

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591662

研究課題名(和文)自己炎症性疾患TRAPSモデルマウス作製と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of mouse model for autoinflammatory disease, TRAPS (TNF-receptor associated periodic syndrome)

研究代表者

中村 元信 (NAKAMURA, Motonobu)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：30303837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：全身性自己炎症性疾患の1つであるTRAPS (TNF receptor associated periodic syndrome) はその原因がTNF受容体遺伝子の変異であるが、その病態の全貌はまだ解明されておらず、変異をもったモデルマウスを作製した。1匹は胎内で死亡し、1匹は死亡時期が不明で死亡、1匹は生後6週で死亡した。生後6週で死亡したマウスは体重が22.5gと同週令のマウスの体重25gと比較して軽かった。皮膚組織を検討すると毛器官が成長期にあり、同週令のマウスが休止期であることと比較し、毛周期に異常があり、TNF受容体遺伝子の変異が正常な発達に重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：To address the pathomechanism of autoinflammatory disease, TRAPS (TNF receptor associated periodic syndrome), we tried to develop a mouse model of TRAPS by a forced expression of mutant TNF receptor. cDNA with a mutation in TNF receptor gene was ligated into the expression plasmid vector under the CMV promoter. This plasmid was linearized and cut with restriction enzymes and injected into C57BL/6J mice fertilized eggs. Out of 99 mouse specimens analyzed with PCR (polymerase chain reaction), 3 specimens were found to contain inserted plasmid DNA. One mouse died in utero, one mouse died within a few weeks after the birth and one mouse passed away at the age of 6 weeks after birth. The transgenic mouse at 6 weeks after the birth showed retardation in growth and abnormalities in hair follicle development and/or hair cycling. Taken together, these results suggested an important role of normal TNF receptor for development of hair follicles and other unspecified organs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：自己炎症性疾患 TRAPS TNF受容体 マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 自己炎症性疾患は、1999年McDermottらにより、持続性の高熱、関節痛、筋肉痛やさまざまな皮疹を伴う今日TRAPSと呼ばれる疾患にTNF受容体遺伝子(*TNFRSF1A*)に異常があることが報告された際に提唱された疾患概念である。自己免疫疾患が自己抗体や自己反応性T細胞などの存在から獲得免疫系の異常によるものと捉えられているのに対し、自己炎症性疾患は自然免疫の異常によると考えられている。現在、自己炎症性疾患はTRAPSのほか、家族性地中海熱、高IgD症候群、Muckle Wells症候群、家族性寒冷蕁麻疹、CINCA症候群、Blau症候群などがみつかり、それぞれの原因遺伝子が同定されているが病態については不明な点が多い。

TRAPSは、1982年アイルランドでFamilial Hibernian Feverとして初めて報告された遺伝性周期性発熱症候群で、発熱、腹痛、筋肉痛、発疹、関節痛、眼症状、胸膜炎などが主な症状である。発症年齢は平均10歳(1-63歳)、発熱期間は平均14日である。当初、北欧の家系からの報告が多く、アジアではまれな疾患と考えられているが、日本でも2004年に最初の家系が報告されて以来、症例報告がなされている。産業医科大学皮膚科でもTRAPSを経験し、症例発表した(Nakamura M et al. Br J Dermatol 2010。中には、副腎皮質ホルモンの全身投与で軽快せず、生物学的製剤を用いた治療を行わざるを得ず、TRAPSの病態を正確に把握し、その治療法を検討することは臨床的にまた免疫学的に非常に重要な課題である。

(2) TRAPSの動物モデルを作る試みとしては、ギリシャのグループにより、202番目から206番目のアミノ酸を欠失した*TNFRSF1A*ノックインマウスが作製された。ただし、このマウスは肝炎こそ自然発症するものの、関節炎をおこさず、また、202番目から206番目

のアミノ酸に相当するアミノ酸を欠失するTRAPS患者はいないことから、TRAPSの臨床症状を正確に体现しているとはいいたい。そこで、われわれは重症TRAPS患者でみられる変異に相当する変異をもったTNF受容体遺伝子を高発現するトランスジェニックマウスを作製し、TRAPSのマウスモデルを作る試みを行う。

2. 研究の目的

ヒトの重症TRAPS患者におけるTNF受容体遺伝子に相同な遺伝子変異をもったマウス変異TNF受容体遺伝子高発現トランスジェニックマウスを作製を試み、ヒトのTRAPSの臨床症状と比較検討する。

3. 研究の方法

(1) C57BL6/J マウス脾臓から mRNA を抽出し、C57BL6/J マウス mRNA から RT-PCR 法で TNF 受容体(*Tnfrsf1a*)遺伝子 cDNA を増幅させる。

(2) 変異導入キットを用いて、ヒトの重症TRAPS患者での変異 p.T50K と相同な p.T79K マウス *Tnfrsf1a*cDNA 変異を導入する。DNA シークエンス法により変異が的確に導入されたことを確認する。

(3) p.T79K 変異マウス *Tnfrsf1a*cDNA を pcDNA3.1CMV プロモーター下流に挿入プラスミドを制限酵素 BlnI と PvuI で切断し、断片を精製する。

(4) 切断断片を C57BL6/J マウス受精卵に注射する。

(5) 生まれてきたマウスの尻尾から DNA を抽出し、PCR 法で p.T79K 変異 *Tnfrsf1a*cDNA が挿入されているか確認する。

(6) 変異 *Tnfrsf1a*cDNA が挿入されていることが確認されたマウスの組織、表現型を解析する。

4. 研究成果

(1) 重症TRAPS患者において変異のあるTNF受容体遺伝子と相同なマウスTNF受容体遺伝子(*Tnfrsf1a*)変異を含んだプラスミドpcDNA3.1m*Tnfrsf1a*を作製することに成功した。

(2) 変異 DNA を含んだpcDNA3.1m*Tnfrsf1a* のマウス受精卵への注射により、99 のマウス胎児、成体検体より3検体においてDNAの挿入を認めた。

(3) 1匹は胎内で死亡し、1匹は死亡時期が不明で死亡、1匹は生後6週で死亡した。生後6週で死亡したマウスは体重が22.5gと同週令のマウスの体重25gと比較して軽く、全身の正常な発達にTNF受容体は重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(4) 皮膚組織を検討すると毛器官が成長期にあり、同週令のマウスが休止期であることと比較し、毛周期に異常があることが明らかとなった。

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3件)

中村 元信. TRAPS (TNF-R associated periodic syndrome)

アレルギー 免疫 : 査読無 : 20, 2013, 1416-1422

Ohmori S, Nakamura M, Tokura Y

Inflammatory cytokine expression in the skin lesions of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome.

Rheumatology: 査読有 : 51, 2012, 196-199
Tokura Y

Ohmori S, Hino R, Nakamura M, Tokura Y
Heparin serves as a natural stimulant of the inflammasome and exacerbates the symptoms of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS).

Journal of Dermatological Science: 査読有 : 66, 2012, 82-84

[学会発表](計5件)

中村 元信. 自己炎症性疾患 TRAPS の病態. 第134回日本皮膚科学会宮崎地方会, 2013年6月29日、宮崎市

中村 元信. 自己炎症性疾患 TRAPS の病態. 第134回日本皮膚科学会宮崎地方会, 2013年3月17日、松山市

中村 元信. 自己炎症性疾患 TRAPS の病態. 第20回長崎皮膚疾患研究会, 2013年2月6日、長崎市

中村 元信. 自己炎症性疾患 TRAPS の病態. 第80回金沢皮膚研究会, 2013年7月4日、金沢市

中村 元信. 自己炎症性疾患 TRAPS の病態. 第20回鹿児島皮膚アレルギー研究会, 2013年12月15日、鹿児島市

[図書](計1件)

中村元信、南江堂、今日の治療と看護 改訂第3版、2013、42-43

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

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

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

中村 元信 (NAKAMURA Motonobu)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：30303837

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし