

201024140A

厚生労働省科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

Cryopyrin-associated periodic syndrome (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

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中畑龍俊

平成23(2011)3月

厚生労働省科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

Cryopyrin-associated periodic syndrome (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

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 畑 龍 俊

京都大学 iPS 細胞研究所
臨床応用研究部門 疾患再現研究分野

はじめに

自己炎症疾患は1999年に Kastner らがはじめて用いた Systemic autoinflammatory syndrome から由来しており、比較的新しい概念である。自己免疫疾患が獲得免疫系の異常で発症するのに対して、自己炎症疾患では主として自然免疫系の異常でおこり、またその大部分は遺伝性疾患である。臨床的には、発熱特に周期熱、関節炎・関節痛、発疹等を伴い、リウマチ、膠原病における鑑別疾患として大変重要であるとともに、特異的な治療法が存在するため稀少疾患とはいえ正確な診断を下すことが大変重要である。

我々は自己炎症疾患の中でも、厚生労働省における難治性疾患研究克服事業としてクリオピリン関連周期熱症候群：Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) を取り上げた。クリオピリン関連周期熱症候群は2001年に Hoffman らによりはじめて原因遺伝子が NLRP3 であることが示された。さらに2003年に NLRP3 インフラマソーム活性化機構が明らかになり、CAPS の主病態が IL-1 β の過剰産生であることが判明した。この発見は治療戦略における分子標的として IL-1 β が重要であることを示し、実際海外を中心に抗 IL-1 療法としてアナキンラの有効性が報告された。一方アナキンラ治療の経験の蓄積により同治療において不応性の病態として骨関節症状が存在し、CAPS において未知の病態が存在する事が明らかになった。通常遺伝子改変マウスを用いた疾患モデルが作成され、患者検体の得にくい組織の研究が行われるが、これまで作成された遺伝子改変 CAPS モデルマウスはヒトと表現型が大きく異なり、ヒト由来細胞を用いた疾患モデルの作成が1つの解決法として期待された。

また病因論として解決されるべき問題として、CINCA 症候群の約 40%には NLRP3 遺伝子異常を伴わない症例が存在する事が知られている。これまで他の関連遺伝子変異が疑われてきたが、2008年我々はその一部が潜在性 NLRP3 遺伝子体細胞モザイクであることを示した。しかし本邦における症例数が限られているため、NLRP3 遺伝子変異陰性 CINCA 症候群のうち、NLRP3 遺伝子体細胞モザイクの占める割合は明らかではなかった。さらに真の NLRP3 遺伝子変異陰性 CINCA 症候群は、CINCA 症候群の新しい病因の探索対象であった。

以上の背景を元に、本研究では、1) 日本における CAPS の実態調査を行う、特に一部で用いられているアナキンラ等の抗 IL-1 療法の効果の調査、2) 国際共同研究による NLRP3 変異陰性 CINCA 症候群における NLRP3 体細胞モザイクの調査、3) CAPS 由来 iPS 細胞を樹立してその分化系を開発してヒト単球、軟骨における病態の再現、網羅的な解析による病態の解明、を目標に研究を開始した。平成 22 年度においては、昨年度の研究を発展させ、2) NLRP3 変異陰性体細胞モザイクの国際調査を完了し、3) CAPS 患者 iPS 細胞からの単球マクロファージ系への分化、機能評価系の確立、樹立細胞での変異 NLRP3 機能の再現の確認を行い、さらに臨床面では CAPS における慢性炎

症に伴う動脈硬化の評価、CINCA/NOMID と MWS の詳細な臨床的な差異の検討を加えた。

本報告書が関係者の参考になれば幸いである。

平成 23 年 3 月 研究代表者 中畑 龍俊

目 次

I. 研究組織	1
II. 平成 22 年度総括研究報告	3
中畑 龍俊	
III. 平成 22 年度分担研究報告	
1. CINCA/NOMID 症候群における動脈硬化に関する研究	9
原 寿郎	
2. クリオピリン関連周期性症候群における臨床症状の検討	13
横田 俊平	
3. NLRP3 変異陰性 CINCA 症候群/NOMID における <i>NLRP3</i> 体細胞モザイクの頻度	17
平家 俊男	
4. 次世代シーケンサを用いた NLRP3 体細胞モザイク迅速診断の試み	21
西小森 隆太	
5. CAPS 様の症状を来す非典型例における NLRP3 遺伝子の体細胞モザイク	23
河合 利尚	
6. CAPS 患者特異的 iPS 細胞の樹立とその解析	25
斎藤 潤	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧	29
V. 研究成果の刊行物・印刷物	33

I. 研究組織

平成 22 年度厚生科学研究

「Cryopyrin-associated periodic syndrome(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」研究班

研 究 組 織

	氏 名	所 属
研究代表者	中畑 龍俊	京都大学 iPS 細胞研究所
分担研究者	原 寿郎	九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野
	横田 俊平	横浜市立大学大学院発生成育小児医療学
	平家 俊男	京都大学大学院医学研究科発達小児科学
	河合 利尚	国立成育医療研究センター
	西小森 隆太	京都大学大学院医学研究科発達小児科学
	斎藤 潤	京都大学 iPS 細胞研究所

Ⅱ. 平成 22 年度 総括研究報告書

Cryopyrin-associated periodic syndrome (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

総括研究者：中畑 龍俊
(京都大学 iPS 細胞研究所 特定拠点教授)

研究要旨

Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) は自己炎症性疾患の1つで、最重症のCINCA症候群/NOMID (CINCA/NOMID)、中等症のMuckle-Wells症候群 (MWS)、最軽症の家族性寒冷蕁麻疹を総称した疾患である。中枢神経病変による発達障害、てんかん、難聴、慢性無菌性髄膜炎、関節炎による関節拘縮、持続する炎症に伴うAAアミロイドーシスが患者予後を不良とし、本邦でも有効な治療の確立が必要とされてきた。近年、その病因は名前の由来でもあるCryopyrin蛋白/NLRP3遺伝子の異常により発症し、またその主病態はIL-1 β の過剰産生であり、分子標的薬として抗IL-1療法が著効したことにより証明された。

前年度、1) 本邦でのCAPS患者の現状、特に治療の現況を把握し、治療戦略を提案する、2) 病因論として、CINCA/NOMIDに観察されるNLRP3遺伝子体細胞モザイクの頻度を明らかにする、3) IL-1 β 以外の病態を解明するための解析系の開発として疾患特異的iPS細胞の樹立・分化系の確立する、事を目標に研究班を組織した。今年度は前年度の結果を踏まえ課題2)、3) をさらにすすめるとともに、新たにCINCA/NOMIDにおける動脈硬化の評価、CINCA/NOMIDとMWSにおける臨床症状の詳細な検討を行った。

海外主要施設との国際共同研究によるNLRP3遺伝子変異陰性CINCA/NOMID 26症例中18例にNLRP3モザイクを認め、正常コントロール19例にはNLRP3モザイクを検出せず、NLRP3体細胞モザイクはCINCA/NOMIDの原因の重要な部分を占めることを証明した。NLRP3体細胞モザイク症例の臨床的な特徴として、神経学的症状がより軽微であることが分かった。また体細胞モザイク診断のため、次世代シーケンサを用いる診断法を確立し、既知NLRP3モザイク症例の診断に成功した。さらにNLRP3体細胞モザイクで発症した非典型的なCAPSもしくはMWSの症例を経験し、NLRP3体細胞モザイクがCINCA/NOMIDのみならず、他のCAPSでも起こりうることを証明した。

NLRP3遺伝子変異体細胞モザイク症例2例より、正常NLRP3もしくは変異NLRP3を持つiPS細胞を樹立し、それぞれマクロファージへの分化系を確立した。さらに機能解析系としてIL-1 β 産生能を検討したところ、変異NLRP3由来iPS細胞が有為にIL-1 β 産生能の亢進を認め、変異NLRP3による機能再現に成功した。

非侵襲的な動脈硬化評価の結果、CINCA/NOMID 3例中3例に著明な動脈硬化を認めた。また、MWSとCINCA/NOMIDでの臨床症状の比較ではNOMIDがMWSに比してより早期の発症で、かつ神経症状、骨関節症状を認め、NOMIDがMWSよりも重症例であることを確認した。

以上総括すると、本年度は、昨年度のCAPSの現状把握を元に臨床症状の詳細を検討した。NLRP3体細胞モザイク国際共同研究の結果を得、同体細胞モザイクの簡便な診断法を確立した。さらにCAPSの新しい病因を探索するため、疾患特異的iPS細胞を用いた細胞工学的手法の確立に成功した。

総括研究者

中畑 龍俊 京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部
門疾患再現研究分野 特定拠点教授

分担研究者

原 寿郎 九州大学大学院医学研究院
成長発達医学分野
教授

横田 俊平 横浜市立大学大学院
発生成育小児医療学 教授

平家 俊男 京都大学大学院医学研究科
発達小児科学 教授

河合 利尚 国立成育医療研究センター
成育遺伝研究部 室長

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

斎藤 潤 京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部
門疾患再現研究分野 特定拠点助教

A：研究目的

Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) は自己炎症性疾患の1つで、最重症のCINCA症候群／NOMID(CINCA/NOMID)、中等症のMuckle-Wells症候群(MWS)、最軽症の家族性寒冷蕁麻疹(FCAS)を総称した疾患である。中枢神経病変による発達障害、てんかん、難聴、慢性無菌性髄膜炎、関節炎による関節拘縮、持続する炎症に伴うAAアミロイドーシスが患者予後を不良とする。2001年に原因遺伝子がNLRP3遺伝子であることが示され、2003年にはNLRP3インフラマソーム活性化機構が明らかになり、CAPSの主病態がIL-1βの過剰産生であることが判明した。続いて治療戦略における分子標的としてIL-1βが重要であることを、抗IL-1療法としてのアナキンラが著効したことで証明された。

本邦のCAPSをとりまく背景として以下の3項目が存在した。

1) 抗IL-1製剤であるアナキンラが本邦では未承認であり、その治療効果について本邦におけるまとまった報告はこれまで存在せず標準治療が未確定で、またCAPSの疫学調査がまだ手つかずの状態であった。

2) CINCA/NOMIDの約40%にはNLRP3遺伝子異常を伴わない症例が存在する事が知られ、その一部が潜在性NLRP3遺伝子体細胞モザイクであることが指摘されていた。しかしCINCA/NOMIDでNLRP3遺伝子変異陰性症例中、NLRP3遺伝子体細胞モザイクの占める割合については、症例数が少なく検討されていなかった。

3) アナキンラ不応性の病態として骨関節症状が存在し、CAPSにおいてIL-1β過剰以外の病態が存在する事も明らかにされている。しかしこれまで作成された遺伝子改変CAPSモデルマウスはヒトCAPSと表現型が異なり、ヒト由来細胞を用いた疾患モデルの作成が1つの

解決法として期待された。

以上の背景をもとに、以下の3項目を目標に昨年度本研究班が形成された。

1) 日本におけるCAPSの実態調査を行う、特にアナキンラ等の抗IL-1療法の効果の調査、それにもとづく標準的治療を提案する。

2) 国際共同研究によるNLRP3変異陰性CINCA症候群におけるNLRP3体細胞モザイクの普遍性の検討、その頻度の検討する

3) CAPS由来疾患特異的iPS細胞を樹立、各細胞への分化系、特に単球・マクロファージ系、軟骨への分化系を開発する。

昨年度の業績として

1) 全国アンケートによる実態調査、アナキンラ治療例での効果の検討、骨関節障害におけるアナキンラの効果

2) NLRP3変異陰性CINCA/NOMID症例を海外主要研究施設よりDNA検体を集積、遺伝子解析を開始

3) 正常ヒトES/iPS細胞からマクロファージ系細胞への分化誘導をおこなった。

今年度は昨年度を引き継ぐ形で、

1) 調査終了。標準治療策定は新規生物製剤ACZ885の治験の結果待ち。

2) NLRP3変異陰性CINCA/NOMID症例を海外主要研究施設よりDNA検体(患者、正常コントロール)を集積、遺伝子解析を終了し、NLRP3体細胞モザイクの臨床的な特徴を検討した。また次世代シーケンサによる大量遺伝子解析を用いたより簡便な体細胞モザイク診断法の確立を試みた。(II項)

3) NLRP3体細胞モザイクCINCA/NOMID患者2名より、正常及び変異陽性iPS細胞を樹立し、マクロファージ系細胞への分化誘導後、その機能解析をおこない、iPS細胞での病態の再現性を検討した。(III項)

さらにCAPSの臨床像解明のため次の臨床研究をおこなった。

4) CINCA/NOMIDおよびMWSでの臨床的な差異の検討を行い本邦でのCAPSの臨床的な実態を検討した。(I-2項)

5) CINCA/NOMIDでは、抗IL-1療法の登場で改善した生命予後により長期生存例も増加してきている。一方慢性炎症は動脈硬化のリスク因子のひとつとされており、乳児期早期より難治性慢性炎症が続くCINCA/NOMID症候群で動脈硬化のリスクがきわめて高い事が推定される。今回、CINCA/NOMID症候群において小児にも施行可能な非侵襲的手法を用いて動脈硬化のリスクを検討した。(I-1項)

B：研究方法

本研究では、研究の実施にあたっては基盤整備、応用

研究を含めた以下の3テーマを他大学や医療機関との共同で研究を進めた。

I. CAPSにおける臨床像の解析

I-1. CINCA/NOMID 症候群における動脈硬化に関する研究

九州大学附属病院小児科受診中、CINCA/NOMID 症候群3例における動脈硬化の有無・程度を、IMT, stiffness parameter β , baPWV, ABIといった、小児にも施行可能な非侵襲的手法を用いて検討した。

I-2. クリオピリン関連周期性症候群における臨床症状の検討

横浜市立大学附属病院小児科を受診中のCAPS症例について、遺伝子変異の有無と部位、初発年齢、初発症状ならびに各臨床症状(発熱、皮疹、頭痛、関節炎、骨関節レントゲン変化)の有無と発症時期について、MWSとNOMIDの診断別、あるいは各項目別に比較を行い、MWSとNOMIDの両疾患における差異を検討した。

II. CAPSにおけるNLRP3体細胞モザイクの検討

II-1. NLRP3 変異陰性 CINCA/NOMID における NLRP3 体細胞モザイクの頻度

NLRP3 変異陰性 CINCA/NOMID 症例のDNA検体を、フランス6例、アメリカ6例、スペイン4例、オランダ4例、日本6例の計26症例集積した。また正常コントロールとして、健常患者家族19症例を集積した。DNA検体は、サブクローニングシサンガー法でシーケンシングを行った。体細胞モザイクの臨床症状への影響を明らかにすべく、各症例の臨床症状、経過情報を担当医より集め検討した。

II-2. 次世代シーケンサを用いた NLRP3 体細胞モザイク迅速診断

NLRP3 変異陰性 CINCA/NOMID 症例の全血/PBMCより抽出されたDNA検体を用いてNLRP3のエクソン3、4、6を2段階のPCR法で増幅後、次世代シーケンサー(Roche 454 Genome Sequencer FLX)を用いてそれぞれ約1000フラグメントを解析した。

II-3. CAPS 様の症状を来す非典型例における NLRP3 遺伝子の体細胞モザイク

CAPS非典型症例(軽症型Muckle-Wells症候群)について、臨床所見、NLRP3遺伝子解析を行った。

III. CAPS 患者特異的 iPS 細胞の樹立とその解析

NLRP3 体細胞モザイク CINCA/NOMID 患者2名よりiPS細胞株を樹立、単球・マクロファージ分化系へ分化させ、患者由来iPS細胞における表現型の解析をおこなった。患者由来NLRP3変異陽性及び陰性細胞より分化させたマクロファージを用い、サイトカイン産生能及び発現解析等の網羅的解析を行った。

C: 結果

I. CAPS における臨床像の解析

I-1. CINCA/NOMID 症候群における動脈硬化に関する研究

IMT, stiffness parameter β , baPWVは3例中3例で、ABIは2例で異常値であり、しかも年齢とともに増悪する

傾向がみられた。

I-2. クリオピリン関連周期性症候群における臨床症状の検討

MWSとNOMIDの比較を新生児期発症、発熱、皮疹、頭痛、関節炎、骨関節レントゲン変化、髄膜炎、肝脾腫、難聴、視神経炎と視力低下の有無により比較を行った。新生児期発症、関節炎、骨関節XP変化、視神経炎がNOMIDにおいてMWSよりも多く認められた。

新生児期発症の有無によりCAPS症例を分類し、それぞれの群における発熱、皮疹、頭痛、関節炎、骨関節レントゲン変化、髄膜炎、肝脾腫、難聴、視神経炎と視力低下の有無について比較を行った。新生児期発症例では、関節炎、骨関節XP変化、髄膜炎を認める症例が多く、一方、視神経炎は少ない傾向にあった。

髄膜炎の有無により分類し、両群で同様に比較検討を行った。髄膜炎症例では頭痛、難聴と視神経炎を認める症例多く、一方、骨関節XP変化と肝脾腫は少ない傾向にあった。

II. CAPS における NLRP3 体細胞モザイクの検討

II-1. NLRP3 変異陰性 CINCA 症候群/NOIMD における NLRP3 体細胞モザイクの頻度

26症例中18症例(69.2%)にNLRP3モザイクを同定した。健常CINCA/NOMID患者家族19症例で同様の検討をおこなったが体細胞モザイクは全例で同定されず、NLRP3体細胞モザイクの疾患関与は有意と考えられた($P < 0.0001$)。モザイク患者の臨床症状検討では、概して典型的な症状を有していたが、精神発達遅滞の発症頻度は低く神経症状の軽症傾向がみとめられた。

II-2. 次世代シーケンサを用いた NLRP3 体細胞モザイク迅速診断

サブクローニング法にて確認済みのNLRP3体細胞モザイク1症例にて同じミスセンス変異Y570Cを13.3%認めた。これはサブクローニング法による12.3%とほぼ同じであった。次世代シーケンサによるNLRP3体細胞モザイク同定は可能且つ有効であることが示された。

II-3. CAPS 様の症状を来す非典型例における NLRP3 遺伝子の体細胞モザイク

生後2日目より全身に慢性蕁麻疹、炎症反応持続陽性、髄膜炎なし。眼科的異常なし、難聴なし。3歳時膝関節炎を認め、若年性特発性関節炎と診断した。

ゲノムDNAのダイレクトシーケンスでは、NLRP3遺伝子に異常は認めず、NLRP3変異単球がLPS依存性に細胞死に陥ることを用いて、変異陽性細胞を濃縮して遺伝子解析したところ、ミスセンス変異(K355T)による体細胞モザイクと診断した。したがって、本症例はNLRP3体細胞モザイクのMWS(軽症型)であり、CINCA/NOMIDだけでなく他のCAPSにもNLRP3体細胞モザイクは存在し、今後診断上重要な検討課題であることがわかった。

III. CAPS 患者特異的 iPS 細胞の樹立とその解析

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、複数のiPS細胞クローンを樹立した。患者が体細胞モザイクのため、NLRP3変

異を持つものと持たないものの双方が得られた。

これを OP9 フィーダー上で血球細胞へと分化させたところ、サイトカイン産生能、貪食能などを持つ、機能的マクロファージに分化した。

NLRP3 変異を持つクローンでは、すべて IL-1 β の過剰産生が認められた一方で、変異なしクローンでは IL-1 β 産生は正常であった。マイクロアレイによる発現解析では、両者は極めて類似した発現プロファイルを示していた。

D：考察及び今後の展望

I. CAPS における臨床像の解析

CINCA/NOMID 症候群 3 例における動脈硬化の指標は 5 才というきわめて若年から異常値であり、しかも年齢とともに増悪する傾向がみられた。乳児期早期からの慢性炎症のため、きわめて若年から動脈硬化を発症するものと考えられた。

今後抗 IL-1 療法の導入、普及とともに生命予後が改善されるに従って、動脈硬化も CINCA/NOMID の予後因子として重要になると考えられ、対象を増やし経時的な観察が必要と考えられた (I-1)。

CAPS における重症度は FCAS <MWS <CINCA/NOMID と考えられているが、それぞれのどのような症状・所見を呈するか本邦では検討されなかった。今回、一施設での試みではあるが、MWS と CINCA/NOMID での臨床症状の比較では NOMID が MWS に比してより早期の発症で、かつ神経症状、骨関節症状を認める傾向にあったことは、NOMID が MWS よりも重症例であることを確認した。ただし両者を明確に区別することは困難で、診断名として CAPS を用いることの方がより簡潔に行い得ると思われた。

今後本邦での症例、特に今回検討されなかった FCAS を含めて、その臨床症状・所見・経過等を前方視的に観察し、CAPS の病像を明らかにしていくことが肝要と考えられた。(I-2)

II. CAPS における NLRP3 体細胞モザイクの検討

国際共同研究により、N を増やした検討の結果、NLRP3 変異陰性 CINCA/NOMID 患者で約 70% に NLRP3 体細胞モザイクを認め、CINCA/NOMID 全体の 28% が NLRP3 体細胞モザイクで発症している事が判明した。健常患者家族では NLRP3 体細胞モザイクは同定されず、同定された変異のいずれにおいても疾患関連性が確認された。さらに NLRP3 体細胞モザイク症例では神経学的な所見、症状が軽い傾向がみられた。

今後の課題として、今回の研究でモザイク変異が同定されなかった“NLRP3 変異陰性”CINCA/NOMID 症例については、NLRP3 以外の遺伝子変異の可能性に加え、NLRP3 に関連する可能性として、エクソン 3、4、6 以外の他エクソン、プロモーター領域を含めた非翻訳領域での変異、5%未満の体細胞モザイク、また今回検討していない細胞種でのモザイク、以上の 4 つの可能性があり、今後の検討課題である。(II-1)

また 5%未満のモザイクに関しては、その検出力をあ

げるため次世代シーケンサを用いた解析が有効である。今回次世代シーケンサをもちいて、既知 NLRP3 体細胞モザイク 1 症例を診断可能か検討し、成功した。現在、他のエクソンも含め、NLRP3 体細胞モザイクの診断系の確立を試みている。(II-2)

これまで体細胞モザイクは de novo 変異の多い CINCA/NOMID を中心に解析されてきたが、本研究で明らかになった NLRP3 体細胞モザイクによる MWS の存在は、非典型例もしくは MWS、FCAS 症例の中に NLRP3 体細胞モザイク症例が存在する事を示唆した。今後 CINCA/NOMID で行った研究の対象を広げていく必要性を感じた。(II-3)

III. CAPS 患者特異的 iPS 細胞の樹立とその解析

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。今回の研究では、患者 iPS 細胞の樹立、マクロファージへの分化、サイトカイン産生異常の検出と病態の再現が確認された。H23 年度以降は NLRP3 特異的阻害薬や、病態の解析など、さらに詳細な検討を行う予定である。(III)

F：健康危険情報

特になし。

G：研究発表

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 (Oxford)*. 49: 194-196, 2010 (Letter to the Editor(Case Report))
2. 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*. 54: 329-331, 2010
3. Mizuno Y, Chang H., Umeda K., Niwa A., Iwasa T., Awaya T., Fukada S., Hiroshi Yamamoto H., Yamanaka S., Nakahata T, Heike T.: Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J*. 24: 2245-2253, 2010
4. Kubota M, Adachi S, Usami I, Okada M, Kitoh T, Shiota M, Taniguchi Y, Tanizawa A, Nanbu M, Hamahata K, Fujino H, Matsubara K, Wakazono Y, Nakahata T: Characterization of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in Japanese children: a retrospective multi-center study. *Int J Hematol*. 91(2):252-257, 2010
5. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Nishikawa K, Tanimura Y, Makinoshima H, Goda M, Akashi H, Inutsuka A, Niwa A, Shigemoto T, Nabeshima Y, Nakahata T, Nabeshima Y, Fujiyoshi Y, Dezawa M.: Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci U*

- S A. 107(19):8639-43, 2010
6. Kaichi S, Hasegawa K, Takaya T, Yokoo N, Mima T, Kawamura T, Morimoto T, Ono K, Baba S, Doi H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T.: Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice. *Cardiovasc Res.* 88: 314-323, 2010
 7. Iwasa T, Baba S, Doi H, Kaichi S, Yokoo N, Mima T, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T, Nakahata T, Heike T: Neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells improve the cardiac function of acute ischemic heart mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 400(1):27-33, 2010
 8. Matsuda K, Taira C, Sakashita K, Saito S, Tanaka-Yanagisawa M, Yanagisawa R, Nakazawa Y, Shiohara M, Fukushima K, Oda M, Honda T, Nakahata T, Koike K. : Long-term survival after nonintensive chemotherapy in some juvenile myelomonocytic leukemia patients with CBL mutations, and the possible presence of healthy persons with the mutations. *Blood* ;115(26):5429-31, 2010
 9. Kumada T, Yamanaka Y, Kitano A, Shibata M, Awaya T, Kato T, Okawa K, Abe T, Oshima N, Nakahata T, Heike T.: Ttyh1, a Ca(2+)-binding protein localized to the endoplasmic reticulum, is required for early embryonic development. *Dev Dyn.*: 239(8):2233-45. 2010
 10. Kusunoki T, Morimoto T, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Fujii T, Nakahata T.: The effect of past food avoidance due to allergic symptoms on the growth of children at school age. *Allergology International.* 59: 369-374, 2010

邦文

1. 中畑龍俊：増血因子と臨床応用。臨床検査(第54巻第6号) 623-629, 2010
2. 中畑龍俊：iPS細胞と遺伝性疾患(特集 臨床遺伝学の進歩と日常診療. 遺伝性疾患の新しい治療と今後期待される治療研究) 日本医師会雑誌(第139巻第3号) 632-634, 2010
3. 浅井康一、井澤和司、納富誠司郎、大野光洋、北村律子、矢野潤、加藤文英、菊池清、足立壮一、中畑龍俊：骨髄移植後、RSウイルス感染を契機に特発性器質化肺炎と考えられる肺合併症を呈した Down 症候群の 1 例。小児科臨床 Vol. 63 No. 8

