

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461591

研究課題名(和文)疾患iPS細胞を用いたモザイク型CINCA症候群の病態解明と治療法開発

研究課題名(英文)Disease modeling of mosaic CINCA syndrome with iPS cells

## 研究代表者

齋藤 潤 (Saito, Megumu)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：90535486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：体細胞モザイクCINCA患者由来iPS細胞株を用いて、以下の2つを目標とする。1)ヒト発生における体細胞モザイクの系統樹を作製し、iPS細胞を用いた体細胞モザイク解析技術の基盤を確立する。2)NLRP3インフラマソームを阻害する化合物の作用機序を明らかにし、NLRP3制御による慢性炎症抑制薬開発のシーズを得る。結果、1)体細胞系譜をiPS細胞を用いて解析することが可能であることが示唆された。2)iPS細胞由来単球および単球株を用いたスクリーニング系の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：Taking advantage of iPS cells from CINCA syndrome patients with somatic mosaicism, we aimed at 1) exploring the pathogenic mechanism of somatic mosaicism, and investigating the function of compounds that might inhibit the activity of NLRP3 inflammasome. As a result, 1) our data suggested that the somatic ontogeny might be tracked using iPS cells, 2) we established a screening system using iPS cell-derived monocytic cells and monocytic cell lines.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：CINCA症候群 体細胞モザイク iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) NLRP3 インフラマソームと CINCA 症候群

炎症反応は生体防御において極めて重要な反応であるが、その一方過剰な炎症性応答は様々な疾患の原因となる。IL-1 は主要な炎症性サイトカインの一つであり、種々の刺激に応じて前駆型 IL-1 が産生され、その後インフラマソームと呼ばれるタンパク複合体によって活性化型 IL-1 に変換され、細胞外に分泌される。NLRP3 はインフラマソームを構成するタンパクの一つで、病原体の菌体成分や他の細胞の破壊により生じる「危険シグナル」を認識してインフラマソームのアセンブリを促進する。興味深いことに、NLRP3 インフラマソームは痛風、アルツハイマー病、動脈硬化など様々な慢性炎症性疾患の原因となる分子を認識して活性化することが判明し、これらの慢性炎症性疾患の発症病理として NLRP3-IL-1 経路が重要な役割を果たすことが示唆されている。

一方で、NLRP3 の遺伝的な異常によって Cryopyrin 関連周期熱症候群 (CAPS) と呼ばれる自己炎症性疾患が発症する。CAPS の中で最重症型のもを、CINCA (chronic infantile neurological cutaneous articular) 症候群と呼ぶ。CINCA 症候群では、患者は出生直後から発熱・発疹・髄膜炎・関節症状などを呈し、強い全身炎症のため早世する。我々は、以前より CAPS/CINCA 症候群に注目して研究を進めており、主にヒトプライマリ細胞を用いて、CAPS の遺伝的背景の解明や、CAPS の原因遺伝子である NLRP3 依存性細胞死、NLRP3 の肥満細胞における役割などを解明してきた (Saito M, Arthritis Rheum 2005, Fujisawa Blood 2007, Saito M, Blood 2008, Nakamura Y, J Exp Med 2009)。現在、抗 IL-1 療法が CAPS の他、幾つかの慢性炎症疾患でも効果を上げているが、抗 IL-1 薬は生物学的製剤しか存在せず、より安価で安定な化合物製剤が待ち望まれている。

### 2) CINCA 症候群患者由来 iPS 細胞を用いた体細胞モザイクの解析

我々は、ヒト ES/iPS 細胞からの血球分化系開発 (Niwa A, PlosONE 2011) のほか、疾患 iPS 細胞を用いた免疫疾患の病態解析と創薬へ向けた研究を行っている。iPS 細胞は、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細胞であり (Takahashi K. Cell, 2007, 131;861)、患者の体細胞から作製して様々な細胞に分化できる。

我々は、CINCA 症候群の約半数の患者が NLRP3 変異を体細胞モザイクとして持つことを報告したが (Saito M, Blood 2008)、これらの患者における NLRP3 変異細胞の比率は 10%-30% 程度と低く、NLRP3 変異細胞が病気を引き起こすのか、それとも他にすべての体細胞に共通の構成的な遺伝子変異がある

のか、決着がついていなかった (Masters SL, Annu Rev Immunol, 2009)。しかし、患者から NLRP3 変異細胞のみを取り出して解析することは不可能であった。そこで、一つの iPS 細胞クローンが一つの体細胞に由来することに注目し、体細胞モザイク患者から iPS 細胞クローンを複数樹立すれば、それぞれのクローンが患者の個々の体細胞の表現型を代表するのではないかと考えた。体細胞モザイク CAPS 患者 2 名から iPS 細胞を樹立し、NLRP3 変異を有するクローンと有しないクローンを複数得て、これをマクロファージに分化させたところ、NLRP3 変異クローン由来マクロファージだけが IL-1B を過剰産生し、さらに、変異クローンと正常クローンを共培養すると、IL-1B 産生が亢進することを確認した。これにより、体細胞モザイク CAPS 患者での責任細胞を明らかにし、iPS 細胞を用いて体細胞モザイクの解析が行えることを示した (Tanaka T, Blood 2012)。さらに、この疾患 iPS 細胞は、NLRP3 が常に活性化型であるため、NLRP3-IL-1B 病の陽性コントロールとなる、*in vitro* の系であり、ハイスループットスクリーニングに適している、などの利点がある。

