HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	STAT1機能獲得型変異による慢性皮膚粘膜カンジダ症の病態解析 ： 2つの新奇ミスセンス変異の同定，サイトカイン産生プロファイル，抗IL-17F自己抗体
Author(s)	山崎，康博
Description	配架番号：2118
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11512号
Issue Date	2014-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11512
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57208
Type	doctoral thesis
File Information	Yasuhiro_Yamazaki.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

STAT1 機能獲得型変異による 慢性皮膚粘膜カンジダ症の病態解析: 2 つの新奇ミスセンス変異の同定, サイトカイン産生プロファイル, 抗 IL-17F 自己抗体

(Studies on STAT1 gain-of-function mutation responsible for chronic mucocutaneous candidiasis: two novel mutations, cytokine production profiles, and anti-IL-17F autoantibodies)

2014 年 9 月

北 海 道 大 学

山崎 康博

目　　次

発表論文目録及び学会発表目録 ……1頁
緒言 ……2頁
略語表 ……6頁

第一章
緒言 ……7頁
患者背景 ……8頁
実験方法 ……11頁
結果 ……20頁
考察 ……28頁

第二章
緒言 ……31頁
実験方法 ……31頁
結果 ……34頁
考察 ……37頁

第三章
緒言 ……39頁
実験方法 ……40頁
結果 ……43頁
考察 ……45頁

総括及び結論 ……48頁
謝辞 ……48頁
引用文献 ……49頁

【発表論文目録および学会発表目録】

本研究の一部は以下の論文に投稿中である.

1. Yasuhiro Yamazaki, Masafumi Yamada, Toshinao Kawai, Tomohiro Morio, Masafumi Onodera, Masahiro Ueki, Nobuyuki Watanabe, Hidetoshi Takada, Shunichiro Takezaki, Natsuko Chida, Ichiro Kobayashi, Tadashi Ariga

Two Novel Gain-of-Function Mutations of *STAT1* Responsible for Chronic Mucocutaneous Candidiasis Disease: Impaired Production of IL-17A and IL-22, and the Presence of anti-IL-17F Autoantibody

The Journal of Immunology

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. Yasuhiro Yamazaki, Masafumi Yamada, Shunichiro Takezaki, Natsuko Chida, Ichiro Kobayashi, Tadashi Ariga

Chronic mucocutaneous candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the STAT1 DNA-binding domain.

Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiency (ESID). (Oct 3-6, 2012, Florence, Italy)

2. 山崎康博, 山田雅文, 河合利尚, 森尾友宏, 小野寺雅史, 植木将弘, 渡辺信之, 高田英俊, 竹崎俊一郎, 千田奈津子, 小林一郎, 有賀正

STAT1 機能獲得型変異による慢性皮膚粘膜カンジダ症の新奇 2 変異と, Th17 関連サイトカイン産生能と抗 IL-17F 自己抗体

第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会　平成 26 年 6 月 19 日

北海道大学医学部フラテ会館

3. 山崎康博, 植木将弘, 千田奈津子, 竹崎俊一郎, 山田雅文, 小林一郎, 有賀正

STAT1 機能獲得型変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症の多彩な臨床像

第 4 回北海道免疫不全症研究会　平成 25 年 6 月 22 日　札幌

【緒言】

慢性皮膚粘膜カンジダ症（Chronic mucocutaneous candidiasis; CMC）は、皮膚・爪，口腔外陰部などの粘膜に，反復性・持続性のカンジダ感染を呈する一群の原発性免疫不全症である．重症複合型免疫不全症の様なT細胞の完全な機能不全症にも併発しうるが，それほど重篤でない原発性免疫不全症に伴う事もある．CMCを原発性免疫不全症の唯一の臨床症状として発症する場合はCMC disease（CMCD)と呼ばれる[1 2 3]．2011年の日本原発性免疫不全症全国調査では，1240名の原発性免疫不全症患者のうちCMCD患者は17名（1.4%）を占めていた[4]．CMCを主徴とする主な原発性免疫不全症と，その原因遺伝子を表1に示す．

表1．CMCを主徴とする原発性免疫不全症

疾患名	遺伝子	遺伝形式	文献
APECED, APS-1	*AIRE*	AR	Nagamine et al.1997[5]
CD25異常症	*IL-2RA*	AR	Sharfe et al.1997[6]
高IgE症候群	*TYK2*	AR	Minegishi et al.2006[7]
高IgE症候群	*STAT3*	AD	Minegishi et al.2007[8]
高IgE症候群	*DOCK8*	AR	Engelhardt et al 2009[9]
CARD9異常症	*CARD9*	AR	Glocker et al.2009[10]
IL-12Rβ1異常症	*IL12Rb1*	AR	De Beaucoudrey et al.2010[11]
IL-17RA異常症	*IL17RA*	AR	Puel et al.2011[12]
IL-17F異常症	*IL17F*	AD	Puel et al.2011[12]
STAT1異常症	*STAT1*	AD	Van der Veerdonk et al. [13] Liu et al.2011[14]
IL-12p40異常症	*IL12B*	AR	Prando et al.2013[15]
ACT1異常症	*ACT1*	AR	Boisson et al.2013[16]

上記でCMCDと呼ばれるのはIL-17RA異常症，IL-17F異常症，STAT1異常症，ACT1異常症であるが，STAT1異常症では繰り返すヘルペスウイルス感染や甲状腺疾患，自己免疫疾患の合併等CMC以外の症状の報告もある．

これらヒトの原発性免疫不全症の解析により，ヒトにおける皮膚粘膜のカンジダ感染防御には以下の図1に示すような免疫細胞とその分子が重要な役割を

果たしている事が明らかになってきた．枠で囲ってある赤字で示した分子がヒト CMC 発症の原因となる分子である．

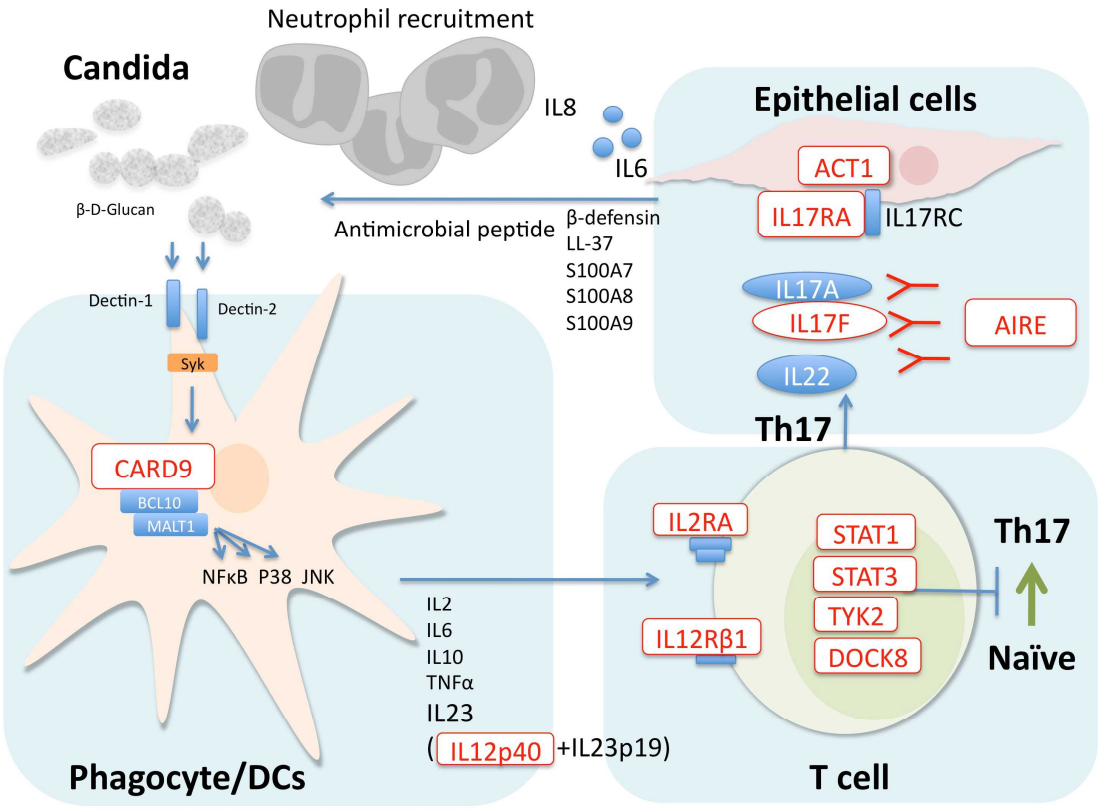


図 1. 皮膚粘膜のカンジダ感染防御機構とヒト CMC 発症の責任遺伝子

CMCの原因は以下のように大別できる

1. 抗原提示細胞におけるカンジダ抗原の認識と，そこから放出されるサイトカインの異常．

2. T細胞におけるサイトカイン受容体/シグナル伝達物質/転写因子の異常によるTh17への分化障害．

3. Th17から放出されるIL-17A，IL-17F，IL-22の，それ自体もしくは中和抗体による異常と，その受容体の異常

我々はこのうち Th17 分化に影響を与える事によって CMC を発症すると考えられている STAT1 異常症についての研究を行った．第一章では CMC 患者 2 家系，3 例の患者における STAT1 の新奇 2 変異とその機能解析について，第二章では

STAT1機能獲得型(gain-of-function:GOF)変異を有するCMC患者(以後STAT1 GOF変異CMC患者と記す）におけるTh17関連サイトカイン産生能について，第三章ではSTAT1 GOF変異CMC患者血清における抗Th17関連サイトカイン抗体について述べた.

Th17関連サイトカインに関する背景知識

・主なTh17関連サイトカインはIL-17A，IL-17F，IL-22である
・IL-17A：主にTh17細胞（CD4陽性IL-17A陽性細胞）より産生され，上皮細胞やマクロファージなど様々な細胞に働き，サイトカイン(TNFαやG-CSFなど)，ケモカイン（CXCL1，2，3，5，IL-8)，抗菌ペプチドを産生させる[17]
・IL-17F：IL-17ファミリーの中で最もIL-17Aと相同性が高く(50%)，受容体(IL-17RA，IL-17RC)も共有している[18]．またIL-17AとIL-17Fはホモダイマー，またはヘテロダイマーとして分泌され，受容体を共有している事から似た生理活性をきたすと考えられている．一方IL-17Fの方が炎症誘導能が低い事，また上皮細胞など広範な細胞から産生される事などその違いも明らかになってきている.
・IL-22：Th17細胞に高発現するが，他にもγδT細胞，NK細胞，Th22細胞(CD4陽性IL-22陽性，IFNγ，IL-4，IL-17A非産生細胞)などからも産生される．主な働きは呼吸器，腸管，皮膚，肝臓の上皮細胞からの抗菌ペプチド（βdefensin，Lipocalin，LL-37，S100A7，8，9）産生である[19].

カンジダ感染におけるこれら3つのサイトカインの作用は，上皮細胞などを介した間接的なものだと考えられている.

STAT1に関する背景知識[20,21]

・STAT1は細胞内シグナル伝達物質兼転写因子であり，そのファミリーはSTAT1，STAT2，STAT3，STAT4，STAT5A，STAT5B，STAT6の7つから構成される．STAT1のC端のTransactivator domainにスプライスバリアントがあり，91kDaのSTAT1αと，84kDaのSTAT1βの2つが存在するため，ウェスタンブロットでは2本の

バンドを検出する.

・STAT1 を活性化する因子としては IFNα,IFNβ,IFNγ,IFNλ, IL-2,3,6,9,12,15,17,21,22,26,27, Epidermal Growth Factor, Vascular Endotherial Growth Factor, Fibroblast Growth Factor,Hepatocyte Growth Factor, Growth Hormone, Angiotensin, Oncostatin M などがある. IFNα,IFNγで刺激されると核内に移行し転写活性化因子として働くが, 全ての刺激で転写活性化因子として働くわけではなく, 例えば Hepatocyte Growth Factor 刺激ではリン酸化はするが, 核内に移行はしない.

・IFNγが細胞表面の IFNγ受容体に結合すると, 細胞内のチロシンキナーゼ Jak が活性化され, STAT1 のチロシン部位がリン酸化される. リン酸化 STAT1 は 2 量体を形成して核内へ移行し,DNA の Interferon-Gamma Activated Sequence(GAS) domain に結合し, 転写因子として標的遺伝子の転写を促す. DNA から解離した STAT1 はホスファターゼによって脱リン酸化を受け転写活性を喪失する. また IFNα刺激でリン酸化した STAT1 はホモダイマーのみならず, STAT2, IRF-9 とともに 3 量体も形成し, Interferon Stimulated Response Element (ISRE) domain に結合する. この STAT1 の細胞内での挙動についてはまだ不明な点が残されている.

【略語表】

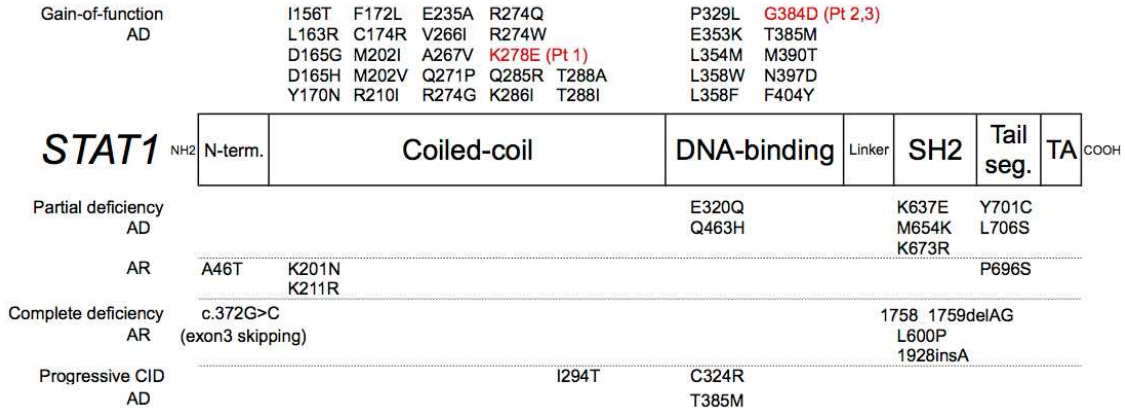
Ab	Antibody
AD	Autosomal dominant
APC	Allophycocyanin
APECED	Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy
APS-1	Autoimmune polyendocrine syndrome type-1
AR	Autosomal recessive
CBA	Cytometric Beads Array
CCD	Coiled-coil domain
CMC	Chronic mucocutaneous candidiasis
DBD	DNA-binding domain
DDW	Distilled deionized water
FBS	Fetal bovine serum
GFP	Green fluorecent protein
GOF	gain-of-function
IFN	Interferon
IFNα	Interferon alfa
IFNγ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IOM	Ionomycin
IP10	Interferon gamma-induced protein 10
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	phycoerythrin
PMA	Phorbol myristate acetate
p/s	0.1% penicillin/streptomycin
SNP	Single nucleotide polymorphism
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
TBST	Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20
WT	Wild type
XR	X-linked recessive

第一章

慢性皮膚粘膜カンジダ症をきたすSTAT1の新奇2変異

【第一章　緒言】

2011 年，AD 遺伝形式の CMC 家系や，孤発例の CMC 症例に対する全エクソン解析により，*STAT1* のヘテロミスセンス変異が CMC を引き起こす事が報告された[13,14]．この変異は STAT1 の脱リン酸化障害を生じる GOF 変異であり，APECED を除く CMC のおよそ半数を占める事が明らかとなってきた[22]．STAT1 機能喪失型変異は，ウイルスや抗酸菌などの細胞内寄生菌に対して易感染性を来す．このように同一分子がアミノ酸置換によって大きく異なる臨床像を引き起こす事は RAG1 欠損症にも認めるが[23]，非常に稀な現象である．



N-term.：N-terminal domain. Coiled-coil：Coiled-coil domain. DNA-binding：DNA-binding domain. Linker：Linker domain. SH2：Src homology 2 domain. Tail seg.： Tail segment domain. TA：Transactivation domain. CID：Combined immunodeficiency

図2. ヒト疾患の原因となるSTAT1変異部位. 上段はCMCの原因となるGOF変異. 赤字は今回我々が新たに証明したSTAT1変異を示す.

当初この STAT1 変異は Coiled-coil 領域（CCD）に集中していると報告されたが，2012 年に当科の竹崎らは STAT1 の DNA 結合領域（DBD）の変異でも CMC の原因となる事を初めて報告した[24]．これまで CCD に 21 変異，DBD に 9 変異の計 30

変異が報告されている[13 14 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36].今回我々はCMC患者2家系，3例の患者に，STAT1の未報告のアミノ酸置換であるp.K278E，p.G384Dを同定し(図2)，その機能解析を行った．また過去の報告では野生型(WT)STAT1と変異STAT1が共存する状況でのWT STAT1リン酸化についての報告はなかった．それはこれまでの報告ではSTAT1を欠損したU3C細胞にSTAT1をtransfectし評価を行っていたためである[14,22,31]．我々はWT STAT1を有するHeLa細胞に変異STAT1をtransfectすることにより，より実際の患者に近い細胞内状況を作り出し内因性WT STAT1のリン酸化について評価した．その際，内因性WT STAT1とtransfectしたSTAT1を区別するため，またtransfection効率を確認するために，transfectするSTAT1のC端にGFPを結合させた．

【患者背景】

P1（p.K278E）

20歳女性．両親に近親婚なし．1歳時より反復性鵞口瘡を発症し，CMCと診断した．4歳から5回以上帯状疱疹に罹患し，18歳でカンジダ食道炎を発症し，19歳時に右大腿の伝染性膿痂疹を発症し抗生剤治療で治癒した．小児期より2ヶ月に1回程度口内炎を発症し約1週間で治癒していた．家族にCMCを疑わせるものはいない．

P2（p.G384D）

35歳女性．乳児期より反復性鵞口瘡を発症し，頻回に口内炎を発症した．17歳時に気管支拡張症を指摘された．19歳時に食道狭窄症を発症し，バルーン拡張術を受けた．鉄欠乏性貧血を伴っていたため，当初はPlummer-Vinson症候群が疑われたが，最終的にはカンジダ食道炎による食道狭窄と診断された．10歳，30歳，34歳時に帯状疱疹に罹患した．口腔カンジダ症に対してイトラコナゾール内服治療を継続し，頬部，体感の掻痒を伴う紅斑はアトピー性皮膚炎と診断され，抗ヒスタミン剤の内服とステロイド外用療法を行っている．

P3（p.G384D）

5歳男児，P2の第1子．同胞無し．父はカンジダ感染の既往なし．1歳時に反復性鵞口瘡を発症した．4歳時に帯状疱疹に罹患した．爪カンジダ症も認めたが，イトラコナゾール内服で改善した．

CMC P1から3に，爪・歯牙の異常なく，眼瞼炎・結膜炎，甲状腺疾患，難治性の腸炎の既往もなかった．表2に示す様に低ガンマグロブリン血症なども認めなかった．これらの所見はSTAT1 GOF変異CMC患者に合併した報告のあるものである．

P4　(p.R274Q)

STAT1ヘテロp.R274Q変異によるCMCであることが既に報告されている15歳女性．両親に近親婚なし．生後1ヶ月より鵞口瘡を発症し徐々に悪化した．生後5ヶ月よりカンジダ皮膚炎を認め，1歳時にカンジダ食道炎による胃食道逆流症を発症し，いずれも抗真菌剤で治癒した．母は健康でSTAT1に変異を認めず，父はSTAT1ヘテロp.R274Q変異を有し生後21日よりCMCを発症した．7歳時に肺結核を発症し，32歳時に脳血管炎による脳梗塞のため死亡した．

P5　(p.T385M)

竹崎ら[24]が報告したCMC患者で，既に機能解析にてSTAT1の脱リン酸化障害と，リン酸化の増強をきたす事が報告されている．EBウイルス不死化細胞株をコントロールとして用いた．

表2. 新奇変異 P1,P2,P3の血液検査結果

		P1	P2	P3	正常範囲
検査時年齢（歳）		20	35	5	
免疫グロブリン					
	IgG (g/l)	19.63	13.35	10.42	6.8-16.2
	IgA (g/l)	3.51	2.11	0.84	0.84-4.38
	IgM (g/l)	1.43	1.65	0.72	0.57-2.88
	IgE (IU/ml)	2	NA	NA	<250.0
補体	C3 (mg/dl)	132	80	115	86-160
	C4 (mg/dl)	29	16	23	17-45
	CH50 (U/ml)	22.5	41	53.3	30.0-40.0
白血球数（cell/μl）		5320	5400	7300	
	Neutrophils	3468	4104	4416	
	Lymphocytes	1324	918	2445	
	Monocytes	345	216	182	
リンパ球分画（%）					
	CD3	86	87	66	
	CD4	50	59	44	
	CD8	27	28	22	
	CD45RA+CD31+/CD4+	57	NA	NA	
	CD19	3.7	2.4	26	
	CD27+/CD19+	10.6	NA	NA	
	CD16+CD3-	4.9	NA	NA	
	CD56+CD3-	6	6.7	8.5	
甲状腺機能	TSH (uIU/ml)	0.341	1.74	4.76	0.746-4.118
	FT3 (pg/ml)	2.79	2.70	4.7	2.51-3.47
	FT4 (ng/dl)	0.92	1.12	1.37	0.68-1.26

【第一章　実験方法】

遺伝子解析は国立大学法人北海道大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する規則に則り，本人もしくは代諾者に説明の上，承諾書を得て行った．また本研究は北海道大学医学部研究倫理審査委員会の承認を得て行った．

DNAの抽出

ヘパリン血300μlに，Lysis buffer（0.3 M NH_4Cl，8 mM $NaHCO_3$，1 mM EDTA）を4 ml添加し，常温で7分間転倒混和し溶血した．4℃，1500g，5分間遠心した後に，PBS （137 mM NaCl，8.1 mM Na_2PO_4，2.7 mM KCl，1.5 mM KH_2PO_4）で2回洗浄し，この細胞からSepaGene® （Eidia,Tokyo,Japan）を用いて，添付されているプロトコールに従いDNAを抽出した．

ダイレクトシークエンス解析

*STAT1*のダイレクトシークエンス解析は表3のようにプライマーを設定し，KAPA Taq HS ReadyMix with dye®（NIPPON Genetics Co,Ltd,Japan）を用いて，添付されているプロトコールに従ってPCR反応液を調製した．PCRの条件はdenaturation 94℃-30秒，annealing 58℃-30秒，extension 72℃-50秒，35サイクルとした．

表3．*STAT1*プライマーの塩基配列

Exon	Forward Primer	Reverse Primer
3	ACAACCTGATGCTAGGAAGGC	GCCATTGATGGAATTCATCTTC
4	AAAGCAATGTCAGTTTCAAAAGAAG	TGTGTGCTCAATTGTATTTGCTG
5	GGTACCTGCACTTAGAAAGTTAAAGC	TCTGATTCTCCCACTTCTTGG
6	CATGTCAGAAGATCTGGAAGGC	AAAAGACTGAACTCAGTTACGAGG
7	CATAGAAGCAATACTCTGTTGCC	GGTTATCAAGGAAGAATTCAGAGTC
8	TTTGACCTGTCACTAGGCAGC	TTTCCTCTCTTCTAAACTTTGAGTCC
9	GCCCCAGTTGAGAATGAAATG	CAGGGTAAGCAGAAGCTGGAC
10	ATTCCCTTTAATCCAGGCTGC	TGAATTAACGGTAAAATGTTCCTC
11	TTCAGGAAAATCATTGTGATTGC	TTTCCTCAAAAGCACCCTATATAAC
12	TAAGCGGTTCCACAGCTAGG	GTGGAGGAATCTGTGCTTGAG
13-14	TCATCATTCACTTACACTCTTATGCTC	ACAGGAAGACACCAGCCAC

15	GGTTGTGATTCCAAGAGATCC	ACCAACTGACCTGTCCTTGC
16	TGAGTCTTCAGACTTGCCACTG	AATACCTCCAGAACAAACACTGAG
17	AGGCTAAGCAGTTATCTGAAGGTG	ATGCAGCAGTGAGAGCGTG
18	CTCTTCCCCTACTGTGAAAGCA	CTCATCATGTCAGGGACTTCCT
19	CAAGAGCCATCCGTCCAAC	GCCAGAGAAGAACACGCC
20	CTGTGCTGAATGGGACAGTTC	AATACTGAAGCTGGACTCAGGC
21	ACATTCCAGCCATTTTCTTGG	ATGTCCCAAACGCACTATCTG
22	TGTCCTCTTTCATTTTGGGATG	CTGCATGGGTGGAGTTTCAG
23	GGAGGCTAAGCTGTCTAGAAACAC	GTTCAGCTGTGATGGCGATAG
24	TCTGGCTATTGCTTATCACATCC	GCTCATCTGAGCACTGCACTC
25	GACAAGCAATGTTTAATGTATGAGTC	CCCACAGAAATTTACCGTTCC

PCR産物を1.5%アガロースゲルに電気泳動し目的のバンドを切り出した．QIAGEN Extraction kit® (QIAGEN,Germantown,MD) を用いて，添付のプロトコールに従って抽出しダイレクトシークエンス解析を行った．

塩基置換・アミノ酸置換のデーターベースによる解析

塩基配列は，Ensembl database (http://www.ensembl.org/)，Mutation@A Glance (http://rapid.rcai.riken.jp/mutation/) から得た．アミノ酸置換がSingle Nucleotide Polymorphism (SNP) かどうかを確認するため，National Center for Biotechnology Information Database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), Ensembl database(http://www.ensembl.org/index.html), the Human Genetic Variation database (http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/)から情報を得た．またアミノ酸置換がタンパク機能へ与える影響の予測ツールとして，タンパク構造をもとに予測するPolyPhen-2アルゴリズム (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)，配列保存性をもとにタンパク機能を予測するツールとしてSIFTアルゴリズム (http://sift.jcvi.org/) を用いた．アミノ酸の種間の保存に関するデータはMutation@A Glance (http://rapid.rcai.riken.jp/mutation/) から得た．

EBウイルス不死化B細胞株（EBV-LCL）の樹立

PBMCを採取し，RPMI1640 medium(Life Technologies,Carlsbad,CA)+10% Fetal Bovine Serum(FBS)(Thermo,Rockford,IL)+0.1% penicillin streptomycin(p/s) 1 mLでペレットをsuspendし，EBウイルス溶液（B95-8株上清を0.45μm DISMIC-25AS®（ADVANTEC, Dublin, CA）で濾過したもの）を200μlと，Cyclosporine Aを2.5μg/mlとなるように加え，37℃，5% CO_2培養器で培養した．培養液が黄色く変化するたびにメディウムを300μl捨て，新しいメディウム300μlを添加することを繰り返し樹立した．

EBV-LCLの核内STAT1のリン酸化状態の解析

EBV-LCLをRPMI 10% FBS+p/sで$1x10^6$ cells/mlにsuspendし，recombinant human(rh)IFNγ(Shionogi,Osaka,Japan)は1000 U/mlで37℃，30分間，rhIFNα（Biosource International,Camarillo,CA）は1500 U/mlで37℃，15分間刺激した．対照として無刺激のものも用意した．4℃，1500g，5分間遠心して得たペレットは一旦-80℃に保存し，後日後述する核内タンパク抽出法にて核内タンパクを抽出した．

Full-length STAT1-GFP fusion proteinを発現するPlasmidコンストラクトの作成

WT STAT1と変異STAT1を見分けるためにSTAT1のC端にGFP(EGFP)をfusionさせた．C端にGFPを結合させると，STAT1のリン酸化とDNA結合の障害にならない事が報告されている[21]．またGFPはTransfection効率の確認にも用いた．まず健常者PBMCからTRIzol®（Life technologies,Carlsbad,CA)を用いて以下の様にtotal RNAを抽出した．TRIzol®をPBMCペレットに1 ml加えピペッティングし室温で5分間静置し，200μlのクロロホルムを加えて激しく15秒間混ぜ室温で2から3分間静置した．12000g，4℃,15分間遠心し，白濁したタンパクを含む層を吸い取らないように透明な上清を別のチューブに移し，500μlのイソプロピルアルコール（2-プロパノール）を加え，室温で2分間静置した．12000g，4℃，10分間遠心し上清を捨て75% エタノール1 mlを加えてvortexし，再度7500g，4℃,5分間遠心し，エタノールを室温で10分乾燥させた． RNase free waterを加えてvortexし，60℃で10分間溶解させtotal RNAを得た．cDNAを得る逆転写はPrimeScript RT reagent Kit®(Takara Bio Inc.Japan)を用いて添付のプロトコールに従って行った．Total

RNAの濃度を測定し，反応液10μlあたり500 ng以下の量になるように調整し，37℃-15分，85℃-5秒，以後4℃で逆転写反応を行った.
取り出したTotal cDNAからfull-length *STAT1* cDNAを以下のプライマーを用いてRT-PCRした． PCR産物は1.5%アガロースゲルに電気泳動し目的のバンドを切り出し，QIAGEN Extraction kit®（QIAGEN,Germantown,MD）を用いて添付のプロトコールに従って抽出した.
STAT1 cDNA F primer
ATGTCTCAGTGGTACGAACTTCAGCAGCT

STAT1 cDNA R primer
GAGACATCTTAAGCTGTCATACTACTTGTGTCATATC

Full-length *STAT1* cDNAをpCR 2.1-TOPO® vectorにTOPO TA Cloning Kit®（Life Technologies,Carlsbad,CA）を用いてTA cloningを行った．方法は添付されたプロトコールに従い，コンピテントセルはDH5αを用いた.Kanamycin（20μg/ml）とbacto agarを加えたLB培地のプレート表面にX-gal®（Promega,Madison,WI）を塗布した後，transformation後のコンピテントセルをプレートに撒いて，37℃，16から20時間培養した．白いコロニーをDistilled deionized water（DDW）50μlにsuspendし，そのうち1μlを鋳型として*STAT1* cDNA F primerとT7 primerを用いてPCRを行い挿入を確認した．目的のcDNAが挿入されたplasmidを有するコロニーはKanamycin（20μg/ml）を加えたLB培地で培養し，その後QIAprep Spin Miniprep Kit®（QIAGEN,Germantown,MD）を用いてプラスミドを精製した．精製したプラスミドはT7 primerを用いて塩基配列を確認した.

上記で作成した，full-length *STAT1* cDNA が挿入された pCR™2.1-TOPO® vector から，*STAT1* cDNA を pEGFP-N1 vector の multi cloning site に BamHI で切断して挿入するが，そのまま挿入すると，*STAT1* と GFP の間にストップコドン TAG が存在するため，pCR2.1-STAT1 WT に Mutagenesis を行い TAG を TG に変異させ，*STAT1* cDNA と EGFP のフレームが合うようにした．*STAT1* cDNA と GFP の間の TAG を TG に変化させるプライマー（*STAT1* N1 ver1，ver2 primer）を作成し，正確性と伸張性の高い PrimeStar max DNA polymerase®（Takara Bio Inc. Japan)を用いて PCR を行った.方法は添付のプロトコールに則り，条件は 98℃-10 秒，55℃

-30秒，72℃-3分，30サイクルとした.

STAT1 N1 ver1 primer
CACAGTATGGGATCCAAGGGCGAATT

STAT1 N1 ver2 primer
GGATCCCATACTGTGTTCATCATAC

前述のfull-length WT *STAT1* cDNAが挿入されたpCR2.1-TOPO® vectorを5μg, BamHI(Takara Bio Inc.Japan) 2μl, 10x K buffer 3μlをDDWで計30μlとし37℃，4時間処理した．発現vectorのpEGFP-N1® vector(Takara Bio Inc.Japan)はPlasmid DNA 5μg，BamHI 2μl，10x K buffer 3μl，単一の酵素のためCIP 2μlを加え，DDWで計30μlとし37℃，4時間で処理した．制限酵素処理したサンプルは1.5%アガロースゲルに電気泳動し,目的のバンドを切り出し,QIAGEN Extraction kit®を用いて，添付のプロトコールに従って抽出した．インサート(full-length WT *STAT1* cDNA)と切断した発現vector(pEGFP-N1®)を，両方とも50 ng以上で，モル比が10:1となるように混ぜ，DNA Ligation kit<Mighty mix>®(Takara Bio Inc.Japan)を等量加えて16℃，30分でligationし， full-length WT STAT1のC端にGFPが融合したタンパクを作り出すコンストラクトを得た．さらにこの*STAT1*に患者で検出された変異を持たせるため,プライマーとしてK278E-1，K278E-2，G384D-1，G384D-2を用意し，前述の方法でMutagenesisを行った．DH5αで増やしたPlasmidは，MiraCLEAN Endotoxin Removal Kit®(Mirus,Madison,WI)を用いて添付のプロトコールに従って,2回エンドトキシン除去を行った.

K278E-1
CAGCTTGAAAAGTTGGAGGAATTGGAA

K278E-2
CAACTTTTCAAGCTGCTGCCGAACTTG

G384D-1

ATTTTGGACACGCACACAAAAGTGATG

G384D-2

GTGCGTGTCCAAAATGTTGAACTTCCT

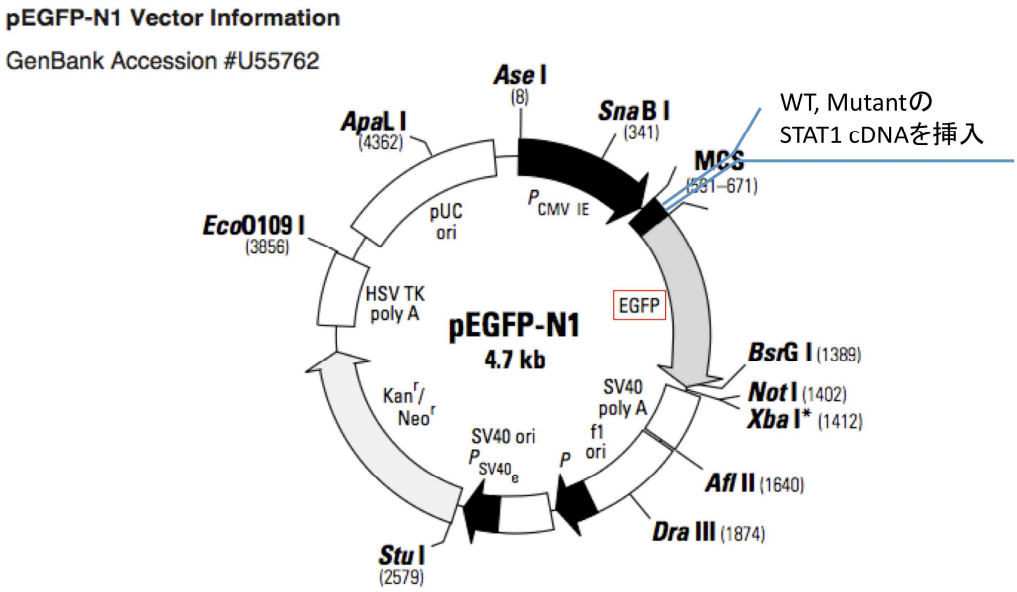


図3. Full-length STAT1-GFP fusion proteinを発現するPlasmidコンストラクトの構造

HeLa細胞へのTransfection

HeLa 細胞は 1950 年に亡くなった 30 代黒人女性の子宮頸癌細胞から分離された接着系細胞株である．この細胞株に TranIT-LT1 Reagent® (Mirus, Madison, WI) を用いてリポソーム法で Full-length STAT1-GFP fusion protein を発現する Plasmid コンストラクトを Transfect した．HeLa 細胞を DMEM(SIGMA, St. Louis, MO) 10% FBS+p/s で $2.5x10^5$/ml に suspend し，6 well plate に 2.5 ml ずつ分注した．6 から 8 時間後，細胞がコンフルエントとなる前に Transfection を行った．1 well あたり 250μl の Opti-MEM Reduced serum medium®

（Life technologies,Auckland,NZ）にPlasmid DNA 2.5μgをsuspendし，あらかじめ室温に戻したTranIT-LT1 Reagent®を5μl加え,室温で30分間静置し，それを1well あたり250μlを均一に滴下し加え,37℃のCO_2培養器で培養した．36から48時間後に1000 U/mlのrhIFNγで30分刺激を行い,0.25% Trypsin-EDTA®（Life Technologies,Auckland,NZ）300μlを加えて，剥がれたところでDMEM 10% FBS p/sを700μl加えて回収した．細胞は1回遠心し上清を捨てた後，再度トリプシンを除くためPBSで1回洗浄した．

Transfection効率の確認

回収したHeLa細胞の一部は，FACSCalibur™を用いて，GFP陽性細胞率をもとにTransfection効率を調べた．

IFNγ刺激によるEBV-LCLのIP10産生の測定

STAT1の機能をみるために，IFNγ刺激によってSTAT1を介して産生されるIP10(IFNγ-induced protein 10: CXCL10)を測定した．上述の方法で樹立したEBV-LCL（1x10^6 cells/ml）に対して1000 U/mlのrhIFNγを添加したサンプルと添加しないサンプルに分け，それぞれtriplicateとし，37℃のCO_2培養器で6時間刺激した．その後培養上清中のIP10濃度を，後述するCytometric Bead Array®で測定した．

Cytometric Bead Array®(CBA)を用いた培養上清中のサイトカインの測定

培養上清中のIP10の測定はCytometric Bead Array®（BD,San Diego,CA）を使用した．以下の試薬類はBD CBA Human Soluble Protein Master Buffer Kit®（BD,San Diego,CA）に含まれている．CBAはビーズに捕捉されたサイトカインをPE標識したDetection抗体によりサンドイッチ状に挟む事で，サイトカインの濃度に応じてビーズのPEシグナルが強くなることを利用している． Standardサイトカインで検量線を引き，ビーズのPEのシグナル強度をもとに，サイトカインの濃度を測定する．それぞれ培養上清50μlをサンプルとし，kitに含まれるstandardサイトカインをAssay diluent 200μlで希釈し，2500 pg/mlのstandardを得た．Assay diluent®で希釈列（2500, 1250, 625, 312.5, 156, 80, 40, 20, 10 pg/ml）を作り，BlankはAssay Diluent®そのものとした．サイトカインCapture Beads®をCapture Beads Diluent®で50倍希釈したもののうち50μlをサンプルもしくは

standard 50μlと混合し，室温遮光下で1時間反応させた．さらにそれぞれのサイトカインのPE Detection Reagent®をDetection Reagent Diluent®で50倍希釈したものを50μl添加し，室温遮光下で2時間反応させた．Assay Diluent®で洗浄の後にFACSCalibur™とFCAP Array Software®を用いて解析を行った．

Staurosporine処理によるSTAT1のリン酸化状態の解析

STAT1の脱リン酸化状態をチロシンキナーゼ阻害剤であるStaurosporine（Almone Labs,Jerusalem,Israel）を使用して評価した．Staurosporine を加えるとリン酸化が抑えられるため,フォスファターゼによるSTAT1の脱リン酸化を評価する事ができる．難水溶性のStaurosporineを，DMSOで200μMとなるように溶解し，使用直前にメディウムで倍に希釈し100μM液を準備し，それを1/100 v/vとなるように加え，DMSOの最終濃度を0.5%とした．

HeLa 細胞への full-length STAT1-GFP fusion protein を発現する Plasmid の Transfection は前述の通りに行った．Transfection の 36 時間後に rhIFNγは 1000 U/ml を加え 30 分間 37℃の CO_2 培養器で培養し，rhIFNαは 1500 U/ml を加え 37℃，15 分間 37℃の CO_2 培養器で培養しトリプシンを加え回収した．

Staurosporine は IFNγ，IFNα刺激後，メディウムは交換せず 1μM の濃度となるように加え，さらに 15 分培養した．それぞれトリプシン処理後の細胞の一部を Transfection 効率確認のため使用した．回収した細胞は 1 回遠心し上清を捨てた後，再度トリプシンを除くため PBS で 1 回洗浄した後，後述する方法で核内蛋白を抽出し，STAT1 のリン酸化状態の解析を行った．

核内蛋白の抽出

核内蛋白を抽出するため，細胞をPBSで洗浄し，4℃，1500g，5分間遠心し上清を除去しペレットを得た．ペレットの5倍量の低浸透圧のCytoplasmic extract buffer; CE buffer (10 mM HEPES [pH 7.9], 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM NaF [pH 8], 4% Complete [Roche, Mannheim, Germany]) でsuspendし，15分間on iceで静置した後に，1/16量の10 % Nonidet P-40®（Nacalai Tesque, Kyoto, Japan）を添加した．Vortexした後に4℃，1500 g，5分間遠心し，上清を吸引した後に100μl CE bufferでsuspendし，4℃，1500g，5分間遠心した．上清を十分に除去した後，ペレットの2倍量の高浸透圧の Nuclear extract buffer (20 mM HEPES [pH 7.9], 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1

mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM NaF [pH 8], 4% complete) を，泡をたてないように加え，4℃，60分間培養した．4℃，20000g，5分間遠心し，上清を核内蛋白のサンプルとして得た．核内蛋白の濃度はProtein assay®（Bio-RAD,Hercules,CA）を用いて，添付のプロトコールに従ってタンパク濃度を計測した．

ウェスタンブロット法によるリン酸化STAT1の解析

核内蛋白のsampleに4xSDS sample buffer（200 mM Tris-HCl, 8% Sodium Dodecyl Sulfate, 20% Glycerol）と，最終濃度が5%となるように2-mercaptoethanolを添加した．4分間boilした後に4℃，20000 g，5分間遠心し，上清をウエスタンブロット解析のサンプルとした．1 wellあたり10μgの蛋白をloadし，10% SDS-PAGEで展開したのちに，Immobilon-P Transfer PVDF Membranes®（Millipore,Billerica,MA）に15V，1時間電気泳動法で転写した．

リン酸化STAT1を評価するウェスタンブロット解析では吸引式免疫反応システムであるSNAP i.d.®2.0 Protein Detection System(Millipore,Billerica,MA)を使用した．ブロッキングはTBSTに0.5%スキムミルク(Yukijirushi,Sapporo,Japan)を溶解したものを使用した．

一次抗体としてTBSTで2500倍希釈したAnti-lamin A Antibody（BioLegend,San Diego,CA），purified mouse anti-STAT1 Ab, purified mouse anti-STAT1 pY701 Antibody（いずれもBD,San Diego,CA）を用いた．2次抗体としてはLamin Aに対してはTBSTで2500倍希釈したHorseradish Peroxidase(HRP) Goat anti-rabbit IgG Antibody（GE Healthcare,Buckinghamshire,U.K）を使用し，STAT1, STAT1 pY701に対してはECL™ Anti-mouse IgG,HRP linked whole antibody from sheep(GE health care UK Limited)を使用した．蛍光はLuminata™ Forte Western HRP Substrate®(Millipore,Billerica,MA)を用いて，添付されたプロトコールに従って発光したバンドをLAS-1000UV®（Fujifilm,Tokyo,Japan）で検出した．

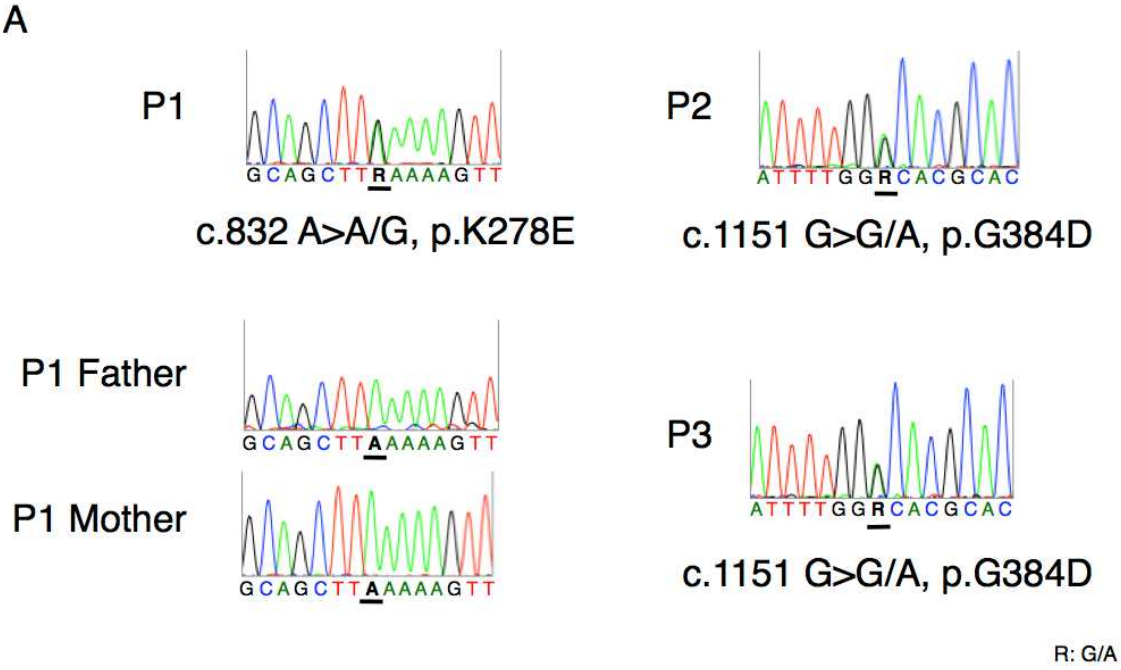
【第一章　結果】

STAT1 p.K278E, p.G384Dは新奇変異の可能性がある

3症例の患者のSTAT1ダイレクトシークエンスを行った結果,P1では*STAT1* exon10にc.832A>Gの塩基置換によるp.K278Eのヘテロアミノ酸置換を認め, P2,P3では*STAT1* exon14にc.1150G>Aの塩基置換によるp.G384Dのヘテロアミノ酸置換を認めた（図4A). P1の両親にSTAT1の変異は認めなかった（図4A). STAT1 K278,G384は種間を超えてよく保存されていた（図4B). またこれらアミノ酸置換はヒトSTAT1異常症の原因遺伝子としてまだ報告されておらず, National Center for Biotechnology Information DatabaseやEnsembl database, 1208名の日本人のSNP情報を掲載したHuman Genetic Variation databaseにもSNPとしての報告はなかった. また当科で追加で施行した100例の正常対照でも同塩基置換は認めなかった.

The Sort Intolerant from Tolerant algorithm (SIFT)は同じタンパクファミリーのアミノ酸の配列保存性から, あるアミノ酸置換がタンパク機能に影響を与えるかどうかを予測するツールであり, The Polymorphism Phenotype-2 algotithm (PolyPhen-2)は他の生物種との配列保存性や, 化学的な特徴, タンパク質構造やドメイン情報を元に, タンパク機能への影響を予測するツールである. これらはあくまでも予測ツールであり, 機能解析にて疾患原因と証明された変異でも, それぞれtolerated, benignの結果となってしまうものもある. SIFTではP1のp.K278Eはscore 0.16でtoleratedの結果で, P2,P3のp.G384Dもscore 0.15でtoleratedの結果だった. またPolyPhen-2では, p.K278Eはscore 0.011 (sensitivity: 0.96; specificity: 0.78)でbenignで, p.G384Dはscore 1.000(sensitivity: 0.00; specificity: 1.00)でprobably damagingの結果だった.

A


P1
GCAGCTTRAAAAGTT
P2
ATTTTGGRCACGCAC
c.832 A>A/G, p.K278E
c.1151 G>G/A, p.G384D
P1 Father
GCAGCTTAAAAAGTT
P1 Mother
GCAGCTTAAAAAGTT
P3
ATTTTGGRCACGCAC
c.1151 G>G/A, p.G384D
R: G/A

B

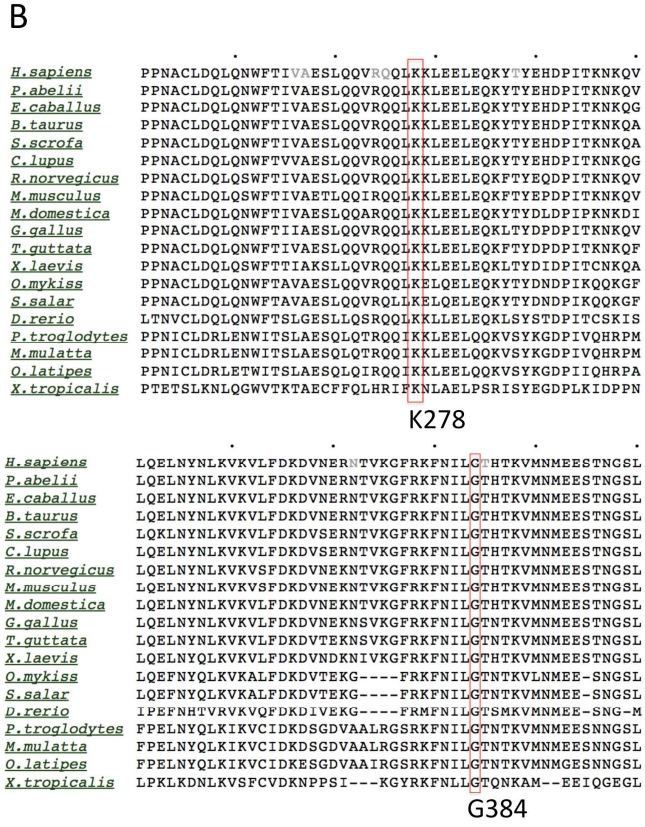

H.sapiens PPNACLDQLQNWFTIVAESLQQVRQQLKKLEELEQKYTYEHDPITKNKQV
P.abelii PPNACLDQLQNWFTIVAESLQQVRQQLKKLEELEQKYTYEHDPITKNKQV
E.caballus PPNACLDQLQNWFTIVAESLQQVRQQLKKLEELEQKYTYEHDPITKNKQG
B.taurus PPNACLDQLQNWFTIVAESLQQVRQQLKKLEELEQKYTYEHDPITKNKQA
S.scrofa PPNACLDQLQNWFTIVAESLQQVRQQLKKLEELEQKYTYEHDPITKNKQA
C.lupus PPNACLDQLQNWFTVVAESLQQVRQQLKKLEELEQKYTYEHDPITKNKQG
R.norvegicus PPNACLDQLQSWFTIVAESLQQVRQQLKKLEELEQKFTYEQDPITKNKQV
M.musculus PPNACLDQLQSWFTIVAETLQQIRQQLKKLEELEQKFTYEPDPITKNKQV
M.domestica PPNACLDQLQNWFTIVAESLQQARQQLKKLEELEQKYTYDLDPIPKNKDI
G.gallus PPNACLDQLQNWFTIIAESLQQVRQQLKKLEELEQKLTYDPDPITKNKQV
T.guttata PPNACLDQLQNWFTIVAESLQQVRQQLKKLEELEQKFTYDPDPITKNKQF
X.laevis PPNACLDQLQSWFTTIAKSLLQVRQQLKKLEELEQKLTYDIDPITCNKQA
O.mykiss PPNACLDQLQNWFTAVAESLQQVRQQLKELQELEQKYTYDNDPIKQQKGF
S.salar PPNACLDQLQNWFTAVAESLQQVRQLLKELQELEQKYTYDNDPIKQQKGF
D.rerio LTNVCLDQLQNWFTSLGESLLQSRQQLKKLLELEQKLSYSTDPITCSKIS
P.troglodytes PPNICLDRLENWITSLAESQLQTRQQIKKLEELQQKVSYKGDPIVQHRPM
M.mulatta PPNICLDRLENWITSLAESQLQTRQQIKKLEELQQKVSYKGDPIVQHRPM
O.latipes PPNICLDRLETWITSLAESQLQIRQQIKKLEELQQKVSYKGDPIIQHRPA
X.tropicalis PTETSLKNLQGWVTKTAECFFQLHRIFKNLAELPSRISYEGDPLKIDPPN
K278
H.sapiens LQELNYNLKVKVLFDKDVNERNTVKGFRKFNILGTHTKVMNMEESTNGSL
P.abelii LQELNYNLKVKVLFDKDVNERNTVKGFRKFNILGTHTKVMNMEESTNGSL
E.caballus LQELNYNLKVKVLFDKDVNERNTVKGFRKFNILGTHTKVMNMEESTNGSL
B.taurus LQELNYNLKVKVLFDKDVNERNTVKGFRKFNILGTHTKVMNMEESTNGSL
S.scrofa LQKLNYNLKVKVLFDKDVSERNTVKGFRKFNILGTHTKVMNMEESTNGSL
C.lupus LQELNYNLKVKVLFDKDVSERNTVKGFRKFNILGTHTKVMNMEESTNGSL
R.norvegicus LQELNYNLKVKVSFDKDVNEKNTVKGFRKFNILGTHTKVMNMEESTNGSL
M.musculus LQELNYNLKVKVSFDKDVNEKNTVKGFRKFNILGTHTKVMNMEESTNGSL
M.domestica LQELNYNLKVKVLFDKDVNEKNTVKGFRKFNILGTHTKVMNMEESTNGSL
G.gallus LQELNYNLKVKVLFDKDVNEKNSVKGFRKFNILGTNTKVMNMEESTNGSL
T.guttata LQELNYNLKVKVLFDKDVTEKNSVKGFRKFNILGTNTKVMNMEESTNGSL
X.laevis LQELNYQLKVKVLFDKDVNDKNIVKGFRKFNILGTHTKVMNMEESTNGSL
O.mykiss LQEFNYQLKVKALFDKDVTEKG----FRKFNILGTNTKVLNMEE-SNGSL
S.salar LQEFNYQLKVKALFDKDVTEKG----FRKFNILGTNTKVMNMEE-SNGSL
D.rerio IPEFNHTVRVKVQFDKDIVEKG----FRMFNILGTSMKVMNMEE-SNG-M
P.troglodytes FPELNYQLKIKVCIDKDSGDVAALRGSRKFNILGTNTKVMNMEESNNGSL
M.mulatta FPELNYQLKIKVCIDKDSGDVAALRGSRKFNILGTNTKVMNMEESNNGSL
O.latipes FPELNYQLKIKVCIDKESGDVAAIRGSRKFNILGTNTKVMNMGESNNGSL
X.tropicalis LPKLKDNLKVSFCVDKNPPSI---KGYRKFNLLGTQNKAM--EEIQGEGL
G384

図4. *STAT1*シークエンス解析結果と，種間のアミノ酸保存状況．A)P1の*STAT1* exon10にc.832A>G, p.K278Eのヘテロアミノ酸置換を認め，P2,P3の*STAT1* exon14にc.1150G>A, p.G384Dのヘテロアミノ酸置換を認めた．B)これらのアミノ酸は種間を超えてよく保存されていた.

K278E, G384DはSTAT1の機能亢進をきたす

IP10はIFNγ刺激によって産生されるが，そのシグナルにはSTAT1が関与するためSTAT1の機能とIP10産生にはある程度の相関があると考えられる．P1（K278E/WT）とP3（G384D/WT）のEBV-LCLのIFNγ刺激によるIP10産生量は，健常者のEB-LCL（WT1, WT2）に比べて有意に増加していた（図5）．この結果はK278EとG384Dのアミノ酸置換がSTAT1の機能を亢進する事を示唆する.

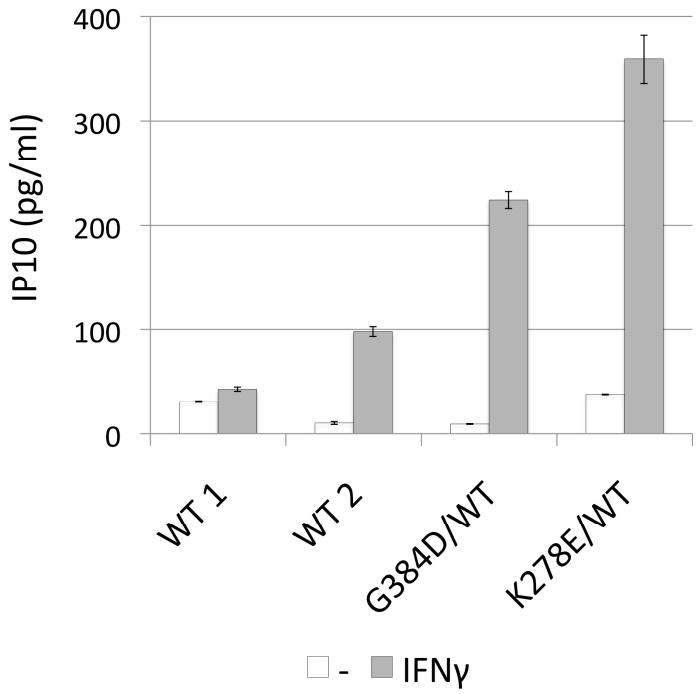


図5. IFNγ刺激によるEBV-LCLのIP10産生量の測定.P1(K278E/WT)とP3(G384D/WT)のEBV-LCLのIFNγ刺激によるIP10産生量は，WT1，WT2に比べて有意に増加していた．エラーバーは独立した3検体の標準偏差を示す.

K278E,G384DはSTAT1の強いリン酸化を生じる

P1（K278E/WT）とP3（G384D/WT）のEBV-LCLをIFNγ，またはIFNαで刺激した際の核内STAT1は，同様に刺激したWTのEBV-LCLに比べて，強いリン酸化を示した（図6A,B）．またGFPをSTAT1のC端に結合させた発現ベクターをHeLa細胞に一過性にTransfectし，IFNγで刺激した場合も同様にK278E，G384Dを有する変異STAT1の強いリン酸化を認めた（図6C）．Transfection効率は，HeLa細胞のGFP陽性率で評価し(図7)，ウェスタンブロットのレーン下部に記載した．すでにリン酸化の亢進が証明されているT385M[24]は比較のために使用した(図6C)．いずれの結果においても，DBDの変異であるG384Dは，CCDの変異であるK278Eよりもリン酸化がやや強い傾向にあった．

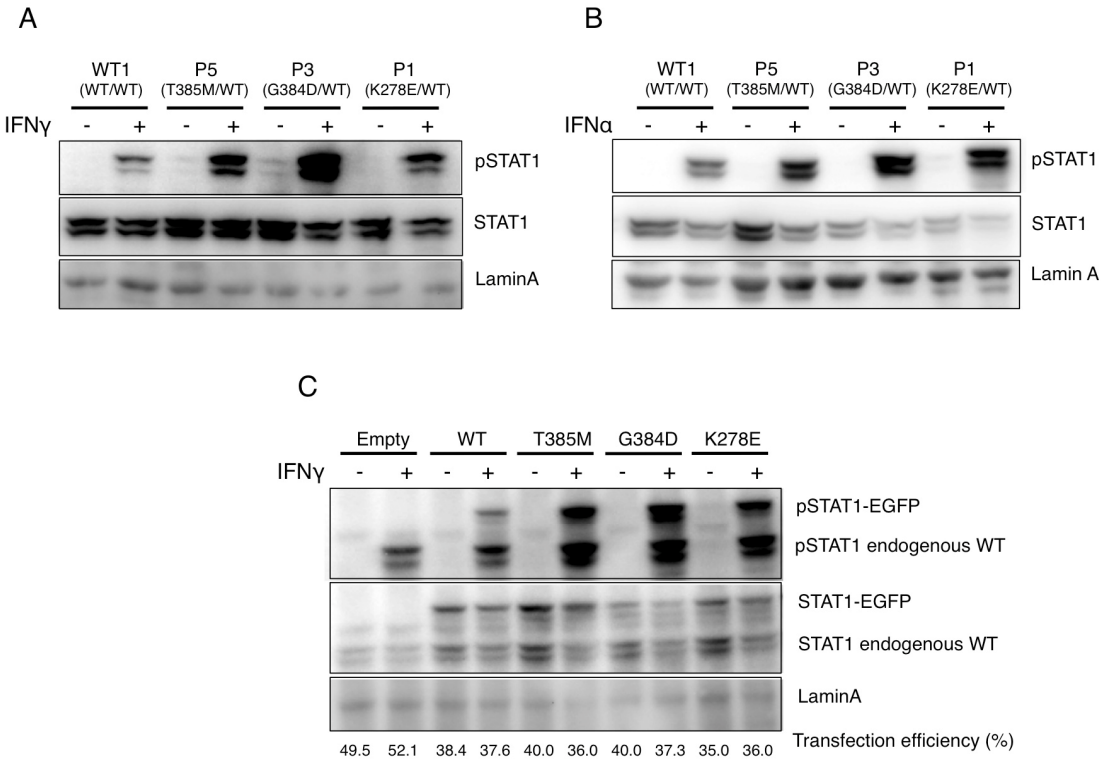


図6．核内STAT1のリン酸化状態の解析．A,B)P1（K278E/WT）とP3（G384D/WT）のEBV-LCLをIFNγ，またはIFNαで刺激して得た核内STAT1は， WTに比べて強いリン酸化を示した．P5は既にSTAT1のリン酸化増強が示されている患者のEBウイルス不死化細胞株で，コントロールとして用いた．C)GFPをSTAT1のC端に結合させた発現ベクターをHeLa細胞に一過性にTransfectし，IFNγで刺激したところ

K278E, G384D変異STAT1の強いリン酸化を認めた．またHeLaの内因性(endogenous) WT STAT1は変異STAT1をtransfectした場合，リン酸化が強くなった．

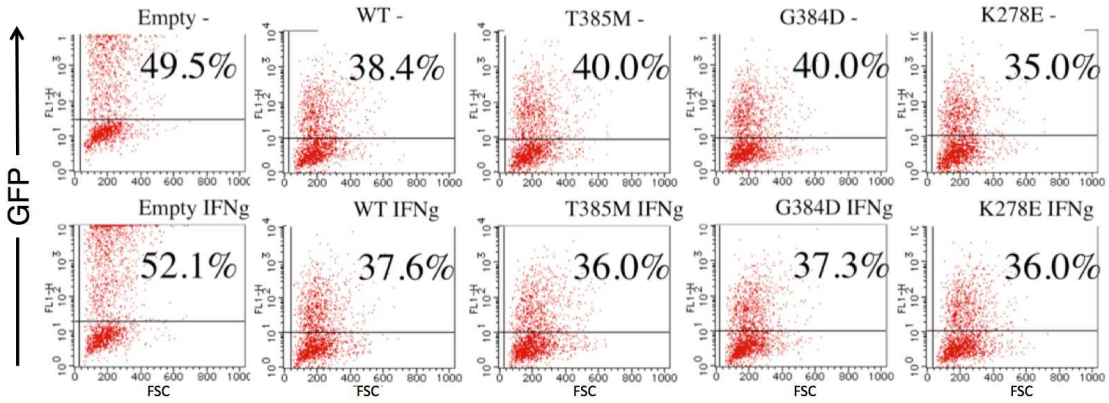
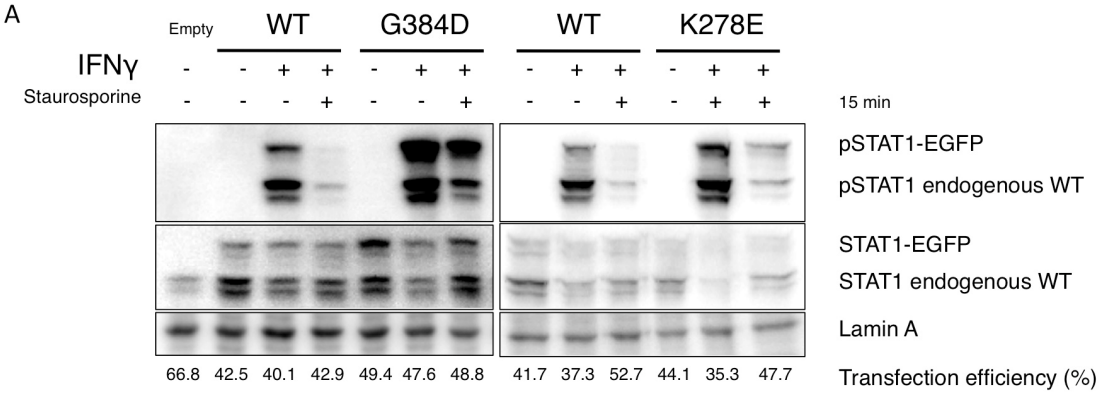


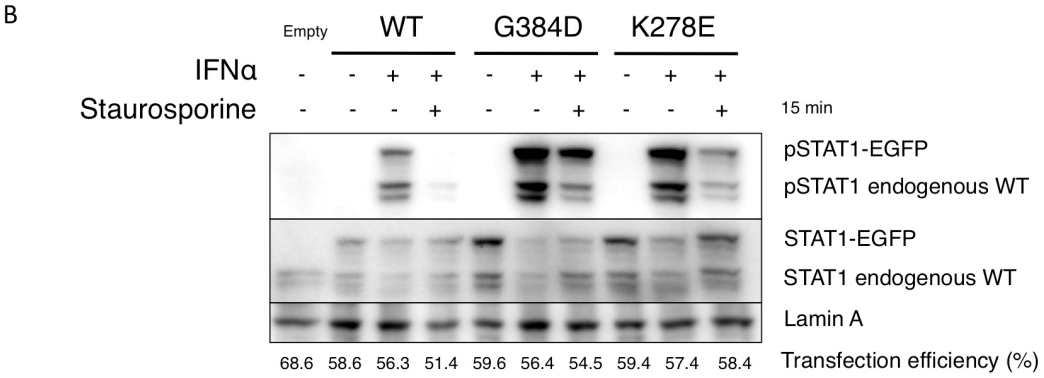
図7．HeLa細胞へのTransfection効率．それぞれのサンプルのTransfection効率をGFP陽性細胞率(%)で評価した．この結果は図6Cの対応するレーン下部に示した．

K278E,G384D変異STAT1は脱リン酸化障害をきたす

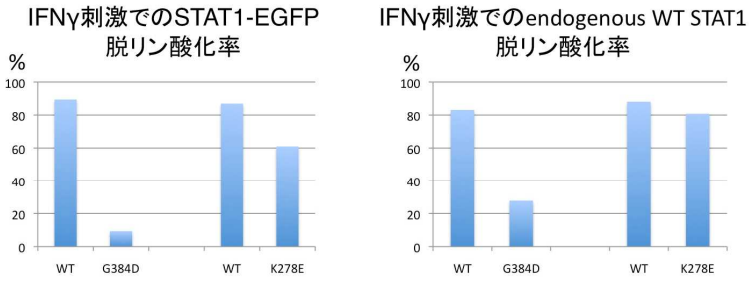
CMCの原因となるSTAT1変異のリン酸化の増強は，脱リン酸化障害によるものである事が既に示されている[14,24]．K278E,G384Dを有するSTAT1の強いリン酸化も，脱リン酸化障害による可能性が考えられたため，チロシンキナーゼ阻害剤であるStaurosporineを用いて，脱リン酸化障害の有無について検討した(図8)．STAT1のC端にGFPを結合させた発現vectorをHeLa細胞に一過性にTransfectしIFNγで30分間(A)，IFNαで15分間(B)刺激した細胞と，それぞれをStaurosporineでさらに15分処理した細胞の，核内リン酸化STAT1は，WTをtransfectした場合と比べてK278E,G384Dのアミノ酸置換を有するSTAT1でStaurosporine処理15分後の脱リン酸化の遅延を認めた（図8)．ウェスタンブロットのそれぞれのバンドの濃度をimagej（http://imagej.nih.gov/ij/)で測定し，核内蛋白のローディングコントロールであるLamin Aの濃度で除した値を，Staurosporine投与前後のバンドで比較し，STAT1脱リン酸化率を算出した．Transfectした変異STAT1の脱リン酸化率はWTに比べて低下していた（図8C,D)．IFNγ刺激，IFNα刺激いずれにおいてもG384Dの方がK278Eよりも脱リン酸化率

が低かった．HeLaの内因性STAT1も変異STAT1をtransfectする事で脱リン酸化率の低下を認めたが，こちらもG384Dの方がK278Eをtransfectした場合よりも脱リン酸化率が低かった．





C



D

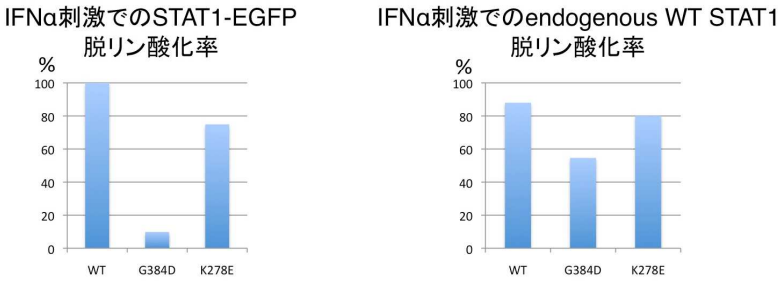


図8. Staurosporine処理による核内STAT1のリン酸化状態の解析. 核内におけるSTAT1のリン酸化は, WTをtransfectした場合と比べて, K278E,G384D変異STAT1で強く, チロシンキナーゼを加えた15分後の脱リン酸化の遅延も認めた(A,B). Aは3回の独立した実験の代表的データ, Bは2回の独立した実験の代表的データを示した. C,DはA,Bのバンドの濃度から脱リン酸化率を算出した結果で, Transfectした変異STAT1の脱リン酸化率はWTに比べて低下していた. IFNγ刺激, IFNα刺激いずれにおいてもG384Dの方がK278Eよりも脱リン酸化率が低かった. HeLaの内因性STAT1も変異STAT1をtransfectする事で脱リン酸化率の低下を認めたが, こちらもG384Dの方がK278Eをtransfectした場合よりも脱リン酸化率が低かった.

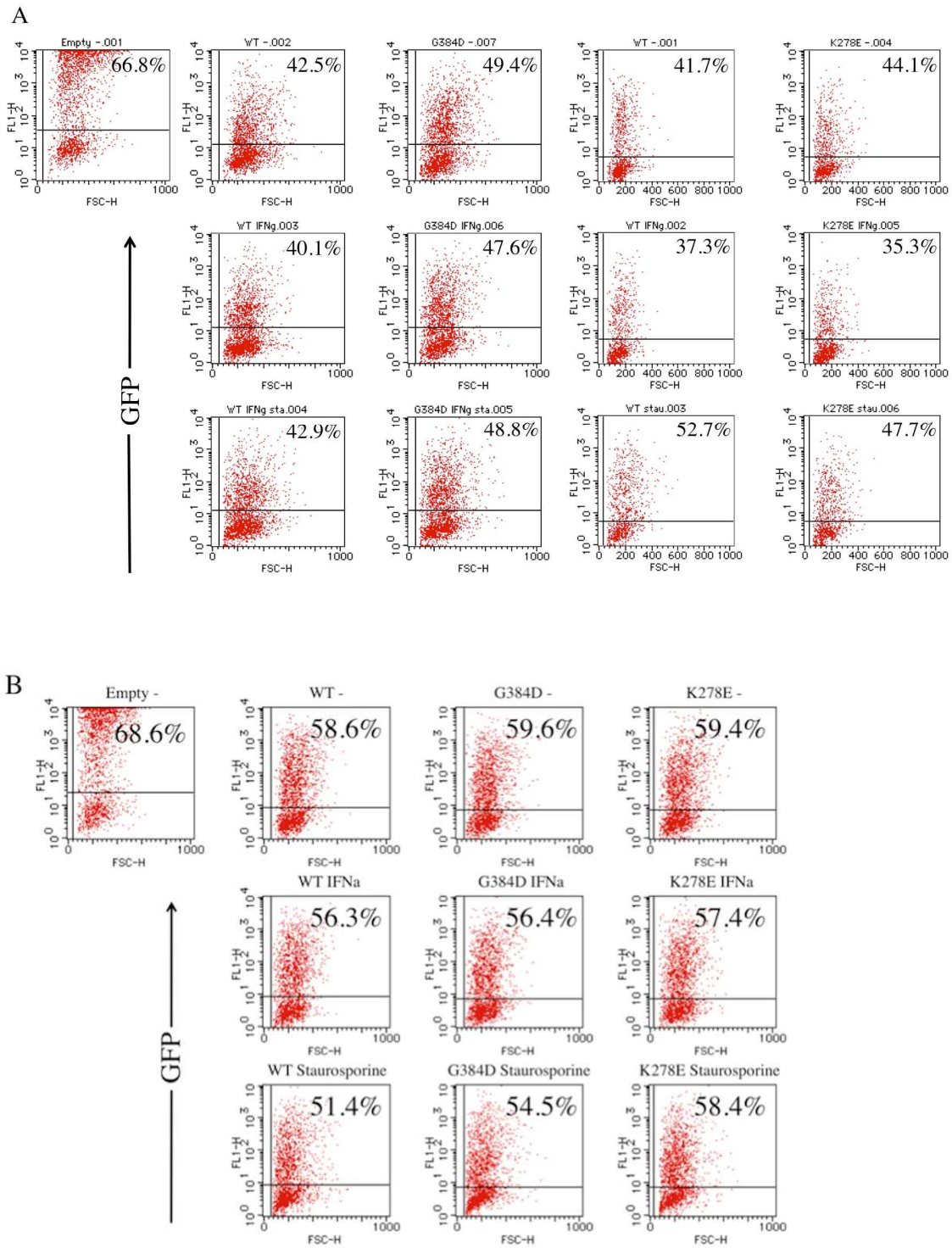


図 9. Staurosporine 処理実験における HeLa 細胞への Transfection 効率．それぞれのサンプルの Transfection 効率は GFP 陽性細胞率(%)で評価した．この結果は図 8 の各レーン下部にも示している．

変異 STAT1 のみならず，内因性 WT STAT1 も脱リン酸化障害によるリン酸化の増強をきたす

変異STAT1をtransfectする事によって，HeLa細胞の内因性 WT STAT1のリン酸化増強と，脱リン酸化障害を認めた(図8)．我々の検討では変異STAT1がWT STAT1に具体的にどのような影響を与えたかまでは明らかにはなっていない．

【第一章　考察】

本研究ではSTAT1のGOF変異として未報告の2つのミスセンス変異（p.K278E,p.G384D）を同定し，さらにこれらの変異が従来報告されている変異と同様に，脱リン酸化障害をきたすことを明らかにした．G384はG340，L383，T385，H406，L407，Q408とともにポケット構造を作り，2量体形成時にもう一方のCCDのF172がはまり込むことが示唆されている[37]．このSTAT1が反対向きに結合した2量体構造は，anti-parallel型と呼ばれ，リン酸化されたチロシン残基が露出するため，脱リン酸化を受け易い構造だと考えられている[38]．2006年，Mertensらは*in vitro*でSTAT1をG384A，G384W変異にすることにより，STAT1の脱リン酸化障害とそれに伴うリン酸化の持続をきたす事を報告している[39]．この報告はG384のアミノ酸置換がSTAT1脱リン酸化障害を来す事を示唆し，我々の報告したG384Dが脱リン酸化障害をきたす変異である可能性をさらに支持する．

我々の報告した新奇変異を有する3症例のうち2例は帯状疱疹を繰り返し，1例は5歳時と早期に帯状疱疹を発症した．STAT1のGOF変異ではウイルス感染防御に働くIFNα刺激のシグナルが増強するが，これは帯状疱疹を繰り返す事と一見矛盾している．この理由は明らかではないが，MitsdoerfferらはTh17細胞がB細胞の増殖と抗体産生を促進・誘導すること[40]，またIL-17を阻害すると胚中心の数と大きさが有意に減少することを報告している．またTh17細胞の減少をきたすSTAT3機能喪失型変異による高IgE症候群患者では，central memory T cellsの発生障害を来たし，これがヘルペスウイルスの易感染性と関連しているかもしれないと報告されている[41]．STAT1 GOF変異CMC患者においてはTh17への分化障害が指摘されており，同様の機序でウイルス感染への易感染性を来す可能性がある．

STAT1のリン酸化をウェスタンブロットで検討した実験において，EBV-LCLを用いた実験（図6A）でも，HeLa細胞にTransfectした実験（図6C,図8）においても，DBDのG384Dは，CCDのK278Eよりも強いリン酸化を認めた．過去に報告されたSTAT1 GOF変異CMC患者の臨床像をまとめたところ[13,14,22,24-35,42]（表4），DBDのT385Mは，竹崎ら[24]の報告した1名は反復性の肺炎とDICを繰り返し14歳時に血球貪食症候群と肺高血圧症で死亡しており，またNigelら[42]の報告のうち1名が7歳時に重篤なCMV感染で死亡しており，1名は8歳時に重篤なEBV感染で死亡と，重篤な経過が目立った．しかし同じ変異でも臨床像に大きな違いがあり，過去の報告のまとめではDBD変異の方がCCD変異より臨床像が重篤である，または変異により臨床像に軽重があるとの結論を出す事は出来なかった．

STAT1はIFNγ刺激ではホモダイマーを形成するが，変異STAT1とWT STAT1がヘテロで存在する状態における，WT STAT1のリン酸化状態についての報告はこれまでのところない．それは過去の報告ではSTAT1を欠損したU3C細胞が用いられ，WT STAT1の存在しない変異STAT1のみの状況での検討だったからである[14,22,31]．我々の実験ではWT STAT1を有するHeLa細胞を用い，その内因性 WT STAT1とtransfectしたSTAT1を分けて評価するためにGFPを結合したSTAT1を用いた．図6CではHeLa細胞に変異STAT1をTransfectすると内因性 WT STAT1のリン酸化も強くなった．また図8では変異STAT1をTransfectすると内因性 WT STAT1も脱リン酸化障害をきたした．我々の実験では詳細なメカニズムについては明らかにならないが，WTと変異STAT1がヘテロで存在する状況で，変異STAT1のホモダイマーのみならず，WTと変異STAT1のヘテロダイマーが形成され，そのヘテロダイマーが脱リン酸化障害をきたしている可能性が推測される．

表4. STAT1 GOF変異CMC患者の変異部位とCMC以外の臨床症状のまとめ

	Mutation	生存	死亡	致死的合併症	CMC以外の感染症	自己免疫/内分泌	その他
CCD	L163R	1					
	D165G	1					
	D165H	1				自己免疫性甲状腺機能低下症	
	Y170N	1				自己免疫性甲状腺機能低下症	
	F172L	1		播種性ヒストプラスマ症(7歳)			卵巣機能不全
	C174R	6	1	扁平上皮癌(54歳)		自己免疫性甲状腺機能低下症	
	M202I	4				SLE	
	M202V	6	1	扁平上皮癌(55歳)	皮膚フサリウム症	自己免疫性甲状腺機能低下症	
	R210I	0	1	侵襲性肺アスペルギルス感染	HSV口内炎, RS気管支炎, Mycobacterium avium気管支炎	溶血性貧血, インスリン依存性糖尿病, 甲状腺抗体陽性	骨粗鬆症, 血小板減少, 腎血管性高血圧, 蛋白漏出性胃腸症, 絨毛平滑, 低身長, 思春期遅延, 気管支拡張症, 肺高血圧
	E235A	4		基底細胞癌, HPV陽性口腔癌, 頸動脈・腹腔動脈解離	帯状疱疹, 肺炎(緑膿菌, 肺炎球菌, セラチア, Mycobacterium avium, RS)		進行性抗体産生不全症, IgG2サブクラス欠損症, B細胞減少症
	V266I	1			RS気管支炎, 気管支拡張症, 帯状疱疹, 中枢性VZV感染症	インスリン依存性糖尿病	骨粗鬆症,肝脾腫, 腎動脈性高血圧,低身長, 思春期遅発,腎動脈狭窄, 大動脈, 腹腔・上腸間膜動脈石灰化,頸動脈瘤
	A267V	21	1	扁平上皮癌, 口腔がん, 頭蓋内コクシジオイド症	アフタ口内炎, 角膜炎, 膀胱炎, 水痘, 反復性HSV, 肺炎, 眼瞼炎Penicillium marneffei	抗壁細胞抗体陽性巨赤芽血球性貧血,自己免疫性甲状腺機能低下症	エナメル形成不全, 鉄欠乏性貧血, 眼瞼炎, 角膜炎
	Q271P	0	1	扁平上皮癌			
	R274G	1		Histoplasma capsulatum播種性感染症, 緑膿菌敗血症			JCウィルス進行性多巣性白質脳症
	R274Q	15	3	脳血管障害, 口腔がん	フルンケル症,肺結核,水痘, 肺炎, アフタ性口内炎	LKM1抗体陽性・抗平滑筋抗体陽性自己免疫性肝炎,インスリン依存性糖尿病, 禿瘡, 甲状腺機能低下	エナメル形成不全, 膀胱炎, 歯周病, 吸収不良症候群・多発消化性潰瘍,びまん性角膜炎,気管支拡張症,分類不能型免疫不全症
	R274W	17	1	扁平上皮癌	反復性HSV口唇炎,顔面HSV感染症, VZV右大腿・膝感染, 反復性帯状疱疹, Tricophyton trubrum皮膚真菌症,ニューモシスチス肺 ,CMV感染症	自己免疫肝炎, 自己免疫性溶血性貧血, 悪性貧血, 肺塞栓, 甲状腺抗体陽性	気管支拡張症,食道狭窄, 鉄欠乏性貧血, 過敏性腸症候群
	K278E	1			反復性帯状疱疹		
	Q285R	1			肺炎, アフタ性口内炎		
	K286I	3	1	脳血管障害			
	T288A	3					
	T288I	1					
DBD	P329L	2				赤芽球癆, 自己免疫性溶血性貧血	
	E353K	1			肺コクシジオイデス症, 皮膚コクシジオイデス症, Trichophyton tonsurans頭部白癬・禿瘡		
	L354M	2			クリプトコッカス髄膜炎,反復性HSV感染症	甲状腺機能低下症	過敏性腸症候群
	L358W	0	1	脳出血	RS, 気管支拡張症, HSV皮膚感染症	GAD抗体陽性インスリン依存性糖尿病, 自己抗体陽性甲状腺機能低下	骨粗鬆症, 多発骨折, 骨髄炎, 指炎, 頸動脈瘤, 低身長, 反復性クロストリジウム腸炎, 反復性腸重積, 肝脾腫, リンパ球性好酸球性腸炎・絨毛平滑化
	L358F	1			CMV肺炎, Penicillium marneffei播種性感染		
	G384D	1			反復性帯状疱疹		
	T385M	6	1	血球貪食症候群(DIC)	Mycobacterium fortuitum頸部リンパ節炎, 播種性ヒストプラスマ症, 肺炎, アフタ性口内炎, フルンケル症, とびひ, 眼瞼炎, 水痘, 反復性HSV感染症, candida parapsilosis カテーテル感染, 中耳炎, 反復性クループ	自己免疫性溶血性貧血/特発性血小板減少性紫斑病 , 自己抗体陰性甲状腺機能低下	気管支拡張症, 特発性進行性筋萎縮症, 小児期多発骨折, 気管支拡張症, 低身長症, 発語遅延, 思春期遅発, 絨毛萎縮, 慢性胃炎, 慢性リンパ球性腸炎, 成長ホルモン分泌不全症, 蛋白漏出性胃腸症,好中球減少症
	M390T	1			慢性EBV感染症, 水痘重症化		低IgG2血症, 反復性下痢症
	N397D	1	造血幹細胞移植を施行				反復性下痢症, 体重増加不良
	F404Y	3			インフルエンザ呼吸障害, 口唇ヘルペス		

第二章

STAT1 GOF 変異 CMC 患者における Th17 関連サイトカイン産生能

【第二章　緒言】

STAT1 GOF 変異 CMC 患者における Th17 への分化障害は過去に示されているが[14,24,28,30,33,35]，末梢血 Th17 細胞率(CD4 陽性 IL-17A 陽性細胞)が健常者と変わらない症例も報告されている[29]．第一章に示した新奇変異を有する 3 例の STAT1 GOF 変異 CMC 患者の末梢血 Th17 細胞の割合を調べたところ，2 例は健常者より Th17 細胞率が低かったが,1 例で Th17 細胞が健常者と変わらない事を見いだした(後掲図 10)．Th17 細胞は IL-17A，IL-17F，IL-22 を産生するが，CMC を伴う APECED 患者においては PBMC の刺激結果から IL-17F と IL-22 の低下が CMC 発症に重要な役割を果たしているのではないかと報告されている[43]．STAT1 GOF 変異 CMC 患者において同じ条件でこの３つのサイトカイン産生を評価した報告がなく，どのサイトカインが CMC の病態に重要な役割を果たしているかについて検討した．また代表的な Th1 サイトカインである IFNγ，Th2 サイトカインである IL-4 についても検討を行った．

【第二章　実験方法】

PBMCとCD4陽性細胞の分離

患者と健常者のヘパリン血を生理食塩水で 2 倍に希釈し，Histopaque®- 1077 (SIGMA,St.Louis,MO)に重層し，20℃，1500 g，30 分間遠心し比重遠心法で分離した．CD4 陽性細胞は CD4 MicroBeads，human® (Miltenyi Biotec,Auburn,CA) を用い添付のプロトコールに従い分離した．具体的には PBMC の一部に 20μl の上記ビーズと MACS buffer(PBS，pH 7.2，0.5% BSA，2 mM EDTA) 80μl を加え，暗所で 4℃，15 分反応させた．MACS MS column® (Miltenyi Biotec,Auburn,CA) に 500μl の MACS buffer を 3 回加え下準備し，ビーズを反応させた細胞に 2 ml の MACS buffer を加え 4℃，2000 rpm，5 分間遠心し上清を捨て，1 ml の MACS buffer を加えて，メッシュを 2 回通した．それをマグネットにセットした下準備後の MACS MS column®にアプライし磁力でカラムに吸着させた．3 回 500μl の MACS buffer で洗い，マグネットから外して MACS buffer で勢い良く押し流

しCD4陽性細胞を得た.CD4陽性細胞のpurityはCD4 PECy5抗体(BioLegend,San Diego,CA)を用いてFACSCalibur™で確認した.

CD4陽性IL-17A産生細胞のFlow cytometryを用いた解析

PBMCをRPMI 10%FBS+p/sで1x10^6 cells/mlにsuspendし96 well plateに200μlずつ分注した. そこにPhorbol myristate acetate(PMA) 500 ng/ml, Ionomycin(IOM) 5μg/mlとなるように加え, 37℃で4時間培養した. その後2時間, IL-17Aが細胞外に放出されるのを抑制するため細胞内輸送タンパク阻害剤のBrefeldin Aを10μg/mlとなるように加え培養しPBSで洗浄した. APC anti-human CD4抗体 (BioLegend)を加え, 4℃の暗所で25分反応させ, 2回PBSで洗浄した. Foxp3 Staining Buffer Set®(eBioscience,Inc.San Diego,CA)に含まれているFixation/Permeabilization Concentrate®を同梱のFixation/Permeabilization Diluent®で希釈し, 100μlずつ加えて20分, 4℃の暗所で反応させた. PBSで洗浄後, DDWで10倍に希釈した10x Permeabilization Buffer®を100μl加え, 冷暗所で15分洗浄した. PBSで洗浄し, PE anti-human IL-17A抗体(Biolegend,San Diego,CA)を加え, 4℃の暗所で20分反応させ, 2回PBSで洗い, BD LSRFortessa™にて解析した.

CD3/28, Candida, PMA+IOM刺激

CD3/28刺激は, Dynabeads Human T-Activator CD3/28® (Life Technologies,AS,Norway)を用いて, PBMC, CD4陽性細胞それぞれ1x10^6 cells/mlに対して, 同ビーズ25μlを使用した. PBMCは48 well plateに300μlずつ, CD4は96 well plateに100μlずつtriplicateで分注し, 37℃のCO_2培養器で72時間培養した後-80℃に一旦保存した. カンジダは1x10^6 cells/mlのPBMCに, PBSで溶解したカンジダ粉末 (Torii Pharmaceutical co.,limited,Tokyo,Japan) を100μg/mlとなるように加え,48 well plateに300μlずつtriplicateで分注し,37℃のCO_2培養器で72時間培養した後, -80℃に一旦保存した. PMA+IOM刺激は, 最終濃度がPMA 400 ng/ml, IOM 10 μg/mlとなるように1x10^6 cells/mlのCD4陽性細胞に加え, 96 well plateに100μlずつtriplicateで分注し, 37℃のCO_2培養器で6時間培養した後,-80℃に一旦保存した.それぞれ無刺激も同様にtriplicateで用意した. サンプルは後日, IL-17A, IL-17F, IFNγ, IL-4はCytometric Bead Array® (CBA) を用いて, IL-22はELISAにて後述の方法で測定した.

Cytometric Bead Array®を用いた培養上清中のサイトカインの測定

培養上清中のIL-17A, IL-17F, IFNγ, IL-4の測定は，前述のIP10と同様にCBAを用いて行った．BD CBA Human Soluble Protein Master Buffer Kit®（BD,San Diego,CA）に含まれる試薬を用いた．それぞれ培養上清50μlをサンプルとし，kitに含まれるstandardサイトカインをAssay diluent 200μlで希釈し，2500 pg/mlのstandardを得た．Assay diluent®で希釈列（2500, 1250, 625, 312.5, 156, 80, 40, 20, 10 pg/ml）を作り，BlankはAssay Diluent®そのものとした．それぞれのサイトカインCapture Beads®をCapture Beads Diluent®で50倍希釈したもののうち50μlをサンプルもしくはstandard 50μlと混合し，室温遮光下で1時間反応させた．さらにそれぞれのサイトカインのPE Detection Reagent®をDetection Reagent Diluent®で50倍希釈し，それを50μl添加し室温遮光下で2時間反応させた．Assay Diluent®で洗浄の後にFACSCalibur™とFCAP Array Software®を用いて解析を行った．

ELISA法を用いた培養上清中のサイトカイン測定

培養上清中のIL-22の測定はHuman IL-22 Quantikine® ELISA kit（R&D systems,Minneapolis,MN）を使用し添付のプロトコールに従って行った．以下の試薬類は，すべてHuman IL-22 Quantikine® ELISA kitに含まれている．培養上清50μlをAssay Diluent 50μlで2倍希釈しサンプルとした．standardはCalibrator Diluent RD6-10®で希釈列（2500, 1250, 625, 312.5, 156, 80, 40, 20, 10 pg/ml）を作り，BlankはCalibrator Diluent RD6-10®そのものとした．サンプルとstandardそれぞれ100μlをIL-22抗体でコートされた96 well plateに入れ，室温で2時間反応させた．4回洗浄した後に，200μlのIL-22 Conjugateを添加し，室温で2時間反応させた．4回洗浄した後に200μlのSubstration Solution®を添加し，室温・遮光下で30分反応させた．その後50μlのStop Solution®を添加し速やかに解析を行った．解析はMULTISKAN JX®（Thermo,Rockford,IL）を用いた．

【第二章　結果】

新奇変異患者3名のIL-17A陽性細胞率

STAT1 GOF変異CMC患者ではTh17細胞が減少し疾患発症に関連していると指摘されている[14,24,28,30,33,35]．そこで患者，コントロールのPBMCをPMA+IOMで刺激し，CD4陽性IL-17A陽性細胞をFlow cytometryを用いて測定した．CD4陽性細胞におけるIL-17A陽性細胞の割合はP1:0.28%，P2:0.58%，P3:0.25%で，正常コントロールでは0.49%,0.93%,1.16%であり(図10)，P2では健常者と変わらない程度の割合だった．

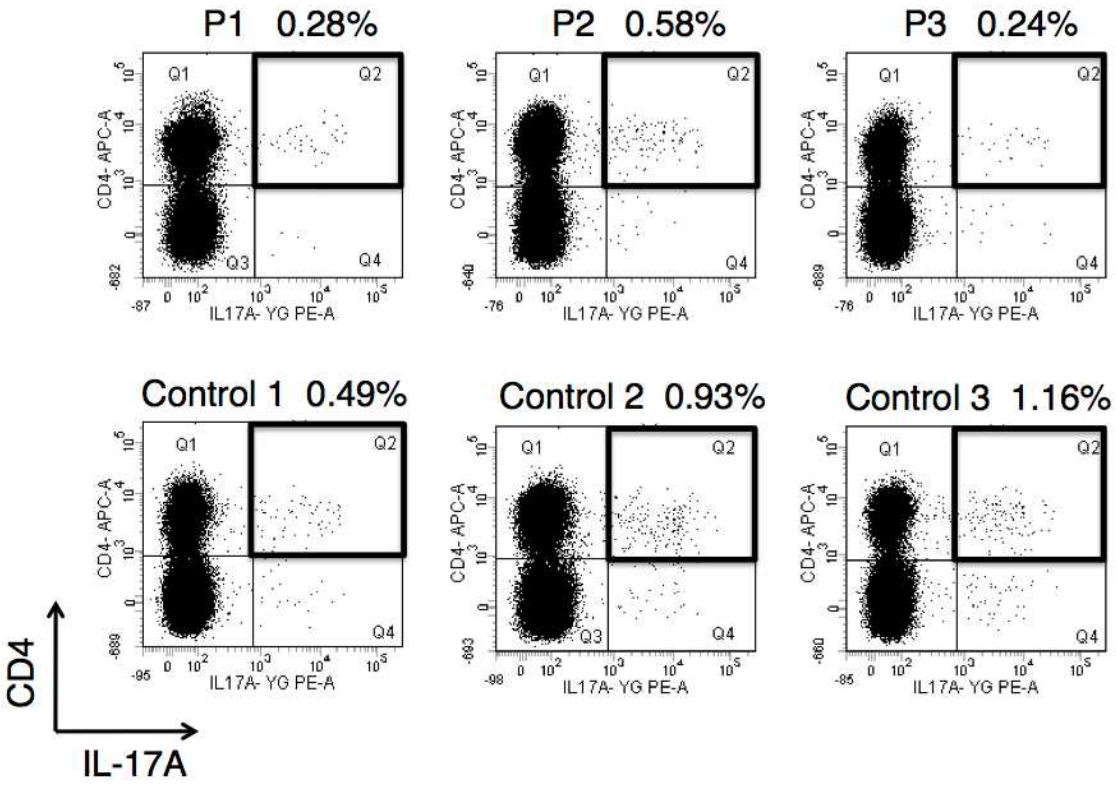


図10．CD4陽性細胞における，IL-17A陽性細胞の割合．

STAT1 GOF変異CMC患者のサイトカイン産生能の解析

STAT1 GOF変異CMC患者におけるTh17関連サイトカイン産生能について，PBMC，CD4陽性細胞に分けてIL-17A，IL-17F，IL-22，IFNγ，IL-4産生能を検討した(図11)．いずれの条件においても，無刺激のサンプルはほとんどサイトカインを産生しなかったため示さなかった．IL-17A，IL-22はPBMCのCD3/28刺激，カンジダ刺激，CD4陽性細胞のCD3/28刺激で有意にSTAT1変異患者で低下して

いた．IL-17FはPBMCのカンジダ刺激でSTAT1変異患者において有意な低下を認めたが，PBMC，CD4陽性細胞のCD3/28刺激では有意差を認めなかった．これらの結果はSTAT1 GOF変異CMC患者の病態において，IL-17Fよりも，IL-17A，IL-22の方がより重要な役割を果たしている可能性を示す．CD4陽性細胞のPMA+IOM刺激は全てのサイトカイン産生に関して有意差を認めなかった．IFNγ，IL-4に関しては，いずれの刺激においても有意差は認めなかったが，IFNγはカンジダ刺激とCD4陽性細胞のPMA+IOM刺激で，STAT1 GOF変異CMC患者で産生が低い傾向があり，IL-4はCD4陽性細胞のCD3/28刺激，PMA+IOM刺激においてSTAT1 GOF変異CMC患者で高い傾向があった．IFNγとIL-4はTh17に抑制的に働くと言われているが[44]，IFNγ産生の多い患者でのIL-17A，IL-17F，IL-22の産生量，IL-4産生の多い患者でのIL-17A，IL-17F，IL-22の産生量に明らかな負の関連は認めなかった．

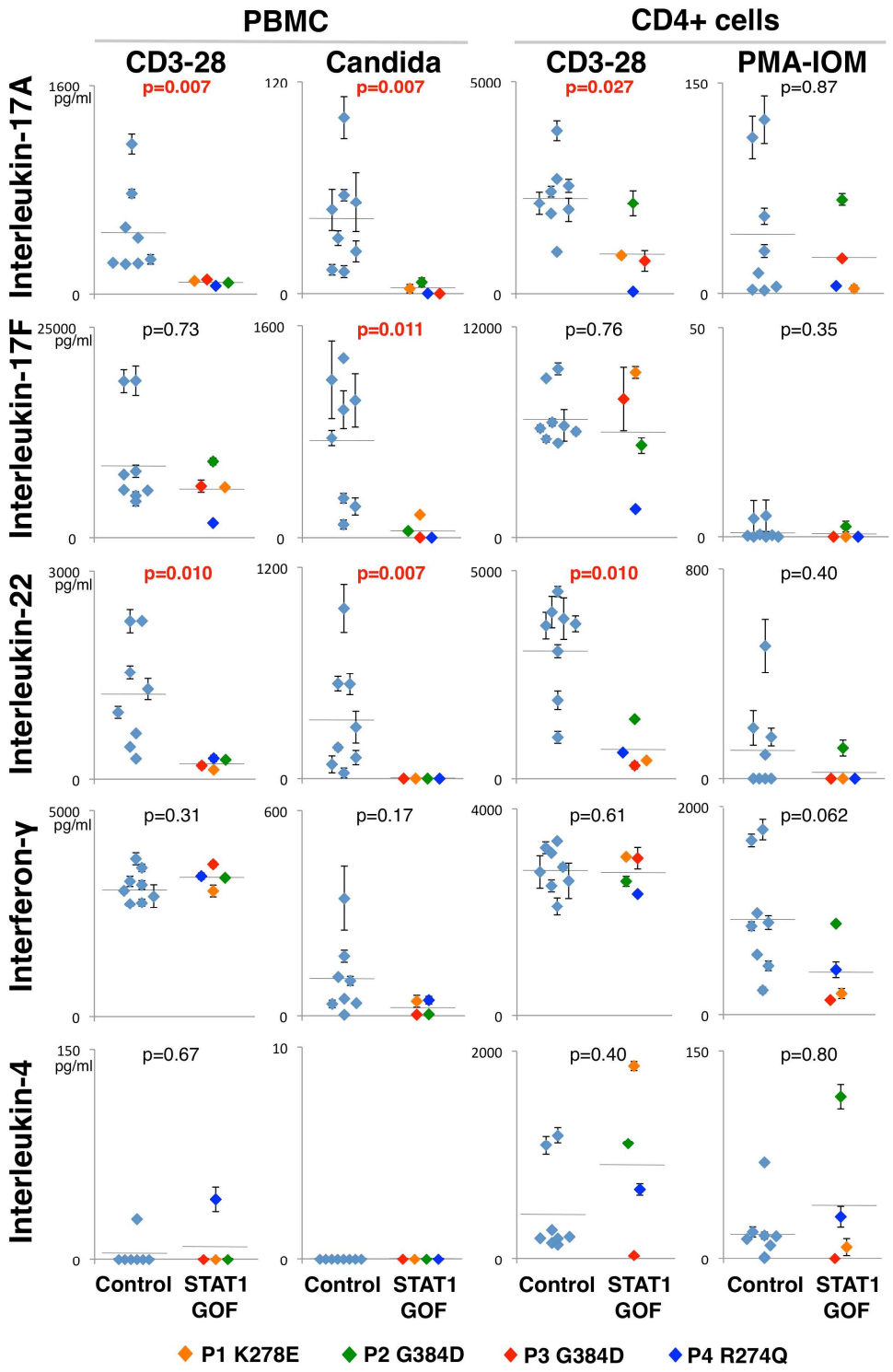


図11. STAT1 GOF変異CMC患者のサイトカイン産生能の解析. PBMCのCD3/28刺激とカンジダ刺激, CD4陽性細胞のCD3/28刺激は72時間行い, CD4陽性細胞の

PMA+IOM刺激は6時間行った．有意差検定はMann-WhitneyのU testを用いた．エラーバーは独立した3検体の標準偏差を示す．0.05未満のp値は赤字で示した．

表5. CD4陽性細胞のリンパ球またはソーティング後全血球における純度(%)

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	P1	P2	P3	P4
/lymph	99.4	99.4	99.6	99.0	99.7	99.5	99.3	99.4	99.6	99.7	97.5	99.4
/total	98.9	99.2	98.0	98.5	99.5	99.3	99.0	96.2	95.2	92.0	93.8	99.2

【第二章　考察】

我々はSTAT1 GOF変異CMC患者のPBMC，CD4陽性細胞のCD3/28刺激によるサイトカイン産生量から，IL-17Aのほうが IL-17FよりCMC発症に重要な役割を果たしていると考えた．しかしIL-17AとIL-17F産生の偏りについては以下のような報告もある．2013年Meltonら[45]は，T細胞-B細胞共培養系において，144の薬理学的修飾物質で刺激した場合の，CD4陽性細胞のIL-17AとIL-17Fの産生の偏りについて調べ，TLR2 ligandであるHKLM (heat-killed Listeria monocytogenes)がIL-17AよりもIL-17Fの産生を強く誘導する事を示した．TLR2は細菌のペプチドグリカンだけでなく*Candida*の細胞壁に存在するザイモザンによっても刺激を受ける．これらの事から慢性的なカンジダ感染は持続的なTLR2刺激のため，CD4陽性細胞がIL-17F産生に傾いた状態にあると推測される．そのためSTAT1 GOF変異CMC患者ではTh17細胞は減少しているが，健常者に近い量のIL-17Fを産生した可能性もある．

我々の実験ではIFNγの産生量はSTAT1 GOF変異CMC患者と健常者の間に有意差はなかった．過去の報告ではIFNγ産生量に関しては，健常者よりも有意に低下しているとする報告，または健常者と有意差はないとする報告の２つに分かれる．有意に低下するとしている報告は，Van de Veerdonkら[13]のPBMCのカンジダ48時間刺激，Horiら[27]のPBMCのβ-glucan 72時間刺激，Leeら[28]のPBMCの*Candida albicans*または*Penicillium marneffei conidia* 48時間刺激の報告である．一

方IFNγ産生が健常者と変わらないとするものは前述のHoriらのPBMCのPHA 72時間刺激，Soltezら[33]のPBMCのカンジダ48時間刺激，Sampaioら[31]のPBMCのPMA+IOM 6時間刺激である．IFNγ受容体欠損症などIFNγシグナルの低下を伴う原発性免疫不全症がCMCを発症しない事から，IFNγ産生量の多寡はCMC発症に直接的な影響はないと考えられる．しかし一方IFNγはウイルス感染や抗酸菌感染防御には重要な役割を果たしている事が知られており，STAT1 GOF変異CMC患者における肺結核(当科 P4の父)や*Mycobacterium avium* 気管支炎[35]，*Mycobacterium fortuitum* 頸部膿瘍[31]を来した報告は，IFNγシグナルの低下を示唆するものである．我々の実験においてもPBMCのカンジダ刺激とCD4陽性細胞のPMA+IOM刺激でSTAT1 GOF変異CMC患者でIFNγ産生が低い傾向があり更なる症例の蓄積と検討が必要である．

第三章

STAT1 GOF変異CMC患者血清における抗IL-17F抗体

【第三章　緒言】

CMCを主徴とする原発性免疫不全症の原因遺伝子(表1)の中で，最初に同定されたのはAutoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy （APECED）またはAutoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS-1)と呼ばれる疾患の責任遺伝子*AIRE*である．*AIRE*は，胸腺髄質上皮細胞において，末梢組織特異的抗原の発現を制御することで，自己反応性T細胞の選択除去に関与している[46 47 48]．また樹状細胞，二次リンパ器官にも発現し末梢性免疫寛容にも関与していることが示唆されている[49-51]．この疾患では，胸腺でのNegative selectionに異常が生じ，さまざまな自己免疫疾患を発症する．頻度の高いものから，副甲状腺機能低下症(80%)，アジソン病(80%)，性腺機能低下症（50%)，禿瘡（46%)，甲状腺機能低下症（40%）などがある[52]．また同疾患はCMCを93%もの高頻度に認める．しかし他の病原体には易感染性を示さず，CMCのみ高頻度に伴う原因は長らく不明であった． Meagerらにより APECED患者の多くは抗IFNα自己抗体を有する事は知られていたが[53]，2010年にKisandら，Puelらにより，IL-17A，IL-17F，IL-22に対する中和活性をもつ自己抗体がAPECED患者におけるCMC発症の原因であると示された[43,54]．
Kisandらの報告では，APECED患者162名の血清におけるこれらのIgG型自己抗体の陽性率は，IL-17A:41%，IL-17F:75%，IL-22:87%であった．一方51名の健常者でははっきりと低い，もしくは検出不能であった．Puelらの報告では，33名のAPECED患者の血漿におけるこれら自己抗体の陽性率は，IL-17A:67%，IL-17F:94%，IL-22:91%であった．37名の健常者にはこれらの自己抗体を認めなかった．さらにKisandらはIL-17F，IL-22自己抗体のそれぞれの中和活性力価と，末梢血単核球(PBMC)をStaphylococcus enterotoxin Bで刺激した時のそれぞれのサイトカイン産生との間に負の相関がある事を示した（図12)．活性化したTh17細胞の表面にIL-17A，IL-17Fが存在する事が知られており[55]，自己抗体を介した細胞障害活性が影響しているのではないかと推測されているが，まだ不明な点は多い．

STAT1 GOF変異CMC患者については，2012年，Horiら[27]が1名の慢性活動性肝炎を伴う患者血清に抗IL-17F抗体が検出されたと報告した．これまでこの1例の報告しかなく，また中和活性についての検討もされていなかったため，我々は計17例のSTAT1 GOF変異CMC患者の血清において，APECEDで見られたTh17関連サイトカイン抗体とAPECED患者に高率にみられる抗IFNα抗体の有無を調べた．

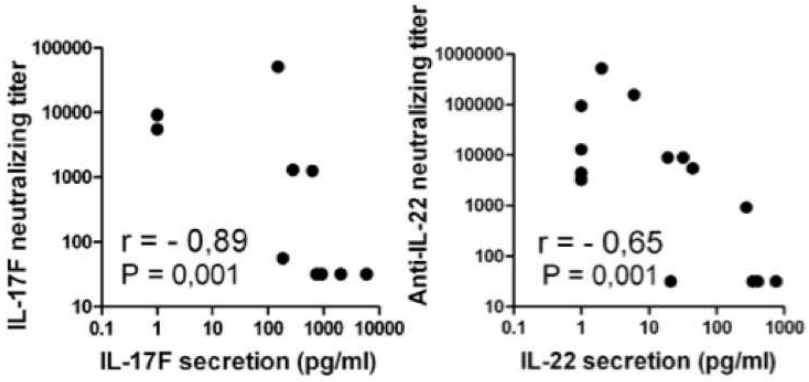


図12．抗IL-17F，IL-22抗体の中和活性力価と，それぞれのサイトカイン産生量．Kisandらは抗IL-17F，IL-22抗体の中和活性力価と，末梢血単核球(PBMC)をStaphylococcus enterotoxin Bで刺激した時の各サイトカイン産生との間に負の相関があることを示した[43]．

【第三章　実験方法】

抗サイトカイン抗体の検出には，第一章の4名の患者に加え，13名のSTAT1 GOF変異CMC患者にご協力いただいた．最終的に患者血清は17検体，男性9名，女性8名だった．2名のAPECED患者と，2名のCMCを伴うSTAT3異常による高IgE症候群(HIES)患者，CMCを伴わない健常者として計22名(男性14名，女性8名)にご協力いただいた．本研究は北海道大学医学部研究倫理審査委員会の承認を得て行った．

<u>ウエスタンブロット法による抗サイトカイン抗体の検出</u>

rhIL-17A，rhIL-17F，rhIL-22，rhIL-23 (R&D systems，Minneapolis，MN)，rhIFNα (Biosource International,Camarillo,CA) を2x SDS sample buffer

（100 mM Tris-HCl, 4% Sodium Dodecyl Sulfate, 1.8M 2-mercaptoethanol, 10% Glycerol）と等量で混和し，4 分間 boil した．20000g，5 分間遠心し上清をとり，1 well あたりの蛋白量を 500 ng としてウエスタンブロット解析を行った．15% SDS-PAGE で展開したのちに，Immobilon-P Transfer PVDF Membranes®（Millipore, Billerica, MA）に 15V, 1 時間で電気泳動法で転写し，5%スキムミルクを含む TBST で 1 時間ブロッキングを行った．1 次抗体として患者もしくは健常者の血清を 5% スキムミルクを含む TBST で 1500 倍希釈し，4℃，overnight で反応させた．TBST で 3 回洗浄の後に HRP-Goat Anti-Human IgG®（Invitrogen, Frederick, MD）を TBST で 150000 倍希釈し，4℃，1 時間反応させた．TBST で 4 回洗浄後に，Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent®（GE Healthcare UK Limited）を用いて，添付されたプロトコールに従って発光したバンドを LAS-1000 UV mini®（Fujifilm, Tokyo, Japan）で検出した．検出後，メンブレンは再利用するために Stripping buffer（2-ME 0.7 ml, SDS 2g, 1M Tris（pH 6.8）6.25 ml, DDW 93ml）を加えてラッピングし，65℃，30 分湯煎し，TBST で 3 回洗った後，再度 5% スキムミルクを含む TBST で 1 時間ブロッキングした．1 メンブレンあたり 4 回程度使用した．

<u>中和活性を評価するrhIL-17F至適濃度の決定</u>

まず Primary fibroblast を刺激する rhIL-17F（R&D systems, Minneapolis, MN）の適正濃度を調べた．Primary fibroblast を $2.5x10^4$ cells/ml の濃度で 96 well plate に 200μl ずつ分注し 37℃の CO_2 培養器にて 24 時間培養した．上清をサクションし rhIL-17F を DMEM 10%FBS で 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ng/ml の濃度として加え 37℃の CO_2 培養器にて 24 時間刺激した．上清の IL-6 濃度は後述する CBA で測定した．その上清の IL-6 濃度を表したものが図 13 である．図 13 の結果を元に中和活性を評価する rhIL-17F の濃度を 50 ng/ml と設定した．

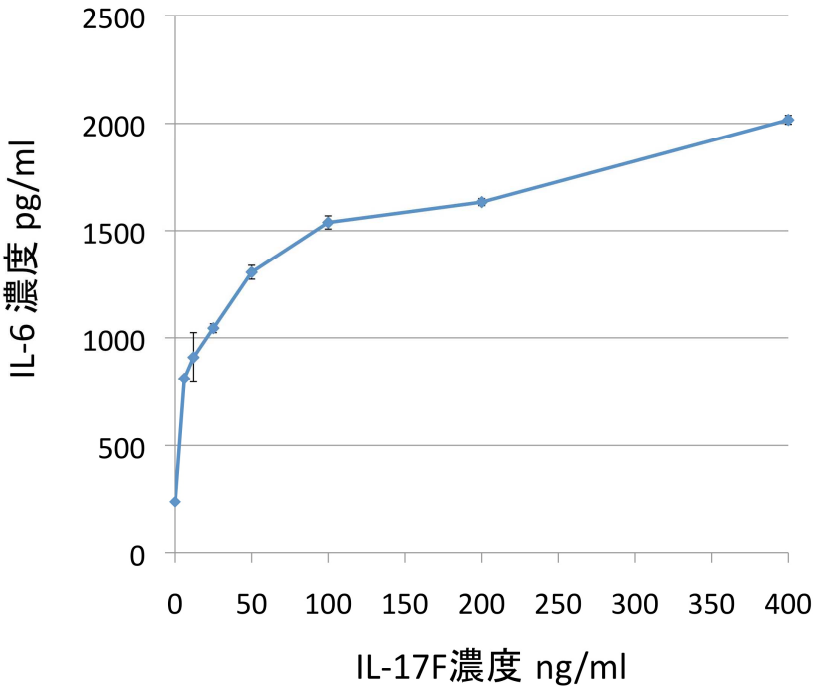


図13. IL-17F至適濃度決定のための準備実験. Primary fiboblastからのIL-6産生量. 中和活性に使用するIL-17Fの濃度を50 ng/mlとした.

Cytometric Bead Array®を用いたIL-6の測定

培養上清中のIL-6の測定は, 前述のIP10やTh17関連サイトカインなどと同様にCBAを用いて行った. BD CBA Human Soluble Protein Master Buffer Kit® (BD, San Diego, CA) に含まれる試薬を用い, それぞれ培養上清50μlをサンプルとした.

抗IL-17F抗体の中和活性

Primary fibroblast を DMEM 10%FBS で $2.5x10^4$ cells/ml の濃度とし, 96 well plate に 200μl ずつ分注して 24 時間 37℃の CO_2 培養器で培養した. 10% v/v の健常者, 患者の血清と, 無刺激としてメディウムを, rhIL-17F の DMEM 10%FBS 溶液に rhIL-17F 最終濃度が 50 ng/ml となるように加え, 37℃, CO_2 培養器にて 2 時間反応させた. Primary fibroblast のメディウムを一旦除去し, 2 時間反応させたものを 200μl ずつ, それぞれ duplicate とし分注した. 24 時間後に上清の IL-6 濃度を Cytometric Bead Array®にて測定した.

【第三章　実験結果】

STAT1 GOF変異CMC患者ではIL-17Fに対する自己抗体を認める

第一章で示した3名の新奇STAT1ミスセンス変異患者を含む，計17名のSTAT1 GOF変異CMC患者の血清を調べたところ，17名中11名（64.7%）にIL-17Fに対するIgG自己抗体を検出した(図14)．一方IL-17A，IL-22，IL-23，IFNαに対する抗体は認めなかった．2名のAPECED患者のうち1名はIL-22と抗IFNα抗体を認め，もう1名は抗IL-17F抗体と抗IL-17A，IL-22，IFNα抗体を認めた．HIES患者は2名とも抗IL-17F抗体のみ検出した．血清を反応させず2次抗体のみ反応させた場合にはバンドは出現せず，2次抗体によるアーチファクトは否定的だった．22名のCMCを伴わない健常者では，1名にIFNαに対する自己抗体を認め，1名に抗IL-17F抗体を認めた．健常者では抗IL-17F抗体を22名中1名(4.5%)に認めたのみであるのに対し，STAT1 GOF変異CMC患者では64.7%，HIES患者は2名のみだが両者に抗IL-17F抗体を検出した事から，ウェスタンブロットによる抗IL-17F抗体の検出はCMCの疾患マーカー(感度:64.7%,特異度:95.5%)として有用な可能性がある．それぞれのバンドは2枚以上の別のメンブレンで確認した．

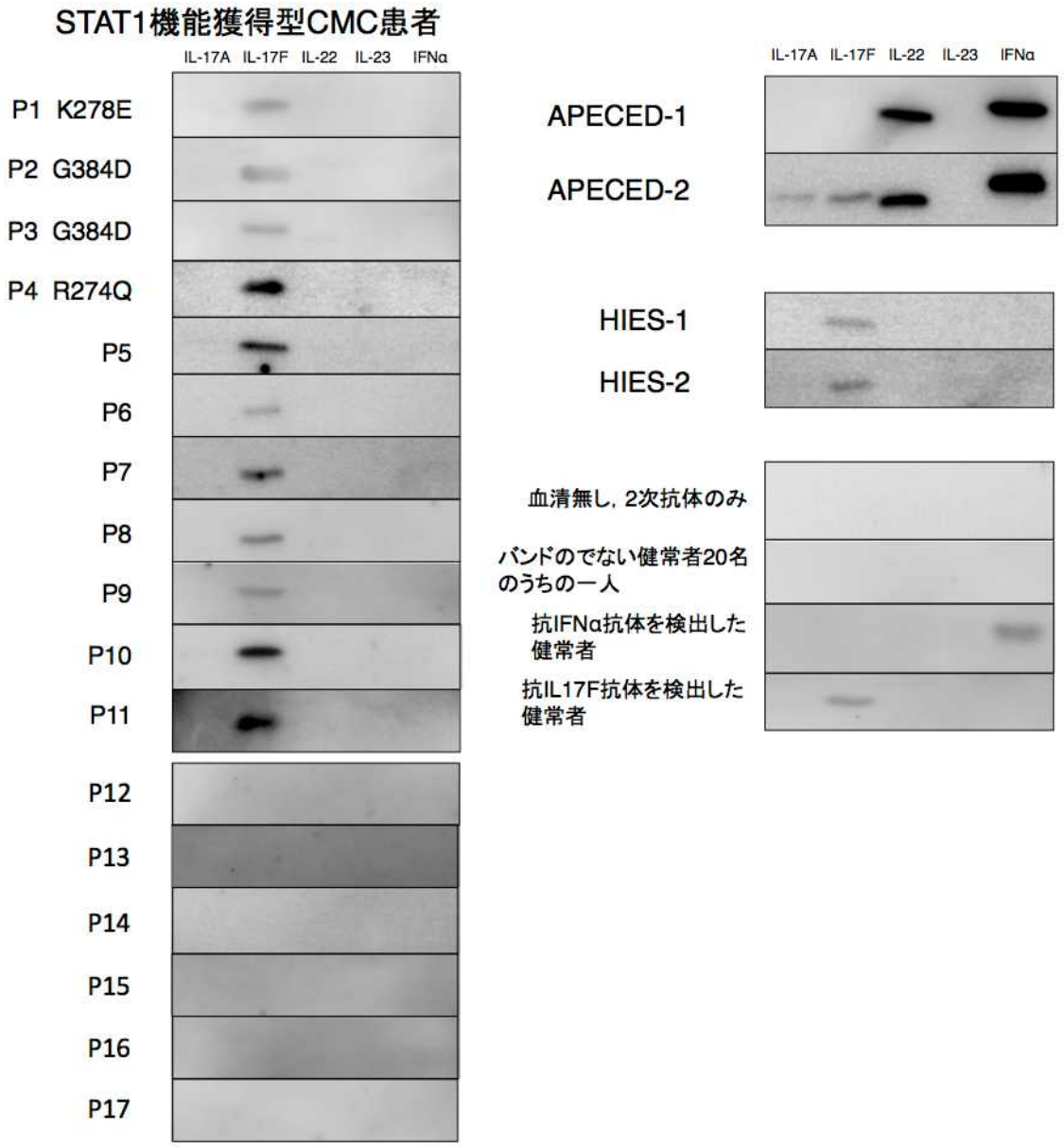


図14. 血清中のIL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23, IFNαに対する自己抗体の検出.

抗IL-17F抗体の中和活性は認めなかった

APECED患者において抗IL-17F抗体が検出されたとの報告は, Kisandら[43], Puelら[54], Wolffら[56]の3編があるが, 抗IL-17F抗体の中和活性を実際に示したのはKisandらの報告のみである[43]. 我々はSTAT1 GOF変異CMC患者に検出された抗IL-17F抗体の中和活性について検討した. あらかじめ抗IL-17F抗体を有するCMC患者血清, または抗IL-17F抗体を持たない健常者の血清と, rhIL-17Fを2時間反応させ, そ

れぞれを健常者のfibroblastに24時間反応させ上清のIL-6を測定した（図15）．fibroblastはrhIL-17F刺激にてIL-6を産生するため，抗IL-17F抗体に中和活性があれば，IL-6の産生量が低下すると予想されるが，抗IL-17F抗体を有するCMC患者の血清を加えた場合，健常者よりもIL-6の産生がむしろ高い結果となり中和活性は認めなかった．

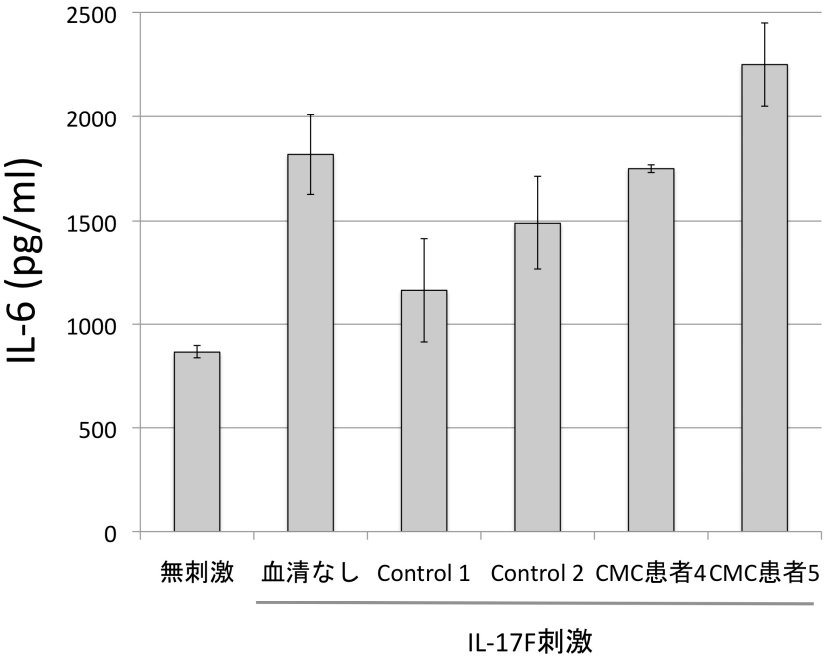


図15．IL-6産生量の測定による抗IL-17F抗体の中和活性解析．エラーバーは独立した2検体の標準偏差を示す．

【第三章　考察】

2011年のLiuらの報告には，未発表データとしてSTAT1 GOF変異CMC患者47名においてIL-17A，IL-17F，IL-22に対する自己抗体は認めなかったとしているが[14]実験方法の記載がなかった．一方2012年HoriらはSTAT1 GOF変異CMC患者1名に抗IL-17F抗体が存在する事を報告している[27]．STAT1 GOF変異CMC患者の抗IL-17F抗体の存在に関しては，これまでのところHoriらの1例の報告[27]のみである．我々

の実験もHoriらの実験も，ウェスタンブロットで抗IL-17F抗体を検出しており，Liuらの報告との違いは実験系の違いによるものかもしれない．

我々の実験では抗IL-17F抗体の中和活性を認めなかったが，中和活性がないという事の証明は非常に困難である．まず血清を用いた実験であるため，血清中のIL-6産生に影響を与えうる分子の影響は否定できない．また例えば補体や，好中球などIgGのFc部分により活性化される因子，つまり直接的なTh17細胞障害活性等の影響は十分反映されておらず，生体内での環境を反映しているとは言えないからである．APECED患者ではTh17関連サイトカインに対する中和活性を有する自己抗体がCMC発症に関わっていると考えられているが，APECED患者と今回解析したSTAT1 GOF変異CMC患者には以下の相違点がみられる．

1．APECED患者ではIL-17A，IL-17F，IL-22に対する高い自己抗体保有率を認めたが，STAT1 GOF変異CMC患者ではIL-17Fに対する抗体のみで，また約65%のみにしか検出しなかった．
2．図12に示したようにAPECED患者では自己抗体の中和活性力価とそのサイトカイン産生に負の相関がみられたが，STAT1 GOF変異CMC患者では自己抗体を持たないIL-17AやIL-22の産生が低下している一方，自己抗体のあるIL-17Fの産生はCD3/28刺激において健常者と有意差のない産生を認め負の相関はみられなかった．
3．APECED患者のCMC発症年齢の平均は3.7歳[54]，中央値は3歳[57]から4.3歳[58]で，STAT1 GOF変異CMC患者のCMC発症中央値はおよそ1歳と早かった．

以上からSTAT1 GOF変異CMC患者におけるCMC発症は，APECED患者で報告されている自己免疫を介したものとは別のメカニズムによると考えた．

STAT1 GOF変異CMC患者が自己免疫疾患を併発する事は稀ではない．実際にSTAT1 GOF変異CMC患者で抗甲状腺抗体陽性の甲状腺炎は約6%[13,14,22,24-35,42]に認め，また抗LKM1抗体陽性，抗平滑筋抗体陽性自己免疫性肝炎[27]や抗GAD抗体陽性インスリン依存性糖尿病[35]，自己免疫性溶血性貧血[24,35]などの自己免疫疾患を併発した患者の報告がある．STAT1 GOF変異CMC患者では，図6Bに示すようにIFNα刺激によ

るシグナル伝達が増強する．IFNαは治療薬としてC型慢性肝炎，B型慢性活動性肝炎，慢性骨髄性白血病，腎癌，多発性骨髄腫などの患者に用いられる事があるが，その重大な副作用として自己免疫肝炎，溶血性貧血，インスリン依存性糖尿病，SLE，関節リウマチ，重症筋無力症などの自己免疫現象を来す事が知られている．そのためIFNα刺激シグナルが増強するSTAT1 GOF変異CMC患者は自己免疫を発症し易い素因を有すると推測される．ではなぜ抗IL-17F抗体のみ出現するのか．APECED患者での自己抗体保有率では，Kisandらの報告[43]ではIL-22が最も高く87%で，次いでIL-17Fが75%であったが，Puelらの報告[54]ではIL-17Fが94%と最も高い保有率であった．これはIL-17Fの抗原性の高さを示唆する．また我々の実験では，IL-17Fの絶対的な産生量はIL-17A，IL-22よりも非常に多かった．図14で示す様に健常者1名にIFNαに対する自己抗体を認めたが，抗IFNα抗体は健常者でも認めることがあることが報告されている[59,60]．またIFNαは抗ウイルス作用を持つサイトカインでありウイルス感染によって誘導され，ウイルス感染後に健常者で抗IFNα抗体が産生される事も報告されている[61]．これは抗原性を有するサイトカインが感染などにより多量に産生されると，そのサイトカインに対する自己抗体が誘導されうる事を示唆する．前述したSTAT1 GOF変異CMC患者の自己免疫を発症し易い素因と，IL-17Fの抗原性の高さ，産生量の多さが抗IL-17F抗体出現につながったのではないかと推測した．

【総括及び結論】

○CMCの原因となる新奇STAT1変異2例(K278E, G384D)を報告し，機能解析により過去の報告と同様に脱リン酸化障害によるGOF変異であることを証明した.

○変異STAT1がWT STAT1にも影響を与え，WT STAT1も脱リン酸化障害をきたすことを初めて示した.

○ STAT1 GOF変異CMC患者ではIL-17Fよりも，IL-17A,IL-22の産生が特に低下しており，2つのサイトカインの病態へのより強い関与が示唆された.

○STAT1 GOF変異CMC患者血清の約65%に抗IL-17F抗体を認めた．中和活性は認めなかったがCMCの疾患マーカーとして有用かもしれない.

【謝辞】

今回の学位研究に当たりご協力いただいた患者様，患者様のご家族に深く感謝いたします．また検体の提供やご家族との連絡を取っていただきました成育医療センター 小野寺雅史先生，河合俊尚先生，渡辺信之さん，東京医科歯科大学森尾友宏先生，九州大学 高田英俊先生に感謝いたします.

また本研究の機会を与えていただき，御指導を賜りました北海道大学大学院小児科学分野 有賀正教授，研究全般にわたり基礎から論文作成まで様々な御指導をしていただいた北海道大学病院小児科 山田雅文先生，様々な御協力を頂いた北海道大学大学院小児科学分野免疫班の小林一郎先生，竹崎俊一郎先生，植木将弘先生，千田奈津子先生をはじめ，私の研究を支えてくださった皆様に感謝いたします.

【引用文献】

1 Canales, L., Middlemas, R. O., 3rd, Louro, J. M. & South, M. A. Immunological observations in chronic mucocutaneous candidiasis. *Lancet* **2**, 567-571 (1969).

2 Kirkpatrick, C. H., Rich, R. R. & Bennett, J. E. Chronic mucocutaneous candidiasis: Model-building in cellular immunity. *Ann. Intern. Med.* **74**, 955-978 (1971).

3 Wells, R. S., Higgs, J. M., Macdonald, A., Valdimarsson, H. & Holt, P. J. Familial chronic muco-cutaneous candidiasis. *J. Med. Genet.* **9**, 302-310 (1972).

4 Ishimura, M. *et al.* Nationwide survey of patients with primary immunodeficiency diseases in japan. *J. Clin. Immunol.* **31**, 968-976 (2011).

5 Nagamine, K. *et al.* Positional cloning of the apeced gene. *Nat. Genet.* **17**, 393-398 (1997).

6 Sharfe, N., Dadi, H. K., Shahar, M. & Roifman, C. M. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 3168-3171 (1997).

7 Minegishi, Y. *et al.* Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity* **25**, 745-755 (2006).

8 Minegishi, Y. *et al.* Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of stat3 cause hyper-ige syndrome. *Nature* **448**, 1058-1062 (2007).

9 Engelhardt, K. R. *et al.* Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (dock8) in the autosomal-recessive form of hyper-ige syndrome. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **124**, 1289-1302 e1284 (2009).

10 Glocker, E. O. *et al.* A homozygous card9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1727-1735 (2009).

11 de Beaucoudrey, L. *et al.* Revisiting human il-12rbeta1 deficiency: A survey of 141 patients from 30 countries. *Medicine* **89**, 381-402 (2010).

12 Puel, A. *et al.* Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* **332**, 65-68 (2011).

13 van de Veerdonk, F. L. *et al.* Stat1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 54-61 (2011).

14 Liu, L. *et al.* Gain-of-function human stat1 mutations impair il-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J. Exp. Med.* **208**, 1635-1648 (2011).

15 Prando, C. *et al.* Inherited il-12p40 deficiency: Genetic, immunologic, and clinical features of 49 patients from 30 kindreds. *Medicine* **92**, 109-122 (2013).

16 Boisson, B. *et al.* An act1 mutation selectively abolishes interleukin-17 responses in humans

with chronic mucocutaneous candidiasis. *Immunity* **39**, 676-686 (2013).

17 Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. & Nakae, S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* **34**, 149-162 (2011).

18 Song, X. & Qian, Y. Il-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Cell. Signal.* **25**, 2335-2347 (2013).

19 Yang, X. & Zheng, S. G. Interleukin-22: A likely target for treatment of autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* (2014).

20 Najjar, I. & Fagard, R. Stat1 and pathogens, not a friendly relationship. *Biochimie* **92**, 425-444 (2010).

21 Reich, N. C. Stats get their move on. *JAKSTAT* **2**, e27080 (2013).

22 Mizoguchi, Y. *et al.* Simple diagnosis of stat1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J. Leukoc. Biol.* (2013).

23 Lee, Y. N. *et al.* A systematic analysis of recombination activity and genotype-phenotype correlation in human recombination-activating gene 1 deficiency. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **133**, 1099-1108 (2014).

24 Takezaki, S. *et al.* Chronic mucocutaneous candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the stat1 DNA-binding domain. *J. Immunol.* **189**, 1521-1526 (2012).

25 Al Rushood, M. *et al.* Autosomal dominant cases of chronic mucocutaneous candidiasis segregates with mutations of signal transducer and activator of transcription 1, but not of toll-like receptor 3. *J. Pediatr.* **163**, 277-279 (2013).

26 Aldave, J. C. *et al.* A 1-year-old girl with a gain-of-function stat1 mutation treated with hematopoietic stem cell transplantation. *J. Clin. Immunol.* **33**, 1273-1275 (2013).

27 Hori, T. *et al.* Autosomal-dominant chronic mucocutaneous candidiasis with stat1-mutation can be complicated with chronic active hepatitis and hypothyroidism. *J. Clin. Immunol.* **32**, 1213-1220 (2012).

28 Lee, P. P. *et al.* Penicillium marneffei infection and impaired ifn-gamma immunity in humans with autosomal-dominant gain-of-phosphorylation stat1 mutations. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **133**, 894-896 (2014).

29 Mekki, N. *et al.* Il-17 t cells' defective differentiation in vitro despite normal range ex vivo in chronic mucocutaneous candidiasis due to stat1 mutation. *J. Invest. Dermatol.* (2013).

30 Romberg, N. *et al.* Gain-of-function stat1 mutations are associated with pd-l1 overexpression and a defect in b-cell survival. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **131**, 1691-1693 (2013).

31 Sampaio, E. P. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 1 (stat1) gain-of-function

mutations and disseminated coccidioidomycosis and histoplasmosis. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **131**, 1624-1634 (2013).

32 Smeekens, S. P. *et al.* Stat1 hyperphosphorylation and defective il12r/il23r signaling underlie defective immunity in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *PLoS one* **6**, e29248 (2011).

33 Soltesz, B. *et al.* New and recurrent gain-of-function stat1 mutations in patients with chronic mucocutaneous candidiasis from eastern and central europe. *J. Med. Genet.* **50**, 567-578 (2013).

34 Toth, B. *et al.* Herpes in stat1 gain-of-function mutation. *Lancet* **379**, 2500 (2012).

35 Uzel, G. *et al.* Dominant gain-of-function stat1 mutations in foxp3 wild-type immune dysregulation-polyendocrinopathy-enteropathy-x-linked-like syndrome. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **131**, 1611-1623 (2013).

36 Wildbaum, G. *et al.* Continuous g-csf therapy for isolated chronic mucocutaneous candidiasis: Complete clinical remission with restoration of il-17 secretion. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **132**, 761-764 (2013).

37 Mao, X. *et al.* Structural bases of unphosphorylated stat1 association and receptor binding. *Mol. Cell.* **17**, 761-771 (2005).

38 Zhong, M. *et al.* Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated stat1 for the activation-inactivation cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 3966-3971 (2005).

39 Mertens, C. *et al.* Dephosphorylation of phosphotyrosine on stat1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the n-terminal domain. *Genes. Dev.* **20**, 3372-3381 (2006).

40 Mitsdoerffer, M. *et al.* Proinflammatory t helper type 17 cells are effective b-cell helpers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 14292-14297 (2010).

41 Siegel, A. M. *et al.* A critical role for stat3 transcription factor signaling in the development and maintenance of human t cell memory. *Immunity* **35**, 806-818 (2011).

42 Sharfe, N. *et al.* Fatal combined immunodeficiency associated with heterozygous mutation in stat1. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **133**, 807-817 (2014).

43 Kisand, K. *et al.* Chronic mucocutaneous candidiasis in apeced or thymoma patients correlates with autoimmunity to th17-associated cytokines. *J. Exp. Med.* **207**, 299-308 (2010).

44 Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing cd4+ effector t cells develop via a lineage distinct from the t helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123-1132 (2005).

45 Melton, A. C. *et al.* Regulation of il-17a production is distinct from il-17f in a primary human cell co-culture model of t cell-mediated b cell activation. *PLoS one* **8**, e58966 (2013).

46 Anderson, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**, 1395-1401 (2002).

47 Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L. & Goodnow, C. C. Aire regulates negative selection of organ-specific t cells. *Nat. Immunol.* **4**, 350-354 (2003).

48 Peterson, P., Org, T. & Rebane, A. Transcriptional regulation by aire: Molecular mechanisms of central tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 948-957 (2008).

49 Kogawa, K. *et al.* Expression of aire gene in peripheral monocyte/dendritic cell lineage. *Immunol. Lett.* **80**, 195-198 (2002).

50 Gardner, J. M. *et al.* Deletional tolerance mediated by extrathymic aire-expressing cells. *Science* **321**, 843-847 (2008).

51 Perniola, R. Expression of the autoimmune regulator gene and its relevance to the mechanisms of central and peripheral tolerance. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 207403 (2012).

52 Kluger, N., Krohn, K. & Ranki, A. Absence of some common organ-specific and non-organ-specific autoimmunity in autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy. *Endocr. Connect.* **2**, 61-68 (2013).

53 Meager, A. *et al.* Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med* **3**, e289 (2006).

54 Puel, A. *et al.* Autoantibodies against il-17a, il-17f, and il-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type i. *J. Exp. Med.* **207**, 291-297 (2010).

55 Brucklacher-Waldert, V. *et al.* Phenotypical characterization of human th17 cells unambiguously identified by surface il-17a expression. *J. Immunol.* **183**, 5494-5501 (2009).

56 Wolff, A. S. *et al.* Anti-cytokine autoantibodies preceding onset of autoimmune polyendocrine syndrome type i features in early childhood. *J. Clin. Immunol.* **33**, 1341-1348 (2013).

57 Meloni, A. *et al.* Autoimmune polyendocrine syndrome type 1: An extensive longitudinal study in sardinian patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, 1114-1124 (2012).

58 Rautemaa, R. *et al.* Decreased susceptibility of candida albicans to azole antifungals: A complication of long-term treatment in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (apeced) patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 889-892 (2007).

59 Ross, C., Hansen, M. B., Schyberg, T. & Berg, K. Autoantibodies to crude human leucocyte interferon (ifn), native human ifn, recombinant human ifn-alpha 2b and human ifn-gamma in healthy blood donors. *Clin. Exp. Immunol.* **82**, 57-62 (1990).

60 Burbelo, P. D. *et al.* Anti-cytokine autoantibodies are associated with opportunistic infection in

patients with thymic neoplasia. *Blood* **116**, 4848-4858 (2010).

61 Pozzetto, B., Mogensen, K. E., Tovey, M. G. & Gresser, I. Characteristics of autoantibodies to human interferon in a patient with varicella-zoster disease. *J. Infect. Dis.* **150**, 707-713 (1984).