

令和元年6月27日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10171

研究課題名(和文) 中條-西村症候群様症状を呈する孤発例における新規PSMB9変異の病的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathological significance of a novel PSMB9 mutation in a sporadic case with Nakajo-Nishimura syndrome-like symptoms

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：PSMB9遺伝子の新規ヘテロ変異症例では、明らかなプロテアソーム酵素活性の低下やユビキチンの蓄積はみられず、単なるプロテアソーム機能低下ではない未知の機序が自己炎症の発症に寄与していると考えられた。さらに、血中CD8⁺ T細胞低下、NK細胞欠損とポリオマウイルス持続感染など、変異ノックインマウスと同様の免疫不全を認め、同じ変異を持つ新規患者が見出されたことから、本疾患をプロテアソーム関連自己炎症・免疫不全病(PRAID)と呼ぶ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究により、PSMB9の特異な変異によって、中條-西村症候群などのプロテアソーム関連自己炎症症候群(PRAAS)と異なり、免疫不全が前面に立つ、プロテアソーム関連自己炎症・免疫不全病(PRAID)を発症することが明らかとなった。新規PSMB9変異の病的意義の解明やプロテアソーム機能異常によって引き起こされる様々な臨床像の病態の解明を行うことにより、新たな治療標的となるシグナル分子の同定や、プロテアソームの新たな機能的意義や制御機構が明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In a case with a novel heterozygous PSMB9 mutation, no apparent reduction of proteasome enzyme activity or ubiquitin accumulation was found, and it was thought that an unknown mechanism, not a simple dysfunction of the proteasome, contributes to the onset of autoinflammation. As a new patient with the same mutation have been found to show immunodeficiency with reduced peripheral blood CD8⁺ T cells, defective NK cells and persistent polyoma virus infection, which were commonly observed in the mutation-knockin mice, the disease has been designated as proteasome-related autoinflammation and immunodeficiency disease (PRAID).

研究分野：自己炎症性疾患

キーワード：PSMB9 autoinflammatory Nakajo-Nishimura proteasome PSMB8

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中條 西村症候群 (NNS) は、1939 年に東北帝国大学の中條、次いで 1950 年に和歌山県立医科大学の西村らによって「凍瘡ヲ合併セル続発性肥大性骨骨膜症」として報告された特異な遺伝性炎症・消耗性疾患である。幼小児期に凍瘡様皮疹や周期熱で発症し、次第に長く節くれだった指や限局性脂肪筋肉萎縮を呈することを特徴とする。申請者の属する和歌山県立医科大学と長崎大学を中心とした共同研究により、免疫プロテアソーム $\beta 5i$ サブユニットをコードする *PSMB8* 遺伝子のホモ変異が同定され、新しい遺伝性自己炎症性疾患であることが示された (Arima K, et al. PNAS 2011)。プロテアソームの活性中心であるサブユニット $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ の誘導型である $\beta 1i$ 、 $\beta 2i$ 、 $\beta 5i$ は他のサブユニットとともに免疫プロテアソームを形成し、樹状細胞などの免疫担当細胞やウイルス感染細胞において、非リソソーム系蛋白質分解だけでなく、抗原ペプチドの生成などにも重要な役割を果たしていると考えられる。詳細なメカニズムはまだ明らかでないが、 $\beta 5i$ (LMP7) サブユニットの変異によるプロテアソーム機能不全のために不要蛋白質が蓄積し、それに対するストレス応答の結果として NNS を生じると考えられている。2010 年には海外からも類似の症状を呈する症例の報告が相次ぎ、いずれも *PSMB8* 遺伝子に変異が同定されたことから、NNS と共にプロテアソーム機能不全症として新しいカテゴリーの遺伝性自己炎症性疾患としてまとめられている。海外では、interferonopathy (IFN 制御不全症) としての解析が進み、JAK 阻害剤の有効性も報告されている。本邦でも、2015 年 7 月に中條・西村症候群として難病指定を受け、更なる症例の集積が期待されている。

申請者は、稀少な NNS の小児例をフォローしながら、科学研究費 (若手研究 B) を得て、平成 24 年度から 2 年間「遺伝性プロテアソーム不全症である中條 西村症候群の病態解明と酵素補充療法の試み」、平成 26 年度から 2 年間「プロテアソーム阻害剤による皮膚障害における *PSMB8* の変異解析」をテーマに、NNS とプロテアソーム阻害剤によって特徴的な皮膚障害を生じた患者の検体を用いて、自己炎症シグナルに関わる分子の解析を行ってきた。その過程で、琉球大学小児科より和歌山県立医科大学皮膚科に照会があった NNS あるいは重症皮膚筋炎様の臨床症状 (生後 2 週頃に出現した四肢顔面の紅斑、肝障害、哺乳力低下を伴う floppy infant、両側被殻の石灰化、重症肺高血圧、右下腿筋炎・脂肪織壊死など) を呈する 1 孤発例に遭遇した。難病指定時に定められた NNS の臨床診断基準を満たすが、*PSMB8* 遺伝子に変異はみられなかったため、長崎大学との共同研究で次世代シーケンサーを用いたエキソーム解析を行ったところ、*PSMB9* 遺伝子に *de novo* のヘテロ変異が見出された。

これまで本邦の NNS 患者で見いだされた変異はすべて同じで強い創始者効果を認めているが、海外からは *PSMB8* 遺伝子の異なるホモ変異やヘテロ変異、さらに変異のない症例も報告されており、*PSMB9* 遺伝子の新規ヘテロ変異を認めた本症例は、新たなプロテアソーム関連遺伝性自己炎症性疾患の可能性がある。*PSMB9* 遺伝子は免疫プロテアソームの $\beta 1i$ (LMP2) サブユニットをコードしており、この変異によってプロテアソーム複合体の形成阻害が予想されたが、蛋白質分解酵素活性には明らかな低下を認めていない (未発表データ)。この変異が何らかのプロテアソーム機能異常を来して疾患を生じているならば、プロテアソームの新たな機能的意義や制御機構が明らかになることが期待される。

2. 研究の目的

PSMB9 変異症例と NNS の類似点と相違点を明らかにし、新規 *PSMB9* 変異の病的意義の解明、プロテアソーム機能異常によって引き起こされる様々な臨床像の病態の解明、さらには新たな治療標的となるシグナル分子の同定を目指す。

3. 研究の方法

- 1) *PSMB9* 変異症例由来細胞におけるプロテアソーム酵素活性の測定・複合体形成の検討
患者末梢血単核球、不死化 B 細胞などを用いてプロテアソーム酵素活性を測定し、NNS 患者や健常者由来細胞と比較する。さらに、各細胞から細胞質蛋白質を抽出してグリセロール濃度勾配を用いた超遠心にて分画し、各分画における酵素活性を測定、比較する。分画した蛋白質を SDS-PAGE に流し、プロテアソームの各サブユニットに対する抗体でウェスタンブロットを行い、複合体形成不全の有無、発現状況について検討する。
- 2) *PSMB9* 変異症例由来細胞・組織におけるユビキチン蓄積の検討
患者末梢血単核球、不死化 B 細胞などから細胞質蛋白質を抽出して SDS-PAGE に流し、抗ユビキチン抗体でウェスタンブロットを行い、NNS 患者や健常者由来細胞と比較する。また、患者の皮疹や筋肉病変などの組織標本の薄切切片を抗ユビキチン抗体で免疫染色し、浸潤細胞に陽性所見が得られれば、CD68 などと二重染色して蓄積細胞を同定する。
- 3) *PSMB9* 変異症例由来細胞における NF- κ B、MAPK、JAK-STAT シグナル活性化の検討
患者末梢血単核球、不死化 B 細胞などから細胞質と核蛋白質を分離抽出して SDS-PAGE に流し、各種 NF- κ B、MAPK、JAK-STAT シグナル伝達物質に対する抗体でウェスタンブロットを行い、NNS 患者や健常者由来細胞と比較する。差が見られなければ、TNF α 、IFN γ 、LPS などで刺激して検討する。
- 4) *PSMB9* 変異症例の皮疹や筋肉病変への浸潤細胞の検討
患者の皮疹や筋肉病変などの組織標本を用いて、CD4、CD8、CD68、MPO、CD303 などの免疫染色を行って浸潤細胞を明らかにし、NNS との類似点と相違点を明らかにする。

5) *PSMB9* 変異症例における血清中サイトカインの網羅的解析

患者血清中の炎症性サイトカイン・ケモカイン濃度を網羅的に測定し、NNS 患者や健常者血清と比較する。治療の影響を含めた経時的変化も検討する。

6) 変異 *PSMB9* 遺伝子導入細胞株における炎症性サイトカイン、ケモカインの検索

ヒト単球系細胞株の THP-1 に、CRISPR/Cas9 システムを用いて *PSMB9* 変異あるいは NNS の原因となる *PSMB8* 変異を導入する。得られた変異細胞株および親株において、炎症性サイトカインやケモカインの構成的な産生、あるいは LPS や種々の免疫アジュバント刺激による誘導的な産生を比較解析する。

7) 変異 *PSMB9* 遺伝子ノックインマウスの樹立と解析

PSMB9 遺伝子変異部位のアミノ酸は、ヒトとマウスの間で保存されているため、このアミノ酸に患者と同様のアミノ酸変異を起こすようにガイド RNA を作成し、CRISPR/Cas9 システムを用いてマウス受精卵に遺伝子改変を行い、ノックインマウスとノックアウトマウスを作成する。*PSMB9* 変異ノックインしたヘテロ、ホモマウス、*PSMB9* ノックアウトマウスについて、臨床所見や *in vitro* での実験結果と関連する項目を中心に、表現型を検討し、主に樹状細胞やマクロファージを用いた *ex vivo* 解析を行う。また、*in vivo* 解析として、種々の誘発型炎症モデル (TNBS、オキサゾロンやイミキモドなどにより誘発される皮膚炎、UV 照射後皮膚炎など) を用いて、変異と炎症の関連性を解析する。

4. 研究成果

・平成 28 年度

PSMB9 遺伝子に新生新規ヘテロ変異を認めた症例とその母親の末梢血から単核球、CD14 陽性単球、さらに死細胞を除いた細胞について、各プロテアソーム酵素活性を測定したが、明らかな酵素活性の低下は見られなかった。そこで、*PSMB9* 変異患者と母親、さらに NNS 患者と健常者の末梢血から作成した不死化 B 細胞について、長崎大学原爆後障害医療研究所の協力を得てグリセロール濃度勾配を用いた蛋白質分画を用意し、各プロテアソーム酵素活性を測定したところ、ある程度の酵素活性低下を認めるものの、NNS 患者に比べるとその程度は軽度であった。一方、分画した蛋白質を用いたウェスタンブロットでは、NNS と同様の複合体形成不全を示唆する結果とともに、1i と 5i サブユニットともに未成熟なバンドをメインで認めた。すなわち、ウェスタンブロットではプロテアソーム複合体形成不全と活性低下が示唆されるにもかかわらず、実際の活性低下は軽度で、結果に乖離を認めた。*PSMB9* 変異患者の炎症性皮膚の免疫組織学的検討においても、浸潤細胞を中心にユビキチンの蓄積を認めるもののその程度は NNS 患者に比べると軽度であった。浸潤細胞の多くは CD68 陽性で一部 MPO 陽性、リンパ球は一部 CD4 陽性で、CD8 は陰性であり、CD4 陰性、CD8 陽性の NNS と差異を認めた。

・平成 29 年度

PSMB9 遺伝子に新規ヘテロ変異を認めた症例の皮膚生検につき、引き続き組織学的検討を行った。ユビキチンは浸潤細胞に陽性であったが、脂肪織や汗腺などの付属器にも陽性所見がみられた。NNS 患者組織と比較すると、MPO と CD68 についてはほぼ同様の結果が認められたが、ユビキチンに関しては NNS で浸潤細胞、正常組織ともに強い発現を認めている一方、*PSMB9* 変異患者では発現は認めなかった。オートファジーに関連する p62 を染色したところ、NNS 患者では強い発現があったが、*PSMB9* 変異患者では発現が認められなかった。また、プロテアソームの酵素活性については、NNS 患者ではキモトリプシン様活性、トリプシン様活性、カスパーゼ様活性のいずれも酵素活性が低下しているが、*PSMB9* 変異患者では低下はみられなかった。免疫染色の結果および酵素活性の比較結果から考えると、プロテアソーム機能不全ではない機序が自己炎症の発症に寄与していると考えられる。

患者に同定された変異を導入した *Psm9* ノックインマウスについて、そのヘテロ変異マウス由来脾細胞の解析を行ったところ、脾細胞の減少し、特に、T 細胞や B 細胞が顕著に減少しており、疾患との関連が推測された。

・平成 30 年度

PSMB9 遺伝子の新規ヘテロ変異を持った乳児例が岐阜で新たに見つかり、生後 1 ヶ月から皮疹と発熱・痙攣を伴う激しい炎症を繰り返しステロイドパルスが行われ、頭蓋内石灰化と重度肺高血圧も認め、臨床像は我々の症例と非常によく似ていた。さらに、髄液・血清中の IFN α 高値を認めるのに対し、末梢血中 CD8 \cdot $\gamma\delta$ T 細胞の低下、NK 細胞の欠損とポリオーマウイルスの持続感染を認め、免疫不全状態と考えられた。これらは変異ノックインマウスにおける免疫不全に合致する表現型と考えられた。すでに 8 歳となる我々の症例においても、免疫グロブリンの低下と RS ウイルスへの易感染性を認めていたため末梢血を解析し直したところ、B 細胞の減少とポリオーマウイルスの持続感染を認めた。一方、末梢血における代表的な IFN 応答遺伝子の発現を解析したところ、岐阜の症例では IFN α 高値に合致して IFN 応答の亢進を認めただのに対し、沖縄の症例では亢進を認めなかった。初代培養線維芽細胞の解析においては、IFN γ にて β 1i の発現を誘導した状態で、沖縄の症例の不死化 B 細胞の解析と同様に、 β 1i の成熟不全や 20S プロテアソーム複体の形成不全を認め、キモトリプシン活性も 20S のみ明らかな低下を認めた。明らかなユビキチンの蓄積は認めず、皮疹の免疫染色でも同様であった。変異ノックインマウスの胎児線維芽細胞の解析でも同様の結果を得たことから、この *PSMB9* の特異な変異によって、NNS などのプロテアソーム関連自己炎症症候群 (PRAAS) とは異なり、免

疫不全が前面に立つ、プロテアソーム関連自己炎症・免疫不全病 (PRAID) を発症することが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

1. Kunimoto K, Honda-Ozaki F, Saito MK, Furukawa F, Kanazawa N: Beneficial effect of methotrexate on a child case of Nakajo-Nishimura syndrome. *J Dermatol in press*
2. Kanazawa N, Hara M, Hara T, Kunimoto K, Mikita N, Furukawa F: CO₂ narcosis as a notable cause of premature death in Nakajo-Nishimura syndrome. *Mod Rheumatol Case Rep* 3: 74-8, 2019
3. Kanazawa N, Honda-Ozaki F, Saito MK: Induced pluripotent stem cells representing Nakajo-Nishimura syndrome. *Inflamm Regen* 39: 11, 2019
4. Inaba Y, Kanazawa N, Kunimoto K, Furukawa F: Antinuclear antibodies in Nakajo-Nishimura syndrome. A bridge with research on refractory autoimmune diseases. *Trends Immunother* 2: 1078, 2018
5. Inaba Y, Kunimoto K, Kanazawa N, Furukawa F: Effects of a humanized anti-human IL-6 receptor monoclonal antibody on Nakajo-Nishimura syndrome. *Trends Immunother* 2: 1051, 2018
6. Honda-Ozaki F, Terashima M, Niwa A, Saiki N, Kawasaki Y, Ito H, Hotta A, Nagahashi A, Igura K, Asaka I, Li HL, Yanagimachi M, Furukawa F, Kanazawa N, Nakahata T, Saito MK: Pluripotent stem cell model of Nakajo-Nishimura syndrome untangles proinflammatory pathways mediated by oxidative stress. *Stem Cell Reports* 10: 1835-50, 2018
7. 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 Dermatol* 16: 141-3, 2017
8. 花見由華、山本俊幸、金澤伸雄、三島博之、木下晃、吉浦孝一郎：エカルディ・グティエール症候群(家族性凍瘡様ループス)の父子例 当初中條-西村症候群を疑った症例 . *Visual Dermatol* 16: 128-32, 2017

〔学会発表〕(計 21 件)

1. Kanazawa N, Ida H, Kinjo N, Ishikawa T, Nishikomori R: Diagnostic criteria for proteasome-associated autoinflammatory syndromes (PRAASs) including Nakajo-Nishimura syndrome, JMP syndrome and CANDLE syndrome. 10th Congress of the International Society of Systemic Auto-Inflammatory Diseases (ISSAID), 2019.3.31-4.3, Genoa, Italy
2. Hemmi H, Ozasa T, Kinoshita A, Kato T, Orimo T, Sasaki I, Fukuda-Ohta Y, Kinjo N, Yoshiura KI, Mizushima T, Kanazawa N, Kaisho T: Impaired development of dendritic cells in proteasome subunit mutant mice. The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2018.12.10-12, Fukuoka, Japan
3. Kunimoto K, Inaba Y, Nakatani Y, Kinjo N, Kinoshita A, Yoshiura K, Jinnin M, Kanazawa N: Comparative immunohistochemical study of the skin lesions of Nakajo-Nishimura syndrome and *PSMB9*-related proteasome-associated autoinflammatory syndrome with cutaneous adverse reactions induced by a proteasome inhibitor. *International Investigative Dermatology* 2018, 2018.5.16-19, Orlando, USA
4. Kanazawa N, Honda-Ozaki F, Terashima M, Niwa A, Yanagimachi M, Furukawa F, Nakahata T, Saito MK: Pluripotent stem cell model of Nakajo-Nishimura syndrome

untangles proinflammatory pathways mediated by oxidative stress. International Investigative Dermatology 2018, 2018.5.16-19, Orlando, USA

5. Kunimoto K, Nakatani Y, Inaba Y, Kinjo N, Kinoshita A, Yoshiura K, Kanazawa N: No apparent ubiquitin accumulation in a skin lesion of *PSMB9*-related proteasome-associated autoinflammatory syndrome. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2017.12.15-17, Kochi, Japan
6. Kunimoto K, Kanazawa N, Furukawa F, Manabe K, Asagoe K, Yamasaki O, Kabahara T, Kanaoka M, Aihara M, Teraki Y, Izaki S, Okuyama R, Yamamoto T, Hanna J: Comparative study of cutaneous adverse reactions induced by a proteasome inhibitor with skin eruptions in Nakajo-Nishimura syndrome. The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2016.12.9-11, Sendai, Japan
7. Inaba Y, Nakatani Y, Furukawa F, Kanazawa N: Enhanced phosphorylation of Janus kinase 1 in Nakajo-Nishimura syndrome. The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2016.12.9-11, Sendai, Japan
8. 金澤伸雄、中谷友美、原知之、稲葉豊、国本佳代、古川福実、神人正寿：遺伝性自己炎症性皮膚疾患の全国皮膚科疫学調査結果のまとめ．第70回日本皮膚科学会西部支部学術大会、2018.11.10-11、松江
9. 金澤伸雄、尾崎富美子、寺嶋聖佳、丹羽明、柳町昌克、古川福実、中畑龍俊、斎藤潤：iPS細胞を用いた中條-西村症候群の病態解明と治療薬開発の試み．第39回日本炎症・再生医学会、2018.7.11-12、東京
10. 金澤伸雄、尾崎富美子、寺嶋聖佳、丹羽明、柳町昌克、古川福実、中畑龍俊、斎藤潤：iPS細胞を用いた中條-西村症候群の病態解明と治療薬開発の試み．第117回日本皮膚科学会総会、2018.5.31-6.3、広島
11. 金澤伸雄、中谷友美、原知之、稲葉豊、国本佳代、古川福実、神人正寿、金城紀子、水島恒裕、三嶋博之、木下晃、吉浦孝一郎、加藤喬、福田有里、邊見弘明、改正恒康：中條-西村症候群からプロテアソーム関連自己炎症/免疫不全症候群へ．第25回分子皮膚科学フォーラム、2018.4.13-14、函館
12. 国本佳代、金澤伸雄、眞部恵子、浅越健治、山崎修、蒲原毅、金岡美和、相原道子、寺木祐一、伊崎誠一、奥山隆平、山本俊幸、John Hanna：プロテアソーム阻害薬による皮膚障害．第461回日本皮膚科学会大阪地方会、2017.5.27．和歌山
13. 国本佳代、金澤伸雄、古川福実、眞部恵子、浅越健治、山崎修、蒲原毅、金岡美和、相原道子、寺木祐一、伊崎誠一、奥山隆平、山本俊幸、John Hanna：プロテアソーム阻害薬による「中條-西村症候群型」薬疹．第23回分子皮膚科学フォーラム、2016.4.15-16、大阪

〔図書〕(計 1件)

1. 金澤伸雄:中條-西村症候群 .日本医師会雑誌第 148 巻特別号「指定難病ペディア 2019」、水澤英洋・五十嵐隆・北川泰久・高橋和久・弓倉整監修・編集、日本医師会、pp.180-1、2019

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：金澤伸雄

ローマ字氏名：Kanazawa Nobuo

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：90343227

研究分担者氏名：稲葉豊

ローマ字氏名：Inaba Yutaka

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：00647571

研究分担者氏名：邊見弘明

ローマ字氏名：Hemmi Hiroaki

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20451924

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。