

令和 5 年 9 月 14 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03719

研究課題名(和文) 自己炎症疾患の発作の周期性や炎症の多様性を規定する責任分子調節分子群の包括的特定

研究課題名(英文) Comprehensive identification of responsible regulatory molecules that define the seizure periodicity and inflammatory diversity of autoinflammatory diseases

研究代表者

増本 純也 (Masumoto, Junya)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：20334914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コムギ無細胞タンパク質合成によるヒトタンパク質アレイを用いて、自己炎症疾患責任遺伝子産物と相互作用して協働するタンパク質を多数同定した。特に、自己炎症疾患の責任遺伝子産物や、これらの分子と協働するシグナル伝達経路にかかわるデスドメインスーパーファミリータンパク質を網羅的にコムギ無細胞合成し、総当たりの結合実験を行った結果、病態に関わると考えられるあらたな総合作用分子を多数同定できた。また、新規に同定したタンパク質のモデルマウスを使った個体での検証実験を行った。同時に、炎症発作のトリガーのひとつの候補として、アミロイド線維形成とインフラマソーム形成との関係を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己炎症疾患は、自己抗体や自己反応性T細胞の介在しない炎症疾患で、単一の責任遺伝子のコードする疾患責任タンパク質の機能異常が原因とされている。しかしながら、『自己炎症疾患の炎症発作にはどのような分子群や環境因子が関わって全体像を構成しているのか?』という本研究課題の核心をなす学術的「問い」について明確な答えはない。本研究では、自己炎症疾患責任タンパク質の周囲で働く未知の協働分子をいくつか同定することができた。この研究成果は、これらの分子が周期性炎症の鍵を握る分子である可能性を示したという学術的意義を有すると同時に、これらの分子を標的とした治療や診断への応用が期待できるという社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used a human protein array based on wheat-germ cell-free protein synthesis system to identify several proteins that interact and cooperate with the gene products responsible for autoinflammatory diseases. We performed a comprehensive death domain superfamily proteins involved in signaling that orchestrate with the gene products responsible for autoinflammatory diseases. In addition, we conducted individual validation experiments using model mice. Finally, we clarified the relationship between amyloid fibril formation and inflammasome formation as one of the candidates for triggering inflammatory attacks.

研究分野：病理学

キーワード：自己炎症疾患 インフラマソーム 周期熱症候群

1. 研究開始当初の背景

自己炎症疾患は、周期性の発熱発作を特徴とする炎症疾患で、自己反応性Tリンパ球や自己抗体の関与のない点から、自己免疫疾患と異なる疾患スペクトルを形成する。自然免疫に関わるシグナル伝達系の機能獲得型の異常が原因のひとつとして理解しやすい。

クリオピリン関連周期熱症候群(Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS))は、好中球浸潤による皮疹、発熱、関節炎を主徴とし、*CIAS1*がコードするタンパク質である NLRP3(別名 Cryopyrin)に恒常活性化型となるアミノ酸の変異がある。Blau 症候群(Blau syndrome: BS)/若年性サルコイドーシス(Early-onset sarcoidosis: EOS)では、*IBD1*がコードするタンパク質である NOD2 に恒常活性化型となるアミノ酸変異がある。NLRP3 はウイルスや細菌などの病原体の構成分子(Pathogen-associated molecular patterns: PAMPs)や細胞傷害による自己代謝物(Damage-associated molecular patterns: DAMPs)などにより活性化し、ASC というアダプター分子を介して Caspase-1 と NLRP3 インフラマソームを形成し、IL-1 β 前駆体を切断することで活性化する(図1)。NOD2は細菌細胞壁のペプチドグリカンの単位である MDP を認識して RIPK2 とノドソームを形成し、NF- κ B を活性化して炎症に関わる。

