

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	前田（阪上） 由可子
論文題目	Rapid Flow Cytometry-Based Assay for the Functional Classification of <i>MEFV</i> Variants (フローサイトメトリー法による迅速評価系を用いた <i>MEFV</i> 遺伝子バリエントの機能的分類)		
(論文内容の要旨)			
【背景】 自然免疫系細胞質センサーのパイリンは <i>MEFV</i> 遺伝子にコードされ、細菌毒素による RhoA 不活化を感知して ASC や procaspase-1 とパイリンインフラマソームを形成し、炎症性サイトカイン IL-18 産生や pyroptosis と呼ばれるプログラム細胞死を誘導する。 パイリン関連自己炎症性疾患 (pyrin-associated autoinflammatory diseases; PAADs) は、<i>MEFV</i> 遺伝子変異により発症する広い臨床的スペクトラムを有する疾患概念で、周期熱や漿膜炎を特徴とする家族性地中海熱 (Familial Mediterranean fever; FMF) や好中球性皮膚炎を特徴とする pyrin-associated autoinflammation with neutrophilic dermatosis (PAAND) などを含む。特異的治療 (コルヒチン・抗 IL-18 薬) により炎症抑制や腎アミロイドーシス等の合併症予防が可能であり、早期診断・早期治療が重要である。しかし、同一遺伝子のバリエントが多様な病態を形成する機構は未解明であり、400 個近く報告されているバリエントの多くが意義不明の変異 (variants of unknown significance; VOUS) に分類されるなど、遺伝子検査が診断に直結しない現状がある。患者細胞を用いた機能解析が報告されているが、疾患活動性・治療条件が影響する懸念がある。そこで、<i>MEFV</i> バリエントの病原性を簡便かつ迅速に評価する in vitro 解析法を開発した。 【方法】 GFP 標識した野生型または変異 <i>MEFV</i> 遺伝子をヒト単球系細胞株 THP-1 に Nucleofection 法で強制発現し、パイリンアゴニスト (UCN-01 またはクロストリディウムディフィシルトキシン A; TcdA) で刺激した。刺激後のパイリン活性化を pyroptosis (フローサイトメトリー法)・ASC スペック形成 (免疫染色)・IL-18 産生 (培養上清) により評価した。 【結果】 - 代表的病原性変異の M694V は、野生型と比較して刺激後の pyroptosis・ASC スペック形成・IL-18 産生が有意に亢進し、これらは caspase-1 ノックアウトやパイリン阻害剤コルヒチンで正常化した。従って本解析法は変異パイリンの過剰活性化を反映していると考えた。 - VOUS を含む 32 種類の <i>MEFV</i> バリエントを pyroptosis パターンに基づき階層的クラスタリングを行うと、臨床像と相関する 6 つのクラスターに分類された。PAAND 関連変異は無刺激で細胞死が亢進し、Exon10 に存在する FMF 関連変異の多くは UCN-01 と TcdA への過剰反応を認めた。Exon10 以外の FMF 関連変異は UCN-01 にのみ過剰反応を認めた。また、細胞死亡率は臨床的重症度とも相関する傾向を認めた。以上より、本解析法は <i>MEFV</i> バリエントの病原性			

や臨床像との相関を評価可能であることが示唆された。 3. 臨床報告のない <i>MEFVP257L</i> 変異を有する家系が見出されたため、本解析法で検討したところ、P257L 変異は野生型と比して有意なパイリン機能亢進を認めた。患者血解析でもパイリン機能亢進が確認され in vitro と ex vivo 機能解析の結果は良好に相関していた。よって、本家系は PAADs と診断され、特異的治療により臨床的改善を得た。 【考察】 本解析法により <i>MEFV</i> バリエントの迅速な病原性評価が可能であり PAADs 患者の早期診断・早期治療・病態解明に役立つ可能性がある。			
(論文審査の結果の要旨) 本研究は、家族性地中海熱 (FMF) を含むパイリン関連自己炎症性疾患 (PAADs) 発症に関与する <i>MEFV</i> バリエントの病原性をパイリンインフラマソーム活性化の観点から評価分類することを目的に、ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞に GFP 標識した <i>MEFV</i> 遺伝子を強制発現させ、パイリンアゴニスト (UCN-01・TcdA) で刺激後、細胞死 (フローサイトメトリー法)・ASC speck 形成 (免疫染色)・IL-1 β 分泌 (培養上清) を評価した。 まず、典型的 FMF の病原性バリエントを THP-1 に強制発現すると、刺激より強い細胞死が誘導され、それは ASC speck 形成と IL-1 β 分泌を伴い、caspase-1 依存性であることから、パイリンインフラマソーム活性化による pyroptosis であると証明された。次に 32 種の <i>MEFV</i> バリエントについて無刺激または UCN-01・TcdA 刺激による細胞死を測定しクラスター解析を行うと、6 つのクラスターに分類され、その分類は臨床的表現型による分類とよく相関していた。さらに未報告の <i>MEFVP257L</i> 変異を本検査法により病原性バリエントと評価した。これは患者血を用いた機能評価と合致していた。 以上の研究は、多数の <i>MEFV</i> バリエントの病原性を再現性ある方法で迅速に評価することを初めて可能にし、PAADs 患者の早期診断・早期治療・病態解明に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、令和 5 年 1 月 23 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			