

平成21年 5月25日現在

研究種目：基盤研究 C

研究期間：H19 ～ H20

課題番号：19591249

研究課題名（和文） CIAS1 遺伝子異常を伴わない CINCA 症候群の病因病態の解明

研究課題名（英文） Study on causes and pathophysiology of CINCA syndrome patients without CIAS1 gene mutations.

研究代表者 西小森 隆太 (NISHIKOMORI RYUTA)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70359800

研究成果の概要：蕁麻疹様の発疹、関節症状、無菌性髄膜炎を3主徴とする CINCA 症候群の原因遺伝子として CIAS1 が報告されたが、約40%に同遺伝子異常を認めない。本研究で CIAS1 遺伝子異常を認めない症例を集積し、4例中3例に潜在性 CIAS1 体細胞モザイクが存在することを示した。また同疾患患者単球は TLR4 リガンドである LPS 刺激で細胞死が誘導されることを示し、同性状を用いた診断法を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	2,200,000	660,000	2,860,000
平成20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床医学・小児科学

キーワード：小児免疫・アレルギー・膠原病学、CINCA 症候群、CIAS1、体細胞モザイク、自己炎症症候群、自己炎症性疾患

1. 研究開始当初の背景

近年周期的に発熱を繰り返す一連の家族性周期熱症候群の原因遺伝子が同定されてきており、主として自然免疫系の異常に基づくため、獲得免疫系の異常としての自己免疫症候群という名称に対応する形で、全身性自己炎症症候群という概念が提唱されている (McDermott MF, Cell 1999, 97;133)。そのなかでも NOD ファミリー蛋白に属する CIAS1 遺伝子の関与が報告されている CINCA 症候群は、生下時からの蕁麻疹様発疹、慢性髄膜炎を主体とする中枢神経症状、関節

炎を3主徴とする、持続する炎症が主病態の臨床診断に基づく疾患単位である (Prieur AM, Scand J Rheumatol Suppl. 1987, 66;57)。自然免疫系関連分子の代表格として Toll like receptors が主として細胞表面にあり微生物由来物質を認識する一方で、CIAS1 遺伝子の発現蛋白である cryopyrin は、細胞質内に存在し微生物由来物質を認識していると考えられている。CINCA 症候群における発症機序は CIAS1 遺伝子に gain of function の変異が導入され、リガンドなしに自然活性化している状態と

なり、炎症性サイトカインIL-1 β が無制御に分泌されることが推定されている (Agostini L, *Immunity* 2004, 20:319)。これまで原因遺伝子として前述のCIAS1遺伝子が報告されているが、CINCA症候群の約半数はCIAS1遺伝子翻訳領域に異常が検出されないことが知られており、CIAS1遺伝子の制御領域の異常、CIAS1遺伝子以外の原因遺伝子の存在が予想されている (Aksentijevich I, *Arthritis Rheum* 2002 46:3340)。

2005年、我々はCIAS1遺伝子の体細胞モザイクの症例を世界で初めて発見し、約25%のCIAS1遺伝子体細胞モザイクでも疾患として発症し、また通常のヘテロ変異を持つ症例よりも比較的軽症であることを報告した (Saito M, *Arthritis Rheum* 2005, 52:3579)。制御されていないサイトカイン過剰産生を主病態とする本疾患において、体細胞モザイクがCINCA症候群を十分引き起こすことを示した点が病態を考える上でユニークであった。しかしその後、CIAS1遺伝子モザイクがCIAS1遺伝子変異の同定されないCINCA症候群においてどのぐらいみられるのかについては、まだ結論がでない (Aksentijevich I, *Arthritis Rheum* 2006 54:2703)。

2. 研究の目的

今回我々は、CIAS1異常の同定されないCINCA症候群での原因として、通常のシークエンシングでは検出できないCIAS1遺伝子体細胞モザイクが関与しているのではないかと仮説を立てた。CIAS1体細胞モザイクを証明するためには、CIAS1異常を持つ細胞と異常のない細胞を分別する方法を確立する必要がある。我々はCIAS1異常細胞の生物学的性質を検討し、CIAS1異常を持つ単球がLPSにて細胞死に至ることを発見した (未発表データ)。まずこの性質を用いて、CIAS1遺伝子変異が同定されていないCINCA症候群の症例において、LPS刺激にて細胞死が誘導される細胞群を分離し、CIAS1遺伝子異常部位の同定を試みる。以上の検討により、臨床疾患単位として特徴的なCINCA症候群におけるCIAS1遺伝子異常の寄与を明らかにする。さらにCIAS1遺伝子モザイクを含めたCIAS1異常の関与しないCINCA症候群が同定可能となり、新規遺伝子異常の探索およびCIAS1遺伝子の制御領域の異常を検討する。また一方、LPSで誘導される細胞死という異常CIAS1遺伝子の生物学的な特徴がCINCA症候群の病態形成にどのよう

に関わっているかを検討する。さらに疾患原因であるCIAS1遺伝子変異を通して、自然免疫系におけるCIAS1の生理学的な意味づけを検討していく。

3. 研究の方法

1) CIAS1遺伝子異常“陰性”CINCA症候群におけるモザイク症例の検討

CINCA症候群という臨床診断がついていながら、CIAS1遺伝子の異常が翻訳領域のシークエンシングにて発見されない症例をまず集積する。CIAS1異常を認める細胞の特徴を探るため、これまで日本におけるCINCA症候群にてCIAS1遺伝子異常を認める症例6例を集積し、その生物学的な性質を検討したところ、LPS刺激にて単球が細胞死に至ることを同定しており、この性質を使って、上記CIAS1遺伝子異常が同定できないCINCA症候群患者にCIAS1異常細胞が存在するかを検討する。方法としてはLPS刺激にて細胞死が誘導される細胞集団が単球に存在するかみる。さらに細胞死に至りつつある細胞をFACSソーティングにて回収、CIAS1遺伝子のシークエンシングを行い、CIAS1遺伝子異常の有無を検討する。遺伝子異常が見つかった症例では、同異常が遺伝学的に正常コントロールにはないのを確認し、ASC依存性のNF- κ Bの活性化を用いて、病因となりうるか検討する。

2) CIAS1異常の単球におけるLPS刺激による細胞死のメカニズムの検討

CIAS1異常細胞がLPS刺激により細胞死にいたるメカニズムを検討するために、LPS刺激によりCIAS1遺伝子発現の検討を行う。CIAS1遺伝子発現の上昇と細胞死の関連性をみる目的で、各種TLRリガンド、各種阻害剤投与下での、単球のCIAS1発現および細胞死の誘導を検討する。CIAS1の発現はウェスタンブロットティング、real-time PCRを用いたmRNAの検討で行う。

細胞死の機序を解明するため、異常CIAS1発現細胞株の作成を試みる。候補株としてはTHP-1細胞株を用いた。これまでの検討でTHP-1細胞株に異常CIAS1をelectroporationでトランジェントに強制発現させると、ネクロース様の細胞死が誘導されることがわかっている。そのため異常CIAS1を強制発現させたステーブルトランスフェクションさせたTHP-1細胞株を作成し、細胞死の誘導がLPS刺激でおこるか検討する。系が作成されれば、細胞株を用いて細胞死のシグナル伝達系を生化学的、分子生物学的な手法を用いて、明らかにし

ていく。もし安定発現細胞株がとれない場合、テトラサイクリン誘導発現系を用いて、異常CIAS1強制発現系を作成し、細胞死を誘導する。

3) 異常CIAS1の生物学的な特徴と臨床的な特徴の検討

CINCA 症候群はさまざまな症状と CIAS1 遺伝子異常の関係、genotype-phenotype を検討する。その際に、CIAS1 遺伝子の異常でおこる現象として、ASC 依存性 NF- κ B の活性化、THP-1 細胞における一時的強制発現による細胞死の誘導能、IL-1 β の誘導能を *in vitro* にて検討し、臨床症状との関連性を検討する。これまで CIAS1 異常の見つかった患者さん 6 人をリクルートしており、臨床症状、*in vitro* の検査との関連をまずすでに遺伝子解析済みの 6 人で検討する。

上記の検討で CIAS1 誘導細胞死と ASC 依存性 NF- κ B の誘導能に相関性がないものが存在すれば、その臨床像との検討で、関節炎、皮膚症状、中枢神経症状との相関を調べ、CIAS1 のどの作用が病態に重要であるか作業仮説を立てる。

4) CIAS1 モザイクの否定された症例の検討

CIAS1 モザイクが否定された CINCA 症候群は CIAS1 遺伝子以外の遺伝子異常が原因である可能性がある患者群である。まず CIAS1 遺伝子の発現制御、alternate splicing による CIAS1 産物の変化の有無、各種体細胞でのモザイクの有無の再確認を行い、CIAS1 の遺伝子自体が異常ないことを確認する。上記スクリーニングで残った症例、CIAS1 異常のある CINCA 症候群、正常コントロールより単球細胞を採取して、cDNA アレイを用い、網羅的に遺伝子発現を検討する。cDNA アレイにて発現の増強、低下のみられた遺伝子は、real time PCR で発現レベルを確認し、原因遺伝子の探索を行う。

4. 研究成果

1) CIAS1 変異陰性 CINCA 症候群における CIAS1 モザイクの検討

まず CIAS1 モザイク患者を診断するための方法を確立するため、CIAS1 変異陽性細胞特異的な生物学的性状の検討をおこなった。6 例の CIAS1 変異ヘテロ患者単球が LPS 刺激にてネクロシス様の細胞死に陥ることを発見した(図 1)。

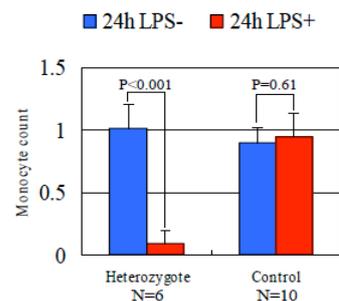


図 1 CIAS1 変異単球は LPS で細胞死が誘導される。

続いて我々が発見した CIAS1 モザイク症例において CIAS1 変異陽性単球が選択的に LPS で細胞死に陥るか検討した(図 2)。LPS 刺激ありなしで 24 時間培養後、単球 (CD14+)、非単球 (CD14-) を単離し CIAS1 変異部位を遺伝子解析した。LPS 刺激した単球で変異遺伝子が消失した。患者単球において、LPS 刺激により CIAS1 変異陽性単球選択的に細胞死が誘導され、また同細胞死は抗 IL-1 製剤である anakinra 使用中でも観察され、細胞外の炎症所見に左右されず、CIAS1 変異細胞に内因的に備わった性質であることを示唆した。

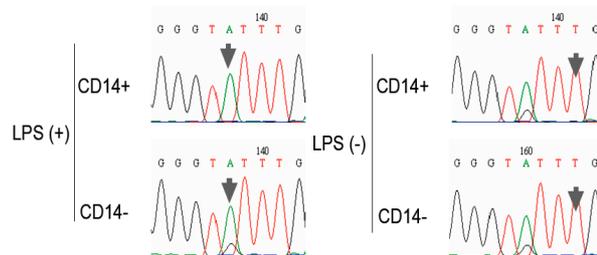


図 2 CIAS1 モザイク患者において CIAS1 変異陽性単球に選択的に細胞死が誘導される。

続いて CIAS1 変異細胞特異的生物学的性状として同定された LPS 刺激による単球の細胞死を利用して、CIAS1 変異細胞を濃縮し、変異部位診断が可能か検討した。CIAS1 モザイク患者 PBMC を LPS 刺激し、細胞死に至りつつある単球 (CD14+PI+細胞) をソーティングで回収して、遺伝子変異部位を解析した(図 3)。刺激前変異陽性率 16.7% から LPS 刺激後 CD14+PI+細胞では 40.9% まで上昇し、この細胞集団では約 80% まで CIAS1 変異陽性細胞が濃縮された。さらに CD14+PI-細胞では 4.9%

へ低下し正常細胞が濃縮された。以上より同方法を用いて、CIAS1 モザイクにおける変異部位同定に使用可能であることが、証明された。

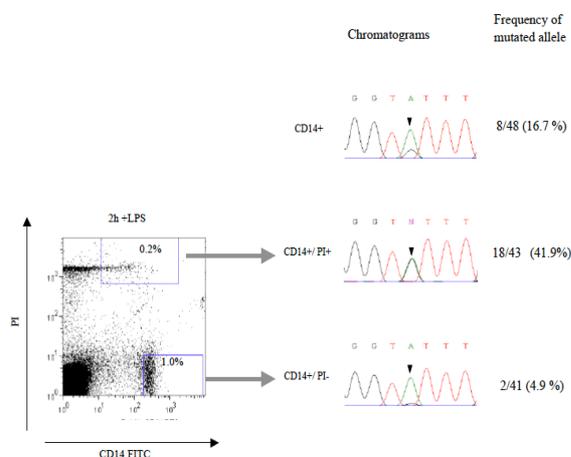


図3 LPS 刺激により細胞死誘導される単球を用いて CIAS1 モザイク患者で CIAS1 変異単球を濃縮可能である。

本邦にて集積した CIAS1 変異が同定できなかった CINCA 症候群（一人は軽症型の Muckle-Wells syndrome)において、CIAS1 モザイクが同定できるか上記方法を用いて検討した（図4）。その結果、4人中3人に正常コントロールでは検出できない変異が認められた。そのうち L264F は CINCA 症候群として報告があり、G307S、E567K は新規の変異と考えられた。

