

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791170

研究課題名(和文) 遺伝性プロテアソーム不全症である中條-西村症候群の病態解明と酵素補充療法の試み

研究課題名(英文) Elucidation of the pathophysiology of the Nakajo-Nishimura syndrome which is hereditary proteasome disability and trial of the enzyme replacement therapy

研究代表者

国本 佳代 (KUNIMOTO, KAYO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10438278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：中條-西村症候群は乳児期に凍瘡様紅斑で発症し、次第に間欠的な発熱と浸潤を伴う皮疹を繰り返し、限局性脂肪萎縮を呈する疾患である。免疫プロテアソーム遺伝子であるPSMB8 遺伝子のホモ変異が原因遺伝子として同定された。この研究では、MHCクラス I、II に異常がないか、患者血球より作成した不死化B細胞とPBMCを用いて検討を行った。患者の不死化B細胞の細胞表面のHLA-DRの発現は見られなかったが、細胞内での発現は確認できた。HLA-DRの構造異常を想定し、ヒッチハイク変異を検討するため、遺伝子検索をおこなったが、有意な変異は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：Nakajo-Nishimura syndrome is a autosomal recessively-inherited disorder that onset s in infancy with pernio-like rashes and gradually develops into partial lipodystrophy. A homozygous mutation of the PSMB8 immunoproteasome subunit gene has been identified to be responsible for NNS. Abolished MHC class I expression and CD8 T cell proliferation in PSMB8-knockout mice have been reported. In this study, expression and functional abnormality of MHC (class I and II) has been examined using immortalized B cells and peripheral blood mononuclear cells obtained from NNS patients. Expression of HLA-DR was defective in NNS-imB cells, but HLA-DR expression was observed intracellularly in NNS-imB/PBMC. Presence of some structural abnormality is suspected in HLA-DR. There is a possibility that a hitchhiking mutation in the HLA-DR gene causes a structural change, because the PSMB8 gene is located in the MHC class II region. Hitchhiking mutation in the HLA-DR gene was not detected in gene analysis.

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：中條-西村症候群 PSMB8 プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

中條-西村症候群 (NNS: ORPHA2615, MIM#256040) は、1939年に東北帝国大学皮膚科泌尿器科の中條、次いで1950年に和歌山県立医科大学皮膚科泌尿器科の西村らによって、「凍瘡ヲ合併セル続発性肥大性骨骨膜症」として報告されて以後、東北と関西を中心に本邦から20例を超える報告がある遺伝性稀少難治性疾患である。当初から指摘された凍瘡様皮疹、長く節くれ立った指、進行性の限局性脂肪筋肉萎縮に加え、幼少児期から周期熱を来す例を多数認め、反復性炎症と進行性消耗を特徴とする新しい自己炎症疾患と位置づけられる。平成21年度より厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業の研究奨励分野の対象疾患の一つに採択され(班長: 和歌山県立医科大学皮膚科 古川福実教授) 全国疫学調査とともに、長崎大学・久留米大学との共同研究による原因遺伝子の解明が進められ、ついに本疾患が免疫プロテアソームサブユニットをコードする PSMB8 遺伝子変異によってユビキチン蓄積を来す新しいカテゴリーの自己炎症疾患であることが明らかとなった (Arima K et al, PNAS 2011)。また、秋田と新潟の報告例を独自に解析した徳島大学のグループからも同じ変異が同定され、ほぼ同時期に報告された (Kitamura et al, JCI2011)。世界的にも、2010年になって欧米や中東から JMP 症候群、CANDLE 症候群という類症が報告され、さらに PSMB8 遺伝子の異なる変異が同定され、報告が相次いでいる (Agarwal et al, AJHG2010; Ramot et al, A&R in press)。すなわち中條-西村症候群は、世界的に分布する遺伝性プロテアソーム機能不全症の中で、日本人特異的 PSMB8 変異による固有の病態として捉えなおすことができる。和歌山県立医科大学皮膚科では本邦で現在認められる症例のほとんどをフォローしており、患者へのフロントラインとして、患者試料を用いた基礎的、臨床的検討が求められている。申請者も平成23年度から研究協力者として厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服事業に参画し、患者資料・試料の提供などを行ってきた。一方、長崎大学で作成された変異 PSMB8 遺伝子のノックインマウスの初期検討が終わり、当大学への導入の準備を進めている。申請者は、現在生存する唯一の幼児症例の担当医であり、常に患児とその母親と対峙する中で、疾患のメカニズムを解明し、その進行を抑えるために有効で安全な治療法を早急に見出す必要に迫られている。申請者が担当する和歌山市出身の幼児患者は、生後2ヶ月時に膿か疹様の発疹と発熱で発症し、軽快後もしばしば明らかな誘因なく発作を繰り返したが、膠原病や血液疾患は否定的で、両親の血族婚もないため遺伝性疾患

が疑われる事もなく、長らく診断がつかなかった。5歳になって、特徴的な頬のやせた顔貌と節くれだった指が明らかになって初めて中條-西村症候群が疑われ、頭部CTでの基底核石灰化と遺伝子解析での PSMB8 ホモ変異が証明されてようやく診断が確定した。現在はステロイド内服を間欠的に増量することで発作に対応するが、減量すると発作が再燃するため、中止できずにいる (Kunimoto et al, paper in preparation)。現在のところステロイド内服による明らかな副作用もなく、発作時以外は問題なく元気に生活しているが、脂肪筋肉萎縮に対しては無効で、有効な治療法もないために着実に進行しつつある。今後ステロイド長期内服による副作用が顕在化することも予想され、病因・病態に基づいた根本的な治療の開発が早急に求められている。

2. 研究の目的

中條-西村症候群は、反復性炎症と進行性消耗を特徴とする、本邦特有の遺伝性稀少難治性疾患である。申請者は、本疾患患者の中で生存する唯一の幼児患者の主治医であり、早期治療の必要を常に感じているが、有効な治療法はまだない。最近、責任遺伝子変異が同定され、本疾患がプロテアソーム機能不全によるユビキチン蓄積を伴う新しいカテゴリーの自己炎症疾患であることが明らかとなったことを受け、本研究では、患者検体を用いた病態解明を進め、有効な治療薬を開発すること、特に酵素補充療法の可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

平成24年度

1. 中條-西村症候群患者検体でのユビキチン蓄積の確認

末梢血については、赤血球の混入を避けるために Lymphoprep を2回行って純度を上げた単核球を用い、Lysis buffer に解かして western blot にて、またサイトスピンでスライドグラスに貼付けたものを免疫染色にて、あるいは細胞内蛍光染色したものを FACS にて、ユビキチンの蓄積を確認した。サイトスピンや FACS の場合は、細胞表面マーカーで二重染色することによって、ユビキチンが蓄積する細胞の種類、性質を詳細に解析した。またサイトスピン標本を細胞内小器官のマーカーで二重染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察することによって、ユビキチンが蓄積する小器官を明らかにした。

2. 中條-西村症候群患者検体での MHC class I, II、インバリエント鎖の発現についての検討

患者末梢血単核球を用いて、MHC class I, II、インバリエント鎖の発現について、細胞内・外蛍光染色したものを FACS で、サイトスピンでスライドグラスに貼付けたものを蛍光染色し、さらに種々の細胞内小器官マーカーや CLIP の抗体と二重染色し、共焦点レ

ーザー顕微鏡にて各分子の局在を観察した。また、各種細胞内小器官の tracker を添加した培養液にて数時間から 2 4 時間培養して MHC の発現を誘導した単核球も、同様に染色して観察した。

患者の両親から作成した不死化 B 細胞を MG132 で処理し、HLA-DR の発現に変化があるか FACS で確認した。

HLA-DR 遺伝子にヒッチハイク変異があるかどうか、遺伝子解析を行った。

平成 25 年度は、京都大学 iPS 細胞研究所で進行している患者由来 iPS 細胞の解析に平行して、患者末梢血単球および不死化 B 細胞を用いて、様々な刺激に対するサイトカイン産生を ELISA で測定し、iPS 細胞由来細胞との比較を行った。

4 . 研究成果

平成24年度：患者末梢血から得られたPBMCのサイトスピン標本を免疫染色し、ユビキチンが細胞内に蓄積していることを確認した。MHC class Ⅱ の発現については、MHC class Ⅱ の発現は正常であったが、class Ⅱ の細胞外発現はみられなかった。患者の不死化B細胞でも同様の結果であった。PBMCにおいてHLA-DRの細胞内染色を行い、サイトスピン標本で観察すると、細胞内では発現がみられた。細胞表面へのMHC class Ⅱ の輸送障害がclass Ⅱ の発現に影響している可能性を考え、サイトスピン標本でearly endosome、phagolysosome、Golgi体を免疫染色した。HLA-DRは主に細胞膜近傍に観察され、いずれの器官にも蓄積はみられなかった。細胞内外を染色する数種類の異なるepitopeに対する抗体を用いて染色すると、抗体によりHLA-DRの染色に差がみられた。以上の結果より、特異抗体による認識の違いからHLA-DRの構造異常を想定したが、PSMB8変異に関連する有意なヒッチハイク変異はみられなかった。特異抗体による認識も安定せず、細胞表面発現が不安定という結論に至った。患者両親から作成した不死化B細胞をMG132で処理し、HLA-DRの発現の変化を確認したが、発現の低下はみられなかった。

平成25年度：IFNγ刺激によるIP-10産生は末梢血単球とiPS由来単球で共通に健常者細胞に比べ有意に高値を示したが、不死化B細胞では一定しなかった。また不死化B細胞のプロテアソーム活性についてキットを用いて測定した結果、患者由来細胞では健常者あるいはヘテロ変異を持つ両親由来細胞に比べてキモトリプシン様活性の低下を認めた。以上の結果から、末梢血単球のIFNγ刺激によるIP-10産生と不死化B細胞におけるキモトリプシン様活性の低下が、中條-西村症候群の病態を反映する指標になると考えられた。今後、これらの実験系を指標に、正常プロテアソームの補充や異常beta5iサブユニット

の発現抑制による病態改善効果の検討を進めたい。また、中條-西村症候群の特徴である脂肪萎縮の病態を反映すると想定される血清中のアディポサイトカインであるレプチンとアディポネクチンについて、抗IL-6受容体抗体製剤投与前後での活性を測定し、その変化を検討中である。

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](計2件)

1. Kanazawa N, Kunimoto K, Ishii N, Inamo Y, Furukawa F: Is CANDLER the best nomenclature? Br J Dermatol : in press ,2014 査読有
DOI:: 10.1111/bjd.12962.

2. Kunimoto K, Kimura A, Uede K, Aoyagi N, Furukawa F, Kanazawa K: A new infant case of Nakajo-Nishimura syndrome with a genetic mutation in the immunoproteasome subunit, Dermatology 227: 26-30, 2013 査読有
DOI:10.1159/000351323

[学会発表](計7件)

1. Kunimoto K, Furukawa F, Ida H, Kanazawa N: Genetic modification of HLA-DR linked with the PSMB8 mutation in Nakajo-Nishimura syndrome, International Investigative Dermatology 2013, May 8-11, 2013, Edinburgh, Scotland

2. 稲葉 豊、国本佳代、金澤伸雄、古川福実：PSMB8 遺伝子変異による中條 西村症候群における自己抗体の出現．第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、2013.11.29-12.1. 金沢

3. 金澤伸雄、国本佳代、古川福実、井田弘明：PSMB8 変異に伴う遺伝性自己炎症疾患である中條-西村症候群における HLA-DR の発現異常、第 23 回日本樹状細胞研究会、2013.5.17、京都

4. 金澤伸雄、国本佳代、古川福実：抗 IL-6 受容体抗体を投与した中條 - 西村症候群の 1 例、大塚藤男教授退任記念 第 81 回日本皮膚科学会茨城地方会、2013.3.9-10、茨城

5. Kunimoto K, Furukawa F, Ida H, Kanazawa N: Modified HLA-DR expression on antigen-presenting cells harboring the PSMB8 mutation responsible for Nakajo-Nishimura syndrome, The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Dec.7-9, 2012, Okinawa、

Japan

6. Kanazawa N, Kunimoto K, Arima K, Ida H, Yoshiura K-I, Furukawa F: Nakajo-Nishimura syndrome, an autoinflammatory disorder with partial lipodystrophy, is caused by a mutation of the PSMB8 gene encoding an immunoproteasome subunit. 2nd Eastern Asia Dermatology Congress (EADC), June 13-15, 2012, Beijing, China

7. 国本佳代、金澤伸雄、古川福実：中條-西村症候群：和歌山発・プロテアソーム機能不全による新しい遺伝性自己炎症疾患、第 80 回和歌山医学会総会、2012.7.8、和歌山

6 . 研究組織

(1)研究代表者

国本 佳代 (KUNIMOTO KAYO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10438278