

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22780

研究課題名(和文) STAT1機能獲得型変異を有する患者での二次性生着不全の病態解明及び治療法開発

研究課題名(英文) Establishment of treatment for secondary graft failure in patients with STAT1 gain-of-function mutations

研究代表者

玉浦 萌 (Tamura, Moe)

広島大学・医系科学研究科(医)・研究員

研究者番号：60876762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：STAT1-GOF変異を持つ患者において、造血幹細胞移植時に高頻度で生じる二次性生着不全の病態を解明するために、申請者らが樹立した、本症患者の好発変異であるR274Q変異を導入したマウス(GOF-Stat1R274Qマウス)を用いた骨髄再構築アッセイを確立することを試みた。GOF-Stat1R274Q/WTマウスをレシピエントした骨髄移植実験では再現性のある結果が得ることが出来なかったため、解析対象をGOF-Stat1R274Q/R274Qマウスに拡大することを検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年STAT1-GOF変異を持つ患者において、JAK阻害薬の一つであるRuxolitinibの有効例が報告されている。一方で、副作用として血小板減少、貧血、好中球減少症などの骨髄抑制があり、長期的な使用に際し、その効果、副作用の検証が必要であり、本症患者において、分子メカニズムに基づいた根治的治療法の確立が求められている。そのため、本研究を推進していき、造血幹細胞移植時の二次性生着不全の病態を明らかにすることは、本症患者の予後の改善に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of secondary engraftment failure that frequently occurs in patients with STAT1 GOF mutations after hematopoietic stem cell transplantation, we attempted to establish a bone marrow reconstitution assay using mice transfected with the human R274Q GOF mutation (GOF-Stat1R274Q mice), which was established by the applicants. The R274Q mutation is one of the most common mutations in these patients. Since bone marrow transplantation experiments using GOF-Stat1R274Q/WT mice as donors did not yield reproducible results, we will consider the inclusion of GOF-Stat1R274Q/R274Q mice in the analysis.

研究分野：小児科学

キーワード：STAT1機能獲得型変異 造血幹細胞移植 二次性生着不全 皮膚粘膜カンジダ症 インターフェロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚粘膜カンジダ症 (CMCD: Chronic mucocutaneous candidiasis disease) は、皮膚粘膜局所に反復性の難治性カンジダ感染を呈する原発性免疫不全症である。CMCD 患者の検討により 2011 年に責任遺伝子として *STAT1* 機能獲得型 (*STAT1*-GOF) 変異が同定され、IFN- γ 、IFN- β などのサイトカイン刺激後の *STAT1* のリン酸化亢進とインターフェロンによって誘導される遺伝子群の活性化、IL-17 産生不全により CMCD を発症することが示された [1,2]。重篤な感染症・自己免疫疾患・癌合併例に対し、根治療法として造血幹細胞移植 (Hematopoietic stem cell transplantation: HSCT) が行われるが、本症の移植患者における実態調査で、移植 3 年後の全生存率が 40% と不良であること、高頻度に見られる二次性生着不全が予後不良因子であることが報告されている [3]。

申請者は、これまでに本症患者の好発変異である R274Q 変異を導入したマウス (*GOF-Stat1^{R274Q}* マウス) を樹立し、患者の病態解明に有用なツールとなることを示した [4]。また、定常下マウス小腸粘膜固有層リンパ球の CD4 陽性 T 細胞を用いた RNA シークエンスにおいて、*GOF-Stat1^{R274Q}* マウスでは、IFN- γ 誘導遺伝子群が活性化していることを示した。

IFN- γ は造血細胞の抑制制御因子であり [5]、生着不全に関与する重要な因子だと考えられている。IFN- γ への反応性が失われる IFN- γ 受容体 1 欠損症の患者や IFN- γ R1 欠損マウスでは、IFN- γ に対する不応性に基づき、血清中の IFN- γ が増加する。一方で、HSCT 時にはこの過剰な IFN- γ 産生が、IFN- γ 受容体を持ち、IFN- γ への反応性を有する移植幹細胞に影響をもたらし、生着不全を誘発することが報告されている [6,7]。しかしながら、本症患者で二次性生着不全が生じる分子基盤の研究は行われておらず、そのメカニズムについて不明な点が多い。*STAT1*-GOF 変異を持つ患者では、IFN- γ などのサイトカイン刺激後に過剰な *STAT1* のリン酸化が生じ、*STAT1* ホモ 2 量体 (non-activating factor: GAF) の転写活性の亢進および、それによって誘導される遺伝子群の活性化が生じることが報告されている [2,8]。また、本症患者では Th1 優位であり、Th17 細胞減少が特徴的所見である。HSCT 後、造血細胞はドナー細胞に置き換えられるが、それ以外の細胞はレシピエント由来細胞のままであることから、本症患者ではそれらの支持細胞が Th1 優位の環境のもと、GAF を介した過剰シグナルをきたし、IFN- γ を含む Th1 サイトカインまたは炎症性サイトカイン過剰を引き起こすことによって、生着不全を発症するという仮説を着想した。

2. 研究の目的

本疾患患者において、*STAT1*-GOF 変異に起因する IFN- γ シグナルの亢進が生着不全に関与するとの仮説を立て、本症重症例の予後改善のため、本症移植例で二次性生着不全が生じる病態解明及びその病態に基づく治療法の開発を着想した。

申請者が新規に樹立した *GOF-Stat1^{R274Q}* マウスを用いた骨髄移植実験を行い、競合的骨髄再構築アッセイを構築する。さらに、抗 IFN- γ 抗体投与することにより、生着不全が回避され、キメリズムが改善するかを評価する。また、骨髄移植前後での骨髄血の網羅的遺伝子発現プロファイル解析を行い、遺伝子発現の面からも、IFN- γ シグナルと生着不全発症の関連について検討する。

3. 研究の方法

- (1) 骨髄生着不全における IFN- γ シグナルの役割を明らかにするため、*GOF-Stat1^{R274Q}* マウス (Ly5.2) に加え、IFN- γ 不応性の IFN- γ R1 欠損マウス (Ly5.2)、野生型マウス (Ly5.1 および Ly5.2) を利用し骨髄移植実験を行う。IFN- γ R1 欠損マウス (Ly5.2) 及び野生型マウス (Ly5.1) 由来の骨髄細胞をそれぞれ単独、ないしは 1:1 など混合比を変えて、放射線照射を行った *GOF-Stat1^{R274Q}* マウス (Ly5.2) に移植し、競合的骨髄再構築アッセイを行う。対照群として、放射線照射後の野生型マウス (Ly5.2) にも同様に IFN- γ R1 欠損マウス (Ly5.2) 及び野生型マウス (Ly5.1) 由来の骨髄細胞を移植する。キメリズム評価は、骨髄血及び末梢血を CD45.1 抗体、CD45.2 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析する。
- (2) CD4 陽性細胞を対象とし、骨髄移植前後での *GOF-Stat1^{R274Q}* マウス及び野生型マウスの骨髄血のシングルセルソーティングを行い、RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現プロファイル解析を行う。

4. 研究成果

当初、*GOF-Stat1^{R274Q/WT}* マウス、IFN- γ R1 欠損マウス、野生型マウスを利用し移植実験を行うことを予定していたが、IFN- γ R1 欠損マウスの入手に時間を要したため、まず *GOF-Stat1^{R274Q/WT}* マウスと野生型マウスの骨髄移植実験を行なった。放射線照射を行なった野生型マウス (Ly5.2) に、野生型マウス (Ly5.1) 由来の骨髄細胞を移植したところ、生着はえられ、フローサイトメトリーでキメリズム評価も可能であった。しかしながら、放射線照射後の *GOF-Stat1^{R274Q/WT}* マウス

に対して、野生型マウス(Ly5.1)由来の骨髄細胞を移植した実験では、再現性のある結果が得ることが出来なかった。そのため、今後解析対象を GOF-*Stat1*^{R274Q/R274Q} マウスに広げ、GOF-*Stat1*^{R274Q/R274Q} マウスをレシピエントとした骨髄移植実験を行うことを検討している。

<引用文献>

- [1] van de Veerdonk FL, Plantinga TS, Hoischen A, Smeekens SP, Joosten LA, Gilissen C, et al. STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med* 2011;365:54-61.
- [2] Liu L, Okada S, Kong XF, Kreins AY, Cypowyj S, Abhyankar A, et al. Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med* 2011;208:1635-48.
- [3] Leiding JW, Okada S, Hagin D, Abinun M, Shcherbina A, Balashov DN, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with Gain of Function STAT1 Mutation. *J Allergy Clin Immunol* 2017.
- [4] Tamaura M, Satoh-Takayama N, Tsumura M, Sasaki T, Goda S, Kageyama T, et al. Human Gain-of-Function STAT1 Mutation disturbs IL-17 Immunity in Mice. *Int Immunol* 2019.
- [5] Snoeck HW, Van Bockstaele DR, Nys G, Lenjou M, Lardon F, Haenen L, et al. Interferon gamma selectively inhibits very primitive CD34⁺CD38⁻ and not more mature CD34⁺CD38⁺ human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1994;180:1177-82.
- [6] Delisle JS, Gaboury L, Belanger MP, Tasse E, Yagita H, Perreault C. Graft-versus-host disease causes failure of donor hematopoiesis and lymphopoiesis in interferon-gamma receptor-deficient hosts. *Blood* 2008;112:2111-9.
- [7] Rottman M, Soudais C, Vogt G, Renia L, Emile JF, Decaluwe H, et al. IFN-gamma mediates the rejection of haematopoietic stem cells in IFN-gammaR1-deficient hosts. *PLoS Med* 2008;5:e26.
- [8] Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, et al. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J Leukoc Biol* 2014;95:667-76.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsumura Miyuki, Miki Mizuka, Mizoguchi Yoko, Hirata Osamu, Nishimura Shiho, Tamaura 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakata Sonoko, Tsumura Miyuki, Matsubayashi Tadashi, Karakawa Shuhei, Kimura Shunsuke, Tamaura Moe, Okano Tsubasa, Naruto Takuya, Mizoguchi Yoko, Kagawa Reiko, Nishimura Shiho, Imai Kohsuke, Le Voyer Tom, Casanova Jean-Laurent, Bustamante Jacinta, Morio Tomohiro, Ohara Osamu, Kobayashi Masao, Okada Satoshi	4. 巻 32
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 International Immunology	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 玉浦 萌, 岡田 賢	4. 巻 75
2. 論文標題 先天性免疫異常	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 1881-1930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玉浦 萌, 古川 年宏, 大野 綾香, 湊崎 和範, 檜垣 雅裕, 渡邊 千種, 河原 信彦, 石川 暢恒
2. 発表標題 Duchenne型筋ジストロフィーの若年死亡群の検討
3. 学会等名 第64回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------