

200936218A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

高IgD症候群に対する細胞分子生物学的手法を駆使した診療
基盤技術の開発（H21－難治－一般－163）

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 平家 俊男

平成22（2010）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

高IgD症候群に対する細胞分子生物学的手法を駆使した診療
基盤技術の開発（H21－難治－一般－163）

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 平家 俊男

平成22（2010）年 4月

目次

I. 総括研究報告

- 高IgD症候群に対する細胞分子生物学的手法を駆使した診療基盤技術の開発に関する研究 -- 1
平家 俊男
(資料) 高IgD症候群の実数把握のためのアンケート調査用紙 -- 9

II. 分担研究報告書

- 1 高IgD症候群由来ヒト疾患特異的iPS細胞作成に関する研究 -- 11
中畑 龍俊
- 2 高IgD症候群確定診断のためのメバロン酸キナーゼ活性測定系開発に関する研究 -- 15
西小森 隆太
- 3 高IgD症候群の遺伝子診断に関する研究 -- 21
小原 収
- 4 高IgD症候群の迅速鑑別診断に向けた尿中メバロン酸測定系の開発に関する研究 -- 27
重松 陽介
- 5 自己免疫疾患の疫学に関する研究 -- 31
横田 俊平
- 6 日本人高IgD症候群の臨床所見の把握に関する研究 -- 35
荒川 浩一
- 7 高IgD症候群の疫学に関する研究 -- 39
原 寿郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -- 43

IV. 研究成果の刊行物・別冊 -- 49

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

高 IgD 症候群に対する細胞分子生物学的手法を駆使した診療基盤技術の開発
関する研究

研究代表者：平家 俊男
（京都大学医学研究科発達小児科学教授）

研究要旨

高 IgD 症候群はメバロン酸キナーゼ（MK）をコードする MVK 遺伝子の機能喪失型変異により発症する自己炎症性疾患の 1 つである。その臨床症状は、炎症症状としての発熱、関節炎に留まるものから、精神発達遅延、小脳失調、発育不全、白内障等の重度障害を来すものまで存在する。世界で 100 例以上が報告されているのに対し、日本では 2008 年末時点で 2 症例が報告されているのみであった。本症の特異な臨床的所見は周期性発熱のみであり、臨床所見からの確定診断は困難である。また、名前の由来となっている高 IgD 血症も、その有無について、疑問の点が多い。また、確定診断に結びつく MK 活性測定、尿中メバロン酸測定は国内では確立されておらず、現時点での日本における高 IgD 症候群の診療体系は未整備である。

この状況下において、所謂高 IgD 症候群の日本における実態調査を行うとともに、MK 活性測定、尿中メバロン酸測定等を確立し、高 IgD 症候群の診断体系を確立した。

今後、これを基盤に、高 IgD 症候群疾患特異的 iPS 細胞作成、研究や臨床治療研究を行い、高 IgD 症候群に対する診療体系の確立を行う。

A. 研究目的

高 IgD 症候群は遷延する炎症性疾患で、発熱、関節炎に留まるものから、発育不全、精神発達遅延等の重度の障害に至るものまで、多様性を持つ疾患である。加えてメバロン酸キナーゼ (MK) 機能喪失という代謝性疾患の性格も併せ持つ。

我々は自己炎症症候群の診療において中心的な役割を果たし、日本における周期熱症例を全国より集積、遺伝子解析を中心に疾患研究を行ってきた。その結果本邦で発見された 5 例すべての高 IgD 症候群の診断に関わり、日本における問題点を発見した。1) 血清 IgD 値が高値ではない症例が多い、2) 特異度、感度の高い尿中メバロン酸測定の体制が整っていない、3) 診断確定に必須の酵素活性測定を海外の施設に依存している、以上より日本では、診断に至らずに適切に診療されていない症例が数多く存在することが危惧された。また治療展開においても、抗サイトカイン生物製剤に加えて、コレステロール代謝に関与する薬剤の有効性も示唆されているが、裏づける分子生物学的知見も不足している。以上の状況を踏まえ、日本における高 IgD 症候群に対する確固とした包括的診療基盤を確立することを目的とする。

B. 研究計画・方法

本研究において以下の研究を予定した。

1) 本邦における高 IgD 症候群の実態を調査する、2) 尿中メバロン酸測定・メバロン酸キナーゼ (MK) 活性測定の系を確立することにより確実且つ迅速な診断体制を整える、3) 日本での同疾患の臨床的な特徴、プロフィールを提供する、

4) 高 IgD 症候群特異的 iPS 細胞を作成し、そこから血球系細胞への分化誘導を行い、炎症の発生機構を解明する、5) iPS 細胞由来血球細胞を我々が開発したヒト細胞機能が評価できる免疫不全マウス NOG に移植し、疾患モデルを作成する、6) 現在までに試行されてきた治療方法の蓄積、および上記モデル等を駆使した治療基盤の確立により、治療プロセスを策定する。

(倫理面への配慮)

本研究は、疾患を有する患者さんから検体を頂き iPS 細胞を作成して行う研究であるため、患者さんの同意・協力を必要とする研究である。また、作成する iPS 細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必須であり、個人情報取り扱いの配慮を必要とする研究である。この 2 点に対して、我々は、疾患特異的 iPS 細胞研究を行うにあたり、京都大学医学部医の倫理委員会に、ヒトを対象とした医学の研究および臨床応用実施申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究」およびヒト遺伝子解析申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の 2 申請を行った。その後、京都大学医学部医の倫理委員会での審査を頂き、平成 20 年 6 月 4 日付けで、実施に関して承認を頂いた。今後の研究においては、その内容を忠実に順守して行う。

C. 研究成果

平成 21 年度の研究において、1)、2)、3) については、ほぼ達成できた。高 IgD 症候群の日本における 10 年間の患者数を把握するために、小児科入院施設を有する 704 医療機関 (厚生労働省の全国の病院・診療所データから検索) に対し、

アンケート調査を行った。厚労省へ12月22日提出締め切りの事後評価用資料作成時には5例の確定診断例のみの報告であったが、アンケートの締め切りが12月末日であったため、その後症例が追加され、確定診断例9例、疑診例7例と集計された。我々の従来からの研究により、日本における高 IgD 症候群の臨床症状、検査所見は、欧米において報告されているものと特徴を異とする感触を得ているが、現在、これらの新規報告例についてそれらを明らかとするため、診断に至った経緯、臨床症状について、詳細なアンケート調査、聞き取り調査を進めている。

一方、日本においては、高 IgD 症候群の最終確定診断方法である尿中メバロン酸測定、メバロン酸キナーゼ (MK) 活性測定が確立されておらず、臨床的に高 IgD 症候群と診断されていても、確定診断に至らない場合に直面することが多く、高 IgD 症候群の診療における障害となっていた。我々は、この問題を解決するため、尿中メバロン酸測定、メバロン酸キナーゼ (MK) 活性測定を、本研究助成にて確立した。新規に報告された疑診例、さらに所謂確定診断例についても、分子学的基盤に基づく再評価が必要と考えており、引き続き検索を進めている。この検索により、日本における真の高 IgD 症候群の症例数、およびそれらの病態について把握が可能となり、欧米人と特徴と異と思われる日本の高 IgD 症候群の臨床症状、検査所見、病態の正確な把握、それに基づく診断基準の作成、ひいては治療指針の作成が可能となる。

また、4)、5)、6) に記した病態解明、治療基盤開発に有用な疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成は、現在進行中である。物理的にも時間を要する研究であるが、上記の新規登録症例への臨床研究と並行し、継続して研究を進め、社会に還元できる診療基盤技術の開発を目指していく。

D. 考察

高 IgD 症候群は、世界で100例以上が報告されているのに対し、日本では平成20年度末で疑い2症例が報告されているのみであった。今回、本研究助成による調査により、検索途中ではあるが確定診断例9例、疑診例7例の集計結果を得た。この症例数は、従来からの調査からは到達しえない数であり、日本にも高 IgD 症候群が存在することが証明されたという面で、学術的にも社会的にも意義深いものである。

一方、高 IgD 症候群診断の精度という意味では、依然、疑問の念が払拭しきれない。高 IgD 症候群の診断は、尿中メバロン酸高値、メバロン酸キナーゼ (MK) 活性欠損という分子学的基盤をもって確定診断となる。しかし、日本においては、尿中メバロン酸測定、メバロン酸キナーゼ (MK) 活性測定は確立されておらず、上記の症例がどのような経緯をもって診断されてきたのか、しっかり検証を行う必要がある。その意味で、確定診断例9例、疑診例7例の集計結果も、分子学的基盤に基づく検索がなされて、初めて有意なものとして受け入れられるべき結果となる。

本研究助成により、我々は、尿中メバロン酸測定、メバロン酸キナーゼ (MK)

活性測定迅速、確実な系を確立した。この成果により、初めて日本における高 IgD 症候群の診断基盤が確立されたという意味で、また、その成果を診断が苦慮されていた患者さんに還元できるという意味で、学術的・社会的意義が大きい。

一方、本研究にて把握できた確定診断例 9 例の内 5 例は、上記の我々が確立した尿中メバロン酸測定、メバロン酸キナーゼ (MK) 活性測定により診断し得た真の高 IgD 症候群である。この 5 症例から得られた知見として、1) ほとんどの症例の血清 IgD 値が、欧米人と異なり正常範囲内に留まる、2) 欧米人では高率に認められる消化器症状、関節炎、皮疹の発症頻度が低い、など、日本の高 IgD 症候群に特有な所見が存在することが上げられる。畢竟、欧米人の高 IgD 症候群を出発点とした現在の疾患定義は、日本人の高 IgD 症候群を診療するには適切ではないことが危惧される。そのため、残りの症例について、分子基盤に基づく診断の再確認を行った上、日本における疾患プロフィールを総括することにより、より高い視点に立って世界に向けて発信できる疾患把握が可能となる。世界的視野での包括的な高 IgD 症候群の把握が可能となったという点で、国際的な意義が大きい。

我々の研究の進展により、日本における高 IgD 症候群に対する診断基盤は、格段の向上をした。その意味で、患者さん、医療関係者を含む社会的波及効果は大である。今後、作成を予定している高 IgD 症候群由来 iPS 細胞を用いることにより、より深い視野に根差した包括的研究が可

能となり、学術的・国際的・社会的意義の観点から、大きな成果を生み出すことが期待される。今後、これらの成果を踏まえ、未だ適切な治療法開発がなされていない同疾患に対して、一層の治療基盤の整備に邁進していく。

E : 結論

自己炎症性症候群は新しい疾患概念であり、その中でも特に高 IgD 症候群は多くの臨床医に行き届いていない疾患である。1) 原因であるメバロン酸キナーゼ (MK) 機能喪失の程度により臨床症状が多様性であるため疾患把握が困難である、2) 尿中メバロン酸測定が診断方法として有用であるが、構造不安定性のため、通常の有機酸分析では測定不可能である、3) 確定診断としての MK 酵素活性測定を海外に依存している等、日本における高 IgD 症候群の診療基盤は、貧弱であった。我々は、本研究助成により、これらの問題を克服し、我々の手で、迅速確実な、分子学的基盤に基づく診断体系を確立した。この結果、十分な医療の恩恵に授けられなかった患者さんに対して、希望の持てる扉が開かれたと確信している。

しかし、自己炎症性症候群の概念が提唱されるようになり、やっと 10 年が経過したばかりである。いわんや高 IgD 症候群は、多くの臨床医にとって、血清 IgD の高い疾患として理解されているのが現実である。しかも、我々の研究により、大多数の日本人の高 IgD 症候群の血清 IgD 値は、正常範囲内に留まることが明らかとなった。我々の確立した高 IgD 症候群に対する診断体系を、対象患者さんに

迅速、適切に還元するためには、我々の知見に基づく新しい疾患概念、診断基準の再確認を新規症例において行うとともに、それを、臨床医ばかりでなく、周期性発熱を呈し診断に苦慮されている患者さんに対しても、広く周知・徹底させる必要がある。その結果として、周期性発熱を呈する患者さんに対して、前方視的発想で、尿中メバロン酸測定・MK 活性測定にて確定診断が受けられる診療体制の確立が可能となると確信している。本邦において高 IgD 症候群の患者さんの見落としがない体制を構築する必要に迫られている。

幸いにも、我々の教室において、原因不明の周期性発熱疾患の遺伝子検査を、網羅的に施行していることが全国に知られており、検体集積が積極的に行える状況にある。容易にヒットするホームページの作成、学会・研究会での発表等を通して、その実現を図る。

また、治療薬として、欧米においては、スタチン製剤、抗 IL-1 製剤が使用され、重症例では骨髄移植の有効性が知られている。しかし、確定診断方法そのものが存在しなかった日本においては、治療展開の経験が乏しい。今後、分子学的基盤に基づく確定診断のもと、日本人患者さんにおけるこれらの治療薬の有効性について検討し、治療スキームの確立を図る。さらに、高 IgD 症候群由来 iPS 細胞を用いる詳細な病態解明、新規治療基盤の開発に向けた足がかりとする。

一方、高 IgD 症候群に対する有効な治療法の開発、確立には、疾患病態の解明が必要である。

現時点での病態として、高 IgD 症候群の疾患責任遺伝子であるメバロン酸キナーゼ (MK) 酵素活性欠損により、コレステロール代謝が破綻し、その結果生じる small GTPase のゲラニルゲラニル化修飾異常により IL-1 β 産生抑制機能が喪失し、IL-1 β 産生が亢進して炎症が惹起されるためと推測されている。しかし、IL-1 β 産生亢進を発症基盤とする他の自己炎症性症候群との間には、臨床所見の上でも大きな差異があり、IL-1 β 産生亢進のみにて高 IgD 症候群を捉え、治療展開を図っていくことに大きな疑問が存在する。また治療においては、スタチン製剤や抗 IL-1 β 療法等の生物製剤を含めた治療が試みられているが重症例には無効であり、最終的な治療法として造血幹細胞移植が試みられている場合もある。畢竟、高 IgD 症候群の病態本態を、コレステロール代謝に起因する IL-1 β 産生亢進のみに帰納することに、疑問が存在する。高 IgD 症候群の病態に関して、未だ不明の点が多い。

一方、欧米の報告では、疾患の重症度の程度により、上記のスタチン製剤が有効な軽症例も存在することが事実である。そのため、現在欧米にて行われている治療法から得られている知見をもとに標準プロトコール作成を目指すことが最初の課題となる。最も一般的に使用されているスタチン製剤を導入し、本邦の高 IgD 症候群患者での有効性、安全性を判定する。本研究において診断された症例を対象とし、スタチン製剤治療の説明と同意を患児・法的保護者に行い文書同意を得た上で研究を行う。そして安全性の評価

として投与期間中の有害事象をすべて収集する。さらにスタチン製剤無効例には抗 IL-1 製剤、骨髄移植を検討する。

前述したように、日本人の高 IgD 症候群における臨床症状、検査所見は、欧米人のそれと特徴を異とする。その観点から、日本人の高 IgD 症候群の病態にせまる分子生物学的基盤に基づく病態解明、それに基づく治療基盤の開発が必須である。我々の研究室では、すでに疾患特異的ヒト iPS 細胞作成、研究に対して倫理委員会からの承認を頂き、多くの疾患に由来するヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成、研究に踏み出している。我々が診断し得た高 IgD 症候群の患者さんから iPS 細胞を作成させて頂き、臨床症状と対比しながら、その疾患基盤、および治療に向けた研究を進めていく。さらに、我々は、ヒト細胞の生着を許容する免疫不全マウス NOG マウスを開発済みであり、ヒト細胞を移植することにより、マウス体内でヒト組織、病態を再構築することに成功している。iPS 細胞、NOG マウスを統合することにより、マウスにおいて高 IgD 症候群を再現することが可能となり、日本人特有の症状を有する高 IgD 症候群に対して、より詳細な病態解析および治療基盤開発研究を進めていく。

F. 健康危険情報

特記すべき事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N, Kambe N, Fijisawa A, Yamazaki S, Saito

M, Yoshioka T, Kawai T, Sakai H, Tanizaki H, Heike T, Miyachi Y, Nakahata T: Role of NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. *Arthritis & Rheumatism* 60: 242-250, 2009

2. Sakai H, Ito S, Nishikomori R, Takaoka Y, Kawai T, Saito M, Okafuji I, Yasumi T, Heike T, Nakahata T: A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene. *Rheumatology* 49: 194-196, 2009.
3. Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukuda S, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T: Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J* 23:1907-1919, 2009.
4. Yokoo N, Baba S, Kaichi S, Niwa A, Mima T, Doi H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T: The effects of cardiac drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387:482-488, 2009.
5. Niwa A, Umeda K, Chang H, Saito M, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T: Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via Flk-1(+) hemoangiogenic progenitors. *J Cell Physiol* 221:367-377, 2009.
6. Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T,

Nakahata T, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y: Selective infection of CD(4)+ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-infected humanized NOD/SCID/IL-2Rgamma(null) mice. *Virology* 139: 64-72, 2009.

7. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Patrizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochov G, Sakaguchi S: Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4(+) cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30:899-991, 2009.
8. Yoshimoto M, Heike T, Chang H, Kanatsu-Shinohara M, Baba S, Varnau JT, Shinohara T, Yoder MC, Nakahata T: Bone marrow engraftment but limited expansion of hematopoietic cells from multipotent germline stem cells derived from neonatal mouse testis. *Exp Hematol* 37: 1400-1410, 2009.

2. 学会発表

1. 酒井秀政、田原昌博、桑門克治、西小森隆太、重松陽介、水野隆久、荒川浩一、小原収、大嶋宏一、八角高裕、平家俊男：本邦における高 IgD 症候群と欧米症例との臨床的差異. 第 19 回日本小児リウマチ学会総会・学術集会、2009. 10
2. 村田祐樹、八角高裕、井澤和司、西小森隆太、平家俊男、斎藤潤、中畑龍俊、白川龍太郎、堀内久徳：家族性血球貪食性リンパ組織球症 3 型の

新たな迅速診断法の開発. 第 3 回日本免疫不全症研究会 2010. 1

3. 河田紗耶架、西小森隆太、河合朋樹、阿部純也、酒井秀政、井澤和司、横山宏司、田中尚子、村田祐樹、八角高裕、平家俊男：体重増加不良から非定型抗酸菌 *Mycobacterium szulgai* 感染症を診断しえた NEMO 異常症の 1 男児例. 第 3 回日本免疫不全症研究会 2010. 1
4. 八角高裕、村田祐樹、井澤和司、西小森隆太、平家俊男、斎藤潤、中畑龍俊、白川龍太郎、堀内久徳、：血小板を用いた家族性血球貪食症候群 3 型の新たな迅速診断法. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 原発性免疫不全症候群に関する調査研究班平成 21 年度班会議 2010. 1
5. 村田祐樹、八角高裕、井澤和司、斎藤潤、西小森隆太、中畑龍俊、白川龍太郎、堀内久徳、平家俊男：家族性血球貪食性リンパ組織球症 3 型の新たな迅速診断法の開発. 第 9 回小児免疫・アレルギー研究会 2010. 2
6. Toshio Heike: Pitfall for diagnosis of autoinflammatory disorders. 第 2 回 Symposium for PID in Asia 2010. 2

H: 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

厚生労働科学省研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

“高IgD症候群に対する細胞分子生物学的手法を駆使した診療基盤技術の開発”班

“CAPSに対する細胞分子生物学的手法を用いた診療基盤技術の開発”班

貴施設名：

ご記入名：

過去10年間、高IgD症候群、CAPS（CINCA/NOMID、Muckle-Wells症候群、家族性寒冷蕁麻疹）の診断例、疑い例の有無についてお尋ねします。

高IgD症候群： あり なし
CAPS : あり なし

	確定診断例	疑診例
高IgD症候群	() 例	() 例

CAPS (Cryopyrin-associated periodic syndrome)

	確定診断例	疑診例
CINCA/NOMID	() 例	() 例
Muckle-Wells症候群	() 例	() 例
家族性寒冷蕁麻疹	() 例	() 例

ご協力ありがとうございました。

2009年11月

調査事務局：〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町5-4

京都大学大学院医学研究科発達小児科学 担当 平家 俊男

TEL:075-751-3291, FAX: 075-752-2361

Mail: heike@kuhp.kyoto-u.ac.jp

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

高 IgD 症候群由来ヒト疾患特異的 iPS 細胞作成に関する研究

研究分担者：中畑 龍俊

（京都大学 iPS 細胞研究センター教授）

研究要旨

高 IgD 症候群はメバロン酸キナーゼ（MK）をコードする MVK 遺伝子の機能喪失型変異により発症する自己炎症性疾患の 1 つである。その臨床症状は、炎症症状としての発熱、関節炎に留まるものから、精神発達遅延、小脳失調、発育不全、白内障等の重度障害を来すものまで存在する。また、病態解析という観点では、MK はコレステロール代謝に関与し、同症候群では Small GTPase のゲラニルゲラニル化修飾異常が起こり、最終的に IL-1 β 産生が亢進し炎症を惹起すると推測されているが、その詳細な機序は未だ明らかにされていない。また治療においては一部の症例にスタチン製剤が有効であるが、重症例では無効で抗 IL-1 β 療法等の生物製剤を含めた病態に基づく治療法の開発が望まれている。このため、高 IgD 症候群の患者さん由来の iPS 細胞を作成し、より詳細な病態解析を行い、治療基盤開発のための研究を進展させる。

現在、ヒト疾患特異的 iPS 細胞作成のための倫理委員会からの承認を頂き、ヒト疾患特異的 iPS 細胞作成のための基盤整備を行っている。

A. 研究目的

高 IgD 症候群はメバロン酸キナーゼ(MK)機能喪失という代謝性疾患の性格を有する疾患であり、遷延する炎症性疾患で、発熱、関節炎に留まるものから、発育不全、精神発達遅延等の重度の障害に至るものまで、多様性を持つ疾患である。

しかし、病態解析という観点では、MKはコレステロール代謝に関与し、同症候群では Small GTPase のゲラニルゲラニル化修飾異常が起こり、最終的に IL-1 β 産生が亢進し炎症を惹起すると推測されているが、その詳細な機序は未だ明らかにされていない。また治療においては一部の症例にスタチン製剤が有効であるが、重症例では無効で抗 IL-1 β 療法等の生物製剤を含めた病態に基づく治療法の開発が望まれている。

このように、高 IgD 症候群の病態においては不明の部分が多いため、疾患の有効な治療法が確立されず、患者さんに恩恵が還元できない状況にある。これを解決すべく、高 IgD 症候群特異的 iPS 細胞作成・解析を通して、病態の解明、治療基盤の開発を行う。

B. 研究計画・方法

高IgD症候群患者よりiPS細胞を作成する。ヒト疾患特異的iPS細胞作製、研究に対して、京都大学医学部医の倫理委員会より承認を得ており、iPS細胞研究センター中畑研究室を中心として、同山中研究室の技術供与を受けながら行う。

MK遺伝子の発現は、血球、非血球系細胞両者に見られるが、骨髓移植で血球系細胞を正常化することにより寛解が得ら

れており、血球系細胞が臨床症状発現と密接に関係している。しかし治療の影響を排除した末梢血を繰り返し患者から採取することは困難である。iPS細胞からこれらの細胞を作成し、病態解明、治療基盤開発を行う。なお現在iPS細胞から単球系への分化は確認できている。患者由来iPS細胞を補完する形で、患者由来末梢血、線維芽細胞を用いた病態の解明も同時進行で進める。

高IgD症候群の病態を解明する上で、生体での評価は欠かせない。我々が開発してきたヒト細胞の生着を許容する免疫不全マウスNOGマウスに上記細胞を移植して疾患モデルマウスを作成し、病態解析および治療基盤開発研究を行う。

C. 研究結果ならびに今後の方針

皮膚生検により組織を頂く。採取された組織に関する個人情報、連結可能匿名化される。

採取後、各分担研究者により、それぞれの組織からの細胞単離の常法を用いて標的とする細胞を単離・培養を行う。

単離・培養された細胞にレトロウイルスベクターを用いて3あるいは4遺伝子(Oct3/4、Sox2及びKlf4、あるいはこれらに加えてc-Myc)を導入することによりiPS細胞を作成する。

上記のシステムを稼働させるべく、現在、iPS細胞研究センターにて基盤整備を行っている。

すでに、他のいくつかの疾患に関して、ヒト疾患特異的 iPS 細胞作成が開始されており、問題点を解決しながら、高 IgD 症候群に対しても iPS 細胞作成を開始す

る予定である。

D. 考察

現在までに、上記の方法により血液疾患、免疫疾患、筋肉疾患に対して iPS 細胞を作成しており、健常人における場合と同様に作成可能であることを確認している。作成過程そのものに大きな問題は生じていないため、高 IgD 症候群由来ヒト iPS 細胞作成も、開始できる状況にあると思われる。

今後、iPS 細胞としての品質（未熟性、分化能等）に関して、健常人由来 iPS 細胞と比較検討し、研究に安全、有効に供することができるシステムの確立を図る必要がある。

E. 結論

ヒト疾患特異的 iPS 細胞作成のための基盤整備が順調に進行している。今後、高 IgD 症候群に対しても、患者さんから同意を頂き、作成に向けた研究を進展させる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N, Kambe N, Fijisawa A, Yamazaki S, Saito M, Yoshioka T, Kawai T, Sakai H, Tanizaki H, Heike T, Miyachi Y, Nakahata T: Role of NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. *Arthritis & Rheumatism* 60: 242-250, 2009
2. Sakai H, Ito S, Nishikomori R, Takaoka Y, Kawai T, Saito M, Okafuji I, Yasumi T, Heike T, Nakahata T: A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene. *Rheumatology* in press 2009.
3. Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukuda S, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki Y, Takeda S, Heike T, Nakahata T: Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB J* 23:1907-1919, 2009.
4. Yokoo N, Baba S, Kaichi S, Niwa A, Mima T, Doi H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T: The effects of cardiac drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387:482-488, 2009.
5. Niwa A, Umeda K, Chang H, Saito M, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T: Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via Flk-1(+) hemoangiogenic progenitors. *J Cell Physiol* 221:367-377, 2009.
6. Mizuno Y, Chang H, Umeda K, Niwa A, Iwasa T, Awaya T, Fukuda S, Yamamoto H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T: Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J* in press, 2009.

7. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Patrizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochoy G, Sakaguchi S: Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4(+) cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30:899-991, 2009.
8. Yoshimoto M, Heike T, Chang H, Kanatsu-Shinohara M, Baba S, Varnau JT, Shinohara T, Yoder MC, Nakahata T: Bone marrow engraftment but limited expansion of hematopoietic cells from multipotent germline stem cells derived from neonatal mouse testis. *Exp Hematol* in press 2009.
- 龍太郎、堀内久徳、平家俊男：家族性血球貪食性リンパ組織球症3型の新たな迅速診断法の開発。第9回小児免疫・アレルギー研究会 2010.2

H：知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

2) 学会発表

1. 村田祐樹、八角高裕、井澤和司、西小森隆太、平家俊男、斎藤潤、中畑龍俊、白川龍太郎、堀内久徳：家族性血球貪食性リンパ組織球症3型の新たな迅速診断法の開発。第3回日本免疫不全症研究会 2010.1
2. 八角高裕、村田祐樹、井澤和司、西小森隆太、平家俊男、斎藤潤、中畑龍俊、白川龍太郎、堀内久徳：血小板を用いた家族性血球貪食症候群3型の新たな迅速診断法。厚生労働省難治性疾患克服研究事業 原発性免疫不全症候群に関する調査研究班 平成21年度班会議 2010.1免疫不全研究会
3. 村田祐樹、八角高裕、井澤和司、斎藤潤、西小森隆太、中畑龍俊、白川

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

高 IgD 症候群確定診断のためのメバロン酸キナーゼ活性測定系開発に関する
研究

研究分担者：西小森 隆太
(京都大学医学研究科発達小児科学助教)

研究要旨

高 IgD 症候群は常染色体劣性遺伝性疾患でメバロン酸キナーゼ遺伝子が責任遺伝子であるが、本邦において 2009 年初めて報告された。欧米より報告がかなり遅れた一因は、これまで有効な診断法が整備されていなかった事である。特に新規変異が責任病態であると確定する機能評価系としてのメバロン酸キナーゼ活性測定は本邦では施行されていなかった。

今回我々は高 IgD 症候群の確定診断法として、メバロン酸キナーゼ活性測定系を確立した。遺伝子診断等で診断が確定した高 IgD 症候群症例及び健康成人においてメバロン酸キナーゼ活性測定系の validation を行ったところ、健康成人に比べ高 IgD 症候群患者は低値であることが確認された。以上より、本邦でも高 IgD 症候群の診断に必須であるメバロン酸キナーゼ活性の測定が可能となった。

A. 研究目的

高 IgD 症候群は、自己炎症性疾患に属し、常染色体劣性遺伝疾患で、その責任遺伝子はメバロン酸キナーゼである。自己炎症性疾患という概念が一般に受け入れられるようになってまだ5年であり、多くの臨床医にとって血清 IgD の高い疾患として誤解されているのが現実である。これまでの我々の研究により、大多数の日本人の高 IgD 症候群の血清 IgD 値は、正常範囲内に留まることが明らかとなった。

本邦の高 IgD 症候群の診断においては、より特異度の高いメバロン酸キナーゼ酵素活性の測定、尿中メバロン酸の測定、メバロン酸キナーゼ遺伝子解析が重要である。特にメバロン酸キナーゼ酵素活性はより特異度が高く、また未報告メバロン酸キナーゼ遺伝子異常を発見した場合の機能解析系として重要である。しかし現在本邦でメバロン酸キナーゼ活性を測定できる施設はなく、オランダまで検体を輸送して依頼しているのが現状である。今回、メバロン酸キナーゼ活性測定系の確立、高 IgD 症候群の診断への応用を試み、本邦における高 IgD 症候群の診断系の確立を目指した。

B. 研究計画・方法

高 IgD 症候群疑い患者及び正常健康人から当大学倫理委員会に認められた informed consent を取得し、末梢血の採取を行った。

各患者もしくは健康成人より得られた末梢血よりPBMCを分離して、PHA刺激によりT細胞株を作成した。PHAによるT細胞株

を用いる利点としては、(1)細胞融解で得られる蛋白に赤血球数由来の蛋白が混入するのを防ぐことが可能で、より正確な活性を測定可能である、(2)PHA刺激により保存に比較的強いT細胞を活性化するため、末梢血単核球の採血後の経過時間や保存状態の活性に与える影響を最小限にできる、(3)末梢血単核球を用いて測定したものより健常人の活性が高値であることから、高IgD症候群のように活性が低い患者を同定するのに好都合である、などが挙げられる。

PHA刺激により作成したT細胞株を遠心して細胞ペレットとし、凍結融解を繰り返すことにより細胞溶解液とした。得られた細胞溶解液の蛋白濃度を測定し、細胞融解液の蛋白として5 μ gを一条件として測定した。3H-メバロノラクトンはアルカリ化によりメバロン酸に変化させ、ATPとバッファーと合わせてタンパクと37°Cで25分間反応させた。反応した混合物をブタノール：水：ギ酸=77:13:10の吸着バッファーにより、TLCプレート上で薄層クロマトグラフィーを行い、リン酸化メバロン酸とメバロン酸とを分離した。分離したそれぞれの分画を液体シンチレーションカウンターで測定し、毎分単位蛋白量あたりのメバロン酸のリン酸化を算出し、メバロン酸キナーゼ酵素活性とした。

C. 研究結果ならびに今後の方針

健常人10名よりPHA刺激T細胞株のメバロン酸キナーゼ活性測定を行ったところ、 320 ± 102 pmol/min/mgであった。一方

既に診断の確定している高 IgD 症候群患者 (N=1) では 15.6pmol/min/mg、MVK 遺伝子にヘテロの変異を持つ患者の両親では、父が 83.6pmol/min/mg、母が 48.8pmol/min/mg であった。これらを正常の数値で除した値はそれぞれ 5%、26%、15% であり、優位に活性の低下があることが確認された。

以上により、本方法により MVK 遺伝子の両方のアリルの変異により生じる高 IgD 症候群の患者のみならず、MVK 遺伝子のヘテロの変異患者も同定することが可能であった。また、メバロン酸キナーゼ活性測定に要する時間は細胞の芽球化と合わせて 10 日から 2 週間程度で可能であり、従来の全エクソンにわたる遺伝子検査より迅速に診断出来た。

D. 考察

高 IgD 症候群はオランダを初めとする欧州地域に多く発症するとされ、我国での MVK 遺伝子の変異に基づく症例報告は 2009 年の成戸らによる報告が最初であり、日本を含むアジア諸国では、人種間における遺伝子アリルの差異から非常に稀と考えられていた。事実、欧州での報告例のうち半分は V377I という変異を持ち、この変異アリルが欧州地域に広く分布していると考えられるのに対して、我国での報告は第一例の報告と今回の変異例を含めて、V377I という変異は認めていない。また、我々が確認した症例において、変異アリルは近親婚で見られがちな同一変異のホモではなく、2 家系ともそれぞれまったく異なる変異型が同定されている。これらのことから、我国におけ

る高 IgD 症候群は欧州地域とは異なる変異型であることが予想された。

これらのことは、従来まで本邦で高 IgD 症候群の診断に用いられてきた遺伝子検査により変異が見つかったとしても、本邦独特の変異であれば、既報告例を参考にして診断することが困難であることを意味する。即ち新規変異が同定された際には、メバロン酸キナーゼの酵素活性を測定する機能解析が必須となる。実際、2007 年末より 2009 年末まで当科にて同定された MVK 遺伝子の変異 4 アリルのうち、実に 3 アリルまでが新規変異であり、今後本邦における高 IgD 症候群の症例蓄積にあたっては、メバロン酸キナーゼ酵素活性を測定するシステムが不可欠であった。

現在のところ、本システムにより遺伝子検査より先に高 IgD 症候群であると確定できた症例は存在しないが、今後我国における高 IgD 症候群の診断の上では必要不可欠である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Sakai H, Ito S, Nishikomori R, Takaoka Y, Kawai T, Saito M, Okafuji I, Yasumi T, Heike T, Nakahata T: A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene. *Rheumatology in press* 2009.
2. Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N, Kambe N, Fijisawa A, Yamazaki S, Saito

- M, Yoshioka T, Kawai T, Sakai H, Tanizaki H, Heike T, Miyachi Y, Nakahata T: Role of NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. *Arthritis & Rheumatism* 60: 242–250, 2009
3. Nakamura Y, Kambe N, Saito M, Nishikomori R, Kim YG, Murakami M, Núñez G, Matsue H: Mast cells mediate neutrophil recruitment and vascular leakage through the NLRP3 inflammasome in histamine-independent urticaria. *J Exp Med.* 206:1037–1046, 2009.
 4. Okada S, Konishi N, Tsumura M, Shirao K, Yasunaga S, Sakai H, Nishikomori R, Takihara Y, Kobayashi M: Cardiac infiltration in early-onset sarcoidosis associated with a novel heterozygous mutation, G481D, in CARD15. *Rheumatology* 48:706–707, 2009.
 5. Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N, Kambe N, Fujisawa A, Yamazaki S, Saito M, Yoshioka T, Kawai T, Sakai H, Tanizaki H, Heike T, Miyachi Y, Nakahata T: Role of NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. *Arthritis & Rheumatism* 60: 242–250, 2009
 6. Saito, M., R. Nishikomori, N. Kambe, A. Fujisawa, H. Tanizaki, K. Takeichi, T. Imagawa, T. Iehara, H. Takada, T. Matsubayashi, H. Tanaka, H. Kawashima, K. S. Kagami, I. Okafuji, T. Yoshioka, S. Adachi, T. Heike, Y. Miyachi, T. Nakahata. : Disease-associated CIAS1 mutations induce monocyte death, revealing low-level mosaicism in mutation-negative cryopyrin-associated periodic syndrome patients. *Blood*, 2008, 111:2132–2141
 7. Kanegane H., T. Itazawa, M. Saito, R. Nishikomori, T. Makino, T. Shimizu, Y. Adachi, T. Nakahata, and T. Miyawaki. : A CIAS1 mutation in a Japanese girl with familial cold autoinflammatory syndrome. *Eur J Pediatr*, 2008, 167:245–247
 8. Ohga S., K. Ichino, K. Urabe, M. Ishimura, H. Takada, R. Nishikomori, M. Furue, and T. Hara. 2007. Early-onset sarcoidosis mimicking refractory cutaneous histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*, 2008, 50:723–726
 9. Fujisawa A., N. Kambe, M. Saito, R. Nishikomori, H. Tanizaki, N. Kanazawa, S. Adachi, T. Heike, J. Sagara, T. Suda, T. Nakahata and Y. Miyachi. : Disease-associated mutations in CIAS1 induce cathepsin B-dependent rapid cell death of human THP-1 monocytic cells. *Blood*, 2007, 109:2903–11.
 10. Tono C., Y. Takahashi, K. Terui, S. Sasaki, T. Kamio, T. Tandai, T. Sato, K. Kudo, T. Toki, N. Tachibana, T. Yoshioka, T. Nakahata, T. Morio, R. Nishikomori, and E. Ito. : Correction of immunodeficiency associated with NEMO mutation by umbilical cord blood

- transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant*, 2007, 39:801-4.
11. Tamai K., T. Koyama, S. Saida, R. Nishikomori, and K. Togashi.: MR imaging findings of eosinophilic cystitis in an 8-year-old girl. *Pediatr Radiol*, 2007, 37:836-9.
- 2) 学会発表
1. 酒井秀政、西小森隆太、斎藤潤、河合朋樹、田中尚子、田中孝之、村田祐樹、井澤和司、平家俊男、中畑龍俊：高 IgD 症候群の 1 家系。厚生労働省難病治性疾患克服研究事業 原発性免疫不全症候群に関する調査研究班 平成 20 年度班会議総会 2009. 1
 2. 酒井秀政、西小森隆太、河合朋樹、斎藤潤、八角高裕、平家俊男、中畑龍俊、水野隆久、荒川浩一、小原収：新規 MVK 変異による高 IgD 症候群が疑われる 1 家系～周期熱の鑑別における IgD の役割。第 2 回日本免疫不全症研究会 2009. 1
 3. 酒井秀政、岡藤郁夫、西小森隆太、田中尚子、村田祐樹、河合朋樹、斎藤潤、八角高裕、平家俊男、中畑龍俊：本邦における若年性サルコイドーシス 23 症例～早期診断・治療を目指して。第 8 回小児免疫・アレルギー研究会 2009. 2
 4. 甲原貴子、河北理恵、八角高政、西小森隆太、平家俊男、中畑龍俊：乳児喘息と鑑別を要した慢性好酸球性肺炎の一例。第 12 回京都小児喘息・アレルギー研究会 2009. 2
 5. 丹羽明、梅田勝嗣、張 璽、深津智樹、才田聡、加藤格、森嶋達也、田中孝之、沖田圭介、高橋和則、中川誠人、山中伸弥、平家俊男、中畑龍俊：マウス iPS 細胞からの試験管内分化誘導における、一次・二次造血の経時的分化。第 8 回再生医療学会総会 2009. 3
 6. 深津智樹、丹羽明、梅田勝嗣、張 璽、森嶋達也、沖田圭介、酒井宏水、山中伸弥、平家俊男、中畑龍俊：マウス iPS 細胞からの in vitro 選択的赤血球分化誘導における経時的解析と機能評価。第 8 回再生医療学会総会 2009. 3
 7. 水野雄太、張 璽、丹羽明、梅田勝嗣、栗屋智就、深田宗一郎、山本元、山中伸弥、平家俊男、中畑龍俊：マウス iPS 細胞からの移植可能な骨格筋前駆細胞の作成。第 8 回再生医療学会総会 2009. 3
 8. 酒井秀政、水野隆久、西小森隆太、斎藤潤、八角高裕、平家俊男、小原収、荒川浩一、中畑龍俊：新規 MVK 変異による高 IgD 症候群が疑われる 1 家系～周期熱の鑑別における IgD の役割。第 112 回日本小児科学会学術集会、2009. 4
 9. 酒井秀政、伊藤周作、西小森隆太、岡藤郁夫、河合朋樹、斎藤潤、八角高裕、平家俊男、中畑龍俊：NOD2 遺伝子に 6 塩基欠失の変異を認めた若年性サルコイドーシスの一例。第 112 回日本小児科学会学術集会、