

201128134B

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～23年度
総合研究報告書

研究代表者 金澤 伸雄

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総合研究報告

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

金澤 伸雄 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 19

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 37

総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合研究報告書

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（ORPHA 2615; あるいは中條症候群: 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を特徴とする本邦固有の遺伝性炎症・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。平成 22, 23 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、検索しえた患者全てに強い **founder effect** を伴う同じ変異を認めた。(2) 患者由来不死化リンパ球株において、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。プロテアソームサブユニット蛋白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が予測された通り、プロテアソーム複合体成熟過程での障害が同定された。(3) 患者病変部皮膚に浸潤する細胞において、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における NF- κ B p65 の挙動は EMSA 法にて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、血中 IgE 値は IgG 値と正の相関を示した。(5) 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。(6) 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 細胞などの抗原提示細胞ではなく、IFN γ 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た。(7) 患者由来

iPS 細胞は脂肪細胞にきちんと分化した。(8) 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た。(9) *Psm8* 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 γ 刺激線維芽細胞における *Psm8* 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を認めた。(10) 和歌山で新規幼児例が見出されたのを契機に、関西と東北地方の 300 床以上の病院の関連各科を対象に追加疫学調査を行ったが、新たな症例は見出されなかった。(11) 海外より報告のあった類縁疾患における *PSMB8* 遺伝子変異をまとめて国際自己炎症疾患研究会が運営するデータベース INFEVERS に登録し、金澤と井田が管理することとなった。

本研究の最大の成果として、中條一西村症候群の責任遺伝子変異の同定から明らかになった発症メカニズムまでをまとめて、平成 23 年 8 月に *Proc Natl Acad Sci USA* 誌に報告し、マスコミ各紙にて紹介された。世界で最初のプロテアソーム機能不全症の報告は逃したものの、相前後して次々に世界から報告された類症における *PSMB8* 遺伝子変異によって、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

早世する。平成 21 年度「中條一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、平成 21 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・患者由来 iPS 細胞の樹立と解析・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・変異遺伝子ノックインマウスの作成と解析、同大学分子設計学（のち分子医学）教室による分子・細胞機能異常の検

A. 研究目的

中條一西村症候群 (NNS: ORPHA 2615; 中條症候群: 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

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・関節リウマチの病態解明への応用を合わせて、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た。

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、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。また、プロテアソームを構成する各サブユニットやシャペロン蛋白の発現をウエスタンブロット法にて検討した。

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：井田弘明・金澤伸雄）

患者末梢血由来不死化リンパ球株から抽出した蛋白質についてウエスタンブロット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。

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) にて検討し、健常者から樹立した細胞株と比較した。

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化試験も検討した。さらに患者 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 で一晚培養し、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 γ 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 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。

抗 IL-6 受容体抗体による治療の試み (担当：金澤伸雄)

研究成果により明らかとなった病態から抗 IL-6 受容体抗体 (トシリズマブ) の有効性が予測されたが、重篤な感染症などの副作用のリスク、保険診療の問題、高額であることなどを考慮して、6 ヶ月間は本研究費から支出して投与するという内容で和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得た。

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ットベクターを 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 サスペンションアレイ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 γ 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 γ 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。

追加疫学調査／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)

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。

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 Tuitou 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。さらにこれら 3 疾患の違いを文献的に検討し

た。

研究成果の発信・班会議の開催 (担当：金澤伸雄・井田弘明)

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 月末に東京で会議を企画した。

(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

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、分離したプロテアソーム分画を用いた検討にて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 $\beta 1i$ 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、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 ユビキチン (Ub) が強く、K63 Ub は弱く染色された。

NF- κ B p65 の挙動を EMSA 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。

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。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。

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

患者末梢血単核球 (PBMC) において K48 Ub は LysoTracker とよく共局在し、K48 Ub がライソソームに蓄積することが示された。

一方、K48 Ub 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 γ 刺激後の末梢血単球における 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。

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。

当初計画していたトシリズマブの患者への投与は、患者の容態が良くなく、あるいは良好であったために、行えなかった。

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 Exon 1b 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髓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 γ 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 γ 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 β 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。

追加疫学調査／国際的な臨床情報・検体の収集・検討

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。

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。さらにこれら3変異について、これまでに報告された特徴について文献的に検討し、プロテアソーム形成能、活性低下のパターン、IFN γ による STAT1 チロシンリン酸化の変化などに違いを認めた。

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。

D. 考察

平成 21 年度研究班から継続する患者ゲノムのホモ接合部マッピングにより、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、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。

平成 22 年度に相次いで諸外国から報告された類縁疾患である CANDLE 症候群・JMP 症候群は、いずれも中條—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。さらに平成 24 年 3 月に、CANDLE 症候群の原因遺伝子として *PSMB8* 遺伝子の 224C>T (T75M) ホモ変異のみならず、

そのヘテロ変異、405C>A (C135X) ホモ変異も原因であることが報告された。T75M のホモ、ヘテロ、変異なしに関わらず、末梢血にて IFN 関連遺伝子の発現上昇が見られ、単球の IFN γ 刺激による STAT1 チロシンリン酸化が亢進していることから、JAK キナーゼ阻害剤の有効性が示唆された一方、C135X や G201V と異なりプロテアソーム形成不全はなさそうであり、変異による病態の違いも想定される。

我々も論文化を急ぎ、平成 23 年 8 月に Proc Natl Acad Sci USA 誌に掲載することができた (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。

一方、IFN γ 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。

最後に、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。国際的には、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。

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、プロテアソーム機能不全症という新たな疾患概念が生まれ、研究が進みつつある。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、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. 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
6. 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
7. 井田弘明：自己炎症症候群 カレントセラピー 28(10): 970-971, 2010
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 井田弘明：自己炎症症候群の遺伝子異常. 内科 107: 645-652, 2011.
13. 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
14. 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
15. 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回浜名湖皮膚病理研究会記録集 pp5-6, pp14-15, 2011
16. 金澤伸雄：自己炎症疾患とは. 皮膚病診療 33: 8-14, 2011
17. 金澤伸雄：名前をつけよう. 臨床皮膚科 65: 85, 2011
18. 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
19. 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

20. 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 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
皮疹と限局性脂肪委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

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 $\beta 5i$ 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

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

Kanazawa N, Furukawa F, 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 F, 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 F: 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 F, 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 F, 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

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 immunoproteasome 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