

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10104

研究課題名(和文)慢性肉芽腫症における肉芽腫形成の機序の解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Elucidation and novel therapies development for granuloma formation in chronic granulomatous disease

研究代表者

重村 倫成 (Shigemura, Tomonari)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：70623916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：食細胞からの活性酸素(ROS)の低下にて易感染性のみならず、肉芽腫や腸炎を合併する慢性肉芽腫症(CGD)ではROS産生のない食細胞が異常な免疫をきたすことが予想された。そこでROS産生に起因する食細胞での炎症関連の発現の違いを検討したが、今回検討では明らかな違いはみいだせなかった。また食細胞の一種である好中球の成熟障害を来す疾患での検討では、成熟障害を来すクローンは正常の好中球分化に影響を与えなかった。一方、特殊腸炎疾患の検討では肉芽腫を伴う腸炎に獲得免疫異常の関与が確認された。以上からCGDにおいても獲得免疫に異常が病態に関与する可能性が推察され、重要な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性肉芽腫症(CGD)は食細胞の機能異常のため易感染性を示すことから、CGDでみられる肉芽腫や肉芽腫を伴う腸炎の病態にも食細胞が強く関わっているとされてきた。今回の研究からCGDの肉芽腫形成に、食細胞以外の獲得免疫の異常が関与することが示唆された。そのことは肉芽腫を基本病態とするクローン病、サルコイドーシス、肉芽腫性血管炎、また単一遺伝子疾患である若年性サルコイドーシスなどに対しても重要な知見であり、それらの肉芽腫疾患に対しても大きな福音と成り得る。

研究成果の概要(英文)：Chronic granulomatous disease (CGD) is accompanied by granulomas and enteritis as well as susceptibility to infections due to reduction of reactive oxygen species (ROS) from phagocytes. We hypothesized that phagocytes without ROS production would cause abnormal immunity and compared the differences in inflammation-related expression in phagocytes caused by ROS production. However, no clear difference was found in this study. In the study of rare disorder caused impaired maturation of neutrophil, which is a type of phagocytes, clones with impaired maturation did not affect normal neutrophil differentiation. On the other hand, the research of particular kind of enteritis disease revealed the involvement of acquired immune abnormality in enteritis associated with granulomas. These findings suggest that abnormalities in acquired immunity caused by ROS may be involved in the pathology of CGD.

研究分野：免疫

キーワード：慢性肉芽腫症 活性酸素 肉芽腫 腸炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体防御の最前線を担う食細胞（主に好中球、単球、マクロファージ）は、細菌や真菌に対する感染防御において中心的な役割を担っている。食細胞は病原菌を貪食し活性化すると、食細胞内に強い活性酸素(Reactive Oxygen Species; ROS)を産生し殺菌を行うことで感染防御を行う。慢性肉芽腫症(chronic granulomatous disease; CGD)は ROS 産生が欠損するため、乳幼児期より重症細菌・真菌感染症を反復する遺伝性免疫不全症である。わが国では X連鎖性の遺伝子変異による gp91phox 欠損型(X-CGD)が約 80%を占める。従来、CGD は予後不良で青年期までに大半が死亡するとされてきたが、予防内服や抗菌剤・真菌剤の発達やインターフェロンの導入、日常生活管理指導などにより、患者予後は改善してきた。しかし、一方で年長児での Crohn 病様腸炎(CGD colitis)や諸臓器に形成される肉芽腫形成による障害が問題になっている。肉芽腫病変は肺や消化管、肝臓、皮膚、尿管、時に頭蓋内にもみられ、臓器障害、通過障害を引き起こし、患者を苦しめる。これらの炎症を抑えるため、もともと細菌、真菌に対する感染防御が欠損した疾患に関わらず、ステロイドや免疫抑制剤、リウマチ疾患で効果のある抗 TNF モノクローナル抗体など免疫を低下させる治療を行わなくてはならない。しかし、このことで感染症が増悪し死亡する例も多数報告されており、その使用は著しく制限せざるを得ない。

