

201442056A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業

自己炎症性疾患の治療標的分子の同定 および薬剤開発基盤の整備

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 平家 俊男

平成27（2015）年 3月

本報告書は、厚生労働省の科学研究委託事業による委託業務として、国立大学法人京都大学学長 松本 紘（業務主任・研究代表者：平家俊男）が実施した、平成26年度「自己炎症性疾患の治療標的分子の同定および薬剤開発基盤の整備」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患実用化研究事業

自己炎症性疾患の治療標的分子の同定 および薬剤開発基盤の整備

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 平家 俊男

平成27（2015）年 3月

目次

I. 班員・研究協力者名簿	1
II. 委託業務成果報告（総括）	
研究班の統括「自己炎症疾患の治療標的分子の同定および薬剤開発基盤の整備」	3
平家 俊男 京都大学大学院医学研究科発達小児科学 教授	
III. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 患者検体・遺伝子改変マウスを中心にしたモデル動物・患者由来細胞株（iPS細胞を含む）を用いた病態解析	
a. CAPS	
iPS細胞を用いた自己炎症性疾患における血管炎・動脈硬化の病態解明	13
原 寿郎 九州大学大学院医学研究院成育発達医学 教授	
b. MKD	
メバロン酸キナーゼ欠損症の治療標的分子の同定および薬剤開発基盤の整備	16
平家 俊男 京都大学大学院医学研究科発達小児科学 教授	
c. Blau	
ブラウ症候群患者由来疾患特異的iPS細胞の樹立と病態解析の試み	20
神戸 直智 千葉大学大学院医学研究院皮膚科学 准教授	
d. NNS	
中條－西村症候群とその類症の病態解析	25
金澤 伸雄 和歌山県立医科大学医学部皮膚科 講師	
e. FMF	
バイオマーカーの探索；MEFV 遺伝子変異と臨床像、治療反応性ならびに 血清サイトカイン・プロファイルに関する検討	32
谷内江 昭宏 金沢大学医薬保健学域医学類小児科学 教授	
家族性地中海熱患者由来 iPS細胞の作成	35
井田 弘明 久留米大学医学部呼吸器・神経・膠原病内科 教授	
f. PAPA	
化膿性無菌性関節炎・壊疽性膿皮症・アクネ症候群（PAPA症候群）の 治療標的分子の同定および薬剤開発に関する研究	37
森尾 友宏 東京医科歯科大学小児科学 教授	

2. モデル動物・患者由来細胞株（iPS細胞を含む）を利用した革新的な候補薬剤のスクリーニング系の開発	
a. CAPS	
疾患 iPS 細胞由来単球株を用いた自己炎症疾患の薬剤開発基盤構築	40
齋藤 潤 京都大学iPS細胞研究所 准教授	
患者由来iPS細胞を用いたCINCA症候群の骨幹端軟骨過形成に対する薬剤スクリーニング	44
西小森 隆太 京都大学大学院医学研究科発達小児科学 准教授	
自己炎症性疾患に対する薬剤探索	47
萩原 正敏 京都大学大学院形態形成機構学 教授	
奥野 友紀子 京都大学大学院医学研究支援センター 特定助教	
b. 疾患マウスモデル作製	
新規自己炎症疾患原因遺伝子変異探索、単一細胞機能解析基盤開発、及びマウス疾患モデル開発に関する研究	49
小原 收 理化学研究所統合生命医科学研究センター グループディレクター	
古関 明彦 理化学研究所統合生命医科学研究センター グループディレクター	
c. 薬剤探索支援	
コムギ無細胞蛋白質合成技術を用いた試験管内インフラマソーム再構成の試み	54
増本 純也 愛媛大学プロテオサインスセンター 教授	
3. 既知の遺伝子変異陰性症例の遺伝子探索	
PIDJデータベースシステムを用いた自己炎症疾患のバイオバンク整備に関する研究	57
野々山 恵章 防衛医科大学校小児科学講座 教授	
IV. 学会等発表実績	63
V. 研究成果の刊行物・別刷	69

「自己炎症性疾患の治療標的分子の同定
および薬剤開発基盤の整備」班
班員・協力者名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	平家 俊男	京都大学大学院医学研究科発達小児科学	教授
研究分担者	西小森 隆太	京都大学大学院医学研究科発達小児科学	准教授
	原 寿郎	九州大学大学院成育発達医学小児科学	教授
	井田 弘明	久留米大学医学部呼吸器・神経・膠原病内科	教授
	神戸 直智	千葉大学大学院皮膚科学	准教授
	金澤 伸雄	和歌山県立医科大学皮膚科	講師
	谷内江 昭宏	金沢大学医薬保健研究域医学類小児科学	教授
	森尾 友宏	東京医科歯科大学小児科学	教授
	野々山 恵章	防衛医科大学小児科学講座	教授
	小原 収	理化学研究所統合生命医科学研究センター	グループディレクター
	古関 明彦	理化学研究所統合生命医科学研究センター	グループディレクター
	萩原 正敏	京都大学大学院形態形成機構学	教授
	奥野 友紀子	京都大学大学院医学研究支援センター	特定助教
	斎藤 潤	京都大学 iPS 細胞研究所	准教授
	増本 純也	愛媛大学プロテオサインスセンター	教授
研究協力者	伊藤 達也	京都大学大学院臨床研究総合センター	助教
	八角 高裕	京都大学大学院医学研究科発達小児科学	講師
	河合 朋樹	京都大学大学院医学研究科発達小児科学	特定助教

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

自己炎症性疾患の治療標的分子の同定および薬剤開発基盤の整備

研究代表者：平家俊男 京都大学医学研究科発達小児科学・教授

研究要旨

自己炎症性疾患の病態解明と、治療標的となる分子もしくは疾患特異的な形質の同定を試みる事を目的とし、以下の研究を重点的に行った。

（１）患者検体・モデル動物・患者由来細胞株（iPS 細胞を含む）を用いた病態解析

CAPS に関しては、疾患特異的 iPS 細胞を用いた解析系に於ける全身性炎症と骨幹端過形成に対する病態解明が進み、それぞれの病態に於ける治療標的分子を同定した。又、iPS 細胞由来の内皮細胞を用い、血管炎や動脈硬化の病態を解明する系が確立しつつある。MVK では、単球・マクロファージ系以外の細胞を巻き込んだ炎症機構の存在を示唆する所見が得られており、NNS では単球からの IP-10 産生が病態に関与している事が判明している。Blau/FMF/PAPA の 3 疾患に関しても疾患特異的 iPS 細胞や患者由来検体を用いた機能解析系の確立が進んでいる。

（２）モデル動物・患者由来細胞株（iPS 細胞を含む）を利用した革新的な候補薬剤のスクリーニング系の開発

CAPS の全身性炎症病態に対して、患者 iPS 細胞由来単球細胞株を用いて IL-1b をリードアウトとした薬剤スクリーニング系を構築した。骨幹端過形成に関する薬剤探索においては、軟骨前駆細胞における変異株・野生株間の SOX9 発現の差異に着目し、SOX9 promoter 活性の差を抑制する化合物を探索する系を構築した。この他、各疾患での薬剤スクリーニング系の開発を促進させる基礎的技術支援として、CRISPR/Cas9 技術による遺伝子改変マウス作製パイプラインの構築、単一細胞からのサイトカイン分泌計測系の確立、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成技術によって試験管内にインフラマソームの構成分子を再構成するシステムの構築を進めた。

（３）既知の遺伝子変異陰性症例の遺伝子探索

既知遺伝子変異除外症例にエクソーム解析を行い、Aicardi-Goutières症候群の新規原因遺伝子変異を同定し、NNS類似症例に責任候補遺伝子を見出した。加えて、原発性免疫不全症データベース (PIDJ) と自己炎症疾患データベースを連結し、患者検体保存の有無、採取回数、生体試料の保存場所、保存検体種類、生体試料採取時の患者状況などの情報が入力できるシステムの構築を進め、患者検体を用いた解析を円滑に進める基盤の整備を進めた。

<p>① 研究班の統括</p> <p>a. 研究班の総合推進 b. 研究班会議の開催 平家俊男：京都大学大学院医学研究科 発達小児科学・教授</p> <p>② 患者検体・遺伝子改変マウスを中心 にしたモデル動物・患者由来細胞株 (iPS細胞を含む) を用いた病態解析</p> <p>a. CAPS 西小森隆太：京都大学大学院医学研究 科発達小児科学・准教授 原寿郎：九州大学大学院成育発達医学 小児科学・教授</p> <p>b. MKD 平家俊男：京都大学大学院医学研究科 発達小児科学・教授</p> <p>c. Blau 神戸直智：千葉大学大学院医学研究院 皮膚科学・准教授</p> <p>d. NNS 金澤伸雄：和歌山県立医科大学医学部 皮膚科・講師</p> <p>e. FMF 谷内江昭宏：金沢大学医薬保健学域医 学類小児科学・教授 井田弘明：久留米大学医学部呼吸器・ 神経・膠原病内科 教授</p> <p>f. PAPA 森尾友宏：東京医科歯科大学小児科 学・教授</p>	<p>③ モデル動物・患者由来細胞株 (iPS 細胞を含む) を利用した革新的な候補 薬剤のスクリーニング系の開発</p> <p>a. CAPS 西小森隆太：京都大学大学院医学研究 科発達小児科学・准教授</p> <p>b. Blau 神戸直智：千葉大学大学院医学研究院 皮膚科学・准教授</p> <p>c. 疾患マウスモデル作成 古関明彦：理化学研究所統合生命化学 研究センター生物物理・グループディ レクター</p> <p>d. 薬剤探索支援 増本純也：愛媛大学プロテオサインス センター病理学部門・教授</p> <p>④ 既知の遺伝子変異陰性症例の遺伝 子探索</p> <p>小原收：理化学研究所統合生命化学研 究センター統合ゲノミクス研究グル ープ・グループディレクター 野々山恵章：防衛医科大学小児科学講 座・教授</p>
--	--

A. 研究目的

自己炎症性疾患は、自然免疫系関連遺伝子変異により発症する、周期性発熱を主症状とする遺伝性疾患である。その臨床症状よりリウマチ膠原病疾患の鑑別診断として重要であり、本邦でも診断症例が蓄積されつつあるが、標準的な診療手順は未確立である。平成 24・25 年度に組織された、厚生労働科学研究費補助金“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”班に於いて、自己炎症性疾患の診療基盤の整備と全患者登録システム構築が進み、患者臨床情報と研究資料の集積が可能となった。更に、抗 IL-1 療法をはじめとした新規治療法の導入が進み、特に Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) では全身性炎症の制御が可能となった。しかし、関節病変など制御困難な臓器合併症が依然として残存しており、臓器特異的な病態の解明と、それに基づいた新規治療薬の開発が望まれている。同様な問題がその他の疾患にも残存している事に加え、原因遺伝子は特定されているものの病態解明が不十分で治療標的分子が未同定の疾患も残っており、これらの疾患では既存の治療薬が奏効しないため、革新的な治療薬の開発が求められている。

上記の問題を解消するため、CAPS・Mevalonate kinase deficiency (MKD)・Blau 症候群 (Blau)・中條・西村症候群 (NNS)・家族性地中海熱 (FMF)・PAPA 症候群 (PAPA) の 6 疾患を対象とし、病態の解明と、治療標的となる分子もしくは疾患特異的な形質の同定を試みる事を本研究の目的とする。

B. 研究計画・方法

本研究の目的を達成する為、(1) 患者検体・遺伝子改変マウスを中心にしたモデル動物・患者由来細胞株 (iPS 細胞を含

む) を用いた病態解析、(2) モデル動物・患者由来細胞株 (iPS 細胞を含む) を利用した革新的な候補薬剤のスクリーニング系の開発、(3) 既知の遺伝子変異陰性症例の遺伝子探索、の 3 つを基本計画として掲げる。平成 29 年度までに病態解析に基づく標的分子を同定すると共に薬剤スクリーニング系を確立し、CAPS・MKD に関しては平成 28 年度中に、その他の疾患は平成 30 年度以降に創薬のシーズ選定を行う。

(1) 患者検体・遺伝子改変マウスを中心にしたモデル動物・患者由来細胞株 (iPS 細胞を含む) を用いた病態解析

A : CAPS

患者由来 iPS 細胞を用い、炎症に関与する単球・マクロファージ、骨幹端過形成の主要病態と考えられる肥大軟骨、血管炎や動脈硬化に関与する血管内皮細胞の病態解析を行い、標的分子もしくは疾患特異的な形質の同定を行う。

B : MKD

患者末梢血由来差血球細胞、及び疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解析により、標的分子もしくは疾患特異的な形質の同定を行う。in vivo モデルとして、遺伝子改変マウスを作製する。

C : Blau

疾患特異的 NOD2 変異体を遺伝子導入した単球系細胞株、疾患特異的 iPS 細胞、TALEN テクノロジーで遺伝子を正常化した isogenic コントロール iPS 細胞を用いた病態解析を行い、標的分子もしくは疾患特異的な形質の同定を行う。

D : NNS

モデルマウス解析により、疾患病態を代表する標的細胞の同定及びその解析を行う。プロテアソーム関連酵素活性測定系と PSMB8 関連遺伝子解析系を樹立する。

E : FMF

典型的な症状を示すエクソン10変異を有する症例と、非典型的な症状を示すエクソン3変異を有する症例より各々疾患特異的 iPS 細胞を作成し、疾患の標的細胞と考えられる単球・好中球への分化を行う。同時に、典型例・非典型例の患者検体を集積し、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析を用いた病態解明を進める。

F: PAPA

疾患特異的 iPS 細胞を作成し、標的細胞と想定されている単球・好中球への分化を行う。遺伝子改変マウスを作成する。同時に、患者末梢血由来好中球と単球を用いた解析を行う。

(2) モデル動物・患者由来細胞株 (iPS 細胞を含む) を利用した革新的な候補薬剤のスクリーニング系の開発

A: CAPS

炎症に関与する単球・マクロファージ、及び肥大軟骨を用いた薬剤スクリーニング系を確立する。

B: Blau

候補薬剤が確立された際の治療効果判定指標として、関節エコーによる臨床的炎症評価系を確立する。

C: 疾患マウスモデル作成

各疾患の病態解析と in vivo での薬剤評価系を確立する事を目的とし、MVK と PAPA のモデルマウスを作製する。

D: 薬剤探索支援

小麦発現系を用いたインフラマソーム阻害薬のスクリーニング系を確立する。

(3) 既知の遺伝子変異陰性症例の遺伝子探索

患者登録システムを活用し、遺伝性の自己炎症性疾患が疑われるものの既知の遺伝子に異常を認めない症例を集積し、原因遺伝子探索を進める。同時に、このシ

ステム自体の精度向上と効率化を図る。

(倫理面への配慮)

1) 患児及びその家族の遺伝子解析の取扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”及び文部科学省研究振興局長通知に定める細則に沿い、提供者その家族血縁者その他の関係者の人権及び利益の保護について十分配慮しながら研究する。

2) 本研究は、治療薬剤の標的分子を同定することを目的として、バイオマーカー選定と評価に関する研究も設定している。その目的達成のための1つの方策として、同一疾患の中で異なる変異を有する患者から作製した iPS 細胞を用いてバイオマーカーに関する研究を含む。患者の同意・協力とともに、個人情報取り扱いの配慮を必要とする研究であるため、京都大学医学部医の倫理委員会に「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

申請を行い、平成20年6月4日付けで実施に関して承認済みである。今後の研究はその内容を忠実に遵守して行う。

3) ヒト iPS 細胞の使用に関しては、ヒト ES 細胞で規定された使用に関する規則をそのまま遵守することを「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」において定めており、同規則を遵守して研究を行う。

4) 本研究は生体試料の採取をとまなう研究であり、また患者登録において患者臨床情報等を扱う。よって個人情報保護を厳密に扱う必要があり、“疫学研究倫理指針”および“臨床研究倫理指針”を遵守し研究計画を遂行する。

C. 研究成果

(1) 患者検体・遺伝子改変マウスの中

心にしたモデル動物・患者由来細胞株 (iPS 細胞を含む) を用いた病態解析

A : CAPS

自己炎症性疾患では、血管炎に伴う動脈硬化 (アテローム硬化) および内皮機能低下が報告されている。この病態への内皮細胞の関与について解明する為、CAPS の最重症型である CINCA 症候群患者より iPS 細胞を樹立し、血管内皮細胞および血管壁細胞へ分化誘導を行った。今後は炎症性サイトカインや mRNA の発現解析などの手法を用いて多角的に解析を行う予定である。

CAPS で認められる骨幹端過形成に関しては、NLRP3 変異体細胞モザイク患者より樹立した野生型と変異型 iPS 細胞からの軟骨分化系を用いて解析を行った。その結果、変異株では野生株に比べて軟骨分化主要制御因子である SOX9 の発現が亢進し、軟骨の細胞外基質の産生が IL-1 β 非依存性に亢進している事が明らかとなった。

B : MKD

患者および健常者由来 iPS 細胞より分化させた CD14 陽性細胞を精製し、LPS や ATP 刺激によるサイトカイン濃度を測定したが、患者とコントロールで分泌には差がなかった。一方、患者 PBMC を LPS で刺激した場合、非発作時には患者と健常コントロールとの間でサイトカイン分泌に差を認めなかったが、発作時には IL-1 β 、IL-6 などの過剰分泌を認めた。この差は、分離した単球を単独刺激した場合より末梢血単核球全体を刺激した場合に顕著であり、MVK の炎症病態にリンパ球など単球以外の細胞が関与している事が示唆された。

C : Blau

NOD2 遺伝子に R334W 変異をヘテロに有する患者の末梢血から、京都大学の iPS 細胞研究所プロトコールに従い iPS 細胞

を樹立した。続いて、樹立した患者由来疾患特異的 iPS 細胞からマクロファージ・樹状細胞へと分化する事に成功した。今後これらの細胞を用いた病態解析を行うと共に、治療標的分子や疾患特異的形質の同定を行う。

D : NNS

NNS 患者由来細胞や iPS 細胞を用いた機能解析、*Psm8* 遺伝子変異導入モデルマウス作成と解析、新たな NNS 類似症例における網羅的遺伝子解析を行ったところ、以下の3点が明らかとなった。① 抗 IL-6 受容体抗体を投与した患者 2 例において炎症・萎縮ともに明らかな軽減は認められず、CRP 値と関係なく血清中 IP-10 が高値を持続したことから、NNS の病態形成においては IL-6 よりも IP-10 などの IFN 誘導因子が大きな役割を担うことが示唆された。更に、患者末梢血単球及び iPS 細胞由来単球とも、正常コントロール細胞に対して IFN γ 刺激に対する IP-10 産生が亢進していることから、IP-10 産生の責任細胞は単球であることが示唆された。② NNS 関連 *Psm8* 変異ノックインマウスに於いて患者と同様 $\beta 5i$ に加えて他の誘導サブユニットにおいても成熟不全を認め、分子レベルで NNS の病態が再現された。自然免疫系を活性化する系としてイミキモド誘発皮膚炎を誘導したところ、コントロールマウスに比べて激しい皮膚炎を生じた。③ NNS と臨床的によく似る 3 症例に対してプロテアソーム関連遺伝子のパネル解析とエキソーム解析を行った結果、1 例に *PSMB9* 遺伝子の新規ミスセンス変異をヘテロで見出した。一方、1 例は患者とその父ともに *TREX1* 遺伝子に既知のヘテロ変異を持つ Aicardi-Goutieres 症候群 (AGS) であり、残る 1 例は未解明である。今後、これらの解析の推進により有効な治療法の開発につながる事が期待される。

E : FMF

FMF 典型例 M694I/E148Q : 2 名、非典型例 P369S/R408Q : 2 名より疾患特異的 iPS 細胞の作成を行った。又、MEFV 遺伝子検索を施行した症例 225 例について、その臨床像や治療反応性、血清サイトカインと遺伝子変異との関連を検討したところ、Exon 10 変異の全て、E84K 変異のほとんどは典型的な FMF の臨床像を示し、他の変異の場合は多様な臨床症状が観察される事が明らかとなった。Exon 10 変異のほとんどはコルヒチン投与が著効したが、他の変異では E84K、G304R、S503C 変異例で高率に有効性が認められた。Exon 10 に変異を有する典型例では持続的な IL-18 高値が特徴的で、長期的にはコルヒチンによる病態の改善に伴い正常化する傾向が観察された。

F : PAPA

責任遺伝子産物である PSTPIP1 の機能を解明するために、野生型および変異型の細胞膜透過性 PSTPIP1 組換えタンパクを好中球に導入して、その機能を apoptosis および ROS 産生から評価した。その結果、変異 PSTPIP1 の導入により Apoptosis 亢進が認められたが、ROS 産生に関しては、タンパクの安定性を保つために用いる protease inhibitor の作用により測定ができなかった。この問題を克服するモデル細胞を作成すべく、CRISPR/CAS9 を用いた knock-in PLB-985 の作成に向けて、guide RNA をデザインし、その切断効率等の検討に入っている。

又、患者好中球において細胞内基質のチロシンリン酸化について検討を行ったところ、顕著にリン酸化が亢進する分子が検出され、他にもいくつかの過リン酸化バンドが認められた。今後、過リン酸化バンドの同定とともに、PSTPIP1 (wt および mutant) と会合する分子を同定し、治療標的分子の同定と治療薬探索に向かい

たい。

(2) モデル動物・患者由来細胞株 (iPS 細胞を含む) を利用した革新的な候補薬剤のスクリーニング系の開発

A : CAPS

炎症病態を抑制する薬剤のスクリーニング系として、患者 iPS 細胞由来単球細胞株を用い、IL-1b をリードアウトとしたスクリーニング系の構築を行った。患者 iPS 細胞由来単球細胞株を MCSF 存在下でマクロファージへ分化させ、384 穴プレートに播種し、LPS : 2mcg/ml で刺激後、回収した上清に HTRF 試薬を加えてマイクロプレートリーダーで測定を行い、安定して Z' factor > 0.5 を確保し用量依存性に阻害剤の効果が評価できる系を構築した。

骨幹端過形成に関する薬剤探索においては、軟骨分化の途中課程の細胞である軟骨前駆細胞における変異株・野生株間の SOX9 発現の差異に着目し、この SOX9 promoter 活性の差を抑制する化合物を luciferase assay を用いて探索する系を構築した。

上記2つのスクリーニング系に於いて、現在化合物ライブラリを用いた 1 次スクリーニングを施行中である。

B : Blau

遺伝子診断の確定している症例の滑膜病変を関節エコーで網羅的に評価した結果、本症の滑膜病変は広く関節部位に分布しその多くが無痛性である事が反映した。炎症は関節滑膜よりも腱鞘滑膜に認められ、特に手関節および足関節で高頻度に腱鞘滑膜炎を認めた。治療前後の経時的変化が確認出来た 2 症例の解析からは、本症の関節炎に TNF 阻害剤+MTX 治療が有効であること、関節エコー所見が既存の関節炎の評価方法よりも鋭敏に治療効果を反映することが示唆された。以上の結果より、炎症のコントロール指標と

して関節エコーが有用であることが示された。

C: 疾患マウスモデル作成

CRISPR/Cas9 技術によって遺伝子改変マウスを作製するパイプラインを構築した。これにより、公開されているガイド RNA デザイン法によりガイド RNA を作製し、MVK 遺伝子において、ヒトで見出された変異を該当するマウス遺伝子に導入するためのノックインマウス作製実験を進めた。PSTPIP1 遺伝子についても、マウス受精卵にマイクロインジェクションするガイド RNA 作製などための材料調製を行った。

D: 薬剤探索支援

単一細胞からの分泌計測系を確立し、ヒト単球からの IL-1 β 放出が細胞膜の破壊の直後に起きることを実時間観察した。これにより、個々の細胞からの IL-1 β 放出が細胞死ととが密接に関係している事を確認する事が出来た。更に、カスペース 1 の活性を直接モニターできるセンサーと組み合わせて蛍光顕微鏡観察をする事で、インフラマソームの活性化によるプロカスペース 1 の活性化、細胞膜の破壊、IL-1 β 放出に至る時間経過をマウスマクロファージの系で観察することに成功した。加えて、インフラマソームの構成分子をコムギ胚芽無細胞蛋白質合成技術によって合成し、試験管内にインフラマソームを再構成するシステムの構築を進めた。

(3) 既知の遺伝子変異陰性症例の遺伝子探索

原発性免疫不全症データベース (Primary Immunodeficiency Database in Japan: PIDJ) に作製済みの検体歴データベース (免疫不全症検体登録) を活用し、同じ形式を自己炎症疾患のデータベースに作製し、患者検体保存の有無、採取回

数、生体試料の保存場所、保存検体種類、生体試料採取時の患者状況などの情報が入力できるシステムの構築を進めた。更に、定期的に自己炎症のデータベースに入力された検体データとPIDJのデータベースのデータ補完を行う事とした。以上により、自己炎症疾患患者の保存検体について、検体取得した時点での患者の臨床状態や臨床検査データがデータベース検索で分かるようになり、今後、患者検体を用いた解析を行う際に利便性が高いシステムの構築が可能となった。

自己炎症性疾患診断を迅速に進めるため、遺伝子パネルに解析遺伝子を追加し、既知遺伝子における変異による症例を除外したものについて、新規にエクソーム解析を行った。発端者を含むトリオ解析を原則として進め、今年度の解析総数は19検体であった。同時に、既に得られていたエクソーム解析データからの疾患原因の候補変異の絞り込みを継続し、Aicardi-Goutières症候群の新規の原因遺伝子変異を報告した。エクソーム解析で可能性の高い疾患原因変異候補が見出せなかった症例については、他の可能性を調べるために、ゲノムワイドに遺伝子コピー数変化を調べるアプローチも並行して行った。

D. 考察

自己炎症性疾患は、自然免疫系関連遺伝子変異により発症する遺伝性疾患である。その臨床症状よりリウマチ膠原病疾患の鑑別診断として重要であり、本邦でも診断症例が蓄積されつつあるが、標準的な診療手順は未確立である。抗 IL-1 療法をはじめとした新規治療法の導入が進み、一部の疾患では全身性炎症の制御が可能となった。しかし、関節病変など制御困難な臓器合併症が依然として残存しており、臓器特異的な病態の解明とそれ

に基づいた新規治療薬の開発が望まれている。本研究では、CAPS・MKD・Blau・NNS・FMF・PAPAの6疾患を対象とし、病態の解明と、標的となる分子もしくは疾患特異的な形質の同定を進めた。

上記疾患の内、最も病態解明の進んでいるCAPSに関しては、疾患特異的iPS細胞を用いた解析系に於ける全身性炎症と骨幹端過形成に対する治療標的分子が同定されており、これを基に確立した薬剤クリーニング系を用いて計画通りに1次薬剤スクリーニングを施行中である。

MVKに関しては、当初想定された単球・マクロファージ系細胞を中心とした炎症病態とは異なる結果が得られており、十分な病態解析が行われているとは言い難い。しかし、本年度に得られた結果は従来の概念を覆す可能性を秘めたものであり、十分な時間を掛けて解析を進めるべきものであると考えられる。もともと本年度中の病態解明を予定していた訳では無く、マウスモデルの作成もほぼ予定通りに進んでいる。

Blau/NNS/FMF/PAPAの4疾患に関しては、病態解明や治療標的分子の同定にはかなりの時間を要すると想定されていた。その中にあり、疾患特異的iPS細胞や患者由来検体を用いた機能解析系の確立が進んでおり、ほぼ予定通りの進展を見せていると考えている。

新たな自己炎症性疾患原因遺伝子の探索に於いては、まずは既知の自己炎症性疾患診断を迅速に進める目的で、遺伝子パネルに解析遺伝子を追加した。既知遺伝子における変異による症例を除外したものについて、新規にエクソーム解析を行いAicardi-Goutières症候群の新規原因遺伝子変異を発見した。

更に、患者検体を用いた今後の解析を円滑に進める目的で原発性免疫不全症データベース(PIDJ)と自己炎症疾患データ

ベースを連結し、患者検体保存の有無、採取回数、生体試料の保存場所、保存検体種類、生体試料採取時の患者状況などの情報が入力できるシステムの構築を進めた。今後、患者検体を用いた解析を行う際に利便性が高いシステムが構築されると期待される。

E：結論

平成26年度は「自己炎症性疾患の治療標的分子の同定および薬剤開発基盤の整備」に向け、ほぼ予定通りの研究が遂行できたと考えている。一部の疾患に解析の遅れはあるものの基盤の整備は着実に進んで居り、Aicardi-Goutières症候群の新規の原因遺伝子同定など、自己炎症性疾患の広がりを感じさせる成果を得る事も出来た。自然免疫系の異常による炎症病態は生活習慣病などとも深く結びついており、自己炎症性疾患の病態解明が医療全体に及ぼす影響は非常に大きいと期待されるものである。来年度以降も引き続き研究を進めて行く。

F. 健康危険情報

特記すべき事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

BCG vaccination in patients with severe combined immunodeficiency: complications, risks, and vaccination policies. Marciano BE, Huang CY, Joshi G, Rezaei N, Carvalho BC, Allwood Z, Ikinogullari A, Reda SM, Gennery A, Thon V, Espinosa-Rosales F, Al-Herz W, Porras O, Shcherbina A, Szaflarska A, Kiliç Ş, Franco JL, Gómez Raccio AC, Roxo P Jr, Esteves I, Galal N, Grumach

AS, Al-Tamemi S, Yildiran A, Orellana JC, Yamada M, Morio T, Liberatore D, Ohtsuka Y, Lau YL, Nishikomori R, Torres-Lozano C, Mazzucchelli JT, Vilela MM, Tavares FS, Cunha L, Pinto JA, Espinosa-Padilla SE, Hernandez-Nieto L, Elfeky RA, Ariga T, Toshio H, Dogu F, Cipe F, Formankova R, Nuñez-Nuñez ME, Bezrodnik L, Marques JG, Pereira MI, Listello V, Slatter MA, Nademi Z, Kowalczyk D, Fleisher TA, Davies G, Neven B, Rosenzweig SD. *J Allergy Clin Immunol.* 133:1134-41. 2014

Real-time single-cell imaging of protein secretion. Shirasaki Y, Yamagishi M, Suzuki N, Izawa K, Nakahara A, Mizuno J, Shoji S, Heike T, Harada Y, Nishikomori R, Ohara O. *Sci Rep.* 4:4736. 2014

Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations. Oda H, Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, Hijikata A, Nishikomori R, Funatsuka M, Ohshima Y, Sugawara Y, Yasumi T, Kato H, Shirai T, Ohara O, Fujita T, Heike T. *Am J Hum Genet.* 95:121-5. 2014

Enhanced chondrogenesis of iPS cells from neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase-1-independent cAMP/PKA/CREB pathway. Yokoyama K, Ikeya M, Umeda K, Oda H, Nodomi S, Nasu A, Matsumoto Y, Izawa K, Horigome K, Kusaka T, Tanaka T, Saito MK, Yasumi T, Nishikomori R, Ohara O, Nakayama N, Nakahata T, Heike T, Toguchida J. *Arthritis Rheumatol.* 67:302-314. 2015

2. 学会発表

Muckle-Wells 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異の検討 中川権史、西小森隆太、Eva Gonzalez-Roca、Juan I. Arosutegui、河合利尚、梅林宏明、武井修治、小林法元、小原收、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、平家俊男 第 37 回日本小児遺伝学会学術集会 2014. 4. 10

次世代シーケンサーを用いた、“変異陰性 TRAPS” における体細胞モザイクの検索 中川権史、西小森隆太、河合朋樹、八角高裕、平家俊男 第 117 回日本小児科学会学術集会 2014. 4. 11-13

自己炎症性疾患における診療研究の新展開 “炎症” と小児発熱性疾患 疾患特異的 iPS 細胞を用いた CINCA/NOMID における骨幹端家系性の機序解 西小森隆太、横山宏司、梅田雄嗣、池谷真、中川権史、納富誠司郎、八角高裕、田中孝之、斎藤潤、小田紘嗣、小原收、中山直樹、戸口田淳也、平家俊男 第 117 回日本小児科学会学術集会 2014. 4. 11-13

Muckle-Wells 症候群における NLRP3 体細胞モザイク変異の検討 中川権史、西小森隆太、河合朋樹、八角高裕、平家俊男 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2014. 4. 24-26

ヒト免疫とリウマチ性疾患 自己炎症性疾患とリウマチ性疾患の Crossroad CINCA 症候群/NOMID の骨幹端過形成をとりあげて 西小森隆太、横山宏司、梅田雄嗣、池谷真、中川権史、納富誠司郎、八角高裕、田中孝之、斎藤潤、小田紘嗣、小原收、中山直樹、戸口田淳也、平家俊

男 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会
2014. 4. 24-26

インフラマソーム 西小森隆太、中川権史、
横山宏司、平家俊男 第43回日本臨床免疫
学会総会 2014. 9. 25-27

H：知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：軟骨過形成疾患の予防
および治療剤ならびにそのスクリー
ニング方法

出願番号：特願 2014-227500

出願日：2014/11/7

発明者：戸口田淳也、西小森隆太、
横山宏司、池谷真、平家俊男

出願人：国立大学法人京都大学

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

iPS 細胞を用いた自己炎症性疾患における血管炎・動脈硬化の病態解明

原 寿郎 九州大学大学院成育発達医学小児科学・教授

研究協力者：小野宏彰、小原洋志、坂本千香、石村匡崇、山村健一郎、
高田英俊、谷健三郎

研究要旨

自己炎症疾患は自然免疫系の異常により慢性的に炎症を繰り返す疾患である。周期性発熱や関節炎症状を呈する他、ぶどう膜炎などの血管炎や、血管炎に伴う動脈硬化（アテローム硬化）および内皮機能低下が報告されている。自己炎症性疾患における血管炎は、血管組織におけるマクロファージの活性化が重要な役割を果たしていると考えられてきたが、内皮細胞自体の関与については明らかにされていない。自己炎症性疾患である「CINCA 症候群」「家族性地中海熱」「PAPA 症候群」において、末梢血細胞より iPS 細胞を樹立し、血管内皮細胞および血管壁細胞へ分化誘導を行い、炎症性サイトカインや mRNA の発現解析などの手法を用いて多角的に解析することで、自己炎症疾患における血管炎・動脈硬化の機序を解明したい。

A. 研究目的

自己炎症性疾患とは、繰り返す、あるいは遷延する炎症性疾患であり、感染などの外因や自己抗体、抗原特異的 T 細胞が病態に関与していない疾患の総称である。CINCA（Chronic infantile neurologic cutaneous, and articular）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、自己炎症性疾患の代表的な疾患であり、それぞれ責任遺伝子として、NLRP3、MEFV および PSTPIP1 が知られている。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 β を中心とした炎症性サイトカインの産生亢進が基本的な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 β 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（Nature 2010）。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。当施設において、CINCA 症候群患児では動脈硬化性病態をきたしやすいことを初めて報告した（Rheumatology 2014）。CINCA 症候群においても全身の炎症性病態が動脈硬化を促進するものと考えられる。

本研究では、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) iPS 細胞の作成、血管内皮細胞および血管壁細胞（平滑筋）の分化誘導、解析

CINCA 症候群、家族性地中海熱、PAPA 症候群の疾患由来 iPS 細胞を樹立、培養する。iPS 細胞より、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞へ分化誘導を行い、得られた細胞を解析する。

2) 関連する各種リガンドやサイトカインで刺激し、自己炎症性疾患における血管炎・動脈硬化の病態を解明する

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

自然免疫系を活性化する各種のリガンドやサイトカイン、薬剤で細胞を刺激し、その反応を解析することにより、各疾患における血管炎・動脈硬化の病態を機能的に明らかにする。

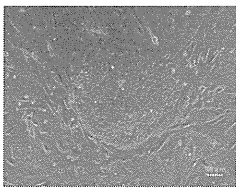
（倫理面への配慮）

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

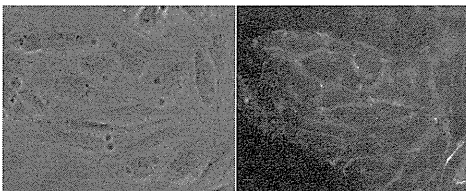
CINCA 症候群、家族性地中海熱、PAPA 症候群の患者から iPS 細胞を作成した。樹立の方法は、センダイウイルスを用いて Oct3/4, c-Myc, Klf4, Sox2 の 4 遺伝子を末梢血由来の T リンパ球に組み込み、iPS 細胞へと再プログラムした。未分化マーカー発現を免疫染色で確認した。血管内皮細胞や血管壁細胞への効率的な分化誘導系の確立に向けた研究を行っている。iPS 細胞から胚様体形成を行い、血管内皮細胞および平滑筋細胞への分化誘導を行った。それぞれ、VE-cadherin および SMA α の発現を免疫染色で確認し、それぞれの細胞への分化を確認した。

図： FMF iPS cell



図：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

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や、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、疾患に直接関連した遺伝的背景を有する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ことができると考え、研究を継続している。

E. 結論

CINCA 症候群、家族性地中海熱、PAPA 症候群の 3 疾患の患者由来 iPS 細胞を樹立した。iPS 細胞から血管内皮細胞および血管壁細胞へと分化誘導することができた。

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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

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.

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

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

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

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.

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.

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

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

学会発表

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

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

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

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

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
（予定を含む。）
なし。

メバロン酸キナーゼ欠損症の治療標的分子の同定および薬剤開発基盤の整備

研究代表者 平家俊男 （京都大学大学院医学研究科発達小児科学 教授）
研究協力者 吉岡耕平 （京都大学大学院医学研究科発達小児科学 医員）
研究協力者 田中孝之 （京都大学大学院医学研究科発達小児科学 医員）

研究要旨

Mevalonate kinase deficiency (MKD) 患者より樹立した iPS 細胞および患者血液を用いて病態解析を行った。発作時の患者末梢血単核球(PBMC)から著明なサイトカインの分泌が見られた。既存の報告では MK 活性の低下した単球がサイトカインを出しやすい状態にあることが疾患の病態と推測されていたが、MK 活性の低下した単球以外の細胞が、単球と相互作用することによって、サイトカイン分泌がさらに促進されている可能性が示唆された。血球間の相互作用を遮断するという新規治療法開発のため、相互作用機序の解明を進めたい。

A. 研究目的

MKD では従来の治療法に加え生物学的製剤の導入により炎症コントロールの改善が認められているが、重症例では未だ不十分な状態である。コレステロール代謝に関わる遺伝子 *MVK* の変異が炎症の表現型にどうつながるかは、いまだに不明である。病態の解明がよりよい治療法の開発につながると考え、iPS 細胞および患者検体を用いて解析を行った。

B. 研究方法

遺伝子変異の異なる MKD 患者 3 名より皮膚線維芽細胞を採取し、エピソーマルベクターを用いて iPS 細胞を樹立した。サイトカインなどで刺激して iPS 細胞を単球へ分化させ、サイトカイン分泌能を評価した。また当院通院中の患者より血液を採取し、機能を解析した。京都大学医学部倫理委員会にて承認をうけた“ヒト原発性免疫不全症の臨床的遺伝子診断” (G-432) に基づいて、インフォームドコンセントを得た後に解析をおこなった。

C. 研究結果

患者および健常者由来 iPS 細胞より分化させた浮遊細胞の CD14 陽性率は 80%以上であり、効率よく単球を得ることができた。磁気ビーズを用いて CD14 陽性細胞を精製した。LPS や ATP で刺激を行い、培養上清中のサイトカイン濃度を測定したところ、患者とコントロールで分泌には差がなかった (図 1)。

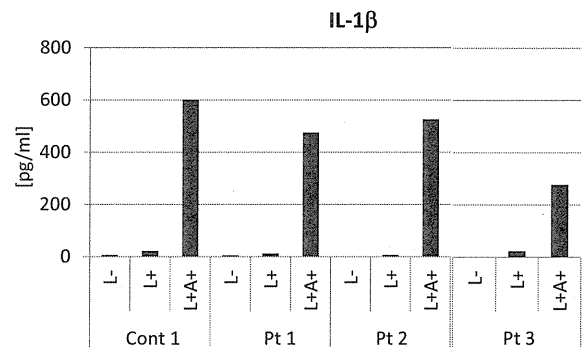


図 1 iPS 細胞由来単球からの IL-1β分泌

健常者 (cont 1) および 3 名の患者 (Pt1, Pt2, Pt3) 由来 iPS 細胞から作製した単球を無刺激 (L-)、LPS 刺激 (L+)、LPS+ATP 刺