

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15716

研究課題名(和文) 若年発症の抗NMDAR脳炎における遺伝素因の検討

研究課題名(英文) Genetic basis and molecular mechanism of anti-NMDAR encephalitis in early infant.

研究代表者

小林 良行 (Kobayashi, Yoshiyuki)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：20723290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：IRAK4 欠損症は自然免疫の障害で発症する免疫不全症で、重症化を防ぐために早期診断が極めて重要となる。一方で抗 NMDAR 脳炎は、宿主獲得免疫の賦活化を介した自己免疫機序が発症に関与しており、中枢性低換気、不随意運動などを認める。乳児期発症の抗 NMDAR 脳炎は非常に稀であり、全エクソーム解析を試行した結果、IRAK4のヘテロ接合性新規遺伝子変異(Y10Cfs*9, R12P) が同定された。両変異の機能解析を行い、IRAK4 遺伝子変異を適切に評価する新規の評価系を確立した。また、本研究で、早期発症の抗 NMDAR脳炎の一部が先天的な免疫異常に基づき発症している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗NMDAR脳炎を発症したIRAK4欠損症の症例を世界で初めて同定し、稀少疾患に着目したという点で、独自性が高い。また、IRAK4欠損HEK293T細胞を用いることでIRAK4遺伝子変異の病的意義を簡便かつ正確に評価できる新規のNF- κ Bレポーターアッセイを確立した部分で学術的意義や社会的意義は高い。同時に乳児期発症の抗NMDAR脳炎が先天的な免疫異常に基づいて発症する可能性を示唆した部分でも学術的意義は高いと考える。

研究成果の概要(英文)：IRAK4 deficiency is an immunodeficiency syndrome caused by impairment of innate immunity, and early diagnosis is extremely important to prevent severe and fetal outcomes. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis, on the other hand, is an autoimmune encephalitis characterized by central hypoventilation and involuntary movements. Since infantile-onset anti-NMDAR encephalitis is very rare, we performed whole exome analysis and identified novel heterozygous mutations in IRAK4 (Y10Cfs*9, R12P). We performed functional analysis of both mutations and established a novel evaluation system to properly assess IRAK4 mutations. In this study, we also suggest the possible link between inborn errors of immunity and early onset anti-NMDAR encephalitis.

研究分野：小児神経学

キーワード：抗NMDAR脳炎 若年発症 IRAK4欠損症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗 N-methyl-D-aspartate 受容体 (NMDAR) 脳炎は、NMDAR に対する自己抗体の産生に基づき発症する自己免疫性脳炎である。小児期発症の抗 NMDAR 脳炎は、非特異的なウイルス感染症を契機とした宿主獲得免疫の賦活化を介した自己免疫機序により、抗 NMDAR 抗体が産生されると想定されているが、本症発症の詳細な分子メカニズムは不明である。(2) 我々は、獲得免疫系が未熟な乳児期における抗 NMDAR 脳炎は、何らかの宿主の免疫異常に基づき発症すると作業仮説を立て、該当症例に対してエクソーム配列解析を用いた網羅的遺伝子解析を行った結果、IL-1R 関連キナーゼ (IRAK) 4 を欠損した 1 例の同定に成功した。IRAK4 欠損症は非常に稀な疾患で、細菌感染に対する初期応答が著しく障害される。自験例は、従来、「獲得免疫の異常」に起因すると考えられていた抗 NMDAR 脳炎の発症に「自然免疫の異常」が寄与する可能性を示唆する症例ともいえる。自験例の病態解析を通じて宿主因子という側面に着目し抗 NMDAR 脳炎の病態解明につなげる可能性を考慮した。

2. 研究の目的

(1) 分子生物学的検討による IRAK4 欠損症の診断の妥当性の検証

患者は、*IRAK4* 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異 (R12P/ Y10CfsX) を有し、本症で特徴的な臍帯脱落遅延の既往、末梢血単球におけるリポ多糖体 (LPS) に対する反応性の低下を認めている。他方で、侵襲性細菌感染症の既往は認めていないため、IRAK4 欠損症の診断の妥当性を実験的に検証する。

(2) IRAK4 欠損症患者における抗 NMDAR 抗体の網羅的測定

IRAK4 欠損症患者、MyD88 欠損症患者 (MyD88 は IRAK4 の上流に存在する分子で、患者は IRAK4 欠損症に非常に酷似した症状を呈する) 由来の血清を用いて、抗 NMDAR 抗体を測定し、これら疾患群患者における抗 NMDAR 抗体の陽性頻度を検討する。

(3) 若年発症抗 NMDAR 脳炎患者の網羅的遺伝子解析

獲得免疫が未熟な 5 歳未満発症の抗 NMDAR 脳炎を対象に、エクソーム解析による網羅的な遺伝子解析を行う。IRAK4 や TLRs シグナル伝達に関与する遺伝子群、自然免疫に関与する遺伝子群を中心に解析し、自然免疫の異常が抗 NMDAR 脳炎の発症に関与する可能性を検討する。

IRAK4 欠損症は稀少疾患で、病態、自然歴など不明な部分が多い。一方で、乳児期発症の抗 NMDAR 脳炎も検索しえた限りでは 3 歳未満の発症例は非常に稀である。IRAK4 欠損症という「単一の免疫関連分子が先天的に障害された患者」における抗 NMDAR 脳炎の発症機序について検討する。

3. 研究の方法

(1) 分子生物学的検討による IRAK4 欠損症の診断の妥当性の検証

自験例で認めた *IRAK4* 遺伝子の変異 (R12P, Y10CfsX) の発現プラスミドを作製する。CRISPR/Cas9 により IRAK4 を欠損させた HEK293T 細胞を用いて、R12P, Y10CfsX 変異体の蛋白発現をウエスタンブロットで確認する。さらに、これらの変異体の NFκB 転写活性をレポーターアッセイで検討し、変異が IRAK4 の機能に与える影響を検証する。

患者末梢血単核球を用いて、IRAK4 mRNA 発現、蛋白発現を検討する (qPCR、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット)。並行して、患者由来 SV-40 不死化線維芽細胞を樹立する (患者、健常者の初代線維芽細胞は取得済み)。樹立した SV-40 線維芽細胞に対し、種々の TLR リガンド刺激 (PAM2CSK4: TLR2 リガンド, polyIC: TLR3 リガンド, LPS: TLR4 リガンドなど) を行い、反応性に産生される IL-6 を ELISA で検出する。

(2) IRAK4 欠損症患者における抗 NMDAR 抗体の網羅的測定

自然免疫異常である IRAK4 欠損症、MyD88 欠損症と、抗 NMDAR 抗体脳炎との関連性を検討する。海外研究施設 (Jean-Laurent Casanova 教授: ロックフェラー大学) と共同研究で、IRAK4 欠損症患者 5 名、MyD88 欠損症患者 1 名の血清 (髄液は採取済みの検体のみ) を入手し、これらの先天性免疫不全症患者における血清中の抗 NMDAR 抗体の測定を行う。抗 NMDAR 抗体の測定は、NMDAR を構成している NR1 と NR2 subunit を遺伝子導入させ発現させた細胞を用いた cell-based assay (CBA) で行う。

(3) 若年発症抗 NMDAR 脳炎患者の網羅的遺伝子解析

獲得免疫が未熟な 5 歳未満発症の抗 NMDAR 脳炎を対象に、エクソ - ム解析を用いた網羅的遺伝子解析を行う。特に、*IRAK4* や TLR シグナル伝達に関与する遺伝子群、自然免疫に関与する遺伝子群に着目して解析し、若年発症の抗 NMDAR 脳炎と、遺伝的な自然免疫の異常との関連性を検討する。

4. 研究成果

乳児期発症の抗 NMDAR 脳炎の対象患者にエクソーム解析を行い、IRAK4 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異を同定した。(R12P, Y10CfsX) 両親の解析も行い、父は Y10C のフレームシフト変異、母は R12P の点変異で両親ともにヘテロ接合性変異を認めた。

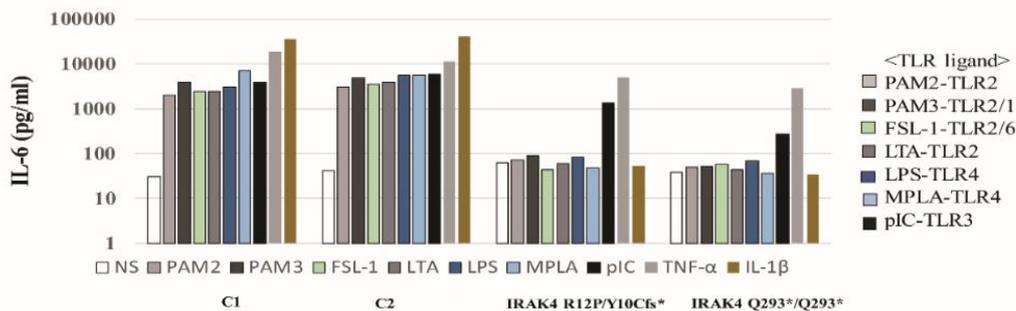
(1) まず、本患者末梢血での IRAK4 の mRNA 発現を検討し、対照群の約 2/3 程度に減少していることを証明した。

(2)患者末梢血をリンパ球分画(CD4、CD8、CD19、CD14)に分けて IRAK4 蛋白の発現を検討した。一般的に IRAK4 欠損症の患者の CD14 monocyte では LPS 刺激によって TNF- α 産生が阻害され、スクリーニングにも用いられている。そこでフローサイトメトリーを用いて、患者の細胞内 TNF- α 産生能を検討した。コントロール群では LPS 刺激によって TNF- α は産生されているが、患者では TNF- α の産生は認められなかった。IRAK4 の蛋白の発現を認めなかったことから、IRAK4 蛋白が T 細胞、B 細胞、単球のいずれにおいても欠損していることを証明した。

(3)フローサイトメトリーを用いて末梢血での IRAK4 タンパク発現を調べた。コントロールでは T 細胞、B 細胞、単球いずれも IRAK4 蛋白は発現していたが、患者ではすべての細胞で IRAK4 タンパクの発現は認められなかった。

(4)患者由来 SV-40 不死化線維芽細胞を樹立し、それを用いて、種々の TLR リガンドによる刺激を行い、反応性に産生される IL-6 を検討した。本患者では、pIC と TNF- α 刺激以外の TLR リガンドでは IL-6 の産生障害を認めた。pIC は TLR3 のリガンドであり、IRAK4 を介さない経路による刺激のため、阻害されておらず IL-6 を産生していた。また TNF- α は別の経路 (NF κ B や MAPK/JNK) を介して IL-6 が産生されるので阻害されていなかった。これらの結果から本症例の細胞では IRAK4 を経由した IL-6 の産生能が阻害されていることが証明された。

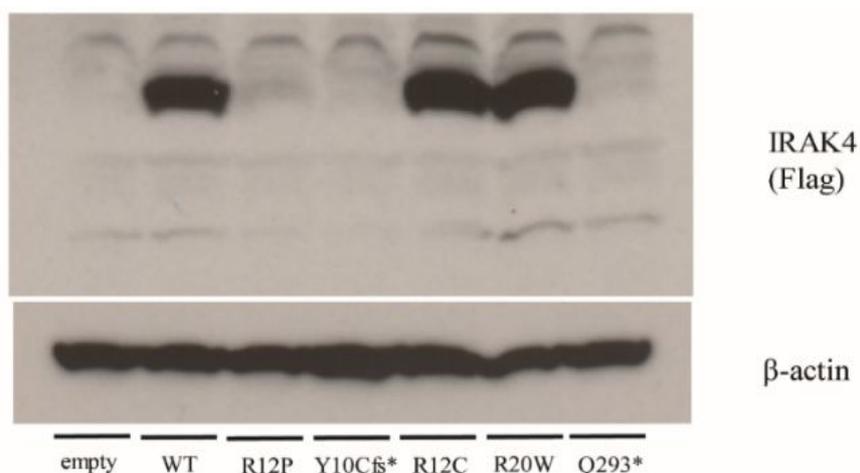
IL-6 production with the stimulation of fibroblasts with various TLR ligands



(5)CRISPR/Cas9 により IRAK4 を欠損させて HEK293T 細胞にプラスミドを導入し、変異 alleles の蛋白発現を検討した。

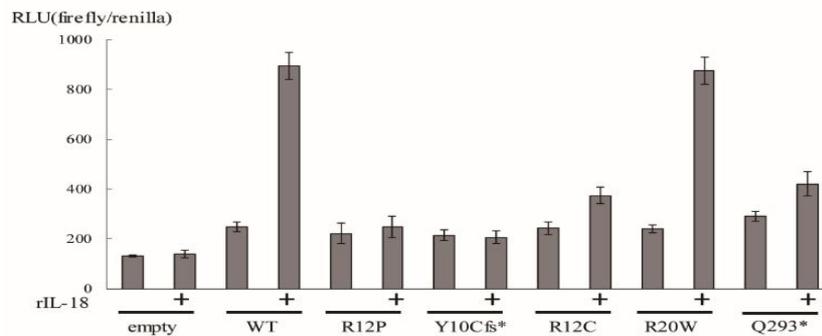
R12P, Y10Cfs が本患者の変異で、Q293X は既報の機能喪失型変異、R20W は正常活性をもつ一塩基多型であるが、本症例の変異である Y10CfsX 変異体に加えて、既報の変異である Q293X では、いずれも蛋白発現が完全に欠損しており、R12P 変異の蛋白発現も著明に低下しているという結果を認めた。

IRAK4 protein expression in HEK293T transfectants



(6) HEK293T 細胞にプラスミドを導入し、IL-18 刺激による NFκB 転写活性をレポーターアッセイで検討したところ、野生型に比べて本症例の変異は両方とも NFκB の活性が著しく阻害されることが判明した。この NF-κB レポーターアッセイシステムを行うことにより、病的意義不明な *IRAK4* 遺伝子の変異が *IRAK4* の機能に及ぼす影響を簡便かつ正確に評価する手法を確立することができた。

NF- κB reporter activity in HEK293T transfectants



(7) *IRAK4* 欠損症患者における抗 NMDAR 抗体の網羅的測定を行う目的で *IRAK4* 欠損症患者 5 名、および *MyD88* 欠損症患者 1 名の血清中抗 NMDAR 抗体の測定を cell-based assay にて行ったがいずれも陰性という結果であった。並行して若年発症(具体的には 5 歳未満発症)の抗 NMDAR 脳炎患者における *IRAK4* や TLR シグナル伝達に關与する遺伝子群を中心にエクソーム解析を用いた網羅的解析を行ったが、共通した有意な候補遺伝子の同定には至らなかった。

引用文献

Yamamoto T, et al. Functional assessment of the mutational effects of human *IRAK4* and *MyD88* genes. *Mol Immunol* 58: 66-76, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shiho Nishimura, Yoshiyuki Kobayashi, Hidenori Ohnishi, Kunihiko Moriya, Miyuki Tsumura, Sonoko Sakata, Hidetoshi Takada, Zenichiro Kato, Vanessa Sancho-Shimizu, Capucine Picard, Satoshi R. Irani, Osamu Ohara, Jean-Laurent Casanova, Anne Puel, Nobutsune Ishikawa, Satoshi Okada, Masao Kobayashi	4. 巻 41
2. 論文標題 IRAK4 Deficiency Presenting with Anti-NMDAR Encephalitis and HHV6 Reactivation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 125 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-020-00885-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nobutsune Ishikawa, Yuichi Tateishi, Hiroo Tani, Yoshiyuki Kobayashi, Satoshi Okada	4. 巻 167
2. 論文標題 Effects of perampanel add-on therapy on immunoglobulin levels in pediatric patients with epilepsy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Epilepsy Research	6. 最初と最後の頁 106447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.epilepsyres.2020.106447	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nobutsune Ishikawa, Yuichi Tateishi, Hiroo Tani, Yoshiyuki Kobayashi, Masao Kobayashi	4. 巻 94
2. 論文標題 Clinical profiles associated with serum perampanel concentrations in children with refractory epilepsy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Epilepsy & Behavior	6. 最初と最後の頁 82-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yebeh.2019.02.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林良行
2. 発表標題 IRAK4遺伝子異常が認められた抗NMDAR脳炎の乳児例
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------