

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07847

研究課題名(和文) 新規遺伝性自己炎症性疾患: ROSAH症候群(ALPK1変異)の病態解析と治療確立

研究課題名(英文) The study of the pathogenesis and possible treatment of ROSAH syndrome, a novel inherited autoinflammatory disease caused by ALPK1 gene mutation.

研究代表者

石村 匡崇 (Ishimura, Masastaka)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：10448417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ALPK1変異をもつROSAH症候群患者由来iPS細胞を作成した。疾患iPS細胞および正常コントロールiPS細胞より、単球系へ分化誘導を行った。分化誘導した単球をサイトカインおよびALPK1のリガンドであるADP-heptoseで刺激し、患者由来細胞での過剰炎症応答を証明した。また、iPS細胞より誘導した網膜組織オルガノイドを用いて眼炎症との原因について検討した。抗TNFα抗体治療をうけた患者血清で、治療による炎症性サイトカインの抑制を認めた。ROSAH症候群患者白血球でLPSおよびADP-heptoseで刺激での過剰炎症反応をin vitroで示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALPK1遺伝子異常によるROSAH症候群に関し、患者血清、細胞を用いて病態および治療反応性の解析を行った。病状の主座である炎症と眼病変に関する病態解析を行うため、患者由来iPS細胞から単球・網膜への誘導を行いその病態を検討した。病因遺伝子同定からの期間が短く、病因である蛋白のALPK1の機能も不詳である。患者由来検体を用いた本研究は病態のみならず患者治療につながる有用な研究である。

研究成果の概要(英文)：The iPS cells derived from patients with ROSAH syndrome carrying ALPK1 mutations were generated. The differentiated monocytes were stimulated with cytokines and with ADP-heptose, the ligand for ALPK1. Patient-derived cells showed an excessive inflammatory responses. In addition, retinal organoids derived from iPS cells were examined to analyze the causes of ocular inflammation. The inflammatory cytokines levels were reduced in the serum of the patient treated with anti-TNFα antibodies. White blood cells from patients with ROSAH syndrome also showed an excess inflammatory response to LPS and ADP-heptose stimulation in vitro.

研究分野：先天性免疫異常症・遺伝性自己炎症性疾患

キーワード：ROSAH症候群 自己炎症性疾患 ALPK1 ADP-heptose 周期性発熱 ぶどう膜炎 網膜オルガノイド iPS細胞

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

ROSAH 症候群は *ALPK1* 遺伝子異常により若年発症ぶどう膜炎、脾腫、無汗症、片頭痛を発症する新規遺伝性自己炎症性疾患である¹⁾。2019 年に初めて報告され、これまでの報告ではほぼ全例で同じ *ALPK1* のヘテロミスセンスバリエーション(c.710 C>T, p.T237M)であるという特徴がある²⁾。申請者らは本邦初の ROSAH 症候群患者 2 名を同定した。ROSAH 症候群患者は周期性発熱、関節炎、蕁麻疹をしばしば合併し、特に脾腫や片頭痛は発熱時に増悪し、解熱により消退する特徴的な経過を示す。また、ROSAH 症候群は若年発症ぶどう膜炎が特徴的で、視神経乳頭浮腫から数年の経過で網膜変性に至り、治療抵抗性に視力障害が進行する。これらの自己炎症の所見は *Alpk1*-KO マウスの表現型としては確認されておらず、p.T237M のヘテロミスセンス変異が原因と推察されるが、未だヒトにおける ROSAH 症候群のぶどう膜・および全身性炎症の病態は明らかではない。*Alpk1* がヘリコバクターピロリの菌体に含まれる Lipopolysaccharide (LPS)の代謝産物である ADP-heptose をリガンドとした自然免疫受容体として機能し³⁾。*Alpk1* は ADP-heptose を認識し、TIFA-TRAF6 のシグナル経路を介して NF- κ B を活性化し、各種炎症性サイトカインの産生、好中球の遊走を誘導する⁴⁾。しかしながら *ALPK1* のヒトにおける自然免疫応答や臓器特異的な機能に関する情報は限定的であった。

2. 研究の目的

ALPK1 のミスセンスバリエーション(T237M)がどのように全身性の病態および周期性発熱やぶどう膜炎に関与し、*ALPK1* のヒトにおける自然免疫応答の関与について検討することで、治療法が確立していない ROSAH 症候群患者に対して適切な治療を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

- ROSAH 症候群患者末梢血単核球より誘導した疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。患者由来 iPS 細胞をオルガノイド(単球系、網膜)に分化誘導した。誘導したオルガノイドでフローサイトメリーでの単球系細胞特性の評価および免疫染色による網膜構造・蛋白発現解析を行った。
- ALPK1*(T237M)の自然免疫応答に関わる機能を評価するために、シグナル経路に関わる外来抗原である LPS および ADP-heptose で末梢血単核球および、患者 iPS 細胞由来単球様細胞の刺激を行い、炎症反応の評価を行った。
- TNF 阻害剤により長期に治療を受け、周期性発熱および脾腫の消失、ぶどう膜炎の進行を抑制できた患者患者血清を用い、治療前後における炎症反応の変化を評価した。

なお、研究期間中に新規の ROSAH 症候群患者が同定された場合に新たに解析を行う計画であったが、期間中に新規診断症例は見出されなかった。

4. 研究成果

- ROSAH 症候群末梢血単核球より iPS 細胞を樹立した(図 1a, 1b)。iPS 細胞における *ALPK1* 発現を Western blotting 法で確認した(図 1c)。iPS 細胞より単球系細胞へ誘導し、フローサイトメリーで CD14+CD34-CD45+の単球系であることを確認した(図 1d)。Wright-Giemsa 染色でも単球様細胞であることを確認した(図 1e)。誘導した単球系細胞(ML)で Western blot 法により *ALPK1* の発現を確認した(図 1f)。

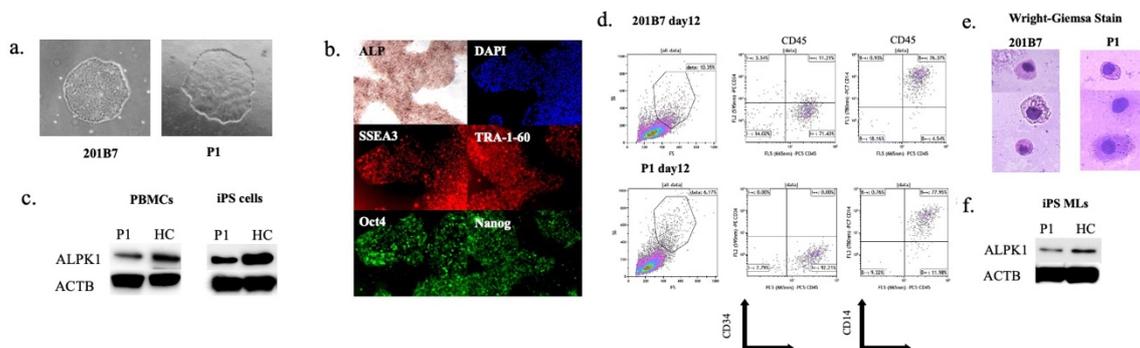


図 1. ROSAH 症候群患者由来 iPS 細胞の樹立および単球系細胞への誘導 HC : healthy control, ML: monocytic lineage, P : patient, PBMC : peripheral blood mononuclear cell

無血清凝集浮遊培養法により iPS 細胞より網膜オルガノイドへの誘導を行い(図 2a)、組織染色により確認した(図 2b)。誘導した網膜オルガノイドにおける ALPK1 発現も組織染色により確認した(図 2c, 2d)。

- 患者末梢血単核球および患者 iPS 由来単球細胞様細胞を LPS および ADP-Heptose で刺激した。末梢血単核球では LPS 刺激では炎症性サイトカイン産生において有意差を認めなかったが(図 3a)、ADP-heptose 刺激において TNF α /IL-6 および IL10 において患者細胞でのサイトカイン産生亢進を認めた(図 3b)。患者 iPS 由来単球細胞様細胞では、LPS 刺激で TNF α /IL1 β /IL6/IL10 の産生亢進を認めた(図 3c)。ADP-heptose 刺激では、TNF α /IL-1 β /IL8/IL12p70 の産生亢進を認めた(図 3d)。

