

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591551

研究課題名(和文)CARD15の炎症性疾患における病態形成機序に関する研究

研究課題名(英文)Pathogenesis and pathophysiology of CARD15 related inflammatory disorders

研究代表者

高田 英俊(Hidetoshi, Takada)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70294931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ブドウ膜炎、家族性地中海熱、CINCA症候群の原因となる遺伝子変異を同定した。それらの患者末梢血から、SeVベクターを用いて4因子(OCT4、SOX2、KLF4、MYC)を発現させる方法で、疾患特異的iPS細胞を樹立した。iPS細胞からEmbryoid bodyを作成し、血球系細胞に分化させた。Embryoid bodyからCD34陽性細胞を純化し、これから血管内皮細胞、およびAGM-S3 stromal cell line等と培養することでmyeloid系細胞を分化させることができた。各細胞集団に各TLRリガンド刺激を行い培養上清、細胞のmRNA発現を検討した結果、特徴ある反応を呈した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the genetic causes of uveitis, familial Mediterranean fever, and CINCA syndrome patients, and established disease specific iPS cells from peripheral blood cells of the patients using SeV vector for the induction of OCT4, SOX2, KLF4, and MYC expression. Embryoid bodies were established from the iPS cells, and differentiated into hematopoietic cells. CD34-positive cells were purified from embryoid cells by using magnetic beads, and differentiated into vascular endothelial cells and vascular wall cells. In addition, myeloid cells were differentiated by incubating the cells with AGM-S3 stromal cells. When we analyzed the responsiveness to produce cytokines, individual cells derived from disease-specific iPS cells showed characteristically enhanced responsiveness compared with normal control cells.

研究分野：小児科学

キーワード：iPS細胞 CARD15 自己炎症性疾患

1. 研究開始当初の背景

CARD15 は細菌の細胞膜成分であるペプチドグリカンの構成要素である muramyl dipeptide を認識し、自然免疫における病原体認識する主体であると考えられている。CARD15 からのシグナルは NF- B や MAP/SAP kinase 経路を活性化し、種々の遺伝子発現を介して炎症を惹起する。CARD15 遺伝子異常がクローン病患者の原因の 1 部であり、また 4 歳以前に発症する若年発症サルコイドシスでも CARD15 の遺伝子変異が認められる。これまでに我々は、若年発症サルコイドシスではない通常のぶどう膜炎などでも CARD15 遺伝子異常があり、疾患と関連していることを確認している。しかし CARD15 遺伝子異常が実際の病態にどのように関与しているかはまだ不明な点が多い。これらの患者の病像は、CINCA 症候群 (Chronic Infantile Neuro-Cutaneous Articular syndrome) や家族性地中海熱とは全く異なることから、CARD15 遺伝子異常による疾患の病態解明には、好中球、単球などの血球系細胞での解析以外に、血管内皮細胞、軟骨細胞など種々の細胞ごとの分子生物学的評価が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、ぶどう膜炎、大動脈炎症候群、若年性特発性関節炎、炎症性腸疾患等、種々の炎症性疾患について、多数の症例で CARD15 遺伝子変異の関与を調べ、iPS 細胞から分化させた各種の細胞を用いて、炎症性疾患の病態を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ぶどう膜炎、大動脈炎症候群、若年性特発性関節炎、炎症性腸疾患などの炎症性疾患、及び家族性地中海熱、CINCA 症候群患者を対象として、末梢血から DNA および total RNA を抽出し、CARD15 遺伝子や他の炎症の原因となる遺伝子異常の有無を調べた。CARD15 遺伝子変異を認めた場合、変異 CARD15 遺伝子を発現ベクター p3xFLAG-CMV-14 vector に cloning し、NF- B の活性化をルシフェラーゼアッセイで定量した。炎症病態の責任遺伝子が同定された後、疾患特異的 iPS 細胞を、患者末梢血単核球から作成し、軟骨細胞、血管内皮細胞、単球/マクロファージに分化させ、分化した細胞での機能的解析を行い、各遺伝子異常による各疾患の病態解析を行った。

4. 研究成果

ぶどう膜炎、家族性地中海熱、CINCA 症候群の原因となる遺伝子変異を同定した。それらの患者末梢血から、SeV ベクターを用いて 4 因子 (OCT4、SOX2、KLF4、MYC) を発現させる方法で、疾患特異的 iPS 細胞を樹立した (図 1)。iPS 細胞から Embryoid body を作成し (図 2)、血球系細胞に分化させた。

図 1. 疾患特異的 iPS 細胞の作成

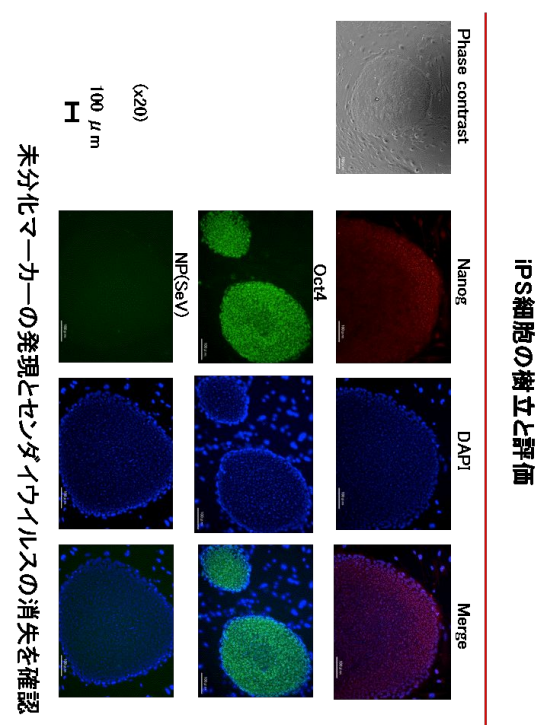
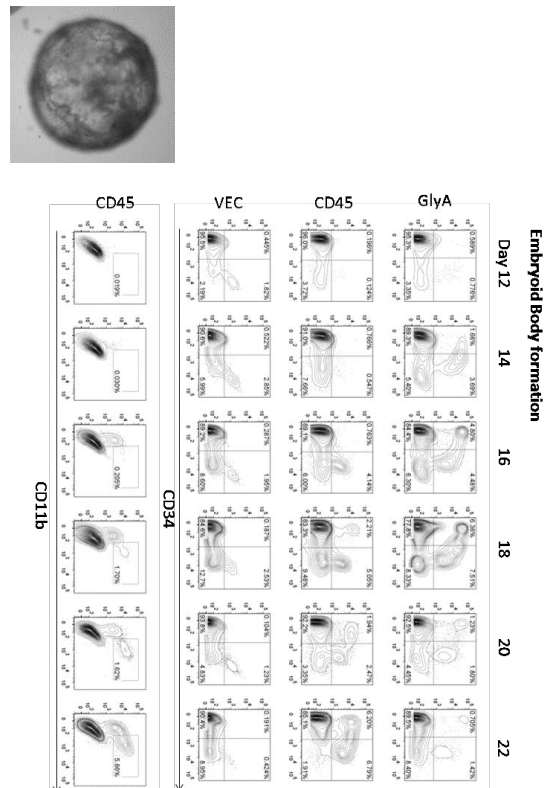


図 2. Embryoid body formation

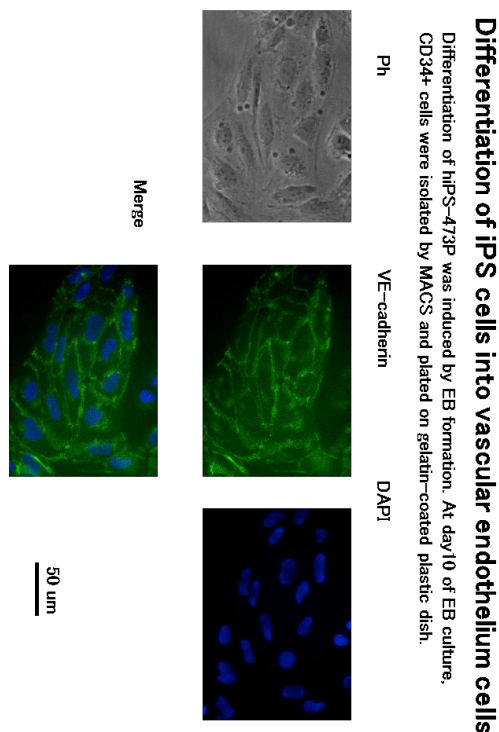


Embryoid body から CD34 陽性細胞を純化し、これから血管内皮細胞 (図 3) および AGM-S3 stromal cell line 等と培養することで myeloid 系細胞を分化させることができた。各細胞集団に各 TLR リガンド刺激を行い培養上清、細胞の mRNA 発現を検討した結果、特徴

ある反応を呈した。

これらの結果から、類似した炎症病態ではあるが、NF- κ B 経路、Caspase 1 経路、いずれの炎症過程をとるかによって、細胞自身が原因によって異なる正確を有し、血管内皮細胞自身の炎症病態など、これまで知られていなかった病態が明らかになった。

図.3 疾患特異的 iPS 細胞から血管内皮細胞への分化



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 14 件)

Takimoto T, Takada H, Ishimura M, Kirino M, Hata K, Ohara O, Morio T, Hara T: Wiskott-Aldrich syndrome in a girl caused by heterozygous WASP mutation and extremely skewed X-chromosome inactivation: a novel association with maternal uniparental isodisomy 6. *Neonatology* 107(3): 185-190, 2015
doi: 10.1159/000370059.

Mitsuiki N, Yang X, Bartol SJ, Grosserichter-Wagener C, Kosaka Y, Takada H, Imai K, Kanegane H, Mizutani S, van der Burg M, van Zelm MC, Ohara O, Morio T: Mutations in Bruton's tyrosine kinase impair IgA responses. *Int J Hematol* 101(3): 305-313, 2015
doi: 10.1007/s12185-015-1732-1.

Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H, Saito M, Tanaka T, Yamamura K, Sakai Y, Takada H, Miyamoto T, Mizuno Y, Ouchi K, Waki K, Hara T: Kawasaki

disease-specific molecules in the sera are linked to microbe-associated molecular patterns in the biofilms. *PLoS One* 20;9(11): e113054, 2014

doi: 10.1371/journal.pone.0113054.

Yamazaki Y, Yamada M, Kawai T, Morio T, Onodera M, Ueki M, Watanabe N, Takada H, Takezaki S, Chida N, Kobayashi I, Ariga T: Two novel gain-of-function mutations of STAT1 responsible for chronic mucocutaneous candidiasis disease: impaired production of IL-17A and IL-22, and the presence of anti-IL-17F autoantibody. *J Immunol* 193(10): 4880-4887, 2014

doi: 10.4049/jimmunol.1401467.

Yamamura K, Takada H, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Morihana E, Ohga S, Hara T: Early progression of atherosclerosis in children with chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 53(10): 1783-1787, 2014

doi: 10.1093/rheumatology/keu180.

Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Hu W, Kobayashi M, Lawo JP, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T: Efficacy and safety of IgPro20, a subcutaneous immunoglobulin, in Japanese patients with primary immunodeficiency diseases. *J Clin Immunol* 34(2): 204-211, 2014

doi: 10.1007/s10875-013-9985-z.

Doi T, Ohga S, Ishimura M, Takada H, Ishii K, Ihara K, Nagai H, Hara T: Long-term liposteroid therapy for idiopathic pulmonary hemosiderosis. *Eur J Pediatr* 172(11): 1475-1481, 2013

doi: 10.1007/s00431-013-2065-9.

Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T: B cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol* 98(3): 355-360, 2013

doi: 10.1007/s12185-013-1408-7.

Ishimura M, Yamamoto H, Mizuno Y, Takada H, Goto M, Doi T, Hoshina T, Ohga S, Ohshima K, Hara T: A non-invasive diagnosis of histiocytic necrotizing lymphadenitis by means of gene expression profile analysis of peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Immunol* 33(5): 1018-1026, 2013

doi: 10.1007/s10875-013-9897-y.

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* 23(3): 425-429, 2013

doi: 10.1007/s10165-012-0769-8.

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* 31(2): 302-309, 2013 <http://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=5478>

Muñoz-Ruiz M, Pérez-Flores V, Garcillán B, Guardo AC, Mazariegos MS, Takada H, Allende LM, Kilic SS, Sanal O, Roifman CM, López-Granados E, Recio MJ, Martínez-Naves E, Fernández-Malavé E, Regueiro JR: Human CD3 δ , but not CD3 ϵ , haploinsufficiency differentially impairs α versus β surface TCR expression. *BMC Immunol* 21; 14:3, 2013 doi: 10.1186/1471-2172-14-3.

Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T: Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan. *Clin Endocrinol* 77(4): 628-634, 2012

doi:10.1111/j.1365-2265.2012.04390.

x.

Shiraishi A, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Takimoto T, Takada H, Miyamoto T, Abe Y, Hara T: Treatment choice of immunotherapy or further chemotherapy for Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 59(2): 265-270, 2012 doi: 10.1002/pbc.24039.

[学会発表](計 17 件)

Takada H Symposium: Primary Immunodeficiency Diseases: Basic and clinical advances Gene therapy for PID: A novel approach. The 11th Asian Society for Pediatric Research Apr 15-18, 2015, Osaka International Convention Center, Osaka, Osaka

Takada H, Takimoto T, Ishimura M, Urata M, Morio T, Hara T: Wiskott-Aldrich syndrome in a girl caused by heterozygous WASP mutation and extremely skewed X-chromosome inactivation: an association of non-random X-chromosome inactivation and uniparental isodisomy

6. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Oct 29-Nov 1, 2014, Prague, Czech Republic Mitsuki N, Yang X, Bartol S, Kosaka Y, Takada H, Imai K, Kanegane H, Mizutani S, Burg VD, Zeim MV, Ohara O, Morio T: Mutations in Bruton's tyrosine kinase impair IgA responses. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Oct 29-Nov 1, 2014, Prague, Czech Republic

Hara T, Ishimura M, Takada H, Kusuda Y, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H: Association between primary immunodeficiency diseases and vasculitis syndrome. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Oct 29-Nov 1, 2014, Prague, Czech Republic

Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Hara T, Rojavin M, Hu W, Hubsch A, Nonoyama S: Safety and tolerability of Hizentra in patients with primary immunodeficiency in Japan, Europe, and the US. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Oct 29-Nov 1, 2014, Prague, Czech Republic

Imai K, Kanegane H, Yamada M, Takada H, Ariga T, Kobayashi M, Rojavin M, Bexon M, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T: Safety, Tolerability, and Efficacy of Hizentra® in Japanese Patients with Primary Immunodeficiency over 48 Weeks. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, Feb 28-Mar 4, 2014, San Diego, CA, USA

Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Tsutani K, Igarashi A, Bexon M, Rojavin M, Kobayashi M, Lawo JP, Zbrozek A, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T: Health-related quality of life of Japanese patients with primary immunodeficiency diseases receiving Ig-Pro20, a 20% liquid subcutaneous immunoglobulin (Hizentra®). American Academy of Allergy, Asthma & Immunology, Feb 28-Mar 4, 2014, San Diego, CA, USA

Takada H: Clinical and genetic characteristics of interleukin-1 receptor-associated kinase-4 deficiency in Japan. The 4th Japanese Society of Hematology International Symposium 2013 in Ehime May24, 2013, Matsuyama-shi Dougo Onsen Yamatoyahonten, Ehime, Matsuyama

Hara T, Ishimura M, Takada H: Autoimmune diseases in patients with primary immunodeficiency diseases. Controversies in Rheumatology & Autoimmunity

2013, April 4-6, 2013 Budapest, Hungary
Hara T, Ishimura M, Yamamoto H, Mizuno Y, Takada H, Ohshima K: A Non-invasive Diagnosis of Histiocytic Necrotizing Lymphadenitis. Frontiers in Immunology Research 2013 International Conference, July 1-4, 2013 Monte Carlo, Monaco
Hara T, Eljaafari FM, Takada H: IFN-production from cord blood NK cells by various Toll-like receptor ligands. Frontiers in Immunology Research 2012 International Conference. Jul 1-4, 2012, Salzburg, Austria
Miyawaki T, Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Nonoyama S, Ariga T, M Bexon, M Rojavin, Kobayashi M, Hara T: Efficacy and safety of Hizentra®, a subcutaneous immune globulin, in Japanese patients with primary immunodeficiency diseases. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Oct 3-6, 2012, Florence, Italy
Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T: Endocrine Complications in Primary Immunodeficiency Diseases in Japan. The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research. May 17-19, 2012, Seoul, Korea
Shiraishi A, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Takimoto T, Takada H, Miyamoto T, Abe Y, Hara T: Treatment outcomes of Epstein Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in a single institution. The 8th Asian Society for Pediatric Research. May 17-19, 2012, Seoul, Korea
Ishimura M, Muneuchi J, Takada H, Hoshina T, Ikeda K, Ohga S, Hara T: Incomplete Kawasaki disease with coronary artery aneurism in a patient with chronic granulomatous disease. The 10th International Kawasaki Disease Symposium. Feb 7-10, 2012, Hyatt Regency Kyoto, Kyoto, Japan
Ishimura M, Mizuno Y, Takada H, Goto M, Doi T, Hoshina T, Ohga S, Hara T: An Early and Non-invasive Diagnostic Method for Histiocytic Necrotizing Lymphadenitis. The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research (ASPR). May 17-19, 2012, Seoul, Korea
Takada H, Ishimura M, Doi T, Imai K, Sasahara Y, Kanegane H, Nishikomori R, Morio T, Heike T, Kobayashi M, Ariga S, Tsuchiya S, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T: Nation-wide survey of patients with primary immunodeficiency diseases in Japan: 2008. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiency

ciencies. Oct 3-5, 2012, Firenze
Takada H, Nozaki M, Ishimura M, Ihara K, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T: Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan. 15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiency. Oct 3-5, 2012, Firenze

〔図書〕(計4件)

高田英俊:

原発性および続発性免疫不全状態 .
小児の臓器移植および免疫不全状態における予防接種ガイドライン 2014 .

監修: 日本小児感染症学会

作成: 「小児の像医移植および免疫不全状態における予防接種ガイドライン 2014」作成委員会

協和企画 東京 2014

高田英俊:

免疫不全症-自然免疫不全 .

小児の発熱 A to Z .

編集: 原 寿郎

診断と治療社 東京 2012

高田英俊:

Mydosome 異常症 (IRAK4 および MyD88 欠損症) .

自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患 .

編集: 近藤直美、平家俊男

診断と治療社 東京 2012

高田英俊:

Mendel 遺伝型マイコバクテリア感染症 (IL-12、IFN- 系の異常) .

自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患 .

編集: 近藤直美、平家俊男 診断と治療社 東京 2012

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

該当するものなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 英俊 (TAKADA Hidetoshi)

九州大学・大学院医学研究院周産期・小児
医療学・教授

研究者番号: 70294931

(2) 研究分担者

瀧本 智仁 (TAKIMOTO Tomohito)

九州大学・大学病院・医師不足分野等教育
指導者

研究者番号: 50599511

田中 珠美 (TANAKA Tamami)
九州大学・大学院医学研究院・学術研究員
研究者番号： 60423547

(3) 連携研究者
該当者なし