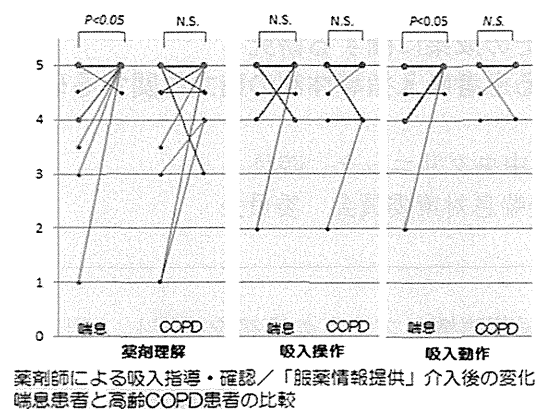
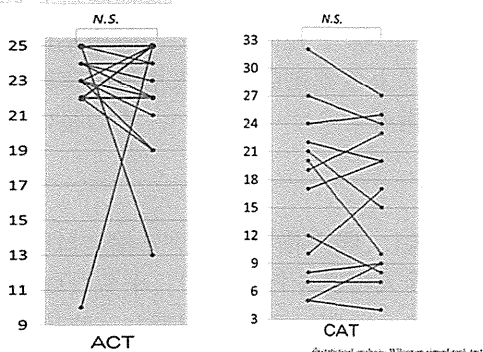


の意識をどのように改善するかも課題の1つと言える。



薬剤師による吸入指導・確認/「服薬情報提供」介入後の変化  
喘息患者と高齢COPD患者の比較



＜結果＞ 喘息・COPDにおける薬剤師による吸入指導・確認  
/「服薬情報提供」介入後の変化 (ACT・CAT)

## E. 結論

吸入薬に関する「服薬情報提供書」は喘息および COPD 患者の管理においても有用で、患者指導・医薬連携に効果的なツールとなりうる可能性があるが、高齢 COPD 患者においては効果が限定的となっている。

このシステムを活用した医師薬剤師間の情報共有は医療連携を強化し、近年問題となっている高齢喘息患者の管理を改善・維持する手立てとしても期待されるが、高齢患者においてはなんらかの追加的な教育支援策を検討する必要があると考えられた。

## G. 研究発表

### 1.論文発表

1)東元一晃、井上博雅.「喘息死ゼロ作戦」における取り組み. *International Review of Asthma and COPD*. 2012; 14(4): 185-90

### 2.学会発表

1)Higasimoto I, Shinmura M, Inoue H. Impact of Pharmaceutical Asthma Educational Program using Medication Adherence Reporting Note. The 22nd Congress of Interasthma. North-Asia. 2012. Fukuoka

2)新村昌弘、東元一晃、田上寛容、井上博雅. 喘息・COPD における医薬連携:「服薬情報提供書」を利用した連携教育プログラムの有用性に関する検討. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会. 2012. 神戸

## 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

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

『喘息死ゼロ作戦』の軌跡とその成果に関する研究  
『喘息死ゼロ』達成の基盤としての薬剤師による患者吸入指導体制の確立に関する研究

研究協力者 大林 浩幸 東濃中央クリニック 院長  
東濃喘息対策委員会 委員長

研究要旨

東濃喘息対策委員会では、2009年より積極的に医薬連携システムの構築を推進し、認定吸入指導薬剤師による患者吸入指導体制整備を行い、地区内の喘息死がほぼゼロになるまでの成果を挙げた。今回、岐阜県薬剤師会の協力と依頼を受け、岐阜県内の東濃地区以外の地区にて、同システム構築を試み、その効果を検証する。その第1段階として、関市薬剤師会、もとす薬剤師会の全面協力を得て、無記名アンケートによる薬剤師の吸入指導の実態調査を行った。さらに、両地区で東濃喘息対策委員会の吸入指導セミナーを行い、その後の検定試験で、吸入指導方法の知識の定着度を検討した。

A. 研究目的

『喘息死ゼロ作戦』の達成のため、2009年7月に組織された東濃喘息対策委員会（岐阜県）は、あらゆる医療職種が連携する独自の連携システムを構築し、現在も活動している。《第1層》病院医とプライマリー医の病診連携、専門医・非専門医間の連携、《第2層》医師と薬剤師間の医薬連携、《第3層》救急隊との連携、《第4層》行政介護職との連携といった、4層構造の病・診・薬・行政連携システムを構築し、活動を行ってきた。その中でも、《第2層》の医薬連携の構築を最重要課題と位置付け、活動を行っている。喘息治療の主軸となる吸入ステロイド薬（配合剤含む）は、患者の吸入器具（デバイス）の誤操作が多く、治療効果や患者のアドヒアランスにも大きな影響を及ぼす。そのため、吸入薬の処方を受け皿となる、薬剤師における患者吸入指導は非常に重要である。昨年度までの活動で、東濃地区内の全調剤薬局薬剤師を対象に、市販の全吸入器具（デバイス）を直接手にして、その使用法や特性を実地で学ぶ機会を提供する吸入指導セミナーを行い、全165薬局の100%受講を達成し、本年度も継続している。また、岐阜県薬剤師会の東濃地区薬剤師会と恵那地区薬剤師会の全面的な協力と許可を受けて、受講した薬剤

師対象に、吸入指導に関する検定試験を行い、患者吸入指導を行う上で、十分な知識と技量が身についているかを調査し、昨年度報告した。昨年度末までに、9回の検定試験を実施し、122名の調剤薬局薬剤師が検定受験し、その内120名が合格点に達し、委員会認定吸入指導薬剤師となった。現在、東濃地区の全薬剤師に占める認定吸入指導薬剤師は、57.7%となっている。東濃地区5市別に、各市の全薬剤師に占める認定吸入指導薬剤師率は、多治見市：43.7%、土岐市：59.1%、瑞浪市：52.9%、恵那市：40.9%、中津川市：83.8%になった。

これら昨年度までの成果を受け、岐阜県薬剤師会（山崎 太会長）と各地区薬剤師会と協議し、その依頼と協力を受けて、この東濃式の医薬連携システムを、県内の他地区にも拡充する動きが起きている。この第1段階として、県内の東濃地区以外の2か所で、これまで東濃喘息対策委員会が行ってきた、吸入指導セミナーおよび、検定試験を実施することとなった。その事前調査として、無記名式アンケートによる薬剤師の吸入指導の実態調査も行ったので報告する。

## B. 研究方法

岐阜県薬剤師会の協力と許可を得て、岐阜地区の関市薬剤師会・飛騨地区薬剤師会合同の研修会、および、西濃地区もとす薬剤師会の2か所で、東濃喘息対策委員会が行ってきたものと同じ内容の吸入指導セミナーおよび、検定試験を実施する。検定試験は、吸入指導セミナーを受講した薬剤師のみが受けることとし、患者吸入指導を行う上で、十分な知識と技量が身につけているか、セミナー内容の習得度や理解度を調査する。また、無記名式のアンケートにより薬剤師の実態調査を行う。本研究は、岐阜県薬剤師会と地区薬剤師会の全面的な協力と許可を受けて、行われた。

(倫理面への配慮)

岐阜県薬剤師会地区薬剤師会の許可の基、その主体的な協力が得られる地区のみで吸入指導セミナーと検定試験を行った。受験希望がある薬剤師のみを対象とし、アンケートは無記名とし、検定試験結果は個人情報として、岐阜県薬剤師会地区薬剤師会および、東濃喘息対策委員会の責任の基、厳格に扱う

## C. 研究結果

### 1) 薬剤師実態調査アンケート結果

関市薬剤師会 27名、もとす薬剤師会 26名より回答が得られた。各問の回答を表に示す。

問1.日常業務で、患者さんに吸入指導する頻度はどの程度ありますか？

	全体	関市	もとす
1度もない	8.6	3.7	12.9
年に数件	19.0	25.9	12.9
月に数件	41.4	37.0	45.2
週に数件	17.2	18.5	16.1
1日に数件	13.8	14.8	12.9
それ以上	0.0	0.0	0.0

関市、もとすの各薬剤師会で分布に差はあるが、ほぼ4割の薬局は、月に数件の吸入指導を行っている。

問2.患者さんへの吸入指導はどのようにしていますか？

	全体	関市	もとす
指導していない	3.5	3.7	3.2
添付説明書を読むよう促すのみ	3.5	3.7	3.2
説明書を見ながら患者に実践させるのみ	13.8	14.8	12.9
模範を示すのみ	41.4	37.0	45.2
模範を示し、患者も実践	37.9	40.7	35.5

薬剤師が模範を示し、患者にも練習させる双方向性の吸入指導が行われている薬局は、各薬剤師会の4割程度であり、薬局間に格差があり、充実した吸入指導がなされていない薬局が過半数を占める実態が示されている。

問3.自信を持って患者指導できていますか？

	全体	関市	もとす
非常に自信ある	1.7	0.0	3.2
自信がある	32.8	25.9	38.7
どちらでもない	27.6	37.0	19.4
なんとなく自信がない	29.3	29.6	29.0
全く自信がない	8.6	7.4	9.7

日々の吸入指導に自信を持って行えている薬剤師は、両地区とも3割程度であり、患者指導内容が不安定な薬局が、過半数を占める実態が示されている。

問4.薬局において、患者吸入指導を行う役割は重要とご思いますか？

	全体	関市	もとす
非常に重要である	84.5	85.2	83.9
重要である	15.5	14.8	16.1
どちらでもない	0.0	0.0	0.0
重要ではない	0.0	0.0	0.0

ほぼ全ての薬剤師が吸入指導の重要性を認識している。

問5.薬剤師の先生ご自身が、正しい吸入方法の指導を受けたことはありますか？

	全体	関市	もとす
一度もない	31.0	37.0	25.8
過去に1回あった	32.8	22.2	41.9
過去に複数回あった	34.5	37.0	32.3
今もしばしばある	1.7	3.7	0.0

半数以上の薬剤師自身が、過去に1度、あるいは吸入指導方法の指導を受けたことが無い

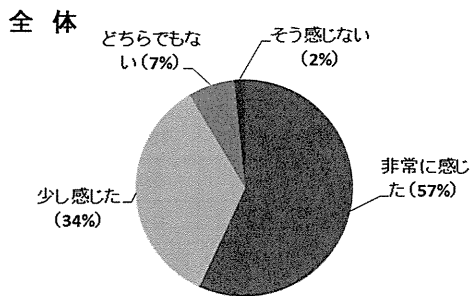
実態が明らかとなり、十分な知識が無いまま、患者吸入指導に臨んでいる実態が明らかになった。

**問 6.これまで直接接触したことのある吸入デバイスの頻度は？**

%	ディスク ス	ディスク ヘラー	タービュ ヘラー	ツイスト ヘラー	p MDI	ブリー ズヘラー	ハンディ ヘラー	レスピマ ット
一度もない	6.4	2.2	6.4	63.8	39.1	76.6	26.1	20.0
過去に1~2回	8.5	23.9	12.8	12.8	6.5	19.1	13.0	17.8
過去に数回	42.6	39.1	38.3	17.0	37.0	4.3	28.3	37.8
しばしばある	42.6	34.8	42.6	6.4	17.4	0.0	32.6	24.4

デバイスごとに大きな格差があり、ディスクス、ディスクヘラー、タービュヘラー、ハンディヘラー、レスピマットは、ほとんどの薬剤師が実際にデバイスに触れている経験があった。しかし、その一方で、ディスクス以外のデバイスでは、3割の薬剤師が、過去に1~2度触ったことがあるか、吸入指導セミナーで初めて触れた程度であった。ツイストヘラーやブリーズヘラーは、7~8割以上の薬剤師が過去に1~2度触ったことがあるか、吸入指導セミナーで初めて触れていた程度であった。

**問 7.セミナー後、これまで患者さんに間違っ  
た(曖昧な)指導をしていたと感じまし  
たか？**



(%)	関市	もとす
非常に感じた	59.3	54.9
少し感じた	33.3	35.5
どちらでもない	3.7	9.7
そう感じない。	3.7	0

全体の57%が非常に感じ、34%が少し感じており、9割以上の薬剤師が日々の患者吸入指導が間違っ(曖昧な)者であったと回答している。

**2) 吸入指導セミナー (写真 1)**

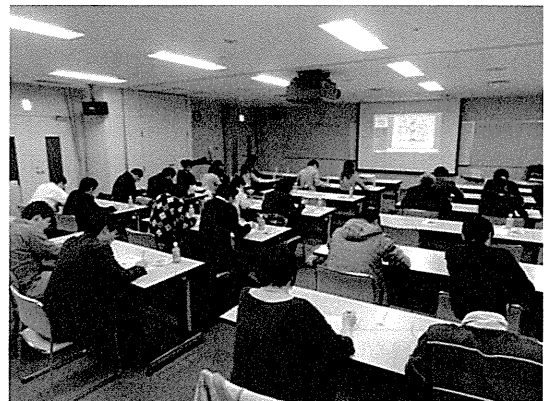
関市薬剤師会 28名、もとす薬剤師会 35名の参加があった。セミナー受講完了後、全員が東濃喘息対策委員会による検定試験を受ける受験条件を満たした。



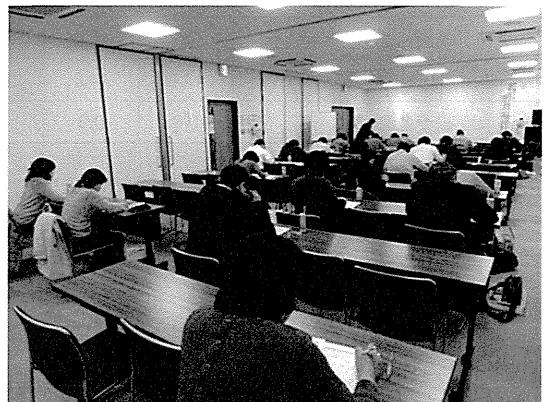
写真 1)吸入指導セミナーの様子 関市薬剤師会

**3) 検定試験とその結果 (写真 2)**

検定試験受験数：関市薬剤師会 27名、もとす薬剤師会 26名であった。検定試験採点結果：関市薬剤師会：82.9+/-10.9点、もとす薬剤師会：84.2+/-9.9点であり、全員が合格基準を満たした。



関市薬剤師会検定試験



もとす薬剤師会検定試験



写真 2) 検定試験問題と、検定試験の様子

#### D. 考察

東濃喘息対策委員会では、2009年より、医薬連携を推進し、認定吸入指導薬剤師の体制整備を積極的に行い、地区内の喘息死がほぼゼロになるまでの成果を挙げた。今回、岐阜県薬剤師会の協力と依頼を受け、岐阜県内の東濃地区以外の地区にて、これまで活動してきた東濃喘息対策委員会のシステムを構築する試みを行うこととなった。その第1段階として、東濃地区以外の薬剤師の実態アンケート調査を行った。その結果、ほぼ全ての薬剤師が吸入指導の重要性を認識している中で、自信を持って患者吸入指導を行えている薬剤師が、驚くほど少数である実態が浮き彫りとなった。半数以上の薬剤師自身が、これまでの確な吸入指導方法の指導を受けたことが無く、セミナー後には、9割以上の薬剤師がこれまでの患者吸入指導が誤っていた、あるいは曖昧であったと回答した。さらに、薬剤師自身が、当セミナーまでほとんど触れたことが無かった吸入デバイスが多くあり、デバイスごとの経験にも大きな格差があることも分かった。処方箋が突然持ち込まれることで、実際に触れた経験が十分に無いデバイスにもかかわらず、その患者吸入指導を行わなければならない場面が日常的に想起できる状態で

あった。この事態は、患者の吸入薬に対する理解やアドヒアランスに大きな悪影響が及ぶ可能性があり、喘息死ゼロ達成の障壁になる。薬剤師は、現在市販されている吸入薬の全てのデバイスに精通している必要があるが、それが行われていない現状がわれわれの前にある。

今回、吸入指導セミナーでは、市販の全ての吸入デバイスの使用を実体験し、正しい吸入手技操作の手順方法や誤った吸入操作法を十分な時間をとり、実地で解説した。その結果、セミナーを終了後、ほぼ全ての薬剤師が正しい吸入指導法を理解し、その後の検定試験に臨むことが出来た。検定試験の結果、両薬剤師会会員とも、平均点で8割以上の正答率が得られており、実際に日常臨床現場で患者吸入指導が可能な実力が十分に取得されたと考えられる。

#### E. 結論

東濃喘息対策委員会で行ってきた、薬剤師対象の吸入指導セミナーによる吸入指導方法と、それを基盤とした検定システムは、他地区の薬剤師の吸入指導方法の定着化に有効である。今後、岐阜県内の、さらに多くの地区において、実施を予定している。

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

- 1)大林浩幸. 岐阜県東濃地区の『喘息死ゼロ作戦』(均一で良質な吸入指導体制の確立に向けて). 日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌 2012; 10(1):7-12
- 2)大林 浩幸.『吸入デバイス操作のピットホール — 添付説明書だけで本当に的確な吸入が出来るのか?—』. 喘息. 2012; 25(2); 1-4
- 3)大林浩幸. 吸入指導のコツとピットホール. クリニシアン. 2012; 692; 151-156
- 4) 大林浩幸. 患者側の要因：服薬アドヒアランスと吸入手技（難治性喘息とみなされる吸入デバイス誤操作）. 呼吸器内科.

