

令和元年6月6日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15514

研究課題名(和文)全エクソンシーケンスに基づく成人スチル病の「病態制御システム」の同定

研究課題名(英文) Identification of "disease control system" of adult still disease based on whole exon sequence

研究代表者

古賀 智裕 (KOGA, Tomohiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：90537284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ASD患者を対象とした次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い疾患感受性遺伝子の同定とその機能解析を行うため既存の自己炎症疾患研究会や西九州自己免疫疾患研究会との連携を図り、ASDのネットワークを構築した。

上記の専門医ネットワークを活用して収集された臨床情報、ゲノムDNA、血清、血漿、生検組織を収集した。得られたゲノムDNAは長崎大学人類遺伝学吉浦孝一郎教授との共同研究による次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い、疾患感受性SNPの候補を同定した。上記コンソーシアムで得られた血清試料と敗血症患者の血清試料を用いて、両者を識別するサイトカインを同定、特許出願を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ASDは特異的な自己抗体等の血清バイオマーカーがなく、診断は除外診断である。また、重症例ではサイトカインストームによる血球貪食症候群や播種性血管内凝固症候群を引き起こし予後不良である。本研究は、血清バイオマーカーによるASDの層別化や敗血症との鑑別を試み、診断に有用なサイトカインの組み合わせを同定した。また、全エクソン解析において、疾患感受性SNPを同定した。現時点でこれらのSNPの病的意義は不明であり、今後の機能的解析が必要であるが、病態解明および新規治療法の開発のシーズとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify the disease susceptibility gene and analyze its function by analyzing whole exons using a next-generation sequencer for patients with ASD, and to clarify the pathophysiology of ASD and to develop a new therapeutic drug. The study was carried out as follows. The ASD network was constructed in cooperation with existing autoimmune disease workshop and West Kyushu autoimmune disease workshop.

Clinical information, genomic DNA, serum, blood plasma, and biopsy tissue were collected utilizing the specialist network described above. The obtained genomic DNA was analyzed in whole exon using the next generation sequencer by the cooperative research with Professor Koichiro Yoshiura of Human Genetics, Nagasaki University, and the candidate of disease susceptibility SNP was identified. Using serum samples with ASD and serum samples from patients with sepsis, a cytokine that discriminates between them was identified.

研究分野：リウマチ・膠原病学

キーワード：成人発症スチル病 IL-1 IL-18 全エクソン解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

成人スチル病 (ASD) は平成 27 年 1 月より医療費助成対象疾病 (指定難病) となったが、その病因や病態は不明な点が多く、治療においても現在有効性が確立されたものは副腎皮質ステロイドのみである。これまでに ASD の疾患感受性遺伝子として IL-18 プロモーターの変異が (Sugiura et al. *Genes Immun.* 2002;3:394-9.) また、病型と家族性地中海熱遺伝子変異/多型の関連が (Nonaka et al. *Clin Exp Immunol.* 2015; 179:392-7.) 報告されているが、次世代シーケンサーを用いた解析は行われていない。

ASD の病態としては血液検査所見で自己抗体は陰性であり、白血球増多、CRP 高値、肝機能上昇に加え、フェリチンの著増と血清 IL-18 の高値を特徴的とする。重症例ではマクロファージ活性化症候群 (MAS; Macrophage activation syndrome)/血球貪食症候群 (HPS; Hemophagocytic syndrome) を合併し、自己炎症疾患に分類され、活性化マクロファージが病態の主体であることが示唆されているが、詳細な分子メカニズムは明らかでない。

私たちは、これまでに家族性地中海熱 (FMF) を中心とした自己炎症疾患の病態解明に取り組んでおり、分担研究者として次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析に関しては長崎大学人類遺伝学吉浦孝一郎教授、インフラマソームの機能解析に関しては愛媛大学プロテオサイエンスセンター増本純也教授と密接な協力体制のもとにある。

## 2. 研究の目的

ASD 患者を対象とした次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い疾患感受性遺伝子の同定とその機能解析を行い、ASD の病態解明と新規治療薬の開発の足がかりとすることを目的とする。特に ASD の病態の中心と考えられるインフラマソーム活性化機序を明らかにし、自己炎症疾患に対する新たな分子標的療法の基盤の確立を目標とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ASD 専門医ネットワークの形成とゲノム DNA の収集

申請者等を中心に、ASD のネットワークを構築し、効率的な臨床情報とゲノム DNA の収集を行う。既存の自己炎症疾患研究会 (代表世話人: 井田弘明 久留米大学医学部 呼吸器・神経・膠原病内科教授) や西九州自己免疫疾患研究会 (代表世話人: 川上 純 長崎大学大学院医歯薬総合研究科展開医療科学教授) との連携を図る。

### (2) ASD 生体試料バンクの構築と次世代シーケンサーによる包括的ゲノム解析

収集された臨床情報、ゲノム DNA、血清、血漿、生検組織をバンク化する。長崎大学と長崎医療センター内にバンクを設置し、データベースの整備を行う。

得られたゲノム DNA は長崎大学人類遺伝学吉浦孝一郎教授との共同研究による次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行うことで網羅的に検出する。

