

## 家族性地中海熱遺伝子関連腸炎の 診断法の確立並びに病態解明

研究分担者 仲瀬 裕志 消化器内科学講座 教授

研究要旨：今回我々は、FMF 関連腸炎（IL-1 関連腸炎）の診断法の確立並びに機序解明に取り組んだ。コルヒチン反応性 FMF 関連腸炎 50 症例の患者群を検討した結果、日本人 FMF 腸炎症例の 70%以上が Exon2 部位での変異を有し、FMF の非定型例あるいは基準を満たさない症例が全体の 3 分の 2 を占めることが判明した。また、消化管病変の内視鏡的特徴所見では、直腸に病変を伴わない大腸の連続性病変を有し、多くの場合 UC 様の粘膜所見を呈した。一方、CD 様の狭窄例も存在することが明らかとなった。基礎研究結果では、Exon2 部位の変異プラスミドが導入された 293T 細胞では、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の発現増強が確認された。また、MEFV 変異部位の違いにより、Toll like receptor ligand 刺激に対する反応性が異なることが明らかとなった。これらの研究結果から、腸内細菌構成成分による刺激ならびに Exon2 変異は炎症性サイトカイン発現増強を促し、腸管炎症に寄与することが示唆された。

### 共同研究者

飯田智也（札幌医科大学消化器内科学講座）  
平山大輔（札幌医科大学消化器内科学講座）  
櫻井晃弘（札幌医科大学 遺伝医学）  
久松理一（杏林大学第 3 内科）  
松本主之（岩手医科大学消化器内科消化管分野）  
江崎幹宏（佐賀大学医学部）  
国崎玲子（横浜市立大学附属市民総合医療センター 炎症性腸疾患センター）  
松浦 稔（京都大学医学部附属病院内視鏡部）  
大宮美香（関西医科大学内科学第 3 講座）  
荒木寛司（岐阜大学医学部光学医療診療部）  
渡辺憲治（兵庫医科大学腸管病態解析学）  
田中浩紀（札幌厚生病院 IBD センター）  
小林 拓（北里大学大学院医療系研究科炎症性腸疾患先進治療センター）  
日比紀文（北里大学大学院医療系研究科炎症性腸疾患先進治療センター）  
竹内 健（東邦大学医療センター佐倉病院 消化器内科学）  
鈴木康夫（東邦大学医療センター佐倉病院 消化器内科学）

### A. 研究目的

日本人炎症性腸疾患 (IBD) 患者には、MEFV 遺伝子変異を有し、コルヒチンのみで寛解する家族性地中海熱 (FMF) 関連腸炎群が存在する可能性が極めて高い。本研究は、増加しつつある IBD 患者群から本疾患を見出すため、FMF 関連腸炎の診断法の確立を目指すものである。

### B. 研究方法

1. 対象 分類不能腸炎 (IBDU) 患者を対象とした。
2. 基本デザイン 観察的研究
3. 目標症例数 100 症例
4. 評価項目

#### 【IBDU 患者における MEFV 遺伝子解析】

血液検体を採取し、DNA を抽出する。抽出された DNA を用いてピリン蛋白をコードする MEFV 遺伝子解析を行う。（札幌医科大学 医の倫理委員会 承認番号 G718）

#### 【FMF 遺伝子関連腸炎の臨床データの解析】

臨床情報・遺伝子解析データで得られた情報から、FMF 関連腸炎の臨床特徴を明らかにする。

（UMIN 登録 ID 000022289）

【MEFV 遺伝子変異各種細胞株の作製ならびにサイトカイン産生能の評価】

MEFV 遺伝子変異プラスミド作製を行い、293T 細胞などに遺伝子導入する。その後、これらの細胞を Toll like receptor ligand(TLR)で刺激し、炎症性サイトカインならびに NLRP3 の発現について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究を行うにあたっては、『ヘルンシキ宣言(2013年改訂)』『人を対象とする医学研究に関する倫理指針(平成29年2月28日一部改定)』に従う。本研究で収集した全ての対象者の遺伝情報の匿名化は札幌医科大学消化器内科学講座で実施する。匿名化については、札幌医科大学医学部の規定に沿って行い、個人情報、遺伝子解析研究を行う前に、札幌医科大学消化器内科学講座において研究対象者の氏名、生年月日等、すなわち、個人を特定することができる情報を除去する。また、連結可能匿名化においては、対応表を個人情報管理者の下で厳重に保管する

### C. 研究結果

コルヒチン反応性 FMF 関連腸炎 50 症例の患者群を検討した結果、日本人 FMF 腸炎症例のほとんどが、Exon2 部位での変異を有した。中でも、E148Q のアミノ酸置換を伴う Exon2 の変異の頻度が最も多いことが明らかとなった。FMF 腸炎患者の臨床的特徴所見では、非定型例と言われる症例が全体の 3 分の 2 を占めることが判明した。消化管病変の内視鏡的特徴所見に関しては、(a)大腸には連続性病変がみとめられるが、しばしば直腸には病変が認められない。(b)潰瘍性大腸炎様の粘膜所見を呈する傾向が多い(52%) (c)狭窄例も存在する。

MEFV 変異部位に基づき、アミノ酸置換を伴うピリン蛋白を産生するプラスミドを作製した。これらのプラスミドを 293T 細胞に導入し、Toll like receptor(TLR)ligand による刺激を行った。その結果、変異プラスミド導入細胞株では、NLRP3 発現の増強につながることも、ならびに MEFV 変異部位の違いにより、各 TLR ligand 刺激に対する反応性が異なる

ことが明らかとなった。さらに、Pyrin の N 端に存在する pyrin domain は Caspase-1 により、330 番目のアスパラギン酸で切断され、核内に移行することが判明した。我々は Exon2 の変異 pyrin domain を作製、293T 細胞に導入した。その結果、日本人で変異の頻度が高い E148Q、L110P のアミノ酸置換を生じる Exon2 の変異が導入された細胞では、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の発現増強が確認された。

### D. 考察

FMF の発症機序は、変異 Pyrin 蛋白による Caspase-1 制御機能消失の結果、成熟型 IL-1 $\beta$  の産生亢進によるとされている。加えて、FMF は漿膜炎が病態の主体であるため、消化管病変の検討についてはほとんど行われていなかった。2012 年我々は、既存治療抵抗性の腸炎患者が MEFV 遺伝子変異を有し、コルヒチン投与のみで寛解にいたった FMF 関連腸炎の症例を報告した。その後、日本において FMF 腸炎の症例報告は増加傾向にある。今回、多施設の協力を得て、MEFV 遺伝子変異を有する 50 症例の FMF 患者群の臨床的特徴を検討した。FMF 腸炎患者では、非定型例と言われる症例が 3 分の 2 以上を占めていた。内視鏡所見では、UC に類似した連続性病変がみとめられるものの、直腸病変を伴わないことが特徴的な所見の一つであった。さらに、CD 患者に見られるような狭窄病変を有する症例が存在した。このことは、現在 IBD と診断されている患者の中に FMF 腸炎患者が存在する可能性を強く示唆している。

FMF は常染色体劣性遺伝形式をとるとされてきたが、その発症機序は未だ不明な点が多い。その理由として、ピリン欠損マウスでは全身炎症の誘導が認められない、さらに heterozygous 変異での発症が多いことが挙げられる。また、地中海領域に住む患者では Exon10 の変異がほとんどであるが、日本では Exon2 変異を有する患者が大部分を占める。Exon 10 での変異は、C-terminal domain に存在する B30.2 の機能変化をきたす結果 Caspase-1 活性化が生じ、成熟型 IL-1 $\beta$  の産生に繋がることが報告されている。しかしながら、Exon2 変異に伴うアミノ酸置換の FMF 発症への関与は明らかとなっていない。Exon1 およ

び Exon2 は N-terminal domain である Pyrin をコードする領域である。Pyrin は caspase-1 により 330 番目のアスパラギン酸で切断され、pyrin domain が核内に移行することが報告された。我々は Exon2 の変異 pyrin domain を発現するプラスミドを作製、293T 細胞に導入した。その結果、E148Q、L110P、R202Q、のアミノ酸置換を生じる Exon2 遺伝子変異が導入された細胞では、コントロールに比べて IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  の発現増強が確認された。このことから、Exon2 変異により FMF 腸炎が生じる理由として、変異 pyrin domain の核内移行が炎症性サイトカインの誘導に寄与する可能性が示唆された。さらに、MEFV 変異は TLR 刺激に対する反応性に影響を及ぼすことも明らかとなった。これらの研究結果から、我々は、変異ピリン蛋白による炎症性サイトカインならびに NLRP3 発現増強 (gain-of-function) に加えて、患者の腸内細菌叢変化が FMF 関連腸炎発症に関与しているものと考え、FMF 患者の腸内細菌叢の解析に現在取り組んでいる。

#### E. 結論

我々が今回注目した FMF 関連腸炎患者は、IBD 患者の中に予想以上に多く存在する可能性が高い。我々のデータを基盤に診断基準の作成に取り組む必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### 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