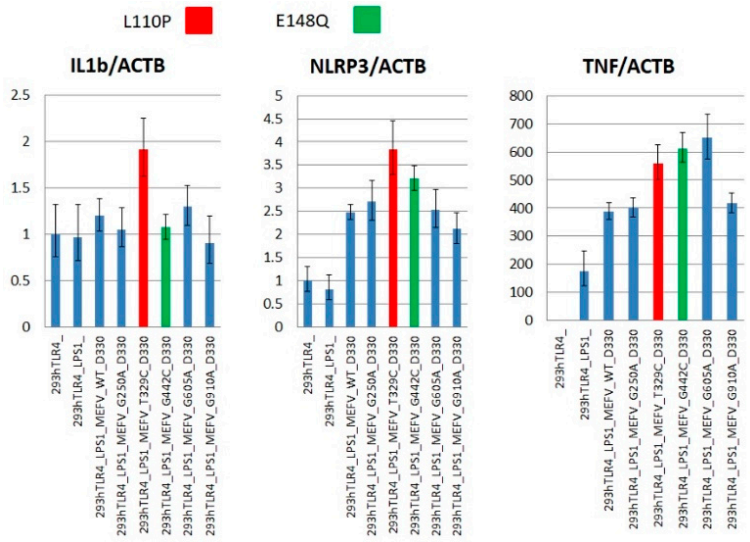
88　家族性地中海熱関連腸炎の診断法確立・機序解明	仲瀬　裕志

【目的】炎症性腸疾患（以下、inflammatory bowel disease：IBD）患者数の増加は著しく、個々の患者の病態を基盤とした治療開発が必要である。現在まで、家族性地中海熱（*FMF*）遺伝子変異とIBDとの関連並びに病態解明に関する研究はほとんど行われていない。今回の研究目的は、IBD患者群においていままでとは全く異なった機序が関与するFMF関連腸炎（IL-1β関連腸炎）の診断法の確立並びに機序解明を行うことである。

【方法】1. IBDU 患者における *MEFV* 遺伝子解析：血液検体を採取し、DNA を抽出する。抽出された DNA を用いてピリン蛋白をコードする *MEFV* 遺伝子解析を行った（札幌医科大学医の倫理委員会承認番号 G718）。2. *FMF* 遺伝子関連腸炎に関する臨床像（内視鏡所見を含む）の検討（UMIN 登録 ID 000022289）：(1) *MEFV* 遺伝子変異陽性 IBDU 患者群に対して、患者情報ファイルを作成した。(2) *MEFV* 遺伝子関連腸炎の臨床像（内視鏡所見含む）を明らかにし、遺伝子解析データと組み合わせた検討を行った。3. *MEFV* 遺伝子変異各種細胞株の作製ならびにサイトカイン産生能の評価：*MEFV* 遺伝子変異プラスミド作製を行い 293T 細胞に遺伝子導入した。これらの細胞を TLR ligands で刺激し、NLRP3 の発現ならびに活性化について検討した。

【結果】1. コルヒチン反応性 FMF 関連腸炎 50 症例の患者群の検討結果：1）*MEFV* 遺伝子変異部位について：日本人 FMF 腸炎症例の 70%以上が Exon2 部位での変異を有した。2）*FMF* 遺伝子関連腸炎の臨床的特徴所見：非定型例あるいは基準を満たさない症例が全体の 3 分の 2 を占めることが判明した。3）消化管病変の内視鏡的特徴所見では、(1) 直腸に病変を伴わない大腸の連続性病変。(2) 潰瘍性大腸炎様の粘膜所見（68%）。(3) 狭窄例も存在することが明らかとなった。2. 発症機序解明に向けての研究成果：FMF は、変異ピリン蛋白の Caspase-1 制御機能消失により発症する常染色体劣性遺伝疾患（Loss-of-function）とされてきた。しかしながら、heterozygous 変異での発症が多いこと、ピリン欠損マウスでは全身炎症の誘導が認められないことから、loss of function で本疾患発症機序は説明できない。Pyrin の N 端に存在する pyrin domain は Caspase-1 により、330 番目のアスパラギン酸で切断されることが判明した。我々は Exon2 の変異 pyrin domain を作製、293T 細胞に導入した。その結果として、日本人で変異の頻度が高い E148Q L110P のアミノ酸置換を生じるプラスミドが導入された細胞では、IL-1β、TNF-α の発現増強が確認された。さらに、MEFV 変異部位の違いにより、各 Toll like receptor ligand 刺激に対する反応性が異なることが明らかとなった。これらの研究結果から、患者の腸内細菌叢変化が FMF 関連腸炎発症に関与しているものと考えられた。

Exon2 部位におけるアミノ酸変異を伴う pyrin domain がサイトカイン産生に与える影響



88. 家族性地中海熱関連腸炎の診断法確立・機序解明

仲瀬　裕志

札幌医科大学 医学部 消化器内科学講座

Key words：家族性地中海熱，炎症性腸疾患，分類不能腸炎，Pyrin 蛋白，IL-1β

緒　言

潰瘍性大腸炎（UC）やクローン病（CD）をはじめとする炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease）の本邦患者数は、1950年以降増加の一途をたどっている。本疾患は、若年者に多く発症するため生涯治療の継続が必要とされる難治性疾患である。慢性の経過により日常生活や学業・就労の制限を生み、患者のQOLが大きく損なわれている。従って、発症予防を目指した原因解明、ならびに適切な診断・治療法確立が必須である。

インフラマソームは、炎症性サイトカインの１つであるIL-1β産生を制御する細胞内のタンパク質複合体である。外的ならびに内的因子によるインフラマソームの活性化は、種々の疾患の発症に関与している。インフラマソームは、ASCの近接によってカスパーゼ1を活性化し、IL-1β前駆体を切断して成熟型のIL-1βに変換する細胞内分子である。持続的なインフラマソーム活性化は、様々な自己炎症性疾患の発症に繋がることが明らかとなっている［1］。

インフラマソームの活性化異常に関連する疾患の１つに家族性地中海熱（Familial Mediterranean fever：FMF）がある。FMF は周期性発熱と漿膜炎を特徴とする遺伝性炎症性疾患である。責任遺伝子（*MEFV*遺伝子）は 1997 年に同定されている［2］。本疾患は、腹膜炎に由来する腹痛が最も高頻度にみられるが、漿膜炎が病態の主体であるため腸管病変を伴うことは稀とされてきた。我々は、2012 年既存治療抵抗性の腸炎患者が *MEFV*遺伝子変異を有し、インフラマソーム活性化を抑制するコルヒチンの投与のみで寛解にいたった症例を報告した［3］。その後、本邦においてコルヒチン投与反応性腸炎症例の報告が増加しつつある［4］。従って、IBD 患者群には *MEFV*遺伝子変異を有し、コルヒチンのみで寛解する IL-1β関連腸炎群が存在する可能性が高いと推測される。

今回我々は、FMF 関連腸炎（IL-1β関連腸炎）の診断法の確立並びに機序解明に取り組んだ。コルヒチン反応性 FMF 関連腸炎 50 症例の患者群を検討した結果、日本人 FMF 腸炎症例の 70%以上が Exon2 部位での変異を有し、非定型例あるいは基準を満たさない症例が全体の 3 分の 2 を占めることが判明した。また、消化管病変の内視鏡的特徴所見では、直腸に病変を伴わない大腸の連続性病変を有し、多くの場合 UC 様の粘膜所見を呈した。一方、CD 様の狭窄例も存在することが明らかとなった。基礎研究結果では、Exon2 部位の変異プラスミドが導入された 293 細胞では、IL-1β、TNF-αの発現増強が確認された。また、MEFV 変異部位の違いにより、各 Toll like receptor ligand 刺激に対する反応性が異なることが明らかとなった。これらの研究結果から、腸内細菌構成成分による刺激ならびに Exon2 変異が炎症性サイトカイン発現増強を促し、腸管炎症を寄与することが示唆された。

