

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2015
課題番号：25670474
研究課題名(和文) 寒冷誘発炎症を主症状とするメンデル遺伝疾患を利用した寒冷誘発遺伝子発現の機序解明

研究課題名(英文) Elucidation of cold-induced gene induction mechanism by analyzing Mendelian-inherited diseases with cold-induced inflammation

研究代表者
西小森 隆太 (NISHIKOMORI, RYUTA)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70359800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Aicardi-Goutieres症候群は、進行性の脳症、基底核石灰化を認め、重症凍瘡等の寒冷誘発炎症を示す自己炎症性疾患である。その機序として、細胞内核酸代謝異常に伴う核酸受容体活性化、I型インターフェロン過剰産生が推定されている。今回、既知責任遺伝子変異陰性症例に対し、全エクソーム解析を行うことにより新規責任遺伝子IFIH1を同定した。患者末梢血検体では、I型インターフェロン関連遺伝子の増強がみられ、in vitro検査ではI型インターフェロン産生を亢進する機能獲得型のIFIH1変異であった。一方、同変異のリガンド応答性は低下していることも見いだした。

研究成果の概要(英文)：Aicardi-Goutieres syndrome (AGS) is an autoinflammatory disease with early-onset progressive encephalopathy, calcification of basal ganglia, and cold-induced inflammation such as severe chilblain. The disease mechanism of AGS is overproduction of type I interferon caused by stimulation of intracellular nucleic acids sensors due to abnormalities of nucleic acids metabolism. In this study, we identified a new responsible gene, IFIH1 for AGS by performing whole exome sequencing on 3 patients and their families. The patients' PBMCs showed type I interferon signature and in vitro overexpression study showed that the IFIH1 variants causing AGS (p.Ala452Thr, p.Leu372Phe, p.Arg779His) induce more type I interferons, which suggested the IFIH1 variants are gain of function. On the other hand, we also found that the IFIH1 variants lacked ligand-specific responses, which is shared by the Ifih1 variant (p.Gly821Ser) identified in a mouse model of SLE.

研究分野：小児科学

キーワード：Aicardi-Goutieres症候群 インターフェロン IFIH1 MDA5 寒冷刺激

1. 研究開始当初の背景

不明熱・周期性発熱症候群の原因となっている自然免疫系の遺伝子異常である自己炎症疾患の診断、治療に我々に関わってきた。とくに *NLRP3* 遺伝子変異で発症し、蕁麻疹様発疹、関節炎、無菌性髄膜炎を3主徴とする CINCA 症候群について研究を行ってきた。*NLRP3* 遺伝子は寒冷にて発熱等炎症反応が惹起されることが知られており、寒冷が如何に炎症を引き起こすかまだその機序は知られていない。また寒冷誘発遺伝子 *NLRP3* 遺伝子関連疾患の診療に関わっている関係で、寒冷に伴う炎症疾患症例が多数紹介され、寒冷誘発凍瘡・発熱の1家系を解析する機会を得、本邦初の *TREX1* 異常による Aicardi-Goutières 症候群 (AGS) を発見した。AGS は、進行性の脳症で乳児期に発症し、画像所見では基底核石灰化、白質の異常等、TORCH 症候群等の先天性ウイルス感染症に臨床像は類似する。これまで *TREX1* を含む6責任遺伝子が同定され、その発症機序として、細胞内核酸分解が低下し、細胞内 Pattern recognition receptor を介して I 型インターフェロンが産生され、ウイルス感染様様の症状を呈することが推定されている。また AGS も寒冷にて炎症が惹起されるが、その機序は解明されていない。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、(1)上記2つの疾患をモデルに、寒冷誘発の炎症発症機構の解明、(2)その寒冷誘発遺伝子の情報を利用して、上記2疾患で遺伝子異常が同定されていない家系・症例の新規遺伝子同定を試みる。

上記目的のうち、今回成果の得られた(2)既知 AGS 遺伝子変異陰性例の責任遺伝子 *IFIH1* (蛋白名 MDA5) の同定について記載する。

3. 研究の方法

厚労省研究班による AGS の全国調査 (文献 2) によって既知 AGS の原因遺伝子 (*TREX1*, *RNASEH2A*, *RNASEH2B*, *RNASEH2C*, *SAMHD1*, *ADAR*)

に変異を認めない7症例を同定した。以上の症例のうち、同意が得られた3症例について、全エクソーム解析をおこなった。得られた新規責任遺伝子 *IFIH1* に同定された変異の *in vitro* 機能解析を行うとともに、推定される

型インターフェロン発現高値を患者末梢血で検討した。さらに、変異 *IFIH1* の構造解析をおこなうことにより、その機序を推定するとともに、*in vitro* 再構築系を利用して、変異 *IFIH1* のリガンド応答性について検討した (文献 1)。

4. 研究成果

臨床的に AGS をみたした患者 18 人中、11 人に既知 AGS 責任遺伝子に変異を認めた。残り 7 人中、informed consents が得られた 3 人を患者及びその両親のトリオベースの全エクソーム解析を行った。de novo モデル、AR モデル、compound hetero モデル、X 連鎖モデルで検討したところ、de novo モデルで 3 人に共通して *IFIH1* 遺伝子にミスセンス変異を認めた (図 1)。

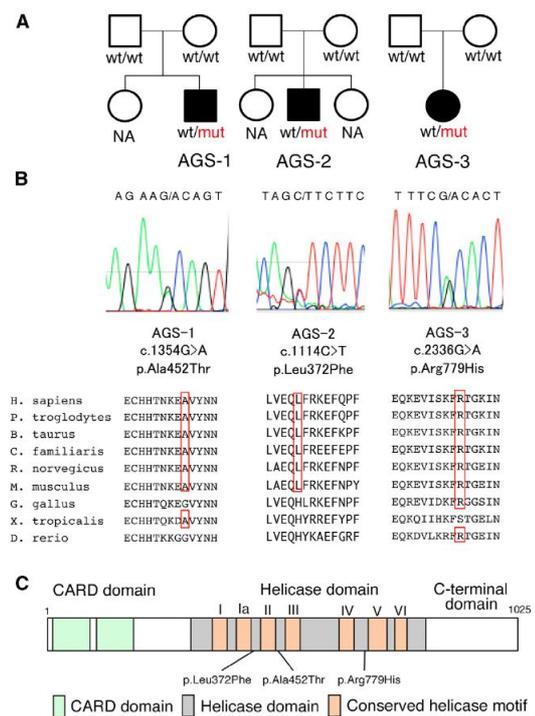


図 1 AGS 家系情報と同定された *IFIH1* 変異情報
A) AGS の家系図。 B) 同定された *IFIH1* 変異のクロマトグラム。下段に他の生物におけるアミノ酸配列の比較。赤括弧は保存されている

る種を示す。C) *IFIH1* 遺伝子の構造。Helicase domain に変異は集中している。

これらの変異はいずれも、1208 人の日本人の HGVD データベース、312 人のインハウスデータベースで認めず、さらに 4 種の機能予測ソフトウェア (SIFT、PolyPhen2、Mutation Tester、PROVEAN) のいずれかにおいて病的変異が推定された。

IFIH1 (蛋白名 MDA5) は dsRNA の細胞質内パターン認識受容体である。dsRNA に結合すると、MDA5 は C 型をした輪状構造を形成し、N 末の CARD 領域は外側となり、重合して繊維状構造物を形成する。外側に CARD 領域がミトコンドリア外膜に存在する MAVS を重合化し、TBK1 活性化、IRF3 リン酸化、I 型インターフェロン転写を亢進する (図 2)。

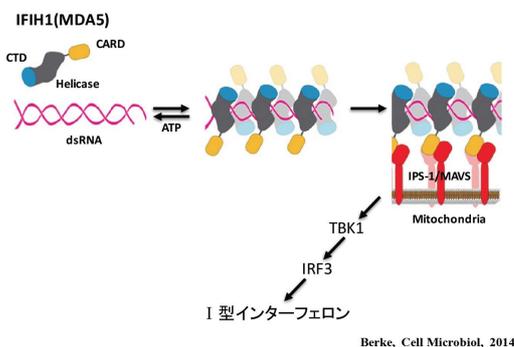


図 2 *IFIH1* (蛋白名 MDA5) の活性化機構
MDA5 がリガンドである dsRNA と結合、重合化し繊維状構造物を形成する。外側に CARD 領域がならび、ミトコンドリア外膜に存在する MAVS (IPS-1) と重合し、TBK1、IRF3 を介して I 型インターフェロン産生を亢進する。Berck Cell Microbiol, 2014 から引用。

続いて MDA5-dsRNA 複合体の結晶構造において、それぞれの変異がどこに位置するか既報告の構造解析データから検討した (Protein Data Bank code; 4gl2)。Ala 452 は dsRNA と接触部分に存在し、Ala452Thr 変異により、dsRNA と Ala452Thr は静電的な汎発が起こる事が推定された (図 3,A,B,C,D)。Leu372 は ATP 結合部位に存在し、Leu372Phe 変異は ATP 加水分解活性に影響を及ぼす事が推定された (図 3,A,B,E,F)。さらに Arg779 は MDA モノマー間の接触部位に存在し、

Arg779His 変異は静電的な相互作用に影響を及ぼす事が推定された (図 3,A,B,G,H)。

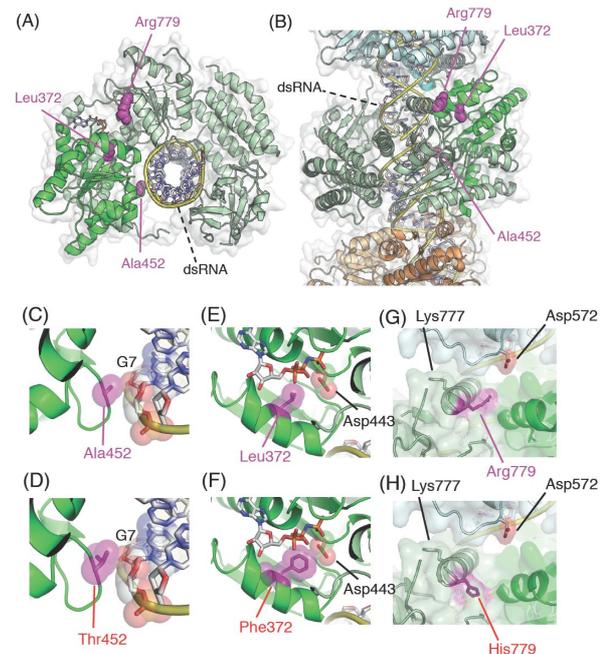


図 3. MDA アミノ酸変異による蛋白構造変化の予測

(A, B) ATP 結合領域、その他の MDA5 領域は緑もしくは薄緑で記載し、接する MDA5 モノマーはライトブルーもしくはオレンジで記載した。変異部位、Ala452, Leu372, Arg779 は紫で示した。(A) MDA 蛋白と dsRNA の 3 次元構造を上から見た図。(B) MDA5 モノマーの重合を横から見た図。これらのモデルは、MDA5 モノマーと 38bps の dsRNA を MDA5-dsRNA 線維 (EMDB code; 5444) の電顕解析から得られた電子密度図に当てはめた。(C, D, E, F, G, H) アミノ酸変異部位の拡大図。(C) Ala452 は dsRNA のグアニン残基 (G7) のリボース基の O2' 分子と接している。(D) Ala452Thr 変異により、Thr452 と dsRNA の O2' 分子が静電反発力が生じる。(E) Leu372 は ATP 結合ポケットに存在する。(F) Leu372Phe 変異は ATP 結合ポケットにおけるアミノ酸側鎖を増加させ、ATP 加水分解活性に影響を及ぼす。(G) Arg779 は MDA5 モノマー間の接合部に存在し、モノマー間の静電的な相互作用に関わっている。(H) Arg779His 変異は、その静電的な相互作用に影響を及ぼす。

今回の患者の臨床所見としては、典型的な AGS であり、周産期の感染症はなく、重度の発達遅滞、進行性の小頭症を認めた。3 人とも自己免疫現象を合併したが、興味深い事に凍瘡様皮疹は合併しなかった。

同定された *IFIH1* 変異と AGS の臨床症状の関係を見る目的で、患者末梢血の I 型インターフェロン活性化遺伝子発現を検討した (図

4) AGS 患者では、インターフェロン関連遺伝子発現の増強が観察され、*IFIH1* 遺伝子活性化、それに伴う Ⅱ型インターフェロン産生亢進が推定された。すなわち、*IFIH1* 遺伝子の機能獲得型変異により、Ⅱ型インターフェロンが過剰産生されていることが疑われた。

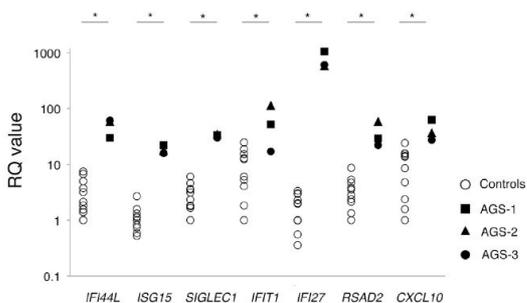


図 4. *IFIH1* 変異を伴う AGS 患者の末梢血インターフェロン関連遺伝子発現
それぞれ アクチンで標準化しインターフェロン関連遺伝子発現を RT-qPCR で測定した。○はコントロール 10 人、黒はそれぞれの患者の値。統計解析は Mann-Whitney U test で行い、* $p < 0.05$ 。

続いて、変異 *IFIH1* の Ⅱ型インターフェロン誘導能を検討するため、FLAG タグをつけた変異 *IFIH1* を *IFNB1* レポーターと一緒にヒト肝細胞癌株 Huh7 に強制発現した (図 5)。WT *IFIH1* に比べ、AGS 患者由来 *IFIH1* は *IFNB1* レポーター活性が高値であった。また GWAS で同定された SLE 関連 *IFIH1* 変異 (p.Ala946Thr) にくらべてもより高値を示した。即ち、AGS 関連 *IFIH1* 変異はインターフェロン産生能を亢進させることを示唆した。

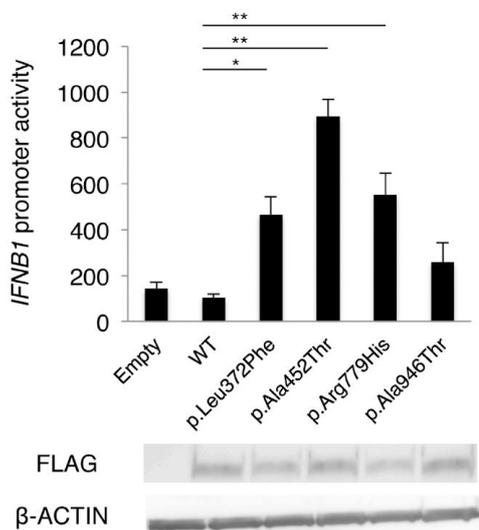


図 5. 変異 *IFIH1* の *IFNB1* レポーター活性への効果
ヒト肝細胞癌株 Huh7 に、*IFNB1* レポーターと変異 *IFIH1* を強制発現して、*IFNB1* レポーター活性を測定した。下段に変異 *IFIH1* 発現量 (FLAG) 蛋白量 (β -ACTIN) を示した。統計解析は Student's t test で行った。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

さらに、変異 *IFIH1* 機能を検討するため、*Ifih1* 欠損マウス胎児繊維芽細胞にレトロウイルスで各ヒト変異 *IFIH1* を再構成し、*IFIH1* 特異的に刺激可能である EMCV を感染させ、それぞれの *IFIH1* のリガンド応答性を検討した (図 6)。

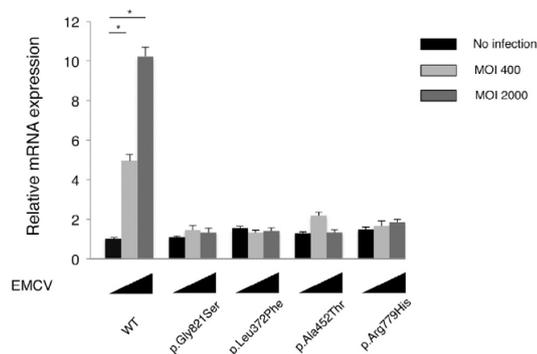


図 6. *Ifih1* 欠損マウス胎児繊維芽細胞にヒト変異 *IFIH1* 遺伝子発現した場合の *Ifnb* mRNA 発現
Ifih1 欠損マウス胎児繊維芽細胞にマウス WT *Ifih1*、変異マウス *Ifih1* (p.Gly821Ser)、AGS 患者由来変異ヒト *IFIH1* (p.Leu372Phe、p.Ala452Thr、p.Arg779His) をそれぞれ発現するレトロウイルスで再構成した。48 時間後 *IFIH1* 特異的な刺激可能な EMCV をそれぞれの MOI で感染、6 時間後に *Ifnb* mRNA の発現を RT-qPCR にて測定した。内部コントロールとして 18S rRNA を用い、トリプリケートの平均 \pm SEM で示した。2 回の実験の代表値を示す。統計解析は Student's t test で行い、* $p < 0.001$ 。各レトロウイルス再構成 *IFIH1* 分子は FLAG タグで発現レベルを確認した。

マウス WT *Ifih1* では EMCV のリガンド応答性を認めたが、マウス SLE モデルである *Ifih1* p.Gly812Ser 及び同定された *IFIH1* 変異では、いずれもリガンド応答性がみられなかった。即ち、変異 *IFIH1* は恒常的に Ⅱ型インターフェロンを活性化する機能獲得型変異であるが、リガンド応答性は欠落している事を示唆した。

以上、今回の研究の成果として、Aicardi-Goutières 症候群の新規遺伝子として *IFIH1* を同定した。さらに疾患関連変異は、型インターフェロン産生を亢進する機能獲得型の変異であるが、特異的なリガンドに対してはリガンド応答性を失っていることを見いだした。

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3件)

1. Oda, H., K. Nakagawa, J. Abe, T. Awaya, M. Funabiki, A. Hijikata, R. Nishikomori, M. Funatsuka, Y. Ohshima, Y. Sugawara, T. Yasumi, H. Kato, T. Shirai, O. Ohara, T. Fujita, and T. Heike, Aicardi-Goutieres syndrome is caused by *IFIH1* mutations. *Am J Hum Genet* 95:121-5, 2014.
2. Abe, J., K. Nakamura, R. Nishikomori, M. Kato, N. Mitsuiki, K. Izawa, T. Awaya, T. Kawai, T. Yasumi, I. Toyoshima, K. Hasegawa, Y. Ohshima, T. Hiragi, Y. Sasahara, Y. Suzuki, M. Kikuchi, H. Osaka, T. Ohya, S. Ninomiya, S. Fujikawa, M. Akasaka, N. Iwata, A. Kawakita, M. Funatsuka, H. Shintaku, O. Ohara, H. Ichinose, and T. Heike, A nationwide survey of Aicardi-Goutieres syndrome patients identifies a strong association between dominant *TREX1* mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study. *Rheumatology (Oxford)* 53:448-58, 2014.
3. Abe, J., K. Izawa, R. Nishikomori, T. Awaya, T. Kawai, T. Yasumi, N. Hiragi, T. Hiragi, Y. Ohshima, and T. Heike, Heterozygous *TREX1* p.Asp18Asn mutation can cause variable neurological symptoms in a family with Aicardi-Goutieres syndrome/familial chilblain lupus.

Rheumatology (Oxford) 52:406-8, 2013.

〔学会発表〕(計3件)

1. 西小森隆太 自己炎症性症候群アップデート 第59回日本リウマチ学会総会 4/23-25, 2015, 名古屋
2. Nishikomori, R. Aicardi-Goutières syndrome: Type I inteferonopathy Padiatric Academic Societies Meeting 4/25-28, 2015, San Diego USA
3. Oda, H., K. Nakagawa, J. Abe, T. Awaya, M. Funabiki, A. Hijikata, R. Nishikomori, M. Funatsuka, Y. Ohshima, Y. Sugawara, T. Yasumi, H. Kato, T. Shirai, O. Ohara, T. Fujita, and T. Heike Aicardi-Goutieres syndrome is caused by *IFIH1* mutations. *American Society of Human Genetics*, 10/19, 2014, San Diego, USA

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

西小森 隆太 (NISHIKOMORI, Ryuta)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70359800

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

小原 収 (OHARA, Osamu)
かずさDNA研究所・ヒトゲノム研究部・副
所長
研究者番号：20370926