



Title	STAT1 coiled-coil domain新奇優性阻害型変異によるMendelian susceptibility to mycobacterial diseasesの病態解析
Author(s)	植木, 将弘
Description	配架番号 : 2279
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12538号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12538
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65890
Type	doctoral thesis
File Information	Masahiro_Ueki.pdf



学 位 論 文

STAT1 coiled-coil domain 新奇優性阻害型変異による

Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases の病態解析

(Studies on novel heterozygous mutation in coiled-coil domain of *STAT1* in a patient with Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases.)

2017 年 3 月

北海道大学

植木 将弘

Masahiro Ueki

学 位 論 文

STAT1 coiled-coil domain 新奇優性阻害型変異による

Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases の病態解析

(Studies on novel heterozygous mutation in coiled-coil domain of *STAT1* in a patient with Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases.)

2017 年 3 月

北海道大学

植木将弘

Masahiro Ueki

目 次

発表論文目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	8 頁
患者背景	10 頁
実験方法	11 頁
実験結果	29 頁
考察	46 頁
総括・結論	48 頁
謝辞	49 頁
引用文献	50 頁

【発表論文目録】

本研究の一部は以下の論文に発表した

1. A heterozygous dominant-negative mutation in the coiled-coil domain of STAT1 is the cause of autosomal-dominant Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases

Masahiro Ueki, Masafumi Yamada, Kenta Ito, Yusuke Tozawa, Saeko Morino, Yuho Horikoshi, Hidetoshi Takada, Shimaa Said Mohamed Ali Abdrabou, Shunichiro Takezaki, Ichiro Kobayashi, Tadashi Ariga

Clinical Immunology, 2016 Nov 14;174:24-31.

【緒言】

1. 原発性免疫不全症と Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD)

原発性免疫不全症とは、先天的な遺伝子の異常を背景に免疫系に異常を生じ、その結果としてウイルス・真菌・細菌等の一つもしくは複数の病原体に対して易感染性を呈する疾患である。また近年、免疫系の異常な活性化により生じる自己炎症疾患も原発性免疫不全症の範疇に含まれるようになった。2015年に発表された International Union of Immunodeficiency societies による免疫不全症の分類では「(1) 複合型免疫不全症、

(2) 免疫不全を伴う特徴的な症候群、(3) 抗体産生不全症、(4) 免疫調節障害、(5) 食細胞数・機能の異常、(6) 自然免疫異常、(7) 自己炎症疾患、(8) 補体欠損症、(9) 原発性免疫不全症の表現型をとる疾患」の9つに分類されている¹。

この中で、Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD) は(5) 食細胞の数・機能の異常に含まれる。MSMDは *Mycobacterium bovis* (Bacille de Calmette et Guérin: BCG) 等の弱毒菌を含むマイコバクテリアやサルモネラなどの細胞内寄生菌に対して易感染性を呈する疾患である²。その発症機序は下記の免疫システムの破綻である。マイコバクテリアやサルモネラ等の細胞内寄生菌が生体内に侵入した際に、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞が抗原を認識する。これらの細胞は IL-12, IL-23 等のサイトカインを分泌しヘルパーT細胞を Th1 へ分化、さらに Th1 細胞および Natural Killer 細胞 (NK 細胞) を活性化させる。活性化した Th1 細胞は IFN- γ を産生し、抗原提示細胞を活性化させることで免疫応答を増強させ、抗原を除去する。MSMD ではこの IL-12・IFN- γ シグナルに関連する分子が欠損または障害されることで発症する³ (図1)。これまでに報告されている MSMD を発症する疾患について表1に示す。

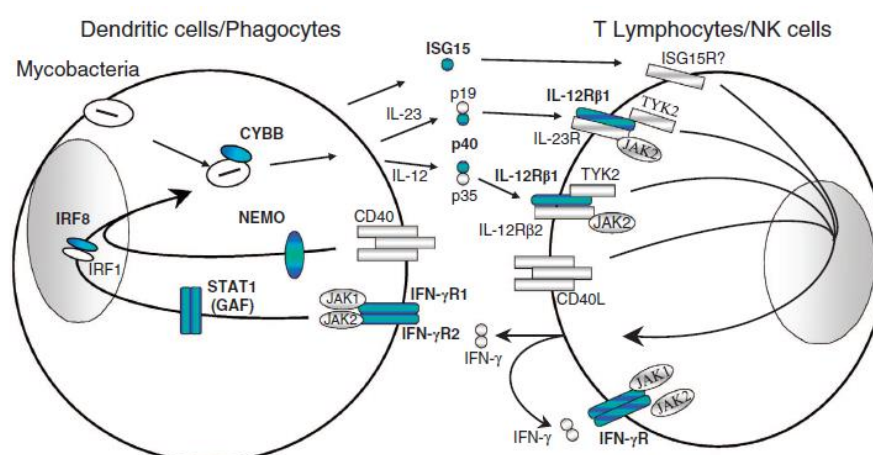


図1 IL-12・IFN- γ シグナルの模式図と既報の原因蛋白(文献3より引用)
青で示された蛋白の異常で MSMD を発症することが報告されている。

疾患名	遺伝子	遺伝形式	文献
IFN- γ R1 欠損症	<i>IFNGR1</i>	AR・AD	Jouanguy, E. et al. 1996 ⁴ Newport, M. J. et al. 1996 ⁵ Jouanguy, E. et al. 1999 ⁶
IFN- γ R2 欠損症	<i>IFNGR2</i>	AR・AD	Dorman, S. E. et al. 1998 ⁷ Kong, X. F. et al. 2013 ⁸
IL-12・IL-23R1 欠損症	<i>IL12RB1</i>	AR	Altare, F. et al. 1998 ⁹ de Jong, R. et al. 1998 ¹⁰
IL-12p40 欠損症	<i>IL12B</i>	AR	Altare, F. et al. 1998 ¹¹
STAT1 欠損症	<i>STAT1</i>	AD	Dupuis, S. et al. 2001 ¹²
NEMO 異常症	<i>IKBKG</i>	XR	Filipe-Santos, O. et al. 2006 ¹³
マクロファージ gp91phox 欠損症	<i>CYBB</i>	XR	Bustamante, J. et al. 2011 ¹⁴
IRF8 欠損症	<i>IRF8</i>	AD・AR	Hambelton, S. et al. 2011 ¹⁵
ISG15 欠損症	<i>ISG15</i>	AR	Bogunovic, D et al. 2012 ³

表 1 MSMD を発症する原発性免疫不全症

AD; Autosomal dominant, AR; Autosomal recessive, IFN; Interferon, IL; Interleukin, IRF; Interferon regulatory factor, ISG; Interferon stimulated gene, XR; X-linked recessive

これらの中で、マイコバクテリア属に対する易感染性が中心のものはマクロファージ gp91phox 欠損症と AD-IRF8 欠損症であり、IFN- γ R1 欠損症、IL-12・IL23R1 欠損症、IL-12p40 欠損症、IFN- γ R2 欠損症、STAT1 欠損症ではサルモネラ属など細胞内寄生菌全般に易感染性を示す。また、IFN- γ R1 欠損症、IFN- γ R2 欠損症では様々なウイルス感染症も報告されている¹⁶。AR-IRF8 欠損症ではマイコバクテリア属に加えてカンジダ属に易感染性を呈する。また、NEMO 異常症では外胚葉の発生異常を伴い、歯牙の異常が見られることが多いといったように、疾患によっては MSMD 以外の症状を伴うものも含まれる。

2. Signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 に関する背景知識¹⁷⁻¹⁹

STAT ファミリーは STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6 の 7 つから構成されており, STAT1 は細胞内シグナル伝達蛋白であると同時に転写因子として機能している. STAT1 を活性化する因子として, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- λ , IFN- ω , IL-2, IL-3, IL-6, IL-9, IL-12, IL-15, IL-17, IL-22, IL-26, IL-27, Epidermal Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor, Fibroblast Growth Factor, Hepatocyte Growth Factor, Growth Hormone, Angiotensin, Oncostatin M 等がある. STAT1 は活性化因子・シグナルによって役割が一部異なり, IFN- α ・IFN- γ ・Growth Hormone 等の刺激ではシグナル伝達蛋白および転写因子として機能するが, Hepatocyte Growth Factor 刺激ではリン酸化されシグナル伝達蛋白としては機能するが, 転写因子としては機能しない.

IFN シグナルにおいて STAT1 はシグナル伝達・転写因子として重要な役割を担っている. IFN- α ・IFN- β ・IFN- ϵ ・IFN- κ ・IFN- λ ・IFN- ν ・IFN- ω らの Type-I Interferon や IFN- λ 1~3 の Type-III Interferon シグナルでは, リガンドが受容体に結合すると TYK2 と JAK1 が活性化し, STAT1・STAT2 のチロシン部位をリン酸化する. リン酸化 STAT1・STAT2 は IRF9 と heterotrimer を形成し, 核内へ移行する. 核内へ移行した複合体は DNA の Interferon-stimulated response elements (ISRE) 領域へ結合し, 関連遺伝子の発現を増加させる. その後解離した複合体はフォスファターゼによる脱リン酸化を受け, 転写活性を喪失する. Type-II interferon である IFN- γ が受容体に結合した場合には, JAK1 と JAK2 が活性化し, STAT1 のチロシン部位をリン酸化する. リン酸化 STAT1 は homodimer を形成し核内へ移行, 核内へ移行した複合体は Interferon- γ -activated sites (GAS) 領域に結合して関連遺伝子の発現を増加させる. その後解離した複合体はフォスファターゼによる脱リン酸化を受けて転写活性を喪失する. しかし, この STAT1 の細胞内動態に関しては不明な点も残されている. Type-I interferon シグナルは主にウイルス感染に対する免疫応答として重要な役割を担っているのに対し, Type-II interferon は主にマイコバクテリア属やサルモネラ属など細胞内寄生菌に対する免疫応答として重要である. (図 2)

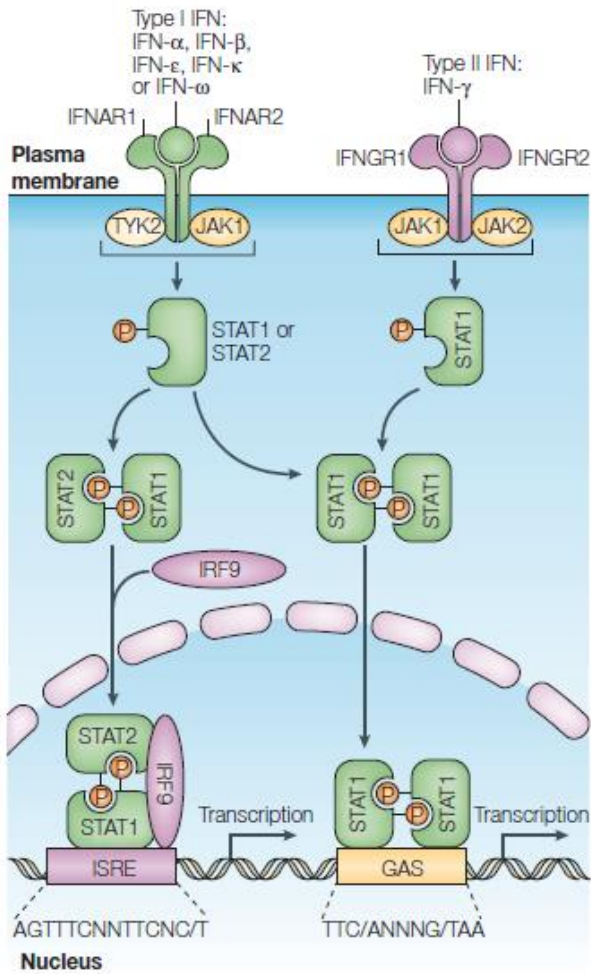


図2 Type-I interferon・Type-II interferon シグナル (文献 17 より引用)

Type-I interferon は主にウイルス感染に, Type-II interferon は主にマイコバクテリアやサルモネラなどの細胞内寄生菌感染に重要な役割を果たす.

3. 既報の *STAT1* 変異

これまでに、*STAT1* の変異では次の 5 種類の遺伝形式・表現型の疾患が生じることが報告されている。1 つの遺伝子で複数の遺伝形式、異なる表現型を呈することは同じ先天性免疫不全症である RAG1 や WASP 遺伝子でも報告されているが、稀である^{20, 21}。

1. 常染色体優性（機能獲得型）慢性皮膚粘膜カンジダ症（Autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis : AD-CMCD）
2. 常染色体優性（優性阻害型）メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症（Autosomal dominant Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases : AD-MSMD）
3. 常染色体優性複合型免疫不全症（Autosomal dominant combined immunodeficiency : AD-CID）
4. 常染色体劣性 *STAT1* 部分欠損症
5. 常染色体劣性 *STAT1* 完全欠損症

これまでに 83 種類の AD-CMCD、7 種類の AD-MSMD、2 種類の AD-CID、4 種類の *STAT1* 部分欠損症、4 種類の *STAT1* 完全欠損症の遺伝子変異が報告されている（図 3）。

Gain-of-function AD (CMCD)	R70H N89Y	D151E I156T I160F L163R D165G D165H Q167H Q167E	Q167P D168E Y170N D171N F172L C174R N179K M202I	M202V M202T L206H R210I E235A V266I A267V M202I	R274G R274Q R274W K278E L283M Q285R K286I Y287D	Y287H T288A T288I T288P Y289H Y289C D292N D292E	P293S P293L P293T I294T K298N L301del D292N	R321S R321G C324R P329L K344E L351F E353K L354M	N355D N357D L358W L358F E370D G384D G384C T385M	T385K T387A K388E V389A M390T M390I M392T N397D	L400V L400Q F404Y T419R S466R D517G N574I	H629Y N658S	T720I E711Q
STAT1	NH2	N-term.	Coiled-coil				DNA-binding		Linker	SH2	Tail seg.	TA	COOH
Partial deficiency AD (MSMD)			G250A				E320Q Q463H			K637E M654K K673R	Y701C L706S		
Partial deficiency AR	A46T	K201N K211R									P696S		
Complete deficiency AR	c.372G>C (exon 3 skipping)									c.1758_1759delAG L600P c.1928insA			
Complete deficiency AD (Progressive CID)		I294T					C324R						

図 3 既報のヒト疾患の原因となる *STAT1* 遺伝子変異の一覧。

我々が今回証明した優性阻害型変異を赤で示した。

STAT1 coiled-coil domain (CCD) には多数の AD-CMCD の遺伝子変異がこれまでに報告されてきているが、AD-MSMD の報告はされていない。我々は今回、患者血球、EB ウイルス不死化 B 細胞株、一過性に変異 *STAT1* を発現した HeLa 細胞で解析を行い、AD-MSMD を発症する *STAT1* 変異を CCD において初めて証明した。

4. 抗サイトカイン自己抗体

以前我々は STAT1 AD-CMCD では抗 IL-17F 自己抗体産生例が多い点について報告した²²。また、多腺性自己免疫疾患 1 型の患者では各種のサイトカインに対する自己抗体が産生され、それらが中和活性をもつため、病態に関連する可能性が示唆されている²³⁻²⁵。さらに、マイコバクテリア属感染症を呈した患者の中に抗 IFN- γ 自己抗体を持つ患者がいることが 1998 年に Madariaga らから報告された²⁶。近年になりそのエピトープなども解明され、マイコバクテリア属等の感染症では重要な要素と考えられている^{27, 28}。

【略語表】

Ab	Antibody
AD	Autosomal dominant
AR	Autosomal recessive
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
CBA	Cytometric Bead Array [®]
CCD	Coiled-coil domain
CE	Cytoplasmic extract
CID	Combined immunodeficiency
CMCD	Chronic mucocutaneous candidiasis disease
CT	Computed tomography
DBD	DNA-binding domain
DDW	Deionized distilled water
EBV	Epstein-Barr virus
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
FBS	Fetal bovine serum
GAS	Interferon- γ -activated sites
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP-10	Interferon gamma-induced protein 10
IRF	Interferon regulatory factor
ISG	Interferon stimulated gene
ISRE	Interferon-stimulated response elements
LCL	Lymphoblastoid cell lines
LPS	Lipopolysaccharide
MDM	Monocyte-derived macrophage
MRI	Magnetic resonance imaging

MSMD Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases
NK Natural killer
PBMC Peripheral blood mononuclear cell
PBS Phosphate buffered saline
rh Recombinant human
STAT Signal transducers and activator of transcription
TBST Tris buffered saline with 0.1% Tween®20
Th Helper T cell
qRT-PCR Quantitative RT-PCR
WT Wild type
XR X-linked recessive

【患者背景】

3歳女児，両親に近親婚なし．家族歴に特記事項無し．新生児期に臍帯脱落遅延はなく，新生児期・乳児期にウイルス・真菌・細菌感染症の反復や重症化のエピソードはなかった．生後4か月でBCG接種を受け，生後7か月で左腋窩・左鎖骨上窩のリンパ節腫大が出現した．BCGリンパ節炎の診断でイソニアジド治療を6か月間施行され，リンパ節は縮小した．2歳4か月時に左鎖骨上窩リンパ節腫大の再出現と下顎部の腫脹が出現した．

Magnetic resonance imaging (MRI)・Computed tomography (CT)による全身検索を行ったところ，左鎖骨上窩リンパ節腫大，MRIでの肋骨・下顎部の異常信号，肝臓・脾臓に結節性病変を認めた．下顎骨骨生検を施行したところ，抗酸菌が陽性となりイソニアジド・リファンピシン・シプロフロキサシンで治療を開始した．培養検査の結果，*Mycobacterium bovis*が検出され，感受性に合わせてイソニアジド・リファンピシン治療を継続し，MRI・CT画像でもリンパ節・下顎骨とも病変は縮小・消失している．

これまでに，インフルエンザ菌・肺炎球菌・ジフテリア・破傷風・百日咳・ポリオの不活化ワクチンを施行され，特記すべき副作用はなく特異抗体も獲得していた．麻疹・風疹・水痘・ムンプス生ワクチンを施行され，副作用や特異抗体の獲得に問題はなかった．

好中球の数・機能の異常を示唆する所見はなく，リンパ球数・サブセットとも異常はなかった．Phytohemagglutinin・Concanavalin Aによるリンパ球幼若化試験も正常であった．

以上より，マイコバクテリア属に対する免疫不全症が疑われた．

【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、本人と代諾者（親権者）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

採取されたヘパリン加血液300 μ lに対し、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°C, 1500g, 5分間遠心した後に、1xPhosphate buffered saline (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、添付されたプロトコールに則ってDNAを抽出した。

ダイレクトシーケンス解析

患者の *CYBB*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IKBKG*, *IL12B*, *IL12RB1*, *IRF8*, *ISG15*, *STAT1* 遺伝子のダイレクトシーケンス解析はかずさ DNA 研究所に依頼した。PCR とシーケンスに使用したプライマーは表 2 の通りである。PCR は illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, U.K), シーケンスは BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を添付のプロトコールに則って行った。

未報告であるが *IL12RB2* 遺伝子異常でも MSMD を発症する可能性が考えられたため、ダイレクトシーケンス解析を行った。プライマーの設計には Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) を用いた。用いたプライマーは表 2 の通りである。*IL-12RB2* 遺伝子の PCR は KAPA Taq HS ReadyMix with dye® (NIPPON Genetics Co, Ltd, Japan) を用いた。添付されているプロトコールに則って PCR 反応液を調製し、PCR の条件は denaturation 94°C-30 秒, annealing 58°C-30 秒, extension 72°C-50 秒, 35 サイクルとした。PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、増幅された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則り DNA を抽出した。ダイレクトシーケンス解析は PCR で使用したプライマーを用いて FASMAC 社に依頼した。

CYBB

Exon	Forward sequence	Reverse sequence
1	AGGGCTGCTGTTTTTCATTTTC	CCAAGATAACCCCGAGAAGTC
2	GGAATCTACTGTGGAAATGCG	GGAAGATGAACAAGAATGTCTG
3	ACAGGGCATATTCTGTGCTC	GGCCTTTGAAAATTAGAGGAAC
4	AAATGTTTGACACATAGCAAGC	AAAGGTATCTATGAATAGAGGGAAGTC
5	CTTACAATAAATTTGTTTCATACCCTTC	TCCTCAATTGTAATGGCCTAGAG
6a	AATAGTCCTGCATTTGAGAACC	TCACAAAGAGATGATGTGTGTACC
6b	TTGTCATCACGCTGTGCC	GCATCCTGCCTAGAAATTGAG
7	TGAAAAGTACAGGGCCTACATC	CTTAGACACAGGTAAAGATTGTCAG
8	GCCTACAAAGATTAAGTTGGCTTC	AGGAGTTGGGAAGACTTGTCC
9a	TGGGCCAATTTAGCTCAG	CACAGCCACAAGCATTGAAC
9b	GTCAAGTGCCCAAAGGTGTC	AAACATGGAGGAAGAGGAGC
10a	TGCCCCATCTCACTCTGAAG	TTGAGAATGGATGCGAAGG
10b	TTCAGCTATGAGGTGGTGATG	GCCTCACATGGCAGAGTATG
11	GGTAATGCTGATAGGGCCTG	GGGAAGTTCGTAAGCCCTG
12	TTGTATGTGCTTTTACAGAATGTCTC	CGCTTTAGGCAGATGCAAG
13	TTTGTAGACATCTCATCCCAAAG	TTATTTGAGCATTTGGCAGC

IFNGR1

Exon	Forward sequence	Reverse sequence
1	GGTCCCGCAGGCGCTCG	CTCGGAGAAGCGGGGCG
2	TGGGCAATGTGGCATCTTAC	GGGAAGGCTGATGAAAGAAC
3a	GCAAAGCACAGACAGAAATGG	TCCAACCCTGGCTTTAACTC
3b	TCAGAAATGGATTGATGCCTG	CTGACTCTAAATTCCTCCAAGTG
4a	CCATTTAGTTCCAAGGCCAG	TTCGGGATCATAATCGACTTC
4b	TGATTGACATATTTACCCCTTCAG	CACTACAGAAAGGAACAACCTTTTG
5a	TTGTTTGACCAGGACTAATATGG	CACCCACACATGTAAGACTC
5b	GCGATTCCAGTATCCTCACTG	GATCCTATTTTAGTTACTGCTCCCTC
6	TGTTCTTTAAACTCTGGCCC	TGACTGATTGATGGCAGGTG
7a	AAATGTGCCATTTGGTGGTC	ATGCCTGGAAGTGTGCTG
7b	GAAAAGGAGGTGGTCTGTGAAG	GGTGAAGAACTCTCTCTCTATTGG
7c	CAATCCAGGAAAAGTGAAC	TGATCACTCTCAGAACAAATTC
7d	GGCAGCATCGCTTTAAACTC	CGCTATCATCCACAAGTAGATCC

7e	CCAGCTGTCTGGAATCACATAG	AAAGCAGAAAACTGTCCAGG
----	------------------------	----------------------

IFNGR2

Exon	Forward sequence	Reverse sequence
1	GGGCGGCGACGTGAGCG	GCCGCGGAGGCCAGG
2	TTGTAATTATTTCCCTCTCTCTCCTC	CCAGGGTTCCGCACGATG
3a	TGGGGAAACTATTACACATGAAAC	GCGTAGAGTGACATTGAAATCC
3b	AGTGTGACTTCACTGCCGC	CGCAAGTGAAGAAAACCTGG
4	TATCTATAATACATATGTGTATGTGTG	TTTGCTAAGCCAGAACTGC
5a	AAAGATGTAGGCAGCTTGGC	GTTGCTTAAATGCCCCACTC
5b	CAGAAGCAACTCCATTTTCATTG	TAAGCATTCCCCGATTTAC
6a	TCTTTAAGCAGCATGGATGG	TGCTTGGTGGAGTGTGAAAC
6b	GAACATTTTCGTTGCTGTCG	GCAACAGAGCAAGACCTG
7	AAAAGGTCTGGTATACTGAACTGG	AGCTCCGATGGCTTGATCTC

IKBK

Exon	Forward sequence	Reverse sequence
1a	CCTCCCACAGGCCCATC	AACAGCATCTTTCCCCACC
1b	AATCCCAGTCTCTTCCCCTC	GCCACTTCCTGCCTTCTCAG
2a	TGGGTAAGGATGTGGGTCTC	AGGCAGGTGCAGCATGG
2b	CAACTGTGTGAGATGGTGCAG	GTGCAGGTGGGGAGAAGAC
3a	CTGGCCTCTGACTTCCTGAG	CCTTCTGCCTCTTCAGATCG
3b	CCAGAGGGAGGAGAAGGAG	GTTCCCTTGTGGAACACTGG
4	CTTGCGGATGGCAGGAG	GCTTTTGAAACCCTGGAAG
5a	TCACAGGGTGTTCAGAGCC	CGCTGACTCACTTCTCCTCC
5b	CTGGAGAGTGAGCGCGAG	TCAAGTGTAGAACCACAGACCC
6	GGCTGGACTGGCATGAG	TCTCAAGGTTCAAGGCCAC
7	CTTCTCAGCCAGCCTCG	AGACTCTCCAGGTCCCAGTG
8	TCTGCTTTGTTCTGTGGTG	ACCCACTGCTCACACGG
9	CACTAGTCCAGCCAAGGAGC	AAGGTCGAAGTGTGACCTCC
10	TCCTGCCAAGTCTCCGTC	CGCAGACTGCACGGTCC

IL12B

Exon	Forward sequence	Reverse sequence
2	CAAAGGTAACAAGAATTATTGACATTC	GCCCAAGAGTCCTGGCTTAG
3a	AAAACACAGTCCCAGAGTTCC	TTAGAACCTCGCCTCCTTTG
3b	TGGTATCACCTGGACCTTGG	GACTTGGCTTTTCAATTTGTTG
4	GATTCATCACAATCAAAACCTTTC	AGGTCACTGAGAGGTTGCCC
5a	TGGCTACAATCACTAGGAACTC	ATGGGCAGACTCTCCTCAGC
5b	GGGGACAACAAGGAGTATGAG	ACCACCTACCCACAGTGC
6a	AACCACTGAACTCCAAAGCC	CAGGGAGAAGTAGGAATGTGG
6b	GCCATTAAAGAATTCTCGGC	TCTTCTCACTTTATGGTGGGC
7	TATGCATTGCAGAAACAGGC	CTTTCCTCTCCAACACAGCC

IL12RB1

Exon	Forward sequence	Reverse sequence
1	AGGTGGCAGAGAGGCTCC	ACACATACACGTGCCTCCAC
2	TCTCCCCACACAGTGCAAG	GGATGGGGTCAGGCAGAG
3	CTTAGGCACGAAGACCCCTC	TGAAGCAAGAGTGGGATGG
4a	TGATGCACAAAGTCGGCTG	CTGGCCCAGGATTCCAC
4b	AGGCTGCAGTTCTCCGAC	AGCCTGATGGCCTCTCTG
5	TTCAGGGCCCATTAACCTCAC	GAAGGTGCCCTGGAGAGG
6	AACAGCAAATATTTTTCAGCACC	AAATTCAGCATTGGACCTGG
7	TGCCAAGTCCTGGACAATTC	CCGGCTGTTGCCTTATTTTC
8	CCATCAGTCTTTCTCTCCTTCC	CCTAGGCTTTTGCCTCCTG
9a	TGCCTATGGGATGATGAGTG	AGGCAGCACCCGAGAGATAG
9b	GCTGTCTCTGCCGTGTAAG	GTGCTCAGCTCTGAGGGG
10a	GGGGAGAGAGATGGCAAC	AGGCTGCAGGTGGCAAG
10b	ATGTATTGGCCAGCCCG	ACCTAAAAGGGAGGGCACAG
11	GCAGAGGTGGGAACACAATC	AGTCACTGTGCCCAGCCTC
12a	GGCCTCGACCAGCATTC	CAGCGGACAACATACTCCTTTAG
12b	CGGTGAAGAATCATAGCTTGG	CCAGGATCCTCCCTTCCTC
13	GGCCTCTGAGGAGTAAAGAGG	ATTGTGGGAAGCGCAGTG
14	CCTGAGGAAGAGGCAGGAG	TGCCCAGCATCATTACCATC
15	AAAAACCTCAGCTCCTCTCAC	AATGCGTAACCCTTGTCCAG

16a	CTGCTGTGGATGGGAAGTAG	CTCAGGTAGCTCTGTCTTCTCG
16b	AGGAGGCCCTGGTGGTAG	AGCGATGGATGTCTAGCCC
17	ACCAAATCCCTACAACCACC	GGGTCCAAATGTGACTCCTG

IL12RB2

Exon	Forward sequence	Reverse sequence
1	GACAGCAAATACAAATGGAAGTT	GACGCGAGACACGGAATC
2	TCTGAGCTATTTTGGCTCTGG	CCAACTACCAGAACATTTACCACA
3	TGGGGAATTACATAAACTCTTCA	TGGGAAAAGAAAGAACATTAACC
4	CCTGGGTTTACGGCATGTG	AGAAGATCTACAAAACAGCTGCAA
5	TCCCCTAGTCATAAGATTGACC	TCTCTGTCTTTCTTGAAACAACCA
6	GCTCATGCCAGTACATAAGACAA	TCTCTCGTGTGTACTTTTGGGATA
7	TAAGATCAAATAGCCTGGGTTT	TGCTTTTTTGATTGAGCACCA
8	CCAGAATTGTTTACTGAATGACCA	AGGAAGTGGGATTGAAACGA
9	GTCCAGGCACAGAGCATCAG	GGCCTGCAGGAGATAAGAGA
10	CGTTGGGATAAGCTGTTTGG	ATTGAAGGCAGGGTTCTGG
11–12	CCAGACTGTGCTTGAACCAT	GTGCACACACACCTCCTTGTGT
13	CGCATACACCAATCAGGATTTT	GAGTGTCCATTTCCCTGACC
14	TGCACTGAGAACCTGTGCTT	ACCCAGGCTTCCTCGTAACT
15	GGAGACAGTGCAGGTTGTGA	TGGGGTTTCACCATGTTAGC

IRF8

Exon	Forward sequence	Reverse sequence
2a	GGGTTGCTGTGATGAATGAG	AAGGGATCCGGAACATGC
2b	GATCGAGCAGATTGACAGTAGC	AGGGAAAGGAGACACTGTGC
3a	TATTTGTGATTGGAGTCGGC	CTTCCTCAAAATCTGGGCTC
3b	CTTGGAAGACGAGGTTACGC	TGTGGTGAAGGCTACAGGC
4	AGCAAAGGCTGTGATGCC	CCAGAAGACATGAGACTCCTCC
5	CCAGGTGGGAGATCAGTGAC	GTAAACCCTTCAGGCCATG
6	CTCCCTGTACACCACACCTG	TGGGTTATCTGGGCTTTGTC
7a	CAGGAGGGACCCTGTATGTC	GTCACCTGCCTCTGTTCGC
7b	CTGTCCCTGAGCCAGCC	CCTGCCTTTGCACACCAC
7c	GGAAGCTGTTCGGGCAC	GCAAATGGCACACAGATAGG
8	GGGAGTTGGAGGTCATCTCG	AAAAAAAAAAGCTGCCC

9a	GTCAAAGACAGTGCCCACC	CTGGAAACATCCGGAAGACC
9b	GGGAAGAGCTGTGGAGCC	AGGGAGATGGATGCAGGAC

ISG15

Exon	Forward sequence	Reverse sequence
1	AAATTTGGCCACCAGCG	GAAAATTGGCTGGCACAGAG
2a	GCAGCCAGTGCCTTGTG	GTCCTGCAGCGCCACAC
2b	CTGAAGGCGCAGATCACC	CTGCGGCCCTTGTATTTC
2c	GGTGGTGGACAAATGCGAC	GAGCTGGTCTCCAGGG
2d	CTGGAGGGTGTGCAGGAC	CAACAGCCTTTATTTCCGGC

STAT1

Exon	Forward sequence	Reverse sequence
3	TTGGAGCTATGGTTTCCATATAC	TCACTTAATCAACCAGTACTTTTAAGG
4	ACATTTGTTTTGTCTGTTTTACATAG	TGAATGAAGAAAAGTGCCTTCC
5	CAATACACAATAAAGTAAACATTCTGC	TCATTGCTTTGACATGGGC
6	GTGGGGACTTGACTTTGGAG	ACACCCCAAGCAATTGAAAC
7	GCCTAAAGTCTTTGGAAGTTGC	TCATCTTCGTTATCTAGTGTGAACAG
8	TGAATCTTGGCTTTTGTGG	TTTCCTCTCTTCTAAACTTTGAGTCC
9a	CCCCAGTTGAGAATGAAATG	ACCAGTTCTGCAGCTGATCC
9b	AACTTACCCAGAATGCCCTG	CAAAGGTACATTTATGTGTTTATGTGG
10a	TTAATCCAGGCTGCTTCTGG	AAGACTGAAGGTGCGGTCC
10b	AGAGTCTGCAGCAAGTTCGG	TGAATTAACGGTAAAATGTTTCCTC
11	TCATTGTGATTGCCTCAACC	GGGGTACAAACTACGTGACAGG
12	AAACGTTAATAGGGAATTGGC	TGGAGGAATCTGTGCTTGAG
13	TTCACTTACACTCTTATGCTCTTATAC	GCCCCAAATGTTGAACTTCC
14	GAGAAATACAGTAAAAGGTACGTG	TCTATTGTCAAAAGTCCTAAGAAACC
15	GAAGATAGCAACTTTGACCATTACC	TCCTTGCTAGACAGACCTGC
16	AGGATCTCTGTGGCCTGTTG	AAATACCTCCAGAACAAACACTG
17	TTATCTGAAGGTGACATTTCTGTG	GCGTGGGGTCTCTGCTTAAC
18	AGTGCCACACTTGTGACTGG	CAAAATAGCAGAGGGGAAAAG
19	GCAAATACAAGAGCCATCCG	CACAGCAAGAAACATGAGAACC
20	GGGCCATGGTAAGTCATTG	GTCTCAACCTCGCAGCAC
21	CAGCCATTTTCTTGGTTTGTAAAG	AGAGGGACTTCACACACATGG

22	TCCTCTTTCATTTTGGGATG	TTTGGATACAGATACTTCAGGGG
22b	CTTTCCTGACATCATTCGC	CCCCTCATCAGGAAAGACTG
23	TTGTATTCTGATGGAATTTTCGG	AAGGCTGGCTTGAGGTTTG
24	TCAATTACAGACAAAAGATAAAGTGTG	CTCCCTGCCTCTGAGCAC
25	CAAGCAATGTTTAATGTATGAGTCTG	GCTGGCCTTTCTTTCATTTTC

表 2 *CYBB*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IKBKG*, *IL12B*, *IL12RB1*, *IL12RB2*, *IRF8*, *ISG15*, *STAT1* 各遺伝子のダイレクトシーケンス解析に用いたプライマーの塩基配列

塩基置換・アミノ酸置換のデータベースによる解析

それぞれの遺伝子の塩基配列は, Ensembl database (<http://www.ensembl.org/>), Mutation@A Glance (<http://rapid.rcai.riken.jp/mutation/>) から得た. 検出された塩基置換が既報の疾患関連変異や Single Nucleotide Polymorphism・Single nucleotide variant であるかどうかを確認するために, National Center for Biotechnology Information database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Exon Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), および Human Genome Variation Database (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/index.html>) に照合した.

塩基置換・アミノ酸置換の影響の評価ツールとして, 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 SIFT アルゴリズム (<http://sift.jcvi.org/>), またこれらの影響を複合的に評価する Mutation Taster2 (<http://www.mutationtaster.org/>)²⁹ を用いた.

末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cell; PBMC) の分離

ヘパリン加血液 5 ml を生理食塩水で 2 倍に希釈し, Histopaque® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 4 ml に重層した. 20°C, 1500g, 30 分間遠心し, 濃度勾配法によって分離された生理食塩水・血漿の層を吸引したのちに PBMC 層を採取した. 1xPBS で 2 回洗浄・遠心を繰り返し, PBMC を得た.

Epstein-Barr ウイルス不死化 B 細胞株 (Epstein-Barr virus lymphoblastoid cell lines : EBV-LCL) の樹立

10% Fetal bovine serum (FBS) (Thermo, Rockford, IL) と 100 IU/ml Pen Strep (Life Technologies, Carlsbad, CA) を含む RPMI1640 培地 (Life Technologies) (RPMI 10%FBS) 1 ml に PBMC を懸濁した。これに B95-8 株上清を 0.45 μ m DISMIC-25AS[®] (ADVANTEC, Dublin, CA) で濾過した EBV 溶液 200 μ l とシクロスポリンを 2.5 μ g/ml の濃度になるよう添加し 37°C, 5%CO₂ で培養した。培養液の色が黄色に変化したところで培養液を 300 μ l 破棄し, RPMI 10%FBS を 300 μ l 添加することを繰り返し, EBV-LCL を樹立した。

Total RNA の抽出・Reverse Transcription PCR

2x10⁶ cells の PBMC または EBV-LCL に TRIzol[®] (Life Technologies) 1 ml を加え, ピペッティングした後に室温で 5 分間静置し, 200 μ l のクロロホルムを加えて激しく 15 秒間混和した。12000g, 4°C, 15 分間遠心し, 透明な上清を別のチューブに移した。500 μ l 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°C, 10 分間遠心し, 上清を廃棄した後に 75%エタノール 1ml を添加して激しく混和し, 再度 12000g, 4°C, 4 分間遠心した。室温で 10 分間乾燥させた後, RNase free water を 20 μ l 加えて激しく混和し, 60°C, 10 分間で溶解し, total RNA を得た。cDNA を得るための逆転写反応は PrimeScript RT reagent kit[®] (TaKaRa Bio Inc., Kusatsu, Japan) を用いて添付のプロトコールに従った。反応時間は 37°C-15 分, 85°C-5 秒, その後 4°C とした。

TA クローニング

患者で見られた塩基置換がアーチファクトではないこと, およびもう一方の allele が正常配列であることを確認するために, STAT1 の full-length cDNA (FL-STAT1 cDNA) を RT-PCR で作成し, TOPO-TA Cloning kit[®] (Life Technologies) を用いてクローニングを行った。FL-STAT1 cDNA は前述で得られた cDNA を PrimeSTAR[®] Max Premix を使用し, 表 3 の FL-STAT1 プライマーで, 条件を denaturation 94°C-30 秒, annealing 58°C-30 秒, extension 72°C-2 分, 35 サイクルとした。得られた RT-PCR サンプルを用いて, TA クローニングを行った。vector は pCR[™]2.1-TOPO[®]vector, コンピテントセルは DH5 α (Frontier institute, Ishikari, Japan) を使用し, クローニングの方法は添付のプロトコールに従った。Ampicillin (100 μ g/ml) を添加した LB 培地プレートの表面に X-gal[®] (Promega, Madison, WI) を塗布した後に, 形質転換後のコンピテントセルを散布し, 37°C, 5%CO₂ で 18 時間培養した。形成された白色のコロニーを滅菌した Distilled

deionized water (DDW) に suspend し、このうち 1 μ l を使用して PCR を行った．酵素は KAPA Taq HS ReadyMix with dye[®] (NIPPON Genetics) を使用し、プライマーは M13R プライマーと T7 プライマー（表 3）を使用、PCR 条件は denaturation 94℃-30 秒、annealing 58℃-30 秒、extension 72℃-2 分 30 秒、35 サイクルとした．得られた PCR 産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、2.5 kb の目的のサイズのバンドが形成されたかどうかでインサートチェックを行った．インサートの確認できたコロニーを培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit[®] (QIAGEN) を用いて plasmid を精製した．精製した plasmid は M13R, T7, および各 STAT1 プライマーを用いてダイレクトシーケンス解析を行った．（図 4）

表 3 M13R, T7, FL-*STAT1*, *STAT1* ダイレクトシーケンス解析に用いたプライマーの塩基配列

	Forward sequence	Reverse sequence
FL- <i>STAT1</i>	ATGTCTCAGTGGTACGAACTTCAGCAGCT	GCTCTGTAGAATTTCGACAGTATGATGAACACAGTATAG
M13R	TAAAACGACGGCCAG	
T7		TAATACGACTCACTATAGGG
<i>STAT1</i> -1	CAAATGCAAAACCTTGCAGA	TCGTTTGTGGTGGAAAGACA
<i>STAT1</i> -2	CTTGAAGACAGGGGTCCAGTT	AGGACAGATTCCTGGGTTC

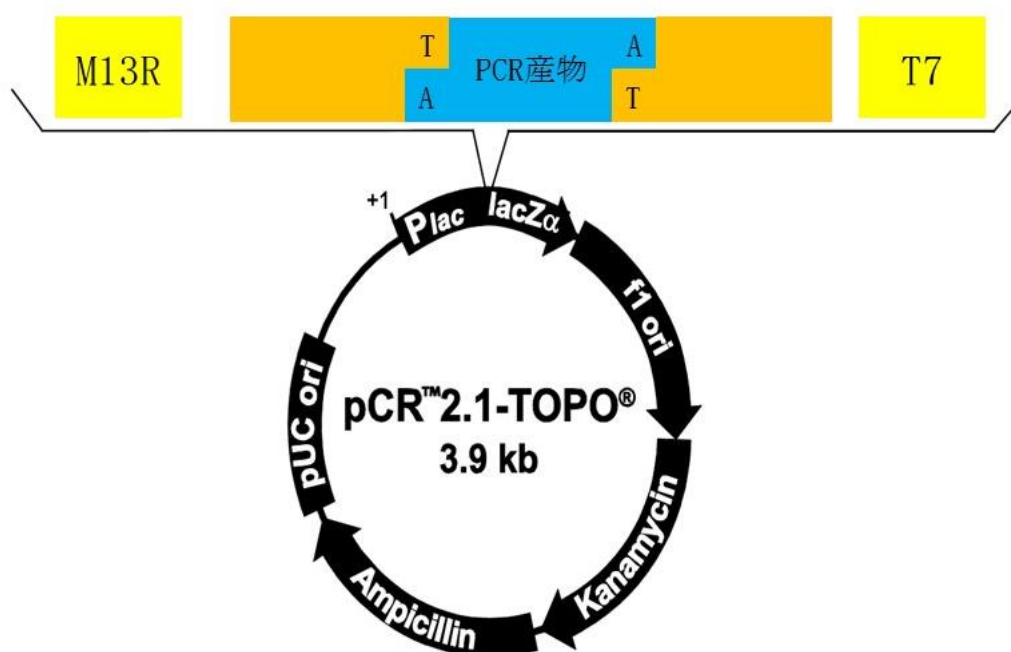


図 4 TOPO-TA Cloning vector の構造と各プライマー・クローニングサイトの位置関係 (TOPO[®] TA Cloning[®] Kit user guide より引用，一部改編)

Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) -STAT1 fusion protein および His-STAT1 fusion protein を発現する Plasmid construct の作成

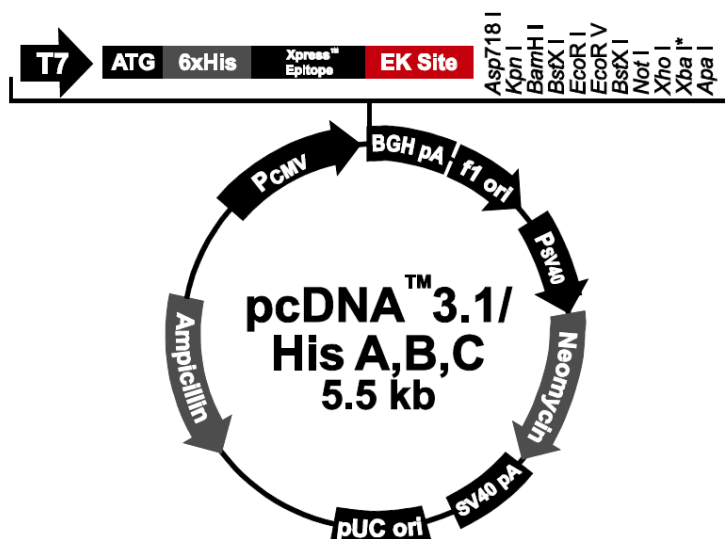
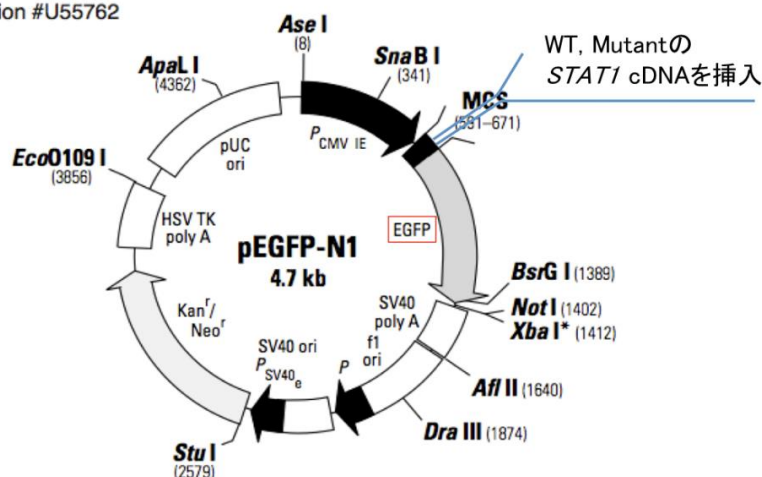
変異体の一過性発現実験のために EGFP-STAT1 fusion protein および His-STAT1 fusion protein を発現する Plasmid construct の作成を行った．既報の論文で STAT1 の C 端に EGFP を結合することでリン酸化や DNA 結合に影響することなく解析可能であることが確認されており，今回もその方法に習った³⁰．FL-*STAT1* cDNA をクローニングした pCR™ 2.1-TOPO® vector から，FL-*STAT1* cDNA を pEGFP-N1 vector (図 5) の multiple cloning site に BamHI で切断して挿入することができるが，そのまま挿入すると STAT1 と EGFP の間にストップコドン TAG が存在することになる．これを避けるため，pEGFP-N1 vector に挿入する前に，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 EGFP 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.) を用いて mutagenesis PCR を行い変化させた部分を含む FL-*STAT1* cDNA の配列を確認した．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

pEGFP-N1 Vector Information

GenBank Accession #U55762



Comments for pcDNA™ 3.1/His A
5514 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863
T7 promoter/priming site: bases 863-882
ATG Initiation codon: bases 920-922
Polyhistidine region: bases 932-949
Xpress™ epitope: bases 989-1012
Enterokinase recognition site: bases 998-1012
Multiple cloning site: bases 1012-1085
BGH reverse priming site: bases 1105-1122
BGH polyadenylation signal: bases 1104-1318
f1 origin: bases 1381-1794
SV40 early promoter and origin: bases 1859-2183
Neomycin resistance gene: bases 2219-3013
SV40 polyadenylation signal: bases 3029-3268
pUC origin: bases 3700-4373 (Complementary strand)
Ampicillin resistance gene: bases 4518-5379 (Complementary strand)

*There is a stop codon
following the Xba I
site in version A.

図 5 pEGFP-N1 vector (add gene (<https://www.addgene.org/39299/>) より引用，一部改編) と pcDNA™ 3.1/His vector (pcDNA™ 3.1/His A, B, C user guide より引用) の構造

pEGFP-N1 vector および pcDNATM3.1/His vector への導入方法は FL-*STAT1* cDNA が挿入された pCR2.1-TOPO[®] vector を 5 μ g, BamHI (TaKaRa Bio Inc.) 2 μ l, 10x K buffer 3 μ l, DDW で計 30 μ l とし 37°C, 4 時間処理した. 発現 vector の pEGFP-N1[®] vector (TaKaRa Bio Inc.) または pcDNATM3.1/His vector (Life Technologies) は Plasmid DNA 5 μ g, BamHI 2 μ l, 10x K buffer 3 μ l, 単一の酵素であり self-ligation を防ぐため CIP 2 μ l を加え, DDW で計 30 μ l とし 37°C, 4 時間で処理した. このサンプルを 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, QIAGEN Extraction kit[®] (QIAGEN) を用いて, 添付のプロトコールに従って抽出した. 制限酵素処理したインサート (FL-*STAT1* cDNA) と切断した発現 vector (pEGFP-N1[®] または pcDNATM3.1/His vector) 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.) を等量加えて 16°C, 30 分で ligation し, FL-*STAT1* の C 端に EGFP が融合した蛋白 (EGFP-*STAT1*), および His-tag を融合した蛋白 (His-*STAT1*) を作り出すコンストラクト (それぞれ pEGFP-*STAT1* vector, および pHis-*STAT1* vector) を得た. さらに今回の変異および既報の *STAT1* 優性阻害変異をもつコンストラクトを作成するため, プライマーとして G250A-1, G250A-2, L706S-1, L706S-2 を用意し, pEGFP-*STAT1* WT または pHis-*STAT1* WT に対してそれぞれ Mutagenesis PCR を行った.

G250A-1 : ATTGGGGCGCCGCCCAATGCTTGCTTG

G250A-2 : GGGCGGCGCCCAATACAGGCGCTCTG

L706S-1 : ACTGAGTCGATTTCTGTGTCTGAAGTT

L706S-2 : AGAAATCGACTCAGTCTTGATATATCC

Mutagenesis PCR は Takara PrimeSTAR[®] Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa Bio Inc.) を用いて, 添付のプロトコールに従って行った. 各コンストラクトを発現する plasmid を DH5 α (Frontier institute) に形質転換して増やし, それぞれの plasmid を精製後に, MiraCLEAN Endotoxin Removal Kit[®] (Mirus, Madison, WI) を用いて添付のプロトコールに従って, エンドトキシン除去を行った.

単球由来マクロファージ (Monocyte-derived Macrophage; MDM) への分化誘導³¹

PBMC を採取し, CD14 Microbeads[®] (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて, 添付のプロトコールに従い CD14 陽性細胞の positive sort を行った. 抽出された CD14 陽性細胞は 5×10^5 cells/ml の濃度で RPMI10%FBS に suspend した. 5 ng/ml Recombinant human (rh) M-CSF (R&D systems, Minneapolis, MN) の存在下, 37°C, 5%CO₂ で 7 日間培養し分化させた.

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 Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10), IL-12p70 の測定には Cytometric Bead Array® (CBA) (BD, San Diego, CA) を使用した。また、測定に必要な以下に記載する薬品は BD CBA Human Soluble Protein Master Buffer kit® (BD) を使用した。

CBA はサイトカインに対する抗体をもつビーズに対して、PE 標識した Detection antibody が反応することにより、サイトカイン濃度に応じてシグナルが強くなることを利用している。濃度の測定はあらかじめ決まった濃度に調整されている標準溶液を段階希釈したスタンダードを用いて検量線を作成し、実際のサンプル濃度をその検量線に照らし合わせることで濃度を決定する。培養上清 6 μ l を Assay diluent® 54 μ l で希釈し、このうち 50 μ l をサンプルとした。Standard は Human IP-10 Standard® または Human IL-12p70 Standard® を Assay diluent® 200 μ l で希釈し、2500 pg/ml のスタンダード溶液を作成した。Assay diluent® で希釈列 (2500, 1250, 625, 312.5, 156, 80, 40, 20, 10 pg/ml) を作成し、Blank は Assay diluent® そのものとした。Human IP-10 Capture Bead B5® および Human IL-12p70 Capture Bead E5® を Capture Bead Diluent for serum/plasma® で 50 倍希釈したものうち 50 μ l をサンプルまたはスタンダード 50 μ l と混合し、室温遮光下で 1 時間反応させた。次に、Human IP-10 PE Detection Reagent® および Human IL-12p70 PE Detection Reagent® を Detection Reagent Diluent® で 50 倍希釈したもの 50 μ l をサンプルまたはスタンダードに混合し、室温遮光下で 2 時間反応させた。Wash buffer® で洗浄した後に BD FACS Calibur™ (BD) で測定し、FCAP Array™ Software (BD) を用いて解析した。

IFN- γ 刺激後の MDM, EBV-LCL からの IP-10, IL-12p70 産生量の測定

STAT1 変異の影響を評価するために、IFN- γ 刺激後の MDM または EBV-LCL 培養上清中の IP-10, および MDM からの IL-12p70 産生量の評価を行った。前述の方法で作成した MDM (5×10^5 cells/ml) に対して Lipopolysaccharide (LPS) 刺激を行う 30 分前に 1000 U/ml rhIFN- γ (Shionogi, Osaka, Japan) 刺激を行う群と行わない群のサンプルをそれぞれ triplicate で作成し、その後 1 μ g/ml の LPS (Sigma) で 24 時間刺激を行い、培養上清中の IP-10・IL-12p70 を CBA で測定した。また、EBV-LCL (1×10^6 cells/ml) を 1000 U/ml rhIFN- γ で 6 時間刺激し、上清中の IP-10 濃度を MDM 同様 CBA で測定した。それぞれの実験で Negative control として無刺激群を置いた。

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) 法による IFN- γ 刺激後の EBV-LCL における *CXCL9*, *CXCL10* 発現の評価³²

STAT1 変異による IFN- γ 関連蛋白の遺伝子発現を評価するために, IFN- γ 刺激後の EBV-LCL における *CXCL9*, *CXCL10* 発現を qRT-PCR で評価した. 1×10^6 cells/ml の EBV-LCL を無刺激, 1000 U/ml rhIFN- γ で 2 時間または 6 時間刺激し, 前述の方法で RNA を抽出し, cDNA を作成した. 作成した cDNA は 10 ng/ml の濃度に調整し, 10 ng/ml $\cdot$ 1 ng/ml $\cdot$ 100 pg/ml $\cdot$ DDW の希釈系列を作成した. qRT-PCR は SYBR[®] Premix EX Taq[™] II (Takara Bio Inc.) を用いて添付のプロトコールに従い, 解析は ABI PRISM[®] 7000 software (Applied Biosystems, Foster City, CA) で行った. Reference dye は ROX を使用した. Housekeeping gene として GAPDH を採用し, 最初に *CXCL9* $\cdot$ *CXCL10* $\cdot$ *GAPDH* それぞれで増幅効率の確認, 検量線の作成と primer dimer 形成の有無を評価した. これらに問題がないことを確認したうえで, 各サンプルの *CXCL9*, *CXCL10*, *GAPDH* の発現量を測定した. 相対的発現量は $\Delta \Delta C_t$ 法を用いて, *GAPDH* を基準として算出した. 使用したプライマーは表 4 の通りである.

表 4 qRT-PCR 解析で用いた *CXCL9*, *CXCL10*, *GAPDH* のプライマー塩基配列

Genes	Forward sequence	Reverse sequence
<i>CXCL9</i>	TTTTCCTCTTGGGCATCATC	TTGGGGCAAATTGTTTAAGG
<i>CXCL10</i>	CCACGTGTTGAGATCATTGC	ATTTTGCTCCCCTCTGGTTT
<i>GAPDH</i>	AATGACCCCTTCATTGACCTC	ATGGGATTTCCATTGATGACA

HeLa 細胞への発現 vector の導入

STAT1 変異の影響を評価するために, 一過性に変異 STAT1 を HeLa 細胞に発現させ解析を行った. HeLa 細胞を 2×10^5 cells/ml の濃度で DMEM (Sigma) 10% FBS に suspend し, 37°C, 5%CO₂ で 8 時間培養し接着させた. その後 TransIT[®]-LT1 または TransIT[®]-HeLa MONSTER (いずれも Mirus, Madison, WI) を用いて, 添付のプロトコールに従って各変異体の導入を行い 37°C, 5%CO₂ で 48 時間培養した. 36-48 時間後に IFN- γ 等での刺激を行い, 0.25% Trypsin-EDTA[®] (Life Technologies) を添加して細胞を剥がし, DMEM 10% FBS を加えて細胞を回収した. 導入効率はフローサイトメトリー法での GFP 陽性細胞の割合またはウェスタンブロット法での抗 His 抗体での発光量で評価した.

GAS, ISRE 転写活性の luciferase reporter assay

STAT1 の転写活性を評価するために、luciferase reporter assay を行った。5x10⁴ cells/ml の HeLa 細胞を 37℃, 5%CO₂ で 8 時間培養しプレートに接着させた。TransIT®-LT1 を用いて、添付のプロトコールに従って pEGFP-STAT1 WT・G250A・または L706S の各発現 vector, および GAS または ISRE reporter vector を共発現させた。37℃, 5%CO₂ で 24 時間経過後に、GAS reporter vector 群は無刺激または 1000 U/ml rhIFN- γ , ISRE reporter vector 群は無刺激または 1500 U/ml rhIFN- α で各 16 時間刺激した。刺激後の細胞は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) を用いて、添付のプロトコールに従って溶解・反応させ、GloMax® Multi+Microplate Multimode Reader with Instinct® Software (Promega) で検出した。

核内蛋白の抽出と SDS-PAGE での展開

STAT1 のリン酸化と核内移行を評価するため、EBV-LCL または STAT1 を一過性に発現させた HeLa 細胞を用いて解析を行った。細胞を 1xPBS で洗浄した後、エッペンドルフチューブに移し、4℃, 1500g, 5 分間遠心した。ペレットの約 5 倍程度の 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, Na₃VO₄, 1 mM NaF [pH 8], 4% cOmplete™ Protein Inhibitor cocktail [Roche, Mannheim, Germany]) で suspend した。15 分間 on ice で incubate した後に、CE buffer の 1/16 量の 10% Nonidet P-40 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した。激しく混和した後に 4℃, 1500g, 5 分間遠心した。上清を破棄し、100 μ l の CE buffer でペレットを洗浄した後で再度 4℃, 1500g, 5 分間遠心した。上清を完全に破棄し、ペレットの 2 倍程度の Nuclear extract buffer (20 mM HEPES [pH 7.9], 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF [pH 8], 4% cOmplete™ Protein Inhibitor cocktail) を泡立てないように緩徐に添加し、4℃, 60 分間 incubate した。4℃, 20000g, 5 分間遠心し、その上清を核内蛋白として得た。蛋白濃度は Protein assay® (Bio-LAD, Hercules, CA) を用いて、添付のプロトコールに従って蛋白濃度を測定した。その後、核内蛋白サンプルの 2/9 の量の 4xSDS sample buffer (200 mM Tris-HCl, 8% Sodium Dodecyl Sulfate, 20% Glycerol, Bromophenol blue) と 1/9 の量の 2-mercaptoethanol を添加した。100℃, 4 分間 boil した後で 4℃, 20000g, 5 分間遠心し、上清をウェスタンブロッティングのサンプルとした。核内蛋白量が 10 μ g/well となるようにサンプルを well に添加し、7.5% SDS-PAGE で展開した。分子量は、同時に展開した Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards と比較して判断した。その後、蛋白を Immobilon-P Transfer PVDF Membranes® (Millipore, Billerica, MA) に 15V, 1 時間、セミドライ式ブロッティング装置・WSE-4020 (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて電気泳

動法で転写し、1xTris Buffered Saline with 0.1% Tween[®]20 (TBST ; 50 mM Tris, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% Tween[®]20) 5%スキムミルクで1時間ブロッキングを行った後に各種抗体反応を行った。

EBV-LCL における核内 STAT1 のリン酸化状態の解析

前述の方法で作成した EBV-LCL を 1×10^6 cells/ml の濃度で RPMI 10% FBS に suspend した。無刺激または 1000 U/ml rhIFN- γ で 30 分間刺激した後、1xPBS で洗浄し、前述の方法で核内蛋白を抽出した。SDS-PAGE・membrane への transfer・スキムミルクでのブロッキングを行った。核内蛋白の Loading control としては Lamin A/C を採用し、一次抗体として 1xTBST・5%スキムミルクで 2000 倍希釈した Rabbit Anti-Lamin A/C Antibody (Ab) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を 4°C, 18 時間反応させた後に 1xTBST で 3 回洗浄し、二次抗体として 1xTBST・5%スキムミルクで 2000 倍希釈した HRP-conjugated Donkey anti-rabbit IgG Ab (BioLegend, San Diego, CA) を室温で 1 時間反応させた。1xTBST で 3 回洗浄し、Pierce Western blotting Substrate[®] (Thermo, Rockford, IL) 各 300 μ l と Amersham ECL Select[™] Western blotting detection reagent (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, U.K) 各 300 μ l を混合して反応させた。発光したバンドは LAS-1000UV[®] (Fujifilm, Tokyo, Japan) で検出・撮影した。LAS-1000UV で撮影後にメンブレンを再利用するために、メンブレンに Stripping buffer (2-ME 0.7 ml, SDS 2 g, 1 M Tris [pH 6.8] 6.25 ml, DDW 93 ml) を 4 ml 加えてラッピングし、65°C, 30 分湯煎した。1xTBST で 3 回洗浄した後に 1xTBST・5%スキムミルクで 1 時間ブロッキングした後で次の抗体反応を行った。STAT1 および phospho-STAT1 はそれぞれ 1xTBST・5%スキムミルクで 2000 倍希釈した purified mouse anti-STAT1 Ab, purified mouse anti-phospho-STAT1 (pY701) Ab (いずれも BD) を一次抗体、HRP-conjugated Goat anti-mouse Ab を二次抗体として anti-Lamin A/C Ab 同様にバンドを検出した。

Staurosporine 処理による EBV-LCL の核内 STAT1 脱リン酸化状態の解析

Staurosporine はチロシンキナーゼ阻害薬である。IFN- γ 刺激後に Staurosporine を添加することで、STAT1 のリン酸化を抑制し、フォスファターゼによる STAT1 脱リン酸化を評価することができる。

EBV-LCL における脱リン酸化障害の有無を評価するために、EBV-LCL を 1×10^6 cells/ml の濃度で RPMI 10% FBS に suspend し、1000 U/ml rhIFN- γ で 30 分間刺激した後に、1 μ M Staurosporine (Almone Labs, Jerusalem, Israel) をそれぞれの時間反応させ、脱リン酸化の状態を評価した。反応時間は無添加・15 分、30 分、60 分とした。また、IFN- γ ・Staurosporine とも添加しない無刺激のサンプルも用意した。それぞれのサンプルから核内蛋白を抽出し、核内 STAT1 のリン酸化状態を前述の方法で評価した。

変異 STAT1 を一過性発現した HeLa 細胞における核内 STAT1 リン酸化状態の解析

変異 STAT1 自体のリン酸化状態を評価するため、前述の方法で作成された pEGFP-STAT1 WT, G250A および L706S の各発現 vector を HeLa 細胞にトランスフェクションし、無刺激または 1000 U/ml rhIFN- γ で 30 分間刺激した後で、核内蛋白を抽出した。SDS-PAGE での展開、電気泳動による転写、Lamin A/C, STAT1, phospho-STAT1 (pY701) の各検出は前述した EBV-LCL と同様に行った。STAT1, phospho-STAT1 (pY701) では、84kDa および 91kDa の位置に HeLa 細胞の内因性 STAT1 が、120kDa 前後の位置に EGFP-STAT1 融合蛋白が検出されるため、HeLa 細胞の内因性 STAT1 と一過性発現させた STAT1 を区別することが可能であった。

変異 STAT1 の有する STAT1 リン酸化阻害効果の検討

変異 STAT1 が、dimer を形成する WT に対して有するリン酸化阻害効果を評価するため、His-STAT1 WT, G250A, または L706S と EGFP-STAT1 WT を HeLa 細胞に共発現させた。この際に、pEGFP-STAT1 WT vector が導入された HeLa 細胞に His-STAT1 各 vector も導入されるよう、pEGFP-STAT1 WT vector 0.8 μ g に対して His-STAT1 各 vector 4 μ g と 1:5 の量で導入した。導入には TransIT-HeLa MONSTER を使用し、添付のプロトコールに従って行った。HeLa 細胞への STAT1 発現 vector の導入、核内蛋白の抽出、SDS-PAGE、リン酸化状態の解析は前述した変異 STAT1 自体のリン酸化評価と同様に行った。

立体構造上での STAT1 変異残基の局在に関する検討³³

STAT1 機能獲得型変異において、Liu らは立体構造上で機能喪失型変異残基と機能獲得型変異残基で局在の偏りがある可能性を示唆していた³³。そこで、リン酸化 STAT1 (PDB accession number: 1BF5) の立体構造上での CCD と DNA-binding domain (DBD) の既報の STAT1 変異残基の位置を RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/>) で確認し、CCD・DBDに見られた優性阻害型変異残基と機能獲得型変異残基の局在を、同一方向からの立体構造表面に確認できたものについて検討した。また、STAT1 機能獲得型変異でもマイコバクテリア感染症を呈した変異が報告されており、その変異残基の局在も同時に検討した。

抗 IFN- γ 自己抗体の検出

本患者の血清中に IFN- γ に対する自己抗体の有無を評価するために、rhIL-17A, rhIL-17F (R&D systems) rhIFN- α (Biosource International, Camarillo, CA), rhIFN- γ (Shionogi) を 2x SDS sample buffer (100 mM Tris-HCl, 4% Sodium Dodecyl Sulfate, 1.8 M 2-mercaptoethanol, 10% Glycerol) と等量で混和し、4 分間 boil した。24℃, 20000g, 5 分間遠心し、上清を解析に用いた。1 well 当たりの蛋白量を 500 ng として、15% SDS-PAGE で展開し、Immobilon-P Transfer PVDF Membranes[®] (Millipore) に 15V, 1 時間、セミドライ式ブロッキング装置・WSE-4020 (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて電気泳動法で転写した。1xTBST・5%スキムミルクで 1 時間ブロッキングを行った後に、一次抗体として STAT1 AD-MSMD 患者もしくは APECd 患者の血清を 1xTBST・5%スキムミルクで 1500 倍に希釈したものを 4℃で 16 時間反応させた。1xTBST で洗浄した後で HRP Goat Anti-Human IgG[®] Ab (Invitrogen, Frederick, MD) を 1xTBST・5%スキムミルクで 150000 倍希釈し、4℃, 1 時間反応させた。1xTBST で洗浄した後に、STAT1 と同様の方法で発光・検出を行った。

統計学的解析

統計学的解析は JMP[®] Pro 12 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った。患者と健常者 2 名を比較する際には Dunnett の検定を、1 対のペアを比較する際には Student の t 検定を用いた。

【実験結果】

STAT1 G250A は新奇ミスセンス変異である可能性が強く示唆される．

患者の *CYBB*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IKBKG*, *IL12B*, *IL12RB1*, *IL12RB2*, *IRF8*, *ISG15*, *STAT1* 各遺伝子のダイレクトシーケンス解析では, *STAT1* の CCD に未報告のヘテロ接合塩基置換 c.749G>C (p.G250A) を認めた (図 6)．この塩基置換は National Center for Biotechnology Information database, Ensemble database, Single Nucleotide Polymorphism Database, Exon Variant Server, Human Genome Variation Database, Mutation@A Glance のいずれのデータベースでも Single nucleotide variants や疾患遺伝子変異としての報告はなかった．両親の *STAT1* 該当部位のダイレクトシーケンス解析では, 塩基置換を認めず *de novo* の塩基置換と考えられた (図 6)．その他の遺伝子に有意な変異は認めなかった．患者の FL-*STAT1* cDNA の TA-Cloning の結果では, 片方の Allele には c.749G>C の塩基置換を認め, もう一方の Allele は正常配列である事が確認された．ここまでの結果から MSMD 関連遺伝子のシーケンス解析では *STAT1* の *de novo* ヘテロ接合変異 c.749G>C (p.G250A) が本患者で確認された．

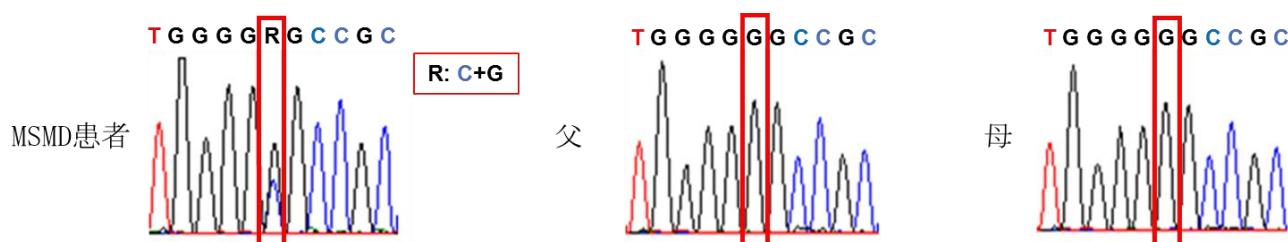


図 6 *STAT1* シーケンス解析結果

患者でみられた c.749G>C のヘテロ接合変異は両親ではみられず, *de novo* 変異であることが確認された．

蛋白の変化の影響を予測するソフトである SIFT では TOLERATED (Score 0.75) (図 7A), PolyPhen-2 では HumDiv で Benign (Score 0.271), HumVar でも Benign (Score 0.128) (図 7B) といずれもアミノ酸変化の影響は少ないと予測された．しかし, アミノ酸変化の影響を多角的に評価する Mutation Taster では disease causing (Score 0.9999) (図 7C) と変異の影響が非常に大きいことが予測された．

A SIFT

SIFT: PREDICTIONS

User Input	ENSP	Pos	Ref	Subst	Prediction	SIFT Score	Median Information Content	# Seqs
ENSP00000354394,G250A	ENSP00000354394	250	G	A	TOLERATED	0.75	2.36	220

B PolyPhen-2

PolyPhen-2 report for P42224 G250A

Query

Protein Acc	Position	AA ₁	AA ₂	Description
P42224	250	G	A	Canonical; RecName: Full=Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta; AltName: Full=Transcription factor ISGF-3 components p91/p84; Length: 750

Results

☐ Prediction/Confidence PolyPhen-2 v2.2.2r398

HumDiv

This mutation is predicted to be **BENIGN** with a score of **0.271** (sensitivity: **0.91**; specificity: **0.88**)

HumVar

This mutation is predicted to be **BENIGN** with a score of **0.128** (sensitivity: **0.90**; specificity: **0.70**)

C Mutation Taster

Prediction

disease causing

Model: *simple_aae*, prob: 0.999999997824988 [\(explain\)](#)

Summary

- amino acid sequence changed [hyperlink](#)

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr2:191862618C>G show variant in all transcripts IGV
HGNC symbol	STAT1
Ensembl transcript ID	ENST00000361099
Genbank transcript ID	NM_007315
UniProt peptide	P42224
alteration type	single base exchange
alteration region	CDS
DNA changes	c.749G>C cDNA.1137G>C g.23069G>C
AA changes	G250A Score: 60 explain score(s)
position(s) of altered AA	250
frameshift	no
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G. Search ExAC .
regulatory features	H3K36me3, Histone, Histone 3 Lysine 36 Tri-Methylation PolII, Polymerase, RNA Polymerase II
phyloP / phastCons	PhyloP PhastCons (flanking) -3.098 0.005 6.029 1 (flanking) 6.029 1 explain score(s) and/or inspect your position(s) in in UCSC Genome Browser
splice sites	no abrogation of potential splice sites
distance from splice site	37

D 結果のまとめ

	Prediction	score
SIFT	Tolerated	0.75
Polyphen-2 HumDiv	Benign	0.271
HumVar	Benign	0.128
Mutation Taster	Disease causing	0.999

図7 蛋白変異予測ソフトの結果 A SIFT, B PolyPhen-2, C Mutation Taster, D 結果のまとめ SIFT・PolyPhen-2 では変異の影響は少ないと予想されたが, Mutation Taster では変異の影響は大きいと評価された.

また同部位は種を超えて保存性が高いアミノ酸であることが確認されており (図8), そのアミノ酸の変化により構造や機能に影響が出る可能性が示唆される.

以上より本患者で見られた STAT1 c.749G>C (p.G250A) が *de novo* 新奇ミスセンス変異であることが強く示唆された.

species	alignment	G250
<i>H. sapience</i>	R R Q Q S A C I G	G P P N A C L D Q L Q N
Patient	R R Q Q S A C I G	A P P N A C L D Q L Q N
<i>P. troglodytes</i>	R R Q Q S A C I G	G P P N A C L D Q L Q N
<i>M. mulatta</i>	R R Q Q S A C I G	G P P N A C L D Q L Q N
<i>M. musculus</i>	R R Q Q S A C I G	G P P N A C L D Q L Q S
<i>D. rerio</i>	R R Q Q M A C I G	G L T N V C L D Q L Q N
<i>X. tropicalis</i>	H R Q Q I A C I G	G P P N A C L D Q L Q S

図8 各種族における蛋白の保存性 本患者で変異が存在する G250 は種を越えて保存性が高い部位と考えられる.

MSMD 患者の EBV-LCL では STAT1 リン酸化・IFN- γ 誘導ケモカインの低下を認めない。

これまでの報告では、STAT1 AD-MSMD 患者由来の EBV-LCL において、IFN- γ 刺激による STAT1 のリン酸化の低下および IFN- γ 誘導ケモカインの低下が示されている^{12, 34, 35}。そこで、患者および健常者 2 名の EBV-LCL に対して IFN- γ 刺激を 6 時間行い、産生される IFN- γ 誘導ケモカインの一つである IP-10 を CBA で測定した。その結果、患者の EBV-LCL の培養上清中の IP-10 の濃度は健常者 2 名と比較して低下しておらず、むしろ有意に高値であった (図 9)。

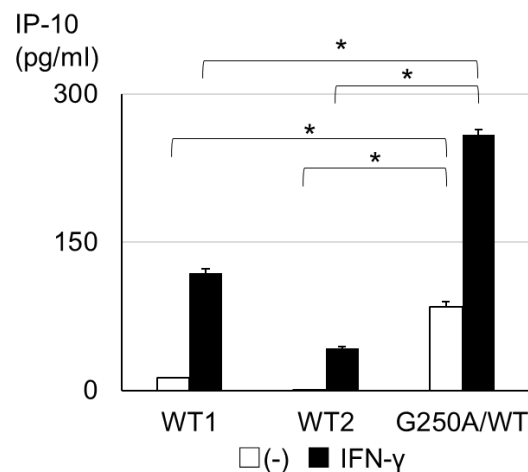


図 9 IFN- γ 刺激による EBV-LCL からの IP-10 産生量の評価

患者 (G250A/WT) では無刺激・IFN- γ 刺激後ともに健常者 (WT1, WT2) より有意に IP-10 産生量が増加している。p 値は Dunnett の検定を用いて算出した。*: $p < 0.005$, エラーバーは独立した 3 検体の標準偏差を示す。

そこで、mRNA レベルで IFN- γ 誘導ケモカインである *CXCL9*, *CXCL10* の発現が患者と健常者で差があるかを qRT-PCR 法で評価した。結果は患者では健常者と同等の IFN- γ 誘導ケモカインが発現していることが確認された (図 10A, B)。

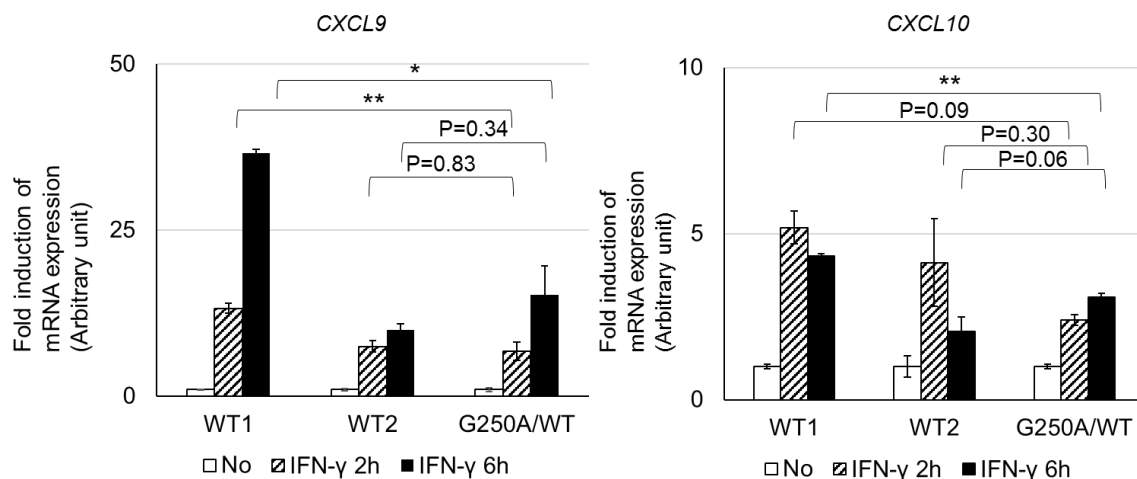


図 10 EBV-LCL における *CXCL9*, *CXCL10* 遺伝子発現

EBV-LCL における各遺伝子の発現を qRT-PCR 法で評価した．患者（G250A/WT）では健常人（WT1, WT2）に比較して明らかな遺伝子発現の低下はみられなかった．P 値は Dunnett の検定を用いて算出した．* : $p < 0.005$, ** : $p < 0.05$, エラーバーは独立した 3 検体の標準偏差を示す．

次に，細胞内シグナルを評価するために EBV-LCL を IFN- γ で 30 分間刺激後の核内蛋白を抽出し，STAT1 のリン酸化状態をウェスタンブロット法で評価した．この実験でも患者の EBV-LCL は健常人 2 名と同等の STAT1 のリン酸化能を持つことが確認された（図 11）．

以上の結果から，患者の EBV-LCL では STAT1 シグナルおよび IFN- γ 誘導ケモカインの低下は認めなかった．

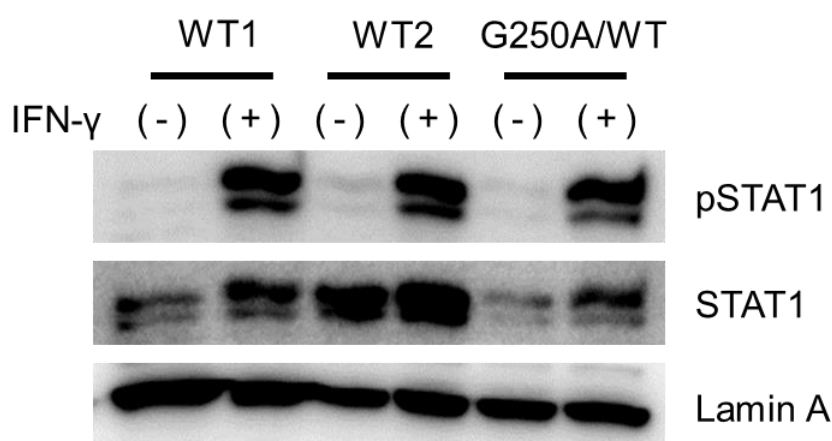


図 11 EBV-LCL における IFN- γ 刺激後の核内 STAT1 リン酸化の評価

患者（G250A/WT）でも，IFN- γ 刺激後に核内の STAT1 リン酸化は健常人（WT1, WT2）と同様に確認された．Lamin A をローディングコントロールとして用いた．

患者 EBV-LCL からの IP-10 産生は機能獲得型変異に比して有意に低く，脱リン酸化障害を呈さない．

前項で患者 EBV-LCL では IP-10 産生が健常者と比較して有意に亢進していた．これは機能獲得型変異で見られる特徴である．そこで，我々が以前機能獲得型変異として報告した STAT1 T385M 変異をもつ患者の EBV-LCL と本患者の EBV-LCL を IFN- γ で刺激し，培養上清の IP-10 濃度を CBA で測定した．この実験では，機能獲得型変異患者と比較して本患者では明らかに IP-10 の産生量は低いことが確認された．（図 12）

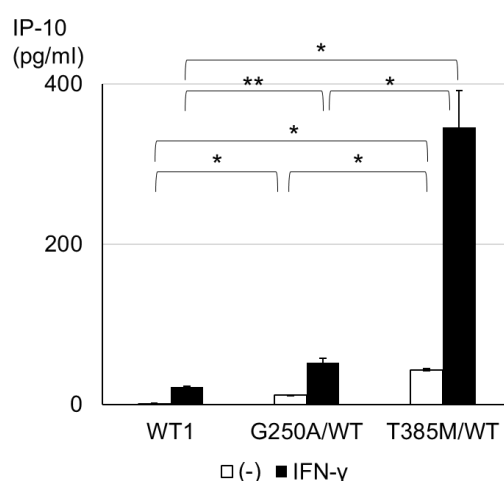


図 12 IFN- γ 刺激による EBV-LCL からの IP-10 産生量の評価

患者（G250A/WT）は健常者（WT1）と比較して有意に IP-10 産生量は増加していたが，機能獲得型変異患者（T385M/WT）と比較して明らかに産生量は少なかった．p 値は Student の t 検定を用いて算出した．*：p<0.005，**：p<0.05，エラーバーは独立した 3 検体の標準偏差を示す．

また，機能獲得型変異のメカニズムとして STAT1 の脱リン酸化障害が存在することが，これまでに報告されている^{22, 33, 36}．そこで，EBV-LCL を IFN- γ で 30 分刺激した後に脱リン酸化薬の一つである Staurosporine を反応させ，脱リン酸化障害が見られるかをウェスタンブロット法で評価した．患者では健常者同様に脱リン酸化が生じており，脱リン酸化障害は認められなかった．（図 13）以上の結果から，患者 EBV-LCL は健常者より IFN- γ 誘導ケモカインの産生が増加しているが，機能獲得型変異を有する EBV-LCL に比して明らかに低く，また脱リン酸化障害も見られなかった．

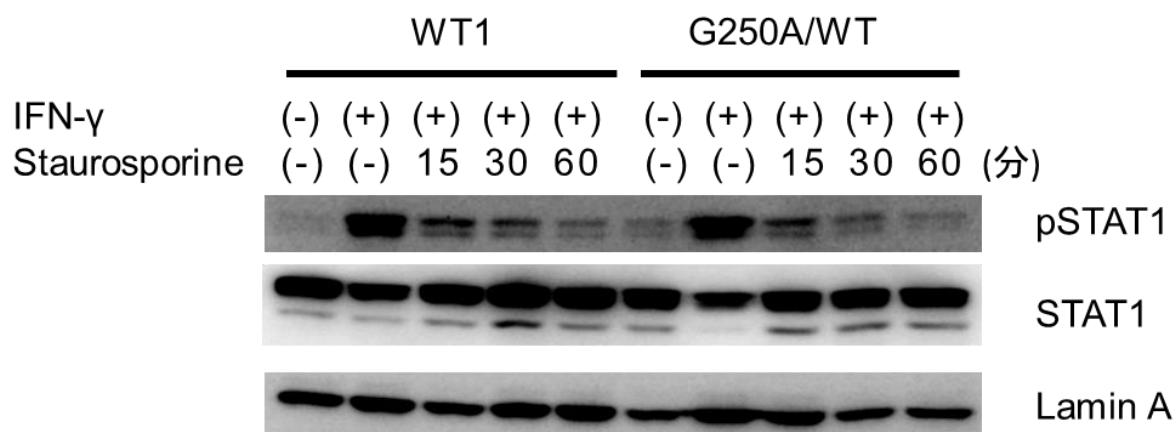


図 13 Staurosporine 処理による EBV-LCL での IFN- γ 刺激後の脱リン酸化障害の評価。

EBV-LCL を IFN- γ で刺激した後に，Staurosporine 処理し核内 STAT1 のリン酸化状態を評価した．患者（G250A/WT）では健常者（WT1）と同様に脱リン酸化が見られており，脱リン酸化障害はないと考えられた．Lamin A をローディングコントロールとして用いた．

患者の単球・マクロファージ系細胞では IFN- γ 誘導サイトカイン・ケモカインの産生低下を生じる．

これまでの結果から，患者 EBV-LCL では STAT1 の機能低下を示唆する所見は認めなかった．そこで，マイコバクテリア属感染で中心的な役割を担う単球・マクロファージ系における STAT1 シグナルを評価することとした．患者および健常者の血液から PBMC を分離し，その後マイクロビーズを用いて CD14 陽性の単球を分離した．分離した単球を M-CSF 存在下で 7 日間培養してマクロファージに分化させた後に，無刺激，LPS 単独刺激または 30 分間の IFN- γ 刺激後に LPS 刺激を 24 時間行った．その後，培養上清中の IFN- γ 誘導ケモカイン・サイトカインを CBA で測定した．IFN- γ 存在下での培養上清中の IP-10 は患者では健常者と比較して有意に低く，特に IL-12p70 産生は患者ではほとんどみられなかった（図 14A，B）．

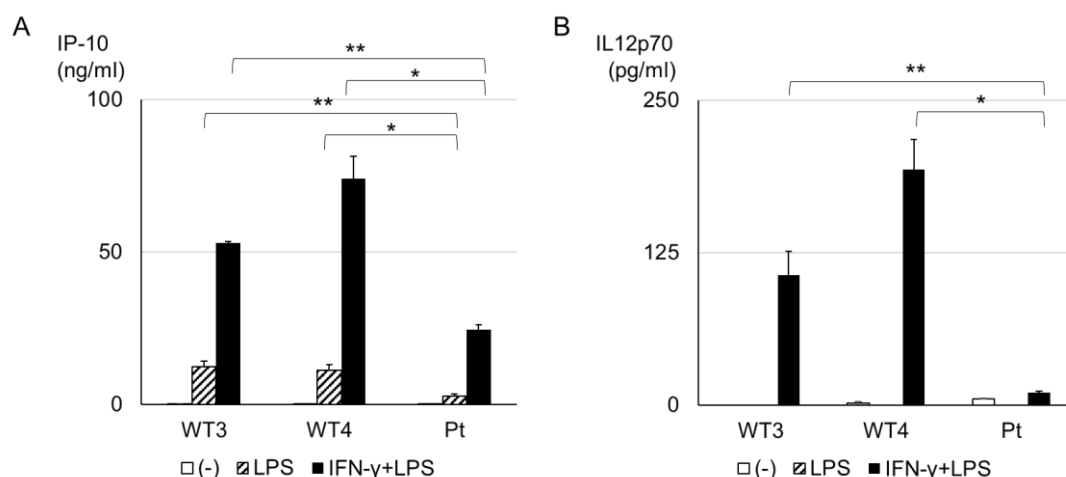


図 14 IFN γ 刺激による単球由来マクロファージからのケモカイン・サイトカイン産生量の評価

患者では健常者 (WT3, WT4) と比較して有意に (A) IP-10, (B) IL-12p70 産生量が低下していた. p 値は Dunnett の検定を用いて算出した. *: $p < 0.005$, **: $p < 0.05$, エラーバーは独立した 3 検体の標準偏差を示す.

STAT1 G250A 変異体は既報の優性阻害型変異体と同様, IFN- γ 刺激後の GAS 転写活性に対して優性阻害効果を呈するが, IFN- α 刺激後の ISRE 転写活性に対しては優性阻害効果を認めない.

単球・マクロファージにおける IFN- γ 誘導サイトカイン・ケモカイン産生低下は MSMD 発症の要因と考えられた. そこで, IFN- γ および IFN- α 刺激における STAT1 転写活性を評価するために Luciferase reporter assay を行った. HeLa 細胞に対して pEGFP-STAT1 WT, G250A 変異体および既報の優性阻害型変異を有する変異体である L706S と GAS および ISRE の reporter vector をそれぞれ共発現させ, GAS vector に対して 1000 U/ml rhIFN- γ , ISRE vector に対して 1500 IFN- α でそれぞれ 16 時間刺激し, 転写活性を評価した. GAS では STAT1 WT 導入細胞では転写活性が上昇したのに対して, G250A および L706S 変異体導入細胞では vector のみを導入した細胞よりも有意に転写活性が低下した. (図 15A) それに対し, ISRE では G250A 導入細胞は正常 STAT1 と同等, L706S 導入細胞では転写活性は低下していたが, 無導入の細胞と比較すると転写活性は上昇していた (図 15B). この結果は GAS reporter assay において STAT1 G250A および L706S 変異は HeLa 細胞の内因性 STAT1 に対して優性阻害効果を示したことによって, IFN- γ 刺激による転写活性が低下したためと考えられる.

以上より STAT1 G250A 変異は GAS 転写活性において優性阻害効果を持つことが示された.

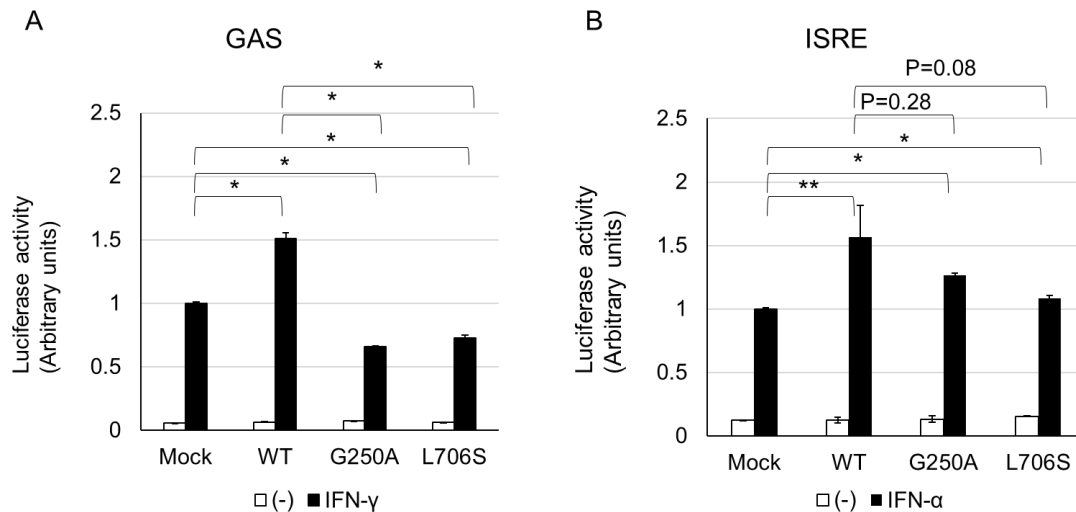


図 15 Luciferase reporter assay による (A) GAS, (B) ISRE 転写活性の評価.

それぞれ, HeLa 細胞に STAT1 WT または各変異体と reporter vector を発現させ, GAS reporter vector は IFN- γ , ISRE reporter vector は IFN- α で刺激し転写活性の変化を評価した.

(A) STAT1 WT では Mock と比較して転写活性は上昇したが, G250A および L706S 変異体では Mock に比較して有意に転写活性が低下し, 優性阻害効果を有していると考えられた.

(B) STAT1 WT, G250A, L706S とともに Mock と比較して転写活性が上昇し, 優性阻害効果は見られなかった. p 値は Student の t 検定を用いて算出した. *: $p < 0.005$, **: $p < 0.05$, エラーバーは独立した 6 検体の標準偏差を示す.

STAT1 G250A 変異体は自身のリン酸化が低下する変異である.

ここまでの結果から, STAT1 G250A 変異は優性阻害効果により GAS 転写活性を低下させることが確認された. 既報の STAT1 優性阻害型変異では変異 STAT1 自体のリン酸化が低下しているもの^{12, 34, 35, 37}とリン酸化は低下しないが DNA 結合が阻害されるもの³⁸が報告されていることから, G250A 自身のリン酸化状態を評価することとした. EGFP-STAT1 WT および G250A, L706S 変異体を HeLa 細胞に一過性に発現させ, IFN- γ で 30 分刺激した後で核内蛋白を抽出し, リン酸化 STAT1 をウェスタンブロット法で検出した. その結果, G250A 変異体は完全にリン酸化が消失する L706S 変異体ほどではないが, 正常 STAT1 に比較してリン酸化が強く障害されていることが確認された (図 16).

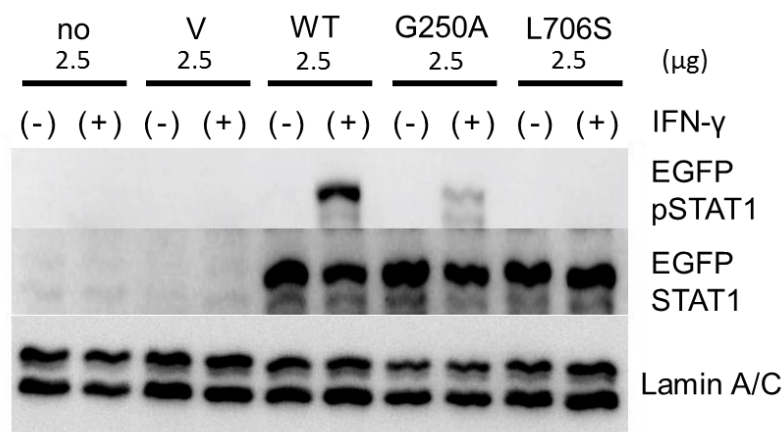


図 16 核内 STAT1 のリン酸化状態の解析

HeLa 細胞に EGFP vector, EGFP-STAT1 WT および各変異体を発現させ、IFN- γ 刺激後の核内 STAT1 リン酸化状態を評価した。G250A 変異体は L706S 変異体ほどではないが、WT と比較してリン酸化が強く障害されていた。Lamin A/C をローディングコントロールとして用いた。

STAT1 G250A 変異体は正常 STAT1 に対してリン酸化阻害効果を持つ。

前項では STAT1 G250A 変異体では IFN- γ 刺激後の自身のリン酸化が障害されていることが確認された。また、既報の L701C や L706S ヘテロ変異をもつ EBV-LCL においては、IFN- γ 刺激による STAT1 リン酸化がほぼ完全に障害されており^{12, 34, 35}、これらの変異体が STAT1 WT と dimer を形成した際に STAT1 WT のリン酸化が障害される可能性が考えられた。そこで、HeLa 細胞に EGFP-STAT1 WT と His-STAT1 WT または各変異体を共発現させ、IFN- γ で刺激後の EGFP-STAT1 WT のリン酸化状態の変化を評価することで変異体の WT に対するリン酸化阻害効果の有無を確認することとした。その際に pEGFP-STAT1 vector と pHis-STAT1 vector の導入量を 1:5 とすることで、pEGFP-STAT1 vector が導入された HeLa 細胞には pHis-STAT1 vector も非常に高い確率で導入されるように導入割合を設定した。もし、His-STAT1 G250A や L706S にリン酸化に関して優性阻害効果がある場合には、EGFP-STAT1 WT のリン酸化が阻害されることが予想された (図 17)。

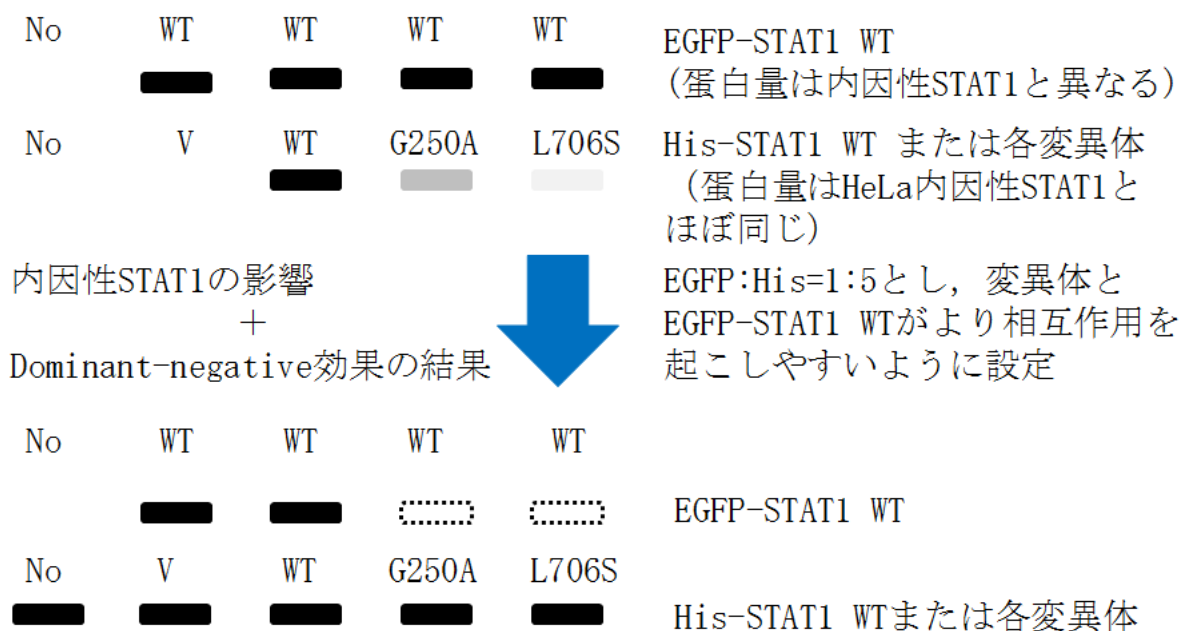


図 17 STAT1 リン酸化阻害効果検証実験の模式図とリン酸化阻害効果が存在した場合の予想結果

pEGFP-STAT1 vector: pHis-STAT1 vector=1:5 とすることで、EGFP STAT1 WT が発現した細胞では His STAT1 も発現するように条件を設定した。リン酸化阻害効果があった場合には EGFP-STAT1 WT のリン酸化が低下することが予想される。

G250A, L706S 変異体を導入した細胞では EGFP-STAT1 WT のリン酸化が阻害された上に、内因性 STAT1 のリン酸化も阻害された (図 18)。

この実験結果から、STAT1 AD-MSMD の患者で生じている GAS 転写活性の低下の原因の一つとして dimer を形成する STAT1 WT に対し、リン酸化を阻害することでこれらの変異体が優性阻害効果を発揮する可能性が示唆された。

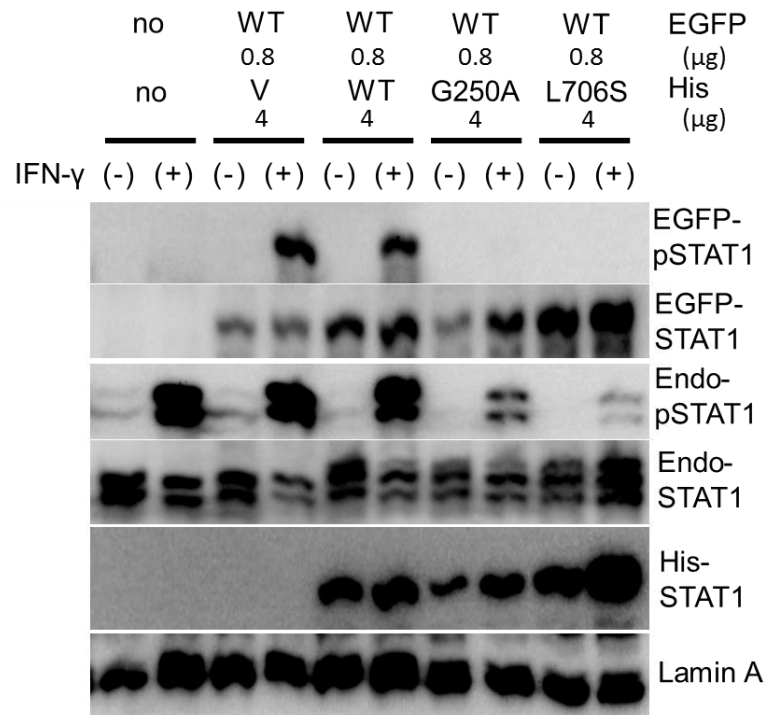


図 18 核内 STAT1 のリン酸化阻害効果の評価

HeLa 細胞に EGFP-STAT1 WT および His-vector, His-STAT1 WT または各変異体を発現させ、IFN- γ で刺激し核内 STAT1 リン酸化を評価した。G250A 変異体、L706S 変異体を発現した HeLa 細胞では、EGFP-STAT1 WT のリン酸化を阻害し、HeLa 細胞の内因性 STAT1 のリン酸化も阻害した。Lamin A をローディングコントロールとして用いた。

ヘテロ STAT1 G250A 変異を有する患者の血清では抗 IFN- γ 自己抗体を認めない。

ここまでの実験結果から STAT1 G250A 変異体は正常 STAT1 のリン酸化に対して優性阻害効果を持つことで GAS 転写活性が低下し、MSMD を発症する可能性が示唆された。ここで、STAT1 機能獲得型変異では抗 IL-17F 自己抗体を産生する例が多いこと、またマイコバクテリア属への易感染性を呈した患者で抗 IFN- γ 自己抗体産生が病態に関連している報告を参考に、STAT1 MSMD 患者において抗 IFN- γ 自己抗体の産生が見られないかをウェスタンブロット法で評価した。IL-17A, IL-17F, IFN- α , IFN- γ の各リコンビナントタンパクを SDS-PAGE で展開し、メンブレンに転写、患者の血清を一次抗体、HRP 結合抗ヒト抗体を二次抗体として自己抗体の有無を評価した。陽性コントロールとして各種サイトカインに自己抗体を産生することで、皮膚粘膜カンジダ症を含む各種免疫不全を呈する疾患である多腺性自己免疫症候群 1 型患者の血清でも同様に実験を行った。結果、多腺性自己免疫症候群 1 型患者では IL-17A, IFN- α , IFN- γ に対して自己抗体の産生が確認された。

のに対して、MSMD 患者では IFN- γ を含むこれらのサイトカインに対して自己抗体の産生を認めなかった (図 19)。

少なくとも本患者においては、抗 IFN- γ 自己抗体産生が MSMD の病態に関連している可能性は否定的と考えられた。

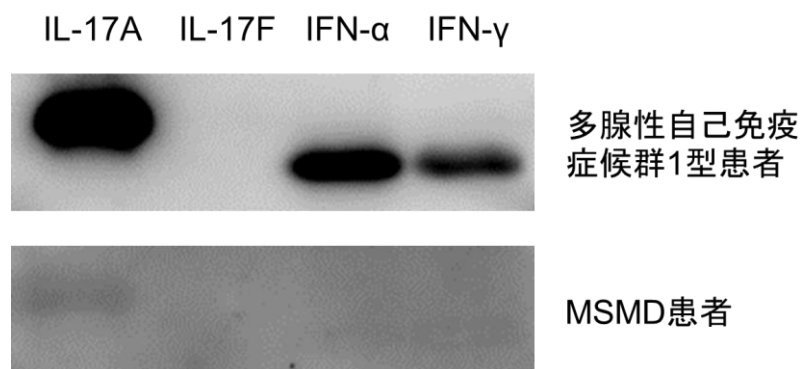
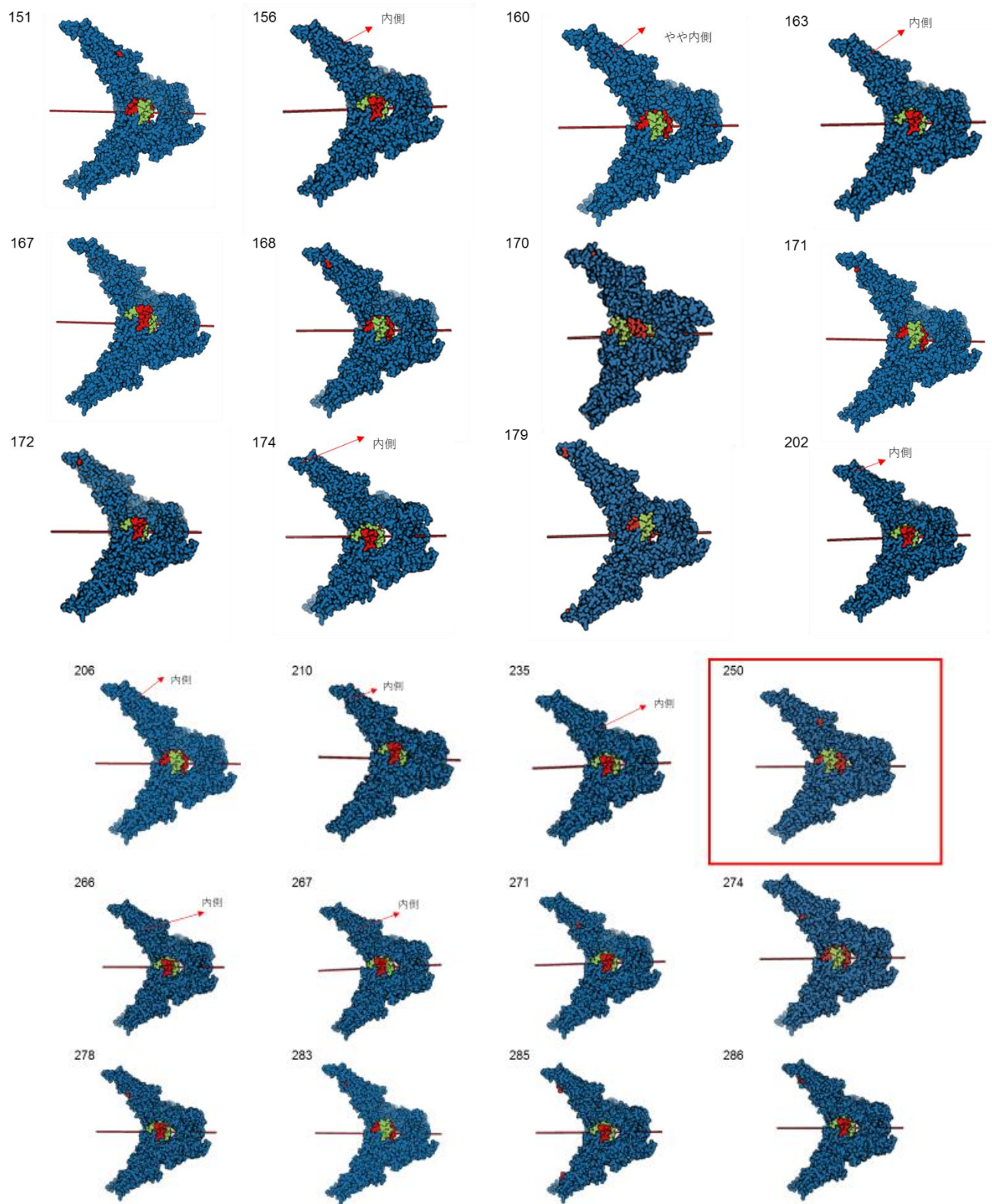


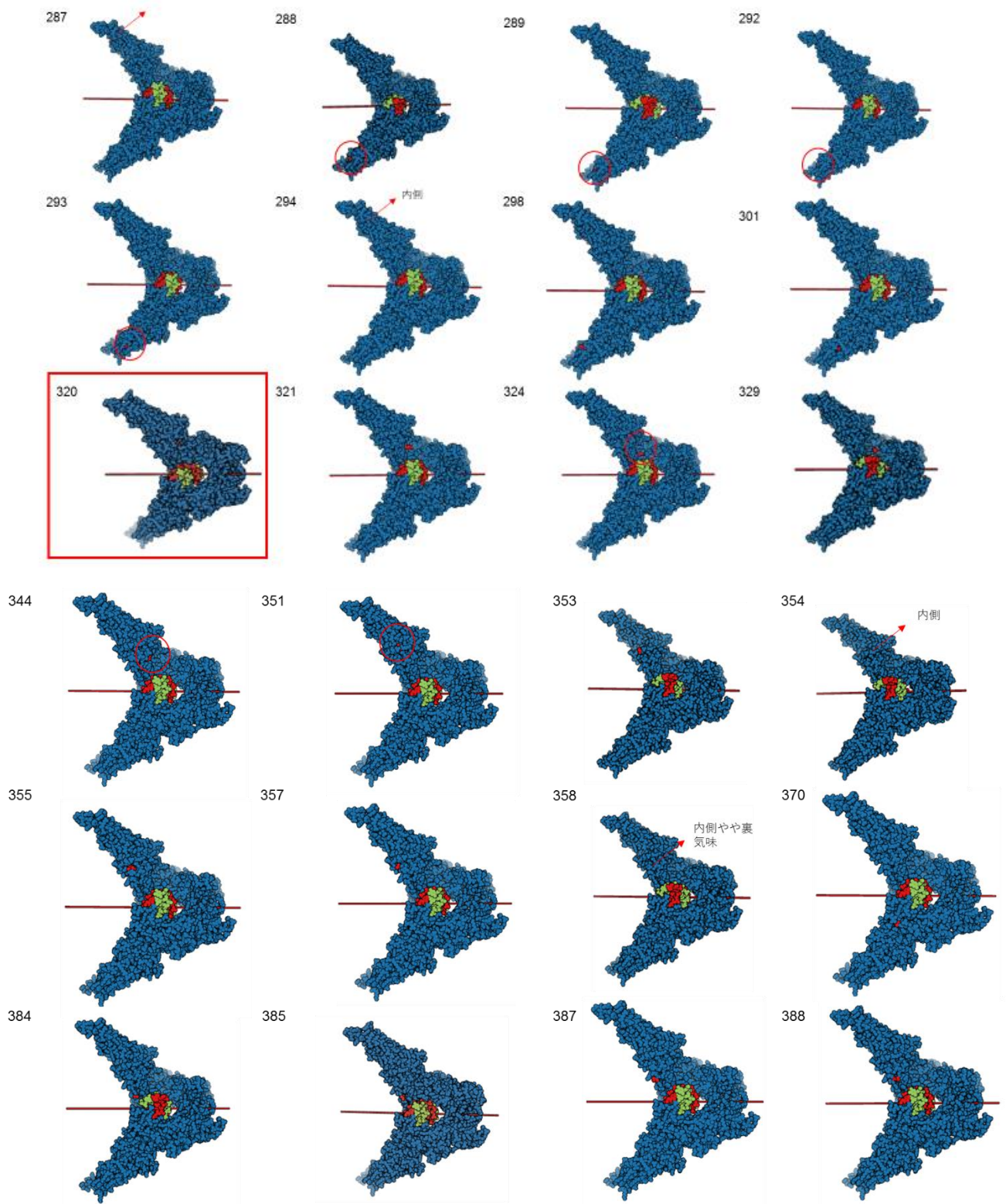
図 19 抗サイトカイン抗体の検出

IL-17A, IL-17F, IFN- α , IFN- γ の各蛋白に対して患者血清を反応させ、自己抗体を検出した。多腺性自己免疫症候群 1 型患者では IL-17A, IFN- α , IFN- γ に対して自己抗体を認めたが、MSMD 患者では自己抗体を認めなかった。

STAT1 変異残基の局在と症状には相関がある可能性が示唆される。

STAT1 G250A 変異体はリン酸化に関して優性阻害効果を発揮することで MSMD を発症することをこれまでの実験結果で示した。STAT1 の CCD には多数の機能獲得型変異がこれまでに報告されているが優性阻害型変異は G250A が最初であった。以前、Liu らは機能喪失型変異残基と機能獲得型変異残基では STAT1 の立体構造における局在が異なる可能性があることを示している³³。そこで、我々はこれまでに報告された CCD および DBD における機能獲得型変異残基と優性阻害型変異残基をリン酸化 STAT1 における立体構造での位置を確認し、その局在に何らかの特徴がないか検討した。また、Toubiana らは STAT1 機能獲得型変異を持つ患者の中で複数名がマイコバクテリア感染を起こしたと報告しており³⁹、その患者らでみられた変異残基の位置も確認し、比較検討した。それぞれの変異の位置を確認した結果を図に示す (図 20)。





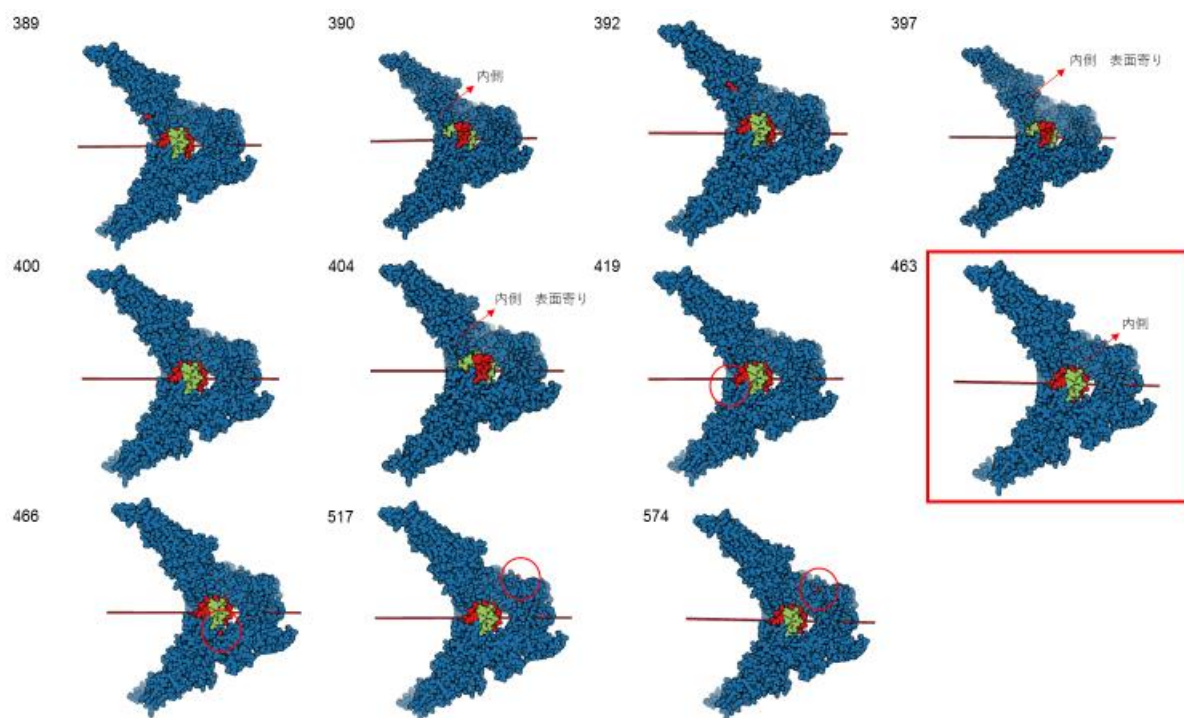


図 20 CCD, DBD における, 既報変異残基のリン酸化 STAT1 立体構造上の位置

それぞれの残基の位置を赤で示した. 機能喪失型変異は本論文のものも含め赤く縁取りした 3 つが報告されている.

STAT1 の優性阻害型変異 3 つのうち 2 つは STAT1 立体構造の表面に存在することが確認された. そこで, 最も多くの既報変異残基を確認できる角度を設定し, その角度で表面に確認可能な変異残基をプロットした結果を図に示した (図 21). STAT1 の機能獲得型変異残基は我々が設定した角度からでは STAT1 の周辺部に位置しているものが多数を占め, 特に CCD の変異残基は図の左側・外周に沿って集積していることが確認された (図 21 橙円). 一方でこれまでに報告された優性阻害型変異残基は STAT1 の比較的内側に存在していることが確認された (図 21 赤). また, 機能獲得型変異残基を持つ患者の中でマイコバクテリア感染を起こした患者は優性阻害型変異残基と比較的近接した場所に変異が存在することが確認された (図 21 黄円).

この結果から, STAT1 の変異例では立体構造上の局在と症状には関連性があることが示唆された.

【考察】

本研究により，BCG 菌による播種性感染・BCG 骨髄炎を発症した患者において，STAT1 の CCD に *de novo* 新奇ヘテロ接合変異 G250A を発見し，この変異によって AD-MSMD を発症することを証明した．STAT1 の CCD に認められた優性阻害型変異は本報告が初である．また，STAT1 G250A 変異は正常 STAT1 のリン酸化を阻害することにより，IFN- γ 刺激による GAS 転写活性を低下させることで優性阻害効果を発揮することを示した．

これまでに STAT1 AD-MSMD では 7 つの変異が報告されており，それらの共通の特徴は IFN- γ 刺激による GAS 転写活性において優性阻害効果を持つが，IFN- α 刺激による ISRE 転写活性に対しては優性阻害効果を持たないというものである．既報の論文では STAT1 を欠損した細胞株を用いて，変異 STAT1 を強制発現させる実験系で DNA 結合能・転写活性を評価していたが，DNA 結合能の低下を生じるメカニズムは不明であった．本論文で，G250A 変異が正常 STAT1 のリン酸化を低下させることを証明し，これが優性阻害効果を発揮するメカニズムの一つであることが示唆された．

本患者では BCG 菌の播種性感染と多発 BCG 骨髄炎を呈したが，これまでの AD-MSMD 患者においても弱毒性マイコバクテリア，特に BCG 菌による多発性骨髄炎はその特徴の一つとされている．STAT1 AD-MSMD 以外にも AD-IFN γ R1 欠損症でも弱毒性マイコバクテリアによる多発性骨髄炎は報告されており，IFN- γ シグナル上流の異常がマイコバクテリア多発性骨髄炎と関連すると考えられる．逆にマイコバクテリア多発性骨髄炎を呈した患者ではこれらの遺伝子異常の検索が必要と考えられる．

これまでの STAT1 AD-MSMD の報告では，EBV-LCL，単球・マクロファージ系細胞，および強制発現実験で共通して IFN- γ シグナルの異常が指摘されていたが，本患者では単球・マクロファージ系細胞では IFN- γ 誘導蛋白の産生低下を，強制発現実験では STAT1 リン酸化に関する優性阻害効果による IFN- γ シグナルの異常を認めたが，EBV-LCL ではそれらが見られなかった．その理由は不明であるが，変異体によって生じる障害が T 細胞，B 細胞，単球・マクロファージ系細胞など，細胞毎に異なり，マクロファージで優性阻害効果が見られた可能性がある．Toubiana らが報告したように，STAT1 機能獲得型変異と報告された例でもマイコバクテリア感染を呈した症例もあり³⁹，これらの症例では単球・マクロファージ系では IFN- γ シグナルが低下している可能性も否定できない．さらに，機能獲得型変異でも複合型免疫不全症を呈した症例もあり⁴⁰，今後は変異の影響を免疫細胞の系統別に詳細に検討していく必要もあると考えられる．

これまで CCD に報告された変異は大部分が機能獲得型変異であった．さらに，DBD まで拡大してもその傾向は変わらない．しかし，機能獲得型変異においてもマイコバクテリア感染を呈する例があるなど，機能獲得型変異でも新たな，かつ多彩な臨床症状を伴う例が

報告されてきている³⁹。以前、STAT1 の立体構造上で機能獲得型変異残基はある脱リン酸化に関連する pocket にクラスターを形成すると報告されていた³³。しかし、その後多数の機能獲得型変異が報告され、必ずしもそのクラスターにのみ機能獲得型変異残基が存在するとは限らないことが確認された。今回、ある一方向かつ STAT1 表面上に存在するという限られた変異においては、機能獲得型変異残基は STAT1 構造の周辺を中心にある局在が見られること、マイコバクテリア感染を伴った機能獲得型変異残基はそれよりも内側に局在し、優性阻害型変異に近い場所に集積すること、優性阻害型変異残基は DNA 結合部にやや近く・内側に存在することが確認され、変異と表現型毎に局在がある可能性を発見した。これは STAT1 の複雑な役割や各変異による多彩な表現型を検証していく手掛かりとなるかもしれない。しかし、立体構造内部を含めると機能獲得型変異残基と優性阻害型変異残基が近接している部位もあり、今後も検討・検証が必要と考えられる。

STAT1 はウイルス感染、マイコバクテリア属などの細胞内寄生菌感染において非常に重要な役割を担っている。また、その異常症は機能獲得型、優性阻害型、機能喪失型、STAT1 欠損と多彩であり、それぞれが様々な病原体に対する易感染性など様々な症状を呈する。また、症状がオーバーラップする部分もあるが、それぞれの病態に関しては不明な点も多い。さらに STAT1 は悪性腫瘍でも重要な役割を担っていることが報告されており⁴¹⁻⁴³、免疫不全症としての STAT1 の機能を解明することで悪性腫瘍などより多くの患者に対して治療法などの新たな情報を提供できる可能性が考えられる。

【総括・結論】

○これまで STAT1 の CCD には多数の機能獲得型変異が報告されているが、今回の報告で STAT1 の CCD に世界初の新奇優性阻害型ミスセンス変異（G250A）を特定した。

○既報の STAT1 AD-MSMD 変異と同様に、G250A 変異も IFN- γ 刺激による GAS 転写活性が低下することで MSMD を発症することが確認された。また、優性阻害効果を生じるメカニズムの一つとして変異体が正常 STAT1 のリン酸化を阻害する作用があることを示した。

○既報の STAT1 AD-MSMD の変異と異なり、G250A 変異は単球・マクロファージ系細胞、強制発現 HeLa 細胞では優性阻害効果を認めたが、EBV-LCL では認めなかった。STAT1 変異の影響は T 細胞、B 細胞、単球・マクロファージ系細胞などでそれぞれ異なる可能性が示唆される。

○STAT1 の機能獲得型変異と優性阻害型変異では立体構造上の変異残基の局在が異なる可能性が示唆された。また、STAT1 機能獲得型変異でもマイコバクテリア感染を伴った症例では優性阻害型変異残基と局在が類似していたことから、臨床症状と変異残基の局在が関連する可能性も示唆された。

【謝辞】

今回の学位研究にあたり、御協力を頂きました患者様および患者様の御家族に深く感謝を致します。また、患者様の御紹介を頂きました九州大学大学院医学研究科成長発達医学分野 高田英俊先生、患者様の詳細な経過や情報、検体の提供や御家族との調整を下さった東京都立小児医療センター 森野紗衣子先生・伊藤健太先生・堀越裕歩先生、ダイレクトシーケンス解析を施行して頂きましたかずさ DNA 研究所 小野真太郎先生・小原收先生に感謝致します。

本研究の機会を与えて頂き御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究科小児科学分野 有賀正教授、本研究に関して様々な御協力・御助言を頂いた北海道大学大学院医学研究科小児科学分野免疫班の小林一郎先生、竹崎俊一郎先生、山崎康博先生、野川奈津子先生、戸澤雄介先生、シェイマー・サイード・モハメッドアリ先生をはじめ、私の研究を支えて下さった皆様に感謝を致します。特に、研究手技の獲得からその応用、研究方針の設定と適切な修正、論文作成と内容の指導など、研究全般にわたり御指導を頂きました北海道大学大学院医学研究科小児科学分野 山田雅文先生の御尽力があってこそその研究であったと深謝致しております。

本当にありがとうございました。

【引用文献】

- 1 Bousfiha, A., Jeddane, L., Al-Herz, W., Ailal, F., Casanova, J. L., Chatila, T., Conley, M. E., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J. L., Gaspar, H. B., Holland, S. M., Klein, C., Nonoyama, S., Ochs, H. D., Oksenhendler, E., Picard, C., Puck, J. M., Sullivan, K. E. & Tang, M. L. The 2015 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J. Clin. Immunol.* **35**, 727-738 (2015).
- 2 Casanova, J. L. & Abel, L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 581-620 (2002).
- 3 Bogunovic, D., Boisson-Dupuis, S. & Casanova, J. L. ISG15: leading a double life as a secreted molecule. *Exp. Mol. Med.* **45**, e18 (2013).
- 4 Jouanguy, E., Altare, F., Lamhamedi, S., Revy, P., Emile, J. F., Newport, M., Levin, M., Blanche, S., Seboun, E., Fischer, A. & Casanova, J. L. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1956-1961 (1996).
- 5 Newport, M. J., Huxley, C. M., Huston, S., Hawrylowicz, C. M., Oostra, B. A., Williamson, R. & Levin, M. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1941-1949 (1996).
- 6 Jouanguy, E., Lamhamedi-Cherradi, S., Lammas, D., Dorman, S. E., Fondaneche, M. C., Dupuis, S., Doffinger, R., Altare, F., Girdlestone, J., Emile, J. F., Ducoulombier, H., Edgar, D., Clarke, J., Oxelius, V. A., Brai, M., Novelli, V., Heyne, K., Fischer, A., Holland, S. M., Kumararatne, D. S., Schreiber, R. D. & Casanova, J. L. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat. Genet.* **21**, 370-378 (1999).
- 7 Dorman, S. E. & Holland, S. M. Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J. Clin. Invest.* **101**, 2364-2369 (1998).
- 8 Kong, X. F., Vogt, G., Itan, Y., Macura-Biegun, A., Szaflarska, A., Kowalczyk, D., Chapgier, A., Abhyankar, A., Furthner, D., Djambas Khayat, C., Okada, S., Bryant, V. L., Bogunovic, D., Kreins, A., Moncada-Velez, M., Migaud, M., Al-Ajaji, S., Al-Muhsen, S., Holland, S. M., Abel, L., Picard, C., Chaussabel, D.,

- Bustamante, J., Casanova, J. L. & Boisson-Dupuis, S. Haploinsufficiency at the human IFNGR2 locus contributes to mycobacterial disease. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 769-781 (2013).
- 9 Altare, F., Durandy, A., Lammas, D., Emile, J. F., Lamhamedi, S., Le Deist, F., Drysdale, P., Jouanguy, E., Doffinger, R., Bernaudin, F., Jeppsson, O., Gollob, J. A., Meinl, E., Segal, A. W., Fischer, A., Kumararatne, D. & Casanova, J. L. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* **280**, 1432-1435 (1998).
 - 10 de Jong, R., Altare, F., Haagen, I. A., Elferink, D. G., Boer, T., van Breda Vriesman, P. J., Kabel, P. J., Draaisma, J. M., van Dissel, J. T., Kroon, F. P., Casanova, J. L. & Ottenhoff, T. H. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* **280**, 1435-1438 (1998).
 - 11 Altare, F., Lammas, D., Revy, P., Jouanguy, E., Doffinger, R., Lamhamedi, S., Drysdale, P., Scheel-Toellner, D., Girdlestone, J., Darbyshire, P., Wadhwa, M., Dockrell, H., Salmon, M., Fischer, A., Durandy, A., Casanova, J. L. & Kumararatne, D. S. Inherited interleukin 12 deficiency in a child with bacille Calmette-Guerin and Salmonella enteritidis disseminated infection. *J. Clin. Invest.* **102**, 2035-2040 (1998).
 - 12 Dupuis, S., Dargemont, C., Fieschi, C., Thomassin, N., Rosenzweig, S., Harris, J., Holland, S. M., Schreiber, R. D. & Casanova, J. L. Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science* **293**, 300-303 (2001).
 - 13 Filipe-Santos, O., Bustamante, J., Haverkamp, M. H., Vinolo, E., Ku, C. L., Puel, A., Frucht, D. M., Christel, K., von Bernuth, H., Jouanguy, E., Feinberg, J., Durandy, A., Senechal, B., Chapgier, A., Vogt, G., de Beaucoudrey, L., Fieschi, C., Picard, C., Garfa, M., Chemli, J., Bejaoui, M., Tsolia, M. N., Kutukculer, N., Plebani, A., Notarangelo, L., Bodemer, C., Geissmann, F., Israel, A., Veron, M., Knackstedt, M., Barbouche, R., Abel, L., Magdorf, K., Gendrel, D., Agou, F., Holland, S. M. & Casanova, J. L. X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production. *J. Exp. Med.* **203**, 1745-1759 (2006).
 - 14 Bustamante, J., Arias, A. A., Vogt, G., Picard, C., Galicia, L. B., Prando, C., Grant, A. V., Marchal, C. C., Hubeau, M., Chapgier, A., de Beaucoudrey, L., Puel,

- A., Feinberg, J., Valinetz, E., Janniere, L., Besse, C., Boland, A., Brisseau, J. M., Blanche, S., Lortholary, O., Fieschi, C., Emile, J. F., Boisson-Dupuis, S., Al-Muhsen, S., Woda, B., Newburger, P. E., Condino-Neto, A., Dinauer, M. C., Abel, L. & Casanova, J. L. Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease. *Nat. Immunol.* **12**, 213-221 (2011).
- 15 Hambleton, S., Salem, S., Bustamante, J., Bigley, V., Boisson-Dupuis, S., Azevedo, J., Fortin, A., Haniffa, M., Ceron-Gutierrez, L., Bacon, C. M., Menon, G., Trouillet, C., McDonald, D., Carey, P., Ginhoux, F., Alsina, L., Zumwalt, T. J., Kong, X. F., Kumararatne, D., Butler, K., Hubeau, M., Feinberg, J., Al-Muhsen, S., Cant, A., Abel, L., Chaussabel, D., Doffinger, R., Talesnik, E., Grumach, A., Duarte, A., Abarca, K., Moraes-Vasconcelos, D., Burk, D., Berghuis, A., Geissmann, F., Collin, M., Casanova, J. L. & Gros, P. IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **365**, 127-138 (2011).
- 16 Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Abel, L. & Casanova, J. L. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN-gamma immunity. *Semin. Immunol.* **26**, 454-470 (2014).
- 17 Platanias, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 375-386 (2005).
- 18 Najjar, I. & Fagard, R. STAT1 and pathogens, not a friendly relationship. *Biochimie* **92**, 425-444 (2010).
- 19 Ank, N. & Paludan, S. R. Type III IFNs: new layers of complexity in innate antiviral immunity. *Biofactors* **35**, 82-87 (2009).
- 20 Lee, Y. N., Frugoni, F., Dobbs, K., Walter, J. E., Giliani, S., Gennery, A. R., Al-Herz, W., Haddad, E., LeDeist, F., Bleesing, J. H., Henderson, L. A., Pai, S. Y., Nelson, R. P., El-Ghoneimy, D. H., El-Feky, R. A., Reda, S. M., Hossny, E., Soler-Palacin, P., Fuleihan, R. L., Patel, N. C., Massaad, M. J., Geha, R. S., Puck, J. M., Palma, P., Cancrini, C., Chen, K., Vihinen, M., Alt, F. W. & Notarangelo, L. D. 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).
- 21 Shcherbina, A., Rosen, F. S. & Remold-O'Donnell, E. WASP levels in platelets and lymphocytes of wiskott-aldrich syndrome patients correlate with cell

- dysfunction. *J. Immunol.* **163**, 6314-6320 (1999).
- 22 Yamazaki, Y., Yamada, M., Kawai, T., Morio, T., Onodera, M., Ueki, M., Watanabe, N., Takada, H., Takezaki, S., Chida, N., Kobayashi, I. & Ariga, T. 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. *J. Immunol.* **193**, 4880-4887 (2014).
 - 23 Wolff, A. S., Sarkadi, A. K., Marodi, L., Karner, J., Orlova, E., Oftedal, B. E., Kisand, K., Olah, E., Meloni, A., Myhre, A. G., Husebye, E. S., Motaghedi, R., Perheentupa, J., Peterson, P., Willcox, N. & Meager, A. Anti-cytokine autoantibodies preceding onset of autoimmune polyendocrine syndrome type I features in early childhood. *J. Clin. Immunol.* **33**, 1341-1348 (2013).
 - 24 Puel, A., Doffinger, R., Natividad, A., Chrabieh, M., Barcenas-Morales, G., Picard, C., Cobat, A., Ouachee-Chardin, M., Toulon, A., Bustamante, J., Al-Muhsen, S., Al-Owain, M., Arkwright, P. D., Costigan, C., McConnell, V., Cant, A. J., Abinun, M., Polak, M., Bougneres, P. F., Kumararatne, D., Marodi, L., Nahum, A., Roifman, C., Blanche, S., Fischer, A., Bodemer, C., Abel, L., Lilic, D. & Casanova, J. L. 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).
 - 25 Kisand, K., Boe Wolff, A. S., Podkrajsek, K. T., Tserel, L., Link, M., Kisand, K. V., Ersvaer, E., Perheentupa, J., Erichsen, M. M., Bratanic, N., Meloni, A., Cetani, F., Perniola, R., Ergun-Longmire, B., Maclaren, N., Krohn, K. J., Pura, M., Schalke, B., Strobel, P., Leite, M. I., Battelino, T., Husebye, E. S., Peterson, P., Willcox, N. & Meager, A. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J. Exp. Med.* **207**, 299-308 (2010).
 - 26 Madariaga, L., Amurrio, C., Martin, G., Garcia-Cebrian, F., Bicandi, J., Lardelli, P., Suarez, M. D. & Cisterna, R. Detection of anti-interferon-gamma autoantibodies in subjects infected by *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2**, 62-68 (1998).
 - 27 Lin, C. H., Chi, C. Y., Shih, H. P., Ding, J. Y., Lo, C. C., Wang, S. Y., Kuo, C. Y., Yeh, C. F., Tu, K. H., Liu, S. H., Chen, H. K., Ho, C. H., Ho, M. W., Lee, C. H., Lai, H. C. & Ku, C. L. Identification of a major epitope by anti-interferon-

- gamma autoantibodies in patients with mycobacterial disease. *Nat. Med.* **22**, 994-1001 (2016).
- 28 Kampitak, T., Suwanpimolkul, G., Browne, S. & Suankratay, C. Anti-interferon-gamma autoantibody and opportunistic infections: case series and review of the literature. *Infection* **39**, 65-71 (2011).
- 29 Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M. & Seelow, D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods.* **11**, 361-362 (2014).
- 30 Mizoguchi, Y., Tsumura, M., Okada, S., Hirata, O., Minegishi, S., Imai, K., Hyakuna, N., Muramatsu, H., Kojima, S., Ozaki, Y., Imai, T., Takeda, S., Okazaki, T., Ito, T., Yasunaga, S., Takihara, Y., Bryant, V. L., Kong, X. F., Cypowyj, S., Boisson-Dupuis, S., Puel, A., Casanova, J. L., Morio, T. & Kobayashi, M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J. Leukoc. Biol.* **95**, 667-676 (2014).
- 31 Shimizu, Y., Taraborrelli, L. & Walczak, H. Linear ubiquitination in immunity. *Immunol. Rev.* **266**, 190-207 (2015).
- 32 Okura, Y., Yamada, M., Kuribayashi, F., Kobayashi, I. & Ariga, T. Monocyte/macrophage-specific NADPH oxidase contributes to antimicrobial host defense in X-CGD. *J. Clin. Immunol.* **35**, 158-167 (2015).
- 33 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).
- 34 Tsumura, M., Okada, S., Sakai, H., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Murata, T., Obata, H., Yasumi, T., Kong, X. F., Abhyankar, A., Heike, T., Nakahata, T., Nishikomori, R., Al-Muhsen, S., Boisson-Dupuis, S., Casanova, J. L., Alzahrani, M., Shehri, M. A., Elghazali, G., Takihara, Y. & Kobayashi, M. Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Hum. Mutat.* **33**, 1377-1387 (2012).
- 35 Hirata, O., Okada, S., Tsumura, M., Kagawa, R., Miki, M., Kawaguchi, H., Nakamura, K., Boisson-Dupuis, S., Casanova, J. L., Takihara, Y. & Kobayashi, M. Heterozygosity for the Y701C STAT1 mutation in a multiplex kindred with multifocal osteomyelitis. *Haematologica* **98**, 1641-1649 (2013).
- 36 Takezaki, S., Yamada, M., Kato, M., Park, M. J., Maruyama, K., Yamazaki, Y., Chida, N., Ohara, O., Kobayashi, I. & Ariga, T. Chronic mucocutaneous

- candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the STAT1 DNA-binding domain. *J. Immunol.* **189**, 1521-1526 (2012).
- 37 Sampaio, E. P., Bax, H. I., Hsu, A. P., Kristosturyan, E., Pechacek, J., Chandrasekaran, P., Paulson, M. L., Dias, D. L., Spalding, C., Uzel, G., Ding, L., McFarland, E. & Holland, S. M. A novel STAT1 mutation associated with disseminated mycobacterial disease. *J. Clin. Immunol.* **32**, 681-689 (2012).
- 38 Chapgier, A., Boisson-Dupuis, S., Jouanguy, E., Vogt, G., Feinberg, J., Prochnicka-Chalufour, A., Casrouge, A., Yang, K., Soudais, C., Fieschi, C., Santos, O. F., Bustamante, J., Picard, C., de Beaucoudrey, L., Emile, J. F., Arkwright, P. D., Schreiber, R. D., Rolinck-Werninghaus, C., Rosen-Wolff, A., Magdorf, K., Roesler, J. & Casanova, J. L. Novel STAT1 alleles in otherwise healthy patients with mycobacterial disease. *PLoS Genet.* **2**, e131 (2006).
- 39 Toubiana, J., Okada, S., Hiller, J., Oleastro, M., Lagos Gomez, M., Aldave Becerra, J. C., Ouachee-Chardin, M., Fouyssac, F., Girisha, K. M., Etzioni, A., Van Montfrans, J., Camcioglu, Y., Kerns, L. A., Belohradsky, B., Blanche, S., Bousfiha, A., Rodriguez-Gallego, C., Meyts, I., Kisand, K., Reichenbach, J., Renner, E. D., Rosenzweig, S., Grimbacher, B., van de Veerdonk, F. L., Traidl-Hoffmann, C., Picard, C., Marodi, L., Morio, T., Kobayashi, M., Lilic, D., Milner, J. D., Holland, S., Casanova, J. L. & Puel, A. Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype. *Blood* **127**, 3154-3164 (2016).
- 40 Baris, S., Alroqi, F., Kiykim, A., Karakoc-Aydiner, E., Ogulur, I., Ozen, A., Charbonnier, L. M., Bakir, M., Boztug, K., Chatila, T. A. & Barlan, I. B. Severe Early-Onset Combined Immunodeficiency due to Heterozygous Gain-of-Function Mutations in STAT1. *J. Clin. Immunol.* **36**, 641-648 (2016).
- 41 Bozeman, R., Abel, E. L., Macias, E., Cheng, T., Beltran, L. & DiGiovanni, J. A novel mechanism of skin tumor promotion involving interferon-gamma (IFN γ)/signal transducer and activator of transcription-1 (Stat1) signaling. *Mol. Carcinog.* **54**, 642-653 (2015).
- 42 Chen, J., Zhao, J., Chen, L., Dong, N., Ying, Z., Cai, Z., Ji, D., Zhang, Y., Dong, L., Li, Y., Jiang, L., Holtzman, M. J. & Chen, C. STAT1 modification improves therapeutic effects of interferons on lung cancer cells. *J. Transl. Med.* **13**, 293 (2015).
- 43 Kharma, B., Baba, T., Matsumura, N., Kang, H. S., Hamanishi, J., Murakami,

R., McConechy, M. M., Leung, S., Yamaguchi, K., Hosoe, Y., Yoshioka, Y., Murphy, S. K., Mandai, M., Hunstman, D. G. & Konishi, I. STAT1 drives tumor progression in serous papillary endometrial cancer. *Cancer Res.* **74**, 6519-6530 (2014).