

- syndrome: results of an International Multicenter Collaborative Study. *Arthritis Rheum* 2011 Nov;63(11):3625-32.
9. 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* in press.
10. Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Morio T, Kobayashi M, Imai K, Nonoyaa S, Hara T. Endocrine Complications in Primary Immunodeficiency Diseases in Japan. *Clinical Endocrinology* in press.
4. 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-Ghonaium 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

なし。

参考文献

1. Picard C, Casanova JL, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ deficiency. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Jul;24(3):490-7.
3. 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-Ghonaium 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.

TREX1 の精製と exonuclease 活性測定に関する研究

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

Aicardi-Goutieres 症候群及び Familial Chilblain Lupus の 1 原因遺伝子と同定されている TREX1 に関して、homodimer 蛋白作成とその ssDNA exonuclease 活性測定系を確立した。

A. 研究目的

Aicardi-Goutières 症候群 (AGS) は、主に常染色体劣性遺伝形式に発症する家族性早発型脳症である。大脳基底核石灰化、髄液細胞増多や IFN- α 上昇などを特徴とし、また約 40% の症例に凍瘡様皮疹を認める。現在までに 5 種類の原因遺伝子 (TREX1、RNASEH2B、RNASEH2A、RNASEH2C、SAMHD1) が同定されている。Familial chilblain lupus (FCL) は、常染色体優性遺伝形式に凍瘡を発症する疾患であり、AGS の責任遺伝子の中の 2 種類 (TREX1、SAMHD1) が原因遺伝子として同定されている。TREX1 蛋白は生体内ではダイマーを形成して、3'→5' exonuclease である。

我々は寒冷誘発重症凍瘡を呈する 1 家系の解析から、昨年本邦初の FCL/AGS 家系 (TREX1 ヘテロ D18N 変異) を報告した。現在 TREX1 蛋白作成ならびにその機能解析系の構築により、変異 TREX1 の疾患原性の評価を行った。

B. 研究方法

正常 TREX1 cDNA 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)

成人コントロール対象者には、実験の主旨をインフォームドコンセント後に同意を得た。

C. 研究結果

作成 TREX1 蛋白を SDS-PAGE 後に、CBB

stain/Flamingo® stain/Western blotting を行い、正常 TREX1 蛋白を確認した (図 1)。その後 ssDNA exonuclease assay で精製蛋白の活性も確認した (図 2)。

図1 CBB stain Flamingo® stain anti-TREX1 WB

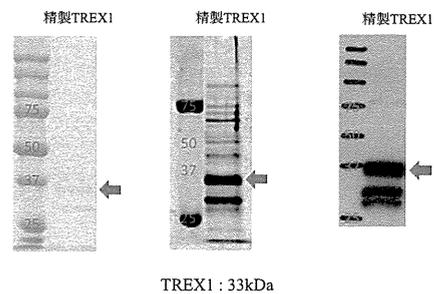
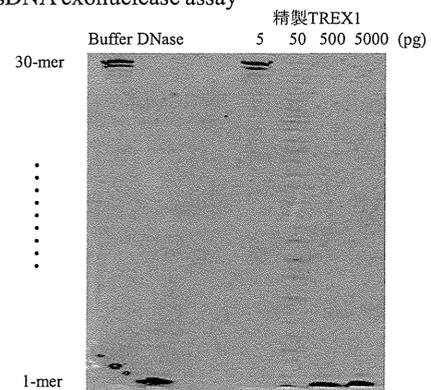


図2 ssDNA exonuclease assay



D. 考察

TREX1 はダイマー形成することが知られ、今回正常 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。AGS 患者の中には、TREX1 ヘテロ変異で発症する患者も存在するため、今後変異 TREX1 ホモダイマー、ヘ

テロダイマーを作成し 3'→5' exonuclease を検討し、病態解明につとめる。今回は ssDNA を用いて活性測定をおこなったが、今後 nicked dsDNA も基質として用い、検討をおこなっていく。

E. 結論

正常 TREX1 ホモダイマー作成とその ssDNA exonuclease 活性系を確立し、TREX1 変異の機能検索系の構築に成功した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakai H, Okafuji I, Nishikomori R, Abe J, Izawa K, Kambe N, Yasumi T, Nakahata T, Heike T : The CD40-CD40L axis and IFN- γ play critical roles in Langhans giant cell formation. *Int Immunol.* 2011 (in press)

2. Mizukami T, Obara M, Nishikomori R, Kawai T, Tahara Y, Sameshima N, Marutsuka K, Nakase H, Kimura N, Heike T, Nunoi H : Successful Treatment with Infliximab for Inflammatory Colitis in a Patient with X-linked Anhidrotic Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2011 (in press)

3. 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.* 2011:31(968-976)

4. Imamura M, Kawai T, Okada S, Izawa K, Takachi T, Iwabuchi H, Yoshida S, Hosokai R, Kanegane H, Yamamoto T, Umezu H, Nishikomori R, Heike T, Uchiyama M, Imai C : Disseminated BCG infection mimicking metastatic nasopharyngeal carcinoma in an immunodeficient child with a novel hypomorphic NEMO mutation. *J Clin Immunol.* 2011 : 31(802-810)

5. 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 JI, 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 syndrome:

Results of an international multicenter collaborative study *Arthritis Rheum.* 2011: 63(3625-3632)

6. Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa K, Sakai H, Abe J, Tanaka N, Kawai T, Oshima K, Saito M, Nishikomori R, Ohara O, Ishii E, Nakahata T, Horiuchi H, Heike T : Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood.* 2011 : 118(1225-1230)

7. Adachi M, Watanabe A, Nishiyama A, Oyazato Y, Kamioka I, Murase M, Ishida A, Sakai H, Nishikomori R, Heike T : Familial cases of periodic fever with aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome. *J Pediatr.* 2011 : 158(155-159)

8. Tahara M, Sakai H, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Nagata I, Inui A, Fujisawa T, Shigematsu Y, Nishijima K, Kuwakado K, Watabe S, Kameyama J : Patient with neonatal-onset chronic hepatitis presenting with mevalonate kinase deficiency with a novel MVK gene mutation. *Mod Rheumatol.* 2011 (in press)

9. Sakai H, Ito S, Nishikomori R, Takaoka Y, Kawai T, Saito M, Okafuji I, Yasumi T, Heike T, Nakahata T: A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene. *Rheumatology.* 2011 : 49(194-196)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

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 及び関連因子の構造生物学的解析研究

研究分担者 枋尾 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が、他に、IL-1 や IL-18 といったサイトカインのシグナル伝達にも関連する。本研究では、IL-18 とその受容体との相互作用を構造生物学的アプローチによって解析した。

共同研究者

大西 秀典(岐阜大学・医学部・小児科)

A. 研究目的

IRAK4 は、TLR (Toll-like Receptor) シグナルの他に、IL-1 や IL-18 のシグナル伝達経路においても、MyD88 とともに重要な役割を果たしている。本課題では、IL-18 受容体による IL-18 の分子認識を原子レベルで解明する。得られる知見は、その相互作用を制御し、IL-18 の作用をコントロールする薬剤の合理的デザインに貢献する。

B. 研究方法

本課題では、溶液 NMR と X 線結晶回折法を用いて IL-18 と受容体複合体の構造を原子レベルで解析した。(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

溶液 NMR で IL-18 と IL-18 受容体 α ($R\alpha$) との二者複合体、IL-18 受容体 α 及び β ($R\beta$) との三者複合体の測定を行い、IL-18 中の相互作用部位を同定した。三者複合体の結晶化スクリーニングを行い結晶が得られる条件を見いだした。X 線結晶回折実験を行い、現在までに、低分解能ながらデータを取得できている。

D. 考察

IL-18 やその受容体のシステムは IL-1 とその受容体システムと類似している。近年、IL-1 と受容体の三者複合体の結晶構造が解かれた。本研究における解析の

結果、IL-18 と $R\alpha$ の複合体は、IL-1 と IL-1RI との複合体と酷似していることがわかった。一方で、二者複合体から三者複合体形成へ至る様式は、IL-1 のシステムとは異なることが明らかとなった。

E. 結論

IL-18 の受容体の相互作用(接触)部位を同定した。

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

Isogai, S., et al., *J Biol Chem* **286**, 31864-74 (2011)

Sekiyama, N., et al., *J Biomol NMR* [Epub ahead of print](2012).

Yamada, H., et al., *ACS Chem Biol* [Epub ahead of print](2012).

2. 学会発表

堤 尚孝ら「Structural basis for receptor recognition of interleukin 18」第 34 回分子生物学会年会 ポスター発表

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 と関連する分子群の相互作用解析について
研究分担者 加藤 善一郎 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 臨床教授

研究要旨

IRAK4、MyD88 欠損症は、Toll 様受容体(TLR)の細胞内下流分子群の多量体(Myddosome)の形成異常により発症する。Myddosome とは、アダプター分子 MyD88 を中心として、Toll 様受容体の細胞内 TIRドメインと、細胞膜誘導型アダプター分子 Mal/TIRAP の TIRドメイン、シグナル伝達型アダプター分子である MyD88 の TIRドメインの会合と、MyD88 のデスドメイン(DD)、IRAK4 の DD、IRAK2 の DD の会合を組み合わせた高次複合体のことを意味する。マクロファージ等の抗原提示細胞においては、TLR の下流における Myddosome が重要であるが、IL-18 受容体を発現する Th1 細胞や NK 細胞においては、Mal はシグナル伝達に関与しておらず、どのような Myddosome 形成が生じているのか詳細には判明していない。

本研究では、ヘルパーT細胞1型反応に重要なIL-18シグナル伝達経路において、TLRシグナルにおけるMalと同様の細胞膜誘導機能を果たす分子の同定を進めた。具体的には、同じTIRドメイン含有アダプター分子 TRAM/TICAM2 が有力であるため、種々の in vitro アッセイ系で検証したところ、IL-18R-TRAM-MyD88 の複合体形成が証明された。興味深いことに MyD88 の R196 に変異を導入すると TRAM との会合が減弱した。このことから MyD88 欠損症における免疫機能低下状態には、自然免疫機能の低下だけでなく、Th1 反応の低下が寄与している可能性が示唆される。

共同研究者

大西秀典(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
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)
川本典生(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)
枋尾豪人(京都大学工学研究科生体分子機能化学講座)

TLR の下流における Myddosome が重要であるが、IL-18 受容体を発現する Th1 細胞や NK 細胞においては、Mal はシグナル伝達に関与しておらず、どのような Myddosome 形成が起きるか詳細には判明していない。

本研究では、ヘルパーT細胞1型反応に重要なIL-18シグナル伝達経路において、TLRシグナルにおけるMalと同様の細胞膜誘導機能を果たす分子の同定を進めた。

A. 研究目的

IRAK4、MyD88 欠損症は、Toll 様受容体(TLR)の細胞内下流分子群の多量体(Myddosome)の形成異常により発症する。Myddosome とは、アダプター分子 MyD88 を中心として、Toll 様受容体の細胞内 TIRドメインと、細胞膜誘導型アダプター分子 Mal/TIRAP の TIRドメイン、シグナル伝達型アダプター分子である MyD88 の TIRドメインの会合と、MyD88 のデスドメイン(DD)、IRAK4 の DD、IRAK2 の DD の会合を組み合わせた高次複合体のことを意味する。マクロファージ等の抗原提示細胞においては、

B. 研究方法

1. MyD88-TIR, TRAM-TIR, Mal-TIR, TLR1-TIR, IL-18R α -TIR, IL-18R β -TIRを、pGEX系発現ベクターに組み込み、大腸菌BL21(DE3)を形質転換し、各種TIRドメインタンパクを発現させ、液体クロマトグラフィー法で単離あるいはGST融合タンパクとして精製した。
2. pcDNA3.1+に、TRAM-FLAG、myc-MyD88(全長及びTIRドメイン)、IL-18R β を組み込み、pACGFP1-C1及びpDsRed-Monomer-N1ベクターにそれぞれMyD88とTRAMを組み込んだ発現ベクターを構築した。

3. 1&2.の発現ベクターに対して、GeneEditor *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System(Promega)を使用して、遺伝子置換を行った。

4. Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare)を使用してGST融合タンパクと単離TIRタンパクの結合実験を行った(GSTプルダウン法)。

4. Reporter gene assay用のplasmidとして、pGL3-basicベクターにNF- κ B結合配列を組み込み、pGL4-LucベクターにINF- β promoter領域の配列を組み込んだ。

5. siRNAによるノックダウン実験用に、Invivogen社のpsiRNA-h7SKgz-Scr、psiRNA-TICAM-2を購入した。

6. HEK293T細胞及びHEK293-hTLR4-MD2-CD14細胞(Invivogen)を、10%FCSを添加したDMEM培地で培養した。各種 Plasmid 群の形質転換にはLipofectamine2000(Invitrogen)を使用した。

7. Reporter gene assayは、Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega)で行った。

8. 免疫沈降実験は、MultiMACS Protein G MicroBeads (Miltenyi Biotec)を使用して行った。

9. TRAM欠損マウスとバックグラウンドマウス(C57BL/6)の脾組織を、Oriental Bio Serviceから提供を受け、汎T細胞をPan T Cell Isolation Kit II

(Miltenyi Biotec)で分離抽出して、mouse IL-18あるいはmouse IL-12p70添加下で10%FCSを添加したRPMI1640培地で培養した。

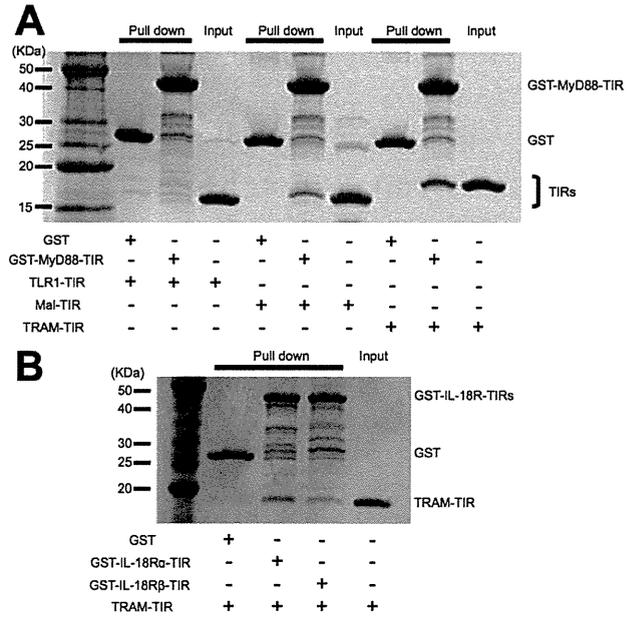
10. マウス細胞の培養上清中のmouse IL-6とmouse IFN- γ を、ELISA法で測定した。

