

令和元年5月28日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16255

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた家族性地中海熱の診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnosis and treatment approaches for Familial Mediterranean Fever using iPS cells

研究代表者

田中 孝之(Tanaka, Takayuki)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：20625678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：患者検体を用いた実験から、家族性地中海熱(FMF)患者の単球とマクロファージはIL-1bの分泌において表現型が異なることを明らかにした。患者単球からのIL-1b分泌はコルヒチンにより抑制されない一方、患者マクロファージからのIL-1b分泌はコルヒチンにより抑制された。また患者マクロファージは、健常者より多くのIL-1bを分泌した。次に患者iPS細胞よりマクロファージを作製し、末梢血由来マクロファージの表現型を再現した。最後に疾患原性が不明のMEFV変異を発現した遺伝子改変マクロファージを作製し、IL-1b分泌亢進の有無を評価した。これにより、種々のMEFV変異を評価する土台を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MEFV変異は300近く同定されているが、これまでは患者数の多い変異でしか5つしかFMF発症との関連が証明されていなかった。本研究では日本の2家系で同定されているN679Hが新たにFMF発症と関連があることを証明した。われわれが開発した方法を用いることにより、疾患原性の有無が不明なMEFV変異がFMF発症に寄与しているかどうかを明らかにすることができる。これまでは疾患原性が不明な患者ではコルヒチン試験投与への反応性でFMFかどうかの診断がなされていたが、将来的には遺伝子変異が同定された時点でFMFかどうか診断される症例が増えることが予想される。

研究成果の概要(英文)：Through experiments with patient-derived samples, we revealed that monocytes and macrophages derived from Familial Mediterranean Fever (FMF) patients show distinctive phenotypes. While colchicine failed to inhibit IL-1b secretion from patients' monocytes, it inhibited IL-1b secretion from patients' macrophages. In addition, patients' macrophages secreted higher levels of IL-1b than controls. We next obtained macrophages from patient-derived iPS cells, and found that they recapitulated the characteristics of peripheral blood-derived macrophages. Finally, we established genetically-engineered macrophages that expressed MEFV variants with undetermined pathogenicity, and evaluated the presence or absence of IL-1b hypersecretion. By this approach, we established the platform to evaluate various MEFV variants.

研究分野：iPS細胞を用いた免疫疾患の病態解明

キーワード：家族性地中海熱 サイトカイン iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

家族性地中海熱(Familial Mediterranean Fever: FMF)は pyrin タンパクをコードする *MEFV* 遺伝子の変異により、pyrin インフラマソーム活性化が亢進し、炎症性サイトカイン IL-1 β が過剰分泌されて炎症症状を生じる自己炎症性疾患である。患者は若年期から周期的な発作を呈し、発作期には発熱、腹膜炎、胸膜炎、関節炎などの症状が見られる。地中海沿岸地方に患者が多いが、日本でも 500 名程度の患者の存在が推定される。Tel Hashomere 基準にしたがい臨床症状に基づいて診断される。個々の症状は非特異的なため診断が困難な場合には、補助として遺伝子検査が行われるが、国際的データベース([Infevers](#))に 2018 年現在、340 種類もの *MEFV* 変異が登録されていて、同定された *MEFV* 変異の解釈が困難な場合がある。その理由として E148Q 変異のように FMF 患者でも認められるが、健常者の 20% 以上にも認められ SNP とも考えられる *MEFV* 変異もある。このため遺伝子検査結果を行っても診断が確定しない患者もあり、臨床の現場で混乱が続いている。

この問題を解決するため、FMF 患者の血球にはどんな機能異常を解明する試みが行われてきているが、どういった表現型が見られるかは controversial であった。原因の一つとして報告ごとに対象として使用する細胞が PBMC、単球、単球由来マクロファージ(MP)と異なっており、結果として FMF 典型例の患者血球がサイトカインを過剰分泌するかしらないか、あるいは有効な治療薬であるコルヒチンがサイトカイン分泌を抑制するかしらないか、といった重要な点で結果に一貫性がなく、診断に応用できる安定した評価系が確立されていなかった。

2. 研究の目的

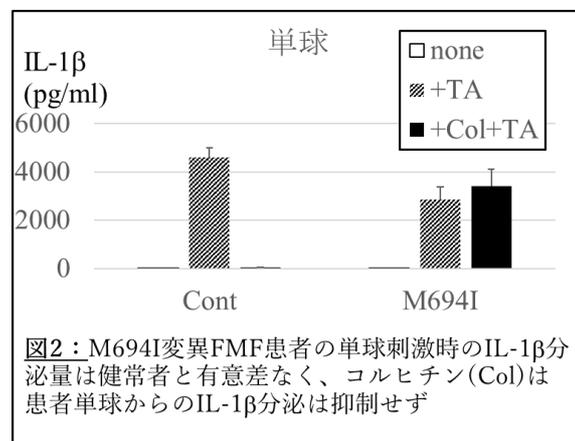
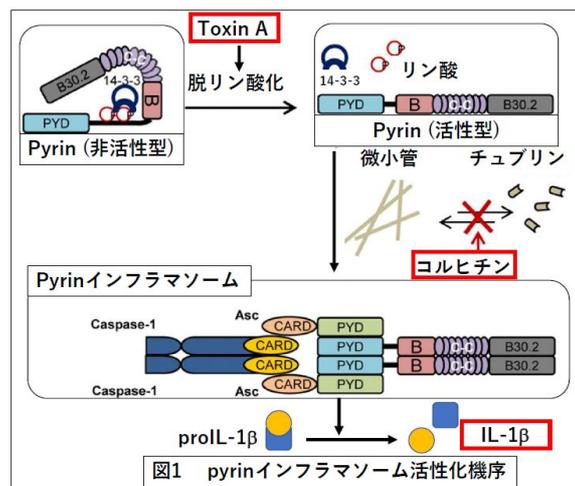
本研究の第一の目的として、FMF 患者単球と単球由来 MP がサイトカイン分泌能において健常者とどのように異なっているかを比較することとした。

第二の目的として、患者 iPS 細胞由来 MP が末梢血 MP の表現型を再現するかを明らかにすることとした。

第三の目的として、iPS 細胞由来 MP の系を用いることで、疾患の原因としての意義がはっきりしていない *MEFV* 変異の機能評価を行うこととした。

3. 研究の方法

本研究では pyrin インフラマソームの活性化刺激として細菌性毒素の Clostridium Difficile Toxin A、阻害剤として微小管阻害剤のコルヒチンを用い、活性化の指標として IL-1 β を測定した(図 1)。第一の実験では FMF 患者より採取した単球および単球由来マクロファージを使用した。第二の実験では FMF 患者 iPS 細胞から分化させた MP を使用した。第三の実験では、日本国内の自己炎症性疾患が疑われる家系から同定された *MEFV* 変異の N679H を健常者 iPS 細胞へ発現させた、iPS-MP を使用した。



4. 研究成果

FMF 患者単球からの IL-1 β 分泌量は健常者と差がない一方、患者単球はコルヒチンにより IL-1 β 分泌が抑制されず、臨床的な表現型と合致しなかった(図 2)。一方、単球由来 MP は IL-1 β 分泌亢進、コルヒチンによる抑制を示し、臨床症状と合致した(図 3)。さらに、外来性に *MEFV* を発現させた iPS 細胞由来 MP でも、WT に比べ M694I で IL-1 β 分泌亢進を認めた(図 4)。この実験系で典型的な FMF の症状を示す患者 1 家系 2 人で認められた N679H 変異を発現させた MP でも IL-1 β 分泌が亢進し、N679H 変異が FMF 発症の原因となることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

現在、Journal of Allergy and Clinical Immunology 社へ投稿後、revise 対応中である。

〔学会発表〕(計 8 件)

2018 年

第 26 回近畿小児リウマチ・膠原病研究会

MEFV 遺伝子の多様な variants に対する疾患関連評価系の検討

芝剛 1 田中孝之 1 西小森隆太 1 井田弘明 2 柴田洋史 1 井澤和司 1 河合朋樹 1
八角高裕 1 齋藤潤 3 平家俊男 1,4

2018 年

第 121 回日本小児科学会学術集会

患者由来 iPS 細胞を用いた家族性地中海熱の病態解明

田中孝之 1 西小森隆太 1 井田弘明 2 柴田洋史 1 井澤和司 1 河合朋樹 1 八角高裕 1
齋藤潤 3 平家俊男 1,4

2018 年

第 28 回日本小児リウマチ学会総会・学術集会

意義不明な MEFV 遺伝子の変異/SNP が疾患発症に関連するかの評価系の検討

田中孝之 1 芝剛 1 西小森隆太 1 井田弘明 2 柴田洋史 1 井澤和司 1 八角高裕 1 齋藤潤 3 平家俊男 1,4

2018 年

18TH BIENNIAL MEETING OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR IMMUNODEFICIENCIES (国際学会)

