

激 (L+A+)で4時間培養した後に、上清中のサイトカイン濃度を測定した。

患者 PBMC を LPS で刺激した時には IL-1 β を含むサイトカインが健常者に比べて過剰に分泌されるとされている。細胞では非発作時にはサイトカイン分泌が健常者と差がない一方、発作時には IL-1 β , IL-6 などの過剰分泌を認めた。特に、単球単独を刺激した場合は2倍程度の差しか認められなかったが(図2)、PBMC 全体を刺激した場合は著明な差が見られた(図3)。

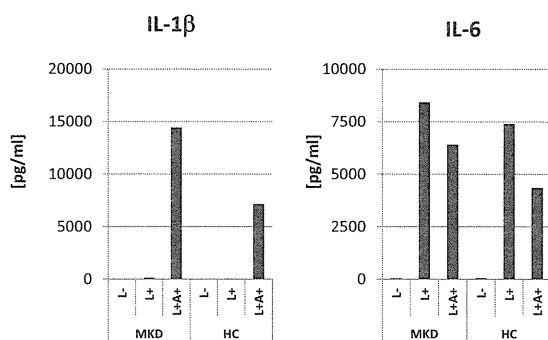


図2 発熱発作時の単球からのサイトカイン分泌

患者(MKD) および健常者 (HC) 由来の単球を精製し図1と同様の条件で刺激し、上清中のサイトカイン濃度を測定した。

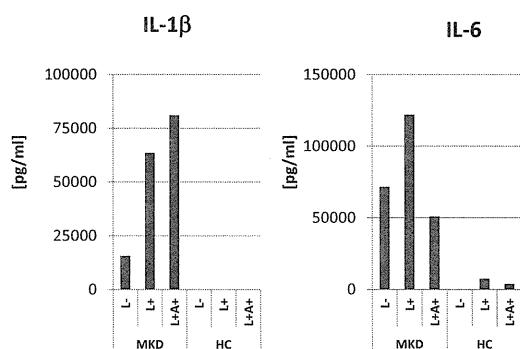


図3 発熱発作時のPBMCからのサイトカイン分泌

図2と同日に採取したPBMCを同様の条件で刺激し、上清中のサイトカイン濃度を測定した。

これまで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。

D. 考察

現在の血球分化法でiPS細胞から作成される血球は一次造血の細胞に近く、通常のヒトで見られる二次造血を反映していない可能性が指摘されている。患者由来iPS細胞を用いた単球で、健常者と差が出なかったのは、血球分化法の制約と関連があるかもしれない。

一方、発作時の患者細胞ではIL-1 β , IL-6などの過剰分泌を認め、さらに単球単独を刺激した場合よりPBMC全体を刺激した場合に顕著なサイトカイン分泌を認めた。これは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。この相互作用の機序が解明できれば、発作時に血球間相互作用を抑えることで、炎症を鎮静化させるなど、新規治療法の開発につながる可能性がある。

E. 結論

MKD患者検体を用いた解析により、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。新規治療法の開発へつなげるため、症例数を増やして再現性を確認し、機序の解明を進めたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells

- syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. Nakagawa K, Gonzalez-Roca E, Souto A, Kawai T, Umebayashi 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 JI. *Ann Rheum Dis.* 74:603-610. 2015
2. Enhanced chondrogenesis of induced pluripotent stem cells from patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase 1-independent cAMP/Protein Kinase A/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
3. Aicardi-Goutieres 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* 95:121-125. 2014
4. Munc13-4 deficiency with CD5 downregulation on activated CD8+ T cells. Wada T, Yasumi T, Toma T, Hori M, Maeda S, Umeda K, Heike T, Adachi S, Usami I, Yachie A : *Pediatr Int* 56:605-608. 2014
5. 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)* 53:448-458. 2014
6. 自己炎症性疾患の新展開(総説) 西小森隆太、中川権史、栗屋美絵、河合朋樹、八角高裕、平家俊男 *臨床リウマチ* 26巻 Page79-87. 2014
2. 学会発表
1. 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
2. 免疫疾患のホットトピック IBD患者では有意な Mucosal associated invariant T細胞の減少、アポトーシスの亢進が認められる 西小森隆太、日衛嶋栄太郎、河合朋樹、仲瀬裕志、鶴山竜昭、森本剛、八角高裕、松浦稔、吉野琢哉、池内浩基、久松理一、河田健二、酒井義治、千葉勉、

- 平家俊男 第 43 回日本臨床免疫学会総会
2014. 9. 25
3. 当科における FHL(家族性血球貪食性リンパ組織球症)スクリーニングの現状 堀雅之、八角高裕、西小森隆太、平家俊男 第 43 回日本臨床免疫学会総会 2014. 9. 25
4. アナキンラを用いて治療を行った高 IgD 症候群の 2 例 下寺佐栄子、西小森隆太、吉岡耕平、河合朋樹、八角高裕、平家俊男 第 24 回小児リウマチ学会総会・学術集会 2014. 10. 3
5. 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、小原収、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
6. 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
7. 患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の解明 横山宏司、西小森隆太、納富誠司郎、田中孝之、斎藤潤、梅田雄嗣、池谷真、中畑龍俊、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
8. 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
- G. 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

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
研究分担者 神戸直智 千葉大学大学院医学研究院皮膚科学 准教授

研究要旨

ブラウ症候群は、細胞内で微生物特異的な分子パターン認識に関わる NOD2 遺伝子の変異によって、主に皮膚、関節、眼に肉芽腫を来す自己炎症性疾患の 1 つである。疾患に関連する変異は NOD2 遺伝子の中央部の NOD 領域に確認され、これまで機能獲得型の変異と考えられ、実際に同定された変異は HEK293 細胞に強制発現させるとリガンドの非存在下で NF- κ B の転写亢進をもたらす。

しかしながら、NOD2 を発現する患者末梢血 CD14 陽性細胞を用いて発現する遺伝子を網羅解析したが、病態解明に繋がるような差違を健常者由来の検体との間に確認することはできず、また最近報告された R334Q に相当する変異をマウス Nod2 にノックインしたモデルマウスでは、むしろ機能喪失型を示唆するという結果が得られている。

これら遺伝子の活性から想定される結果とは一見すると矛盾する現象を説明するため、我々は患者由来疾患特異的 iPS 細胞の樹立に着手した。本検討によって、ヒト単球の分化段階においていつから NOD2 が発現してくるのか、また疾患関連変異をもった NOD2 の発現とともに、単球において NF- κ B の転写亢進が誘導されるのかを確認し、本症の病態に基づいた治療法確立のためのターゲットを明らかにできると期待される。

研究協力者

松江弘之・千葉大学大学院医学研究院
皮膚科学 教授

中野倫代・千葉大学大学院医学研究院
皮膚科学

江原瑞枝・千葉大学大学院医学研究院
皮膚科学

高田紗奈美・千葉大学大学院医学研究
院皮膚科学

中畑龍俊・京都大学 iPS 細胞研究・副所
長

斎藤潤・京都大学 iPS 細胞研究所臨床応
用研究部門疾患再現研究分野・准教授

A. 研究目的

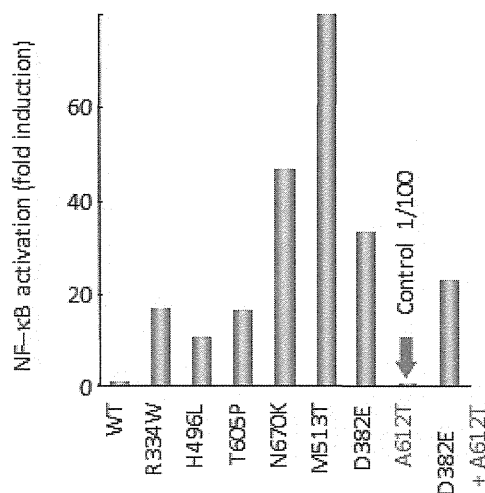
ブラウ症候群は自己炎症症候群に分類される疾患の 1 つであり、NOD2 遺伝子の変異を背景として皮疹、関節炎、ブドウ膜炎を三主徴とし、主に 4 歳以下で発症する。常染色体優性遺伝形式を示す家族性の疾患をブラウ症候群、孤発例を若年発症サルコイドーシス (early-onset sarcoidosis, EOS) と呼称して区別されることもあったが、ともに細胞内で微生物特異的な分子パターン認識に関わる NOD2 遺伝子の変異によって肉芽腫を来す同一の疾患であることから、2015 年 1 月から施行される指定難病 (110) 疾患では両者を区別せずにブラウ症候群としている。ここでも両者を区別せずにブラウ症候群としてまとめる。

ブラウ症候群は家系連鎖解析より消化管に肉

芽腫を来すクローン病とほぼ同一座に原因遺伝子があると推定されていたが、2001年にクローン病において発症に関連する遺伝子異常としてNOD2遺伝子の変異が同定されてまもなく、ブラウ症候群においてもNOD2遺伝子に変異があることが確認された。しかしながら、クローン病において報告されたNOD2遺伝子の変異がリガンド認識ドメインであるC末端のleucin-rich repeats (LRR)に位置し、リガンドに対して応答性を失う機能喪失性 (loss-of-function, LOF) 変異であるのに対して、ブラウ症候群では遺伝子変異は蛋白の自己重合化に関わる中央部に位置するNOD領域 (nucleotide-binding oligomerization domain) に位置し、リガンド非存在下でもNF- κ B転写が亢進する機能獲得型 (gain-of-function, GOF) 変異であると推定されていた。実際、我々が2005年に、国内でEOSとして報告されていた孤発例から同定したNOD2変異を用いて、HEK293細胞へと遺伝子導入を行ってそのNF- κ Bの転写活性をルシフェラーゼを指標として検討すると、ブラウ症候群において確認されるNOD2変異は図1に示すように、GOF型の変異であることが確認された。その一方で、GOF型の変異が如何にして皮膚や関節、眼に肉芽腫を来すかは、残念ながら依然として不明であり、このため病態に基づいた本症に対する治療法も確立していない。病態解明を目指して、我々もNOD2遺伝子変異が同定されたブラウ症候群患者の末梢血を用いて、健常者との比較を行ってきたが、末梢血中に置いてNOD2遺伝子を発現するCD14陽性単球を分離し、かずさDNA研究所の協力を得てそこに発現する遺伝子をGene

図1 EOS患者に同定されたNOD2変異とHEK293細胞へと発現させた時の自発的なNF- κ B転写活性の亢進 1症例からは健常者100ゲノム中に1つ同定されたA612変異とD382E変異の2つの変異が確認されたが、ブラウ症候群としての病態に関わっているのはGOF型の変異であるD382Eであると推定される。

Chipによって網羅的に解析したが、残念ながら



らこれまで報告してきた様に、健常者との間に炎症や細胞接着に関わる遺伝子発現や、HEK293細胞への過剰発現の実験系で想定されるようなNF- κ Bの転写亢進を示唆するような遺伝子発現も確認されなかった。さらに最近、ブラウ症候群で確認されるR334Q変異に相当する遺伝子変異をマウスNod2遺伝子に導入したノックインマウスが作られたが、興味深いことに、このマウスにおいてはブラウ症候群に認められるNod2変異はLOF型変異であると報告されるとともに、ブラウ症候群患者の末梢血を用いた検討においても、NOD2のリガンドであるMDPに対する反応性が、むしろ健常者に比して低下していると報告された。実際に、我々も外来で経過観察している薬物治療を行っていないブラウ症候群患者の末梢血を用いて、発症起点となったと推定されるBCG接種に着目して、5日間培養してマクロファージへの分化を誘導した細胞をBCGと共培養し、その上清中に放出される炎症性のサイトカインを測定したところ、上記の報告同様に、むしろブラウ症候群患者においてはサイトカインの産生が低下しているという結果が得られている (未発表データ)。このように遺伝子を強制発現させた実験系と、モデルマウスあるいは患者末梢血を用いた検討で、一見すると矛盾する結果が得られることから、ヒトの末梢血においてNOD2遺伝子の変異がいつから確認されるのか、また実際

に分化誘導した末梢血 CD14 陽性細胞において NF- κ B の転写亢進を示唆する様な所見が得られるのかを検討する目的で、iPS 細胞を用いた検討に着手することとした。

B. 研究方法

千葉大学医学部附属病院皮膚科の外来で経過観察している兄弟 (NOD2 遺伝子に R334W 変異をヘテロに有することが確認されている) に対して、その両親に文章で同意を得て末梢血を採取し、匿名化处理の上で京都大学の iPS 細胞研究所へと送付し、プロトコルに従い iPS 細胞を樹立した。

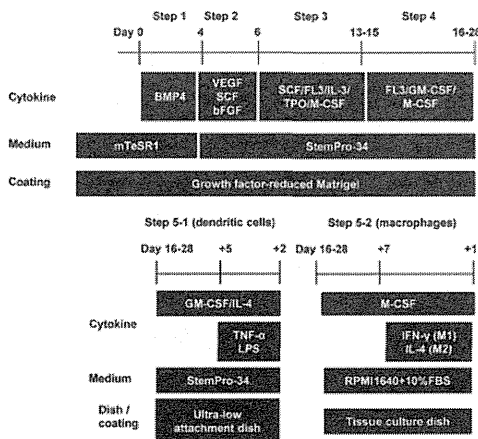
(倫理面への配慮)

疾患特異的遺伝子変異の同定、および患者由来疾患特異的 iPS 細胞の樹立および樹立された細胞の取り扱い当たっては、研究分担者が所属する千葉大学とともに京都大学のそれぞれの該当する倫理委員会に申請を行い、承認を得て、その内容を忠実に順守して研究を行っている。

C. 研究結果

NOD2 遺伝子に R334W 変異をヘテロに有する末梢血から、京都大学の iPS 細胞研究所においてプロトコルに従い iPS 細胞を樹立した。

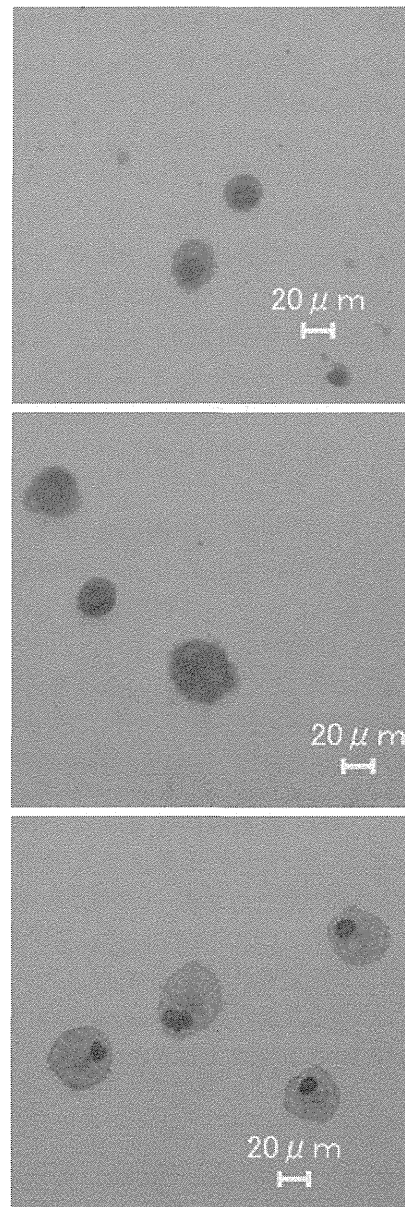
図 2 iPS 細胞からマクロファージ、樹状細胞へと分化誘導を行うプロトコル



樹立された iPS 細胞は、ゲノム DNA のシーケンシングにより、NOD2 遺伝子の 1000 番目の塩

基が C から T に変わる R334W の変異をヘテロに持つことを確認するとともに、正常核形 (46XY) であることを確認した。続いて、樹立した患者由来疾患特異的 iPS 細胞を、Yanagimachi らが 2013 年に報告した iPS 細胞からマクロファージ、樹状細胞へと分化誘導を行うプロトコル (図 2) に従って、CD14 陽性細胞、マクロファージ、および樹状細胞へと分化誘導されることを確認した (図 3)。

図 3 患者由来疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した CD14 陽性単球 (上)、樹状細胞 (中) およびマクロファージ (下)



D. 考察

これまでの検討によって、NOD2 遺伝子に R334W 変異を有する患者から樹立した iPS 細胞が、解析が先行する他の自己炎症症候群であるクリオピリン関連周期熱症候群 (cryopyrin-associated periodic syndrome, CAPS) での解析同様に、CD14 陽性の単球およびそこからマクロファージあるいは樹状細胞へと分化できることを確認することができ、この細胞を用いて十分な検証が行える目処がたった。しかしながら、先行した CAPS での検証では、患者由来 iPS 細胞を疾患関連変異体をもつ細胞と正常細胞とが混在するモザイク変異の症例から樹立することで、変異遺伝子以外の遺伝情報が全く同一のコントロール細胞を得ることができ、この両者を比較するといった実験が可能であった。このため本研究においても、まずは NOD2 遺伝子変異を正常へと戻した細胞を樹立し、変異遺伝子以外の遺伝情報が全く同一のコントロール細胞を得ることを目指して、その細胞取得のための実験に取りかかっている。

次の課題は、HEK293 細胞に変異 NOD2 を導入した際に確認される NF- κ B 転写の亢進が、果たしてヒトの単球においても確認されるかを検証することである。研究に iPS 細胞を用いる利点の 1 つは、プラスチック内においてヒトの細胞の正常分化を辿ることができることに加えて、幼弱な未分化の細胞に対してであれば遺伝子導入が比較的容易にできる点にある。この特色を利用して、予め NF- κ B の転写活性をモニターできるレポーターを組み込んだ細胞を樹立する予定である。

また、iPS 細胞から分化誘導した CD14 陽性細胞において、期待したような NOD2 の発現、あるいは疾患変異 NOD2 遺伝子の発現が誘導できたにもかかわらず NF- κ B の転写亢進が誘導出来なかった場合には、この iPS 細胞から分化誘導した CD14 陽性細胞を、マクロファージあるいは樹状細胞へと分化誘導する予定である。最近、組織中に分布するマクロファージや樹状細胞は細胞遊走因子であるケモカインに対する反応性などを検証

すると、末梢血 CD14 陽性細胞から分化した細胞よりも、むしろより個体発生段階のより幼弱な細胞から分化して、予め生体組織に分布している可能性が示唆されている。我々にとって幸いなことに、iPS 細胞から分化誘導したマクロファージや樹状細胞は、ケモカインへの反応性を検証すると、末梢血 CD14 陽性細胞から分化した細胞よりも、むしろこの組織に分布している細胞としての性格を強くもつ事が示唆されている。このため、これまで末梢血 CD14 陽性細胞を用いても示すことが出来なかった病態に、この iPS 細胞から分化誘導した CD14 陽性細胞からの分化誘導系を用いることで迫ることができるのではと期待している。

E. 結論

ブラウ症候群の病態解明と、それに基づいた治療法の確立のため、我々は本症の患者において同定される遺伝子変異を HEK293 細胞へと強制発現させた時の活性から想定される結果と、最近樹立された患者変異に相当する変異をマウス *Nod2* へと導入したモデルマウスにおいて確認される現象との間の矛盾を説明するため、患者由来疾患特異的 iPS 細胞の樹立に着手した。

本検討によって、ヒト単球の分化段階においていつから NOD2 が発現してくるのか、また疾患関連変異をもった NOD2 の発現とともに単球において NF- κ B の転写亢進が誘導されるのかを確認することで、本症の病態に基づいた治療法確立のためのターゲットが明らかにされると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文

- Ikeda K, Kambe N, Takei S, Nakano T, Inoue Y, Tomiita M, Oyake N, Satoh T,

Yamatou T, Kubota T, Okafuji I, Kanazawa N, Nishikomori R, Shimojo N, Matsue H, Nakajima H. Ultrasonographic assessment reveals detailed distribution of synovial inflammation in Blau syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16: R89.

和文

1. 若林正一郎, 神戸直智. 肉芽腫疾患の病態と臨床を理解する 若年発症サルコイドーシス/Blau 症候群. 日皮会誌. 2014; 124: 3109-11.
2. 中村悠美, 神戸直智. 特集「最近のトピックス 2014」最近話題の皮膚疾患 自己炎症性疾患. 臨皮. 2014; 68 (5 増): 10-4.2.
3. 高田紗奈美, 神戸直智. アレルギー用語解説シリーズ インフラマソーム. アレルギー. 2014; 63: 1142-3.
4. 高田紗奈美, 神戸直智. Trend in Allergy インフラマソーム. 皮膚アレルギーフロンティア. 2014; 12: 164-5.
5. 中野倫代, 神戸直智. 特集「自己炎症症候群の診断と治療」若年発症サルコイドーシス/Blau 症候群. 分子リウマチ治療. 2014; 7: 22-4.
6. 江原瑞枝, 神戸直智. 総説 若年発症サルコイドーシス/Blau 症候群. 呼吸. 2014; 33: 3-9.
7. 若林正一郎, 神戸直智. 内科疾患と皮疹 自己炎症症候群と皮疹. medicina. 2014; 51: 871-5.

学会発表

国際学会

1. Nakano M, Kambe N, Matsue H. BCG vaccination as a trigger of skin eruptions in Blau syndrome/ early-onset sarcoidosis. 11th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, 2014 June 11-14, Heidelberg, Germany.

国内学会

1. 若林正一郎, 神戸直智. 教育講演 50 「肉芽腫性疾患の病態と臨床を理解する」若年発症サルコイドーシス/Blau 症候群. 第 113 回日本皮膚科学会総会, 2014 年 5 月 30 日-6 月 1 日, 京都市.
2. 神戸直智. 「インフラマソームとデンジャーシグナル」インフラマソームの自発的活性化を病態とする自己炎症症候群. 日本アレルギー学会第 1 回総合アレルギー講習会, 2014 年 12 月 20-21 日, 横浜市.

H. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業） 平成26年度委託業務成果報告

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

研究項目：中條－西村症候群とその類症の病態解析

担当責任（研究分担）者：金澤 伸雄 和歌山県立医科大学医学部皮膚科 講師

研究要旨

本分担研究は、平成21年度以来の厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業の成果をもとに、中條－西村症候群（NNS）とその類症の病態を解明し、治療薬開発に向けた基盤を整備することを主たる目的とする。NNSは戦前から本邦固有の疾患として報告されてきたもので、幼小児期に発症し反復する凍瘡様や結節性紅斑様皮疹、弛張熱と徐々に進行する脂肪筋肉萎縮、拘縮を特徴とする。平成23年に原因として免疫プロテアソーム $\beta 5i$ サブユニットをコードする*PSMB8*遺伝子変異が同定されるとともに、諸外国からも同じ遺伝子に変異を持つ類症が報告され、プロテアソーム機能不全による新しい遺伝性自己炎症疾患としての疾患概念が確立した。ただ、その病態についてはまだ不明な点が多く、有効な治療法もない。そこで今年度は、NNS患者由来細胞や検体、特に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の作成と解析、新たなNNS類似症例における網羅的遺伝子解析を軸に研究を推進した。①抗IL-6受容体抗体を投与したNNS患者2例において、炎症・萎縮ともに明らかな軽減なく、CRPの上下と関係なく血清中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。さらに、患者末梢血単球、iPS細胞由来単球ともにコントロールに対して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。②NNS関連*Psm8*変異ノックインマウスにおいて、患者と同様に $\beta 5i$ のみならず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、コントロールに比べて激しい皮膚炎を生じた。③NNSと臨床的によく似る3症例において、プロテアソーム関連遺伝子のパネル解析と全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。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ことを期待される。

担当責任（研究協力）者：

尾崎富美子・京都大学 iPS 細胞研究所・日本学術振興会特別研究員

安友康二・徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体防御医学・教授

吉浦孝一郎・長崎大学大学院医歯薬学総合研究科人類遺伝学・教授

A. 研究目的

中條-西村症候群（NNS）は、乳幼児期に凍瘡様皮疹で発症し、弛張熱や結節性紅斑様皮疹を伴い、次第に顔面・上肢を中心とした上半身のやせと拘縮を伴う長く節くれ立った指趾が明らかになる特異な遺伝性疾患であり、有効な治療法はなく早世する症例もある。難治性疾患克服研究事業（研究奨励分野）として3年間行われた研究事業「中條-西村症候群の疾患概念の確立と病態解明へのアプローチ」（平成21年度）、「中條-西村症候群の疾患概念の確立と病態解明に基づく特異的治療法の開発」（平成22,23年度）により、疫学的には、現在生存が明らかな患者は1幼児例を含む関西の12例のみであり、その多くを和歌山県立医科大学皮膚科でフォローしていることが判明した。また病因として、昭和14年の中條、昭和25年の西村らによって「凍瘡を合併せる続発性骨骨膜炎」として報告されて以来70年ぶりに、検索した全ての患者に、免疫プロテアソームβ5i サブユニットをコードする *PSMB8* 遺伝子の c.602G>T (G201V) ホモ変異が同定された。さらに患者由来細胞・組織の解析により、プロテアソーム機能不全によってユビキチン化蛋白質が蓄積することによっ

てストレス応答が高まり、核内にリン酸化 p38 が蓄積することによって IL-6 が過剰産生されることが本態であることが示された (Arima K, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2011)。

一方、近年になって海外から報告され、*PSMB8* 遺伝子の異なる部位にホモあるいはヘテロ変異を持つ CANDLE 症候群においては、末梢血の遺伝子発現プロファイルから IFN signature が示され、IFN シグナルを抑制する JAK 阻害薬の投与が試みられている。これらの成果から、NNS と CANDLE 症候群など関連疾患を合わせてプロテアソーム機能不全による新しい遺伝性自己炎症疾患とする疾患概念は確立したといえる。ただ、その病態についてはまだ不明な点が多く、有効な治療法として確立したものはない。

そこで本研究においては、NNSおよび類縁疾患の診療と研究に携わる医師・研究者の英知を結集し、NNSの病態を多角的に明らかにすることを目標に、患者由来細胞を用いた簡便なプロテアソーム酵素活性測定による NNS診断の試み、患者由来細胞や検体、特に iPS細胞を用いた機能解析、変異 *Psmb8* 遺伝子導入マウスの作成と解析、新たな NNS類似症例における網羅的遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

①NNS患者と非NNSコントロールの末梢血10mlから Lymphoprep tube で単離した単核球と、EB ウィルスを感染させて不死化した B細胞について、一部は IFN γ で24時間刺激した後、Promega製の研究用キットを用いて各プロテアソーム酵素活性を測定した。

②同意を得て、関節リウマチに準じて 3-4 週間おきに抗 IL-6 受容体抗体であるトシリズマブを投与した NNS の成人 2 症例において、投与前後での血清中サイトカイン・ケモカイン濃度をマルチで測定し、炎症マーカーとの相関を検討した。

③患者血清中で高値を示し、NNS の病態への関与が疑われるサイトカイン、特に IL-6、IP-10、IFN α について、末梢血より MACS で単離した CD14⁺単球と、患者皮膚線維芽細胞より樹立した iPS 細胞から Yanagimachi らの方法を用いて誘導した単球からの、LPS+ATP あるいは IFN γ 刺激に応じた産生能を ELISA で測定し比較した。

④*Psmb8* 遺伝子 G201V 変異ノックインマウスを樹立し、脾細胞における各プロテアソームサブユニットの発現をウェスタンブロット法にて解析した。皮膚炎、関節炎などの自発的な炎症症状の発現を検討するとともに、連日イミキモドを耳介に塗布してその厚さを測定し、コントロールマウスと比較した。

⑤NNSを疑って和歌山県立医科大学皮膚科に照会のあった症例のうち、*PSMB8*変異はないが臨床的にNNSとの鑑別が困難であった横浜市立大学小児科と琉球大学小児科の小児例、福島県立医科大学皮膚科の成人例について、患者と両親の同意を得て、末梢血から抽出したゲノムについてプロテアソーム関連遺伝子のパネル解析を行うとともに、トリオ（福島例は父子のみ）でエキソーム解析を行った。

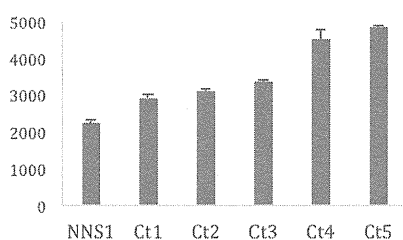
（倫理面への配慮）

本研究で用いた患者由来試料は、和歌山県立医科大学の臨床研究・遺伝子解析研究に関する倫理委員会および長崎大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認を得た計画に基づき、書面にてインフォームドコンセントを得て収集されたものである。また、マウスの作成・解析については、徳島大学の所定の委員会の承認を得た計画に基づいて行われた。

C. 研究結果

①ほぼ同時に採血したコントロール5名由来のPBMCについて検討した結果、キモトリプシン活性はほぼ連続性に約2倍の開きがあった（図1）。NNS患者ではコントロールに比べて低い傾向にあったが、コントロールのばらつきが大きく患者よりも低い値を取ることもあった。また冷凍保存の基質を融解した後の冷蔵保存期間によって発光の程度が異なり、その絶対値で正常値を決めることも困難であった。PBMCを培養すると、患者とコントロールの差が大きくなるような印象もあったが、これも検体によって一定しなかった。一方、キモトリプシン以外のトリプシン、カスパーゼ活性は患者とコントロールの間で一定した傾向は見られなかった。またIFN γ に対する反応性も、コントロール細胞において活性が2倍以上に上がるものからほとんど上がらないものまでばらつきが見られた。不死化B細胞についても同様の結果で、まとめるとヘテロ（両親）やコントロールに比べて患者でキモトリプシン活性が低い傾向にあった以外には明らかな差は認められず、IFN γ による活性増強も見られなかった。

図 1. PBMC のキモトリプシン活性



②上半身の萎縮が目立ちすでに炎症症状が目立たない1症例では、トシリズマブ投与にても著変を認めず、肺炎を発症し投与を中止した。この間、CRPは常時1mg/ml前後で肺炎の時のみ10前後まで上昇したが、IL-6をはじめG-CSF, IFN α 2, MCP-1はCRP上昇に合わせて産生されていたのに対し、IFN γ とIP-10はトシリズマブ投与中も継続的に産生され、むしろ肺炎時は産生されていなかった。一方、発熱や皮疹が日常的に出没している症例では、他覚的な改善はないものの筋症状の自覚が改善し投与を継続しているが、トシリズマブ投与前は継続的に、投与後も断続的にCRPが5-10mg/mlあり、IL-6, G-CSF, MCP-1がCRPにやや遅れて上昇するのに対し、IFN α 2は検出感度以下で、IFN γ とIP-10は継続的に産生されていた。

③末梢血から単離したCD14⁺単球をLPS+ATPあるいはIFN γ で刺激すると、前者でIL-6が産生されるものの患者とコントロールで差がなく、後者でIP-10が産生され患者で有意に高値であった。一方、IFN α 2はこれらの刺激では安定して産生されなかった。患者と代表的な健常者由来iPS細胞由来単球でも検討した結果、やはりLPS+ATP刺激でIL-6、IFN γ 刺激でIP-10が産生され、いずれも患者で有意に高値であった。一方、IFN α 2

はいずれの刺激でも産生されたが、双方とも患者で有意に低値であった。ちなみに、このiPS細胞由来単球のプロテアソーム酵素活性をPromegaのキットで測定したところ、IFN γ 非存在下では患者と健常者で差がなく、IFN γ による活性上昇が患者では約半分になるという結果であった。

④変異*Psm8*ノックインホモマウス の脾細胞においては、ヘテロに比べ、 β 5iの発現が低下し β 5の発現が強くなっており、 β 1i, β 2i, β 5iいずれも本来のサイズのバンドの上方に陽性バンドを認め、活性化や複合体形成に重要な蛋白切断による誘導型サブユニットの成熟が完全でないことが示された。これまでのところ自然発症性の表現型は見られていないが、イミキモド誘発皮膚炎モデルにおいて、ノックインホモマウスの方が野生型に比べ有意に耳介腫脹が強いという結果を得ている。

⑤NNSの診断基準を満たすものの、指はソーセージ様で長く節くれだった特徴は見られない横浜市大の症例においては、パネル解析で変異なく、エキソーム解析でも有力な変異は見いだせていない。萎縮がなくNNSの診断基準を満たさず、筋炎や肺高血圧を呈する琉球大の症例において、患児特異的に*PSMB9*のヘテロミスセンス変異を認め、また*PSMD9*のヘテロミスセンス変異を父子共通に認めた。NNSの診断基準を満たし、精神発達遅滞を認め、父親にも遅発性の似た症状を認める福島県立医大の成人例において、パネル解析で父子ともに*ADRM1*のヘテロミスセンス変異を認めたが、エキソーム解析結果を詳細に

見直した結果、父子ともに *TREX1* D18N ヘテロ変異を認め、これによる Aicardi-Goutieres 症候群 (AGS) と診断された。

D. 考察

研究計画に基づき、プロテアソーム関連酵素活性測定、*PSMB8* 関連遺伝子解析系の確立、モデルマウスの作成解析による標的細胞解析、iPS 細胞の標的細胞への分化誘導を目標に研究を推進した。①については、末梢血を用いたプロテアソーム酵素解析では安定した結果が得られず、現時点では NNS 診断に使えるほど精度の高いものを確立することはできていない。使用する基質キットは簡便であるが、融解後の保存法に工夫が必要かもしれない。PBMC の採取法は簡便で侵襲が少ない Lymphoprep tube を用いているが、赤血球や死細胞の混入が避けられず、結果が安定しない一因と考えられる。MACS で $CD14^+$ 細胞を単離して測定することも試みたが、10ml の採血では細胞数を確保することが困難であった。今後は死細胞をできるだけ除いて行うことを試みる予定である。②の結果より、NNS 患者で上昇するサイトカインは IL-6, G-CSF, MCP-1 の群と $IFN\gamma$, IP-10 の群に分けられ、抗 IL-6 療法では後者を抑制できず、病勢が抑えられないことが示唆された。③においても、 $IFN\gamma$ で刺激された単球からの IP-10 産生は、末梢血単球と iPS 細胞由来単球のいずれにおいても患者で高値を示したことから、「単球由来 IP-10 高値」が本疾患の一つの特徴と思われる。すなわち、NNS 患者血清中 IP-10 値が異常に高くなるのも、 $IFN\gamma$ 高値ゆえの IP-10 高値のみ

ならず、 $IFN\gamma$ シグナルが強くなるためと説明できる。これは実は、すでに CANDLE 症候群で言われていたことであり、患者末梢血の mRNA アレイで *IFN signature* を認め、単球を $IFN\gamma$ で刺激した時の STAT1 リン酸化が患者で亢進していることが示されている。これらのデータから、CANDLE 症候群では JAK 阻害薬が有効とされ、現在治験が進行中とされる。NNS でも以前不死化 B 細胞で同様の検討を行い、コントロールと有意な差を認めなかったが、今回、異なる形で CANDLE 症候群とほぼ同じ結論に至ったといえる。今後は、 $IFN\gamma$ シグナルにおけるプロテアソームの役割について明らかにし、NNS/CANDLE で $IFN\gamma$ -IP10 シグナルが増強するメカニズムを解明することが求められる一方、 $IFN\gamma$ -IP10 シグナルの増強のみでこの疾患のすべての表現型が説明できるのか、特に脂肪萎縮における $IFN\gamma$ -IP10 シグナルの役割について明らかにする必要がある。一方、NNS 患者由来 iPS 細胞については、誘導単球におけるプロテアソーム酵素活性の低下が明らかでなく、患者細胞の性質をきちんと反映しているかもう少し見極める必要があると思われる。コントロールとなる健常者由来 iPS 細胞についても同様で、むしろ患者由来 iPS 細胞の *PSMB8* 変異を修復した細胞をコントロールにするのが最も望ましいと考えられる。④ *Psm8* ノックアウトマウス、ノックインマウスとも表現型が明らかでなかったが、今回、ノックインマウスにおいて NNS とほぼ同じプロテアソームサブユニットの発現、成熟異常が明らかになったことで、疾患モデルとして有用である可能性が高い。イミキモド

は TLR7 を介して IFN α 産生、NF- κ B 活性化を誘導することが知られており、これらを介した皮膚炎形成におけるプロテアソームの役割の解明が待たれる。脂肪萎縮についてもマウスモデルを用いて病態解明が進むことが切望される。⑤NNS によく似た 1 症例に *de novo* の *PSMB9* ミスセンス変異を見出したことは驚きであるが、萎縮がなく NNS の診断基準を満たさず、NNS と病態が異なることも考えられ、変異の意義を慎重に検討する必要がある。変異の位置から酵素機能低下よりも複合体形成不全が予想されるが、これまでのところプロテアソーム酵素活性が低下しているという結果は得られていない。ヘテロ変異であることから、むしろ機能獲得型変異という可能性も考えられる。一方、NNS の診断基準を満たす成人例と遅発性の父親においては、遺伝子解析の結果が出てから数か月経ってようやく、既報告の *TREX1* 変異を見出し、AGS と診断できた。*ADRM1* 変異もありプロテアソーム関連疾患という先入観があり、またプロテアソーム酵素活性が患者特異的に低下しているという結果が得られたことで、精神発達遅滞があるにもかかわらず AGS を疑っていなかった。凍瘡と大脳基底核石灰化がある症例では必ず AGS 関連遺伝子も検討する必要があることを思い知らされた。ただ、患者に *de novo* で出現した変異を解析することで、父子の表現型の違いを説明できる可能性があり、今回の解析を生かして検討を加える余地はある。最後に、これまでの解析でめばしい変異を見いだせないでいる症例については、今回の解析ですでに答えが出ていることを前提に、今後も粘り

強く関連情報を収集し、候補遺伝子を見出す努力を続ける必要がある。

E. 結論

本分担研究によって、NNS および類縁疾患の診療と研究に携わる医師・研究者の英知を結集し、NNS の病態を多角的に明らかにし創薬につなげるという目標に向けた大きな一歩が踏み出された。難病行政の改革により、NNS も認定に向けて準備が進められているところであり、1 日でも早く成果を患者に還元できるよう、研究の進展が望まれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanazawa N, Kunimoto K, Ishii N, Inamo Y, Furukawa F : Is CANDLE the best nomenclature? *Br J Dermatol* 2014; 171: 659-660
2. Kanazawa N, Tchernev G, Wollina U: Autoimmunity versus autoinflammation - friend or foe? *Wien Med Wochenschr* 2014; 164: 274-277
3. 金澤伸雄 : 中條 - 西村症候群、別冊日本臨床 新領域症候群シリーズ No.27 神経症候群 (第 2 版) —その他の神経疾患を含めて—、日本臨床社、東京、2014、pp.683-688
4. 金澤伸雄 : 中條 - 西村症候群、分子リウマチ治療、2014; 7: 25-29

2. 学会発表

第26回日本アレルギー学会春季臨床大会、
2014.5.9-11. 京都

金澤伸雄、稲葉豊、古川福実：自己炎症性疾患とアレルギー、プロテアソーム機能不全症（中條-西村症候群）における高IgE血症.

第443回日本皮膚科学会大阪地方会和歌山開催、2014.5.24. 和歌山

国本佳代、金澤伸雄、古川福実：中條-西村症候群：小児例の治療経過報告.

第14回日本抗加齢医学会総会、2014.6.6-8. 大阪

安友康二：炎症性疾患の免疫遺伝学.

第35回日本炎症・再生医学会、2014.7.1-4. 沖縄

安友康二：自己炎症性疾患の免疫遺伝学.

第438回日本皮膚科学会京滋地方会、
2014.12.19. 京都

金澤伸雄、中谷友美、稲葉豊、国本佳代、古川福実：中條-西村症候群患者血中サイトカインの経時的解析.

第8回日本免疫不全症研究会学術集会、
2015.1.24、東京

金城紀子、中矢代真美、金澤伸雄、三嶋博之、木下晃、吉浦孝一郎：新生児期発症の中條-西村症候群様症状を呈した男児例.

国際学会

The 11th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, 2014.6.11-14, Heidelberg, Germany

Nobuo Kanazawa, Yutaka Inaba, Kayo Kunimoto, Fukumi Furukawa: Nakajo-Nishimura syndrome: a hereditary proteasome disability syndrome sharing the genetic origin with JMP and CANDLE syndrome.

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

厚生労働科学研究委託金（難治性疾患実用化研究事業）
委託業務成果報告

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

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

分担研究者；谷内江昭宏

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科小児科

研究要旨

不明熱などを理由に *MEFV* 遺伝子検索を施行した症例 225 例（男性 104 例、女性 121 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。この内、*MEFV* に全く変異を認めなかった例は 39%、E84K が 2%、L110P-E148Q が 27%、R202Q が 6%、(E148Q)-P369S-R408Q が 9%、G304R が 2%、S503C が 4%、いずれかの組み合わせが 3%、exon 10 の M694I あるいは M694V が 8% 認められた。Exon 10 変異の全て、E84K 変異のほとんどは典型的な FMF の臨床像を示した。他の変異の場合は多様な臨床症状が観察された。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。

A. 研究の目的

自己炎症性疾患の中でも周期性発熱症候群に分類される疾患の多くは、炎症制御機構であるインフラマソームに関わる分子の異常により発症することが知られている。最も発症頻度が多いとされる家族性地中海熱 (familial Mediterranean fever; FMF) は遺伝子変異あるいは多型と臨床像との関係が不明な点が多い。Exon 10 に変異を示す例では典型的な臨床像を示すことが多く、コルヒチンによる治療反応性も良好である一方、長期の炎症持続によるアミロイドーシス合併のリスクを伴う。一方、exon 2 あるいは exon 3 に特有の変異を示す症例は典型的な臨床像を示さない一方、PFAPA を含む他の炎症病態の修飾因子として機能する可能性が示唆されている。本研究では、発熱を主訴として炎症性疾患症例において、

MEFV 遺伝子変異と臨床像との関連を精査すること、コルヒチン応答性や血清サイトカイン・プロファイルの特徴を明らかにすることを目的とした。

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。

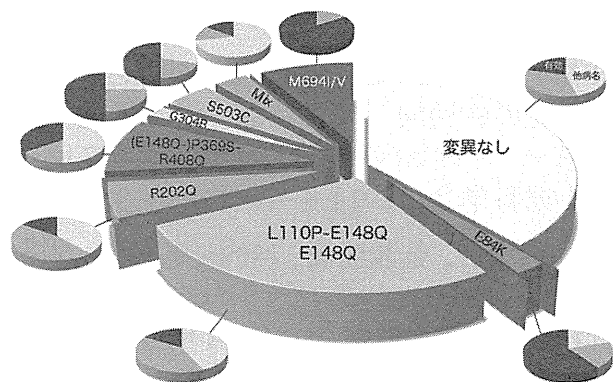
これらの研究計画（遺伝子変異に基づく家族性地中海熱インフラサーム病態解明と炎症制御に向けたトランスレーショナル研究）は金沢大学倫理委員会の審査による承認を受けている。

C. 研究結果

1) MEFV遺伝子変異の頻度ならびにコルヒチンの有効性

MEFVに全く変異を認めなかった例は39%、E84Kが2%、L110P-E148Qが27%、R202Qが6%、(E148Q)-P369S-R408Qが9%、G304Rが2%、S503Cが4%、いずれかの組み合わせが3%、exon 10のM694IあるいはM694Vが8%認められた。Exon 10変異の全て、E84K変異のほとんどは典型的なFMFの臨床像を示した。Exon 10変異のほとんど、ならびにE84K変異、S503C変異、G304R変異の多くでコルヒチン投与が有効であった。一方、変異なし症例、exon 3 variants、R202変異などでは有効性は低かった（図1）。

図1. 解析対象の臨床症状



2) 血清サイトカイン・プロファイル

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。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2）。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。一方、発作時には IL-18 の高値に加え、IL-6 値の増加が観察された。これらのプロファイルはコルヒチン治療が奏功すると、次第に正常化した（図3）。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）。

図2. 典型例における血清 IL-18 と CRP

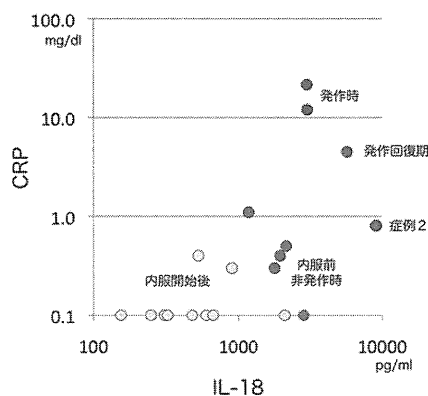


図3. 発作時/非発作時プロファイルと治療による変化

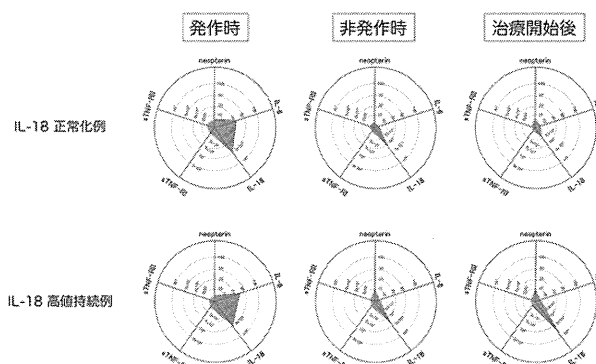
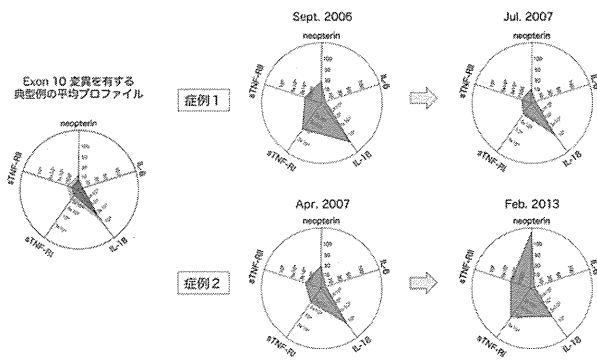


図4. 重症例の治療経過



D. 考察

FMF、特に典型例においてはNLRP3インフラマソームの恒常的活性化が起こっていることが予想され、血清IL-18の持続高値はその事実を反映していると考えられる。特に、FMF典型例において発作間歇期においてもIL-18高値が持続していることは、無熱期における本疾患診断の有用な補助となることを示している。さらに、コルヒチンによる治療が奏功する症例においては速やかにIL-18が正常化しており、通常の炎症指標以外の客観的な治療反応性指標としても有用であると評価される。

E. 結論

血清IL-18の変動は典型例におけるコルヒチン治療反応性と良く相関し、発作頻度や重症度以外の治療反応性の客観的な評価指標として有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimizu M, Nakagishi Y, Yoshida A, Yachie A. Serum interleukin-18 as a diagnostic remission criterion in systemic juvenile

idiopathic arthritis. *Modern Rheumatol* 2014; 41: 2328-30.

2) Takahara T, Shimizu M, Nakagishi Y, Kinjo N, Yachie A. Serum interleukin-18 as a potential specific marker for differentiating systemic juvenile idiopathic arthritis from incomplete Kawasaki disease. *Rheumatol Int* 2015; 35: 81-4.

2. 学会発表

1) 外山有加、吉村健、谷内江昭宏ら。川崎病と若年性特発性関節炎の鑑別におけるインターロイキン18の有用性。第46回日本小児感染症学会。2014年10月18日。東京

2) 田崎優子、清水正樹、谷内江昭宏ら。全身型若年性特発性関節炎における予後推定および寛解基準としての血清IL-18濃度測定の有用性。第24回日本小児リウマチ学会。2014年10月3日。仙台

3) 清水正樹、中岸保夫、谷内江昭宏。全身型若年性特発性関節炎に合併するマクロファージ活性化症候群の発症予測指標としての血清IL-18の有用性。第24回日本小児リウマチ学会。2014年10月3日。仙台

4) 谷内江昭宏。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～ バイオマーカー研究。第117回日本小児科学会。2014年4月11日。名古屋

5) 和田泰三、金兼弘和、谷内江昭宏ら。XIAP欠損症における血清IL-18の持続高値。第117回日本小児科学会。2014年4月11日。名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患実用化研究事業）

委託業務成果報告

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

研究項目：家族性地中海熱患者由来 iPS 細胞の作成

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

自己炎症性疾患の治療標的分子の同定、薬剤開発基盤の整備のために iPS 細胞を利用した病態解析が重要と思われる。本年度は、家族性地中海熱(FMF)患者 4 名(完全型 M694I/E148Q; 2 名、不全型 P369S/R408Q; 2 名)について同意を取り、平成 26 年 7 月、9 月、11 月、平成 27 年 2 月に 1 例ずつ iPS 細胞用の末梢血を採取、京都大学 iPS 細胞研究所へ患者 iPS 細胞作成を依頼した。今後、作成された計 4 名の iPS 細胞を好中球、マクロファージへ分化させ、インフラマソームの機能異常を確認する。また、FMF 患者で好中球からの NET (neutrophil extracellular traps)放出が病態形成に重要であること、また、有熱期と無熱期の好中球では、NET 放出能に違いがあることが報告されているため、その違いがどうして生じるのか、iPS 細胞で検討したい。

A. 研究目的

自己炎症性疾患の治療標的分子の同定、薬剤開発基盤の整備のためには、患者 iPS 細胞を利用した病態解析が重要と思われる。私たちは、家族性地中海熱(FMF)患者の末梢血から iPS 細胞を樹立して、目的する細胞に分化させ、病態解析を行うことが重要と考えこの研究を計画した。

B. 研究方法

FMF 患者 4 名(完全型 M694I/E148Q; 2 名、不全型 P369S/R408Q; 2 名)について同意を取り、平成 26 年 7 月、9 月、11 月、平成 27 年 2 月に 1 例ずつ iPS 細胞用の末梢血を採取、京都大学 iPS 細胞研究所へ患者 iPS 細胞作成を依頼した。

C. 研究結果

FMF 患者 4 名(完全型 2 名、不全型 2 名)

の iPS 細胞を作成中である。

D. 考察

本邦に多くの患者が存在する FMF の治療法は、コルヒチンが主流である。しかし、約 1 割の FMF 患者は、コルヒチン耐性と言われている。コルヒチン耐性 FMF 患者には、抗 IL-1 製剤が有効と言われているが、抗 IL-1 製剤は高額であり、安価な薬剤の開発が望まれている。

私たちは、FMF 患者の iPS 細胞を利用して、病態解析を行うことが解析の近道と考えた。病態解析には、大量の細胞が必要であり、患者から採取することは、倫理的に問題がある。その点、iPS 細胞は、目的とする細胞を大量に準備できる。また、患者末梢血と異なり、コルヒチンなどの治療薬にさらされていない状態の細胞を使用できる利点もある。

FMF は、*MEFV* がコードする pyrin 蛋白の異常でインフラマソームの機能異常が生じて発症していると考えられているため、その異常を患者 iPS 細胞を使用して解析したい。また、FMF 患者で好中球からの NET (neutrophil extracellular traps) 放出が病態形成に重要であること、また、有熱期と無熱期の好中球では、NET 放出能に違いがあることが報告されている (Apostolidou E, et al. Neutrophil extracellular traps regulate IL-1 β -mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann. Rheumatic Dis.* In press.)。同じ FMF 患者の有熱期と無熱期の好中球で機能が変化することを解析することは、治療にもつながると思われる。

E. 結論

FMF 患者 4 名の iPS 細胞作成を試みた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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