

## 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	坂田 園子
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Autosomal recessive complete STAT1 deficiency caused by compound heterozygous intronic mutations (イントロン領域の複合ヘテロ接合性変異による常染色体劣性 STAT1 完全欠損症)			
論文審査担当者			
主 査	教授	保 田 朋波流	印
審査委員	教授	一 戸 辰 夫	
審査委員	教授	田 代 聡	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>STAT1 はシグナル伝達兼転写活性化因子に属し，生体内にユビキタスに発現する分子である。IFN-<math>\gamma</math> および IFN-<math>\alpha</math> 刺激に反応してリン酸化を受け，ターゲット遺伝子群の発現調節を担当する。常染色体劣性 STAT1 完全欠損症（AR-STAT1 完全欠損症）は，非結核性抗酸菌（NTM）とウイルスに対して易感染性を示す原発性免疫不全症（PID）である。現在までに世界で 5 家系 8 症例が報告されており，本邦での報告は無い。既報例は全例，STAT1 遺伝子のエクソン領域におけるホモ接合性変異が同定されており，イントロン領域の変異による本症発症の報告は無い。致死的な重症感染症により予後は極めて不良である一方で，造血幹細胞移植により根治が見込めることから，早期診断が重要となる。</p> <p>申請者は本研究において，重症ウイルス感染症，播種性 NTM 感染症を反復した患者において，STAT1 遺伝子のイントロン領域における複合ヘテロ変異を同定し，機能解析に基づき診断を確定した。</p> <p>症例は 6 歳の日本人男児。近親婚は認めず。11 か月時に播種性 BCG 感染症に罹患し，当初はメンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症（MSMD）と診断されていた。全エクソーム解析（WES）をトリオ解析で行い，本人，無症状の母に STAT1 遺伝子のヘテロ変異（c.128+2 T&gt;G）を同定したのみで，病因解明には至らなかった。PID の既知遺伝子群を対象としたターゲット RNA シークエンスを用いた遺伝子発現解析を実施したところ，患者で STAT1 遺伝子の著明な発現低下が検出された。その結果に基づいて WES データを再解析したところ，本人，無症状の父に STAT1 遺伝子ヘテロ変異（c.542-8 A&gt;G）を同定した。本変異は，初回の WES 解析では，イントロン変異としてフィルタリング過程で除かれていた。ターゲット RNA シークエンスから，c.128+2 T&gt;G，c.542-8 A&gt;G 変異は，それぞれ STAT1 遺伝子のエクソン 3，エクソン 8 のスプライシングに影響を与える事が示唆された。これらのスプライス異常は，RT-PCR 法でも確認された。さらに患者における STAT1 遺伝子の発現低下は，qPCR 法でも確認された。一連の結果から，ターゲット RNA シークエンスで得られたデータが，信頼性が高いデータであることが示された。</p> <p>同定された 2 つのイントロン変異は新規変異であり，STAT1 の機能に及ぼす影響を検証した。ウエスタンブロット法による解析で，患者末梢血では STAT1 タンパクが完全に欠損していることが判明した。さらに，フローサイトメトリーを用いた末梢血 CD14 陽性単球の解析で，IFN-<math>\gamma</math> および IFN-<math>\alpha</math> 刺激に対する STAT1 リン酸化の欠損が証明された。以上の結果から，同定された 2 つのイントロン変異は病的変異と判断し，AR-STAT1 完全欠損症と診断した。その後の臨床経過で，患者は重症ウイルス感染症，播種性 NTM 感染症を反復した。NTM 感染巣のリンパ節生検では肉芽形成を認めず，AR-STAT1 完全欠損症の診断と合致する臨床経過と考えた。</p> <p>次に，同定した STAT1 変異が遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。末梢血 CD14 陽性単球を IFN-<math>\gamma</math> または IFN-<math>\alpha</math> で刺激後に，RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果，患者 CD14 陽性単球において，STAT1 のターゲット遺伝子群の広汎な反応低下を認め，STAT1 を介する転写活性化の障害が証明された。また，同定した変異が血球系細胞以外に及ぼす影響を検討した。患者（自験例），既報の STAT1 欠損症患者</p>			

(STAT1<sup>-/-</sup>)、および健常者から SV40 不死化線維芽細胞 (SV40 線維芽細胞) を樹立して解析した。その結果、患者と STAT1<sup>-/-</sup>由来の SV40 線維芽細胞において、STAT1 タンパクの完全欠損、IFN- $\gamma$  および IFN- $\alpha$  刺激に対する STAT1 のリン酸化反応の消失が確認された。さらにゲルシフトアッセイでは、患者と STAT1<sup>-/-</sup>の SV40 線維芽細胞で、IFN- $\gamma$  および IFN- $\alpha$  刺激下での STAT1 の gamma-activated sequence (GAS) への DNA 結合能の欠損が確認された。

本研究で、イントロン領域の複合ヘテロ接合性変異による AR-STAT1 完全欠損症の症例を同定した。全世界で 6 家系目、本邦においては初の症例であり、イントロン領域の変異で本症を発症した世界初の症例であった。

以上の結果から、本論文は、WES 実施後の未診断例に対するターゲット RNA シークエンスなどの網羅的遺伝子発現解析の導入が、診断率向上に寄与する可能性を示唆するものと考えられた。

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。