

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	岩崎 智之
審査委員	主査 佐山 浩二 副査 白石 敦 副査 茂木 正樹 副査 中城 公一 副査 藤原 弘

論文名： ブラウ症候群/若年発症サルコイドーシスの発症機構の解明と
創薬に有用な無細胞 Nod2-ノドソームの再構成

審査結果の要旨：

[背景・目的]

若年発症サルコイドーシス(Early-onset sarcoidosis; EOS)は、関節炎・ぶどう膜炎・皮膚炎を3主徴とする慢性肉芽腫性炎症疾患である。1985年、EOSと酷似する臨床像を呈する常染色体優性遺伝形式の家族例がアメリカのブラウにより報告され、この疾患はブラウ症候群(Blau syndrome; BS)と命名された。その後2001年、BSに特異的な変異を生じる原因遺伝子としてNod2が同定された。2005年には、EOSにおいてもNOD2の変異がその責任遺伝子であることが証明されている。

Nod2はRICK/RIPK2/RIP2と呼ばれるアダプター分子と結合して、Nod2-ノドソームを構成し、細胞壁ペプチドグリカンの構成要素であるMuramyl dipeptide (MDP)を認識することにより、NF- κ Bを活性化する。BS/EOSにおける変異型Nod2はNF- κ Bの恒常的機能亢進型であることが、内外の多くの研究で明らかにされている。

しかしながら、BS/EOSに特異的な治療薬はなく、恒常的Nod2の活性化が肉芽腫を形成するメカニズムは未だに不明である。

そこで我々は、BS/EOSに特異的な治療薬の開発と分子プローブを探索する目的で、コムギ胚芽無細胞蛋白質合成技術により、野生型のNod2とBS/EOS疾患に特異的な変異をもつNod2およびRICKを合成し、試験管内に無細胞Nod2-ノドソームを再構成した。

[方法]

Nod2、RICKをコードする完全長cDNAをコムギ胚芽無細胞蛋白質合成用発現ベクターであるpEUベクターにサブクローニングし、ビオチン化Nod2 (Nod2-Btn)およびその変異体、FLAG標識RICK(FLAG-RICK)とその欠失体を重層法により合成した。合成の確認はイムノブロット法で行なった。Nod2とRICKの特異的結合を確認するため、Nod2-Btnをストレプトアビジンアガロースビーズでプルダウンし、抗FLAGモノクローナル抗体によるイムノブロット法により検出した。

次に、Nod2とRICK間の相互作用に関わる最小領域とされているカスパーゼリクルートメントドメイン(CARD)の Nod2-CARD1+CARD2(CARDs)、RICK-CARD、またBS/EOSの変異型Nod2であるNod2(R334W)とNod2(N670K)をコムギ胚芽無細胞蛋白質合成し、それぞれの蛋白質間の近接作用をAmplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay (ALPHA)によって検出した。

[結果と考察]

コムギ胚芽無細胞蛋白質合成法による Nod2-ノドソームの構成蛋白質の合成を確認した。

次に、Nod2-Btn と FLAG-RICK の反応生成物をストレプトアビジンアガロースビーズでプルダウンし、イムノブロット法で抗 FLAG モノクローナル抗体により検出した。その結果、MDP 存在下で FLAG-RICK が検出され、細胞を用いた先行研究で報告されている Nod2-RICK 間の相互作用に MDP が関与していることが無細胞合成系で確認できた。

次に、Nod2 と RICK の近接を検証するため ALPHA をおこなった。野生型の Nod2-Btn、FLAG-RICK に加え、Nod2-CARDs-Btn、FLAG-RICK-CARD を無細胞合成し、それぞれの組み合わせで ALPHA をおこなった。その結果、Nod2-CARDs-Btn と FLAG-RICK-CARD でのシグナルが最も高い数値を示し、CARD 領域による結合が示唆された。また MDP と MDP 構成成分や類似化合物の添加による比較では、MDP 添加においてのみ顕著なシグナル上昇が確認された。さらに BS/EOS における変異型 Nod2 と野生型 Nod2 で比較すると、野生型に比べ、疾患変異型 Nod2 は MDP 濃度依存的に、より高いシグナルが確認され、ALPHA による無細胞 Nod2-ノドソームの再構成が確認できた。

[結語]

無細胞 Nod2-ノドソームにおいて、MDP による相互作用の亢進、BS/EOS に関与する変異型 Nod2 での MDP 反応性の上昇が確認できた。これらから、新規治療薬の開発や特異的な分子プローブの探索に有用と考えられる無細胞試験管内 Nod2-ノドソームの構築に成功したと考える。

公開審査会は平成 28 年 12 月 19 日に開催され、申請者は研究内容を明快に発表し、以下の内容を含む多くの質問に対する確に応答した。主な質疑の内容として、1)クローン病を含めた他の Nod2 の変異に関して、2) ALPHA の解析方法に関して、3) EOS/Blau 症候群の臨床症状に関して、4) MDP による Nod2 と RICK の結合に関して、5) 試験管内と細胞質内での Nod2、RICK の反応性の相違に関して、などであった。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。