Site of mutation	790C>T (L264F)	919G>A (G307S)	1699G>A (E567K)
Frequency of mutant allele			
Whole blood	2/47 (4.3%)	2/47 (4.3%)	3/46 (6.5%)
CD14+/PI+	7/36 (19.4%)	3/27 (11.1%)	7/46 (15.2%)
CD14+/PI-	2/46 (4.3%)	1/38 (2.6%)	3/48 (6.3%)

図4 CIAS1 変異陰性 CAPS に認められた CIAS1 モザイクのまとめ

これらの変異は通常の遺伝子解析では検出困難な約5%（細胞当たりにして10%）という低頻度モザイクであった。これらの変異が実際疾患に関連しているか検討するため、正常人で同 CIAS1 モザイクの有無、変異 CIAS1 の機能検査を ASC 依存性 NF- κ B 活性化及び THP-1 細胞株での細胞死誘導能の2つで検討した。

正常人での CIAS1 モザイクの有無はアレル特異的 PCR の系（検出限界 0.6%）を構築、正

常人100人で検討したところ、上記 CIAS1 モザイクはいずれも認めなかった。

続いて疾患関連変異で認められる ASC 依存性 NF- κ B 活性化（図5）及び THP-1 細胞株での細胞死誘導能（図6）を検討した。いずれも CIAS1 モザイクで同定された CIAS1 変異は陽性を示し、その活性は通常のヘテロで同定された CIAS1 変異に比べてより大きい活性を示した。

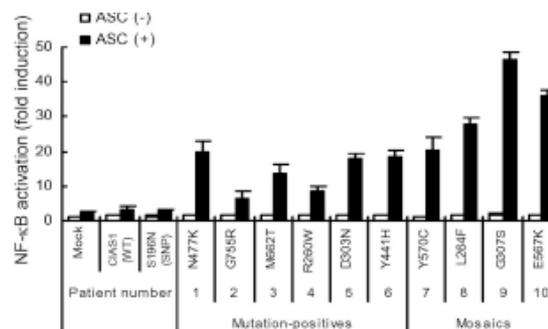


図5 同定された CIAS1 モザイクの ASC 依存性 NF- κ B 活性化能

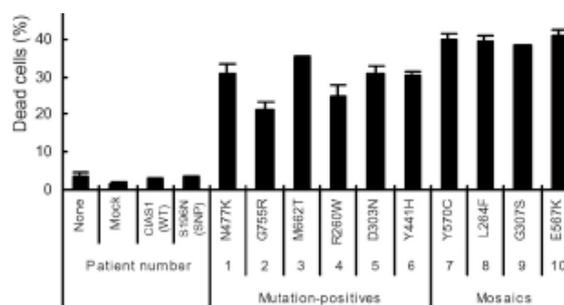


図6 同定された CIAS1 モザイクの THP-1 細胞株細胞死誘導能

CIAS1 変異が同定できなかった1症例では全エクソンを100クローンずつサブクローニング法で検討したが、CIAS1 モザイクは同定できず、同症例は CIAS1 遺伝子の翻訳領域には異常を認めない症例であることが分かった。即ちすべての CIAS1 変異陰性 CINCA 症候群が CIAS1 モザイクで説明される訳ではないことが判明した。

2) CIAS1 異常の単球における LPS 刺激による細胞死のメカニズムの検討

CIAS1 変異患者単球の LPS 刺激による細胞死の機序解析のため、LPS 以外の各種 TLR リガンドで刺激して、細胞死（図7）、CIAS1 遺伝子誘導能（図8）を検討した。Pam3CSK、

ssRNA において有為に細胞死がみられたが LPS ほどではなく、LPS が最も有効であることが分かった。同時に CIAS1 mRNA 誘導能を検討したところ、LPS が最も強く CIAS1 を誘導し、Pam3CSK、Flagellin、MDP が弱く誘導した。CIAS1 誘導と細胞死の関係を検討するため、プロテアソーム阻害剤である MG132 を用いたところ、CIAS1 mRNA 誘導、細胞死ともに抑制され、CIAS1 mRNA 誘導が細胞死に重要であることを示唆した (図 9)。THP-1 細胞での疾患関連 CIAS1 の強制発現系では、THP-1 細胞死誘導はカスパーゼ 1 非依存性、カテプシン B 依存性であった。そのため患者細胞を用いて検討したところ、同様にカスパーゼ 1 非依存性、カテプシン B 依存性細胞死であることが判明し、同様の機序で細胞死が誘導されていることが示唆された (図 10)。

