

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04656

研究課題名(和文)トルコと日本の自己炎症疾患発症責任分子複合体を活性化する生体・環境因子の比較調査

研究課題名(英文)Comparative survey of endogenous and environmental factors that activate autoinflammatory disease responsible gene products in Turkey and Japan

研究代表者

増本 純也(MASUMOTO, JUNYA)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：20334914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：族性地中海熱の患者さんの血清中のサイトカイン濃度には特異的なパターンがあることがわかった。特にIL-6, IL-17, IL-18の重要性が示されたことから、PyrinインフラマソームがIL-1ではなく、IL-18の活性化に重要な可能性が示唆された。無細胞インフラマソーム再構成系を用いて、相互作用によってインフラマソーム形成を促進する内因性物質の探索を行なった。その結果、隣島アミロイドポリペプチド(IAPP)とベータアミロイド(A $\beta$ )が、インフラマソームに直接相互作用することがわかった。一方でpyrinはIAPPやA $\beta$ とは異なるアミロイドと相互作用してインフラマソーム形成することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A $\beta$ やIAPPとは異なるアミロイドがpyrinインフラマソームの形成を促進することが明らかになった。トルコ周辺では宗教上の理由から、絶食期間が一定の割合で生活習慣の一部になっているケースが多く、この期間に内因性アミロイドが増加すると考えられる。自己炎症疾患の発作の予防には、規則正しい食生活と睡眠によって、血中のアミロイドの増加を抑えることが考えられるが、診断と治療への応用については、さらなる解析が必要である。

研究成果の概要(英文)：We found that there is a specific pattern of serum cytokine levels in patients with familial Mediterranean fever. In particular, since the importance of IL-6, IL-17, and IL-18 was suggested, the pyrin inflammasome may be important for the activation of IL-18, but not IL-1. Using the cell-free inflammasome reconstitution system, we studied for endogenous ligands that promote inflammasome formation in a cell-free inflammasome. As a result, we found that islet amyloid polypeptide (IAPP) and beta amyloid (A $\beta$ ) interact with inflammasome directly. On the other hand, we found that pyrin interacts with another amyloid different from IAPP and A $\beta$ .

研究分野：病理学

キーワード：自己炎症疾患 インフラマソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

自己炎症疾患は、周期性の発熱発作を特徴とする炎症疾患で、自己反応性の T リンパ球や自己抗体の関与のない点から、自己免疫疾患とは区別されている。そのうち、『家族性地中海熱 (FMF)』、『クリオパイリン関連周期熱症候群 (CAPS)』の疾患責任遺伝子産物はそれぞれ Pyrin、Cryopyrin ということが判明しており、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  を切断して活性化するインフラマソームという細胞内病原体認識複合体の制御異常に関わることが申請者や内外の研究によって明らかにされている。このように、IL-1 $\beta$  の産生に必須のインフラマソームの動態は『自己炎症疾患の周期性』を規定する重要なシグナル伝達複合体と考えられる。

世界で 10 万人以上存在する代表的な自己炎症疾患である『家族性地中海熱 (FMF)』は、数ヶ月に 1 週間ほど持続する周期性の発熱、関節痛、腹痛を特徴とする。トルコなどの地中海沿岸に 4 人に 1 人もの遺伝子キャリアがいるのに発症しないメカニズムも不明である。これまで臨床的研究、遺伝学的研究、細胞やマウス使った生物学的な研究は非常に多く行われてきたが、日本と中東での発症様式のちがいに着目して患者検体を比較調査した研究はほとんどない。

そこで、わたしたちは、試験管内インフラマソーム再構成アッセイシステムにより、患者血清中に存在する炎症発作の直接原因となりうる単一成分候補を複数同定し、『自己炎症疾患の発症と周期性には、複数のインフラマソームが関与し、ひとつが特異的なトリガー物質を認識して有勢となると、他が他に干渉する遷移状態を経るが、この状態の制御に環境因子と疾患特有の蛋白質変異の両方が影響する』すなわち『周期性は環境因子と疾患責任変異分子の両方が生み出す』という仮説をたてた。今回はトルコの研究者との共同研究も実施し、これらの仮説を検証し、自己炎症疾患の周期性や病態の多様性の謎に迫りたい。

## 2. 研究の目的

現在までに私たちは発作のトリガーとなりうる候補物質を複数絞り込んでいる。その結果を踏まえ、自己炎症疾患の遺伝子変異をもつ症例の多いトルコの研究機関と連携し、申請者らの開発した無細胞疾患責任分子複合体再構成系と質量分析により、患者臨床検体中の発症トリガー物質と疾患責任分子複合体との相互作用の変化を明らかにし、生活習慣や環境で異なる自己炎症疾患の発症と周期性の分子メカニズムを明らかにし、自己炎症疾患の明確な診断と治療に発展させる。

## 3. 研究の方法

### (1) インフラマソーム再構成系での活性化値の定量

コムギ無細胞インフラマソーム再構成系を用いて、アルファによりベースの野生型インフラマソーム再構成系活性化値を決定する。コムギ無細胞インフラマソーム再構成系を用いて、生体成分との相互作用とインフラマソーム活性化への影響を明らかにする。

### (2) 家族性地中海熱特異的変異導入インフラマソーム再構成系活性化値の定量

疾患特異的なタンパク質のアミノ酸変異を導入した無細胞自己炎症疾患特異的インフラマソーム再構成系を用いて、アルファにより生体成分との相互作用と自己炎症疾患患者血清による疾患特異的インフラマソーム活性化値を定量する。

### (3) 血清中の生化学的データの解析

日常的に行われる血清の生化学検査とマルチプレックスでのサイトカインマーカーの検査を行う。また、前回までの研究で、アミロイドタンパク質の炎症発作への影響が示されていることからアミロイドとの相互作用の解析を行う。

### (4) トルコでの衣食住衛生環境と生活習慣の調査

フィールドワークによりトルコでの上下水道の整備状況、食生活、宗教上の絶食期間など公衆衛生的な観点からの情報収集と調査を行う。

### (5) 自己炎症疾患予防・診断・治療への応用

自己炎症疾患の発作の機構が解明されたことを利用して、発作の予防的方策、臨床検査キットの開発、治療への提言を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 無細胞インフラマソーム再構成系を活性化する物資について

無細胞インフラマソーム再構成系を用いて、相互作用によってインフラマソーム形成を促進する内因性物質の探索を行なった。その結果、膵島アミロイドポリペプチド(IAPP)とベータアミロイド(Aβ)が、NLRP3 インフラマソームに直接相互作用することがわかった。一方で pyrin は IAPP や Aβ とは異なるアミロイドと相互作用してインフラマソーム形成する (図 1)。

##### (2) 患者血清中のサイトカイン濃度とインフラマソームを活性化する内因性物質について

家族性地中海熱の患者さんの血清中のサイトカイン濃度には特異的なパターンがあることがわかった。特に IL-6, IL-17, IL-18 の重要性が示されたことから、Pyrin インフラマソームが IL-1βではなく、IL-18 の活性化に重要な可能性が示された。

IL-18 を活性化するのに必須の細胞内シグナル伝達複合体であるインフラマソームを試験管内無細胞系で再構成し、有力な内因性アミロイドであるベータ・アミロイドによる形成を解析したところ、多量体形成した Aβ によって、NLRP3 インフラマソームの形成が認められた(図 1)。

同様の手法で、IAPP の多量体化によって NLRP3 インフラマソームの形成が認められた(図 2)。

Aβや IAPP とは異なるアミロイドが pyrin インフラマソームの形成を促進することを明らかにした(未発表のため図表は掲載しません)。

トルコ周辺では宗教上の理由から絶食期間が一定の割合で生活習慣の一部になっているケースが多く、この期間に内因性アミロイドが増加するデータが示されている。しかしながら、微量のアミロイドでは試験管内インフラマソームの再構成は起こらず、生理的な評価については今後の課題である。

##### (3) 自己炎症疾患予防・診断・治療への応用について

以上の結果を踏まえ、自己炎症疾患の発作の予防には、規則正しい食生活と睡眠によって、血中のアミロイドの増加を抑えることが考えられるが、診断と治療への応用については、さらなる解析が必要である。

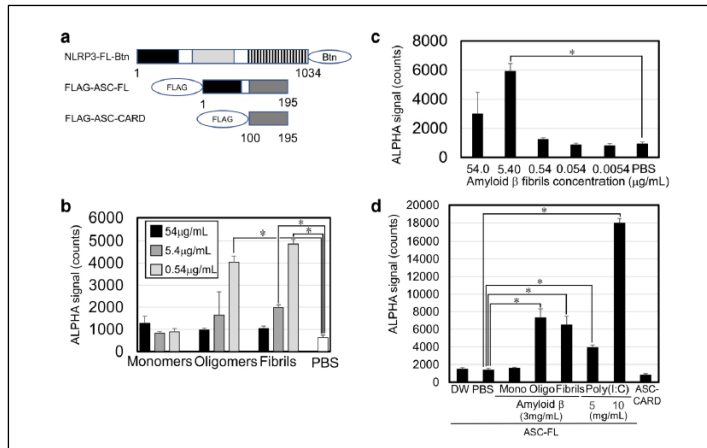


図 1. ベータ・アミロイドによる無細胞インフラマソームの活性化

Pyrin と同様にインフラマソームを形成する NLRP3 が Aβと相互作用して活性化することを明らかにした。Pyrin も同様に別のタイプのアミロイドと相互作用することデータを得て現在発表の準備を進めている。(未発表のため図表は掲載しません)。どのような機構でアミロイドがインフラマソーム構成分子と相互作用をするかは不明だが、内因性のアミロイドが周期性を規定する可能性が示された。

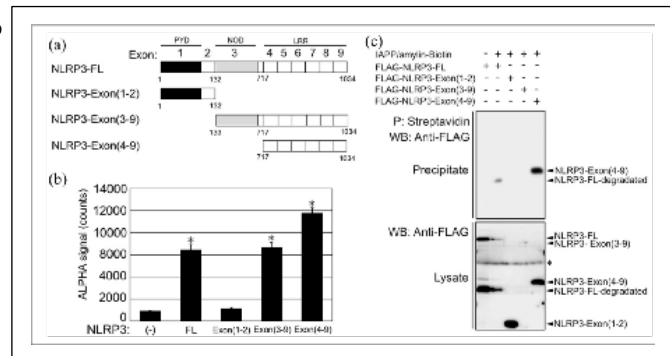


図 2. 膵島アミロイドポリペプチドによる無細胞インフラマソームの活性化

Pyrin と同様にインフラマソームを形成する NLRP3 が Aβと相互作用して活性化することを明らかにした。Pyrin も同様に別のタイプのアミロイドと相互作用することデータを得て現在発表の準備を進めている。(未発表のため図表は掲載しません)。どのような機構でアミロイドがインフラマソーム構成分子と相互作用をするかは不明だが、内因性のアミロイドが周期性を規定する可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Nakanishi A, Kaneko N, Takeda H, Sawasaki T, Morikawa S, Zhou W, Kurata M, Yamamoto T, Akbar SMF, Zako T, Masumoto J.	4. 巻 38
2. 論文標題 Amyloid directly interacts with NLRP3 to initiate inflammasome activation: identification of an intrinsic NLRP3 ligand in a cell-free system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-018-0085-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Endo Y, Koga T, Ishida M, Fujita Y, Tsuji S, Takatani A, Shimizu T, Sumiyoshi R, Igawa T, Umeda M, Fukui S, Nishino A, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Agematsu K, Yachie A, Masumoto J, Migita K, Kawakami A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Musculoskeletal manifestations occur predominantly in patients with later-onset familial Mediterranean fever: Data from a multicenter, prospective national cohort study in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-018-1738-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Morikawa S, Kaneko N, Okumura C, Taguchi H, Kurata M, Yamamoto T, Osawa H, Nakanishi A, Zako T, Masumoto J.	4. 巻 32
2. 論文標題 IAPP/amylin deposition, which is correlated with expressions of ASC and IL-1 in $\beta$ -cells of Langerhans' islets, directly initiates NLRP3 inflammasome activation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Immunopathology and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 2.05874E+14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2058738418788749	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hachiya A, Kobayashi N, Matsuzaki S, Takeuchi Y, Akazawa Y, Shigemura T, Motoki N, Masumoto J, Agematsu K.	4. 巻 37
2. 論文標題 Analysis of biomarker serum levels in IVIG and infliximab refractory Kawasaki disease patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1937 ~ 1943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10067-017-3952-7	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 Koga T, Migita K, Sato T, Sato S, Umeda M, Nonaka F, Fukui S, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Ueki Y, Masumoto J, Agematsu K, Yachie A, Yoshiura KI, Eguchi K, Kawakami A.	4. 巻 57
2. 論文標題 MicroRNA-204-3p inhibits lipopolysaccharide-induced cytokines in familial Mediterranean fever via the phosphoinositide 3-kinase pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 718 ~ 726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/kex451	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 Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto J.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 The role of interleukin-1 in general pathology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-019-0101-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Y, Shigemura T, Kobayashi N, Nagumo H, Furumoto M, Ogasawara K, Fujii H, Takizawa M, Soga T, Matoba H, Masumoto J, Fukushima K, Migita K, Ojima T, Umeda Y, Agematsu K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Clinical features and new diagnostic criteria of the syndrome of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis (PFAPA)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Hachiya A, Kobayashi N, Matsuzaki S, Takeuchi Y, Akazawa Y, Shigemura T, Motoki N, Masumoto J, Agematsu K	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Analysis of biomarker serum levels in IVIG and infliximab refractory Kawasaki disease patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10067-017-3952-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koga T, Migita K, Sato T, Sato S, Umeda M, Nonaka F, Fukui S, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Ueki Y, Masumoto J, Agematsu K, Yachie A, Yoshiura KI, Eguchi K, Kawakami A	4. 巻 57
