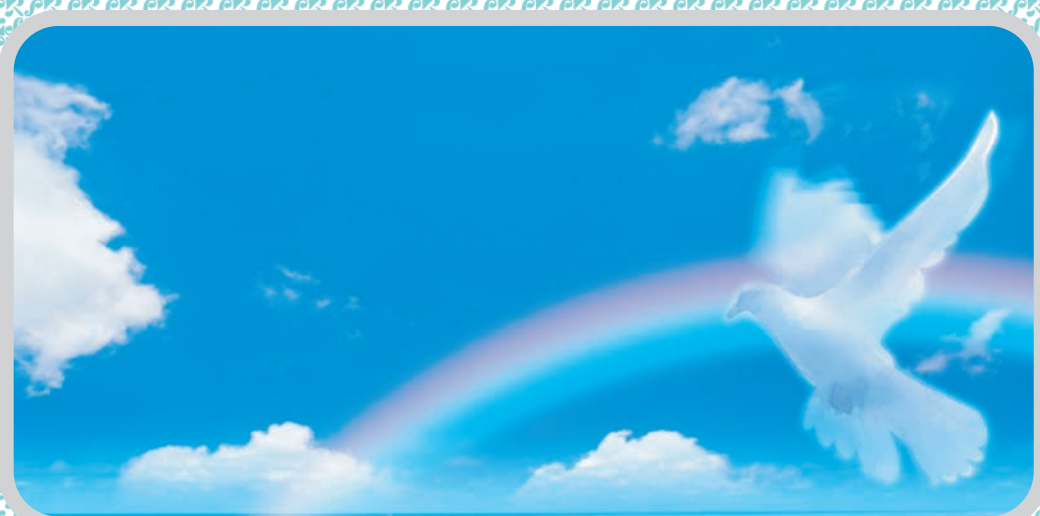
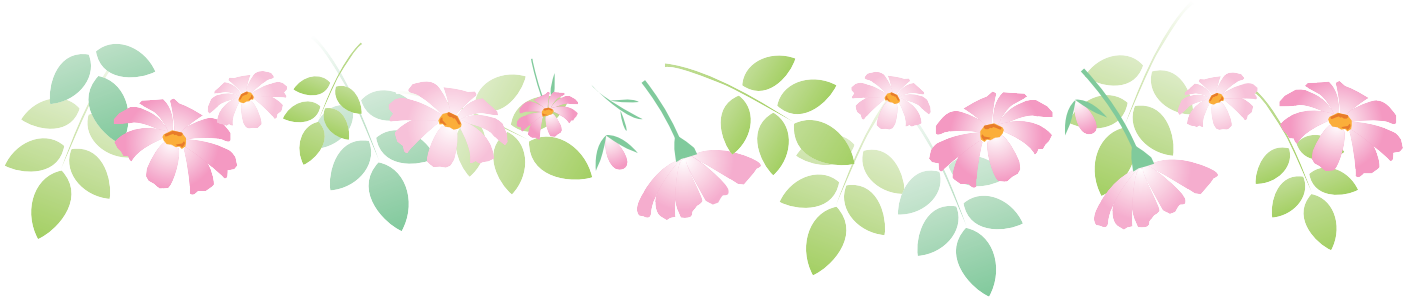


No. 39
2013.10

難病研究財団ニュース



公益財団法人 難病医学研究財団
Japan Intractable Diseases Research Foundation



目 次

巻頭の言葉「疾病対策部会による難病対策の改革提言を拝読して」

評 議 員 猿 田 享 男 1

1. 平成 23 年度医学研究奨励助成金受賞者の研究報告概要 2

2. 平成 25 年度医学研究奨励事業の応募状況について 24

3. 平成 25 年度国際シンポジウム事業計画概要 24

4. 研究雑感「『難病』克服への道」

評 議 員 御 子 柴 克 彦 25

5. 新着情報 26

厚生労働省の難病対策に関する動向

厚生労働省難治性疾患克服研究事業（研究班）の動向

6. 疾患ミニ解説「突発性難聴」 27

7. 賛助会員へのご加入及びご寄付のお願い 28



「疾病対策部会による難病対策の 改革提言を拝読して」

公益財団法人難病医学研究財団

評議員 猿田 享男

(慶應義塾大学 名誉教授)

昭和47年の難病対策要綱に基づき開始された難病対策事業は、これまでに日本の難病の実態の把握、診断や治療法の開発等、多大な業績を挙げてきた。しかし、開始から40年が過ぎ、社会情勢の変化や医学・医療の著しい進歩に伴い、事業の改革が求められている。厚生科学審議会疾病対策部会難病対策委員会（金澤一郎委員長）では、平成24年10月から難病対策の改革に関する審議を開始され、平成25年1月に、委員の皆様方の努力により、大変立派で理想的な提言を発表された。

この提言では、難病の治療研究面、医療費助成の問題および難病事業に関する国民の理解の促進など、3つの面での改革を提言された。ここでは私がこれまで関係してきた難病研究面での感想と、これからの改革の希望について述べてみたい。

私が難病研究に従事するようになったのは昭和57年頃、特定疾患調査研究班の副腎ホルモン産生異常症班の班員になった時である。その後、この班の班長として、難病としての副腎疾患の調査研究に従事してきた。当時は稀少疾患と考えられていた原発性アルドステロン症や褐色細胞腫等は、その後、検査法の進歩等により稀少疾患でなく、症例数や診断・治療面からみて、難病に該当しなくなっている。同様のことは他の研究班でもみられ、難病の定義や研究班の見直しが必要である。

その後、私が難病事業調査委員会の事前評価委員長の時（平成20年）、舩添大臣が難病の重要性を強調され、調査研究事業の研究費を約45億円から100億円と増額された。突然の増額となったため、その使用法を十分に議論できず、各研究班で意義ある研究をしている方々に、適当に配分された。その後も増額分が継続されるなら、しっかりした事業計画と納得いく予算配分が必要であったと反省している。

以上のような難病事業とは別に、現在、私は文部科学省の橋渡し研究支援事業のディレクターとして、アカデミアにおけるライフサイエンス研究の実用化促進の事業に関係している。全国7拠点で、各拠点が有するシーズの実用化が進められているが、それらのシーズには企業が利益面から開発を躊躇する稀少疾患に関するものが多い。この事業の第Ⅰ期（5年間）で注目されたのは、日本で約50人程度の難病の脂肪萎縮症にレプチンが有効なことを京都大学の中尾一和教授らが明らかにし、第Ⅰ期終了時に治験届が受理され、治療薬としての実用化に成功したことである。このような事業と難病事業との連携が、今後必要と思われる。

このような橋渡し研究と連携し、厚生労働省では平成23年から早期・探索的臨床試験拠点整備事業を開始し、まず代表的な5疾患領域の拠点整備の1つとして、免疫・難病拠点を整備中である。さらに新薬・医療機器の開発を促進する臨床研究中核病院として10拠点の整備も始まっており、これからの難病研究は、このような諸事業としっかりと連携し、効果的に進められることが望まれるかと思われる。

➡ 医学研究奨励助成金の概要 ◀

1. 趣 旨

めざましい医学の進歩にもかかわらず、なお原因が解明されず治療方法も確立されていないいわゆる難病の研究を推進するため、昭和51年度から当財団が独自で40才未満の若手研究者を対象とし、一般公募により研究内容が将来有用と期待される研究について医学研究奨励助成金を交付し、研究の支援を行っている。なお、平成23年度より「臨床分野特別枠」を新設した。

2. 公募対象

難病の専門分野における40才未満の研究者や現に難病の診療に携わっている40才未満の医師で、厚生労働省難治性疾患克服研究班研究代表者、総合大学及び医科大学の医学部長または附属病院長、難治性疾患研究を行っている研究機関の長、難治性疾患の診療を行っている医療機関・研究機関の長のいずれかの推薦を受けた者を対象としている。

3. 公募状況

平成23年度は、一般枠へ38名、臨床分野特別枠へ21名の応募があり、7名の専門審査委員による厳正な審査を経て10名の方が受賞することとなった。

4. 助 成 金

1 名につき200万円

5. 研究報告概要等

研究報告概要は後記の通りであり、これらの研究を基に難病に対する医学研究が益々推進され、難病患者とそのご家族や関係者に有用となることを期待している。

参考 第36回 贈呈式

平成24年1月18日（水）11時～

式次第

(1) 挨拶	会 長	高久 史磨
(2) 趣旨及び審査経過報告	評議員・企画委員長	金澤 一郎
(3) 医学研究奨励助成金贈呈	理事長	吉原 健二
(4) 祝 辞	厚生労働大臣	小宮山洋子 殿（代理出席）
	上智大学名誉教授	青木 清 殿
(5) 受賞者代表謝辞	横浜市立大学学術院医学群	
	眼科学教室視覚器病態学分野	
	特任助教	河越 龍方 殿

⇒ 医学研究奨励助成金受賞者の研究報告概要 ⇐

(註) 本研究報告は、平成23年度（第36回）に当財団が助成した医学研究奨励助成金受賞者の研究報告概要を取り纏めたものです。

(一般枠)

- チロシンキナーゼ阻害薬イマチニブ封入ナノDDSを用いた重症肺動脈性肺高血圧症に対する新規低侵襲治療法の開発
〔阿部 弘太郎 九州大学大学院医学研究院循環器内科学講座 助教〕
- CIDPの難治・治療抵抗性を規定する要因の解明
〔飯島 正博 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学 特任助教〕
- 視神経脊髄炎発症機構の解明
〔荻谷 慶喜 福島県立医科大学生化学講座 准教授〕
- サルコイドーシスにおける自己抗体網羅的検索
〔河越 龍方 横浜市立大学医学部大学院視覚器病態学講座 助教〕
- 皮膚細胞を利用した劇症肝炎治療の試み
〔鈴木 淳史 九州大学生体防御医学研究所器官発生再生学分野 教授〕
- テロメア・テロメラーゼ関連因子による骨髄不全疾患の発症機構
〔仁田 英里子 慶應義塾大学医学研究科発生・分化生物学 日本学術振興会特別研究員RPD〕

(臨床分野特別枠)

- 骨髄異形成症候群における細胞代謝とハイドロキシメチル化シトシン定量の調査研究
〔坂田 麻実子 筑波大学医学医療系血液内科 准教授〕
- 拡張型心筋症に対する新規診断法と治療法の開発に向けた探索的研究
〔福畹 五月 大阪大学大学院医学系研究科外科学講座心臓血管外科学 助教〕
- Mendelian susceptibility to mycobacterial diseasesの早期診断法の確立および新規遺伝子検索の試み
〔保科 隆之 九州大学病院 助教〕
- 肺線維症・上皮間葉転換を制御するマイクロRNAの探索と新規治療法の開拓
〔柳 重久 宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野 助教〕

チロシンキナーゼ阻害薬イマチニブ封入ナノDDSを用いた重症肺動脈性肺高血圧症に対する新規低侵襲治療法の開発

九州大学大学院医学研究院循環器内科学講座 助教 阿部 弘太郎



<共同研究者>

岡山大学大学院医学研究院循環器内科学 講師 中村 一文

九州大学大学院医学研究院循環器内科学 教授 砂川 賢二

九州大学大学院医学研究院循環器病先端医療研究開発学 教授 江頭 健輔

肺高血圧症は、肺小血管の変成（血管平滑筋の過剰な増殖など）により、肺動脈圧と肺血管抵抗が上昇し、右心不全から死に至る重篤な疾患です。近年、様々な治療薬が開発されてきましたが、未だに5年生存率が50%以下の予後不良の難病疾患です。現在、肺高血圧症の治療薬として、プロスタグランジン I_2 製剤（ドルナーなど）、エンドセリン受容体拮抗薬（トラクリアなど）、ホスホジエステラーゼ5阻害薬（レバチオなど）などが使用されていますが、近年、チロシンキナーゼ阻害薬イマチニブ（グリベック）が肺高血圧症の新たな治療薬として承認され、注目されています。しかしながら、高用量のイマチニブの経口投与は肺動脈圧低下と同時に重大な体血圧低下も引き起こす可能性もあり、また心毒性や肝機能障害など全身の副作用の報告があります⁽¹⁾。従って、肺動脈性肺高血圧症の治療に対して病態に則したより適切な作用機序、送達方法による新規治療法の開発が求められています。本研究の目的は、イマチニブ封入ナノ粒子製剤を開発し、DDS（Drug Delivery System）を基盤とし、イマチニブを病的肺血管選択的に送達させ、イマチニブの経口投与と比較して優れた治療効果を明らかにすることです。

近年、我々は生体吸収性、生体適合性に優れた高分子である乳酸・グリコール酸共重合体（PLGA）を「高分子球形晶析法」という方法によりナノ粒子化するとともに、ペプチドや遺伝子プラスミドなどを封入するカプセル化技術を開発しました⁽²⁾。PLGAは生体吸収性縫合糸の材料として30年以上、病院で使用されており、また、PLGAマイクロ粒子によるリ्यूブリン（酢酸リ्यूブプロレリン長期徐放型注射剤）の実績などからも生体内での安全性は保障されている生体適合性ポリマーです。さらに、PLGAナノカプセル粒子は、DDSとして、薬物の酵素分解からの保護や薬物の放出制御などの通常の機能に加えて、生体膜付着性による組織滞留性の向上、それに起因する薬物の局所濃度の増大による薬物吸収の促進などの諸機能が既に示されています。PLGAは生体内で分解され、体外へ排泄されるため極めて安全性が高く、ヒトに対しても安全性がすでに確認されています。

一方、肺動脈性肺高血圧症への治療因子の投与経路として、静脈内投与でのアプローチが考えられます。肺動脈性肺高血圧においては、正常血管に比べて肺の微細動脈の血管透過性が向上していることが知られています。そこで、本研究では、重症肺高血圧症ラットモデルを用いて、蛍光色素を封入したPLGAナノ粒子を経気管内投与あるいは静脈内投与を行い、肺の微細動脈に選択的に送達されるか、また、全身への暴露が懸念される静脈内投与を行う事によって他の臓器と比較して病的肺血管に選択的に送達されるかを評価し、新規ナノ治療の開発の先駆的な研究開発を行いました。

疾患モデルとして、モノクロタリン誘発性肺高血圧症モデルを使用しました⁽³⁾。3週後に麻酔下で頸静脈からカテーテルを挿入し、血行動態の計測を行いました。

PLGA7520をナノ粒子の基剤として使用しました。蛍光色素であるFITC及びイマチニブを内包させたPLGAナノ粒子は上述のエマルション溶媒拡散法にて作製しました⁽⁴⁾（図1）。PLGAナノ粒子の特徴は図の通りです。

次に、2群間でばらつきが無いように、1. FITC封入PLGAナノ粒子経気管内投与群、2. FITC封入PLGAナノ粒子静脈内投与群の2群に群分けを行いました。気管内投与群は麻酔下での挿管投与、また、静脈内投与群は無麻酔下で尾静脈から投与しました。30分後過麻酔と安楽死を行った後、肺をホ

ルマリン固定しました。各病理切片を作製し、蛍光顕微鏡でFITCの発現を観察しました。

モノクロタリン投与3週間後、収縮期肺動脈圧を反映する右室収縮期圧63mmHg（正常値 27 mmHg）と著明に高値を示し、右室/左室重量比 0.40（正常値 0.20）と右室肥大が認められました。また、肺血管病理像としては著明な中膜肥厚を認められました。

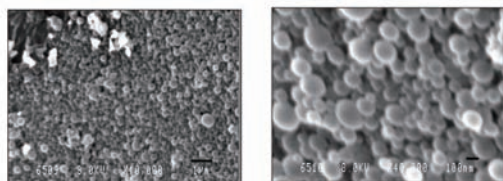
肺組織において、PLGAナノ粒子経気管内投与群では肺胞を中心にFITCの発現を認めたのに対し、FITC封入PLGAナノ粒子静脈内投与群では肺小動脈病変に特異的に取り込まれるのが確認されました（図2）。

最後に、イマチニブ封入ナノ粒子の肺高血圧症に対する有効性を検討するために、肺高血圧症患者様由来の肺動脈平滑筋細胞を用いて平滑筋細胞の抑制アッセイを行いました。その結果、イマチニブ単独（1, 10 μ g/mL）あるいはイマチニブ封入ナノ粒子を培養液中に添加すると、イマチニブ単独群に比べイマチニブ封入ナノ粒子がより血管平滑筋細胞の過剰な増殖を抑制することが明らかになり、本研究において、蛍光色素を封入したPLGAナノ粒子を経気管内投与と比較して静脈内投与を行い、肺の微細動脈に選択的に送達することが明らかになりました。また、全身への暴露が懸念される静脈内投与を行う事によって他の臓器と比較して病的肺血管に特に選択的に送達されることが明らかになりました。この結果から、イマチニブ封入ナノ粒子が肺高血圧症の治療に有効性が示す可能性が示唆されました。

今後は、イマチニブ封入ナノ粒子を肺高血圧症ラットモデルに経静脈投与し、より効果的な治療効果を確認する予定です。肺高血圧症の血管病変への選択的な治療が可能となり、さらには予後が飛躍的に改善することが期待されます。

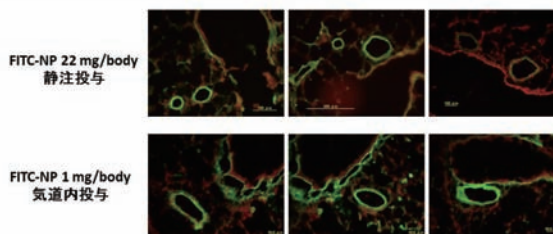
本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただいた公益財団法人難病医学研究財団に深謝申し上げます。

図1 PLGAナノ粒子の走査型電子顕微鏡写真



- ◆ 医薬品に使用実績のある生体吸収性ポリマー-PLGAを使用
 - ◆ 界面活性剤等を使用しない溶媒拡散法で製造
 - ◆ ナノ粒子化：高い患部への送達性
 - ◆ PLGA使用：患部での徐放効果
- Drug Delivery System (DDS)

図2 肺高血圧症ラットへのFITC封入ナノ粒子の静脈投与は気管内投与と比較して肺小動脈へ選択的に取り込まれた



〔参考文献〕

1. Abe K, Toba M, Alzoubi A, Koubsky K, Ito M, Ota H, Gairhe S, Gerthoffer WT, Fagan KA, McMurtry IF, Oka M. Tyrosine kinase inhibitors are potent acute pulmonary vasodilators in rats. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011. 45 (4) : 804-8.
2. Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, Hino T, Niwa T. Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods. Eur J Pharm Biopharm 1998. 45: 41-8.
3. Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, Hattori T, Nakashima Y, Kaibuchi K, Sueishi K, Takeshit A. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. Circ Res. 2004. 94 (3) : 385-93.
4. Nakano K, Egashira K, Masuda S, Funakoshi K, Zhao G, Kimura S, Matoba T, Sueishi K, Endo Y, Kawashima Y, Hara K, Tsujimoto H, Tominaga R, Sunagawa K. Formulation of nanoparticle-eluting stents by a cationic electrodeposition coating technology: efficient nano-drug delivery via bioabsorbable polymeric nanoparticle-eluting stents in porcine coronary arteries. JACC Cardiovasc Interv. 2009. 2 (4) : 277-83.

CIDPの難治・治療抵抗性を規定する要因の解明

名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学 特任助教 飯島 正博



慢性炎症性脱髄性多発根ニューロパチー（chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy, CIDP）は、四肢の脱力と感覚障害をきたす自己免疫性の末梢神経疾患である。症状は慢性進行性もしくは再発性であり、治療が奏効しなければ長期にわたり日常生活は障害される。疾患の原因は未だ不明で、厚生労働省の難治性疾患克服研究事業の対象疾患に指定されるとともに、平成21年からは「慢性炎症性脱髄性多発神経炎」として特定疾患治療研究事業の対象としても認定されている。これらを契機にCIDPの認知度は高まり、合わせて社会的サポート体制も整えられつつある。

治療にはステロイド薬、血漿浄化療法、免疫グロブリン大量療法が有効とされるが、これらに反応しない難治・治療抵抗性を示す症例が一定の割合で存在し、関連する病態の解明が求められている。本研究は治療抵抗性を規定する病態を解明することで、難治・治療抵抗例に対する新規治療法の開発を目指している。

CIDPの疫学

2004年から1年間にわたり、国内の疫学を厚生労働省の班会議を通じて調査した結果、CIDPの有病率は10万人当たり1.61人、発症率は0.48人、性比は2.01：1.23（男性優位）、小児で稀な疾患であるのに対し、年齢が高くなるにつれて有病率が増加する傾向が明らかとなった。近年は診断に必要とされる検査条件が緩和された診断感度に優れた新たな診断基準が定着しつつあることから、今後の罹患者数の増加が見込まれている。（Iijima M, et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:1040-3.）

治療反応性と軸索障害の関与

末梢神経は軸索とそれを覆う髄鞘から構成されるが、CIDPは髄鞘を選択的に障害（脱髄）されるのが特徴である。病態には広範な自己免疫機序の関与が推定され、病変部神経に浸潤するマクロファージの重要性が指摘されている。本研究で最初に病変部神経における網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、治療反応性は 1) 反応良好で長期にわたり再発のない反応群、2) 非反応群、3) 反応良好なものの1～2ヶ月で頻回に再発を繰り返す治療依存群の3群に分類されることが示された。いずれの群もコントロールと比べて高度の炎症関連因子の発現亢進が確認されたが、特に治療依存群では他の2群より顕著な亢進が確認された。また反応群と非反応群における発現プロファイルは近似し、非反応群特異的な要素は認められなかった。本実験系の対象はmRNAの存在するシュワン細胞と浸潤炎症細胞であることから、非反応群に対する治療戦略にはシュワン細胞や炎症細胞の関与しない要素に着目する必要性が示唆された。

さらにCIDP 312症例による臨床電気生理学的な解析から、非反応群では罹病早期から出現する軸索障害（筋萎縮、CMAP低下）の合併が判明した。これらより難治性・治療抵抗性を規定する要因は軸

索障害に由来することが示された。(Iijima M, et al. *Neurology*. 2005;64:1471-5.)

軸索障害機序と遺伝子多型解析

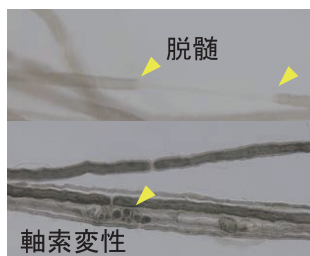
難治性・治療抵抗性が軸索障害に起因するとの病態仮説に基づき、宿主の遺伝子的多様性と治療反応性との関連性を検証した。末梢神経の構成分子と炎症関連因子を候補に一塩基多型 (SNP) と治療反応性との相関を、連鎖不平衡ブロック内のSNPsハプロタイプ／ディプロタイプ解析で検証した結果、軸索?髄鞘間相互作用を担う神経特異的分子 (transient axonal glycoprotein-1, TAG-1) の相関が明らかとなった。これはTAG-1の構造を決定するアミノ酸を規定するSNPの個体差が、脱髄に付随する軸索障害の合併、ひいては難治性・治療抵抗性を規定する可能性を示唆する。(Iijima M, et al. *Neurology*. 2009;73:1348-52, Iijima M, et al. *J Peripher Nerv Syst*. 2011;16 Suppl 1:52-5.)

動物モデルへの実験的自己免疫性ニューロパチー (EAN) 誘導による検証

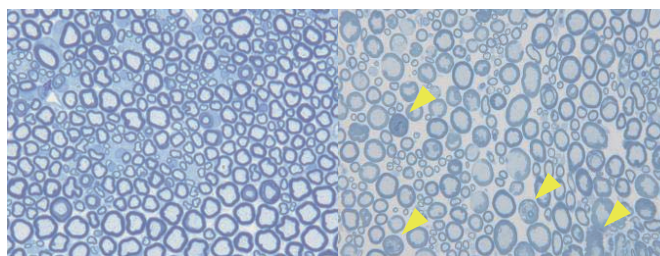
TAG-1異常による表現型への影響を、ノックアウトマウス (KO) を用いて解析した。TAG-1 KOは野生型 (WT) と比べて出生時より体格が小さく、出生後の体重増加も低いまま経過した。またヘテロ交配による正常凍結胚から仮腹出産を試みたところ、TAG-1 KOはメンデル比より顕著に低率であった (13.8%)。これはTAG-1が神経系の発生に関わる胎生期から機能を有すると推定される。



Post-EAN TAG-1 KO (teased fiber)



Post-EAN WT (TB) Post-EAN TAG-1 KO (TB)



さらに末梢神経構成分子 (myelin protein zero) 由来ペプチドを免疫し、EANを誘導した結果、野生型では脱髄のみを来した一方、TAG-1 KOは軸索障害の病理像を合併した。臨床解析でも野生型EANより高度の運動障害 (cage activity, foot print analysis, rotor rod, clinical score) と軸索障害を反映する電気生理学的所見を有することから、TAG-1 KOが難治性・治療抵抗性の病態を反映する軸索脆弱性の実験モデルとして期待される。

今後の展望

CIDPの難治性・治療抵抗性症例に対する新規治療法開発には、炎症機序に特化した従来型治療とは異なるアプローチが必要と考えられた。軸索障害にTAG-1の関与が示唆されており、今後も軸索?髄鞘間相互作用を標的とした新規治療法の開発を視野に検討を予定している。最後に、本研究に対し難病医学研究財団より賜りましたサポート、励ましのお言葉に深謝申し上げます。

視神経脊髄炎発症機構の解明

福島県立医科大学大学生化学講座 准教授 荻谷 慶喜



【研究の背景】

視神経脊髄炎（Neuromyelitis optica：NMO）は、19世紀より多発性硬化症（Multiple sclerosis：MS）の種類の一つ（視神経脊髄型MS）と考えられてきました。ところが2004年、アクアポリン4と呼ばれるタンパク質に対する抗体がNMO患者さんの血清中に特異的に存在する事が発見されました。その後の研究から、この抗体が脳内のアストロサイトと呼ばれる細胞に存在するアクアポリン4を攻撃することでNMOが発症するということがわかってきました。このことは、ミエリンと呼ばれるタンパク質のダメージにより発症するMSとは異なるメカニズムでNMOが発症するということを示唆しており、両者は異なる疾患であると認識されるようになってきています。

実際にNMOはMSと異なり、発症から急性に視力障害から失明に至る場合があります。また、治療においてMS患者さんではインターフェロン β の投与は有効ですが、NMO患者さんへの投与は病状を悪化させることがあるので注意が必要です。したがって、NMOにおいては早期に的確にMSと判別し、適切な治療をおこなうことが重要であるといえます。

現在、NMOとMSを判別するにあたっては、先に述べたアクアポリン4に対する抗体が患者さんの血清中にあるかないかを調べます。しかしながら、それは技術的に難しい検査であるため、実施可能な機関は全国で4ヶ所と限られています。以上のことから現在、アクアポリン4とは異なる、簡便かつスピーディーに検出可能なNMOとMSの新たな判別マーカーが求められています。また、NMOがどのようにして発症するのか、そのメカニズムがわかればNMOの根本的治療薬の開発が可能となるかもしれません。

【研究の目的】

本研究では簡便かつスピーディーに検出可能なNMOとMSの判別マーカーを同定するとともに、NMOの発症メカニズムについて調べることを目的としました。

【研究方法と結果】

NMO、MS、その他の神経疾患の患者さんの脳脊髄液中のタンパク質について解析をおこないました。脳脊髄液を対象とした理由は、脳と直接接していることから、脳内の変化を直接反映している可能性が高いと考えられたからです。解析はウェスタンブロットおよびELISAと呼ばれる手法を用いました。これらの方法は非常に一般的であり、多くの病院で実施可能です。解析の結果、NMO患者さんにおいてのみ顕著な増加が認められる細胞外マトリックス関連タンパク質Xを発見しました（図1）。更に、NMO患者さんの脳組織を調べると、タンパク質Xが脳白質に非常に

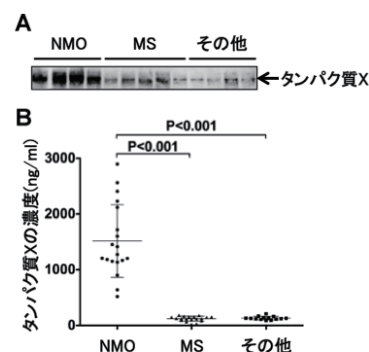


図1. NMO、MS、その他の患者さん由来髄液におけるタンパク質Xの存在量。(A)タンパク質Xの抗体を用いたウェスタンブロット法による確認。(B)ELISA法による各患者さん由来髄液におけるタンパク質Xの濃度測定。いずれの方法においてもNMO患者さん由来髄液においてタンパク質Xの量が非常に多いことが確認された。

多く存在しており、それらは脳内の細胞が作り出していることがわかりました。NMO患者さんの脳組織においては、炎症が起こっています。炎症時にはマクロファージと呼ばれる細胞が血液から脳内にやってくるのですが、NMOにおいては炎症が非常に激しいため、MSなどと比べ、非常に多くのマクロファージが脳内に存在していました。そうした血管から浸潤してきたマクロファージは、タンパク質Xを自分自身でも作り出していることがわかりました。

それでは、NMO患者さんの脳内で大量に作られているタンパク質Xは、NMOの病態に関与しているのでしょうか？先ほど述べたマクロファージの脳内への浸潤はNMOの病態と相関しています。そこで、タンパク質Xがマクロファージの脳内への移動を促進する役割をしているのではないかと考えました。マクロファージに対して、NMO患者さん由来あるいはMS患者さん由来の脳脊髄液を処理すると、NMO患者さん由来脳脊髄液においてマクロファージの移動能力が大幅に促進されました（図2 AおよびB）。この移動はタンパク質Xの阻害抗体により抑制されました（図2 C）。このことはすなわち、NMO患者さん由来脳脊髄液中のタンパク質Xがマクロファージの移動を促進した、といえます。

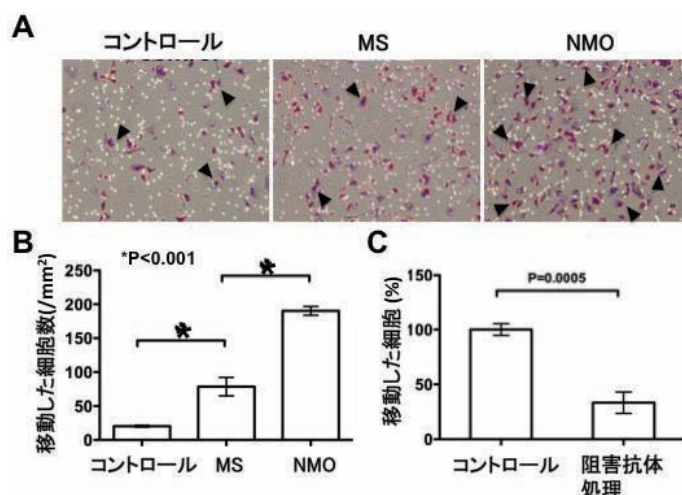


図2. NMOおよびMS患者さん由来髄液により誘導されたマクロファージの運動能の測定. (A)移動したマクロファージの様子. 色がついているのがマクロファージ(矢頭). (B) (A)の写真から移動したマクロファージの数を定量化したもの. (C) NMO患者さん由来髄液により誘導されたマクロファージの運動に対するタンパク質X阻害抗体の影響. これらの結果よりNMO患者さん由来髄液中に含まれるタンパク質Xがマクロファージの運動を非常に強く促進することがわかる.

【まとめと今後の展望】

本研究の主な成果として次の2つが挙げられます。

- 1) NMO患者さんの脳脊髄液において大量に存在するタンパク質Xを発見しました。これは、簡便かつスピーディーに検出可能であり、MSとの新たな判別マーカーになる可能性が高いものです。
- 2) タンパク質Xは、マクロファージの運動能力を高めることで、血管から脳内への浸潤を促進し、NMO病態における炎症を悪化させる可能性が示唆されました。

最近、自己免疫疾患に関与すると考えられているTh17免疫細胞とタンパク質Xが深い関わりを持つとの報告がありました。タンパク質Xは、NMO発症において本研究で示したマクロファージへの影響だけでなく、自己免疫疾患と関係するTh17細胞にも影響している可能性があります。今後、これらのメカニズムを更に詳しく調べることで、タンパク質Xを標的にしたNMOの分子標的治療薬の開発をおこなっていきたいと思います。

最後になりましたが、本研究を遂行するにあたり多大なご支援を賜りました公益財団法人 難病医学研究財団関係者の方々に深く感謝申し上げます。

サルコイドーシスにおける自己抗体網羅的検索

横浜市立大学医学部大学院視覚器病態学講座 助教 河越 龍方



【背景・目的】

サルコイドーシスは、両側肺門リンパ節・肺・眼・皮膚をはじめとした全身の様々な臓器に、非乾酪性類上皮細胞肉芽腫を形成する、原因不明の疾患である。血清ACE (angiotensin converting enzyme) の上昇やCa代謝異常などの検査所見が診断の参考になるが、現在のところ本疾患を特定するためのバイオマーカーとして確実な指標は存在しない。そこで本研究では、サルコイドーシスに対する診断を、正確かつ迅速におこなうための診断指標となりうるマーカーの探索を目的とした。

サルコイドーシスにおけるB細胞の役割はまだよくわかっていないが、CD20抗体を用いると病態が改善するという報告が散見され、その関与は大きいと考えられる。また、サルコイドーシス患者血液中ガンマグロブリンは高値を示すことが多く、やはり病態形成に自己抗体が関与していると推察できる。しかしこれまで、自己抗体を定性的に同定するための機能的な方法が無かったため、詳しい研究はおこなわれてこなかった。今回我々は、研究協力者である愛媛大学澤崎達也博士らが開発した、新規自己抗体網羅的検索技術を用いて、サルコイドーシス患者血清中自己抗体のプロファイリングをおこなった。

【方 法】

一般的に自己免疫疾患における自己抗体の検出では、ELISA法が用いられる。しかし、スクリーニング目的に、数千種類のタンパク質を精製し実用化することは現実的には難しい。また、未精製タンパク質を用いた反応を行うと非常にバックグラウンドが高くなり、信頼性の高いデータを得ることが容易ではない。大規模な自己抗体プロファイリングを行うためには、新しい高感度な抗原抗体反応を検出する技術が必要とされていた。研究協力者の澤崎らは小麦胚芽を用いて大量にタンパク質合成をおこなう技術を開発した。その技術を応用し、1) 目的のタンパク質だけを特異的にビオチンでラベル化し、ビオチン化タンパク質のみを検出するという方法を用いて反応の特異性を劇的に高める、2) 簡便で高感度なおかつ液相化タンパク質を検出できるAlphaScreen法を用いる、といった技術上の改善に成功し、自己抗体の大規模スクリーニングが可能な系を構築した (Matsuoka et al. J Proteome Res. 2010; 9 (8): 4264-73)。今回この方法を用いて、サルコイドーシス患者の血清中自己抗体を網羅的にスクリーニングした。特異的な抗体の上昇を認めるか、特徴的な抗体上昇パターンを示すかなど、他疾患の結果と比べ差異化できるか検討した。

平成23年度は、横浜市立大学医学部附属病院を受診した、サルコイドーシス、ベーチェット病、vogt-小柳-原田病、視神経炎、BDUMP (bilateral diffuse uveal melanocytic proliferation) の患者血清を、患者に本研究の意義を十分説明し納得をえたうえで採取し、研究実施対象とした。

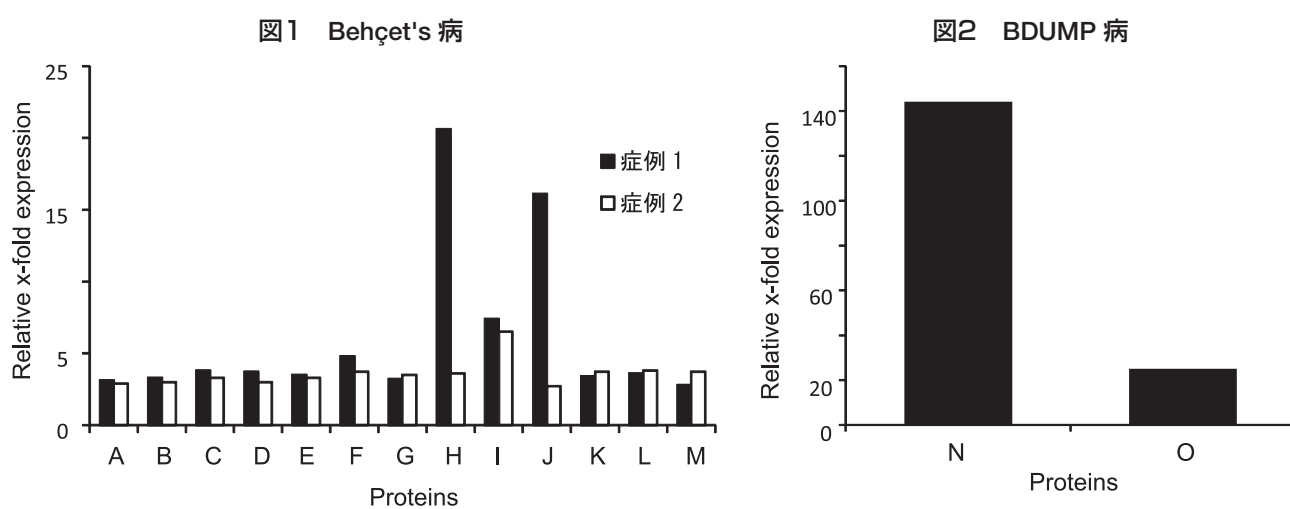
平成24年度は、共同研究施設である愛媛大学プロテオサイエンスセンターにて、自己抗体網羅的検

索技術を用いて、患者血清中自己抗体スクリーニングをおこなった。

本研究は横浜市立大学附属病院倫理委員会にて承認を受け【承認番号 B110707051およびB120301001】、厚生労働省の定める倫理指針および学内の倫理指針に沿って行われた。

【結 果】

サルコイドーシスにおいて、今回スクリーニングに用いた2000種類のタンパク質に対しする自己抗体は見つからなかった。それに比し、ベーチェット病およびBDUMPにおいて特異的自己抗体の存在を見つけることができた（図1，図2参照）。



【考 察】

今回スクリーニングに用いたタンパク質は2000種類超と大変多いものであり、しかも、疾患を引き起こす可能性が高いと考えられる免疫関連タンパク質、細胞膜表面発現タンパク質を選んでスクリーニングした。しかしサルコイドーシスにおいては、自己抗体が検出されなかった。このことより、サルコイドーシスにおいては細胞表面ではなく、細胞内タンパク質に対する自己抗体が疾患形成に寄与している可能性が考えられる。

サルコイドーシスの臨床所見は多岐に渡りまた病理所見も多彩であるため、様々な原因からなる非乾酪性類上皮細胞肉芽腫を形成する疾患の集まりであるとも推測することもできる。そのため今回調べた症例では陽性反応を示さなかったが、他の症例では陽性を示す可能性もあるため、さらに検体を採取し検討していく必要がある。

最後に、難病医学研究財団およびご寄付を頂いた皆様方に深く御礼申し上げます。今後本研究をさらに推し進めていき、難病医療の発展につなげていく所存です。

皮膚細胞を利用した劇症肝炎治療の試み

九州大学生体防御医学研究所器官発生再生学分野 教授 鈴木 淳史

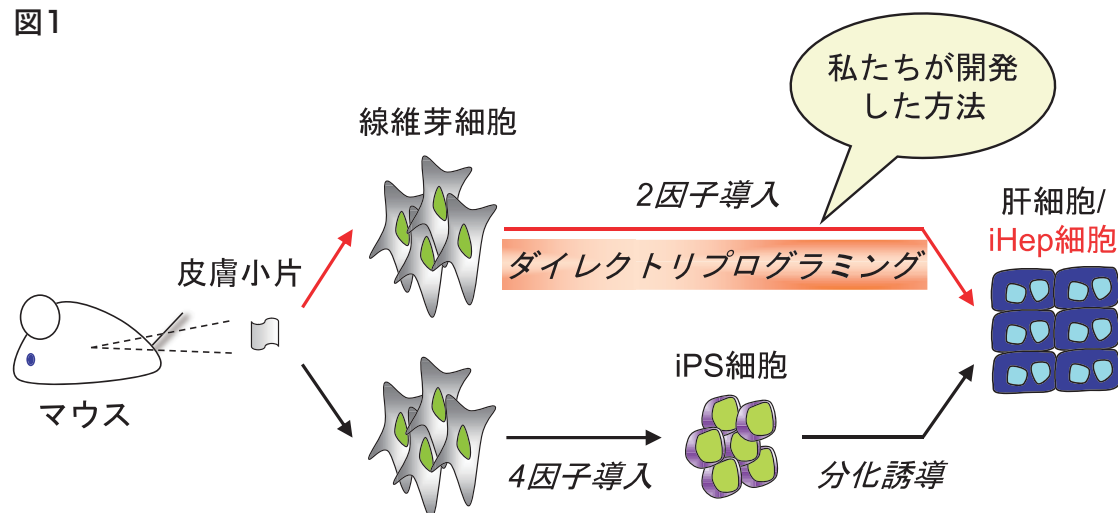


1. 背景と目的

突発的に発症する劇症肝炎は大量の肝細胞が急激に死滅することにより肝機能不全に陥る致死性の高い疾患であるが、肝臓は強い再生能力を持った臓器であるため、死滅した肝細胞が再生するまでの間、肝細胞移植や人工肝臓などで肝機能を補助することができれば、肝臓の自然再生によって危機的な状況を脱することができる。ところが、肝細胞は生体外で維持・保存することが極めて難しいため、肝細胞を使った肝機能補助を実現するためには、肝細胞を供給可能な細胞源が必要である。

肝細胞は多くの転写因子の働きによって胎生期に肝前駆細胞から分化するのが普通だが、稀に、障害を受けた膵臓の外分泌細胞や骨髄などに含まれる間葉系幹細胞から肝細胞が分化することがある。また、骨髄移植後に血液細胞が肝細胞と融合し、肝細胞として肝臓組織を構築することもある。これらの事象は、肝細胞以外の細胞を肝細胞に変化させる因子の存在を示唆しており、ある環境下ではそれらの因子が活性化して肝細胞以外の細胞を肝細胞に変化させていると考えられる。したがって、もし、このような肝細胞の運命決定因子を同定することができれば、それらを使って皮膚の線維芽細胞を肝細胞へと直接変化させることが可能になるかもしれない。そこでわれわれは、肝細胞の運命決定を担う特定因子を同定し、マウスの線維芽細胞から肝細胞を直接作り出すことを試みた。その結果、線維芽細胞にHnf4 α とFoxa (Foxa1、Foxa2、Foxa3のいずれかひとつ) という肝細胞分化に関連した2種類の転写因子を導入することで、線維芽細胞を肝細胞の性質をもった細胞 (iHep細胞) へと直接変化させることに成功し、肝細胞の運命決定因子を同定した (Sekiya and Suzuki, *Nature*, 2011) (図1)。

図1



作製したiHep細胞は肝細胞の形態的特徴や遺伝子・タンパク質発現を有し、肝細胞特有の機能をもったまま培養下での増殖や維持、凍結保存が可能であった。また、肝機能不全で死に至る高チロシン血症モデルマウスの肝臓へiHep細胞を移植すると、肝細胞として障害を受けた肝臓組織を機能的に再構築し、マウスの致死率を大幅に減少させることが可能であった。このように、皮膚から作製できて増殖や保存が可能なiHep細胞は、ヒトに応用された場合、機能的な肝細胞として医療への応用が期待される。

以上を踏まえ、本研究では、マウスの皮膚から作製したiHep細胞を劇症肝炎モデルマウスの肝臓へ移植することで、その治療効果を検証し、ヒト皮膚由来のiHep細胞を用いた劇症肝炎治療の基盤研究を行った。

2. 結果と考察

まず、マウス胎仔及び成体マウスの皮膚組織から分離・培養した線維芽細胞に対し、肝細胞の運命決定因子として同定したHnf4aとFoxaをレトロウイルスによって導入し、コラーゲンや肝細胞増殖因子を含む肝細胞分化に適した培養環境を提供することで、それぞれの細胞からiHep細胞を作製した。また、同時にiHep細胞を緑色蛍光タンパク質（GFP）によって標識した。作製したiHep細胞を解析したところ、肝細胞の形態的特徴や遺伝子・タンパク質発現を有することが確認された。

次に、四塩化炭素投与によって劇症肝炎を誘導したマウスに対し、線維芽細胞もしくは作製したiHep細胞を門脈経由で肝臓に移植した。その結果、線維芽細胞をそのまま移植したコントロール群に対し、iHep細胞を移植した群においては、マウス生存率の改善が認められた。また、肝臓の組織解析を行ったところ、iHep細胞由来のGFP陽性細胞による肝臓の組織構築が観察された。

本研究の結果を踏まえ、今後は、レシピエントマウスの生存率や肝機能の解析をさらに進めるとともに、レシピエントマウスを長期的にフォローすることで、腫瘍形成の有無についても解析を行う。われわれは、現在、ヒトの皮膚組織から分離・培養した線維芽細胞からもiHep細胞の作製を進めている。そのため、ヒト皮膚細胞に由来するiHep細胞の作製が成功した際には、マウスでの実験をさらに発展させ、四塩化炭素投与によって劇症肝炎を誘導した免疫不全マウスの肝臓へヒトiHep細胞を移植する。そして、マウスiHep細胞に加え、ヒトiHep細胞が劇症肝炎に対する治療効果を有するか否かを、レシピエントマウスの生存率や肝臓の組織学的解析によって検証したいと考えている。

3. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人難病医学研究財団より研究助成のご支援を賜りましたことを心より感謝申し上げます。

テロメア・テロメラーゼ関連因子による 骨髄不全疾患の発症機構

慶應義塾大学医学研究科発生・分化生物学 日本学術振興会特別研究員RPD

仁田 英里子



再生不良性貧血は骨髄低形成の為に汎血球減少を来たす一つの症候群で、特に中等症以上の症例では輸血に依存し、感染や出血のため致命的となる重要な疾患である。その大部分は原因不明の特発性再生不良性貧血で、造血機能が低下する機序として造血幹細胞自身の質的異常と、免疫学的機序による造血幹細胞の傷害が考えられているが、その根本的な発症機構は解明されていない。

近年では抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリンなどの免疫抑制療法によって約7割に寛解が得られその長期生存率は90%に達し、またHLA一致同胞からの同種造血幹細胞移植では90%以上の長期生存率が得られている。しかし超重症例では感染をコントロールできず治療の機会も得られないまま死に至る症例が現在も少なくなく、再生不良性貧血という疾患の重要性を物語っている。

再生不良性貧血は除外診断であるため、類縁の骨髄不全を来たす疾患を含め多彩な発症機構の症例が混在していると考えられ、免疫抑制療法によく反応し治癒が得られる症例が多い一方で、全く治療に反応しない症例も多く認められる要因である。その背景には疾患の成因が明らかでないことがあり、長期生存が期待できる治療が得られる現在こそ、発症機構の解明は急務と考えられる。

研究の目的

先天性の骨髄不全症を来たす疾患のひとつであるdyskeratosis congenita (DKC) の原因遺伝子はいずれも、テロメラーゼ複合体という染色体末端でテロメアを構成する複数のタンパク質を構成する分子である。最近では後天性の再生不良性貧血やMDSにおいてもテロメラーゼ複合体遺伝子の変異を持つ症例が報告されるなど、骨髄不全の成因にテロメラーゼ複合体の関与が注目されている。

テロメラーゼ複合体における逆転写酵素タンパク質本体であるtelomerase reverse transcriptase (TERT) は分化した細胞では発現が見られず生殖細胞や幹細胞に限られる分子であり、造血幹細胞活性の維持に重要な役割を担うと考えられるが、その詳細は未だ明らかでない。我々はこの幹細胞制御の鍵分子であるTERTを切り口としてTERTが司る造血幹細胞制御の分子機構を明らかにすることで、テロメラーゼ複合体の異常が関与する骨髄不全疾患の発症機構に迫ることを目的として研究を進めた。

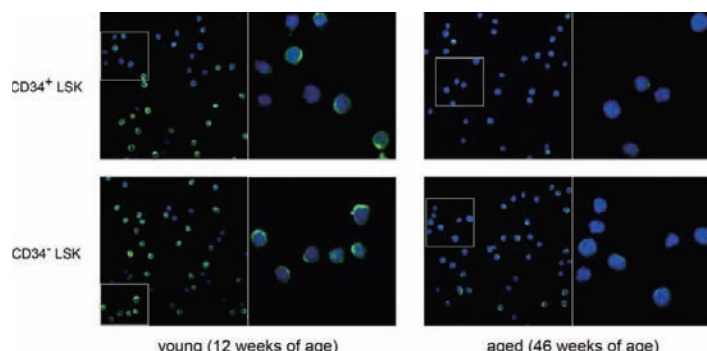
研究結果

我々はこれまで日本国内で樹立されたTERTノックアウトマウスを用いて個体レベルにおけるTERTの造血幹細胞制御機構を解析し、活性酸素種の蓄積を生じる遺伝子改変マウスと掛け合わせると造血幹細胞のアポトーシスが亢進し、結果として造血幹細胞能が低下するばかりでなく造血組織の老化を来たしマウス個体の寿命まで短縮することを明らかにした。

アポトーシスはプログラムされた細胞死とも言われ、不要な細胞や傷害を受け生存に不利な細胞を排除する機構である。再生不良性貧血症例の造血幹細胞でもアポトーシスの亢進を認めるなど骨髄不

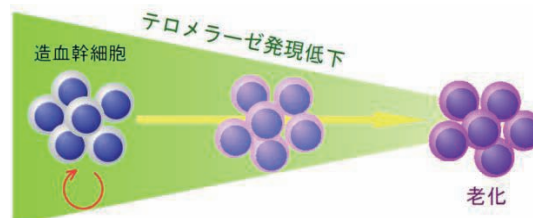
全疾患のうち造血幹細胞のアポトーシスが発症機序に関与しているものが少なからずあると推測されており、TERTによる造血幹細胞のアポトーシス防御機構が再生不良性貧血の成因に繋がると考えられる。さらに細胞学的・分子生物学的に検討した結果、TERTは造血幹細胞を活性酸素の蓄積により惹起されるアポトーシスから防御することを証明し、この機構にはTERTによるアポトーシス抑制因子BCL-2の発現維持が関与することを示した。

我々はまた造血幹細胞において老化に伴いTERT発現が低下することを明らかにし(図)、TERTの発現低下が幹細胞機能減弱の鍵を担う可能性を示唆した。そこでこの



図：TERTの蛍光タンパク質(緑色)が、老齢マウス造血幹細胞では減弱している

仮説を基に、定量リアルタイムPCRを用いて若齢と老齢の野生型マウス造血幹細胞で遺伝子発現の比較解析を行うと同時に、TERTノックアウトマウス造血幹細胞も解析し、結果を比較することでTERTに制御されるアポトーシス制御因子や幹細胞制御因子を探索した。まず個体差を考慮し個体別に造血幹細胞を回収して解析したが、予想以上に個体間での遺伝子発現の差が大きく、結論を得ることができなかった。これは同じ造血幹細胞として回収された細胞集団の中でも細胞間での差異があるためと考え、今後、1細胞毎の遺伝子発現解析を予定している。



また我々は異なる側面からのTERTによる造血幹細胞制御機構へのアプローチとしてTERTと結合して細胞内で複合体を作る既知のタンパク質に着目し、現在それらによる造血幹細胞制御を確認している。そのひとつである核小体タンパク質Nucleostemin (NS) をノックダウンし発現を抑制すると造血幹細胞が維持できなくなることを解明し、その細胞学的機構について現在解析を進めている。また他のTERT結合タンパク質でも造血幹細胞維持に重要であることを明らかにしており、今後TERTを中心としたタンパク質複合体による造血幹細胞制御について研究を進める。

今後の研究の発展

今後これらの研究を発展させ、テロメラーゼ複合体とくにTERTが司る造血幹細胞のアポトーシス制御、造血幹細胞制御因子、複合体によるダイナミックな制御機構などの詳細について解明することにより、生理的機構の破綻により発症する幹細胞病とも言える再生不良性貧血を始めとした骨髄不全疾患の成因解明の一助を得ると考える。

骨髓異形成症候群における細胞代謝と ヒドロキシメチル化シトシン定量の調査研究

筑波大学医学医療系血液内科 准教授 坂田 麻実子



【研究の背景】

骨髓異形成症候群とは造血不全（正常に血液をつくれなくなる）と白血病化（白血病という血液のがんを発症する）を特徴とする難治性疾患です。高齢者に発症することが多いため、高齢化社会が進むにつれて、次第に患者数が増加しています。

骨髓異形成症候群は、ゲノムDNAとエピゲノム（ゲノムDNAあるいはヒストン修飾）の異常が総合して生じると考えられています。したがって、骨髓異形成症候群が加齢に伴って発症率が高くなるのは、加齢とともにこうしたゲノムDNA、エピゲノムDNA異常が次第に蓄積していくためと一般には考えられています。エピゲノム異常については、がん抑制遺伝子領域におけるシトシンDNAの異常なメチル化集積による転写抑制が最もよく研究されてきましたが、メチル化シトシンが集積するメカニズムは、長い間、明らかではありませんでした。こうした中、一昨年骨髓異形成症候群において、TET2（tet oncology family member2）遺伝子の機能欠損型変異が約20%～40%の症例でみられることが報告されました。TET2遺伝子はメチル化シトシンをヒドロキシメチル化シトシンへ変換する酵素をコードすることが明らかにされており、TET2遺伝子変異があるとDNA修飾に異常がきたしこのために骨髓異形成症候群の発症に至ると考えられています。しかしながら、残りの60-80%の症例では、TET2遺伝子の変異はみられません。このことから、少なくともTET2遺伝子変異以外のエピゲノム異常、さらには腫瘍発症のメカニズムが存在すると考えられます。

【研究方法】

骨髓異形成症候群やその背景となる加齢によるエピゲノム修飾への影響を明らかにするためにヒドロキシメチル化シトシン定量的解析をDot blot法により行いました。さらには、細胞代謝を中心とした「遺伝子異常以外のメカニズム」によりエピゲノム異常が生じるメカニズムを解析しました。

[結 果]

末梢血中の単核球および分離したT細胞において、加齢によるヒドロキシメチル化シトシン量は減少していました（図1）。一方、今回の研究では、当初の予想していた細胞代謝物質の一つである α ケトグルタル酸とヒドロキシメチル化シトシン量の相関を得ることはできませんでした。しかしながら、エピゲノム調節遺伝子Xの遺伝子発現量は減少していました（図2）。

図1

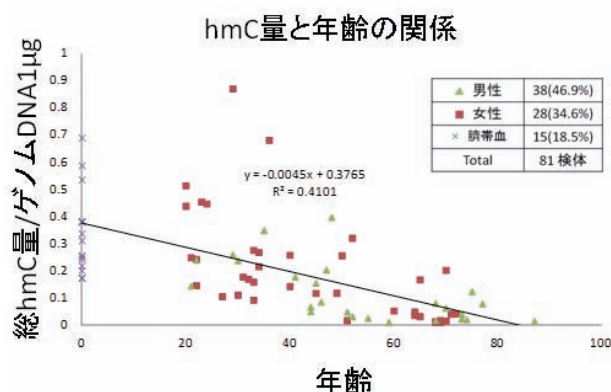
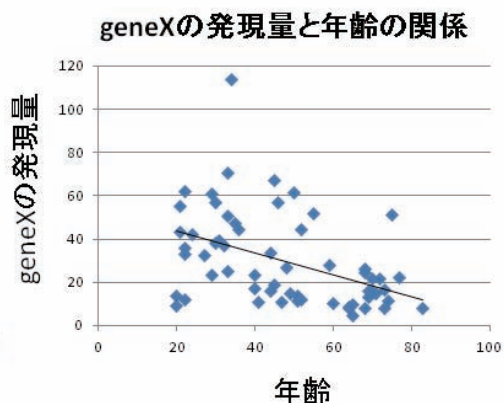


図2



[考 察]

本研究から、ヒドロキシメチル化シトシン量は骨髄異形成症候群の素因となる加齢変化の段階から減少していることが明らかとなりました。この研究は、当初予想していた細胞代謝ではありませんでしたが、遺伝子異常以外の仕組みによりヒドロキシメチル化シトシン量の調節異常をおこす新たなメカニズムを明らかにすることができました。

本研究は平成23年度医学研究奨励助成金のサポートで行いました。貴重な援助をいただきました公益財団法人難病医学研究財団の関係者の皆様に深く感謝を申し上げます。



拡張型心筋症に対する新規診断法と治療法の開発に向けた探索的研究



大阪大学大学院医学系研究科外科学講座心臓血管外科学 助教 福 富 五月

【研究の背景】

拡張型心筋症は、あらゆる年齢に起こりうる原因不明の心疾患であり、進行性に心不全を呈し最終的には死に至る難治性疾患です。これに対する治療として心臓移植が最も有効であることが示されてきましたが、罹患患者数に比べて提供ドナー数が圧倒的に少ないのが現状であり、心臓移植のみでは本疾患を克服できないことは明確です。補助人工心臓も本疾患に対して有効であることが示されており、特に植込み型の人工心臓は技術革新が重ねられ、健常人とほぼ同等の日常生活を過ごすことができるまで進化してきました。しかしながら、現行の医療保険制度において、植込み型人工心臓を用いることができるのは心臓移植待機患者に限られており、罹患患者全てに適応される治療ではありません。著者が所属している施設においても、末期的拡張型心筋症の治療として、本邦の多施設に先駆けて心臓移植、補助人工心臓を積極的に行い、世界的にも認められる良い成績を挙げてきましたが、同時にドナー不足、感染、拒絶反応などこれら置換型治療の限界を痛感しています。

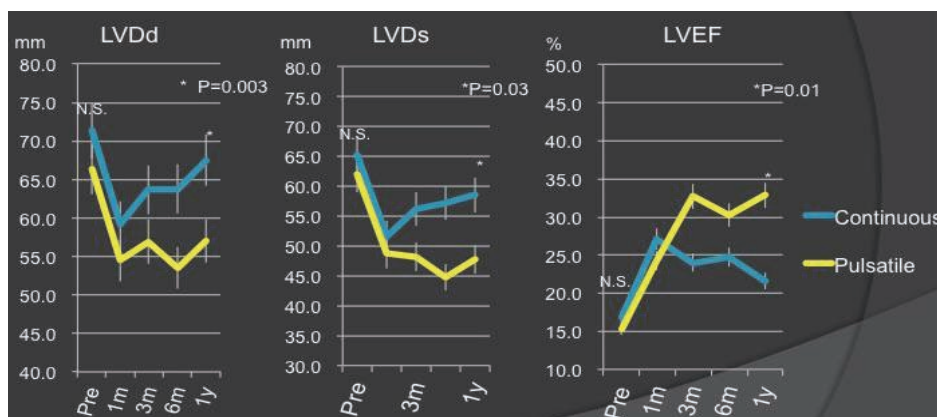
一方で当施設では、補助人工心臓装着中に自己治癒機転が効果的に働き、心機能が向上し人工心臓離脱に至り、ほぼ普通の日常生活に回復する症例にしばしば遭遇してきました。そして、この心機能の回復には心筋の間質の線維化や血管数が関与していることを示し、細胞移植に代表される再生型治療が線維化の軽減や血管数の増加といった自己治癒機転をより効果的に働かせることを、主に動物実験を通じて証明してきました。そこで本研究では、植込み型人工心臓を装着し、その後心臓移植に到達した拡張型心筋症症例の特に心筋間質における微小血管の数や形態などを検証することにより、植込み型人工心臓による心臓の負荷の軽減が、如何に自己治癒機転に影響を及ぼすかを検討しました。また、線維化や微小血管の構成を支配していると考えられているmicroRNAに着目し、人工心臓装着前後における変化を検討しました。

【結 果】

1. 植込み型人工心臓装着により末期的拡張型心筋症の心機能が向上する

末期的拡張型心筋症に対して、拍動型あるいは非拍動型の植込み型人工心臓を装着し心臓移植に到達した24症例の、人工心臓装着中の心機能を心臓超音波検査にて計測し、その変化を統計学的に解析したところ、程度の差はあるものの拍動型、非拍動型ともに、左心室駆出率の増加、左心室内腔の狭小化が認められました【図1】。

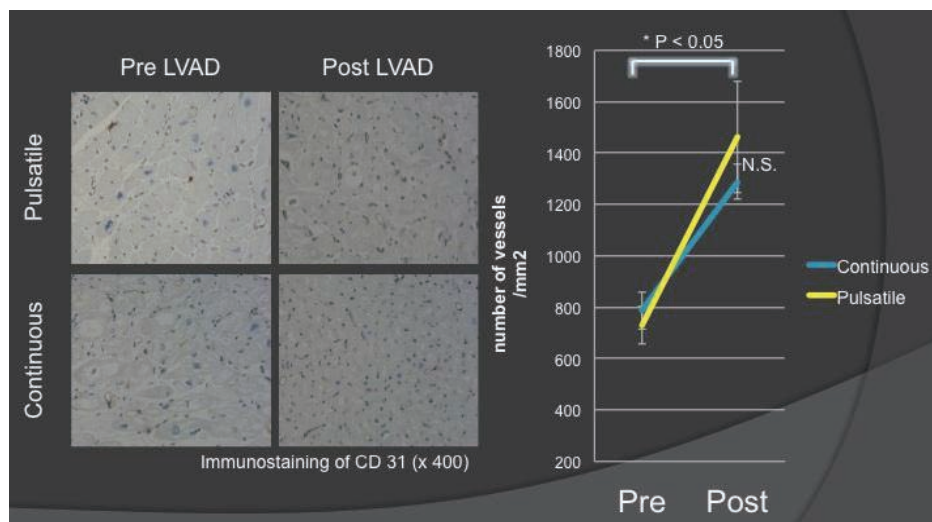
図1 LVDd; 左心室拡張期径、LVDs; 左心室収縮期径、LVEF; 左心室駆出率、Continuous; 非拍動型、Pulsatile; 拍動型、Pre; 人工心臓装着前、m; 月、y; 年



2. 植込み型人工心臓装着により心筋微小血管数が増加する

これらの症例の人工心臓装着時および心臓移植時の心筋を採取し、免疫染色後に顕微鏡検査を行い微小血管の数を測定したところ、人工心臓補助中に血管数が顕著に増加することがわかりました【図2】。すなわち、人工心臓を装着し心臓への負荷を減らすことにより、心臓を還流する血流が増加しこれが心機能向上をもたらすと考えられました。

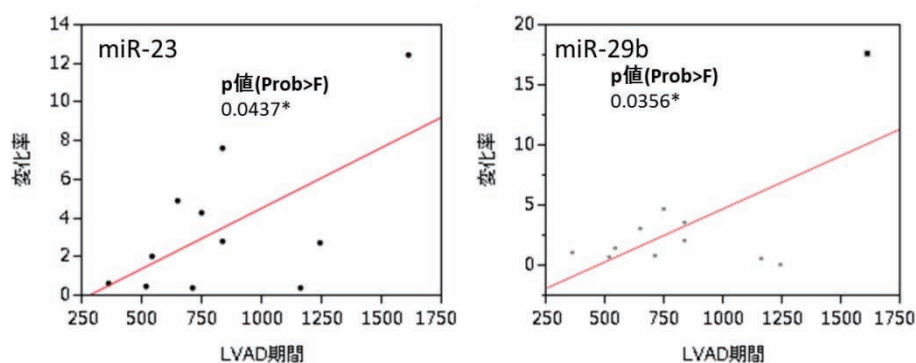
図2



3. 心機能向上とmicroRNA発現との間に相関が存在する

同様に人工心臓装着前後における、microRNAの発現をMicroArray法およびreal-time PCR法にて計測しその変化率と、人工心臓装着期間との関係を解析すると、miR-23p, miR-29bにおいて統計学的に有意な相関を示しました【図3】。

図3 LVAD; 左室補助人工心臓



【まとめ】

当施設における末期的拡張型心筋症に対する補助人工心臓装着中の心筋の変化を様々な手法を用いて検討したところ、補助人工心臓装着により心機能、血管数、microRNAなど様々な因子がダイナミックに変化することがわかりました。これらをより詳細に検討することにより、拡張型心筋症の自己治癒機転を解明し、それを元にした治療を開発することができると考えられました。

Mendelian susceptibility to mycobacterial diseasesの 早期診断法の確立および新規遺伝子検索の試み



九州大学病院 助教 保科 隆之

【研究の背景と目的】

結核菌などの抗酸菌をはじめとする細胞内寄生菌に対して選択的に易感染性を示す症候群は、Mendelian susceptibility to mycobacterial disease (MSMD, MIM209950) と総称されている。臨床的にはBCG菌をはじめとする非結核性抗酸菌による難治性、再発性の感染症が特徴である。細胞内寄生菌に対する免疫応答には、主にマクロファージや樹状細胞が関与しており、細菌が侵入すると、これらの細胞よりinterleukin (IL)-12が分泌され、T細胞などに発現しているIL-12受容体に結合する。続いて、IL-12受容体を介したシグナルと提示された抗原によるT細胞受容体からのシグナルによりinterferon (IFN)- γ が分泌され、マクロファージ上のIFN- γ 受容体に結合する。その結果、細胞内のsignal transducer and activator of transcription (STAT)-1がリン酸化され、核内に移行し、tumor necrosis factor (TNF)- α 、IL-12などの遺伝子が発現し、貪食細胞が活性化され、抗酸菌排除が誘導される。このIFN- γ /IL-12経路の先天的な免疫異常により、細胞内寄生菌に対し易感染性を呈する。現在までに、IFN- γ receptor 1 (IFN- γ R1)、IFN- γ R2、IL-12p40、IL-12 receptor β 1 (IL-12R β 1)、STAT-1の5分子の遺伝子異常が報告されてきたが、近年さらに、CD40を介したnuclear factor (NF)- κ B経路の活性化に関与している分子であるNF- κ B-essential Modulator (NEMO)、顆粒球やマクロファージおよび樹状細胞の分化に関与するInterferon regulatory factor 8 (IRF8) およびマクロファージによる貪食に関連しているNADPH oxidaseのサブユニットであるgp91phoxをコードしているCYBBの遺伝子異常でも細胞内寄生菌に対し易感染性を示すことが明らかになっている。

過去に日本におけるMSMDの臨床的特徴および遺伝的背景に関する検討は行われておらず、早期診断のためのスクリーニングも行われていない。本研究は、日本におけるMSMDの疫学の検討および遺伝子異常の早期スクリーニングの確立を行うことを目的とした。

【日本のMSMDに関する疫学研究】

BCG菌をはじめとした非結核性抗酸菌感染と診断した46例について検討した。この46例の起炎菌としてはBCG菌が最も多かった(表1)。患者は男性が多く、細胞内寄生菌による感染症が原因で死亡した症例はいなかった。遺伝子異常を認めたのは7例であり、IFN- γ R1異常症が6例、NEMO異常症例が1例だった(表2)。これらの症例のうち6例(85.7%)は、抗酸菌感染症に複数回罹患しており、骨髓炎を発症した6症例では、病巣が複数だった。このことから、遺伝子異常を認めた症例は、認めなかった症例と比較して重篤であることが示唆された(表3)。

表1 起炎菌の内訳と感染巣

	遺伝子異常あり No. (%)	遺伝子異常なし No. (%)	合計 No. (%)
起炎菌*			
BCG	3 (42.9)	35 (89.7)	38 (82.6)
<i>M. avium</i> complex	1 (14.3)	3 (10.2)	4 (8.7)
BCG + <i>M. avium</i> complex	2 (28.5)	0 (0)	2 (4.3)
<i>M. avium</i> complex + <i>M. tuberculosis</i>	1 (14.3)	1 (2.6)	2 (4.3)
感染巣**			
osteomyelitis/arthritis	7 (43.8)	24 (55.8)	31 (52.5)
lymphadenitis	8 (50.0)	8 (18.6)	16 (27.1)
dermatitis/subcutaneous abscess	3 (18.8)	11 (25.6)	14 (23.7)
pulmonary abscess	0 (0)	2 (4.7)	2 (3.4)

* 遺伝子異常あり群は7例、遺伝子変異なし群は39例

** 合計59エピソード(遺伝子異常あり群16、遺伝子異常なし群43)

表2 遺伝子変異を認めた症例の特徴

症例	性別	診断時 年齢	発症 年齢	診断までの感染歴	遺伝子異常
1	男	1y9m	8m	BCGリンパ節炎、肝腫大 BCG多発骨髓炎	<i>IFNGR1</i> 818del4
2	男	41y	36y	結核性リンパ節炎2回 MAC多発骨髓炎	<i>IFNGR1</i> 818del4
3	男	2y	2y	BCG多発骨髓炎	<i>IFNGR1</i> 818del4
4	女	1y7m	10m	BCGリンパ節炎、皮膚炎 BCG多発骨髓炎	<i>IFNGR1</i> 811del4
5	男	19y	4m	BCG皮膚炎、リンパ節炎 BCG多発骨髓炎 MAC皮下膿瘍、骨髓炎	<i>IFNGR1</i> E278X
6	女	12y	6m	BCGリンパ節炎 MAC多発骨髓炎	<i>IFNGR1</i> 774del4
7	男	10y	10m	結核性リンパ節炎 非結核性抗酸菌症 MAC多発リンパ節炎 敗血症、肺炎4回頸部リンパ節炎2回	<i>NEMO</i> E315Q

症例2は症例1の父親

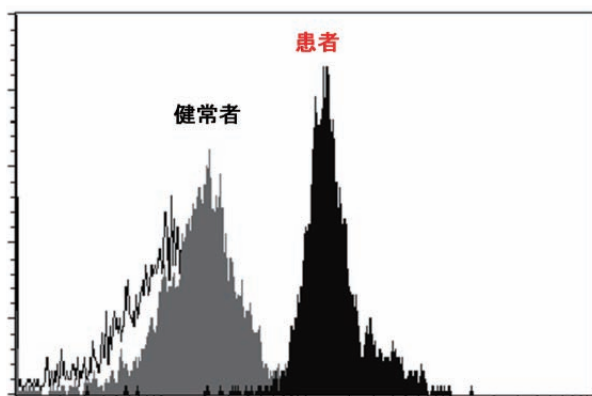
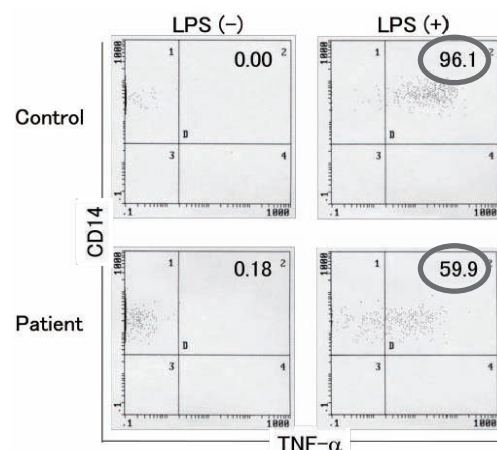
表3 遺伝子変異の有無による違い

	遺伝子変異あり (n=7)	遺伝子変異なし (n=39)
発症年齢	10 (4-36)	14 (4-75)
男女比	2.5: 1	1.8: 1
家族歴あり(人)	2	0
発症までの期間 (BCG感染症例)	9.5 (7-15, n=4)	10 (1-46, n=35)
複数罹患歴あり(%)	85.7*	7.7
骨髓炎多発病変例(%)	100* (n=6)	4.2 (n=24)

* $p < 0.001$

【MSMD患者における遺伝子異常の早期スクリーニング】

IFN- γ R1異常症と診断した症例では、単球/マクロファージ表面のIFN- γ R1の高発現を認める。また、NEMO異常症と診断した症例では、lipopolysaccharide刺激後の単球/マクロファージからのTNF- α 産生能が低下している。これらをフローサイトメトリーで確認し、両遺伝子異常の早期スクリーニング法を確立した（図1、2）。

図1 単球表面のIFN- γ R1発現図2 LPS刺激による単球内TNF- α 産生能

これらに加えて、IL-12R β 1異常症ではT細胞表面のIL-12R β 1の発現が低下していることをフローサイトメトリーで確認する方法を確立し、IFN- γ レセプターおよびIL-12レセプターからのシグナル伝達にかかわる蛋白のリン酸化を検出することによる診断法も開発したが、本研究期間中にこれらの方法でスクリーニングを行い遺伝子異常が新たに判明した症例はいなかった。

【新規MSMD原因遺伝子の検索】

我々は、MSMDと診断された症例の中で、既知の遺伝子異常を認めなかった症例について、cDNAマイクロアレイを用いた末梢血単核球mRNA発現の網羅的な解析を行い、これらの症例において発現が特異的に亢進または低下している分子を同定し、その結果を基に新しい原因遺伝子を解明することを計画したが、新たな遺伝子異常を同定することはできなかった。

肺線維症・上皮間葉転換を制御するマイクロRNAの探索と新規治療法の開拓



宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野 助教 柳 重久

研究の背景

特発性肺線維症（IPF）は原因不明の肺線維増殖性疾患で、進行性の呼吸不全を来し、予後不良である。急性肺損傷（ALI）は、敗血症など種々の病態を誘因として発症し、急速に重篤な呼吸不全に陥る難治性疾患である。IPFとALIに対する既存の薬物療法に有効性はなく、いずれの疾患も高い致死率を呈することから、両病態の解明と有効な治療法の開発は喫緊の医療課題である。正常肺では、肺胞上皮細胞（AEC）が互いにタイトに結合した強固なバリアーとして存在し、液性成分や蛋白質が肺胞腔内に滲みださないように隔てている。AECの損傷と修復異常がIPFとALIの発症および進展機構に重要とされている。しかしながら、AECバリアーの制御機構や制御分子については明らかにされていない。癌抑制遺伝子PtenはPI3K/Akt経路を負に制御する脂質ホスファターゼである。これまでに、上皮細胞Pten発現の臓器線維化における役割はわかっていない。本研究では、AEC特異的Pten欠損マウスを用いてALI/肺線維症モデルを作成し、ALI/肺線維症発症制御におけるAEC-Ptenの役割を解析した。

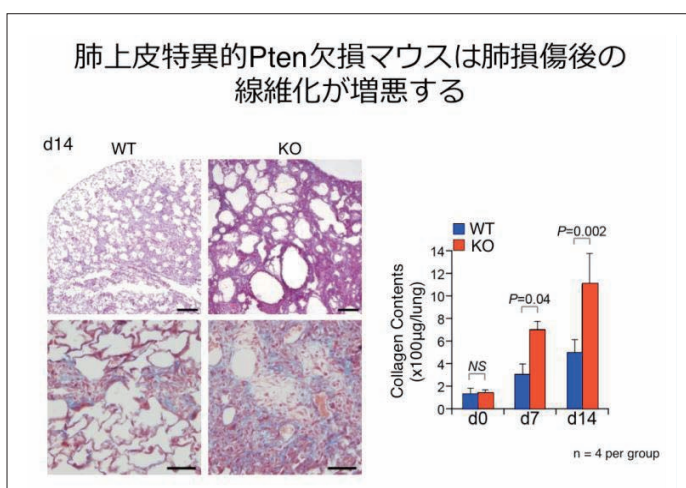
研究成果

1. AECでのPten発現はALIと肺線維症の発症制御に必須である。

AEC特異的Pten欠損マウスと野生型マウスにブレオマイシンを気管内投与した結果、AEC特異的Pten欠損マウスは野生型と比較して著明な低酸素血症により早期に死亡した。Pten欠損マウスの肺組織において広範な肺水腫と肺構築破壊を伴う線維化がみられた。

2. AECでのPten欠損は肺損傷後のAECタイトジャンクション破綻と基底膜破綻を増悪させる。

肺損傷後の肺組織において、アポトーシス細胞数は野生型とPten欠損マウスとで差が見られなかった。一方、電顕像にて肺損傷後Pten欠損マウスのAEC細胞間の解離がみられ、claudin-4, ZO-1, occludin等のタイトジャンクション構成蛋白の発現が低下していた。Pten欠損マウスでは野生型と比較して肺損傷後の基底膜断裂が増悪していた。In vitroの解析について、lentivirusで野生型Pten遺伝子、dominant-negative Pten遺伝子を導入したヒト肺上皮由来細胞BEAS-2Bを作成し、上皮バリアー統合性を経上皮電気抵抗並びにclaudin-4, ZO-1発現にて解析した。野生型Pten遺伝子導入BEAS-2Bはcontrol vectorと比較してTGF-beta処理後の上皮バリアー統合



性保持が増強していたのに対し、dominant-negative Pten遺伝子導入BEAS-2BではTGF-beta処理後上皮バリアー統合性保持が著しく損なわれていた。

3. 肺損傷後修復期でのPten欠失は肺線維化を増悪させる。

Dox誘導性に肺損傷後にAECでPtenを欠損させたマウスでは、肺損傷早期相での肺水腫の程度は野生型と比べて差が無かった一方、ALIの遷延と線維化の増悪がみられた。以上の結果から、急性期のみならず修復期におけるAECでのPten欠損も肺線維症の進展に重要と考えられた。

4. AECでのPten欠損は肺損傷後のAEC由来myofibroblast数を増加させる。

AEC特異的にGFPにて標識したlineage tracingマウスを用いた解析の結果、Pten欠損マウスにおいて肺損傷後にAEC由来myofibroblast数の増加がみられた。

5. AEC特異的Pten欠損マウスにおいて、AEC由来fibroblastsは非AEC由来fibroblastsと比較して増殖能、遊走能、アポトーシス抵抗性が亢進する。

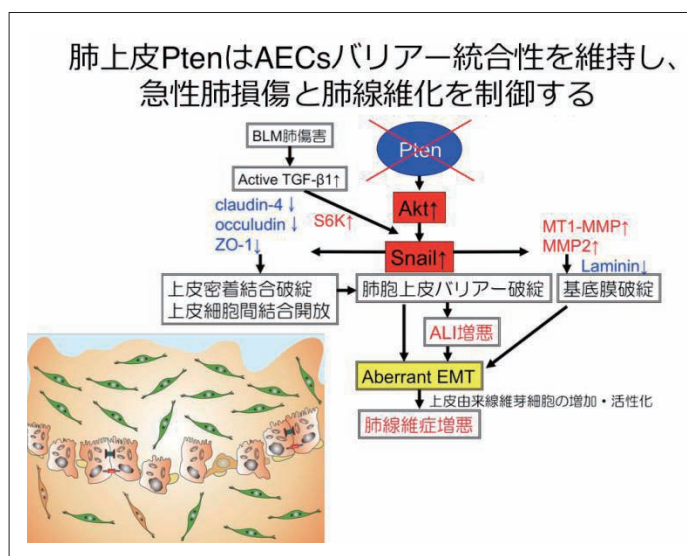
6. AEC特異的Pten欠損マウスにおけるAEC統合性関連分子の発現変化。

AEC特異的Pten欠損マウスの肺組織ならびに単離AECにおいて、AktとS6Kの活性化、SnailとMMP2とMT1-MMPの発現亢進がみられた。

7. Akt阻害剤投与によりAEC特異的Pten欠損マウスの肺損傷後のALIと肺線維化が軽減する。

ブレオマイシン気管内投与Pten欠損マウスに連日Akt阻害剤を腹腔内投与した結果、ALIと肺線維化が軽減し、生存率の改善がみられた。AECバリアー統合性も対照群と比較して保持されていた。

8. IPF患者肺組織のAECにおいてPten発現低下とAkt活性化がみられた。



結 語

AECバリアー統合性の保持、修復はALIやIPFの病態機構の理解にきわめて重要である。今回の我々の解析により、AECでのPten発現が上皮バリアー統合性・修復機構制御を介して、ALIや肺線維症の進展制御に重要な働きを有することが初めて明らかになった。AECでのPI3K/Pten/Akt経路はIPFやALIの治療標的になり得ることが示唆された (Yanagi, et al., *Am J Respir Crit Care Med* 187; 262-275, 2013)。本研究は、平成23年度医学研究奨励助成金のサポートで行うことができました。貴重な援助をいただきました公益財団法人 難病医学研究財団の関係者の皆様、ご寄付をいただいた方々に深く感謝を申し上げます。

2

平成25年度医学研究奨励助成事業の応募状況について

- (1) 一般枠 28件
- (2) 臨床枠 18件
- (3) 採択予定件数 一般枠と臨床枠合わせて10件
- (4) 受賞者選考結果は平成25年11月上旬申請者等に通知する。
- (5) 贈呈式 平成26年1月16日(木)

3

平成25年度国際シンポジウム事業計画概要

■ 会 議 名：色素性乾皮症とその関連疾患：DNA損傷応答異常疾患
ーベンチからベッドサイドまで

■ シンポジウム開催の趣旨：

色素性乾皮症(XP)、コケイン症候群(CS)、硫黄欠乏性毛髪発育異常症(TTD)などのDNA修復機構に異常をもつ疾患群ならびにその他、DNA損傷応答反応に異常をもつ難治性先天性疾患について発表、討議を行う。これら疾患群の原因遺伝子産物はすべてDNA修復をはじめとしたDNA損傷応答に関わっており、生物の恒常性を保つ上で、重要な働きを持つことがわかっているが、これら疾患群の病態の分子メカニズム、とりわけ予後に影響を与える神経症状の病態は全くわかっておらず、現状、効果的な治療法もない。これらの疾患にかかわる国内外の医師や医学研究者が一堂に会し、臨床的、基礎医学的な見地から発表、議論を行い、新しい診断法、治療法の開発、さらには重要な生命機能の発見に繋げることが期待される。

■ 主 催：公益財団法人難病医学研究財団
色素性乾皮症とその関連疾患国際シンポジウム実行委員会
〔実行委員長：錦織 千佳子(神戸大学大学院医学研究科 教授)〕

■ 後 援：厚生労働省
社団法人日本皮膚科学会
公益社団法人日本小児科学会



シンポジウムポスター

公益財団法人 難病医学研究財団

評議員 御子柴 克彦

(理化学研究所脳科学総合研究センター

発生神経生物研究チーム シニアチームリーダー)

「難病とは」

皆様は「難病」という言葉は日本人の発明であることをご存知でしょうか。Intractable diseaseという英語訳にしてもどうもしっくりしないようで、最近は海外の学会でも「なんびょう、Nanbyou」と云う言葉を使い始めています。

この新しい疾患概念を作れたのは日本の文化には他国とは違うユニークさをもっているからではないかと思います。宗教と文化とは深い関係にあります。外国は一神教であるのに対して、日本は多神教であり、全てをうけいれまとめあげます。その意味で日本は諸外国と異なる文化をもち考え方をしているといっていでしょう。原因が不明で治療法も確立していない疾病に対して「難病」という病気の概念を日本人が作り上げたわけです。

「難病の病因メカニズム解明と治療法の開発への日本人への期待」

日本にはすばらしいオリジナルな研究の歴史があります。日本が鎖国していた江戸時代に、数学を作り上げました。関孝和は、行列式、集結式を提案しました。暦の作成にあたって円周率の近似値をだしています。世界で最初に全身麻酔に成功した華岡青洲。日本の夏の風物詩である朝顔も江戸時代における品種改良。鯉の品種改良は日本の得意なところであり遺伝学を駆使した成果であります。「踊るネズミ」は突然変異マウスとして江戸時代に記載され、交配して家系図まで作成されています。米国のジャクソン研究所での突然変異マウスの研究よりも早いのです。全身麻酔も米国よりも早いのです。このように日本人にはオリジナルな研究を生み出す力があるので、ユニークな新しい取り組み方により、新しい視点からなかなか手ごわい相手である「難病」の原因究明と治療法の開発を必ずなしとげるものと考えております。是非若い研究者に期待したいところです。

「難病」の社会との関わり

難病と一般の他の病気との違いは病気の関係上、長期かつ重度の精神的、経済的負担を社会全体にもたらすことです。家族の負担は大変なものです。難病の患者さんの社会参加を支援しなければなりません。たとえ難病にかかっても地域で尊厳をもって生きられる社会を目指していく必要があります。

医療体制の整備が必要になるでしょう。すなわち「難病」は家族、社会を巻き込んだ形で存在することです。「難病」と云ってもその症状は多様ですので、官民が協力して社会全体として支援が公平に行われなければなりません。またその支援が継続されなければなりません。支援をする為には患者さんの病気の状態をきちんと把握する医療技術の向上、制度の向上と有効な活用をすることが必要となります。

まさに、全国規模で情報を共有し、各指定病院（特定機能病院）との緊密な連携が求められます。

まずは難病に対する普及啓蒙活動、相談・支援の充実、官民一体となった地域ネットワークの構築を始めなければなりません。

これらのことに対して、厚生労働省からは予算を計上して頂き、サポートして頂いている事は大変に心強いものです。私達の「難病財団」も微力ながら色々な立場から、厚生労働省と協力しながら、日本で確立した「難病」の本当の意味の研究が力強く推進され、何とか悲惨な難病を1日でも早く無くして克服していくために更に貢献していくつもりです。

⇒ 厚生労働省の難病対策に関する動向 ⇐

1. 制度関係

(1) 社会保障制度改革国民会議報告書～確かな社会保障を将来世代に伝えるための道筋～がとりまとめられた。(平成25年 8 月 6 日)

3 医療保険制度改革において(3) 難病対策等の改革が報告された。

(2) 「社会保障制度改革推進法第 4 条の規程に基づく「法制上の措置」の骨子について」が閣議決定された。(平成25年 8 月21日)

2 医療制度において、難病対策に係る必要な措置を講ずるための閣議決定がなされた。

(3) 平成26年度厚生労働省予算概算要求について

難病対策として、財務省に対して以下の要求がなされた。

○難病患者に対する支援の強化 【3.6億円】

難病患者やその家族の社会参加に資するよう、都道府県の難病相談・支援センターの相談体制を充実するとともに、難病に対する社会全体の理解を深めるための普及啓発を行う。

註) 詳細については、厚生労働省ホームページを参照してください。

2. 難病対策委員会関係

(1) 厚生科学審議会疾病対策部会難病対策委員会が次のとおり開催された。

○厚生科学審議会疾病対策部会第30回難病対策委員会 (平成25年 9 月 3 日)

○厚生科学審議会疾病対策部会第31回難病対策委員会 (平成25年 9 月12日)

(2) 第30回難病対策委員会では、「難病対策の改革に係る検討状況及び難病対策委員会の進め方について」「今後の難病対策の改革を進める上での論点について」の議論がなされた。

(3) 第31回難病対策委員会では、「難病対策に関する患者団体等との意見交換会でいただいた御意見について」「今後の難病対策の改革を進める上での論点について」の議論がなされた。

⇒ 厚生労働省難治性疾患克服研究事業(研究班)の動向 ⇐

○平成25年度 難治性疾患克服研究事業採択課題一覧を、当財団難病情報センターホームページに掲載。

詳細は、当財団難病情報センターホームページ (<http://www.nanbyou.or.jp/entry/3373>) 参照。

註）難病情報センターホームページへのアクセスが多い疾患の一つを取り上げました。

1. 疾患の概要

耳の病気を経験したこともない人が、明らかな原因もなく、あるとき突然に通常一側の耳が聞こえなくなる病気をいいます。

患者数は約35,000人、有病率は100万人当たり275.0人です（平成13年調査）。

50～60代に多く、男女差はありません。現時点で、遺伝しないと考えられています。

2. 原因

未だ解明されていませんが、原因説の有力なものが2つあります。

- ① ウイルス感染説
- ② 内耳循環障害説

上記が考えられていますが、今のところはっきりとした結論はありません。

3. 症状

突然耳が聞こえなくなると同時に、耳鳴りや耳が詰まった感じ、めまいや吐き気を生じることがあります。めまいは約半数の患者に認められますが、難聴がよくなったあとにめまいを繰り返すことはありません。また、耳以外の神経症状は認められません。

突発的に耳が聞こえなくなった、ということから、患者さんが発症の時期を覚えていることが多く、いつからか徐々に聞こえなくなったという難聴は、突発性難聴ではありません。

4. 治療法

最も有効な治療法が何かは明らかになっていません。

急性期の治療で重要なのは、安静です。ストレスを感じている場合が多く、心身ともに安静にすることで内耳循環障害が解消されることもあります。

ウイルス感染に対しては、副腎皮質ステロイドを用い、内耳循環障害には血管拡張薬、抗凝固薬などの薬剤治療と二酸化炭素ガスを吸引したりします。

再発することはありません。

（註）くわしくは、難病情報センターホームページを参照

<http://www.nanbyou.or.jp/entry/164>



賛助会員へのご加入及びご寄付のお願い

当財団は、主に難治性疾患等に関する調査研究及び研究奨励助成並びに関係情報の提供などを行っている公益財団法人であり、事業運営は、主に賛助会員による会費、一般の方々及び法人からの善意のご寄付並びに国庫補助金及び資産運用益によって賄われております。

円滑な事業運営により、難病で御苦勞をされておられる患者さん及びご家族のご期待にお応えするべく極力努力しております。

つきましては、皆様方のご理解とご支援、ご協力をお願い申し上げます。

■ご寄付について

ご寄付はすべて公益事業に使用いたします。

金額は問いませんので、当財団へご連絡をお願いいたします。

また、規程に基づき当財団からの感謝状の贈呈があります。

■寄付等に関する所得税、法人税、相続税の取り扱いについて

当財団は、公益財団法人となっており、寄付金及び賛助会費については、所得税、法人税、相続税の優遇措置が受けられます。なお、個人の所得税に関しては「所得控除」または「税額控除」を選択適用することが出来ます。

※詳しくは、納税地の税務署にお尋ね下さい。

■手続きについて

		寄付等の種類	申込手続き	お振込先
賛助会員 (年間)	法人 (団体)	1口 10万円 (1口以上何口でも結構です)	入会申込書 (ご送付いたします) ※当財団ホームページ からも申込書を ダウンロードできます	【三井住友銀行】 麹町支店 普通預金 No. 0141426 【みずほ銀行】 神田支店 普通預金 No. 1286266 【三菱東京 UFJ 銀行】 神田駅前支店 普通預金 No. 1125491 【郵便振替口座】 00140-1-261434 《口座名義人》 カネサキ・イノベーション 公益財団法人 カネサキ・イノベーション 難病医学研究財団
	個人	1口 1万円 (1口以上何口でも結構です)		
寄付 (随時)		金額は問いません	寄付申込書 (ご送付いたします) ※当財団ホームページ からも申込書を ダウンロードできます	

◎ご不明の点は、財団事務局までお問い合わせ下さい。

発行所 公益財団法人 難病医学研究財団

〒101-0063 東京都千代田区神田淡路町 1 丁目 7 番地
ひまわり神田ビル 2F

電 話 03 - 3257 - 9021

<http://www.nanbyou.jp>

【難病情報センター】

<http://www.nanbyou.or.jp>