DISEASE-ASSOCIATED MONOCYTE/MACROPHAGE SPECIFIC CYTOKINE SECRETION PATTERNS IN FMF PATIENTS

T. Shiba1, T. Tanaka1, H. Shibata1, K. Izawa1, T. Yasumi1, R. Nshikomori1, M. Saito2, H. Ida3, T. Heike4

2019 年

第 2 回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会

MEFV 遺伝子の多様な variants に対する疾患関連評価系の確立

芝剛 1 田中孝之 1 西小森隆太 1 井田弘明 2 柴田洋史 1 井澤和司 1 八角高裕 1 齋藤潤 3 平家俊男 1,4 滝田順子 1

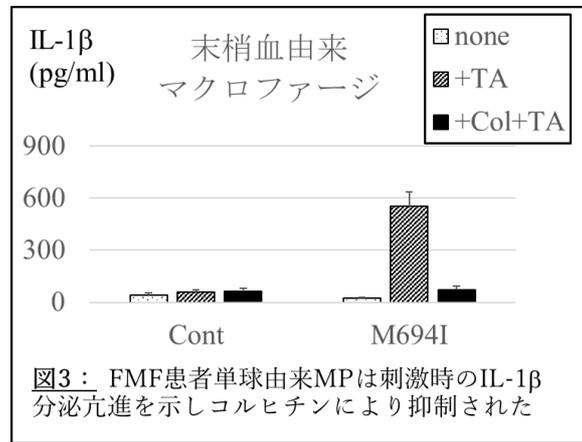


図3: FMF患者単球由来MPは刺激時のIL-1 β 分泌亢進を示しコルヒチンにより抑制された

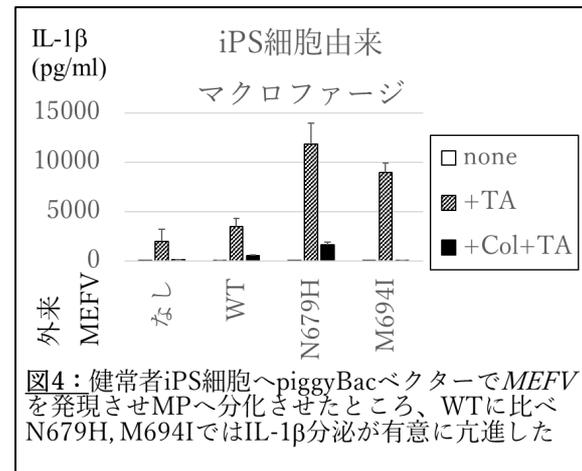


図4: 健常者iPS細胞へpiggyBacベクターで*MEFV*を発現させMPへ分化させたところ、WTに比べN679H, M694IではIL-1 β 分泌が有意に亢進した

2019 年
10th Biannual Meeting of the International Society of Systemic Auto-Inflammatory Diseases
(国際学会)
Differential activation of the pyrin inflammasome in monocytes and macrophages predicts
the pathological significance of MEFV variants in familial Mediterranean fever (FMF)
patients

2019 年
Takeshi Shiba¹, T. Tanaka¹, H. Ida², M. Watanabe¹, H. Nakaseko⁴, M. Osawa⁵, H. Shibata¹,
K. Izawa¹, T. Yasumi¹, Y. Kawasaki⁵, M. K.Saito⁵, J. Takita¹, T. Heike⁶, R. Nishikomori¹
第 63 回日本リウマチ学会総会・学術集会
MEFV 遺伝子の多様な塩基置換と FMF 発症との関連をサイトカイン分泌の指標で評価する系の確
立
田中孝之¹ 芝剛¹ 西小森隆太² 井田弘明³ 柴田洋史¹ 井澤和司¹ 八角高裕¹

2019 年
第 122 回日本小児科学会学術集会
MEFV 遺伝子の多様な変異に対する疾患関連評価系の確立
芝剛¹ 田中孝之¹ 西小森隆太² 井田弘明³ 柴田洋史¹ 井澤和司¹ 八角高裕¹ 齋
藤潤⁴ 平家俊男^{1,5} 滝田順子¹

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：西小森隆太
ローマ字氏名：Ryuta Nishikomori

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。