

家族性地中海熱の責任遺伝子 *MEFV* の働きを迅速に解析する検査方法を開発

概要

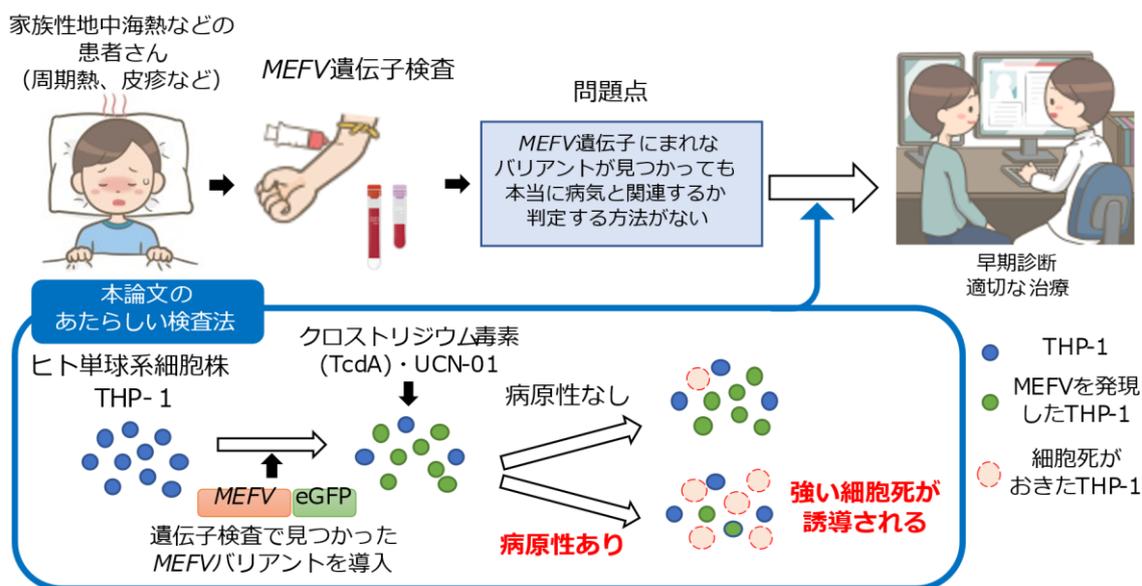
パイリンインフラマソームという細胞内のタンパク質複合体は、からだの中に侵入した特定の病原体や毒素を検出し、免疫系を活性化してそれらを排除する働きを持ちます。その主要な構成要素であるパイリン(pyrin)は *MEFV* という遺伝子によって作られています。*MEFV* 遺伝子に変異が起きてその働きが活性化しすぎると、からだの中で過剰な炎症が起こり、家族性地中海熱⁽¹⁾ を含む pyrin-associated autoinflammatory diseases (パイリン関連自己炎症疾患=PAADs) という疾患を引き起こします。

PAADs を診断するには患者さんの症状に加え、遺伝子検査を行うことが重要です。遺伝子検査を行うと様々なバリエーション⁽²⁾ が見つかりますが、注意が必要なのは見つかったバリエーションが必ずしも病気と関係しているとは限らないという点です。患者さんを診療する際には、こうした病気とは無関係のバリエーションと、病気と関係のある病原性バリエーションとを区別して考える必要があります。*MEFV* 遺伝子には 380 個を超えるバリエーションが報告されていますが、これらが果たして病気と関係するののか否かを簡単に区別する方法はこれまで確立されていませんでした。そのため、*MEFV* 遺伝子にバリエーションが見つかったとしても本当に病気の原因なのかははっきりしないことも多く、PAADs 患者さんの診療における大きな課題でした。

今回、京都大学大学院医学研究科発達小児科学教室 本田吉孝 特定病院助教、前田由可子 同博士課程学生、井澤和司 同助教、八角高裕 同准教授、久留米大学医学部小児科 西小森隆太教授らの研究グループは *MEFV* の病原性バリエーションをヒト単球系細胞株 (THP-1) へ強制発現すると、パイリンインフラマソームが過剰に活性化し強い細胞死が誘導されることを発見しました。

この検査法を用いて *MEFV* バリエーションの病原性 (=病気と本当に関係するかどうか) を迅速に判別することで、より正確に遺伝子検査の結果を解釈できるようになり PAADs 患者さんの迅速で適切な診断・診療につながることを期待できます。また、PAADs のさらなる病態解明の助けとなる可能性があります。

本研究は 2021 年 3 月 17 日 (日本時間) に The Journal of Clinical Immunology 誌に掲載されました。



1. 背景

パイリン(pyrin)はからだの中に侵入した特定の病原体や毒素を感知する自然免疫センサーの一つで、インフラマソームという巨大なタンパク複合体を形成します。病原体を感知したパイリンインフラマソームは活性化し、細胞にパイロトーシスという細胞死を引き起こしたり、IL-1 β という炎症を起こすサイトカインを放出したりして、病原体を排除するための炎症反応を引き起こします。パイリンは *MEFV* 遺伝子により作られますが、*MEFV* 遺伝子に変異がおきてその働きが過剰になる (= 機能獲得型変異) ことで、体内において過剰な炎症が起こり家族性地中海熱などの pyrin-associated autoinflammatory diseases (PAADs) という 自己炎症性疾患 ⁽³⁾ を発症します。

次世代シーケンサーという新しい遺伝子解析機器が普及したことで、PAADs を疑われる患者さんに対して *MEFV* 遺伝子検査が行われる機会が増え、様々なバリエーションが検出されるようになりました。しかし、遺伝子検査で見つかったバリエーションは必ずしも病気と関係しているとは限らず、そのバリエーションが病原性を持つかどうかは慎重に判断する必要があります。長年、パイリンが実際にからだの中でどのように働いているかは不明であったため、*MEFV* 遺伝子にバリエーションが見つかったとしても、それが病気と関係するか否かを検査して判定する方法がありませんでした。そのため、現在報告されている 380 個を超える *MEFV* バリエーションの多くは意義不明の変異(variants of unknown significance; VOUS)に分類されており、*MEFV* 遺伝子にバリエーションが見つかったとしても本当に PAADs と診断してよいか迷う場合があります。この数年でパイリンの働きが徐々に明らかとなり、2020 年から 2021 年にかけて、当科や海外の研究グループから、患者さんの血液細胞などの働きをみることで、PAADs かどうかを判定する検査法が報告されました。しかし、患者さんの血液細胞を使って確認するこれらの検査法には、血液の輸送条件や血液を採取したときの患者さんの状態によって結果が左右される懸念や、たくさん量の血液が必要となるため、体格の小さい小児の患者さんではなかなか行いにくいなどの問題がありました。そのため、我々は患者さんの血液によらず、研究用の培養細胞を用いて *MEFV* バリエーションが実際に病気と関連しているかどうかを簡便かつ迅速に評価し分類する検査法を開発するため、今回の研究を計画しました。

2. 研究手法・成果

ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞に、GFP という蛍光色素で標識した *MEFV* 遺伝子を強制発現させ、UCN-01 あるいは TcdA というパイリンを活性化させる 2 つの薬剤で刺激し、フローサイトメトリー法 ⁽⁴⁾ を用いて刺激後に誘導される細胞死を評価しました。すると、よく知られた病原性変異である M694V 変異は、正常の *MEFV* と比較して、強い細胞死を誘導することがわかりました。そして、この細胞死はインフラマソームが活性化した結果起こるパイロトーシスという特徴的な細胞死であることも明らかになりました。この検査法を用いて、これまで報告されている 32 種類の *MEFV* バリエーションを評価したところ、誘導される細胞死の性質は、全てのバリエーションで同じというわけではなく、バリエーションの種類により少しずつ異なることがわかりました (無刺激でも細胞死が起こるもの、UCN-01 と TcdA 刺激どちらにも強く反応するもの、UCN-01 のみに反応するもの、いずれの刺激にも反応しないもの、など)。この性質の違いを評価するため、階層的クラスタリングという統計学的手法を用いて解析したところ、これらのバリエーションは 6 つの異なる性質をもったクラスターに分類されることがわかりました。このクラスター分類は、各バリエーションが患者さんにどのような症状を引き起こすかという、これまでの臨床的な情報

ともよく相関していました。そのため、本検査法を用いることで *MEFV* バリエントの病原性の有無が区別できるだけでなく、病原性の強弱や変異の性質も評価することが可能であることが示されました。

さらに、これまで臨床報告のない *MEFV* バリエント (P257L 変異) がみつき、これが本当に病気と関係する変異であるか本検査法を用いて評価しました。すると、P257L 変異は正常の *MEFV* よりも THP-1 に強い細胞死を引き起こすことがわかり、病原性変異と評価できました。この結果は、患者さんの血液を用いた他の PAADs 判定方法とも矛盾しないものでした。これらの検査結果をもとに、この患者さんは PAADs と診断され、コルヒチンや抗 IL-1 療法といった PAADs に有効な治療を受け、長年悩まされてきた様々な症状を和らげることができました。

3. 波及効果、今後の予定

本検査法は患者さんの治療状況や病状に左右されることなく *MEFV* バリエントの病原性を簡便かつ迅速に評価分類することができ、PAADs 患者さんの早期診断や病態解明に役立つ可能性があります。

今回の研究では一つ一つのバリエントを個別に解析しているため、複数の遺伝子変異を同時に持つ場合の影響は不明です。また、遺伝的に均一な培養細胞を使って評価しているため、多様な遺伝的背景を持つ個々の患者さんの状況を完全に模倣しているとは言えず、本検査法のみでは病原性の判定が難しいバリエントが存在する可能性もあります。今後、これらの影響も考慮した病原性評価を行うことができれば、実際の PAADs 患者さんの病態をより正確に評価し再現することができるようになると考えられます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、以下の研究助成を受けて行われました。

- ・日本学術振興会科学研究費助成事業若手研究
- ・日本学術振興会科学研究費助成事業基盤研究 (C)
- ・日本医療研究開発機構 (AMED) 難治性疾患実用化研究事業「Adenosine Deaminase 2 (ADA2)

欠損症の病態解明と治療薬開発の基盤構築」「原発性免疫不全症・自己炎症性疾患・早期発症型炎症性腸疾患の臨床ゲノム情報を連結した患者レジストリの構築研究」

・厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業「自己炎症性疾患とその類縁疾患の全国診療体制整備、移行医療体制の構築、診療ガイドライン確立に関する研究」

<研究者のコメント>

この研究が家族性地中海熱を含む、PAADs 患者さんの早期診断や病態解明の一助となり、まだ解明されていないインフラマソームの謎を解明する手がかりとなればうれしいです。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Rapid flow cytometry-based assay for the functional classification of *MEFV* variants
(フローサイトメトリーを用いた迅速なアッセイによる *MEFV* バリエントの機能的分類)

著者：Yoshitaka Honda*, Yukako Maeda*, Kazushi Izawa**, Takeshi Shiba, Takayuki Tanaka, Haruna Nakaseko, Keisuke Nishimura, Hiroki Mukoyama, Masahiko Isa-Nishitani, Takayuki Miyamoto, Hiroshi Nihira, Hirofumi Shibata, Eitaro Hiejima, Osamu Ohara, Junko Takita, Takahiro Yasumi**, Ryuta

Nishikomori

*These authors contributed equally to this work (共同筆頭著者)

**Corresponding Author (責任著者)

掲載誌： The Journal of Clinical Immunology

DOI : <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01021-7>

<用語解説>

1. **家族性地中海熱**：パイリンの変異で発症する自己炎症性疾患で、発作性の発熱や腹痛・胸痛、関節炎や皮疹などを認めます。
2. **バリエント**：遺伝子は DNA と呼ばれる A (アデニン)、T (チミン)、C (シトシン)、G (グアニン) の 4 つの化合物 (塩基) が並んだ物質で、A・T・C・G の 4 文字で書かれた情報としてとらえることができます。遺伝子検査は、この DNA の並びを調べる検査です。同じ遺伝子であっても、DNA の文字の並びはヒトによって異なる箇所があることが知られており、それらは「バリエント」と呼ばれています。
3. **自己炎症性疾患**：自然免疫にかかわる遺伝子の異常を原因として、体質的に発熱などの炎症症状が起ってくる疾患です。
4. **フローサイトメトリー法**：細胞 (あるいは他の粒子) が一列になって流れている状態にし、一つ一つの細胞にレーザー光を当て、反射する光の強さを電気信号に置き換えて定量化することで細胞の性質を自動的に検出・計測・選別する方法です。