

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390263

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析及び細胞工学的手法を用いた不明発熱症候群の原因解明

研究課題名(英文) Exploration of the responsible gene and the pathophysiology for unidentified fever syndromes by whole genome analysis and cell-based engineering

研究代表者

西小森 隆太(Nishikomori, Ryuta)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70359800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーによる自己炎症疾患の遺伝子検査を確立、体細胞モザイク診断の系も構築し、Muckle-Wells症候群でNLRP3体細胞モザイクが原因となることを示した。原因不明の炎症性疾患患者に全エクソーム解析を行い、FLNA異常症、IFIH1異常症、NLRC4異常症を同定した。CINCA症候群の骨幹端過形成の機序解析のため、iPS細胞から軟骨分化系を確立した。NLRP3変異陽性iPS細胞由来軟骨はより大きく、SOX9活性化、細胞外基質の産生増加が関与することを示した。また同表現型にインフラマソームは関与せず、NLRP3変異応答性にcAMP/PKA/CREB経路が関与する事を発見した。

研究成果の概要(英文)：We implemented Massive Parallel Sequencing technology to reduce the costs for diagnostic sequencing and to detect somatic mosaicism. We also demonstrated that NLRP3 mosaicism causes Muckle-Wells syndrome in a collaborative study with the Spanish group. To identify the responsible genes for the unidentified but suspected cases with inflammation, trio-based whole exome sequencing was performed. We identified three genes responsible for the inflammatory diseases, FLNA, IFIH1 and NLRC4. For the delineation of pathophysiology of epiphyseal overgrowth in CINCA syndrome, we utilized iPS technology by differentiating patient-derived iPS cells into chondrocytes. The chondrocyte tissues obtained from the mutated iPS cells showed the larger sizes, increased SOX9 expression, and increased production of extracellular matrix. NLRP3 inflammasome is not contributing to the larger chondrocyte tissues. cAMP/PKA/CREB pathway is important for the SOX9 upregulation by NLRP3 mutants.

研究分野：自然免疫系メンデル遺伝疾患特に自己炎症性症候群

キーワード：自己炎症性症候群 炎症 メンデル遺伝疾患 全エクソーム解析 自然免疫 NLRP3 軟骨 不明熱

1. 研究開始当初の背景

感染症、悪性新生物、リウマチ疾患の診断の向上により、不明熱と一時診断された症例の最終診断に上記3疾患が占める割合は減少し、体質性に発熱を繰り返す患者の占める割合が増加している。1990年代後半より原因遺伝子が次々発見された自己炎症疾患は、体質性に発熱を繰り返す周期性発熱疾患の主要原因であり、患者QOLを大きく損なう疾患である為、解決されるべき重要な疾患群である。本邦においてもこの10年間でその概念が確立され、これまで原因不明の周期性発熱疾患とされていた症例が、責任遺伝子の変異同定により同疾患として診断され、適切な診断とそれに基づく治療が行われるようになってきた。

しかし本邦における不明熱・周期性発熱において、遺伝子異常が同定される症例は約10%程度であり、90%が原因不明のままである。特に臨床的にCINCA症候群/NOMID(CINCA/NOMID)と診断されるが遺伝子変異のみつからない症例は*NLRP3*変異陰性CINCA/NOMIDと言われており、CINCA/NOMIDの約40-50%を占める。さらにTRAPSの臨床症状を有するが、原因遺伝子*TNFRSF1A*異常が同定されない症例はTRAPS様症候群として診断されており、その原因同定、原因に基づく治療法の開発が期待されている。さらに、各自己炎症疾患の特徴的な臨床症状が如何に形成されているか、さらにその有効な治療の開発等まだ解決されるべき問題が山積みである。

我々は2005年、*NLRP3*遺伝子の体細胞モザイクの症例を世界で初めて発見し、約20%の低頻度*NLRP3*遺伝子体細胞モザイクでも疾患として発症することを報告し、体細胞モザイクがCINCA/NOMIDで重要な病態機序である事を証明した。また自己炎症疾患においては、マウスとヒトにおいて表現型に種差が認められるため、動物モデルに加えヒト細胞を用いた解析系の樹立が望まれていた。CINCA/NOMID体細胞モザイク症例より変異陰性iPS細胞・変異陽性iPS細胞を樹立し、iPS細胞からマクロファージ・好中球分化法を確立し、自然免疫系病態解析系の樹立に成功した。

