

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07619

研究課題名(和文) CAPS患者単球におけるIL-1 異常産生制御の1細胞分泌計測からのアプローチ

研究課題名(英文) Analytical approaches based on single-cell secretion measurements to the regulation of abnormal IL-1beta production in monocytes from CAPS patients.

研究代表者

山岸 舞 (Yamagishi, Mai)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・薬学部研究員

研究者番号：90332501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫機能を担う免疫細胞は、メッセージ物質を放出したり受容したりすることで協働し、健康な体を維持しているが、例えばある難病では、ごくわずかの異常免疫細胞のみがメッセージ物質を大量放出することで発症してしまう。本研究ではメッセージ物質の放出をリアルタイムに観察する技術を用いて、大量にメッセージ物質を放出する異常細胞を特定、その場から一細胞ずつ取り出して解析することで、疾患原因となる遺伝子配列情報を検出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体を構成する細胞は各々個性豊かで、互いにメッセージ物質をやり取りしながら細胞社会を形成している。我々の研究からメッセージ物質発信の強さにも個性があり、ごく一部の強いメッセージを発信する細胞が周囲の細胞に影響を与える状況が明らかになってきた。この構造はSNSで発信力の高いインフルエンサーが社会現象を巻き起こす構造とよく似ている。本研究は、メッセージ物質放出強度を調べることで疾患におけるインフルエンサー細胞を同定して単離し、インフルエンサーとなるに至った背景や性質などを明らかにする試みである。

研究成果の概要(英文)：Immune cells responsible for immune function work together to maintain a healthy body by releasing and accepting message molecules. Some intractable diseases are caused by the massive release of message molecules by a very small number of abnormal immune cells. In this study, disease-causing gene sequence information was successfully detected by identifying abnormal cells that release large amounts of message molecules using real-time observation techniques, picking them up from the field individually and analyzing the gene sequence for each cell.

研究分野：ライブセルイメージング

キーワード：一細胞機能解析 臨床検体 体細胞モザイク 一細胞遺伝子アレル配列解析 自己炎症疾患 IL-1  
薬効経過観察 確定診断

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome (CAPS) は指定難病のひとつで、NLRP3 遺伝子の gain-of-function 変異を原因とする自己炎症性疾患の総称である。CAPS は常染色体優性遺伝であるが、重症型の CINCA 症候群においては孤発例が多く、体細胞モザイク変異によっても発症することがわかっている (Saito M. et al., *Arthritis Rheum.*, 52, 3579-3585 (2005)、Tanaka N. et al., *Arthritis Rheum.*, 63, 3625-3632 (2011))。炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 (IL-1) の阻害薬 (抗 IL-1 抗体薬のカナキマブなど) が著効するため、変異 NLRP3 を発現する単球などからの IL-1 産生亢進が症状惹起の要因と考えられる。早期の抗 IL-1 療法開始は症状の緩和や予防につながり患者の QOL の大幅な改善が期待できるため、迅速な確定診断が望まれる。しかしながらモザイク率の低い患者からの変異同定や、検出された変異の疾患原因変異としての断定が困難であり、未だ統一化された診断基準が存在しない。

申請者はこれまで、CAPS における IL-1 異常産生の様相を 1 細胞解像度で明らかにすること、ならびに IL-1 異常産生を指標とした迅速・簡便かつ高感度な 1 細胞遺伝子変異確定診断法の開発を目標として、患者由来末梢血単球に対し申請者が開発した 1 細胞分泌実時間イメージング法 (Shirasaki Y. et al., *Sci. Rep.*, 22, 4736 (2014)、後に LCI-S と命名) や既報を参考にした方法 (Microengraving 法、Love J.C. et al., *Nat. Biotechnol.*, 24, 703-7 (2006)) を用いて 1 細胞レベルでの IL-1 分泌動態を明らかにしてきた。その過程で、CAPS 患者単球からの IL-1 異常産生は変異を持つ単球全てからは検出されず、分泌陽性は一部の細胞にとどまること、健常者由来の単球であっても IL-1 を大量に分泌する細胞が低い割合で見られることなどを明らかにした。

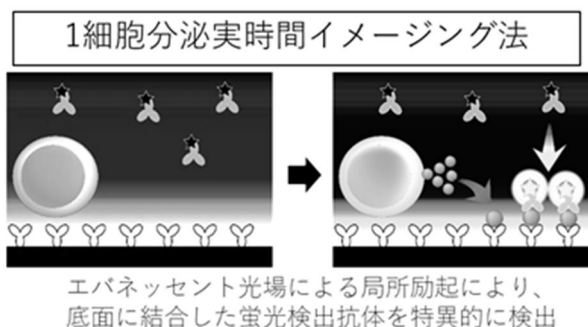


図1 1細胞実時間分泌測定概要

CAPS 患者由来単球の IL-1 異常産生の有無が、NLRP3 変異やその他なんらかの細胞内状態に規定されることから、IL-1 異常産生を示している細胞の特徴を選択的に解析できる手法の必要性が浮き彫りになった。そのような解析が可能となれば、変異と IL-1 異常産生の関連性を明らかにし、確定診断法としての医療応用への展開が期待できる。

### 2. 研究の目的

NLRP3 遺伝子の gain-of-function 変異を原因とする自己炎症性疾患、Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome (CAPS) の迅速確定診断法の確立、ならびに IL-1 異常産生単球の特徴を明らかにして次世代治療開発の分子基盤を明らかにすることを目的とし、研究代表らの開発した「LCI-S に基づく選択的実時間回収法」が CAPS 患者の IL-1 異常産生単球特異的なアレル単位での NLRP3 ゲノム配列取得による確定診断や、IL-1 異常産生単球の特徴づけを実現し、創薬・治療の標的を浮き彫りにし得るかを検討する。

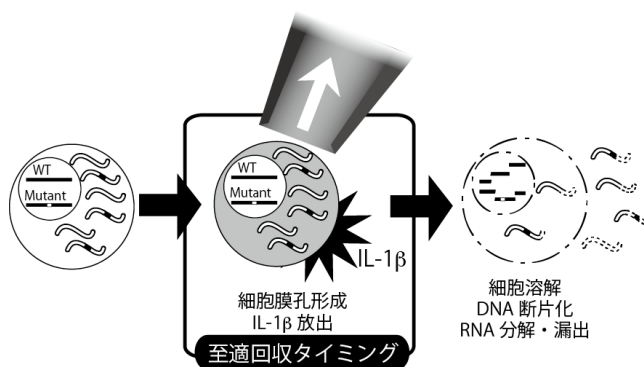


図2 選択的 1 細胞実時間回収法の概念図

### 3. 研究の方法

LCI-S に基づく選択的実時間回収法 (特許 6338262) を CAPS 患者単球からの炎症性細胞死に伴う IL-1 産生に適用した。モザイク率が数%以下と考えられる抗体製剤適用前の CAPS 患者 (疑いを含む、計 5 名) の協力を得て、抗体製剤投与前、投与後 1 か月、投与後 3 か月における末梢血単球の異常 IL-1 産生動態を 1 細胞分泌実時間イメージング法を用いて観察した。また、投与前の計測においては 12 時間の分泌計測中、異常 IL-1 産生を呈した細胞を産生後 1 時間以内に回収し、その後の解析に供するため直ちに凍結して保存した。凍結保存した細胞を各種解析に供して、有用な情報が得られるかを検討した。

#### 4 . 研究成果

患者は抗体製剤投与によって一定の症状の緩和が見られていたが、一細胞レベルの IL-1 異常産生に関しては沈静化する傾向が見られたもののその程度には個人差があった。回収した細胞を代表者が開発した NLRP3 遺伝子アレル配列解析に供した。

診断時の次世代シーケンシング解析では変異アレル頻度が 5%以下であった検体から、5-6 倍の検出力で変異同定に成功した。さらに、1 検体においては次世代シーケンシングで見出された変異と異なる変異が見出されており、従来の診断法では見出すことのできない病原変異を検出できる可能性が示唆された。これに関しては、検証実験の構想ならびに環境整備を進めている。うち 1 例は、これまで研究代表が観察してきた分泌動態とは異なる様態を呈し、臨床所見としても CAPS 様ではないとのことで、ネガティブコントロールとしての類似疾患患者を扱っている可能性が高い。

一細胞に 1 対しかないゲノムの点変異を対象とすることの手技的な難しさを鑑み、転写産物を配列解析の標的とすることを検討した。このことは、実際に変異アレルから転写が起こって発現していることを保証することにもなると期待した。しかしながら、患者由来単球において細胞死を伴う IL-1 放出を呈する細胞から、1kb を超えるような長鎖の核酸増幅は困難であり、IL-1 放出観察自体や細胞回収プロセスに革新的な変更が必要であることが明らかとなった。そこで、現在、他プロジェクトで開発を進めている、ハイスループット化分泌観察システムの適用を検討している。開発されたシステムでは、炎症性サイトカインの放出をこれまでと同様に 1 細胞粒度で観察できることを確認し、現在は細胞分取システムとの統合を図っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamagishi Mai, Shirasaki Yoshitaka	4. 巻 2274
2. 論文標題 Live-Cell Imaging Technique to Visualize DAMPs Release During Regulated Cell Death	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 337 ~ 352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-1258-3_28	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mai Yamagishi, Kazushi Izawa, Sotaro Uemura, Ryuta Nishikomori, Takashi Funatsu, Yoshitaka Shirasaki
2. 発表標題 Method for a selective gene analysis of single cells with abnormal cytokine production
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2021)（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 1 細胞からの細胞外微粒子産生の可視化技術	発明者 白崎善隆、山岸舞、 依田和樹	権利者 株式会社ライブ セルダイアグノ シス、東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-196355	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------