

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

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

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。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。昨年度までの研究で IRAK4 欠損症及び MyD88 欠損症で同定される遺伝子変異により、Myddosome の形成障害をきたすことが判明しており、これら2疾患を総称して Myddosome 異常症と呼んでいる。本年度は、それぞれの遺伝子型の *in vitro* 機能検証の手法の開発を進め、MyD88 についてはタンパク発現、NF- κ B 活性測定、タンパク間相互作用実験が有用であることが確立された。一方、IRAK4 についてはタンパク発現、タンパク間相互作用実験は有用であるが、一般的に利用できる培養細胞上での NF- κ B 活性測定では、機能差異が同定されない遺伝子型があることが判明した。次年度以降、IRAK4 ノックアウト細胞の導入を検討する。

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)
加藤善一郎(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)
山本崇裕(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
朽尾豪人(京都大学工学研究科生体分子機能化学講座)
堤尚孝(京都大学工学研究科生体分子機能化学講座)

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異常症(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、難治的で重症化しやすく、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。本分担研究では特に、IRAK4欠損症、MyD88欠損症を対象として、自然免疫機

能の迅速診断スクリーニングで陽性となり、かつ新規遺伝子変異(特にミスセンス型)が同定された場合に備え、各遺伝子型についての*in vitro*機能評価方法の確立を行うことを目的としている。

B. 研究方法

- 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する。
- 1.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の遺伝子解析を行う。
- pcDNA系発現ベクターにMyD88(全長、TIRドメイン)及びIRAK4遺伝子を組み込んだ発現ベクターを構築する。また、pUNO-IL-1R1をInvivogen社から購入。pcDNA3.1+に、IL-1RAcP、IL-18RAcPLを組み込んだ。

4. pGEX系発現ベクターにMyD88デスドメイン(DD)、TIRドメイン及び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する。

5. 既知の遺伝子変異、及びdbSNPに登録されている遺伝子多型、新規に同定された遺伝子変異型について、Promega社のGeneditor site-directed mutagenesis kitを使用して3.及び4.のベクター遺伝子を置換する。

6. HEK293系培養細胞に、pUNO-IL1R1、IL-1RAcP、IL-18RAcPLをそれぞれの組み合わせで発現させ、さらに3.のIRAK4シリーズ、MyD88シリーズ発現ベクターをco-transfectさせ、Promega社のDual Luciferase Assay法で、NF- κ Bのreporter gene活性を測定した。

7. 大腸菌BL21(DE3)株を用いて、4.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。MyD88-TIR野生型及びMyD88-TIR R196C変異型タンパクを1H-15N安定同位ラベル培地で培養し、ラベル化タンパクとして精製した。

8. MyD88-TIR野生型及びMyD88-TIR R196C変異型タンパクを溶液NMR法で、1H-15N-HSQCスペクトルを測定した。

9. 7.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 法でタンパク間相互作用を検討した。

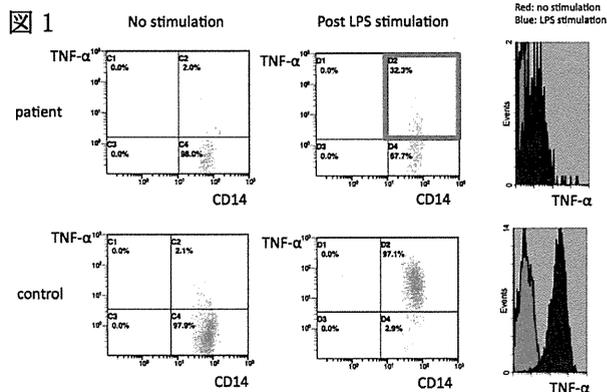
(倫理面への配慮)

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。

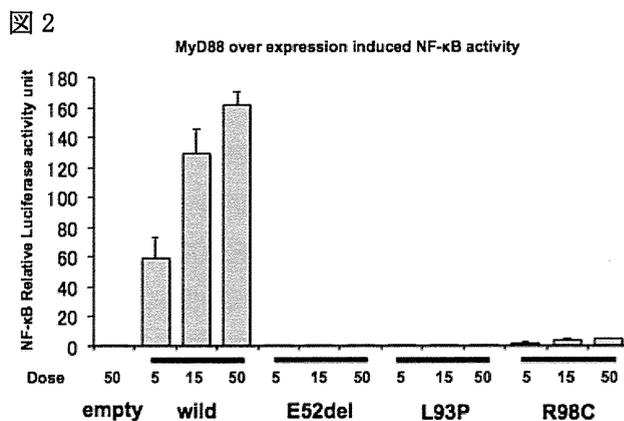
C. 研究結果

1. 国内で診断された IRAK4 欠損症症例(遺伝子型: c.118insA, homozygous)について、方法1の迅速診断スクリーニングを施行したところ、既報の通りLPS刺激後のTNF- α 陽性CD14細胞比率の低下が確認された

(図1)。

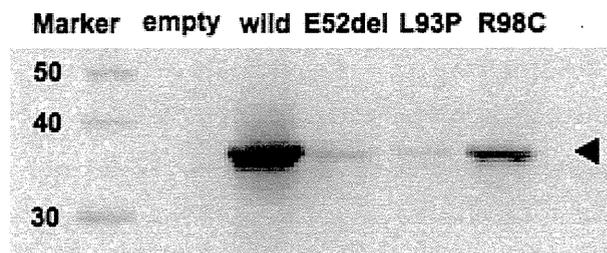


2. MyD88(全長)に遺伝子変異を導入した発現ベクターを形質転換し、NF- κ B活性を測定したところ、野生型では著しく活性が上昇するのに比較して、DD上の変異(E52del, L93P, R98C)は活性が低下していた(図2)。



また、E52del, L93Pはタンパク発現量が低下していたが、R98Cのタンパクはやや減弱しているも十分な発現が確認された(図3)。

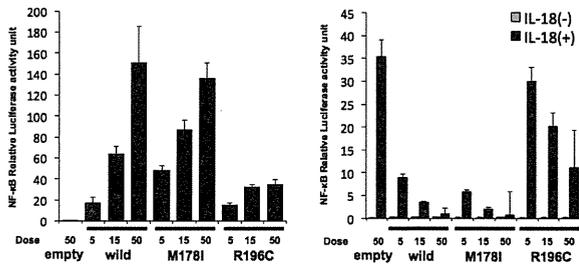
図3 MyD88 variants expression in HEK293T cell



3. MyD88(全長)及びTIRドメインにTIRドメイン上の変異(M178I, R196C)を導入した発現ベクターを形質転換し、NF- κ B活性を測定したところ、MyD88(全長)M178Iは野生型と同等の活性を示したが、R196Cは

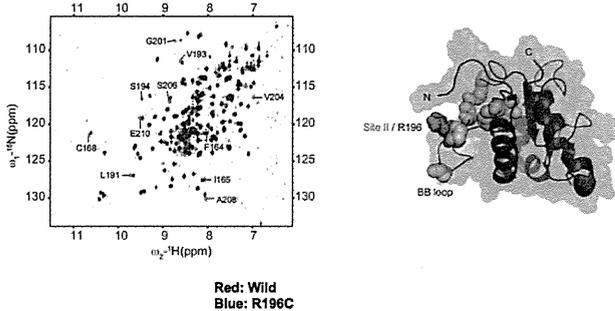
低下していた(図 4A)。また MyD88 TIR ドメイン野生型は、IL-18RAcPL を発現させた HEK293 細胞に対して IL-18 等のリガンド刺激後に得られる NF- κ B 活性の上昇を dominant negative 効果で抑制し、MyD88-TIR-M178I も野生型と同等の抑制効果を示したが、R196C では抑制効果が減弱していた(図 4B)。

図 4 A. MyD88-fullの dominant positive effect を利用した方法 B. MyD88-TIRの dominant negative effect を利用した方法



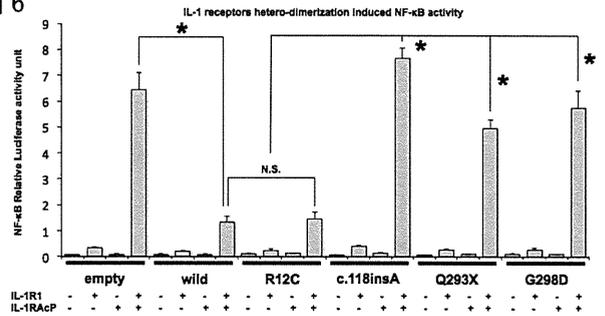
4. MyD88-TIR 野生型及び R196C リコンビナントタンパクの 1H-15N 安定同位ラベル化したサンプルを調整し、1H-15N-HSQC スペクトルを測定したところ、変異導入箇所に限局した構造変化が認められ、全体構造としては保持されていることが判明した(図 5)。

図 5



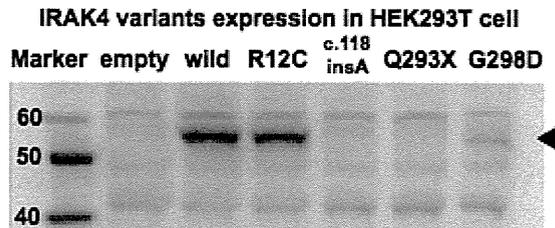
5. HEK293 細胞に IL-1R1 及び IL-1RAcP を共発現させ、NF- κ B 活性を測定するとリガンドである IL-1 非存在条件下でも NF- κ B 活性が上昇する。そこにさらに IRAK4 野生型を一過性共発現させると NF- κ B 活性が低下することが確認された。Kinase ドメイン上の変異(Q293X, G298D)及び DD 上で生じるナンセンス変異(c.118insA)では、この抑制効果が減弱していたが、DD 上のミスセンス変異(R12C)では抑制効果は野生型と差異がみられなかった(図 6)。

図 6



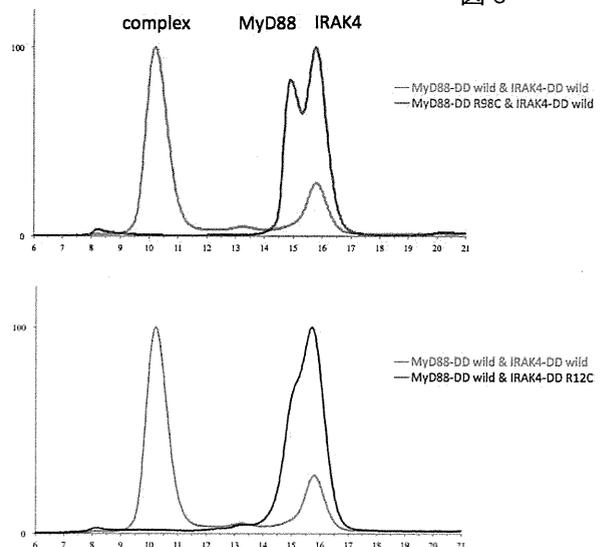
また、IRAK4 タンパク発現は、前述の変異(c.118insA, Q293X, G298D)で減弱していたが、R12C では野生型と同等の発現が確認される(図 7)。

図 7



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していた(図 8)。

図 8



D. 考察

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。本研究では、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ている。

