



ブラウ症候群患者由来iPS細胞から分化誘導した単球細胞株における炎症シグナル経路の検討

皮膚科学教室 谷崎英昭、松田智子、植木瑤子、岸本 泉、Ma ni、Mai Trang、神戸直智

本研究の背景と目的

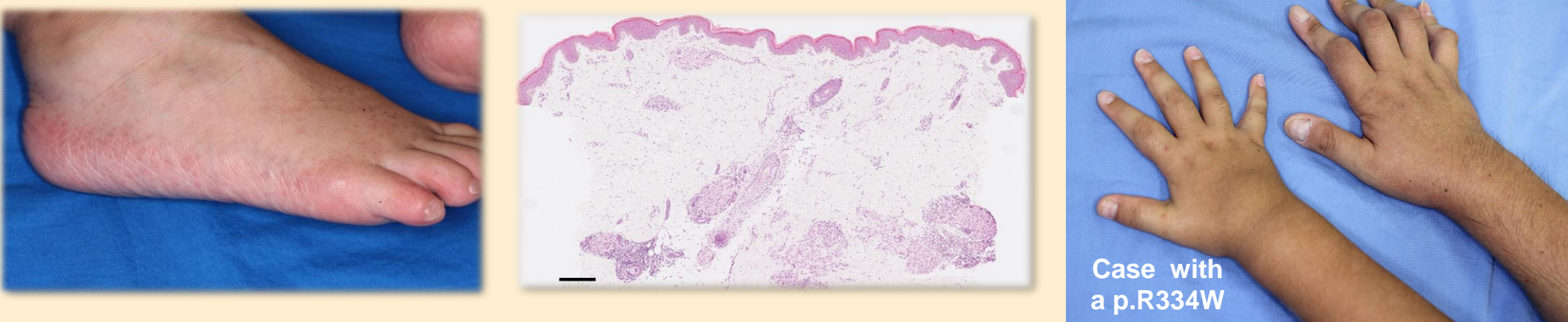
Blau症候群は、皮膚、関節、眼に肉芽腫を生じる難病の一つで、NOD2という炎症・免疫反応に関わる遺伝子に異常があることが分かっている。しかし、このNOD2の変異がどのようなメカニズムで症状を引き起こしているのかは不明である。

今回、Blau 症候群の患者由来のiPS細胞を作成し、ゲノム編集技術 (CRISPR-Cas9システム) を用いて遺伝子変異を修復した正常なiPS細胞、健康者由来のiPS細胞に、同じゲノム編集技術を用いて、今度はNOD2遺伝子変異の挿入を行った。

これらのiPS細胞に対してNOD2のリガンドとして知られるMuramyl dipeptide (MDP) とIFN- γ を添加して炎症反応を惹起し、炎症性サイトカイン産生能を調べるとともに、Blau症候群の病態解明や治療薬のスクリーニングに利用するモデルとして確立する。

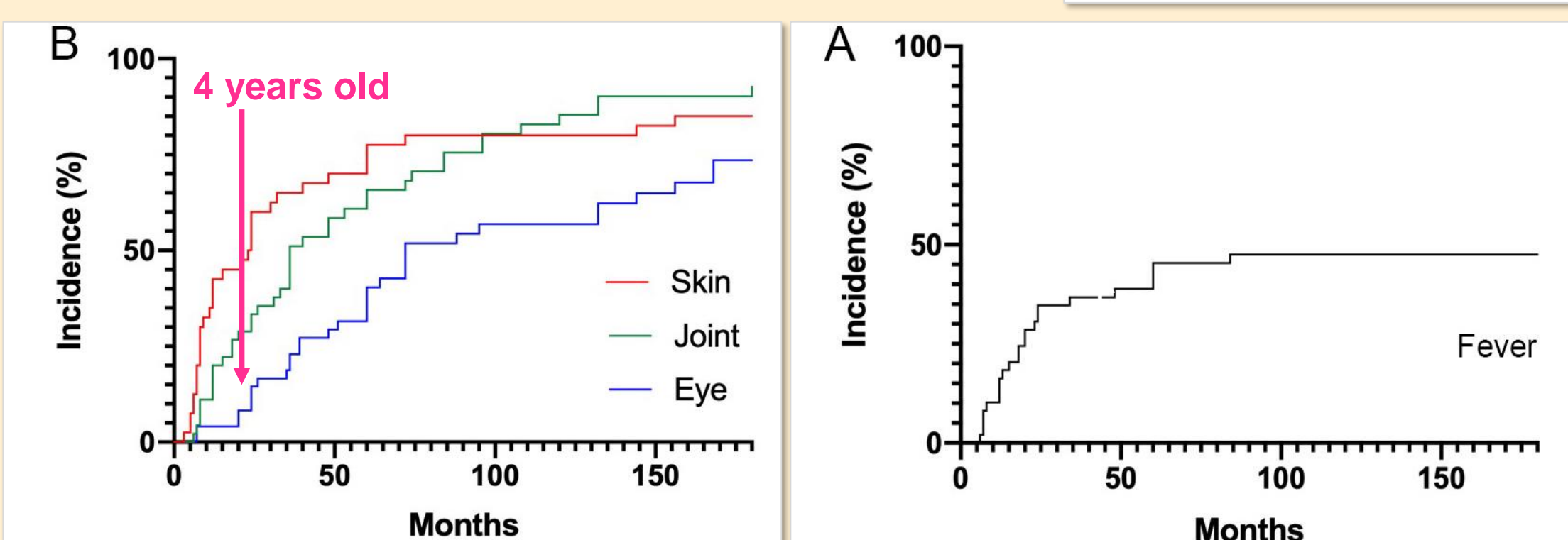
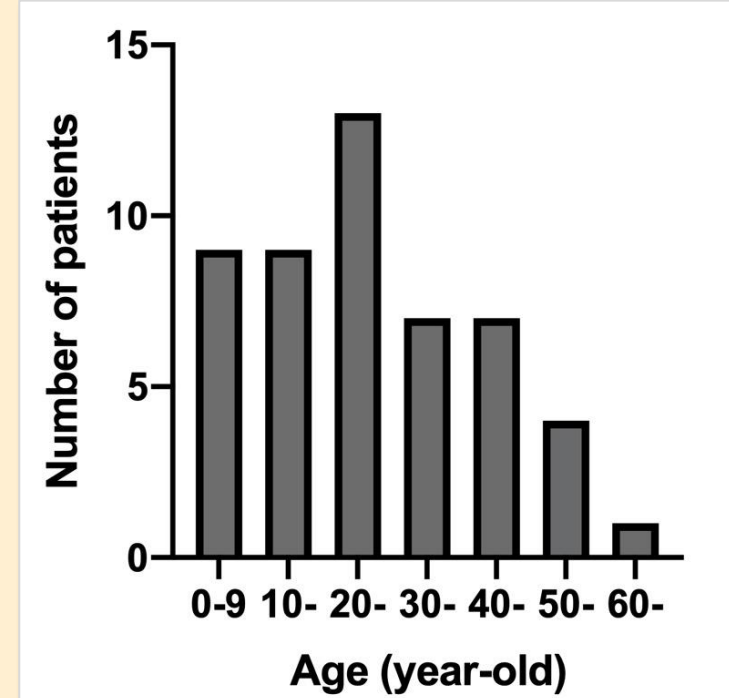
Blau 症候群 (指定難病110)

皮膚・関節・眼症状を3主徴とする全身性肉芽腫疾患である。初発症状である皮膚より生検し、非乾酪性肉芽腫を確認することで診断につながる。Blau症候群の発生機序として、クローン病の原因となる遺伝子と同じNOD2遺伝子の変異がかかわっていることが分かっている。本邦でBlau症候群と診断した50症例について以下の通りまとめ報告したので最初に提示する。



