The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Complement and inflammasome overactivation mediates paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with autoinflammation
Author(s)	大里, 真幸子
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76469
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	大里　真幸子
論文題名 Title	Complement and inflammasome overactivation mediates paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with autoinflammation （補体とインフラマソーム活性化による自己炎症性発作性夜間ヘモグロビン尿症）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)は、造血幹細胞のPIGA遺伝子の突然変異により発症する血液疾患で溶血発作を主症状とする。最近PIGTを原因遺伝子とするPIGT-PNHが報告され、従来のPNH(PIGA-PNH)に見られない長期間持続する自己炎症症状が特徴的である。この症状の違いは、PIGA欠損ではGPI合成の最初のステップで止まるのに対し、PIGTは前駆タンパク質にGPIアンカーを付加する反応に関わるため、その欠損によりタンパク質の付かないGPI(free GPI)が細胞表面に蓄積し、補体活性化と共にインフラマソームの活性化をきたし炎症を呈していると考えている。その機序をヒト単球細胞株THP-1のPIGT欠損株とPIGA欠損株を作製し解析した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

ヒト単球細胞株THP-1のPIGT欠損株とPIGA欠損株をCRISPR/Cas9の系を用いて作製し、それぞれcDNAでレスキューした細胞を作製した。これら細胞をマクロファージに分化させた後、第2経路の活性化補体源として酸性化血清を単独で与え37℃で5時間培養し、培養液中のIL-1βの濃度をELISAにて測定した。インフラマソームの活性化に関与する活性化補体のうちC5a-C5aRを介するシグナルと最終産物であるMAC(membrane attack complex)の形成が知られているが、この実験系における両者の役割を確認するため、anti-C5抗体、C5a-C5aR阻害剤やMACの補体成分であるC6、C7欠損血清を用いてIL-1βの分泌量を解析した。また、細胞表面に沈着したC3活性化断片、C4dとMAC形成をフローサイトメトリーにて測定した。

酸性化血清刺激においては、PIGT欠損株で培養液中のIL-1βが有意に高値を示し、PIGA欠損株の約2倍、野生株の約50倍でありそれぞれの欠損株にcDNAを戻すと野生株同様低値を示した。この増加は血清を熱処理、あるいは抗C5モノクローナル抗体添加により抑制されたことからC5の活性化によるものと考えられた。また、酸性化血清にC5a受容体アンタゴニストあるいはC5aR抗体を添加しても、IL-1β分泌は抑制されなかった。一方、C6またはC7欠損の酸性化血清による刺激ではIL-1β分泌の抑制を認め、精製したC6またはC7の添加によりIL-1β分泌亢進を認めたことからC5a-C5aRを介するシグナルではなく、最終産物であるMAC形成がインフラマソームの活性化に重要であることがわかった。また、酸性化血清刺激によりPIGT欠損株では、細胞表面のC3活性化断片とMAC形成がPIGA欠損株の約3倍検出された。補体の活性化経路としては、古典的経路、 レクチン経路、第2経路の3つがある。酸性化血清は、第２経路を活性化することが知られているが、血清中には古典的経路やレクチン経路に関与する分子が存在するので、その関与の有無を確認するためC4dの沈着を解析した。PIGT欠損株では、C4dの沈着がPIGA欠損株の約1.4倍を認め、これはマンノース添加によりC4d沈着が約50%抑制されることからレクチン経路の関与が示唆された。

〔総　括(Conclusion)〕

PIGT欠損株では、異常な補体活性化とPNH細胞におけるfree GPIの発現によりPIGA欠損株に比べ強いインフラマソームの活性化を示し、このTHP-1を使ったモデルはPIGT-PNH患者の病態を再現していた。この反応には、C5aRを介したシグナルは不要でMAC形成が必要であり、PIGT-PNHではfree GPIを認識するレクチン経路の活性化が加わることで、補体の活性化がより増強されている可能性が示唆された。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）大里　真幸子

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	長山　直敏
	副　査	大阪大学教授	猪阪　善隆
	副　査	大阪大学教授	桑木　克矢

論文審査の結果の要旨

PNHは、造血幹細胞における*PIGA*遺伝子の体細胞変異により発症する（PIGA-PNH）。本論文は、*PIGT*遺伝子の片方のアレルに遺伝的変異があり、造血幹細胞における体細胞突然変異による*PIGT*を含む周辺領域の欠損が加わり発症した新規のPNH（PIGT-PNH）を報告し、その病態機序を明らかにした。PIGT-PNHは、長期にわたり蕁麻疹、関節痛、無菌性髄膜炎等の自己炎症症状を来しており、この相違は、*PIGA*欠損ではGPI合成が全くできないのに対し、*PIGT*欠損ではタンパク質を付加しないGPI（free GPI）が細胞表面に発現しているため、補体介在性のインフラマソームの活性化を来し、炎症を誘導することをヒト単球細胞株THP-1 PIGT欠損細胞で明らかにした。また、補体の第二経路にレクチン経路が加わり補体の活性化がより増幅し、膜侵襲複合体形成が促進され、IL-1βの分泌亢進に至ることを証明し、新規のPNH病型の臨床的特徴の機序を明らかにしたものである。よって、申請者は学位の授与に値すると考えられる。