

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）
「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
委託業務成果報告

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

研究分担者	森尾友宏	東京医科歯科大学大学院・発生発達病態学分野
研究協力者	熊木恵里	東京医科歯科大学大学院・発生発達病態学分野
	岡村美湖	東京医科歯科大学大学院・発生発達病態学分野
	井田弘明	久留米大学医学部 呼吸器・神経・膠原病内科

研究要旨

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 を組換えタンパクとして用意し、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。変異 PSTPIP1 の導入により Apoptosis 亢進が認められたが、ROS 産生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。そのため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た。

患者好中球においてはいくつかの過リン酸化バンドが認められ、その同定とともに、PSTPIP1(wt および mutant)と会合する分子を同定して、治療標的分子の同定と治療薬探索に向かいたい。

A. 研究目的

本研究では化膿性無菌性関節炎・壊疽性膿皮症・アクネ症候群(以後 PAPA 症候群)に焦点をあて、その分子病態を明らかにすることにより、治療標的分子を同定し、最終的には薬剤開発につなげることを目的とする。

具体的には上記に至る過程として、PSTPIP1 変異を持つ患者において免疫担当細胞の機能解析を行い、また変異 PSTPIP1 は細胞に導入可能な形の組換え型タンパクとして用意して、その会合分子や、シグナルにおける役割を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) PSTPIP1 遺伝子解析

DNA抽出キット(QIAGEN)を用いて全血から genomic DNA を精製した。PSTPIP1 遺伝子については Sanger 法により遺伝子変異の有無を解析した。

2) 免疫担当細胞機能解析

Mono-Poly 分離試薬により好中球を含む分画を収集し、さらに negative selection 法によりリンパ球を除去することにより好中球を精製した。活性酸素(reactive oxygen species: ROS)産生能を PMA, LPS+fMLP, fMLP 刺激後にルミノール法で、CXCR2 や PILRalpha などの接着遊走に関与する分子の発現を flow cytometry 法で、細胞内基

質のチロシンリン酸化を 4G10 プロットにて検討した。

3) 細胞膜透過性 PSTPIP1 (野生型、変異型) の作成と機能解析

Hph-1 (細胞膜透過性ペプチド) -PSTPIP1 (A230T, E250K, G258A) 発現ベクターを構築し、E coli において発現させた。発現させたタンパクは Nickel beads にて精製し、Imidazole で溶出して実験に用いた。

4) CRISPR/Cas9 による knock-in 細胞の作製

Coiled coil domain における変異導入を目的に c688G>A, c748G>C, c.748G>A, c.773G>C の knock-in を作成できるように guide RNA をデザインし、モデル細胞である HL60 および PLB-985 への導入および切断について検討を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断や責任遺伝子産物解析等にあたっては、各種臨床研究指針や遺伝子解析に関わる指針を遵守して、患者への説明と同意の下に実施した。本研究についてはまた、東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会及び、遺伝子解析に関わる倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1) PSTPIP1 遺伝子解析

2名の PAPA 症候群疑い患者において遺伝子

変異解析を行った。1名ではPSTPIP1遺伝子に変異を認めず、1名では未知の遺伝子変異をFCH(Fes/CIP4 homology) domainとCoiled coil domainの間の部分に同定した。

2) 免疫担当細胞機能解析・3) 細胞膜透過性PSTPIP1 (野生型、変異型) の作成と機能解析

E250K PSTPIP1を導入した健常者好中球でのapoptosisは亢進しており、一方wild type PSTPIP1導入では、同効果は認められなかった。細胞膜透過性ペプチドのみの導入でもapoptosisは認められず、変異PSTPIP1によってもたらされた現象と判断される。

PAPA症候群患者好中球ではROS産生の亢進が認められるため、さらに同現象をHph-1-変異PSTPIP1導入健常者好中球にて検討を試みた。ROS産生はDHR123染色法およびルミノール法にて検討したが、ともにどのPSTPIP1を導入しても、あるいは細胞膜透過性ペプチドのみの導入でもROS産生は検出されなかった。原因を探索した結果、組換えタンパク作成で用いるprotease inhibitorおよびその溶媒が、化学反応を抑制することが明らかになった。Protease inhibitorの濃度変更や組み合わせの変更も、精製タンパクのdegradationなどの問題に至り、分離した好中球は、本検討に適さないと判断した。

患者好中球においては細胞内基質のチロシンリン酸化についても検討を行った。その結果、下に示すように40, 50, 250kD rangeに顕著にリン酸化が亢進する分子が検出された。そのほかにもいくつかの過リン酸化バンドが認められた。

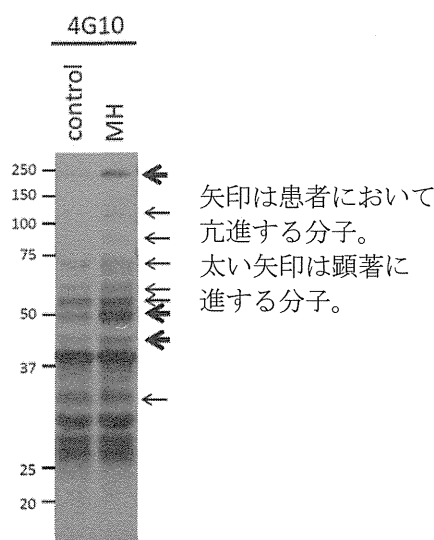


図1 末梢血好中球の4G10 blot

4) CRISPR/CAS9によるknock-in細胞の作製

PSTPIP1 c688G>A, c748G>C, c.748G>A, c.773G>Cのknock-in作成のためguide RNAをデザインし、モデル細胞であるHL60への導入お

よび切断について検討を行った。またモデル細胞としては、PLB-985も候補として検討を開始している。今まではHL60を用いてATRA, DMSOにて好中球への分化誘導を行っていたが、PLB-985も同様にATRAとDMSOにて好中球に分化誘導可能であり、またPMAによって単球にも分化する。この細胞株の分化系や遺伝子導入、遺伝子改変系を確立して、変異PSTPIP1の機能について詳細な検討を加える予定である。

D. 考察

PSTPIP1タンパクの機能自体がいまだに明らかでないことが主たる原因となり、PSTPIP1変異による分子病態、疾患成立機序は不明のままである。本研究では野生型あるいは変異型PSTPIP1と会合する分子の同定や、変異PSTPIP1導入による免疫担当細胞の生化学的変化を同定することにより、疾患の本態に迫りたいと考えている。

