

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591176
 研究課題名（和文）サイトカインストームと細胞エネルギー不全の関連—RANBP2 を通じた解明
 研究課題名（英文）Association of RANBP2 with cytokine storm and cellular energy failure
 研究代表者
 齋藤 真木子 (SAITOH MAKIKO)
 東京大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：20225733

研究成果の概要（和文）：日本人の急性壊死性脳症(ANE)の病態としてサイトカインストームが推定されているが、欧米の家族性反復性急性壊死性脳症(ANE1)のように単一遺伝子疾患であるかどうか、未だに不明である。ANE1 原因遺伝子 *RANBP2* の産物である RANBP2 の結合蛋白質に着目し、ANE 患者 24 例において *COX* 遺伝子群の変異・多型解析を行った。*COX11* 遺伝子の全エクソンに変異は認められなかったが、1 例に *COX10* exon3 のヘテロ接合一塩基置換 c.260C>T(T87I)があった。また、*COX15* には MAF<0.01 である rs2231682 のマイナーアリルを有する症例が 3 例あった。COX 群はミトコンドリア電子伝達系に関わっており、エネルギー産生に必要である。また、*COX* 遺伝子群は ANE と病態の類似する Leigh 脳症の原因遺伝子として報告されている。ANE 患者で認められたこれらの一塩基置換がミトコンドリアエネルギー産生に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Cytokine storm may play an important role in the pathomechanism of acute necrotizing encephalopathy (ANE) recognized in Japan. It is still unknown whether ANE is caused by a single gene mutation such as *RANBP2*. We conducted genetic analysis of *COX* genes, which are the potential binding proteins of RANBP2 and co-operate on mitochondrial electron transfer system. We could not detect the mutation in *COX11* and *COX17* in 24 ANE patients. We found a heterozygous amino acid substitution in exon 3 of *COX10* in a case with ANE. Three patients had minor allele A of non-synonymous rs2231682 in *COX15* (MAF <0.01). We suggested that these amino acid substitutions of COXs may be relevant to mitochondrial dysfunction and predispose to the onset of ANE.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：サイトカインストーム、遺伝子解析、ミトコンドリア電子伝達系

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児は感染を契機に SIRS/MOF/敗血

症／急性脳症のようなサイトカインストームを根底とする重篤な全身反応をしばしば示す。サイトカインストームの指標としてチトクローム c や mGOT の放出が知られているようにこれらの疾患では障害組織細胞がエネルギー不全状態に陥り、最終的にはアポトーシスやネクローシスが誘導される。この過程でサイトカイン、サイトカイン受容体、シグナル伝達蛋白、ミトコンドリア膜蛋白および反応性の過酸化物質などが、複雑な相互作用を及ぼしており、その全貌は未だに解明されていない。

(2) サイトカインストームが病態に関与すると考えられている急性壊死性脳症(ANE)は日本をはじめとする東アジアの症例と、欧米を中心とした家族性、反復性を示す ANE1 症例があり、後者においては 2009 年に責任遺伝子が解明された。

(3) 日本人症例の ANE の遺伝的素因についてはまだ研究されておらず、ANE1 のように単一遺伝子疾患なのかどうか、また ANE1 と同じ責任遺伝子によって発症するのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

急性脳症は小児期における感染症合併症のうち最も重篤なものの一つであり、減少しているとはいえ、死亡率も 10%前後で、神経学的後遺症も多い。急性壊死性脳症の病態はサイトカインストームによる細胞障害や血液脳関門の破綻と推測されているが、詳細は未だ不明である。本研究はサイトカインストームから細胞エネルギー不全に至る過程において Ran binding protein 2 (RANBP2)の機能に着目して両者をつなぐメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 症例の集積

神経小児神経科医が多数参加するメーリングリストでの呼びかけを通じて ANE 患者の検体の集積を行う。得られた検体から genomic DNA を抽出し、まず RANBP2 遺伝子の全長遺伝子解析スクリーニングを行う。

(2) RANBP2 変異蛋白発現細胞の作成
RANBP2 ロイシンリッチドメイン正常型 cDNA を鋳型としてサブクローン化し、キットを用いて ANE1 ですでに報告されている点変異を導入後、GST 融合蛋白を作成する。各臓器由来の培養細胞、または組織由来の蛋白との GST プルダウンアッセイおよび SDS-PAGE を行って COX11 抗体で検出する。日本人症例でもし ANE1 と異なる RANBP2 変異が検出された場合はそれらについても同様に GST 融合蛋白を作成する。

(3) COX 遺伝子群解析

RANBP2 が結合する COX11 遺伝子や同じくミトコンドリアのチトクローム c アセンブリーを補佐するシャペロン遺伝子である COX10, COX15, COX17 について変異や多型の検出を行う。

4. 研究成果

(1) イタリア人一家系で RANBP2 c. 1880 C>T を既に検出していたが、発端者父親にあらたに c. 2084A>G が検出された。日本人 24 例の ANE の RANBP2 スクリーニングでは変異は見つからなかった。そこで、既に報告された c. 1880 C>T、c. 2085C>T および c. 2094A>G に加え、c. 2084A>G の計 4 種類についてそれぞれ変異・多型を組み込んだベクターを作成した。ベクターのシークエンスによってこれらの変異・多型を確認した。さらに GST 融合蛋白を作成した。各々、GST プルダウンアッセイ後、COX11 抗体によって wild-type と変異・多型ドメインの結合が認められたが、シグナルが十分でなかった。結合強度比較のため、COX11 抗体の種類を変えて最適条件を検討している。

(2) 日本人 ANE 患者 24 例について COX11, COX10, COX15 および COX17 遺伝子の全長塩基配列解析を行った。

① COX11, COX17 遺伝子については変異を認めず、また有意差のある SNP も検出されなかった。

② COX10, COX15 遺伝子

1 例について COX10 exon3 にヘテロ接合で c. 260C>T の一塩基置換を認めた。これはデー

データベース上で検索した範囲では変異・SNP の報告にはなく、アミノ酸置換 (T87I) を伴った。このアミノ酸はほ乳類で保存されていた。他には有意差のある SNP は認めなかった。3例について *COX15* rs2231682 (G/A) のうちマイナーアレル A をヘテロで検出していた。この SNP は 1000GENOME プロジェクトデータベース上、日本人をふくむアジア人にのみ認められ、MAF<0.01 で G→R のアミノ酸置換を伴う。同データベースの日本人 89 人のうち遺伝子型 A/G は 1 名のみであった。

日本人 ANE では *RANBP2* 以外の遺伝的素因によって発症する。今回の検討によって *RANBP2* と結合してミトコンドリアのエネルギー産生に関わる *COX* 遺伝子群の新しい一塩基置換や MAF<0.01 のマイナーアレルが 12.5% の症例で含まれることが判明した。ANE においてはミトコンドリア電子伝達系の機能不全が病態に関わることが示唆された。また、*RANBP2* や *COX* 群はすべて分子シャペロン機能を持つ事が知られており、感染症による発熱がこれらの蛋白機能や酵素活性に影響を与えるかどうか今後の検討課題と考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) Bergamino L, Capra V, Biancheri R, Rossi A, Tacchella A, Ambrosini L, Mizuguchi M, Saitoh M, Marazzi MG. Immunomodulatory therapy in recurrent acute necrotizing encephalopathy ANE1: is it useful? *Brain Dev* 34:384-91, 2012, doi:10.1016/j.braindev.2011.08.001 査読あり
- 2) Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, Kubota M, Saito Y, Takanashi J, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndromes. *Brain Dev* 34:337-343, 2012, doi:10.1016/j.braindev.2011.07.012 査読あり
- 3) Saitoh M, Shinohara M, Hoshino H, Kubota M, Amemiya K, Takanashi JL, Hwang SK, Hirose S, Mizuguchi M. Mutations of the *SCN1A* gene in acute encephalopathy. *Epilepsia* 53:558-64, 2012, doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03402.x 査読あり

4) Kobayashi K, Ohzono H, Shinohara M, Saitoh M, Ohmori I, Ohtsuka Y, Mizuguchi M. Acute encephalopathy with a novel point mutation in the *SCN2A* gene. *Epilepsy Res.* 102:109-112, 2012 doi: org/10.1016/j.eplepsyres.2012.04.016 査読あり

5) Shinohara M, Saitoh M, Takanashi, JI, Yamanouchi H, Kubota M, Goto T, Kikuchi M, Shiihara T, Yamanaka G, Mizuguchi M. Carnitine palmitoyl transferase II polymorphism is associated with multiple syndromes of acute encephalopathy with various infectious diseases. *Brain Dev* 33:512-516, 2011, doi: 10.1016/j.braindev.2010.09.002 査読あり

6) Kumakura A, Iida C, Saito M, Mizuguchi M, Hata D. Pandemic influenza A-associated acute necrotizing encephalopathy without neurological sequelae. *Pediatr Neurol* 45:344-346, 2011, doi:10.1016/j.pediatrneurol.2011.08.004 査読あり

7) 齋藤 真木子:急性脳症の遺伝子異常. 小児科診療 74:925-929. 2011(総説), 査読なし

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 齋藤 真木子、篠原 麻由、星野 英紀、久保田 雅也、雨宮 馨、高梨 潤一、廣瀬 伸一、水口 雅. 急性脳症における *SCN1A* 遺伝子解析. 第 54 回日本小児神経学会総会 2012 年 5 月 (札幌)
- 2) 篠原 麻由、齋藤 真木子、山中 岳、雨宮 馨、久保田 雅也、山形 崇倫、菊池 健二郎、川脇 寿、亀井 淳、赤坂 真奈美、安西 有紀、塩見 正司、水口 雅. テオフィリン関連急性脳症における遺伝的素因. 第 54 回日本小児神経学会総会, 2012 年 5 月 (札幌)
- 3) 星野 愛、齋藤 真木子、篠原 麻由、池田 尚広、吉田 健司、豊島 光雄、李 守永、水口 雅. 急性壊死性脳症における遺伝的素因. 第 54 回日本小児神経学会総会, 2012 年 5 月 (札幌)
- 4) 星野 愛、齋藤 真木子、Le Nguyen Nhit Tin, 篠原 麻由、高梨 潤一、久保田 雅也、奥村 彰久、熊倉 啓、田中 学、豊島 光雄、安藤 直樹、遠藤 雄策、水口 雅. 急性壊死性脳症に

における Cox 遺伝子解析. 第 53 回日本小児神経学会総会, 2011 年 5 月 (横浜)

5) 篠原 麻由、Le Nguyen Nhit Tin, 齋藤 真木子、久保田 雅也、菊池 健二郎、山中 岳、後藤 知秀、山内 秀雄、高梨 潤一、山形 崇倫、豊島 光雄、廣瀬 伸一、水口 雅. 日本人けいれん重積型急性脳症患者における遺伝的素因の検討. 第 53 回日本小児神経学会総会, 2011 年 5 月 (横浜)

6) 齋藤 真木子、Le Nguyen Nhit Tin, 篠原 麻由、高梨 潤一、久保田 雅也、宮本 晶恵、水口 雅. 急性壊死性脳症における *RANBP2* 遺伝子解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 2011 年 8 月 (東京)

7) 齋藤 真木子、篠原 麻由、高橋 寛、高梨 潤一、山中 岳、雨宮 馨、久保田 雅也、水口 雅. テオフィリン関連急性脳症におけるアデノシン受容体 A2a の SNP 解析. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 2010 年 4 月 (盛岡)

8) 齋藤 真木子、高梨 潤一、山内 秀雄、久保田 雅也、後藤 知英、菊地正広、椎原 隆、山中 岳、水口 雅. 日本人急性脳症患者の遺伝的素因について-SNP による CPT II 遺伝子型解析-. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010 年 5 月 (福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 真木子 (SAITOH MAKIKO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20225733

(3) 連携研究者

水口 雅 (MIZUGUCHI MASASHI)

東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20209753