

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月5日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791021

研究課題名（和文）ヒト遺伝子導入マウス iPS 細胞由来の樹状細胞を用いた慢性肉芽腫症の病態解析

研究課題名（英文）Mechanism of hyperinflammation in chronic granulomatous disease: mouse iPS cells expressing human gp91phox

研究代表者

河合 利尚（KAWAI TOSHINAO）

（独）国立成育医療研究センター・成育遺伝研究部・室長

研究者番号：20328305

研究成果の概要（和文）：慢性肉芽腫症（CGD）における過剰な炎症反応の病態について検討を行った。免疫応答を制御する役割を持つ単球では、活性酸素がNF κ BやNLRP3インフラマソームを介した細胞内シグナル伝達経路において抑制的に作用することが示唆された。CGDでは、NADPH オキシダーゼ由来活性酸素が低下するため、抑制作用が減弱し炎症性サイトカイン産生能が亢進すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated an underlying mechanisms of excessive inflammation in patients with chronic granulomatous disease. Our data suggested that reactive oxygen species generated by NADPH oxidase suppressed the lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production through NLRP3 inflammasome and NF κ B signaling pathway in monocytes that play a central role of immune response. Although further works are required to clarify the mechanisms of excessive inflammation in CGD patients, this data indicates that reduction of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase would induce dysregulated production of inflammatory cytokines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：小児免疫・アレルギー・膠原病学

1. 研究開始当初の背景

（1）慢性肉芽腫症（CGD）は原発性免疫不全症の中で最も発生頻度が高く、重症感染症を繰り返し、様々な臓器に肉芽腫を形成する疾患である。しかし、本疾患における過剰炎症や肉芽腫形成の機序についてはほとんど明らかにされていない。

（2）CGDでは慢性腸炎や自己免疫性疾患を合併することが多いため、好中球の殺菌能障害以外の病態が存在すると推測された。

（3）CGDの原因遺伝子である *CYBB* 遺伝子は、マウスと高いホモロジーを示すが、マウスとヒト細胞間の相違も明らかとなった。そこで、CGDモデルマウス由来iPS細胞へヒト

変異型 *CYBB* 遺伝子を導入し、変異型 *CYBB* 遺伝子の機能異常を解析できれば、患者負担、倫理的な問題を軽減し、免疫担当細胞の機能解析が可能になると期待された。

2. 研究の目的

(1) CGD の遺伝子変異によって生じる細胞機能と臨床像の関連を検討し、CGD でみられる過剰な炎症反応の臨床像を明らかにする。

(2) CGD にみられる細胞機能の特徴と、新たな治療法の可能性について検討する。

(3) CGD モデルマウス由来 iPS 細胞へヒト変異型 *CYBB* 遺伝子を導入し、マウス iPS 細胞を用いたヒト疾患遺伝子の機能解析の可能性について探求する。

3. 研究の方法

(1) CGD の臨床像について

当センター経過観察中の CGD 症例 23 例の臨床的な特徴について、後方視的検討を行う。また、末梢血リンパ球解析を行う。

(2) 細胞機能解析

患者末梢血単球について、サイトカイン産生能を網羅的に解析する。また、サイトカイン産生に関連する細胞内シグナル伝達経路の変化について検討する。

(3) ヒト疾患モデル iPS 細胞の樹立

CGD モデルマウス由来 iPS 細胞へヒト *CYBB* 遺伝子を導入する。その後、既報告と同様に単球、マクロファージ、樹状細胞へ分化誘導し、サイトカイン産生、細胞内シグナル伝達の変化について検討する。

4. 研究成果

(1) CGD における炎症性疾患

CGD の臨床像を評価するために 2~4 7 才の X 連鎖 CGD 23 例について、感染症以外の炎症性疾患について検討した。炎症性疾患では、肉芽腫形成と CGD 関連腸炎（慢性腸炎）を認め、それぞれ全体の 91.3%、43.5%であった。ただし、肉芽腫については感染巣に一致して形成されているため、感染症との関連が示唆された。

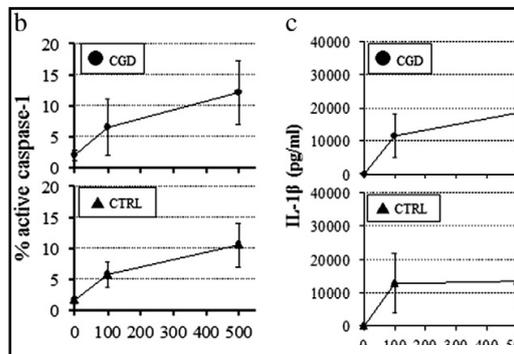
一般に、クローン病や潰瘍性大腸炎など炎症性腸疾患の発生頻度が 0.5~1 人/10 万人であることから、CGD では *CYBB* 遺伝子異常に関連して CGD 腸炎をきたす病態が推測された。今回、*CYBB* 遺伝子変異部位と CGD 腸炎発症との関連は認めなかった。

CGD 末梢血リンパ球解析では、CD27⁺CD19⁺メモリー B 細胞の著明な低下を認めたが、クラススイッチの障害等はみられなかった。B 細胞ではわずかに gp91phox が発現するが、その役割については更なる検討が必要と考えられた。

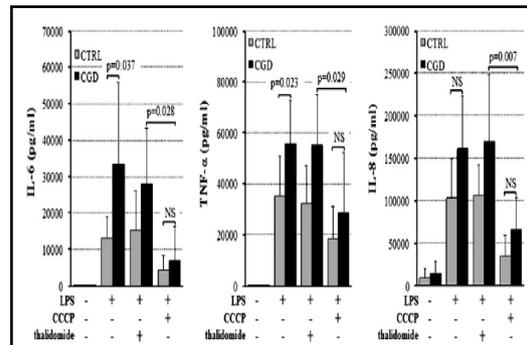
(2) CGD 単球の機能解析と新たな治療の可能性

CGD 症例の臨床像に関する検討(1)から、CGD の過剰炎症は肉芽腫や CGD 関連腸炎の病態に関与することが示唆された。これらの合併症に対して、これまでステロイドや免疫抑制剤による治療が行われた。しかし、免疫不全症に対する免疫抑制治療は易感染性を増悪するため、治療は制限される。そこで、CGD 単球機能を検討するとともに、易感染性を増悪せず過剰な炎症反応を抑制する治療の可能性について探求した。

i) CGD では、lipopolysaccharide (LPS) に対する単球の IL-1 β 産生能は保持されていた。一方、ミトコンドリア由来活性酸素(mROS)を阻害する carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) で IL-1 β 産生能は抑制されたことから、mROS が IL-1 β 産生シグナルに関与することが示唆された。



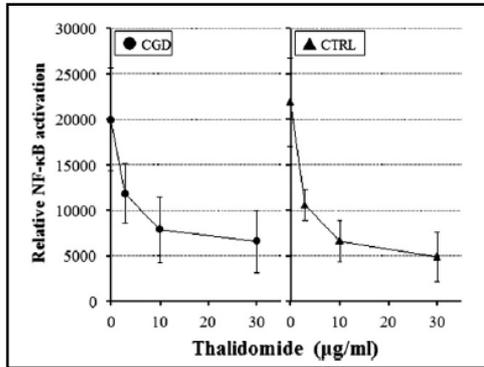
ii) LPS に対する IL-6、IL-8、TNF α などの炎症性サイトカイン産生能は、CGD 単球において有意に亢進していた。これらのサイトカインは、CCCP で有意に低下した。そのため、LPS に対する IL-6、IL-8、TNF α 産生シグナル経路において、mROS は正の制御、NADPH オキシダーゼ由来活性酸素は負の制御に関与することが示唆された。



iii) サリドマイドは TNF α 阻害作用が報告され、実際に、ベーチェット病やサルコイドーシスなどの疾患で臨床的效果が確認されている。サリドマイドの特徴は健常者において、抗 TNF α 阻害生物学的製剤 (イ

ンフリキシマブ等)と異なり、感染症に関連する TNF α 作用を阻害しない点である。このため、単球の炎症機序に与えるサリドマイドの効果について検討した。

NF- κ B は、核内で炎症性サイトカイン関連遺伝子の転写を開始し炎症反応を惹起する。サリドマイドは、CGD 単球において健常者と同様に NF- κ B の核内移行を阻害した。



一方、サリドマイドは、i)、ii)に示した様に、CGD 単球でも健常者と同様に細菌細胞壁成分である LPS 刺激に対するサイトカイン産生阻害作用を認めなかった。このことから、サリドマイドは生体内において感染症に対する免疫応答は維持しながら、過剰な炎症反応を抑制する可能性が示唆された。

