

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17301

研究課題名(和文) STAT1機能獲得型変異が自己免疫性の内分泌障害を引き起こす分子病態の解明

研究課題名(英文) Study of molecular pathology in which STAT1 gain-of-function mutations cause autoimmune endocrine disorders

研究代表者

香川 礼子 (Kagawa, Reiko)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：40806634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：STAT1の機能獲得型変異は、慢性皮膚粘膜カンジダ感染を主要症状とするが、一部では複合型免疫不全症などを合併する重症例が存在する。本研究で、重症型であるT385M変異の新規症例を同定した。このT385M変異の2症例は臨床的に重症度に相違を認めた。重症化する因子の解明のため、IFN- γ 刺激による特異的な遺伝子発現の解析を行なった。患者末梢血から分離したT細胞をIFN- γ で刺激し、網羅的な遺伝子発現プロファイルを解析したところ、ISG(Interferon-stimulated genes)の過剰に発現が示された。また、STAT1-GOF変異が特定の脱リン酸化酵素に対し抵抗性を示すことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

STAT1-GOF変異を有する患者で認める遺伝子型と表現系関連の背景に存在する分子メカニズムの一部の解明が可能であった。これまで、同変異における標的分子の転写因子の減増により臨床的な重症度が相関することが多くの仮説とされており、網羅的な変異体における機能評価がなされてきた背景がある。標的分子の量的変化に着目されることが多いが、この度は標的分子の質的な変化により、臨床的な重症度が変化することが示された。

研究成果の概要(英文)：The gain-of-function research mutation of STAT1 has chronic mucocutaneous Candida infection as the main symptom. But some of the cases are detected such as complicated with combined immunodeficiency disease and autoimmune polyglandular syndrome. In this study, I identified a novel case of the severe T385M mutation. The two cases of this T385M mutation were clinically different in severity.

In order to evaluate the factors that cause the severe symptoms, we analyzed the specific gene expression by IFN- γ stimulation. I analysed comprehensive gene expression profile by the T cells isolated from the patient's peripheral blood with stimulated by IFN- γ . It was showed the overexpression of ISG (Interferon-stimulated genes). For the next study, It was also shown that the STAT1-GOF mutation is resistant to specific dephosphorylating enzymes. Both of the finding were some of the factors that induced the severity symptoms of T385M mutation.

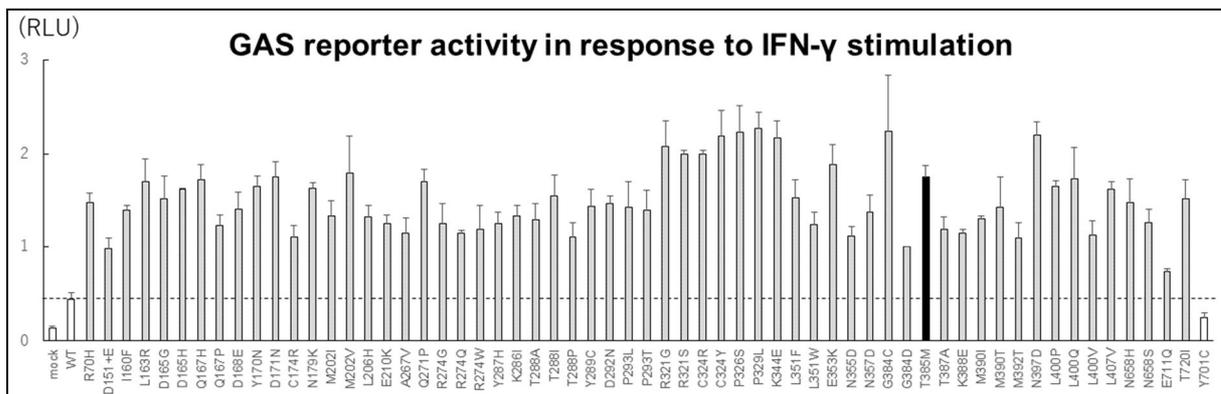
研究分野：小児内分泌・先天代謝異常

キーワード：STAT1-GOF CMCD 複合型免疫不全症 脱リン酸化酵素 ISG

1. 研究開始当初の背景

STAT1 は IFN- γ 、IFN- β など多彩なサイトカインのシグナル伝達を介在し、宿主の免疫反応に重要な役割を果たすシグナル伝達兼転写因子の一つである。2011 年に、皮膚、口腔粘膜などに難治性のカンジダ感染を呈する慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMCD) の原因として、STAT1 の機能獲得型変異 (GOF 変異) が同定された (参考文献 1)。その後、新たな患者が発見され、その多彩な臨床像が明らかになっている。症例の蓄積により i) 患者は CMCD 以外では、細菌、ウイルスなどの多彩な病原体に対しても易感染性を呈すること、ii) 一部の患者は、自己免疫機序による難治性腸炎、多腺性内分泌不全症などを発症しており、IPEX-like 症候群 (多腺性内分泌不全症、腸疾患を伴う免疫調節異常症に酷似する疾患) と診断されることもあること、iii) 重篤な症状を呈する症例では、複合型免疫不全症と診断されることもあること、などが示された (参考文献 2, 3)。複合免疫不全症や IPEX-like 症候群の臨床像を呈する重症例の変異は、STAT1 の DNA 結合ドメインの変異を持つ頻度が高く、特定の変異に見られることが多い。『遺伝子型-表現型相関』の存在が想定されるが、その分子メカニズムは未だ解明されていない。本研究では、遺伝子型-表現型相関の背景にある分子メカニズムの解明に着目した。

STAT1 は、IFN- γ などのサイトカイン刺激により活性化され、リン酸化を受けて核内に移行し、GAS などの標的 DNA 配列に結合することで転写を活性化する。STAT1-GOF 変異では、サイトカイン刺激に対し、過剰なリン酸化を示す。それに伴って標的分子の転写活性化が亢進する。STAT1 転写活性の測定には、GAS (Interferon-Gamma Activated Sequence) レポーターアッセイが有用で、それを用いて申請者らは、STAT1 変異体の機能評価を行ってきた。しかし、STAT1-GOF 変異を網羅的に解析した結果、GAS 転写活性の亢進の程度と、臨床的な重症度の間に相関を認めなかった (図 1)。このため、重症化する分子メカニズムとして「標的分子の転写因子の増強の程度」では説明できないと考えられた。これらの経緯より「STAT1 が転写を活性化する標的分子の変化」が存在するのではないかという仮説を立案した。



【図 1】 既知の STAT1-GOF 変異の GAS 転写活性(reporter assay)

全ての GOF 変異体(灰色)で、IFN- γ で誘導される過剰な GAS 転写活性を認めた。DNA 結合ドメインの変異における GAS 転写活性の程度と、臨床的な表現型に明らかな相関は認めなかった。本検討では IPEX-like 症候群に関連する T385M 変異(黒)に特徴的な傾向は認めなかった。(Y701C は機能喪失型変異であり陰性コントロールとして使用)

2. 研究の目的

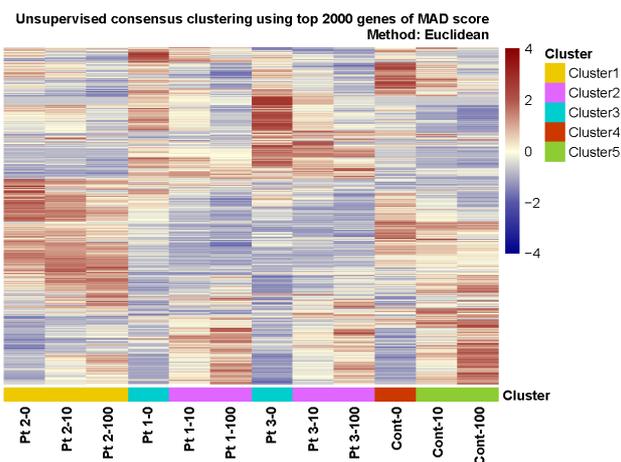
現在のところ、STAT1-GOF 変異に対する医療管理においては、疾患特異的な治療法が存在しないため対症療法が行われている。一部の重症例では造血幹細胞移植が行われることもあるが、その成績は良好とは言い難く、疾患特異的治療法の開発が望まれる (参考文献 5)。本研究では、重症化に関わる分子メカニズムを解明することを目的としており、これらが解明することで、分子標的治療法の開発につなげることを目的としている。これまでは、重症化の因子として、「GOF 変異による標的分子の転写増強」ということが多く想定されており、網羅的な変異体の機能解析などのアプローチがなされているが、遺伝子型-表現型相関の解明には至っていない、臨床的にも疾患特異的な治療法は見当たらない。

これまでの症例の蓄積により重症化に関与する GOF 変異は STAT1 の DNA 結合ドメインに集中していることが示されている。これらの点に着目し、「GOF 変異によって、STAT1 が転写を活性化する標的分子が変化することで、重症化をきたす」ことを仮説として立案し、重症化のメカニズムを、網羅的な遺伝子発現などを解析することにより、明らかにすることを目的としている。

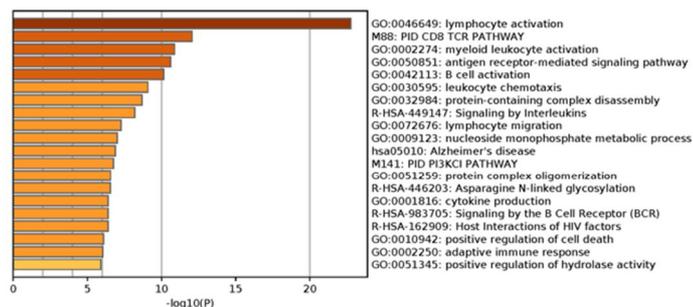
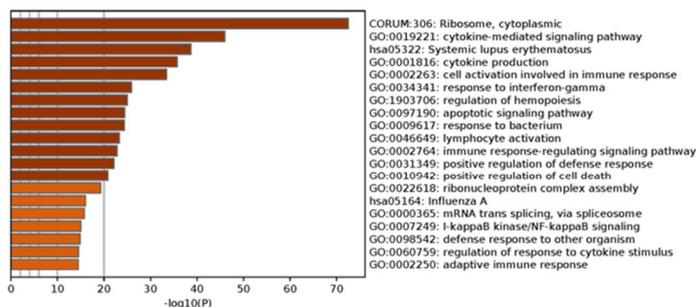
CD3+CD8+キラーT細胞に対し、クロマチン免疫シーケンス解析 (ChIP-Seq 解析) を行い、T385M 変異に特有と考えられる DNA 配列を選択した。これらの DNA 配列に対しゲルシフトアッセイを行い STAT1 の結合状態を確認したが、T385 M 変異と R274Q 変異間で差異を認めなかった。これらの結果では、重症化を示す T385M に特異的な遺伝子発現を示す群を特定することはできなかった。

STAT1 の脱リン酸化の障害の分子メカニズムとして特定のフォスファターゼへの耐性の評価を行なった結果、数種類のフォスファターゼが STAT1 脱リン酸化に関与していることが示された。また、WT-STAT1 および GOF-STAT1 におけるリン酸化状態がこれらのフォスファターゼで影響されるか、IFN- 刺激を加えた際の評価を行なった。この結果、いくつかの GOF-STAT1 においては、一定のフォスファターゼによる過剰なリン酸化が示された。今後は、T385M 変異における脱リン酸化障害の特定フォスファターゼを同定することを検討している。

(図 4)



(図 5)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakata S, Tsumura M, Matsubayashi T, Karakawa S, Kimura S, Tamura M, Okano T, Naruto T, Mizoguchi Y, Kagawa R, Nishimura S, Imai K, Le Voyer T, Casanova JL, Bustamante J, Morio T, Ohara O, Kobayashi M, Okada S.	4. 巻 30;32(10)
2. 論文標題 Autosomal recessive complete STAT1 deficiency caused by compound heterozygous intronic mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Immunol	6. 最初と最後の頁 663-671.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa043.	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 Imanaka Yusuke, Taniguchi Maki, Doi Takehiko, Tsumura Miyuki, Nagaoka Rie, Shimomura Maiko, Asano Takaki, Kagawa Reiko, Mizoguchi Yoko, Karakawa Shuhei, Arihiro Koji, Imai Kohsuke, Morio Tomohiro, Casanova Jean-Laurent, Puel Anne, Ohara Osamu, Kamei Katsuhiko, Kobayashi Masao, Okada Satoshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Inherited CARD9 Deficiency in a Child with Invasive Disease Due to Exophiala dermatitidis and Two Older but Asymptomatic Siblings	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 975 ~ 986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-021-00988-7	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 Tsumura Miyuki, Miki Mizuka, Mizoguchi Yoko, Hirata Osamu, Nishimura Shiho, Tamura Moe, Kagawa Reiko, Hayakawa Seiichi, Kobayashi Masao, Okada Satoshi	4. 巻 149
2. 論文標題 Enhanced osteoclastogenesis in patients with MSMD due to impaired response to IFN-	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 252 ~ 261.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2021.05.018	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 Go, Kagawa Reiko, Sakura Fumiaki, Nakamura-Utsunomiya Akari, Hara Keiichi, Yuasa Miori, Hasegawa Yuki, Sasai Hideo, Okada Satoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Current Perspectives on Neonatal Screening for Propionic Acidemia in Japan: An Unexpectedly High Incidence of Patients with Mild Disease Caused by a Common PCCB Variant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Neonatal Screening	6. 最初と最後の頁 35 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijns7030035	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kagawa Reiko, Tajima Go, Maeda Takako, Sakura Fumiaki, Nakamura-Utsunomiya Akari, Hara Keiichi, Nishimura Yutaka, Yuasa Miori, Shigematsu Yosuke, Tanaka Hiromi, Fujihara Saki, Yoshii Chiyoko, Okada Satoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Pilot Study on Neonatal Screening for Methylmalonic Acidemia Caused by Defects in the Adenosylcobalamin Synthesis Pathway and Homocystinuria Caused by Defects in Homocysteine Remethylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Neonatal Screening	6. 最初と最後の頁 39 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijns7030039	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------