

Retinal Vasculopathy with Cerebral Leukoencephalopathy (RVCL) 関連変異型 TREX1 の炎症誘導と細胞毒性

安藤 昭一郎

新潟大学医歯学総合研究科 分子細胞医学専攻 脳神経内科学
主任教授：小野寺理 教授（脳神経内科学）

RVCL-mutant TREX1 induces inflammation and cytotoxicity

Shoichiro ANDO

Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University

要 旨

Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy (RVCL) は DNA 特異的 3'-5' エキソヌクレアーゼ活性を持つ three-prime repair exonuclease 1 (TREX1) の遺伝子変異によって発症する疾患群の一つである。成人期に脳腫瘍類似の病巣を来し、急速に進行し死に至る。TREX1 は、小胞体に局在し、細胞質の DNA を分解し、DNA 誘導性の自然免疫応答を抑制する。実際、エキソヌクレアーゼ活性が失活した TREX1 遺伝子変異をもつ患者では若年より自己免疫性疾患を発症する。一方、RVCL 関連変異型 TREX1 では、エキソヌクレアーゼ活性は残存する。よって炎症反応が惹起されるか不明である。今回、私は、まず RVCL の脳生検病理所見報告を渉猟し、炎症性変化の有無を検討した。その結果、9 症例中 7 症例 (77.8%) の脳病変で炎症性変化を認めた。次に、RVCL で最も頻度の多い p.Val235GlyfsTer6 (V235fs) 変異 TREX1 の細胞モデルを作製した。V235fs TREX1 は、小胞体への局在を失った。さらに野生型 TREX1 に比して、インターフェロン α 1 とインターロイキン 8 が上昇すること、細胞死が亢進することを見出した。以上より RVCL においても、変異型 TREX1 による炎症反応の亢進を介した細胞毒性機序の可能性を示した。

キーワード：RVCL (Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy), TREX1, 脳小血管病, 炎症性サイトカイン, 炎症反応, 細胞毒性

緒 言

Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy (RVCL) は、30-50 代で脳腫瘍様の病変を大脳白質に呈し、約 10 年の経過で死亡する常染色体優性遺伝性疾患である¹⁾。原因遺伝子

は DNA 特異的 3'-5' エキソヌクレアーゼ活性を持つ three-prime repair exonuclease 1 (TREX1) を産生する TREX1 遺伝子である²⁾。TREX1 は 3 つのエキソヌクレアーゼドメインと C 末端側の膜貫通ドメイン (transmembrane domain, TMD) で構成され³⁾、核周囲の小胞体 (endoplasmic

Reprint requests to: Shoichiro ANDO
Department of Neurology,
Brain Research Institute, Niigata University,
1-757, Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 943-0147, Japan.

別刷請求先：〒 951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学脳研究所臨床神経科学部門
脳神経内科学分野

安藤 昭一郎

reticulum, ER) に局在し、細胞質の DNA を分解し、DNA 由来の自然免疫応答を抑制する⁴⁾。

TREX1 遺伝子のエキソヌクレアーゼドメインの変異では、エカルディ・グティエール症候群 (Aicardi-Goutières syndrome, AGS) 等の自己免疫性疾患を発症する。これは、TREX1 のエキソヌクレアーゼ活性の低下により、細胞質内に残存した未分解の二本鎖 DNA により惹起された自然免疫応答が関連する。二本鎖 DNA は、cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) によって感知され、stimulator of interferon genes (STING) の活性化を介し、I 型インターフェロン (interferon, IFN) 等が増加し炎症が惹起される⁵⁾。実際、AGS 患者血清や脳脊髄液では、I 型 IFN は増加し⁶⁾⁷⁾、AGS 患者由来の線維芽細胞より作製した神経細胞は、細胞内 DNA 蓄積により I 型 IFN が誘導されて、アポトーシスが亢進する⁸⁾。

しかし、RVCL 関連変異型 TREX1 が同様に炎症を引き起こすかは明らかになっていない。RVCL は、TREX1 の C 末端側の TMD の異常でおこる。ER への局在は失うが、エキソヌクレアーゼ活性は維持される。よって、エキソヌクレアーゼ失活型 TREX1 と同様な I 型 IFN による炎症は引き起こさないと報告されている⁹⁾。一方、RVCL の剖検脳組織では、CD3 および CD8 陽性リンパ球やマクロファージの浸潤¹⁰⁾ や、血管周囲における CD68 および MHC クラス II 陽性のミクログリアの発現を認め、炎症の関与が疑われる¹¹⁾。

そこで、私は RVCL でも炎症反応が引き起こされていると仮説をたて、この立証を試みた。まず、文献的に RVCL 患者の病変活動期の脳生検病理所見を検討した。次に、RVCL 細胞モデルを作製し、炎症性サイトカインを測定した。最後に RVCL 細胞モデルでの細胞毒性評価を行った。その結果、RVCL 脳病理では高率に炎症性変化を認めた。また、RVCL 細胞モデルでは I 型 IFN の上昇を認め、細胞毒性も認めた。以上から、RVCL でも炎症反応が病態に関与している可能性が示唆された。

材料と方法

1. RVCL 脳生検病理を含む症例報告の収集と炎症所見の評価

2021 年 12 月 1 日時点、pubmed で “Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy” で検索される総説、原著論文または症例報告を対象とした。この中で、頭部 MRI で造影効果を有する病変部位からの脳生検病理報告を含む症例を抽出した。以下の所見を認めた場合、炎症性変化が陽性であると判定した：(1) 炎症反応が起きている (inflammation) という記載がある (2) リンパ球浸潤またはそれに準ずる記載がある。

2. 発現プラスミドの作製

発現プラスミドの作製には、Retro-X Tet-On 3G Inducible Expression System (Clontech, 以下 tet-on システム) または、Flp-In System (Thermo Fisher Scientific, 以下 flp-in システム) を用いた。

Tet-on システムでは、遺伝子発現制御用でジェネティシン (G418) 耐性遺伝子を有する pRetroX-Tet3G vector (tet-on システムキットに同封)、エンベロープベクターとして pAmpho vector (TaKaRa Bio) を用意した。野生型 (wild type, WT) ヒト TREX1 遺伝子 (以下、WT hTREX1) または RVCL 疾患変異である p.Val235GlyfsTer6 (V235fs) ヒト TREX1 遺伝子 (以下、V235fs hTREX1) はピューロマイシン耐性遺伝子を有する pRetro-TRE3G vector (tet-on システムキットに同封) に存在する 2 つの制限酵素認識部位 (BamHI, MluI) の間に挿入クローニングした。

Flp-in システムでは、まず WT hTREX1 をハイグロマイシンとブラストサイジン耐性遺伝子を有する pcDNA5/FRY/TO vector に挿入してクローニングした。次に、このベクターを鋳型にして、GeneArt Site-Directed Mutagenesis System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、V235fs hTREX1 を挿入した。

いずれのシステムでも、ドキシサイクリン (doxycycline, dox) 10 ng/ml の存在下で各 TREX1 遺伝子の発現が誘導される。また、挿入した各 TREX1 遺伝子

には N 末端に myc-His × 6 tag を付加した。各塩基配列はシーケンスにより確認を行った。

3. 変異型 TREX1 安定発現細胞の樹立

Tet-on システムでは、まず GP2-293 パッケージ細胞株 (TaKaRa Bio) に pAmpho vector と pRetroX-Tet3G vector または TREX1 遺伝子を挿入した pRetro-TRE3G vector を遺伝子導入し、遺伝子発現制御ウイルスベクターと TREX1 遺伝子発現ウイルスベクターを産生させた。次に、この 2 つのウイルスベクターを用いて、IMR-90 細胞 (ヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞) に遺伝子導入を行った。最後に、ピューロマイシン 2 µg/ml と G418 600 µg/ml を抗生剤非含有の 10 % ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (gibco, 以下 DMEM) に添加して 6 日間培養して、生存した細胞を増殖させた。抗生剤の暴露濃度および期間は、tet-on システムのプロトコルに従い、無処理の IMR-90 細胞に暴露させたときに、完全に死滅する条件を予備実験で確認して設定した。

Flp-in システムでは、まず作製した各 TREX1 発現プラスミドを Flp リコンビナーゼ発現プラスミド (Thermo Fisher Scientific, pOG44) とともに Flp-In T-REx-293 細胞株 (Thermo Fisher Scientific, ヒト胚性腎臓細胞由来細胞株) に遺伝子導入した。次に、ハイグロマイシン (250 µg/ml) を抗生剤非含有 10%FBS 含有 DMEM に添加して培養した。得られたコロニーをピックアップしてスケールアップした。

4. ウエスタンブロッティング

Dox 投与 24 時間後では播種した細胞の一部で導入した TREX1 の発現がみられなかった。Dox 投与 48 時間後では全ての細胞で TREX1 の発現を認めたが、Dox 投与 72 時間後になると異形細胞が出現した (データ未掲載)。以上から、dox 投与 48 時間後に細胞を細胞溶解液 (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.5%NP-40, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), protease inhibitor,

phosphatase inhibitor) で溶解した。溶解物を遠心し、上清のタンパク質濃度を BCA 法により算出した。同一の濃度となるように SDS サンプル化した後、ウエスタンブロッティングを行った。電気泳動ゲルには SuperSep Ace (Wako), メンブレンは PVDF 膜を用いた。ブロッッキング剤には、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO) を使用して、室温で 2 時間反応させた。一次抗体は、Can Get signal 1st solution (TOYOBO) で希釈して、4 °C で一晩インキュベーションした。翌日、Can Get signal 2nd solution (TOYOBO) で希釈した二次抗体を室温で 1 時間反応させた。一次抗体には rabbit anti-TREX1 antibody (abcam, ab185228 ; 1 : 1000) を用いた。二次抗体には goat-anti-Rabbit IgG antibody (Dako ; 1 : 10000) を用いた。検出されたバンドを Image Quant LAS4000 で検出した。

5. 細胞免疫染色

4-Well CultureSlide (CORNING) 内に、細胞密度が 1.0×10^4 /well になるように細胞を播種した。前項と同様の理由で、dox 投与 48 時間後に、室温で 15 分間、4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定した。膜の透過処理のため、室温下、0.3% Triton X-100 で 15 分間インキュベーションした。Phosphate buffered salts (PBS) で調整した 5% ウシ血清アルブミンをブロッッキング剤として、室温下 1 時間で反応させた。一次抗体はブロッッキング剤で希釈して、4 °C で一晩インキュベーションした。翌日、PBS で希釈した二次抗体を室温で 1 時間反応させた。核染色には Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, 1 : 10000) を用い、最後に prolong Gold (Thermo Fisher Scientific) で封入を行った。一次抗体には rabbit anti-myc antibody (MBL, MBL562 ; 1 : 500), mouse anti-protein disulfide isomerase (PDI) antibody (Thermo Fisher Scientific, MA3-018 ; 1 : 1000) を用いた。二次抗体には anti-mouse IgG antibody Alexa Fluor488 (Thermo Fisher Scientific ; 1 : 1000), anti-rabbit IgG antibody Alexa Fluor568 (Thermo Fisher Scientific ; 1 : 500) を用いた。

観察は共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss LCM710) で行った。ER 染色における myc 染色の共局在率と myc 染色の細胞質 / 核比を、それぞれ Imaris で算出した。

6. Droplet digital PCR (ddPCR) による炎症性サイトカインの測定

ddPCR には、tet-on システムで作製した細胞を用いた。100mm dish (CORNING) に 3.0×10^6 /dish となるように細胞を播種した。Dox 投与後 14 日間培養を継続した。その間は、目視で 70 % コンフルエントとなったら、再び 3.0×10^6 /dish となるように継代した。細胞を回収する 2 日前に、6-well plate (NIPPON Genetics) に細胞密度が 1.5×10^5 /well となるように細胞を播種した。

Dox 投与 14 日目に、培地を除去して PBS で洗浄した後 TRI Reagent (Zymo Research) を添加してセルスクレーパー (TPP) で細胞を回収した。回収した細胞より、Direct-zol RNA Kit (Zymo Research) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA と SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を反応させて cDNA を作製した。cDNA における炎症性サイトカインの発現を QX200 Droplet Digital PCR system (BIO-RAD) で測定した。内在性コントロールとして GAPDH を用いた。

7. 細胞毒性の評価

損傷した細胞から放出されるアデニル酸キナーゼ (adenylate kinase, AK) を用い、ToxiLight bioassay kit (Lonza) で細胞毒性評価を行った。96 well plate (NIPPON Genetics) に 5×10^3 /well となるように細胞を播種した。解析日に、予め tris acetate buffer を 10 μ l 入れた well へ各培養メディアウムを 20 μ l ずつ添加した。室温で 10 分間インキュベーションした後、AK detection reagent を 100 μ l ずつ加えて、室温下 5 分間で反応させた。最後に、FilterMax F5 (MOLECULAR DEVICES) で蛍光値を測定した。試薬は全てキット内に同封されていたものを用いた。

8. 統計解析

すべての統計解析は、IBM SPSS Statistics バージョン 22.0 を使用した。定量的なデータは、平均 \pm 標準偏差として表した。WT TREX1 発現細胞群と V235fs TREX1 発現細胞群の比較には、Student's t-test または Mann-Whitney's U test を用いた。全ての検定は、 p 値 < 0.05 で有意差があると判定した。

結 果

1. RVCL 脳生検病理における炎症性変化

Pubmed で検索した RVCL の総説、原著論文または症例報告 148 論文の中で、頭部 MRI で造影効果を有する病変部位からの脳生検病理報告を含む 7 論文を抽出し、合計 9 症例を表 1 にまとめた。男女比は 2 : 1、平均発症年齢は 41.1 ± 7.5 歳であった。TREX1 遺伝子変異の内訳は、V235fs が 6 例、T249fs、T270fs、K271fs がそれぞれ 1 例であった。9 症例のうち、炎症性変化を認めた症例は 7 症例であった (7/9, 77.8%)。炎症性変化を認めた全ての症例で血管周囲の炎症細胞浸潤を認めた。

2. RVCL 細胞モデルの作製

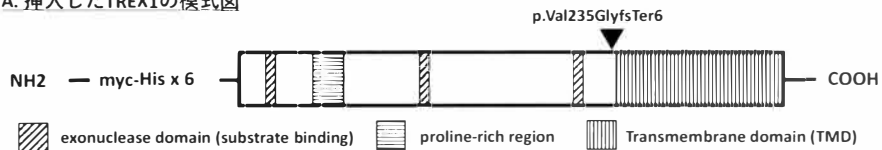
材料と方法に記載の通り、変異型 TREX1 安定発現細胞を作製した。RVCL 変異型 TREX1 には、渉猟した症例で最も多く認めた V235fs TREX1 を用いた。挿入した各 TREX1 遺伝子には N 末端に myc-His x 6 tag を付加した (図 1 A)。

各細胞における TREX1 の発現を抗 myc 抗体のウエスタンブロットで確認した (図 1 B, C)。WT TREX1 は 35.8kDa、V235fs TREX1 は 28.3kDa に相当する。WT TREX1 発現細胞に比した、V235fs TREX1 発現細胞の actin による myc の補正発現量 (myc/actin) は、tet-on システムでは 1.11 倍、flp-in システムでは 3.71 倍だった。内在性 TREX1 は、tet-on システムと flp-in システムの両方で検出できなかった。

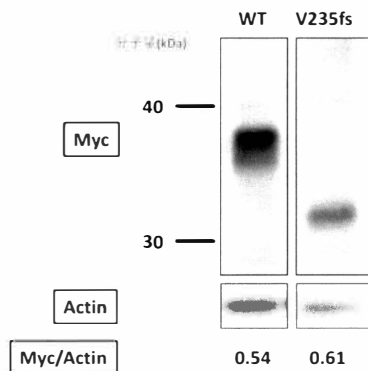
表 1 RVCL 脳生検病理における炎症性変化のまとめ

出典	発症年齢	性別	TREX1 変異	脳生検採取部位	炎症の有無	炎症所見
<i>DiFrancesco JC et al. 2015</i> ²⁰⁾	35	男	V235fs	右前頭葉	-	
	36	男	T270fs	右前側頭葉	+	Chronic inflammatory perivascular infiltration.
<i>Raynowska J et al. 2018</i> ²¹⁾	58	男	V235fs	右前頭葉	+	Perivascular lymphocytosis.
<i>Hardy TA et al. 2018</i> ²²⁾	35	男	V235fs	右側頭葉	+	Perivascular lymphocytic infiltration.
	41	男	V235fs	右前頭葉	+	Perivascular lymphocytic infiltration.
<i>Monroy-Jaramillo N et al. 2018</i> ²³⁾	46	女	V235fs	左側頭葉	-	
<i>Macaron G et al. 2021</i> ²⁴⁾	44	女	K271fs	左前頭葉	+	Perivascular chronic inflammation.
<i>Xie N et al. 2021</i> ²⁵⁾	39	女	V235fs	右前頭葉	+	Vasculopathy with inflammatory changes.
<i>Yan Y et al. 2021</i> ²⁶⁾	36	男	T249fs	左前頭葉	+	Perivascular inflammatory cell infiltration.

A. 挿入したTREX1の模式図



B. IMR-90細胞 (Tet-onシステム)



C. T-REx293細胞 (Flp-inシステム)

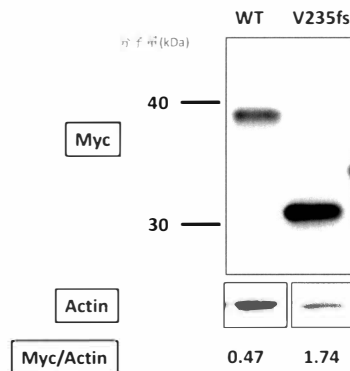


図 1 細胞へのヒト TREX1 の挿入

(A) 細胞へ導入した TREX1 の模式図を示した。TREX1 は 3 つのエクソヌクレアーゼドメインと C 末端側の TMD で構成されている。本実験では、N 末端側に myc-His×6tag をつけて標識した。RVCL 細胞モデルに用いた V235fs 変異の位置を模式図に記載した。(B, C) Tet-on システムと flp-in システムで作製した細胞における TREX1 の発現。提示されたバンドは、いずれも導入した外来性ヒト TREX1 であり、内在性 TREX1 は検出感度以下であった。Actin による myc の補正発現量を Myc/Actin として表記した。

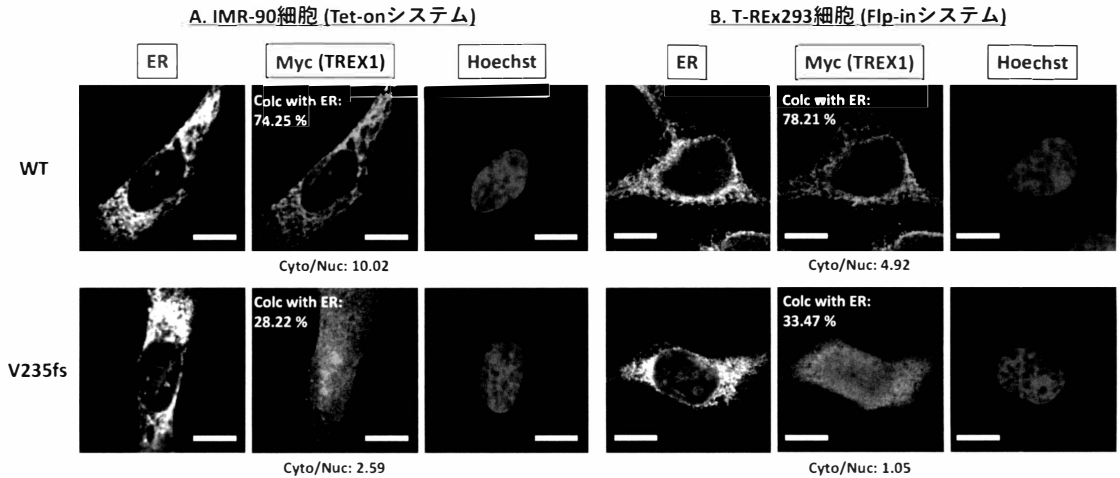


図2 RVCL細胞モデルにおけるTREX1の局在

(A, B) IMR-90細胞(A)とT-REx293細胞(B)におけるTREX1の局在。TREX1の局在は、導入したプラスミドに付与しているmyc-tagを標識することで評価した。各細胞におけるER染色におけるmyc染色の共局在率(Colc with ERと記載)とmyc染色の細胞質/核比(Cyto/Nucと記載)を示した。スケールバー:10 μ m。

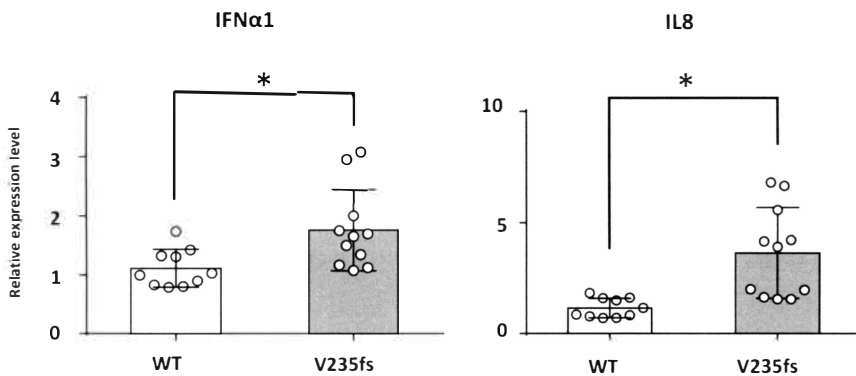


図3 ddPCRによる炎症性サイトカインの測定

V235fs TREX1導入細胞とWT TREX1導入細胞より抽出したcDNAを用いてddPCRにより炎症性サイトカインを測定した。IFN α 1とIL8の発現が、WT TREX1発現細胞と比較してV235fs TREX1発現細胞で有意に上昇していた。縦軸はGAPDHで発現量を補正後のdox非投与細胞の発現量に対するdox投与細胞の発現量の比を表している。統計解析はMann-Whitney U testを用いた。* $p < 0.05$ 。

3. V235fs TREX1の細胞内局在

V235fs TREX1の細胞内局在を評価するため、tet-onシステムとflp-inシステムで作製した細胞のmyc染色をER染色とともにを行った(図2)。

ER染色におけるmyc染色の共局在率は、WT TREX1発現細胞ではtet-onシステムで74.25%、flp-inシステムでは78.21%であった。一方、

V235fs TREX1発現細胞ではtet-onシステムで28.22%、flp-inシステムでは33.47%であった。

また、myc染色の細胞質/核比は、WT TREX1発現細胞ではtet-onシステムで10.02、flp-inシステムでは4.92であった。一方、V235fs TREX1発現細胞ではtet-onシステムで2.59、flp-inシステムでは1.05であった。

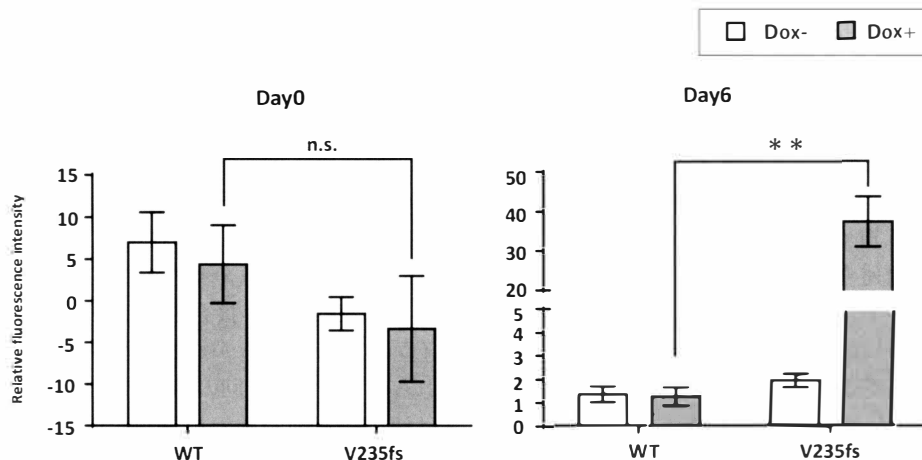


図4 ToxiLight bioassay による細胞毒性評価

Dox 投与前 (Day0) と投与6日目 (Day6) の細胞を用いて、細胞毒性アッセイを行った。Dox 投与6日目では、細胞毒性を反映する蛍光度が、WT TREX1 発現細胞と比較して V235fs TREX1 発現細胞で有意に上昇した。縦軸は、陽性コントロールにおける蛍光度との相対値を示している。統計解析は Student's t-test を用いた。** $p < 0.01$ 。

4. RVCL 細胞モデルにおける炎症性サイトカインの上昇

作製した細胞より cDNA を作製し、ddPCR による炎症性サイトカインの測定を行った。WT TREX1 発現細胞と比較して、V235fs TREX1 発現細胞では IFN α 1 とインターロイキン (interleukin, IL) 8 の有意な発現上昇を認めた ($p < 0.05$, 図3)。

5. RVCL 細胞モデルにおける細胞毒性

最後に、RVCL 関連変異型 TREX1 の細胞毒性を検討した。細胞毒性評価には flp-in システムを用いた。V235fs TREX1 発現細胞群で野生型に比して細胞毒性を認めた ($p < 0.01$, 図4)。

考 察

本論文では、(1) RVCL 脳生検病理では高率に炎症性変化を認めること、(2) V235fs TREX1 は ER への局在を消失すること、(3) V235fs TREX1 は炎症反応を惹起すること、(4) V235fs TREX1 は細胞毒性があることを示した。

本症では、急性増悪期に脳腫瘍様の大脳白質病

変を呈するため、同部位からの脳生検病理所見が散見される^{20)–26)}。これらの脳生検病理像で血管周囲に炎症細胞浸潤を高率に認め、本症の背景に炎症機転の関与を疑わせた。この結果は、剖検脳病理での、CD3 および CD8 陽性リンパ球やマクロファージの浸潤¹⁰⁾ や、血管周囲における CD68 および MHC クラス II 陽性のミクログリアの発現と一致する¹¹⁾。これらの結果から、RVCL の病態に炎症機転が関与していると推察する。

さらに、私は、モデル細胞系で RVCL 関連変異型 TREX1 : V235fs TREX1 が、抗ウイルス免疫を媒介する分泌型シグナル分子である I 型 IFN に属する IFN α 1 と、好中球の遊走や食作用の誘導に機能する IL8 の増加を誘導することを示した。特に I 型 IFN の増加は、エキソヌクレアーゼ失活型 TREX1 での報告と一致する⁶⁾⁷⁾。エキソヌクレアーゼ失活型 TREX1 では、二本鎖 DNA が細胞質に蓄積し、二本鎖 DNA センサーである cGAS が活性化され、cyclic GMP-AMP (cGAMP) が合成される。この cGAMP が ER に局在するシグナル伝達アダプタータンパク質である STING と結合し、I 型 IFN や tumor necrosis

factor (TNF) α , IL1などの自然免疫反応を誘導する⁵⁾。実際、エキソヌクレアーゼ失活型 TREX1で発症する AGS では、幼少期から I 型 IFN の上昇をきたし、慢性的な炎症状態を引き起こす^{6) 7) 12)}。以上から、エキソヌクレアーゼ失活型 TREX1 は、細胞内 DNA 蓄積による I 型 IFN の上昇を伴う自然免疫反応が背景にあるとされる。RVCL 関連変異型 TREX1 : V235fs TREX1 発現細胞でも I 型 IFN の上昇を認めたことから、今後、RVCL においてこの細胞内 DNA 蓄積の有無の検討が必要である。

一方、RVCL 関連変異型 TREX1 はエキソヌクレアーゼ活性を保持しているため、細胞内 DNA 蓄積機序とは別の病態機序も推察される。その一つとして、局在異常による仮説がある。RVCL 関連変異型 TREX1 は TMD 領域内のフレームシフト変異により ER 局在性を失い、核内にも広がる²⁾。私の結果からも、V235fs TREX1 は、ER への局在を減弱していた。TREX1 の ER での役割として、ER に局在する膜タンパク質複合体であるオリゴ糖転移酵素複合体と相互作用し、脂質結合型オリゴ糖の短い糖部分を新生タンパク質に転移する役割が唱えられている⁹⁾。実際、TREX1 ノックアウトマウス由来骨髄由来マクロファージでは、遊離糖鎖が増加し、TANK-binding kinase 1 (TBK1) 依存的なメカニズムを介して IFN 誘導遺伝子の発現が誘導される⁹⁾。今回、我々が検討した V235fs TREX1 でも、この機序が背景にある可能性がある。また、V235fs TREX1 は核内にも存在するために、核内での TREX1 の影響による可能性も考えられる。今後 RVCL と他の TREX1 関連疾患との相違を説明できる、炎症性サイトカインが上昇する機序を検討する必要がある。

また、RVCL 細胞モデルでは、細胞毒性を呈した。エキソヌクレアーゼ失活型 TREX1 でも、AGS 患者由来線維芽細胞より作製した神経細胞では、アポトーシスによる細胞毒性が示されている⁸⁾。従って、RVCL 関連変異型 TREX1 による細胞毒性は、I 型 IFN の上昇により誘導されている可能性がある。今後、RVCL 関連変異型 TREX1 による細胞死もアポトーシスによるか検

討する必要がある。

一方、今回の私の結果は、RVCL の患者像や、モデルマウスの結果とは異なる。RVCL の患者は AGS で認める自己免疫性疾患類似の臨床症状を示さず成人期まで無症状である¹³⁾。また全身性の I 型 IFN の上昇も観察されない¹²⁾。さらに、C 末端変異により ER 局在を喪失した TREX1 を有するマウスでは全身性の ISG 発現亢進は観察されず⁹⁾、ヘテロ接合性 V235fs TREX1 ノックインマウスは明らかな表現型を示さない¹⁴⁾。これらの事実は、今回の私の結果と矛盾する。これは使用した細胞種の相違が影響した可能性がある。実際、RVCL では、特定の細胞集団で ISG の発現が亢進することや⁹⁾、特定の免疫細胞が増加することが報告されている¹⁵⁾。また、通常内在性の TREX1 の発現は極めて少なく¹⁶⁾、今回の細胞モデルにおける過剰な発現が影響している可能性がある。今後、これらの可能性について検討が必要である。

RVCL 患者は、脳腫瘍様病変と表現される重篤な局所の炎症性病変が、ある時点を境に急激に出現する。しかし、この急性増悪の機序は明らかとなっていない。今回我々が見出した細胞毒性は、この機序に関与する可能性がある。近年、細胞死により誘導される炎症性サイトカインが、カストロフィックな増悪を引き起こすプロセスが注目され、PANoptosis と称される¹⁷⁾。この PANoptosis が関与する急性増悪として、COVID-19 感染症におけるサイトカインストームがある¹⁸⁾。本症における急性増悪も PANoptosis が背景となっている可能性があり、急性増悪時の治療手段の開発の観点から注目される。

本論文の limitation は次の点である。1 つ目は、RVCL 脳生検病理で認めた炎症反応が反応性である可能性である。2 つ目は、使用した細胞が培養細胞系である点である。自己 DNA の感知には、ある特定の細胞種が関与している可能性も提唱されており¹⁹⁾、今後、モデル動物解析などにより詳細な解析が必要である。3 つ目は、本実験の細胞モデルでは外来性のヒト TREX1 を強制発現させているが、この発現量が高いことによる影響

が想定される点である。実際、細胞毒性解析において、WT TREX1 発現細胞と V235fs TREX1 発現細胞での TREX1 発現量比 (V235fs TREX1/WT TREX1) は 3.71 と高値であり、これが細胞死の原因となっている可能性がある。また TREX1 の発現は通常極めて少量である点もこの可能性を支持する¹⁶⁾。今後、生理学的条件下での TREX1 の発現量を解析し、検討する必要がある。4 つ目は、炎症性サイトカインの上昇や細胞毒性の機序を示せていないことである。

今回私は、RVCL の病態に炎症機転が関与している可能性を、文献的検索と細胞実験により示した。しかし、今回の結果では、TREX1 遺伝子変異が関連する自己免疫性疾患との病態の差を説明できない。また、本症の患者は、成人期に発症するまで明らかな異常を示さない。この事実は、今回の細胞毒性の結果とは矛盾する。今後、これらの問題を解決し、本症の病態に応じた治療方法が開発されることを期待したい。

結 論

RVCL 症例では、脳生検病理において高率に炎症性変化を認めた。それに一致して、RVCL 細胞モデルでは I 型 IFN と IL8 の上昇を認め、同時に細胞死の誘導が観察された。以上のことから、RVCL 関連変異型 TREX1 は炎症反応の活性化を介して、その病態に関与している可能性が示された。

謝 辞

本研究の計画・遂行にあたり、ご指導ご助言をいただきました。新潟大学脳研究所脳神経内科小野寺理教授、同分子神経疾患資源解析学分野加藤泰介准教授、新潟市民病院脳神経内科野崎洋明先生に深謝申し上げます。

参 考 文 献

1) Ophoff RA, DeYoung J, Service SK, Joosse M, Caffo NA, Sandkuijl LA, Terwindt GM, Haan J,

van den Maagdenberg AM, Jen J, Baloh RW, Barilla-LaBarca ML, Saccone NL, Atkinson JP, Ferrari MD, Freimer NB, Frants RR: Hereditary vascular retinopathy, cerebroretinal vasculopathy, and hereditary endotheliopathy with retinopathy, nephropathy, and stroke map to a single locus on chromosome 3p21.1-p21.3. *Am J Hum Genet* 69: 447-453, 2001.

- 2) Richards A, van den Maagdenberg AMJM, Jen JC, Kavanagh D, Bertram P, Spitzer D, Liszewski MK, Barilla-LaBarca ML, Terwindt GM, Kasai Y, McLellan M, Grand MG, Vanmolkot KRJ, de Vries B, Wan J, Kane MJ, Mamsa H, Schäfer R, Stam AH, Haan J, de Jong PTVM, Storimans CW, van Schooneveld MJ, Oosterhuis JA, Gschwendter A, Dichgans M, Kotschet KE, Hodgkinson S, Hardy TA, Delatycki MB, Hajj-Ali RA, Kothari PH, Nelson SF, Frants RR, Baloh RW, Ferrari MD, Atkinson JP: C-terminal truncations in human 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause autosomal dominant retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy. *Nat Genet* 39: 1068-1070, 2007.
- 3) UniProt: Q9NSU2 (TREX1_HUMAN), <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9NSU2>
- 4) Yang YG, Lindahl T, Barnes DE: Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell* 131: 873-886, 2007.
- 5) Takahashi A, Loo TM, Okada R, Kamachi F, Watanabe Y, Wakita M, Watanabe S, Kawamoto S, Miyata K, Barber GN, Ohtani N, Hara E: Downregulation of cytoplasmic DNase is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat Commun* 28: 1249, 2018.
- 6) Rice GI, Forte GM, Szykiewicz M, Chase DS, Aeby A, Abdel-Hamid MS, Ackroyd S, Allcock R, Bailey KM, Balottin U, Barnerias C, Bernard G, Bodemer C, Botella MP, Cereda C, Chandler KE, Dabydeen L, Dale RC, De Laet C, De Goede CG, Toro MD, Effat L, Enamorado NN, Fazzi E, Gener B, Haldre M, Lin JP,

- Livingston JH, Lourenco CM, Marques W Jr, Oades P, Peterson P, Rasmussen M, Roubertie A, Schmidt JL, Shalev SA, Simon R, Spiegel R, Swoboda KJ, Temtamy SA, Vassallo G, Vilain CN, Vogt J, Wermenbol V, Whitehouse WP, Soler D, Olivieri I, Orcesi S, Aglan MS, Zaki MS, Abdel-Salam GMH, Vanderver A, Kisand K, Rozenberg F, Lebon P, Crow YJ: Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR: a case-control study. *Lancet Neurol* 12: 1159-1169, 2013.
- 7) Takanohashi A, Prust M, Wang J, Gordish-Dressman H, Bloom M, Rice GI, Schmidt JL, Crow YJ, Lebon P, Kuijpers TW, Nagaraju K, Vanderver A: Elevation of proinflammatory cytokines in patients with Aicardi-Goutières syndrome. *Neurology* 80: 997-1002, 2013.
- 8) Thomas CA, Tejwani L, Trujillo CA, Negraes PD, Herai RH, Mesci P, Macia A, Crow YJ, Muotri AR: Modeling of TREX1-dependent autoimmune disease using human stem cells highlights L1 accumulation as a source of neuroinflammation. *Cell Stem Cell* 21: 319-331, 2017.
- 9) Hasan M, Fermaintt CS, Gao N, Sakai T, Miyazaki T, Jiang S, Li QZ, Atkinson JP, Morse HC 3rd, Lehrman MA, Yan N: Cytosolic Nuclease TREX1 regulates oligosaccharyltransferase activity independent of nuclease activity to suppress immune activation. *Immunity* 43: 463-474, 2015.
- 10) Saito R, Nozaki H, Kato T, Toyoshima Y, Tanaka H, Tsubata Y, Morioka T, Horikawa Y, Oyanagi K, Morita T, Onodera O, Kakita A: Retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy: clinicopathologic features of an autopsied patient with heterozygous TREX1 mutation. *J Neuropathol Exp Neurol* 78: 181-186, 2019
- 11) Kothari PH, Kolar GR, Jen JC, Hajj-Ali R, Bertram P, Schmidt RE, Atkinson JP: TREX1 is expressed by microglia in normal human brain and increases in regions affected by ischemia. *Brain Pathol* 28: 806-821, 2018.
- 12) Rodero MP, Decalf J, Bondet V, Hunt D, Rice GI, Werneke S, McGlasson SL, Alyanakian MA, Bader-Meunier B, Barnerias C, Bellon N, Belot A, Bodemer C, Briggs TA, Desguerre I, Frémond ML, Hully M, van den Maagdenberg AMJM, Melki I, Meyts I, Musset L, Pelzer N, Quartier P, Terwindt GM, Wardlaw J, Wiseman S, Rieux-Laucat F, Rose Y, Neven B, Hertel C, Hayday A, Albert ML, Rozenberg F, Crow YJ, Duffy D: Detection of interferon alpha protein reveals differential levels and cellular sources in disease. *J Exp Med* 214: 1547-1555, 2017.
- 13) Rice GI, Rodero MP, Crow YJ: Human disease phenotypes associated with mutations in TREX1. *J Clin Immunol* 35: 235-243, 2015.
- 14) Mulder IA, Rubio-Beltran E, Ibrahimi K, Dzyubachyk O, Khmelinskii A, Hoehn M, Terwindt GM, Wermer MJH, MaassenVanDenBrink A, van den Maagdenberg AMJM: Increased mortality and vascular phenotype in a knock-in mouse model of retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations. *Stroke* 51: 300-307, 2020.
- 15) Sakai T, Miyazaki T, Shin DM, Kim YS, Qi CF, Fariss R, Munasinghe J, Wang H, Kovalchuk AL, Kothari PH, Fermaintt CS, Atkinson JP, Perrino FW, Yan N, Morse HC 3rd: DNase-active TREX1 frame-shift mutants induce serologic autoimmunity in mice. *J Autoimmun* 81: 13-23, 2017.
- 16) Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, Caneda C, Plaza CA, Blumenthal PD, Vogel H, Steinberg GK, Edwards MS, Li G, Duncan JA 3rd, Cheshier SH, Shuer LM, Chang EF, Grant GA, Gephart MGH, Barres BA: Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and function differences with mouse. *Neuron* 89: 37-53, 2016.
- 17) Malireddi RKS, Kesavardhana S, Kanneganti TD: ZBP1 and TAK1: Master regulators of NLRP3 inflammasome/pyroptosis, apoptosis,

- and necroptosis (PAN-optosis). *Front Cell Infect Microbiol* 9: 406, 2019.
- 18) Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, Williams EP, Zalduondo L, Samir P, Zheng M, Sundaram B, Banoth B, Malireddi RKS, Schreiner P, Neale G, Vogel P, Webby R, Jonsson CB, Kanneganti TD: Synergism of TNF- α and IFN- γ triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in SARS-CoV-2 infection and cytokine shock syndromes. *Cell* 184: 149-168, 2021.
- 19) Vanpouille-Box C, Demaria S, Formenti SC, Galluzzi L. Cytosolic DNA sensing in organismal tumor control. *Cancer Cell* 34: 361-378, 2018.
- 20) DiFrancesco JC, Novara F, Zuffardi O, Forlino A, Gioia R, Cossu F, Bolognesi M, Andreoni S, Saracchi E, Frigeni B, Stellato T, Tolnay M, Winkler DT, Remida P, Isimbaldi G, Ferrarese C. TREX1 C-terminal frameshift mutations in the systemic variant of retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy. *Neurol Sci* 36: 323-330, 2015.
- 21) Raynowska J, Miskin DP, Pramanik B, Asiry S, Anderson T, Boockvar J, Najjar S, Harel A. Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy (RVCL): A rare mimic of tumefactive MS. *Neurology* 91: e1423-e1428, 2018.
- 22) Hardy TA, Young S, Sy JS, Colley AF, Terwindt GM, Ferrari MD, Hayes MW, Hodgkinson S: Tumefactive lesions in retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations (RVCL-S): a role for neuroinflammation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 89: 434-435, 2018.
- 23) Monroy-Jaramillo N, Cerón A, León E, Rivas V, Ochoa-Morales A, Arteaga-Alcaraz MG, Necedal-Rustrian FC, Gallegos C, Alonso-Vilatela ME, Corona T, Flores J: Phenotypic variability in a Mexican Mestizo family with retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy and TREX1 mutation p.V235Gfs*6. *Rev Invest Clin* 70: 68-75, 2018.
- 24) Macaron G, Khoury J, Hajj-Ali RA, Prayson RA, Srivastava S, Ehlers JP, Mamsa H, Liszewski MK, Jen JC, Bermel RA, Ontaneda D: Novel de novo TREX1 mutation in a patient with retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations mimicking demyelinating disease. *Mult Scler Relat Disord* 52: 103015, 2021.
- 25) Xie N, Sun Q, Yang J, Zhou Y, Xu H, Zhou L, Zhou Y: High clinical heterogeneity in a Chinese pedigree of retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations (RVCL-S). *Orphanet J Rare Dis* 16: 56, 2021.
- 26) Yan Y, Jiang S, Wang R, Wang X, Li P, Wu B: Serial magnetic resonance imaging changes of pseudotumor lesions in retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy and systemic manifestations: a case report. *BMC Neurol* 21: 219, 2021.

(令和4年1月17日受付)