

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

CINCA 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

研究分担者 平家俊男（京都大学大学院医学研究科発達小児科学 教授）

研究要旨

CINCA 症候群は NLRP3 インフラマゾームの異常活性化による IL-1 $\beta$  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 症候群症例 4 例を報告したが、症例数が少なく、その意義づけ、臨床像には不明な点が多かった。海外主要研究施設の国際協力のもと、NLRP3 変異陰性 CINCA 症候群症例における体細胞モザイク頻度及びその臨床的な特徴を検討した。NLRP3 遺伝子異常陰性の CINCA 症候群患者およびその家族の DNA 検体を解析したところ、26 症例の患者の内 18 症例に体細胞モザイクを同定し、19 例の健康患者家族にモザイクは同定されなかった。遺伝子変異-臨床症状相関があるため、変異部位をそろえてヘテロ変異と比較したところ、炎症所見、関節症状、皮膚所見には差異は認めなかったが、神経症状が軽症である傾向がみとめられた。同傾向は我々のコホート内で、CINCA 症候群モザイク症例と“真の NLRP3 変異陰性”症例との比較でも観察された。また各組織でのモザイク率を同一症例で比較検討したところ、ほぼ同様のモザイク率であり、発生早期に体細胞モザイクを発症したことが推察された。CINCA 症候群診断には NLRP3 体細胞モザイクの検討が不可欠であり、CINCA 症候群の主要原因の 1 つと考えられ、体細胞モザイク症例では神経症状が軽症化する傾向が見られた。

A. 研究目的

CINCA 症候群は、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 症候群の集積により、4 例の本邦 NLRP3 体細胞モザイク症例を同定した。NLRP3 体細胞モザイクの CINCA 症候群への寄与、またその臨床像を明らかにすべく、CINCA 症候群海外

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 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。また正常コントロールとして、健康患者家族 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ケンシングを行った。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。また臨床症状の比較のため、ヘテロ変異 CINCA 患者の臨床症状を文献的に集積した。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。

(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。

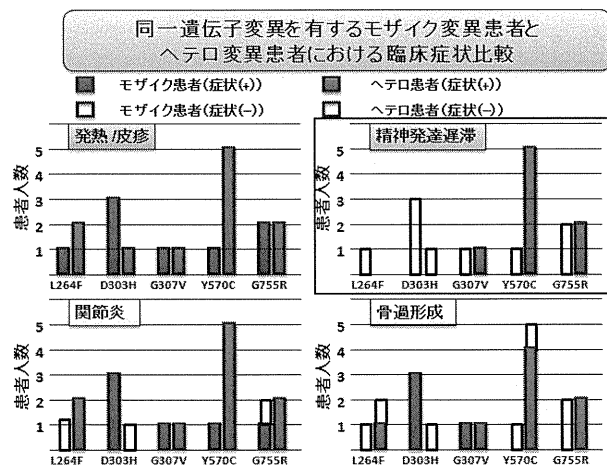
### C. 研究結果

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 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- $\kappa$ 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、皮疹、発熱、骨過形成、関節炎に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。また今回のコホート内での体細胞モザイク症例と“真の NLRP3 変異陰性” CINCA

症候群症例との比較でも、精神発達遅滞の合併率が低値であった。

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。



一個体内での細胞種間 NLRP3 モザイク頻度に有意差なし

	シークエンス変異	アミノ酸置換	Source of genomic DNA					P value
			好中球	単球	T 細胞	B 細胞	頬粘膜細胞	
J1	1709A>G	Y570C	12.6%	9.8%	8.0%	9.5%	8.3%	0.8
J3	919G>A	G307S	9.1%	10.8%	6.9%	10.6%	9%	0.9
J4	1699G>A	E567K	3.5%	2.3%	3.7%	3.4%	2.2%	1.0
J5	907G>C	D303H	14.4%	8.7%	7.7%	8.5%	13.5%	0.4

### D. 考察

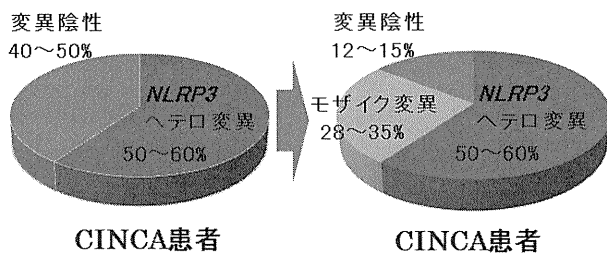
今回の解析結果では約 7 割の NLRP3 変異陰性 CINCA 患者で NLRP3 体細胞モザイクを認め、CINCA 症候群全体の 28% が NLRP3 体細胞モザイクで発症していると考えられた。健常患者家族では NLRP3 体細胞モザイクは同定されず、同定された変異のいずれにおいても疾患関連性が確認された。NLRP3 体細胞モザイクは CINCA 症候群の主要病因の一つであることが確認された。今回の研究でモザイク変異が同定されなかった“真の NLRP3 変異陰性” CINCA 症候群症例については今後の検討を有する。NLRP3 以外の遺伝子変異の可能性に加え、NLRP3 に関連する可能性として、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。

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。

#### 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

- Sakai H, Okafuji I, Nishikomori R, Abe J, Izawa K, Kambe N, Yasumi T, Nakahata T, Heike T : The CD40-CD40L axis and IFN- $\gamma$  play critical roles in Langhans giant cell formation. *Int Immunol.* 2011 (in press)
- Mizukami T, Obara M, Nishikomori R, Kawai T, Tahara Y, Sameshima N, Marutsuka K, Nakase H, Kimura N, Heike T, Nunoi H : Successful Treatment with Infliximab for Inflammatory Colitis in a Patient with X-linked Anhidrotic Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2011 (in press)
- 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;31(968-976)

- Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T, Saito MK : A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS One.* 2011; 6(e22261)
- Imamura M, Kawai T, Okada S, Izawa K, Takachi T, Iwabuchi H, Yoshida S, Hosokai R, Kanegane H, Yamamoto T, Umezumi H, Nishikomori R, Heike T, Uchiyama M, Imai C : Disseminated BCG infection mimicking metastatic nasopharyngeal carcinoma in an immunodeficient child with a novel hypomorphic NEMO mutation. *J Clin Immunol.* 2011 : 31(802-810)
- Tanaka N, Izawa K, Saito MK, Sakuma M, Oshima K, Ohara O, Nishikomori R, Morimoto T, Kambe N, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, de Saint Basile G, Neven B, van Gijn M, Frenkel J, Aróstegui JI, Yagüe J, Merino R, Ibañez M, Pontillo A, Takada H, Imagawa T, Kawai T, Yasumi T, Nakahata T, Heike T : High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in patients with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome: Results of an international multicenter collaborative study *Arthritis Rheum.* 2011: 63(3625-3632)
- 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 FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood.* 2011 : 118(1225-1230)
- 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.* 2011 :

226(1283-1291)

- Adachi M, Watanabe A, Nishiyama A, Oyazato Y, Kamioka I, Murase M, Ishida A, Sakai H, Nishikomori R, Heike T : Familial cases of periodic fever with aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome. *J Pediatr.* 2011 : 158(155-159)
  - 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. *Mod Rheumatol.* 2011 (in press)
  - 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.* 2011 : 49(194-196)
2. 学会発表
- K. Izawa, A. Hijikata, R. Nishikomori, O. Ohara, J. Abe, N. Tanaka, M. K. Saito, R. Goldbach-Mansky, I. Aksentijevich, T. Kawai, T. Yasumi, T. Nakahata, T. Heike: Diagnosis of NLRP3 Somatic Mosaicism in CINCA/NOMID Patients Using Next-Generation Sequencing: Poster Session, Board P292: 18th European Pediatric Rheumatology Congress, September 14-18 , 2011. Bruges, Belgium
  - R. Nishikomori, N. Tanikaze, K. Izawa, M. K. Saito, R. Goldbach-Mansky, I. Aksentijevich, G. de Saint Basile , B. Neven, J. Frenkel, M. Van Gijn, J. I. Arostegui, J. Yague, T. Morimoto, M. Sakuma, N. Kambe, T. Yasumi , T. Kawai, A. Pontillo, K. Oshima, H. Takada, T. Imagawa, R. Merino, M. Ibanez, T. Nakahata, T. Heike, O. Ohara: High Incidence of NLRP3 Somatic Mosaicism in Chronic Infantile Neurological Cutaneous and Articular Syndrome Patients: A Report from An International Multicenter Collaborative Study: Oral

Session, OP0142: Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2011, May 25 – 28 , 2011. London, United Kingdom

- 井澤和司、阿部純也、河合朋樹 八角高裕、平家俊男、土方敦司、小原収、斎藤潤、中畑龍俊、武井修治、河合利尚 : NLRP3 体細胞モザイクを認めた Muckle-Well 症候群の 2 例 ; 第 5 回日本免疫不全症研究会, 2012 年 1 月 21 日, 東京
- 井澤和司、西小森隆太、八角高裕、平家俊男、土方敦司、小原収: Rapid detection of NLRP3 somatic mosaicism using next-generation sequencing: 第 56 回日本人類遺伝学会・第 11 回東アジア人類遺伝学会共同大会: 2011 年 11 月 9 日~12 日, 千葉
- 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 日~14 日, 東京.
- 田中尚子、井澤和司、西小森隆太、神戸直智、河合朋樹、酒井秀政、八角高裕、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 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2011 年 7 月 18 日~20 日, 神戸

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

NLRP3 体細胞モザイクの診断法の確立

研究分担者 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）

研究要旨

CINCA 症候群は NLRP3 インフラマゾームの異常活性化による IL-1 $\beta$  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。NLRP3 遺伝子を 13 アンプリコンに分割し、Roche Genome sequencer FLX を用いて、各 500 リード以上解析し体細胞モザイクの有無を検討した。またエラーか体細胞モザイクか判定するため、モザイクのない正常人 50 人をコントロールとし、エラー分布を検討し、各塩基部位での体細胞モザイク判断基準を作成した。体細胞モザイク診断患者 DNA を用いて検討したところ、本システムで診断可能であり、次世代シーケンサーを用いた NLRP3 体細胞モザイク診断は可能と考えられた。

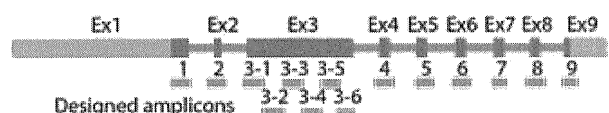
A. 研究目的

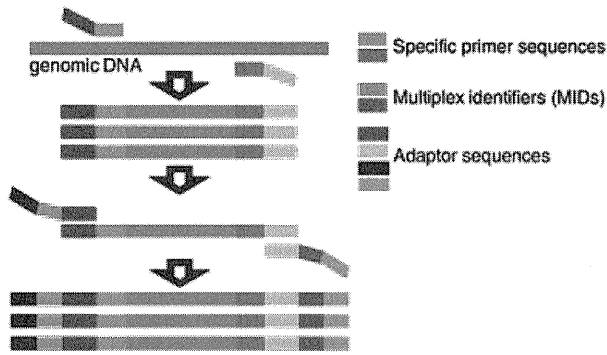
CINCA 症候群は、責任遺伝子として NLRP3 遺伝子が同定され、常染色体優性遺伝することが知られている。近年、我々は NLRP3 遺伝子変異陰性 CINCA 症候群の集積により、4 例の本邦 NLRP3 体細胞モザイク症例を同定した。解析においてはサブクローニング法を用いたが、多大な時間と労力を要するため、より簡便な解析方法が望まれる。我々は次世代シーケンサーを用いて、NLRP3 体細胞モザイク症例をより簡便な方法で診断する方法を検討した。

B. 研究方法

NLRP3 変異陰性 CINCA 症候群症例の全血/PBMC より抽出された DNA 検体を用いて NLRP3 遺伝子翻訳領域及びそのエクソン-イントロン接合部位を、13 アンプ

リコンにわけ、2 段階の PCR 法で増幅、患者タグをつけた後、次世代シーケンサー（Roche 454 Genome Sequencer FLX）を用いてそれぞれ 500 リード以上を解析した。また次世代シーケンサー自体でおこるエラーの性質を検討するため、体細胞モザイクがないと考えられる正常人 50 人での遺伝子解析結果をもとに、各塩基でのエラープロファイルを作成、それを基準に体細胞モザイクの有無を検討、同解析法による NLRP3 体細胞モザイクの診断可能性を検討した。





(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。

#### C. 研究結果

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。

#### D. 考察

次世代シーケンサーを用いた体細胞モザイクの診断は癌の領域で検討されている。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。今後何%の体細胞モザイクまで検出可能か、また実際に未知の検体で検出可能か検討していく必要がある。

#### E. 結論

次世代シーケンサーは、より簡便な NLRP3 体細胞モザイク診断法として有望であることがわかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Tanaka N, Izawa K, Saito MK, Sakuma M, Oshima K, Ohara O, Nishikomori R, Morimoto T, Kambe N, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, de Saint Basile G, Neven B, van Gijn M, Frenkel J, Aróstegui JI, Yagüe J, Merino R, Ibañez M, Pontillo A, Takada H, Imagawa T, Kawai T, Yasumi T, Nakahata T, Heike T : High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in patients with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome: Results of an international multicenter collaborative study *Arthritis Rheum.* 2011; 63(3625-3632)
- 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. *Mod Rheumatol.* 2011 (in press)
- 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 FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood.* 2011 : 118(1225-1230)
- Adachi M, Watanabe A, Nishiyama A, Oyazato Y, Kamioka I, Murase M, Ishida A, Sakai H, Nishikomori R, Heike T : Familial cases of periodic fever with aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome. *J Pediatr.* 2011 : 158(155-159)
- Sakai H, Okafuji I, Nishikomori R, Abe J, Izawa K, Kambe N, Yasumi T, Nakahata T, Heike T : The

CD40-CD40L axis and IFN- $\gamma$  play critical roles in Langhans giant cell formation. *Int Immunol.* 2011 (in press)

- 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.* 2011 : 49(194-196)

## 2. 学会発表

- K. Izawa, A. Hijikata, R. Nishikomori, O. Ohara, J. Abe, N. Tanaka, M. K. Saito, R. Goldbach-Mansky, I. Aksentijevich, T. Kawai, T. Yasumi, T. Nakahata, T. Heike: Diagnosis of NLRP3 Somatic Mosaicism in CINCA/NOMID Patients Using Next-Generation Sequencing: Poster Session, Board P292: 18th European Pediatric Rheumatology Congress, September 14-18, 2011. Bruges, Belgium
- R. Nishikomori, N. Tanikaze, K. Izawa, M. K. Saito, R. Goldbach-Mansky, I. Aksentijevich, G. de Saint Basile, B. Neven, J. Frenkel, M. Van Gijn, J. I. Arostegui, J. Yague, T. Morimoto, M. Sakuma, N. Kambe, T. Yasumi, T. Kawai, A. Pontillo, K. Oshima, H. Takada, T. Imagawa, R. Merino, M. Ibanez, T. Nakahata, T. Heike, O. Ohara: High Incidence of NLRP3 Somatic Mosaicism in Chronic Infantile Neurological Cutaneous and Articular Syndrome Patients: A Report from An International Multicenter Collaborative Study: Oral Session, OP0142: Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2011, May 25 - 28, 2011. London, United Kingdom
- 井澤和司、阿部純也、河合朋樹、八角高裕、平家俊男、土方敦司、小原収、斎藤潤、中畑龍俊、武井修治、河合利尚: NLRP3 体細胞モザイクを認めた Muckle-Well 症候群の 2 例; 第 5 回日本免疫不全症研究会, 2012 年 1 月 21 日, 東京
- 井澤和司、西小森隆太、八角高裕、平家俊男、

土方敦司、小原収: Rapid detection of NLRP3 somatic mosaicism using next-generation sequencing: 第 56 回日本人類遺伝学会・第 11 回東アジア人類遺伝学会共同大会: 2011 年 11 月 9 日~12 日, 千葉

- 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 日~14 日, 東京
- 田中尚子、井澤和司、西小森隆太、神戸直智、河合朋樹、酒井秀政、八角高裕、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 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2011 年 7 月 18 日~20 日, 神戸

## 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 $\beta$  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 $\beta$  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。本年度は、主に、4 を行った。

- 1) CAPS 患者からの iPS 細胞株の樹立。体細胞モザイク患者から細胞を樹立することにより、同じ遺伝子背景を持った NLRP3 変異陰性、陽性単球を作成し、有効な対照群とする。
- 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。サイトカイン産生、貪食能、殺菌能、抗原提示能などを測定できる系を確立する。
- 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



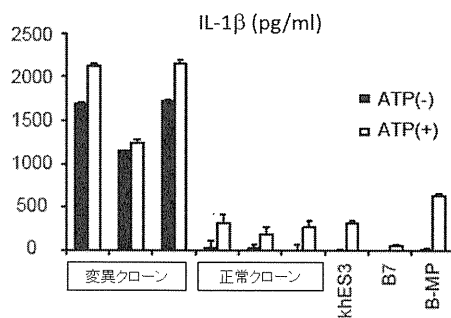
疾患解析に関する研究」およびヒト遺伝子解析申請書として「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究」の2申請を行い、承認を頂いている。その内容を忠実に順守して研究を行っている。

### 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-1b 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-1b 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。



変異iPSC由来マクロファージによるIL-1β過剰産生

さらに NLRP3 変異特異的に誘導される細胞死 (Pyroncrosis) 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。また、変異細胞においては、ROS の産生も亢進していた。

この CAPS 患者特異的 iPS 細胞に由来するマクロファージは、NLRP3 異常症の炎症性サイトカイン分泌を制御する薬剤を探索するのに最適のソースであると考えられる。そのため、これを用いて、創薬スクリーニングを開始した。

### D. 考察と今後の展望

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。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T, Saito MK\*. A Novel Serum-Free Monolayer Culture for Orderly Hematopoietic Differentiation of Human Pluripotent Cells via Mesodermal Progenitors. PLoS One. 2011;6(7):e22261. Epub 2011 Jul 27.

齋藤潤、平家俊男. iPS 細胞を用いた再生医療 小児科診療 75 巻 1 号 pp102-106,2011

齋藤潤 【iPS 細胞の臨床応用の展望】 疾患特異的 iPS 細胞の臨床応用 BIO Clinica 26 巻 9 号 pp796-800, 2011

齋藤潤 CAPS : クライオパイリン関連周期熱症候群 日本臨床免疫学会会誌 34 巻 5 号 pp.369-377,2011

#### 2. 学会発表

● 齋藤潤 : 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

- Takayuki Tanaka, et al. DISEASE MODELING WITH INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS REVEALS THE PATHOGENESIS OF SOMATIC MOSAICISM IN AN NLRP3-DRIVEN AUTOINFLAMMATORY SYNDROME. ISSCR, Toronto, Canada (June,2011)

- Megumu Saito, et al. DISEASE MODELING OF A NLRP3-DRIVED AUTOINFLAMMATORY DISEASE WITH INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS. IAIS, Paris, France (June,2011)

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

#### 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

備考:CINCA 症候群の疾患 iPS 細胞に関連する特許出願

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

備考:樹状細胞の分化誘導方法

#### 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

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	出版社名	出版地	出版年	ページ
原 寿郎	小児のHIV感染症	山口 徹 北原光夫 福井次矢	今日の治療指針～私はこう治療している～2011年度版	医学書院	日本	2011	1195-6
原 寿郎	9.症候と鑑別診断 1.発熱	佐地 勉 竹内義博 原 寿郎	ナーズの小児科学 改定5版	中外医学社	日本	2011	133-136
原 寿郎	6.免疫、アレルギー一性疾患 A.免疫不全	佐地 勉 竹内義博 原 寿郎	ナーズの小児科学 改定5版	中外医学社	日本	2011	299-305
齋藤潤、 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
水野由美 原 寿郎	Q99 髄膜炎について、教えてください	五十嵐 隆	ナーシングケアQ&A ～これだけは知っておきたい小児ケアQ&A～第2版（改訂版）	総合医学社	日本		印刷中
原 寿郎	原発性免疫不全症候群	永井良三 大田 健	今日の治療と看護（改訂第3版）	南江堂	日本		印刷中
原 寿郎	リウマチ熱	山口 徹 北原光夫 福井次矢	今日の治療指針～私はこう治療している～2012年度版	医学書院	日本		印刷中
原 寿郎	多発性硬化症(MS)	大関 武彦 古川 漸 横田俊一郎	今日の小児治療指針 第15版	医学書院	日本		印刷中
原 寿郎	免疫不全、無 $\gamma$ グロブリン血症、重症複合免疫不全症、母子免疫、新生児溶血症		岩波生物学辞典第5版	岩波書店	日本		印刷中

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Adachi S., Suemori H., <u>Nakahata T.</u> , <u>Heike T.</u>	Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells.	J. Cell. Physiol.	226(5)	1283-1291	2011
<u>Heike T.</u> , <u>Saito M.</u> , <u>Nishikomori R.</u> , Yasumi T., <u>Nakahata T.</u>	Autoinflammatory diseases-a new entity of inflammation.	Inflammation and Regeneration	31	125-136	2011
Niwa A., <u>Heike</u> <u>T.</u> , Umeda K., Os hima K., Kato I., Sakai H., Suemo ri H., <u>Nakahata T</u> <u>.</u> , <u>Saito M.</u>	A novel serum-free mono layer culture for orderly hematopoietic differentiati on of human pluripotent cells via mesodermal pro genitors.	PloS ONE	6(7)	e22261	2011
Murata Y., Yasumi T., Shirakawa R., Izawa K., Sakai H., Abe J., Tanaka N., Kawai T., Oshima K., <u>Saito M.</u> <u>Nishikomori R.</u> , Ohara O., Ishii E., <u>Nakahata T.</u> , Horiuchi H., <u>Heike</u> <u>T.</u>	Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc 13-4 protein.	Blood	118	1225-1230	2011

Tanaka N., Nishikomori R., Saito M., Izawa K., Sakuma M., Morimoto T., Kambe N., Watanabe S., Oshima K., Ohara O., Goldbach-Mansky R., Aksentijevich 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
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.	31	728-35	2011
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	56(2)	267-272	2011
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	31	309-14	2011
Eljaafari FM, Takada H, Tanaka T, Doi T, Ohga S, Hara T	Potent induction of IFN- $\gamma$ production from cord blood NK cells by the stimulation with single-stranded RNA.	J Clin Immunol	31	728-35	2011
Nishio H, Kanno S, Onoyama S, Ikeda K, Tanaka T, Kusuhara K, Fujimoto Y, Fukase K, Sueishi K, Hara T	Nod1 ligands induce site-specific vascular inflammation.	Arterioscler Thromb Vasc Biol.	31	1093-99	2011

Saito M, Nagasawa M, Takada H, <u>Hara T</u> , 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.	208	235-49	2011
Ohga S, Ishimura M, Yoshimoto G, Miyamoto T, Takada H, Tanaka T, Ohshima K, Ogawa Y, Imadome K, Abe Y, Akashi K, <u>Hara T</u>	Clonal origin of Epstein-Barr virus (EBV)-infected T/NK-cell subpopulations in EBV-positive T/NK-cell lymphoproliferative disorders of childhood.	J Clin Virol.	51	31-7	2011
Kusuda T, Hikino S, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Tokunaga S, Ihara K, Hata Y, <u>Hara T</u>	Genetic variation of vascular endothelial growth factor pathway does not correlate with the severity of retinopathy of prematurity.	J Perinatol.	31(4)	246-250	2011
Kinjo T, Ohga S, Ochiai M, Honjo S, Tanaka T, Takahata Y, Ihara K, <u>Hara T</u>	Serum chemokine levels and developmental outcome in preterm infants.	Early Hum Dev.	87(6)	439-43	2011
Makimura M, Ihara K, Kojima-Ishii K, Nozaki T, Ohkubo K, Kohno H, Kishimoto J, <u>Hara T</u>	The signal transducer and activator of transcription 5B gene polymorphism contributes to the cholesterol metabolism in Japanese children with growth hormone deficiency.	Clin Endocrinol.	74(5)	611-7	2011
Iwayama M, Kira R, Kinukawa N, Sakai Y, Torisu H, Sanefuji M, Ishizaki Y, Nose Y, Matsumoto T, <u>Hara T</u>	Parental age and child growth and development: child health check-up data.	Pediatr Int	53	709-14	2011

Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsui N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, <u>Hara T</u> , Miyawaki T, Nonoyama S	Quantification of $\kappa$ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects.	J Allergy Clin Immunol.	128	223-225	2011
Yanagimachi M, Goto H, Miyamae T, Kadota K, Imagawa T, Mori M, Sato H, Yanagisawa R, Kaneko T, Morita S, Ishii E, <u>Yokota S</u> .	"Association of IRF5 Polymorphisms with Susceptibility to Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Children."	J Clin Immunol	31	946-951	2011
Yanagimachi M, Naruto T, Miyamae T, <u>Hara T</u> , Kikuchi M, Hara R, Imagawa T, Mori M, Sato H, Goto H, <u>Yokota S</u> .	Association of IRF5 polymorphisms with susceptibility to macrophage activation syndrome in patients with juvenile idiopathic arthritis.	J Rheumatol	38	769-774	2011
Yanagimachi M, Naruto T, <u>Hara T</u> , Kikuchi M, Hara R, Miyamae T, Imagawa T, Mori M, Kaneko T, Morita S, Goto H, <u>Yokota S</u> .	Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis.	Br J Clin Pharmacol	71	237-243	2011
Kato I, Niwa A, <u>Heike T</u> , Fujino H, <u>Saito MK</u> , Umeda K, Hiramatsu H, Ito M, Morita M, Nishinaka Y, Adachi S, Ishikawa F, <u>Nakahata T</u> .	Identification of hepatic niche harboring human acute lymphoblastic leukemic cells via the SDF-1/CXCR4 axis.	PLoS One.	6(11)	E27042	2011



Imamura M, Kawai T, Okada S, Izawa K, Takachi T, Iwabuchi H, Yoshida S, Hosokai R, Kanegane H, Yamamoto T, Umezu H, <u>Nishikomori R</u> , <u>Heike T</u> , Uchiyama M, Imai C	Disseminated BCG infection mimicking metastatic nasopharyngeal carcinoma in an immunodeficient child with a novel hypomorphic NEMO mutation.	Journal of clinical immunology	31	802-810	2011
Kusunoki T., Morimoto T., Sakuma M., Mukaida K., Yasumi T., <u>Nishikomori R.</u> , Fujii T., <u>Heike T.</u>	Total and low-density lipoprotein cholesterol levels are associated with atopy in schoolchildren.	J Pediatr	158	334-336	2011
Karakawa S., Okada S., Tsumura M., Mizoguchi Y., Ohno N., Yasunaga S., Ohtsubo M., Kawai T., <u>Nishikomori R.</u> , Sakaguchi T., Takihara Y., Kobayashi M.	Decreased Expression in Nuclear Factor-kappaB Essential Modulator Due to a Novel Splice-Site Mutation Causes X-linked Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency.	Journal of clinical immunology	31	762-772	2011
Ishimura M., Takada H., Doi T., Imai K., Sasahara Y., Kanegane H., <u>Nishikomori R.</u> , Morio T., <u>Heike T.</u> , Kobayashi M., Ariga T., Tsuchiya S., Nonoyama S., Miyawaki T., <u>Hara T.</u>	Nationwide survey of patients with primary immunodeficiency diseases in Japan.	Journal of clinical immunology	31	968-976	2011
Adachi M., Watanabe A., Nishiyama A., Oyazato Y., Kamioka I., Murase M., Ishida A., Sakai H., <u>Nishikomori R.</u> , <u>Heike T.</u>	Familial cases of periodic fever with aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome.	J Pediatr	158	155-159	2011
Hiejima E., Komatsu H., Takeda Y., Sogo T., Inui A., Okafuji I., <u>Nishikomori R.</u> , <u>Nakahata T.</u> , Fujisawa T.	Acute 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

Sakai H., Okafuji I., <u>Nishikomori R.</u> , Abe J., Izawa K., Kambe N., Yasumi T., <u>Nakahata T.</u> , <u>Heike T.</u>	The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation.	Int. Immunol.			in press
Hikino S, Ohga S T, Kinjo T, Kusuda T, Ochiai M, Inoue H, Honjo S, Ihara K, Ohshima K, <u>Hara T</u>	Tracheal aspirate gene expression of preterm newborns developing bronchopulmonary dysplasia.	Pediatr Int.			in press
Tanabe F, Kasai H, Morimoto M, Oh S, Takada H, <u>Hara T</u> , Ito M	Novel heterogenous CHS1 mutations identified in five Japanese patients with Chediak-Higashi syndrome.	Case report in Medicine			in press
Ohga S, Ishii E, Takada H, <u>Hara T</u>	Stem cell transplantation for pediatric malignancy Hemophagocytic lymphohistiocytosis.	15th Congress of Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation, Proceedings			in press
Yamamura K, Ihara K, Ikeda K, Nagata H, Mizuno Y, <u>Hara T</u>	Histo-blood group gene polymorphisms as potential genetic modifiers of the development of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease.	Int J Immunogenet.			in press
Shiraishi A, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Takimoto T, Takada H, Miyamoto T, Abe Y, <u>Hara T</u>	Treatment Choice of Immunotherapy or Further Chemotherapy for Epstein-Barr Virus-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis.	Pediatric Blood & Cancer			Accepted
Ozawa R, Inaba Y, Mori M, Hara R, Kikuchi M, Higuchi R, Miyamae T, Imagawa T, Fujiwara T, Saito T, <u>Yokota S</u>	Definitive differences in laboratory and radiological characteristics between two subtypes of juvenile idiopathic arthritis: systemic arthritis and polyarthritis	Mod Rheumatol.			in press
Tahara M., Sakai H., <u>Nishikomori R.</u> , Yasumi T., <u>Heike T.</u> , Nagata I., Inui A., Fujiwara T., Shigematsu Y., Nishijima K., Kuwakado K., Watabe S., Kamayama J.	Patient with neonatal-onset chronic hepatitis presenting with mevalonate kinase deficiency with a novel MVK gene mutation.	Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association			in press

Mizuno T., Sakai H., Nishikomori R., Oshima K., Ohara O., Hata I., Shigematsu Y., Ishige T., Tamura K., Arakawa H.	Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome.	Rheumatol Int				in press
Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito M K, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O.	Detection of Base Substitution-Type Somatic Mosaicism of the NLRP3 Gene with >99.9% Statistical Confidence by Massively Parallel Sequencing.	DNA Res				in press
中畑龍俊	iPS細胞は長寿へ導く夢のタイムマシーンである (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
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
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
中畑龍俊	iPS細胞の臨床応用の展望	BIO Clinica	26 (9)	16-17		2011
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
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
齋藤潤、平家俊男	iPS細胞を用いた再生医療	小児科診療	75巻1号	102-106		2011
齋藤潤	【iPS細胞の臨床応用の展望】 疾患特異的iPS細胞の臨床応用	BIO clinica.	26巻9号	796-800		2011
齋藤潤	CAPS : クライオパイリン関連周期熱症候群	日本臨床免疫学会会誌	34巻5号	369-377		2011
齋藤潤	インフラマソームとその関連疾患の最近の知見	日本臨床免疫学会会誌	34巻1号	20-28		2011
西小森隆太、酒井秀政、田中尚子、井澤和司	自己炎症症候群の鑑別診断	炎症と免疫	19	142-146		2011
西小森隆太、田中尚子、井澤和司	自己炎症疾患の治療 抗IL-1 $\beta$ 抗体canakinumabの可能性	リウマチ科	45	444-450		2011
西小森隆太、井澤和司	自己炎症疾患と抗IL-1製剤	感染・炎症・免疫	41	69-70		2011
神戸直智、佐藤貴史、西小森隆太	インフラマソームの自発的活性化を病態とする自己炎症症候群	生体の科学	62	221-227		2011

西小森隆太、井澤和司	繰り返す・治らない原因 そもそも感染症なのか？	小児内科	43	204-208	2011
森嶋達也、平家俊男	血液内科領域の移植医療 と再生医療-診療と研究 における最近の動向 ヒ トiPS細胞からの好中球 分化誘導	月刊血液内科	63	332-338	2011