

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08784

研究課題名(和文)自己炎症的機序を端緒とした肉芽腫形成の分子機構解明

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanism of granuloma formation by autoinflammation

研究代表者

神戸 直智 (Kambe, Naotomo)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50335254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肉芽腫形成のメカニズムには不明な点が多く、特異的治療法も確立していない。我々はNOD2遺伝子の機能獲得型変異により自己炎症的機序から皮膚・関節・眼に肉芽腫を形成する単一遺伝子病であるブラウ症候群を肉芽腫形成のモデルとして、患者由来iPS細胞を樹立するなど独自の手法を用いて成果を報告してきた。しかしながら、遺伝子や蛋白発現の網羅解析では健常者との間に差異を明らかにできず、ブラウ症候群を特徴づける肉芽腫形成の病態解析の端緒を見出せずにきた。これに対して、翻訳後修飾の1つであるリン酸化に着目した解析から、現在解析を進めている分子Aの免疫調整機構を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肉芽腫形成のメカニズムには不明な点が多く、特異的治療法も確立していない。皮膚・関節・眼に肉芽腫を形成する単一遺伝子病であるブラウ症候群は、国内での報告例が50例程度の希少疾患であるが、NOD2遺伝子の機能獲得型変異により自己炎症的機序から肉芽腫を形成する疾患であることから、肉芽腫形成のメカニズムを解明する上でのモデルとして適している。本研究において、タンパク翻訳後修飾の1つであるリン酸化に着目した解析から、分子Aを同定した。この分子A自身も翻訳後修飾に関わる分子であり、肉芽腫形成のメカニズムに翻訳後修飾が関わっている可能性という新たな病態解明の糸口が見出された。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of granuloma formation remains unclear, and no specific treatment has been established. We have studied Blau syndrome, a single gene disease, as a model for granuloma formation. Blau syndrome is a disease in which a gain-of-function mutation in the NOD2 gene causes granuloma formation in the skin, joints, and eyes through an autoinflammatory mechanism. We have reported the results of our original method, including the establishment of patient-derived iPS cells. However, comprehensive analysis of gene and protein expression did not reveal any differences between Blau syndrome and healthy controls, and no clue to the pathological analysis of granuloma formation, which characterizes Blau syndrome, has been found. In contrast, the analysis focusing on phosphorylation, a post-translational modification, has allowed us to identify the immunoregulatory mechanism of Molecule A, which is currently being analyzed.

研究分野：皮膚科学

キーワード：肉芽腫 iPS細胞 ブラウ症候群

## 1. 研究開始当初の背景

我々は臨床での患者との出会いを契機として、細胞内パターン認識受容体である NOD2 遺伝子に変異を有し、皮膚と関節、眼に自己炎症的機序から肉芽腫をきたすブラウ症候群 (指定難病 110) の解析に従事してきた。これまでの解析から、同じ NOD2 遺伝子に変異を有し消化管に肉芽腫を形成するクローン病とは異なり、ブラウ症候群での変異は分子重合化に関わる中央部の NOD 領域に位置し、遺伝子の過剰発現系で NF- $\kappa$ B の転写活性を指標として解析すると、リガンドである MDP の非存在下でも自発的な転写亢進が確認される機能獲得型の変異と考えられてきた。しかし、発熱などを指標として活動期を評価できる炎症性疾患 (例えば、我々がブラウ症候群の解析に平行して進めてきた *NLRP3* 遺伝子の変異を背景としたクリオピリン関連周期熱症候群, CAPS) に比して、病勢の結果をみているに過ぎないのかもしれない肉芽腫の解析は、今がアクティブであるというタイミングを捉えることが難しいためか、患者検体を用いての解析では健常者から得た検体との間に差異のある現象を見出すことができず、病態解明の端緒となる事象を捕まえることができていなかった。

この状況を打破するために我々は、京都大学 iPS 研究所との共同研究として患者由来 iPS 細胞を樹立し、その機能解析に着手した。その結果、iPS 細胞から分化誘導した単球に IFN $\gamma$  を添加することで NOD2 の発現が増強し、この条件ではじめて遺伝子発現系での解析同様に、変異 NOD2 をもつ細胞が NF- $\kappa$ B の転写亢進や、その結果としてのサイトカインの産生亢進を示すことを確認できた。その一方で、当初の予想に反して、この解析の中で、定常状態の細胞では変異 NOD2 を発現する細胞は、NOD2 を活性化するリガンドである MDP を添加した際に、むしろ低反応性を示すことが確認された。

## 2. 研究の目的

本研究は、「肉芽腫形成は、免疫応答が十分に行えない結果としての代償反応」なのではという仮説のもと、この NOD2 変異をもった細胞の低反応性を解析することで、肉芽腫形成の分子機序を解明する端緒とすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

MDP 添加時の低反応性の機序を明らかにするため、樹立した患者由来 iPS 細胞と、その細胞を Crisper-Cas9 を用いて NOD2 の変異のみを野生型へと戻した細胞を用いて、IFN $\gamma$  を添加して NOD2 を発現した際と、そこに NOD2 を活性化させる MDP を添加した際の蛋白のリン酸化を、DNA 研究所にてリン酸化プロテオームを行い、網羅解析を実施した。

## 4. 研究成果

上記の解析の結果、分子 A が高率にリン酸化されていることが同定された。

実際に変異 NOD2 の機能解析として頻用している HEK293 細胞に NOD2 のプラスミドを遺伝子導入して NF- $\kappa$ B の転写亢進をルシフェラーゼの発現によって検討する系に、分子 A を共発現させると、NOD2 による NF- $\kappa$ B の転写亢進能が抑制されることが観察され、変異 NOD2 を発

現した細胞の細胞レベルでの MDP に対する応答性の低下はこの分子が NF- $\kappa$ B の下流で翻訳およびリン酸化を受けて活性化しているためと推定された。

この様に、この分子 A はタンパクの翻訳後修飾に関わる分子であり、NOD2 の活性化に伴って代償的に分子 A が誘導されることで、機能獲得型変異である NOD2 を発現する細胞において、むしろ免疫応答が低下するという表現系を呈している可能性がある。現在、ブラウ症候群による肉芽腫形成機序として、この分子 A の同定を端緒とした翻訳後修飾の影響について引き続き研究を継続している。

## 文献

1. Matsuda T, Kambe N, Takimoto-Ito R, Ueki Y, Nakamizo S, Saito MK, Takei S, Kanazawa N. Potential Benefits of TNF Targeting Therapy in Blau Syndrome, a NOD2-Associated Systemic Autoinflammatory Granulomatosis. *Front Immunol.* 2022; 13: 895765. doi: 10.3389/fimmu.2022.895765. eCollection 2022. PMID: 35711422
2. Kitagawa Y, Kawasaki Y, Yamasaki Y, Kambe N, Takei S, Saito MK. Anti-TNF treatment corrects IFN- $\gamma$ -dependent proinflammatory signatures in Blau syndrome patient-derived macrophages. *J Allergy Clin Immunol.* 2022; 149(1): 176-188.e7. doi: 10.1016/j.jaci.2021.05.030. Epub 2021 Jun 24. PMID: 34175136
3. Nishiyama M, Li HJ, Okafuji I, Fujisawa A, Ehara M, Kambe N, Furukawa F, Kanazawa N. Sustained Surface ICAM-1 Expression and Transient PDGF-B Production by Phorbol Myristate Acetate-Activated THP-1 Cells Harboring Blau Syndrome-Associated NOD2 Mutations. *Children (Basel).* 2021; 8(5): 335. doi: 10.3390/children8050335. PMID: 33923123
4. Arakawa A, Kambe N, Nishikomori R, Tanabe A, Ueda M, Nishigori C, Miyachi Y, Kanazawa N. NOD2 Mutation-Associated Case with Blau Syndrome Triggered by BCG Vaccination. *Children (Basel).* 2021; 8(2): 117. doi: 10.3390/children8020117. PMID: 33562038
5. Matsuda T, Kambe N, Ueki Y, Kanazawa N, Izawa K, Honda Y, Kawakami A, Takei S, Tonomura K, Inoue M, Kobayashi H, Okafuji I, Sakurai Y, Kato N, Maruyama Y, Inoue Y, Otsubo Y, Makino T, Okada S, Kobayashi I, Yashiro M, Ito S, Fujii H, Kondo Y, Okamoto N, Ito S, Iwata N, Kaneko U, Doi M, Hosokawa J, Ohara O, Saito MK, Nishikomori R; PIDJ members in the JSIAD; PIDJ (Primary Immunodeficiency and Autoinflammatory Diseases Database Project) members in the JSIAD (Japanese Society for Immunodeficiency and Autoinflammatory Diseases). Clinical characteristics and treatment of 50 cases of Blau syndrome in Japan confirmed by genetic analysis of the NOD2 mutation. *Ann Rheum Dis.* 2020; 79(11): 1492-1499. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-217320. Epub 2020 Jul 9. PMID: 32647028
6. Takada S, Saito MK, Kambe N. Blau Syndrome: NOD2-related systemic autoinflammatory granulomatosis. *G Ital Dermatol Venereol.* 2020; 155(5): 537-541. doi: 10.23736/S0392-0488.19.06524-6. Epub 2020 Jul 2. PMID: 32618442
7. Bonnekoh H, Butze M, Kallinich T, Kambe N, Kokolakis G, Krause K. Spectrum of Genetic Autoinflammatory Diseases Presenting with Cutaneous Symptoms. *Acta Derm Venereol.* 2020; 100(7): adv00091. doi: 10.2340/00015555-3427. PMID: 32147748

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsuda T, Kambe N, Takimoto-Ito R, Ueki Y, Nakamizo S, Saito MK, Takei S, Kanazawa N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Potential Benefits of TNF Targeting Therapy in Blau Syndrome, a NOD2-Associated Systemic Autoinflammatory Granulomatosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 895765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.895765	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 Kitagawa Y, Kawasaki Y, Yamasaki Y, Kambe N, Takei S, Saito MK.	4. 巻 149
2. 論文標題 Anti-TNF treatment corrects IFN- $\gamma$ dependent proinflammatory signatures in Blau syndrome patient-derived macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 176-188.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2021.05.030	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 Arakawa A, Kambe N, Nishikomori R, Tanabe A, Ueda M, Nishigori C, Miyachi Y, Kanazawa N.	4. 巻 8
2. 論文標題 NOD2 Mutation-Associated Case with Blau Syndrome Triggered by BCG Vaccination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Children	6. 最初と最後の頁 117-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/children8020117	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 Matsuda T, Kambe N, Ueki Y, et al.	4. 巻 79
2. 論文標題 Clinical characteristics and treatment of 50 cases of Blau syndrome in Japan confirmed by genetic analysis of the NOD2 mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1492 -1499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2020-217320	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 Takada S, Saito MK, Kambe N.	4. 巻 155
2. 論文標題 Blau Syndrome: NOD2-related systemic autoinflammatory granulomatosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia	6. 最初と最後の頁 537-541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.23736/S0392-0488.19.06524-6	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 該当する

1. 著者名 Furuya M, Iribe Y, Nagashima Y, Kambe N, Ohe C, Kinoshita H, Sato C, Kishida T, Okubo Y, Numakura K, Nanjo H, Nakaigawa N, Makiyama K, Hasumi H, Iwashita H, Ohta J, Kitamura H, Nakajima T, Yoshida T, Nakagawa M, Tanaka R, Yao M.	4. 巻 73
2. 論文標題 Clinicopathological and molecular features of hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer-associated renal cell carcinomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 819-825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jclinpath-2020-206548	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 Nishikomori R, Izawa K, Kambe N, Ohara O, Yasumi T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Low-frequency mosaicism in cryopyrin-associated periodic fever syndrome: mosaicism in systemic autoinflammatory diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 649-655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz047	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 Bonnekoh H, Butze M, Kallinich T, Kambe N, Kokolakis G, Krause K.	4. 巻 100
2. 論文標題 Spectrum of Genetic Autoinflammatory Diseases Presenting with Cutaneous Symptoms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Derm Venereol.	6. 最初と最後の頁 adv00091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2340/00015555-3427.	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takada S, Kambe N.
2. 発表標題 NOD2-related systemic autoinflammatory granulomatosis, Blau syndrome
3. 学会等名 24th World Congress of Dermatology, Milan, Italy (Workshop) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kambe N, Ly NTM, Saito KM, Okamoto H.
2. 発表標題 Gain-of-function mutation of NOD2 impairs its ligand specific immune responses in Blau syndrome patient-derived iPS cells
3. 学会等名 10th International Congress 2019 FMF and Systemic Auto Inflammatory Diseases, Genova, Italy (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------