

Chediak-Higashi 症候群

—Protein kinase C 活性の異常低下による免疫不全—

田辺文憲*

Chediak-Higashi syndrome

—The immunodeficiency caused by the abnormal decline in protein kinase C activity—

Fuminori Tanabe

(1998年10月30日受付)

ABSTRACT

The Chediak-Higashi syndrome (CHS) is an autosomal recessive disorder characterized by partial oculocutaneous albinism, severe pyogenic infections and the presence of abnormally large granules in many cells. It was recently reported that human CHS and beige mice have homologous disorder associated with *Lyst* mutation. *Lyst* protein is considered to be important for cellular signal transduction, however, the precise function has not been clarified. My previous studies revealed that the abnormal decline in protein kinase C (PKC) activity in neutrophils and natural killer (NK) cells from beige mice was responsible for the impaired cellular functions. It is therefore considered that the study on the relationship between *Lyst* gene and the dysregulation of PKC is of great importance for elucidation of the pathogenesis of CHS and its effective treatment.

Key words : Chediak-Higashi syndrome, beige mouse, protein kinase C, gene

*本学 短期大学部 人間・健康の科学 (微生物学)

1 はじめに

Chediak-Higashi syndrome (CHS) は、1952年に Chediak¹⁾が巨大顆粒を、また1954年に東²⁾が先天性ペルオキシダーゼ陽性巨大顆粒症を報告したが、同一の疾患であるため後に CHS と命名された。CHS は常染色体劣性遺伝の稀な免疫不全症であり、食細胞の機能低下と natural killer (NK) 活性の低下がみられ、黄色ブドウ球菌などに対し細菌感染を繰り返すことを特徴とする。

筆者は CHS が細菌に対し易感染性を示すことと特徴ある免疫不全を呈することに興味をもち、山梨医科大学の伊藤正彦教授とともにその病因の研究を続けてきた。これまでの我々の研究により、CHS の動物モデルであるベージュマウスにおいて、細胞内情報伝達機構に重要な役割をもつ protein kinase C (PKC) の制御に異常があり、細胞膜の PKC が著明に低下していることがわかっている³⁾。さらに、PKC 分解酵素であるカルパインの阻害剤、E-64を反応に加えるとベージュマウスの PKC 活性が上昇し、低下していた NK 活性などが回復することも報告した。したがって、PKC 活性の低下は CHS の病態発現に大きく関与していることが考えられる^{4,5)}。

CHS の原因遺伝子はなかなか発見されなかったが、1996年に Barbosa ら⁶⁾と Perou ら⁷⁾の2つのグループがほぼ同時に CHS とベージュマウスの相同な欠陥遺伝子 (*Lyst*) を報告した。しかし、この遺伝子産物である *Lyst* タンパクは未知の新しいタンパク質であるため、CHS の病態との詳細な関連性は不明のままである。

今回、これまでに報告してきたベージュマウスにおける PKC 活性の異常低下と細胞機能を中心に、CHS の病態について述べる。

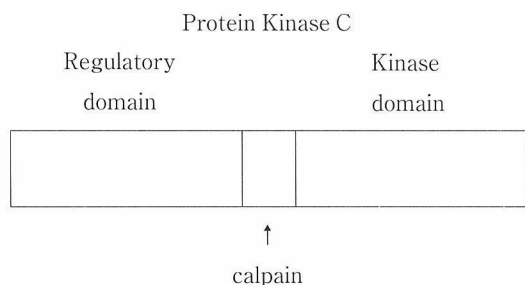
2 CHS とベージュマウスの病態

CHS の免疫能低下の特徴を表1にまとめた。CHS の好中球には巨大なライソソームがみられ、エラスターゼやカテプシン G などのライソソーム酵素の放出障害があり、殺菌能の低下がみられる⁸⁾。さらに、リンパ球の NK 活性の低下も特徴的である⁹⁾。一方、B 細胞の機能にははっきりした異常は認められない。その他、メラニン色素の分布異常のため、部分的白子症となる。患者は、黄色ブドウ球菌などに感染しやすく、かつ、増悪期にリンパ腫様病変をおこし、死亡の原因となることが多い。

また、ウシ、ネコ、ミンク、ラット、マウスなどに CHS と同じ病態がみられ、この疾患の研究にはベージュマウスがよく用いられる。野生型の C57BL/6 マウスは毛色が黒であるのに対し、ベージュマウスは毛色がうすく、ベージュ色である。さらに、好中球や NK 活性などの免疫不全がヒトの CHS とほぼ同じであり、最近、CHS とベージュマウスの相同な欠陥遺伝子が発見された^{6,7)}。CHS の病態について、古くから微小管の機能異常、cyclic nucleotide 産生の異常、膜の流動性の低下などがあげられている¹⁰⁾。試験管内では、cyclic GMP を増加させるカルバミルコリンがベージュマウスの巨大顆粒を回復させるという報告もあったが¹¹⁾、臨床的にはあまり効果がみられなかった。プレドニンやビンクリスチンなどが一時的に有効な例もあるが、確立された治療薬はない。骨髄移植の成功例がある。

表1 CHS における免疫機能の特徴

細胞	機能	
好中球	遊走能	低下
	殺菌能	低下
	Con A cap 形成	増加
マクロファージ	遊走能	低下
T 細胞	キラー T 活性	低下
B 細胞	抗体産生	正常
NK 細胞	NK 活性	低下

図1 PKC (α , β , γ) の構造

活性化に必要な脂質と Ca^{2+} を結合しリン酸化能を調節する regulatory domain と酵素活性をもつ kinase domain から構成される。カルパインは両 domain の結合部を切断し PKC を失活させる。

3 ベージュマウスにおける PKC 活性の異常低下

PKC は細胞内情報伝達系に重要な役割をもつリン酸化酵素であり、西塚により発見された¹²⁾。PKC は種々の細胞機能発現に必須であることが知られているが、伊藤と筆者らはリンパ球の NK 活性の発現に PKC の活性化が不可欠であることを最初に報告している¹³⁾。PKC は10種を超えるアイソザイムがあるが、図1には代表的な classical PKC (α , β , γ) の構造を示した。PKC は Ca^{2+} とフォスファチジルセリン、ジアシルグリセロールなどの脂質が必要であり、構造的には活性化因子を結合しリン酸化能を調節する regulatory domain とリン酸化活性をもつ kinase domain から構成される。PKC は細胞において通常は細胞質に多く存在するが、フォルボルエステルなどの刺激により、細胞質から細胞膜へ移動 (translocation) し活性化する¹⁴⁾。また、PKC の活性化と並行して、タンパク分解酵素であるカルパインが PKC の両 domain 結合部を切断し、PKC を失活させることがわかっている (図1)。

筆者のこれまでの研究により、ベージュマウスの好中球および NK 細胞を PMA などのフォルボールエステルで刺激すると、細胞膜の

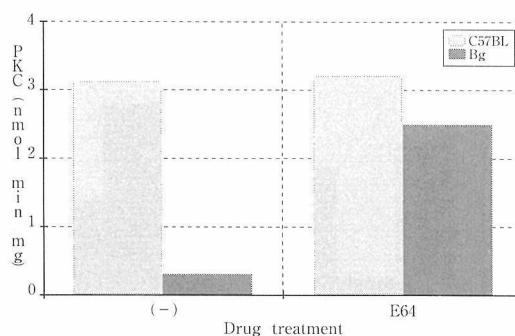


図2 PMA で刺激された好中球膜の PKC 活性

ベージュマウス (Bg) の好中球膜の PKC は PMA (0.1 μM) 20分刺激により正常マウス (C57BL) に比べ著明に低下している (左)。しかし、E-64 (100ng/ml) で30分細胞を前処理したのち PMA で刺激すると、ベージュマウスの PKC 低下はみられなくなった (右)。図は平均値を示した。

PKC が急速に低下 (down-regulation) することがわかった。図2は、正常マウスである C57BL/6 マウスとベージュマウス (Bg) の好中球を PMA で20分刺激したときの細胞膜の PKC 活性を示した。ベージュマウスでは PKC 活性が著明に低下している。しかし、PKC の分解酵素であるカルパインの阻害剤である E-64¹⁵⁾を加えることによりこの PKC 活性の低下が消失することがわかった (図2)。すなわち、ベージュマウスではカルパインによる PKC の分解が何らかの機序で亢進していることが示唆された。

