

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591563

研究課題名(和文)慢性肉芽腫症の治療法の開発

研究課題名(英文)Development for a 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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：好中球が活性酸素を生成しないために発症する慢性肉芽腫症(CGD)は小児期から感染症を繰り返す。本課題の目的は、CGDの治療に資する基礎的な解析結果を提出することである。研究代表者のこれまでの解析から、CGDをいくつかのクラスに分類し、また、活性酸素産生タンパク質の内、gp91phoxを中心とするタンパク質の転写調節やエピゲノム解析を行った。その結果、新たなCGDの解析結果を著すことができた(J Clin. Immunol. and Chest 2015)。

研究成果の概要(英文)：The goal of this research is a presentation of a basic scientific results concerning Chronic Granulomatous Disease (CGD) together with an analysis of transcription, post-transcription and the modulation of mRNA. This research clarified a new type of CGD (J Clin. Immunol. 2015) and revealed a rare type of female CGD (Chest 2015).

研究分野：生化学

キーワード：好中球 活性酸素 慢性肉芽腫症

1. 研究開始当初の背景

(1) 病原微生物等の貪食など、細胞が刺激された時に、細胞休止期には細胞内に存在する蛋白質、p47phox, p67phox, p40phox (phoxはphagocyte oxidaseの略)とRacが、細胞膜に移行して膜蛋白質であるシトクローム b558(p22phoxとgp91phoxのヘテロダイマー)と結合することにより、食細胞NADPHオキシダーゼは活性化される。この活性化型NADPHオキシダーゼは活性酸素の1種であるスーパーオキシド(O_2^-)を生成し、この O_2^- 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。NADPHオキシダーゼ構成蛋白質の中で、gp91phoxだけはX染色体にコードされるので、慢性肉芽腫症(CGD)患者の約75%を占める。また、このgp91phoxは細胞内のNADPHから細胞外の酸素分子に電子を渡すための全ての機能ドメイン、即ち、NADPH及びFAD結合ドメイン、heme結合サイトを分子内に持つ。日本を含む先進国でのCGDの発症頻度は100万人に対し4から5人であり、新生児マススクリーニングにて検査されるフェニルケトン尿症とホモシスチン尿症の中間に位置する。

(2) CGD患者の一部は、NADPHオキシダーゼを構成する主要蛋白質であるgp91phox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gp91phoxが転写され、正常人と同等の活性酸素が生成される結果、致死的な感染症はこれまで避けられた。このようにgp91phox遺伝子のプロモーターに変異の解析やmRNAのナンセンス変異の解析は重要と考えられる。CGD患者への治療法としては、これまで経験的にIFNの有効例が多かったが、その理由や作用機序は不明であった。

2. 研究の目的

本課題の目的は、CGDの治療に資する基礎的な解析を行うことである。これまでの解析結果から、CGDをいくつかのクラスに分類し、更に、gp91phoxを中心とするタンパク質の転写調節、あるいは、エピゲノム解析を行いたい。同じ薬物で適切に治癒する人もいれば、効果のない人、副作用がでる人もいる。薬の効果・副作用と遺伝子型との相関性の研究が必須になりつつある現在、いわゆる「オーダーメイドの医療」においては薬物反応性と遺伝子多型との関係を調べておき、その中から個人に対してより確実な有効性とより低い副作用発現の可能性の選択を、本研究を進めることにより期待できる。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者のこれまでの解析から、gp91phox遺伝子には様々な遺伝子変異が存在する。これらの中にはIFNに反応するCGDもあれば、無効の患者さんも存在する。即ち、

gp91phoxをコードする遺伝子上で、電子伝達機構上必須である領域をコードしている重要な部分、あるいは構造維持のために必要な部位に欠損を生じる場合はIFNが無効と考える。このIFN無効の症例を解析することにより、gp91phoxの機能的にも構造的にも重要な領域を明らかにできると考える。

(2) 培養細胞における実験系を作成し、正常人あるいはCGDのgp91phoxcDNA由来の細胞で、生成される活性酸素量の比較を行い、この人工細胞の系において、どの程度の活性が確認できれば、臨床的な治療が有効であるのかを推測できるデータを提供する。同時にIFN無効CGD患者由来gp91phoxcDNAを遺伝子導入した細胞においても、IFNによる活性酸素の生成を確認する。

(3) 活性酸素産生タンパク質とUPF2(upframeshiftの略)との関連をリン酸化酵素とあわせて、細胞レベルで確かめる。具体的には、UPF2に対する抗体を用いた免疫沈降法によりUPF2を分離して、リン酸化の有無を調べる。リン酸化UPF2が実際にUPF1や3、その他に種々の蛋白質が直接間接的に結合していると考えられるので、それらの同定もを行い、活性酸素産生系のタンパク質複合体との関連を解析する。

4. 研究成果

(1) 研究代表者等はこれまで、NADPHオキシダーゼの中心酵素であるgp91phoxの解析を進めてきた。特にgp91phoxの好酸球正常型CGD(Kuribayashi et al., *BBRC* 1995)を世界で最初に発見したことを機に解析を進めてきた。特にp40phoxが活性酸素を生じ調整していることを明らかにした(Kuribayashi et al., *EMBO* 2002)。平成27年度になって新たなgp91phox異常CGDの解析結果を著すことができた(発表論文)。同様に比較的稀なタイプ、即ち成人女性のCGDの報告も行なった(発表論文)。gp91phoxはBリンパ球にも発現するが、このBリンパ球のエピゲノム解析を行なった(発表論文)と。更に、好中球をはじめとする活性酸素産生細胞の多くは遊走能を持つが、この遊走に関する解析を行った(発表論文)。

