

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591094

研究課題名（和文） 新しい自己炎症疾患から学ぶポストゲノム時代の蛋白機能解析

研究課題名（英文） Functional human protein analysis in the post-genome era learning to new autoinflammatory diseases

研究代表者 井田 弘明 (IDA HIROAKI)
久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：60363496

研究成果の概要（和文）：中條-西村症候群において、最初の報告から 70 年目に原因となる遺伝子を同定、細胞内の不良蛋白を浄化する細胞内器官（プロテアソーム）の一つの分子 LMP7 (b5i) の異常であり、プロテアソームの機能が低下していた。つまり、遺伝子変異によるプロテアソーム機能異常に起因した世界で初めての疾患であった。肥大型骨関節症の検討では、プロスタグランジン E2 に関係した *SLCO2A1* 遺伝子変異で生じ、自己炎症疾患の家族性地中海熱の原因遺伝子 (*MEFV*) の変異が、炎症を増悪させている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In Nakajo-Nishimura syndrome, a decrease in proteasome activity, which is associated with a novel mutation of the $\beta 5i$ immunoproteasome subunit, causes definitive human autoinflammatory phenotypes. This fact suggests that the ubiquitin-proteasome pathway might play an important role for inflammation and provides a new insight into the pathogenesis of other persistent inflammatory diseases.

Primary hypertrophic osteoarthropathy (PHO) should be caused by *SLCO2A1* mutations and *MEFV* mutations might be one of the risk factors for inflammatory responses in this disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：自己炎症、自己炎症疾患、遺伝学、遺伝子、ゲノム、生体分子、プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト遺伝子がすべて解読されたポストゲノム時代、遺伝子がコードする蛋白がどのような機能をもつかを解析することに研究はシフトしている。これまで、多くのノックア

ウトマウスが作成され、それを利用して、コードする蛋白の機能が証明されてきた。しかし、マウスとヒトとは、異なる部分が多く、ヒトの疾患を想定した場合、マウスでは説明がつかない複雑なメカニズムであることが

多い。私たちは、遺伝子異常から明白なフェノタイプがヒトに出現する「自己炎症疾患」を研究することで、ヒトの遺伝子がコードする蛋白の機能が解明できると考え、本研究を企画した。

(2) 私たちは、2004年、本邦で初めて、自己炎症疾患である TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS)患者とその家系を報告した。そのデータをもとに、平成17年度の科学研究費補助金の交付を受け、基盤研究(C)企画調査(代表研究員)「本邦初の TRAPS 患者の全国大規模疫学調査と診断基準の作成に関する研究」で、全国の疫学調査を行った。また、平成18年度の基盤研究(C)(代表研究員)「TNF レセプター分子サイドから見直した自己免疫疾患における異常と治療への応用」で TRAPS の疾患原因である TNF レセプター分子の遺伝子異常と自己免疫疾患の関連を検討した。これらの成果を論文報告、および学会報告した。当初あまり注目されていなかったが、全国的に症例が増加したこともあり、今や本邦でも新しい概念「自己炎症疾患」として注目される分野となった。さらに、平成19年度の基盤研究萌芽(分担研究員)「新しい遺伝子連鎖分析法を駆使した遺伝性自己免疫性疾患患者の新規遺伝子の同定」で、自己炎症疾患である本邦特有の遺伝病「中條病」の候補遺伝子検索をジーンチップによる新しい方法で解析開始、平成21年度厚生労働科学研究費補助金(分担研究員)「中條-西村症候群の疾患概念の確立と病態解明へのアプローチ」で解析を続けている。

(3) このように、ひとりの患者の発見から始まった自己炎症疾患の一連のプロジェクトは、本研究によってヒト蛋白の機能解析法として新たに注目されることが予想される。

2. 研究の目的

自己炎症疾患と考えられる「中條-西村症候群」と「肥大性骨関節症」について、疾患遺伝子の同定とその遺伝子がコードする蛋白の機能解析を行うことが、本研究の目的である。

(1) 新しい自己炎症疾患「中條-西村症候群」の疾患遺伝子の同定と蛋白機能解析

私たちは、自己炎症疾患である本邦特有の遺伝病「中條-西村症候群」の疾患遺伝子の遺伝子座を新しい方法(ジーンチップ)を使って同定した。本研究では、その遺伝子座の中の30個の候補遺伝子のシーケンスを行って疾患遺伝子を同定、クローニングする。疾患遺伝子は、症状の多彩さからも、重要な蛋白をコードしていると考えられ、遺伝子を同定後、すみやかにノックアウトマウス、あるいはノックインマウスを作成し、その蛋白の機能解析を行う。

(2) 「肥大性骨関節症」の疾患遺伝子の同定と蛋白機能解析、および、新しい発熱誘導分子の臨床的意義の検討

私たちは、平成20年4月、骨と発熱との関連が示唆される発熱を伴う肥厚性骨膜炎の3症例を報告した(第52回日本リウマチ学会総会; 発表者: 藤川敬太)。肥大性骨関節症(肥厚性骨膜炎)患者の疾患遺伝子を同定するとともに、コードする蛋白の機能解析を行う。また、発熱機構を解明したい。

3. 研究の方法

「中條-西村症候群」と「肥大性骨関節症」について、GeneChip アレイを用いた SNPs の homozygosity mapping で遺伝子座を同定した後、疾患遺伝子を同定する。同定された疾患遺伝子がコードする蛋白にもよるが、患者由来の細胞を使用して、機能解析を行う。

4. 研究成果

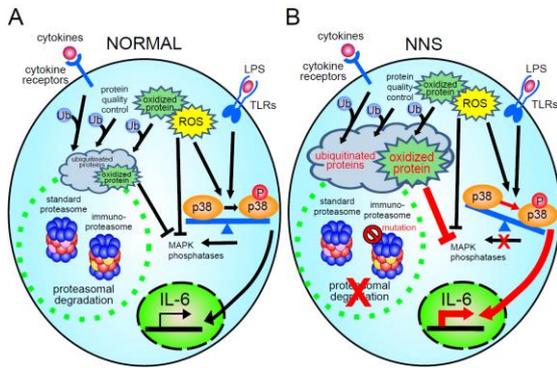
(1) 新しい自己炎症疾患「中條-西村症候群」の疾患遺伝子の同定と蛋白機能解析

中條-西村症候群の疾患遺伝子を同定した。GeneChip アレイを用いて SNPs の homozygosity mapping を行い、患者に共通かつ特異的なホモ領域の候補遺伝子座を同定、その領域にある30遺伝子を候補遺伝子として、シーケンスを行った。イムノプロテアソームの1コンポーネント *PMSB8* に点遺伝子変異が存在し、アミノ酸置換を伴っていた。次に、患者、患者の母親、健常者から樹立した細胞株を使用してプロテアソームの機能解析を行った。酵素活性のうち、キモトリプシン活性が著減、トリプシン活性とカスパーゼ活性も半減していた。患者の母親(ヘテロ)の線維芽細胞では、各酵素活性とも、患者と健常者の中間の値であった。さらに、プロテアソームの各コンポーネントのウエスタンプロット法にて、プロテアソーム形成不全を証明した。患者皮膚組織と患者由来培養細胞において、ユビキチン蓄積を認めた。以上の結果から、中條-西村症候群は、遺伝子変異によるプロテアソーム機能異常に起因する疾患であることが判明した。

プロテアソームと炎症との関係を検討するために、患者血清・線維芽細胞株・末梢血を使用、健常者と比較した。患者血清中のサイトカイン・ケモカインは、IL-6、IP-10、MCP-1、G-CSF が有意に上昇、患者線維芽細胞・末梢血の検討では、NF- κ B 非依存性であり、リン酸化 p38 の核での蓄積を認めた。また、線維芽細胞では、TNF α 刺激・無刺激ともに、有意な IL-6 産生増加がみられた。

近年、欧米から似た疾患(JMP 症候群、CANDLE 症候群)が報告されたが、ともに中條-西村症候群と同様、*PMSB8* の変異に起因するプロテアソーム機能不全症であった。

これらの病態をシェーマにすると以下のようになる。(A;健常者B;患者)



(2) 「肥大性骨関節症」の疾患遺伝子の同定と蛋白機能解析、および、新しい発熱誘導因子の臨床的意義の検討

欧米の研究者によって肥大性骨関節症 (PHO) の疾患遺伝子 (*HPGD*, *SLC02A1*) が同定されたため、患者 4 例の臨床像と疾患遺伝子、および成人の不明熱で最も多い自己炎症性疾患である家族性地中海熱の疾患遺伝子 (*MEFV*) を検討した。

①臨床的に 4 例は、家族性の完全型 PHO 1 例と孤発例の不全型 PHO 3 例であった。② *HPGD* 遺伝子変異は、4 例ともなかった。③ *SLC02A1* 遺伝子では、完全型 PHO 患者でホモ変異、不全型 PHO 患者でヘテロ変異が複数みられた。④ *MEFV* 遺伝子解析では、3 例に FMF variant (P369S/R408Q, R202Q/G304R) の変異がみられた。

以上の結果から、PHO は *SLC02A1* 遺伝子変異で生じ、*MEFV* 遺伝子変異が炎症を増悪させている可能性が示唆された。

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 9 件)

1. Migita K, Uehara R, Nakamura Y, Yasunami M, Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, Nakamura A, Masumoto J, Yachie A, Furukawa H, Ishibashi H, Ida H, Yamazaki K, Kawakami A, Agematsu K. Familial Mediterranean Fever in Japan. *Medicine (Baltimore)* 査読有 91:337-343, 2012 DOI; 10.1097/MD.0b013e318277cf75.
2. Migita K, Ida H, Moriuchi H, Agematsu K. Clinical relevance of *MEFV* gene mutations in Japanese patients with unexplained fever. *J Rheumatol.* 査読有 39:875-877, 2012 DOI;10.3899/jrheum.110700.
3. 井田弘明, 有馬和彦, 金澤伸雄, 吉浦孝一

郎 中條-西村症候群の原因遺伝子とプロテアソーム機能異常 リウマチ科 査読無 47:654-660, 2012

4. 井田弘明, 有馬和彦, 金澤伸雄, 吉浦孝一郎 プロテアソーム病 炎症と免疫 査読無 20:609-614, 2012

5. Arima K, Kinoshita A, Mishima H, Kanazawa N, Kaneko T, Mizushima T, Ichinose K, Nakamura H, Tsujino A, Kawakami A, Matsunaka M, Kasagi S, Kawano S, Kumagai S, Ohmura K, Mimori T, Hirano M, Ueno S, Tanaka K, Tanaka M, Toyoshima I, Sugino H, Yamakawa A, Tanaka K, Niikawa N, Furukawa F, Murata S, Eguchi K, Ida H, Yoshiura K. Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 査読有 108:14914-14919, 2011 DOI; 10.1073/pnas.1106015108.

6. 井田弘明, 吉浦孝一郎, 金澤伸雄 特集Ⅱ 自己炎症症候群 中條-西村症候群の臨床と病態 炎症と免疫 査読無 19:153-157, 2011

7. 井田弘明 医学用語解説 プロテアソーム 炎症と免疫 査読無 19:297-299, 2011

8. 金澤伸雄, 有馬和彦, 井田弘明, 吉浦孝一郎, 古川福実 中條-西村症候群 日本臨床免疫学会誌 査読無 34:388-400, 2011

9. 井田弘明, 金澤伸雄 中條-西村症候群 医学のあゆみ 査読無 235:1191-1195, 2010

[学会発表] (計 16 件)

1. Ida H Proteasome disability syndrome: a novel autoinflammatory syndrome. IEIIS 2012 Homeostatic Inflammation Symposium 2012.10.23-26 Tokyo
2. 井田弘明 成人の自己炎症性疾患の炎症病態 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会 H24 年 7 月 17 日~20 日 神戸
3. 金澤伸雄 中條-西村症候群：新規幼児例の報告と類似疾患の外国報告例との比較 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会 H24 年 7 月 17 日~20 日 神戸
4. 有馬和彦 全身性炎症を呈する遺伝性プロテアソーム機能不全症の発見 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会 H24 年 7 月 17 日~20 日 神戸

5. 井田弘明 プロテアソーム機能不全症(中條-西村症候群)の炎症病態 第33回日本炎症再生医学会 H24年7月5日~6日 福岡

6. 井田弘明 自己炎症症候群であるプロテアソーム機能不全症の解析結果を利用した関節リウマチの病態解明の試み 第56回日本リウマチ学会学術集会 H24年4月26日~28日 東京

7. Ida H Proteasome disability syndrome: an analysis of the pathogenesis of a new autoinflammatory syndrome, Nakajo-Nishimura syndrome. 75th annual meeting of the American College of Rheumatology (ACR 2011) 2011.11.5-9 Chicago

8. Ida H A novel mutation of proteasome subunit causes decrease of proteasome activity in Nakajo-Nishimura syndrome (familial Japanese fever). 10th World Congress on Inflammation 2011.06.25-29 Paris

9. Kanazawa N Nakajo-Nishimura syndrome (familial Japanese fever) and related autoinflammatory disorders accompanied with lipodystrophy. 10th World Congress on Inflammation 2011.06.25-29 Paris

10. 井田弘明 プロテアソーム機能不全症(中條-西村症候群)の病態解析 第32回日本炎症・再生医学会 H23年6月2日~3日 京都

11. 金澤伸雄 中條-西村症候群(家族性日本熱)と脂肪萎縮を伴う自己炎症疾患 第32回日本炎症・再生医学会 H23年6月2日~3日 京都

12. Arima K Decrease of proteasome activity is associated with a novel mutation of the proteasome catalytic subunit in an autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR 2011) 2011.5.25-28 London

13. 井田弘明 自己炎症疾患の診断と病態解析 第57回日本臨床検査医学会学術集 H22年9月9日~12日 東京

14. Ida H Functional human protein analysis in the post-genome era learning to new autoinflammatory syndrome (Nakajo-Nishimura syndrome). 6th International Congress on FMF and SAID (Autoinflammation 2010) 2010.9.2-9.6 Amsterdam

15. Kanazawa N, Nakatani Y, Ida H, Yoshiura K, Furukawa F National surveillance of Nakajo-Nishimura syndrome (familial Japanese fever) in Japan. 6th International Congress on FMF and SAID (Autoinflammation 2010) 2010.9.2-9.6 Amsterdam

16. 井田弘明 自己炎症症候群から学ぶポストゲノム時代の蛋白機能解析 第54回日本リウマチ学会総会・学術集 H22年4月22日~25日 神戸

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 自己炎症疾患又は自己免疫疾患関連遺伝子及びその利用

発明者: 長崎大学: 吉浦孝一郎、久留米大学: 井田弘明、和歌山県立医科大学: 金澤伸雄

権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2011-177269

出願年月日: 平成23年8月12日

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井田 弘明 (IDA HIROAKI)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号: 60363496

(2) 研究分担者

有馬 和彦 (ARIMA KAZUHIKO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 30423635

(3) 連携研究者

吉浦 孝一郎 (YOSHIURA KOHICHIRO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00304931