方　法

1. IBDU 患者における *MEFV*遺伝子解析

血液検体を採取し、DNA を抽出する。抽出された DNA を用いてピリン蛋白をコードする *MEFV*遺伝子解析を行う。（札幌医科大学医の倫理委員会承認番号 G718）。

2. *FMF*遺伝子関連腸炎の臨床データの解析

臨床情報・遺伝子解析データで得られた情報から、FMF 関連腸炎の臨床特徴を明らかにする。

（UMIN 登録 ID 000022289）

1）*MEFV*遺伝子変異陽性 IBDU 患者群に対して、患者情報ファイルを作成する。

2）FMF 関連腸炎の実態調査と共にその臨床像（内視鏡・病理所見含む）を明らかにし、遺伝子解析のデータと組み合わせた検討を行う。

3. *MEFV*遺伝子変異各種細胞株の作製ならびにサイトカイン産生能の評価

MEFV 遺伝子変異プラスミド作製を行い、293T 細胞などに遺伝子導入する。その後、これらの細胞を Toll like receptor ligand で刺激し、NLRP3 の発現について検討した。

結　果

1. FMF 関連腸炎患者の臨床的特徴

コルヒチン反応性 FMF 関連腸炎 50 症例の患者群を検討した結果、日本人 FMF 腸炎症例のほとんどが、Exon2 部位での変異を有した（図 1a）。中でも、E148Q のアミノ酸置換を伴う Exon2 の変異の頻度が最も多いことが明らかとなった（図 1b）。FMF 腸炎患者の臨床的特徴所見では、非定型例と言われる症例（臨床像（a）発熱の持続期間が 12～72 時間ではない（b）発熱が必ずしも 38℃以上とならない（c）腹部発作が不完全（限局性、腹膜刺激症状がない）（d）漿膜炎の発作期間が短いあるいは長い（e）関節炎が非典型的な部位に発症するなどである。）が全体の 3 分の 2 を占めることが判明した。消化管病変の内視鏡的特徴所見に関しては、（a）大腸には連続性病変が認められるが、しばしば直腸には病変が認められない。（b）潰瘍性大腸炎様の粘膜所見を呈する傾向が多い（52%）（c）狭窄例も存在する。

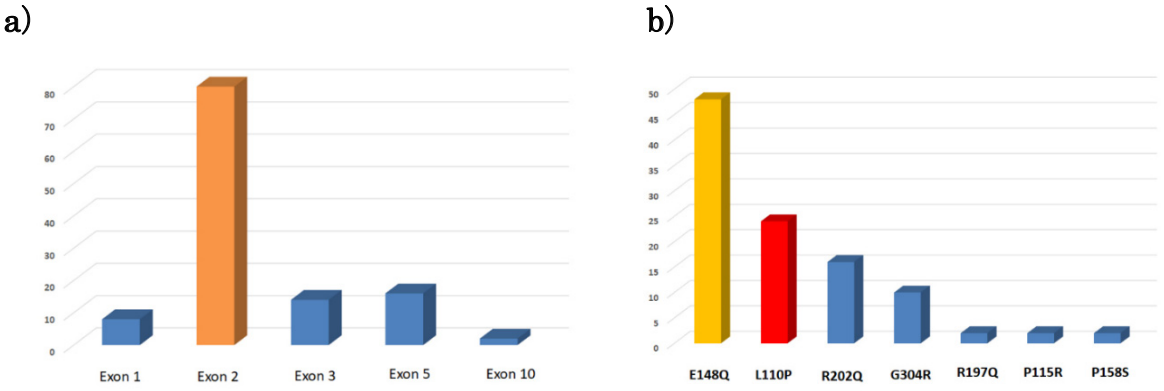


図 1. FMF 腸炎患者における *MEFV*遺伝子変異

a）*MEFV*遺伝子変異部位の頻度

b）Exon2 変異におけるアミノ酸置換部位の頻度

2. 発症機序解明

MEFV 変異部位に基づき、アミノ酸置換を伴うピリン蛋白を産生するプラスミドを作製した。これらのプラスミドを 293T 細胞に導入し、Toll like receptor（TLR）ligand による刺激を行った。その結果、変異プラスミド導入細胞株では、NLRP3 発現の増強につながること、ならびに *MEFV*変異部位の違いにより、各 TLR ligand 刺激に対する反応性が異なることが明らかとなった（図 2）。

さらに、Pyrin の N 端に存在する pyrin domain は Caspase-1 により、330 番目のアスパラギン酸で切断され、核内に移行することが判明した。我々は Exon2 の変異 pyrin domain を作製、293T 細胞に導入した。その結果、日本人で変異の頻度が高い E148Q、L110P のアミノ酸置換を生じる Exon2 の変異が導入された細胞では、IL-1β、TNF-α の発現増強が確認された（図 3）。

a)　　b)

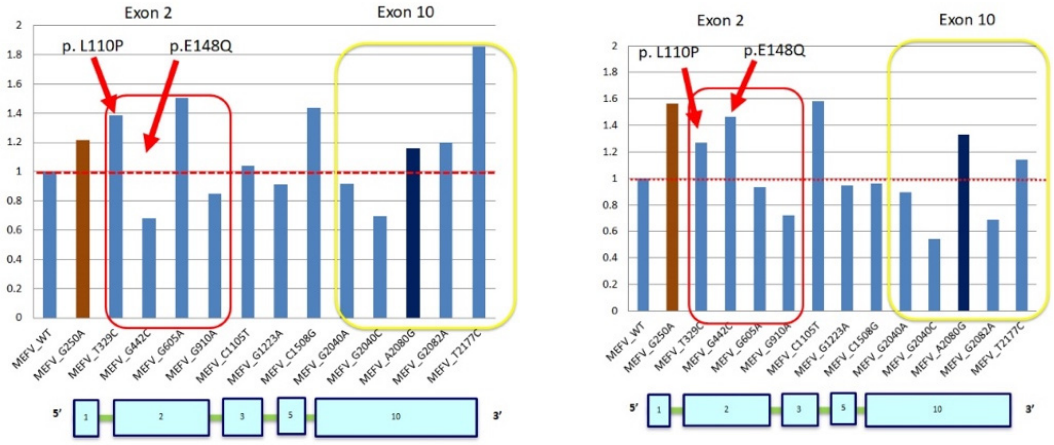


図 2.　*MEFV* 遺伝子変異プラスミド導入 293 細胞に対する TLR ligand 刺激後の NLRP3 発現

a）TLR4 agonist で刺激後の NLRP3 発現

b）TLR9 agonist で刺激後の NLRP3 発現

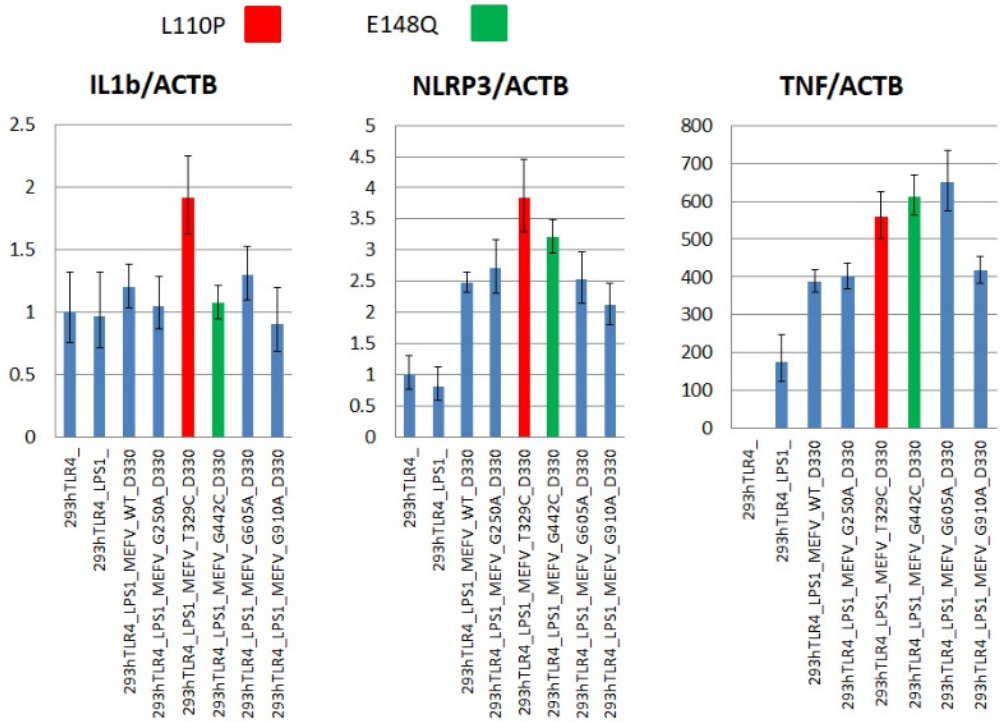


図 3.　変異 Pyrin domain 導入 293 細胞における IL-1β、NLRP3、TNF-αの遺伝子変化

コントロールに比べ、E148Q、L110P のアミノ酸置換を伴うプラスミドを導入した細胞株では、IL-1β、NLRP3、TNF-αの遺伝子発現の増強が認められた。

考　察

IBD の発症機序は、疾患感受性遺伝子ならびに環境因子が複雑に作用し、腸内細菌叢の乱れと共に、消化管粘膜免疫異常が引き起こされ発症するものと考えられている。現在までの研究結果から、腸管局所における炎症性サイトカイン TNF-α、IL-12／23 が UC および CD の病態に関与していることが明らかとなっている。その結果、これらのサイトカインに対する抗体製剤が開発された。抗体製剤の開発は、患者 QOL の向上、長期予後の改善など、多くの IBD 患者に福音をもたらしてきたといえる。一方で、これらの抗体製剤にも全く反応しない IBD 患者が存在する。このことは、TNF-α、IL-12／23 以外の炎症性サイトカインが病態の主軸となる IBD の存在を示唆している。

FMF の発症機序は、変異 Pyrin 蛋白による Caspase-1 制御機能消失の結果、成熟型 IL-1β の産生亢進によるとされている。加えて、FMF は漿膜炎が病態の主体であるため、消化管病変の検討についてはほとんど行われていな買った。2012 年我々は、既存治療抵抗性の腸炎患者が *MEFV* 遺伝子変異を有し、コルヒチン投与のみで寛解にいたった FMF 関連腸炎の症例を報告した。その後、日本において FMF 腸炎の症例報告は増加傾向にある。今回、多施設の協力を得て、*MEFV* 遺伝子変異を有する 50 症例の FMF 患者群の臨床的特徴を検討した。FMF 腸炎患者では、非定型例と言われる症例が 3 分の 2 以上を占めていた。内視鏡所見では、UC に類似した連続性病変がみとめられるものの、直腸病変を伴わないことが特徴的な所見の１つであった。さらに、CD 患者に見られるような狭窄病変を有する症例が存在した。このことは、現在 IBD と診断されている患者の中に FMF 腸炎患者が存在する可能性を強く示唆している。

FMF は常染色体劣性遺伝形式をとるとされてきた。しかしながら、その発症機序は未だ不明な点が多い。その理由として、ピリン欠損マウスでは全身炎症の誘導が認められない、さらに heterozygous 変異での発症が多いことが挙げられる。また、地中海領域に住む患者では Exon10 の変異がほとんどであるが、日本では Exon2 変異を有する患者が大部分を占める。Exon 10 での変異は、C-terminal domain に存在する B30.2 の機能に影響を及ぼし、その結果 Caspase-1 活性化が生じ、成熟型 IL-1β の産生に繋がることが報告されている。しかしながら、Exon2 変異に伴うアミノ酸置換が FMF 発症への関与は明らかとなっていない。Exon1 および Exon2 は N-terminal domain である Pyrin をコードする領域である。Pyrin は caspase-1 により 330 番目のアスパラギン酸で切断され、pyrin domain が核内に移行することが報告された［5］。我々は Exon2 の変異 pyrin domain を発現するプラスミドを作製、293T 細胞に導入した。その結果、E148Q、L110P、R202Q,のアミノ酸置換を生じる Exon2 の変異が導入された細胞では、コントロールに比べて IL-1β、TNF-α の発現増強が確認された。このことから、Exon2 変異により FMF 腸炎が生じる理由として、変異 pyrin の核内移行が炎症性サイトカインの誘導に寄与する可能性が示唆された。さらに、*MEFV* 変異は TLR 刺激に対する反応性に影響を及ぼすことも明らかとなった。これらの研究結果から、我々は、変異ピリン蛋白による炎症性サイトカインならびに NLRP3 発現増強（gain-of-function）に加えて、患者の腸内細菌叢変化が FMF 関連腸炎発症に関与しているものと考え、FMF 患者の腸内細菌叢の解析に現在取り組んでいる。

日本における IBD 患者数は増加の一途をたどっている。しかしながら、IBD 患者の発症原因は、個々の患者により異なっているはずである。我々が今回注目した FMF 関連腸炎患者は、IBD 患者の中に予想以上に多く存在する可能性が高い。我々のデータを基盤に診断基準の作成に取り組む必要がある。近い将来、病態に関連するサイトカインによって IBD は分類され、FMF 関連腸炎は IL-1β 関連腸炎と分類される日がくるであろう。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、飯田智哉、平山大輔（札幌医科大学）、松本主之（岩手医科大学）、松浦稔、久松理一（杏林大学）、江崎幹宏（佐賀大学医学部）、国崎玲子（横浜市立大学附属 市民総合医療センター 炎症性腸疾患センター）、大宮美香（関西医科大学内科学第 3 講座）、荒木寛司（岐阜大学医学部 光学医療診療部）、渡辺憲治（兵庫医科大学腸管病態解析学）、田中浩紀（札幌厚生病院 IBD センター）、小林拓、日比紀文（北里大学大学院医療系研究科炎症性腸疾患先進治療センター）、竹内健、鈴木康夫（東邦大学医療センター佐倉病院消化器内科学）である。

文　献

1) Martinon F,Burns K,Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol Cell. 2002 Aug;10(2):417-26. PMID: 12191486
2) Padeh S,Berkun Y. Familial Mediterranean fever.Curr Opin Rheumatol. 2016 Sep;28(5):523-9. doi: 10.1097/BOR.0000000000000315. Review.
3) Arasawa S, Nakase H, Ozaki Y, Uza N, Matsuura M, Chiba T. Mediterranean mimicker. Lancet 380: 2052, 2012. Lancet. 2012 Dec 8;380(9858):2052. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61377-4. PMID:23217869.
4) Asakura K,Yanai S, Nakamura S, Kawaski K, Eizuka M, Ishida K, Endo M, Sugai T, Migita K, Matsumoto T. Familial Mediterranean fever mimicking Crohn disease: A case report. Medicine (Baltimore) 2018 Jan;97(1):e9547. doi: 10.1097/MD.0000000000009547.
5) Chae JJ, Wood G, Ricgard K, Jaffe H,Colburn NT, Masters SL,Gimucio DL, Shoham NG, Kastner DL. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, is cleaved by caspase-1 and activates NF-kappaB through its N-terminal fragment. Blood. 2008 Sep 1;112(5):1794-803. doi: 10.1182/blood-2008-01-134932. Epub 2008 Jun 24.