## 2. 研究の目的

体細胞モザイク CINCA 患者由来 iPS 細胞株を用いて、以下の 2 つを目標とする。

- 1) ヒト発生における体細胞モザイクの系統樹を作製し、iPS 細胞を用いた体細胞モザイク解析技術の基盤を確立する。
- 2) NLRP3 インフラマソームを阻害する化合物の作用機序を明らかにし、NLRP3 制御による慢性炎症抑制薬開発のシーズを得る。

## 3. 研究の方法

本研究では、既に樹立・解析を進めている体細胞モザイク CINCA 症候群患者由来 iPS 細胞を用いて、1) 体細胞モザイクの細胞系譜の解析、及び 2) NLRP3 インフラマソーム阻害薬の作用機構解析を行う。

## 4. 研究成果

### 1) 体細胞モザイクの細胞系譜の解析

樹立した iPS 細胞クローンそれぞれについて、Exome 解析を行った。このデータを元に、クローンごとの遺伝子変異 (Single nucleotide variations: SNV) のパネルを作製した。次に、得られたクローンごとの体細胞変異を用いて unbiased clustering を行った。すると、NLRP3 変異の有無によって他の体細胞変異の有無についても別のクラスターに分類されることがわかり、体細胞系譜を iPS 細胞を用いて解析することが可能であることが示唆された。

このクラスタリングデータをもとに NLRP3 変異細胞と正常細胞に特徴的な遺伝子変異を解析した。結果、いくつかの遺伝子変異によって、それぞれの群がさらにサブクラスター

に分けられることが判明した。

また、新規遺伝子変異を持つ CINCA 症候群患者の iPS 細胞を作製し、単球分化させて IL-1b 産生を評価し、この患者さんが体細胞モザイクであることを確認した。

## 2) NLRP3 インフラマソーム阻害薬の作用機構解明

すでに同定した化合物 X について、再検を繰り返したところ、十分な再現性が得られなかったため、スクリーニング系の再構築と、新たな化合物探索が必要と考えられた。このため、まず、患者由来 iPS 細胞由来単球の株化を行った。熊本大学の千住先生らが開発した遺伝子導入法により、未熟単球系細胞の株化に成功した。この細胞は、マクロファージへ分化させることにより、プライマリ単球と同様の反応性を示した。さらに、この細胞株を用いたスクリーニング系の構築に着手した。

得られた単球細胞株を樹状細胞とマクロファージへ分化させた。樹状細胞に分化させ、さらに成熟させると、樹状突起をもつ典型的な細胞形態が観察された。また、樹状細胞の成熟に伴って、CD11c, CD80, CD86 が細胞表面に発現した。一方、マクロファージへと分化させると、M1/M2 への分化が可能であった。次に、CINCA-iPS-MLMP を用いた高スループットスクリーニング系の構築するために、既存の IL-1b 産生経路阻害剤が用量依存的にサイトカイン産生を阻害するか検討した。検討の結果、既存薬が用量依存的にサイトカイン阻害を行う条件を決定した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Yokoyama K, Ikeya M, Umeda K, Oda H, Nodomi S, Nasu A, Matsumoto Y, Izawa K, Horigome K, Kusaka T, Tanaka T, Saito MK, Yasumi T, Nishikomori R, Ohara O, Nakayama N, Nakahata T, Heike T, Toguchi da J. Enhanced chondrogenesis of iPS cells from neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase-1-independent cAMP/PKA/CREB pathway. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Jan;67(1):302-14. doi: 10.1002/art.38912.
2. 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.

3. Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK\*. 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
4. 齋藤潤 iPS 細胞を用いた難病研究 . アレルギー・免疫 . 2013, 20(10), 1410-1415
5. 齋藤潤 疾患特異的 iPS 細胞を用いた難治性血液・免疫疾患の病態解析 . *Medical Science Digest* . 2013, 39(11), 522-525
6. 齋藤潤 自己炎症疾患の病態 CINCA 症候群における体細胞モザイク 炎症と免疫 . 2014, 22(2), 123-127
7. 齋藤潤 患者由来 iPS 細胞を用いた疾患モデル作成研究 : 血液免疫疾患 . *医学のあゆみ* . 2015, 252(8), 899-903
8. 齋藤潤 臨床応用を目指した基礎研究疾患モデル細胞、iPS 細胞を用いた毒性評価と創薬研究 難治性血液・免疫疾患由来の疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析 . *日本臨床* . 2015, 73(増刊 5), 423-428
9. 齋藤潤、中畑龍俊 iPS 細胞を使った血液疾患研究 . *病理と臨床* . 2015, 33(6), 582-586
10. 齋藤潤、中畑龍俊 血液・免疫疾患の iPS 細胞研究 *細胞* 2016, 48(2), 65-68

