

***NLRP3*バリエントと*MEFV*ハプロタイプバリエントの共保有症例における
自己炎症性疾患発症の可能性について**
研究分担者 近藤直実 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 教授

研究要旨

自己炎症性症候群は、自己抗体や自己反応性 T 細胞を認めず、自然免疫の異常により全身性の炎症を来す疾患とされる。多くは発熱、急性期タンパクの上昇、皮疹や関節炎などの臓器症状を繰り返す、または持続するのが特徴である。遺伝性の自己炎症性症候群のうちクライオパイリン関連周期熱症候群 (CAPS) は *NLRP3* (Nod-like receptor family pyrin domain containing 3) 遺伝子が原因遺伝子であり、病的意義の明らかにされた遺伝子変異は exon3 領域に集中しているが、exon3 以外に位置する変異も報告されている。本分担研究では、*NLRP3* 遺伝子の exon5 上に位置する G809S variant と家族性地中海熱 (FMF, Familial Mediterranean fever) の原因遺伝子 *MEFV* (Mediterranean fever) のハプロタイプ variant の共保有症例を同定し、その遺伝子型が非典型的な自己炎症性症候群の表現型に与える影響について *in vitro* の病態解析を行った。その結果、*NLRP3*-G809S の日本人健常者でのアレル保有頻度は 0.02 と比較的稀であり、健常者では *MEFV* 遺伝子 exon3 におけるハプロタイプ variant との共保有症例は認めなかった。また、*NLRP3*-G809S は MSU に対する NF- κ B 活性の反応性が低下していたが、ASC の speck 形成頻度は野生型と比較して有意に増加していた。このため、*NLRP3*-G809S はインフラマソーム活性化に影響を与えうると考えられ、また複数の疾患関連遺伝子バリエントの効果により表現型が修飾され、非典型的な臨床症状を呈している可能性が示唆された。

研究分担者・共同研究者

近藤直実(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
大西秀典(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
久保田一生(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
加藤善一郎(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)

A. 研究目的

自己炎症性症候群は、自己抗体や自己反応性 T 細胞を認めず、自然免疫の異常により全身性の炎症を来す疾患とされる。多くは発熱、急性期タンパクの上昇、皮疹や関節炎などの臓器症状を繰り返す、または持続するのが特徴である。遺伝性の自己炎症性症候群のうちクライオパイリン関連周期熱症候群 (CAPS) は *NLRP3* (Nod-like receptor family pyrin domain containing 3) 遺伝子が原因遺伝子であり、病的意義の明らかにされた遺伝子変異は exon3 領域に集中しているが、exon3 以外に位置する変異も報告されている。一方、家族性地中海熱の責任遺伝

子 *MEFV* (Mediterranean fever) には、exon10 に存在する遺伝子変異の他に多くの遺伝子多型が同定されており、疾患発症への関与について不明の点も多い。本研究では、当施設で見いだした CAPS や FMF の典型例とは異なる臨床症状を伴い周期性発熱を呈する 2 症例について、遺伝子検査を施行したところ *NLRP3* と *MEFV* 遺伝子にそれぞれ遺伝子多型を保有していることが判明したため、その病的意義について解析を行うこととした。

B. 研究方法

- 1) 対象：典型的な自己炎症性症候群とは異なる臨床症状を呈する 2 症例を含む 2 家系を対象とした。さらに、アレル頻度の解析には健常者 421 人を対照とした。
- 2) 遺伝子解析：患者末梢血より Sepa Gene キットでゲノム DNA を抽出し、PCR 法で増幅した後ダイレクトシーケンスを行い、*NLRP3*、*MEFV*、

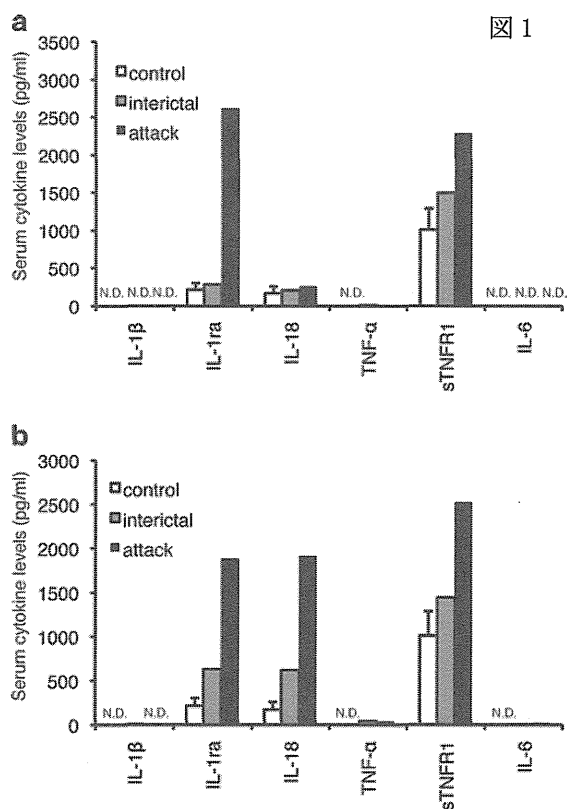
- MVK*(Mevalonate kinase), *TNFRSF1A*(Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A) 遺伝子のエクソンの塩基配列を決定した。また, real time PCRを用いて *NLRP3*G809Sのアレル頻度を検討した。
- 3) 血清サイトカイン等の測定：発作時と非発作時の血清 IL-1 β , IL-1ra, IL-18, TNF- α , sTNFR1 および IL-6 濃度を human ELISA kit で測定した。
- 4) 単球からの IL-1 β 産生：患者末梢血から単球を分離し, IFN- γ 20ng/ml と LPS 1 μ g/ml 刺激で 24 時間培養後, 5mM ATP 刺激を 30 分間行った。培養上清の IL-1 β を human ELISA kit で測定した。
- 5) NF- κ B レポーター遺伝子活性解析:HEK293T 細胞に, pcDNA3.1+ FLAG-tagged NLRP3 (野生型と置換体), pcDNA3.1+ HA-tagged pyrin, pcDNA3.1+ myc-tagged ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), pGL4.74-hRluc/TK および pGL4.32-luc2P/NF- κ B-RE/Hygro をリポフェクタミン 2000 で形質移入し, NLRP3 のリガンドである R837 や MSU で刺激し, Dual-Luciferase Assay System で解析した。
- 6) Speck 形成実験： HEK293 細胞に Nucleofector で pcDNA3.1+ myc-tagged ASC を形質移入し, G418 で選択して ASC 安定発現株を樹立した。ASC 安定発現株に NLRP3 (野生型と置換体) 発現ベクターをリポフェクタミン LTX で形質移入して 24 時間培養した後, 蛍光免疫染色を行い, 蛍光顕微鏡を用いて ASC の Speck 形成頻度を計測した。

C. 研究結果

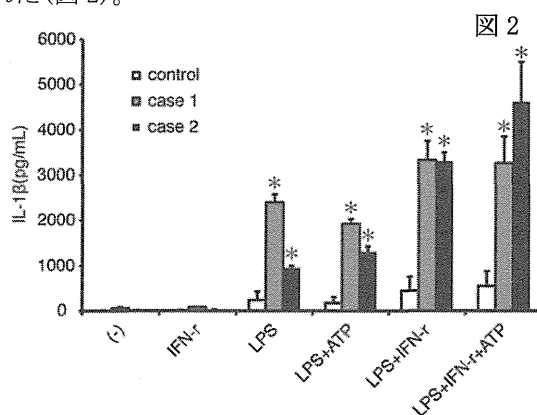
- 1) 遺伝子解析：症例 1 は *NLRP3* 遺伝子に G809S をヘテロ接合性に, *MEFV* 遺伝子に P369S-R408Q をヘテロ接合性に認めた。症例 1 の父は *NLRP3* 遺伝子と *MEFV* 遺伝子にそれぞれ症例 1 と同じ variant を有し, 母は *MEFV* 遺伝子に P369S-R408Q をヘテロ接合性に認めた。一方, 症例 2 は, *NLRP3* 遺伝子に症例 1 と同じ G809S をヘテロ接合性に, *MEFV* 遺伝子に E148Q-P369S-R408Q をヘテロ接合性に認めた。症例 2 の父は *NLRP3* 遺伝子に G809S をヘテロ接合性に, 母は *MEFV* 遺伝子に E148Q-P369S-R408Q をヘテロ接合性に認めた。健常者における G809S のアレル頻度

は 2%で, 同時に *MEFV* 遺伝子に P369S-R408Q を持つ健常者は認めなかった。

- 2) 血清サイトカイン等の測定：症例 1 (図 1a)、症例 2 (図 1b) のいずれの症例も発作時に IL-1ra と sTNFR1 が上昇したが, IL-1 β , TNF- α , IL-6 は上昇しなかった。IL-18 は症例 2 でのみ非発作時及び発作時に上昇が見られた。



- 3) 単球からの IL-1 β 産生：いずれの症例から抽出した末梢血単球も LPS 刺激または LPS+ IFN- γ 刺激を加えると, 健常者のものと比較して有意な IL-1 β 産生の増加を認めた。症例 1 と異なり, 症例 2 は ATP 刺激を加えるとさらに IL-1 β の産生の増加がみられた (図 2)。



4) NF- κ B レポーター遺伝子活性解析: 典型的な遺伝子変異とされる *NLRP3* 遺伝子の D303N や G755R では, ASC 発現ベクターの共発現や R837 刺激を行うと野生型に比較して NF- κ B 活性が有意に上昇するのに対して, G809S 置換体では NF- κ B 活性の上昇は確認できるものの野生型に比較して有意な上昇ではなかった(図 3a-b)。一方で, G809S 置換体は MSU 刺激に対する NF- κ B 活性の反応性が消失していた(図 3c)。*NLRP3* (野生型と置換体) に pyrin 発現ベクターを共発現させると NF- κ B 活性の低下がみられたが, 野生型 *NLRP3* と置換体との有意差はみられなかった(図 4)。

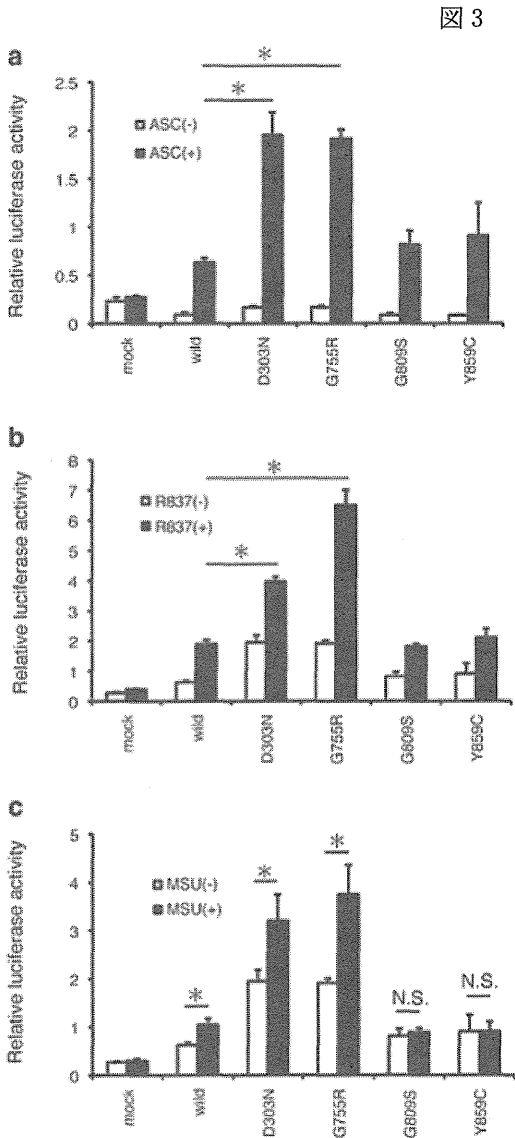


図 3

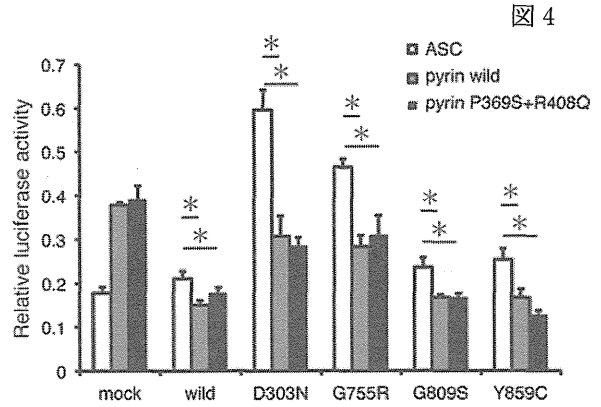


図 4

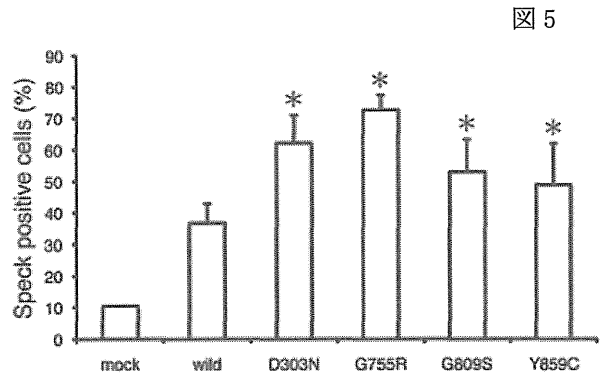


図 5

5) Speck 形成実験: 野生型 *NLRP3* に比較して *NLRP3* 置換体は ASC の Speck 形成は有意に増加した(図 5)。

D. 考察

NLRP3 置換体 G809S は *NLRP3* の一部のリガンドに対する NF- κ B 活性の反応性が欠如していた。一方で, Speck 形成実験では野生型 *NLRP3* に比較して有意な Speck の増加を認め, *NLRP3* インフラマソームに何らかの機能的変化を与えているものと考えられた。また患者由来の試料において, IL-1 関連サイトカインである IL-1ra がどちらの症例でも血清中で上昇していたことや, 単球からの IL-1 β 産生が増加していたことから, IL-1 β 産生に関わるインフラマソームを活性化させていることが示唆される。以前, 申請者らは E688K と G809S の複合ヘテロ接合体を認めた CAPS 症例を報告しており, E688K のみをヘテロ接合性に認める母よりも症状が重く, G809S は CAPS の重症度に関与していると考えられた。一方, この G809S に加えて, いずれの症例にも *MEFV* 遺伝子に variant が同定された。一般に, 遺伝性の自己炎症性症候群は単一遺伝子病であると考えられているが, それぞれの遺伝子変異でみられる疾患とは異なる非典型的な自己炎症性症候群を発症する可能性があると考えられた。

E. 結論

NLRP3 遺伝子の exon5 上に位置する G809S variant と *MEFV* 遺伝子のハプロタイプ variant の共存が非典型的な自己炎症性症候群の表現型に与える影響について *in vitro* の解析を行った。その結果、複数の疾患関連遺伝子 variant の効果によって表現型が修飾され、非典型的な自己炎症性症候群を発症する可能性があることを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文業績

1. Ohnishi H, Miyata R, Suzuki T, Nose T, Kubota K, Kato Z, Kaneko H, Kondo N: A rapid screening method to detect autosomal-dominant ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 129:578-580 (2012)
2. Nada M, Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Kamatari Y, Tsutsumi N, Shirakawa M, Kondo N: Molecular analysis of the binding mode of Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain proteins during TLR2 signaling. *Mol Immunol* 52:108-116 (2012)
3. 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)
4. Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kawamoto N, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Funasaka T, Nakano H, Wong RW, Shirakawa M, Kondo N: TRAM is involved in IL-18 signaling and functions as a sorting adaptor for MyD88. *PLoS One* 7:e38423 (2012)

5. Kubota K, Ohnishi H, Teramoto T, Matsui E, Murase K, Kanoh H, Kato Z, Kaneko H, Seishima M, Kondo N: In Vitro Analysis of the Functional Effects of an NLRP3 G809S Variant with the co-Existence of MEFV Haplotype Variants in Atypical Autoinflammatory Syndrome. *J Clin Immunol*. (in press)
6. Hori T, Ohnishi H, Teramoto T, Tsubouchi K, Naiki T, Hirose Y, Ohara O, Seishima M, Kaneko H, Fukao T, Kondo N: Autosomal-Dominant Chronic Mucocutaneous Candidiasis with STAT1-Mutation can be Complicated with Chronic Active Hepatitis and Hypothyroidism. *J Clin Immunol* 32:1213-20 (2012)
7. 近藤直実, 他 : 原発性免疫不全症の概念と分類, および自己炎症性疾患・自然免疫不全症・近縁疾患の位置付け. 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患. 近藤直実, 平家俊男 編. 診断と治療社. 2-31 (2012)
8. 大西秀典, 寺本貴英, 久保田一生, 近藤直実: 皮膚症状からみた自己炎症性症候群. *小児科* 53: 1201-1209 (2012)

学会発表

1. 近藤直実: 演者: セミナー I : 小児喘息の長期管理. 国際喘息学会日本・北アジア部会 (第 22 回) (2012 年 7 月 6 日, 福岡)
2. 近藤直実: 演者: シンポジウム 1 : 小児喘息から成人喘息治療への移行. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第 24 回) (2012 年 5 月 12 日, 大阪)
3. Hidenori Ohnishi, Takahide Teramoto, Zenichiro Kato, Kazuo Kubota, Hideo Kaneko, Naomi Kondo. Characterization of NLRP3 Variants in Japanese Cryopyrin-associated

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

Periodic Syndrome Patients. AUTOIMMUNITY 2012,
May 9-13, 2012, Granada, Spain.

4. Kazuo Kubota, Hidenori Ohnishi, Takahide Teramoto, Yusuke Aoki, Eiko Matsui, Kana Murase, Hiroyuki Kanoh, Zenichiro Kato, Hideo Kaneko, Mariko Seishima, Naomi Kondo.
Atypical periodic autoinflammatory syndrome patients with a mutation in the leucine-rich repeat domain of NLRP3 in Japanese children.
AUTOIMMUNITY 2012, May 9-13, 2012, Granada, Spain.

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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24年度分担研究報告書

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
研究項目：不明熱患者における自己炎症症候群の遺伝子検索

分担研究者：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)

研究要旨

当院および全国の施設から紹介された342例の不明熱患者の遺伝子検索を行った。同意が取れた症例に、家族性地中海熱(FMF)の疾患遺伝子 *MEFV* と TNF receptor associated periodic syndrome (TRAPS)の疾患遺伝子 *TNFRSF1A* を解析した。315例の *MEFV* 遺伝子検索では、FMF 確実例(M694I;I/I,M/I)は17例(5.4%)であった。2) 遺伝子多型の E148Q, L110P を除く FMF が疑われる *MEFV* 変異(E84K, R202Q, E225K, G304R, R354Q, P369S, R408Q)は52例(16.5%)であった。3) 318例の *TNFRSF1A* 遺伝子検索では、エクソン2,3,4の突然変異は15例(4.7%)(T61I; 9例、C88Y; 1例、V125M; 5例)にみられた。

今回の検討から、不明熱症例の75.4%は、FMFとTRAPSの診断(疑い例も含め)がつかなかった。

全国規模で自己炎症疾患研究会を設立し、不明熱症例を相談する受け皿作りを行ってきた。平成24年度には、第5回、第6回自己炎症疾患研究会をそれぞれ平成24年7月6日(福岡)と平成25年2月2日(東京)に開催した。

A. 研究目的

自己炎症疾患は、全身性の炎症を来すため、多くは発熱がみられ、不明熱の鑑別診断として重要である。特に、家族性地中海熱は本邦でも報告が増え、今や不明熱症例の鑑別診断としてかかせない疾患となった。全国の施設から不明熱として相談を受けた症例の解析を行い、*MEFV* 遺伝子変異、*TNFRSF1A* 遺伝子変異の存在を検討することで、家族性地中海熱、TRAPSの診断をつけることを目的とした。さらに、全国規模で自己炎症疾患研究会をひらくことで、不明熱症例を相談する受け皿作りと自己炎症症候群の啓蒙活動を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. 不明熱症例の遺伝子解析

得られた血液から genomic DNA を分離、*MEFV* (exon 2, 10)、*TNFRSF1A* (exon 2, 3, 4) を PCR で増幅後、シーケンスを行った(M694I, E148Q, P369S, R408Q, L110P, E84Kの変異を中心に検索した)。*MEFV* 遺伝子解析は、長崎医療センター 右田清志先生にお願いした。

2. 自己炎症疾患研究会の開催

今年度は、平成24年7月6日に福岡朝日ビルで第5回自己炎症疾患研究会、平成25年2月2日にベルサール八重洲で第6回自己炎症疾患研究会開催した。

C. 研究結果

1. 不明熱症例の遺伝子解析

全国の施設から相談を受けた 342 症例を解析した。

解析結果を以下に示す。

1) *MEFV*

Mutation	N	%
M694I/M694I	1	0.3
M694I/E148Q	11	3.5
M694I/E148Q/L110P	2	0.6
M694I/normal	3	1.0
E148Q/E148Q	4	1.3
E148Q/E148Q/L110P/L110P	2	0.6
E148Q/E148Q/L110P	2	0.6
E148Q/E148Q/P369S/R408Q	5	1.6
E148Q/L110P	32	10.2
E148Q/L110P/E84K	1	0.3
E148Q/L110P/G304R	2	0.6
E148Q/E84K	2	0.6
E148Q/R202Q	1	0.3
E148Q/P369S/R408Q	6	1.9
E148Q/P369S/L110P	1	0.3
E148Q/P369S	1	0.3
E148Q/normal	50	15.9
E84K/normal	11	3.5
R202Q/normal	4	1.3
G304R/normal	5	1.6
R354Q/normal	1	0.3
E225K/P369S/R408Q	1	0.3
P369S/R408Q	10	3.2
P369S/normal	1	0.3
Normal	156	49.5
Total	315	100

遺伝子多型もあるが、315 症例中のべ 159 例に遺伝子変異がみられた。変異のうち、FMF 確実例(M694I;I/I,M/I)は 17 例(5.4%)であった。遺伝子多型の E148Q, L110P を除く FMF が疑われる *MEFV* 変異(E84K, R202Q, E225K, G304R, R354Q, P369S, R408Q)は 52 例(16.5%)であった。

2) *TNFRSF1A*

TNFRSF1A 遺伝子のエキソン 2,3,4 の突然変異は 318 症例中 15 例(T61I ; 9 例、C88Y ; 1 例、その他 5 例) 4.7%にみられた。

2. 自己炎症疾患研究会の開催

自己炎症疾患研究会は、平成 20 年 7 月 10 日に設立され、年 1 回会合を開いている。その目的を以下に記述する。「本研究会は、内科・小児科・皮膚科などの臨床家と基礎医学の研究者を中心に、本邦における自己炎症疾患の疫学、臨床像、定義、病因、治療法などを検討することを目的とする。自己炎症疾患を疑った場合、どのようなプロセスで診断、鑑別、治療するのか、ガイド

ラインを作成するとともに、本邦の自己炎症疾患の現状を把握し、迅速な診断と的確な治療が行えるように、研究会で議論する。そして、最終的には、それらの情報が自己炎症疾患患者へ還元できることを最大の目的とする。」

平成 24 年度の自己炎症疾患研究会のプログラムを以下に記載する。

第 5 回自己炎症疾患研究会のお知らせ

平成 24 年 7 月 6 日(金) 午後 2 時から 5 時
福岡朝日ビル(博多駅博多口徒歩 2 分: 地下 1 階・13+14 号室)入場無料

自己炎症疾患研究会を例年通り、日本炎症再生医学会(7月5,6日)の最終日の午後開催いたします。今年で本研究会も 5 回目を迎えました。今年も基礎・臨床において、本邦の自己炎症疾患研究者にホットな話題を提供いただきます。また、今年のプログラムの最後に、今後の会のあり方についても話し合いを行う予定です。奮ってご参加ください。

発起人 井田弘明(久留米大学 膠原病内科)、西小森隆太(京都大学 小児科)

研究会プログラム

I. 発起人挨拶 (14:00-14:05)

II. 自己炎症疾患の基礎研究 (14:05-14:45)

1. インフラマソームと自然炎症

増本純也 愛媛大学
大学院医学系研究科ゲノム病理学分野
プロテオ医学研究センター自己炎症・自己免疫疾患病理解析部門

2. iPS 細胞から単球・樹状細胞の分化誘導と疾患 iPS 細胞研究への応用

柳町昌克¹⁾、丹羽明¹⁾、田中孝之¹⁾、村田祐樹²⁾、八角高裕²⁾、金澤伸雄³⁾、平家俊男²⁾、中畑龍俊¹⁾、齋藤潤¹⁾
¹⁾京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用部門、
²⁾京都大学 小児科³⁾和歌山県立医大 皮膚科

III 自己炎症疾患の臨床研究 (14:45-15:25)

3. 当科における不明熱症例の解析と診断困難例の検討

藤枝雄一郎、渥美達也 北海道大学
大学院医学研究科 免疫・代謝内科

4. Blau/EOS における関節病態の臨床解析

武井修治¹⁾²⁾、山遠 剛²⁾、久保田知洋²⁾、
山崎雄一²⁾、池田 啓³⁾、神戸直智⁴⁾
¹⁾ 鹿児島大学医学部保健学科、²⁾ 鹿児島大
学附属病院小児診療センター
³⁾ 千葉大学アレルギー・膠原病内科、⁴⁾ 千
葉大学大学院医学研究院 皮膚科学

休憩 (1525-15:35)

IV. 自己炎症疾患の治療 (15:35-16:35)

5. 治療からみるベーチェット病の免疫異常
岳野光洋
横浜市立大学 リウマチ・血液・感染症内科

6. CAPS に対するカナキマブ治験につ
いて
今川智之 横浜市立大学小児科

7. 高IgD症候群に対するアナキンラ治療に
ついて
西小森隆太 京都大学小児科

V. 今後の会のあり方について (16:35-16:55)

VI. 閉会の挨拶 (16:55-17:00)

第6回自己炎症疾患研究会のお知らせ
平成25年2月2日13時-16時15分
場所：ベルサール八重洲（東京駅近く）
入場無料

自己炎症疾患は、1999年にKastnerらにより提唱された疾患概念です。まだ10年強の歴史の領域ですが、2008年より各自己炎症疾患が厚生省研究班に採択されたことにより、本邦の自己炎症疾患の実態が明らかになってきました。しかしながら、診断に苦慮する症例が存在し、一部の疾患では有効な治療薬、標準的な治療が存在せず、まだまだ患者のニーズに十分応えていない現状が存在します。以上の問題を解決すべく厚生省研究班“自己炎症疾患およびその類縁疾患に対する診療基盤の確立”が本年度採択されました。本研究会としても同研究班との連携を深めていきたいと考えており、第6回自己炎症疾患研究会は、例年と異なり、新春早々2月開催と致しました。

今回のプログラムでは、前回と同様中心的な疾患の新たな知見、治療等についてお話しいただくとともに、特別講演として東

京大学医科学研究所の三宅健介先生に自己炎症疾患とも関連の深い概念である“自然免疫と自然炎症”についてお話し頂くことになっております。また診断に苦慮している症例、治療に難渋している症例、教訓的な症例など、供覧する時間を取りたいと考えております。奮ってご参加のほど、何卒よろしくお願い申し上げます。

発起人 井田弘明(久留米大学 第一内科)、
西小森隆太(京都大学 小児科)

研究会プログラム

13:00 開会の挨拶 井田・西小森

13:05-13:20 長崎医療センター 内科 右
田清志先生 “本邦におけるFMFの臨床像”

13:20-13:35 金沢大学 小児科 谷内江昭
宏先生 “家族性地中海熱におけるサイトカ
イン・プロファイルと炎症病態”

13:35-13:50 東京女子医科大学 膠原病リ
ウマチ痛風センター内科 川口鎮司先生
“周期性発熱患者における10遺伝子に対し
ての網羅的多型解析”

13:50-14:05 富山大学 小児科 金兼弘和
先生 “X連鎖リンパ増殖症候群”

14:05-14:20 名古屋大学 皮膚科 杉浦一
充先生 “Familial generalized pustular
psoriasis”

14:20-14:50 特別講演 東京大学医科学研
究所 感染遺伝学分野 三宅健介先生
“自然免疫と自然炎症”

14:50-15:00 自己炎症疾患の研究班について
京都大学 小児科 平家俊男先生

15:00-15:10 休憩

15:10-16:10 症例検討会

症例1 PAPA症候群の1例 土浦共同病院
内科 高部和彦先生

症例2 治療に難渋しているPAPA症候群
の1例 東京医科歯科大学 小池竜司先生

症例3 PFAPAが疑われた成人の1症
例 国立国際医療研究センター感染症内
科 忽那賢志先生

症例4 MEFV variant 変異を有したCRMO

の1例 岸和田市民病院小児科 村田佑樹先生

症例5 エンブレル不応性の TRAPS の1例
日本医科大学小児科 五十嵐徹先生

16:10-16:15 閉会の挨拶 井田・西小森

今年度も活発な議論が展開された。

D. 考察

全国施設から 342 例の不明熱症例の相談があり、遺伝子解析を行った。*MEFV* 遺伝子変異は多型が多く、診断に苦慮するが、17例を確定診断とした。*MEFV* variant のような非典型例が報告されているため、exon 10 以外の変異も検討した。exon 10 以外の変異 (E84K, R202Q, E225K, G304R, R354Q, P369S, R408Q) は 52 例(16.5%)存在した。また、本邦に多い E148Q, L110P の compound heterozygote をどのように扱うか、今後診断基準の中で、*MEFV* variant をどのように取り扱うか、検討が必要である。*TNFRSF1A* に関しては、健常者にもみられる T61I 変異の扱いをどうするかが、今後の検討課題である。

家族性地中海熱などの自己炎症症候群は、疾患概念が提唱されて10年余りしかたっておらず、一般臨床家の認識まだまだ低い。さらに啓蒙していく必要がある。そのためには、自己炎症疾患研究会の活動を通じて、これらの疾患がまれではないことを浸透させていく必要がある。今後は、苦慮する症例の相談窓口の設定などを行っていききたい。

E. 結論

不明熱症例 342 例における 315 症例の *MEFV* 遺伝子検索で、17 例は家族性地中海熱確実例であった。

第5回、第6回自己炎症疾患研究会を開催した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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)* 2012;91(337-343)

Migita K, Ida H, Moriuchi H, Agematsu K. Clinical relevance of *MEFV* gene mutations in Japanese patients with unexplained fever. *J Rheumatol.* 2012;39(875-877)

Kita J, Tamai M, Arima K, Nakashima Y, Suzuki T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Okada A, Koga T, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Aoyagi K, Uetani M, Eguchi K, Kawakami A. Treatment discontinuation in patients with very early rheumatoid arthritis in sustained simplified disease activity index remission after synthetic disease-modifying anti-rheumatic drug administration. *Mod Rheumatol.* 2012;22(346-352)

Kita J, Tamai M, Arima K, Nakashima Y, Suzuki T, Kawashiri SY, Okada A, Koga T, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Aramaki T, Nakashima M, Fujikawa K, Tsukada T, Ida H, Aoyagi K, Uetani M, Eguchi K, Kawakami A. Delayed treatment with tumor necrosis factor inhibitors in incomplete responders to synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs shows an excellent effect in patients with very early rheumatoid arthritis with poor prognosis factors. *Mod Rheumatol.* 2012;22(195-201)

Hida A, Akahoshi M, Takagi Y, Imaizumi M, Sera N, Soda M, Maeda R, Nakashima E, Ida H, Kawakami A, Nakamura T, Eguchi K. Lipid infiltration in the parotid glands: a clinical manifestation of metabolic syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2012;120(110-115)

Ichinose K, Origuchi T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Fujikawa K, Aramaki T, Kamachi M, Arima K, Tamai M, Nakamura H, Ida H, Kawakami A, Eguchi K. Long-term follow-up of adalimumab monotherapy for rheumatoid arthritis in Japanese patients: a report of six cases. *Rheumatol Int.* 2012;32(483-487)

Tamai M, Kawakami A, Uetani M, Fukushima A, Arima K, Fujikawa K, Iwamoto N, Aramaki T, Kamachi M, Nakamura H, Ida H, Origuchi T, Aoyagi K, Eguchi K. Magnetic resonance imaging (MRI) detection of synovitis and bone lesions of the wrists and finger joints in early-stage rheumatoid arthritis: comparison of the accuracy of plain MRI-based findings and gadolinium-diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced MRI-based findings. *Mod Rheumatol.* 2012;22(654-658)

井田弘明、有馬和彦、金澤伸雄、吉浦孝一郎 中條-西村症候群の原因遺伝子とプロテアソーム機能異常 リウマチ科 47(6):654-660, 2012

井田弘明、福田孝昭 自己炎症症候群の定義と分類 九州リウマチ 32(2):75-78, 2012

井田弘明、福田孝昭 自己炎症症候群 日本臨床 70(suppl 8):561-568, 2012

井田弘明 自己炎症症候群 日本医事新報 4615:78-83, 2012

井田弘明、有馬和彦、金澤伸雄、吉浦孝一郎 プロテアソーム病 炎症と免疫 20(6):609-614, 2012

2. 学会発表

国内学会

第 56 回日本リウマチ学会学術集会 H24 年 4 月 26 日～28 日 東京都
井田弘明、海江田信二郎、本多靖洋、有馬和彦、金崎克也、福田孝昭
自己炎症症候群であるプロテアソーム機能不全症の解析結果を利用した関節リウマチの病態解明の試み

第 33 回日本炎症再生医学会 H24 年 7 月 5 日～6 日 福岡
井田弘明、有馬和彦、金澤伸雄、吉浦孝一郎
プロテアソーム機能不全症(中條-西村症候群)の炎症病態

国際学会

IEIIS 2012 Homeostatic Inflammation Symposium 2012.10.23-26 Tokyo
Hiroaki Ida, Shinjiro Kaieda, Seiyo Honda, Kazuhiko Arima, Koh-ichiro Yoshiura, Nobuo Kanazawa, Takaaki Fukuda Proteasome disability syndrome: a novel autoinflammatory syndrome

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許得取得

「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

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に関する研究

分担研究報告書

クリオピリン関連周期性症候群疾患関連変異体の機能に着目した病態解析

研究分担者 神戸直智 千葉大学大学院医学研究院皮膚科学 准教授

研究要旨

蕁麻疹を表現形とするクリオピリン関連周期性症候群（CAPS）では、NLRP3 が恒常的に活性化し、インフラマソームの会合を介して活性化 IL-1 β が放出されるとともに、ネクローシス様のプログラム細胞死が誘導される。しかし、その後の知見が蓄積される中で、NLRP3 自体が外来核酸の認識に関わること、あるいは遺伝子導入に用いた手技が細胞膜の破綻に関わっていた可能性が指摘された。このため、CAPS 関連変異体の形質を明らかにするため、Dox を添加した際に NLRP3 が発現する Tet-on モデル、NLRP3 の P_{yrin} 領域と強制重合を誘導できる FKBP とのキメラ蛋白を発現させるモデルを作成した。さらにマウス背部に air pouch を作成して、活性化 NLRP3 の発現によって誘導される好中球誘遊走を検証した。

その結果、CAPS 患者で認められる NLRP3 恒常活性変異体を発現させるだけで、他の外因性の刺激を必要とせずに、ネクローシスとしての形質を持ったプログラム細胞死が起こることを確認した。Air pouch を用いた検証では、IL-1 β の放出を伴わない NLRP3 依存性のネクローシス細胞死単独でも好中球を遊走させることが示された。

以上の結果から、ネクローシス様の細胞死は NLRP3 の活性化そのものが誘導する特異的な現象であると明らかになった。自発的な NLRP3 遺伝子の活性を基盤として臨床症状を呈する CAPS においても、臨床経過を詳細に検討し、特に抗 IL-1 β 療法で改善しない病態を明らかにすることで、活性化した NLRP3 が誘導する細胞死が関わる臨床症状を明確化することができると考えた。

研究協力者

松江弘之・千葉大学大学院医学研究院
皮膚科学 教授

佐藤貴史・千葉大学大学院医学研究院
皮膚科学 助教

中村悠美・米国ミシガン大学病理学

パターン認識受容体である NLR 分子が恒常的に活性化されることによって特有の臨床症状を呈する自己炎症性疾患の解析に従事してきた。

特に蕁麻疹を表現形とするクリオピリン関連周期性症候群（cryopyrin-associated periodic syndrome, CAPS）においては、NLR 分子の 1 つである NLRP3 が恒常的に活性化し、インフラマソームが会合する結果として IL-1 β が自発的に活性化・放出されること (*Arthritis Rheum.* 2005; 52: 3579-85, *J Exp Med.* 2009; 206: 1037-46) を、臨床検体を用いて明らか

A. 研究目的

我々はこれまで、遺伝子異常によって細胞内

にしてきた。この解析の中で、NLRP3 の疾患関連変異体は、これまで明らかにされているプログラム細胞死である caspase 酵素群を介したシグナルとは全く異なる経路によって、ネクローシス様のプログラム細胞死を誘導することを明らかにし (*Blood* 2007; 109: 2903-11, *Blood* 2008; 111: 2132-41), その成果は *Nature Review Immunology* 誌 (2008; 8: 372-9) などに引用され、「pyronecrosis」という名称が与えられ注目されている。しかし、この細胞死がライソゾーム酵素である cathepsin B の阻害剤によって抑制されること以外は、その分子メカニズムはほとんど分かっていない。

我々が *Blood* 誌に報告した上記の論文では、NLRP3 の疾患関連変異体をプラスミド遺伝子として導入し過剰発現する系での検討であったが、その後の知見が蓄積される中で、NLRP3 そのものが外来核酸の認識に関わること、あるいは遺伝子導入に用いた手技が細胞膜の破綻に関わっていた可能性が指摘された。また、別の論文では、患者末梢血単球における細胞死の評価に際して、NLRP3 の疾患関連変異体の誘導に LPS 刺激を用いたが、LPS 刺激が NLRP3 の他にも種々の蛋白発現を誘導することから、NLRP3 そのものの機能を必ずしも反映していない可能性を指摘されていた。

そこで自己炎症疾患の病態解明を目指す上で本研究では、CAPS 関連変異体としての形質を明らかにする目的で、これらの問題点を克服した新たな系を確立して検討を行った。

B. 研究方法

導入した外来遺伝子を認識して NLRP3 が活性化しているという可能性を排除するために Tet-on システムを用いて、doxycycline (Dox) 添加をした際に初めて細胞内に NLRP3 が発現する MC/9 (マウス肥満細胞株) および J774A.1 (マウス単球細胞株) を作成した。

また、NLRP3 のシグナル伝達ドメインで

ある Pysin 領域と薬剤添加によって分子の強制重合を誘導することができる FK-binding protein (FKBP) とのキメラ蛋白を上記の細胞株に恒常発現させ、FKBP の重合を誘導する AP20187 を添加した際に、強制重合化させる NLRP3 活性化モデルを別に作成した。

これらのモデルでの NLRP3 活性化に伴うネクローシスの機序を、各種インヒビターや sh-RNA を使用しつつ、FACS, ELISA, Western Blotting, 共焦点顕微鏡などで検討した。

更にマウス背部に air pouch を作成し、この中に移入した細胞株に Dox を添加することで NLRP3 を発現させ、その結果誘導されるネクローシスが誘導する好中球誘遊走を検証した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた疾患特異的遺伝子変異の症例からの同定に当たっては、研究分担者が所属する千葉大学とともに、京都大学の医の倫理委員会に申請を行い、承認を得て、その内容を忠実に順守して研究を行っている。

また遺伝子組み換え実験および動物実験に関してもそれぞれ、研究分担者が所属する千葉大学に研究計画諸の申請を行い、承認を得て、その内容を順守して研究を行っている。

C. 研究結果

CAPS 患者に認められる NLRP3 疾患関連変異体の機能を解析するため、軽症例である家族性寒冷蕁麻疹 (FCAS) で典型的に認められる R260W 変異、中等度の臨床症状を呈する Muckle-Wells 症候群 (MWS) で認められる D303N 変異、および中枢神経症状を伴う最重症例の CINCA 症候群患者で認められる Y570C 変異に相当する R258W, D301N, Y570C 変異を発現誘導の確認のための EGFP とのキメラ蛋白としてマウス Nlrp3 遺伝子に導入し、これを Tet-on プロモーターで発現させる細胞株を樹立した。

図 1a に示す様に、この細胞に Dox を添加

すると、LPS の添加なしに、Nlrp3 遺伝子とのキメラ蛋白として発現する EGFP の発現が誘導されることが確認された。この細胞に予め pro-IL-1 β を遺伝子導入しておく、疾患関連変異体 (R258W および D301N 変異) では、活性型である IL-1 β (p17) が切り出されることが確認されるとともに、同時に細胞内から HMGB-1 が放出された。

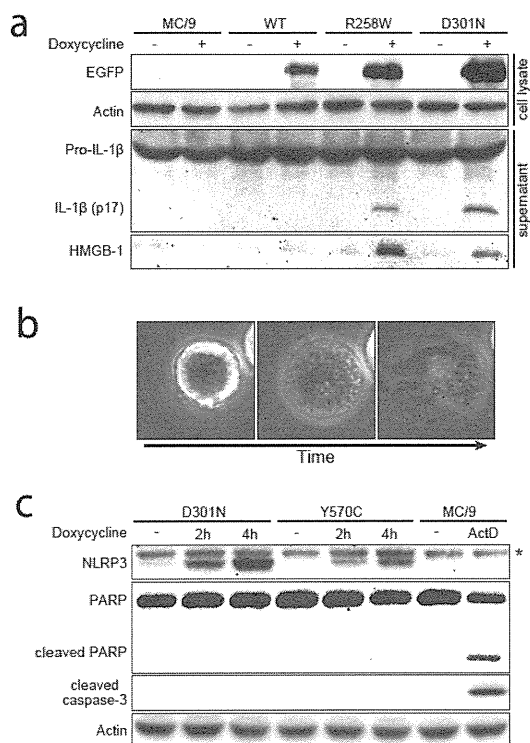


図 1 Dox 添加による Nlrp3 疾患関連変異体の発現によって誘導されるネクローシス様の細胞死

HMGB-1 の細胞外への放出は、ネクローシスとしての性格をもった細胞死が誘導されていることを示唆する。実際に、Dox 添加した疾患関連変異 Nlrp3 を発現する細胞を倒立顕微鏡で観察すると、細胞が膨化し、その後速やかに膜が破綻する様子が観察された (図 1b)。

また、CAPS 関連変異体の発現によって誘導される細胞死が、典型的なプログラム細胞死であるアポトーシスと異なる事は、アポト

ーシスの際に活性化される caspase-3 や PARP の活性化が、陽性コントロールとして使用したアクチノマイシン D (ActD) 処理した細胞のように観察されないことから確認された (図 1c)。

この細胞死は、ここでは図としては示していないが、cathepsin B の阻害剤として知られる CA074-Me の添加によって阻害されることから、NLRP3 疾患関連変異体の発現によって、外来因子としての核酸や LPS 処理なしでも、ネクローシスとしての形質をもった細胞死が誘導されることが確認された。

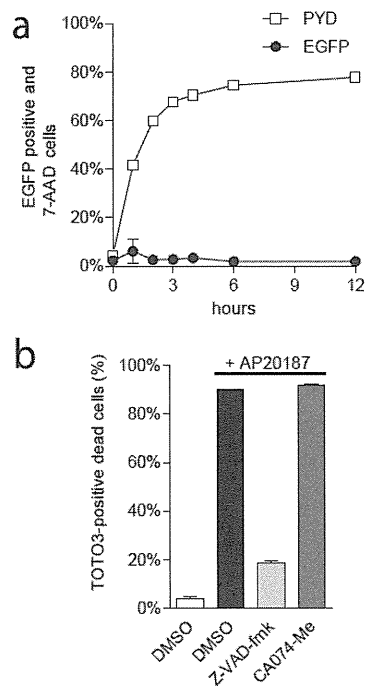


図 2 AP20187 によって FKBP を介して Nlrp3-PYD を強制重合化した際に誘導される細胞死

さらに各種阻害剤を用いて、Nlrp3 の疾患関連変異体の発現に伴って誘導されるネクローシス様のプログラム細胞死の機序を検討する中で我々は、pan-Caspase 阻害剤として知られる Z-VAD-fmk によって細胞死が阻害された細胞では、蛍光標識した ASC の凝集が確認されるのに対して、CA074-Me によ

って細胞死が抑制された細胞では、ASCの凝集が観察されないことに気付いた。そこで、CA074-Meによる細胞死の抑制がASCが凝集する過程よりも前を止めていると考え、FKBPを介して薬剤の添加によって強制重合化を誘導できる系を樹立し、検討した。

Nlrp3のPYD領域とEGFPをFKBPのキメラ蛋白として恒常発現した細胞にAp20187を添加してFKBPを介して蛋白を強制重合化させると、EGFPにFKBPを発現させた細胞では細胞死が誘導されないのに対して、7AAD陽性となる細胞死が時間依存性に誘導されることが明らかになった(図2a)。

この時、阻害剤としてZ-VAD-fmkを添加した細胞では、FKBPの強制重合化によって誘導される細胞死が抑制されるのに対して、CA074-Meの添加では、疾患関連変異体の誘導では抑制される細胞死が、このNLRP3のPYD領域の強制重合化モデルでは抑制できなかった(図2b)。このことは、Z-VAD-fmkはASCの重合化以降のステップを阻害しているのに対して、cathepsin B阻害剤として知られるCA074-Meは、NLRP3の活性化機構においてASCの重合化のステップよりも前で効いていることを物語っていると考えた。

次いで、IL-1 β の産生とともに誘導されるプログラム細胞死が、どのように炎症の惹起に関わっているかを検証した。遺伝子変異の結果として恒常活性化を来すNLRP3遺伝子を基盤として発症するCAPSにおいては、その特徴的な臨床症状として、痒みを訴えない蕁麻疹様の紅斑が観察される。この病変部位の病理組織像では、好中球の遊走が特徴的な所見と言われている。そこで、Dox添加によってNlrp3疾患関連変異体を誘導する細胞株を、マウスの背部に作成したAir pouch内へと移入し、マウス個体にDoxを与えてNlrp3を誘導した際のAir pouch内の好中球遊走について検討した。

図3aに示す様に、予めLPS処理を施してpro-IL-1 β を細胞内に誘導した細胞を移入した際には、Dox添加によって、疾患関連変異体(D301N)を誘導した細胞にのみ好中球の

遊走が観察された。

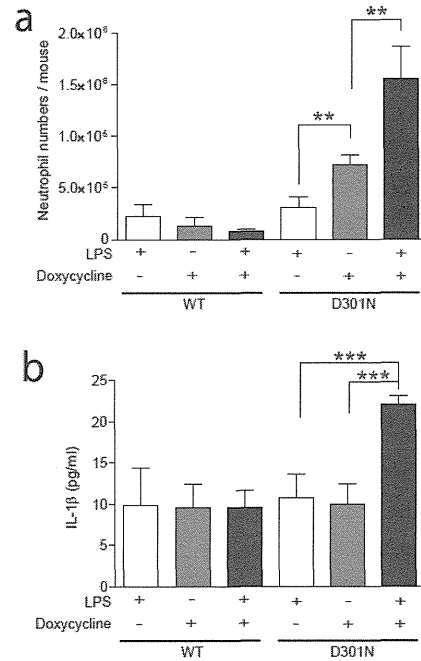


図3 CAPS疾患関連変異体によって誘導されるプログラム細胞死と好中球炎症

興味深いことに、LPS処理をしていない細胞を移入した際にはpro-IL-1 β がないため、図3bに示すように、IL-1 β の放出は確認されず、細胞死のみが確認される。このとき、先ほどのLPS+Doxの系ほどではないにしろ、有意差をもって好中球の遊走が確認されること(図3a)から、NLRP3の活性化によって誘導されるネクロシス様の形質を示すプログラム細胞死は、IL-1 β の産生を修飾する形で、好中球性炎症の惹起に関わっていることが示唆された。

D. 考察

本研究では、NLRP3活性化のモデルとして、CAPS患者で確認される疾患関連変異体を用いて検証した。細胞内において病原性微生物や生体の発する危険信号(Danger signal)を認識すると考えられているNLRP3が活性化することで、ネクロシスとしての形質を

持つプログラムされた細胞死が誘導され、この細胞死はIL-1 β により生じる好中球性炎症を増強していると考えられる。

NLRP3は多種の Danger signal のセンサーであることから、この細胞死は皮疹としての蕁麻疹を特徴的な表現形とする自己炎症症候群のCAPSに限らず、痛風などNLRP3が関与する他の疾患の病態形成にも関わっていると示唆される。

E. 結論

CAPSは、患者共通の臨床症状として好中球浸潤を伴う蕁麻疹様紅斑を呈し、NLRP3 遺伝子の恒常活性変異体により生じる自己炎症疾患である。本研究は、NLRP3 活性化により誘導される細胞死の機序と生体における役割の解明を目的とした。

Tet-on システムを用いてCAPS患者で認められるNLRP3 恒常活性変異体を発現させるだけで他の外因性の刺激を必要とせずにネクロシスとしての形質を持ったプログラムされた細胞死が起こることを確認した。また、この細胞死はASCの存在が不可欠であり、ASC凝集の前後の経路においてそれぞれCA074-MeとZ-VAD-fmkで阻害された。Air pouchを用いた検証では、IL-1 β の放出を伴わないNLRP3依存性のネクロシス単独でも好中球を遊走させることが示された。

以上の結果は、ネクロシス様の細胞死はNLRP3の活性化そのものが誘導する特異的な現象であることが明らかにされた。自発的なNLRP3遺伝子の活性を基盤として臨床症状を呈するCAPSにおいても、臨床経過を詳細に検討し特に抗IL-1 β 療法で改善しない病態を明らかにすることで、細胞死が関わる臨床症状を明確化することができると考えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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; 120: 1299-308.

2. Nakamura Y, Franchi L, Kambe N, Meng G, Strober W, Núñez G. Critical role for mast cells in interleukin-1 β -driven skin inflammation associated with an activating mutation in the Nlrp3 protein. *Immunity*. 2012; 37: 85-95.

3. 神戸直智, 中村悠美. 連載「自己炎症症候群の多様性」 CAPS でみられるヒスタミン非依存性蕁麻疹. 炎症と免疫. 2012; 20: 183-8.

4. 神戸直智. 特集「蕁麻疹患者のQOL向上術」 蕁麻疹様皮疹を呈するクリオピリン関連周期性症候群の診断と管理. *Monthly Book Derma デルマ*. 2012; 194: 63-9.

5. 神戸直智, 中村悠美. 特集「アナフィラキシーショック」 NLRP3 インフラマソームを介したマスト細胞の活性化. *臨床免疫・アレルギー科*. 2012; 58: 560-4.

6. 神戸直智. 自己炎症症候群と皮膚疾患の関連 — 治りにくい蕁麻疹(それと乾癬)について —. *日皮会誌*. 2012; 122: 3286-8.

2. 学会発表

国際学会

1. Satoh T, Kambe N, Matsue H. Programmed necrotic cell death caused by NLRP3 activation is dispensable for TLR stimulation (42nd Annual ESDR Meeting, 2012 Sep 19-22,

Venice, Italy)

なし

2. Nakamura Y, Franchi L, Kambe N, G Meng G, Strober W, Núñez G. Critical role for mast cells in IL-1 β -driven skin inflammation accompanying a disease-associated Nlrp3 mutation. (42nd Annual ESDR Meeting, 2012 Sep 19-22, Venice, Italy)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

国内学会

1. 神戸直智. 教育講演 3 アレルギーと自己炎症症候群 (第 24 回日本アレルギー学会春期臨床大会. 2012 年 5 月 12-13 日, 大阪市)

2. 神戸直智. 教育講演 17「炎症と免疫」自己炎症症候群と皮膚疾患の関連 - 治りにくい蕁麻疹について - (第 111 回日本皮膚科学会総会, 2012 年 6 月 1-3 日, 京都市)

3. 神戸直智. シンポジウム 1「臨床から見た自己炎症症候群」皮膚症状から見た自己炎症症候群 (第 22 回日本小児リウマチ学会総会・学術大会, 2012 年 10 月 5-7 日, 名古屋市)

4. Satoh T, Kambe N, Matsue H. Programmed necrotic cell death caused by NLRP3 activation is dispensable for TLR stimulation (第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012 年 12 月 5-7 日, 神戸市)

5. Kambe N. JSID Award Lecture. The genetic fidelity of the dead or dysing (37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2012 Dec 7-9, Okinawa)

6. Kambe N. Luncheon Seminar 1. Urticaria and innate immunity. Innate Immunity and autoinflammation (37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2010 Dec 7-9, Okinawa)

H. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得

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24年度分担研究報告書

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

研究項目：中條—西村症候群の病態解明

分担研究者：金澤 伸雄 和歌山県立医科大学医学部皮膚科 講師

研究協力者：李 洪錦 和歌山県立医科大学医学部皮膚科 博士研究員

国本 佳代 和歌山県立医科大学医学部皮膚科 助教

上中智香子 和歌山県立医科大学医学部皮膚科（寄付講座） 講師

中谷 友美 和歌山県立医科大学医学部皮膚科 研究補助員

有馬 和彦 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科公衆衛生学 助教

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

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

研究要旨

本分担研究においては、中條—西村症候群（NNS）の更なる病態解明と特異的治療法の開発のため、1) 和歌山地方での健常者における *PSMB8* 変異のアリル頻度を明らかにする目的で、県立高等看護学院の生徒が実習で採取した血液についてインフォームドコンセントを得て分与を受け、ゲノム DNA を採取しダイレクトシーケンス法によって c.602G>T 変異を検索した結果、1/98 アリルに変異を認めた。2) 国際自己炎症疾患研究会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 における *PSMB8* 変異の登録を金澤と井田で管理しているが、イタリアより CANDLE 症候群における未発表の変異である c.220A>T (T74S) の登録があった。3) NNS 患者由来細胞における MHC の発現を検討したところ、クラス I の発現は問題ない一方、クラス II (HLA-DR) の発現に異常を認めたが、特定の抗体でのみ認識されないことから、何らかの構造異常の存在が示唆された。4) 和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得て、NNS に対するトシリズマブの有用性に対する前向きコホート研究を開始し、脂肪筋肉萎縮と関節拘縮、腹部肥満が著明な 1 成人例に 7 ヶ月間投与したところ、特に大きな副作用なく良好な経過である。

A. 研究目的

本分担研究は、難治性疾患克服研究事業（研究奨励分野）として 3 年間行った研究事

業「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」（平成 21 年度）、「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」(平成 22, 23 年度)を引き継いだものである。中條—西村症候群(NNS)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早世するとされている。先の研究事業の一環として行った全国調査によって、現在生存が明らかな患者は、1 幼児例を含む関西の 12 例のみであり、その多くを和歌山県立医科大学皮膚科でフォローしている。長崎大学人類遺伝学で行われたホモ接合マッピングにより、昭和 14 年の中條、昭和 25 年の西村らによって「凍瘡を合併せる続発性骨骨膜炎」として報告されて以来実に 70 年ぶりに、原因遺伝子として、検索した全ての患者に、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 c.602G>T (G201V) 変異が同定された。さらに患者由来細胞・組織の解析により、プロテアソーム機能不全によってユビキチン化蛋白質が蓄積することによってストレス応答が高まり、核内にリン酸化 p38 が蓄積することによって IL-6 が過剰産生されることが本態であることが示された(Arima K, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2011)。本年はこの報告を受け、本疾患のさらなる病態解明と特異的治療法の開発を目的として、以下の研究が推進された。

