

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07804

研究課題名(和文)慢性肉芽腫症の治療をmRNAのスプライシングを利用して行う。

研究課題名(英文)Treatment options for 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者等はこれまで「活性酸素」の研究を行ってきた。体内で発生する活性酸素は一般的に体に悪いものとして考えられている。例えば、動脈硬化や梗塞後に産生される活性酸素は臓器細胞を障害する。そのため、活性酸素除去のための様々な機構を人体は備えている。細菌にも類似機構が存在し、殺菌のために宿主が産生する活性酸素から逃れる。体内の活性酸素の過剰も人体に害を及ぼすが、ヒトが活性酸素を発生しなくなると、細菌感染から自身を防御することができなくなり、感染症を繰り返す。本課題は後者、即ちヒトの感染防御のために活性酸素がどのように必要なのか、そして治療方法についての研究である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの科研費で活性酸素と生体との関係を明らかにしてきた。特に白血球による殺菌機構の解析や活性酸素の生成に関わる好中球NADPHオキシダーゼ(NOX family)の解析を行ってきた。例えば、内皮細胞に発現する活性酸素とVEGFR2の関係を明らかにし(J Biol Chem. 295:11877, 2020)、白血病細胞の治療機序を解析した(Biosci Biotechnol Biochem. 84:2319, 2020)。2021年には食物に含まれるフラボンがNOX2発現を制御することを著した(Fundamental Toxicological Sciences 8:53, 2021)。

研究成果の概要(英文)：I have been doing my research about superoxide, or reactive oxygen species (ROS). Molecular oxygen (O₂) is likely to catch four electrons and change to water (2H₂O). ROS in human body is generally thought to be a bad reagent. For example, ROS produced by arteriosclerosis or recanalization after ischemic attacks in the body damages local tissues and organs. Thus, human body has several mechanisms to avoid the bad effects by ROS. Bacteria have same mechanisms by which they escape from human defense system for bacterial toxic effects. Thus, overexpression of ROS affects human body as bad reagents, however, low doses or the state without ROS in our body is also not good. In the latter case, we suffer from bacterial infections. In this study we focus on the better effect by ROS and capability for the treatment against bacterial infections.

研究分野：生化学

キーワード：NADPHoxidase 活性酸素 NOX 好酸球 好中球 7D5

1. 研究開始当初の背景

本課題研究代表者が医師になった1990年代にはCGD患者の多くは就学前に命を落とした。治療法が進歩した現在でも平均余命は25～30歳前後である。その背景の中、応募者等が以前IFN

による治療機構を解明したCGD患者は、世界で最も長寿であり孫までいた。この患者は、X染色体にコードされるNOX2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投与によって正常なNOX2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、致命的な感染症を避けることができた(*BBRC 1995*)。NADPHオキシダーゼは蛋白質複合体として構成され活性酸素を産生し殺菌することがこれまで明らかになった。即ち酵素本体のNOX2とp67, p47, p40とRacから構成されており、応募者はオランダでNOX2の解析を実施し(*Blood 1996*)九州大学でp40の機能を明らかにした(*EMBO J 2002*)。

研究代表者はCGDの基礎研究と臨床応用の促進を目的として2009年に川崎医科大学学生化学教室に赴任し研究体制を整えてきた。まず、CGD患者好中球で活性が低下するNADPHオキシダーゼ蛋白質複合体の本体であるgp91のエピゲノム調節を明らかにした(*J Immunol 2011, J Biol Chem 2012, BBRC 2015, BBRC 2018*)。CGDの解析に関しては、北大、九州大、宮崎大小児科、及び川崎医大総合医療センターとの共同研究を継続してきた(*J Clin Immun 2015, 本大学病院: Chest 2015*)。

2. 研究の目的

本課題では患者好中球を直接使用することなく、NADPHオキシダーゼ再構成系を構築できる細胞を使用してNOX familyの構造と機能を明らかにしたい。CGDの解析を通して、IFNによるNASの機構の解明と治療法の確立ができれば、他の血液疾患への応用はもちろんであるが、更に、これまでIFNを使用していないpre-mature stopを持つ遺伝病にも、IFNによる新たな治療法を提供できる可能性がある。

3. 研究の方法

対象細胞としては、白血球由来の培養細胞や患者由来のBリンパ球培養細胞を利用した。これらの細胞の利用方法は研究代表者等が既に確立している。これらの培養細胞には様々な性質がある。例えばNOX2の発現が皆無な細胞、NOX2発現を支持するp22phoxの発現のない細胞もある。これらの性質を利用して解析を進めた。刺激に応じたNOX2のmRNAの発現やタンパク質の発現と機能を独自の方法を用いて検出した。

4. 研究成果

本課題の研究を開始するに当り、まずNOX2の構造を特異的抗体によって明らかにした(*Infection Immunity 2018*)。研究代表者等は2020年になってNOX familyの解析結果を著すことができた(NOX4は*J Biol Chem 2020*, NOX1は*Free Radic Res 2020*)。

このNOX2の発現機構を解析して、フラボンによって発現が高まることやビタミンA (retinoic

acid) による発現を明らかにした (Fundamental Toxicological Sciences 2020, 2021)。まあカルコンによる発現機構を解析した (*Microbiol Immunol.*2020)。更に、白血病細胞の治療方法への基礎的結果を提供した (*Biosci Biotechnol Biochem.*2020)。

日本で最初に発見された慢性肉芽腫症 (CGD) 患者は世界で最も長寿だった。これは好酸球正常型 CGD のためであった (*BBRC.*1995)。この発見は患者の予後に重要であることのみならず、医科学の進歩としても重要である。即ち好中球の殺菌能力が低下していても、寄生虫対応と考えられていた好酸球が細菌感染をも対応可能であることを示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hidehiko Kikuchi, Kaori Harata, Sumiko Akiyoshi, Harishkumar Madhyastha, Futoshi Kuribayashi	4. 巻 8
2. 論文標題 3', 4'-Dihydroxyflavone enhances all-trans retinoic acid-induced superoxide-generating activity through up-regulating transcription of gp91-phox in human monoblastic U937 cells, as opposed to flavone and other hydroxyflavone derivatives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 53-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.8.53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hidehiko Kikuchi, Kaori Harata, Chikage Kawai, Harishkumar Madhyastha, Akira Yamauchi, Futoshi Kuribayashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Retinoic acid dramatically enhances cytotoxicity of equol against human monoblastic U937 cells, but not against human peripheral neutrophils	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 201-206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.8.53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto S, Miyano K, Kajikawa M, Yamauchi A, Kuribayashi F.	4. 巻 84
2. 論文標題 The rRNA synthesis inhibitor CX-5461 may induce autophagy that inhibits anticancer drug-induced cell damage to leukemia cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem	6. 最初と最後の頁 2319-2326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1801378	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyano K, Okamoto S, Yamauchi A, Kawai C, Kajikawa M, Kiyohara T, Tamura M, Taura M, Kuribayashi F.	4. 巻 295
2. 論文標題 The NADPH oxidase NOX4 promotes the directed migration of endothelial cells by stabilizing vascular endothelial growth factor receptor 2 protein.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 11877-11890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014723.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyano K, Okamoto S, Yamauchi A, Kajikawa M, Kiyohara T, Taura M, Kawai C, Kuribayashi F.	4. 巻 54
2. 論文標題 Constitutive activity of NADPH oxidase 1 (Nox1) that promotes its own activity suppresses the colon epithelial cell migration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radic Res.	6. 最初と最後の頁 640-648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2020.1823383.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi H, Mimuro H, Madhyastha H, Kuribayashi F.	4. 巻 63
2. 論文標題 Chalcone skeleton promotes transcription of gp91-phox gene but inhibits expression of gp91-phox protein, and hydroxyl groups in hydroxychalcones participate in the stable expression of gp91-phox protein.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 438-443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12732.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawai C, Yamauchi A, Kuribayashi F.	4. 巻 62
2. 論文標題 Monoclonal antibody 7D5 recognizes the R147 epitope on the gp91phox , phagocyte flavocytochrome b558 large subunit.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 269-280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12584.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山内明、岡本秀一郎、宮野佳、板谷益美、川井千景、栗林太
2. 発表標題 高尿酸血症の免疫機能への影響：尿酸は敵か味方か？
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (横浜)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内明、岡本秀一郎、宮野佳、板谷益美、川井千景、栗林太
2. 発表標題 高尿酸状態の免疫細胞機能への影響 ~尿酸に善玉作用はあるのか~
3. 学会等名 第53回日本痛風・尿酸核酸学会(小倉)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊池 秀彦, 三室 仁美, 栗林 太
2. 発表標題 レスベラトロールはgp91-phox遺伝子の発現増強を介してU937細胞のレチノイン酸誘導性スーパーオキシド産生能を強力に惹起する
3. 学会等名 第 41 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学生化学教室 https://m.kawasaki-m.ac.jp/classroom/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------