

成分と骨成分が無秩序に存在していた。

C. 考察

iPS 細胞を用いて研究を行う際には対照群の選定が問題になるが体細胞モザイク患者から iPS 細胞を作成することで NLRP3 遺伝子以外は遺伝学的に均一なコントロールを用いて解析することができる。これまで iPS 細胞を用いた疾患の研究は血液・心臓・神経などの分野が中心であったが、今回我々は新たな軟骨分化系を樹立し軟骨細胞を高効率に作成できるようになった。この新たな分化系を用いて我々は野生型・変異型 NLRP3 iPS 細胞由来軟骨組織を得て、解析を行った。

In vitro 軟骨分化誘導実験においては誘導された軟骨組織は変異型が優位に大きく、In vivo の軟骨分化誘導実験においては in vitro においては困難な骨成分への分化をおこない、患者関節症において認められる組織像を再現することが可能であった。iPS 細胞技術の骨軟骨領域疾患への応用を考える上でも本研究は意義深いと考える。

E. 結論

骨幹端過形成を軟骨分化、内軟骨骨化の実験系により再現、その病態病理並びに変異型 NLRP3 の分子学的機能について解析解析可能な系の構築に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

A nationwide survey of Aicardi-Goutieres syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study. Abe J, Nakamura K, Nishikomori R, Kato M, Mitsuiki N, Izawa K,

Awaya T, Kawai T, Yasumi T, Toyoshima I, Hasegawa K, Ohshima Y, Hiragi T, Sasahara Y, Suzuki Y, Kikuchi M, Osaka H, Ohya T, Ninomiya S, Fujikawa S, Akasaka M, Iwata N, Kawakita A, Funatsuka M, Shintaku H, Ohara O, Ichinose H, Heike T. *Rheumatology (Oxford)*. In press.

The first case of adult-onset PFAPA syndrome in Japan. Kutsuna S, Ohmagari N, Tanizaki R, Hagino N, Nishikomori R, Ujiie M, Takeshita N, Hayakawa K, Kato Y, Kanagawa S. *Mod Rheumatol*. In press.

Obvious optic disc swelling in a patient with cryopyrin-associated periodic syndrome. Kawai M, Yoshikawa T, Nishikomori R, Heike T, Takahashi K. *Clin Ophthalmol*. 2013;7:1581-5. doi: 10.2147/OPHTH.S49281. Epub 2013 Aug 6.

MEFV Variants in Patients with PFAPA Syndrome in Japan. Taniuchi S, Nishikomori R, Iharada A, Tuji S, Heike T, Kaneko K. *Open Rheumatol J*. 2013 Apr 19;7:22-5. doi: 10.2174/1874312901307010022. Print 2013.

Safety and efficacy of canakinumab in Japanese patients with phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndrome as established in the first open-label, phase-3 pivotal study (24-week results). Imagawa T, Nishikomori R, Takada H, Takeshita S, Patel N, Kim D, Lheritier K, Heike T, Hara T, Yokota S. *Clin Exp Rheumatol*. 2013 Mar-Apr;31(2):302-9. Epub 2013 Feb 1

Guidance on the use of canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome in Japan. Yokota S, Nishikomori R, Takada H, Kikuchi M, Nozawa T, Kanetaka T, Kizawa T, Miyamae T, Mori M, Heike T, Hara T, Imagawa T. *Mod Rheumatol*.

2013 May;23(3):425-9. doi: 10.1007/s10165-012-0769-8. Epub 2012 Oct 20. Review.

Heterozygous TREX1 p.Asp18Asn mutation can cause variable neurological symptoms in a family with Aicardi-Goutieres syndrome/familial chilblain lupus. Abe J, Izawa K, Nishikomori R, Awaya T, Kawai T, Yasumi T, Hiragi N, Hiragi T, Ohshima Y, Heike T. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Feb;52(2):406-8. doi: 10.1093/rheumatology/kes181. Epub 2012 Jul 23. No abstract available.

2. 学会発表

患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の分子機構の解明

横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、斎藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、平家俊男、戸口田淳也 第 34 回日本炎症再生医学会

Understanding the pathology of the arthropathy in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome by using iPS cells technology

横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、斎藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、平家俊男、戸口田淳也 第 28 回 日本整形外科学会基礎学術集会

Intrinsic hyperplastic capacity of neonatal onset multisystem inflammatory disease chondrocytes demonstrated by iPS cell technology

横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、斎藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、平家俊男、戸口田淳也 第7回武田科学振興財団薬科学シンポジウム

H. 知的財産権の出願・登録状況
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。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。実際にスクリーニングを行い、実験系の有用性を検討した。

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。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。昨年度までに、モザイク型の CAPS 患者 2 例より iPS 細胞を樹立し、単球系細胞の表現型の再現に成功した。CAPS の責任遺伝子である NLRP3 は、アルツハイマー病、動脈硬化、珪肺、痛風など様々な慢性炎症性疾患の病態に深く関与していることが知られている。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

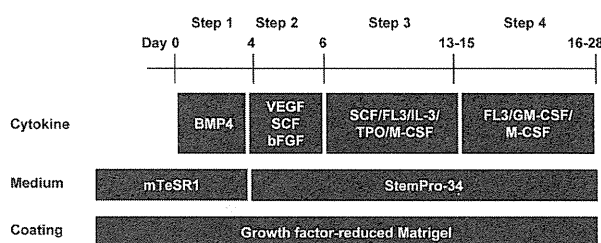
2 人のモザイク型 CAPS 患者(患者 1-CIRA188Ai および患者 2-CIRA086Ai)より樹立した iPS 細胞株を用いて実験を行った。

iPS 細胞の in vitro マクロファージ分化

iPS 細胞を我々が開発した 2 次元分化法で単球へと分化させた (Yanagimachi, PLOS one, 2013)。CD14 陽性の iPS 細胞由来単球は、autoMACSpro (MiltenyiBiotec)

を用いて純化した。

図：単球分化プロトコル



化合物スクリーニング

京都大学 iPS 細胞研究所で活性既知の化合物を用いてスクリーニングを行った。化合物を 384 穴プレートに分注し、3,600cells/30ul の iPS 細胞由来単球をさらに分注した。二時間後に LPS を最終濃度 20nM となるように追加し、18 時間培養した。その後培養上清を回収し、Homogenous time-resolved fluorescence 法 (HTRF) を用いてサイトカインを定量した。

倫理面での配慮

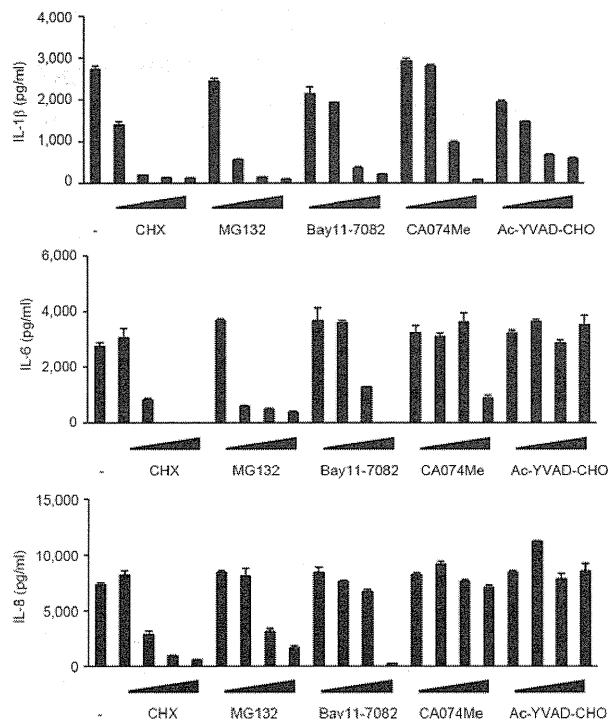
本研究は、疾患を有する患者さんから検体を頂き iPS 細胞を作成して行う研究であるため、患者さんの同意・協力を必要とする研究である。また、作成する iPS 細胞を用いた疾患解析においては、遺伝子解析が必須であり、個人情報の取り扱いの配慮を必要とする研究である。この 2 点に対して、京都大学医学部医の倫理委員会に、ヒトを対象とした医学の研究および臨床応

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

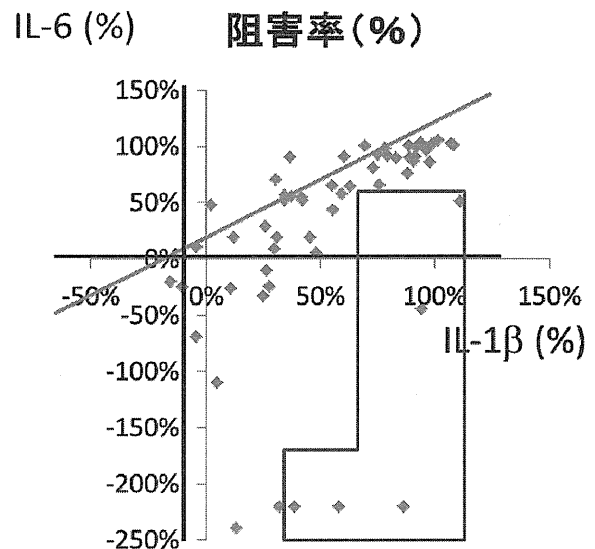
CAPS-iPS 細胞由来単球の刺激に対する応答

昨年までに樹立・評価を行った CAPS-iPS 細胞由来単球について、実際に化合物スクリーニングに用いることができるかを検討するために、既知の阻害剤に対する応答を検討した。NLRP3 変異 iPS 細胞由来単球に LPS 刺激を加え、様々な阻害剤による効果を検討したところ、シクロヘキシミド (CHX) や MG132 などの阻害剤では IL-1 β のみならず IL-6 や IL-8 など阻害されたが、NLRP3 シグナル直下の分子である Caspase-1 の活性を阻害する Ac-YVAD-CHO を用いると、IL-1 β 分泌のみが用量依存性に阻害された。従って、IL-1 β 分泌に対する阻害率が高く、IL-6 や IL-8 に対する阻害率が低い化合物を選択することにより、NLRP3-IL-1 β 経路の阻害剤をスクリーニングすることができるのではないかと期待される。



次に、京都大学 iPS 細胞研究所で所有する活性既知の化合物に対して、化合物スクリーニングを行うことを考えた。

LPS 非添加の well を阻害率 100%、LPS 添加かつ化合物非添加の well を阻害率 0% とし、化合物添加による阻害率を、IL-1 β と IL-6 に対して検討した。基準 well を設定して、系の安定性を評価したところ、Z' -factor 0.8 程度、S/B ratio 6-8 程度で安定していたので、スクリーニング系として妥当であると考えた。実際に 4000 の活性既知化合物をスクリーニングしたところ、3 つの化合物が IL-1 β 特異的な阻害剤としてヒットした。これらの化合物は、既報のあるものであったため、系の有用性が証明された。現在、更に検索する化合物の範囲を拡張することを検討している。



D. 考察

iPS 細胞由来単球を用い、炎症性サイトカインを指標としたスクリーニング系の構築に成功した。このシステムは、他の様々な自己炎症性疾患にも応用可能と思われる。しかし、分化系の安定化や、どのサイトカインを指標にするかと言った問題、あるいはサイトカイン産生に必要なシグナルの同定については、それぞれの疾患での詳細が検討である。引き続き、検討を進めたい。

E. 結論

iPS 細胞由来単球を用い、炎症性サイトカインを指標としたスクリーニング系の構築に成功した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T. Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica*. 2013 Aug;23:98: doi 10.3324/haematol.2013.083873
- ② Saida S, Watanabe KI, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, 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*; 121(21):4377-87, 2013. May 23; doi: 10.1182/blood-2012-12-474387.
- ③ 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*. 4/3/ 2013; 8(4): e59243. doi:10.1371/journal.pone.0059243
- ④ Koder Y, Yamamoto K, Harada M, Morishima Y, Dohy H, Asano S, Ikeda Y, Nakahata T, Imamura M, Kawa K, Kato S, Tanimoto M, Kanda Y, Tanosaki R, Shiobara S, Kim SW, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R, Hamajima N, Fukushima M, Tamakoshi A; for the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A.: PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Sep 30. doi: 10.1038/bmt.2013.147. In press.
- ⑤ Tomizawa D., Akio Tawa A., MD/PhD, 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.: 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). *Leukemia* doi:10.1038/leu.2013.153 In press.
- ⑥ Honda Y., Tsuchida M., Zaike Y., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukemia who developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology (JSPHO). *Brit. J. Haematol*. In press.
- ⑦ 斎藤潤、中畑龍俊：疾患特異的 iPS 細胞。再生医療 12(1):19-29,2013.

2. 学会発表

- ① 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞研究が切り開く未来の医療。日本学術会議公開学術講演会「未来社会を築く生命科学と医療のフロンティア」 2013 年 8 月 3 日 京都大学薬学部記念講堂
- ② 中畑龍俊：特別講演、iPS 細胞の小児医療への応用。第 38 回東日本小児科学会 2013 年 11 月 23 日 大宮ソニックシティ（さいたま市）
- ③ 中畑龍俊：教育講演、iPS 細胞の臨床応用。第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会。2013 年 11 月 29 日-12 月 1 日(30 日) ヒルトン福岡シーホーク
- ④ 中畑龍俊：基調講演、iPS 細胞を用いた今後の医療の可能性。日本製薬医学会第 4 回年次大会 2013 年 7 月 19 日 エーザイ株式会社本社 5 階ホール(塩野義製薬)

- ⑤ 中畑龍俊：基調講演、iPS細胞を活用した医療の可能性と倫理. 第10回STSフォーラム「科学技術が拓く人間の未来」公開シンポジウム 2013年10月5日 京都商工会議所ビル講堂
- ⑥ 横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男：罹患者由来 iPS細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の分子機構の解明. 第34回日本炎症・再生医学会 2013年7月2-3日(ポスター) 国立京都国際会館
- ⑦ Hasegawa D., Hama A., Nozawa K., Salaguchi H., Yabe M., Ito E., Ito M., Kojima S., Nakahata T., Manabe A.: Hematological and morphological characteristics of inherited bone marrow failure syndromes(IBMFS). The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2013年10月11-13日(12日) さっぽろ芸文館
- ⑧ Suzuki N., Hira A., Niwa A., Matsuo K., Takata M., Yabe M., Nakahata T., Saito M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 11th Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). 7/12-7/15, Boston, MA, USA.
- ⑨ Honda Y., Tsuchida M., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 17 children with JMML who developed blast crisis. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology(第75回日本血液学会学術集会) 2013年10月11-13日(12日) 札幌市教育分化会館
- ⑩ 中畑龍俊：iPS細胞による疾患モデル樹立と創薬への展望. 日経バイオテクプロフェッショナルセミナー「次の10年間 iPS細胞実用化をリードする iPS細胞創薬の現状と課題」 2013年6月19日 コクヨホール(東京) 日経BP

H.知的財産権の出願・登録状況

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、若年性サルコイドーシス患者さんより血球細胞を採取し、樹立を進めている。中條西村症候群については、患者由来iPS細胞を単球へ分化させ、免疫プロテアソーム活性を評価した。

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

昨年度までに、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、エピソーム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。本年度は若年性サルコイドーシス(EOS)患者1名と家族1名より同意を取得し、血液を採取した。現在iPS細胞の樹立中である。

iPS細胞のin vitro単球分化

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(Yanagimachi et al., PLOS one, 2013)。この系を用いて、NNS患者由来単球の機能評価を行った。

プロテアソーム活性評価

東京大学薬学研究科の濱崎純先生との共同研究で行った。iPS細胞あるいはiPS細胞由来単球を東京大学に送付し、プロテアソーム活性の評価を行っていただいた。

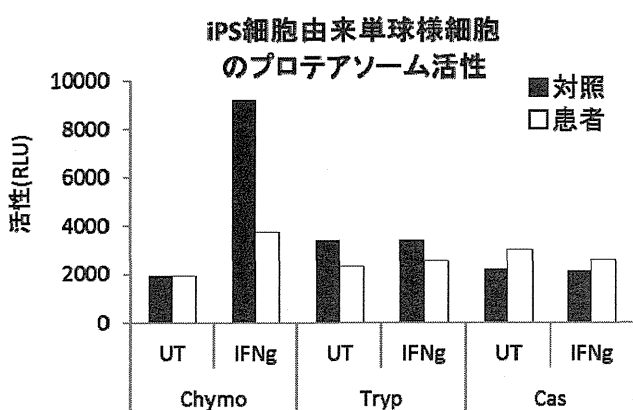
倫理面での配慮

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

NNS-iPS細胞の解析

NNS の原因遺伝子である PSMB8 は免疫プロテアソームサブユニット $\beta 5i$ をコードしており、 $\beta 5i$ は免疫プロテアソーム内でキモトリプシン様活性を発揮して、タンパク分解に貢献している。東京大学薬学系研究科の濱崎純先生との共同研究で、NNS-iPS 細胞由来の単球のプロテアソーム活性を評価した。NNS-iPS 細胞を下図に示すように、定常状態では正常対照との間でプロテアソーム活性に大きな違いはないが、IFN γ 添加により免疫プロテアソームが誘導されると、キモトリプシン様活性が選択的に低下した。従って、iPS 細胞由来単球では免疫プロテアソームの誘導が可能であり、かつ患者由来細胞ではその機能が低下していることが考えられた。



また、患者由来 iPS 細胞の遺伝子変異を修復するため、TALEN を用いた相同組み換えを計画した。本年度は、TALEN 切断部位の設計及び TALEN コンストラクトの作製と修復用のターゲティングベクターの作製を行った。

EOS-iPS 細胞の樹立

EOS 患者 1 名とその家族より血液を採取し、iPS 細胞の樹立を開始した。iPS 細胞樹立後は、単球系細胞に分化させ、各種機能解析を行う予定である。

D. 考察

NNS の病態は、免疫プロテアソーム活性が損なわれ、それに伴ってタンパク分解能が低下し、細胞内ストレス、例えば ER ストレスなど、が蓄積することにより、炎症性のシグナルが亢進することだと考えられている。ただ、その詳細なメカニズムについては依然として不明な点が多く、また疾患発症に重要と考えられる単球・マクロファージ系の細胞を患者から十分に得ることは難しい。今回の検討では、NNS 患者由来 iPS 細胞から分化させた単球でプロテアソーム活性を評価することに成功した。これは病態の根幹となる異常であるので、iPS 細胞を使って病態解析が可能であると期待される。

引き続き、細胞生物学的な解析を行い、NNS の病態解明と治療法開発につなげたい。

E. 結論

自己炎症性疾患患者の病態を、iPS 細胞を用いて解析している。NNS については、病態の根幹となるプロテアソーム活性の評価に成功した。他の疾患についても、随時樹立と解析を進めてゆきたい。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakagawa K, Gonzalez-Roca E, Souto A, Kawai T, Umabayashi H, Campistol JM, Cañellas J, Takei S, Kobayashi N, Callejas-Rubio JL, Ortego-Centeno N, Ruiz-Ortiz E, Rius F, Anton J, Iglesias E, Jimenez-Treviño S, Vargas C, Fernandez-Martin J, Calvo I, Hernández-Rodríguez J, Mendez M, Dordal MT, Basagaña M, Bujan S, Yashiro M, Kubota T, Koike R, Akuta N, Shimoyama K, Iwata N, Saito MK, Ohara O, Kambe N, Yasumi T, Izawa K, Kawai T, Heike T, Yagüe J, Nishikomori R, Aróstegui JJ. Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis.* 2013 Dec 10. [Epub ahead of print]

2. Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T. Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica.* 2013 Aug 23. [Epub ahead of print]

3. 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.* 2013;8(4):e592437.

2. 学会発表

1. 特別講演： 齋藤潤 「疾患 iPS 細胞を用いた血液

- 疾患の病態解析」第17回九州小児血液セミナー，福岡，2013
2. シンポジウム講演：齋藤潤 「iPS細胞を用いた自己炎症性疾患の解析について」第57回日本リウマチ学会総会・学術集会，京都，2013
 3. シンポジウム講演：齋藤潤 「iPS細胞を用いた自己炎症性疾患の解析について」第57回日本リウマチ学会総会・学術集会，京都，2013
 4. シンポジウム講演：齋藤潤 「疾患 iPS細胞を用いた自己炎症性疾患の病態解析」10th Bloodmaster，京都，2013
 5. 国際学会ポスター発表：Megumu K. Saito 「Disease modeling and drug discovery using iPS cells from CINCA syndrome patients」15th International Congress of Immunology, Milano, Italy, 2013
 6. 特別講演：齋藤潤 「疾患 iPS細胞を用いた小児疾患の病態解析」京津小児診療最前線セミナー2013，京都，2013
 7. シンポジウム講演：齋藤潤 「疾患 iPS細胞を用いた血液・免疫疾患の病態解析」疾患特異的 iPS細胞を利用した病態解明・創薬開発セミナー，東京，2013
 8. 全体講演 A：齋藤潤 「疾患 iPS細胞を用いた病態解析と創薬の試み」第4回スクリーニング学研究会，東京，2013
 9. シンポジウム講演：Megumu K. Saito 「Disease-specific iPS cells derived from patients with hematological and immunological disorders」CiRA symposium, 吹田，2014

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

小児 CINCA 症候群患者における動脈硬化の進行

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

慢性炎症性疾患では、動脈硬化が進行しやすいことが明らかになってきている。CINCA 症候群は IL-1 β の過剰産生により、新生児期から著しい全身の炎症性病変を来す疾患である。CINCA 症候群で動脈硬化が評価された報告はない。今回、超音波断装置および血圧脈波検査装置を用いて、動脈硬化指数である、Intima-media thickness (IMT)、Stiffness-parameter β 、pulse wave velocity などを測定したところ、小児 CINCA 症候群患者 3 名いずれも異常値であり、CINCA 症候群では小児期から動脈硬化性変化を来している事が確認された。

A. 研究目的

CINCA 症候群は、Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) の最重症型であり、新生児期から皮疹や発熱などで発症し、次第に、関節症、ブドウ膜炎、無菌性髄膜炎などの全身性の慢性炎症による症状を呈し、長期的にはアミロイドーシスによる臓器障害を呈する疾患である。Cryopyrin を code する NLRP3 遺伝子変異によって、Caspase1 の活性化が持続する結果、IL-1 β の過剰産生がおこることがその病態である。

他方、近年、慢性的な炎症が、動脈硬化性変化を来すことが知られるようになり、実際に、成人では慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、家族性地中海熱などでは、動脈硬化のリスクが高いことが報告されている⁽¹⁻⁴⁾。また小児でも慢性的な炎症は、動脈硬化のリスクであるとアメリカ心臓協会が報告している⁽⁵⁾。

今回、CINCA 症候群 3 名の動脈硬化指数を測定し、CINCA 症候群における強い全身性の慢性炎症状態によって、小児期から動脈硬化性変化が生じていることを明らかにした。

B. 研究方法

CINCA 症候群 3 名、age-match 健常者 19 名を対象として研究を行った。CINCA 症候群 3 名はいずれも NLRP3 遺伝子変異が確認されている。3 名の CINCA 症候群患者および健常者の臨床データを Table. 1 に示す。

	Case 1	Case 2	Case 3	NOMID/CINCA patients (n = 3)	Control subjects (n=19)	p value
Male/female	Male	Female	Male	2 / 1	9 / 10	0.53
Age (years)	5	7	15	9.0 \pm 5.3	9.3 \pm 4.3	0.65
Body mass index (kg/m ²)	16.0	15.5	16.8	16.1 \pm 0.6	17.3 \pm 2.9	0.51
Systemic blood pressure (mmHg)	91	96	128	105 \pm 20	99 \pm 8	0.38
Diastolic blood pressure (mmHg)	45	50	68	54 \pm 12	53 \pm 4	0.73
Total cholesterol (mg/dl)	123	122	131	125 \pm 5	159 \pm 17	0.0046
triglyceride (mg/dl)	61	79	157	99 \pm 51	70 \pm 28	0.17
C-reactive protein (mg/l)	6.76	7.11	3.40	5.76 \pm 2.05	0.08 \pm 0.16	<0.0001
Glucose (mg/dl)	93	85	102	94 \pm 3	94 \pm 6	0.95

頸動脈超音波検査は、Philips iE33 を用いて行った。Intima-media thickness (IMT) は心拡張末期に測定した。Stiffness parameter β は $B = [\ln(SBP/DBP)] / (\Delta D/D)$ の式で算出した (SBP : systolic blood pressure、DBP : diastolic blood pressure、D : 経度脈拡張期径、 ΔD : 収縮による頸動脈径の変化)。

Pulse wave velocity (PWV) と ankle brachial index (ABI) は、BP-203RPEIII (Omron) を用いて測定した。

(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

Table 2 で示すように、IMT と stiffness parameter β は、健常者と比較して、CINCA 症候群患者で有意に高かった。

また、Table 3 に示すように、PWV も CINCA 症候群患者では有意に健常者よりも高い値であった。他方、ABI は両群に有意差は認められなかった。

	Case 1	Case 2	Case 3	NOMID/CINCA patients (n = 3)	Control subjects (n=19)	p value
Intimal media thickness (mm) (normal value of each age)	0.47 (0.40)	0.5 (0.40)	0.57 (0.50)	0.51±0.05	0.44±0.04	0.0021
Systolic diameter (mm)	5.5	5.8	5.8	5.7±0.2	6.2±0.8	0.30
Diastolic diameter (mm)	4.8	5.2	5.4	5.1±0.3	5.3±1.7	0.63
Stiffness parameter β (normal value of each age)	4.8 (3.4)	5.7 (3.7)	7.6 (4.5)	6.1±1.7	3.9±1.0	0.018

	Case 1	Case 2	Case 3	NOMID/CINCA (n = 3)	Control subjects (n=19)	p value
Right baPWV (cm/s)	1068	920	1566	1185±338	850±114	0.0025
Left baPWV (cm/s)	1053	1022	1587	1221±318	859±114	0.0014
Averaged baPWV (cm/s) (normal value of each age)	1061 (<941)	971 (<919)	1577 (1041)	1203±328	855±114	0.0017
Right ABI	1.15	0.91	0.98	1.00±0.10	1.04±0.10	0.67
Left ABI	1.16	0.95	0.92	0.99±0.10	1.06±0.10	0.48
Averaged ABI (normal value of each age)	1.16 (>1.00)	0.93 (>1.00)	0.95 (>1.00)	0.99±0.10	1.05±0.10	0.54

D. 考察

近年、動脈硬化における炎症病態の関与が明らかになってきた。慢性関節リウマチやSLE患者における病勢の強さと、心血管系合併症との関連が示されている。炎症性サイトカインによる血管内皮障害がアテローム性動脈硬化病変を誘発しているものと考えられる。また炎症病態における脂質代謝異常も、血管内皮、血管平滑筋細胞、およびアテローム動脈硬化病変における免疫担当細胞なども、この病態に関与しているものと推測される。

CINCA 症候群では、長期的に全身性の強い炎症が持続することから、今回の結果は、CINCA 症候群患者の長期的な管理において、貴重な示唆を与えるものであると考えられた。また、IL-1 blocker による治療が、CINCA 症候群患者の動脈硬化性病変に、どのように影響してくるのか、今後、長期的な観察が必要であろう。

E. 結論

CINCA 症候群では、全身性の慢性炎症のため、動脈硬化性病変が小児期から認められることが明らかになった。

参考文献

- 1) Bacon PA, Stevens RJ, Carruthers DM, Young SP, Kitas GD. Accelerated atherogenesis in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2002;1:338-47.
- 2) Manzi S, Wasko MC. Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. *Ann Rheum Dis* 2000;59:321-5.
- 3) Haskard DO. Accelerated atherosclerosis in inflammatory rheumatic diseases. *Scand J Rheumatol* 2004;33:281-92.
- 4) Tyrrell PN, Beyene J, Feldman BM, McCrindle BW, Silverman ED, Bradley TJ. Rheumatic disease and carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1014-26.
- 5) Kavey RE, Allada V, Daniels SR, et al.

Cardiovascular risk reduction in high-risk pediatric patients: a scientific statement from the American Heart Association Expert Panel on Population and Prevention Science; the Councils on Cardiovascular Disease in the Young, Epidemiology and Prevention, Nutrition, Physical Activity and Metabolism, High Blood Pressure Research, Cardiovascular Nursing, and the Kidney in Heart Disease; and the Interdisciplinary Working Group on Quality of Care and Outcomes Research: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* 2006;114:2710-38.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Ninomiya T, Takada H, Nagatomo Y, Nanishi E, Nagata H, Yamamura K, Doi T, Ikeda I, Hara T: Development of Kawasaki disease in a patient with PFAPA. *Pediatrics International* 2013, 55: 801-2
2. Higuchi Y, Shimizu J, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Takada H, Ishimura M, Hara T, Ohara O, Asagoe K, Kubo T: The identification of a novel splicing mutation in ClqB in a Japanese family with Clq deficiency: a case report. *Pediatr Rheumatol Online J.* 11(1): 41, 2013
3. 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.* 23(3): 425-9, 2013
4. Imagawa T, Nishikomori R, Takada H, Takeshita S, Patel N, Kim D, Lheritier K, Heike T, Hara T, Yokota S: Safety and efficacy of canakinumab in Japanese patients with phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndrome as established in the first

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

open-label, phase-3 pivotal study (24-week results). Clin Exp Rheumatol. 31: 302-9, 2013

学会発表

Yamamura K, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Takada H, Ohga S, Hara T: Early progression of atherosclerosis in children with cryopyrin-associated periodic syndrome. May 9-12, 2013, Sarawak, Malaysia

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

なし。

厚生労働省科学研究費補助金
分担研究報告書

Chronic recurrent multifocal osteomyelitis(CRMO)/chronic non-bacterial
osteomyelitis(CNBO)の診断プロセスと治療選択に関する研究

研究分担者 横田 俊平 横浜市立大学大学院医学研究科発生成育小児医療学教授
研究協力者 阿多由梨加 神奈川県立こども医療センター
西村 謙一 横浜市立大学大学院医学研究科
今川 智之 神奈川県立こども医療センター

研究要旨：骨髄における自己炎症疾患である CRMO/CNBO について、効率的な診断の
手順の検討を行い、実際の治療を通じて治療反応の多様性について検討を行った。
CRMO と CNBO とは、多巣性か、単巣性かの違いで分けられている。臨床的には罹患
部位の疼痛と患部を覆う皮膚に炎症を認め、血液検査上は炎症所見を認めるが、変化の
ない例も多い。患部の単純 X 線で骨病変を検索後、FDG-PET により多巣性か単巣性か
を確定する。次いで MRI により骨髄炎所見を確定する。当科の CRMO 16 例の検討で
は、FDG-PET→MRI で骨髄炎を確定した部位は平均 11.5 カ所であった。足根骨、距
骨、足趾の頻度が高く、一部に鎖骨内側 1/3 部位に骨髄炎を認めた。12 例の骨髄病理
組織ではリンパ球・組織球の浸潤を認め、細菌培養及び multiplex PCR により感染性
骨髄炎との鑑別を行った。骨髄中のサイトカインの検討も行った。治療には
NSAID+biphosphonate を用いた。16 例中 11 例では軽快したが 5 例で増悪し、TNF α
阻害薬、IL-6 阻害薬を用いて症状、検査所見の改善が得られた。

A. 研究目的

最近、CRMO は自己炎症疾患に属する
疾患とされるようになったが、一般の疾
患認識はいまだ低い。責任遺伝子座は確
定されていないが、過剰な炎症性サイト
カインにより病態が形成され、実際、サ
イトカイン阻害薬により治療が可能とな
ってきた。そこで、診断の手順および治
療選択のプロセスを明らかにし、早期診
断を可能とするために研究を行った。

B. 研究方法

当科で経験された CRMO 16 例につい

て、臨床所見、検査手順、診断確定方法
について後方視的に症例検討を行った。
各症例について実施された治療法を評価
し、治療手順について検討した。

C. 研究結果

1. 診断の手順と結果

臨床症状は当該皮膚の発赤と疼痛で始
まり、皮膚炎症の基盤に下層の骨病変を
示唆する所見を認めた。血液検査では、
CRP や赤沈値などの炎症マーカーが上昇
するが、必ずしも強い炎症を示唆する数
値ではなく、炎症マーカーが正常値をと

る例も稀ではなかった。画像検査では骨 Xp により骨髄の乱れ、濃淡の陰影、骨破壊などを認め、同部位の MRI により骨髄炎の所見を得られた。ついで、FDGF-PET により多巣性を証明した。なお、Tc-骨シンチグラフィで代用することも可能であると思われた。診断確定には骨生検を行い、無菌性の証明、骨髄組織所見、骨髄液中の炎症性サイトカインの測定を行った。

CRMO 16 例の検討では、骨髄炎を呈した骨は平均 11.5 カ所であり、単一の骨に留まる例はなかった。骨髄炎を認めた骨は、足趾節骨(33%)、手指節骨(31%)、脛骨(11%)、大腿骨(8%)、腓骨(7%)、踵骨(6%)、骨盤骨(1%)、鎖骨(1%)であった。骨髄液の培養はすべて陰性、multiplex PCR 法によっても陽性例はなかった。骨髄の組織所見は、リンパ球、組織球の浸潤から慢性炎症を示唆する所見であった。炎症性サイトカインは TNF α および IL-6 の著増が認められる例が目立った。

2. 治療の手順

全例に NSAID + Bisphosphonate の投与が行われた。その結果、16 中 11 例に改善が認められた。残りの 5 例については骨髄中の炎症性サイトカインの結果から、TNF α 阻害薬 (4 例)、IL-6 阻害薬(1 例)を用いたところ、いずれも改善が認められた。

D. 考察

責任遺伝子座はいまだ明らかではないものの、炎症のメカニズムに不具合が生じて骨髄の持続的炎症を起こしたものが CRMO であろう。現在、次世代シーケンサーを用いて解析を進めている。

CRMO 16 症例について後方視的に解析した結果、本症の診断は、1)臨床所見の把握、2)当該骨の単純 X 線検査、3)異常所見を得た骨の MRI 検査、4)骨髄炎が疑われたならば FDG-PET を行い、多巣性を証明する、5)病巣の大きな部位 (骨生検を前提にする) に対して MRI 検査を行う、6)骨生検を行う (培養・multiplex PCT、病理組織、炎症性サイトカインの検索) と、手順を踏んで行い、最終的に骨髄の生検により診断確定を行っていた。したがって、診断はこのような手順を行うことが推奨される。

治療は、NSAID + Biphosphonate が第一選択となる。約 1/3 の例は治療抵抗性で生物学的製剤を必要としたが、この場合も骨髄液中の炎症性サイトカインのプロファイルをもとに薬剤選択を行う必要がある。現在の問題は、治療当初より生物学的製剤を用いるべきか否かという点である。今後、症例数を増やして前方視的な研究をすすめる必要がある。

E. 結論

わが国の CRMO 症例の報告はきわめて少ない。今回、神奈川県内で経験した 16 例の報告を行ったが、全国的には未診断例が多数存在するものと思われる。疾患認知度が低いためであるのか、長期予後が比較的良好であるために未診断であった対症療法で改善が図られてしまうのか、原因は不明である。

今回の CRMO 16 症例の臨床症状、検査の手順などを参考に診断の手引きを作成して積極的に診断に至る過程を示した。正確な診断が可能となることにより多数の症例を重ね、その結果、病因を明らか

にできる機会が得られればよいと思われる。

臨床症状では、皮膚の発赤から骨髓炎を推定できる臨床能力の涵養が必須で、血液検査からは炎症マーカーの上昇が必ずしも認められるわけではないこと、局所の Xp・MRI から骨髓炎が疑われたならば、FDG-PET により多巣性を証明する努力が必要であることなどが明らかになった。骨生検では、無菌性を証明し、病理検査では慢性炎症所見を得て、さらに炎症性サイトカインの同定が治療選択に重要であることも判明した。

治療は、2/3 の例が NSAID および Bisphosphonate の併用で改善をみたが、1/3 の例では生物学的製剤を導入せざるを得なかった。したがって、第一選択は NSAID +Bisphosphonate で、不応例に対して生物学的製剤を用いるのがよいか、第一選択薬としてはじめから生物学的製剤を用いるのがよいか、今後症例を重ねて検討を行うことが求められる。

F. 研究発表

1. 永嶋早織、野澤 智、木澤敏毅、他。
間質性筋炎を呈した慢性再発性多発性骨・骨髓炎の 1 男児例。日本臨床免疫学会会誌 2013;36:52-57.
2. 第 40 回日本関節病学会 : Chronic non-bacterial osteomyelitis の 6 例 (2012 年 11 月 8-9 日)。
3. International Federation of Paediatric Orthopaedic Societies (Toronto, Canada). Disease characteristics and clinical outcome of 11 cases with chronic non-bacterial osteomyelitis.

