

201128252A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大西秀典

平成24(2012)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
IRAK4 欠損症全国症例調査二次調査票
自然免疫不全症の簡易診断フローチャート (改定版)

II. 分担研究報告

1. IRAK4欠損症及びMyD88欠損症の全国症例調査 (二次調査) 結果について

分担研究者: 大西秀典 13

2. Myddosome異常症で同定されるIRAK4及びMyD88遺伝子型の*in vitro*
機能解析法の確立

分担研究者: 大西秀典 17

3. 新規に同定された常染色体優性遺伝無汗性外胚葉形成不全免疫不全症
(AD-EDA-ID) 症例におけるIKBA遺伝子型の機能解析について

分担研究者: 大西秀典 22

4. IRAK4欠損症の病態解析に向けたサイトカイン・プロフィール解析

分担研究者: 谷内江昭宏 26

5. 肺炎球菌反復感染症例における血清中特異抗体測定の意義

分担研究者: 大石和徳 28

6. 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 34

7. TREX1の精製とexonuclease活性測定に関する研究

分担研究者: 西小森隆太 38

8. 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 40

9. IRAK4と関連する分子群の相互作用解析について

分担研究者: 加藤善一郎 41

III. 研究成果の刊行に関する一覧 45

IV. 研究成果の刊行物・別冊 53

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 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 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。平成 22 年度に行った国内での IRAK4 欠損症及び MyD88 欠損症患者発生の実態調査に基づき、国内での発生症例について二次調査を行った。国内の IRAK4 欠損症患者発生数は、2011 年度時点で 7 名であり、うち 4 名が重症感染症で死亡していた。生存例の 3 名は、肺炎球菌ワクチンの複数回接種を抗体価の推移をモニタリングしながら施行されており、抗生剤の予防投与との組み合わせにより、感染罹患に対して効果的に対処されていた。興味深いことに、IRAK4 欠損症の生存症例のうち、肺炎球菌莢膜特異抗体価の部分低下が認められた。また、フローサイトメーターを利用した自然免疫異常症の迅速診断スクリーニング法の運用、及び最適化の過程で、他の原発性免疫不全症の診断に至る例が複数存在し、それら疾患群(特に IKBA 異常症、TREX1 異常症等)についても病因病態解析を行った。

一方、遺伝子診断の後、確定診断を行う手法の開発を行っている。IRAK4 欠損症及び MyD88 欠損症の病因の本質は、Toll 様受容体(TLR)シグナル伝達経路において、MyD88 を中心とした高次複合体(Myddosome)の形成障害であることを報告したが、それぞれの遺伝子型に対応した、*in vitro* の病的意義判定方法が確立していなかった。本研究では、培養細胞(HEK293 細胞)を用いた Cell biology の手法と、リコンビナントタンパクを用いた Proteomics の手法を組み合わせ、*in vitro* の機能判定法の検討を進めた。

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

大石和徳 大阪大学・微生物病研究所 特任教授

加藤善一郎 岐阜大学・医学部附属病院・小児科 臨床教授

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

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。

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異常症患者の症例数等の実態が不明であったため、平成 22 年度に全国症例調査を行った結果、国内での IRAK4 欠損症患者は 7 名と報告されている。また、MyD88 欠損症患者の発生報告はない。7 名の IRAK4 欠損症患者の担当医宛に、二次調査票を郵送し、解答を得た(資料 2)。

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

2. 自然免疫異常症が疑われ、診断依頼があった患者検体について、資料3のフローサイトに基づき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。さらにこの手法の所用時間短縮方法、UNC93B1欠損症のスクリーニング法についても検討した。

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異常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. pcDNA系、pGEX系発現ベクターにIRAK4、MyD88等の遺伝子を組み込み、それぞれの遺伝子変異型を導入したものを構築した。

5. 大腸菌BL21(DE3)、HEK293細胞にそれぞれの発現ベクターを形質転換し、タンパクを発現させた。

6. 種々のタンパク間相互作用(溶液NMR法、液体クロマトグラフィー法、GSTプルダウン法等)、Westernblot法によるタンパク発現量の比較、Luciferase reporter gene assay法によるNF- κ B活性の比較を行った。

7. 小児のIPDおよび再発性肺炎症例より血清サンプルを採取し、血清中血清型特異IgG濃度は第3世代ELISA法を用い、血清OPA titerはmultiplex opsonophagocytic assay (MOPA)法により測定した。ELISAで測定する血清型はPCV7に含有される7血清型(4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F)とし、OPA titerはこの7価に加え血清型6Cを測定した。測定結果はそれぞれ特異IgG(μ g/ml)、OPA titerとして表した。

8. 細菌性髄膜炎のほか、熱性痙攣、痙攣重積型脳症(AESD)、急性散在性脳脊髄炎(ADEM)などの中枢神経疾患を対象とした。患者髄液中の炎症性サイトカイン(IL-6、neopterin、sTNF-RI、sTNF-RII)と軸索損傷マーカーであるタウ蛋白について、ELISA法により定量した。

9. 正常TREX1cDNAから、HaloTag® system (Promega)を用いて正常TREX1ホモダイマー蛋白を作成した。その後TREX1蛋白と、5'側を蛍光標識した30-mer oligo ssDNAとを30分反応させ蛍光イメージアナライザーで解

析した(ssDNA exonuclease assay)。

(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. IRAK4欠損症患者について行った二次調査票では、主に臨床経過、主要症状(特に臍帯脱落までの期間、感染症罹患頻度)、感染症罹患がある場合起因菌、免疫機能プロファイル、ワクチン接種状況、治療状況、生存状況、遺伝子診断について聴取した。結果、IRAK4欠損症患者7名中4名がすでに死亡しており、3名が生存していた。IRAK4の遺伝子型は6例が(c.118insA)のホモ接合性変異で、1例は(c.118insA)と(R183X)のコンパウンドヘテロ接合性変異であった。主要な感染症罹患歴として、肺炎球菌化膿性髄膜炎、緑膿菌肝膿瘍、ブドウ球菌皮下膿瘍、緑膿菌壊死性筋膜炎が挙げられ、死亡例はそのいずれかによって致命的となっていた。また、生存例では幼児期に繰り返しマイコプラズマ肺炎に罹患しており、この点も留意が必要かもしれない。臨床的な特徴として臍帯脱落遅延があり、7名中6名で生後2週間以上の遅延を認めている。従来から白血球接着不全症においても臍帯脱落遅延が特徴的な症状として挙げられているが、本症例でも特徴的な所見であるといえる。検査データでは、致命的細菌感染症への罹患であることに比して、CRP頂値の上昇が緩やかな症例が2例(CRP peak: 2.29, 1.05 mg/dl)と、十分上昇が確認された症例が3例(CRP peak: 20.64, 17.64, 16.0 mg/dl)が認められた。また、肺炎球菌化膿性髄膜炎罹患症例では、致命的な程重篤であるにも関わらず、髄液細胞数の上昇が少ない(203, 2, 64 / μ l)ことが多々あることが判明した。IRAK4欠損症症例7名全例で、血球分画や免

疫グロブリン値に明らかな異常を認めていない。生存例3例のうち2例では、兄弟がIRAK4欠損症に合併した肺炎球菌化膿性髄膜炎で死亡したため、早期に診断されており、生後1歳まではγグロブリン製剤の補充療法を施行し、7価肺炎球菌ワクチン(PCV7)を抗体価の推移を追跡しながら3回接種、及び23価肺炎球菌ワクチン(PPV23)を1回接種していた。残る1例でも同様に7価肺炎球菌ワクチンを3回、23価肺炎球菌ワクチンを1回接種していた。尚、3例とも肺炎球菌特異的IgG2抗体価の上昇が確認されている。興味深いことに、PCV7の3回接種、PPV23の1回接種後にも関わらず、1症例で血清型23F特異的特異IgG濃度が0.20 μg/ml未満であった。それ以外は、いずれの血清型でも0.20 μg/ml以上であった。IRAK4欠損症においても肺炎球菌ワクチン接種後のある程度の免疫応答の可能性が期待される。ワクチンによる予防療法に加えて、ST合剤及びペニシリン製剤、あるいはST合剤単独の予防投与が行われており、感染罹患時に早めの抗生剤投与(静注)を行うことで重篤な感染症への罹患を免れており、現在の感染症罹患頻度は年2-4回程度である。

2. IRAK4欠損症症例は、重症感染症が発症する前に前述のような治療法で適切に予防を講じることが必要であるが、何よりも患者を発症前に診断することが重要である。本研究班では、特にTLRシグナルに関連する自然免疫異常症全般の迅速診断スクリーニング法の開発を進めている。フローサイトメーターを利用した患者末梢血のLPS刺激後単球内TNF-α陽性率の検討法は、平成22年度に報告した通り、IRAK4欠損症、MyD88欠損症のみならず無汗性外胚葉形成不全免疫不全症(NEMO異常症、IKBA異常症)の診断にも有効であるが、検査時にステロイド剤等免疫抑制療法の使用の影響を受けるため留意が必要である。また、これまでに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、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欠損症しかない。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-α産生細胞の割合を検討したところ、健常者末梢血をssRNAで刺激した場合、ssRNAが10⁶・g/mlの濃度で、TNF-α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。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。

3. IRAK4欠損症は、肺炎球菌化膿性髄膜炎で発症する頻度が高い。致命的な重症感染症の発症前もしくは発症早期にIRAK4欠損症の可能性を疑い、早期診断を行うための指標を確立するため、小児期-成人期における多様な中枢神経疾患における髄液サイトカイン・プロファイルの解析を行った。その結果、細菌性髄膜炎では、タウ蛋白を除く全てのサイトカインが高値を示したが、特にIL-6は著しい高値を示した。一方、熱性痙攣では、いずれのサイトカイン、タウ蛋白とも上昇は認められなかった。AESDでは、neopterinとタウ蛋白の上昇が特徴的であった。ADEMでは、neopterinの異常高値が認められたが、他の炎症性サイトカインは軽度の上昇までに留まることが多かった。IRAK4欠損症では、in vivoでのIL-6/TNF-α産生が障害されている可能性があり、特に肺炎球菌性髄膜炎においては髄液サイトカイン産生が抑制されていることが予想される。このようなプロファイルは、通常の細菌性髄膜炎とは異なるためIRAK4欠損症診断の契機となる可能性が考えられた。

4. MyD88、IRAK4分子は、それぞれ機能性ドメインを複数有する細胞内タンパクである。それぞれのドメインの機能に焦点を当てたin vitro機能解析系の構築を試みた。MyD88のデスドメイン(DD)上の変異では培養細胞上でのタンパク発現実験、培養細胞への一過性発現によるNF-κB活性の比較、タンパク間相互作用(液体クロマトグラフィー、溶液NMR滴定実験)の検討が有用であった。TIRドメイン上の変異では、培養細胞上でのタンパク発現実験、培養細胞への一過性発現によるNF-κB活性の比較(リガンド刺激後のTIRドメインによる優性抑制効果の比較も有用)、タンパク間相互作用(GSTプルダウン法、溶液NMR滴定実験)の検討が有用であった。一方、IRAK4では、本来IRAK4はTLRやIL-1/18シグナルにおいて炎症反応産生誘導に必須な分子であるはずが、HEK293T細胞上に一過性発現した場合、IL-1受容体の2量体化によるNF-κB転写活性誘導を抑制するという一見矛盾した反応が生じた。その上で、IRAK4 Kinaseドメイン上の変異やDD上のフレームシフトによる早期終止コドン発生型変異について、タンパク発現が低下するvariantの場合、

HEK293 細胞への一過性発現による NF- κ B 活性の比較が有用であったが、DD 上のミスセンス変異(R12C)では発現量、NF- κ B 活性ともに野生型との差異が確認できない。しかし、平成 22 年度に本研究班で報告した通り、IRAK4-DD と MyD88-DD のタンパク間相互作用は、R12C 変異導入により減弱するため、現時点では IRAK4 遺伝子変異型の機能評価には、培養細胞を用いた手法とタンパク間相互作用の手法を組み合わせる必要がある。

5. TIRドメイン含有アダプター分子群のうち、従来シグナル伝達アダプター分子であるMyD88、TRIFは、膜誘導アダプター分子であるMal、TRAMとそれぞれ相互作用することが知られており、MyD88とTRAMは相互作用しない組み合わせと考えられていたが、本研究によりMyD88-TRAM間の相互作用が可能であることが明らかとなった。またその生物学的位置づけは、IL-18シグナル伝達においてシグナル伝達アダプターであるMyD88を、TRAMが効率的に細胞膜上のIL-18受容体に誘導することである。MyD88とTRAMの相互作用点は、MyD88-Malと重複する。すなわち、MyD88欠損症でみられるTIRドメイン上の変異は、TLR4-Mal-MyD88の複合体形成を阻害するだけでなく、IL-18R-TRAM-MyD88の複合体形成も阻害することになり、IL-18によるTh1反応の誘導も減弱すると考えられる。

6. 類縁疾患の解析として、IKBA異常症、TREX1異常症の*in vitro*解析を行った。HEK293hTLR4-MD2-CD14細胞にpcDNA-IKBA-FLAG(野生型、変異型)を発現させ、LPS刺激後のNF- κ B活性をLuciferase reporter gene assay法で測定する系は、IKBA遺伝子変異の機能評価に有用である。TREX1はダイマー形成することが知られ、正常TREX1ホモダイマーを作成し、TREX1蛋白の3'→5' exonuclease活性を、ssDNAを用いて測定する系を構築した。

D. 考察

国内におけるIRAK4欠損症の二次症例調査により、患者は肺炎球菌髄膜炎や緑膿菌感染等の侵襲性感染症により高率に致死性的であることが判明した。また、患者血液の一般的な免疫プロファイルには異常がみられず、免疫不全症の一次診断から漏れうるものが推察され

る。さらに化膿性髄膜炎等の重症感染症に罹患しているにも関わらず、血清CRPや髄液細胞数の上昇が緩やかな症例が認められた。

いずれにしても早期診断が必須であり、臍帯脱落遅延はIRAK4欠損症の有力な早期発見の指標と考えられる。また易感染性を認めた場合、積極的にフローサイトメーターを使用した患者迅速診断スクリーニングを行うことが不可欠であると考えられる。その次のステップとして、*In vitro*の機能解析系の確立は、患者の確定診断のために必要である。

IRAK4欠損症及びMyD88欠損症の全世界症例調査により、年長児での致死的重症感染症への罹患頻度が減じることが明らかになっており、乳幼児期の適切な感染予防が本疾患の治療に必要である。国内の生存症例では、抗生剤予防投与及び肺炎球菌ワクチンの接種により効果的に感染予防が実行されていた。生存例はいずれも肺炎球菌特異IgG2抗体価がモニタリングされており、ワクチン接種後に抗体価の上昇が確認されているが、経時的に低下がみられている。また、一部の肺炎球菌荚膜特異抗原において抗体価の上昇がみられない型もあり、PCV7接種に過信はできないようである。

E. 結論

IRAK4 欠損症及び MyD88 欠損症を中心とした TLR シグナル伝達に関連する自然免疫異常症全般の診断スクリーニング、遺伝子診断、*in vitro* 機能解析法の確立を進めている。これらの手法を用いて適切に患者を早期診断することで、有効な治療法を行うことができる。特に、抗生剤の予防投与に加え、7 価肺炎球菌ワクチンの複数回接種と肺炎球菌特異抗体価の経時的モニタリングが患者の重症感染症罹患予防に、非常に有効であることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Ohnishi H, 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. 2011 Dec 24.

2: 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. 2011 Nov 10.

3: 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. 2011 Sep;49(9):3432-5.

2. 学会発表

1: Ohnishi H: Gene polymorphisms in innate immune signaling pathways associated with allergic disease (Symposium). 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) 2011.10.28-30, Fukuoka,

2: 大西秀典、加藤善一郎、金子英雄、近藤直実、宮田理英、鈴木智典、能勢統一郎:フローサイトメーターによるスクリーニング法で診断された新規遺伝子変異を有する $I\kappa B\alpha$ 欠損症の1男児例 春期日本アレルギー学会(第23回) 2011年5月14-15日 千葉

3: 大西秀典:自然免疫不全症の病態解明と診断手順について(特別講演) 第6回岐阜小児アレルギー・喘息研究会 平成23年6月2日 岐阜

4: 大西秀典、加藤善一郎、安陽、松井永子、木村豪、名田匡利、久保田一生、山本崇裕、金子英雄、近藤直実:自然免疫不全症の構造生物学的病態解析 日本小児科学会(第114回) 2011年8月12-14日 東京

5: 大西秀典、加藤善一郎、近藤直実: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(ミニシンポジ

ウム) 日本アレルギー学会秋季学術大会(第61回) 平成23年11月10-12日 東京

6: 大西秀典、山本崇裕、加藤善一郎、近藤直実:IRAK4 ミスセンス遺伝子変異の病的意義の判定方法 日本免疫学会(第40回) 2011年11月27-29日 千葉

7: 大西秀典、堀友博、寺本貴英、深尾敏幸、近藤直実、坪内肯二、清島真理子、金子英雄:STAT1 遺伝子に変異を有する常染色体優性慢性皮膚粘膜カンジダ症に合併した慢性活動性肝炎の病態について 日本免疫不全症研究会(第5回) 2012年1月21日 東京

8: 大西秀典:難治性免疫異常症の診断戦略について(特別講演) 第9回岐阜小児血液免疫アレルギー難治疾患研究会 2012年2月16日

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。そのうち、生存例は平成 23 年度時点で 3 例です。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、通常免疫機能検査(ガンマグロブリン値、免疫細胞数など)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、無汗性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

ペニシリン系製剤やST合剤といった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(特にPCV7)が有効ですが、経時的に抗体価の低下が認められるため、肺炎球菌特異抗体の適宜モニタリングを行い、必要に応じて追加接種を検討する必要があります。乳児期にはγ-グロブリン製剤の補充療法も試みられています。

自然免疫不全症に関する二次調査表

(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: _____	確定診断時年齢: _____

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: _____
年 () 歳 病名: _____
年 () 歳 病名: _____
年 () 歳 病名: _____
年 () 歳 病名: _____
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

(感染症発症からの時間経過 _____ 時間)

血清補体値:

*医師推定

C3: _____ mg/dl, C4: _____ mg/dl, CH50: _____ U/ml

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: _____ %

好中球貪食能: _____ %

好中球殺菌能: _____ %

NK 細胞活性: _____ %

その他 (特に化膿性髄膜炎に罹患されている患者様の場合髄液所見の経過を御記入ください):

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(_____)

ワクチン接種歴（接種済みのものを○でお示してください）：

BCG ・ ポリオ ・ DPT ・ 麻疹風疹 ・ 日本脳炎 ・

肺炎球菌ワクチン(7価 ・ 23価) ・ HIB ワクチン ・

(その他 _____)

遺伝子検査結果: 同定された遺伝子変異の Genotype について御記載願います。

IRAK4 (_____)

MyD88 (_____)

その他 (_____)

治療方法: 現在、試みておられる該当する治療方法に○印を付けてください。

1. 抗菌薬（薬剤名： _____)
2. ガンマグロブリン製剤（ 定期投与 ・ 重症感染時のみ使用 _____)
3. その他 (_____)

診断後の感染症罹患頻度:

入院を要しない感染症 _____ 年 _____ 回程度

入院を要する重症感染症 _____ 年 _____ 回程度

最終観察: 該当項目に○印を付けてください。

1. 生存 西暦 _____ 年 _____ 月 _____ 日

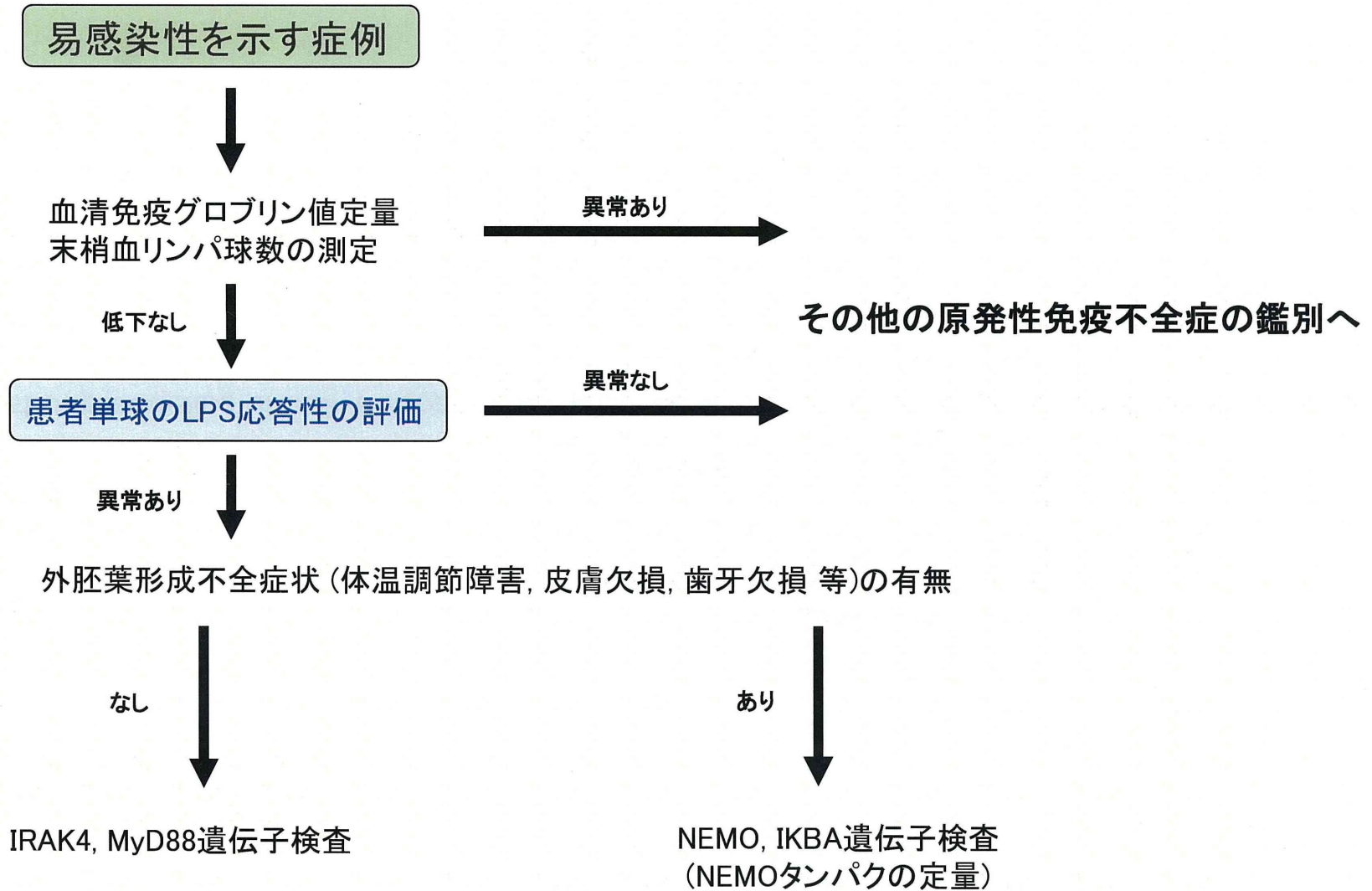
2. 死亡 西暦 _____ 年 _____ 月 _____ 日

3. その他

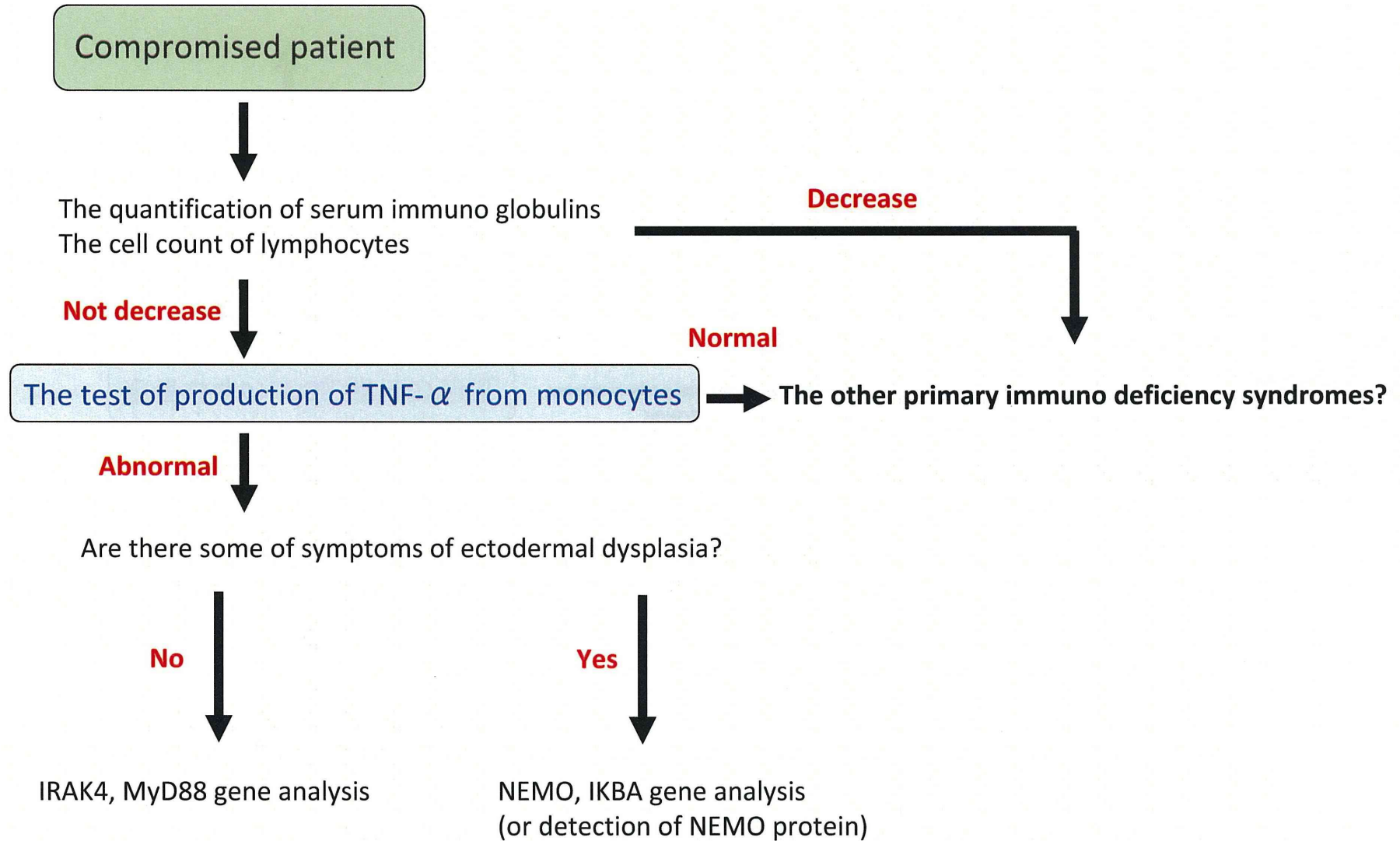
フォロー終了、転院などありましたらご記入ください。

問い合わせ先 主任研究者：大西秀典
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
e-mail: ohnishih@gifu-u. ac. jp

自然免疫不全症の簡易診断フローチャート



The diagnosis flow chart of Innate immune defect patients



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MyD88欠損症の全国症例調査(二次調査)結果について

研究分担者(代表) 大西 秀典 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 併任講師

研究要旨

自然免疫異常症(特に IRAK4 欠損症及び MyD88 欠損症)の多くは、免疫グロブリン値や免疫細胞数等の一般的な免疫学的検査で異常がみられない、原発性免疫不全症の一種である。平成 22 年度に行った国内での IRAK4 欠損症及び MyD88 欠損症患者発生の実態調査に基づき、国内での発生症例について二次調査を行った。さらに、自然免疫異常症が疑われる症例に、迅速診断スクリーニング法と遺伝子診断を組み合わせ、診断を試みた。

国内の IRAK4 欠損症患者発生数は、2011 年度時点で 7 名であり、うち 4 名が重症感染症で死亡していた。生存例の 3 名は、肺炎球菌ワクチンの複数回接種を抗体価の推移をモニタリングしながら施行されており、抗生剤の予防投与との組み合わせにより、感染罹患に対して効果的に対処されていた。

自然免疫異常症を疑われた 30 名の解析を行ったところ、1 例が IKBA 異常症と確定診断され、1 例で自然免疫応答の低下を認めるが既知の責任遺伝子に変異が認められず解析を継続している。また、迅速診断スクリーニングは、ステロイド製剤の影響を強く受けることが判明した。

自然免疫異常症の診断フローチャートに基づき、迅速診断スクリーニングと遺伝子解析の組み合わせで、IRAK4 欠損症を含む自然免疫異常症が効率的に診断可能である。特に IRAK4 欠損症では、早期診断により重症感染罹患の予防が可能である。

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(国立病院機構長良医療センター臨床研究部)
加藤善一郎(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)
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)

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向上を図る必要がある。本分担研究では、平成22年度に行った国内でのIRAK4欠損症及びMyD88欠損症患者発生の実態調査に基づき、国内における発生症例についての二次調査を行うことを目的とした。また、一方で平成22年度までに確立された自然免疫異常症の迅速診断スクリーニング及び遺伝子検査を、IRAK4欠損症の疑い症例について当施設で受け入れており、その経過を報告する。

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。原発性免疫不全症の国際分類において1型として分類される自然免疫異常症(IRAK4欠損症、MyD88欠損症など)は、血清免疫グロブリン値や免疫細胞数等の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

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異常症患者の症例数等の実態が不明であったため、平成 22 年度に全国症例調査を行った結果、国内での IRAK4 欠

損症患者は7名と報告されている。また、MyD88 欠損症患者の発生報告はない。7名の IRAK4 欠損症患者の担当医宛に、二次調査票を郵送し、解答を得た。

2. 自然免疫異常症が疑われ、診断依頼があった患者検体について、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異常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。

（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充分な理解（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。

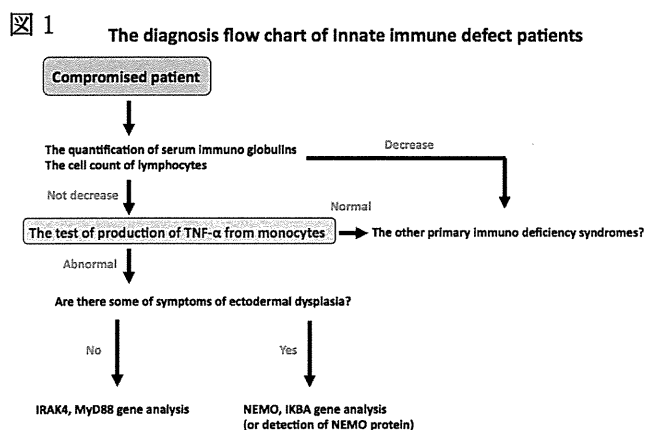
C. 研究結果

1. IRAK4 欠損症患者について行った二次調査票では、主に臨床経過、主要症状(特に臍帯脱落までの期間、感染症罹患頻度)、感染症罹患がある場合起因菌、免疫機能プロファイル、ワクチン接種状況、治療状況、生存状況、遺伝子診断について聴取した。結果、IRAK4欠損症患者7名中4名がすでに死亡しており、3名が生存していた。IRAK4の遺伝子型は6例が(c.118insA)のホモ接合性変異で、1例は(c.118insA)と(R183X)のコンパウンドヘテロ接合性変異であった。主要な感染症罹患歴として、肺炎球菌化膿性髄膜炎、緑膿菌肝膿瘍、ブドウ球菌皮下膿瘍、緑膿菌壊死性筋膜炎が挙げられ、死亡例はそのいずれかによって致死性となっていた。また、生存例では幼児期に繰り返しマイコプラズマ肺炎に罹患しており、この点も留意が必要かもしれない。臨床的な特徴として臍帯脱

落遅延があり、7名中6名で生後2週間以上の遅延を認めている。従来から白血球接着不全症においても臍帯脱落遅延が特徴的な症状として挙げられているが、本症例でも特徴的な所見であるといえる。検査データでは、致死性細菌感染症への罹患であることに比して、CRP 頂値の上昇が緩やかな症例が2例(CRP peak: 2.29, 1.05 mg/dl)と、十分上昇が確認された症例が3例(CRP peak: 20.64, 17.64, 16.0 mg/dl)が認められた。また、肺炎球菌化膿性髄膜炎罹患症例では、致死的な程重篤であるにも関わらず、髄液細胞数の上昇が少ない(203, 2, 64 / μ l)ことが多々あることが判明した。IRAK4欠損症症例7名全例で、血球分画や免疫グロブリン値に明らかな異常を認めない。生存例3例のうち2例では、兄弟がIRAK4欠損症に合併した肺炎球菌化膿性髄膜炎で死亡したため、早期に診断されており、生後1歳までは γ グロブリン製剤の補充療法を施行し、7価肺炎球菌ワクチンを抗体価の推移を追跡しながら3回接種、及び23価肺炎球菌ワクチンを1回接種していた。残る1例でも同様に7価肺炎球菌ワクチンを3回、23価肺炎球菌ワクチンを1回接種していた。尚、3例とも肺炎球菌特異的IgG2抗体価の上昇が確認されている。加えて、ST合剤及びペニシリン製剤、あるいはST合剤単独の予防投与が行われており、感染罹患時に早めの抗生剤投与(静注)を行うことで重篤な感染症への罹患を免れており、現在の感染症罹患頻度は年2-4回程度である。

2. 自然免疫異常症が疑われ、当施設で2010年7月1日-2012年2月29日までに当施設で検査依頼を受けた症例は、30例である。内訳は、肺炎球菌化膿性髄膜炎4例(うち2例は再発症例)、肺炎球菌硬膜下膿瘍1例、肺炎球菌反復感染(肺炎など)5例、肺炎球菌菌血症6例、化膿性髄膜炎後症候性てんかん2例、黄色ブドウ球菌性リンパ節炎1例、黄色ブドウ球菌性皮下膿瘍1例、緑膿菌肝膿瘍1例、HIB髄膜炎2例(うち1例は再発例、もう1例は肺炎球菌髄膜炎に続発例)、重症RSウイルス感染症2例、慢性粘膜皮膚カンジダ症1例、反復感染8例であった。自然免疫機能の迅速診断スクリーニング検査を24例に施行し、異常値を示した症例は6例であった。しかし、そのうち4例では検査前にステロイド剤が投与されていた。いずれの症例も再検査で正常反応を示している。異常値を示した症例のうち1例は、平成22年度に報

告した通り IKBA 異常症であった。異常値を示した残り 1 例は、再検査でも異常値を示しているが、IRAK4、MyD88、IKBA、NEMO、TIRAP/Mal 遺伝子に変異を認めていない。現在、引き続き TLR 下流の遺伝子群の解析に取り組んでいる。自然免疫機能の迅速診断スクリーニングと並行して IRAK4 及び MyD88 遺伝子解析も行っているが、既知の病的意義の証明された遺伝子型は同定されなかった。また IRAK4 の遺伝子多型として V205I(ヘテロ接合性)、A428T(ヘテロ接合性)が 1 例ずつ同定されている。検査依頼があった症例は大部分で易感染性があり、平成 22 年度に本研究班が提案した自然免疫異常症の診断フローチャート(本年度に部分改訂した、図 1)に照合すると、他の免疫不全症も疑われることになる。最終的に他の検査も組み合わせて診断を試みたところ、特記すべき症例として、STAT1 異常症 1 例、慢性肉芽腫症 1 例、高 IgE 症候群 1 型 1 例、Hoyeraal-Hreidarsson 症候群 1 例、Mondini 奇形 1 例、肺炎球菌莢膜特異抗体低下症 1 例、著しい臍帯脱落遅延症例(40 日、白血球接着不全症の疑い) 1 例が後に診断されている。



D. 考察

IRAK4 欠損症は、2011 年に Picard らがまとめた全世界の症例調査同様に、国内症例でも肺炎球菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌による致死的重症感染症がみられている。患者で同定される遺伝子型は、欧米の症例で Q293X が大多数を占めるのとは異なり、国内症例では 1 例をのぞき c.118insA のホモ接合性変異であった。特徴的な臨床症状として、臍帯脱落遅延が挙げられ、白血球接着不全症と共に、早期診断の指標となり得ると考えられる。また肺炎球菌の感染予防が IRAK4 欠損症患者の治療に最も重要であるが、前述の報告では肺炎球菌特異抗体価の獲

得率は、約 54%(PCV23 単独接種で 44.4%、PCV7 単独接種で 100%(1 例のみ)、PCV23+PCV7 接種で 66.6%)であるのに比して、国内症例では生存例 3 例全例で肺炎球菌特異的 IgG2 抗体価を獲得できている。但し、経時的に抗体価の低下が認められ、定期的なモニタリングが必要であることと、随時追加接種の必要性が示唆される。また、重症感染症をきたす起因菌は他の菌種(特に緑膿菌に注意が必要)も存在するため、日常の抗生剤予防投与と感染症罹患時に早期の抗生剤の投与が必要である。Picard らの報告では、8 歳以降で致死的重症感染症罹患頻度が無いと報告されており、今後予防投与の継続期間についても検討が必要である。

自然免疫異常症の迅速診断スクリーニングは、平成 22 年度に報告した通り、IRAK4 欠損症、MyD88 欠損症のみならず無汗性外胚葉形成不全免疫不全症(NEMO 異常症、IKBA 異常症)の診断にも有効であるが、検査時にステロイド剤等免疫抑制療法の使用の影響を受けるため留意が必要である。また、我々の提案しているフローチャートでは、易感染性があり、免疫グロブリン値や免疫細胞数の異常がなければ、次のステップに本検査を提案しているため、他の原発性免疫不全症や解剖学的な異常による反復感染罹患症例が検査にまぎれていることがある。自然免疫異常症ではないと診断された症例についても、今後適切なフォローアップが必要である。

E. 結論

IRAK4 欠損症の診断には、自然免疫機能の迅速診断スクリーニングが有効である。また早期診断の指標のひとつとして、臍帯脱落遅延が挙げられる。早期診断により、感染予防対策が講じることが重要であり、その手法としては肺炎球菌ワクチンの複数回接種と経時的肺炎球菌特異的 IgG2 抗体価モニタリング、抗生剤の予防投与が有効であると考えられた。

現在、コマーシャルベースで自然免疫異常症の迅速診断スクリーニングを受託する機関が存在しないため、今後も引き続き当研究班で患者診断・解析の受け入れを継続する。

謝辞 貴重な患者情報を御提供いただきました防衛医科大学小児科学講座野々山恵章先生、宮城県立こども

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

病院神経科富樫紀子先生、沖縄県立南部医療センター・こども医療センター小児腎臓科喜瀬智郎先生、徳島赤十字病院小児科七條光市先生、また本研究にご協力いただいた患者様、担当医様に深謝いたします。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1: 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.* 2011 Dec 24.
- 2: 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.* 2011 Nov 10.
- 3: 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.* 2011 Sep;49(9):3432-5.

2. 学会発表

- 1: Ohnishi H: Gene polymorphisms in innate immune signaling pathways associated with allergic disease (Symposium). 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) 2011.10.28-30, Fukuoka,
- 2: 大西秀典、加藤善一郎、金子英雄、近藤直実、宮田理英、鈴木智典、能勢統一郎:フローサイトメーターによ

るスクリーニング法で診断された新規遺伝子変異を有する I κ B α 欠損症の 1 男児例 春期日本アレルギー学会 (第 23 回) 2011 年 5 月 14-15 日 千葉

3: 大西秀典:自然免疫不全症の病態解明と診断手順について(特別講演) 第 6 回岐阜小児アレルギー・喘息研究会 平成 23 年 6 月 2 日 岐阜

4: 大西秀典、加藤善一郎、安陽、松井永子、木村豪、名田匡利、久保田一生、山本崇裕、金子英雄、近藤直実:自然免疫不全症の構造生物学的病態解析 日本小児科学会(第 114 回) 2011 年 8 月 12-14 日 東京

5: 大西秀典、加藤善一郎、近藤直実: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(ミニシンポジウム) 日本アレルギー学会秋季学術大会(第 61 回) 平成 23 年 11 月 10-12 日 東京

6: 大西秀典、山本崇裕、加藤善一郎、近藤直実:IRAK4 ミスセンス遺伝子変異の病的意義の判定方法 日本免疫学会(第 40 回) 2011 年 11 月 27-29 日 千葉

7: 大西秀典、堀 友博、寺本貴英、深尾敏幸、近藤直実、坪内肯二、清島真理子、金子英雄:STAT1 遺伝子に変異を有する常染色体優性慢性皮膚粘膜カンジダ症に合併した慢性活動性肝炎の病態について 日本免疫不全症研究会(第 5 回) 2012 年 1 月 21 日 東京

8: 大西秀典:難治性免疫異常症の診断戦略について(特別講演) 第 9 回岐阜小児血液免疫アレルギー難治疾患研究会 2012 年 2 月 16 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし