

論文内容要旨

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)

International Immunology, 2020, in press.

主指導教員：岡田 賢教授
(医系科学研究科 小児科学)
副指導教員：秀 道広教授
(医系科学研究科 皮膚科学)
副指導教員：川口 浩史准教授
(医系科学研究科 小児科学)

坂田 園子
(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

論文内容要旨

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- γ および IFN- α 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 7 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発症の報告はない。本症は、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。

本研究では、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、詳細な機能解析に基づき診断を確定した。

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>G) を同定したが、病因解明には至らなかった。網羅的ゲノム解析で診断困難な症例と判断し、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。その結果、患者で STAT1 遺伝子の著明な発現低下が検出された。それに基づいて 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>G) を同定した。本変異は初回の WES 解析では検出されておらず、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ことが判明した。ターゲット RNA シークエンスから、c.128+2 T>G、c.542-8 A>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ことが示唆された。これらのスプライス異常は、RT-PCR 法でも確認された。さらに患者での 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。

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- γ および IFN- α 刺激に対する STAT1 リン酸化反応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有害変異と判断し、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。

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。末梢血から CD14 陽性単球を分離し、IFN- γ および IFN- α 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、患者由来 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。次に STAT1 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 (STAT1^{-/-})、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^{-/-}由来の SV40 線維芽細胞において、STAT1 タンパクの完全欠損、IFN- γ および IFN- α 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、IFN- γ および IFN- α 刺激下での STAT1 の DNA 結合能の欠損が、患者と STAT1^{-/-}の SV40 線維芽細胞で確認された。

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。さらに本研究により、WES 実施後の未診断例に対して、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を導入することで、診断率が向上する可能性が示された。