

平成 22 年 2 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～ 2009

課題番号：20790731

研究課題名 (和文) 疾患モデルマウスを用いた原発性免疫不全症の解析

研究課題名 (英文) Analysis of Primary Immunodeficiency Syndromes using model mice.

研究代表者

岡田 賢 (OKADA SATOSHI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：80457241

研究成果の概要 (和文)：

重症先天性好中球減少症 (SCN) の疾患モデルマウスの作成を試みた。SCN の責任遺伝子の一つである *ELA2* を発現するレトロウイルス (tet-on) ベクターを作成した。正常 *ELA2* と、既存の患者で認める変異 *ELA2* (P110L, R101Q, C194X) をヒト腎癌細胞株 HEK293 細胞に導入し検討した。*ELA2* の発現は誘導できたが、細胞傷害性が強かった。現在、ドキシサイクリンの投与量を細かく調節することで *ELA2* の発現量を調整する検討をしている。この実験系が確立した後に、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に遺伝子導入を行い、マウスを用いて骨髄再構築実験を行う予定である。

研究成果の概要 (英文)：

We tried to generate Severe Congenital Neutropenia (SCN) model mouse. We produced wild-type (WT), P110L, R101Q and C194X *ELA2* by PCR-based mutagenesis and introduced them into retrovirus Tet-on gene expression vector. We performed gene expression experiment by using HEK293 cells. Although *ELA2* expression was observed, we could not analyze them because the *ELA2* introduced cells result in cell death. Now, we are trying to control *ELA2* expression level by control the concentration of doxycycline. After that, we are planning generate SCN model mouse by BM reconstitution using CD34 positive cells from human cord blood.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学, 小児科学

キーワード：免疫学, 遺伝子, 疾患モデルマウス, *ELA2*

1. 研究開始当初の背景

重症先天性免疫不全症 (SCN) は、乳幼児

期からの好中球減少に伴う難治性、再発性の感染症を併発する原発性免疫不全症であ

る。1999年に欧米より、好中球エラスターゼ遺伝子 *ELA2* のヘテロ接合性変異が報告された。さらに2007年に、常染色体劣性遺伝を呈するSCN患者家系で *HAXI* 遺伝子異常が同定された。他にも *GFI1*, *MAPBP1P*, *WAS* の変異が本症の原因として報告されている。現在、約8割のSCN患者において、これらの責任遺伝子に異常が同定できるようになり、本症の診断に重要な役割をはたすようになったが、これらの遺伝子群の異常が好中球減少を引き起こすメカニズムは、十分に解明されていない。とくにSCNのなかでも最も頻度の高い *ELA2* 異常症は、好中球の *in vitro* での培養系が確立していないこと、*Ela2* のノックアウトマウスや、*Ela2* 変異ノックインマウスにより疾患が再現できないことなどから解析が困難な状況である。

2. 研究の目的

ELA2 異常症の病態解明を行うために、疾患モデルマウスを作成するとともに、その解析を行う。

3. 研究の方法

野生型 *ELA2*, SCN患者で多く認められる変異型 *ELA2* (P110L, R191Q, C194X 変異) を、レトロウイルス tet-on 遺伝子発現系ベクターに組み込む (IRES をはさんで、GFP を同時に発現するようにする)。作成したレトロウイルスベクターを、p-tre 応答ベクターを安定導入させたヒト白血病細胞株 (HL-60) に遺伝子導入し *in vitro* で解析する。具体的には、ドキシサイクリン投与で *ELA2* 発現を誘導しフローサイトメトリー、ウエスタンブロッティングで確認するとともに、免疫染色による好中球エラスターゼの局在の観察、アポトーシスアッセイなどを行う。

テトラサイクリン依存性転写調節因子を発現するトランスジェニックマウス (Tet マウス) の骨髄細胞に、レトロウイルス tet-on 遺伝子発現系ベクターで *ELA2* を遺伝子導入し、放射線照射をしたNOGマウス (NOD/SCID/ γ c null) に移植する。

4. 研究成果

当該期間中に *ELA2* cDNA を、レトロウイルス tet-on 遺伝子発現系ベクターに組み込み、正常の *ELA2*, 既存の患者で認める変異

ELA2 (P110L, R191Q, C194X) を発現するコンストラクトを作成した。作成したコンストラクトをp-tre応答ベクターを安定導入させたヒト白血病細胞株 (HL-60) にリポフェクション法で遺伝子導入を試みたが、遺伝子導入の効率が悪く、解析を行うことができなかった。次に、p-tre応答ベクターを安定導入させた HEK293 細胞を作成し、同様の方法で検討を行った。ドキシサイクリン投与により *ELA2* の発現は誘導できたが、細胞傷害性が強く、思うような結果が得られなかった。細胞障害は、野生型 *ELA2*, 変異型 *ELA2* を導入した細胞の双方で認められた。印象として野生型を導入した細胞の方が、より強い細胞障害性が認められる傾向があるように思われた。そのため、発現した好中球エラスターゼのプロテアーゼ活性が細胞障害性に働いている可能性が考えられた。現在、ドキシサイクリンの投与量を細かく調節することで *ELA2* の発現量を調整し、細胞障害が比較的軽度の状態で観察できる実験系を検討している。Tetマウス由来の骨髄細胞に遺伝子導入を行い検討する実験については、上記の検討ができ次第行う予定である。

ELA2 発現が適切にコントロールできる系が完成した後の次のステップの準備として、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用いて、マウスで骨髄再構築する検討を行った。まず、マグネットビーズで純化した 5×10^5 程度の比較的少量の CD34 陽性細胞を用いて NOD/SCID/ β 2MG null マウスに輸注することで、比較的安定して骨髄再構築ができるようになってきている。

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11件)

- 1) Nakamura-Utsunomiya A, Okada S, Hara K, Miyagawa S, Takeda K, Fukuhara R, Nakata Y, Hayashidani M, Tachikawa K, Michigami T, Ozono K, Kobayashi M. Clinical characteristics of perinatal lethal hypophosphatasia: A report of 6 cases. *Clinical Pediatric Endocrinology*, *in press*, 2010 (査読有り)
- 2) Okada S, Konishi N, Tsumura M, Shirao K, Yasunaga S, Sakai H, Nishikomori R,

Takahara Y, Kobayashi M. Cardiac infiltration in early-onset sarcoidosis associated with a novel heterozygous mutation, G481D, in *CARD15*. *Rheumatology*. 48: 706-707, 2009 (査読有り)

3) 岡田 賢, 石川暢恒, 小林正夫. 先天性好中球減少症. 小児科 50: 1146-1151, 2009 (査読無し)

4) 大坪善教, 白尾謙一郎, 岡田 賢, 但馬剛, 佐倉伸夫, 楠本 隆, 青木幹弘, 中下誠郎. 新規*ETHE1* 遺伝子変異を認めたエチルマロン酸脳症の1例. 小児科学会雑誌 113: 739-744, 2009 (査読有り)

5) 小林正夫, 岡田 賢, 溝口洋子. 重症先天性好中球減少症の分子病態. 分子細胞治療 8: 110-116, 2009 (査読無し)

6) Ishikawa N, Okada S (equally contributed), Miki M, Shirao K, Kihara H, Tsumura M, Nakamura K, Kawaguchi H, Ohtsubo M, Yasunaga S, Matsubara K, Sako M, Hara J, Shiohara M, Kojima S, Takihara Y, and Kobayashi M. Neurodevelopmental abnormalities associated with severe congenital neutropenia due to the R86X mutation in the HAX1 gene. *J Med Genet*. 45: 802-807, 2008 (査読有り)

7) Ohtsubo M, Yasunaga S, Ohno Y, Tsumura M, Okada S, Ishikawa N, Shirao K, Kikuchi A, Nishitani H, Kobayashi M, Takihara Y. Polycomb-group complex 1 acts as an E3 ubiquitin ligase for Geminin to sustain hematopoietic stem cell activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 10396-10401, 2008 (査読有り)

8) Tajima G, Sakura N, Shirao K, Okada S, Tsumura M, Nishimura Y, Ono H, Hasegawa Y, Hata I, Naito E, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Kobayashi M. Development of a new enzymatic diagnosis method for very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency by detecting 2-hexadecenoyl-CoA production and its application in tandem mass spectrometry-based selective screening and newborn screening in Japan. *Pediatr Res*. 64: 667-672, 2008 (査読有り)

9) 岡田 賢, 末永麻由美, 川口浩史, 小林正夫. 非結核性抗酸菌による多発性骨髄炎を呈したインターフェロン γ 受容体1異常症の2例. 小児科学会雑誌 112: 1818-1825, 2008 (査読有り)

10) 岡田 賢, 水上智之, 布井博幸, 小林正夫. 慢性肉芽腫症と他の好中球殺菌能異常. 小児内科 増刊号 40: 1336-1347, 2008 (査読無し)

11) 岡田 賢, 津村弥来, 小林正夫. 好中球異常による先天性免疫不全症. 小児科臨床 61: 1791-1797, 2008 (査読無し)

[図書] (計1件)

1) 岡田 賢, 他. 骨髄不全症候群とリボソームの異常, Annual Review 血液 2010, 中外医学社, 41-49, 2010

[学会発表] (計8件)

1) Okada S. Congenital Neutropenia in Japan. The 2nd Symposium for PID in Asia. February 5, 2010, Chiba

2) Karakawa S, Okada S, et al. A novel splicing mutation in *NEMO* gene in a patient with X-linked ectodermal dysplasia with immunodeficiency. 51th ASH annual meeting. December 6, 2009, New Orleans, USA

3) 岡田 賢, 他. 重症先天性好中球減少症, 周期性好中球減少症における*ELA2* 解析. 第71回日本血液学会, 2009年10月25日, 京都

4) 岡田 賢, 他. 先天性好中球減少症と血液腫瘍. 第71回日本血液学会, 2009年10月25日, 京都

5) Nakamura A, Okada S, et al. Follow-Up of 27 patients with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency: Relevance of Genotype for Clinical Course. ENDO 2009: The 91st Annual Meeting & Expo, June 11, 2009, Washington, USA

6) Okada S, et al. Novel Heterozygous Mutation 572insA in TAC1 Identified in a Patient with Selective IgA Deficiency. 50th ASH annual meeting. December 6, 2008, San Francisco, USA

7) 岡田 賢, 他. 重症先天性好中球減少症の遺伝子解析. 第70回日本血液学会. 2008年10月11日, 京都

8) 岡田 賢, 他. 重症先天性好中球減少症の遺伝子解析. 第111回日本小児科学会学術集会. 2008年4月27日, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 賢 (OKADA SATOSHI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：80457241

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし