

図4 WASPは細胞核内において、p54nrbおよびRNA polymerase IIと複合体を形成する

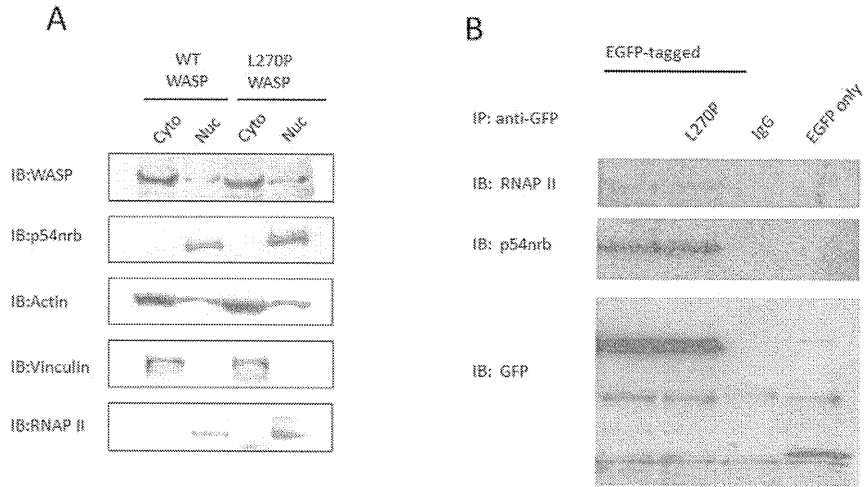


図5 骨髓球系細胞株K562に導入したWASPは、遺伝子発現を調節する

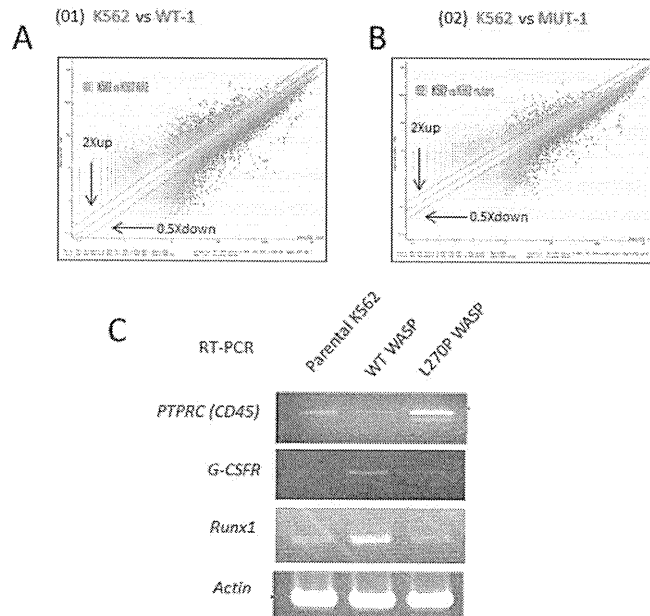
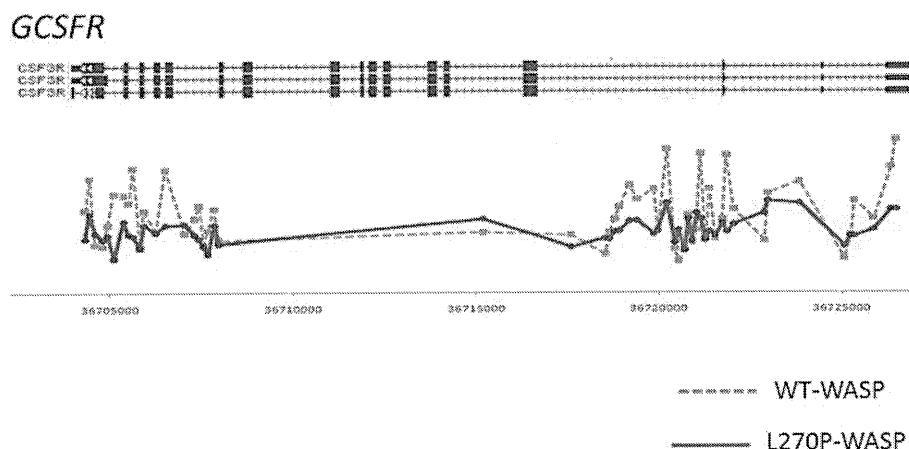


図6 野生型WASPと比較し、恒常的活性化変異WASPはG-CSFR promotor領域への結合親和性が低下する



#### D. 考察

以上の結果から、恒常的活性化変異WASPはその3次構造の変化によりチロシンリン酸化レベルが亢進し、より細胞核へ局在する傾向が見られた。これにはおそらく核移行シグナル(NLS)の露出が関与しているかもしれない。また、WASPはK562においてp54nrb、RNA polymerase IIを含む転写調節因子群と複合体を形成し、DNAと共沈することから、T細胞と同様、骨髄球系細胞においても遺伝子発現調節因子として機能する事が明らかとなった。

しかし、WASPの有無および活性化状態によって遺伝子発現調節の差異が生じるメカニズムについては、未だ不明である。WASP蛋白質の発現自体あるいは3次構造の変化が重要なのか、細胞核内にも存在するアクチン細胞骨格系のArp2/3を介した変化が重要なのか、を解析することが今後の課題である。

これまで、X連鎖性好中球減少症(XLN)発症機構としては、cytokinesisの異常に対して骨髄球系がより感受性が

高いことが原因であると報告されているが、今回の結果から、G-CSF受容体やRunx1といった骨髄球系細胞の分化に重要な遺伝子群の発現調節機構の変化も要因となることが考えられた。

#### E. 結論

- 1) 野生型WASPと比較し、恒常的活性化変異WASPはチロシンリン酸化が亢進し、より細胞核内へ局在した。
- 2) WASPはChIP法にてDNAと共沈し、免疫沈降法にてp54nrb、RNA polymerase IIと複合体を形成した。
- 3) WASP活性化変異により遺伝子発現の差異、遺伝子発現調節領域への結合親和性が異なった。
- 4) 以上より、WASPは骨髄球系の細胞核内において、遺伝子転写調節因子として機能することが示唆された。

#### F. 研究危険情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表

- 1) Adriani M, Jones KA, Uchiyama T, Kirby MR, Silvin C, Anderson SM, Candotti F. Defective inhibition of B-cell proliferation by Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient regulatory T cells. *Blood*, 117(24), 6608-6611, 2011.
- 2) Chung YL, Sato M, Sasahara Y, Tsuchiya S, Kumaki S, et al. Octa-arginine mediated delivery of wild-type Lnk inhibits Jak-2-dependent leukemia cell growth by promoting apoptosis. *PLoS One* 6(8): e23640-23650, 2011.
- 3) Kobayashi I, Kubota M, Sasahara Y, Whitesell L, Ariga T, et al. Auto-antibodies to villin occur frequently in IPEX, a severe immune dysfunction syndrome caused by mutation of FOXP3. *Clin. Immunol.* 141:83-89, 2011.
- 4) Otsubo K, Kamachi Y, Kobayashi I, Sasahara Y, Kanegana H, Miyawaki T, et al. Identification of FOXP3-negative regulatory T-like (CD4+CD25+CD127 low) cells in patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked syndrome. *Clin. Immunol.* 141: 111-120, 2011.
- 5) Ishimura M, Takada H, Doi T, Imai K, Sasahara Y, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T, et al. Nationwide survey of patients with primary immune-deficiency diseases in Japan. *J Clin Immunol*, 31(6): 968-976, 2011.
- 6) Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Karasuyama H, Minegishi Y, et al. Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *J Exp Med* 208: 235-249, 2011.

7) Kudo Y, Minegishi M, Harigae H, Tsuchiya S, et al. Quality assessment of umbilical cord blood units and the time if transplantation. *Int J Hematol* 93: 645-651, 2011.

8) 土屋 滋：総説 原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植、日本小児感染症学会雑誌 小児感染免疫 22 巻 4 号、p381-384、2011.

9) 笹原洋二：総説 Wiskott-Aldrich 症候群の分子病態からみた感染症と WIP の役割、日本小児感染症学会雑誌 小児感染免疫 23 巻 1 号、p75-80、2011.

学会発表

- 1) 内山 徹、笹原洋二、久間木 悟、土屋 滋：フォーミーウイルスベクターによる Wiskott-Aldrich 症候群への遺伝子治療、第 4 回日本免疫不全症研究会（福岡、平成 23 年 1 月 22 日）
- 2) 笹原洋二：疾患レビュー 周期性発熱症候群-Overview-、第 1 回東北感染免疫研究会（仙台、平成 23 年 2 月 19 日）
- 3) Y Sasahara, Y Watanabe, LC Yeng, S Tsuchiya: Mechanisms of ubiquitination and degradation of Wiskott-Aldrich syndrome protein in T cells (oral). 7th ASPR/PAS 2011 joint meeting (Denver, April 30th-May 3rd, 2011)
- 4) 内山 徹：シンポジウム：Stem cell gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency (oral) 第 17 回日本遺伝子治療学会（福岡、平成 23 年 7 月 15-17 日）
- 5) 内山 徹、堀野智史、笹原洋二、久間木 悟、土屋 滋、他：フォーミーウイルスベクターによる Wiskott-Aldrich 症候群の遺伝子治療、第 114 回日本小児科学会学術集会（東京、平成 23 年 8 月 12-14 日）

6) 力石 健、北沢 博、森尾友宏、峯岸  
正好、笹原洋二、土屋 滋：悪性リンパ  
腫を合併した成人期 Wiskott-Aldrich 症  
候群患者に対する骨髄非破壊的前処置に  
よる造血細胞移植の経験、第 53 回日本小  
児血液がん学会（前橋、平成 23 年 11 月  
25-27 日）

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

#### 参考文献

1) de la Fuente MA\*, Sasahara Y\*,  
Calamito M, Gallego MD, Anton IM,  
Suresh K, Siminovitch K, Ochs HD,  
Rosen FS, Geha RS, Ramesh N  
(\*contributed equally to this work).

WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich  
syndrome protein (WASP). Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA.,104(3), p926-931, 2007.

2) 笹原洋二、土屋 滋：総説 Wiskott-  
Aldrich 症候群の分子病態における WIP  
の役割、日本小児血液学会雑誌, 21 卷 5/6  
号, p217-226, 2007.

## 自然免疫の異常による原発性免疫不全症の臨床像と診断

高田 英俊	(九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
吉川 秀人	(宮城県立こども病院)
今泉 益栄	(宮城県立こども病院)
野々山恵章	(防衛医科大学校医学研究科小児科学)
七條 光一	(徳島赤十字病院小児科)
島袋 陽子	(沖縄県立南部医療センター・こども医療センター)
喜瀬 智郎	(沖縄県立南部医療センター・こども医療センター)
Capucine Picard	(The Rockefeller University)
Jean-Laurent Casanova	(The Rockefeller University)
原 寿郎	(九州大学大学院医学研究院成長発達医学)

### 研究要旨

我々は IRAK4 欠損症の迅速スクリーニング法を開発し、遺伝子診断も含めてこれまでに 4 家系 7 名の IRAK4 欠損症を同定した。7 名中 4 名が乳幼児期に死亡しており、急速に進行する肺炎球菌性化膿性髄膜炎によるものが 3 名にみられ、1 例は緑膿菌による壊死性筋膜炎／敗血症であった。臍帯脱落遅延は 6 例に認められた。これらの症例を含めた国内外の症例の検討により、IRAK4 欠損症、MyD88 欠損症の臨床像が詳細に明らかになり、化膿性髄膜炎や敗血症などの Invasive bacterial infection の頻度が高いこと、起炎菌として肺炎球菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌の頻度が高いことなどが判明した。臍帯脱落遅延もこの疾患の特徴であることが明確になった。死亡率は約 50% と高く、また次第に易感染性がなくなることから、早期診断、および乳幼児期の感染症予防の重要性が確認された。自然免疫の異常による原発性免疫不全症によって、ヘルペス脳炎が起ることも明らかになっており、これらの疾患に対する迅速スクリーニング法を開発した。

### A. 研究目的

自然免疫系は下等生物から高等生物まで共通にみられる基本的な免疫機構であり、マクロファージ、樹状細胞、好中球などの細胞が、病原体に共通の分子機構である pathogen-associated molecular pattern (PAMP) を toll-like receptor (TLR) や RIG-like receptor、NOD-like receptor (NLR) 等で認識することにより惹起される機構である。

自然免疫不全に分類される原発性免疫不全症候群 (PID) は、自然免疫受容体の欠損や受容体以降のシグナル伝達障害を原因とするものが含まれ、2011 年の International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies

の PID の分類では、1. Anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency (EDA-ID) (外胚葉形成不全免疫不全症候群)、2. IL-1 receptor associated kinase 4 deficiency (IRAK4 欠損症)、3. Myeloid differentiation primary response gene 88 deficiency (MyD88 欠損症)、4. Herpes simplex encephalitis (単純ヘルペスウイルス脳炎) などが含まれる。

我々は、IRAK4 欠損症の迅速スクリーニング法を開発し、これまでに 4 家系 7 名の IRAK4 欠損症患者を同定してきた。今回、国内症例の臨床像を解析し、これらを含めた国内外の症例での解析結果から IRAK4 欠損症、MyD88 欠損症の臨床像を明らかにした。また、

自然免疫異常による単純ヘルペスウイルス脳炎の迅速診断法の開発研究を行った。

## B. 研究方法

国内の4家系7名のIRAK4欠損症患者を対象としてその臨床像を調べた。IRAK4/MyD88欠損症、UNC93B欠損症のスクリーニングは、全血をLPSあるいはssRNAで4時間刺激し、単球における細胞内TNF- $\alpha$ 産生細胞の割合をフローサイトメーターで解析した。BD Phosflowによる単球内リン酸化NF- $\kappa$ Bの解析は、末梢血単核球(MNC)をLPSで20分刺激し、固定・permeabilizationさせ、単球内のリン酸化NF- $\kappa$ Bを染色し、フローサイトメーターで解析した。

## C. 研究結果

### 1. 国内のIRAK4欠損症の臨床像の解析：

国内では4家系7名のIRAK4欠損症患者を同定した(表1)。そのうち4名が死亡しており、3名が肺炎球菌性化膿性髄膜炎によって、他の1名は急速に進行する緑膿菌性壊死性筋膜炎/敗血症により死亡していた。感染症発症前に診断された2名は、ガンマグロブリン補充、抗菌剤予防投与、肺炎球菌ワクチンなどにより重症感染症をおこしていなかった。肺炎球菌性化膿性髄膜炎を2回おこした患者1名は、IRAK4欠損症との診断後、感染予防により重症感染症はおこしてない。

表 1. IRAK4欠損症国内症例のまとめ

家系	IRAK4欠損症患者・臨床像	転機	臍帯脱落
家系1 (同胞3人)			
	Pt 1. 肺炎球菌性化膿性髄膜炎2回	死亡	遅延
	Pt 2. 感染予防中	生存	遅延
	Pt 3. 感染予防中	生存	遅延
家系2 (同胞2人)			
	Pt 4. 肺炎球菌性化膿性髄膜炎2回	生存	遅延なし
家系3 (同胞2人)			
	Pt 5. 肺炎球菌性化膿性髄膜炎	死亡	遅延
家系4 (同胞4人)			
	Pt 6. 肺炎球菌性化膿性髄膜炎	死亡	遅延
	Pt 7. 緑膿菌による壊死性筋膜炎敗血症	死亡	遅延

7名中6名に臍帯脱落遅延がみられ、この疾患の特徴であると考えられた。MyD88欠損

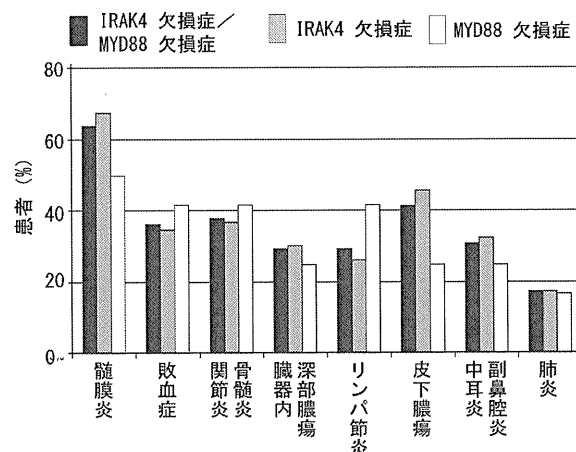
症はまだ国内では同定されていない。

### 2. 国内外のIRAK4欠損症、MyD88欠損症の臨床像の解析：

これらの症例を含め、国内外の解析では、IRAK4欠損症患者では46例中18例がinvasive bacterial infectionで死亡していた。MyD88欠損症患者では12例中6例が死亡していた。IRAK4欠損症では46例中10名に臍帯脱落遅延がみられた。

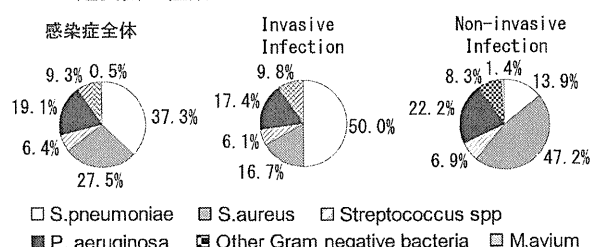
感染症は、化膿性髄膜炎や敗血症、関節炎/骨髄炎などの、いわゆるinvasive bacterial infectionが多く、肺炎などはむしろ少ない(図1)。

図 1. IRAK4欠損症/ MyD88欠損症の臨床像 - 感染症の種類 -



起炎菌の種類としては、肺炎球菌や黄色ブドウ球菌、溶血連鎖球菌などのグラム陽性球菌に加えて、緑膿菌の頻度も高いことがわかった(図2)。

図 2. IRAK4欠損症/ MyD88欠損症の臨床像 - 起炎菌の種類 -



重症感染症の発症は乳幼児期が多く、しだいにその頻度が低下することがわかった(図3)。

重症感染症は 14 歳以降に発症した例はなかった。また 8 歳以降に重症細菌感染症で死亡した例はなかった (図 4)。

図 3. 感染症発症年齢

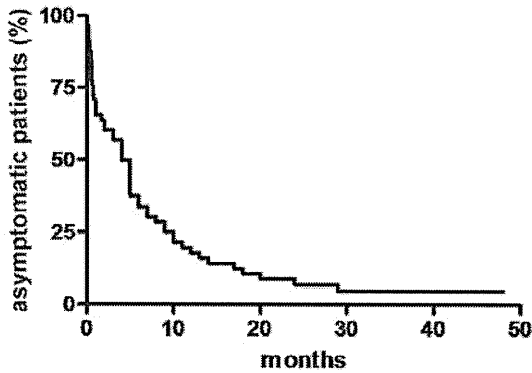
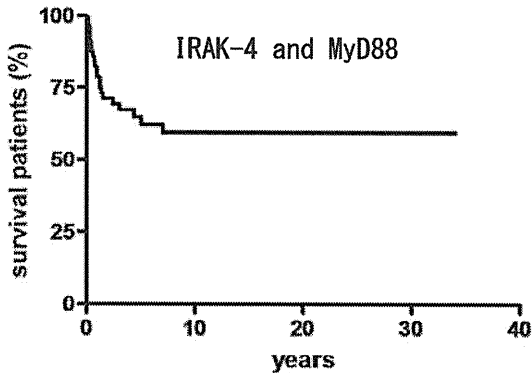


図 4. 生存曲線

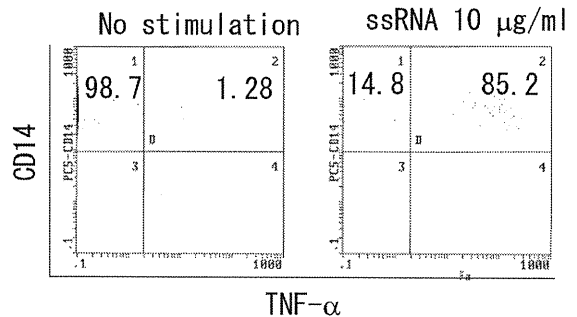


### 3. 自然免疫異常による単純ヘルペス脳炎のスクリーニング

これまで UNC93B1、TLR3、TRAF3、TRIF 欠損症で単純ヘルペス脳炎を起こすことが知られているが、まだ国内からの報告はない。この疾患患者を同定する方法として、遺伝子検査以前に、簡易なスクリーニング法があれば極めて有用である。これまでの報告では、主に繊維芽細胞を用いて各 TLR リガンドやウイルスに対する反応性が低下することを示しているが、末梢血で各種の TLR リガンドに対する反応性が低下する疾患としては UNC93B1 しかないようである。そこでまず、UNC93B1 欠損症に対するスクリーニング法

樹立のため、TLR7/8 のリガンドである ssRNA で末梢血全血を 4 時間刺激し、単球内の TNF- $\alpha$  産生細胞の割合を検討することとした。健常者末梢血を ssRNA で刺激した場合、ssRNA が 10  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で、TNF- $\alpha$  産生単球が 85.2% と高い割合で認められることがわかった (図 5)。

図 5. ssRNA (TLR7/8 agonist) 刺激による単球内 TNF- $\alpha$  産生単球の割合



この方法を用いて、患者末梢血と健常者末梢血を比較することによりスクリーニングが可能であると考えられた。

### D. 考察

これまで IRAK4 欠損症/MyD88 欠損症が疑われる多くの患者をスクリーニングしてきたが、実際にこの自然免疫異常および他の原発性免疫不全症が実際に確認される例は少ない。しかしながら総じて IRAK4 欠損症患者は肺炎球菌性化膿性髄膜炎を繰り返したり、急速に進行する例が多く、より重症であった。IRAK4/MyD88 欠損症でなかった患者のうちの 1 例は、isolated asplenia であることが後に判明した。国内症例では、IRAK4 欠損症では臍帯脱落遅延がみられることが多く、臍帯脱落遅延がみられた場合には、IRAK4 欠損症を含めた原発性免疫不全症がある可能性が高いと考えられる。

### E. 結論

IRAK4 欠損症や MyD88 欠損症は、乳幼児期に肺炎球菌や黄色ブドウ球菌、連鎖球菌などのグラム陽性菌だけでなく、緑膿菌などの

グラム陰性菌に対しても易感染性を呈し、化膿性髄膜炎などの重症感染症が急速に進行し、死亡することが多い。しだいに易感染性が軽快することもあり、早期の診断と、感染の予防が極めて重要である。

#### F. 研究危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. Ishimura M, Takada H, Doi T, Imai K, Sasahara Y, Kanegane H, Nishikomori R, Morio T, Heike T, Kobayashi M, Ariga T, Tsuchiya S, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T. Nationwide survey of patients with primary immunodeficiency diseases in Japan. *J Clin Immunol*. 2011 Dec;31(6):968-76.
2. Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsuiki N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of  $\kappa$ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jul;128(1):223-225.
3. 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.
4. Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Oshima K, Okada S,

Kobayashi M, Ohara O, Hara T. Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan. *J Clin Immunol*. 2011 Jun;31(3):309-14.

#### H. 知的財産の出願・登録状況

なし

#### 参考文献

1. Picard C, Casanova JL, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I $\kappa$ B $\alpha$  deficiency. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Jul;24(3):490-7.
2. 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-Ghonaïum 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)*. 2010 Nov;89(6):403-25.
3. Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, Chrabieh M, Issekutz AC, Cunningham CK, Gallin J, Holland SM, Roifman C, Ehl S, Smart J, Tang M, Barrat FJ, Levy O, McDonald D,



Day-Good NK, Miller R, Takada H, Hara T, Al-Hajjar S, Al-Ghoniaim A, Speert D, Sanlaville D, Li X, Geissmann F, Vivier E, Maródi L, Garty BZ, Chapel H, Rodriguez-Gallego C, Bossuyt X, Abel L, Puel A, Casanova JL. Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med.* 2007 Oct 1;204(10):2407-22.

## IKBA遺伝子に新規変異を有する外胚葉形成不全免疫不全症の病態 解析と迅速診断スクリーニングについて

大西 秀典 (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)  
山本 崇裕 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)  
加藤善一郎 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)  
金子 英雄 (国立病院機構長良医療センター臨床研究部)  
近藤 直実 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)

### 研究要旨

自然免疫不全症は、リンパ球数や免疫グロブリン値等一般的な免疫学的検査で異常がみられない、原発性免疫不全症である。自然免疫不全症が疑われる症例に、迅速診断スクリーニング法を適応し診断を試みた。フローサイトメーターで対象全血を4時間LPS刺激後CD14陽性細胞の細胞内TNF- $\alpha$ 陽性率をカウントした(IRAK4欠損症の診断に有用と報告された手法と同様)。陽性率の低下を認めた症例にIRAK4, MyD88, NEMO, IKBA遺伝子検査を施行した結果、上記スクリーニング法にて反応の低下を認め、外胚葉形成不全症状を伴う症例(男児)を同定した。NEMO遺伝子には変異を認めず、IKBA遺伝子に新規変異Q9Xが同定された。変異I $\kappa$ B $\alpha$ は、野生型I $\kappa$ B $\alpha$ よりも有意に強くLPS刺激後のNF- $\kappa$ B活性を抑制した。IKBA-Q9X変異は病的意義のある変異と考えられた。また常染色体優性遺伝外胚葉形成不全免疫不全症(AD-EDA-ID)の診断スクリーニングにもフローサイトメーターが有用であった。

### A. 研究の目的

Toll様受容体(TLR)は、病原体関連分子パターン(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)を認識し自然免疫を担う主要な受容体である。TLRの細胞内シグナル伝達経路には、IRAK4やNEMO等の分子が存在する。最近、これらの分子の遺伝子異常が原発性免疫不全症をきたすことが報告されてきている。その中で、IRAK4欠損症やMyD88欠損症ではグラム陽性菌群、特に肺炎球菌に対する易感染性がみられ、NEMOやIKBAの異常では外胚葉形成不全症を伴う免疫不全症をきたすことが知られている。しかし、これら自然免疫不全症は、リンパ球数や免

疫グロブリン値等の一般的な免疫学的検査で異常がみられないことが多いため、自然免疫不全症が疑われる症例の迅速診断スクリーニング法を開発することが必要である。

### B. 研究方法

1. 症例は5ヵ月の男児。日齢18日で臍帯が脱落し、若干の遅延傾向を認めた。生後1ヵ月より易感染性を認めた。無汗症による体温調節障害があり、顔面神経麻痺、口角筋欠損がみられた。生後5ヵ月より炎症性腸疾患を発症し、Mesalazineで加療されている。一般的な免疫系プロフィールを表1に示す。

	Patient	Normal values
Number of blood cells ( $\mu\text{L}$ )		
Leukocytes	21,190	6,000-17,500
Lymphocytes	11,230	4,000-13,500
Monocytes	1,270	Unknown
Lymphocytes subsets (%)		
CD3	59.0	58-84
CD4	31.9	25-54
CD8	23.4	23-56
CD19	33.9	5-24
CD20	34.1	3-20
Serum immunoglobulin levels (mg/dL)		
IgG	930	290-960
IgA	91	7-44
IgM	101	41-161
IgG subclass (%)		
IgG1	60.4	39.3-89.0
IgG2	30.0	7.4-50.4
IgG3	9.1	1.3-12.6
IgG4	0.5	0.1-7.8
Lymphocyte proliferation assay (cpm)*		
First time		
No stimulus	151	70-700
PHA	8,660	26,000-53,000
Con A	1,260	20,000-48,000
Second time		
No stimulus	123	
PHA	24,600	
Con A	11,200	

Con A, Concanavalin A; PHA, phytohemagglutinin.

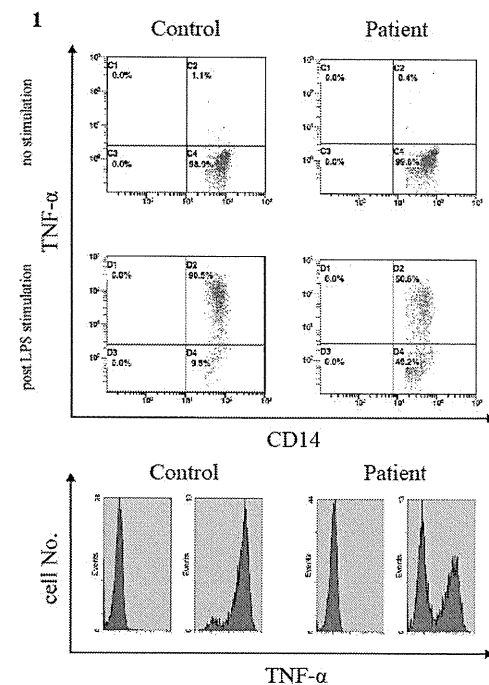
\*Lymphocyte proliferation assay was performed at the age of 10 and 11 months.

2. フローサイトメーターで対象全血を 4 時間 LPS 刺激後 CD14 陽性細胞の細胞内 TNF- $\alpha$  陽性率をカウントした(IRAK4 欠損症の診断に有用と報告された手法と同様)。
3. 2.の手法にて陽性率の低下を認めた症例に IRAK4, MyD88, NEMO, IKBA 遺伝子検査を施行した。
4. 患者末梢血単核球(PBMC)由来の I $\kappa$ B $\alpha$  タンパクと比較した。
5. 3.にて今回遺伝子変異が同定された IKBA について、pcDNA3.1+ plasmid vector に FLAG tag 配列を付加した IKBA 遺伝子を組み込み、既報の遺伝変異型を含めて変異導入を行った(pcDNA-IKBA-FLAGs)。
6. TLR4, MD2, CD14 を発現させた HEK293 細胞株(HEK293hTLR4-MD2-CD14)に pcDNA-IKBA-FLAGs を形質転換し、western blot 法で I $\kappa$ B $\alpha$  タンパクの発現を確認した。
7. HEK293hTLR4-MD2-CD14 に pcDNA-IKBA-FLAGs を発現させ、LPS

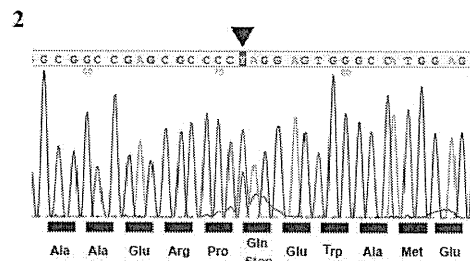
刺激後の NF- $\kappa$ B 活性を Luciferase reporter gene assay で測定した。

### C. 研究結果

1. 上記スクリーニング法にて反応の低下を認め(図 1)、外胚葉形成不全症状を伴う症例(男児)を同定した。

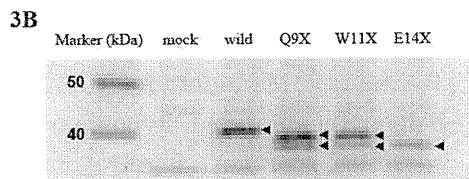
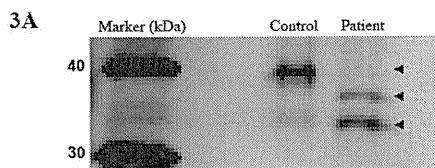


2. IRAK4, MyD88, 及び NEMO 遺伝子には変異を認めず、IKBA 遺伝子の exon1 領域にヘテロ接合性の新規変異(c. 25C>T) (p. Q9X) が同定された(図 2)。

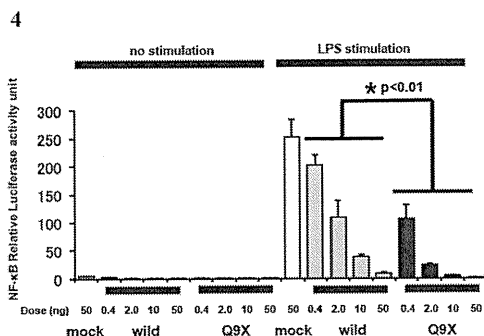


3. 患者 PBMC 由来 I $\kappa$ B $\alpha$  は、健常者の I $\kappa$ B $\alpha$  より分子量が小さく同定され(図 3A)、HEK293 細胞株で発現させた変異

IκBαも同様のパターンを示した(図3B)。



4. IκBα-Q9Xは、野生型 IκBαよりも有意に強く LPS 刺激後の NF-κB 活性の上昇を抑制した(図4)。



#### D. 考察

IKBA-Q9X変異は、IκBαの翻訳開始コードンの冒頭で終止コドンが生じるため、その次の開始コドンから翻訳が再開され、N末端が欠失した変異 IκBαが発現する。IκBαはN末端にセリンリン酸化部位及びユビキチン化部位が存在し、上流からのシグナルによって分解され NF-κB を活性化型に変換するため、N末端が欠失した変異 IκBαは分解されず NF-κB を抑制し続ける。従って Q9X 変異は、病的意義のある遺伝子変異と考えられた。また常染色体優生遺伝外胚葉形成不全免疫不全症(AD-EDA-ID)の診断スクリーニングとしても IRAK4 欠損症の迅速診断法とし

て提案されたフローサイトメーターを利用した手法が有用であった。

#### E. 結論

新規変異を有する IKBA 異常症を自然免疫系のスクリーニング法を利用して診断することが可能であった。変異 IκBα の *in vitro* 機能評価法が確立された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表

- Ozeki M, Fukao T, Kondo N. Propranolol for intractable diffuse lymphangiomatosis. *N Engl J Med*. 364:1380-1382. 2011
- Uchida Y, Morita H, Adachi S, Asano T, Taga T, Kondo N. Bacterial meningitis and septicemia of neonate due to *Lactococcus lactis*. *Pediatr Int*. 53:119-120. 2011
- Kato Z, Manabe T, Teramoto T, Kondo N. Adenovirus infection mimics the cerebellitis caused by rotavirus infection. *Eur J Pediatr*. 170:405-406. 2011
- An Y, Ohnishi H, Matsui E, Funato M, Kato Z, Teramoto T, Kaneko H, Kimura T, Kubota K, Kasahara K, Kondo N. Genetic variations in MyD88 adaptor-like are associated with atopic dermatitis. *Int J Mol Med*. 27:795-801. 2011
- Kaneko H, Fukao T, Kasahara K, Yamada T, Kondo N. Augmented cell death with Bloom syndrome helicase deficiency. *Mol Med Rep*. 40:607-609. 2011
- Nishimuta T, Kondo N, Hamasaki Y,

- Morikawa A, Nishima S. Japanese guideline for childhood asthma. *Allergol Int.* 60:147-169. 2011
7. Katayama I, Kohno Y, Akiyama K, Ikezawa Z, Kondo N, Tamaki K, Kouro O. Japanese guideline for atopic dermatitis. *Allergol Int.* 60:205-220. 2011
  8. Urisu A, Ebisawa M, Mukoyama T, Morikawa A, Kondo N. Japanese guideline for food allergy. *Allergol Int.* 60:221-236. 2011
  9. Kato H, Kanematsu M, Orii K, Morimoto M, Kato Z, Kondo N. Apparition of iodinated contrast agents in the twin neonatal gastrointestinal tracts after maternal contrast-enhanced CT. *Jpn J Radiol.* 29:521-523. 2011
  10. Funato M, Fukao T, Sasai H, Hori T, Terazawa D, Kubota K, Ozeki M, Orii K, Kaneko H, Kondo N. Successful treatment of pediatric immune thrombocytopenic purpura associated with ulcerative colitis. *Pediatr Int.* 53:771-773. 2011
  11. Funato M, Kaneko H, Kubota K, Ozeki M, Kanda K, Orii K, Kato Z, Fukao T, Kondo N. Pediatric acute lymphoblastic leukemia mimicking Henoch-Schönlein purpura. *Pediatr Int.* 53:766-768. 2011
  12. Funato M, Kaneko H, Ohkusu K, Sasai H, Kubota K, Ohnishi H, Kato Z, Fukao T, Kondo N. Refractory chronic pleurisy caused by *Helicobacter equorum*-like bacterium in a patient with X-linked agammaglobulinemia. *J Clin Microbiol.* 49:3432-3435. 2011
  13. Fukao T, Sass JO, Kursula P, Thimm E, Wendel U, Ficicioglu C, Monastiri K, Guffon N, Barić I, Zobot MT, Kondo N. Clinical and molecular characterization of five patients with succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) deficiency. *BBA-Mol Basis Dis.* 1812:619-624. 2011
  14. Kato Z, Kondo N, Kato H, Morita H, Teramoto T, Miyamoto K, Shimizu K. Selective pontine hypoplasia: a possible common feature in 5p monosomy syndrome. *Brain Dev.* 33:702-703. 2011
  15. Morita H, Kaneko H, Ohnishi H, Kato Z, Kubota K, Yamamoto T, Matsui E, Teramoto T, Fukao T, Kasahara K, Kondo N. Structural property of soybean protein P34 and specific IgE response to recombinant P34 in patients with soybean allergy. *Int J Mol Med.* 29:153-158. 2011
  16. Morita H, Kaneko H, Ohnishi H, Kato Z, Kondo N. Antigen-specific immune response to endotoxin-free recombinant P34. *Allergy.* 66:985-986. 2011
  17. Terada T, Nunomura S, Shimokawa T, Murayama K, Era S, Kondo N, Ra C. FCεRI-induced mast cell cytokine production critically involves an aspartic acid residue (D234) in the C-terminal intracellular domain of the FcεRIβchain. *BBRC.* 744-748. 2011
  18. Kato H, Kanematsu M, Kato Z, Teramoto T, Kondo N, Hirose Y, Hoshi H. MR imaging findings of cervical lymphadenopathy in patients with Kikuchi disease. *Eur J Radiol.* 80:e576-e581. 2011
  19. Kato Z, Sasai H, Funato M, Asano T,

- Kondo N. Acute cerebellitis associated with rotavirus infection. World J Pediatr. (in press)
20. Omoya K, Naiki Y, Kato Z, Yoshioka S, Uchida Y, Taga T, Aoki Y, Deguchi H, Kondo N. Sweet's syndrome in a neonate with non-B54 types of human leukocyte antigen. World J Pediatr. (in press)
21. Ohnishi H, Miyata R, Suzuki T, Nose T, Kubota K, Kato Z, Kaneko H, Kondo N. A rapid screening method to detect autosomal-dominant ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome. J Allergy Clin Immunol. (in press)
22. Ohnishi H, Teramoto T, Iwata H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Nishikomori R, Kaneko H, Seishima M, Kondo N. Characterization of NLRP3 Variants in Japanese Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome Patients. J Clin Immunol. (in press)
- 大会(平成 23 年 11 月, 東京, ミニシンポジウム 10(平成 23 年 11 月, 「サイトカイン・ケモカイン(MS10-4): インターロイキン 18 シグナル伝達経路の分子生物学的解析」 演者)
3. Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiriology and Immunology 2011 (APAPARI 2011) 48th Annual Meeting of Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology (48th JSPACI) (2011.10, Fukuoka, Symposium: Gene polymorphisms in innate immune signaling pathways associated with allergic disease; 演者)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

#### 学会発表

1. Joint Congress of Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiriology and Immunology 2011 (APAPARI 2011) and 48th Annual Meeting of Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology (48th JSPACI) (2011. 10, Fukuoka, Joint Symposium: Proteomics analysis for genetic polymorphisms associated with allergy; 演者)
2. 第 61 回日本アレルギー学会秋季学術

## C3 欠損症における遺伝子変異と臨床像の関連の検討

大倉 有加 (北海道大学大学院医学研究科小児科学)  
山崎 康博 (北海道大学大学院医学研究科小児科学)  
山田 雅文 (北海道大学大学院医学研究科小児科学)  
竹崎俊一郎 (北海道大学大学院医学研究科小児科学)  
小林 一郎 (北海道大学大学院医学研究科小児科学)  
有賀 正 (北海道大学大学院医学研究科小児科学)

### 研究要旨

C3 欠損症は常染色体劣性遺伝形式をとる非常に稀な疾患である。本症は易感染性と免疫複合体病の両者の病態が認められるとされているが、症状は一樣ではなく、その遺伝子型と表現型の関係も明らかではなかった。今回、当科における自験例 3 家系を含めた報告例 27 家系における C3 欠損症の臨床像と遺伝子変異を解析しその関連について検討した。その結果、臨床像は大きく①重症感染症、②SLE または SLE 様症状、③腎症状に分類された。また両アリの遺伝子変異が同定されている 11 家系の検討により、 $\beta$ 鎖上および $\alpha$ 鎖の TED ドメインよりも N 末端側に変異を有する症例は全て易感染性を主症状としているのに対し、 $\alpha$ 鎖上の TED ドメインないしそれよりも C 末端側に変異を有する症例は SLE、SLE 様症状ないし腎炎を主症状とすることが明らかとなり、遺伝子型と表現型に相関があることが示された。変異の種類はすべてナンセンス変異あるいはフレームシフト変異を来すものであることより、TED ドメインより N 末側の変異では蛋白発現の欠損につながるが、TED ドメインないしそれより C 末側の変異では変異 C3 蛋白は産生され、感染防御機能は残存しているものの自己免疫疾患の発症のリスクとなる可能性が示唆された。

### A. 研究の目的

補体系は 30 種以上の血清遊離蛋白、膜蛋白からなり、自然免疫の一部として重要な役割を果たしている。補体系には古典経路、第二経路、レクチン経路の 3 つの独立した活性化経路を有する。それぞれの経路の機能は C3 を活性化することに集約され、C3 は補体活性化の中心的役割を果たしている。C3 遺伝子は 41exon からなり、exon1 から exon16 は 645 アミノ酸からなる $\beta$ 鎖、exon16 から exon41 は 991 アミノ酸からなる $\alpha$ 鎖をコードしている。C3 は図 1 で示す anaphylatoxin (ANA) ドメイン、link (LNK) ドメイン、macroglobulin ドメイン (MG1-8)、CUB ドメイン、TED ドメイン、C345C ドメイン

の 13 のドメインから構成されている。

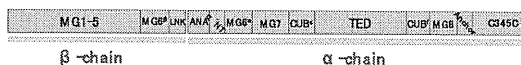


図 1 C3 遺伝子のドメイン

C3 欠損症は常染色体劣性遺伝形式をとる非常にまれな疾患であり、易感染性と免疫複合体病両者の病態が認められるとされているが、症状は必ずしも一樣ではなく、遺伝子型と表現型の関係も明らかではなかった。今回、当科における自験例 3 家系を含めた報告例 27 家系における C3 欠損症の臨床像と遺伝子変異を解析し、その関連について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 当科における解析症例

当科へ遺伝子検査を依頼された C3 欠損症 3 症例に関しては遺伝子解析結果を既に報告しており、臨床像に関する後方視的解析を行った。

2. C3 欠損症の既報告例の検索は PubMed、医学中央雑誌より 2011 年 12 月までに発行された英語または日本語の論文を抽出し、原著より遺伝子変異と臨床症状に関する情報を得た。

## C. 研究結果

### 1. 自験例 3 例の臨床像

自験例 1 現在 15 才の男児で両親に血縁関係がある。7 才時に初めて血尿を指摘され、C3 欠損症であることがわかった<sup>1</sup>。血尿は自然に軽快したが、14 才時より血尿、蛋白尿を認め現在も加療中である。易感染性は認められていない。

自験例 2 現在 6 才の男児で両親に血縁関係はない。乳児期より易感染性があり C3 欠損症であることがわかった<sup>2</sup>。4 才時より discoid lupus erythematosus が出現、以後口腔内潰瘍、抗核抗体が陽性、ループス腎炎の所見を認め SLE の診断となった。

自験例 3 現在 7 才の男児で両親に血縁関係はない。2 才より易感染性を認め C3 欠損症であることがわかった<sup>3</sup>。6 才より膝滑膜炎の所見を認め現在加療中である。

### 2. 自験例 3 例の遺伝子解析の結果

自験例 1 では、C3 遺伝子に 3736\_3737del (F1246X) のホモの変異を認め、両親は同変異のヘテロ接合体であった。自験例 2 は 3116dupT (L1039fs)、C3243G (Y1081X) のコンパウンドヘテロ変異を認め、前者は父由来、後者は母由来であった。自験例 3 におい

ては、C3 遺伝子の exon12 に 1432C>T (R478X)、IVS9 -2 a>t の塩基置換を認めた。前者は母由来、後者は父由来であった。cDNA の解析結果より IVS9 -2 a>t は exon10 の 5'側の 4 塩基のスキップを生じることが示され、これによりフレームシフトにより 14 コドン下流に早期終止コドンを形成することが予測された。

3. 自験例を含む報告例の臨床像のまとめ  
世界中から 27 家系 35 症例の報告がある。そのうち日本からの報告は自験例の 3 家系を含む 6 家系(8 症例)ある。診断時の年齢は 10 ヶ月から 26 才と幅があり、12 家系は血族婚であるが、9 家系では血縁はなく、6 家系は不明である。2 家系(2 症例)で死亡例があり、11 家系は家族歴に本疾患を疑わせる死亡者(16 人)を有する。これらの C3 欠損症の臨床像は下記のようにまとめることができる。

#### ① 重症感染症

髄膜炎、菌血症、骨髄炎、関節炎、腹膜炎、軟部組織膿瘍、肺炎、中耳炎、扁桃炎、腸炎、尿路感染症といった様々な感染症を認めている。15 症例で髄膜炎の既往があり、1 症例では最大 6 回の既往を有していた。起因菌は *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* が多くを占める。3 家系 4 症例(11.4%)で重症感染症の既往を認めていない。7 症例において、感染時に一時的に皮疹を伴っている。紅色の斑丘疹を認めることが多く(4 症例)、そのほか紫斑(2 症例)、多形紅斑(1 症例)を認めている。

#### ② SLE または SLE 様症状

3 家系 3 人で SLE (ACR の診断基準 11 項目のうち 4 項目を満たす)、1 家系 2 人で SLE 様症状、1 家系 1 人で subacute lupus erythematosus を呈している。ANA は弱陽



性であることが特徴である。

### ③ 腎症状

7家系9人で血尿、蛋白尿といった腎症状を認めている。重症度は様々であり無治療で軽快したものから腎移植を行った症例も存在する。5人で病理組織学的な診断が行われている。膜性増殖性糸球体腎炎1型(MPGN1型)が2人、メサングウム増殖性糸球体腎炎が2人(このうち1人はIgA腎症)、ループス腎炎(WHO分類 Class IIIA)が1人である。

### 4. C3 遺伝子変異分析

分子遺伝学的解析が施行されているのは自験例を含め14家系で、そのうち両アレルの遺伝子変異が同定できている症例は11家系であった。自験例2と3の症例はコンパウンドヘテロ変異であったが、それ以外の症例はすべてホモ変異であった。C3 遺伝子変異の種類はナンセンス変異、large deletion、スプライシング異常や1塩基挿入や1~2塩基欠損などによりフレームシフト変異を来す変異があった。ミスセンス変異も2家系で認められたが、いずれも片方のアレルのみの解析しか行われていない。遺伝子変異の分布を図2に示す。

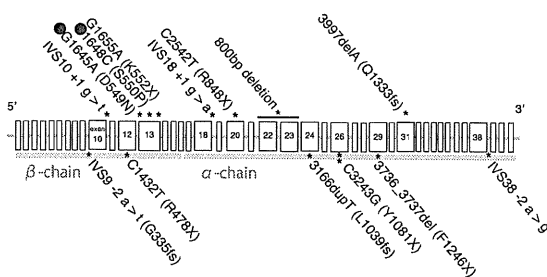


図2 C3 遺伝子変異の分布

□は exon を示す。下段は日本人、上段は日本人以外の変異の位置を\*で示す。●は片方のアレルのみの解析がされている症例。

C3243G (Y1081X)は自験例2とSLE様の症状を呈した日本人症例の2家系で認めているが、その他の変異に関しては明らかな集積は認められていない。

### 5. 遺伝子型-表現型相関

C3 遺伝子変異と対応するドメインを図3に示す。

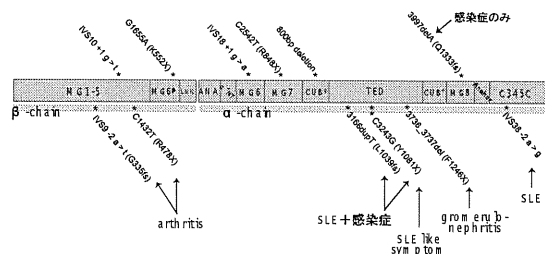


図3 C3 遺伝子変異とドメインの位置関係

変異がβ鎖上またはα鎖のTEDドメインよりもN末端側に存在する症例は全て易感染性を主症状としているのに対し、変異がα鎖上のTEDドメインないしそれよりもC末端側に存在する症例は3997delAのホモ接合体の1症例を除きSLE、SLE様症状、または腎炎を認めている。

### D. 考察

C3 欠損症の臨床像は大きく①重症感染症、②SLE または SLE 様症状、③腎症状に分類された。また遺伝子型と表現型の相関の検討により C3 欠損症の臨床像は、易感染性が主症状となる症例と、易感染性はほとんど問題にはならないが、自己免疫疾患が主症状となる症例に大きく二分されることが明らかとなった。このことより変異 C3 蛋白は検査上では検出されないが、一部の症例では存在している可能性が考えられた。変異の種類はすべてナンセンス変異かフレームシフト変異を来すものであることより、TED ドメインより N 末側の変異では蛋白発現の欠損につながるが、C 末側の変異では変異 C3 蛋白は産生され、感染防御機能は残存しているもの

の自己免疫疾患の発症のリスクがあることが示唆された。

補体欠損症では免疫複合体の除去の低下により免疫複合体病と言われる自己免疫疾患を起こすと考えられている。免疫複合体の除去には特に C3b が重要な分子であることが知られている。C3 は細菌などの異物上で活性化され(図 4)、C3b により共有結合で被覆された異物は貪食されるが、その後分解作用を受け、C3dg、C3d が異物に結合した状態で残ることになる。C3d は TED ドメインに相当する。

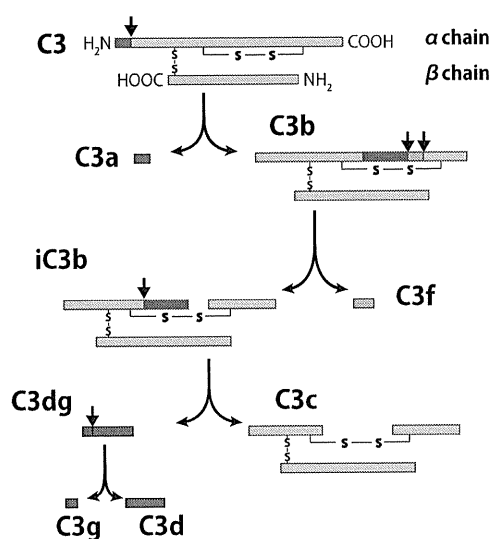


図 4 C3 の活性化と分解過程

C3 は C3 転換酵素により C3a と C3b に分解される。C3b は I 因子 + cofactor により分解され iC3b + C3f に、更に iC3b は C3c と C3dg に分解される。C3dg はトリプシンなどにより C3d + C3g に分解される。

B 細胞、濾胞樹状細胞に存在する complement receptor 2 (CR2) は C3dg、C3d をリガンドとし、抗体産生を促進すると同時に self tolerance の維持にも関与していると言われている。CR2 の SNP と SLE 感受性の関係の報告があることより、C3d-CR2 interaction の破綻が自己免疫疾患発症との

関係が考えられる。atypical hemolytic uremic syndrome と C3 遺伝子変異の報告は、多くはミスセンス変異で TED ドメイン上に集中していることも C3d-CR2 interaction の重要性を示唆する。ナンセンス変異、フレームシフト変異を有する C3 欠損症はいずれも intact な C3d を産生できないことが予想されるため自己免疫疾患発症のリスクがあるが、N 末側に変異を有する症例は重症感染症の存在により自己免疫疾患がマスクされている可能性が考えられる。重症感染症が致死的にならなかった症例では、年齢とともに自己免疫疾患を発症することも考えられる。

## E. 結論

C3 欠損症の遺伝子変異と臨床像には相関があることが示された。また、C3 欠損症の臨床像は一樣ではなく、実際には変異 C3 分子の一部は存在し、何らかの感染防御に寄与している可能性が示唆された。

## F. 研究危険情報

特になし

## G. 研究発表

学会発表

大倉有加、山崎康博、竹崎俊一郎、山田雅文、小林一郎、佐々木聡、山田 豊、神岡一郎、高橋 豊、有賀 正、第 61 回日本アレルギー学会秋期学術大会 2011 年 11 月 10~12 日 東京

論文作成中

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 参考文献

1. Fujioka, H. *et al.* A case of C3 deficiency with a novel homozygous two-base deletion in the C3 gene. *Am*

*J Med Genet A* 138, 399-400 (2005).

2. Kida, M. *et al.* The first confirmed case with C3 deficiency caused by compound heterozygous mutations in the C3 gene; a new aspect of pathogenesis for C3 deficiency. *Blood Cells Mol Dis* 40, 410-3 (2008).
3. Okura, Y. *et al.* Novel compound heterozygous mutations in the C3 gene: hereditary C3 deficiency. *Pediatrics international* 53, e16-9 (2011).

## 次世代シーケンサーを用いた NLRP3 体細胞モザイクの診断の実用

平家 俊男 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)  
西小森隆太 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)  
小原 収 (かずさ DNA 研究所ヒトゲノム研究部)  
土方 敦司 (理化学研究所横浜研究所)  
井澤 和司 (京都大学大学院医学研究科発達小児科学)

### 研究要旨

CINCA 症候群は NLRP3 インフラマゾームの異常活性化による IL-18 過剰産生に伴い全身炎症を生じる自己炎症疾患である。我々は本邦において NLRP3 体細胞モザイクによる CINCA 症候群を報告してきたが、サブクローニング法をもちいたサンガー法によるシーケンスには多大な時間と労力を要する。そのため、次世代シーケンサーを用いた NLRP3 体細胞モザイクの迅速診断を試みた。正常人 50 人での遺伝子解析結果をもとに、シーケンスエラーとモザイクを区別するパイプラインを作成した。NLRP3 ヘテロ変異を有するゲノム DNA と健常人のゲノム DNA による混合試験を行い、アリル頻度 1% の NLRP3 変異まで検出可能であった。また実際に、変異陰性の新規 CINCA 症候群 10 人中 4 人において NLRP3 体細胞モザイク可能であった。

### A. 研究目的

CINCA 症候群は、自然免疫に関わる NLRP3 遺伝子の機能獲得型変異によって発症する自己炎症性疾患である。常染色体優性遺伝形式で発症する以外に、NLRP3 体細胞モザイクで発症することを報告してきた。解析においてはサブクローニング法、サンガー法を用いたが、多大な時間と労力を要するため、より簡便な解析方法が望まれる。我々は次世代シーケンサーを用いて、NLRP3 体細胞モザイク症例をより簡便な方法で診断する方法を検討した。

### B. 研究方法

全血/PBMC より抽出された DNA 検体を用いて NLRP3 遺伝子翻訳領域及びそのエクソン-イントロン接合部位を、14 アンプリコンにわけ、2 段階の PCR 法で増幅、患者タグをつけた後、次世代シーケンサー (Roche 454 Genome Sequencer FLX) を用いてそれぞれ 500 リード以上を解析した。正常人 50 人での遺伝子解析結果をもとに、シーケンスエラ

ーとモザイクを区別するパイプラインを作成した。そのパイプラインを用いて、どの程度までの NLRP3 体細胞モザイクが検出可能かを検討するため、NLRP3 ヘテロ変異を有するゲノム DNA と健常人のゲノム DNA による混合試験を行った。NLRP3 ヘテロ変異を有するゲノム DNA は 3 種類の異なる変異を用いた。また、ダイレクトシーケンスにて変異陰性の新規 CINCA 症候群 10 人のゲノム DNA を用いて NLRP3 体細胞モザイクの検出を試みた。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析を行うにあたり、京都大学医学部医の倫理委員会に、“ヒト原発性免疫不全症の臨床的遺伝子診断”の申請を行い、承認を得ている (G-32)。その内容を忠実に順守して研究を行っている。

### C. 研究結果

いずれの変異をもちいたゲノム DNA 混合試験においても、アリル頻度で 1% の変異まで検出可能であった。また、ダイレクトシー