

201128046A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中 畑 龍 俊

平成 24 (2012) 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 23 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) 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・分化系を確立する、を目標に研究を開始した。本年度は二年間の研究期間の最終年度に当たり、昨年度の成果を引き継いで、1) CAPS における慢性炎症に伴う動脈硬化の経時的な評価、抗サイトカイン療法による炎症性サイトカインの評価、2) NLRP3 変異陰性体細胞モザイクの国際調査と新たな体細胞モザイク診断法の確立、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、変異 NLRP3 機能の再現の確認を行った。

本報告書が関係者の参考になり、CAPS 診療の一助となれば幸いです。

平成 24 年 3 月 研究代表者 中畑 龍俊

目 次

I. 研究組織	1
II. 総括研究報告	3
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	
中畑 龍俊	
III. 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. CINCA 症候群における体細胞モザイクの頻度及びその臨床的特徴	15
平家 俊男	
4. NLRP3 体細胞モザイクの診断法の確立	19
西小森 隆太	
5. CAPS 患者特異的 iPS 細胞の樹立とその解析	23
斎藤 潤	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
V. 研究成果の刊行物・別刷	37

I. 研究組織

平成 23 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
	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. 総括研究報告書

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。

平成22年度より、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、事为目标に研究班を組織した。今年度は2年計画の最終年度であり、前年度の結果を踏まえ1)、2)、3)のそれぞれをさらにすすめた。

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、次世代シーケンサーを用いる診断法を確立し、正常50人の遺伝子解析結果を参考にその遺伝子解析にともなうエラー特性を算出し、診断可能か検討し、有望な結果をえた。

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 産生能や変異特異的細胞死について検討を行った。

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。経時的な観察を行い、抗IL-1療法の開始によって、動脈硬化の指標の増悪を防げることを確認した。また、トシリズマブ・アナキンラ投与時の血液・髄液中サイトカイン濃度を検討した。

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
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
西小森隆太	京都大学大学院医学研究科 発達小児科学 准教授
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 特定拠点講師

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-1 β 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-1 β 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-1 β 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。

今年度は昨年度を引き継ぐ形で、臨床症状の検討 (I項)、モザイク病態の解析 (II項)、及びiPS細胞の解析 (III項)を進めた。

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

昨年度の結果を受けて、今回1年後に同様の検査を行い経時的評価を行った。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

昨年に引き続き、NLRP3 変異陰性 CINCA 症候群症例の全血/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。NLRP3 変異の報告のあるエクソン3,4,6を、PCR法で増幅後、サブクローニングシサンガー法でシークエンシングを行った。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。また体細胞モザイク患者の各組織でのモザイク頻度の検討のため、頬粘膜、末梢血を用いてそれぞれの組織でのモザイク率を検討した。

II-2. 次世代シークエンサーを用いた 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、次世代シークエ

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。

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。本年度は主に、患者由来 iPS 細胞における表現型の解析を行った。

(倫理面への配慮)

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。

また、それぞれの分担研究者の所属機関においても、倫理委員会に研究計画の承認を受けている。

C : 研究結果

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

1 年後の経過観察では、stiffness parameter β は改善がみられ、その他の検査も増悪はみられなかった。

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

トシリズマブ投与前後では血清中 IL-6、IL-1 β に変化は認めず、Anakinra 投与により血清 IL-6 の低下を認めている。また髄液中の IL-6 は血清中に比べて高値を示していることが明らかとなった。さらにトシリズマブは髄液中で検出されず、髄液移行が認められないことが明らかとなった。Anakinra の投与により髄液中の IL-6 の低下を認めた。

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。モザイク患者の臨床症状検討では、皮疹、発熱、骨過形成、関節炎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。各組織でのモザイク率の検討を本邦 4 症例にて検討したが、いずれも同程度のモザイク率であり、発生初期の段階での変異発症が示唆された。

II-2. 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

本邦ですでに確認された NLRP3 体細胞モザイク 4 症例のゲノム DNA を用いて全 NLRP3 遺伝子を最低 500 回ずつ解析したところ、既知の体細胞モザイクが同定された。正常人 50 人でのエラー分布を検討したところ、両方向から読むことによりエラーと真のモザ

イクを判別することができ、CINCA 症候群の大半をしめるミスセンス変異であれば診断可能であることが分かった。

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。これを OP9 フィーダー上で機能的マクロファージに分化させ、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ることを確認した。さらに NLRP3 変異特異的に誘導される細胞死 (Pyronecrosis) の有無を検討したところ、変異細胞特異的にこの現象が確認された。これを用いて、創薬スクリーニングを開始した。

D : 考察及び今後の展望

I. CAPS における臨床像の解析

1 年後の経過観察では、全体として少なくとも増悪はみられず、IL-1 blocker 投与により、炎症が比較的良好にコントロールされている結果と考えられた。本疾患では、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。IL-1 blocker による特異的治療は、動脈硬化の観点からも患児の予後改善に貢献することが期待される (I-1)。

CAPS の治療として、ステロイド薬や各種の免疫抑制薬は無効であり、IL-1 β をターゲットとした Anakinra などの有効性が報告されている。一方、CAPS 症例において血清 IL-6 が高値を示し CRP や発熱など炎症病態への IL-6 の関連が考えられている。本研究では CAPS 症例に対して炎症病態における炎症性サイトカインとして IL-6 と IL-1 β を標的とした治療を行い、その臨床症状の改善と炎症性サイトカインプロファイルについて検討を行った。CAPS に対するトシリズマブは、中枢神経症状を示さない症例に有効であることが示唆された。また Anakinra の投与により血清ならびに髄液中の IL-6 も改善を認めたことは、CAPS の炎症病態において IL-1 β は中心的な炎症性サイトカインであることが考えられた。(I-2)

II. CAPS における NLRP3 体細胞モザイクの検討

NLRP3 体細胞モザイクは CINCA 症候群の主要病因の一つであることが確認された。今回の研究でモザイク変異が同定されなかった“真の NLRP3 変異陰性” CINCA 症候群症例については今後の検討を有する。臨床的には精神発達遅滞の合併率が低値であったが、他の臨床症状はヘテロ変異と差異を認めなかった。20-30%の細胞が変異を持つだけで、なぜヘテロ変異で 100%の細胞が変異を持つ状態と同様の炎症状態が惹起されるのか、病態を考える上で重要な検討課題と考えた。(II-1)

CINCA 症候群では 5%未満の体細胞モザイクも報告され、エラーと体細胞モザイクを如何に評価するかが問題であった。今回正常 50 人の遺伝子解析結果を

参考にその遺伝子解析にともなうエラー特性を算出し、診断可能か検討し、有望な結果をえた。(II-2)

III. CAPS 患者特異的 iPS 細胞の樹立とその解析

疾患 iPS 細胞を用いた病態再現に成功した。NLRP3 は痛風やアルツハイマー病など、様々な成人病における慢性炎症を制御していることが最近判明してきた。iPS 細胞を用いた創薬探索は、CAPS の新たな治療法につながる可能性もあるとともに、このような慢性炎症の制御にも役立つ可能性がある。(III)

E : 結論

以上のように、2 年間の研究期間に CAPS の病態を理解し、診療に役立てるための基盤を形成することができた。引き続き、CAPS の患者さんに貢献できるように、研究を継続していきたい。

F : 健康危険情報

特になし

G : 研究発表

1. 論文発表

1. Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Adachi S., Suemori H., Nakahata T., Heike T.: Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J. Cell. Physiol.* 226(5):1283-1291,2011.
2. Heike T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Nakahata T.: Autoinflammatory diseases-a new entity of inflammation. *Inflammation and Regeneration* 31:125-136, 2011.
3. Niwa A., Heike T., Umeda K., Oshima K., Kato I., Sakai H., Suemori H., Nakahata T., Saito M.: A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PloS ONE* 2011;6(7):e22261.
4. Murata Y., Yasumi T., Shirakawa R., Izawa K., Sakai H., Abe J., Tanaka N., Kawai T., Oshima K., Saito M., Nishikomori R., Ohara O., Ishii E., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc 13-4 protein. *Blood* 118: 1225-1230, 2011.
5. Tanaka N., Nishikomori R., Saito M., Izawa K., Sakuma M., Morimoto T., Kambe N., Watanabe S., Oshima K., Ohara O., Goldbach-Mansky R., Aksentjevich I., Arostegui J.I., Yague Jm Joost F., van Gijn M.E., SaintBasile G., Pontillo A., Kawai T., Yasumi T., Nakahata T., Horiuchi H., Heike T.: High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome patients; the results of an international multicenter collaborative study. *Arthritis Rheum.* 63:3625-3632,2011.
6. Hiejima E., Komatsu H., Takeda Y., Sogo T., Inui A., Okafuji I., Nishikomori R., Nakahata T., Fujisawa T.:

Acut liver failure in young children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis without macrophage activation syndrome: Report of two cases. *J. Pediatr. Child Health* in press.

7. Sakai H., Okafuji I., Nishikomori R., Abe J., Izawa K., Kambe N., Yasumi T., Nakahata T., Heike T.: The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation. *Int. Immunol.* In press.
 8. 中畑龍俊: iPS 細胞は長寿へ導く夢のタイムマシンである (特集 02 カラダを再生する画期的な細胞の誕生). *Back Up* 30:8-12, 2011.
 9. 中畑龍俊: 小児医療をめぐる最先端医学 iPS 細胞を用いた今後の医療. (特集 小児医療の最先端—これからの新たな展望—) *東京小児科医会報* 29 (3) :26-33, 2011.
 10. 中畑龍俊: 幹細胞に魅せられて. (リレー随想) *小児科臨床* 64(7): 1638-1645, 2011.
 11. 中畑龍俊: iPS 細胞の臨床応用の展望. *BIO Clinica* 26 (9):16-17 2011.
 12. 中畑龍俊: 疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子治療・個別化医療. *小児科* 52 (12) :1743-1749, 2011.
 13. 中畑龍俊: 再生医療の進歩 (II 再生医療の進歩). *小児科診療* 75(1) :57-63, 2012.
- #### 2. 学会発表
1. 中畑龍俊: 特別講演: iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 60 回日本医学検査学会 2011 年 6 月 5 日 東京国際フォーラム
 2. 中畑龍俊: iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 60 回日本医学検査学会 (市民公開講座) 2011 年 6 月 6 日 東京国際フォーラム
 3. 中畑龍俊: 教育講演: 疾患特異的 iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 28 回日本医学会総会 2011 年 9 月 17-18 日 (18 日) 東京国際展示場
 4. 粟屋智就、加藤竹雄、柴田実、中畑龍俊、平家俊男: ヒト ES/iPS 細胞から骨格筋への分化誘導と筋疾患への応用. 第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 12-14 日 (13 日) (口演) グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
 5. 田中孝之、斎藤潤、西小森隆太、平家俊男、中畑龍俊: 患者特異的 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群体細胞モザイクでの病態の再現と解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 12-14 日 (14 日) (口演) グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
 6. 酒井秀政、岡藤郁夫、西小森隆太、阿部純也、八角高裕、中畑龍俊、平家俊男: Langerhans 型巨細胞の形成には CD40-CD40L シグナルが必須である. 第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 12-14 日 (13 日) (ポスター) グランドプリンスホテル新高輪 (東京)
 7. 田中尚子、井澤和司、斎藤潤、作間未織、大嶋宏一、小原収、西小森隆太、森本剛、中畑龍俊、平家俊男: NLRP3 体細胞モザイクは CINCA 症候群

- の25%以上に認められる。第114回日本小児科学会学術集会 2011年8月12-14日(13日)(ポスター) グランドプリンスホテル新高輪(東京)
8. Tatsutoshi Nakahata: Keynote Lecture: Various clinical applications of human induced pluripotent stem cells. 2011 International Symposium on Recent Advances in Pluripotent Stem Cells & 7th Annual Meeting of Taiwan Society for Stem Cell Research
 9. 2011年10月1-2日(1日) Taipei Medical University, Taipei, Taiwan.
 10. Miyuki Tsumura, Satoshi Okada, Hidetoshi Sakai, Ryuta Nishikomori, Shin'ichiro Yasunaga, Motoaki Ohtsubo, Toshio Heike, Tatsutoshi Nakahata, Yoshihiro Takihara, Masao Kobayashi: Identification of a novel type of AD-STAT1 deficiency with mutations in the SH2 domain. 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14-16日(15日) 名古屋国際会議場
 11. 中畑龍俊: 特別講演: 小児疾患における iPS 細胞の応用. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会 2011年11月25~27日(25日) ベイシア文化ホール(前橋市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

Ⅲ. 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 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。我々はこれまで3例の CINCA 症候群患者を明らかにし、遺伝子診断で確定するとともに、単球の細胞死の特徴からスクリーニングすることによって新規患者をさらに同定した。またこの疾患は慢性炎症が持続することから動脈硬化のリスクが高いと想定されるが、これまで成人に至らず死亡していた例が多く、動脈硬化に関する報告はこれまでなかった。我々は3例の CINCA 症候群患者の動脈硬化の有無やその程度を超音波検査で 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解析した結果、動脈硬化の指数が高いことを初めて明らかにした。さらに、抗 IL-1 療法開始1年後に再度検査を行ったところ、これらの指数が改善した。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、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。

A. 研究目的

本研究の目的は CINCA 症候群 (chronic infantile neurologic cutaneous and articular syndrome) の診断法, 特に迅速診断に結びつくスクリーニング法の開発, および分子的基盤に基づく臨床像の解析である.

CINCA 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 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ため, 今回, 動脈硬化の有無・程度について検討した.

B. 研究方法

1. スクリーニング法の開発と有用性の

検討

CINCA 症候群患者, その疑い患者, 及び健常者を対象として, 末梢血単核球を $5 \times 10^6/\text{ml}$ で 24 時間, LPS ($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$) の存在下に培養し, 培養後の単核球の割合をフローサイトメーターで解析した.

2. 動脈硬化の解析

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). IL-1 blocker による治療を受けている症例であり, 今回 1 年後に同様の検査を行い経時的評価を行った.

C. 研究結果

CINCA 症候群患者末梢血単核球は LPS 刺激によって細胞死を起こすことが明らかにされている. この性質を利用して 2 例の heterozygous な NLRP3 遺伝子異常を確認した CINCA 症候群患者を解析したところ, いずれの患者でも単核球特異的な細胞死が観察された.

この方法を用いて, CINCA 症候群疑いの患者をスクリーニングした結果, 単核球の細胞死が観察され, 遺伝子解析により診断を確定し, 新たに CINCA 症候群患者を同定することができた. この患者の NLRP3 遺伝子は新規変異 (exon 3 ヘテロ G \rightarrow A, 354Ala \rightarrow Thr) であった.

次に動脈硬化に関する研究結果を以下に示す. 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，しかも年齢の高い症例ほど重症である傾向がみられた．1 年後の経過観察では，stiffness parameter β は改善がみられ，その他の検査も増悪はみられなかった．

2010 年 [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)

2011 年 [症例 1, 2, 3 (小児基準値)]

- 1) IMT: 0.47, 0.51, 0.56 (0.40) mm
- 2) stiffness parameter β :
2.43, 3.98, 7.39 (3.5-4.0)
- 3) baPWV: 716, 1139, 1389
(919-952) cm/s
- 4) ABI: 1.11, 0.92, 0.92 (1.00 以上)

D. 考察

本スクリーニング法にて新たに CINCA 症候群を診断することができた．この方法は NLRP3 遺伝子異常の体細胞 mosaicism 例には応用は難しいと考えられるが，簡便なスクリーニング法として有用である．

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，しかも年齢の高い症例ほど重症である傾向がみられた．1 年後の経過観察では，全体として少なくとも増悪はみられず，IL-1 blocker 投与により，炎症が比較的良好にコントロールされている結果と考えられた．

本疾患では，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．IL-1 blocker による特異的治療は，動脈硬化の観点からも患児の予後改善に貢献することが期待される．

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．抗 IL-1 療法は，動脈硬化の進展を抑制する効果がある可能性が示されたが，まだ経過観察期間が 1 年と短く，今後も経時的評価を継続する必要がある．

F. 研究発表

1. 1. Ishimura M, Takada H, Doi T, Imai K, Sasahara Y, Kanegane H, Nishikomori R, Morio T, Heike T, Kobayashi M, Ariga T, Tsuchiya S, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T. Nationwide survey of patients with primary immunodeficiency diseases in Japan. *J Clin Immunol*. 2011 Dec;31(6): 968-76.
2. 2. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsuki N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jul;128(1):223-225.

3. 3. Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Nonoyama S, Karasuyama H, Minegishi Y. Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. J Exp Med. 2011 Feb 14;208(2):235-49.
4. 4. 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. J Clin Immunol. 2011 Jun;31(3):309-14.

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 における炎症性サイトカインの治療による推移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。昨年度の分担では CAPS の臨床症状に関する検討を行い、NOMID と MWS の臨床症状の差異が発症時期と神経症状、視力障害、難聴で有ることが明らかとなった。本年度は CAPS 症例に対する治療として抗 IL-1 治療ならびに抗 IL-6 治療を行い、その炎症性サイトカインのプロファイル変化について検討を行い、CAPS の炎症病態に関わるサイトカインを明らかにする。

B. 研究方法

横浜市立大学附属病院小児科を受診中の CAPS 1 症例について、抗 IL-6 受容体抗体と抗 IL-1 受容体アンタゴニストによる治療を行い、その経過における炎症性サイトカイン（IL-1 β 、IL-6、TNF α ）について血清、髄液での測定を行った。

CAPS 症例は 12 歳男児。新生児期より蕁麻疹様皮疹・発熱・肛門周囲膿瘍を繰り返し、CRP は常に陽性であった。非ステロイド性抗炎症薬、ステロイド薬、

メトトレキサート、シクロスポリン、コルヒチンなどが投与されたが、いずれの薬剤によっても炎症所見の改善は得られなかった。さらに、関節痛・発熱・全身倦怠感・頭痛を反復し、また両視神経炎、網膜血管炎、白内障による視力低下や感音性難聴も徐々に認められた。遺伝子検査にて Y441H の変異を認め NOMID と診断された。抗 IL-6 受容体抗体であるトシリズマブの投与を行われているが、発熱・炎症反応改善以外に頭痛や皮疹など臨床症状の改善は得られなかった。その後 Anakinra の投与を開始し、頭痛、耳鳴、皮疹は改善した。

（倫理面への配慮）

トシリズマブならびに Anakinra の投与に関して横浜市立大学附属病院倫理委員会での審査と承認を得て行った。

C. 研究結果

1. トシリズマブ投与による臨床症状の変化として、8mg/kg の 2 週間毎に点滴投与により、速やかな発熱と関節炎の改善と CRP や赤血球沈降速度の正常化を認めた。一方、蕁麻疹様皮疹と反復する頭痛の改善が見られなかった。一方、IL-1 阻害薬である Anakinra 2mg/kg の連日皮下投与では、発熱、皮疹ならびに関節炎の改善とともに頭痛の顕著な改善を認めた。

2. トシリズマブならびに Anakinra の投与前後の炎症性サイトカインを血清と髄液で測定を行った(表)。トシリズマブ投与前後では血清中 IL-6、IL-1 β に変化は認めず、Anakinra 投与により血清 IL-6 の低下を認めている。また髄液中の IL-6 は血清中に比べて高値を示していることが明らかとなった。さらにトシリズマブは髄液中で検出されず、髄液移行が認められないことが明らかとなった。Anakinra の投与により髄液中の IL-6 の低下を認めた。

	トシリズマブ		Anakinra		
	投与前	投与2時間	投与前	投与1年後	
血清トシリズマブ	<1.00	68.7	—	—	
血清IL-1 β	53	29	37	48	<10pg/ml
血清IL-6	126	116	133	10	<5pg/ml
血清TNF α	<5	<5	<5	<5	<5pg/ml
髄液トシリズマブ	<1.00	<1.00	—	—	
髄液IL-1 β	<10	<10	12.6	<10	<10pg/ml
髄液IL-6	734	690	692	15	<5pg/ml
髄液TNF α	<5	<5	<5	<5	<5pg/ml
髄液細胞数	333/3	ND	1056/3	98/3	0-5

D. 考察

CAPS の治療として、ステロイド薬や各種の免疫抑制薬は無効であり、IL-1 β をターゲットとした anakinra などの有効性が報告されている。一方、CAPS 症例において血清 IL-6 が高値を示し CRP や発熱など炎症病態への IL-6 の関連が考えられている。本研究では CAPS 症例に対して炎症病態における炎症性サイトカインとして IL-6 と IL-1 β を標的とした治療を行い、その臨床症状の改善と炎症性サイトカインプロファイルについて検討を行った。

トシリズマブの投与では、発熱や炎症反応などの速やかな改善を認めたが、中枢神経症状である頭痛・無菌性髄膜炎の改善が得られなかった。この原因として IgG 構造を有するトシリズマブの髄液移行が認められないことが本研究結果より考えられた。CAPS に対するトシリズマブは、中枢神経症状を示さない症例に有効であることが示唆された。一方、

Anakinra は抗体に比べて小分子であり髄液への移行が考えられている。本研究結果においても頭痛や髄膜刺激症状、髄液細胞数の減少を認めており、中枢神経症状を認める CAPS 症例においても有効と考えられた。また Anakinra の投与により血清ならびに髄液中の IL-6 も改善を認めたことは、CAPS の炎症病態において IL-1 β は中心的な炎症性サイトカインであることが考えられた。

E. 結論

CAPS 症例における抗サイトカイン療法では、抗 IL-6 受容体抗体であるトシリズマブは中枢神経症状を認めない CAPS 症例に対して有効な治療法となる可能性が示され、抗 IL-1 遮断薬である Anakinra は中枢神経症状の改善と血清・髄液中の IL-6 の改善を認めたことから CAPS に対する有効な治療薬であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

● なし (投稿準備中)

2. 学会発表

● T. Imagawa, R. Nishikomori, H. Takada, N. Patel, R. Preiss, T. Heike, T. Hara, S. Yokota. Safety and efficacy of canakinumab for 19 Japanese patients with cryopyrin associated periodic fever syndrome (CAPS). EULAR 2011 Congress in London, UK. 2011年5月25-29日、ロンドン、イギリス

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