確定診断時の患者年齢

現在、日本で50症例 (男性26人:女性24人) の症例を確認した。その内訳は、血縁関係のない9家族で18例、散発的に32例であった。40代までは比較的均等に分布し、50歳以降に確定診断がついた患者数は減少した。



皮疹

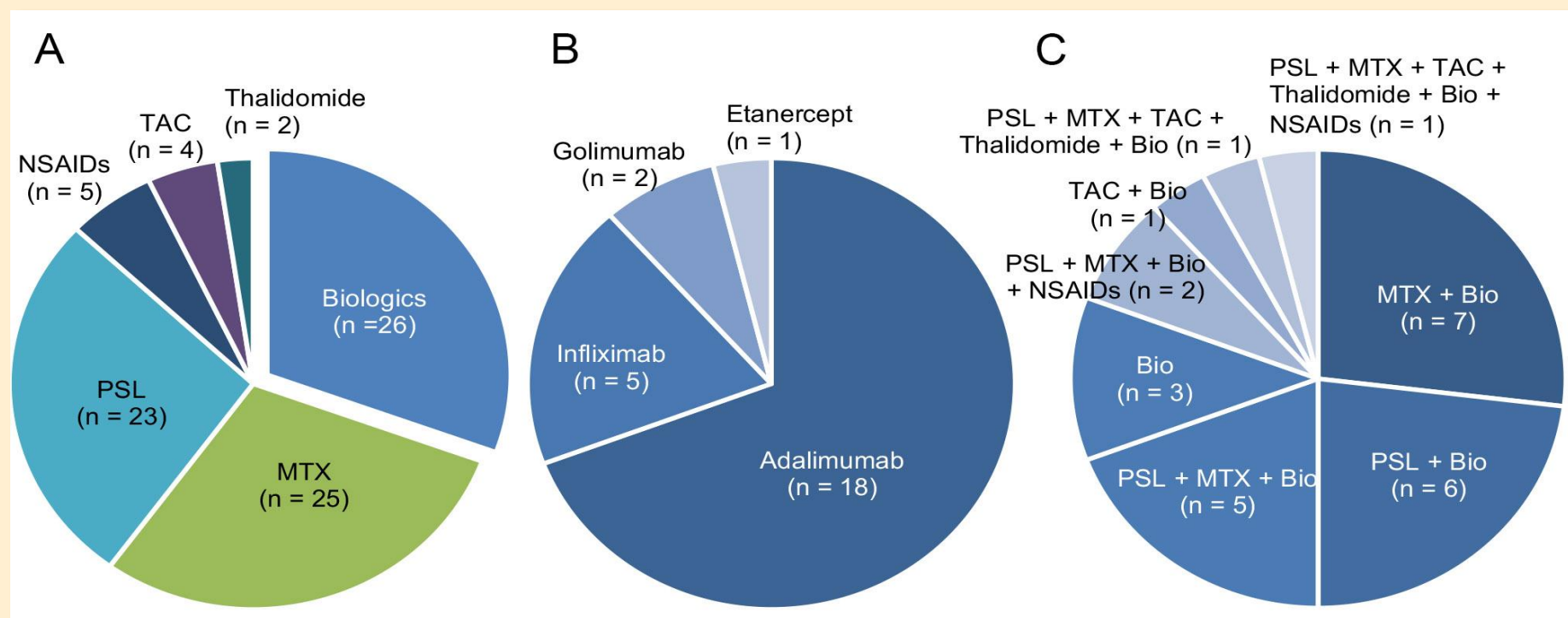
91%に発疹を認めた。27人の患者 (63%) が最初の症状として紅斑を呈していた。

関節病変

92%で認めた。ほとんどの場合、関節病変の発症は皮膚発疹よりも遅く、眼の病変よりも早かった。

治療方法

26人の患者が生物製剤を使用し、それらはすべて抗TNF剤であった。



治療情報のない7人の患者を除く43人の患者の現在の全身治療を示す。盲目だった7人の患者のうち5人は生物学的製剤で治療されていなかった。抗TNF剤を投与された1人の患者が盲目であった。

Matsuda T, Kambe N, et al. Ann Rheum Dis 2020

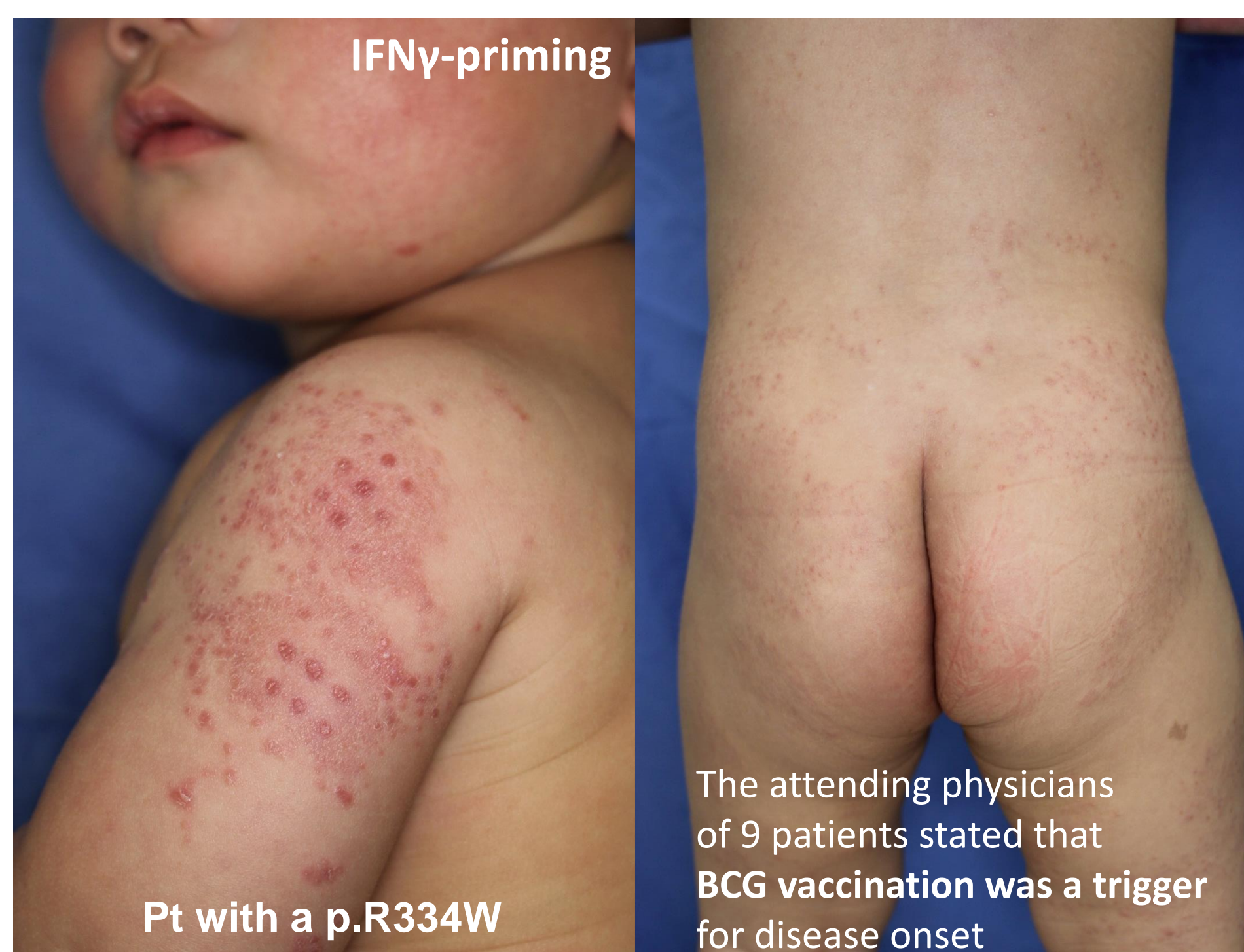
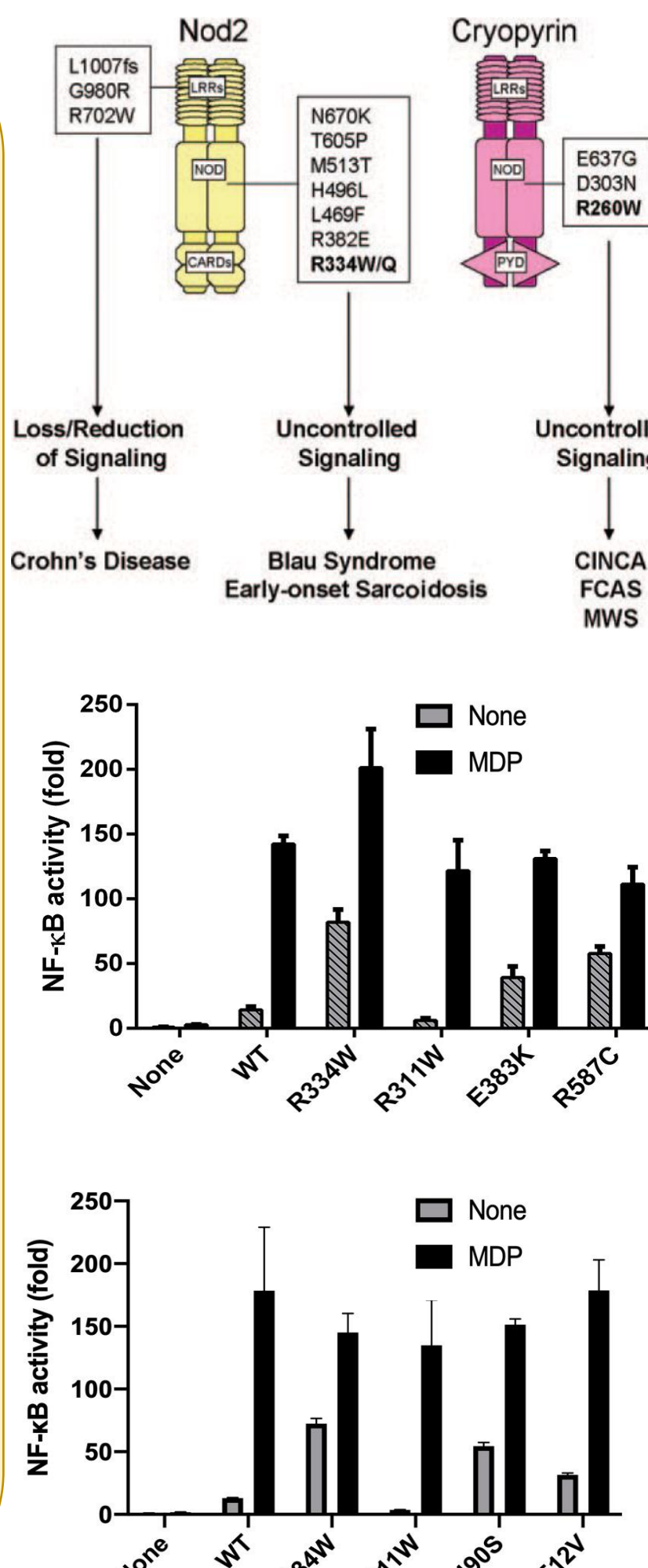
NOD2遺伝子とは

細菌の細胞壁構成成分であるmuramyl dipeptide (MDP) を認識することによって活性化し、NF- κ Bの転写亢進にかかわっている。

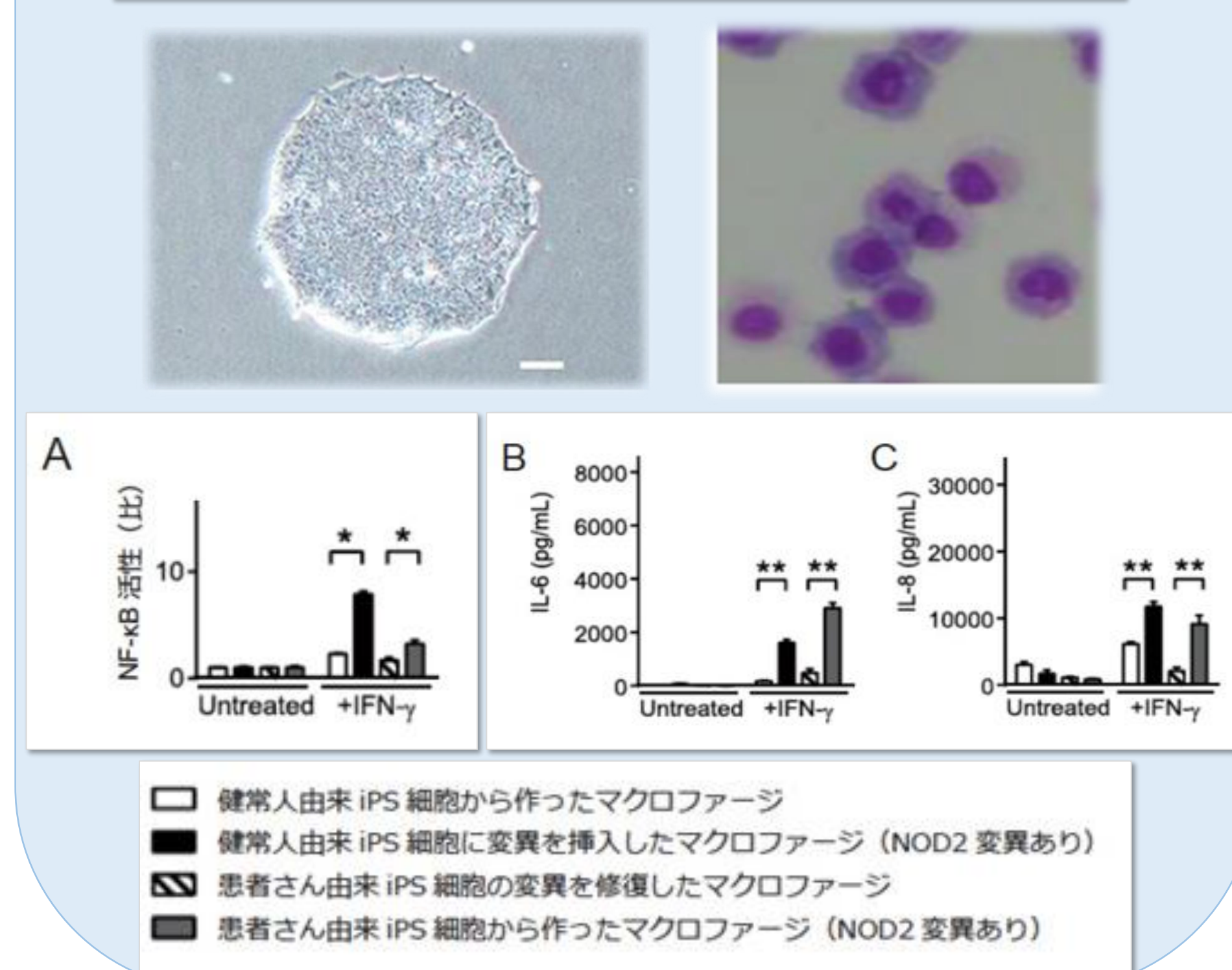
クローン病:リガンドを認識するleucine rich repeat (LRR) が変異し、リガンドに対する反応が低下する機能喪失型の変異。

Blau症候群: 分子の重合化にかかわるnucleotide-binding oligomerization domain (NOD) が変異しNF- κ Bの活性が亢進する、機能獲得型の変異。

