

## 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 山崎 康博

### 学位論文題名

STAT1 機能獲得型変異による慢性皮膚粘膜カンジダ症の病態解析:  
2つの新奇ミスセンス変異の同定, サイトカイン産生プロファイル,  
抗 IL-17F 自己抗体

(Studies on STAT1 gain-of-function mutation responsible for chronic  
mucocutaneous candidiasis: two novel mutations, cytokine production  
profiles, and anti-IL-17F autoantibodies)

【背景と目的】慢性皮膚粘膜カンジダ症 (Chronic mucocutaneous candidiasis; CMC) は、皮膚・爪、口腔外陰部などの粘膜に、反復性・持続性のカンジダ感染を呈する原発性免疫不全症である。2011年、*STAT1* のヘテロミスセンス変異が CMC を引き起こす事が報告された(Liu et al. 2011 JEM, van de Veerdonk et al. 2011 NEJM)。この変異は *STAT1* の脱リン酸化障害を生じる機能獲得型 (gain-of-function : GOF) 変異であり、これまで計 30 変異が報告されている。我々はこの *STAT1* GOF 変異患者についての研究を行った。第一章は CMC 患者 2 家系 3 症例の患者における *STAT1* の新奇 2 変異とその機能解析について、第二章は *STAT1* GOF 変異患者における Th17 関連サイトカイン産生能について、第三章は *STAT1* GOF 変異患者血清における抗 Th17 関連サイトカイン抗体についての報告である。

### 第一章

【患者背景】これまでに報告のない *STAT1* c.832A>G/A (p.K278E) と、*STAT1* c.1151G>G/A (p.G384D) を、CMC 患者 2 家系 3 症例に認めた。p.K278E を有する P1 は 20 歳女性で、1 歳時より反復性鷺口瘡を発症し、18 歳でカンジダ食道炎を発症した。CMC の家族歴はなく両親の *STAT1* に変異は認めなかった。p.G384D を有する P2, P3 は母子で、P2 は 35 歳女性、乳児期より反復性鷺口瘡を発症し、19 歳時にカンジダ食道炎による食道狭窄症を発症しバルーン拡張術を受けた。P3 は 5 歳男児で、1 歳時に反復性鷺口瘡を発症し爪カンジダ症も認めた。P3 の父に CMC は認めなかった。

【方法と結果】*STAT1* の K278E, G384D は種間を超えてよく保存されたアミノ酸で、p.K278E, p.G384D はデータベース上、変異または SNP との報告はなかった。EB ウィルス不死化細胞株 (EB-LCL) の IFN $\gamma$  刺激による IL-6 産生量を Cytometric Beads Array (CBA) で調べたところ、健常者のものと比べて患者で高く *STAT1* 機能の亢進が示唆された。また EB-LCL の IFN $\gamma$  または IFN $\alpha$  刺激でのリン酸化 *STAT1* をウェスタンブロットで確認したところ健常者よりも患者で強く、それは HeLa 細胞への transfection 実験でも確認された。さらに *STAT1* の脱リン酸化状態に関して評価するため、チロシンキナーゼ阻害剤である staurosporine 処理を行ったところ、ウェスタンブロットで変異 *STAT1* の脱リン酸化の遅延を認めた。

これまでの報告では WT *STAT1* と変異 *STAT1* が共存する状況での WT *STAT1* のリン酸化についての報告はなかった。それは *STAT1* を欠損した U3C 細胞に *STAT1* を transfect し評価を行っていたためである。我々は HeLa 細胞の内因性 WT *STAT1* と、transfect し

た STAT1 を区別するため STAT1 の C 端に GFP を結合させた。それによりウェスタンブロットで内因性 WT STAT1 と、transfect した STAT1 を分離評価することができた。変異 STAT1 を transfect した場合、内因性 WT STAT1 のリン酸化も増強し、また脱リン酸化の遅延を来す事を発見した。

【考察】内因性 WT STAT1 が変異 STAT1 からどのような影響を受け脱リン酸化障害をきたしたかは証明できていないが、IFNs 刺激により WT と変異 STAT1 のヘテロダイマーが形成され、そのヘテロダイマーが脱リン酸化障害をきたした可能性が推測される。

【結論】 p.K278E, p.G384D は STAT1 の脱リン酸化障害をきたす GOF 変異である事を示した。

## 第二章

【背景と目的】STAT1 GOF 変異患者において Th17 細胞への分化障害が報告されているが、末梢血 Th17 細胞率が健常者と変わらない症例報告もある(Mekki et al. 2013 J Invest Dermatol)。新奇変異を有する 3 例の末梢血 Th17 細胞率を調べたところ、P2 で健常者と変わらなかった。Th17 細胞からは IL-17A, IL-17F, IL-22 が産生されるが、CMC を伴う APECED 患者では、IL-17A よりも IL-17F と IL-22 の産生が低下しており、その 2 つが CMC 発症に重要な役割をはたしているとし唆されている(Kisand et al. 2010 JEM)。STAT1 GOF 変異患者において IL-17A, IL-17F, IL-22 のどのサイトカインが重要な役割を果たしているかについて検討した。

【方法と結果】P1-P3 と STAT1 GOF 変異患者である P4 R274Q の計 4 名の、PBMC の CD3/28 またはカンジダ粉末 72 時間刺激と CD4 陽性細胞の CD3/28 72 時間刺激による IL-17A, IL-17F, IL-22 産生を、8 名の健常者と比較検討した。IL-17A, IL-22 産生はいずれの刺激においても STAT1 GOF 変異患者で有意に低下していたが、IL-17F は PBMC のカンジダ粉末刺激のみ STAT1 変異患者において有意な低下を認め、他の刺激では有意差を認めなかった。

【結論】STAT1 GOF 変異患者においては、IL-17F よりも、IL-17A, IL-22 の方が CMC 発症に重要な役割を果たしている事が示唆された。

## 第三章

【背景と目的】Negative selection 障害をきたす APECED 患者の CMC 発症原因は、IL-17A, IL-17F, IL-22 に対する中和抗体であると示されている(Kisand et al. 2010 JEM, Puel et al. 2010 JEM)。一方 STAT1 GOF 変異患者において抗 IL-17F 抗体が検出されたとの症例報告もある(Hori et al. 2012 J Clin Immunol)。しかしこれまでこの 1 例の報告しかなく、また中和活性についての検討もされていなかった。

【方法と結果】計 17 例の STAT1 変異 CMC 患者について、血清抗 IL-17A, IL-17F, IL-22 抗体の有無をウェスタンブロットにて調べたところ、17 名中 11 名に IL-17F のみに対して IgG 型自己抗体を検出した。CMC を伴わない健常者では 22 名中 1 名に抗 IL-17F 抗体を検出した。また primary fibroblast は IL-17F 刺激により IL-6 を産生するが、抗 IL-17F 抗体を有する血清の IL-6 産生阻害能を検討したところ、抗 IL-17F 抗体を有する STAT1 GOF 患者血清に中和活性は認めなかった。

【結論】STAT1 GOF 変異患者の抗 IL-17F 抗体に中和活性は認めなかったが、疾患マーカー (感度 64.7%, 特異度 95.5%) として有用な可能性がある。