

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第747号	氏名	清田 今日子
指導教員	講座名 氏名	小児科学 井原 健二・前田 知己	
審査委員会委員	主査氏名	小林 隆志	
	副査氏名	武田 鶴信	
	副査氏名	行波英充	伊藤

論文題目

A gain-of-function PIK3CD variant, R512W, impairs T cell function through polyamine-dependent metabolic dysregulation

(PIK3CDの機能獲得型変異である R512W はポリアミン代謝依存性に T 細胞機能を障害する)

論文掲載雑誌名

Biochemical and Biophysical Research Communications

論文要旨

PI3K ファミリーは細胞内シグナル伝達に関与する脂質キナーゼであり、PIP2 を PIP3 に変換し、下流の AKT/mTOR 経路を活性化する。PI3K の p110δ サブユニットをコードする PIK3CD 遺伝子の機能獲得型変異（代表的には E1021K）によって生じる activated PI3Kδ syndrome (APDS) は、過剰な PI3Kδ シグナルにより AKT/mTOR 経路が恒常的に活性化され、T 細胞の疲弊および免疫不全を引き起こすことが知られている。一方、従来の APDS に典型的な免疫不全症状を示さず、川崎病、特発性血小板減少性紫斑病、全身性エリテマトーデスなど自己免疫性の臨床像を呈した患者において、新規ヘテロ接合性の PIK3CD ミスセンス変異 (p.R512W) が先行研究により同定された。そこで本研究では、この表現型の分子機構を明らかにするために、R512W 変異の機能的および構造的解析を行った。マウス T 細胞株にヒト p110δ (R512W) 変異体を過剰発現させたところ、PIP3 の蓄積と AKT リン酸化の増加が認められ、機能獲得型変異としての性質が確認された。しかし、R512W を発現する T 細胞では、IL-2 産生の低下、増殖能の障害、PD-1 発現の上昇およびアポトーシスなど、いわゆる「T 細胞疲弊様状態」を呈する機能不全が認められた。トランスクリプトーム解析では、Odc1、Amd1、Smox を含むポリアミン生合成関連遺伝子の発現低下と、細胞内ポリアミン量の減少が明らかとなった。培地にスペルミジンを添加すると、T 細胞の増殖障害が部分的に回復したことから、可逆的な代謝不全が関与していることが示唆された。構造モデリング解析では、R512W 変異が p110δ のヘリカルドメインの立体構造を変化させ、過剰活性化に寄与する可能性が示された。これらの結果から、R512W 変異は従来の APDS 関連変異とは異なり、PI3K の過剰活性化と T 細胞応答の有効性を乖離させることで、シグナル伝達および代謝経路の両面から免疫異常を誘導することが明らかとなった。

本研究により、R512W 変異による自己免疫優位型の表現型が明らかとなり、PIK3CD 関連疾患における変異特異的な臨床的多様性が示された。さらに、異常な PI3K シグナル伝達とポリアミン代謝との新たな連関を明らかにした点は学術的に重要であり、代謝経路を標的とする治療戦略が PI3K 依存性自己免疫疾患の一部に有効である可能性を示した点は、臨床的にも意義深い。

このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 課・論	第747号	氏名	清田 今日子
指導教員		講座名 氏名	小児科学 井原 健二・前田 知己
審査委員会委員		主査氏名	小林 隆志 
		副査氏名	武田 篤信 
		副査氏名	行波 天亮 

学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。

1. R512W変異は体細胞全体で起きているのか、造血幹細胞に限定されているのか説明しなさい。
2. マウス68-41細胞はどんなT細胞株で、どのようなサイトカインを産生するのか説明しなさい。
3. ヒト変異PIK3CDの機能をヒトT細胞株ではなくマウスT細胞株を用いて解析したのはなぜか説明しなさい。
4. 細胞増殖アッセイの定量性は、CellTiterなどが高いと思うがこのアッセイ系にした理由を説明しなさい。
5. 細胞増殖アッセイについて生細胞数カウントに比べてCFSE希釈法の利点を説明しなさい。
6. SYBR Green PCRの場合、Off Target効果のリスクがあるが、それはどのように考えるか説明しなさい。
7. R512W変異の機能をin vivoで解析したか？形成される腫瘍はどの腫瘍が増大するのか説明しなさい。
8. 内在性p110δの発現量はどの程度か、また、導入した遺伝子産物との量比はどの程度か説明しなさい。
9. E1024KはR512Wに比べPIP3の増加が著しいが、AKTのリン酸化レベルに大きな差が無い理由を説明しなさい。
10. 図2Aの増殖試験でTCR刺激を加えたときのR512Wの細胞増殖能に変化がみられたか答えなさい。
11. 図2のデータ数はn=3で測定しているが、p値は統計学的に信頼できるものと考えられるか答えなさい。
12. 図2CのPdcd1 mRNAがR512Wで有意に上昇していたが、RAG1/2の発現低下はみられたか答えなさい。
13. 図2Dで68-41細胞をTCR刺激するとLive cell (%)が低下したが、この時の総細胞数はTCR刺激なしに比べ増加したか、それともアポトーシスによって減少したか答えなさい。
14. SPDS（スペルミジン合成酵素）やSPMS（スペルミン合成酵素）の発現は低下していたか答えなさい。
15. Smox（スパーミンオキシダーゼ）の低下はスペルミンからスペルミジンへのリサイクルの障害が考えられるが、スペルミンは蓄積していたと考えられるか答えなさい。
16. ポリアミン代謝の障害はE1021KによるAPDSでも観察されるか答えなさい。
17. R512W変異によりSmox, Amd1, Odc1の発現低下が起きるメカニズムを説明しなさい。
18. R512WもE1021Kも共にAKTリン酸化亢進とポリアミン代謝障害を伴う機能獲得型変異だが、その臨床像はR512Wが自己免疫疾患でE1021Kは免疫不全を示すのはなぜか説明しなさい。
19. AlphaFold Protein Structure Databaseはどのようなものか説明しなさい。
20. P110δのヘリカルドメインの変異によりp85のnSH2ドメインとの結合力が低下したと考えられるか、また、それをどのように証明したらよいか答えなさい。

これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学位論文要旨

氏名 清田 今日子

研究指導教員 講座名：小児科 氏名：井原 健二

修学指導教員 講座名：小児科 氏名：前田 知己

論文題目

A gain-of-function *PIK3CD* variant, R512W, impairs T cell function through polyamine-dependent metabolic dysregulation

(*PIK3CD*の機能獲得型変異であるR512Wはポリアミン代謝依存性にT細胞機能を障害する)

要旨

(緒言) ホスホイノシチド3キナーゼ(PI3K)はAKTやmTORを介して細胞機能を制御する脂質キナーゼであり、*PIK3CD*がコードするp110δは主に白血球に発現し免疫細胞活性化に重要な役割を果たす。*PIK3CD*の機能獲得型変異は活性化PI3Kδ症候群(activated PI3Kδ syndrome: APDS)を引き起こし、反復感染やリンパ節腫脹を主徴とするが、約30%の症例に自己免疫疾患を認める。我々は、典型的免疫不全を欠きながら自己免疫疾患を呈した新規変異R512Wを報告した。APDSにおける自己免疫疾患の発症は未だ十分に解明されていない。今回は、R512Wによる免疫への影響の解明を目的とした。

(研究対象及び方法) マウス由来T細胞株にレトロウイルスベクターを用いて、ヒト*PIK3CD*遺伝子を過剰発現させ、遺伝子が導入された細胞をFACS Ariaを用いて選別した。この細胞を用いて、PI3K-AKTシグナルや細胞機能の解析および細胞内代謝の解析を行った。さらに、変異により、タンパク質の構造に変化が生じていないかをin silico解析を行った。

(結果) R512W を導入した T 細胞では、PIP3 の増加と AKT リン酸化が亢進し、R512W が機能獲得型変異であることを同定した。R512W を発現する T 細胞は、増殖能の障害、IL-2 産生の減少、Pd-1 発現の増加、グルコースの細胞内取り込み低下を示し、これらは T 細胞の疲弊に似た状態の特徴であった。トランスクリプトーム解析の結果、Odc1、Amd1、Smox などのポリアミン生合成遺伝子の発現の低下を認め、細胞内ポリアミンレベルの低下が明らかになった。そこで、培養液にスペルミジンを添加すると、増殖不全が部分的に回復したことから、可逆的なポリアミンの代謝不全が示唆された。さらに、これらの現象を生じる理由として、タンパクの構造に変化が生じている可能性を考え、タンパク構造解析を行ったところ、R512W は p110 δ のヘリカルドメインの構造や極性を変化させており、このことが活性化の亢進に寄与している可能性が示唆された。

(考察) R512W 変異は、典型的 APDS 変異よりも弱いが持続的な PI3K-AKT シグナル亢進を引き起す。この変化は、シグナル伝達経路と代謝経路の両方を介して免疫調節異常をもたらすと考えられる。臨床的には免疫不全よりも自己免疫症状が前景に立つことから、R512W は変異特異的な病態を形成している可能性がある。特に、本研究で明らかになったポリアミン代謝異常は、PI3K シグナル異常と T 細胞機能障害をつなぐ新たな機序を示している。ポリアミンは T 細胞の増殖やエフェクター機能に必須であり、その欠乏は免疫疲弊と関連する。スペルミジン補充による増殖能部分回復は、この代謝異常が可逆的であることを示唆し、PIK3CD 関連疾患の一部において代謝経路を標的とする治療戦略の可能性を示唆する。

(結語) 本研究により、新規 PIK3CD 機能獲得型変異 R512W がポリアミン依存性代謝異常を介して T 細胞機能を障害することが明らかとなった。これらの知見は、PI3K シグナル異常とポリアミン代謝の新たな関連性を提示し、PI3K 調節異常を伴う特定の症例においては代謝標的治療の可能性を示唆する。