

ヒト iPS 細胞を用いた家族性地中海熱の疾患モデル作製の試み

大阪医科大学附属病院 第二内科

辻本 裕之

1.緒言

家族性地中海熱 (Familial Mediterranean fever : FMF) は持続期間が短い周期性発熱と腹膜炎、胸膜炎などの漿膜炎症状を主徴とする遺伝性自己炎症性疾患である。疾患関連遺伝子として MEFV 遺伝子が同定され、その遺伝子産物である *pyrin* の機能異常、および *pyrin* を高発現しているマクロファージのインフラサーム亢進が病態に関わっていることが報告されている。

ヒト誘導性多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells ; iPS 細胞) は、無限に増殖する能力を保ちながら、体を形成する全ての細胞に分化する能力を持つ細胞である。近年、患者数が少ないために臨床研究が難しい希少難病疾患の病態解明や新規治療法を開発する画期的な方法として、疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究が行われている。

今回、iPS 細胞からマクロファージへの分化誘導法を確立させ、FMF の病態解明や新規治療法の開発を目的として研究を行った。

2.方法

FMF モデリングのため、野生型 iPS 細胞を用いて、血球細胞に分化させた。iPS 細胞をプレートに撒き、70~80%程度 confluent したのを確認し、浮遊プレートに移して低酸素条件にて分化を開始した。20 日目にフローサイトメトリーを用いて血球細胞への分化を確認した。次に、浮遊プレートから接着プレートに移して通常酸素条件にて培養し、14 日培養後にフローサイトメトリー・qPCR を用いてマクロファージへの分化を確認した。

3.結果

野生型 iPS 細胞を用いて、まずは血球細胞への分化誘導を行った。iPS 細胞から血球細胞への分化プロトコルは既報にあるが、十分な量の血球細胞を作製するため、プロトコル改良を一つの目的として研究を行った。

20 日目の段階でのフローサイトメトリーにて、D34・CD43・CD45 が高発現しており、血球細胞への分化を確認した。同細胞を更に培養し、34 日目の段階でのフローサイトメトリーでは、CD11b・CD163 が高発現しており、さらに qPCR にて SPI-1・CEBPB が高発現して

おり、マクロファージへの分化と判断した。また qPCR にて野生型 iPS 細胞由来マクロファージにおける MEFV 遺伝子の高発現を確認した。

4.考察

FMF は MEFV 遺伝子の機能消失によりインフラマゾームの亢進をきたす遺伝的自己炎症性疾患（常染色体劣性遺伝）である。FMF の治療法としてはコルヒチン・IL-1 レセプター拮抗剤があるが、いまだ根治治療法は確立されていない。そこで今回、病態解明や新規治療法を開発するための研究を行った。

FMF の原因遺伝子である MEFV 遺伝子については組織特異的な発現であり、iPS 細胞ではほぼ発現しないことが判明しているため、iPS 細胞からのマクロファージへの分化研究を行った。

Cell line やマウスとヒトとの実際のインフラゾームの活性化機構が異なることが報告されており、ヒト iPS 細胞を用いたマクロファージの研究は意義が高いと考える。また手技・操作を一定化させバラつきの少ないマクロファージを作製するために non-feeder 培地を用いたプロトコルを確立させた。現在、血球の分化までの段階とそれからのマクロファージの分化の段階に分けて、マクロファージを作製するためのプロトコルを確立させた。

今後、この手法を用いて FMF 患者の iPS、および野生型 iPS に FMF 典型例・非典型例で見られる MEFV 抑制の遺伝子変異を与え、これらを用いてマクロファージを分化・誘導し、野生型と比較してインフラマゾーム関連の炎症について検討する。

また、マクロファージの M1 がターゲットになりうるか否か、M2 から M1 への変化は極めて困難とされるが可能かどうか、FMF 患者由来の iPS 細胞と比較することで MEFV 遺伝子自体が単独で問題になるのかどうか、これらを今後の研究課題として検討していく。

5.結語

iPS 細胞からマクロファージへの分化誘導法を確立させ、それを用いて FMF の病態解明や新規治療法の開発を目指して本研究をすすめていく。

6.文献

1) S Grandemange¹, I Aksentjevich², I Jeru³, A Gul⁴ and I Touitou¹

The regulation of MEFV expression and its role in health and familial Mediterranean fever *Genes and Immunity* (2011) 12, 497–503

2) Jae Jin Chae^{*†}, Geryl Wood^{*}, Seth L. Masters[‡], Katharina Richard^{*§}, Grace Park[¶], Brian J. Smith[‡], and Daniel L. Kastner^{*} The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 β production *PNAS* June 27, 2006 vol. 103 no. 26 9982–9987

3) Hafize Emine Sönmez^{*}, Ezgi Deniz Batu^{*}, Seza Özen Familial Mediterranean fever: current

perspectives *Journal of Inflammation Research* 2016;9 13–20

4) Norio Nakamura • Takeshi Fujita • Reiichi Murakami • Ryuichiro Kumasaka • Michiko Shimada • Yuko Shimaya • Hiroshi Osawa • Hideaki Yamabe • Ken Okumura • Akihiro Yachie A case of familial Mediterranean fever-associated systemic amyloidosis

CEN Case Rep (2012) 1:4–6

5) Apurva Kanneganti^{1,2,3,4,5}, R.K. Subbarao Malireddi⁶, Pedro H.V. Saavedra^{1,2}, Lieselotte Vande Walle^{1,2}, Hanne Van Gorp^{1,2}, Hiroto Kambara^{4,5}, Heather Tillman⁷, Peter Vogel⁷, Hongbo R. Luo^{4,5}, Ramnik J. Xavier^{3,8}, Hongbo Chi⁶, and Mohamed Lamkanfi^{1,2} GSD MD is critical for autoinflammatory pathology in a mouse model of Familial Mediterranean Fever *J. Exp. Med.* 2018 Vol. 215 No. 6 1519–1529

6) Tomohiro Koga^{1,2}, Kiyoshi Migita³, Tomohito Sato¹, Shuntaro Sato⁴, Masataka Umeda¹, Fumiaki Nonaka^{1,5}, Shoichi Fukui¹, Shin-ya Kawashiri¹, Naoki Iwamoto¹, Kunihiro Ichinose¹, Mami Tamai¹, Hideki Nakamura¹, Tomoki Origuchi¹, Yukitaka Ueki⁶, Junya Masumoto⁷, Kazunaga Agematsu⁸, Akihiro Yachie⁹, Koh-ichiro Yoshiura¹⁰, Katsumi Eguchi⁶ and Atsushi Kawakami¹ MicroRNA-204-3p inhibits lipopolysaccharide-induced cytokines in familial Mediterranean fever via the phosphoinositide 3-kinase c pathway *Rheumatology* 2018;57:718-726

7) Hanne Van Gorp^{a,b,1}, Pedro H. V. Saavedra^{a,b,1}, Nathalia M. de Vasconcelosa^b, Nina Van Opdenboscha^b, Lieselotte Vande Walle^{a,b}, Magdalena Matusiaka^b, Giusi Prencipe^c, Antonella Insalaco^c, Filip Van Hauwermeirena^b, Dieter Demona^b, Delfien J. Bogaert^{d,e,f}, Melissa Dullaers^{d,g}, Elfride De Baere^h, Tino Hochepeidaⁱ, Joke Dehoorne^j, Karim Y. Vermaelen^{b,k}, Filomeen Haerynck^{d,e,f}, Fabrizio De Benedetti^c, and Mohamed Lamkanfi^{a,b,2} Familial Mediterranean fever mutations lift the obligatory requirement for microtubules in Pyrin inflammasome activation 14384–14389 | *PNAS* | December 13, 2016 | vol. 113 | no. 50