2013. in press

- 5)大林浩幸. 成人気管支喘息の難治化要因とその対策. 吸入指導はなぜ必要か? どのような指導が最も効果的か? アレルギー免疫. 2013: in press

## 2.学会発表

- 1)大林浩幸、奥村昌彦、山田秀樹. 岐阜県東濃地区における患者吸入指導体制構築の試み. 第24回日本アレルギー学会春季臨床大会. 大阪.
- 2)大林浩幸. 「患者吸入指導のコツと吸入デバイス操作法のピットホール」. 第56回日本薬学会関東支部大会 ランチョンセミナー. 2012.10.13, 東京.
- 3)大林浩幸. 「地域で築く医療ネットワーク」岐阜県東濃地区の医薬連携による患者吸入指導体制整備の試み. 第56回日本薬学会関東支部大会 シンポジウム 2. 2012.10.13, 東京.

- 4)大林浩幸. 『効率的な吸入指導を行うためのQ and A』. 教育講演 5、第24回日本アレルギー学会秋季学術大会.2012.11.29, 大阪.

- 5)大林浩幸. Establishment of certified inhalation guidance pharmacists to enhance patients' adherence. 国際シンポジウム 2、第24回日本アレルギー学会秋季学術大会.2012.11.29,大阪.

- 6)大林浩幸. 吸入デバイスに対する市中調剤薬局薬剤師の実態調査. 第25回日本アレルギー学会春季臨床大会. 2013、横浜.

## 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

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

乳幼児気管支喘息の非侵襲的診断方法に関する研究  
—尿中ロイコトリエン E4 について—

研究協力者	森川 昭廣	群馬大学名誉教授 社会福祉法人希望の家附属北関東アレルギー研究所所長
	荒川 浩一	群馬大学大学院医学系研究科小児科学教授
	滝沢 琢己	群馬大学大学院医学部研究科小児科学准教授
	田端 雅彦	医療法人恵洋愛会どんぐりこども診療所院長
	小山 晴美	群馬大学大学院医学系研究科小児科学
	佐藤 幸一郎	群馬大学大学院医学系研究科小児科学

**研究要旨**

乳幼児喘息の鑑別診断のためのマーカーの候補として、尿中ロイコトリエン E4 の測定を行い、次の成果を得た。

1. 乳幼児で初めて喘息を呈し、RSウイルス感染を否定できた患児について尿中ロイコトリエン E4 を測定したところ、 $\beta$  刺激薬に反応のない児（非RSウイルス性細気管支炎の疑い）では高値を示し、一方、反応のある児（乳児喘息の疑い）では低値を示した。
2. 尿中ロイコトリエン E4 は間欠型の喘息では必ずしも高値を示さなかった。
3. 初回喘息群について、今後経過観察を行うとともにその他のマーカーを検討する必要がある。

**A. 研究目的**

乳幼児喘息においては、早期診断、早期治療が重要である。しかし、この時期の喘息は種々の疾患で観察され、その鑑別は必ずしも容易ではない。現在では、気道感染の有無に関わらず、明らかな呼気性喘息を3エピソード以上繰り返した場合の、広義の乳児喘息と診断している。

広義の乳児喘息は、喘息のみならず、ウイルス感染に伴った喘息群を含む可能性があり、IgE、特異的 IgE 抗体、好酸球数などのマーカー測定が望まれるが、年齢的に困難な場合が少なくない。我々が昨年度、気管支喘息の重症度決定に関する研究の中で、尿中ロイコトリエン測定の方法を確立した。

そこで、本年は非侵襲的に採取できる尿中ロイコトリエン E4 測定が喘息を有する児の鑑別診断に使用しうるか否かを検討した。

**B. 研究方法**

**1) 測定方法**

尿中ロイコトリエン E4 は本研究班において、平成 23 年度に報告した方法により測定した。すなわち、従来の方法に、i) 除蛋白、ii) 尿へのフリーラジカルスカベンジャー使用、iii) メタノールによる親水化、iv) ELISA の使用、等を考慮し、図 1 の方法で資料を調整し、測定は ELISA Kit (Cysteny1 Leukotriene Express EIA Kit) で行った。

**2) 喘息患児**

研究協力者 MT の診療所を平成 23 年 10 月から平成 24 年 3 月までに受診した乳幼児喘息疾患患者について検討した。(表 1)

i) 初回呼気性喘息群 1 ( $\beta$  刺激薬非改善群、図 2 で 1 episode-A と表記)。1 回の喘息のエピソードがあり、RSウイルス陰性かつ家族歴で喘息・アトピー性皮膚炎、花粉症またはアレルギー性鼻炎がある患者 (13 名)。平均年齢は 1 歳 2 ヶ月 (m : f、8 : 5)

ii) 初回呼気性喘鳴群 2 i と同様であるが、 $\beta 2$  刺激薬の吸入で改善が認められた者 (14 名)。(図 2 で 1 episode-B と表記)。平均年齢は 1 歳 6 ヶ月 (m : f、10 : 4)

iii) 発熱対照群 発熱はあるが、尿路感染や喘鳴のない者。RS ウイルスは陰性であり、家族歴に喘息・アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎のない者 (14 名)。平均年齢 6 ヶ月 (m : f、10 : 4) (図 2 で Ctrl と表記)

iv) 間欠型喘息群すでに JPGL2012 の乳幼児喘息の基準を満たし、その重症度は間欠型である者 14 名。平均年齢 6 歳 2 ヶ月 (m : f、6 : 8) (図 2 で intermittent と表記)。

これらの患児は採尿から 1 か月前までの服薬や吸入後の治療を行わず、また RS ウイルス陰性と確認できた者である。

(倫理面への配慮)

被験者ならびに保護者には事前にその内容、意義等について説明し、自由参加であることを述べ書面で承諾を得た。

### C. 研究結果

i) 非 R A ウイルス感染喘鳴群と対照群の尿中ロイコトリエン E4 について (図 2)

図 2 に示したように、尿中ロイコトリエン量は、コントロール群に比して 1 episode-A 群が有意に高値を示した。A、B 両群の間に有意差は認められなかった。

ii) 間欠型喘息群では、尿中ロイコトリエン量は、1 episode-A 群や対照群に比して有意に低値であった。

### D. 考察

ロイコトリエン C4、D4 はアレルギー性疾患において重要な chemical mediator であり、尿中にはその最終代謝産物であるロイコトリエン E4 として排泄される。その測定についてはすでに 1990 年代に行われ、尿中ロイコトリエン E4 が増加する疾患としては、アスピリン、喘息、好酸球性鼻ポリープ、血管炎、重症喘息(または発作時)アナフィラキシー、好酸球性肺炎などが挙げられている。その後、小児・成人についてその測定値は重症度、肺機能との相関が報告され、非侵襲的バイオマーカーとして報告されてきた。しかし、これ

らの値は治療により変化することが知られており、抗ロイコトリエン薬や ICS の使用では減少することが知られている。

今回、乳幼児で初めて喘鳴を呈し、RS ウイルス感染を否定できた未治療の患児について尿中ロイコトリエン E4 を測定し検討したところ、高値を示した児では  $\beta 2$  刺激薬に対する反応がなく、一方低値を示した群では反応がみられた。今後の検討にもよるが、喘鳴を呈する乳幼児の鑑別診断には、 $\beta 2$  刺激薬の反応性に加えて尿中ロイコトリエン E4 もその参考項目になるものと思われた。今後さらにこれらの患者を追跡し喘息発症との関連を観察する予定である。

### E. 結論

喘鳴を呈する乳幼児の尿中のロイコトリエン E4 の測定を行った。尿中ロイコトリエン E4 の測定は乳幼児の喘名を呈する気道感染症の病態を表す一つとして関あげられ、また乳幼児の喘鳴の鑑別診断に有用である可能性があると考えられた。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

11) 宇理須厚雄、ほか：重症心身障害児 (者) 気管支喘息診療ガイドライン 2012 日本重症心身学会雑誌 2012

#### 2. 学会発表

- 1) 森川昭廣：「JPGL2012 について」～ならびに喘息患者に合併する疾患の治療について～. 第 3 回小児喘息セミナー. 2012 : 沖縄
- 2) 荒川浩一ほか：小児科領域におけるバイオマーカーの最新情報 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2012 : 大阪

### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし



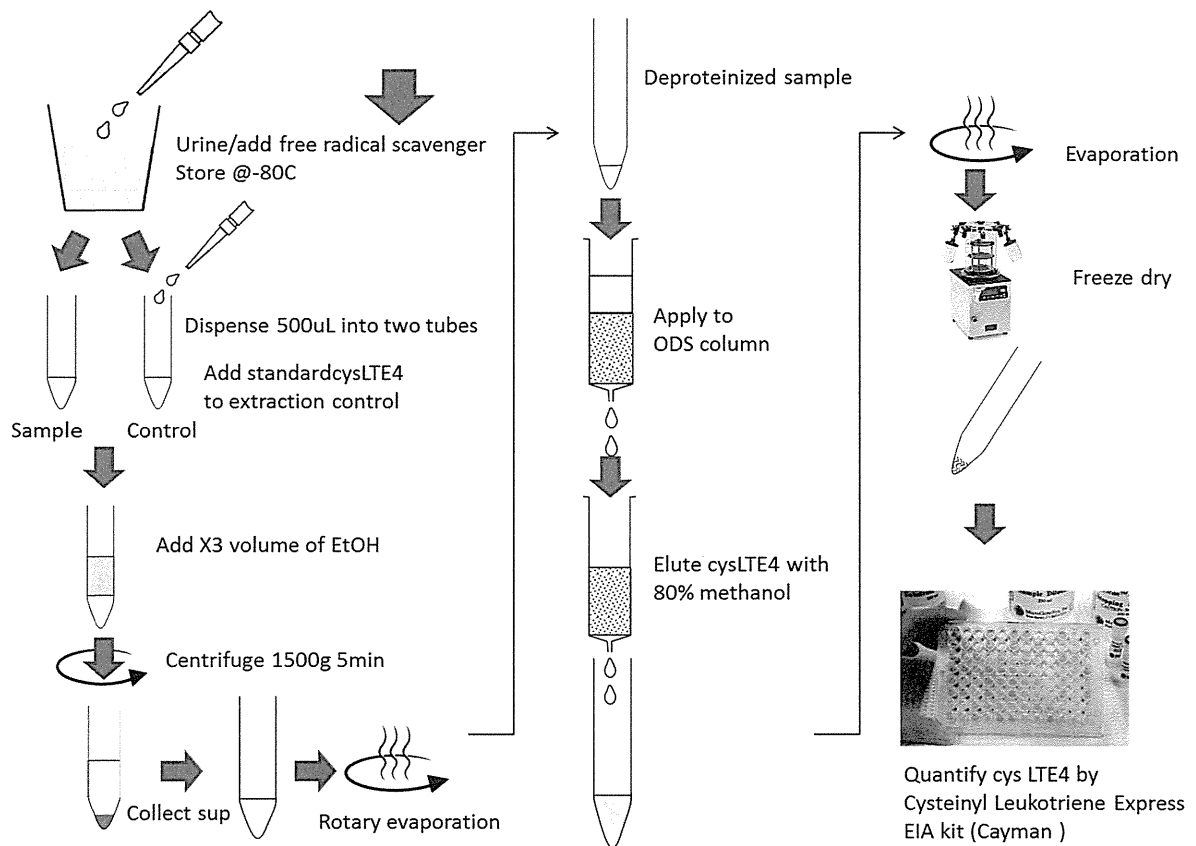


図 1. 測定方法

表 1. 対象

	初回呼吸性喘鳴群 1	初回呼吸性喘鳴群 2	発熱対照群	間欠型喘息群
n	13	14	14	14
平均年齢	1歳2ヶ月	1歳6ヶ月	6ヶ月	6歳2ヶ月
男女比	8:5	10:4	10:4	6:8
RS ウイルス	陰性	陰性	陰性	陰性
家族歴	あり	あり	なし	あり
β2 吸入に対する反応性: 呼吸音の改善や喘鳴の消失	改善 乏しい	改善あり		
血清 IgE 値				18.3~ 2303

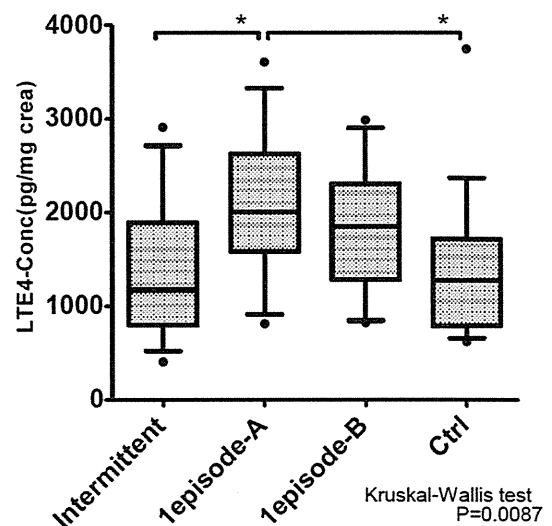


図 2. 非RS ウイルス感染喘鳴群と対照群の比較

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
大田健、長瀬洋之、向井功	III 副作用各論—重大な副作用—呼吸器 間質性肺炎	日本臨牀社	日本臨牀 70巻増刊号6 医薬品副作用学(第2版)	日本臨牀社	東京	2012	517-520
大田健	第3編抗体応用技術 I-疾患概論 第2章アレルギー疾患1節 気管支喘息	浜窪隆雄、津本浩平、巖倉正寛、岡部尚文、柘植郁哉、野村文夫	新機能抗体開発ハンドブック	エヌ・ティー・エス	東京	2012	277-283
大田健、新井秀宜	重症喘息発作	貫和敏博 他	呼吸器疾患最新の治療2013-2015	南江堂	東京	2013	173-175

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻(号)	ページ	出版年
大田健	ガイドラインとその活用のしかた	Medical Practice	29	543-550	2012
大田健	国際ガイドライン(GINA)アップデート	最新医学	6	1225-1228	2012
鈴木真穂、大田健	レプチンと好塩基球機能	臨床免疫・アレルギー科	58(1)	99-104	2012
大田健	GINA 改訂のポイント	International Review of Asthma & COPD	14(2)	34-37	2012
足立満、大田健、東田有智、森川昭廣、西間三馨、向井功	日本における喘息患者実態電話調査 2011—Asthma Insights and Reality in Japan 2011: AIRJ 2011—	アレルギー—免疫	19(10)	60-68	2012
大田健	『喘息予防・管理ガイドライン 2012』改訂のポイント	International Review of Asthma & COPD	15(1)	34-38	2013
大田健	「喘息予防・管理ガイドライン 2012」のワンポイント解説(成人)	アレルギー—	62(2)	139-143	2013
大田健	成人気管支喘息の難治化要因とその対策 I 総論～難治性喘息のフェノタイプとエンドタイプ～	アレルギー—免疫	20(4)	12-17	2013

Sugimoto N, Yamaguchi M, Tanaka Y, Nakase Y, nagase H, Akiyama H, Ohta K	The basophil activation test identified carminic acid as an allergen inducing anaphylaxis	J Allergy Clin Immunol: In Practice	20(4)	197-199	2013
齋藤明美、釣木澤尚実、押方智也子、中澤卓也、安枝浩、秋山一男	日本における空气中ダニアレルゲン測定法としてのシャーレ法の評価	アレルギー	61	1657-1664	2012
surikisawa N, Oshikata C, Tsuburai T, Mitsui C, Tanimoto H, Takahashi K, Sekiya K, Nakazawa T, Minoguchi K, Otomo M, Maeda Y, Saito H, Akiyama K	Markers for Step-down of Inhaled Corticosteroid Therapy in Adult Asthmatics.	Allergol Int	61	419-429	2012
Tsurikisawa N, Saito H, Oshikata C, Tsuburai T, Akiyama K.	High-dose intravenous immunoglobulin treatment increases regulatory T cells in patients with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis.	J Rheumatol	39	1019-1025	2012
押方智也子、釣木澤尚実、他	多発嚢胞性陰影を呈した human T-cell leukemia virus I 関連気管支肺炎症/細気管支肺炎異常症の1剖検例.	日本呼吸器学会誌	1	78-82	2012
Oshikata C, Tsurikisawa N, Takigawa M, Omori T, Sugano S, Tsuburai T, Mitomi H, Takemura T, Akiyama K.	An adult patient with Henoch-Schönlein purpura and non-occlusive mesenteric ischemia.	BMC Res Notes	23(6)	26	2013
Munakata M.	Exhaled nitric oxide (FeNO) as a non-invasive marker of airway inflammation.	Allergol Int	61(3)	365-372	2012
Munakata M.	Respiratory medicine during the great East Japan earthquake and tsunami: what we as respiratory physicians can learn from Japan's complex 3.11 disasters.	Respir Invest	50(4)	123	2012
Sato S, Tanino Y, Saito J, Nikaido T, Inokoshi Y, Fukuhara A, Fukuhara N, Wang X, Ishida T, Munakata M.	The relationship between 25-hydroxyvitamin D levels and treatment course of pulmonary tuberculosis	Respir Investig	50(2)	40-45	2012
Fukuhara A, Sato S, Uematsu M, Misa K, Nikaido T, Inokoshi Y, Fukuhara N, Wang X, Kanazawa K, Tanino Y, Ishida T, Munakata M.	Impacts of the 3/11 disaster in fukushima on asthma control.	Am J Respir Crit Care Med	186(12)	1309-1310	2012
Saito J, Sato S, Fukuhara A, Sato Y, Nikaido T, Inokoshi Y, Fukuhara N, Saito K, Ishii T, Tanino Y, Ishida T, Munakata M.	Association of Asthma Education with Asthma Control Evaluated by Asthma Control Test, FEV(1), and Fractional Exhaled Nitric Oxide.	J Asthma	50(1)	97-102	2013

Tanino Y, Chang MY, Wang X, Gill SE, Skerrett S, McGuire JK, Sato S, Nikaido T, Kojima T, Munakata M, Mongovin S, Parks WC, Martin TR, Wight TN, Frevert CW.	Syndecan-4 regulates early neutrophil migration and pulmonary inflammation in response to lipopolysaccharide.	Am J Respir Cell Mol Biol	47(2)	196-202	2012
棟方充	東日本大震災における放射線汚染と避難命令への対応	日本胸部臨床	71(3)	224-231	2012
棟方充	気管支喘息、COPD 安定期の治療中等症以上の気管支喘息の治療はどうあるべきか	Medicina	49(3)	461-464	2012
佐藤俊、棟方充	呼吸器疾患 慢性咳嗽.	診断と治療	100	S47-S53	2012
佐藤俊、棟方充	炎症病態の診療上の意義とその評価	Medical Practice	29(4)	591-594	2012
佐藤俊、棟方充	難治性喘息の表現型	最新医学	67(6)	73-78	2012
佐藤俊、棟方充	先天性ならびに遺伝子異常に伴う気道病変 先天性疾患線毛異常症	日本胸部臨床	71	S81-S86	2012
佐藤俊、棟方充	NO など客観的指標を用いた吸入ステロイド療法のモニタリング.	喘息	25(2)	50-55	2012
Kaneko Y, Yatagai Y, Yamada H, Iijima H, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N	The search for common pathways underlying asthma and COPD.	Int J Chron Obstruct Pulmon Dis	8	65-78	2013
Ano S, Morishima Y, Ishii Y, Yoh K, Yageta Y, Ohtsuka S, Matsuyama M, Kawaguchi M, Takahashi S, Hizawa N	Transcription Factors GATA-3 and ROR $\gamma$ t Are Important for Determining the Phenotype of Allergic Airway Inflammation in a Murine Model of Asthma.	J Immunol	190(3)	1056-1066	2013
Tomita K, Sakashita M, Hirota T, Tanaka S, Masuyama K, Yamada T, Fujieda S, Miyatake A, Hizawa N, Kubo M, Nakamura Y, Tamari M	Variants in the 17q21 asthma susceptibility locus are associated with allergic rhinitis in the Japanese population	Allergy	68(1)	92-100	2013
Iijima H, Kaneko Y, Yamada H, Yatagai Y, Masuko H, Sakamoto T, Naito T, Hirota T, Tamari M, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N	A Distinct Sensitization Pattern Associated with Asthma and the Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) Genotype	Allergol Int	[Epub ahead of print]		2012
Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, Yatagai Y, Yamada H, Konno S, Nishimura M, Noguchi E, Hizawa N	Asthma Phenotypes in Japanese Adults - Their Associations with the CCL5 and ADRB2 Genotypes	Allergol Int	[Epub ahead of print]		2012
Hizawa N	Associating Serum Biomarkers with Genetic Susceptibility to Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Step towards Improved Diagnosis and Therapy?	Am J Respir Crit Care Med	186(12)	1201-1202	2012

Hizawa N	The search for genetic links in NSAID-induced acute urticaria and the arachidonic acid pathway	Clin Exp Allergy	42(12)	1660-1663	2012
Hirota T, Takahashi A, Kubo M, Tsunoda T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Tanaka S, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Okumura K, Ogawa H, Ikeda S, Noguchi E, Sakamoto T, Hizawa N, Ebe K, Saeki H, Sasaki T, Ebihara T, Amagai M, Takeuchi S, Furue M, Nakamura Y, Tamari M	genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population	Nat Genet	44(11)	1222-6	2012
Fujita J, Kawaguchi M, Kokubu F, Ohara G, Ota K, Huang SK, Morishima Y, Ishii Y, Satoh H, Sakamoto T, Hizawa N	Interleukin-33 induces interleukin-17F in bronchial epithelial cells	Allergy	67(6)	744-750	2012
Konno S, Hizawa N, Fukutomi Y, Taniguchi M, Kawagishi Y, Okada C, Tanimoto Y, Takahashi K, Akasawa A, Akiyama K, Nishimura M	The prevalence of rhinitis and its association with smoking and obesity in a nationwide survey of Japanese adults	Allergy	67(5)	653-660	2012
Kaneko Y, Masuko H, Sakamoto T, Iijima H, Naito T, Hizawa N	The opposite effect of the CCL5 gene on asthma and baseline FEV(1) in nonasthmatic healthy adults	Allergol Int	61(1)	177-178	2012
Hirai Y, Iyoda M, Shibata T, Kuno Y, Kawaguchi M, Hizawa N, Matsumoto K, Wada Y, Kokubu F, Akizawa T	IL-17A stimulates granulocyte colony-stimulating factor production via ERK1/2 but not p38 or JNK in human renal proximal tubular epithelial cells	Am J Physiol Renal Physiol	302(2)	F244-250	2012
Hattori T, Konno S, Shigemura M, Matsuno K, Shimizu C, Shigehara K, Shijubo N, Hizawa N, Yamaguchi E, Nishimura M	Total serum IgE levels and atopic status in patients with sarcoidosis	Allergy Asthma Proc	33(1)	90-94	2012
Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kawamoto N, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Funasaka T, Nakano H, Wong RW, Shirakawa M, Kondo N	TRAM is involved in IL-18 signaling and functions as a sorting adaptor for MyD88	PLoS One	7	e38423	2012
Nada M, Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Kamatari YO, Tsutsumi N, Shirakawa M, Kondo N	Molecular analysis of the binding mode of Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain proteins during TLR2 signaling	Mol Immunol	52	108-116	2012

Kawamoto N, Fukao T, Kaneko H, Hirayama K, Sakurai S, Arai T, Kondou M, Kawamoto M, Matsui E, Teramoto T, Kasahara K, Bai C, Zhang G, Omoya K, Matsukuma E, Morimoto M, Suzuki H, Aoki Y, Kimura T, Nada M, Morita H, Tokumi T, Takemura M, Seishima M, Shiraki M, Iwasa S, Kondo N	Risk factors for infantile atopic dermatitis and recurrent wheezing	J Investig Allergol Clin Immunol.	22	116-125	2012
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	32	221-229	2012
Teramoto T, Kasahara K, Kondo N	Structural property of soybean protein P34 and specific IgE response to recombinant P34 in patients with soybean allergy	Int J Mol Med	29	153-158	2012
田中明彦, 横江琢也, 橋本直方, 山本真弓, 渡部良雄, 大田進, 山口宗大, 水間紘子, 大脇理子, 足立満	ガイドラインに基づく軽症喘息患者の治療目標の設定	呼吸	31(12)	689-693	2012
足立満, 田中明彦	気管支喘息治療最近の話題 - 抗IgE抗体治療を中心として -	日本内科学会雑誌	101(3)	689-693	2012
Tanaka A, Minoguchi K, Pawankar R, Adachi M	Asthma in Patients With Japanese Cedar Pollinosis	World Allergy Organization Journal	5	S218-S222	2012
田中明彦	喘息難治化の要因と治療 - IgE の位置付け	アレルギーの臨床	32(14)	1310-1314	2012
田中明彦	抗IgE抗体療法の現状と新たな展開	臨床免疫・アレルギー科	59(1)	64-70	2013
元一晃, 井上博雅	「喘息死ゼロ作戦」における取り組み	International Review of Asthma and COPD	14(4)	185-190	2012
大林浩幸	岐阜県東濃地区の『喘息死ゼロ作戦』（均一で良質な吸入指導体制の確立に向けて）	日本小児難治喘息・アレルギー疾患学会誌	10(1)	7-12	2012
大林浩幸	成人気管支喘息の難治化要因とその対策. 吸入指導はなぜ必要か? どのような指導が最も効果的か?	アレルギー免疫	25(2)	1-4	2012
大林浩幸	吸入指導のコツとピットホール	クリニカル	692	151-156	2012

大林浩幸	大林浩幸. 患者側の要因：服薬アドヒアランスと吸入手技（難治性喘息とみなされる吸入デバイス誤操作）	呼吸器内科		in press	2013
大林浩幸	成人気管支喘息の難治化要因とその対策. 吸入指導はなぜ必要か？どのような指導が最も効果的か？	アレルギー免疫		in press	2013
Ohta K, Bousquet PJ, Aizawa H, Akiyama K, Adachi M, Ichinose M, Ebisawa M, Tamura G, Nagai A, Nishima S, Fukuda T, Morikawa A, Okamoto Y, Kohno Y, Saito H, Takenaka H, Grouse L, Bousquet J	Prevalence and impact of rhinitis in asthma. SACRA, a cross-sectional nation-wide study in Japan.	Allergy	66 (10)	1287-1295	2012
Urisu A, Ebisawa M, Mukoyama T, Morikawa A, Kondo N, Japanese Society of Allergology.	Japanese guideline for food allergy	Allergol Int	60 (2)	221-236	2011
重症心身障害児(者)気管支喘息診療ガイドライン作成WG：宇理須厚雄、岡田邦之、小河野陽一、佐藤一樹、多田羅勝義、長谷川久弥、藤澤隆夫、細木興亜、本荘哲、宮野前健、近藤直実、西間三馨、西牟田敏之、濱崎雄平、森川昭廣、大田健	重症心身障害児(者)気管支喘息診療ガイドライン 2012(日本小児アレルギー学会，日本小児呼吸器疾患学会，日本重症心身障害学会)	日本小児呼吸器学会雑誌	23 (2)	206-216	2012

#### IV. 主な成果物



# TRAM Is Involved in IL-18 Signaling and Functions as a Sorting Adaptor for MyD88

Hidenori Ohnishi<sup>1\*</sup>, Hidehito Tochio<sup>2\*</sup>, Zenichiro Kato<sup>1</sup>, Norio Kawamoto<sup>1</sup>, Takeshi Kimura<sup>1</sup>, Kazuo Kubota<sup>1</sup>, Takahiro Yamamoto<sup>1</sup>, Tatsuyoshi Funasaka<sup>3</sup>, Hiroshi Nakano<sup>3</sup>, Richard W. Wong<sup>3</sup>, Masahiro Shirakawa<sup>2</sup>, Naomi Kondo<sup>1</sup>

**1** Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Gifu University, Gifu, Japan, **2** Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan, **3** Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Department of Biology, School of Natural System, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, Japan

## Abstract

MyD88, a Toll/interleukin-1 receptor homology (TIR) domain-containing adaptor protein, mediates signals from the Toll-like receptors (TLR) or IL-1/IL-18 receptors to downstream kinases. In MyD88-dependent TLR4 signaling, the function of MyD88 is enhanced by another TIR domain-containing adaptor, Mal/TIRAP, which brings MyD88 to the plasma membrane and promotes its interaction with the cytosolic region of TLR4. Hence, Mal is recognized as the “sorting adaptor” for MyD88. In this study, a direct interaction between MyD88-TIR and another membrane-sorting adaptor, TRAM/TICAM-2, was demonstrated *in vitro*. Cell-based assays including RNA interference experiments and TRAM deficient mice revealed that the interplay between MyD88 and TRAM in cells is important in mediating IL-18 signal transduction. Live cell imaging further demonstrated the co-localized accumulation of MyD88 and TRAM in the membrane regions in HEK293 cells. These findings suggest that TRAM serves as the sorting adaptor for MyD88 in IL-18 signaling, which then facilitates the signal transduction. The binding sites for TRAM are located in the TIR domain of MyD88 and actually overlap with the binding sites for Mal. MyD88, the multifunctional signaling adaptor that works together with most of the TLR members and with the IL-1/IL-18 receptors, can interact with two distinct sorting adaptors, TRAM and Mal, in a conserved manner in a distinct context.

**Citation:** Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kawamoto N, Kimura T, et al. (2012) TRAM Is Involved in IL-18 Signaling and Functions as a Sorting Adaptor for MyD88. *PLoS ONE* 7(6): e38423. doi:10.1371/journal.pone.0038423

**Editor:** Tianyi Wang, University of Pittsburgh, United States of America

**Received:** February 8, 2012; **Accepted:** May 9, 2012; **Published:** June 7, 2012

**Copyright:** © 2012 Ohnishi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Sports Science, Culture and Technology of Japan and by Health and Labour Science Research Grants for Research on Intractable Disease from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: ohnishih@gifu-u.ac.jp (HO); tochio@moleng.kyoto-u.ac.jp (HT)

## Introduction

Toll-like receptors (TLRs) are representative innate immune receptors that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). MyD88, a cytosolic adaptor protein, is involved in the signaling pathways initiated by all of the reported TLRs with the exception of TLR3 [1]. Usually, PAMPs first bind to the extracellular domain of the TLRs, and the cytosolic region of TLRs then interact with MyD88, which allows the signal to be transmitted to the downstream kinase Interleukin (IL)-1 receptor associated kinase 4 (IRAK4). The resulting activation of IRAK4 eventually leads to the activation of the transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 via conserved phosphorylation cascades [2]. MyD88 is composed of two functional domains: an N-terminal death domain (DD) and a C-terminal Toll/Interleukin-1 receptor homology (TIR) domain [3]. The DD is a protein interaction module that is involved in a variety of cellular events. Similar to the DD, the TIR domain also mediates protein-protein interactions via homotypic TIR-TIR interactions. In contrast to the DD, the TIR domain is almost exclusively found in the TLR related cytosolic adaptors or in the cytosolic regions of the TLRs, IL-1 and IL-18 receptors. Homotypic interactions of these protein interaction modules play a pivotal role in transmitting the signals

downstream from the TLR; the TIR of MyD88 interacts with the TIR of the TLRs, and the DD of MyD88 interacts with the DD of IRAK4, which forms a large protein complex called the Myddosome [4].

TLR4 signaling, the best characterized signaling pathway among a dozen of known TLR pathways, is activated by lipopolysaccharide (LPS) from gram-negative bacteria, and the pathway plays a major role in endotoxin shock. Two modes of the signaling have been described: the MyD88-dependent and MyD88-independent pathways. In the MyD88-dependent TLR4 signal transduction pathway, another TIR domain-containing adaptor protein, Mal (also called TIRAP), plays an important role. Mal binds MyD88 via a homotypic TIR interaction and then associates with the plasma membrane using its PIP2-binding domain. Thus, Mal has been suggested to serve as a “sorting adaptor” that recruits the “signaling adaptor”, MyD88, to the membrane region where the activated TLR4 resides [5]. Mal is not an essential factor for the signaling because signal transduction can occur even without Mal [6,7], but Mal can substantially facilitate the signaling. A pair of TIR domain-containing adaptors, TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF) and TRIF-related adaptor molecule (TRAM), is known to play important roles in the MyD88-independent TLR4-signaling

pathway in which TRIF and TRAM function as the signaling and the sorting adaptors, respectively. This pathway transmits signals from TLR4 at early endosomes after the LPS-induced internalization of TLR4 [8,9]. TRAM is known to deliver TRIF to the endosomes via a specific region of the plasma membrane by using its myristoylation site and polybasic region [10]. These findings indicate that the specific combinations of the sorting and the signaling TIR-containing adaptors define the specific signal transduction pathways.

MyD88 is also involved in acquired immune responses because it mediates the signals from the inflammatory cytokines IL-1 and IL-18; ligand-activated IL-1/IL-18 receptors that subsequently interact with MyD88 to trigger downstream protein kinase cascades that eventually activate the transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 in a similar manner to TLR signaling. Although the intracellular signaling pathway is similar to the MyD88-dependent TLR4 pathway, the sorting-adaptor Mal is not involved [11]. As mentioned above, TLR4 signaling is facilitated either by Mal (MyD88-dependent pathway) or TRAM (MyD88-independent pathway) in a pathway-dependent manner. The former mainly localizes in PIP2 rich plasma membrane regions, while the latter is found not only in the plasma membrane but also in the internalized early endosomes that dispatch the signals. Thus, different sorting adaptors recruit MyD88 to different membrane regions and create distinct types of signal initiation complexes. In contrast to TLR signals, IL-1/IL-18 signaling has not thus far been thought to require such sorting adaptors. Interestingly, Kagan *et al.* reported that an engineered MyD88 that is endowed with PIP2 binding ability could rescue the LPS-TLR4 signaling in mouse embryonic fibroblast (MEF) cells from MyD88 and Mal double knockout mice, although it failed to rescue IL-1 signaling in the cells [5]. This observation suggests that TLR4 and IL-1R are located in distinct regions of the plasma membrane, which then raises the hypothesis that unidentified sorting adaptors selectively bring MyD88 to the appropriate membrane region to form signal initiation complexes with activated IL-1 and IL-18 receptors.