このような先行研究を受けて、遺伝的に原因不明の炎症性難病を発症する家系について、ゲノムワイド関連解析(GWAS)が行われ、NLRC4 に変異がある NLRC4 異常症、NLRP1 に変異がある NLRP1 異常症(NLRP1-associated autoinflammation with arthritis and dyskeratosis: NAIAD)、NLRP12 に変異がある NLRP12 関連周期熱症候群などが次々と報告された。また家族性地中海熱(Familial Mediterranean fever: FMF)の原因遺伝子産物の PYRIN については、常染色体潜性遺伝疾患だったことから、ASC と NLRs の結合に対する抑制的競合阻害の異常によるインフラマソーム抑制障害仮説が長く信じられてきたが、PYRIN そのものがインフラマソームを形成する恒常的活性化説が有力な仮説である。以上のような先行研究の成果を基盤にして、自己炎症疾患は一つの疾患責任遺伝子の異常が原因という共通のコンセンサスで、遺伝子パネル検査ができるようになり、診断と治療が飛躍的に向上している。一方で、臨床診断基準を満たしても、疾患責任遺伝子に変異のみられない症例があること、臨床症状や経過などの表現型(フェノタイプ)に違いがあること、成人発症例があること、寛解する症例があること、薬剤抵抗性のため治療に難渋する症例があること、など、『自己炎症疾患の炎症発作にはどのような分子群や環境因子が関わって全体像を構成しているのか?』という本研究課題の核心をなす学術的「問い」への明確な「答え」が明らかになっていないため、未だに診断や治療に難渋する症例も少なくない。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、自己炎症疾患が基本的に単一の疾患責任遺伝子のコードするタンパク質の変異によって起こる疾患であるという前提に立った上で、『疾患責任遺伝子の周囲で働く未知の協働分子群が疾患のトリガーや炎症発作の周期性を規定し、それらの分子の組織局在が病態を規定する』という仮説を証明することを目的とする。この仮説を証明できれば、自己炎症疾患の原因を単一分子の遺伝子変異に限定することなく、一連の分子群の異常として再定義することができ、その分子群全体を標的とする分子標的治療法の開発ができる。ひいては、自己炎症疾患の正確な診断と適切な時期における適切な治療である治療機会の窓(“Window of opportunity”)(O'Dell JR. *Arthritis Rheum.* 46:283-285, 2002)を開くことができると期待される。

3. 研究の方法

この目的を達成するために、自己炎症疾患責任遺伝子産物である NLRP3 をはじめと

する自己炎症疾患責任タンパク質と相互作用するタンパク質群を、愛媛大学プロテオサイエンスセンター独自開発のヒト 24,000 タンパク質アレイ (24,000 human protein array: 24K-HUPA) のスクリーニングにより網羅的に同定する。同定したタンパク質との相互作用を Amplified Luminescence Proximity Homogeneous Assay (ALPHA) で定量する。同時に、自己炎症疾患責任遺伝子の変異タンパク質を全て無細胞合成し、同様の変異プラスミドを作製し、培養細胞に遺伝子導入する。細胞内の疾患責任タンパク質の近傍に存在するタンパク質群を一気にビオチン化する近位依存性ビオチン標識法とプルダウン-SDS-PAGE と TOF-MS を用いて網羅的に同定する。

4. 研究成果

本研究では、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成によるヒトタンパク質アレイを用いて、自己炎症疾患責任遺伝子産物と相互作用して協働するタンパク質を多数同定した。特に、自己炎症疾患の責任遺伝子産物や、これらの分子と協働するシグナル伝達経路にかかわるデスドメインスーパーファミリータンパク質を網羅的にコムギ胚芽無細胞合成し、総当たりの結合実験を行った結果、病態に関わると考えられるあらたな相互作用分子を多数同定できた。また、新規に同定したタンパク質のモデルマウスを使った個体での検証実験を行った。同時に、炎症発作のトリガーのひとつの候補として、アミロイド線維形成とインフラマソーム形成との関係を明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Zhou Wei, Kaneko Naoe, Nakagita Tomoya, Takeda Hiroyuki, Masumoto Junya	4. 巻 28
2. 論文標題 A comprehensive interaction study provides a potential domain interaction network of human death domain superfamily proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 2991 ~ 3008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41418-021-00796-x	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 Ochi Toshiki, Maruta Masaki, Tanimoto Kazushi, Kondo Fumitake, Yamamoto Toshihiro, Kurata Mie, Fujiwara Hiroshi, Masumoto Junya, Takenaka Katsuto, Yasukawa Masaki	4. 巻 4
2. 論文標題 A single-chain antibody generation system yielding CAR-T cells with superior antitumor function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 273 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01791-1	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 Yushiro Endo, Tomohiro Koga, Kazusato Hara, Kaori Furukawa, Kazunaga Agematsu, Akihiro Yachie, Junya Masumoto, Kiyoshi Migita, Atsushi Kawakami.	4. 巻 38 Suppl 127
2. 論文標題 The possession of exon 2 or exon 3 variants in the MEFV gene promotes inflammasome activation in Japanese patients with familial Mediterranean fever with a heterozygous exon 10 mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Exp Rheumatol	6. 最初と最後の頁 49 ~ 52
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomohiro Koga, Shuntaro Sato, Hiroyuki Mishima, Kiyoshi Migita, Yushiro Endo, Masataka Umeda, Remi Sumiyoshi, Fumiaki Nonaka, Shoichi Fukui, Shin-Ya Kawashiri, Naoki Iwamoto, Kunihiro Ichinose, Mami Tamai, Hideki Nakamura, Tomoki Origuchi, Yukitaka Ueki, Junya Masumoto, et al.	4. 巻 38 Suppl 127
2. 論文標題 Next-generation sequencing of the whole MEFV gene in Japanese patients with familial Mediterranean fever: a case-control association study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Exp Rheumatol	6. 最初と最後の頁 35 ~ 41
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko Naoe, Kurata Mie, Yamamoto Toshihiro, Shigemura Tomonari, Agematsu Kazunaga, Yamazaki Takashi, Takeda Hiroyuki, Sawasaki Tatsuya, Koga Tomohiro, Kawakami Atsushi, Yachie Akihiro, Migita Kiyoshi, Yoshiura Koh-ichiro, Urano Takeshi, Masumoto Junya	4. 巻 10
2. 論文標題 KN3014, a piperidine-containing small compound, inhibits auto-secretion of IL-1 from PBMCs in a patient with MuckleWells syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13562 ~ 13562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70513-0	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 Mokuda Sho, Tokunaga Tadahiro, Masumoto Junya, Sugiyama Eiji	4. 巻 47
2. 論文標題 Angiotensin-converting Enzyme 2, a SARS-CoV-2 Receptor, Is Upregulated by Interleukin 6 through STAT3 Signaling in Synovial Tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1593 ~ 1595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3899/jrheum.200547	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 Sakaue Tomohisa, Hamaguchi Mika, Aono Jun, Nakashiro Koh-ichi, Shikata Fumiaki, Kawakami Natsuki, Oshima Yusuke, Kurata Mie, Nanba Daisuke, Masumoto Junya, Yamaguchi Osamu, Higashiyama Shigeki, Izutani Hironori	4. 巻 110
2. 論文標題 Valve Interstitial Cell-Specific Cyclooxygenase-1 Associated With Calcification of Aortic Valves	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Annals of Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 40 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.athoracsur.2019.09.085	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 Koizumi Mitsuhiro, Watanabe Takao, Masumoto Junya, Sunago Kotaro, Imamura Yoshiki, Kanemitsu Kozue, Kumagi Teru, Hiasa Yoichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD regulates the growth of pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22351 ~ 22351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01465-2	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 Kaneko Naoe, Mori Wakako, Kurata Mie, Yamamoto Toshihiro, Zako Tamotsu, Masumoto Junya	4. 巻 36
2. 論文標題 Inflammasome assembly is required for intracellular formation of 2-microglobulin amyloid fibrils, leading to IL-1 secretion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Immunopathology and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 3.94632E+13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/03946320221104554	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 Namiguchi Kenji, Sakaue Tomohisa, Okazaki Mikio, Kanno Kaho, Komoda Yuhei, Shikata Fumiaki, Kurata Mie, Ota Noritaka, Kubota Yoshiaki, Kurobe Hirotsugu, Nishimura Takashi, Masumoto Junya, Higashiyama Shigeki, Izutani Hironori	4. 巻 8