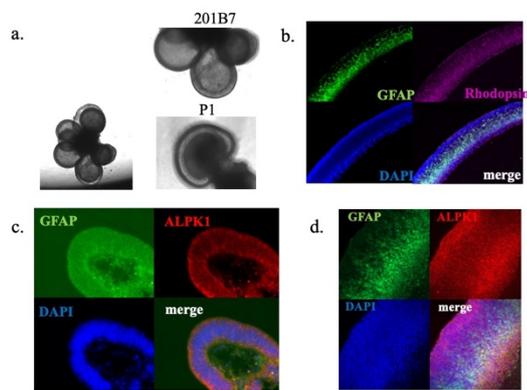


図 2. ROSAH 症候群患者由来 iPS 細胞から誘導した網膜オルガノイド

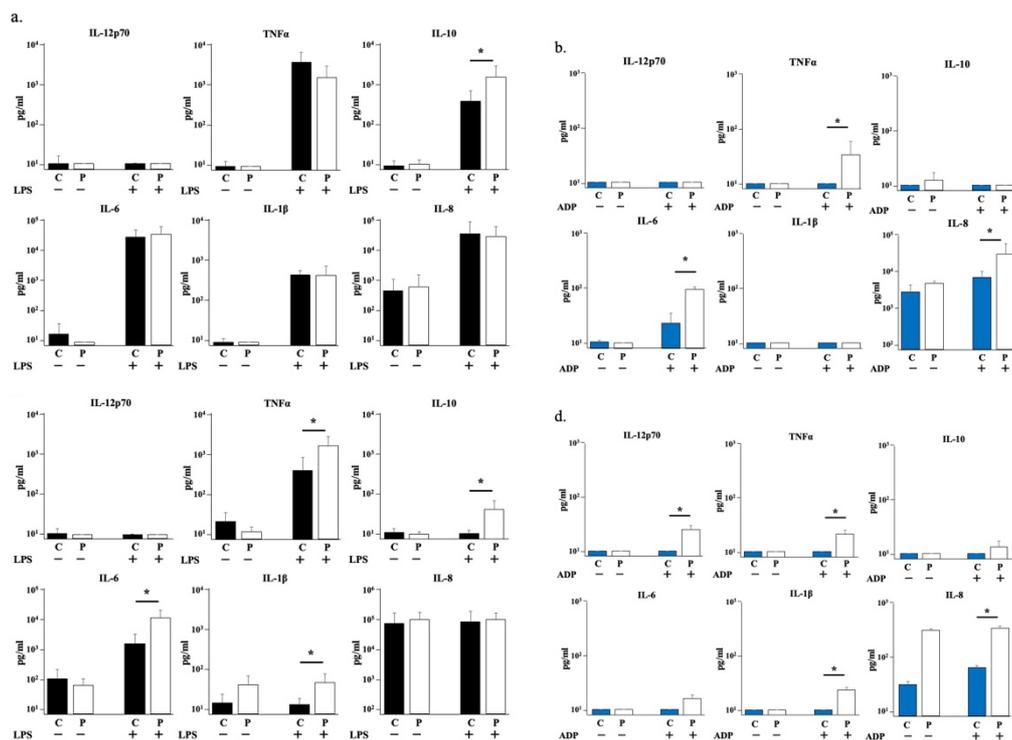


図 3. 末梢血単核球および iPS 由来単球細胞を LPS 100 ng/mL または ADP-heptose 20 μ g/mL 刺激によるサイトカイン評価, C:control, P:patient, *p < 0.01

- 患者血清をもちいて、治療前後における血清サイトカイン測定を行った。治療前に sTNFR および IL1 β /IL6/IL8/IL10 が高値であったが、治療により患者血清でサイトカインの抑制を認めた(図 4)。

上記により患者末梢血および患者由来 iPS 細胞から誘導した単球系細胞において、ADP-heptose 刺激により炎症性サイトカインの過剰産生を確認した。また、TNF 阻害剤による治療介入により過剰なサイトカイン産生の抑制を行える可能性を見出した。今後患者 iPS 由来網膜オルガノイドを用いた炎症病態および治療介入について検討が必要である。

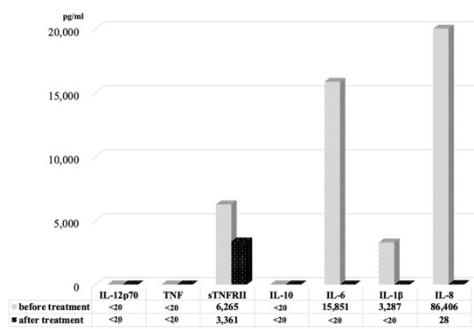


図 4. TNF 阻害剤前後での血清サイトカイン評価

引用文献

- Williams LB, et al. Genet Med. 2019; 21: 2103-2115.
- Zhong L, et al. J Clin Immunol. 2020; 40: 350-358.
- Zhou P, et al. Nature. 2018; 561: 122-126.
- García-Weber D, Arriemerlou C. Cell Mol Life Sci. 2020; 26.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishimura Masataka, Eguchi Katsuhide, Sonoda Motoshi, Tanaka Tamami, Shiraishi Akira, Sakai Yasunari, Yasumi Takahiro, Miyamoto Takayuki, Voskoboinik Ilia, Hashimoto Kunio, Matsumoto Shirou, Ozono Shuichi, Moritake Hiroshi, Takada Hidetoshi, Ohga Shouichi	4. 巻 119
2. 論文標題 Early hematopoietic cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in a regional treatment network in Japan	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 592-602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-024-03721-3	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 Miyamoto T, Izawa K, Masui S, Yamazaki A, Yamasaki Y, Matsubayashi T, Shiraki M, Ohnishi H, Yasumura J, Kawabe T, Miyamae T, Matsubara T, Arakawa N, Ishige T, Takizawa T, Shimbo A, Shimizu M, Kimura N, Maeda Y, Maruyama Y, Shigemura T, //, Eguchi K, Sonoda M, Ishimura M, et al, the Japan CAPS Working Group	4. 巻 76
2. 論文標題 Clinical Characteristics of Cryopyrin Associated Periodic Syndrome and Long Term Real World Efficacy and Tolerability of Canakinumab in Japan: Results of a Nationwide Survey	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 949-962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.42808	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 Fukuda Yosuke, Yawata Nobuyo, Hasegawa Eiichi, Yamana Satoshi, Shirane Mariko, Ito Takako, Takeda Atsunobu, Sonoda Motoshi, Eguchi Katsuhide, Ishimura Masataka, Ohga Shouichi, Sonoda Koh-Hei	4. 巻 31
2. 論文標題 Clinical Features of Pediatric Uveitis at a Tertiary Referral Center in the Western Region of Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ocular Immunology and Inflammation	6. 最初と最後の頁 2032-2038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09273948.2023.2273363	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 Yonemoto K, Fujii F, Taira R, Ohgidani M, Eguchi K, Okuzono S, Ichimiya Y, Sonoda Y, Chong PF, Goto H, Kanemasa H, Motomura Y, Ishimura M, Koga Y, Tsujimura K, Hashiguchi T, Torisu H, Kira R, Kato TA., Sakai Y, Ohga S	4. 巻 255
2. 論文標題 Heterogeneity and mitochondrial vulnerability configurate the divergent immunoreactivity of human induced microglia-like cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 109756-109756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2023.109756	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 K, Nakano T, Honda Y, Tsumura M, Ogishi M, Sonoda M, Nishitani-Isa M, Uchida T, Hbibi M, Mizoguchi Y, Ishimura M, Izawa K, Asano T, Kakuta F, Abukawa D, Rinchai D, Zhang P, Kambe N, Bousfiha A, Yasumi T, Boisson B, Puel A, Casanova JL, Nishikomori R, Ohga S, Okada S, Sasahara Y, Kure S.	4. 巻 220
2. 論文標題 Human RELA dominant-negative mutations underlie type I interferonopathy with autoinflammation and autoimmunity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20212276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20212276	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 Koga Tomohiro, Sato Shuntaro, Hagimori Naoko, Yamamoto Hiroshi, Ishimura Masataka, Yasumi Takahiro, Kirino Yohei, Ikeda Kei, Yachie Akihiro, Migita Kiyoshi, Kishida Dai, Atsumi Tatsuya, Kawakami Atsushi	4. 巻 40
2. 論文標題 A randomised, double-blind, placebo-controlled phase III trial on the efficacy and safety of tocilizumab in patients with familial Mediterranean fever	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1535-1542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.55563/clinexprheumatol/fgx9vv	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 0件）

1. 発表者名 石村 匡崇、園田 素史、大賀正一
2. 発表標題 新たに見いだされた自己炎症性疾患:ALPK1遺伝子変異によるROSAH 症候群
3. 学会等名 第6回日本免疫不全・自己炎症学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担者	八幡 信代 (Yawata Nobuyo) (90315812)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究 分担者	山元 裕之 (Yamamoto Hiroyuki) (00710170)	九州大学・環境発達医学研究センター・特任助教 (17102)	
研究 分担者	園田 素史 (Sonoda Motoshi) (00748006)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	

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
---------	---------