

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249056

研究課題名(和文)自己炎症性疾患に対する新たな分子細胞生物学的手法を駆使した病態解明・治療基盤開発

研究課題名(英文)Analysis and development of medical treatment for autoinflammatory diseases

研究代表者

平家 俊男(HEIKE, TOSHIO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90190173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,800,000円、(間接経費) 11,040,000円

研究成果の概要(和文)：自己炎症症候群は周期性発熱と特徴とし、自然免疫系に異常の端を発する新しい疾患概念である。インフラマソームの制御逸脱による炎症性サイトカイン産生が発症起点とされるが、分子病態において不明の点が多い。さらに、個々の疾患が有する多臓器病変が、インフラマソームの制御機構に帰するか否かについては不明である。患者さんより頂ける検体から病態解析を行うとともに、疾患特異的iPS細胞を作成し、分子細胞生物学的手法、モデル動物作成、次世代シーケンサーを用いたゲノミクス、トランスクリプトミクスの技法を駆使して自己炎症症候群の包括的解明を行い、新規の診療基盤体系確立、自然免疫系解明に繋げる。

研究成果の概要(英文)：Autoinflammatory disease is a new entity of inflammatory disorder, characterized by periodic fever. Although it is comprehended that autoinflammatory disease is caused by inflammatory cytokine production through dysregulated inflammasome function, many aspects are still remained to be resolved from the view point of molecular mechanism. Moreover, it is not well evaluated that multiple organ pathophysiology is all derived from dysregulated inflammasome function. Base on this fund, we develop the evaluation of autoinflammatory disease through patient-derived samples, disease-specific iPS cells, animal model experiment, and new medical technology such as next generation sequencing. These results lead to the establishment of medical care system for inflammatory disease along with the precise comprehension for autoinflammatory disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：自己炎症性疾患 インフラマソーム モザイシズム CAPS 高IgD症候群 NLRP3

1. 研究開始当初の背景

医学の進歩により、多くの感染症疾患、アレルギー性疾患、自己免疫疾患における炎症病態の解明が進み、それに基づいた治療基盤の開発に進みつつある。しかし、いまだに、日常診療においては、発熱を繰り返す原因不明の炎症性疾患に数多く遭遇し、診療に難渋している。近年、そのような疾患の中で、自然免疫系に関する分子の異常を基に、周期的に発熱を繰り返す一連の家族性周期熱症候群の存在が報告され、自己炎症症候群という概念提唱されている (McDermott MF, Cell 1999, 97:1333)。

この疾患群は、獲得免疫系の異常として知られる自己免疫疾患と発症機構の面から対比される疾患群であり、新たな疾患概念を持った疾患群である。自己炎症性疾患として、CAPS(cryopyrin-associated periodic syndrome, 原因遺伝子: NLRP3)、高 IgD 症候群 (原因遺伝子: mevalonate kinase) などの疾患が知られているが、いまだ原因不明の周期性発熱を示す多くの疾患が存在する。原因遺伝子が同定されていない疾患も含めて、血清サイトカインプロファイリングの結果等により過剰に産生される IL-1 β や IL-18 が炎症疾患の本態であると推測され、事実、NLRP3 変異の同定できないが臨床的には CAPS と診断される症例においても、抗 IL-1 β 製剤が病態の軽減を来すことが知られている。その分子基盤は、自然免疫系を司るインフラマソームと命名されたカパーゼ活性化複合体の制御機構の破綻が中心に位置すると考えられているが、(Martinon F, Cell 2004, 117:561)、その破綻のメカニズムは、様々な段階で発生し得る。単球、マクロファージ、樹状細胞など自然免疫を司る細胞には、ウイルスや細菌などの病原体に対して、速やかにかつ特異的に作動するよう、病原体が固有に持つ構造を認識するパターン認識受容体 (pattern-recognition receptor: PRR) がインフラマソーム内に存在する。NOD-like receptor (NLR) ファミリーに属する分子群が細胞質 PRR として機能し、中でも、NLRP3 (Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing) が重要な役割を果たし、50% の CAPS 症例に限り、NLRP3 遺伝子変異に基づく異常活性化が発症に寄与することが示された。さらに、NLRP3 は、アスベスト、シリカといった環境ストレスや尿酸、アミロイド β 線維といった宿主細胞由来物質をも認識してインフラマソームを活性化することが明らかとなり、高 IgD 症候群における蓄積分子、欠損分子の関与を含め、様々な要因によるインフラマソーム活性化による発症が示唆されている。さらに、新規のパターン認識受容体 (pattern-recognition receptor: PRR) を組み込むインフラマソームの存在も知られるようになっており、これらの新しい分子の異常