2. 論文標題 Unique Angiogenesis From Cardiac Arterioles During Pericardial Adhesion Formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 761591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcvm.2021.761591	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 Yamada Yuichi, Kinoshita Izumi, Miyazaki Yoshiko, Tateishi Yuki, Kuboyama Yusuke, Iwasaki Takeshi, Kohashi Kenichi, Yamamoto Hidetaka, Ishihara Shin, Toda Yu, Ito Yoshihiro, Susuki Yosuke, Kawaguchi Kengo, Hashisako Mikiko, Yamada-Nozaki Yui, Kiyozawa Daisuke, Mori Taro, Yamamoto Takeo, Masumoto Junya, et al	4. 巻 480
2. 論文標題 Myxoid type and non-myxoid type of intimal sarcoma in large vessels and heart: review of histological and genetic profiles of 20 cases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 919 ~ 925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-022-03293-9	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 Watanabe Hirofumi, Mokuda Sho, Tokunaga Tadahiro, Kohno Hiroki, Ishitoku Michinori, Araki Kei, Sugimoto Tomohiro, Yoshida Yusuke, Yamamoto Toshihiro, Matsumoto Mayuko, Masumoto Junya, Hirata Shintaro, Sugiyama Eiji	4. 巻 43
2. 論文標題 Expression of factor XIII originating from synovial fibroblasts and macrophages induced by interleukin-6 signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-022-00252-4	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 Yamamoto Toshihiro, Kurata Mie, Kaneko Naoe, Masumoto Junya	4. 巻 18
2. 論文標題 Intestinal edema induced by LPS-induced endotoxemia is associated with an inflammasome adaptor ASC	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0281746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0281746	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 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 増本純也, 金子直恵, 倉田美恵, 山本敏弘, 重村倫成, 上松一永, 山崎崇志, 谷内江昭宏, 浦野健, 右田清志, 吉浦 孝一郎, 古賀智裕, 川上純.
2. 発表標題 無細胞インフラマソーム再構成系による自己炎症疾患に対する分子標的薬の開発
3. 学会等名 第4回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会 2021年 2月6~7日 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増本純也, 重村倫成, 重村倫成, 上松一永, 山崎崇志, 谷内江昭宏, 浦野健, 右田清志, 吉浦孝一郎, 古賀智裕, 川上純.
2. 発表標題 無細胞NLRP3インフラマソーム再構成系によるMuckle-Wells症候群に対する分子標的薬の開発
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2020年 8月17日~9月15日
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増本純也, 金子直恵, 倉田美恵, 山本敏弘, 森川紳之祐, 竹田浩之, 澤崎達也, 重村倫成, 上松一永.
2. 発表標題 インフラマソーム病に対する特異的低分子阻害薬の探索と分子病理診断への応用
3. 学会等名 第109回日本病理学会 2020年 4月16~18日
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wei Zhou, 竹田浩之, 中北智哉, 金子直恵, 増本純也.
2. 発表標題 無細胞合成タンパク質アレイと AlphaScreenを用いたヒト Death Domain-fold Superfamilyインタラクトームの網羅的研究
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 2020年 9月14日～16日
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wei Zhou, Tomoya Nagagita, Naoe Kaneko, Hiroyuki Takeda, Junya Masumoto
2. 発表標題 A Comprehensive Analysis of Human Death Domain-fold Superfamily Interactome Using Recombinant Protein Array and AlphaScreen
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会 2020年 7月28日
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増本純也
2. 発表標題 プロテオインタラクトームによる自己炎症疾患の病態解明
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会(神戸)2022年4月14日～16日(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本敏弘、倉田美恵、金子直恵、増本純也
2. 発表標題 エンドトキシン誘発敗血症モデルにおけるインフラマソーム非依存性炎症の組織像
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会(千葉)2022年11月30日～12月2日
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子直恵、森若子、倉田美恵、山本敏弘、座古保、増本純也
2. 発表標題 2ミクログロブリンのアミロイド線維形成にはインフラマソームの形成が必須である
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会(千葉)2022年11月30日～12月2日
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増本純也
2. 発表標題 細胞傷害によるインフラマソームの活性化とその意義
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会(下関)2023年4月13日～15日(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 マックルウェルズ症候群の治療用医薬組成物	発明者 増本純也、金子直恵、澤崎達也、竹田浩之	権利者 愛媛大学
産業財産権の種類、番号 特許、7072260	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

<p>コムギ胚芽無細胞再構成系で稀少難病の治療薬候補を開発 https://www.ehime-u.ac.jp/data_relese/data_relese-129613/</p>
--

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
研究分担者	吉浦 孝一郎 (Yoshiura Koichiro) (00304931)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授 (17301)	
研究分担者	竹田 浩之 (Takeda Hiroyuki) (40609393)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授 (16301)	
研究分担者	澤崎 達也 (Sawasaki Tatsuya) (50314969)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授 (16301)	
研究分担者	右田 清志 (Migita Kiyoshi) (60264214)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
研究分担者	堀内 浩幸 (Horiuchi Hiroyuki) (80243608)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授 (15401)	
研究分担者	川上 純 (Kawakami Atsushi) (90325639)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	
研究分担者	古賀 智裕 (Koga Tomohiro) (90537284)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教 (17301)	

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
---------	---------