次に、ベージュマウスの PKC の低下が細胞機能にも関与しているかどうかを調べたところ、図3に示したように、E-64を加えることにより、低下していた NK 活性が正常の約80%まで回復することがわかった。また、好中球の concanavalin A (Con A) cap 形成細胞の割合について調べたところ、ベージュマウスでは C57BL/6 マウスに比べ約2倍に増加していたが、E-64によりほぼ正常レベルに回復した (図3)。Con A cap 形成は、正常マウスの細胞に微小管破壊剤であるコルヒチンを加えると増加することから、微小管機能と密接に関連が考えられている。これらの結果より、ベージュマウスの PKC の低下は細胞機能の低下にも大きく関与

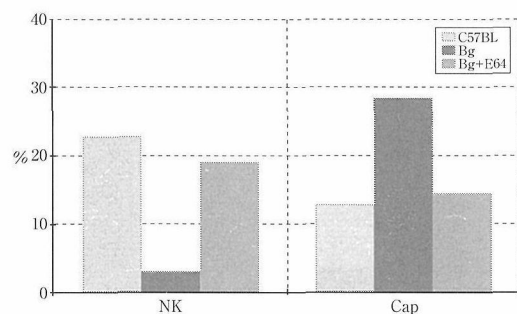


図3 E-64によるベージュマウスのNK活性とCon A capの回復

ベージュマウスの低下しているNK活性(左)と異常増加したCon A cap形成細胞の割合(右)はE-64(100ng/ml)を加えるとほぼ正常化した。図は平均値を示した。

していることがわかった。

筆者の最近の研究により、カルパイン阻害剤はベージュマウスの巨大ライソソームやライソソーム酵素の活性も回復させることがわかってきた(投稿準備中)。さらに、ヒトCHSの患者のB細胞にEBウィルスを感染させトランスフォームさせたcell lineにおいても、前述したPKCの異常低下がみられることを確認しており、PKC活性とCHSの病態には深い関連があることが示唆される。

4 セラミドによるPKC分解の亢進

細胞内脂質はジアシルグリセロールのようにシグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして重要な働きをもつことはよく知られている。また、スフィンゴ脂質においてもスフィンゴシンやリゾスフィンゴ脂質がPKCを強く抑制する^{16,17)}ことが注目されてきた。その他のスフィンゴ脂質に関しては最近までシグナル伝達における役割は認められていなかったが、スフィンゴミエリン分解産物であるセラミドが細胞のアポトーシスを誘導するなどその重要な働きが徐々に明らかにされた^{18,19)}。

CHSにおいては古く、細胞膜のスフィンゴミエリン加水分解が亢進しているとの報告が

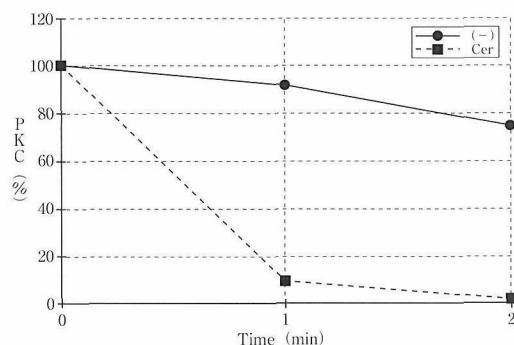


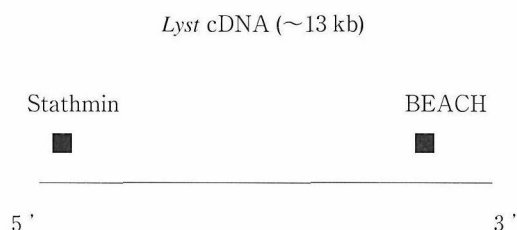
図4 セラミドによるPKCβの分解亢進作用

正常マウスより精製したPKCβとカルパインをCa²⁺とフォスファチジルセリン存在下で20℃で反応させた。セラミド(3μM)を加える(■)と加えないとき(●)に比べ、PKCの分解による失活は急速に生じた。図は平均値を示した。

