

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 竹崎 俊一郎

学位論文題名

機能獲得型の *de novo* 新奇変異を *STAT1* の DNA-binding domain に認めた

慢性皮膚粘膜カンジダ症の病態解析

【背景と目的】慢性皮膚粘膜カンジダ症 (Chronic mucocutaneous candidiasis; CMC) は皮膚・粘膜に反復性のカンジダ感染症を呈する一群の原発性免疫不全症である。CMC は遺伝形式が単一でないことから複数の原因によって構成されている疾患と考えられてきたが、CMC の原因と病態についてはほとんど解明されていなかった。最近 Th17 細胞や自然免疫系のパターン認識レセプターの発見を契機に、皮膚粘膜の真菌感染防御機構が飛躍的に解明されてきた。さらに網羅的な遺伝子解析方法の開発も加わり、CMC の原因と病態が徐々に明らかになってきた。2011 年、常染色体優性遺伝形式をとる CMC や孤発例の CMC が Coiled-coil domain (CCD) に限局した機能獲得型 *STAT1* 変異によることが報告され、現在ではこれが CMC 全体の 70-80%程度を占めると考えられている。今回我々は CMC の責任遺伝子が特定されていない 3 患者の解析を行い、責任遺伝子の特定とその発症メカニズムを解明することを目的とした。【対象】それぞれ血縁のない別家系の 3 患者を対象とした。(患者 1) 12 歳男性。2 歳時に CMC と診断された。3 歳時より肺炎球菌による反復性の肺炎・中耳炎を発症し、5 歳時に気管支拡張症を認めた。(患者 2) 14 歳男性。6 歳時に CMC と診断された。7 歳時に気管支拡張症、肺炎球菌による反復性の肺炎を認めた。13 歳時血球貪食症候群を発症し、14 歳原因不明の肺高血圧症で死亡した。(患者 3) 15 歳女性。出生 1 か月時に CMC と診断された。反復性の細菌感染症や気管支拡張症は発症していない。父も出生後より CMC を発症し、20 歳過ぎより IDDM・CVID・MRSA 膿胸を発症した。31 歳時に脳血管炎による脳梗塞で死亡した。患者 2 は解析を始めて間もなく死亡したため遺伝子解析のみ施行した。

【方法】CMC の既知の責任遺伝子のダイレクトシーケンス解析を行った。*CARD9* に 1 塩基置換を認めた患者 1 については、家族のシーケンス解析と Dectin1-CARD9 シグナル系を介した IL6 産生を ELISA で確認した。*STAT1* に未報告のヘテロの 1 塩基置換を認めた患者 1、2 については、同部位のクローニングによる確認、患者家族と健常者 108 名の解析を行った。*STAT1* の機能をみるために、IFN γ 刺激による単球由来マクロファージ、不死化 B 細胞株 (EBV-LCL) の IP10 産生を Cytometric Bead Array[®]で測定した。*STAT1* のリン酸化状

態の解析は EBV-LCL を IFN γ 、IFN α 、IL27 のいずれかで刺激した後に、核内蛋白を抽出し SDS-PAGE で展開し、リン酸化 STAT1 特異抗体でウェスタンブロット解析を行った。STAT1 の過剰リン酸化のメカニズムを特定するために、リン酸化を阻害するプロテインキナーゼ阻害剤 (staurosporine) と脱リン酸化を阻害するフォスファターゼ阻害剤 (pervanadate) を用いてウェスタンブロット解析を行った。Th17、Th1 分画については、末梢血単核球を PMA、ionomycin で刺激した後に、CD4⁺IL17A⁺細胞、CD4⁺IFN γ ⁺細胞で評価した。【結果】ダイレクトシーケンス解析では患者 1 の *CARD9* に未報告のヘテロの 1 塩基置換を認めた。*CARD9* 欠損症は常染色体劣性遺伝であること、健常である患者 1 の父に同一の塩基置換を認めること、また患者 1 の Dectin1-CARD9 シグナル系を介した IL6 産生は正常であることから疾患関連性は否定された。次に患者 1、2 の *STAT1* の DNA-Binding domain (DBD) にヘテロの 1 塩基置換を認めた (c.1153C>T, p.T385M)。患者 1 の家族や健常者 108 人には同一の塩基置換は確認されず、さらに T385 は種を超えて保存されていた。以上より T385M が *de novo* の新奇ミスセンス変異であることが強く示唆された。一方患者 3 では *STAT1* に既報の機能獲得型ミスセンス変異 (c.821G>A, p.R274Q) を CCD に認めた。IFN γ 刺激による患者・健常者由来の単球由来マクロファージ、EBV-LCL の IP10 産生は、患者 1 と患者 3 では健常者に比べてともに亢進しており、*STAT1* の機能が亢進していることが示唆された。また *STAT1* のリン酸化は、IFN γ 、IFN α 、IL27 いずれの刺激でも患者 1、3 とともに亢進していることが確認された。staurosporine, pervanadate 処理した検体を用いたウェスタンブロット解析によって、その原因が脱リン酸化障害であることが明らかになった。また患者 1、3 の Th1 細胞は健常者と有意差が認められなかった (p=0.76) のに対し、Th17 細胞は健常者に比べ有意に減少していた (p=0.039)。患者 3 (0.7%) に比べ患者 1 (0.2%) の方がより Th17 細胞が減少していた。【考察】*STAT1* T385M 変異は、R274Q 変異と同様に *STAT1* の脱リン酸化障害によって機能獲得をきたすことが示された。立体構造解析から、CCD と DBD の T385 を含む特定のアミノ酸が結合することによって parallel から antiparallel 構造へ変化し、これによって脱リン酸化がおきやすくなることが示唆されている。実際 DBD の G384 に変異を作成した解析では、*STAT1* の脱リン酸化障害を生じることが示されている。新奇変異 T385M を有する *STAT1* は、G384 の場合と同様にこの構造変化がとれないために脱リン酸化障害を生じる可能性がある。IFN γ 、IFN α 、IL27 は *STAT1* を介して Th17 分化を抑制することが報告されており、*STAT1* の機能獲得によって、Th17 分化が障害される可能性が考えられる。しかし、Th17 分化障害を来す詳細なメカニズムは不明である。T385M 変異患者は CCD 変異患者には報告のない反復性の細菌感染症、気管支拡張症、血球貪食症候群を発症し、臨床像がより重症な印象を受けた。リン酸化状態や Th17 分化障害の程度と臨床像が関連している可能性がある。しかし患者数が少なく、変異例が増えれば今後明らかにできる可能性がある。【結論】今まで機能獲得型変異として未報告であった *STAT1* の DBD に世界で初めて新奇のミスセンス変異を特定し、CCD の変異と同様に *STAT1* の脱リン酸化障害による機能獲得をきたすことを明らかにした。