

図1: エクソーム解析概要

はじめに断片化したゲノムDNAの両端にアダプターを付加したライブラリーを作製する（図中ではアダプターは省略）。ライブラリーとベイト(全エクソン配列を対象としたRNAプローブ)をハイブリダイズし、ベイトに相補的なDNAのみを回収することでエクソン領域DNAを濃縮する。回収したDNAの配列を次世代型シーケンサーで読み取る。配列データを整列・マッピングし、リファレンス配列と異なる塩基を抽出することで全エクソン領域にわたる変異解析を実施できる。

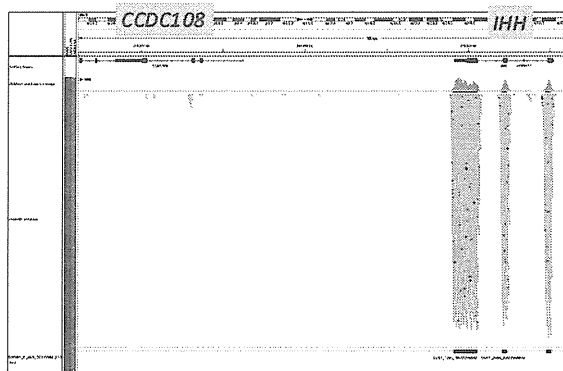


図2: Custom SureSelect kitによる選択的なDNAキャプチャーの例

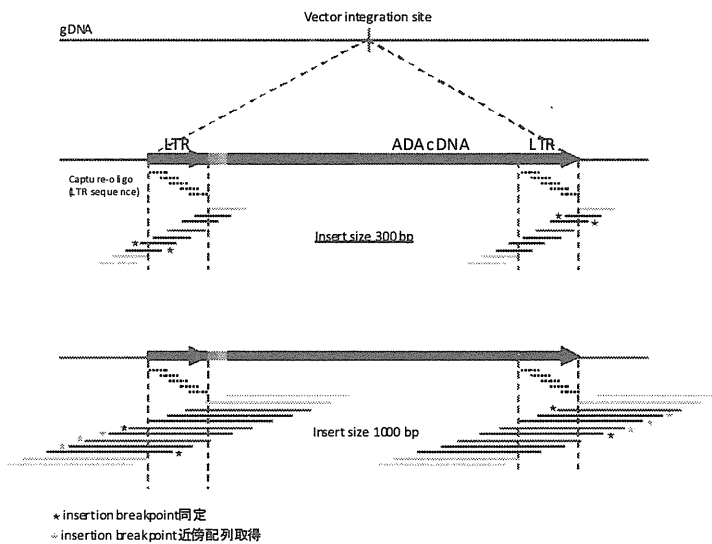


図3: LTR配列をbaitとしたキャプチャーデザイン

PKU 遺伝子治療におけるコドン最適化の試み

研究分担者 久米晃啓

自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部 准教授

研究要旨

ベクター挿入発癌リスクのない非組込み型ベクターの一つであるアデノ随伴ウイルスベクターの発現効率改善のため、治療用遺伝子のコドン適正化の効果を検討した。マウスフェニルアラニン水酸化酵素（PAH）のアミノ酸配列は保ったまま、そのコード領域 1362 塩基中 282 塩基に変異を導入した人工遺伝子（野生型との相同率 79%）を合成し、3 種類のプロモータと組み合わせて発現プラスミドを構築した。これらを 3 種のヒト細胞株にトランスフェクションし、イムノブロットで PAH 発現量を量ったところ、最大 5.5 倍の発現量増加を見出した。フェニルケトン尿症遺伝子治療に向けて、治療用ヒト PAH 遺伝子のコドン最適化の効果も検討する予定である。

A. 研究目的

最近、種々の先天性疾患に対して遺伝子治療の効果が示され、さらに適用疾患の拡大が期待されている。遺伝子治療を安全に施行するためには、急性毒性のみならず染色体挿入発癌など長期リスクを可能な限り低減しなければならない。アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、肝臓や骨格筋など終末分化した実質臓器への遺伝子導入に適し、染色体外で長期間安定に存在するため染色体挿入発癌のリスクが小さいため、フェニルケトン尿症（PKU）など多くの先天代謝異常症へ応用が期待されている。AAV ベクターの効率改善の一法として、治療用遺伝子のコドンを改変して発現効率を高められないか、古典型 PKU の責任遺伝子であるフェニルアラニン水酸化酵素（PAH）遺伝子について検討した。

B. 研究方法

1. 野生型マウス PAH 遺伝子（mPAHwt）のコード領域（1362 塩基）をもとに、GeneOptimizer ソフトウェア（GENEART 社）のアルゴリズムを使用してアミノ酸配列を保ったままコドンを最適化した人工遺伝子（mPAHco）を作成した。人工遺伝子の作成と合成はタカラバイオ（株）に委託し、pUC プラスミドに組込んだ形で供給された。このプラスミドから mPAHco を切り出し、サイトメガロウイルスプロモータ（CMV）・肝特

異的合成プロモータ（LP1）・哺乳類細胞用汎用プロモータ（CAG）の下流につないで発現プラスミドを構築した（pCMV-mPAHco、pLP1-mPAHco、pCAG-mPAHco）。これと対応して、それぞれのプロモータに mPAHwt を組み合わせた発現プラスミドも構築した（pCMV-mPAHwt、pLP1-mPAHwt、pCAG-mPAHwt）。

2. 上記 6 種のプラスミドを、ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞・ヒト肝由来 Hc 細胞・ヒト肝癌由来 Huh7 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞を溶解してライセートを調整した。各ライセートをポリアクリルアミドゲルで電気泳動後メンブレンに転写し、抗 PAH 抗体と ECL 試薬を用いてイムノブロットし、LAS-4000mini イメージアナライザを用いて PAH を定量した。同様に、抗アクチン抗体を用いて各ライセート中に含まれるアクチンも定量し、PAH 比較の補正に用いた。

C. 研究結果

1. トランスフェクション条件の設定

HEK293 細胞については、トランスフェクション前日に 60mm ディッシュに  $2 \times 10^6$  個の細胞をまき、 $2 \mu\text{g}$  のプラスミド DNA と推奨量の Lipofectamine Plus 試薬を用いてリポフェクションを行えば、安定して 90% 以上の細胞に遺伝

子導入できることは確認済みである。一方、Hc細胞とHuh7細胞については、同じ条件でトランスフェクションを行うと、極めて遺伝子導入効率が低かった。そこで、GFPレポータープラスミドを用いてトランスフェクション条件を予備検討した。結果、それぞれ60mmディッシュに $3 \times 10^5$ 個の細胞をまき、翌日プラスミド DNA2 $\mu$ g と Lipofectamine Plus 試薬を用いてトランスフェクションを行い、Hc細胞で約20%、Huh7細胞で約70%の遺伝子導入効率を得たので、以後の実験はこれに従った。

2. 図1は、上記6種類のプラスミドでHc細胞(A)、Huh7細胞(B)に遺伝子導入して48時間後のイムノブロットである。それぞれ上段はPAH、下段はアクチンの発現を示す。図2は、図1において、それぞれの細胞でpCMV-mPAHwt遺伝子導入後PAHのシグナルをアクチンのシグナルで補正した値を100%としたときの相対値を示す。これらの値をもとに、PAH遺伝子コドン最適化の効果を、細胞別・プロモータ別にまとめたのが表1である。両細胞腫とも、CMVプロモータでPAH遺伝子をドライブした場合にはコドン最適化による明らかな発現増強が見られたが、肝特異的プロモータでは逆効果だった。CAGプロモータでは、細胞腫により効果の食い違いが見られた。

表1. コドン最適化によるPAH発現の増強

	CMV	LP1	CAG
Hc細胞	5.5	0.1	1.4
Huh7細胞	3.4	0.05	0.4

(単位:倍)

