

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24年5月15日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591365

研究課題名（和文）

遺伝子疾患の治療を mRNA のスプライシングの調節により行なう。

研究課題名（英文）

Modulation of mRNA splicing for the genetic diseases

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

研究成果の概要（和文）：

転写調節や転写後 mRNA の制御機構の解明と遺伝子疾患の治療のための基礎データを提供することを目的とした。今回の科学研究費にて、NADPH オキシダーゼ構成因子の転写調節や (J. Immunol. 2011, Biochem Biophys Res Commun. 2010)、酸化ストレスのシグナル伝達機構を明らかにした (Biochem Biophys Res Commun. 2011)。また、微量活性酸素の定量方法の開発にも成功した (Tropical Medicine and Health. 2011)。

研究成果の概要（英文）：

The goal of this research is an analysis of transcription, post-transcription and the modulation of mRNA. This researches clarified transcriptional regulation of the phagocyte NADPH oxidase (J. Immunol. 2011, BBRC 2010) and signal transduction by oxidative stress for the cells (BBRC 2011). This research further developed the method to detect superoxide quantitatively (Tropical Medicine and Health. 2011).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：小児免疫・アレルギー・膠原病学

1. 研究開始当初の背景

(1) 病原微生物等の食食など、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、p47*phox*, p67*phox*, p40*phox*

(*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* (p22*phox* と gp91*phox* 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 (O₂⁻) を生成し、この O₂⁻ 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、gp91 $phox$ 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 gp91 $phox$ 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 gp91 $phox$ 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 γ 投与により正常な gp91 $phox$ 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 gp91 $phox$ 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 γ 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

(1) 本応募課題の目的は、これまで全くわからなかった IFN γ による治療機構を明らかにすることにより、少しでも CGD の治療に役立つデータを提供することである。応募者の解析結果から、IFN γ の有効例と無効例の遺伝子変異部位を明らかにし、今後発生する CGD の変異部位の同定から、IFN γ 投与の有効性を予め判定可能となることを目指す。

(2) 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) 応募者のこれまでの解析から、gp91 $phox$ 遺伝子の exon 内に pre-mature stop が存在する CGD 患者の中には、IFN γ の無効例が存在する。この無効例では、スキップされる 1 つの exon がコードする部分蛋白質は、活性酸素生成上の重要な領域と考えられる。即ち、91 $phox$

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対応する exon の欠損を生じる場合は IFN γ が無効と考える。この IFN γ 無効の症例を解析することにより、gp91 $phox$ 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、IFN γ 刺激下、あるいは非刺激下での exon skip の実験的証明を行う。具体的な方法としては、応募者が既に作成した NADPH オキシダーゼ再構成系が可能な細胞に、まず gp91 $phox$ 以外のオキシダーゼ構成蛋白質を全て発現させる。その後、IFN γ が有効な患者由来、あるいは正常人由来 gp91 $phox$ cDNA を、薬剤耐性を組み込んだプラスミッドと共に遺伝子導入を行う。gp91 $phox$ の発現は、細胞の外側から認識するモノクローナル抗体により確認し、必要があればソーティングにより分取し、オキシダーゼ構成蛋白質を全て発現する細胞を作成する。まず、その細胞においても、IFN γ 刺激後の短い gp91 $phox$ mRNA や蛋白質の発現を確認するとともに、オキシダーゼ活性も調べる。正常人あるいは CGD の gp91 $phox$ cDNA 由来の細胞で、生成される活性酸素量の比較も行い、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、臨床的に IFN γ 投与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 γ 無効 CGD 患者由来 gp91 $phox$ cDNA を遺伝子導入した細胞においても、IFN γ により exon skip は起こるが活性酸素は生成されないことを確認する。

(3) Exon skip は本来のスプライスの後、何らかのチェック機構が pre-mature stop を探し出し、該当する exon を更にスプライスにより取り除く。正常のスプライスを担うスプライソソームは、exon skip においても重要と考えられている。一方これまでの解析から、正常スプライスに関与するスプライソソームの 1 つである UPF2 (up frameshift の略) の存在が Exon skip に必須であることがわかって来た。また、UPF2 はリン酸化されることがわかっているが、そのリン酸化酵素やリン酸化の生理的意義はわかっていない。そこで、UPF2 に対する抗体の作成を行い、細胞レベルで IFN γ が UPF2 のリン酸化に関与していることを確かめる。具体的には、IFN γ 刺激後経時的に細胞を調整し 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、それらの同定も行う。

4. 研究成果

(1) 応募者らはこれまで、NADPH オキシダーゼの中心酵素である gp91 $phox$ の解

析を進めてきた。特に転写調節から翻訳への過程を明らかにすることにより、CGDの病因の解明や治療法の開発に努めてきた。これはgp91phoxに限らず、他のタンパク質の発現機構や生命現象の解明にも応用されるものと考えられる。Gp91phoxの発現に関しては、プロモーター異常型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。昨年度はヒストンのアセチル化に関与するGCN5によるgp91phox発現の調節機構を明らかにした (Kikuchi H, Kuribayashi F et al., *J Immunol* 2011)。同様にNADPHオキシダーゼを発現しているBリンパ球においても、このGCN5は、SykやBtkなどのガン遺伝子の発現を制御しながら、酸化ストレスから細胞を保護していることを示唆した (Kikuchi H, Kuribayashi F et al., *BBRC* 2011)。更に、Bリンパ球では転写におけるPKCなどのリン酸化酵素の重要性を明らかにした (Kikuchi H, Kuribayashi F et al., *Results in Immunology*, Accepted for publication on the tenth of November in 2011)。