MyD88 は、N 末端側にデスドメイン(DD)と、C 末端側に TIR ドメインを有するアダプター分子である。我々は、MyD88 の TIR ドメイン上で同定された遺伝子変異 R196C について、Ohnishi H et al. PNAS2009.にて、GST プルダウン法及び溶液 NMR 法を用いて細胞内アダプター分子 Mal/TIRAP との相互作用の低下を報告している。本年度の研究で R196C 変異体は、ドメイン構造は安定なタンパクであり、純粋に相互作用の低下に起因して、MyD88 欠損症が発症していることが裏付けられた。また現在までの検討で、TIR-TIR の安定複合体形成は困難であることが判明していたため、液体クロマトグラフィー法によるタンパク相互作用実験は TIR-TIR 間では不適當であるが、溶液 NMR 法や GST プルダウン法によるタンパク間相互作用の検討は有効である。一方、リコンビナントタンパクレベルで DD-DD 間の安定複合体形成が、平成 22 年度の本研究で観測できることが判明していた。それらを利用してさらに検討を進めているが、今年度の検討により MyD88 各遺伝子型の機能差異の分析方法を確立した。すなわち MyD88 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- κ B 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- κ B 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 は N 末端側に MyD88 と会合する DD と C 末端側に Kinase ドメインを有する分子である。IRAK4 の各遺伝子型については、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(特に国内症例ではこの変異=c.118insA が多い)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。しかしながら、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- κ B 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ている。J Qin et al J Biol Chem 2004.によると、ヒト IRAK4 欠損症患者由来の繊維芽細胞を利用した実験系では、その問題点が解決されることが示されており、今後 IRAK4 欠損マウス由来細胞の導入、ヒト培養細胞上で IRAK4 のノックアウト実験を行う必要がある。

E. 結論

MyD88 の *in vitro* 機能解析法は確立されたと考えている。一方、IRAK4 についてはさらなる検討、特に IRAK4 ノックアウト細胞の導入が必要であると考えている。国内で同定された IRAK4 欠損症患者において、機能未検証な新規遺伝子変異(R183X)が存在するため、次年度の解析課題である。さらに dbSNP 上には、同定される頻度が極めて稀なミスセンス型の遺伝子多型が報告されているため、特に DD 上の IRAK4 variant に関して、機能検証を行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1: Ohnishi H, 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,
Respirology 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

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

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型である。平成22年度の本研究にて、自然免疫異常症が疑われる症例に、自然免疫機能の迅速診断スクリーニング法を適応し診断を試みたところ、新規遺伝子変異を有する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, IKBA異常症)が見いだされた。遺伝子型が新規であったため、*in vitro*の手法を用いて、変異I κ B α の機能検証を試みた。結果、変異I κ B α は、N末端が部分欠失したタンパクを発現し、野生型I κ B α よりも有意に強くLPS刺激後のNF- κ B活性を抑制した。従って、本症例で同定されたIKBA-Q9X変異は病的意義のある変異と考えられた。本研究により、EDA-ID症例も自然免疫異常症の迅速診断スクリーニングで同定可能であることが示され、また変異I κ B α の病的意義を確認するための*in vitro*の手法が確立された。

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(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)
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)

リーニング法を開発することが必要である。本研究では、平成22年度に本手法で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, IKBA異常症)症例で見いだされた新規遺伝子変異IKBA-Q9Xの*in vitro*機能検証について、症例の確定診断のために行うことを目的とする。

A. 研究目的

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、これら自然免疫異常症は、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、自然免疫異常症が疑われる症例の迅速診断スク

B. 研究方法

1. 症例は5カ月の男児。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カ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カ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ァイルを表1に示す。

	Patient	Normal values
Number of blood cells (μL)		
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- α 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 κ B α 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 κ B α 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- κ B活性をLuciferase reporter gene assay法で測定した。

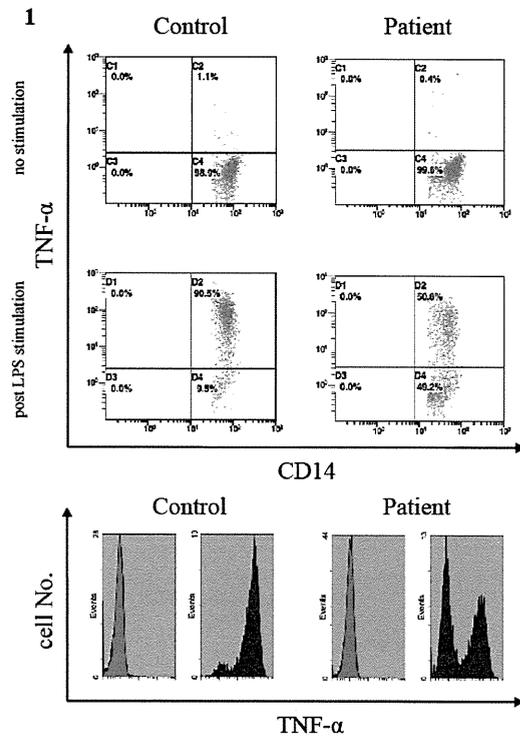
(倫理面への配慮)

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

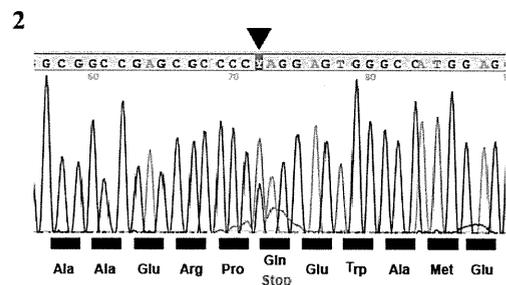
上で実施される。また倫理面でも、結果による不利益は全く生じないように配慮が充分になされ、対象となる個人の人権擁護が充分になされていることから問題がないと判断される。

C. 研究結果

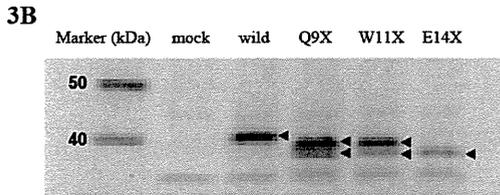
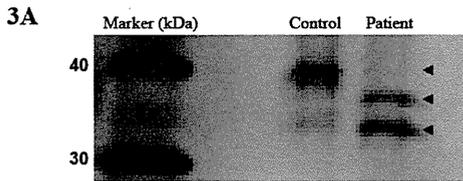
1. 上記スクリーニング法にて反応の低下を認め(図1)、外胚葉形成不全症状を伴う症例(男児)を同定した。



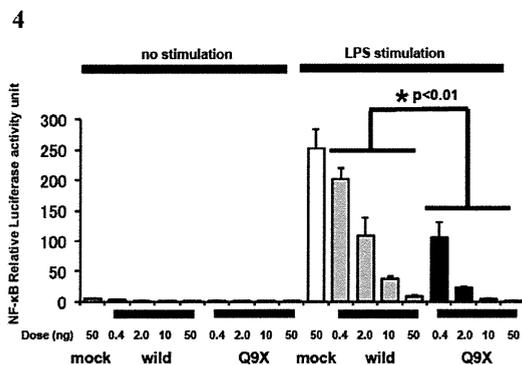
2. IRAK4, MyD88, 及び NEMO 遺伝子には変異を認めず、IKBA 遺伝子の exon1 領域にヘテロ接合性の新規変異(c. 25C>T) (p. Q9X) が同定された(図 2)。



3. 患者 PBMC 由来 I κ B α は、健常者の I κ B α 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 I κ B α も同様のパターンを示した(図 3B)。



4. $I\kappa B\alpha$ -Q9X は、野生型 $I\kappa B\alpha$ よりも有意に強く LPS 刺激後の NF- κ B 活性の上昇を抑制した(図 4)。



D. 考察

IKBA-Q9X 変異は、 $I\kappa B\alpha$ の翻訳開始コ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 $I\kappa B\alpha$ が発現する。 $I\kappa B\alpha$ 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- κ B を活性化型に変換するため、N 末端が欠失した変異 $I\kappa B\alpha$ は分解されず NF- κ B 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 $I\kappa B\alpha$ 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

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

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

IRAK4 欠損症の病態解析に向けたサイトカイン・プロファイル解析

研究分担者 金沢大学医薬保健研究域医学系小児科 教授 谷内江昭宏

研究要旨

IRAK4 欠損症では、自然免疫応答としての IL-6、TNF- α 産生が欠如ないし低下していると考えられている。重症肺炎球菌感染症などに罹患し、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、IRAK4 欠損症の病態解析のための基礎的検討として、多様な炎症性疾患におけるサイトカイン・プロファイルの解析を行った。血清あるいは髄液を用いて、様々なサイトカイン値を検討した結果、異なる炎症病態において特有のサイトカイン・プロファイルが存在することが判明した。今後、実際の IRAK4 欠損症症例での検討を積み重ね、早期診断に有用な指標を明らかにしていく予定である。

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

本邦における IRAK4 欠損症の報告はまだ少なく、その早期発見のためには特徴的な臨床所見、病態を明らかにすることが必要である。本研究では、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「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

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。得られたサイトカイン値等のパターンを 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

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(図)。

D. 考察

異なる中枢神経疾患により、それぞれ特徴的なサイトカイン・プロフィールが観察された。これらの疾患が、炎症細胞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。一方、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。このようなプロフィールは、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。

E. 結論

髄液サイトカイン・プロフィー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) Tone Y, Toma T, Toga A, Sakakibara Y, Wada T, Yabe M, Kusafuka H, Yachie A. Enhanced exon 2 skipping caused by c.910G>A variant and alternative splicing of MEFV genes in two independent cases of familial Mediterranean fever. *Mod Rheumatol*. 2012;22:45-51.
- 2) Yokoyama T, Shimizu M, Ohta K, Yuno T, Okajima M, Wada T, Toma T, Koizumi S, Yachie A. Urinary heme oxygenase-1 as a sensitive indicator of tubulointerstitial inflammatory damage in various renal diseases. *Am J Nephrol*. 2011;33:414-420.

2. 学会発表

- 1) 和田泰三、榊原康久、梅暁子、東馬智子、金兼弘和、谷内江昭宏「抗体アレイを用いた EB ウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症のサイトカイン解析」第 43 回日本小児感染症学会 2011 年 10 月(岡山)

- 2) 榊原康久、和田泰三、東馬智子、谷内江昭宏「成人スチル病合併妊娠における妊娠時の母体と出生後の児の IL-18 値の経過を追えた一例」第 61 回日本アレルギー学会 2011 年 11 月(東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

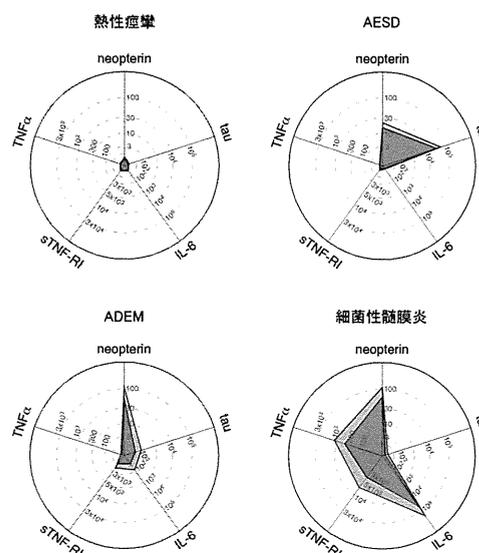
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



図;異なる中枢神経疾患における髄液サイトカイン・プロフィール

「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」

研究分担者 大阪大学微生物病研究所 特任教授 大石和徳
研究協力者 明田幸宏 大阪大学微生物病研究所

研究要旨

インターロイキン受容体関連キナーゼ4 (IRAK4) および骨髄分化因子88 (Myd88) 欠損症における侵襲性肺炎球菌感染症の実態と予防法の確立を明らかにするため、小児の肺炎球菌性侵襲性感染症 (IPD) および再発性肺炎症例を収集し、得られた血清サンプル中の血清型特異 IgG 濃度および血清中 OPA titer を測定した。その結果、原因血清型の判明した IPD 例では原因血清型に対する血清中オプソニン活性の欠如もしくは低値が認められた。さらに PCV7 未接種の IPD もしくは再発性肺炎例では特異 IgG 濃度とともに血清 OPA titer が低く、積極的なワクチン接種が必要と考えられた。

IRAK 欠損症の2例については、7価コンジュゲートワクチンを含む肺炎球菌ワクチン接種後に特異 IgG 濃度は、1症例で血清型 23F 特異的特異 IgG 濃度が 0.20 $\mu\text{g/ml}$ 未満である以外は、いずれの血清型でも 0.20 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。これらの結果から、原因血清型の決定した小児 IPD 症例では血清中 OPA titer はより感染病態を反映するマーカーであり、小児 IPD 症例や再発性肺炎例、IRAK 欠損症では7価コンジュゲートワクチンの早期接種の必要性が示唆された。

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、2003年に海外で初めて報告された新規の遺伝性免疫不全症であり、主に肺炎球菌や黄色ブドウ球菌等のグラム陽性菌による感染が敗血症や髄膜炎などの重症化を引き起こし、死に至ることが報告されている。この疾患で中心的な役割を担う IRAK4 は Toll-like receptor を介した自然免疫系において特に重要な役割を持つタンパク質であり、IRAK4 欠損マウスでは自然免疫系シグナルがほぼ全て抑制されることが明らかとなっている。また2008年に報告された IRAK4 関連分子である骨髄分化因子88 (MyD88) 欠損症も IRAK4 欠損症と同様の病態を示すことが報告されている。本邦における IRAK4 および MyD88 欠損症はこれまでに数例の症例報告がなされているが、その実態は明らかでなく、その実態解明と共に早期診断・予防法の開発が急務である。

乳幼児の7価コンジュゲートワクチン(PCV7)接種

後の血清中特異 IgG 抗体 0.35 $\mu\text{g/ml}$ は住民レベルの侵襲性感染症を予防できる閾値であり、血清中オプソニン(OPK) titer 8 と相関するとされている (WHO 2005)。また、22F CPS 阻害による ELISA では血清中特異 IgG の 0.20 $\mu\text{g/ml}$ を感染予防閾値として提案している (Henckaerts I, et al. *Clin Vacc Immunol* 13:356-60, 2006)。

本研究では、小児における侵襲性肺炎球菌性感染症 (invasive pneumococcal disease: IPD) や再発性肺炎患者の血清中血清型特異抗体とオプソニン活性を測定し、IRAK4 および MyD88 欠損との関連性を検討することを目的とする。

B. 研究方法

小児の IPD および再発性肺炎症例9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（ $\mu\text{g/ml}$ ）、OPA titer として表した。

（倫理面への配慮）

本臨床研究の実施に関して大阪大学微生物病研究所の倫理委員会の承認を取得した。

C. 研究結果

1) 平成 23 年度症例

平成 23 年度に 9 例が侵襲性肺炎球菌感染症もしくは反復性肺炎症例として登録され、その内訳は男 5 名、女 4 名であった。これらの検討症例の臨床的特徴を表 1 に示す。月齢の中央値は 24 ヶ月（10～46 ヶ月）であった。臨床診断は肺炎球菌性髄膜炎 4 例、肺炎球菌性硬膜下膿瘍 1 例、肺炎球菌性菌血症を伴う肺炎 1 例であり、IPD は以上の 6 例であった。IPD 以外では、再発性肺炎球菌例 2 例、再発性の気管支炎・中耳炎 1 例であった。この中には IRAK4、MyD88 欠損例は認められなかった。

また、IRAK4 欠損症例の 2 例（男 1 名、女 1 名；月齢それぞれ 69 ヶ月、83 ヶ月）についても血清中抗体測定を実施した。この 2 例に IPD のエピソードは認められず、またいずれの症例も PCV7 を 3 回、23 価肺炎球菌ワクチン（PPV23）を 1 回接種済みであった。

2) 血清中血清型特異 IgG と OPA titer

1. 原因菌の血清型が決定された 3 例の解析

9 例中 3 例において原因菌の血清型が決定されている。PCV7 1 回接種後に血清型 6B による肺炎球菌性髄膜炎を呈した 1 例（症例 2）における血清型 6B に対する特異 IgG 濃度は $1.33 \mu\text{g/ml}$ であるのに対し OPA titer は 2 であり、血清型 6B に対するオプソニン活性が欠如していた。血清型 6C による肺炎球菌性髄膜炎例（症例 6）の血清型 6C に対する OPA titer は 2 であり、血清型 6B に対するオプソニン活性が欠如していた。また、血清型 6B および 23A による繰り返す肺炎球菌性髄膜炎例（症例 7）の血清型 6B に対する特異 IgG 濃度は $1.69 \mu\text{g/ml}$ であるのに対し OPA titer は 42 であ

り、血清型 6B に対するオプソニン活性が低値であった。

2. 原因血清型が決定されていない 2 症例の解析

肺炎球菌性菌血症を伴う肺炎例（症例 3）における特異 IgG 濃度は、いずれの血清型でも $0.19\sim 1.01 \mu\text{g/ml}$ と比較的 low であり、またオプソニン活性も同様であった。

肺炎球菌感染の証明されていない再発性肺炎例（症例 5）におけるいずれの血清型に対する特異 IgG 濃度は $0.52\sim 5.29 \mu\text{g/ml}$ に分布する一方、全血清型に対するオプソニン活性はすべて検出できなかった。

3. IRAK4 欠損症の男女 2 症例の解析

この 2 症例には最近の肺炎球菌感染症のエピソードは認められていない。症例 10（女児例）の血清中特異 IgG 濃度は血清型 4； $2.92 \mu\text{g/ml}$ 、血清型 6B； $0.86 \mu\text{g/ml}$ 、血清型 9V； $1.26 \mu\text{g/ml}$ 、血清型 14； $9.70 \mu\text{g/ml}$ 、血清型 18C； $0.54 \mu\text{g/ml}$ 、血清型 19F； $1.86 \mu\text{g/ml}$ 、血清型 23F； $0.27 \mu\text{g/ml}$ であった。また、症例 11（男児例）では血清型 4； $2.19 \mu\text{g/ml}$ 、血清型 6B； $9.47 \mu\text{g/ml}$ 、血清型 9V； $1.19 \mu\text{g/ml}$ 、血清型 14； $9.27 \mu\text{g/ml}$ 、血清型 18C； $0.48 \mu\text{g/ml}$ 、血清型 19F； $3.47 \mu\text{g/ml}$ 、血清型 23F； $0.10 \mu\text{g/ml}$ であった。

D. 考察

症例 2 では、PCV7 を接種後であるにもかかわらず、血清中には血清型 6B に対するオプソニン活性が欠損していることから、髄膜炎が発症したと考えられた。症例 6 および 7 においても、6C、6B の対するオプソニン活性の欠損や低値が髄膜炎発症に関与したと推察される。症例 3 および 5 は PCV7 未接種者であることもあり、血清中の全ての血清型に対する特異 IgG は検出されるものの、いずれの血清型に対するオプソニン活性は low であるか、もしくは全く検出できなかった。

IRAK4 欠損症の 2 例については、7 価コンジュゲートワクチンを含む肺炎球菌ワクチン接種後に特異 IgG 濃度は、1 症例で血清型 23F 特異的特異 IgG 濃度が $0.20 \mu\text{g/ml}$ 未満である以外は、いずれの血清型でも $0.20 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。なお、IRAK4 欠損症 2 例は感染予防のために抗菌薬内服が継続されており、血清

OPA titer を測定できなかった。この結果から、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。

小児の IPD や再発性肺炎症例、IRAK 欠損症に対しては早期の PCV7 接種の必要性が示唆される。

E. 結論

今回、血清中特異抗体を検討した侵襲性肺炎球菌感染症もしくは反復性肺炎の 9 症例からは IRAK4 および MyD88 遺伝子変異例は検出されなかった。感染血清型の決定した IPD 症例ではその感染血清型に対する血清中特異 IgG 濃度よりも血清オプソニン活性がより感染防御効果を反映している可能性が考えられた。さらに PCV7 未接種の IPD もしくは再発性肺炎症例では特異 IgG 濃度とともに血清 OPA titer が低く、積極的なワクチン接種が望まれる。

IRAK4 欠損症 2 例では 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 未満である以外は、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。小児の IPD や再発性肺炎症例、IRAK 欠損症に対しては早期の PCV7 接種の必要性が示唆される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Piao Z, Oma K, Ezoe H, Akeda Y, Tomono K, Oishi K. Comparative effects of toll-like receptor agonists on a low dose PspA intranasal vaccine against fatal pneumococcal pneumonia in mice. *J Vaccines Vaccin* 2:1, 2011 <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7560.1000113>
2. Kataoka K, Fujihashi K, Oma K, Fukuyama Y, Hollingshead SK, Fukui M, Sekine S, Kawabata S, Ito H, Briles DB, Oishi K. Nasal dendritic cell

targeting Flt3 ligand as a safe adjuvant elicits effective protection against fatal pneumococcal pneumonia. *Infect Immun*, 79: 2819-2828, 2011

3. Kerdsin A, Dejsirilert S, Puangpatra P, Sripakdee S, Chumla K, Boonkerd N, Polwichai P, Tanimura S, Takeuchi D, Nakayama T, Nakamura S, Akeda Y, Gottschalk M, Sawanpanyalert P, Oishi K. Genotypic profile of *Streptococcus suis* serotype 2 and clinical features of infection in humans, Thailand. *Emerg Infect Dis* 17:835-842, 2011.

4. Kerdsin A, Dejsirilert S, Sawanpanyalert P, Boonnark A, Noithachang W, Sriyakun D, Simkum S, Chokngam S, Gottschalk M, Akeda Y, Oishi K. Sepsis and spontaneous bacterial peritonitis in Thailand. *Lancet* 378:960, 2011

5. Uchida Y, Matsubara K, Wada T, Oishi K, Morio T, Takada H, Iwata A, Yura K, Kamimura K, Nigami H, Fukaya T. Recurrent bacterial meningitis by three different pathogens in an isolated asplenic child. *J Infect Chemother*. DOI 10.1007/s10156-011-0341-z

6. Alonzo MTG, Lacuesta TLV, Dimaano EM, Kurosu T, Suarez LC, Mapua CA, Akeda Y, Matias RR, Kuter DJ, Nagata S, Natividad FF, Oishi K. Platelet apoptosis and apoptotic platelet clearance by macrophages in secondary dengue virus Infections. *J Infect Dis* 2012 Mar 1. [Epub ahead of print]

7. Takeuchi D, Kerdsin A, Pienpringam A, Loetthong P, Samerchea S, Pakkinee Loetthong P, Khamisra K, Wongwan N, Areeratana P, Chiranairadul P, Lertchayanti S, Petcharat S, Yowang A, Chaiwongsaen P, Nakayama T, Yukihiro Akeda Y, Hamada S, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S, Oishi K. Population-based study of *Streptococcus suis* infection in humans in Phayao Province in Northern

Thailand. PLoS ONE 7(2):e31265.

8. Miyasaka T, Tetsuji Aoyagi T, Uchiyama B, Oishi K, Nakayama T, Kinjo Y, Miyazaki Y, Kunishima H, Hirakata Y, Kaku K, Kawakami K. A possible relationship of natural killer T cells with humoral immune response to 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in clinical settings. Vaccine (in press)

9. 川上健司、赤沢 学、大石和徳. わが国の高齢者に対する肺炎球菌ワクチンの定期接種化は必要か？呼吸と循環. 59: 1227-1231, 2011.

10. 大石和徳. 肺炎球菌ワクチンの3回以降接種の可否. 医事新報. No. 4575 60-61, 2011

2. 学会発表

1. Ezoe H, Akeda Y, Okuzaki D, Oishi K. Identification of the host and bacterial factors contributing to secondary pneumococcal pneumonia after influenza virus infection. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo. Sep 6-10, 2011.

1. Nakayama T, Takeuchi D, Akeda Y, Oishi K. Association of haemolytic activity of human isolates of *S. suis* serotype 2 with their capacity of crossing the blood-CSF barrier. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo. Sep 6-10, 2011.

2. Kerdsin A, Dejsirilert S, Phetcharaj S, Uagvichitpojchana C, Simkam S, Chokngam S, Takeuchi D, Nakayama T, Akeda Y, Oishi K. An outbreak of *Streptococcus suis* infection in humans, Pechabun Province, Thailand in 2010. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo. Sep 6-10, 2011.

3. Takeuchi D, Nakayama T, Akeda Y, Oishi K. *Streptococcus suis* infection in Thailand. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo. Sep 6-10, 2011.

4. Piao Z, Ezoe H, Akeda Y, Oishi K. Comparative effects of toll-like receptor agonists on a low dose PspA intranasal vaccine against fatal pneumococcal pneumonia in mice. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo. Sep 6-10, 2011.

5. Oishi K. Role of apoptotic platelet clearance in thrombocytopenia in dengue, a reemerging infectious disease. Symposium, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sapporo. Sep 6-10, 2011.

7. Oishi K, Oishi T, Ishiwada N, Wada A and the Pediatric IPD study group. Serotype-specific immunity and unresponsiveness to 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in pediatric patients with invasive pneumococcal disease during the introductory phase of this vaccine in Japan IDSA 49 th annual meeting. Boston, USA, October 20-23, 2011.

9. Oishi K, Alonzo MTG. A role of apoptosis and apoptotic platelet clearance in secondary dengue virus infection. IDSA 49 th annual meeting. Boston, USA, October 20-23, 2011.

10. Oishi K. Recent topics of bacterial infections in Asian countries. Oriental Congress of Pediatrics. Shanghai, China, Oct 28-30, 2011.

11. Oishi K, Oishi T, Ishiwada N, Wada A, Akeda Y and the Pediatric IPD study group. Serotype - specific immunity

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

and unresponsiveness to 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in pediatric patients with invasive pneumococcal disease during the introductory phase of this vaccine in Japan. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 15 th Acute Respiratory Infection Panel Meeting. Wakayama. Nov 14-15, 2011.

12. Takeuchi D, Kerdsin A, Nakayama T, Akeda Y, Nakamura S, Iida T, Hamada S, Dejsirilert S, Oishi K. *Streptococcus suis* infection in humans in Thailand. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012. Kobe. Jan 11-12, 2012.

13. 江副浩和、明田幸宏、奥崎大介、大石和徳。インフルエンザ後二次性肺炎の発症に關与する宿主および細菌性因子の同定。第 54 回日本感染症学会中日本地方会学術集会。奈良。2011 年 11 月 24-25 日。

14. 大石和徳。細菌性ワクチン：その効果と限界。シンポジウム 3：予防医学を考える。第 54 回日本感染症学会中日本地方会学術集会、第 59 回日本化学療法学会。西日本支部総会。奈良市。11 月 24-26 日。

15. 古泉ゆか、明田幸宏、大石和徳。小児におけるインフルエンザ菌 type b ワクチン接種前後の血清殺菌能に関する検討。第 15 回日本ワクチン学会。東京。12 月 10-11 日。

16. 大島信治、永井英明、大石和徳。肺炎球菌ワクチン再接種時の安全性および免疫原性の検討。第 15 回日本ワクチン学会。東京。12 月 10-11 日。

17. 大石智洋、石和田稔彦、田村和世、庵原俊昭、大石和徳。小児の侵襲性肺炎球菌感染症患児における血清型特異免疫に関する検討。第 15 回日本ワクチン学会。東京。12 月 10-11 日。

18. 大石和徳。教育講演。高齢者肺炎とワクチン戦略。日本内科学会第 45 回生涯教育講演。米子、2011 年 11 月 13 日。

19. 大石和徳。教育講演。高齢者肺炎に対するワクチン戦略の新展開。第 78 回日本呼吸器学会近畿地方会、大阪、2011 年 12 月 3 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 検討症例の臨床的特徴

症例	性別	年齢(月)	診断名	感染血清型	基礎疾患	PCV7 接種歴	PPV23 接種歴
1	M	10	肺炎球菌髄膜炎	ND	-	-	-
2	F	29	肺炎球菌髄膜炎(再発例)	6B	-	-	-
3	M	26	肺炎球菌性菌血症を伴う肺炎	ND	-	-	-
4	M	35	反復感染(肺炎球菌感染含む)	ND	-	-	-
5	F	24	反復感染、肺炎(肺炎球菌感染は証明なし)	ND	-	-	-
6	M	23	肺炎球菌性髄膜炎	6C	-	1 回接種	-
7	F	46	肺炎球菌性髄膜炎	6B, 23A	右内耳奇形	-	1 回接種
8	F	20	肺炎球菌性硬膜下膿瘍	ND	-	-	-
9	M	23	気管支炎, 中耳炎(肺炎球菌証明無し)	ND	-	2 回接種	-
10	F	69	-	-	IRAK4 欠損症	3 回接種	1 回接種
11	M	83	-	-	IRAK4 欠損症	3 回接種	1 回接種

PCV7;7 価コンジュゲートワクチン, PPV23; 23 価肺炎球菌ポリサッカライドワクチン, ND:未決定

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

国内の IRAK4 欠損症の 4 家系 7 名を解析した。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。国内外の症例の検討の結果、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¹⁾。

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

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- α 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- κ 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- κ B を染色し、フローサイトメーターで解析した。

(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

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いない。

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

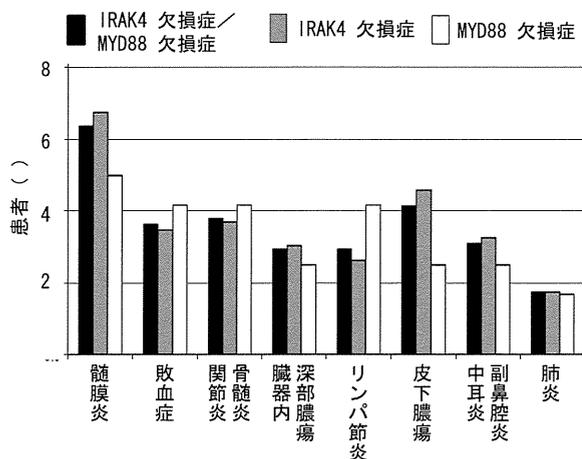
7名中6名に臍帯脱落遅延がみられ、この疾患の特徴であると考えられた。MyD88 欠損症はまだ国内では同定されていない。

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。

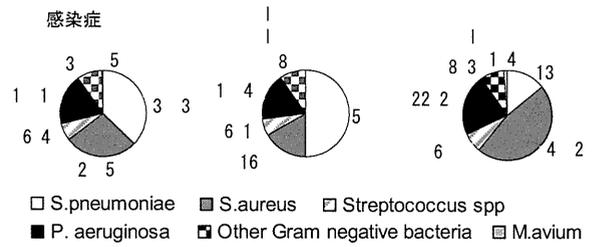
感染症は、化膿性髄膜炎や敗血症、関節炎／骨髄炎などの、いわゆる invasive bacterial infection が多く、肺炎などはむしろ少ない（図1）。

図 1 IRAK4 欠損症 MYD88 欠損症の臨床像 感染症の種



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 炎菌の種

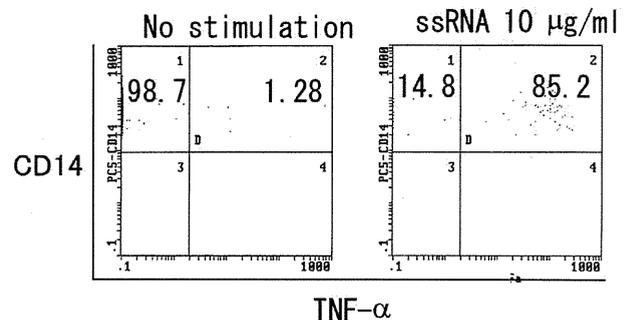


重症感染症の発症は乳幼児期が多く、しだいにその頻度が低下することがわかった。重症感染症は14歳以降に発症した例はなかった。また8歳以降に重症細菌感染症で死亡した例はなかった。

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-α 産生細胞の割合を検討することとした。

図 3. ssRNA (TLR7/8 agonist) 刺激による単球内 TNF-α 産生単球の割合



健常者末梢血を ssRNA で刺激した場合、ssRNA が 10 µg/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（図3）。

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

IRAK4/MyD88 欠損症をスクリーニングし、これらの疾患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. 健康危険情報

特になし。

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 κ -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, Ohshima 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.
5. Eljaafari FM, Takada H, Tanaka T, Doi T, Ohga S, Hara T. Potent induction of IFN- γ production from cord blood NK cells by the stimulation with single stranded RNA. *J Clin Immunol* 2011 Aug; 31(4):728-35.
6. Marcus N, Takada H, Law J, Cowan MJ, Gil J, Regueiro JR, Plaza Lopez de Sabando D, Lopez-Granados E, Dalal J, Friedrich W, Manfred H, Hanson IC, Grunebaum E, Shearer WT, Roifman CM. *J Allergy Clin Immunol* 2011 Nov;128(5):1050-7.
7. Rahman P, Huysmans RD, Wiradjaja F, Gurung R, Ooms LM, Sheffield DA, Dyson JM, Layton MJ, Sriratana A, Takada H, Tiganis T, Mitchell CA. Silencer of death domains (SODD) inhibits skeletal muscle and kidney enriched inositol 5-phosphatase (SKIP) and regulates phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2011 Aug 26;286(34):29758-70.
8. Tanaka N, Izawa K, Saito MK, Sakuma M, Oshima K, Ohara O, Nishikomori R, Morimoto T, Kambe N, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, de Saint Basile G, Neven B, van Gijn M, Frenkel J, Aróstegui JJ, Yagüe J, Merino R, Ibañez M, Pontillo A, Takada H, Imagawa T, Kawai T, Yasumi T, Nakahata T, Heike T. High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in patients with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular