

201231075B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

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

平成 23 ～ 24 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

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)

資料1～6

II. 研究成果の刊行に関する一覧…………… 21

III. 研究成果の刊行物別冊…………… 37

I. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書

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

研究期間 平成23年4月1日から平成25年3月31日まで

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 等の自然免疫関連分子の異常が報告されている。本研究では、全国症例調査による患者実態調査を行い、診断基準・システムの確立、治療方法の確立の 2 点を進めた。

2010 年度に行った国内での IRAK4 欠損症及び MyD88 欠損症患者発生の実態調査に基づき、2011 年度に国内での発生症例について二次調査を行った。国内の IRAK4 欠損症患者発生数は、4 家系 7 名であり、うち 4 名が重症感染症で死亡していた。さらに 2012 年度に GBS 及び肺炎球菌髄膜炎に罹患した 1 例の新規患者が同定され生存している。興味深いことに、8 症例全例で臍帯脱落遅延を認めていた。

患者迅速診断のため、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、及び最適化を行っている。LPS 刺激後の単球内 TNF- α 産生率の検討は、IRAK4 欠損症だけでなく、免疫不全症を伴う外胚葉形成異常症(EDA-ID)の診断にも有用であった。また、本検査ではステロイド剤等の使用時には偽陽性が認められる。患者診断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。

一方、遺伝子診断の後、確定診断を行う手法の開発を行っている。疑い症例で同定される IRAK4 及び MyD88 の各遺伝子型に対応した、*in vitro* の病的意義判定方法が確立していないため、培養細胞(HEK293 細胞)を用いた Cell biology の手法と、リコンビナントタンパクを用いた Proteomics の手法を組み合わせ、*in vitro* の機能判定法の検討を進めた。その結果、IRAK4 欠損症及び MyD88 欠損症の病因の本質は、Toll 様受容体(TLR)シグナル伝達経路において、MyD88 を中心とした高次複合体(Myddosome)の形成障害であることが明らかとなった。

治療としては、生存例の 3 名で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。しかし、肺炎球菌莢膜特異抗体価の部分低下(23F)が認められワクチン接種だけでは不十分な可能性も示唆された。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)）
総合研究成果報告書

研究組織

(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

(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

枳尾豪人・京都大学・工学研究科 准教授

大石和徳・大阪大学・微生物病研究所・感染症国際研究センター 特任教授(平成23年度)

明田幸宏・大阪大学・微生物病研究所・感染症国際研究センター 特任講師(平成24年度)

(研究協力者)

近藤直実・岐阜大学・大学院医学系研究科・小児病態学 教授

金子英雄・国立病院機構長良医療センター・臨床研究部 臨床研究部長

松井永子・岐阜大学・医学部附属病院・小児科 臨床准教授

寺本貴英・岐阜大学・医学部附属病院・小児科 臨床准教授

木村豪・岐阜大学・医学部附属病院・小児科 臨床講師

久保田一生・岐阜大学・医学部附属病院・小児科 医員

山本崇裕・岐阜大学・医学部附属病院・小児科 医員

和田泰三・金沢大学・医薬保健研究域医学系・小児科 講師

東馬智子・金沢大学・医薬保健研究域医学系・小児科 助教

(事務局)

大西秀典

岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学

〒501-1194

岐阜県岐阜市柳戸1-1

TEL 058-230-6386

FAX 058-230-6387

e-mail ohnishih@gifu-u.ac.jp

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)等の患者の中にまぎれている可能性が高い(資料 1)。これらの疾患は、難治性で重症化しやすく、ときに致死性である。従って早期診断により適切な治療を行う事で、患者予後を著しく改善させ、QOL 向上を図る必要がある。本研究では特に、IRAK4 欠損症を対象として、国内での患者発生の実態調査及び早期診断システムの確立、治療法の確立に向けた研究を行うことを目的とした。すなわち、以上の点に鑑み、本研究の目的は次の 2 つである。

①診断基準・システムの確立: IRAK4 欠損症を中心とした自然免疫異常症が疑われる患者の臨床症状・所見の分析、サイトカインの産生パターン、病因遺伝子等を検討し、これらにより以下の 1-5 を行う。

1. 診断マーカーと診断のための網羅的スクリーニング法の確立。
2. 診断基準、フローチャートの確立(早期診断)。
3. 原因遺伝子のハイスループット解析システムの整備(確定診断、発症ハイリスク因子の同定)。
4. 変異タンパクの機能分析により、同定された変異の病因への関連づけを検証する。
5. 実態調査

②治療法の確立

1. 個々の疾患の病因病態解明についてタンパク立体構造解析技術を用いて行い、構造基盤による創薬技術を利用して、新規治療法の開発を進める。
2. 肺炎球菌ワクチン投与による抗体価の経時変化の測定を行い、有効な投与スケジュールの検討を行う。

B. 研究方法

1. 全国症例調査: 国内での IRAK4 欠損症をはじめとし

た自然免疫異常症患者の症例数等の実態が不明であったため、資料 2 を使用して平成 22 年度に全国症例調査を行った結果、国内での IRAK4 欠損症患者は7名と報告されている。また、MyD88 欠損症患者の発生報告はない。平成 23 年度に7名の IRAK4 欠損症患者の担当医宛に、二次調査票(資料 3)を郵送し、全例から解答を得られたので、内容を分析した。

2. 迅速診断方法の開発: 平成23年度に引き続き自然免疫異常症が疑われ、診断依頼があった患者検体について、迅速診断スクリーニング法として、全血1mlに Brefeldin A及び、LPSを加え、CO₂ incubatorで4時間培養後、抗CD14抗体で染色後、permeabilizationし、抗 TNF- α 抗体で細胞内TNF- α を染色した後、フローサイトメーターで解析した。解析は、単球にgateをかけ、TNF- α 産生細胞の割合を検討した。

3. 遺伝子診断: 2.のスクリーニング法でTNF- α 産生量の低下が認められた症例及び、臨床症状から自然免疫異常症が疑われた症例についてIRAK4、MyD88、TIRAP/Mal、NEMO、IKBA等の遺伝子解析を行った。

4. 遺伝子型の機能解析: pcDNA系、pGEX系発現ベクターにIRAK4、MyD88等の遺伝子を組み込み、それぞれの遺伝子変異型を導入したものを構築した。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。種々のタンパク間相互作用(溶液NMR法、液体クロマトグラフィー法、GST プルダウン法等)、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活性の比較を行った。

5. 患者評価 1: IRAK4 欠損症症例、小児の IPD および再発性肺炎症例より血清サンプルを採取し、血清中の血清型特異 IgG 濃度は第 3 世代 ELISA 法を用い、血清 OPA titer は multiplex opsonophagocytic assay (MOPA)法により測定した。ELISA で測定する血清型は PCV7 に含有される7血清型 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F)とし、OPA titer はこの 7 価に加え血清型 6C を測定した。測定結果はそれぞれ特異 IgG (μ g/ml)、OPA titer として表した。

6. 患者評価2: IRAK4欠損症では肺炎球菌をはじめとする起病因菌による細菌性髄膜炎の発症が多く認められる。細菌性髄膜炎のほか、熱性痙攣、痙攣重積型脳症(AESD)、急性散在性脳脊髄炎(ADEM)などの中枢神経疾患を対象として、患者髄液中の各種炎症性サイトカインと軸索損傷マーカーであるタウ蛋白について、ELISA法により定量した。また、周期性発熱症候群、EBV 関連疾患について血清中の各種炎症性サイトカインを定量した。

7. 類縁疾患評価1～2: 原発性免疫不全症8分類のうち、自然免疫不全症に分類される疾患である、常染色体優性遺伝免疫不全症を伴う無汗性外胚葉形成異常症(AD-EDA-ID, IKBA 異常症)、STAT1 機能獲得型変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症患者を見いだしたため、その病態解析を行った。

8. 類縁疾患評価 3: IFN- α の機能異常をきたす Aicardi-Goutieres 症候群(AGS)及び Familial Chilblain Lupus の本邦における症例の既報告原因 5 遺伝子 TREX1、RNASEH2B、RNASEH2A、RNASEH2C、SAMHD1)の遺伝子解析をおこなった。また、TREX1 異常症の病態解析として、疑い症例の遺伝子解析を行った。

9. 創薬: 創薬に向けたモデルとして、IRAK4 のシグナル上流分子である IL-18 の構造解析を行った。BL21(DE3)及び SF9 細胞に、IL-18 及び受容体遺伝子を形質転換し、タンパクを発現精製させ、複合体タンパクを作成、結晶化を行った。得られた結晶の X 線構造解析を行った。また、IL-18 の立体構造原子座標を用いて、分子ドッキング実験を行い、阻害薬の探索を行った。30 万分子の結合実験から、30 分子を抽出し、それらの IL-18 阻害活性を比較したところ、4 種類において、明らかな阻害活性が得られた。それらの分子について、これまで、IL-18 阻害活性の報告はなく、新規の阻害薬候補と考えられた。

C. 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。本研究における患者実態把握及び病態解析については、“自然免疫不全症の全国症例調査に関する研究”として第 158 回岐阜大学大学院医学系研究科医学研究等倫理審査委員会にて承認されている。研究対象者には、文書により本研究の内容、方法および予想される結果を十分に説明し十分な理解(インフォームドコンセント)を得た上で実施される。また倫理面でも、結果による不利益は全く生じないように配慮が充分になされ、対象となる個人の人権擁護が充分になされていることから問題がないと判断される。

D. 研究結果

1. 患者実態調査(大西、高田、明田): IRAK4欠損症患者について行った二次調査票では、主に臨床経過、主要症状(特に臍帯脱落までの期間、感染症罹患頻度)、感染症罹患がある場合起病因菌、免疫機能プロファイル、ワクチン接種状況、治療状況、生存状況、遺伝子診断について聴取した。結果、IRAK4欠損症患者7名中4名がすでに死亡しており、3名が生存していた。IRAK4の遺伝子型は6例が(c.118insA)のホモ接合性変異で、1例は(c.118insA)と(R183X)のコンパウンドヘテロ接合性変異であった。主要な感染症罹患歴として、肺炎球菌化膿性髄膜炎、緑膿菌肝膿瘍、ブドウ球菌皮下膿瘍、緑膿菌壊死性筋膜炎が挙げられ、死亡例はそのいずれかによって致死的となっていた。さらに2012年度にGBS及び肺炎球菌による細菌性髄膜炎に罹患した1例の新規患者が同定され生存している。臨床的な特徴として臍帯脱落遅延があり、8症例全例で生後2週間以上の遅延を認めている(14日～39日、中央値23.5日)。従来から白血球接着不全症においても臍帯脱落遅延が特徴的な症状として挙げられているが、本症例でも特徴的な所見であるといえる。検査データでは、致死性細菌感染症への罹患であることに比して、CRP頂値の上昇が緩やかな症例が2例(CRP peak: 2.29, 1.05 mg/dl)と、十分上昇が確認された症例が4例(CRP peak: 20.64, 17.64, 16.0, 25.041 mg/dl)が認められた。また、肺炎球菌化膿性髄膜炎罹患症例では、致死的な程重篤であるにも関わらず、髄液細胞数の上昇が少ない(203, 2,

64/ μ l)ことがあることが判明した。IRAK4欠損症症例7名で、血球分画や免疫グロブリン値に明らかな異常を認めていない(2012年に診断された1例については調査中)。生存例3例のうち2例では、兄弟がIRAK4欠損症に合併した肺炎球菌化膿性髄膜炎で死亡したため、早期に診断されており、生後1歳までは γ グロブリン製剤の補充療法を施行し、7価肺炎球菌ワクチン(PCV7)を抗体価の推移を追跡しながら3回接種、及び23価肺炎球菌ワクチン(PPV23)を1回接種していた。残る1例でも同様に7価肺炎球菌ワクチンを3回、23価肺炎球菌ワクチンを1回接種していた。尚、3例とも肺炎球菌特異的IgG2抗体価の上昇が確認されている。興味深いことに、PCV7の3回接種、PPV23の1回接種後にも関わらず、1症例で血清型23F特異的特異IgG濃度が0.20 μ g/ml未満であった。また、他の2症例においても23Fに対する抗体価は比較的低値であった。それ以外のいずれの血清型でも0.20 μ g/ml以上であり、IRAK4欠損症においても肺炎球菌ワクチン接種後のある程度の免疫応答の可能性が期待される。ワクチンによる予防療法に加えて、ST合剤及びペニシリン製剤、あるいはST合剤単独の予防投与が行われており、感染罹患時に早めの抗生剤投与(静注)を行うことで重篤な感染症への罹患を免れており、現在の感染症罹患頻度は年2-4回程度である。

2. 迅速診断方法の開発(大西、高田、西小森): IRAK4欠損症症例は、重症感染症が発症する前に前述のような治療法で適切に予防を講じることが必要であるが、何よりも患者を発症前に診断することが重要である。本研究班では、特にTLRシグナルに関連する自然免疫異常症全般の迅速診断スクリーニング法の開発を進めている。フローサイトメーターを利用した患者末梢血のLPS刺激後単球内TNF- α 陽性率の検討法(資料4)は、平成22年度に報告した通り、IRAK4欠損症、MyD88欠損症のみならず免疫不全症を伴う無汗性外胚葉形成異常症(EDA-ID)(NEMO異常症、IKBA異常症)の診断にも有効であるが、検査時にステロイド剤等免疫抑制療法の使用の影響を受け一時的にTNF- α 産生が低下することがあるため留意が必要である。また、BTK欠損症、高IgE症候群、STAT1機能獲得型変異、慢性肉芽腫症患者では、本方

法では検出できなかった。本手法による検査を軸にした診断フローチャートを提案している(資料5)。

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

また、一部の自然免疫不全症では炎症性腸疾患の合併が知られており、本研究班で見いだしたIKBA異常症においてもIBDの発症が認められた。さらに最近新たな自然免疫不全症として、LUBAC欠損をきたすHOIL-1異常症が報告され、この疾患ではIBD症状等の自己炎症疾患様の症状を呈していた。このため、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・プロファイルの検討を行った。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、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。また、前述のIBDを合併したIKBA異常症においても血清IL-18値の上昇を認めている。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

性が起こっていることが示された。

4. 遺伝子型の機能解析(大西、加藤): 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)の検討が有用であった。TIRドメイン上の変異では、培養細胞上でのタンパク発現実験、培養細胞への一過性発現による NF- κ B 活性の比較(リガンド刺激後の TIR ドメインによる優性阻害効果の比較も有用)、タンパク間相互作用(GST プルダウン法、溶液 NMR 滴定実験)の検討が有用であった。一方、IRAK4 では、本来 IRAK4 は TLR や IL-1/18 シグナルにおいて炎症反応産生誘導に必須な分子であるはずが、HEK293T 細胞上に一過性発現した場合、IL-1 受容体の 2量体化による NF- κ B 転写活性誘導を抑制するという一見矛盾した反応が生じた。その上で、IRAK4 Kinase ドメイン上の変異や DD 上のフレームシフトによる早期終止コドン発生型変異について、タンパク発現が低下する variant の場合、HEK293 細胞への一過性発現による NF- κ B 活性の比較が有用であったが、DD 上のミスセンス変異(R12C)では発現量、NF- κ B 活性ともに野生型との差異が確認できない。しかし、平成 22 年度に本研究班で報告した通り、IRAK4-DD と MyD88-DD のタンパク間相互作用は、R12C 変異導入により減弱するため、現時点では IRAK4 遺伝子変異型の機能評価には、培養細胞を用いた手法とタンパク間相互作用の手法を組み合わせる必要がある。

5. 類縁疾患評価1(大西): 類縁疾患の解析として、IKBA異常症の *in vitro* の病態解析を行った。本研究班において、1症例の新規患者を同定している。HEK293hTLR4-MD2-CD14 細胞に pcDNA-IKBA-FLAG (野生型、変異型) を発現させ、LPS刺激後のNF- κ B活性をLuciferase reporter gene assay法で測定する系は、IKBA遺伝子変異の機能評価に有用であった。

尚、本症例では前述の通り IBD を合併しており、血清IL-18値が高値を示した。

6. 類縁疾患評価2(大西): 類縁疾患の解析として、STAT1機能獲得型変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症の *in vitro* の病態解析を行った。本研究班において、1症例の新規患者を同定している。患者PBMCsをカンジダ由来Mitogenであるcurdlanで刺激した際に産生されるIFN- γ 、IL-17Aが健常者より著しく低下していることが判明した。また、本症例では自己免疫性肝炎様の炎症性疾患を合併していたが、血清IL-18値は高値を示し、肝組織にて単球とIL-18の集積が認められた。

7. 類縁疾患評価 3(西小森): 類縁疾患の解析として、TREX1 異常症の症例集積、遺伝子解析、及び *in vitro* の病態解析を行った。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。

8. 創薬(朽尾、加藤、大西): 自然免疫異常症のうち、EDA-ID や最近報告されたHOIL-1 欠損症では、前述の通り IBD の合併がみられ、また STAT1 機能獲得型変異でも自己免疫性肝炎様の炎症性疾患を合併し、血清IL-18 値の上昇が認められている。本研究では IRAK4 の上流分子である IL-18 のリガンド受容体複合体構造解析を行った。その結果、IL-18 とその受容体の相互作用様式は、IL-1 のものと極めて類似していることが明らかとなった。また、創薬モデルケースとして IL-18 の立体構造原子座標を用いて、分子ドッキング実験を行い、阻害薬の探索を行った。30 万分子の結合実験から、30 分子を抽出し、それらの IL-18 阻害活性を比較したところ、4 種類において、明らかな阻害活性が得られた。それらの分子について、これまで、IL-18 阻害活性の報告はなく、新規の阻害薬候補と考えられた。今後、特に IL-18 受容体側の構造基盤に基づいた IL-18 阻害剤の開発を進め、自然免疫不全症に合併する炎症性疾患の治療薬開発を目指す予定である。

E. 考察

国内におけるIRAK4欠損症の二次症例調査により、患者は肺炎球菌髄膜炎や緑膿菌感染等の侵襲性感染症により高率に致死的事であることが判明した。また、患者血液の一般的な免疫プロファイルには異常がみられず、免疫不全症の一次診断から漏れうることが推察される。さらに化膿性髄膜炎等の重症感染症に罹患しているにも関わらず、血清CRPや髄液細胞数の上昇が緩慢な症例が認められた。

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

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

F. 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、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。しかし、一般への疾患認知度がまだまだ低いこと、コマーシャルベースの検査で診断ができないことから未診断例が多数存在すると推測される。そのため、疾患概念啓蒙の一環として、書籍“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/平家俊男編集，診断と治療社，2012年)を発売した。今度も、疑い症例の診断受け入れを継続していく方針であり、当研究班施設への診断依頼書(資料6)を示す。

本研究班の当初の目標である、患者診断基準・システム方法の確立は、達成されたと考えている。また治療法の確立については、肺炎球菌ワクチンの有効性とその不十分性が確認でき、抗生剤の併用療法が必須であるという結論に至ったが、タンパク立体構造情報を基盤とした創薬は現在いまだ進行中であり、最終目的に到達できていない点が今度の課題である。

G. 研究成果の公表

別項、研究成果の一覧表にまとめる。

資料 1

インターロイキン 1 受容体関連キナーゼ 4 (IRAK4) 欠損症とは

1. 概要

インターロイキン 1 受容体関連キナーゼ 4 (IRAK4) 欠損症は、2003 年に Picard らによって初めて報告された疾患で、自然免疫を担当する Toll 様受容体 (TLR) のシグナル伝達を担う分子 IRAK4 遺伝子の異常により生じる常染色体劣性遺伝形式の疾患です。本邦でも現在までに数例の症例報告がなされていますが、実態は明らかではありません。IRAK4 欠損症及び、関連分子である MyD88 欠損症は、類似した表現型としてグラム陽性菌 (特に肺炎球菌や黄色ブドウ球菌、緑膿菌) による感染症が反復、あるいは重症化 (敗血症、細菌性髄膜炎など) することが報告されており、従来原因不明の侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) とされていた症例の中に、両症例が含まれていると考えられています。

2. 疫学

平成 22 年度に施行した疫学調査の結果、国内での症例数は 7 例が報告されています。そのうち、生存例は平成 23 年度時点で 3 例です。全世界では、すでに 30 症例以上が報告されています。

3. 原因

TLR あるいはインターロイキン 1 受容体 (IL-1R) が刺激により活性化されると、アダプター分子である骨髄分化因子 88 (MyD88) が受容体と結合します。さらに、IRAK4、IRAK1 が誘導され、IRAK4 は IRAK1 をリン酸化し、以降下流のキナーゼカスケードの働きで、多くの炎症性サイトカインの発現を促す転写因子 NF- κ B の活性化に至ります。IRAK4 遺伝子の異常により、TLR および IL-1R のシグナル伝達障害が起こり、自然免疫応答低下をきたし、特に肺炎球菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌に対する易感染性を示します。

4. 症状

生後まもなくより膿瘍形成や重症細菌感染症 (化膿性髄膜炎、敗血症など) を繰り返します。その多くは肺炎球菌によるものであり、より頻度は落ちます

が黄色ブドウ球菌によることもあるようです。グラム陰性菌(特に緑膿菌)による重症感染を呈することも時にありますが、寄生虫感染症、真菌感染症、ウイルス感染症が重症化する傾向にあるとの報告はありません。

5. 合併症

前述の通り、細菌感染症の合併により、敗血症、細菌性髄膜炎等を合併し、時に致死的となります。

6. 診断方法

乳幼児期に反復性、あるいは重症の細菌感染症で発症しますが、通常の免疫機能検査(ガンマグロブリン値、免疫細胞数など)は年齢相応の数値を示し、明らかな異常がみられないのが特徴です。早期診断スクリーニング方法としてフローサイトメーターを利用した手法が、九州大学大学院医学研究院成長発達医学講座の高田英俊先生らによって考案されています。最終的には、IRAK4やMyD88の遺伝子検査にて確定診断します。類縁疾患として、無汗性外胚葉形成不全症を伴う免疫不全症(EDA-ID)も知られており、同様の手法で診断スクリーニングが可能です。EDA-IDは、NEMOやIKBAの遺伝子検査にて確定診断可能です。

7. 治療法

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

資料 2

インターロイキン 1 受容体関連キナーゼ 4(IRAK4)欠損症、MyD88 欠損症 一次調査票

平成 22 年度 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)欠損症の全国症例調査
及び早期診断スクリーニング・治療法開発に関する研究班

本調査票は実態把握にのみ使用し、個人情報には目的以外には利用いたしません。
以下の各質問につきまして、ご回答をお願いいたします。

貴施設名： _____	記載者氏名： _____
記載年月日：平成 22 年 ____ 月 ____ 日	
住所：〒 _____	
電話： _____	FAX： _____ E-mail： _____

1. 以下の疾患の患者様を診療しておられますか？

○ IRAK4 欠損症

確定診断症例： はい（症例数： 人） ・ いいえ

疑い症例： はい（症例数： 人） ・ いいえ

○ MyD88 欠損症

確定診断症例： はい（症例数： 人） ・ いいえ

疑い症例： はい（症例数： 人） ・ いいえ

2. 免疫グロブリン値等の一般的な免疫機能の検査で異常を認めないが、生後まもなくより膿瘍形成や重症細菌感染症(化膿性髄膜炎、敗血症など)を繰り返す症例を診療されていますか？

はい (症例数： 人) ・ いいえ

“はい” とお答え頂いた場合、IRAK4 及び MyD88 遺伝子検査を希望されますか？

はい ・ いいえ

ご協力ありがとうございました。

資料 3 自然免疫不全症に関する二次調査表

(患者コード: _____)

貴施設名 : _____	診療科 : _____
電話番号 : _____	FAX : _____
記載医師氏名 : _____	E-mail : _____
性別 : _____	生年月日 : _____
臨床診断名 : _____	確定診断時年齢 : _____

病歴 (特に現在までの感染症罹患歴を御記載ください):

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

主要症状:

1. 発症時期	歳	医師推定	患者申告		
2. 発熱	なし あり	13. 扁桃腺の有無	なし あり		
3. 体温頂値	_____ °C	14. 頸部リンパ節腫脹	なし あり		
4. 咳嗽	なし あり	15. 胸腺の有無*	なし あり		
5. 鼻汁	なし あり	16. 臍帯脱落までの日数 (_____ 日)			
6. 嘔吐	なし あり	17. 歯牙欠損の有無	なし あり		
7. 下痢	なし あり	18. 家族歴			
8. けいれん	なし あり				
9. 髄膜刺激症状	なし あり				
10. 発達遅滞	なし あり	19. その他の合併症			
11. 皮疹	なし あり				
12. 肝脾腫	なし あり				

*胸部レントゲン, CT 画像検査で確認できるか否か

検査所見: 発症時の検査所見を可能な範囲で御記載願います。

初診時 WBC 値 : _____ / μ l

免疫グロブリン値 :

WBC の頂値 : _____ / μ l

IgG: _____ mg/dl, IgA: _____ mg/dl, IgM _____ mg/dl

(感染症発症からの時間経過 _____ 時間)

IgG サブクラス分画: IgG1 _____ mg/dl, IgG2 _____ mg/dl

*医師推定

IgG3 _____ mg/dl, IgG4 _____ mg/dl

分画: Ne: _____ %, Ly: _____ %, Mo: _____ %, Ba: _____ %, Eo: _____ %

上記免疫グロブリン測定時の年齢

核左方移動の有無: Stab: _____ %, Seg _____ %

(_____ 歳 _____ カ月)

初診時 CRP 値 : _____ mg/dl

血清 IgE 値 : _____ IU/ml

CRP の頂値 : _____ mg/dl

(感染症発症からの時間経過 _____ 時間)

血清補体値 :

*医師推定

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

赤沈 60 分値 : _____ mm/hour

TB リンパ球サブセット :

CD3: _____ %, CD4: _____ %, CD8: _____ %, CD19: _____ %

プロカルシトニン値 : _____ ng/ml

リンパ球幼若化反応 (LST) :

フェリチン : _____ ng/ml

ConA: _____ %, PHA: _____ %

好中球貪食能 : _____ %

好中球殺菌能 : _____ %

NK 細胞活性 : _____ %

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

起因菌:

1. 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
2. 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
3. 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
4. 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
5. 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
6. 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)
7. 検出部位 咽頭, 喀痰, 鼻腔, 尿, 血液, 髄液, 関節液, その他(_____)

ワクチン接種歴（接種済みのものを○でお示してください）:

BCG ・ ポリオ ・ DPT ・ 麻疹風疹 ・ 日本脳炎 ・

肺炎球菌ワクチン(7価 ・ 23価) ・ Hib ワクチン ・

(その他 _____)

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

IRAK4 (_____)

MyD88 (_____)

その他 (_____)

治療方法: 現在、試みておられる該当する治療方法に○印を付けてください。

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

診断後の感染症罹患頻度:

入院を要しない感染症 _____ 年 _____ 回程度

入院を要する重症感染症 _____ 年 _____ 回程度

最終観察: 該当項目に○印を付けてください。

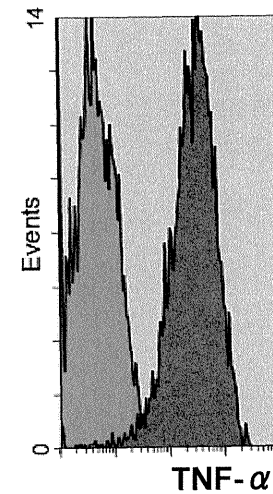
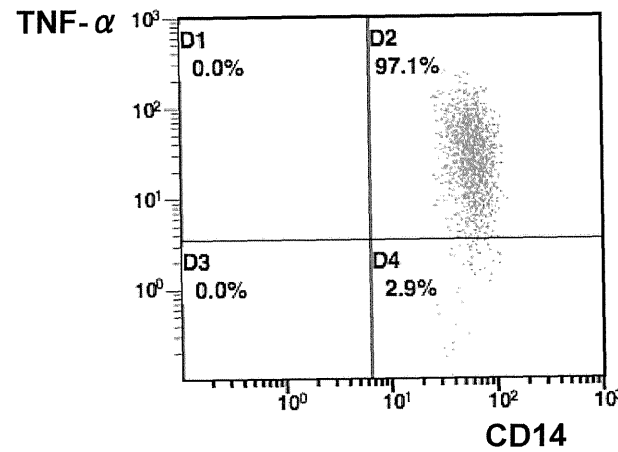
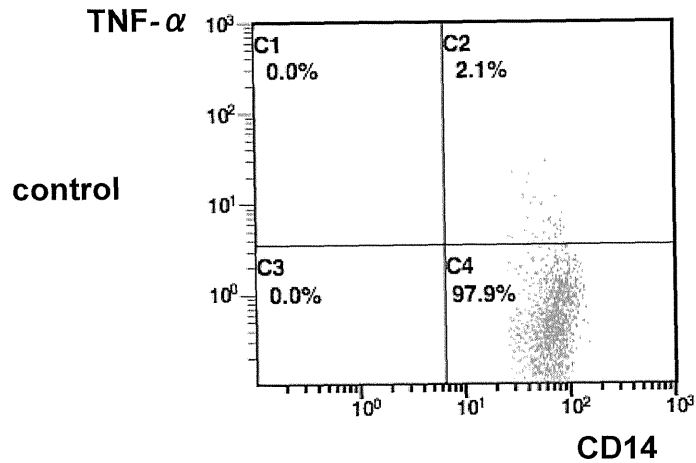
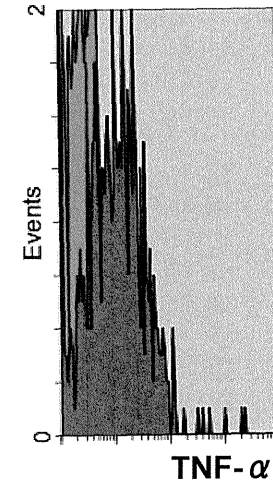
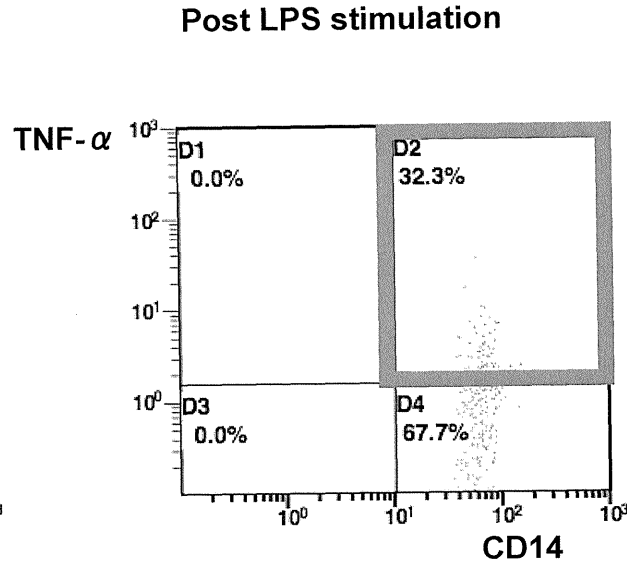
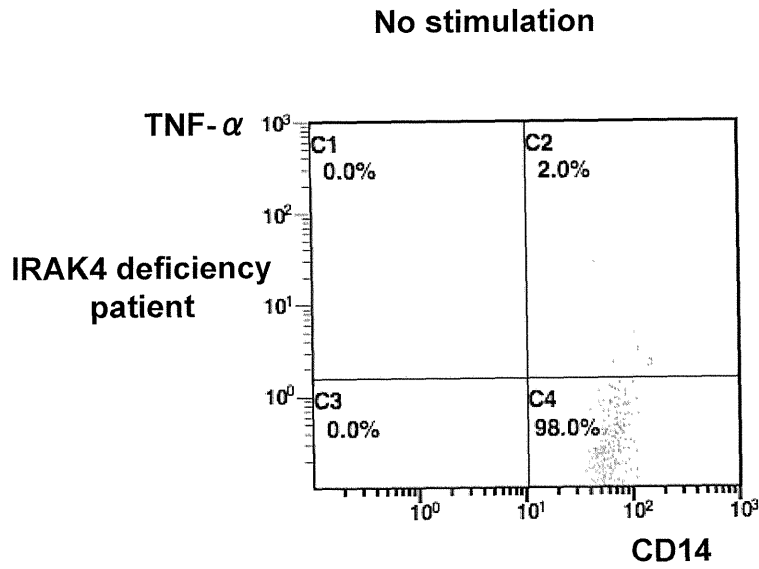
1. 生存 西暦 _____ 年 _____ 月 _____ 日
2. 死亡 西暦 _____ 年 _____ 月 _____ 日
3. その他 _____

フォロー終了、転院などありましたらご記入ください。

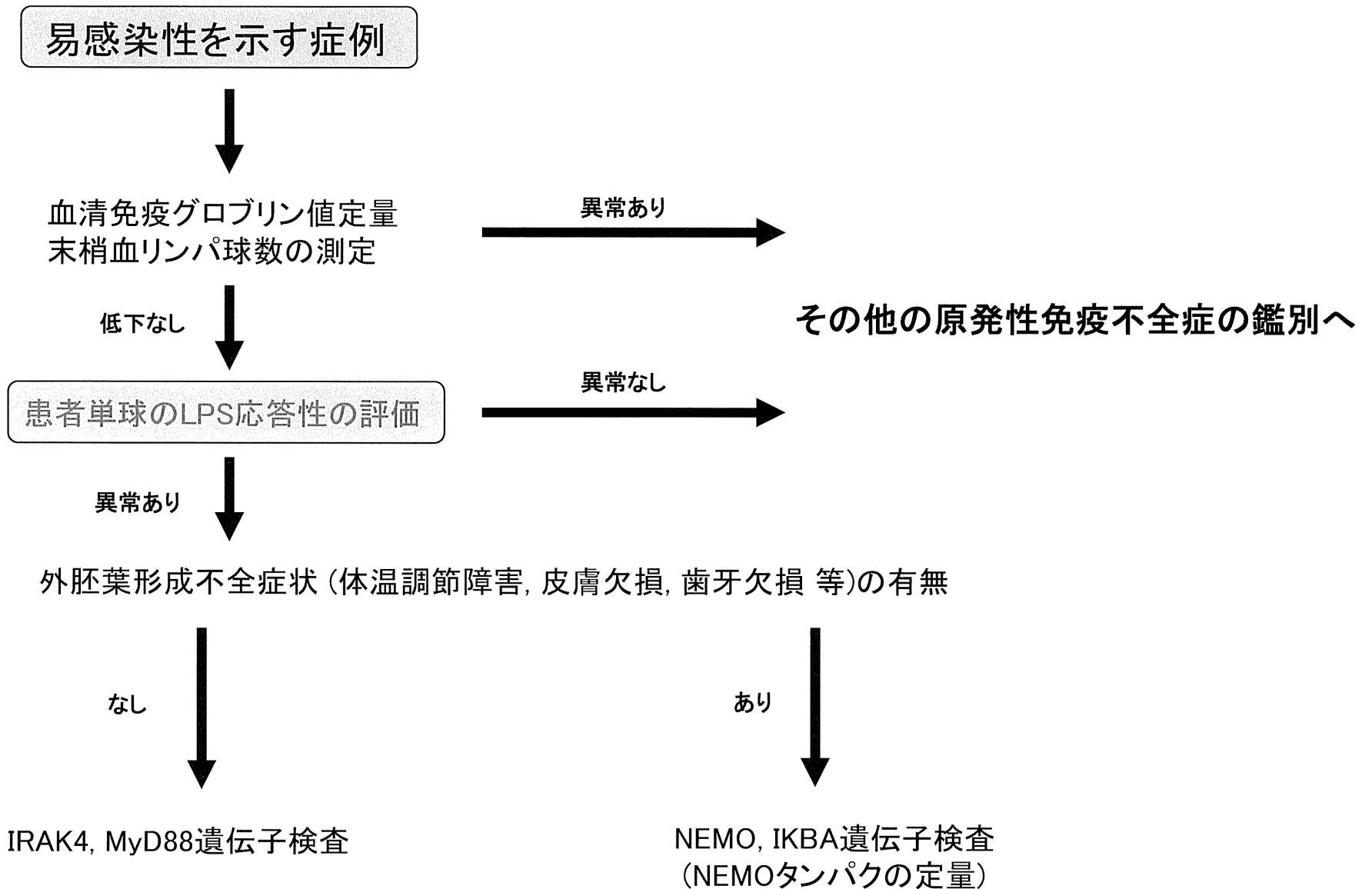
問い合わせ先 主任研究者: 大西秀典
岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学
〒501-1194 岐阜県岐阜市柳戸1-1
TEL:058-230-6386 FAX:058-230-6387
e-mail: ohnishih@gifu-u.ac.jp

Intracellular TNF-alpha production test

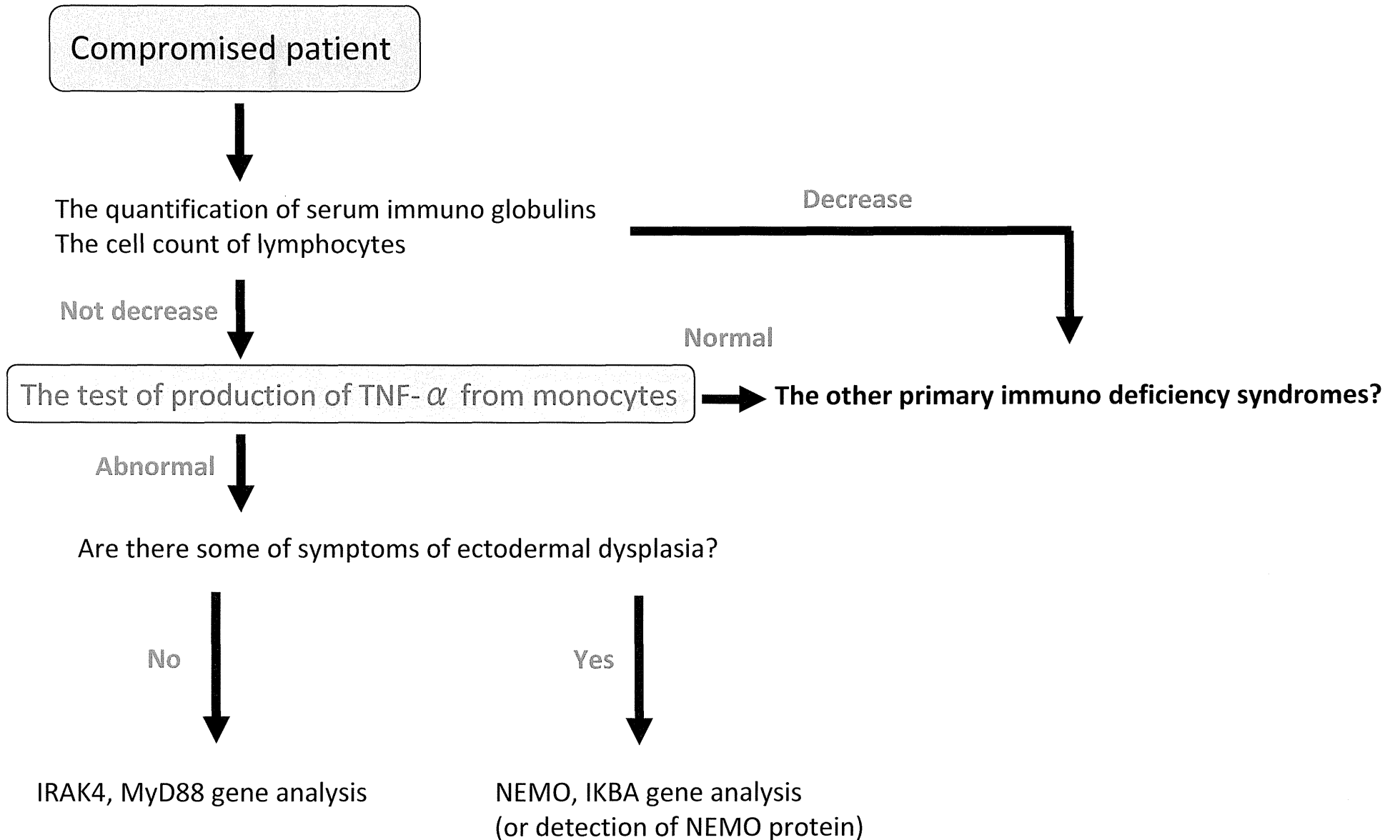
Red: no stimulation
Blue: LPS stimulation



自然免疫不全症の簡易診断フローチャート



The diagnosis flow chart of Innate immune defect patients



資料6 自然免疫不全症 疑い例 遺伝子診断依頼書
(患者コード: _____)

貴施設名: _____	診療科: _____
電話番号: _____	FAX: _____
記載医師氏名: _____	E-mail: _____
性別: _____	生年月日: _____
臨床診断名: _____	

病歴 (特に現在までの感染症罹患歴を御記載ください):

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

主要症状:

1. 発症時期	歳	医師推定	患者申告	
2. 発熱	なし あり	13. 扁桃腺の有無	なし あり	
3. 体温頂値	_____℃	14. 頸部リンパ節腫脹	なし あり	
4. 咳嗽	なし あり	15. 胸腺の有無*	なし あり	
5. 鼻汁	なし あり	16. 臍帯脱落までの日数 (_____ 日)		
6. 嘔吐	なし あり	17. 歯牙欠損の有無	なし あり	
7. 下痢	なし あり	18. 家族歴		
8. けいれん	なし あり			
9. 髄膜刺激症状	なし あり			
10. 発達遅滞	なし あり	19. その他の合併症		
11. 皮疹	なし あり			
12. 肝脾腫	なし あり			

*胸部レントゲン, CT 画像検査で確認できるか否か