

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

NLRP3 変異陰性 CINCA 症候群／NOMID における NLRP3 体細胞モザイクの頻度

研究分担者 平家俊男（京都大学大学院医学研究科 教授）

研究要旨

CINCA 症候群／NOMID は NLRP3 インフラマゾームの異常活性化による IL-1 β 過剰産生に伴い全身炎症を生じる自己炎症疾患である。約 6 割の患者で NLRP3 に変異が同定されるが、それ以外の患者の病因は不明であった。我々は体細胞モザイクを有する本邦 CINCA 症候群／NOMID 症例 4 例を報告したが、症例数が少ないこと、本邦のみでの研究であったことより、その意義づけ、臨床像には不明な点が多かった。今回、海外 CINCA 症候群／NOMID 主要研究施設（5 カ国）の国際協力のもと、NLRP3 変異陰性 CINCA 症候群／NOMID 症例における体細胞モザイクを検討した。NLRP3 遺伝子異常陰性の CINCA 症候群／NOMID 患者およびその家族の DNA 検体の提供を受けサブクローニングによるシークエンス解析をおこない 26 症例の患者の内 18 症例に体細胞モザイクを同定した。19 例の患者家族にモザイクは同定されなかった。モザイク患者の臨床症状は概して典型的ではあったがより神経症状が軽症である傾向がみとめられた。CINCA 症候群／NOMID 診断には NLRP3 体細胞モザイクの検討が不可欠であり、CINCA 症候群／NOMID の主要原因の 1 つと考えられた。

A. 研究目的

CINCA 症候群／NOMID (CINCA/NOMID) は、責任遺伝子として NLRP3 遺伝子が同定され、常染色体優性遺伝することが知られている。その遺伝学的な特徴として de novo 変異が多数をしめ、臨床所見、治療薬に対する反応性において明らかな差がないにもかかわらず約 4 割の患者で NLRP3 遺伝子変異を同定できないことが知られていた。我々は NLRP3 遺伝子変異陰性 CINCA/NOMID の集積により、4 例の本邦 NLRP3 体細胞モザイク症例を同定し、NLRP3 体細胞モザイクの CINCA/NOMID への寄与、臨床像を明らかにすべく、CINCA/NOMID 海外主要研究施設との共同研究をおこなった。

B. 研究方法

NLRP3 変異陰性 CINCA/NOMID 症例の全血/PBMC より抽出された 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、これまで NLRP3 変異の報告のあるエクソン 3, 4, 6 を、KOD を用いた PCR 法で増幅後、サブクローニングしサンガー法でシークエンシングを行った。5%のモザイクを 95%の確率で検出できるクローン数として 96 と設定した。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。

（倫理面への配慮）当研究は、京都大学倫理委員会の承認をうけ海外主要施設は、本研究における遺

伝子解析研究の共同施設として登録した。また遺伝子解析の informed consent は各海外施設にて取得し、当大学にて解析を施行した。

C. 研究結果

26 症例中 18 症例 (69.2%) に NLRP3 モザイクを同定した。モザイク頻度は 4.2%~35.8% (平均 12.1 ± 7.9%) であった。7 変異が新規変異 (G307S、K355N、M406V、T433I、F566L、E567K、K568N) で、6 変異が既報告例 (L254F、D303H、G307V、A439P、Y570C、G755R) であった。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為と考えられた (P<0.0001)。さらに各モザイク同定変異の病的機能を明らかにすべく ASC 依存性 NF- κ B 活性化能、THP-1 細胞における細胞死誘導能を検討しいずれのモザイク同定変異でも疾患関連性が確認された。またモザイク症例での新規同定変異ではヘテロでの既報告変異より強い疾患関連性を有していることが示された。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。

D. 考察

今回の解析結果では約 7 割の NLRP3 変異陰性 CINCA/NOMID 患者で 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と考えられた。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。NLRP3 体細胞モザイクは CINCA/NOMID の主要病因の一つであり、今後臨床症状を含めたさらなる検討を有すると考えられた。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 症例については今後の検討を有する。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%未満のモザイク、また今回検討していない細胞種でのモザイクの可能性がある。これらを解決する新規解析方法として次世代シーケンサーによる大量遺伝子解析が有用と考えられるがエラー率の高さを補完する機能解析などのさらなる検討が必要と考えられた。

E. 結論

NLRP3 体細胞モザイクは CINCA/NOMID の主要原因である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kusunoki T, Morimoto T, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Mukaida K, Fujii T, Nakahata T: Breastfeeding and the prevalence of allergic diseases in school children: Does reverse causation matter? *Pediatr Allergy Immunol*, 2010. 21:60-66.
- 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*, 2010. 24:2245-2253.
- 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*, 2010. 88 : 315-322.
- 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*, 2010. 239 : 2233-2245.
- Kaichi S, Takaya T, Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Ono K, Shimatsu A, Baba S, Heike T,

Nakahata T, Hasegawa K.: Cyclin-dependent kinase 9 forms a complex with GATA4 and is involved in the differentiation of mouse ES cells into cardiomyocytes. *J Cell Physiol*, 2010. 226 : 248-254.

● 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*, 2010. 400 (1) : 27-33

● Nagai K, Yamamoto K, Fujiwara H, An J, Ochi T, Suemori K, Yasumi T, Tauchi H, Koh K, Sato M, Morimoto A, Heike T. Ishii E, Yasukawa M. Subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes. *PLoS One*, 2010. 30;5(11):e14173

● Mukaida K, Kusunoki T, Morimoto T, Yasumi T, Nishikomori R, Heike T. Fujii T, Nakahata T. The effect of past food avoidance due to allergic symptoms on the growth of children at school age. *Allergol Int*, 2010 59(4):369-74.

2. 学会発表

● 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: サイトカインを標的とした病態制御の可能性 抗 IL-1 療法; 第 30 回日本炎症・再生医学会, 2010 年 8 月 5 日~6 日, 東京.

● 酒井秀政, 西小森隆太, 畑郁恵, 重松陽介, 大嶋宏一, 小原収, 八角高裕, 平家俊男: 高 IgD 症候群が隠れていませんか?: 酵素活性測定法による確定/除外診断法. 第 113 回日本小児科学会総会, 2010 年 4 月 23 日~25 日.

● 西小森隆太, 田中尚子, 井澤和司, 斎藤潤, 八角高

裕, 小原収, 中畑龍俊, 平家俊男: 自己炎症症候群の新しい展開 "NLRP3 変異陰性" CINCA 症候群 / NOMID における NLRP3 モザイシズムについて: 第 55 回日本リウマチ学会総会, 2010 年 4 月 24 日~27 日.

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

次世代シーケンサーを用いた NLRP3 体細胞モザイク迅速診断の試み

研究分担者 西小森隆太（京都大学大学院医学研究科 准教授）

研究要旨

Chronic infantile neurological cutaneous and articular (CINCA) 症候群/NOMID は NLRP3 インフラマゾームの異常活性化による IL-1 β 過剰産生に伴い全身炎症を生じる自己炎症疾患である。我々は本邦において NLRP3 体細胞モザイクによる CINCA 症候群を報告してきたが、サブクローニング法をもちいたサンガー法によるシーケンスには多大な時間と労力を要する。そのため、次世代シーケンサーを用いた NLRP3 体細胞モザイクの迅速診断を試みた。

A. 研究目的

CINCA 症候群/NOMID (CINCA/NOMID) は、責任遺伝子として NLRP3 遺伝子が同定され、常染色体優性遺伝することが知られている。近年、我々は NLRP3 遺伝子変異陰性 CINCA/NOMID の集積により、4 例の本邦 NLRP3 体細胞モザイク症例を同定した。解析においてはサブクローニング法を用いたが、多大な時間と労力を要するため、より簡便な解析方法が望まれる。我々は次世代シーケンサーを用いて、NLRP3 体細胞モザイク症例をより簡便な方法で診断する方法を検討した。

B. 研究方法

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する。次世代シーケンサーにおいては PCR 産物をクローナルに増幅できるため、サブクローニングが不要である。

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

本邦ですでに確認された NLRP3 体細胞モザイク 1 症例のゲノム DNA を用いて NLRP3 エクソン 3、4、6 を解析し、エクソン 3 に Y570C 変異を 13.3%に認めた。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。

D. 考察

今回はエクソン 3、4、6 のみを 1 症例のみで解析したが、全エクソンに対して同様の解析を行うことにより、NLRP3 遺伝子 coding region の体細胞モザイクの有無を検索することが可能であると考えられる。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いることにより、より簡便に NLRP3 体細胞モザイクを診断する事が可能になった。今後、症例数を増やして検討しテイク予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Sakai, H., S. Ito, R. Nishikomori, Y. Takaoka, T. Kawai, M. Saito, I. Okafuji, T. Yasumi, T. Heike, and T. Nakahata, A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene. *Rheumatology (Oxford)*, 2010. 49(1): p. 194-6.
- Kambe, N., T. Satoh, H. Tanizaki, A. Fujisawa, M.K. Saito, and R. Nishikomori, Enhanced NF-kappaB activation with an inflammasome activator correlates with activity of autoinflammatory disease associated with NLRP3 mutations outside of exon 3: comment on the article by Jeru et al. *Arthritis Rheum*, 2010. 62(10): p. 3123-4; author reply 3124-5.
- Kambe, N., Y. Nakamura, M. Saito, and R. Nishikomori, The inflammasome, an innate immunity guardian, participates in skin urticarial reactions and contact hypersensitivity. *Allergol Int*, 2010. 59(2): p. 105-13.

2. 学会発表

- 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: サイトカインを標的とした病態制御の可能性 抗 IL-1 療法; 第 30 回日本炎症・再生医学会, 2010 年 8 月 5 日~6 日, 東京.
- 西小森隆太: "炎症"病態の観点から見た小児疾患 自己炎症性疾患における炎症病態 NLRP3 遺伝子を中心にして: 第 113 回日本小児科学会総会, 2010 年 4 月 23 日~25 日.
- 西小森隆太, 田中尚子, 井澤和司, 斎藤潤, 八角高裕, 小原收, 中畑龍俊, 平家俊男: 自己炎症症候群の新しい展開 "NLRP3 変異陰性" CINCA 症候群 / NOMID における NLRP3 モザイシズムについて: 第 55 回日本リウマチ学会総会, 2010 年 4 月 24 日~27 日.

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

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

研究分担者 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）

研究要旨

Cryopyrin 関連周期熱症候群(CAPS)は、NLRP3 遺伝子の変異によって発症する自己炎症性疾患であり、CAPS のうち最重症型である CINCA 症候群の一部は体細胞モザイクによって発症することが知られている。我々は、CINCA 症候群の診断基準に合致しない軽症型の CAPS 様症状を呈する症例において、NLRP3 の体細胞モザイクを同定した。このような症例は診断基準から漏れる可能性があり、個々の症例について慎重を行う必要がある。

A. 研究目的

Cryopyrin 関連周期熱症候群(CAPS)は、NLRP3 遺伝子の変異によって発症する自己炎症性疾患であり、その一部は体細胞モザイクによって発症することが知られている。モザイク例の多くは CAPS のうち最重症型である CINCA 症候群の孤発例で報告されている。しかし、モザイク例では表現型がやや軽症であることを考えると、より軽症あるいは非特異的な表現型を呈するモザイク症例も存在することが考えられる。このような症例の診断は困難である可能性がある。我々は、このことを念頭に置き、非典型的な蕁麻疹様発疹を認める症例において、NLRP3 遺伝子の体細胞モザイクが存在するか検討した。

B. 研究方法

対象患者に対して、末梢血単核球を採取し、遺伝子検査を実施。研究は京都大学医の倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

症例 7 歳女児。家族歴、母が寒冷蕁麻疹。既往歴、妊娠分娩歴に異常なし。

経過：生後 2 日目より全身に膨疹が出現。慢性蕁麻疹として抗アレルギー薬、抗ヒスタミン薬を内服したが、改善せず。白血球数は 10,000~20,000/ μ l、CRP は 5~9 mg/dl 程度を推移した。抗核抗体、抗 dsDNA 抗体、抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体などは陰性だった。髄膜炎の既往なし。眼科的所見はなく、染色体は正常。発達正常、知能正常、難聴なし。