今まではprimary細胞を用いて好中球や単球などの機能を解析してきた。その目的のためにはタンパク導入の手法が一定の成果を上げたものと考えている。一方、会合分子の同定や変異PSTPIP1による機能変化の詳細な解析には、モデル細胞が必要と認識するに至っている。今まではTHP1細胞などを用いて

His-tag-Hph1-PSTPIP1(wt or mutant)を導入し、affinity precipitation→4G10 blot, high sensitive protein stainingなどで会合分子を探索してきたが、今後はknock-in細胞を用いての検討を第一候補としたい。

E. 結論

PAPA症候群における責任遺伝子産物であるPSTPIP1の機能と、変異によるその変化を明らかにするために、PSTPIP1変異における好中球シグナル伝達の異常、PSTPIP1変異で変化する会合分子の同定を試みた。Primary細胞である好中球を用いた検討では、ROS産生の評価が困難で、また精緻な生化学的検査には大量の細胞が必要になることが明らかになった。現時点では鍵となる分子の同定に至っていないが、タンパク導入手法に加えて、モデルknock-in細胞の作成を試み、標的分子の同定を目指している。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Park T, Park S, Cho J, Moon J, Kim N, Park K, Seong RH, Lee S, **Morio T**, Bothwell AL, Lee S. ROR γ t-specific transcriptional interactomic

inhibition suppresses autoimmunity associated with TH17 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **111**:18673-8, 2015.

2. Yamazaki Y, Yamada M, Kawai T, **Morio T**, Onodera M, Ueki M, Watanabe N, Takada H, Takezaki S, Chida N, Kobayashi I, Ariga T. Two Novel Gain-of-Function Mutations of STAT1 Responsible for Chronic Mucocutaneous Candidiasis Disease: Impaired Production of IL-17A and IL-22, and the Presence of Anti-IL-17F Autoantibody. *J Immunol*. **193**:4880-7, 2014.
3. Matsubara Y, Chiba T, Kashimada K, **Morio T**, Takada S, Mizutani S, Asahara H. Transcription activator-like effector nuclease-mediated transduction of exogenous gene into *IL2RG* locus. *Scientific Reports*. **4**:5043, 2014.
4. Endo A, Watanabe K, Ohye T, Matsubara T, Shimizu N, Kurahashi H, Yoshikawa T, Katano H, Inoue N, Imai K, Takagi M, **Morio T**, Mizutani S. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID. *Clin. Infect. Dis*. **59**:545-8, 2014.
5. Marciano BE, Huang CY, Joshi G, Rezaei N, Carvalho BC, Allwood Z, Ikinciogullari A, Reda SM, Gennery A, Thon V, Espinosa-Rosales F, Al-Herz W, Porras O, Shcherbina A, Szaflarska A, Kiliç S, 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. BCG vaccination in patients with severe combined immunodeficiency: Complications, risks, and vaccination policies. *J Allergy Clin Immunol*. **133**:1134-41, 2014.

2. 学会発表

1. 森尾友宏：免疫不全症・異常症におけるリ

ンパ球亜群解析、ヒューマン免疫学フォーラム、京都、2014年12月13日

2. 森尾友宏：原発性免疫不全症からみる Common Disease: 病態解析及び治療の最近の進歩、第42回日本臨床免疫学会総会、東京、2014年9月25日
3. 岡村美湖、遠藤彰、吉川俊輔、森尾友宏：敗血症発症時の好中球の免疫機構の変化、第42回日本臨床免疫学会、東京、2014年9月25日～27日
4. 白水 優光、石村 匡崇、今井 崇史、瀧本 智仁、高田 英俊、原 寿郎、森尾 友宏：PAPA(pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum and acne)症候群の3歳女児例 第480回日本小児科学会福岡地方会、福岡、2014年6月14日
5. 森尾友宏：免疫応答の遮断により惹起される感染症：背景の理解から臨床へ、第6回KOCS小児リウマチ研究会（招待講演）、博多、2014年5月31日
6. **Morio T**. Primary Immunodeficiency. *Brain Korea 21 Plus Project Seminar*. Korea. May 2014.
7. 森尾友宏：Overview2 ヒトリンパ球解析の現状と展望、日本リウマチ学会総会（シンポジウム（ヒト免疫とリウマチ性疾患））、東京、2014年4月26日

3. 総説

1. 森尾友宏：自然免疫と発熱 小児内科 **46**:324-327, 2014.
2. 高島健浩, 森尾友宏：原発性免疫不全症の分子的背景と免疫異常 リウマチ科 **51**:590-591, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

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

齋藤潤(京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門)

研究要旨

iPS 細胞由来単球細胞株を用いた、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。CINCA 症候群患者由来 iPS 細胞を既報にしたがって単球へ分化させた。単球系細胞を浮遊細胞として回収し、これらにレンチウイルスベクターを用いて 3 因子 (cMYC, BMI1, MDM2) を導入した。その後、M-CSF 存在下に培養を継続し、増殖する細胞を単球細胞株として回収した。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た。LPS 2mcg/ml で刺激し、上清を回収、HTRF 試薬を加えて、マイクロプレートリーダーで測定を行った。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。今後、この系の Validation を継続して行い、病態解析への応用についても検討する予定である。

A. 研究の目的

炎症の制御はヒト疾患の制御において重要な課題である。ヒトと他の動物種では炎症制御経路が異なることがあり、ヒト試料による探索は有用であるが、患者由来サンプルを用いた免疫疾患の研究では、得られる細胞数が限られることや、生体内のサイトカイン環境などに影響されることもあり、治療薬候補をスクリーニングする試みはあまり行われていない。ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立が解決策となり得るが、目的の分化細胞の純度・収量や成熟度が不十分でバッチ毎にばらつくこと、分化のコストが高いことなどの問題がある。そこで、本研究では、患者由来 iPS 細胞より

誘導した単球系細胞を株化することにより、均一な機能的分化細胞を大量に得、これを用いた疾患解析・創薬探索系を構築することを目的とする。なお、分担研究者らは、多くの疾患 iPS 細胞樹立を行っており、免疫疾患由来 iPS 細胞を用いて化合物スクリーニングが行えることも示している (Tanaka, Blood, 2012) 他、効率のよい単球分化系を開発している (Yanagimachi, PlosONE, 2013)。

B. 研究方法

単球細胞株を用いたスクリーニング系の構築

CINCA 症候群患者由来 iPS 細胞を既報にしたがって単球へ分化させた。単球系

細胞を浮遊細胞として回収し、これらにレンチウイルスベクターを用いて3因子(cMYC, BMI1, MDM2)を導入した。その後、M-CSF存在下に培養を継続し、増殖する細胞を単球細胞株として回収した。

単球細胞株をM-CSF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た。LPS 2mcg/mlで刺激し、上清を回収、HTRF試薬を加えて、マイクロプレートリーダーで測定を行った。

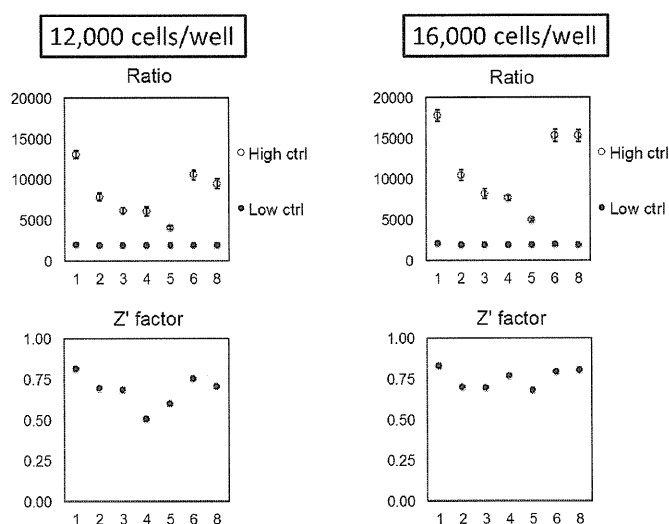
(倫理面への配慮)

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

単球細胞株を用いたスクリーニング系の構築

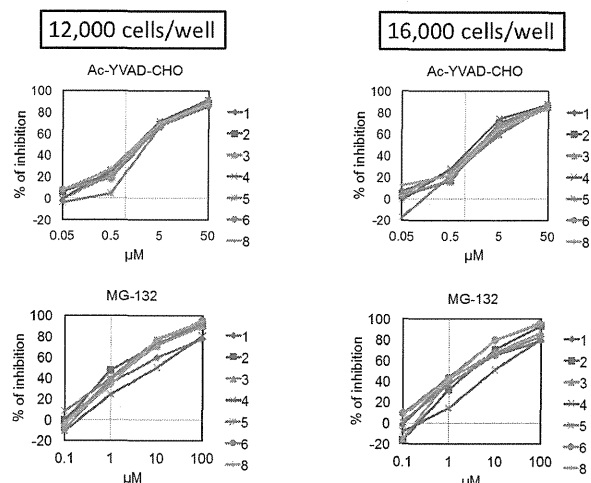
CINCA症候群患者由来単球は、LPS刺激のみで(二次シグナル非依存性に)IL-1bを産生する。そこで、このiPS細胞由来単球細胞株を用いて、創薬スクリーニング系の構築を試みた。当初は安定したデータが得られなかったが、細胞数を12000-16000/wellに増やすことにより、安定してZ' factor>0.5を確保することが可能となった。なお、Low controlは無刺激、High controlはLPS刺激である。



この条件で、Caspase-1阻害剤(YVAD)とプロテアソーム阻害剤(MG-132)の阻害効果について、用量依存性を見たところ、どちらの阻害剤に関しても、高い再現性で用量依存性が確認された(次頁図)。以上により、IL-1bをリードアウトとしたスクリーニング系の構築に関しては、安定した系の構築に成功したと考えた。

D. 考察

疾患特異的iPS細胞を用いた創薬開発、2)患者細胞を用いた免疫疾患の新規治療法開発、はいずれも多大な成果が見込まれる領域であるが、様々な問題点のた



め、世界的に見ても有用なスクリーニング系は確立していない。今回、単球株化により、均質かつ大量の疾患特異的分化細胞の取得が可能となった。これを用いることにより、汎用性の高く、相対的に低コストのスクリーニング系を確立できる可能性がある。

E. 結論

iPS細胞由来単球細胞株を用いた、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。今後、この系のValidationを継続して行い、病態解析への応用についても検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J. Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Pluripotent Stem Cells through a Neural Crest Lineage using Small Molecule Compounds with Defined Media. PLoS One. 2014 Dec 2;9(12):e112291. doi:

10.1371/journal.pone.0112291.
eCollection 2014.

2. 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. Enhanced chondrogenesis of iPS cells from neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase-1-independent cAMP/PKA/CREB pathway. Arthritis Rheumatol. 2014 Oct 9. doi: 10.1002/art.38912. [Epub ahead of print]
3. Saito MK*, Matsunaga A, Takasu N, Yamanaka S. Donor recruitment and eligibility criteria for HLA-homozygous iPS cell bank in Japan. In: Ilic D (ed), Stem cell banking, Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, New York : Springer; 2014. p.67-76
4. 齋藤潤. 明日の診療に役立つ細胞分子生物学再生医療-iPS細胞の応用. 日本呼吸器学会雑誌 3(5) 625-629, 2014
2. 学会発表
 1. 齋藤潤. 疾患特異的iPS細胞を用いた免疫疾患の解析について. 大阪リウマチカンファレンス(大阪). 2014/04/19
 2. 齋藤潤. 疾患iPS細胞を用いた血液・免疫疾患の病態解析. 第5回小児炎症研究会(東京). 2014/06/21
 3. 齋藤潤. 疾患特異的iPS細胞を用いた免疫疾患の病態解析. 第6回炎症性腸

疾患と免疫を語る会(横
浜).2014/06/26

4. 齋藤潤. 再生医療用 iPS 細胞ストック
のドナーリクルートについて .日本臓
器保存生物医学会(大阪).
2014/11/28

5. 齋藤潤. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた
免疫疾患の病態解析.横浜小児先端
セミナー(横浜). 2014/09/12

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

厚生労働省科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）

委託業務成果報告

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

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
研究協力者： 中川 権史 京都大学大学院医学研究科発達小児科学 大学院生
研究協力者： 横山 宏司 京都大学大学院医学研究科発達小児科学 医員

研究要旨

CINCA 症候群の全身性炎症に対しては抗 IL-1 療法が奏功するが、骨幹端軟骨過形成には無効であることが知られている。我々は患者由来 iPS 細胞を用いて、骨幹端軟骨過形成の病態の解明を行った。その際見られた変異株・野生株間の表現型の差異を抑制できる化合物は、骨幹端軟骨過形成に対する新たな薬剤となりうるため、そのような化合物をスクリーニングできるシステムの構築を試みた。

A. 研究目的

CINCA 症候群は蕁麻疹様皮疹・中枢神経症状・骨幹端軟骨過形成等の症状を呈する自己炎症性疾患である。原因遺伝子として *NLRP3* が同定されており、その機能獲得型変異により IL-1 β が過剰に産生され、慢性炎症が惹起されることが病態とされている。全身性炎症に対しては抗 IL-1 療法が奏功することが知られているが、骨幹端軟骨過形成には無効であり IL-1 β 以外の因子が関与している可能性も考えられていた。今回我々は、この骨幹端軟骨過形成に対し有効となりうる薬剤を探するため、まず iPS 細胞技術を用いて、患者検体としては入手困難である軟骨過形成の病態の再現と解明を行った。その上で、新たな薬剤を探索すべく、再現された表現型を抑制できる化合物のスクリーニングシステムの構築を試みた。

B. 研究方法

体細胞モザイク変異を有する CINCA 症候群患者由来 iPS 細胞の野生株・変異株それぞれから軟骨細胞への分化を行い、野生株・変異株間の差異を観察し検討を行った。次に、この変異株・野生株間の差

異を抑制できる化合物は骨幹端過形成に対する治療薬になりうるかと考え、そのような化合物をスクリーニングできるシステムの構築を行った。

(倫理面への配慮)

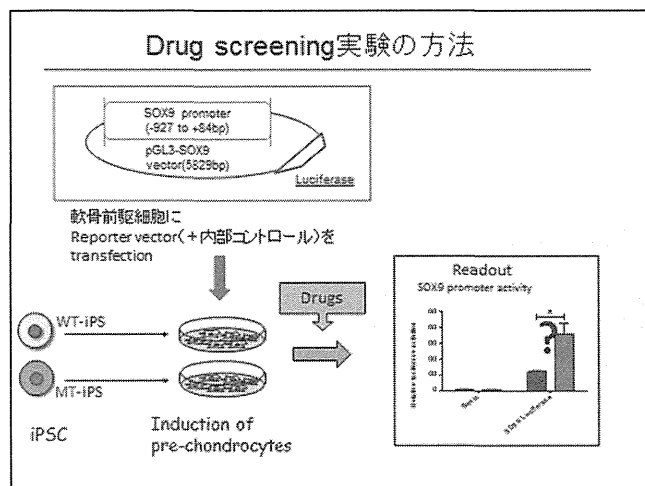
ヒト iPS 細胞の使用に関しては、京都大学医学部医の倫理委員会で承認を受けた「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究」を遵守して研究を行った。

C. 研究結果

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亢進して軟骨サンプルは有意に大きくなった。NOG マウスの皮下にこの軟骨を移植して軟骨内骨化を再現したところ、変異株では野生株よりそのサイズが大きくなるとともに、骨成分が無秩序に分布することが観察された。また、変異株で見られた軟骨の肥大は IL-1 β 非依存性であった。

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* 発現の差異に着目することとした。具体的に

は、軟骨前駆細胞の変異株・野生株間の 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することとした。現在化合物ライブラリを用いて 1 次スクリーニングを施行中である。



D. 考察

変異株で見られた軟骨の肥大は IL-1 β 非依存性で、NLRP3 インフラマソーム非依存性と考えられ、骨幹端軟骨過形成に対してはやはり抗 IL-1 薬とは異なる機序の薬剤の開発が必要と考えられた。

E. 結論

体細胞モザイク変異を有する CINCA 症候群患者由来 iPSC 細胞を用いて、骨幹端軟骨過形成に対する薬剤を探索すべく、まずその病態解明を行った。現在、変異株・野生株間の差異を抑制できる化合物のスクリーニングに着手している。

F. 研究発表

1. 論文発表

● Yokoyama K, Ikeya M, Nishikomori R, et al. 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. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Jan;67(1):302-14.

2. 学会発表

●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. 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 iPSC 細胞を用いた CINCA/NOMID における骨幹端過形成の機序解明. 第 117 回日本小児科学会学術集会 2014 年 4 月 11-13 日 名古屋

●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. 罹患者由来 iPSC 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の解明. 第 117 回日本小児科学会学術集会 2014 年 4 月 11-13 日 名古屋

●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. 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. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2014 年 4 月 24-26 日 東京

●横山宏司、西小森隆太、井澤和司、八角高裕、平家俊男. Understanding the pathology of the arthropathy in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome (CINCA) by using induced pluripotent stem cells (iPSCs) technology. 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2014 年 4 月 24-26 日 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

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

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
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

分担研究者：萩原 正敏（京都大学 大学院医学研究科 教授）
奥野 友紀子（京都大学 大学院医学研究科 特定助教）

分担研究課題：自己炎症性疾患に対する薬剤探索

研究要旨：

小児疾患を対象とした創薬、特に本研究班で対象とするような自己炎症性疾患を含む遺伝疾患は対象となる患者数も少なく、製薬企業の開発パイプラインからは外れがちである。従って医療者と研究者が密接に連携でき、アカデミア主導創薬が大きい力を発する領域であると考えられる。

当分担者らは自己炎症性疾患に対する患者iPS細胞由来分化細胞も活用した治療候補薬剤の探索を行う。本年度は本事業の研究対象である自己炎症性疾患のうち、疾患経路がもっとも明らかになっている、Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS)について化合物スクリーニング環境の確立及びスクリーニングに供する化合物コレクションの拡充を行った。

A. 研究目的

小児疾患を対象とした創薬はエビデンスの蓄積が難しく、特に本研究班で対象とするような、自己炎症性疾患を含む遺伝疾患は対象となる患者数も少なく、製薬企業の開発パイプラインからは外れがちである。従って医療者と研究者が密接に連携でき、アカデミア主導創薬が大きい力を発する領域であると考えられる。

京都大学医学研究科ではアカデミア創薬を入口の化合物スクリーニングから出口の臨床研究・導出まで一貫してサポートできる体制整備に力を入れている。当分担者らの属する医学研究支援センターは、化合物スクリーニングから作用機序解析までの「創薬の入口」を支える「医療にもっとも近い創薬支援施設」として整備・活動を進めて来た。当事業において当分担者らは自己炎症性疾患に対する患者 iPS 細胞由来分化細胞も活用した治療候補薬剤の探索を行う。

B. 研究方法

本年度は本事業の研究対象である自己炎症性疾患のうち、疾患経路がもっとも明らかになっている、Cryopyrin-associated periodic

syndrome (CAPS)について化合物スクリーニング環境の確立を行った。実際には、京都大学・横山らの確立した CAPS 患者 iPS 細胞由来軟骨前駆細胞の SOX9 プロモーター活性測定系を用い、医学研究支援センター保有機器を用いた化合物一次スクリーニングに向けた多検体アッセイ系への適用を行った。

（倫理面への配慮）

京都大学の倫理規定にしたがって、各種実験を実施した。

C. 研究結果

当年度は当事業分担者である京都大学・西小森らと共に、上記系を多検体スクリーニングに適応させるための条件検討を行った。CAPS 患者細胞では cAMP の過蓄積が見られるが、cAMP 産生に関わるアデニル酸シクラーゼ阻害剤 SQ22536 による SOX9 プロモーター活性抑制が小スケール系でも再現できた。現在医学研究支援センター保有機能既知化合物/既存薬コレクションを用いてスクリーニングを進めている。

D. 考察

CAPS では NLRP3 遺伝子の変異によりインフラマソームの過剰活性化が起っているが、現在までに、患者軟骨組織での軟骨過形成には NLRP3 下流の炎症抑制に直接機能する薬剤はこれを阻害しないことが判っている。従って NLRP3 活性化に関わる上流因子の調節剤が本疾患治療薬として同定されることが期待される。

本年度はスクリーニング系の最適化とともに同機序に関わる化合物を含む機能既知化合物コレクションの拡充も行った。現在スクリーニングに利用可能な状態に整備を進めており、来年度にかけた軟骨過形成抑制剤のスクリーニングに資することができる。

E. 結論

当該年度で多検体スクリーニングの手技が確立し、現在医学研究支援センター保有機能既知化合物コレクションを用いた一次スクリーニングを開始した。医学研究支援センターではスクリーニング環境の整備と同時に、CAPS の原因遺伝子 NLRP3 の関与する、NLRP3 インフラマソーム調節剤を含む化合物コレクションを拡充し、NLRP3 インフラマソーム活性化系と CAPS 軟骨過形成の関連を、ケミカルバイオロジー手法を用いて解析できる環境を整えた。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida M, Kataoka N, Miyauchi K, Ohe K, Iida K, Yoshida S, Nojima T, Okuno Y, Onogi H, Usui T, Takeuchi A, Hosoya T, Suzuki T, Hagiwara M. Rectifier of aberrant mRNA splicing recovers tRNA modification in familial dysautonomia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Feb 9. pii: 201415525.

2. Kuwasako K, Takahashi M, Unzai S, Tsuda K, Yoshikawa S, He F, Kobayashi N, Güntert P, Shirouzu M, Ito T, Tanaka A, Yokoyama S, Hagiwara M, Kuroyanagi H, and Muto Y. (2014) RBFOX and SUP-12 sandwich a guanine base to form a stable complex and regulate tissue-specific splicing. Nat. Struct. Mol. Biol. doi:10.1038/nsmb.2870.

3. Yamamoto M, Onogi H, Kii I, Yoshida S, Iida K, Sakai H, Abe M, Tsubota T, Ito N, Hosoya T, and Hagiwara M. (2014) CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses. J Clin Invest. 124(8):3479–3488.

2. 学会発表

特になし

H. 知的所得権の出願・登録状況

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（業務項目）

「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

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

研究分担者

小原收

（独）理研統合生命医科学研究センター、統合ゲノミクス研究グループディレクター
古関明彦

（独）理研統合生命医科学研究センター、免疫器官形成研究グループディレクター

自己炎症性疾患の新規な治療標的分子の探索のために、網羅的なタンパク質コード遺伝子領域の構造解析による新しい遺伝子変異の探索研究をおこなった。さらに、これまで炎症性サイトカインの放出などを指標としてしかスクリーニングできなかった自己炎症性疾患の新規化合物探索のために、よく知られている炎症性サイトカインである IL-1 β の分泌とカスパー活性化を単一細胞解像度で、実時間で追跡できるシステムを開発した。こうした新規治療標的分子が自己炎症をもたらす過程をさらに詳細に研究するためには、それらの治療標的分子に変異導入したモデルマウスを作製する必要があり、自己炎症疾患 3 種類についてのモデルマウス作製を開始した。

A. 研究目的

自己炎症性疾患は発症機序に不明な部分が多く残されている疾患であり、その治療標的分子を同定して、効果的な治療薬剤を開発するためには 1) 新たな創薬作用点の同定、2) 炎症をリードアウトとした革新的な創薬スクリーニングシステム、3) 詳細な発症機序の解析を可能とするモデル動物系などの基盤整備が求められている。本分担研究では、特に研究代表者のグループとの連携の下に、自己炎症性疾患患者様からの DNA 検体での新規原因遺伝子の同定、インフラマゾームの活性化と IL-1 β 放出の 2 つの現象を単一細胞レベルで計測する創薬基盤開発、自己炎症性疾患のモデル動物での再現を目指したノックイン動物作製を目的とする。

B. 研究方法

1) 新規原因遺伝子変異探索

自己炎症性疾患は症状からだけで遺伝的な発症原因の特定がしばしば困難である。そのため、既知疾患遺伝子に変異がある患者様を新規変異の探索集団から除外診断す

るために、10 種類前後の遺伝子で構成される遺伝子パネルでの解析を進めた。その後、既知の遺伝子に変異が見いだされなかった症例については、全エクソン構造解析を行った。得られた配列情報は本分担研究者の下でヒトリファレンス配列と比較解析し、候補遺伝子変異の絞り込みに進んだ。疾患原因である可能性が低い変異しか見いだされなかった場合は、ゲノムワイドな遺伝子のコピー数変化など他の可能性も考慮し探索を進めた。

遺伝子解析については、厚生労働科学研究委託費「原発性免疫不全症候群の病態解明と新規治療法開発への応用に関する研究」班、ならびに「小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子解析ネットワークとエピゲノム解析拠点整備」研究班、(公財) かずさ DNA 研究所とも協力関係を維持しながら研究を進めた。

2) IL-1 β 放出の単一細胞実時間解析

本分担研究者のグループが開発を続けてきた単一細胞実時間分泌計測システム (Sci. Rep. 2014 と、東大薬学部三浦正幸教授のグループの開発された Caspase-1 活性化セ

ンサー技術を融合し、マウスモデルを用いて、この2つの光学的な方法で単一細胞からのインフラマゾーム活性化後の IL-1 β 放出に至るまでの動的プロセスを解析した。

3) 既知疾患変異ノックインマウスの作製

本研究代表者と本分担研究者のグループが新規に同定した Aicardi-Goutières 症候群に見られる *IFIH1* 遺伝子、高 IgD 症候群 (メバロン酸キナーゼ機能低下) に見られる代表的な *MVK* 遺伝子変異、PAPA (化膿性関節炎・壊疽性膿皮症・ざ瘡) 症候群の原因として知られる *PSTPIP1* における代表的な遺伝子変異の3種類のノックインマウスの作製を迅速に行うために、受精卵に直接 CRISPR/Cas9 系によって変異導入を行う戦略を選択した。この実現のために、予備実験としてノックアウトマウス作製などを実施する事で、CRISPR/Cas9 による遺伝子改変マウスモデル作製のパイプラインを本分担研究者の古関らが理化学研究所に構築した。それぞれの遺伝子変異に対して、通常の方法でガイド RNA のデザインを行い、受精卵へのマイクロインジェクションで改変作業を進めた。

倫理面への配慮

本研究では遺伝子解析を行うため、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則って研究を進めるため、所属する理化学研究所での倫理審査委員会の承認を得た。理化学研究所では患者検体の直接の採取は行われず、研究代表者のグループの属する京都大学で同意書取得、連結可能匿名化 (連結作業は京都大学でのみ可能) が行われた検体の受け入れを行った。京都大学でも本研究のために、別途倫理審査によって実験計画の承認を得ている。

また、本分担研究では実験動物を用いるため、実験動物愛護上の配慮なども含めて、所属研究機関の承認・届出を行った後に実験を進めた。

C. 研究結果

1. 自己炎症性疾患のための8遺伝子からなる遺伝子パネルのデザインを行い、それを用いた解析で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、今年度は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、今年度のエクソーム解析の総数は19検体であった。解析データは本研究代表者のグループに報告し、疾患原因候補変異の絞り恋を共同で進めた。更に、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すると共に、機能解析による結果をまつ自己炎症性疾患の新規な候補変異を2症例で単一遺伝子まで絞り込めた。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。

2. 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、報告した。これにより、個々の細胞からの IL-1 β 放出が細胞死とカップルしている事の確認を得る事が出来た。さらに、東京大学薬学部三浦教授のグループが開発されたカスパー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、インフラマゾームの活性化によるプロカスパー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、論文として報告した。

3. 近年技術的な成熟が進んでいる 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、先行する *IFIH1* 遺伝子、*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. 考察

メンデル型遺伝の単一遺伝子に起因する疾患に関しては、エクソーム解析で30%程度の成功率で疾患原因が見出されると言われている。本研究でもそれに近い割合で候

補遺伝子変異が見出されている。残された疾患原因についてどのようなアプローチを進めるかが一つの課題であるが、それについてはヒト遺伝学研究者が活発に一般論としての検討を進めており、コピー数変化や転写産物レベルでの解析などの方法を組み合わせる事で、複雑な表現型を呈する自己炎症性疾患の本態に迫れるものと期待される。

今回の単一細胞からの IL-1 β 放出プロセスを可視化可能となった事は、抗炎症作用をもつ薬剤スクリーニングをインフラマソーム活性化と他の遺伝子活性化に作用する薬剤を区別しながら進める事が出来る事を意味する。更に、こうした単一細胞スクリーニング系がルーチン化されれば、現在は細胞の調製コストのために実施が遅れている iPS 細胞をベースにしたスクリーニングを現実的な選択肢とするであろう。

自己炎症性疾患の詳細な発症機序を探るためにモデルマウス創出は、新規な治療法探索には必須のツールとなる。これまでの実験から、CRISPR/Cas9 系がノックアウトマウス作製を著しく簡便化することが知られている。しかし、求められる箇所に求められる変異を導入する事は未だ成功率が低い段階にある。それはガイド RNA 配列によると考えられており、現在進行中の CRISPR/Cas9 によるノックインマウス作製の結果を見て、従来の ES 細胞を介したノックインマウス作製も並行して進める事も計画する予定である。

E. 結論

1. 自己炎症性疾患の遺伝子解析を 200 症例以上に対して行い、本年度は網羅的な遺伝子解析によって Aicardi-Goutières 症候群の新規な原因遺伝子について報告を行った。

2. 単一細胞からの IL-1 β 放出プロセスの実時間観察に成功し、更にプロカスペース 1 の活性化、細胞膜透過性の上昇、IL-1 β 放出の進行の実時間計測に成功し、それらを報告した。

3. *IFIH1* 遺伝子、*MVK* 遺伝子、*PSTPIP1* 遺伝子にヒト疾患で見られる変異をもつノックインマウスの作製を進めた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1: 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. Somatic NLRP3 mosaicism in Muckle-Wells syndrome. A genetic mechanism shared by different phenotypes of cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis*. 2015 Mar 74(3), 603-10

2: 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. 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. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Jan 67(1), 302-14

3: Nakagomi D, Suzuki K, Meguro K, Hosokawa J, Tamachi T, Takatori H, Suto A, Matsue H, Ohara O, Nakayama T, Shimada S, Nakajima H. Matrix metalloproteinase 12 is produced by M2 macrophages and plays important roles in the development of contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Dec. [Epub ahead of print]

4: Hasegawa Y, Ishikura T, Hasegawa T, Watanabe T, Suzuki J, Nakayama M,

- Okamura Y, Okazaki T, Koseki H, Ohara O, Ikeno M, Masumoto H. Generating a transgenic mouse line stably expressing human MHC surface antigen from a HAC carrying multiple genomic BACs. *Chromosoma*. 2014 Oct. [Epub ahead of print]
- 5: Liu T, Yamaguchi Y, Shirasaki Y, Shikada K, Yamagishi M, Hoshino K, Kaisho T, Takemoto K, Suzuki T, Kuranaga E, Ohara O, Miura M. Single-cell imaging of caspase-1 dynamics reveals an all-or-none inflammasome signaling response. *Cell Reports*. 2014 May, 8 (4), 974-82
- 6: Saito Y, Kagami S, Sanayama Y, Ikeda K, Suto A, Kashiwakuma D, Furuta S, Iwamoto I, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H. AT-rich-interactive domain-containing protein 5A functions as a negative regulator of retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor γ t-induced Th17 cell differentiation. *Arthritis Rheumatol*. 2014 May 66 (5), 1185-1194
- 7: Shirasaki Y, Yamagishi M, Suzuki N, Izawa K, Nakahara A, Mizuno J, Shoji S, Heike T, Harada Y, Nishikomori R, Ohara O. Real-time single-cell imaging of protein secretion. *Scientific Reports*. 2014 Apr 4, 4736
- 8: Blackledge NP, Farcas AM, Kondo T, King HW, McGouran JF, Hanssen LL, Ito S, Cooper S, Kondo K, Koseki Y, Ishikura T, Long HK, Sheahan TW, Brockdorff N, Kessler BM, Koseki H, Klose RJ. Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell*. 2014, 157:1445-59
- 9: Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Nakayama M, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Masumoto H, Ohara O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K. The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2014, 15:571-9
2. 学会発表
1. *IFIH1* 遺伝子変異は Aicardi-Goutières 症候群の原因となる、小田 紘嗣 中川 権史 阿部 純也 粟屋 智就 船曳 正英 土方 敦 八角 高裕 白井 剛 小原 收 加藤 博己 藤田 尚志 西小森 隆太 平家 俊男、第 59 回 日本人類遺伝学会 2014 年 11 月 22 日
 2. 臨床研究のための疾患遺伝子解析パイプラインの構築、小原 收、第 59 回 日本人類遺伝学会、2014 年 11 月 22 日
 3. HIGH-THROUGHPUT SINGLE-CELL SECRETION MEASUREMENT ON AN OPTICAL WAVEGUIDE CHIP, Yoshitaka Shirasaki, Nobutake Suzuki, Mai Yamagishi, Asahi Nakahara, Shuichi Shoji and Osamu Ohara, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2014 年 10 月 26 日 -30 日
 4. Aicardi-Goutières syndrome is caused by *IFIH1* mutations, Hirotsugu Oda, Kenji Nakagawa, Junya Abe, Tomonari Awaya, Masahide Funabiki, Atsushi Hijikata, Ryuta Nishikomori, Makoto Funatsuka, Yusei Ohshima, Yuji Sugawara, Takahiro Yasumi, Hiroki Kato, Tsuyoshi Shirai, Osamu Ohara, Takashi Fujita and Toshio Heike, American Society of Human Genetics, 2014 年 10 月 19 日
 5. 1 細胞分泌実時間測定による IL-1 β 非古典的分泌機序の解明、白崎 善隆、劉 霆、山口 良文、山岸 舞、鈴木 信勇、井澤 和司、水野 潤、庄子 習一、原田 慶恵、西小森 隆太、平家 俊男、三浦 正幸、小原收、第 52 回日本生物物理学会

年会、2014年9月25日-27日

6. Time-resolved live-cell FluoroSpot assay on Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy, Yoshitaka Shirasaki, Nobutake Suzuki, Mai Yamagishi, Osamu Ohara、EMBL Conference Series Microfluidics 2014、2014年7月23日
7. 炎症性細胞死に伴う IL-1 β サイトカイン分泌の1細胞イメージング (ポスター)、白崎 善隆、劉 霆、山口 良文、山岸 舞、鈴木 信勇、三浦 正幸、小原 收、第23回日本 Cell Death 学会学術集会、2014年7月18日-19日
8. リアルタイム分泌イメージング法を用いたインフラマソーム活性化に伴う IL-1 β 分泌機序の解析 (ポスター)、白崎 善隆、山岸 舞、鈴木 信勇、劉 霆、山口 良文、改正 恒康、星野 克明、三浦 正幸、小原 收、第66回日本細胞生物学会大会、2014年6月11日-13日
9. Real-time single-cell imaging of IL-1 β secretion by Inflammasomes, Yoshitaka Shirasaki, Mai Yamagishi, Kazushi Izawa, Hirotsugu Oda, Toshio Heike, Ryuta Nishikomori, Osamu Ohara, CSH 2014 meeting on Gene expression & signaling in the immune system、2014年4月22日 - 26日
10. **Koseki H.** iPS-mediated induction of human NKT cells and their application for cancer therapy. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society of Inflammation and Regeneration, Okinawa, Japan. 2014年7月3日

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

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

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

研究分担者 増本 純也 愛媛大学プロテオサイエンスセンター 教授

研究要旨 自己炎症疾患は、炎症性サイトカインであるIL-1 β の活性化を制御するインフラマソームの中心的インフラマソームの制御異常が疾患の本態と考えられる。実際に、代表的な疾患であるクリオパイリン関連周期熱症候群(CAPS)の原因遺伝子産物であるNLRP3の疾患特異的変異は、インフラマソームの持続活性化が原因と言われている。そこで、本研究では、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系することによって、試験管内でのインフラマソームの制御異常を明らかにするとともに、その異常を標的とした分子標的治療薬を探索する。

A. 研究目的

インフラマソームは、細胞内の病原体や代謝産物などを認識して、炎症性サイトカインであるIL-1 β を活性化するのに必須の細胞内蛋白質複合体である。特にインフラマソームの構成分子であるNLRP3に変異のあるクリオパイリン関連周期熱症候群は自己炎症疾患を理解するうえで重要なモデルである。そのため、自己炎症疾患の発作においてはインフラマソームの制御異常が重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、本研究では、愛媛大学のコムギ胚芽無細胞蛋白質合成技術を用いて、インフラマソームを構成する複数の蛋白質を合成し、試験管内で再構成することによって、インフラマソームに対する疾患関連分子の制御異常を明らかにするとともに、その異常を標的する分子標的薬を探索することを目的とする。

B. 研究方法

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、NLRC4、Pyrin、ASCなどと、イン

フラマソームと同様のシグナル複合体でありながらアダプターにRICKを使うNod1、Nod2などを合成し、試験管内で複合体形成が起こった際の発光を指標にインフラマソームの活性化を解析する。

（倫理面への配慮）

本研究課題では、特に倫理面での問題は生じないと考えられるが、疾患関連の変異蛋白質を使用するため、その際にプライバシーその他の患者さんの不利益にならぬよう、ヘルシンキ宣言に基づいた対応を行う。個人情報推定されうる場合には、秘密を厳守し、患者さんの不利益とならない様に注意する。倫理面が想定されるケースとしては、蛋白質の変異が世界に1例しかないような極めてまれな症例のために、症例が特定されうる場合などが考えられる。

C. 研究結果

これまでに、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

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している。

D. 考察

インフラマソームを直接活性化する分子は自己炎症疾患の周期性炎症発作の原因物質と考えられる。また、インフラマソームを直接阻害する分子は自己炎症疾患の魅力的な分子標的薬の候補になると考えられる。これまで、培養細胞やモデル動物を使った実験では、直接インフラマソームと相互作用して活性化する原因物質と間接的な原因物質を区別することが困難であった。また同様の理由で、阻害物質探索においても直接相互作用する分子の同定は困難であった。一方で、蛋白質合成に関して、酵母や大腸菌を使ったりコンピ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、試験管内でインフラマソームを再構成することは難しかった。今回、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、これらの弱点を克服し、試験管内家族性地中海熱インフラマソームの再構成が成功したと考えられる。

E. 結論

今回、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成技術により、試験管内インフラマソーム再構成系の構築に成功した。家族性地中海熱が、インフラマソーム動態という定量系で解析できると同時に、インフラマソームを標的とした分子標的薬の探索ができるようになったことで、診断や治療薬の探索に向けた臨床応用が加速すると考えられる。

E. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

[雑誌論文]

1. 著者 : Migita 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.

題名 : Dysregulated mature IL-1 β production in familial Mediterranean fever.

雑誌名 : Rheumatology (Oxford)

巻号年頁 : 印刷中2015年査読有

2. 著者 : Ito Y, Kaneko N, Iwasaki T, Morikawa S, Masumoto J.

題名 : IL-1 as a target in inflammation.

雑誌名 : Endocr Metab Immune Disord Drug Targets

巻号年頁 : 印刷中2014年査読有

3. 著者 : Yamazaki T, Shigemura T, Kobayashi N, Honda K, Yazaki M, Masumoto J, Migita K, Agematsu K.

題名 : IL-18 serum concentration is markedly elevated in typical familial Mediterranean fever with M694I mutation and can distinguish it from atypical type.

雑誌名 : Mod Rheumatol

巻号年頁 : 25巻1号2015年166-168頁査読有

4. 著者 : Mokuda S, Kanno M, Takasugi K, Okumura C, Ito Y, Masumoto J.

題名 : Tocilizumab improved clinical symptoms of a patient with systemic tophaceous gout who had symmetric polyarthritis and fever: An alternative treatment by blockade of interleukin-6 signaling

雑誌名 : SAGE Open Medical Case Reports

巻号年頁 : 2巻1号2014年2050313X13519774

頁査読有

5. 著者 : Sugiyama R, Agematsu K, Migita K, Nakayama J, Mokuda S, Ogura F, Haraikawa K, Okumura C, Suehiro S, Morikawa S, Ito Y, Masumoto J.

題名 : Defect of suppression of inflammasome-independent interleukin-8 secretion from SW982 synovial sarcoma cells by familial Mediterranean fever-derived pyrin mutations.

雑誌名 : Mol Biol Rep

巻号年頁 : 41巻1号2014年545-553頁査読有

6. 著者 : Mokuda S, Miyazaki T, Saeki Y, Masumoto J, Kanno M, Takasugi K.

題名 : Epstein-Barr virus-related MTX-LPD in rheumatoid arthritis patients exhibits a viral pattern of the CD64 and CD35 expression on neutrophils: Three case reports.

雑誌名 : Mod Rheumatol

巻号年頁 : 25巻1号2014年166-168頁査読有

7. 著者 : Kurata M, Nose M, Shimazu Y, Aoba T, Kohada Y, Yorioka S, Suehiro S, Fukuoka E, Matsumoto S, Watanabe H, Kumon Y, Okura T, Higaki J, Masumoto J.

題名 : Microvasculature of carotid atheromatous plaques: hemorrhagic plaques have dense microvessels with fenestrations to the arterial lumen.

雑誌名 : J Stroke Cerebrovasc Dis

巻号年頁 : 23巻6号2014年1440-1446頁査読有

8. 著者 : 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.

題名 : Familial Mediterranean fever: genotype-phenotype correlations in Japanese patients.

雑誌名 : Medicine (Baltimore)

巻号年頁 : 93巻3号2014年158-164頁査読有

9. 著者 : Migita K, Izumi Y, Jiuchi Y, Kozuru H, Kawahara C, Nakamura M, Nakamura T, Agematsu K, Masumoto J, Yasunami M, Kawakami A, Eguchi K.

題名 : Serum amyloid A induces NLRP-3-mediated IL-1 β secretion in neutrophils.

雑誌名 : PLoS One

巻号年頁 : 9巻5号2014年e96703頁査読有

10. 著者 : Okumura C, Haraikawa K, Suehiro S, Ito Y, Masumoto J.

題名 : The inflammasome.

雑誌名 : Nihon Rinsho

巻号年頁 : 71巻8号2014年1497-1504頁

2. 学会発表

1. 演者 : Masumoto J.

題名 : Defect of suppression of inflammasome-independent interleukin-8 secretion from sw982 synovial sarcoma cells by familial mediterranean fever-derived pyrin mutations, 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Plagh, 2014 October 30-November 1.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許5493714 : クラスリン結合性ペプチド複合体, 2014

発明人 : 宮川 眞一、清水明、北原弘恵、増本純也.