

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08754

研究課題名(和文)新規遺伝性インターフェロン制御異常症の同定と解析

研究課題名(英文)Identification and analysis of novel inherited dysregulation of interferon

研究代表者

国本 佳代(Kunimoto, Kayo)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10438278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：父由来Xaと母由来Xbの複合ヘテロ変異を持つ患児と両親のIFN 刺激後の細胞内STAT1リン酸化は、不死化B細胞では父、患児で増強した。末梢血単核球におけるI型IFN応答遺伝子の発現はqRT-PCRで患児と父で高値であった。皮疹の免疫組織学的検討では、患児、父ともにpSTAT1の発現は陽性であった。野生型XとXa、Xb変異遺伝子を導入した293T細胞でのXの発現、293T細胞およびX欠損HAP1細胞におけるIFN 刺激後のISREとGASのレポーターアッセイでは変異による差を見出だせなかった。TRIFおよびIRF3の過剰発現によるIfna4プロモーターの活性化も変異による差はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者由来不死化B細胞などで観察された、IFN刺激後のSTAT1リン酸化の亢進が、293T細胞やHAP1細胞に遺伝子を過剰発現させた系では再現できず、X変異の機能的意義を示すことができなかったため、変異マウスの作成やタンパク質の作成ができていない。しかし、XaとXb変異はマウスでもよく保存されていることから、それらの生体内での意義を明らかにし、X欠損マウスと異なるI型IFN異常症モデルを得ることを目標に、CRSPAR/Cas9システムを用いてXa変異マウスとXb変異マウスを作成し、かけあわせて複合ヘテロ変異マウスを得るよう進めていく。

研究成果の概要(英文)：Intracellular STAT1 phosphorylation after IFN stimulation of cells from affected children and parents with a compound heterozygous mutation of paternal Xa and maternal Xb was enhanced in immortalized B cells in the father and affected children. Expression of type I IFN response genes in peripheral blood mononuclear cells was higher in affected children and father by qRT-PCR. Immunohistological examination of the skin rash showed positive expression of pSTAT1 in both the affected child and the father. Expression of X in wild-type X and Xa and Xb mutant 293T cells, and reporter assays for ISRE and GAS after IFN stimulation in 293T cells and X-deficient HAP1 cells showed no difference due to mutation. Activation of the Ifna4 promoter in 293T cells overexpressing TRIF and IRF3 also did not differ by mutation.

研究分野：自己炎症性疾患

キーワード：凍瘡様皮疹 インターフェロン制御異常症 新規遺伝子変異 自己炎症性疾患

1. 研究開始当初の背景

NNS は本邦において戦前から主に皮膚科と内科領域から断続的に報告されてきた疾患であり、乳幼児期発症の周期的な発熱、凍瘡様・結節性紅斑様皮疹、筋炎などの炎症とともに進行性のやせ、萎縮、拘縮などの消耗をきたす。近年になって海外から報告された joint contractures, muscular atrophy, microcytic anemia and panniculitis-induced lipodystrophy (JMP) 症候群と chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperature (CANDLE) 症候群とともに、*PSMB8* 遺伝子変異による免疫プロテアソーム機能不全を原因とすることから、PRAASs と呼ばれる。インフラマソーム/IL-1 β 異常を来す従来の自己炎症性疾患と異なり、全身性エリテマトーデスや皮膚筋炎などの全身性自己免疫疾患の特徴でもある I 型 IFN 異常を示し、核酸の代謝や認識に関わる遺伝子に変異を持つエカルディ・グティエール症候群 (AGS) や STING-associated vasculopathy with onset in infancy (SAVI) などとともに、自己免疫疾患との接点に位置する第二の自己炎症性疾患として注目されている。

以前から、和歌山県立医科大学皮膚科では、臨床的に NNS が疑われる症例について全国から症例を集め遺伝子解析を行ってきたが、*PSMB8* 遺伝子変異が見いだされないものについて次世代シーケンサーを用いたエキソーム解析を行ったところ、その中の 1 例にこれまでに疾患関連変異の報告のない IFN 制御遺伝子である *X* に複合ヘテロ変異を見出した。この症例は凍瘡様皮疹と周期性発熱を示すものの脂肪萎縮がなく、またヘテロ変異の一方をもつ父親も同様のエピソードをもち、現在も診断未確定の炎症性皮疹を伴うことから同症あるいは類症と考えられるなど、NNS と異なる特徴をもつ。また、*X* 欠損マウスは自然発症する表現型はないが、IFN に対する応答異常を認めることから、*X* の生体内での重要性は明らかである。そこで本研究では、「NNS 様症例に見いだされた 2 つの *X* 変異に病的意義はあるのか?」、さらに「この症例にとって I 型 IFN 異常症が本当に病態形成に重要なのか?」という問いに対する答えを明らかにするため、検証を行う。

2. 研究の目的

本研究においては、NNS 様新規症例における *X* 変異とそれによる IFN シグナル異常の病的意義を明らかにすることを目的とする。*X* は 1998 年にクローニングされた分子で、ノックアウトマウスも作成されているが明らかな表現型はなく、またこれまでヒトの疾患での疾患関連変異の報告はない。

I 型 IFN 異常症 (type I interferonopathy) とは核酸の認識から I 型 IFN 産生、さらに IFN 受容体から転写応答に至る一連のシグナル異常により I 型 IFN 応答が亢進することを指すが、AGS や SAVI などその最上流の変異による疾患に対し、*X* は最下流の転写を制御する分子であり、その変異による疾患は、I 型 IFN 異常症の中でも特異な存在となる。最下流の新たな作用点による I 型 IFN 異常症の存在が明らかになれば、IFN 受容体からのシグナルを抑える JAK 阻害薬以上に、全ての I 型 IFN 異常症に有効な新たな創薬ターゲットが見いだされる可能性がある。

3. 研究の方法

X 変異による IFN 応答の亢進を確認するため、*Xa* と *Xb* の複合ヘテロ変異を持つ患児とその両親 (*Xa* ヘテロ変異を持つ父親と *Xb* ヘテロ変異を持つ母親) の末梢血単核球あるいは不死化 B 細胞を用い、IFN 添加後の細胞内 STAT1 リン酸化の程度を FACS で解析した。

さらに、皮膚炎の生検組織における STAT1 と p-STAT1 の発現を検討し、炎症局所における I 型 IFN 応答亢進の有無について病理組織学的に検討した。

野生型 *X*、*Xa*、*Xb* 変異遺伝子の組み込まれたレンチウイルスベクターを作成し、293T 細胞 (野生型では *X* の発現を認めない) に導入し *X* の発現をウェスタンブロットにて検討した。

293T 細胞と *X* 欠損 HAP1 細胞 (CML 由来一倍体細胞) に変異遺伝子を強制発現させる系を用い、IFN 刺激後の IFN 刺激応答因子 (ISRE: pSTAT1 と pSTAT2 のヘテロダイマーが結合) と活性化配列 (GAS: pSTAT1 のホモダイマーが結合) のレポーターアッセイによって変異による差異を検討した。

Xa と *Xb* 変異はマウスでもよく保存されていることから、それらの生体内での意義を明らかにし、*X* 欠損マウスと異なる I 型 IFN 異常症モデルを得ることを目標に、CRSPAR/Cas9 システムを用いて *Xa* 変異マウスと *Xb* 変異マウスを作成し、かけあわせて複合ヘテロ変異マウスを得る。これらのマウスは自己炎症あるいは免疫不全の表現型を示す可能性があるため、生存率、体重変化を確認すると共に、脾臓、胸腺、骨髄における血球産生・分布に異常がないか、FACS あるいは病理組織学的に検討する。さらに、寒冷刺激やウイルス感染を模した CpG-DNA 刺激後の各種サイトカイン産生、遺伝子発現の変化、皮疹の出現の有無などを検討する。

4. 研究成果

まず病的意義が疑われる父親由来の Xa と意義はないと思われる母親由来の Xb の複合ヘテロ変異を持つ患児と両親の末梢血単核球および不死化 B 細胞を用い、IFN 刺激後の細胞内 STAT1 リン酸化の程度を FACS で経時的に解析した結果、末梢血単核球においては、患児と父親で無刺激で陽性であり、IFN 刺激後は特に患児で大きく増強した。不死化 B 細胞においては、父親で無刺激で陽性となり、IFN 刺激後は患児と父親とも同程度に増強した。母親ではいずれも陰性であった。以上の結果から、Xb 変異は単独では機能的な意義はないが、Xa 変異と共存するとその機能を修飾する可能性が考えられた。また、末梢血単核球における I 型 IFN 応答遺伝子の発現について qRT-PCR にて検討した結果、患児と父親では 6 遺伝子のいずれも健常者コントロールより高値であり、患児と父親で発現量に大きな違いはなかった。

さらに、患児と父親の皮疹の生検組織について免疫組織学的に検討した結果、患児では MP0 陽性好中球と CD68 陽性マクロファージが主に浸潤するのに対して父親では CD68 陽性マクロファージと CD4、CD8 陽性 T 細胞が主に浸潤し、p-STAT1 の発現は両者の浸潤細胞ともに陽性で、父親でより強く発現が見られた。

次に、野生型 X と Xa、Xb 変異遺伝子をそれぞれ発現ベクターに組み込んだプラスミドを作成して 293T 細胞に導入し X の発現をウェスタンブロットにて検討したが、分子量や発現量に明らかな差は見られなかった。そこで、これらのプラスミドを X 欠損 HAP1 細胞に導入し、IFN 刺激後の細胞内 STAT1 リン酸化をウェスタンブロットにて検討したが、Xa、Xb 変異ともに野生型と明らかな差を認めなかった。

患者由来細胞や皮膚炎組織において、pSTAT1 の発現に差を認めたが、X が STAT1 のリン酸化を直接抑制するという報告はないことから、確率した 293T 細胞と X 欠損 HAP1 細胞 (CML 由来一倍体細胞) に変異遺伝子を強制発現させる系を用い、IFN 刺激後の IFN 刺激応答因子 (ISRE:pSTAT1 と pSTAT2 のヘテロダイマーが結合) と 活性化配列 (GAS:pSTAT1 のホモダイマーが結合) のレポーターアッセイによって変異による差異の検出を試みた。

293T 細胞を用いた IFN 刺激 16 時間後の IRSE-Luc アッセイにて、野生型 X が容量依存性に Luc 活性を低下させたが、父親由来 Xa、母親由来 Xb 変異のいずれもその程度に変化なく、またインターナルコントロールとして用いた HSV-Tk 活性は X の容量依存性に増加していた。そこで IFN 刺激 16 時間後の GAS-Luc アッセイと IRSELuc アッセイを行なったが、いずれも同様の結果で、Xa、Xb 変異いずれも活性変化の程度は野生型 X と差はなかった。ただ、293T は X を欠損するわけではないので、同様の実験を X 欠損 HAP1 細胞にて行った。

まず、IFN 刺激 16 時間後の GAS-Luc アッセイと IFN 刺激 16 時間後の IRSE-Luc アッセイを行ったが、いずれも野生型 X、Xa、Xb 変異ともに単独での Luc 活性の低下は明らかでなく、インターナルコントロールの HSV-Tk 活性が X の容量依存性に増加するため、対比として見かけ上低下するように見えるという結果であった。

そこで、インターナルコントロールを SV40 に変更したところ、活性の X 容量依存性増加は消失し、Luc 活性の X 容量依存性低下がはっきり見えるようになったが、変異による差を見出すことはできなかった。

引き続き遺伝子過剰発現系を用いた検証を進めた。

293T 細胞および X を欠損する HAP1 細胞において、IFN 刺激による ISRE の活性化 IFN 刺激による ISRE および GAS の活性化が誘導されることを確認し、野生型 X と Xa あるいは Xb の過剰発現した場合の活性化の変化を比較したが、いずれも同様の抑制効果が観察された。さらに、X が IRF3 の活性化を抑制するとの報告があることから、293T 細胞における TRIF および IRF3 の過剰発現による Ifna4 プロモーターの活性化を確認し、野生型 X と Xa あるいは Xb の過剰発現した場合の活性化の変化を比較したが、やはりいずれも同様の抑制効果が観察され、変異による差をとらえることはできなかった。

末梢血に UBA1 遺伝子のヘテロ変異を見出した 64 歳発症の VEXAS 症候群患者について、さらに唾液や皮疹、筋病変から抽出した遺伝子の解析を行い、それぞれ変異なし、ヘテロ、変異なしという結果から、体細胞モザイクと証明した。さらに、診断不能な好中球性紅斑としてすでに論文報告されていた 84 歳の症例についても、同じ UBA1 変異を血液でほぼヘテロに見出すも、唾液では変異なく、体細胞モザイクによる VEXAS 症候群と確定診断した。

患者由来不死化 B 細胞などで観察された、IFN 刺激後の STAT1 リン酸化の亢進が、293T 細胞や HAP1 細胞に遺伝子を過剰発現させた系では再現できず、X 変異の機能的意義を示すことができないため、当初行う予定だった変異マウスの作成やタンパク質の作成に踏み出せないでいる。しかし、Xa と Xb 変異はマウスでもよく保存されていることから、それらの生体内での意義を明らかにし、X 欠損マウスと異なる I 型 IFN 異常症モデルを得ることを目標に、CRSPAR/Cas9 システムを用いて Xa 変異マウスと Xb 変異マウスを作成し、かけあわせて複合ヘテロ変異マウスを得るように今後は実験を進めていく。これらのマウスは自己炎症あるいは免疫不全の表現型を示す可能性があるため、生存率、体重変化を確認すると共に、脾臓、胸腺、骨髄における血球産生・

分布に異常がないか、FACS あるいは病理組織学的に検討する。さらに、寒冷刺激やウイルス感染を模した CpG-DNA 刺激後の各種サイトカイン産生、遺伝子発現の変化、皮疹の出現の有無などを検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanazawa N, Hemmi H, Kinjo N, Ohnishi H, Hamazaki J, Mishima H, Kinoshita A, Mizushima T, Hamada S, Hamada K, Kawamoto N, Kadowaki S, Honda Y, Izawa K, Nishikomori R, Tsumura M, Yamashita Y, Tamura S, Orimo T, Ozasa T, Kato T, Sasaki I, Fukuda-Ohta Y, Wakaki-Nishiyama N, Inaba Y, Kunimoto K, 他6名	4. 巻 12
2. 論文標題 Heterozygous missense variant of the proteasome subunit -type 9 causes neonatal-onset autoinflammation and immunodeficiency.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 6819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27085-y.	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 国本 佳代, 金澤 伸雄	4. 巻 293
2. 論文標題 NNS、PRAAS、ORAS/自己炎症性脂肪萎縮症	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Derma.	6. 最初と最後の頁 33-41
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 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 Kanazawa N, Hemmi H, Kinjo N, Ohnishi H, Hamazaki J, Mishima H, Kinoshita A, Mizushima T, Hamada S, Hamada K, Kawamoto N, Kadowaki S, Honda Y, Izawa K, Nishikomori R, Tsumura M, Yamashita Y, Tamura S, Orimo T, Ozasa T, Kato T, Sasaki I, Fukuda-Ohta Y, Wakaki-Nishiyama N, Inaba Y, Kunimoto K, 他6名	4. 巻 14
2. 論文標題 Heterozygous missense variant of the proteasome subunit -type 9 causes neonatal-onset autoinflammation and immunodeficiency.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 6819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27085-y.	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 Takayuki Miyamoto 1, Yoshitaka Honda, Kazushi Izawa, Nobuo Kanazawa, 他	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 Front. Immunol	6. 最初と最後の頁 :905960.
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 本田亮ほか
2. 発表標題 乳児期から発熱と凍瘡様皮疹を反復し、新規のインターフェロン調節遺伝子異常が疑われた親子例
3. 学会等名 第2回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会
4. 発表年 2019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
研究分担者	金澤 伸雄 (Kanazawa Nobuo) (90343227)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	邊見 弘明 (Henmi Hiroaki) (20451924)	岡山理科大学・獣医学部・教授 (35302)	

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