

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：17501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23947

研究課題名（和文）PIK3CD遺伝子の新規変異によるSLE発症の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of SLE onset due to a novel mutation in the PIK3CD gene

研究代表者

清田 今日子（Kiyota, Kyoko）

大分大学・医学部・医員

研究者番号：30774492

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：複数の自己免疫疾患を既往に持つSLEの患者に新規PIK3CD遺伝子変異を同定した。PIK3CD遺伝子の活性型変異では、先天性免疫不全症候群を呈し、自己免疫疾患の合併も40%程度あると報告されている。今回同定した新規PIK3CD遺伝子により、SLEが発症した可能性を考え研究を行なった。新規PIK3CD遺伝子変異が機能獲得型変異であるかをマウス由来のT細胞株を用いて実験を行い、機能獲得型の変異であることがわかった。さらに、ヒトの新規PIK3CD遺伝子変異を導入したゼブラフィッシュでは、遺伝子が導入された部分に腫瘍を形成した。このことより、この遺伝子変異によって細胞増加があることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PIK3CD遺伝子の機能獲得型変異であっても、免疫不全を生じない可能性があることがわかった。ただし、免疫を調整する遺伝子であるためにそのバランスが崩れた場合には、自己免疫疾患を生じることもある。複数の自己免疫疾患を生じている場合には、免疫不全がなかったとしても、PIK3CD遺伝子の変異がないかの探索を行う意義があると考えられる。自己免疫疾患に関しては、それぞれの疾患で治療法が異なるが、PIK3CD遺伝子の変異によることがわかっている場合には、今後PI3K阻害剤なども選択肢に上がり、より病態に即した治療ができる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：A novel PIK3CD gene mutation was identified in SLE patients with a history of multiple autoimmune diseases. Active mutations in the PIK3CD gene have been reported to present with congenital immunodeficiency syndrome and are associated with autoimmune disease in approximately 40%. We investigated the possibility that SLE was caused by the novel PIK3CD gene identified this time. When a mouse T cell line was used to test whether the novel PIK3CD gene mutation was a gain-of-function mutation, it was found to be a gain-of-function mutation. Furthermore, in zebrafish into which a novel human PIK3CD gene mutation was introduced, a mass was formed at the gene transfer site. This revealed that this mutation caused cell proliferation.

研究分野：小児科

キーワード：PIK3CD SLE 機能獲得型変異

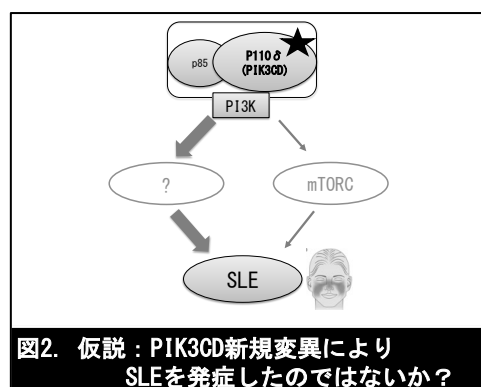
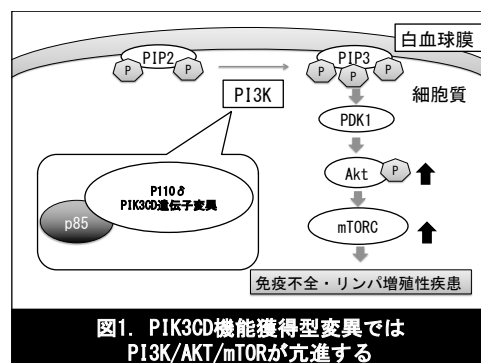
1. 研究開始当初の背景

小児期早期より複数の免疫異常が関わる疾患(免疫性血小板減少性紫斑病と川崎病とSLEなど)を発症した患児の診療を行なった。遺伝的背景に異常がないかを確認するために表現型正常の両親と患児のトリオ全エクソーム解析を行った結果、PIK3CD 遺伝子の新規突然変異(p. R512W)を同定した(Eur J Med Genet (2016)に報告)。

PIK3CD 遺伝子は、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ(PI3K)の p110 δ サブユニットをコードしている。これは、リンパ球系細胞に特異的に発現している。PI3K は、細胞内伝達分子のリン酸化を介して細胞増殖や分化に重要な働きを担う(図1)。

この PIK3CD 遺伝子の活性型変異により mTOR の活性化異常が原因となる免疫不全の症例が報告されている。(Lucas C. et al. Nature Immunol. 2014:88-97)

今回は、SLE の患者で同定された PIK3CD 遺伝子の新規突然変異(p. R512W)が T 細胞内の mTOR の活性に影響を与えることで SLE の病態形成の関与する可能性を推定した(図2)。



2. 研究の目的

本研究では、変異 PIK3CD 遺伝子の①機能獲得の分子メカニズム、②SLE の病態形成への関与を明らかにすることを目的とする。加えて、実験動物としてゼブラフィッシュを使用する。それにより SLE のより簡便な薬剤スクリーニングモデルの作製につながると考える。

3. 研究の方法

(1) 新規 PIK3CD 遺伝子の機能獲得の分子メカニズムの解析

機能獲得型変異であるかの証明:

新規 PIK3CD 遺伝子(R512W)が、機能獲得型変異であるかを証明する。マウス T 細胞株にヒトの PIK3CD 遺伝子を導入し、PI3K の下流で働く、Akt や mTOR が活性化しているかを検討した。

分子構造の変化について

PIK3CD 遺伝子でコードされる p110 δ は、調節ユニットである p85 α と二量体を形成し、PI3K という酵素として働いている。p85 α は、酵素活性を抑制するように調節をしているために、この二つの分子の結合に変化がないかを検討した。

(2) In vivo における表現型の確認:

ヒト PIK3CD 遺伝子を導入したゼブラフィッシュを用いて、表現型に差がないかを検討した。

4. 研究成果

(1) 新規 PIK3CD 遺伝子変異(R512W)は、機能獲得型の変異である

ヒト PIK3CD 遺伝子を導入したマウス由来 T 細胞株を用いて、pAkt と pS6 のシグナル強度をフローサイトメトリーとウェスタン法で解析をした。その結果、R512W は、WT と比較すると Akt と S6 のリン酸化の増加が見られたことより、既報と同様に機能獲得型変異であることを証明した。

ただし、PIK3CD 遺伝子の機能獲得型変異として最も頻度が高い E1021K に比べると、リン酸化の程度は弱いことがわかった(図 3)。この違いにより、R512W では、免疫不全を生じなかった可能性があるが、なぜ自己免疫疾患だけを発症するのかは解明できていない。

(2) p110 δ と p85 α との結合

PIK3CD 遺伝子でコードされる p110 δ とその抑制性の調節を行う p85 α との結合に差がないかを確認したが、それらに差がないことが分かった(図 4)。そのため、どのように機能を亢進させるのか、その機序についてはさらに検討を行なっていく。

(3) ゼブラフィッシュにおけるヒト

PIK3CD 遺伝子変異の表現型の検討

ヒト PIK3CD 遺伝子を導入したゼブラフィッシュを作製した。F1 世代は得ることができていないが、F0 世代で、R512W を導入したゼブラフィッシュで腫瘍を形成したものを確認した。腫瘍の由来組織については、現在検討中であるが、免疫染色でその部位に遺伝子が導入されていることと他に比べて pS6 が発現していることを確認した。つまり、PIK3CD(R512W) が過剰に発現されれば、組織の増殖が盛んになることを証明した。SLE の表現型と考える腎臓の組織の評価も今後、行なっていく。

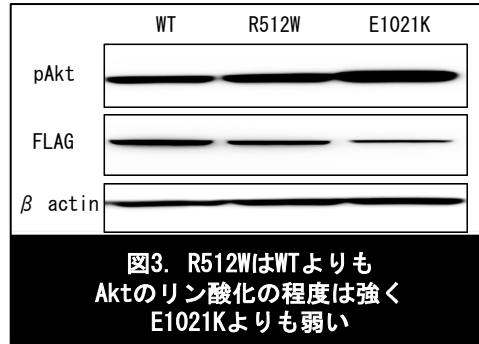


図3. R512WはWTよりもAktのリン酸化の程度は強くE1021Kよりも弱い

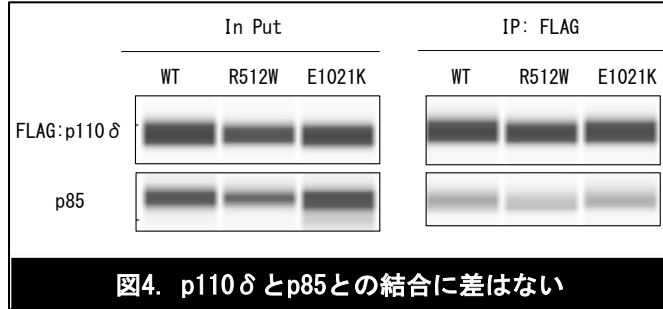


図4. p110 δ と p85 との結合に差はない

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	井上 真紀 (Inoue Masanori)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関