

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07836

研究課題名（和文）SIFD病態解明のためのTRNT1機能解析

研究課題名（英文）TRNT1 functional analysis for the Pathological Understanding of SIFD

研究代表者

長森 恒久（Nagamori, Tsunehisa）

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：40400098

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）：研究期間全体では、患者細胞ではTRNT1蛋白は健常と同じサイズで発現低下する事、これは不安定性によりプロテアソームで恒常的分解を受けている為とわかった。患者線維芽細胞では、健常に比して薬剤誘導小胞体ストレスの亢進をみた。不死化線維芽細胞におけるTRNT1siRNAノックダウンでは、同様に小胞体ストレス亢進を認め、またケミカルシャペロンである4-フェニル酪酸により解除を受ける事を見た。マウスマクロファージ系のRaw細胞でTRNT1ノックダウンするとTNF産生の亢進とNF-κBシグナルの亢進を見た。上記から、SIFDでは小胞体ストレス反応亢進が起こり、これが病状に関わる可能性が高まった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SIFDは最近発見された希少疾患であり、病態の解明が十分になされていない。本研究でTRNT1機能低下を示す異なる条件で共通して見られた小胞体ストレス亢進は、tRNAアミノアシル化に係る酵素の機能喪失の結果を詳細解明する点で学術的な意義があるのはもちろんだが、本疾患は臨床的に35%が早期死亡する予後不良の疾患である。骨髄移植は合併症により成績も悪く、現状は多彩な症候に対する対症療法を行うしか解決方法は無い。しかし本研究の知見は、ケミカルシャペロン作用のある薬剤を投与する事で、病気の進行を抑制できる可能性を示している。明らかに新規治療法開発に貢献する知見である。

研究成果の概要（英文）：During study period, the following findings were made:

1. In PBMC of the patient, TRNT1 was expressed at a lower level than in healthy individuals, even though it was the same size. This was due to its constant degradation by the proteasome because of its instability. 2. Patient fibroblasts exhibited increased drug-induced endoplasmic reticulum (ER) stress compared to healthy fibroblasts. 3. TRNT1 siRNA knockdown in immortalized fibroblasts also showed increased ER stress, which was alleviated by the chemical chaperone 4-phenylbutyric acid. 4. When TRNT1 was knocked down in mouse macrophage-like Raw cells, there was an increase in TNF production and NF-κB signaling.

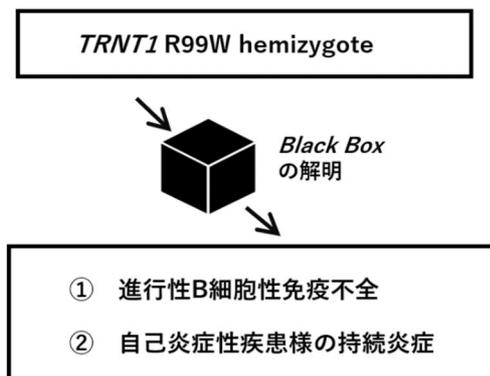
From the above, it was suggested that in SIFD (Sideroblastic Anemia with B-cell Immunodeficiency, Periodic Fevers, and Developmental Delay), enhanced ER stress response occurs, which is likely involved in the pathogenesis of the disease.

研究分野：小児科学

キーワード：SIFD TRNT1 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

Sideroblastic anemia with B-cell immunodeficiency, periodic fevers, and developmental delay :SIFD は常染色体劣性の遺伝性疾患である。2013 年に TRNT1(MIM_612907)が原因遺伝子として同定され、世界で 30 例前後、日本では 1 例が報告されている。我々は B 細胞性免疫不全、感音性難聴、精神発達遅滞、低身長、特徴的な顔貌等を呈し、37 年間の観察期間を有する患者で片アレルに TRNT1 を含む 600k 塩基対の微細欠失および対アレルに TRNT1 p_R99W を持つヘミ接合性変異を同定し、SIFD と診断した。元来 TRNT1 は tRNA アミノアシル化に必要な 5' 末端の CAA 配列保持を担保する酵素(tRNA nucleotidyltransferase, CCA-adding1)をコードし、tRNA のアミノアシル化に必要な 5' 末端の CCA 配列を欠失した tRNA に CCA の再付与を行う。従ってその機能低下により成熟 tRNA の割合が低下し、蛋白翻訳の精度が低下する事が示唆されている(Sasarman F, et al. Hum Mol Genet 2015)。一方で臨床免疫学的には、患者の B 細胞性免疫不全は進行性で、幼少期は成熟 B 細胞が少量ながら存在したものが年齢と共に消失し、IgM,IgA も検出感度以下となった特徴的な経過を見た(図 2)。B 細胞免疫不全は SIFD の中核をなす症候だが、進行性に関しここまで明確に示した過去の報告はない。また患者は病原体不明の発熱を繰り返し、無熱時血清の向炎症性サイトカイン値は健常成人に比し常時高値で、自己炎症性疾患としての病態をうかがわせる。しかし SIFD において、なぜ TRNT1 の機能喪失が進行性 B 細胞性免疫不全や自己炎症性疾患様持続炎症といった免疫学的症候を呈するに至るのか、そのメカニズムについては十分な解明がされていない。



2. 研究の目的

本研究の目的は、TRNT1 機能低下と進行性 B 細胞性免疫不全や自己炎症性疾患様持続炎症といった免疫学的症候との関連を解明する事にある。既報から小胞体 (Endoplasmic reticulum:ER) ストレスの関与に着目し、以下の仮説を持っている。

TRNT1 機能低下は ER ストレスの亢進によるアポトーシスへの高感受性を引き起こす
形質細胞では高分子蛋白 (免疫グロブリン) の産生という機能特性から、ER ストレスの影響が出やすい為、SIFD では (進行性) B 細胞性免疫不全が起こる
自己炎症様病態は ER ストレスから直接、あるいは欠陥 tRNA の蓄積が、自然免疫シグナルを持続的に刺激することによる
上記仮説を患者及び TRNT1 ノックダウン系を用いて関連解明する。

3. 研究の方法

TRNT1p.R99W ヘミ接合性変異の意義と動態; まず患者の持つ TRNT1 遺伝子変異が TRNT1 蛋白の発現にどのような影響を及ぼしているか調べる。患者末梢血単核球を分離して TRNT1 の mRNA, 蛋白発現を健常コントロールと比較する。また MG132 によるプロテオソーム阻害の影響についても解析する。

患者皮膚線維芽細胞における ER ストレスの評価：患者皮膚線維芽細胞において、薬剤誘導性 ER ストレスを評価する。ツニカマイシン投与下にスプライسد XBP-1 の発現量を調べる。

TRNT1 ノックダウンによる ER ストレスの評価：不死化正常線維芽細胞(hTERT-BJ1)において TRNT1 を siRNA でノックダウンする。この影響をツニカマイシン誘導 ER ストレスの変化として評価する。またケミカルシャペロンとしての 4 - フェニル酪酸の影響を評価する。

TRNT1 機能低下と自己炎症病態の関連：マウスマクロファージにおける TRNT1 のノックダウンの影響を評価する。マウスマクロファージ系の RAW264.7 細胞で TRNT1 siRNA ノックダウンを導入し無刺激、または LPS 刺激下の培養上清中の向炎症性サイトカインの産生を評価する。また NF- κ B 活性の SEAP レポーターアッセイ系が導入された RAW-Blue cell で同様にノックダウンによる NF- κ B 活性化への影響を評価し、もって TRNT1 機能低下と自己炎症様病態との関連を解明する。

4. 研究成果

TRNT1pR99W ヘミ接合性変異の動態：まず患者末梢血単核球で TRNT1 mRNA と蛋白の発現を見た。定量的 PCR における TRNT1 mRNA の発現は健常人と比較して 50% 程度の発現量であった。一方で蛋白においては健常人と同じ分子量できわめて少ない発現量を見た(図1)。何らかの恒常的分解を疑ってプロテアソーム阻害剤である MG132 を末梢血単核球に加えて蛋白発現を見たところ、健常成人の TRNT1 に変化はなく、患者の TRNT1 のみ発現量が亢進した。したがって、TRNT1pR99W は遺伝子変異による蛋白の不安定性があり、そのためミスフォールディング蛋白としてプロテアソームによる持続的な分解を受けていることがわかった(図2)。

患者皮膚線維芽細胞における ER ストレスの評価
次に患者の皮膚線維芽細胞における ER ストレスをみた。ツニカマイシンによるスプライسد XBP-1 の発現は健常成人に比較して高く、ER ストレスの亢進状態にあることがわかった。(図3)

TRNT1 ノックダウンによる ER ストレスの評価
正常線維芽細胞に siRNA による一時的な TRNT1 ノックダウンを行いツニカマイシン誘導 ER ストレスを評価した。TRNT1 ノックダウンではスプライسد XBP1 発現は亢進していた。また、正常と TRNT1 ノックダウン双方で、4 - フェニル酪酸の添加で XBP-1 発現が抑制されることがわかった。(図4)

TRNT1 機能低下と自己炎症病態の関連
マウスマクロファージ RAW264.7 細胞において TRNT1 ノックダウンを行った。siRNA の量に従って培養上清中の TNF 濃度の上昇を認めた。また、NF- κ B 活性のレポーターアッセイ系を持つ RAW-Blue cell での TRNT1 ノックダウンでも同様に NF- κ B 活性の上昇を認めた。(図5)

図 1

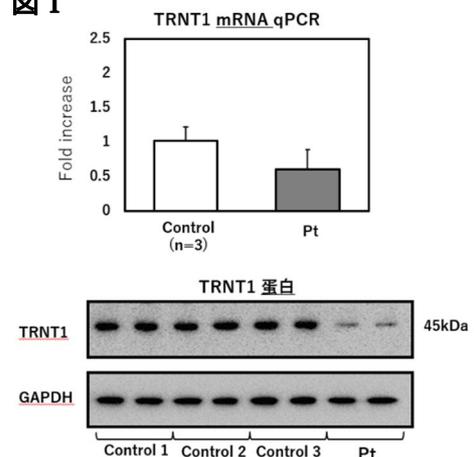


図 2

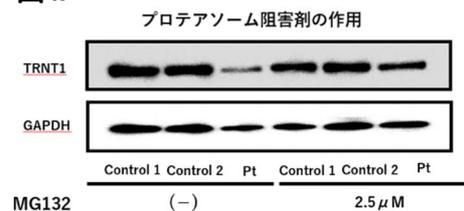


図 3

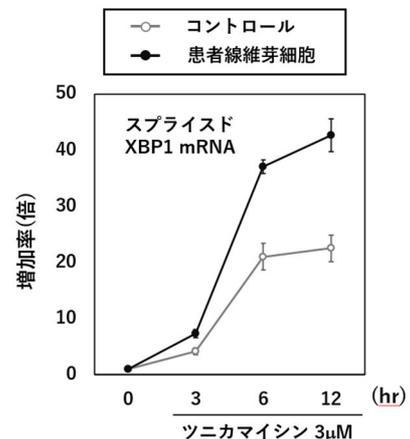


図 4

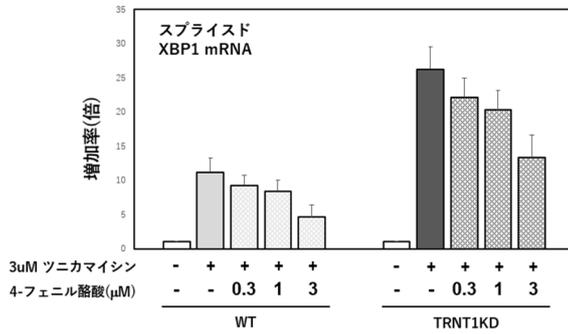
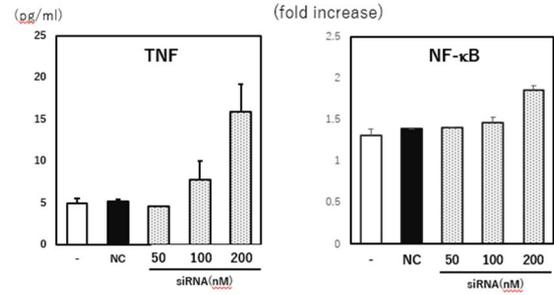


図 5



上記結果からの考察として；

本症例は報告されているもので最高齢の SIFD である。TRNT1R99W では主に蛋白の不安定性による分解で発現量が低下する事で TRNT1 活性が低下する事が示唆された。乳児期早期死亡例などでは酵素活性や tRNA 結合領域周辺での変異に集中する事が示唆されており、おそらく少量の酵素活性が残る軽症に関連する変異であることが推察される。

ER ストレスの亢進を線維芽細胞で見た。これまで T 細胞などでの報告があるが、新規に確認できた。TRNT1 はユビキタスに発現する蛋白であるが、患者の症状（毛髪、皮膚の異常、先天性白内障、感音性難聴、内分泌学的異常、B 細胞性免疫不全）を考えると、ER ストレスの亢進はユビキタスに起こり、特に何かしらの高分子タンパク質や、蛋白分泌に関わる細胞などでは細胞死高感受性から機能低下を起こすことが推定された。またケミカルシャペロンで解除されることも示し、治療法開発の点で意義があると考え

マクロファージにおける TRNT1 機能低下では炎症反応の亢進が見られた。残念ながらその機序に関しては未解明だが、これも治療対象として今後の研究の対象として興味深いものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長森 恒久
2. 発表標題 Sideroblastic anemia with Immunodeficiency, fevers and developmental delay (SIFD) の一例における小胞体ストレスの解析
3. 学会等名 第7回日本免疫不全・自己炎症性学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2024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	吉田 陽一郎 (Yoshida Yoichi rou) (80750306)	旭川医科大学・大学病院・助教 (10107)	
研究分担者	石羽澤 映美 (Ishibazawa Emi) (90516402)	旭川医科大学・大学病院・病院助教 (10107)	

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