

## 学位取得者／学位記

●平成30年度 (2018.4~2019.3) ●

### ●学位取得者

#### 池田 佳世

Slc3a2 Mediates Branched-Chain Amino Acid-Dependent Maintenance of Regulatory T cells  
Cell Rep. 14;21(7):1824-1838. 2017.

取得年月日：2018年5月31日

#### 宮奈 香

Unfolded protein response is activated in Krabbe disease in a manner dependent on the  
mutation type

J Hum Genet, 63 (6): 699-706, 2018.

取得年月日：2018年12月31日

#### 安田 紀恵

Relationship between dose of antithyroid drugs and adverse events in pediatric patients with  
Graves' disease

Clin Pediatr Endocrinol, 26(1) : 1-7, 2017.

取得年月日：2019年3月25日

#### Mohammad Saiful Islam

Functional analysis of monocarboxylate transporter 8 mutations in Japanese Allan- Herndon-  
Dudley syndrome patients

Endocrine Journal, 66 (1) , 19-29, 2019.

取得年月日：2019年3月25日



## Slc3a2 Mediates Branched-Chain Amino Acid-Dependent Maintenance of Regulatory T cells (Slc3a2は分枝鎖アミノ酸依存的な制御性T細胞の維持に関与する)

池田 佳世  
医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻  
Cell Rep. 2017 Nov 14;21(7):1824-1838.

### ● 目的

制御性T細胞 (Treg) は免疫応答を抑制するT細胞のサブセットであり、様々な自己免疫疾患との関連が示されている。Tregは生体内で高い増殖能を示すが、その機序について不明な点が多い。Tregは周囲の栄養環境から強く影響を受けており、栄養源としてグルコースや脂肪酸の必要性が指摘されている。また、グルタミンやロイシンをはじめとするアミノ酸はT細胞の分化に関与しているが、分化した後のTregとのかかわりは不明であった。そこで今回、アミノ酸、特に分枝鎖アミノ酸 (BCAA) とTregとの関連を検討することを目的として実験を行った。

### ● 方法ならびに結果

BCAAそれぞれ一種類を減量したイソロイシン (Ile) 減量食、ロイシン(Leu)減量食、バリン減量食で2週間飼育したマウスの脾臓を解析した結果、IFN- $\gamma$ +, IL-17+, IL-10+ CD4+ T細胞の数は変わらなかったが、Tregの減少を認めた。特にIle減量食ではTregの減少が顕著であり大腸、小腸でもTregの減少がみられた。Ile欠損はTregへの分化、アポトーシスには影響を与えず、Tregの増殖を抑制していることが明らかとなった。アミノ酸、特にBCAAはmTOR経路を活性化することが知られている。そこで、Ile減量がmTOR経路に与える影響について解析を行った。Ile減量食群のTregでは、コントロール群に比べて、mTOR経路の重要なシグナルであるp70S6Kのリン酸化が低下していた。またin vitroにおいてIleまたはLeuを添加することによりTregにおいてはmTOR経路のリン酸化が誘導されたが、Foxp3- CD4+ T細胞では誘導されず、Tregでは、他のT細胞のサブセットに比べてmTORの活性化にIle、Leuが重要であると考えられた。Ile欠損食で飼育したマウスのTregは減少しているだけでなく、免疫抑制能に必須なCTLA-4, GITRの発現も低下していた。In vitroでT細胞と共培養して検討したところ、Ile減量群のTregの抑制能は低下していた。IleがTregの増殖、維持にかかわる機序を明らかにするため、BCAAの輸送にかかわる遺伝子の発現を解析したところ、Tregでは、特にSlc3a2の発現が高かった。そこで、TregにおけるSlc3a2の役割を解析するため、TregでSlc3a2を特異的にノックアウトしたマウスを作製した。このマウスのTregはIle欠損群のマウスと同様に増殖能が低下しており、脾臓、大腸においてTregの減少を認めた。このTregではイソロイシンの取り込みが阻害されており、細胞内のIle濃度も低下していた。そしてこのTregではIle、Leu刺激によって誘導されるmTOR経路の活性化が阻害されていた。mTORC1はT細胞の代謝状態を制御していることが知られている。そこでこのTregにおいてミトコンドリア呼吸能および解糖系のパラメータを解析すると、通常のTregと比べて代謝状態が変化していた。さらに、このマウスのTregはIle減量食群のTregと同様に免疫抑制能は低下していた。このマウスにおいて40週齢以上の組織を検討したところ、種々の臓器で著明なリンパ球浸潤を認めた。以上よりSlc3a2はTregの機能に必須であると考えられた。

### ● 総括

Slc3a2を介して取り込まれたBCAAがmTOR経路のシグナルを活性化させることにより、生体内でのTregの増殖能および免疫抑制能を制御していることが明らかとなった。

## ● 本人コメント

腸管に関する研究がしたい、という思いが強く、大菌先生のご厚意で同じフロアにある免疫制御学講座を紹介していただきました。最先端の免疫学研究を行っている活気ある、厳しい環境のラボで大学院生活を送ることができたことは本当に貴重な経験でした。当初テーマとして希望していた腸管からは離れてしまいましたが、アミノ酸と免疫、という小児科でこれまで興味を持ってきた栄養に関する研究を行うことができました。論文投稿からアクセプトまでに非常に時間がかかりつらい時期もありましたが、小児科の先生方から多くの助言や励ましをいただき、なんとか形にすることができました。本当にありがとうございました。



## Unfolded protein response is activated in Krabbe disease in a manner dependent on the mutation type

宮奈 香

医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻

J Hum Genet, 63 (6): 699-706, 2018

### ● 目的

Krabbe病はリソソーム病の一種でありgalactocerebrosidase (GALC)の欠損が原因である。中枢および末梢の神経障害をきたすがその機序はいまだに不明であり、根治的治療法も定まっていない。近年、一部のリソソーム病では小胞体ストレス応答の活性化が認められ、病態との関連が示唆されている。GALCも他のリソソーム酵素と同様に小胞体で合成されたのちにリソソームへ輸送され活性を生じるが、変異GALCは小胞体などに蓄積することが報告されている。Krabbe病における小胞体ストレス応答の活性化について解析を行い、治療へ利用できる知見について検討した。

### ● 方法ならびに結果

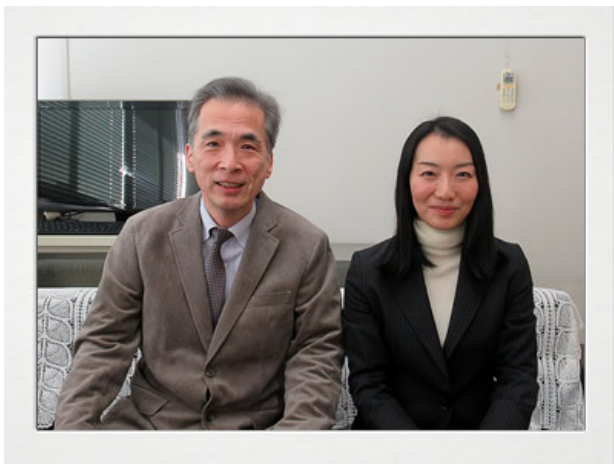
Krabbe病変異を導入したCOS-7細胞およびKrabbe病患者の皮膚線維芽細胞を用いて、小胞体ストレス応答の代表的な経路であるPERK経路(CHOP)、ATF6経路(ATF6)、IRE1経路(XBP1-s)、小胞体シャペロン・逆輸送経路(HERPUD1)の活性化について、PT-RCPおよびスプライシング率の計算を用いて検討した。乳児期発症型のT652P変異を導入したCOS-7細胞でCHOP、ATF6、XBP1-s、HERPUD1の発現が増加しそれぞれPERK経路、ATF6経路、IRE1経路および逆輸送経路の活性化を示唆したが、成人型変異ではいずれの増加も認めなかった。乳児期発症患者の皮膚線維芽細胞でもCHOP、ATF6、XBP1-s、HERPUD1の発現増加を認める一方で成人発症患者ではCHOPのみで発現増加を認めた。

### ● 総括

Krabbe病では小胞体ストレス応答が重症度に関与している可能性が示唆された。共通して増加しているCHOPの阻害が治療的介入につながる可能性がある。

### ● 本人コメント

患者さんの病態を基礎的な面からもとらえられるようになりたいと思い、卒後12年という遅めの時期ではありましたが、大学院へ入学いたしました。リソソーム蓄積病の診断、遺伝子解析、ERストレスなどの生化学的解析、遺伝カウンセリングまで包括的にかかわらせていただき、大変貴重な経験を積むことができました。この場をお借りして、大藪先生、酒井先生をはじめ、ご指導いただいた多くの先生方に心よりお礼申し上げます。



## Relationship between dose of antithyroid drugs and adverse events in pediatric patients with Graves' disease

安田 紀恵

医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻

Clin Pediatr Endocrinol. Jan;26(1):1-7. 2017

### ● 目的

バセドウ病は小児の甲状腺機能亢進症の大部分を占める疾患で、治療の第一選択は抗甲状腺薬（メチマゾール以下MMIまたはプロピルチオウラシル以下PTU）による治療である。MMIは多くの患者で有効な治療薬であるが、重大な副作用との関連が報告されており、近年初期投与量を減らす傾向にある。しかしながら、小児においてはMMI初期投与量と副作用に関する報告は少ない。そこで我々は、小児期発症バセドウ病患者における抗甲状腺薬の初期投与量と副作用との関連について検討することを目的として研究を行った。

### ● 方法ならびに結果

1979年2月から2014年10月までに当院で加療した15歳以下発症のバセドウ病患者56名の診療記録を用いて後方視的に検討した。性別は男性が11例、女性が45例で、診断時年齢は2-15歳（中央値11歳）、観察期間は1ヶ月～34.5年（中央値9.1年）であった。基礎疾患を12例21.4%に認め、その内訳は染色体異常が2例、自己免疫疾患が4例、心疾患が3例、その他が6例であった。甲状腺疾患の家族歴を20例35.7%に認め、そのうちバセドウ病の家族歴を持つものが13例23.2%であった。診断時の血清free T4値は、5ng/dl未満の軽症例が22例、5-7ng/dlの中等症例が17例、7ng/dl以上の重症例が9例、不明が1例で、血清total T4値を測定していた7例については今回の検討から除外した。診断契機は甲状腺腫大が最も多く28例、ついで甲状腺中毒症所見が21例、眼球突出が6例、偶然血液検査で発見されたものが1例であり、甲状腺中毒症所見を示した21例中2例で甲状腺クリーゼを認めた。56名全ての患者が抗甲状腺薬で治療を開始されており、MMIで治療を開始されたものが52例、PTUで開始されたものが4例であった。観察期間中に抗甲状腺薬による治療を中止できた症例は15例で、甲状腺切除術を施行された症例が5例であった。

次に、抗甲状腺薬による副作用についての結果を示す。MMIで治療を開始された52例のうち20例で副作用を認め、それによりPTUへ変更されたものが12例であった。その内訳は、多関節炎が5例、発疹が4例、好中球減少が3例であった。PTUへ変更後も副作用を認めた例が4例あり、それぞれ抗好中球細胞質抗体（antineutrophil cytoplasmic antibody以下ANCA）関連血管炎、ANCA関連糸球体腎炎、肝障害、発疹を認めた。MMIによる副作用の発現は治療開始後3ヶ月以内が8割を占めたが、治療開始5年後に発疹を1例、治療開始1年後、9年後、11年後に好中球減少をそれぞれ1例ずつ認めた。

次に、MMI初期投与量による副作用を比較した結果を示す。本研究においては、MMI初期投与量が0.7mg/kg/day未満を低用量群、0.7mg/kg/day以上あるいは30mg/day以上のものを高用量群とした。MMIで治療を開始した52名のうち、20名は低用量、32名は高用量で治療を開始されていた。副作用は低用量群では好中球減少が3例、発疹が1例で、高用量群では発疹および関節炎が5例、発疹が5例、好中球減少が2例、肝障害が2例、関節炎が1例、高CPK血症が1例であった。低用量群は20%、高用量群は50%の症例で副作用を認めており、高用量群で有意に多い結果となった（ $p = 0.031$ ）。また、肝障害、関節炎、高CPK血症は高用量群でのみ認められたが、好中球減少と発疹については両群でみられた。また、好中球数が500未満である無顆粒球症を2例認めたが、いずれも低用量群の症例であった。

## ●総括

日本小児内分泌学会ガイドラインに準じた低用量MMIへの治療変遷により、今後副作用の発現が減少することが期待されるが、好中球減少と発疹についてはMMIの投与量と関係なく発症する可能性があるため注意すべきである。また、MMIによる副作用は治療開始後3ヶ月以内に多くが発現するが、無顆粒球症については治療開始後数年で発症した例もあるため、治療期間に関係なく常に注意が必要であると考えられた。

## ●本人コメント

大阪大学小児科の過去35年間にも及ぶ症例を解析するという貴重な経験をさせて頂きました。自身も実際に診療に携わっている疾患であり、この研究成果を学位論文としてまとめることができたことは、臨床医として非常に光栄で嬉しく思います。このような機会を与えて下さいました大菌先生、三善先生をはじめ、ご指導いただいた多くの先生方へ、この場を借りて厚く御礼申し上げます。



## Functional analysis of monocarboxylate transporter 8 mutations in Japanese Allan-Herndon-Dudley syndrome patients.

Islam Mohammad Saiful

医学系研究科 情報統合医学 小児科学専攻

Endocr J. 2018 Oct 25. doi: 10.1507/

endocrj.EJ18-0251. [Epub ahead of print]

### ● Purpose

To elucidate the functional outcomes of human monocarboxylate transporter 8 (hMCT8) mutations regarding transport of triiodothyronine (T3). MCT8 facilitates T3 uptake into cells. Mutations in MCT8 lead to Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS), which is characterized by severe psychomotor retardation and abnormal thyroid hormone profile.

### ● Methods and Results

Nine uncharacterized MCT8 mutations in Japanese patients with severe neurocognitive impairment and elevated serum T3 levels were studied regarding the transport of T3 in wild-type (WT) or mutant hMCT8-transfected human placental choriocarcinoma cells (JEG3) by visualizing the locations of the proteins in the cells, detecting specific proteins, and measuring T3 uptake. We identified 6 missense (p.Arg445Ser, p.Asp498Asn, p.Gly276Arg, p.Gly196Glu, p.Gly401Arg, and p.Gly312Arg), 2 frameshift (p.Arg355Profs\*64 and p.Tyr550Serfs\*17), and 1 deletion (p.Pro561del) mutation(s) in the hMCT8 gene. All patients exhibited clinical characteristics of AHDS with high free T3, low-normal free T4, and normal-elevated TSH levels. All tested mutants were expressed at the protein level, except p.Arg355Profs\*64 and p.Tyr550Serfs\*17, which were truncated, and were inactive in T3 uptake, excluding p.Arg445Ser and p.Pro561del mutants, compared with WT-hMCT8. Immunocytochemistry revealed plasma membrane localization of p.Arg445Ser and p.Pro561del mutants similar with WT-hMCT8. The other mutants failed to localize in significant amount(s) in the plasma membrane and instead localized in the cytoplasm. These data indicate that p.Arg445Ser and p.Pro561del mutants preserve residual function, whereas p.Asp498Asn, p.Gly276Arg, p.Gly196Glu, p.Gly401Arg, p.Gly312Arg, p.Arg355Profs\*64, and p.Tyr550Serfs\*17 mutants lack function.

### ● Conclusion

These findings suggest that the mutations in MCT8 cause loss of function by reducing protein expression, impairing trafficking of protein to plasma membrane, and disrupting substrate channel.

## ● Comments

I was really so lucky for getting the opportunity to conduct research in the department of Pediatrics under outstanding supervision of Professor Keiichi Ozono. I am indebted to former associate professor of this department, Dr. Noriyuki Namba (Director, Department of Pediatrics, Osaka Hospital) who paved my research by his research design, continuous advice, and encouragement throughout the Ph.D. journey. I also received huge supports from the other teachers engaged with this research group namely Dr. Takuo Kubota, Dr. Yasuhisa Ohata, Dr. Makoto Fujiwara and Dr. Shinji Takeyari. You will be remembered with deep respect throughout the rest of my life. I have tried to characterize the monocarboxylate transporter 8 mutations in Japanese Allan-Herndon-Dudley syndrome patients. I was frightened at the beginning as it was my first experience to work with cell line. As a beginner, I also passed difficult time in western blotting and non-radioactive uptake assays. However, prudent guidelines from the teachers brought me out from the difficulties. Furthermore, I had a difficult time after submitting the paper when received several comments from the reviewers. I overcame this difficult time successfully with the support of all teachers. I am thankful to you all.