

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 植木 将弘

学位論文題名

STAT1 coiled-coil domain 新奇優性阻害型変異による Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases の病態解析

(Studies on novel heterozygous mutation in coiled-coil domain of *STAT1* in a patient with Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases.)

【背景と目的】 Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD) は BCG 等の弱毒性マイコバクテリアやその他の細胞内寄生菌に対してのみ易感染性を呈する原発性免疫不全症である。これまでに IFN- γ ・IL-12 シグナルに関連する 9 の責任遺伝子が報告されており、*STAT1* もその一つである。今までに MSMD を来す 7 つの *STAT1* 変異が報告されており、DNA-binding domain (DBD), SH2 domain, tail segment の 3 つに分布していた。いずれも優性阻害型変異であり、常染色体優性遺伝形式 (AD) をとる AD-MSMD であった。今回、多発性 BCG 骨髄炎を発症した患者において、*STAT1* の coiled-coil domain (CCD) にヘテロ接合の未報告アミノ酸置換を認め、これが AD-MSMD の原因となるかを検証した。また、今まで CCD に位置する優性阻害型変異の報告がないため、CCD 変異の大部分を占める機能獲得型変異との立体構造上の局在の相違を検討した。

【患者背景】 3 歳女児。生後 4 か月で BCG 接種を受け、生後 7 ヶ月で BCG リンパ節炎、2 歳 4 か月時に多発性 BCG 骨髄炎を発症した。その他の感染症の既往はなく、MSMD が疑われた。9 の責任遺伝子及び *IL12RB2* 遺伝子のダイレクトシーケンス検査で *STAT1* の CCD にヘテロ接合の *de novo* アミノ酸置換 p. G250A (G250A) を認めた。その他の遺伝子には異常はなかった。

【方法と結果】 *STAT1* G250 は種を超えて保存されており、G250A アミノ酸置換は Mutation Taster で解析すると強い影響があることが示唆された。既報では AD-MSMD 患者の不死化 B 細胞株 (EBV-LCL) やマクロファージ、変異体を一過性に発現させた細胞株で *STAT1* シグナルの障害や優性阻害効果が示されている。そこで、まず G250A アミノ酸置換を有する患者の EBV-LCL における IFN- γ 刺激後の IFN- γ 誘導ケモカイン・サイトカイン産生を Cytometric Bead Array 法 (CBA) で、IFN- γ 誘導ケモカイン RNA 発現を qRT-PCR 法で、*STAT1* のリン酸化をウェスタンブロット法で解析することで *STAT1* シグナルを評価した。その結果、患者 EBV-LCL ではこれらの全てで *STAT1* シグナルの障害はみられなかった。マイコバクテリア感染時の免疫応答にはマクロファージが直接関与するため、患者単球由来マクロファージで IFN- γ 刺激後の IFN- γ 誘導ケモカイン・サイトカイン産生を CBA で解析したところ、*STAT1* シグナルが強く障害されていた。そこで、*STAT1* シグナル障害のメカニズムを明らかにするために、*STAT1* 変異体を一過性に発現させた HeLa 細胞において *STAT1* の転写活性を Luciferase reporter assay で評価したところ、G250A 変異体は IFN- γ 刺激において優性阻害効果を認めた。一方で、IFN- α 刺激では優性阻害効果を認めず、既報変異体と同様に *STAT1* AD-MSMD として合致する結果であった。また、IFN- γ 刺激後の G250A 変異体自体のリン酸化と共発現した *STAT1* WT のリン酸化いずれもが強く障害されていた。

マイコバクテリア易感染性に抗 IFN- γ 自己抗体の関与が報告されているが、本患者の血清では抗 IFN- γ 自己抗体は検出されなかった。

STAT1 の機能獲得型変異は常染色体優性遺伝形式をとる慢性皮膚粘膜カンジダ症 (AD-CMCD) を発症し、その変異は CCD や DBD に多く報告されている。最近になって、AD-CMCD

の中にもマイコバクテリア感染を合併する例が報告された。そこで、CCD および DBD に存在する機能獲得型変異、マイコバクテリア感染を合併した機能獲得型変異、優性阻害型変異のそれぞれのアミノ酸残基の位置を検証し、機能獲得型変異と優性阻害型変異は局在が異なり、マイコバクテリア感染を合併した機能獲得型変異と優性阻害型変異は局在が類似していた。

【考察】 *STAT1* の CCD に位置する新奇ヘテロ接合ミスセンス変異 G250A が優性阻害効果を有し、AD-MSMD を生じることを世界で初めて報告した。G250A 変異体は既報の変異体と同様、GAS の転写活性において優性阻害効果を有していた。既報変異例では GAS 領域への *STAT1* の結合障害と EBV-LCL における *STAT1* のリン酸化障害が示されているが、今回の解析で、少なくとも一部の変異例においては変異体が dimer を形成する *STAT1* WT のリン酸化を阻害することで優性阻害効果を発揮する可能性が示唆された。本患者でみられた BCG 多発骨髄炎は *STAT1* AD-MSMD と AD partial IFN γ R1 欠損症でみられる所見であり、IFN- γ シグナルの上流の異常との関連性が示唆される。

G250A 変異を有する患者の単球由来マクロファージで強くみられた *STAT1* シグナルの障害が EBV-LCL ではみられなかったことは、特筆すべき点である。既報の *STAT1* AD-MSMD 患者の EBV-LCL では IFN- γ による *STAT1* リン酸化や *STAT1* シグナルが保たれていたという報告はないため、施設によっては EBV-LCL のみを用いた *STAT1* AD-MSMD の診断がなされている可能性がある。しかし、今回の解析結果から EBV-LCL で *STAT1* シグナルの障害がなくも本疾患を否定できないことが明らかになった。また、既報の M654K 変異例の EBV-LCL では *STAT1* リン酸化の低下が報告されているが、実際は極めて軽度であり、このような例はほかにも存在する可能性がある。さらに、ごく最近になってマイコバクテリア感染を合併したり、複合免疫不全症を呈した機能獲得型変異例が報告されており、変異のなかにはその影響が細胞間で異なるものが存在する可能性が考えられる。

立体構造上で *STAT1* 変異残基の局在の違いが表現型の違いに関連する可能性が示唆された。しかし、これはあくまで 1 方向から、かつ立体構造表面に限定された結果であり、今後も検証と検討が必要である。

【結論】 これまで *STAT1* 機能獲得型変異が多数報告されている CCD に、世界初の新奇優性阻害型ミスセンス変異 G250A を特定した。既報の AD-MSMD 変異と同様に IFN- γ 刺激による GAS の転写活性を優性阻害する効果を有し、そのメカニズムの一つとして変異体が dimer を形成する *STAT1* WT のリン酸化阻害作用があることを示した。一方で既報変異例と異なり G250A 変異を有する EBV-LCL では *STAT1* シグナルの障害が見られず、*STAT1* 変異の影響は細胞間で異なる可能性が示唆された。また、*STAT1* の機能獲得型変異残基と優性阻害型変異残基では立体構造上の局在が異なる可能性が示唆された。マイコバクテリア感染を伴った症例の機能獲得型変異残基が優性阻害型変異残基と局在が類似していたことから、変異残基の局在と臨床症状が関連する可能性も示唆された。