

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10112

研究課題名(和文) Stat1機能獲得型変異ノックインマウスを用いた感染症発症の分子病態解析

研究課題名(英文) Molecular pathological analysis of infectious disease development using gain-of-function STAT1 knock-in mice.

研究代表者

津村 弥来 (Tsumura, Miyuki)

広島大学・医系科学研究科(医)・研究員

研究者番号：80646274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：慢性皮膚粘膜カンジダ症(CMCD)は、皮膚・粘膜を主病変とし、難治性・反復性のカンジダ感染を呈する原発性免疫不全症である。CMCD患者の半数でSTAT1の機能獲得型変異を認め、IFN- γ などの刺激に対しSTAT1の過剰なリン酸化を呈する。本研究では、ヒトと相同性のあるSTAT1-機能獲得型変異を導入したノックインマウスを作製し、本症患者との類似性及び機能解析に有用であるかを検討した。これらのマウスは、Th17細胞におけるIFN- γ によるSTAT1のリン酸化亢進、カンジダ排除障害を呈し、CMCD患者と同様にTh17免疫応答障害をきたしており、CMCDの病態解明に有用であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではGOF-Stat1R274QマウスでのC. albicans排除障害にTh17分化障害が重要な役割を果たすとともに、今回樹立したGOF-Stat1R274QマウスはTh17免疫応答を中心とした、CMCDの病態解明に有用であることを示した。今後は本症で多彩な感染症を発症する病態を更に解明するために、GOF-Stat1R274Qマウスを用いて、C. albicans以外の病原体としてマイコバクテリアやヘルペスなどの感染実験を行うことが必要であると考えられる。それによって、本症患者のさらなる病態解明が進むとともに、新規の治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Patients with gain-of-function (GOF)-STAT1 mutations display a broad variety of infectious and autoimmune manifestations in addition to chronic mucocutaneous candidiasis (CMC), and those with severe infections and/or autoimmunity have a poor prognosis. In this study, we generated GOF-Stat1R274Q mice to better understand the disease pathogenesis caused by GOF-STAT1 mutations in humans. The mice replicated the human molecular and cellular phenotypes by presenting with hyperphosphorylation of STAT1 upon cytokine stimulation and impairment of Th17 cells in the small intestine. Moreover, GOF-Stat1R274Q mice might show slightly increased susceptibility to C. albicans infection, probably because of impaired IL-17-based immunity. The GOF-Stat1R274Q mice established here should be a useful model to understand the human primary immunodeficiency disease caused by GOF-STAT1 mutations.

研究分野：免疫不全

キーワード：Stat1ノックインマウス 慢性皮膚粘膜カンジダ症 STAT1機能獲得型変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性皮膚粘膜カンジダ症 (Chronic Mucocutaneous Candidiasis: CMCD) は、口腔粘膜、皮膚、爪、消化管、外性器を主病変とし、難治性・反復性の *Candida albicans* (*C. albicans*) 感染を呈する原発性免疫不全症であり、約半数の CMCD 患者で STAT1 の機能獲得型変異 (GOF 変異) が同定されている。STAT1-GOF 変異を持つ患者は常染色体優性遺伝を呈し、IFN- γ などの刺激によって STAT1 の過剰なリン酸化を認める。また、IL-17 産生障害をきたすため、*C. albicans* への易感染性を持つと考えられているが、IL-17 産生障害が生じる分子病態に関しては不明な点が多い。更に、近年、本症患者が *C. albicans* 感染以外にも細菌、ウイルス、マイコバクテリア などの様々な感染症を発症することが明らかになった。

本研究では、ヒトと相同性のある STAT1-GOF 変異 (R274Q 変異) を導入したノックインマウス (GOF-Stat1^{R274Q} マウス) を新規に作製し、本症患者で多彩な感染症を発症する分子病態を検討した。

2. 研究の目的

新規に樹立した GOF-Stat1^{R274Q} マウスの表現型を解析し、本症患者との類似性及び機能解析に有用であるかを検討する。また、STAT1-GOF 変異を有する患者では、Th17 細胞減少が特徴的所見であるため、恒常的に Th17 細胞を発現しているマウス小腸粘膜固有層リンパ球 (SI-LPL) を解析対象とし、IL-17 産生障害に着目して、STAT1-GOF 変異が多彩な感染症を引き起こす分子病態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) GOF-Stat1^{R274Q} マウスの表現型の確認

定常下でのヘテロ接合型ノックインマウス (GOF-Stat1^{R274Q/WT} マウス)、ホモ接合型ノックインマウス (GOF-Stat1^{R274Q/R274Q} マウス) 及び野生型マウスの SI-LPL を用いてフローサイトメトリー解析を行い、CD4⁺ T 細胞における STAT1 蛋白の発現、IFN- γ 刺激による STAT1 のリン酸化、IL-17 産生細胞数及び Th17 細胞数を評価した。また、定常下での GOF-Stat1^{R274Q/R274Q} マウス及び野生型マウスの SI-LPL の CD4⁺ T 細胞を用いて、RNA-seq を施行した。

(2) GOF-Stat1^{R274Q} マウスにおける *C. albicans* への易感染性の検証

GOF-Stat1^{R274Q/R274Q} マウス及び野生型マウスに *C. albicans* の経胃投与を行った。感染 3 週後の SI-LPL を用いてフローサイトメトリー解析を行い、CD4⁺ T 細胞における IL-17 産生細胞数及び Th17 細胞数を評価した。また、*C. albicans* 感染後のマウスの小腸上皮細胞のリアルタイム PCR を施行し、IL-17 によって誘導される抗菌ペプチドである *defensin3* の定量を行なった。加えて、感染 3 週後の *C. albicans* の排除障害を評価するため、マウス小腸を抗 *C. albicans* 抗体を用いて免疫染色を行い、*C. albicans* の発現を評価した。また、リアルタイム PCR によって、糞便中での *C. albicans* DNA 量を定量した。更に、Th17 細胞の分化障害の原因を検索するために、その分化に関連する遺伝子として、非感染及び *C. albicans* 感染後の CD4⁺ T 細胞における *Tbx21*、*Ifngr1*、*Il27ra*、*Stat3*、*Socs3* の発現を評価した。

4. 研究成果

(1) GOF-Stat1^{R274Q/R274Q} マウス由来の SI-LPL の CD4⁺ T 細胞は、野生型に比し、抗原・サイトカイン刺激がない定常状態での STAT1 蛋白の発現亢進、IFN- γ 刺激下での STAT1 のリン酸化亢進が認められた。GOF-Stat1^{R274Q/WT} マウスは野生型と GOF-Stat1^{R274Q/R274Q} マウスの中間的な表現型を示し、STAT1 のリン酸化亢進について野生型よりもリン酸化が亢進する傾向を認めたものの、統計学的有意差はなかった。また、GOF-Stat1^{R274Q/R274Q} マウス由来 SI-LPL の CD4⁺ T 細胞における STAT1 蛋白は、FACS 蛍光強度から、野生型マウスと同等の発現量であり、IFN- γ 刺激により野生

型よりも過剰なリン酸化を示す集団 (Basal-STAT1) と、野生型マウスよりも過剰に発現しつつ、IFN- 刺激によるリン酸化亢進は認めない集団 (Inducible-STAT1) に分類された (図 1)。GOF-*Stat1*^{R274Q/R274Q} マウスでは、IFN- 刺激による Basal-STAT1 蛋白の過剰なリン酸化が認められるのに対し、Inducible-STAT1 では有意なリン酸化亢進はみられなかった。

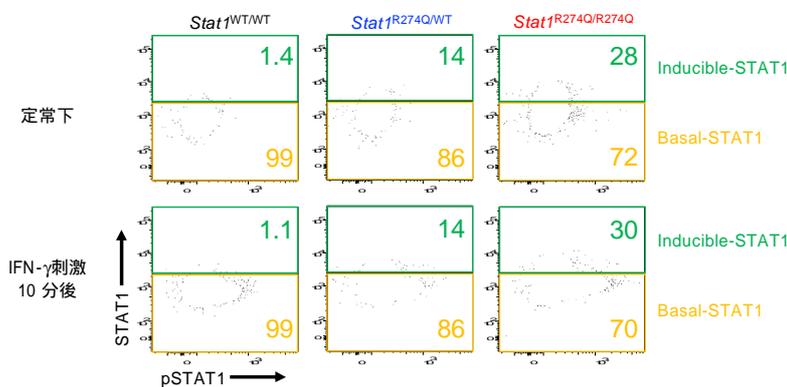


図1. 定常下及びIFN-γ刺激後の SI-LPL由来CD4⁺ T細胞における STAT1及びpSTAT1発現

さらに、GOF-*Stat1*^{R274Q/R274Q}

マウスにおいては、SI-LPL

における Th17 細胞の絶対数減少ならびに IL17 産生低下が認められた。これは Th17 細胞分化に必須である ROR γ t の発現低下による分化障害によるものと考えられた。これらの結果から、GOF-*Stat1*^{R274Q/R274Q} マウスの SI-LPL は CMCD 患者末梢リンパ球と同様の表現型を示していた。なお、GOF-*Stat1*^{R274Q/WT} マウスは、Th17 細胞数及び IL17 産生に関して、野生型と GOF-*Stat1*^{R274Q/R274Q} マウスの中間的な表現型を示したため、以後の解析はより表現型が強く機能解析に適したホモ接合型マウス (GOF-*Stat1*^{R274Q/R274Q} マウス) を中心に検討した。

RNA-seq による定常下 SI-LPL の CD4⁺ T 細胞の解析では、GOF-*Stat1*^{R274Q/R274Q} マウスにおいて、IFN- 誘導遺伝子の亢進を認めることから、定常下においても STAT1 の転写活性が亢進し、その結果 gamma-interferon activated sites (GAS) の亢進が生じていると考えられた。

(2) *C. albicans* への易感染性を評価する為に、*C. albicans* の経胃投与を行い、感染 3 週間後の SI-LPL を用いた解析を行なった。GOF-*Stat1*^{R274Q/R274Q} マウスでは野生型マウスと比較して、SI-LPLCD4⁺ T 細胞での IL-17A 産生低下および ROR γ t 発現抑制を認めた。また、GOF-*Stat1*^{R274Q/R274Q} マウスでは、小腸上皮細胞における IL-17A 産生低下に起因する抗菌ペプチドである α -defensin 3 の発現低下が認められた。GOF-*Stat1*^{R274Q/R274Q} マウスの小腸粘膜上皮細胞には *C. albicans* が検出され、糞便中における *C. albicans* DNA 量増加が認められた。これらの結果から、*C. albicans* 感染後においても、GOF-*Stat1*^{R274Q/R274Q} マウスでは、小腸由来の Th17 細胞の分化障害による IL-17A 産生障害が生じており、*C. albicans* の排除機構障害の原因と考えられた。

定常下および *C. albicans* 感染後での SI-LPL の CD4⁺ T 細胞において、Th17 分化に関連する遺伝子である *Tbx21*, *Ifngr1*, *Il27ra*, *Stat3*, *Socs3* の発現を比較検討した結果、定常下では野生型マウスと GOF-*Stat1*^{R274Q} マウスでは差を認めなかった。一方、*C. albicans* 感染後には、GOF-*Stat1*^{R274Q} マウスにおいて、*Tbx21* のみ発現上昇を認められた (図 2 及び図 3)。更に、*Tbx21* にコードされる T-bet の発現増加を認め、T-bet は ROR γ t の抑制因子であることから、GOF-*Stat1*^{R274Q} マウスでの Th17 細胞の分化障害に関与していると考えた。

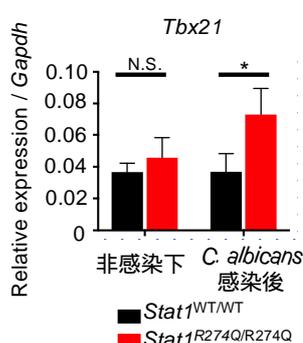


図2. SI-LPL由来CD4⁺ T細胞における *Tbx21* の発現

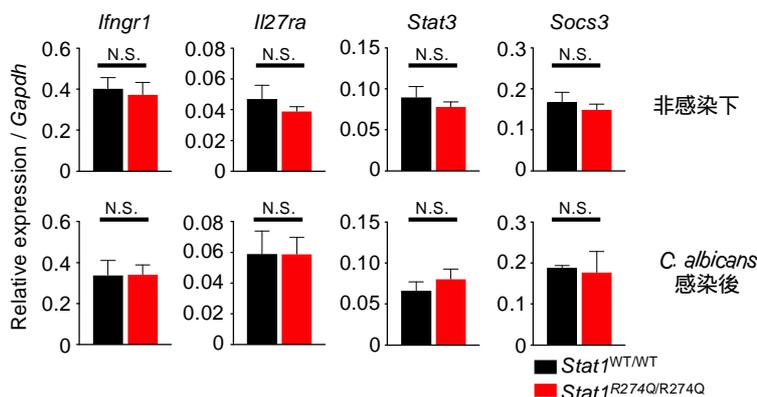


図3. SI-LPL由来CD4⁺ T細胞における *Ifngr1*, *Il27ra*, *Stat3*, *Socs3* の発現

以上から、本研究では GOF-*Stat1*^{R274Q} マウスでの *C. albicans* 排除障害に Th17 分化障害が重要な役割を果たすとともに、今回樹立した GOF-*Stat1*^{R274Q} マウスは Th17 免疫応答を中心とした、CMCD の病態解明に有用であることを示した。今後は本症で多彩な感染症を発症する病態を更に解明するために、GOF-*Stat1*^{R274Q} マウスを用いて、*C. albicans* 以外の病原体としてマイコバクテリアやヘルペスなどの感染実験を行うことが必要であると考えられる。それによって、本症患者のさらなる病態解明が進むとともに、新規の治療法の開発につながることを期待される。

以上の研究成果を論文化し、報告した。Human gain-of-function STAT1 mutation disturbs IL-17 immunity in mice., *International Immunology*, 2020, 32(4):259-272.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Cardinez C, Miraghadzadeh B, Tanita K, da Silva E, Hoshino A, Okada S, Chand R, Asano T, Tsumura M, Yoshida K, Ohnishi H, Kato Z, Yamazaki M, Okuno Y, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Andrews TD, Field MA, Burgio G, Morio T, Vinuesa CG, Kanegane H, Cook MC.	4. 巻 215
2. 論文標題 Gain-of-function IKBKB mutation causes human combined immune deficiency	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 2715 ~ 2724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20180639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Asano T, Okada S, Tsumura M, Yeh TW, Mitsui-Sekinaka K, Tsujita Y, Ichinose Y, Shimada A, Hashimoto K, Wada T, Imai K, Ohara O, Morio T, Nonoyama S, Kobayashi M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Enhanced AKT Phosphorylation of Circulating B Cells in Patients With Activated PI3K Syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.00568	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhang SY, Clark NE, Freije CA, Pauwels E, Taggart AJ, Okada S, Mandel H, Garcia P, Ciancanelli MJ, Biran A, Lafaille FG, Tsumura M, et al.	4. 巻 172
2. 論文標題 Inborn Errors of RNA Lariat Metabolism in Humans with Brainstem Viral Infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 952 ~ 965.e18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2018.02.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tajima G, Hara K, Tsumura M, Kagawa R, Okada S, Sakura N, Maruyama S, Noguchi A, Awaya T, Ishige M, Ishige N, Musha I, Ajihara S, Ohtake A, Naito E, Hamada Y, Kono T, Asada T, Sasai H, Fukao T, Fujiki R, Ohara O, Bo R, Yamada K, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Takayanagi M, Hata I, Shigematsu Y, Kobayashi M.	4. 巻 122
2. 論文標題 Newborn screening for carnitine palmitoyltransferase II deficiency using (C16 + C18:1)/C2: Evaluation of additional indices for adequate sensitivity and lower false-positivity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism	6. 最初と最後の頁 67 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgme.2017.07.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kagawa R, Fujiki R, Tsumura M, Sakata S, Nishimura S, Itan Y, Kong XF, Kato Z, Ohnishi H, Hirata O, Saito S, Ikeda M, El Baghdadi J, Bousfiha A, Fujiwara K, Oleastro M, Yancoski J, Perez L, Danielian S, Ailal F, Takada H, Hara T, Puel A, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Okada S, Kobayashi M.	4. 巻 140
2. 論文標題 Alanine-scanning mutagenesis of human signal transducer and activator of transcription 1 to estimate loss- or gain-of-function variants	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 232 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2016.09.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hoshino A, Okada S, Yoshida K, Nishida N, Okuno Y, Ueno H, Yamashita M, Okano T, Tsumura M, Nishimura S, Sakata S, Kobayashi M, Nakamura H, Kamizono J, Mitsui-Sekinaka K, Ichimura T, Ohga S, Nakazawa Y, Takagi M, Imai K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Nonoyama S, Morio T, Kanegane H.	4. 巻 140
2. 論文標題 Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in human subjects with germline IKZF1 mutations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 223 ~ 231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2016.09.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 但馬 剛、津村 弥来、岡田 賢、小比賀 聡
2. 発表標題 アンチセンス核酸によるG6PC高頻度スプライシング変異の発現修復
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 但馬 剛、原 圭一、香川 礼子、宇都宮 朱里、津村 弥来、岡田 賢、湯浅 光織、畑 郁江、重松 陽介、山口 清次
2. 発表標題 全国施行が実現したCPT2欠損症マススクリーニングの現状報告
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯浅 光織、畑 郁江、杉原 啓一、磯崎 由宇子、重松 陽介、大嶋 勇成、津村 弥来、香川 礼子、岡田 賢、原 圭一、但馬 剛
2. 発表標題 標識脂肪酸負荷末梢血単核球中のアシルカルニチン比による脂肪酸代謝異常症の診断
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 賢、今中 雄介、津村 弥来、落合 博、中田 慎一郎、小原 収、山本 卓、小林 正夫
2. 発表標題 ELANE変異アレル破壊による遺伝子治療の検討
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Tanita, C Cardinez, B. Miraghanzadeh, A. Hoshino, S. Okada, T. Asano, M. Tsumura, H. Ohnishi, Z. Kato, T. Morio, C.G. Vinuesa, H. Kanegane, M.C. Cook
2. 発表標題 Gain-of-function IKBKB mutation causes human combined immune deficiency
3. 学会等名 第2回日本免疫不全・自己炎症学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷田 けい、星野 顕宏、岡田 賢、浅野 孝基、津村 弥来、大西 秀典、加藤 善一郎、山崎 雅英、森尾 友宏、金兼 弘和
2. 発表標題 IKBKB機能獲得変異による新奇遅発症複合免疫不全症
3. 学会等名 第46回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅野 孝基、西村 志帆、小林 良行、津村 弥来、石川 暢恒、大西 秀典、高田 英俊、Sancho-Shimizu Vanessa、森谷 邦彦、Puel Anne、Picard Capucine、Irani Sarosh R.、Casanova Jean-Laurent、岡田 賢、小林 正夫
2. 発表標題 抗N-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体脳炎を契機に診断に至ったIRAK4欠損症
3. 学会等名 第46回日本臨床免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 但馬 剛、原 圭一、津村 弥来、香川 礼子、岡田 賢、湯浅 光織、畑 郁江、重松 陽介、山口 清次
2. 発表標題 新指標(C16+C18:1)/C2 & C14/C3によるCPT2欠損症の新生児マスキリーニング
3. 学会等名 第60回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 但馬 剛、岡田 賢、津村 弥来
2. 発表標題 アンチセンス核酸によるG6PCスプライシング変異c.648G>Tの発現修復
3. 学会等名 第60回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Asano, S. Nishimura, Y. Kobayashi, M. Tsumura, N. Ishikawa, H. Ohnishi, H. Takada, V. Sancho-Shimizu, K. Moriya, A. Puel, C. Picard, S.R. Irani, J.L. Casanova, S. Okada, M. Kobayashi
2. 発表標題 Anti-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis Associated with IRAK4 Deficiency
3. 学会等名 18th European Society for Immunodeficiencies (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 但馬 剛、原 圭一、香川 礼子、津村 弥来、岡田 賢、湯浅 光織、畑 郁江、重松 陽介、山口 清次
2. 発表標題 CPT2欠損症スクリーニング新指標の有用性 最近の診断例を加えた検討
3. 学会等名 第45回日本マス・スクリーニング学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	岡田 賢 (Okada Satoshi) (80457241)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	