

STAT1 機能獲得性変異による CMCD 患者の迅速診断法の確立

岡田 賢、溝口洋子、津村弥来、平田 修、小林正夫

広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学

研究要旨

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。2011 年に、*STAT1* の機能獲得性変異により CMCD が発症することが発見された。さらに後の検討で CMCD 患者の約 40-50% で同変異が同定されることが明らかとなるとともに、本邦でも多数の *STAT1* 機能獲得性変異による CMCD 患者が同定されている。

我々は本研究で、患者細胞を用いて迅速かつ鋭敏に *STAT1* の機能解析を行う手法を開発した。具体的には、i) IFN- γ 刺激後の *STAT1* リン酸化 (p*STAT1*) の解析、ii) IFN- γ 刺激で p*STAT1* を誘導、その後 staurosporine (protein kinase inhibitor) 処理下で *STAT1* 脱リン酸化を解析、上記 2 点をフローサイトメトリーで解析することで、*STAT1* 脱リン酸化障害を検討した。その結果、*STAT1* 機能解析に基づいた CMCD 患者の迅速診断法を確立した。

A. 研究目的

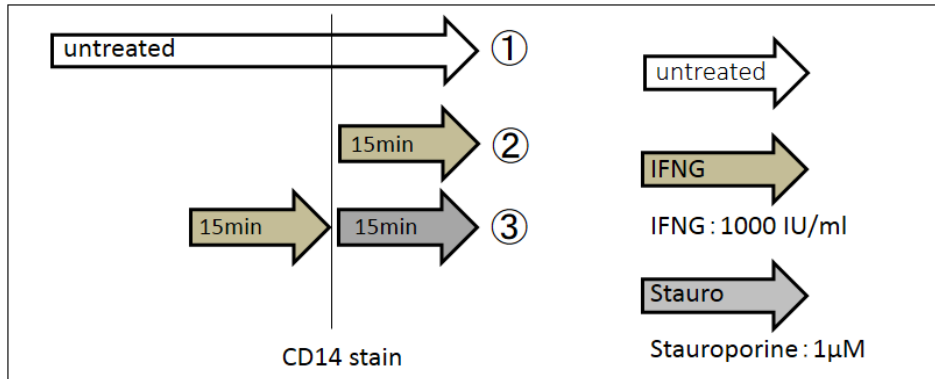
慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMCD) は、皮膚・爪・口腔粘膜・外性器を主病変とした、反復性または持続性の *C. albicans* 感染を臨床的特徴とする。2011 年に、*STAT1* の機能獲得性変異により CMCD が発症することが明らかとされ、その後の検討により欧米では CMCD 患者の約 40-50% で同変異が同定されることが明らかとなった。本邦においても、20 例以上の *STAT1* 機能獲得性変異を有する CMCD 患者が同定されている。

今回我々は、これらの患者の診断を容易にするため、フローサイトメトリーを用いた *STAT1* 機能獲得性変異の迅速診断法の確立を試みた。

B. 研究方法

STAT1 機能獲得性変異を有する CMCD 患者、*STAT1* 変異を持たない CMCD 患者、健常者を対象に、フローサイトメトリーによる解析を行った。これまでの検討で、*STAT1* 機能獲得性変異では、*STAT1* の脱リン酸化が障害されており、その結果として *STAT1* の過剰なリン酸化に至ることが明らかとなっていたため、*STAT1* の脱リン酸化障害に着目して検討を行った。

具体的には、末梢血単核球細胞を比重遠心法により分離した後に IFN- γ で刺激し、*STAT1* のリン酸化を促した。その後、staurosporine (protein kinase inhibitor) 処理を行い、*STAT1* の新たなリン酸化を阻害した状況下で、脱リン酸化を検討した (詳細は Fig. 1)。



The PBMCs were stimulated with or without 10^3 IU/ml of IFN- γ for 15min.
 The cells washed and incubated with or without $1\mu\text{M}$ staurosporine for min.
 We investigated STAT1 phosphorylation by flow cytometer.

Staurosporine: The main biological activity of staurosporine is the inhibition of protein kinases through the prevention of ATP binding to the kinase.

Figure 1

C. 研究結果

1) *STAT1* 機能獲得性変異を有する患者の同定 (Figure 2)

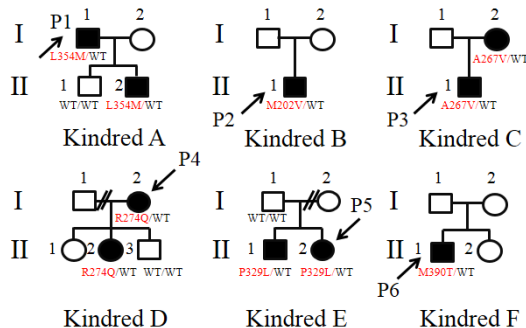


Figure 2

本邦の CMCD 患者 (15 症例, 10 家系) を対象に *STAT1* 全エクソンシーケンスによる遺伝子解析を行い、*STAT1* 変異を有する 10 症例 (6 家系) の同定を行った。同定した *STAT1* 変異のうち、そのうち、P329L, L354M, M390T は新規遺伝子変異であった。

2) 同定した変異の機能解析

STAT1 null fibrosarcoma cells (U3C) に、野生型ないしは変異型 *STAT1* を一過性に強制発現させ

機能解析を行った。機能解析は IFN- γ 刺激 (1000 U/ml, 8 hour) による GAS 転写活性を、レポーターアッセイにより測定した (Figure 3)。その結果 M390T を除く全ての変異は、機能獲得性変異であった。M390T 変異は、低濃度の IFN- γ 刺激 (10 U/ml) で GAS 転写活性亢進を顕著に認め、他の変異と同様に機能獲得性変異であった (data not shown)。

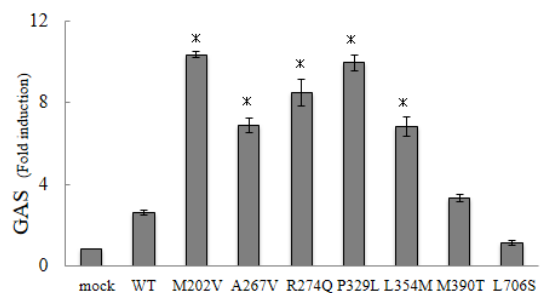


Figure 3

3) フローサイトメトリーによる *STAT1* 機能解析

患者の末梢血単核球を分離し、Figure 1 の方法に従い IFN- γ , staurosporine で処理したのち、フローサイトメトリーで *STAT1* のリン酸化 (p*STAT1*) 状態を検討した。検討は、p*STAT1* を特に強く認める単球 (CD14 陽性細胞) に注目して行った。

Figure 4 に示すように、*STAT1* 機能獲得性変異を有する患者では、IFN- γ 刺激後の pSTAT1 の増強が認められた。STAT1 のリン酸化の増強は staurosporine 処理を行うことで強調され、この条件下で患者と対象との間に pSTAT1 の重複を認めなかった。

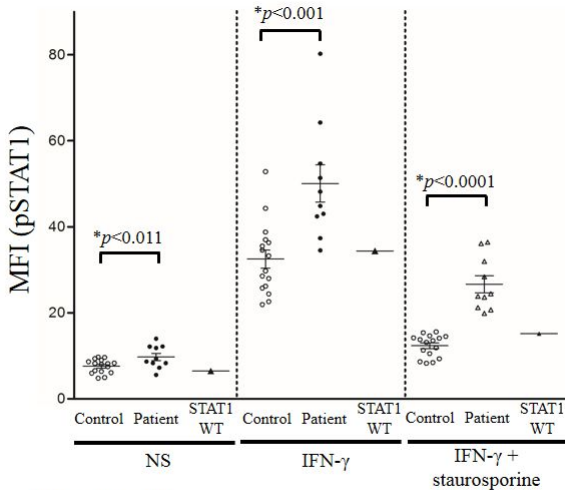


Figure 4

D. 考察

本邦における CMCD 患者 15 症例 (10 家系) の解析で、10 症例 (6 家系) において *STAT1* 機能獲得性変異を同定した。欧米において、CMCD 患者の 40-50% で *STAT1* 機能獲得性変異が同定されるが、本邦においても *STAT1* 異常は CMCD の重要な分子基盤になると考えられた。

STAT1 機能獲得性変異は、主に *STAT1* の coiled coil domain (CCD), DNA-binding domain (DBD) に同定されるが、その他の機能ドメインでも、少数ながら変異が認められる。新規変異を認めた場合、確実な診断を行うためには機能解析を行うことが望ましく、特に変異好発部位以外で変異が同定された場合は機能解析が必須となる。機能解析は、GAS 転写活性を検討するレポーター解析が最も鋭敏かつ信頼性が高いが、遺伝子改変ベクターを用いた発現実験を行う必要があり非常に煩雑である。今回の検討で我々は、患者細胞を用いて迅速かつ鋭敏に機能解析を行う方法を開発した。さらに本解析手法は、同

定した *STAT1* 変異の機能解析に使用可能なだけでなく、CMCD 患者における *STAT1* 変異の有無のスクリーニングを目的とした迅速診断に使用可能であった (Mizoguchi Y, et al. J Leukoc Biol. 2013)。

E. 結論

IFN- γ , staurosporine 処理下で pSTAT1 をフローサイトメトリーで観察することで、*STAT1* の機能解析が可能であった。本解析手法は、*STAT1* の機能解析のみならず、*STAT1* 機能獲得性変異を有する CMCD 患者のスクリーニングに有用と考えられた。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 学会発表

Kobayashi M, Mizoguchi Y, Karakawa S, Okada S, Kawaguchi H, Nakamura K: Genetic characteristic of patients with severe congenital neutropenia in Japan. 27th International Congress of Pediatrics, August 24-29, Melbourne, Australia

2. 論文発表

- 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, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant V, Kong X, Crypwy S, Dupuis S, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M: Simple diagnosis of *STAT1* gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. Journal of Leukocyte Biology, 2013 (in press).
- Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M: Identification of the integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with

- anisocytosis. *British Journal of Haematology* 160: 521-9, 2013.
3. Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K: Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia-derived pluripotent stem cells with heterozygous *ELANE* mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 3023-8, 2013.
 4. Hirata O, Okada S, 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.
 5. Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, 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: Naïve and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *Journal of Experimental Medicine* 210: 2739-53, 2013.
 6. 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: Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations underlying autosomal dominant hyper-IgE syndrome impair human CD8(+) T-cell memory formation and function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132: 400-11, 2013.
 7. Berglund LJ, Ma CS, Avery DT, Moens L, Deenick EK, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Wong M, Adelstein S, Arkwright PD, Fulcher DA, Ziegler JB, Smart JM, Kobayashi M, Casanova JL, Cook MC, Uzel G, Tangye SG: IL-21 signalling via STAT3 primes human naïve B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. *Blood* 122: 3940-50, 2013.
 8. Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito M, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica*, Epub ahead of print Aug 23, 2013.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし
- 参考文献
Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. Liu L, Okada S, et al. *J Exp Med*. 208: 1635-48, 2011
STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. van de Veerdonk FL,

Plantinga TS, et al. *N Engl J Med.* 365: 365:54-61, 2011

Chronic mucocutaneous candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the STAT1 DNA-binding domain. Takezaki S, Yamada M., et al. *J Immunol.* 189: 1521-6, 2012