B. 研究方法

1) 和歌山県立高等看護学院の生徒が卒前実習で採取した血液について、インフォームド

コンセントを得て分与を受け、ゲノム DNA を採取しダイレクトシーケンス法によって c.602G>T 変異を検索した。

2) 国際自己炎症疾患研究会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 における *PSMB8* 変異の登録を金澤と井田で管理し、遺伝子の書式の統一など新規登録に対応した。

3) 患者と家族由来不死化 B 細胞と末梢血単核球について、各種抗 HLA-ABC、抗 HLA-DR 抗体 (DAKO、BD、eBioscience) を用いた細胞表面・細胞内染色を行い、フローサイトメーターにて解析した。末梢血については抗 CD14, CD19 抗体との二重染色を行ってから FACS で解析した。また細胞の一部はサイトスピンにかけて固定してから抗 HLA-ABC、抗 HLA-DR 抗体 (DAKO) で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。患者由来不死化 B 細胞の一部は mRNA を抽出し、HLA-DR について RT-PCR を行った。さらに一部の細胞は抗 HLA-DR 抗体 (DAKO) と抗 EEA1、γ-adaptin、LAMP1 抗体との細胞内二重染色を行った上でサイトスピンにかけ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4) 患者家族由来不死化 B 細胞をプロテアソーム阻害剤である MG132 あるいは DMSO (溶媒) で 12 時間処理して抗 HLA-DR 抗体 (BD) で染色し、細胞表面の HLA-DR の発現変化をフローサイトメーターで検討した。

5) NNS に対するトシリズマブの有用性に対する前向きコホート研究について和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得て (承認番号 959)、脂肪筋肉萎縮と関節拘縮、腹部肥満が

著明な1成人例に8mg/kgのトシリズマブ（アクテムラ®）を4週間に1回投与した。

（倫理面への配慮）

本研究で用いた患者由来試料は、和歌山県立医科大学の臨床研究・遺伝子解析研究に関する倫理委員会の承認を得た計画に基づき、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

1) インフォームドコンセントを得て和歌山県内各地とその近郊出身の20-40歳代の男女49名から受与された血液について *PSMB8* c.602G>T 変異を検索した結果、1名にヘテロ変異が見出され、当地での変異アレル頻度は1/98と算出された。

2) INFEVERS に、イタリアの研究者より、CANDLE 症候群に関連した未発表の *PSMB8* 変異の登録があり、変異のある exon 番号、mRNA の位置などを既報告の変異に合わせて、c.220A>T (T74S) の登録を承認した（表1）。

表1 疾患関連 *PSMB8* 変異の特徴

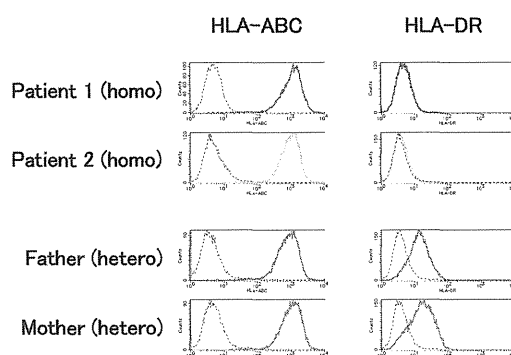
変異	T74S	T75M	C135X	G201V
疾患	CANDLE	JMP CANDLE	CANDLE	NNS
β5i 活性	×	×	×	×
複合体形成	○	○	×	×

この変異は、JMP 症候群や CANDLE 症候群で報告されている T75M と同様、成熟β5i が前駆体から切り出された断端に位置することから、

キモトリプシン様酵素活性を発揮するのに重要な活性中心に影響する一方、免疫プロテアソーム複合体形成への影響は小さいと予想される。

3) NNS 患者由来不死化 B 細胞における HLA の発現をフローサイトメーターで検討したところ、HLA-ABC の発現は問題なく認められたのに対し、HLA-DR の発現は患者特異的に認められなかった。（図1）

図1 NNS 患者と家族由来不死化 B 細胞表面の HLA 発現（抗 HLA-DR 抗体として L243 を使用）

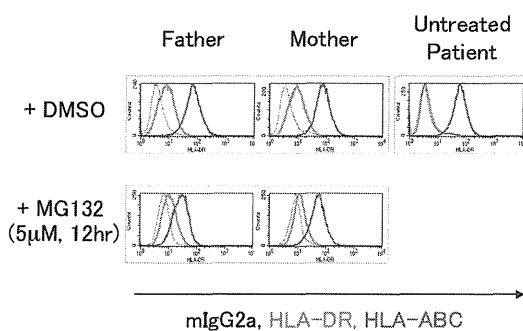


これは患者末梢血単核球中の CD14 陽性単球、CD19 陽性 B 細胞においても同様であった。一方、患者末梢血単核球のサイトスピン標本を固定し、細胞内領域を認識する DAKO の抗体（TAL.1B5）で検討すると、HLA-DR も HLA-ABC と同様に発現が認められた。RT-PCR にて HLA-DR mRNA の十分な発現も確認されたことから、細胞内輸送の障害によりいずれかの小器官に蓄積していることが予想された。そこで、患者由来不死化 B 細胞を固定して HLA-DR (TAL.1B5) と各種小器官のマーカーである EEA1、γ-adaptin、LAMP1 と二重染色してからサイトスピン標本を作製し、

共焦点レーザー顕微鏡で観察したが、いずれのマーカーとも共局在せず、HLA-DR は細胞表面の形質膜に局在することが確認された。そこで、改めて当初用いた BD の抗体 (L243) を用いて細胞内染色してフローサイトメーターで検討したところ、やはり HLA-DR の発現は認められず、一方、eBioscience の抗体 (LN3) を用いて染色し細胞表面の HLA-DR 発現をフローサイトメーターで検討したところ、発現を認めた。

4) 患者家族由来のコントロール不死化 B 細胞をプロテアソーム阻害薬である MG132 あるいは溶媒である DMSO のみで 12 時間処理し、細胞表面の HLA-DR の発現の変化を BD の抗体 (L243) を用いてフローサイトメーターで解析した結果、図 2 に示すように一見 MG132 処理後 HLA-DR の発現が低下したように見えるが、アイソタイプの MFI が上昇しコントロールの HLA-ABC の MFI が低下していることから、HLA-DR の発現がはっきり低下しているとは結論できなかった。

図 2 NNS 患者家族由来不死化 B 細胞を MG132 処理した後の HLA-DR 発現の変化



5) IL-6 が病態形成に大きく関わることを示唆

されたことを受け、NNS に対するトシリズマブの有用性に対する前向きコホート研究がすでに平成 23 年に和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得、脂肪筋肉萎縮と関節拘縮、腹部肥満が著明な 1 成人例に投与を予定していたが、同年 10 月に発熱を伴う下肺野の肺炎を発症したため、投与を延期していた。この時抗生物質に加え大量ステロイド投与による治療が奏効し、その後は冬期も順調に推移した。このエピソードを踏まえ、調子のいい夏期に入院してアクテムラ®8mg/kg (440mg/55kg) の導入を行った。肺炎については一部の無気肺を残すのみで浸潤影は消失していたが、白血球 1930/μl、血小板 25000/μl と低値、また炎症所見としては CRP 0.74mg/dl、SAA 37μg/ml、sIL-2R 645U/ml であった。特に問題なく導入した後、1 週間後には CRP 0.05mg/dl、SAA 5μg/ml と陰性化し、4 週間後まで維持した。血小板が 17000/μl まで低下していたため 2 回目の投与を 1 週間延期したところ、臨床的な感染徴候なく CRP 1.69mg/dl、SAA 126μg/ml と跳ね上がったため、その後は 4 週間に 1 回のペースを崩さず投与を継続している。血小板は 4 回目投与前に 11000/μl まで低下したが、その後は上昇傾向にあり、出血傾向の自覚はない。投与前 201IU/l と正常範囲内であった CPK が 3 回投与前に 621IU/l まで上昇したが、特に自覚なく、その後は徐々に低下し正常化した。12 月より CRP 0.07mg/dl、SAA 11μg/ml とやや上昇しているが、手足の凍瘡様紫紅色斑が出現している以外は特に問題ない。7 ヶ月間投与した現在、自覚的に明らかな改善徴候もないが、食欲や生活意欲も出て表情は明