

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19700

研究課題名(和文) プロテアソーム機能不全単球からのIFN誘導ケモカインIP-10の産生機序の解明

研究課題名(英文) The analysis of mechanism of interferon-induced IP-10 production in monocytes with proteasome deficiency.

研究代表者

稲葉 豊 (INABA, YUTAKA)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00647571

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)：プロテアソーム機能不全である中條-西村症候群患者において、末梢血単球をIFNで刺激後、IP-10の産生が増加していることがわかっている。しかしIFNシグナル伝達のどこに異常があるかは不明であり、今回検討した。不死化B細胞をIFNで刺激し、リン酸化STAT1、リン酸化JAK1のレベルをウェスタンブロットで検討した。中條-西村症候群患者において健常者に比べ、リン酸化JAK1レベルが上昇しており、リン酸化STAT1レベルには変化を認めなかった。これらの結果は、中條-西村症候群患者において、リン酸化JAK1がプロテアソームにおいて分解される事がIFNシグナル伝達にとって重要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Nakajo-Nishimura syndrome (NNS) patients derived peripheral blood monocytes produced larger amount of IP-10 than control cells after IFN stimulation. However, it remains unclear how proteasome disability enhances IFN signaling. By western blotting, IFN-induced phosphorylated JAK1 level in immortalized B cells was higher in NNS patients-derived cells than in control cells. In contrast, phosphorylated STAT1 level did not change after IFN stimulation in either of NNS patients-derived immortalized B cells and control cells. These results suggest that proteasome degradation of phosphorylated JAK1 is critical for IFN signaling in NNS.

研究分野：自己炎症性疾患

キーワード：自己炎症性疾患 インターフェロン JAK STAT 中條-西村症候群 プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

中條-西村症候群 (NNS) は、幼小児期に凍瘡様皮疹で発症し、弛張熱や結節性紅斑様皮疹を伴いながら、次第に顔面・上肢を中心とした上半身のやせと拘縮を伴う長く節くれだった指趾が明らかになり、遂には内臓機能の低下に至る特異な遺伝性炎症・消耗性疾患である (Kanazawa N. *Allergol Int* 2012)。近年世界各国から類症が報告されるようになったが、戦前に本邦で最初に報告され、現在も泉南から和歌山を中心とした関西に 10 数名の患者が存在する (中條敦. *皮泌誌* 1939)。原因は長らく不明であったが、長崎大学内科・人類遺伝学と和歌山県立医科大学皮膚科を中心とした共同研究により、プロテアソーム β5i サブユニットをコードする *PSMB8* 遺伝子のホモ変異が原因であることが同定され、本疾患が遺伝性プロテアソーム機能不全症であることが明らかとなった (Arima K, et al. *PNAS* 2011)。患者由来不死化 B 細胞と初代培養線維芽細胞の解析によって、本疾患ではプロテアソーム機能不全のためにポリユビチン化蛋白質が細胞内に蓄積し、MAP キナーゼホスファターゼが抑制され核内のリン酸化 p38 が増加することによって、IL-6 の産生・分泌が増え慢性炎症をきたすと報告されたが、その病態には不明な点が多い。

和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得て、2013 年より NNS 患者 2 例に対して試験的に抗 IL-6 受容体抗体であるトシリズマブが投与されたが、発熱や皮疹などの炎症症状に対しても十分な効果は得られなかった。本疾患の多彩な病像が IL-6 のみで説明できるとは考えにくく、類症である CANDLE 症候群においては末梢血における遺伝子発現プロファイルで IFN signature が認められ、in vitro、in vivo とともに JAK 阻害薬であるトファシチニブが有効であったと報告されている (Liu Y et al, *Arthritis Rheum* 2012)。

NNS 患者においても、血清中に IFN 誘導ケモカインである IP-10 (CXCL10) の異常高値を認めたが、初代培養線維芽細胞の解析にて IP-10 の産生は健常者と患者で差を認めず、血清中の IFN γ も上昇していなかったため、当初は IL-6 が重要と報告された。

その後、トシリズマブを投与された NNS 患者 2 例において、いずれも血清中の IP-10 が投与前後を通じて高値を持続したこと、さまざまな刺激を加えた末梢血液細胞からの IP-10 産生をチェックした結果、IFN γ 刺激 CD14+単球において患者で有意に高い IP-10 の産生を認めたことから、NNS でも単球由来 IP-10 が炎症病態形成に重要な役割を果たしている可能性が高い。

IP-10 は全身性エリテマトーデスでも血中濃度が上昇し、しかも病勢に一致するといわれている。また開発中の抗 IP-10 抗体製剤の関節リウマチに対する有効性が報告されている (Yellin M et al, *Arthritis Rheum* 2012)。一方、IFN γ 刺激は受容体 (IFNGR1/2) を活性化し、JAK1/2 のリン酸化と IFNGR1 のリン酸化を通じて STAT1 のリン酸化と二量体形成を促し、これが核内に移行して転写を活性化することで IFN signature を発現する。リン酸化 JAK2 や、STAT1 の活性化に伴って産生されネガティブフィードバックに働く SOCS-1 がユビチン化されプロテアソームで分解されることから、IFN γ シグナルの制御にプロテアソームが関わりとされるが、その詳細は明らかでない。

そこで本研究では、NNS 患者末梢血単球において、IFN γ からその受容体、JAK/STAT を経由し、IP-10 産生に至る経路のどこに異常があるか確認することで、JAK/STAT 経路の制御へのプロテアソームの関与を明らかにし、それを標的とした治療法の可能性を模索する。

2. 研究の目的

中條-西村症候群は、プロテアソーム β5i サブユニット遺伝子の変異による遺伝性プロテアソーム機能不全症であり、発熱・皮疹・筋炎などの炎症症状を繰り返しながら、脂肪筋肉萎縮・関節拘縮・臓器障害などの消耗症状が徐々に進行する特異な自己炎症疾患である。本疾患の病態形成における、単球由来 IFN 誘導ケモカイン IP-10 の重要性が明らかになりつつあることから、本研究では、本疾患患者末梢血単球における IFN_γ 受容体から JAK/STAT を介して IP-10 産生に至る経路の異常を確認し、プロテアソームの JAK/STAT 経路制御への関与を明らかにし、それを標的とした治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

中條-西村症候群患者と健常者から分離採取した末梢血単球に IFN_γ を投与し、経時的に細胞を回収し細胞膜、細胞質と核成分に分けて蛋白質を抽出する。IFNGR1, IFNGR2, JAK1, JAK2, STAT1, SOCS-1 とそのリン酸化物の抗体を用いてウェスタンブロットを行い、それらの発現量の変化を網羅的・定量的に検討する。患者単球と健常者単球の結果を比較することで、プロテアソームが IFN_γ-JAK/STAT 経路のどの部分に作用しているか明らかになれば、プロテアソーム補充、正常 *PSMB8* 遺伝子導入、変異 *PSMB8* 遺伝子抑制によって回復できないか検討する。また既存の JAK/STAT 阻害薬で IP-10 産生が阻害できるかも検討する。

4. 研究成果

「中條 - 西村症候群患者と健常者末梢血から単離した CD14+単球に IFN_γ を添加して経時的に細胞を回収して M-Per にて溶解し SDS-PAGE に展開して抗リン酸化 STAT1 抗体を用いてウェスタンブロットを行い、陽性バンドを得る」ことから実験を開始したが、患者の通院に合わせた採血に依存するため

実験が思うように進まず、また予想される大きさのバンドは見られなかった。そこで末梢血に EB ウイルスを感染させて作成した不死化 B 細胞を用いて再度抗リン酸化 STAT1 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。患者 2 名と健常者ともに IFN_γ 添加 24 時間後をピークに陽性バンドを検出し、両者に明らかな差異を認めなかった。コントロールとして抗 β-actin 抗体を用いたウェスタンブロットを行い、全タンパク量に差異がないことを確認した。一方、リン酸化のコントロールとして抗 STAT1 抗体を用いたウェスタンブロットを行ったが、有意なバンドは見られず、リン酸化の割合を評価することはできなかった。

次いで、STAT1 の上流にある JAK1 のリン酸化について検討するため、抗リン酸化 JAK1 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。患者 2 名で IFN_γ 添加 12 時間後をピークに陽性バンドを検出したのに対し、健常者では陽性バンドを認めなかった。そこで、リン酸化 JAK1 のユビキチン化を確認するため、抗ユビキチン抗体を用いたウェスタンブロットを行ったが、リン酸化 JAK1 と同じ位置にはバンドは見られなかった。予想に反してリン酸化 STAT1 には差がなく、むしろリン酸化 JAK1 に差があるという結果を得た。この結果は、CANDLE 症候群とは異なる IFN シグナル異常の存在を示唆するが、転写に依存した IP-10 の発現亢進があるなら STAT のリン酸化に差があるはずであった。しかし本研究は、原因不明の自己炎症性疾患である中條 - 西村症候群の病態解明の一助になったと考えられる。

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 1 件)

1, 稲葉 豊, 国本 佳代, 金澤 伸雄, 古川
福実: 抗核抗体高値を伴った中條 - 西村症
候群 本疾患における自己抗体出現のま
とめ. Visual Dermatology 2017; 16 卷: 141-3
(査読なし)

[学会発表](計2件)

1, Yutaka Inaba, Yumi Nakatani, Kayo
Kunimoto, Fukumi Furukawa, Nobuo
Kanazawa:

Enhanced phosphorylation of Janus kinase
1 in Nakajo-Nishimura syndrome 76th
Annual Meeting of the Society for
Investigative Dermatology
2017.4, Portland, USA

2, Yutaka Inaba, Yumi Nakatani, Kayo
Kunimoto, Fukumi Furukawa, Nobuo
Kanazawa:

Enhanced phosphorylation of Janus kinase
1 in Nakajo-Nishimura syndrome 46th
Annual Meeting of the Japanese Society
of Investigative Dermatology, 2016.12
Sendai, Japan

[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:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 豊 (INABA YUTAKA)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00647571

(2) 研究分担者

金澤 伸雄 (KANAZAWA NOBUO)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 90343227

国本 佳代 (KUNIMOTO KAYO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10438278