総 説

慢性肉芽腫症研究の新展開

布 井 博 幸

Two breakthroughs in CGD studies

Hiroyuki NUNOI M.D., Ph.D.

Department of Reproductive and Developmental Medicine Faculty of Medicine University of Miyazaki

(Received January 6, 2007)

summary

Studies in Chronic Granulomatous Disease showed two breakthroughs during this past decade. First, the discovery of 7 Nox/Duox family proteins, Noxo1 and Noxa1 (homologues of gp91^{phox}, p47^{phox} and p67^{phox}) may clarify novel physiological mechanisms for superoxide regulation in various organs, such as the regulation of blood pressure, mucosal defense system in respiratory/digestive tract and nephron. Secondly, the success in bone marrow transplantation and gene therapy for CGD should facilitate treatment for other genetic diseases as well.

Key words—Nox; Duox; gp91^{phox}; BMT; genetherapy

抄 録

慢性肉芽腫症の活性酸素産生異常について、これまで、活性酸素を生成する NADPH オキシダーゼが欠損していること、その酵素は食細胞膜の gp91^{phox}, p22^{phox} と細胞質の p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}, rac21 から構成され、刺激により細胞膜で会合し、活性化されることが明らかにされた。この十年で、以下の 2 つの大きな発展があった。

一つは 2000 年に入ってから、この酵素の本体である gp91^{phox} のホモログである NOX ファミリーや、p67^{phox}, p47^{phox} ホモログも発見されたことである。今後種々の臓器でこの酵素群が活性酸素産生制御に関わり、各臓器の生理作用への影響が検討されることになる。

もう一つは、慢性肉芽腫症の根治療法として骨髓移植が 1990 年代から開始され、移植技術の進歩と相まって、骨髓非破壊的移植法が用いられ移植成績が向上していることと、これまで期待されていた遺伝子治療の成功が治療前処置の導入により 2006 年に報告がされたことである。この成功により、慢性肉芽腫症治療法のさらには遺伝性疾患の治療選択を広げようとしている。

はじめに

慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease; CGD) は乳幼児期より重症細菌・真菌感染症を反復し、諸臓器に肉芽腫形成を伴うのを特徴とする原発性免疫不全症候群の一疾患である。患者では活性酸素産生が障害された結果、食細胞内に貪食されたブドウ球菌、クレブシエラ菌、大腸菌、カンジダ、アスペルギルスといった非 H₂O₂ 産生・カタラーゼ陽性菌を殺菌できなくなる。このため患者は全身性にこれらの菌による化膿性病巣を形成することになる。肺や消化管などに肉芽腫を形成することもあり、肉芽腫を形成する機序は不明だが、貪食した菌

を殺菌できない単球が活性化状態を持続したまま多種のサイトカインを放出し、周囲に炎症細胞を集結させる結果、肉芽腫を形成し、増大していくものと予想される。好中球をはじめとする食細胞は、自ら産生した活性酸素種 (H₂O₂, OH⁻, ⁻OCI) を用いた殺菌機構を有する。この活性酸素産生の主要な分子が NADPH oxidase とよばれる酵素複合体である (図 1-b)。この酵素複合体を形成する分子のうち、gp91^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} のいずれかが欠損すると CGD を発症する。

本稿では、まず、この疾患の解析が NADPH オキシダーゼの構成因子のクローニングへと繋がり、その後 gp91^{phox} ホモログとして NOX ファミリー、さらには Noxo1, Noxa1 などがクローニングされることとなった経緯をのべ、各々の Nox による産

図1 Nox ファミリーとその調節蛋白構成
細胞質因子に関しては↑は刺激による膜移行可能であることを示している。

生される活性酸素産生機構とその生物学的意義について現在の知見をまとめた。

次に、慢性肉芽腫症の臨床面でも従来の抗菌剤、抗真菌剤やインターフェロンなどの保存的治療に加えて、根治療法となる骨髄移植や遺伝子治療が盛んに検討されているので、その進展について述べる。

1. Nox/Duox ファミリーの発見

Nox ファミリーとして最初に発見されたのは Nox1 である。Lambeth ら¹⁾のグループは種々の癌細胞で活性酸素依存的な増殖を示し、大腸、前立腺、血管平滑筋でも発現している gp91^{phox} ホモログを Mox1 として発見した。Banfi ら²⁾は活性酸素産生の際に発生するプロトンを排出するプロトンポンプをクローニングする過程でやはり gp91^{phox} ホモログである NOH1L を発見している。菊池ら³⁾も gp91^{phox} ホモログとして、Nox1, Nox3 をクローニングした。現在 Nox ファミリーは Nox1-5 と Duox1/2 を含む 7 つの分子が知られている (図 2)^{4,5)}。この様に Nox ファミリーは基質である NADPH から酸素分子へ電子伝達を担った分子で、N 末端に 6 つの膜貫通ヘリックスを持ち、第 3 番目と第 6 番目にはヒスチジン残基がそれぞれ 2 カ所存在し、2 つのヘムが結合している。また、細胞質

図2 Nox 蛋白の構造比較

側の C 末領域には FAD 結合ドメインと NADPH 結合ドメインが共通して存在している。従って Nox 蛋白質には NADPH から FAD さらにヘムからヘムと電子が伝達されて、酸素分子から活性酸素を産生するのに必要な電子伝達系の全てのドメインを有していることになる。Nox5 は上記の基本構造に加え、N 末に Ca^{++} を結合する EF ドメインを 4 カ所もっている。Duox1/2 は N 末に 2 カ所の EF ドメインとペルオキシダーゼドメインを有しているが、後者の活性に必須なヒスチジン残基が認められないため、後者の活性はない。

これらの Nox/Duox 単独では、活性酸素を全く産生出来ないか、産生されても極少量しか細胞外に産生できず、Nox2/gp91^{phox} と同様 p22^{phox} が必要

表 1 Nox 蛋白の特徴

分子名	遺伝子座	アミノ酸	発現臓器	機 能	p22phox	細胞質因子	Rac の役割	調節因子
Nox 1	Xq22	564	大腸, 前立腺 血管平滑筋	AngII による 血圧上昇	+	Noxo 1 Noxa 1	活性上昇	
Nox 2	Xp21.1	570	食細胞 B リンパ球	感染防御	+	p47 phox p67 phox p40 phox	必須	
Nox 3	6q 25.1-26	568	内耳 胎児腎	耳石形成	+	p47 phox Noxo 1 p67 phox	活性上昇	
Nox 4	11q 14.2-21	578	腎 血管内皮	?	+	—	—	
Nox 5	15q 22.31	737	精子, 脾臓 リンパ球	?	—	—	—	Ca
Doux 1	15q 21	1551	甲状腺, 気管支 唾液腺	?	—	—	—	Ca
Duox 2	15q 21	1548	甲状腺, 大腸	甲状腺 ホルモン合成	—	—	—	Ca

表 2 Nox 調節蛋白の特徴

分子名	遺伝子座	アミノ酸	疾 患	機 能	機能ドメイン		
p47 phox	7q 11.23	390	CGD	Nox 2, 3 活性化	PX		SH3X2
p67 phox	1q 25	526	CGD	Nox 2, 3 活性化		TPR PB1	SH3X2
p22 phox	16q 24	195	CGD	Nox 1, 2, 3, (4?)			
p40 phox	22q 13.1	348	?	(Nox 2 活性化?)	PX		SH3
rac 1/2	7p 22	192	CGD 様	Nox 1, 2, 3 活性化			
Noxo 1	16p 13.3	376/371/370	?	Nox 1, 2, 3 活性化	PX		SH3X2
Noxa1	9q 34.3	483	?	Nox 1, 3 の活性化		TPR PB1	SH3X2
Duoxa 1	15q 21.1	483	?	Duox 1 成熟援護			
Duoxa 2	15q 15.1	320	先天性甲状腺低下症	Duox 2 成熟援護			

な分子 (Nox1-3) や細胞質因子として Noxo1, Noxa1 が必要な分子等, 各臓器でその存在様式を異にしている^{6,7)}. それぞれの Nox 蛋白の発現組織や調節機構について, 表 1, 2 にまとめたので, 参照いただきたい.

1. Nox の各臓器における意義

1) Nox1 は先にも述べた様に, 1999 年から 2000 年に gp91^{phox} ホモログとしてクローニングされ, 大腸に最も発現が高く, 精巣, 腎, その他の組織でも少量ながら発現していることが確認されている. 六反らは腸管においては小腸から大腸にかけては Nox1 の高い発現が見られ, さらに上部では Duox が発現していることを明らかにし, また消化管での発癌にも関わっていると報告している. また Nox1 KO マウスではアンジオテンシン II による高

血圧が起こらないことから, 血管平滑筋細胞に発現する Nox1 の血圧調節作用が明らかとなった. その他, Nox1 の mRNA が TNF- α , INF- γ で誘導されるなど今後とも新しい知見が示されて来るものと思われる.

Nox1 は p22^{phox} と結合して膜に存在するが, その活性化には Noxo1 と Noxa1 の両者が必要である. しかし, gp91^{phox}/Nox2 と違って Noxo1 の SH3 ドメインがリン酸化を受けずに常に p22^{phox} と結合しているため, Noxo1 と Noxa1 とも非刺激時でも細胞膜に移行しており, 残る Rac が Noxa1 に結合することで Nox1 の活性化を制御していることが明らかにされている (図 1-a)^{8~10)}.

2) Nox2 は主に食細胞での殺菌に関わっており, gp91^{phox} として知られていたが, Nox ファミリーの発見で Nox2 という位置付けになっている. 慢性肉

芽腫症では, *rac* のヘテロの異常症が遊走能低下と活性酸素産生能低下として報告され, *p40^{phox}* 以外の調節蛋白異常について報告されたことになる. 詳細は慢性肉芽腫症の項で詳述する.

3) *Nox3* は *in vitro* の実験で *p22^{phox}* と複合体を形成し, 恒常的な活性酸素を産生し, *p47^{phox}*, *p67^{phox}*, *Nox1* によりさらに活性化されることが明らかにされている (図 1-c)¹¹⁾. 生体では内耳に発現しており, *Nox3* 変異マウスで平衡障害 (Head tilt mouse) が認められている¹²⁾. ヒトでは *Nox3* と結合する *p22^{phox}* 欠損型慢性肉芽腫症で平衡障害が起こるのではないかと考えられているが, まだ報告はなく, ヒトでの *Nox3* の役割は不明である.

4) *Nox4* はヒト腎皮質遠位尿細管上皮細胞や, 血管内皮細胞に多く発現しているが, 種々の細胞でも少量の発現は認められる. Gorin らは streptozotocine による実験糖尿病モデルで *Nox4* が腎肥大や fibronectin の増加に関与していると報告している¹³⁾ (図 1-d). *Nox4* の細胞内局在については抗体の違いによりまだ一定の見解が得られていない.

5) *Nox5* は精巣や脾臓リンパ球に存在し, 他の *Nox* 蛋白と違い N 末の延長した細胞質領域に Ca^{++} 結合モチーフを 4 カ所持っており, *p22^{phox}* 関与なく単独で膜に存在し, Ca^{++} 刺激や H_2O_2 で *Nox5* の活性が誘導される. *Nox5* のリン酸化や Ca^{++} 刺激の程度をどのように行っているのかまだ十分わかっていない (図 1-e)^{13,14)}.

6) *Duox1/2* (図 2)

Duox は, 甲状腺の cDNA ライブラリーから *gp91^{phox}* ホモログとしてクローニングされ, その名は C 末に NADPH oxidase, N 末に peroxidase 様の 2 つの oxidase ドメイン (dual oxidase) を持つことに由来している^{15,16)}. *Duox* は直接 H_2O_2 を産生している. ヒトでは *Duox1* と 2 が存在し, いずれも甲状腺で良く発現し, 甲状腺ホルモン合成に関わっている. *Duox2* 遺伝子異常¹⁷⁾や *Duoxa2* の変異¹⁸⁾でも先天性甲状腺機能低下がすでに報告されている. *Duox1* については IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインで数倍の, *Duox2* は IFN- γ などの Th1 サイトカインで高度に誘導されることがわかっている¹⁹⁾.

2. H_2O_2 の細胞内シグナルとしての役割

何らかの外來刺激は TLR, IL-1R, TNFR などを通じて *Nox* ファミリーを刺激し, H_2O_2 を産生すると, NF- κ B を介した炎症反応の亢進を促すことに

なる²⁰⁾. この様に H_2O_2 は単に殺菌に関わるのみではなく, 細胞機能のシグナルとしての働いていることもわかって来ている. 種々の臓器での活性酸素産生に, これらの *Nox* ファミリーが関わり, 環境の変化に対する細胞の対応を調節していると考えられている.

II. 慢性肉芽腫症の現状と治療法の進歩

このように, 慢性肉芽腫症研究から *Nox* ファミリーの発見へつながる一方, 慢性肉芽腫症の治療に関しても大きく進歩して来ている. 後半では, 慢性肉芽腫症の遺伝子解析状況も含めて, 治療の現状を報告する.

1. 慢性肉芽腫症の現状

慢性肉芽腫症患者は原発性免疫不全症候群の登録患者中で最多で約 18% を占める. 発症頻度は 22.5 万出生に 1 人程度であり, 国内では 2006 年末現在 260 名以上が登録されている. 男女比はおよそ 6.9 : 1 で, 国内に偏りなく分布している. CGD 患者は敗血症やアスペルギルス感染症などで命を落とすことが多く, 平均寿命は 25~30 歳とされたが, 最近は生命予後が改善して 30 歳以上の患者が増えてきている.

2. 病型分類と遺伝子解析 (表 3)

病型別では X 連鎖性の *gp91^{phox}* 欠損型が 75% を占め最多である. 諸外国に比べ *p47^{phox}* 欠損型が 6.0% と少なく, *p22^{phox}* 欠損型が 8.7% とやや多いのが特徴である (表 3). 筆者らの施設では CGD 患者の病型判定ならびに *gp91^{phox}*, *p22^{phox}* 欠損型の遺伝子解析を行っている. このうち現在まで遺伝子解析が終了している *gp91^{phox}* 欠損患者は他の日本の施設から報告されているのも合わせると 92 名であった. 国内の *gp91^{phox}* 欠損型患者の変異の部位と種

表 3 慢性肉芽腫症の病型分類

Component	Type of CGD	Cyt <i>b</i> ₅₅₈ (%)	O ₂ ⁻ production (%)	Incidence (%)
<i>gp91^{phox}</i>	X91 ⁰	0	0	138 (75.4%)
	X91 ⁺	100	0	5 (2.7%)
<i>p22^{phox}</i>	A22 ⁰	0	0	16 (8.7%)
	A22 ⁺	100	0	1 (0.5%)
<i>p47^{phox}</i>	A47 ⁰	100	0-1	11 (6.0%)
<i>p67^{phox}</i>	A67 ⁰	100	0-1	12 (6.6%)

gp91^{phox}での変異部位

図3 CYBB 遺伝子の変異部位

表4 CYBB 遺伝子解析結果

	家族数	日本患者数	%	EU 諸国 %
Missense	18	21	23%	24%
Nonsense	24	27	29%	24%
Splice site	13	17	18%	18%
Insertion	7	8	9%	9%
Deletion	11+5	11+5	17%	25%
Insetion/Deletion	2	2	2%	—
Promoter	1	1	1%	—
合計 (患者数)	81	92	92	700

(+)として示した数は1 Kb 以上の欠失を伴った5症例を示している。

類を図3に、変異の統計を表4に示している。

3. 治療

一般的な治療方針は抗生物質、抗真菌剤の投与であり、感染症罹患時の対症療法と、予防投薬とに分けられる。薬剤では不十分な場合、顆粒球輸血が用いられることがある。根治療法には造血幹細胞移植、そして海外で実施された遺伝子治療がある。造血幹細胞移植は肉芽腫を十分に治癒できない症例や、臓器障害などによりこれ以上の薬物治療を続けることが困難な症例などに実施されたため、成績は決して満足できるものではなかったが、最近は移植前処置法や管理の進歩、新たな薬剤の登場などにより、成績も良好になってきた。ここでは、基本的な治療法の進歩にも少し触れておきたい。

1) 日常生活管理指導

幼小児から成人までを含めて、安全な日常生活を送るためにはメリハリの効いた日常生活管理指導が必要である。欧米の Web site を参考に 2003 年食細

胞機能異常症研究会によって「日常生活の手引き」が発刊された。内容の詳細は、宮崎大学小児科教室ホームページ (<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/pediatrics/index.htm>) を見ていただきたい。その他、慢性肉芽腫症生活日記（主治医との連絡簿？：毎日の体温や調子をまとめたもの）などを書いてもらい、日常生活管理に役立てておられるところもある。

2) 予防内服薬や抗真菌剤の詳細は本稿の趣旨ではないので、説明は他誌に譲る。

3) インターフェロン・ガンマ (IFN-γ)

1991 年の二重盲検による欧米多施設共同研究で、IFN-γ が CGD の約 1/3 の患者で重症感染症の発症を抑制できることが報告された。日本でも CGD 患者の約 3-4 割に投与されている。

IFN-γ の作用機序は未だ明らかではない。Newburger らの報告したバリエーション型 gp91^{phox} 欠損患者では IFN-γ 投与により gp91^{phox}mRNA スプライシングが改善するとされている^{21,22)}。われわれは gp91^{phox} 遺伝子の exon 3 スプライスサイトにサイレント変異 (GCGgta→GCAgta) を有する患者で IFN-γ が有効な症例を経験した²³⁾。IFN-γ はおそらく、幼弱骨髓球レベルで mRNA スプライスは正に影響しているものと思われる。この症例は IFN-γ の有効な Newburger らの症例に続く世界で第 2 の症例となった。

この数年このようなスプライシング異常の機構が注目されている。splice 変異の解釈の一つに 5', 3' splice site, branch point などの古典的なイントロン内に存在するスプライスシグナルの他にエキソン内に存在する exonic splicing enhancer (ESE),

図4 ESE/ESS 依存性スプライスモデルと SR 蛋白質の構造

Alternative splicing は各遺伝子上の exonic splicing enhancers (ESE), silencers (ESS), ならびに, intronic splicing enhancers (ISE) and silencers (ISS) と, それらに結合する組織特異的また発達段階特異的に発現するタンパクによりコントロールされている。

USA data: N Engl J Med 344:881-888,2001

図5 骨移植の前処置とその結果 (諸外国との比較)

exonic splicing silencer (ESS) などが知られてきた (図4)。実際, Missense 変異の 16-20% 以上が ESE を破断すると予想されている。変異蛋白の発現実験では機能異常を証明出来ない Missense 変異は ESE を破壊するスプライシング変異であることが多い²⁴⁾と考えられている。また Nonsense 変異に関しても nonsense-mediated altered splicing などが報告されている²⁵⁾。明らかに IFN- γ が臨床的にも有効であった症例についても, このようなスプライス異常の観点からの解析が検討され, 治療につながる知見が得られないかと考えている。

4. 根治療法

1) 造血幹細胞移植

1990 年代前半までは HLA 一致血縁者間でも生着率が低く, 骨髓移植もなかなか進まなかった。

最近では reduced intensity stem cell transplantation (RIST) の導入や, 移植後管理技術の進歩などにより成功率が改善し, 症例数も増加してきた (図5)。

Seger らは欧州の造血幹細胞移植 27 症例について報告している。その内訳は, ドナーが HLA 一致同胞 25 例, HLA 一致非血縁 2 例, 移植細胞は末梢血幹細胞 3 例で残りは骨髓幹細胞であった。大半は busulfan (BU), cyclophosphamide (CY) を用いたレジメンで前処置され, 27 例中 23 例が生生存し 4 例が死亡した。図5左の円グラフにはその後報告された症例も加えて示している。彼らは移植時点での活動性感染症, 活動性炎症 (大腸炎など) や臓器障害の有無によって 3 グループに分類し, 移植に対するリスクを評価した。その結果, Group 1 (移植時点で活動性感染症を有していた群) は, Group 2 (移植時点で活動性炎症または臓器障害を有してい

図6 ドナーの違いと移植結果

これまで日本国内で行われた 28 症例, 31 移植の結果を示している。

MS: HLA 一致同胞, UR: HLA 一致非血縁, hiS: HLA 一座不一致同胞, Mo: 母親, Fa: 父親

た群) や Group 3 (移植時点で明らかな活動性感染症や炎症を有しなかった群) に比較して死亡例が 4 例あり, ハイリスクであったことを示した²⁶⁾。

米国からは, 移植前に複数回の難治性感染症に罹患した 10 症例に対する骨髄非破壊的末梢血幹細胞移植の結果が報告された²⁷⁾ (図 5 右の円グラフ)。CY と fludarabine (Flu) に抗胸腺細胞グロブリンを加えたレジメンで処置した後に, 移植で HLA 一致同胞から採取した T 細胞除去済み末梢血幹細胞が移植された。結果としては 10 例中 3 例が死亡 (IV 度急性 GVHD1 例含む), 1 例が拒絶されている。RIST を用いて比較的安全に移植を実施した点は重要で, その後の移植症例の前処置法選択に影響している。しかし移植後に混合キメラとなることが多い点, 年齢の高い患者で死亡例が多い点などが問題であった。

日本国内ではこれまで食細胞機能異常研究会を通じて 28 症例 31 移植 (再移植含む) の調査が行われている。ドナー細胞では, HLA 一致同胞骨髄と HLA 一致非血縁骨髄とでは, ともに成績良好で差はなかった (図 6)。臍帯血幹細胞は半数 (4 例中 2 例) が死亡されていた。前処置レジメンは BU + CY, CY + Flu とで全体の約 7 割を占め, 最近では CY + Flu が主流となっている (図 5 中央の円グラフ)。

国内症例を Seger らのリスク分類で分けると, Group 1 が 16 例中 2 例死亡, 1 例拒絶で, 他の群より成績不良であった。しかし活動性感染症を抱えていても無事移植できたのは, 多くの症例で, 生着までの期間が短く合併症が少ない CY + Flu が採用

されたことと関係があると思われる。CY + Flu の欠点は移植後に混合キメラ状態が持続し, 徐々にドナー細胞が減少する症例が多く見られることである。この場合 donor lymphocyte infusion (DLI) が施行される場合があるが, DLI も有効例から無効例, その副作用に加療を要したものなど症例差が大きく, その適応は十分検討する必要がある。国内 28 症例全体の転帰は, 生存 22 例死亡 6 例であり, 死因は移植後の感染症が多かった。

造血幹細胞移植はまだ解決すべき問題も多いが, CGD の根治療法としてその有効性は明らかで, 今後症例数が蓄積されるにつれて, さらに安全かつ有効なプロトコール, 管理法, GVHD 予防法が見いだされられると思われる。

2) 遺伝子治療

造血幹細胞移植の発達は同時に, 幹細胞を用いた遺伝子治療が可能になることも示している。健康保因者の解析から, 正常好中球が全体の 5% 以上あれば重症感染症を回避できることもわかっており, より安全で効果的な遺伝子治療の開発が望まれていた。

基礎的実験レベルではレトロまたはレンチウイルスベクター (RD114-pseudotyped MFGS-gp91, MSCV-m91Neo, VSV-G-pseudo typed lentivector-gp91phox など) が開発され, 遺伝子導入した患者や gp91^{phox} ノックアウトマウス造血幹細胞を異種移植して, NADPH oxidase 活性の再構築が確認されている。

臨床応用として, 1995 年 NIH の Malech らは, p47^{phox} 欠損型 CGD 患者 5 名に遺伝子治療を実施し

た。症例により違いはあるが、一度の遺伝子導入で、1ヶ月後頃から活性のある好中球が末梢血中に0.01%程度出現し、1-2ヶ月間持続して消失した²⁸⁾。その後末梢血幹細胞の動員方法および遺伝子導入にretroectinを用いるなどの改良がなされ、1997年にはIndiana大学のDinauerらがMSCV-h91Neoを用いて²⁹⁾、また1998年には再びMalechらがレトロウイルスベクター(MFGS-gp91, MFGS-p47)を用いて³⁰⁾、gp91^{phox}およびp47^{phox}欠損型CGD患者に実施したが、最高でも1%以下の改善であった。その後、重症複合型免疫不全(X-SCID)の遺伝子治療で懸念されていた白血病発生(1名死亡)という不幸な出来事がFischerらのグループから報告されたため、遺伝子治療の動きが一時中断していた。

