

氏名 (本籍)	久保田 一 生 (岐阜県)		
学位の種類	博 士 (医学)		
学位授与番号	甲第	897	号
学位授与日付	平成 24 年 11 月 21 日		
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	In Vitro Analysis of the Functional Effects of an <i>NLRP3</i> G809S Variant with the co-Existence of <i>MEFV</i> Haplotype Variants in Atypical Autoinflammatory Syndrome		
審査委員	(主査) 教授	竹 内 保	
	(副査) 教授	石 塚 達 夫	教授 前 川 洋 一

論文内容の要旨

自己炎症性症候群は、自己抗体や自己反応性 T 細胞を認めず、自然免疫の異常により全身性の炎症を来す疾患とされる。多くは発熱、急性期タンパクの上昇、皮疹や関節炎などの臓器症状を繰り返す、または持続するのが特徴である。遺伝性の自己炎症性症候群のうちクライオパイリン関連周期熱症候群 (CAPS) は *NLRP3* (Nod-like receptor family pyrin domain containing 3) 遺伝子が原因遺伝子であり、病的意義の明らかにされた遺伝子変異は exon3 領域に集中しているが、exon3 以外に位置する変異も報告されている。今回申請者らは、*NLRP3* 遺伝子の exon5 上に位置する G809S variant と家族性地中海熱 (FMF, Familial Mediterranean fever) の原因遺伝子 *MEFV* (Mediterranean fever) のハプロタイプ variant の共存が非典型的な自己炎症性症候群の表現型に与える影響について *in vitro* の病態解析を行った。

【対象と方法】

- 1) 対象: 典型的な自己炎症性症候群とは異なる臨床症状を呈する 2 症例を含む 2 家系を対象とした。さらに、アレル頻度の解析には健常者 421 人を対照とした。
- 2) 遺伝子解析: 患者末梢血より Sepa Gene キットでゲノム DNA を抽出し、PCR 法で増幅した後ダイレクトシーケンスを行い、*NLRP3*、*MEFV*、*MVK* (Mevalonate kinase)、*TNFRSF1A* (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A) 遺伝子のエクソンの塩基配列を決定した。また、real time PCR を用いて *NLRP3* G809S のアレル頻度を検討した。
- 3) 血清サイトカイン等の測定: 発作時と非発作時の血清 IL-1 β 、IL-1ra、IL-18、TNF- α 、sTNFR1 および IL-6 濃度を human ELISA kit で測定した。
- 4) 単球からの IL-1 β 産生: 患者末梢血から単球を分離し、IFN- γ 20ng/ml と LPS 1 μ g/ml 刺激で 24 時間培養後、5mM ATP 刺激を 30 分間行った。培養上清の IL-1 β を human ELISA kit で測定した。
- 5) NF- κ B レポーター遺伝子活性解析: HEK293T 細胞に、pcDNA3.1+ FLAG-tagged *NLRP3* (野生型と置換体)、pcDNA3.1+ HA-tagged pyrin、pcDNA3.1+ myc-tagged ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)、pGL4.74-hRluc/TK および pGL4.32-luc2P/NF- κ B-RE/Hygro をリポフェクタミン 2000 で形質移入し、*NLRP3* のリガンドである R837 や MSU で刺激し、Dual-Luciferase Assay System で解析した。
- 6) Speck 形成実験: HEK293 細胞に Nucleofector で pcDNA3.1+ myc-tagged ASC を形質移入し、G418 で選択して ASC 安定発現株を樹立した。ASC 安定発現株に *NLRP3* (野生型と置換体) 発現ベクターをリポフェクタミン LTX で形質移入して 24 時間培養した後、蛍光免疫染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて ASC の Speck 形成頻度を計測した。

【結果】

- 1) 遺伝子解析：症例 1 は *NLRP3* 遺伝子に G809S をヘテロ接合性に、*MEFV* 遺伝子に P369S-R408Q をヘテロ接合性に認めた。症例 1 の父は *NLRP3* 遺伝子と *MEFV* 遺伝子にそれぞれ症例 1 と同じ variant を有し、母は *MEFV* 遺伝子に P369S-R408Q をヘテロ接合性に認めた。一方、症例 2 は、*NLRP3* 遺伝子に症例 1 と同じ G809S をヘテロ接合性に、*MEFV* 遺伝子に E148Q-P369S-R408Q をヘテロ接合性に認めた。症例 2 の父は *NLRP3* 遺伝子に G809S をヘテロ接合性に、母は *MEFV* 遺伝子に E148Q-P369S-R408Q をヘテロ接合性に認めた。健常者における G809S のアレル頻度は 2% で、同時に *MEFV* 遺伝子に P369S-R408Q を持つ健常者は認めなかった。
- 2) 血清サイトカイン等の測定：いずれの症例も発作時に IL-1ra と sTNFR1 が上昇したが、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 は上昇しなかった。IL-18 は症例 2 でのみ非発作時及び発作時に上昇が見られた。
- 3) 単球からの IL-1 β 産生：いずれの症例から抽出した末梢血単球も LPS 刺激または LPS+ IFN- γ 刺激を加えると、健常者のものと比較して有意な IL-1 β 産生の増加を認めた。症例 1 と異なり、症例 2 は ATP 刺激を加えるとさらに IL-1 β の産生の増加がみられた。
- 4) NF- κ B レポーター遺伝子活性解析：典型的な遺伝子変異とされる *NLRP3* 遺伝子の D303N や G755R では、ASC 発現ベクターの共発現や R837 刺激を行うと野生型に比較して NF- κ B 活性が有意に上昇するのに対して、G809S 置換体では NF- κ B 活性の上昇は確認できるものの野生型に比較して有意な上昇ではなかった。一方で、G809S 置換体は MSU 刺激に対する NF- κ B 活性の反応性が消失していた。*NLRP3* (野生型と置換体) に pyrin 発現ベクターを共発現させると NF- κ B 活性の低下がみられたが、野生型 *NLRP3* と置換体との有意差はみられなかった。
- 5) Speck 形成実験：野生型 *NLRP3* に比較して *NLRP3* 置換体は ASC の Speck 形成は有意に増加した。

【考察】

NLRP3 置換体 G809S は *NLRP3* の一部のリガンドに対する NF- κ B 活性の反応性が欠如していた。一方で、Speck 形成実験では野生型 *NLRP3* に比較して有意な Speck の増加を認め、*NLRP3* インフラマソームに何らかの機能的変化を与えているものと考えられた。また患者由来の試料において、IL-1 関連サイトカインである IL-1ra がどちらの症例でも血清中で上昇していたことや、単球からの IL-1 β 産生が増加していたことから、IL-1 β 産生に関わるインフラマソームを活性化させていることが示唆される。以前、申請者らは E688K と G809S の複合ヘテロ接合体を認めた CAPS 症例を報告しており、E688K のみをヘテロ接合性に認める母よりも症状が重く、G809S は CAPS の重症度に関与していると考えられた。一方、この G809S に加えて、いずれの症例にも *MEFV* 遺伝子に variant が同定された。一般に、遺伝性の自己炎症性症候群は単一遺伝子病であると考えられているが、それぞれの遺伝子変異でみられる疾患とは異なる非典型的な自己炎症性症候群を発症する可能性があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者 久保田一生は、*NLRP3* 遺伝子の exon5 上に位置する G809S variant と *MEFV* 遺伝子のハプロタイプ variant の共存が非典型的な自己炎症性症候群の表現型に与える影響について *in vitro* の解析を行った。その結果、複数の疾患関連遺伝子 variant の効果によって表現型が修飾され、非典型的な自己炎症性症候群を発症する可能性があることを明らかにした。本論文は自己炎症性症候群の病態把握、治療に有益な知見をもたらすものと期待でき、審査員の合議により学位論文に値すると判定された。

[主論文公表誌] Kazuo Kubota, Hidenori Ohnishi, Takahide Teramoto, Eiko Matsui, Kana Murase, Hiroyuki Kanoh, Zenichiro Kato, Hideo Kaneko, Mariko Seishima, Naomi Kondo: In Vitro Analysis of the Functional Effects of an *NLRP3* G809S Variant with the co-Existence of *MEFV* Haplotype Variants in Atypical Autoinflammatory Syndrome. *J Clin Immunol* 33, 325-34 (2013)