に端を発する自己炎症性疾患の存在も推測される。

2. 研究の目的

このような自己炎症性症候群の病態解明が進展する一方で、新たな多くの疑問が生じてきている。本研究においては、これらの疑問の解決を行い、自己炎症性疾患に対する病態解明を行うことを目的とする。

1) CAPS においては、NLRP3 の機能獲得型変異が報告されているが、なお半数の症例においては NLRP3 の変異を認めず、新たな原因を同定する必要がある。

2) 高 IgD 症候群においては mevalonate kinase の活性低下がどのような分子機構を介してインフラマソームの活性化を惹起するか不明である。

3) CAPS、高 IgD 症候群とも、炎症制御機構の破綻による炎症という共通症状を有するが、同時に CAPS にお症状、高 IgD 症候群における中枢神経症状等、疾患特有な症状が存在し、疾患の統括的把握がなされていない。

4) 原因不明の多くの周期性発熱疾患が存在する。

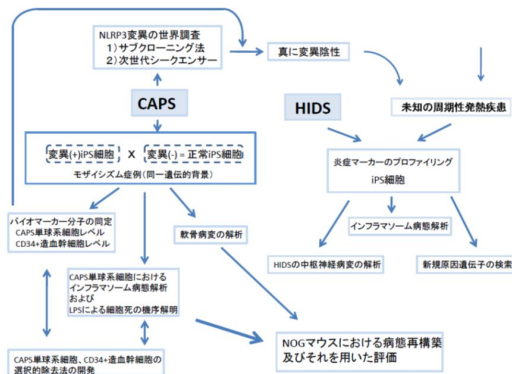
5) 包括的治療基盤が確立されていない。

このような課題のもと、最近我々は、通常検索で遺伝子変異の同定されない CAPS 症例において、NLRP3 遺伝子変異が体細胞モザイクで存在する症例を世界で初めて発見し、通常のヘテロ変異を持つ症例よりも、症状が比較的軽症であることを示した (Saito M, Arthritis Rheum 2005, 52:3579)。引き続いて、本邦 4 例の変異陰性症例の内 3 例に変異モザイシズムを同定し、日本において、体細胞モザイシズムが CAPS の発症において 25% 程度の頻度を占めることを報告した (Saito M, Blood 2008, 111:2132)。全世界的に CAPS の発症におけるモザイシズムの関与、意義について研究を進展させる必要に迫られている。また、最近我々は、高 IgD 症候群の確定診断法としての mevalonate kinase 測定系を日本で初めて確立し、確定診断実績がなかった日本で、6 例の高 IgD 症候群症例を見出し、高 IgD 症候群に対する研究基盤を整備した。さらに、iPS 細胞研究に関しては血液、骨格筋分、心筋領域においてすでに結果を蓄積しており、速やかに展開できる体制にある。(財)かずさ DNA 研究所とは共同研究の実績を積み重ねており、次世代シーケンサーを含む新規の視点からの研究展開が容易である。

3. 研究の方法

本研究は、自己炎症性症候群の中でも CAPS、高 IgD 症候群に重点をおき、CAPS におけるモザイシズム型発症病態解明・NLRP3 以外の新規責任遺伝子同定・軟骨病態解明・新規診断治療基盤開発、高 IgD 症候群における炎症活性化機構解明・中枢神経病変の病態解析・

新規治療基盤開発を行うとともに、原因が特定されていない周期性発熱疾患の病態・責任遺伝子同定を行い、自己炎症性症候群の包括的解明を行う。その成果を新規自然免疫炎症関連分子の検索に繋げ、自然免疫システムの機構解明に貢献する。以下にシエマを記す。



