

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08924

研究課題名(和文)原因遺伝子のmRNA非翻訳領域の変異による自己炎症症候群の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analyses of pathogenic mechanism of mutation of mRNA untranslated region of the causative gene in autoinflammatory syndrome

研究代表者

山崎 聡士(Yamasaki, Satoshi)

久留米大学・その他部局等・准教授

研究者番号：30367388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：自己炎症症候群は遺伝子異常に起因するが、アミノ酸置換が起こらない遺伝子変異の症例が存在し、その発症機序は未解明である。本研究では3'非翻訳領域(3'un-translated region:3'UTR)の変異に着目し、その病態への関与の可能性を検証した。レポーターmRNAに自己炎症性疾患に関連する6遺伝子の野生型と変異型のmRNA 3'UTRを接続し、その細胞株における発現を確認した。結果として、6遺伝子のうちNLRP3の発現に対して抑制効果を発揮するtristetraprolin(TTP)、さらにこれとほぼ同等の影響をもたらすRNA結合蛋白「c」の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己炎症生疾患に関連する6遺伝子、IL1RN(2)、MEFV(6)、MVK(3)、NLRP3(2)、NRLP7(6)、NOD2(6)のmRNA 3'UTRにを介したこれらの遺伝子のmRNA制御メカニズムを検討した。その中で、クライオパイリン関連周期熱症候群の原因遺伝子NLRP3に関して、tristetraprolin(TTP)、さらにこれとほぼ同等の影響をもたらすRNA結合蛋白「c」の同定に成功した。今後の検討の足がかりとなる成果を得ることができた。自己炎症症候群の非コード領域の遺伝子変異と病態の関連に関して新たな解析の方向性を示す研究としての意義がある。

研究成果の概要(英文)：Autoinflammatory syndrome is caused by a genetic abnormality, but there are cases of gene mutations in which amino acid substitution does not occur. In this case, the pathogenic mechanism is unknown. In this study, we focused on mutations in the 3'un-translated region(3'UTR) of autoinflammatory diseases and examined their potential involvement in the pathology. Wild-type and mutant mRNA 3'UTR of 6 genes related to autoinflammatory disease were ligated to the reporter mRNA, and their expression in the cell line was confirmed. As a result, we succeeded in identifying tristetraprolin(TTP), which exerts an inhibitory effect on the expression of NLRP3, and RNA-binding protein "c", which has almost the same effect as TTP.

研究分野：リウマチ学

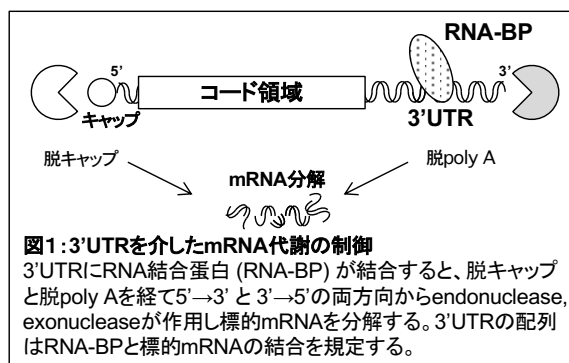
キーワード：自己炎症性疾患 転写後制御 3'非翻訳領域

1. 研究開始当初の背景

自己炎症症候群の病態は、遺伝子変異による原因分子の機能喪失：loss of function “LOF” と機能獲得：gain of function “GOF” によって説明されている。本邦でも頻度の高い家族性地中海熱(familial Mediterranean fever: FMF)では、MEFV 遺伝子の変異によって、この遺伝子がコードする Pylrin が “LOF” に陥る。Pylrin は interleukin-1β (IL-1β) 活性化に必要な細胞質内複合体 “NLRP3 インフラマソーム” の抑制分子であるため、Pylrin の “LOF” は IL-1β の産生過剰をもたらし、FMF の病態を形成する。一方、クリオピリン関連周期性発熱症候群 (Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome: CAPS) では、NLRP3 遺伝子の変異が NLRP3 分子に “GOF” をもたらし、FMF と同様に IL-1β の産生過剰が誘導される。このように、自己炎症症候群は遺伝子変異による特定分子の “LOF” と “GOF” によって病態が形成されると考えられている。原因遺伝子の “LOF” や “GOF” は、遺伝子変異がアミノ酸置換を伴う場合には理解しやすい。しかし、アミノ酸置換を伴わない場合には自己炎症症候群の病態モデルに矛盾が生じる。

当科の検討では、FMF 診断確定症例の 39% (26/67 症例) で、MEFV 遺伝子のアミノ酸配列の置換を伴う遺伝子異常が見出せない。自己炎症症候群 30 疾患の遺伝子情報を掲載しているウェブサイト「Infever」(<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/>) には、30 遺伝子の 2848 変異 (2017/10 月時点) が報告されている。その多くはアミノ酸置換を伴う変異であるが、3'UTR における変異 (6 遺伝子の 25 変異) が報告されている。しかしながら、自己炎症症候群における 3'UTR 変異の病態形成における意義は不明であった。

mRNA の安定性は、mRNA の 3'非翻訳領域 (3' un-translated region: 3'UTR) と RNA 結合蛋白 (RNA binding protein: RNA-BP) との結合によって制御されている (図 1)。従って、3'UTR 配列の変異は mRNA と RNA-BP との親和性に変化をもたらし、その結果として mRNA の安定性に影響を与える。mRNA の発現量は蛋白発現量に直結するため、3'UTR 配列の変異は遺伝子の機能獲得 (Gain of Function: GOF)、遺伝子の機能喪失 (Loss of Function: LOF) を決定しうる。



2. 研究の目的

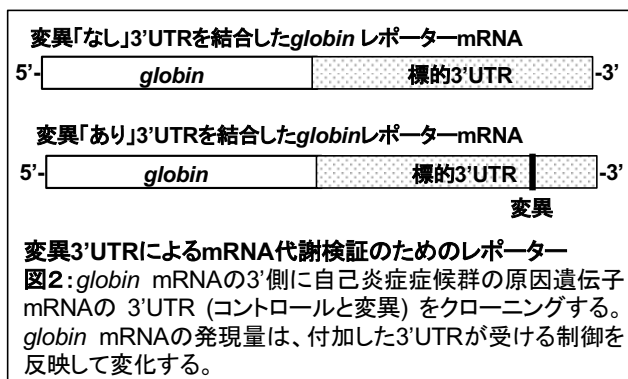
mRNA 代謝解析技術を用いて解析した。「FMF において約 1/3 の症例ではアミノ酸変化なし」という臨床的疑問点に対して、自己炎症症候群の研究に関して原因遺伝子の 3'UTR の変異の病態整理における意義を解明する目的がある。本研究では自己炎症症候群の原因遺伝子の 3'UTR における変異に着目し、「mRNA 代謝が原因遺伝子の “LOF” と “GOF” をもたらし、自己炎症症候群の病態形成に関与するか?」という問いに対して、これを解明することを目的としている。

さらに今後、自己炎症症候群の遺伝子解析は、新たな技術によってより広範で網羅的に行われていくが、非コード領域の遺伝子変異と病態の関連を解析ニーズは高まることが予想される。このような遺伝子疾患の新たな病態解析アプローチを示す目的もある。

3. 研究の方法

自己炎症症候群の既知の 3'UTR 変異を手掛かりに、原因遺伝子の mRNA の代謝を検討した。具体的には、自己炎症性疾患遺伝子解析サイト「Infever」で開示された自己炎症性疾患で報告された変異を有する遺伝子のうち、3'UTR の変異が報告されている 6 遺伝子に関して、レポータープラスミドである pTet-7B へのクローニングおよび遺伝子配列確認を行なった。

pTet-7B は Rabbit 由来の globin の 3'側に目的とする 3'UTR 配列をクローニングすることで、目的とする 3'UTR 配列を介した mRNA 代謝レベルをモニターすることが可能である。これらのプラスミドを U2OS 細胞株へトランスフェクション後、抽出したトータル



RNA をサンプルとして、レポーターである Rabbit 由来の *globin* mRNA に対するプローブを用いてノーザンブロットを行い、レポーターの発現を確認した。

QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit(アジレント・テクノロジー)を用いて、*globin* mRNA の 3'UTR 側に、「Infever」に報告されている 3'UTR における変異(6 遺伝子の 25 変異)を挿入した(図 2)。6 遺伝子とは、*IL1RN*(2)、*MEFV*(6)、*MVK*(3)、*NLRP3*(2)、*NRLP7*(6)、*NOD2*(6) (括弧内の数は各遺伝子 mRNA 3'UTR における変異の報告数を示す)の 25 の変異配列と正常配列とを合わせて計 32 個のプラスミドを作成した。これを細胞株へ導入し、発現を検討した。

4. 研究成果

① *IL1RN*, *MEFV*, *MVK*, *NLRP3*, *NRLP7*, *NOD2* の 3'UTR による mRNA 制御の差異

IL1RN, *MEFV*, *MVK*, *NLRP3*, *NRLP7*, *NOD2* の 3'UTR の野生型、および自己炎症症候群の既知の 3'UTR 変異を挿入した pTet-7B を用いて、各遺伝子の 3'UTR がレポーターである Rabbit 由来の *globin* mRNA 発現に及ぼす影響を確認した。結果として、*globin* mRNA レポーターの発現レベルは、各遺伝子の 3'UTR の挿入により変化した。これは各遺伝子の 3'UTR を介した mRNA の代謝が、異なるメカニズム、おそらく異なる RNA 結合蛋白の結合により制御していることを示唆する知見である。

② *IL1RN*, *MEFV*, *MVK*, *NLRP3*, *NRLP7*, *NOD2* の 3'UTR の変異の効果

IL1RN, *MEFV*, *MVK*, *NLRP3*, *NRLP7*, *NOD2* の 3'UTR の野生型、および *IL1RN*, *MEFV*, *MVK*, *NLRP3*, *NRLP7*, *NOD2* の 3'UTR の変異を含む *globin* mRNA レポーターの発現を検討した。全ての遺伝子の 3'UTR において、野生型と変異型の *globin* mRNA レポーターの発現レベルに変化は確認されなかった。すなわち、無刺激の状態・定常状態では mRNA 代謝に対して、*IL1RN*, *MEFV*, *MVK*, *NLRP3*, *NRLP7*, *NOD2* の 3'UTR の既知の変異は影響を及ぼさないことが確認された。

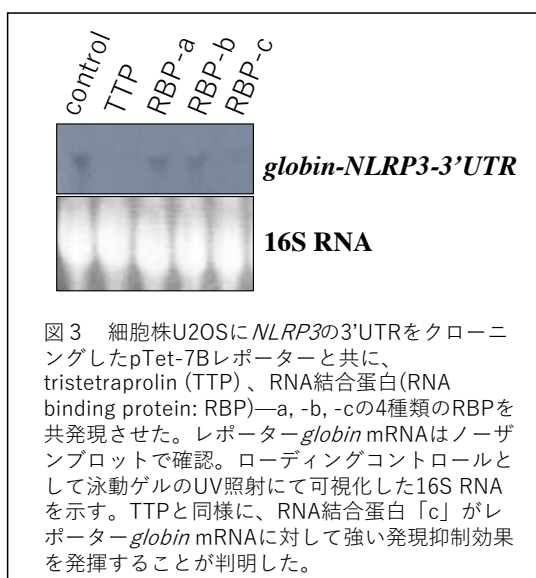
③ *IL1RN*, *MEFV*, *MVK*, *NLRP3*, *NRLP7*, *NOD2* の 3'UTR による mRNA 代謝に対する RNA 結合蛋白の共発現が及ぼす効果

IL1RN, *MEFV*, *MVK*, *NLRP3*, *NRLP7*, *NOD2* の 3'UTR の変異は、定常状態ではレポーター mRNA の発現に大きな影響を与えないことが判明したため、自己炎症症候群の病態において mRNA 代謝を変化させるメカニズムへの反応生に変化をもたらすのではないかと考え、炎症生サイトカイン刺激、ストレスインデューサー刺激、RNA 結合蛋白の共同強発現を試みスクリーニングをおこなった。その結果、炎症生サイトカイン刺激、ストレスインデューサー刺激は *IL1RN*, *MEFV*, *MVK*, *NLRP3*, *NRLP7*, *NOD2* の 3'UTR の野生型と変異型を比較しても Rabbit 由来の *globin* mRNA レポーターの発現レベルに影響を与えなかった。

しかし、RNA 結合蛋白(RNA binding protein: RBP)の *tristetraprolin* (TTP)と RBP-c の共同強発現が *NLRP3* の野生型 3'UTR をクローニングしたレポーターに対して強い発現抑制効果を

発揮することが判明した(図 3)。*NLRP3* は、そのヘテロ変異により自己炎症性症候群のクライオパイリン関連周期熱症候群(Cryopyrin-associated periodic syndrome : CAPS)を引き起こし、その原因は過剰産生される IL-1 β に起因する重要な遺伝子であり、その発現制御の解明は喫緊の課題である。TTP は CCCH タイプの Zinc finger を有し、これを介して標的 mRNA の 3'UTR に結合する。TTP が結合した mRNA には CCR4 (carbon catabolite repressor protein 4)・NOT (negative on TATA-less) de-adenylase 複合体が動員され、脱アデニル化と mRNA の急速な分解が誘導される。TTP と標的 mRNA との結合は、TTP のリン酸化によって制御されている。TTP による *NLRP3* mRNA 制御は報告があり(J Biol Chem. 2017;292(17):6869-6881.)、本アッセイにおいてはポジティブコントロールとして機能している。TTP と並列に検討された RBP-a, -b, -c において、RBP-a, -b は control と比較して変化が確認されないが、RBP-c では TTP と同様にほぼ完全に *globin* mRNA レポーターの発現を抑制した(図 3)。

RBP-c の共同強発現による *globin* mRNA レポーターの発現を抑制に対して、*NLRP3* の 3'UTR 変異が影響を与えるか検討をおこなった。結果として、RBP-c の共同強発現は *NLRP3* の 3'UTR 変異の有無には左右されず、*globin* mRNA レポーターの発現は完全に抑制された。



研究成果の結論として、自己炎症生疾患に関連する 6 遺伝子、*IL1RN*(2), *MEFV*(6), *MVK*(3), *NLRP3*(2), *NLRP7*(6), *NOD2*(6) の mRNA 3'UTR における報告変異 25 のレポーター遺伝子に対する影響を検証したが、本研究での条件においてはこれらの変異が確定的な影響を及ぼす条件の同定には至らなかった。一方で、クライオパイリン関連周期熱症候群の原因遺伝子 *NLRP3* に関しては TTP とほぼ同等の影響をもたらす RNA 結合蛋白「c」の同定に成功し、今後の検討の足がかりとなる成果を得ることができた。

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 0件）

1. 著者名 Hidaka Yukiko, Fujimoto Kyoko, Matsuo Norikazu, Koga Takuma, Kaieda Shinjiro, Yamasaki Satoshi, Nakashima Munetoshi, Migita Kiyoshi, Nakayama Manabu, Ohara Osamu, Hoshino Tomoaki, Nishikomori Ryuta, Ida Hiroaki	4. 巻 31
2. 論文標題 Clinical phenotypes and genetic analyses for diagnosis of systemic autoinflammatory diseases in adult patients with unexplained fever	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 704 ~ 709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1784542	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 Fujimoto Kyoko, Hidaka Yukiko, Koga Takuma, Kaieda Shinjiro, Yamasaki Satoshi, Nakashima Munetoshi, Hoshino Tomoaki, Ida Hiroaki	4. 巻 59
2. 論文標題 Clinical and Genetic Analysis of 22 Japanese Patients with Familial Mediterranean Fever: An Examination of <i>MEFV</i> and 10 Other Genes Related to Autoinflammatory Syndromes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1373 ~ 1378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3778-19	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	井田 弘明 (Ida Hiroaki) (60363496)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	

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
---------	---------