



千葉大学大学院医学研

究院（皮膚科学）

・講師，医学博士

神戸直智

京都大学大学院医学研

究科（発達小児科学）

・助教，医学博士

西小森隆太

平成 6 年 群馬大学医学部卒業

平成 11 年 群馬大学大学院医学研究科

博士課程修了

平成 11 年 米国バージニア州立大学

医学校（内科学）留学

平成 13 年 京都大学医学部助手

（皮膚科学）

平成 19 年 現職

家族性寒冷蕁麻疹原因遺伝子 *CIAS1* の肥満細胞での役割

はじめに

微生物特異的な構造を認識するパターン認識受容体である Toll 様受容体（TLR）に加え，細胞内で微生物センサーとして機能する遺伝子群の存在が注目されつつある。このうち，自己重合化に係る中央部の NOD 領域（nucleotide-binding oligomerization domain）とそれに続く C 末端に微生物特異的構造の認識に関与すると考えられる LRRs（leucine-rich repeats）を共通の構造として有する NOD-LRRs 遺伝子群（NLR）は，その遺伝子変異によって乳児期発症の不明熱などを主症状とする自己炎症性疾患を引き起こすことから注目を集めている。自己炎症性疾患の 1 つに分類される家族性寒冷蕁麻疹（familial cold autoinflammatory syndrome, FCAS）は，生後まもなく蕁麻疹様紅斑で発症する遺伝性疾患であり，これに感音性難聴や関節症状を伴う Muckle-Wells 症候群，さらに皮疹と関節症状に加えて，発熱，反復する髄膜炎，眼症状など多彩な症状を呈する最重症型の CINCA 症候群とともに，NLR の 1 つである *CIAS1* の変異が同定されており，今日では *CIAS1* のコードする cryopyrin にちなんで，cryopyrin-associated periodic syndrome（CAPS）とも総称される。

NLR の機能は未だ十分に解析されているとは言えないが，植物では耐病遺伝子としてその重要性が認識され，病原微生物の細胞内侵入を感知して周囲に炎症を惹起するとともに，感染を許した細胞自身は細胞死に至るという過敏反応を誘導することが知られる。本研究では，*CIAS1* の異常症である CAPS の主症状として蕁麻疹様紅斑が認められることに注目して，疾患特異的な遺伝子変異が肥満細胞の活性化を引き起こし，この結果として蕁麻疹の形成に関与しえるかの検証を目指している。

マウス肥満細胞での *cias1* の発現

マウス粘膜型肥満細胞としての形質を持った骨髓由来培養肥満細胞 (BMCMC) は、無刺激の状態では *cias1* をほとんど発現しないが、ヒト末梢血単球での *CIAS1* の発現誘導と同様に、LPS 処理によって *cias1* の発現は速やかに誘導された (図 1)。さらにこの発現誘導は、プロテアソーム阻害剤である MG132 の添加によって抑制された。

TLR7 の ligand としても知られる合成抗ウイルス薬である imiquimod (R837) は、cryopyrin を活性化し IL-1 β の活性化を誘導する。BMCMC では TLR7 の発現が見られないことを確認した後、R837 で刺激した際に培養上清中へと放出される IL-1 β を検証した。その結果、R837 で単独刺激した BMCMC では IL-1 β の産生は確認されなかったが、あらかじめ LPS 処理によって *cias1* を誘導した条件で R837 を添加することで、有意な IL-1 β の産生を確認することができた (図 2)。なお LPS 添加前にあらかじめ MG132 処置をすることで、R837 添加時の IL-1 β の産生は抑制された。また、BMCMC からの TNF- α および IL-6 の産生に関しては、LPS 処置のみで十分な産生が認められることを確認している。さらに興味深いことに、BMCMC から IL-1 β の産生が確認された条件においても肥満細胞の脱顆粒は確認されず (図 3)、これは CAPS で認められる蕁麻疹様紅斑に対して、IL-1 β 阻害剤である anakinra が著効する一方で、ヒスタミン H1 受容体拮抗薬が無効であること

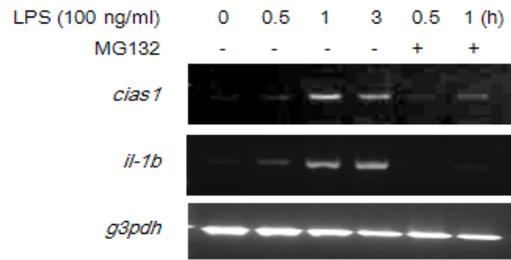


図 1. マウス肥満細胞での *cias1* の発現

その発現は LPS 添加によって速やかに誘導され、MG132 によって抑制された。

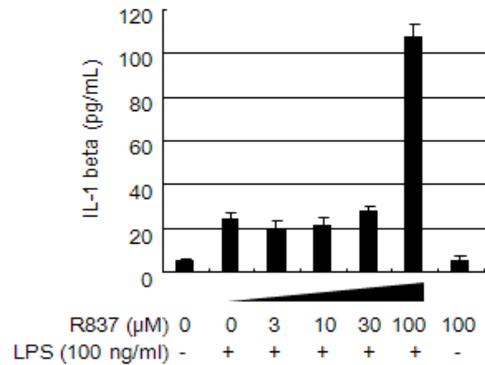


図 2. 肥満細胞からの IL-1 β の産生

IL-1 β の産生に際しては、LPS 処理した細胞への R837 刺激が必須である。

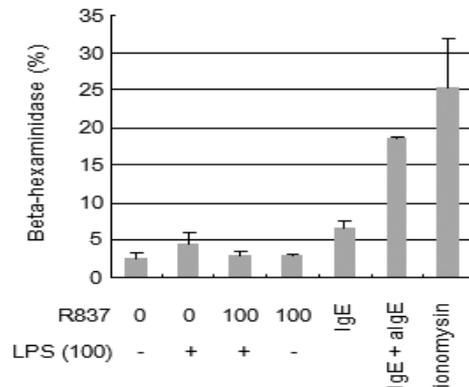


図 3. 肥満細胞の脱顆粒反応

IL-1 β が産生される条件でも、脱顆粒は確認されなかった。

に合致する所見と考えた。

一方、マウス肥満細胞においては、BMCMC を線維芽細胞との共生で結合織型へと形質転換した際に、形質転換誘導因子の1つとして *cias1* の発現増強が報告されている。我々は結合織型肥満細胞としての形質を保持する胎児皮膚由来培養肥満細胞 (FSMC) での *cias1* の発現を検討したが、その発現の振る舞いは BMCMC と変わるものではなく、また R837 添加時の IL-1 β の産生に際しても、LPS による前処置を必要とした。

CAPS 疾患関連変異体に該当するマウス *cias1* 遺伝子の作成

CAPS の疾患関連変異体はこれまでに 30 種類ほどの変異が報告されているが、その多くは中央部の NOD 領域に認められる。CAPS の代表的な変異である R260W (260 番目のアルギニン (R) がトリプトファン (W) へと置換, 以下同様), D303N および Y570C では、該当部分の amino 酸がヒトとマウスにおいて保存されていることを確認した (図 4) 後、これらの変異をマウス *cias1* へと導入し、会合する *asc* とともに HEK293 細胞へと遺伝子導入し、レポーター・アッセイにて NF- κ B の活性上昇を検証した。その結果、ヒト *CIAS1* 疾患関連変異体同様に、疾患変異を導入したマウス *cias1* においても、*asc* との共存において、ligand の存在なしに自発的に活性化され、NF- κ B の活性上昇が誘導されることを確認した (図 5)。

```

H 251 FDYLFYIHCREVSLVTQRSLS
M 247 -----F-----R-P---
                W

H 301 GFDELQGAFFDEHIGPLCTDW
M 299 -----N-----EV-----
                N

H 561 ENYGKFEKGYLIFVVRFLFG
M 561 -----C-----
                C
  
```

図 4. ヒト *CIAS1* とマウス *cias1*

疾患に関連する変異部位の amino 酸は種を超えて保存されている。

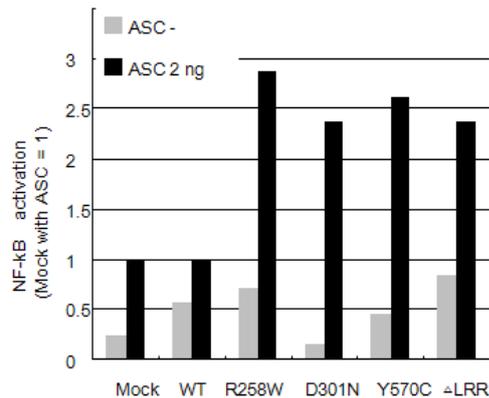


図 5. *cias1* 変異体の NF- κ B 活性

疾患関連変異体では、*asc* との共存において ligand の存在なしに自発的に活性化がみられる。

CAPS 疾患関連変異体のマウス肥満細胞への導入

cias1 疾患関連変異体をレトロウイルス・ベクター-pMX-IRES GFP (東京大学医科学研究所 北村教授より分与) へと組み込み、肥満細胞へと遺伝子導入を試みた。その結

果、高濃度に遺伝子を発現した細胞（GFP 発現細胞として同定）では、ヒト単球細胞株である THP-1 細胞へと遺伝子導入した際¹⁾、あるいは *CIAS1* に変異を有する患者末梢血単球を LPS 処理し *CIAS1* の発現を誘導した際²⁾と同様に、急速な細胞死が誘導されることを確認した。

このとき、GFP 陽性細胞数あたりの IL-1 β 産生量を検討すると、LPS 添加時において、疾患変異体では有意な IL-1 β 産生が確認された（図 6）。*cias1* は、N 末に位置する pyrin domain (PYD) を介して下流分子である *asc* と会合してそのシグナルを伝えることから、PYD を欠損する疾患関連変異体（ Δ PYD_R258W および Δ PYD_Y570C）を作成したところ、これら変異体では IL-1 β の産生は確認されなかった。

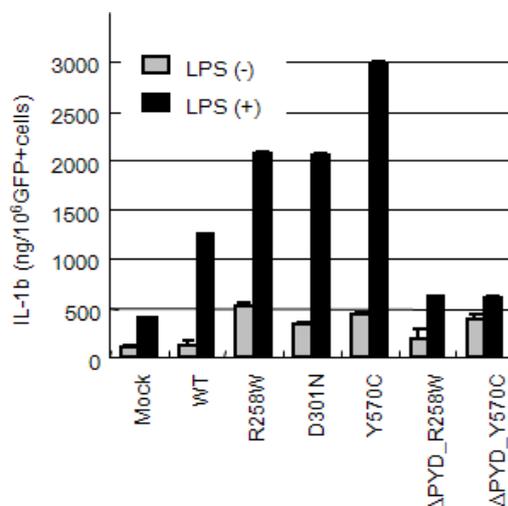


図 6. *cias1* 疾患関連変異体導入時の

肥満細胞からの IL-1 β 産生

疾患関連変異体の導入によって、LPS 処理をした肥満細胞は cryopyrin に対する ligand 非依存性に自発的な IL-1 β の産生を認めた。

まとめ

マウス肥満細胞は、ヒト単球の場合と同様、定常状態では *cias1* を発現しないが、LPS 処理によって速やかに *cias1* を発現した。その結果、ligand である R837 を介して肥満細胞は活性化され、活性化 IL-1 β の産生が確認された。一方、自己炎症性疾患関連 *cias1* 変異体は、*asc* 共存下に NF- κ B の活性化を誘導するとともに、マウス肥満細胞へと導入した際には、ligand 非依存性に IL-1 β の産生が確認された。

以上の結果は、単球に加えて肥満細胞も、CAPS の病変局所において IL-1 β を自発的に産生して、蕁麻疹を始めとした CAPS の特徴的な臨床症状の病態形成に役割を担っている可能性を示唆するものと考えた。今後は、各種 KO マウスを用いて上記の実験結果を検証するとともに、*in vivo* での役割をさらに検討する予定である。

参考文献

- 1) Saito M, Nishikomori R, Kambe N, *et al.* **Blood** (in press)
- 2) Fujisawa A, Kambe N, Saito M, Nishikomori R, *et al.* **Blood**. 2007; 109: 2903-11.