

令和 4 年 5 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08320

研究課題名(和文) 患者検体・iPS細胞を用いた様々なMEFV変異による自己炎症発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of autoinflammatory syndromes using patient samples and iPS cells caused by various MEFV variants

研究代表者

田中 孝之 (TANAKA, TAKAYUKI)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：20625678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞に、GFP で標識した MEFV 遺伝子を強制発現させ、刺激時の細胞死を、FCMで評価した。病原性変異である M694V変異は、正常のMEFV と比較して、強い細胞死を誘導した。これを用いて、32種類のMEFVバリエーションを評価したところ、バリエーションにより細胞死が異なった。階層的クラスタリングによりバリエーションは 6 つのクラスターに分類されこれまでの臨床的な情報ともよく関連していた。そのため、本検査法を用いることでMEFV バリエーションの病原性の有無が区別できることが示された。患者検体採取を必要としないMEFVバリエーション評価系を確立し、論文として公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家族性地中海熱の原因遺伝子であるMEFVは多種の遺伝子多型があり、検査で見付かっても評価が困難でしたが、MEFV多型を分類する手法を開発しました。特に患者さんの血液を必要とせず、実験室だけで完了することができる点が本法の利点です。MEFV遺伝子検査後にどう判断し、治療するかという場面において、それぞれのMEFV多型の意義を正確に判断できるようになり、臨床的にメリットが大きいと考えられます。

研究成果の概要(英文)：We evaluated cell death of THP-1 cells, a human monocytic cell line, after transfection of GFP-labelled various MEFV variants. Pathogenic M694V variant induced stronger cell death compared to WT MEFV. We evaluated 32 MEFV variants with this method. Hierarchical clustering divided the variants into 6 clusters. This grouping correlated well with clinical phenotypes of each variant. Therefore, we established a method of MEFV variants evaluation that does not need patient-derived samples, and published as a research paper.

研究分野：自己炎症性疾患

キーワード：家族性地中海熱 遺伝子検査 遺伝子多型 MEFV

1. 研究開始当初の背景

背景 パイリン(pyrin)はからだの中に侵入した特定の病原体や毒素を感知する自然免疫センサーの一つで、インフラマソームという巨大なタンパク複合体を形成します。病原体を感知したパイリンインフラマソームは活性化し、細胞にパイロトーシスという細胞死を引き起こしたり、IL-1 β という炎症を起こすサイトカインを放出したりして、病原体を排除するための炎症反応を引き起こします。パイリンは MEFV 遺伝子により作られますが、MEFV 遺伝子に変異がおきてその働きが過剰になる (=機能獲得型変異)ことで、体内において過剰な炎症が起こり家族性地中海熱などの pyrin-associated autoinflammatory diseases (PAADs)という自己炎症性疾患を発症します。次世代シーケンサーという新しい遺伝子解析機器が普及したことで、PAADs を疑われる患者さんに対して MEFV 遺伝子検査が行われる機会が増え、様々なバリエーションが検出されるようになりました。しかし、遺伝子検査で見つかったバリエーションは必ずしも病気と関係しているとは限らず、そのバリエーションが病原性を持つかどうかは慎重に判断する必要があります。長年、パイリンが実際にからだの中でどのように働いているかは不明であったため、MEFV 遺伝子にバリエーションが見つかったとしても、それが病気と関係するか否かを検査して判定する方法がありませんでした。そのため、現在報告されている 380 個を超える MEFV バリエーションの多くは意義不明の変異(variants of unknown significance; VOUS)に分類されており、MEFV 遺伝子にバリエーションが見つかったとしても本当に PAADs と診断してよいのか迷う場合があります。この数年でパイリンの働きが徐々に明らかとなり、2020 年から 2021 年にかけて、当科や海外の研究グループから、患者さんの血液細胞などの働きをみることで、PAADs かどうかを判定する検査法が報告されました。しかし、患者さんの血液細胞を使って確認するこれらの検査法には、血液の輸送条件や血液を採取したときの患者さんの状態によって結果が左右される懸念や、たくさんの量の血液が必要となるため、体格の小さい小児の患者さんではなかなか行いにくいなどの問題がありました。

2. 研究の目的

そのため、我々は患者さんの血液によらず、研究用の培養細胞を用いて MEFV バリエーションが実際に病気と関連しているかどうかを簡便かつ迅速に評価し分類する検査法を開発するため、今回の研究を計画しました。

3. 研究の方法

ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞に、GFP という蛍光色素で標識した MEFV 遺伝子を強制発現させ、UCN-01 あるいは TcdA というパイリンを活性化させる 2 つの薬剤で刺激し、フローサイトメトリー法を用いて刺激後に誘導される細胞死を評価しました。

4. 研究成果

よく知られた病原性変異である M694V 変異は、正常の MEFV と比較して、強い細胞死を誘導することがわかりました (図 1) 。

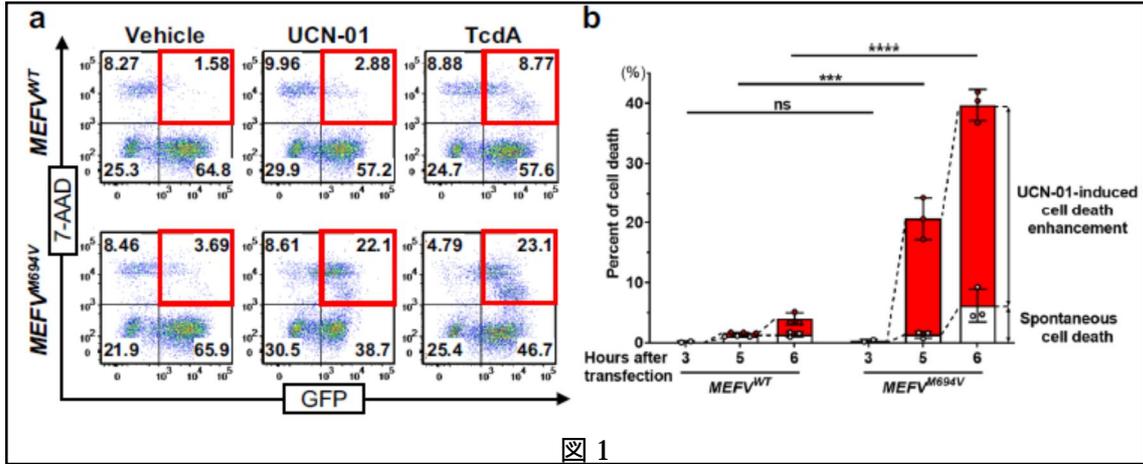


図 1

そして、この細胞死は インフラマソームが活性化した結果起こるパイロトーシスという特徴的な細胞死であることも明らかになりました。この検査法を用いて、これまで報告されている 32 種類の MEFV バリエントを評価したところ、誘導される細胞死の性質は、全てのバリエントで同じというわけではなく、バリエントの種類により少しずつ異なることがわかりました (図 2 : 無刺激でも細胞死が起こるもの、UCN-01 と TcdA 刺激どちらにも強く反応するもの、UCN-01 のみに反応するもの、いずれの刺激にも反応しないもの、

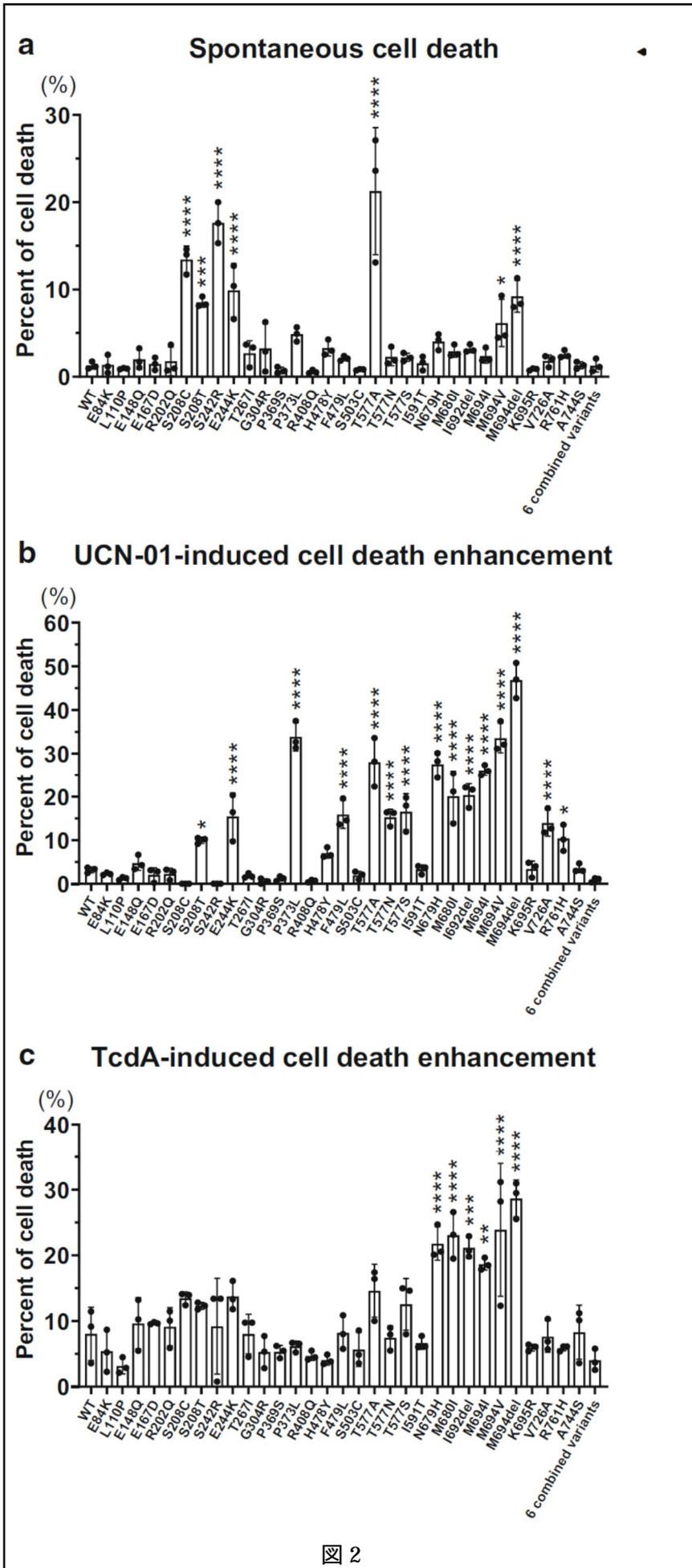


図 2

など)、この性質の違いを評価するため、階層的クラスタリングという統計学的手法を用い

で解析したところ、これらのバリエントは6つの異なる性質をもったクラスターに分類されることがわかりました(図3)。このクラスター分類は、各バリエントが患者さんにどのような症状を引き起こすかという、これまでの臨床的な情報ともよく関連していました。

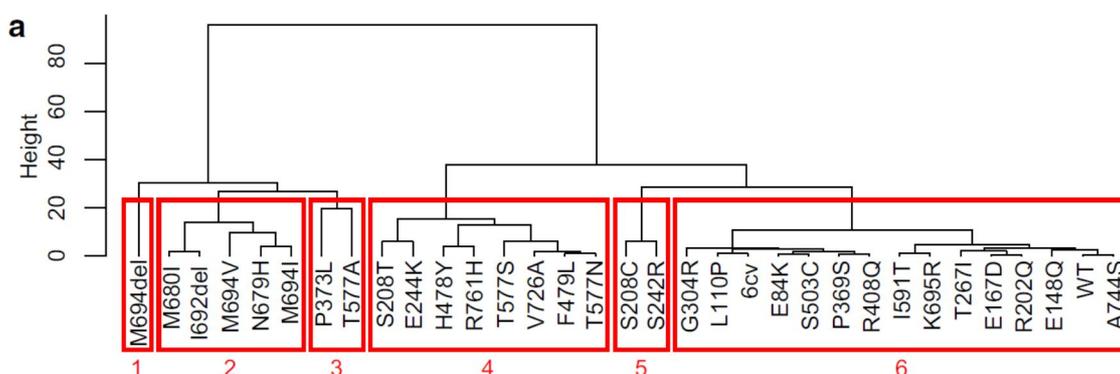


図3

そのため、本検査法を用いることで MEFV バリエントの病原性の有無が区別できるだけでなく、病原性の強弱や変異の性質も評価することが可能であることが示されました。さらに、これまで臨床報告のない MEFV バリエント (P257L 変異) がみつき、これが本当に病気と関係する変異であるか本検査法を用いて評価しました。すると、P257L 変異は正常の MEFV よりも THP1 に強い細胞死を引き起こすことがわかり、病原性変異と評価できました。この結果は、患者さんの血液を用いた他の PAADs 判定方法とも矛盾しないものでした。これらの検査結果をもとに、この患者さんは PAADs と診断され、コルヒチンや抗 IL-1 療法といった PAADs に有効な治療を受け、長年悩まれてきた様々な症状を和らげることができました。

波及効果として、本検査法は患者さんの治療状況や病状に左右されることなく MEFV バリエントの病原性を簡便かつ迅速に評価分類することができ、PAADs 患者さんの早期診断や病態解明に役立つ可能性があります。今後の課題としては、今回の研究では一つ一つのバリエントを個別に解析しているため、複数の遺伝子変異を同時に持つ場合の影響は不明です。また、遺伝的に均一な培養細胞を使って評価しているため、多様な遺伝的背景を持つ個々の患者さんの状況を完全に模倣しているとは言えず、本検査法のみでは病原性の判定が難しいバリエントが存在する可能性もあります。今後、これらの影響も考慮した病原性評価を行うことができれば、実際の PAADs 患者さんの病態をより正確に評価し再現することができるようになると考えられます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiba Takeshi, Tanaka Takayuki, Ida Hiroaki, Watanabe Misa, Nakaseko Haruna, Osawa Mitsujiro, Shibata Hirofumi, Izawa Kazushi, Yasumi Takahiro, Kawasaki Yuri, Saito Megumu K., Takita Junko, Heike Toshio, Nishikomori Ryuta	4. 巻 144
2. 論文標題 Functional evaluation of the pathological significance of MEFV variants using induced pluripotent stem cell-derived macrophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1438 ~ 1441.e12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2019.07.039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honda Yoshitaka, Maeda Yukako, Izawa Kazushi, Shiba Takeshi, Tanaka Takayuki, Nakaseko Haruna, Nishimura Keisuke, Mukoyama Hiroki, Isa-Nishitani Masahiko, Miyamoto Takayuki, Nihira Hiroshi, Shibata Hirofumi, Hiejima Eitaro, Ohara Osamu, Takita Junko, Yasumi Takahiro, Nishikomori Ryuta	4. 巻 41
2. 論文標題 Rapid Flow Cytometry-Based Assay for the Functional Classification of MEFV Variants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1187 ~ 1197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-021-01021-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Takayuki, Shiba Takeshi, Honda Yoshitaka, Izawa Kazushi, Yasumi Takahiro, Saito Megumu K., Nishikomori Ryuta	4. 巻 13
2. 論文標題 Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Monocytes/Macrophages in Autoinflammatory Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.870535	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田由可子、本田吉孝、井澤和司、芝剛、田中孝之、東口素子、加藤健太郎、宮本尚幸、伊佐（西谷）真彦、仁平寛士、柴田洋史、日衛嶋栄太郎、滝田順子、八角高裕、西小森隆太
2. 発表標題 新規機能解析系によるMEFVバリエントの病原性評価・分類の試み
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田由可子、本田吉孝、井澤和司、芝剛、田中孝之、中瀬古春奈、西村啓佑、向山宙希、東口素子、加藤健太郎、宮本尚幸、伊佐（西谷）真彦、仁平寛士、柴田洋史、日衛嶋栄太郎、小原收、滝田順子、八角高裕、西小森隆太
2. 発表標題 新規機能解析系によるMEFVバリエントの病原性評価・分類の試み
3. 学会等名 第4回日本免疫不全・自己炎症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芝剛 田中孝之 西小森隆太 井田弘明 柴田洋史 井澤和司 八角高裕 齋藤潤 平家俊男 滝田順子
2. 発表標題 MEFV遺伝子の多様なvariantsに対する疾患関連評価系の確立
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中孝之 芝剛 西小森隆太 井田弘明 柴田洋史 井澤和司 八角高裕
2. 発表標題 MEFV遺伝子の多様な塩基置換とFMF発症との関連をサイトカイン分泌の指標で評価する系の確立
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中孝之 芝剛 西小森隆太 柴田洋史 井澤和司 柳町昌克 齋藤潤 中畑龍俊 小原收 平家俊男 滝田順子 八角高裕
2. 発表標題 インフラマソームを介した自己炎症性疾患の診断・治療にiPS細胞がどのように役立つか？
3. 学会等名 第29回日本小児リウマチ学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田 由可子, 本田 吉孝, 井澤 和司, 芝 剛, 田中 孝之, 中瀬古 春奈, 西村 啓佑, 向山 宙希, 宮本 尚幸, 伊佐 真彦[西谷], 仁平 寛士, 柴田 洋史, 八角 高裕, 西小森 隆太
2. 発表標題 新規機能解析系によるMEFVバリエーションの病原性分類
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学発表のプレスリリース https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-04-20-1?fbclid=IwAR1VrygHwkrwe9PBLozW01kMIGr2tIvClfag2xa-iZi300oK41_EqdgB_vY 上記サイト内の、研究内容についての詳述 https://www.kyoto-u.ac.jp/sites/default/files/2021-04/210317_honda-427b6686c51a042f5c36d248d863cc5d.pdf</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------