In this study, we sought the sorting adaptor for IL-18 signaling and discovered that TRAM is responsible for this function. TRAM was demonstrated to directly interact with MyD88 in *in vitro* binding experiments in which a homotypic TIR-TIR interaction plays a vital role. The efforts to identify the interacting sites in the MyD88-TIR interaction revealed that two surface sites of MyD88-TIR are direct interfaces with TRAM-TIR. Interestingly, these interaction sites overlap with the sites for Mal binding [12]. Furthermore, cellular assays demonstrated the functional involvement of TRAM in the IL-18 signal transduction, and TRAM changed the localization of MyD88 from the cytosol to the membranous regions. These new findings strongly suggest that TRAM is the membrane-sorting adaptor for MyD88 in IL-18 signaling and plays a critical role in transmitting the signal. Thus, the mechanism of signal initiation is more conserved between the MyD88-dependent TLR4 pathway and IL-18 signaling than previously thought.

## Results

### Binding of TRAM to MyD88

Five TIR containing adaptor proteins have been previously identified: MyD88, Mal, TRIF, TRAM and SARM. Mal and TRAM were reported to be the sorting adaptors for MyD88 and TRIF, respectively [13]. Because a model structure of the TIR domain of TRAM represents a substantially large negatively charged surface area (Figure S1), while the TIR domain of MyD88 is covered by positive charge, we expected some interaction

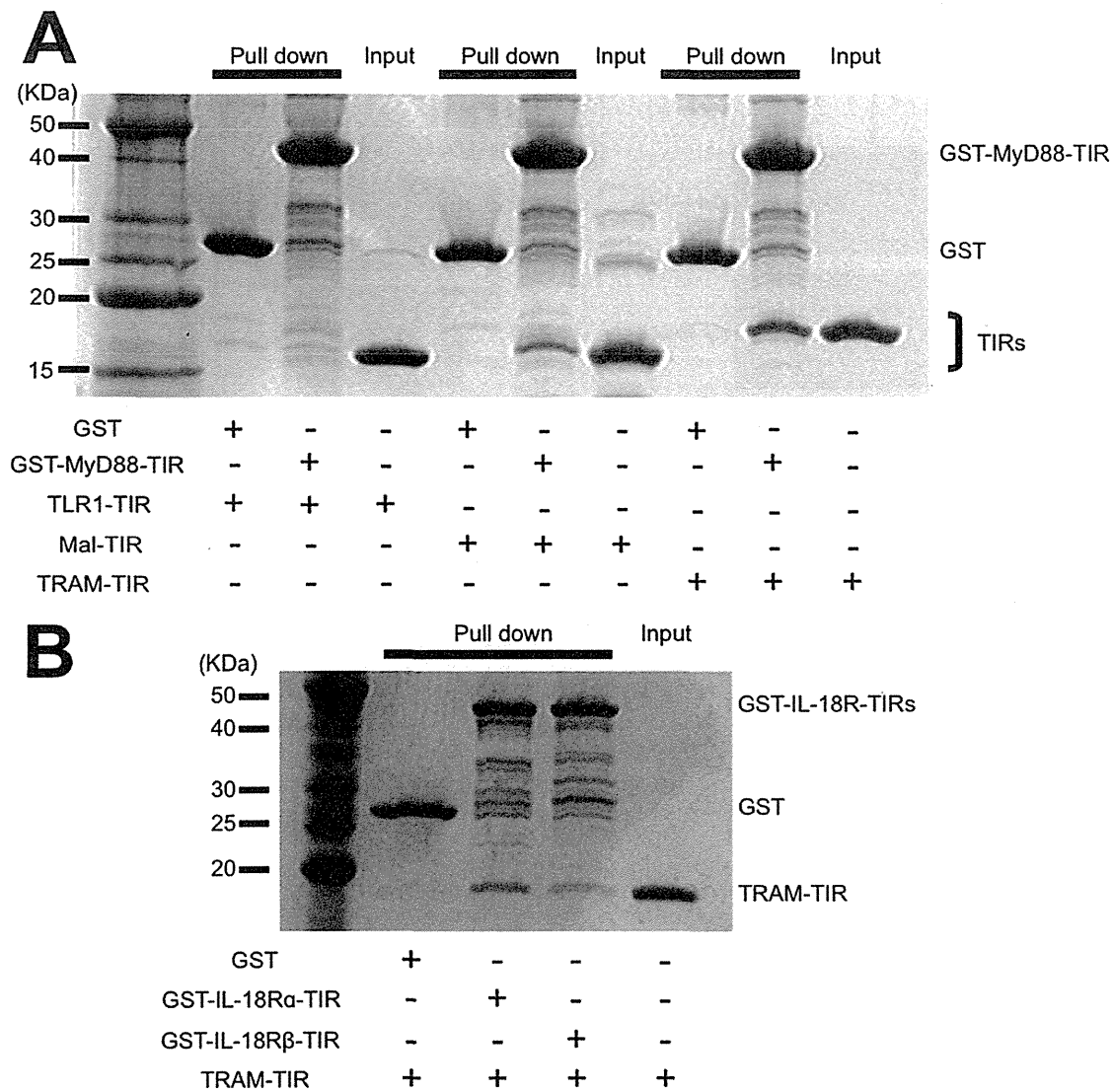
between these two adaptor molecules. We thus further hypothesized that TRAM also functions as the sorting adaptor for MyD88 in the IL-18 signaling pathway. To test these ideas, we first examined the direct interaction between MyD88 and TRAM. As both of the adaptors contain the TIR domain, which mediates the protein-protein interaction generally via homomeric or heteromeric TIR-TIR interactions, the direct interaction between the MyD88-TIR and the TRAM-TIR was examined with a GST-pull down assay. The results indicated that the wild-type MyD88-TIR directly bound the TRAM-TIR with a higher affinity than Mal, while the interaction between MyD88-TIR and TLR1-TIR, which had been shown not to bind the MyD88-TIR [14], was not detected in this method (Figure 1A). We then examined the interaction between MyD88 and TRAM in cells using a co-immunoprecipitation analysis. When Myc-MyD88 and FLAG-TRAM were co-expressed in HEK293 cells, the Myc-MyD88 constitutively associated with the FLAG-TRAM (Figure 2), which is consistent with our GST-pull down assay. Strikingly, upon stimulation of the cells with IL-18, the MyD88-TRAM complex gradually dissociated over a 30- to 120-minute time course. The HEK293 cells inherently express IL-18R $\alpha$  (formerly called IL-1Rrp), which is a necessary component for IL-18 signaling, but lack IL-18R $\beta$  (formerly called IL-1AcPL). Thus, we additionally co-expressed IL-18R $\beta$  in the cells for this experiment.

### Binding of TRAM to IL-18 Receptors

For the activation of IL-18 signaling, the heterodimerization of two IL-18 receptors, IL-18R $\alpha$  and IL-18R $\beta$ , has been shown to be required [15]. These receptors belong to the IL-1 receptor superfamily and are thus structurally homologous to one another. The extracellular region contains immunoglobulin (Ig)-like chains, while the cytosolic region has a TIR domain that interacts with the TIR domain of MyD88. To test the interaction of TRAM with these IL-18 receptors, we performed GST pull-down assays using the TIR domains of the IL-18 receptors and TRAM. The results showed that the TIR domains from both IL-18R $\alpha$  and IL-18R $\beta$  directly bound the TRAM-TIR (Figure 1B).

### Involvement of TRAM in IL-18 Signaling

After obtaining the evidence that TRAM interacts with MyD88 both *in vitro* and in cells, we then examined the possible involvement of TRAM in IL-18 signaling. We knocked-down the endogenous TRAM expression in HEK293 cells using siRNA techniques and then performed NF- $\kappa$ B reporter assays for the IL-18 signal transduction in the cells. The shRNA for the TRAM expressing vector was generated based on the previously reported target sequence [16]. When the expression of TRAM was knocked-down (Figure 3A), NF- $\kappa$ B activity after IL-18 stimulation was markedly decreased relative to the negative control experiments that used scrambled shRNA (Figure 3B). This result indicates that the knock-down of TRAM expression actually impaired the IL-18 signal transduction. We confirmed the knock-down effect of this shRNA sequence for TRAM via the LPS-stimulated activation of IFN- $\beta$  promoter, which is presumably due to the suppression of the MyD88-independent TLR4 pathway mediated by TRAM and TRIF (Figure 3C). The effect was similar when compared to the results obtained from a dominant negative form of TRAM (C117H). TRAM (C117H) showed an almost complete shutdown of the LPS/TLR4/IFN- $\beta$  signaling in the cells (Figure 3D) and the decrease of the enhancement of NF- $\kappa$ B activity induced by IL-18 (Figure 3E). To further confirm the involvement of TRAM in the IL-18 signaling pathway, we evaluated the cytokine production from helper type 1 differentiated T (Th1) cells isolated from TRAM-deficient mice and



**Figure 1. Protein interaction assays.** (A) GST pull-down assay investigating the direct interactions between the GST-MyD88-TIR and the TRAM-TIR or TLR1-TIR. (B) GST pull-down assay between the GST-IL-18 receptor TIRs and TRAM-TIR.  
doi:10.1371/journal.pone.0038423.g001

MyD88-deficient mice. IL-18 did not produce IFN- $\gamma$  from not only MyD88-deficient Th1 cells but also TRAM-deficient Th1 cells, significantly. And, IL-18 alone or IL-18 and IL-12 co-stimulated TRAM-deficient Th1 cells produced significantly lower IFN- $\gamma$  levels than those of wild-type Th1 cells (Figure 4).

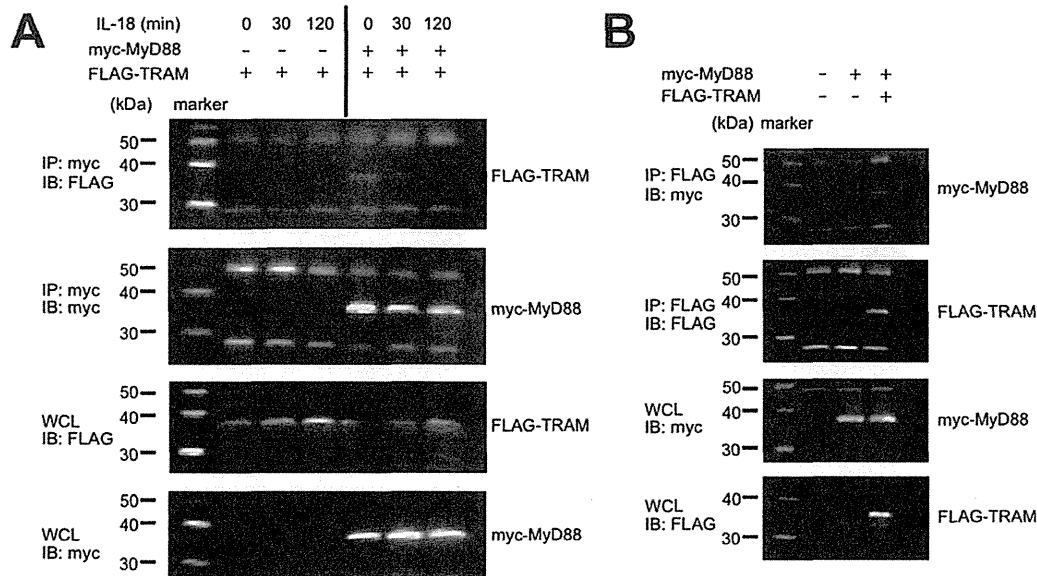
#### IL-18 Modulates MyD88-TRAM Subcomplex in Human Cells

Next, we further investigated whether MyD88 actually interacted with TRAM in human HEK293T cells by live cell fluorimaging. When we transiently transfected a DsRed-TRAM construct into HEK293T cells, the protein localized to the plasma membrane region, which was consistent with a previous report [10] (Figure 5A). In contrast, GFP-MyD88 was dominantly found as foci in the cytosol in the cells expressing the protein; this has also been shown by others [17] (Figure 5B). Strikingly, when

HEK293T cells were co-transfected with expression plasmids for GFP-MyD88 and DsRed-TRAM, MyD88 proteins moderately co-localized with TRAM in the membrane regions (Figure 5C). These data strongly suggest that this transient interaction between the two proteins dramatically altered the localization of GFP-MyD88 from the cytosol to the membranes. Thus, TRAM both bound and endowed MyD88 with membrane targeting properties as has been previously demonstrated for Mal [5].

#### Identification of Important Amino Acid Residues of the MyD88-TIR in IL-18 Signaling

Having established that MyD88 and TRAM directly interact and that the interaction is critical in IL-18 signaling, we next carried out experiments to identify the amino acid residues of MyD88 that are important in this interaction. A cell-based reporter assay system was utilized to examine various mutations in



**Figure 2. Assay of the interaction between MyD88 and TRAM in IL-18 signaling.** (A) MyD88 and TRAM were co-expressed in HEK293T cells along with IL-18R $\beta$ . IL-18 stimulation was carried out as indicated. MyD88 was immunoprecipitated using the Myc-tag antibody; co-immunoprecipitated TRAM was also detected. (B) The opposite direction co-immunoprecipitation assay between MyD88 and TRAM. Myc-MyD88 was detected with immunoprecipitated FLAG-TRAM.  
doi:10.1371/journal.pone.0038423.g002

the MyD88-TIR as previously reported [12]. The results are shown in Figure 6A. An alanine substitution of any one of eight residues (Arg196, Asp197, Lys214, Arg217, Lys238, Arg269, Lys282 or Arg288) caused significantly reduced dominant negative inhibitory effects on IL-18 signaling indicating that these residues are involved in the signal transduction. These eight residues are mapped on the protein structure of the MyD88-TIR (PDB code: 2z5v) (Figure 6B). In our previous experiments for LPS/TLR4 signaling using the same luciferase reporter system, three discrete functional sites were found on the surface of the MyD88-TIR, which we designated Site I, Site II, and Site III (Figure 6B) [12]. Five out of the eight residues, Arg196 (Site II), Asp197 (Site II), Arg217 (Site I), Lys282 (Site III) or Arg288 (Site III) were previously found to be important in the LPS/TLR4 signaling. We then examined the direct binding of the representative mutants of each functional sites of MyD88-TIR to the TRAM-TIR using GST pull-down assays (Figure 6C). The results indicate that the binding between the MyD88-TIR and TRAM-TIR is dependent on Sites II and III because the alanine substitution of either Arg196 or Arg288 resulted in decreased binding. Furthermore, the interaction between the MyD88-TIR and TRAM-TIR was completely abrogated when both Arg196 and Arg288 were mutated. Additionally, co-immunoprecipitation assay also showed the reduction of interaction between MyD88 R196A-R288A mutant and TRAM (Figure 6D). In contrast, a Site I mutant, R217A, did not show a significant decrease in binding affinity. Overall, these interactions are very similar to those observed between the MyD88-TIR and Mal-TIR [12], indicating that TRAM and Mal share the same binding sites on MyD88-TIR.

## Discussion

### Involvement of TRAM in the IL-18 Pathway

Mal has been reported to function as the sorting adaptor in the TLR4 signaling that brings MyD88 to the plasma membrane to

mediate the interactions between TLR4 and MyD88 [5]. Because the IL-1 and IL-18 receptors also form signal initiation complexes that contain MyD88, presumably at distinct membrane regions from TLR4, the existence of currently unidentified sorting adaptors that recruit MyD88 to specific membrane regions and mediate the interactions between MyD88 and the IL-1/IL-18 receptors has been hypothesized [5]. Although several reports have been published to date, the involvement of TRAM in IL-1 signaling remains controversial [16,18,19,20]. Using TRAM-deficient mice, Yamamoto *et al.* showed that TRAM is not involved in IL-1 signaling. Despite the homology between IL-1 and IL-18, the relationship between TRAM and IL-18 had not yet been elucidated. In this study, we sought the sorting adaptor that acts in IL-18 signaling and found that TRAM fulfils this role. It was proposed that the electric potential is important for the specific interactions between the TIR domain proteins [21]. According to the electric surface potentials of the TIR domain structures, the TRAM-TIR and Mal-TIR both have a largely acidic surface patch, while the MyD88-TIR has a largely basic surface patch (Figure S1). Therefore we hypothesized that TRAM interacts with MyD88 and works as the sorting adaptor that recruits MyD88 in IL-18 signaling. In fact, TRAM has already been reported as the sorting adaptor in the MyD88-independent TLR4 pathway in which TRAM recruits TRIF to specific membrane regions [10,22]. Nonetheless, in this work we obtained multiple results that indicate that TRAM functions as the sorting adaptor for IL-18 signals as we initially hypothesized. First, TRAM bound to MyD88 *in vitro* and in cells (Figure 1A, 2, and 5C). Second, the intracellular TIR domains of IL-18 receptors also bound to TRAM-TIR (Figure 1B). Finally, the shRNA knock-down of TRAM expression and knock-out of TRAM caused a significant decrease in the cellular response to IL-18 stimulation (Figure 3 and 4). These findings strongly suggest that TRAM functions as the sorting adaptor for MyD88 in IL-18 signaling. On