#### D. 考察

英米で進行中の血友病B遺伝子治療(Nathwani AC et al, N Engl J Med 365: 2357-2365, 2011)や、慢性肉芽腫症遺伝子治療ベクターの開発(Moreno-Carranza B et al, Gene Ther 16:111-118, 2009)において、ベクターに搭載する遺伝子のコドン最適化は目覚ましい効果をあげており、殊に前者では30-50倍もの発現増強効果を示した。今回PKU遺伝子治療ベクターの効率改善を目指してPAH遺伝子コドンの最適化を試み、培養細胞系でその効果を検討したが、用いたプロモータによって効果が分かれた。その機序は不明であるが、少なくとも組み

合わせるプロモータによって明らかな発現増強は認められるので、今後のベクター構築において考慮の材料となろう。最適化のアルゴリズムによっても、用いる系に適切な最適化がなされるか左右されることも十分あり得る。最終的には、実際にアデノ随伴ウイルスなどのベクター系に組込んだ上、PKUモデルマウスに投与してその効果を検討する必要がある。

#### E. 結論

治療用遺伝子のコドン最適化は有用な技術だが、さらに検討を重ねて実際に有用なものを絞り込んでいく必要がある。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ogura M, Urabe M, Akimoto T, Onishi A, Ito T, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Muto S, Kusano E, Ozawa K: Interleukin-10 expression induced by adeno-associated virus vector suppresses proteinuria in Zucker obese rats. Gene Ther 19: 476-482, 2012.
- 2) Uchibori R, Tsukahara T, Mizuguchi H, Saga Y, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: NF- $\kappa$ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. Cancer Res 73: 364-372, 2013.

##### 2. 学会発表

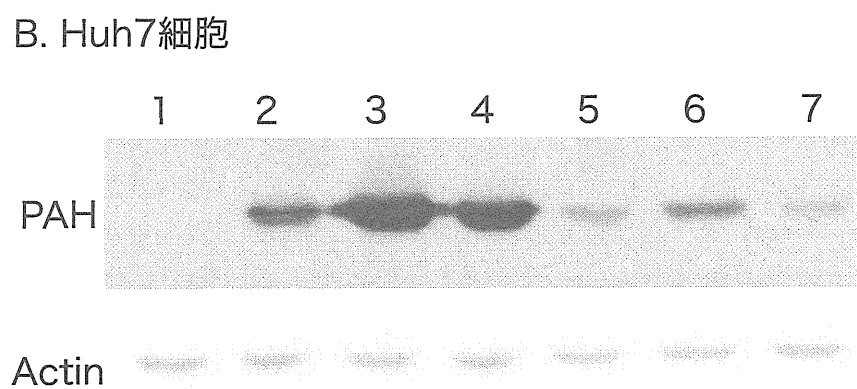
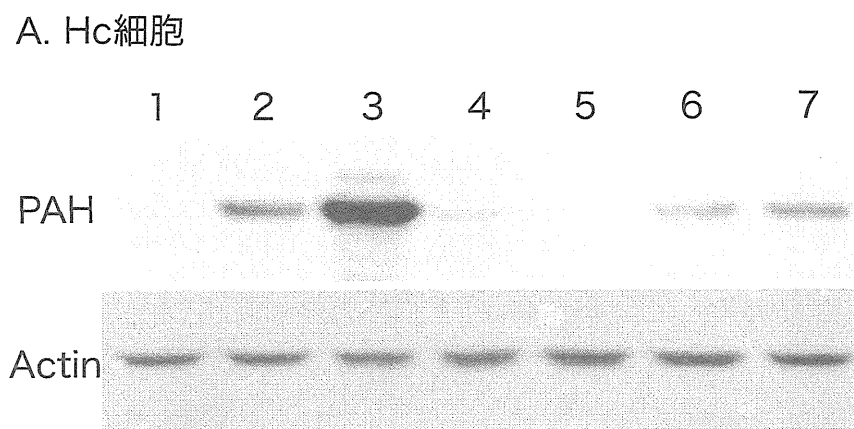
- 1) Onishi A, Urabe M, Morishita Y, Hirahara I, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Kusano E, Ozawa K: AAV vector-mediated systemic delivery of interleukin-10 attenuates the progression of peritoneal fibrosis in a rat model of peritoneal dialysis. American Society of Gene and Cell Therapy 15th Annual Meeting, May 17, 2012, Philadelphia, PA, USA. (Mol Ther 20 suppl 1: S99-100, 2012)
- 2) Mizukami H, Mimuro J, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Ohmori T, Madoiwa S, Sakata Y, Ozawa K: Dose-response relationship of

- factor IX expression in non-human primates following IV administration of AAV8 vectors. American Society of Gene and Cell Therapy 15th Annual Meeting, May 19, 2012, Philadelphia, PA, USA. (Mol Ther 20 suppl 1: S253, 2012)
- 3) Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Nakamura Y, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Fukushima N, Ozawa K, Nakano I: AADC gene therapy for Parkinson disease: Long-term outcomes and preliminary results of an autopsy case. Japan Society of Gene Therapy 18th Annual Meeting, June 28, 2012, Kumamoto. (Abstracts p94)
- 4) Onishi A, Urabe M, Morishita Y, Hirahara I, Tsukahara T, Mizukami H, Kume A, Kusano E, Ozawa K: Interleukin-10 prevents the progression of peritoneal fibrosis in an animal model of peritoneal dialysis. Japan Society of Gene Therapy 18th Annual Meeting, June 28, 2012, Kumamoto. (Abstracts p176)
- 5) Tsukahara T, Yamamoto C, Ohmine K, Uchibori R, Ido H, Urabe m, Mizukami H, Kume A, Nakamura M, Riviere I, Sadelain M, Brentjens RJ, Ozawa K: Genetically modified T lymphocytes targeted to CD19 mediated-cytotoxicity for B cell lymphoma. Japan Society of Gene Therapy 18th Annual Meeting, June 28, Kumamoto. (Abstracts p183)
- 6) Mizukami H, Mimuro J, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Ohmori T, Madoiwa S, Sakata Y, Ozawa K: Relationship between vector dose and factor IX expression in non-human primates following IV administration of AAV8 vectors. Japan Society of Gene Therapy 18th Annual Meeting, June 29, 2012, Kumamoto. (Abstracts p125)
- 7) 塚原智典、大嶺謙、内堀亮介、井戸寛之、卜部匡司、水上浩明、久米晃啓、中村正孝、小澤敬也: Bリンパ腫に対する抗CD19キメラ抗原受容体発現T細胞の抗腫瘍効果. 第71回日本癌学会総会、2012年9月20日、札幌。(抄録 p402)
- 8) 上原貴行、金澤丈治、水上浩明、内堀亮介、塚原智典、卜部匡司、久米晃啓、三澤清、小澤敬也: 頭頸部扁平上皮癌におけるガラニン受容体2型シグナルを介する新たな抗腫瘍機構の解明. 第71回日本癌学会総会、2012年9月20日、札幌 (抄録 p404)
- 9) Mizukami H, Mimuro J, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Ohmori T, Madoiwa S, Sakata Y, Ozawa K: Dose-response relationship of factor IX expression in non-human primates using AAV8-based vector. 第74回日本血液学会学術集会、2011年10月20日、京都 (臨床血液 53: 318, 2012)
- 10) Tsukahara T, Ohmine K, Uchibori R, Ido H, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Nakamura m, Riviere I, Sadelain M, Brentjens R, Ozawa K: Anti-tumor activity of T-lymphocytes expressing an anti-CD19 CAR for B cell lymphoma. 第74回日本血液学会学術集、2011年10月20日、京都 (臨床血液 53: 599, 2012)
- 11) Mizukami H, Mimuro J, Tsukahara T, Urabe M, Kume A, Ohmori T, Madoiwa S, sakata Y, Ozawa K: Threshold dose of factor IX expression in non-human primates following IV administration of AAV8 vectors. European Society of Gene and Cell Therapy and French Society for Cell and Gene Therapy Collaborative Congress 2012, October 26, 2012, Versailles, France. (Hum Gene Ther 23:A77-78, 2012)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

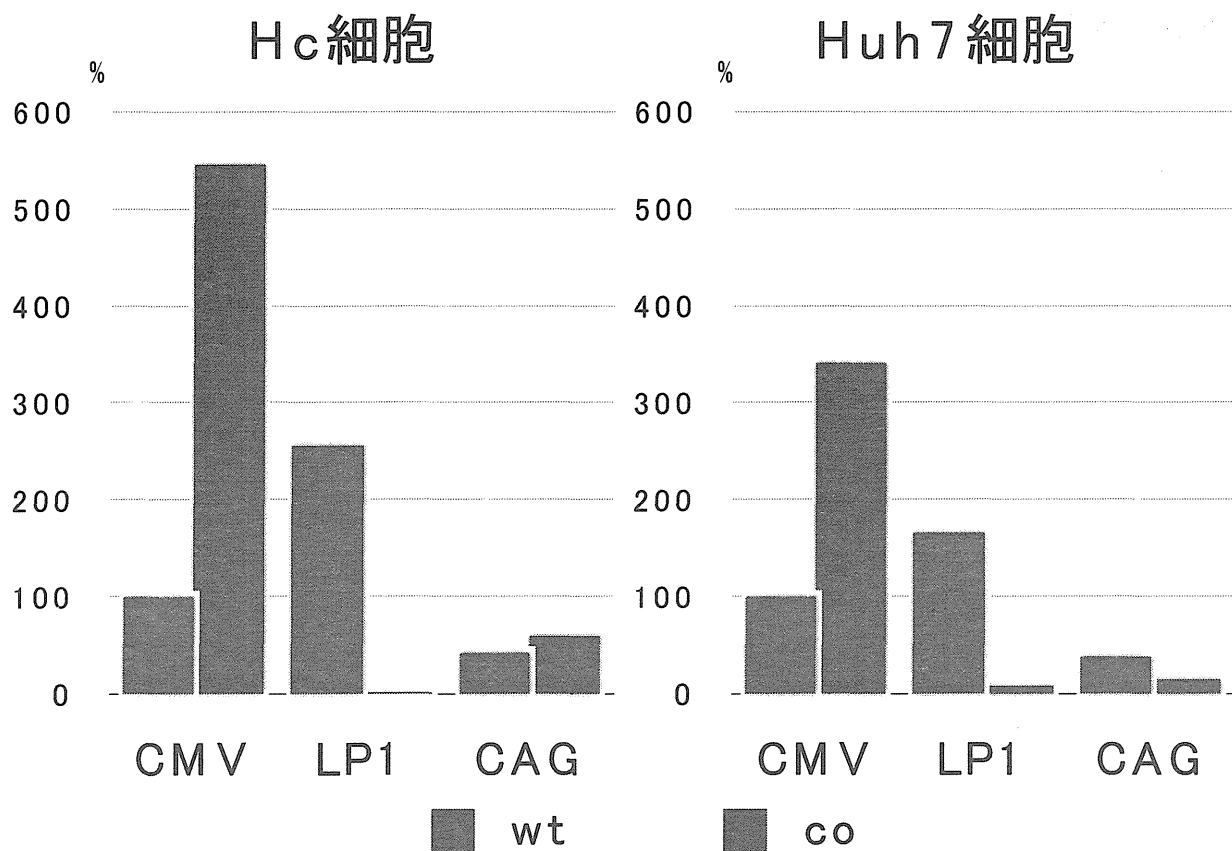
該当なし

図1. イムノブロット



- レーン 1 : 対照 (遺伝子導入なし)  
2 : pCMV-mPAHwt  
3 : pCMV-mPAHco  
4 : pLP1-mPAHwt  
5 : pLP1-mPAHco  
6 : pCAG-mPAHwt  
7 : pCAG-mPAHco

図2. イムノブロット定量



それぞれの細胞において、pCMV-mPAHwtにて遺伝子導入したときの PAH 発現量をアクチン発現量で補正したものを 100%としたときの相対値を示す。

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）  
分担研究報告書

遺伝子治療臨床研究における前処置等の検討とそのフォロー  
脂肪細胞を用いた遺伝子治療の臨床応用について

研究分担者 福島 敬  
筑波大学医学医療系 臨床医学域 小児科学准教授

**研究要旨**

新たな遺伝子治療の手法として、遺伝子改変自家脂肪細胞を臨床利用するための基礎研究が継続され、成果が集積されてきた。ペプチド/蛋白の補充を目的としたものである。摘出した脂肪組織を試験内で培養し、フラスコの天井に付着した（天井培養、Ceiling Culture）細胞を抽出することによって、増殖能力を有し、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入が可能な細胞集団（ceiling culture-derived proliferative adipocytes, ccdPA）を安定的に得ることができる。こうして得られた ccdPA に、目的とする遺伝子を導入し、動物への移植実験によって、遺伝子産物の機能がマウス体内で発現することが確認されている。

Lecithine cholesterol acyltransferase (LCAT) 欠損症の治療を目的とした臨床研究実現に向けた行政手続きが、千葉大学医学部附属病院とセルジェンテック社との協力によって進められているところである。一方で、ライフイノベーションをそのメインスローガンの1つとする「つくば国際戦略総合特区」の認定（平成23年12月）を機に、筑波大学 CREIL センターが参画して、この ccdPA を利用した遺伝子治療の対象疾患を拡大するための検討が開始された。

**A. 研究目的**

脂肪細胞 (ceiling culture-derived proliferative adipocytes, ccdPA) を用いた遺伝子治療の開発の経緯について検証し、今後の臨床応用に向けた課題を抽出する。

**B. 研究方法**

学術文献を中心に情報を収集・整理し、臨床応用の実現に向けて更に学術

的検討を加えるべき事項・課題を抽出する。

**C. 研究結果**

**1. ccdPA 遺伝子治療技術再発の経緯**

ベンチャー企業であるセルジェンテック社が、2003年10月20日に設立された。難病の治療と克服を目的とした治療遺伝子導入ヒト脂肪細胞の加工細胞医薬品を医療に提供し、多くの

難病で苦しむ患者様と家族の生活の質の向上に貢献することを目的としている。

2005年12月20日、脂肪細胞を用いる新しい技術をタカラバイオ社と共同開発することに合意。

2006年11月27日、千葉大学産学連携・知的財産機構の研究成果紹介ページに掲載。

2009年8月14日、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の「平成21年度第2回イノベーション実用化助成事業」に採択。

2010年5月17日、千葉大学との共同研究成果に基づき、千葉大学より脂肪細胞を用いた遺伝子治療臨床研究の実施申請、厚生科学審議会科学技術部会で審議開始。

2010年10月26日、遺伝子治療用脂肪細胞の実用化権利を支える「遺伝子治療用初代脂肪細胞」特許(エーザイ出願)が、米国にて成立(US 7,820,438 B2)。

2012年、筑波大学CREILセンター・附属病院との共同臨床研究の検討を開始。

## 2. 学術的成果

ccdPA と、adipose stem cell および bone marrow mesenchymal stem cells との比較検討によってその生化学的・生理学的特徴が示された(1)。

次に、この ccdPA にレトロウイルスベクターを用いて LCAT 等の遺伝子を導入し、試験管内でそのペプチド・蛋白の発現、更に発現された分子が本来の機能を発揮することが確認され

た(2)。

一方では、遺伝子導入 ccdPA が、その遺伝子に由来する蛋白を発現することが、Fibrin glue によって促進されること(3)、更に platelet rich plasma を2%濃度で添加すると、ccdPA のアポトーシスが抑制されたこと(4)が確認された。

遺伝子導入した ccdPA をマウスに移植して、有効性と安全性とを確認する研究も同時に進められてきた。インスリン遺伝子導入 ccdPA を糖尿病マウスに移植することによって、マウスの血清インスリン値の上昇、血糖値の下降が確認され、移植した細胞塊を摘出することによってこれらの効果が消失することが報告されている(5、図1)。

LCAT 遺伝子ノックアウトマウスに LCAT 遺伝子導入 ccdPA を移植する実験においては、Fibrin glue が、移植 ccdPA の生存率を改善させると同時に、遺伝子産物の増加をもたらすことが確認された(6、図2)。

## D. 考察

ccdPA を利用した遺伝子治療を臨床応用するにあたり、以下の点につき前臨床研究を含めた確認が必要であると考えられる(7)。

(A) 狙った細胞に確実に遺伝子を入れられるか。(B) 治療に見合う量の蛋白を産生させることが可能か。(C) 効率よく遺伝子を細胞に入れられるか。(D) 導入遺伝子は安定に保持されるか。(E) 狙っていない細胞への遺伝



子導入を避けることおよびその確認。

(F) 遺伝子を導入した細胞が持つ本来の性質を損なうこと（脆弱化／癌化）の回避。(G) 長期安定した持続分泌が可能か（遺伝子治療の期待される効果）。

一方で、行政的手続きを進めるに当たり、つくば国際戦略総合特区（平成23年12月22日、内閣総理大臣決定）において、期待される研究開発テーマの一つに挙げられるように準備できれば、能率的である。

#### E. 結論

脂肪細胞を利用した遺伝子治療の臨床応用および対象疾患拡大の検討は、学術的側面と同時に行政的側面を十分に踏まえて進める必要がある。

#### <<引用論文>>

1) Sakiyo Asada, Masayuki Kuroda, Yasuyuki Aoyagi, Yoshitaka Fukaya, Shigeaki Tanaka, Shunichi Konno, Masami Tanio, Masayuki Aso, Kaneshige Satoh, Yoshitaka Okamoto, Toshinori Nakayama, Yasushi Saito, Hideaki Bujo. Ceiling culture-derived proliferative adipocytes retain high adipogenic potential suitable for use as a vehicle for gene transduction therapy *Am J Physiol Cell Physiol* 301:C181-C185, 2011.

2) Sakiyo Asada, Masayuki Kuroda, Yasuyuki Aoyagi, Hideaki Bujo, Shigeaki Tanaka, Shunichi Konno, Masami Tanio, Itsuko Ishii, Masayuki

Aso, Yasushi Saito. Disturbed apolipoprotein A-I-containing lipoproteins in fish-eye disease are improved by the lecithin:cholesterol acyltransferase produced by gene-transduced adipocytes in vitro. *Molecular Genetics and Metabolism* 102:229-231, 2011

3) Yasuyuki Aoyagi, Masayuki Kuroda, Sakiyo Asada, Shigeaki Tanaka, Shunichi Konno, Masami Tanio, Masayuki Aso, Yoshitaka Okamoto, Toshinori Nakayama, Yasushi Saito, Hideaki Bujo. Fibrin glue is a candidate scaffold for long-term therapeutic protein expression in spontaneously differentiated adipocytes in vitro. *Experimental Cell Research* 318: 8-15, 2012

4) Yoshitaka Fukaya, Masayuki Kuroda, Yasuyuki Aoyagi, Sakiyo Asada, Yoshitaka Kubota, Yoshitaka Okamoto, Toshinori Nakayama, Yasushi Saito, Kaneshige Satoh, Hideaki Bujo. Platelet-rich plasma inhibits the apoptosis of highly adipogenic homogeneous preadipocytes in an in vitro culture system. *Experimental and Molecular Medicine*, 44:330-339, 2012

5) M Ito, H Bujo, K Takahashi, T Arai, I Tanaka, Y Saito. Implantation of primary cultured adipocytes that secrete insulin modifies blood glucose levels in diabetic mice.

6) Y Aoyagi, M Kuroda, S Asada, H Bujo, S Tanaka, S Konno, M Tanio, I Ishii, M Aso, Y Saito. Fibrin glue

increases the cell survival and the transduced gene product secretion of the ceiling culture-derived adipocytes transplanted in mice. *Experimental and Molecular Medicine* 43: 161-167, 2011

7) セルジェンテック株式会社 HP  
<http://www.cellgentech.com/project1.html>

#### F. 健康危険情報

該当事項なし。

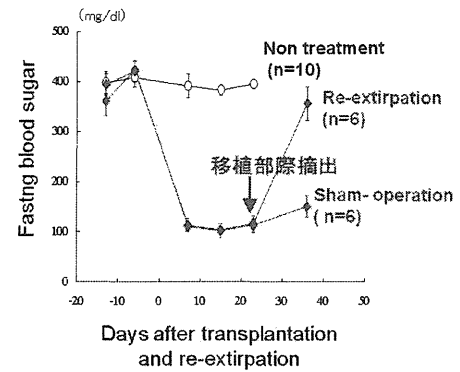
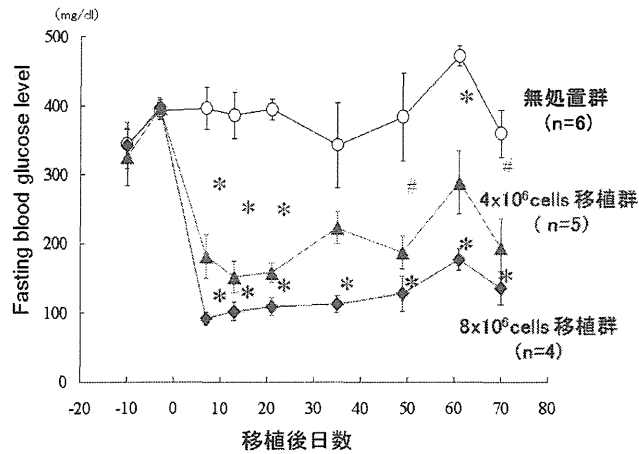
#### G. 研究発表

1. 論文発表  
該当論文なし。
2. 学会発表  
該当演題なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当事項なし。
2. 実用新案登録 該当事項なし。
3. その他 該当事項なし。

(以上)



\* $p < 0.01$ ; # $p < 0.05$  vs control: one mouse died

図 1

FBG levels of s1s2B10-Ins/PA-implanted STZ mice. Implantation of control cells (open circle,  $n=6$ ), or a low cell number (solid triangle,  $4 \times 10^6$  cells/mouse,  $n=5$ ) and high cell number (solid diamond,  $8 \times 10^6$  cells/mouse,  $n=4$ ) of s1s2B10-Ins/PA cells was performed at day 17 after STZ administration. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  vs control.

Resection of the implants diminished the glucose-lowering effect and plasma insulin concentration in mice. a FBG levels. Implantation of control cells (open circle,  $n=6$ ) or s1s2B10-Ins/PA was performed as shown in Fig. 3. In s1s2B10-Ins/PA-implanted mice, the gross implants were removed surgically (open diamond,  $n=3$ ) at 3 weeks after implantation (arrow). (reference 5,7)

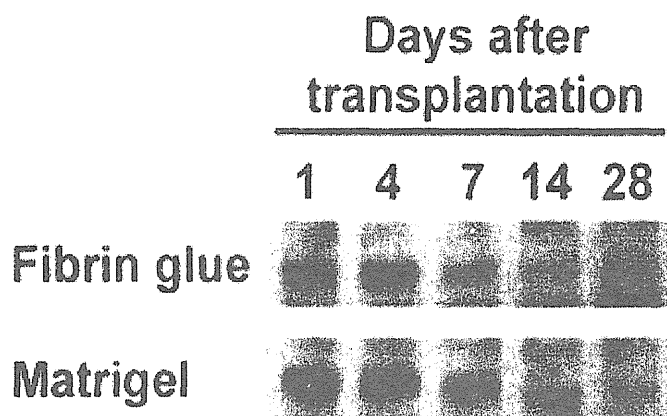


图 2 A

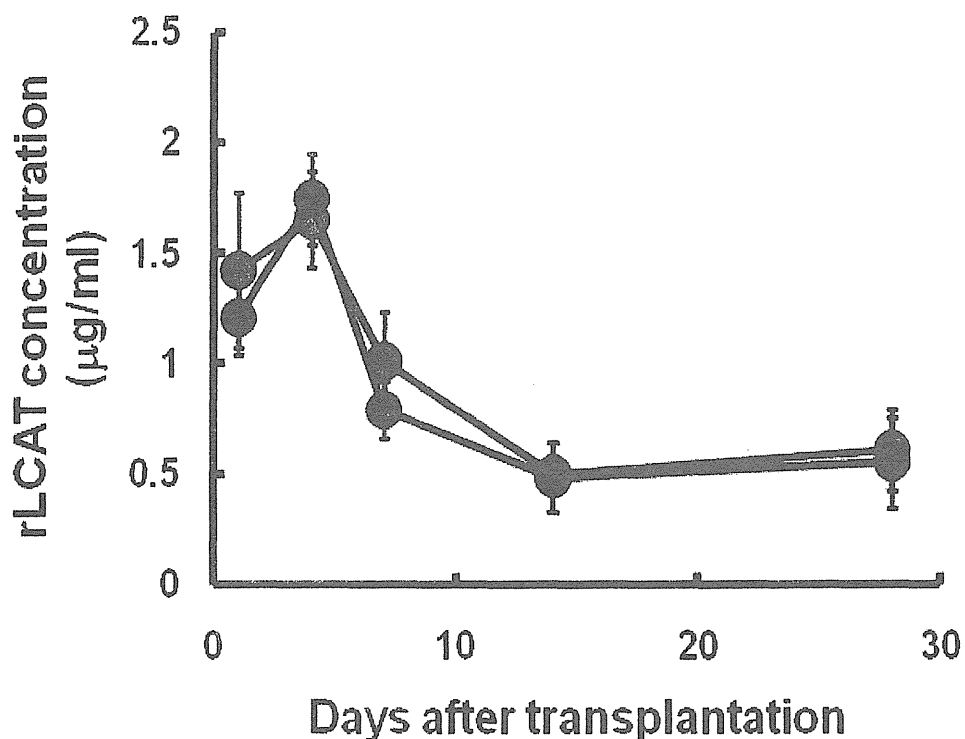


图 2 B

Effect of fibrin glue on hLCAT protein delivery. Human *lcat* gene-transduced m-cddPA were subcutaneously transplanted in C57BL/6J mice using fibrin glue or Matrigel as scaffolds. Representative data of the experiments were shown (A), in which hLCAT delivery was monitored in a single mouse.

Concentrations of hLCAT protein in cell-transplanted mice sera with Matrigel (closed circle) or fibrin glue (closed triangle) were quantified by densitometric analysis after ICP-Western experiments (B). \* $P < 0.05$ .

(reference 6,7)

慢性肉芽腫症腸炎における血中サイトカインの検討

研究分担者 布井 博幸 (宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野 教授)  
研究協力者 西村 豊樹(宮崎大学医学部)、水上 智之(国立病院機構熊本再春荘病院小児科)

**研究要旨:** 慢性肉芽腫症 CGD は殺菌能欠損に加えて、肉芽形成、CGD 腸炎などの過剰炎症症候群をきたし、その結果、器質的障害もきたすことでも知られている。過剰炎症症候群の一つである CGD 腸炎 3 名について血清サイトカイン濃度測定を行い、病態解析を行った。CGD 腸炎の診断時には IL-1 $\beta$ 、IL-18、IFN $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12 が健常者と比較して有意に上昇し、治療前後でも指標になっていた。1 症例の経過では、発熱の時期に一致して CRP と IL-18 が変化した。活性酸素種は IL-1 $\beta$  と IL-18 の活性化に関わる caspase-1 抑制、NF- $\kappa$ B を介してサイトカイン産生に関わる Nrf2 や Scramblase の活性化を介して、pyroptosis、酸化ストレス、efferocytosis などによる炎症抑制に関わっているが、慢性肉芽腫症では活性酸素産生が出来ないため、これらの経路を介しての炎症抑制が十分でなく、肉芽腫形成や炎症性腸炎を起こっているのではないかと考えられた。

### A. 研究目的

CGD は殺菌能欠損に加えて、肉芽形成、CGD 腸炎などの過剰炎症症候群をきたし、その結果、器質的障害もきたすことでも知られている。これらの過剰炎症に対しては、抗生剤は無効で、むしろステロイドや免疫抑制剤が有効な場合がある。我々は今回、過剰炎症症候群の一つである CGD 腸炎 3 名について、血清サイトカイン濃度を測定し病態解析を試みた。

### B. 研究方法

#### 1) 症例1:20 歳男性

Gp91 phox の責任遺伝子である CYBB を含む 2Mbp の遺伝子欠損があり McLeod (マックレオード) 症候群を合併している。予防投薬は ST 合剤、ポリコナゾールを行っていた。19 歳時に肺アスペルギルス肉芽腫、脾肉芽腫、鼠径リンパ節肉芽腫を発症し、入院加療にて軽快退院した。その 1 ヶ月後から周期性に発熱し (4~5 日間の発熱、10~12 日周期)、それに一致して炎症反応高値を認めるため精査加療目的で入院した。身体所見では頸部ソ径部にリンパ節腫脹を認めましたがそれ以外に特記事項なし、画像検査は全身 CT、Ga シンチを行ったが特に異常所見なし

血液検査では CRP が軽度上昇しているのみであった。不明熱の原因検索のため、入院中に下部消化管内視鏡を施行した。回腸末端から直腸まで多発する連続性のアフタ、びらんを認めました。病理組織は明らかな肉芽腫形成はないものの、炎症細胞の集簇や、内部に deposit を多く含む泡沫細胞が散見された。上部消化管内視鏡も行い、胃の竹の節状外観、十二指腸に notch 状外観を認め、クローン病と類似した所見を認めた。

症例 2 : 18 歳男性。CYBB の 2 塩基欠失。予防投薬としては ST 合剤、イトコナゾール内服を行っていた。18 歳の夏頃から時々下痢 (1 日数回)、腹痛を訴えることがあり、整腸剤を内服していた。同年秋に、前回とは別の方向に肛門周囲膿瘍、痔瘻を形成した。痔瘻を反復したため、CGD 腸炎の合併を疑い大腸内視鏡を実施した。身体所見は頸部リンパ節腫大があり 肛門 6 時方向に肛門周囲膿瘍があったもののそれ以外に特記事項なし。血液検査では CRP が軽度上昇しているのみであった。大腸内視鏡所見では、回盲部から直腸の粘膜は全体的に黄褐色調であり、盲腸から直腸まで多発するアフタを認めた。病理は粘膜固有層に deposit の貯留した泡沫細胞を多数認めた。

症例3：症例2の兄で同じくCYBBの2塩基欠失を認め、予防投薬としてST合剤 ポリコナゾール内服を行い、IFN $\gamma$ の投与を行っていた。22歳の春に真菌性肺炎に罹患、VRCZ、MCFG併用にて軽快したが、以後もCRP 1mg/dL前後で推移するため、CGD腸炎を疑って大腸内視鏡検査を実施した。身体所見は頸部リンパ節腫脹以外に特記事項なく、血液検査も軽度のCRP上昇以外は特記事項なかった。回腸末端にわずかにびらんを認め、血管の透見性不明瞭な部分が多数みられた。盲腸から直腸にかけてはアフタが散見され、直腸にいくにしたがって増強する黄色の小顆粒状の色素沈着を認めた。病理は肉芽種性変化を認め、活動性炎症の所見はなく、depositのたまった泡沫細胞が多数認められた。

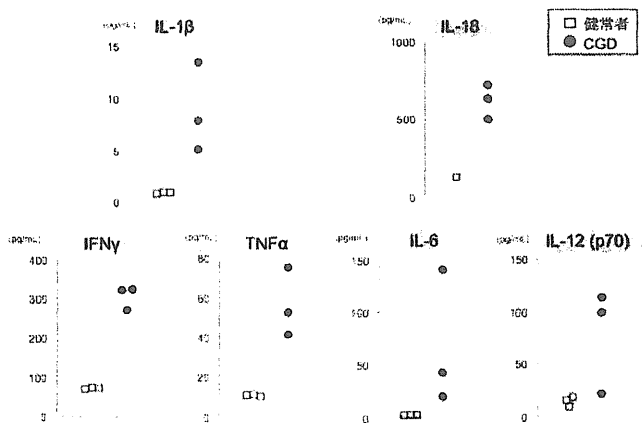
2) サイトカイン測定：血清サイトカイン濃度はBio-Plex Pro Human cytokine 27-Plex Panel (Bio-Rad) およびIL-18 ELISA (MBL) で測定した。

### C. 結果

#### 1) 3症例の血中サイトカイン比較

IL-1 $\beta$ 、IL-18、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12は健常者と比較してCGD腸炎診断時に有意に上昇していた(図1)。他のサイトカインは病勢を反映していなかった。

図1：腸炎診断時の血中サイトカイン値



3症例の血中サイトカインプロファイル濃度を、健常者を1として対数軸に患者サイトカイン濃度を表すと、健常者(黄色)に対し、3症例ともに、IL-1 $\beta$ 、IL-18、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6が高かった。特にIL-1とIL-6の上昇が大きく、IL-12のばらつきは大きかったが、パターンがよく似ていた(図2)。

#### 2) 腸炎治療前後でサイトカイン変化

腸炎治療によるIL-1 $\beta$ 、IL-18、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、

IL-12の変化はよく病状を反映していた(図3)。

図2：腸炎診断時の血中サイトカインプロファイル

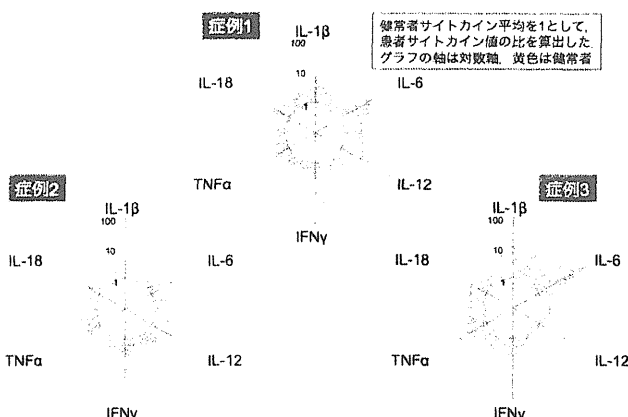
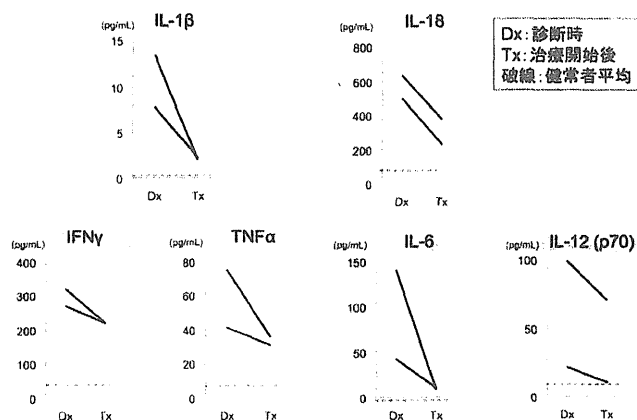


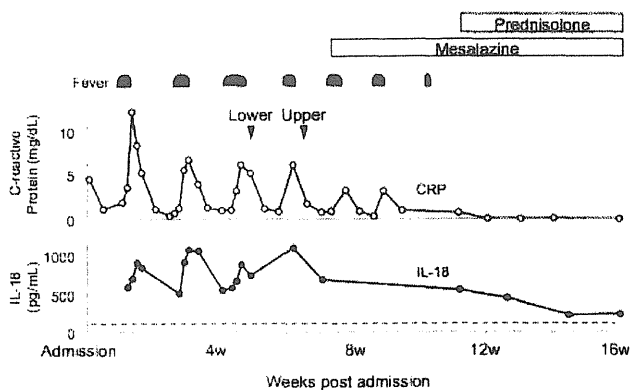
図3：腸炎前後での血中サイトカインの変化



#### 3) 症例1でのサイトカインの経時変化(図4)

発熱の時期に合致してCRPとIL-18が変動した。下部消化管内視鏡、上部消化管内視鏡後、CGD腸炎と診断しメサラジン内服加療を開始したが、炎症反応の改善が認められず、PSL内服(0.58mg/kg/day)の追加内服を開始したところ、炎症反応は低下した。

図4：CGD腸炎の経過と血中IL-18



3ヶ月後の内視鏡でもアフタ性病変の改善を認めた。IL-18の血清中濃度も改善していた。しかしIFN- $\gamma$ 、

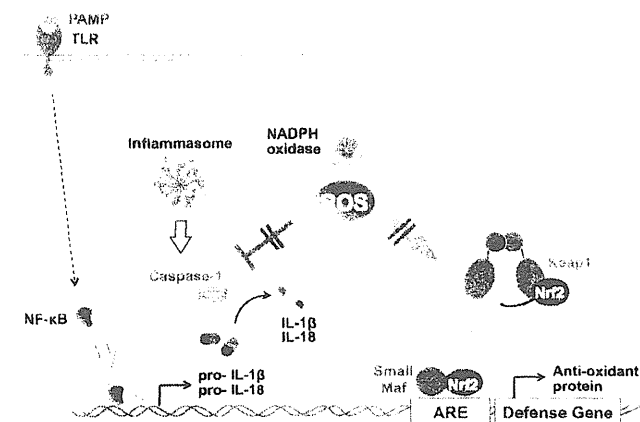
TNF- $\alpha$ などのサイトカインは症状改善したのちも高値であり産生過剰が考えられた。

#### D. 考察

CGD 腸炎でのサイトカイン測定により、CGD 腸炎診断時に IL-1 $\beta$ 、IL-18、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12の上昇が認められた。CGDにおける過剰炎症の機序に3つの経路が考えられている。

第一の経路として IL-1 $\beta$  と IL-18 産生に関わる Pyroptosis の経路である。IL-1 $\beta$  と IL-18 は前駆体の pro-IL-1 と IL-18 が単球、マクロファージの Caspase-1 の活性化により、活性型 IL-1 $\beta$  や IL-18 として放出される。今回のサイトカイン測定により IL-1、IL-18 の上昇があり、IL-18 は腸炎再燃時に再上昇し、CGD 腸炎に関与していた。また、p47phox 欠損 CGD 単球に正常 p47phox 蛋白を導入すると IL-1 $\beta$  産生亢進が解消されるという報告 (1) や ROS が caspase3 を不活性化するという報告 (2) がある。TLR が病原体を認識すると NF $\kappa$ B が活性化され、IL-1 $\beta$  IL-18 前駆物質が産生され、これらの前駆物質は caspase1 によって IL-1 $\beta$  IL-18 に活性化されることが知られている。CGD では Caspase1 活性 IL-18 産生が亢進していて活性酸素種が Caspase1 活性抑制に関わっていることが示唆されている (3, 4)。これらの事から、活性酸素種によって Caspase-1 が抑制され IL-1 $\beta$ 、-18 の活性化が制御されるはずが CGD では活性酸素がないために Caspase-1 の活性化抑制が出来ず IL-1 $\beta$  と-18 の過剰産生が起こって、過剰炎症をおこしていることが考えられた (図5左)。

図5:活性酸素種が関わる抗炎症機序

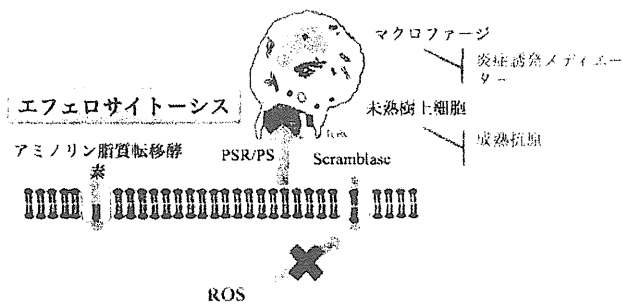


第二の経路である酸化ストレス反応の制御系としては、

Keap1 蛋白は酸化ストレスセンサーとして細胞質内で二つのアームで Nrf2 を抱え込むようにして存在しているが、活性酸素種によって Keap1 蛋白のシステイン残基が酸化され Nrf2 が Keap1 から遊離し細胞質から核に移行し、ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) などの抗酸化蛋白を誘導し、NF $\kappa$ B の活性化を抑制していることが知られている。しかし、活性酸素種産生が出来ない CGD では Nrf2 が核内へ移行せず、転写因子として機能しないためヘムオキシゲナーゼ 1 などの抗酸化蛋白が誘導されず、結果として NF $\kappa$ B が抑制されないで、炎症が継続すると考えられている (5) (図5右)。NF $\kappa$ B の活性化で転写活性される分子に TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12 が知られていることから、これらの血中サイトカインの上昇が起こったのではないかと考えられる。

第三の経路としてアポトーシス細胞の処理にあたるエフェロサイトーシスの経路が CGD では傷害されていると報告されている (6)。病原体を貪食してアポトーシスを起こした貪食細胞は活性酸素存在化に Scramblase が活性化され、細胞膜内面から表面にフォスファチジルセリン (PS) を表出し、マクロファージが PS の Receptor を介してこの好中球を貪食し、エフェロサイトーシスが起り、炎症が終演する。CGD では活性酸素産生ができないため、Scramblase が活性化されず、PS の細胞膜表面への表出が十分できず、エフェロサイトーシスが十分に起こらず、好中球などの処理が出来ず、エフェロサイトーシスを起こしたマクロファージが放出する TGF $\beta$  や PGE2 などの抗炎症性サイトカインの産生が低下し、その結果過剰炎症が継続すると考えられている (7) (図6)。

図6:活性酸素種とエフェロサイトーシス



#### E. 結論

CGD 腸炎の診断時には IL-1 $\beta$ 、IL-18 のほか、TNF- $\alpha$  や IFN $\gamma$  など肉芽腫形成・維持に関与するサイトカインの血中濃度が増加していた。この機序として、活性酸素種

の caspase-1 抑制、Nrf2 や Scramblase の活性化を介して炎症抑制に関わっているが、CGD では ROS 産生欠損によってこれらの炎症抑制が十分かからず、過剰炎症がおこり、結果として CGD 腸炎や肉芽腫形成が起こっていると考えられた。

#### 参考文献

1. Deffert C, et al. *J Pathol*. 2012

2. Wilkie RP, et al. *Infect Immun*. 2007

3. Meissner F, et al. *Blood*. 2010,

4. van de Veerdonk FL, et al. *PNAS*. 2010

5. Segal BH, et al. *Plos ONE*. 2010

6. Seger RA, et al. *Neth J Med*. 2010

7. Fadok, et al. *J Clin Invest*. 1998

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) A Dual Reporter Splicing Assay Using HaloTag-containing Proteins. Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, Nunoi H, Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara O. *Curr Chem Genomics*. 2012; 6: 27-37.
- 2) Efficacy of Temozolomide in a Central Nervous System Relapse of Neuroblastoma With O<sup>6</sup>-Methylguanine Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation. Yamada A, Moritake H, Shimonodan H, Yokogami K, Takeshima H, Marutsuka K, Nunoi H. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013; 35(1): e38-41.
- 3) Cytomegalovirus retinitis as an adverse immunological effect of pulses of vincristine and dexamethasone in maintenance therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. Moritake H, Kamimura S, Kojima H, Shimonodan H, Harada M, Sugimoto T, Nao-I N, Nunoi H. *Pediatr Blood Cancer*. 2013; 60(2): 329-31.
- 4) Acute myeloid leukemia in clinical practice: a retrospective population-based cohort study in Miyazaki Prefecture, Japan. Matsunaga T, Yamashita K, Kubuki Y, Toyama T, Imataki O, Maeda K, Kawano N, Satou S, Kawano H, Ishizaki J, Yoshida S, Kameda T, Sasaki T, Sekine M, Kamiunten A, Taniguchi Y, Hidaka T, Katayose K,

K-Shimoda H, Shide K, Yamamoto S, Moritake H, Nunoi H, Makino S, Kitanaka A, Matsuoka H, Shimoda K. *Int J Hematol*. 2012; 96(3): 342-9.

- 5) Aberrant cytokine responses to influenza A virus in a child with severe influenza A infections. Hosoki K, Fujisawa T, Hashiguchi A, Nagao M, Hiraguchi Y, Tokuda R, Nakano T, Nunoi H, Ihara T. *Allergol Int*. 2012; 61(3):507-9.
- 6) PEGylated D-amino acid oxidase restores bactericidal activity of neutrophils in chronic granulomatous disease via hypochlorite. Nakamura H, Fang J, Mizukami T, Nunoi H, Maeda H. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012; 237(6): 703-8.
- 7) Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T. *Blood*. 2012; 119(23): 5458-66.
- 8) Acute megakaryoblastic leukemia and severe pulmonary fibrosis in a child with Down syndrome: successful treatment with ultra low-dose cytarabine using GATA1 mutation to monitor minimal residual disease. Moritake H, Yamada A, Kimoto Y, Sawa D, Shimonodan H, Nunoi H. *Am J Hematol*. 2012; 87(4): 447-50.
- 9) Copy number variations due to large genomic deletion in X-linked chronic granulomatous disease. Arai T, Oh-ishi T, Yamamoto H, Nunoi H, Kamizono J, Uehara M, Kubota T, Sakurai T, Kizaki T, Ohno H. *PLoS One*. 2012; 7(2):e27782.
- 10) Concomitant transient erythroblastopenia of childhood with neonatal hepatitis. Moritake H, Hidaka F, Kamimura S, Kojima H, Shimonodan H, Nunoi H. *Pediatr Int*. 2012 ; 54(1):147-50.
- 11) Successful treatment with infliximab for inflammatory colitis in a patient with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. Mizukami T, Obara M, Nishikomori R, Kawai T, Tahara Y, Sameshima N, Marutsuka K, Nakase H, Kimura N, Heike T, Nunoi H. *J Clin Immunol*. 2012 ; 32(1):39-49.



- 12) クローズアップ感染症〈感染症治療の進歩〉急性脳症  
と臓器障害 インフルエンザ脳症を中心に(解説/特  
集) 中原 彰彦, 布井 博幸 小児内科(0385-6305) 44巻  
7号 Page1104-1108, 2012.7
- 13) インフルエンザ脳症 アポトーシスを伴う多臓器不  
全(解説) 布井 博幸 LiSA(1340-8836)19巻別冊'12  
Page92-100, 2012.5

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）  
分担研究報告書

北海道原発性免疫不全症患者データベース（PIDH）の集計結果からみた  
慢性肉芽腫症の死亡要因

研究分担者 有賀 正 北海道大学大学院医学研究科 小児科学分野教授  
分担協力者 竹崎俊一郎 北海道大学大学院医学研究科

研究要旨：北海道原発性免疫不全症患者データベース(PIDH)の集計結果を解析し、慢性肉芽腫症患者の予後、それに関連する要因について検討した。14例の慢性肉芽腫症患者が登録されており、9例が生存中、5例が死亡していた。6例に血液幹細胞移植が実施され、5例が生存している。死因の多くは真菌感染症などの制御不能な感染症であった。予後の改善のためには良い条件での血液幹細胞移植の重要性が示唆された。また、移植の実施が困難である症例に対し、遺伝子治療の適用を正しく評価する必要性を痛感した。

### A. 研究目的

慢性肉芽腫症（CGD）は食細胞の活性酸素産生機構の遺伝的欠陥のために細菌、真菌に対して易感染性を示す原発性免疫不全症である。その予後に関わる要因についての情報は十分とは言えず、予後を改善するために血液幹細胞をどの様に適用させれば良いか、遺伝子治療の適応をどのように考えれば良いかなどまだ、課題は多い。本研究では北海道地域でのCGD 症例を集計し、その予後と予後に関連する要因を解析する事を目的とした。

### B. 研究方法

北海道地域では、北大、札幌大、旭医大とその関連病院が連携し、北海道内の全ての原発性免疫不全症(PID)を登録する北海道原発性免疫不全症患者データベース(PIDH)を実施している。その集積結果から、CGD の現状を解析し、症例ごとの予後の確認と予後に関連する要因について検討した。

### C. 研究結果

1. PIDH に登録された PID の集計(図1)。

CGD は 14 人登録され、最も多い PID であった。また、死亡例も 5 例と最も多かった。他の死亡例は ADA 欠損症で死亡した症例のみであった。

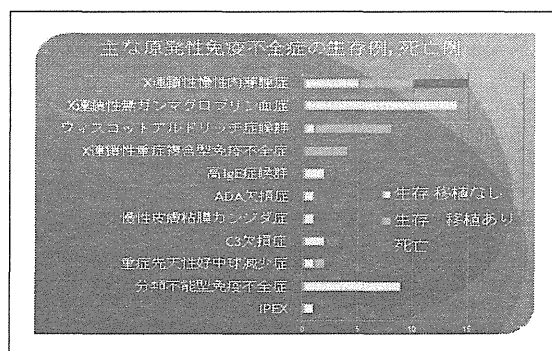


図1. PIDH に登録された PID 症例

2) CGD14 症例の臨床像(図2)。

14 症例のうち、5 例が死亡していた。血液幹細胞移植は 6 例で実施されていた。移植が実施された症例では 30 歳で移植された症例のみ死亡していたが、他の 5 症例は 8 歳以下で実施されており（一例は拒絶されて 2 回目の移植が計画中）、全て生存していた。様々な感染症の既往が確認された。

年齢	性別	移植年齢	移植時		
1	死亡	1	ND	BCGリンパ節炎・アスペルギルス肺炎	
2	17	—	ND	頸部リンパ節炎・骨髄炎・肛門周囲膿瘍・肺炎	
3	23	—	ND	骨髄炎・リンパ節炎・肝膿瘍・硬膜炎・肺炎	
4	6	—	ND	骨盤内膿瘍、OTC合併例一代謝性アシドーシス	
5	32	—	30	肛門周囲膿瘍・サルモネラ敗血症・頸部リンパ節炎、肺炎、移植後合併症(閉塞性イレウス)	
6	生存	6	W+	2	頸部リンパ節炎
7	6	—	4	頸部リンパ節炎	
8	11	W+	5	肛門周囲膿瘍、肝膿瘍	
9	12	W+	8	頸部リンパ節炎・肛門周囲膿瘍・肝膿瘍・肺炎・腸炎	
10	10M	—	10M	肝膿瘍→移植後着生不全、再移植予定	
11	6	W+	ND	頸部リンパ節炎、肺炎	
12	18	W+	ND	肛門周囲膿瘍、頸部リンパ節炎、肝膿瘍	
13	18	Mild	ND	肛門周囲膿瘍、頸部リンパ節炎、肺炎	
14	30	Mild	ND	頸部リンパ節炎	

図2. CGD14症例の臨床像  
移植された6例のまとめを図3に示した。様々な前処置で実施されていた。また、臍帯血移植が3回(1回拒絶され再度)、バンクドナーからが3回、HLA一致同胞からが1回実施されていた。症例5は移植後に移植関連合併症で死亡したが、移植された細胞数が少なかった事が示唆された。

症例	移植時年齢(診断から移植まで)	Fナ-	幹細胞 source	HLA	Activeな感染症	前処置	輸注細胞数(CD34陽性細胞数)
生存							
8	①5才0ヶ月(8ヶ月後)	非血縁者	Cord	DR不一致	-	Flu + L-PAM	7.54×10 <sup>9</sup> /kg (2.60×10 <sup>9</sup> /kg)
	②5才3ヶ月(9ヶ月後)	非血縁者	Cord	B不一致	-	Flu + BU + ALG	4.98×10 <sup>9</sup> /kg (5.98×10 <sup>9</sup> /kg)
9	8才5ヶ月(7年7ヶ月後)	非血縁者	Cord	B不一致	+	BU + CY + ATG	4.40×10 <sup>9</sup> /kg (1.14×10 <sup>9</sup> /kg)
6	2才0ヶ月(1年3ヶ月後)※非親密骨	姉	BM	完全一致	-	Flu + L-PAM + ATG + TBI(3Gy)	3.58×10 <sup>9</sup> /kg (5.41×10 <sup>9</sup> /kg)
7	4才9ヶ月(4年8ヶ月後)	非血縁者	BM	完全一致	-	Flu + BU + ATG + TBI(3Gy)	2.9×10 <sup>9</sup> /kg (4.3×10 <sup>9</sup> /kg)
死亡							
5	30才9ヶ月(30年8ヶ月後)	非血縁者	BM	完全一致	+	Flu + L-PAM + ATG + TBI(2Gy×2)	1.88×10 <sup>9</sup> /kg (0.68×10 <sup>9</sup> /kg)
拒絶							
10	10ヶ月(10か月後)	非血縁者	BM	DR不一致	+	Flu + CY + ATG	4.4×10 <sup>9</sup> /kg (3.2×10 <sup>9</sup> /kg)

図3. 血液幹細胞移植実施症例のまとめ

#### D. 死亡した5症例の要因

症例1は診断自体の遅れと重篤な真菌感染症の把握が種々の状況から遅れ、有効な治療の開始が遅かった事が反省点である。症例2,3の症例は移植の機会を逃し、制御不能となった真菌感染症のため死亡している。症例4は巨大な欠失のために先天性代謝異常であるOTC(オルニチントランスカルバミナーゼ)欠損症を合併した極めて重篤な症例であった。また、症例5は、上記の通り、移植の次期が遅れた事も関係し、相対的に移植細胞数が十分でない事もその要因と考えられた。

#### E. 考察

CGDは重傷複合免疫不全症の様な絶対

的血液幹細胞移植の適応がないため、主治医の移植実施の判断、家族の移植に対する理解と了解に基づいた実施の決定が臨床の現場では容易ではない。そのため、移植のタイミングを逃し、致命的な経過となった症例が少なからず存在する。今回の解析でも症例2,3はそのような経過であった。症例5も年少時に移植を考慮されていれば、違う予後となった可能性がある。

また、他のPID同様に早期診断により、早期から適切な医療管理の下で経過を見る事がその予後改善に役立つ事は言うまでもない。

一方、種々の理由で仮に適合したドナーが存在しても血液幹細胞移植が現実的に不可能/高リスクの症例は存在する。そのような症例にこそ遺伝子治療の適応が正しく評価される指針の必要を痛感する。

#### F. 結論

PIDHの登録集計結果から北海道地域のCGD症例の状況と予後、予後に関連する要因を解析した。CGDの予後改善には早期診断と血液幹細胞移植のタイミングの判断が重要である事が再確認された。移植のタイミングを逃した症例に対し、遺伝子治療が予後改善の切り札の治療として確立する事が期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamada M, Okura Y, Suzuki Y, Fukumura S, Miyazaki T, Ikeda H, Takezaki S, Kawamura N, Ariga T. Somatic mosaicism in two unrelated patients with X-linked chronic granulomatous disease characterized by the presence of a small population of normal cells. *Gene* 497, 110-115, 2012.
- 2) Takezaki S, Yamada M, Kato M, Park M-j, Maruyama K, Yamazaki Y, Chida N, Ohara O, Kobayashi I, Ariga T. Chronic Mucocutaneous Candidiasis Caused by a Gain-of-Function Mutation in the STAT1 DNA-Binding Domain. *Journal of Immunol* 189: 1521-1526, 2012
- 3) 有賀 正: 5) 原発性食細胞機能不全症、各論7章リウマチ性疾患、アレルギー性疾患、免疫不全症、4. 原発性免疫不全症候群、1329-1332内科学。門脇孝、永井良三 総編集、西村書店。東京都 2012
- 4) 有賀 正: 免疫不全症候群、24巻「発熱の診かたと対応」 小児科臨床ピクシス。

五十嵐 隆 総編集。田原卓浩 専門編集。 中山書店。東京都、印刷中

## 2. 講演

- 1) 有賀 正 特別講演：慢性肉芽腫症の診断・治療・トピックス。石川県小児免疫不全セミナー 2012年3月2日、金沢市
- 2) 有賀 正 特別医療講演：原発性免疫不全症に対する遺伝子治療の現状と問題点。PIDつばさの会総会、2012年4月29日、東京
- 3) 竹崎俊一郎、山崎康博、山田雅文、小林一郎、有賀正 当科および当科関連病院で経験した慢性肉芽腫症患者の死亡率を高めている要因についての検討。第64回北日本小児科学会、2012年9月8日、新潟
- 4) 竹崎俊一郎、山崎康博、山田雅文、小林一郎、有賀正 当科および当科関連病院で経験した慢性肉芽腫症患者の死亡率を高めている要因についての検討。第20回食細胞機能異常症研究会、2012年12月15日

H.知的財産権の出願・登録状況  
特になし。