

iPS細胞を用いた Blau 症候群の炎症病態評価についての研究

研究分担者 中畑 龍俊 京都大学iPS細胞研究所
研究協力者 齋藤 潤 京都大学iPS細胞研究所

研究要旨

Blau 症候群は、自己炎症症候群の一つでNOD2遺伝子のヘテロ変異を伴う。しかし、NOD2の変異がどのようなメカニズムで症状を引き起こしているのかは不明であった。そこで今回、iPS細胞を用いたBlau症候群の病態モデルを構築し、自己炎症の機序を明らかにすることを目的として研究を行った。結果、NOD2変異iPS細胞由来マクロファージではIFN- γ の添加により、炎症性サイトカインが異常産生された。今回の研究成果は、Blau症候群のさらなる病態解明に貢献しうると期待される。

A. 研究目的

Blau 症候群は、皮膚、関節、眼に肉芽腫を生じる難病の一つで、患者さんは NOD2 という遺伝子のヘテロ変異を伴っている。ヒト生体においては、細菌やウイルスなどの病原体が侵入した際に反応する免疫システムが存在する。NOD2 は、この免疫システムに関わる遺伝子のひとつで、細菌の成分の一部を認識して体に炎症を引き起こす。NOD2 が病原体を認識すると、転写因子の NF- κ B が活性化することで、生理活性物質である炎症性サイトカインが産生され、体内の免疫応答・炎症反応を引き起こす。Blau 症候群の疾患関連 NOD2 遺伝子変異がどのようなメカニズムで患者さんの症状を引き起こしているのかは分かっていなかった。そこで今回、iPS 細胞を用いた Blau 症候群の病態モデルを構築し、自己炎症の機序を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1) 遺伝的に背景をそろえたコントロールiPS細胞の作製

患者さんの血液細胞からiPS細胞を作製し、患者さんがもつNOD2遺伝子の変異をゲノム編集技術で修復して、遺伝的に背景をそろえてNOD2遺伝子のみが違うコントロールiPS細胞を作製した。同様に、今度は健常な方から作ったiPS細胞にゲノム編集技術を用いて、患者さんと同じNOD2の遺伝子変異をノックインしたコントロール細胞を作製した。それらのiPS細胞から、マクロファージを分化誘導して機能解析を行った（図1）。

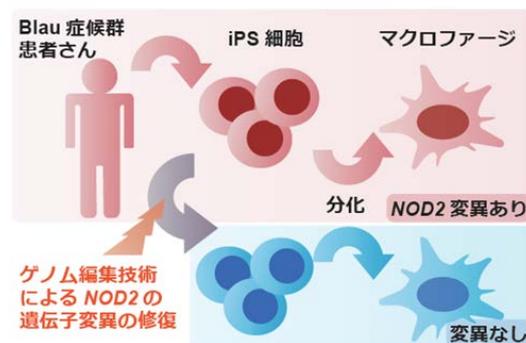


図1: 患者さん由来iPS細胞とゲノム編集技術を用いた本研究のモデル図

（倫理面への配慮）

ドナーの遺伝情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”に沿って、京都大学倫理審査委員会の審査承認を受けているが、人権及び利益の保護について、十分配慮しながら実験を行う。iPS細胞作製にあたり、“人を対象とする医学系研究に関する倫理指針”に基づいて、京都大学医の倫理委員会の承認を頂いている。その内容を忠実に順守し、ドナーの同意・協力を得て行う。ドナーには、病歴・経過等について追跡調査を実施する可能性についても説明し、同意を得る。臨床情報、ゲノム情報等は該当する法令、指針に則って適切に管理を行う。iPS細胞樹立に必要な組み換えDNA実験については、“組み換

えDNA実験指針”に基づき、研究計画が同指針に示されている基準に適合することを確認したうえで、計画の申請を京都大学に対して行い、承認を受けた後、規定されている封じ込め手段を適切に行う。

C. 研究結果

IFN- γ で活性化した、患者さん由来iPS細胞から作製したマクロファージでは、NF- κ Bの異常活性化や炎症性サイトカインの異常産生がみられる

患者さん由来iPS細胞から作製したマクロファージやそのコントロール細胞を比較したところ、非刺激時は差がないものの、マクロファージを活性化してNOD2の発現量を増やすIFN- γ を加えると、患者さんのモデル細胞でNF- κ Bの活性化と炎症性サイトカインの産生が増加していた(図2)。また、健常者由来細胞に変異を導入した細胞でも、同様にNF- κ Bの活性化と炎症性サイトカインの産生が増加した(図2)。このことから、本来は病原体に対して反応し炎症を引き起こすNOD2が、遺伝子の変異によってIFN- γ に対して異常な炎症を引き起こしていることが示唆された。

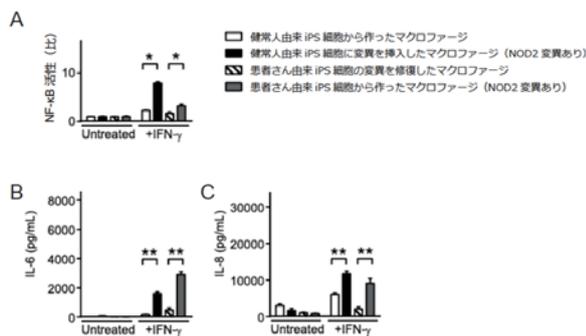


図2: 患者さん由来iPS細胞から作製したマクロファージでのNF- κ Bの活性化と炎症性サイトカインの産生

A: NF- κ Bの活性化を比較。IFN- γ を加えた際に、NOD2遺伝子に変異のある細胞ではそのコントロール細胞と比較してNF- κ B活性が高くなっている。

B, C: 炎症性サイトカイン産生を比較。IFN- γ を加えた際に、NOD2遺伝子に変異のある細胞ではそのコントロール細胞と比較して炎症性サイトカイン(インターロイキン6(IL-6)、インターロイキン8(IL-8))の産生量が多くなっている。

患者さん由来iPS細胞から作製したマクロファージでは、IFN- γ を加える前から炎症シグナルが動き出している

RNA-seqで、患者さん由来iPS細胞から作製したマクロファージとコントロール細胞を比較すると、IFN- γ を加える前の定常状態で、患者さんモデル細胞の中ではすでに炎症シグ

ナルに関連した遺伝子群の発現更新していることが分かった。このことから、定常状態でもすでに変異をもつNOD2は炎症を引き起こす準備をしており、IFN- γ を加えることで異常な炎症が引き起こされる可能性が示唆された。

D. 考察と結論

本研究では、病態を表す適切なモデルが確立されていなかったBlau症候群について、患者さん由来iPS細胞を用いたモデルを構築し、異常な炎症を引き起こすメカニズムの一端を明らかにした。さらに、ゲノム編集技術を用いて、変異を修復したコントロール細胞では異常な炎症が抑えられること、健常者由来細胞に変異を導入した細胞では異常な炎症が引き起こされることを示した。今回の研究成果は、Blau症候群のさらなる病態解明とともに、肉芽腫を生じる他の疾患の病態解明や治療薬の探索に貢献するものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Mitsuda Y, Morita K, Kashiwazaki G, Taniguchi J, Bando T, Obara M, Hirata M, Kataoka TR, Muto M, Kaneda Y, Nakahata T, Liu PP, Adachi S, Sugiyama H, Kamikubo Y: RUNX1 positively regulates the ErbB2/HER2 signaling pathway through modulating SOS1 expression in gastric cancer cells. *Sci Rep.* 2018 Apr 23;8(1):6423. doi: 10.1038/s41598-018-24969-w.
- Hashii Y, Yoshida M, Hara J, Nishimura S, Yumura-Yagi K, Horibe K, Nakahata T: Acid-suppressing Drugs and a Low 1 Level of Antithrombin as Risk Factors for L-Asparaginase-associated Pancreatitis: A Case-control Study in the Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS). *J Pediatr Hematol Oncol.* 2018 Jul;40(5):374-378. doi: 10.1097/MPH.0000000000001193.
- Ono H, Ohta R, Kawasaki Y, Niwa A, Takada H, Nakahata T, Ohga S, Saito MK: Lysosomal membrane permeabilization causes secretion of IL-1 β in human vascular smooth muscle cells. *Inflamm Res.* 2018 Oct;67(10):879-889. doi: 10.1007/s00011-018-1178-z. Epub 2018 Aug 22.
- Kirino K, Nakahata T, Taguchi T, Saito MK: Efficient derivation of sympathetic neurons from human pluripotent stem cells with a defined condition. *Sci Rep.* 2018 Aug 27;8(1):12865. doi: 10.1038/s41598-018-31256-1.
- Kurata T, Matsuda K, Hirabayashi K, Shigemura T, Sakashita K,

Nakahata T, Koike K.: Panobinostat inhibits the proliferation of CD34+ CD38- cells under stimulation of hematopoietic growth factors on AGM-S3 cells in juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2018 Nov;65(11):e27261. doi: 10.1002/pbc.27261. Epub 2018 Jul 16.

6) Taoka K, Arai S, Kataoka K, Hosoi M, Miyauchi M, Yamazaki S, Honda A, Aixinjueluo W, Kobayashi T, Kumano K, Yoshimi A, Otsu M, Niwa A, Nakahata T, Nakauchi H, Kurokawa M.: Using patient-derived iPSCs to develop humanized mouse models for chronic myelomonocytic leukemia and therapeutic drug identification, including liposomal clodronate. *Sci Rep*. 2018 Oct 26;8(1):15855. doi: 10.1038/s41598-018-34193-1.

7) Ichishima J, Suzuki NM, Samata B, Awaya T, Takahashi J, Hagiwara M, Nakahata T, Saito MK: Verification and rectification of cell type-specific splicing of a Seckel syndrome-associated ATR mutation using iPSC cell model. *Journal of Human Genetics*. In press (published online: 08 March 2019)

2. 学会発表

- 1) 金澤伸雄、尾崎富美子、寺嶋聖佳、丹羽明、柳町昌克、古川福実、中畑龍俊、齋藤潤: iPSC細胞を用いた中條-西村症候群の病態解明と治療薬の試み. 第39回日本炎症・再生医学会 2018年7月11-12日(ポスター) 京王プラザホテル
- 2) 中畑龍俊:iPSC細胞が切り開くこれからの小児医療. 第14回医学生・若手医師のための小児科診療最前線 ~新生児医療から高度先端医療・移植医療まで~ 2018年7月21日 北野病院5階きたのホール
- 3) 迎恭輔、竹信尚典、杉野隆一、大平美紀、佐藤俊平、遠藤悠紀、岡田龍、春日雅之、戸口田淳也、長船健二、中畑龍俊、上條岳彦:iPSC細胞由来神経堤細胞の神経芽腫発生メカニズム解析のための細胞モデル開発. 第77回日本癌学会学術集会 2018年9月27-29日(29日) 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪
- 4) 田中邦昭、加藤 格、田中美幸、盛田大介、高橋義行、梅田雄嗣、平松英文、中畑龍俊、足立壯一、滝田順子、中沢洋三:中枢神経浸潤白血病 異種移植マウスモデルにおけるpiggyBac CD19 CAR-T細胞の脳室内投与の安

全性と有効性の検討. 第60回日本小児血液・がん学会学術集会 2018年11月14-16日 ロームシアター京都/京都市勧業館みやこめっせ(16日、ポスター、みやこめっせ)

- 5) Akira Niwa, Tatsutoshi Nakahata, Megumu K Saito.: iPSC-Based Phenomic Screen Revealed an Impact of Uncontrolled NFkB Activity at the Initiating Stages of AML1-ETO Related Leukemia. 60th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego Convention Center, December 3, 2018(Poster)
- 6) Kuniaki Tanaka, Itaru Kato, Miyuki Tanaka, Daisuke Morita, Yoshiyuki Takahashi, Tatsutoshi Nakahata, Katsutsugu Umeda, Hidefumi Hiramatsu, Souichi Adachi, Junko Takita, Yozo Nakazawa. PiggyBac CD19 CAR T Cells Eradicate CNS Leukemia By Direct Delivery into Cerebral Ventricle of Xenograft Mice Model. 60th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego Convention Center, December 3, 2018(Poster)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし