

平成30年6月16日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04876

研究課題名(和文) 難治性炎症病態を示す免疫異常症の原因遺伝子探索及び病態解明のための基盤構築

研究課題名(英文) Exploration of the causative genes and elucidation of the pathophysiology on immune dysregulatory diseases with intractable inflammation

研究代表者

西小森 隆太 (Ryuta, Nishikomori)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70359800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：難治性炎症性疾患の原因遺伝子探索、病態解明を行うため、全エクソーム解析を含む遺伝子解析、疾患特異的iPS細胞及びマウスモデルを用いた病態解明を行った。CINCA/NOMIDの新規原因遺伝子としてNLRC4を同定、iPS細胞を用いた遺伝子改変で疾患関連変異であることを証明した。また、FLNA異常症の診断、病態解明を行った。動物モデルでは、メバロン酸キナーゼ欠損症、Aicardi-Goutieres症候群のマウスモデルを作成、解析を行った。

研究成果の概要(英文)：To identify the responsible gene for the intractable inflammatory diseases, we performed genomic analysis including whole exome-sequencing. In addition, we utilized disease-specific iPS cells as well as gene-targeted mouse models to delineate the pathophysiology of the inflammatory diseases. First, we identified NLRC4 gene as a new responsible gene for the CINCA/NOMID. In particular, we demonstrated the identified NLRC4 variant was disease-causing by genetic modification of iPS cells by CRISPR/Cas9 system. We also diagnosed FLNA deficiency on the 2 brothers suffering from inflammatory bowel diseases, valvulopathy, malrotation of intestine, and chronic intestinal pseudo-obstruction. We created and studied knock-in mice for mevalonate kinase deficiency and BAC transgenic mice for Aicardi-Goutieres syndrome.

研究分野：小児科学

キーワード：NLRC4異常症 FLNA異常症 iPS細胞 全エクソーム解析 メバロン酸キナーゼ欠損症 Aicardi-Goutieres症候群 炎症性疾患 原発性免疫不全症

## 1. 研究開始当初の背景

原発性免疫不全症は、ヒト免疫系のメンデル遺伝性疾患で、獲得免疫系、自然免疫系の異常症が知られている。これまで易感染性を主症状とする獲得免疫系の機能喪失症の解析が進んだが、近年、炎症病態が前面にでる疾患群が注目されている。その表現型は、自己免疫疾患、炎症性腸疾患、周期性発熱として現れ、主として自然免疫系遺伝子が関与する。疾患特異的なバイオマーカーが乏しいため、原因遺伝子の同定が進んでいない。

一方、難治性炎症病態を示し最も解析が進んでいる疾患として、Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS)が存在する。同疾患は *NLRP3* 遺伝子変異による *NLRP3* インフラマソームの恒常活性化に基づく炎症性疾患である。分子病態の解明が治療標的 *IL-1β* の同定、抗 *IL-1* 療法の開発・劇的な患者 QOL の改善をもたらした。さらに、*NLRP3* インフラマソームという分子病態が解明され、痛風・アルツハイマー病等のより一般的な疾患の炎症病態解明に結びついた。即ち、メンデル遺伝性疾患の遺伝子探索を行う事で、より一般的な多因子疾患の病態解明にも寄与しうる。

ヒトゲノム計画の完了、近年の次世代シーケンサーによる遺伝子解析手法の進歩により遺伝性疾患の原因遺伝子探索は飛躍的に進歩した。この技術進歩により、1家系でも原因遺伝子が同定でき、de novo 変異・散发発症例の重要性が明らかになった。しかし、原因遺伝子の同定は必ずしも病態の解明にはつながらない。難治性炎症病態を示すメンデル遺伝性疾患の最終目標は疾患の根治であり、病態の解明が治療戦略上重要である。

近年のゲノム編集技術の進歩は、ノックインマウス等の動物モデル、iPS 細胞のゲノム改変等、疾患モデル作成において強力なツールとなり、より精巧な病態解析系の構築を可能にした。遺伝子改変マウスは、細胞レベルの解析だけでなく、器官、個体レベルでの解析を可能にする。しかし、自然免疫異常症モデルマウスはヒト疾患の病態を必ずしも再現しないことが知られている。一方、ヒト疾患特異的 iPS 細胞から分化細胞を用いた解析系は、ヒト疾患病態の再現において強力なツールになりうる。しかし、iPS 細胞を用いた系は、あくまでも単一細胞を中心に解析するため、動物で観察可能な多種類の細胞による相互作用、組織・個体レベルの観察が困難である。これらの問題点を克服するため、難治性炎症病態を示す免疫異常症の病態解明の戦略として、動物モデル、iPS 細胞、等、多方面からのアプローチが必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では難治性炎症病態を示すメンデル遺伝性疾患を対象とする。難治性炎症病態を示すメンデル遺伝性疾患を強く疑う症例の原因遺伝子を同定し、患者末梢血・疾患特異的 iPS 細胞・動物モデルによる病態解析基盤の構築、を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 難治性炎症病態を示すメンデル遺伝性疾患疑い症例における網羅的遺伝子解析

次世代シーケンサーを用いた炎症性疾患の遺伝子パネル、自己炎症性疾患で観察される低頻度モザイク検出法により、疾患関連変異をスクリーニングする。疾患関連変異陰性であった症例を対象とし、病歴にて自然軽快することなく継続して炎症が続いている、乳幼児期発症、家族歴陽性、血族婚陽性を目安に症例を選択、主としてトリオベース（患者・患者両親）の全エクソーム解析を行う。同解析は、かずさ DNA 研究所にてイルミナ社 HiSeq2000 等を用いて行う。

### (2) iPS 細胞を用いた難治性炎症病態を示すメンデル遺伝性疾患の病態解析

候補遺伝子が同定できたら、疾患特異的 iPS 細胞を作成する。その疾患関連性を証明するため、CRISPR/Cas9 にて疾患関連変異を正常化もしくは欠損させた iPS 細胞を作成する。同 iPS 細胞を各組織に分化させ、炎症病態の解明を行う。

### (3) マウスを用いた難治性炎症病態を示すメンデル遺伝性疾患の病態解析

CRISPR/Cas9 を用いた受精卵への直接導入にて変異ノックインマウス、変異体の強制発現によるトランスジェニックマウス、を作成、炎症病態の解明を行う。

### (4) 候補遺伝子変異の疾患関連性の評価

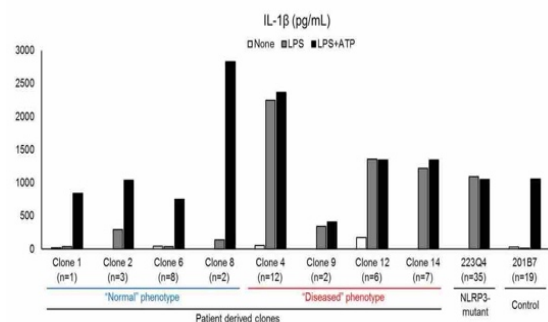
疾患関連変異の強制発現系を用いて疾患関連性について検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 難治性炎症病態を示すメンデル遺伝性疾患疑い症例における網羅的遺伝子解析

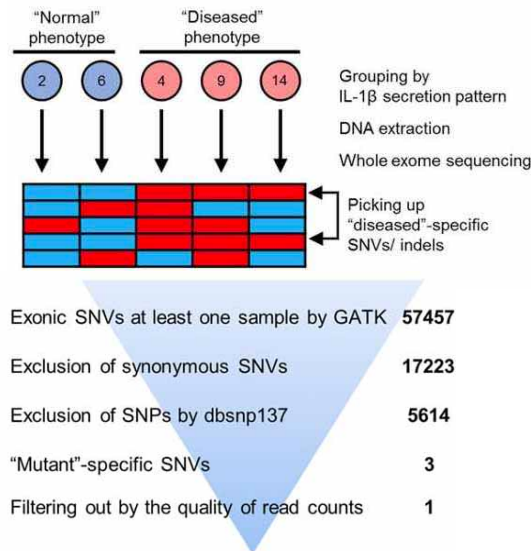
① *CINCA/NOMID* の新規原因遺伝子 *NLRP4* 発見  
CAPS は *NLRP3* 遺伝子の機能獲得型変異で発症する自己炎症性疾患である。体細胞モザイクを含めた *NLRP3* 変異が否定された CAPS の最重症病型である *CINCA/NOMID* 患者が本邦の調査で 3 名おり、そのうちの 1 人より iPS 細胞を作成、解析をおこなった。

*NLRP3* 変異陽性 CAPS 患者由来 iPS 細胞をマクロファージに分化させたところ、LPS 単独で *IL-1β* の産生がみられ、インフラマソームの活性化が観察される。同様に、*NLRP3* 変異陰性患者 iPS 細胞から分化させたマクロファージを LPS 刺激してみると、一部のクローンで *IL-1β* 産生がみられ、一部では正常細胞と同様に *IL-1β* 産生に ATP を要した (図 1)。



**図1 患者 iPS 細胞由来マクロファージ**  
クローン 4, 9, 12, 14 は LPS のみで IL-1 $\beta$  産生する疾患関連 iPS 細胞クローン。クローン 1 等は IL-1 $\beta$  産生に ATP をさらに要する。

LPS に対する反応性の違いは、遺伝子変異のモザイクによる可能性を考慮して、変異陽性クローンと変異陰性クローンで全エクソーム解析を行なったところ、インフラマソーム活性化クローンに一致した遺伝子変異として NLRC4 p. Thr177Ala を同定した(図2)。



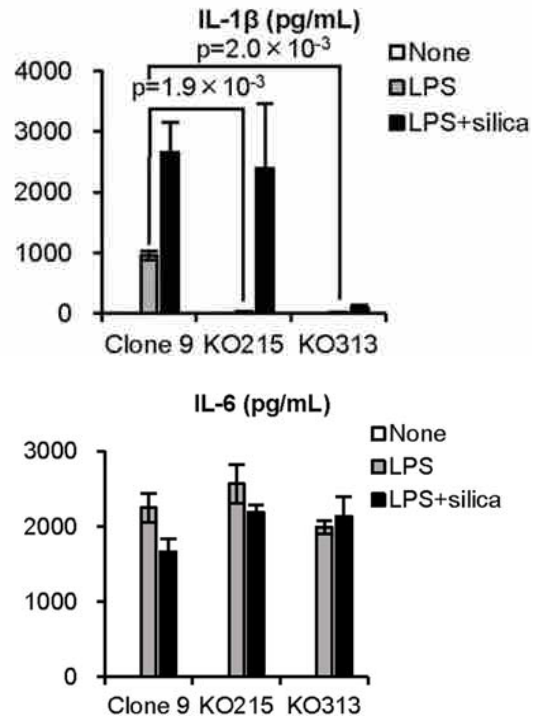
**図2 iPS 細胞クローン毎の全エクソーム解析による疾患関連変異の同定ストラテジー**

疾患関連 iPS 細胞で存在、正常 iPS 細胞では存在しない変異を選別、NLRC4 p. Thr177Ala を同定した。

末梢血由来 DNA での患者家族のトリオ解析にても NLRC4 p. Thr177Ala が同定された。同変異はゲノム変異のデータベースである、ExAC データベース、日本人の HGVD データベースに 1 塩基多型として登録されておらず、大変稀な変異であった。

近年、NLRC4 は自己炎症性疾患の原因遺伝子である事が報告され、重症例ではマクロファージ活性化症候群と乳児期腸炎 (AIFEC) を特徴とし、軽症例では家族性寒冷蕁麻疹の表現型をとることが知られている。マウス NLRC4 蛋白の構造解析データをもとに、ヒト NLRC4 p. Thr177 変異部位の 3 次元構造解析を行ったところ、Thr177 は ADP と相互作用し、ADP による NLRC4 分子の自己抑制に関与する事が推定された。

次に、この変異が炎症病態の原因であることを示すため、CRISPR/Cas9 システムにて NLRC4 遺伝子をノックアウトした iPS 細胞クローンを作成した。LPS に対する反応性を検討したところ、LPS のみでは IL-1 $\beta$  の産生が観察されず、NLRC4 が今回の iPS 細胞クローンの表現型の原因であることが証明された(図3)。



**図3 CRISPR/Cas9 による NLRC4 遺伝子ノックアウト細胞の表現型**

NLRC4 変異陽性単球細胞株 (Clone9) ならびその NLRC4 遺伝子ノックアウト細胞 (KO215, KO313) の IL-1 $\beta$  産生能を示す。ノックアウト細胞では LPS のみでの IL-1 $\beta$  産生は消失する。IL-6 は影響を受けない。

本研究では CINCA/NOMID と臨床診断された 1 例が NLRC4 異常症であることが判明した。CAPS は、重症から軽症まで、CINCA/NOMID, Muckle-Wells 症候群、家族性寒冷蕁麻疹と一連のスペクトラム異常症として知られているが、NLRC4 異常症も重症から軽症まで、AIFEC、CINCA/NOMID 様、家族性寒冷蕁麻疹とスペクトラム異常症として考えられる。

また NLRC4 異常症の同定には、iPS 細胞を利用した解析が使用され、またその変異の疾患原性は iPS 細胞を改変することにより証明された。NLRC4 異常症のような、稀少な遺伝性疾患の原因同定、病態解明において iPS 細胞は有効なツールであることを示した。

**②炎症性腸疾患・心臓弁膜症・腸回転異常をきたした 2 兄弟 1 家系の原因遺伝子 FLNA 同定**

炎症性腸疾患、腸回転異常、心臓弁膜症、慢性偽性腸閉塞症、鼠径ヘルニアを有する兄弟例について、トリオベースの全エクソーム解析を行ったところ、CLEC18A, COG8, FLNA の変異を候補として同定した。臨床所見から、FLNA 異常症で腸回転異常、心臓弁膜症、慢性偽性腸閉塞症が報告されていることより、X 染色体に存在する FLNA の 4 塩基欠失が原因と診断した。

FLNA4 塩基欠失は早期ストップコドンをもたらした、C 末が短縮した機能欠失型の FLNA 蛋白

となり、男性では胎生致死となることが多い。この家系では、兄弟とも同じ変異を有しており、遺伝子型から想定される臨床所見より軽症型である事がわかった。

その原因を調べるため、FLNA 蛋白の発現を検討したところ、兄弟では短縮した FLNA ではなく、正常とほぼ同じサイズの FLNA の減少した発現が観察された(図 4)。

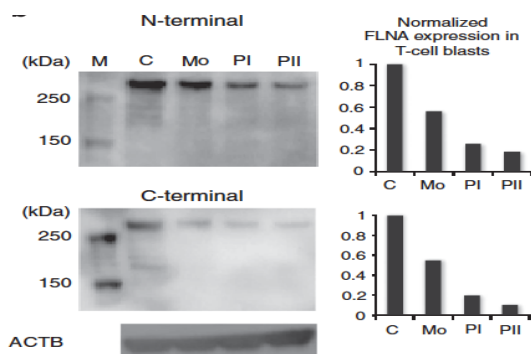


図 4 患者末梢血 FLNA 発現

左は FLNA の N 端、C 端に対する抗体によるウェスタンブロッティングの結果を示す。右は左を定量化。C: コントロール, Mo: 母, PI, P2: 患者

RT-PCR にて FLNA の発現を検討すると、兄弟では 4 塩基欠失部分のエクソンをスキップした転写物が同定され、エクソンスキッピングにより、132 塩基欠失、インフレームで 44 アミノ酸短縮した蛋白が発現していることが推定された(図 4, 5)。

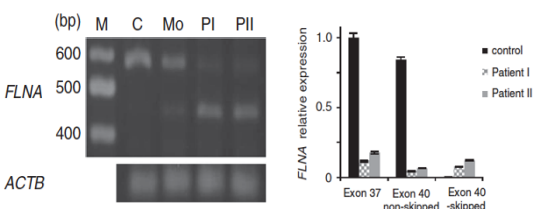


図 5 患者 FLNA の発現解析

左はエクソン 39 とエクソン 42 での RT-PCR。患者 (PI, PII) で約 450bp のエクソンスキップした転写物が同定される。右は RT-qPCR による各エクソンの発現量。患者ではエクソン 40 がスキップした転写物の亢進を認める。C: コントロール, Mo: 母, PI, P2: 患者

この 44 アミノ酸短縮した蛋白の機能を、GST プルダウンアッセイ、ならびに FLNA 欠損株への FLNA 変異体の強制発現系で焦点接着を検討したところ、4 塩基欠失による C 末欠失蛋白ではいずれも正常型 FLNA に比べ低下していたが、エクソンスキッピングによる 44 アミノ酸短縮 FLNA では正常型と同等の機能を有している事が判明した。以上より、4 塩基欠失の変異であるがエクソンスキッピングにより発現量は減少したものの正常機能をもつ 44 アミノ酸短縮 FLNA が発現、胎生致死をまねがれたと考えられる。本研究により、FLNA 異常

症の治療法の 1 つとしてエクソンスキッピングが有効である事を示した。

③その他同定した炎症性疾患の原因遺伝子全エクソーム解析にて、以下の原因遺伝子を同定、現在病態について解析中である。

骨融解性関節炎: *MAFB*

肺線維症・関節炎: *COPA*

肺障害・骨幹端異常・網膜異常: *PCYT1A*

LPS 不応性致死性免疫不全症: *NEMO* 新規変異

(2) iPS 細胞を用いた難治性炎症病態を示すメンデル遺伝性疾患の病態解析

①メバロン酸キナーゼ欠損症の炎症病態解明

まず患者末梢血を入手して LPS 刺激して IL-1 $\beta$  産生を検討した。患者末梢血は、正常コントロールと比べ、LPS 刺激に対して IL-1 $\beta$  産生が亢進、この性質は単球でも同様に再現された(図 6)。

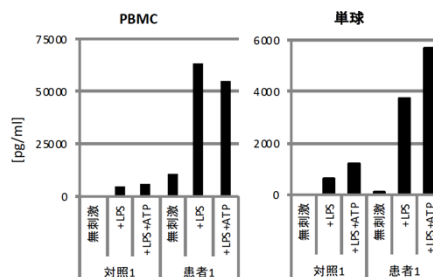


図 6 メバロン酸キナーゼ欠損症の IL-1 $\beta$  産生 PBMC、単球で正常にくらべ患者での IL-1 $\beta$  産生の亢進が認められる。

次に患者由来 iPS 細胞からマクロファージに分化させ、同様の実験を行ったところ、コントロールと患者では LPS、LPS+ATP 刺激に対する IL-1 $\beta$  産生において有意な産生亢進を認めなかった(図 7)。

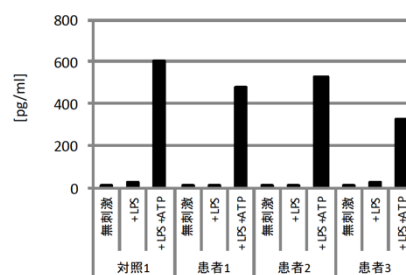


図 7 メバロン酸キナーゼ欠損症疾患特異的 iPS 細胞由来マクロファージの IL-1 $\beta$  産生能異なる患者 3 名、正常で差異を認めない。

RNAseq による発現解析では、iPS 由来マクロファージはヒト単球よりヒトマクロファージに近かった。サイトカイン産生能において iPS 細胞由来マクロファージで患者末梢血の表現型を再現できなかった 1 つの理由として、単球、マクロファージの分化状態の違いが推定された。

(3) マウスを用いた難治性炎症病態を示すメンデル遺伝性疾患の病態解析

①メバロン酸キナーゼ欠損症モデルマウス

CRISPR/Cas9 システムにてヒト MVK p. Gly326Arg に該当する変異を導入したマウ

スを作成、変異ホモ接合体をえた。現在、解析中である。

## ②AGSモデルマウス

Aicardi-Goutières 症候群で同定された IFIH1 変異 p.Arg779His を導入した BAC クローンによるトランスジェニックマウスを作成した。現在のところ、各組織で I 型インターフェロン発現の亢進が観察され、心筋障害を来すことが判明、その機序を解析中である。

## (4)候補遺伝子変異の疾患関連性の評価

NLRC4 異常症における変異 NLRC4 を単球細胞株 THP-1 に強制発現すると細胞死が誘導されることを同定した。同細胞死はカスパーゼ 1 阻害剤で抑制されず、カテプシン B 阻害剤で抑制された。CRISPR/Cas9 システムにて THP-1 細胞のカスパーゼ 1 を欠失させると、部分的に細胞死が抑制された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Nakayama M, Oda H, Nakagawa K, Yasumi T, Kawai T, Izawa K, Nishikomori R, Heike T, Ohara O. Accurate clinical genetic testing for autoinflammatory diseases using the next-generation sequencing platform MiSeq. *Biochem Biophys Rep.* 2017;9:146-52.

DOI:10.1016/j.bbrep.2016.12.002

② Lasiglie D, Mensa-Vilaro A, Ferrera D, Caorsi R, Penco F, Santamaria G, Di Duca M, Amico G, Nakagawa K, Antonini F, Tommasini A, Consolini R, Insalaco A, Cattalini M, Obici L, Gallizzi R, Santarelli F, Del Zotto G, Severino M, Rubartelli A, Ravazzolo R, Martini A, Ceccherini I, Nishikomori R, Gattorno M, Arostegui JJ, Borghini S. Cryopyrin-associated Periodic Syndromes in Italian Patients: Evaluation of the Rate of Somatic NLRP3 Mosaicism and Phenotypic Characterization. *The Journal of rheumatology.* 2017;44(11):1667-73.

DOI:10.3899/jrheum.170041

③ Kawasaki Y, Oda H, Ito J, Niwa A, Tanaka T, Hijikata A, Seki R, Nagahashi A, Osawa M, Asaka I, Watanabe A, Nishimata S, Shirai T, Kawashima H, Ohara O, Nakahata T, Nishikomori R, Heike T, Saito MK. Identification of a High-Frequency Somatic NLRC4 Mutation as a Cause of Autoinflammation by Pluripotent Cell-Based Phenotype Dissection. *Arthritis & rheumatology.* 2017;69(2):447-59.

DOI:10.1002/art.39960

④ Kawai T, Hiejima E, Oda H, Izawa K, Yasumi T, Nishikomori R, Okamoto S, Heike T. Reply to Walsh et al. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(8):907. DOI:10.1038/ejhg.2016.192

⑤ Ueda N, Ida H, Washio M, Miyahara H, Tokunaga S, Tanaka F, Takahashi H, Kusahara K, Ohmura K, Nakayama M, Ohara O, Nishikomori R, Minota S, Takei S, Fujii T, Ishigatsubo Y, Tsukamoto H, Tahira T, Horiuchi T. Clinical and Genetic Features of Patients With TNFRSF1A Variants in Japan: Findings of a Nationwide Survey. *Arthritis & rheumatology.* 2016;68(11):2760-71. DOI:10.1002/art.39793

⑥ Oda H, Sato T, Kunishima S, Nakagawa K, Izawa K, Hiejima E, Kawai T, Yasumi T, Doi H, Katamura K, Numabe H, Okamoto S, Nakase H, Hijikata A, Ohara O, Suzuki H, Morisaki H, Morisaki T, Nunoi H, Hattori S, Nishikomori R, Heike T. Exon skipping causes atypical phenotypes associated with a loss-of-function mutation in FLNA by restoring its protein function. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(3):408-14. DOI:10.1038/ejhg.2015.119

⑦ Mensa-Vilaro A, Teresa Bosque M, Magri G, Honda Y, Martinez-Banaclocha H, Casorran-Berges M, Sintes J, Gonzalez-Roca E, Ruiz-Ortiz E, Heike T, Martinez-Garcia JJ, Baroja-Mazo A, Cerutti A, Nishikomori R, Yague J, Pelegrin P, Delgado-Beltran C, Arostegui JJ. Brief Report: Late-Onset Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome Due to Myeloid-Restricted Somatic NLRP3 Mosaicism. *Arthritis&rheumatology.* 2016;68(12):3035-41. DOI:10.1002/art.39770

⑧ Eroglu FK, Kasapcopur O, Besbas N, Ozaltin F, Bilginer Y, Barut K, Mensa-Vilaro A, Nakagawa K, Heike T, Nishikomori R, Arostegui J, Ozen S. Genetic and clinical features of cryopyrin-associated periodic syndromes in Turkish children. *Clinical and experimental rheumatology.* 2016;34(6 Suppl 102):S115-S20

[学会発表] (計 6 件)

① 西小森隆太 自己炎症性疾患 病態と治療 PFS を中心に 第 60 回 日本リウマチ学会総会 2017.

② 西小森隆太 知っておきたい稀少疾患 自己炎症性疾患 特に蕁麻疹様発疹をきたす疾患 第 34 回 日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会総会 2017.

③ 西小森隆太 小児免疫疾患における分子標的薬 日本臨床免疫学会 2016.

④ 本田吉孝, 河合朋樹, 西小森隆太, 八角高裕, 井澤和司, 日衛嶋栄太郎, 中川権史, 柴田洋史, 下寺佐栄子, 大音泰介, 芝剛, 仁平寛士, 小田紘嗣, 小原收, 平家俊男 PFAPA の臨床像で発症し、長期経過後に腸管炎症、陰部潰瘍を合併したため診断に至った孤発性の TNFA1P3 異常症の 1 例 小児リウマチ学会

2016.

⑤田中孝之, 吉岡耕平, 酒井秀政, 西小森隆太, 阿部純也, 日衛嶋栄太郎, 小原收, 河合朋樹, 八角高裕, 平家俊男 本邦でのメバロン酸キナーゼ欠損症のまとめ 日本小児リウマチ学会総会 2015.

⑥Nakagawa K., Okuno Y., Nishikomori R., Yokoyama K., Tanaka T., Kawai T., Yasumi T., Umeda K., Nakayama N., Toguchida J., Hagiwara M., Heike T. Understanding the pathophysiology of NOMID arthropathy for drug discovery by iPSCs technology. 8th International Society of Systemic Autoinflammatory Diseases Meeting 2015, 2015.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西小森 隆太 (NISHIKOMORI, Ryuta)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70359800

### (2) 研究分担者

平家 俊男 (HEIKE, Toshio)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90190173

八角 高裕 (YASUMI, Takahiro)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：00511891

齋藤 潤 (SAITO, Megumu)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：90535486

### (3) 連携研究者

小原 收 (OHARA, Osamu)

かずさDNA研究所・ヒトゲノム研究部・部長

研究者番号：20370926

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA, Junya)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：40273502

藤田 尚志 (FUJITA, Takashi)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：10156870

加藤 博紀 (KATO, Hiroki)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号：10597173

### 4) 研究協力者

田中 孝之 (TANAKA, Takayuki)

中川 権史 (NAKAGAWA, Kenji)

本田 吉孝 (HONDA, Yoshitaka)

下寺 佐栄子 (SHIMODERA, Saeko)

大音 泰介 (OHTO, Taisuke)

小田 紘嗣 (ODA, Hirotsugu)