

200807021A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

川崎病の疾患関連遺伝子の探索と
遺伝子型に基づくテーラーメイド治療法の確立

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 羽田 明

平成21(2009)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

川崎病の疾患関連遺伝子の探索と
遺伝子型に基づくテーラーメイド治療法の確立

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 羽田 明

平成21(2009)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- 川崎病の疾患関連遺伝子の探索と遺伝子型に基づくテーラーメイド治療法の確立
に関する研究1

II. 分担研究報告

1. 川崎病疾患関連遺伝子の探索と遺伝子解析13
尾内 善広
2. 川崎病の疾患関連遺伝子の候補遺伝子による探索と相関研究における
統計学的検出力の検討17
鈴木 洋一
3. 統一プロトコールによる川崎病の治療と遺伝子解析-127
寺井 勝
4. 統一プロトコールによる川崎病の治療と遺伝子解析-229
鈴木 啓之

III. 研究成果の刊行に関する一覧表33

IV. 研究成果の刊行物・別刷35

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

川崎病の疾患関連遺伝子の探索と遺伝子型に基づくテーラーメイド治療法の確立

研究代表者 羽田 明 千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学 教授

研究要旨

本研究の目的は①*ITPKC*以外の川崎病発症関連遺伝子を同定しその関与について明らかにする、②遺伝子に関する研究成果を実際の川崎病治療に役立てるために、新規発症例を対象とした統一プロトコールによるゲノムコホート研究をおこない、ベッドサイドでの遺伝子検査による冠動脈異常発生リスクとIVIG反応性の予知を可能にする、③疾患感受性遺伝子である*ITPKC*が関与するNFAT系を抑制する薬剤であるシクロスポリンの川崎病治療における臨床的有用性を検証する、ことである。①に関して、新たにゲノムワイド関連解析(GWAS: genome-wide association study)という手法を使って全ゲノムを対象に解析を行ったところ、新たな発症関連遺伝子が複数、明らかになりつつある。これらの知見を加えると、当初の*ITPKC*遺伝子単独の場合よりもさらに予測精度が上がるのが期待できる。②のゲノムコホート研究に関して、初年度は各施設の倫理申請の承認が遅れたため、正式なスタートは遅れたが、遺伝子解析は承認後に実施することで、プロトコールの統一作業を先行させた。③のシクロスポリン投与のプロトコール作成は、各施設での意見を集約するのに時間がかかったが、共通化することができた。千葉大学の臨床治験部の協力を得て、症例登録も厳密に行うことができるようになった。予備的なシクロスポリン投与の効果は、かなり期待できるものであり、2年度の6月までの経験を基に、あらたな治療プロトコールを作成する予定である。IVIG治療法を補完あるいは代替する治療法となる可能性がある。

分担研究者

羽田 明 千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学 教授
尾内善広 理化学研究所ゲノム医科学研究センター・循環器疾患研究チーム 上級研究員
寺井 勝 東京女子医科大学八千代医療センター小児科 教授
鈴木啓之 和歌山県立医科大学小児科 准教授
鈴木洋一 千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学 准教授

A. 研究目的

我々は、これまでに人類遺伝学的手法を駆使して、川崎病の発症関連遺伝子の1つが inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C (*ITPKC*)である事を初めて明らかにし、この遺伝子の多型と川崎病の最も重要な合併症である冠動脈異常の発生との有意な相関、および合併症予防に有用な免疫グロブリンの静注療法(IVIG)効果との有意な相関を見いだした

(Onouchi et al. Nature Genet 2008).