11. GFPあるいはDsRed 融合タンパクの細胞内局在は、Zeiss LSM5 EXCITER confocal microscopeで観察した。

C. 研究結果

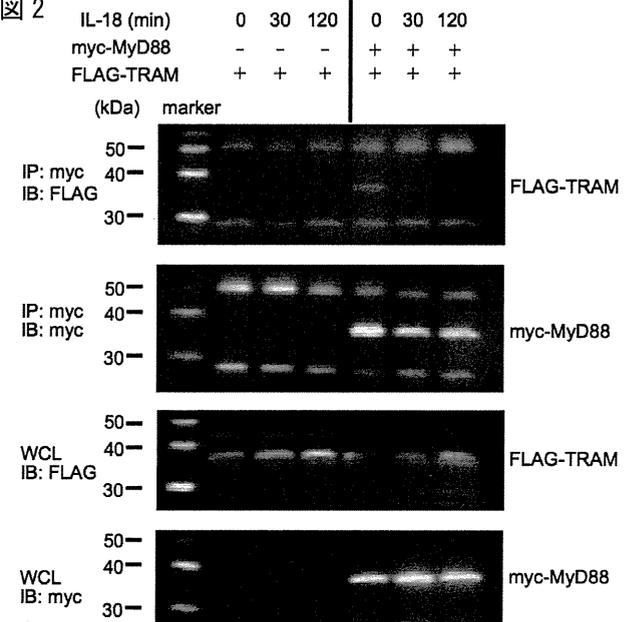
1. MyD88-TIRとTLR1-TIRは、GSTプルダウン法で直接結合は検出できないが、MyD88-TIRとMal-TIR及びTRAM-TIRの結合が強く検出された。また、IL-18R α -TIRとIL-18R β -TIRは共にTRAM-TIRと結合した(図1)。

図 1



2. 免疫沈降実験で、細胞内でMyD88とTRAMの相互作用が観測され、さらにその結合はIL-18刺激下で経時的に解離していくことが判明した(図2)。

図 2



3. TRAMをsiRNA発現ベクターでノックダウンした場合、あるいはTRAMの優性阻害変異(C117H)を発現させた場合、LPS刺激によるINF- β promoter活性上昇のみならず、IL-18刺激後のNF- κ B活性上昇も有意に抑制された(図3)。

図 3

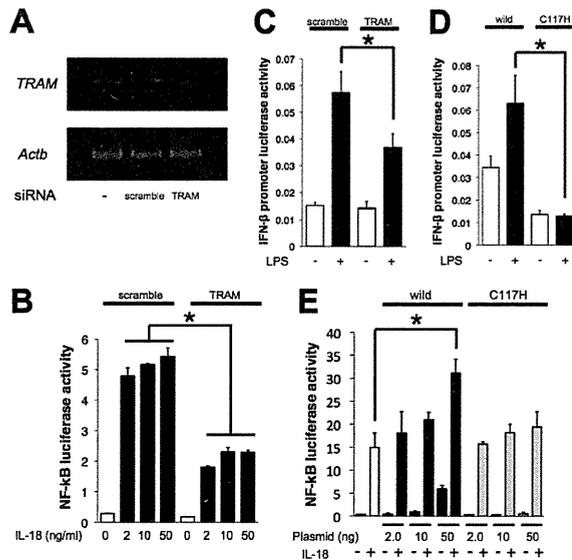
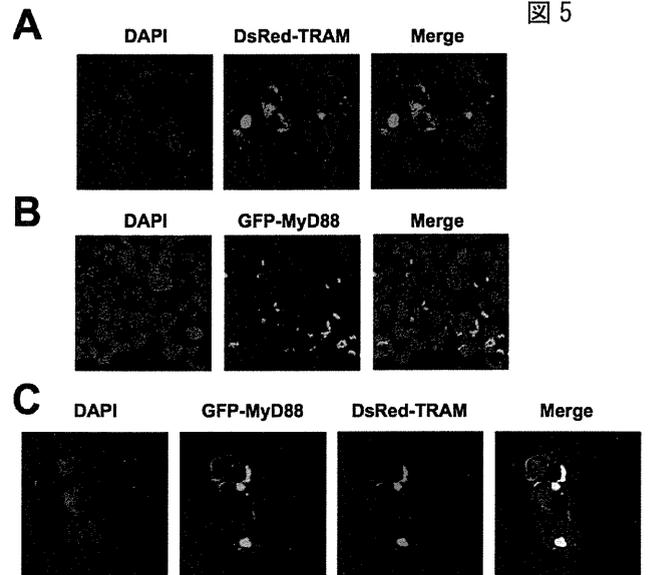
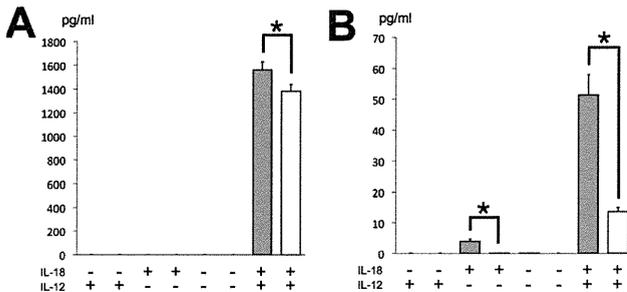


図 5



4. マウス脾由来汎 T 細胞を、マウス IL-12 とマウス IL-18 の組み合わせで刺激したところ、IL-12 と IL-18 の共刺激でのみ IFN- γ の産生が確認され、TRAM-KO マウスで有意に産生量が低下していた。また IL-6 の産生量は、IL-18 単独刺激でも検出され、同様に TRAM-KO マウスで有意に産生量が低下していた (図 4)。

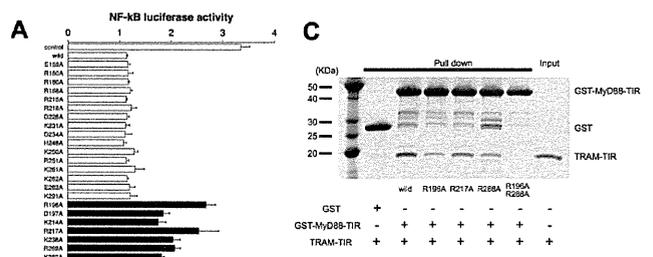
図 4



5. HEK293 細胞に MyD88 を発現させると、細胞質内にタンパクが凝集した foci を形成する。TRAM は、一部は細胞質内に存在し、細胞膜にも局在が認められる。MyD88 と TRAM を共発現させると、MyD88 の局在が大きく変化し、細胞膜に局在するようになる (図 5)。

6. MyD88-TIR の優性阻害効果を利用して、IL-18 刺激に関与する MyD88-TIR 上のアミノ酸残基を判定したところ、R196, D197, R217, K238, R269, K282, R288 が野生型及び他残基群と比して有意差が認められた。これらの残基の一部は、LPS/TLR4 シグナルにおいて機能的に重要な残基群とオーバーラップしている。
 7. 変異導入した GST-MyD88-TIR と TRAM-TIR の結合は、R196A, R288A 及び R196A-R288A で減弱が認められた (図 6)。

図 6



D. 考察

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、My88 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。

E. 結論

TRAM は、MyD88 との相互作用を介して、IL-18 シグナル伝達経路に関与する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

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.
- 4: Okura Y, Yamada M, Kobayashi I, Santisteban I, Arredondo-Santisteban G, Kato Z, Iguchi A, Yoshida M, Ohara O, Nakagawa N, Imai K, Hershfield MS, Ariga T. ADA-SCID with 'WAZA-ART' mutations that

synergistically abolished ADA protein stability. Br J Haematol. 2011 Jun;153(5):675-6.

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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> , Miyata R, Suzuki T, Nose T, Kubota K, <u>Kato Z</u> , Kaneko H, Kondo N.	A rapid screening method to detect autosomal-dominant ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome.	J Allergy Clin Immunol.	129	578-80	2012
<u>Ohnishi H</u> , Teramoto T, Iwata H, <u>Kato Z</u> , Kimura T, Kubota K, <u>Nishikomori R</u> , Kaneko H, Seishima M, Kondo N.	Characterization of NLRP3 Variants in Japanese Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome Patients	J Clin Immunol.		Epub ahead of print	2011
Funato M, Kaneko H, Ohkusu K, Sasai H, Kubota K, <u>Ohnishi H</u> , <u>Kato Z</u> , Fukao T, Kondo N.	Refractory chronic pleurisy caused by Helicobacter equorum-like bacterium in a patient with X-linked agammaglobulinemia.	J Clin Microbiol.	49	3432-5	2011
Okura Y, Yamada M, Kobayashi I, Santisteban I, Arredondo- Santisteban G, <u>Kato Z</u> , Iguchi A, Yoshida M, Ohara O, Nakagawa N, Imai K, Hershfield MS, Ariga T.	ADA-SCID with 'WAZA-ARI' mutations that synergistically abolished ADA protein stability.	Br J Haematol.	153	675-6	2011
Tone Y, Toma T, Toga A, Sakakibara Y, Wada T, Yabe M, Kusafuka H, <u>Yachie A</u> .	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.	22	45-51	2012
Yokoyama T, Shimizu M, Ohta K, Yuno T, Okajima M, Wada T, Toma T, Koizumi S, <u>Yachie A</u> .	Urinary heme oxygenase-1 as a sensitive indicator of tubulointerstitial inflammatory damage in various renal diseases.	Am J Nephrol.	33	414-420	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ishimura M, <u>Takada H</u> , Doi T, Imai K, Sasahara Y, Kanegane H, <u>Nishikomori R</u> , 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.	31	968-76	2011
Hoshina T, <u>Takada H</u> , 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.	31	309-14	2011
Saito M, Nagasawa M, <u>Takada H</u> , 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.	208	235-49	2011
Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, <u>Takada H</u> , 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 maturation defects.	J Allergy Clin Immunol.	128	223-5	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Marcus N, <u>Takada H</u> , 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.	Hematopoietic stem cell transplantation for CD3 δ deficiency.	J Allergy Clin Immunol	35	275-9	2011
Rahman P, Huysmans RD, Wiradjaja F, Gurung R, Ooms LM, Sheffield DA, Dyson JM, Layton MJ, Sriratana A, <u>Takada H</u> , 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.	286	29758-70	2011
Tanaka N, Izawa K, Saito MK, Sakuma M, Oshima K, Ohara O, <u>Nishikomori R</u> , Morimoto T, Kambe N, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, De Saint Basile G, Neven B, Van Gijn M, Frenkel J, Aróstegui JI, Yagüe J, Merino R, Ibañez M, Pontillo A, <u>Takada H</u> , Imagawa T, Kawai T, Yasumi T, Nakahata T, Heike T.	High incidence of NLRP3 somatic mosaicism in patients with chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome: results of an International Multicenter Collaborative Study.	Arthritis Rheum.	63	3625-32	2011
Eljaafari FM, <u>Takada H</u> , 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.	31	728-35	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Uchida Y, Matsubara K, Wada T, <u>Oishi K</u> , Morio T, <u>Takada H</u> , 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.		in press	2012
Nozaki T, <u>Takada H</u> , Ishimura M, Ihara K, Morio T, Kobayashi M, Imai K, Nonoyaa S, Hara T.	Endocrine Complications in Primary Immunodeficiency Diseases in Japan.	Clinical Endocrinology.		in press	2012
高田英俊	原発性免疫不全	小児内科	43	265	2011
高田英俊	IRAK4欠損症と感染症	小児感染免疫	23	81-7	2011
Piao Z, Oma K, Ezoe H, Akeda Y, Tomono K, <u>Oishi K</u> .	Comparative effects of toll-like receptor agonists on a low dose PspA intranasal vaccine against fatal pneumococcal pneumonia in mice.	J Vaccines Vaccin.	2:01	http://dx.doi.org/10.4172/2157-7560.1000113	2011
Kataoka K, Fujihashi K, Oma K, Fukuyama Y, Hollingshead SK, Fukui M, Sekine S, Kawabata S, Ito H, Briles DB, <u>Oishi K</u> .	Nasal dendritic cell targeting Flt3 ligand as a safe adjuvant elicits effective protection against fatal pneumococcal pneumonia	Infect Immun.	79	2819-28	2011
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, <u>Oishi K</u> .	Genotypic profile of <i>Streptococcus suis</i> serotype 2 and clinical features of infection in humans, Thailand.	Emerg Infect Dis.	17	835-842	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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
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.		Epub ahead of print	2012
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, Akeda Y, Hamada S, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S, Oishi K.	Population-based study of <i>Streptococcus suis</i> infection in humans in Phayao Province in Northern Thailand.	PLoS ONE	7	e31265	2012
Miyasaka T, 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	2012
川上健司 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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Sakai H, Okafuji I, <u>Nishikomori R</u> , Abe J, Izawa K, Kambe N, Yasumi T, Nakahata T, Heike T.	The CD40-CD40L axis and IFN- γ play critical roles in Langhans giant cell formation.	Int Immunol.	24	5-15	2012
Mizukami T, Obara M, <u>Nishikomori R</u> , Kawai T, Tahara Y, Sameshima N, Marutsuka K, Nakase H, Kimura N, Heike T, Nunoi H.	Successful Treatment with Infliximab for Inflammatory Colitis in a Patient with X-linked Anhidrotic Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency.	J Clin Immunol.	32	39-49	2012
Imamura M, Kawai T, Okada S, Izawa K, Takachi T, Iwabuchi H, Yoshida S, Hosokai R, Kanegane H, Yamamoto T, Umezu H, <u>Nishikomori R</u> , Heike T, Uchiyama M, Imai C.	Disseminated BCG infection mimicking metastatic nasopharyngeal carcinoma in an immunodeficient child with a novel hypomorphic NEMO mutation.	J Clin Immunol.	31	968-76	2011
Murata Y, Yasumi T, Shirakawa R, Izawa K, Sakai H, Abe J, Tanaka N, Kawai T, Oshima K, Saito M, <u>Nishikomori R</u> , Ohara O, Ishii E, Nakahata T, Horiuchi H, Heike T.	Rapid diagnosis of FHL3 by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein.	Blood	118	1225-30	2011
Adachi M, Watanabe A, Nishiyama A, Oyazato Y, Kamioka I, Murase M, Ishida A, Sakai H, <u>Nishikomori R</u> , Heike T.	Familial cases of periodic fever with aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenitis syndrome.	Pediatr.	158	155-159	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Tahara M, Sakai H, <u>Nishikomori R</u> , Yasumi T, Heike T, Nagata I, Inui A, Fujisawa T, Shigematsu Y, Nishijima K, Kuwakado K, Watabe S, Kameyama J.	Patient with neonatal-onset chronic hepatitis presenting with mevalonate kinase deficiency with a novel MVK gene mutation.	Mod Rheumatol.	21	641-5	2011
Sakai H, Ito S, <u>Nishikomori R</u> , Takaoka Y, Kawai T, Saito M, Okafuji I, Yasumi T, Heike T, Nakahata T.	A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene.	Rheumatology	49	194-196	2011
Isogai S, Morimoto D, Arita K, Unzai S, Tenno T, Hasegawa J, Sou YS, Komatsu M, Tanaka K, Shirakawa M, <u>Tochio H.</u>	Crystal structure of the ubiquitin-associated (UBA) domain of p62 and its interaction with ubiquitin.	J Biol Chem.	286	31864-74	2011
Sekiyama N, Jee J, Isogai S, Akagi KI, Huang TH, Ariyoshi M, <u>Tochio H</u> , Shirakawa M.	NMR analysis of Lys63-linked polyubiquitin recognition by the tandem ubiquitin-interacting motifs of Rap80.	J Biomol NMR.		Epub ahead of print	2012
Yamada H, Mizusawa K, Igarashi R, <u>Tochio H</u> , Shirakawa M, Tabata Y, Kimura Y, Kondo T, Aoyama Y, Sando S.	Substrate/Product-Targeted NMR Monitoring of Pyrimidine Catabolism and Its Inhibition by a Clinical Drug.	ACS Chem Biol.		Epub ahead of print	2012

IV. 研究成果の刊行物・別冊

Letter to the Editor

A rapid screening method to detect autosomal-dominant ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome

To the Editor:

A patient presented to us with autosomal-dominant anhidrotic ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome (EDA-ID). By using a rapid flow cytometric screening system, we detected a novel mutation of the *IKBA* gene in the patient.

Toll-like receptors are one of the major groups of pathogen-associated molecular pattern recognition receptors in the innate immune system. Following Toll-like receptor activation, intracellular signaling components such as interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) and NF-kappa-B essential modulator (NEMO) are sequentially activated. This leads to the degradation of inhibitor of κ B ($I\kappa$ B), which causes the activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and expression of inflammatory cytokines.¹ Recently, defects in various components of this

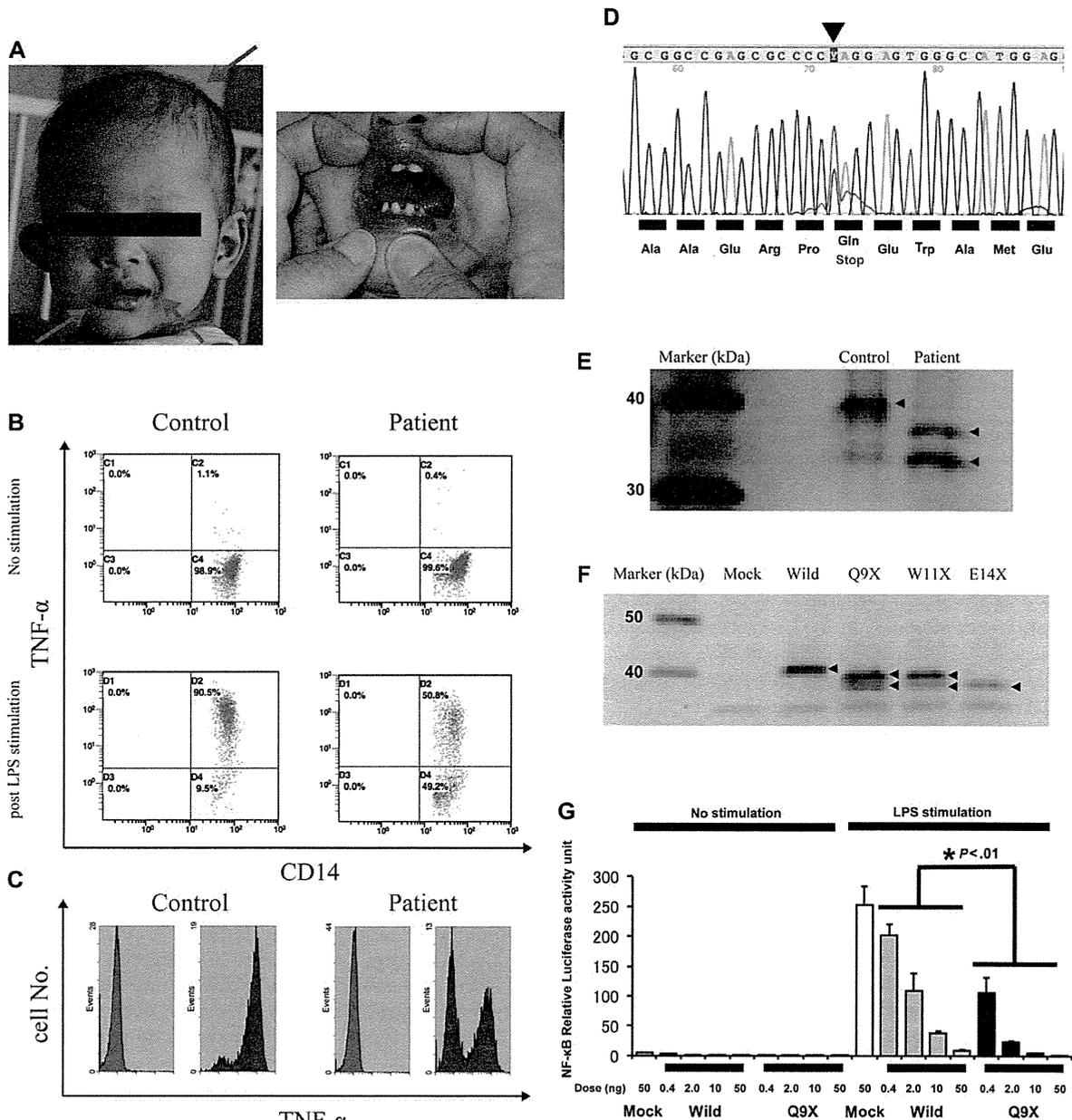


FIG 1. A, External abnormalities of the AD-EDA-ID patient at the age of 16 months. B and C, Flow cytometric analysis of intracellular TNF- α production in CD14⁺ cells in response to LPS stimulation. D, Genetic analysis of the *IKBA*. E and F, Western blot analyses of expressions of wild-type and mutant types $I\kappa$ B α proteins. G, NF- κ B reporter gene activities.

TABLE I. Immunological findings of the AD-EDA-ID patient at the age of 5 months

	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.

signaling pathway have been reported; IRAK4 deficiency was seen to cause high susceptibility to bacterial infections such as *Streptococcus pneumoniae*,² and NEMO deficiency was observed to lead to X-linked recessive anhidrotic ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome.³ In 2003, a hypermorphic mutation of the *I κ B α* gene was reported as another causative gene defect for EDA-ID.⁴ As the hereditary form of this disease is autosomal dominant, it is termed AD-EDA-ID.

The patient we assessed was a 5-month-old male infant with some dysmorphisms (Fig 1, A). His umbilical separation date was 18 days after his birth. The patient's body temperature regulation was poor because of his anhidrosis. He suffered recurrent infections from his first month, including hepatitis with *Cytomegalovirus* infection, enteritis with *Rotavirus*, bronchiolitis with respiratory syncytial virus, bacterial pneumonia, urinary tract infection, and acute otitis media. His family has no history of primary immunodeficiency. The results of a blood examination at the age of 5 months are shown in Table I. Serum immunoglobulin values were normal for his age. It should be noted that his serum IgA levels, but not IgM levels, increased with age (IgA, 751 mg/dL, and IgM 125, mg/dL at 9 months; normal ranges of IgA and IgM in Japanese infants are 10-56 and 55-200 mg/dL, respectively).

We used a previously described rapid screening method for IRAK4 deficiency syndrome using the patient's blood cells.⁵ Flow cytometric analysis of intracellular TNF- α production in CD14⁺ cells in response to 4 hours of LPS stimulation (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) showed a substantially lower proportion of CD14 and

TNF- α double-positive cells in the patient than in age-matched healthy subjects (mean, 95.7%; SD, 2.78; n = 10) (Fig 1, B). The histogram of LPS-stimulated TNF- α positive monocytes (blue) of this patient showed a twin peak pattern (mean fluorescence intensity of the peaks, 0.878 and 56.6) compared with the histogram of nonstimulated TNF- α monocytes (red). Monocytes from healthy subjects displayed a single right-shifted peak pattern (mean fluorescence intensity of the peaks, 73.0; SD, 40.2; n = 10) (Fig 1, C).

We next analyzed the *IRAK4*, *MyD88*, *NEMO*, and *IKBA* genes and found a novel mutation (c. 25C>T) (p. Q9X) in the *IKBA* gene (Fig 1, D). The *IRAK4*, *MyD88*, and *NEMO* genes were normal. Other *IKBA* gene mutations have been previously reported in AD-EDA-ID, namely, S32I, W11X, and E14X.^{4,6,7} The serine residues of the N terminus of I κ B α , S32 and S36, are functionally important phosphorylation sites. Phosphorylation leads to degradation of this protein and release of active NF- κ B. If these residues are substituted or deleted, NF- κ B cannot be inactivated by I κ B α . Interestingly, a mechanism by which disease onset is caused by gene substitution at the stop codon near the 5' end of the gene sequence has been reported, and this causes a hypermorphic effect of N terminus-truncated I κ B α protein.⁶

We confirmed the functional effect of the Q9X mutation in the *IKBA* gene in our patient by analyzing for endogenous I κ B α protein in his lysed blood cells. Western blots using an anti-I κ B α antibody (C-21, Santa Cruz) showed 2 shorter bands for the patient than for a control subject (Fig 1, E). A subsequent *in vitro* protein expression study on HEK293 cells of C-terminal FLAG-tagged I κ B α Q9X and W11X showed 2 shorter bands compared with wild-type I κ B α , while I κ B α E14X showed a single shorter band. We believe that the 2 bands are likely to be N terminus-truncated I κ B α proteins that are translated from M13 (I κ B α Δ 1-12) or M37 (I κ B α Δ 1-36) (Fig 1, F). If this is correct, the N terminus-truncated I κ B α Δ 1-36 should have no serine phosphorylation site. An NF- κ B reporter gene activity assay showed a significant dose-dependent inhibitory effect of I κ B α Q9X compared with wild-type I κ B α on LPS-stimulated Toll-like receptor 4-MD2-CD14 coexpressed HEK293 cells (Fig 1, G). On the basis of these results, we diagnosed this patient as having AD-EDA-ID.

Because NF- κ B is an essential component of immune responses, some EDA-ID patients have combined T-cell dysfunction.⁴ There are also reports of EDA-ID patients dying from complications of mycobacterial disease. In addition, NEMO deficiency was recently reported to be one of the candidate deficiencies of Mendelian susceptibility to mycobacterial disease syndrome.⁸ We therefore evaluated the patient's T-cell response by using lymphocyte proliferation assays. Lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin and concanavalin A proliferated only to low levels (Table I). As an additional feature, inflammatory bowel disease has also often been reported in XL-EDA-ID patients. The mechanism of the onset of inflammatory bowel disease with EDA-ID remains unknown, but our AD-EDA-ID patient also showed symptoms of inflammatory bowel disease.

This is the first report of an AD-EDA-ID patient with a novel Q9X mutation of the *IKBA* gene. This case also demonstrates that the screening method using LPS-stimulated intracellular TNF- α -producing CD14 cells is an effective method for the rapid diagnosis of innate immune defects, not only in IRAK4-deficient patients but also in EDA-ID patients.