あったが²⁰⁾、その詳細についてはまだ明らかではない。そこで筆者は、セラミドに着目しPKCに対する作用を調べた。ベージュマウスの好中球に存在するPKCはPKCβであることがわかったので、正常マウスより精製したPKCβとカルパインを反応させ、経時的にPKCの分解の度合いを調べた。図4に示すように、反応系にセラミドを加えるとPKCの分解による失活が著しく促進された。また、セラミドはPKCβを直接活性化することによりカルパインによる分解を亢進させることもわかった²¹⁾。セラミドにより活性化されたPKCは立体構造が変わりカルパインによる分解を受けやすくなるためと思われる。筆者の最近の実験により、ベージュマウスの好中球では刺激後にセラミドが異常に増加することをつきとめている(投稿準備中)ので、セラミドがPKC分解亢進をひき起こしていると思われる。

5 CHSの責任遺伝子

他の先天性疾患の原因遺伝子が次々と明らかにされる中で、CHSについては第1染色体長腕(C1q)に異常があるという推定のみでなかなか解明されなかった。ようやく、1996年にPerouらとBarbosaらの2つのグループから、

図5 CHS の責任遺伝子 (*Lyst*)

Lyst cDNA の 5' 末端付近に stathmin という微小管機能調節蛋白に類似した構造をもち、3' 末端付近には BEACH とよばれる小胞体輸送蛋白に類似した構造が存在する。

CHS とベージュマウスの共通の欠陥遺伝子 (*Lyst*) が同定された^{6,7)}。*Lyst* の cDNA は 13kb と非常に長く (図 5)、3801 のアミノ酸からなる巨大タンパクである。分子量は約 400kD と推定され、未知のタンパク質である^{22,23)}。Barbosa らによると CHS の患者数例でこの遺伝子を調べたところ、ほとんどの症例では点突然変異などの変異がみついているが、まだ変異が確定されていない症例もある²⁴⁾。*Lyst* は N 末端の 463 番目から 536 番目にスタスミンとよばれる微小管機能を調節するタンパクと相同性があり、おもしろいことにこの領域に PKC によってリン酸化される部位が多数存在することがわかっている。また、C 末端には BEACH とよばれる酵母菌の小胞体輸送タンパクと相同性の高い部分があり、その機能性に関心がもたれている。

前述した CHS における PKC 活性異常と *Lyst* 遺伝子との関連はまだ不明である。この関連性を解明するために、山梨医科大学微生物学教室との共同実験により、正常な *Lyst* 遺伝子をベージュマウスの細胞に組み込み、細胞機能および PKC 活性が正常化するかどうかを調べる実験を計画している。

6 今後の課題

CHS の主な異常である NK 活性低下と好中球の機能不全が PKC を回復させることで細胞機能も正常化することを述べた。CHS は PKC

の異常低下によりすべての病態が生じている可能性がある。*Lyst* 遺伝子と PKC 活性低下の関連性およびメカニズムを追求することは、CHS の病因を完全に解明することだけでなく、セラミド産生経路など PKC の上流のシグナル伝達の調節機構を解明する手がかりになるだろう。さらに、CHS の遺伝子治療へもつながるものと思われる。

CHS では黄色ブドウ球菌や化膿菌などの回復する感染症が致命的となる。したがって、細菌感染をいかに防ぐかが CHS の治療において重大な課題である。PKC 回復剤の E-64 は感染防御に効果が期待できるので、薬剤治療への応用に向けて検討を重ねていきたい。

謝辞

稿を終わるにあたり、ご指導を賜りました山梨医科大学の伊藤正彦教授に深く感謝いたします。

文献

- 1) M.Chediak: Nouvelle anomalie leukocytaire de caractere constitutionnel familial, Rev.Hematol., 7, 362-367, 1952.
- 2) O.Higashi: Congenital giantism of peroxidase granules: the first case ever reported of qualitative abnormalities of peroxidase, Tohoku J.Exp.Med., 59, 315-332, 1954.
- 3) M.Ito, F.Tanabe, Y.Takami, et al.: Rapid down-regulation of protein kinase C in (Chediak-Higashi syndrome) beige mouse by phorbol ester, Biochem.Biophys.Res.Comm., 153, 648-656, 1988.
- 4) M.Ito, A.Sato, F.Tanabe, et al.: The thiol proteinase inhibitors improve the abnormal rapid down-regulation of protein kinase C and the impaired natural killer cell activity in (Chediak-Higashi syndrome) beige mouse, Biochem. Biophys. Res. Commun., 160, 433-440, 1989.
- 5) A.Sato, F.Tanabe, M.Ito, et al.: Thiol proteinase inhibitors reverse the increased protein kinase C down-regulation and concanavalin A cap formation in polymorphonuclear leukocytes from Chediak-Higashi syndrome (beige) mouse, J.Leukocyte Biol., 48, 377-

- 381,1990.
- 6) M.D.F.S.Barbosa, Q.A.Nguyen,V.T.Tchernev, et al. : Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes, *Nature*, 382, 262-265, 1996.
- 7) C.M.Perou, K.J.Moore, D.L.Nagle, et al. : Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning, *Nature genetics*, 13, 303-308, 1996.
- 8) R.K.Root, A.S.Rosenthal, D.J.Balestra : Abnormal bactericidal metabolic and lysosomal functions of Chediak-Higashi syndrome leukocytes, *J.Clin.Invest.*, 51, 649-655, 1972.
- 9) P.Katz, A.M.Zaytoun, A.S.Fauci, et al. : Deficiency of active natural killer cells in the Chediak-Higashi syndrome : Localization of the defect using a single cell cytotoxicity assay, *J.Clin.Invest.*, 69, 1231-1238, 1982.
- 10) J.G.White, C.C.Clawson : The Chediak-Higashi microtubules in monocytes and lymphocytes, *Am.J.Hematol.*, 7, 349-356, 1985.
- 11) J.M.Oliver, J.A.Krawiec, R.D.Berlin : Carbamylcholine prevents giant granule formation in cultured fibroblasts from beige (Chediak-Higashi) mice, *J.Cell Biol.*, 69, 205-210, 1976.
- 12) Y.Nishizuka : Studies and perspectives of protein kinase C, *Science*, 233, 305-312, 1986.
- 13) M.Ito, F.Tanabe, A.Sato, et al. : A potent inhibitor of protein kinase C inhibits natural killer activity, *Int.J. Immunopharmac.*, 10, 211-216, 1988.
- 14) M.Ito, F.Tanabe, A.Sato, et al. : Possible involvement of microfilaments in protein kinase C translocation, *Biochem.Biophys. Res.Comm.*, 160, 1344-1349, 1989.
- 15) M.Tamai, K.Matsumoto, S.Omura, et al. : In vitro and in vivo inhibition of cysteine proteinases by EST, a new analog of E-64, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 9, 672-677, 1986.
- 16) Y.A.Hannun, C.R.Loomis, A.H.Merril, et al. : Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets, *J.Biol.Chem.* 261, 12604-12609, 1986.
- 17) Y.A.Hannun, R.M.Bell : Lysosphingolipids inhibits protein kinase C : implications for the sphingolipidosis, *Science*, 235, 670-674, 1987.
- 18) M.Pushkareva, L.M.Obeid,Y.A.Hannun : Ceramide : an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression, *Immunol. Today*, 16, 294-297, 1995.
- 19) H.Sawai, T.Okazaki,H.Yamamoto, et al. : Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells, *J.Biol.Chem.*, 270, 27326-27331, 1995.
- 20) J.N.Kanfer, R.S.Blume, R.A.Yankee, et al. : Alteration of sphingolipid metabolism in leukocytes from patients with the Chediak-Higashi syndrome, *New Engl.J.Med.*, 279, 410-413.
- 21) F.Tanabe, S-H.Cui, M.Ito : Ceramide promotes calpain-mediated proteolysis of protein kinase C β in murine polymorphonuclear leukocytes, *Biochem. Biophys.Res.Comm.*, 242, 129-133, 1998.
- 22) C.M.Perou, J.D.Leslie, W.Green, et al. : The beige/Chediak-Higashi syndrome gene encodes a widely expressed cytosolic protein, *J.Biol.Chem.*, 272, 29790-29794, 1997.
- 23) W.Faigle, C.Raposo, D.Tenza, et al. : Deficient peptide loading and MHC class II endosomal sorting in a human genetic immunodeficiency disease : the Chediak-Higashi syndrome, *J.Cell.Biol.*, 141, 1121-1134, 1998.
- 24) M.D.F.S.Barbosa, F.J.Barrat, V.T.Tchernev, et al. : Identification of mutations in two major mRNA isoforms of Chediak-Higashi syndrome gene in human and mouse, *Human Mol.Genetics*, 6, 1091-1098, 1997.