(2) 転写後mRNAのスプライスの機構の解析途上であり、その一部を論文発表した (Yamazaki T et al., *Tropical Medicine and Health* 2011)。また、予期せぬ結果ではあったが、クルクミンがNADPHオキシダーゼ構成因子の発現を上昇させることによって、活性酸素を正に制御していることも明らかにできた (Kikuchi H, Kuribayashi F et al., *BBRC* 2010)。

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7件)

- ① Akira YAMAUCHI, Akitoyo ICHINOSE, Chikage KAWAI, and Futoshi KURIBAYASHI
Review: The phagocyte NADPH oxidase and bacterial infections
Kawasaki Medical Journal. 査読有
(Accepted for publication on the 17th of January in 2012)
- ② Hidehiko Kikuchi, Masami Nakayama, Yasunari Takami, Futoshi Kuribayashi, Tatsuo Nakayama
Possible involvement of Helios in controlling the immature B cell functions via transcriptional regulation of protein kinase Cs
Results in Immunology
Results in Immunology 査読有 1, 2011, 88-94
DOI:10.1016/j.rinim.2011.11.002
- ③ Tsuyoshi Yamazaki, Chikage Kawai, Akira Yamauchi, and Futoshi Kuribayashi
A highly sensitive chemiluminescence assay for superoxide

detection and chronic granulomatous disease diagnosis

Tropical Medicine and Health 査読有 39, 2011, 41-45

DOI:10.2149/tmh.2011-08

④ Hidehiko Kikuchi, Futoshi Kuribayashi, Yasunari Takami, Shinobu Imajoh-Ohmi, and Tatsuo Nakayama

GCN5 regulates the activation of PI3K/Akt survival pathway in B cells exposed to oxidative stress via controlling gene expressions of Syk and Btk

Biochem Biophys Res Commun. 査読有 405, 2011, 657-661

DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.01.088

⑤ Hidehiko Kikuchi, Futoshi Kuribayashi, Naomi Kiwaki, Yasunari Takami, and Tatsuo Nakayama
GCN5 regulates the superoxide generating system in leukocytes via controlling gp91-phox gene expression

J. Immunol. 査読有 186, 2011, 3015-3022,

DOI: 10.4049/jimmunol.1000364

⑥ Takeshi Tanaka, Natsuki Motoi, Yoshiko Tsuchihashi, Ryushi Tazawa, Chinatsu Kaneko, Takahito Nei, Toshiyuki Yamamoto, Tomayoshi Hayashi, Tsutomu Tagawa, Takeshi Nagayasu, Futoshi Kuribayashi, Koya Ariyoshi, Koh Nakata, and Konosuke Morimoto

Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB

J. Med. Genet. 査読有 48, 2011, 205-209,

DOI:10.1136/jmg.2010.082586

⑦ Hidehiko Kikuchi, Futoshi Kuribayashi, Naomi Kiwaki and Tatsuo Nakayama

Curcumin dramatically enhances retinoic acid-induced superoxide generating activity via accumulation of p47-phox and p67-phox proteins in U937 cells.

Biochem Biophys Res Commun. 査読有 395, 2010, 61-65

DOI:10.1016/j.bbrc.2010.03.136

[学会発表] (計9件)

① Akira Yamauchi, Robust directionality of neutrophil chemotaxis to fMLP is due to holding up the morphology 日本細菌学会 2012年3月29日 長崎

② 山内明 好中球は走化性因子によって遊走パターンが異なる 分子予防環境医学研究会 2012年1月27日 倉敷

③ Mitsunori Ikeda MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A STEROID RECEPTOR-BINDING PROTEIN, SRB-RGS cDNA 日本生化学会・日本分子生物学会 2010年12月10日 神戸

④ 山内明 好中球の遊走パターンと遊走中

の形態解析 細胞機能可視化研究会研究集会 2010年9月21日 東京

⑤山内明 TAXIScan法によるヒトリンパ球の遊走解析 日本免疫毒性学会学術大会., Sep. 10, 2010年9月10日 つくば市

⑥山内明 活性酸素を生成する食細胞NADPHオキシダーゼの発現解析 日本生体防御学会(シンポジウム) 2010年7月24日 仙台

⑦山内明 「新規細胞動態解析装置TAXIScan技術の開発と応用 岡山県医用工学研究会セミナー(招待講演) 2010年6月15日 岡山市

⑧栗林太、Lucigenin-enhanced CL depends on adhered granulocytes 日本分子生物学会 2009年12月9日 横浜

⑨ Naomi Kiwaki、GCN5 regulates the superoxide producing system in leukocytes 日本分子生物学会 2009年12月9日 横浜

[図書] (計1件)

①Akira Yamauchi and Futoshi Kuribayashi
Functions of the phagocyte NADPH oxidase and Chronic Granulomatous Disease (CGD)
Nova Science Publishers (In: Neutrophils: Lifespan, Functions and Roles in Disease)
Chapter 14, 2010, 1-7

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

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：60251443

(2) 研究分担者

山内 明 (YAMAUCHI AKIRA)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80372431