

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006 ~ 2008

課題番号：18590524

研究課題名 (和文) 自己炎症性疾患の臨床分子免疫病理学的研究

研究課題名 (英文) Clinicoimmunopathological study on autoinflammatory syndrome

研究代表者

増本 純也 (MASUMOTO JUNYA)

信州大学・医学部・講師

研究者番号：20334914

研究成果の概要：細胞内病原体受容体の NOD 蛋白質の変異による自己炎症性疾患の病態を解析することで、炎症を制御するインフラマソームの機能を詳細に描き出すことができ、その制御の異常によって自己炎症性疾患が発症することが裏付けられた。今回の研究でインフラマソームの果たす炎症制御への役割が類推できたことで、炎症性疾患の予防や治療への応用が可能になると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	510,000	3,910,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床, 免疫, 病理, 細菌, シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

生物には、抗原特異的な免疫応答を司る獲得免疫系以外に、抗原非特異的な初期免疫応答を司る自然免疫系と呼ばれる機構が存在する。ほ乳類では、細胞表面の Toll-like receptor (TLR) が 10 種類報告され、それぞれは、細菌の構成成分である LPS (リポポリサッカライド) や、鞭毛のフラジェリン、CpGDNA など、細菌に特有の構造を瞬時に把握し、炎症反応という初期免疫応答を惹起し、獲得免疫への橋渡しを行っている。一方、細胞内では NOD ファミリー蛋白質 (NODs) と呼ばれる一連の分子群が、病原体の小さな構成成分に対するセンサーとして働いている (図 1, 2)。NODs

の認識する細菌構成成分は、それぞれに特異性がある。細菌細胞壁を構成するペプチドグリカンの側鎖構造である MDP (ムラミルジペプチド) が Nod2 に認識され、iEDAP (ジアミノピメリン酸誘導体) が Nod1 に認識される (図 2, 3)。さらに、グローバルな視点から言えば、ミトコンドリア内膜に存在する、電子伝達系蛋白質チトクローム c は、ミトコンドリアがストレスを受けた際、細胞質に流出し、NODs の一つである Apaf-1 に認識され、Caspase-9 の多量体化による活性化によって内因性アポトーシス (細胞死) を誘導する (図 1)。ミトコンドリアが古代細菌の末裔で、真核生物との共生の結果、現在の形に進化し

たとすれば、太古の昔より保存されてきた極めて原始的ながら、驚くべき分子機構であると言える。

これらの NODs の発見は、原因不明とされてきた難病に解明の糸口を与えた。とりわけ、最近提唱されている『自己炎症性疾患』が、NODs のシグナル伝達制御の異常によることが報告されたことで、急速にその発症メカニズムが明らかにされてきている。例えば、Nod2 の細菌構成成分の認識部位のアミノ酸変異が、炎症性腸疾患である Crohn 病の原因の一つであったこと、Nod2 の多量体化を制御するドメインの変異が、肉芽腫形成性疾患である Blau 症候群や、若年性サルコイドーシスの原因であったこと、同様に、Cryopyrin のアミノ酸変異が、全身性慢性炎症症候群の原因であったこと、Pyrin の変異が、家族性地中海熱の原因であったことなど、診断と治療方針の決定に重要な発見が相次いだ(図 4)。このように NODs は特定のリガンド(菌体成分)を認識し、結合した下流実行分子を近接活性化させるという機能を持つ。この機構に異常がみられると炎症疾患を発症する場合のあることが知られてきている。

2. 研究の目的

本研究では、未だ原因の特定されていない炎症疾患の原因が NODs の異常によるという仮説を検証する。第 1 に非常に解析のしやすい遺伝子変異を解析する。第 2 に発現の制御の異常を解析する。第 3 に血中の NODs 特異的リガンドに起因する異常を解析する。第 4 にシグナル伝達制御に起因する異常を解析するという基本姿勢で、実験を行い、最終目標として、原因不明の炎症性難病いくつかの原因は NODs-ASC シグナル伝達系にあるという仮説を立証することを目的とする。NODs 蛋白質の解析を終え、自己炎症性疾患を含む炎症性難病に付随する抗核抗体の意義や、サイトカイン産生の意義を明らかにし、検査による診断基準への新たな提言や治療方針への提言をも将来的な目標とするものとする。

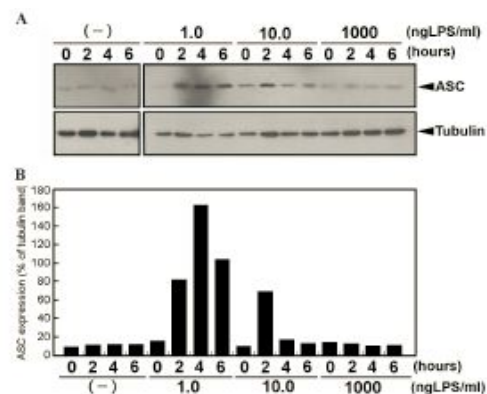
3. 研究の方法

原因不明の炎症性疾患の臨床検体から DNA を抽出し、NOD 遺伝子のシーケンスを行う。得られた変異の NOD の機能解析を細胞レベル、個体レベルで行う。

4. 研究成果

比較的切除標本の得やすい『クローン病』の患者の生検材料、手術材料を使ったサイトカインアッセイを行った。切除された『クローン病』発症消化管粘膜、あるいは大腸癌の非癌部の正常粘膜を、短時間各種濃度の細菌構成成分と培養し、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF

α 、IFN γ を経時的に測定した。また、Western blot 法によって ASC の定量を経時的に行った。その結果、グラム陰性細菌の莢膜のリポ多糖(LPS)に対して、正常粘膜は容量依存的に IL-8、TNF α を産生し、10ngLPS/ml 程度で極大を迎え、10ngLPS/ml 以上の濃度では逆にサイトカインの産生が抑えられた。これは、病原細菌に対する過剰な反応が、正常粘膜では制御され、自身の組織破壊を防ぐように働くということで説明できる。一方、『クローン病』発症消化管粘膜では、無刺激でも相当量の IL-8、TNF α の産生が見られ、10ngLPS/ml を超える濃度でも抑制が見られなかった。予想外なことに消化管粘膜からの IL-1 β 、IFN γ の産生は検出感度以下であった(図 1)。



Masumoto et al. Fig.1

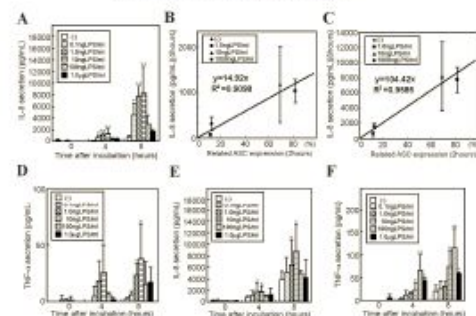


図 1. クローン病発症消化管粘膜でのサイトカイン産生の変化

原因不明の肉芽腫形成性疾患患者の組織サンプルから抽出した DNA の解析をおこなった。転写産物に変化のみられないサイレント変異がいくつかの症例でみられたが、それが病態に関係しているのか不明なままであった。

自己炎症性疾患の一つであるマックル・ウェルズ症候群(MWS)と診断され、信州大学医学部附属病院に治療のため入院した患者から分離した単核球を、IL-1 β レセプター拮抗薬のアナキニラによる治療の前後で、短時間各種濃度のグラム陰性細菌の莢膜のリポ多糖(LPS)や細胞壁の構成成分であるムラミルジペプチド(MDP)などの細菌構成成分を加えて

培養し、上清中の IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , IFN γ 濃度を経時的に測定した。その結果、病態の理解に迫る新しい発見があった。健康なボランティアの3人から分離した単核球は、IL-1 β , TNF α の分泌は通常ほとんどないが、MWS の患者から分離した単核球は IL-1 β の産生が亢進しており、LPS や MDP の刺激に対して過剰な分泌を示した。驚いたことに TNF α の産生は低値のままで、LPS や MDP の刺激に対してもほとんど変化が認められなかった。アナキソラによる治療を開始後、IL-1 β の産生は速やかに低下し、LPS や MDP の刺激に対する反応はコントロールとほぼ変わらないパターンになった。一方で、TNF α の分泌は低値で、LPS や MDP の刺激に対しても反応は見られず低値のままであった。このことは、MWS において、原因遺伝子産物の NOD 蛋白質である cryopyrin を含むシグナル伝達複合体のインフラゾームが活性化したままの状態であることを間接的に示している。しかし、IL-1 β の過剰発現がみられなくなったことから、アナキソラの作用機序が IL-1 β レセプターそのものだけでなく、インフラゾームにも及んでいる可能性も考えられた。IFN γ の産生は検出感度以下であった。(図2)

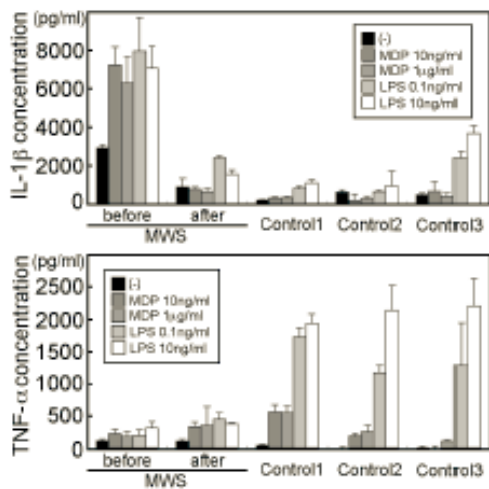


図2. Muckle-wells 症候群患者の末梢血単核球からのサイトカイン産生パターンの変化

自己炎症性疾患の一つである Blau 症候群 (BS) と診断され、信州大学医学部附属病院に治療のため入院した患者から分離した単核球を、短時間各種濃度のグラム陰性細菌の莢膜のリポ多糖 (LPS) や細胞壁の構成成分であるムラミルジペプチド (MDP) などの細菌構成成分を加えて培養し、上清中の IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , IFN γ 濃度を経時的に測定した。その結果、病態の理解に迫る新しい発見があった。健康なボランティアの2人から分離した単核球は、IL-1 β , TNF α の分泌に異常は

ほとんどないが、BS の患者から分離した単核球は IL-1 β の産生において TLR シグナルと NLR シグナルの相乗効果の欠落が見られた。(図3)

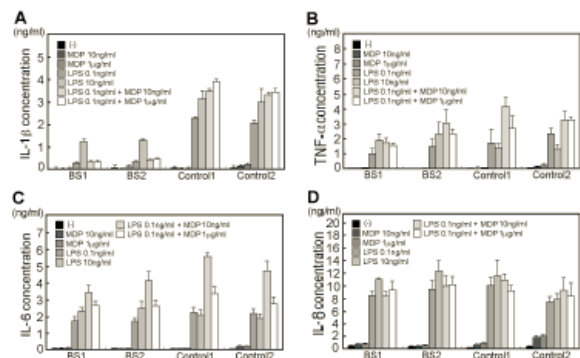


図3. Blau 症候群患者の末梢血単核球からのサイトカイン産生パターンの変化

今後はこれらの知見によりインフラゾームによる炎症制御機構に果たす役割の重要性が示唆されたので、生化学的手法による機能解析を進め、治療への応用を考えていきたい。

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13件)

①著者: Masumoto J, Yamazaki T, Ohta K, Nakayama J, Agematsu K

題名: Interleukin-1 β suppression in Nod2-defect Blau syndrome

雑誌名: Arthritis and Rheumatism

巻号年頁: 印刷中 2009年 査読有

②著者: Kobayashi M, Hoshino H, Masumoto J, Fukushima M, Suzawa K, 他

題名: GlcNAc6ST-1-mediated decoration of MAdCAM-1 protein with L-selectin ligand carbohydrates directs disease activity of ulcerative colitis

雑誌名: Inflammatory Bowel Disease

巻号年頁: 15巻・5号 2009年 697-706 頁

査読有

③著者: Yajima N, Takahashi M, Morimoto H, Shiba Y, Takahashi Y, Masumoto J 他

題名: Critical role of bone marrow apoptosis-associated speck-like protein, an inflammasome adaptor molecule, in neointimal formation after vascular injury in mice

雑誌名: Circulation

巻号年頁: 117巻・号 2008年 3079-3087 頁

査読有

④著者：増本純也，長谷川瑞穂，猪原直弘
題名：Nod2 と Crohn 病
雑誌名：炎症と免疫
巻号年頁：16 巻・5 号 2008 年 592-593 頁
査読無

⑤著者：山崎崇志，増本純也，上松一永
題名：家族性地中海熱の分子メカニズムと臨床像
雑誌名：日本小児科学会誌
巻号年頁：112 巻・号 2008 年 1358-1368 頁
査読無

⑥著者：増本純也，篠崎康治，上松一永
題名：家族性地中海熱の分子病態
雑誌名：炎症と免疫
巻号年頁：16 巻・2 号 2008 年 149-157 頁
査読無

⑦著者：増本純也，長谷川瑞穂，猪原直弘
題名：Nod-like receptor の機能から考える「自己炎症性疾患」の分子病態
雑誌名：小児リウマチ
巻号年頁：1 巻・1 号 2008 年 51-56 頁
査読無

⑧著者：Yamazaki T, Masumoto J, Agematsu K, Sawai N, Kobayashi S 他.
題名：Anakinra improves sensory deafness in a Japanese patient with Muckle-Wells syndrome, possibly by inhibiting the cryopyrin inflammasome.
雑誌名：Arthritis and Rheumatism
巻号年頁：58 巻・3 号 2008 年 864-868 頁
査読有

⑨著者：Kobayashi T, Masumoto J, Tada T, Hongo K, Nomiyama K, Nakayama J 題名：Prognostic significance of the immunohistochemical staining of cleaved-caspase-3, an activated form of caspase-3, in gliomas
雑誌名：Clinical Cancer Research 13 巻・13 号 2007 年 3868-3874 頁 査読有

⑩著者：Masumoto J, Hasegawa M, Inohara N.
題名：The molecular mechanism of autoinflammatory disease-lessons from the function of NOD protein families-
雑誌名：Japanese Journal of Clinical Immunology 30 巻・2 号 2007 年 68-77 頁
査読有

⑪著者：Masumoto J, Kobayashi H, Nakamura T, Kaneko Y, Ota H, 他.
題名：Regulation of the ASC expression in

response to LPS stimulation is related to IL-8 secretion in the human intestinal mucosa
雑誌名：Biochemical and Biophysical Research Communications
巻号年頁：346 巻・3 号 2006 年 968-973 頁
査読有

⑫著者：Masumoto J, Yang K, Varambally S, Hasegawa M, Tomlins SA, Qiu S 他.
題名：Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo
雑誌名：Journal of Experimental Medicine
巻号年頁：203 巻・1 号 2006 年 203-213 頁
査読有

⑬著者：Ozoren N, Masumoto J, Franchi L, Kanneganti TD, Body-Malapel M 他.
題名：Distinct Roles of TLR2 and the Adaptor ASC in IL-1 β /IL-18 Secretion in Response to Listeria monocytogenes
雑誌名：Journal of Immunology 176 巻・7 号 2006 年 4337-4342 頁 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

①発表者名：増本純也，山崎崇志，重村倫成，上松一永，小池健一
演題名：アナキンラはインフラマゾームを阻害してマックルウェルズ症候群患者の感音性難聴を改善した
発表場所：社団法人日本薬学会第 128 年会(横浜)
2008 年 3 月 26 日-28 日 パシフィコ横浜

②発表者名：柏倉隆一，増本純也，宮崎祐子，下條康代，小林幸弘，本田孝行，中山淳演
題名：肺扁平上皮癌におけるクライオパイリンの発現
発表場所：社団法人日本薬学会第 128 年会(横浜)
2008 年 3 月 26 日-28 日 パシフィコ横浜

③発表者名：Masumoto J, Nakayama J
演題名：Application of immunohistochemistry for study of ASC-related molecules in diseases (Invited speaker)
発表場所：第 48 回日本組織細胞化学会総会(第 8 回日中合同組織細胞化学セミナー)/第 39 回日本臨床分子形態学会総会 2007 年 9 月 28 日-29 日 山梨県甲府市総合市民会館

④発表者名：増本純也
演題名：細胞内菌体受容体 NOD と炎症性疾患の解析(学会賞受賞講演)

発表場所：第 53 回日本臨床検査医学会学術集会(弘前;弘前市民会館・弘前文化センター・ホテルニューキャッスル) 2006 年 11 月 9 日

⑤発表者名：増本純也，山崎崇志，上松一永，佐野健司，勝山努

演題名：マックル-ウェルズ症候群(MWS)と末梢血単核球免疫応答

発表場所：第 53 回日本臨床検査医学会学術集会(弘前;弘前市民会館・弘前文化センター・ホテルニューキャッスル) 2006 年 11 月 9 日

⑥発表者名：山崎崇志、重村倫成、小池健一、上松一永、増本純也、安井耕三、澤井信邦、小林真二

演題名：3) Muckle-Wells 症候群の 1 女児例

発表場所：第 16 回日本小児リウマチ学会総会・学術総会(松本; 信州大学旭研究棟) 2006 年 10 月 6 日

⑦発表者名：増本純也

演題名：NOD 蛋白質の機能から考える「自己炎症疾患」発症の分子メカニズム

発表場所：第 16 回日本小児リウマチ学会総会・学術総会(松本; 信州大学旭研究棟) 2006 年 10 月 6 日

⑧発表者名：Masumoto J, Yang K, Varambally S, Hasegawa M, Tomlins SA 他

演題名：Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo

発表場所：20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 2006 年 6 月 18 日

⑨発表者名：増本純也、太田浩良、佐野健司、勝山努

演題名：クローン病消化管粘膜からの_異常な IL-8 と TNF- α の産生

発表場所：第 95 回日本病理学会総会(新宿; 京王プラザホテル) 2006 年 4 月 30 日

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増本 純也(MASUMOTO JUNYA)

信州大学・医学部・講師

研究者番号：20334914

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし