

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16097

研究課題名(和文) 蛋白欠損GPIによるインフラマソーム活性化：PIGT-PNHの自己炎症機序の解明

研究課題名(英文) Inflammasome activation by non-protein-linked GPI: elucidation of the autoinflammatory mechanism in PIGT-PNH

研究代表者

村田 祥吾 (Murata, Shogo)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80646034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)の新しい病型として、20番染色体上のPIGT遺伝子の変異を原因とするPIGT-PNHが報告された。PIGT-PNHは典型的なPNHの症状に加えて自己炎症症状を伴う特徴があり、その機序としてNLRP3インフラマソームの活性化に着目した。PIGT-PNHではPIGA-PNHと異なり、蛋白質の付加がない蛋白欠損GPIが細胞膜表面に蓄積する。PIGT-PNH患者検体、PIGT-KO THP-1細胞株を用いて検討した結果、蛋白欠損GPIが補体系ならびにインフラマソーム活性化に関与し、PIGT-PNHにおいて自己炎症症状を引き起こす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、PIGT-PNHに特異的な自己炎症症状を蛋白欠損GPIの蓄積によるNLRP3インフラマソーム活性化に起因するものと想定し、その分子機序の解明を行った。本研究の成果は今後のインフラマソーム研究において新たな知見を提供するものである。実臨床では、原因不明の自己炎症性疾患の診断に際し、PIGT-PNHを鑑別に挙げる一助となり、病型を同定することで適切な治療の提供に貢献できる。また、自己炎症性疾患の分子病態を標的とした治療法の開発にも貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：PIGT-PNH is caused by germline heterozygous mutation in PIGT gene in combination with somatic deletion of the normal PIGT gene localized on chromosome 20q. PIGT-PNH patients have clinically typical PNH, but they have in addition autoinflammatory features. Here, we focused on NLRP3 inflammasome activation as a autoinflammatory mechanism in PIGT-PNH. In PIGT mutation, non-protein-linked GPI accumulates on the cell surface. From our studies using PIGT-PNH patients' samples and PIGT-KO THP-1 cells, it is suggested that non-protein-linked GPI is involved in complement and inflammasome activation, causing autoinflammation in PIGT-PNH.

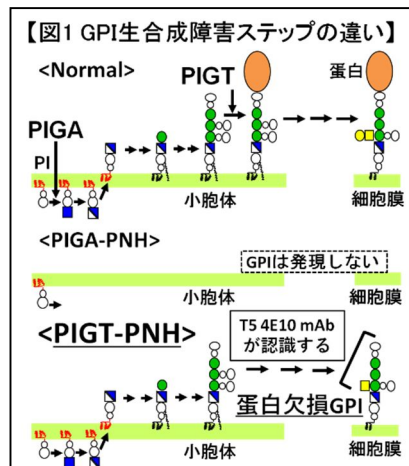
研究分野：血液内科学

キーワード：PIGT-PNH 蛋白欠損GPI インフラマソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH; paroxysmal nocturnal hemoglobinuria) は長らく、X 染色体遺伝子である *PIGA* の体細胞突然変異により GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカーを欠損した造血幹細胞がクローン性に拡大することで発症するとされてきた (PIGA-PNH)。PNH は GPI アンカー型の補体制御因子である CD55 と CD59 欠損による血管内溶血、血栓症、骨髄不全を 3 主徴とする。PIGT-PNH は、*PIGT* 遺伝子が局在する 20 番染色体の母方アリルに生殖細胞変異を伴った患者に、父方アリルの体細胞突然変異が加わることで発症する。2013 年に初めて報告され (Krawitz PM, et al. *Blood* 2013)、我々は本邦で世界第 2 例目の PIGT-PNH を同定した。2 症例とも典型的な PNH の症状に加えて、PIGA-PNH には見られない強い自己



炎症症状 (発熱、関節痛、蕁麻疹、反復性無菌性髄膜炎) が特徴的であり、Cryopyrin 関連周期熱症候群 (CAPS) の自己炎症症状と類似していた。CAPS の自己炎症症状は NLRP3 インフラソームの活性化に起因することが知られており、そこから類推し、PIGT-PNH においても NLRP3 インフラソーム (以下 インフラソームと表記) の活性化が起こっているのではないかと着想した。

インフラソームは NLRP3、ASC、pro-caspase1 より構成される細胞質内の蛋白質複合体であり、生体内への病原微生物の侵入などを契機に形成される。様々な分子により

活性化され、IL-1 や IL-18 などの炎症性サイトカインの分泌を引き起こす。この反応には Toll like receptor (TLR) を介して NF- κ B を活性化し、pro-IL-1 や NLRP3 の発現を促進する 1 次シグナルと、形成されたインフラソームを活性化し、caspase1 の作用により活性型の IL-1 の産生、分泌を誘導する 2 次シグナルが必要である。

GPI 生合成経路の過程で *PIGA* は第一ステップに必須であり、*PIGT* は生合成された GPI を蛋白質に付加する最終ステップに関与する。このため、細胞膜表面に GPI が全く発現しない *PIGA* 変異と異なり、*PIGT* 変異では蛋白質に付加のない GPI 中間体 (蛋白質欠損 GPI) が細胞膜表面に蓄積する (図 1)。この蛋白質欠損 GPI が PIGT-PNH におけるインフラソーム活性化の 1 次、2 次シグナルとして作用し、特異的な自己炎症を惹起しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

上述の背景のもと、自己炎症症状を伴う新しい PNH の病型として PIGT-PNH の疾患概念を確立し、その特異的な自己炎症機序を解明することを目的とした。自己炎症症状が PIGT-PNH に特異的に発現する蛋白質欠損 GPI の蓄積によるインフラソーム活性化に起因すると着想し、患者検体、細胞株を用いて詳細な機序の解明を試みた。さらに、得られた知見をもとに、インフラソーム活性化を伴う自己炎症性疾患の治療法の確立につなげることも長期的な目的とした。

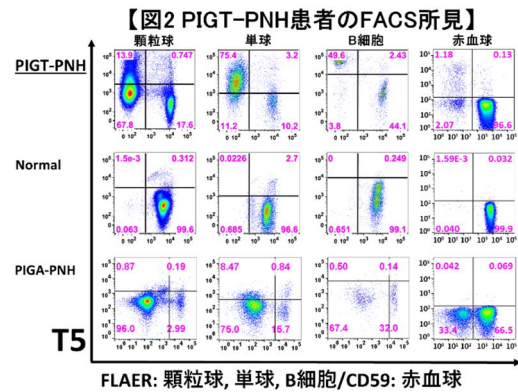
3. 研究の方法

独自に考案したフローサイトメトリー法によるスクリーニング検査により、新規 PIGT-PNH 患者の収集を全国規模で行った。PIGT-PNH、PIGA-PNH、健常人の末梢血単核球を用いて、インフラソームの活性化を ELISA 法、ウエスタンブロット法により検討した。ヒト単球由来細胞株 THP-1 を用いて、蛋白質欠損 GPI による補体系とインフラソーム活性化について ELISA 法により検討した。

(1) 新規 PIGT-PNH 患者の収集

PIGT-PNH では細胞膜表面に蛋白質に付加していない蛋白欠損 GPI が蓄積する。我々は蛋白欠損 GPI の側鎖を認識する T5 4E10 モノクローナル抗体 (T5mAb) (Tomavo S, et al. *Parasitology* 1994) と PNH 血球を同定する FLAER, CD59 抗体を用いたフローサイトメトリー法により、PIGT-PNH 患者の顆粒球、単球、B 細胞、赤血球の PNH 血球で T5 陽性集団が発現することを確認していた (図 2)。この方法を用いて、全国規模で炎症症状を伴う PNH 患者や原因不明の自己炎症性疾患患者のスクリーニング検査を施行した。

スクリーニング検査により T5 陽性の PNH 血球が確認された際には、患者血球よりゲノムを抽出し、PIGT 遺伝子のターゲットエクソームシーケンスを行う。これにより変異が見つかった場合は、その変異をサンガー法にて確認することとした。体細胞変異は、頬粘膜細胞を採取してゲノムを抽出し、同様にサンガー法にて確認することとした。



(2) 患者血球を用いたインフラマソーム活性化の検討

ELISA 法による IL-1 発現量の検討

PIGT-PNH 患者より採取した末梢血を密度勾配遠心分離法により単核球に分離。分離した単核球をインフラマソーム活性化に必要な 1 次シグナル (Pam3CSK4, Staphylococcal lipoteichoic acid (LTA), 酸性化ヒト血清 (acidified serum: AS))、2 次シグナル (ATP, Monosodium urate (MSU), AS) により刺激後の上清を採取し、インフラマソーム活性化の指標である IL-1 の発現量を ELISA 法で測定した。同様の方法により、PIGA-PNH 患者、健常人との発現量の差を検討した。

ウエスタンブロット法による pro-IL-1 , IL-1 , NLRP3 蛋白発現量の検討

ELISA 法による検討と同様に、1 次シグナル、2 次シグナルで刺激後の PIGT-PNH 患者の末梢血単核球の溶解物と上清を用いたウエスタンブロット法により、pro-IL-1 , IL-1 , NLRP3 の蛋白レベルでの発現量を検討した。

末梢血検体のサイトカイン測定

血管内溶血を伴う未治療 PIGA-PNH 患者 4 名の血清 IL-18、アミロイド A を測定し、PIGT-PNH 患者と比較した。

(3) 細胞株を用いた補体介在性のインフラマソーム活性化機序の検討

PIGT-PNH 患者の自己炎症症状が抗 C5 モノクローナル抗体 (エクリズマブ) により改善することが確認されていたため (Kawamoto M, et al. *BMJ Case Rep* 2018)、インフラマソーム活性化には補体の関与も想定されていた。しかし、In vitro の実験ではヒト単球細胞は補体活性化により容易に破壊されてしまうため、ヒト単球由来細胞株 THP-1 を用いて、補体活性化とインフラマソーム活性化の関係を検討した。PIGT, PIGA 遺伝子をそれぞれを knock out した THP-1 細胞株由来のマクロファージを用いて、AS により補体を活性化し、IL-1 の発現量を ELISA 法で測定した。また、IL-1 の分泌に補体活性化産物である C5a、membrane attack complex (MAC) のいずれが強く関与するかを C5a 受容体アンタゴニスト (W-54011)、抗 C5a 受容体抗体 (anti-C5aRmAb) ならびに C6, C7-depleted AS を用いてそれぞれ検討した。

4. 研究成果

(1) 新規 PIGT-PNH 患者の収集

炎症症状を伴う症例を含む 20 例の PNH 患者末梢血を採取し、T5mAb と FLAER, CD59 抗体を用いたフローサイトメトリー法により、PIGT-PNH のスクリーニング検査を行った。しかし、今回の研究期間中には T5 陽性の PNH 血球を持つ新たな PIGT-PNH 症例は確認できなかった。引き続き、自己炎症症状を伴う PNH 症例や原因不明の自己炎症性疾患のスクリーニング検査を継続していく。

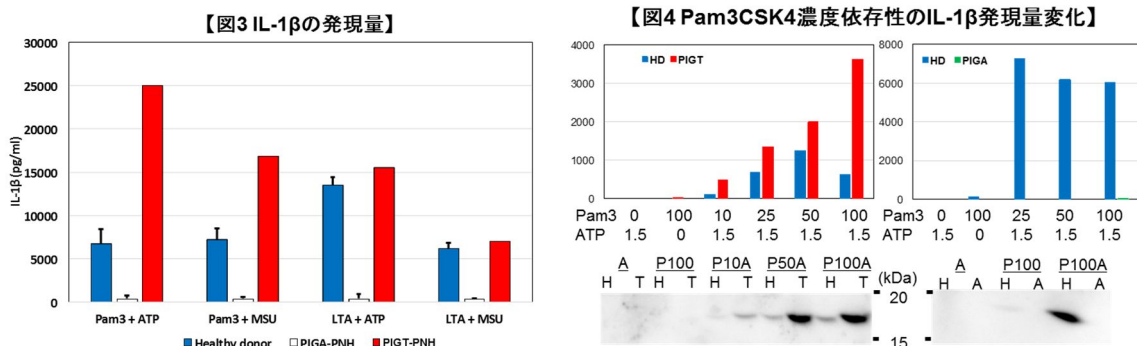
(2) 患者血球を用いたインフラマソーム活性化の検討

ELISA 法による解析

PIGT-PNH 患者では、インフラマソーム活性化の 1 次シグナル (Pam3CSK4 または LTA) と 2 次シグナル (ATP または MSU) の刺激により、PIGA-PNH 患者と比較し 45-60 倍の IL-1 の発現を認めた (図 3)。一方で、AS による刺激では、PIGT-PNH 患者で明らかな IL-1 発現の増加は認めなかった。また、PIGT-PNH 患者における IL-1 の発現は Pam3CSK4 の濃度依存性の増加を認めた (図 4)。

ウエスタンブロット法による解析

ELISA 法の結果と同様に、PIGT-PNH 患者では、健常人と比較し IL-1 の蛋白発現は増加しており、Pam3CSK4 濃度依存性の増加も認めた (図 4)。



Pam3CSK4、LTA はいずれも Toll like receptor 2 (TLR2) のリガンドであり、その刺激には GPI アンカー型蛋白である CD14 を必要とする。PNH 患者では通常 CD14 を欠損しているため、PIGT-PNH 患者の単球には CD14 欠損の影響を乗り越える強い刺激が加わっていることが想定された。PIGT-PNH 患者の TLR2 の感受性亢進ならびにインフラマソームの易活性化に寄与する因子として、異常蓄積した蛋白欠損 GPI の関与が考えられた。

末梢血検体のサイトカイン測定

血管内溶血を伴う未治療 PIGA-PNH 患者 4 名の血清 IL-18、アミロイド A を測定し、PIGT-PNH 患者と比較したところ、いずれも PIGT-PNH 患者で高値であることを確認した (下表)。

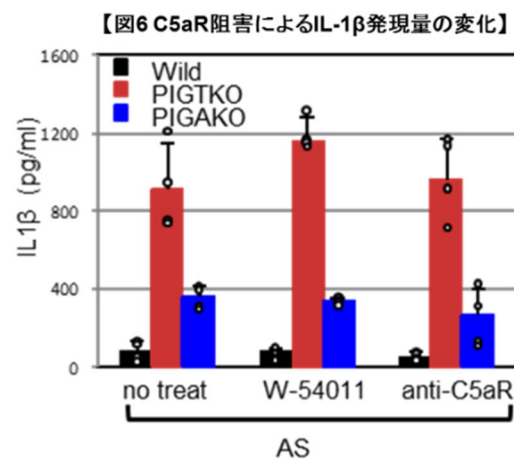
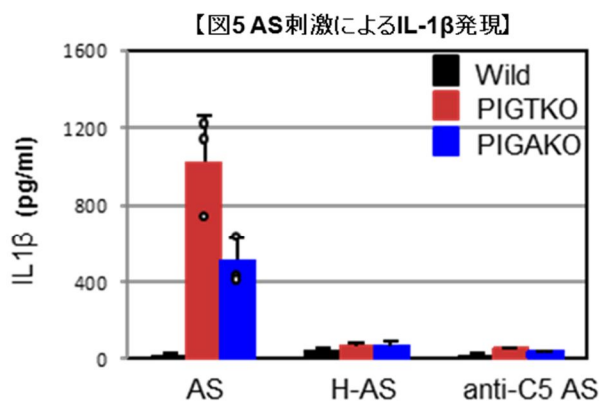
Patient	PIGA1	PIGA2	PIGA3	PIGA4	PIGT	Normal range
IL18 (pg/ml)	288	289	263	443	1410	<211.0
Serum amyloid A (μg/ml)	5.0	7.1	6.8	8.3	282.6	<8.0

(3) 細胞株を用いた補体介在性のインフラマソーム活性化機序の検討

ASにより補体の alternative pathway を活性化したところ、PIGT-KO, PIGA-KO THP-1 由来のマクロファージでは IL-1 の発現を認めたが (PIGT-KO > PIGA-KO)、heat inactivated AS や抗 C5 抗体を添加した AS では IL-1 の発現は阻害された (図 5)。この結果より、インフラマソームの活性化には C5 の活性化が関与すると考え、C5 の活性化産物である C5a と MAC に着目した。

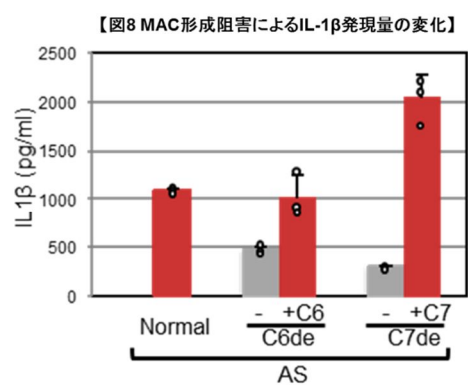
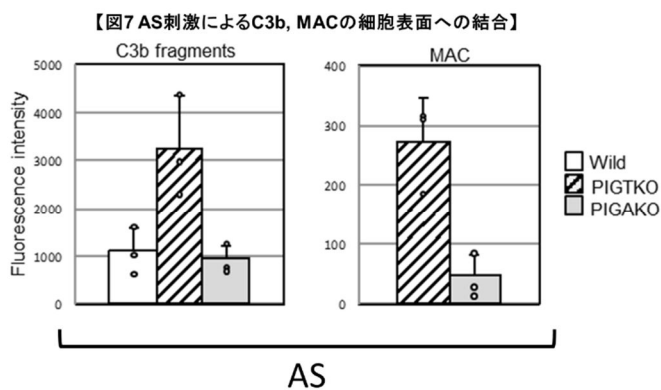
C5a 受容体阻害による検討

まず、WT, PIGA-KO, PIGT-KO THP-1 cell で C5a 受容体の発現が同レベルであることを確認した。次に、C5a 受容体アンタゴニスト (W-54011)、抗 C5a 受容体抗体 (anti-C5aRmAb) による 2 通りの方法で C5a 受容体を介したシグナル伝達を阻害したところ、いずれも IL-1 発現の明らかな抑制効果は認められなかった (図 6)。



MAC 形成阻害による検討

AS 刺激を行った THP-1 の細胞表面に付着する C3b, MAC をフローサイトメトリー法で確認したところ、PIGA-KO と比較し、PIGT-KO THP-1 に付着する C3b, MAC がいずれも高値であった (図 7)。次に、C6, C7-depleted AS を用い、C5a の産生は阻害せずに MAC 形成のみを阻害した条件下で IL-1 の発現を検討したところ、いずれも IL-1 発現の著明な減少を認めた。C6, C7 を depleted AS に補充したところ、IL-1 の発現は回復した (図 8)。



以上の結果より、インフラマソーム活性化による IL-1 の発現には C5a より MAC が重要な役割を果たしており、PIGT-PNH における MAC 形成の亢進には PIGT-PNH に特異的に発現する蛋白欠損 GPI の関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Akagi Y and Murata S, Yamashita Y, Tanaka K, Hiroi Y, Mushino T, Hosoi H, Nishikawa A, Tamura S, Sonoki T	4. 巻 -
2. 論文標題 Two episodes of transfusion-related acute lung injury (TRALI) occurring within a short period: A case report.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murata Shogo, Mushino Toshiki, Hosoi Hiroki, Kuriyama Kodai, Nishikawa Akinori, Nagakura Shoichi, Horikawa Kentaro, Yonemura Yuji, Nakakuma Hideki, Sonoki Takashi, Hanaoka Nobuyoshi	4. 巻 143
2. 論文標題 Soluble NKG2D Ligands Are Potential Biomarkers and Sentinels of Immune-Mediated Bone Marrow Injury in Bone Marrow Failure Syndromes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Haematologica	6. 最初と最後の頁 33 ~ 39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000500657	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 Hochsmann Britta, Murakami Yoshiko, Osato Makiko, Knaus Alexej, Kawamoto Michi, Inoue Norimitsu, Hirata Tetsuya, Murata Shogo, Anliker Markus, Eggermann Thomas, Floettmann Ricarda, Hollein Alexander, Nishimura Jun-ichi, Kanakura Yuzuru, Kohara Nobuo, Schrezenmeier Hubert, Krawitz Peter M., Kinoshita Taroh	4. 巻 129
2. 論文標題 Complement and inflammasome overactivation mediates paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with autoinflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 5123 ~ 5136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI123501	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hosoi Hiroki, Mushino Toshiki, Nishikawa Akinori, Murata Shogo, Kuriyama Kodai, Yamashita Yusuke, Kobata Hiroshi, Ooiwa Takehiro, Hanaoka Nobuyoshi, Tamura Shinobu, Sonoki Takashi	4. 巻 139
2. 論文標題 Marked Elevation of Serum Hyaluronic Acid in Patients Exhibiting Late-Phase Ascites after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Haematologica	6. 最初と最後の頁 81 ~ 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000486702	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 Hosoi Hiroki, Mushino Toshiki, Nishikawa Akinori, Hashimoto Hisako, Murata Shogo, Hatanaka Kazuo, Tamura Shinobu, Hanaoka Nobuyuki, Shimizu Norio, Sonoki Takashi	4. 巻 107
2. 論文標題 Severe graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with residual mogamulizumab concentration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 717 ~ 719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-2456-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hosoi Hiroki, Hatanaka Kazuo, Murata Shogo, Mushino Toshiki, Kuriyama Kodai, Nishikawa Akinori, Hanaoka Nobuyoshi, Tamura Shinobu, Nakakuma Hideki, Sonoki Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Long-term complete remission of early hematological relapse after discontinuation of immunosuppressants following allogeneic transplantation for Sezary syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hematology Reports	6. 最初と最後の頁 7497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4081/hr.2018.7497	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 村上良子、大里真幸子、村田祥吾、川本未知、植田康隆、西村純一、幸原伸夫、井上徳光、金倉謙、木下タロウ
2. 発表標題 自己炎症症状を伴う発作性夜間へモグロビン尿症 : PIGT-PNH
3. 学会等名 第3回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会
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
研究協力者	大里 真幸子 (Osato Makiko)	大阪大学微生物病研究所・藪本難病解明寄附研究部門・大学院生 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	村上 良子 (Murakami Yoshiko)	大阪大学微生物病研究所・藪本難病解明寄附研究部門・教授 (14401)	
研究協力者	木下 タロウ (Kinoshita Taroh)	大阪大学微生物病研究所・藪本難病解明寄附研究部門・教授 (14401)	