

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19610

研究課題名(和文) 臨床検体、iPS細胞、マウスモデルを用いたメバロン酸キナーゼ欠損症の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenesis of mevalonate kinase deficiency with clinical samples, iPS cells, and mouse model

研究代表者

田中 孝之(Tanaka, Takayuki)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：20625678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：3名のMKD患者および2名の健常者から由来のiPS細胞からCD14陽性血球を作製した。血球よりlysateを作製しMK活性を測定したところ、患者血球は健常者の2%未満と著明に低下しており、末梢血血球と同様の病態が再現された。次に血球を刺激してIL-1b分泌を比較したところ、末梢血単球で見られた差が再現されなかった。

CRISPR/CAS9システムを用いて変異MVK遺伝子をヘテロに発現するマウスを作製し、これを交配することによって変異MVKをホモに有するマウスを作製した。

また研究期間中に新たに診断した症例を含めて国内で10例の患者が同定されたので、臨床および検査所見をまとめて論文投稿中である。

研究成果の概要(英文)：We produced CD14-positive blood cells through iPS cells derived 3 MKD patients and 2 healthy controls. The MK activity of patient-derived blood cells was potently reduced and below 2% of healthy controls, so the phenotype of the peripheral blood cells was reproduced in iPS cell-derived blood cells. Next, we compared IL-1beta secretion from iPS-derived blood cells, but found no difference between patient-derived and control cells.

We developed genetically-engineered mouse that express heterozygous mutant MVK gene. Then we bred them and obtained homozygous mutant mouse.

We identified 10 Japanese MKD patients in total, including newly-diagnosed patients during the research period. We are preparing to submit a paper regarding the clinical and laboratory information.

研究分野：免疫学

キーワード：iPS細胞 自己炎症性疾患 サイトカイン

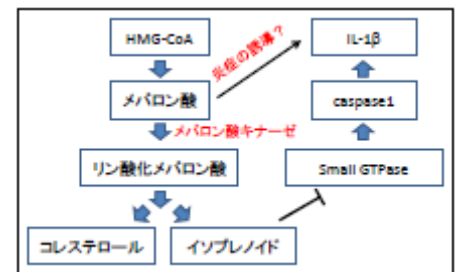
1. 研究開始当初の背景

自己炎症性疾患では遺伝子変異に基づき、乳幼児期より周期性に発熱が見られる。その中で、CAPS(cryopyrin-associated periodic syndrome, 原因遺伝子: NLRP3)において、最も病態解明・治療開発の関連が明確であった。この疾患ではNLRP3の機能獲得型変異により、NLRP3を含む複合体インフラマソームが活性化され、IL-1 β が過剰産生される (Cell 2004, 117:561)。そこで生物学的製剤を用いた抗IL-1療法が開始され、劇的な効果が見られた (NEJM 2009, 360:2416)。

一方、メバロン酸キナーゼ欠損症 (mevalonate kinase deficiency : MKD)の原因遺伝子 MVK(mevalonate kinase)はコレステロールなどの代謝に関わる酵素をコードしている。MK活性低下に伴う細胞内代謝動態の変動が、インフラマソーム活性化からIL-1 β の過剰産生を惹起すると推測されている (Clin Immunol 2013, 147:197)。MKは脂質代謝に関わる分子の一つで、体内のほとんどすべての細胞で発現している。MK活性が低下するとメバロン酸が蓄積する一方、下流の代謝産物が減少する (右図)。患者PBMCを抗CD2抗体+抗CD28抗体や (Arthritis Rheum 2002, 46:2794)、lipopolysaccharide(LPS)で刺激すると(Arthritis Rheum 2006, 54:3690)、イソプレノイドの枯渇が原因となって過剰なIL-1 β 分泌が見られることが見出され、その後単球細胞株をHMG-CoA還元酵素阻害剤で処理して人工的にイソプレノイド枯渇を再現した研究が行われ、Rac1などのsmall GTPaseの翻訳後修飾の異常からcaspase 1が活性化されて過剰IL-1 β 分泌がもたらされることが明らかとなっている (Blood 2008, 112:3563)。

これらの知見に基づきMKDに対しても抗IL-1療法が導入されたが、炎症の抑制が

見られる症例もある一方、部分的な改善にとどまる症例や治療不応例もあり (Pediatrics 2011, 128:e152)、抗IL-6療法への変更が有効であった症例(Rheumatol 2014, epub)も見られる。患者50例の長期観察では、2/3の症例で寛解、ないし発作強度の軽減が見られたが(Pediatrics 2011, 128:e152)、その機序は不明である。さらにHMG-CoA還元酵素阻害剤投与が発作日数を減少させたという報告と (Clin Pharmacol Ther 2004, 75:476)、無効であったという報告があり (Pediatrics 2011, 128:e152)、結論が出ていない。より有効性の高い治療法の開発のため、メバロン酸の蓄積が炎症に寄与するかどうかの解明や、単球が活性化されてIL-1 β などのサイトカインを分泌するのを抑制する手段の開発など、さらなる基礎的な研究が必要とされている。



2. 研究の目的

以下の3点を目的として研究を開始した。

- A) 患者細胞を用いた細胞間相互作用の解明
- B) iPS細胞由来単球を用いたIL-1 β 分泌阻害物質の探索
- C) マウスモデルを用いた発熱の周期性の解明

3. 研究の方法

- A) MKD患者のPBMCおよび単球からのサイトカイン産生を評価した。また研究期間中に新たに診断した症例を含めて国内で10例の患者が同定されたので、臨床および検査情報を主治医、患者より収集した。
- B) 3名のMKD患者および2名の健常者由来のiPS細胞からフィーダーフリー分化系を用いてCD14陽性血球を作製し、サイトカイン産生を評価した。
- C) CRISPR/CAS9システムを用いて変異MVK遺伝子をヘテロに発現するマウスを作製し、これを交配することによって変異MVKをホモに有するマウスを作製した。

4. 研究成果

計画 A: 患者細胞を用いた細胞間相互作用

の解明 炎症発作期にある MKD 患者の

PBMC および単球からのサイトカイン産生を評価した (図 1)。その結果、既報通り患者単球からの IL-1b 分泌が 2 倍程度に亢進していたことに加えて、PBMC からの IL-1b 分泌は大きく亢進していた。この現象が発熱発作により非特異的に生じた現象でないかを評価するため、類似の自己炎症性疾患である TRAPS の患者が発熱発作を生じた際に血液を採取し、サイトカイン産生を評価した (図 2)。その結果、PBMC での IL-1b 分泌亢進は見られず、図 1 で見られた IL-1b 過剰分泌は発熱発作中の血球一般に見られるものではなく、MKD 患者に特異的な現象と推測された。そこで、この現象の再現性を確認するため、非発作時期にある 3 名のメバロン酸キナーゼ欠損症の患者細胞を用いてサイトカイン分泌を比較するアッセイを行った。その結果、PBMC 全体からの IL-1b 分泌は健常者に比べて 4 倍に亢進していたが、単球からの IL-1b 分泌も 3 倍程度に亢進しており、非発作時の MKD 患者における IL-1b 分泌の亢進は主に単球からの分泌亢進によると考えられ、PBMC の細胞間の相互作用はそれほど大きくないと考えられた。最初の患者で見られた PBMC からの IL-1b 過剰産生は炎症発作期の MKD 患者では再現性のある現象の可能性はあるが、従来のコルチコステロイド内服療法に加えて抗 IL-1b 抗体などの生物学的製剤を用いた治療が保険適応となり MKD 患者の炎症コントロールが改善しているため、発熱発作期にある MKD 患者の血液を入手できる機会は少なく、患者検体を用いた解析はこの段階で中断した。

計画 B: iPS 細胞由来血球を用いた解析

3 名の MKD 患者および 2 名の健常者由来の iPS 細胞からフィーダーフリー分化系を用

図1 発作時PBMCのIL-1β分泌亢進

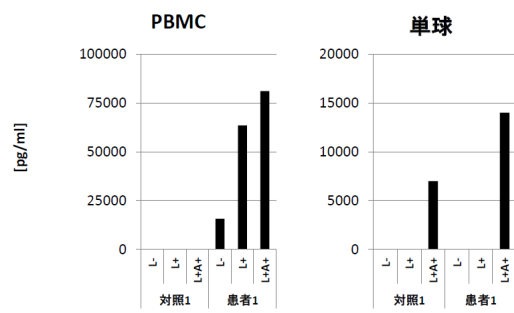


図2 TRAPS患者の発作時PBMC

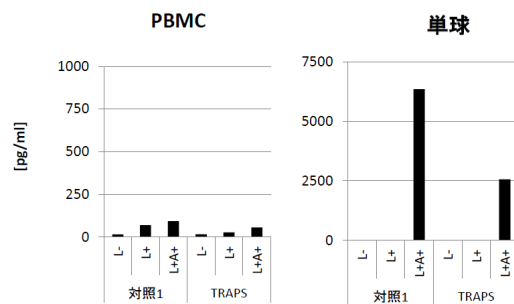
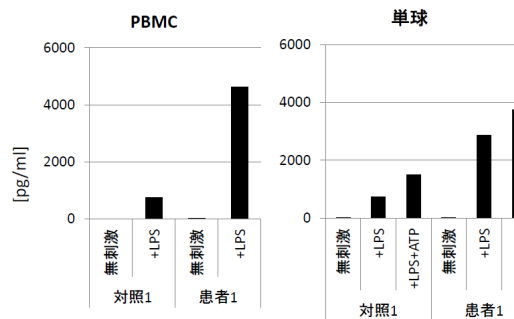


図3 非発作時MKD患者のIL-1β分泌



いて CD14 陽性血球を作製した。変異の有無で血球分化の効率には差がなく、分化後の浮遊細胞の CD45 陽性率はほぼ 100% で、CD14 陽性率も 90% 程度だった (図 4)。さらに血球を純化して実験を行うため、CD14 陽性を指標に磁気ビーズを用いて精製したところ、血球の CD14 陽性率は 97% 以上と上昇した。細胞は表面抗原の発現で成熟した血球であることを確認した。作製した血球より lysate を作製し MK 活性を測定したところ、患者血球は健常者の 2% 未満と著明に低下しており、末梢血血球と同様の病態が再現された。次のこの血球を LPS や ATP で刺激して IL-1b 分泌を比較

したところ、患者由来、健常者由来とも同程度に IL-1b を分泌し (図 5)、末梢血単球で見られた差が再現されなかった。原因を明らかにするために細胞の分化段階を評価した。PBMC から CD14 陽性を指標に精製した単球、その単球を 1 週間 in vitro で培養して作製したマクロファージ、および iPS 細胞由来血球にメイギムザ染色を行い細胞の形態を比較したところ、単球は N/C が大きく空胞をわずかに認めるのみであったが、iPS-血球は細胞質が広くて N/C 比が小さく、細胞質に空胞も多く認め、マクロファージに近かった (図 6)。また RNA-Seq を用いて種々の血球の遺伝子発現を比較したところ、iPS-血球は末梢血マクロファージ(M)と最も近く、単球とは遺伝子発現がやや異なっていることが明らかとなった (図 7)。患者より単球を採取し、マクロファージへ分化させた場合に IL-1b の過剰分泌が見られるかどうかは評価できていないが、患者細胞を用いて IL-1b の過剰分泌を同定した既報告ではいずれも単球を用いてアッセイが行われていることと合わせて考えると、iPS 細胞由来 CD14 陽性血球は、末梢血由来マクロファージに近いことが、患者 iPS 細胞由来血球で IL-1b の過剰分泌が見られない原因の一つである可能性が考えられた。

計画 C : マウスモデルの作製
 CRISPR/CAS9 システムを用いて変異 MVK 遺伝子をヘテロに発現するマウスを作製し、これを交配することによって変異 MVK をホモに有するマウスを作製した。現在このマウスを経過観察中であり、今後血球のサイトカイン産生能や MK 活性低下の有無を評価する予定である。

MKD 患者の全国調査

また研究期間中に新たに診断した症例を含めて国内で 10 例の患者が同定されたので、臨床および検査所見をまとめて論文投稿準備中である。

図4 表面抗原の発現に差を認めず

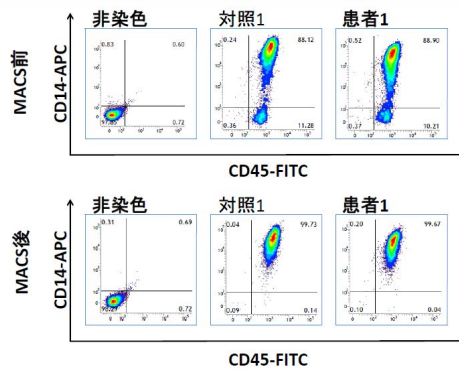


図5 IL-1βの分泌に差を認めず

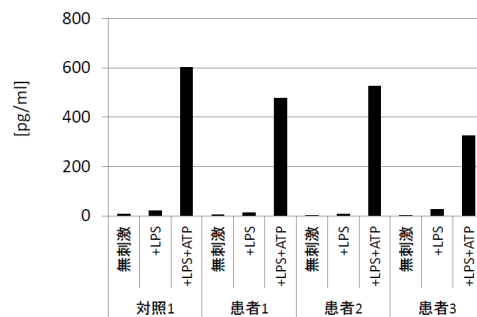


図6 iPS-血球は形態がマクロファージに近い

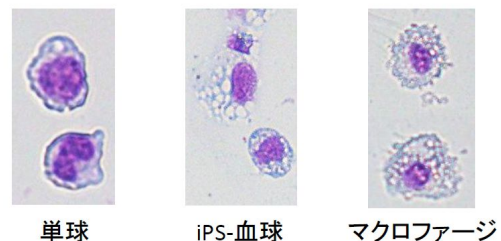
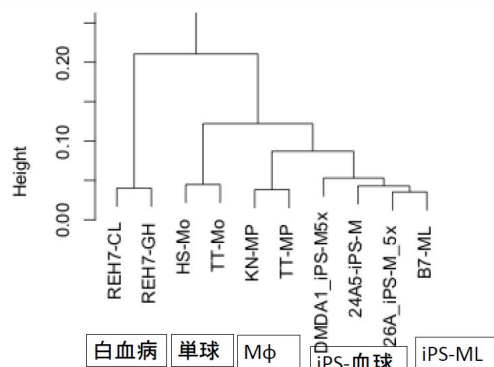


図7 遺伝子発現の比較



備中である。これまで MKD はヨーロッパから多数の患者の情報をまとめた報告が出されていたが、ヨーロッパ以外の地域では報告がなかった。そこで今回われわれは、MKD 患者の全国調査を行った。705 の小

児が入院できる施設へ質問紙を送り、40%の施設より回答を得た。MKD 患者を診察していると回答した施設へ二次調査票を送り、詳細な情報を収集した。また MKD 疑い患者の診断のために遺伝子検査、MK 活性測定に依頼を受ける際に、存在が確認された症例も対象に含めた。その結果、10 例の MKD 患者が同定された。

発症の時期は出生直後から 3 カ月までの乳児期だった。発熱は前例に認め、リンパ節腫脹を 70%に、粘膜皮膚症状を 90%に、消化器症状を 90%に、関節症状を 40%に認め、ヨーロッパからの報告と同様だった。持続性の発熱を 50%に認めたのは、ヨーロッパの報告の 13%より高かった。肝障害を 4 例に認め、うち 2 例では肝障害発症が発熱に先行し、当初は MKD と診断することが困難であった。肝障害を認めた残りの 2 例では血球貪食性組織球症の診断基準を満たし、重症であった。検査所見では、尿中メバロン酸は全例で上昇していた。MVK 遺伝子検査では全例でホモ接合型、または複合ヘテロ接合型の変異を有しており、調べられた患者の親は患者の持つ変異の一方を有していた。ヨーロッパで高い頻度で認められる V377I, I268T, H20P/N, P167L といった変異は認められず、海外の症例で報告されたことのない変異が 8 例で認められた。治療としては 4 例では発熱発作時に経口プレドニゾロン内服で炎症がコントロールされた。3 例は生物学的製剤が必要となり、うち 2 例では炎症のコントロールが改善した。残りの 1 例ではカナキマブを 1 回投与した後に急性肝不全が発症しそれ以降の投与を中止したため、効果の判定が困難だった。1 例に造血幹細胞移植が行われたが、その後呼吸器の合併症で死亡した。

この全国調査により、日本の MKD 患者も臨床症状はヨーロッパからの既報の患者と共通点が多いことが分かった。一方、発熱

が持続する症例の割合は国内症例で多く、また肝障害を合併する頻度も高いことが推測された。ヨーロッパからの報告では、V377I 変異を有する患者では 4%しか持続性の発熱を認めないのに対し、V377I 変異を有しない症例では 28%に持続性の発熱を認めた。今回の検討では V377I 変異を有する患者は認められず、MVK 遺伝子の変異部位が異なることが、臨床症状の差につながっている可能性が考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

田中孝之 (TANAKA, Takayuki)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：20625678

(2) 研究分担者

(なし)

研究者番号：

(3) 連携研究者

(なし)

研究者番号：

(4) 研究協力者

(なし)