

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790997

研究課題名(和文)疾患iPS細胞を用いた新規プロテアソーム不全症(中條 西村症候群)の病態解析

研究課題名(英文) Analysis of pathogenesis of Nakajo-Nishimura syndrome associated with proteasome-dysfunction by using disease-specific iPS cell.

研究代表者

柳町 昌克 (Yanagimachi, Masakatsu)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00608911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：中條-西村症候群は免疫プロテアソームの触媒ユニットである 5i をコードする遺伝子である PSMB8 の変異が原因の自己炎症性疾患であるが、病態解明や有効な治療法は開発されていない。中條-西村症候群の患者の皮膚線維芽細胞から疾患特異的 iPS 細胞を作成し以下の検討を行った。中條-西村症候群特異的 iPS 細胞から誘導した単球系細胞を用いてプロテオソーム活性を評価したところ、コントロール iPS 細胞由来の単球系細胞と比べてキモトリプシン活性が低下しており、同様に炎症性サイトカインの産生能力に関しても実際の患者の単球細胞と同じ表現系を再現できた。これらの実験系を用いて病態解析や創薬開発を行っている。

研究成果の概要(英文)：Nakajo-Nishimura syndrome (NNS) is a proteasome-associated autoinflammatory syndrome caused by PSMB8 gene mutation. The pathogenesis of and treatment for NNS remain to be established. We have studied these by using NNS-specific iPS cell. Chymotrypsin-like proteasome activity decreased in monocyte-like cells derived from NNS-specific iPS cells compared to that from control iPS cells. Inflammatory cytokines such as IL-6 were higher in culture supernatant of monocyte-like cells derived from NNS-specific iPS cells than that from control iPS cells. These results were consistent with those of primary monocyte of NNS patients. We are going to continue the study for pathogenesis of and drug discovery for NNS with this technique.

研究分野：内科系臨床医学

キーワード：中條-西村症候群 自己炎症性疾患 プロテオソーム iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 中條-西村症候群(NNS)は、乳幼児期に凍瘡様皮疹で発症し、弛張熱や結節性紅斑様皮疹を伴い、次第に顔面・上肢を中心とした上半身のやせ(脂肪萎縮)と拘縮を伴う長く節くれ立った指趾が明らかになる遺伝性疾患であり、自己炎症性症候群の一つと考えられている。繰り返す炎症と進行するやせ・消耗を主症状とする、早世な疾患である。標準的治療はなく、ステロイド投与により発熱・炎症反応の軽減を認めるが、脂肪筋萎縮・るいそうには無効である。患者は進行する全身の消耗とステロイドの副作用などにより死に至ることから、疾患特異的で副作用の少ない治療法の開発が喫緊の課題である。2011年に、PSMB8(免疫プロテアソーム 5i)遺伝子変異が中條西村症候群の責任遺伝子と同定され(PNAS 2011;108(36):14914-9.)、本症候群は、免疫プロテアソームが責任遺伝子である新規の疾患群(プロテアソーム不全症)であると考えられる。免疫プロテアソームの異常が中條西村症候群の病態の中心であると考えられるが、免疫プロテアソームの異常がどのようにして脂肪萎縮や骨病変などの多彩な炎症・消耗性疾患の病態に関与するのかは不明な状態であった。

(2) iPS細胞(Cell, 2007,131;861)は京都大学iPS細胞研究所の山中らによって確立された多能性幹細胞である。ヒト体細胞より簡便に誘導され、血球をはじめとして、神経細胞・心筋細胞・脂肪細胞など様々な細胞種に分化できることが報告されている。再生医療への応用が期待される一方、患者由来の様々な種類の細胞を得る手段としても極めて有力であり、遺伝子改変技術も進歩しており、疾患特異的iPS細胞を用いた疾患iPS細胞研究の黎明期であった。

2. 研究の目的

(1) PSMB8(免疫プロテアソーム 5i)遺伝子変異が、中條-西村症候群の多彩な病態に及ぼすメカニズムを明らかにする。

(2) 未だ有効な治療法がない中條-西村症候群の治療薬を同定・開発するため、既存薬物・新規化合物を用いて、iPS細胞から分化誘導した免疫系細胞や脂肪細胞を対象に創薬スクリーニングを行い、治療薬候補となる化合物を同定する。

3. 研究の方法

(1)【平成24年度】

中條-西村症候群の患者由来iPS細胞の樹立と評価:2名の患者と保因者3名の皮膚線維芽細胞を採取し、iPS細胞を樹立する。

免疫細胞分化系の確立:京都大学iPS細胞研究所で樹立しているXeno-free, feeder-free血球分化法を改良して、サイトカインや培地の条件を検討し血球前駆細胞 単球 樹状細胞・マクロファージへのステップワイズな分化法を確立する。

脂肪細胞分化系の確立:ヒトES/iPS細胞から誘導した脂肪細胞の機能解析を行うためのiPS細胞からの脂肪細胞の分化系を確立する。

(2)【平成25-26年度】

平成24年度に樹立した系を用いて、疾患特異的iPS細胞と健常コントロールiPS/ES細胞から分化誘導した単球系の血液細胞や脂肪細胞の以下の機能解析を行う。

血球系細胞を用いてプロテアソーム活性の評価を行う。

血球系細胞を用いてサイトカイン産生能の評価を行う。

脂肪細胞と血液細胞の混合培養系を用い

て、脂肪萎縮症や高サイトカイン血症の病態解析を行う。

4. 研究成果

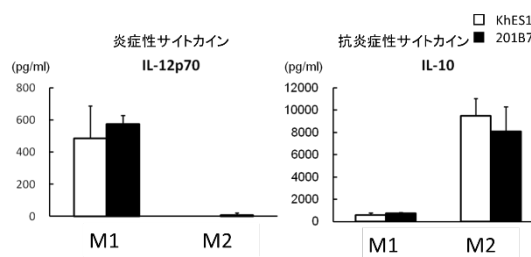
(1) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立

2名の患者と保因者3名の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞の樹立し、iPS 細胞としての評価（テラトーマ試験や遺伝子発現解析など）を行い、今後の研究に使用可能なクローンの選別を行った。さらにそれらの候補クローン別の血球への分化能や脂肪細胞への分化能について検討を行った。iPS 細胞一般的な特徴としてクローンによって分化効率が異なることが知られているが、NNS（中條-西村症候群）-iPS 細胞でもクローン間の分化効率の差は認められたが、正常 iPS 細胞と比べて分化効率や分化能に差は認められなかった。これらの iPS 細胞は理研バイオリソースセンターに提供した。

(2) iPS 細胞からの単球系細胞の分化誘導法の確立

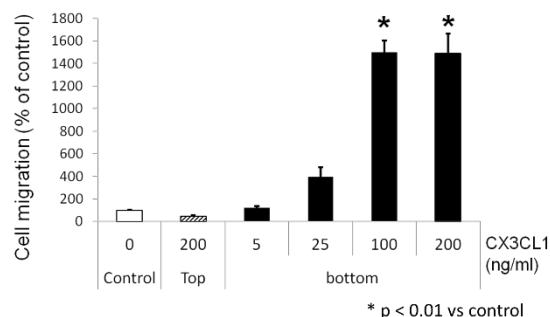
中條-西村症候群は免疫プロテアソームの機能不全が背景にある疾患群であり、免疫プロテアソームが恒常的に発現している単球系細胞（特に樹状細胞）は病態解析において重要なターゲットであり、「iPS 細胞から免疫担当細胞（樹状細胞やマクロファージ）を安定して分化誘導する」実験系の確立が必要である。このテーマに対して既に取り組んでいた実験系の詳細な検討を行った。この系を用いると機能的な単球やマクロファージ・樹状細胞を分化誘導することが可能となった。当方法では iPS 細胞由来の単球から樹状細胞やマクロファージ（特に炎症性マクロファージ(M1)や制御性マクロファージ(M2)）を簡便な方法で安定して誘導できる（図1）。

図1 M1/M2 マクロファージ サイトカイン profile



さらにこれらの iPS 細胞由来の単球やマクロファージ・樹状細胞はサイトカイン産生能や抗原取込能などの機能検査でもプライマリー細胞と近似した機能を有していることを確認した(図2)。

