

令和 6 年 4 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15904

研究課題名（和文）CARD9遺伝子変異の機能解析法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a method for functional analysis of CARD9 mutations

研究代表者

香川 礼子（Kagawa, Reiko）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：40806634

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：CARD9欠損症は、CARD9遺伝子の機能喪失型変異により発症し重篤な真菌感染症を呈する疾患である。我々は、国内初と考えられる本症患者および新規変異を同定した。新規変異の病的意義を評価することが必須であり、本研究を行なった。患者および無症状である同胞の単球において、真菌刺激におけるIL-6、IL-8、TNFの産生の低下を示した。in vitroの評価系として、HEK293細胞による強制発現実験を施行したが、真菌刺激後のIL-8産生やNF-KB活性には有用な結果が得られなかった。無症状者においても、真菌刺激によるサイトカイン産生が低下しており、真菌感染のリスクがあることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本疾患は重篤な真菌感染症を合併する可能性があり、本症を疑われれば迅速かつ正確な診断が必要である。また、本疾患の責任遺伝子であるCARD9遺伝子に病的変異を複合ヘテロ接合性に有していても、無症状患者が存在することもある。本研究では、新規CARD9変異を同定しその病的意義の評価を行なった。無症状患者においても、真菌刺激に対するIL-6、IL-8、TNFの産生低下が認められ真菌感染症のリスクを保因していることを示した。一方でin vitroでの実験系は確立できなかったが、新規変異が同定された場合には、真菌刺激に対するサイトカイン産生を評価することで発症リスクが判断可能となる。

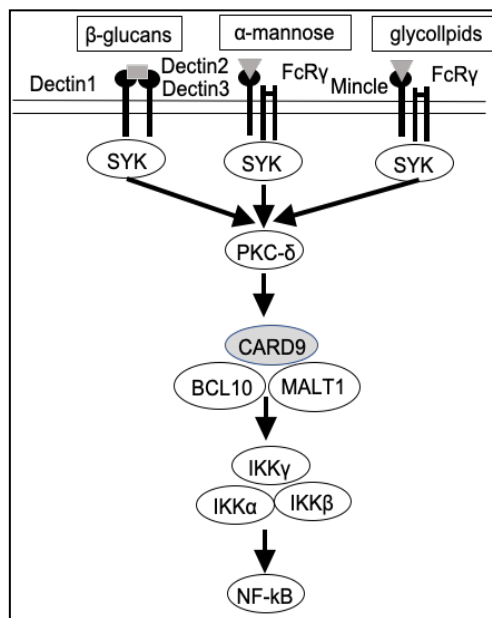
研究成果の概要（英文）：CARD9 deficiency is a disease caused by loss-of-function mutations in the CARD9 gene that results in severe fungal infections. Genetic testing is the mainstay for diagnosis of this disease, and novel mutations must be evaluated for pathological significance. We identified the first patient in Japan with this disease and a novel mutation. The pathological significance of the novel mutations was evaluated in this study. We showed that the production of IL-6, IL-8, and TNF upon fungal stimulation was decreased in monocytes from patients and asymptomatic patients with compound heterozygous mutations. On the other hand, we introduced the mutation into HEK293 cells and evaluated IL-8 production and NF-KB activity after fungal stimulation, but did not obtain useful results. Even in asymptomatic patients, a decrease in cytokine production such as IL-6, IL-8, and TNF can be considered a risk factor for fungal infection.

研究分野：免疫

キーワード：CARD9 IL-6 IL-8 TNF NF-KB

1. 研究開始当初の背景

CARD9 欠損症は、CARD9 遺伝子の機能喪失型変異により発症する常染色体劣性遺伝形式の原発性免疫不全症である。CARD9 は、真菌の構成成分を認識する受容体である Dectin-1、Dectin-2、Mincle の下流で働く分子であり、NF-kB 活性化の誘導に重要な役割を果たす (図 1)。そのため本症患者は、真菌に対する認識機構の障害を分子背景として侵襲性真菌感染症を発症する。我々は、*Exophiala dermatitidis* (黒色真菌) による侵襲性真菌感染を示した患者を経験し、その診断手法に用いた遺伝学的解析において、CARD9 変異【K196E (新規変異) / R373P (既知変異)】を同定した。本変異が CARD9 欠損症の病的変異と判断されれば、本邦初の CARD9 欠損症例となるため、新規変異が持つ病的意義の検証が早急に必要であった。CARD9 欠損症においては、カンジダまたは黒色真菌の構成成分との共培養で誘導される TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 の産生が、患者由来末で低下することが知られている。我々の同定した、患者細胞では CARD9 の mRNA、タンパク発現は正常に認めており、単球における『真菌の構成成分に対する認識機構の障害』を示すことが病的意義の検証に必要と考えた。現時点では、これらの機能評価を検証する *in vitro* の実験系はなく、確実な評価系が必須であった。



【図 1】CARD9 蛋白は、真菌の構成成分を認識する受容体である Dectin-1、Dectin-2、Mincle の下流で働く分子 BCL10、MALT1 と複合体を形成し、NF-kB 転写活性を獲得する機能を有する

2. 研究の目的

本症の臨床像は、初発時期は小児期から成人期までと幅広く、浸透率はほぼ 100% である。症状としては、髄膜炎や脳腫瘍などの中枢神経感染症や、腸炎、多発性骨髄炎、眼炎などの侵襲性真菌感染症を呈する他、慢性皮膚粘膜カンジダ感染 (chronic mucocutaneous candidiasis: CMC) などの表在性真菌感染症も合併する。これら多彩な症状が出現することや、中には重篤な真菌感染症を合併する可能性があることから、本症を疑われれば、迅速かつ適切な診断が必要である。

本症の臨床検査所見では、特異的な指標はなく、診断には遺伝学的検査が施行される。現在、他の疾患においても遺伝学的検査が行われる状況が多いが、中でも病的意義不明の変異が同定されることが問題となっている。本症においても、既知の CARD9 遺伝子変異が同定された場合、遺伝子検査の解釈は容易だが、新規変異の場合は、その病的意義の検証が必要となる。現時点では、CARD9 遺伝子変異の病的意義を正確に評価できる *in vitro* 評価系は確立されていなく、確実な解析系が必要であった。本研究では、*in vitro* の実験系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

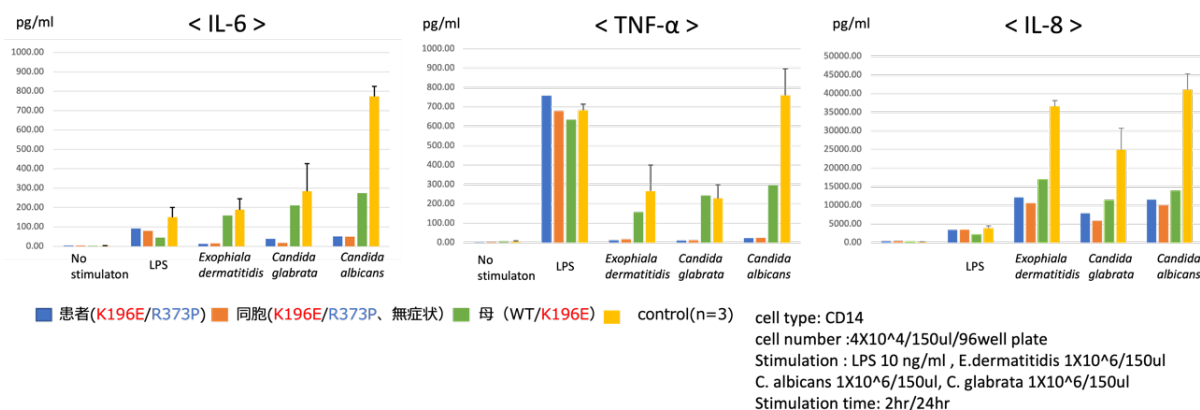
1. CARD9 遺伝子変異が同定された患者および、同様の変異を持つ無症状の同胞で末梢血単球を分離。末梢血単球に真菌刺激を行い、真菌刺激に対する下流の各種サイトカインを測定する。
2. HEK293T 細胞を用い、CARD9、DECTIN-1、SYK、BCL10 を遺伝子導入する。本細胞を真菌刺激したのち、Taqman PCR を用いて IL-8 発現を検討する。
3. THP-1 細胞細胞を用い、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用いて CARD9 遺伝子をノックアウトした THP-1 細胞を作成する。作成した CARD9-null THP-1 細胞に、野生型ないし変異型 CARD9 を一過性強制発現させ、HEK293T 細胞を用いた実験と同様に、真菌刺激に対する遺伝子群の誘導を定量 PCR で測定する。CARD9-null THP-1 細胞を用いた NF-kB レポーターアッセイも実施する。

4. 研究成果

1. 健常コントロール、患者 (K196E/R373P)、患者同胞 (無症状)、母 (WT/K196E) の CD14+Monocyt を用い、LPS、真菌刺激 (*E. dermatitidis*, *C. albicans*, *C. glabrata*) を施行。IL-6、IL-8、TNF の産生を検討したところ、患者および無症状同胞では真菌刺激に対

して IL-6 産生低下を認めたことから、無症状同胞においても真菌刺激に対するサイトカイン産生が低下していることが示唆された。

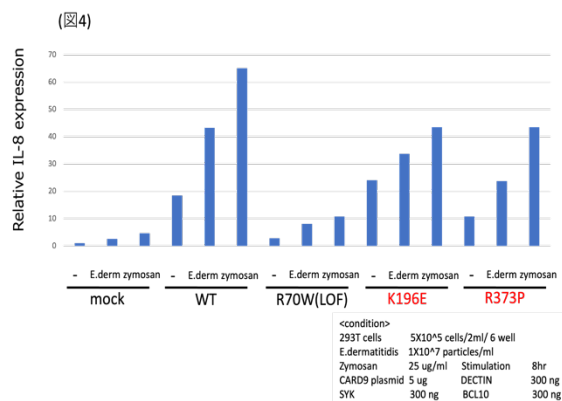
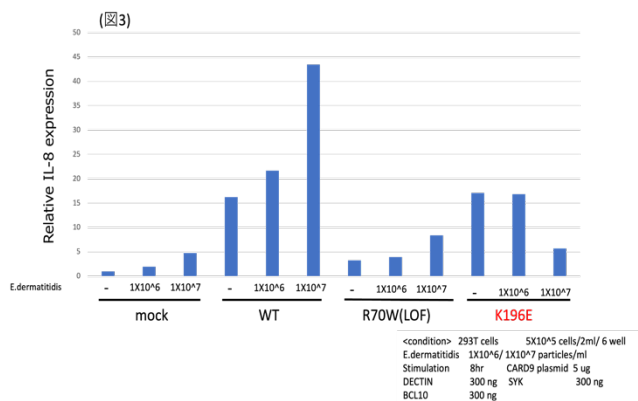
(図2)



(図 2) 患者細胞、および同胞無症の CD14+Monocyt は LPS 刺激に対して IL-6 産生低下は認めなかった。一方、真菌刺激に対して IL-6 産生低下を認めた。ヘテロ接合性の母では真菌刺激に対する IL-6 産生を認めた。

2. 1) CARD9 変異(K196E, R373P)をそれぞれ HET293T 細胞に導入し、Western blotting にて CARD9 変異変異タンパクを検討した。K196E, R373P とともに, CARD9 蛋白発現は WT と同等の発現で会った。

2) CARD9 変異(K196E,)に加えて DECTIN-1, SYK, BCL10 を HET293T 細胞に遺伝子導入を行なった。真菌刺激後、Taqman PCR にて IL-8 発現を検討した。結果 IL-8 産生低下は目的とする K196E 変異には認めなかった(図 3)。次に HEK293T 細胞を用い、前述同様に CARD9 変異(K196E, R373P)に加えて DECTIN-1, SYK, BCL10 を HET293T 細胞に遺伝子導入を行ない、真菌刺激、または Zymosan 刺激を行なった。両者の刺激において IL-8 産生の低下はみられなかった(図 4)。



(図 3) 機能損失型変異である R70W と比較し、K196E の IL-8 産生の低下は認めなかった。

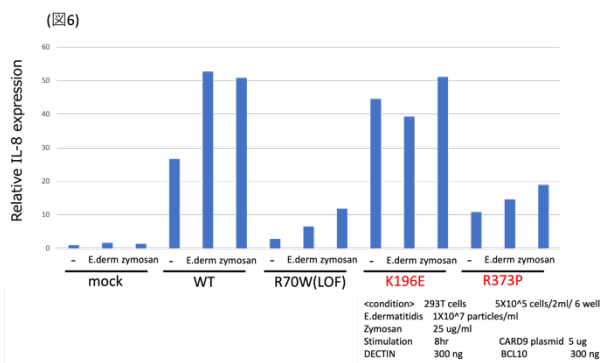
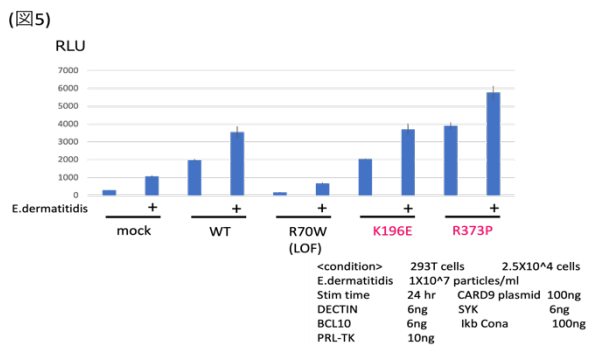
(図 4) E.derm 刺激、Zymosan 刺激にて K196E 変異、R373P 変異における、IL-8 産生の低下は認めなかった。

次に Luciferase assay にて NF-κB 転写活性を検討した。その結果においても、K196E 変異と R373P 変異に転写活性の低下は認めなかった(図 5)。

図5) 機能損失型変異である R70W と比較し、K196E, R373P における NF-kB の低下は見られなかった。

次に HET293 細胞に SYK を除いて、BCL10, DECTIN の 2 つの component を導入し真菌刺激後、Taqman PCR にて IL-8 発現を検討した。この結果 R373P 変異の IL-8 の低下は認めしたが、K196E 変異の IL-8 産生の低下は認めなかった(図6)。

(図6) Component を BCL10, Dection の 2 つとし IL-8 産生を評価したが、K196E, R373P 変異における低下は認めなかった。



本実験にて使用した、HEK293T 細胞は遺伝子導入が容易である利点があり、かつ内在性の CARD9 を持たない。しかしながら、CARD9 のシグナル伝達に必要な他の分子群 (DECTIN-1, SYK, BCL10) も発現していないので、それらの分子群の共導入が必要となる。本研究において正確な評価系が得られなかった原因として、共導入する分子が多く、CARD9 の純粋な活性を評価できなかったと考えた。

CARD9 シグナル伝達に必要な全てのコンポーネントを持つ単球系細胞である THP-1 細胞を用いた評価系を確立することを考案した。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用いて CARD9 遺伝子をノックアウトした THP-1 細胞を作成、CARD9-null THP-1 細胞に、野生型ないし変異型 CARD9 を一過性強制発現させ、HEK293T 細胞を用いた実験と同様に、真菌刺激に対する遺伝子群の誘導を定量 PCR で測定することを試みた。しかしながら、HEK293T 細胞と比較して遺伝子導入効率が低く、有効なデータが得られなかった。

本研究において、CARD9 遺伝子変異をもつ無症状の同胞で末梢血単球を真菌刺激することでサイトカイン産生(IL-6, TNF- $\alpha$ ) の低下を認めた。in vitro における機能解析により、病的意義を実証することは現段階で困難であるが、患者細胞の真菌刺激によるサイトカイン産生を評価することで、無症状者の真菌感染のリスク評価が可能となることが明らかとなり、本研究は有用であると考えられる。In vitro での評価系を確立するために、さらに検討が必要であると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Asano Takaki, Utsumi Takanori, Kagawa Reiko, Karakawa Shuhei, Okada Satoshi	4. 巻 149
2. 論文標題 Inborn errors of immunity with loss- and gain-of-function germline mutations in STAT1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 252-261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cei/uxac106	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 Tsumura Miyuki, Miki Mizuka, Mizoguchi Yoko, Hirata Osamu, Nishimura Shiho, Tamaura Moe, Kagawa Reiko, Hayakawa Seiichi, Kobayashi Masao, Okada Satoshi	4. 巻 149
2. 論文標題 Enhanced osteoclastogenesis in patients with MSMD due to impaired response to IFN-	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 252 ~ 261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2021.05.018	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 Imanaka Yusuke, Taniguchi Maki, Doi Takehiko, Tsumura Miyuki, Nagaoka Rie, Shimomura Maiko, Asano Takaki, Kagawa Reiko, Mizoguchi Yoko, Karakawa Shuhei, Arihiro Koji, Imai Kohsuke, Morio Tomohiro, Casanova Jean-Laurent, Puel Anne, Ohara Osamu, Kamei Katsuhiko, Kobayashi Masao, Okada Satoshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Inherited CARD9 Deficiency in a Child with Invasive Disease Due to Exophiala dermatitidis and Two Older but Asymptomatic Siblings	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 975 ~ 986
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10875-021-00988-7	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 Tsumura Miyuki, Miki Mizuka, Mizoguchi Yoko, Hirata Osamu, Nishimura Shiho, Tamaura Moe, Kagawa Reiko, Hayakawa Seiichi, Kobayashi Masao, Okada Satoshi	4. 巻 149
2. 論文標題 Enhanced osteoclastogenesis in patients with MSMD due to impaired response to IFN-	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 252 ~ 261.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2021.05.018	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 Tajima Go, Kagawa Reiko, Sakura Fumiaki, Nakamura-Utsunomiya Akari, Hara Keiichi, Yuasa Miori, Hasegawa Yuki, Sasai Hideo, Okada Satoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Current Perspectives on Neonatal Screening for Propionic Acidemia in Japan: An Unexpectedly High Incidence of Patients with Mild Disease Caused by a Common PCCB Variant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Neonatal Screening	6. 最初と最後の頁 35 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijns7030035	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 Kagawa Reiko, Tajima Go, Maeda Takako, Sakura Fumiaki, Nakamura-Utsunomiya Akari, Hara Keiichi, Nishimura Yutaka, Yuasa Miori, Shigematsu Yosuke, Tanaka Hiromi, Fujihara Saki, Yoshii Chiyoko, Okada Satoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Pilot Study on Neonatal Screening for Methylmalonic Acidemia Caused by Defects in the Adenosylcobalamin Synthesis Pathway and Homocystinuria Caused by Defects in Homocysteine Remethylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Neonatal Screening	6. 最初と最後の頁 39 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijns7030039	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
---------	---------