

# 日本医療研究開発機構 ゲノム創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）MEFV 遺伝子の網羅的な VUS 機能的アノテーションと新規 Ex vivo assay を用いた患者細胞機能評価・詳細な遺伝子型解析の統合による家族性地中海熱の病態及びパイリンインフラマソーム活性化機構解明  
（英 語）Integration of comprehensive in vitro functional annotation of VUS and patient-cell based functional/genetic analysis to understand the Familial Mediterranean Fever pathophysiology and pyrin inflammasome biology.

研究開発実施期間：令和 4 年 4 月 22 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）本田吉孝  
（英 語）Yoshitaka Honda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
（日本語）京都大学高等研究院・ヒト生物学高等研究拠点・特定助教  
（英 語）Kyoto University, Institute for the Advanced study of Human Biology, Program-specific assistant professor

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

自然免疫系は病原体・宿主由来の分子パターンを認識し炎症を誘導する。Inflammasome は自然免疫センサー・アダプター蛋白（ASC）・エフェクター蛋白（Caspase-1）から構成される巨大蛋白複合体である。各種自然免疫センサーが固有のリガンドを認識して活性化することで ASC をリクルートして ASC speck を形成する。その後、Caspase-1 がリクルートされて活性化し、Pyroptosis と呼ばれる炎症性細胞死や IL-1b/IL-18 といった炎症サイトカイン産生が誘導される。自然免疫センサーの機能獲得性変異は、自然免疫センサーの過剰活性化を誘導し、遺伝性自己炎症性疾患を発症する。MEFV 遺伝子によりコードされる自然免疫センサーPyrin の変異はPyrin 関連自己炎症性疾患（PAADs）と総称されるヒト炎症性疾患を発症する。ヒトPyrin 蛋白はN末端側からPyrin domain(PYD)、リン酸化リンカードメイン（PLD）、B-box ドメイン、CHS（Central Helix Scaffold）ドメイン、B30.2 ドメインの5つのドメイン構造で構成され、古典的にはB30.2 ドメインの機能亢進型変異によって発症し、主に常染色体潜性遺伝性形式をとる家族性地中海熱（FMF）が知られていた。しかしながら、近年になってB30.2 ドメイン以外の領域の変異が、主に常染色体顕性遺伝性形式をとる他の炎症性疾患を発症することが報告された。すなわちPLD 変異によるPAAND（Pyrin-associated autoinflammation with neutrophilic dermatosis）、CHS 変異によるFMF 様疾患、B-box domain・CHS ドメイン変異による重症周期熱などがあり、これらPyrin の変異により発症する炎症性疾患を総称する用語としてPAADs（Pyrin 関連自己炎症性疾患）が提唱

されている。近年新たに同定された新規疾患には確立した診断基準がなく、患者診断における遺伝子診断・MEFV バリエントの機能的アノテーションの重要性が増している。

しかしながら、自己炎症性疾患関連遺伝子に関する世界最大の public database である Infevers に登録されている 400 個近い MEFV バリエントの約半数が Variants of uncertain significance (VUS) であり、実験的に病原性が裏付けられたバリエントは 19 個に過ぎない。これには近年まで MEFV 遺伝子の VUS 機能評価系が未確立であったため、炎症病態を呈する患者で同定された変異が機能的に検証されることなく、VUS として登録されていることも大きく影響しており、PAADs の遺伝子型-表現型相関に大きな混乱を生じている。また、各ドメインの変異がどの様に Pyrin 活性化を制御し、PAADs 発症に関わるかも明らかではない。特に FMF 変異が集中する B30.2 ドメインの機能的意義は、遺伝子同定後 30 年近くが経過したにも関わらず、いまだに解明されていなかった。

本研究開発課題では、研究開発代表者が先行研究で確立した In vitro の MEFV バリエント機能評価系を応用展開し、Infevers データベース上の全ミスセンスバリエントを網羅的に機能評価し、遺伝子診断・病態解析に資するデータベースを構築した。また網羅的機能アトラスの情報をもとに、Pyrin 活性化の分子メカニズムを解明し、FMF 発症機序の解明につながる重要なデータを得た。

#### 【網羅的機能アノテーションデータベースの構築】

Infevers 上から全ミスセンスバリエント 265 の情報を抽出 (benign/likely benign (47 個; 17.7 %), pathogenic/likely pathogenic (46 個; 17.4 %), VUS/not classified/undetermined (172 個; 64.9 %)) し、発現ベクターライブラリーを構築、単球系細胞株である THP-1 へ個別に導入して Pyroptosis 誘導能を評価した。アッセイ間の誤差を補正するため、各バリエントの Pyroptosis 誘導能は、同実験回の野生型に対する相対値として定義し、各 3 回の独立した実験結果の平均を各バリエントの相対活性とした。相対活性の分布に基づき、中立 (82 個)・機能喪失性変異 (75 個)・中等度の機能亢進性変異 (66 個)・強い機能亢進性変異 (42 個) に再分類された。既報で機能的裏付けのある 19 の病原性変異に関する判定精度を確認すると、いずれも機能亢進性変異に分類されており (17: 強い機能亢進, 2: 中等度の機能亢進), 本アノテーション系の有用性が確認された。また、相対活性の程度と臨床的重症度・浸透率の相関をみると、相対活性の高いバリエントほどより重症度が高く、浸透率も高い傾向にあり、こうした情報も遺伝子診断における有用な情報となると考えられた。また、本解析により 25 個の新規変異が機能亢進性と判定され、新たな genotype-phenotype 相関の理解に資する基本資料となることが期待できる。

さらに、本ミスセンスバリエント評価系は、既に日本の MEFV 遺伝子結果解析報告体系に組み込まれており、保険収載された MEFV 遺伝子検査の全解析結果を日本免疫不全・自己炎症性学会と共有し、臨床的に疑義のある VUS が同定された場合、直ちに機能評価につなげることで、患者の遺伝子診断の質向上に資する体制を構築した。具体的には、研究全期間を通して 10 件を超える照会があり、新規病原性変異を 3 件同定した (個別の症例報告として報告準備中)。

#### 【Pyrin 活性化分子機構の解明】

機能喪失性変異の分布について検討すると、PYD・B30.2 ドメインに集中することが分かり、これらのドメインが Pyrin 活性化に重要であることが明らかになった。PYD は自己重合・ASC 結合を介して Inflammasome 活性化を制御していることが分かっており、本研究で同定した PYD の機能喪失性変異も重合能が低下している結果、Inflammasome 活性が喪失していることが確認された。B30.2 ドメインの機能的意義を解明するために、Pyrin の細胞内局在を詳細に解析したところ、機能喪失性変異では活性化に伴う Pyrin 凝集体の形成が阻害される一方で、機能亢進性変異では同凝集体形成が促進されることが明らかになった。また、近年 Pyrin 活性化制御に重要な因子として同定された CDC42 との関与を確認したところ、CDC42 は Pyrin B30.2 ドメインと相互作用して Pyrin の細胞内輸送を制御しており、同相互作用が Pyrin の凝集体形成を制御する重要な因子であること

が明らかになった。AlphaFold3により複合体予測モデルでは、高い信頼度スコアをもって同2分子が直接結合している可能性が示唆された。複合体予測モデルにおける計算の結果、網羅的解析で同定したB30.2ドメインの機能喪失性変異はPyrin B30.2ドメインとCDC42の相互作用により強く関与しており、結合親和性が高くなることが予想された。実際の共免疫沈降実験でCDC42と各種Pyrinバリエントの相互作用をみると、FMF関連機能亢進性変異は野生型Pyrinと比較してCDC42への結合能が亢進していた。以上のことから、従来機能が不明であったPyrin B30.2ドメインがCDC42との相互作用を介して自身の細胞内分布を制御するとともに、活性化に伴う凝集体形成を制御する因子であることが、初めて明らかになった。また、FMF関連変異がCDC42との結合能が亢進することも初めて証明し、今まで不明であったFMF発症機序解明につながる重要な知見であると考えられた。

#### 【In silico 病原性予測ツールとの相関】

近年、機械学習モデルを用いたミスセンスバリエントの病原性予測ツールが長足の進歩を遂げている。しかしながら、その予測精度はいまだ完全ではない。本研究で実施した網羅的機能解析データと網羅的な病原性予測ツールであるAlphaMissenseとの相関を解析したところ、強い機能亢進性変異のほとんど(42個中38個)、機能喪失性変異の約6割(75個中47個)において乖離が見られ、特に機能亢進性変異における低い予想精度が確認された。病原性予測の正確性を左右するパラメータを解析したところ、構造不安定性予測スコアが低い病原性変異が、こうした予測ツールで見逃される傾向にあることを明らかにした。今後、本研究で確立したデータベースを利活用して、In silico 病原性予測ツールのさらなる精度改善につなげる研究を進める予定である。

まとめると、本研究開発の成果は以下のとおりである。

- ① MEFV 遺伝子バリエントの機能アトラス構築：265 のミスセンスバリエントを、Pyroptosis 誘導活性に基づき層別化した。活性の強さは臨床的重症度・変異の浸透率と良好に相関しており、遺伝子診断における重要なリファレンスとして活用可能である。
- ② 日本全体を網羅する遺伝子解析体制への MEFV 遺伝子バリエント機能評価系の実装：保険収載された MEFV 遺伝子検査の全解析結果を日本免疫不全・自己炎症性学会と共有しており、臨床的に疑義のある VUS が同定された場合、直ちに機能評価につなげ患者の遺伝子診断の質向上に資する体制を構築した。本研究により新規疾患関連変異を3つ同定した(個別の症例報告として投稿準備中)
- ③ 網羅的機能解析結果と In silico のミスセンスバリエント病原性予測ツール (Alpha Missense) との相関を解析、機能獲得性変異に関する予測精度が極めて低いことを明らかにした。今後、機能解析データを利活用し、In silico ツールの予測精度の改善に資する研究を開始予定である。
- ④ 網羅的機能解析結果をもとに、Pyrin インフラマソーム活性化機構ならびに FMF 発症の背景となる分子病態を解明し研究代表者を責任著者とする英語論文を現在投稿中である。
- ⑤ 国内学会での成果報告で指導大学院生が最優秀演題賞を受賞した(2025 年 2 月日本免疫不全・自己炎症学会)

Mutations in the *MEFV* gene, encoding pyrin, are associated with a spectrum of inflammatory conditions called pyrin-associated autoinflammatory diseases (PAADs). Of the 400 *MEFV* variants listed in the Infevers database, the majority is classified as variants of uncertain significance, leaving genetic diagnosis of PAADs challenging. The human pyrin protein is composed of five structural domains: amino (N)-terminal pyrin domain (PYD) encoded by exon1, phosphorylated linker domain (PLD) encoded by exon 2, B-box domain encoded by exon3, central helical scaffold (CHS) domain encoded by exons 4-9, and carboxyl (C)-terminal B30.2 domain encoded by exon 10. In 1997, four most common pathogenic variants in pyrin B30.2 domain, M680I/M694V/M694I/V726A, were reported responsible for Familial Mediterranean Fever (FMF) that is mainly inherited in autosomal recessive manner. Recently, mutations outside of B30.2 domain have been reported to cause phenotypes different from FMF which are mainly inherited dominantly: pyrin-associated autoinflammatory disease with neutrophilic dermatosis (PAAND) by PLD domain variants (S242R/G, E244K), FMF-like diseases/severe periodic fever by B-box (P373L) or CHS domain variants (H478Y/T577A/S/N), and pyrin-associated autoinflammatory disease with neuroinflammation (PAANI) by CHS domain variant (E583A). However, the precise molecular mechanisms of pyrin activation by each structural domain remain poorly understood, especially in explaining the complex inflammatory phenotypes of PAADs.

Here, 265 missense *MEFV* variants in Infevers were stratified by their pyroptosis-inducing activity, which well reflected the clinical severity and penetrance of well-established pathogenic variants. We successfully identified 42 strong gain-of-function (GOF) variants including 25 novel GOF variants as well as 75 loss-of-function (LOF) variants.

By the detailed analysis of specific variants, we also identified that the interaction of the pyrin B30.2 domain and CDC42 regulates intracellular trafficking and activation of pyrin. The classical familial Mediterranean fever (FMF)-related variants bind to CDC42 with high affinity to induce pyrin overactivation, while certain non-FMF variants could induce pyrin overactivation independent of CDC42, indicating that multiple pathways are involved in pyrin activation. In summary, our functional *MEFV* map will guide us to a better understanding of PAADs pathogenesis and of pyrin inflammasome biology.