

京都大学	博士 (医学)	氏 名	田 中 孝 之
論文題目	Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. (体細胞モザイクの分析と新薬開発のモデルとしての CINCA 症候群患者由来の iPS 細胞)		
(論文内容の要旨)			
【背景】 自己炎症症候群である慢性乳児神経皮膚関節症候群 (chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome; CINCA syndrome) 患者の約半数は、すべての体細胞に <i>NLRP3</i> 遺伝子にヘテロ点変異を持つが、患者の約 3 割は <i>NLRP3</i> 変異を体細胞の 4-35%に有している。これらの体細胞モザイクとして変異を有する患者でも臨床症状がヘテロ患者とほぼ同程度のため、モザイク患者で少数の <i>NLRP3</i> 変異細胞が強い炎症を起こすのか、未知の変異を有するすべての体細胞が疾患を起こしているのか不明であった。 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) は自己複製能と多分化能を有することの他に、一つのクローンが single cell に由来するという特徴を持つ。そのため、体細胞モザイク患者から iPS 細胞を樹立すれば、<i>NLRP3</i> 変異の有無のみ異なる iPS 細胞株を樹立することが可能となる。 【目的】 CINCA 症候群体細胞モザイク患者より iPS 細胞を樹立し、その後血球へ分化させ、同一患者由来で <i>NLRP3</i> 変異の有無のみ異なるマクロファージを入手すること。その後、IL-1βの分泌など鍵となる機能を比較し、モザイク患者での疾患発症に寄与している細胞群を明らかにすること。さらに、樹立した iPS 細胞が、今後の創薬研究に有用かを検討すること。 【結果】2名の CINCA 症候群体細胞モザイク患者より informed consent を得て、皮膚小片を採取し、線維芽細胞を樹立した。レトロウイルスベクターで転写因子遺伝子を導入して、iPS 細胞を樹立し、変異クローン、正常クローンを入手した。未分化 iPS 細胞を OP9 細胞上へ播種し、10%血清を含む培地で培養したところ、接着性の血球への分化が認められた。形態観察、免疫染色、表面抗原解析、食食能評価、microarray による遺伝子発現解析にて、これらの血球が血液由来マクロファージと同等の性質を持つことを確認した。 正常血球は lipopolysaccharide (LPS) と ATP の二つの刺激があつて初めて IL-1βを分泌するが、CINCA 症候群患者の血球は LPS 刺激のみで IL-1βを分泌し、過剰な IL-1βによって全身の炎症が生じる。そこで、iPS 細胞由来血球を用いて、IL-1βの分泌を比較した。CD14 の発現を指標に磁気細胞分離を行い、分化後の細胞集団からマクロファージを精製し、LPS などで刺激してから上清を回収し、ELISA 法で IL-1β濃度を測定した。その結果、患者由来 <i>NLRP3</i> 変異マクロファージは LPS 単独で大量の IL-1βを分泌した一方、患者由来 <i>NLRP3</i> 正常マクロファージは LPS+ATP 刺激で初めて IL-1βを分泌した。また IL-1β分泌に関わる経路に対する既知の阻害剤を添加したところ、IL-1β分泌が抑制された。 【考察】 <i>NLRP3</i> 変異細胞が体細胞モザイク CINCA 症候群患者の疾患発症に寄与していることが明らかとなった。CINCA 症候群由来 iPS 細胞は <i>NLRP3</i> インフラマソーム阻害剤の開発に利用可能と考えられる。			

(論文審査の結果の要旨) 慢性乳児神経皮膚関節症候群 (chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome; CINCA syndrome) 患者の約 3 割は <i>NLRP3</i> 変異を体細胞の 4-35%に有するモザイク患者である。こういった患者で少数の <i>NLRP3</i> 変異細胞が強い炎症を起こすのか、未知の変異を有するすべての体細胞が疾患を起こしているのか不明であった。 2 名の CINCA 症候群体細胞モザイク患者より皮膚線維芽細胞を採取し、レトロウイルスで iPS 細胞を樹立して、変異クローン、正常クローンを入手した。未分化 iPS 細胞を OP9 細胞上へ播種し、マクロファージへ分化させた。マクロファージを LPS などで刺激し、ELISA 法で上清中の IL-1β濃度を測定した。その結果、患者由来 <i>NLRP3</i> 変異マクロファージは LPS 単独で大量の IL-1βを分泌した一方、患者由来 <i>NLRP3</i> 正常マクロファージは LPS+ATP 刺激で初めて IL-1βを分泌した。また IL-1β分泌に関わる経路に対する既知の阻害剤を添加したところ、IL-1β分泌が抑制され、これらのマクロファージが新規 IL-1β分泌抑制薬の創薬に有用であることが示された。 以上の研究は体細胞モザイク CINCA 症候群患者の疾患発症機序の解明に貢献し、疾患研究へ iPS 細胞を用いる有効性の実証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みとめる。 なお、本学位授与申請者は、平成 2 4 年 8 月 8 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。
要旨公開可能日： 年 月 日 以降