

201024230A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

**中條一西村症候群の疾患概念の確立と
病態解明に基づく特異的治療法の開発**

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 古川 福実

平成23（2011）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

中條一西村症候群の疾患概念の確立と病態解明に基づく
特異的治療法の開発

古川 福実 ----- 1

II. 分担研究報告

1. 中條一西村症候群の遺伝子変異の検索・原因遺伝子の同定

吉浦 孝一郎 ----- 11

2. 中條一西村症候群の分子・細胞機能異常の検索

有馬 和彦 ----- 20

3. 中條一西村症候群患者から得られた細胞・組織を使った
病態解明へのアプローチ

井田 弘明 ----- 29

4. 中條一西村症候群患者検体の解析・追加疫学調査と
疑い症例の検討

金澤 伸雄 ----- 37

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 47

総括研究報告

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

中條一西村症候群の疾患概念の確立と
病態解明に基づく特異的治療法の開発

研究代表者

古川 福実 和歌山県立医科大学医学部皮膚科 教授

研究分担者

吉浦 孝一郎 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
人類遺伝学 教授

有馬 和彦 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
分子設計学 助教

井田 弘明 久留米大学医学部
呼吸器・神経・膠原病内科 准教授

金澤 伸雄 和歌山県立医科大学医学部皮膚科 講師

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

中條-西村症候群の疾患概念の確立と病態解明に基づく特異的治療法の開発

研究代表者：古川 福実 和歌山県立医科大学医学部皮膚科 教授

研究要旨

中條-西村症候群（ORPHA 2615, MIM 256040）は、乳幼児期に凍瘡様皮疹で発症し、弛張熱や結節性紅斑様皮疹を伴い、次第に顔面・上肢を中心とした上半身のやせと拘縮を伴う長く節くれ立った指趾が明らかになる特異な遺伝性炎症・消耗性疾患である。

本研究班は、本疾患の病態解明と特異的治療法の開発を目標に、症例の蓄積があり臨床疫学的アプローチを担当する和歌山県立医科大学皮膚科学教室を中心に、分子遺伝学的アプローチを担当する長崎大学人類遺伝学教室、細胞生物学的アプローチを担当する同大学病態解析学教室により平成 22 年度に組織された「中條-西村症候群の疾患概念の確立と病態解明へのアプローチ」班を発展的に継続し、細胞生物学的アプローチを長崎大学分子設計学教室と久留米大学呼吸器・神経・膠原病内科学教室が共同で担当するように変更したものである。本年度の研究の結果、(1) 患者ゲノムのホモ接合部マッピングにより、免疫プロテアソームのサブユニットをコードする *PSMB8* 遺伝子のホモ変異を同定した。検索しえた患者全てに同じ変異を認め、強い founder effect を伴った。(2) 患者由来不死化リンパ球株において、プロテアソームサブユニットの合成・成熟が阻害され、キモトリプシン様、トリプシン様、カスパーゼ様蛋白分解活性はいずれも低下し、特にキモトリプシン様活性の低下が著明であった。(3) 患者病変部皮膚に浸潤する細胞には、シグナル伝達に関わる K63 よりもプロテアソームの識別に関わる K48 ポリユビキチン鎖の蓄積が著明であり、患者由来初代培養線維芽細胞を用いた EMSA 法にて、NF-Kb p65 の挙動は健常者由来細胞と差がなかった。(4) 患者血清・患者由来線維芽細胞培養上清ともに IL-6 の高値を認めた。関西と東北地方の 300 床以上の病院の関連各科を対象に行った追加疫学調査では新たな症例は見出されなかったが、海外より *PSMB8* 遺伝子変異による類似疾患の報告があった。本研究によって、プロテアソーム病という新たな疾患概念が生まれつつあり、今後、iPS 細胞やノックインマウスも用いた更なる研究の進展によって、病態の全体像が明らかとなり、特異的に作用する分子標的薬の適応あるいは開発につながれば、患者や家族に福音をもたらすのみならず、医学研究領域に本邦発の大きなインパクトを与えることが期待される。

A. 研究目的

中條-西村症候群（ORPHA 2615, MIM 256040）は、乳幼児期に凍瘡様皮疹で発症し、弛張熱や結節性紅斑様皮疹を伴い、次第に顔面・上肢を中心とした上半身のやせと拘縮を伴う長く節くれ立った指趾が明らかになる特異な遺伝性疾患であり、有効な治療法はなく多くの症例が早死する。昨年度「中條-西村症候群の疾患概念の確立と病態解明へのアプローチ」研究班によって行われた全国調査によって、現在生存する患者は関西に 11 例あるのみであることが判明し、特に 1 例は調査対象外であった 300 床の病院で見出された新規幼児例であった。

本研究は、昨年度研究班を発展的に継続し、和歌山県立医科大学皮膚科学教室を中心に、同教室による患者検体の解析・追加疫学調査と疑い症例の検討、長崎大学人類遺伝学教室による遺伝子変異の検索・原因遺伝子の同定、同大学分子設計学教室による分子・細胞機能異常の検索と久留米大学呼吸器・神経・膠原病内科学教室による細胞・組織を使った病態解明へのアプローチを合わせて、稀少難治性疾患である中條-西村症候群の病態解明と、それに基づいた特異的な治療法を開発することを目的としている。

B. 研究方法

遺伝子変異の検索・原因遺伝子の同定 (担当：吉浦孝一郎)

和歌山県立医科大学皮膚科でフォロー中

の患者 5 名と非罹患兄弟 3 名の末梢血から抽出したゲノム DNA について、Affimetrix GeneChip Human Mapping 500k array set を用いて全ゲノム SNP（一塩基多型）タイピングを行い、さらに Partek Genomics Suite v6.4 を用いてホモ接合マッピングを行った。患者 5 名とも共通にホモ遺伝子型領域が連続しかつ非罹患兄弟でホモ遺伝子型が連続しない 1.1Mb 領域を同定し、含まれる 53 遺伝子すべてについて、エキソン-イントロン境界を含む全エキソンを PCR にて増幅し直接シーケンスすることにより、変異検索を行った。

さらに、見つかった変異部位周辺の SNP をデータベースから選択し、患者 7 名・患者の親 1 名・健常人 8 名について、ゲノム PCR 後に直接シーケンスを行ってホモ接合であるかを確認した。

分子・細胞機能異常の検索（担当：有馬和彦）

和歌山県立医科大学皮膚科でフォロー中の患者 3 名とその家族 5 名の不死化リンパ球株について、真核生物のプロテアソームが有する代表的な蛋白分解活性(キモトリプシン様、トリプシン様、カスパーゼ様活性)を、それぞれの特異的配列を含有する蛍光標識ペプチド基質 (Suc-LLVY-MCA, Boc-LRR-MCA, Z-LLE-MCA) とマルチプレートリーダー Arvo x3 を用いて測定した。さらに詳細に検討するため、グリセオール濃度勾配を用いた超遠心分画法にてプロテア

ソームを含む 32 の分画を分離し、各分画について、上記蛍光標識したペプチド基質を用いて各酵素活性を測定した。

また、プロテアソームを構成する α , β サブユニットの発現をウエスタンブロット法にて検討した。

患者細胞・組織を使った病態解明へのアプローチ (担当：井田弘明)

患者末梢血由来不死化リンパ球株からタンパク質を抽出、ウエスタンブロット法でポリユビキチンを検出し、健常者から樹立した細胞株と比較した。

患者の凍瘡様皮疹部における皮膚生検組織を K48 および K63 ポリユビキチン鎖に対するモノクローナル抗体で免疫染色し、関節リウマチ患者滑膜組織、大腸癌患者癌部位と比較した。

さらに、患者由来初代培養線維芽細胞における NF- κ b p65 の動態を EMSA (electrophoretic mobility shift assay) 法にて検討し、健常者から樹立した細胞株と比較した。

患者検体の解析・追加疫学調査と疑い症例の検討 (担当：金澤伸雄)

和歌山県立医科大学皮膚科でフォローしている患者とその家族について、血清中と初代培養線維芽細胞の培養上清中のサイトカイン、特に IL-6 について、ELISA にて測定した。また PHA と PWM による末梢血リンパ球幼弱試験も検討した。

関西と東北地方の 300 床以上 500 床未満

の病院の関連各科(免疫・代謝・神経内科、整形外科、小児科、皮膚科)に対して、昨年度と同様の追加疫学調査を行った。

昨年に諸外国から報告された JMP 症候群と CANDLE 症候群との関連について、文献的に検討した。

(倫理面への配慮)

なお本研究は、和歌山県立医科大学および長崎大学の倫理委員会の承認を得て開始され、全ての試料は書面にてインフォームドコンセントを得て収集されたものである。

C. 研究結果

遺伝子変異の検索・原因遺伝子の同定

染色体 6p21.31-32 (NCBI Build 36.1; 32,798,004-33,903,106) の 1.1 Mb に含まれる 53 個の遺伝子について変異解析を行った結果、一般集団 272 名には存在せず、患者にのみホモ接合で存在する変異が一つ見つかった。*PSMB8* (NCBI database; NM_148919) 遺伝子のエキソン 5 の nonsynonymous (ミスセンス) 変異であった。塩基配列上では 602G>T、アミノ酸としては Gly201Val (G201V) と表記される。見つかった変異について患者 7 名の変異解析をしたところ、全員同じ変異のホモ接合体であった。

変異の前後それぞれ約 15kb、合計 30kb のゲノム領域にある SNP をデータベースから選び、患者 7 名・親 1 名・健常者 8 名の遺伝子型を決定した。すべての SNP で患者全員がホモ接合であり、患者親はヘテロ接合の部分も存在し、一般集団ではヘテロ接

合が十分な頻度で確認された。患者間でホモ接合領域が重なっている領域は founder 由来であり、本変異は founder 由来であると推察される。

分子・細胞機能異常の検索

患者由来不死化リンパ球株の総プロテアソーム活性は健常者由来リンパ球株と比較して低下していた。プロテアソームの代表的蛋白分解活性であるキモトリプシン様・トリプシン様・カスパーゼ様活性は全て低下し、特にキモトリプシン様活性の著明な低下を認めた。分離したプロテアソーム分画を用いた検討でも同様の結果であった。

