

201231075A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

インターロイキン 1 受容体関連キナーゼ 4 (IRAK4)
欠損症の全国症例数把握及び
早期診断スクリーニング・治療法開発に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大 西 秀 典

平成 25 (2013) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金報告書目次

I. 総括研究報告

- インターロイキン 1 受容体関連キナーゼ 4(IRAK4)欠損症の全国症例数把握及び早期診断スクリーニング・治療法開発に関する研究…………… 1
(研究代表者 大西秀典)

II. 分担研究報告

1. 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…………… 5
(分担研究者:大西秀典)
2. STAT1 機能獲得型変異で発症した慢性皮膚粘膜カンジダ症の1家系…………… 9
(分担研究者:大西秀典)
3. 炎症病態解析のためのサイトカイン・プロファイル評価の意義…………… 14
(分担研究者:谷内江昭宏)
4. 国内の IRAK4 欠損症の臨床像…………… 17
(分担研究者:高田英俊)
5. IRAK4 欠損症例における血清中肺炎球菌特異抗体価…………… 21
(分担研究者:明田幸宏)
6. 日本における Aicardi-Goutieres 症候群の遺伝子解析…………… 25
(分担研究者:西小森隆太)
7. IRAK4 及び関連因子の構造生物学的解析研究…………… 28
(分担研究分担者:朽尾豪人)
8. 自然免疫関連分子を標的とした薬剤開発研究…………… 31
(分担研究者:加藤善一郎)

III. 研究成果の刊行に関する一覧…………… 33

IV. 研究成果の刊行物別冊…………… 43

I. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書

インターロイキン 1 受容体関連キナーゼ 4(IRAK4)欠損症の全国症例数把握及び 早期診断スクリーニング・治療法開発に関する研究

研究代表者 大西秀典 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 併任講師

研究要旨

国際免疫学会(IUIS)の原発性免疫不全症の分類によると、2011 年の分類では自然免疫不全症として 9 疾患 15 遺伝子が分類されている。その中で特に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。

本研究班では、国内における IRAK4 欠損症及び MyD88 欠損症患者の全国実態調査を行い、さらに国内症例の病態分析を行った(臨床症状、免疫学的検査、サイトカイン等)。また、IRAK4 欠損症の迅速診断スクリーニング法の開発を行った。確定診断は遺伝子診断によってなされるが、疑い症例の中に新規の遺伝子型や遺伝子多型が同定されることがあるため、*In vitro* の機能評価法を確立した。

IRAK4 欠損症の治療として、国内生存例の 3 名は、肺炎球菌ワクチンの複数回接種を抗体価の推移をモニタリングしながら施行されており、抗生剤の予防投与との組み合わせにより、感染罹患に対して効果的に対処されていた。興味深いことに、IRAK4 欠損症の生存例のうち、肺炎球菌莢膜特異抗体価の部分低下が認められた。

また、フローサイトメーターを利用した自然免疫異常症の迅速診断スクリーニング法の運用、及び最適化の過程で、他の原発性免疫不全症の診断に至る例が複数存在し、それら疾患群(特に IKBA 異常症、STAT1 異常症、TREX1 異常症等)についても病因病態解析を行った。興味深いことに、IRAK4 欠損症以外の自然免疫不全症では、炎症性疾患の発症が認められ、IL-18 の関与が示唆された。

患者解析と並行して、IL-18 及び IL-18 受容体(α 鎖、 β 鎖)複合体構造解析を行い、3 者複合体構造が得られている。構造情報を基盤とした IL-18 機能阻害低分子のスクリーニングを行い、候補分子を見いだしている。これらは、自然免疫不全症に合併する炎症病態に対し有力な治療薬になりうると考えられる。

分担研究者

谷内江昭宏 金沢大学 医薬保健研究域医学系 小児

科 教授

加藤善一郎 岐阜大学 医学部附属病院 小児科 臨床

教授

高田英俊 九州大学 大学院医学研究院 成長発達医学

准教授

西小森隆太 京都大学 大学院医学研究科 発達小児

科学 准教授

朽尾豪人 京都大学 工学研究科 准教授

明田幸宏 大阪大学 微生物病研究所 特任講師

A. 研究目的

近年、Toll 様受容体を中心とした自然免疫のシグナル伝達経路の異常により、アレルギー疾患や免疫不全症を発症することが知られてきている。原発性免疫不全種の 1 型として分類される自然免疫不全症 (IRAK4 欠損症、MyD88 欠損症など) は、一般的な免疫検査で診断することができず、従来原因不明とされてきた反復性グラム陽性菌感染や侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)等の患者の中に

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

まぎれている可能性が高い。これらの疾患は、難治性で重症化しやすく、ときに致死性である。従って早期診断により適切な治療を行う事で、患者予後を著しく改善させ、QOL向上を図る必要がある。本研究では特に、IRAK4欠損症を対象として、1. 国内での患者発生の実態調査、2. 早期診断システムの確立、3. 患者病態解析、4. 新規治療法の確立に向けた研究を行った。

B. 研究方法

1. IRAK4欠損症をはじめとする自然免疫異常症が疑われ、診断依頼があった患者検体について、迅速診断スクリーニング法として、全血 1ml に Brefeldin A 及び、LPS を加え、CO₂ incubator で 4 時間培養後、抗 CD14 抗体で染色後、permeabilization し、抗 TNF- α 抗体で細胞内 TNF- α を染色した後、フローサイトメーターで解析した。解析は、単球に gate をかけ、TNF- α 産生細胞の割合を検討した。

2. 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異常症が疑われた症例について IRAK4、MyD88、TIRAP/Mal、NEMO、IKBA 等の遺伝子解析を行った。Aicardi-Goutieres 症候群が疑われた症例については、TREX1、RNASEH2B、RNASEH2A、RNASEH2C、SAMHD1 遺伝子の解析を行った。

3. IRAK4 欠損症、類縁疾患と診断された症例については、詳細な臨床像の把握を行った。

4. 患者から得られた生体資料、特に血清中のサイトカイン及び肺炎球菌特異抗体価の測定を行った。

5. pcDNA 系、pGEX 系発現ベクターに IRAK4、MyD88 等の遺伝子を組み込み、それぞれの遺伝子置換型を導入したベクターを構築した。

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

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

(倫理面への配慮)