### (3) 新規疾患遺伝子の同定

次世代シーケンサーで明らかとなった ASD の DNA 配列を健常人の DNA 配列と比較することで新規疾患遺伝子の同定を試みる。解析においては Hardy-Weinberg 平衡や多重性を考慮した解析、一般集団との変異頻度の差の検出等情報処理を行う。

### (4) 無細胞系インフラマソーム解析による候補遺伝子のスクリーニング

共同研究者である増本教授の施設である愛媛大学プロテオサイエンスセンター病理学部門では、コムギ胚芽無細胞タンパク質からインフラマソームを構成する全蛋白の無細胞合成に成功しており、この合成技術を用い NRLP3、AIM2 インフラマソームを試験管内で再構築する技術が確立している。

この実験系を用い同定された ASD の疾患遺伝子の変異体がインフラマソームの活性化にどのような影響を与えているかを *in vitro* の実験系にて解析を行い、インフラマソームを阻害する遺伝子を抽出する。

### (5) 動物モデルの作成

全エクソン解析で抽出された疾患感受性遺伝子のうち、インフラマソームを活性化しうる遺伝子を選定し、その機能を *in vivo* で検証するため、CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集により、目的遺伝子 X をノックアウト (KO) したマウスを作成する。

### (6) 疾患の発症機序の解明

前述の通り作成した X 遺伝子の KO マウスを用い、以下の手順でその機能を解析する。

WT マウスおよび KO マウスの腹腔内に尿酸塩結晶 (MSU) 3mg/body を投与し、自己炎症を惹起する。

投与後 4 時間後にマウスを安楽死させ、腹腔内の細胞を回収し、フローサイトメトリーでマクロファージ、好中球の活性化、IL-1 の産生能を WT マウスと KO マウスで比較し、*in vivo* における X 遺伝子の自己炎症反応に対する作用を検討する。

## 4. 研究成果

ASD 患者を対象とした次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い疾患感受性遺伝子

の同定とその機能解析を行うため既存の自己炎症疾患研究会や西九州自己免疫疾患研究会との連携を図り、ASDのネットワークを構築した。

上記の専門医ネットワークを活用して収集された臨床情報、ゲノムDNA、血清、血漿、生検組織を収集した。得られたゲノムDNAは長崎大学人類遺伝学吉浦孝一郎教授との共同研究による次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行い、疾患感受性SNPの候補を同定した。上記コンソーシアムで得られた血清試料と敗血症患者の血清試料を用いて、両者を識別するサイトカインを同定、特許出願を行った。

今回同定されたSNPのmutationを用いた、無細胞系インフラマソーム解析による候補遺伝子のスクリーニング、動物モデルの作製、疾患の発症機序の解明に関しては現在進行中である。

ASDは特異的な自己抗体等の血清バイオマーカーがなく、診断は除外診断である。また、重症例ではサイトカインストームによる血球貪食症候群や播種性血管内凝固症候群を引き起こし予後不良である。本研究成果は、血清バイオマーカーによるASDの層別化や敗血症との鑑別を試み、診断に有用なサイトカインの組み合わせを同定した。また、全エクソン解析において、疾患感受性SNPを同定した。現時点でこれらのSNPの病的意義は不明であり、今後の機能的解析が必要であるが、病態解明および新規治療法の開発のシーズとなる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Tomohiro Koga, Remi Sumiyoshi, Shuntaro Sato, Kiyoshi Migita, Toshimasa Shimizu, Masataka Umeda, Fumiaki Nonaka, Shoichi Fukui, Shin-ya Kawashiri, Naoki Iwamoto, Kunihiro Ichinose, Mami Tamai, Hideki Nakamura, Tomoki Origuchi, Akihiro Yachie, Takahiro Maeda, Atsushi Kawakami, Serum fibroblast growth factor 2 is a useful biomarker to distinguish adult onset still disease from sepsis, Annual European Congress of Rheumatology (EULAR), Amsterdam, The Netherlands, 2018年6月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：スティル病と敗血症との鑑別用バイオマーカー

発明者：古賀智裕、川上 純、右田清志、佐藤俊太郎

権利者：長崎大学、福島県立医科大学

種類：特許

番号：(特願)2018-083489

出願年：2018年4月

国内外の別：国内

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：吉浦 孝一郎

ローマ字氏名：YOSHIURA, Koh-ichiro

所属研究機関名：長崎大学

部局名：原爆後障害医療研究所

職名：教授

研究者番号 ( 8 桁 ): 00304931

研究分担者氏名 : 右田 清志

ローマ字氏名 : MIGITA, Kiyoshi

所属研究機関名 : 福島県立医科大学

部局名 : 医学部

職名 : 教授

研究者番号 ( 8 桁 ): 60264214

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。