

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590403

研究課題名(和文) プロテアソーム不全と炎症疾患：細胞ストレスによる新たな発症機序の解明

研究課題名(英文) Proteasome dysfunction and autoinflammatory diseases: A novel pathogenic mechanism caused by cell stress.

研究代表者

木下 晃 (KINOSHITA, Akira)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・講師

研究者番号：60372778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：不要なタンパク質を分解するプロテアソームのサブユニットをコードするPSMB8遺伝子の変異は自己炎症性疾患、中條-西村症候群(NNS)を引き起こす。本研究では、変異(G201V)を導入したモデルマウスの作製・解析を行った。加えて原因不明の自己炎症性疾患の変異解析を行った。モデルマウスは、細胞内のユビキチン化タンパク質の過剰な蓄積や過剰なリン酸化p38の核内移行は確認されたが、NNS様の病態は示さなかった。しかし雌マウスは出産後に子宮頸部と指に炎症を起こし、脂肪の消失を伴って死亡する。また次世代型シーケンサーを用いた解析で、別のプロテアソームサブユニット遺伝子にde novo変異が同定された。

研究成果の概要(英文)：We have reported that G201V mutation in PSMB8 gene encoding immunoproteasome beta 5i subunit causes an autoinflammatory disease, Nakajo-Nishimura syndrome (NNS) in 2011. In this study, we established NNS model mice harboring G201V mutation by gene-targeting method and analyzed their phenotypes. Excess accumulation of ubiquitinated proteins and excess nuclear translocation of phosphorylated p38 were observed in mice as in NNS patients, but homozygous mutant mouse didn't develop NNS-like phenotypes. However, female homozygous mutant mice developed severe inflammations of the endocervix and fingers after parturition, and died within a month. Additionally, mutational analyses were performed for four Japanese families with unidentified autoinflammatory diseases. A de novo mutation was identified in a patient with an autoinflammatory disease using Next Generation Sequencing systems.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：プロテアソーム 自己炎症性疾患 中條-西村症候群 PSMB8 ジーンターゲティング 次世代型シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

「自己炎症性疾患」は自己免疫疾患、アレルギー疾患、免疫不全症とは異なる新しい疾患概念であり、遺伝的な「自然免疫の異常」が原因で起きる炎症反応と組織障害が特徴の疾患とされている。

中條-西村症候群(NNS)は自己炎症性疾患の一種であり、幼少期の凍瘡様皮疹から始まり、結節性紅斑様皮疹と周期性の発熱を繰り返しながら、部分的な脂肪・筋肉の萎縮が進行していく。また節くれだった指や拘縮した指・肘関節、大脳基底核の石灰化も特徴である。

これまでに40例程度の症例報告がある希少疾患であるが、患者は和歌山・泉南地域や東北地域に集積しており、「創始者効果」が疑われる。また常染色体劣性遺伝形式で発症すると考えられている。

報告者らは、インフォームド・コンセントを得た後に、NNS患者を含むいとこ婚家系から、血液(DNA)および不死化B細胞と線維芽細胞細胞を採取し、研究材料とした。

Affymetrix社のGeneChip Human Mapping 500K array setを用いて、患者間で共通するホモ接合領域(つまり共通祖先に由来する領域)を抽出した。この結果、免疫関連遺伝子が密集する6番染色体短腕(6p21.31-32)に存在するPSMB8遺伝子(*PSMB8*)のG201V変異(201番目のアミノ酸がグリシンからバリンに変異)のホモ接合がNNSの原因であることを明らかにした。

細胞内には不要なタンパク質(例えば古いタンパク質や正しい立体構造を取れなかったタンパク質)は、ユビキチンライゲースによるユビキチン化を受け、「プロテアソーム」によって分解される。プロテアソームは多数のサブユニットから構成される巨大タンパク質複合体であり、「構成的プロテアソーム」と免疫における抗原提示を担当する「免疫プロテアソーム」に分類される。