ウエスタンブロット法では、成熟した 26S と 20S プロテアソーム分画において、すべての α サブユニット蛋白と β サブユニット蛋白が患者由来細胞で減少していた。一方、未成熟プロテアソーム分画においては、健常者由来細胞では認められない α サブユニット蛋白の蓄積と β サブユニット蛋白の成熟前のプロペプチドの蓄積の増加を認めた。更に、遺伝子変異を持つ *PSMB8* がコードする蛋白においては、移動度が異なる未知のバンドの存在を認めた。

患者細胞・組織を使った病態解明へのアプローチ

患者由来不死化リンパ球株で強くポリユビキチンの蓄積が見られ、この結果は初代培養線維芽細胞でも同様であった。

患者病変部皮膚の浸潤細胞においては、K48 ポリユビキチン鎖が強く、K63 ポリユ

ビキチン鎖は弱く染色された。転写因子 NF- κ B p65 の挙動を EMSA 法にて検討したが、TNF- α 刺激前後で、スーパーシフトを含め、患者由来線維芽細胞と健常者由来細胞で差はなかった。

患者検体の解析・追加疫学調査と疑い症例の検討

血清の multiplex ELISA 解析にて、中條—西村症候群患者においては健常者に比べ IL-6・G-CSF・IP-10 と MCP-1 が有意に高く、IL-17 が有意に低値を示した。初代培養線維芽細胞の培養上清中 IL-6 に関しても、患者由来細胞で、健常者由来細胞に比べて無刺激で有意に高く、TNF- α 刺激によってさらに高い産生を認めた。

一方、PHA と PWM によるリンパ球幼弱試験では、患者においても健常者と同様の増殖活性化能を認めた。

追加疫学調査として、関西 530 施設（うち和歌山県内 19 施設）と東北 231 施設に一次調査用紙を送付したが、それぞれ 117 施設（和歌山 9 施設）と 70 施設から回答を得、回答率はそれぞれ 22%（47%）と 30%であった。新規患者は確定、疑い例ともになかった。そのほか 4 疑い例について遺伝子検索を行ったが、いずれも診断基準案を満たさず、また *PSMB8* 遺伝子のエキソンにアミノ酸置換を伴うような変異はなかった。

2010 年 3 月に報告された CANDLE（Chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperature）症候群は、スペインの 4 症例とイスラエル

の1症例を含み、弛張熱、出没する浸潤性紅斑、脂肪筋肉萎縮、肝脾腫、大脳基底核石灰化等の症状を呈し、中條—西村症候群と酷似し、長く節くれ立った指も認める。

2010年9月に報告されたJMP症候群(an autosomal recessive syndrome of joint contractures, muscular atrophy, microcytic anemia, and panniculitis-associated lipodystrophy)も、ポルトガルとメキシコの兄弟例を含み、家族内発症・浸潤性紅斑(脂肪織炎)・脂肪筋肉萎縮・手足の関節拘縮・肝脾腫・大脳基底核石灰化等の症状を呈し、中條—西村症候群の診断基準を満たす。ただ発熱はなく、てんかんや小球性貧血、強い関節拘縮などの症状があり、本症候群と近いが異なる疾患と考えられたが、12月に、*PSMB8* 遺伝子の異なる一塩基変異が原因であることが報告された。

D. 考察

昨年度研究班から継続する患者ゲノムのホモ接合体マッピングにより、染色体6p21上に局在する*PSMB8* 遺伝子のエキソン5のミスセンス変異602G>T (G201V)のホモ接合体が、中條—西村症候群の原因であることが遺伝学上確定した。複数の患者に共通であるのみならず、ヘテロ接合体を持つ患者の両親・兄弟とは重ならないという条件により、早期に遺伝子座を狭く絞り込むことができた。最も驚くべきことは、患者7名に見出された変異が全て同じであったことである。強いfounder effectからも、患者が皆このfounderの子孫であることは疑い

ない。症例は泉南から和歌山にかけての狭い範囲に集中するが、そのような症例のみならず、新潟の症例も含まれていることから、本邦症例に広く共通な変異と考えられる。ポルトガルとメキシコの症例に*PSMB8* 遺伝子の異なる変異が見つかったことから、変異が民族特異的である可能性も想定される。

PSMB8 遺伝子がコードする免疫プロテアソームサブユニットは、炎症刺激によってプロテアソームサブユニットと入れ替わってプロテアソーム複合体に組み込まれ、MHCに提示されやすいペプチドを効率的に切り出すようになることとされる。プロテアソームの研究は本邦が世界をリードしており、東京都臨床医学総合研究所の田中啓二先生はこの領域の第一人者である。長崎大学分子設計学のグループは、田中啓二先生と東京大学大学院薬学系研究科蛋白質代謝学教室の村田瑞穂先生の協力を得て、詳細なプロテアソーム機能解析とウエスタンブロット法による発現解析を行い、中條—西村症候群患者細胞でのプロテアソーム蛋白分解機能活性の低下と各サブユニットの合成・成熟不全を見事に明らかにした。すなわち本疾患は、ほ乳動物においてプロテアソーム機能不全によって発症することが明らかとなった初めての疾患である。

ではなぜプロテアソーム機能不全によって自己炎症・消耗性疾患が発症するのか？

炎症・免疫の活性化において中心的な役割を持つ転写因子であるNF- κ Bの活性化には、プロテアソームによるI κ Bの分解が必

要であるが、このときプロテアソームは I κ B に結合したポリユビキチン鎖を認識する。プロテアソームによる蛋白質分解の多くが、48 番目のリジンを紹介して重合した K48 ポリユビキチン鎖を識別する一方、63 番目のリジンを紹介して重合した K63 ポリユビキチン鎖は蛋白質結合ドメインとして機能し、シグナル伝達や DNA 修復に関与するとされる。久留米大学呼吸器・神経・膠原病内科学のグループは、昨年度に見出した中條—西村症候群の皮疹に浸潤する CD68 陽性細胞に蓄積するユビキチンについて、さらに K48 と K63 ポリユビキチン特異的抗体で染色し、K48 ポリユビキチン鎖が多く蓄積することを見出した。EMSA 法にて NF- κ B p65 の挙動を検討したが、TNF- α 刺激前後で患者と健常者由来の線維芽細胞に差を認めず、本症候群の慢性炎症には NF- κ B 以外の経路が関係している可能性が示唆された。

では炎症症状の源は何か？患者血清中のサイトカイン濃度を網羅的に検索した結果、中條—西村症候群患者においては、IL-6・G-CSF・IP-10・MCP-1 が有意に高く、IL-17 が有意に低かった。IL-6 は患者由来初代培養線維芽細胞においても無刺激で有意に高い産生を認め、本疾患の病態形成に一役買っているものと考えられた。抗 IL-6 受容体抗体製剤であるトシリツマブが若年性特発性リウマチに対して保険適応があることを考えると、将来の臨床応用の可能性は十分ある。しかし、プロテアソーム機能不全から IL-6 過剰産生に至る経路、さらに IL-6 過剰産生から脂肪筋肉萎縮・大脳基底核石灰

化に至る経路の解明はまだこれからである。

関西と東北に絞って追加疫学調査を行ったが、新たな症例を見出すことはできなかった。また 4 大学小児科より問い合わせのあった疑い例は、いずれも診断基準を満たさず、*PSMB8* の変異も認めなかった。従って、症状が出揃う前の乳幼児例についての問題が残るものの、昨年度に作成した診断基準案に合わない症例は見出されていない。

最後に、今年度大きな衝撃を受けたのは、諸外国からの類似疾患の報告である。

CANDLE 症候群・JMP 症候群ともに、中條—西村症候群の診断基準案を満たす。特に CANDLE 症候群は長く節くれ立った指も認め、臨床写真でも本症候群と酷似するため、当方での遺伝子検索を提案したが、拒否された。JMP 症候群は、発熱はないが、てんかんや小球性貧血、強い関節拘縮を認めるなど、近いが異なる疾患と考えられたが、12 月に、*PSMB8* 遺伝子の 224C>T (T75M) 変異が原因であることが報告された。この変異ではプロテアソーム各サブユニットの合成は正常で、酵素活性のうちキモトリプシン様活性のみ特異的に低下し、血清中サイトカインでは IL-6 のほかに IL-8 と IFN- γ の高値を認めたとあり、臨床像の違いを反映したものかもしれない。

今年度も積極的に学会や雑誌にて本疾患の紹介を行った。新たな自己炎症疾患としての本疾患の紹介、全国調査のまとめを、京都免疫ワークショップ（高月清奨励賞）・

日本リウマチ学会総会・日本皮膚科学会総会（ポスター賞）・日本アレルギー学会春期臨床大会・日本皮膚科学会東部支部学術大会（会長賞）、さらに国際免疫学会・国際自己炎症カンファレンス・欧州研究皮膚科学会・東アジア皮膚科会議などの国際学会で発表し、また新規幼児例について、日本皮膚科学会中部支部学術大会、日本免疫不全症研究会、日本小児リウマチ学会総会などで報告した。

JMP 症候群の原因遺伝子が *PSMB8* であることが報告され、プロテアソーム遺伝子異常による新しい自己炎症疾患を世界で初めて発信することはできなくなったが、遺伝子変異から疾患発現に至る経路を可能な限り明らかにし、科学領域トップジャーナルに論文を掲載することを目指している。

類似疾患を含め、プロテアソーム異常による自己炎症・消耗性疾患が次々と世に出ることで、プロテアソーム病という新たな疾患概念が生まれ、研究が進むことが予想される。遺伝子変異から症状発現に至る経路の解明が進み、新たな分子標的薬の適応あるいは開発のターゲットとして世界中で検討が加えられることによって有効な治療薬が開発されれば、本疾患の患者や家族に福音がもたらされるのみならず、医学研究領域にとって大きなインパクトになると期待される。

さらに本疾患は既知のいずれの自己炎症疾患とも異なり、病気の進行に従って自己抗体が出現するという特徴を有しており、プロテアソーム異常によって抗原提示が異

常となっている可能性がある。また本疾患は、特徴的な大脳基底核の石灰化や進行性の脂肪筋肉萎縮などに見られるように、発育・代謝異常、消耗性疾患としての側面も併せ持つことから、プロテアソームを中心とした本疾患の病態解明が神経・筋・骨関節・脂肪などにおける代謝ホメオスタシスの解明、さらには糖尿病や肥満などの生活習慣病の病態解明に広くつながる可能性がある。

E. 結論

本研究によって、プロテアソーム病という新たな疾患概念が生まれつつある。iPS細胞やノックインマウスを用いた解析を駆使して、本疾患の詳細な病態解明を行うと同時に、有効な治療薬の探索を行う必要があり、有効な治療薬の同定、創薬につながれば、本疾患の患者や家族に福音をもたらすのみならず、医学研究領域にとって本邦発の大きなインパクトとなりうる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 井田弘明：自己炎症症候群 久留米医学会雑誌 73(11-12): 312-318, 2010
2. 井田弘明、金澤伸雄：中條-西村症候群 医学のあゆみ 235(12-13): 1191-1195, 2010

3. 井田弘明：自己炎症症候群 カレントセラピー 28(10): 970-971, 2010

4. 金澤伸雄：自己炎症性疾患とは？マルホ皮膚科セミナー放送内容集 203: 48-52, 2010

5. 金澤伸雄：自己炎症疾患. 日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会雑誌 4: 23-29, 2010

6. 金澤伸雄, 古川福実, 松中成浩, 小池通夫, 杉野禮俊：凍瘡様皮疹と限局性脂肪萎縮を伴う自己炎症疾患である家族性日本熱（中條-西村症候群）. 日本小児皮膚科学会雑誌 29: 7-12, 2010

7. 金澤伸雄：自己炎症疾患とは. 皮膚病診療 33: 8-14, 2011

8. Kanazawa N: Hereditary autoinflammatory diseases with skin manifestations. The 22nd World Congress of Dermatology Special Book PP 270-274, 2011

2. 学会発表

国内学会

第 13 回京都免疫ワークショップ学術集会 2010.2.13, 大阪

西山瑞穂, 中谷友美, 金澤伸雄, 古川福実：
中條-西村症候群（家族性日本熱）：凍瘡様皮疹と限局性脂肪萎縮を伴う日本固有の遺伝性周期熱症候群（高月清奨励賞）

第 109 回日本皮膚科学会総会 2010.4.16-18, 大阪

西山瑞穂, 中谷友美, 金澤伸雄, 古川福実,
上出康二：中條-西村症候群（家族性日本熱）の全国疫学調査のまとめ（ポスター賞）

第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010.4.22-25, 神戸

井田弘明, 有馬和彦, 金澤伸雄, 江口勝美
自己炎症症候群から学ぶポストゲノム時代の蛋白機能解析

金澤伸雄, 井田弘明, 古川福実：中條-西村症候群（家族性日本熱）の全国疫学調査のまとめ

第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2010.5.8-9, 京都

西山瑞穂, 中谷友美, 金澤伸雄, 古川福実：
中條-西村症候群（家族性日本熱）の全国疫学調査のまとめ

第 57 回日本臨床検査医学会学術集会 2010.9.9-12, 東京

井田弘明：自己炎症疾患の診断と病態解析

第 61 回日本皮膚科学会中部支部総会・学術大会 2010.9.11-12, 大阪

国本佳代, 木村文子, 上出康二, 青柳憲幸,
金澤伸雄, 古川福実：中條-西村症候群の新規幼児例

第 74 回日本皮膚科学会東部支部学術大

会 2010.11.20-21, 仙台

金澤伸雄, 豊澤聖子, 中谷友美, 古川福実 :
中條-西村症候群 (家族性日本熱) の東北
症例のまとめ (会長賞)

**第 4 回日本免疫不全症研究会 2011.1.22,
福岡**

金澤伸雄, 国本佳代, 木村文子, 上出康二,
青柳憲幸, 月野隆一, 鈴木啓之, 古川福実 :
中條-西村症候群の新規幼児例

**第 11 回浜名湖皮膚病理研究会
2011.1.29, 浜松**

木村文子, 国本佳代, 上出康二, 青柳憲幸,
古川福実, 金澤伸雄 : 凍瘡様紅斑を繰り返
す幼児の 1 例

**第 20 回日本小児リウマチ学会総会・学
術集会 2011.2.11-13, 沖縄**

国本佳代, 木村文子, 上出康二, 青柳憲幸,
月野隆一, 鈴木啓之, 古川福実, 金澤伸雄 :
中條-西村症候群の新規幼児例

国際学会

**14th International Congress of Immunology,
2010.8.22-27, Kobe, Japan**

Kanazawa N, Furukawa E, Matsunaka M,
Sugino H, Yoshiura K, Ida H: Familial
Japanese fever (Nakajo-Nishimura syndrome):
a novel autoinflammatory syndrome with
periodic fever, skin eruptions and partial
lipodystrophy.

**6th International Conference on FMF and
other Autoinflammatory Diseases, 2010.9.2-6,
Amsterdam, The Netherlands**

Ida H, Arima K, Kinoshita A, Mishima H,
Kanazawa N, Furukawa E, Yoshiura K, Eguchi
K: Functional human protein analysis in the
post-genome era learning to new
autoinflammatory syndrome (Nakajo-
Nishimura syndrome).

Kanazawa N, Ida H, Yoshiura K, Furukawa E:
National surveillance of Nakajo-Nishimura
syndrome (familial Japanese fever) in Japan.

**40th Annual Meeting of the European Society
for Dermatological Research, 2010.9.8-11,
Helsinki, Finland**

Kanazawa N, Furukawa E, Matsunaka M,
Sugino H, Yoshiura K, Ida H: Familial
Japanese fever (Nakajo-Nishimura syndrome):
a novel autoinflammatory syndrome with
periodic fever, skin eruptions and partial
lipodystrophy.

**The First Eastern Asia Dermatology
Congress, 2010.9.30-10.3. Fukuoka, Japan**

Nishiyama M, Kanazawa N, Furukawa E,
Matsunaka M, Sugino H, Yoshiura K, Ida H:
Familial Japanese fever (Nakajyo-Nishimura
syndrome): a novel autoinflammatory
syndrome with periodic fever, skin eruptions
and partial lipodystrophy.

The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2010.12.3-5, Wakayama, Japan

Kanazawa N, Arima K, Mishima H, Furukawa F, Ida H, Yoshiura K: A mutation of the immunoproteasome subunit gene causes a novel autoinflammatory disorder Nakajo-Nishimura syndrome (familial Japanese fever).

Kanazawa N: Finding *in vivo* critical pathways by the analysis of rare hereditary autoinflammatory disorders

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許得取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

平成 22 年度分担研究報告書

中條-西村症候群の疾患概念の確立と病態解明に基づく特異的治療法の開発

研究項目：中條-西村症候群の遺伝子変異の検索・原因遺伝子の同定

分担研究者：吉浦 孝一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）

研究協力者：木下 晃（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教）

研究協力者：三嶋 博之（長崎大学 COE 研究員）

研究要旨

中條-西村症候群は、乳幼児期に凍瘡様皮疹で発症し、弛張熱や結節性紅斑様皮疹を伴い、次第に顔面・上肢を中心とした上半身のやせと拘縮を伴う長く節くれ立った指趾が明らかになる特異な遺伝性疾患である。

本研究において、分担研究者である長崎大学人類遺伝学研究グループは、原因遺伝子変異を明らかとし病態解明をはかることを第一目標に掲げた。昨年度は疾患患者から提供された血液試料を用いてホモ接合マッピングを行い、遺伝子座候補領域を確定させたので、本年度は候補領域内の全ての遺伝子について変異解析をおこない原因遺伝子を同定した。

A. 研究目的

本研究は、和歌山県立医科大学の皮膚科学教室を中心として、遺伝性炎症性疾患である中條-西村症候群の病態解明を目指し、本難病の治療への手がかりをつかむことを目的としている。長崎大学人類遺伝学グループでは、治療に向けて基本となる原因遺伝子同定を分子遺伝学的手法により行うことが第一目的である。

中條-西村症候群は、乳幼児期に凍瘡様皮疹で発症し、弛張熱や結節性紅斑様皮疹を伴い、次第に顔面・上肢を中心とした上半身のやせと拘縮を伴う長く節くれ

立った指趾が明らかになる特異な遺伝性疾患で、有効な治療法がなく多くの症例が早死する。本邦特有とされ東北と泉南から和歌山地方に偏在する。家族内発症が見られ血族婚により発症していることから、常染色体劣性遺伝形式であると推定できる。

我々は平成 21 年度に患者から提供された血液試料を用いてホモ接合マッピングを行い、遺伝子座候補領域を確定させた。本年度は候補領域に存在するすべての遺伝子について変異解析をおこない DNA 変異を見つけることを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象患者とホモ接合マッピング

中條-西村症候群患者は、和歌山県立医科大学皮膚科において経過観察されている患者 5 名の血液試料と 3 名の非罹患兄弟試料を提供してもらいホモ接合マッピング解析に用いた。

ホモ接合マッピングは Affymetrix 社の GeneChip Human Mapping 500K array set を用いてジェノタイピング後に Partek Genomics Suite v6.4 (Partek 社) を使用し、共通にホモ遺伝子型領域が連続する部分を選定し、その場所を原因遺伝子が存在する候補領域とした。「ホモ遺伝子型が連続する領域」の基準は患者において 500 kb 以上連続する領域とし、最後にそれらの領域を重ねあわせて、患者 5 名とも共通にホモ遺伝子型領域が連続する領域でかつ非罹患兄弟で「ホモ遺伝子型が連続しない領域」を中條-西村症候群の原因遺伝子座とした。500 kb のカットオフ値の設定は、血族婚でない一般集団の GeneChip Human Mapping 500K array set のデータに基づき決定した。

2. 候補遺伝子の変異解析

上記ホモ接合マッピング法によって、全ゲノム中の一箇所 1.1 Mb が候補領域と考えられ、そこに存在する 53 遺伝子すべてについて変異解析をおこなった。変異解析は、database の情報からエクソン-イントロン境界を含んだエクソン部分の塩基配列情報を取得し PCR にて増幅後、直接シーケンス

法で塩基配列決定を行った。53 遺伝子の splice variant も含めた全てのエクソンに対して変異解析を行った。

3. SNP array タイピングによるホモ接合マッピング法の検証および変異部位周辺の haplotype 決定

Affymetrix 社の GeneChip Human Mapping 500K array set により描出され、患者に共通にホモ接合領域と判定された部分が、本当に連続したホモ接合領域であるか、すなわち、本実験手法がうまくはたらいっているかを検証した。見つかった変異部位周辺の SNP をデータベースから選択し、患者 7 名、患者の親 1 名、正常健常人 8 名を PCR 後に直接シーケンスを行ってホモ接合領域であるかを確認した。

(倫理面への配慮)

全ての試料は書面にてインフォームドコンセントを得て収集された試料である。本研究の研究対象試料は、和歌山県立医科大学および長崎大学の臨床研究倫理委員会に承認を得て開始された。

C. 研究結果

1. GeneChip Human Mapping 500K array set を使ったホモ接合マッピング

患者 5 名において「ホモ遺伝子型が 500 kb 以上連続する領域」かつ非罹患兄弟 3 名で「ホモ遺伝子型が連続しない領域」を合成し候補領域を選定したところ、染色体 6p21.31-32 (32,798,004 to 33,903,106; NCBI Build 36.1) の 1.1 Mb が唯一の候補領域として同定された。

2. 候補遺伝子の変異解析

中條-西村症候群の原因遺伝子の存在が示唆される候補領域にある 53 個の遺伝子について、splice variant も含め全てのエ

キソン-イントロン境界部を含んで PCR にて増幅後、直接シーケンス法によって変異解析を行った。一般集団 272 名には存在せず、患者にのみホモ接合で存在する変異が一つ見つかった。*PSMB8* (NM_148919 in NCBI database) 遺伝子のエキソン 5 の nonsynonymous (ミスセンス) 変異であった(図 1)。塩基配列上では 602 (602G>T) と表記され、アミノ酸としては Gly201Val (G201V) と表記される。見つかった変異について患者 7 名を変異解析した。全員同じ変異のホモ接合体であった。

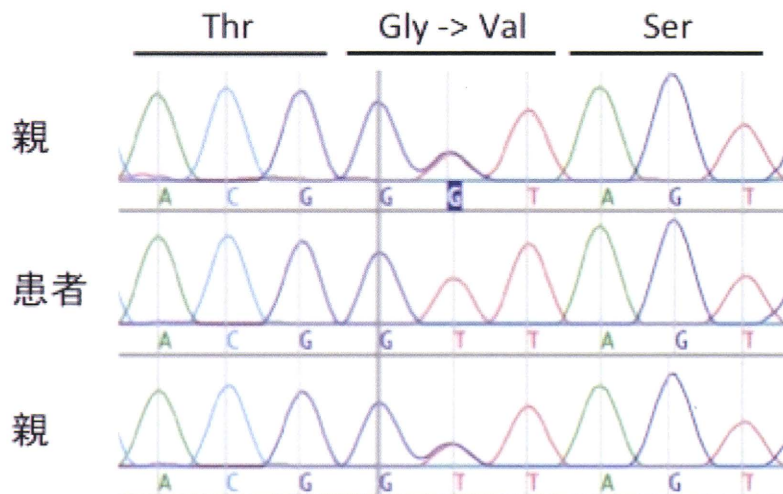


図 1. 同定された DNA 変異

3. SNP array タイピングによるホモ接合マッピング法の検証

唯一見つかった DNA 変異を含むゲノム塩基配列の前後それぞれ約 15 kb, 合計 30kb

のゲノム領域にある SNP をデータベースから選び、患者 7 名, 親 1 名, 正常健常人 8

名の遺伝子型を決定した (表 1)。患者 7 名は, SNP 500K によってタイピングした 5 名の他 3 名も加えて解析をおこなった。すべての SNP で患者全員がホモ接合であり, 患者親はヘテロ接合の部分も存在し, 一般集団ではヘテロ接合が十分な頻度で確認され

た。GeneChip Human Mapping 500K array set で抽出した患者間でホモ接合領域が重なっている領域は founder 由来であり, 本変異は founder 由来であると推察される。

SNP name	position	TJMT1								MMG-1	MMG-2	MMG-3	MMG-4	MMG-6	MMG-7	MMG-8	MMG-9
		患者親	TJMT4	SyPt	SBNPt	NKOPt	NKPt	FM	ISZWPt								
TAP 2																	
rs 2857103	chr6:32,899,277	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	GG	TT	GG	GT	GG	GG	GT	TT
rs 10484565	chr6:32,903,010	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	AG	AG	GG	GG	GG	GG	GG
rs 4148876でのSeq	chr6:32,904,750	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	AA	GA	AA	GA	AA	AA	GG	GG
rs 241439でのSeq	chr6:32,905,500	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AC	AC	AC	AA
rs 241439	chr6:32,905,515	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	AA	AC	AC	AC	AC	AA	AC	CC
rs 241433でのseq	chr6:32,906,768	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	AA	GA	GG	AA	GG	GA	GG	GA
rs 241433	chr6:32,906,773	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	GT	TT	GG	GT	GT	TT
rs 4148872	chr6:32,910,785	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GG
rs 241429	chr6:32,911,819	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	TC	CC	TT	TC	TC	CC
rs 3819717	chr6:32,912,277	TC	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	CC	TC	TC	CC	TT	TC	TT	TC
rs 241425	chr6:32,912,887	TC	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TC	CC	TT	CC	TC	TC	TT
rs 4148870	chr6:32,914,369	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	GG	GA	GA	GA	AA	GA	GA	GG
rs 4713598	chr6:32,914,764	GT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	GT	GT	TT	GG	GT	GT	TT
rs 3763366	chr6:32,915,424	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	GG	CG	CG	GG	CC	CG	CG	GG
rs 3763364	chr6:32,915,498	AT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	AA	TT	TT	TT
PSMB8 gene																	
rs 3763349	chr6:32,916,210	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	TT	TC	TC	TT	CC	TC	TC	TT
PSMB8 (6025>T: G201V: GGT>G TT)	chr6:32,917,426	GT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs 9357155	chr6:32,917,826	AG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	AG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs 9276810	chr6:32,918,421	AG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	AG	GG	GG	AA	AG	AG	GG
rs 6924102	chr6:32,919,361	AG	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AG	AG	AA	GG	AG	AG	AA
rs 4713599	chr6:32,919,508	AC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs 2071543	chr6:32,919,607	AC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	AC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs 2071463	chr6:32,920,506	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	AA	AG	GG	AA	GG	AG	GG	AG
rs 2071541	chr6:32,920,836	TC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	TT	TT	TC	TT	TT	TT	TT	TT
rs 2071540	chr6:32,920,894	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	AA	AG	GG	AA	GG	AG	AG	AA
TAP 1																	
rs 1057373	chr6:32,921,257	GT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	GG	GG	GT	GG	GG	GG	GG	GG
rs 4711312	chr6:32,922,637	AG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	AA	AA	AG	AA	AA	AA	AA	AA
rs 735883	chr6:32,924,032	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CT	CC	TT	CT	CT	CC
rs 2071482	chr6:32,924,678	GT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	GG	GG	GT	GG	GG	GG	GG	GG
rs 4148882	chr6:32,924,936	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	CC	TC	TT	CC	TT	TC	TC	CC
rs 12527715	chr6:32,924,976	TC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	TT	TT	TC	TT	TT	TT	TT	TT
rs 12529313	chr6:32,925,108	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	AA	AA	GA	AA	AA	AA	AA	AA
rs 2395269	chr6:32,925,752	GT	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	TT	TT	GT	TT	TT	TT	TT	TT
rs 2071538	chr6:32,926,656	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	TT	CC	CC	TC	CC	TC	TC	TC
rs 4148880	chr6:32,926,752	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	AA	AA	GA	AA	AA	AA	AA	AA
rs 1351383	chr6:32,930,247	GT	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	TT	TT	GG	TT	GG	GT	GT	TT

D. 考察

GeneChip Human Mapping 500K array set によって、従兄弟婚患者の全ゲノム SNP タイピングを行い 500kb のカットオフ値をつかって ROH を描出した。正常兄弟によって疾患とは関連がないと思われる領域を候補から外すことで、約 1.1Mb の領域を中條-西村症候群の原因候補領域として抽出することが出来た。

候補領域から 1 個の missense mutation を見出し、患者 7 名全員に共通にホモ接合として保持されていた。変異の周辺の haplotype も共通に保持されていて founder mutation であることは確実である。

本変異遺伝子は、20S proteasome あるいは 28S proteasome の中でも、immunoproteasome と呼ばれる誘導型 proteasome を構成するサブユニットである。本変異の発見によって、proteasome が炎症の惹起に関与していることが明らかとなった。

E. 結論

候補領域から中條-西村症候群原因遺伝子・原因変異を同定した。今後は、本変異による proteasome 異常により生体内で何が起きているのか、炎症に繋がる経路は何なのかを明らかにしていく必要がある。PSMB8 遺伝子変異のマウスへの導入を通して in vivo での PSMB8 の多彩な機能を明らかにしていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Tsuda M, Yamada T, Mikoya T, Sogabe I, Nakashima M, Minakami H, Kishino T, Kinoshita A, Niikawa N, Hirano A, Yoshiura K. A type of familial cleft of the soft palate maps to 2p24.2-p24.1 or 2p21-p12. *J Hum Genet.* 2010 Feb;55(2): 124-126.
2. Takahata T, Yamada K, Yamada Y, Ono S, Kinoshita A, Matsuzaka T, Yoshiura KI, Kitaoka T. Novel mutations in the SIL1 gene in a Japanese pedigree with the Marinesco-Sjögren syndrome. *J Hum Genet.* 2010 Mar;55(3): 142-146.
3. Miura K, Miura S, Yoshiura K, Seminara S, Hamaguchi D, Niikawa N, Masuzaki H. A case of Kallmann syndrome carrying a missense mutation in alternatively spliced exon 8A encoding the immunoglobulin-like domain IIIb of fibroblast growth factor receptor 1. *Hum Reprod.* 2010 Apr;25(4): 1076-1080.
4. Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Beck AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC, Lee C, Turner EH, Smith JD, Rieder MJ, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, Niikawa N, Nickerson DA, Bamshad MJ, Shendure J. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki