

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293232

研究課題名(和文) 自己炎症疾患責任遺伝子変異症例の前向き研究による自己炎症疾患発症トリガーの解明

研究課題名(英文) A prospective study in order to identify inflammatory attack triggers in autoinflammatory diseases

研究代表者

増本 純也 (Masumoto, Junya)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：20334914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：自己炎症疾患は、周期性の炎症発作を特徴とする難治性炎症疾患である。いくつかの自己炎症疾患の責任遺伝子産物は、炎症性サイトカインであるインターロイキン1 β を活性化するのに必須のタンパク質複合体であるインフラマソームを形成するため、これを活性化する物質が炎症発作のトリガーと考えられる。そこで、本研究では、試験管内の無細胞条件でインフラマソームを再構成し、直接活性化する分子を探索した。その結果、いくつかの周期性炎症発作の原因となる内因性物質候補を選定することができた。

研究成果の概要(英文)：Autoinflammatory disease is refractory inflammatory diseases characterized by recurrence of periodic fever. Several causative gene products reported be component of inflammasome, an IL-1 β processing platform. We developed reconstituted inflammasome in a cell-free system to identify inflammatory attack triggers on autoinflammatory disease and identified several candidates as inflammatory attack trigger.

研究分野：病理学

キーワード：自己炎症疾患 インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

自己炎症疾患は、周期性の発熱発作を特徴とする炎症疾患で、自己反応性の T リンパ球や自己抗体の関与のない点から、自己免疫疾患とは区別されている。そのうち、『家族性地中海熱(FMF)』、『クリオパイリン関連周期熱症候群(CAPS)』の疾患責任遺伝子産物はそれぞれ P_{yrin}、C_{ryopyrin} ということが判明しており、炎症性サイトカインである IL-1 β を切断して活性化するインフラマソームという細胞内病原体認識複体の制御異常に関わることが申請者や内外の研究によって明らかにされている。そのため、インフラマソームの制御異常のある自己炎症疾患症例では、健常人なら反応しないような『自己炎症疾患の発症や周期性を規定する共通のトリガーが存在する』と考えられた。したがって、IL-1 β の産生に必須のインフラマソームの動態は『自己炎症疾患の周期性』を規定する重要な要素と考えられている。しかしながら、研究開始当初において、インフラマソームを直接活性化する発症トリガーの詳細は未解明であった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、これまで内外の研究で用いられたような、細胞やモデル動物を用いた解析方法によらず、独自に開発した試験管内の無細胞条件で、自己炎症疾患のインフラマソームを再構成し、これを直接活性化するような臨床検体中の発症トリガーを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試験管内無細胞変異 NLRP3 インフラマソーム再構成システムの構築

無細胞タンパク質合成装置を用いてインフラマソームを構成する蛋白質を大量に合成し、試験管内インフラマソーム活性化アッセイシステムを構築し、内因性リガンドのスクリーニングを行う。

(2) (1)で構築した無細胞インフラマソーム再構成システムに、臨床検体をアプライし、内因性のインフラマソーム活性化因子を同定する。

4. 研究成果

(1) 自己炎症疾患のうち、C_{ryopyrin} 関連周期熱症候群 (CAPS)の原因となる NLRP3 インフラマソームの試験管内無細胞再構成システムを完成させることができた。NLRP3 インフラマソームを構成する NLRP3 と ASC を無細胞合成し、NLRP3 インフラマソームの材料を試験管内に揃え、先行論文で報告されている細菌やウイルスの 1 本鎖 RNA のアナログである polyI:C が直接 NLRP3 インフラマソームを活性化することが示された(図 1)。次にこのシステムを使って、内因性の活性化物質のスクリーニングを行ったところ、炎症組織や創傷治癒の際に線維芽細胞や中皮から産生される