(2013.5.1-4).

4. 第 86 回日本整形外科学会 : Chronic non-bacterial osteomyelitis の 6 例 (2013 年 5 月 23-26 日)
5. 第 24 回日本小児整形外科学会 : Disease features and clinical outcome of 16 cases with chronic non-bacterial osteomyelitis. (2013 年 11 月 8-9 日)
- 6.

自己炎症性疾患治療薬開発へ向けた IL-18・受容体の高次会合体構造解析

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 名誉教授

研究要旨

背景: インターロイキン(IL-)18 は、IL-1 β と同様の機構でインフラマソームの起動により活性化される炎症性サイトカインである。家族性地中海熱、全身型若年性特発性関節炎等で血清中に高濃度に検出されることから、自己炎症性疾患におけるバイオマーカーや治療標的として注目されている。

目的: IL-18 は、IL-18 受容体 α 鎖及び β 鎖と結合し複合体を形成することでシグナル伝達を開始するが、その詳細な結合様式は不明であった。本研究では、抗 IL-18 薬開発を目的として、IL-18 リガンド・受容体複合体の蛋白立体構造解析を行った。

方法: 大腸菌及び昆虫細胞でタンパクを発現・精製し、結晶化タンパクから得た X 線回折情報を基に構造解析を行った。構造情報から得られた相互作用部位について変異導入を行い、タンパク間相互作用を検討した。

結果: IL-18 の受容体認識機構は、従来の予測とは異なり、IL-1 と受容体の結合様式に類似していた。しかし、結合面の微細構造には差異が認められた。

考察: タンパクの高次複合体構造は、阻害剤開発における重要な創薬基盤であり、現在、すでに決定された IL-1 高次構造を基に *in silico* の低分子スクリーニングを実施しているが、今回明らかにした新規構造により、抗 IL-18 薬についても実施可能となった。

研究協力者

大西秀典(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)

木村豪(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)

堤尚孝(京都大学大学院工学研究科生体分子機能化学講座)

枋尾豪人(京都大学大学院工学研究科生体分子機能化学講座)

A. 研究目的

インターロイキン(IL-)18 は、IL-1 β と同様に病原体関連分子パターン(PAMPs)刺激等によりその前駆体が発現し、Caspase-1 の活性化により前駆体から活性型に変換されその生理作用を発現する炎症性サイトカインである。種々のアレルギー疾患や自己免疫疾患の発症への関与が報告されているが、自己炎症性疾患においてもその関与が指摘されている。家族性地中海熱やクライオパイリン関連周期熱症候群(うち重症例)で血清 IL-18 値が高値を示すことが報告されており、また全身型若年性特発性関節炎において血清 IL-18 値が著増することが知られている。さらに、最近 Hoffman HMらによって CAPS モデルマウスにおいては IL-1 シグナルを遮断するより、IL-18 シグナルを遮断した方が組織への炎症細胞浸潤や血清サイトカイン上昇が有意に抑制されることが報告されている(Brydges SD et al., J Clin Inv. 2013)。すなわち、抗 IL-18 薬の

開発は抗 IL-1 薬以外の新たな自己炎症性疾患の治療戦略のひとつになりうると考えられる。本研究では、IL-18-IL-18R α -IL-18R β の複合体分子構造を決定することで、新規抗 IL-18 薬設計の基盤情報を得ることを目的とした。

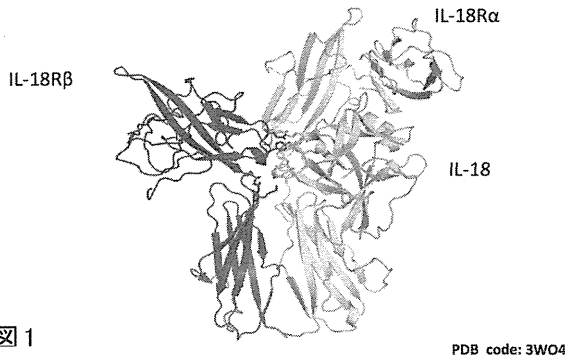
B. 研究方法

1. pGEX 系 plasmid に IL-18 をコードする遺伝子を導入し、大腸菌 BL21(DE3)にて GST fusion IL-18 を発現させ、アフィニティー精製、ゲル濾過精製を経て高純度の IL-18 タンパクを得た。
2. pFastBac1 plasmid に his tag を付加した IL-18R α 及び IL-18R β をコードする遺伝子を導入し、Bacmid を精製、SF9 細胞に感染させ、培養上清中に IL-18R α 及び IL-18R β を発現させた。アフィニティー精製、ゲル濾過精製を経て高純度の受容体タンパクを得た。
3. IL-18, IL-18R α , IL-18R β 混合溶液をゲル濾過精製し、高純度の 3 者複合タンパクを得た。
4. 蒸気拡散法により 3 者複合タンパクを結晶化し、放射光実験施設を利用して X 線回折像を得る事で、構造解析を行った。
5. 得られた構造情報から推定される結合サイトについて、IL-18, IL-18R α , IL-18R β それぞれにアミノ酸置換を導入した発現 plasmid を作成した。
6. IL-18 変異型タンパクは BL21(DE3)で発現精製し、IL-18R α 、及び IL-18R β 変異型タンパクはそれぞれ蚕を使用して発現精製した。
7. IL-18, IL-18R α , IL-18R β それぞれの野生型、変

異型タンパクを使用して表面プラズモン解析によるタンパク間相互作用の検討を行った。

C. 研究結果

Overall structure of the IL-18 complex



1. 決定されたIL-18-IL-18R α -IL-18R β の3者複合体構造を図1に示す。構造情報はProtein data bankに登録した(PDB code: 3WO4)。従来予測されていた結合構造(Kato Z. et al., Nat Struc Biol. 2003)とは異なり、2010年にWangらによって報告されたIL-1 β -IL-1RII-IL-1RAcPの3者複合体構造の結合構成と類似していた(Wang D. et al., Nat Immunol. 2010)。

2. 得られた構造を参照すると、IL-18表面の2箇所(Site α 1, Site α 2とした)でIL-18R α と結合し、IL-18とIL-18R α の結合により形成される領域にIL-18R β が結合している(IL-18側をSite β とした)。この3箇所のSiteに関与すると推測されるアミノ酸残基群を置換したタンパクを使用して表面プラズモン解析を行ったところ、一部のアミノ酸置換で結合の欠損、その他で結合力の低下が観測され、結晶構造の溶液中での妥当性が確認された。

D. 考察

タンパク立体構造情報を利用した *in Silico* の薬剤候補シード化合物のスクリーニングが広く行われている。先行して決定された IL-1 β -IL-1RI-IL-1RAcP の 3 者複合体構造(PDB code: 4DEP)を元に IL-1 β 阻害低分子の選定を行っており、有望なデータが得られている(未発表データ)。同様の戦略により今回決定された IL-18-IL-18R α -IL-18R β の 3 者複合体構造の情報を元にして IL-18 阻害低分子のスクリーニングを進める予定である。

E. 結論

IL-18, IL-18R α , IL-18R β の 3 者複合体の結晶構造を決定した。相互作用様式は IL-1 β と受容体のものと類似していたが、直接相互作用に関与するアミノ酸

残基が異なる等、詳細な分子構造には差異がみられた。今回得られた構造情報に基づいて、今後 *in Silico* の低分子スクリーニングが可能となった。抗IL-18薬は、自己炎症性疾患の新たな治療戦略のひとつとして期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文業績

1. Yamamoto T, Tsutsumi N, Tochio H, Ohnishi H, Kubota K, Kato Z, Shirakawa M, Kondo N. Functional assessment of the mutational effects of human IRAK4 and MyD88 genes, Mol Immunol. 2014;58:66-76.
2. Ebisawa M, Nishima S, Ohnishi H, Kondo N. Pediatric allergy and immunology in Japan. Pediatr Allergy Immunol. 2013 Nov;24(7):704-14.

学会発表

1. 大西秀典, 寺本貴英, 久保田一生, 加藤善一郎, 近藤直実. カナキヌマブで治療した家族性寒冷自己炎症性症候群症例の免疫プロファイルの推移. 第116回日本小児科学会総会. 2013年4月19-21日(広島).
2. 大西秀典, 寺本貴英, 久保田一生, 加藤善一郎, 近藤直実. カナキヌマブで治療した家族性寒冷自己炎症性症候群の1家系の免疫プロファイルの推移. 第25回日本アレルギー学会春期臨床大会, 2013年5月11-12日(横浜).
3. Takeshi Kimura, Naotaka Tsutsumi, Hidenori Ohnishi, Hidehito Tochio, Mariko Ariyoshi, Kyohei Arita, Zenichiro Kato, Masahiro Shirakawa, Naomi Kondo. Structural analysis of the interleukin-18 ligand-receptor complex for the development of new therapeutic molecules. 第50回日本小児アレルギー学会, 2013年10月19-20日(横浜).

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25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・教授)

研究要旨

当院および全国の施設から紹介された422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。1) 375例の *MEFV* 遺伝子検索では、FMF 確実例(M694I;I/I,M/I)は19例(5.1%)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61例(16.3%)であった。3) 404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(3.7%)(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77.5%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25年度には、第7回自己炎症疾患研究会を平成26年2月1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、シークエンスを行った(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、第7回自己炎症疾患研究会を平成26年2月1日にベルサール八重洲で開催した。

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422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	12	3.2
M694I/E148Q/L110P	2	0.5
M694I/normal	4	1.1
E148Q/E148Q	4	1.1
E148Q/E148Q/L110P/L110P	2	0.5
E148Q/E148Q/L110P	3	0.8
E148Q/E148Q/P369S/R408Q	5	1.3
E148Q/L110P	40	10.7
E148Q/L110P/P369S	1	0.3
E148Q/L110P/E84K	1	0.3
E148Q/L110P/G304R	2	0.5
E148Q/E84K	2	0.5
E148Q/R202Q	1	0.3
E148Q/P369S/R408Q	6	1.6
E148Q/P369S/L110P	1	0.3
E148Q/P369S	1	0.3
E148Q/normal	64	17.1
E84K/normal	11	2.9
R202Q/G304R	1	0.3
R202Q/normal	6	1.6
G304R/normal	7	1.9
R354Q/normal	1	0.3
E225K/P369S/R408Q	1	0.3
P369S/R408Q	12	3.2
P369S/normal	1	0.3
*9C>T	1	0.3
Normal	182	48.5
Total	375	100

遺伝子多型もあるが、375 症例中のべ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 19 例(5.1%)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 61 例(16.3%)であった。

2) TNFRSF1A

TNFRSF1A 遺伝子のエキソン 2,3,4 の突然変異は 404 症例中 15 例(T61I ; 9 例、C88Y ; 1 例、その他 5 例) 3.7%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。」

今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 7 回自己炎症疾患研究会のお知らせ

平成 26 年 2 月 1 日 13 時-16 時 30 分

場所：フクラシア東京ステーション会議室K (5階)

東京都千代田区大手町2-6-1 朝日生命大手町ビル (東京駅近く)

入場無料

自己炎症疾患は、主に遺伝的な要因を背景として発症する炎症を基本病態とした疾患群です。概念の提唱から 10 年強と歴史が浅く、診断に苦慮する症例や有効な治療法のない疾患が存在するなど、患者さんのニーズに十分応えられていないのが現状ですが、昨年度には厚生労働省“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” 研究班が立ち上げられ、病態解明に向けた基礎的研究・各疾患の診療フローチャートや患者登録システムの整備・WEB サイトの作成等、診療基盤体制の整備が進められています。

第 7 回研究会では、前回に引き続いて代表的な疾患に関する最新の知見や治療等に関する講演を予定すると共に、“代謝性疾患と炎症” をトピックとして取り上げ、東京医科歯科大学の小川佳宏先生に“生活習慣病と慢性炎症”、オランダ・ユトレヒト大学 Joost Frenkel 先生に“メバロン酸キナーゼ欠損症” について特別講演を行って頂く事となりました。昨年と同様、診断・治療に苦慮している症例や教訓的な症例などを供覧する時間も予定しておりますので、奮ってご参加下さいますようお願い申し上げます。

症例提示をご希望の先生は、平成 26 年 1