

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・プロファイル解析

研究分担者 谷内江昭宏 金沢大学医薬保健研究域医学系小児科 教授

研究要旨

IRAK4 欠損症の早期診断のための炎症性サイトカインプロファイリングの有用性について検討した。IRAK4 欠損症では、自然免疫応答としてのIL-6産生、あるいはTNF- α 産生の欠如ないし低下が予想される。重症肺炎球菌感染症など、IRAK4 欠損症が疑われる症例で、迅速に診断するためのスクリーニングシステムの確立が必要とされている。本研究では、血清あるいは髄液を用いたサイトカイン・プロファイリングが果たす役割について明らかにするために多様な炎症性疾患におけるサイトカイン値を定量、プロファイリングの意義について検討した。その結果、異なる炎症病態に特有のサイトカイン・プロファイリングが存在することが明らかにされた。今後、IRAK4 欠損症事例での検討を積み重ねて、早期診断に関わる方法論を提供する計画である。

共同研究者

和田 泰三(金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

東馬 智子(金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

A. 研究目的

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とされる。本研究では、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の指標を「炎症制御機構の異常」の観点から明らかにすることを目的とする。本年度は、小児期～成人期における多様な炎症病態における血清サイトカイン・プロファイルの特徴を明らかにする。個々の疾患に特徴的なパターンを把握した上で、将来あらたな IRAK4 欠損症が見出された場合に、その炎症病態を解析するための助けとする。

B. 研究方法

全身型若年性特発性関節炎(sJIA)、EBV 関連血球貪食症候群(EBV-HLH)、川崎病(KD)、家族性地中海熱(FMF)、PFAPA、血管炎症候群などの炎症性疾患を対

象とした。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法により定量した。得られたサイトカイン値のパターンを radar chart に表示し、そのプロファイルを比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子解析の施行にあたっては、文部科学省、厚生労働省ならびに経済産業省より告示された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、学内倫理審査委員会の審査を得ることとする。さらに、本研究における遺伝子解析ならびにリンパ球解析に際して研究の内容ならびに以下の確認事項をあらかじめ書面により説明し、本人あるいは家族の承諾を書面により得るものとする。

- 1) 末梢血液に関して、血清ならびにリンパ球検体は連結可能匿名化とし、本研究の目的以外には使用しない。
- 2) 得られた情報の秘密は厳守し、決して他人に漏らしたり譲渡したりしないこと。

C. 研究結果

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(図)。

D. 考察

異なる炎症性疾患により、それぞれ特徴的なサイトカイン・プロファイルが観察された。これらの疾患が、強いマクロファージ活性化や血管内皮傷害などの特徴を一部共有しながら、それぞれ異なるパターンを示したことは、各々に固有の基本病態を反映していることが示唆された。

E. 結論

血清サイトカイン・プロファイルを用いた病態解析が、IRAK4 における炎症病態の把握にも有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimizu M., Yokoyama T., Yamada K., Kaneda H., Wada H., Wada T., Toma T., Ohta K., Kasahara Y., Yachie A. Distinct cytokine profiles of systemic-onset juvenile idiopathic arthritis-associated macrophage activation syndrome with particular emphasis on the role of interleukin-18 in its pathogenesis. *Rheumatology* 2010;49:1645-53.

2. 学会発表

1) 榑原康久、梅暁子、水野和徳、和田泰三、金兼千春、東馬智子、谷内江昭宏 「川崎病ならびに全身型若年性特発性関節炎におけるサイトカイン・プロファイル

の比較」第 47 回 日本小児アレルギー学会 2010 年 12 月(横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

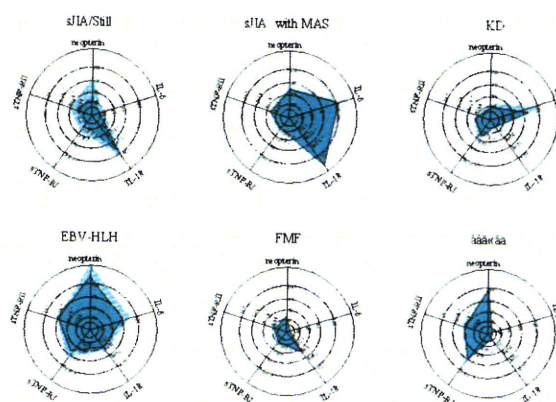
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



図：異なる炎症性疾患における血清サイトカイン・プロファイル

IRAK4、MyD88 欠損症の迅速診断法の確立に関する研究

研究分担者 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

研究要旨

Interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK) 4 欠損症は 2003 年に、Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)欠損症は 2008 年にそれぞれ初めて報告された原発性免疫不全症である。いずれも自然免疫に重要な役割を担う Toll-like receptor (TLR) からの細胞内シグナル伝達に必要な蛋白であり、これらの欠損症では様々な TLR からのシグナル伝達の障害がおこる。これらの疾患は乳幼児期に肺炎球菌、ぶどう球菌による重症感染症おこしやすく死亡率も高い。他方、幼児期以降には易感染性がしだいになくなっていくことが知られており、乳幼児期の早期の診断、感染予防が極めて重要である。IRAK4 欠損症の診断は遺伝子検査によって最終的に行われるが、より迅速に診断可能なシステムの開発が重要である。今回、lipopolysaccharide (LPS) で患者血液細胞を刺激した後、単球内 TNF- α 産生能を調べることにより、これらの疾患を早期に診断可能であることを明らかにした。遺伝子検査やこの迅速検査を用いて、国内で 4 家系 7 名の IRAK4 欠損症患者を同定した。7 名中 4 名が死亡しており、早期の診断および乳幼児期の感染症の予防の重要性が再認識された。

