

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890096

研究課題名(和文) NLRP3モザイクによる疾患発症、炎症波及機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of NLRP3 mosaicism

研究代表者

井澤 和司 (Izawa, Kazushi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・医員

研究者番号：90634931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：自己炎症性疾患であるCINCA症候群はNLRP3遺伝子の機能獲得型変異によって発症する。遺伝形式は常染色体優性遺伝であるが、約半数の患者にヘテロNLRP3変異を認めない。ヘテロ変異を認めない患者の7割にNLRP3モザイク変異を認め、疾患発症の原因と考えられる。しかし低頻度モザイクによる疾患発症機序の詳細は未だ不明である。そこで、今回われわれは、疾患機序解明のため、単細胞培養系を用いたサイトカイン測定法を確立した。その系において、CINCA症候群における主要なサイトカインであるIL-1 β の放出は、細胞膜の整合性が失われた直後におこることが確認された。

研究成果の概要(英文)：CINCA syndrome is an autoinflammatory syndrome caused by gain-of-function NLRP3 mutations. The inheritance of CINCA syndrome is sporadic and autosomal dominant. It has been known that conventional genetic analyses fail to detect disease-causing mutations in approximately 50% of patients. We reported 70% of mutation negative patients have somatic mosaicism of NLRP3. However, the mechanism of inflammation by somatic mosaicism of NLRP3 is not elucidated. To elucidate the mechanisms of NLRP3 mosaicism, we developed real-time single-cell imaging of IL-1 β secretion. We found that most of the IL-1 β secreted cells lost their membrane integrity. Also, we found IL-1 β secretion followed to the loss of cell membrane integrity with some lag time.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、小児科学

キーワード：自己炎症性疾患 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

自己炎症性疾患である CINCA 症候群は発熱、蕁麻疹様発疹、慢性髄膜炎、感音性難聴などの症状を呈する。*NLRP3* 遺伝子の機能獲得型変異によって発症する。遺伝形式は常染色体優性遺伝であるが、*de novo* の変異も多い。約半数の患者にヘテロ *NLRP3* 変異を認めないが、その 7 割に *NLRP3* モザイク変異を認めることを国際共同施設研究において示した。また、次世代シーケンサーを用いた低頻度体細胞モザイク検出法を確立した。しかしながら低頻度体細胞モザイクによる疾患発症機序の詳細は未だ不明である。

2. 研究の目的

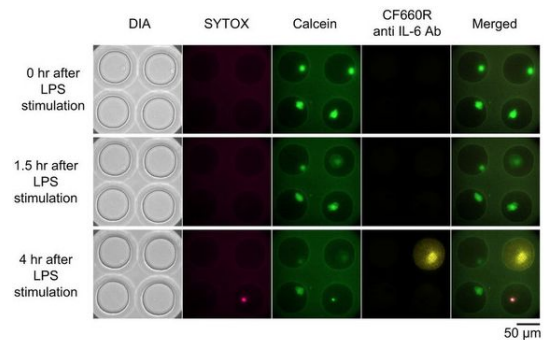
低頻度体細胞モザイクによる疾患発症機序を解明するため、単細胞培養系を用いたサイトカイン測定、遺伝子解析方法を確立する。

3. 研究の方法

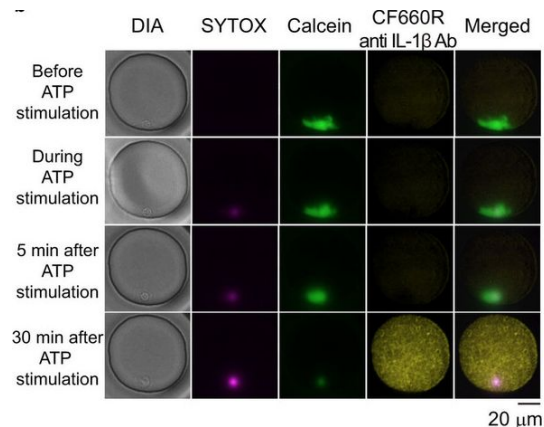
まずは健常者健常者の血液から MACS を用いて、CD14 陽性単球細胞を分離する。LPS, ATP 刺激を行い、そこから放出される IL-1、IL-6 をリアルタイムに測定する。また、カルセインの消失、SYTOX の流入を同時に評価することにより、細胞膜の整合性の消失と IL-1、IL-6 放出との時間的関係を明らかにする。また *NLRP3* ヘテロ患者、*NLRP3* 体細胞モザイク患者末梢血より MACS を用いて、CD14 陽性単球細胞を分離する。LPS, ATP 刺激を行い、単細胞から分泌される IL-1 を測定する。次に、遺伝子解析により同定した *NLRP3* 変異陽性・陰性単球からの単細胞におけるサイトカイン測定を用いて、変異陰性単球が生体内ですでに IL-1 などの影響によりサイトカイン産生能が亢進状態にあるかを検討する。

4. 研究成果

健常者から血液を採取し、MACS により分離した CD14 陽性単球を LPS, ATP にて刺激した。その結果、単細胞培養システムにおいて、単細胞から分泌される IL-1、IL-6 をリアルタイムに測定することが可能であった。LPS 刺激により IL-6 が放出されるが、IL-6 を放出した細胞の 91% はカルセイン (+)/SYTOX (-) であり、細胞膜の整合性は保たれており、生細胞であると考えられた。



一方、単球は LPS, ATP 刺激により細胞死を起こすことが知られていたがその詳細は不明であった。LPS, ATP 刺激により、カルセインの消失と SYTOX の流入が起こり、つづいて、IL-1 が検出された。すなわち IL-1 の放出は細胞膜の整合性が失われた後におこることがこの系によって、明らかにされた。



また、健常者、*NLRP3* ヘテロ患者、*NLRP3* モザイク患者の単球における IL-1 の測定、遺伝子解析も現在進行中である。

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 5件)

1: 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*. 2014; 4: 4736.

査読あり

2: Abe J, Nakamura K, Nishikomori R, Kato M, Mitsuiki N, Izawa K, Awaya T, Kawai T, Yasumi T, Toyoshima I, Hasegawa K, Ohshima Y, Hiragi T, Sasahara Y, Suzuki Y, Kikuchi M, Osaka H, Ohya T, Ninomiya S, Fujikawa S, Akasaka M, Iwata N, Kawakita A, Funatsuka M, Shintaku H, Ohara O, Ichinose H, Heike T. A nationwide survey of Aicardi-Goutieres syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study. *Rheumatology* in press 査読あり

3: Nakagawa K, Gonzalez-Roca E, Souto A, Kawai T, Umebayashi H, Campistol JM, Cañellas J, Takei S, Kobayashi N, Callejas-Rubio JL, Ortego-Centeno N, Ruiz-Ortiz E, Rius F, Anton J, Iglesias E, Jimenez-Treviño S, Vargas C, Fernandez-Martin J, Calvo I, Hernández-Rodríguez J, Mendez M, Dordal MT, Basagaña 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, Yagüe J, Nishikomori

R, Aróstegui JI. Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis*. in press 査読あり

4: Yoshioka T, Nishikomori R, Hara J, Okada K, Hashii Y, Okafuji I, Nodomi S, Kawai T, Izawa K, Ohnishi H, Yasumi T, Nakahata T, Heike T. Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency caused by a novel NFKBIA mutation, p.Ser36Tyr, presents with mild ectodermal dysplasia and non-infectious systemic inflammation. *J Clin Immunol*. 2013; 33(7) 1165-74 査読あり

5: Abe J, Izawa K, Nishikomori R, Awaya T, Kawai T, Yasumi T, Hiragi N, Hiragi T, Ohshima Y, Heike T. Heterozygous TREX1 p.Asp18Asn mutation can cause variable neurological symptoms in a family with Aicardi-Goutieres syndrome/familial chilblain lupus. *Rheumatology (Oxford)* 2013 52(2) 406-408 査読あり

{学会発表}(計 4件)

1: Yoshitaka Shirasaki, Mai Yamagishi, Kazushi Izawa Hirotsugu Oda, Toshio Heike, Ryuta Nishikomori, Osamu Ohara gene expression and signaling in the immune system, 2014年4月22日~26日, New York

2: 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 小原収 Eva Gonzalez-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
41 回日本臨床免疫学会 2013 年 11 月 27 日
下関

3: 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 小原収 Eva Gonzalez-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 2013 年 10 月 12
日 埼玉

4: 中川権史 井澤和司 西小森隆太 河合朋
樹 八角高裕 津下充 小林法元
河島尚志 谷口敦夫 窪田哲朗 松林正 平家
俊男 CAPS に対するアナキンラ治療の有効性
及び安全性の後方視的検討 第 57 回日本リウ
マチ学会 2013 年 4 月 18 日 京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井澤和司 (Izawa Kazushi)

京都大学医学研究科、医員

研究者番号：90634931