

201442044A

厚生労働科学研究委託業務

難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

遺伝子変異に基づく家族性地中海熱（FMF）
インフラマソーム病態解明と
炎症制御に向けたトランスレーショナル研究
（26310301）

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 川上 純

平成27（2015）年 3月

委託業務成果報告書への標記について

委託業務に係る成果報告書の表紙裏に、次の標記を行うものとする。

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、国立大学法人長崎大学が実施した平成26年度「遺伝子変異に基づくFMFインフラマソーム病態解明と炎症制御に向けたトランスレーショナル研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告 (総括)	
遺伝子変異に基づくFMFインフラマソーム病態解明と炎症制御に向けた トランスレーショナル研究	----- 5
川上 純	
II. 委託業務成果報告 (業務項目)	
1. FMF患者の炎症性サイトカインプロファイルの包括的解析に関する研究	----- 11
川上 純	
2. 遺伝子変異に基づくFMFインフラマソーム病態解明と炎症制御に向けた トランスレーショナル研究	----- 14
右田 清志	
3. 次世代シーケンスによる家族性地中海熱 Mediterranean fever 遺伝子 (MEFV) のゲノム領域の網羅的変異検索	----- 16
吉浦 孝一郎	
4. 家族性地中海熱ならびに類似疾患におけるMEFV遺伝子変異と 臨床像、血清サイトカイン・プロファイルの多様性	----- 21
谷内江 昭宏	
5. 家族性地中海熱とその類縁疾患との識別に関する研究	----- 24
上松 一永	
6. 試験管内疾患インフラマソーム動態の解析と分子標的治療薬の探索	----- 28
増本 純也	
III. 学会等発表実績	----- 31
IV. 研究成果の刊行物・別冊	----- 49

I. 委託業務成果報告（総括）

平成26年度厚生労働科学委託業務
(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化事業(難治性疾患実用化研究事業)))
「遺伝子変異に基づく FMF インフラマソーム病態解明と炎症制御に向けたトランスレーショナル研究」
研究総括報告書

研究代表者:

川上 純 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座リウマチ・膠原病内科学分野(第一内科) 教授

研究分担者:

右田清志 国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター 病因解析研究部長

吉浦孝一郎 長崎大学原爆後障害医療研究所 教授

谷内江明宏 金沢大学大学院医歯薬保健学総合研究科小児科 教授

増本純也 愛媛大学プロテオサイエンスセンター 教授

上松一永 信州大学医学研究科感染防御学 准教授

研究要旨

家族性地中海熱(FMF)は家族性地中海熱遺伝子(*Mediterranean fever:MEFV*遺伝子)の変異・多型に起因する自己炎症疾患と考えられているが、本邦の FMF と地中海沿岸地域の FMF では、遺伝学的に同一か否かは不明な点が多い。この点を明らかにし、本邦 FMF の診断と活動性の評価におけるバイオマーカーを明らかにし、本邦 FMF インフラマソームを試験管内で再構成し、特異的な分子標的治療の開発を目指す研究を開始した。本研究班で構成したコンソーシアムで生体試料バンクを整備し、ゲノム DNA から次世代シーケンサーを用いた *MEFV* 遺伝子の全塩基配列の解析を開始した。バイオマーカーに関しては研究分担者の個別解析に加え、これに関してもコンソーシアムで集積した検体を用いての包括的なアレイ解析を開始した。インフラマソームの再構成に関しては、変異を有する複数のインフラマソーム構成蛋白質の合成に成功し、現在、この試験管内インフラマソーム再構成系を用いてインフラマソームや pyrin の働きを直接制御する化合物の探索を進め、インフラマソームを制御する複数の化合物候補を選定中である。これら情報を研究班全体で共有かつ討議し、次年度の臨床情報を含めての結果の包括的な整合性の評価、遺伝子異常の知見の分子機構への展開、FMF の新たな分子標的治療の確立に向けてのロードマップを策定した。

A.研究目的

家族性地中海熱(FMF)は家族性地中海熱遺伝子(*Mediterranean fever:MEFV*遺伝子)の変異・多型に起因する自己炎症疾患と考えられている。しかしながら本邦の FMF においては通常シーケンスにおける *MEFV* 遺伝子のヘテロ変異/多型、もしくは *MEFV* 遺伝子変異を認めない症例が、全体の 90%を占めることが明らかとなっている。すなわち、FMF には *MEFV* 遺伝子以外の疾患遺伝子が存在する可能性があり、その全貌の理解には、*MEFV* 遺伝子の全ゲノム解析を実施し、その変異/多型遺伝子で構成されるインフラマソームの解析が必須であることが示された。今研究班ではその目標に向かい、以下の研究方法を立案し、研究を開始した。

B.研究方法

1.専門医コンソーシアムの形成と生体試料バンクの構築
本研究班で集積した血清検体を用いた(FMF、健常人、疾患コントロールとして成人スティル病、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス)。血清の包括的な解析は川上が担当し、Human Cytokine/Chemokine Panel 1 の 41 Plex プレミックス(41 分子の打ち分けはメルクカタログを参照された)、カスタムでの IL-18、SDF-1 α 、sCD54、sCD106) の 45 分子で、炎症性サイトカイン/ケモカイン、増殖因子を網羅した。また、これらの発現機序の解析に関しては、血清からの分泌型 miRNA を TORAY のアレイで行った。これらの包括的な解析に加え、各研究分担者(右田、谷内江、上松が担当)が従来から着目している分子に関して、FMF バイオマーカーとしての有用性について ELISA や血球細胞の FACS を用いた方法での評価を依頼した。

2.FMF の包括的ゲノム解析

MEFV 遺伝子はエクソン 10 個から構成され、イントロンと UTR を含めて約 15 kilo-base pair (kb) にわたり、16p13.3 上に存在しているが、5' UTR 部位は GC 含有量がそれほど高いわけでもなく、明確なプロモーター部位は明らかにされていない。そこで、解析対象範囲を ZNF200 遺伝子と LINC00921 遺伝子の H3K27Ac 部位まで含めた合計約 30 kb のゲノム領域として、次世代シーケンサー(Illumina HiSeq2500)で塩基配列を決定した。FMF358 例、成人スティル病 72 例が生体試料バンクから提供され、このうち FMF221 例と AOSD51 例について、塩基配列バリエーションについて、解析を終了した。これは吉浦、川上が担当した。

3. *In vitro* インフラマソーム再構成システム

コムギ胚芽無細胞合成技術を用いて、インフラマソームの構成分子である NLRP3、AIM2、ASC などと家族性地中海熱の責任遺伝子産物である pyrin を合成し、試験管内でインフラマソームを形成した際の発光を指標にインフラマソーム動態を解析した。これらは増本が技術を確立し、インフラマソームや pyrin の働きを直接制御する分子を探索することを目的とする研究である(増本が担当)。

(倫理面への配慮)

上記の研究は長崎医療センター倫理診査委員会(承認番号 25106 家族性地中海熱の発症に関わる遺伝因子の網羅的遺伝子解析 国内共同研究)、長崎大学医歯薬学総合研究科ヒトゲノム・遺伝子研究解析計画(第 140828293 号家族性地中海熱の発症に関わる遺伝因子の網羅的遺伝子解析)および長崎大学病院臨床研究倫理委員会(承認番号 14092956 家族性地中海熱の発症に関わるバイオマーカーと遺伝因子の網羅的解析)の承認を受け、これらは長崎医療センターと長崎大学病院の担当する部署のホ

ームページに情報を公開し、また、各施設の倫理委員会の承諾を得ている。

C. 研究結果

川上は本研究班で集積した FMF 発作時血清 19 例、非発作時血清 24 例、健常人血清 35 例を用い、45 分子を解析した。G-CSF、IL-6、IP-10 は FMF 発作時には非発作時と比較して高値であり、IFN- γ 、IL-18、IL-17 は非発作時においても健常人と比較して高値を示した。Preliminary な結果ではあるが活動性 RA 血清を解析中であるが(生物学的製剤導入前であるが基礎治療は受けている)、活動性 RA では IL-1 β 、TNF- α は健常人と比較して高値を示したが、FMF では発作時および非発作時においても高値を示さなかった。典型的発作を示した FMF1 例で分泌型マイクロ RNA (miRNA) アレイを実施したが、発作時において miR-204 が検出された。

吉浦、川上は ZNF200 遺伝子と LINC00921 遺伝子の H3K27Ac 部位まで含めた合計約 30 kb のゲノム領域として、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq2500) で塩基配列を決定した。MEFV 遺伝子領域について、depth > 300 の情報を得ることが出来ており、本実験システムが十分に機能していることを示している。FMF221 例と成人スティル病 51 例について、塩基配列バリエーションについて、解析を終了した。MEFV 遺伝子領域で、コントロール試料と比較して異なった variant は、c.2082G>A (M694I) in exon10 (ゲノムデータ hg19 表記: chr16:3293405C>T)であった。本変異は、FMF の原因変異(あるいは、非常に強いリスクアレル)であると確認されているものであり、本解析には、陽性コントロールとして M694I 変異をもつ患者群 28 名を加えて解析しており、本部位が関連 variant をして描画されることは、想定内であった。しかし、それ以外の関連が示唆される変異は見つからなかった。コントロールに見つからず FMF で 1% 程度の頻度をもつ variant が認められたが、有意とは認められない。成人スティル病についても、MEFV 遺伝子内に関連が示唆される variant は認められなかった。

右田は FMF12 例を対象に血清活性型 IL-1 β の検出をイムノブロット法で試みた。還元状態において FMF 発作時の血清では 17kDa の活性型 IL-1 β が検出され、活性型 IL-1 β の免疫グロブリン軽鎖のバンドに対する比を定量化したが、これは関節リウマチと比較して発作時 FMF では有意に高値であった。右田は成人スティル病 49 例の MEFV 遺伝子の Exon1、2、3、10 を解析したが、Exon10 変異は成人スティル病で有意に高率であった(6.1% vs 0%, p=0.03)。また MEFV 多型/変異を有する群は有しない群に比して単周期全身型が少なく(16.1% vs 55.6%, p=0.004)、再燃を繰り返す症例が多かった。

谷内江は繰り返すあるいは遷延する発熱を理由に MEFV 遺伝子検索を施行した 225 例を対象に解析し、MEFV 遺伝子両側アレルに exon 10 変異を含む変異を認め、典型

的な臨床像を示した 17 例の特徴を、サイトカインの IL-18 を中心に次のように集約した。①発作時、非発作時を通じて IL-18 の高値を認めた。②ほとんどの症例で、臨床的にはコルヒチンの有効性が確認された。一方、コルヒチン投与により臨床的には寛解状態に入った症例の一部で、血清 IL-18 の持続高値が観察された。

増本は自己炎症疾患に関与する変異を持つ複数のインフラマソーム構成蛋白質の合成に成功し、試験管内でのインフラマソーム再構成系を構築した。現在、この試験管内インフラマソーム再構成系を用いてインフラマソームや pyrin の働きを直接制御する化合物の探索を進め、インフラマソームを制御する複数の化合物候補を選定中である。

上松は FMF と鑑別が必要となる周期性発熱・アフタ性口内炎・咽頭炎・頸部リンパ節炎症候群(Syndrome of periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis:PFAPA)に着目し、鑑別のバイオマーカーの検索を行った。FMF50 例と PFAPA100 例を対象としたが、PFAPA では MEFV 遺伝子 exon3 variants の保有はきわめて少なかった。CD64 発現による好中球活性化の評価では、FMF 発作時ではその発現は軽度であるのに対し、PFAPA においては強発現を認めた。サイトカインプロファイルでは、血清 IL-18 が典型例 FMF において非発作時にも高値であり、発作時にはさらに増加した。しかしながら、PFAPA では IL-18 の上昇はみられなかった。IFN- γ と G-CSF が PFAPA 発作時に高値であったが、FMF では両サイトカインともに血清中に増加はみられなかった。

D. 考察

平成 26 年度においては血清およびゲノム DNA 検体を集積する生体試料バンクの整備は大きく進展したと考えられた。バイオマーカーの探索に関しては、研究分担者の個別研究において、FMF では IL-1 β と IL-18 の有用性が示された。包括的なアレイ解析においても IL-18 の重要性は確認されたが、IL-1 β に関しては、イムノブロット法での追認が必要かもしれない。アレイにおける結果では FMF よりも活動性 RA で IL-1 β は高値を示し、この点を含めての discussion も課題と思われた。アレイにおいては G-CSF、IL-6、IP-10、IFN- γ 、IL-17 も候補バイオマーカーであることが示唆され、これらは IL-18 や IL-1 β を含め、miRNA の結果を踏まえての *in vitro* における細胞機能解析(マクロファージ細胞株などを想定している)で確認したい。

MEFV 遺伝子の包括的解析も大きく進展したと思われる。現段階の解析までの結論は、FMF で共通に認められる MEFV 遺伝子変異は、MEFV 遺伝子のエクソン 10 に存在する c.2082G>A (M694I)のみであったが、今後はこれに臨床情報を加味しての絞り込みを予定しており、情報処理も含めて順調に進んでいると考えられる。すなわち、本事業次年度の新規原因遺伝子同定に向けて準備は出来たと考える。次のステップとしては、階層化して均一患者集団としてからの exome 解析が必須と思われる。FMF と鑑別が難し

い成人スティル病も、この exome 解析の候補になると考えられる。

In vitro インフラマソーム再構成システムは、蛋白質間相互作用を直接的に評価しうる、画期的な手法であるが、このシステム整備も大きく進展したと思われる。すなわち、従来の酵母や大腸菌を使ったリコンビアント蛋白質合成では、ミスフォールディングや不溶化のために克服できなかった部分を、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成技術を用いることによって合成可能とし、試験管内 FMF インフラマソームの再構成が成功したと考えられる。次年度からは新たなゲノム情報を用いての解析が多いに期待される。

FMF には *MEFV* 遺伝子以外の疾患遺伝子が存在する可能性があり、その全貌の理解には、変異/多型遺伝子で構成されるインフラマソームの解析が必須である。また、FMF の新たな分子標的治療の確立を目指すには、バイオマーカーの検索も非常に重要であるが、今年度はその基礎的検討が十分になされたと思われる。

E. 結論

本研究は、FMF のバイオマーカー、ゲノム情報、インフラマソーム解析および分子標的治療薬の開発を目標とするが、今年度はその遂行に向けて確実な成果を得たと考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

II. 委託業務成果報告（業務項目）

平成26年度厚生労働科学委託業務
(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化事業(難治性疾患実用化研究事業)))
「遺伝子変異に基づく FMF インフラマソーム病態解明と炎症制御に向けたトランスレーショナル研究」
研究分担報告書
FMF 患者の炎症性サイトカインプロファイルの包括的解析に関する研究

分担研究者:川上 純¹

研究協力者:古賀智裕^{1,2}

¹長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座リウマチ・膠原病内科学分野(第一内科)

²長崎大学病院医療教育開発センター

研究要旨

家族性地中海熱(FMF)は FMF 発作を繰り返すが、発作時と非発作時の炎症性サイトカインプロファイルの包括的解析を、磁気ビーズ法で解析するアレイで評価した。本研究班で集積した FMF 発作時血清 19 例、非発作時血清 24 例、健常人血清 35 例を用い、45 分子を解析した。FMF 発作期血清では非発作時と比較して、G-CSF、IL-6、IP-10 が高値であった。IFN-gamma、IL-17、IL-18 は FMF 非発作時においても健常人と比較して高値であった。FMF 典型例の発作時と非発作時の血清(1 例)で分泌型マイクロ RNA(miRNA)アレイを実施したが、発作時において miR-204 が検出されたが、これは IP-10 を標的すると報告されている。今後は miRNA アレイの定量化、培養細胞を用いた miRNA-サイトカインシグナル伝達の詳細を解析し、FMF の活動性を反映するバイオマーカーおよび診断に寄与するバイオマーカーの特定を目指すとともに、FMF インフラマソーム機能・家族性地中海熱遺伝子(*Mediterranean fever:MEFV*) 遺伝子・臨床病態の層別化の関連解析を目標とする。

A.研究目的

家族性地中海熱(FMF)は家族性地中海熱遺伝子(*Mediterranean fever:MEFV* 遺伝子)の変異・多型に起因する自己炎症疾患と考えられている。発作期には急性期相蛋白質が上昇し炎症性サイトカイン・ケモカインの発現増加が報告されるが、その包括的な解析はなされていない。FMF のインフラマソーム機能や分子標的治療の開発に向けては、FMF の活動性や診断に寄与するバイオマーカーの探索は必須である。今年度は FMF の活動期と非活動期の血清を用いて、FMF のバイオマーカーの探索を、包括的なアレイ解析で行った。

B.研究方法

本研究班で集積した患者血清を用いた(FMF、健常人、疾患コントロールとして成人スティル病、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス)。血清の包括的な解析は Human Cytokine/Chemokine Panel 1 の 41 Plex フレミックス(41 分子の打ち分けはメルクカタログを参照されたい)、カスタムでの IL-18、SDF-1alpha、sCD54、sCD106 のトータル 45 分子で、炎症性サイトカイン/ケモカイン、増殖因子を網羅した。また、これらの発現機序の解析に関しては、血清からの分泌型 miRNA を TORAY のアレイで行った。

(倫理面への配慮)

上記の研究は長崎大学医歯薬学総合研究科ヒトゲノム・遺伝子研究解析計画(第 140828293 号家族性地中海熱の発症に関わる遺伝因子の網羅的遺伝子解析)および長崎大学病院臨床研究倫理委員会(承認番号 14092956 家族性地中海熱の発症に関わるバイオマーカーと遺伝因子の網羅的解析)の承認を受け、ホームページに情報を公開している。

C.研究結果

本研究班で集積した FMF 発作時血清 19 例、非発作時血

清 24 例、健常人血清 35 例を用い、研究方法で述べた 45 分子を解析した。図 1 に発作時には非発作時と比較して高値であった分子を示すが、G-CSF、IL-6、IL-10 が抽出された。図 2 に非発作時においても健常人と比較して高値を示す分子を示すが、IFN-gamma、IL-18、IL-17 が抽出された。Preliminary な結果ではあるが活動性 RA 血清を解析中で(生物学的製剤導入前であるが基礎治療は受けている)、活動性 RA では IL-1beta、TNF-alpha は健常人と比較して高値を示したが、FMF では発作時および非発作時においても高値を示さなかった。典型的発作を示した FMF1 例で分泌型マイクロ RNA(miRNA)アレイを実施したが、発作時において miR-204 が検出された。

D.考察

FMF は発作時には自然免疫に関連する細胞群の活性化(好中球やマクロファージなど)が認められるが、G-CSF、IL-6、IP-10 の上昇はこれに合致する所見と思われた。非発作時の IL-17、IL-18 の上昇も FMF の病態に関連すると考えられるが、リンパ球由来の IFN-gamma の上昇は、獲得免疫系が自然免疫系から情報を伝達された結果と考えられた。miRNA アレイは発作時の IP-10 上昇に寄与すると考えられた。

E.結論

今回の検討により、FMF のバイオマーカーには自然免疫の活性化に関連する分子の寄与が大きいと思われ、関節リウマチとは異なる機序で炎症が惹起される可能性が示唆された。また、FMF の活動期を反映するバイオマーカーと診断に寄与するバイオマーカーは異なる可能性も考えられた。今後は疾患コントロール間の比較、miRNA アレイの定量化、培養細胞を用いた miRNA-サイトカインシグナル伝達解析、*MEFV* 遺伝子を含めた臨床病態の層別化を進め、FMF インフラマソーム機能解析の結果を加味しながら、FMF の治療候補分子の探索を進めたい。

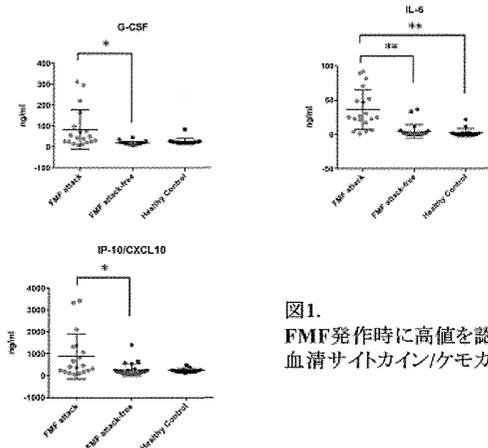


図1. FMF発作時に高値を認める血清サイトカイン/ケモカイン

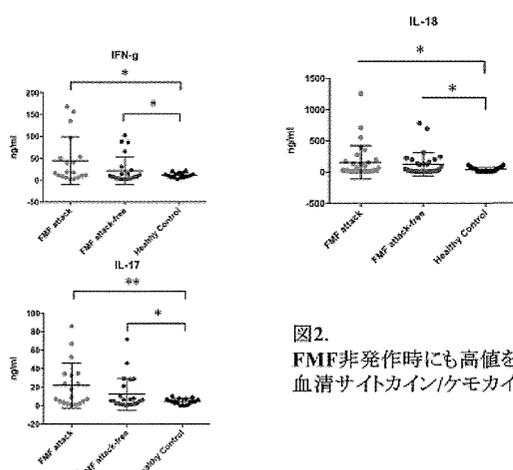


図2. FMF非発作時にも高値を認める血清サイトカイン/ケモカイン

F. 健康危険情報 なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Nakamura H, Takahashi Y, Yamamoto-Fukuda T, Horai Y, Nakashima Y, Arima K, Nakamura T, Koji T, and **Kawakami A**. Direct infection of primary salivary gland epithelial cells by HTLV- I that induces the niche of the salivary glands of sjogren's syndrome patients. *Arthritis Rheumatol*. 2015, in press.
- ② Fujikawa K, Migita K, Shigemitsu Y, Umeda M, Nonaka F, Tamai M, Nakamura H, Mizokami A, Tsukada T, Origuchi T, Yonemitsu N, Yasunami M, **Kawakami A**, Eguchi K. MEFV gene polymorphisms and TNFRSF1A mutation in patients with inflammatory myopathy with abundant

macrophages. *Clin Exp Immunol*. 2014 Nov;178(2):224-8. doi: 10.1111/cei.12407.

- ③ Fujikawa K, Migita K, Nagasato A, Tsukada T, **Kawakami A**, Eguchi K. Mediterranean fever (MEFV) Variant P369S/R408Q in a Patient with Entero-Behçet's Disease who Successfully Responded to Treatment with Colchicine. *Intern Med*. 2014;53(20):2381-4. Epub 2014 Oct 15.
 - ④ Nonaka F, Migita K, Jiuchi Y, Shimizu T, Umeda M, Iwamoto N, Fujikawa K, Izumi Y, Mizokami A, Nakashima M, Ueki Y, Yasunami M, **Kawakami A**, Eguchi K. Increased prevalence of MEFV exon 10 variants in Japanese patients with adult onset Still's disease. *Clin Exp Immunol*. 2014 Oct 6. doi:10.1111/cei.12463. [Epub ahead of print]
 - ⑤ Nonaka F, Migita K, Iwasaki K, Shimizu T, **Kawakami A**, Yasunami M, Eguchi K. Overlap syndrome between Familial Mediterranean fever and tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome in a lupus patient. *Tohoku J Exp Med*. 2014;233(2):73-7.
 - ⑥ Migita K, Agematsu K, Yazaki M, Nonaka F, Nakamura A, Toma T, Kishida D, Uehara R, Nakamura Y, Jiuchi Y, Masumoto J, Furukawa H, Ida H, Terai C, Nakashima Y, **Kawakami A**, Nakamura T, Eguchi K, Yasunami M, Yachie A. (2014) Genotype-Phenotype Correlations in Japanese Patients with Familial Mediterranean Fever. *Medicine*. 2014 May;93(3):158-64.
 - ⑦ Horai Y, Koga T, Fujikawa K, Takatani A, Nishino A, Nakashima Y, Suzuki T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Ida H, Kakugawa T, Sakamoto N, Ishimatsu Y, Mukae H, Hamaguchi Y, Fujimoto M, Kuwana M, Origuchi T, Kohno S, **Kawakami A**. Serum interferon- α is a useful biomarker in patients with anti-melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) antibody-positive dermatomyositis. *Mod Rheumatol*. 2014 Apr 9. [Epub ahead of print]
 - ⑧ Migita K, Izumi Y, Jiuchi Y, Kozuru H, Kawahara C, Izumi M, Sakai T, Nakamura M, Motokawa S, Nakamura T, **Kawakami A**. Effects of Janus kinase inhibitor tofacitinib on circulating serum amyloid A and interleukin-6 during treatment for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2014 Feb;175(2):208-14.
 - ⑨ **川上 純**. 特集 自己炎症症候群の診断と治療序. *分子リウマチ治療*. 7 (1) : 2014
- ### 2. 学会発表
- ① Fujikawa K, Migita K, Shigemitsu Y, Umeda M, Nonaka F, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M,

- Nakamura H, Mizokami A, Ida H, Ysukada T, Origuchi T, Ueki Y, **Kawakami A**, Eguchi K. MEFV and TNFRSF1A gene mutations in patients with inflammatory myopathy with abundant macrophages. Annual European Congress Of Rheumatology. 2014/6/11-6/14.
- ②道辻 徹, 中島宗敏, 岡田覚丈, 右田清志, **川上 純**. 家族性地中海熱症状を発症した一家系. 第48回九州リウマチ学会 九州・沖縄支部学術集会. 2014/9/6-7.
- ③清水俊匡, 野中文陽, **川上 純**, 右田清志, 江口勝美. コルヒチンが著効したMEFV遺伝子変異を有するCPPD結晶沈着症の1例. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014/4/24-26.
- ④清水俊匡, 藤川敬太, 野中文陽, **川上 純**, 右田清志, 江口勝美. 家族性地中海熱に対するトシリズマブの有効性. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014/4/24-26.
- ⑤江口勝美, 野中文陽, 清水俊匡, **川上 純**, 右田清志. 家族性地中海熱と痛風は共にインフラソーム病である. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014/4/24-26.
- ⑥野中文陽, 江口勝美, 清水俊匡, **川上 純**, 右田清志. 成人発症 Still 病におけるMEFV遺伝子変異とその臨床的特徴. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014/4/24-26.
- ⑦重光良香, 藤川敬太, 右田清志, 梅田雅孝, 野中文陽, 川尻真也, 岩本直樹, 一瀬邦弘, 玉井慎美, 中村英樹, 溝上明成, 井田弘明, 塚田敏昭, 折口智樹, 植木幸孝, **川上 純**, 江口勝美. Inflammatory myopathy with abundant macrophages(IMAM)におけるMEFVおよびTNFRSF1A遺伝子解析. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014/4/24-26.
- ⑧右田清志, 上松一永, 和泉泰衛, 川原知瑛子, 矢崎正英, 岸田 大, 古川 宏, 寺井千尋, 野中文陽, 中村正, 井田弘明, **川上 純**, 江口勝美, 谷内江昭宏. 家族性地中海熱(FMF)の病型と遺伝子異型の関連. 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2014/4/24-26.
- ⑨長郷彰雄, 藤川敬太, 塚田敏昭, 右田清志, **川上 純**. MEFV遺伝子異常を認めた腸管型ベーチェット病の1例. 第47回九州リウマチ学会. 2014/3/15-3/16.
- ⑩山田寛子, 野中文陽, 清水俊匡, 藤本武士, **川上 純**, 右田清志, 江口勝美. MEFV遺伝子E148Qを有すCrowned dens症候群の1例. 第47回九州リウマチ学会. 2014/3/15-3/16.
- ⑪梅田雅孝, 荒牧俊幸, 藤川敬太, 岩本直樹, 寺田 馨, 竹尾 剛, 植木幸孝, 右田清志, 吉村俊朗, **川上 純**. くり返す筋膜炎を呈し、筋生検で筋・筋膜への好中球浸潤を認めた家族性地中海熱の1例. 第47回九州リウマチ学会. 2014/3/15-3/16.
- ⑫江口勝美, 野中文陽, 清水俊匡, **川上 純**, 右田清志. MEFV(Mediterranean Fever) 遺伝子変異と自己免疫疾患. 第47回九州リウマチ学会. 2014/3/15-3/16.
- ⑬池田貴裕, 梅田雅孝, 荒牧俊幸, 藤川敬太, 寺田 馨, 竹尾 剛, 植木幸孝, 吉村俊朗, **川上 純**. 成人発症ステイル病との鑑別を要した inflammatory myopathy with abundant macrophages (IMAM)の1例. 第47回九州リウマチ学会. 2014/3/15-3/16.
- ⑭堀 麻美, 藤川敬太, 塚田敏昭, 右田清志, **川上 純**. 異なるMEFV遺伝子異常を認めた家族性地中海熱非典型例の姉妹. 第47回九州リウマチ学会. 2014/3/15-3/16.
- ⑮江原大輔, 中島好一, 高谷亜由子, 西野文子, 鈴木貴久, 寶來吉朗, 川尻真也, 岩本直樹, 一瀬邦弘, 玉井慎美, 中村英樹, 折口智樹, **川上 純**. FMF合併RAに対しファシチニブが奏功した1例. 第47回九州リウマチ学会. 2014/3/15-3/16.

H.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。

平成26年度厚生労働科学委託業務
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化事業 (難治性疾患実用化研究事業)))
「遺伝子変異に基づく FMF インフラマソーム病態解明と炎症制御に向けたトランスレーショナル研究」
研究分担報告書
遺伝子変異に基づく FMF インフラマソーム病態解明と
炎症制御に向けたトランスレーショナル研究

分担研究者：右田清志

国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター 病因解析研究部長

研究要旨

家族性地中海熱 (Familial Mediterranean fever, FMF) の診断、病態把握に有用なバイオマーカー探索を行った。その結果は、FMF患者の発作期の血清中に活性型IL-1 β が検出された。関節リウマチなど自己免疫疾患の活動期には検出されていないことより、IL-1 β が責任サイトカインと考えられる自己炎症疾患に特異的なバイオマーカーと考えられた。また成人発症スチル病では、*MEFV*遺伝子exon10の変異の頻度が健常人に比べ、有意に高頻度に検出されることが判った。自己炎症が発症に関わっているリウマチ性疾患の遺伝的要因の一つとして*MEFV*遺伝子の異常が示唆された。

A. 研究目的

家族性地中海熱 (Familial Mediterranean fever) は、遺伝性自己炎症疾患で、遺伝型式は常染色体劣性と考えられている。しかし、我々が行った本邦FMF症例を対象とした全国調査では、FMFの原因遺伝子である*MEFV*遺伝子に2アレル変異を認めた症例は限られており、ヘテロ変異や遺伝子変異を認めない症例でも、典型的なFMFの臨床像を呈することが明らかになっている。今年度の研究としてFMFの診断に有用な遺伝子マーカー、血清マーカーを同定することを目標にした。また*MEFV*遺伝子の異常が、FMF以外のリウマチ性疾患の発症、病像の修飾に関連していないか、成人発症スチル病 (AOSD) を対象に検討した。

B. 研究方法

FMF症例12症例を対象とし、臨床像により典型例、非典型例の2群に分類して解析を行った。FMF症例の発作時、非発作時の血清を用い、イムノプロット法でIL-1 β の検出を行った。成人病スチル病 (AOSD) のDNA検体を用い、*MEFV*遺伝子エクソン1、2、3、10をダイレクトシーケンシング法で解析し変異の有無を調べた。

C. 研究結果

FMF 症例の発作時の血清を、還元状態、非還元状態で SDS-PAGE で電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写後、活性型 IL-1 β を認識する抗体でイムノプロットを行った。還元状態では 17kDa の活性型 IL-1 β が検出されたが、非還元状態では活性型 IL-1 β のバンドは検出されず、また健常人、非発作時の FMF 患者の血清においても活性型 IL-1 β のバンドは検出されなかった。次に FMF 患者 12 名と活動期の関節リウマチ (RA) 患者 15 名の血清を用いて同様の検討を行った。FMF 患者、RA 患者において急性期蛋白である血清アミロイド A 蛋白 (SAA) の濃度に差はみられなかったが、活性型 IL-1 β は FMF 患者で多く

検出され、活性型 IL-1 β の免疫グロブリン軽鎖のバンドに対する比を定量化し、比較した所、FMF 患者で有意に活性型 IL-1 β が上昇していた。

成人発症 Still 病 (AOSD) は広義の自己炎症疾患とされているが、その病因はいまだ不明である。山口の分類基準を満たす 49 名の AOSD 患者の臨床像と *MEFV* 遺伝子 Exon1、2、3、10 を解析した。*MEFV* 遺伝子変異/多型の比率は健常人と有意差がなかったが、Exon10 変異は AOSD 患者で有意に高率であった (6.1% vs 0%, p=0.03)。また *MEFV* 多型/変異を有する群は有しない群に比して単周期全身型が少なく (16.1% vs 55.6%, p=0.004)、再燃を繰り返す症例が多かった。AOSD の病因に *MEFV* 遺伝子が関与していることが示唆された。

D. 考察

FMFの原因は、*MEFV*遺伝子異常によるそのコードする蛋白質であるPyrinの機能異常によるNLRP3インフラマソームの活性化と考えられている。その周期性炎症を誘導するサイトカインはIL-1 β と考えられており、IL-1 β に対する抗体医薬の本症の治療への有効性も示されている。しかし、FMF症例血清を用いた検討で、IL-1 β の上昇は確認されていない。

その原因としてIL-1 β は、血液の中では結合蛋白であるIL-1結合蛋白(IL-1BP)と複合体を形成していることも原因の一つとして考えられる。血清を還元状態にし、S-S結合を切断することで、IL-1 β とIL-1BPを解離させ、イムノプロットを行うことで活性型IL-1 β を検出することができ、FMFの発作時に特異的に上昇していた。これら結果は、FMFの発作時はNLRP-3インフラマソームによりcaspase-1の活性化が生じ、Pro IL-1 β が活性型に変換されていることを示している。されにこれら活性型IL-1 β は自己免疫疾患である活動性のあるRA患者の血清には検出されず、自己炎症疾患の活動性のバイオマーカーにな

ることが考えられた。また、自己炎症のメカニズムが考えられているAOSDにより高率にMEFV遺伝子変異が検出された。近年、Pyrin自体がある種の細菌の菌体成分を認識するセンサーであることが示されている。さらにMEFV遺伝子変異は、loss of functionではなく、gain of functionでPyrinの機能に影響することも示唆されている。MEFV遺伝子の異常がヘテロ変異であっても、FMFに加え自己炎症が関与しているリウマチ性疾患の発症、病型に影響することが示唆された。

E. 結論

血液中の活性型IL-1 β をイムノブロット法による検出方法を確認し、FMF患者の発作時に特異的に増加していることを明らかにした。日本人AOSD患者で、高率にMEFV遺伝子変異がみられることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Migita K*, Izumi Y, Jiuchi Y, Kozuru H, Kawahara C, Nakamura M, Nakamura T, Agematsu K, Masumoto J, Yasunami M, Kawakami A, Eguchi K. :Serum amyloid A induces NLRP-3-mediated IL-1 β secretion in neutrophils. PLoS One 9:e96703,2014.
- ②Nonaka F, Migita K*, Jiuchi Y, Shimizu T, Umeda M, Iwamoto N, Fujikawa K, Izumi Y, Mizokami A, Nakashima M, Ueki Y, Yasunami M, Kawakami A, Eguchi K. : Increased prevalence of MEFV exon 10 variants in Japanese patients with adult onset Still's disease. Clin Exp Immunol doi: 10.1111/cei.12463. [Epub ahead of print],2014.
- ③Migita K*, Izumi Y, Fujikawa K, Agematsu K, Masumoto J, Jiuchi Y, Kozuru H, Nonaka F, Shimizu T, Nakamura T, Iwanaga N, Furukawa H, Yasunami M, Kawakami A, Eguchi K. : Dysregulated mature IL-1 β production in familial Mediterranean fever. Rheumatology (Oxford) pii: keu359. [Epub ahead of print],2014.
- ④Fujikawa K, Migita K*, Shigemitsu Y, Umeda M, Nonaka F, Tamai M, Nakamura H, Mizokami A, Tsukada T, Origuchi T, Yonemitsu N, Yasunami M, Kawakami A, Eguchi K. :MEFV gene polymorphisms and TNFRSF1A mutation in patients with inflammatory myopathy with abundant macrophages. Clin Exp Immunol 178:224-8,2014.
- ⑤Migita K*, Agematsu K, Yazaki M, Nonaka F, Nakamura A, Toma T, Kishida D, Uehara R, Nakamura Y, Jiuchi Y, Masumoto J, Furukawa H, Ida H, Terai C, Nakashima Y, Kawakami A, Nakamura T, Eguchi K, Yasunami M, Yachie A. :Familial mediterranean Fever: genotype-phenotype correlations in Japanese patients. Medicine (Baltimore) 93:158-64,2014.
- ⑥Migita K*, Agematsu K, Masumoto J, Ida H, Honda S, Jiuchi Y, Izumi Y, Maeda Y, Uehara R, Nakamura Y, Koga T, Kawakami A, Nakashima M, Fujieda Y, Nonaka F, Eguchi K, Furukawa H, Nakamura T, Nakamura M, Yasunami M. : The contribution of SAA1 polymorphisms to Familial Mediterranean fever susceptibility in the Japanese population. PLoS One 8:e55227,2013.
- ⑦Fujikawa K*, Migita K, Tsukada T, Kawakami A, Eguchi K. : Protracted febrile myalgia syndrome in a Japanese patient with fasciitis detected on MRI. Intern Med 53:2817-9,2014.
- ⑧Fujikawa K*, Migita K, Nagasato A, Tsukada T, Kawakami A, Eguchi K. : Mediterranean fever (MEFV) variant P369S/R408Q in a patient with entero-Behçet's disease who successfully responded to treatment with colchicine. Intern Med 53:2381-4, 2014.
- ⑨Izumi Y, Takeshita H, Moriwaki Y, Hisatomi K, Masakazu M, Yamashita N, Kawahara C, Shigemitsu Y, Iwanaga N, Kawakami A, Kurohama H, Niino D, Ito M, Migita K*. :Multicentric Castleman disease mimicking IgG4-related disease: a case report. Mod Rheumatol, in press.
- ⑩Matsuoka N*, Iwanaga J, Ichinose Y, Fujiyama K, Tsuboi M, Kawakami A, Migita K. : Two elderly cases of familial mediterranean fever with rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis doi: 10.1111/1756-185X.12354. [Epub ahead of print] , 2014.
- ⑪Nakamura T*, Migita K, Ando Y, Takaoka H, Suzushima H, Shiraishi N. : Amyloid A amyloidosis in a Japanese patient with familial Mediterranean fever associated with homozygosity for the pyrin variant M694I/M694I. Mod Rheumatol 24:349-52, 2014.
- ⑫ Nonaka F, Migita K*, Haramura T, Sumiyoshi R, Kawakami A, Eguchi K. :Colchicine-responsive protracted gouty arthritis with systemic inflammatory reactions. Mod Rheumatol 24:540-3, 2014.
- ⑬Migita K*, Abiru S, Sasaki O, Miyashita T, Izumi Y, Nishino A, Jiuchi Y, Kawakami A, Yasunami M. :Coexistence of familial Mediterranean fever and rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol 24:212-6, 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

平成26年度厚生労働科学委託業務
(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化事業(難治性疾患実用化研究事業))
「遺伝子変異に基づく FMF インフラマソーム病態解明と炎症制御に向けたトランスレーショナル研究」
研究分担報告書

次世代シーケンスによる家族性地中海熱 Mediterranean fever

遺伝子 (MEFV) のゲノム領域の網羅的変異検索

分担研究者：吉浦孝一郎

長崎大学・原爆後障害医療研究所・人類遺伝学・教授

研究要旨

研究目的は、家族性地中海熱患者試料を用いて MEFV 遺伝子を含むゲノム領域 (16p13.3) のイントロン、プロモーターも含めて網羅的な変異解析をすることである。キャピラリーシーケンサーによるスクリーニングによって見落とされるイントロン変異や構造異常等を含めて全ての MEFV 変異を同定し、原因変異全てを同定する。その結果を基盤として、MEFV 遺伝子によって説明不可能な家族性地中海熱患者グループを選別し、今後の研究方針決定の重要な資料とする。

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いて MEFV 遺伝子を含むゲノム領域 (16p13.3) のイントロン、プロモーターも含めて網羅的に解析することを目的とした。

家族性地中海熱患者 (FMF) は、MEFV 遺伝子のコード領域のキャピラリーシーケンサーによるスクリーニングによって、エクソン内変異は過去に一度スクリーニングされている。しかし、常染色体劣性遺伝形式 (AR) を仮定すると MEFV 遺伝子では、発症を説明出来ない症例が圧倒的に多いが、これまでのキャピラリーシーケンスデータでは否定的である。常染色体優性疾患 (AD) としてヘテロ接合変異で発症している可能性がある。家族性地中海熱患者群において MEFV 遺伝子内で全ての“変異”を明らかにし、患者群を「ヘテロ接合変異で説明可能な群 (常染色体優性群)」「複合ヘテロ接合変異で説明可能な群 (常染色体劣性群)」「MEFV 遺伝子では説明不可能な群」の区別を明確にすることが重要であると考えられる。

今回のスクリーニングは、イントロン変異や構造変化も含めて全ての変異を明らかにし、来年度以降の新規家族性地中海熱原因遺伝子単離や薬剤有効例予測のための DNA variant 同定等、今後の研究基盤情報となる。

B. 研究方法

1) ゲノム変異解析

MEFV 遺伝子はエクソン 10 個から構成され、イントロンと UTR を含めて約 15 kilo-base pair (kb) にわたり、16p13.3 上に存在している。MEFV に 3' 側にある ZNF200 遺伝子、5' 側にある LINC00921 遺伝子には、明瞭なヒストン H3 の 27 番目のリジンのアセチル化 H3K27Ac (プロモーターやエンハンサーと考えられる) 領域が認められるが、MEFV 遺伝子の 5' UTR 部位は GC 含有量がそれほど高いわけでもなく、明確なプロモーター部位は明らかにされていない。そこで、解析対象範囲を ZNF200 遺伝子と LINC00921 遺伝子の H3K27Ac 部位まで含めた合計約 30 kb のゲノム領域について変異解析を行うことにした。

ゲノム DNA は、KAPA High-Throughput Library Preparation Kit にて、両側にアダプターを ligation して次世代シーケンサー解析用 DNA ライブラリーを作成した (Illumina 社用 HiSeq2500 解析用)。塩基配列決定対

象領域ゲノム DNA の濃縮は、Roche 社の SeqCap EZ Choice Library にて行った。本法は、DNA bait とよばれる biotin-label した 55-105bp の合成オリゴヌクレオチドと患者 DNA から調製したライブラリーを hybridization 法によって雑種形成させ、biotin-avidin 反応によって bait DNA を回収して、目的領域を選択的に濃縮する。

濃縮された患者 DNA 断片を鋳型として~10 サイクルほど PCR を行い、十分量の目的領域の患者濃縮 DNA を入手し、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq2500) で塩基配列を決定した。本実験では hybridization 法による濃縮が患者の目的部位 DNA 量依存的に起こること、PCR のサイクルが少ないこと、target 領域を MEFV 遺伝子のゲノム領域全体 (イントロンや遺伝子前後の発現調節領域も含めた) としたことによって、MEFV 遺伝子のゲノム領域の欠失、重複、逆位などの単純な PCR-ダイレクトシーケンス法では検出不可能な構造異常も含めて全ての変異が検出できると期待される。濃縮は、濃縮用 bait が含まれた 1 本のチューブに 12 試料を混ぜてキャプチャーし、シーケンスランは、Illumina HiSeq2500 の Rapid Mode にて、96 sample / run で塩基配列情報を取得した。

2) 解析対象試料

地中海熱患者 (FMF) 358 例、成人発症型スティル病 (AOSD) 72 例が既に提供された。このうち FMF221 例と AOSD51 例について、塩基配列バリエーションについて、解析を終了した。その他の症例および、構造異常の検出は現在進行中で本報告書には含まれない。

C. 結果

1) ゲノム変異データ取得

Illumina HiSeq2500 の Rapid Mode の 1 回のランに 96 試料分の塩基配列データを得て、4 回のランを終了し、372 試料分のデータを得た。一部、コントロールも含めたことと、時間が限られていたことから、地中海熱患者 358 例、成人発症型スティル病 72 例の一部について、まだデータが得られていない。しかし、372 名分のデータは良質であった。

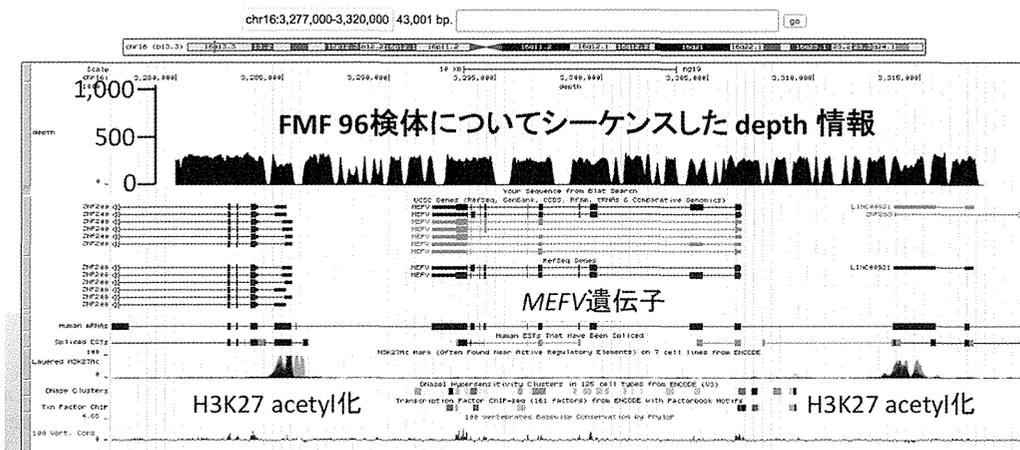


図 1

図 1 に示すように、Depth 情報で黒く塗られているところが、情報が得られた部分である。MEFV 遺伝子領域について、depth > 300 の情報を得ることが出来ていた。本実験システムが十分に機能していることを示している。取得情報がない部分は、Alu リpeat配列等の繰り返し配列であり、情報が無くても問題とならない。

2) 変異データ情報処理

Novoalign ソフトを使用し、塩基配列情報を参照配列に対して整列させ、GATK にて配列調製を行い、変異コールを行った。提供された 358 例の試料のうち、FMF221 例、AOSD51 例の塩基配列情報と 112 例の対照群の MEFV ゲノム情報を取得した (2014 年 12 月末現在)。

DNA variant 情報を整理し、配列解析対象領域 30 kb の全ての塩基について多型情報を整理し、Plink ソフトを使って、患者群と対照群の関連解析 (χ^2 乗検定または Fisher の直接検定) を行った。

陽性コントロールとして M694I 変異をもつ患者群 28 名を加えて解析しており、本部位が関連 variant をして描画されることは、想定内であった。しかし、それ以外の関連が示唆される変異は見つからなかった。コントロールに見つからず FMF で 1% 程度の頻度をもつ variant が認められたが、有意とは認められない。

成人発症型スティル病についても、MEFV 遺伝子内に関連が示唆される variant は認められなかった。

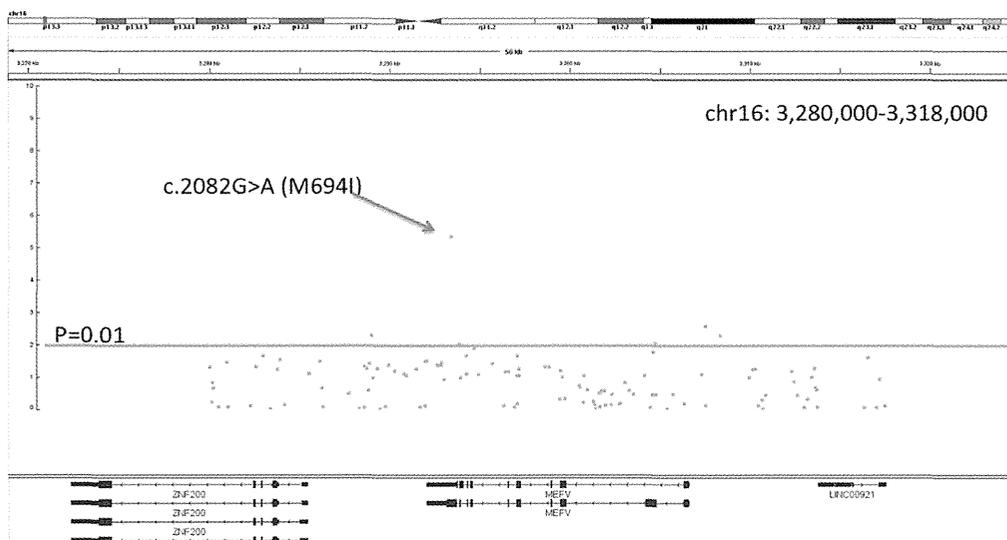


図 2

結果は、図 2 に示されている。MEFV 遺伝子領域で、コントロール試料と比較して異なった variant は、c.2082G>A (M694I) in exon10 (ゲノムデータ hg19 表記: chr16:3293405C>T) であった。本変異は、FMF の原因変異 (あるいは、非常に強いリスクアレル) であると確認されているものであった。本解析には、

D. 考察

FMF 患者のける MEFV 遺伝子変異解析から「これまでに知られていた強い感受性アレルのみが、有意に患者集団で見つかる」との結論を得た。これらの事実から考えられることは、1) 地中海熱として収集されている疾患の一部は、ヘテロ接合で発症している。劣性遺伝形式を示唆するホモ接合変異および複合ヘテロ接合変異はほとんど認められない。2) c.2082G>A (M694I) in exon10 以上のリスクアレルは無い。3) c.2082G>A リスクアレルは、これと連鎖不平衡にある variant はないことから、独立に変異して地中海熱患者集団に保持されていると考えられる。すなわち、創始者効果 (founder effect) はないと考えられる。4) ヘテロ接合変異も見つけれない患者は、MEFV 遺伝子以外の遺伝子の関与を考えた方が合理的である。

1) ~ 4) の結論は、プロモーターやイントロンも含めたとはいえ、キャピラリーシーケンス解析によって得られていた知見以上の新しい知見が加わったこにはならない。今回の変異解析の大きなメリットである遺伝子の構造解析を行っておらず、まだ解析途中であって最終的な結論ではない。今後、MEFV 遺伝子の欠失/逆位/重複といったキャピラリーシーケンス解析では得られない構造解析情報を用いて、上記 1) ~ 4) の結論の確認を要する。ただし、3) に関しては現在のデータでも確定的結果である。

1) の結果に関しては、これまでの遺伝病原因遺伝子を考える単純な機能喪失変異なのかは、疑問が残る。通常機能喪失変異は翻訳が停止する変異アレルが見つかる事が多く、また遺伝子全体に変異が散らばる傾向があるが、MEFV 遺伝子変異は、c.2082G>A (M694I) のみであり、経験的には機能獲得なり、特異的なドメイン変異により別機能獲得等を考えた方が良い変異患者群である。

4) の結果に関しては、来年度以降のゲノム解析に関して重要である。MEFV 遺伝子に全く変異や構造異常を認めない患者でかつ均一な臨床症状 (コルヒチンが著効する等) の集団を選択して exome 解析に供することで、新規の地中海熱感受性変異・感受性アレルを同定できる可能性がある。

E. 結論

現段階の解析までの結論は、地中海熱患者群で共通に認められる MEFV 遺伝子変異は、MEFV 遺伝子のエクソン10 に存在する c.2082G>A (M694I) のみであった。今後、新規地中海熱感受性変異アレルを探索するためには、患者群を何らかの視点から階層化して均一患者集団としての exome 解析が必須と思われる。また、c.2082G>A (M694I) は、単純な機能喪失と考えるよりは、ドメイン特異的な変異による機能獲得、あるいは、ドメイン特異的な変異による特異的シグナル経路変異と考えられる。

——達成度について——

本年度、exome 解析によるデータ取得を進めた。既知の疾患原因遺伝子は確実に捉えられているので、次世代シーケンサーを使った解析は、情報処理も含めて順調に進んでいると考えられる。本事業次年度の新規原因遺伝子同定に向けて準備は出来たと考える。また、これまでの

MEFV 遺伝子変異に阿寒する知見について、確定的に整理出来たと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

- ① Kaname T, Ki CS, Niikawa N, Baillie GS, Day JP, Yamamura KI, Ohta T, Nishimura G, Mastuura N, Kim OH, Sohn YB, Kim HW, Cho SY, Ko AR, Lee JY, Kim HW, Ryu SH, Rhee H, Yang KS, Joo K, Lee J, Kim CH, Cho KH, Kim D, Yanagi K, Naritomi K, Yoshiura KI, Kondoh T, Nii E, Tonoki H, Houslay MD, Jin DK. Heterozygous mutations in cyclic AMP phosphodiesterase-4D (PDE4D) and protein kinase A (PKA) provide new insights into the molecular pathology of acrodysostosis. *Cell Signal*. 2014 Nov; 26(11): 2446-2459. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.07.025.
- ② Nagata E, Kano H, Kato F, Yamaguchi R, Nakashima S, Takayama S, Kosaki R, Tonoki H, Mizuno S, Watanabe S, Yoshiura KI, Kosho T, Hasegawa T, Kimizuka M, Suzuki A, Shimizu K, Ohashi H, Haga N, Numabe H, Horii E, Nagai T, Yoshihashi H, Nishimura G, Toda T, Takada S, Yokoyama S, Asahara H, Sano S, Fukami M, Ikegawa S, Ogata T. Japanese founder duplications/triplications involving BHLHA9 are associated with split-hand/foot malformation with or without long bone deficiency and Gollop-Wolfgang complex. *Orphanet J Rare Dis*. 2014 Oct 21; 9(1):125.
- ③ Miura K, Morisaki S, Abe S, Higashijima A, Hasegawa Y, Miura S, Tateishi S, Mishima H, Yoshiura K, Masuzaki H. Circulating levels of maternal plasma cell-free pregnancy-associated placenta-specific microRNAs are associated with placental weight. *Placenta*. 2014 Oct; 35(10):848-851. doi: 10.1016/j.placenta.2014.06.002.
- ④ Miura K, Hasegawa Y, Abe S, Higashijima A, Miura S, Mishima H, Kinoshita A, Kaneuchi M, Yoshiura K, Masuzaki H. Clinical applications of analysis of plasma circulating complete hydatidiform mole pregnancy-associated miRNAs in gestational trophoblastic neoplasia: A preliminary investigation. *Placenta*. 2014 Sep; 35(9):787-789. doi: 10.1016/j.placenta.2014.06.004.
- ⑤ Miura K, Mishima H, Kinoshita A, Hayashida C, Abe S, Tokunaga K, Masuzaki H, Yoshiura KI. Genome-wide association study of HPV-associated cervical cancer in Japanese women. *J Med Virol*. 2014 Jul;86(7):1153-1158. doi: 10.1002/jmv.23943.
- ⑥ Matsumoto H, Tsuchiya T, Yoshiura K, Hayashi T, Hidaka S, Nanashima A, Nagayasu T. ABCC11/MRP8 Expression in the Gastrointestinal Tract and a Novel Role for Pepsinogen Secretion. *Acta Histochem Cytochem*. 2014 Jun 28; 47(3):85-94. doi: 10.1267/ahc.13040.
- ⑦ Tsurusaki Y, Koshimizu E, Ohashi H, Phadke S, Kou I, Shiina M, Suzuki T, Okamoto N, Imamura S, Yamashita M, Watanabe S, Yoshiura K, Koderia H, Miyatake S, Nakashima M, Saito H, Ogata K, Ikegawa S, Miyake N, Matsumoto N. De novo SOX11 mutations cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Commun*. 2014 Jun 2;5:4011. doi: 10.1038/ncomms5011.
- ⑧ Miura K, Higashijima A, Miura S, Mishima H, Yamasaki K, Abe S, Hasegawa Y, Kaneuchi M, Yoshida A,

Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Predominantly placenta-expressed mRNAs in maternal plasma as predictive markers for twin-twin transfusion syndrome. *Prenat Diagn.* 2014 Apr; 34(4):345-349. doi: 10.1002/pd.4307.

- ⑨ Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Yoshida A, Kaneuchi M, Yoshiura K, Masuzaki H. Single human papillomavirus 16 or 52 infection and later cytological findings in Japanese women with NILM or ASC-US. *J Hum Genet.* 2014 May; 59(5):251-255. doi: 10.1038/jhg.2014.9.
- ⑩ Amani D, Khalilnezhad A, Ghaderi A, Niikawa N, Yoshiura K. Transforming growth factor beta1 (TGFβ1) polymorphisms and breast cancer risk. *Tumour Biol.* 2014 May; 35(5):4757-4764.
- ⑪ Tsukamoto O, Miura K, Mishima H, Abe S, Kaneuchi M, Higashijima A, Miura S, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Identification of endometrioid endometrial carcinoma-associated microRNA in tissue and plasma. *Gynecol. Oncol.* 2014 Mar; 132(2): 715-721.

2) 学会発表

国際学会

なし

国内学会等

招待講演

- ① 平成 25 年度長崎県医師会母体保護法指定医師研修会 平成 26 年 3 月 2 日 (日), 長崎県医師会館. 産婦人科における臨床遺伝学-ゲノム医療の展開- 総論.
- ② 第 18 回小児血液セミナー 平成 26 年 4 月 5 日 (土), ANA クラウンプラザホテル福岡. 「小児血液・主要研究における全エクソーム解析の可能性」次世代シーケンサーを用いた疾患解析法～総論
- ③ 第 57 回日本形成外科学会総会・学術集会 平成 26 年 4 月 9 日 (水) ~11 日 (金), 長崎ブリックホール. 特別企画「予防的乳房切除の今後」特別企画 1-1 遺伝子診断が医療にもたらすもの
- ④ 平成 26 年度長崎県高等学校理科教育研究会第 55 回定期大会総会, 2014 年 5 月 23 日 (金) 長崎県佐世保北高校. 医学系研究のための高等学校理科から医学部学生教育について
- ⑤ 第 23 回日本組織適合性学会大会@長崎大学良順会館 ランチョンセミナー 次世代シーケンサーで何が出来るのか 平成 26 年 9 月 14 日 (日)
- ⑥ 第 10 回広島大学-長崎大学連携研究事業カンファランス -放射線災害医療の国際教育拠点確立に向けた機関連携事業- 2014 年 5 月 31 日 (土), 場所: 長崎大学良順会館専斎ホール, 長崎. digital PCR を利用した rare

variant/mutation 検出法の検討. 渡辺聡, 朝重耕一, 吉浦孝一郎, 三嶋博之, 木下晃

- ⑦ 第 59 回日本人類遺伝学会 2014 年 11 月 19 日 (水) ~22 日 (土), 場所: タワーホール船堀 (東京都江戸川区), 東京
- 1B0-1: 家族性肺がんにおける新規責任遺伝子の同定. Novel causative gene of familial non-small cell lung cancer. 朝重耕一, 渡辺聡, 三嶋博之, 木下晃, 松本桂太郎, 及川将弘, 宮崎拓郎, 土谷智史, 山崎直哉, 福島喜代康, 永安 武, 吉浦孝一郎
- 101-3: 多発性歯牙腫合併症例を含む SATB2 遺伝子変異症候群の新規変異の同定. Identification of Novel Mutations in Patients with SATB2 Gene Mutation Syndrome without Multiple Odontom. 三嶋博之, 菊入 崇, 三古谷 忠, 木下晃, 吉浦孝一郎
- 1014-2: ddPCR を用い他 McCune-Albright 症候群の GNAS モザイク変異検出の試み. GNAS mosaic mutation detection of the McCune-Albright syndrome with ddPCR. 渡辺 聡, 伊達木 澄人, 中富明子, 木下 晃, 朝重耕一, 木下英一, 三嶋博之, 森内浩幸, 吉浦孝一郎
- 203-2: Panic 障害多発家系例に対する Exome 解析. The molecular analysis of familial Panic disorder. 森本芳郎, 小野慎治, 森貴俊, 黒滝直弘, 吉浦孝一郎, 小澤寛樹
- 304-1: 母体血漿中への妊娠関連胎盤特異的 microRNA の流入量および分娩後の消失速度と陣痛との関連について. Effect of labor on plasma concentrations and postpartum clearance of pregnancy-associated, plasma-specific microRNA. 森崎慎太郎, 三浦清徳, 東島 愛, 阿部修平, 三浦生子, 長谷川ゆり, 吉田敦, 金内優典, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- 304-2: 母体血と比較して胎児血で高発現する microRNA の同定. Identification of highly expressed microRNAs in fetal blood cells compared maternal blood cells. 東島 愛, 三浦清徳, 三嶋博之, 木下 晃, 塚本大空, 阿部修平, 長谷川ゆり, 吉田 敦, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- 304-3: 母体血漿中 miR-517a および miR518b は前置胎盤に対する帝王切開時の出血量に関連する. miR-517a and miR518b in maternal plasma as a predictive marker for the hemorrhage volume in placenta previa at delivery. 長谷川ゆり, 三浦清徳, 東島 愛, 阿部修平, 三浦生子, 吉田 敦, 金内優典, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- 304-4: 母体血漿中 cell-free microRNA 流入量と母体の body mass index および新生児出生体重との関連. Circulating levels of maternal plasma cf-miR-21 are associated with maternal body mass index and

neonatal birth weight. 瀧 直樹, 三浦清徳, 東島 愛, 長谷川ゆり, 阿部修平, 三浦生子, 村上優子, 三嶋博之, 木下 晃, 金内優典, 吉浦孝一郎, 増崎英明

304-5: 相胎間輸血症候群発症予測における母胎血漿中胎盤特異的 cell-free mRNA の有用性に関する検討. Predominantly placenta-expressed mRNAs in maternal plasma as predictive markers for twin-twin transfusion syndrome. 村上優子, 三浦清徳, 東島 愛, 長谷川ゆり, 阿部修平, 三浦生子, 三嶋博之, 木下 晃, 金内優典, 吉浦孝一郎, 増崎英明

3011-4: NILM/ASC-US 例における HPV-16 単独感染群と HPV-52 単独感染群の細胞診所見の変化. Single human papillomavirus 16 or 52

infection and later cytological findings in Japanese women with NILM or ASC-US. 阿部修平, 三浦清徳, 三浦生子, 山崎健太郎, 長谷川ゆり, 東島 愛, 吉田 敦, 金内優典, 吉浦孝一郎, 増崎英明

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許得取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成26年度厚生労働科学委託業務
 (難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化事業(難治性疾患実用化研究事業)))
 「遺伝子変異に基づく FMF インフラマソーム病態解明と炎症制御に向けたトランスレーショナル研究」
 研究分担報告書
 家族性地中海熱ならびに類似疾患における *MEFV* 遺伝子変異と臨床像、
 血清サイトカイン・プロファイルの多様性

分担研究者：谷内江昭宏
 分担協力者：和田泰三、東馬智子、清水正樹
 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科小児科

研究要旨

家族性地中海熱 (Familial Mediterranean Fever: FMF) の内、典型的な臨床像を示す症例の多くは *MEFV* 遺伝子の exon 10 に変異を認めると共に、コルヒチン投与に対する反応性も良好である。本研究では、FMF ならびに類縁疾患において *MEFV* 遺伝子変異と臨床像、炎症病態の指標としての血清サイトカイン・プロファイルを比較検討した。対象は繰り返す、あるいは遷延する発熱を理由に *MEFV* 遺伝子検索を施行した 225 例である。*MEFV* 遺伝子両側アレルに exon 10 変異を含む変異を認め、典型的な臨床像を示した 17 例の特徴は次のように集約された。①発作時、非発作時を通じて IL-18 の高値を認めた。②ほとんどの症例で、臨床的にはコルヒチンの有効性が確認された。一方、コルヒチン投与により臨床的には寛解状態に入った症例の一部で、血清 IL-18 の持続高値が観察された。これらの結果より、FMF 症例における血清 IL-18 値の定量が病態ならびに治療反応性の評価に有用であることが示された。今後、コルヒチン投与後の血清 IL-18 の変化が治療選択の指標になるか否かについて、検討を重ねることが必要と考えられた。

A. 研究の目的

自己炎症性疾患の多くはその原因遺伝子が明らかとなり、遺伝子変異の解析が臨床診断に直接結びつくことが多い。一方で家族性地中海熱 (FMF) の原因遺伝子とされる *MEFV* は exon 10 変異を含む両側アレル変異が典型的な臨床症状と関連することが明らかとなっている。一方、exon 3 や exon 5 の変異では片側アレルの変異のみにより非典型的な臨床像が惹起されることも示唆されている。*MEFV* 遺伝子変異がもたらす多様な炎症病態の発症に関わる分子機序を明らかにし、より明確な診断・治療介入基準を確立することが必要とされている。

本研究では、繰り返す、あるいは遷延する発熱を理由に *MEFV* 遺伝子変異検索を行った症例を対象に、*MEFV* 遺伝子変異と臨床像、さらに全身炎症病態の指標としての血清サイトカイン・プロファイル、コルヒチン反応性などとの関連を検討した。

B. 対象と方法

遷延する発熱、繰り返す発熱、あるいは原因不明の炎症所見を理由に *MEFV* 遺伝子解析依頼のあった 225 名を対象とした。

対象年齢は 1 才～77 才、男性 104 名、女性 121 名であった。

遺伝子解析について説明し、書面による同意を得た。血清サイトカインは ELISA 法により定量、*MEFV* 遺伝子はすべての exon ならびに exon-intron 境界部の塩基配列を解析した。FMF 典型例においては、コルヒチン投与前ならびに投与後の経過を通じて IL-18 を経時的に定量し変動を評価した。

これらの研究計画 (遺伝子変異に基づく家族性地中海熱インフラマソーム病態解明と炎症制御に向けたトランスレーショナル研究) は金沢大学倫理委員

会の審査による承認を受けている。

C. 研究結果

1) 解析対象の臨床症状と年齢分布

対象のおおよそ 2/3 は遷延する発熱、あるいは繰り返す発熱など、FMF ならびに類縁疾患を示唆する症状を示した。一方、10 才未満の症例では PFAPA の診断基準を満たす例が多く見られた (図 1)。PFAPA 様の臨床症状を示す症例を多く含むことから、男女ともに 10 才未満の症例が最も多くを占めた。それ以降では、女性は 20 才～30 才、男性は 40 才～50 才がピークとなり、男女差が見られた。PFAPA と FMF 典型例では、発症年齢分布に明確な差が認められた (図 3)。

図 1. 解析対象の臨床症状

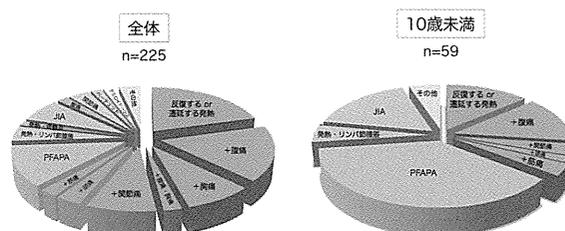


図2. 解析対象の年齢分布

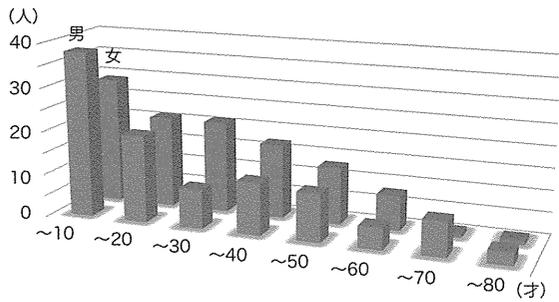
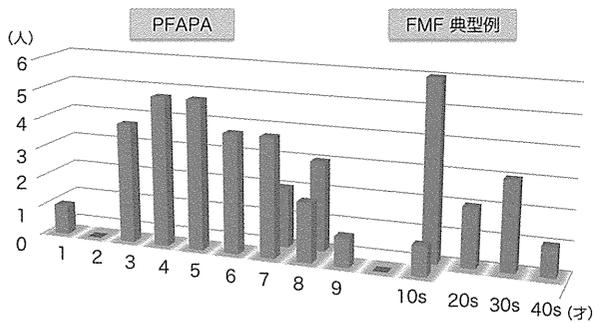


図3. PFAPA と FMF 典型例の発症年齢

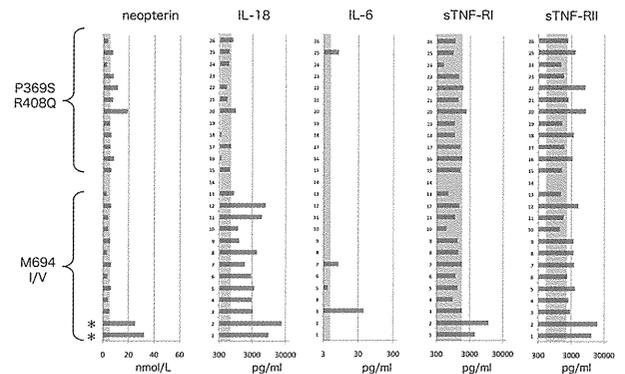


2) 血清サイトカイン・プロファイルとコルヒチン反応性

網羅的なサイトカイン定量を MEFV 遺伝子 exon 10 に変異を有する 13 例、ならびに exon 3 variant 症例 12 例を対象に施行した。

両群間で明確な差を認めたのは、血清 IL-18 のみであった。Exon 10 に変異を示す FMF 典型例の全てで、IL-18 の高値を認めた (図 4)。IL-18 値の上昇は恒常的に認められ、発作時、非発作時に関わらず持続した。典型例の内、アミロイドーシスを合併した 2 例では、neopterin や可溶性 TNF 受容体の高値も認められ、強い炎症病態と臓器傷害の合併が示唆された。

図4. MEFV 遺伝子変異によるサイトカイン・プロファイルの特徴



MEFV 遺伝子 exon 10 変異を示す典型例のほとんどでは診断確定後コルヒチン投与が開始された。コルヒチンは全例で臨床的有効性が確認され、炎症病態も改善を認めた。しかし、典型例で特徴的な増加を認めた IL-18 値の変動を評価すると、症例により異なったパターンが認められた (図 5、図 6)。治療開始後、臨床症状の改善と同時に速やかに IL-18 値が正常化する症例がある一方、臨床症状が改善しても IL-18 高値が遷延する症例が確認された。当初は治療コンプライアンスの不良や、投与量の不足を示す指標となるかと考えられたが、きちんと内服され臨床症状もコントロールされている例においても IL-18 高値を維持することがあり、コルヒチンの作用機序には NLRP3 インフラマソームの活性制御以外の機序があることが考えられた。

図5. コルヒチン投与による血清 IL-18 値の変動

