

論文内容要旨

**Simple diagnosis of *STAT1* gain-of-function alleles in patients with chronic
mucocutaneous candidiasis**

(機能獲得性 *STAT1* 変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症に対する迅速診断法)

Journal of Leukocyte Biology, in press.

主指導教員：小林 正夫 教授

(統合健康科学部門 小児科学)

副指導教員：瀧原 義宏 教授

(原爆放射線医科学研究所 幹細胞機能学)

副指導教員：中村 和洋 准教授

(統合健康科学部門 小児科学)

溝口 洋子

(医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻)

論文内容要旨

機能獲得性 *STAT1* 変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症に対する迅速診断法

慢性皮膚粘膜カンジダ症 (Chronic mucocutaneous candidiasis disease, CMCD) は、皮膚、爪、口腔、膣粘膜などの *Candida albicans* による反復性及び持続性感染を特徴とする原発性免疫不全症である。CMCD の病態に、IL-17A, IL-17F, IL-22 に代表される Th-17 免疫の障害に関与する種々の責任遺伝子が同定されている。2011 年、CMCD の原因遺伝子の一つとして、機能獲得性 *STAT1* 変異が同定され、本疾患が *STAT1* の脱リン酸化障害に起因することが報告された。本研究では、日本の 4 家系 2 散発例の CMCD 患者において、新規 3 変異を含む 6 種類の *STAT1* ヘテロ接合性変異を同定し、*STAT1* の機能解析及び *STAT1* リン酸化解析を用いた迅速診断法を確立した。

本邦における 5 家系 5 散発例、計 17 名の CMCD 患者について *STAT1* 遺伝子解析を行い、4 家系 2 散発例、計 10 名の CMCD 患者において、新規 3 変異を含む 6 種類の *STAT1* ヘテロ接合性変異 (L354M、P329L、M390T、M202V、A267V、R274Q) を同定した。これらの変異はすべて *STAT1* の Coiled-coil domain 及び DNA binding domain に集中していた。

STAT1 は $\text{IFN-}\alpha/\beta$ 及び $\text{IFN-}\gamma$ のシグナル伝達に重要な役割を果たす転写因子であり、 $\text{IFN-}\gamma$ の刺激で、リン酸化され homodimer (gamma-activating factor, GAF) を形成する。GAF は核内へ移行後、gamma-activation site (GAS) 配列に結合し、マイコバクテリウムを代表とする細胞内寄生菌に対する感染防御に重要な遺伝子群の発現を誘導する。*STAT1* null osteosarcoma cell への *STAT1* 変異遺伝子の強制発現実験から、遺伝子変異を有する *STAT1* のシグナル伝達に及ぼす影響を検討した。 $\text{IFN-}\gamma$ 刺激に対し、*STAT1* 変異遺伝子発現細胞では正常コントロールに比し、*STAT1* リン酸化亢進ならびに GAF の DNA 結合能の増加が認められた。また、M390T 以外の 5 種類の *STAT1* 変異細胞において、 $\text{IFN-}\gamma$ に対する有意な GAS 転写活性の亢進を認めた。一方、 $\text{IFN-}\alpha$ に対する interferon-stimulated response element 転写活性は、*STAT1* 変異遺伝子発現細胞において正常コントロールに比し軽度の増加を確認したが、有意差は認められなかった。さらに M390T 及び R274Q の変異をもつ *STAT1* 遺伝子発現細胞において、GAS 転写活性の増加は低濃度の $\text{IFN-}\gamma$ 刺激でも認められた。これらから機能獲得型 *STAT1* 変異は $\text{IFN-}\gamma$ 刺激に対し *STAT1* の機能亢進をもたらすことが証明された。

次に末梢血単核球 (PBMC) を用いて、チロシンリン酸化阻害剤、staurosporine 存在下で、*STAT1* のリン酸化及び脱リン酸化能を Immunoblot 法で検討した。患者 PBMC では未刺激状態で、正常コントロールでは認められないわずかな *STAT1* のリン酸化が確認された。また $\text{IFN-}\gamma$ 刺激に対して、脱リン酸化障害に起因する *STAT1* のリン酸化亢進が認められた。*STAT1* 変異による CMCD 患者 PBMC にみられる *STAT1* の脱リン酸化障害を応用し、*STAT1* 遺伝子変異患者の PBMC を用いた flow cytometry による診断法を試みた。14 名の正常コントロール

と 10 人の CMCD 患者の末梢血を IFN- γ で 15 分刺激後 staurosporine 存在下で培養し、CD14 陽性細胞におけるリン酸化 STAT1 の mean fluorescence intensity (MFI) 値を比較した。CMCD 患者群では、staurosporine 作用後の CD14 陽性細胞のリン酸化 STAT1 の MFI 値は、正常コントロール群に比し、有意に高値であった。

以上の結果から、機能獲得性 STAT1 変異 CMCD の病態は STAT1 の脱リン酸化障害によるリン酸化亢進によるものであり、staurosporine を用いた flow cytometry での STAT1 リン酸化解析は、“STAT1 異常 CMCD の迅速診断”として有用な方法と考えられた。