本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省)等の規定に基づいての倫理委員会の議を経て行われる。研究対象者には、文書により本研究の内容、方法および予想される結果を十分に説明し充分な理解(インフォームドコンセント)を得た上で実施される。また倫理面でも、結果による不利益は全く生じないように配慮が充分になされ、対象となる個人の人権擁護が充分になされていることから問題がないと判断される。

C. 研究結果

1. H24年度に1例新規のIRAK4欠損症患者が報告された。既知の国内症例と同様、IRAK4の遺伝子型は(c.118insA)のホモ接合性変異であった。詳細な臨床像については、分担研究報告書“IRAK4欠損症の臨床像(高田)”を参照されたい。興味深いことに国内発症例8例全例で臍帯脱落遅延を認めている。

2. MyD88、IRAK4分子は、それぞれ機能性ドメインを複数有する細胞内タンパクである。それぞれのドメインの機能に焦点を当てた *in vitro* 機能解析系の構築を試みた。MyD88のデスドメイン(DD)上の変異では培養細胞上でのタンパク発現実験、培養細胞への一過性発現によるNF- 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)の検討が有用であることがH23年度までの検討で明らかになっている。本年度は、dbSNPに記載のある遺伝子型について検討したところ、R20Wは機能減損型の多型であることが判明した。詳細な

解析データについては、分担研究報告書“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(大西)”を参照されたい。

3. 自然免疫不全症の1病型であるSTAT1機能獲得型変異により発症した慢性皮膚粘膜カンジダ症の1家系を見いだした。本家系は、多彩な臨床像を呈していた。特に自己炎症性肝炎を合併し、その病態にはIL-18の関与が示唆された。詳細な臨床像については、分担研究報告書“STAT1機能獲得型変異により発症した慢性皮膚粘膜カンジダ症の1家系(大西)”を参照されたい。

4. 自然免疫の過剰反応により周期性発熱症候群(自己炎症疾患)を呈することが知られている。TLR経路の欠損症においても自己炎症疾患様の病態を示す例が存在する。H22年度に報告したIKBA異常症例においても、炎症性腸疾患を合併し、血清IL-18値が高値を示した。また、家族性地中海熱については典型例において、非発作時においても継続的にIL-18が高値を示すことが明らかにされた。全身性若年性特発性関節炎についてはマクロファージ活性化症候群(MAS)合併時や急性炎症増悪期のみでなく、持続的な炎症制御機構の活性化が起こっていることが示された。詳細な解析データについては、分担研究報告書“炎症病態解析のためのサイトカイン・プロファイル評価の意義(谷内江)”を参照されたい。

5. Aicardi-Goutieres 症候群は、髄液や血清中のIFN- α 、Neopterinが高値を示す自然免疫関連の炎症性疾患の1病型である。本邦の AGS/FCL 症例を集積し、遺伝子変異の解析を通して、本邦におけるAGS/FCLの実態調査を行った結果、TREX1遺伝子変異を5家系15症例、RNASEH2B変異を1症例、RNASEH2A変異を1症例、SAMHD1変異を3症例に、それぞれ同定した。詳細な解析データについては、分担研究報告書“日本におけるAicardi-Goutieres症候群の遺伝子解析(西小森)”を参照されたい。

6. 国内のIRAK4欠損症3症例では、7価肺炎球菌ワクチン(PCV7)を抗体価の推移を追跡しながら3回接種、及び23価肺炎球菌ワクチン(PPV23)を1回接種されていた。3例とも肺炎球菌特異的IgG2抗体価の上昇が確認されている。しかし、興味深いことに、1症例で血清型23F特異的特異IgG濃度が0.20 μ g/ml未満であった。残る2症例は、いずれの血清型でも0.20 μ g/ml以上であったが、23Fのみ比較的低値であった。詳細な解析データについては、分担研究報告書“IRAK4 欠損症例における血清中肺炎球菌特異抗体価(明田)”を参照されたい。

7. 3.及び4.で述べた通り、自然免疫不全症に合併する炎症病態には、サイトカインIL-18の関与が強く示唆されている。本研究では、タンパク立体構造情報を基盤とした創薬を行うことを目的に、IL-18及びIL-18受容体(α 鎖、 β 鎖)の複合体結晶構造解析を行った。詳細な解析データについては、分担研究報告書“IRAK4 及び関連因子の構造生物学的解析研究”(朽尾)及び“自然免疫関連分子を標的とした薬剤開発研究”(加藤)を参照されたい。

D. 考察

IRAK4欠損症の国内症例では、肺炎球菌による化膿性髄膜炎を発症する頻度が高く、死亡率も50%と高いことが明らかになっている。そのため、本患者の救命には早期診断、早期治療が必須であり、臍帯脱落遅延はIRAK4欠損症の有力な早期発見の指標と考えられる。また易感染性を認めた場合、積極的にフローサイトメーターを使用した患者迅速診断スクリーニングを行うことが不可欠であると考えられる。その次のステップとして、*In vitro*の機能解析系の確立は、患者の確定診断のために必要である。

IRAK4欠損症及びMyD88欠損症の全世界症例調査により、年長児での致死的重症感染症への罹患頻度が減ることが明らかになっており、乳幼児期の適切な感染予防が本疾患の治療に必要である。国内の生存症例では、抗生剤予防投与及び肺炎球菌ワクチンの接種により効果的に感染予防が実行されていた。生存例はいずれも

肺炎球菌特異IgG2抗体価がモニタリングされており、ワクチン接種後に抗体価の上昇が確認されているが、経時的に低下がみられている。また、一部の肺炎球菌莢膜特異抗原において抗体価の上昇がみられない型もあり、PCV7接種に過信はできないため、抗生物質投与との組み合わせが必須と考えられる。

また、自然免疫不全症には、炎症病態が合併することがあるが、IL-18の関与が示唆されているが、現時点ではIL-18阻害剤は存在しない。今後、本研究を進展させIL-18阻害剤の開発につなげる予定である。

3. その他

なし

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

別項、研究成果の一覧表にまとめる。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

II. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

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 兼任講師

研究要旨

侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)等を呈する免疫不全の責任遺伝子として IRAK4、MyD88 等自然免疫関連分子の異常が報告されている。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。昨年度に引き続き、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、さらに本年度は、IRAK4 の death domain 領域において dbSNP に報告のある遺伝子多型の機能評価を行った。R20W は、IRAK4 と MyD88 の相互作用面に存在し、IRAK4-DD のタンパク安定性が減ることにより、MyD88 との相互作用が R12C 変異とほぼ同等に減弱することが判明した。遺伝子多型として dbSNP に登録のある遺伝子型であっても、特に常染色体劣性遺伝形式の疾患の場合、疾患関連遺伝子変異である可能性を考慮しなければならない。

共同研究者

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

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、難治性で重症化しやすく、ときに致死性である。従って早期診断により適切な治療を行う事で、患者予後を著しく改善させ、QOL向上を図る必要性がある。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

1. プラスミドベクターpcDNA3.1+にIRAK4(N末FLAG tag付加)、IRAK4-デストメイン(DD) (1-150)、IL-1RAcP遺伝子を組み込んだ発現ベクターを構築した。また、pUNO-IL-1R1をInvivogen社から購入した。
2. プラスミドベクターpGEX-6P-1にIRAK4-DD、及びMyD88-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。
3. 既知のIRAK4遺伝子変異(R12C)、及びdbSNPに登録されている遺伝子多型(I5V, R20W, I26T, I39V, S98R)について、Promega社のGeneeditor site-directed mutagenesis kitを使用して1.及び2.のベクター遺伝子を置換する。

4. HEK293T細胞にpcDNA3.1+ FLAG-IRAK4シリーズをtransfectし、48時間後に細胞を回収。FLAG tag抗体を使用し、Western blot法でタンパク発現を確認した。
5. HEK293 系 培 養 細 胞 に 、 pUNO-IL1R1 、 pcDNA3.1+IL-1RAcPをそれぞれの組み合わせで発現させ、さらにIRAK4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。
6. 大腸菌BL21(DE3)株を用いて、2.の発現ベクターを形質転換し、IRAK4-DD及びMyD88-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。また、MyD88-DD野生型タンパクを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。
7. 溶液NMR法で、MyD88-DD野生型タンパクの1H-15N-HSQCスペクトルを測定した。さらにIRAK4-DDシリーズをそれぞれ添加し、スペクトルの変化を観測した。(MyD88-TIRやMyD88-DDのスペクトルは、相互作用パートナー分子と高次複合体を形成することによりシグナルが減衰することが判明している。)
8. MyD88-DDとIRAK4-DDシリーズを分析ゲル濾過でタンパク間相互作用を検討した。
9. HEK293T細胞にpcDNA3.1+ FLAG-IRAK4-DDシリーズをtransfectし、培養中のサンプルにシクロヘキシミドを添加し、経時的にサンプルを回収した。その後、FLAG tag抗体を使用し、Western blot法でタンパク発現を確認した。

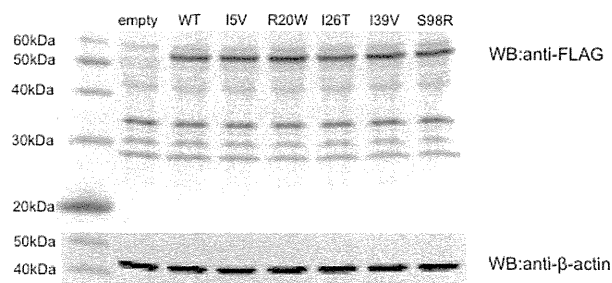
(倫理面への配慮)

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

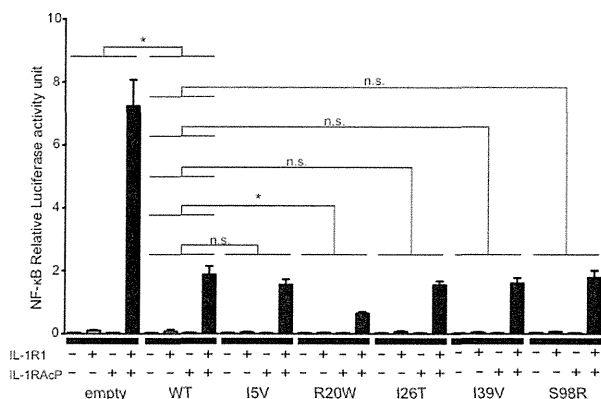
1. IRAK4-DD領域において報告のあるSNP群をHEK293細胞に発現させたところ、全てのタンパクが野生型と同様に発現が確認された(図1)。

図1

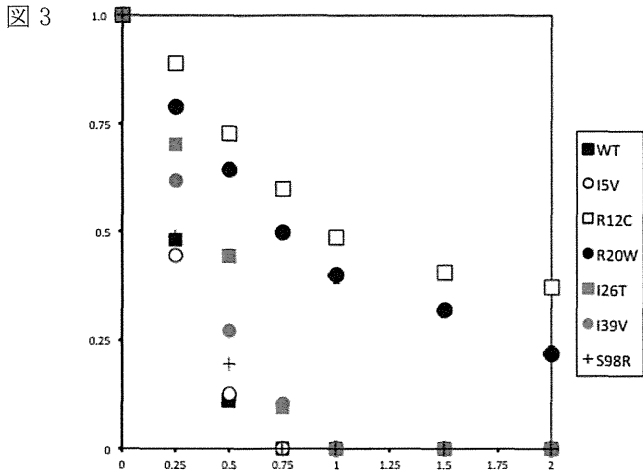


2. HEK293細胞にIL-1R1及びIL-1RAcPを共発現させ、NF- κ B活性を測定するとリガンドであるIL-1非存在条件下でもNF- κ B活性が上昇する。そこにさらにIRAK4野生型を一過性共発現させるとNF- κ B活性が低下することを昨年度に報告した。検討した全ての遺伝子型で野生型同様にNF- κ B活性の低下が観測されたが、特にR20Wは野生型より有意に低下した(図2)。

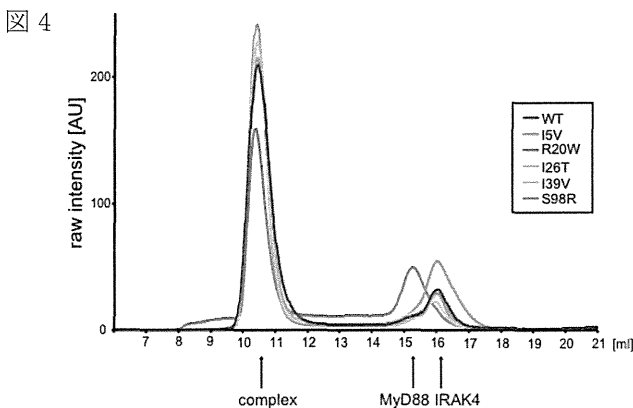
図2



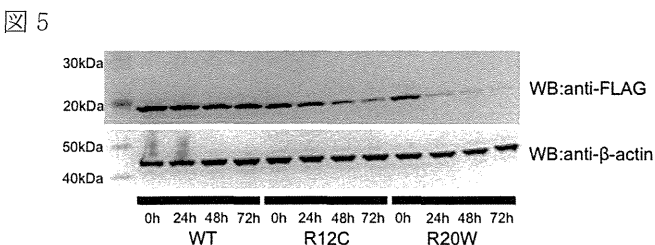
3. IRAK4 デスドメイン(野生型、R12C、SNPs)、MyD88 デスドメイン(野生型)それぞれのリコンビナントタンパクを高純度に大量精製することができた。それぞれの組み合わせについて、液体クロマトグラフィー法及び溶液NMR法を用いた滴定実験によりタンパク間相互作用を検討したところ、IRAK4-DD-R20Wは液体クロマトグラフィー法ではMyD88-DDとの複合体形成が観測されるがその総量は減少しており(図3)、



かつ溶液 NMR 法では R12C と同様に複合体形成が減弱していることが観測された(図 4)。



4. シクロヘキシミドにより新たな転写翻訳を停止させた状態で、タンパクの安定性を評価したところ、IRAK4-DD-R20W は、野生型と比較して明らかにタンパクの安定性が低いことが観測された(図 5)。



D. 考察

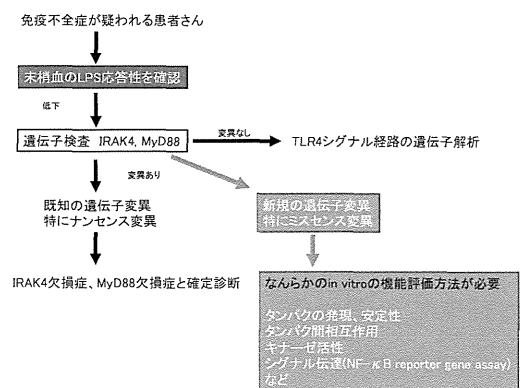
MyD88、IRAK4 分子は、それぞれ機能性ドメインを複数有する細胞内タンパクである。本年度の研究では、昨年度構築した IRAK4-DD の機能に焦点を当てた *in vitro* 機能解析を使用して、IRAK4-DD 領域に存在する遺伝

子多型の評価を行った。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。すなわち Myddosome の形成障害がこの遺伝子型における主たる病的要因であるが、dbSNP に報告のある R20W 多型においても同様の結果が得られた。近年、エクソーム解析等の次世代技術を使用した遺伝子解析手法の著しい進歩により dbSNP に登録される遺伝子型が急激に増加しているが、特に常染色体劣性遺伝形式の疾患の場合、疾患関連遺伝子変異が SNP として登録されている可能性を考慮しなければならない。IRAK4 欠損症としての表現型(つまり肺炎球菌等に対する易感染性を示し、LPS 刺激による TNF- α 産生が低下した症例)を示す症例の遺伝子解析において、dbSNP 等の遺伝子多型データベースに掲載されている遺伝子型が同定された場合、本手法による *In vitro* の検討が診断確定に有用であると考えられる。

E. 結論

IRAK4 欠損症が疑われた症例において、新規の遺伝子変異(特にミスセンス型)が同定された場合、家系内遺伝子解析に加え、*In vitro* の解析が必要である。本手法を含めた診断フローチャートを示す(図 6)。

図 6



F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Nada M, Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Kamatari Y, Tsutsumi N, Shirakawa M, Kondo N: Molecular analysis of the binding

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

mode of Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain proteins during TLR2 signaling. *Mol Immunol* 52:108-116 (2012)

2: 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)

3: Kubota K, Ohnishi H, Teramoto T, Matsui E, Murase K, Kanoh H, Kato Z, Kaneko H, Seishima M, Kondo N: In Vitro Analysis of the Functional Effects of an NLRP3 G809S Variant with the co-Existence of MEFV Haplotype Variants in Atypical Autoinflammatory Syndrome. *J Clin Immunol* 33: 325-334 (2013)

4: Kawamoto N, Ohnishi H, Kondo N, Strominger JL: The role of dendritic cells in the generation of CD4+ CD25HI Foxp3+ T cells induced by amino acid copolymers. *Int Immunol* 25: 53-65 (2013)

5: 大西秀典, 他 : 原発性免疫不全症の概念と分類, および自己炎症性疾患・自然免疫不全症・近縁疾患の位置付け. 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患. 近藤直実, 平家俊男 編. 診断と治療社. (2012)

7: 大西秀典, 寺本貴英, 久保田一生, 近藤直実: 皮膚症状からみた自己炎症性症候群. *小児科* 53: 1201-1209 (2012)

8: 大西秀典, 寺本貴英, 久保田一生, 山本崇裕, 渡邊倫子, 加藤善一郎, 金子英雄, 近藤直実: 原発性(先天性)免疫不全症の分類-2012update-. *小児科診療* 75: 134-151 (2012)

9: 大西秀典, 松井永子, 木全かおり, 加藤善一郎, 近藤直実. Gene polymorphisms in innate immune signaling pathways associated with allergic disease. *小児アレルギー学会雑誌* 26: 113-119 (2012)

10: 大西秀典, 山本崇裕. IRAK4欠損・MyD88欠損をはじめとするToll様受容体(TLR)シグナル伝達の異常症に関する最近の知見. *小児内科* 44: 1227-1233 (2012)

1: Hidenori Ohnishi, Takahide Teramoto, Zenichiro Kato, Kazuo Kubota, Hideo Kaneko, Naomi Kondo.

Characterization of NLRP3 Variants in Japanese Cryopyrin-associated Periodic Syndrome Patients. *AUTOIMMUNITY* 2012, May 9-13, 2012, Granada, Spain.

2: Kazuo Kubota, Hidenori Ohnishi, Takahide Teramoto, Yusuke Aoki, Eiko Matsui, Kana Murase, Hiroyuki Kanoh, Zenichiro Kato, Hideo Kaneko, Mariko Seishima, Naomi Kondo. Atypical periodic autoinflammatory syndrome patients with a mutation in the leucine-rich repeat domain of NLRP3 in Japanese children. *AUTOIMMUNITY* 2012, May 9-13, 2012, Granada, Spain.

3: Hidenori Ohnishi, Zenichiro Kato, Takeshi Kimura, Kazuo Kubota, Takahiro Yamamoto, Naomi Kondo: Molecular analysis of signal transduction pathway of IL-18, related with allergic condition. The 22nd Congress of Interasma Japan / North Asia, July 6-7, 2012, Fukuoka Japan.

4: Hidenori Ohnishi, Naotaka Tsutsumi, Takahiro Yamamoto, Hidehito Tochio, Zenichiro Kato, Kazuo Kubota, Masahiro Shirakawa, Naomi Kondo. The functional assessments of mutational effect of human IRAK4 and MyD88 gene. *APAPARI* 2012, October 19-21, 2012, Taipei, Taiwan

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

2. 学会発表

STAT1機能獲得型変異により発症した慢性皮膚粘膜カンジダ症の1家系

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

国際免疫学会(The International Union of Immunological Societies; IUIS)が公表している原発性免疫不全症の分類において、慢性皮膚粘膜カンジダ症(Chronic mucocutaneous candidiasis; CMC)が、責任遺伝子群の同定及び病態解明の進展に伴い、2011年度から新たに自然免疫不全症の1疾患として再分類されている。STAT1機能獲得型変異を有する1家系を見いだしたので、その臨床像と検査所見について提示する。発端者では甲状腺機能低下症及び自己免疫性肝炎を合併しており、また父親は口腔内悪性腫瘍を発症していた。STAT1機能獲得型変異によるCMC症例では、CMC症状だけでなく全身に多彩な合併症を呈しうることに留意する必要がある。

共同研究者

堀友博(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
寺本貴英(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)
近藤直実(岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)

A. 研究目的

国際免疫学会(The International Union of Immunological Societies; IUIS)が公表している原発性免疫不全症の分類において、従来は“Other well defined immunodeficiency syndromes”の項に分類されていた慢性皮膚粘膜カンジダ症(Chronic mucocutaneous candidiasis; CMC)が、責任遺伝子群の同定及び病態解明の進展に伴い、2011年のIUIS分類表から新たに自然免疫不全症の1疾患として再分類されている。T細胞機能異常を伴う原発性免疫不全症(重症複合免疫不全症など)では、カンジダをはじめとする真菌感染症が問題となるのは旧来から知られているが、近年カンジダに特異的な免疫不全症が注目されている。自己免疫性多腺性内分泌不全症I型(APS1, APECEDとも呼ばれる)は、責任遺伝子の明白なCMCを示す代表的な疾患と考えられていた。APS1ではCMC症状のみならず、主に自己免疫的機序による副甲状腺機能低下、副腎機能低下等の多内分泌腺症状を示す。最近になり、2009年にカンジダ由来のPAMPsを認識する自然免疫系受容体Dectin-1の下流分子であるCARD9の遺伝子変異により易真菌感染症を発

症することが報告された。また、APS1の易カンジダ感染に関する病因探索の過程で、IL-17ファミリー分子に対する自己抗体が注目された。すなわちAPS1のCMC症状は、自己免疫疾患のひとつとして発生した抗IL-17抗体による二次性免疫不全症ではないかという説である。特に、IL-17ファミリーのうち、IL-17Fは皮膚粘膜における防御機構に強く関与しており、CMC症状のみを有する症例についてIL-17関連分子の遺伝子検索が行われた結果、2011年にIL-17F、IL-17R欠損症が報告されている。現時点では、CARD9欠損症、IL-17F及びIL-17R欠損症はいずれもごく少数の患者からのみ同定されているものであるが、2011年7月に2施設から同時に、合わせて60名以上のCMC患者からSTAT1遺伝子の機能獲得型変異が同定されている。我々の施設において、CMC症状を示す患者の解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 臨床情報: 年齢・性別: 11歳女児。
主訴: 爪および口腔内のカンジダ症、低身長。
家族歴: 父; 幼少時より慢性皮膚粘膜カンジダ症を認め、口腔内悪性腫瘍のため49歳で死亡。
既往歴・現病歴: 幼少時より爪および口腔内カンジダ症を認め、慢性皮膚粘膜カンジダ症(CMC)として皮膚科で加療中であった。11歳時、学校健診で低身長を指摘され、近医を受診。甲状腺機能低下症と肝機能異常を認め、

当院を紹介受診した。

身体所見：初診時（11 歳時）、身長 123cm（-3.6SD）、体重 35kg（-0.6SD）。口腔に驚口瘡あり。爪カンジダ症あり。顔面・手指に浮腫あり。乾燥肌。甲状腺は触知せず。問診により、当科初診の数年前より寒がりで動作が緩慢となる等の症状が明らかとなった。

検査所見：TSH 622 μ IU/mL、FT4 0.06 μ g/dL と原発性甲状腺機能低下症を認めた。抗 TPO 抗体陽性。甲状腺超音波検査で甲状腺の著明な萎縮があり、放射性ヨード摂取率は低値であった。AST 137IU/L、ALT 159IU/L、LDH 885IU/L と肝逸脱酵素の上昇を認め、抗核抗体（ANA）陽性（160 倍）、抗平滑筋抗体陰性、抗ミトコンドリア抗体陰性、患者 22 歳の再検査時に抗肝腎マイクロゾーム抗体陰性（index）24（ \pm ）、IgG 1947mg/dL、各種肝炎ウイルスマーカーは陰性、肝生検で piecemeal necrosis を認め、病理学的に慢性活動性肝炎の所見を有し、自己免疫性肝炎の国際診断基準スコアリングシステムにおける確診例であった。

経過・治療：CMC 症状に対しては抗真菌薬の外用・内服、原発性甲状腺機能低下症に対してレボチロキシンナトリウムの内服、肝炎に対してはプレドニゾロン、アザチオプリン等の内服加療を行った。CMC、肝炎の病状はこれらの治療で比較的良好なコントロールを得ている。また、甲状腺機能の改善に伴い甲状腺機能低下症に関する諸症状や身長増加不良は改善した。

2. 1.の CMC 症状を示した症例について末梢血から genome DNA を分離し、AIRE, CARD9, STAT1 遺伝子を解析した。

3. 患者（及び健常者、I 型高 IgE 症候群症例）の末梢血から単核球分画を分離抽出し、 β -glucan (curdlan)、PHA 等の Mitogen で刺激後 72 時間培養後、培養上清中のサイトカイン（TNF- α , IFN- Γ , IL-17A）を ELISA 法で測定した。

4. 血清 IL-18 値を ELISA 法で測定した。

5. リコンビナント IL-17A、IL-17F、IL-22 を SDS/PAGE 法で展開し、患者血清を一次抗体とした Western blot 法でタンパクを検出し、患者血清中に含まれる抗サイトカイン抗体を検出した。

6. 肝機能異常が悪化した際に施行した肝生検で得られた組織を IL-17A 抗体、CD68 抗体で免疫染色を施行した。

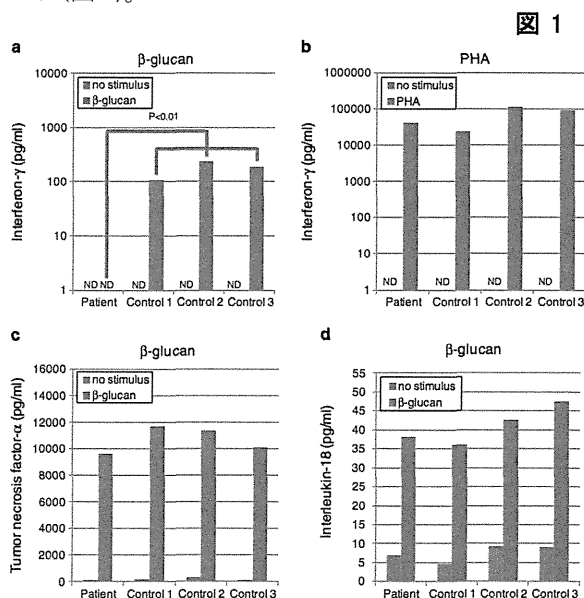
（倫理面への配慮）

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

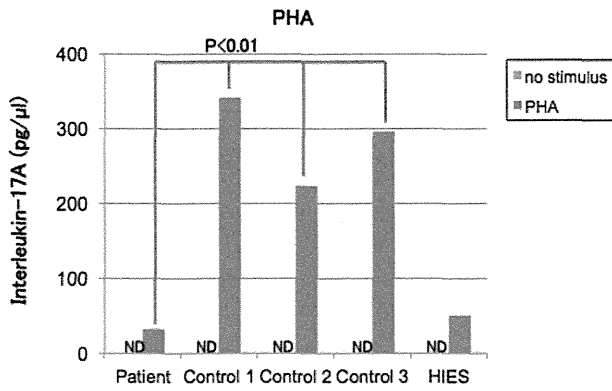
1. 患者と、父の保存されていた組織から抽出した DNA において、c.821 G>A, p.Arg274Gln 変異をヘテロ接合性に認め、STAT1 異常症と診断した。

2. 患者 PBMCs から産生されるサイトカインは、 β -glucan 刺激による IFN- Γ の産生が低下していたが、PHA 刺激による IFN- Γ の産生は健常者と差がなく、また β -glucan 刺激による TNF- α 、IL-18 の産生も健常者と差は認めなかった（図 1）。



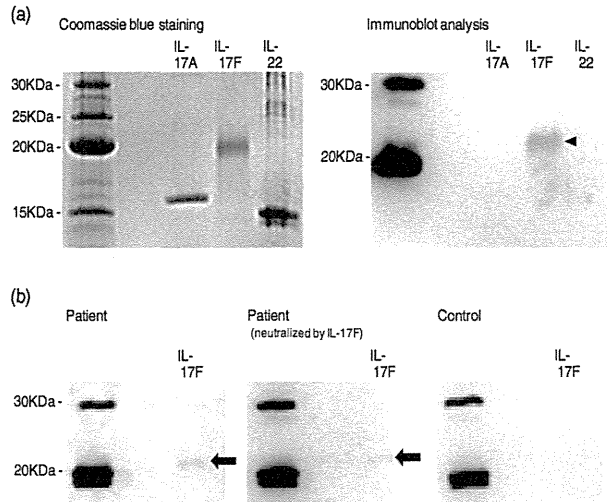
さらに、PHA 刺激による IL-17A の産生誘導は、I 型高 IgE 症候群症例と同様に健常者より有意に低下していた（図 2）。

図 2



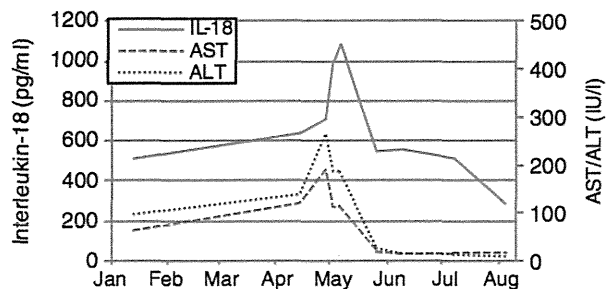
3. Western blot 法により患者血清中に抗 IL-17F 抗体が含まれることが判明した(図 3)。

図 3



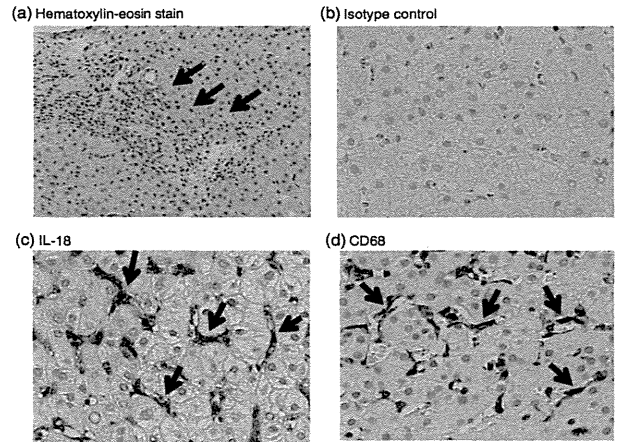
4. 自己免疫性肝炎の急性増悪期に AST、ALT 値と並行して、血清 IL-18 値の上昇がみられた(図 4)。

図 4



5. 肝類洞領域に CD68 陽性細胞の浸潤と、IL-18 の発現が確認された(図 5)。

図 5



D. 考察

STAT1 異常症の診断スクリーニング法として、サイトカイン産生パターン分析(特に IL-17A 産生低下)が有効である。また、他の自然免疫異常症に合併する炎症病態同様、本疾患に合併した自己免疫性肝炎の病態にも IL-18 の関与が示唆された。

E. 結論

STAT1 異常症は、CMC 症状だけでなく全身に多彩な合併症を呈しうることに留意する必要がある。既報論文から臨床情報を抽出し、表 1 にまとめた。特に、脳動脈瘤の合併や、本報告患者の父親のように、口腔内悪性腫瘍(扁平上皮がん)の発症は生命予後に直結する重大な合併症であり、生涯に渡り慎重な観察を要する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Hori T, Ohnishi H, Teramoto T, Tsubouchi K, Naiki T, Hirose Y, Ohara O, Seishima M, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. Autosomal-dominant chronic mucocutaneous candidiasis with STAT1-mutation can be complicated with chronic active hepatitis and hypothyroidism. J Clin Immunol. 2012 Dec;32(6):1213-20.

2. 学会発表

1: 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

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

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

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

表 1 慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMC) の原因遺伝子とその臨床症状

遺伝子名	<i>AIRE</i> (APS-1/APECED)	<i>STAT1</i>		<i>CARD9</i>	<i>IL17RA</i>	<i>IL17F</i>	
遺伝形式	常・劣	常・優		常・劣	常・劣	常・優	
報告論文		van de Veerdonk ら N Engl J Med 2011	Liu ら J Exp Med 2011	Glocker ら N Engl J Med 2009	Puel ら Science 2011		
臨床症状	患者数	(※ 1)	n = 14 (5 家系)	n = 47 (※ 3) (20 家系)	n = 7 (1 家系)	n = 1 (1 家系)	n = 5 (1 家系)
慢性皮膚粘膜カンジダ症	73 ~ 100 %		n = 14	n = 47	n = 7 (※ 5)	n = 1	n = 5
内分泌疾患							
自己免疫性甲状腺疾患	8 ~ 18 %		n = 3 (※ 2)	n = 8	ND	ND	ND
Addison 病	60 ~ 100 %		ND	ND	ND	ND	ND
副甲状腺機能低下症	77 ~ 100 %		ND	ND	ND	ND	ND
性腺機能低下症	31 ~ 60 %		ND	ND	ND	ND	ND
1 型糖尿病	4 ~ 23 %		ND	ND	ND	ND	ND
自己免疫性肝炎	10 ~ 19 %		n = 1	ND	ND	ND	ND
その他の合併症 (カッコ内は報告患者数)	外胚葉異形成症 脱毛症 白斑 角膜障害 悪性貧血 慢性胃炎 など		顎形成不全 (6) 鉄欠乏生貧血 (3) 眼瞼炎 (3) 逆流性食道炎 (2) 自己免疫性溶血生貧血 (1) 肺塞栓 (1) 角膜炎 (1)	脳動脈瘤 (2) (※ 4) SLE (1)	2 型糖尿病 (1) 腎結石症 (1)		
腫瘍	~ 10 % (※ 1)		n = 2 口腔がん (1) 食道がん (1)	n = 4 扁平上皮がん (4)	n = 1 脳腫瘍 (1)	ND	ND

ND ; 未報告。 ※ 1 : *AIRE* 遺伝子変異 (APS-1/APECED) に関しては、一般的な合併頻度を記す。腫瘍の報告の多くは口腔・食道の扁平上皮がんである。 ※ 2 : 3 人とも甲状腺機能低下症、そのうち 2 人で甲状腺自己抗体陽性。甲状腺疾患未発症のうち 1 人にも甲状腺自己抗体陽性。 ※ 3 : すべての症例で IL-17A, IL-17F, IL-22 に対する自己抗体を認めず。 ※ 4 : 2 人とも若年 (8 歳と 34 歳) で死亡している。 ※ 5 : 少なくとも 2 人は脳への侵襲性のカンジダ性髄膜 (脳) 炎により若年期に死亡している。

インターロイキン1受容体関連キナーゼ4（IRAK4）欠損症の全国症例数 把握及び早期診断スクリーニング・治療法開発に関する研究

炎症病態解析のためのサイトカイン・プロファイル評価の意義

研究分担者 谷内江昭宏 金沢大学医薬保健研究域医学系小児科 教授

研究要旨 IRAK4 欠損症自体はまれであり、直接本疾患におけるサイトカイン産生機序について解析を進めることはできなかった。新たな症例の経験もない。

しかし、下記に示すように、多様な感染性疾患、炎症性疾患について血清サイトカイン・プロファイリングの検討を重ねて、一定の成果が得られた。

EBV 血球貪食症候群においては多様な EBV 関連疾患において、炎症病態と血清サイトカイン・プロファイルの関連を検討。背景となる病態に関わらず、血球貪食と強い臓器傷害を伴う症例において IL-6、IL-10、HO-1、IL-18 などの compensation 機構に関わるサイトカインが共通して高値を示した。

周期性発熱症候群、なかでも家族性地中海熱については典型例において、非発作時においても継続的に IL-18 が高値を示すことが明らかにされた。全身性若年性特発性関節炎については MAS 合併時や急性炎症増悪期のみでなく、持続的な炎症制御機構の活性化が起こっていることが示された。

これらの知見は、今後 IRAK4 欠損症におけるサイトカイン産生異常を評価する上で有用な指標となるものであり、一定の成果であると考えられる。

A. 研究目的

血清サイトカインが持続的に高値を示す炎症病態は多数知られているが、個々の疾患における特徴的な炎症病態・臨床症状・検査所見と血清サイトカイン・プロファイルの関連は必ずしも明確にされていない。

本研究では臨床診断が必ずしも明確になっていない炎症性疾患について、サイトカイン・プロファイル解析を駆使することによる病態の異なる亜群の存在することを明らかにし、それぞれの早期診断と治療反応性評価の指標を確立することを目的とした。

B. 研究方法

対象：周期性発熱症候群が疑われた発熱を繰

り返す症例124例の内、*MEFV*遺伝子において exon 10の変異を認めた症例16例（A群）、ならびに exon 3 variant と呼ばれる変異を認めた症例17例（B群）。臨床症状ならびに炎症所見より全身型若年性特発性関節炎（sJIA）と診断された18例。

方法：末梢静脈血より白血球を分離、DNAを抽出した。これらの症例全てについて、*MEFV* 遺伝子の全 exonの配列を解析した。血清サイトカイン値はELISA法により定量した。定量したサイトカインは、neopterin、IL-6、IL-18、sTNF-RI、sTNF-RIIである。これらの値から、サイトカイン・プロファイル解析のために radar chart を作成して異なる疾患でそのパターンを比較検討した。

倫理面への配慮：全ての遺伝子解析事例について、患者本人あるいは保護者にその内容を説明、納得して頂いた上で同意を得た。
MEFV 遺伝子変異解析については、金沢大学医薬保健学域倫理委員会（IRB）規定に則って施行した。

C. 研究結果

1；FMF症例における血清サイトカイン
炎症性サイトカインでは、IL-18がA群でのみ高値を示した。B群ではほぼ正常範囲に留まった。検討したサイトカインの内、IL-18のみが両群間で有意差を示した（図1）。典型例の内、発作時の検討が可能であった2例では、IL-6も高値を示した。

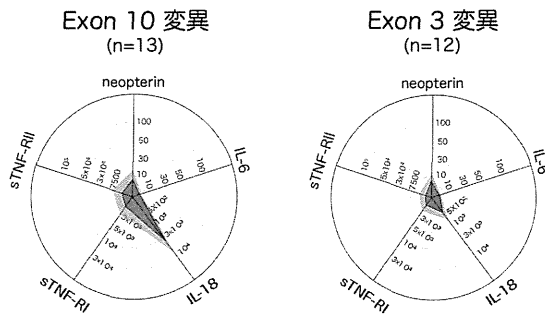


図1；FMF の異なる病態とサイトカイン

2；sJIA症例における血清サイトカイン
全身型JIAとして検討した症例の内、10例は発症時よりIL-6が高値 (> 50 pg/ml) を示し、IL-18の上昇は著明であったが限定的 (< 50,000 pg/ml) であった (A群)。一方、8例はIL-6が軽度の上昇 (< 30 pg/ml) を示すのみであり、むしろIL-18が顕著な高値 (> 100,000 pg/ml) を示した (B群)。A群においては、関節炎症を強く認める例が多く、マクロファージ活性化症候群 (MAS) の合併は認めなかった。一方、B群における関節炎は軽度であり、MASを合併する頻度が明らか

かに高値 (50%) であった (図2)。

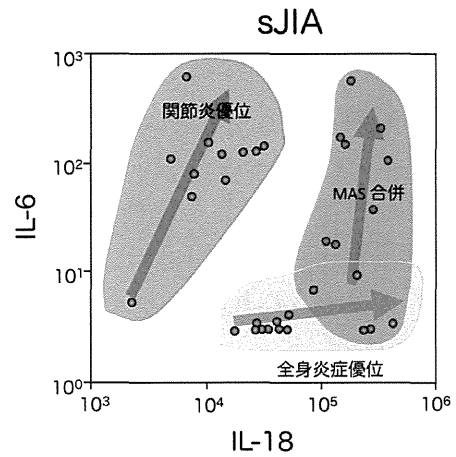


図2；sJIAの亜群とサイトカイン・プロファイル

D. 考察

Exon 10変異を認めることが多いFMF典型例と、exon 3 variant症例で見られるような不全型の症状がどのような病態の差を反映しているかは明らかにされていない。

今回の研究では exon 10に変異をもつFMF 典型例において持続的なIL-18上昇が確認された。この事実は、本疾患が非発作時においても継続的なinflammasomeの活性化状態が持続していることを示唆している。

さらに、sJIA症例における検討により、少なくとも2つの異なる病態を特徴とする亜群が存在することが示唆された。このことはこれまでの臨床経験から示唆されたいが、「関節炎」が主体の病態と、「全身炎症」が主体の病態が、炎症に寄与するサイトカインの差によって示されたことは重要である。

このようなサイトカイン・プロファイルからは、FMF、sJIA共に発作時の急性炎症病態に対する治療に加え、基盤となっている持続的な炎症病態をいかに制御するかが重要であることが理解される。

E. 結論

FMF 典型例においては、IL-18高値に反映されるinflammasomeの持続的な活性化が起こっていることが示唆された。sJIAにおいては、IL-18は持続する炎症病態の主要な維持機構を構成していることが示唆された。サイトカイン・プロファイリングは炎症病態の分析のみでなく、異なる亜群の鑑別や治療反応性評価などの臨床的ツールとして有用であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimizu M, Yachie A. Compensated inflammation in systemic juvenile idiopathic arthritis: role of alternatively activated macrophages. *Cytokine*. 2012; 60: 226-32.
2. Shimizu M, Nakagishi Y, Yachie A. Distinct subsets of patients with systemic juvenile idiopathic arthritis based on their cytokine profiles. *Cytokine*. 2013 in press.

2. 学会発表

1. 東馬智子、和田泰三、清水正樹、上野和之、谷内江昭宏。MEFV 変異を有する周期性発熱症候群におけるサイトカイン・プロファイリングの特徴。第22回日本小児リウマチ学会総会・学術集会。2012年10月5日～7日（名古屋）

G. 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

特になし