A. 研究目的

IRAK4 欠損症、MyD88 欠損症は TLR からのシグナル伝達障害により乳幼児期に肺炎球菌やブドウ球菌による重症感染症をきたしやすく、死亡率も高い。他方、次第に易感染性がなくなっていくことも特徴であり、乳幼児期の感染症を予防することが極めて重要である。早期にこれらの疾患を診断するため、今回フローサイトメーターによる迅速診断法を開発した。

B. 研究方法

全血 1ml に Brefeldin A を 10 μ g、LPS を 1 μ g 加え CO₂ incubator で 4 時間培養し PC5-抗 CD14 抗体 (BD Bioscience Pharmingen, San Diego CA) で染色した後、FACS lysing solution (BD Bioscience Pharmingen) で lysing し、FACS Permeabilizing Solution (BD Bioscience Pharmingen) で permeabilization し、Phycoerythrin (PE)-抗 TNF- α 抗体で細胞内 TNF- α を染色しフローサイトメーター EPICS XL (Beckman Coulter, Miami, FL) で

解析した。解析は、PC5 と side scatter で、単球に gate をかけ、TNF- α 産生細胞の割合を検討した。IRAK4 や MyD88 の遺伝子は、血液細胞から DNA を抽出し、各 exon を PCR で増幅した後、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer, Foster City, CA) を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

この研究は九州大学倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

健常者の末梢血を LPS で刺激し、4 時間後に単球内 TNF- α 産生能をフローサイトメーターで調べると、90% 以上の単球が TNF- α を産生していた。他方、遺伝子検査で確認された IRAK4 欠損症患者では、著しく低下していた。この方法を用いて乳幼児期に肺炎球菌やブドウ球菌、緑膿菌感染症などによる化膿性髄膜炎などの重症感染症を起こした患者をスクリーニングし、遺伝子検査と組み合わせることで早期に診断する事が可能となった。これまでに、4 家系 7 名の IRAK4 欠損症患者を確認した。MyD88 欠損症患者は確認されていな

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

い。以下 IRAK4 欠損症の 4 家系の発端者の経過について概説する。

家系 1、第 1 子が 1 歳時と 2 歳時に肺炎球菌による化膿性髄膜炎に罹患し、2 回目の化膿性髄膜炎にて死亡。

家系 2、第 2 子が生後 5 か月時と 11 か月時に肺炎球菌による化膿性髄膜炎に罹患。治療により治癒。

家系 3、第 1 子が生後 11 か月時に急速に進行した化膿性髄膜炎で死亡。

家系 4、第 4 子が生後 9 か月時に緑膿菌による蜂窩織炎・敗血症に罹患し急速に進行し死亡。第 1 子は生後 7 か月時に緑膿菌による肝膿瘍に罹患、3 歳時に肺炎球菌による化膿性髄膜炎にて死亡していた。

これらの経過はいずれも急速に重症感染症が進行していることが特徴的であると考えられる。これらの患者同胞の一部も IRAK4 欠損症と診断されているが、抗菌剤投与や肺炎球菌ワクチンの接種などで重症感染症は起こっていない。全体として 7 名中 4 名が死亡していた。

D. 考察

IRAK4 欠損症や MyD88 欠損症の患者では臍帯脱落遅延が認められることがあり、診断の参考となり得る。国内外の検討では乳幼児期の感染症は予防可能であり、その後易感染性が軽減し消失していくことから、乳幼児期の感染予防が重要である。その意味から早期診断法の意義は大きいものと考えられる。

E. 結論

IRAK4 欠損症 MyD88 欠損症の迅速診断法を確立した。国内では 4 家系 7 名の IRAK4 欠損症を確認した。その内 4 名が死亡していた。MyD88 欠損症は現在までのところ確認されていない。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, Chrabieh M, Levy O, Arkwright PD, McDonald D, Geha RS, Takada H, Krause JC, Creech CB, Ku CL, Ehi S, Maródi L, Al-Muhsen S, Al-Hajjar S, Al-Ghoniaim A, Day-Good NK, Holland SM,

Gallin JI, Chapel H, Speert DP, Rodriguez-Gallego C, Colino E, Garty BZ, Roifman C, Hara T, Yoshikawa H, Nonoyama S, Domachowske J, Issekutz AC, Tang M, Smart J, Zitnik SE, Hoarau C, Kumararatne DS, Thrasher AJ, Davies EG, Bethune C, Sirvent N, de Ricaud D, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Guedes M, Vitor AB, Rodrigo C, Almazán F, Méndez M, Aróstegui JI, Alsina L, Fortuny C, Reichenbach J, Verbsky JW, Bossuyt X, Doffinger R, Abel L, Puel A, Casanova JL.

Clinical Features and Outcome of Patients With IRAK-4 and MyD88 Deficiency. *Medicine (Baltimore)* 89: 403-425, 2010

Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T. Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan. *Journal of Clinical Immunology* (in press)

Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Nonoyama S, Karasuyama H, Minegishi Y. Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2011 Feb 14;208(2):235-49.

Tanabe F, Kasai H, Morimoto M, Oh S, Takada H, Hara T, Ito M: Novel heterogenous CHS1 mutations identified in five Japanese patients with Chediak-Higashi syndrome. *Case report in Medicine* (in press)

Takada H, Nomura A, Ishimura M, Ichiyama M, Ohga S, Hara T:

NEMO mutation as a cause of familial occurrence of Behçet's disease in female patients. *Clin Genet* 78: 575-579, 2010

Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T, Mizuno Y, Hijikata A,

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

Ohara O, Takada H, Kusahara K, Hara T:

Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease.

Clin Exp Immunol, 160, 246-55, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

Inoue H, Takada H, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Takahashi N, Morio T, Kosaki K, Hara T:

Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism.

Eur J Pediatr 169: 839-844, 2010

Ohga S, Ishimura M, Yoshimoto G, Miyamoto T, Takada H, Tanaka T, Ohshima K, Ogawa Y, Imadome KI, Abe Y, Akashi K, Hara T.

Clonal origin of Epstein-Barr virus (EBV)-infected T/NK-cell subpopulations in EBV-positive T/NK-cell lymphoproliferative disorders of childhood.

J Clin Virol in press

Torio M, Ishimura M, Ohga S, Doi T, Utsunomiya R, Ohkubo K, Suga N, Takada H, Hara T.

Nephrolithiasis as an extra-intestinal presentation of pediatric inflammatory bowel disease unclassified.

J Crohns Colitis 4, 674-678, 2010

Muneuchi J, Ishimura M, Takada H, Hoshina T, Utsunomiya R, Ikeda K, Yamaguchi K, Ohga S, Kusahara K, Hara T.

Incomplete Kawasaki disease in a patient with chronic granulomatous disease.

Pediatr Int. 2010 Jun;52(3):e134-6.

Hepatitis-associated aplastic anemia during a primary infection of genotype 1a torque teno virus.

Ishimura M, Ohga S, Ichiyama M, Kusahara K, Takada H, Hara T, Takahashi M, Okamoto H.

Eur J Pediatr. 2010 Jul;169(7):899-902.

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

研究分担者 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

研究要旨

自然免疫系異常により発症する症例を集積したところ、寒冷誘発による発熱、冬期の重症凍瘡を主訴とする症例を得た。同症例はその他に、軽度精神発達遅滞、低身長、大脳基底核石灰化をともなっていた。寒冷誘発発熱遺伝子 NLRP3, NLRP12、中條・西村症候群責任遺伝子 PSMB8 のいずれにも異常をみとめなかったが、Aicardi-Goutières 症候群の原因遺伝子の1つ TREX1 に異常を認めた。TREX1異常を認めた Aicardi-Goutières 症候群、本邦初症例であった。

共同研究者

井澤和司(京都大学大学院医学研究科発達小児科学)

A. 研究目的

IRAK4 欠損症は TLR-IL1R の下流に存在し、自然免疫系における重要な分子である。当科では IRAK4 欠損症症例を同定すべく、繰り返す細菌感染症とくに重症肺炎球菌感染症罹患症例4例において、高田らによる LPS 刺激での単球からの TNF- α 産生能による IRAK4 欠損症スクリーニングを行ったが、IRAK4 欠損症は同定できなかった。症例集積の過程で、自然免疫系の異常が疑われた、寒冷誘発による発熱、冬期重症凍瘡症例を得た。同症例の同一家系において、同様の症状を呈する症例が多数存在し、なんらかの遺伝子異常症が疑われた。我々は、同症例の責任遺伝子の同定を試みた。

B. 研究方法

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に基づいて、京都大学倫理委員会に承認を得たプロコールに則り、患者よりインフォームドコンセントを得て、免疫不全症関連遺伝子解析を行った。

患者末梢血より genomic DNA、cDNA を作成し、NLRP3、NLRP12、PSMB8、TREX1 遺伝子解析をシーケンシングにより行った。

C. 研究結果

(症例呈示)13歳女性。36週2500gにて出生した。1歳頃より秋から春にかけて重症の凍瘡を発症した。凍瘡がひどくなるときに発熱を認めたが、CRP 上昇、WBC 増多は認めなかった。低身長を6歳時に指摘され(-3.16SD)、その際頭部 CT にて両側淡蒼球に石灰化あり。9歳時、自己抗体(SSA、SSB、抗カルジオリピン抗体、アンチループスコアグラント、抗核抗体、クリオグロブリン、寒冷凝集素)陰性、補体正常であった。発達遅滞あり、DQ50。既往歴で1歳3か月に熱性痙攣。

家族歴で母親、また血族に同様の冬期の重症凍瘡あり。

以上より寒冷誘発発熱の原因遺伝子として、NLRP3、NLRP12 遺伝子解析を行ったが、異常なかった。また凍瘡様皮疹、大脳基底核石灰化より中條・西村症候群の原因遺伝子 PSMB8 の遺伝子解析を行ったが異常なかった。冬期の重症凍瘡、頭部石灰化、発達遅延より Aicardi-Goutières 症候群を疑い、原因遺伝子(TREX1、RNASEH2A、RNASEH2B、RNASEH2C、SAMHD1)のうち、まず TREX1 を検討した。患者 TREX1 に D18N という Familial chilblain lupus もしくは Aicardi-Goutières 症候群で報告のある TREX1 遺伝子異常を同定できた。

本症例は、軽症であるが中枢神経症状を合併しているため、Aicardi-Goutières 症候群と診断した。TREX1 異常が証明された本邦初症例であった。

D. 考察

Aicardi-Goutières 症候群は頭蓋内石灰化、中枢神経症状を伴い、約40%の症例で凍瘡を伴うことが知られて

いる。一方、TREX1 異常症で中枢神経症状を欠く疾患として Familial chilblain lupus が存在する。

本症例は典型的な Aicardi-Goutières 症候群にしては中枢神経症状が軽く、Familial chilblain lupus を当初疑ったが、頭蓋内石灰化、発達遅延の存在より Aicardi-Goutières 症候群と診断した。

このように重症凍瘡、寒冷誘発発熱が主訴となるような症例のなかに軽症型の Aicardi-Goutières 症候群もしくは Familial chilblain lupus が埋もれている可能性が示唆された。本症例は Aicardi-Goutières 症候群で TREX1 遺伝子異常を証明できた本邦初症例である。同様の症例の集積を行い、寒冷誘発の発熱もしくは冬期の重症凍瘡を示し、自然免疫系異常症が疑われる症例のうち、どのぐらい TREX1 異常症が存在するか今後の検討課題である。

E. 結論

IRAK4 欠損症スクリーニングを行ったが新規 IRAK4 欠損症の症例は同定できなかった。同症例の集積過程で寒冷誘発発熱、冬期重症凍瘡を示し、自然免疫系の異常症が疑われた1例を得、遺伝子解析により TREX1 異常による Aicardi-Goutières 症候群と診断した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakai, H., S. Ito, R. Nishikomori, Y. Takaoka, T. Kawai, M. Saito, I. Okafuji, T. Yasumi, T. Heike, and T. Nakahata, A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene. Rheumatology 49: 194-196, 2010

2. 学会発表

1. 寒冷刺激による発熱と凍瘡を契機に診断に至った、TREX1 変異を伴う Aicardi-Goutières syndrome の1例とその1家系 井澤和司 西小森隆太 阿部純也 酒井秀政 谷風尚子 村田佑樹 河合朋樹 八角高裕 平家俊男 平城徹 平城直子 大嶋勇成 第4回日本免疫不全研究会、福岡市、2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

IRAK4 及び関連因子の構造生物学的解析研究

研究分担者 朽尾豪人 京都大学大学院工学研究科 准教授

研究要旨

IRAK4 は TLR (Toll-like Receptor) シグナルの伝達において重要な役割を果たす。TLR は IRAK4 と直接相互作用するわけではなく、細胞内アダプター分子 MyD88 を介する。本研究では、両者の相互作用を構造生物学的アプローチによって解析する。

共同研究者

大西 秀典(岐阜大学医学部附属病院小児科)

A. 研究目的

TLR (Toll-like Receptor) シグナルにおいて、多くの場合、TLR の細胞内領域が細胞内アダプター分子 MyD88 を介して IRAK4 と相互作用しこれを活性化する。本分担研究では、IRAK4 と MyD88 との相互作用様式の原子レベルでの解明を目的とする。

B. 研究方法

MyD88 と IRAK4 の Death ドメイン同士が相互作用すると報告されているが、未だその詳細な様式は明らかでない。そこで、両者の Death ドメインを調製し NMR、X 線結晶回折法を用いて相互作用を原子レベルで解明する。

(倫理面への配慮)

当該分担研究では該当しない。

C. 研究結果

IRAK4 と MyD88 の Death ドメイン(各々 MyD88-DD、IRAK4-DD と呼ぶ)の良好な発現と大量調製のために、発現させる Death ドメインの領域を最適化した。分析ゲル濾過により、MyD88-DD は三量体を、IRAK4-DD は二量体を形成していること、両者が複合体を形成することを明らかにした。IRAK4-DD の R12C 置換体や、MyD88-DD の R98C 置換体では複合体は形成されなかった。MyD88-DD の結晶化スクリーニングを行い微結晶が得られる条件を見いだした。

D. 考察

MyD88 の R98C 変異は NF- κ B の活性化が减弱すると報告されているが、これは IRAK4 と結合できないからだと考えられる。一方、IRAK4 で見つかった R12C 変異でも、同様の表現型が見られる可能性がある。

E. 結論

構造解析に必要な十分な試料の調製法を確立したほか、IRAK4 の R12C 変異について新規知見を得た。

F. 健康危険情報

当該分担研究には該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohnishi H., et al., *Biomol NMR assign*, **4**, p123-5 (2010).
Iwaya, N., et al., *J Biol Chem* **285**, 16822-29 (2010)
Jee, J.-G., et al., *J Biol Chem* **285**, 15931-40 (2010).
Sekiya, N., et al., *Proteins* **78**, 1491-1502 (2010).

2. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

IRAK-4 欠損症の分子構造基盤についての研究

研究分担者 加藤善一郎 岐阜大学医学部附属病院小児科 准教授

研究要旨

IRAK4 遺伝子産物であるタンパクの立体構造基盤については十分な解析が行われていないのが現状であり、その基盤を明らかにして患者解析等臨床病態への還元を行うことを目的として、立体構造解析を行った結果、日本人家系を含む患者にみられる、各遺伝子変異のみならず影響が明らかとなった。

共同研究者

大西秀典(岐阜大学医学部附属病院小児科)

A. 研究目的

インターロイキン 1 受容体関連キナーゼ 4(IRAK4)欠損症は、乳幼児期に致死的な細菌感染症をきたすことのある原発性免疫不全症の 1 種であり、主に原因不明の繰り返す重症肺炎球菌感染(髄膜炎、敗血症など)、黄色ブドウ球菌感染、緑膿菌感染を生じる。一方、ウイルス感染等の易感染性はみられず、また、通常の免疫機能検査(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されている。

本症の分子メカニズムは、IRAK4 分子の細胞内シグナル伝達経路の障害であるが、そのシグナル伝達系については、自然免疫系分子である TLR あるいは炎症性サイトカインの代表的分子であるインターロイキン 1 受容体(IL-1R) が刺激により活性化されることにより開始される。細胞内では、アダプター分子である MyD88 および TIRAP 等が集合化することが必須であり、その構造学的基盤については、すでに、我々が報告している(PNAS 2009)。

次の段階として、受容体群とアダプター群が会合した状態に、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 の活性化に至ることが明らかになってきている。

本症は、この 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すと理解されている。

遺伝子変異と患者病態における、genotype

-phenotype correlation についての研究が進みつつあるが、まだ十分に確立されていない。また、遺伝子変異からどのようにして機能低下が生じるかというメカニズムについて、特に、その遺伝子産物であるタンパクの立体構造基盤についてははっきりしていないのが現状であり、その基盤を明らかにして患者解析等臨床病態への還元を行うことを目的とする。

B. 研究方法

本研究では、上記の課題について、臨床的特徴と遺伝子変異、そして、タンパク立体構造から得られた知見を統合する新しい方法についての確立を目指し主に、IRAK4 遺伝子産物であるタンパクの立体構造からみたシグナル伝達メカニズムの理解、患者遺伝子変異のタンパク立体構造に与える影響について解析を行った。各ドメインの原子座標を用いて、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、MOE 等の解析ソフトを用いたシミュレーションを含む研究を、multicore ワークステーション等を用いて行った(参考:Kato et al. PNAS 2008 等)。

(倫理面への配慮)

岐阜大学倫理委員会等における十分な審査管理のもと実施された。

C. 研究結果

IRAK4 遺伝子産物であるタンパクは、二つの機能ドメインからなり、機能ドメイン 1 (DDDドメイン)は、会合体形成

する機能が主であり、TLR等からのシグナル伝達の過程で、MyD88 タンパクのDDDメインとの高次会合体を形成して、シグナル複合体を形成する(図1)。機能ドメイン2(キナーゼドメイン)は、活性中心をもつ酵素であり、その活性中心に参与する原子に影響を与える残基が特定された。各遺伝子変異によるタンパク構造変化についての結果が得られた(図2、3)。

D. 考察

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的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。ミスセンス変異については、DDDメインの変異R12Cについては、DD高次会合複合体の結合面に位置することから、高次会合複合体形成に異常を来すことが考えられた(図3)。今後、生化学的解析を含めた総合的な解析を進める予定である。キナーゼドメインのミスセンス変異については、静止構造の解析のみではそのメカニズムについては、必ずしも明確にならないため、今後、分子力動的解析などを踏まえた検討を要すると考えられた。キナーゼドメインが失われる変異については、DDDメイン残存による高次会合体形成への影響も考えられ、この変異をヘテロで持つ保因者等についても、これまでの生化学的解析に加え、構造的な検討がなされるべきと考えられた。今後の遺伝子変異の機能解析・臨床病態解析において重要な知見となると考えられる。

E. 結論

患者遺伝子変異の臨床病態に与える影響について、タンパク立体構造基盤の一部について明らかとなったことより、今後、臨床へのフィードバックとして、病型の詳細な分類などを含め、本症の実態把握等へ寄与するものと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kato Z, Manabe T, Teramoto T, Kondo N. Adenovirus infection mimics the cerebellitis caused by rotavirus infection. *Eur J Pediatr*. 2010 Oct 8.

Stern JN, Keskin DB, Kato Z, Waldner H, Schallenberg S, Anderson A, von Boehmer H, Kretschmer K, Strominger JL. Promoting tolerance to proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis through targeting dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 5;107(40):17280-5.

Kato Z, Stern JN, Nakamura HK, Miyashita N, Kuwata K, Kondo N, Strominger JL. The autoimmune TCR-Ob.2F3 can bind to MBP85-99/HLA-DR2 having an unconventional mode as in TCR-Ob.1A12. *Mol Immunol*. 2010 Nov-Dec;48(1-3):314-20.

Kato Z, Morimoto M, Orii KE, Kato T, Kondo N. Developmental changes of radiological findings in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Pediatr Radiol*. 2010 Jun 23

Takanashi J, Miyamoto T, Ando N, Kubota T, Oka M, Kato Z, Hamano S, Hirabayashi S, Kikuchi M, Barkovich AJ. Clinical and radiological features of rotavirus cerebellitis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2010 Oct;31(9):1591-5.

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.

Kato Z, Ohnishi H, Kimura T, Kondo N. Prediction of the pathogenesis of the mutation in MeCP2 C-terminal domain. *Brain Dev*. 2010 Feb;32(2):169

2. 学会発表

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.

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

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.

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.

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

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

2-6 September 2010, Amsterdam, Netherlands.

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.

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許 出願番号 特願 2010-119645 発明名称:IL-18 阻
害薬剤

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図1 IRAK4 タンパクの立体構造

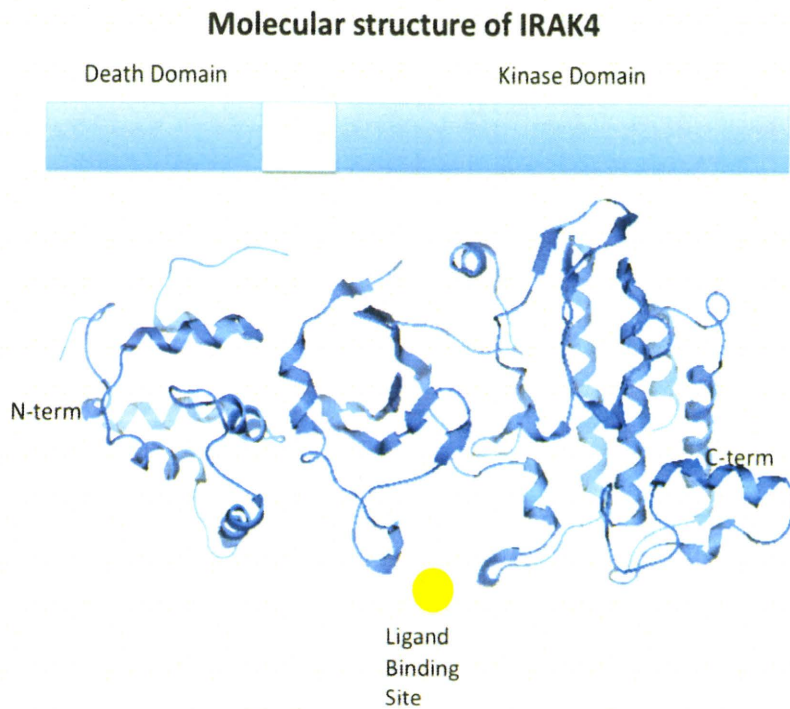


図2 遺伝子変異によるタンパク構造変化 代表例を示す
黄色の部分が失われるためドメインの機能が喪失される。

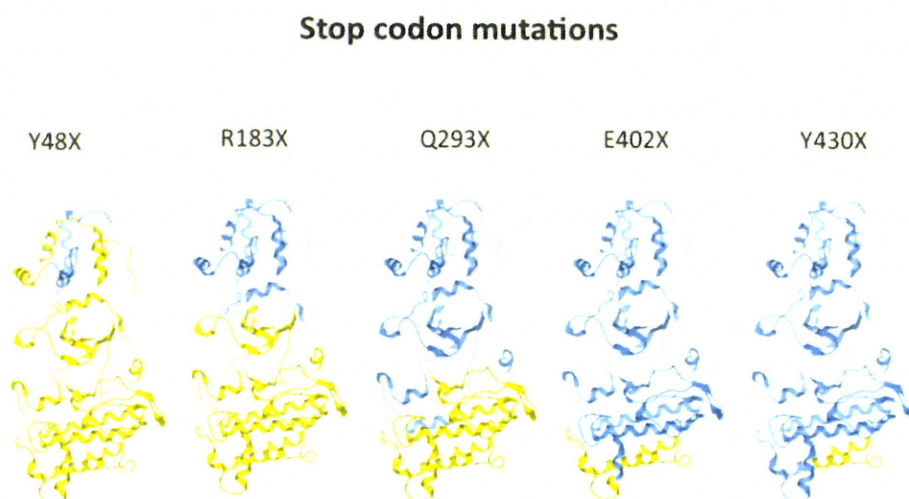
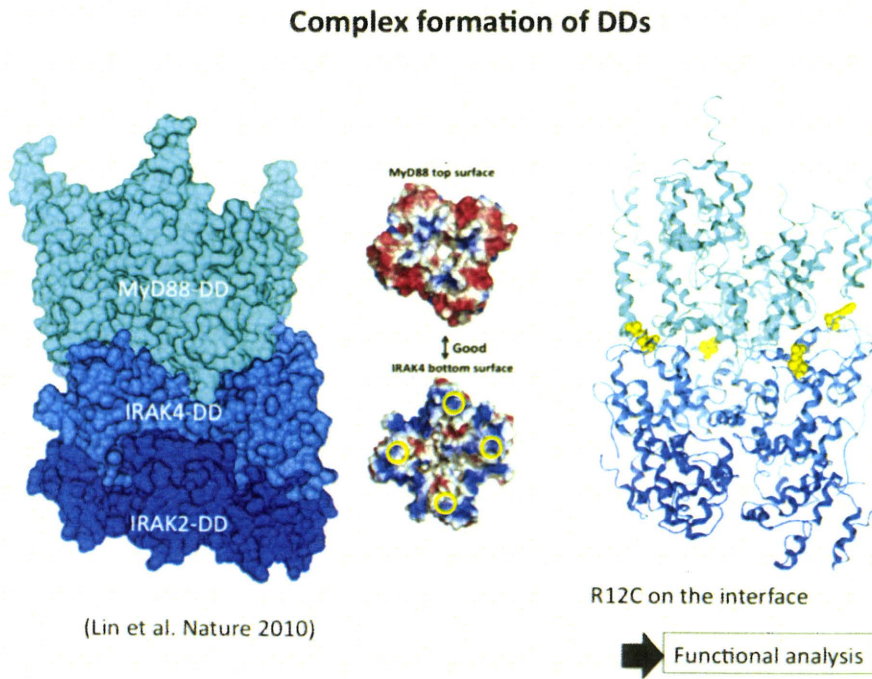


図3 DDドメインの変異R12C DD高次会合複合体の結合面に位置し、高次会合複合体形成に異常を来す



III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
高田英俊	自己炎症性疾患	五十嵐隆	小児科臨床ピク シス20かぜ症候 群と合併症	中山書店	東京	2010	186-189

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
<u>Ohnishi H.</u> <u>Tochio H.</u> <u>Kato Z.</u> Kimura T. Hiroaki H. Kondo N. Shirakawa M	1H, 13C, and 15N resonance assignment of the TIR domain of human MyD88.	Biomol NMR Assign	4(2)	123-5	2010
Yang An. <u>Hidenori Ohnishi</u> , Eiko Matsui, Michinori Funato, <u>Zenichiro Kato</u> , 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	E-pub ahead		2011
Yamauchi A, Iwata H, <u>Ohnishi H.</u> Teramoto T, Kondo N. Seishima M.	Interleukin-17 expression in the urticarial rash of familial cold autoinflammatory syndrome: a case report.	Br J Dermatol	163(6)	1351-1353	2010
Morita H. Kaneko H. <u>Ohnishi H.</u> Kato Z, Kondo N.	Antigen-specific immune response to endotoxin-free recombinant P34.	Allergy	E-pub ahead		2011
Kaneko H. Teramoto T. Kondo M. Morita H. <u>Ohnishi H.</u> 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	20(6)	538-539	2010
Aoki Y, Fukao T, Zhang G, <u>Ohnishi H.</u> 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	26(5)	667-671	2010
Shimizu M., Yokoyama T. Yamada K., Kaneda H., Wada H., Wada T, Toma T, Ohta K., Kasahara Y, <u>Yachie A.</u>	Distinct cytokine profiles of systemic-onset juvenile idiopathic arthritis-associated macrophage activation syndrome with particular emphasis on the role of interleukin-18 in its pathogenesis	Rheumatology	49	1645-1653	2010
Hoshina T, Takada H. Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T	Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan	Journal of Clinical Immunology			in press
Ohga S, Ishimura M, Yoshimoto G, Miyamoto T, <u>Takada H.</u> Tanaka T, Ohshima K, Ogawa Y, Imadome KI, Abe Y, Akashi K, Hara T	Clonal origin of Epstein-Barr virus (EBV)-infected T/NK-cell subpopulations in EBV-positive T/NK-cell lymphoproliferative disorders of childhood.	J Clin Virol			in press

Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Nonoyama S, Karasuyama H, Minegishi Y	Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells	J Exp Med	14;208(2)	235-249	2011
Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, Chrabieh M, Levy O, Arkwright PD, McDonald D, Geha RS, Takada H, Krause JC, Creech CB, Ku CL, Ehl S, Maródi L, Al-Muhsen S, Al-Hajjar S, Al-Ghoniem A, Day-Good NK, Holland SM, Gallin JJ, Chapel H, Speert DP, Rodriguez-Gallego C, Colino E, Garty BZ, Roifman C, Hara T, Yoshikawa H, Nonoyama S, Domachowski J, Issekutz AC, Tang M, Smart J, Zitnik SE, Hoarau C, Kumararatne DS, Thrasher AJ, Davies EG, Bethune C, Sirvent N, de Ricaud D, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Guedes M, Vitor AB, Rodrigo C, Almazán F, Méndez M, Aróstegui JJ, Alsina L, Fortuny C, Reichenbach J, Verbsky JW, Bossuyt X, Doffinger R, Abel L, Puel A, Casanova JL	Clinical Features and Outcome of Patients With IRAK-4 and MyD88 Deficiency.	Medicine (Baltimore)	89	403-425	2010
Tanabe F, Kasai H, Morimoto M, Oh S, Takada H, Hara T, Ito M	Novel heterogenous CHS1 mutations identified in five Japanese patients with Chediak-Higashi syndrome.	Case report in Medicine			in press
Takada H, Nomura A, Ishimura M, Ichiyama M, Ohga S, Hara T	NEMO mutation as a cause of familial occurrence of Behçet's disease in female patients.	Clin Genet	78	575-579	2010
Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T, Mizuno Y, Hijikata A, Ohara O, Takada H, Kusuhashi K, Hara T	Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease.	Clin Exp Immunol,	160	246-55	2010
Inoue H, Takada H, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Takahashi N, Morio T, Kosaki K, Hara T.	Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism.	Eur J Pediatr	169	839-844	2010

Torio M, Ishimura M, Ohga S, Doi T, Utsunomiya R, Ohkubo K, Suga N, Takada H, Hara T.	Nephrolithiasis as an extra-intestinal presentation of pediatric inflammatory bowel disease unclassified.	J Crohns Colitis	4	674-678	2010
Muneuchi J, Ishimura M, Takada H, Hoshina T, Utsunomiya R, Ikeda K, Yamaguchi K, Ohga S, Kusuhara K, Hara T.	Incomplete Kawasaki disease in a patient with chronic granulomatous disease.	Pediatr Int.	52(3)	e134-136	2010
Ishimura M, Ohga S, Ichiyama M, Kusuhara K, Takada H, Hara T, Takahashi M, Okamoto H.	Hepatitis-associated aplastic anemia during a primary infection of genotype 1a torque teno virus.	Eur J Pediatr	169(7)	899-902	2010
高田英俊	PAPA syndrome, DIRA・他の自己炎症性疾患	医学のあゆみ	235(12, 13)	1185-1190	2010
高田英俊	基礎疾患のある難治性・反復性感染症への対応 原発性免疫不全症	小児内科	43 (2)	269-276	2011
高田英俊、峯岸克行	高IgE症候群の最近の話題	日本臨床免疫学会誌	33(1)	15-19	2010
高田英俊	文献紹介 Ori Toker and Philip J Hashkes. Critical appraisal canakinumab in the treatment of adults and children with cryopyrin-associated periodic fever syndrome (CAPS). Biologic: Targets and Therapy 4, 131-138, 2010.	Pedi!	30	7	2011
Sakai, H., S. Ito, R. Nishikomori, Y. Takaoka, T. Kawai, M. Saito, I. Okafuji, T. Yasumi, T. Heike, and T. Nakahata	A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene.	Rheumatology	49	194-196	2010
Iwaya, N., Kuwahara, Y., Fujiwara, Y., Goda, N., Tenno, T., Akiyama, K., Mase, M., Tochio, H., Ikegami, T., Shirakawa, M. and Hiroaki, H..	A common substrate recognition mode conserved between katanin P60 and VPS4 governs microtubule severing and membrane skeleton reorganization.	J Biol Chem	285	16822-29	2010
Jee, J.-G., Mizuno, T., Kamada, K., Tochio, H., Chiba, Y., Yanagi, K., Yasuda, G., Hiroaki, H., Hanaoka, F. and Shirakawa, M.	Structure and mutagenesis studies of the C-terminal region of licensing factor Cdt1 enable the identification of key residues for binding to replicative helicase Mcm proteins.	J Biol Chem	285	15931-40	2010

Sekiyama, N., Arita, K., Ikeda, Y., Hashiguchi, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Saitoh, H. and Shirakawa, M.	Structural basis for regulation of poly-SUMO chain by a SUMO-like domain of Nip45.	Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics	78	1491-1502	2010
Kato Z, Manabe T, Teramoto T, Kondo N.	Adenovirus infection mimics the cerebellitis caused by rotavirus infection.	Eur J Pediatr	E-pub ahead		2010
Stern JN, Keskin DB, Kato Z, Waldner H, Schallenberg S, Anderson A, von Boehmer H, Kretschmer K, Strominger JL.	Promoting tolerance to proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis through targeting dendritic cells.	Proc Natl Acad Sci U S A.	107	17280-5.	2010
Kato Z, Stern JN, Nakamura HK, Miyashita N, Kuwata K, Kondo N, Strominger JL.	The autoimmune TCR-Ob.2F3 can bind to MBP85-99/HLA-DR2 having an unconventional mode as in TCR-Ob.1A12.	Mol Immunol.	48	314-20.	2010
Kato Z, Morimoto M, Orii KE, Kato T, Kondo N.	Developmental changes of radiological findings in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy.	Pediatr Radiol.	E-pub ahead		2010
Takanashi J, Miyamoto T, Ando N, Kubota T, Oka M, Kato Z, Hamano S, Hirabayashi S, Kikuchi M, Barkovich AJ.	Clinical and radiological features of rotavirus cerebellitis.	AJNR Am J Neuroradiol.	31	1591-5.	2010
Kato Z, Ohnishi H, Kimura T, Kondo N.	Prediction of the pathogenesis of the mutation in MeCP2 C-terminal domain.	Brain Dev.	32	169	2010

IV. 研究成果の刊行物・別冊