

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 安藤 昭一郎
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1042 号
学位授与の日付 令和4年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Retinal vasculopathy with cerebral leukoencephalopathy (RVCL) 関連変異型
TREX1 の炎症誘導と細胞毒性

論文審査委員 主査 教授 柿田 明美
副査 教授 池内 健
副査 准教授 武井 延之

博士論文の要旨

背景と目的. 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 (endoplasmic reticulum, ER) 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. 本研究の目的は, RVCL でも炎症反応が病態に関わっている可能性を検討することである.

方法. 申請者は, まず RVCL の脳生検病理所見報告を渉猟し, RVCL 患者活動性脳病変における炎症性変化の有無を検討した. 次に, Retro-X Tet-On 3G Inducible Expression System (tet-on システム), または, Flp-In System (flp-in システム) を用いて, 野生型 (WT) ヒト TREX1 遺伝子, または, RVCL 疾患変異である p.Val235GlyfsTer6 (V235fs) ヒト TREX1 遺伝子を対象細胞へ導入して, RVCL 細胞モデルを作製した. 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. 導入細胞における TREX1 の発現を抗 myc 抗体のウエスタンブロッティングで確認した. また, 導入した TREX1 の細胞内局在を, 抗 myc 抗体および抗 ER 抗体の免疫染色で確認した. さらに, 得られた細胞から RNA を抽出して cDNA を作製して, droplet digital PCR (ddPCR) で炎症性サイトカインを測定した. 最後に, 細胞から放出されるアデニル酸キナーゼを測定し, 細胞毒性評価を行った.

結果. 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 症例をまとめた. その結果, 9 症例中 7 症例の活動性脳病変で炎症性変化を認めた. 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. ウエスタンブロッティングでは, WT TREX1 は 35.8 kDa, V235fs TREX1 は 28.3 kDa に相当するバンドを検出した. 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. 細胞免疫染色では, 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, WT TREX1 発現細胞に比して, V235fs TREX1 発現細胞ではインターフェロン (IFN) α 1 とインターロイキン (IL) 8 が有意に上昇した ($p < 0.05$)。さらに, V235fs TREX1 発現細胞群で WT に比して, 細胞から放出されるアデニル酸キナーゼの増加を認めた ($p < 0.01$)。

考察と結論. 今回, 申請者は, (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 は小胞体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。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。今後, 炎症性サイトカインの上昇や細胞毒性の機序を明らかとすることで, 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。

審査結果の要旨

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白質病巣を来し, 急速に進行し死に至る。申請者は, (1) RVCL 患者の脳生検病理では高率に炎症性変化を認めること, (2) RVCL 細胞モデルでは変異型 V235fs TREX1 は小胞体への局在を消失すること, (3) V235fs TREX1 は炎症性サイトカインが上昇し細胞毒性が亢進すること, (4) DNA 損傷マーカーが上昇することを示した。更に, 同細胞モデルに核外排出シグナルを導入するとこうした現象が抑制されることをみいだした。このように RVCL 関連変異型 TREX1 は, 核内における DNA 損傷を背景に, 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。本研究はこれまで不明であった RVCL の細胞病態を理解する in vivo モデルを提唱した。ここに学位論文としての価値を認める。