

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670477

研究課題名(和文)慢性皮膚粘膜カンジダ症の疾患モデルマウスの作成と治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of mouse model of chronic mucocutaneous candidiasis disease and use them to find therapeutic target

研究代表者

岡田 賢 (Okada, Satoshi)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：80457241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：IL-17は、皮膚粘膜におけるカンジダ感染防御に重要な役割を果たす。STAT1機能獲得性変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症患者では、IL-17産生細胞が減少する。本研究で、患者由来ナイーブT細胞は、IFN-a/b, IFN-g, IL-27に対する感受性が亢進しており、IL-17産生細胞への分化が障害されていることを発見した。この分化障害はIFN-a/b, IFN-g, IL-27中和抗体により改善し、IFN-a/b, IFN-g, IL-27が本症の治療における分子標的になる可能性が見いだした。期間中に作成したSTAT1ノックインマウスを用いて、今回発見した所見の検証を今後予定している。

研究成果の概要(英文)：We clarified the impact of STAT1 GOF mutations on the development of IL-17 producing T cells. We first investigated the effect of IFN-a/b, IFN-g and IL-27, cytokines that predominantly activate STAT1, in the differentiation of naive T cells into IL-17A-producing cells. We observed a much stronger reduction of the proportion of IL-17A T cells in the patients than in healthy controls. These data suggested that the poor development of IL-17 T cells in patients heterozygous for STAT1 alleles could result from enhanced IFNs and IL-27 responses via STAT1. We then treated cells with neutralizing antibodies (Abs) against IFN-a/b, IFN-g and IL-27. The combination of these Abs rescued the development of IL-17 T cells in CMCD patients carrying STAT1 mutations. These experiments established a key mechanism underlying impaired development of IL-17 T cells in the patients. This discovery also give us a new potential therapeutic target to cure host susceptibility to Candida in those patients.

研究分野：感染免疫

キーワード：STAT1 CMCD IL-17 マウス

1. 研究開始当初の背景

慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMCD) は、皮膚・爪・外陰部・口腔粘膜を主病変に、慢性・反復性にカンジダ感染症を呈する先天性免疫不全症である。申請者たちは 2011 年に、*STAT1* の機能獲得性変異により常染色体優性遺伝を呈する CMCD が発症することを同定した。さらに本邦において、約 50% の CMCD 患者で *STAT1* 変異が認められることが明らかとなり、*STAT1* は CMCD の主要な責任遺伝子と考えられた。症例の蓄積により近年、*STAT1* 異常による CMCD 患者の一部で、複合型免疫不全症を呈し従来の抗真菌薬による治療で対応できず、造血幹細胞移植を必要とする重症例が存在することが明らかとなった。そのため、重症例における療法の確立が急務となっていた。

2. 研究の目的

STAT1 機能獲得性変異を有する CMCD 患者の病態解析を行い、治療法の開発に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

健常者・患者の末梢血から naïve T 細胞を分離して、IL-1 β 、IL-23 存在下で培養し、IL-17 産生細胞への分化を促した。さらに、培養上清の IL-17 の測定も行った。IL-17 産生細胞への分化に抑制的に働く INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 の存在下、または INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 に対する中和抗体存在下でも IL-17 産生細胞への分化を検討した。さらに、末梢血由来 naïve T 細胞と、*C. albicans* でパルスした allogeneic ないしは autologous の単球を共培養し、IL-17 産生細胞への分化を誘導する研究も行った。

上記の実験と同時に *STAT1* 変異を導入したノックインマウスの作成を試みた。

4. 研究成果

1) *STAT1* 機能獲得性変異を有する患者における IL-17 産生細胞への分化障害の機序の同定

STAT1 異常症患者では、末梢血中に存在する IL-17 産生細胞が減少しており、この所見が CMCD 発症の分子基盤であることが、過去の研究で推測されている。我々は、IL-17 産生細胞減少の分子メカニズムを解明することが、患者の治療に役立つと考えた。そこで、*STAT1* 機能獲得性変異を有する患者において IL-17 産生細胞が減少する機序を検討した。

末梢血由来 naïve T 細胞と、*C. albicans* でパルスした allogeneic ないしは autologous の単球を共培養し、IL-17 産生細胞を誘導する実験を行った。その結果、患者では IL-17 産生細胞の分化障害が認められた。このことから患者では、抗原特異性に IL-17 産生細胞への分化障害があると考えた。

次に、naïve T 細胞を IL-1 β 、IL-23 存在下

で 12 日間培養することで、IL-17 産生細胞が誘導される培養条件を確立し、この条件下で患者、健常者の比較検討を行った。その結果、患者において IL-17 産生細胞への分化障害を認めた。*STAT1* 機能獲得性変異を有する患者では、INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 に対する反応性が亢進していること、INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 は naïve T 細胞から IL-17 産生細胞への分化に抑制的に働くことが知られていることから、患者の INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 への感受性亢進が、IL-17 産生細胞への分化障害の原因であるという作業仮説のもとに研究を行った。具体的には、既に確立してある naïve T 細胞を IL-1 β 、IL-23 存在下で 12 日間培養し IL-17 産生細胞を誘導する実験系を用いて、INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 による IL-17 産生細胞への分化抑制効果を、患者、健常者と比較検討した。その結果、健常者と比較して患者では、INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 による IL-17 産生細胞への分化抑制効果がより強く認められた。これらのことから、患者では INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 に対する感受性の増強に基づいた IL-17 産生細胞への分化障害が存在することを示した。

2) INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 中和抗体による、患者で認めた IL-17 産生細胞への分化障害の回復の確認

一連の研究で、患者における INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 に対する感受性の増強が、IL-17 産生細胞への分化障害の分子基盤であることが明らかとなり、INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 の抑制が治療に有用と考えた。そこで、既に確立してある naïve T 細胞を IL-1 β 、IL-23 存在下で 12 日間培養することで IL-17 産生細胞を誘導する実験系を用いて、INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 中和抗体の効果を検討した。その結果、患者では INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 中和抗体を加えることで IL-17 産生細胞への分化障害が改善した。一方で健常者では、INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 中和抗体は効果がなかった。これらの結果から、INF- γ 、IFN- α/β 、IL-27 の抑制が、患者の治療に役立つ可能性が見いだされた。

3) ノックインマウスの作成

上記の研究と平行してノックインマウスの作成を継続した。確立した ES クローンからキメラマウスの作成を試み、試行錯誤の上で、ノックインマウスの作成に成功した。今後、作成したノックインマウスを利用して、病態解析、治療法の開発を進めていく予定である。

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 15 件)

1) Dobbs K, Conde CD, 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, Ciftci E, Felgentreff K, Ohsumi TK, Pedergnana V, Boisson B, Haskologlu S, 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 T, Comeau AM, Geha RS, Abel L, Buckley RH, Ikinçioğullari A, Al-Herz W, Helminen M, Doğu F, Casanova JL, Boztuğ K, Notarangelo LD. DOCK2 and a Recessive Immunodeficiency with Early-Onset Invasive Infections. *N Engl J Med.*, in press (査読有り)

2) Ciancanelli MJ, Huang SX, Luthra, 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, Pedergnana V, Boisson B, **Okada S**, Picard C, Ringuier B, Troussier F, Chaussabel D, Abel L, Pellier I, Notarangelo LD, García-Sastre A, Basler CF, Geissmann F, Zhang SY, Snoeck HW and Casanova JL, Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency, *Science.*, doi: 10.1126/science.aaa1578, [Epub ahead of print] (査読有り)

3) 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, García-Sastre A, Abel L, Lebon P, Notarangelo LD, Crow YJ, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Pellegrini S, Human intracellular ISG15 prevents interferon- α/β over-amplification and auto-inflammation. *Nature*, 517, 89-93, January, 2015. doi: 10.1038/nature13801. (査読有り)

4) 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, June, 2014 (査読有り)

5) 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, Cypowjy 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, April, 2014. doi: 10.1189/jlb.0513250. (査読有り)

6) Mekki N, Ben-Mustapha I, Liu L, Boussofara L, **Okada S**, Cypowjy S, Ghariani 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, April, 2014. doi: 10.1038/jid.2013.480. (査読有り)

7) 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, October, 2013. doi: 10.1182/blood-2013-01-480814. (査読有り)

8) Hirata O, **Okada S (equal contribution)**, **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, October, 2013. doi: 10.3324/haematol.2013.083741. (査読有り)

9) Soltész B, Tóth B, Shabashova N, Bondarenko A, **Okada S**, Cypowjy 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, September, 2013. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-101570. (査読有り)

10) 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, May, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0058286. (査読有り)

11) Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Moens L, Stoddard JL, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, **Tsumura M**, Kobayashi M, Arkwright PD, Averbuch D, Engelhard D, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, French MA,

Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, Klein C, Holland SM, Uzel G, Casanova JL, Ma CS, Tangye SG. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *J Exp Med*. 210: 2739-53, 2013. doi: 10.1084/jem.20130323. (査読有り)

12) Ives ML, Ma CS, Palendira U, Chan A, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright PD, Engelhard D, Averbuch D, Magdorf K, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, **Tsumura M**, Kobayashi M, Uzel G, Casanova JL, Tangye SG, Deenick EK. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations underlying autosomal dominant hyper-IgE syndrome impair human CD8(+) T-cell memory formation and function. *J Allergy Clin Immunol*. 132: 400-11. e9, 2013. doi: 10.1016/j.jaci.2013.05.029. (査読有り)

13) **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 (査読無し)

14) **岡田 賢**, 見逃しやすい免疫不全. *小児内科* 46: 1499-504, 2014 (査読無し)

15) **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* 69: 405-9, 2014 (査読無し)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) **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, 2013, 広島(口演: シンポジウム)

2) **岡田 賢**, 中村和洋, 小林正夫. 申請時期の好中球減少症. 第 24 回 日本産婦人科・新生児血液学会学術集会, 2014, 横浜(口演: ワークショップ)

〔図書〕(計 1 件)

1) **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, 226-31, 2014

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 賢 (OKADA SATOSHI)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号: 80457241

(2) 研究分担者

津村 弥来 (TSUMURA MIYUKI)

広島大学・医師薬保健学研究院・研究員

研究者番号: 80646274

(3) 連携研究者

小原 収 (OHARA OSAMU)

公益財団法人かずさ DNA 研究所・ヒトゲ

ノム研究部・研究室長

研究者番号: 20370926