

# CVIDのTREC, KRECによる病型分類

Classification of CVID by TREC and KREC quantification.

防衛医科大学校小児科 >>>

釜江 智佳子、本間 健一、野々山 恵章

防衛医科大学校医療情報部、東京医科歯科大学小児科 >>>

今井 耕輔

防衛医科大学校医療情報部 >>>

佐藤 弘樹

東京医科歯科大学小児科、かずさ DNA 研究所 >>>

満生 紀子

かずさ DNA 研究所、理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター >>>

小原 収

Common variable immunodeficiency (CVID) は低 $\gamma$ -グロブリン血症をきたす免疫不全症であるが、大部分のCVID患者の原因遺伝子が明らかでない。 $\gamma$ -グロブリン定期補充で予後良好な症例がある一方、自己免疫疾患や悪性腫瘍を合併する症例、複合免疫不全症が進行性に悪化後、造血幹細胞移植が必要になる症例もある。我々は、低ガンマグロブリン血症患者を、T細胞新生能を測るTREC、B細胞新生能を測るsjKRECを用いて、亜群分類し、臨床的予後との相関について検討した。

【対象】CVID40例(男:女=21:19)を対象とした。紹介時の年齢は $18.3 \pm 2.0$ 歳、診断時のIgGは $370 \pm 33$ mg/dl、IgAは $30 \pm 7$ mg/dl、IgMは $40 \pm 6$ mg/dlであった。

【結果】TREC, sjKRECにより4群に分けられ、両方検出可能なA群が19例、sjKRECのみ検出感度以下のB群は7例、TRECのみ検出感度以下のC群は8例、いずれも検出感度以下のD群は6例となった。年齢及びIg値は各群で有意差を認めなかった。末梢血T細胞数、B細胞数は、A群で $806 \pm 204$ 、 $269 \pm 65$ 、B群で $1665 \pm 430$ 、 $35 \pm 16$ 、C群で $517 \pm 124$ 、 $60 \pm 11$ 、D群で $1425 \pm 724$ 、 $29 \pm 16$  / $\mu$ lであった。メモリーT細胞はA群に比してC、D群で有意に増加していた(A:  $37 \pm 16\%$ , B:  $67 \pm 13\%$ , C:  $92 \pm 8.2\%$ , D:  $83 \pm 14\%$ ,  $p < 0.01$ )。次に、日和見感染症、自己免疫疾患、悪性疾患の発症をイベントとして発生率を検討した。A群0.04、B群0.30、C群0.62、D群0.98 events/10patient-yearsとなり、AからD群にかけて明らかな増加を認めた(A vs. B:  $p = 0.0692$ , C:  $p = 0.0092$ , D:  $p = 0.0022$ )。各イベントのcumulative incidenceを群毎に比較したところ、日和見感染症で有意な群間差( $p = 0.0059$ )を、全てのイベントでは群間差( $p = 0.1237$ )を認めた。D群では、1例死亡、2例で幹細胞移植を行われていた。以上の結果より、A群、B群、C群、D群の順に予後に影響する合併症頻度が高いと考えられた。

【結語】TREC, sjKRECを用いて、T細胞新生能、B細胞新生能の評価により、CVID患者の亜群分類が可能であり、造血幹細胞移植の適応となり得る患者を抽出し、臨床的予後の改善につながると考えられた。



# ATM欠損早期T細胞分化におけるリンパ球分化異常と発がんへの分岐点を可視化

Visualization of bifurcation into immunodefect and oncogenesis in early thymocyte lacking ATM.

東京医科歯科大学発生発達病態学小児科 >>>

磯田 健志

東京医科歯科大学 >>>

高木 正稔、森尾 友宏、水谷 修紀

理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター免疫発生研究チーム >>>

河本 宏

遺伝性毛細血管拡張性小脳失調症は、ATM遺伝子の変異で生じ、T及び、Bリンパ球減少症、白血病リンパ腫の発症、小脳失調症を呈する先天性免疫不全症である。ATMはV(D)J再構成にも補助的に作用し、cNHEJの系でcoding end及びsignal endの結合を誘導する。Tリンパ球減少は、ATM<sup>-/-</sup>マウス胸腺の解析でTCRa鎖再構成不良によりDouble Positive (DP) 期からSingle Positive (SP) 期への移行不良が原因とされている。またATM<sup>-/-</sup>マウス胸腺リンパ腫は、高率に14番染色体のTCRd鎖を切断点としTCRVa領域の増幅を伴う染色体転座を形成する。この報告は、分化段階の早期に染色体転座が生じることを示唆している。

しかし、分化段階のDouble Negative (DN) 期に分化異常、及び発癌への染色体転座形成の好発期があるかは明らかでない。そこで、我々はATM<sup>-/-</sup>T細胞分化のDN期に焦点を置き解析を進めた。我々は、ATM<sup>-/-</sup>マウスの解析、及びin vitroのT細胞分化誘導実験からDN3aからDN3b期への移行不良を確認した。移行不良の原因検索として、ATM<sup>-/-</sup>造血幹細胞 (Ly5.2) は、WT (Ly5.1) マウスへ骨髄移植後、WT胸腺環境でも同様の移行不良を生じ、ATM<sup>-/-</sup>胸腺ストローマが分化不良の原因でないことを確認した。ATM<sup>-/-</sup>RAG2<sup>-/-</sup>マウスに抗CD3e抗体を腹腔内投与すると、DN3からDPへ分化誘導され、分化シグナルに異常は見られなかった。これらより、移行不良の原因は、TCRb鎖の再構成異常であると結論付けられる。

さらに、DN3aからDN3bの移行期の染色体異常を検索するため、in-vitro 培養系でTCRa/d鎖を含む14番染色体転座を分化段階に応じてFISH法で検出を試みた。ATM<sup>-/-</sup>造血幹細胞からの分化誘導実験では、DN2-3aでRAG依存性のTCRd鎖の切断を約5%に検出し、DN3b-4でも切断は遷延した。DN2-3aではTCRd鎖を切断点とする転座検出率は低いが、DN3b-4では約10%に検出でき、DN3aのVDJ組換え異常が主体となり染色体転座を生じていることが考えられた。

また、TCRd鎖切断後に、dicentric形成に伴うTCRVa領域の増幅、12番染色体切断、12番14番染色体転座を低頻度ながら検出でき、RAG依存性、非依存性の複合的な機序により、リンパ腫で見られる染色体異常に段階的に近づく細胞が検出された。今回の我々の解析で、ATM欠損T細胞のDN3aからDN3b期の移行不良は、Tリンパ球分化異常の早期の原因でもあり、14番染色体転座を形成する発癌の起源にもなりうることを示された。また我々の実験系は、ATMの正確な機能の探索や、新薬の検討にも有用と考えている。

# STAT1遺伝子に変異を有する常染色体優性遺伝慢性皮膚粘膜カンジダ症に合併した慢性活動性肝炎の病態について

STAT1-mutated autosomal-dominant chronic mucocutaneous candidiasis with chronic active hepatitis.

岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 )))

大西 秀典、堀 友博、寺本 貴英、  
深尾 敏幸、近藤 直実

長良医療センター臨床研究部 )))

金子 英雄

中濃厚生病院小児科 )))

坪内 肯二

岐阜大学大学院医学系研究科皮膚病態学 )))

清島 真理子

【緒言】近年、慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMC) の責任遺伝子の報告が相次いでいるが、2011年に常染色体優性遺伝形式の慢性皮膚粘膜カンジダ症 (AD-CMC) の責任遺伝子としてSTAT1遺伝子が報告された。一方、多腺性自己免疫症候群 (APS) 1型は、自己免疫に起因する複数の内分泌/非内分泌疾患に慢性皮膚粘膜カンジダ症を合併し、その原因としてAIRE遺伝子変異が同定されている。今回我々は、当初臨床症状からAPS1型を疑った症例を経験し、最終的にSTAT1異常によるAD-CMCと診断しえたので、臨床経過とともに文献的考察を含めて報告する。

【症例】初診時11歳女児 (現在23歳)。低身長を主訴に当院小児科受診、甲状腺機能低下症 (抗TPO抗体陽性) と肝機能異常を認めた。各種自己抗体検査や肝生検より自己免疫性肝炎と診断し、プレドニゾン、アザチオプリン等の内服加療を行った。また、3歳時より爪および口腔内カンジダ症を認め、慢性皮膚粘膜カンジダ症として当院皮膚科で加療されている。一方、父親も幼少時より慢性皮膚粘膜カンジダ症を認め、多発口腔癌のため49歳で死亡している。

【方法】STAT1遺伝子の検索を行った。健常者及び患者の末梢血単核球 (PBMC) を分離し、PHA、 $\beta$ -glucanで刺激培養後、培養上清中のサイトカイン (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) を測定した。患者血清中のIL-17抗体をwestern blot法で検出した。肝組織中のCD68及びIL-18を免疫染色で検出した。

【結果】本症例と父親のgenomic DNAにおいて、(c.821 G>A), (p.Arg274Gln) 変異をヘテロ接合性に認めた。本患者のPBMCは、 $\beta$ -glucan刺激後のIFN- $\gamma$ 産生低下を認めた。患者血清中でIL-17A、IL-22の抗体は検出されなかったが、IL-17F抗体が検出された。肝組織の免疫染色でCD68陽性細胞の浸潤と、IL-18を検出した。

【考察】CMCを発症するSTAT1異常症には、比較的高率に甲状腺機能低下症が合併するが、稀な合併症として慢性活動性肝炎や口腔癌の発症が挙げられる。CMC症状や甲状腺機能低下の発症機序には自己免疫的機序 (IL-17抗体、抗甲状腺抗体) と、サイトカインネットワークの異常 (IL-17産生障害、TSHによるSOCS1を介したSTAT1リン酸化の抑制) の両側面が指摘されている。慢性活動性肝炎発症機序については、肝炎の活動期にAST, ALT値と並行して血清IL-18値が上昇しており、また肝組織でIL-18が検出されたことから、この病態に反復するカンジダ感染によるIL-18の産生過剰が関与していることが推測された。CMCを発症する免疫不全症の中でAPS1型とSTAT1異常症は、全身的に多彩な合併症を呈するので、留意する必要がある。



# STAT1機能獲得性変異による慢性皮膚粘膜カンジダ症

Chronic Mucocutaneous Candidiasis due to gain-of-function mutations in STAT1.

広島大学小児科 >>>

岡田 賢、小林 正夫

INSERMU980 >>>

Liu Luyan, Abel Laurent, Picard Capucine, Puel Anne

The Rockefeller University >>>

Kong Xiao-Fei, Kreins Alexandra, Cypowyj Sophie,  
Boisson-Dupuis Stephanie, Casanova Jean-Laurent

慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMCD) は、皮膚・爪・口腔粘膜・外性器を主病変とした、反復性または持続性の *C. albicans* 感染を臨床的特徴とする。近年、カンジダの認識機構に関わる遺伝子群の異常、Th17の分化増殖・IL-17シグナル伝達に関わる遺伝子群の異常がCMCD発症に関与していることが明らかとなり、注目を集めている。我々は、既知の責任遺伝子に異常を認めないCMCD患者を対象にエクソームシーケンスを行い、4症例でSTAT1のヘテロ接合性異常を同定した。そこで、他のCMCD症例を対象にSTAT1の全エクソンシーケンスを行い、約70症例 (39家系) でSTAT1のヘテロ接合性遺伝子変異を同定した。

変異はSTAT1のcoiled-coil domain、DNA-binding domainに集中していた。STAT1異常を認めた家系例では、i) 4歳未満発症が約70%、ii) 自己免疫性甲状腺炎の合併が約20%、iii) 浸透率が非常に高く、有症状患者における変異同定率が100%、という特徴を認めた。従来STAT1のヘテロ接合性遺伝子変異は、細胞内寄生菌に対して選択的に易感染性を呈する免疫不全症 (Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases: MSMD) の発症に関与すると考えられていたため、MSMD患者で認めるSTAT1変異 (MSMD-STAT1変異) との比較検討を行った。CMCD患者で認めたSTAT1変異 (CMC-STAT1変異) はIFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IL-27刺激に伴うSTAT1のリン酸化 (pY701) の亢進、GAS (gamma activated sequence) 転写活性の亢進を認めた。IFN- $\alpha$ 刺激後のISRE (interferon stimulated response element) 転写活性は、ほぼ正常であった。一方、MSMD-STAT1変異は、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IL-27刺激に伴うGAS転写活性の低下を認めた。チロシンリン酸化阻害薬であるstaurosporine処理下でSTAT1の脱リン酸化を検討したところ、CMCD-STAT1変異では脱リン酸化障害を認め、過剰なリン酸化の原因と考えた。

一連の結果から、CMCD-STAT1変異は機能獲得性変異であり、MSMD-STAT1変異は機能喪失性変異であると考えられた。STAT1機能獲得性変異がCMCDを引き起こす分子基盤は未だ明らかではない。我々は、1) 患者でIL-17A陽性のCD3細胞が減少していること、2) IL-27がSTAT1を介してTh17細胞の分化増殖に抑制的に働くという報告がなされていることより、Th17細胞の分化増殖の異常を介したCMCD発症を疑い解析を進めている。

### Ⅲ 分担研究報告



# 原発性免疫不全症候群疫学調査二次調査結果 内分泌疾患に関して

石村 匡崇 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)  
野崎 高史 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)  
高田 英俊 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)  
井原 健二 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)  
今井 耕輔 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)  
森尾 友宏 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学)  
小林 正夫 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学)  
野々山恵章 (防衛医科大学校医学研究科小児科学講座)  
原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)

## 研究要旨

2008 年度原発性免疫不全症候群全国疫学調査に関して、内分泌疾患合併例の二次調査結果をまとめた。内分泌疾患合併例は 49 例報告された。原発性免疫不全症患者若年人口における、各内分泌疾患の有病率は一般若年人口における有病率より高率であった。自己免疫性（1 型糖尿病、橋本病）、非自己免疫性（甲状腺機能低下症（橋本病以外）、成長ホルモン分泌不全症、性腺機能低下症）内分泌疾患の臨床データ、経過を調査し報告した。IPEX 症候群の 1 型糖尿病合併率は 33.3%で、70%以上という欧米の報告よりも低かった。また XLA、CGD、IgG サブクラス欠損症で甲状腺機能低下症、高 IgE 症候群、CGD で成長ホルモン分泌不全症、先天性無ガンマグロブリン血症、高 IgE 症候群で性腺機能低下症の合併例が新規に報告された。内分泌疾患は補充療法など治療可能な疾患も多いが、治療開始時期が重要であり、見逃してはならない重要な合併症である。

## A. 研究目的

医学研究の進歩により新たな原発性免疫不全症（PID）が見出され、また多くの PID の原因遺伝子が明らかになってきている。PID の合併症として、悪性腫瘍や自己免疫疾患はよく知られており、これまで我が国の現況を報告してきた。近年、内分泌系と免疫系の相互作用が注目されているが、PID の合併症として内分泌疾患に着目した大規模調査の報告はこれまでにない。2008 年度に行った全国疫学調査の二次調査で報告された PID の合併症のうち、内分泌疾患に関する調査結果をまとめ、報告する。

## B. 研究方法

2008 年原発性免疫不全症全国疫学調査方法に

関しては平成 21 年度原発性免疫不全症に関する調査研究班報告書に記載している。二次調査で内分泌疾患合併ありとの回答施設に、各疾患毎に追加調査票を送付し、臨床データや経過を調査した。

## C. 研究結果

### 1：総論

二次調査で報告された PID 923 例のうち、内分泌疾患合併例は 49 例報告された。PID の各疾患別では、内分泌徴候が主要症状である DiGeorge 症候群、IPEX 症候群、APECED で内分泌疾患の合併が高率にみられた（表 1）。また PID 若年人口（0-19 歳）における各内分泌疾患の有病率は、一般若年人口より高率であっ

た (表 2)。

表 1. PID と内分泌疾患合併症

疾患名	疾患登録数	内分泌疾患合併数	頻度 (%)	内訳
SCID	75	4	5.3	橋本病 (CD4欠損症), 甲状腺機能低下症 (RAG1欠損症, 未確定) 2例, GH分泌不全性低身長症 (未確定)
XLA	138	3	2.2	甲状腺機能低下症, 低リン血症, 肥満
CVID	93	6	6.5	1型糖尿病, 橋本病, GH分泌不全性低身長症, ACTH単独欠損症, 肥満 2例
IgGサブクラス欠損症	50	2	4.0	甲状腺機能低下症 2例
高IgE症候群	46	3	6.5	GH分泌不全性低身長症, 性腺機能低下症, 偽性低アルドステロン症
DiGeorge症候群	32	14	43.8	副甲状腺機能低下症 14例
AT	13	1	7.7	2型糖尿病
CMCC	13	1	7.7	橋本病
IPEX症候群	6	4	66.7	1型糖尿病 2例, 橋本病, 副腎クリーゼ+低血糖症
APECED	5	2	40.0	副甲状腺機能低下症, 1型糖尿病+橋本病
CGD	87	2	2.3	甲状腺機能低下症, GH分泌不全性低身長症
家族性地中海熱 (FMF)	36	1	2.8	2型糖尿病
<b>その他</b>				
低ガンマグロブリン血症 (1型糖尿病), 先天性無ガンマグロブリン血症 (GH分泌不全性低身長症+性腺機能低下症), ICF症候群 (性腺機能低下症), Shwachman-Diamond症候群 (GH分泌不全性低身長症), NEMO異常症 (低リン血症性くる病), WHIM症候群 (1型糖尿病+甲状腺機能低下症)				

表 2. PID に合併した各内分泌疾患の有病率

内分泌疾患	糖尿病		甲状腺機能低下		GHD	性腺機能低下症	副甲状腺機能低下症	ACTH単独欠損症
	1型	2型	橋本病	その他				
計	6	2	5	7	6	3	15	1
PID若年人口 (0-19歳) 有病率 (人/万)	93	16	47	109	93	47	233	16
(日本人)一般若年人口 有病率 (人/万)	1.19	0.461 <sup>*2</sup>	30.0 <sup>*2</sup>	13.5 <sup>*3</sup>	1.47	ND	0.072 <sup>*1</sup>	0.035

GHD: 成長ホルモン分泌不全症, \*1: 総人口における有病率, \*2: 発症率, \*3: アメリカ合衆国におけるデータ, ND: データなし

## 2: 各論

### 1) 1型糖尿病

二次調査報告例は 6 例であった。1 型糖尿病合併例の臨床データを表 3 に示す。IPEX 症候群では、2 例ともこれまでの報告と同様、1 型糖尿病の発症時期が乳児期と早期で、糖尿病性ケトアシドーシスを呈し、血糖コントロールは不良であった。また本調査における IPEX 症候群の 1 型糖尿病合併率は 6 例中 2 例 (33.3%) で、70%以上という欧米の報告より低率であった。ただし、今回の調査では生存例および新規診断

し死亡した例のみを対象としており、重症の死亡例が含まれてないため、頻度が低くなっている可能性がある。なお、WHIM 症候群での 1 型糖尿病合併例は世界初の報告である。

### 2) 橋本病

二次調査報告数は 5 例で、うち CVID と CMCC の 2 例は橋本病成人発症例であった (表 4)。全例抗甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO)、抗サイログロブリン (Tg)、甲状腺刺激ホルモンレセプター自己抗体 (TRAb) のうち少なくとも 1

つの自己抗体を有しており、IPEX 症候群の患者では発症が非常に早期（出生時）であった。また CID（CD4 欠損症）の 1 例は、造血幹細胞移植は受けていなかった。

### 3) 甲状腺機能低下症（橋本病以外）

二次調査報告数は 7 例で、うち XLA、IgG サブクラス欠損症、WHIM 症候群の 3 例は新生児マススクリーニングで検出された原発性甲状腺機能低下症（クレチン症）であった（表 5）。他 4 例は TSH が正常で中枢性甲状腺機能低下症と考えられたが、病因は不明であった。また SCID の 2 例は造血幹細胞移植を受けていたが、ともに甲状腺機能低下症発症後であり、複合免疫不全の影響が考えられた。なお XLA、IgG サブクラス欠損症、CGD における甲状腺機能低下症の報告はこれまでにない。

### 4) 成長ホルモン分泌不全症（GHD）

二次調査報告数は 6 例であった。GH 分泌不全を伴性無ガンマグロブリン血症が知られており、過去の我が国の調査でも報告があるが、今回のアンケート調査での報告はみられなかった。6 例のうち、先天性無ガンマグロブリン血症の 1 例を除き、5 歳前後で診断され、GH 補充療法を行われていた（表 6）。先天性無ガンマグロブリン血症、CGD の 2 例は先天奇形を合併していた。GHD を呈する一部の SCID 患者では、*STAT5b* 遺伝子変異がみられることが報告されている。また CVID 患者における GHD の発症の機序に関しては、IGF-1 と IgG 経路共通の障害や、抗下垂体抗体の存在などが一部で報告されている。なお、高 IgE 症候群、CGD での GHD の合併は初の報告である。

### 5) 性腺機能低下症

二次調査報告数は 3 例で、うち 2 例は高ゴナドトロピン性（原発性）性腺機能低下症を呈し、残り 1 例は低ゴナドトロピン性（中枢性）性腺機能低下症を呈した（表 7）。全例造血幹細胞移

植は受けていなかった。また先天性無ガンマグロブリン血症、高 IgE 症候群での性腺機能低下症合併の報告はこれまでにない。

## D. 考察とまとめ

二次調査で内分泌疾患合併例は 49 例報告され、PID 若年人口（0-19 歳）における各内分泌疾患の有病率は、自己免疫性のみならず、非自己免疫性疾患でも一般若年人口より高率であった。うち、自己免疫性（1 型糖尿病、橋本病）、非自己免疫性（甲状腺機能低下症（橋本病以外）、成長ホルモン分泌不全症、性腺機能低下症）内分泌疾患の臨床データ、経過を調査し報告した。IPEX 症候群の 1 型糖尿病合併率は 33.3% で、欧米の報告よりも低かった。また XLA、CGD、IgG サブクラス欠損症で甲状腺機能低下症、高 IgE 症候群、CGD で成長ホルモン分泌不全症、先天性無ガンマグロブリン血症、高 IgE 症候群で性腺機能低下症の合併例が新規に報告された。内分泌疾患は補充療法など治療可能な疾患も多いが、治療開始時期が重要であり、見逃してはならない PID の重要な合併症である。また近年、内分泌系と免疫系の相互作用が注目されており、本調査のような内分泌疾患に着目した PID での大規模疫学調査から、発症機序に関する更なる知見が得られるかもしれない。

## E. 研究危険情報

特になし

## F. 知的財産の出願・登録状況

特になし



表 3. 1 型糖尿病合併例の臨床像

症例	1	2	3	4	5	6
疾患	IPEX 症候群	IPEX-like 症候群	APECED -like	WHIM 症候群	CVID	低ガンマ グロブリン血症
遺伝子変異	FOXP3	不明	不明	CXCR4	不明	NT
年齢/性別	8y/男	14y/男	21y/女	18y/女	19y/女	25y/男
1型糖尿病発症年齢	3m	10m	7y	5y	7y	6y
臨床症状	多飲, 多尿	多飲, 体重減少	ND	多飲, 多尿	-	-
DKAの有無	有	有	無	無	無	有
検査所見	(治療開始後)					
空腹時血糖 (mg/dL)	571	524	110	136	149	139
HbA1c (%) (4.3-5.8)	7.9	8.3	8.7	8.9	5.6	9.1
抗GAD抗体 (U/mL) (<1.5)	+	+	+	+	-	-
抗IAA抗体 (nU/mL) (<125)	69.1	4860	9.3	92	ND	ND
	-	ND	+	+	ND	ND
	2.8		ND	ND		
治療	インスリン	インスリン	インスリン	インスリン	インスリン	インスリン

NT: not tested, ND: no data available, DKA: diabetic ketoacidosis, GAD: glutamic acid decarboxylase, IAA: insulin autoantibody

表 4. 橋本病合併例の臨床像

症例	1	2	3	4	5
疾患	CID (CD4欠損症)	CVID	CMCC	IPEX 症候群	APECED -like
遺伝子変異	NT	NT	不明	FOXP3	不明
年齢/性別	13y/女	68y/男	44y/男	20y/男	21y/女
橋本病発症年齢	4y	55y	22y	出生時	15y
臨床症状	なし	なし	なし	なし	なし
検査所見	(治療開始後)				
Free T4 (ng/dL) (1.0-1.8)	0.75	0.8	1.32	-	0.91
Free T3 (pg/mL) (2.2-4.4)	2.68	2.4	3.00	-	3.26
T4 (µg/dL) (4.6-12.6)				1.5	
TSH (µIU/mL)	29.71	64.2	2.98	788	0.505
抗TPO抗体 値 (U/mL) (<0.3 / <100 <sup>1</sup> )	+	ND	-	+	+
抗Tg抗体 値 (nU/mL) (<0.3 / <100 <sup>2</sup> )	0.4			1600 <sup>*1</sup>	227
	-	-	+	-	+
TRAb 値 (%) (<15)	ND	+	ND	ND	ND
		18.9			

NT: not tested, ND: no data available, \*1: マイクロゾームテスト, \*2: サイロイドテスト, TPO: thyroid peroxidase, Tg: thyroglobulin, TRAb: TSH receptor antibody

表 5. 甲状腺機能低下症（橋本病以外）合併例の臨床像

症例	1	2	3	4	5	6	7
疾患	SCID (T-B-NK+)	SCID	XLA	IgG サブクラス 欠損症	IgG サブクラス 欠損症	CGD	WHIM 症候群
遺伝子変異	不明	RAG1	BTK	NT	NT	NT	CXCR4
造血幹細胞移植	CBSCT (1y)	CBSCT (2y)	-	-	-	-	-
年齢/性別	5y/男	7y/女	3y/男	7y/女	6y/男	30y/男	18y/女
甲状腺機能低下症 発症年齢	8m	1y	出生時	出生時	5m	不明	出生時
甲状腺機能低下症の タイプ	中枢性	中枢性	原発性	原発性	中枢性	中枢性	原発性
新生児 マスキリーニング	ND	陰性	陽性	陽性	陰性	陰性	陽性
臨床症状	ND	便秘, 腹部膨満	なし	ND	便秘	なし	なし
検査所見	(治療開始後)						
Free T4 (ng/dL)	0.55	0.57	1.1	2.1	0.8	0.7	
Free T3 (pg/mL)	1.07	2.42	3.9	3.6	4.39	2.5	
T4 (µg/dL)							4.5
T3 (ng/mL)							1.5
TSH (µIU/mL)	0.89	1.24	32.65	9.09	2.62	4.18	29

CBSCT: cord blood stem cell transplantation

表 6. 成長ホルモン分泌不全症（GHD）合併例の臨床像

症例	1	2	3	4	5	6
疾患	SCID (T-B-)	CVID	先天性無ガンマ グロブリン血症	高IgE 症候群	CGD	Shwachman- Diamond症候群
遺伝子変異	NT	NT	不明	STAT3	CYBB	SBDS
造血幹細胞移植	CBSCT(1y)	-	-	-	-	-
年齢/性別	15y/女	15y/男	29y/男	14y/男	16y/男	8y/女
GHD診断時年齢	5y	4y	17y	4y	7y	6y
Target height (cm)	149	165	164	ND	168	ND
診断時の身長 (cm)	94.1	102	105.5	93.5	106	89.8
SD	-3.0	-3.1	-11.3	-2.5	-3.0	-5.2
検査所見						
IGF-I (ng/mL)	91 (74 - 230)	110 (29 - 173)	5 (287 - 555)	88 (29 - 173)	16 (50 - 356)	47 (74 - 230)
負荷試験における GH分泌不全	有	有	有	有	有	有
その他の合併症	なし	なし	精神発達遅滞, 先天性白内障, 感音性難聴	アトピー性 皮膚炎	精神発達遅滞, 血尿,蛋白尿, 肝臓瘍,多指症	骨髄異形成 症候群, 小腸吸収障害
治療	GH	GH	無治療	GH	GH	GH

NT: not tested, ND: no data available, ( ): 各年齢における正常範囲, CBSCT: cord blood stem cell transplantation

表 7. 性腺機能低下症合併例の臨床像

症例	1	2	3
疾患	先天性無ガンマグロブリン血症	高IgE症候群	ICF症候群
遺伝子変異	不明	不明	<i>DNMT3B</i>
性別	29y/男	18y/男	30y/男
性腺機能低下症診断時年齢	17y	16y	13y
性腺機能低下症のタイプ	中枢性	原発性	原発性
Target height (cm)	164	ND	ND
性腺機能低下症発症時の身長 (cm)	105.5	146.2	141
SD	-11.3	-3.9	-2.9
性腺機能低下症発症時の体重 (kg)	15.6	52.6	33.4
SD	-4.6	-0.7	-1.7
Tanner stage	1	2	3
<b>検査所見</b>			
LH (mIU/mL)	0.12 (1.7 - 11.2)	8.4 (1.7 - 11.2)	<b>23.2</b> (0.2 - 12.4)
FSH (mIU/mL)	0.24 (2.1 - 18.6)	<b>47.4</b> (2.1 - 18.6)	<b>246.7</b> (2.6 - 10.1)
testosterone (ng/dL)	4 (28 - 1110)	338 (28 - 1110)	5.7 (28 - 1110)
<b>負荷試験</b>			
LHRH	低反応	NT	NT
hCG	NT	NT	ND
治療	無治療	無治療	テストステロン

NT: not tested, ND: no data available, DNMT3B: DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 $\beta$ ,

( ): 各年齢における正常範囲

## STAT1 異常症の解析

平田 修 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学)  
津村 弥来 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学)  
唐川 修平 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学)  
岡田 賢 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学)  
小林 正夫 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学)

### 研究要旨

STAT1 (signal transducer and activator of transcription-1) は IFN を代表とするサイトカインのシグナル伝達を担う重要な細胞内分子であり, STAT1 異常症は細胞内寄生菌や種々のウイルスに対する易感染性を示し, Mendelian susceptibility to mycobacterial disease (MSMD) などの原発性免疫不全症の一つとして注目されている. AD-STAT1 異常症の患者 (2 家系 5 症例) において, 新規 STAT1 遺伝子ヘテロ接合性変異 2102 A>G (Y701C), 2018 A>G (K673R) を同定し, 機能解析を行った. SH2 ドメインに変異を認める K673R では, リン酸化能・核移行能の低下があり, TS ドメインに変異を認める Y701C は, Y701 リン酸化部位の変異であり完全にリン酸化が障害されていた. どちらの変異も共導入実験で IFN- $\alpha$  刺激に対する ISRE 転写活性はほぼ正常であるものの, IFN- $\gamma$  刺激に伴う GAS 転写活性の優性阻害効果を認めており, 細胞内寄生菌への易感染性が示唆された.

### A. 研究目的

*STAT1* は, マクロファージ内における細胞内寄生菌の殺菌に重要な役割を果たしている IFN- $\gamma$ /IL12 経路のシグナル伝達に関わり, MSMD の責任遺伝子の一つに挙げられている. AD-STAT1 異常症の患者では, 非定型抗酸菌などの細胞内寄生菌にのみ易感染性を示し, STAT1 の完全に欠損している AR-STAT1 異常症では, IFN- $\alpha$ / $\beta$  経路も障害されるため, ウイルスに対しても易感染性を呈する. 本研究では, 新規遺伝子変異を認めた AD-STAT1 異常症患者の解析を行い, 本新規遺伝子変異の機能異常, STAT1 異常症の病態解明を目的とする.

### B. 研究方法

#### 1) 症例

症例 1 は 3 歳の男児. 生後 2 カ月ごろに発疹を伴う不明熱の既往, 一過性の白血

球増多, 好酸球増多があり, 改善後も CRP 弱陽性は持続していた. 3 歳時に背部痛があり, 椎体・頭蓋骨・脛骨などに多発性の骨病変を認めた. 家族の遺伝子解析で同じ変異を認めた母には, 18 歳頃に多発性骨髄炎の既往があり, 現在では画像上腰椎の変形や頸椎に融合性変化などを認めている.

症例 2 は 6 歳男児. 乳児期に BCG による副反応の既往があり, 6 歳時に外傷後の左肘腫脹に気づかれ, 画像検査で椎体, 左肘部などに多発性の骨病変を認めた. 家族の遺伝子解析で同様の変異を認めた姉にも BCG による副反応の既往があり, 父は変異を持ちながら生来健康であった.

#### 2) シークエンス

患者末梢血白血球より cDNA を抽出し, *STAT1* をシークエンスした. cDNA の解析で新規 STAT1 ヘテロ接合性変異を同

定し, genomicDNA でも同様の変異を確認した.

### 3) サイトカイン産生能

患者末梢血から CD14 陽性細胞をビーズ法で純化し, LPS および濃度差をつけた IFN- $\gamma$  刺激で 48 時間培養後, それぞれの上清の TNF- $\alpha$  を Luminex で測定した.

### 4) Y701 リン酸化の検討

患者由来の EBV-transformed B cell (EBB cell), STAT1 null osteosarcoma 細胞である U3C 細胞に導入したコンストラクトを IFN- $\gamma$  または IFN- $\alpha$  で 15 分刺激し, STAT1 のリン酸化能を Western blotting assay で検討した.

### 5) pSTAT1 核移行能の検討

U2OS 細胞に導入したコンストラクトを IFN- $\gamma$  で 20 分刺激後, pSTAT1, DAPI で染色し, 蛍光顕微鏡で pSTAT1 の核移行能を検討した.

### 6) GAS, ISRE 配列への結合能の検討

EBB cell を用いて, IFN- $\gamma$  または IFN- $\alpha$  による刺激 15 分での GAS 配列への結合能, IFN- $\alpha$  刺激 15 分での ISRE 配列への結合能を Electrophoresis Mobility Shift Assay で検討した.

### 7) GAS, ISRE 転写活性の検討

U3C 細胞に導入したコンストラクトを IFN- $\gamma$  で 16 時間または IFN- $\alpha$  で 12 時間刺激し, ルミノメーターで GAS 転写活性, ISRE 転写活性を測定した. mutant STAT1 の WT に対する影響を検討するため, 一定量の WT に mutant STAT1 量を段階的に共導入した共発現実験も行った.

## C. 研究結果

### 1) シーケンス

DNA 解析により, 症例 1 の発端者 P1, 母 P2 に新規 STAT1 ヘテロ接合性変異 2102 A>G (Y701C) を同定した (図 1). 症例 2 では発端者 P3, 姉 P4 に新規 STAT1 ヘテロ接合性変異 2018 A>G (K673R) を

同定し, 無症状であった父にも同様の変異を確認した (図 2).

### 2) サイトカイン産生能

患者 CD14 陽性細胞では TNF- $\alpha$  の産生能をほとんど認めず, STAT1 に変異をもちながら無症状であった症例 2 の父も同様であった.

### 3) Y701 リン酸化

患者由来の EBB cell ではいずれの刺激に対してもリン酸化の障害を認め, Y701C で顕著であった. U3C 細胞への導入実験では, Y701C で完全なリン酸化障害, K673R でリン酸化能低下を認めた.

### 4) pSTAT1 核移行能

リン酸化が完全に障害されていた Y701C, では STAT1 の核移行を認めず, K673R では核移行能が低下していた.

### 5) GAS, ISRE 配列への結合能

患者由来の EBB cell では, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  いずれの刺激に対しても GAS 配列への結合能は WT と比べて低下しており, Y701C で顕著であった. IFN- $\alpha$  刺激に対する ISRE 配列への結合能は変異株でも正常とほぼ同程度であった.

### 6) GAS, ISRE 転写活性

Y701C では, GAS 転写活性が完全に障害されていたが, K673R では WT と比較して約 14% の残存活性を認めた. しかし, 共発現実験ではいずれの変異も GAS 転写活性の STAT1 量に依存する阻害効果を認め (図 3), ISRE 転写活性での共発現実験では阻害効果を認めなかった. (図 4)

## D. 考察

これまでに報告されている AD-STAT1 異常症は, TS ドメインに変異のある L706S の 2 家系, DBD ドメインに変異のある E320Q, Q463H のそれぞれ 1 家系である. DBD ドメインの変異では, DNA 結合障害を認め, TS ドメインの変異では,

STAT1 のリン酸化障害により、IFN- $\gamma$ 刺激による GAS 転写活性が阻害されることが報告されている。自験例では、病変部位から抗酸菌などの細胞内寄生菌の感染を特定できなかった。しかし、1 症例目の Y701C は STAT1 のリン酸化部位である Y701 の変異であり、L706S 同様にリン酸化の完全な障害を認め、GAS 転写活性の優性阻害効果も認めることから抗酸菌などの細胞内寄生菌に対する易感染性を呈すると考えられた。2 症例目の K673R では DNA 結合能、GAS 転写活性はわずかに残存しているものの、共発現実験で GAS 転写活性の優性阻害効果を認めており、細胞内寄生菌に対する易感染性を示すことが示唆された。また、いずれの変異も EBB cell での ISRE 結合能、共発現実験での ISRE 転写活性は正常とほぼ同程度であり、ウイルスに対しては正常な反応を示すと考えられた。

また、自験例に共通する臨床的特徴として多発性骨病変の存在があり、既報の症例でも 2 例に多発性骨髄炎の既往があった。この点は、MSMD 責任遺伝子である IFNGR1 異常症の表現型と類似しており、原因の特定できない多発性骨髄炎症例に対して、これらの疾患も鑑別の一つに挙げられる。

#### E. 結論

AD-STAT1 異常症の新規遺伝子変異を同定した。これらの変異は IFN- $\gamma$ 誘導性 STAT1 シグナル伝達を優性的に阻害し、GAS 転写活性の低下によりマイコバクテリウムに対して易感染性を示していると推測された。

#### F. 研究危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

Mizoguchi Y, Nakamura K, Karakawa S, Okada S, Kawaguchi H, Kobayashi M: Clinical and genetic characteristics of patients with severe congenital neutropenia in Japan. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, December 10-13, 2011

Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Mochizuki S, Yamamoto S, Matsuzaka E, Hanada S, Ohnishi R, Tani K, Eto K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K: Suppressed Neutrophil Development in Hematopoiesis of Induced Pluripotent Stem Cells Derived From a Severe Congenital Neutropenia Patient with ELA2 Mutation. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, CA, December 10-13, 2011.

Hanada I, Terui K, Toki T, Kudo K, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Sugita K, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Ito E: JAK2 mutations and CRLF2 rearrangements in Down Syndrome-Associated Acute Lymphoblastic Leukemia in Japan. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, CA, December 10-13, 2011.

岡田 賢, 小林正夫, Luyan Liu, Xiao-Fei Kong, Alexandra Y. Kreins, Sophie Cypowyj, Laurent Abel, Capucine Picard, Stéphanie Boisson-Dupuis, Anne Puel, Jean-Laurent Casanova: 常染色体優性遺伝を呈する慢性皮膚粘膜カンジダ症の責任遺伝子の発見 -STAT1 機能獲得性変異による慢性皮膚粘膜カンジダ症- 第 39 回日本臨床免疫学会総会 2011 年 9 月 15-17 日

Tsumura M, Okada S, Sakai H, Nishikomori R, Yasunaga S, Ohtsubo M, Heike T, Nakahata T, Takihara Y,



Kobayashi M: Identification of a novel type of AD-STAT1 deficiency with mutations in the SH2 domain 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14-16日

## 2. 論文発表

Karakawa S, Okada S, Tsumura M, Mizoguchi Y, Ohno N, Yasunaga S, Ohtsubo M, Kawai T, Nishikomori R, Sakaguchi T, Takihara Y, Kobayashi M: Decreased Expression in Nuclear Factor- $\kappa$ B Essential Modulator Due to a Novel Splice-Site Mutation Causes X-linked Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 31:762-772,2011

Liu L, Okada S, Kong XF, Kreins AY, Cypowyj S, Abhyankar A, Toubiana J, Itan Y, Audry M, Nitschke P, Masson C, Toth B, Flatot J, Migaud M, Chrabieh M, Kochetkov T, Bolze A, Borghesi A, Toulon A, Hiller J, Eyerich S, Eyerich K, Gulácsy V, Chernyshova L, Chernyshov V, Bondarenko A, Grimaldo RM, Blancas-Galicia L, Beas IM, Roesler J, Magdorf K, Engelhard D, Thumerelle C, Burgel PR, Hoernes M, Drexel B, Seger R, Kusuma T, Jansson AF, Sawalle-Belohradsky J, Belohradsky B, Jouanguy E, Bustamante J, Bué M, Karin N, Wildbaum G, Bodemer C, Lortholary O, Fischer A, Blanche S, Al-Muhsen S, Reichenbach J, Kobayashi M, Rosales FE, Lozano CT, Kilic SS, Oleastro M, Etzioni A, Traidl-Hoffmann C, Renner ED, Abel L, Picard C, Maródi L, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL: Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med.* 208:1635-48, 2011

Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Ohshima K, Okada S,

Kobayashi M, Ohara O, Hara T: Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan. *J Clin Immunol.* 31:309-14, 2011.

Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsui N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S: Quantification of  $\kappa$ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol.* 128:223-225.e2,2011

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

## 参考文献

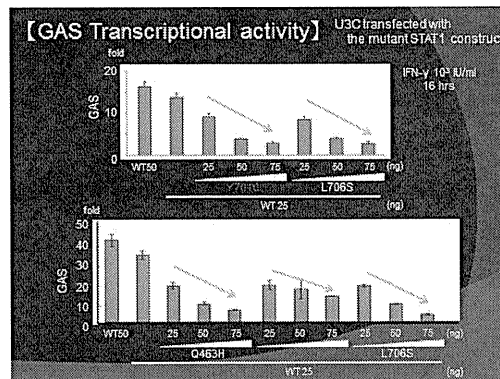
Dupuis, S., Dargemont, C., Fieschi, C., Thomassin, N., Rosenzweig, S., Harris, J., Holland, S.M., Schreiber, R.D. and Casanova, J.L. (2001) Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science*, **293**, 300-303.

Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I.Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., Chapgier, A., Eidenschenk, C., Eid, P. *et al.* (2003) Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet*, **33**, 388-391.

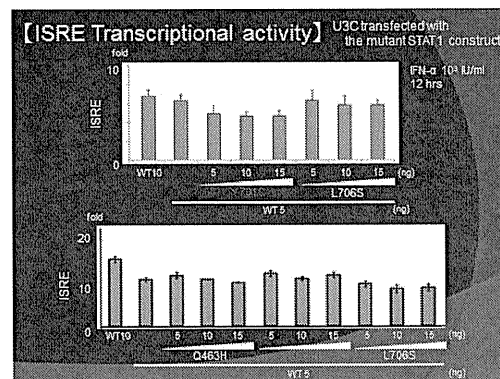
Chapgier, A., Boisson-Dupuis, S., Jouanguy, E., Vogt, G., Feinberg, J., Prochnicka-Chalufour, A., Casrouge, A., Yang, K., Soudais, C., Fieschi, C. *et al.* (2006) Novel STAT1 alleles in otherwise healthy patients with mycobacterial disease. *PLoS Genet*, **2**, e131.

Filipe-Santos, O., Bustamante, J., Chapgier, A., Vogt, G., de Beaucoudrey, L., Feinberg, J., Jouanguy, E., Boisson-Dupuis, S., Fieschi, C., Picard, C. *et al.* (2006) Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol*, **18**, 347-361.

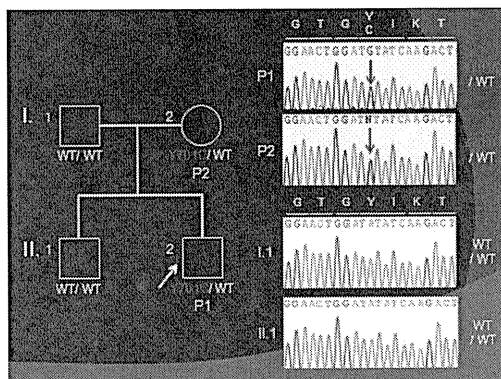
Esther van de Vosse, Marieke A Hoeve, and Tom H M Ottenhoff. (2004) Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis*, **4**, 739-49.



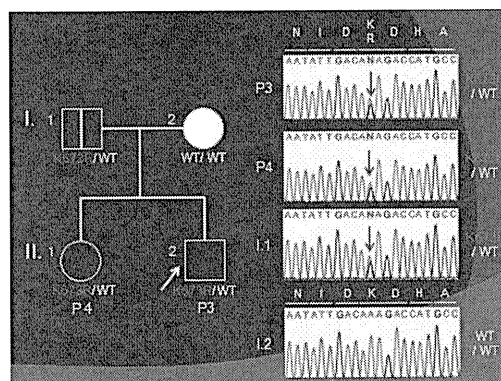
⊠ 4



⊠ 1



⊠ 2



⊠ 3

# 高 IgE 症候群における骨異常の発症機構の解明

峯岸 克行 (東京医科歯科大学大学院免疫アレルギー学)

## 研究要旨

高 IgE 症候群は、黄色ブドウ球菌による皮膚膿瘍と肺炎にアトピー性皮膚炎・血清 IgE 高値を合併する原発性免疫不全症である。骨異常を特徴とする 1 型の高 IgE 症候群の主要な原因が STAT3 のドミナントネガティブ(DN)変異であることが明らかになったが、その病態形成機構には不明な点が多い。骨異常の発症機構を検討する目的で、STAT3-DN を全身に発現する高 IgE 症候群のモデルマウスを作製した。この検討により①骨芽細胞の機能低下による骨の機械的強度の低下と②骨芽細胞上の RANKL(Receptor activator of NF- $\kappa$ B Ligand)の発現低下と破骨細胞の分化障害を明らかにしてきたが、その分子メカニズムは不明であった。今回我々は、このメカニズムを検討し STAT3 は炎症による骨破壊だけでなく、生理的な骨破壊にも重要な役割を果たしていることを明らかにした。このことは、一般の骨粗鬆症の治療に STAT3 の機能制御が有効である可能性を示唆している。

## A. 研究の目的

骨異常の合併を特徴とする 1 型の高 IgE 症候群において、その原因遺伝子が STAT3 であることが明らかになったものの、STAT3 の分子異常がどのようなメカニズムで骨異常を引き起こしているかは明らかでない。そこで我々は、どのようなメカニズムで骨異常が発症するかを検討するために、STAT3-DN のマウスモデルを樹立し、それにより高 IgE 症候群の骨異常の原因を検討した。本研究は高 IgE 症候群の骨症状に対する有効な治療法、さらには一般の骨粗鬆症の新たな制御法を見いだすことを目的とする。

## B. 研究方法

STAT3 の異常は LIF のシグナル伝達を阻害して ES 細胞の生存と増殖に悪影響を及ぼす可能性があるため、野生型 STAT3 の cDNA とネオマイシン耐性遺伝子を loxP 配列ではさみ、その下流にヒトで発見された  $\Delta$ V463 の変異を導入した exon 16 を配置することにより、コンディショナルに STAT3 変異体の発現ができるようにコンストラクトを設計した。キメラマウスの germline transmission を確認し、このマウスと卵細胞特異的に Cre を発現する ZP3-Cre マウスの

雌を交配し、全身に STAT3-DN を発現するモデルマウスを作製した。このマウスにおいては、ヒトの高 IgE 血症と同様に、高 IgE 血症、Th17 サイトカインの産生障害などが見られることが予備的解析により明らかになっている。

## C. 研究結果

### 1. 高 IgE 症候群モデルマウスにおける骨芽細胞機能の低下

カルセインを 96 時間間隔で 2 回投与し、骨の新生能を生体内で検討すると STAT3-DN マウスにおいては骨芽細胞の骨新生能が低下していた。試験管内においても頭蓋冠由来骨芽細胞の分化能は低下していた。さらにこのマウスの大腿骨の機械的強度を検討すると STAT3-DN マウスにおいては、野生型マウスと比較して弱い外力で骨折することが明らかとなった。

### 2. 高 IgE 症候群モデルマウスにおける破骨細胞分化障害

STAT3-DN マウスの破骨細胞数は野生型マウスと比較して顕著に減少していた。しかし破骨細胞の試験管内分化を検討すると、STAT3-DN マウスの骨髄細胞は RANKL と

M-CSF の添加により正常に破骨細胞分化した。そこで、ビタミン D3 とプロスタグランジン E2(PGE2)で刺激した骨芽細胞上での破骨細胞分化を検討すると、STAT3-DN 由来の骨髄細胞は正常に破骨細胞に分化するが、STAT3-DN 由来の骨芽細胞は正常骨髄細胞の破骨細胞分化を誘導できなかつた。さらに、STAT3-DN マウス骨芽細胞ではビタミン D3 と PGE2 刺激後の RANKL の発現が低下していた。

### 3. 骨芽細胞の RANKL 発現が低下しているメカニズムの解明

これまでの報告ではビタミン D3 や副甲状腺ホルモン(PTH), PGE2 などの生理的骨吸収のシグナル伝達には STAT3 は関与しないと考えられていた。しかし今回我々は、これらの生理的骨吸収を誘導する分子は急速に IL-6 ファミリーサイトカインの発現を誘導し、この発現が RANKL の持続的発現と破骨細胞分化に必要であることが明らかにした。さらに、STAT3 は RANKL のプロモーター領域に直接結合してその転写を誘導することを明らかにした。

### D. 考察

STAT3 の分子異常により発症する高 IgE 症候群は、骨と歯牙の異常の合併に臨床的特徴があるが、その原因は世界的にも不明であった。今回の我々の検討により、高 IgE 症候群においては、1) STAT3 の機能低下のために骨芽細胞の機能障害が見られること。2) 骨芽細胞の RANKL 発現が低下しているために破骨細胞分化が低下していること。3) STAT3 はビタミン D3 や PTH などの生理的骨破壊の誘導にも必須の役割を果たしていることが明らかになった。これらが、高 IgE 症候群において骨粗鬆症と病的骨折、さらには乳歯の脱落遅延と独特の顔貌の原因となっているものと考えられた。この知見は高 IgE 症候群だけでなく、一般の骨粗鬆症の制御にも有用である可能性が示唆された。

### E. 結論

ヒトの STAT3 分子の異常により発症する高

IgE 症候群において、骨芽細胞の機能異常により骨新生能の低下と破骨細胞数の減少が起こっており、これが高 IgE 症候群に独特の骨粗鬆症、病的骨折、独特の顔貌、乳歯の脱落遅延の原因になっているものと考えられた。

### F. 研究発表

#### 1. 学会発表

1. Y Minegishi, "Molecular Defects in Hyper IgE Syndrome" The First international conference on primary immunodeficiency diseases. 2011 New Delhi, India

2. Y Minegishi, "Molecular pathology of Hyper IgE Syndrome" Pediatric Academic Society 2011, Denver Convention Center, Denver, USA

3. Y Minegishi, "Japan's Contribution to PID Research" World Immunology Conference, Jun 1-5, Rockefeller University, New York, USA

4. Y Minegishi, "Molecular pathogenesis of Hyper IgE Syndrome" The Third EMBO Conference on Host Genetic Control of Infectious Diseases Sep 28-30, 2011, Pasteur Institute, Paris, France

#### 2. 論文発表

1. Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Nonoyama S, Karasuyama H, Minegishi Y. Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *J Exp Med* 208, 235-249, 2011

2. Nishikado H, Mukai K, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H., NK cell-depleting anti-asialo GM1 Ab exhibits a lethal 'off-target' effect on basophils *in vivo* *J*

*Immunol* 186, 5766-5771, 2011

3. Watarai A, Niiyama S, Morita M, Bando Y, Minegishi Y, Katsuoka K. Hyper IgE syndrome diagnosed in early infancy by gene analysis of STAT3 mutation. *Eur J Dermatol*, 21, 254-255, 2011

4. Minegishi Y, Saito M. Molecular mechanisms of the immunological abnormalities in hyper IgE syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 1246, 2011

5. Yamagishi H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Obata K, Ugajin T, Sato S, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. Basophil-derived mouse mast cell protease 11 induces microvascular leakage and tissue edema in a mast cell-independent manner *Biochemical and Biophysical Research Communications* 415, 709-713, 2011

6. Minegishi Y, Saito M. Cutaneous manifestations of hyper IgE syndrome. *Allergology Int.* 2012 (in press)

7. 峯岸克行 原発性免疫不全症の新展開  
炎症と免疫 19、3-4、2011

8. 峯岸克行 高 IgE 症候群における易感染性のメカニズム 呼吸器内科 20, 83-86, 2011

9. 齋藤雅子 峯岸克行 高 IgE 症候群の病  
因・病態解析 アレルギー・免疫 18,72-76, 2011

H. 知的財産権の出願登録状況  
該当なし

# 高 IgE 症候群 STAT3 変異体の解析

上松 一永 (信州大学医学研究科感染防御学)

## 研究要旨

常染色体優性高 IgE 症候群の責任遺伝子 Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) は、DNA binding domain, SH2 domain, space loop, transactivation domain などのさまざまな部位でのヘテロ接合性の変異が報告されている。各々の STAT3 変異体について、Y705 リン酸化、gp130 結合能、二量体化、局在、DNA 結合能ならびに transcription の検討を wild-type と比較し行った。多くの STAT3 変異体は、刺激後の局在に差異はみられたものの、gp130 との結合、リン酸化、二量体化には必ずしも影響を及ぼさなかった。しかしながら、DNA 結合能や transcriptional 活性が wild-type に比べ低下していた。生体内での実際の反応とは異なる可能性はあるものの、IL-6/IL-10 などシグナル伝達系において、STAT3 が関与するさまざまな過程で STAT3 変異は影響を与え、高 IgE 症候群の病態に関わっているものと考えられた。

## A. 研究目的

高IgE症候群は、黄色ブドウ球菌を中心とする細胞外寄生細菌による皮膚膿瘍と肺炎、新生児期から発症するアトピー性皮膚炎、血清IgEの高値を3主徴とする免疫不全症である。多くの症例で特有の顔貌、脊椎の側弯、病的骨折、骨粗鬆症、関節の過伸展、乳歯の脱落遅延などの骨・軟部組織・歯牙の異常を合併する。常染色体優性高IgE症候群の責任遺伝子Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)は、DNA binding domain, SH2 domain, space loop, transactivation domainなどのさまざまな部位でのヘテロ接合性の変異が報告されている。突然変異はSTAT3分子の片アレルのみで起こり、DNA結合領域とSH2領域に集中している。STAT3の変異は、機能的にはドミナントネガティブ作用を有し、片アレルに存在するだけで、もう一方の正常のアレルの機能を阻害するように働く。

本研究では、高IgE症候群患者においてSTAT3変異部位による差異を検討することを目的に、それぞれのSTAT3変異体の移入による解析を行った。

## B. 研究方法

1. HeLa 細胞に患者由来の変異 STAT3 をリポフェクタミンにて移入し、蛍光顕微鏡で局在とリン酸化を調べた。
2. HeLa 細胞に患者由来の変異 STAT3 をリポフェクタミンにて移入し、免疫沈降後に 2 量体化を解析した。
3. COS7 細胞に患者由来の変異 STAT3 をリポフェクタミンにて移入し、ゲルシフト法で変異体と DNA の結合を検討した。
4. HepG2 細胞細胞に患者由来の変異 STAT3 をリポフェクタミンにて移入し、ルシフェラーゼ法で転写活性を検討した。
5. 患者末梢血単核球を刺激し、STAT3 のリン酸化をフローサイトメーターで解析した。(倫理面への配慮)

免疫不全症の遺伝子解析には、信州大学医学部の倫理委員会の承諾を得ており、検体の取り扱いなどについては委員会の指針に従っている。

## C. 研究結果 (表)

### 1. 局在とリン酸化

細胞内に均一に分布していた wild-type の STAT3 は、IL-6 での刺激後、核内に移行して核の辺縁に局在する。これに対し、DNA binding domain の変異では刺激後、細胞質