

「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」
平成23年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

安友康二

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

稀少遺伝性炎症疾患の原因遺伝子同定に基づく炎症制御法の開発

§1. 研究実施体制

(1)「安友」グループ

① 研究代表者: 安友康二 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部、教授)

② 研究項目

- ・JASL の炎症誘導機構の解析
- ・家族性寒冷蕁麻疹の原因遺伝子同定研究
- ・家族性肺線維症の原因遺伝子同定研究
- ・その他の家族性炎症性疾患のゲノム解析研究

(2)「西岡」グループ

① 主たる共同研究者: 西岡安彦 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部、教授)

② 研究項目

- ・JASL 由来細胞における IL-6 誘導メカニズムの検討
- ・孤発で発症する家族性肺線維症のゲノム解析研究

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

【研究のねらい】

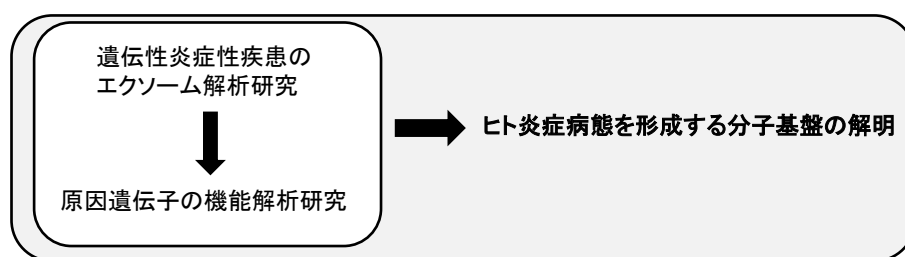
炎症性疾患の病態形成には、遺伝的要因が大きく寄与することが知られているが、未だヒト炎症性疾患の遺伝的要因の大半は未解明である。その理由としては、ヒトの雑多な遺伝的背景あるいは疾患の多様性のために疾患発症に関わる遺伝的要因を解明する事が困難であることが挙げられる。一方、明らかな遺伝的要因によって発症する炎症性症候群の原因遺伝子を同定することは、ヒトの炎症性病態の発症に決定的に寄与する遺伝子群を同定することに結びつくと考えられる。稀少疾患の原因遺伝子が多因子で発症する疾患の病態の全貌を解明できるわけではないが、その原因遺伝子の同定とその関連分子群の機能解析は、ヒト炎症性病態の理解を格段に進展させる可能性を秘めていると思われる。

以上の背景から、本研究では、稀少遺伝性炎症性疾患を対象として、その原因遺伝子を同定することにより、ヒト炎症性病態の発症に決定的に寄与する遺伝子群を同定することを研究目的とした。

【研究進捗状況と成果】

本研究では、稀少遺伝性疾患の原因遺伝子を同定し、ヒト炎症性病態の分子基盤を解明する事を目的とし、平成 24 年度には下記の研究項目を実施した(図 1)。

図1. 稀少遺伝性炎症疾患の原因遺伝子同定に基づく炎症制御法の開発



1. JASLの原因遺伝子である*PSMB8*の機能解析
 - (a) *PSMB8*の発現メカニズムの解析→*PSMB8*の転写に重要な転写因子の同定
 - (b) JASLのモデルマウス樹立
 - (c) *PSMB8*変異による炎症性サイトカイン誘導機構の解析
2. FCASの原因遺伝子同定研究
 - (a) 新しいFCASの原因遺伝子(*FCAS4*)を同定した。
 - (b) *FCAS4*の機能解析
3. 家族性肺線維症の原因遺伝子同定研究
常染色体劣性遺伝し形式で発症する肺線維症家系の原因遺伝子の同定を目指した。
4. 他の遺伝性炎症性疾患の原因遺伝子同定研究
連鎖解析、エクソーム解析により原因遺伝子の同定研究を実施した。

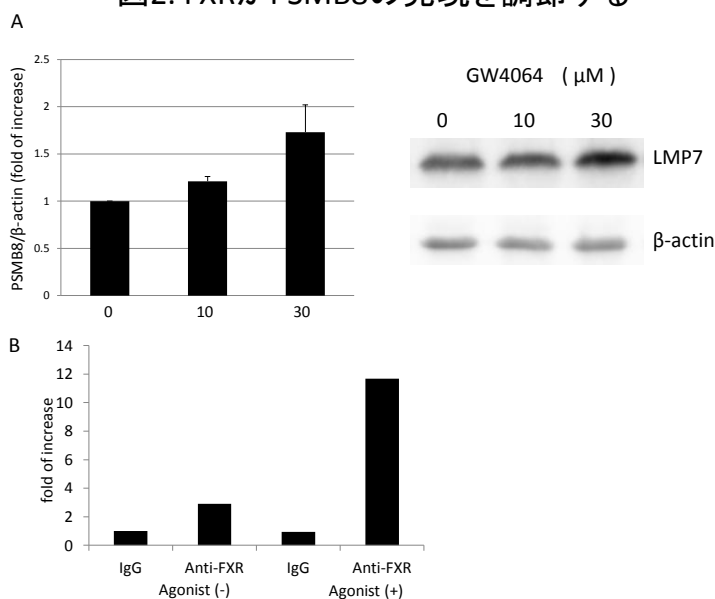
(1) 新規に発見した自己炎症性症候群(JASL)の原因遺伝子である PSMB8 の機能解析

a. JASL の動物モデルの開発

1. PSMB8 が炎症病態に及ぼす役割を明らかにするために、JASL と同変異を持つトランスジェニックマウスを樹立し、解析を実施中である。変異 PSMB8 遺伝子は MHC クラス II を発現する細胞で、発現するように設計した。
2. JASL と同変異を持つノックインマウスの樹立を行っている。

- b. PSMB8 の IFN- γ 非依存的発現調節機構を解明するために、PSMB8 のプロモーターアッセイを実施し、翻訳開始部位から-109 から-90 の領域に、PSMB8 の転写を調節する重要な領域が存在していると考えられた。データベースより、その領域には Farnesoid-X-Receptor (FXR) が結合すると考えられ、FXR 刺激剤で細胞を刺激すると、PSMB8 の発現が上昇し(図 2A)、FXR は PSMB8 のプロモーター領域に結合する事をクロマチン免疫沈降法で明らかにした(図 2B)。また、その結合は FXR agonist によって細胞を刺激すると増強することを見いだした。

図2. FXRがPSMB8の発現を調節する



- c. JASL 由来の細胞では、インターロイキン 6 (IL-6) の発現が増加していることから、その発現増加メカニズムを検討した。HeLa 細胞、CHO 細胞などをプロテアソーム阻害剤で処理したところ IL-6 の発現増加が観察された。その発現増加は p38 に依存していることを明らかにした。

(2) 家族性寒冷蕁麻疹(FCAS)の原因遺伝子同定研究

- a. 日本人の家族性寒冷蕁麻疹の 1 家系の罹患者、罹患者同胞、両親等のゲノム DNA を用いて、全ゲノム連鎖解析およびエクソーム解析を実施した。連鎖解析では、小さい家系で

あるために、2 を超える LOD 値を示す領域は存在しなかった。エクソーム解析と組み合わせることにより、FCAS4 のミスセンス変異が原因となる変異と考えられた。

- b. FCAS4 の変異によって FCAS4 のタンパク発現そのものは減少しないが、その変異によって FCAS4 の重合が促進されていることを明らかにした。
- c. 変異 FCAS4 をインバリアント鎖プロモーター下に発現させたトランスジェニックマウスを樹立した。このトランスジェニックマウスでは、高度の脾腫、関節炎および皮膚炎が観察された。

(3) 家族性肺線維症の原因遺伝子同定研究

- a. 近親婚歴を有する日本人の家族性肺線維症家系を用いて、原因遺伝子の同定研究を実施した。ホモ接合体マッピングとエクソーム解析を実施して、候補遺伝子として IPF1 を見いだすことに成功した。IPF1 は肺胞上皮細胞や免疫細胞に発現しているが、これまで肺線維症の病態との関連性は明らかではなかった。
- b. 変異 IPF1 を有する遺伝子改変マウスを樹立中である。
- c. 西岡グループが中心となり、孤発例の肺線維症の症例を 30 例近く集積した。孤発例で IPF1 の変異の有無を検索予定である。各種薬剤の肺線維症に対する効果についても検討し^{1),2)}、FAK 阻害剤がブレオマイシン誘導性の肺線維症を抑制できることを解明した。

(4) それ以外の家族性疾患のゲノム解析

上記 3 疾患以外の疾患群についても、ゲノム解析、候補遺伝子の絞り込みを実施中である。

【今後の見通し】

JASL については、免疫プロテアソームの機能異常がどのように炎症病態を引き起こしているかについて個体レベルで明らかにすることと、変異 PSMB8 がどのように免疫プロテアソームの分子集合に影響を与えているかを明らかにすることが来年度以降の課題である。FCAS については候補遺伝子である FCAS4 が同定され、その機能的意義も個体レベルで解析中である。今後は、その解析をすすめるとともに、FCAS4 が家族性寒冷蕁麻疹以外の多因子の炎症性疾患の病態にも関与するかを解明する事が必要であると思われる。家族性肺線維症については、今年度に原因遺伝子として IPF1 の同定に成功したが、その変異がどのように肺線維症を引き起こしているかについての分子基盤が明らかではないため、来年度以降はその分子機構を明らかにすることが重要な課題である。それ以外の疾患群についても、原因遺伝子の同定に成功した疾患群もあり、来年度以降はその機能解析をすすめていく。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Aono Y, Ledford JG, Mukherjee S, Ogawa H, Nishioka Y, Sone S, Beers MF, Paul W, Noble PW, Wright JR, SP-D regulates effector cell function and fibrotic lung remodeling in response to bleomycin injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 185 (5):525-536, 2012.
2. Kinoshita K, Aono Y, Azuma M, Kishi J, Takezaki A, Kishi M, Makino H, Okazaki H, Uehara H, Izumi K, Sone S, Nishioka Y. Antifibrotic effects of focal adhesion kinase inhibitor in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, in press.

(3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)