

201024149A

# 厚生労働科学研究費補助金

## 難治性疾患克服研究事業

日本人特有の病態を呈する高IgD症候群に向けた  
新規診療基盤の **確立**

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 平家 俊男

平成23（2011）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

日本人特有の病態を呈する高IgD症候群に向けた  
新規診療基盤の開発（H22－難治－一般－094）

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 平家 俊男

平成23（2011）年 4月

# 目次

## I. 総括研究報告

- 日本人特有の病態を呈する高IgD症候群に向けた新規診療基盤の確立に関する研究 …… 1  
平家 俊男  
(資料) 高IgD症候群の確定診断のための二次調査用紙

## 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 …… 19  
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 … 23  
重松 陽介
- 5 自己免疫疾患の疫学に関する研究 …… 27  
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 …… 31  
荒川 浩一
- 7 高IgD症候群の疫学に関する研究 …… 35  
原 寿郎

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …… 39

## IV. 研究成果の刊行物・別冊 …… 45

## 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

#### 日本人特有の病態を呈する高 IgD 症候群に向けた新規診療基盤の確立 に関する研究

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。H21 年度の実態調査において、日本において確定診断例 9 例、疑診例 7 例の症例集積を見たが、H22 年度の本研究においては、この 16 例について個別二次調査を行うとともに、我々が開発した MK 活性測定、尿中メバロン酸測定により、診断の確定を行ったところ、真の高 IgD 症候群の症例は、6 例に留まる事を見出した。日本の高 IgD 症候群の診療に大きな問題が存在することが明らかとなった。今後、この確定診断例について、詳細な診療情報を収集し整理することにより、確固とした診療基盤の開発を行う。

一方、高 IgD 症候群は、自己炎症性疾患としての病態とともに、メバロン酸キナーゼ活性低下という代謝病としての病態を併せ持つ。確定診断例から保護者の同意を頂いた上、高 IgD 症候群 iPS 細胞を作成し、病態解明とともに治療基盤の開発を行う。

## 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22年度の研究において、1)、2)、3)については、ほぼ達成できた。平成21年度の一次調査において、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。その結果、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ため、平成22年度の調査研究として、この16例について、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るとともに、2)で我々が開発した確定診断法を用いて、真の高IgD症候群の把握を行った。その結果、真の高IgD症候群の症例は、6例に留まる事を見出した。

これらの確定診断例における詳細な診療情報を集積、整理し、日本における高IgD症候群の診療基盤の整備を行っている。この検索により、日本における真の高IgD症候群のさらなる集積、およびそれらの病態について把握が可能となり、欧米人と特徴と異なるとされる日本の高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細胞の作成については、確定診断例6例のうち5例について、保護者より同意書を取得して皮膚生検を終了しており、iPS細胞作成を行っている。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。平成21年度の本研究助成による調査により、平確定診断例9例、疑診例6例の症例集積を得たが、平成22年度の二次調査およびメバロン酸キナーゼ活性測定、尿中メバロン酸測定により、真の高IgD症候群の症例は、6例に留まる結果を得た。

このように、日本の高IgD症候群診断の精度という意味では、疑問の念が払拭しきれない。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)活性測定の迅速、確実な系を確立し、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真の高IgD症候群6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か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パロン酸キナーゼ (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 のグラニルグラニル化修飾異常により IL-1 $\beta$  産生抑制機能が喪失し、IL-1 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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。現在 CAPS (cryopyrin-associated periodic fever syndrome) に対して、新規の抗 IL-1 製剤である Cananinumab の臨床治験が行われている。本剤は、既存の抗 IL-1 製剤である Anakinra に比較して、使用についていくつかの利便性を認める。今後高 IgD 症候群についても、倫理委員会の承認のもと臨床研究として、Cananinumab の有用性について検討を行っていく。

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. Tahara M, Sakai H, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Nagata I, Inui A, Fujisawa T, Shigematsu Y, Nishijima K, Kuwakado K, Watabe S, Kameyama J : Patient with neonatal-onset chronic hepatitis presenting with mevalonate kinase deficiency with a novel MVK gene mutation. *Rheumatology* 2011 in press
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, 2010.
3. Kusunoki T, Morimoto T, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Mukaida K, Fujii T, Nakahata T: Breastfeeding and the prevalence of allergic diseases in schoolchildren: Does reverse causation matter? *Pediatr Allergy Immunol.* 21:60-66, 2010.
4. 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* 24:2245-2253, 2010.
5. 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 : 315-322, 2010
6. 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.* 226 : 248-254, 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. 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.* 30;5(11):e14173. 2010
  9. 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.* 59(4):369-74 2010
- 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.
  2. 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.
  3. 八角高裕、村田祐樹、井澤和司、斎藤潤、西小森隆太、中畑龍俊、平家俊男：フローサイトメトリーを用いた家族性血球貪食症候群 Type3(FHL3)の迅速診断. 第113回日本小児科学会 2010.
  4. 河合朋樹、西小森隆太、阿部純也、横山宏司、井澤和司、田中尚子、酒井秀政、村田祐樹、八角高裕、平家俊男：外胚葉形成不全免疫不全症に高頻度にみられるリバージョンモザイクズムについての検討. 第113回日本小児科学会 2010.4
  5. 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 2010.
  6. 河田紗耶架、柴田洋史、田中篤志、横山宏司、八角高裕、西小森隆太、平家俊男：プロピルチオウラシル (PTU) による ANCA 関連血管炎と考えられた1女児例. 第415回日本小児科学会京都地方会 2010. 井澤和司、西小森隆太、阿部純也、酒井秀政、谷風尚子、村田祐樹、河合朋樹、八角高裕、平家俊男、平城

徹、平城直子、大嶋勇成：寒冷刺激による発熱と凍瘡を契機に診断に至った、TREX1 変異を伴う

Aicardi-Goutieres syndrome の 1 例とその 1 家系. 第 4 回日本免疫不全症研究会 2011.

#### 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

MKD/HIDS の二次調査票 ご施設名 ( \_\_\_\_\_ ) 御芳名 ( \_\_\_\_\_ 先生)

診断根拠 (すべて選択) 診断時年齢 \_\_\_\_\_ 歳 \_\_\_\_\_ カ月 現年齢 \_\_\_\_\_ 歳 \_\_\_\_\_ カ月 (男・女)  
臨床症状・血清 IgD ( \_\_\_\_\_ mg/dl) ・尿中メバロン酸 ( \_\_\_\_\_ ug/mg・Cr) ・MK 活性 ( \_\_\_\_\_ %) ・  
MVK 変異・家族歴・その他 ( \_\_\_\_\_ )  
MVK 変異 有・無・未検 変異部位 (V377I など) ( \_\_\_\_\_ )

※所見内容など、書ききれない場合は裏面を御利用ください。

臨床症状 初発症状時年齢 \_\_\_\_\_ 歳 \_\_\_\_\_ カ月  
発熱 明らかな発熱発作の誘因 (ワクチン・感染症・外傷・その他) 内容 ( \_\_\_\_\_ )  
HIDS 以外の鑑別診断 (FMF・JIA・PFAPA・感染症・悪性腫瘍・その他 ( \_\_\_\_\_ ))  
発熱頻度 (1年当り) (a.12回以上 b.7-11回 c.1-6回 d.1回未満) 血清 IgD ( \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ mg/dl)  
発熱の持続日数 (A.1日以内 B.2-3日 C.4-7日 D.7日以上) 血清 IgA ( \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ mg/dl)  
発熱時のおよそ WBC ( \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ /ul)、CRP ( \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ mg/dl)  
間欠期のおよそ WBC ( \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ /ul)、CRP ( \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ mg/dl)

※発症 10年以上経過の患者さんは、発熱頻度・日数の変遷を以下に記号で選択してください。

発症 10・20年 発熱頻度 (\_\_\_\_) 持続日数 (\_\_\_\_) 発症 20年以後 発熱頻度 (\_\_\_\_) 持続日数 (\_\_\_\_)

発熱発作中の併発症状 腹痛(有・無) 嘔吐(有・無) 下痢(有・無) 試験開腹術(有・無)  
関節痛(有 (部位 \_\_\_\_\_ )・無) アフトロ内炎(有・無)  
咽頭炎(有・無) 扁桃炎(有・無) リンパ節腫脹 (有・無) 脾腫 (有・無)  
肝臓腫大・肝機能異常 (有 (GPT = \_\_\_\_\_ ~ \_\_\_\_\_ IU/L 前後)・無)  
皮疹 斑点様丘疹(有・無) 膨疹(有・無) 紫斑(有・無) 陰部潰瘍(有・無) 結節性紅斑(有・無)

合併症 アミロイドーシス (有・無) 部位 ( \_\_\_\_\_ )  
関節拘縮 (有・無) 部位 ( \_\_\_\_\_ ) 腸管癒着 (有・無)

就学 (可・不可・未) 最終学歴 (小・中・高・大) 就職 (可・不可・未)

結婚 (既・未) 女性の場合→出産 (可・不可・未)

治療詳細 ステロイド PSL 換算発作時投与量 ( \_\_\_\_\_ mg/kg/day) 維持投与量 ( \_\_\_\_\_ mg/kg/day)  
statin (有・無・中止) 開始年齢 \_\_\_\_\_ 歳 効果 (著効・有効・無効・不明)  
生物学的製剤 (あれば) ( \_\_\_\_\_ ) 開始 \_\_\_\_\_ 歳 効果 (著効・有効・無効・不明)

※御差し支えなければ、裏面などを利用して、特異的な経過や、簡単な病歴、家系図などをお示し下さい。

## 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 細胞研究所教授）

#### 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。その多彩な臨床症状は、コレステロール代謝に関与する MK の異常により、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 $\beta$  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。本研究は、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ことを目的に行われた。

本年度、京都大学医の倫理委員会により承認された研究計画に従い、高 IgD 症候群ヒト疾患特異的 iPS 細胞作成のための研究を進めた。

高 IgD 症候群の 5 名の患者からインフォームドコンセントを取得し、皮膚生検により皮膚組織を頂いた。皮膚組織は細片化後、10%FCS 存在下 DMEM 中で 3 週間培養し、トリプシン処理により増殖した細胞を回収し、洗浄後、新たな 4 枚のシャーレに播種し培養する。このような培養を繰り返すことにより、十分な量の線維芽細胞のストックを作成中である。

今後、作成された線維芽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、Klf4、 $\pm$ c-Myc/L-Myc）を導入することにより iPS 細胞を作成する予定である。

## 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 $\beta$  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 $\beta$  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. 研究方法

高IgD症候群患者よりiPS細胞を作成する。京都大学医の倫理委員会により認められた「ヒト疾患特異的iPS細胞の作成とそれを用いた疾患解析のに関する研究」の研究計画に従って研究を開始した。iPS細胞研究所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疾患特異的iPS細胞の樹立を行うこととした。

MK遺伝子の発現は、血球、非血球系細胞両者に見られるが、骨髄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・マクロファージ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であるNOD/SCID/c $\gamma$  null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

高 IgD 症候群の 5 名の患者からインフォームドコンセントを取得した。皮膚生検により皮膚組織を頂いた。採取された組織に関する個人情報、連結可能匿名化された。生検で得られた皮膚組織は 6 cm のプラスチックシャーレ中で細片化した後、10%FCS 存在下、DMEM 中で培養した。培養 3 週間後、トリプシン処理により増殖した細胞を回収し、洗浄後、新たな 4 枚のシャーレに播種し培養する。このような培養を繰り返すことにより、十分な量の線維芽細胞のストックを作成中である。

今後、作成された線維芽細胞にレトロ

ウイルスベクターを用いて 3 あるいは 4 遺伝子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、± c-Myc/L-Myc) を導入することにより iPS 細胞を作成する予定である。

上記のシステムを稼働させるべく、現在、iPS 細胞研究所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

我々は現在までに、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 細胞を作成してきた。多くの疾患では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が、通常の方法では iPS 細胞が樹立できない疾患も存在することが明らかとなってきた。今までに得られたこれらの情報を参考にし、高 IgD 症候群患者由来 iPS 細胞作成も、開始できる状況にあると思われる。

今後、高 IgD 症候群患者由来 iPS 細胞が樹立できた暁には、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 細胞と比較検討するとともに、患者病態を解析するための評価システムを構築していく予定である。

#### 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。5 名の高 IgD 症候群の患者さんから同意を頂き、皮膚線維芽細胞のストックを作成中であ

る。近く 3 (4) 因子を用いた高 IgD 症候群患者由来 iPS 細胞の作成を開始する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### 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 (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. 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

4. 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
5. 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 年
6. 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 年

## 2) 学会発表

1. 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 2010.4 盛岡市民文化ホール
2. 中畑龍俊: Various clinical applications of human induced pluripotent stem cells (iPS cells). 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会 2010.7 栃木県総合文化センター
3. 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 2010.12 月 国立京都国際会館
4. 丹羽明、齋藤潤、加藤格、大嶋宏一、百瀬大、高橋和利、末盛博文、中辻憲夫、山中伸弥、平家俊男、中畑龍俊: ヒト ES/iPS 細胞からの試験管内造血系を用いた分化過程の解析. 第 9 回日本再生医療学会総会 2010.3

広島国際会議場

5. 村田祐樹、八角高裕、井澤和司、西小森隆太、平家俊男、齋藤潤、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
6. 八角高裕、村田祐樹、井澤和司、西小森隆太、平家俊男、齋藤潤、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
7. 村田祐樹、八角高裕、井澤和司、齋藤潤、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

## 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

## 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

#### 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。本研究では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系の確立を目指した。

遺伝子診断で診断が確定した高 IgD 症候群症例、高 IgD 症候群キャリア症例、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、それぞれの群において、活性値は有為に差を認めた。さらに各群間でオーバーラップはなく、メバロン酸キナーゼ活性測定が高 IgD 症候群診断に有用であることを証明した。

## 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、初診時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、正常コントロール、高 IgD 症候群患者、高 IgD 症候群ヘテロキャリアーでのメバロン酸キナーゼ活性を測定し、本邦における高 IgD 症候群の診断系の確立を試みた。

## B. 研究方法

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高い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、などが挙げられる。

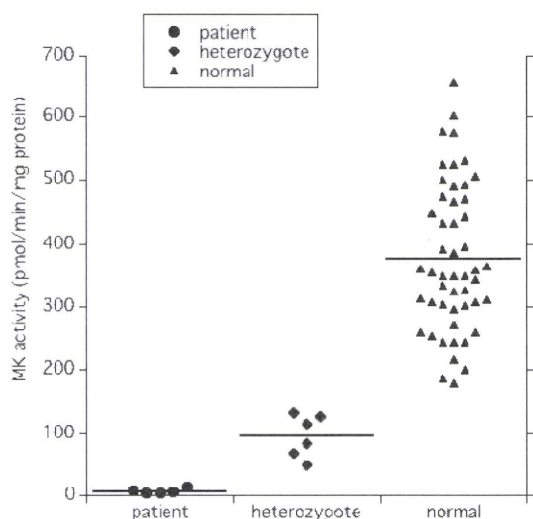
PHA刺激により作成したT細胞株を遠心して細胞ペレットとし、凍結融解を繰り返すことにより細胞溶解液とした。得られた細胞溶解液の蛋白濃度を測定し、細胞融解液の蛋白として5  $\mu$ gを一条件として測定した。3H-メバロノラクトンはアルカリ化によりメバロン酸に変化させ、ATPとバッファーと合わせてタンパクと37°Cで25分間反応させた。反応した混合物をブタノール:水:ギ酸=77:13:10の吸着バッファーにより、TLCプレート上で薄層クロマトグラフィーを行い、リン酸化メバロン酸とメバロン酸とを分離した。分離したそれぞれの分画を液体シンチレーションカウンターで測定し、毎分単位蛋白量あたりのメバ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

健康人50名よりPHA芽球を分化させ測定を行ったところ、 $376.6 \pm 115.0$  pmol/min/mg という数値を得られ、既に確定している高 IgD 症候群患者 (N=5) では  $6.5 \pm 3.9$  pmol/min/mg、MVK 遺伝子にヘテロの変異を持つ患者の両親 (N=6) では、 $95.9 \pm 31.0$  pmol/min/mg であった。これらを正常の数値で除した値は、患者は  $1.7 \pm 1.0$  %、変異遺伝子ヘテロキャリアは  $25.2 \pm 8.2$  %であった。以上により、本法は MVK 遺伝子の両方のアレ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と考えられた。

2010年に京都大学小児科にMK活性測定依頼のあった不明熱疾患の患者数は全国から44名であり、うち43名はMK活性が正常範囲  $401.3 \pm 120.8$  pmol/min/mg ( $106.5 \pm 32.1\%$ )であった。1名で  $8.0$  pmol/min/mg



(2.1%)とMK活性の低下を認め、遺伝子検査で本邦第一例報告症例と同一の遺伝子型G326Rホモ接合体変異が確認できた。なお、この患児と本邦第一例との間に血縁関係はなかった。また、MK活性の正常範囲例のうちMVK遺伝子解析の同意が取得出来た全ての患者でMVK遺伝子に有意な変異を認めなかった。このことは、当科におけるMK活性測定が高IgD症候群の診断において、MVK遺伝子解析に代わる役目を十分果たしうることを示唆した。

#### 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レ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、この変異アレ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という変異は認めず、人種差による変異遺伝子型の違いが想定される。

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り、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5アレルのうち、実に3アレ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。

今回、我々が樹立したメバロン酸キナーゼ活性測定は、正常例、患者例、キャリアー症例を区別することができ、また患者例ではMVK遺伝子異常も確認できた。即ち、高IgD症候群を診断する上で、信頼できる機能解析系が樹立できた。

#### E. 結論

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。同測定法により、高IgD患者、キャリアー、正常コントロールを区別することができ、診断に有用であることを証明した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 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.

2) 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.

3) 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

1) 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, 齋藤潤, 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.

2) 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.

3) 西小森隆太, 田中尚子, 井澤和司, 齋藤潤, 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.

## H. 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