

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461491

研究課題名(和文) 関節症における骨融解・骨新生を誘導する新しい分子の同定とiPS細胞による病態解析

研究課題名(英文) Detection of new molecules which induce bone lysis and new bone formation, and analysis of pathophysiology in arthropathy using induced pluripotent stem (iPS) cells

研究代表者

井田 弘明 (Ida, Hiroaki)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60363496

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)：関節破壊が進行する疾患1家系の姉弟(姉が患者で血族婚)において、次世代シーケンサーでデータ取得後、遺伝子を抽出、10遺伝子11か所のみ抽出された。さらに変異の有無をシーケンスで確認したところ、6カ所のミスセンス変異を確認した。さらに、6カ所のミスセンス変異も候補遺伝子の発現をRT-PCRで確認した。軟骨細胞、骨芽細胞において、5つの候補遺伝子で発現が確認された。患者からインフォームドコンセント取得後、末梢血を採取、京都大学iPS細胞研究所に患者の疾患特異的iPS細胞作成を依頼、平成28年3月に樹立されたiPS細胞を受け取った。軟骨細胞、破骨細胞、骨芽細胞へ分化させる条件決めを行った。

研究成果の概要(英文)：We performed homozygosity mapping for a consanguineous patient suffered from joint destruction using SNPs GeneChip array compared with a healthy patient brother. We detected 2049 candidate genes in this study. As we could not narrow down the candidate genes in homozygosity mapping, we examined the candidate genes using next generation sequencing. We could detect 10 candidate genes from 11 locuses in this system, and narrow down and confirm 6 missense mutations after Sanger sequencing. Moreover, we confirmed the 5 gene expressions from 6 candidate genes using RT-PCR in both chondrocytes and osteoblasts. To know the role of pathophysiology in this arthropathy, we planned to establish the iPS cells. Several clones of the iPS cells derived from a patient were established in CiRA (Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University). After we received iPS cells from CiRA, we tried to differentiate into chondrocytes, osteoblasts, and osteoclasts.

研究分野：膠原病学

キーワード：骨破壊 遺伝子 関節 次世代シーケンサー iPS細胞

### 1. 研究開始当初の背景

関節症には、関節リウマチ(RA)を代表する骨融解を伴う疾患と変形性関節症(OA)を代表する骨新生を伴う疾患がある。RA と OA は、関節症の多くを占め、全国的にも患者は多い。

RA において骨融解・破壊が進行する原因はまだよく解明されていない。生物学的製剤の革命的な進歩により、臨床的寛解を達成することができ、構造的寛解、機能的寛解が求められる時代に突入した。RA において骨融解・破壊の機序を解明することは特に重要である。一方 OA は、関節軟骨の変性・摩耗とその後の軟骨・骨の新生増殖、および二次性滑膜炎などに基づく進行性の変性関節疾患で、骨の異常を修復する過程で骨棘が形成される。OA の骨変化の抑制・治療は、RA よりも進んでいないのが現状である。

### 2. 研究の目的

私たちは、遺伝性関節融解症(疾患名としては正式な名称ではないが、RA 発症後に短期間で関節融解が生じた血族婚の患者症例であり、あえてこの名称を使用)と遺伝性肥大性骨関節症 (Primary hypertrophic osteoarthropathy:PHO,Pachydermoperiostosis) という骨に関して骨融解、骨新生という全く異なる病態を示す家系を発見した。この家系における遺伝子解析から骨融解、骨新生の新しいメカニズムを解明することができる可能性があり、さらに関節症の代表である RA と OA の骨変化に関するメカニズムを解明することにつながると考え、この研究を計画した。

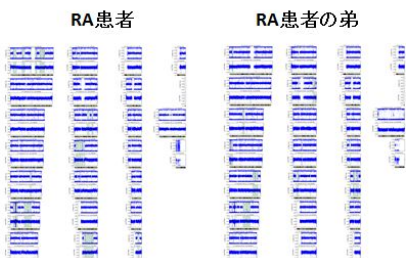
### 3. 研究の方法

遺伝性関節融解症の 1 家系の姉弟(姉が患者で血族婚)において遺伝子解析を行った。



(1) イルミナ社の HumanOmni1-Quad を使用して homozygosity mapping を行った。

イルミナ社: Infinium アッセイ (HumanOmni1-Quad)



