

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07840

研究課題名(和文) インターロイキン36関連分子の構造解析による臨床応用への展開

研究課題名(英文) The protein structure determination of IL-36 related molecules and their clinical application.

研究代表者

大西 秀典(Ohnishi, Hidenori)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60381620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膿疱性乾癬の病因分子であるIL-36及びIL-36Raのそれぞれ受容体鎖(IL-36R)との複合体構造決定、及び構造情報を元にした臨床応用への展開を目的とした。研究の結果、構造解析に必要な各種リコンビナント蛋白の精製方法を確立した。精製したカイコ由来IL-36RはIL-36Raと複合体形成可能であることが証明された。さらに、IL-36受容体拮抗分子欠損症(DITRA)の疑義患者から同定されたIL36RN遺伝子上の意義不明遺伝子バリエーション(VUS)のin vitro機能解析系の開発を行った。新たな研究計画の元、引き続き構造解析に挑戦する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IL-36受容体を標的とした抗体製剤の開発が進んでおり、IL-36が膿疱性乾癬の治療標的分子として有望であることは明らかである。蛋白立体構造の解明は、構造基盤による創薬につながる情報となりうる。また、患者遺伝子解析から様々なIL36RN遺伝子変異が同定されることを経験するが、既知遺伝子変異の場合、疾患関連性の判定は容易であるが、ときに新規のバリエーションに遭遇することがある。その場合、なんらかのin vitro実験を行う必要があるため、一般臨床医には診断に至るまでの過程のハードルが著しく高くなってしまふ。そこで詳細な構造情報があれば、病因変異かどうかの判定に利用することができる点でも有用である。

研究成果の概要(英文)：Interleukin-36, which is associated with the self-defense system in dermis, is one of a molecule of IL-1 family. Recently, it was reported that generalized pustular psoriasis was caused by loss-of-functional mutation of IL36RN gene coding IL-36-receptor antagonist (IL-36Ra). In this study, we aimed a determination of the complex protein structure of IL-36 or IL-36Ra and IL-36-receptor chain (IL-36R). Additionally, we tried to use the structural information for the clinical application. As the results, we established a purification method of recombinant proteins (IL-36, IL-36Ra and IL-36R). An IL-36R protein produced by the silkworm expression system could bind an IL-36Ra. Furthermore, we established an in vitro assay system to evaluate the variants of IL36RN whether is pathogenic or not. The protein structure determination will be continued in the next new research project.

研究分野：小児科

キーワード：蛋白立体構造解析 自己炎症性疾患 乾癬 サイトカイン 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

自己炎症性疾患は1999年にKastner DLらが提唱した疾患概念で、主に自然免疫系の分子の制御異常により発症する慢性炎症性疾患であり、高力価の自己抗体や自己反応性T細胞を有しないものと定義されている(McDermott MF, Cell 1999)。その臨床像は周期性発熱あるいは持続性発熱、関節炎、皮疹、消化器症状等のリウマチ性疾患に類似した症状を呈するものが多い。1997年に家族性地中海熱、1999年にTNF受容体関連周期性症候群(TRAPS)、2001年にCryopyrin関連周期性発熱症候群(CAPS)の責任遺伝子が明らかにされ、その後次世代シーケンサーによる全Exome解析の時代となり、近年では次々と新たな自己炎症性疾患の責任遺伝子が明らかとなってきている。その状況の中で、2011年には炎症性サイトカインであるインターロイキン(IL)-1ファミリー分子のひとつIL-36の内因性アンタゴニスト分子をコードするIL36RN遺伝子の欠損により汎発性膿疱性乾癬(Deficiency of interleukin thirty-six receptor antagonist; DITRA)を引き起こすことが報告された(Marrakchi S, N Engl J Med 2011)。DITRAを含め汎発性膿疱性乾癬に対して様々な治療的試みが為されているが、難治性疾患でしばしば治療に難渋するため、新規の画期的治療薬の開発が期待されている。

2. 研究の目的

Structure-Based Drug Designは、タンパク立体構造を元に新規薬剤を創出するよく知られた手法である。IL-1ファミリー分子のタンパク立体構造については、IL-1、IL-18については我々が明らかにした構造を含め(Tsutsumi N, Nat Commun. 2014)、受容体との詳細な複合体構造情報が明らかとなっているが、IL-36ファミリー分子については受容体との相互作用構造情報は未解明である。そこで、本研究では、IL-36、IL-36受容体拮抗分子(IL-36Ra)及びその受容体(鎖: IL-36R、鎖: IL-1RAcP)の複合体構造決定と構造情報に基づく新規抗IL-36薬の設計を主目的とした。一方で、我々は汎発性膿疱性乾癬を含む皮膚自己炎症性疾患患者の遺伝子解析研究を行っているが、最近日本人の汎発性膿疱性乾癬患者の遺伝的素因分析と治療効果判定に関する検討を行い報告している(Ohnishi H, Eur J Dermatol. in press)。その際に、様々なIL36RN遺伝子変異が同定されることを経験しているが、それが既知遺伝子変異の場合、疾患関連性の判定は容易であるが、ときに新規のバリエーションに遭遇することがある。その場合、なんらかの*in vitro*実験を行う必要があるため、一般臨床医には診断に至ることが困難な状況にある。そこで詳細な構造情報があれば、病因変異かどうかの判定に利用することができる。さらに構造情報から病原性を予測し、それを裏付けるための*in vitro*実験系の構築についても本研究の目的に含めた。

3. 研究の方法

リコンビナントタンパク群(IL-36、IL-36Ra、IL-36R、IL-1RAcP)の効率のよい発現精製系を構築する。具体的には大腸菌発現系(pGEX-BL21(DE3)系)を用いてIL-36、IL-36Raの発現・精製を行う。昆虫細胞発現系(pFastBac1-SF9あるいはカイコ)を用いてIL-36R細胞外ドメイン(ECD)、IL-1RAcP-ECDの発現・精製を行う。

IL-36、IL-36R、IL-1RAcPのそれぞれ精製タンパクを混合し、液体クロマトグラフィーで複合体形成を確認し、高純度精製を行う。

IL-36Ra、IL-36Rのそれぞれ精製タンパクを混合し、液体クロマトグラフィーで複合体形成を確認し、高純度精製を行う。

及び得られた複合体タンパクについて、それぞれ結晶化スクリーニング実験を行うことで、効率のよい結晶化条件の探索を行う。

pcDNA3.1+にIL-36R全長遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを構築し、HEK293細胞を利用したIL-36シグナル伝達実験系を構築する。

汎発性膿疱性乾癬患者から同定された遺伝子変異Thr123Met及び変異Aを導入したIL-36Raタンパクを精製する。

で精製したIL-36Raを使用しての実験系で機能を確認する。

4. 研究成果

タンパク立体構造解析に用いるタンパク群(IL-36、IL-36Ra、IL-36R-ECD、IL-1RAcP-ECD)の試料の高純度精製法の確立に成功した。

タンパク複合体形成実験によりIL-36とIL-36R-ECD、IL-36RaとIL-36R-ECDの組み合わせでそれぞれ複合体タンパクの作成を行った。構造解析に向けたタンパク結晶については現在作成中である。

汎発性膿疱性乾癬患者で見出されたThr123Metと変異AについてそれぞれIL-36Raタンパクを作成した。

IL-36シグナル伝達系の機能解析を目的としたcell-based assay systemを構築した。HEK293T細胞にpcDNA3.1+_IL-36Rをtransfectし、大腸菌発現系で精製したIL-36を添加す

ることで転写因子 NF- κ B の活性化が Luciferase reporter gene assay で検出できることを確認した。さらに IL-36Ra を添加することで用量依存的に IL-36 刺激による NF- κ B 活性上昇が抑制できることを確認した。これにより IL-36Ra 変異体の病的意義を確認する in vitro 実験系が確立された。

で作成した IL-36Ra 変異体タンパクについて の実験法で確認したところ、機能減損型変異であることが証明された。

と同様の実験系を DITRA の類縁疾患である (Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist; DIRA) についても構築した。すなわち HEK293T 細胞に IL-1 を添加することで上昇する NF- κ B の活性化を IL-1Ra が抑制できるかどうか確認を行った。この実験系によりトルコの症例で見出された R29X 変異体は、残存活性を有する機能減損型変異であることが証明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Moriya K, Kadowaki S, Nakano T, Akarcan SE, Kutukculer N, Aksu G, Sasahara Y, Kure S, Ohnishi H, Casanova JL, Puel A, Fukao T.	4. 巻 40
2. 論文標題 The IL1RN Mutation Creating the Most-Upstream Premature Stop Codon Is Hypomorphic Because of a Reinitiation of Translation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 643-645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-020-00770-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimizu Maho, Matsubayashi Tadashi, Ohnishi Hidenori, Nakama Mina, Izawa Kazushi, Honda Yoshitaka, Nishikomori Ryuta	4. 巻 e-pub
2. 論文標題 Haploinsufficiency of A20 with a novel mutation of deletion of exons 2-3 of TNFAIP3.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1719595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Kento, Takahashi Tomoko, Matsuyama Kanako, Fujii Asami, Mizutani Yoko, Ohnishi Hidenori, Seishima Mariko	4. 巻 47
2. 論文標題 Impetigo herpetiformis with a CARD14 Thr79Ile variant successfully treated with granulocyte and monocyte adsorption apheresis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e84-e85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa B, Aoki M, Ohnishi H, Ohashi T, Hayashi H, Kuze B, Ito Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 The Long-Term Efficacy of Cochlear Implantation for Hearing Loss in Muckel-Wells Syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Int Adv Otol.	6. 最初と最後の頁 454-458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5152/iao. 2019.6871	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nozawa Akifumi, Ozeki Michio, Yasue Shiho, Endo Saori, Kawamoto Norio, Ohnishi Hidenori, Fumino Shigehisa, Furukawa Taizo, Tajiri Tatsuro, Maekawa Takanobu, Fujino Akihiro, Souzaki Ryota, Fukao Toshiyuki	4. 巻 e-pub
2. 論文標題 Immunologic Effects of Sirolimus in Patients With Vascular Anomalies.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000001650	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ibusuki Atsuko, Nishikawa Takuro, Hiraki Tsubasa, Okano Tsubasa, Imai Kohsuke, Kanegane Hirokazu, Ohnishi Hidenori, Kato Zenichiro, Fujii Kazuyasu, Tanimoto Akihideo, Kawano Yoshifumi, Kanekura Takuro	4. 巻 46
2. 論文標題 Prominent dermal Langerhans cells in an Omenn syndrome patient with a novel mutation in the IL2RG gene.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1019 ~ 1023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hori Tomohiro, Ohnishi Hidenori, Kadowaki Tomonori, Kawamoto Norio, Matsumoto Hideki, Ohara Osamu, Fukao Toshiyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Autosomal dominant Hashimoto 's thyroiditis with a mutation in TNFAIP3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Pediatric Endocrinology	6. 最初と最後の頁 91 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1297/cpe.28.91	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsutsumi Naotaka, Yokota Ayumi, Kimura Takeshi, Kato Zenichiro, Fukao Toshiyuki, Shirakawa Masahiro, Ohnishi Hidenori, Tochio Hidehito	4. 巻 9
2. 論文標題 An innate interaction between IL-18 and the propeptide that inactivates its precursor form	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42661-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Cardinez Chelisa, Miraghazadeh Bahar, Tanita Kay, da Silva Elizabeth, Hoshino Akihiro, Okada Satoshi, Chand Rochna, Asano Takaki, Tsumura Miyuki, Yoshida Kenichi, Ohnishi Hidenori, et al.	4. 巻 215
2. 論文標題 Gain-of-function IKKB mutation causes human combined immune deficiency	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 2715 ~ 2724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20180639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Uno Masatoshi, Watanabe-Nakayama Takahiro, Konno Hiroki, Akagi Ken-ichi, Tsutsumi Naotaka, Fukao Toshiyuki, Shirakawa Masahiro, Ohnishi Hidenori, Tochio Hidehito	4. 巻 54
2. 論文標題 Intramolecular interaction suggests an autosuppression mechanism for the innate immune adaptor protein MyD88	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 12318 ~ 12321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8cc06480f	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moriya Kunihiko, Sasahara Yoji, Ohnishi Hidenori, Kawai Tomoki, Kanegane Hirokazu	4. 巻 38
2. 論文標題 IKBA S32 Mutations Underlie Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency and Severe Noninfectious Systemic Inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 543 ~ 545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-018-0522-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueno HM, Kato T, Ohnishi H, Kawamoto N, Kato Z, Kaneko H, Kondo N, Nakano T.	4. 巻 142
2. 論文標題 Hypoallergenic casein hydrolysate for peptide-based oral immunotherapy in cow's milk allergy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol	6. 最初と最後の頁 330 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2018.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ohnishi H., Kadowaki T., Kawamoto N., Hori T., Nishimura K., Kobayashi C., Shigemura T., Ogata S., Inoue Y., Kawai T., Hiejima E., Izawa K., Matsubayashi T., Takagi M., Imai K., Nishikomori R., Ito S., Heike T., Ohara O., Morio T, Kanegane H., Fukao T.
2. 発表標題 The clinical and immunological profiles of haploinsufficiency of A20 in Japan.
3. 学会等名 The 10th Biannual Meeting of the International Society of Systemic Auto-Inflammatory Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohnishi H., Kataoka S., Muramatsu H., Kadoi E., Kanazawa N., Okada S., Honda Y., Izawa K., Nishikomori R., Taketani T., Hamazaki J., Murata S., Takahashi Y., Fukao T.
2. 発表標題 A case of novel identified proteasome-related autoinflammation and immunodeficiency syndrome caused by PSMB9 mutation.
3. 学会等名 The 10th Biannual Meeting of the International Society of Systemic Auto-Inflammatory Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohnishi H.
2. 発表標題 What PID to suspect when a child present with difficult to treat mycobacterial infections?
3. 学会等名 The 15th Congress of Asian Society for Pediatric Research (ASPR) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西秀典
2. 発表標題 自己炎症性疾患の診断と治療およびイラリスの適正使用
3. 学会等名 日本小児リウマチ学会総会・学術集会(第28回)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishimura S, Kobayashi Y, Tsumura M, Ishikawa N, Ohnishi H, Takada H, Sancho-Shimizu V, Moriya K, Anne P, Capucine P, Irani S, Casanova JL, Okada S, Kobayashi M.
2. 発表標題 Anti-NMDA receptor encephalitis associate with IRAK4 deficiency.
3. 学会等名 ESID 2018 (European Society for Immunodeficiencies) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 真部 淳、松藤 凡、小林 京子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 380
3. 書名 病態・治療論 [14] 小児疾患	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	INSERM			
トルコ	Ege University Faculty of Medicine			
米国	The Rockefeller University			