。申請者等が以前報告した CGD 患者は NADPH オキシダーゼを構成する主要蛋白質である gp91^{phox} をコードする遺伝子のプロモーター領域に変異がある。そのため、転写機構が好中球と異なる好酸球は IFN 投与により正常な gp91^{phox} が転写される。好酸球が正常人と同等の活性酸素を生成する結果、致死的な感染症を避けることができた。しかし、gp91^{phox} 遺伝子のプロモーターに変異のある症例は数例であり、CGD の原因の約 40%は、他の遺伝病と同様、ナンセンス変異により翻訳が途中で終了することによる (*Blood* 1996)。その中途ストップを持つ患者に対しても、経験的に IFN の有効例が多いが、これまでその理由は不明であった。

2. 研究の目的

好中球は病原微生物等を貪食すると、細胞休止期には細胞内に存在する蛋白質が、細胞膜に移行して膜蛋白質であるシトクローム b₅₅₈ (p22^{phox} と gp91^{phox} のヘテロダイマー) と結合し、食細胞 NADPHoxidase は活性化される。この活性化型 NADPHoxidase は活性酸素の 1 種であるスーパーオキシド (O₂⁻) を生成

し、この O₂⁻ から派生した様々な活性酸素種は強力な殺菌作用を持つ。これまで、CGD の診断は申請者等が作成したモノクローナル抗体 (7D5) により行って来た。この抗体は、gp91^{phox} を細胞外から認識する抗体であり、非常に便利ではあったが、エピトープ (gp91^{phox} 上の抗原) は不明のままであった。本申請課題の目的は 7D5 と結合するエピトープを明らかにすることであり、更にはエクソスキップの機構を明らかにする。

3. 研究の方法

申請者等がこれまで行った研究から、7D5 はヒトの好中球 gp91^{phox} には結合するが、アミノ酸レベルで 80% のホモロジーのあるマウスの gp91^{phox} には結合しない。その相違を利用して 7D5 の抗原部位を決定する。ヒト gp91^{phox} 遺伝子を発現ベクターに組み込んだプラスミドを COS 細胞に導入し、gp91^{phox} の発現を 7D5 にて染色される細胞として確認する。同様に、マウス gp91^{phox} を COS 細胞にトランスフェクションし、マウス由来の gp91^{phox} の発現が見られないことを確認する。タンパク質の発現自体は、ヒト及びマウス間で同一抗原である C 末に対する抗体を用いて、Western blot 法にて確認する。その後、ヒト及びマウスのキメラタンパク質をドメインごとに、あるいはエクソンごとにキメラの組合せを作成し、COS 上での発現を 7D5 にて確認する。更にはアミノ酸 1 残基ごとの置換体を作成し解析することにより 7D5 の認識部位をピンポイントに把握する。

4. 研究成果

ヒトとマウスのキメラタンパク質の解析結果から gp91^{phox} の 143 から 151 番目のペプチドが 7D5 の認識部位として重要であることを明らかにした。この部位は細胞外ドメインであり、推定上のヘム結合部位や N リンクによる糖鎖の共有結合アミノ酸と近接している。更

に、147番目のアルギニンは7D5とgp91^{phox}との結合に重要であり、かつ不可欠であることを証明した。このことにより、丸ごとのエクソンが存在しないgp91^{phox}やイントロンの一部が組み込まれたgp91^{phox}の検出を確実に行うことができるようになった。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計9件)

1. Kawai C, Yamauchi A, Kuribayashi F. Monoclonal antibody 7D5 recognizes the R147 epitope on the gp91^{phox}, phagocyte flavocytochrome b558 large subunit. *Microbiol Immunol*. 2018;62(4):269-280. 査読有 (doi: 10.1111/1348-0421.12584.)
2. Kikuchi H, Mimuro H, Kuribayashi F. Resveratrol strongly enhances the retinoic acid-induced superoxide generating activity via up-regulation of gp91-phox gene expression in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(1):1195-1200. 査読有 (doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.161.)
3. Yamauchi A, Yamamura M, Katase N, Itadani M, Okada N, Kobiki K, Nakamura M, Yamaguchi Y, Kuribayashi F. Evaluation of pancreatic cancer cell migration with multiple parameters in vitro by using an optical real-time cell mobility assay device. *BMC cancer*. 2017; 17(1):234. 査読有 (doi: 10.1186/s12885-017-3218-4.)
4. Kikuchi H, Nakayama M, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Nakayama T. Histone acetyltransferase PCAF is involved in transactivation of Bcl-6 and Pax5 genes in immature B cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;(3):509-13. 査読有 (doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.011.)
5. Kikuchi H, Nakayama M, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T. Paired box gene 5 isoforms A and B have different functions in transcriptional regulation of B cell development-related genes in immature B cells. *Microbiol Immunol*. 2015;59(7):426-31. 査読有 (doi: 10.1111/1348-0421.12272.)
6. Kikuchi H, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nakayama M, Takami Y, Nishitoh H, Nakayama T. Lack of GCN5 remarkably enhances the resistance against prolonged endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through up-regulation of Bcl-2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;463(4):870-5. 査読有 (doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.027.)

7. Okura Y, Yamada M, Kuribayashi F, Kobayashi I, Ariga T. Monocyte/macrophage-specific NADPH oxidase contributes to antimicrobial host defense in X-CGD. *J Clin Immunol*. 2015 Feb;35(2):158-67. 査読有 (doi: 10.1007/s10875-015-0138-4.)
8. Yamagishi T, Ochi N, Yamane H, Kuribayashi F, Takigawa N. A 60-year-old asymptomatic woman with pulmonary lesions and cervical lymphadenopathy. *Chest*. 2015;147(2):e48-51. 査読有 (doi: 10.1378/chest.14-1215.)
9. Kikuchi H, Nakayama M, Kawai C, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T. Histone acetyltransferase p300/CBP-associated factor is an effective suppressor of secretory immunoglobulin synthesis in immature B cells. *Microbiol Immunol*. 2015;59(4):243-7. 査読有 (doi: 10.1111/1348-0421.12237.)

〔学会発表〕(計6件)

1. Yamauchi A, Okamoto S, Itadani M, Kawai C, Kuribayashi F. The Effect of ROS on the chemotaxis of Inflammatory cells. Con Bio 2017 第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会 合同大会 (神戸市), 2017/12/06
2. Yamauchi A, Okamoto S, and Kuribayashi F. ROS suppress the cellular chemotaxis. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, ICIS 2017. (金沢市), 2017/10/30
3. Yamamura M, Yamauchi A, Katase N, Okawaki M, Katata Y, Kuribayashi F, Kurebayashi J, Yamaguchi Y. Heat shock protein 90 inhibitors suppress PDGFRA reactivation and other receptor tyrosine kinase activation important in drug resistant gastrointestinal stromal tumors. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017. (Washington, D.C., USA) 2017/04/03
4. 山村真弘, 山内明, 片瀬直樹, 栗林太, 山口佳之. HSP90阻害剤は、膵臓癌細胞における増殖、走化性および上皮間葉転換を阻害する. 第54回日本癌治療学会学術集会(横浜市), 2016/10/06
5. 刀祢重信, 杉本憲治, 斉藤典子, 佐久間哲史, 山本卓, 網代廣三, 栗林太. アポトーシスにおける核凝縮と核内ボディーの解析 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 (神戸市), 2015/12/03
6. Yamauchi A, Yamamura M, Katase N, Itadani M, Okada N, Yamaguchi Y,

Nohno T, Kuribayashi F. Suppressing pancreatic cancer metastasis by small molecular compounds. International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015 (東京), 2015/07/10

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗林 太 (Kuribayashi, Futoshi)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号： 60251443

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

川井 千景 (Kawai, Chikage)

川崎医科大学・医学部・研究補助員

板谷 益美 (Itadani, Masumi)

川崎医科大学・医学部・実験補助員