(2) 1 家系の患者と健常者の遺伝子を次世代

シーケンサー(5500 SOLiD シークエンサー; Life Technologies 社)でデータ取得後、以下の条件を満たす遺伝子を抽出した。

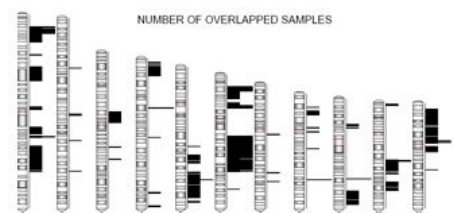
非患者は正常ホモかヘテロをもつ、患者は変異ホモをもつ、 malignant な変異 (nonsynonymous SNV, stop gain/loss, frameshift, nonframeshift, スプライシング異常) である、1,000 人ゲノムプロジェクト (1,000g project) およびエキソームシーケンシングプロジェクト 6,500 (ESP6,500 project) から多型ではない、segmental duplication 領域ではない。

(3) ヒト由来軟骨細胞と骨芽細胞を継代培養後、RNA を抽出した。6 つの候補遺伝子 (ANKS1A, CPNE5, KIAA1967, HPS6, SBF2, MICAL2) に対してプライマーを作成、各遺伝子ごとに RT-PCR (Stratagene Mx3005P; Agilent Technologies) を行った。

(4) 関節破壊が進行する疾患 1 家系の姉弟(姉が患者で血族婚)において、姉からインフォームドコンセント取得後、末梢血を採取、京都大学 iPS 細胞研究所に患者の疾患特異的 iPS 細胞作成を依頼する。iPS 細胞樹立後、軟骨細胞、破骨細胞、骨芽細胞へ分化させる条件決めを行った。

### 4. 研究成果

(1) 1 家系の姉弟における subtraction では、2049 遺伝子が候補遺伝子として同定された。そのうち、以下に示すように、Ossification に関係する遺伝子が 23、Inflammatory response に関係する遺伝子が 35 あった。



RA患者-RA患者の弟; 2049 遺伝子



#### Ossification: 23遺伝子

APC, BMP1, BMP4, C1orf9, CALCA, CTSK, ECM1, EXT2, FBXL15, GABBR1, KAZALD1, LRP4, NELL1, PLA2G4A, PTGS2, PTH, PTK2B, SMOC1, STC1, SUFU, TGFB3, TRAF6, TUFT1

#### Inflammatory response: 35遺伝子

CALCA, CD44, CDO1, CHST1, CHUK, F2, FOS, HIF1A, HIST1H2BA, IL10RB, IL23R, KLKB1, MAPK13, MRGPRX1, MS4A2, NR1H3, PLA2G4A, PSMA1, PSMA6, PSMB4, PTAFR, PTGS2, SAA1, SAA2, SAA3P, SAA4, SAAL1, SCGB1A1, SELE, SELP, SERPINC1, SERPING1, TICAM2, TNFSF4, XCL1

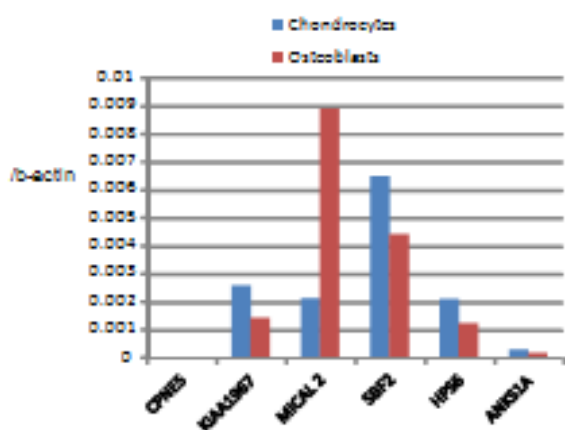
(2) 研究方法に示した条件を満たす遺伝子は、10 遺伝子 11 か所のみ抽出された。さらに変異の有無を確認するため、シーケンスを行い確認したところ、患者で変異のあるホモ、健常兄弟でホモあるいはヘテロである 6 か所のミスセンス変異を確認した。変異による蛋白構造変化を PolyPhen2 プログラムで予測したところ、probably damaging を示すものが存在した。(下表)

GeneID	unig_bcd	recessive	dominant	#F1_HOM	#F1_HET
SMPDL3B	1	1	1	1	0
HMP12	1	1	1	1	0
GPRIN1	1	1	1	1	0
HLA-DQB1	2	1	1	2	0
ANKK1A	1	1	1	1	0
CPNE5	1	1	1	1	0
KIAA1967	1	1	1	1	0
HPS6	1	1	1	1	0
SBF2	1	1	1	1	0
MICAL2	1	1	1	1	0

(3) 以下の 6 つの候補遺伝子の発現が軟骨細胞、骨芽細胞に存在するか、RT-PCR で確認した。

- 1) ANKS1A:(Odin); Src family kinase target
- 2) CPNE5: ubiquitous Ca(2+)-dependent, phospholipid-binding proteins
- 3) KIAA1967:(DBC1);a putative tumor-suppressor gene
- 4) HPS6:Hermansky-Pudlak syndrome (HPS)
- 5) SBF2:Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4 (CMT4)
- 6) MICAL2:neuronal growth, actin microfilament regulation

5 つの候補遺伝子で発現が確認された。(下图)



(4) 関節破壊が進行する疾患 1 家系の姉弟(姉が患者で血族婚)において、姉からインフォームドコンセントが得られ、末梢血を採取、京都大学 iPS 細胞研究所に患者の疾患特異的 iPS 細胞作成を依頼、平成 28 年 3 月に樹立された iPS 細胞を受け取った。軟骨細胞、破骨細胞、骨芽細胞へ分化させる条件決めを行った。今後、患者由来疾患特異的 iPS 細胞を

軟骨細胞、破骨細胞、骨芽細胞へ分化させ、正常人由来 iPS 細胞から分化させた細胞と増殖能、細胞形態などを比較する。差がある場合、同定された 5 つの候補遺伝子を iPS 細胞へ戻すことによって、その差がなくなるか検討、この患者の病態に候補遺伝子が関与しているか確認する。

## 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 23 件)

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 Vol. 10, No. 5, 2015, e0125938

Horai Y, Koga T, Fujikawa K, Takatani A, Nishino A, Nakashima Y, Suzuki T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Ida H, Kakugawa T, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Mukae H, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Kuwana M, Origuchi T, Kohno S, Kawakami A. Serum interferon- $\alpha$  is a useful biomarker in patients with anti-melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) antibody-positive dermatomyositis. Mod Rheumatol. 査読有 Vol. 25, No. 1, 2015, 85-89

井田弘明、自己炎症症候群の診断と臨床検査について、臨床病理、査読無、63 巻、2015、598-604

井田弘明、自己炎症症候群の診断と治療、日本内科学会雑誌、査読無、104 巻、2015、1964-1973

井田弘明、内科医が診る不明熱の鑑別診断、日本内科学会雑誌、査読無、105 巻、2015、457-463

井田弘明、自己炎症症候群の病態と検査、臨床病理、査読無、63 巻、2015、1207-1212

國武由紀子、永田隆信、吉田稚明、吉田直実、若杉大輔、海江田信二郎、田中啓之、谷川健、鹿毛攻義、井田弘明、急性心不全症状で発症した血管型ベーチェット病の一例、九州リウマチ、査読有、35 巻、2015、115-120

井田弘明、自己炎症症候群-インフラマソームの機序と機能について、リウマチ科、査読無、53 巻、2015、274-280

井田弘明、膠原病に病像の似た自己炎症症候群の鑑別診断の進めかた、Medical Practice、査読無 32 巻、2015、1137-1142

井田弘明、TNF 受容体関連周期性症候群、リウマチ科、査読無、54 巻、2015、143-148

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 Vol. 93, No. 3, 2014, 158-164

Yoshida N, Kaieda S, Yoshimura S, Ida H. Facial and laryngeal edema in a patient with dermatomyositis. *Intern Med*. 査読有 Vol. 53, No. 8, 2014, 921

Kaieda S, Kobayashi T, Moroki M, Honda S, Yuge K, Kawano H, Mitsuyama K, Sata M, Ida H, Hoshino T, Fukuda T. Successful treatment of rectal ulcers in a patient with systemic lupus erythematosus using corticosteroids and tacrolimus. *Mod Rheumatol* 査読有 Vol. 24, No. 2, 2014, 357-360

Nakajima K, Takahashi M, Yamamoto M, Takahashi A, Sano S, Kodama H, Arima K, Ida H. Successful treatment of Schnitzler syndrome with cyclosporine. *Int J Dermatol*. 査読有 Vol. 53, No. 7, 2014, e361-363

Kaieda S, Yoshida N, Idemoto A, Ida H. Cricothyroid perichondritis in a patient with dermatomyositis. *Intern Med* 査読有 Vol. 53, No. 24, 2014, 2833

Komatsu S, Honma M, Igawa S, Tsuji H, Ishida-Yamamoto A, Migita K, Ida H, Iizuka H. Cutaneous necrotizing vasculitis as a manifestation of familial Mediterranean fever. *J Dermatol*. 査読有 Vol. 41, No. 9, 2014, 827-829

Migita K, Agematsu K, Masumoto J, Ida H, Honda S, Jiuchi Y, Izumi Y, Maeda Y, Uehara R, Nakamura Y, Koga T, Kawakami A, Nakashima M, Fujieda Y, Nonaka F, Eguchi K, Furukawa H, Nakamura T, Nakamura M, Yasunami M. The contribution of SAA1 polymorphisms to Familial Mediterranean fever susceptibility in the Japanese population. *PLoS One* 査読有 Vol. 8, No. 2, 2013, e55227

Kita J, Tamai M, Arima K, Kawashiri SY, Horai Y, Iwamoto N, Okada A, Koga T, Nakashima Y, Suzuki T, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Aoyagi K, Uetani M, Eguchi K, Kawakami A. Significant improvement in MRI-proven bone edema is associated with protection from structural damage in very early RA patients managed using the tight control approach. *Mod. Rheumatol*. 査読有 Vol. 23, No.2, 2013, 254-259

本多靖洋、井手元晶子、吉田直実、海江田信二郎、田尻守拡、日高由紀子、井田弘明、弓削健太郎、竹尾正彰、矢野真弓、福田孝昭、シェーグレン症候群に伴う環状紅斑にミゾリピンが著効した1例、九州リウマチ、査読有、33巻、2013、114-118

右田清志、野中文陽、和泉泰衛、江口勝美、

中村正、井田弘明、上松一永、家族性地中海熱の臨床、炎症と免疫、査読無、21巻、2013、40-46

②川上純、右田清志、井田弘明、自己炎症疾患、*medicina*、査読無、50巻、2013、458-462

②井田弘明、遺伝性発熱性疾患の遺伝子診断ガイドライン、リウマチ科、査読無、50巻、2013、507-511

③井田弘明、自己炎症症候群、最新医学、査読無、68巻、2013、2561-2569

〔学会発表〕(計 25 件)

井田弘明、不明熱の鑑別と自己炎症症候群、第 54 回日本内科学会九州支部生涯教育講演会、2015.5.30、久留米大学医学部筑水会館、久留米

井田弘明、教育講演 8 自己炎症症候群の診断と治療、第 112 回日本内科学会、2015.4.10-12、みやこめっせ、京都

井田弘明、シンポジウム 2 自己炎症症候群の病態と検査、第 10 回日本臨床検査医学会特別例会、2015.4.13、グランドプリンスホテル京都ローズルーム、京都

井田弘明、内科医が診る不明熱の鑑別診断、2015 年度 日本内科学会生涯教育講演会 A セッション 2015.5.31、大阪国際会議場、大阪

井田弘明、内科医が診る不明熱の鑑別診断、2015 年度 日本内科学会生涯教育講演会 A セッション 2015.9.27、ニトリ文化ホール(旧北海道厚生年金会館) 札幌

井田弘明、國武由紀子、吉田直実、若杉大輔、田尻守拡、岡元昌樹、富永正樹、海江田信二郎、右田清志、福田孝昭、当科で経験した家族性地中海熱症例の検討、第 59 回日本リウマチ学会総会、2015.4.23-25、名古屋国際会議場、名古屋

Kaieda S, Okamoto M, Tominaga M, Yoshida N, Hidaka Y, Wakasugi D, Kanazaki K, Ida H, IL-38: A New Factor in Rheumatoid Arthritis、第 59 回日本リウマチ学会総会、2015.4.23-25、名古屋国際会議場、名古屋

吉田直実、海江田信二郎、國武由紀子、若杉大輔、田尻守拡、岡元昌樹、富永正樹、井田弘明、星野友昭、搔痒感を伴う浮腫性紅斑を有する皮膚筋炎患者の臨床的特徴、第 59 回日本リウマチ学会総会、2015.4.23-25、名古屋国際会議場、名古屋

國武由紀子、吉田直実、海江田信二郎、永田隆信、田中啓之、吉田稚明、谷川健、鹿毛政義、大島孝一、井田弘明、急性心不全症状を来した血管型ベーチェット病の一例、第 49 回九州リウマチ学会、2015.3.21-22、アクロス福岡、福岡

井田弘明、教育講演 2 Autoinflammatory syndrome、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014.4.24、グランドプリンスホテル新高利輪 国際館パミール、東京

國武由紀子、吉田直実、海江田信二郎、福田孝昭、西小森隆太、井田弘明、新規遺伝子

変異が認められた PAPA 症候群の一例、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014.4.24、グランドプリンスホテル新高利輪国際館パミール、東京

本多靖洋、金崎克也、矢野真弓、久保山昌宏、竹尾正彰、弓削健太郎、鮎川竜祐、海江田信二郎、井手元晶子、日高由紀子、吉田直実、田尻守拓、岩永希、中野輝明、猪口哲彰、井田弘明、福田孝昭、CHARM(Chikugo Adalimumab Research Members)研究会、筑後地区におけるアダリムマブ実臨床下における 2 年継続治療の検討、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014.4.24、グランドプリンスホテル新高利輪 国際館パミール、東京

弓削健太郎、竹尾正彰、井手元晶子、岩永希、鮎川竜祐、矢野真弓、日高由紀子、吉田直実、海江田信二郎、本多靖洋、井田弘明、福田孝昭、関節リウマチ(RA)患者におけるゴリムマブ(GLM)と MTX の併用効果の検討、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014.4.24、グランドプリンスホテル新高利輪 国際館パミール、東京

吉田直実、海江田信二郎、岡元昌樹、田尻守拓、日高由紀子、井田弘明、多発性筋炎/皮膚筋炎患者における抗アミノアシル tRNA 合成酵素抗体の有無による間質性肺炎重症度の臨床および画像比較検討、(抗ARS抗体陽性/陰性症例における筋炎合併間質性肺炎の画像および臨床経過の比較検討、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014.4.24-26、グランドプリンスホテル新高利輪 国際館パミール、東京

國武由紀子、吉田直実、海江田信二郎、井田弘明、福田孝昭、西小森隆太、新規遺伝子変異が認められた PAPA 症候群の一例、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014.4.24-26、グランドプリンスホテル新高利輪国際館パミール、東京

井田弘明、日高由紀子、吉田直実、海江田信二郎、光山慶一、岩本一亜、石丸裕康、藤田久美、熊木恵里、森尾友宏、西小森隆太、炎症性腸疾患を合併した PAPA 症候群の一例、第 35 回日本炎症・再生医学会、2014.7.1-4、万国津梁館、沖縄

井田弘明、海江田信二郎、吉田直実、國武由紀子、三嶋博之、木下晃、吉浦孝一郎、福田孝昭、遺伝性関節症の遺伝子解析結果を利用した関節リウマチの骨破壊に関する基礎研究、第 42 回日本臨床免疫学会、2014.9.25-27、京王プラザホテル、東京

井田弘明、ランチョンセミナー 1: 自己炎症症候群とリウマチ・膠原病との接点、第 25 回日本リウマチ学会中国・四国学術集会、2014.12.5-6、高知市分化プラザかるぼーと、高知

井田弘明、國武由紀子、吉田直実、海江田信二郎、右田清志、福田孝昭 当科で経験した家族性地中海熱症例の検討、第 48 回九州リウマチ学会、2014.9.6-7、石橋文化セン

ター、久留米

Kaieda S, Kanazaki K, Yoshida N, Kunitake Y, Ida H, Hoshino T, IL-38: A New Factor in Rheumatoid Arthritis, 78<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting on American College of Rheumatology, 2014.11.14-19, Boston(USA)

②井田弘明、海江田信二郎、井手元晶子、吉田直実、本多靖洋、福田孝昭、プロテアソーム機能不全症における慢性炎症の解析、第 57 回日本リウマチ学会総会、2013.4.18、国立京都国際会館、京都

②藤川敬太、塚田敏昭、岩本直樹、一瀬邦弘、山崎聡士、中村英樹、川上純、岩永希、植木幸孝、右田清志、井田弘明、原発性肥大性骨関節症患者の疾患遺伝子解析と MEFV 変異の検討、第 57 回日本リウマチ学会総会、2013.4.18、国立京都国際会館、京都

③吉田直実、井田弘明、海江田信二郎、井手元晶子、本多靖洋、右田清志、福田孝昭、不明熱患者における自己炎症症候群の遺伝子検索、第 57 回日本リウマチ学会総会、2013.4.18、国立京都国際会館、京都

④井田弘明、藤川敬太、海江田信二郎、三嶋博之、吉浦孝一郎、右田清志、川上純、福田孝昭、自己炎症性骨疾患である肥大性骨関節症の遺伝子検索、第 34 回日本炎症・再生医学会、2013.7.3、国立京都国際会館、京都

⑤山下文也、井田弘明、吉田直実、井手元晶子、海江田信二郎、右田清志、福田孝昭、不明熱患者における自己炎症症候群の遺伝子検索、第 34 回日本炎症・再生医学会、2013.7.3、国立京都国際会館、京都

〔図書〕(計 4 件)

井田弘明、日本臨床社、免疫症候群(第 2 版)TNF 受容体関連周期性症候群 新領域別症候群シリーズ、2016 年、787

井田弘明、新興医学出版社、総論 自己炎症症候群の分類と診断 2015、10

井田弘明、医学書院、成人発症スチル病 今日の治療指針 2014 年版、2014、795

井田弘明、医学書院、関節リウマチに伴うアミロイドーシス(AA アミロイドーシス) 今日の治療指針 2013 年版、2013、765

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

井田 弘明 (IDA Hiroaki)

久留米大学医学部 呼吸器・神経・膠原病内科・教授

研究者番号: 60363496



(2)研究分担者

海江田 信二郎 (KAIEDA Shinjiro)  
久留米大学医学部 呼吸器・神経・膠原病  
内科・講師  
研究者番号：20330798

(3)連携研究者

吉浦 孝一郎 (YOSHIURA Koichiro)  
長崎大学医歯薬学総合研究科人類遺伝  
学・教授  
研究者番号：00304931

斎藤 潤 (SAITO Megumu )  
京都大学 iPS 細胞研究所・准教授  
研究者番号：90535486