

## 150. STAT 分子の機能的均衡破綻による免疫不全の機序解明

平原 潔

Key words : STAT, Cytokine, RNA-Seq, ChIP-Seq,  
STAT1 gain of function mutation

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

### 緒 言

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目的で行った。

### 方法および結果

#### 1. IL-6, IL-27 により誘導される遺伝子発現変動の定量的評価

相反する生理作用を有する IL-6 と IL-27<sup>1)</sup> 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た。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 RNA-Seq 法を用いて解析した。IL-6, IL-27 刺激にそれぞれ特異的に反応する遺伝子群、共通に反応する遺伝子群をゲノムワイドに定量化した (図 1A)<sup>2)</sup>。

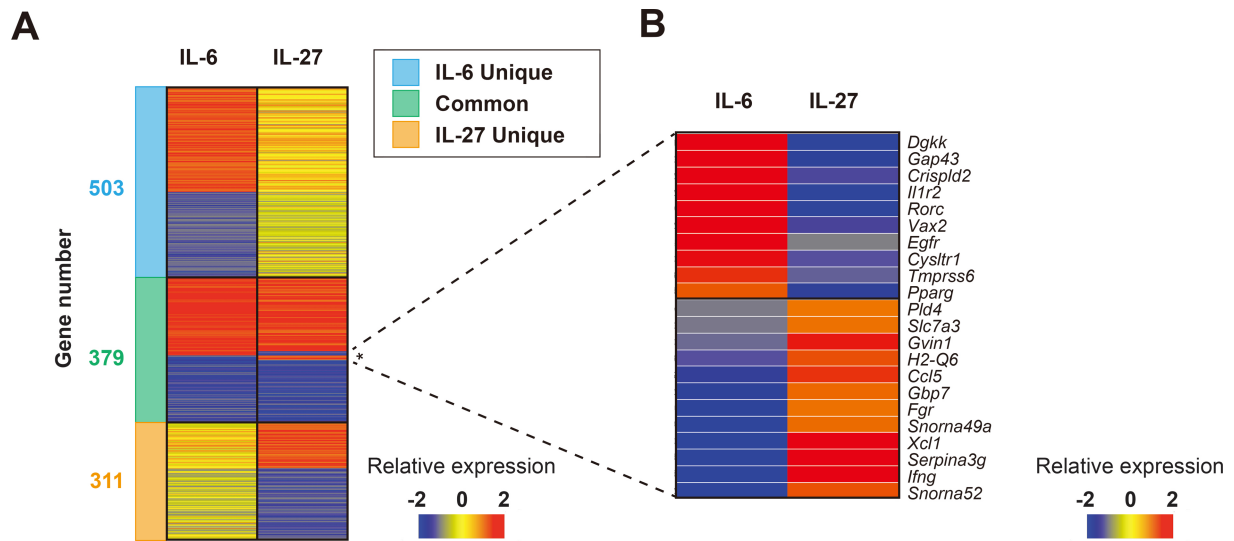


図1. IL-6, IL-27によって誘導される遺伝子群の定量化.

RNA-Seq法により, IL-6, IL-27で誘導されるトランスクリプトームを定量化した.

これらの遺伝子群 (1,193 個) のうち, わずか 22 個の遺伝子群が正反対に制御されていた (図 1B). 一つ一つの遺伝子を見ていくと, *Ifng* や *Ccl5*, *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 1B).

引き続き, 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 2A, 2B). 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 刺激によっては 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 48 時間の時点で消失することが示された (図 2A, 2B).

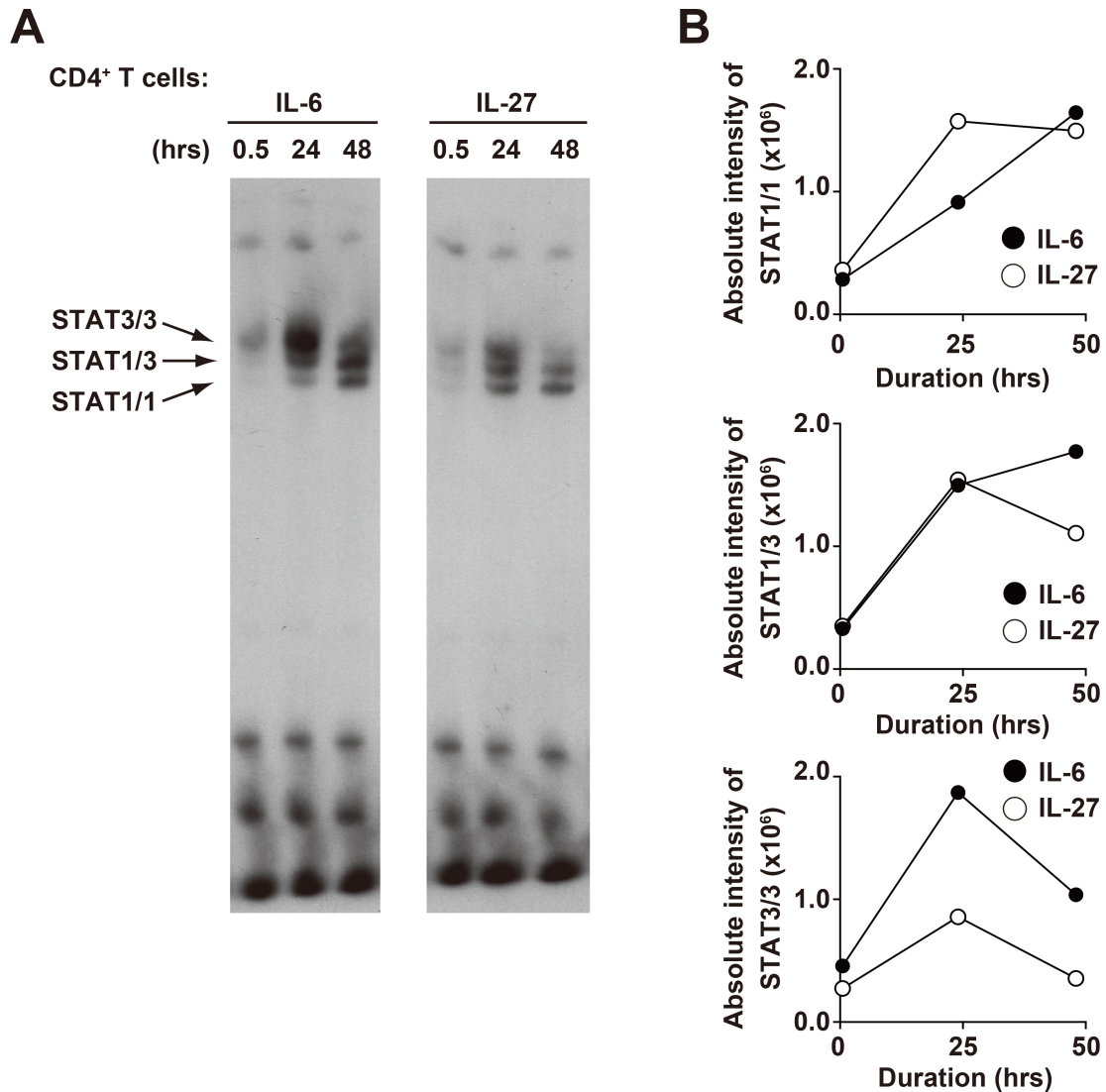


図2. IL-6, IL-27 によって誘導される STAT1-STAT3 二量体の定量化.  
EMSA 法により IL-6, IL-27 によって誘導される STAT1-STAT3 二量体の定量化を行った.

## 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、経時的な遺伝子発現変化における STAT1, STAT3 の役割を解析する目的で、サイトカイン刺激後 72 時間における 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。STAT1 欠損によって、IL-6, IL-27 刺激で誘導される遺伝子群間の特異性が失われた。一方、STAT3 欠損によって、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 3A, 3B)。これは、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。さらに我々は、経時的な遺伝子発現変化における STAT1, STAT3 の役割を解析する目的で、サイトカイン刺激後、6 時間、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 3C)。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。STAT 欠損の影響は、刺激直後はサイトカイン特異的であったが、経時的にもう一方のサイトカインへ影響することが明らかになった (図 3C)。

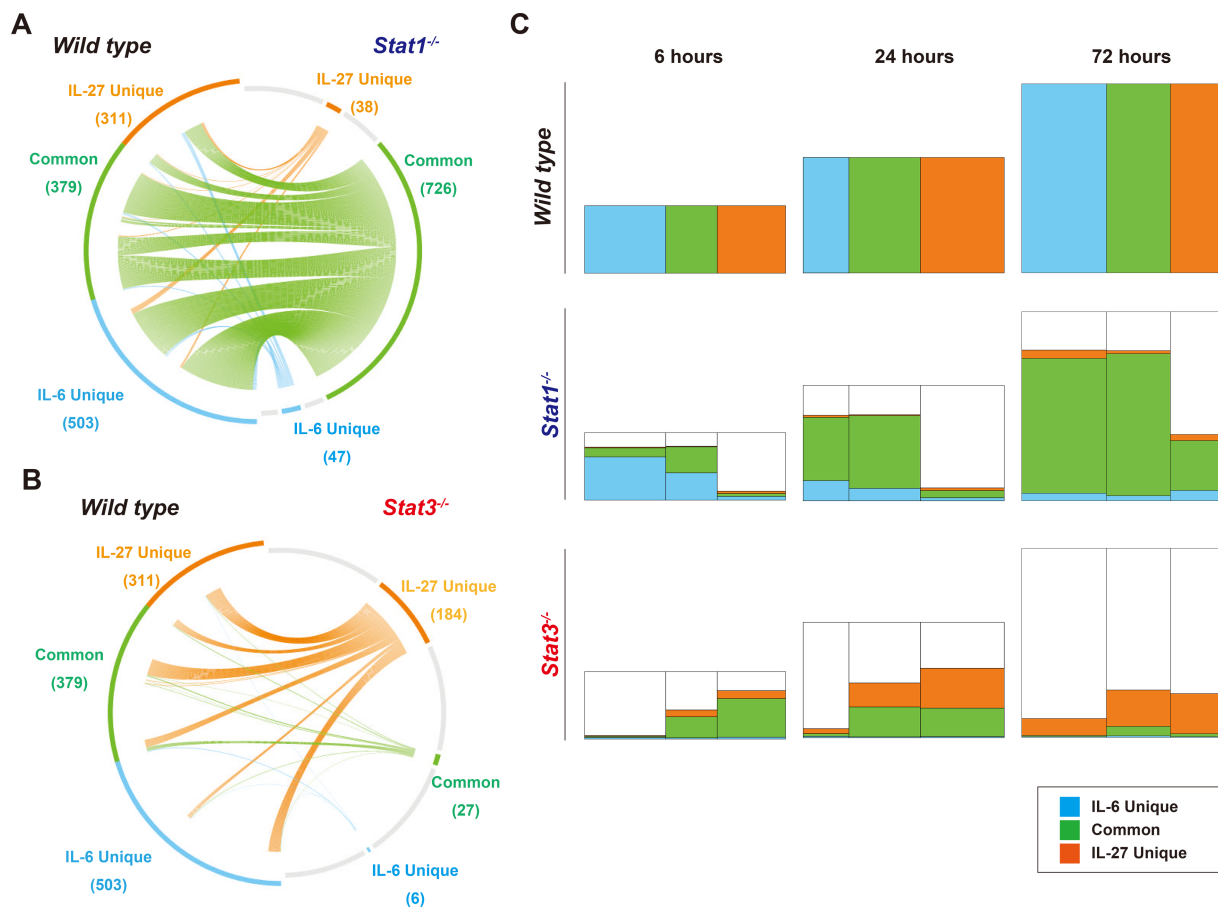


図3. STAT1, STAT3の非対称的関与.

IL-6, IL-27で誘導されるトランスクリプトーム形成におけるSTAT1, STAT3の非対称的関与をサーコス, モザイクプロットを用いて表した.

### 3. STAT1, STAT3の直接結合による遺伝子発現調節機構の解析

上記結果をふまえ, 我々は, 次に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4A). 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だした(図4B). 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(2)の結果を反映している. 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. 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だされた(図4C). 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, 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4C). 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4C). 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.

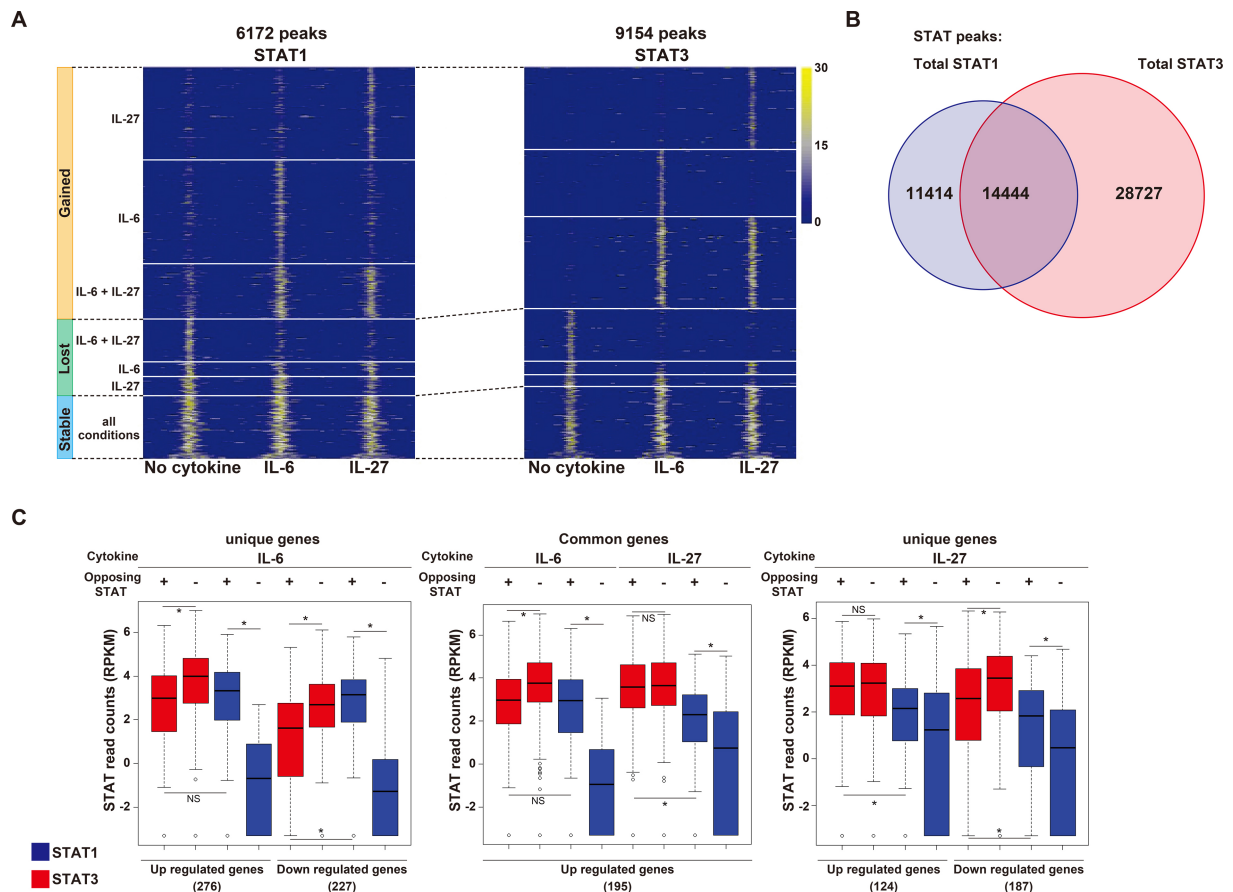


図4. ゲノムワイドな STAT1, STAT3 の DNA 結合パターンの評価.  
STAT1 の DNA 結合の大部分は, STAT3 に依存している.

#### 4. 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

最後に我々は, 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 例および健常人 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.

表 1. *STAT1* 機能獲得変異患者における発現変動獲得遺伝子群のネットワーク解析結果一覧

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 2. *STAT1* 機能獲得変異患者における発現変動喪失遺伝子群のネットワーク解析結果一覧

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    |

## 考 察

サイトカインは生体内で多様な生理作用を有するが、それぞれのサイトカインにおける生理作用の特異性に関する分子機構は不明な点が多い。今回我々は、炎症性サイトカインと知られる IL-6 と抗炎症性サイトカインである IL-27 を用いて、シグナル伝達物質 STAT によって規定される生理作用の分子機構の解析を行った。IL-6 と IL-27 は共に STAT1, STAT3 を活性化するが、それらの STATs がどのように協調して働いているかは不明であった。今回の我々の研究の結果、IL-6, IL-27 で誘導される遺伝子発現変化はその大部分が 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ことが明らかになった。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。さらに、STAT1 の過剰活性化がおこる STAT1 機能獲得変異患者検体の解析の結果から、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を発見した。このことは、非対称的機能を有する STATs が機能的均衡を保つことで免疫恒常性が維持され

ていることを示唆する。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行えるよう研究を進める。

### 共同研究者

以上の研究は、千葉大学大学院医学研究院の小野寺 淳助教、中山俊憲教授、米国国立衛生研究所の菅野由香常任研究員、John J. O'Shea 学術局長との共同研究で行われた。最後に本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

### 文 献

- 1) Hirahara, K., Ghoreschi, K., Yang, X. P., Takahashi, H., Laurence, A., Vahedi, G., Sciumè, G., Hall, A. O., Dupont, C. D., Francisco, L. M., Chen, Q., Tanaka, M., Kanno, Y., Sun, H. W., Sharpe, A. H., Hunter, C. A. & O'Shea, J. J. : Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans *via* induction of the ligand PD-L1. *Immunity*, **36** : 1017-1030, 2012.
- 2) Hirahara, K., Onodera, A., Villarino, A., Bonelli, M., Sciumè, G., Laurence, A., Sun, H. W., Brooks, S. R., Vahedi, G., Shih, H. Y., Gutierrez-Cruz, G., Iwata, S., Suzuki, R., Mikami, Y., Okamoto, Y., Nakayama, T., Holland, S., Hunter, C. A., Kanno, Y. & O'Shea, J. J. : Asymmetric action of STAT transcription factors drive transcriptional outputs and cytokine specificity. *Immunity*, **42** : 877-889, 2015.