2. 研究の目的

上記背景をもとに、本研究では、1) 既知自己炎症疾患の網羅的遺伝子解析系(モザイク含む)を確立、2) 不明熱・周期性発熱症例の新規遺伝子異常同定、3) 患者末梢血・疾患特異的iPS細胞による不明発熱症候群の病態解析・治療基盤の形成、4) 各自己炎症疾患の特徴的な症状の発症機序及びその治療法の開発、を試みる。

3. 研究の方法

1) 不明発熱症例での既知自己炎症疾患遺伝子解析

不明熱・周期性発熱症例が既知自己炎症疾患である可能性の検討を大量遺伝子解析が可能である次世代シーケンサーを用いて、既知自己炎症疾患遺伝子全てにおいて検討する。

2) 不明発熱症例における体細胞モザイクの検討(NLRP3体細胞モザイク含む)

CINCA/NOMIDの約30%が*NLRP3*体細胞モザイク遺伝子異常と判明したが、通常の遺伝子検査では診断できない低頻度モザイクで発症する症例が大部分である。大量遺伝子解析が可能である次世代シーケンサーを用いて他の疾患も含めて診断法を確立する。

3) 不明発熱症例における網羅的遺伝子解析

2)にて異常が見つからなかった症例では、全エクソーム解析にて遺伝子変異を網羅的に解析する。

4) CINCA/NOMID iPS細胞から軟骨細胞への分化誘導・病態解明

抗IL-1療法が無効で、疾患に特徴的である長管骨骨幹端の軟骨肥大の病態解明のため、倫理的に入手が困難である軟骨細胞を患者iPS細胞より作成、特徴的な骨病変の機序を検討する。

5) CINCA/NOMID低頻度体細胞モザイク発症機序解明

*NLRP3*低頻度体細胞モザイクで*NLRP3*ヘテロ変異と同様の全身性炎症を来す機序解明のため、単細胞培養系でのサイトカイン分泌と遺伝子変異解析を組み合わせ、*NLRP3*体細胞モザイク症例患者末梢血の変異陰性・陽性1単球細胞のサイトカイン産生能の検討を行う。

4. 研究成果

1) 不明発熱症例での既知自己炎症疾患遺伝子解析

不明発熱症例での既知自己炎症疾患遺伝子解析法として、1チューブで100アンブリコンをマルチプレックスで増幅後、次世代シーケンサーを用いた解析法を確立した。重複した解析数が十分あり、現在モザイクまで検討できるパイプラインを構築中である。

2) 不明発熱症例における体細胞モザイクの検討(NLRP3体細胞モザイク含む)

Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS)の一つ、Muckle-Wells症候群(MWS)において、変異が同定されない症例があり、*NLRP3*体細胞モザイクの関与をスペインとの共同研究で行った(Nakagawa, Ann Rheum Dis, 2015)。臨床的にMWSを疑った56症例において、*NLRP3*体細胞モザイクの有無を次世代シーケンサーを用いて検討したところ、6変異7症例の*NLRP3*体細胞モ

ザイク MWS を同定した。以上の結果は CAPS 最重症 CINCA/NOMID のみならず、中等症の MWS においても NLRP3 体細胞モザイクが存在し、診断時に注意を要することを示した。

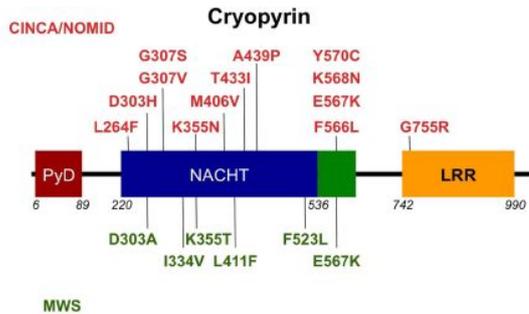


図 1. MWS における NLRP3 体細胞モザイクで同定された変異(下段)。上段に CINCA/NOMID に同定された変異を示す。

TNFRSF1A 遺伝子の機能獲得型変異で発症する TRAPS にて、臨床的に TRAPS を疑うも Sanger 法遺伝子解析にて変異を同定できない 71 症例に対して、次世代シーケンサーにて TNFRSF1A 体細胞モザイクを検討した。結果、TNFRSF1A 体細胞モザイクは同定できず、本邦の TRAPS 疑いコホートにおいては、体細胞モザイクは存在しなかった。

3) 不明発熱症例における網羅的遺伝子解析次世代シーケンサーによる自己炎症関連遺伝子パネルにて異常を同定できなかった症例では、患者、患者両親のトリオ解析による全エクソーム解析を行った。これまで、変異を同定、機能解析により原因遺伝子が同定できたと考えられるのは 3 家系である。

腸管炎症・慢性偽性腸閉塞症、心臓弁膜症、鼠径ヘルニア、血小板減少症を主症状とする兄弟例の解析より、*FLNA* 遺伝子の新規ミスセンス変異を同定した。

脳内石灰化、発達遅滞等の神経症状、髄液 IFN- γ 産生亢進、を認める臨床的に Aicardi-Goutieres 症候群と考えられる症例で、既知変異を認めなかった 3 症例において、*IFIH1* 遺伝子のミスセンス変異を認めた。

CINCA/NOMID の体細胞モザイクを含む *NLRP3* 変異陰性症例から新規 *NLR4* ヘテロ変異を同定した。

以上 3 家系にて新規原因遺伝子を同定した。Aicardi-Goutieres 症候群については、論文として報告 (Oda, Am J Hum Genet, 2015) *FLNA* 遺伝子、*NLR4* については現在機能解析を行い、投稿予定である。

4) CINCA/NOMID iPS 細胞から軟骨細胞への分化誘導・病態解明

2 名の *NLRP3* モザイク CINCA/NOMID (Y570C, G307S) より *NLRP3* 変異陽性 iPS 細胞 (変異株) および変異陰性 iPS 細胞 (正常株) を樹立した。各細胞 3 クローンずつ樹立し実験に使用した。

それぞれの iPS 細胞から神経堤細胞様細胞経路で軟骨前駆細胞を作成し、軟骨分化を行ったところ、2 次元培養、3 次元培養とも変異株由来軟骨は正常株由来軟骨より大きかった (図 2)。

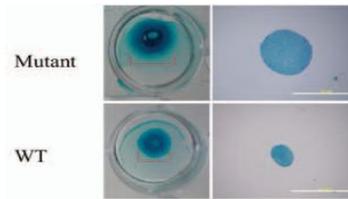


図 2. 変異株由来軟骨 (Mutant) は正常株由来軟骨 (WT) より大きい。左パネルは 2 次元培養、右パネルは 3 次元培養。アルシアンブルー染色。

この軟骨の発現解析を行ったところ、変異株由来軟骨では、軟骨分化制御因子である *SOX9*、軟骨特異的のマーカー *COL2A1*、*ACAN*、*COMP*、*COL10A1*、*IHH*、*MMP13*、*VEGFA* の発現が正常株由来よりより強く発現していた (図 3)。また軟骨組織が大きくなる原因を検討したところ、細胞外マトリックスの産生増大が関与することが判明した。

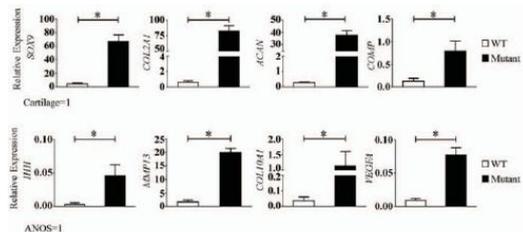


図 3. 軟骨特異的マーカーの発現解析変異株由来軟骨でより強い発現を認める。

軟骨内骨化を誘導するため、免疫不全症マウス NOG に iPS 細胞由来軟骨組織を異種移植した (図 4)。正常株由来軟骨においては骨成分の周囲に秩序だった軟骨成分を認めるが、変異株由来軟骨においては骨成分と軟骨成分が入り混った異常な組織構造を認めた。軟骨内骨化組織がより大きい事と併せ、CINCA/NOMID 患者関節症における軟骨内骨化異常を部分的に再現できた。

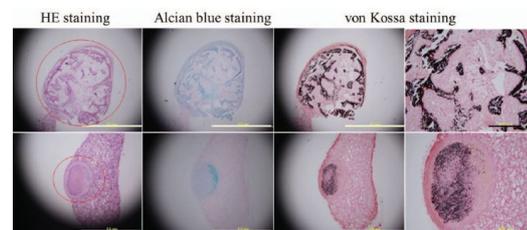


図 4. iPS 細胞由来軟骨組織の NOG マウス異種移植による骨化組織の検討 上段は変異株由来、下段は正常株由来。

変異株由来軟骨が増大する機序として NLRP3 インフラマソームが関与するか検討するため、NLRP3 インフラマソーム構成蛋白の発現をウェスタンブロッティングにて検討したところ、ASC、CASPASE-1 の発現を認めなかった。また CASPASE-1 阻害剤、IL-1 を阻害する IL-1 受容体拮抗薬を軟骨分化系に投与したところ、いずれも変異株における軟骨組織増大を阻害できなかった。以上の結果は、NLRP3 インフラマソームは変異株における軟骨増大には関与していないことを示唆した。

軟骨前駆細胞における *SOX9*、*NLRP3* 遺伝子の発現を継時的に解析したところ、*SOX9* と *NLRP3* の発現上昇はほぼ同時期に起こる事がわかった。即ち、*SOX9* 発現上昇に *NLRP3* 発現が関与する事を示唆した。

変異 *NLRP3* と *SOX9* 発現増強の関係をさらに解析するため、正常株及び変異株由来軟骨前駆細胞を用いて、ヒト *SOX9* プロモーターのレポーターアッセイを行った (図 5)。5' UTR 領域約 1 kb を用い、転写因子結合部位に変異を導入し解析したところ、CREB/ATF 結合サイトが最も強い *NLRP3* 変異依存性を示した。*SOX9* の発現は、CREB/ATF の上流シグナルであるアデニル酸シクラーゼ酵素活性アゴニストで増強、インヒビターで減少した。また変異株由来軟骨前駆細胞では正常株に比べ、cAMP の上昇、リン酸化 CREB の亢進を認め、*NLRP3* 変異依存性に cAMP/PKA/CREB 系の増強が観察された (図 6)。

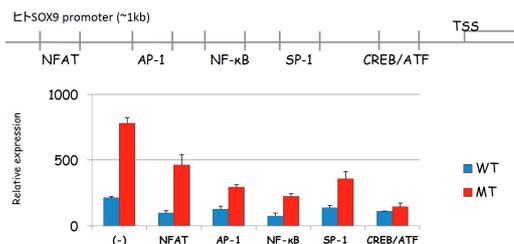


図 5. ヒト *SOX9* プロモーターによるレポーターアッセイ。各転写因子結合部位変異プラスミドを正常株 (WT) 及び変異株 (MT) に強制発現し、プロモーター活性を測定した。

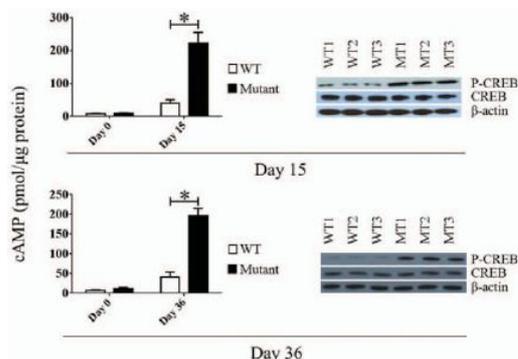


図 6. iPS 細胞 (Day0) 及び軟骨前駆細胞

(Day15, 36)での細胞内 cAMP 濃度及び p-CREB の発現。上段は Day15, 下段は Day36。

5) CINCA/NOMID 低頻度体細胞モザイク発症機序解明

CINCA/NOMID, MWS で観察された低頻度体細胞モザイクで発症する機序を解明するため、患者末梢血単球を用いて、1細胞あたりの IL-1 産生量、IL-1 産生細胞の割合、変異の有無による違い、を検討した。1細胞解析系の構築として、1細胞1ウェルで培養し LPS 刺激した後、分泌された IL-1 を EIA 法で測定する系を確立した。現在、体細胞モザイク患者、ヘテロ患者、正常コントロールでの検討を行っている。1細胞での DNA タイピングを行い、変異単球か正常単球か検討したが、各ウェル間のコンタミが問題となり、現在検討中である。

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](6件)

- Nakagawa K, Gonzalez-Roca E, Souto A, Kawai T, Umebayashi H, Campistol JM, Canellas J, Takei S, Kobayashi N, Callejas-Rubio JL, Ortego-Centeno N, Ruiz-Ortiz E, Rius F, Anton J, Iglesias E, Jimenez-Trevino S, Vargas C, Fernandez-Martin J, Calvo I, Hernandez-Rodriguez J, Mendez M, Dordal MT, Basagana M, Bujan S, Yashiro M, Kubota T, Koike R, Akuta N, Shimoyama K, Iwata N, Saito MK, Ohara O, Kambe N, Yasumi T, Izawa K, Kawai T, Heike T, Yague J, Nishikomori R, Arostegui JI. Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Annals of the rheumatic diseases*. 査読有 2015;74(3):603-10. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204361
- Yokoyama K, Ikeya M, Umeda K, Oda H, Nodomi S, Nasu A, Matsumoto Y, Izawa K, Horigome K, Kusaka T, Tanaka T, Saito MK, Yasumi T, Nishikomori R, Ohara O, Nakayama N, Nakahata T, Heike T, Toguchida J. Enhanced chondrogenesis of induced pluripotent stem cells from patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase 1-independent cAMP/protein kinase A/CREB pathway. 査読有 *Arthritis & rheumatology*. 2015;67(1):302-14. DOI: 10.1002/art.38912
- Shirasaki Y, Yamagishi M, Suzuki N, Izawa K, Nakahara A, Mizuno J, Shoji S, Heike T, Harada Y, Nishikomori R, Ohara O. Real-time single-cell imaging of protein

secretion. Scientific reports. 査読有
2014;4:4736. DOI: 10.1038/srep04736

- Oda H, Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, Hijikata A, Nishikomori R, Funatsuka M, Ohshima Y, Sugawara Y, Yasumi T, Kato H, Shirai T, Ohara O, Fujita T, Heike T. Aicardi-Goutieres syndrome is caused by IFIH1 mutations. American journal of human genetics. 査読有 2014;95(1):121-5. DOI: 10.1016/j.ajhg.2014.06.007
 - Imagawa T, Nishikomori R, Takada H, Takeshita S, Patel N, Kim D, Lheritier K, Heike T, Hara T, Yokota S. Safety and efficacy of canakinumab in Japanese patients with phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndrome as established in the first open-label, phase-3 pivotal study (24-week results). Clinical and experimental rheumatology. 査読有 2013;31(2):302-9. DOI: 10.1182/blood-2012-03-417881
 - Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuser JE, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito MK. Induced pluripotent stem cells for CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. 査読有 Blood. 2012;120(6):1299-308. DOI: 10.1182/blood-2012-03-417881
- [学会発表](計6件)
- 中川権史、西小森隆太、河合朋樹、八角高裕、平家俊男 次世代シーケンサーを用いた、“変異陰性 TRAPS”における体細胞モザイクの検索 第117回日本小児科学会学術集会 2014.4.11-13
 - 横山宏司、西小森隆太、納富誠司郎、田中孝之、斎藤潤、梅田雄嗣、池谷真、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男 罹患患者由来iPS細胞を用いたCINCA症候群における関節病態の解明 第117回日本小児科学会学術集会 2014.4.11-13
 - 小田紘嗣、河合朋樹、中川権史、日衛嶋栄太郎、井澤和司、西小森隆太、小原收、沼部博直、平家俊男 エクソンスキッピングに伴い非典型的な表現型を呈したFilaminA異常症の兄弟例 第117回日本小児科学会学術集会 2014.4.11-13
 - Oda H, Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, Hijikata A, Nishikomori R, Funatsuka M, Ohshima Y, Sugawara Y, Yasumi T, Kato H, Shirai T, Ohara O, Fujita T, Heike T. Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations. American Society of Human Genetics, 2014.10.09
 - 中川権史、西小森隆太、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、河合利尚、梅林宏明、武井

修治、小林法元、小原收、Eva Gozalez-Roca、Juan I. Arostegui、平家俊男 Muckle-Wells症候群におけるNLRP3体細胞モザイク変異の検討 第23回日本小児リウマチ学会総会 2013.10.11-13

- 西小森隆太、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、平家俊男 Cryopyrin-associated periodic syndromeの治療 本邦におけるcanakinumab臨床試験及びアナキンラ疫学調査について 第40回日本臨床免疫学会 2012.9.28

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称:軟骨過形成疾患の予防および治療剤
ならびにそのスクリーニング方法

発明者:戸口田淳也、西小森隆太、横山宏司、池谷真、平家俊男

権利者:国立大学法人京都大学

種類:製剤

番号:特願2014-227500

出願年月日:2014年11月7日

国内外の別:日本

○取得状況(計0件)

[その他] なし

6.研究組織

(1)研究代表者

西小森 隆太(Nishikomori Ryuta)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号:70359800

(2)研究分担者

平家 俊男(Heike Toshio)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号:90190173

(3)研究分担者

八角 高裕(Yasumi Takahiro)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号:00511891

(4)連携研究者

小原 收(Ohara Osamu)

かずさDNA研究所・ヒトゲノム研究部・部長

研究者番号:20370926

(5)連携研究者

斎藤 潤(Saito Megumu)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号:90535486

(6)連携研究者

戸口田 淳也(Toguchida Junya)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号:40273502