

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17405

研究課題名（和文）CCDC22変異がもたらす免疫応答の変化とEBV-HLH発症・重症化との関連

研究課題名（英文）The altered immune response caused by CCDC22 mutation and its association with EBV-HLH development and severity.

研究代表者

山下 友佑（Yamashita, Yusuke）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50794153

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：EBV-HLH重症例から同定したCCDC22V38M変異の機能解析を行った。HEK293Tへの強制発現ではCCDC22のNF- κ B活性への影響は認めなかったが、V38M変異で細胞内局在の変化を認めた。Neuro2aのCCDC22ノックダウンでは、神経分化障害を来した。Ccdc22V38Mマウスは、自然経過では野生型との有意な差を見出すことはできなかった。MEFのRNAseqでは、サイトカイン・ケモカイン関連の遺伝子発現量の変化を認めた。本研究ではCCDC22V38M変異によるHLH発症への直接的な関与は証明できていないが、CCDC22が免疫系・神経系において重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、難治性疾患であるEBV-HLHの重症例より同定したCCDC22新規遺伝子変異の解析を行った。本研究ではCCDC22の免疫系への関与が示唆される新知見が得られた。CCDC22については、NF- κ Bの調節因子であることや、タンパクの細胞内輸送に関わることなど報告されているものの、まだ機能は十分に解明されていない。本研究成果を足がかりにCCDC22の機能解析が進めば、免疫系の新たな調節機構の解明や、EBV-HLHの病態解明に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We conducted a functional analysis of the CCDC22V38M mutation, which was identified in a patient with severe EBV-HLH. NF- κ B activity was unaffected by forced expression of CCDC22 in HEK293T cells. However, the V38M mutation altered its intracellular localization. Knockdown of CCDC22 in Neuro2a cells resulted in impaired neuronal differentiation. CCDC22V38M mice did not significantly differ from wild type in their natural course. RNAseq of MEFs revealed alterations in the expressions of cytokine- and chemokine-related gene. Although this study does not establish a direct link between the CCDC22V38M mutation and the development of HLH, it suggests that CCDC22 plays an important role in the functioning of the nervous and immune systems.

研究分野：血液内科学

キーワード：CCDC22 EBV-HLH NF- κ B

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

EBウイルス関連血球貪食症候群 (EBV-HLH) は、EBV 感染が引き金となって過剰な炎症が生じ、汎血球減少と臓器障害を呈する全身性炎症性疾患である。発症には、EBV 感染細胞に対する宿主の病的免疫応答が関わっているが、その詳細は不明である。申請者は EBV-HLH 患者に NF- κ B 経路を制御する CCDC22 の新規遺伝子変異を同定した。CCDC22 変異による NF- κ B 制御の変調が EBV-HLH の病態に関与していると予想され、CCDC22 の機能解析を行い、CCDC22 変異の EBV-HLH における役割を検討する。

2. 研究の目的

CCDC22 は NF- κ B の制御因子として報告されており、CCDC22 変異の表現型としては低身長、知的障害、脂質異常症などが報告されている。易感染性病態や炎症性病態との関連も予想されているが、まだ報告されていない。本研究では、新たに同定した CCDC22 変異 (c.112G>A, p.V38M) が免疫応答にもたらす変化と EBV-HLH の病態に如何にして関わっているか検討する。申請者の仮説のように、CCDC22 変異によって、EBV に対する免疫応答やサイトカインの制御に差があるならば、CCDC22 を標的とした免疫制御法の開発につながる可能性がある。また、造血器腫瘍の治療には、NF- κ B 阻害剤が実地臨床に応用されているが、CCDC22 の機能解析によって CCDC22 を標的とした NF- κ B 阻害剤の開発につながることも期待できる。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた解析

ヒト CCDC22 を強制発現する vector 構築し、部位特異的遺伝子変異の導入 (CCDC22V38M、CCDC22T17A の作製) を行った。それぞれの vector を HEK293T 細胞に transfection し、Dual-Luciferase Reporter Assay System E1980 (Promega) で NF- κ B 転写因子活性 (ELAM-1 promoter 活性) を測定した。さらに、TNF α 、MYD88 および p65 などの各種因子における NF- κ B 転写因子活性への synergy 効果も確認した。

CCDC22WT と CCDC22V38M をそれぞれ強制発現した HEK293T 細胞を 2 日間培養後に、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で 10 分間浸漬固定を行い、免疫細胞染色を行った。検鏡は共焦点顕微鏡 Zeiss LSM700 と蛍光顕微鏡 KEYENCE BZ-9000 で行った。

マウス神経芽細胞腫株 Neuro2a に対して、レチノイン酸 20 μ M で神経分化誘導を行い、48 時間後の CCDC22 蛋白の細胞内局在の変化を anti-CCDC22 抗体を用いて免疫細胞染色で観察した。続いて、Neuro2a に shRNA-Cdc22 Lentivirus particle と shRNA-Control Lentivirus particle をトランスフェクトし、限界希釈法によるシングルセルクローニングで CCDC22 ノックダウン株 16 クローンと対照株 4 クローンを作製した。CCDC22 発現抑制が強い細胞株を抽出し、レチノイン酸による神経分化実験を行い、細胞形態学的な変化を光学顕微鏡・蛍光顕微鏡で確認した。

(2) 遺伝子改変マウスを用いた解析

Cdc22 V38M 遺伝子改変マウスの作製と解析

CRISPR/hCas9 システムを用いて、Cdc22 遺伝子改変マウス (c.112G>A, p.V38M) を作製した。続いて、今回作製した V38M 変異マウスと野生型マウスの各臓器を摘出し、ホルマリンでの浸漬固定を行い、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で組織学的な検討を行った。さらに、V38M 変異と野生型の成獣マウスの胸腺や脾臓、骨髄の細胞単離を行い、各リンパ球の代表的な表面抗原を BD FACS Verse フローサイトメーターで解析した。

遺伝子改変マウスの胎仔線維芽細胞を用いた検討

V38M 変異を有する雌雄マウスを交配させ、妊娠 13-15 日目のマウスを帝王切開し、胎子マウスを速やかに摘出した。摘出した胎子を用いて MEF を作成した。雄の V38M 変異マウスと野生型マウスの MEF をそれぞれ 3 匹分作製し、実験を行った。継代した MEF から蛋白を抽出し、ウェスタンブロッティングで CCDC22 の蛋白発現量とサイズの変化を検討した。さらに、V38M 変異マウスと野生型マウスの MEF を 3 クローンずつ培養し、LPS 1 μ g/ml もしくは Vehicle で 4 時間刺激を行い、野生型 (Vehicle 添加)、V38M 変異 (Vehicle 添加)、野生型 (LPS 添加)、V38M 変異 (LPS 添加) の 4 群、合計 12 サンプルを解析した。それぞれの RNA を抽出し、RNA シーケンスによるトランスクリプトーム解析を行った。サイトカイン・ケモカインの遺伝子発現プロファイルについて、ウェブツールの ClustVis (Nucleic Acids Res. 2015) を使用して Heat map を作成した。また、今回、各群の遺伝子発現量の統計学的解析は、t 検定で有意差検定を行った。

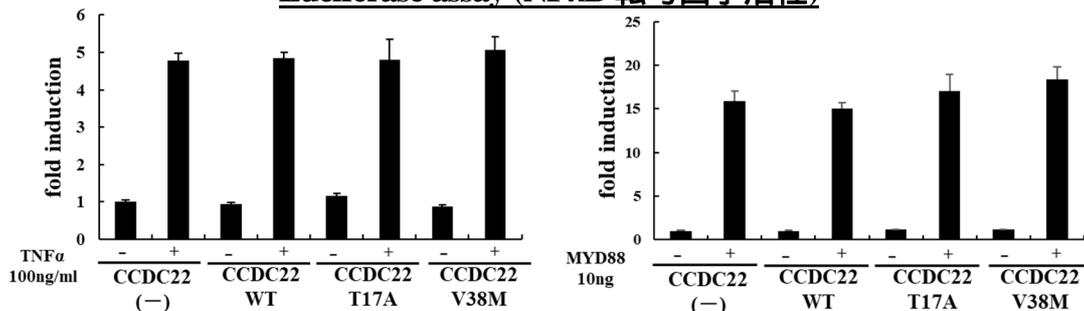
4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた解析

CCDC22 の過剰発現下での NF- κ B 活性の検討

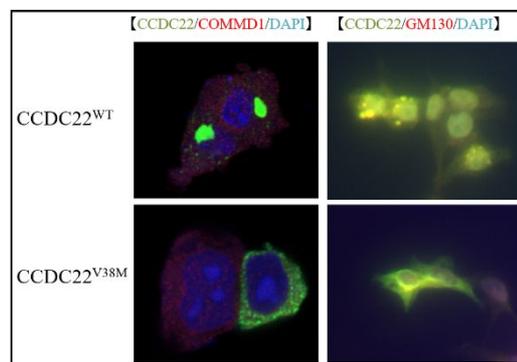
CCDC22WT、CCDC22T17A、CCDC22V38M の発現ベクターを HEK293T 細胞株に遺伝子導入し、CCDC22 過剰発現下でルシフェラーゼアッセイによる NF- κ B 転写因子活性の測定を行ったが、NF- κ B 活性の有意な変化は認めなかった。CCDC22 過剰発現下で、TNF α 、MYD88、p65 による NF- κ B 活性の刺激因子を加えても CCDC22V38M による NF- κ B 活性への影響は検出できなかった。

Luciferase assay (NF κ B 転写因子活性)



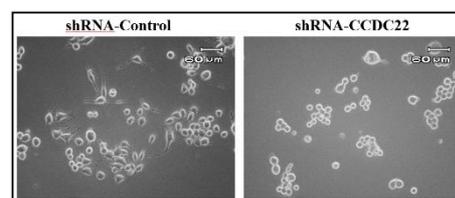
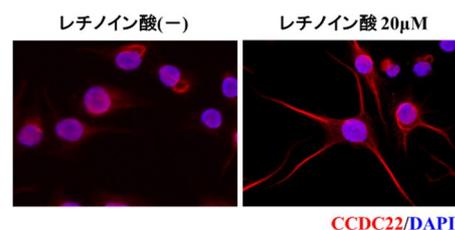
CCDC22 の細胞内局在の検討

CCDC22WT、CCDC22V38M の発現ベクターを遺伝子導入し、CCDC22 を過剰発現させた HEK293T 株の細胞内局在変化を免疫細胞染色法で検討した。V38M 変異では、野生型に比べ、CCDC22 の細胞内局在に大きな変化を認めた。さらに、ゴルジ体構成分子の一つである GM130 との免疫二重染色法を行ったところ、強制発現した CCDC22 蛋白と GM130 蛋白のオーバーラップを認めた。以上より、CCDC22 遺伝子の V38M 変異によって、CCDC22 蛋白は機能変化を来し、ゴルジ細胞内局在やタンパク細胞内輸送に何らかの変化を及ぼすことが示唆された。



CCDC22 ノックダウン細胞株の検討

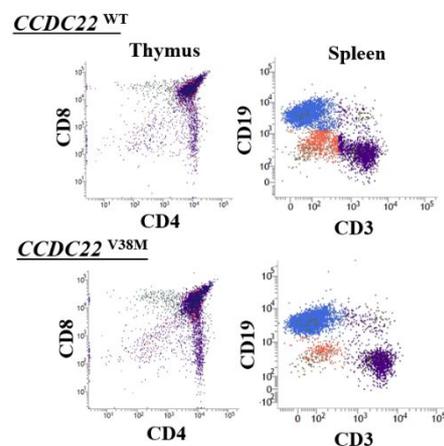
マウス神経芽細胞種 Neuro2a にレチノイン酸を添加し、神経分化誘導を促し、CCDC22 の免疫細胞染色を行った。核・核周囲に発現していた CCDC22 蛋白は、レチノイン酸により神経突起に局在移動を認めた。さらに、shRNA-Ccdc22 Lentivirus を用いて作製した CCDC22 発現抑制の Neuro2a 細胞株では、対照の細胞株と比較して、レチノイン酸による神経分化誘導が抑制、すなわち、神経突起の伸長が抑制された。以上より、CCDC22 が未分化な神経細胞の突起伸長に関わっていることが示唆された。



(2) 遺伝子改変マウスを用いた解析

Ccdc22V38M 遺伝子改変マウスの解析

Ccdc22V38M 遺伝子改変マウスの各臓器を組織学的に検討したが、野生型マウスとの明らかな差異は認めなかった。また、CCDC22V38M 遺伝子改変マウスの胸腺・脾臓・骨髄の細胞単離を行い、フローサイトメーターで T 細胞・B 細胞・NK 細胞の分布を中心に解析したが、野生型マウスとの差異を見出すことはできなかった。また、Ccdc22V38M 遺伝子改変マウスを長期観察しているが、自然経過の観察では特定の疾患を発症することなく、野生型マウスと同様に長期生存している。以上より、CCDC22V38M 遺伝子変異は、他の遺伝子変異や環境変化があわせて起こらないかぎり、観察可能な表現型として変化をもたらさない潜在的変異である可能性が示唆された。



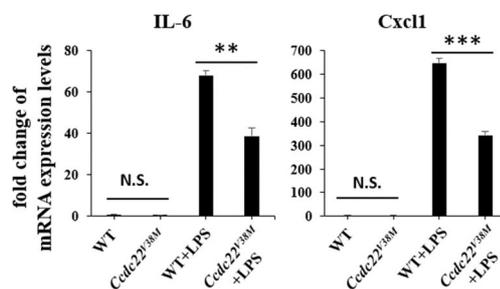
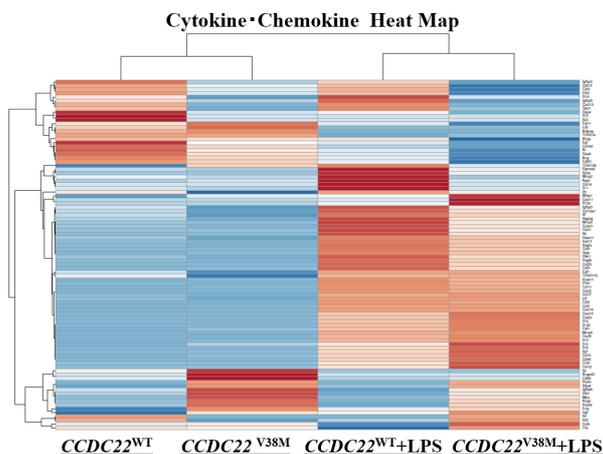
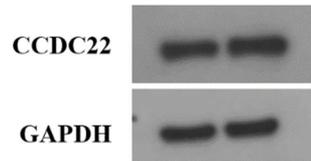
Ccdc22V38M 遺伝子改変マウスの胎仔線維芽細胞を用いた解析
雄の V38M 変異マウスと野生型マウスの MEF を 3 クローンずつ
継代し、それぞれタンパク質を抽出して CCDC22 の発現量と蛋白
サイズをウエスタンブロット法で確認したところ、蛋白発現
量、蛋白サイズともに変化を認めなかった。

さらに、それぞれのクローンを培養し、LPS 刺激下(LPS 1 μ g/ml
を 4 時間)と対照群で RNA を抽出し、野生型(Vehicle 添加)、V38M
変異(Vehicle 添加)、野生型(LPS 添加)、V38M 変異(LPS 添加)の
4 群で RNA シーケンスによるトランスクリプトーム解析を行っ
たところ、V38M 変異と野生型では、サイトカイン・ケモカインの mRNA 発現量に様々な変化
を認め、特に V38M 変異では LPS 刺激による Il-6 遺伝子、Cxcl1 遺伝子の発現誘導が有意に低
下していることが分かった。

MEF の解析ではあるが、以上より、Ccdc22V38M 変異による免疫応答の障害が予想され、
CCDC22 が免疫系に重要な役割を担うことが示唆された。

ウエスタンブロット法

CCDC22^{WT} CCDC22^{V38M}



The data shown are the mean \pm SEM ; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

本研究により、CCDC22 の V38M 変異による機能変化を培養細胞と遺伝子改変マウスの実験
で示すことができ、CCDC22 が免疫系・神経系において重要な役割を担うことが示唆された。
CCDC22V38M 変異による HLH の病態への関与についての検討を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Mushino T, Hiroi T, Yamashita Y, Suzuki N, Mishima H, Ueno M, Kinoshita A, Minami K, Imai K, Yoshiura KI, Sonoki T, Tamura S.	4. 巻 60
2. 論文標題 Progressive Massive Splenomegaly in an Adult Patient with Kabuki Syndrome Complicated with Immune Thrombocytopenic Purpura	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1927-1933
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.6694-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takeda S, Murata S, Tane M, Yoshida K, Iwamoto R, Warigaya K, Sakaki A, Yokoya Y, Tanaka K, Tochino Y, Yamashita Y, Hosoi H, Mushino T, Nishikawa A, Tamura S, Sonoki T.	4. 巻 62
2. 論文標題 Erdheim-Chester disease diagnosed with right atrium tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の頁 91-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.62.91	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 Tamura S, Kosako H, Furuya Y, Yamashita Y, Mushino T, Mishima H, Kinoshita A, Nishikawa A, Yoshiura KI, Sonoki T.	4. 巻 145
2. 論文標題 A Patient with Kabuki Syndrome Mutation Presenting with Very Severe Aplastic Anemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Haematologica	6. 最初と最後の頁 89-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000518227	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 Akagi Y, Kato T, Yamashita Y, Hosoi H, Murata S, Yamamoto S, Warigaya K, Nakao T, Murata S, Sonoki T, Tamura S.	4. 巻 57
2. 論文標題 Intracranial Hemorrhage in a Patient with TAFRO Syndrome Treated with Cyclosporine A and Rituximab	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicina	6. 最初と最後の頁 971
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/medicina57090971	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kanazawa N, Hemmi H, Kinjo N, Ohnishi H, Hamazaki J, Mishima H, Kinoshita A, Mizushima T, Hamada S, Hamada K, Kawamoto N, Yamashita Y, Tamura S, Orimo T, Ozasa T, Kato T, Sasaki I, Fukuda-Ohta Y, Wakaki-Nishiyama N, Inaba Y, Kunimoto K, Okada S, Taketani T, Nakanishi K, Murata S, Yoshiura KI, Kaisho T, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Heterozygous missense variant of the proteasome subunit -type 9 causes neonatal-onset autoinflammation and immunodeficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27085-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tamura S, Hori Y, Hiroi T, Morimoto M, Yamashita Y, Mushino T, Sonoki T.	4. 巻 196
2. 論文標題 Pegcetacoplan for refractory paroxysmal nocturnal haemoglobinuria associated with the C5 genetic variant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 e57-e60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.17963	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 Yamashita Y, Morita S, Hosoi H, Kobata H, Kishimoto S, Ishibashi T, Mishima H, Kinoshita A, Backes BJ, Yoshiura KI, Papa FR, Sonoki T, Tamura S.	4. 巻 21
2. 論文標題 Targeting Adaptive IRE1 Signaling and PLK2 in Multiple Myeloma: Possible Anti-Tumor Mechanisms of KIRA8 and Nilotinib	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176314	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tamura S, Furuya Y, Hori Y, Hiroi T, Yamashita Y, Oiwa T, Murata S, Mushino T, Nishikawa A, Hanaoka N, Sonoki T.	4. 巻 61
2. 論文標題 Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria treated with eculizumab in Wakayama, Japan: a retrospective analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の頁 605-611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.61.605	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 Akagi Y, Murata S, Yamashita Y, Tanaka K, Hiroi T, Mushino T, Hosoi H, Nishikawa A, Tamura S, Sonoki T.	4. 巻 59
2. 論文標題 Two Episodes of Transfusion-related Acute Lung Injury (TRALI) Occurring within a Short Period	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2577-2581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.4700-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita Y, Hori Y, Kosako H, Oiwa T, Warigaya K, Mushino T, Murata S, Fujimoto M, Nishikawa A, Murata SI, Sonoki T, Tamura S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Brentuximab vedotin for refractory anaplastic lymphoma kinase-negative anaplastic large cell lymphoma in leukemic phase with RUNX3 overexpression.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hematology Reports	6. 最初と最後の頁 8368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4081/hr.2020.8368.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tamura S, Kaki T, Niwa M, Yamano Y, Kawai S, Yamashita Y, Tanaka H, Saito Y, Kajimoto Y, Koizumi Y, Yamaue H, Nakao N, Nojiri T, Hironishi M.	4. 巻 58
2. 論文標題 Risk Factors for Therapeutic Intervention of Remdesivir in Mild to Moderate COVID-19-A Single-Center Retrospective Study of the COVID-19 Fourth Pandemic Period in Wakayama, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicina (Kaunas)	6. 最初と最後の頁 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicina58010118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida K, Murata S, Morimoto M, Mushino T, Tanaka K, Yamashita Y, Hosoi H, Nishikawa A, Tamura S, Hatakeyama K, Matsumoto M, Sonoki T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Sudden Cardiac Death in a Patient with Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: A Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hematology Reports	6. 最初と最後の頁 203-209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/hematolrep14020027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kosako H, Yamashita Y, Tanaka K, Mishima H, Iwamoto R, Kinoshita A, Murata SI, Ohshima K, Yoshiura KI, Sonoki T, Tamura S.	4. 巻 58
2. 論文標題 Intestinal Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Transforming into Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Young Adult Patient with Neurofibromatosis Type 1: A Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicina (Kaunas)	6. 最初と最後の頁 1830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicina58121830	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kosako H, Yamashita Y, Morita S, Iwabuchi S, Hashimoto S, Matsuoka TA, Sonoki T, Tamura S.	4. 巻 23
2. 論文標題 Allosteric Inhibition of c-Abl to Induce Unfolded Protein Response and Cell Death in Multiple Myeloma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 16162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232416162.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------