〔学会発表〕(計 25 件)

1. 齋藤潤, 疾患 iPS 細胞を用いた血液疾患の病態解析 第 17 回九州小児血液セミナー(福岡) 2013 年 04 月
2. 齋藤潤, iPS 細胞を用いた自己炎症性疾患の解析について 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会(京都) 2013 年 04 月
3. 齋藤潤, 疾患 iPS 細胞を用いた自己炎症性疾患の病態解析 10th Bloodmaster(京都) 2013 年 06 月
4. Megumu K. Saito, Disease modeling and drug discovery using iPS cells from CINCA syndrome patients 15th

- International Congress of Immunology(Milano, Italy) 2013 年 08 月
5. 齋藤潤, 疾患 iPS 細胞を用いた小児疾患の病態解析 京津小児診療最前線セミナー-2013(京都) 2013 年 11 月
  6. 齋藤潤, 疾患 iPS 細胞を用いた血液・免疫疾患の病態解析 疾患特異的 iPS 細胞を利用した病態解明・創薬開発セミナー(東京) 2013 年 11 月
  7. 齋藤潤, 疾患 iPS 細胞を用いた病態解析と創薬の試み 第 4 回スクリーニング学研究会(東京) 2013 年 11 月
  8. Megumu K. Saito, Disease-specific iPS cells derived from patients with hematological and immunological disorders CiRA symposium(吹田) 2014 年 01 月
  9. 齋藤潤, 疾患 iPS 細胞を用いた血液免疫疾患の病態解析 第 13 回日本再生医療学会総会(京都) 2014 年 03 月
  10. 齋藤潤, 疾患特異的 iPS 細胞を用いた免疫疾患の解析について 大阪リウマチカンファレンス(大阪) 2014 年 04 月
  11. 齋藤潤, 疾患 i P S 細胞を用いた血液・免疫疾患の病態解析 第 5 回小児炎症研究会(東京) 2014 年 06 月
  12. 齋藤潤, 疾患特異的 iPS 細胞を用いた免疫疾患の病態解析 第 6 回炎症性腸疾患と免疫を語る会(横浜) 2014 年 06 月
  13. 齋藤潤, 疾患特異的 iPS 細胞を用いた免疫疾患の病態解析 横浜小児先端セミナー(横浜) 2014 年 09 月
  14. 齋藤潤, 疾患 i P S 細胞を用いた血液疾患の病態解析 京大病院 iPS 細胞・再生医療研究会(京都) 2015 年 01 月
  15. 齋藤潤, 疾患特異的 iPS 細胞を用いた血液疾患の病態解析 第 14 回日本再生医療学会総会(横浜) 2015 年 03 月
  16. Megumu K. Saito, Modeling Human Neurological Disorders with Induced Pluripotent Stem Cells 13th Asian and Oceania Congress of Child Neurology(Taipei) 2015 年 05 月
  17. 齋藤潤, CAPS の臨床と疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態研究 第 114 回日本皮膚科学会総会(横浜) 2015 年 05 月
  18. 齋藤潤, CAPS の iPS 研究について 第 3 回 CAPS 勉強会(東京) 2015 年 07 月
  19. 齋藤潤, iPS 細胞を用いた血液疾患の病態解析 第 26 回長崎障害者支援再生医療研究会(長崎) 2015 年 09 月
  20. 齋藤潤, iPS 細胞を用いた病態解析の試み 小児リウマチ学会(金沢) 2015 年 10 月
  21. 齋藤潤, iPS 細胞による小児免疫疾患の病態解析 臨床免疫学会(神戸) 2015 年 10 月
  22. 齋藤潤, iPS 細胞を用いた 血液疾患の創薬に向けた研究 創薬シンポジウム

- (東京) 2015 年 12 月
23. 齋藤潤, iPS 細胞を用いた血液疾患の疾患モデリング 細胞アッセイ研究会(東京) 2016 年 01 月
  24. 齋藤潤, iPS 細胞を用いた 自己炎症疾患研究の現状と展望 第 9 回自己炎症疾患研究会(東京) 2016 年 02 月
  25. 齋藤潤, 血液疾患 iPS 細胞モデルと創薬 第 15 回日本再生医療学会総会(大阪) 2016 年 03 月

〔図書〕(計 1 件)

1. Saito MK\*, Niwa A. Hematological disorders. In: Fukuda K (ed), Human iPS cells in disease modeling, New York : Springer; 2016. P.69-81

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 潤 (SAITO, Megumu)

京都大学・iPS 細胞研究所・准教授

研究者番号 : 90535486