図2 Chemotaxis assay for CX3CL1



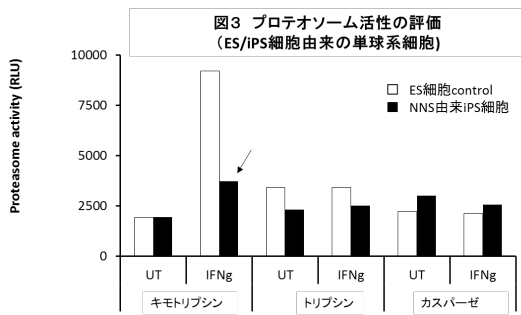
この iPS 細胞/ES 細胞からの単球・樹状細胞・マクロファージの分化誘導系の確立に関して英文雑誌に報告した（PLoS One. 2013;8(4):e59243.）。

（国際特許：PCT/JP2012/055152）

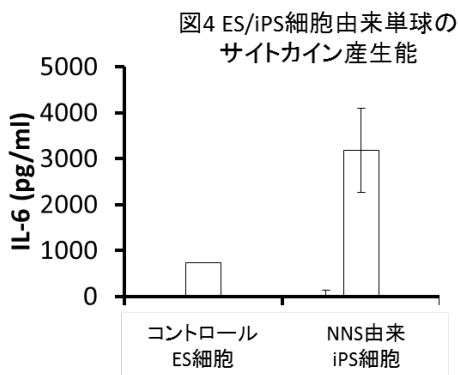
(3) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた機能解析

京都大学 iPS 細胞研究所で樹立した健康コントロール ES/iPS 細胞と中條-西村症候群の患者由来 iPS 細胞を用いて、単球分化を行い、得られた 2 種類の単球の Proteasome 活性を測定した。

中條-西村症候群の患者 iPS 細胞由来単球では、健康コントロールに比べてキモトリプシン活性が低く、Trypsin 活性や Caspase 活性は健康コントロールと同程度であり、実際の患者の血球を用いた既報の通りの結果が再現された(図3)。



サイトカイン産生についても検討し、中條西村症候群の患者 iPS 細胞由来単球は、LPS+ATP 刺激により健常コントロール iPS 細胞由来の単球に比べて IL-6, IL-1beta の産生が高く、IFN-刺激により IP-10 の産生が高いことが判明し、今後の病態解明や創薬に繋がる実験系として確立できた(図 4)。



また、本疾患の病態における活性酸素の関与を評価するために患者の尿中 8-OHdG を測定したが健常コントロールと有意差を認めなかった。今後他の手法による酸化ストレスの評価を行う。

(4) 創薬

上記のサイトカイン評価系を応用して、本疾患特異的に炎症性サイトカインを抑制する薬剤を発見するために化合物ライブラリーなどを用い創薬のスクリーニングを行う。

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 1 件)

1) Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, et al. Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell-free conditions. PLoS One. 2013;8(4):e59243. 【doi: 10.1371/journal.pone.0072551】(査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

柳町昌克, 丹羽明, 田中孝之, 他: iPS 細胞からの M・樹状細胞の分化誘導法の確立 ~ 自己免疫疾患・自己炎症性疾患の病態解明にむけて ~ 第 14 回神奈川小児免疫病・リウマチ性疾患研究会 2013.7.12 横浜ベイシェラトン(神奈川県横浜市)

柳町昌克, 丹羽明, 田中孝之, 他: iPS 細胞から単球・樹状細胞の分化誘導と疾患 iPS 細胞研究への応用. 第 5 回自己炎症疾患研究会 2012.7.6 福岡朝日ビル(福岡県福岡市)

Masakatsu Yanagimachi,

Differentiation of monocytic lineage cells from human iPS cells by using a serum- and feeder-free culture method. The ISSCR 10th Annual Meeting 2012.6.16 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称: Method for producing dendritic cells from pluripotent stem cells
発明者: 中畑龍俊/斎藤潤/丹羽明/柳町昌克
権利者: 国立大学法人京都大学
種類: 特許
番号: 14/001,004
出願年月日: 2012/2/23
国内外の別: 国際

名称: Method for producing dendritic cells from pluripotent stem cells
発明者: 中畑龍俊/斎藤潤/丹羽明/柳町昌克
権利者: 国立大学法人京都大学
種類: 特許
番号: EP12749212.2
出願年月日: 2012/2/23
国内外の別: 国際

名称：多能性幹細胞から樹状細胞を製造する
方法
発明者：中畑龍俊/齋藤潤/丹羽明/柳町昌克
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特許
番号：特願 [2013-539023](#)
出願年月日：2012/2/23
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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

6．研究組織

(1)研究代表者

柳町 昌克 (YANAGIMACI, Masakatsu)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：00608911