

2022 年 4 月 28 日

## CDC42-C 末端異常症に於ける炎症病態を解明

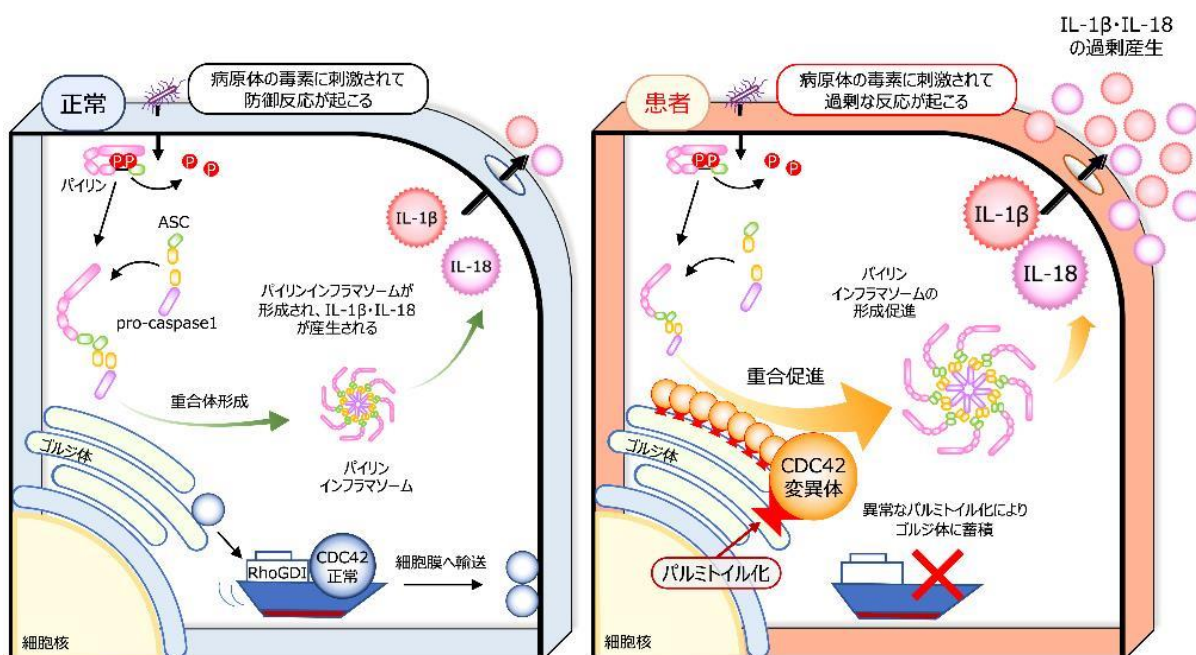
### —ゴルジ体への異常蓄積がパイリンインフラマソーム形成を過剰促進—

#### 概要

私達の身体には、病原体を認識し排除するシステムとして「自然免疫」という即時型の反応が備わっています。自然免疫の代表的な仕組みの1つに、病原体に特徴的なタンパク質などの“分子パターン”を認識して炎症を引き起こす「インフラマソーム」(後述)の形成があります。正常な状態では、病原体の種類に応じて特定のインフラマソームが形成されて適切な炎症が誘導されますが、自然免疫の調節機構の障害により過剰な炎症が引き起こされる場合があります。発熱、皮膚炎、関節炎など、リウマチや膠原病に類似した症状が認められ「自己炎症性疾患」と呼ばれています。

京都大学大学院医学研究科の八角高裕 准教授と伊佐(西谷)真彦 同博士課程学生(研究当時)、東北大学大学院医学系研究科の笹原洋二 准教授、及び東北大学大学院生命科学科の田口彦彦 教授と向井康治朗 同助教らの共同研究グループは、近年報告された CDC42 遺伝子の C 末端突然変異による自己炎症性疾患の原因が、パイリンインフラマソームの過剰形成である事を解明しました。変異 CDC42 タンパク質が異常なパルミトイル化 [注1] を受けてゴルジ体に蓄積すると、パイリンインフラマソームの形成が促進されて炎症誘導物質である IL-1 $\beta$  や IL-18 が過剰産生される事が明らかになりました。今回の発見は、未解明の部分が多いパイリンインフラマソーム形成過程の全容解明へ新たな視点を提供し、新規治療法開発への足掛かりになることが期待されます。

本成果は、2022 年 4 月 28 日(現地時刻)に米国の国際学術誌「Journal of Experimental Medicine」にオンライン掲載されます。



#### CDC42-C 末端異常症に於ける炎症メカニズム

C 末端変異を有する CDC42 分子は異常なパルミトイル化を受けてゴルジ体に集積し、パイリンインフラマソーム形成を促進して過剰な炎症を引き起こす。

## 1. 背景

病原体を認識・排除する自己防衛システムである自然免疫に関わる機構に“インフラマソーム”があります。これは、侵入してきた細菌の毒素やペプチドに反応する細胞質センサー、アダプター分子である ASC（アポトーシス関連スペック様タンパク質）、及び蛋白切断分子の前駆体である pro-caspase 1 からなる複合体です。細胞質センサーにはパイリン(Pyrin)や NLRP1、NLRP3、NLRC4 などがあり、各々が決まった成分に対する防御を担っています。各種センサー分子に刺激が入るとインフラマソームが重合し、caspase-1 が切り出されて活性化します。活性化 caspase-1 は、IL (インターロイキン [注 2] )-1 $\beta$  と IL-18 を各々の前駆体から切り出したり、Gasdermin D (GSDMD) を切断して活性化させたりします。GSDMD 断片は細胞膜に孔を開けてパイロトーシス (pyroptosis)[注 3]というプログラム細胞死を誘導し、これにより IL-1 $\beta$  や IL-18 などの炎症を惹起する物質が放出されます (図 1)。

自己炎症性疾患は、自然免疫の異常な反応を原因とする疾患であり、繰り返す発熱や関節炎、皮疹などの症状が認められます。代表的な疾患に家族性地中海熱 (FMF) が挙げられ、この場合の原因はパイリン分子の変異です。異常なパイリン分子は刺激に過剰反応、あるいは無刺激下で自発的に活性化してインフラマソームを形成し、発作性の発熱、腹痛や胸痛、関節炎や皮疹などを引き起こします。

近年、新しい自己炎症性疾患が次々と報告されていますが、CDC42-C 末端異常症という CDC42 遺伝子の突然変異を原因とする疾患が 2020 年に報告され、我々も CDC42<sup>R186C</sup> 変異を有する 2 症例を経験しました。海外からの報告例と同様、出生直後より重篤な炎症を認め、ステロイドなどによる炎症抑制を行いました救命する事は出来ませんでした。CDC42 は GTP を GDP に加水分解する酵素である GTP アーゼ (GTPase) の 1 つであり、細胞膜に局在してシグナルを伝えるスイッチの役割を果たします。しかし、CDC42 分子の C 末端変異が炎症を引き起こす機構は未解明でした。

## 2. 研究手法・成果

本研究では、患者さん由来の iPS 細胞 [注 5] からマクロファージ [注 6] (iPS-MP) を分化・作成し、炎症病態の評価を行いました。CDC42<sup>R186C</sup> 変異の患者血液中 IL-1 $\beta$  や IL-18 が上昇していたことからインフラマソーム形成を介した自己炎症性疾患である事を疑い、様々な刺激への反応を確認してどのインフラマソームが活性化しているかを調べました。その結果、患者由来の iPS-MP はパイリンの特異的的刺激物質である Clostridium difficile 毒素 A (TcdA) に対して特異的に過剰反応することが判明しました (図 2)。

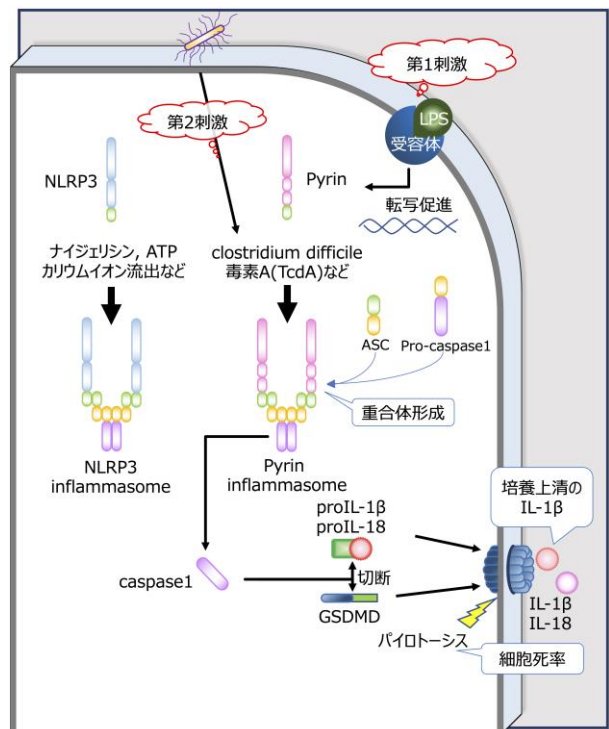


図 1：インフラマソーム形成と生理的機能  
進入病原体に反応して順を追って反応が進む。実験学的には LPS [注 4] 刺激を加えた後、第 2 刺激として各種刺激を加える。パイリンは Clostridium difficile 毒素 A (TcdA) 刺激に対して特異的に反応することが知られている。反応の程度は、“ASC スペック” (インフラマソームが形成されて ASC が集簇し、斑点状に見える状態) 陽性細胞率、細胞死の割合、培養上清中の IL-1 $\beta$  濃度などで評価される。

タンパク質は、遺伝子からポリペプチド鎖に変換された後にリン酸、糖鎖、脂質などが付加される“翻訳後修飾”というものを受けます。CDC42<sup>R186C</sup>では変異が起きた186番目のシステインに異常なパルミトイル化が起り、細胞内での分布が変わることが報告されていました。またCDC42-C末端異常症の原因としてCDC42<sup>C188Y</sup>とCDC42<sup>X192C</sup>も報告されていたため併せて評価しました。その結果、CDC42<sup>X192C</sup>はCDC42<sup>R186C</sup>と同様にゴルジ体に異常集積し、CDC42<sup>C188Y</sup>は細胞膜に局在できないことがわかりました(図3)。パルミトイル化阻害薬である2-ブロモパルミチン酸(2-bromopalmitate; 2-BP)によりゴルジ体への集積は解除されました。

続いて、CRISPR-Cas9 [注7] 技術を用いて野生型 iPS 細胞に CDC42<sup>R186C</sup>、CDC42<sup>C188Y</sup>、CDC42<sup>X192C</sup> の遺伝子変異を導入し、iPS-MP を作

成して炎症の評価を行いました。ゴルジ体への異常集積が確認された CDC42<sup>R186C</sup> と CDC42<sup>X192C</sup> では IL-1β の過剰産生が起り、2BP で改善しました。一方、CDC42<sup>C188Y</sup> では IL-1β の過剰産生は認められませんでした(図4)。更に、ゴルジ体に集積した CDC42 分子によるパイリンインフラマソームの過剰形成は、CDC42 分子の GTP アーゼとしての働きとは無関係である事も確認されました。

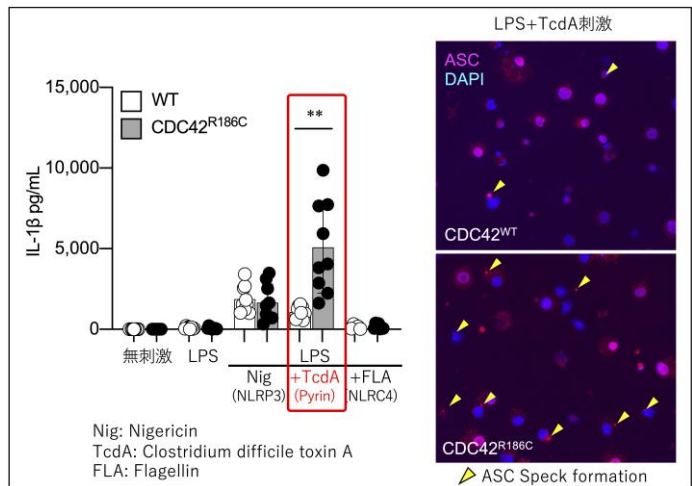


図2：iPS-MPを用いたインフラマソームの評価

(左)パイリンへの刺激であるLPS+TcdA刺激に対し、患者由来のiPS-MPは野生型(WT)細胞に比べて多くのIL-1βを産生しました。

(右)インフラマソーム形成の指標である“ASCスペック”が患者由来細胞に多く認められます。

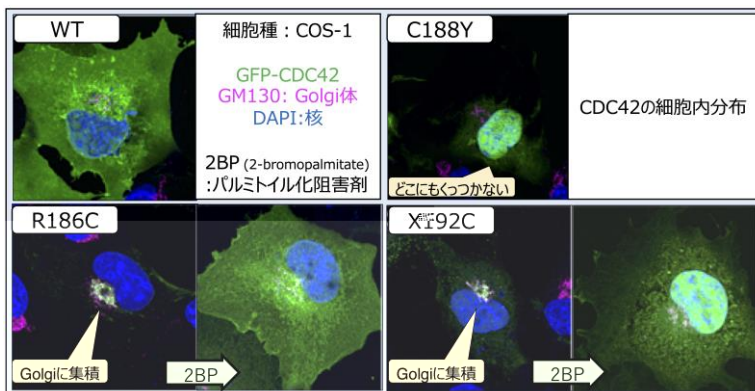


図3：CDC42蛋白の細胞内分布

蛍光蛋白であるGFPを付加したCDC42分子をCOS-1細胞に発現させた。変異CDC42分子は野生型と局在が異なる。

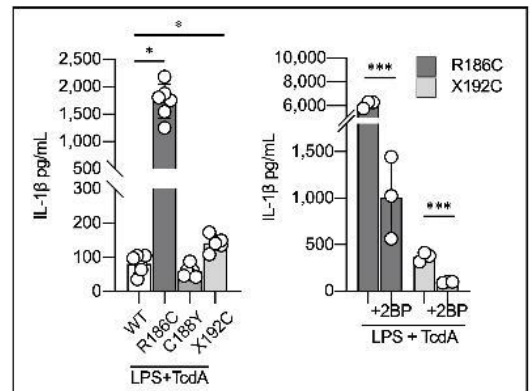


図4：遺伝子編集iPS-MPを用いた変異毎のIL-1β産生評価

### 3. 波及効果、今後の予定

CDC42-C末端異常症は稀ではあるものの致死的な疾患です。抗IL-1β療法が奏功したという報告はありますが、今後はパイリンインフラマソームの特異的阻害剤の開発が焦点になると考えられます。パイリンインフラマソームは他のインフラマソームと比較して機能解析が進んでいませんが、今回の結果からCDC42の局在異常が過剰活性化を引き起こすことが判明し、その活性化や制御機構を解明する重要な一歩になると考えます。

#### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、科学研究費助成事業[課題番号：21K07795, 20H03202, 19H00974]、日本医療研究開発機構 (AMED) 難治性疾患実用化研究事業[課題番号：JP20ek0109387]、AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム (疾患特異的 iPS 細胞の活用促進・難病研究加速プログラム) [課題番号：JP21bm0104001, JP21bm0804005, JP19bm0804001]、AMED 革新的先端研究開発支援事業 PRIME[課題番号：JP20gm5910025]、厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患政策研究事業)、持田記念医学薬学振興財団、等の支援により行われました。

##### <用語解説>

[注 1] **パルミトイル化** … タンパク質翻訳後修飾の一種であり、パルミチン酸などの脂肪酸をタンパク質のシステイン残基に共有結合させる反応のこと。タンパク質の輸送やタンパク質間の相互作用に関わっている。

[注 2] **IL (インターロイキン)** … 白血球などから分泌されるタンパク質の総称で、細胞同士の情報伝達を担うものである。現時点で 30 種類以上が発見されている。

[注 3] **パイロトーシス (pyroptosis)** … インフラマソームの活性化により引き起こされる特徴的な細胞死。

[注 4] **LPS : Lipopolysaccharide** … 主にグラム陰性菌の外膜に存在する糖脂質の 1 種。細胞表面の受容体に結合することで、シグナル伝達経路を活性化させて炎症を引き起こす。

[注 5] **iPS 細胞 (人工多能性幹細胞)** … 脊椎動物の初期胚などが持つ、全ての種類の体細胞へ分化する能力である「多能性」を持ち、培養して無限増殖が可能である細胞を多能性幹細胞という。iPS 細胞は、ヒトの血液や皮膚の細胞に幾つかの遺伝子を導入して作製した多能性を持つ幹細胞の一つである。

[注 6] **マクロファージ** … 骨髄由来の免疫細胞の一種。病原体を貪食・分解する活性が強い細胞であり、免疫の初期応答、特に炎症の惹起に関わる中心的な細胞である。

[注 7] **CRISPR-Cas9**…DNA 配列中の狙った部分を切断できる遺伝子改変手法。切断したい部分に結合するように短い塩基配列を設計し、DNA 切断酵素である Cas9 タンパクを発現させる遺伝子配列と同時に細胞に導入することで、DNA 配列の狙った部分を切断・編集することが可能となる。

##### <研究者のコメント>

本研究で使用した iPS 細胞を提供頂いた患者さんを実際に診療していた時点では、CDC42 C 末端異常症という疾患は知られていませんでした。病態不明なまま重症の炎症に対応せざるを得ず、残念ながらお二人とも生後数ヶ月で亡くなられています。今回、この疾患に於ける炎症病態の一部が解明されましたが、更に解析を進めて新しい治療法の開発に繋がりたいと考えています。(京都大学大学院医学研究科発達小児科学・八角高裕)

##### <論文タイトルと著者>

タイトル：Trapping of CDC42 C-terminal variants in the Golgi drives pyrin inflammasome hyperactivation (CDC42 C 末端変異体のゴルジ体への集積はパイリンインフラマソームを過剰に活性化させる)

著者：Masahiko Nishitani-Isa\*, Kojiro Mukai\*, Yoshitaka Honda, Hiroshi Nihira, Takayuki Tanaka, Hirofumi Shibata, Kumi Kodama, Eitaro Hiejima, Kazushi Izawa, Yuri Kawasaki, Mitsujiro Osawa, Yu Katata, Sachiko Onodera, Tatsuya Watanabe, Takashi Uchida, Shigeo Kure, Junko Takita, Osamu Ohara, Megumu K. Saito, Ryuta Nishikomori, Tomohiko Taguchi, Yoji Sasahara#, Takahiro Yasumi# (\*共筆頭著者、#共責任著者)

掲載誌：Journal of Experimental Medicine DOI : 10.1084/jem.20211889

**<お問い合わせ先>**

八角 高裕 (やすみ たかひろ)  
京都大学大学院医学研究科発達小児科学・准教授  
TEL : 090-6555-7156 FAX : 075-752-2361  
E-mail : yasumi@kuhp.kyoto-u.ac.jp

**<報道・取材に関するお問い合わせ先>**

京都大学 総務部広報課国際広報室  
TEL : 075-753-5729 FAX : 075-753-2094  
E-mail : comms@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp

東北大学大学院医学系研究科・医学部広報室  
東北大学病院広報室  
TEL : 022-717-7149 FAX : 022-717-8931  
E-mail : press@pr.med.tohoku.ac.jp

**<AMED 事業に関するお問い合わせ先>**

日本医療研究開発機構 (AMED)  
シーズ開発・研究基盤事業部 革新的先端研究開発課  
TEL : 03-6870-2224  
E-mail : kenkyuk-ask@amed.go.jp