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8件)

Monocyte/macrophage-Specific NADPH Oxidase Contributes to Antimicrobial Host Defense in X-CGD Yuka Okura, Masafumi Yamada, Futoshi Kuribayashi, Ichiro Kobayashi, and Tadashi Ariga

J Clin. Immunol. 35(2):158-167. 2015

査読有 doi: 10.1007/s10875-015-0138-4.
A 60-Year-Old Asymptomatic Woman With
Pulmonary Lesions and Cervical
Lymphadenopathy Woman With Pulmonary
Lesions and Lymphadenopathy Tomoko
Yamagishi, Nobuaki Ochi, Hiromichi
Yamane, Futoshi Kuribayashi, and Nagio
Takigawa
Chest 147(2):e48-51. 2015 査読有
doi: 10.1378/chest.14-1215.
The histone acetyltransferase
p300/CBP-associated factor acts as an
effective suppressor of secretory
immunoglobulin synthesis in immature B
cells Hidehiko Kikuchi, Masami Nakayama,
Chikage Kawai, Futoshi Kuribayashi, Hitomi
Mimuro, Shinobu Imajoh-Ohmi, Nishitoh H,
Yasunari Takami, and Tatsuo Nakayama
Microbiol. Immunol. 59(4):243-7. 2015
査読有 doi: 10.1111/1348-0421.12237.
GCN5 is involved in regulation of
immunoglobulin heavy chain gene expression
in immature B cells Hidehiko Kikuchi,
Masami Nakayama, Futoshi Kuribayashi,
Shinobu Imajoh-Ohmi, Hideki Nishitoh,
Yasunari Takami, and Tatsuo Nakayama
Gene. 544(1):19-24. 2014 査読有
doi:10.1016/j.gene.2014.04.030.
Protein kinase C θ gene expression is
oppositely regulated by GCN5 and EBF1 in
immature B cells Hidehiko Kikuchi, Masami
Nakayama, Futoshi Kuribayashi, Shinobu
Imajoh-Ohmi, Hideki Nishitoh, Yasunari
Takami, and Tatsuo Nakayama *FEBS Lett*
588(9):1739-42, 2014 査読有
doi: 10.1016/j.febslet.2014.03.025.
Systematic single cell analysis of migration
and morphological changes of human
neutrophils over stimulus concentration
gradients Akira Yamauchi, Mikako

Degawa-Yamauchi, Futoshi Kuribayashi,
Shiro Kanegasaki, and Tomoko Tsuchiya *J*
Immunol. Methods. 404:59-70. 2014 査読有
doi: 10.1016/j.jim.2013.12.005.
Down-regulation of Fas-mediated apoptosis
by plasma transglutaminase factor XIII that
catalyzes fetal-specific cross-link of the Fas
molecule Hidehiko Kikuchi, Futoshi
Kuribayashi, and Shinobu Imajoh-Ohmi
Biochem Biophys Res Commun.
443(1):13-17. 2014 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.163.
GCN5 is essential for IRF-4 gene expression
followed by transcriptional activation of
Blimp-1 in immature B cells Hidehiko
Kikuchi, Masami Nakayama, Futoshi
Kuribayashi, Shinobu Imajoh-Ohmi, Hideki
Nishitoh, Yasunari Takami, and Tatsuo
Nakayama *J Leukoc Biol.* 95(3):399-404.
2014 査読有 doi: 10.1189/jlb.0413232.

〔学会発表〕(計5件)

大山文男、栗林太、乃祢重信 マウス妊
娠初期における胎仔・胎盤のトリプトフ
アン分解活性の strain による差異につ
いて 第 37 回日本分子生物学会年会
2014 年 11 月 27 日 パシフィコ横浜(横
浜市)
山岸智子、越智宣昭、山根弘路、瀧川奈
義夫、川井千景、栗林太 成人女性に無
症候性の肺アスペルギルス症として発症
した慢性肉芽腫症の 1 例 第 109 回日本
内科学会中国地方会 2013 年 11 月 23 日
岡山コンベンションセンター(岡山市)
大本純子、栗林太、中村三千男、大海忍 多
形核白血球細胞のアクチン分解と好中球
機能変化 第86回日本生化学会大会
2013年9月12日 パシフィコ横浜(横浜
市)
栗林太、菊池秀彦、大海忍 GCN5 ファミ
リーによるタンパク質リン酸化のエピジ
エネティック制御 機構の解析および発
癌・癌悪性化への関与の検討 東京大学
医科学研究所共同研究拠点成果報告会

招待講演 2013年3月11日 東京大学

医化学研究所(東京)

Akira Yamauchi, Shiro Kanegasaki, and
Futoshi Kuribayashi. Robust
directionality in neutrophil
chemotaxis toward the end-target
chemoattractant fMLP: an optical
approach to the mechanism.
International Endotoxin and Innate
Immunity Society Meeting 2012
(IEIIS2012) and the 2nd Homeostatic
Inflammation Symposium (HIS2012).
2012年10月23日 学士会館(東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kweb-res.kawasaki-m.ac.jp/kwmhp/KgApp?section=13&kyoinId=Kgygmosb>

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: 24591563

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし