

認めた。障害の程度では歩行障害を29%に認め、うち12%が車いすの生活でいずれも CINCA で MWS には認めなかった。中枢神経症状として髄膜炎は CINCA 64%、MWS 80%とほぼ同等に認めたが、発達遅滞は CINCA 55%、MWS 0%と CINCA に多い傾向を示した。

臓器障害としての合併症として関節障害による歩行障害が29%、難聴が76%、発達遅滞35%、肝アミロイドーシス6%にみられ、高頻度に後遺症を残すことが判明した。

治療においては全体の24%にあたる4例において抗 IL-1 療法としてアナキンラの投与を受けていた。いずれも著効をしめした。一方これまでの治療の主体であったステロイド療法は64%が有効であり、特にステロイドパルス療法は、全例有効であった。しかし免疫抑制剤、DMARDs の治療を組み合わせても、抗 IL-1 療法以外の治療では臓器障害を合併している症例が多いことより、不十分な治療と考えられた。

CAPS の症例では、聴力障害、発達遅延、関節症状による制限があり就学、就職に関しては十分な周囲の配慮、サポートが必要と考えられるが今回の回答に関しては発達遅延の少ない症例が大半を占めており、良好な支援状況下での就学がなされていることが示唆された。

疾患概念自体が確立されてから間がないため、小児科年齢周辺でのフォロー症例が大半を占めていること、重症死亡例で診断がなされていない症例の可能性もあることから、今後アミロイドーシスの発症や生命予後などにつきさらなる追跡、および、検討を必要とする。

E. 結論

全国主要病院へのアンケート調査により CINCA 11例、MWS 6例、計17例の臨床情報を入手し、解析した。蕁麻疹様発疹、発熱はほぼ必発の症状で

あり、また重篤な臓器障害として関節障害による歩行障害が29%、難聴が76%、発達遅滞35%、肝アミロイドーシス6%を認めた。近年効果が報告されている抗 IL-1 製剤はいずれも著効した。これまでの治療はステロイド、DMARDs、免疫抑制剤の組み合わせ治療を受けていたが、上記合併症を防ぐことは困難で、より早期からの診断、抗 IL-1 製剤での治療が肝要であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 原 寿郎. 自己炎症性疾患 Autoinflammatory diseases. 臨床リウマチ 21: 293-301, 2009.
- Tabrizi SJ, Niuro H, Masui M, Yoshimoto G, Iino T, Kikushige Y, Wakasaki T, Baba E, Shimoda S, Miyamoto T, Hara T and Akashi K. T Cell Leukemia/Lymphoma 1 and Galectin-1 Regulate Survival/Cell Death Pathways in Human Naïve and IgM+ Memory B Cells through Altering Balances in Bcl-2 Family Proteins. J Immunol. 182: 1490-1499, 2009.
- Minegishi Y, Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Karasuyama H. Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. J Exp Med. 206: 1291-301, 2009.
- Tsuboi S, Takada H, Hara T, Mochizuki N, Funyu T, Saitoh H, Terayama Y, Yamaya K, Ohyama C, Nonoyama S, Ochs HD. FBP17 Mediates a Common Molecular Step in the Formation of Podosomes and Phagocytic Cups in Macrophages. J Biol Chem. 284: 8548-56, 2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

本邦における CINCA 症候群の全国調査結果

研究分担者 齋藤 昭彦（国立成育医療センター 膠原病・感染症科 部長）

研究要旨

Cryopyrin 関連周期熱症候群の最重症型である CINCA 症候群は約 60%を占めるヘテロ NLRP3 遺伝子異常群の他、体細胞モザイク及び NLRP3 変異なしの計 3 群に分けられるが、疾患概念を理解し、正確な診断・治療指針を作成するためには、これら各群の表現型に違いがあるかを調査する必要がある。そこで、CINCA 症候群の診療状況について、全国調査を行った。

結果、全国調査により 20 例の CINCA 症候群疑い症例が確認され、そのうち 12 例が診断基準を満たした。12 例中 7 例が通常のヘテロ変異、3 例が体細胞モザイク、2 例が変異陰性であった。表現型を比較したところ、発熱、発疹は全例に認められたが、軟骨病変はモザイク群で、重症中枢神経病変(画像上の異常、大脳萎縮、発達遅滞)はヘテロ群で多い傾向が認められた。治療については、12 例中 6 例で投与されたアナキンラ(IL-1 受容体拮抗薬)が、6 例全例で著しい効果を示した。

引き続き症例を集積し、データの信頼性を高め、本邦における CINCA 症候群の遺伝型-表現型関係を明らかにし、より信頼できる診断基準作成のための基盤としたい。

A. 研究目的

Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) は自然免疫系の異常で発症する自己炎症スペクトラムの 1 つであり、CINCA 症候群、Muckle-Wells 症候群 (MWS)、家族性寒冷蕁麻疹 (FCAS) の 3 疾患を総称して CAPS と呼んでいる。CAPS の内、最重症型の CINCA 症候群では慢性無菌性髄膜炎、関節炎、蕁麻疹様の発疹が持続し、重症例では発達遅延、てんかん、関節拘縮、難聴、腎不全を来した患者 QOL を損ない、早期の診断適切な治療が必要である。CAPS は NLRP3 遺伝子の機能獲得変異により発症し、炎症性サイトカインである IL-1 β が過剰産生される事が病態の中心とされている。これまで本邦では、CAPS として約 40 例が報告されており、NLRP3 遺伝子の変異も報告されているが、CINCA 症候群では

約 40%に NLRP3 遺伝子異常を認めない。その大多数は NLRP3 体細胞モザイシズムによることが判明している。つまり CAPS は通常の変異(ヘテロ)、体細胞モザイク及び NLRP3 変異なしの 3 群に分けられるが、疾患概念を理解し、正確な診断・治療指針を作成するためには、これら各群の表現型に違いがあるかを調査する必要がある。まず、モザイク症例の多い CINCA 症候群について、全国調査を行い、表現型の違いが存在するかを検討した。

B. 研究方法

原発性免疫不全研究班(宮脇班)において行われた原発性免疫不全症の全国調査で集計された一時調査票に記載された「自己炎症性疾患を診療中の施設」に、2 次調査票を御送りし、ご返送いただいたデータ

を解析した。

表現型が Goldbach-Mansky らの診断基準(表)を満たすものを確定例として、詳細に検討を行った。NLRP3 変異が陰性であった患者については、サブクローニング法で体細胞モザイクか否かを判定した。

表：CINCA症候群診断基準 (Goldbach-Mansky, et al., NEJM, 2007)

以下のうち少なくとも2つの症状を満たすもの

- 1 蕁麻疹様の発疹
- 2 中枢神経病変 (乳頭浮腫、髄膜炎、難聴など)
- 3 骨幹端あるいは膝蓋骨の過成長

体細胞モザイクの遺伝子解析を行うにあたり、分担研究者の西小森に依頼し、京都大学医学部医の倫理委員会承認済みの“ヒト原発性免疫不全症の臨床的遺伝子診断” (G-32) により解析を行った。

C. 研究結果

原発性免疫不全症の全国調査では、全国の小児科標榜病院 567 施設に調査票を送付し、うち 382 施設(67%)から回答を得た。20 例の CINCA 症候群疑い症例が確認されたので、これらの症例を診療されている施設に二次調査票を送付し、全症例から回答を得た。疑い例のうち 12 例が診断基準を満たした。患者の年齢(調査時)は 5 歳 1 ヶ月から 20 歳 6 ヶ月、性別は男性 8 例、女性 4 例であった。

遺伝子変異を検索したところ、12 例中 7 例が通常のヘテロ変異、3 例が体細胞モザイク、2 例が変異陰性であった。この 3 群で表現型を比較したところ、発熱、発疹は全例に認められたが、軟骨病変はモザイク群で、重症中枢神経病変(画像上の異常、大脳萎縮、発達遅滞)はヘテロ群で多い傾向が認められた(統計学的な有意差はなし)。

また、これらの患者に認められた NLRP3 変異が機能的なものであるか否かを培養株細胞を用いた強制発現系で検討したところ、いずれの変異も機能的であることが確認された。

調査時点での治療としては従来のステロイド、メ

ソトレキセート、非ステロイド系抗炎症剤のほか、抗サイトカイン療法が試みられており、12 例中 6 例で投与されたアナキンラ(IL-1 受容体拮抗薬)は全例で著しい効果を示した。

D. まとめと今後の展望

本調査は本邦で初の CINCA 症候群に関する全国調査である。CINCA 症候群における NLRP3 変異には明らかなホットスポットがなく、明確な表現型-遺伝型の関係は明らかではなかった。NLRP3 変異に関してはさらにヘテロ、体細胞モザイク、変異陰性の 3 群が混在しており、ヘテロの診断が比較的簡単なのに対し、体細胞モザイク及び変異陰性例の遺伝子診断は容易ではない。

今回の調査でも明らかになったが、CINCA 症候群では、抗 IL-1 療法が著効する。それ故、早期診断と積極的な治療が患者の長期 QOL 向上のためには重要であると考えられる。診断プロセスとしては基本的には前述の Goldbach-Mansky らによる診断基準等を用いて臨床診断を行い、必要に応じて遺伝子診断を行うことになろう。遺伝子診断は有用な方法であるが、陰性であるからと言って本疾患の診断は否定できない。しかし、正確な予後予測、新たな診断治療技術の開発等のためには、個々の患者の遺伝学的背景を明らかにすることが極めて重要であり、臨床的に CINCA 症候群と診断された患者を層別化し、変異のタイプとの関連を明らかにすることができれば、非常に有用な診断治療基準が作成できると考えられる。

本調査では、3 群間で表現型の差異が生じている可能性が示唆された。このことは CINCA 症候群患者の層別化に有用な手掛りとなる可能性があるが、患者数が少なく、統計学的な検討が十分に行えるまでには至っていない。引き続き症例を集積し、データの信頼性を高めるとともに、in vitro の検討や国際調

査との整合性の検討など、研究班の他のグループとの情報交換も積極的に行い、できるだけ早期に本邦における CINCA 症候群の遺伝型-表現型関係を明らかにし、より信頼できる診断基準作成のための基盤としたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

研究分担者 横田俊平（横浜市立大学発生成育小児医療学）

研究要旨

NOMID (Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease) における骨・関節病変に対する IL-1 レセプターアンタゴニスト、anakinra の効果を検討した。Anakinra は全身的な慢性炎症抑制効果のみならず、X線所見にて短軸方向主体であった骨端過成長部の長軸方向への成長と骨化が認められた。MRI 所見では anakinra 開始前 T1、T2 強調画像にて膝関節成長板の肥大と骨・軟骨境界部のガドリニウム造影効果を認めていたが、リモデリングの正常化に伴い、これらの所見が改善した。臨床的には骨端過成長による可動域制限の解除により、歩行可能になるなど、ADL の改善をもたらした。NOMID 発症早期の anakinra 導入は骨・関節病変に有効である。

A. 研究目的

Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) は、責任遺伝子 *NALP3* がコードする蛋白 cryopyrin の異常によっておこる自己炎症症候群で、本症の本態は IL-1 β の過剰産生であり、それに対し IL-1 受容体アンタゴニスト (rHuIL-1Ra, anakinra) の有効性が報告されている。CAPS のうち最重症型の臨床像を呈する NOMID (Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease) における骨・関節病変に対する効果については定まった見解のない現況である。NOMID の骨・関節病変に対する anakinra の効果を検討した。

B. 研究方法

NOMID 症例に対し anakinra を投与し、全身性の炎症抑制効果とともに骨・関節病変の変化として、経時的な X線、MRI 所見の変化、X線写真から計測される骨長の変化を検討した。

C. 研究結果

症例は 3 歳 10 ヶ月、女児。生後 10 ヶ月からの発育・発達障害、反復する発熱、皮疹、肝脾腫を主訴に 1

歳 4 ヶ月時に当科初診。1 歳 8 ヶ月時に両膝関節の腫脹が出現、X線所見にて NOMID に特徴的な大腿骨の骨端過成長を認め、本症と診断。anakinra 2mg/kg/日の投与を 2 歳 7 ヶ月より投与開始した。治療開始時、身長 77.8cm (-3.2SD), 8590g (-2.2SD) で、両膝関節は骨性に腫脹し、可動域制限を -30° / -25° で認めた。歩行不能でははいはいで移動していたが、anakinra 開始 3 日後より伝い歩き、1 ヶ月後には独歩可能となった。膝関節の可動域も徐々に改善された。X線所見では短軸方向主体であった骨端過成長部の長軸方向への成長と骨化が認められた。頸骨・大腿骨長の伸長が確認された。MRI 所見では anakinra 開始前 T1、T2 強調画像にて膝関節成長板の肥大と骨・軟骨境界部のガドリニウム造影効果を確認していたが、anakinra 投与 20 ヶ月後の画像では成長板の肥大は改善し、骨・軟骨部の造影効果もほとんどみられなくなっており、リモデリングの正常化に伴う所見の変化と考えられた。3 歳 10 ヶ月現在、炎症所見はなく、88.4cm (-2.1SD), 11.6 kg (-1.5SD) と成長障害についても改善傾向がみられている。

D. 考察/E. 結論

NOMID 発症早期の anakinra 導入は骨・関節病変に有効である。NOMID に特徴的な大腿骨の骨端過成長所見のメカニズムは不明であるが、軟骨細胞 ATDC5 の動態や中足骨の長軸方向の成長において、IL-1 β が抑制的に作用するという報告がみられており、また一方で NOMID の責任遺伝子である NALP3 が軟骨に発現しているため、内軟骨骨化部位においてアポトーシスの異常が起こり、そのために骨端過成長が発生するという推察もある。今後の検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Miyamae T, Inaba Y, Nishimura G, Kikuchi M, Kishi T, Hara R, Kaneko U, Shinoki T, Imagawa T, Yokokta S.; Effect of anakinra on arthropathy in CINCA/NOMID syndrome. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2010 Mar 16;8:9.

2. 学会発表

- Miyamae T, Inaba Y, Nishimura G, Kikuchi M, Kishi T, Hara R, Kaneko U, Shinoki T, Imagawa T, Yokokta S.; Effect of anakinra on arthropathy in CINCA/NOMID syndrome. The 9th World Congress on Inflammation. June 6-10, 2009, Tokyo.
- 宮前多佳子, 稲葉裕, 菊地雅子, 岸崇之, 原良紀, 金子詩子, 篠木敏彦, 今川智之, 森雅亮, 横田俊平; CINCA 症候群の骨・関節病変に対する anakinra の効果. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウム, 2009 年 4 月 23 日-26 日, 東京.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

NLRP3 遺伝子変異陰性 CINCA 症候群における NLRP3 体細胞モザイクについて

（本邦以外における調査）

研究分担者 西小森 隆太（京都大学大学院医学研究科 発達小児科学 助教）

研究要旨

CAPS の最重症型である CINCA 症候群において約 40%において NLRP3 遺伝子変異陰性の症例が存在し、その一部が NLRP3 遺伝子の低頻度体細胞モザイクで発症する事を我々は本邦の症例を解析することで明らかにした。今回、海外主要施設との共同研究にて、“NLRP3 遺伝子変異陰性症例”を集積して NLRP3 遺伝子体細胞モザイクの有無を検討した。海外主要施設での検討でも体細胞モザイク症例が存在する事が明らかになった。現在遺伝子解析が進行中である。

A. 研究目的

CINCA 症候群、Muckle-Wells 症候群（MWS）、家族性寒冷蕁麻疹（FCAS）は自然免疫系の異常で発症する自己炎症症候群の 1 つであり、その異常分子の名から Cryopyrin-associated periodic syndrome（CAPS）と言われている。いずれも NLRP3 遺伝子の異常により発症すると言われているが、最重症型の CINCA 症候群では、約 40%に NLRP3 遺伝子異常を翻訳領域に認めないことが知られている。また CINCA 症候群においては家族集積例が少なく孤発例が多く、上記遺伝子変異の見つからないこととあわせ、病因における多様性が推測されていた。

我々は 2005 年に NLRP3 遺伝子体細胞モザイクで発症した世界ではじめての CINCA 症候群症例を報告した。この症例は CINCA 症候群が体細胞の 20%が異常になるだけで発症しうることを示し、上記 NLRP3 遺伝子変異陰性症例の中に、NLRP3 遺伝子体細胞モザイク症例が見逃されている可能性を提起した。2008 年、我々は本邦における 4 例の NLRP3 遺伝子変異陰性 CINCA 症候群症例を解析し、3 例に NLRP3 体細胞モザイクが存在することを報

告した。

今回、1) 我々の観察した NLRP3 体細胞モザイクが海外主要施設においても同定可能であるか、2) その頻度は NLRP3 体細胞モザイクのうちのどのぐらい存在するのか、3) 体細胞モザイクの臨床的な特徴はなにか、4) 真の NLRP3 遺伝子変異陰性症例の臨床的な特徴はなにか、を明らかにするため、海外主要施設との共同研究を行い、NLRP3 遺伝子変異陰性 CINCA 症候群症例の集積を行い、その体細胞モザイクの有無を検討した。

B. 研究方法

海外主要施設として、アメリカ（NIAMS/NIH）、フランス（ネッカー小児病院）、スペイン（バルセロナ病院）、オランダ（ユトレヒト大学病院）より通常の遺伝子解析では NLRP3 変異が同定されなかった CINCA 症候群の DNA 検体を計 21 症例集積した。また体細胞モザイクが正常人にはないことを確認するため、患者家族で健康である人をコントロールとして選び、同様に 19 検体の DNA を得た。これまで遺伝子変異が報告されているエクソン 3, 4, 6 を PCR で増幅してサブクローニングし、5%

のモザイクを95%の確率で2クローン以上同定可能となるクローン数は93クローンであり、各エクソン96クローンを解析した。2クローン以上認められた遺伝子変異を体細胞モザイクと考え、そのうちアミノ酸置換を伴うものを同定した。

遺伝子解析を行うにあたり、京都大学医学部医の倫理委員会に、“ヒト原発性免疫不全症の臨床的遺伝子診断”の申請を行い、承認を得ている(G-32)。その内容を忠実に順守して研究を行っている。

C. 研究結果

これまでの遺伝子解析により、アメリカ、フランス、スペイン、オランダいずれの国からもNLRP3体細胞モザイクが存在することを確認し、本邦外でも検討した国において全てNLRP3体細胞モザイクは存在した。

D. 考察と今後の展望

現在遺伝子解析中(約80%が終了)であるが、NLRP3体細胞モザイクはいずれの国においても存在する事が判明し、本邦だけで認められた現象ではないことが明らかになった。さらに未報告NLRP3変異が体細胞モザイクとして発見されていることが判明している。

患者のNLRP3遺伝子解析を終了することにより、CINCA症候群における体細胞モザイクの正確な頻度が判明する。さらに強制発現系における変異NLRP3遺伝子の機能評価により疾患関連性を検討することにより、同定された新規NLRP3変異体細胞モザイクがSNPsではなく疾患を惹起する変異であることが確認される。さらに正常コントロール100人でアレル特異的なPCRを用いて健康成人には新規変異が存在しないことを確認する。また同時に患者家族における健康コントロールのNLRP3遺伝子体細胞モザイクを検討中で、体細胞モザイクが健康成人にはみられず疾患と密接に関わっていることを証明する。

以上のようにH21年度の研究は順調に目標を達成

している。

E. 研究発表

1. 論文発表

- Nakamura Y, Kambe N, Saito M, Nishikomori R, Kim YG, Murakami M, Nunez G, Matsue H. Mast cells mediate neutrophil recruitment and vascular leakage through the NLRP3 inflammasome in histamine-independent urticaria. *J Exp Med*. 2009;206:1037-1046.
- 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 the NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis. *Arthritis Rheum*. 2009;60:242-250.
- 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 (Oxford)*. 2009;48:706-707.
- 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 (Oxford)*. 2010 Jan;49(1):194-6. Epub 2009 Oct 23. No abstract available.
- Kawabata H, Murakami M, Nishikomori R, Saito M, Takaoka Y, Nanao K, Maezawa M. A Japanese case of familial Mediterranean fever with a MEFV gene mutation. *Hokkaido Igaku Zasshi*. 2009;84:419-422.

2. 学会発表

- 土屋邦彦, 家原知子, 西小森隆太, 斎藤潤, 細井創: CINCA 症候群の年長児に対するヒト IL-1 β 受容体アンタゴニスト anakinra の使用経験. 第112

回日本小児科学会総会. 2009年4月17日～19日, 奈良

- 大森多恵, 西口康介, 玉木久光, 伊藤昌弘, 三沢正弘, 大塚正弘, 関一郎, 斎藤潤, 高岡優貴, 西小森隆太: 家族性寒冷自己炎症症候群(FCAS)の一例. 第112回日本小児科学会総会. 2009年4月17日～19日, 奈良
- 西小森隆太: 小児リウマチ性疾患に対する分子標的治療薬の適応 CINCA 症候群に対する抗 IL-1 療法について. 第53回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009年4月23日～25日, 東京
- 西小森隆太, 田原昌博, 桑門克治, 酒井秀政, 重松陽介, 斎藤潤, 八角高裕, 平家俊男: 乳児期より肝障害、炎症所見がみられ自己免疫性肝炎と診断していた高 IgD 症候群の1例. 第26回小児肝臓疾患研究会. 2009年7月18日～19日, 横浜
- 西小森隆太: 自己炎症性疾患の病態とシグナル伝達. 第41回小児感染症学会総会. 2009年11月14日～15日, 福井

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

CAPS 患者特異的 iPS 細胞の樹立とその解析

研究分担者 平家 俊男（京都大学医学部大学院医学研究科 発達小児科学 教授）

研究要旨

CAPS 病態解析のため、患者特異的 iPS 細胞を作成した。2 例の体細胞モザイク患者から iPS 細胞を樹立し、変異型と正常型の 2 種類のクローンを複数得た。また、解析のため、造血分化系を構築し、分化させた単球・マクロファージの機能解析系を樹立した。現在患者由来クローンの解析を進めており、新たな知見が得られることが期待される。

A. 研究目的

CINCA 症候群、Muckle-Wells 症候群（MWS）、家族性寒冷蕁麻疹（FCAS）は自然免疫系の異常で発症する自己炎症症候群の 1 つであり、その異常分子の名から Cryopyrin-associated periodic syndrome（CAPS）と言われている。NLRP3 遺伝子の異常により IL-1 β が過剰産生される事が病態の中心とされ、慢性無菌性髄膜炎、関節炎、蕁麻疹様の発疹が持続し、重症例では発達遅延、てんかん、軟骨異常増殖、難聴、腎不全を来した患者 QOL を損ない、早期の診断適切な治療が必要である。本疾患では抗 IL-1 療法が著効することが報告されており、この治療法の導入により患者 QOL が向上した。しかし、変異型 NLRP3 の IL-1 β 活性化機構や、骨軟骨病変における病態、NLRP3 変異陰性例での原因遺伝子など、未だ解決されていない問題も多い。

この問題を解決するために、1) NLRP 変異導入マウスの解析や、2) CAPS 患者血液中単核球を用いた解析が行われている。しかし、前者は実際の患者と表現型が異なること、後者は得られる検体が限られていることや薬物治療が解析に影響を与えることが問題となる。

そこで、これらの問題を解決するため、疾患関連 iPS 細胞を用いた解析を開始した。

B. 研究方法

研究は以下の段階を踏んで行う。

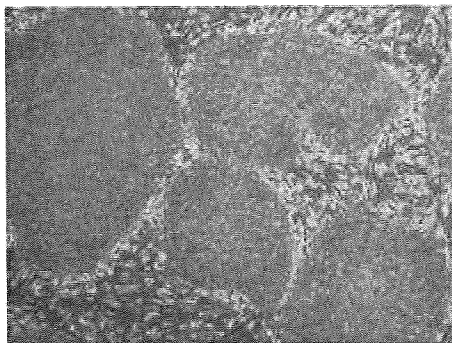
- 1) CAPS 患者からの iPS 細胞株の樹立。体細胞モザイク患者から細胞を樹立することにより、同じ遺伝子背景を持った NLRP3 変異陰性、陽性単球を作成し、有効な対照群とする。
- 2) ヒト ES/iPS 細胞からの単球・マクロファージ分化系の確立。
- 3) 分化させた単球・マクロファージの評価系の確立。サイトカイン産生、貪食能、殺菌能、抗原提示能などを測定できる系を確立する。
- 4) 患者由来 iPS 細胞における表現型の解析。サイトカイン産生能など既知の機能から開始し、発現解析等の網羅的解析を併用して、NLRP3 陽性特異的マーカーの探索を行う。

本研究を含む疾患特異的 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申請を行い、承認を頂いている。その内容を忠実に順守して研究を行っている。

C. 研究結果

当科で診療中の CAPS 患者のうち、NLRP3 遺伝子変異の体細胞モザイクで発症した CINCA 症候群患者 2 例から、同意を得て皮膚を採取した。皮膚より線維芽細胞を増殖させ、これにレトロウイルスベクターを用いて 4 因子(cmyc, klf4, oxt3/4, sox2)を導入し、複数の iPS 細胞クローンを樹立した。1 例について Genotyping が終了しており、患者が体細胞モザイクのため、iPS 細胞クローンとして、NLRP3 変異を持つものと持たないものの双方が得られた。



図：CAPS患者から樹立したiPS細胞

並行してヒト ES 細胞、iPS 細胞の血液系細胞への分化系を確立した。OP9 フィーダー上で分化させた血球をさらに複数のサイトカインを培地に添加した状態で単珠・マクロファージに分化させたところ、この細胞は刺激に応じて炎症性サイトカインを放出することが確認された。

以上のように H21 年度の研究は順調に目標を達成している。現在この系を用いて患者クローンを解析中であり、病態の再現が確認されたら、H22 年度以降にさらに詳細な検討を行う予定である。

D. 考察と今後の展望

疾患 iPS 細胞を用いた病態解析は、まだ始まったばかりの分野であり、その成果の解釈には慎重な評価が必要である。従来の解析では得られなかった様々な利点があると考えられるが、信頼できる結果を得るためには、適切な対照群の設定、分化させた細胞の評価系の確立が必須であるとする。本年度はこの二つの目標の達成に注力し、一定の成果を得た。この成果を来年度に生かすために、引き続き精力的に研究を行いたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 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.* 2009 Nov;221(2):367-77.
- 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 (Oxford).* 2010 Jan;49(1):194-6. Epub 2009 Oct 23. No abstract available.

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表(英文)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Higashi AY, Ikawa T, Muramatsu M, Economides AN, Niwa A, Okuda T, Murphy AJ, <u>Heike T</u> , <u>Nakahata T</u> , Kawamoto H, Kita T, Yanagida M	Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreER	J Immunol	182	5633-5640	2009
Hasegawa D., Manabe A., Yagasaki H., Ohisuka Y., Inoue M., Kikuchi A., Ohara A., Tsuchida M., Kojima S., <u>Nakahata T.</u>	Treatment of Childhood MDS Study Group Trial (MDS99).	Pediatr. Blood Cancer	53	1011-1015	2009
Hiraumi Y, Iwai-Kanai E, Baba S, Yui Y, Kamitsuji Y, Mizushima Y, Matsubara H, Watanabe M, Watanabe KI, Toyokuni S, Matsubara H, <u>Nakahata T</u> , Adachi S.	Granulocyte colony-stimulating factor protects cardiac mitochondria in the early phase of cardiac injury	Am J Physiol Heart Circ Physiol	296	823-832	2009
Okafuji I, Nishikomori R, Kanazawa N, Kambe N, Fujisawa A, Yamazaki S, Saito M, Yoshioka T, Kawai T, Sakai H, Tanizaki H, <u>Heike T</u> , Miyachi Y, <u>Nakahata T.</u>	Role of the NOD2 genotype in the clinical phenotype of Blau syndrome and early-onset sarcoidosis	Arthritis Rheum	60	242-250	2009
Yokoo N., Baba S., Kaichi S., Niwa A., Mima T., Doi H., Yamanaka S., <u>Nakahata T.</u> , <u>Heike T.</u>	The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells.	Biochem. Biophys. Res. Com.	387	482-488	2009
Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T, Mizuno Y, Hijikata A, Ohara O, Takada H, Kusuhara K, <u>Hara T.</u>	Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease.	Clin Exp Immunol.		in press	2009
Fukushima-Shintani M, Suzuki KI, Iwatsuki Y, Abe M, Sugasawa K, Hirayama F, Kawasaki T, <u>Nakahata T.</u>	AKR-501 (YM477) a novel orally-active thrombopoietin receptor agonist	Eur J Haematol	82	247-254	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Chang H, Yoshimoto M, Umeda K, Iwasa T, Mizuno Y, Fukada SI, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki YM, Takeda S, Heike T, Nakahata T.	Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells	FASEB J	23	1907-1919	2009
Kawabata H, Murakami M, Nishikomori R, Saito M, Takaoka Y, Nanao K, Maezawa M.	A Japanese case of familial Mediterranean fever with a MEFV gene mutation.	Hokkaido Igaku Zasshi	84	419-422	2009
Yamaguchi K, Ikeda K, Ihara K, Takada H, Kusuhashi K, Hara T.	Lack of association between E148Q MEFV variant and Kawasaki disease.	Hum Immunol.	70	468-71	2009
Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Perizot C, Tafin 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+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor.	Immunity	30	899-911	2009
Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Perizot C, Tafin 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
Watanabe M, Adachi S, Matsubara H, Imai T, Yui Y, Mizushima Y, Hiraumi Y, Watanabe K, Kamitsuji Y, Toyokuni S, Hosoi H, Sugimoto T, Toguchida J, Nakahata T.	Induction of autophagy in malignant rhabdoid tumor cells by the histone deacetylase inhibitor FK228 through AIF translocation	Int J Cancer	124	55-67	2009
Inuo M, Ihara K, Matsuo T, Kohno H, Hara T.	Association study between B- and T-lymphocyte attenuator gene and type 1 diabetes mellitus or systemic lupus erythematosus in the Japanese population.	Int J Immunogenet.	36	Aug-65	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Tsuboi S, Takada H, Hara T, Mochizuki N, Funyu T, Saitoh H, Terayama Y, Yamaya K, Ohyama C, Nonoyama S, Ochs HD	FBP17 Mediates a Common Molecular Step in the Formation of Podosomes and Phagocytic Cups in Macrophages.	J Biol Chem.	284	8548-56	2009
Minegishi Y, Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Karasuyama H	Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome.	J Exp Med.	206	1291-301	2009
Nakamura Y, Kambe N, Saito M, Nishikomori R, Kim YG, Murakami M, Nunez 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
Tabrizi SJ, Niuro H, Masui M, Yoshimoto G, Iino T, Kikushige Y, Wakasaki T, Baba E, Shimoda S, Miyamoto T, Hara T and Akashi K	T Cell Leukemia/Lymphoma 1 and Galectin-1 Regulate Survival/Cell Death Pathways in Human Naïve and IgM+ Memory B Cells through Altering Balances in Bcl-2 Family Proteins.	J Immunol.	182	1490-1499	2009
Niwa A., Umeda K., Chang H., Saito M., Okita K., Takahashi K., Nakagawa M., Yamanaka S., <u>Nakahata T.</u> , <u>Heike T</u>	Orderly Hematopoietic Development of Induced Pluripotent Stem Cells via Flk-1+ Hemoangiogenic Progenitors	J. Cell. Physiol	221	367-377	2009
Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, <u>Nakahata T.</u> , Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S	Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas	Nature	459	712-716	2009
Kusunoki T, Morimoto T, <u>Nishikomori R.</u> , <u>Heike T.</u> , Fujii T, <u>Nakahata T.</u>	Allergic status of schoolchildren with food allergy to eggs, milk or wheat in infancy.	Pediatr Allergy Immunol	20	642-647	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Muneuchi J, Ohga S, Ishimura M, Ikeda K, Yamaguchi K, Nomura A, Takada H, Abe Y, Hara T	Cardiovascular complications associated with chronic active Epstein-Barr virus infection.	Pediatr Cardiol.	30	274-81	2009
Niwa A, Umeda K, Aways T, Yui Y, Matsubara H, Hiramatsu H, Watanabe KI, Adachi S, Itoh T, Uemoto S, Nakahata T	Successful autologous peripheral blood stem cell transplantation with a double-conditioning regimen for recurrent hepatoblastoma after liver transplantation	Pediatr Transplant	13	259-262	2009
Matsubara H, Watanabe M, Imai T, Yui Y, Mizushima Y, Hiraumi Y, Kamitsuji Y, Watanabe K, Nishijo K, Toguchida J, Nakahata T, Adachi S.	Involvement of extracellular signal-regulated kinase activation in human osteosarcoma cell resistance to the histone deacetylase inhibitor FK228 [(1S,4S,7Z,10S,16E,21R)-7-ethylidene-4,21-bis(propan-2-yl)-2-oxa-1,2,13-dithia-5, 8,20,23-tetraazabicyclo[8.7.6]tricyclo-1,6-ene-3,6,9,19,22-pentone].	Pharmacol Exp Ther	328	839-848	2009
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
Miyamae T, Inaba Y, Nishimura G, Kikuchi M, Kishi T, Hara R, Kaneko U, Shinoki T, Imagawa T, Yokokita S.	Effect of anakinra on arthropathy in CINCA/NOMID	Pediatr Rheumatol Online J.	8	9	2010
Suzuki N, Yumura-Yagi K, Yoshisa M, Hara J, Nishimura S, Kudoh T, Tawa A, Usami I, Tanizawa A, Hori H, Ito Y, Miyaji R, Oda M, Kato K, Hamamoto K, Osugi Y, Hashii Y, Nakahata T, Horibe K	Outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with induction failure treated by the Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS) ALL F-protocol	Pediatric Blood Cancer	54(1)	71-78	2010
Kusumoki T, Morimoto T, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Fujii T, Nakahata T.	Changing Prevalence and Severity of Childhood Allergic Diseases in Kyoto, Japan, from 1996 to 2006	Allergol Int.	58(4)		in press
Yoshimoto M, Heike T, Chang H, Kanatsushinohara 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
Ueno H, Blanck JP, Sidney J, Zurawski SM, Bourdery L, Benteibbel SE, Zurawski G, Nicewander D, Heike T, Nakahata T, Arai K, Arai N	Blankenship D, Sette A, Banchereau J: Circulating CD4+ T cells Specific for H5 Hemagglutinin in Healthy Subjects.	J. Infectious Diseases			in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kato I, Umeda K, Awaya T, Yui Y, Niwa A, Fujino H, Matsubara H, Watanabe KI, Heike T, Adachi N, Endo F, Mizukami T, Nunoi H, Nakahata T, Adachi S	Successful treatment of refractory donor lymphocyte infusion-induced immune-mediated pancytopenia with rituximab	Pediatr Blood Cancer			in press
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-bases deletion in the NOD2 gene	Rheumatology			in press
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-1-infected humanized NOD/SCID/IL-2Rgamma(null) mice.	Virology			in press

研究成果の刊行に関する一覧表(和文)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
丹羽明、中畑龍俊	I. 造血幹細胞 I. iPS細胞からの造血分化	Annual Review 血液	2009	1-8	2009
澤田明久、井上雅美、近藤純、木本富子、山田佳世、中山雅弘、桑江優子、西川正則、大川洋二、井田孔明、徳田桐子、眞部淳、土屋邦彦、奥山宏臣、窪田昭男、川原央好、長谷川利路、米田光宏、竹本理、山田淳二、川端秀彦、田村太資、木内恵子、平野慎也、宇野誠、竹下泰史、石原卓、岡村隆行、坂田尚己、水谷修紀、中畑龍俊、迫正廣、多和昭雄、尾路祐介、坪井昭博、小山真穂、岡芳弘、安井昌博、杉山治夫、河敬世	小児がんに対するWT1ペプチドによるワクチン療法	日本小児がん学会雑誌	46-1	6-16	2009
深尾大輔、加藤格、梅田雄嗣、徳舛麻友、瓜生久美子、馬場志郎、松原央、渡邊健一郎、土井拓、足立壮一、中畑龍俊、水嶋康浩、片岡昭浩、若園吉裕	感染性心内膜炎合併後に安全に非血縁臍帯血移植を施行し得た乳児白血病の1例	日本血液学会雑誌	23-2	126-130	2009
河井昌彦、中畑龍俊	プロトロンビン時間を重視した早期新生児のDIC診断基準	日本産婦人科新生児血液学会誌	18-2	85-90	2009
長井静世、依藤亨、土井拓、河井昌彦、百井亨、岡本晋弥、土井隆一郎、中本裕士、増江道哉、加古伸雄、岡本浩之、加藤英治、長沖優子、上本伸二、中畑龍俊	集学的アプローチにより腫瘍核出術をしえた局所型先天性高インスリン血症	日本小児科学会雑誌	113-5	838-842	2009
伊藤仁也、中畑龍俊	対外増幅造血細胞移植	医学のあゆみ	1229-9	786-792	2009
徳舛麻友、松原央、瓜生久美子、加藤格、梅田雄嗣、渡邊健一郎、足立壮一、仲俣岳晴、中山富貴、坪山直生、戸口田淳也、中畑龍俊	京大病院にて治療を行なった6歳以下発症の骨肉腫4例の検討	小児がん	46-2	195-200	2009
堀部敬三、土田昌宏、鶴澤正仁、中畑龍俊	わが国の小児造血器腫瘍診療施設の実態	日本小児科学会雑誌	113-1	105-111	2009
中畑龍俊	さい帯血造血幹細胞の発見からさい帯血移植へ	日本さい帯血バンクネットワーク設立10周年記念『そして明日から』		26-27	2009
瓜生久美子、松原央、加藤格、徳舛麻友、梅田雄嗣、今井剛、渡邊健一郎、足立壮一、中畑龍俊	小児T細胞型急性リンパ性白血病に合併したgroove膀胱の1例	日本小児血液学会誌	23-3	209-212	2009
中畑龍俊	疾患特異的iPS細胞	学術の動向	14-9	78-83	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
中畑龍俊	インフォームド・コンセント2ーシステムとしての対応。(特集 医療事故とリスクマネジメント)	小児科診療	72-10	1793-1800	2009
中畑龍俊	疾患特異的iPS細胞	MSD メディカル・サイエンス・ダイジェスト 10月臨時増刊号	35	12-459	2009
中畑龍俊	さまざまな幹細胞を用いた今後の再生医療	血液フロンティア 11月号	19-11	17-18	2009
中畑龍俊	疾患特異的iPS細胞の医療応用	再生医療	8-4	7	2009
河井昌彦、磯目賢一、三宅史子、岩永甲午郎、松倉崇、柴田実、丹羽房子、中畑龍俊	S G A児のメタボリック・シンドロームのリスクについての検討ーS G A児の高血圧は幼児期から始まる？	日本周産期新生児医学会雑誌	45(4)	1274-1275	2009
原 寿郎	自己炎症性疾患Autoinflammatory diseases	臨床リウマチ	21(4)	293-301	2009
高田英俊、原 寿郎	自然免疫異常による免疫不全症	臨床検査	53	615-620	2009
高田英俊、石村匡崇、菊繁吉謙、有信洋二郎、土居岳彦、石川文彦、赤司 浩一、原 寿郎	B細胞、NK細胞、形質細胞様樹状細胞欠損症。	臨床免疫・アレルギー科	52	339-343	2009
西小森隆太	Cryopyrin	最新医学	64	2319-2323	2009
西小森隆太	くすりを使うとき アナキメラ。	Topics in Atopy	8	43-44	2009
西小森隆太	【免疫不全症候群と遺伝子異常】 各疾患の遺伝子異常, 診断と治療 自己炎症性疾患。	臨床検査	53	605-610	2009
西小森隆太、斎藤潤	【小児の症候群】 感染・免疫・アレルギー CINCA症候群。	小児科診療	72	402	2009
西小森隆太、酒井秀政、田中尚子、井澤和司	【小児リウマチ性疾患をどう診るか 変貌した一次医療と専門医療】 自己炎症性疾患。	小児科臨床	62	1949-1957	2009
西小森隆太、八角高裕。	【小児におけるリウマチ・免疫疾患と生物学的製剤】 生物学的製剤の特徴と有用性・安全性のエビデンス サイトカインを標的とする生物学的製剤 抗インターロイキン(IL)製剤 抗IL-1抗体。	アレルギー・免疫。	17	222-227	2010
西小森隆太、八角高裕、平家俊男	自己炎症性疾患の最近の進歩。	Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology.	4	49-51	2010