

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09975

研究課題名(和文) 高安動脈炎の病因解明と治療法改良への遺伝子研究成果からのアプローチ

研究課題名(英文) Approach to understanding of pathogenesis and invention of new treatments from the results of preliminary genetic studies

研究代表者

吉藤 元 (Yoshifuji, Hajime)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20422975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：高安動脈炎は、大動脈などを侵し、若年女性に好発する希少疾患である。高安動脈炎の全ゲノム関連解析によりIL12B遺伝子領域のSNPが見つかった。IL12B遺伝子はp40をコードし、p40はIL-12、IL-23の共通サブユニットである。高安動脈炎患者と健康者のPMBCやiPS細胞を用いて、IL12B遺伝子の病態への関連を検討した。リスク型SNPを持つ患者由来マクロファージにおいて、リスク型SNPを持たない患者由来マクロファージよりも、上清中p40濃度が有意に高かった。p40濃度は、患者iPS細胞由来マクロファージ上清中で、健康者iPS細胞由来マクロファージ上清中よりも高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高安動脈炎患者において、発症リスク型SNPの影響によりp40産生能が高くなり、ヘルパーT細胞の活性化を通して、血管炎病態を引き起こしている可能性が示唆された。2015年、著者らはp40を阻害する生物学的製剤ウスチキヌマブを高安動脈炎患者3名に投与するパイロット試験を行い、症状・臨床データの改善を認めた(Terao, Scand J Rheum)。次段階となる臨床試験の論理的根拠を強化するために、本計画において、高安動脈炎患者検体や疾患特異的iPS細胞を用いた基礎実験を行った。今回得られた結果は、p40を標的とする高安動脈炎の新規治療薬開発につながることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Takayasu arteritis is a rare disease that affects large arteries, and often affects young women. An SNP in IL12B gene region has been found by genome-wide association study of Takayasu arteritis. IL12B gene encodes p40, which is a shared subunit of IL-12 and IL-23. We used peripheral blood mononuclear cells and iPS cells of patients with Takayasu arteritis and healthy controls, and examined the role of IL12B gene in the pathology of Takayasu arteritis. Supernatant p40 concentration was significantly higher in macrophages from patients with risk-type SNPs than in macrophages from patients without risk-type SNPs. Supernatant p40 concentration was higher in the disease-specific iPS cell-derived macrophages than in the control iPS cell-derived macrophages.

研究分野：膠原病学

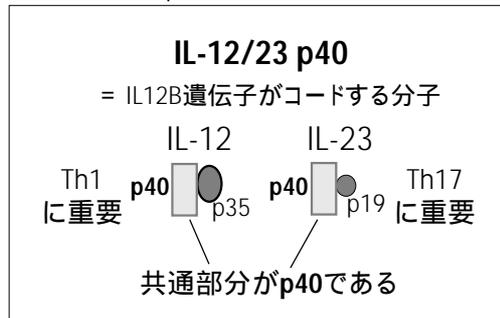
キーワード：高安動脈炎 iPS細胞 IL-12

1. 研究開始当初の背景

(1) 高安動脈炎は、若年女性に好発する本邦約 6000 人の希少疾患である。大動脈およびその一次分枝を侵す自己免疫疾患と考えられている。標準薬のステロイドを用いても、その漸減中に約半数が再燃し、進行すると弁膜症、脳梗塞、失明、大動脈瘤などの重大な合併症をきたし問題となる。近年、高安動脈炎に対するアバタセプト[1]やトシリズマブ[2]などの生物学的製剤のランダム化比較試験が報告されたが、いずれも初期エンドポイントを達成できなかった。さらなる高安動脈炎のメカニズムの解明と新規治療法の開発が課題である。

(2) 著者は、厚労省難治性血管炎研究班の分担研究者であり、大型血管炎分科会で疫学研究や診療ガイドライン作成[3]を行ってきた。また、高安動脈炎患者会「あけぼの会」のオブザーバーを務め、患者相談に対応してきた。2013 年、379 例の患者検体を収集して、全ゲノム関連解析により *IL12B* 遺伝子領域の SNP rs6871626 が高安動脈炎の発症と相関すること ($p = 1.7 \times 10^{-13}$)、同 SNP は臨床症状とも相関することを報告した[4]。この SNP がアデニン (A) である場合、シトシン (C) である場合に対して高安動脈炎の発症リスクとなる。*IL12B* 遺伝子は IL-12/23 p40 をコード (図 1) し、高安動脈炎の発症にこれらのサイトカインが関与することが示唆される。そこで、これらのサイトカイン制御による高安動脈炎の治療アプローチを着想した。2015 年、倫理委員会の承認を得て IL-12/23 p40 を阻害する生物学的製剤ウスチヌマブを高安動脈炎患者 3 名に投与するパイロット試験を行い、症状・臨床データの改善を認めた[5]。臨床試験の論理的根拠を強化するために、高安動脈炎末梢血検体および高安動脈炎疾患特異的 iPS 細胞や患者由来検体を用いた基礎実験が必要と考え、本研究を計画した。

図1. IL-12/23 p40の役割



(3) 応募者は、京都大学大学院医学研究科・代謝制御学・曽根正勝特定准教授との共同研究により、発症リスク型 *IL12B* SNP を有する家族内発症の重症高安動脈炎患者 2 名から疾患特異的 iPS 細胞 (2 株) を樹立した。また、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) との協力によりこれらの iPS 細胞を単球に分化誘導することを計画した。iPS 細胞は増殖させることができるため、患者から頻回に検体を採取しなくても実験をリピートできる利点がある。

2. 研究の目的

(1) 発症リスク型の SNP を有する患者において p40 の発現が亢進するという仮説を立てて、以下の検討を行う。高安動脈炎患者の血漿・血球を用い、患者を *IL12B* SNP リスク型保有者と非保有者の 2 群に層別化し表現型を比較することにより、*IL12B* 遺伝子の病態への関連を検討する。

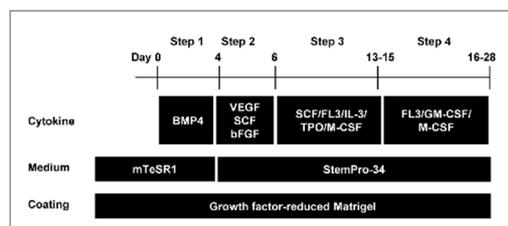
(2) 高安動脈炎疾患特異的 iPS 細胞 (= 発症リスク型 *IL12B* SNP を保有) と健常者 iPS 細胞をマクロファージに分化誘導し表現型を比較することにより、*IL12B* 遺伝子の病態への関与を検討する。

3. 研究の方法

(1) 患者血漿中の IL-12p40, IL-12p70, IL-23 などのサイトカイン濃度を ELISA で測定し、健常者血漿と比較した。次に、患者を *IL12B* SNP リスク型保有者と非保有者の 2 群に層別化し、血漿中の各サイトカイン濃度を比較することにより、*IL12B* SNP の高安動脈炎病態への関連を検討した。

(2) 患者末梢血単球に、Johnston らの方法[6]に従いインピトロで IL-10 5 ng/mL, IL-6 5 ng/mL, M-CSF 10 ng/mL を 72 時間, IFN- γ 50 ng/mL を 30 時間添加し、マクロファージに分化させ、LPS 1 μ g/mL で 12 時間刺激し、上清中の IL-12p40, IL-12p70, IL-23 などを ELISA で測定した。それらの濃度を、健常者由来マクロファージと患者由来マクロファージの間で比較した。さらに、患者を *IL12B* SNP リスク型保有者と非保有者の 2 群に層別化し、マクロファージによるサイトカイン産生能を比較することにより、*IL12B* SNP の高安動脈炎病態への関連を検討した。

図2. iPS細胞から単球への分化誘導プロトコル



(文献7より引用抜粋)

(3) 高安動脈炎の疾患特異的 iPS 細胞 (2 株) を曽根正勝先生より供与いただいた。疾患特異的 iPS 細胞および健常者 iPS 細胞に、Yanagimachi らの方法 (図 2) [7] に従い、インビトロで BMP4 (Day 0-3), VEGF, SCF, bFGF (Day 4-5), SCF, FL3, IL-3, TPO, M-CSF (Day 5-14), FL3, GM-CSF, M-CSF (Day 15-28) を添加して、単球に誘導した。さらに、IL-10, IL-6, M-CSF, IFN- γ を添加してマクロファージに分化誘導した。

(4) 患者 iPS 細胞由来マクロファージおよび健常者 iPS 細胞由来マクロファージを LPS 1 μ g/mL で 12 ~ 24 時間刺激し、上清中の IL-12p40, IL-12p70, IL-23 などを用いた ELISA で測定し、両者のサイトカイン産生能を比較した。著者らが用いた疾患特異的 iPS 細胞は発症リスク型 *IL12B* SNP を保有している。また、発症リスク型 *IL12B* SNP を有する、あるいは有さない健常者 iPS 細胞も用いた。これらの iPS 細胞から誘導したマクロファージの機能比較により、*IL12B* 遺伝子の病態への関与を検討した。

(5) 患者および健常者の血漿、血球、ゲノムの解析 (G412) と iPS 細胞を用いた解析 (R0091/G259) についてはについては京都大学医の倫理委員会の承認を得た。被検者より紙面で同意書を得てサンプルを採取した。

4. 研究成果

(1) 健常者および高安動脈炎患者の血漿を採取し、血漿中の IL-12p40 濃度を測定したところ、患者で p40 濃度が有意に高かった (図 3)。次に、患者を *IL12B* SNP リスク型保有者と非保有者の 2 群に層別化し、血漿中の p40 濃度を比較したところ、リスク型 SNP を持つ患者で p40 濃度が高い傾向にあった (図 4)。

(2) p40 の主たる産生細胞が単球/マクロファージであることから、高安動脈炎患者や健常者から単球を回収してインビトロでマクロファージに分化させ、さらに LPS で刺激を加え、サイトカイン産生能を比較した。その結果、高安動脈炎患者のマクロファージでは上清中 p40 濃度が健常者のマクロファージに比べて有意に高かった (図 5)。さらに、高安動脈炎患者のうち、リスク型 SNP を持つ患者由来マクロファージにおいて、リスク型 SNP を持たない患者由来マクロファージよりも、上清中 p40 濃度が有意に高かった (図 6)。

(3) 疾患特異的 iPS 細胞および健常者 iPS 細胞に、インビトロで各成長因子を添加し、単球誘導を試みた。Day 25 に May-Giemsa 染色を施したところ、単一の核を有する小型細胞を認めた (図 7 左)。さらに、Day 20 の時点でフローサイトメトリーで確認したところ、CD45⁺CD14⁺細胞 (= 単球に相当) を全細胞の 60-70% に認めた (図 7 右)。さらに IL-10, IL-6, M-CSF を 72 時間、IFN- γ を 30 時間添加し、マクロファージに分化させた。

(4) 疾患特異的 iPS 細胞由来マクロファージおよび健常者 iPS 細胞由来マクロファージを LPS 1 μ g/mL で 12 ~ 24 時間刺激し、上清中サイトカイン

図3. 高安動脈炎患者と健常者の血漿p40濃度

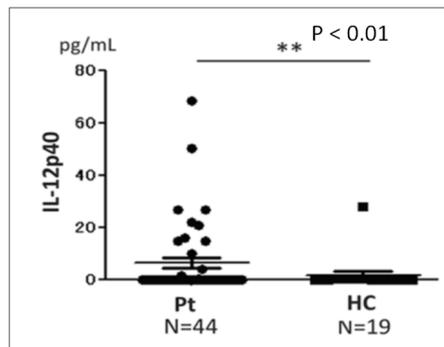


図4. 患者をp40 SNPリスクアレル保有で層別化した際の血漿p40濃度

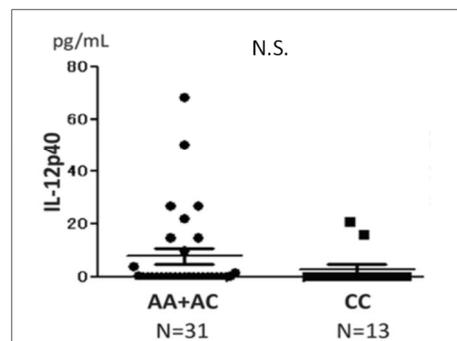


図5. 高安動脈炎患者と健常者由来マクロファージの上清p40濃度

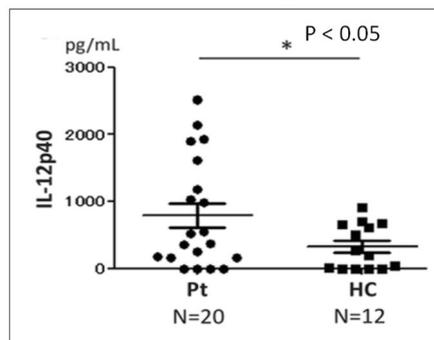
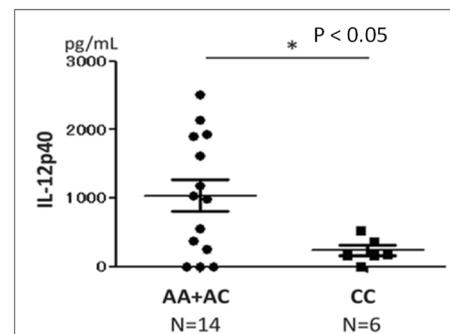


図6. SNPリスクアレル保有で層別化した際の患者由来マクロファージ上清p40濃度



ンを測定した。p40 濃度は、患者 iPS 細胞由来マクロファージ上清中で、健常者 iPS 細胞由来マクロファージ上清中よりも高かった (図 8)(N = 1 vs. 1)。上清中 IL-23 濃度も、患者 iPS 細胞由来マクロファージ上清中で高かった (図 9)(N = 1 vs. 1)。上清中 IL-12p70 はすべての群で測定感度以下であった。

次に、*IL12B* リスク型 SNP(A)を有する(AC)健常者 iPS 細胞由来マクロファージと、リスク型を有さない(CC)健常者 iPS 細胞由来マクロファージを比較した。p40 濃度は、リスクアレルを有する健常者 iPS 細胞由来マクロファージ上清中で、リスクアレルを有さない健常者 iPS 細胞由来マクロファージ上清中よりも高かった (図 8、下段)(N = 1 vs. 1)。

〔まとめ〕

高安動脈炎は難治性疾患であり、新規治療法の開発が望まれている。著者らは、高安動脈炎の GWAS を行い、*IL12B* 遺伝子領域を見出し、それがコードする IL-12/23p40 分子に注目した。発症リスク型の SNP を有する患者において p40 の発現が亢進するという仮説を立てて、患者由来細胞および疾患特異的 iPS 細胞を用いて検証した。発症リスク型の SNP を有する患者由来マクロファージは、発症リスク型の SNP を有さない患者由来マクロファージに比べて有意に p40 産生能が高かった。IL-12p70 の産生能も、発症リスク型の SNP を有する高安動脈炎患者由来マクロファージが有意に高かった (data not shown)。一方、IL-23 産生能に差を認めなかった。Th1 サイトカインである IL-12p70 産生能が患者で高かったのは、高安動脈炎の病態が Th1 優位である可能性や、分化刺激段階で IFN- γ を添加したために Th1 の性質が強まった可能性が示唆された。次に、高安動脈炎の疾患特異的 iPS 細胞および健常者 iPS 細胞をマクロファージに誘導して機能を検討したところ、疾患特異的 iPS 細胞由来マクロファージにおいて、健常者 iPS 細胞由来マクロファージよりも、p40 産生能が高かった。IL-23 産生能も、疾患特異的 iPS 細胞由来マクロファージにおいて高かった。一方、IL-12p70 はいずれの細胞上清でも測定できなかった。我々はフローサイトメトリーで正しく単球への分化が起きていることを示したが、iPS 細胞から誘導したマクロファージでは何らかのエラーにより IL-12p70 を発現しなくなっている可能性も考えられた。なお、iPS 細胞を用いた実験は N = 1 で行ったため、今後、例数を増やして検証する必要がある。以上をまとめると、高安動脈炎患者において、発症リスク型 SNP の影響により、p40 産生能が高まり、ヘルパー T 細胞などが活性化され、血管炎病態を引き起こしている可能性が示唆された。今回得た結果は、p40 を標的とする高安動脈炎の新規治療薬開発につながりうる。

〔謝辞〕

本研究は、著者および京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学(現・田附会北野病院)の中島俊樹が中心的に行った。京都大学大学院医学研究科内科学講座代謝制御学の曾根正勝先生より疾患特異的 iPS 細胞を供与いただいた。京都大学 iPS 細胞研究所の長船健二先生からは健常人 iPS 細胞を供与いただいた。単球誘導法は京都大学大学院医学研究科小児科学の田中孝之先生に指導いただいた。この場を借りて深謝いたします。

〔参考文献〕

1. Langford CA, Cuthbertson D, Ytterberg SR, Khalidi N, Monach PA, Carette S, et al. A Randomized, Double-Blind Trial of Abatacept (CTLA-4Ig) for the Treatment of

図7. iPS細胞より分化した単球

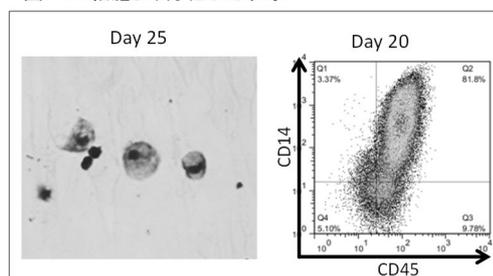


図8. iPS細胞由来マクロファージ上清p40濃度

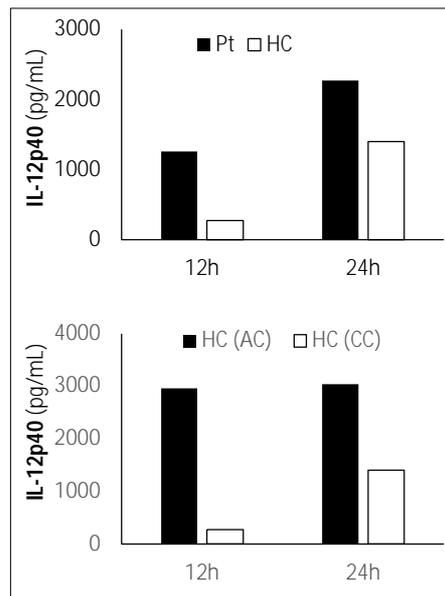
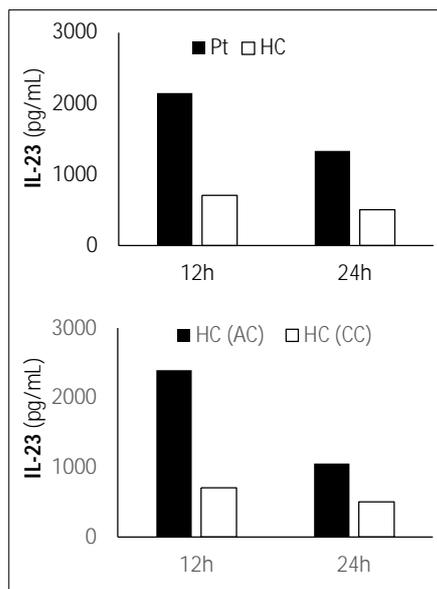


図9. iPS細胞由来マクロファージ上清IL-23濃度



- Takayasu Arteritis. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69:846-53.
2. Nakaoka Y, Isobe M, Takei S, Tanaka Y, Ishii T, Yokota S, et al. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with refractory Takayasu arteritis: results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial in Japan (the TAKT study). *Ann Rheum Dis.* 2018;77:348-54.
 3. Isobe M, Amano K, Arimura Y, Ishizu A, Ito S, Kaname S, et al. JCS 2017 Guideline on Management of Vasculitis Syndrome- Digest Version. *Circ J.* 2020;84:299-359.
 4. Terao C, Yoshifuji H, Kimura A, Matsumura T, Ohmura K, Takahashi M, et al. Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. *Am J Hum Genet.* 2013;93:289-97.
 5. Terao C, Yoshifuji H, Nakajima T, Yukawa N, Matsuda F, Mimori T. Ustekinumab as a therapeutic option for Takayasu arteritis: from genetic findings to clinical application. *Scand J Rheumatol.* 2016;45:80-2.
 6. Johnston A, Xing X, Swindell WR, Kochkodan J, Riblett M, Nair RP, et al. Susceptibility-associated genetic variation at IL12B enhances Th1 polarization in psoriasis. *Hum Mol Genet.* 2013;22:1807-15.
 7. Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Honda-Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, et al. Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell-free conditions. *PLoS One.* 2013;8:e59243.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Terao C, Yoshifuji H, Matsumura T, Naruse TK, Ishii T, Nakaoka Y, Kirino Y, Matsuo K, Origuchi T, Shimizu M, Maejima Y, Amiya E, Tamura N, Kawaguchi T, Takahashi M, Setoh K, Ohmura K, Watanabe R, Horita T, Atsumi T, Matsukura M, Miyata T, et al.	4. 巻 115
2. 論文標題 Genetic determinants and an epistasis of LILRA3 and HLA-B*52 in Takayasu arteritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 13045-13050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1808850115	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 Yoshifuji H	4. 巻 29
2. 論文標題 Pathophysiology of large vessel vasculitis and utility of interleukin-6 inhibition therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol	6. 最初と最後の頁 287-293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2018.1546358	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 Nakajima T, Yoshifuji H, Shimizu M, Kitagori K, Murakami K, Nakashima R, Imura Y, Tanaka M, Ohmura K, Matsuda F, Terao C, Mimori T.	4. 巻 19
2. 論文標題 A novel susceptibility locus in the IL12B region is associated with the pathophysiology of Takayasu arteritis through IL-12p40 and IL-12p70 production.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther	6. 最初と最後の頁 197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-017-1408-8	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉藤 元.
2. 発表標題 【教育講演3 血管炎】 ポリジーンから見た大型血管炎の病態と治療.
3. 学会等名 日本リウマチ学会中国・四国支部学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakajima T, Yoshifuji H, Terao C, Murakami K, Nakashima R, Imura Y, Ohmura K, Mimori T.
2. 発表標題 The SNP rs6871626 Located in IL12B Region may Influence on Vascular Lesions of Takayasu Arteritis.
3. 学会等名 欧州リウマチ学会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉藤 元
2. 発表標題 Genetic Backgrounds and Pathophysiology of Large Vessel Vasculitis.
3. 学会等名 日本循環器学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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