

令和 4 年 8 月 26 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08923

研究課題名(和文) TNF受容体関連周期性疾患の疾患モデル細胞・モデルマウス作成と病態解析

研究課題名(英文) The investigation of the pathogenesis of TNF receptor-associated periodic syndrome

研究代表者

平野 紘康 (Hirano, Hiroyasu)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：10454828

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)：TRAPS変異モデルマウス(T79M、G87V、C62Y、T90I変異)4系統を用いて解析を行った。炎症惹起刺激としてLPS+D-Galactosamineの投与を行ったところ、野生型・T90Iで致死反応を認める一方、T79M、G87V変異マウスでは致死反応が低下した。マウス骨髄由来マクロファージを用いた実験で、T79M、G87V変異細胞はTNFに対する反応性が低下しており、その機序として、TNFR1の細胞表面発現が低下していた。本研究で検討した刺激においては、炎症病態の再現はできておらず、病態特異的な他の炎症惹起因子が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TRAPSは自己炎症性疾患のプロトタイプとされているが、その病態の詳細は未だ不明である。TRAPSモデルマウスを用いた本研究では、ヒト患者同様の炎症病態を再現することは出来なかったが、TRAPS変異がTNFR1の挙動・機能にどのように影響するかが明らかとなった。本研究での知見の一部は既報と相反するものであり、現在までの知見を修正する報告となった。これらTRAPS変異マウスの解析を進めることで、TRAPSの病態解明、さらにはTNFR1を介する炎症性疾患の病態理解につながると考える。

研究成果の概要(英文)：Four strains of TRAPS mutant model mice (T79M, G87V, C62Y, and T90I mutants) were used for analysis. When LPS+D-Galactosamine was administered as inflammatory stimuli, lethal responses were observed in wild-type and T90I mice, while the lethal responses were reduced in T79M and G87V mutant mice. In experiments using mouse bone marrow-derived macrophages, T79M and G87V mutant cells showed decreased responsiveness to TNF, and the cell surface expression of TNFR1 was reduced. The stimuli examined in this study did not reproduce the inflammatory pathology observed in TRAPS patients, suggesting the presence of other pathology-specific proinflammatory factors.

研究分野：リウマチ・膠原病学、免疫学

キーワード：TNF受容体関連周期性症候群 TRAPS 自己炎症性疾患 TNF マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

近年「自己炎症性疾患」という概念が提唱された。繰り返す発熱を来す症候群で、発熱に加え関節・皮膚・腸・眼・骨等の炎症を伴う。いくつかの疾患に分類され、各責任遺伝子変異による自然免疫の活性化が原因となる。不明熱の原因疾患として注目されている。

TRAPS は、TNFR1 をコードする *TNFRSF1A* を責任遺伝子とする常染色体優性遺伝疾患で、本邦では数十家系が報告されている。変異は TNFR1 の細胞外ドメインの遺伝子座に存在し、exon 2-4 に多く報告されている (C33Y、T50M、T61I、R92Q 等)。通常 TNFR1 は小胞体で構成され、ゴルジ体を通り細胞表面に発現する。近年、TRAPS 変異を有する TNFR1 蛋白は、折りたたみ (folding) 異常により、小胞体に蓄積し、過剰な小胞体ストレスが炎症反応を誘導している可能性が報告された (Ann Rheum Dis 2012;71:2035-43)。その他に想定されている機序には、TNFR1 mRNA 発現変化 (Exon2 skipping)、TNFR1 の shedding 異常、オートファジー異常、アポトーシス障害がある (Ann Rheum Dis 2014;73:290-7, Ann Rheum Dis 2013;72:1044-52, J Autoimmunity 2018;88:11-20)。しかし、報告によって相反する実験結果もあり、その理由として実験に用いた細胞の違い、また変異部位による発症機序の違いが考えられている。それに加えて、我々は従来行われてきたプラスミドベクターによる変異 TNFR1 の過剰発現モデル自体に大きな問題があると考えている。すなわち、過剰発現という人工的操作による非生理的細胞反応の影響やヒト TRAPS と同様の heterozygote の遺伝子異常が再現できていないという問題である。実際、既報の過剰発現細胞モデルでは、TRAPS 変異による炎症反応亢進という現象を必ずしも再現できていない。そのため、TRAPS の病態の正確な理解には、過剰発現によらず、かつヘテロ変異を再現したモデルが必要と考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ゲノム編集技術を用いて TRAPS 変異のモデル細胞・モデルマウスを作成し、*TNFRSF1A* 変異が炎症を誘発する機序を明らかとすることである。

3. 研究の方法

3-1. TRAPS 変異モデルマウスの作成

CRISPR/Cas9 システムを用いて、マウスの *Tnfrsf1a* 遺伝子に T79M、G87V、C62Y、T90I の変異をそれぞれ挿入した変異マウス 4 系統を作成した。T79M、C62Y は TRAPS 変異として報告のある変異、G87V は我々が TRAPS 変異として報告した変異、T90I は VUS の変異。

3-2. LPS + D-galactosamine 投与に対する致死的反応の評価

TRAPS 変異マウスに LPS + D-galactosamine を腹腔注射し、炎症評価として、その後の致死的反応を評価した。

3-3. TNF トランスジェニックマウスとの交配

TRAPS 変異マウスをヒト TNF トランスジェニックマウスと交配し、TNF 依存性関節炎に及ぼす影響を解析した。

3-4. 骨髄由来マクロファージ培養実験

TRAPS 変異マウスから骨髄細胞を回収し、M-CSF によるマクロファージを分化誘導した。骨髄由来マクロファージを用いて、TNF、LPS、リンフォトキシン 刺激による炎症反応(炎症性サイトカイン遺伝子発現、TNFR1 下流のシグナルの活性化)を評価した。TNFR1 発現をフローサイトメトリーで評価した。

3-5. 脾細胞培養実験

TRAPS 変異マウスより脾細胞を回収し、LPS、TNF、PMA、ConA、CD3+CD28 抗体で刺激した。至適に対する反応を炎症性サイトカイン遺伝子発現で評価した。

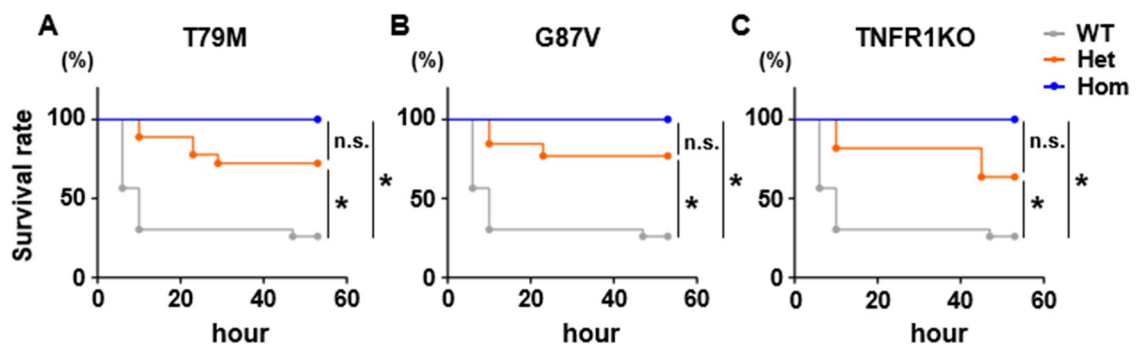
4. 研究成果

4-1. TRAPS 変異マウス

予定のマウス(T79M、G87V、C62Y、T90I 変異)を作成できた。通常飼育下では明らかな炎症所見を呈さなかった。

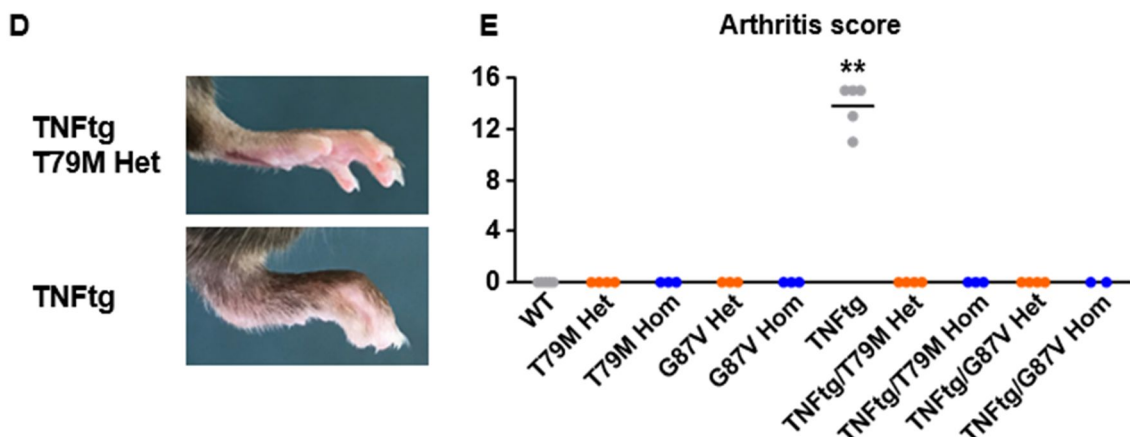
4-2. LPS + D-galactosamine 投与に対する致死的反応の評価

炎症惹起刺激として LPS+D-Galactosamine の投与を行ったところ、野生型・T90I で致死的反応を認める一方、T79M、G87V 変異のヘテロマウスでは致死的反応が低下し、ホモマウスでは全く致死的反応を認めなかった。



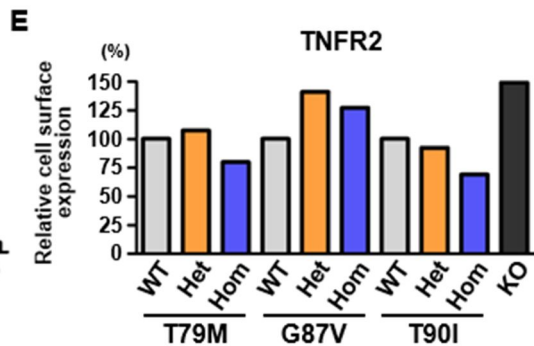
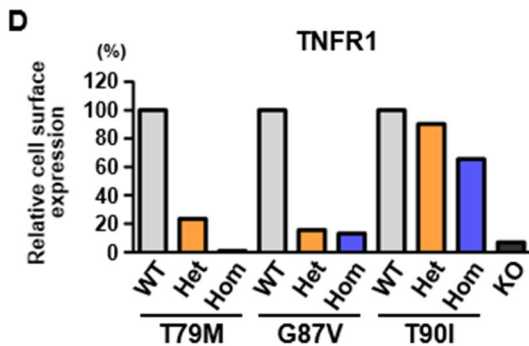
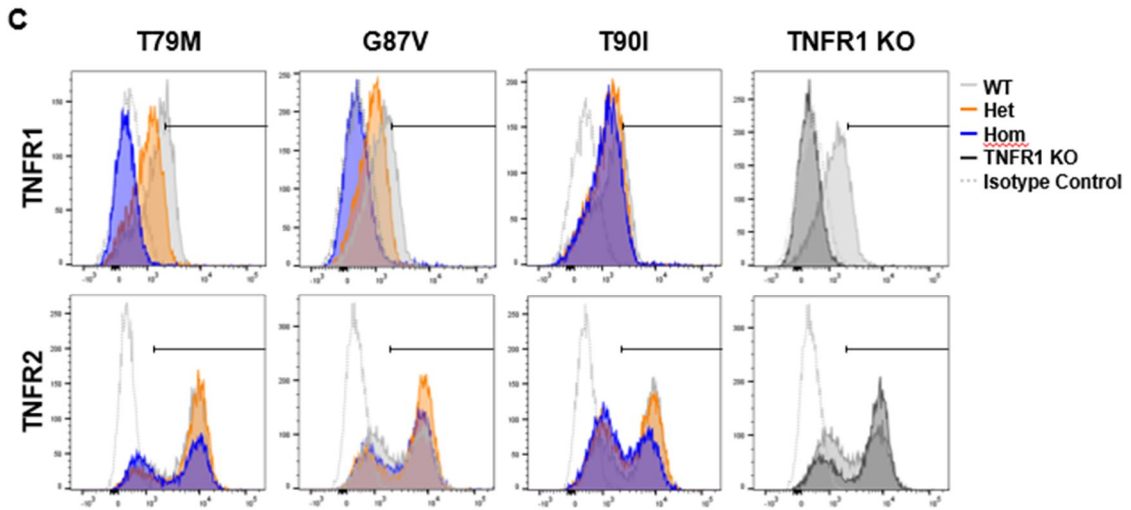
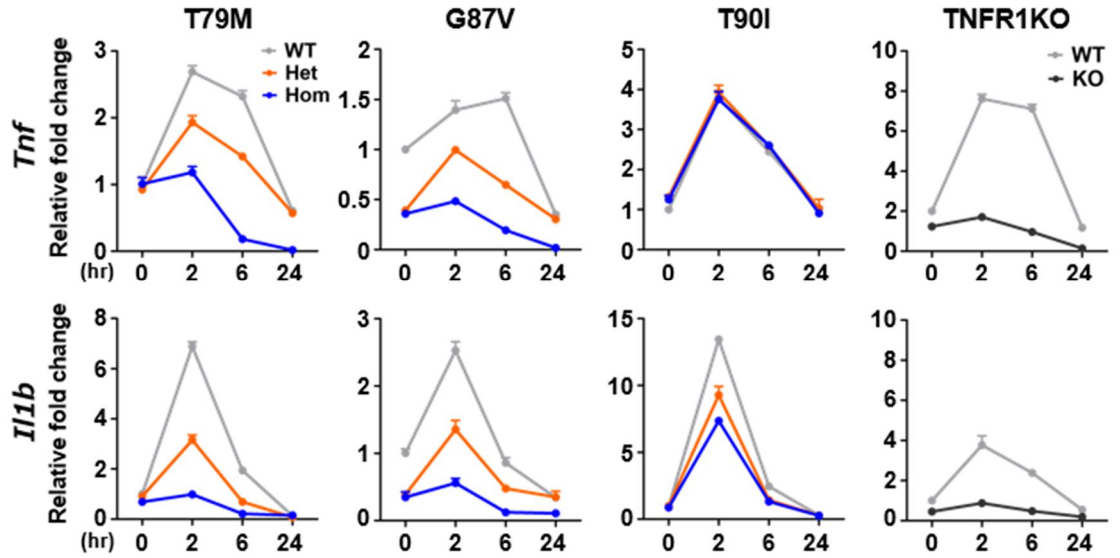
4-3. TNF トランスジェニックマウスとの交配

ヒト TNF トランスジェニックマウスとの交配実験で、T79M、G87V 変異マウス(ヘテロおよびホモマウス)は、TNF 依存性関節炎を認めなかった。



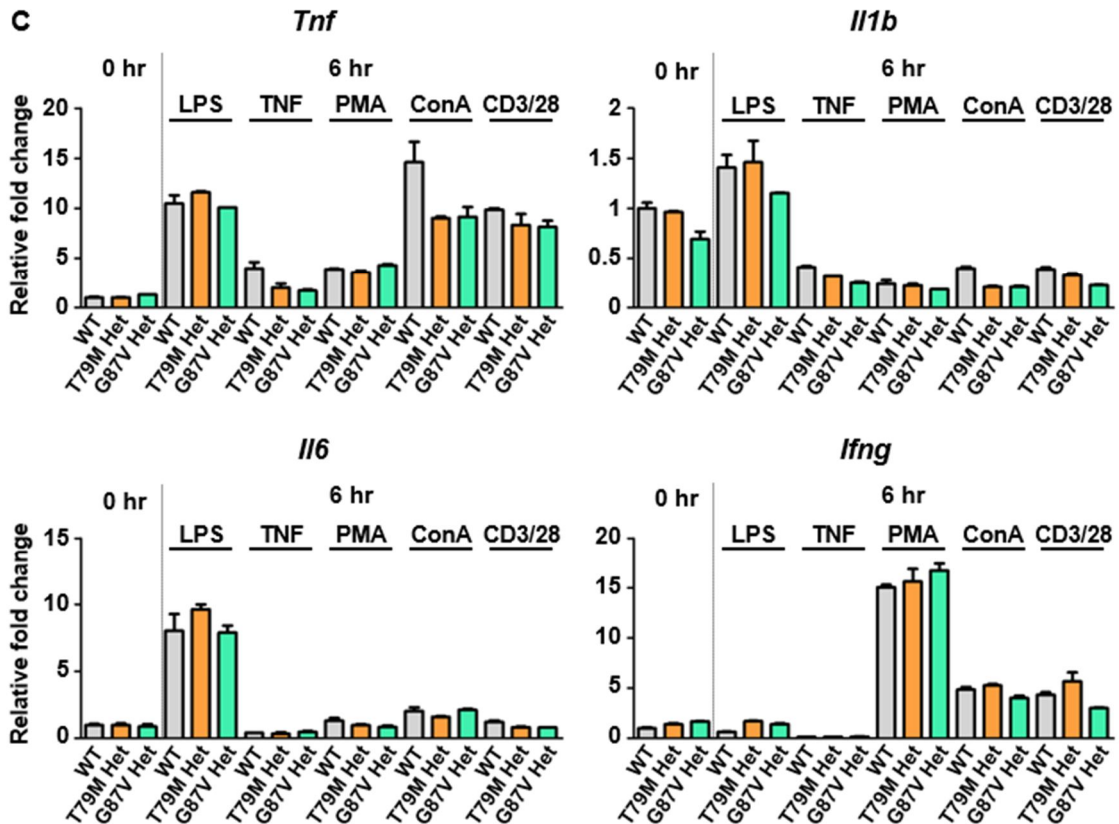
4-4. 骨髄由来マクロファージ培養実験

マウス骨髄由来マクロファージを用いた実験で、T79M、G87V 変異マウスは TNF に対する反応性(炎症性サイトカイン遺伝子発現、TNFR 下流のシグナルの活性化)が低下していた。その機序として、T79M 変異、G87V 変異により、TNFR1 の細胞表面発現が低下していた。



4-5. 脾細胞培養実験

脾細胞を回収し、LPS、TNF、PMA、ConA、CD3+CD28 抗体で刺激し炎症反応を誘導した。炎症反応の程度は野生型と TRAPS 変異マウスの脾細胞で有意な差を認めなかった。



4-6. まとめ

今回の研究結果から、T79M、G87V 変異は膜型 TNFR1 の発現が低下することで TNF への反応性が低下することが分かった。同様にリンホトキシン に対する反応性も低下していた。本研究で検討した刺激においては、ヒト TRAPS 患者にみられる炎症病態の再現はできておらず、炎症反応の誘導には病態特異的な他の炎症惹起因子が存在することが示唆された。

既報では TRAPS 変異 (T79M) により、LPS+D-Galactosamine による致死的反応が増加するとされていたが、本研究では逆の結果が得られた。そのため、過去の知見・TRAPS の想定される機序については、再評価が必要と考えられた。当教室で作成したモデルマウスを用いて、病態解析を進めていきたい。

現在までの本研究の成果をまとめて現在論文を投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shoko Tsuji, Tomoyuki Mukai, Hiroyasu Hirano, Yoshitaka Morita	4. 巻 31
2. 論文標題 In vivo analysis of thrombus formation in arthritic mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 498-503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2020.1740401	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 -

1. 著者名 Tsuji S, Matsuzaki H, Iseki M, Nagasu A, Hirano H, Ishihara K, Ueda N, Honda Y, Horiuchi T, Nishikomori R, Morita Y and Mukai T	4. 巻 198
2. 論文標題 Functional analysis of a novel G87V TNFRSF1A mutation in patients with TNF receptor-associated periodic syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 416-429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cei.13365	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shoko Tsuji, Hidenori Matsuzaki, Masanori Iseki, Akiko Nagasu, Hiroyasu Hirano, Katsuhiko Ishihara, Naoyasu Ueda, Yoshitaka Honda, Takahiko Horiuchi, Ryuta Nishikomori, Yoshitaka Morita, Tomoyuki Mukai
2. 発表標題 The Study of the Novel G87V Mutation in the TNFRSF1A Gene Identified in a Family with TNF Receptor-Associated Periodic Syndrome (TRAPS)
3. 学会等名 2019 American College of Rheumatology(ACR) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向井知之, 辻尚子, 松崎秀紀, 井関将典, 長洲晶子, 平野紘康, 石原克彦, 上田尚靖, 本田吉孝, 堀内孝彦, 西小森隆太, 守田 吉孝
2. 発表標題 TNF受容体関連周期性症候群 (TRAPS) 患者におけるG87V変異 TNFRSF1Aの同定と機能解析
3. 学会等名 第47回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shoko Tsuji, Tomoyuki Mukai, Akiko Nagasu, Hiroyasu Hirano, Masanori Iseki, Takahiro Horiuchi, Ryuta Nishikomori, Yoshitaka Morita
2. 発表標題 The Study of the novel G58V mutation in the TNFRSF1A gene identified in a family with TNF Receptor-Associated Periodic Syndrome(TRAPS)
3. 学会等名 The 63rd Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiko Akagi, Tomoyuki Mukai, Sumie Asano, Masanori Iseki, Ayano Yahagi, Hiroyasu Hirano, Kazuhisa Nakano, Katsuhiko Ishihara, Yoshitaka Morita
2. 発表標題 The investigation of the pathogenesis of TNF Receptor- Associated Periodic Syndrome (TRAPS) using murine TRAPS models
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahiko Akagi, Tomoyuki Mukai, Sumie-Hiramatsu Asano, Kazuhisa Nakano, Yoshitaka Morita
2. 発表標題 The study of the pathogenesis of TNF Receptor-Associated Periodic Syndrome (TRAPS) using murine TRAPS models
3. 学会等名 The 23rd Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学 免疫学 研究テーマ https://m.kawasaki-m.ac.jp/classroom/course.php?id=208

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
研究分担者	向井 知之 (Mukai Tomoyuki) (00454421)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究分担者	井関 將典 (Iseki Masanori) (30532353)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	
研究分担者	守田 吉孝 (Morita Yoshitaka) (50346441)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究分担者	松崎 秀紀 (Matsuzaki Hidenori) (80335463)	県立広島大学・生命環境学部・助教 (25406)	

	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
研究協力者	赤木 貴彦 (Akagi Takahiko)		
研究協力者	辻 尚子 (Tsuji Shoko)		
研究協力者	松山 誠 (Matsuyama Makoto)		

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			