

令和 6 年 6 月 5 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：21K15905

研究課題名（和文）プロテオーム解析に基づいた先天性好中球減少症における小胞体ストレス発症機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of endoplasmic reticulum stress in congenital neutropenia based on proteome analysis

研究代表者

溝口 洋子（Mizoguchi, Yoko）

広島大学・医系科学研究科（医）・助教

研究者番号：30750533

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）：GSTP1発現低下がCNの病態に関与していると考え、正常iPS細胞を用いてCRISPR/Cas9法によるGSTP1遺伝子の遺伝子破壊を施行し好中球分化を行ったが、分化障害はみられなかった。このことからGSTP1の単独欠損のみでは好中球分化へ影響がないことが示された。さらなるCNにおける分子学的病態について解析を行うため、ELANE異常症患者由来iPS細胞(CN-iPSC)において、CRISPR/Cas9法を用いてELANE遺伝子破壊を行い分化したところ、分化障害の改善を認めた。RNA-seqの結果よりCNの病態にUPRのみならず、酸化ストレスが関わっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CNの病態にUPRのみならず酸化ストレスも関与している可能性が示唆され、薬剤スクリーニングを通して好中球分化障害を改善する分子を同定できれば、患者のQOLを改善する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Based on the hypothesis that decreased GSTP1 expression might be involved in the pathogenesis of CN, gene disruption of GSTP1 was performed using the CRISPR/Cas9 method in healthy-derived iPS cells. However, no differentiation defect was found. This indicates that a single deletion of GSTP1 alone does not affect neutrophil differentiation. For further analysis, we disrupted the ELANE gene using the CRISPR/Cas9 method in patient-derived iPS cells (CN-iPSC-NE KO) and examined whether the impairment of neutrophil differentiation was improved. CN-iPSC-NE KO showed an improved neutrophil differentiation defect. RNA-seq of CN-iPSC and CN-iPSC-NE KO-derived neutrophil progenitors revealed dysregulation of the antioxidant pathway in CN-iPSC. This suggests that not only UPR but also oxidative stress is involved in the pathogenesis of CN.

研究分野：小児血液・腫瘍

キーワード：先天性好中球減少症 iPSC UPR 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

先天性好中球減少症 (Congenital neutropenia: CN) は慢性好中球減少により、生後早期より回復する重症細菌感染症と白血化を特徴とする単一遺伝子疾患である。ELANE, SRP54, HAX1, GFI-1 遺伝子などこれまでに 22 種類の責任遺伝子が同定されており、CN は種々の原因によってもたらされる多様な疾患群と考えられている。骨髄において、好中球前駆細胞の成熟障害、細胞死が共通して認められるが、解析に適切な細胞及び動物モデルがないこと等により病態解明が進んでいないのが現状である。治療として好中球の分化・増殖を促す G-CSF が導入され感染症に対する予後が大幅に改善されたが、G-CSF 投与による血液悪性腫瘍の高率な合併を認める。根治療法である造血幹細胞移植では種々の移植関連合併症の可能性があり、G-CSF 代替薬あるいは G-CSF 製剤使用量を減少させる薬剤探索が必要とされている。

これまで研究代表者は、CN の新規遺伝子変異 (SRPRA 及び SRP19) を同定し、iPS 細胞モデルを用いた機能解析を行った (manuscript under submission)。さらに CN で最も頻度の高い ELANE 遺伝子、2 番目に頻度が高い SRP54、及び新たに同定した SRP19、SRPRA 遺伝子異常を持つ患者好中球のプロテーム解析を行った。病態解明を進めるにあたり、3,138 種類の蛋白について網羅的解析を行い、それぞれの責任遺伝子特異的に変動を認める蛋白質群と、4 つの責任遺伝子各々に依存せず共通して異常が認められる蛋白質群をそれぞれ抽出した。その中で、各遺伝子に共通して量の異常がみられる蛋白質に注目し解析した結果、全ての遺伝子異常に共通して小胞体ストレス反応 (UPR) を認めた。これまで ELANE 異常症では UPR の関与が指摘されていたが、その他の遺伝子異常では明らかな関連性は指摘されておらず、UPR は CN において共通して認められる病態であることが初めて明らかとなった。また各遺伝子変異群に共通して発現量が低下している 14 種類の蛋白質を同定し、その中でも UPR と最も関連していることが想定される分子として Glutathione S-Transferase Pi 1 (GSTP1) を抽出した。研究代表者は実際に CN 好中球における GSTP1 の発現低下を Immunoblotting 法で確認している (3 頁、図右上)。

