

# 慢性真菌感染症を呈する免疫疾患の新規治療標的の同定

千葉大学大学院 医学研究院 先進気道アレルギー学寄附講座

平原 潔

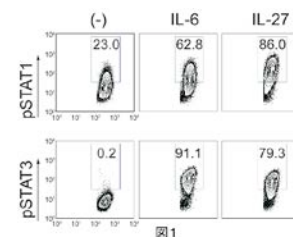
## 1. はじめに (緒言 目的 背景 序論)

近年、重症の慢性真菌感染症を呈する原発性免疫不全症候群の中に *STAT1* 遺伝子変異を有する患者が少なからず存在することが明らかになった。しかし、*STAT1* 遺伝子変異による免疫能低下の機序は不明である。そのため、本疾患に対する治療は対症療法のみで、根治的な治療はない。 サイトカインは複数の STATs を同時に活性化することが知られている。しかし、活性化された複数の STATs がサイトカインの多様な生理機能を制御する機構について、網羅的な解析は未だになされていない。私は、“サイトカインによって活性化される複数の STATs の機能的バランス破綻が、*STAT1* 遺伝子変異による免疫能低下の原因として重要である”との仮説を立てた。本研究では、複数の STATs がサイトカインの多様な生理作用をもたらす機序を解明し、この機序の破綻が、原発性免疫不全症候群に及ぼすインパクトを明らかにする。 これらの新規知見によって、免疫不全症候群に対する根治的な治療薬の開発への貢献を目指す。

## 2. 方法

### (1) IL-6, IL-27 の生理作用誘導における複数 STAT (STAT1, STAT3) の機能解析

相反する生理作用を有する IL-6 と IL-27 をモデルサイトカインとし、同サイトカインの受容体を発現しているヘルパー T 細胞をモデル細胞として用いる。予備検討の結果、ヘルパー T 細胞では IL-6, IL-27 刺激で STAT1, STAT3 が活性化される (図1)。このシステムを用いて IL-6, IL-27 で誘導される STAT のリン酸化の経時的変化、STAT1, STAT3 の二量体形成 (ホモ二量体・ヘテロ二量体) の時空間的解析を行う。



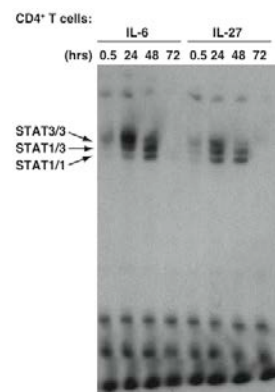
さらに、サイトカインの生理作用を標的細胞の遺伝子発現変化を指標にして解析する。サイトカイン応答における STAT の機能を解析する目的で、野生型マウス、STAT1 欠損マウス、STAT3 欠損マウスの脾臓から単離したヘルパー T 細胞にサイトカイン刺激を 72 時間加えた後、各種解析を行う。網羅的かつ定量的な遺伝子発現解析を、STAT1 欠損マウス、STAT3 欠損マウスを用いて行うことで、それぞれの STAT の遺伝子発現調節における特異的役割を解明する。また、この系では同時に多量のサンプルが調整可能であるため、実験に大量の細胞が必要な遺伝子発現解析 (RNA-Seq)、STAT のクロマチンへの直接結合およびエピジェネティック変化の解析 (ChIP-Seq) を同一サンプルで施行することが可能となり、多角的な解析ができる利点がある。

### (2) STAT1, STAT3 協働による遺伝子発現調節機構の解析

STAT1, STAT3 のクロマチンへの直接結合を ChIP-Seq 法で研究することで、今まで報告のない STAT1, STAT3 ホモ二量体・ヘテロ二量体のゲノム上の分布を網羅的に解析し、STAT1, STAT3 の協働での遺伝子発現調節機構を解明する。

### (3) ヒトにおける“STAT の機能的均衡モデル”破綻による重症の慢性真菌感染症の機序解明

*STAT1* GOF 患者における STAT1 の過剰な活性化が、サイトカインに対する反応をどのように変化させ慢性真菌感染症の重症化の原因となるかについて、“サイトカイン生理作用誘導における STAT の協働機構破綻”という観点から遺伝子発現、エピジェネティック変化の網羅的解析を行う。特に免疫抑制性分子に着目して、患者検体における発現増強の有無、さらには、患者の免疫抑制状態を引き起こす原因候補分子の探索を行う。



## 3. 結果 研究成果

### (1) 複数の STATs がサイトカインの多様な生理作用をもたらす機序の解明

まず申請者は、IL-6, IL-27 によりサイトカイン特異的な STAT1, STAT3 の二量体形成 (ホモ二量体・ヘテロ二量体) の時系列的変化を EMSA 法を用いて解析した (図2)。その結果、サイトカイン刺激後 24 時間では、IL-6 は STAT3-STAT3 のホモダイマーを強く誘導する一方、IL-27 刺激によつては STAT1-STAT1 のホモダイマーが誘導されることが明らかになった。さらに、これらの二量体は、刺激後 72 時間の時点で消失することが示された。

図2

続いて、申請者はIL-6, IL-27が誘導する遺伝子発現変化の網羅的・定量的な解析を行い、それぞれのトランスクリプトームの特異性・共通性について定量化した(図3)。この結果、IL-6, IL-27は生体内で相反する生理作用を有するにもかかわらず、約30% (n=379)の遺伝子が共通に制御されていることを明らかにした(図3A)。興味深いことに、全く反対方向に制御されている遺伝子はわずか22個だった。一つ一つの遺伝子を細かく見ていくと、*Ifng*や*Ccl15*, *Rorc*といった免疫応答に重要な遺伝子がこれらのグループには含まれていた(図3B)。

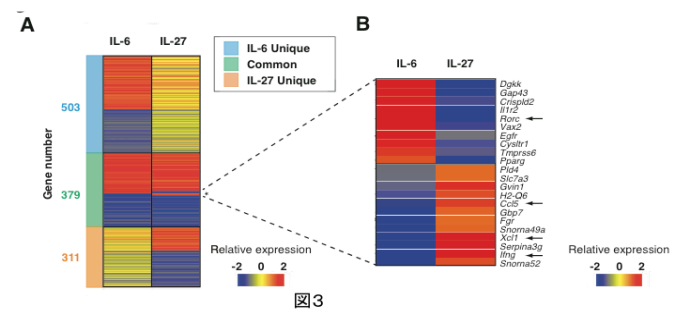


図3

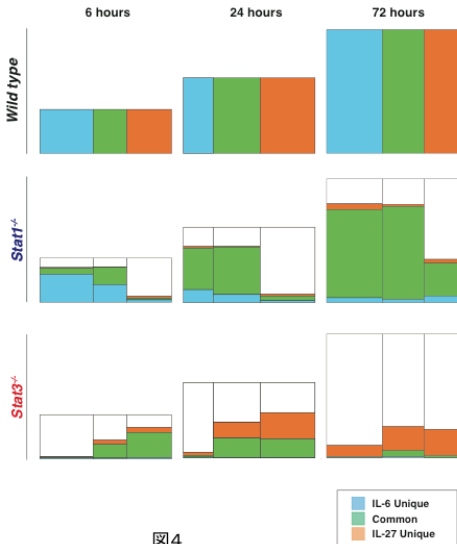


図4

24時間、72時間のタイムポイントにおけるSTAT1欠損マウス、STAT3欠損マウス由来のヘルパーT細胞を用いたサンプルのRNA-Seq解析を行った(図4)。サイトカイン刺激後6時間の時点では、STAT1欠損は、IL-27特異的遺伝子の発現低下の原因となる一方、STAT3欠損は、IL-6特異的遺伝子の発現低下を引き起こした。大変興味深いことに、刺激後72時間の時点では、全く異なる結果が認められた(図4)。つまり、STAT1欠損は、IL-6, IL-27間の特異性が失われる原因となり、STAT3欠損では両サイトカインにより誘導される遺伝子発現が著しく損なわれることが明らかとなった(図4)。図5は、別の表記方法で提示した結果であり、相同性のあるシグナル伝達物質が非対称的機能を有することを明解に示した世界初の所見である。以上まとめると、① IL-6, IL-27はそれぞれ特徴的なSTAT1, STAT3の二量体を誘導すること、② STAT1, STAT3がそれぞれ非対称的機能を有することを見出した。

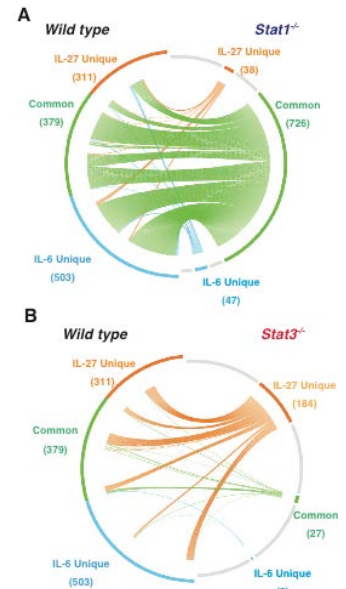


図5

## (2) STAT1, STAT3協働による遺伝子発現調節機構の解析

続いて我々は、IL-6, IL-27刺激によって誘導されるSTAT1, STAT3の機能的二量体が遺伝子発現誘導を調節する機構を解析する目的で、STAT1, STAT3のDNAへの直接結合をChIP-Seq法を用いて解析した。まず、我々は、全ゲノム上におけるSTAT1, STAT3の結合変化のダイナミクスについて解析を行った。その結果、サイトカイン刺激で誘導されるSTAT1, STAT3結合変化は、その60%がサイトカイン刺激で出現する一方、20%はサイトカイン刺激で消失し、残りの20%はサイトカイン刺激で変化がないという知見を得た(図6)。また我々は、STAT3の結合ピーク数は、STAT1の結合ピーク数と比較すると2倍以上存在することを見出した(図7)。これは、IL-6, IL-27で誘導される遺伝子発現の変化の大部分がSTAT3によって制御されているという(1)の結果を反映している。

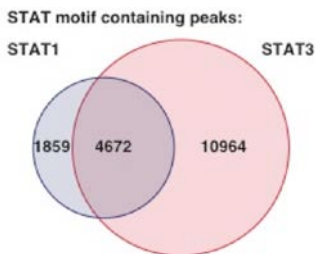


図7

さらに、我々は、遺伝子発現調節におけるSTAT1, STAT3の役割を解析する目的で、(1)で分類したそれぞれの遺伝子群 (IL-6特異的遺伝子群, 共通遺伝子群, IL-27特異的遺伝子群) におけるSTAT1, STAT3の結合を定量化した。IL-6特異的遺伝子群では、STAT1, STAT3の両方が関与していた。興味深いことに、IL-6刺激で発現低下する遺伝子群において、STAT1結合がSTAT3結合に比較し増強していることが見出された(図8)。このことは、STAT1がこれらの遺伝子群について抑制的に作用している可能性を示唆している。さらに、このようなSTAT1, STAT3の結合様式が他方のSTATがなくなることでどのように変化するかについて、それぞれのSTAT欠損T細胞を用いて検証した。その結果、IL-6特異的遺伝子群では、STAT1欠損状況下においては、STAT3の結合は増加したのに対して、STAT3欠損状況下においては、STAT1の結合は著明に減少した(図8)。一方、IL-27特異的遺伝子群では、STAT3欠損状況下において、STAT1の結合は比較的保たれていた(図8)。このことは、IL-27特異的遺伝子群の遺伝子発現調節は、STAT1-STAT1の二量体で行われている可能性を示唆している。

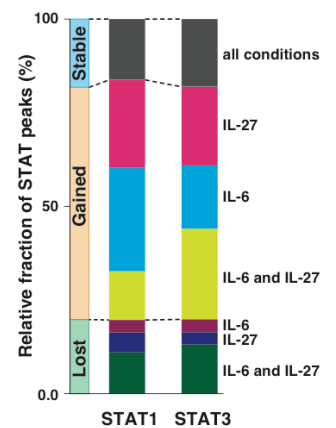


図6

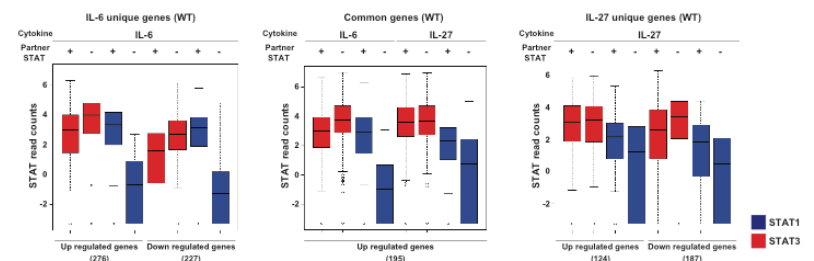


図8

### (3) ヒトにおける“STATの機能的均衡モデル”破綻による重症の慢性真菌感染症の機序解明

STAT1 機能獲得変異（以下 STAT1 GOF）患者における STAT1 の過剰な活性化が、サイトカインに対する反応をどのように変化させ慢性真菌感染症の重症化の原因となるかについて、“サイトカイン生理作用誘導における STAT の協働機構破綻”という観点から遺伝子発現の網羅的解析を行った。STAT1 GOF 患者 5 例および健康人 4 例の末梢血から単離した CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞に IL-6, IL-27 刺激を 72 時間加えた後、回収し RNA-Seq で網羅的遺伝子発現変化を解析した。二群間の遺伝子発現を比較した結果、STAT1 GOF 患者群において、3,458 個の遺伝子が、新たにそれぞれのサイトカインでの発現変動を呈した（発現変動獲得遺伝子群）一方、573 個の遺伝子群でその発現変化が認められなくなった（発現変動喪失遺伝子群）。それぞれの遺伝子群について、どのような特徴を有する遺伝子が多く認められるかについてネットワーク解析を行った。大変興味深いことに、発現変動獲得遺伝子群（表 1）および発現変動喪失遺伝子群（表 2）の両群において、免疫疾患関連遺伝子群が有意に多数存在することが明らかになった。

Network Analysis with the genes (n=3458) which are gained in GOF patients

ID	Associated Network Functions	Score
1	RNA Post-Transcriptional Modification, Cellular Assembly and Organization, Cell-To-Cell Signaling and Interaction	35
2	Developmental Disorder, Drug Metabolism, Hereditary Disorder	33
3	Cellular Assembly and Organization, Cancer, Immunological Disease	33
4	Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Carbohydrate Metabolism	33
5	Cellular Development, Free Radical Scavenging, Small Molecule Biochemistry	33

表1

Network Analysis with the genes (n=573) which are lost in GOF patients

ID	Associated Network Functions	Score
1	Cellular Compromise, Cancer, Cellular Development	39
2	Cell Cycle, Hepatic System, Development and Function, Organ Development	35
3	Embryonic Development, Hair and Skin Development and Function, Organ Development	33
4	DNA Replication, Recombination, and Repair, RNA Post-Transcriptional Modification, Gene Expression	33
5	Immunological Disease, Inflammatory Disease, Inflammatory Response	31

表2

#### 4. 考察 まとめ

本申請課題の研究を通して以下の点を明らかにした。IL-6, IL-27で誘導される遺伝子発現変化は大部分が STAT3により制御されている。一方、STAT1はIL-6, IL-27で誘導される遺伝子群間の特異性を制御している。つまり、サイトカインの生理機能を規定する上で、STAT1, STAT3はそれぞれ非対称的機能を有する。STAT1 機能獲得変異患者では、免疫疾患関連遺伝子群の発現変動が認められる。今後は STAT1GOF 患者で発現変動している遺伝子群から様々な機能遺伝子の同定を行い、新たな治療戦略の提案をおこなえるよう研究を進める。

#### 5. 発表論文、参考文献

- Hosokawa H, Tanaka T, Kato M, Shinoda K, Tohyama H, Hanazawa A, Tamaki Y, **Hirahara K**, Yagi R, Sakikawa I, Morita A, Nagira M, Poyurovsky MV, Suzuki Y, Motohashi S, Nakayama T: Gata3/Ruvbl2 complex regulates T helper 2 cell proliferation via repression of Cdkn2c expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(46):18626-18631 (2013)
- Nakayama S, Poholek AC, Lu KT, Takahashi H, Kato M, Iwata S, **Hirahara K**, Cannons JL, Schwartzberg PL, Vahedi G, Sun HW, Kanno Y, O’Shea JJ.: Type I IFN Induces Binding of STAT1 to Bcl6: divergent roles of STAT family transcription factors in the T follicular helper cell genetic program. *J Immunol*. 192(5):2156-2166 (2014)
- Steward-Tharp SM, Laurence A, Kanno Y, Kotlyar A, Villarino AV, Sciumè G, Kuchen S, Resch W, Wohlfert EA, Jiang K, **Hirahara K**, Vahedi G, Sun HW, Feigenbaum L, Milner JD, Holland SM, Casellas R, Powrie F, O’Shea JJ: A mouse model of HIES reveals pro-and anti-inflammatory functions of STAT3. *Blood*. 123(19):2978-2987 (2014)
- Watanabe Y, Onodera A, Kanai U, Ichikawa T, Obata-Ninomiya K, Wada T, Kiuchi M, Iwamura C, Tumes DJ, Shinoda K, Yagi R, Motohashi S, **Hirahara K**, Nakayama T.: Trithorax complex component Menin controls differentiation and maintenance of T helper 17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(35):12829-12834 (2014)
- Endo Y, **Hirahara K**, Yagi R, Tumes DJ, Nakayama T: Pathogenic memory type Th2 cells in allergic inflammation. *Trends Immunol*. 35(2):69-78 (2014)
- Bonelli M, Shih HY, **Hirahara K**, Singelton K, Laurence A, Poholek A, Hand T, Mikami Y, Vahedi G, Kanno Y, O’Shea JJ.: Helper T Cell Plasticity: Impact of Extrinsic and Intrinsic Signals on Transcriptomes and Epigenomes. *Curr Top Microbiol Immunol*. 381:279-326 (2014)
- Shih HY, Sciumè G, Poholek A, Vahedi G, **Hirahara K**, Villarino AV, Bonelli M, Bosselut R, Kanno Y, Muljo SA, O’Shea JJ. : Transcriptional and epigenetic networks of helper T and innate lymphoid cells. *Immunol Rev*. 261(1):23-49 (2014)
- Endo Y, **Hirahara K**, Iinuma T, Shinoda K, Tumes DJ, Asou KH, Matsugae N, Obata-Ninomiya K, Yamamoto H, Motohashi S, Oboki K, Nakae S, Saito H, Okamoto Y, and Nakayama T.: The Interleukin-33-p38 kinase axis confers memory T helper-2 cell pathogenicity in the airway. *Immunity*. 42(2): 294-308 (2015)
- Iinuma T, Okamoto Y, Yamamoto H, Inamine-Sasaki A, Ohki Y, Sakurai T, Funakoshi U, Yonekura S, Sakurai D, **Hirahara K**, and Nakayama T.: IL-25 and mucosal T cells in noneosinophilic and eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 114(4):289-298 (2015)
- Hirahara K**, Onodera A, Villarino AV, Bonelli M, Sciumè G, Laurence A, Sun HW, Brooks RS, Vahedi G, Shih HY, Gtierrez-Cruz G, Iwata S, Suzuki R, Mikami Y, Okamoto Y, Nakayama T, Holland S, Hunter CA, Kanno Y, and O’Shea JJ.: Asymmetric action of STAT transcription factors drive transcriptional outputs and cytokine specificity. *Immunity*. 42(5):877-889 (2015)
- Yang XP, Jiang K, **Hirahara K**, Vahedi G, Afzali B, Sciumè G, Bonelli M, Sun HW, Jankovic D, Kanno Y, Sartorelli V, O’Shea JJ and Laurence A.: EZH2 is crucial for both differentiation of regulatory T cells and T effector cell expansion. *Sci Rep*. June 19;5:10643 (2015)
- Endo Y, Asou HK, Matsugae N, **Hirahara K**, Shinoda K, Tumes DJ, Tokuyama H, Yokote K, and Nakayama T: Obesity drives Th17 cell differentiation by inducing the lipid metabolic kinase, ACC1. *Cell Rep*. 12;1042-1055 (2015)