本邦で異なる15変異を特定し、p.W490SとD512Vは新規変異部位として同定した。最も頻度の高い突然変異はp.R334W (c.1000A>T) であった。

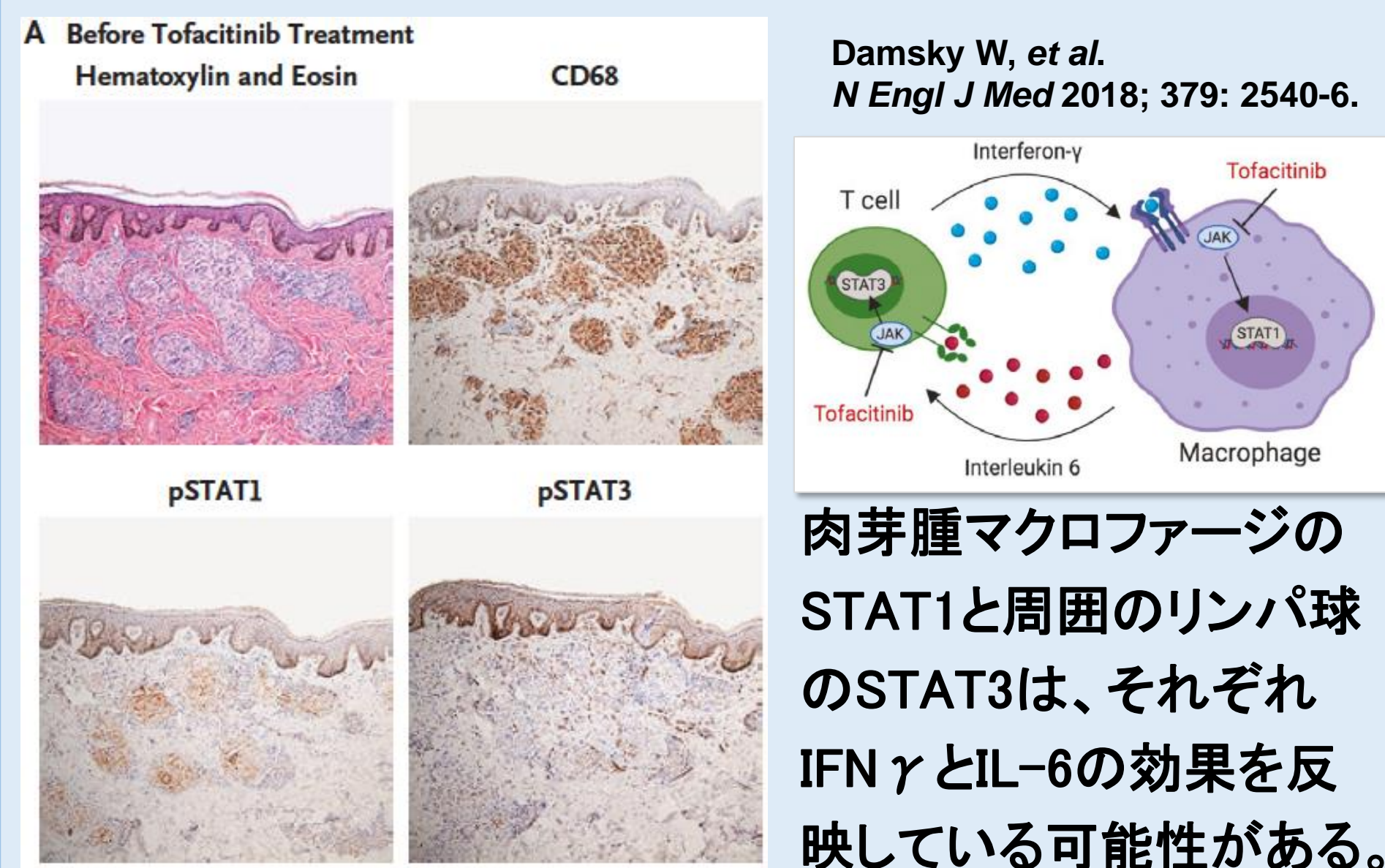


患者由来iPS細胞から作製したマクロファージでは、NF- κ Bの活性化と炎症性サイトカインの産生を認めた

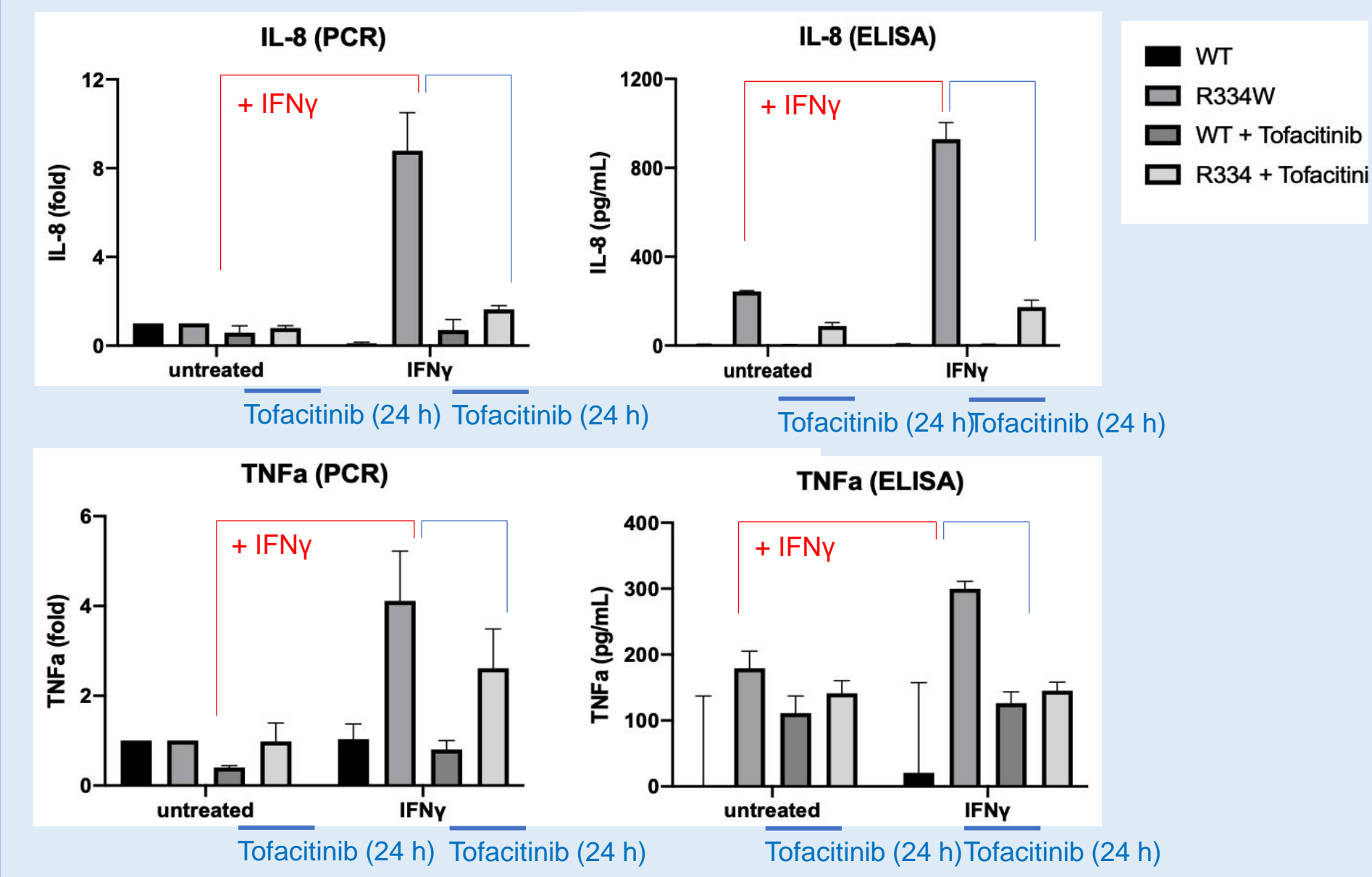


健康人由来 iPS 細胞から作ったマクロファージ
 健康人由来 iPS 細胞に変異を挿入したマクロファージ (NOD2 変異あり)
 患者さん由来 iPS 細胞の変異を修復したマクロファージ
 患者さん由来 iPS 細胞から作ったマクロファージ (NOD2 変異あり)

トファシチニブ (JAK阻害剤) が肉芽腫疾患として代表的なサルコイドーシスに有効であるとの報告から患者由来iPS単球細胞に対してIFN γ 刺激下によるサイトカイン産生能について評価した。

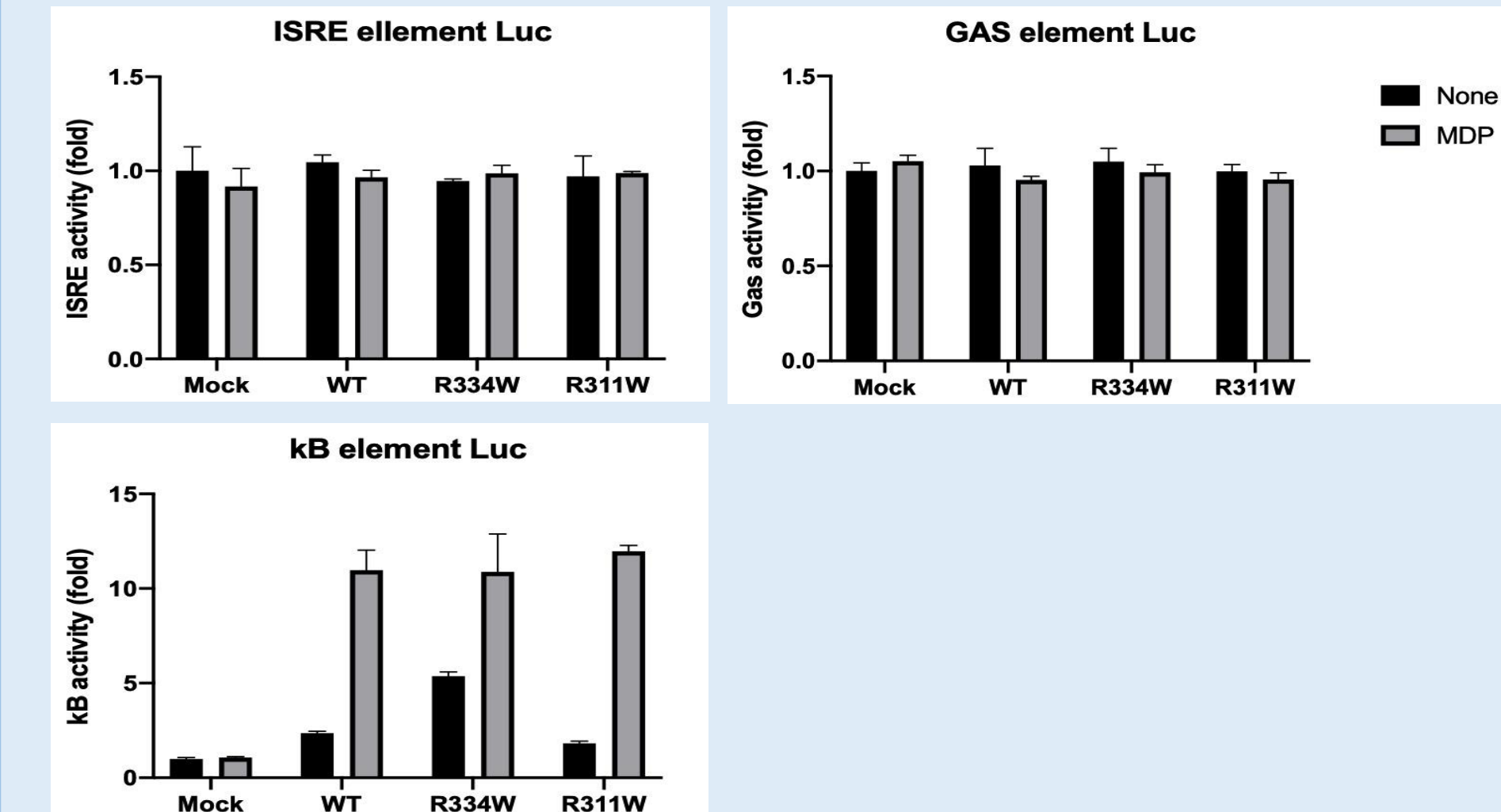


トファシチニブは、NOD2からiPS細胞からの変異単球細胞におけるIFN γ 誘発性サイトカイン産生を阻害する。

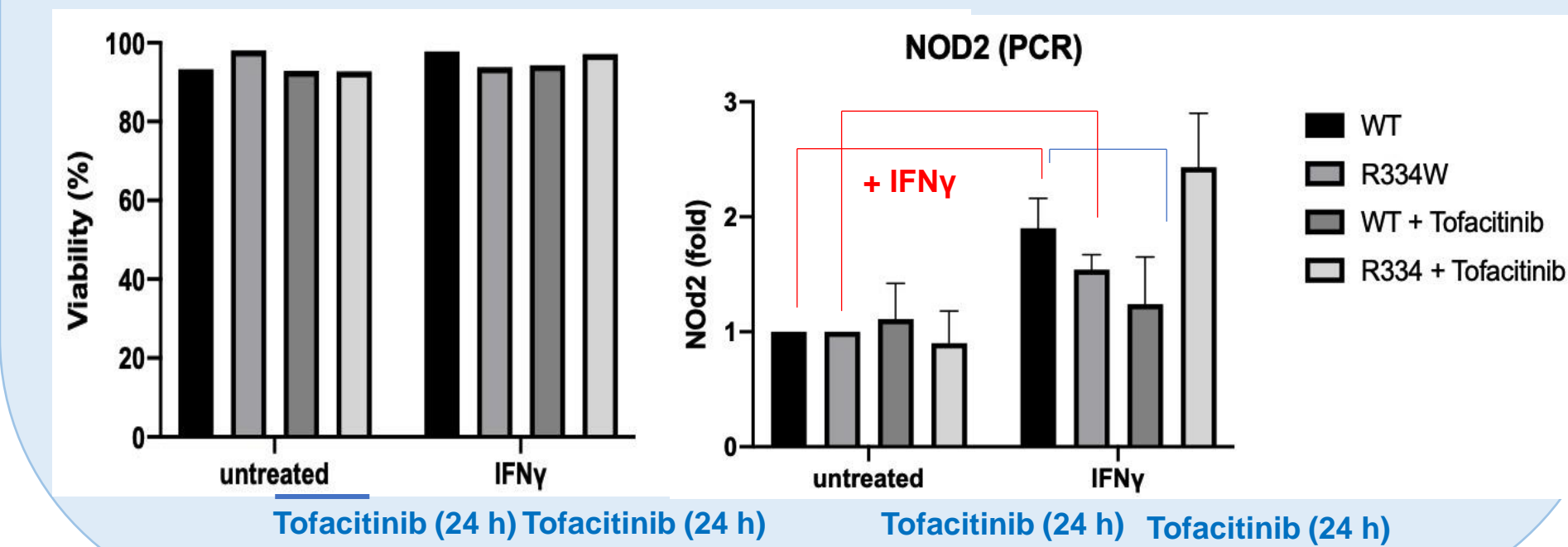


トファシチニブはどこでNOD2変異体の活性を阻害するかについて以下検討をおこなった。

1) NOD2変異体はJAK-STAT経路を活性化しなかった。



2) トファシチニブはIFN γ によるNOD2の誘導をブロックする可能性が示唆された。



京都大学 iPS細胞研究所 Megumu K. Saito
千葉大学皮膚科 Sanami Takada, Hiroyuki Matsue
久留米大学小児科 Ryuta Nishikomori

まとめと今後の予定

・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。
 ・一方、機能獲得型変異と考えられるR334W変異をもった細胞がNOD2のリガンドであるMDPに対して低反応性を示す現象が観察されており、NOD2の下流においてNF- κ Bのネガティブフィードバックと呼ぶべき機構を介してシグナル調整をしていることが示唆されている。今後はこの機構を詳細に検討することで、生体内での微生物に対する免疫反応において、急性期炎症から肉芽腫形成といった遅発性の免疫応答に移行する機序の解明に引き続き取り組みたい。