

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	内海 孝法
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Exclusive Characteristics of the p.E555K Dominant-Negative Variant in Autosomal Dominant E47 Deficiency (常染色体顕性 E47 欠損症における p.E555K ドミナントネガティブ変異の排他的特徴)			
論文審査担当者			
主 査	教授 松浦 伸也	印	
審査委員	教授 川上 秀史		
審査委員	准教授 久米 広大		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>骨髄 B 細胞分化に関わる分子の遺伝子変異は、B 細胞欠損と無ガンマグロブリン血症を特徴とする先天性免疫異常症の原因となる。その約 85%を X 連鎖性に発症する <i>BTK</i> 遺伝子変異が占めており、残りの 15%は常染色体顕性 (AD) あるいは常染色体潜性 (AR) に発症する疾患である。<i>TCF3</i> 遺伝子は、選択的スプライシングによって生成される 2 つのタンパク質 E12 と E47 をコードする。これらのタンパク質は二量体形成を担う helix-loop-helix (HLH) ドメインと、特異的 DNA 配列 (E-box) への結合に関わる basic region (b) を構造的特徴とする bHLH 型転写因子である。E47 は、リンパ系共通前駆細胞に発現することで、これらの細胞を B 細胞系列へと分化させるための重要な分子である。そのため、E47 の量的・質的な欠損は、B 細胞系列への分化を早期に停止させ、B 細胞欠損症と無ガンマグロブリン血症をもたらす。2013 年には、<i>TCF3</i> 遺伝子のヘテロ接合性ミスセンス変異 (c.1663 G>A; p.E555K) が AD E47 欠損症を引き起こすことが報告された。同報告にて変異アレルから生成された E555K 変異体は、野生型 E47 (WT) に干渉することでその機能を障害する dominant-negative (DN) 効果を発揮することが示された。AD E47 欠損症は、世界で 6 例の文献報告に留まる希少疾患であるが、その全ての症例が同一変異 p.E555K を保有するという共通点をもつ。本研究は、<i>TCF3</i> DN 変異による AD E47 欠損症の臨床像を拡充すると共に、原因変異として p.E555K のみが独占的に存在する分子学的機序を解明することを目的とした。</p> <p>症例は 25 歳の日本人男性で、生後 6 か月時に肺炎を発症したことを契機に無ガンマグロブリン血症と診断された。患者の両親は血族婚ではなく、2 人の同胞を含め生来健康であった。患者は呼吸器感染症を反復し、感染症を予防するために定期的な免疫グロブリン補充を必要とした。患者末梢血を用いた免疫表現型解析では、末梢血中の B 細胞を完全に欠損していたが、T 細胞および NK 細胞分画は正常であった。先天性免疫異常症関連遺伝子パネル解析で <i>TCF3</i> 遺伝子に既報変異 p.E555K をヘテロ接合性に同定し、AD E47 欠損症と確定診断した。患者の臨床表現型を詳細に調査したところ、幼少期より耳介低位、眼間離開、眼裂斜下、鞍鼻、上向きの上唇といった軽度の顔貌異常を呈していた。これらの形態的特徴は既報の AD E47 欠損症では報告されていないものの、<i>TCF3</i> タンパク質 (E12 と E47 の両方) を欠損する AR <i>TCF3</i> 欠損症で報告されている特徴と高い類似性を示した。本症例は、AD E47 欠損症においても顔貌異常を呈する可能性を示す貴重な症例と考えられた。</p> <p>著者らは、E47 の basic region における E555 残基の役割と、p.E555K 変異のもつ特殊性を明らかにするために、(i) basic region を構成するアミノ酸をアラニン (A) に置換し機能を解析したアラニンスキニングと、(ii) 555 位のグルタミン酸 (E) をリジン (K) を含む 19 種のアミノ酸に置換し、その機能を解析した網</p>			

網羅的変異解析を行った。Basic region のアラニンスキャニングの結果、E555A 置換体のみが WT と共発現させた場合に WT の転写活性を強く抑制することを見出した。さらに、E555 部位に着目した網羅的変異解析の結果、全ての E555 変異体の中で E555K 変異体のみが WT との共発現させた場合に極めて強力な DN 効果を発揮することを明らかにした。タンパク質立体構造解析では、555 位の E から K への変化は DNA 塩基との水素結合を完全に消失させるだけでなく、E47 タンパク質の表面電荷を電気的中性状態から強く正に帯電した状態へ変化させることが予測された。この変化は、DNA との結合をより困難にするだけでなく、WT との二量体形成においてはより有利に働くと考えられた。in silico 解析によって明らかとなった E555K 変異体の分子学的特徴は、同変異体がもつ強力な DN 効果を支持した。

以上の結果から、本論文はアジア初となる AD E47 欠損症の患者を報告し、本疾患が免疫表現型以外にも幅広い臨床表現型を呈する可能性を示した。さらに、E47 の機能において basic region 内の E555 残基が重要な役割を担っていること、この部位の K への置換のみが極めて強力な DN 効果をもたらすことを実験的に明らかにし、本疾患の原因変異として p.E555K が独占的に存在する理由の一端を明らかにした。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。