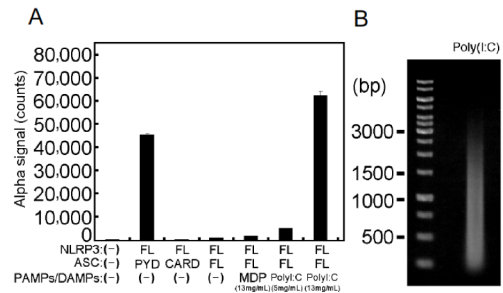


図 1.無細胞 NLRP3 インフラマソームの polyI:C による活性化(Kaneko et al. 発表論文①)

ヒアルロン産によって、活性化されることが示された(図 2)。

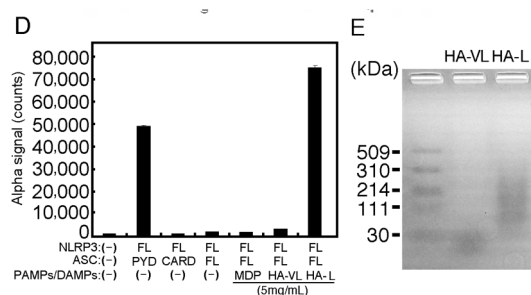


図2.無細胞 NLRP3 インフラマソームのヒアルロン酸による活性化(Kaneko et al. 発表論文①)

これらの分子をビオチンラベルし、NLRP3 との結合を解析したところ、NLRP3 の LRR ドメインと多量体化ドメインが協働して、これらの分子を認識していることが示唆された(図 3)。

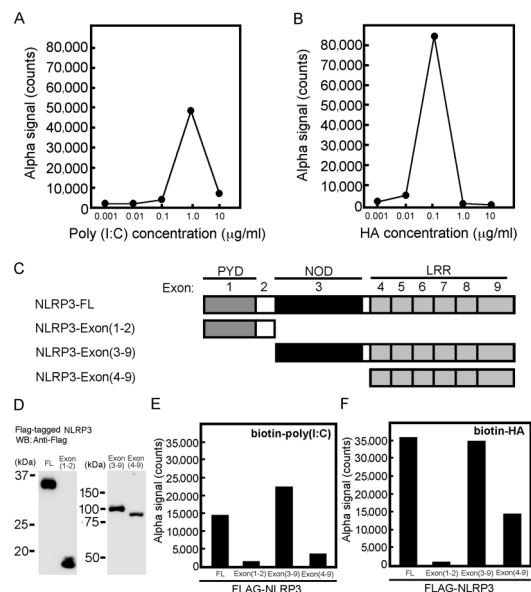


図3.polyI:C と HA の NLRP3 結合部位の解析(Kaneko et al. 発表論文①)

その他にも、自己の代謝産物が直接 NLRP3

に結合している可能性が示されたため、現在臨床検体を使用して、微量分析を行っているところである。

(2)次に、自己炎症疾患のうち、肉芽腫形成性の自己炎症疾患である Blau 症候群/若年性サルコイドーシスの原因となる Nod2 ノドゾームの試験管内無細胞再構築システムを完成させ、疾患特異的な変異によって、先行論文で明らかにされている、細菌細胞壁ペプチドグリカンの構成成分である MDP に対する感受性の違いが明らかになった(図4)。

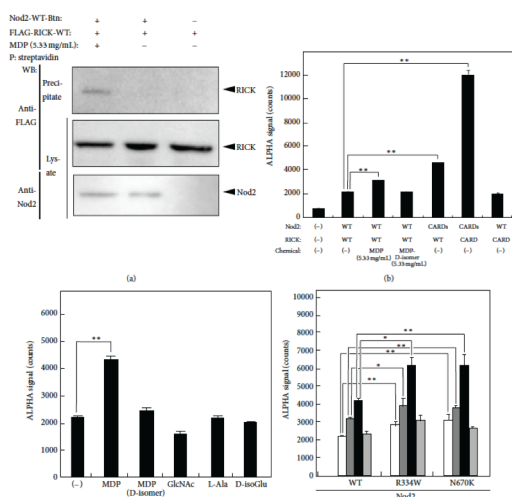


図4. Blau 症候群/若年性サルコイドーシス関連変異を導入した Nod2 ノドゾーム(Iwasaki et al. 発表論文⑤)

