

CAPS に対するアナキンラ治療の有効性及び安全性の後方視的検討

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

Cryopyrin-associated periodic syndrome(CAPS)に対し、本邦においてアナキンラで治療を行った症例を集積し、診療録を中心に後方視的にその有効性及び安全性を調査した。発熱・発疹・頭痛等の臨床症状や血液検査の炎症マーカーは治療開始後全例で改善が見られており、治療は有効と考えられた。また感染症に注意は必要ではあるものの、安全性についても良好な結果が得られた。

A. 研究目的

Cryopyrin-associated periodic syndrome(CAPS)は、*NLRP3* 遺伝子異常により、*IL-1β* の過剰産生が惹起され、炎症を生じる自己炎症疾患である。これまで CAPS の治療として、抗 *IL-1* 製剤であるアナキンラ・カナキヌマブ・リロナセプトの有効性が報告されている。しかし本邦では、2011 年 9 月にカナキヌマブが承認されるまでは、未承認薬としてアナキンラが主として使用されていた。カナキヌマブはヒト化抗ヒト *IL-1β* モノクローナル抗体であり、これまで CAPS 患者に対して良好な治療効果が得られている。しかしその長期的な効果は不明であり、また副反応等で使用できなくなった際、代替となる有効な治療法が存在しない。

以上の背景をもとに、もう一つの抗 *IL-1* 療法であるアナキンラを投与された CAPS 症例を集積し、後方視的にその安全性・有効性を調査した。

B. 研究方法

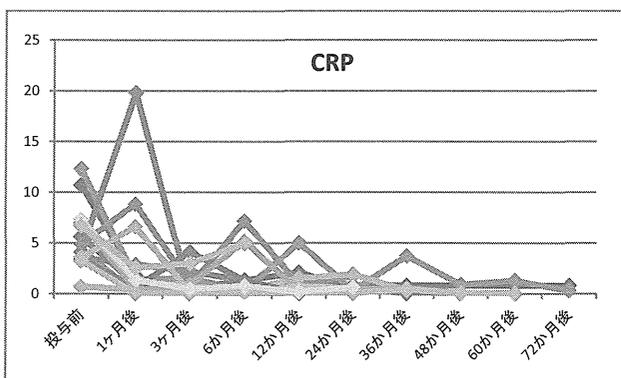
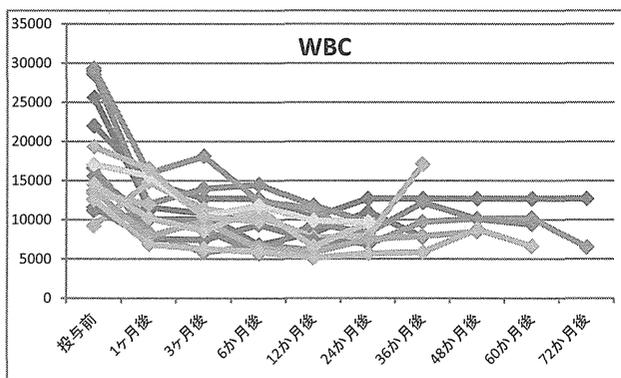
全国で CAPS 患者に対してアナキンラ治療を行った施設に対し、調査票を送付し記入していただき、アナキンラ治療前後での臨床症状・検査データの推移や、副作用の有無等を評価した。

C. 研究結果

全国から 16 症例を集めることができた。

	臨床診断	投与開始 年齢(歳)	遺伝子変異
症例 1	CINCA	15	Y570C(mosaic)
症例 2	CINCA	12	M662T
症例 3	CINCA	13	R260W
症例 4	CINCA	14	G307S(mosaic)
症例 5	CINCA	4	N477K
症例 6	CINCA	2	G755R
症例 7	CINCA	12	なし
症例 8	CINCA	2	D303H
症例 9	CINCA	14	Y441H
症例 10	CINCA/M WS	36	E304K
症例 11	MWS	24	H312P
症例 12	MWS	9	Y859C
症例 13	MWS	13	E567K(mosaic)
症例 14	MWS	8	R260W
症例 15	MWS	2	なし
症例 16	MWS	2	E304K

投与期間は3か月間から最長で7年6か月であった。発熱・発疹・頭痛等の臨床症状や、CRP等の炎症マーカーは、治療開始後全例で改善が見られた。また難聴を認めた11例中3例で難聴の改善も見られた。治療継続期間は症例により様々だが、アナキンラに対するアレルギー反応のために中止せざるを得なくなった一例を除き、他の全例で治療を継続することができた。またアナキンラ治療開始時に8例でステロイド投与が行われていたが、治療開始後に6例で投与が中止でき、2例で減量が可能となっていた。合併症として肺炎を3例、帯状疱疹を1例、胃腸炎を1例認めたが、いずれも通常の治療で軽快していた。軽度の局所反応は半数の症例で認められた。



D. 考察

臨床症例や血液検査の炎症マーカーの改善が全例で見られており、CAPSに対するアナキンラ治療は有効であると考えられた。難聴に対する効果は一部の症例に限られていたが、投与開始年齢との関連も考えられた。合併症として、重症のものではないもの

の、感染症に注意が必要とは思われた。

E. 結論

アナキンラはCAPSの治療薬として有効と考えられた。また安全性についても、感染症に注意は必要なものの、良好な結果が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

● Tanaka T., Takahashi K., Yamane M., Tomida S., Nakamura S., Oshima K., Niwa A., Nishikomori R., Kambe N., Hara H., Mitsuyama M., Morone N., Heuser J. E., Yamamoto T., Watanabe A., Sato-Otsubo A., Ogawa S., Asaka I., Heike T., Yamanaka S., Nakahata T., Saito M. K. Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery *Blood* 120: 1299-1308, 2012.

● Shinar Y., Obici L., Aksentijevich I., Bennetts B., Austrup F., Ceccherini I., Costa J. M., De Leener A., Gattorno M., Kania U., Kone-Paut I., Lezer S., Livneh A., Moix I., Nishikomori R., Ozen S., Phylactou L., Risom L., Rowczenio D., Sarkisian T., van Gijn M. E., Witsch-Baumgartner M., Morris M., Hoffman H. M., Touitou I., European Molecular Genetics Quality Network. Guidelines for the genetic diagnosis of hereditary recurrent fevers *Annals of the rheumatic diseases* 71: 1599-1605, 2012.

● Ohnishi H., Teramoto T., Iwata H., Kato Z., Kimura T., Kubota K., Nishikomori R., Kaneko H., Seishima M., Kondo N. Characterization of NLRP3 variants in Japanese cryopyrin-associated periodic syndrome patients *J Clin Immunol* 32: 221-229, 2012.

● 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 *Rheumatology international* 32: 3761-3764, 2012.

● 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 *International journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 19: 143-152, 2012.

● Aoyama K., Amano H., Takaoka Y., Nishikomori R., Ishikawa O. Cryopyrin-associated periodic syndrome: a case report and review of the Japanese literature *Acta dermato-venereologica* 92: 395-398, 2012.

● 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 *Rheumatology international* 32: 3761-3764, 2012.

● 西小森 隆太、井澤 和司、平家 俊男. 【クローズアップ感染症】 PFAPA 以外の周期性発熱症候群についての知見 *小児内科* 44: 1221-1226, 2012.

● 西小森 隆太、井澤 和司、平家 俊男. 原発性免疫不全症における臨床遺伝学 日本における自己炎症疾患の遺伝子診断について *日本遺伝カウンセリング学会誌* 33: 63-68, 2012.

2. 学会発表

● 中川権史、井澤和司、西小森隆太、河合朋樹、八角高裕、家原知子、津下充、小林法元、河島尚志、谷口敦夫、窪田哲朗、高田英俊、松林正、川上清、平家俊男 CAPS に対するアナキンラ治療の有効性及び安全性の後方視的検討 第22回日本小児リウマ

チ学会総会・学術集会、10月5-7日、2012、名古屋

● 中澤 裕美子、澤 新一郎、河合 利尚、西小森 隆太、小野寺 雅史. 周期性発熱を認めなかったクリオリピン関連周期性発熱症候群、第114回日本小児科学会学術集会、4月20-22日、2012、福岡

● 井澤 和司、土方 敦司、西小森 隆太、小原 收、斎藤 潤、吉岡 耕平、堀 雅之、日衛嶋 栄太郎、中川 権史、小田 紘嗣、阿部 純也、河合 朋樹、八角 高裕、中畑 龍俊、平家 俊男、武井 修治、河合 利尚. NLRP3 体細胞モザイクを認めた Muckle-Wells 症候群の2例 第40回日本臨床免疫学会総会、9月27-29日、2012、東京

● 井澤 和司、土方 敦司、西小森 隆太、小原 收、田中 尚子、河合 朋樹、八角 高裕、斎藤 潤、中畑 龍俊、平家 俊男. 次世代シーケンサーによる NLRP3 体細胞モザイクの診断、第114回日本小児科学会学術集会、4月20-22日、2012、福岡

● 吉岡 耕平、西小森 隆太、日衛嶋 栄太郎、阿部 純也、酒井 秀政、高岡 優貴、井澤 和司、河合 朋樹、八角 高裕、平家 俊男. 高 IgD 症候群に対してアナキンラを使用した一例 第40回日本臨床免疫学会総会、9月27-29日、2012、東京

● 安村 純子、西小森 隆太. TNFRSF1A(T50M)に変異を認めた TRAPS の2歳女児例 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会・国際リウマチシンポジウム 4月26-28日、2012、東京

● 西小森 隆太. わかりにくい免疫疾患をわかりやすく 自己炎症疾患を疑ったときに考えること 鑑別診断のポイントを中心にして 第49回日本小児アレルギー学会、9月15-16日、2012、大阪

● 西小森 隆太、井澤 和司、河合 朋樹、八角 高裕、平家 俊男. 感染症、免疫不全・免疫異常症 Cryopyrin-associated periodic syndrome の治療 本邦における canakinumab 臨床試験及びアナキンラ疫学調査について 第40回日本臨床免疫学会総会、9月

27-29 日、2012、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業
(「自己炎症疾患とその類縁疾患に対する新規診療基盤の確立」研究班)
分担研究報告書

ヒト多能性幹細胞を用いた Cryopyrin 関連周期熱症候群の病態解析・治療法開発に関する研究

研究分担者 中畑 龍俊 京都大学 iPS 細胞研究所 教授・副所長

研究要旨

自己炎症性疾患の病態解明、新たな創薬シーズ探索のため、患者より iPS 細胞を樹立している。NLRP3 遺伝子変異体細胞を体細胞モザイクとしてもつ Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) 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、それぞれを既に確立した分化系を用いて、単球・マクロファージへと分化させた。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い、変異 NLRP3 を持つ細胞のみが特徴的な表現型を示すことを確認した。この細胞を用いて、新規 NLRP3 インフラマソーム抑制薬をスクリーニングするための実験系を構築した。

A. 研究目的

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) は、京都大学の山中らによって開発された細胞で、ヒト体細胞から誘導され、ES 細胞と同様の多分化能を有する。我々は iPS 細胞を疾患解析研究に応用することを考えた 6)。患者から作られた疾患関連 iPS 細胞は、その疾患の病態解明や創薬、治療に非常に有用であると考えられる。我々は CAPS の遺伝的背景として NLRP3 遺伝子を体細胞モザイクとして持つ患者が多数存在することを世界に先駆けて報告している 7), 8)。そこで、NLRP3 変異を体細胞モザイクとして持つ CAPS 患者さん 2 名から iPS 細胞を作製し、単球/マクロファージへ分化させて IL-1 β 産生を評価したうえで、IL-1 β 産生を抑制する薬剤をスクリーニングすることにより、CAPS はもとより、様々な IL-1 関連の慢性炎症性疾患の制御に役立つ薬剤を創出することができるのではないかと考えた。

B. 研究方法

iPS 細胞

2 人のモザイク型 CAPS 患者 (患者 1-CIRA188Ai および患者 2-CIRA086Ai) より樹立した iPS 細胞株を用いて実験を行った。

遺伝子解析

線維芽細胞または iPS 細胞のゲノム DNA は、QIAamp DNA Blood mini キット (Qiagen) を用いて抽出した。既報通り NLRP3 の Genotyping を行った。

iPS 細胞の in vitro マクロファージ分化

iPS 細胞を mitotic inactivation した OP9 支持細胞層上で 10 日間培養し、出現した CD34+KDR+造血系前駆細胞を FACS Aria II (BD バイオサイエンス) を用いてソートした。その後、これらの造血系前駆細胞をさらに 16 日間別の OP9 支持細胞層上で培養し、マクロファージへの分化を誘導した。CD14 陽性の iPS 細胞由来マクロファージ (iPS-MP) は、autoMACSpro (Miltenyi Biotec) を用いて純化した。

マクロファージからのサイトカイン分泌

純化した iPS-MP をリポポリサッカロイド (LPS) などの刺激物質存在下に 4 時間培養し、さらに ATP (シグマ社) を追加して 30 分間培養し、細胞上清を回収した。上清中のサイトカイン濃度は、ELISA 法によって測定した。

統計分析

データは SPSS 統計 18 パッケージ・ソフトを使用して処理され、値は平均値と標準誤差を用いて表した。グループ間の比較は対応のないスチューデント t 検定を使用して行い、 $P < 0.05$ を統計学的に有意とした。

倫理面での配慮

本研究は、疾患を有する患者さんから検体を頂き iPS 細胞を作成して行う研究であるため、患者さんの同意・協力を必要とする研究である。また、作成する iPS 細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必須であり、個人情報の取り扱いの配慮を必要とする研究である。この 2 点に対して、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

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申請を行った。その後、京都大学医学部医の倫理委員会での審査を頂き、平成20年6月4日付けで、実施に関して承認を頂いた。本研究においては、その内容を忠実に順守して行った。

C. 研究結果

CAPS-iPS 細胞のマクロファージへの分化

CAPS 患者では単球で IL-1b 過剰産生が認められるため、ヒト ES 細胞の血球系細胞への分化を支持することが知られている OP9 細胞株を用いて、患者由来の iPS 細胞の単球/マクロファージ系統への分化を試みた。OP9 支持細胞層上で iPS 細胞を 10 日間培養した後、KDR+CD34+ のヘマンギオブラストを回収した。ヘマンギオブラストへの分化効率に変異クローンと野生型クローン間で有意な差はなかった。KDR+CD34+ 細胞を新たな OP9 支持細胞層上でさらに 16 日培養し、CD68 陽性のマクロファージを得た。iPS 細胞より分化させたマクロファージ (iPS-MP) は、マクロファージに典型的な形態を示した。iPS-MP は、CD68 および CD51 などのマクロファージに関連遺伝子、および CD45、CD14、CD64 および CD163 などの表面抗原を発現していた。

iPS-MP の遺伝子発現プロファイルを確認したところ、由来 iPS 細胞クローンより血液由来のマクロファージに近いグローバルな遺伝子発現パターンを示した。さらに食細胞機能を比較するため、グラム陽性のリステリア菌 (*Listeria Monocytogenes*) を iPS-MP に感染させたところ、変異型および野生型 iPS-MP はいずれも同程度の食菌能を示した。これらのデータから、モザイク CINCA 患者に由来した変異型および野生型 iPS-MP は、遺伝子発現、表面マーカー表現および食細胞機能などの評価では同等の表現型を呈することが分かった。

iPS-MP の疾患特異的な特性 (図)

正常なマクロファージでは、IL-1b 分泌にリポ多糖類 (LPS) + ATP といった、2 段階シグナルが必要とされる。一方、CAPS 患者の単球/マクロファージでは、変異型 NLRP3 を含む inflammasome が構成的に活性化しているため、LPS 単独刺激のみで、強力な IL-1b 分泌が誘導される。実際、未治療の CAPS 症候群患者からの単球あるいは単核球では、IL-1b 分泌が亢進しており、これによって持続的な炎症が惹起されている。我々は、疾患特異的な表現型として、IL-1b 分泌の評価を行った。まず、LPS 刺激前後での proIL-1b と NLRP3 の発現量を検討したところ、い

れも刺激によって発現が誘導されていた。次に、LPS および ATP 刺激時の細胞上清における IL-1b 量を定量したところ、野生型では LPS と ATP の刺激がどちらも必要であったのに対し、変異型のクローンは全て LPS 単独のみで有意に IL-1b を産生していた。IL-6 や TNF といった他の炎症性サイトカイン産生量は野生型と変異型の間で同程度であった。これらのデータにより、患者体内で起こっている IL-1b 過剰産生を、iPS-MP を用いて再現できたものと考えた。さらに、IL-1b 産生以外の疾患特異的な表現型として、カテプシン B 依存性の細胞死が、変異型 iPS-MP で誘導されるかを確認した。実際、LPS 添加により、変異型 iPS-MP は野生型より有意に細胞傷害を来し、それはカテプシン B の阻害剤である CA074Me 添加によって抑制された。

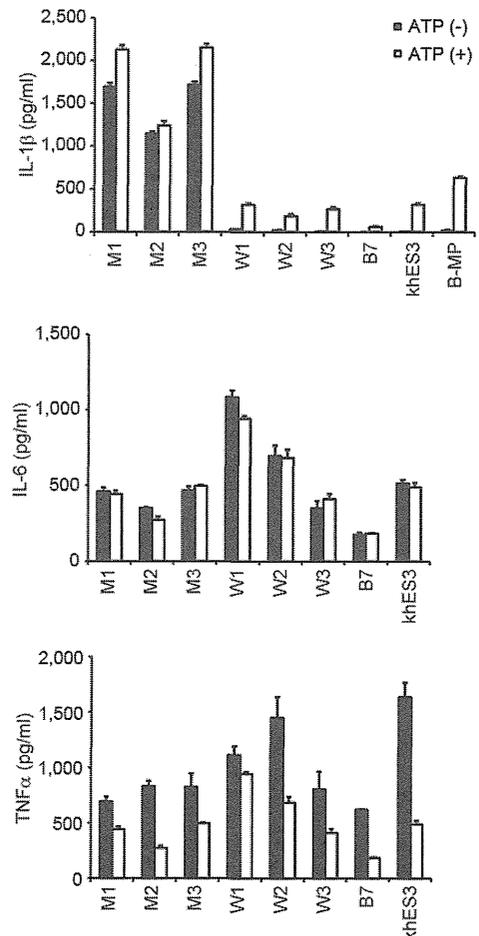


図3: iPS細胞から誘導したマクロファージをLPSによって刺激した際のサイトカイン産生能。M1-M3: 変異型、W1-W3: 正常型、B7: 対照iPS細胞、KhES3: 対照ES細胞、B-MP: 血球由来マクロファージ。

IL-1b 制御薬の効果

次に、これらの細胞を用いて薬剤スクリーニングが可能か、ということを検証するため、変異型 NLRP3

をもつ iPS-MP に LPS を添加した際に、様々な阻害剤の効果を検討したところ、カスパーゼ 1 阻害薬やカテプシン B 阻害薬など、IL-1b の産生を抑制することが知られている薬剤は患者 iPS-MP の IL-1b 産生も抑制することが示された。同時に他の炎症性サイトカインである IL-6 や TNF の産生を確認したところ、IL-1b を特異的に抑制することが確認された。現在、この系を用いた化合物スクリーニングの解析系を構築している。

D. 考察

iPS 細胞を用いた疾患モデリングは既に既報が多数存在し、その多くで創薬への応用が謳われている。しかし、iPS 細胞を用いた創薬には、まだ解決すべき問題が存在する。例えば神経細胞や心筋細胞では多彩な神経種が混在したり、心房筋と心室筋が混在するなど、細胞の分化が不均一であるうえに、これらの細胞の純化が困難であるという問題が存在する。我々の血球細胞分化系は、多数の細胞を簡便に純化できるため、創薬のプラットフォームとして好適であると考えている。

E. 結論

疾患特異的 iPS 細胞を用いてモザイク型 CAPS の病態解析に成功した。また、創薬スクリーニングへの可能性を検討した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.* 24(1):5-15, 2012.
- ② 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.* 19(2):143-152, 2012.
- ③ Hiejima E., Komatsu H., Takeda Y., Sogo T., Inui A., Okafuji I., Nishikomori R., Nakahata T., 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* 48(3):E122-5, 2012.

- ④ Kawai T., Nishikomori R., Izawa K., Murata Y., Tanaka N., Sakai H., Saito M., Yasumi T., Takaoka Y., Nakahata T., Mizukami T., Nunoi H., Kiyohara Y., Yoden A., Mutara T., Sasaki S., Ito E., Akutagawa H., Kawai T., Imai C., Okada S., Kobayashi M., Heike T.: Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency. *Blood* 119(23):5458-66, 2012.
- ⑤ Tsumura M., Okada S., Sakai H., Yasunaga S., Ohtsubo M., Murata T., Obata H., Yasumi T., Kong X., Abhyankar A., Heike T., Nakahata T., Nishikomori R., Al-Muhsen S., Boisson-Dupuis S., Casanova J., AlZahrani M., Shehri MA., ElGhazali G., Takihara Y., Kobayashi M.: Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Human Mutation* 33(9):1377-87, 2012.
- ⑥ Tanaka T., Takahashi K., Yamane M., Tomida S., Nakamura S., Oshima K., Niwa A., Nishikomori R., Kambe N., Hara H., Mitsuyama M., Morone N., Heuse J.E., Yamamoto T., Watanabe A., Sato-Otsubo A., Ozawa S., Asaka I., Heike T., Yamanaka S., Nakahata T., Saito M.K.: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood* 120(6):1299-308, 2012.
- ⑦ Kawai T., Saito M., Nishikomori R., Yasumi T., Izawa K., Murakami T., Okamoto N., Mori Y., Nakagawa N., Imai K., Nonoyama S., Wada T., Yatie A., Oomori K., Nakahata T., Heike T.: Multiple reversions of an IL2RG mutation restore combined immunodeficiency patient. *J. Clin. Immunol.* 32(4):690-7, 2012.
- ⑧ Morishima T., Nomura A., Saida S., Watanabe K., Yagi H., Matsumoto M., Fujimura Y., Heike T., Nakahata T., Adachi S.: Pediatric idiopathic TTP diagnosed with decreased ADAMTS13 activity. *Pediatr. Int.* 54(3):422-3, 2012.
- ⑨ Nakazawa Y., Saito S., Yanagisawa R., Suzuki T., Toshiro Ito T., Ishida F., Muramatsu H., Matsumoto K., Kato K., Ishida H., Umeda K., Souichi Adachi S.,

Nakahata T., Koike K.: Recipient seropositivity for adenovirus type 11 is highly predictive of the development of hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. in press.

- ⑩ Saida S., Watanabe K., Sato-Otsubo A., Terui K., Yoshida K., Okuno Y., Toki T., Wang RN., Shiraishi Y., Miyano S., Kato I., Morishima T., Fujino H., Umeda K., Hiramatsu H., Adachi S., Ito E., Ogawa S., Ito M., Nakahata T., Heike T.: Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. Blood in press.
- ⑪ Kondo T., Asai M., Tsukita K., Kutoku Y., Ohsawa Y., Sunada Y., Imamura K., Egawa N., Yahata N., Okita K., Takahashi K., Asaka I., Aoi T., Watanabe A., Watanabe K., Kadoya C., Nakano R., Watanabe D., Maruyama K., Hori O., Hibino S., Choshi T., Nakahata T., Hioki H., Kaneko T., Naitoh M., Yoshikawa K., Yamawaki S., Suzuki S., Hata R., Ueno S., Seki T., Kobayashi K., Toda T., Murakami K., Irie K., Klein W.K., Mori H., Asada T., Takahashi R., Iwata N., Yamanaka S., Inoue H.: Modeling Alzheimer's disease using iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. Cell Stem Cell in press.
- ⑫ 中畑龍俊：白血病治療の進歩と今後の展望。日本小児血液・がん学会雑誌（第49巻1・2号、2012）。
- ⑬ 中畑龍俊、丹羽明：幹細胞増幅、第10章 内科疾患と再生医療、カラー版内科学、門脇孝、永井良三（総編集）、p447-450, 2012, 西村書店、東京。
- ⑭ 斎藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPSC 細胞、再生医療（Vol.12 No.1）、19-32、2013

2. 学会発表

- ① 中畑龍俊;特別講演：iPS 細胞研究の今、その可能性と将来展望。第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月20-22日（20日）福岡国際会議場
- ② 井澤和司、土方敦司、西小森隆太、小原収、田中尚子、河合朋樹、八角高裕、斎藤潤、中畑龍俊、平家俊男：次世代シーケンサーによる NLRP3 体制モザイクの診断。第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月20-22日（21日）福岡国際会議場
- ③ 石田宏之、今井耕輔、本間健一、田村真一、今村俊彦、斎藤潤、大嶋宏一、伊藤雅文、中畑龍俊、野々山恵章：白血球減少、骨髓異形成とリンパ浮腫を呈する GATA-2 異常。第115回日本

小児科学会学術集会 2012年4月20-22日（21日）福岡国際会議場

- ④ Yanagimachi M, Niwa A, Tanaka T Oshima K, Saito M Nakahata T: Differentiation of monocytic lineage cells from human iPS cells by using a serum and feeder free culture method. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
- ⑤ Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Tanaka T, Saida S, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Matsubara K, Adachi S, Nakahata T, Heike T: Induced pluripotent stem cell model of severe congenital neutropenia with HAX1 gene deficiency. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
- ⑥ Yokoyama K, Ikeya M, Nasu A, Tanaka T, Saito M, Umeda K, Nishikomori R, Nakahata T, Heike T, Toguchida J: Understanding the pathology of the arthropathy in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome by using iPS cells technology. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
- ⑦ Tanaka T, Saito MK., Takahashi K, Yamanaka S, Nakahata T: Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
- ⑧ Niwa, Akira, Saito, Megumu, Oshima, Koich, Yanagimachi, Masakatsu, Tanaka, Takayuki, Kato, Itaru, Nakahata, Tatsutoshi: Human ESC/iPSC-Derived mesenchymal stroma can support hematopoietic progenitors. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June13-16, 2012, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.
- ⑨ Manabe A, Kikuchi A, Kojima S, Tsuchida M, Hayashi Y, Koike K, Ohara A, Ishii E, Komada Y, Nakahata T: Long-term follow-up of more than 545 children with myelodysplastic syndrome (MDS) and myeloproliferative neoplasms (MPN). VI International Symposium on Myelodysplastic Syndromes and Bone Marrow Failures in Childhood, November 7-9, 2012, Prague
- ⑩ Honda Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi

- A, Kojima S, Ito M, Kikuchi A, Nakahata T, Manabe A: Clinic characteristics of 23 children with juvenile myelomonocytic leukemia who developed blast crisis: MDS Committee of LSPHO. VI International Symposium on Myelodysplastic Syndromes and Bone Marrow Failures in Childhood, November 7-9, 2012, Prague
- ⑪ Hasegawa D, Chen X-j, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A: Treatment outcome of 67 cases with refractory cytopenia of childhood(RCC): A Protective Registration Through The Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology(JSPHO). VI International Symposium on Myelodysplastic Syndromes and Bone Marrow Failures in Childhood, November 7-9, 2012, Prague
- ⑫ Tomizawa D., Tawa A., Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., MD, Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe K., Nakahata T., Adachi S.: Excess Reduction of Anthracyclines Results in Inferior Event-Free Survival in Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia in Children; A Report From the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). 54th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 8-11, 2012, Atlanta.
- ⑬ Suzuki N., Hira A., Niwa A., Saito M., Matsuo K., Nakahata T., Takata M., Yabe M.: Mesodermal Development From Reprogrammed Fanconi Anemia Cells Is Affected by ALDH2 Enzymatic Activity. 54th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 8-11, 2012, Atlanta
- ⑭ Yagasaki H., Watanabe K., Kudo K., Tsuchida M., Shichino H., Morimoto A., Kobayashi R., Yabe H., Kikuchi A., Ohga S., Ito E., Ohara A., Nakahata N., Kojima S.: Immunosuppressive Therapy with Antithymocyte Globulin and Cyclosporine for Fulminant Aplastic Anemia. 54th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 8-11, 2012, Atlanta.
- ⑮ Tomizawa D., Tawa A., Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe k., Nakahata T., Adachi S.: Appropriate Dose Modification in Induction Therapy Is Essential for the Treatment of Infants with Acute Myeloid Leukemia; A Report From the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). 54th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 8-11, 2012, Atlanta.
- ⑯ Hasegawa D., Tawa A., Tomizawa D., Watanabe T., Saito A., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe K., Nakahata T., Adachi S.: Attempts to Optimize Post-Induction Treatment in Childhood Acute Myeloid Leukemia without Core Binding Factors: A Report From the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). 54th Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December 8-11, 2012, Atlanta.
- ⑰ 中畑龍俊：iPS細胞を用いた今後の医療の可能性、第23回小児科血液セミナー、2012年7月19日
- ⑱ 中畑龍俊;特別講演：小児患者におけるiPS細胞の応用、第49回日本小児アレルギー学会2012年9月15-16日(16日)大阪国際会議場
- ⑲ 中畑龍俊;特別講演：iPS細胞研究の進展、第59回日本臨床検査医学会学術集会 2012年11月29日～12月2日(11/30) 国立京都国際会館

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業
〔自己炎症疾患とその類縁疾患に対する新規診療基盤の確立〕研究班)
分担研究報告書

ヒト多能性幹細胞を用いた自己炎症性疾患の病態解析・治療法開発に関する研究

研究分担者 齋藤 潤 京都大学 iPS 細胞研究所 准教授

研究要旨

自己炎症性疾患の病態解明、新たな創薬シーズ探索のため、患者よりiPS細胞を樹立している。研究班内の共同研究として、PSMB8遺伝子に変異を持つ中條西村症候群患者、MVK遺伝子に変異を持つ高IgD症候群患者よりiPS細胞を樹立し、その評価を行った。また、若年性サルコイドーシス及び家族性地中海熱についても研究班内の共同研究として樹立を進めるべく、研究計画書の整備を行っている。また血球分化系を整備し、フィーダー・血清フリーでiPS細胞から単球・樹状細胞を分化させ、その機能的な解析が行える系を開発した。中條西村症候群については、患者由来iPS細胞をこの系を用いて単球・樹状細胞・マクロファージへ分化させるほか、脂肪細胞へも分化させて機能解析を行っている。

A. 研究目的

炎症反応は生体防御において極めて重要な反応であるが、その一方過剰な炎症性応答は様々な疾患の原因となる。自己炎症性疾患は自然免疫系炎症の異常によって発症する疾患群で、その多くは遺伝子変異を伴っている。病態の解析に当たり、患者の血球細胞は比較的容易に得られるものの、患者の状態や投薬によって刺激に対する反応性が変動することから、詳細な検討は困難なことが多い。

人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS細胞)は、京都大学の山中らによって開発された細胞で、ヒト体細胞から誘導され、ES細胞と同様の多分化能を有する。我々はiPS細胞を疾患解析研究に応用することを考えた。患者から作られた疾患関連iPS細胞は、その疾患の病態解明や創薬、治療に非常に有用であると考えられる。本研究計画では、自己炎症性疾患研究班内で連携し、様々な自己炎症性疾患患者からiPS細胞を樹立し、血球細胞に分化させ、病態解析を行うとともに、炎症性疾患の制御に役立つ薬剤を創出することを目的としている。

B. 研究方法

iPS細胞

自己炎症性症候群患者(中條西村症候群: NNS2名、高IgD症候群: HIDS5名)由来の線維芽細胞に初期化因子を導入し、iPS細胞株を樹立した。導入方法は、エピソードベクター法及びレトロウイルス法を用い、iPS細胞コロニーをピックアップして性状評価を行った。

遺伝子解析

線維芽細胞またはiPS細胞のゲノムDNAは、QIAamp DNA Blood miniキット(Qiagen)を用いて抽出した。

iPS細胞のin vitroマクロファージ分化

我々が開発したヒトiPS細胞からの血球分化系(Niwa et al., PLOS one, 2011)を応用して、単球・マクロファージ・樹状細胞を分化させる系を構築した。この系を用いて、マクロファージ・樹状細胞の機能評価を行った。

血管内皮細胞分化

我々が開発したヒトiPS細胞からのヘマンギオブラスト分化系(Niwa et al., PLOS one, 2011)を応用して、血管内皮細胞特異的なマーカーを発現する細胞を回収した。

脂肪細胞分化

京都大学医学部附属病院第二内科 中尾一和先生の研究室に分化法をご教示いただき、NNS-iPS細胞の脂肪細胞分化を行った。

倫理面での配慮

本研究は、疾患を有する患者さんから検体を頂きiPS細胞を作成して行う研究であるため、患者さんの同意・協力を必要とする研究である。また、作成するiPS細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必須であり、個人情報取り扱いの配慮を必要とする研究である。この2点に対して、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申請を行った。その後、京都大学医学部医の倫理委員会での審査を頂き、平成20年6月4日付けで、実施に関して承認を頂いた。本研究においては、その内容を忠実に順守して行った。

C. 研究結果

マクロファージ分化系の確立

単球系細胞分化系の評価として、クローン数を増やして検討したが、5クローンのヒト iPS/ES 細胞株から安定して誘導可能であった。また、単球系の純度は一貫して60-90%程度であり、細胞純化を行わずに機能評価が可能であった。分化した単球をマクロファージに分化させ、さらにM1/M2マクロファージへと分極させることが可能か検討したところ、マクロファージは刺激に対してM1/M2それぞれに一致するサイトカイン分泌能を示した。したがって、ヒト多能性幹細胞から誘導したマクロファージは適切な刺激により分極が可能であることが判明した。

iPS 細胞樹立

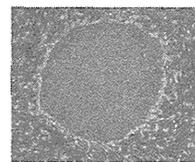
NNS 患者2名とその家族より iPS 細胞を樹立した。これらの細胞については、引き続き分担研究者らにより、解析を行っている。

また、HIDS 患者5名より、エピソームベクター及びレトロウイルスベクターを用いて、計60クローンの iPS 細胞を樹立した。これらのクローンについては、京都大学小児科学教室で引き続き解析が行われる予定である。

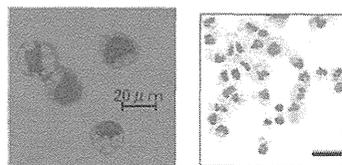
NNS-iPS 細胞の分化

2名のNNS患者由来の iPS 細胞を私たちが開発した分化系を用いて、単球・マクロファージ用細胞に分化させた。また既存の分化系を応用して、脂肪細胞及び血管内皮細胞へと分化させた (図)。NNS 患者由来の iPS 細胞の各種細胞への分化能に、大きな差はなかった。今後、機能解析を進めていく予定である。

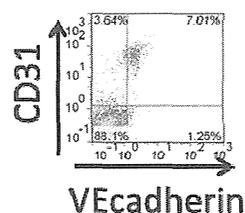
iPS細胞



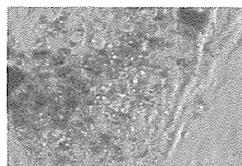
単球・好中球



血管内皮細胞



脂肪細胞 (Oil red O染色)



NNS-iPSC の疾患特異的な特性 (図)

D. 考察

iPS 細胞を用いた疾患モデリングは既に既報が多数存在し、その多くで創薬への応用が謳われている。しかし、iPS 細胞を用いた創薬には、まだ解決すべき問題が存在する。iPS 細胞を用いた分化系で、十分な機能を発揮する細胞を高純度で得ることが重要であるが、現時点では分化系の洗練が不十分であることも多い。NNS 患者由来 iPS 細胞においても各種分化能は確認できたが、引き続き分化系の改善と、細胞生物学的な解析が必要である。

E. 結論

自己炎症性疾患患者7名より iPS 細胞の樹立に成功した。また、マクロファージ分化系を改善し、NNS-iPS 細胞については、各種分化系を用いて分化細胞を得ることに成功した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S,

Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK*. Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. PLoS ONE, in press

2. Saito MK*, Niwa A. Disease-associated iPS cell lines representing hematological and immunological disorders. Inflammation and regeneration. 2012 Sep;32(4): 171-7.

3. Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuser JE, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito MK*. Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. Blood. 2012 Aug 9;120(6):1299-308. Epub 2012 Jun 21.

4. Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Mutara T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T. Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. Blood. 2012 Jun 7;119(23):5458-66. Epub 2012 Apr 19.

5. Kawai T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, Izawa Km Murakami T, Okamoto S, Mori Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Ohmori K, Nakahata T, Heike T. Multiple reversions of an IL2RG mutation restore T cell function in an X-linked severe combined immunodeficiency patient. J Clin Immunol. 2012 Aug;32(4):690-7. Epub 2012 Mar 30.

6. Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito MK, 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. 2012 Apr;19(2):143-52. Epub 2012 Jan 24.

7. 齋藤潤 インフラマソームと自己炎症性症候群 実験医学 30(11):1736-1740, 2012

2. 学会発表

1. シンポジウム講演：齋藤潤 「疾患 iPS 細胞を用いた血液疾患の病態解析」 CiRA mini symposium 2012, 京都, 2012

2. シンポジウム講演：齋藤潤 「ヒト iPS 細胞からの造血分化と疾患解析への応用」 第22回日本産婦人科・新生児血液学会, 津, 2012

3. 特別講演：齋藤潤 「疾患 iPS 細胞研究の最前線」 第124回遠江医学会, 浜松, 2012

4. セミナー：齋藤潤 「ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた難治性免疫・血液疾患の病態解析」 平成24年度第1回難治研大学院セミナー, 川崎, 2012

H. 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

二世代および三世代にわたって見られた家族性地中海熱

高田英俊 九州大学大学院医学研究院成長発達医学 准教授

原 寿郎 九州大学大学院医学研究院成長発達医学 教授(分担研究者)

研究要旨

家族性地中海熱は、常染色体劣性遺伝形式をとり、数時間から3-4日の発熱が周期的に見られることを特徴とし、発熱発作時に腹痛や胸痛、関節痛、皮疹などを伴うことも多い。MEFV 遺伝子変異が多く症例で確認される。今回、家族性地中海熱が父娘で認められた家系、および3世代にわたって認められた家系について報告し、その遺伝的背景について考察する。家系1：父64歳。31歳頃から胸痛、腹痛を伴う発熱発作が持続している。娘36歳。10歳頃から胸痛を伴う発熱発作がみられている。家系2では、3世代にわたって5名に同様の症状が認められている。臨床像、経過から家族性地中海熱と診断し、MEFV 遺伝子の c.442G>C (E148Q) および c.2082G>A (M694I) 変異を確認した。家系1では、この2つの変異の複合ヘテロ変異であり、家系2では、1つのアレル上に2つの遺伝子変異が存在していた。

A. 研究目的

家族性地中海熱は、数時間から3-4日の発熱が周期的に見られることを特徴とし、発熱発作時に腹痛や胸痛、関節痛、皮疹などを伴うことも多い。MEFV (Mediterranean fever) 遺伝子変異が多く症例で確認される。家族性地中海熱は常染色体劣性遺伝の疾患である。しかし、ごくまれに、常染色体優性遺伝形式をとることがあるが、その詳細は知られていない。また、国内からは常染色体優性遺伝形式をとる家系は報告されていない。今回、二世代および三世代にわたってみられた家族性地中海熱の家系を同定したので、その遺伝的背景について検討した。

B. 研究方法

家族性地中海熱の臨床像を呈した患者、およびその家族の、MEFV 遺伝子変異の有無を解析した。さらに各アレルでの変異を確認するために、MEFV cDNA 全長をクローニングし、塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

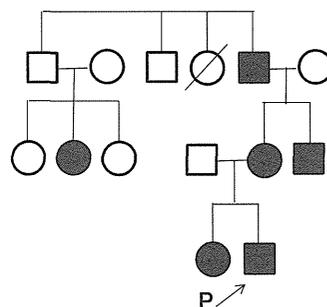
この研究は九州大学倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

家系1 発端者：14歳男性

幼児期から周期的に発熱がみられるようになり、1か月に1回程度の発熱発作で、1~数日発熱が持続し、胸痛を伴っていた。遺伝子検査を含めた精査のため、受診した。発端者の姉、母、母方叔父、母方祖父、母方従兄弟伯母にも同様の症状がみられた(図1)。

図1



発端者の MEFV 遺伝子を解析したところ、E148Q (c442G→C) と M694I (c2082G→A) の2つの変異が確認された(図2)。

家系内で解析可能であった7名の MEFV 遺伝子を解析したところ、図3のような結果であった。このことから、この家系では、家族性地中海熱が常染色体優性遺伝形式で遺伝しており、その遺伝的背景として、単

一アレルに、E148Q と M694I の 2 つの変異があることが明らかになった。

図 2

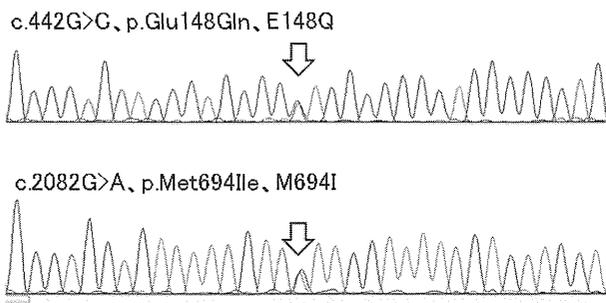
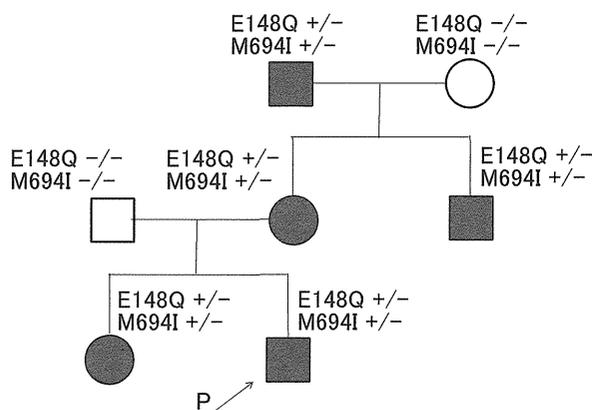


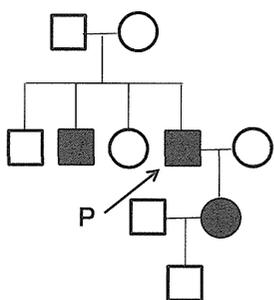
図 3



家系 2 発端者：63 歳男性

31 歳頃から周期的に発熱がみられるようになった。胸痛・腹痛が出現した後、高熱が 24 時間程度持続する。前医で、発熱発作時に白血球増多、CRP の上昇を指摘された。兄、娘 35 歳にも同様の症状がある（図 4）。

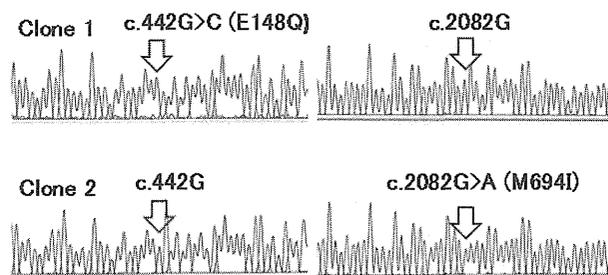
図 4



発端者と娘の MEFV 遺伝子を解析したところ、E148Q (c442G→C) と M694I (c2082G→A) の 2 つの変異が確認

された。それ以外の家族の遺伝子解析ができなかったため、常染色体優性遺伝かどうかを明らかにするため、MEFV 遺伝子の cDNA PCR Product 全長をクローニングし、塩基配列を調べたところ、E148Q 変異と M694I 変異は異なるアレルに存在することがわかり、compound heterozygote であることが確認された (pseudo-dominant inheritance) (図 5)。

図 5



D. 考察

家族性地中海熱は常染色体劣性遺伝形式をとるが、ごくまれに常染色体優性遺伝形式をとることが知られていた。これまで国内からは常染色体優性遺伝形式をとる家族性地中海熱の報告はなかった。

今回、国内で初めて、常染色体優性遺伝形式をとる家族性地中海熱の家系を明らかにし、その遺伝的背景として、単一アレルに、MEFV 遺伝子の E148Q (c442G→C) と M694I (c2082G→A) の 2 つの変異が存在することが報告されている。2 つの遺伝子変異が存在することによって、その遺伝子産物が pyrin の機能異常を呈し、家族性地中海熱の発症に関与していると考えられるが、病態の詳細はまだ明らかになっていない。

また、今回 pseudo-dominant inheritance を示す家系を明らかにした。日本人健常者では、E148Q 変異の割合が高く (42%)、家族性地中海熱の典型的な症状を呈する M694I を有する家系などでは、pseudo-dominant inheritance を呈する症例が多いものと考えられた。

E. 結論

国内で初めてとなる常染色体優性遺伝形式をとる
家族性地中海熱の家系、および pseudo-dominant
inheritance を呈する家系を明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

- 1) Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T: Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 77: 628-634, 2012
- 2) Obinata K, Lee T, Niizuma T, Kinoshita K, Shimizu T, Hoshina T, Sasaki Y, Hara T: Two cases of partial dominant interferon- γ receptor 1 deficiency that presented with different clinical courses of bacille Calmette-Guérin multiple osteomyelitis. *J Infect Chemother.* (in press)
- 3) Kusuhara K, Hoshina T, Saito M, Ishimura M, Inoue H, Horiuchi T, Sato T, Hara T: Successful treatment of a patient with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome using a half-dose of etanercept. *Pediatr Int.* 54: 552-555, 2012
- 4) Hoshina T, Kusuhara K, Saito M, Mizuno Y, Hara T: NKRP1A+ $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cells are preferentially induced in patients with Salmonella infection. *Hum Immunol.* 73: 623-628, 2012
- 5) Yamamura K, Ihara K, Ikeda K, Nagata H, Mizuno Y, Hara T: Histo-blood group gene polymorphisms as potential genetic modifiers of the development of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease. *Int J Immunogenet.* 39(2): 119-125, 2012
- 6) Onoyama S, Ihara K, Yamaguchi Y, Ikeda K, Yamaguchi K, Yamamura K, Hoshina T, Mizuno Y, Hara T: Genetic susceptibility to Kawasaki disease: analysis of pattern recognition receptor genes. *Hum Immunol.* 73: 654-660, 2012
- 7) Yamamura K, Joo K, Ohga S, Nagata H, Ikeda K, Muneuchi J, Watanabe M, Hara T: Thrombocytosis in asplenia syndrome with congenital heart disease: a previously unrecognized risk factor for thromboembolism. *Int J Cardiol.* 2012 (in press)
- 8) Shiraishi A, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Takimoto T, Takada H, Miyamoto T, Abe Y, Hara T: Treatment choice of immunotherapy or further chemotherapy for Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 59: 265-270, 2012
- 9) Imagawa T, Takei S, Umebayashi H, Yamaguchi K, Itoh Y, Kawai T, Iwata N, Murata T, Okafuji I, Miyoshi M, Onoe Y, Kawano Y, Kinjo N, Mori M, Mozaffarian N, Kupper H, Santra S, Patel G, Kawai S, Yokota S: Efficacy, pharmacokinetics, and safety of adalimumab in pediatric patients with juvenile idiopathic arthritis in Japan. *Clin Rheumatol.* 31: 1713-1721, 2012
- 10) Yokota S, Nishikomori R, Takada H, Kikuchi M, Nozawa T, Kanetaka T, Kizawa T, Miyamae T, Mori M, Heike T, Hara T, Imagawa T: Guidance on the use of canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome in Japan. *Mod Rheumatol.* (in press)
- 11) Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusuhara K, Hara T: Differential transmission and postnatal outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Development Patho.* 15: 151-155, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

なし。

参考文献

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

1. Booth DR, Gillmore JD, Lachmann HJ, Booth SE, Bybee A, Soytürk M, Akar S, Pepys MB, Tunca M, Hawkins PN. The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever QJM. 93(4): 217-21, 2000
2. Yamaguchi K, Ikeda K, Ihara K, Takada H, Kusuhara K, Hara T Lack of association between E148Q MEFV variant and Kawasaki disease. Hum Immunol. 70(6): 468-71 2009
3. Migita K, Uehara R, Nakamura Y, Yasunami M, Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, Nakamura A, Masumoto J, Yachie A, Furukawa H, Ishibashi H, Ida H, Yamazaki K, Kawakami A, Agematsu K. Familial Mediterranean fever in Japan. Medicine (Baltimore). 91(6): 337-43. 2012

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

自己炎症疾患とその類縁疾患に対する新規診療基盤の確立に関する研究
～慢性再発性多巣性骨髄炎～

研究分担者：横田 俊平
(横浜市立大学医学研究科小児科学教授)

研究要旨

自己炎症症候群に分類される骨疾患、慢性再発性多巣性骨髄炎 14 例につき臨床的
症状、検査所見、画像検査、骨髄生検につき検討を行った。その結果、臨床的に
は運動時の骨痛を訴える例が多く、寒冷時に増悪する傾向があった。血液検査では
炎症マーカーの動きは軽微で、MRI にて骨髄炎所見を得ることで診断に至る例が多
かった。「多巣性」を証明するには、Ga-シンチと FDG-PET/CT などが有用であったが、
FDG の取り込みは癌腫に比較すれば経度で、SUV > 4.0 のものは稀であった。したが
って、Ga-シンチも FDGF-PET/CT も読影に修練が必要であると考えられた。治療は第
一選択として NSAID + ビスフォスフォネートが用いられており、一定程度の効果を
認めたが、3 か月以上経度の炎症が持続するものについてはインフリキシマブへの
変更が行われ、炎症の終息を図ることができた。慢性再発性多巣性骨髄炎はわが国
ではいまだ疾患認識は低く、骨破壊、生活傷害に至る例をしばしばみる。上記のよ
うな診断手順の普及を図り、早期の治療介入を行うことで、本症の制圧を推し進め
たい。

A. 研究目的

無菌性骨髄炎は、自己炎症症候群のひとつとしての位置が確立しようとしている。報告例は世界的にも約 200 例と過少であるが、実際は未診断例が多いものと思われる。報告例が少ないため臨床的なスペクトラムが明確でない点が疾患としての認識が進まない理由である。そこで、当研究においては、自験例 14 例について詳細な臨床症状、検査所見、治療選択の理由、治療反応性などについて、病態を明らかにする方向で検討を加える。さらに、諸報告例と自験例とを比較・検討し、診断の手順、治療の選択方法について一定の方向性を示したいと考える。

B. 研究方法

当科に登録された「慢性再発性多巣性骨髄炎および慢性無菌性骨髄炎」14 症例の臨床症状の検討を行う。臨床検査値について炎症マーカー (WBC 及び分画、CRP、ESR)、骨代謝マーカー、画像検査 (Xp、MRI、Ga-シンチグラフィ、FDG-PET～FDG-PET/CT)、骨髄生検 (multiplex-PCR、組織病理所見) などの結果から、診断の手順と方法について検討する。

C. 研究結果

(1) 臨床所見：運動時の骨痛がもっとも多く、寒冷時に悪化する傾向があった。皮疹を伴う例はなく、SAPHO 症候群とみなせる例はなかった。骨痛部位を覆う皮膚の発赤・疼痛を訴える例もあった。

(2) 血液検査：白血球数は全例で 6,000～10,000/uI と正常域にあった。赤沈値は 10～30mm/h (mean: 15mm/h) とわずかに上昇している例が多く、CRP は陰性例が多く、数例で 3～5mg/dl と上昇していた。IgG 値は慢性炎症を反映して上昇していた例が 4 例、抗核抗体は全例(-)であった。

(3) 画像検査：Ga-シンチまたは FDG-PET が全例で行われていた。いずれも“多巣性”を証明する方法として優れていた。ただし、PET では SUV>4 の病巣はなく、FDG の炎症巣への取り込みは「癌病巣」のようではなく、読影経験のない医師には判断が難しいと思われた。検出された炎症巣を MRI で検討すると「骨髄炎」所見が得られる。したがって、骨痛・皮膚所見から MRI 検査を行う例と、Ga-シンチまたは FDG-PET を先行させて検出された病巣を MRI で検討を行う方法とが考えられた。

(4) 骨髄生検：検体の細菌学的検討は①細菌培養、②multiplex-PCR 検査、③細胞診を行った。①/②から有意な細菌は検出されなかった。細胞診では好中球と単核球の混在する所見、線維化の進行する所見が得られ、“骨髄炎”が証明された。

(5) 治療：NSAID+ビスファスフォネートが第一選択として用いられ、炎症の抑制が不十分と判断された例ではインフリキシマブが用いられ効果を得た。なお、長期観察の中で病巣が少ない例では無治療で改善をみた例もあった。

D. 考察

慢性無菌性骨髄炎 (CNBO) と慢性再発性多巣性骨髄炎 (CRMO) との違いは明らかではないが、どちらも骨髄から起炎菌が証明されない共通点をもち、わずかに病巣数が多数にわたるものを後者としている。なお、好中球性皮膚病変を伴う例を SAPHO 症候群とするが、今回の 14 小児例では皆無であり、文献的に CRMO は小児疾患、SAPHO 症候群は成人疾患とされていることに符合する。臨床的に運動時の増悪する骨痛が主要な所見であり、血液検査にて著しい炎症所見が得られるわけではないので、本症が鑑別疾患として考えられる機会が少な

いために、症例の新d何が遅れ、あるいは未診断のまま経過する例があるのであろう。本症は進行すると骨破壊、生活障害に至ることもあり、今回の研究が日常臨床の場で生かされる必要がある。

E. 結論

慢性無菌性骨髄炎(CNBO)と慢性再発性多巣性骨髄炎(CRMO)は、運動時の骨痛、とくに寒冷時に増悪する特徴から疑われ、Ga-シンチまたはFDG-PETで病巣を検出し、発見された病巣をMRIで検討することで診断に至る。血液検査による炎症マーカーは正常であることもしばしばあり、正常であるから骨髄炎は否定されるわけではない。これらの検査手順を踏んで診断を行い、第一選択としてNSAID+ビスフォスフォネートによる治療を約3か月間行い、効果が認められない場合にはインフリキシマブによる治療へ切り替える必要がある。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Yokota S, Nishikomori R, Takada H, Kikuchi M, Nozawa T, Kanetaka T, Kizawa T, Miyamae T, Mori M, Heike T, Hara T, Imagawa T.” Guidance on the use of canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome in Japan. “Mod Rheumatol. 2012 Oct 20. [Epub ahead of print]

2. Imagawa T, Takei S, Umebayashi H, Yamaguchi K, Itoh Y, Kawai T, Iwata N, Murata T, Okafuji I, Miyoshi M, Onoe Y, Kawano Y, Kinjo N, Mori M, Mozaffarian N, Kupper H, Santra S, Patel G, Kawai S, Yokota S. “Efficacy, pharmacokinetics, and safety of adalimumab in pediatric patients with juvenile idiopathic arthritis in Japan.”

Clin Rheumatol. 2012 Oct 2. [Epub ahead of print]

3. Inaba Y, Ozawa R, Aoki C, Imagawa T, Mori M, Hara R, Miyamae T, Saito T, Yokota S. “Radiologic analysis of the effect of tocilizumab on hands and large joints in children with systemic juvenile idiopathic arthritis.” Mod Rheumatol. 2012 Jul 13. [Epub ahead of print]

4. Yuzurihara SS, Ao K, Hara T, Tanaka F, Mori M, Kikuchi N, Kai S, Yokota S. “Human parechovirus-3 infection in nine neonates and infants presenting symptoms of hemophagocytic lymphohistiocytosis.” J Infect Chemother. 2012 May 10. [Epub ahead of print]

5. Shinoki T, Hara R, Kaneko U, Miyamae T, Imagawa T, Mori M, Yokota S. “Safety and response to influenza vaccine in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis receiving tocilizumab.” Mod Rheumatol. 2012 Nov;22(6):871-6.

2) 学会発表

1. Yokota S 「炎症性サイトカインと小児疾患」5月17(木)～19(土)ソウル A S P L A R 2 0 1 2

2. Yokota S 「炎症性サイトカインの動態からみた小児リウマチ性疾患の考え方と治療法の進歩～川崎病と全身型 J I A と C A P S について～」7月13日(金) 山口外来&防府小児科医会研修会

3. Yokota S 「Recent Advanxes in Pediatric Rheumatic Deseases from the Viewpoint of Dysregulation of Proinflammatory Cytokines」9月8日(土)～15日(土) ヨルダン A P L A R 2012

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