

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713039

研究課題名(和文)慢性皮膚粘膜カンジダ症の新規責任遺伝子の同定とSTAT1異常に伴う分子病態の解析

研究課題名(英文)Identification of new responsible gene for chronic mucocutaneous candidiasis disease. Analysis of molecular pathogenesis of STAT1 dysregulation.

研究代表者

岡田 賢 (Okada, Satoshi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・講師

研究者番号：80457241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性皮膚粘膜カンジダ感染(CMC)を呈した免疫不全症患者を対象にexome配列解析を行い、常染色体劣性遺伝を呈するROR γ T機能欠損症(ROR γ T欠損症)を発見した。さらにROR γ Tが、Th17細胞の分化、IL-17産生を介した宿主のカンジダに対する粘膜免疫と、IFN- γ 産生を介した抗酸菌に対する全身応答に重要であることを発見した(Okada S, et al. Science 349: 606-13, 2015)。網羅的アラニン変異体を用いた機能解析を行い、STAT1変異の機能障害を予想するデータベースを作製するとともに、STAT1変異が機能障害を起こすメカニズムを解明した(投稿作業中)

研究成果の概要(英文)：We discovered bi-allelic RORC loss-of-function mutations in seven individuals from three kindreds of different ethnic origins with both candidiasis and mycobacteriosis. The lack of functional ROR γ T resulted in the absence of IL-17A/F-producing T cells in these individuals, probably accounting for their chronic candidiasis. Unexpectedly, leukocytes from ROR γ T-deficient individuals also displayed an impaired IFN- γ response to Mycobacterium. This principally reflected profoundly defective IFN- γ production by circulating T cells and CD4+CCR6+ CXCR3+ T cells. We thus discovered that both mucocutaneous immunity to Candida and systemic immunity to Mycobacterium require ROR γ T in human (Okada S, et al. Science 349: 606-13, 2015).

We performed functional assay based on systematic alanine-scanning mutagenesis of human STAT1, which can be used to estimate the gain-of-function or loss-of-function status of nonsynonymous mutations (manuscript in preparation).

研究分野：小児免疫学

キーワード：ROR γ T STAT1 CMC MSMD

1. 研究開始当初の背景

慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMCD: Chronic Mucocutaneous Candidiasis Disease) は、皮膚・爪・外陰部・口腔粘膜を主病変とし、慢性・反復性にカンジダ感染症を呈する遺伝性の免疫不全症である。現在までに、CMCD の責任遺伝子として、*IL17F*, *IL17RA*, *CARD9* (*CARD9* 異常症はCMCD以外に侵襲性真菌感染症を併発) が同定されており、*CARD9* 異常症はカンジダの認識機構の障害、*IL17F*, *IL17RA* 異常症はIL-17のシグナル伝達の障害を介してCMCDを発症する。しかしながら、これらの責任遺伝子に変異を有したCMCD患者はごく稀で、大多数の患者の遺伝的背景は不明であった。

2011年に申請者らは留学先の研究施設で、次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析によりSTAT1のcoiled-coiledドメインのヘテロ接合性変異を同定し、*STAT1*の機能獲得性変異が、常染色体優性遺伝を呈するCMCDを引き起こすことを明らかとした。その後の検討で、*STAT1*変異は1) DNA結合ドメインにも存在すること、2) 中東、ヨーロッパ、南アメリカを中心としたCMCD患者群の約40%で同定されること、3) 一部の患者はCMCDの他に甲状腺機能低下症などの自己免疫性疾患を合併することを明らかとしている。

*STAT1*変異は本邦のCMCD患者でも同定されており、本邦においても主要な責任遺伝子と考えられている。さらに我々は遺伝子発現実験の結果から、患者で認められる変異STAT1はリン酸化チロシンの脱リン酸化が障害されており、IFN- γ などのサイトカイン刺激に対し過剰なリン酸化が起こり、下流のGAS (gamma activating sequence) 転写活性が亢進することを明らかとした。しかしながら、*STAT1*の機能獲得型変異がCMCD発症につながる分子基盤は明らかとなっていない。

一方で、疾患責任遺伝子*STAT1*の発見により、約40%のCMCD患者の遺伝的背景が明らかになったが、残りの約半数の患者では未だに責任遺伝子が同定されておらず、今後の研究成果を待つ状況であった。

2. 研究の目的

CMCD患者の遺伝背景を明らかにすることを目的に、候補遺伝子法による責任遺伝子の検索、次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による新規責任遺伝子の同定を行う。同時に、CMCD患者において、*STAT1*変異がシグナル伝達に及ぼす影響とその分子基盤について検討する。

3. 研究の方法

CMCD患者において、直接シーケンスによるSTAT1遺伝子解析を行った。さらにSTAT1正常のCMCD患者を対象にエクソーム配列解析を行い、原因検索を行った。同定したROR γ T

遺伝子変異(ROR γ Tの責任遺伝子)の機能解析は、immunoblot, EMSA, reporter assayなどで行った。さらに患者末梢血を用いたIL-17, IFN- γ 産生能の検討、Th17細胞への分化能の検討を行った。ヒトで認められた表現系を、*Rorc*欠損マウスを用いて検証した。

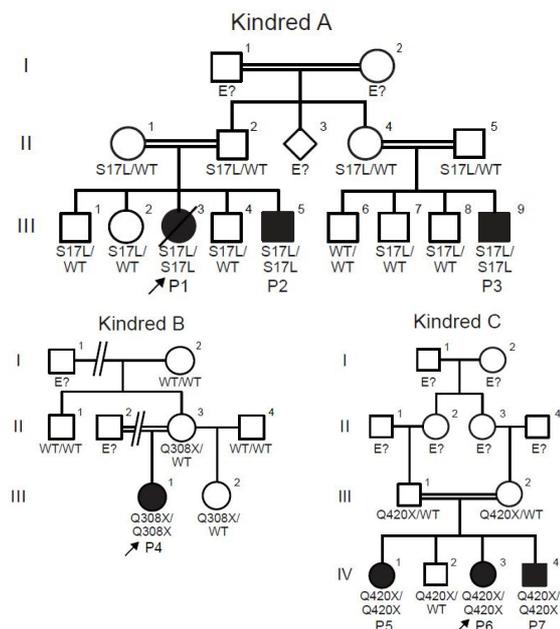
STAT1遺伝子のcoiled-coiledドメイン(CCD), DNA結合ドメイン(DBD)に存在する342のアミノ酸をアラニンに置換した変異体を個々に作成した。それぞれの変異体をGAS reporter assayにより機能解析を行うことで、STAT1変異ライブラリーを作製した。

4. 研究成果

1) STAT1正常のCMCD患者を対象にexome配列解析を行い、常染色体劣性遺伝を呈するROR γ T機能欠損症(ROR γ T欠損症)を発見した。興味深いことに、ROR γ T欠損症の患者は、カンジダに易感染性を呈するのみならず、抗酸菌による重症感染症を発症した。詳細な機能解析の結果、患者ではTh17分化障害に基づくIL-17産生障害があり、CMC発症に至ることが明らかとなった。さらに患者由来末梢血T細胞では、抗酸菌感染で誘導されるIFN- γ の産生能が障害されており、抗原特異的なIFN- γ 産生障害が抗酸菌に対する易感染性の背景に存在することを発見した。抗酸菌に対する易感染性はRor γ t欠損マウスでも確認され、ヒトのみならずマウスにおいてもROR γ Tが抗酸菌排除に必須であることが明らかとなり、ROR γ Tが持つ新たな機能が今回の研究で示された。これら一連の研究成果は高く評価され、Science誌に掲載された (Okada S, et al. Science 349: 606-13, 2015)。

図: ROR γ T欠損症の家系例

3家系7症例のROR γ T欠損症患者が同定さ



れた。全ての家系で近親婚を認め、患者は

RORC 遺伝子のホモ接合性変異を有していた。

2) ROR T 欠損症の機能解析と並行して、*STAT1* 変異により引き起こされる原発性免疫不全症の分子基盤の解明に勤めた。これまでの検討で、ヘテロ接合性の *STAT1* 機能喪失型変異 (LOF 変異) は、メンデル遺伝性マイコバクテリア易感染症 (MSMD) を発症し、ヘテロ接合性の *STAT1* 機能獲得型変異 (GOF 変異) は、慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMCD) を引き起こすことが知られている。*STAT1* の CCD、DBD には、GOF 変異、LOF 変異が混在することが知られており、患者で認めた個々の変異の病的意義の検証には機能解析が必須であった。そこで我々は、*STAT1* の CCD、DBD に存在するアミノ酸を網羅的にアラニンに置換し、それらアラニン置換体の網羅的な機能解析 (アラニンスキャニング) を行い、*STAT1* 変異のライブラリー作製を行った。さらに作製した変異ライブラリーの有用性を検討するために、既知の GOF 変異、LOF 変異が適切に評価されているか検証した。その結果、既知の GOF 変異の 75%、LOF 変異の 100% がアラニンスキャニングで適切に評価されていることが明らかとなり、変異ライブラリーの作製が患者で同定された新規 *STAT1* 変異の質的評価に有用と考えられた。*STAT1* は通常、ホモ二量体を形成して存在しており、リン酸化を受けていない定常状態では antiparallel dimer を、刺激によりリン酸化を受けると parallel dimer を形成する。興味深いことに、アラニンスキャニングで GOF 変異と判断された変異は、antiparallel dimer の接合面に集中しており、GOF 変異は antiparallel dimer の形成を阻害することが明らかとなった。以上の研究成果は、現在投稿作業中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

1. Hayakawa S, Okada S (corresponding author), Tsumura M, Sakata S, Ueno Y, Imai K, Morio T, Ohara O, Chayama K, Kobayashi M. A Patient with CTLA-4 Haploinsufficiency Presenting Gastric Cancer. *J Clin Immunol.* 36: 28-32, 2016 (査読有り)
2. Kataoka S, Muramatsu H, Okuno Y, Hayashi Y, Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Kobayashi M, Sano C, Sato H, Oh-Iwa I, Ito M, Kojima D, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Extrapulmonary tuberculosis mimicking Mendelian susceptibility to mycobacterial disease in a patient with signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutation. *J Allergy Clin Immunol.* 137: 619-622.e1, 2016 (査読有り)
3. Okada S, Markle JG, Deenick EK, Mele F, Averbuch D, Lagos M, Alzahrani M, Al-Muhsen S, Halwani R, Ma CS, Wong N, Soudais C, Henderson LA, Marzouqa H, Shamma J, Gonzalez M, Martinez-Barricarte R, Okada C, Avery DT, Latorre D, Deswarte C, Jabot-Hanin F, Torrado E, Fountain J, Belkadi A, Itan Y, Boisson B, Migaud M, Arlehamm CS, Sette A, Breton S, McCluskey J, Rossjohn J, de Villartay JP, Moshous D, Hambleton S, Latour S, Arkwright PD, Picard C, Lantz O, Engelhard D, Kobayashi M, Abel L, Cooper AM, Notarangelo LD, Boisson-Dupuis S, Puel A, Sallusto F, Bustamante J, Tangye SG, Casanova JL. Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science.* 349: 606-13, 2015 (査読有り)
4. Ciancanelli MJ, Huang SX, Luthra P, Garner H, Itan Y, Volpi S, Lafaille FG, Trouillet C, Schmolke M, Albrecht RA, Israelsson E, Lim HK, Casadio M, Hermesh T, Lorenzo L, Leung LW, Pedergrana V, Boisson B, Okada S, Picard C, Ringuier B, Troussier F, Chaussabel D, Abel L, Pellier I, Notarangelo LD, Garcia-Sastre A, Basler CF, Geissmann F, Zhang SY, Snoeck HW, Casanova JL. Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. *Science.* 348: 448-53, 2015 (査読有り)
5. Zhang X, Bogunovic D, Payelle-Brogard B, Francois-Newton V, Speer SD, Yuan C, Volpi S, Li Z, Sanal O, Mansouri D, Tezcan I, Rice GI, Chen C, Mansouri N, Mahdavian SA, Itan Y, Boisson B, Okada S, Zeng L, Wang X, Jiang H, Liu W, Han T, Liu D, Ma T, Wang B, Liu M, Liu JY, Wang QK, Yalnizoglu D, Radoshevich L, Uzé G, Gros P, Rozenberg F, Zhang SY, Jouanguy E, Bustamante J, Garcia-Sastre A, Abel L, Lebon P, Notarangelo LD, Crow YJ, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Pellegrini S. Human intracellular ISG15 prevents interferon- / over-amplification and auto-inflammation. *Nature.* 517: 89-93,

2015 (査読有り)

6. Dobbs K, Domínguez Conde C, Zhang SY, Parolini S, Audry M, Chou J, Haapaniemi E, Keles S, Bilic I, **Okada S**, Massaad MJ, Rounioja S, Alwahadneh AM, Serwas NK, Capuder K, Çiftçi E, Felgentreff K, Ohsumi TK, Pedergrana V, Boisson B, Haskoğlu Ş, Ensari A, Schuster M, Moretta A, Itan Y, Patrizi O, Rozenberg F, Lebon P, Saarela J, Knip M, Petrovski S, Goldstein DB, Parrott RE, Savas B, Schambach A, Tabellini G, Bock C, Chatila TA, Comeau AM, Geha RS, Abel L, Buckley RH, İkinçioğulları A, Al-Herz W, Helminen M, Doğu F, Casanova JL, Boztuğ K, Notarangelo LD. Inherited DOCK2 Deficiency in Patients with Early-Onset Invasive Infections. *N Engl J Med*. 372: 2409-22, 2015 (査読有り)
7. Kreins AY, Ciancanelli MJ, **Okada S**, Kong XF, Ramírez-Alejo N, Kilic SS, El Baghdadi J, Nonoyama S, Mahdavian SA, Ailal F, Bousfiha A, Mansouri D, Nieves E, Ma CS, Rao G, Bernasconi A, Sun Kuehn H, Niemela J, Stoddard J, Deveau P, Cobat A, El Azbaoui S, Sabri A, Lim CK, Sundin M, Avery DT, Halwani R, Grant AV, Boisson B, Bogunovic D, Itan Y, Moncada-Velez M, Martinez-Barricarte R, Migaud M, Deswarte C, Alsina L, Kotlarz D, Klein C, Müller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Cormier-Daire V, Rose-John S, Picard C, Hammarstrom L, Puel A, Al-Muhsen S, Abel L, Chaussabel D, Rosenzweig SD, Minegishi Y, Tangye SG, Bustamante J, Casanova JL, Boisson-Dupuis S. Human TYK2 deficiency: Mycobacterial and viral infections without hyper-IgE syndrome. *J Exp Med*. 212: 1641-62, 2015 (査読有り)
8. Ma CS, Wong N, Rao G, Avery DT, Torpy J, Hambridge T, Bustamante J, **Okada S**, Stoddard JL, Deenick EK, Pelham SJ, Payne K, Boisson-Dupuis S, Puel A, Kobayashi M, Arkwright PD, Kilic SS, El Baghdadi J, Nonoyama S, Minegishi Y, Mahdavian SA, Mansouri D, Bousfiha A, Blincoe AK, French MA, Hsu P, Campbell DE, Stormon MO, Wong M, Adelstein S, Smart JM, Fulcher DA, Cook MC, Phan TG, Stepensky P, Boztuğ K, Kansu A, İkinçioğulları A, Baumann U, Beier R, Roscioli T, Ziegler JB, Gray P, Picard C, Grimbacher B, Warnatz K, Holland SM, Casanova JL, Uzel G, Tangye SG. Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 136: 993-1006.e1, 2015 (査読有り)
9. Hirata O, **Okada S**, Tsumura M, Karakawa S, Matsumura I, Kimura Y, Maihara T, Yasunaga S, Takihara Y, Ohara O, Kobayashi M. Mosaicism of an ELANE Mutation in an Asymptomatic Mother in a Familial Case of Cyclic Neutropenia. *J Clin Immunol*. 35: 512-6, 2015 (査読有り)
10. Mizoguchi Y, Tsumura M, **Okada S**, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J Leukoc Biol*. 95: 667-76, 2014 (査読有り)
11. Mekki N, Ben-Mustapha I, Liu L, Boussofara L, **Okada S**, Cypowyj S, Gharani N, Saidi W, Denguezli M, Casanova JL, Puel A, Barbouche MR. IL-17 T Cells' Defective Differentiation In Vitro Despite Normal Range Ex Vivo in Chronic Mucocutaneous Candidiasis Due to STAT1 Mutation. *J Invest Dermatol*. 134: 1155-7, 2014 (査読有り)
12. Yasumura J, Wago M, **Okada S**, Nishikomori R, Takei S, Kobayashi M. A 2-year-old Japanese girl with TNF receptor-associated periodic syndrome: A case report of the youngest diagnosed proband in Japan. *Mod Rheumatol*. 20: 1-4, 2014 (査読有り)
13. Hirata O, **Okada S (co-first author)**, Tsumura M, Kagawa R, Miki M, Kawaguchi H, Nakamura K, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Takihara Y, Kobayashi M. Heterozygosity for the Y701C STAT1 mutation in a multiplex kindred with multifocal osteomyelitis. *Haematologica*. 98: 1641-9, 2013 (査読有り)

読有り)

14. Moncada-Vélez M, Martínez-Barricarte R, Bogunovic D, Kong XF, Blancas-Galicia L, Tirpan C, Aksu G, Vincent QB, Boisson B, Itan Y, Ramírez-Alejo N, **Okada S**, Kreins AY, Bryant VL, Franco JL, Migaud M, Espinosa-Padilla S, Yamazaki-Nakashimada M, Espinosa-Rosales F, Kutukculer N, Abel L, Bustamante J, Vogt G, Casanova JL, Boisson-Dupuis S. Partial IFN- γ R2 deficiency is due to protein misfolding and can be rescued by inhibitors of glycosylation. *Blood*. 122: 2390-401, 2013 (査読有り)
15. Grant AV, El Baghdadi J, Sabri A, El Azbaoui S, Alaoui-Tahiri K, Abderrahmani Rhorfi I, Gharbaoui Y, Abid A, Benkirane M, Raharimanga V, Richard V, Orlova M, Boland A, Migaud M, **Okada S**, Nolan DK, Bustamante J, Barreiro LB, Schurr E, Boisson-Dupuis S, Rasolofy V, Casanova JL, Abel L. Age-Dependent Association between Pulmonary Tuberculosis and Common TOX Variants in the 8q12-13 Linkage Region. *Am J Hum Genet*. 92: 407-14, 2013 (査読有り)
16. Soltész B, Tóth B, Shabashova N, Bondarenko A, **Okada S**, Cypowyj S, Abhyankar A, Csorba G, Taskó S, Sarkadi AK, Méhes L, Rozsival P, Neumann D, Chernyshova L, Tulassay Z, Puel A, Casanova JL, Sediva A, Litzman J, Maródi L. New and recurrent gain-of-function STAT1 mutations in patients with chronic mucocutaneous candidiasis from Eastern and Central Europe. *J Med Genet*. 50: 567-78, 2013 (査読有り)
17. Kong XF, Bousfiha A, Rouissi A, Itan Y, Abhyankar A, Bryant V, **Okada S**, Ailal F, Bustamante J, Casanova JL, Hirst J, Boisson-Dupuis S. A novel homozygous p.R1105X mutation of the AP4E1 gene in twins with hereditary spastic paraplegia and mycobacterial disease. *PLoS One*. 8: e58286, 2013 (査読有り)

[学会発表](計 6 件)

[国際学会:口演]

1. **Satoshi Okada**. Chronic Mucocutaneous Candidiasis. Pediatric Academic Societies annual meeting 2015, San

Diego, USA, Apr. 26, 2015

[国内学会:口演]

1. **Satoshi Okada**, Janet Markle, Anne Puel, Jacinta Bustamante, Masao Kobayashi, and Jean-Laurent Casanova. Impairment of IL-17 immunity to *Candida* and IFN- γ immunity to *Mycobacterium* in humans with inherited ROR γ T deficiency. the 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Sapporo, Nov. 18, 2015
2. **岡田 賢**, 小林正夫. ROR γ T 異常による原発性免疫不全症. 日本人類遺伝学会第 60 回大会, 東京, Oct. 15, 2015
3. **岡田 賢**. 慢性皮膚粘膜カンジダ症 ~ IL-17 異常を分子基盤とした原発性免疫不全症 ~. 第 25 回 日本小児リウマチ学会 総会・学術集会, 金沢, Oct. 9, 2015
4. **岡田 賢**, 中村和洋, 小林正夫. 新生児期の好中球減少症. 第 24 回 日本産婦人科・新生児血液学会学術集会, 横浜, Jun. 14, 2014
5. **岡田 賢**. STAT1 異常による原発性免疫不全症. 第 116 回 日本小児科学会, 広島, Apr. 21, 2013

[図書](計 13 件)

1. **岡田 賢**. STAT1 gain-of-function mutation. 日本臨床 免疫症候群 (第 2 版) III, 日本臨床社, 723-727, 2016
2. 香川礼子, **岡田 賢**. IL-17F 異常症. 日本臨床 免疫症候群 (第 2 版) III, 日本臨床社, 719-722, 2016
3. 浅野孝基, **岡田 賢**. IL-17RA 欠損症. 日本臨床 免疫症候群 (第 2 版) III, 日本臨床社, 714-718, 2016
4. 早川誠一, **岡田 賢**. CARD9 欠損症. 日本臨床 免疫症候群 (第 2 版) III, 日本臨床社, 709-713, 2016
5. 坂田園子, **岡田 賢**. ACT1 異常症. 日本臨床 免疫症候群 (第 2 版) III, 日本臨床社, 728-730, 2016
6. **岡田 賢**, 小林正夫. 慢性皮膚粘膜カンジダ症. 小児疾患診療のための病態生理 2 改訂第 5 版 47: 東京医学社, 750-754, 2015
7. **岡田 賢**, 小林正夫. MSMD. 小児疾患診療のための病態生理 2 改訂第 5 版 47: 東京医学社, 761-765, 2015
8. 溝口洋子, 小林正夫, **岡田 賢**. 好中球減少症および白血球接着異常症. 小児疾患診療のための病態生理 2 改訂第 5 版 47: 東京医学社, 736-745, 2015
9. 齋藤聡志, **岡田 賢**. 成人領域における免疫不全症. アレルギー・免疫 22: 医薬ジャーナル社, 1260-1268, 2015
10. **岡田 賢**, 中村和洋, 小林正夫. 新生児期の好中球減少症. 日本産婦人科・新生児血液学会雑誌 24: 3-7, 2015

11. **岡田 賢**. 真菌感染症と免疫不全症. 小児内科 46: 東京医学社, 1499-1504, 2014
12. **岡田 賢**, 小林正夫. IL-21 シグナルはナイーブ B 細胞を IL-2 感受性にして形質細胞に分化させる. 血液内科 46: 科学評論社, 1499-1504, 2014
13. **岡田 賢**, 小林正夫. 免疫不全者への対応. 当直医のための小児救急ポケットマニュアル, 中山書店, 226-231, 2014

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hiroshima-u.ac.jp/top/kenkyu/now/no42/>

世界初！ヒトにおいて RORC 遺伝子異常が原発性免疫不全症の原因になることを同定

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/10513>

Candida 属細菌に対する粘膜免疫および Mycobacterium 属細菌に対する全身性の免疫応答には RORC 遺伝子が必須である

http://www.hiroshima-u.ac.jp/news/show/id/23584/dir_id/19

[研究成果]慢性皮膚粘膜カンジダ感染とマイコバクテリア感染が同時に起こる原因遺伝子を同定

<http://www.qlifepro.com/news/20150812/identify-the-gene-responsible-for-primary-immunodeficiency-diseases-with-compromised-of-cmc-and-mycobacteria.html>

CMC とマイコバクテリアの易感染性を持つ原発性免疫不全症の原因遺伝子の同定に成功
- 広島大

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田 賢 (OKADA SATOSHI)

広島大学・医歯薬保健学研究院 (医)・講師

研究者番号：80457241