

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790987

研究課題名（和文） 日本における細胞内寄生菌易感染症例の臨床的特徴および遺伝的背景

研究課題名（英文） Clinical and host genetic characteristics of patients susceptible to intracellular bacterial pathogens in Japan.

研究代表者

保科 隆之 (HOSHINA TAKAYUKI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30398078

研究成果の概要（和文）：

本研究では、抗酸菌、サルモネラなどの細胞内寄生菌に易感染性を示す Mendelian susceptibility to mycobacterial disease (MSMD) のわが国における臨床的特徴および遺伝的背景を明らかにするとともに、既知の遺伝子異常を認めない症例において、関与が疑われる遺伝子の解析を行い、MSMD のさらなる病態解明を進めることを目的とした。

MSMD 症例の集積を行い、それらの起炎菌や罹患部位などの臨床的情報の集積と既知の責任遺伝子 (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12B*, *IL12RB1*, *STAT1* および *NEMO*) の解析を行ったところ、6 症例を IFN- γ R1 異常症、1 症例を IL-12R β 1 異常症そして 1 症例を NEMO 異常症と診断した。これらの症例では、遺伝子異常を認めなかった症例と比較して、抗酸菌の反復感染を起し、また、骨髄炎症例では病変が多発しているなど、有意に重症例が多かった。さらに、近年、新たに MSMD の責任遺伝子であることが判明した顆粒球やマクロファージおよび樹状細胞の分化に関与する *IRF8* およびマクロファージによる貪食に関連している NADPH oxidase のサブユニットである gp91phox をコードしている *CYBB* の遺伝子解析も行ったが異常を認めた症例はいなかった。

また、遺伝子異常の早期スクリーニング法として、フローサイトメトリーを用いた単球および T 細胞表面の受容体発現の解析や LPS 刺激による単球からの TNF- α 産生能解析を行った。これらのスクリーニングに加えて、IFN- γ レセプターおよび IL-12 レセプターからのシグナル伝達にかかわる蛋白のリン酸化を検出することによる新たな診断法も開発した。この方法により細胞表面の分子異常だけでなく、STAT-1 のような抗酸菌排除に関与している細胞内蛋白の異常についても詳細にスクリーニングすることが可能となった。このようなスクリーニング法により既知の遺伝子異常の大部分の早期診断が可能になると考える。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the clinical characteristics and the genetic backgrounds of the patients diagnosed as having Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD) in Japan. Furthermore, we performed analysis of the other genes suspected of association with development of MSMD in the patients without well-known genes.

We performed the genetic analysis on patients diagnosed as having MSMD for the *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12B*, *IL12RB1*, *STAT1*, and *NEMO* genes. Six patients, 1 patient, and 1 patient had mutations in the *IFNGR1*, *IL12RB1* and *NEMO* genes, respectively. The proportions of the patients with recurrent mycobacterial infection or multiple osteomyelitis/arthritis were significantly higher in those with the genetic mutations. We also performed the analysis of *IRF* and *CYBB* genes newly identified as responsible gene of MSMD. However, none of patients had any mutations in these genes.

Flow cytometric analysis of the expression of IFN γ receptor 1 on CD14-positive cells and IL12 receptor β 1 on T cells and the production of TNF in response to LPS stimulation in CD14-positive cells were performed for the screening for this disease. In addition to these screening, we developed a method to detect the phosphorylation of proteins associated with IFN γ /IL-12 pathway. This method is able to detect the

abnormality of the intracellular proteins associated with the elimination of mycobacterium, such as STAT-1, as well as that of molecules on the surface of cells. It is possible that this screening can be useful to detect most of well-known genetic defects rapidly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児感染症学

1. 研究開始当初の背景

抗酸菌をはじめとする細胞内寄生菌に対する免疫応答には、主にマクロファージや樹状細胞が関与している。抗酸菌が侵入すると、これらの細胞より interleukin(IL)-12 が分泌され、T 細胞などに発現している IL-12 受容体に結合する。続いて、IL-12 受容体を介したシグナルと提示された抗原による T 細胞受容体からのシグナルにより interferon(IFN)- γ が分泌され、マクロファージ上の IFN- γ 受容体に結合する。その結果、細胞内の signal transducer and activator of transcription(STAT)-1 がリン酸化され、核内に移行し、tumor necrosis factor(TNF)- α 、IL-12 などの遺伝子が発現し、貪食細胞が活性化され、抗酸菌排除が誘導される。

この IFN- γ /IL-12 経路の免疫異常により、細胞内寄生菌に対し易感染性を示すが、現在までに、IFN- γ receptor 1 (IFN- γ R1)、IFN- γ R2、IL-12p40、IL-12 receptor β 1 (IL-12R β 1) および STAT-1 の 5 分子の遺伝子異常が報告されている。また、CD40 を介した nuclear factor(NF)- κ B 経路の活性化に関与している分子である NF- κ B-essential Modulator (NEMO) の遺伝子異常でも、細胞内寄生菌に対し易感染性を示す。さらに、近年、顆粒球やマクロファージおよび樹状細胞の分化に関与する *IRF8* およびマクロファージによる貪食に関連している NADPH oxidase のサブユニットである gp91phox をコードしている *CYBB* の遺伝子異常でも細胞内寄生菌に対し

て易感染性を示すことが判明した。

上述のような遺伝子異常を認める症例を含め、細胞内寄生菌に対して選択的に易感染性を示す症候群は、Mendelian susceptibility to mycobacterial disease (MSMD, MIM209950) と総称され、BCG 菌をはじめとする非結核性抗酸菌による難治性、再発性の感染症が臨床の特徴である。

我々は、これまでに、BCG 菌をはじめとした非結核性抗酸菌感染症例について前述した 6 遺伝子の解析を行い、上表のように 6 症例を IFN- γ R1 異常症と診断し、1 症例を NEMO 異常症と診断した。

また、これらの症例を診断する過程で、IFN- γ R1 異常症においては、単球/マクロファージ表面の IFN- γ R1 の高発現を認めること、NEMO 異常症においては、lipopolysaccharide 刺激後の単球/マクロファージからの TNF- α 産生能が低下していることをフローサイトメトリーを用いて確認しており、これらの遺伝子異常のスクリーニングが可能であると考えられた。

2. 研究の目的

MSMD のわが国における臨床の特徴および遺伝的背景についての系統的な解析は行われていない。また、これまで報告されている遺伝子異常を認める症例は、MSMD 全体の中では比較的まれであり、その他の症例の原因はいまだに解明されていない。

本研究では、わが国における MSMD の臨床

的特徴および遺伝的背景を明らかにするとともに、既知の遺伝子異常を認めない症例において、関与が疑われる遺伝子の解析を行い、MSMD のさらなる病態解明を進めることを目的とする。

また、フローサイトメトリーを用いたスクリーニングにより、遺伝子異常の有無を推測することが可能であることから、このシステムを用いた早期の遺伝子異常診断法の確立に努める。

3. 研究の方法

① MSMD 症例の集積と遺伝子解析

インフォームドコンセントの得られた MSMD 症例の血液を収集し、DNA および RNA を抽出した。RNA から cDNA を合成し、DNA および cDNA をテンプレートとして PCR 法を用いて *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12B*, *IL12RB1*, *STAT1*, *NEMO*, *IRF8*, *CYBB* 遺伝子の coding 領域全域を増幅し、それぞれの PCR 産物をダイレクトシーケンシングにて塩基配列を決定した。以上のスクリーニング結果をもとに、遺伝子変異の存在の有無を PCR フラグメント毎に検討した。

上記の解析結果から、遺伝子異常を認めた症例と認めなかった症例の 2 群に分け、2 群間の臨床的特徴の比較を行った。

② フローサイトメトリーを用いた遺伝子異常症 (IFN- γ R1、NEMO、IL-12R β 1 異常症) のスクリーニング

MSMD 症例および健常者の血液を採取し、IFN- γ R1 異常症のスクリーニングとして PE 標識 CD119 抗体 (IFN- γ R1 に結合する抗体) と PC5 標識 CD14 抗体 (単球に結合する抗体) を添加して細胞表面を染色し、フローサイトメトリーを用いて解析を行い、患者検体と健常者検体において CD14 陽性細胞中の CD119 陽性細胞の割合を比較した。

NEMO 異常症のスクリーニングとしては、血液に LPS を添加して 4 時間培養し、PC5 標識 CD14 抗体を加えて細胞表面を染色した。細胞表面染色後に permeabilize を行い、PE 標識 TNF- α 抗体を添付し、細胞内染色を行い、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。患者検体と健常者検体において CD14 陽性細胞中の TNF- α 陽性細胞の割合を比

較した。

IL-12R β 1 異常症のスクリーニングとしては、PE 標識 CD212 抗体 (IL-12R β 1 に結合する抗体) と PC5 標識 CD3 抗体 (T 細胞に結合する抗体) を添加して細胞表面を染色し、フローサイトメトリーを用いて解析を行う。患者検体と健常者検体において CD3 陽性細胞中の CD212 陽性細胞の割合を比較した。

4. 研究成果

MSMD 症例の集積を行い、それらの起炎菌や罹患部位などの臨床的情報の集積と既知の責任遺伝子 (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12B*, *IL12RB1*, *STAT1*, *NEMO*, *IRF8*, *CYBB*) の解析を行ったところ、6 症例を IFN- γ R1 異常症、1 症例を IL-12R β 1 異常症そして 1 症例を NEMO 異常症と診断した。これらの症例では、遺伝子異常を認めなかった症例と比較して、抗酸菌の反復感染を起こし、また、骨髄炎症例では病変が多発しているなど、有意に重症例が多かった。

また、遺伝子異常の早期スクリーニング法として、フローサイトメトリーを用いた単球および T 細胞表面の受容体発現の解析や LPS 刺激による単球からの TNF- α 産生能解析を行った。遺伝子異常を認めた症例では、フローサイトメトリーでも健常者とは異なるパターンを示しており、遺伝子異常の一部は、この手法により、早期診断が可能であることが考えられた。

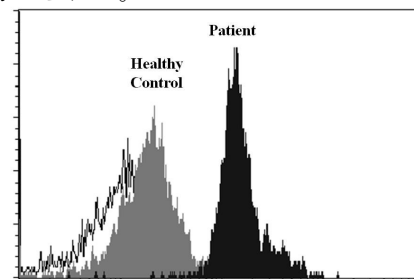


図 CD14 陽性細胞表面における IFNGR1 の発現 IFNGR1 異常症例では、リサイクリングにかかわる領域を欠いた変異レセプターが発現しており、細胞表面に過剰に発現し、ドミナントネガティブに作用する。

これらのスクリーニングに加えて、IFN- γ レセプターおよび IL-12 レセプターからのシグナル伝達にかかわる蛋白のリン酸化を検出することによる新たな診断法も開発した。この方法により細胞表面の分子異常だけでなく、STAT-1 のような抗酸菌排除に関与している細胞内蛋白の異常についても詳細にスクリーニングすることが可能となった。このようなスクリーニング法により既知の遺伝子異常の大部分の早期診断が可能になると

考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Hoshina T, Kusuhara K, Takimoto T, Saito M, Hara T:
Identification of bacterial pathogens in pediatric community-acquired lower respiratory tract infection using a simplified procedure of sputum sampling and examination: comparison between hospitalized children with and without underlying diseases.
European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 29 (5): 519-525, 2010 査読有
- ② Saito M, Kajiwara H, Iida K, Hoshina T, Kusuhara K, Hara T, Yoshida S:
Systemic cytokine response in moribund mice of streptococcal toxic shock syndrome model.
Microbial Pathogenesis 50 (2): 109-113, 2011 査読有
- ③ Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T:
Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan.
Journal of Clinical Immunology. 31 (3): 309-314, 2011 査読有
- ④ 保科隆之、高田英俊、佐々木由佳、楠原浩一、原 寿郎:
BCG 骨髄炎 27 例の検討
小児感染免疫 23 (3): 227-232, 2011 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① Hoshina T, Kusuhara K, Saito M, Hara T:
Identification of bacterial pathogens in pediatric community-acquired lower respiratory tract infection using a simplified procedure of sputum sampling and examination: comparison between hospitalized children with and without underlying diseases.

The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research. April 15-18, 2010, Taipei, Taiwan.

- ② Hoshina T, Kusuhara K, Ikeda K, Mizuno Y, Saito M, Hara T:
High mobility group box 1 (HMGB1) and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Kawasaki disease.
The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research. April 15-18, 2010, Taipei, Taiwan.
- ③ Hoshina T, Ohga S, Kusuhara K, Saito M, Hara T:
Disseminated Bacillus Calmette-Guerin lymphadenitis in a patient with gp91 phox chronic granulomatous disease 25 years after vaccination.
The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research. April 15-18, 2010, Taipei, Taiwan.
- ④ 保科隆之、三原由佳、楠原浩一、原寿郎:
Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases 46 例の検討
第 84 回日本感染症学会 2010. 4. 5-6 京都
- ⑤ 保科隆之、土居岳彦、瀧本智仁、高田英俊、大賀正一、原 寿郎、水上智之:
慢性肉芽腫症症例に対する播種性 BCG 感染症を中心とした抗酸菌感染症治療指針作成の提案
第 18 回 食細胞機能異常研究会
2010. 12. 11 東京
- ⑥ 保科隆之、高田英俊、三原由佳、楠原浩一、岡田 賢、小林正夫、原 寿郎:
Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases 46 例の検討
第 114 回日本小児科学会 2011. 8. 12-14 東京
- ⑦ 保科隆之、高田英俊、三原由佳、楠原浩一、岡田 賢、小林正夫、原 寿郎:
Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases の日本における臨床像および遺伝的背景の検討
第 64 回九州小児科学会 2011. 11. 19-20 佐賀

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保科 隆之 (HOSHINA TAKAYUKI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：30398078

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし