

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591152

研究課題名（和文）

自己炎症疾患における炎症制御機能解析法の開発：家族性地中海熱をモデルとした研究

研究課題名（英文）

Evaluation of immune-regulatory functions in auto-inflammatory illnesses.

研究代表者

東馬 智子 (TOMA TOMOKO)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：00377392

研究成果の概要（和文）：

家族性地中海熱の原因遺伝子 *MEFV* の G304R 変異例では、対照に比べて、exon 2 の欠損した短い mRNA 量が優位に認められた。G304R 変異は、アミノ酸置換を伴うのみならず、選択的スプライシングにより分子量の小さい不完全な pyrin 蛋白を多く合成することにより家族性地中海熱を発症することが示唆された。また、患者末梢血単核球を LPS 刺激し、培養上清中の炎症性サイトカイン産生を測定した。患者発熱期では、健常対照に比べサイトカイン産生の亢進が認められたが、発作間欠期には著明に低下が認められ、本疾患において発熱が周期性を示す事との関連性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Missense variant G304R in the *MEFV* gene was associated with predominance of aberrant short mRNA, depleting exon 2. This particular mutation not only results in the amino acid replacement, but also led to excessive exon 2 skipping due to enhanced alternative splicing, with subsequent development of familial Mediterranean fever (FMF). *In vitro* cytokine production by circulating mononuclear cells was examined after LPS stimulation. During the febrile attacks, cytokine production was significantly increased as compared to normal controls. In contrast, it was markedly suppressed during the interval non-febrile periods. The cyclic patterns of cytokine production may be closely related to the periodicity of the febrile episodes of FMF.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：小児アレルギー

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：自己炎症疾患、家族性地中海熱、MEFV 遺伝子、pyrin 蛋白

1. 研究開始当初の背景

家族性地中海熱 (familial Mediterranean fever, FMF) は周期性発熱、無菌性漿膜炎、関節痛 (炎)、滑膜炎をきたす遺伝性炎症性疾患であり、最も代表的な自己炎症疾患である。FMF の責任遺伝子として *MEFV* が同定されているが、*MEFV* がコードする pyrin 蛋白の機能解析系は未だに存在しない。このため、遺伝子解析により見いだされた変異の意義については、典型的なもの以外はその評価が困難である。

MEFV 遺伝子がコードする蛋白は pyrin と呼ばれ、N 末端に PYRIN ドメイン (PYD) をもつ。Pyrin は PYD を介して炎症におけるシグナル伝達複合体である inflammasome の機能を抑制し、炎症の遷延を防いでいると考えられている。具体的には pyrin は炎症性サイトカインである IL-1 β の活性化を制御し、さらに NF- κ B やアポトーシスの経路も阻害すると報告されている。したがって FMF の本態は pyrin の機能低下による炎症の制御の破綻と考えられるが、なぜコルヒチンがよく効くのか、同じ遺伝子変異があっても臨床的に無症状な phenotype があるのはなぜか、などよくわかっていない部分が多い。現在発表されている機能解析関連の論文は、細胞株に *MEFV* 遺伝子変異を導入して作成した変異株のサイトカイン産生を評価しているものが主であり、個々の患者の細胞を用いた発作時や間欠期の pyrin の機能評価をおこなう系は未だ確立されていない。さらに inflammasome 構成蛋白の遺伝子異常によってひきおこされる遺伝性周期性発熱症候群が、共通の炎症制御機構の破綻によりひきおこされるとされながら、それぞれ臨床症状や治療法はまったく異なることが知られている。このことは、これらの蛋白の未知の機能の存在を示唆している。FMF 患者の pyrin 蛋白の機能解析が可能になれば、疾患の確実な診断が可能となるだけでなく、炎症性サイトカイン制御に関わる pyrin および関連蛋白の機能をさらに明

らかにすることが可能である。

今回我々が解析した異なる家系の 2 症例において、exon 2 の最終塩基に homo の変異が認められた。この変異 (G304R) によりアミノ酸変異を認めるが、データベース上でのこの変異の意味は不明となっている。このうち 1 症例では慢性腎不全のため透析を余儀なくされており、またコルヒチン内服に対しての反応性が良好なことから、この変異とアミロイドーシスとの関連性も示唆される。さらに、これら 2 症例において *MEFV* mRNA 発現を検討したところ、対照に比べ明らかに短い mRNA が優位に認められた、この mRNA は exon 2 が欠損した配列を示すことを確認した。Exon 2 の欠失は 2000 年に Papin らが正常の転写時にもわずかに起こることを発見し、その変異 pyrin の細胞内局在が正常 pyrin と異なることを報告している (Papin S et al., Hum Mol Genet., 2000; 9: 3001-3009)。さらに、fibroblast に exon 2 欠損 *MEFV* 遺伝子を導入したモデルにおいて、exon 2 の有無が pyrin 蛋白の核移行と密接に関連している可能性が示唆されている (Diaz A et al., Arthritis Rheumatism 2004; 50: 3679-3689)。したがって、experiment of nature とも言うべきこの 2 症例の病態解析により pyrin 蛋白と炎症制御機能との関連について解明する手がかりを得ることが期待された。さらに、pyrin 蛋白の機能解析法を構築する端緒となることが予想された。

2. 研究の目的

以下の 2 点に絞って今回の研究を行った。

(1) G304R 変異症例の病態解析

G304R 変異をもつ 2 症例のどちらにおいても exon 2 を欠失した mRNA 発現が主体に認められることを示す。対照として、典型的な FMF の臨床症状と遺伝子変異を認める患者細胞と、健常人を同様に解析する。さらにこれら患者における pyrin 蛋白発現を、immunoblotting 法を用いて確認をする。こ

これらの発現異常が顆粒球と単球で差異が認められるかどうかを、細胞を顆粒球と単核球に分離し検討をくわえる。また、サイトカイン産生に関わる単球機能の評価のために、単核球を LPS で刺激した場合の mRNA 発現の変化やサイトカイン産生を測定することにより、G304R 変異による病態を明らかにする。

(2)Pyrin 蛋白の機能解析法を構築する

我々の予備的検討では、患者血液より分離した単核球を LPS で刺激培養し、炎症性サイトカインの産生パターンを検討した結果、有症状期には末梢血単球における炎症性サイトカイン (TNF α と IL6) の産生が対照に比べ異常に亢進していた。それに対し間欠期には逆に LPS により誘導されるサイトカイン産生が著しく低下していた。このような現象が pyrin 機能低下とどのように関連するかを、正常対照と MEFV 遺伝子変異を有する症例と比較し、さらに蛋白発現量、mRNA 発現量、さらに nuclear translocation のダイナミクスなどの機能に与える影響について検討することをめざした。

3. 研究の方法

(1)対象とする症例の選定

- ①正常対照；FMF を示唆する症状や炎症所見がなく、MEFV 遺伝子にも明らかな多型以外の変異を認めない正常対照者 10 名。
- ②FMF 診断例；E148Q/M694I 変異を認め、典型的な臨床症状、臓器アミロイドーシス、コルヒチン反応性を示す、臨床的確定診断例 3 名。
- ③G304R 変異例；今回解析対象とする 2 名。

(2)MEFV 遺伝子解析

末梢血より新鮮分離された顆粒球ならびに単核球それぞれを単離、cDNA を調整した。さらに、分離した細胞について、無刺激あるいは種々の濃度の LPS を添加、培養後に cDNA を調整する。これらの cDNA より、MEFV 遺伝子発現プロファイル (総発現量ならびに、alternative splicing 量) を比較して検討する。β-actin 遺伝子発現を対照として relative expression レベルを定量する。発現量は PCR 産物の量を指標に半定量した。

(3)Pyrin 蛋白の局在と機能との関連を検討する

上記と同様に単球、顆粒球を分離。一部の実験では LPS 刺激後の細胞を採取、それぞれサイトスピン標本を作成。あるいは、Immunoblotting 用サンプルを調製した。酵素抗体法により pyrin 蛋白の免疫染色を施行、その局在と核/細胞質分布プロファイルの解析を試みた (Jéru I, et al., Arthritis Rheumatism 2005; 52: 1848-1857, Papin S et al., Hum Mol Genet., 2000; 9: 3001-3009)。また、immunoblotting 用サンプルを用いて pyrin 蛋白のサイズ解析を施行。LPS 刺激、あるいは G304R 変異に伴う蛋白発現プロファイルの変化を検討した。

4. 研究成果

(1)対象とする症例の選定と MEFV 遺伝子解析、臨床症状、検査所見の解析

周期性発熱を認め、家族性地中海熱が疑われた症例に対し、MEFV 遺伝子解析を施行した。これらの症例の遺伝子変異と臨床症状との関連性の有無に関して解析し、正常対照における遺伝子変異 (多型) 頻度を調べた。また、典型的な変異である FMF 診断例；E148Q/M694I 変異例、今回の解析対象である G304R 変異例を選定した。

(2) MEFV 遺伝子発現の解析

末梢血を顆粒球と単球に分離し、それぞれから cDNA を作成した。上記対象症例における MEFV 遺伝子発現プロファイル (総発現量ならびに alternative splicing 量) を比較し、G304R 症例においては明らかに exon2 の欠損した alternative

splicing 量が優位であることを明らかにした。(図 1)

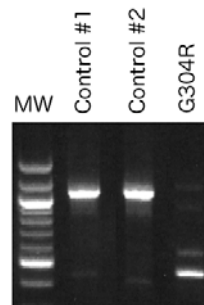
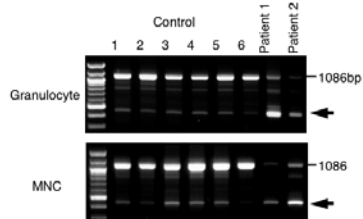


図 1；G304R 変異による exon2 alternative splicing

このような exon 2 の欠損は正常の転写時にもわずかに起こることが報告されているが、患

者においてはexon 2欠損mRNA発現が明らかに優位であることが、健常対照6名との比較PCRで示された。(図2)



このように、G304R変異が単なるアミノ酸変異を伴う変異としてのみならず、alternative splicingによって不完全なpyrin蛋白が合成されることにより、FMF発症に関わっていることを示唆しており、pyrinの機能低下を評価するよいモデルと考えられた。

(3) Pyrin 蛋白発現量および細胞内局在についての検討

HEK293T 細胞に wild type と変異 *MEFV* 遺伝子を遺伝子導入し、免疫組織染色とイムノブロッディング法を用いて確認した。イムノブロッディングによる検討では、 Δ ex2 cDNA を遺伝子導入した細胞において、mRNA サイズから予想できる、分子量の小さい pyrin 蛋白が発現することを明らかにすることができた。細胞内局在に関する検討では、これまでの基礎的研究報告ではこのような exon2 欠損蛋白により、pyrin の細胞内局在に変化が生じることが示唆されているが、今回の解析では確認できなかった。他の inflammasome との相互作用の解析を含めて、今後検討されるべき課題であると考えられた。

(4) LPS 刺激による単核球サイトカイン産生プロファイルの検討

対照ならびに患者末梢血の単核球を分離し、種々の濃度の LPS 添加により培養した。培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法で定量したところ、患者発熱期には炎症性サイトカイン(TNF- α と IL-6)産生の亢進が認められた。一方、間欠期には逆に LPS により誘導されるサイトカイン産生は著しく低下していた。このような現象は、*MEFV* 遺伝子変異の有無や変異部位にかかわらず、臨床的に家族性地中海熱と診断された患者で同様に認められた。

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4件)

- ① Migita K, Uehara R, Nakamura Y, Yasunami M, Tsuchiya-Suzuki A, Yazaki M, Nakamura A, Masumoto J, Yachie A, Furukawa H, Ishibashi H, Ida H, Yamazaki K, Kawakami A, Agematsu K. Familial Mediterranean Fever in Japan. 査読有, *Medicine* 91, 2012, 337-343 DOI: 10.1097/MD.0b013e318277cf75.
- ② Iwata K, Toma T, Yachie A. 38-year-old woman with recurrent abdominal pain, but no fever. 査読有, *Int J Gen Med.* 5, 2012, 265-8 DOI: 10.2147/IJGM.S30867.
- ③ Tone Y, Toma T, Toga A, Sakakibara Y, Wada T, Yabe M, Kusafuka H, Yachie A. Enhanced exon 2 skipping caused by c.910G>A variant and alternative splicing of *MEFV* genes in two independent cases of familial Mediterranean fever. 査読有, *Mod Rheumatol* 22, 2012, 45-51 DOI: 10.1007/s10165-011-0461-4.
- ④ Shimizu M, Tone Y, Toga A, Yokoyama T, Wada T, Toma T, Yachie A. Colchicine-responsive chronic recurrent multifocal osteomyelitis with *MEFV* mutations: a variant of familial Mediterranean fever? 査読有, *Rheumatology* 49, 2010, 2221-2223 DOI: 10.2147/IJGM.S30867.

[学会発表] (計7件)

- ① 谷内江昭宏, 家族性地中海熱におけるサイトカインプロファイルと炎症病態, 第6回自己炎症疾患研究会, 2013年2月2日, ベルサール八重洲(東京都)
- ② 東馬智子, 上野和之, 清水正樹, 谷内江昭宏, *MEFV* 変異を有する周期性発熱症候群におけるサイトカインプロファイルの特徴, 第22回小児リウマチ学会, 2012年10月5日, ウィルあいち(愛知県)
- ③ 東馬智子, 谷内江昭宏, PFAPA 症候群における *MEFV* 遺伝子変異プロファイルの解析, 第61回日本アレルギー学会秋季学術集会, 2011年11月10日, グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都)

- ④ 東馬智子, 和田泰三, 清水正樹, 千田裕美, 谷内江昭宏, PFAPA 症例における *MEFV* 遺伝子変異の検索とその臨床的意義 第 21 回日本小児リウマチ学会総会・学術集会, 2011 年 10 月 16 日, 神戸国際会議場 (兵庫県)
- ⑤ 野村武雅, 村上知隆, 清水薫, 大高幸之助, 三沢知江子, 森有加, 宮崎直樹, 中島秀幸, 木部哲也, 東馬智子 反復する胸痛、発熱を主訴に診断に至った家族性地中海熱の 8 歳ブラジル人女児例 第 114 回日本小児科学会学術集会, 2011 年 8 月 12 日, グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール (東京都)
- ⑥ 谷内江昭宏, 刀祢裕美, 和田泰三, 東馬智子, 当科で解析した *MEFV* 遺伝子異常 Exon 2 splice 異常を特徴とする 2 家系を中心にした話題。*MEFV* 遺伝子異常症にみられる多彩な臨床症状 第 22 回北陸腸内細菌研究会 2010 年 7 月 10 日, 金沢大学 (石川県)
- ⑦ 東馬智子, 榊原康久, 刀祢裕美, 和田泰三, 谷内江昭宏 家族性地中海熱ならびに疑い症例における *MEFV* 遺伝子変異プロフィールの解析 第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2010 年 5 月 8 日 (京都府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東馬 智子 (TOMA TOMOKO)
金沢大学・大学病院・助教
研究者番号：00377392

(2) 研究分担者

谷内江 昭宏 (YACHIE AKIHIRO)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：40210281

(3) 連携研究者

該当なし