

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15939

研究課題名（和文）ADA2欠損症の血管炎病態の分子メカニズム解析

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms underlying vasculitis in ADA2 deficiency

研究代表者

仁平 寛士（Nihira, Hiroshi）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：00881301

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ADA2欠損症は全身性の小～中型動脈炎を特徴とする遺伝性自己炎症疾患で、その血管炎発症機序は依然として不明である。本研究は、ヒト細胞株でCRISPR/Cas9によるADA2ノックアウトを行い、線維芽細胞との共培養によって血管炎病態を再現するアッセイ系を構築した。また、同アッセイ系を用いてJAK阻害薬の有効性を確認した。加えて、免疫沈降及び近位依存性ビオチン化標識法を用いて、従来まで示されていなかったADA2に直接結合或いは相互作用する分子を明らかにした。これにより、ADA2欠損症の分子メカニズム解明につながる新たな可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADA2欠損症は結節性多発動脈炎類似の臨床型を呈し、本結果で得られた知見は、非単一遺伝子性のその他の血管炎症候群の病態理解に寄与する。また患者細胞を使用しない形での病態再現系を構築した事により、継続的な病態解析や新規薬剤評価が可能となった。加えて、既存のデアミナーゼ活性解析以外のADA2機能評価を行う事で、従来とは異なる変異疾患原性評価を可能とした。

研究成果の概要（英文）：ADA2 deficiency is a hereditary autoinflammatory disease characterized by systemic small- to medium-sized arteritis. Its mechanism of vasculitis remains unknown. In this study, we performed ADA2 knockout in a human cell line using CRISPR/Cas9 and constructed an assay system to reproduce the pathological condition of vasculitis by co-culturing with fibroblasts. We also performed drug screening using the same assay system, and confirmed the efficacy of JAK inhibitors. In addition, we used immunoprecipitation and proximal-dependent biotinylation labeling to reveal molecules that directly bind to or interact with ADA2, which had not been shown before. These results indicate a new possibility that could lead to elucidation of the molecular mechanism of ADA2 deficiency.

研究分野：自己炎症性疾患

キーワード：自己炎症性疾患 ADA2欠損症 血管炎 ADA2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ADA2 欠損症は遺伝性自己炎症性疾患の 1 つで、結節性多発動脈炎類似の全身性の小～中型動脈炎を特徴とする疾患である。京都大学発達小児科学教室にて現在 4 名の ADA2 欠損症患者を診療しているが、本邦での確定診断例は、2024 時点で先の 4 名を含めても 11 名しか存在しない稀少疾患である。

ADA2 は、ADA1 (ADA) 同様アデノシン/デオキシアデノシンを脱アミノ化する酵素として作用する一方で、ADA1 とは分布・基質親和性等が大きく異なり、その具体的な働きは ADA1 に比較し不明な点が多い。これまで我々は、ADA2 欠損症患者の急性期・寛解期の両方の時期で末梢血細胞を収集し、mRNA・タンパク発現を網羅的に比較解析することで、従来まで明らかでなかった 2 型インターフェロン (IFN) = IFN- $\gamma$  経路, STAT1 の機能亢進が ADA2 欠損症患者で特異的に生じている事を明らかにした (Nihira H, et al. J Allergy Clin Immunol, 2021.)。その他にも ADA2 欠損症の病態生理に関しては、単球による血管内皮障害, 単球の炎症抑制型マクロファージ分化障害 (Zhou, et al. NEJM 2014.), NETosis の炎症形成への関与 (Carmona-Rivera, et al. Blood 2019) 等の可能性が示されているが、いずれも核心に迫れているとは言えない。全身炎症・脳梗塞に対して抗 TNF- $\alpha$  製剤の有効性が示されているが (Cooray, et al. Rheumatology 2021.) そのメカニズムも依然不明である。加えて、抗 TNF- $\alpha$  製剤の二次無効症例の存在や網状皮斑や造血障害等の抗 TNF- $\alpha$  製剤で抑制されない症状の存在も知られ、代替治療法・新規治療法の探索も求められている。

従来まで、ADA2 欠損症の病態研究は主に患者末梢血サンプルを用いた解析・実験を主軸として為されているが、これはマウス・ラットに ADA2 オルソログが存在せず、また in vitro でも再現性の高い病態解析アッセイが確立されていない事に起因する。患者細胞を用いた解析は、患者体内で生じている現象をより直接的に推察できる一方、治療修飾やサンプルの均一性、サンプリングの容易さ等に課題がある。病態をさらに深く理解するためには、より再現性の高い実験系に基づき、ADA2 欠損症における主要な炎症経路や ADA2 が関与しているシグナル経路の同定が必要である。また、単一遺伝子性に明らかな中型動脈炎を生じる ADA2 欠損症の病態研究成果は、結節性多発動脈炎等の多因子性血管炎症候群の研究・治療を考える上で有用な糸口となると考えられた。

### 2. 研究の目的

ADA2 欠損症において血管炎を生じる際に単球が果たす役割とは何か、また、ADA2 がその分子メカニズムで作用する炎症シグナル経路は何なのかを、ヒト単球系細胞株を用いた共培養アッセイ系を元に解明する事を目的とする。

### 3. 研究の方法

ADA2 欠損ヒト単球系細胞株を用いた血管炎モデル構築

上記病態モデルを用いた JAK 阻害薬を中心としたドラッグスクリーニング

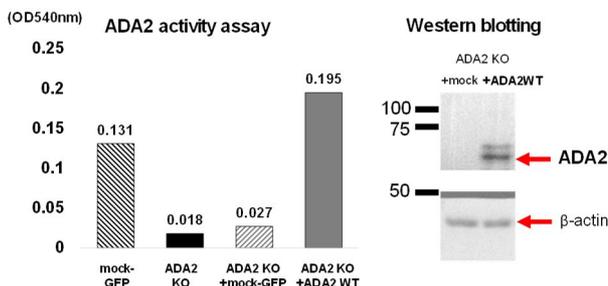
近位依存性ピオチン標識を用いた ADA2 相互作用分子の探索

### 4. 研究成果

#### ADA2 欠損ヒト単球系細胞株と線維芽細胞の共培養系を用いた血管炎モデル構築

ヒト単球系細胞株にレンチウイルス, CRISPR/Cas9 を用いて ADA2 ノックアウト株を作製し (図 1) 線維芽細胞と共培養を行ったところ、ノックアウト株では mock 株に比較し有意に線維芽細胞の剥離が亢進する事が明らかになった (図 2)。ADA2 ノックアウト株に野生型の ADA2 を導入すると剥離は軽減され、野生型の代わりに既知の疾患原性変異を導入した場合には改善が得られない事も確認した。

図 1: ヒト単球系細胞株にレンチウイルスを用いて mock-GFP もしくは ADA2 をノックアウトを導入し、ADA2 活性とウエスタンブロッティングで評価



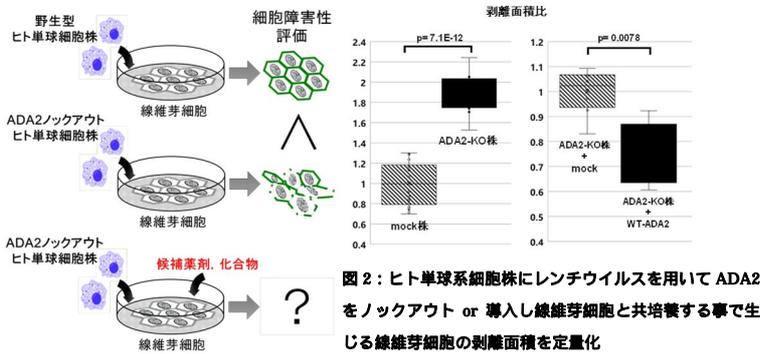
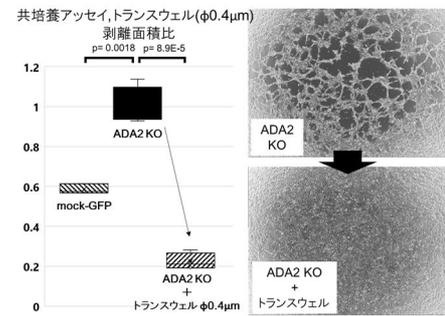


図 3: トランスウェルの使用により細胞障害は消失する



また、共培養の際に細胞透過は困難だが液性成分の通過が可能なサイズの孔径のトランスウェルを使用したところ、剥離が完全に消失する事が示された。本アッセイで生じる細胞障害は単球系細胞と線維芽細胞との細胞間コンタクトが必須である事が分かった。(図 3)

共培養系を用いたドラッグスクリーニングで JAK 阻害薬の一部で有効性を確認

過去の成果 (Nihira H, et al. J Allergy Clin Immunol, 2021.) より、インターフェロン, STAT1 シグナルの抑制が炎症病態抑制に有効となるかを評価した。先の ADA2 ノックアウト株を用いた共培養系で、トファシチニブ, バリシチニブをそれぞれ添加したところ、コントロール (DMSO) に比較し有意に障害が抑制された (図 4 上)。この結果を踏まえ、JAK 阻害薬を中心にドラッグスクリーニングを実施したところ、その他の JAK 阻害薬の一部でも同様に抑制作用が確認できた (図 4 下)。以上は、過去の成果と矛盾しない結果が得られたと共に、ADA2 欠損症における新たな治療選択肢としての JAK 阻害薬の可能性を示す事ができた。

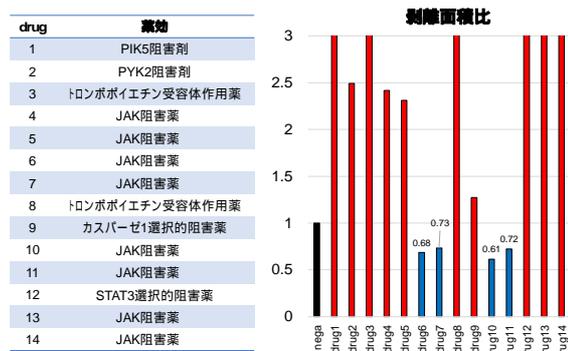
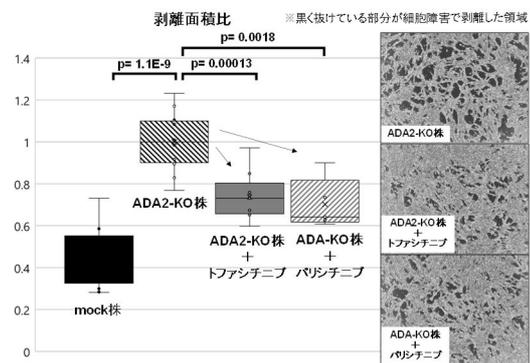


図 4: 共培養系を用いたドラッグスクリーニングにより JAK 阻害薬の細胞障害抑制効果を示された

免疫沈降, 近位依存性ビオチン標識を用いた ADA2 結合分子・相互作用分子の同定, リン酸化プロテオームによるリン酸化シグナル解析

ADA2 ノックアウト株に ADA2 或いはビオチン化酵素を付けた ADA2 (野生型, 変異型) を導入し、ADA2 を標的とした免疫沈降, ビオチン化標識により ADA2 結合分子, 相互作用分子を抽出した。この結果、野生型 ADA2 に結合し且つ相互作用する一方で、変異型 ADA2 では著しくその相互作用が低下する分子を特定した (分子 X)。また、ADA2 野生株とノックアウト株でリン酸化プロテオームを実施する事で、両者で生じているリン酸化シグナルの違いを評価した。上記の結果はいずれも過去に報告の無いデータであり、ADA2 の分子生物学的性質を従来とは異なる視点で明らかにし、ADA2 欠損症で生じている病態メカニズムに関する示唆に富み、ピックアップされた主要なシグナル経路に関して現在追加解析を実施中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 Nishitani-Isa M, Mukai K, Honda Y, Nihira H, Tanaka T, Shibata H, Kodama K, Hiejima E, Izawa K, Kawasaki Y, Osawa M, Katata Y, Onodera S, Watanabe T, Uchida T, Kure S, Takita J, Ohara O, Saito M K., Nishikomori R, Taguchi T, Sasahara Y, Yasumi T	4. 巻 219
2. 論文標題 Trapping of CDC42 C-terminal variants in the Golgi drives pyrin inflammasome hyperactivation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20211889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20211889	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 Miyamoto T, Honda Y, Izawa K, Kanazawa N, Kadowaki S, Ohnishi H, Fujimoto M, Kambe N, Kase N, Shiba T, Nakagishi Y, Akizuki S, Murakami K, Bamba M, Nishida Y, Inui A, Fujisawa T, Nishida D, Iwata N, Otsubo Y, Ishimori S, Nishikori M, Tanizawa K, Nakamura T, Ueda T, Ohwada Y, Tsuyusaki Y, Shimizu M, Ebato T, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Assessment of type I interferon signatures in undifferentiated inflammatory diseases: A Japanese multicenter experience	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.905960	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 Muramoto Y, Nihira H, Shiokawa M, Izawa K, Hiejima E, Seno H	4. 巻 163
2. 論文標題 Anti-Integrin v 6 Antibody as a Diagnostic Marker for Pediatric Patients With Ulcerative Colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1094 ~ 1097.e14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2022.06.026	査読の有無 無
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 Sakura F, Noma K, Asano T, Tanita K, Toyofuku E, Kato K, Tsumura M, Nihira H, Izawa K, Mitsui-Sekinaka K, Konno R, Kawashima Y, Mizoguchi Y, Karakawa S, Hayakawa S, Kawaguchi H, Imai K, Nonoyama S, Yasumi T, Ohnishi H, Kanegane H, Ohara O, Okada S	4. 巻 2
2. 論文標題 A complementary approach for genetic diagnosis of inborn errors of immunity using proteogenomic analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgad104	査読の有無 無
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 Enokizono Mikako, Kurokawa Ryo, Yagishita Akira, Nakata Yasuhiro, Koyasu Sho, Nihira Hiroshi, Kuwashima Shigeko, Aida Noriko, Kono Tatsuo, Mori Harushi	4. 巻 42
2. 論文標題 Clinical and neuroimaging review of monogenic cerebral small vessel disease from the prenatal to adolescent developmental stage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 109 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11604-023-01493-0	査読の有無 無
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
---------------------------	-----------------------	----

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