学会発表

中畑龍俊：iPS細胞を用いた今後の医療。第47回日本小児神経学会近畿地方会 2010年2月13日 ピアザ淡海

中畑龍俊：小児における再生医療の展望。第113回日本小児科学会学術集会 2010年4月23-25日(23日) 盛岡市民文化ホール

中畑龍俊：iPS細胞の臨床展開。第31回日本臨床薬理学会年会 2010年12月1-3日(1日) 国立京都国際会館

中畑龍俊：CAPSに対する細胞分子生物的手法を用いた診療基盤技術の開発。難治性疾患克服研究推進事業研究成果発表会「難治性疾患克服研究の成果と今後」5月23日 星陵会館ホール(東京)

西小森隆太、田中尚子、井澤和司、酒井秀政、村田祐樹、横山宏司、阿部純也、田中孝之、斎藤潤、河合朋樹、八角高裕、中畑龍俊、平家俊男：抗IL-1療法(ワークショップ2：サイトカインを標的とした病態制御の可能性) 第31回日本炎症・再生医学会 2010年8月5-6日(5日) 京王プラザホテル(東京)

丹羽明、斎藤潤、加藤格、大嶋宏一、末盛博文、平家俊男、中畑龍俊：ヒトES/iPS細胞からのin vitro二次元無血清造血誘導における、分化過程の経時的解析(ポスター) 第31回日本炎症・再生医学会 2010年8月5-6日 京王プラザホテル(東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：インフラマソームの活性を抑える薬剤をスクリーニングする方法

発明者：Tatsutoshi Nakahata

Megumu Saito

Takayuki Tanaka

特許出願人：京都大学

米国仮出願日：2010年11月18日

米国仮出願番号：61/415,102

Ⅲ. 平成 22 年度 分担研究報告書

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

CINCA/NOMID 症候群における動脈硬化に関する研究

研究分担者：原 寿郎

(九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野教授)

研究要旨

CINCA/NOMID 症候群は、乳児期早期に発症し、関節症、中枢神経病変、皮疹を特徴とする重症の自己炎症症候群である。CIAS1 遺伝子がコードする蛋白 cryopyrin の異常による IL-1 β の過剰産生が原因であり、cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) の中でも最重症型とされている。

一方、慢性炎症は動脈硬化のリスク因子のひとつとされ、全身性エリテマトーデスや関節リウマチでは健常人より心筋梗塞のリスクが高いことが知られている。また、家族性地中海熱の症例では、動脈硬化の指標である頸動脈エコーでの内膜中膜複合体(Intima-Media Thickness, IMT)や、Stiffness parameter β が、小児期からすでに異常高値であることが報告されている。

乳児期早期より難治性の慢性炎症がみられる CINCA/NOMID 症候群においても、動脈硬化のリスクもきわめて高い可能性があるが、動脈硬化の有無・程度について検討した報告は過去にない。

これまで、本症の予後は不良で、成人に達するまでに 20%の症例が死亡するとされていた。しかしながら、当科でも治験を行っている抗 IL-1 療法の導入により、今後予後の大幅な改善が期待され、成人期の動脈硬化を予見する情報はより一層その重要性を増すものと考えられる。

このため今回我々は、当科通院中の CINCA/NOMID 症候群 3 例における動脈硬化の有無・程度を、IMT, stiffnessparameter β , baPWV, ABI といった、小児にも施行可能な非侵襲的手法を用いて検討する。

A. 研究目的

慢性乳児神経皮膚関節症候群 (chronic infantile neurologic cutaneous and articular syndrome, CINCA) / 新生児発症全身炎症疾患 (neonatal-onset multisystem inflammatory disease, NOMID) 症候群は、乳児期早期に発症し、関節症、中枢神経病変、皮疹を特徴とする重症の自己炎症症候群である。家族性寒冷自己炎症症候群 (FCAS) や Muckle-Wells 症候群 (MWS) と同じく、CIAS1 遺伝子がコードする蛋白 cryopyrin の異常による IL-1 β の過剰産生が病態の主因であるが、CINCA/NOMID 症候群はこれら cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) の中でも最重症型とされる。

一方、慢性炎症は動脈硬化のリスク因子のひとつとされ、全身性エリテマトーデスの症例では心筋梗塞のリスクが健常人の 50 倍高く、関節リウマチでも同様にリスクが高いことが知られる。また、家族性地中海熱の症例では、動脈硬化の指標である頸動脈エコーでの内膜中膜複合体 (Intima-Media Thickness, IMT) や、Stiffness parameter β が、小児期からすでに異常高値であることが報告されている。

乳児期早期より難治性の慢性炎症がみられる CINCA/NOMID 症候群においても、動脈硬化のリスクがきわめて高い可能性があるが、動脈硬化の有無・程度について検討した報告は過去にない。

本研究は、CINCA/NOMID における動脈硬化の指標について検討することを目的とする。

B. 研究方法

当科に通院加療中の CINCA/NOMID 症候群 3 例 (症例 1: 5 才男児, 症例 2: 7 才女児, 症例 3: 15 才男児) について、下記の動脈硬化の指標を非侵襲的に評価した。1) IMT, 2) stiffness parameter β , 3) baPWV (brachial-ankle Pulse Wave Velocity), 4) ABI (Ankle Brachial Index)

C. 研究結果

下記のごとく、IMT, stiffness parameter β , baPWV は 3 例中 3 例で、ABI は 2 例で異常値であり、しかも年齢とともに増悪する傾向がみられた。

[症例 1, 2, 3 (小児基準値)]

- 1) IMT: 0.47, 0.50, 0.57 (0.40) mm
- 2) stiffness parameter β :
4.83, 5.72, 7.60 (3.5-4.0)
- 3) baPWV: 1060, 971, 1576 (919-952) cm/s
- 4) ABI: 1.15, 0.93, 0.95 (1.00 以上)

D. 考察

CINCA/NOMID 症候群 3 例における動脈硬化の指標は 5 才というきわめて若年から異常値であり、しかも年齢とともに増悪する傾向がみられた。乳児期早期からの慢性炎症のため、きわめて若年から動脈硬化を発症するものと考えられ、さらに成人期にはより重度となることが予想される。

乳幼児期から動脈硬化の指標を注意して経過観察する必要があるが、今回用いた検査に関しては乳幼児期の正常対照群のデータが乏しく、同時に正常対照群のデータについても集積する必要がある。

E. 結論

CINCA/NOMID 症候群では若年から動脈硬化のリスクがきわめて高く、経年的に増悪することが示唆された。当科でも治療を行っている IL-1 受容体アンタゴニスト (Anakinra) の効果に期待するとともに、乳幼児期から動脈硬化について注意して経過観察を行う必要がある。

F. 研究発表

Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T: Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan. *Journal of Clinical Immunology* (in press)

Takada H, Nomura A, Ishimura M, Ichiyama M, Ohga S, Hara T: NEMO mutation as a cause of familial occurrence of Behçet's disease in female patients. *Clin Genet* 78: 575-579, 2010

Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, Takahashi R, Asakawa M, Muto G, Mori T, Hasegawa E, Shizuya S, Hara T, Nomura M, Yoshimura A: Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF- β -mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J Immunol* 185: 842-55, 2010

Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, Chrabieh M, Levy O, Arkwright PD, McDonald D, Geha RS, Takada H, Krause JC, Creech CB, Ku CL, Ehl S, Maródi L, Al-Muhsen S, Al-Hajjar S, Al-Ghonaium A, Day-Good NK, Holland SM, Gallin JI, Chapel H, Speert DP, Rodriguez-Gallego C, Colino E, Garty BZ, Roifman C, Hara T, Yoshikawa H, Nonoyama S, Domachowske J, Issekutz AC, Tang M, Smart J, Zitnik SE, Hoarau C, Kumararatne DS, Thrasher AJ, Davies EG, Bethune C, Sirvent N, de Ricaud D, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Guedes M, Vitor AB, Rodrigo C, Almazán F, Méndez M, Aróstegui JI, Alsina L, Fortuny C, Reichenbach J, Verbsky JW, Bossuyt X, Doffinger R, Abel L, Puel A, Casanova JL: Clinical Features and Outcome of Patients With IRAK-4 and MyD88 Deficiency.

Medicine (Baltimore) 89: 403-425, 2010

Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Tabuchi T, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T, for The HLH/LCH and SCT Committees in the Japanese Society of Pediatric Hematology: Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatric Blood & Cancer* 54: 299-306, 2010

Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang R, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Sugita K, Ito E: Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica* 95: 1293-1299, 2010

Kusuda T, Hikino S, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Tokunaga S, Ihara K, Hata Y, Hara T: Genetic variation of vascular endothelial growth factor pathway does not correlate with the severity of retinopathy of prematurity. *J Perinatol* 2010 (in press)

Kitajima J, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T: Serum prohepcidin concentrations at birth and one month after birth in premature infants. *Pediatric Blood & Cancer* 2010 (in press)

Tanabe F, Kasai H, Morimoto M, Oh S, Takada H, Hara T, Ito M: Novel heterogenous CHS1 mutations identified in five Japanese patients with Chediak-Higashi syndrome. Case report in *Medicine* (in press)

Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T, Mizuno Y, Hijikata A, Ohara O, Takada H, Kusuhara K, Hara T: Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol*, 160, 246-55, 2010

Inoue H, Takada H, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Takahashi N, Morio T, Kosaki K, Hara T: Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism. *Eur J Pediatr* 169: 839-844, 2010

書籍

原 寿郎 自己炎症性症候群 今日の診断指針
症候編第 6 版、医学書院、東京、2010、印刷
中

G：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

クリオピリン関連周期性症候群における臨床症状の検討

研究分担者 横田 俊平（横浜市立大学大学院発生成育小児医療学 教授）

研究要旨

CAPS の一病型である MWS と NOMID に関して、臨床症状の比較を行い、症状の差異と重症例の特徴について検討を行った。

A. 研究目的

自己炎症症候群の一疾患であるクリオピリン関連周期性症候群（CAPS）は、周期性発熱、蕁麻疹様皮疹、関節症状、無菌性髄膜炎、視神経炎、感音性難聴を新生児期以降に認める。CAPS には家族性寒冷自己炎症症候群、Muckle-Wells 症候群(MWS)ならびに慢性乳児神経皮膚関節炎症候群(CINCA 症候群/NOMID)が含まれる。これら3疾患は臨床上の重症度が異なるとされているが、各疾患、特に MWS と CINCA 症候群の臨床的な分別は明らかではない。CAPS 症例の臨床所見を検討し、MWS と NOMID について臨床症状の差異が認められるか検討した。

B. 研究方法

横浜市立大学附属病院小児科を受診中の CAPS 症例について、遺伝子変異の有無と部位、初発年齢、初発症状ならびに各臨床症状（発熱、皮疹、頭痛、関節炎、骨関節レントゲン変化）の有無と発症時期について、MWS と NOMID の診断別、あるいは各項目別に比較を行い、MWS と NOMID の両疾患における差異を検討した。

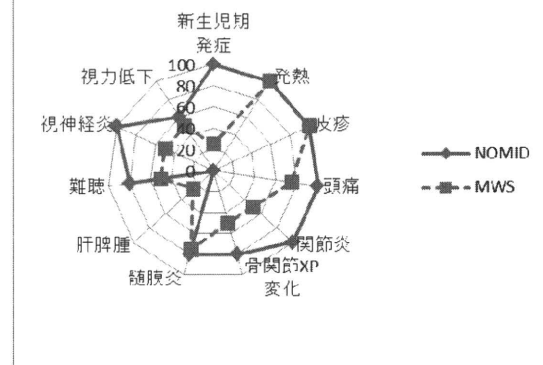
（倫理面への配慮）

患者の個人情報はずべて匿名化しデータの解析を行った。

C. 研究結果

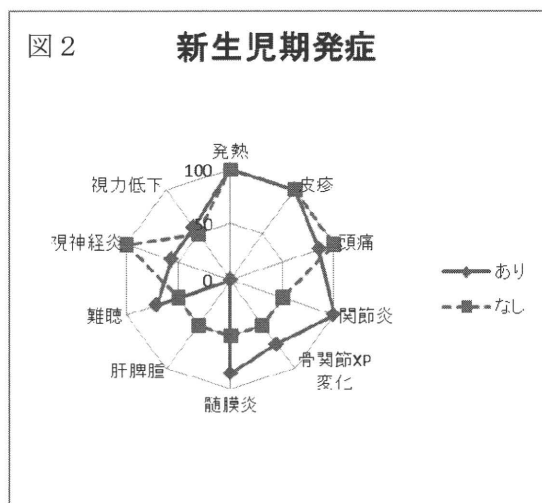
1. MWS と NOMID の比較を新生児期発症、発熱、皮疹、頭痛、関節炎、骨関節レントゲン変化、髄膜炎、肝脾腫、難聴、視神経炎と視力低下の有無により比較を行った（図1）NOMID と MWS では新生児期発症と関節炎（骨関節 XP 変化）、視神経炎が NOMID において MWS よりも多く認めた。

図1 臨床症状の比較 (NOMID vs MWS)

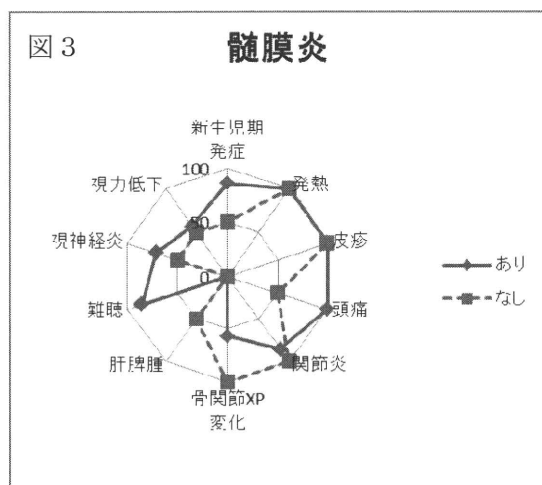


2. 新生児期発症の有無により CAPS 症例を分類し、それぞれの群における発熱、皮疹、頭痛、関節

炎、骨関節レントゲン変化、髄膜炎、肝脾腫、難聴、視神経炎と視力低下の有無について比較を行った(図2)。新生児期発症例では、関節炎(骨関節XP変化)と髄膜炎を認める症例が多く、一方、視神経炎は少ない傾向にあった。



3. 髄膜炎の有無により分類し、両群で同様に比較検討を行った(図3)。髄膜炎症例では頭痛、難聴と視神経炎を認める症例多く、一方、骨関節XP変化と肝脾腫は少ない傾向にあった。



D. 考察

MWSとNOMIDでの臨床症状の比較ではNOMIDがMWSに比してより早期の発症で、かつ視力と聴力といった神経症状と骨関節症状を認める傾向にあったことは、NOMIDがMWSよりも重症例であるこ

とが示唆されたが、明確に両者を区別することはできないため、CAPSを用いることの方が診断をより簡潔に行い得ると思われた。また新生児期発症例では関節炎と骨関節変化、髄膜炎が多く、さらに髄膜炎合併に関連する症状として新生児期発症と頭痛、難聴、視神経炎が認められた。これらの結果から推測されることは、CAPSにおける重症例は、新生児期発症で難聴・視神経炎など神経症状と関節炎・骨関節変化を認める症例である。これらの重症化症例と考えられる所見は、経過により不可逆的な症状と考えられ、より早期より抗IL-1阻害治療などの導入が必要であると考えられる。

E. 結論

NOMIDはMWSに比べて早期発症と神経・関節症状を認めより重症であるが、明確に両者を区別できず、診断名としてCAPSを用いることが診断の上ではより簡潔と考えられる。今後症例の登録制など症例の蓄積と検討を行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- なし(投稿準備中)

2. 学会発表

- 原拓 磨、野澤 智、百村芽依、木澤敏毅、宮前多佳子、今川智之、西小森隆太、大石 勉、森雅亮、横田俊平：当院における Cryopyrin Associated Periodic Syndrome(CAPS)9例の臨床像；第20回日本小児リウマチ学会2011年2月11日～13日、那覇。

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