

令和 2 年 6 月 1 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：17K10243

研究課題名(和文) 疾患特異的iPS細胞を用いたブラウ症候群の病態解明と治療法開発

研究課題名(英文) Research into Blau syndrome using disease-specific iPS cells

研究代表者

川崎 ゆり (KAWASAKI, Yuri)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：70507079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：NOD2遺伝子の変異が原因によるブラウ症候群の病態を解明するため、患者から樹立した疾患特異的iPS細胞を用いて研究を行った。iPS細胞は、その特質を活かし責任細胞に分化させてRNAシーケンスの解析に用いた。その結果、患者サンプルで発現が変動する遺伝子があり、それはNOD2遺伝子に変異があると平常時でも炎症反応が活性化状態にあることを示唆するものであった。また、変異NOD2タンパク質の動態を明らかにするため、細胞内で3×FLAGを付加した変異NOD2タンパク質を過剰発現する系を構築した。3×FLAGを標識することで、変異NOD2タンパク質の細胞内での局在を観察することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブラウ症候群の患者から樹立した疾患特異的iPS細胞と、ブラウ症候群の患者から得られた血液細胞を元にしたRNAシーケンスの解析を行った。どちらの細胞からも同様に「ブラウ症候群の遺伝子変異があると、平常時でも炎症反応が活性化状態にあることが示唆される」という結果を得ることができた。これは、ブラウ症候群の研究に疾患特異的iPS細胞を用いることの有用性を支持するものである。難病に指定され、治療法も確立されていないブラウ症候群にとって、患者の貴重な血液を使用することなく、疾患特異的iPS細胞を用いて研究を推進できることは、病態の解明や治療法開発を進展させるのに意義のあることである。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the pathophysiology of Blau syndrome caused by NOD2 gene mutation, we conducted a study using disease-specific iPS cells established from patient. This iPS cells were differentiated into macrophages (iPS-MPs) by making full use of their properties, and used as samples of RNA sequencing. As a result, RNA sequencing analysis revealed distinct transcriptional profiles of mutant iPS-MPs. Interestingly, we noticed that inflammatory pathway were already upregulated in mutant iPS-MPs, even in the unstimulated state. In addition, to elucidate the kinetics of the mutant NOD2 protein, a system was constructed to overexpress the mutant NOD2 protein with 3×FLAG-tag. By labeling 3×FLAG-tag, intracellular localization of the mutant NOD2 protein was able to be visualized.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ブラウ症候群 NOD2 iPS細胞 IFN- 自己炎症性疾患 RNS-seq

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子変異が原因で発症する小児の難治性疾患は、「早期の確定診断」と「早期からの治療開始」が、根治に至らなくとも予後とQOLに大きく影響する。それは患児のみならず、患児を支える家族にとっても重要な問題である。

小児期に発症する難治性疾患の1つにブラウ症候群がある。ブラウ症候群は遺伝子変異が原因の自己炎症性疾患で、4歳以下で発症し、皮膚・関節・眼の肉芽腫症状を3主徴とする。病気の進行に伴い、関節症状は脱臼や関節拘縮をきたし、眼症状は失明に至る例もある。原因としてNucleotide-binding Oligomerization Domain 2 (*NOD2*)遺伝子の変異が同定されている。この変異は、機能獲得型の変異であるとされているが、なぜ皮膚・関節・眼において肉芽腫を形成するのかなど、その病態機序の多くは不明のままである。そして何より現時点においても確立した根本的な治療法はなく、治療は症例ごとの対症療法にとどまっているのが実情である。

我々の研究室では、疾患特異的 iPS 細胞を用いて、小児期に発症する難治性疾患の病態解析と治療法開発をテーマに研究を行っている。先天的に遺伝子変異が原因の疾患では、疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した病態の原因を作り出している責任細胞は、まさに疾患の特異的な表現型を細胞レベルで再現でき、病態を解明するのに非常に有用である。そこで、この疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究をブラウ症候群にも適用しようと考えた。