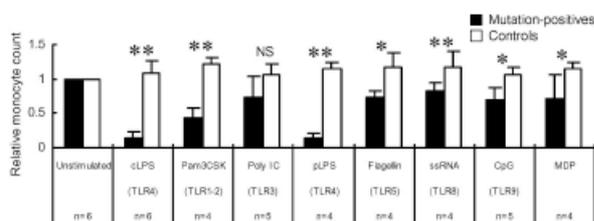


図 7 各種 TLR リガンドと CIAS1 変異単球の細胞死

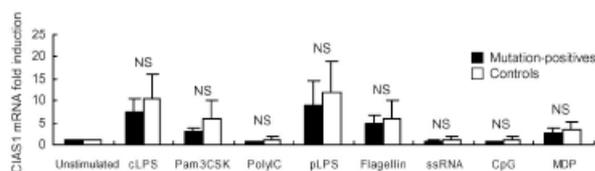


図 8 各種 TLR リガンドと CIAS1 mRNA 誘導能

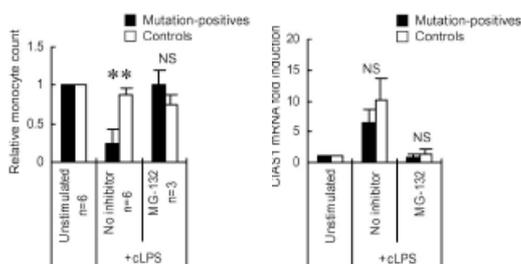


図 9 MG-132 による CIAS1 mRNA 抑制の細胞死に対する効果

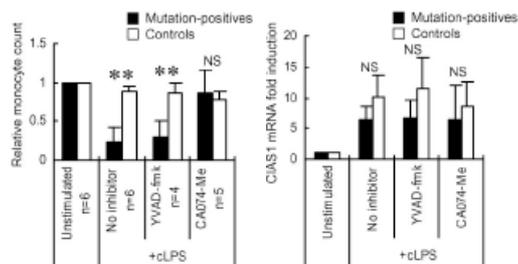


図 10 LPS 刺激による CIAS1 変異単球細胞死はカスパーゼ 1 非依存性、カテプシン B 依存性である。

3) 異常 CIAS1 の生物学的な特徴と臨床的な特徴の検討

本研究期間中に集積した CINCA 症候群症例で genotype-phenotype 関連を検討した。全体の症例数が少なく、各遺伝子変異をもつ症例数が 1 例のみで、解析が困難であった。

そのため *in vitro* の指標である ASC 依存性 NF- κ B 活性化能、THP-1 細胞での細胞死誘導能での相関を見てみると、正の相関が得られた。また両者において一方のみ陽性を示すような変異はみられず、いずれも陽性を示した。なかでも CIAS1 モザイクで同定された変異は通常のヘテロで見つかった変異に比べ、より活性が強い傾向にあった。

また患者細胞による末梢血の IL-1 β 産生能は、生物製剤等の治療に影響を受けているためか、*in vitro* での他のマーカーと相関はしなかった。

4) CIAS1 モザイクの否定された症例の検討

本研究では、1 症例の CIAS1 遺伝子翻訳領域に変異がない CINCA 症候群を同定した。alternative splicing、プロモーター領域の解析等は、本研究中に結果を得るまで到らなかった。

(総括)

本研究により、CIAS1 変異陰性 CINCA 症候群の原因として、CIAS1 モザイクが重要であることがわかった。さらに、そのモザイクは細胞として約 10% の低頻度で存在することがわかり、通常の遺伝子解析では同定不可能であることが分かった。そのため、LPS 刺激で CIAS1 変異細胞に細胞死が誘導される事を利用し、CIAS1 変異細胞を濃縮、遺伝子変異を同定する方法を確立した。以上の結果より、10% の体細胞モザイクでも CINCA 症候群が発症し、この現象はごくまれな現象ではなく、本邦での CIAS1 モザイク頻度より (3/4)、同症候群の約 20%