2. 論文標題 MicroRNA-204-3p inhibits lipopolysaccharide-induced cytokines in familial Mediterranean fever via the phosphoinositide 3-kinase pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford)	6. 最初と最後の頁 718-726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rheumatology/kex451	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Y, Shigemura T, Kobayashi N, Kaneko N, Iwasaki T, Minami K, Kobayashi K, Masumoto J, Agematsu K	4. 巻 36
2. 論文標題 Early diagnosis of early-onset sarcoidosis: a case report with functional analysis and review of the literature	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1189-1196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10067-017-3544-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko N, Iwasaki T, Ito Y, Takeda H, Sawasaki T, Morikawa S, Nakano N, Kurata M, Masumoto J	4. 巻 37
2. 論文標題 Applications of reconstituted inflammasomes in a cell-free system to drug discovery and elucidation of the pathogenesis of autoinflammatory diseases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-017-0040-y. eCollection 2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko N, Ito Y, Iwasaki T, Takeda H, Sawasaki T, Migita K, Agematsu K, Koga T, Kawakami A, Yachie A, Yoshiura K, Morikawa S, Kurata M, Masumoto J	4. 巻 15
2. 論文標題 Poly (I:C) and hyaluronic acid directly interact with NLRP3, resulting in the assembly of NLRP3 and ASC in a cell-free system	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 European Journal of Inflammation	6. 最初と最後の頁 85-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1721727X17711047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakano N, Kaneko N, Kurata N, Yamamoto T, Urano T, Koga T, Kawakami A, Yachie A, Agematsu K, Migita K, Yoshiura K, Ishii E, Masumoto J.
2. 発表標題 Quantitative evaluation of mRNA expression of MEFV gene product pyrin in human tissues
3. 学会等名 European Society for Immunodeficiencies 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田有希子, 金子直恵, 増本純也.
2. 発表標題 インフラマソーム活性化メカニズム解説のための擬人化(キャラクター化)を用いた漫画(マンガ) によるアウトリーチ活動の試み
3. 学会等名 第41回分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中西文香, 金子直恵, 座古保, 増本純也.
2. 発表標題 A のアミロイド凝集体によるNLRP3インフラマソームの活性化
3. 学会等名 第41回分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子直恵, 中西文香, 座古保, 増本純也.
2. 発表標題 アミロイドA の重合化は試験管内無細胞インフラマソームの形成を促進する
3. 学会等名 第39回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増本純也, 金子直恵, 伊藤 有紀
2. 発表標題 無細胞系によるNLRP3と直接相互作用する内因性物質の同定
3. 学会等名 第38回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 増本純也, 金子直恵, 伊藤有紀, 森川紳之祐, 山本敏弘, 倉田美恵
2. 発表標題 無細胞系によるNLRP3インフラソームと直接相互作用する物質の探索, 口演
3. 学会等名 第12回臨床ストレス応答学会大会, 2017/11/4, 国内
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 増本純也, 金子直恵, 伊藤有紀, 山本敏弘, 倉田美恵, 中野直子, 森川紳之祐, 周薇, 竹田浩之, 澤崎達也
2. 発表標題 3. 無細胞タンパク質複合体再構成系による自己炎症疾患の病態解明と特異的分子標的治療薬探索
3. 学会等名 第1回日本免疫不全・自己炎症学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>愛媛大学プロテオサイエンスセンター 病理学部門  <a href="http://www.pros.ehime-u.ac.jp/section/09.html">http://www.pros.ehime-u.ac.jp/section/09.html</a></p>
---



## 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
研究分担者	谷内江 昭宏  (Yachie Akihiro)  (40210281)	金沢大学・附属病院・特任教授    (13301)	
研究分担者	竹田 浩之  (Takeda Hiroyuki)  (40609393)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授    (16301)	
研究分担者	澤崎 達也  (Sawasaki Tatsuya)  (50314969)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授    (16301)	
研究分担者	上松 一永  (Agematsu Kazunaga)  (60262721)	信州大学・医学部・委嘱講師    (13601)	
研究分担者	右田 清志  (Migita Kiyoshi)  (60264214)	福島県立医科大学・医学部・教授    (21601)	
研究分担者	川上 純  (Kawakami Atsushi)  (90325639)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授    (17301)	