

京都大学	博士（医学）	氏名	横山宏司
論文題目	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 (新生児期発症多臓器性炎症性疾患患者由来人工多能性幹細胞における軟骨過形成は caspase-1 非依存的であり、cAMP/PKA/CREB 系に依存する)		
(論文内容の要旨)			
<p>新生児期発症多臓器性炎症性疾患 (NOMID)は蕁麻疹様発疹、中枢神経症状、骨幹端過形成を3主徴とする自己炎症性疾患である。原因遺伝子 NLRP3はASC、CASPASE-1と蛋白集合体 NLRP3 インフラマソームを形成、IL-1<math>\beta</math>産生に関与する。NOMID患者では NLRP3 機能獲得型変異によりリガンド非依存性に IL-1<math>\beta</math>を過剰産生、慢性炎症が惹起される。</p> <p>関節症の病態として継時的な画像評価より骨端から骨幹端にかけての肥大変形が生じ、成長軟骨板の軟骨内骨化の異常が推定されている。病理検査からは、軟骨細胞列が無秩序化し軟骨基質が不規則な異染性を呈し、炎症細胞の浸潤は認めないことが報告されている。また治療応答性の特徴として、抗 IL-1療法は関節症に対して効果が乏しい。そのため、軟骨細胞においては、NLRP3 インフラマソーム/IL-1<math>\beta</math>以外の変異 NLRP3 の増殖分化制御への関与も推定されている。以上の NOMID 関節症の病態を検討するため、倫理的に入手困難な軟骨病変の解析を人工多能性幹(iPS)細胞技術により試みた。</p> <p>NLRP3体細胞モザイク NOMID患者から、NLRP3野生型(野生株)と NLRP3変異型 iPS細胞(変異株)を樹立した。in vitroで iPS細胞を軟骨細胞に分化誘導したところ、変異株由来軟骨組織は野生株に比べ大きく、患者で観察される軟骨組織過形成の再現を示唆した。この大きさの違いは軟骨細胞外基質産生量の増加に起因した。軟骨関連遺伝子の発現解析では、正常株に比べ変異株由来軟骨組織において、軟骨分化誘導主要制御因子である SOX9、軟骨特異的遺伝子である II型、X型コラーゲン、メタロプロテアーゼの発現亢進を認めた。</p> <p>免疫不全マウスへの軟骨組織移植実験により骨組織への分化誘導を行ったところ、正常株由来軟骨においては骨成分の周囲に秩序だった軟骨成分を認めるが、変異株由来軟骨においては骨成分と軟骨成分が入り混った異常な組織構造を認めた。軟骨内骨化組織がより大きい事と併せ、NOMID患者関節症における軟骨内骨化異常を部分的に再現できた。</p> <p>続いて軟骨形成亢進が NLRP3 インフラマソームと関連しているか検討した。iPS細胞由来軟骨組織は NLRP3蛋白を発現するが、他の NLRP3 インフラマソーム構成蛋白は発現しなかった。また CASPASE-1阻害剤および IL-1受容</p>			

体拮抗薬添加の実験で、CASPASE-1にも IL-1にも非依存的に軟骨形成亢進が観察された。以上の結果は、変異株由来軟骨過形成は NLRP3 インフラマソーム非依存性である事を示した。

最後に、SOX9発現増強に注目し、変異 NLRP3の SOX9転写発現増強機構について解析した。軟骨前駆細胞でのヒト SOX9プロモーターを用いたレポーター解析を行ったところ、転写因子結合部位の中で CREB/ATF サイトの変異により、変異型 NLRP3依存性 SOX9発現増強が最も抑制された。また cAMP、活性型 CREBが変異株由来軟骨前駆細胞において強く発現していること、軟骨細胞過形成がアデニル酸シクラーゼアゴニストにより増強、同インヒビターにより抑制されることから、変異型 NLRP3依存性 SOX9発現増強に cAMP/PKA/CREB系の活性化が重要であることがわかった。

NOMID患者由来 iPS細胞を用いた解析は、NOMID患者における軟骨過形成の機序として、インフラマソーム非依存性に変異 NLRP3が cAMP/PKA/CREB系を介して SOX9発現を増強していること、を明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

新生児期発症多臓器性炎症性疾患 (NOMID)は、蕁麻疹様発疹、中枢神経症状及び四肢の関節症を主要徴候とする遺伝性自己炎症性疾患の一つである。抗 IL-1療法の治療応答性の特徴として、関節症に効果が乏しいことが挙げられる。NOMID関節症の病態の主病変が成長軟骨板であり、軟骨内骨化の過程の異常であることから倫理的に患者検体を用いての解析は極めて困難である。本研究では NLRP3変異を体細胞モザイクで持つ2人の患者から人工多能性幹(iPS)細胞を樹立、軟骨細胞に分化誘導を行い解析を行った。軟骨誘導の結果、野生株に比べて変異株は軟骨組織が大きく、その機序が軟骨細胞外基質の産生過剰であることを示した。また軟骨関連遺伝子の解析で SOX9、II型・X型コラーゲンなどの軟骨特異的遺伝子の発現が変異株で亢進していることを証明した。また免疫不全マウスを用いた骨組織への分化実験を行い軟骨内骨化の異常を部分的に再現した。次いで軟骨誘導の亢進が NLRP3 インフラマソーム非依存性であることを示し、最後に変異株由来軟骨前駆細胞の SOX9プロモーター解析、cAMP値測定、活性型 CREBの発現解析により変異型 NLRP3依存性 SOX9発現増強に cAMP/PKA/CREB系活性化が重要であることを示した。

以上の研究は、NOMIDの関節症の病態解明に貢献し、かつ疾患特異的 iPS細胞の軟骨領域での活用に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成29年3月27日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

