

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17293

研究課題名(和文) NLRP3、NLRC4疾患関連変異によるカスパーゼ1非依存性細胞死の機序解明

研究課題名(英文) Mechanisms of caspase-1-independent cell death induced by NLRP3 and NLRC4 disease-associated variants

研究代表者

井澤 和司 (Izawa, Kazushi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90634931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：クリオピリン関連周期熱症候群とNLRC4異常症においては、共にインフラマソームの活性化が起こるが、病態の中心はそれぞれIL-1 β 、IL-18と異なる。まずはNLRC4異常症の炎症機序を解析するため、NLRC4遺伝子変異の機能解析系を構築した。本解析系により疾患関連性を判定することが可能になった。また、インフラマソーム関連疾患である家族性地中海熱において、MEFV遺伝子変異の疾患関連性を見分ける簡便な方法は存在していなかった。本研究において、MEFV遺伝子変異の機能解析系の開発に成功し、論文報告することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己炎症性疾患の診療においては、遺伝子検査を行い診断が確定となる。病原性不明な遺伝子変異が検出された際には、臨床症状や疫学的情報の他に、機能解析等を行い、その病原性を判定する。NLRC4異常症と家族性地中海熱において遺伝子変異が検出された際にその病原性を判定する解析系を構築することができ、自己炎症性診療においてより精度の高い診断を行うことが可能になった。

研究成果の概要(英文)：Both cryopyrin-associated periodic fever syndrome and NLRC4-associated diseases cause inflammasome activation, but the pathogenesis is different with IL-1 β and IL-18, respectively. First, to analyze the inflammatory mechanism of NLRC4-associated diseases, we constructed a functional analysis system using NLRC4 gene mutations. This system made it possible to determine whether the mutation was disease-related or not. In addition, there has been no simple method to distinguish disease association of MEFV gene variants in familial Mediterranean fever, an inflammasome-associated disease. In this study, we succeeded in developing a functional analysis system for MEFV variants.

研究分野：自己炎症性疾患

キーワード：自己炎症性疾患 NLRC4異常症 家族性地中海熱 MEFV インフラマソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己炎症性疾患は、1999年 Kastner らにより提唱された自然免疫系の遺伝子異常により発症する炎症性疾患である。インフラマソームの活性化により発症する代表的な自己炎症性疾患として、NLRP3 機能獲得型変異により発症するクリオピリン関連周期熱症候群と、NLRC4 機能獲得型変異により発症する NLRC4 異常症が存在する。クリオピリン関連周期熱症候群は周期熱、蕁麻疹様発疹、関節炎などを特徴とし、日本では 100 人ほどの患者がいると推定されている。病態の中心は過剰産生される IL-1 である。NLRC4 異常症は、血球貪食症候群、腸炎、蕁麻疹様発疹などを主症状とする。日本においては数十人の患者がいると推定されている。病態の中心は過剰産生される IL-18 である。両疾患において、病態の中心はそれぞれ IL-1、IL-18 と異なるが、その違いに関する機序については不明であった。また、同様にインフラマソーム関連疾患である家族性地中海熱において多数の遺伝子変異が報告されているが、MEFV 遺伝子バリエーションの疾患関連性を見分ける簡便な方法は存在していなかった。

2. 研究の目的

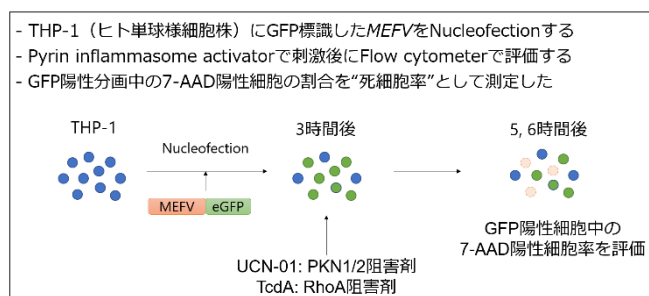
NLRP3、NLRC4 インフラマソーム活性化による細胞死の分子機序は何かということ。またインフラマソームは共に IL-1、IL-18 を産生するが、NLRP3、NLRC4 の機能獲得型変異により、なぜそれぞれ過剰産生されるサイトカインが異なるのかを解明する。NLRP3 の機能解析系はすでに確立しており、NLRC4 の機能解析系の構築を目指す。また MEFV 遺伝子バリエーションの機能解析系の構築を行う。

3. 研究の方法

NLRC4 変異遺伝子導入による THP-1 細胞死を用いた機能解析系の構築

CRISPR/Cas9 によるゲノムワイドノックアウトシステムを利用した細胞死関連分子の同定

MEFV 変異遺伝子導入による THP-1 細胞死を用いた機能解析系の構築



4. 研究成果

NLRC4 変異遺伝子導入による THP-1 細胞死を用いた機能解析系の構築

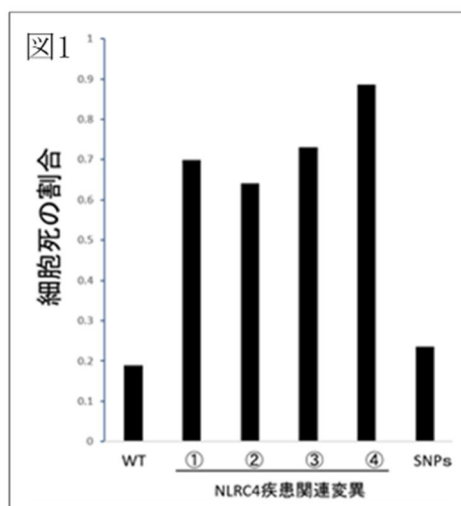
これまで報告されている疾患関連変異をヒト単球系細胞株である THP-1 細胞に遺伝子導入したところ、野生型 NLRC4 遺伝子の導入に比べて有意に細胞死を起こすこと(図1)ならびに IL-1 の過剰産生が認められた。現在、最近認められた新規変異についても解析を行っており、論文投稿準備中である。

CRISPR/Cas9 によるゲノムワイドノックアウトシステムを利用した細胞死関連分子の同定

現時点では再現性のある結果は得られていない。

MEFV 変異遺伝子導入による THP-1 細胞死を用いた機能解析系の構築

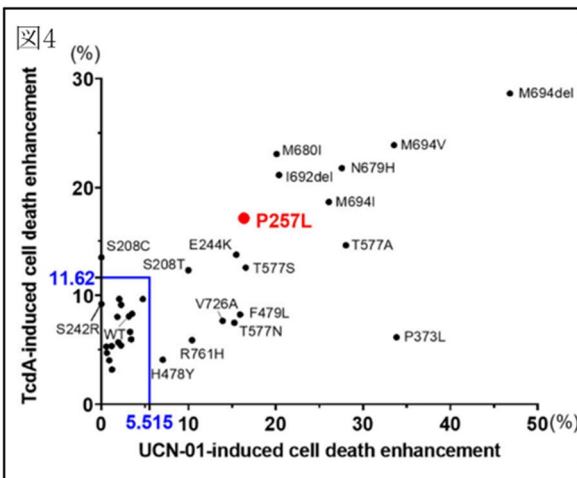
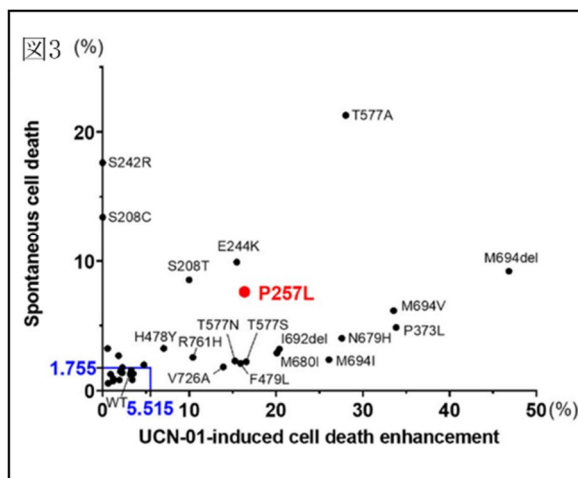
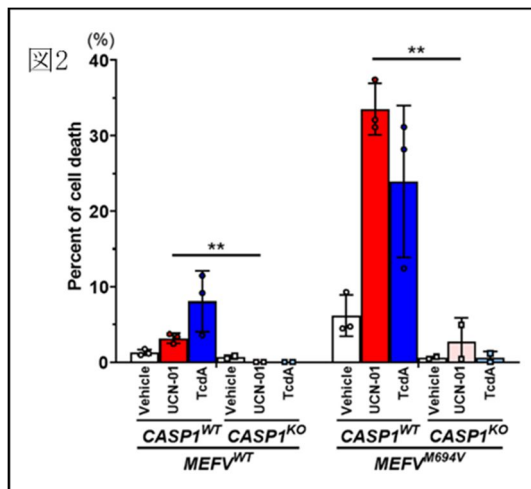
ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞に、GFP 蛍光色素で標識した MEFV 遺伝子を強制発現させ、UCN-01 あるいは TcdA という pyrin を活性化する 2 つの薬剤で刺激し、フローサイトメトリ



一法を用いて刺激後に誘導される細胞死を評価した。その結果、既知の病原性変異である M694V 変異は、正常の MEFV と比較して、有意に細胞死が亢進していた (図 2)。また、本細胞死は ASC speck 形成を伴い、Caspase-1 ノックアウトで抑制された。

次に、この解析を用いて、これまで報告されている 32 種類の MEFV バリエントを評価した。その結果、それぞれのバリエントにより反応は異なっていた。この性質の違いを評価するため、階層的クラスタリングという統計学的手法を用いて解析したところ、これらのバリエントは 6 つの異なる性質をもったクラスターに分類された。このクラスター分類は、各バリエントが患者にどのような症状を引き起こすかという、これまでの臨床的な情報ともよく相関していた。そのため、本検査法を用いることで MEFV バリエントの病原性の有無が区別できるだけでなく、病原性の強弱や変異の性質も評価することが可能であることが示された。

さらに、これまで臨床報告のない MEFV バリエント (P257L 変異) がみつき、本解析法を用いて病原性を評価した。P257L 変異は正常 MEFV よりも 有意に細胞死を引き起こし、病原性変異と判定することができた (図 3、4)。



以上の通り、本研究において MEFV 変異の迅速な新規機能評価系を構築することができた。本評価系は、pyrin-associated autoinflammatory diseases (PAADs) の診断に寄与すると考えられる。本研究成果は、2021 年 3 月 17 日に、国際学術誌「The Journal of Clinical Immunology」に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Honda Yoshitaka, Maeda Yukako, Izawa Kazushi, Shiba Takeshi, Tanaka Takayuki, Nakaseko Haruna, Nishimura Keisuke, Mukoyama Hiroki, Isa-Nishitani Masahiko, Miyamoto Takayuki, Nihira Hiroshi, Shibata Hirofumi, Hiejima Eitaro, Ohara Osamu, Takita Junko, Yasumi Takahiro, Nishikomori Ryuta	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Rapid Flow Cytometry-Based Assay for the Functional Classification of MEFV Variants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 Online ahead
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-021-01021-7	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 Nihira Hiroshi, Izawa Kazushi, Ito Moeko, Umebayashi Hiroaki, Okano Tsubasa, Kajikawa Shunsuke, Nanishi Etsuro, Keino Dai, Murakami Kosaku etc	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Detailed analysis of Japanese patients with adenosine deaminase 2 deficiency reveals characteristic elevation of type II interferon signature and STAT1 hyperactivation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 Online ahead
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2021.01.018	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 Honda Y, Maeda Y, Izawa K, Shiba T, Tanaka T, Nakaseko H, Nishimura K, Mukoyama H, Isa-Nishitani M, Miyamoto T, Nihira H, Shibata H, Hiejima E, Ohara O, Takita J, Yasumi T, Nishikomori R.	4. 巻 Mar 17
2. 論文標題 Rapid Flow Cytometry-Based Assay for the Functional Classification of MEFV Variants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Nihira H, Izawa K, Ito M, Umebayashi H, Okano T, Kajikawa S, Nanishi E, Keino D, Murakami K, Isa-Nishitani M, Shiba T, Honda Y, Hijikata A, Yasu T, Kubota T, Hasegawa Y, Kawashima Y, Nakano N, Takada H, Ohga S, Heike T, Takita J, Ohara O, Takei S, Takahashi M, Kanegane H, Morio T, etc	4. 巻 Jan 30
2. 論文標題 Detailed analysis of Japanese patients with adenosine deaminase 2 deficiency reveals characteristic elevation of type II interferon signature and STAT1 hyperactivation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 1. Shimizu M, Matsubayashi T, Ohnishi H, Nakama M, Izawa K, Honda Y, Nishikomori R.	4. 巻 Feb 3
2. 論文標題 1. Shimizu M, Matsubayashi T, Ohnishi H, Nakama M, Izawa K, Honda Y, Nishikomori R. Haploinsufficiency of A20 with a novel mutation of deletion of exons 2-3 of TNFAIP3.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1719595.	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 2. Shiba T, Tanaka T, Ida H, Watanabe M, Nakaseko H, Osawa M, Shibata H, Izawa K, Yasumi T, Kawasaki Y, Saito MK, Takita J, Heike T, Nishikomori R.	4. 巻 Nov;144(5)
2. 論文標題 Functional evaluation of the pathological significance of MEFV variants using induced pluripotent stem cell-derived macrophages.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 1438-1441.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2019.07.039.	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 3. Rodriguez R, Fournier B, Cordeiro DJ, Winter S, Izawa K, Martin E, Boutboul D, Lenoir C, Fraitag S, Kracker S, Watts TH, Picard C, Bruneau J, Callebaut I, Fischer A, Neven B, Latour S.	4. 巻 Dec 2;216(12)
2. 論文標題 Concomitant PIK3CD and TNFRSF9 deficiencies cause chronic active Epstein-Barr virus infection of T cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 :2800-2818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20190678.	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 5. Masui S, Yonezawa A, Izawa K, Hayakari M, Asakura K, Taniguchi R, Isa M, Shibata H, Yasumi T, Nishikomori R, Takita J, Matsubara K.	4. 巻 May 2;5:9
2. 論文標題 Plasma infliximab monitoring contributes to optimize Takayasu arteritis treatment: a case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharm Health Care Sci.	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40780-019-0136-4	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 Sep 18;31(10)
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 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮本 尚幸,井澤 和司,田中 孝之,前田 由可子,西谷 真彦,仁平 寛士,本田 吉孝,柴田 洋史,八角 高裕,滝田 順子,西小森 隆太
2. 発表標題 MEFV V726A/I692del 複合ヘテロ接合性変異を認め、自己免疫性肝炎を併発した家族性地中海熱の一例
3. 学会等名 第29回日本小児リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 孝之,芝 剛,西小森 隆太,柴田 洋史,井澤 和司,柳町 昌克,齋藤 潤,中畑 龍俊,小原 収,平家 俊男,滝田 順子,八角 高裕,
2. 発表標題 多彩な自己炎症性疾患を紐解く インフラマソームを介した自己炎症性疾患の診断・治療にiPS細胞がどのように役立つか?
3. 学会等名 第29回日本小児リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本田 吉孝,八角 高裕,伊佐 真彦,仁平 寛士,芝 剛,柴田 洋史,田中 孝之,井澤 和司,川崎 ゆり,齋藤 潤,網代 将彦,萩原 正敏,岡田 賢,小原 収,平家 俊男,滝田 順子,西小森 隆太
2. 発表標題 免疫不全 原発性免疫不全症の遺伝子診断におけるExome解析のpitfallと診断困難例に対する解析戦略 患者由来iPS細胞を用いて診断した Deep intron変異による細胞種依存的なNEMO異常症の経験から
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田由可子、本田吉孝、井澤和司、芝剛、田中孝之、東口素子、加藤健太郎、宮本尚幸、伊佐（西谷）真彦、仁平寛士、柴田洋史、日衛嶋栄太郎、滝田順子、八角高裕、西小森隆太
2. 発表標題 免疫疾患の遺伝的背景 新規機能解析系によるMEFVパリアントの病原性評価・分類の試み
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------