### 2. 研究の目的

以下の(1)、(2)の観点から病態の解明を行い、ブラウ症候群の治療法開発につなげることを目的とした。

(1) *NOD2* 遺伝子に変異がある細胞内で起こっているイベントを RNA シーケンスの結果から正常細胞と比較検討する。解析結果より、ブラウ症候群の疾患特異的な遺伝子発現の現象をとらえ、病態機序の解明に反映し、治療の標的となり得るポイントを探査する。

(2) 変異 *NOD2* タンパク質の細胞内での局在を時間的・空間的に観察し、形態学的な現象と、(1)の疾患特異的な遺伝子発現の結果とを照合して、病態の異常なメカニズムを考察する。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究には、ブラウ症候群の患者から樹立した「疾患特異的 iPS 細胞 (Blau2-R334W)」を用いた。ブラウ症候群の原因遺伝子 *NOD2* は主に単球・マクロファージで発現していることから、iPS 細胞の特質を活かし単球やマクロファージ(iPS-MP)に分化させた細胞を研究に用いた。コントロール細胞として、ブラウ症候群の疾患特異的 iPS 細胞をもとに遺伝子の変異部分を正常の遺伝子配列に戻した「遺伝子修復 iPS 細胞 (Blau2-corrected)」を用意した。更に「健康人由来 iPS 細胞 (201B7-WT)」も準備した。

一方、本研究に供されたブラウ症候群の患者5名からの血液は、まず末梢血単核球を密度勾配遠心法により分離した。更にそこから CD14 を発現している細胞を単球としてポジティブセレクションした後、マクロファージコロニー刺激因子存在下で1週間培養しマクロファージ様細胞として用いた。

iPS-MP 細胞そしてマクロファージ様細胞は、インターフェロン ( $\text{IFN-}\gamma$ ) あるいはムラミルジペプチド (MDP) で刺激した。なお、 $\text{IFN-}\gamma$  はブラウ症候群の肉芽腫組織の部分から高濃度に検出されるサイトカインであり、MDP は *NOD2* タンパク質のリガンドで炎症反応を誘発する細菌の菌体成分である。刺激した細胞をサンプルとして RNA シーケンスを実施した。結果は、主成分分析 (Principal Component Analysis; PCA)、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 解析や遺伝子発現量の比較等を実施して、遺伝子変異特異的、刺激特異的、そして患者が受けている治療内容の違いによって発現が変動する遺伝子を抽出した。

(2) 変異 *NOD2* タンパク質の細胞内での局在を時間的・空間的に追跡するため、N 末に 3×FLAG-tag を付加した変異 *NOD2* タンパク質を過剰発現する系を構築した。

開始コドン直後に 3×FLAG-tag の塩基配列を挿入した変異 *NOD2* 遺伝子はレンチウイルスベクターで構築し、HEK293T 細胞に形質導入した。タンパク質としての発現は、抗 FLAG 抗体を用いてウエスタンブロッティングで確認した。HEK293T 細胞内での局在を見るためには、同じく抗 FLAG 抗体を用いて間接蛍光免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

(1) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた RNA シーケンスの結果より、PCA プロット(図1)、GSEA 解析や遺伝子発現量の比較等を実施して、変異 *NOD2* 遺伝子をもつ細胞内で起こっている遺伝子発現の特異的な経路を探査し、遺伝子変異に関連し動きのある遺伝子群を特定した。また、刺激特異的・遺伝子変異特異的に発現が変動する遺伝子を抽出することができた。更に RNA シーケンスの解析結果より、「*NOD2* 遺伝子に変異があると、平常時でも炎症反応が活性化状態ある

ことを示唆する」結果も得られた。これは、ブラウ症候群の患者の定常状態を示すものであり、病態を理解する上で参考になる情報である。

一方、ブラウ症候群の患者5名の末梢血を元にしたRNAシーケンスの結果も同様に解析することができた。いくつかの興味深い情報を得ることができたが、中でも「*NOD2* 遺伝子に変異があると、平常時でも炎症反応が活性化状態にあることを示唆する」という解析結果は、疾患特異的 iPS 細胞を用いて得られた結果と一致するものであった。このことは、疾患特異的 iPS 細胞を責任細胞(ここではマクロファージ)に分化させてブラウ症候群の研究に用いることは、有用であることを支持する結果となった。他にも、患者が受けている治療内容を反映するような情報も得られた。これは病態の解明と治療の効果を結びつける可能性が考えられる。入手に制限のある患者血液に代わって、疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究結果を組み合わせることで、今後の更なる発展させた研究結果が期待できる。

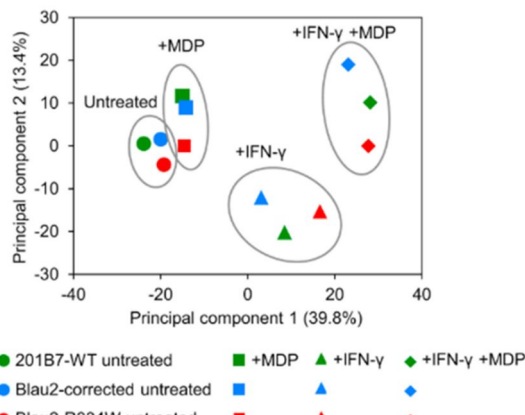


図1 RNA-seqによるサンプル間の主成分分析

(2) 3×FLAG-tag 付き変異 *NOD2* タンパク質の発現は、ウェスタンブロッティングで目的のサイズとして確認できた。また、タンパク質の発現量も十分であった。次に、HEK293T細胞に形質導入した 3×FLAG-tag 付き変異 *NOD2* タンパク質(赤色)の免疫細胞染色の結果を図2に示した。対比染色として、核は青色、NF-κB p65 を緑色で染色した。図2は、MDPを作用させてから30分後の画像である。赤色で染め出された変異 *NOD2* タンパク質は、細胞膜に位置し、特に仮足の部分には集合している様子がうかがえる画像であった。この結果より、構築した過剰発現系のベクターは、変異 *NOD2* タンパク質の細胞内での局在を調べるのに機能し、動態を解析するのに役立つことが期待できる。今後は、本来 *NOD2* タンパク質が発現している単球やマクロファージ系の細胞に形質導入し、より生理的に近い条件で変異 *NOD2* タンパク質が細胞内での部分に位置し、どのようにふるまうのかを正常 *NOD2* タンパク質と比較検討することによって明らかにしていきたいと考えている。

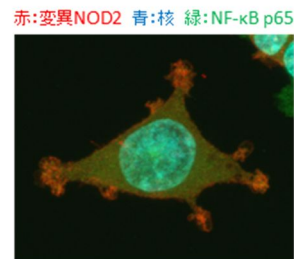


図2 蛍光標識による免疫細胞染色

<引用文献>

Takada, S., Kambe, N., Kawasaki, Y., Niwa, A., Honda-Ozaki, F., Kobayashi, K., et al. (2018). Pluripotent stem cell models of Blau syndrome reveal an IFN-γ-dependent inflammatory response in macrophages. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1), 339-349.e11. doi:S0091-6749(17)30685-1

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takada Sanami, Kambe Naotomo, Kawasaki Yuri, Niwa Akira, Honda-Ozaki Fumiko, Kobayashi Kazuki, Osawa Mitsujiro, Nagahashi Ayako, Semi Katsunori, Hotta Akitsu, Asaka Isao, Yamada Yasuhiro, Nishikomori Ryuta, Heike Toshio, Matsue Hiroyuki, Nakahata Tatsutoshi, Saito Megumu K.	4. 巻 141
2. 論文標題 Pluripotent stem cell models of Blau syndrome reveal an IFN- $\gamma$ -dependent inflammatory response in macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J ALLERGY CLIN IMMUNOL	6. 最初と最後の頁 339 ~ 349.e11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2017.04.013	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Y. Kawasaki, S. Takada, N. Kambe, R. Nishikomori, T. Nakahata, M. K. Saito
2. 発表標題 Pluripotent stem cell models of Blau syndrome reveal an IFN- $\gamma$ -dependent inflammatory response in macrophages
3. 学会等名 24th European Paediatric Rheumatology Congress (国際学会)
4. 発表年 2017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
連携研究者	齋藤 潤  (Saito Megumu)  (90535486)	京都大学・iPS細胞研究所・准教授    (14301)	