

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890118

研究課題名(和文) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた cryopyrin 関連周期熱症候群の病態解析

研究課題名(英文) Modeling and analyzing pathogenesis of cryopyrin-associated periodic syndrome using induced pluripotent stem cells

研究代表者

斎藤 潤 (SAITO MEGUMI)

京都大学・iPS 細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：90535486

研究成果の概要(和文)：Cryopyrin 関連周期熱症候群 (CAPS) と呼ばれる症候群は、NLRP3 遺伝子変異により発症する重篤な疾患で、自己炎症性症候群の一つである。我々は、CAPS の病態解析と創薬のため、体細胞モザイクの CAPS 患者 2 名から患者特異的 iPS 細胞を樹立した。NLRP3 変異陽性クローンと陰性クローンからマクロファージに分化させ、疾患特異的な IL-1 $\beta$  産生、細胞死誘導を確認し、疾患 iPS 細胞を用いた病態再現と疾患モデリングに成功した。

研究成果の概要(英文)：Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) is an severe autoinflammatory syndrome caused by mutations of NLRP3. To investigate the mechanism of disease and for drug screening, we established patient-specific induced pluripotent stem (iPS) cells from two CAPS patients with somatic mosaicism. Both mutant and wild type clones were obtained, and these clones were differentiated into macrophages. Disease-associated features such as overproduction of IL-1 $\beta$ , pyronecrosis were observed only in mutant clones. Thus we succeeded to establish a disease-model of CAPS using iPS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：小児科学、再生医学

科研費の分科・細目：医歯薬学・小児科学

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

Cryopyrin 関連周期熱症候群 (CAPS) と呼ばれる症候群は、CINCA 症候群、Muckle-Wells 症候群、家族性寒冷自己炎症性症候群の 3 症候群を含み、特徴的な皮疹、髄膜炎、感覚器障害、軟骨病変などを認める重篤な疾患であり、小児の熱性疾患の原因として重要である (Hoffman HM, Curr Med Res Opin. 2008, 24:2531)。責任遺伝子は NLRP3 (別名 CIAS1) で、この遺伝子の機能獲得型変異により、疾

患が発症する。本症候群については、NLRP3 の変異が単球系の機能にどのような影響を与えるのか、カテプシン B 依存性の細胞死がどのような分子機構でもたらされるかなど未解決の問題が残されている。軟骨細胞の細胞死制御において NLRP3 が及ぼす影響も不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、小児の遺伝性発熱症候

群・自己炎症性症候群の原因として重要である、Cryopyrin 関連周期熱症候群の病態を疾患関連 iPS 細胞を用いて解析し、診断・治療法の開発を行うことである。

CAPS の病態を解明するために機能獲得変異を導入したノックインマウスの表現型はヒトのそれと一致しないことが知られており、病態の再現には、ヒト検体における詳細な検討が必要である。しかし、CAPS の病態解析に必要な単球系細胞や軟骨細胞を患者さんから大量に採取することは難しい。また、患者から得られた単球系細胞は遺伝子導入が困難である。そこで、CAPS 患者さんの皮膚より疾患特異的 iPS を作成し、単球や軟骨細胞に分化させて解析することにより、従来困難であったこれらの細胞や組織における解析が進むことが期待される。

### 3. 研究の方法

#### A) 疾患特異的 iPS クローンの作製とその評価

患者さんから同意を得て、皮膚線維芽細胞を樹立し、そこにレトロウイルスを用いて Oct4, Sox2, Klf4, cMyc の 4 因子を導入し、iPS 細胞を樹立する。トランスジーンサイレンシング、奇形腫形成など、iPS 細胞の性状を確認する。

#### B) 単球系細胞への分化系

ヒト ES 細胞からの OP9 分化システム (Senju S. Stem Cells. 25:2720, 2007) を参考にして、単球マクロファージ、樹状細胞へとさらに分化させる。

#### C) 単球系細胞の機能評価

サイトカイン産生能、抗原提示能、食食能、感染実験など、従来患者検体では検討が難しかった解析を変異細胞と正常細胞で比較して行う。疾患に関与しうる機能的差異を明らかにする。

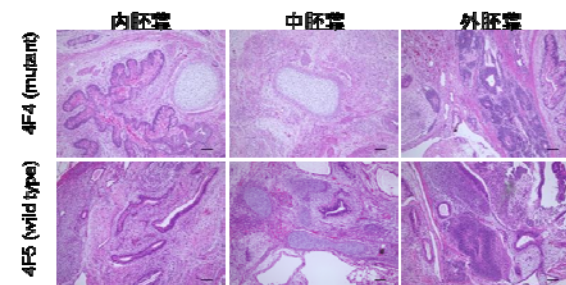
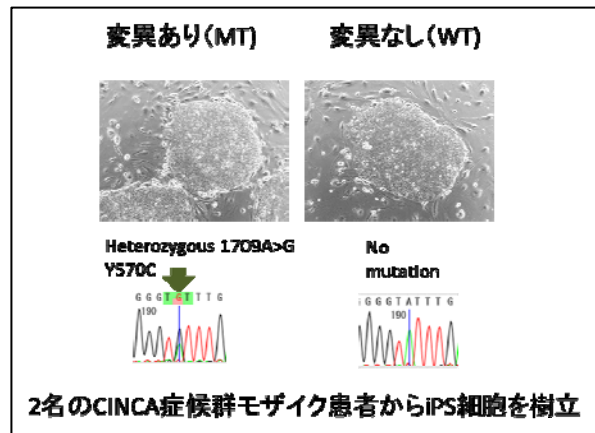
本研究では、疾患特異的 iPS 細胞の作製について、患者さんに十分説明し、同意と協力を得る必要がある。また、作成する iPS 細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必要であり個人情報取り扱い上の配慮を必要とする。そこで京都大学医学部医の倫理委員会に、ヒトを対象とした医学研究及び臨床応用実施申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究」を、ヒト遺伝子解析申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の 2 申請を行い、承認を頂いている。

### 4. 研究成果

体細胞モザイクの Cryopyrin 関連周期熱症候群 (CINCA 症候群) 患者 2 名から患者特異的

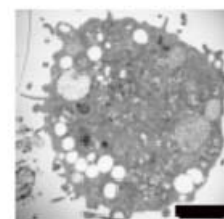
iPS 細胞を樹立した。

NLRP3 変異陽性 iPS クローンと陰性 iPS クローンをそれぞれ複数樹立した。トランスジーンサイレンシング、奇形腫形成などを確認した。



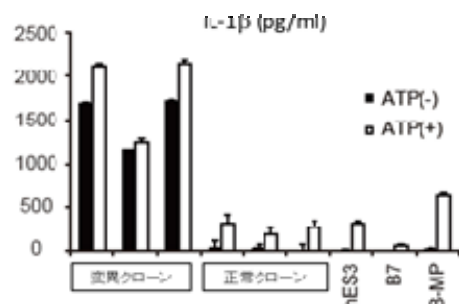
**iPS細胞から作成した奇形腫**

iPS 細胞株を、OP9 上で造血サイトカインを加えることにより、マクロファージに分化させた。マクロファージは機能的であり、サイトカイン産生・食食能などが確認できた。



**患者iPS細胞由来マクロファージ**

NLRP3 変異を持つクローンでは、すべて IL-1 $\beta$  の過剰産生が認められた一方で、変異なしクローンでは IL-1 $\beta$  産生は正常であった。変異 NLRP3 由来クローンでは疾患特異的な細胞死誘導 (pyronecrosis)、活性酸素産生も確認できた。マイクロアレイによる発現解析では、両者は極めて類似した発現プロファイルを示していた。以上より、疾患 iPS 細胞を用いた病態再現と疾患モデリングに成功した。



**変異iPSC由来マクロファージによるIL-1 $\beta$ 過剰産生**

現在この系を用いて、NLRP3 活性を阻害する薬剤のスクリーニングを開始しており、治療法開発に役立てたい。また、遺伝子発現解析や、NLRP3 活性化機構の解明なども進めており、病態の理解に向けた研究を進めていきたい。

#### 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 5 件)

1: (日本語) Saito MK. Inflammasomes and related diseases. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2011;34(1):20-8. PubMed PMID: 21372510.

2: Kambe N, Satoh T, Tanizaki H, Fujisawa A, Saito MK, Nishikomori R. Enhanced NF- $\kappa$ B activation with an inflammasome activator correlates with activity of autoinflammatory disease associated with NLRP3 mutations outside of exon 3: comment on the article by J $\acute{e}$ ru et al. Arthritis Rheum. 2010 Oct;62(10):3123-4

3: Kambe N, Nakamura Y, Saito M, Nishikomori R. The inflammasome, an innate immunity guardian, participates in skin urticarial reactions and contact hypersensitivity. Allergol Int. 2010 Jun;59(2):105-13.

4: Niwa A, Umeda K, Chang H, Saito M, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T. Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via Flk-1(+) hemoangiogenic progenitors. J Cell Physiol. 2009 Nov;221(2):367-77.

5: Nakamura Y, Kambe N, Saito M, Nishikomori R, Kim YG, Murakami M, N $\acute{u}$ ñez G, Matsue H. Mast cells mediate neutrophil recruitment and vascular leakage through the NLRP3 inflammasome in histamine-independent urticaria. J Exp Med. 2009 May;206(5):1037-46.

[学会発表] (計 7 件)

1. 齋藤潤 疾患 iPS 細胞を用いた血液免疫疾患の疾患モデリングと病態解析 再生医療学会 2011 年 3 月、東京

2. 田中孝之、齋藤潤、中畑龍俊 疾患 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群の病態再現免疫不全研究会 2011 年 1 月、福岡

3. 齋藤潤 講演「疾患関連 iPS 細胞の応用: Bedside to bench and back」第 26 回 (2010) 京都賞記念ワークショップ 先端技術部門シンポジウム 2010 年 11 月、京都

4. 齋藤潤 特別講演 「免疫・血液疾患における ES 細胞・iPS 細胞を用いた医療応用について」兵庫小児血液懇話会 2010 年 11 月、神戸

5. 齋藤潤 特別講演 「iPS 細胞を用いた疾患研究の可能性について」第 129 回臨床小児研究会 2010 年 5 月、埼玉

6. 齋藤潤 原発性免疫不全症候群・Fanconi 貧血・骨髄異形成症候群の解析 日本血液学会総会 2009 年 10 月、京都

7. 齋藤潤 招待講演 「再生医療の未来」第 14 回静岡健康・長寿学術フォーラム 2009 年 10 月、静岡

[図書] (計 1 件)

齋藤潤、西小森隆太 自己炎症性疾患の臨床所見と遺伝子異常を基礎とした治療は? 「EBM 小児疾患の治療」pp374-380 中外医学社 2011 年、東京

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: インフラマソームの活性を抑える薬剤をスクリーニングする方法

発明者: 中畑龍俊/齋藤潤/田中孝之/山中伸弥

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: 61/415, 102

出願年月日: 2010/11/18

国内外の別: 国外(米国)

○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:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 潤 (SAITO MEGMU)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：90535486