

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07522

研究課題名(和文) 遺伝性脳小血管病変異TREX1の細胞内局在異常による毒性機能獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of gain-of-toxic function by abnormal subcellular localization of cerebral small vessel disease-related mutant TREX1

研究代表者

加藤 泰介 (Kato, Taisuke)

新潟大学・脳研究所・特任准教授

研究者番号：30598496

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)：我々は二本鎖DNA損傷(DSB) fociの定量解析から、RVCLに関連するTREX1変異タンパク質がDSBを誘導することを突き止め、この毒性はTREX1のエキソヌクレアーゼ活性と核内局在性に依存することを明らかとした。さらに、このDNA毒性は他の自己免疫性疾患に関連するTREX1変異体では誘導されないことから、RVCL変異特有の毒性であることを突き止めた。このRVCL変異TREX1をヒト正常線維芽細胞に持続的に発現することにより、細胞老化が誘導されることを明らかにした。さらに、RVCL変異TREX1発現誘導老化細胞には細胞老化関連分泌形質(SASP)が同時に誘導されることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TREX1遺伝子変異で発症する疾患のうち、RVCLに関わる変異のTREX1へ与える作用が不明であった。本研究結果は、これまで不明とされてきたRVCL関連変異TREX1の、RVCL発症に関わる分子機構に対し、RVCL変異特異的なDNA損傷毒性という機能獲得を発見し、初めて本症の分子メカニズム解明の突破口を開いた。RVCLは、中年期に発症し、死に至る非常に重篤な疾患である。本研究結果は、この重篤な遺伝性疾患の治療法の開発に向けた、画期的な一歩となる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：From quantitative analysis of double-stranded DNA break (DSB) foci, we found that the RVCL-associated TREX1 mutant protein induces DSB, and that this toxicity depends on the exonuclease activity and nuclear localization of TREX1. Furthermore, we found that this DNA toxicity is unique to RVCL mutations, as it is not induced in other autoimmune disease-associated TREX1 mutants. We found that persistent expression of this RVCL mutant TREX1 in normal human fibroblasts induced cellular senescence. Furthermore, we found that cellular senescence-associated secretory phenotype (SASP) was simultaneously induced in the senescent cells induced by expression of RVCL-mutant TREX1.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：TREX1 RVCL DNA損傷毒性 二本鎖DNA切断 細胞老化 SASP

1. 研究開始当初の背景

脳白質ジストロフィーを伴う網膜血管症 (Retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy: RVCL) は、成人期に、脳卒中・視覚障害・認知機能低下などを来す優性遺伝性の脳網膜血管症である。脳の小血管を病態の首座とし、病理学的には、閉塞・血管壁肥厚・基底膜の多層化を認める。進行すると血管漏出や虚血を引き起こし、組織に壊死性変化をもたらす。35~45 歳前後で急速に発症し、およそ 10 年で寝たきり、最終的には死にいたる。RVCL の原因遺伝子は、エキソヌクレアーゼの 1 種である TREX1 であり、変異は全て 3' 末端側のフレームシフト変異である。TREX1 は、小胞体局在性を持つが、RVCL 関連変異を持つ TREX1 は、細胞内にびまん性に局在するようになる。一方、TREX1 変異は RVCL の他にエカルディ・グティエール症候群 (Aicardi-Goutières syndrome: AGS)、家族性凍傷状狼瘡 (familial chilblain lupus: FCL) の原因遺伝子、さらに全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus: SLE) の感受性遺伝子としても知られている。AGS・SLE・FCL は自己免疫が関与する類縁疾患であるが、RVCL とこれらの疾患とは次の理由から異なる。1) 病態スペクトラムの違い: AGS・SLE・FCL では関節炎、血球減少症、皮膚病変を認める。しかし、RVCL ではこのような臨床症状は来さない。また、AGS や SLE では大血管が中心に侵されるが、RVCL では脳の小血管が障害される。2) AGS・SLE・FCL は TREX1 のエキソヌクレアーゼ活性の低下によって発症する: AGS は TREX1 mRNA もしくはタンパクの不安定性をもたらすミスセンス変異やエキソヌクレアーゼドメイン上流でのナンセンス変異のホモ接合体により、TREX1 タンパクの著明な低下もしくはエキソヌクレアーゼ活性の喪失が原因で発症する。SLE・FCL はエキソヌクレアーゼ活性を低下させるヘテロミスセンス変異によって発症する。一方、RVCL 変異ではタンパク発現とエキソヌクレアーゼ活性は共に保たれている。3) 抗 DNA 自己抗体の産生と Type1 interferons: AGS・SLE・FCL ではエキソヌクレアーゼ活性の低下により細胞質での DNA 断片の蓄積と、これに起因する抗 DNA 自己抗体の産生と Type1 interferons (IFNs) の増加が見られる。一方で RVCL ではこれらの変化は認めない。以上の点から、病態・分子メカニズム的に SLE・FCL が AGS に内包された類縁疾患であり、RVCL は原因遺伝子が同一でありながら、これらの疾患群とは異質な疾患であると考えられる。本年度、RVCL の分子メカニズムに関して、新たな仮説の提唱がなされた (Immunity. 2015;43(3):463-74.)。これは、TREX1 の C 末端の小胞体局在ドメインが、オリゴ糖転移酵素の酵素活性を調節しているとするものである。よって、C 末端を欠く RVCL 変異体ではこの調節能が欠如し、糖鎖修飾機構に異常を生じ、遊離糖鎖の蓄積が起こる。これに対する自己抗体の産生により RVCL が引き起こされるというものである。しかし、この機能障害は、RVCL 変異 TREX1 のノックインマウスのホモ接合体によって見出されている。つまり小胞体で機能する野生型 TREX1 遺伝子発現が欠損している。さらに単純な TREX1 遺伝子ノックアウトマウス由来細胞でも同様の糖鎖修飾機構の異常が見られており、AGS にても同様の機能障害が存在すると考えられる。しかし、AGS では脳小血管病は来さず、臨床的にも AGS と RVCL には大きな相違があり、この仮説では、本症の脳小血管病態をはじめとする疾患特異性は説明できない。さらに AGS 変異の保因者や SLE・FCL 変異ヘテロ接合体患者では脳小血管病を来さないため、単純なハプロ不全では本遺伝子は脳小血管病病態を引き起こさない。一方で、RVCL はヘテロ接合体で引き起こされることから、申請者は、RVCL 変異体特異的な毒性獲得機構があると推定した

2. 研究の目的

RVCL 変異 TREX1 は小胞体局在を失い、細胞内にびまん性に分布すると共に、本来存在しない核内にも移入する。RVCL 変異体はエキソヌクレアーゼ活性を保っていることから、申請者は“RVCL では変異 TREX1 タンパクが異所性に核内に局在することによりゲノム DNA に作用し、DNA ダメージを誘導するのではないか”という仮説を立て、これを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

・ドキシサイクリン誘導性変異 TREX1 発現細胞株

野生型・RVCL 関連変異 4 種・AGS 関連変異 2 種・SLE 関連変異 3 種・FCL 関連変異 2 種のドキシサイクリン誘導性 TREX1 発現細胞株を Flp-In T-Rex system と T-Rex 293 細胞を用いて樹立した。加えて、RVCL 関連変異 V235fs に核外排出シグナル (Nuclear export signal) または、エキソヌクレアーゼ失活変異 R62A (Exo.) を負荷した変異体発現細胞株を樹立した。

・イムノブロットティング

Dox 添加から 48 時間後、細胞を細胞溶解液 (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 2% SDS, protease inhibitor, Phosphatase inhibitor) により溶解・遠心後、上清のタンパク質濃度を BCA 法によって算出した。SDS サンプル化後、イムノブロットティングを行った。電気泳動ゲルは SuperSep™ Ace (Wako) を、メンブレンは PVDF 膜を使用した。ブロッキング溶液は、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO) を使用した。一次抗体希釈液は Can Get signal

1st solution (TOYOBO)を用い、4 で一晩インキュベートした。二次抗体希釈液は Can Get signal 2nd solution (TOYOBO) を用い、室温で1時間インキュベートした。一次抗体は rabbit anti-phospho-ATM (Ser1981) antibody (abcam)、rabbit anti-ATM antibody (abcam)、mouse anti-myc antibody (Millipore)、rabbit anti-phospho-chk1 antibody (Ser345) (cell signaling)、rabbit anti-phospho-chk2 antibody (Thr68) (cell signaling)、mouse anti-chk1 antibody (cell signaling)、rabbit anti-chk2 antibody (cell signaling)、rabbit anti-TREX1 antibody (abcam)を用いた。二次抗体は goat-anti-mouse IgG antibody (Dako)、goat-anti-Rabbit IgG antibody (Dako)を用いた。

・細胞増殖率の解析

293細胞の細胞増殖率はPremix WST-1 Cell Proliferation Assay System (Takara)を用いて、添付書のプロトコールに沿って実施した。細胞増殖率は、ドキシサイクリン無添加時、添加後2days, 4days, 6days, 8daysで実施した。

IMR-90細胞の細胞増殖率は、Click-iT Edu Imaging Kits (Thermo Fisher Scientific)を用いて、添付書のプロトコールに沿って実施した。細胞増殖率は、ドキシサイクリン無添加時、添加後2days, 4days, 6days, 8daysで実施した。

・細胞免疫染色

4-Well Culture Slide (CORNING)を内に、細胞密度を 1.0×10^4 /well になるように細胞を播種した。Dox 添加から48時間後に、4%パラホルムアルデヒドで15分細胞を固定した。0.2% Triton X-100 で15分細胞を処理し、膜の透過処理を行った。ブロッキング剤は5% BSAをPBSを用いて調整し、室温で1時間反応させた。その後、ブロッキング剤で希釈した一次抗体液中で一晩反応を行った。一次抗体に mouse anti-H2AX antibody (abcam)、rabbit anti-53BP1 antibody (Novus) を用いた。二次抗体は anti-mouse IgG antibody Alexa Fluor488 (Thermo Fisher Scientific)、anti-rabbit IgG antibody Alexa Fluor568 (Thermo Fisher Scientific) を用い、室温で一時間反応させた。核染色には Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) を用い、prolong Gold (Thermo Fisher Scientific) で封入を行った。観察は共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss LCM710)もしくはKEYENCE BZ-X700で行った。

細胞免疫染色によって得られたDNA二本鎖切断検出用の細胞免疫染色画像から、画像解析ソフトImaris (Bitplane)を用いて、各細胞の抗53BP1抗体と抗H2AX抗体の共陽性顆粒数を測定した。

・細胞死 / 生存率解析

変異TREX1発現による細胞死誘導の定量評価を、ToxiLight™ 非破壊細胞毒性バイオアッセイキット (LONZA) を用いて実施した。解析は、ドキシサイクリン無添加時、添加後2days, 4days, 6days, 8daysで実施した。

加えて、細胞生存率の算出をclonogenic assayによって解析した。Clonogenic assayは、各変異発現293細胞を6-well dishに同数、播種し、10~14日後に形成されたコロニー数を計測した。コロニー数をドキシサイクリン添加 / 非添加条件下での比率として変異間で比較を行った。

・siRNAによる内在性TREX1のノックダウン

siRNAはブレデザインされたIntegrated DNA Technologies社のDicer-Substrate siRNAを使用した。ネガティブコントロールには同社のNegative control Dicer-Substrate siRNAを使用した。24wellプレートに60%コンフルエントになるよう細胞を播種し、RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用いてsiRNA (10 nmole)の導入を行った。3日後、細胞を3分の1の細胞密度に再播種し、次の日に同様の条件で再度siRNAのトランスフェクションを行った。2回目のsiRNAのトランスフェクションから3日後に細胞を免疫染色用に固定、もしくはイムノプロットティング用に細胞を回収した。

・正常ヒト線維芽細胞変異TREX1発現細胞の樹立

Tet-On 3G Inducible発現誘導システム (Takara) を利用し、ドキシサイクリン誘導性に野生型、RVCL関連変異V235fs TREX1を安定発現する正常ヒト線維芽細胞 (IMR-90) を樹立した。

・老化関連 ガラクトシダーゼ染色

老化関連 ガラクトシダーゼ染色 (senescence-associated -galactosidase; Sa Gal staining) は、Cell signaling社のsenescence -Galactosidase Staining Kitを用いて実施した。

・mRNA定量

IMR-90に変異TREX1を長期的に発現させた細胞から、Direct-zol RNA Purification Kits (Zymo Research)を用いてトータルRNAを抽出し、逆転写後、老化関連遺伝子: p16、p21、並びにSASP (Senescence-associated secretory phenotype)関連遺伝子の発現レベルをdroplet digital

PCR を用いて定量評価した。

・統計処理

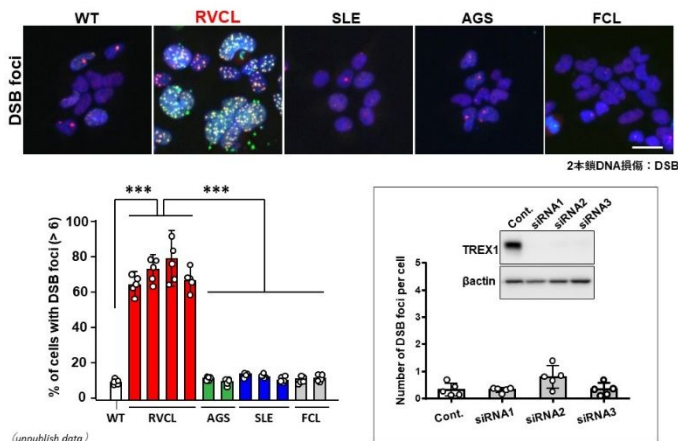
数値データの統計処理は、IBM SPSS Statistics を用いて行った。一元配置分散分析後、Dunnett 法を用いて、野生型細胞株との多重比較を行った。

4. 研究成果

・二本鎖 DNA 切断損傷マーカー (DSB foci) 定量評価

変異 TREX1 発現による、二本鎖 DNA 切断の誘導レベルを DSB foci のカウントによって比較評価した。その結果、RVCL 関連変異 TREX1 を発現させた場合のみ、著明な DSB foci の誘導が認められた (図 1)。この表現型は、内在性 TREX1 ノックダウン細胞では認められず、RVCL 関連変異 TREX1 に特異的な、毒性獲得によるものであることが示された。また、同時に、同細胞では顕著な DNA 損傷修復応答シグナルの亢進が認められた。このシグナルも同様に RVCL 変異 TREX1 発現細胞に特異的な現象であり、この DNA 損傷誘導が RVCL の分子病態の根幹に関与することが示唆された。

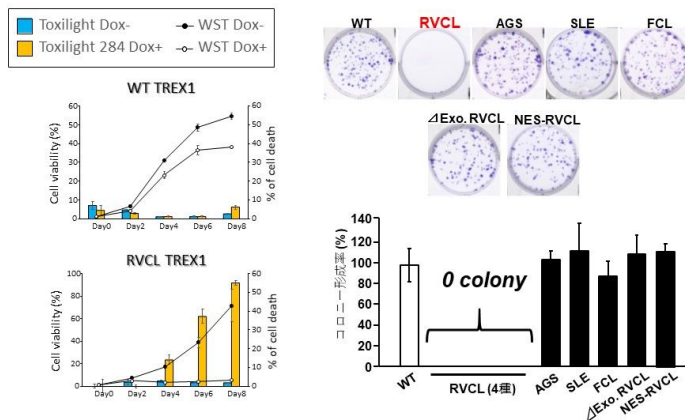
図1：変異TREX1発現と内在性TREX1欠損時のDNA損傷解析



・細胞増殖能 / 細胞死定量評価

変異 TREX1 の長期的発現による細胞増殖能、並びに細胞死誘導を定量評価した結果、293 不死化細胞において、RVCL 関連変異 TREX1 発現時特異的に、細胞増殖の停止と著しい細胞死が誘導された (図 2)。

図2：RVCL変異TREX1発現による不死化細胞への細胞死誘導



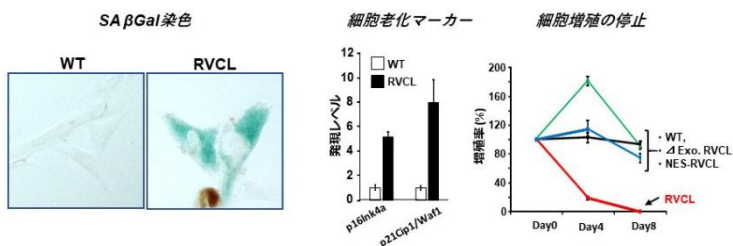
・NES/エキソヌクラーゼ失活変異の影響評価

上記の RVCL 変異 TREX1 発現時表現型に対する、核内局在性並びにエキソヌクラーゼ活性の関与を、NES または、エキソヌクラーゼ失活変異 (Exo.) を負荷することによって評価した。その結果、RVCL 変異 TREX1 発現によって誘導された DSB foci 誘導と細胞増殖停止 / 細胞死誘導は、NES またはエキソヌクラーゼ失活変異の負荷によって、強く抑制された (図 2)。このことから、RVCL 変異 TREX1 の毒性獲得には各内局在と、エキソヌクラーゼ活性が必要であることが示された。

・正常繊維芽細胞に対する RVCL 変異 TREX1 長期発現の影響評価

正常ヒト線維芽細胞である IMR-90 に RVCL 変異 TREX1 を長期発現させた結果、正常細胞では、細胞死ではなく、不可逆的な細胞増殖停止が優先的に誘導された。また、同細胞を SA-βGal 染色によって評価した結果、RVCL 変異 TREX1 を長期的に発現させ、増殖が停止した細胞では SA-βGal 活性が亢進していた。また、同時に、老化関連遺伝子 p16/p21 の発現上昇と、SASP 関連遺伝子の発現上昇が認められた (図 3)。このことから、RVCL 変異 TREX1 は正常細胞において、細胞老化と SASP を誘導することが示唆され

図3：RVCL変異TREX1発現による正常細胞への細胞老化誘導



た。

<引用文献>

Hasan M et al. Cytosolic Nuclease TREX1 Regulates Oligosaccharyltransferase Activity Independent of Nuclease Activity to Suppress Immune Activation Immunity. 2015;43(3):463-74.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤昭一朗、加藤泰介、野崎洋明、笠原杏子、小野寺理
2. 発表標題 RVCL-associated mutant TREX1 induces cell growth arrest
3. 学会等名 第60回日本神経学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤昭一朗、加藤泰介、野崎洋明、笠原杏子、小野寺理
2. 発表標題 Nuclear export and reduced enzyme activity of TREX1 improve cell growth arrest due to RVCL mutation
3. 学会等名 第61回日本神経学会総会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------