に観察される事が予想された。さらに遺伝子病における遺伝子解析をするにあたり、このような体細胞モザイクにより発症する疾患において通常の遺伝子解析ではみのがしてしまう危険性を示し、遺伝子病における体細胞モザイクの重要性を例示した点において重要な仕事であった。

一方問題点として、今回樹立した CIAS1 モザイク診断法が特殊な機械を要し、また手技的に困難で熟練を要するもので、より簡便な診断法の確立が望まれた。また今回集めた症例数が少なく、CIAS1 モザイクの臨床的な特徴まで言及するには及ばなかった。また本邦のみでの研究であり、他の民族でも同様の結果が得られるか不明であった。よって、国際的な研究に発展させ、症例数を増やすことにより CIAS1 モザイクの特徴を追求するとともに、他の民族でも CIAS1 モザイクが観察されるか検討を要する。

今回予定した研究のうち、2) CIAS1異常の単球におけるLPS刺激による細胞死のメカニズムの検討、4) CIAS1モザイクの否定された症例の検討、が途中で終了してしまっただけで、2) については、THP-1細胞の stable transfectantが作成できず、テトラサイクリンによるinducible transfectantを作成中である。患者細胞の入手に限りがあり、細胞株、患者由来iPS細胞からの分化系を利用したCIAS1変異単球細胞作成により、LPS刺激によるCIAS1変異単球の細胞死の機序を明らかにしたい。4)については、国際的な研究により症例数を増やすとともに、網羅的な遺伝子解析、患者由来iPS細胞作成により、新規遺伝子異常同定を試みたい。

さらにCINCA症候群が含まれる自己炎症性疾患群の他の疾患において、体細胞モザイクにより診断が見逃されている症例が存在することが予想される。他の自己炎症症候群に応用できる体細胞モザイク診断法としてDNAベースの診断法を確立したい。

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4件)

- ①Saito, M., R. Nishikomori, N. Kambe, A. Fujisawa, H. Tanizaki, K. Takeichi, T. Imagawa, T. Iehara, H. Takada, T. Matsubayashi, H. Tanaka, H. Kawashima, K. S. Kagami, I. Okafuji, T. Yoshioka, S. Adachi, T. Heike, Y. Miyachi, T. Nakahata. Disease-associated CIAS1 mutations induce monocyte death, revealing low-level mosaicism in

mutation-negative cryopyrin-associated periodic syndrome patients. Blood 111:2132-2141, 2008 査読有り

- ②Fujisawa A., N. Kambe, M. Saito, R. Nishikomori, H. Tanizaki, N. Kanazawa, S. Adachi, T. Heike, J. Sagara, T. Suda, T. Nakahata and Y. Miyachi. Disease-associated mutations in CIAS1 induce cathepsin B-dependent rapid cell death of human THP-1 monocytic cells. Blood 109:2903-2911, 2007 査読有り
- ③Kanegane H., T. Itazawa, M. Saito, R. Nishikomori, T. Makino, T. Shimizu, Y. Adachi, T. Nakahata, and T. Miyawaki. A CIAS1 mutation in a Japanese girl with familial cold autoinflammatory syndrome. Eur J Pediatr 267:245-247, 2008 査読有り
- ④Okafuji I., R. Nishikomori, N. Kanazawa, N. Kambe, A. Fujisawa, S. Yamazaki, M. Saito, T. Yoshioka, T. Kawai, H. Sakai, H. Tanizaki, T. Heike, Y. Miyachi, T. Nakahata. Role of NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. Arthritis Rheum 60:242-250, 2009 査読有り

[学会発表] (計1件)

- ① Saito M., R. Nishikomori, N. Kambe, A. Fujisawa, H. Tanizaki, T. Kawai, H. Sakai, I. Okafuji, T. Yoshioka, S. Adachi, T. Heike, Y. Miyachi, T. Nakahata. Disease-associated CIAS1 mutations induce monocyte death, revealing low-level mosaicism in mutation-negative cryopyrin-associated periodic syndrome patients. 71st ACR annual meeting, Boston MA, 2007. 11. 10

[図書] (計0件)

[産業財産権] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西小森 隆太 (NISHIKOMORI RYUTA)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：70359800

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

神戸 直智 (KAMBE NAOTOMO)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：50335254