Glutathione S-transferases (GSTs) は多くの種に普遍的に発現している酵素である。抗酸化物質の一つであるグルタチオン (GSH) はフリーラジカルや過酸化物質といった活性酸素種から細胞を保護する役割を有している。GSTs は脂肪酸酸化や酸化ストレスで産生される蛋白質にグルタチオンを付加 (この反応をグルタチオン抱合と呼ぶ) することで内因性及び外因性物質の解毒を行っている。特に GSTs の中でも GSTP1 はストレス反応、アポトーシス、炎症、細胞分化や増殖に関わる MAPK 経路や細胞周期制御への関与していることが示されている (*J Biol Chem* 2001;276:12749-55)。また GSTP1 は細胞質、核やミトコンドリアだけでなく、小胞体 (ER) にも存在し、蛋白質の折りたたみの誘導や品質管理を行う ER シャペロン (Bip, calnexin など) に結合していることが明らかとなっている。そのため GSTP1 は、蛋白質の品質管理に重要な ER シャペロンをグルタチオン抱合することで、UPR のシグナル経路を制御していると考えられている (*Antioxid Redox Signal*. 2017;26:247-61)。

これらのことから、GSTP1 低下に伴う ER シャペロン機能をもつ分子のグルタチオン抱合の低下と、ER ストレス反応への感受性の増大が、CN の共通病態に深く関わっている可能性があり、その場合 GSTP1 発現を誘導する治療標的や薬剤探索により、CN を引き起こす全ての責任遺伝子に共通して有効性が認められる治療の開発に結びつく可能性がある。

本研究では、GSTP1 に着目し機能解析を行うことで、『CN の責任遺伝子が小胞体ストレスを引き起こす機序は何か?』、また『CN 好中球に共通して認められる GSTP1 の低下は、CN において小胞体ストレス誘導や MAPK シグナル経路、細胞周期制御に関与しているのか?』という学術的な問いを明らかとする。

## 2. 研究の目的

申請者は、各責任遺伝子に共通して異常が認められる分子から、CNの好中球分化障害の根幹にある病態を明らかとし、CNの好中球分化障害を回復する分子、薬剤を同定することを最終目標としている。本申請課題ではまず、GSTP1の好中球分化及び小胞体ストレス反応やMAPKシグナル経路、細胞周期制御への関与を明らかにすることを目的とする。

本研究の学術的独自性としては、1つ目に責任遺伝子間の好中球プロテオーム比較解析から責任遺伝子に共通して変動を認めた蛋白質群に着目し、GSTP1を抽出したことが挙げられる。個々の遺伝子変異に伴う分子病態のみならず、CN責任遺伝子に共通して認められる分子病態についても検証することが、CN患者好中球の細胞死の根幹にあるメカニズムの解明につながる可能性がある。また学術的独自性の2つ目として、GSTP1の低下がCNの共通病態である小胞体ストレスの上流に位置すると仮定し、その検証を行うことにある。これまでCNの病態に小胞体ストレスが大きく関与していることが示唆されているが、小胞体ストレスがおこる機序については明らかとなっていない。小胞体ストレスに至る機序の解明がCNの病態解明における重要な鍵となる課題であり、病態解明の突破口となる可能性がある。プロテオーム解析より抽出された分子から、CNの病態の本質に迫る本課題は、CNにおいてUPRを引き起こす新たな病態経路を同定できる可能性を秘めており、創造性の高い課題と言える。またCN患者好中球の細胞死のメカニズムの解明及び細胞死を抑制する新規薬剤の開発へ発展できる可能性がある。

## 3. 研究の方法

目的達成のため、まずプロテオーム解析で示された結果の正確性について、CN患者(ELANE異常症、SRP54異常症)好中球及び骨髓検体で、実際にGSTP1の低下及びUPR亢進が認められるかimmunoblot法を用いて検証を行った。具体的にはGSTP1とBip、MAPKシグナル経路(p38、JNK)に対する抗体を用いてCN患者好中球における蛋白発現について検討した。次にCRISPR/Cas9法を用いてGSTP1遺伝子をKnockout(KO)した健康人由来iPS細胞を樹立した。GSTP1 KO前後のiPS細胞を用いて好中球分化を行い、好中球分化能について生細胞数測定やコロニーアッセイを用いて検討した。さらにCRISPR/Cas9法を用いてELANE遺伝子破壊した健康人由来iPS細胞(CN-iPSC-NE KO)を樹立し、これらの細胞の好中球分化を行い、好中球分化能について生細胞数測定やコロニーアッセイを用いて検討した。またCN-iPSC、CN-iPSC-NE KO及び正常iPSC由来好中球前駆細胞をsortし、RNA-seqを施行した。

## 4. 研究成果

先天性好中球減少症(CN)におけるGSTP1発現低下に伴うERシャペロン機能をもつ分子のグルタチオン抱合の低下、及びUPRへの感受性の増大が、CNの共通病態に深く関わっていると仮定し、まずCN患者(ELANE異常症、SRP54異常症)好中球におけるGSTP1蛋白発現をImmunoblot法で確認したところGSTP1蛋白発現低下及びUPRの指標であるBipが上昇していることを確認した。またUPR以外の他のアポトーシス関連因子についても検討を行った結果、発現上昇を認めた。これらはプロテオーム解析で得られた結果と同等の結果であった。次に正常iPS細胞を用いてCRISPR/Cas9法によるGSTP1遺伝子の遺伝子破壊を施行し、CNにみられる好中球分化障害が認められるか検討を行ったが、分化障害はみられなかった。このことからGSTP1の単独欠損のみでは好中球分化へ影響がないことが示された。さらなるCNにおける分子病的病態について解析を行うため、ELANE異常症患者由来iPS細胞(CN-iPSC)において、CRISPR/Cas9法を用いてELANE遺伝子破壊を行い(CN-iPSC-NE KO)、好中球分化障害に改善が得られるか検討したところ、分化障害の改善を認めた。CN-iPSC、CN-iPSC-NE KO及び正常iPSC由来好中球前駆細胞をsortし、RNA-seqを施行した結果、CN-iPSC、CN-iPSC-NE

KOの間で主に anti-oxidant 経路の遺伝子量の dysregulation が認められた。CN の病態に UPR のみならず、酸化ストレスが関わっていることが示唆され、酸化ストレス及び小胞体ストレスを回復する薬剤探索を行うための基礎研究となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yang R, Avery DT, Jackson KJL, Ogishi M, Benhsaien I, Du L, Ye X, Han J, Rosain J, Peel JN, Alyanakian MA, Neven B, Winter S, Puel A, Boisson B, Payne KJ, Wong M, Russell AJ, Mizoguchi Y, . et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 Human T-bet governs the generation of a distinct subset of CD11chighCD21low B cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 3277-3290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciimmunol.abq3277	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 該当する
1. 著者名 Eto S, Nukui Y, Tsumura M, Nakagama Y, Kashimada K, Mizoguchi Y, et al.	4. 巻 42
2. 論文標題 Neutralizing Type I Interferon Autoantibodies in Japanese Patients with Severe COVID-19	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1360 ~ 1370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-022-01308-3	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 該当する
1. 著者名 Noma Kosuke, Mizoguchi Yoko, Tsumura Miyuki, Okada Satoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases: state of the art	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Microbiology and Infection	6. 最初と最後の頁 1429 ~ 1434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmi.2022.03.004	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 Fan Yanxin, Murgia Marta, Linder Monika I., Mizoguchi Yoko, Wang Cong, Lyszkiewicz Marcin, Zietara Natalia, Liu Yanshan, Frenz Stephanie, Sciuccati Gabriela, Partida-Gaytan Armando, Alizadeh Zahra, Rezaei Nima, Rehling Peter, Dennerlein Sven, Mann Matthias, Klein Christoph	4. 巻 132
2. 論文標題 HAX1-dependent control of mitochondrial proteostasis governs neutrophil granulocyte differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI153153	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 Linder Monika I., Mizoguchi Yoko, Hesse Sebastian et al.	4. 巻 141
2. 論文標題 Human genetic defects in SRP19 and SRPRA cause severe congenital neutropenia with distinctive proteome changes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 645 ~ 658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2022016783	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 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 Frey Laura, Zietara Natalia, Lyszkiewicz Marcin, Marquardt Benjamin, Mizoguchi Yoko, Linder Monika I., Liu Yanshan, Giesert Florian, Wurst Wolfgang, Dahlhoff Maik, Schneider Marlon R., Wolf Eckhard, Somech Raz, Klein Christoph	4. 巻 137
2. 論文標題 Mammalian VPS45 orchestrates trafficking through the endosomal system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1932 ~ 1944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.202006871	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 Mizoguchi Yoko, Okada Satoshi	4. 巻 72
2. 論文標題 Inborn errors of STAT1 immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Immunology	6. 最初と最後の頁 59 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.coi.2021.02.009	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 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 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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 溝口洋子
2. 発表標題 小児血友病患者における関節症予防のために定期的な関節超音波評価の重要性
3. 学会等名 日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 溝口洋子、小林正夫
2. 発表標題 血友病個別化治療の実践に向けた当科の取り組み
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoko Mizoguchi, Chihiro Tani, Shiho Nishimura, Keiko Matsubara, Keita Tomioka, Maiko Shimomura, Yuko Nakashima, Hiroshi Kawaguchi, Satoshi Okada and Masao Kobayashi.
2. 発表標題 The efficacy of continuous US evaluation for joint health in pediatric patients with hemophilia.
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 溝口洋子
2. 発表標題 血友病診療の現在と未来
3. 学会等名 第73回 中国四国小児科学会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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