

Journal Club 2021.8.25. by K. Ohmura

ORIGINAL ARTICLE










Somatic Mutations in *UBA1* and Severe Adult-Onset Autoinflammatory Disease

D.B. Beck, M.A. Ferrada, K.A. Sikora, A.K. Ombrello, J.C. Collins, W. Pei, N. Balanda, D.L. Ross, D. Ospina Cardona, Z. Wu, B. Patel, K. Manthiram, E.M. Groarke, F. Gutierrez-Rodrigues, P. Hoffmann, S. Rosenzweig, S. Nakabo, L.W. Dillon, C.S. Hourigan, W.L. Tsai, S. Gupta, C. Carmona-Rivera, A.J. Asmar, L. Xu, H. Oda, W. Goodspeed, K.S. Barron, M. Nehrebecky, A. Jones, R.S. Laird, N. Deutch, D. Rowczenio, E. Rominger, K.V. Wells, C.-C.R. Lee, W. Wang, M. Trick, J. Mullikin, G. Wigerblad, S. Brooks, S. Dell'Orso, Z. Deng, J.J. Chae, A. Dulau-Florea, M.C.V. Malicdan, D. Novacic, R.A. Colbert, M.J. Kaplan, M. Gadina, S. Savic, H.J. Lachmann, M. Abu-Asab, B.D. Solomon, K. Retterer, W.A. Gahl, S.M. Burgess, I. Aksentijevich, N.S. Young, K.R. Calvo, A. Werner, D.L. Kastner, and P.C. Grayson

Autoinflammatory disorders

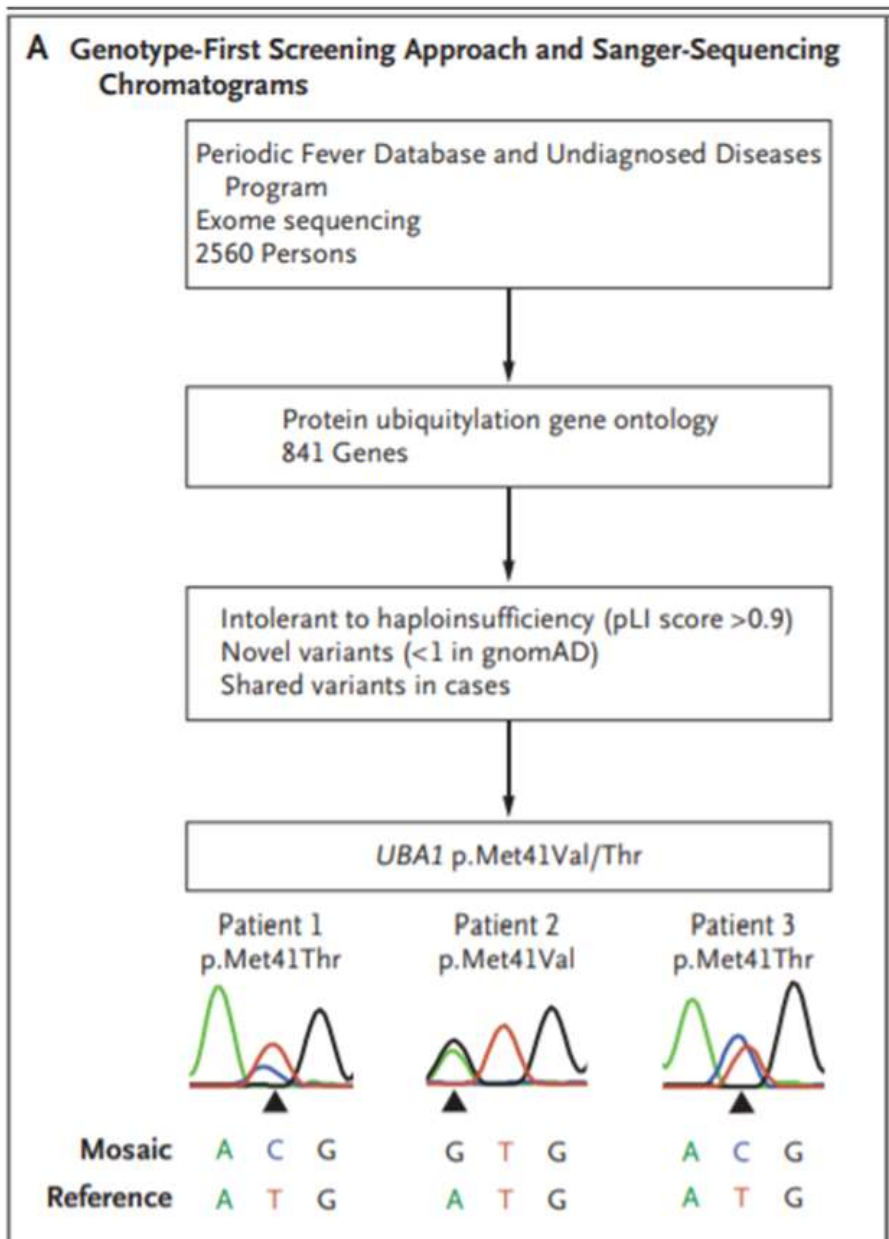
TRANSLATIONAL SCIENCE

Pathogenic *UBA1* variants associated with VEXAS syndrome in Japanese patients with relapsing polychondritis

Naomi Tsuchida ^{1,2}, Yosuke Kunishita ¹, Yuri Uchiyama ^{2,3}, Yohei Kirino ¹, Makiko Enaka,⁴ Yukie Yamaguchi ⁵, Masataka Taguri ⁶, Shoji Yamanaka,⁷ Kaoru Takase-Minegishi ¹, Ryusuke Yoshimi ¹, Satoshi Fujii,^{4,7} Hideaki Nakajima ¹, Naomichi Matsumoto ²

Tsuchida N, *et al. Ann Rheum Dis* 2021;**80**:1057–1061.

変異発見の経緯



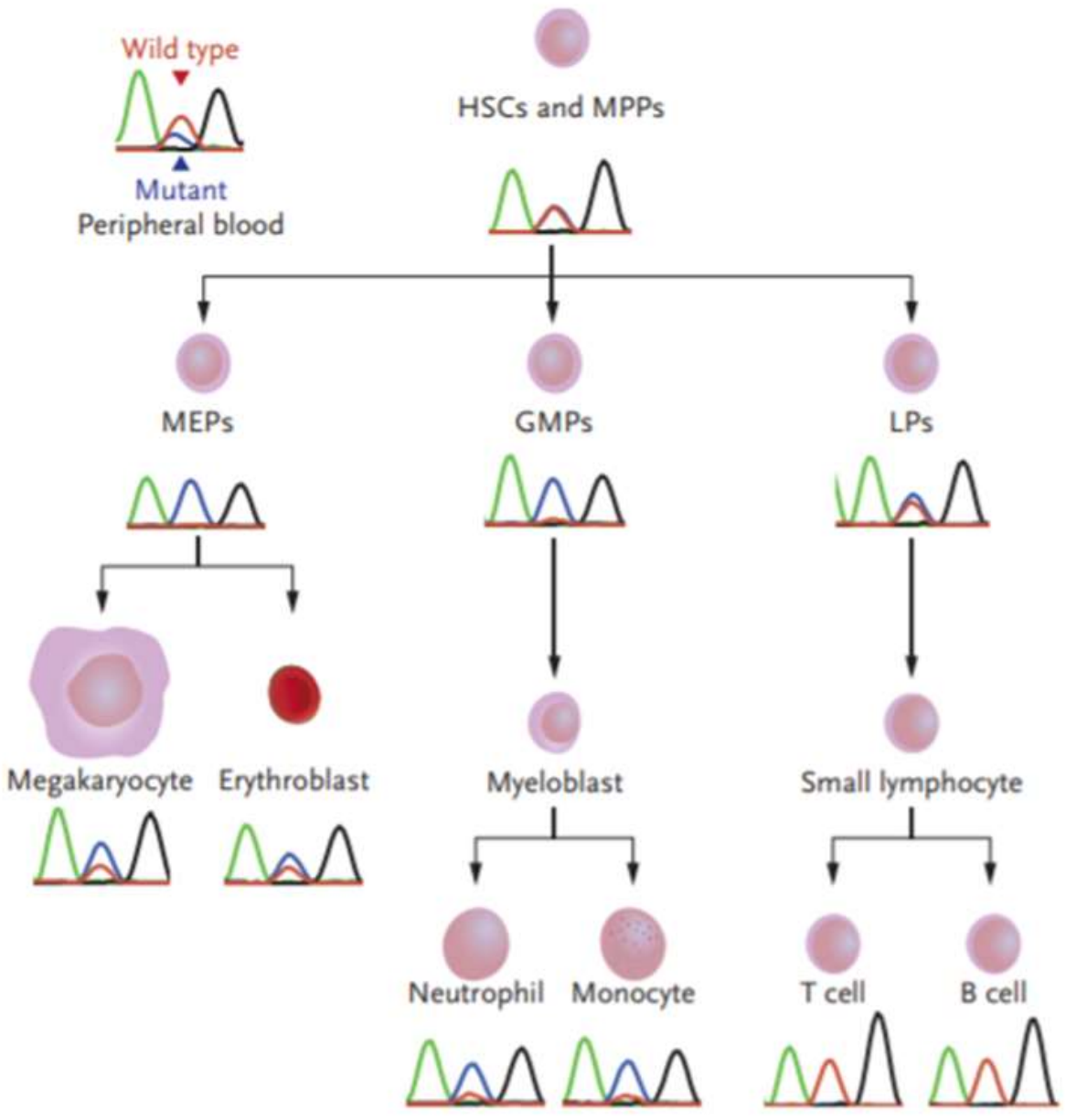
2560人の不明熱患者を
エクソームシーケンス

ユビキチン関連遺伝子
841のうち変異の影響が
大きな (pLI score > 0.9)
変異をもつものを搜した

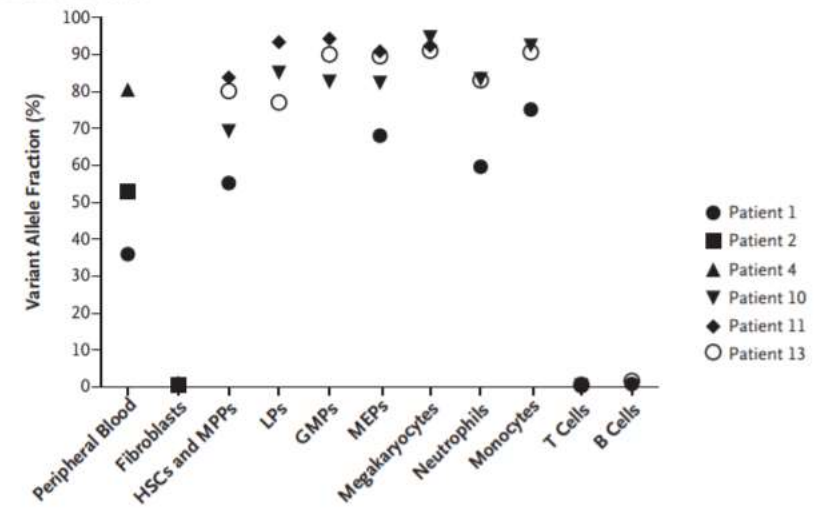
UBA1 の pMet41 に変異を
もつ 3 名の男性を発見

その後、同変異をもつ患者
22名を他コホートから追加
で発見

B Dendrogram of Hematopoietic Differentiation with Overlying Sanger Sequencing



C Quantification of Variant Allele Fraction

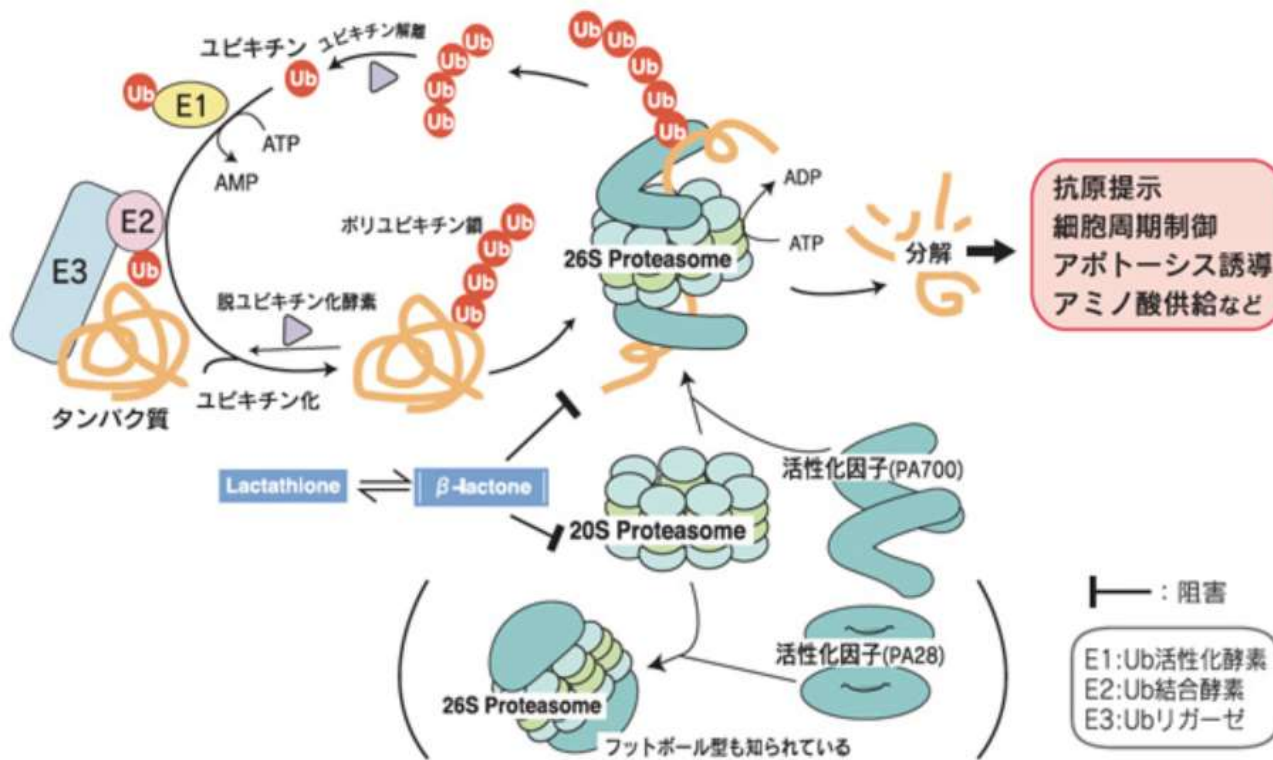


変異は血液幹細胞(+)が、
T, B細胞, fibroblastには(-)

=> **体細胞変異**

Ubiquitin-like modifier activating enzyme I (UBA1)

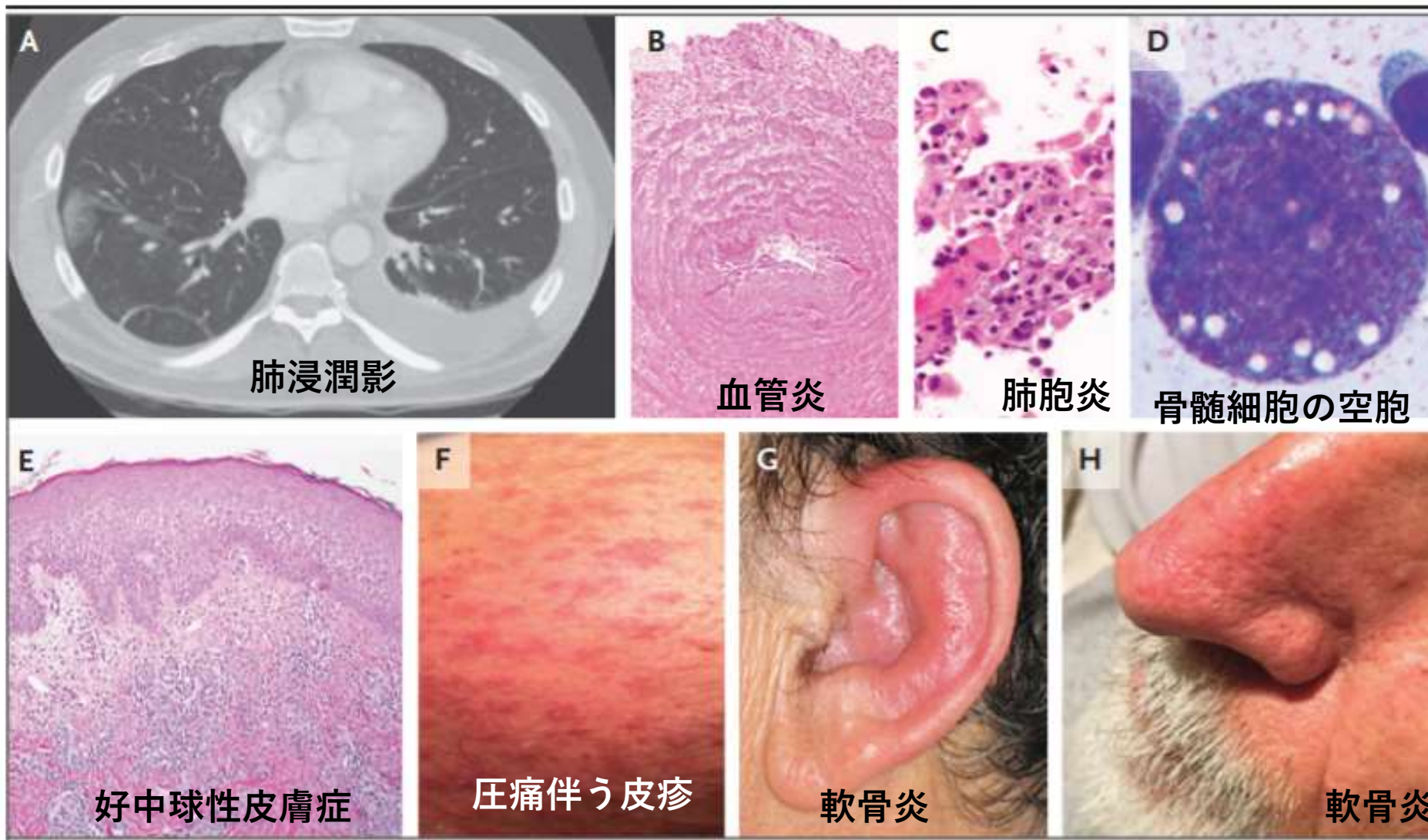
<Ubiquitin-Proteasome経路>



UBA1はユビキチン付加酵素システムの最初のユビキチン活性化酵素E1の中の1つ

ユビキチンは
不要なタンパク質の除去、
DNA修復、
シグナル伝達など
多彩な機能を持っている

VEXAS (Vacuoles, E1 enzyme, X-linked, autoinflammatory, somatic) の臨床的特徴



VEXASの臨床的特徴

Table 1. Demographic and Clinical Characteristics of Participants with the VEXAS Syndrome.*

Characteristic	Participants (N = 25)
Demographic characteristics	
Male sex — no. (%)	25 (100)
Median age at onset (range) — yr	64 (45–80)
Died before the current study — no. (%)	10 (40)
Genetic characteristics	
Somatic <i>UBA1</i> (NM_003334.3) variant (p.Met41) — no. (%)	25 (100)
p.Met41Thr (c.122T→C)	15 (60)
p.Met41Val (c.121A→G)	5 (20)
p.Met41Leu (c.121A→C)	5 (20)
Key clinical features	
Fever — no. (%)	23 (92)
Skin involvement — no. (%)†	22 (88)
Pulmonary infiltrate — no. (%)	18 (72)
Ear and nose chondritis — no. (%)	16 (64)
Venous thromboembolism — no. (%)	11 (44)
Macrocytic anemia — no. (%)	24 (96)
Bone marrow vacuoles — no./total no. (%)	18/18 (100)

Laboratory findings

Median C-reactive protein (IQR) — mg/liter 73 (18–128)

Median ESR (IQR) — mm/hr 97 (64–124)

Current or past treatment

Glucocorticoids — no. (%) 25 (100)

Median no. of synthetic DMARDs (IQR) 2 (1–3)

Median no. of biologic or target synthetic DMARDs (IQR) 2 (0.5–3)

Diagnostic or classification criteria that were met — no. (%)

Relapsing polychondritis 15 (60)

Sweet's syndrome 8 (32)

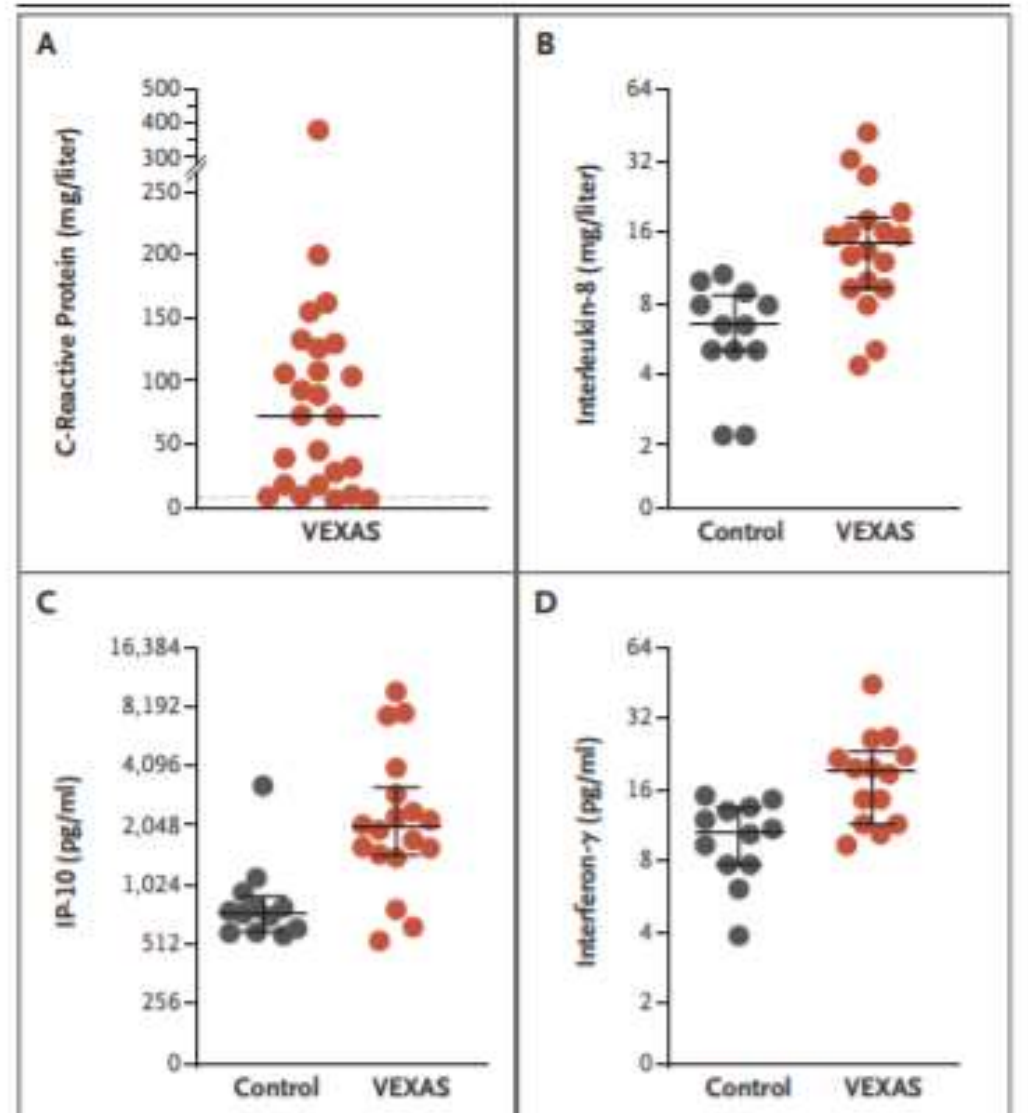
Myelodysplastic syndrome 6 (24)

Multiple myeloma or monoclonal gammopathy of undetermined significance 5 (20)

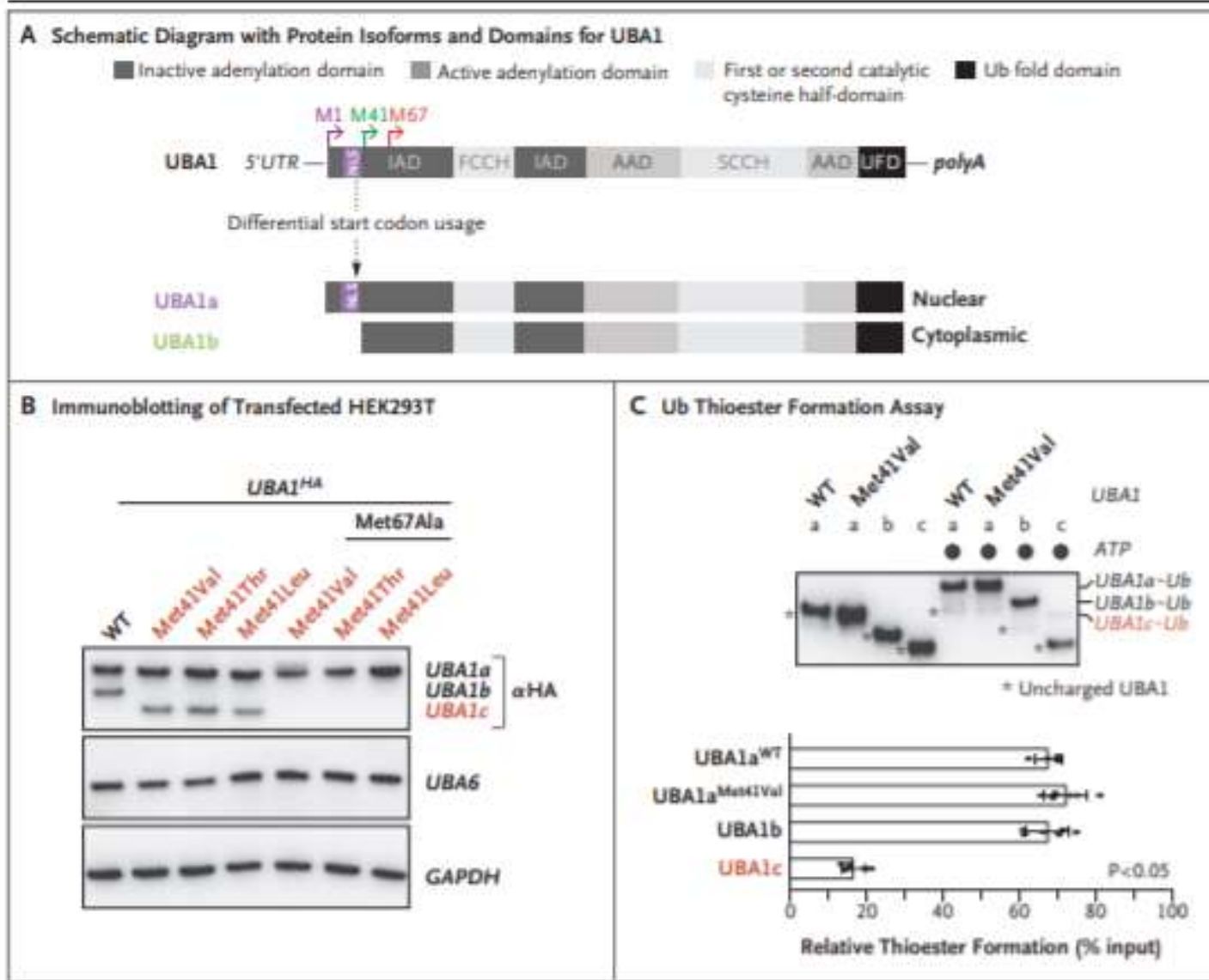
Polyarteritis nodosa 3 (12)

Giant-cell arteritis 1 (4)

VEXASのサイトカイン



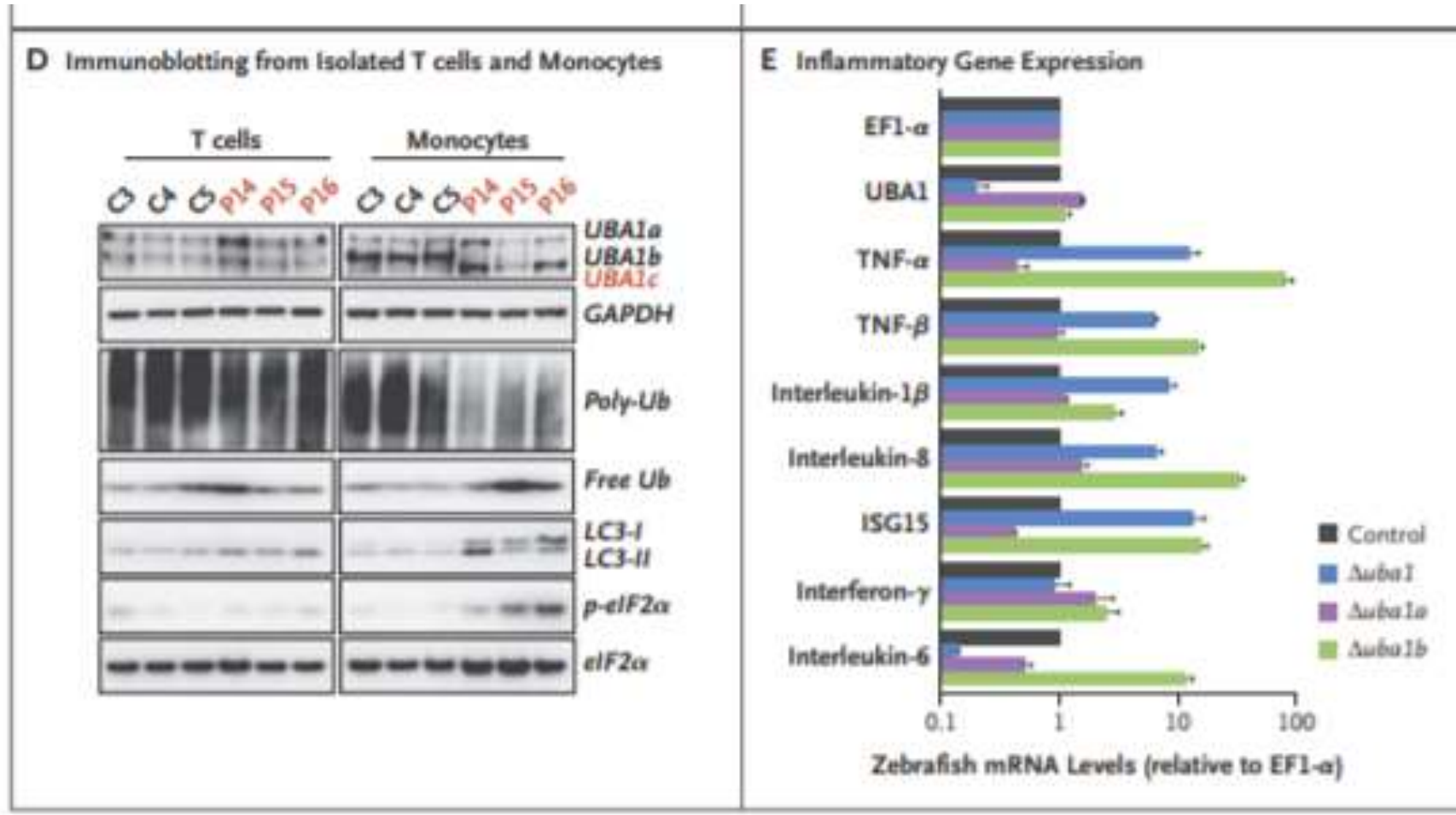
UBA1のp41Met変異による構造的変化



新たなUBA1 isoform UBA1cが
つくられる

UBA1cは酵素機能が減弱

UBA1のp41Met変異による機能的変化



患者単球 (p14-16)では
poly-Ubが減少

UBA1b欠損のZebrafishを作成し、
自己炎症性であることを示した

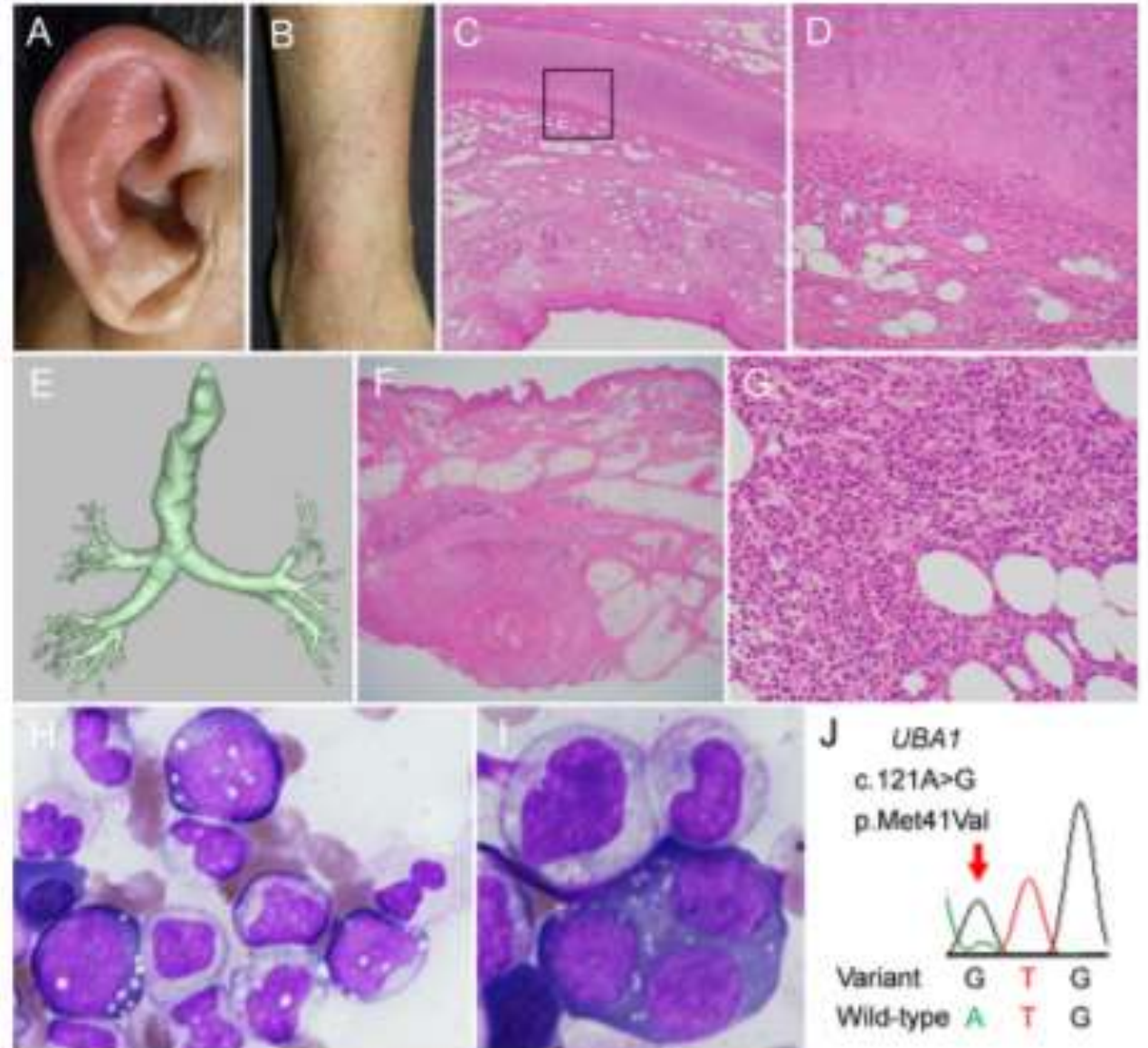
TRANSLATIONAL SCIENCE

Pathogenic *UBA1* variants associated with VEXAS syndrome in Japanese patients with relapsing polychondritis

Naomi Tsuchida ^{1,2}, Yosuke Kunishita ¹, Yuri Uchiyama ^{2,3}, Yohei Kirino ¹,
 Makiko Enaka ⁴, Yukie Yamaguchi ⁵, Masataka Taguri ⁶, Shoji Yamanaka ⁷,
 Kaoru Takase-Minegishi ¹, Ryusuke Yoshimi ¹, Satoshi Fujii ^{4,7},
 Hideaki Nakajima ¹, Naomichi Matsumoto ²

Tsuchida N, *et al. Ann Rheum Dis* 2021;**80**:1057–106

NEJMの論文では、VEXAS
 の60%はRPの分類基準を
 みたしていた
 =>
 RP患者にUBA1変異が認め
 らるか確認した



14名のRP(再発性多発軟骨炎) の臨床像

Table 1 Clinical features of the 14 patients with relapsing polychondritis and *UBA1* variants detected by Sanger sequencing

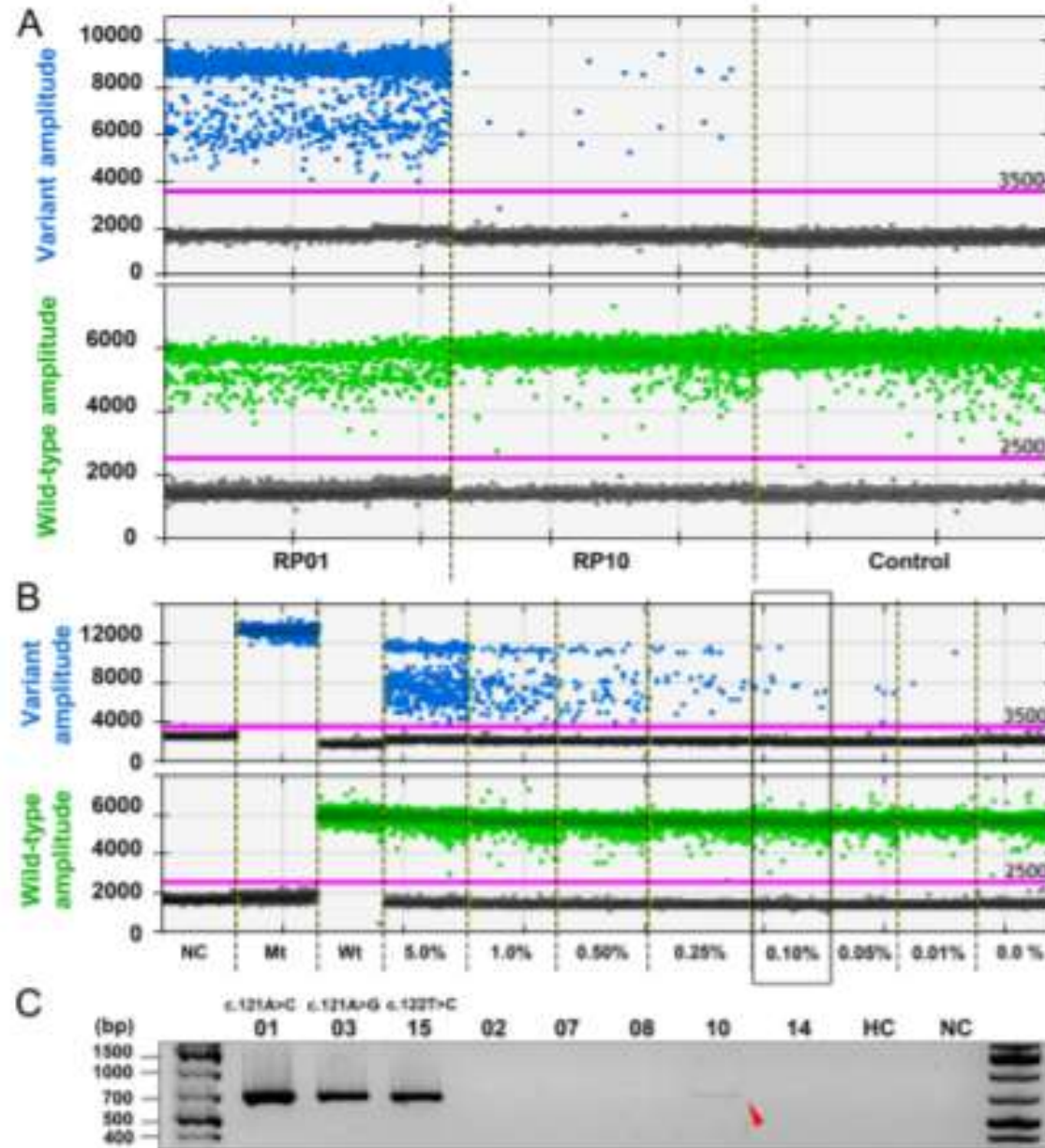
Patient ID	RP01	RP02	RP03	RP04	RP05	RP07	RP08	RP10	RP11	RP12	RP13	RP14	RP15	RP16
Sex (M, male; F, female)	M	F	M	M	M	M	M	F	M	M	M	M	M	M
Age of onset (years)	78.6	93.1	81.1	68.7	71.3	84.2	72.8	43.2	78.5	70.3	66.3	59.9	73.5	66.6
<i>UBA1</i> variants p.Met41 by Sanger sequencing	c.121A>C: p.Met41Leu	-	c.121A>G: p.Met41Val	c.121A>G: p.Met41Val	c.122T>C: p.Met41Thr	-	-	-	c.121A>C: p.Met41Leu	NA	c.122T>C: p.Met41Thr	-	c.122T>C: p.Met41Thr	c.121A>C: p.Met41Leu
Clinical findings														
Fever	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Skin involvement	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
Chondritis	A†, N, R	N, R†	A, R†	A†, R†	A†, R†	A†	A†	N†, R	A†	A, N	A, N	A†, R	A†	A†
Polyarthritis	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
Ocular inflammation	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Audio-vestibular damage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Macrocytic anaemia	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
Bone marrow vacuoles	+	NA	NA	+	+	-	NA	NA	+	+	NA	NA	+	+
Others	MDS	-	-	MDS, IP, endocarditis	MDS, DVT, Sweet's syndrome	-	-	-	MDS	MDS	Peritonitis, pericarditis, meningitis	-	-	Arteritis, MDS, DVT
Anti-type II collagen antibody	+	NA	-	-	NA	-	-	+	+	NA	-	+	+	NA
Diagnostic criteria of RP														
McAdam <i>et al</i> ¹²	3/6	2/6	2/6	3/6	1/6	1/6	2/6	2/6	2/6	3/6	4/6	3/6	1/6	2/6
Damiani <i>et al</i> ¹³	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Michet <i>et al</i> ¹⁴	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No
Treatment	PSL	PSL, colchicine	PSL, AZP, colchicine	PSL, MTX, CyA	PSL, AZP, MTX, MZB, ETN	PSL	PSL, IVIg, MTX, IFX, colchicine	PSL, MTX, TAC, TCZ	PSL, AZP, CyA	PSL	PSL, TCZ, colchicine	PSL, POCY	PSL, TCZ	PSL, AZP, TCZ, colchicine

8/14に
UBA1変異
を認めた
(後でRP10
は変異が
確認される)



結局9/13
(69%)に
UBA1変異
を認めた

変異確認の方法 (ddPCR法とPNA PCR clamp法)



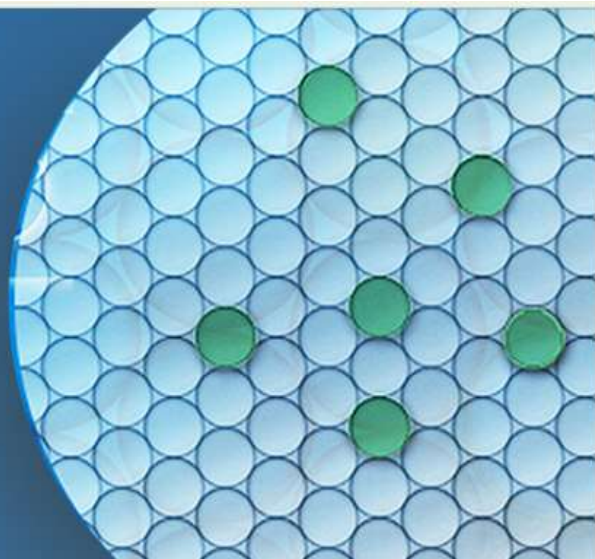
Droplet Digital PCRの利点

絶対定量測定 – 検量線を用いることなくサンプル中のターゲットDNAコピー数を絶対定量にて検出

超高感度・高精度検出 – ドロップレットにより高い存在比率となったターゲットDNAはリアルタイムPCRを凌駕する感度・精度検出に貢献

ハイスループット – 96サンプルまで対応可能なシンプルでハンドリングしやすいワークフローが操作負担を軽減し結果の安定性を向上

PCRバイアスからの解放 – エンドポイントアッセイにより増幅効率の影響を受けないアッセイ系が確立



■ ddPCRの特長

絶対定量	<ul style="list-style-type: none"> 1mLあたりのコピー数 検量線不要 エンドポイント測定なので、増幅効率に影響されにくい
高精度	<ul style="list-style-type: none"> 1.1倍希釈系列を判別可能 qPCRでは困難な低濃度域での精度が高い
高感度	<ul style="list-style-type: none"> バックグラウンドの影響を減少させて、微量なターゲットを増幅 0.001%オーダーで検出
高処理性	<ul style="list-style-type: none"> 1回のランで96サンプルの測定が可能 低ランニングコスト

デジタルPCR | Bio-Rad Laborator <https://www.bio-rad.com/ja-jp/category/digital-pcr?ID=M9HE2R15ies>



1 サンプル調製

- DNAサンプル、プライマー、パイオ・ラッド製 ddPCR Supermix (および、プローブ検出を行う際はプローブ)を混合します



2 ドロップレット作成 (2分/8サンプル)

- 専用カートリッジに調製したサンプルおよび専用オイルを分注します
- カートリッジをセットした後、1サンプルにつき20,000個のドロップレットを作成します
- これによりターゲットDNA (●) とバックグラウンドDNA (●) がランダムに各ドロップレットに分散します



QX200 Droplet Generator

or



Automated Droplet Generator

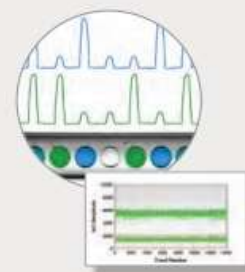


3 PCR

- 2にて専用カートリッジの各ウェルで作成したドロップレットを、96ウェルのPCRプレートの各ウェルに移し、シーリングを行います
- その後、PCRを実施します



C1000 Touch サーマルサイクラー



4 ドロップレット蛍光測定 およびデータ解析 (2.5時間/96サンプル)

- PCR終了後、96ウェルPCRプレートをQX200 Droplet Readerにセットします
- 各ウェル内のドロップレットの蛍光を測定し、'positive' 'negative'を判定します
- QuantaSoftTMソフトウェアを使用し、各サンプルの濃度(コピー/μl)を測定します



QX200 Droplet Reader

https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/japan/japanese/literature/C10561_QX200_ddPCR.pdf

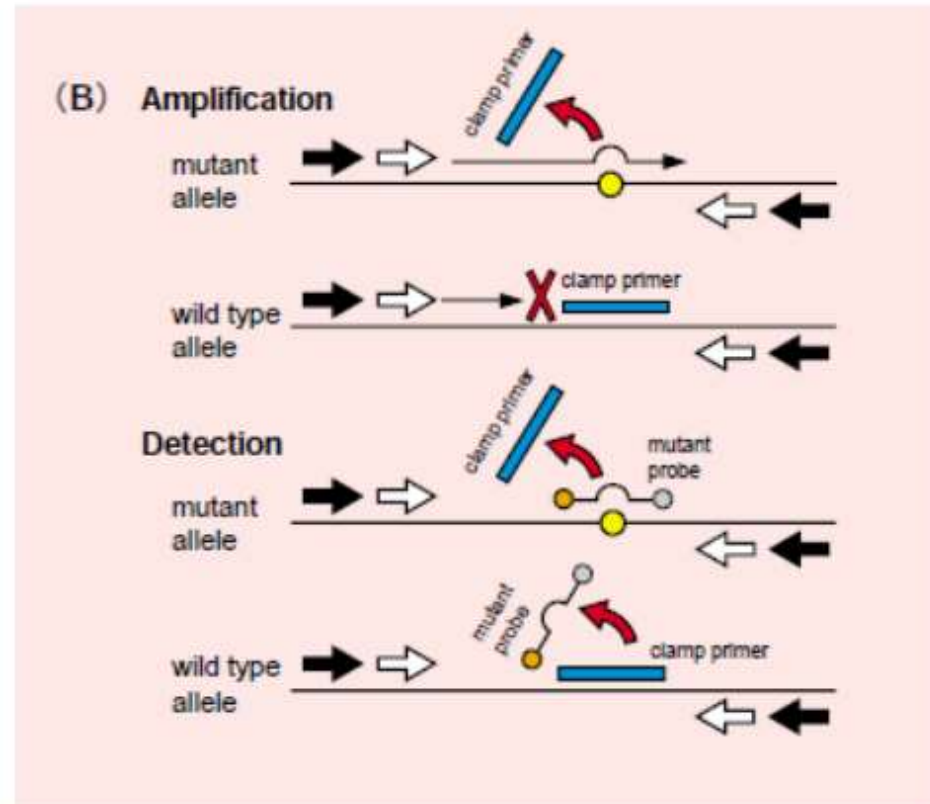
PNA LNA PCR Clamp法

peptide nucleic acid (PNA)
Locked nucleic acid (LNA)

PNA:ペプチド核酸

【特徴】

- DNAやRNAによく似た配列を持つ。
- PNA-DNA間の結合がDNA-DNA間よりも強い。
- 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性に対して耐性がある。
- 特異性が高い。
- プライマーとして機能しない。



BIO VIEW No.50 9より