これらの成果を基に、現在、臨床検体中の無細胞複合体活性化分画を解析中である。

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 20 件)

① Kaneko N, Ito Y, Iwasaki T, Takeda H, Sawasaki T, Migita K, Agematsu K, Koga T, Kawakami A, Yachie A, Yoshiura K, Morikawa S, Kurata M, Masumoto J. Poly (I:C) and hyaluronic acid directly interact with NLRP3, resulting in the assembly of NLRP3 and ASC in a cell-free system. *Eur J Inflamm*, 査読有、2017、in press
DOI: 10.1177/1721727X17711047.

② Kaneko N, Iwasaki T, Ito Y, Takeda H, Sawasaki T, Morikawa S, Nakano N, Kurata M, Masumoto J. Applications of reconstituted

inflammasomes in a cell-free system to drug discovery and elucidation of the pathogenesis of autoinflammatory diseases.

Inflammation and Regeneration, 査読有、37 巻、2017, pp. 9
DOI: 10.1186/s41232-017-0040-y.

③ Shelake RM, Ito Y, Masumoto J, Morita EH, Hayashi H.

A novel mechanism of "metal gel-shift" by histidine-rich Ni²⁺-binding Hpn protein from *Helicobacter pylori* strain SS1.

PLoS One, 査読有

12 巻、2017, pp. e0172182

DOI: 10.1371/journal.pone.0172182.

④ Takeuchi Y, Shigemura T, Kobayashi N, Kaneko N, Iwasaki T, Minami K, Kobayashi K, Masumoto J, Agematsu K.

Early diagnosis of early-onset sarcoidosis: a case report with functional analysis and review of the literature.

Clin Rheumatol, 査読有

36 巻、2017, pp. 1189-1196

DOI: 10.1007/s10067-017-3544-6.

⑤ Iwasaki T, Kaneko N, Ito Y, Takeda H, Sawasaki T, Heike T, Migita K, Agematsu K, Kawakami A, Morikawa S, Mokuda S, Kurata M, Masumoto J.

Nod2-Nodosome in a cell-free system: Implications in pathogenesis and drug discovery for Blau syndrome and early-onset sarcoidosis.

Scientific World Journal, 査読有

2016, pp. 20162597376.

DOI: 10.1155/2016/2597376.

⑥ Shigemura T, Kaneko N, Kobayashi N, Kobayashi K, Takeuchi Y, Nakano N, Masumoto J, Agematsu K.

Novel heterozygous C243Y A20/TNFAIP3 gene mutation is responsible for chronic inflammation in autosomal-dominant Behçet's disease.

RMD Open, 査読有

2 巻、2016, pp. e000223

DOI: 10.1136/rmdopen-2015-000223.

⑦ Koga T, Migita K, Sato S, Umeda M, Nonaka F, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Ueki Y, Masumoto J, Agematsu K, Yachie A, Yoshiura K, Eguchi K, Kawakami A.

Multiple Serum Cytokine Profiling to Identify Combinational Diagnostic

- Biomarkers in Attacks of Familial Mediterranean Fever. *Medicine (Baltimore)*、査読有
95 卷、2016, pp. e344953
DOI: 10.1097/MD.0000000000003449.
- ⑧ Yamazaki T, Shigemura T, Kobayashi N, Honda K, Yazaki M, Masumoto J, Migita K, Agematsu K.
IL-18 serum concentration is markedly elevated in typical familial Mediterranean fever with M694I mutation and can distinguish it from atypical type. *J Mod Rheumatol*、査読有
26 卷、2016, pp. 315-317
DOI: 10.3109/14397595.2014.988861.
- ⑨ Mokuda S, Miyazaki T, Ubara Y, Kanno M, Sugiyama E, Takasugi K, Masumoto J.
CD1a⁺ survivin⁺ dendritic cell infiltration in dermal lesions of systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*、査読有
17 卷、2016, pp. 275-275
DOI: 10.1186/s13075-015-0785-0.
- ⑩ Kaneko N, Ito Y, Iwasaki T, Takeda H, Sawasaki T, Migita K, Agematsu K, Kawakami A, Morikawa S, Mokuda S, Kurata M, Masumoto J.
Reconstituted AIM2 inflammasome in cell-free system. *J Immunol Methods*、査読有
426 卷、2015, pp. 76-81
DOI: 10.1016/j.jim.2015.08.004.
- ⑪ Mokuda S, Miyazaki T, Ito Y, Yamasaki S, Inoue H, Guo Y, Kong WS, Kanno M, Takasugi K, Sugiyama E, Masumoto J.
The proto-oncogene survivin splice variant 2B is induced by PDGF and leads to cell proliferation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Sci Rep*、査読有
22 卷、2015, pp. 9795
DOI: 10.1038/srep09795.
- ⑫ Yasunami M, Nakamura H, Agematsu K, Nakamura A, Yazaki M, Kishida D, Yachie A, Toma T, Masumoto J, Ida H, Koga T, Kawakami A, Eguchi K, Furukawa H, Nakamura T, Nakamura M, Migita K.
Identification of Disease-Promoting HLA Class I and Protective Class II Modifiers in Japanese Patients with Familial Mediterranean Fever. *PLoS One*、査読有
10 卷、2015, pp. e0125938
DOI: 10.1371/journal.pone.0125938.
- ⑬ Nakata H, Miyazaki T, Iwasaki T, Nakamura A, Kidani T, Sakayama K, Masumoto J, Miura H.
Development of tumor-specific caffeine-potentiated chemotherapy using a novel drug delivery system with Span 80 nanovesicles. *Oncol Rep*、査読有
33 卷、2015, pp. 1593-1598
DOI: 10.3892/or.2015.3761.
- ⑭ Migita K, Izumi Y, Fujikawa K, Agematsu K, Masumoto J, Jiuchi Y, Kozuru H, Nonaka F, Shimizu T, Nakamura T, Iwanaga N, Furukawa H, Yasunami M, Kawakami A, Eguchi K.
Dysregulated mature IL-1 β production in familial Mediterranean fever. *Rheumatology (Oxford)*、査読有
54 卷、2015, pp. 660-665
DOI: 10.1093/rheumatology/keu359.
- ⑮ Mokuda S, Miyazaki T, Saeki Y, Masumoto J, Kanno M, Takasugi K.
Epstein-Barr virus-related MTX-LPD in rheumatoid arthritis patients exhibits a viral pattern of the CD64 and CD35 expression on neutrophils: three case reports. *Mod Rheumatol*、査読有
25 卷、2015, pp. 166-168
DOI: 10.3109/14397595.2013.875641.
- ⑯ Migita K, Izumi Y, Jiuchi Y, Kozuru H, Kawahara C, Nakamura M, Nakamura T, Agematsu K, Masumoto J, Yasunami M, Kawakami A, Eguchi K.
Serum amyloid A induces NLRP-3-mediated IL-1 β secretion in neutrophils. *PLoS One*、査読有
9 卷、2015, pp. e96703
DOI: 10.1371/journal.pone.0096703.
- ⑰ Ito Y, Kaneko N, Iwasaki T, Morikawa S, Kaneko K, Masumoto J.
IL-1 as a target in inflammation. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*、査読有
15 卷、2015, pp. 206-211
DOI: 10.2174/1871530315666150316123657.
- ⑱ Mokuda S, Kanno M, Takasugi K, Okumura C, Ito Y, Masumoto J.
Tocilizumab improved clinical symptoms of a patient with systemic tophaceous gout who had symmetric polyarthritis and fever: An alternative treatment by blockade of interleukin-6 signaling. *SAGE Open Medical Case Reports*、査読有
2 卷、2014, pp. 13519774

DOI: 10.1177/2050313X13519774

⑱ Migita K, Agematsu K, Yazaki M, Nonaka F, Nakamura A, Toma T, Kishida D, Uehara R, Nakamura Y, Jiuchi Y, Masumoto J, Furukawa H, Ida H, Terai C, Nakashima Y, Kawakami A, Nakamura T, Eguchi K, Yasunami M, Yachie A.
Familial Mediterranean fever: genotype-phenotype correlations in Japanese patients.
Medicine (Baltimore)、査読有
93 巻、2014, pp. 158-164
DOI: 10.1097/MD.000000000000029.

⑳ Sugiyama R, Agematsu K, Migita K, Nakayama J, Mokuda S, Ogura F, Haraikawa K, Okumura C, Suehiro S, Morikawa S, Ito Y, Masumoto J.
Defect of suppression of inflammasome-independent interleukin-8 secretion from SW982 synovial sarcoma cells by familial Mediterranean fever-derived pyrin mutations.
Mol Biol Rep、査読有
41 巻、2014, pp. 545-553
DOI: 10.1007/s11033-013-2890-y.

[学会発表] (計 9 件)

① Masumoto J, "Inflammatory signaling in familial Behcet's Disease" PATHOLOGY OF BEHCET'S DISEASE, IFRc international symposium, 2017/03/24, Osaka University (Osaka), Japan,

② 増本純也、無細胞自然免疫複合体再構成系による自己炎症疾患の病態解明と創薬への応用、愛媛大学プロテオサイエンスセンター第 4 回学術シンポジウム、2017 年 2 月 11 日、愛媛大学医学部 40 周年記念周年記念講堂(愛媛県東温市)、国内

③ 増本純也、試験管内無細胞インフラマソーム再構成システムの検査・創薬への応用、第 63 回日本臨床検査医学会学術集会、2016 年 9 月 3 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)、国内

④ 増本純也、金子直恵、伊藤有紀、岩崎智之、倉田美恵、試験管内無細胞インフラマソーム再構成システムによる自己炎症疾患の病態解明と創薬への応用、第 37 回日本炎症・再生医学会、2016 年 6 月 16 日、京都市勧業館「みやこめっせ」(京都市京都府)、国内

⑤ Masumoto J, Kaneko N, Iwasaki T, Kurata M, Takeda H, Sawasaki T, Ito Y.
Reconstituted NLRP3 inflammasome in cell-free system. Toll Meeting 2015, 2015/9/30, Marbella, Spain

⑥ Iwasaki T, Kaneko N, Ito Y, Takeda H, Sawasaki T Kurata M, Masumoto J.
Reconstituted Nod2 nodsome in cell-free system. Toll Meeting 2015, 2015/9/30, Marbella, Spain

⑦ Kaneko N, Ito Y, Iwasaki T, Kurata M, Takeda H, Sawasaki T Masumoto J.
Reconstituted AIM2 inflammasome in cell-free system. Toll Meeting 2015, 2015/9/30, Marbella, Spain

⑧ 増本純也、試験管内インフラマソーム再構成による制御分子探索の試み、第 26 回日本生体防御学会学術総会 シンポジウム II 「自然免疫研究の新展開」2015 年 7 月 10 日-12 日台東区生涯学習センター ミレニアムホール(東京都台東区)、国内

[図書] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増本 純也 (Masumoto, Junya)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター教授
研究者番号：20334914

(2) 研究分担者

伊藤 有紀 (Ito, Yuki)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教
研究者番号：10608334

澤崎 達也 (Sawasaki, Tatsuya)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授
研究者番号：50314969

上松 一永 (Agematsu, Kazunaga)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号：60262721

右田 清志 (Migita, Kiyoshi)
長崎医療センター・臨床研究センター・病因
解析研究部長
研究者番号：60264214

大澤 春彦 (Osawa, Haruhiko)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90294800

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

金子 直恵 (Kaneko, Naoe)
愛媛大学・大学院医学系研究科・技術員