しかし、2000年欧州でCGD患者の骨髄への前処置を施した遺伝子治療が開始された。まず英国Institute of Child HealthのThrasherらがgp91^{phox}欠損型CGD患者にmelpharanによる前処置の後、SF71gp91^{phox}ベクターを用いた遺伝子治療を行った。一時は正常の約30%の活性を得たが、1年後にはほとんど活性を認めなくなった。しかしこの間に肺肉芽腫症は改善し、患者は現在も健在である(学会発表のみで雑誌報告はない)。2002年にはドイツのGreßらとスイスのSeegerらとがBU(8 mg/kg)前処置で同じベクターを用いて、26歳と25歳の患者に遺伝子治療を実施し、30-40%と10-20%の活性の再構築を達成、約2年にわたってその活性が維持されたと報告した³¹⁾。骨髄性白血病に関わるMDS/Evi1とPRDM16遺伝子近傍へレトロウイルスの挿入されたクローンが多く認められたが、危惧された白血病の報告は現在までない。論文発表後、最初の症例が感染症を死亡しており、メチル化により2年半の経過で挿入遺伝子の不活化起こっていたと報告を受けている³²⁾。3例目では四肢麻痺が回復するなど臨床的な効果を示しており、注目されている(学会発表)。今後もより安全な治療法を目指して開発が進められている。

国内でも基礎的には杉本ら³³⁾がHa-MDR-IRES-gp91ベクターによる遺伝子導入後、タキソールによる*in vivo* selectionが可能であることを証明したり、原ら³⁴⁾はretrovirus encoding GcRERベクター系を用いて、estrogen刺激による*in vivo*増殖を報告している。臨床的には欧州のGreß博士らと協力して、現在倉辻忠俊成育医療センター研究所長を中

心にCGDの遺伝子治療が計画されている。

文 献

- 1) Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., et al. : Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401** : 79-82, 1999.
- 2) Banfi, B., Maturana, A., Jacon, S., et al. : A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOX-1. *JOURNAL Science* **287** : 138-142, 2000.
- 3) Kikuchi, H., Hikage, M., Miyashita, H. et al. : NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* **254** : 237-243, 2000.
- 4) De Deken, X, Wang, D, Many, M.-C, et al. : Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J. Biol. Chem.* **275** : 23227-23233, 2000.
- 5) J. David Lambeth : NOX ENZYMES AND THE BIOLOGY OF REACTIVE OXYGEN. *Nature Reviews Immunology* **4** : 181-189, 2004.
- 6) Takeya R, Ueno N, Kami K, et al. : Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem.* **278** : 25234-25246, 2003.
- 7) Cheng G, Lambeth JD. : NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. *J Biol Chem.* **279** : 4737-4742, 2004.
- 8) Ueyama T, Lekstrom K, Tsujibe S, et al. : Subcellular localization and function of alternatively spliced Noxo1 isoforms. *Free Radic Biol Med.* **42**(2) : 180-190, 2007.
- 9) Ueyama T, Geiszt M, Leto TL. : Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol Cell Biol.* **26**(6) : 2160-2174, 2006.
- 10) Miyano K, Ueno N, Takeya R, Sumimoto H. : Direct involvement of the small GTPase Rac in activation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1. *J Biol Chem.* **281**(31) : 21857-21868, 2006.
- 11) Cheng G, Ritsick D, Lambeth JD. : Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem.* **279**(33) : 34250-34255, 2004.
- 12) Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F, et al. : Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxi-

- dase. *Genes Dev.* **18**(5) : 486–491, 2004.
- 13) Gorin Y, Block K, Hernandez J, Bhandari B, Wagner B, Barnes JL, Abboud HE. : Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J Biol Chem.* **280**(47) : 39616–39626, 2005.
 - 14) Jagnandan D, Church JE, Banfi B, et al. : Novel mechanism of activation of NADPH oxidase 5 (NOX5) : Calcium-sensitization via phosphorylation. *J Biol Chem.* Papers In Press, published online ahead of print December 12, 2006.
 - 15) De Deken, X. ; Wang, D. ; Many, M.-C. ; Costagliola, S. ; Libert, F. ; Vassart, G. ; Dumont, J. E. ; Miot, F. : Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J. Biol. Chem.* **275** : 23227–23233, 2000.
 - 16) Corinne Dupuy, Renée Ohayon, Alexander Valent, Marie-Sophie Noël-Hudson, Danielle Déme, and Alain Virion. : Purification of a Novel Flavoprotein Involved in the Thyroid NADPH Oxidase CLONING OF THE PORCINE AND HUMAN cDNAs* *J Biol Chem,* **274**(52) : 37265–37269, December 24, 1999.
 - 17) Moreno, J. C. ; Bikker, H. ; Kempers, M. J. E. ; van Trotsenburg, A. S. P. ; Baas, F. ; de Vijlder, J. J. M. ; Vulsma, T. ; Ris-Stalpers, C. : Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *New Eng. J. Med.* **347** : 95–102, 2002.
 - 18) Grasberger H, Refetoff S. : Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J Biol Chem.* **281**(27) : 18269–18272, 2006.
 - 19) Harper RW, Xu C, Eiserich JP, et al. : Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium. *FEBS Lett.* **579**(21) : 4911–4917, 2005.
 - 20) Li Q, Harraz MM, Zhou W, et al. : Nox2 and Rac1 regulate H₂O₂-dependent recruitment of TRAF6 to endosomal interleukin-1 receptor complexes. *Mol Cell Biol.* **26**(1) : 140–154, 2006.
 - 21) Ezekowitz RA, Dianuer MC, Jaffe HS, et al. : Partial correction of the phagocyte defect in patients with X-linked chronic granulomatous disease by subcutaneous interferon gamma. *N Engl J Med.* **319**(3) : 146–151, 1988.
 - 22) Condino-Neto A, Newburger PE. : Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutataion. *Blood.* **95**(11) : 3548–3554, 2000.
 - 23) Ishibashi F, Mizukami T, Kanegasaki S, et al. : Improved superoxide generating ability by interferon-gamma due to splicing pattern change of transcripts in neutrophils from patients with a splice site mutation in CYBB gene. *Blood* **98** : 436–441, 2001.
 - 24) Blencowe BJ. : Exonic splicing enhancers : mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem, Sci.* **25**(3) : 106–110, 2000.
 - 25) Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. : Listening to silence and undestanding nonsense : exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet.* **3**(4) : 285–298, 2002.
 - 26) Seger RA, Gungor T, Belohradsky BH, et al. : Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft : a survey of the European experience. *Blood.* **100**(13) : 4344–4350, 2002.
 - 27) Horwitz ME, Barrett AJ, Brown MR, et al. : Treatment of chronic granulomatous disease with nonmyeloablative conditioning and a T-cell-depleted hematopoietic allograft. *N Engl J Med.* **344**(12) : 881–888, 2001.
 - 28) Sekhsaria S, Gallin JI, Linton GF, et al. : Peripheral blood progenitors as a target for genetic correction of p47phox-deficient chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**(16) : 7446–7450, 1993.
 - 29) Ding C, Kume A, Bjorgvinsdottir H, et al. : High-level reconstitution of respiratory burst activity in a human X-linked chronic granulomatous disease (X-CGD) cell line and correction of murine X-CGD bone marrow cells by retroviral-mediated gene transfer of human gp91^{phox}. *Blood.* **88**(5) : 1834–1840, 1996.
 - 30) Roesler J, Brenner S, Bukovsky AA, et al. : Third-generation, self-inactivating gp91 (phox) lentivector corrects the oxidase defect in NOD/SCID mouse-repopulating peripheral blood-mobilized CD34+ cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Blood.* **100**(13) : 4381–4390, 2002.
 - 31) Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, et al. :

- Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med.* **12** (4) : 401–409, 2006.
- 32) [No authors listed] One of three successfully treated CGD patients in a Swiss–German gene therapy trial died due to his underlying disease : a position statement from the European Society of Gene Therapy (ESGT). *J Gene Med.* **8** (12) : 1435, 2006.
- 33) Sugimoto Y, Tsukahara S, Sato S, et al. : Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 in vivo from an MDR1-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91. *J Gene Med.* **5** (5) : 366–376, 2003.
- 34) Hara T, Kume A, Hanazono Y, et al. : Expansion of genetically corrected neutrophils in chronic granulomatous disease mice by cotransferring a therapeutic gene and a selective amplifier gene. *Gene Ther.* **11** (18) : 1370–1377, 2004.