

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15865

研究課題名（和文）Th17分化障害、自己免疫疾患に着目したSTAT1機能獲得型変異の病態解明

研究課題名（英文）Understanding the Pathophysiology of STAT1 Gain-of-Function Mutations with a Focus on Th17 Differentiation Impairment and Autoimmune Disorders

研究代表者

坂田 園子（SAKATA, Sonoko）

広島大学・病院（医）・寄附講座助教

研究者番号：50897907

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：【STAT1機能獲得型変異（STAT1-GOF）患者におけるTh17細胞減少の分子基盤の解明】Th17細胞の分化培養にIFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ 、IL-27を添加すると、患者ではTh17細胞の分化・増殖が過剰に抑制され、それらのサイトカインを阻害することで分化・増殖は回復した。本研究により、Th17細胞の分化・増殖を抑制する鍵となるサイトカインが同定された。

【I型インターフェロノパチーに着目した自己免疫疾患の分子基盤の解明】シングルセルRNA-seqにて、STAT1-GOF患者では幅広いリンパ球サブセットにおいて、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ で誘導される遺伝子群が亢進していることを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症や自己免疫疾患がコントロールできないSTAT1機能獲得型変異（STAT1-GOF）重症例に対する治療法の開発のために、病態の解明を試みた。

Th17分化・増殖障害の鍵となるサイトカインの同定を行った。その成果はSTAT1-GOFがもたらす複雑な分子病態の理解に繋がり、同定されたサイトカインはTh17細胞の回復のための治療標的となる可能性があり、今後の発展性が期待される。

また、STAT1-GOF患者におけるI型インターフェロノパチーの分子病態を調査した。本成果は、自己免疫疾患合併STAT1-GOF患者に対するJAK阻害薬の有用性を議論するにあたって重要な意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：【Elucidation of the Molecular Basis of Decreased Th17 Cell Count in Patients with STAT1 Gain-of-Function Mutations (STAT1-GOF)】When IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$ , and IL-27 were added to the differentiation culture of Th17 cells, differentiation and proliferation of Th17 cells were excessively inhibited in patients, and their differentiation and proliferation were restored by inhibiting these cytokines. This study identified the cytokines crucial for inhibiting the differentiation and proliferation of Th17 cells.

【Elucidation of the Molecular Basis of Autoimmune Diseases Focusing on Type I Interferonopathy】Using single-cell RNA-seq, it was found that in STAT1-GOF patients, a wide range of lymphocyte subsets exhibited an increase in gene expression induced by IFN- $\gamma$  and IFN- $\beta$ .

研究分野：免疫不全症

キーワード：STAT1機能獲得型変異 Th17細胞 サイトカイン インターフェロノパチー

## 1. 研究開始当初の背景

慢性皮膚粘膜カンジダ感染 (CMC: Chronic Mucocutaneous Candidiasis) は、口腔粘膜、消化管、外性器、皮膚、爪を主要病変とし、難治性・反復性のカンジダ感染症を呈する状態を示す。カンジダに対する局所免疫には、Th17 細胞と、それが産生するインターロイキン 17 (IL-17) が重要で、この免疫機構の破綻により CMC が発症する。過去に CMC を主症状とする患者の解析で、IL-17RA 欠損症、IL-17F 異常症、IL-17RC 欠損症、ACT1 異常症、JNK1 異常症、機能獲得型変異による STAT1 機能過剰症 (STAT1-GOF) が報告されている。なかでも、STAT1-GOF は CMC 患者の約半数を占める主要な原因である。

STAT1-GOF は常染色体優性遺伝形式を示す原発性免疫不全症で、2011 年の最初の報告以降、全世界で 400 例を超える症例が同定されている。本症は CMC の原因として最初に発見され、その後の検討で幅広い表現型を示すことが明らかとなった。患者はカンジダ感染のみならず、細菌感染 (約 70%)、ウイルス感染 (約 40%)、侵襲性真菌感染 (約 10%) などを発症する。さらに、感染症や自己免疫疾患がコントロールできない重症例が少なからず存在しており、それらの患者で造血幹細胞移植が行われるものの、予後不良である。近年、本症患者に対する JAK 阻害薬の有用性が報告されたが、不応例の存在や、侵襲性真菌感染症の発症が問題視されている。そのため、重症患者に対する治療法の開発が喫緊の課題と言える。治療法の開発には、正確な病態理解が必須であり、本研究で STAT1-GOF の病態解明に取り組んだ。

STAT1-GOF 患者では、末梢血中の Th17 細胞の減少が認められ、Th17 細胞減少に基づく IL-17 産生障害が、本症患者における CMC の発症原因と考えられている。一方、STAT1-GOF 患者で Th17 細胞が障害される分子メカニズムは明確にされていない。また、STAT1-GOF 患者における自己免疫疾患の発症メカニズムも不明である。そのため本研究では、STAT1-GOF 患者において 1) どのような分子背景に基づき Th17 細胞減少を呈するのか、2) どのような分子機序で自己免疫疾患を発症するのか、という学術的「問い」の解決を目指した。

## 2. 研究の目的

### A) STAT1-GOF 患者における Th17 細胞減少の分子基盤の解明

STAT1-GOF 患者では、IL-17 産生に中心的な役割を担う Th17 細胞が減少している。IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ 、IL-27 は Th17 細胞の分化・増殖に抑制的に働くことが知られており、これらのサイトカインは STAT1 を介してシグナル伝達を行う。IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ 、IL-27 のシグナルが、STAT1-GOF 変異により過剰に活性化され、Th17 細胞の分化・増殖に抑制的に働くという作業仮説に基づき研究を行った。これらのサイトカインに対する個別の中和抗体を用いた Th17 分化誘導実験で、Th17 細胞の分化・増殖を抑制する鍵となるサイトカインを同定することを目的とした。

### B) I 型インターフェロノパチーに着目した自己免疫疾患の分子基盤の解明

I 型インターフェロノパチーは、自己免疫疾患との関連性が議論されており、患者は血管炎、SLE 様症状、頭蓋内石灰化などを発症するが、STAT1-GOF 患者でも類似した症状を認める。過去に、STAT1-GOF 患者の細胞 (EB ウイルス不死化 B 細胞) が、IFN- $\gamma$  刺激により過剰な STAT1 のリン酸化を示すことを突き止めており、これに基づき、本症患者における自己免疫疾患に、I 型インターフェロノパチーが関与するという仮説を立てて研究を行った。自己免疫疾患を発症した STAT1-GOF 患者で、I 型インターフェロノパチーに特徴的な所見である『IFN signature』の有無を検討し、自己免疫疾患と IFN signature との関連性を検討すること、重症化を招く分子病態の解明に繋げることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### A) STAT1-GOF 患者における Th17 細胞減少の分子基盤の解明

健常者および STAT1-GOF 患者由来のナイーブ T 細胞 (CD45RA+CD4+ T 細胞) を、Th17 細胞への分化条件のもとで培養した。その分化条件に、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ 、IL-27 を添加することで、患者で Th17 細胞の分化・増殖が過剰に抑制されるか検討した。個別のサイトカインに対する中和抗体 (抗 IFN- $\gamma$  抗体、抗 IFN- $\beta$  抗体、抗 IL-27 抗体) を加えることで、Th17 細胞の分化・増殖が回復するか検討した。また、複数抗体のカクテル存在下での培養も行った。

### B) I 型インターフェロノパチーに着目した自己免疫疾患の分子基盤の解明

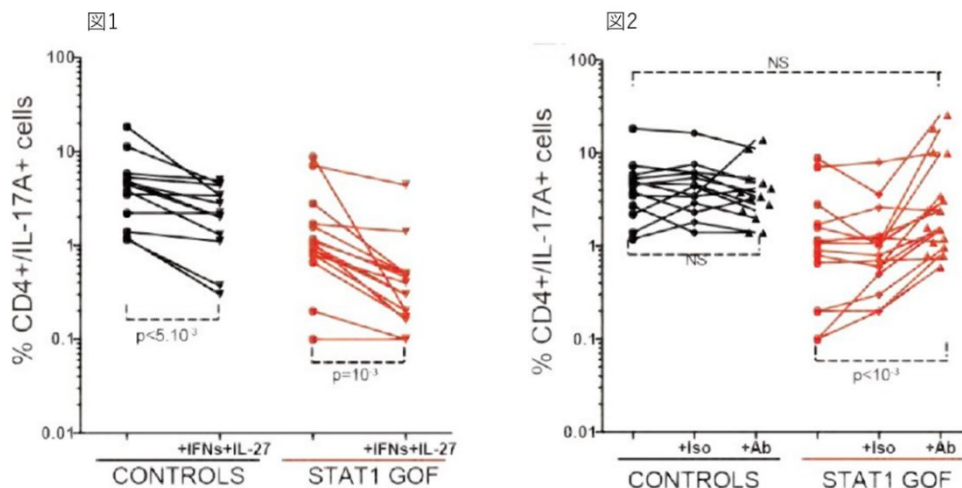
末梢血単核球での特定の 5 遺伝子群 (IFI27, IFIT1, MX1, IFI44L, RSAD2) を IFN- $\gamma$  で誘導さ

れる遺伝子群、炎症性サイトカイン、ケモカインを含む計 139 の遺伝子群の発現状態を、ターゲット RNA-seq で一括して測定した。それにより、I 型インターフェロノパチーの指標となる IFN signature の有無を評価した。

#### 4. 研究成果

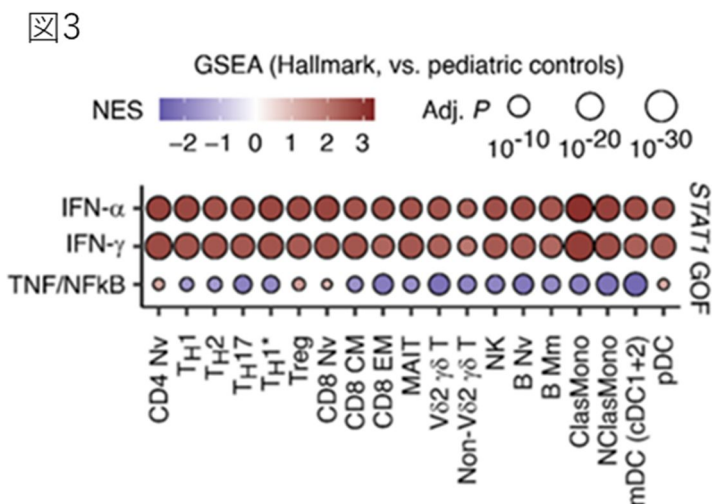
##### A) STAT1-GOF 患者における Th17 細胞減少の分子基盤の解明

Th17 細胞の分化条件に、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-27 を添加することで、STAT1-GOF 患者で Th17 細胞の分化・増殖が過剰に抑制されるか検討を行い、患者では Th17 細胞の分化・増殖が過剰に抑制されることが確認された。(図 1) また、上記のサイトカインに対する中和抗体 (抗 IFN- $\alpha$  抗体、抗 IFN- $\gamma$  抗体、抗 IL-27 抗体) のカクテルを加えて培養を行うことで、Th17 細胞の分化・増殖の回復を認めた。(図 2) これら一連の研究により、Th17 細胞の分化・増殖を抑制する鍵となるサイトカインが同定された。



##### B) I 型インターフェロノパチーに着目した自己免疫疾患の分子基盤の解明

I 型インターフェロン過剰の分子病態を調べるためシングルセル RNA-seq を行い、STAT1-GOF 患者では幅広いリンパ球サブセットにおいて、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  で誘導される遺伝子群が亢進していることを見いだした。(図 3)



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Le Voyer Tom, Sakata Sonoko, Tsumura Miyuki, et al, Boisson-Dupuis S, Casanova Jean-Laurent, Okada Satoshi, Bustamante Jacinta	4. 巻 207
2. 論文標題 Genetic, Immunological, and Clinical Features of 32 Patients with Autosomal Recessive STAT1 Deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 133 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2001451	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 Nishimura Shiho, Kobayashi Yoshiyuki, Ohnishi Hidenori, Moriya Kunihiko, Tsumura Miyuki, Sakata Sonoko, Mizoguchi Yoko, Takada Hidetoshi, Kato Zenichiro, Sancho-Shimizu Vanessa, Picard Capucine, Irani Sarosh R., Ohara Osamu, Casanova Jean-Laurent, Puel Anne, Ishikawa Nobutsune, Okada Satoshi, Kobayashi Masao	4. 巻 41
2. 論文標題 IRAK4 Deficiency Presenting with Anti-NMDAR Encephalitis and HHV6 Reactivation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 125 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-020-00885-5	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 Karakawa Shuhei, Shimomura Maiko, Sakata Sonoko, Matsubayashi Tadashi, Okada Satoshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Successful Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Autosomal Recessive STAT1 Complete Deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 684 ~ 687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-020-00948-7	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 Seyama Rie, Tsuchida Naomi, Okada Yasuyuki, Sakata Sonoko, Hamada Keisuke, Azuma Yoshiteru, Hamanaka Kohei, Fujita Atsushi, Koshimizu Eriko, Miyatake Satoko, Mizuguchi Takeshi, Makino Shintaro, Itakura Atsuo, Okada Satoshi, Okamoto Nobuhiko, Ogata Kazuhiro, Uchiyama Yuri, Matsumoto Naomichi	4. 巻 67
2. 論文標題 Two families with TET3-related disorder showing neurodevelopmental delay with craniofacial dysmorphisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 157 ~ 164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-00986-y	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 -

1. 著者名 Nakamura Utsunomiya Akari, Goda Satoshi, Hayakawa Seiichi, Sonoko Sakata, et al, Kanno Junko, Fujiwara Ikuma, Hasegawa Yukihiro, Yorifuji Tohru, Brickman Wendy, Vantghem Marie Christine, Yamaguchi Kei, Goshima Naoki, Hiyama Takeshi Y.	4. 巻 97
2. 論文標題 Identification of clinical factors related to antibody mediated immune response to the subfornical organ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Endocrinology	6. 最初と最後の頁 72 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cen.14737	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 坂田園子 岡田賢	4. 巻 53巻増刊
2. 論文標題 【小児疾患診療のための病態生理2 改訂第6版】免疫不全 自然免疫系異常 真菌に対する脆弱性 慢性皮膚粘膜カンジダ感染を含めて	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 小児内科	6. 最初と最後の頁 783-786
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
---------	---------