

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

原発性免疫不全症候群および自己炎症性疾患の疾患特異的 iPS 細胞を用いた原因・病態解析

分担研究者 原 寿郎 九州大学大学院医学研究院成長発達医学 教授

研究要旨

平成 25 年度に X 染色体不活化異常を基盤として発症した女性 Bruton 無ガンマグロブリン血症 (XLA) 患者由来の iPS 細胞を樹立した。平成 26 年度は、女性 Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) 患者由来の iPS 細胞を樹立するとともに、X 染色体不活化の解析および薬剤スクリーニングのために、X 染色体の活性化状態を評価する新規手法の開発に着手した。また、自己炎症性疾患における動脈硬化および血管炎合併の病態解析のため、新たに CINCA 症候群、家族性地中海熱、および PAPA 症候群患者由来の iPS 細胞を樹立し、血管内皮細胞への分化誘導実験を行った。樹立した iPS 細胞を用いて in vivo での疾患モデルを確立し、創薬研究を実施する予定である。

A. 研究目的

(1) X 染色体不活化異常を基盤として発症した原発性免疫不全症

Bruton 無ガンマグロブリン血症 (XLA)、Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) は、原発性免疫不全症の代表的疾患であり、X 連鎖劣性遺伝子形式をとる。それぞれ BTK 遺伝子異常、WASP 遺伝子異常が原因である。XLA は、ガンマグロブリン補充療法を受けていても感染症がおこりやすく、また悪性腫瘍の合併頻度も高い。WAS は、血小板減少、難治性湿疹、易感染性によって生活の質が低下し、造血幹細胞移植療法以外では、長期的には悪性腫瘍や自己免疫疾患を高率に合併する。いずれも、高い QOL を確保し、長期生存を得るためには、新たな治療戦略が必要である。

これらの 2 疾患は通常男性にしか発症しないが、我々は、世界で初めて女性 XLA 患者、および世界的に極めて稀である女性 WAS 患者を同定し、いずれも、X 染色体不活化異常が発症に寄与していることを明らかにした。健常女性の X 染色体の 1 つはランダムに不活化されているが、女性 iPS 細胞では、培養条件等により X 染色体不活化の解除がおこることが明らかにされている。iPS 細胞の X 染色体不活化をコントロールすることができれば、女性 XLA 患者、女性 WAS 患者のみならず、X 連鎖劣性遺伝性疾患の新たな治療法に応用できる可能性がある。

健常女性、およびこれらの 2 名の患者由来の iPS 細胞を樹立し、X 染色体不活化機構に関わる分子機構を明らかにし、X 染色体不活化を解除・コントロールする薬剤を同定することを本研究の目的とする。

(2) 自己炎症性疾患における動脈硬化および血管炎

合併の病態解析

自己炎症性疾患とは臨床的には発熱や関節症状などを認め、特定の病原体や抗原が関与せずに自然免疫系の機能亢進がみられる疾患である。CINCA 症候群、家族性地中海熱および PAPA 症候群 (化膿性関節炎・壊疽性膿皮症・座瘡症候群) は、乳児期早期より発症する関節症、中枢神経病変、皮疹などを特徴とする自己炎症症候群である。それぞれ責任遺伝子として、NLRP3、MEFV および PSTPIP1 が知られており、これらの異常により inflammasome の活性化を引き起こし、Caspase1 活性化、IL-1 などの炎症性サイトカインの産生亢進が病態と考えられている。

他方、近年、慢性的な炎症が、動脈硬化性変化を来する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。炎症と動脈硬化発症の機序として、血管内皮細胞内でコレステロール結晶が NLRP3 inflammasome および IL-1 依存性の炎症を惹起することが注目され、近年多数の論文が発表されている。また小児でも慢性的な炎症は、動脈硬化のリスクであり、平成 26 年当施設より CINCA 症候群患児における動脈硬化合併を報告した。

疾患由来 iPS 細胞を用いて、炎症と血管炎・動脈硬化合併の病態を解明したい。

B. 研究方法

(1) X 染色体不活化異常によって発症した、XLA 患者および健常女性の iPS 細胞の X 染色体活性化状態を

評価する新規手法の開発に取り組んだ。

(2) iPS 細胞の作成、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞の分化誘導、解析

FMF、PAPA 症候群の疾患由来 iPS 細胞を樹立した。CINCA 症候群 iPS 細胞は、熊本大学の協力を得て樹立した。疾患由来および健常人由来 iPS 細胞より、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞へ分化誘導を行い、得られた細胞を解析した。

(倫理面への配慮) 研究を行うに当たり、九州大学倫理委員会の指針に基づき、承認を得て informed consent を取得の上で解析を行った。

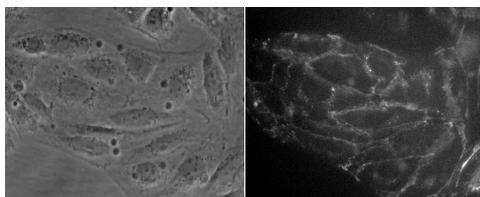
C. 研究結果

(1) X 染色体の活性化状態を評価する新規手法の開発に着手した。

(2) CINCA 症候群、FMF、PAPA 症候群の患者から iPS 細胞を作成した。樹立の方法は、センダイウイルスを用いて Oct3/4, c-Myc, Klf4, Sox2 の 4 遺伝子を末梢血由来の T リンパ球に組み込み、iPS 細胞へと再プログラムした。未分化マーカー発現を免疫染色で確認した。現在、血管内皮細胞や血管壁細胞への分化誘導系を確立する予定であり、健常人由来 iPS 細胞の胚葉体形成を行い、血管内皮細胞および平滑筋細胞への分化誘導を行った。それぞれ、VE-cadherin および SMA の発現を免疫染色で確認した。

正常 iPS 細胞から分化誘導した血管内皮細胞

(左: 位相差 右: VE-cadherin)



D. 考察

(1) X 染色体の活性化状態を評価する新規手法の開発に取り組んでいる。これを基盤として、X 染色体不活化を解除・制御する創薬研究を行う。同時に、X 染色体不活化機構の解明研究を継続する。

(2) 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。疾患由来 iPS 細胞を用いる事により、疾患の特徴を持つ血管内皮細胞および血管平滑筋細胞を詳細に検討することにより、自己炎症疾患における血管炎・動脈硬化の機序解明に寄与する可能性がある。

E. 結論

(1) 現在開発中の X 染色体活性化状態の評価技術を基盤として、X 染色体不活化を解除・制御する創薬研究を行う。同時に、X 染色体不活化機構の解明研究を継続する。

(2) CINCA 症候群、FMF、PAPA 症候群の 3 疾患の患者由来 iPS 細胞を樹立した。また健常人由来 iPS 細胞を血管内皮細胞および血管壁細胞へと分化誘導を行った。今後は、樹立した iPS 細胞の機能評価、効率のよい分化誘導系の確立、炎症性サイトカインや mRNA の発現解析を行う予定である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書へ記載

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takimoto T, Takada H, Ishimura M, Kirino M, Hata K, Ohara O, Morio T, Hara T: Wiskott-Aldrich syndrome in a girl caused by heterozygous WASP mutation and extremely skewed X-chromosome inactivation: A novel association with maternal uniparental isodisomy 6. Neonatology. 2015;107(3):185-90.

2) Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Hu W, Kobayashi M, Lawo JP, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T: Efficacy and safety of IgPro20, a subcutaneous immunoglobulin, in Japanese patients with primary immunodeficiency diseases. J Clin Immunol. 2014

34(2):204-11

3) Yamamura K, Takada H, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Morihana E, Ohga S, Hara T: Early progression of atherosclerosis in children with chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 53(10):1783-7

4) Koga Y, Takada H, Suminoe A, Ohga S, Hara T: Successful treatment of non-Hodgkin's lymphoma using R-CHOP in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome followed by a reduced-intensity stem cell transplant. *Pediatr Transplant*. 2014 18(6):E208-11.

5) Kanno S, Nishio H, Tanaka T, Motomura Y, Murata K, Ihara K, Onimaru M, Yamasaki S, Kono H, Sueishi K, Hara T: Activation of an Innate Immune Receptor, Nod1, Accelerates Atherogenesis in Apoe^{-/-} Mice. *J Immunol*. 2015 194(2):773-80.)

6)石村匡崇、高田英俊、原 寿郎：限られたウイルスに易感染性を示す免疫不全症（単純ヘルペス脳炎、EBV、パピローマウイルス、細胞融解型感染形式をとるウイルス）小児内科 2014

7)戸田尚子、原 寿郎：先天性免疫不全症と低栄養臨床栄養（別冊JCNセレクト9）2014

2. 学会発表

1) Hara T, Ishimura M, Takada H, Kusuda Y, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H: Association between primary immunodeficiency diseases and vasculitis syndrome. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies Oct 29-Nov 1, 2014

2) Takada H, Takimoto T, Ishimura M, Urata M, Morio T, Hara T: Wiskott-Aldrich syndrome in a girl caused by heterozygous WASP mutation and extremely skewed X-chromosome inactivation: an association of non-random X-chromosome inactivation and uniparental isodisomy 6. 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Oct 29-Nov 1, 2014

3) Ishimura M, Mizuno Y, Takada H, Ohga S, Hara T: An Early and Non-invasive Diagnostic Method

for Histiocytic Necrotizing Lymphadenitis. *FISP/M* 2014.8.30

4) 原 寿郎：自然免疫異常と小児疾患．第94回日本小児科学会大分地方会例会 2014.12.7

5) 原 寿郎：自然免疫異常と小児・成人疾患．第134回熊本小児科学会 2014.10.19

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し