これまでの研究から十分な ROS が産生されないため炎症制御機序が十分働かず、過剰サイトカインが産生され、炎症が局所で持続することで難治性腸炎や肉芽腫形成に至るのではと考えられている。肉芽腫形成に過剰炎症が関わっていること以外、発症機序はほとんど解明されていないのが現状である。本疾患は好中球を中心とした自然免疫の異常によって引き起こされ、獲得免疫には異常はないとされてきた。しかし近年の研究から B 細胞や T 細胞など獲得免疫の異常が報告されるようになってきている。CGD で多くみられる炎症性腸炎や肉芽腫も自然免疫異常によるものと考えられてきたが、その本質はまだわかってない。CGD における過剰炎症による肉芽腫機構のメカニズムを明らかにすることで、新しい治療の確立が求められている。

2. 研究の目的

(1) これまで、ROS は食細胞において感染防御、食細胞以外では組織や細胞に害を及ぼす代謝系の副産物と考えられてきた。X-CGD 患者とコントロールの食細胞の発現を比較検討し ROS の有無による炎症に関わるシグナル伝達に關与するか検討する。X-CGD の保因者では、2 本の X 染来のどちらか 1 本が働かなくなる X 染色体不活性化現象から、ROS 産生のある細胞とない細胞が混在していることわかっている。そのため ROS 以外の背景が同一でありより理想的な比較検討が行えることから、ROS 産生(+)/(-)が混在する X-CGD 保因者の血液内でも検討する。

(2) X-CGD の保因者では、ROS を産生する食細胞と活性酸素を産生しない食細胞が混在するが、約半数は ROS 産生能があることから易感染性を示さない。しかし保因者でも肉芽腫を始め多くの免疫異常を経験し、また多くの報告がある。これらの免疫異常に活性酸素産生能のない細胞が関与していることが予想される。そこで CGD と同様に食細胞の疾患である重症先天性好中球減少症(severe congenital neutropenia; SCN)の保因者症例で、変異のある細胞とない細胞を認めたモザイク症例を解析し、好中球の成熟障害が免疫や炎症における影響に關与するか検討する。

(3) CGD 腸炎では Crohn 病同様に病変部に肉芽腫を形成し、自己抗体は検出されず炎症が主体の疾患と考えられている。そのため T 細胞の異常や自己抗体は強く關与しないと予想される。T, NK 細胞が欠損し、抗体産生能が欠如した重症複合免疫不全症(SCID)乳児例で炎症性腸炎を合併した症例を経験し、病変部の生検では肉芽腫が散見された。特殊な疾患での CGD 腸炎同様肉芽を伴う病態であり、腸炎究明のため本症例での原因を検討する。

3. 研究の方法

(1) PPAR アゴニスト作用をもつ Pioglitazone が抗炎症作用をもつことが多く報告され、また Pioglitazone は X-CGD マウスにおける食細胞のミトコンドリア活性酸素を誘導し、黄色ブドウ球菌に対する殺菌を改善することが報告された。そこで PPAR 発現について検討する。また食細胞の微生物に対する殺菌には ROS 以外にも好中球一次顆粒(MPO, defensins, BPI)、好中球二次顆粒(hCAP18, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, lactoferrin)が関わっており、これら発現について a. X-CGD 患者とコントロールの好中球、b. X-CGD 保因者における ROS 産生(+)/(-)好中球で下記の発現についてフローサイトメトリー法にて比較検討する。

(2) ELANE 遺伝子変異が原因である SCN ではヘテロ接合性変異より生下時より重度の好中球減少を来し、その浸透率は極めて高いことが知られている。しかし同様の ELANE 遺伝子変異を認めた母親は易感染性がなく、好中球減少を認めなかった。そこで、まず母親の白血球の分画別の変異の割合、また爪細胞の変異の割合を調べ、次に母親の血液から iPS 細胞を樹立し、樹立したクローン別に ELANE 遺伝子変異の有無を調べる。最後に樹立した変異有/無 iPS 細胞の好中球への分化誘導能を比較検討する。

(3) 血液解析：a. 腸炎を引き起こす病原微生物の同定を試みる、b. 末梢血中のリンパ球の

割合をフローサイトメトリーで解析し、c. わずかに検出された CD3⁺ CD4⁺ T cells について解析する。またクローナルな増殖があるか T 細胞 受容体のクロナリティーを行う。
腸組織解析：a. 病理学的な評価、b. 浸潤細胞を同定する、c. 浸潤している細胞を血液同様に解析し、クローナルな増殖の評価を行う。

4. 研究成果

(1) X-CGD 患者における PPAR 発現をコントロールと比較したところ、単球、好中球ともに X-CGD 患者において PPAR 発現は低下していた (Fig. 1)

微生物の食細胞による殺菌には活性酸素の他、殺菌蛋白も重要な働きを担っている。活性酸素産生がない CGD では、代償的に殺菌蛋白に変化がある可能性が考えて患者とコントロールで比較した。myeloperoxidase (MPO), elastase, NGAL, lactoferrin の発現は患者で低下していたが、Bactericidal Permeability Increasing protein (BPI), hCAP-18 は同程度であった (Fig. 2)。

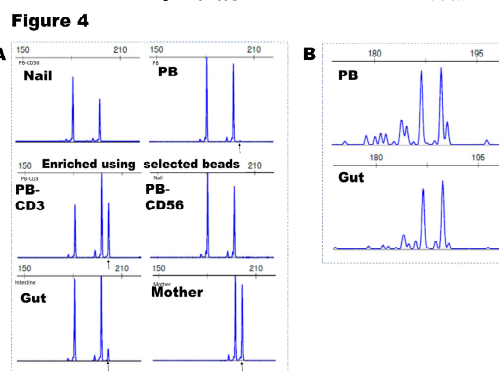
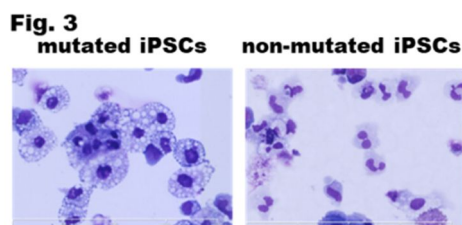
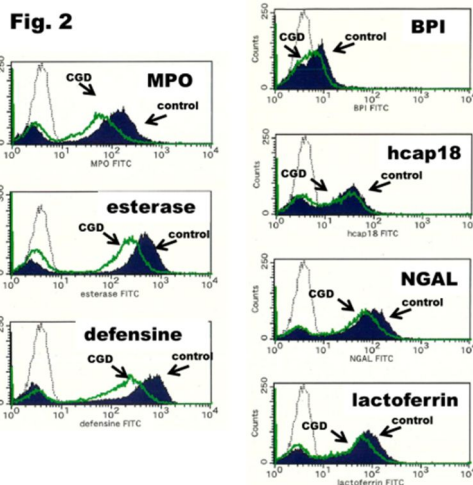
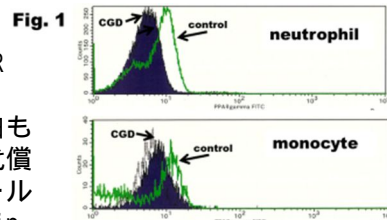
X連鎖性の X-CGD の保因者では、2本の X 染色体のどちらか1本が働かなくなる X 染色体不活性化現象から ROS 産生のある細胞とない細胞が混在していることが判明している。この点に注目し、ROS 産生以外の背景が同一 X-CGD の保因者での食細胞の殺菌蛋白を検討した。gp91phox-p22phox 複合体を認識する 7D5 抗体で ROS 発現のある細胞とない細胞にわけ両者を比較検討した。PPAR、MPO, esterase, -defensin, NGAL, lactoferrin の発現は両者で差がなかった。

(2) 母親の末梢血を分離し変異の割合を解析したところ、単球、リンパ球、血液前駆細胞で約 4-5 割、爪の細胞では 2 割程度の変異アリルを認められた。一方で好中球に変異アリルを認めなかった。さらに無症候性母親の末梢血から iPS 細胞を作製したところ、変異クローン以外にも正常のクローンが存在することを確認できモザイク現象を証明した。

次に、樹立した変異有/無 iPS 細胞の好中球への分化誘導能を検討した。変異無 iPS 細胞からの好中球へ分化は保たれていたが、変異有 iPS 細胞からの好中球へ分化は著しく減弱していた (Fig. 3)。末梢血の好中球数とこれらの結果から、X 連鎖性の慢性肉芽腫症の保因者とは異なり、変異有クローンは正常の好中球分化に影響を与えないことが考えられた。

(3) 腸炎を認めた SICD 患者の IL2RG 遺伝子解析を行い c.536_552delTGAACCACTGTTTGGAG; p.Leu179Argfs*26 の変異を同定した。腸炎を起こしうる病原微生物については PCR、抗原検査、培養検査、虫卵検査を施行したが、原因微生物は検出されなかった。末梢血の CD3⁺ CD8⁺ T 細胞

CD3⁺ CD56⁺ NK 細胞は検出されなかったが、CD3⁺ CD4⁺ T cells (5%) は 81/μL とわずかに検出された。また腸管組織の免疫染色を施行したところ、CD3 陽性 T 細胞が肉芽腫を伴う病変部に著明に浸潤し病態に強く関与していることが考えられた。末梢血の CD3 陽性細胞をマグネットビーズにて濃縮し、その細胞の由来を個人識別の可能な tandem repeat 配列にて確認したところ、母親由来であることが判明した。腸管組織の CD3 陽性 T 細胞も同様に解析し母親由来であることを確認した (Fig. 4A)。また末梢血、腸管組織中ともに T 細胞のモノクローナルな増殖を示唆する T 細胞 受容体のクロナリティーが陽性であった (Fig. 4B)。以上から患者に混入した母親由来の T 細胞がクローナルに増殖し肉芽腫を伴う腸炎に強く関与したことが推察された。CGD でも食細胞のみでなく、ROS に起因する獲得免疫に異常が肉芽腫や腸炎に関与する可能性があり、重要な知見が得られた。



以上から患者に混入した母親由来の T 細胞がクローナルに増殖し肉芽腫を伴う腸炎に強く関与したことが推察された。CGD でも食細胞のみでなく、ROS に起因する獲得免疫に異常が肉芽腫や腸炎に関与する可能性があり、重要な知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Shigemura T, Kobayashi N, Agematsu K, Ohara O, Nakazawa Y.	4. 巻 39(1)
2. 論文標題 Mosaicism of an ELANE Mutation in an Asymptomatic Mother.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 106-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-018-0580-1	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 Maruyama Yuta, Shigemura Tomonari, Aoyama Koki, Nagano Noriyuki, Nakazawa Yozo	4. 巻 22
2. 論文標題 Bacteremia due to Moraxella osloensis : a case report and literature review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Brazilian Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 60 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjid.2017.10.008	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 Shigemura Tomonari, Motobayashi Mitsuo, Matsuda Kazuyuki, Shimodaira Takahiro, Kurata Takashi, Kobayashi Norimoto, Agematsu Kazunaga, Nakazawa Yozo	4. 巻 39
2. 論文標題 Acute Myeloid Leukemia in a Patient With X-linked Severe Combined Immunodeficiency	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	6. 最初と最後の頁 e470 ~ e472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000000892	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 丸山悠太, 重村倫成	4. 巻 80
2. 論文標題 好中球機能異常症	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 1211 -1216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Akio Ogawa, Tatsuo Watanabe, Takenori Natsume, Eri Okura, Shoji Saito, Sawako Kato, Yoshiko Nakayama, Satomi Furukawa, Tomomi Yamaguchi, Tomoki Kosho, Takeshi Uehara, Norimoto Kobayashi, Kazunaga Agematsu, Yozo Nakazawa, Tomonari Shigemura	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Early-onset inflammatory bowel disease caused by mutations in the X-linked gene IL2RG	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 2件)

1. 発表者名 Tomonari Shigemura, Norimoto Kobayashi, Kazunaga Agematsu, Yozo Nakazawa
2. 発表標題 Mosaic ELANE mutation causing severe congenital neutropenia in an asymptomatic mother
3. 学会等名 The 18th Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 重村倫成、小林法元、上松一永、中沢洋三、小原収
2. 発表標題 重症先天性好中球減少症責任遺伝子ELANE変異を認めた無症候性母親の解析
3. 学会等名 第1回日本免疫不全・自己炎症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomonari Shigemura, Akio Ogawa, Tatsuo Watanabe, Takenori Natsume, Eri Okura, Shoji Saito, Sawako Kato, Yoshiko Nakayama, Satomi Furukawa, Tomomi Yamaguchi, Tomoki Kosho, Takeshi Uehara, Norimoto Kobayashi, Kazunaga Agematsu, Yozo Nakazawa
2. 発表標題 Early-onset inflammatory bowel disease in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency
3. 学会等名 The 20th Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----