(3) ヒト疾患モデル iPS 細胞の樹立
CGD では、遺伝子変異の部位や形式によって、易感染性が変化すると報告されている。しかし、今回の研究では CGD の炎症性疾患と遺伝子変異との関連は明らかでなかった。そのため、CGD の変異型 *CYBB* 遺伝子が炎症機序に与える細胞レベルでの影響について検討を試みた。今回、同一の iPS 細胞へ異なる変異型 *CYBB* 遺伝子を導入し機能解析を行うことで、*CYBB* 遺伝子以外の遺伝的素因を除外できると考えられた。そこで、倫理面を重視し CGD モデルマウス由来 iPS 細胞へヒト *CYBB* 遺伝子を導入した。しかし、分化誘導された造血幹細胞および単球はヒト正常 *CYBB* 遺伝子由来 gp91^{phox} 蛋白や活性酸素を産生しなかった。通常、活性酸素は gp91^{phox} とともに他の 6 種類のタンパクで構成される NADPH オキシダーゼによって産生される。今回の検討から、ヒト gp91^{phox} と他のマウス NADPH オキシダーゼ構成タンパクとの相互作用は十分ではなく、CGD 患者由来 iPS 細胞を用いた研究の必要性が明らかとなった。

今回、検討した遺伝子変異に基づく細胞機能の変化と臨床像との関連について、樹状細胞など単球以外の免疫担当細胞の更なる検討

が必要と考える。今後、患者 iPS 細胞を用いた研究をすすめる上で、iPS 細胞から分化誘導された細胞が生体内の細胞と同じ表現型を有するのか比較検討される。そのため、本研究は CGD における免疫応答機序の研究において、iPS 細胞研究を含む多方面の研究の基盤になる可能性がある。さらに、将来的に遺伝子変異と治療効果の関連を検討することで、新たな治療法の開発へ発展することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

① Kawai T, Onodera M, et al. Thalidomide Attenuates Excessive Inflammation without Interrupting Lipopolysaccharide-driven Inflammatory Cytokine Production in Chronic Granulomatous Disease. *Clinical Immunology*. 査読有、147:122-128, 2013、DOI:10.1016/j.clim.2013.03.004.

② Akagi K, Kawai T, et al. A case of macrophage activation syndrome developing in a patient with chronic granulomatous disease-associated colitis. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 査読有、2013.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652865>

③ 河合利尚、食細胞の数、機能の異常症～慢性肉芽腫症と食細胞機能異常症～、小児科診療、査読無、76:431-437、2013

④ 河合利尚、慢性肉芽腫症と他の食細胞機能異常症、小児内科、査読無、44:242-243、2012

⑤ 河合利尚、深在性真菌症の実際、深在性真菌症、査読無、7:44-45、2011

⑥ 河合利尚、慢性肉芽腫症、小児科診療、査読無、73Suppl:226-228、2010

⑦ Kawai T, et al. Osteomyelitis Due to Trimethoprim/Sulfamethoxazole-Resistant *Edwardsiella tarda* Infection in a Patient with X-linked Chronic Granulomatous Disease. *Infection*. 査読有、39:171-3、2011. DOI:10.1007/s15010-011-0080-1.

〔学会発表〕(計 10 件)

① 河合利尚、慢性肉芽腫症腸炎に対するサリドマイド治療の効果と安全性、第 115 回小児科学会学術集会、2012/4/20、福岡

② Kawai T, et al. Foxp3-Retrovirus Transduction to CD4+ T Cells Induce Regulatory Potential with Decreased Secretion of Interferon-gamma. *American Society of Gene & Cell Therapy*. 2012/5/16, Philadelphia, PA, USA

③ 河合利尚、慢性肉芽腫症の肉芽腫性疾患に対するサリドマイド治療、第 44 回小児感染症学会、2012/11/24、北九州

④ 河合利尚、慢性肉芽腫症における非感染性炎症疾患の検討、第 114 回小児科学会学術集

会、2011/8/14、東京

⑤Kawai T. Gene Therapy for a Patient with Chronic Granulomatous Disease. 第17回遺伝子治療学会シンポジウム、2011/7/15、九州

〔図書〕(計1件)

河合利尚、中山書店、小児科診断治療指針(分担 慢性肉芽腫症)、2012、833-836

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 利尚 (KAWAI TOSHINAO)

(独)国立成育医療研究センター・成育遺伝
研究部・室長

研究者番号：20328305