

201024072A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

インターロイキン1受容体関連キナーゼ4 (IRAK4)
欠損症の全国症例数把握及び
早期診断スクリーニング・治療法開発に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大西秀典

平成23(2011)年3月

厚生労働科学研究費補助金報告書目次

I. 総括研究報告

インターロイキン1受容体関連キナーゼ4 (IRAK4) 欠損症の全国症例数把握
及び早期診断スクリーニング・治療法開発に関する研究

研究代表者 大西秀典…………… 1

(資料) インターロイキン1受容体関連キナーゼ4 (IRAK4) 欠損症とは
自然免疫不全症 疑い例 遺伝子診断依頼書
自然免疫不全症の簡易診断フローチャート

II. 分担研究報告

1. IRAK4 欠損症及び自然免疫不全症の患者数把握のための全国症例調査、
自然免疫不全症の遺伝子診断、病因遺伝子変異の *in vitro* 機能解析システムの
開発、及び関連遺伝子の遺伝子多型解析
分担研究者：大西秀典…………… 13
2. IRAK4 欠損症の病態解析のための基礎的検討；炎症制御異常を伴う疾患に
おけるサイトカイン・プロフィール解析
分担研究者：谷内江昭宏…………… 19
3. IRAK4、MyD88 欠損症の迅速診断法の確立に関する研究
分担研究者：高田英俊…………… 21
4. 寒冷誘発による発熱で見つかった TREX1 異常による Aicardi-Goutières
症候群の1例
分担研究者：西小森隆太…………… 25
5. IRAK4 及び関連因子の構造生物学的解析研究
分担研究者：朽尾豪人…………… 27
6. IRAK4 欠損症の分子構造基盤についての研究
分担研究者：加藤善一郎…………… 29

III. 研究成果の刊行に関する一覧…………… 35

IV. 研究成果の刊行物・別冊…………… 41

I. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書

インターロイキン1受容体関連キナーゼ4(IRAK4)欠損症の全国症例数把握及び 早期診断スクリーニング・治療法開発に関する研究

研究代表者 大西秀典 岐阜大学・医学部附属病院小児科 兼任講師

研究要旨

侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)等を呈する免疫不全の責任遺伝子として IRAK4、MyD88 等自然免疫関連分子の異常が報告されている。国内での IRAK4 欠損症をはじめとした自然免疫不全症患者の症例数等の実態が不明であるため、2010 年度に全国症例調査を行った。現在までに IRAK4 欠損症は確定診断例 7 例(現在生存症例は 3 名)が報告されている。疾患概念の確立が 2003 年と日が浅いこともあり、未診断例が相当数存在すると考えられる。そこで、フローサイトメーターを利用した迅速診断スクリーニング法を開発した。これにより IRAK4 欠損症のみならず、類縁疾患の IKBA 欠損症も診断可能であった。肺炎球菌等グラム陽性菌群の細胞膜構成成分は、Toll 様受容体(TLR)2により認識され、アダプター分子 Mal/TIRAPを中継して、MyD88、IRAK4 と連鎖的に高次複合体(Myddosome)を形成する。自然免疫不全症の候補責任遺伝子として Mal を標的とした遺伝子解析を行ったところ、3 種類の機能損失型亜型を同定した。これらの遺伝子型は自然免疫不全症の新規責任遺伝子変異になりうると考えられ、IRAK4 欠損症と類似の表現型を示す患者の解析候補遺伝子と考えている。また、MyD88 欠損症の R196C 変異は MyD88 と Mal の相互作用を減弱させるが、IRAK4 欠損症で同定されているミスセンス型遺伝子変異 R12C は、IRAK4 タンパク自体の欠損ではなく、IRAK4 と MyD88 のタンパク間相互作用の減弱を引き起こすことが明らかになった。すなわち IRAK4 欠損症や MyD88 欠損症は Myddosome の形成障害により発症するといえ、総称して Myddosome 病(仮称)と呼んでいる。

分担研究者

谷内江昭宏 金沢大学・医薬保健研究域医学系・小児科 教授

高田英俊 九州大学・大学院医学研究院・成長発達医学 准教授

西小森隆太 京都大学・大学院医学研究科・発達小児科学 准教授

朽尾豪人 京都大学・工学研究科 准教授

加藤善一郎 岐阜大学・医学部附属病院・小児科 准教授

菌感染や侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)等の患者の中にまぎれている可能性が高い(資料 1)。これらの疾患は、難治性で重症化しやすく、ときに致死性である。従って早期診断により適切な治療を行う事で、患者予後を著しく改善させ、QOL 向上を図る必要がある。本研究では特に、IRAK4 欠損症を対象として、国内での患者発生の実態調査及び早期診断システムの確立、新規治療法の確立に向けた研究を行う。

A. 研究目的

近年、Toll 様受容体を中心とした自然免疫のシグナル伝達経路の異常により、アレルギー疾患や免疫不全症を発症することが知られてきている。原発性免疫不全種の 1 型として分類される自然免疫不全症(IRAK4 欠損症、MyD88 欠損症など)は、一般的な免疫検査で診断することができず、従来原因不明とされてきた反復性グラム陽性

B. 研究方法

- 国内での IRAK4 欠損症をはじめとした自然免疫不全症患者の症例数等の実態が不明であるため、2010 年度に全国症例調査を行った。
- 迅速診断スクリーニング法として、全血 1ml に Brefeldin A 及び、LPS を加え、CO₂ incubator で 4 時間培養後、抗 CD14 抗体で染色後、permeabilization し、抗

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

TNF- α 抗体で細胞内TNF- α を染色した後、フローサイトメーターで解析した。解析は、単球にgateをかけ、TNF- α 産生細胞の割合を検討した。

3. 2.のスクリーニング法でTNF- α 産生量の低下が認められた症例及び、臨床症状から自然免疫不全症が疑われた症例についてIRAK4、MyD88、NEMO、IKBA等の遺伝子解析を行った。

4. 各種免疫異常性疾患の血清サイトカイン値についてELISA法で評価した。

5. 日本人310名(うち健常者103名、アレルギー疾患患者207名)を対象に、末梢血からgenome DNAを抽出し、Mal遺伝子の塩基配列を解読した。

6. pFLAG-CMV-6a vector(SIGMA)にMal cDNAをクローニングし、Promega社のGeneeditor site-directed mutagenesis kitで、同定されたSNPに置換した。

7. HEK293T細胞にpFLAG-CMV-6a_Mal wild及びvariantsを一過性発現させ、Dual Luciferase Assay法で、NF- κ Bのreporter gene活性を測定した。同様に、THP-1細胞にMal wild及びvariantsを一過性発現させ、培養上清中に産生されるTNF- α 、IL-12p40をELISA法で測定した。HEK293hTLR4-MD2-CD14細胞に、pFLAG-CMV-6a_Mal variants (E132K, R143Q, E190D)のTransfect量を変えて一過性発現させ、LPS刺激(100ng/ml)によるNF- κ B活性への影響を評価した。

8. pGEX系発現ベクターにMyD88ドメイン(DD)及びIRAK4-DD遺伝子を組み込んだリコンビナントタンパク発現ベクターを構築した。さらにGeneeditor site-directed mutagenesis kitで、IRAK4欠損症で報告されている遺伝変異(R12C)及びMyD88のSNPデータベースに登録されている亜型(R98C)を変異導入した。

9. 大腸菌BL21(DE3)株を用いて、8.の発現ベクターを形質転換し、MyD88-DD及びIRAK4-DDタンパクを発現させ、液体クロマトグラフィー法で精製した。

10. 9.で精製したMyD88及びIRAK4タンパクを分析ゲル濾過法及び溶液NMR法で相互作用を検討した。

11. IRAK4分子の各ドメインの原子座標をProtein Data Bankより取得し、その構造モデルの作成及び、遺伝子変異における影響について、Multicoreワークステーション上でMOE等の解析ソフトによるシミュレーションを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省)等の規定に基づいての倫理委員会の議を経て行われる。研究対象者には、文書により本研究の内容、方法および予想される結果を十分に説明し十分な理解(インフォームドコンセント)を得た上で実施される。また倫理面でも、結果による不利益は全く生じないように配慮が充分になされ、対象となる個人の人権擁護が充分になされていることから問題がないと判断される。

C. 研究結果

1. 全国511カ所の小児科専門医研修施設を対象にIRAK4欠損症、MyD88欠損症と診断されている患者数及び疑い症例数、遺伝子検査希望についてアンケート調査を行ったところ、373施設から回答を得た(回答率73.0%)。IRAK4欠損症患者の確定診断症例数は5名、MyD88欠損症患者の確定診断症例数は0名であった。原因不明の反復性細菌感染症患者について16施設から回答があった。そのうち4施設の症例ではIRAK4欠損症を想定した検査がすでになされており、否定されている。また1施設の症例は、後述の通り類縁疾患であるIKBA欠損症であった。残り11施設について今後後述の迅速スクリーニング法への適用及び遺伝子診断を勧める予定である。

2. フローサイトメーターを利用した迅速診断スクリーニング法にて、健常者では単球の90%以上がTNF- α を産生した。またIRAK4欠損症の3名の患者では、TNF- α の産生は著しく低下しており、3.94%から47.9%であった。また、後述のIKBA欠損症患者単球でも同様にTNF- α 産生は著しく低下していた。

3. 2.のスクリーニング法で単球内TNF- α 産生細胞の割合が低下している患者についてはIRAK4欠損症、MyD88欠損症等自然免疫不全症の可能性があると考え、遺伝子解析で確定診断した。重症感染症で既に死亡している患者については、遺伝子診断のみをおこなった。合計4家系7名のIRAK4欠損症の国内患者を同定した。そのうち1名は既に死亡しており検体がなく遺伝子解析はできなかったが、家族歴や臨床像から診断した。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

7名中4名は肺炎球菌による化膿性髄膜炎があり、3名が死亡していた。7名中1名は緑膿菌による壊死性筋膜炎、敗血症で死亡していた。これらの重症感染症は急速に病態が悪化する傾向があった。生存している患者では、抗菌剤の投与、肺炎球菌やインフルエンザ菌に対するワクチン接種、ガンマグロブリンの投与などにて、感染症予防がなされている。MyD88欠損症患者は現在までに国内で同定されていない。さらにIRAK4を介するToll様受容体シグナルの下流分子 $I\kappa B\alpha$ をコードするIKBA遺伝子上に新規変異Q9Xをヘテロ接合性に有するIKBA欠損症症例が確定診断された。臨床症状は、現在までに肺炎球菌感染は無く、サイトメガロウイルス、ロタウイルス、MRSA等による反復感染を来している。外胚葉形成不全症状（無汗症、部分皮膚欠損、顔面神経麻痺）を併発していた。この症例は本邦2症例目（全世界でおそらく7例目）のIKBA欠損症と考えられる。また幼小児期発症重症凍瘡を呈する1家系について自然免疫関連異常疾患であるfamilial chilblain lupusを疑い、TREX1遺伝子を解析したところ、本邦第1症例目であるTREX1異常症を確定診断した。現在、自然免疫不全症が疑われる症例の検査受け入れ（資料2）を行っており、患者血液中の単球から産生されるTNF- α が低下している症例の遺伝子診断を進めている。

4. IRAK4欠損症の報告は本邦ではまだ少なく、その早期発見のためには特徴的な臨床像、病態を明らかにすることが必須である。致命的な重症感染症を発症する前にIRAK4欠損症の可能性を疑い、早期診断を行うためにIRAK4欠損症同様、自然免疫異常性疾患である家族性地中海熱（FMF）、PFAPA、全身型若年性特発性関節炎（sJIA）に加え、EBV関連血球貪食症候群（EBV-HLH）、川崎病（KD）、血管炎症候群などの炎症性疾患を対象として、患者血清中の炎症性サイトカイン、IL-6、IL-18、neopterin、sTNF-RI、sTNF-RIIについてELISA法により定量し、そのプロフィールを比較検討したところ、マクロファージ活性化症候群（MAS）を合併するsJIAでは、全てのサイトカインが高値を示したが、特にIL-18は著しい高値を示した。治療介入によりIL-6の高値は速やかに改善するが、IL-18高値は遷延し、sJIAの基本病態に深く関わっていることが推察された。EBV-HLHにおいても多様なサイトカインの巧遅が認め

られたが、IL-18の上昇はsJIAに比べて限定的であった。KDではIL-18は正常範囲に留まることが多く、IL-6の著明な高値が特徴的であった。FMFでは、IL-18が中等度上昇している症例を多く認めた。PFAPAでは一定のパターンは観察されなかった。興味深いことにIKBA欠損症症例では2.の迅速診断スクリーニングで単球からのTNF- α 産生が低下しているにも関わらず、血清TNF- α は高値であった。外胚葉形成不全免疫不全症では、経過中に炎症性腸疾患（IBD）を発症する可能性が高いことが報告されており、今後サイトカインプロファイルの測定が自然免疫不全症に合併する炎症性疾患の診断、病態解明及び治療効果判定に有用である可能性が示唆される。

5. Mal遺伝子上に8種類のSNP（S55N, A99A, Q101Q, E132K, R143Q, S180L, A186A, E190D）が同定され、そのうち4種類は既報の無い新規SNPであった。また3種類は頻度の少ない（310名中7名でいずれもヘテロ接合性）non synonymous SNPであり、HEK293細胞及びTHP1細胞において機能損失型変異であることが確認できた。E132K, R143Q, E190DのLPS/TLR4シグナルに対する影響を評価したところ、E132KはDominant negative effectを有するバリエーションであることが判明した。

6. IRAK4デスドメイン（野生型、R12C=病因遺伝子変異として報告されている）、MyD88デスドメイン（野生型、R98C=SNPとしてデータベースに登録されている）それぞれのリコンビナントタンパクを高純度に大量精製することができた。それぞれの組み合わせについて、液体クロマトグラフィー法及び溶液NMR法を用いた滴定実験によりタンパク間相互作用を検討したところ、IRAK4とMyD88野生型同士の組み合わせでは、強いタンパク間相互作用を示すが、IRAK4-R12CはMyD88野生型との相互作用が低下し、またMyD88-R98Cは、IRAK4野生型との相互作用が低下することが判明した。

7. IRAK4変異導入構造モデルを構築することに成功した。構造的基盤から、従来報告されている遺伝子変異について、欠失変異、フレームシフト変異及び、ストップコドン変異の症例については、そのタンパク構造の中心コア構造の消失及び、キナーゼドメインの機能欠損がその病因と考えられた。

D. 考察

IRAK4欠損症は乳幼児期の重症感染症がおこりやすく、死亡率も高い。学童期以降になると易感染性は著しく低下し、次第に死亡率も低下していくことを考えると、乳幼児期の迅速診断、感染予防が極めて重要である。また本解析で同定されたMal/TIRAPの機能損失型バリエーションはいずれもヘテロ接合性に同定されている。臨床症状としてはいずれの症例も明らかな易感染性はみられないが、IRAK4欠損症と類似の臨床像を呈する症例中に、ホモ接合性あるいは複合ヘテロ接合性の遺伝子型を有する新規自然免疫不全症例が同定される可能性が推測される。病態解析としてはMyD88欠損症のR196C変異はMyD88とMalの相互作用を減弱させるが、IRAK4欠損症で同定されているミスセンス型遺伝子変異R12Cは、IRAK4タンパク自体の欠損ではなく、IRAK4とMyD88のタンパク間相互作用の減弱を引き起こすことが明らかになった。すなわちIRAK4欠損症やMyD88欠損症はMyddosomeの形成障害により発症するといえ、総称してMyddosome病(仮称)と呼んでいる。

E. 結論

LPS 刺激による単球内 TNF- α 産生の解析は、IRAK4欠損症、MyD88 欠損症のみならずさらに下流分子の異常である外胚葉形成不全免疫不全症(IKBA 欠損症、NEMO 異常症)の迅速診断に有用であると考えられた。一方、自然免疫異常症が疑われるにも関わらず、IRAK4、MyD88 等に遺伝子変異を認めない場合、次の解析候補遺伝子としてMal/TIRAPが挙げられる。この結果をもとに自然免疫不全症の診断フローチャートを考案した(資料3)。また病因遺伝子変異としては、タンパク自体の欠失を引き起こす変異だけでなく、Myddosome 内のタンパク間相互作用を低下させるミスセンス変異も病因となりうることを同定した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Hiroaki H, Kondo N, Shirakawa M. 1H, 13C, and 15N resonance assignment of the TIR domain of human MyD88. *Biomol NMR Assign*. 2010 Oct;4(2):123-5.
- 2) Yang An, Hidenori Ohnishi, Eiko Matsui, Michinori Funato, Zenichiro Kato, Takahide Teramoto, Hideo Kaneko, Takeshi Kimura, Kazuo Kubota, Kimiko Kasahara, Naomi Kondo. Genetic variations in MyD88 adaptor-like are associated with atopic dermatitis. *Int J Mol Med*. 2011 in press.
- 3) Yamauchi A, Iwata H, Ohnishi H, Teramoto T, Kondo N, Seishima M. Interleukin-17 expression in the urticarial rash of familial cold autoinflammatory syndrome: a case report. *Br J Dermatol*. 2010 Dec;163(6):1351-3.
- 4) Morita H, Kaneko H, Ohnishi H, Kato Z, Kondo N. Antigen-specific immune response to endotoxin-free recombinant P34. *Allergy*. 2011 Mar 1.
- 5) Kaneko H, Teramoto T, Kondo M, Morita H, Ohnishi H, Orii K, Matsui E, Kondo N. Efficacy of the slow dose-up method for specific oral tolerance induction in children with cow's milk allergy: comparison with reported protocols. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(6):538-9.
- 6) Aoki Y, Fukao T, Zhang G, Ohnishi H, Kondo N. Mutation in the Q28SDD31SD site, but not in the two SQ sites of the survival of motor neuron protein, affects its foci formation. *Int J Mol Med*. 2010 Nov;26(5):667-71.

2. 学会発表

1. Hidenori Ohnishi, Yang An, Eiko Matsui, Zenichiro Kato, Hideo Kaneko, Naomi Kondo. The genetic variations of the MyD88 adaptor protein like (Mal) are associated with allergic diseases in Japanese population. The 20th Interasma Japan/North Asia, 2010 July 2-3 in Tokyo.
2. Hidenori Ohnishi, Hidehito Tochio, Zenichiro Kato, Takeshi Kimura, Naomi Kondo, and Masahiro Shirakawa. Structural basis for the interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. World wide magnetic

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

resonance conference 2010, July 4-9, 2010, in Florence, Italy.

3. H. Ohnishi, H. Tochio, Z. Kato, T. Kimura, T. Funasaka, R. W. Wong, M. Shirakawa, N. Kondo. A conserved interaction mode between MyD88 and distinct membrane-sorting adaptors in TLR4 and IL-18 signaling. 14th International Congress of Immunology. 22-27 August, 2010, Kobe, Japan.

4. T. Kimura, Z. Kato, H. Ohnishi, H. Tochio, M. Shirakawa, N. Kondo. Expression, purification and structural analysis of human IL-18 binding protein: A potent therapeutic molecule for allergy. 14th International Congress of Immunology. 22-27 August, 2010, Kobe, Japan.

5. Hidenori Ohnishi, Takahide Teramoto, Zenichiro Kato, Hideo Kaneko, Ryuta Nishikomori, Naomi Kondo. The LPS induced enhancement of IL-1 β and IL-18 production is a useful tool for diagnosis of familial cold inflammatory syndrome (FCAS). Autoinflammation 2010, 2-6 September 2010, Amsterdam, Netherlands.

6. Takahide Teramoto, Hidenori Ohnishi, Norio Kawamoto, Zenichiro Kato, Hideo Kaneko, Naomi Kondo. A case report of atypical mild chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome showing the phenotype of mixed connective tissue disease. Autoinflammation 2010, 2-6 September 2010, Amsterdam, Netherlands.

7. Hidenori Ohnishi, Hidehito Tochio, Zenichiro Kato, Takeshi Kimura, Masatoshi Nada, Kazuo Kubota, Masahiro Shirakawa, Naomi Kondo. Structural basis for the innate immune deficiency syndrome. The 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology 2010. November 6-9, 2010, in Singapore.

8. Kazuo Kubota, Hidenori Ohnishi, Takahide Teramoto, Eiko Matsui, Hideo Kaneko, Naomi Kondo. Case reports of atypical periodic autoinflammatory syndrome associated with MEFV exon3 and NLRP3 exon5 gene mutations in

Japanese children. The 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology 2010. November 6-9, 2010, in Singapore.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

インターロイキン 1 受容体関連キナーゼ 4 (IRAK4) 欠損症とは

1. 概要

インターロイキン 1 受容体関連キナーゼ 4 (IRAK4)欠損症は、2003 年に Picard らによって初めて報告された疾患で、自然免疫を担当する Toll 様受容体 (TLR) のシグナル伝達を担う分子 IRAK4 遺伝子の異常により生じる常染色体劣性遺伝形式の疾患です。本邦でも現在までに数例の症例報告がなされていますが、実態は明らかではありません。IRAK4 欠損症及び、関連分子である MyD88 欠損症 は、類似した表現型としてグラム陽性菌 (特に肺炎球菌や黄色ブドウ球菌、緑膿菌) による感染症が反復、あるいは重症化 (敗血症、細菌性髄膜炎など) することが報告されており、従来原因不明の侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) とされていた症例の中に、両症例が含まれていると考えられています。

2. 疫学

平成 22 年度に施行した疫学調査の結果、国内での症例数は 7 例が報告されています。全世界では、すでに 30 症例以上が報告されています。

3. 原因

TLR あるいはインターロイキン 1 受容体 (IL-1R) が刺激により活性化されると、アダプター分子である骨髄分化因子 88 (MyD88) が受容体と結合します。さらに、IRAK4、IRAK1 が誘導され、IRAK4 は IRAK1 をリン酸化し、以降下流のキナーゼカスケードの働きで、多くの炎症性サイトカインの発現を促す転写因子 NF- κ B の活性化に至ります。IRAK4 遺伝子の異常により、TLR および IL-1R のシグナル伝達障害が起こり、自然免疫応答低下をきたし、特に肺炎球菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌に対する易感染性を示します。

4. 症状

生後まもなくより膿瘍形成や重症細菌感染症 (化膿性髄膜炎、敗血症など) を繰り返します。その多くは肺炎球菌によるものであり、より頻度は落ちますが黄色ブドウ球菌によることもあるようです。グラム陰性菌 (特に緑膿菌) による重症感染を呈することも時にありますが、寄生虫感染症、真菌感染症、ウイルス感染症が重症化する傾向にあるとの報告はありません。

5. 合併症

前述の通り、細菌感染症の合併により、敗血症、細菌性髄膜炎等を合併し、時に致死的となります。

6. 診断方法

乳幼児期に反復性、あるいは重症の細菌感染症で発症しますが、通常 of 免疫機能検査(ガンマグロブリン値など)は年齢相応の数値を示し、明らかな異常がみられないのが特徴です。早期診断スクリーニング方法としてフローサイトメーターを利用した手法が、九州大学大学院医学研究院成長発達医学講座の高田英俊先生らによって考案されています。最終的には、IRAK4やMyD88の遺伝子検査にて確定診断します。類縁疾患として、外胚葉形成不全症を伴う免疫不全症(EDA-ID)も知られており、同様の手法で診断スクリーニングが可能です。EDA-IDは、NEMOやIKBAの遺伝子検査にて確定診断可能です。

7. 治療法

γ-グロブリン製剤の補充療法、および抗生剤の予防投与が行われています。また、肺炎球菌ワクチン接種も行われていますが、50%の症例では効果がなるとの報告もあります。

自然免疫不全症 疑い例 遺伝子診断依頼書

(患者コード: _____)

貴施設名: _____	診療科: _____
電話番号: _____	FAX: _____
記載医師氏名: _____	E-mail: _____
性別: _____	生年月日: _____
臨床診断名: _____	

病歴 (特に現在までの感染症罹患歴を御記載ください):

年 () 歳	病名:

主要症状:

1. 発症時期	歳	医師推定	患者申告
2. 発熱	なし あり	13. 扁桃腺の有無	なし あり
3. 体温頂値	_____ °C	14. 頸部リンパ節腫脹	なし あり
4. 咳嗽	なし あり	15. 胸腺の有無*	なし あり
5. 鼻汁	なし あり	16. 臍帯脱落までの日数 (_____ 日)	
6. 嘔吐	なし あり	17. 歯牙欠損の有無	なし あり
7. 下痢	なし あり	18. 家族歴	
8. けいれん	なし あり		
9. 髄膜刺激症状	なし あり		
10. 発達遅滞	なし あり	19. その他の合併症	
11. 皮疹	なし あり		
12. 肝脾腫	なし あり		

*胸部レントゲン, CT 画像検査で確認できるか否か

検査所見: 発症時の検査所見を可能な範囲で御記載願います。

初診時 WBC 値 : _____ / μ l 免疫グロブリン値 :
WBC の頂値 : _____ / μ l IgG: _____ mg/dl, IgA: _____ mg/dl, IgM _____ mg/dl
(感染症発症からの時間経過 _____ 時間) IgG サブクラス分画: IgG1 _____ mg/dl, IgG2 _____ mg/dl
*医師推定 IgG3 _____ mg/dl, IgG4 _____ mg/dl
分画: Ne: _____ %, Ly: _____ %, Mo: _____ %, Ba: _____ %, Eo: _____ % 上記免疫グロブリン測定時の年齢
核左方移動の有無 : Stab: _____ %, Seg _____ % (_____ 歳 _____ カ月)

初診時 CRP 値 : _____ mg/dl 血清 IgE 値 : _____ IU/ml
CRP の頂値 : _____ mg/dl 血清補体値 :
(感染症発症からの時間経過 _____ 時間) C3 : _____ mg/dl, C4 : _____ mg/dl, CH50 : _____ U/ml
*医師推定

赤沈 60 分値 : _____ mm/hour TB リンパ球サブセット :
CD3: _____ %, CD4: _____ %, CD8: _____ %, CD19: _____ %

プロカルシトニン値 : _____ ng/ml リンパ球幼若化反応 (LST) :
フェリチン : _____ ng/ml ConA: _____ %, PHA: _____ %

好中球遊走能 : _____ %
好中球殺菌能 : _____ %
NK 細胞活性 : _____ %

その他 :

起因菌:

1. _____ 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
2. _____ 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
3. _____ 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
4. _____ 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
5. _____ 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
6. _____ 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
7. _____ 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
8. _____ 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
9. _____ 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
10. _____ 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)

依頼遺伝子検査項目: 以下の希望項目をを○で囲ってください。

*スクリーニングは全例で行います。スクリーニング検査で陰性の場合の遺伝子検査は要相談とさせていただきます。

○自然免疫不全スクリーニング

(患者単核球をリポポリサッカライドで刺激し, TNF- α 産生を評価します.)

IRAK4

MyD88

NEMO (男児のみ, 外胚葉形成不全症状がある場合)

I κ B α (外胚葉形成不全症状がある場合)

その他 (TLR3, UNC93B1, TRAF3 等)

問い合わせ先

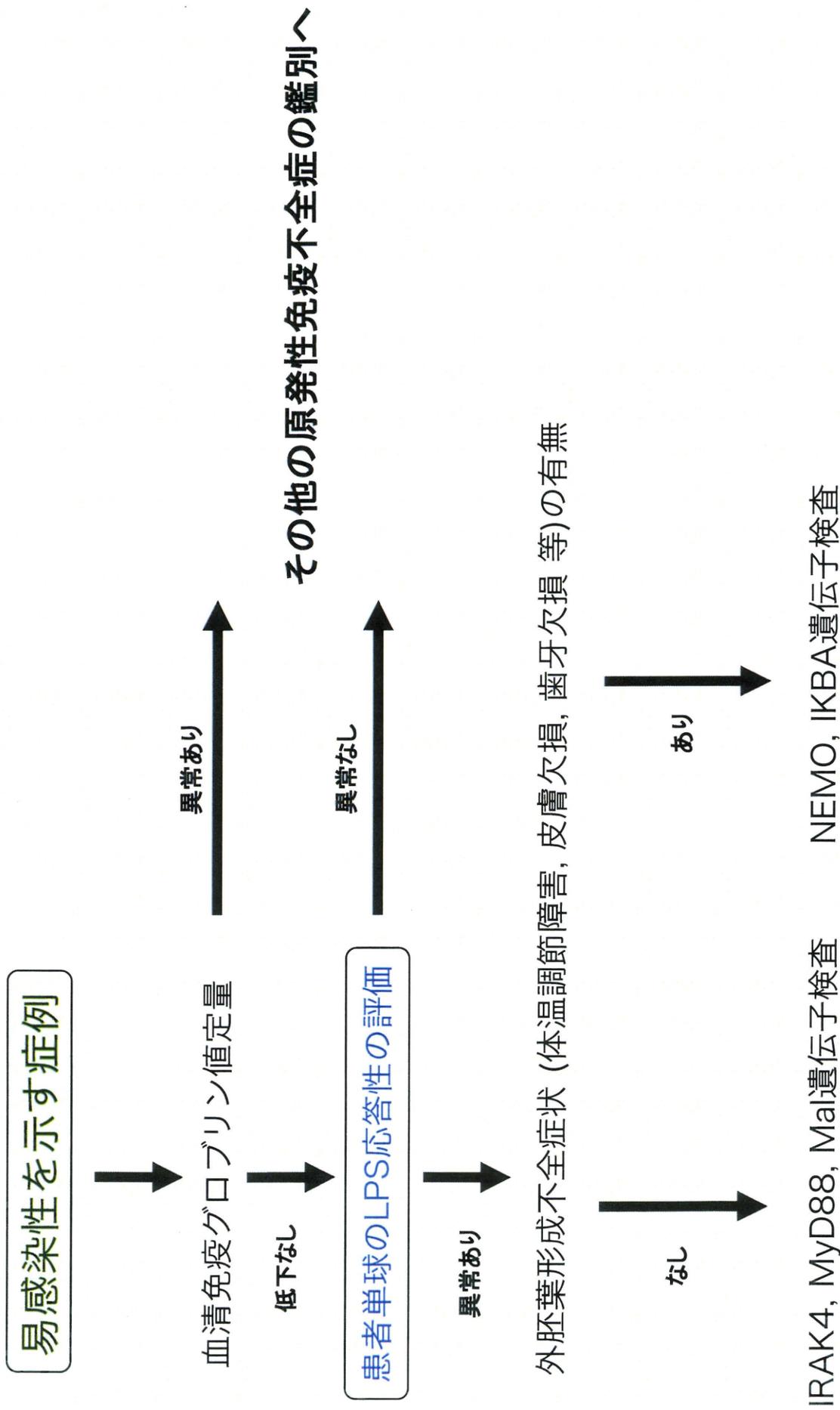
岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学

〒501-1194 岐阜県岐阜市柳戸1-1

TEL:058-230-6386 FAX:058-230-6387

主任研究者: 大西秀典

自然免疫不全症の簡易診断フローチャート



II. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

IRAK4 欠損症及び自然免疫不全症の患者数把握のための全国症例調査、自然免疫不全症の
遺伝子診断、病因遺伝子変異の *in vitro* 機能解析システムの開発、
及び関連遺伝子の遺伝子多型解析

研究分担者(代表) 大西秀典 岐阜大学医学部附属病院小児科 併任講師

研究要旨

侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)等を呈する免疫不全の責任遺伝子として IRAK4、MyD88 等自然免疫関連分子の異常が報告されている。2010 年度に国内での IRAK4 欠損症、MyD88 欠損症患者の全国症例調査を行ったところ、IRAK4 欠損症の確定診断例 5 例が報告された。フローサイトメーターを利用した迅速診断スクリーニング法により IRAK4 欠損症のみならず、類縁疾患の IKBA 欠損症も診断可能であった。Toll 様受容体シグナルは、アダプター分子 Mal/TIRAP を中継して、MyD88、IRAK4 と連鎖的に高次複合体(Myddosome)を形成する。自然免疫不全症の候補責任遺伝子として Mal を標的とした遺伝子解析を行ったところ、3 種類の機能損失型亜型を同定した。これらの遺伝子型は自然免疫不全症の新規責任遺伝子変異になりうると考えられ、IRAK4 欠損症と類似の表現型を示す患者の解析候補遺伝子と考えている。また、IRAK4 欠損症で同定されているミスセンス型遺伝子変異の *in vitro* 機能解析の手法を確立した。

共同研究者

近藤直実(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
金子英雄(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
寺本貴英(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
松井永子(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
木村豪(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
久保田一生(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)

A. 研究目的

近年、Toll様受容体を中心とした自然免疫のシグナル伝達経路の異常により、アレルギー疾患や免疫不全症を発症することが知られてきている。原発性免疫不全種の1型として分類される自然免疫不全症(IRAK4欠損症、MyD88欠損症など)は、一般的な免疫検査で診断することができず、従来原因不明とされてきた反復性グラム陽性菌感染や侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)等の患者の中にまぎれている可能性が高い。これらの疾患は、難治性で重症化しやすく、ときに致死性である。従って早期診断により適切な治療を行う事で、患者予後を著しく改善させ、QOL向上を図る必要性がある。本分担研究

では特に、IRAK4欠損症を対象として、国内での患者発生の実態調査及び早期診断システムと遺伝子診断の運用、新規疾患候補遺伝子の同定、患者から同定された病因遺伝子変異の*in vitro*機能証明法の確立を目的としている。

B. 研究方法

1. 国内での IRAK4 欠損症をはじめとした自然免疫不全症患者の症例数等の実態が不明であるため、2010 年度に全国症例調査を行った。
2. 迅速診断スクリーニング法として、全血 1ml に Brefeldin A 及び、LPS を加え、CO₂ incubator で 4 時間培養後、抗 CD14 抗体で染色後、permeabilization し、抗 TNF- α 抗体で細胞内 TNF- α を染色した後、フローサイトメーターで解析した。解析は、単球に gate をかけ、TNF- α 産生細胞の割合を検討した。
3. 2. のスクリーニング法で TNF- α 産生量の低下が認められた症例及び、臨床症状から自然免疫不全症が疑われた症例について IRAK4、MyD88、NEMO、IKBA 等の遺伝子解析を行った。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

- 日本人310名(うち健常者103名、アレルギー疾患患者207名)を対象に、末梢血からgenome DNAを抽出し、Mal遺伝子の塩基配列を解読した。
- pFLAG-CMV-6a vector(SIGMA)にMal cDNAをクローニングし、Promega社のGeneeditor site-directed mutagenesis kitで、同定されたSNPに置換した。
- HEK293T細胞にpFLAG-CMV-6a_Mal wild及びvariantsを一過性発現させ、Dual Luciferase Assay法で、NF- κ Bのreporter gene活性を測定した。同様に、THP-1細胞にMal wild及variantsを一過性発現させ、培養上清中に産生されるTNF- α 、IL-12p40をELISA法で測定した。HEK293hTLR4-MD2-CD14細胞に、pFLAG-CMV-6a_Mal variants (E132K, R143Q, E190D)のTransfect量を変えて一過性発現させ、LPS刺激(100ng/ml)によるNF- κ B活性への影響を評価した。
- pGEX系発現ベクターにMyD88デスドメイン(DD)及びIRAK4-DD遺伝子を組み込んだリコンビナントタンパク発現ベクターを構築した。さらにGeneeditor site-directed mutagenesis kitで、IRAK4欠損症で報告されている遺伝変異(R12C)及びMyD88のSNPデータベースに登録されている亜型(R98C)を変異導入した。
- 大腸菌BL21(DE3)株を用いて、8.の発現ベクターを形質転換し、MyD88-DD及びIRAK4-DDタンパクを発現させ、液体クロマトグラフィー法で精製した。
- 8.で精製したMyD88及びIRAK4タンパクを分析ゲル濾過法で相互作用を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、岐阜大学医学研究等倫理審査委員会の承認を得て行われており、研究対象者には、文書により本研究の内容、方法および予想される結果を十分に説明し十分な理解（インフォームドコンセント）を得た上で実施される。また倫理面でも、結果による不利益は全く生じないように配慮が充分になされ、対象となる個人の人権擁護が充分になされていることから問題がないと判断される。

C. 研究結果

- 全国511カ所の小児科専門医研修施設を対象にIRAK4欠損症、MyD88欠損症と診断されている患者数

及び疑い症例数、遺伝子検査希望についてアンケート調査を行ったところ、373施設から回答を得た(回答率73.0%)。IRAK4欠損症患者の確定診断症例数は5名、MyD88欠損症患者の確定診断症例数は0名であった。原因不明の反復性細菌感染症患者について16施設から回答があった。そのうち4施設の症例ではIRAK4欠損症を想定した検査がすでになされており、否定されている。また1施設の症例は、後述の通り類縁疾患であるIKBA欠損症であった。残り11施設について今後後述の迅速スクリーニング法への適用及び遺伝子診断を勧める予定である。

- フローサイトメーターを利用した迅速診断スクリーニング法にて、健常者では単球の90%以上がTNF- α を産生した。IRAK4欠損症患者では、TNF- α の産生が著しく低下することが高田らによって報告されているが、後述のIKBA欠損症患者単球でも同様にTNF- α 産生が著しく低下していた(図1A)。

- IRAK4を介するToll様受容体シグナルの下流分子I κ B α をコードするIKBA遺伝子上に新規変異Q9Xをヘテロ接合性に有するIKBA欠損症症例が確定診断された。臨床症状は、現在までに肺炎球菌感染は無く、サイトメガロウイルス、ロタウイルス、MRSA等による反復感染を来している。外胚葉形成不全症状(無汗症、部分皮膚欠損、顔面神経麻痺)を併発していた。この症例は本邦2症例目(全世界でおそらく7例目)のIKBA欠損症と考えられる。

- Mal遺伝子上に8種類のSNP(S55N, A99A, Q101Q, E132K, R143Q, S180L, A186A, E190D)が同定され、そのうち4種類は既報の無い新規SNPであった。また3種類は頻度の少ない(310名中7名でいずれもヘテロ接合性)non synonymous SNPであり、HEK293細胞及びTHP1細胞において機能損失型亜型であることが確認できた。E132K, R143Q, E190DのLPS/TLR4シグナルに対する影響を評価したところ、E132KはDominant negative effectを有するバリエーションであることが判明した。

- IRAK4デスドメイン(野生型、R12C=病因遺伝子変異として報告されている)、MyD88デスドメイン(野生型、R98C=SNPとしてデータベースに登録されている)それぞれのリコンビナントタンパクを高純度に大量精製することができた。それぞれの組み合わせについて、液体ク

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ロマトグラフィー法及び溶液NMR法を用いた滴定実験によりタンパク間相互作用を検討したところ、IRAK4とMyD88野生型同士の組み合わせでは、強いタンパク間相互作用を示すが、IRAK4-R12CはMyD88野生型との相互作用が低下し、またMyD88-R98Cは、IRAK4野生型との相互作用が低下することが判明した(図1B)。

D. 考察

LPS 刺激による単球内 TNF- α 産生の解析は、IRAK4 欠損症、MyD88 欠損症のみならずさらに下流分子の異常である外胚葉形成不全免疫不全症(IKBA 欠損症、NEMO 異常症)の迅速診断に有用であると考えられた。また本解析で同定された Mal/TIRAP の機能損失型バリエーションはいずれもヘテロ接合性に同定されている。臨床症状としてはいずれの症例も明らかな易感染性はみられないが、IRAK4 欠損症と類似の臨床像を呈する症例中に、ホモ接合性あるいは複合ヘテロ接合性の遺伝子型を有する新規自然免疫不全症例が同定される可能性が推測される。病態解析としては MyD88 欠損症の R196C 変異は MyD88 と Mal の相互作用を減弱させるが、IRAK4 欠損症で同定されているミスセンス型遺伝子変異 R12C は、IRAK4 タンパク自体の欠損ではなく、IRAK4 と MyD88 のタンパク間相互作用の減弱を引き起こすことが明らかになった。

E. 結論

IRAK4 欠損症等の自然免疫不全症は乳幼児期の重症感染症がおこりやすく死亡率も高いため、迅速診断、感染予防が極めて重要である。フローサイトメーターを用いた迅速診断スクリーニングシステムは自然免疫不全症全般で有効と考えられる。一方、自然免疫異常症が疑われるにも関わらず、IRAK4、MyD88 等に遺伝子変異を認めない場合、次の解析候補遺伝子として Mal/TIRAP が挙げられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Hiroaki H, Kondo N, Shirakawa M. 1H, 13C, and 15N resonance assignment of the TIR domain of human MyD88. *Biomol NMR Assign.* 2010 Oct;4(2):123-5.
- 2) Yang An, Hidenori Ohnishi, Eiko Matsui, Michinori Funato, Zenichiro Kato, Takahide Teramoto, Hideo Kaneko, Takeshi Kimura, Kazuo Kubota, Kimiko Kasahara, Naomi Kondo. Genetic variations in MyD88 adaptor-like are associated with atopic dermatitis. *Int J Mol Med.* 2011 in press.
- 3) Yamauchi A, Iwata H, Ohnishi H, Teramoto T, Kondo N, Seishima M. Interleukin-17 expression in the urticarial rash of familial cold autoinflammatory syndrome: a case report. *Br J Dermatol.* 2010 Dec;163(6):1351-3.
- 4) Morita H, Kaneko H, Ohnishi H, Kato Z, Kondo N. Antigen-specific immune response to endotoxin-free recombinant P34. *Allergy.* 2011 Mar 1.
- 5) Kaneko H, Teramoto T, Kondo M, Morita H, Ohnishi H, Orii K, Matsui E, Kondo N. Efficacy of the slow dose-up method for specific oral tolerance induction in children with cow's milk allergy: comparison with reported protocols. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2010;20(6):538-9.
- 6) Aoki Y, Fukao T, Zhang G, Ohnishi H, Kondo N. Mutation in the Q28SDD31SD site, but not in the two SQ sites of the survival of motor neuron protein, affects its foci formation. *Int J Mol Med.* 2010 Nov;26(5):667-71.

2. 学会発表

1. Hidenori Ohnishi, Yang An, Eiko Matsui, Zenichiro Kato, Hideo Kaneko, Naomi Kondo. The genetic variations of the MyD88 adaptor protein like (Mal) are associated with allergic diseases in Japanese population. The 20th Interasma Japan/North Asia, 2010 July 2-3 in Tokyo.
2. Hidenori Ohnishi, Hidehito Tochio, Zenichiro Kato, Takeshi Kimura, Naomi Kondo, and Masahiro Shirakawa. Structural basis for the interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. World wide magnetic

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

resonance conference 2010, July 4-9, 2010, in Florence, Italy.

3. H. Ohnishi, H. Tochio, Z. Kato, T. Kimura, T. Funasaka, R. W. Wong, M. Shirakawa, N. Kondo. A conserved interaction mode between MyD88 and distinct membrane-sorting adaptors in TLR4 and IL-18 signaling. 14th International Congress of Immunology. 22-27 August, 2010, Kobe, Japan.

4. T. Kimura, Z. Kato, H. Ohnishi, H. Tochio, M. Shirakawa, N. Kondo. Expression, purification and structural analysis of human IL-18 binding protein: A potent therapeutic molecule for allergy. 14th International Congress of Immunology. 22-27 August, 2010, Kobe, Japan.

5. Hidenori Ohnishi, Takahide Teramoto, Zenichiro Kato, Hideo Kaneko, Ryuta Nishikomori, Naomi Kondo. The LPS induced enhancement of IL-1 β and IL-18 production is a useful tool for diagnosis of familial cold inflammatory syndrome (FCAS). Autoinflammation 2010, 2-6 September 2010, Amsterdam, Netherlands.

6. Takahide Teramoto, Hidenori Ohnishi, Norio Kawamoto, Zenichiro Kato, Hideo Kaneko, Naomi Kondo. A case report of atypical mild chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome showing the phenotype of mixed connective tissue disease. Autoinflammation 2010, 2-6 September 2010, Amsterdam, Netherlands.

7. Hidenori Ohnishi, Hidehito Tochio, Zenichiro Kato, Takeshi Kimura, Masatoshi Nada, Kazuo Kubota, Masahiro Shirakawa, Naomi Kondo. Structural basis for the innate immune deficiency syndrome. The 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology 2010. November 6-9, 2010, in Singapore.

8. Kazuo Kubota, Hidenori Ohnishi, Takahide Teramoto, Eiko Matsui, Hideo Kaneko, Naomi Kondo. Case reports of atypical periodic autoinflammatory syndrome associated with MEFV exon3 and NLRP3 exon5 gene mutations in

Japanese children. The 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology 2010. November 6-9, 2010, in Singapore.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

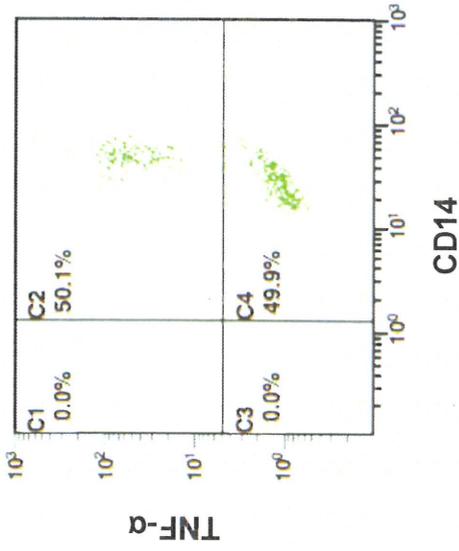
なし

3. その他

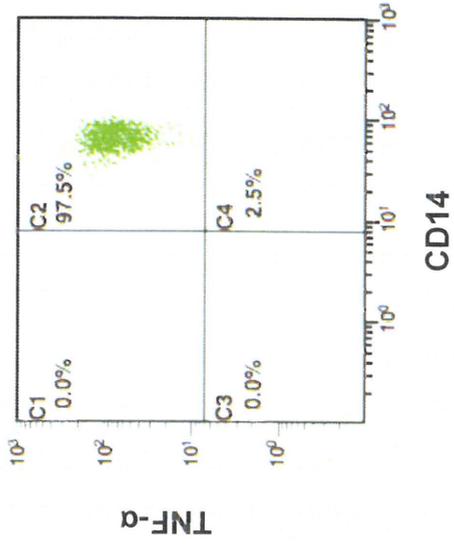
なし



Patient



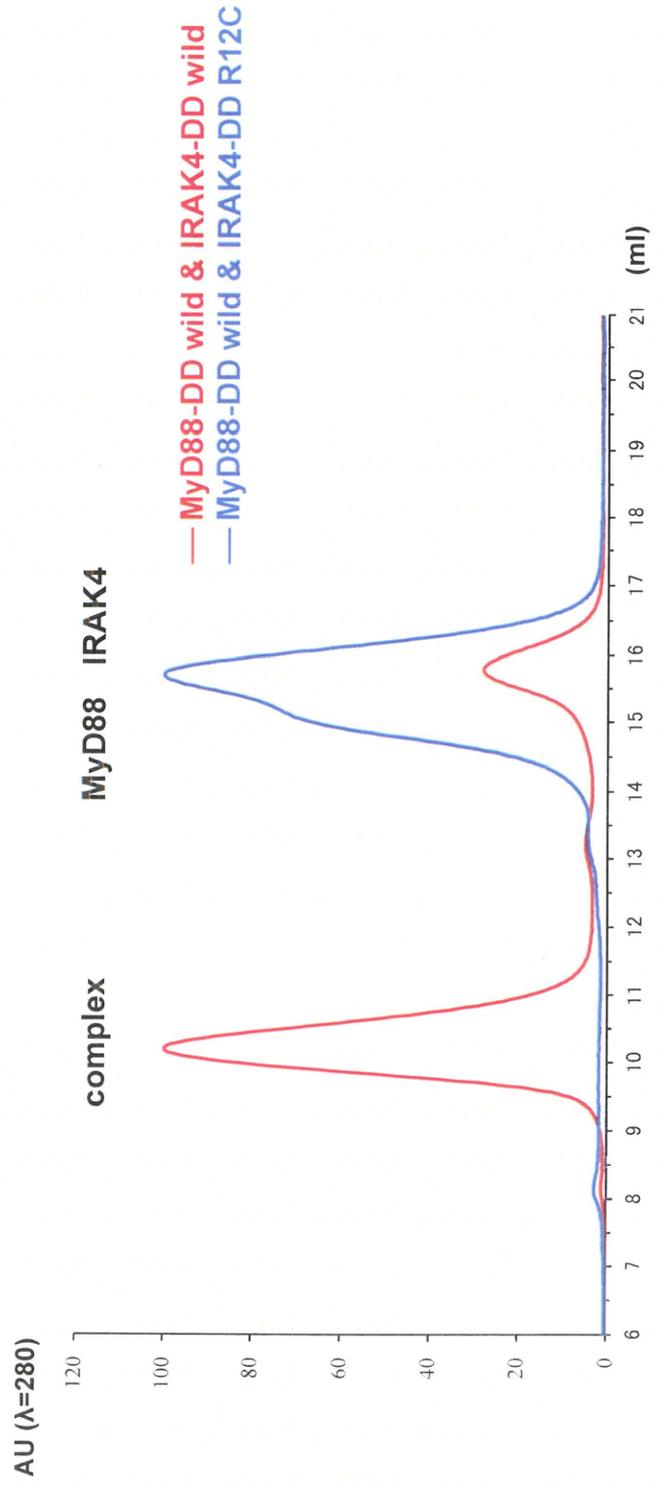
Control



Post LPS stimulation

フローサイトメーターによるLPS応答性の評価

B



MyD88とIRAK4の複合体形成におけるミスセンス変異の影響