*PSMB8*は免疫プロテアソームのβ5iサブユニットをコードし、プロテアソームのキモトリプシン活性を担っている。

NNS患者で同定された変異により、(1)キモトリプシン活性だけでなく、他のサブユニットがもつトリプシンおよびカスパーゼ様活性までもが低下する。(2)プロテアソームは多数のサブユニットが順序だてて取り込まれ形成されていくが、形成過程で障害が起こり、成熟型プロテアソームが減少する。(3)その結果、細胞内に分解されるべきユビキチン化タンパク質が蓄積し、(4)核内へのリン酸化p38が過剰に移行し、インターロイキン6の産生が増加する、ことがNNSの発症機序の一部であることを証明した(PNAS, 2011)。

2. 研究の目的

報告者はNNSの発症機序の一部を証明したが、全てを証明したとは考えていない。またNNSの治療法はまだ開発されていない。

NNSの発症機序に関わるプロテアソームの機能をより詳細に検討し、NNS以外の自己炎症性疾患の治療法の開発を目指して本研究を行った。

(1)上記研究はNNS患者由来の不死化B細胞や線維芽細胞を用いて行ったが、NNS患者の特徴である脂肪の萎縮などは検討できない。このため、ジーンターゲット法によりマウス*Psm8*にG201V変異を導入したノックインマウスを作製し、その表現形の解析を行い、発症機序を明らかにする。

(2)2011年の論文発表後、国内の医療機関からNNSに類似した自己炎症疾患が報告者らのもとに集まるようになった。また論文発表後に当研究機関に次世代型シーケンサー(NGS)が設置され、患者とその両親のDNAを用いた網羅的な変異解析が可能になった。本研究では、NGSを用いて新規の自己炎症性

疾患の責任遺伝子の単離を目指す。

3. 研究の方法

(1) NNS モデルマウスの作製と解析

本研究では、NNS 患者で同定された G201V 変異を ES 細胞内の相同組換え機構を利用したジーンターゲティング法を用いて導入した。

(i) ノックインマウスの作製

マウス *Psm8* を含む領域をクローニングし、ミュータジェネシスによる G201V 変異導入、2つの loxP 配列で挟んだネオマイシン耐性遺伝子とジフテリア毒素耐性遺伝子の挿入を行いノックインコンストラクトとした。

線状化したコンストラクトを C57BL/6 由来 ES 細胞にエレクトロポレーションを行った。ネオマイシン選択後、コロニーをピックアップし、PCR とサザンハイブリダイゼーションによる相同組換え ES 細胞を単離した。この ES 細胞からノックインマウスを作製した。

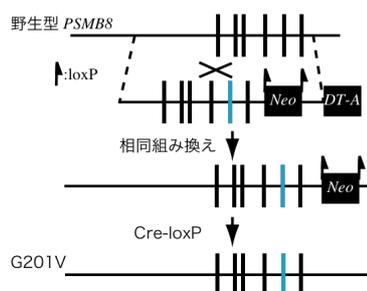


図 1. ノックインマウス作製方法

ノックインマウス同士を交配し、NNS 患者と同じ G201V ホモ接合マウスを誕生させ、本研究に用いた。

(ii) モデルマウスは NNS の病態を再現するか？

a. 野生型マウス、G201V ヘテロマウスおよびホモ接合マウスから皮膚線維芽細胞を単離した。100U/mL 濃度の IFN- γ の刺激により *Psm8* mRNA および $\beta 5i$ タンパク質の発現が大

幅(mRNA で 100 倍以上)に上昇した。これに対してヒト線維芽細胞では、IFN- γ による誘導が全くかからなかった。

b. 細胞抽出液をグリセロール濃度勾配超遠心法で分画した。各分画のプロテアソーム活性を測定したが、20S プロテアソームを含む分画では活性低下が見られたが、26S プロテアソームを含む分画では、NNS 患者で観察されたような活性低下は確認できなかった。

c. 細胞から総タンパク質と核タンパク質を抽出し、ウエスタンブロットを行った。

ホモ接合マウスでは、ユビキチン化タンパク質の蓄積が観察され、IFN- γ 刺激でその差が顕著になった。また、TNF- α 刺激によるリン酸化 p38 の過剰な核内移行が観察された。

d. しかしモデルマウスでは NNS 様の炎症病態は観察されなかった。

e. コロニー維持のためホモ接合マウス同士を交配させると、出産後の雌マウスの子宮頸部と指に炎症がおき、1 ヶ月以内に死亡した。死亡した個体を解剖した結果、腹部の脂肪がほぼ消失していた。

(2) NNS 類似疾患の変異解析

2011 年の論文発表後、国内の医療機関から NNS に類似した自己炎症性疾患が疑われる症例の変異解析の問い合わせが相次いだ。

インフォームド・コンセントと書面による同意書を得た後に、5 家系(患者とその両親のトリオが 4 家系、患者と父親のみが 1 家系)から、採血と DNA 抽出を行った。

解析手法として、*PSMB8* のサンガー法による解析を行い、変異が同定されなかったサンプルは次世代型シーケンサーを用いた解析を行った。アジレント社の SureSelect を用い

た全エキソンを対象とした変異解析(エキソーム解析)。

加えて、プロテアソームサブユニット遺伝子の全エキソンを対象としたカスタム Ampliseq (サーモ社)とサブユニット遺伝子の全領域(エキソン、非翻訳領域、反復配列を除いたイントロン)をキャプチャーするカスタム SureSelect を用いて、より深いリード数で変異解析を行った。

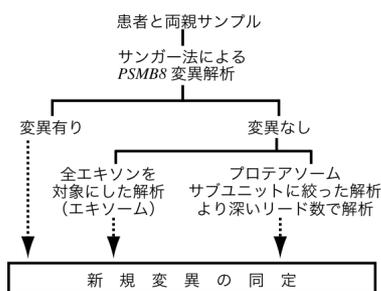


図 2. 変異解析の流れ

その結果、家系 1 で *PSMB8* に新規変異が同定された。また、家系 2 ではサブユニット遺伝子 *ADRM1* に 6 塩基欠失変異が同定された。しかし、父親にも同じ変異が同定されたため、エキソーム解析の結果を総合して、この患者は *TREX1* が原因の Aicardi-Goutieres 症候群と診断された。

家系 3 と 4 では、責任遺伝子の同定はできなかった。

家系 5 ではプロテアソームサブユニット遺伝子に *de novo* 変異が同定された。現在、変異が引き起こすプロテアソーム異常を検討し、論文投稿準備中であるため、遺伝子名は公表できない。しかし、プロテアソーム形成の際に取り込み異常が起きている。

4. 研究成果

報告者らは、自己炎症性疾患・中條-西村症候群(NNS)はプロテアソーム異常で発症すること、およびその発症機序の一部を 2011 年に報告した。本研究では NNS モデルマウスを作製し、その機能解析を行い、より詳細な発症機序の解明を目指した。

これまでに報告されている疾患モデルマウスでも、ヒト疾患表現形を示さないものがある。NNS モデルマウスでも期待に反して、NNS 患者様の病態を示さなかった。考えられる原因として、NNS の原因遺伝子 *Psmb8* の発現パターンがヒトと大きく異なることが考えられる。ヒト線維芽細胞では IFN- γ 刺激を行っても、その発現量は大きく変化しない。しかし、マウス線維芽細胞では、その発現量が RNA レベルで 100 倍以上にまで上昇する。つまりマウスでは、プロテアソームの機能低下を量で補っている可能性がある。今後、プロモーター領域の活性測定やメチル化解析を行う。

また、原因不明の自己炎症疾患患者の変異解析を行った。次世代型シーケンサーの発達により、大きな家系を集積する必要はなく、患者とその両親だけでも変異解析が可能になった。本研究では、全エキソンを一度に解析可能なエキソーム、標的遺伝子(今回はプロテアソーム構成遺伝子)のみを解析する Ampliseq、カスタム SureSelect を使用した。

この結果、自己炎症性疾患が疑われる 2 家系(1 と 5)でプロテアソーム構成遺伝子に、ミスセンス変異を同定した。

今後は、この患者・家族の試料を用いて、プロテアソームの機能異常、形成異常がないかを検討している。

本研究はまだ始まったばかりであり、今後も研究を進めていく。

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 11 件)

1. Genome-wide association study of HPV-associated cervical cancer in Japanese women.

Miura K., Kinoshita A., Higashijima A., Hayashida C., Abe S., Tokunaga K., Masuzaki H., Yoshiura K. Journal of Medical Virology 86, 1153-1158 (2014).

(査読有り)

2. Single human papillomavirus 16 or 52 infection and later cytological findings in Japanese women with NILM or ASC-US.

- Abe S., Miura K., Kinoshita A., Miura S., Yamasaki K., Hasegawa Y., Higashijima A., Jo O., Yoshida A., Kaneuchi M., Yoshiura K., Masuzaki H.
Journal of Human Genetics 59, 251-255 (2014).
(査読有り)
3. Predominantly placenta-expressed mRNAs in maternal plasma as predictive markers for twin-twin transfusion syndrome.
Miura K., Higashijima A., Miura S., Yamasaki K., Abe S., Hasegawa Y., Kaneuchi M., Yoshida A., Kinoshita A., Yoshiura K., Masuzaki H.
Prenatal Diagnosis, 34, 345- 349(2014).
(査読有り)
4. Identification of endometrioid endometrial carcinoma-associated microRNAs in tissue and plasma.
Tsukamoto o., Miura K., Abe S., Kaneuchi M., Higashijima A., Miura S., Kinoshita A., Yoshiura K., Masuzaki H.
Gynecologic Oncology, 132, 715-721 (2014).
(査読有り)
5. Initial viral load in cases of single human papillomavirus 16 or 52 persistent infection is associated with progression of later cytopathological findings in the uterine cervix.
Hamaguchi D, Miura K, Abe S, Kinoshita A., Miura S, Yamasaki K, Yoshiura K, Masuzaki H.
Journal of Medical Virology 82, 2093-2100 (2013).
(査読有り)
6. Copy number variation of the antimicrobial-gene, defensin beta 4, is associated with susceptibility to cervical cancer.
Abe S, Miura K, Kinoshita A., Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Sasaki K, Yoshida A, Yoshiura K. and Masuzaki H.
Journal of Human Genetics 58, 250-253 (2013).
(査読有り)
7. No evidence of association between 8q24 and susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without palate in Japanese population.
Hikida M, Tsuda M, Watanabe A, Kinoshita A., Akita S, Hirano A, Uchiyama T, Yoshiura KI.
Cleft Palate Craniofac Journal 49 714-717 (2012).
(査読有り)
8. The role of Irf6 in tooth epithelial invagination.kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions.
Blackburn J, Ohazama A, Kawasaki K, Otsuka-Tanaka Y, Liu B, Honda K, Rountree R, Hu Y, Kawasaki M, Birchmeier W, Schmidt-Ullrich R, Kinoshita A., Schutte B, Hammond N, Dixon M, Sharpe P.
Developmental Biology 365, 61-70 (2012).
(査読有り)
9. Mutations in PRRT2 responsible for paroxysmal kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions.
Ono S, Yoshiura K, Kinoshita A., Kikuchi T, Konishi T, Kanai K, Inou T, Osamura T, Saito K, Hirose S, Koide H, Tomita H, Ozawa H, Niikawa N, and Kurotaki N.
Journal of Human Genetics 57, 338-341 (2012).
(査読有り)
10. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase II processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair.

- Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake M, Matsuse M, Shimada M, Nardo T, Takahashi Y, Ohyama K, Ito K, Kinoshita A., Ono S, Masuyama R, Kudo T, Utani A, Tateishi S, Yamashita S, Yoshiura K, Ogi, T.
Nature Genetics 44, 586-592 (2012).
(査読有り)
11. Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy.
Higashijima A, Miura K, Mishima H, Kinoshita A., Jo O, Abe S, Hasegawa Y, Miura S, Yamasaki K, Yoshida A, Yoshiura K, Masuzaki H.
Prenatal Diagnosis 33, 214-222 (2012).
(査読有り)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 晃 (KINOSHITA, Akira)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・講師
研究者番号：60372778

(2) 研究分担者

木下 直江 (KINOSHITA, Naoe)
長崎大学・病院(医学系)・助教
研究者番号：50380928