- 1) CAPS 発症要因として、NLRP3 変異モザイシズムを、全世界で検討する
CAPS の病態解析を行う目的で、通常の遺伝子変異検索では NLRP3 変異陰性とされている症例を全世界から集積し解析する。現在、アメリカ、オランダ、スペイン、フランス、イタリア等より 30 症例前後の検体収集が進んでいる。まず、我々が日本の症例で証明した検出方法に則り検証を行う。変異が同定されているエクソン 3, 4, 6 について、各 100 クローンづつ遺伝子検索を行うことにより、5% のモザイシズムを 95% の確率で同定する。また、正常人コントロールとして家族内同胞、もしくは両親に対し同様の検索を行い、遺伝子変異の有意性を統計学的に検討する。CAPS においては、NLRP3 変異ヘテロ型、NLRP3 変異モザイク型、NLRP3 変異陰性（さらに微小なモザイシズム、もしくは新規責任遺伝子）の 3 種類の発症様式があるが、NLRP3 変異モザイク型について質問形式で臨床情報を収集し、その臨床的特徴を把握する。
- 2) 次世代シーケンサーを用いた CAPS モザイシズム同定法の確立
現在我々が確立しているサブクローニングを用いる方法では、5% のモザイシズムを 95% の確率で見出す精度であるという限界があり、微小なモザイシズムを検出できない、すべてのエクソンについては検討できていない、等の問題を含んでいる。そのため、真に NLRP3 に変異を有さない CAPS 様患者を、厳密に絞り込んでいく必要がある。次世代シーケンサーを用いることにより、一度に膨大な量のシーケンスが可能となり、微小なモザイシズムの検出、および高精度でのモザイシズムの除外が可能となった。
- 3) NLRP3 変異モザイシズム患者より iPS 細胞を作成する

NLRP3 の発現は、単球、好中球、軟骨細胞に限られる。しかし、軟骨細胞を患者より頂くことは倫理的に不可能である。また、単球、好中球は寿命が短く、患者から大量、頻回、頂くことにも物理的困難を伴う。従って、患者由来線維芽細胞より iPS 細胞を作成し、in vitro で単球、軟骨細胞作成を行うことで確固とした研究体制を確立できる(Grigoriadis AE, Blood, 2010, 115:2769, Teramura T, Cell Reprogram, 2010, 12:249)。この場合、NLRP3 変異モザイシズム患者より樹立することから、NLRP3 遺伝子のみで異常または正常を有し、遺伝的背景を同一とする 2 種類の異なる iPS 細胞が作成できる。正常 iPS 細胞との純度の高い比較研究を行い、その病態解明を行う。

- 4) NLRP3 変異モザイシズム患者由来 iPS 細胞を用いた軟骨病変に対する病態解析および治療基盤の確立
疾患 iPS 細胞、正常 iPS 細胞から軟骨細胞分化を行い、両者比較の上、インフラマソーム遺伝子変異により、なぜ特異的軟骨病変が発症するのか解明する。発現遺伝子、発現タンパク質を網羅的に解析し、軟骨増殖に至る機序を明らかにする。さらに、軟骨増殖を抑制する分子の同定を行い、治療基盤の開発を行う。
- 5) 高 IgD 症候群患者より iPS 細胞を作成し、炎症機構を解明する
我々の開発した mevalonate kinase 測定系により、高 IgD 症候群の確定診断が日本において可能となり、この 2 年間で 6 名の日本人高 IgD 症候群患者を見出した。高 IgD 症候群におけるインフラマソーム活性化機構は解明されておらず、代謝性疾患としての側面より HMG-CoA 還元酵素阻害薬（スタチン）の使用報告もなされているが、その効果は確定していない。高 IgD 症候群患者より単球、好中球を作成し、炎症機構の解明を行う。さらに、それを抑制する分子を同定し、高 IgD 症候群に対する治療基盤を確立する。

- 6) 原因が特定できない周期性発熱疾患より iPS 細胞を作成する
1) で絞り込んだ真の NLRP3 変異陰性 CAPS 様疾患や、その他の原因不明の周期性発熱疾患から、iPS 細胞を作成する。単球系細胞を作成し、インフラマソーム活性化機構の評価を行い、後の研究の資源とする。

4. 研究成果

- 1) 2) 3)

本研究において、全世界的において NLRP3 遺伝子モザイシズムが、CAPS 発症の 1 つの大きな要因を占めることを見出した。さらに、従

来のサブクローニング法では5%のモザイクが検出限界であるため、1%の感度で検出可能な次世代シーケンサーを用いた大量解析の系を開発し、検索を継続している。さらに、真の変異陰性 CAPS に対して、エクソーム解析等にて原因遺伝子探索を行なっている。

4)

CAPS 患者においては膝関節軟骨細胞の過剰増殖による変形・機能障害がQOLを大きく低下させる。軟骨細胞はCAPSの原因分子であるNLRP3分子を発現するものの、インフラマソームを構成する他の分子を発現しておらず、インフラマソーム活性化がその病態とは考えられない。本研究において、CAPS由来iPS細胞から軟骨細胞を作製することに成功し、かつ疾患特異的な過剰増殖病態を再現した。

5)

併せて、高IgD症候群iPS細胞を作製完了し、病態解明へ研究を進展させている。

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 10 件)

- 1) Nakagawa K, Gonzalez-Roca E, Souto A, Kawai T, Umebayashi H, Campistol JM, Cañellas J, Takei S, Kobayashi N, Callejas-Rubio JL, Ortego-Centeno N, Ruiz-Ortiz E, Rius F, Anton J, Iglesias E, Jimenez-Treviño S, Vargas C, Fernandez-Martin J, Calvo I, Hernández-Rodríguez J, Mendez M, Dordal MT, Basagaña M, Bujan S, Yashiro M, Kubota T, Koike R, Akuta N, Shimoyama K, Iwata N, Saito MK, Ohara O, Kambe N, Yasumi T, Izawa K, Kawai T, Heike T, Yagüe J, Nishikomori R, Aróstegui JI. Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis*. 2013 Dec 10. [Epub ahead of print]
- 2) Kawai M, Yoshikawa T, Nishikomori R, Heike T, Takahashi K : Obvious optic disc swelling in a patient with cryopyrin-associated periodic syndrome. *Clin Ophthalmol* 2013;7(1581-1585)
- 3) Imagawa T, Nishikomori R, Takada H, Takeshita S, Patel N, Kim D, Lheritier K, Heike T, Hara T, Yokota S : Safety and efficacy of canakinumab in Japanese patients with phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndrome as established in the first open-label, phase-3 pivotal study (24-week results). *Clin Exp Rheumatol* 2013;31(302-309)
- 4) Yokota S, Nishikomori R, Takada H, Kikuchi M, Nozawa T, Kanetaka T, Kizawa T, Miyamae T, Mori M, Heike T, Hara T, Imagawa T : Guidance on the use of canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome in Japan. *Mod Rheumatol* 2013;23(425-429)
- 5) Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito MK, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O : Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res* 2012;19(143-152)
- 6) Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuser JE, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito MK : Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood* 2012;120(1299-1308)
- 7) Yokota S, Kikuchi M, Nozawa T, Kizawa T, Kanetaka T, Miyamae T, Mori MA, Nishikomori R, Takata H, Heike T, Hara T, Imagawa T : An approach to the patients with cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) : a new biologic response modifier, canakinumab. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2012;35(23-29) Review. Japanese.
- 8) Sakai H, Heike T : Hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2011;34(382-387) Review. Japanese.
- 9) Tanaka N, Izawa K, Saito MK, Sakuma M, Oshima K, Ohara O, Nishikomori R, Morimoto T, Kambe N, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, de Saint Basile G, Neven B, van Gijn M, Frenkel J,

Aróstegui JI, Yagüe J, Merino R, Ibañez M, Pontillo A, Takada H, Imagawa T, Kawai T, Yasumi T, Nakahata T, Heike T : High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in patients with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome: results of an International Multicenter Collaborative Study. Arthritis Rheum 2011;63(3625-3632)

- 10) Tahara M, Sakai H, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Nagata I, Inui A, Fujisawa T, Shigematsu Y, Nishijima K, Kuwakado K, Watabe S, Kameyama J : Patient with neonatal-onset chronic hepatitis presenting with mevalonate kinase deficiency with a novel MVK gene mutation. Mod Rheumatol 2011;21(641-645)

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 平家俊男：自己炎症性疾患における診療研究の新展開～“炎症”と小児発熱性疾患～. 第 117 回日本小児科学会学術集会 2013.4.12 名古屋
- 2) 平家俊男：自己炎症性疾患の包括的把握に向けた臨床研究体制の整備について. 第 116 回日本小児科学会学術集会 2013.4.20 広島

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 平家俊男 他、診断と治療社、自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患、2012

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

<http://aid.kazusa.or.jp/2013/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平家 俊男 (HEIKE, Toshio)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：90190173

(2) 研究分担者

西小森 隆太 (NISHIKOMORI, Ryuta)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70359800

八角 高裕 (YASUMI, Takahiro)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：00511891

小原 収 (OHARA, Osamu)
(財)かずさ DNA 研究所・ヒトゲノム研究部・部長
研究者番号：20370926

神戸 直智 (KAMBE, Naotomo)
千葉大学・医学研究科・講師
研究者番号：50335254

(3) 連携研究者

なし

()

研究者番号：