3 歳時膝関節炎（MRI 上、膝関節液貯留と滑膜炎の所見あり）を認め、若年性特発性関節炎としてステロイド、メトトレキサートが開始された。しかしその後も皮疹や白血球増多、CRP 高値は続いた。皮疹はある程度ステロイド量に依存し、増やせば軽快し減量すると増悪した。

皮膚生検で真皮上層の血管周囲を中心に CD3 陽性 T 細胞と CD68 陽性の組織球の浸潤を認めた。エクリン汗腺部にも軽度の炎症細胞浸潤を認めた。骨髓穿

刺では顆粒球系優勢で好中球に中毒顆粒を認めた。悪性所見はみられなかった。

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なかった。患者末梢血単核球を採取し、NLRP3 変異単球が Lipopolysaccharide(LPS) 依存性に細胞死に陥ることを用いて、LPS 存在下に細胞死を来した細胞のみを分別して NLRP3 遺伝子のシーケンスを行ったところ、1064A>C(K355T)というミスセンス変異が同定された(図)。サブクローニング法で変異アレルの頻度を確認したところ、患者末梢血では 9.4%のアレルが NLRP3 変異を持つと推定された。したがって、本症例は NLRP3 遺伝子変異

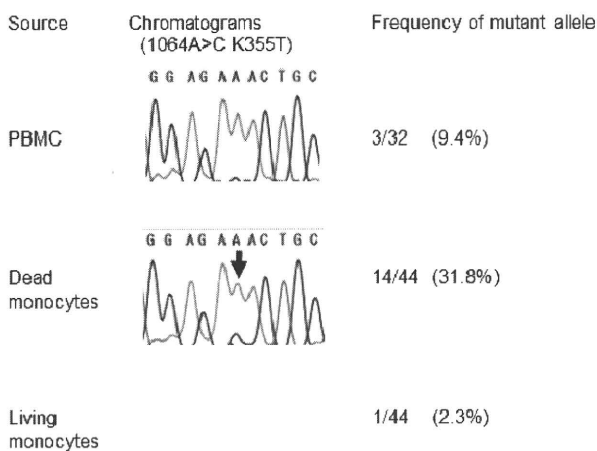


図:LPSによって細胞死に陥る単球をソートすることにより、変異細胞を収集

を体細胞モザイクとして持つことが判明した。

本症例で同定された K355T 変異を細胞株に強制的に発現させたところ、NF- κ B 活性の上昇や細胞死の誘導が認められ、この変異が機能的であることが示唆された。

D. 考察

本症例は、CINCA 症候群の診断基準に合致せず、また明らかな寒冷誘発エピソードにも乏しいことから、軽症型の家族性寒冷蕁麻疹の表現型とも異なる部分がある。しかし、皮膚症状のみならず炎症所見の上昇や関節症状を伴うなど、自己炎症を疑わせる

所見を認めており、このような場合には、NLRP3 変異陰性であっても、体細胞モザイクの検討を行うことが必要かもしれない。

E. 結論

非典型的な CAPS 様の症状を来す症例において、NLRP3 遺伝子の体細胞モザイクを同定した。このような症例は診断基準から漏れる可能性があり、個々の症例について十分な評価を慎重に行っていく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 村山静子、田村英一郎、河合利尚、井田博幸：非感染性腸炎を合併した慢性肉芽腫症の検討 慢性肉芽腫症は自己炎症症候群様の病態を合併する；第 42 回小児感染症学会，平成 22 年 11 月 27 日～28 日，仙台。

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

CAPS 患者特異的 iPS 細胞の樹立とその解析

研究分担者 齋藤 潤 （京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門）

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。疾患関連変異を持つクローンでは IL-1b の過剰産生など、疾患に特徴的な表現型の再現に成功した。今後、創薬スクリーニングや病態解析を進めていきたい。

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。また、NLRP3 活性を直接阻害する薬剤は存在しない。

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行った。

B. 研究方法

研究は以下の段階を踏んで行う。前年度の研究で、1)、2)は完了している。

- 1) CAPS 患者からの iPS 細胞株の樹立。
- 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。
- 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

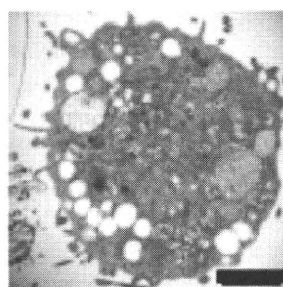
て「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究」およびヒト遺伝子解析申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の2申請を行い、承認を頂いている。その内容を忠実に順守して研究を行っている。

C. 研究結果

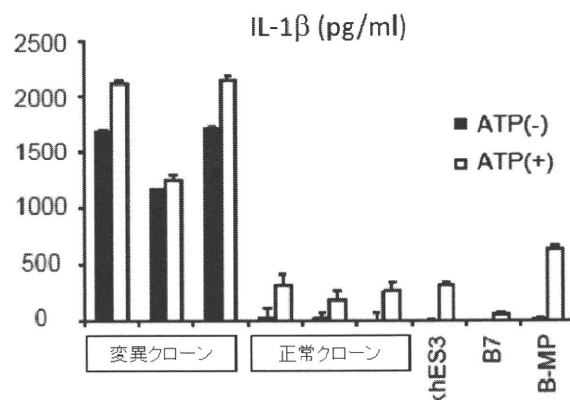
NLRP3 遺伝子変異の体細胞モザイクで発症した CINCA 症候群患者2例から、同意を得て皮膚を採取した。皮膚より線維芽細胞を増殖させ、これにレトロウイルスベクターを用いて4因子(cmyc, klf4, oct3/4, sox2)を導入し、複数のiPS細胞クローンを樹立した。患者が体細胞モザイクのため、iPS細胞クローンとして、NLRP3変異を持つものと持たないものの双方が得られた。

これをOP9フィーダー上で血球細胞へと分化させるところ、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。



患者iPS細胞由来マクロファージ



変異iPSC由来マクロファージによるIL-1 β 過剰産生

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、十分な検討が必要である。上記のように、本年度の研究は順調に目標を達成している。病態の再現が確認されたため、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。

E. 研究発表

1. 論文発表

1: Saito MK. Inflammasomes and related diseases. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi. 2011;34(1):20-8.

2: Kambe N, Satoh T, Tanizaki H, Fujisawa A, Saito MK, Nishikomori R. Enhanced NF- κ B activation with an inflammasome activator correlates with activity of autoinflammatory disease associated with NLRP3 mutations outside of exon 3: comment on the article by Jéru et al. Arthritis Rheum. 2010 Oct;62(10):3123-4; author reply 3124-5.

3: Kambe N, Nakamura Y, Saito M, Nishikomori R. The inflammasome, an innate immunity guardian, participates in skin urticarial reactions and contact hypersensitivity. Allergol Int. 2010 Jun;59(2):105-13. Epub 2010 Feb 25.

3. その他
該当なし

2. 学会発表

- 斎藤潤：疾患 iPS 細胞を用いた血液・免疫疾患の疾患モデリングと病態解析；第 10 回再生医療学会，2011 年 3 月 1 日～2 日，東京.
- 田中孝之、斎藤潤、中畑龍俊：疾患 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群の病態再現；第 4 回日本免疫不全症研究会 2011 年 1 月 22 日、福岡
- 斎藤潤：免疫・血液疾患における ES 細胞・iPS 細胞を用いた医療応用について；兵庫県小児懇話会 2010 年 11 月 5 日、神戸

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

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（出願中）

出願日：2010/11/18

出願番号：61/415,102

出願国：米国

発明者：中畑龍俊/斎藤潤/田中孝之/山中伸弥

発明の名称：多能性幹細胞から樹状細胞への分化誘導法（出願中）

出願日：2011/2/23

出願番号：61/445,856

出願国：米国

発明者：中畑龍俊/斎藤潤/丹羽明/柳町昌克

2. 実用新案登録

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 |
|--|---|-----------------------------|-----|-----------|------|
| Sakai H, Ito S, Nishikomori R, Takaoka Y, Kawai T, Saito M, Okafuji I, Yasumi T, Heike I, Nakahata T. | A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene. | Rheumatology (Oxford). | 49 | 194-196 | 2010 |
| Kato I, Umeda K, Aways 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 |
| Mizuno Y, Chang H, Umeda K, Niwa A, Iwasa T, Aways T, Fukada S, Hiroshi Yamamoto H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike I. | Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. | FASEB J. | 24 | 2245-2253 | 2010 |
| 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 | 252-257 | 2010 |
| 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 | 8639-8643 | 2010 |
| 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 |
| Iwasa T, Baba S, Doi H, Kaichi S, Yokoo N, Mima T, Kanatsu-Shimohara M, Shimohara 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 | 27-33 | 2010 |
| 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 | 5429-5431 | 2010 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|--|--|----------------------------|-----|-----------|------|
| Kumada T, Yamanaka Y, Kitano A, Shibata M, Awaya T, Kato T, Okawa K, Abe T, Oshima N, <u>Nakahata T</u> , <u>Heike T</u> . | Tyhl, a Ca(2+)-binding protein localized to the endoplasmic reticulum, is required for early embryonic development. | Dev Dyn. | 239 | 2233-2245 | 2010 |
| Mukaiida K, Kusunoki T, Morimoto T, <u>Nishikomori R</u> , Yasumi T, <u>Heike T</u> , Fujii T, <u>Nakahata T</u> .: 59: 369-374 | The effect of past food avoidance due to allergic symptoms on the growth of children at school age. | Allergology International. | 59 | 369-374 | 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-Ghoniaim A, Day-Good NK, Holland SM, Gallin JI, Chapel H, Speert DP, Rodriguez-Gallego C, Colino E, Garry BZ, Roifman C, Hara T, Yoshikawa H, Nonoyama S, Domachowski J, Issekutz AC, Tang M, Smart J, Zitnik SE, Hoarau C, Kumaratne 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, <u>Hara T</u> , for The HIL/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 |

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 |
|---|--|---|------|-----------|------|
| 中畑龍俊 | 増血因子と臨床応用 | 臨床検査 | 54 | 623-629 | 2010 |
| 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 | 139 | 632-634 | 2010 |
| 9. 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 | 63 | 1803-1807 | 2010 |
| 河合利尚 | 慢性肉芽腫症 | 小児科診療 | 73増刊 | 226-228 | 2010 |
| 斎藤潤 | インフラマソームとその関連疾患の最近の知見 | 日本臨床免疫学会雑誌 | 34 | 20-28 | 2011 |
| 西小森隆太、田中尚子、井澤和司 | CAPS | 医学のあゆみ | 235 | 1170-1174 | 2010 |
| 松本玲子、松村由美、宮地良樹、西小森隆太 | 足底にみられた新生児エリテマトーデス | 皮膚の科学 | 9 | 197-198 | 2010 |
| 西小森隆太 | 【TLR/NLR/RLRと消化器疾患】 Inflammasomeの異常ほどのような疾患に関するのか | 分子消化器病 | 34 | 236-240 | 2010 |
| 西小森隆太、酒井秀政、平家俊男 | 【自己炎症疾患】 高IgD症候群の病態から炎症を考える | 細胞 | 42 | 376-378 | 2010 |
| 神戸直智、西小森隆太 | 【「分子標的薬」時代へ 投与のコツと副反応のコントロール】 新しい分子標的薬のトピックス IL-1をターゲットとした炎症性皮膚疾患の治療 | Visual Dermatology | 9 | 850-852 | 2010 |
| 西小森隆太、河合朋樹、内尾寛子、神戸直智、松村由美 | 【子どもの皮膚疾患の診かた】 小児皮膚疾患 色素失調症 | 小児科 | 51 | 636-637 | 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 |
| 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IL-1抗体 タロロイキン(IL)製剤 抗IL-1抗体 | アレルギー・免疫 | 17 | 222-227 | 2010 |

研究成果の刊行に関する一覧表(書籍)

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------------------|---------------------|-----------------|-------------------------|-------|-----|------|---------|
| 原 寿郎 | 自己炎症性症候群 | 金沢一郎 永井良三 | 今日の診断指針 症候編第6版 | 医学書院 | 東京 | 2010 | 印刷中 |
| 原 寿郎 | 小児疾患の動向 | 金沢一郎 永井良三 | 今日の診断指針 症候編第6版 | 医学書院 | 東京 | 2010 | 印刷中 |
| 原 寿郎 | 新生児疾患の動向 | 金沢一郎 永井良三 | 今日の診断指針 症候編第6版 | 医学書院 | 東京 | 2010 | 印刷中 |
| 土居 岳彦、大賀 正一、原 寿郎 | 免疫疾患 慢性活動性EBウイルス感染症 | 五十嵐 隆 | 総合小児科診療のための小児科学レビュー2010 | 総合医学社 | 東京 | 2010 | 印刷中 |
| 斎藤潤、西小森 隆太 | 免疫疾患 | 内山 聖、原 寿郎、高橋孝 雄 | EBM小児疾患の治療 | 中外医学社 | 東京 | 2011 | 374-380 |

V. 研究成果の刊行物・印刷物

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】

iPS細胞と遺伝性疾患

中 畑 龍 俊

別 刷

日本医師会雑誌

第139巻・第3号

平成22(2010)年6月

【遺伝性疾患の新しい治療と今後期待される治療研究】

iPS 細胞と遺伝性疾患

中畑龍俊

キーワード●疾患特異的 iPS 細胞, 遺伝性疾患, 疾患モデル, 創薬

はじめに

Induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) のもつ最も画期的な臨床的側面は, さまざまな疾患の患者から疾患特異的 iPS 細胞を樹立できることである。この細胞を用いて, 遺伝性疾患の病態解析, 新規治療法の開発などへの応用が期待されている。京都大学では Duchenne 型筋ジストロフィー患者を第 1 例目として, 疾患特異的 iPS 細胞の作製が 2008 年 6 月より開始された。その後, 多くの疾患患者から iPS 細胞が樹立され, さまざまな解析が始まっている。

iPS 細胞の発見

2006 年, 京都大学の山中教授らはマウス線維芽細胞にたった 4 つの転写因子遺伝子を導入することにより, embryonic stem cell (ES 細胞) と比べても遜色がない能力をもつ iPS 細胞の樹立に成功し, 世界中に大きな衝撃を与えた¹⁾。翌年, 彼らはヒト iPS 細胞の樹立にも成功した²⁾。

iPS 細胞は ES 細胞同様, ほぼ無限の自己複製能とさまざまな細胞への多分化能を併せ持つ細胞であり, 基礎研究への貢献, 再生医療や創薬への応用など, さまざまな面が期待されている。われわれは当初から, 遺伝性疾患を中心に患者

皮膚などから iPS 細胞を作製し, それを用いた疾患の病因, 病態解析を中心に研究している³⁾。

疾患特異的 iPS 細胞

疾患特異的 iPS 細胞を用いることにより, 患者に還元されるさまざまな研究の進展が期待される。いくつかの可能性を列記してみたい。

1. 診断への応用

iPS 細胞から生検が困難な組織の細胞に分化させ, それを用いた診断が期待される。患者皮膚などから樹立した iPS 細胞を生検困難な大脳, 小脳, 脊髄などの中枢神経組織に分化させ, それを使った診断や病態解析が考えられる。心筋, 軟骨, 肺, 膵臓などの組織は生検可能であるが, 大量の組織を繰り返し採取することはできないので, そのような場合も対象となりうるだろう。

2. 疾患の発症機序の解明

患者から作製した iPS 細胞を患部と同じ組織に分化させることができれば, 病気の発症機構を詳細に解析できる可能性がある。健常人と患者の iPS 細胞を同じように分化させて, 各分化段階の細胞を回収して比較することにより, 今までとは違った手法で疾患の本態に迫ることが期待される。

Induced Pluripotent Stem Cells and Genetic Diseases

Tatsutoshi Nakahata : Clinical Application Department, Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University

京都大学 iPS 細胞研究所教授 (医療応用技術開発部門疾患解析学分野)

また、HAX1 遺伝子異常を伴う Kostmann 症候群では好中球減少と中枢神経の異常を、SBDS 遺伝子異常を伴う Shwachman 症候群では膵外分泌の異常と造血障害を合併することが知られているが、関係のなさそうな2つの異常がなぜ合併するのか分かっていない。これらの患者から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、その細胞から血液(好中球)、神経、膵臓に分化させ、その過程を正常と比較することにより、新たな知見を得るための研究が開始されている。

3. 疾患モデルの構築

iPS 細胞技術は、今までモデル動物のなかった疾患に対して新しいモデルを提供すると考えられる。たとえば、脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy ; SMA) と筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis ; ALS) は、筋組織を支配している運動ニューロンが選択的に変性、死滅し、その結果、筋力低下、筋萎縮が生じ、不幸な転帰をとる疾患である。共に良いモデル動物がないことから、病態解明が進んでいないが、iPS 細胞技術を使うことで、SMA、ALS 患者の皮膚細胞から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、この iPS 細胞から SMA、ALS 患者と同じ遺伝子セットをもつ運動ニューロン細胞を大量に作り出すことができるようになった。この運動ニューロン細胞を使うことで、これらの疾患の病態解析や、薬剤探索のスタートラインに立つことができるようになった。

実際、最近、SMA や familial dysautonomia (家族性自律神経失調症) 患者から作製された iPS 細胞を用いて、新規薬剤を開発した事例が報告され^{4,5)}、疾患特異的 iPS 細胞はさまざまな疾患の新規治療法の開発に貢献できることが明確に示された。

4. 時空を超えて疾患の本態に迫る

Duchenne 型筋ジストロフィー患者は一般に10歳ころに歩けなくなり、20歳ぐらいで人工呼吸器が必要となる。たとえば10歳の患者から筋生検をして診断する際、皮膚または筋肉の

細胞から iPS 細胞を樹立すると、その細胞から分化させた骨格筋組織は、いわば生まれたての筋肉の細胞と同じ状態であることが予想される。つまり10年間という時間を過去に遡って、そのときの筋肉の状態と現在の筋組織を比較することが可能になると考えられる。このような手法は今までには考えられなかったことであり、iPS 細胞がもつ強力なインパクトではないかと思っている。

5. 患者自身の細胞を使った薬物試験

新薬の開発に当たっては、一般的に、前臨床試験として動物実験を行った後、健常人である程度安全性を確認してから患者での臨床試験に移ることが多い。しかし、動物実験の結果は必ずしもヒトに当てはまらず、健常人には異常がなくても、患者では重篤な副作用が出現することがしばしば問題となる。実際に薬を投与されるのは患者なのだから、患者の細胞そのものを使って毒性試験や有効試験をするほうがよいはずであり、疾患特異的 iPS 細胞から目的とする細胞に分化させ、その細胞を用いて毒性試験や有効試験を行う時代が始まろうとしている。

6. 新しい遺伝子治療の可能性

従来の遺伝子治療は、限定した自己複製能しかもたない体性幹細胞に遺伝子を導入して、患者に細胞を戻すという方法で実施されてきたが、あまりうまくいかなかった。

iPS 細胞はほぼ無限の自己複製能をもっているため、患者から作製した iPS 細胞の遺伝子を修復して、正常化されたクローンだけを選択して増やすことができる。すでにマウスでは、鎌状赤血球のモデルマウスから作製した iPS 細胞の異常遺伝子を修復し、修復された iPS 細胞から作られた造血前駆細胞を用いた移植実験で、鎌状赤血球マウスの貧血が改善されたモデルが報告されている⁶⁾。将来の遺伝子治療は、iPS 細胞を使って行う治療法となっていくのではないかと筆者は考えている。