

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09677

研究課題名(和文)慢性肉芽腫症における炎症制御異常の機序および遺伝子治療に関する検討

研究課題名(英文)Hyper-inflammation and gene therapy for chronic granulomatous disease

研究代表者

河合 利尚 (Kawai, Toshinao)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・生体防御系内科部免疫科・医長

研究者番号：20328305

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)：慢性肉芽腫症(CGD)では活性酸素種(ROS)が産生されず、感染症や慢性炎症をきたす。今回、gp91phoxの新たな変異型について検討したところ、mRNAの不安定性からgp91phox発現が低下したが、健常者の8割程度のROS産生能が残存した。しかし、本患者はCGD患者に類似した臨床像を呈した。X連鎖CGD保因者と異なり、全ての好中球でROS産生がわずかに低下しても、CGD症状を示すことが示唆された。CGD遺伝子治療では、長期的に高い遺伝子導入効率を維持することは期待できないが、遺伝子導入細胞は正常レベルのROSを産生するため、遺伝子治療はCGDの病態を改善する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Chronic granulomatous disease (CGD) is a rare inherited disorder characterized by an inability of phagocytes to produce reactive oxygen species (ROS), leading to life-threatening infections and aseptic granulomatous colitis (AGC). In this study, we assessed the function of a novel mutation of gp91phox, which causes decreasing of gp91phox expression because of instability of mutant gp91phox mRNA, leading to a slight reduction of ROS generation in phagocytes. This suggests that the slight attenuation of neutrophil and monocyte ability to produce ROS could affect the ability to kill pathogens and affect regulation of inflammatory responses in the patient. In current gene therapy for CGD, it is difficult to achieve high gene marking for long term after gene therapy; however, gene modified phagocytes could produce ROS reaching to that of healthy subjects. This indicates that gene therapy would improve clinical feature in CGD.

研究分野：医歯薬学

キーワード：原発性免疫不全症 慢性肉芽腫症 炎症 感染症

1. 研究開始当初の背景

慢性肉芽腫症(以下CGD)は、国内で300例が登録される希少疾患で、厚生労働省は難治性疾患に指定している。本疾患では、NADPH オキシダーゼから活性酸素種(ROS)が産生されず、細菌や真菌を殺菌できないため重篤な感染症を繰り返す。さらに、慢性的な過剰炎症に伴う症状(肉芽腫形成、CGD 腸炎(広義の炎症性腸疾患)など)が約50%の症例に合併する。肉芽腫を伴う慢性炎症をCGDで高頻度に認めることから、NADPH オキシダーゼに由来するROSはヒトの炎症機構の制御に深く関与すると推測される。しかし、慢性炎症について、いくつかの機序が報告されているが、未だに詳細は不明である。

また、既に、欧米を中心にCGDに対する遺伝子治療が行われているが、重症複合免疫不全症など遺伝子導入細胞が増殖優位性を獲得するような疾患とは異なり、高い遺伝子導入効率を実現することは困難と推測される。しかし、X連鎖CGD保因者の検討から、遺伝子導入効率は10-20%程度でもCGDの病態を回避し得ることが明らかとなっている。一方で、遺伝子導入細胞において、感染症や慢性炎症を回避するために最低限必要とされる活性酸素産生能の域値は不明である。

2. 研究の目的

CGDでは、活性酸素産生能の低下に関連した炎症性腸疾患(CGD 腸炎)を約半数に合併する。そこで、CGD 腸炎および慢性炎症の機序を解析するとともに、CGD 腸炎の疾患活動性マーカーへの臨床応用の可能性について検討した。また、遺伝子治療において、感染症やCGD 腸炎を回避するために必要な遺伝子挿入細胞の活性酸素産生レベルを検討するために、活性酸素の残存活性と臨床症状について検討した。

3. 研究の方法

変異型gp91phoxの解析(末梢血)

患者末梢血を用いて、変異型gp91phox蛋白発現をフローサイトメトリで測定した。ROS産生能は、化学蛍光法およびDHR123を用いたフローサイトメトリで測定した。また、RT-qPCRを用いて、単球におけるgp91phoxのmRNAを測定した。K562細胞株を用いた変異型gp91phoxの解析

野生型あるいは変異型gp91phoxを、レトロウイルスを用いて、K562細胞株へ遺伝子導入し、サブクローニング後、解析に用いた。gp91phox発現をフローサイトメトリで測定した。また、化学蛍光法によってROS産生能を測定した。

炎症性サイトカイン産生能

健常者の単球/マクロファージと変異型gp91phoxを発現する単球/マクロファージについて、LPS刺激に対するTNF、IL-6、IL-8の産生をELISAで測定した。

カルプロテクチン測定

健常者とX連鎖CGD患者のカルプロテクチン産生能について、ELISAを用いて測定した。また、CGD腸炎非罹患CGD患者とCGD腸炎患者について、便中カルプロテクチンをELISAで測定した。

4. 研究成果

今回、NADPH オキシダーゼを構成するgp91phoxの新たな変異に注目した。gp91phox蛋白において、1-304番のアミノ酸置換は、305番以降の変異によって発症するX連鎖慢性肉芽腫症(X-CGD)よりも、臨床経過が重症であることが知られている。本変異は、1-304番に位置する1つのアミノ酸置換であり、患児は、幼児期からBCGリンパ節炎、肺膿瘍、非定型抗酸菌性肺炎に罹患していた。さらに、CGD腸炎でみられる泡沫マクロファ

ージの浸潤を伴う炎症性腸疾患も合併した。臨床的には、X-CGD の経過を示したが、患児の好中球と単球の ROS 産生能は、健常者の 80%程度とわずかな低下であった（典型的な X-CGD は 0%）。次世代シーケンスを用いた遺伝子解析では、ROS 産生に関連する既知の遺伝子に異常を認めなかったことから、本変異と CGD 様症状との関連について検討した。

本変異（変異型 gp91phox）の蛋白発現と ROS 産生に与える影響を検討するために、レトロウイルスを介して gp91phox を発現する K562 細胞株を作成した。フローサイトメトリーでは、変異型 gp91phox の Mean Fluorescence Intensity (MFI) が野生型よりも有意に低下していた。また、化学蛍光法では、PMA に対する ROS 産生は、変異型 gp91phox 発現 K562 細胞で著明に低下していた。そのため、本変異によって gp91phox 蛋白の発現が低下し、ROS 産生能が低下したと推測された。

患者の好中球と単球でも gp91phox の発現（フローサイトメトリー解析の MFI）が健常者よりも低下していた。そこで、単球の gp91phox の mRNA を RT-qPCR で測定したところ、患者単球で mRNA の低下を認めた。gp91phox 発現 K562 細胞株は、野生型と変異型 gp91phox の遺伝子挿入コピー数は約 3 コピーであった。この K562 細胞株においても、単球と同様に変異型 gp91phox の mRNA が低下していた。そこで、K562 細胞株について、BrdU を用いたパルスチェイス法により、mRNA の安定性を検討したところ、変異型 gp91phox の mRNA は、野生型 gp91phox よりも早期に低下していた。これらの結果から、変異型 gp91phox は mRNA の不安定性によって、野生型 gp91phox よりも蛋白発現が低下することが示唆された。

CGD では、単球 / マクロファージの炎症性サイトカイン産生能の亢進が報告されている。患児は、易感染性だけでなく CGD 腸炎と類似した炎症性腸疾患を発症した。そこで、

末梢血から単球を分離し、LPS 刺激に対して産生される炎症性サイトカインを測定した。TNF、IL-6、IL-8 について、患児単球は健常者単球よりも有意に高値を示し、典型的な X-CGD 単球と同様に炎症性サイトカイン産生能が亢進していた。そのため、わずかな ROS 産生能の低下でも、炎症性サイトカイン産生能が亢進し、慢性腸炎をきたす可能性が示唆された。

カルプロテクチンは好中球から産生されるペプチドで、腸炎で好中球が腸管粘膜に浸潤すると、便中のカルプロテクチン濃度が上昇する。実際に、炎症性腸疾患のクローン病や潰瘍性大腸炎では、診断や病勢を評価するために、臨床応用されている。CGD 腸炎でも腸管粘膜へ好中球が浸潤することから、CGD 腸炎患者の便中カルプロテクチン濃度を測定したところ、CGD 腸炎を発症していない CGD 患者や健常者よりも、有意に高値を示した。また、カルプロテクチンの産生経路に対する ROS の関与は不明であったため、健常者と CGD 患者、患児から好中球を分離しカルプロテクチン産生能を比較したところ、明らかな相違は見られなかった。これらの結果から、CGD 患者や患児において、腸炎の補助診断として便中カルプロテクチンの有用性が示唆された。

これまで、正常好中球と異常好中球が混在する X-CGD 保因者の検討では、炎症性腸疾患の報告はみられないことから、細胞数が少なくとも正常レベルの ROS を産生する好中球の存在が、慢性炎症の抑制に寄与することが示唆された。現時点で、CGD の遺伝子治療では、長期的に高い遺伝子導入効率を維持することは期待できない。当センターで遺伝子治療を行った X-CGD 患者は、治療 1 年以降で遺伝子導入細胞は検出されなかった。しかし、遺伝子導入細胞が消失する前には、遺伝子導入細胞は正常レベルの ROS を産生していた。現在、欧米では、レンチウイルスベクターを用

いた遺伝子治療が、CGD に対して行われており、数十%の ROS 産生細胞が検出されたと学会で報告されている。

CGD の遺伝子治療では、10-20%の食細胞で治療遺伝子が発現し、それらの食細胞が健常者と同等の ROS 産生能を示すことで、易感染性や慢性炎症は改善されることが示唆された。

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 3 件)

1. Obayashi N, Arai K, Nakano N, Mizukami T, Kawai T, Yamamoto S, et al. Leopard Skin-Like Colonic Mucosa: A Novel Endoscopic Finding of Chronic Granulomatous Disease-Associated Colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016;62:56-9.
2. Nakazawa Y, Kawai T, Arai K, Tamura E, Uchiyama T, Onodera M. Fecal calprotectin rise in chronic granulomatous disease-associated colitis. *J Clin Immunol* 2017;37:741-743.
3. Ohnishi T, Shinjoh M, Ohara H, Kawai T, Kamimaki I, Mizushima R, et al. Purulent lymphadenitis caused by *Staphylococcus argenteus*, representing the first Japanese case of *Staphylococcus argenteus* (multilocus sequence type 2250) infection in a 12-year-old boy. *J Infect Chemother* 2018;pii:S1341-321X(18)30104-1.

[Epub ahead of print]

[学会発表](計 3 件)

1. Kawai T, Tamura E, Yokoyama M, Watanabe N, Nanbu M, Uchiyama T, et al. An impairment of ROS production in monocytes/macrophages may be associated with induction of granulomatous enteritis. *European Society for Immunodeficiencies. UK* 2017, Oct.
2. Kawai T, Okamura K, Yagita M, Goto F, Nakazawa Y, Uchiyama T, et al. 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. USA* 2016, May.
3. Kawai T. Clinical trials of hematopoietic stem cell gene therapy for monogenic diseases, Symposium. *Japan Society of Gene and Cell Therapy. Osaka* 2015, July.

[図書](計 3 件)

1. 河合利尚. 自己炎症を主体とする免疫異常症. *炎症と免疫* 2017;25:43-48.
2. 河合利尚. 臨床応用された遺伝子治療「原発性免疫不全症」. *小児内科* 2017;49:995-999.
3. 河合利尚. 慢性肉芽腫症. *小児内科* 2015;47Suppl:746-749.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河合利尚 (KAWAI TOSHINAO)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター
ー・生体防御系内科部免疫科・医長
研究者番号：20328305

(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

()