

201128134A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金澤 伸雄

平成24（2012）年 3月



## 目 次

### I. 総括研究報告

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

金澤 伸雄 ----- 1

### II. 分担研究報告

1. 中條—西村症候群の分子・細胞機能異常の検索

有馬 和彦 ----- 13

2. 中條—西村症候群患者検体を用いた病態解明へのアプローチ

金澤 伸雄 ----- 21

3. 中條—西村症候群から得られた解析結果を利用した関節リウ  
マチの病態解明の試み

井田 弘明 ----- 33

4. *Psm8* 変異導入による中條—西村症候群モデルマウスの作成

吉浦 孝一郎 ----- 40

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 49

# 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）

### 平成23年度総括研究報告書

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：金澤 伸雄 和歌山県立医科大学医学部皮膚科 講師

#### 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と拘縮を伴う長く節くれ立った指趾を特徴とする、本邦固有の遺伝性自己炎症・消耗性疾患である。本研究班はこれまで、全国疫学調査や免疫プロテアソーム $\beta 5i$ サブユニットをコードする *PSMB8* 遺伝子変異の同定による疾患概念の確立、患者由来検体の解析による病態解明と、着実に歩みを進めてきた。平成23年度は、これら研究の成果をまとめて一流の科学雑誌に掲載することを当座の第一の目標にするとともに、国際的な類似疾患の臨床症状・検体を収集して遺伝子変異や細胞機能異常を検討し、明らかとなった分子・細胞機能異常をターゲットに、iPS細胞を含む患者由来細胞やノックインマウスを用いて、既存の分子標的薬の適応の検討と新たな治療法の開発に向けた研究を行うことを目指した。その結果、8月に *Proc Natl Acad Sci USA* 誌に論文が掲載され、マスコミ各紙にて紹介された。また、国際自己炎症疾患研究会が運営する変異遺伝子データベースである INFEVERS での *PSMB8* 遺伝子変異の登録と管理を金澤と井田が行うこととなった。ただ、当初計画していた抗 IL-6 受容体抗体であるトシリズマブの患者への投与は行えなかった。

本年度の研究により、(1) 患者由来不死化リンパ球株におけるプロテアソーム機能不全の詳細な定量化と、その成熟過程での障害内容の同定がなされた。健常者由来皮膚線維芽細胞においてプロテアソーム阻害によって発現が変化する炎症関連遺伝子が選別され、プロテアソーム阻害によって蛍光を増強するユビキチン-GFP 融合蛋白発現 HEK293 細胞株が樹立された。(2) 患者末梢血単核球において K48 ユビキチンはライソソームに蓄積するが、蓄積が多い細胞は単球・B細胞を含む抗原提示細胞ではないこと、IFN $\gamma$ 刺激後の STAT1 チロシンリン酸化は患者末梢血単核球では健常人に比べ低下していること、患者血中 IgE 値は IgG 値と正の相関を示すこと、患者由来 iPS 細胞は脂肪細胞にきちんと分化することが示された。(3) 関節リウマチ患者由来培養滑膜細胞のプロテアソーム活性は、変形性関節症患者由来細胞と比べ低下していることが示された。(4) *PSMB8* 遺伝子 G201V 変異を導入したノックインマウスの解析にて、胸腺の退縮の遅延、血中 IL-6 と KC の高値、IFN $\gamma$ 刺激線維芽細胞における *PSMB8* 発現の誘導、20S プロテアソームのキモトリプシン様活性の低下が示された。

我々の報告と相前後して *PSMB8* 遺伝子変異を伴う類症が世界から次々と報告され、プロテアソーム機能不全症ワールドが一気に花開いた。世界的な視野のもとで本研究が今後も発展的に継続され、この分野の研究を牽引し、病態解明と特異的治療法の開発に向けて更なる歩みを進めることが望まれる。

#### 研究分担者

有馬和彦・長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子医学・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

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

の同定による疾患概念の確立、患者由来検体の解析による病態解明と、着実に歩みを進めてきた。ところが、平成 22 年に類似疾患が欧米の 2 グループから報告され、さらに一方からその原因として *PSMB8* 遺伝子の機能喪失型変異が報告され、プロテアソーム機能不全症としての世界で最初の報告を逃してしまった。そこで平成 23 年度は、これまでの研究の成果をまとめて一流の科学雑誌に掲載するとともに、マスコミや国内外の様々な学会で発表し世界にアピールすることを当座の第一の目標とした。同時に、国際的に類似疾患の臨床症状・検体を収集して遺伝子変異や細胞機能異常を検討し、明らかとなった分子・細胞機能異常をターゲットに、iPS 細胞を含む患者由来細胞やノックインマウスを用いて、既存の分子標的薬の適応の検討と新たな治療法の開発に向けた研究を行うことを目標とした。

#### A. 研究目的

中條-西村症候群 (ORPHA 2615, 中條西村症候群: 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と拘縮を伴う長く節くれ立った指趾を特徴とする、本邦固有の遺伝性自己炎症・消耗性疾患である。疾患名も確定していなかったが、稀少疾患の国際的データベースである Orphanet に Nakajo-Nishimura syndrome (Amyopathy-fat tissue anomaly) が登録されていたことから、昭和 14 年に初めて報告した東北帝国大学の中條と、昭和 25 年に中條の報告を再発見し 2 度目の報告を行った和歌山医大の西村の名前を冠した中條-西村症候群として、平成 21 年度に開始された厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業研究奨励分野対象疾患の一つとして申請、採択された。これまでに、全国疫学調査や免疫プロテアソームβ5i サブユニットをコードする *PSMB8* 遺伝子変異

#### B. 研究方法

研究成果の発信、班会議の開催 (担当: 金澤伸雄)

自己炎症疾患の第一人者であるアメリカ NIH の Daniel Kastner 博士の協力を得て、Proc Natl Acad Sci USA 誌に投稿した。論文掲載を受け、各大学などを通じてマスコミに内容をアピールした。さらに各分担研究

の現状に対する情報の共有と、論文が出た後の研究の方向性の確認のため、8月末に大阪で、2月末に東京で班会議を行った。

#### 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、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、各分画の蛋白分解活性(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を用いて経時的に測定した。

健常者由来皮膚線維芽細胞にMG132等のプロテアソーム阻害剤処理を行ない、至適濃度の至適時間における炎症関連90遺伝子の発現量を定量的PCRにて比較した。

HEK293細胞にユビキチンとGFPの融合蛋白の遺伝子導入を行ない、ハイグロマイシンBを用いた選別後に限界希釈法による安定的発現クローンの単離を行なった。各クローンにプロテアソーム阻害剤処理を行ない、蛍光増強の有無を確認した。

#### 患者検体を用いた病態解明へのアプローチ (担当：金澤伸雄)

和歌山県立医科大学皮膚科でフォロー中の患者から採取した末梢血からLymphoprepを用いて単核球を得、10% FBS入りRPMI

で一晩培養し、一部はLysotrackerを添加し2時間さらに培養した。これらの細胞のサイトスピン標本を作製し、抗K48 ubiquitin, CD14, CD19, HLA-ABC, HLA-DR抗体で染色した。

患者末梢血単核球にIFN $\gamma$  10,000 IUを加え37Cで15分間刺激した後、直ちに4% paraformaldehydeを加えて固定しMethanolで細胞に穴をあけ、抗リン酸化STAT1, CD11b抗体で染色し、FACSCaliburで検討した。

患者8名について、それぞれ同時に測定した血中IgE値と血中好酸球数, CRP, IgG値、抗核抗体価との相関を検討した。

患者1名とその家族由来皮膚線維芽細胞にOct3/4, Sox2, Klf4, cMycをレトロウイルスベクターで導入し、得られたiPS細胞についてこれらtransgeneの発現をチェックした。Transgeneのsilencingが良好なクローンを選び、各種サイトカインや成長因子を用いて単球と脂肪細胞に分化させた。

#### 国際的な臨床情報・検体の収集・検討 (担当：金澤伸雄, 井田弘明)

国際自己炎症疾患研究会 (ISSAID) が運営する自己炎症疾患関連遺伝子変異データベースである INFEVERS を管理する Isabelle Touitou 教授に、プロテアソーム機能不全症候群 (JMP/NNS/CANDLE) の原因としての *PSMB8* 変異を新設し、その登録・管理を金澤と井田が行うことを提案した。

#### 得られた解析結果を利用した関節リウマチの病態解明の試み (担当：井田弘明)

*PSMB8* 遺伝子 (Exon 1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6,

UTR)における SNP を関節リウマチ患者 50 例と健常者 50 例で比較した。さらに、関節リウマチと変形性関節症由来培養滑膜細胞のプロテアソーム機能をキモトリプシン、トリプシン、カスパーゼ様酵素活性を測定することで評価、比較した。

### ***Psmb8* 変異導入による疾患モデルマウスの作製 (担当：吉浦孝一郎)**

*Psmb8* G201V 変異を含むジーンターゲティングベクターを C57BL/6 由来 ES 細胞に導入し、ネオマイシン存在下で選択した相同組換え細胞を用いて、キメラマウスそしてヘテロマウス (+/G201V Neo+) を作製した。さらに *CAG-Cre* トランスジェニックマウスと交配させ、得られたネオマイシン耐性カセットを除去したアレル (G201V Neo-, 以下 G201V と呼ぶ) をもつヘテロマウス (+/G201V) 同士を更に交配し、変異ホモマウス (G201V/G201V) を完成させた。

経時的に観察を行い、採集した組織・臓器を固定後、切片を作製し顕微鏡下で観察した。採取した血清について、Bio-Plex サスペンションレイシシステムを用いてサイトカイン濃度を網羅的に定量した。

+/, +/G201V, G201V/G201V マウス胎児由来の皮膚線維芽細胞を作製し、IFN $\gamma$ を添加して 24 時間後に RNA と蛋白質を回収して *Psmb8* の発現を qRT-PCR およびウェスタンブロッティングで定量した。同様に IFN $\gamma$  で 48 時間刺激した皮膚線維芽細胞から回収した蛋白質をグリセロール濃度勾配超遠心法により分画し、各分画のキモトリプシ

ン様活性を測定した。さらに各分画の蛋白質をアセトンで抽出後、ウェスタンブロッティングで $\beta$ 5i を検出した。

(倫理面への配慮)

なお本研究は、和歌山県立医科大学・長崎大学・久留米大学・京都大学の各施設において、倫理委員会をはじめとする必要な委員会の承認を得て開始され、ヒトに関する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**

### **研究成果の発信・班会議の開催**

本研究班によるこれまでの研究成果をまとめた論文”Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome”が 8 月に Proc Natl Acad Sci USA 誌に掲載されたことを受け、和歌山、長崎、久留米各大学のホームページ、産経、朝日、西日本新聞、わかやま新報などに紹介記事が掲載された。さらに 8 月末に大阪、2 月末に東京で班会議を開催し、現状における問題点と今後の研究の方向性について確認した。

### **分子・細胞機能異常の検索**

中條-西村症候群患者由来不死化リンパ球株におけるキモトリプシン様活性は 7.8% と重度に低下し、トリプシン様、カスパーゼ様活性は 36.3%, 47.0% と軽度低下していた。さらに、変異 $\beta$ 5i サブユニット蛋白質のモ

デリングによって、会合するサブユニットとの接触面の立体構造変化による複合体形成不全が予測された通り、未成熟プロテアソーム分画において、健常者由来細胞では認められないβ1iとβ2iサブユニット蛋白の成熟前プロペプチドの蓄積を認め、プロテアソーム組み立てに係るシャペロンであるhUmp1の蓄積も見られた。

健常者由来皮膚線維芽細胞に発現する炎症関連90遺伝子の中から、プロテアソーム阻害剤添加により有意に発現を増加させる19種類の遺伝子と発現低下する2種類の遺伝子を選別した。

プロテアソーム阻害剤に反応して緑色蛍光強度を増加させる発現量の異なるHEK293細胞クローンを13系統単離した

#### 患者検体を用いた病態解明へのアプローチ

患者末梢血単核球(PBMC)においてK48ubiquitin(Ub)はLysotrackerとよく共局在し、K48Ubがライソソームに蓄積することが示された。一方、K48Ubの蓄積が多い細胞は、CD14、CD19、HLA-DRのいずれも陰性で、単球やB細胞などの抗原提示細胞ではないことが示唆された。さらにIFN $\gamma$ 刺激後の末梢血単核球におけるSTAT1のチロシンリン酸化は、患者では健常人に比べ非常に弱くしか検出されなかった。

血中IgE値と血中好酸球数、CRP値、抗核抗体価との間には有意な相関を認めなかったが、血中IgG値と弱いながら正の相関を認めた。

1患者とその親からiPS細胞を樹立し、

transgeneのsilencingが良好なクローンを用いて脂肪細胞に分化させたところ、明らかな異常なく分化した。

#### 国際的な臨床情報・検体の収集・検討

INFEVERSにプロテアソーム機能不全症(JMP/NNS/CANDLE)の原因としてのPSMB8変異の登録サイトを新設し、管理を金澤・井田が行うこととなった。疾患発症にクリティカルなT75M、C135X、G201Vの3変異について、詳細を登録した。

#### 得られた解析結果を利用した関節リウマチの病態解明の試み

PSMB8のExon1bにおいて、関節リウマチ患者2例と健常者3例にアミノ酸置換を伴わないSNPを認めたほかは、いずれのExonとUTR領域においても、患者、健常者ともにSNPはみられなかった。

関節リウマチ患者由来培養滑膜細胞のプロテアソーム活性は、変形性関節症患者由来細胞と比較してキモトリプシン活性、トリプシン活性、カスパーゼ活性すべてにおいて低下していた。

#### Psmb8変異導入による疾患モデルマウスの作製

外見上の異常は生後数ヶ月後までは観察されないが、+/G201VおよびG201V/G201Vマウスでは、生後12週でも充実性の胸腺が退縮せず、組織学的にも皮質と髄質が完全に残っていた。血清中サイトカインの検討では、G201V/G201VマウスにおいてIL-6



と keratinocyte chemoattractant (KC) の濃度が他のマウスと比べて著明に上昇していたが、IP-10 の濃度は差を認めなかった。

胎児由来皮膚線維芽細胞における *Psmb8* の発現の検討では、無刺激では G201V/G201V マウスにおいて+/+, +/G201V マウスに比べ mRNA の発現量が半分以下であったが、IFN $\gamma$ 刺激により全てのマウスで mRNA の発現が著明に増加し、差はなくなった。ウェスタンブロッティングによる蛋白質発現の解析でも同様の結果が得られた。

IFN $\gamma$ 刺激皮膚線維芽細胞から回収した蛋白質をグリセロール濃度勾配超遠心法により分画し、各分画のキモトリプシン様活性を測定した結果、G201V/G201V マウスの 20S プロテアソーム分画において、軽度ながら活性低下を認めた。各分画のウェスタンブロッティングにより、変異 $\beta 5i$  は N 末端が切断されていないプロ蛋白質としてプロテアソームに取り込まれている事が確認された。

#### D. 考察

Proc Natl Acad Sci USA 誌に論文が掲載され (研究発表 1-1) マスコミ各紙にて紹介されたことや、多くの学会で発表した結果、中條—西村症候群の認知が大いに広まったと思われる。さらに、徳島大学のグループからも、東北の症例を用いて独自に *PSMB8* 変異を同定し様々な機能解析を行った論文が J Clin Invest 誌に掲載された (Kitamura A, et al. 2011) ことで、本研究だけでは明らかにできなかった事実が明らかになった。そ

の一つは、*PSMB8* が脂肪細胞の分化そのものに関与し、その機能不全によってダイレクトに脂肪萎縮が引き起こされる可能性が培養細胞とマウスを用いた実験から示唆されたことである。これは、JMP 症候群と CANDLE 症候群の患者において、各種生物学的製剤を含む強力な抗炎症療法が脂肪萎縮には無効であったという報告 (Liu Y et al, Arthritis Rheum 2012) と合致する。そのため、投与を予定していた抗 IL-6 受容体抗体製剤 (アクテムラ) の投与に当っては慎重にならざるをえない。今後ノックインマウスの解析などにより、IL-6 過剰産生と脂肪萎縮との関連の有無が明らかになることが期待される。

INFEVERS での *PSMB8* 遺伝子変異の登録と管理を金澤と井田が行うこととなったが、登録枠が提供されているだけで、実効ある国際的なレジストリとしては、CANDLE 症候群の報告における国際共同研究には到底及ばない。より実効性のものとすべく、学会側と適宜交渉する必要がある。

一方、IFN $\gamma$ による STAT1 チロシンリン酸化の違いなど、全プロテアソーム活性が低下する中條—西村症候群 (NNS) とキモトリプシン活性しか低下しない JMP/CANDLE 症候群とで発症メカニズムが微妙に異なる可能性も考えられる。従って、一方で認められることがそのまま他方にも適応できるか、常に検証が必要であろう。マウスにおいても同じことが言え、これまでのところヒトでの表現型と全く同じではないが、これにはヒトとマウスの違い

というだけでなく、遺伝子変異による立体構造変化の微妙な違い、さらにはマウスの系統による違いも関係している可能性がある。Balb/c をはじめとする他の系統へのバッククロスやさまざまな刺激によりどのように表現型が代わるか、まだまだ検討すべき点は多い。

## E. 結論

本研究によって、1939年の中條の報告以来約70年ぶりに本疾患の原因遺伝子が同定されたが、相前後してPSMB8遺伝子変異を伴う類症が世界から次々と報告され、プロテアソーム機能不全症ワールドが一気に花開いた。世界的な視野のもとで本研究が今後も発展的に継続され、この分野の研究を牽引し、病態解明と特異的治療法の開発に向けて更なる歩みを進めていくことが切に望まれる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Arima K, Kinoshita A, Mishima H, Kanazawa N, Kaneko T, Mizushima T, Ichinose K, Nakamura H, Tsujino A, Kawakami A, Matsunaka M, Kasagi S, Kawano S, Kumagai S, Ohmura K, Mimori T, Hirano M, Ueno S, Tanaka K, Tanaka M, Toyoshima I, Sugino H, Yamakawa A, Tanaka K, Niikawa N, Furukawa F, Murata S, Eguchi K, Ida H, Yoshiura K.

Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. **Proc Natl Acad Sci USA** 2011; 108(36): 14914-9.

2. Kanazawa N: Rare hereditary autoinflammatory disorders: Towards an understanding of critical *in vivo* inflammatory pathways. **J Dermatol Sci** *in press*

3. Kanazawa N: Nakajo-Nishimura syndrome: an autoinflammatory disorder showing pernio-like rashes and progressive partial lipodystrophy. **Allergol Int** *in press*

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

5. 有馬和彦, 井田弘明, 金澤伸雄, 吉浦孝一郎: プロテアソームの機能阻害型遺伝子変異が新規自己炎症疾患である中條—西村症候群を引き起こす. 細胞工学 31: 68-69, 2012

6. 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11回浜名湖皮膚病病理研究会記録集 pp5-6, pp14-15, 2011

7. 金澤伸雄：自己炎症疾患とは．皮膚病診療 33: 8-14, 2011

8. 金澤伸雄：名前をつけよう．臨床皮膚科 65: 85, 2011

9. 金澤伸雄, 有馬和彦, 井田弘明, 吉浦孝一郎, 古川福実：中條-西村症候群．日本臨床免疫学会雑誌 34: 388-400, 2011

10. 井田弘明, 吉浦孝一郎, 金澤伸雄：中條-西村症候群の臨床と病態．炎症と免疫 19: 153-157, 2011

11. 井田弘明：自己炎症症候群の遺伝子異常．内科 107: 645-652, 2011.

12. 井田弘明：医学用語解説 プロテアソーム．炎症と免疫 19: 297-299, 2011

13. 井田弘明：自己炎症症候群と自然免疫．リウマチ科 46: 149-154, 2011

14. 金澤伸雄：中條-西村症候群．原寿郎編 小児の発熱 A to Z 診断と治療社，印刷中

## 2. 学会発表

### 国内学会

**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

**第7回皮膚免疫疾患研究会 2011.4.7, 大阪**  
金澤伸雄：中條-西村症候群：プロテアソーム機能不全による自己炎症疾患

**第32回日本炎症・再生医学会 2011.6.2-3, 京都**

金澤伸雄, 井田弘明：中條-西村症候群（家族性日本熱）と脂肪萎縮を伴う自己炎症疾患

井田弘明, 有馬和彦, 金澤伸雄, 江口勝美：プロテアソーム機能不全症（中條-西村症候群）の病態解析

**第4回自己炎症疾患研究会 2011.6.3, 京都**  
金澤伸雄：中條-西村症候群

**第100回日本皮膚科学会静岡地方会 2011.6.19, 静岡**

金澤伸雄, 古川福実, 有馬和彦, 吉浦孝一郎, 井田弘明：中條-西村症候群：プロテアソーム機能不全による自己炎症疾患

**第55回日本リウマチ学会総会・学術集会 2011.7.17-20, 神戸**

井田弘明：成人の自己炎症性疾患の炎症病

態

有馬和彦, 井田弘明, 折口智樹, 金澤伸雄,  
江口勝美: 全身性炎症を呈する遺伝性プロ  
テアソーム機能不全症の発見

金澤伸雄, 古川福実, 井田弘明: 中條-西村  
症候群: 新規幼児例の報告と類似疾患の外国  
報告例との比較

**第 35 回日本小児皮膚科学会 2011.7.23-24,**  
**横浜**

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

**第 39 回日本臨床免疫学会総会**  
**2011.9.15-17, 東京**

有馬和彦, 井田弘明, 金澤伸雄, 吉浦孝一  
郎: 中條-西村症候群, 全身性炎症を呈する  
遺伝性プロテアソーム機能不全症

**第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会**  
**2011.11.10-12, 東京**

稲葉豊, 金澤伸雄, 古川福実: プロテアソー  
ム機能不全による自己炎症疾患である中條  
-西村症候群における IgE 血症

**第 40 回日本免疫学会学術集会**  
**2011.11.27-29, 千葉**

金澤伸雄, 有馬和彦, 三嶋博之, 古川福実,  
井田弘明, 吉浦孝一郎: 免疫プロテアソーム  
β5iサブユニットをコードするPSMB8 遺伝子

の変異は周期熱・皮疹・脂肪萎縮を特徴とす  
る中條-西村症候群の原因である

**第 56 回日本人類遺伝学会 2011.11.9-12,**  
**千葉**

木下晃, 三嶋博之, 有馬和彦, 金澤伸雄, 村  
田茂穂, 井田弘明, 吉浦孝一郎: 免疫プロテ  
アソームの形成以上と活性低下により自己  
炎症疾患中條-西村症候群が発症する.

**第 15 回九州基礎皮膚科学研究会 2011.12.3,**  
**福岡**

金澤伸雄: 中條-西村症候群: 遺伝性自己炎  
症疾患の解析から見えるもの

国際学会

**2011 Symposium of the Asia Pacific League**  
**of Associations for Rheumatology, 2011.4.15-**  
**17, Taipei, Taiwan**

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).

**The 22nd World Congress of Dermatology,**  
**2011.5.24-29. Seoul, South Korea**

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).



**The Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2011, 2011. 5.25-28, London, UK**

Arima K, Kanazawa N, Mishima H, Furukawa F, Ida H, Yoshiura K: Decrease of proteasome activity is associated with a novel mutation of the proteasome catalytic subunit in an auto-inflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome.

**10th World Congress on Inflammation, 2011.6.25-29, Paris, France**

Kanazawa N, Kunimoto K, Mikita N, Furukawa F, Yoshiura KI, Ida H: Nakajo-Nishimura syndrome (familial Japanese fever) and related autoinflammatory disorders accompanied with lipodystrophy.

Ida H, Arima K, Kinoshita A, Mishima H, Kanazawa N, Furukawa F, Murata S, Yoshiura KI, Eguchi K: A novel mutation of proteasome subunit causes decrease of proteasome activity in Nakajo-Nishimura syndrome (familial Japanese fever).

**The 20th International Rheumatology Symposium, 2011.7.17-20, Kobe, Japan**

Arima K, Ida H, Origuchi T, Kanazawa N, Eguchi K: A novel point mutation causing proteasome dysfunction in NNS.

**The 41st Annual Meeting of European Society for Investigative Dermatological Research, 2011.9.7-10, Barcelona, Spain**

Kanazawa N, Arima K, Mishima H, Furukawa F, Ida H, Yoshiura KI: A mutation of the immunoproteasome subunit gene is responsible for Nakajo-Nishimura syndrome, a distinct autoinflammatory syndrome with periodic fever, skin eruptions and partial lipodystrophy.

**4th East Asian Group of Rheumatology (EAGOR), 2011.10.15, Tokyo, Japan**

Arima K, Kanazawa N, Mishima H, Furukawa F, Ida H, Yoshiura K: Inflammatory cytokines and chemokines in an autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome.

**75th annual meeting of the American College of Rheumatology (ACR 2011), 2011.11.5-9, Chicago, USA**

Ida H, Arima K, Kanazawa N, Yoshiura KI: Proteasome disability syndrome: an analysis of the pathogenesis of a new autoinflammatory syndrome, Nakajo-Nishimura syndrome

**The 36th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2011.12.9-11, Kyoto, Japan**

Kanazawa N, Arima K, Mishima H, Furukawa F, Ida H, Yoshiura KI: Analysis of the pathogenesis of Nakajo-Nishimura syndrome shows a new class autoinflammatory syndromes with proteasome disability.

**International Conference on Rare Diseases  
& Orphan Drugs (ICORD) 2012 Conference,  
2012, 2.4-6, Tokyo, Japan**

Kanazawa N, Kunimoto K, Arima K, Ida H,  
Yoshiura KI, Furukawa F: Nakajo-Nishimura  
syndrome, an autoinflammatory disorder with  
partial lipodystrophy, is caused by a mutation  
of the *PSMB8* gene encoding an immuno-  
proteasome subunit.

**H. 知的財産権の出願・登録状況**  
(予定を含む。)

**1. 特許取得**

「自己炎症疾患又は自己免疫疾患関連遺伝子及びその利用」発明者(長崎大学：吉浦孝一郎、久留米大学：井田弘明、和歌山県立医科大学：金澤伸雄) 出願番号：特願2011-177269

**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23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-西村症候群の分子・細胞機能異常の検索

分担研究者：有馬 和彦（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・助教）

研究協力者：村田 茂穂（東京大学大学院薬学系研究科蛋白質代謝学）

田中 啓二（東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所）

### 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と拘縮を伴う長く節くれ立った指趾を特徴とする遺伝性炎症・消耗性疾患である。当研究班によりプロテアソームの遺伝子変異とその活性低下が示された。

本分担研究において、長崎大学分子設計学グループは、この遺伝子変異が与える影響を分子機能的解析で明らかとし、病態解明への手がかりを得ることを目的とした。

分子機能的解析により、変異蛋白は細胞内蛋白質の品質管理を行なうプロテアソームの機能低下とそれにひき続く炎症関連遺伝子群の発現上昇を引き起こしていることが明らかとなった。

このことは、プロテアソーム機能不全と炎症病態の相互関係を解明する手がかりの発見である。失われて初めてわかるプロテアソームの正常機能を解明することは、他の炎症性疾患の病態理解を深めるとともに、炎症制御戦略の新展開に繋がると期待される。

### 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に、遺伝性炎症・消耗性疾患である中條-西村症候群の病態解明・疾患特異的治療法の開発を目指している。

昨年度の成果として、本難病がヒトにおける初めてのプロテアソームサブユニット遺伝子変異によるプロテアソーム機能不全症であることが見いだされた。

長崎大学分子医学グループは、この遺伝子変異が与える影響をプロテアソームの分子機能的解析で明らかとし、病態解明への手がかりを得ることを目的とした。

細胞内蛋白質はダイナミックで繊細な生成と分解の調節を受けている。千差万別の蛋白質の寿命は、短いものは数分、長いものは数ヶ月と、一万倍以上の個別性を持っている。それらを適正に調節す



る事は生体維持に必須である。ユビキチン-プロテアソーム蛋白質分解系はその最も重要な調節機構である。

26S プロテアソームは、細胞にとって危険な短半減期蛋白質や劣悪な立体構造を持った蛋白質を積極的に分解する ATP 依存性プロテアーゼである。この酵素は 60 以上ものサブユニットから構成され、触媒ユニットである 20S プロテアソームの両端に調節ユニット 19S が二つ会合した分子量 2.5MDa の巨大な分子集合体である。

新規変異が同定された *PSMB8* 遺伝子はプロテアソーム触媒サブユニットをコードしていたが、単独蛋白では蛋白分解活性を発揮出来ないために、患者とその家族及び健常者由来不死化リンパ球株からのプロテアソームの分離精製を行ない、機能不全の定量化と障害成熟過程の同定を目指した。

更に、プロテアソーム阻害による炎症関連遺伝子群の網羅的解析を行なうことでプロテアソーム機能不全が炎症病態に与える影響を明らかにすること、プロテアソーム機能不全に反応するレポーター細胞株を用いて炎症病態がプロテアソーム機能に与える影響を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. プロテアソーム機能不全の定量化と障害成熟過程の同定

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中條-西村症候群患者 3

名とその家族 5 名の不死化リンパ球株をプロテアソーム機能解析に用いた。

プロテアソームは容易に解離し、その蛋白分解活性を失い易いため、東京大学大学院薬学系研究科蛋白質代謝学教室村田茂穂先生、東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所田中啓二先生の協力のもと、グリセオール濃度勾配を用いた超遠心分画法にて連続する 3 2 の分画に分離した。

各分画のプロテアソーム活性を測定し、含有するサブユニット蛋白を Western blotting にて検出した。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) は、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) を用いて測定した。分解による蛍光強度の増強をマルチプレートリーダー Arvo x3 にて経時的に測定した。

### 2. プロテアソーム機能不全によって誘導される炎症関連遺伝子群の選別

健常者由来皮膚線維芽細胞に MG132 等のプロテアソーム阻害剤処理を行ない、至適濃度の至適時間における炎症関連遺伝子群の発現量を定量的 PCR にて比較した。

5 種類の標準遺伝子群を用い、90 種類の候補遺伝子について検討した。

### 3. プロテアソーム機能不全を検出する安定発現細胞株の樹立

HEK293 細胞にユビキチンと GFP の融合蛋

白の遺伝子導入を行ない、ハイグロマイシン B を用いた選別後に限界希釈法による安定的発現クローンの単離を行なった。各クローンにプロテアソーム阻害剤処理を行ない、蛍光増強の有無を確認した。

(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の

承認を得て開始された。

### C. 研究結果

#### 1. プロテアソーム機能不全の定量化と障害成熟過程の同定

至適化されたグリセオール濃度勾配を用いた超遠心法により 20S プロテアソームと 26S プロテアソーム分画の活性ピークが良好に描出され、その活性を失うことなく良好な分離に成功した。

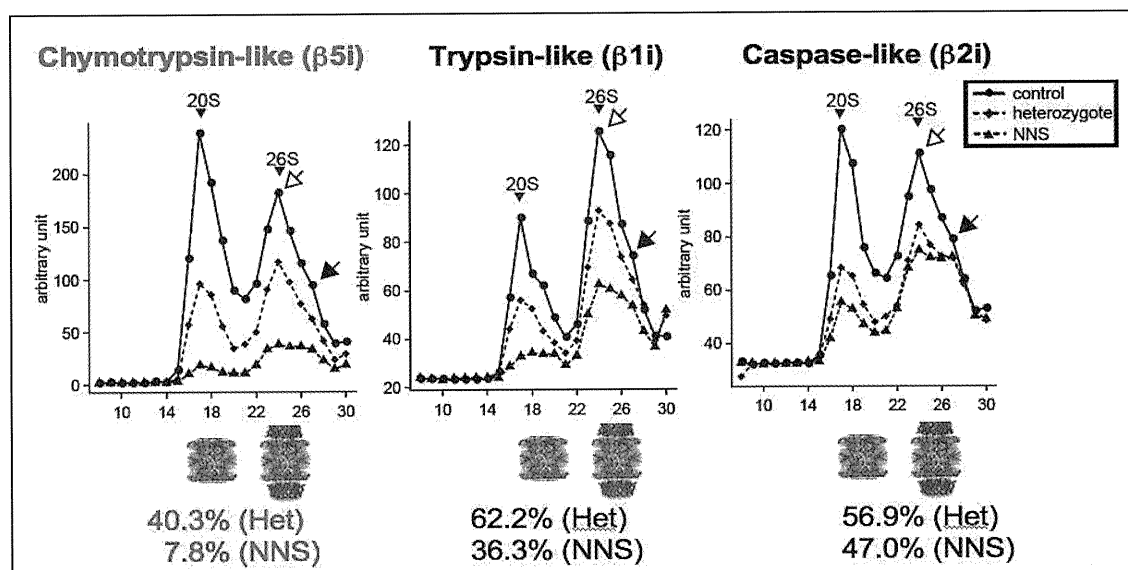


図 1. プロテアソーム機能の定量的解析

その結果、図 1 に示すように中條-西村症候群患者由来不死化リンパ球株におけるキモトリプシン様活性は 7.8% と重度に低下していた。トリプシン様、カスパーゼ様活性は 36.3%, 47.0% と軽度低下していた。

さらに、変異  $\beta 5i$  サブユニット蛋白のモデリングにより、会合するサブユニットとの接触面の立体構造変化が予測された (図 2)。

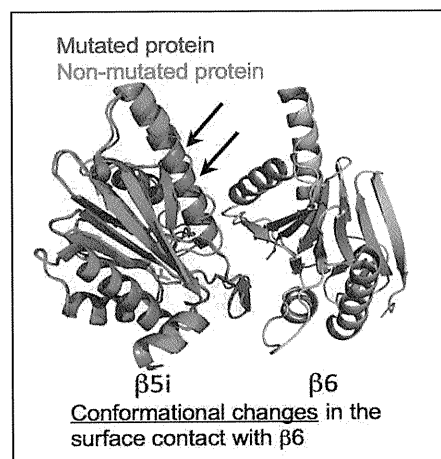


図 2. モデリングによる立体構造変化の予測

プロテアソーム成熟過程の障害を3つの成熟過程（26S プロテアソームと 20S プロテアソームと未成熟プロテアソーム）に分画することで解析した。

その結果、未成熟プロテアソーム分画に

おいて、健常者由来細胞では認められない  $\beta 1i$  と  $\beta 2i$  サブユニット蛋白の成熟前プロペプチドの蓄積を認めた。この分画にはプロテアソーム組み立てに係るシャペロンである hUmp1 の蓄積も見られた。

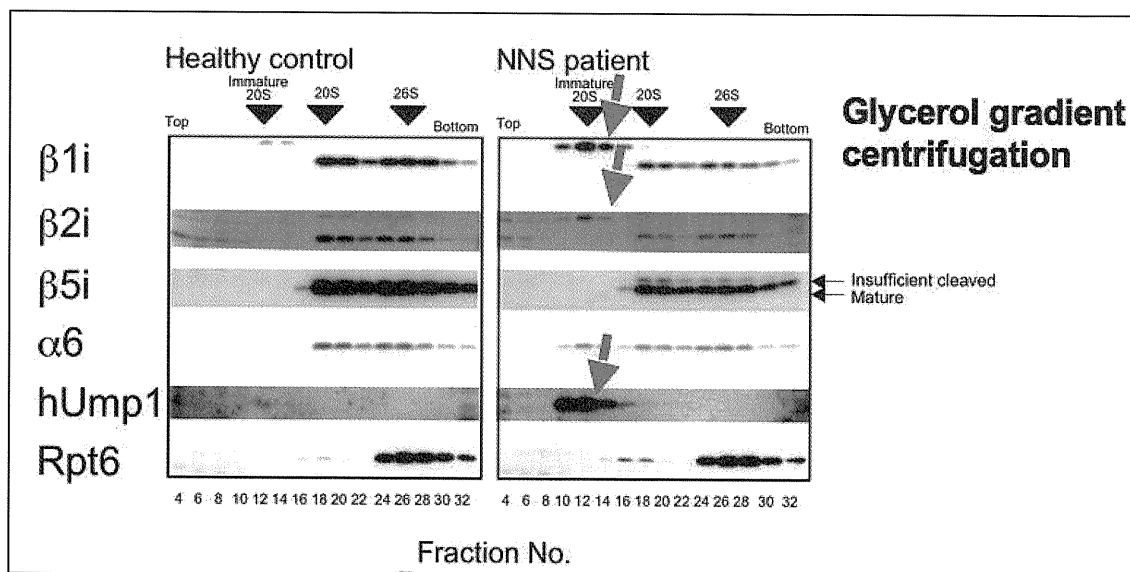


図3. プロテアソーム成熟過程の各分画におけるサブユニット蛋白の検出

## 2. プロテアソーム機能不全によって誘導される炎症関連遺伝子群の選別

図4に示すように、多くの遺伝子が発現を変化させないことが判明した。皮膚線維芽細胞に発現する90種類の炎症関連遺伝子群の候補から、プロテアソーム阻害剤添加により有意に発現を増加させる19種類の遺伝子群と発現低下する2種類の遺伝子を選別することができた。

## 3. プロテアソーム機能不全を検出する安定発現細胞株の樹立

プロテアソーム阻害剤に反応して緑色蛍光強度を増加させる発現量の異なるクローンを13系統単離した(図5)。

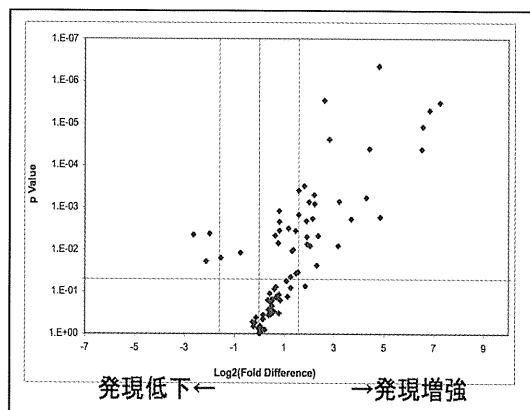


図4. プロテアーゼ阻害剤による遺伝子発現の変化と統計学的有意差

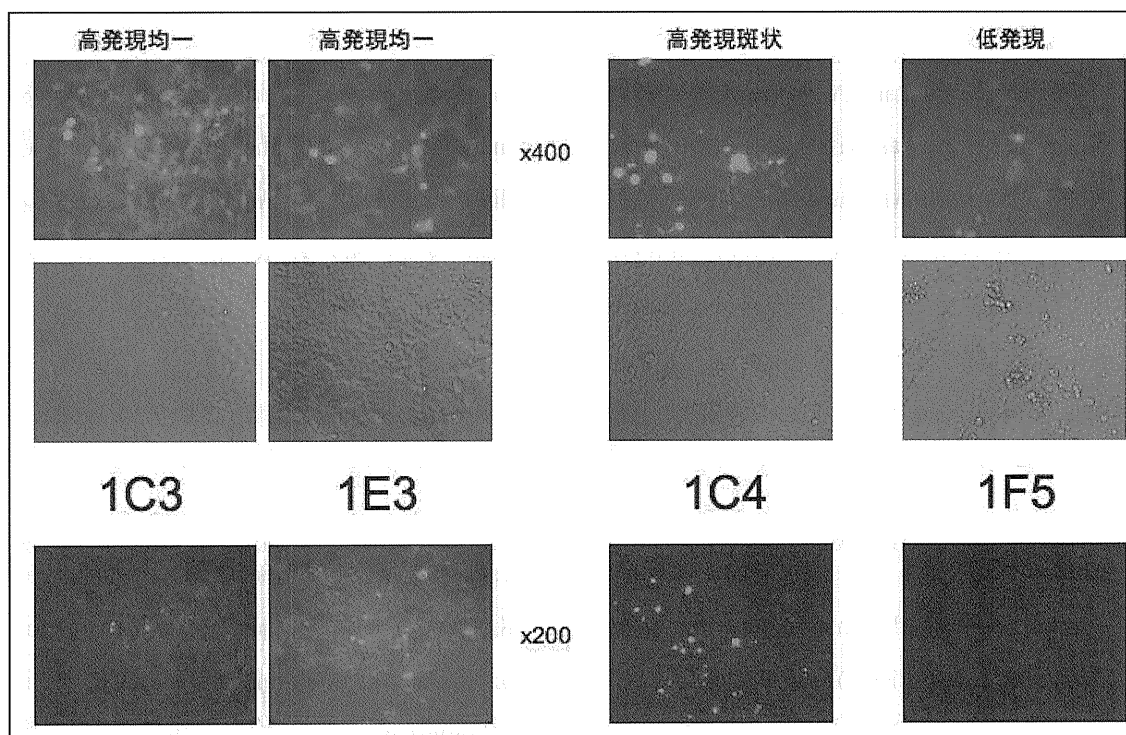


図5. プロテアソーム機能低下を検出すレポーター細胞株

#### D. 考察

本研究班の発見した中條-西村症候群原因遺伝子変異が患者由来細胞において以下の影響を及ぼしていることが明らかとなった。1. プロテアソーム活性低下 (図1)、2. 成熟したプロテアソームの減少 (図3)、3. 未成熟プロテアソームの蓄積 (図3)。

プロテアソーム機能不全が炎症病態に関連する一つの機構として、炎症関連遺伝子群の発現増加が考えられた。このことは、健常者由来細胞にプロテアソーム阻害剤処理を加えることでも再現することができた。

炎症病態がプロテアソーム機能に影響を与えて難治性慢性炎症病態を形成している可能性があり、相互の関係解明は他の炎症性疾患の病態理解を深めるとともに、炎症制御戦略の新展開に繋がると期待される。

#### E. 結論

中條-西村症候群はヒトにおける初めての遺伝性プロテアソーム機能不全症であり、本研究班により同定された遺伝子変異は本難病疾患の病態解明の手がかりである。プロテアソームの異常による炎症性病態は新しい概念であり、その細胞機能的病態解明が本難病の治療法開発の糸口になると考えられた。プロテアソーム機能低下による炎症関連遺伝子発現増加機構に対する制御的介入は広く他の炎症性疾患制御戦略の新展開につながると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表