本研究の目的は①*ITPKC*以外の新規発症関連の遺伝子を同定しその関与について明らかにする、②研究成果の川崎病治療における臨床的有用性を明らかにするため、新規発症例を対象とした統一プロトコールによるゲノムコホート研究をおこない、ベッドサイドでの遺伝子検査による冠動脈異常発生リスクと IVIG 反応性の予知を可能にする、③ \square 疾患感受性遺伝子である *ITPKC* が関与する NFAT(Nuclear factor of activated T cells)系を抑制する薬剤であるシクロスポリン(CyA)の川崎病治療における臨床的有用性を検証する、ことである。川崎病の最も重要な合併症は冠動脈瘤であるが、IVIG 不応症例における発生頻度が高い事が知られている。しかし、不応例に対する有効な治療法が確立していないため新たな治療法の開発が急務である。免疫抑制剤である CyA は、尾内、羽田らが発見した川崎病感受性遺伝子の *ITPKC* 遺伝子が関与する炎症活性化の経路を抑制することが知られていることから、川崎病の治療に CyA が有効であることが期待される。

B. 研究方法

1) 川崎病の疾患関連遺伝子の探索 (分担: 尾内, 鈴木(洋), 羽田)

本研究は、以下の手順で行なう。

1. *ITPKC* の座位である 19 番染色体以外の領域より新規感受性遺伝子の同定をすすめる。
2. 川崎病の新規発症例に対して、統一治療プロトコールに従い臨床経過を記録する。
3. 研究参加への同意が得られた症例の複数の疾患関連遺伝子の多型タイピングをおこない、横断的研究で認められた遺伝子型と治

療抵抗性、冠動脈合併症発生との関連を解析する。

川崎病のヒト試料収集は、東京女子医大八千代医療センターと和歌山県立医大附属病院を基幹病院とし、その関連病院の協力を得ておこなう (図 2)。さらに可能性のある病院にも協力の呼びかけを行なった。研究協力依頼は主治医あるいは研修済みのインフォームド・コンセント履行補助者が行う。ヒト試料は収集機関で連結可能匿名化し、以後は匿名化番号で解析をおこなう。ヒト試料は業務委託をする検査会社で集配、DNA 抽出をおこない理研横浜研究所および千葉大学で遺伝子タイピングを実施する。得られたタイピングデータ、臨床情報を千葉大学で統計解析し、遺伝子多型と合併症、治療抵抗性の関連を明らかにする。

初年度、参加研究者間でプロトコールの確認、各所属の倫理委員会への研究申請をおこない、研究計画の承認後 DNA 抽出用のヒト試料収集を開始する。その後、研究期間を通じて症例収集をおこない、解析を進める。同時に新しい遺伝子の探索をすすめる。その成果を順次、取り入れる。

2) 川崎病疾患関連遺伝子の候補遺伝子による探索と統計学的検出力の検討 (分担: 鈴木(洋))

川崎病発症の感受性遺伝子として、マトリックスメタロプロテアーゼ(*MMP*)遺伝子ファミリーに注目し、特に 11 番染色体に存在する *MMP* 遺伝子クラスターに存在する 9 つの遺伝子のうち、8 つについて、タグとなる一塩基多型(SNP)の一般集団におけるアレル頻度、SNP 間の連鎖不平衡の状態を

明らかにした。血中 MMP 濃度の測定のための採血法について検討をおこなった。本研究計画における患者サンプルを用いた際の、遺伝子多型やその他の疫学要因の川崎病発症・心合併症リスクとの相関を検出するための統計学的検出力を算定した。

3) IVIG 不応例に対するシクロスポリン投与の有用性の検討 (寺井, 鈴木(啓))

治療プロトコルは主任研究者の統括のもとに作成した (図 3)。IVIG 不応例に再度 IVIG を追加し、それでも不応である症例に対して、ITPKC が関与する NFAT 系を抑制することが知られている CyA の経口投与をおこなう。

IVIG 治療の反応性、CyA の有効性と ITPKC 遺伝子型の相関を 3 年間かけて解析する。また、CyA 治療そのものの効果、問題点、安全性等の臨床的有用性を 3 年間かけて検証する。

免疫グロブリン治療 (IVIG) は 2g/kg の単回投与とし、IVIG 不応の定義は以下の基準とする。初回 IVIG 不応を、①IVIG 治療開始後 48 時間の時点まで 37 度 5 分未満に一度も解熱しない例、②IVIG 治療開始後 48 時間を経過するまでに、一旦 37 度 5 分未満に解熱するも治療開始後 48 時間の時点で再度発熱しているもの、③IVIG 治療開始後 48 時間までに解熱していたが、治療開始後 3 日目以降に発熱してきた場合とし、追加 IVIG 不応を、①追加 IVIG 治療終了時まで 37 度 5 分未満に一度も解熱しない例、②追加 IVIG 治療投与中、一旦 37 度 5 分未満に解熱するも治療終了時点で発熱しているもの、③追加 IVIG 治療終了時に解熱していたが、その後発熱してきた場合、とする。対象は年齢 4 ヶ月以上 20 歳以下の男女で急性川崎病の診断基準を満たし、研究参加の同意の得られたものを対象とする。腎機能や肝機能に問題の

ある者、再発例などは除外する。CyA の投与量は、4mg/kg/day を経口投与 (分 2, 食前) とし、シクロスポリントラフ値と臨床症状を考慮して適宜増減とした。アスピリン 30・50mg/kg/day を併用した。

主要評価項目を治療期間中の冠動脈病変合併頻度とし、副次的評価項目として、CyA 服用後の有熱期間、発熱をはじめとする川崎病主要症状、白血球数および幼若好中球の占める割合、CRP、心エコーによる冠動脈径および形態評価、心電図、副次的評価項目として肝機能・アルブミン・血小板数を中心としたその他の血液検査 (IL-2 などの血中サイトカインを含む)、血圧、体重を測定する。

症例収集は東京女子医科大学八千代医療センター、和歌山県立医大附属病院を基幹病院とし、両施設の関連病院の協力を得てすすめる。臨床データ、検査データ、遺伝子データを千葉大学で解析し、その結果を共有し、本プロジェクト参加者間で討議する。

(倫理面への配慮)

遺伝子研究に関しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)、各参加施設の遺伝子解析に関する倫理審査委員会の承認を受けた上で研究を行なった。また、臨床研究に関しては、臨床研究に関する倫理指針 (平成 15 年 7 月 30 日、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 7 月 31 日全部改正、平成 21 年 2 施行) ならびに参加研究者が所属する研究機関で定めた倫理規定を遵守し、各倫理審査委員会の承認を受けた上で研究を開始した。

C. 研究結果

①の川崎病発症関連の新規遺伝子の同定と関与の究明に関しては、新たにゲノムワイド関連解析(GWAS: genome-wide association study)を使って全ゲノムを対象に解析を行ったところ、新たな発症関連遺伝子が複数、明らかになりつつある。現在、この遺伝子の機能解析を急いでいる。これらの知見を加えると、当初のITPKC遺伝子単独の場合よりもさらに予測精度が上がるのが期待できる。②のゲノムコホート研究に関して、初年度は各施設の倫理申請の承認が遅れたため、正式なスタートは遅れたが、遺伝子解析は承認後に実施することで、プロトコルの統一作業を先行させた。また、CyA投与のプロトコル作成は、各施設での意見を集約するのに時間がかかったが、共通化することができた。千葉大学の臨床治験部の協力を得て、症例登録も厳密に行うことができるようになった。予備的なCyA投与の効果は、かなり期待できるものであり、2年度の6月までの経験を基に、あらたな治療プロトコルを作成する予定である。IVIG治療法を補完あるいは代替する治療法となる可能性がある。

1) 川崎病の疾患関連遺伝子の探索と遺伝子解析

研究計画実施以前に和歌山県立医科大学およびその関連施設において収集された川崎病患者 194 人分の DNA の提供を受け、現在解析中である川崎病感受性候補遺伝子内の一塩基多型 (SNP) との相関の確認を行った。その結果、川崎病罹患感受性との相関の再現性が確認された (川崎病 920 人, 対照 1409 人; $P=0.000000060$)。白人集団での川崎病感受性との相関 (川崎病親子 261 組; $P=0.0062$) や SNP の機能的意義についても明らかにし現在論文作成

中である。また東京女子医科大学八千代医療センター及び、和歌山県立医科大学から今回設定した統一プロトコルにより治療を受けた川崎病患者計 19 名分の DNA の提供を受けた。ITPKC 遺伝子の SNP と IVIG の有効性との相関に関しては次年度以降、検体数が解析に足る数に達してから検討を行う予定である。

2) 川崎病疾患関連遺伝子の候補遺伝子による探索と統計学的検出力の検討

遺伝子多型と疾患発症リスクの相関研究における統計学的検出力の検討では、遺伝子が疾患と相関するかどうかは、一塩基多型 (SNP) のアレル頻度について独立性の検定を行うことで判断することとした。1 つの SNP が疾患との相関を示すと考える最低条件はカイ 2 乗検定で有意確率 0.05 を切ったものとし、最終的に遺伝子が疾患と相関するかどうかの判断は、調べた SNP の数とそれらの連鎖不平衡の状態を考え、多重比較を考慮して結論を出すこととした。患者、対照の症例数はそれぞれ 300 例、350 例であり、アレル数としては、それぞれ 600 アレル、700 アレルとなる。このサンプル数では、対照集団の頻度から 4 から 8 ポイントのアレル頻度差、オッズ比 (OR) では、1.37 以上または 0.73 以下の場合に検出力が 80% 以上となることが分かった。

2) IVIG 不応例に対する CyA 投与の有用性の検討

CyA 投与のプロトコル作成は、各施設での意見を集約するのに時間がかかったが、共通化することができた。千葉大学の臨床治験部の協力を得て、症例登録も厳密に行うことができるようになった。予備的な CyA 投与の効果は、かなり期待できるものであり、2年度の6月までの経験を基に、あらたな治

療プロトコールを作成する予定である。IVIG 治療法を代替あるいは補完する治療法となる可能性がある。

和歌山県立医科大学小児科では、2008年5月～2009年3月に新規川崎病として入院した患者のうち、IVIG+アスピリン療法の初期投与を行った14例中、初回IVIGに反応せず、解熱が得られなかった3例(21.4%)に追加IVIG(2g/kg)を施行した。追加IVIG投与にも解熱しなかった1例と関連施設から初回IVIG・追加IVIG不応で当科に紹介された5例の計6例に対して、プロトコールに準じて、CyA 4mg/kgを経口(分2,食前)で2-3週間投与した。その結果、6例中5例ではすみやかな解熱効果が得られ、検査所見も改善した。一方、1例では解熱効果が得られずCyAを増量し、解熱した。また別の1例はCyAを開始した8病日に右側冠動脈に5-6mmの瘤を認め、CyA投与後に速やかに解熱したが、瘤は10-11mm大の巨大瘤に進展した。残りの18例(94.7%)には冠動脈病変は認めなかった。CyAによる重篤な有害事象は認められなかった。臨床症状のない高K血症を一過性に認めた。

東京女子医科大学八千代医療センターでは、2008年1月～09年3月の新規川崎病入院患者のうちIVIG+アスピリン療法の初期投与をおこなった73例中、初回IVIGに反応せず解熱が得られなかった16例(21.9%)に追加IVIG(2g/kg)を施行した。このうち、9例は追加IVIGに反応し、解熱が得られた。一方、追加IVIG投与にも解熱しなかった7例の患者のうち、月齢4ヵ月以上の6

例の患者に対してCyA4mg/kgを経口で3週間投与した。その結果、6例中4例ではすみやかな解熱効果が得られたが、2例では解熱効果が得られずCyAを増量した。このうち1例(1.3%)は、CyA用量を8mg/kgに上げても解熱せず、冠動脈に中等度の動脈瘤(4-5mm)が出現した。残りの72例(98.7%)には冠動脈病変は認めなかった。CyAによる重篤な有害事象は認められなかった。

D 考察:

遺伝子研究については、現在解析中である川崎病感受性候補遺伝子内の一塩基多型(SNP)の川崎病感受性との相関やSNPの機能的意義についても明らかにしていく。ITPKC遺伝子のSNPとIVIGの有効性との相関に関しては次年度以降、検体数が解析に足る数に達してから検討を行う予定である。

初回・追加IVIGに不応な症例にCyAは劇的に効果があることが示された。ただし、CyAに反応が充分でない症例も少なからず存在し、そのITPKC遺伝子型を分担研究者の尾内が解析している。また、CyAは冠動脈障害が生じた後に投与してもその進展を阻止できないことが示唆され、初回IVIG不応の時点など、CyAのより早期投与を考慮する必要がある可能性がある。

参加患者数は2基幹病院で年間100例、関連病院を含めて年間200-250例を予想している。そのうち追加治療が40例程度、シクロスポリン投与は15-20例程度と考えられる。シクロスポリンの有効性に関しては統計的な解析ができるほどの収集は本研究では難しいと考えている。しかし、個々の症例の経験から有効性が示唆された場合、あらためて新規研究を計画する。症例収集

は3年間の研究期間中、続けるが、2年半以内に収集できた症例で解析し、結果を得る予定である。

E 結論：

川崎病の疾患関連遺伝子の探索研究については、9施設での倫理委員会の承認を得て実施中である。

ゲノムワイド関連解析 (GWAS: genome-wide association study) で全ゲノムを対象に解析を行ったところ、新たな発症関連遺伝子が複数、明らかになりつつある。新たに見出した遺伝子 X については論文作成中である。GWAS については今後も症例を追加し、関連の再現性をより確かなものとしていくと同時に $Ca^{2+}/NFAT$ 経路に関与する他の候補遺伝子についてより詳細な SNP 解析を実施していく予定である。IVIG 抵抗性と ITPKC 遺伝子の SNP との相関については統一プロトコールにて治療を受けた症例の蓄積を待ち次年度以降検討していく予定である。

IVIG 不応例に対する CyA 投与の臨床試験については、共通プロトコールを作成した (図3)。今後も症例を積み重ねて解析し、他の施設へ研究参加を呼びかける。また、関連施設の協力を得て、多施設共同研究として行う場合の診療上の問題点などを明らかにしていく必要がある。また、IVIG 不応症例のサイトカインプロファイルを解析する予定である。

F 健康危険情報： 今のところ該せず

G 研究発表：

1. 論文発表

1. Hata A, Onouchi Y. Susceptibility genes for Kawasaki disease: toward im-

plementation of personalized medicine. *J Hum Genet.* 2009;54(2):67-73.

2. Onouchi Y, Gunji T, Burns JC, Shimizu C, Newburger JW, Yashiro M, Nakamura Y, Yanagawa H, Wakui K, Fukushima Y, Kishi F, Hamamoto K, Terai M, Sato Y, Ouchi K, Saji T, Nariai A, Kaburagi Y, Yoshikawa T, Suzuki K, Tanaka T, Nagai T, Cho H, Fujino A, Sekine A, Nakamichi R, Tsunoda T, Kawasaki T, Nakamura Y, Hata A, ITPKC functional polymorphism associated with Kawasaki disease susceptibility and formation of coronary artery aneurysms
3. Abe J, Ebata R, Jibiki T, Yasukawa K, Saito H, Terai M. Elevated granulocyte colony-stimulating factor levels predict treatment failure in patients with Kawasaki disease. *J Allergy Clin Immunol.* 122(5):1008-1013. 2008
4. 鈴木啓之、洪田昌一、武内 崇、末永智浩、南 孝臣、吉川徳茂：IVIG不応に対してシクロスポリンを使用した9例の検討 第28回日本川崎病研究会抄録集38, 2008
5. 尾内 善広、羽田 明、川崎病と遺伝子、日本臨床 66巻2号、272-277, 2008
6. 寺井勝、サイトカインと小児疾患「川崎病」、小児科診療71巻12号、191-2196, 2008
7. 浜田 洋通、寺井 勝、新たな治療法の展望、日本臨床 66(2) 360-364 2008
8. 羽田 明、尾内 善広、川崎病の臨床遺伝学、(臨床遺伝学のトピックス) 小児科診療 72(1), 83-86, 2009
9. 羽田明、尾内善広、川崎病の遺伝的背景と個別化医療の可能性、医学のあゆみ、22 5 919-924、2008
10. 羽田 明、尾内 善広、川崎病とITPKC 遺伝子、Annual Review 循環器、81-92, 2009
11. 羽田 明、尾内 善広、川崎病の遺伝的背景と個別化医療の可能性 (第5土曜特集臨床ゲノム研究--成果と課題)-- (ゲノム薬理学と個別化医療)、医学のあゆみ 22 5(9), 919-924, 2008
12. Yamazaki K, Takahashi A, Takazoe M, Kubo M, Onouchi Y, Fujino A, K amatani N, Nakamura Y, Hata A. Positive association of genetic variants in the upstream region of NKX2-3 with Crohn's disease in Japanese patients. *Gut.* 58(2):228-32. 2009;
13. Bilguvar K, Yasuno K, Niemelä M, Ruigrok YM, von Und Zu Fraunberg M, van Duijn CM, van den Berg LH,

- Mane S, Mason CE, Choi M, Gaál E, Bayri Y, Kolb L, Arlier Z, Ravuri S, Ronkainen A, Tajima A, Laakso A, Hata A, Kasuya H, Koivisto T, Rinne J, Ohman J, Breteler MM, Wijmenga C, State MW, Rinkel GJ, Hernesniemi J, Jääskeläinen JE, Palotie A, Inoue I, Lifton RP, Günel M. Susceptibility loci for intracranial aneurysm in European and Japanese populations. *Nat Genet.* 40, 1472-1477, 2008
14. Mashimo, Y., Suzuki, Y., Hatori, K., Tabara, Y., Miki, T., Tokunaga, K., Katsuya, T., Ogiwara, T., Yamada, M., Takahashi, N., Makita, Y., Nakayama, T., Soma, M., Hirawa, N., Umemura, S., Ohkubo, T., Imai, Y. & Hata, A. Association of TNFRSF4 gene polymorphisms with essential hypertension. *J Hypertens* (2008) 26: 902-913.
 15. Inoue, H., Mashimo, Y., Funamizu, M., Shimojo, N., Hasegawa, K., Hirota, T., Doi, S., Kameda, M., Miyatake, A., Kohno, Y., Okamoto, Y., Tamari, M., Hata, A. & Suzuki, Y. Association on study of the C3 gene with adult and childhood asthma. *J Hum Genet* (2008) 53: 728-38.
 16. Inoue, H., Kayano, S., Aoki, Y., Kure, S., Yamada, A., Hata, A., Matsubara, Y. & Suzuki, Y. Association of the GABRB3 gene with nonsyndromic oral clefts. *Cleft Palate Craniofac J* (2008) 45: 261-6.
2. 学会発表
 1. 鈴木啓之、渡田昌一、武内 崇、末永智浩、南 孝臣、吉川徳茂：IVIG不応に対してシクロスポリンを使用した9例の検討 第28回日本川崎病研究会 2008年10月、札幌
 2. 浜田洋通、本田隆文、大村 葉、土屋 希、前田泰宏、森山陽子、市川るり、廣瀬陽介、吉田雅樹、白戸由理、佐々木香織、武藤順子、林 北見、寺井 勝：川崎病γグロブリン不応例に対するシクロスポリン治療 第182回日本小児科学会千葉地方会 2009年2月
 3. Satoshi Hattori, Yoichi Mashimo, Makiko Funamizu, Naoki Shimojo, Yoshitaka Okamoto, Yoichi Kohono, Akira Hata, Yoichi Suzuki, CD14 -550C/T polymorphism modifies the effect of daycare attendance on total and specific IgE levels in children アメリカ人類遺伝学会, 2008年10月12—15日, フィラデルフィア
 4. Onouchi Y. Identification of a susceptibility gene for Kawasaki disease. 4th Congress of Asian Society for Pediatric Research & Pediatric Academic Societies annual meeting. 2008.5.3. Hawaii (招待講演)
 5. Onouchi Y. Identification of a susceptibility gene for Kawasaki disease. 国際川崎病シンポジウム2008.4.10 台北(招待講演)
 6. Onouchi Y, Gunji T, Burns JC, Shimizu C, Newburger JW, Kawasaki T, Nakamura Y, Hata A. A functional polymorphism in ITPKC is associated with Kawasaki disease and formation of coronary artery aneurysms. 8th East Asia Unit of Human Genetics annual meeting. (ポスター発表) 2008.7.19 札幌
 7. 尾内 善広「ゲノムワイドアプローチによる川崎病感受性遺伝子の同定」大阪小児免疫研究会(特別講演) 2008. 6.21 大阪
 8. 尾内 善広「ゲノムワイドアプローチによる川崎病感受性遺伝子の同定」第22回関東川崎病研究会(特別講演) 2008.6.21 東京
 9. 尾内 善広「ゲノムワイドアプローチによる川崎病感受性遺伝子の同定」和歌山川崎病研究会(特別講演) 2008.12.6 和歌山
 10. 尾内 善広「ゲノムワイドアプローチによる川崎病感受性遺伝子の同定」Asahikawa Winter Conference of Molecular Medicine(特別講演) 2009.2.7 旭川
 11. 尾内 善広「ゲノムワイドアプローチによる川崎病感受性遺伝子の同定」獨協大学臨床小児研究会(特別講演) 2009.2.23 越谷
 12. 尾内 善広「ゲノムワイドアプローチによる川崎病感受性遺伝子の同定」近畿川崎病研究会(特別講演) 2009.3.7 大阪
 13. 尾内 善広、羽田 明「川崎病の罹患感受性および重症化リスクに関与するイノシトール3リン酸キナーゼC遺伝子内SNPの同定」第15回日本遺伝子診療学会大会(一般口頭発表) 2008.7.1 仙台
 14. 尾内 善広「川崎病の罹患感受性遺伝子ITPKCの同定」日本人類遺伝学会第53回大会(奨励賞受賞講演) 2008.9.28 横浜
- H 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)： 該当せず

図 1. ベンチワークからベッドサイドへ

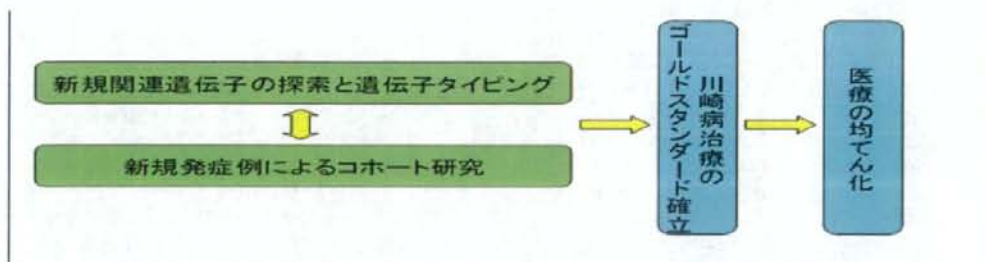
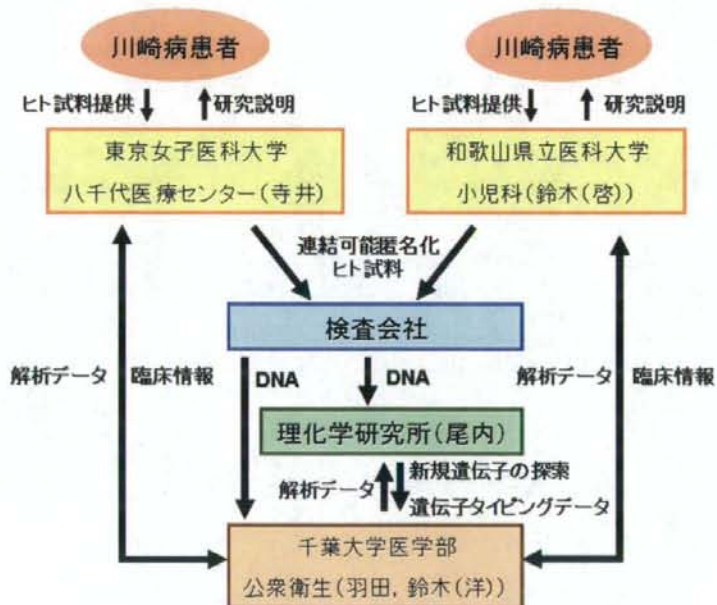
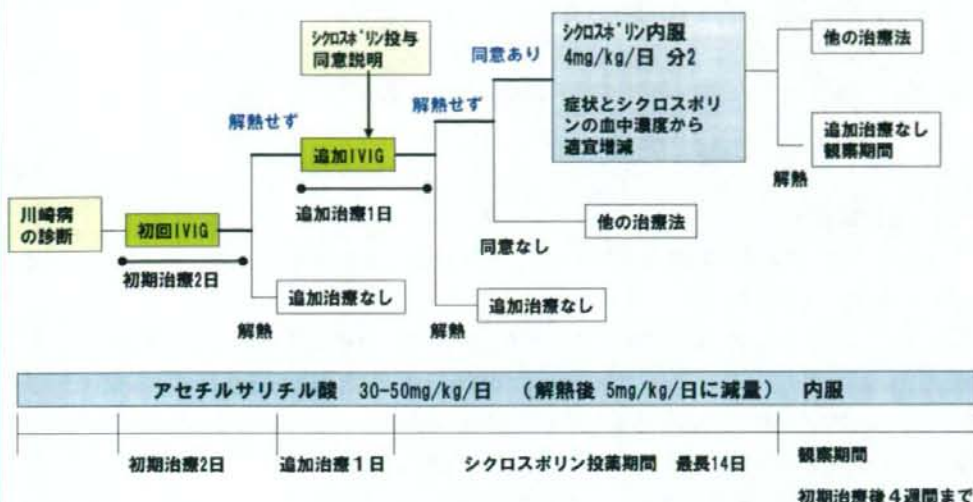


図 2. ゲノムコホート研究



- (1) 研究参加に同意の得られた症例の検査および DNA 抽出用の採血をおこなう。
- (2) 検査会社と業務委託契約を結び、連結可能匿名化ができる注文票を作成（ヒト試料収集施設で連続した番号を予め印刷した注文票を使用）した。
- (3) 患者登録状況は千葉大事務局で管理する。
- (4) 抽出した DNA は下記のフローチャートに従って、千葉大学を經由して理研横浜研究所に送付し、遺伝子タイピングをおこなう（尾内）。
- (5) 臨床データ、検査データ、遺伝子データを千葉大学(羽田, 鈴木(洋))で解析し、その結果を共有し、本プロジェクト参加者間で討議する。

図 3. 治療プロトコール (共同研究プロトコール)



免疫グロブリン大量療法開始後 48 時間経過しても解熱(腋下体温が 37.5℃未満)が得られないときには、免疫グロブリン追加療法を行ない、治療開始後 24 時間で解熱が得られない場合には、シクロスポリンの服用を開始する。

1. IVIG (免疫グロブリン大量療法) :

初回 IVIG 治療は、IVIG 2g/kg で点滴静注を行なう。点滴の流速は、投与開始 30 分は 0.01mL/kg/min で投与し、副作用などの異常所見が認めらなければ、以後 0.03mL/kg/min (10kg で 18mL/時間) とする。この間、アスピリン 30-50mg/kg/day 分 3 を併用し、48 時間の解熱確認後は 5mg/kg/day 分 1 とする。追加 IVIG 投与の適応を治療開始後 48 時間で判定する。

追加 IVIG 治療は、初期治療と同様の流速で IVIG 2g/kg で点滴静注し、アスピリン 30-50mg/kg/day 分 3 を併用する。追加 IVIG に応かどうかを治療開始後 24 時間で判定する。

2. シクロスポリン投与

初回 IVIG 治療開始後 48 時間経過しても解熱(腋下体温が 37.5℃未満)が得られないときには、追加 IVIG 治療を行ない、治療開始後 24 時間で解熱が得られない場合には、シクロスポリンの服用を開始する。

(1)投与量・期間 :

- 初期投与量は 4mg/kg/day (朝、夕 2 回、食前に経口投与) で開始し、目標トランプ値を設定し、血中シクロスポリン濃度と臨床症状により適宜増減する。
- アスピリンはシクロスポリン投与と重ならないように食後投与とし、30-50mg/kg/day 分 3 を併用する。48 時間の解熱を確認した後は 5mg/kg/day 分 1 とする。

図 3. 治療プロトコール (共同研究プロトコール)

- シクロスポリンは重篤な有害事象が出現しない限り、最大 2 週間の経口投与とする。解熱が得られ、血液検査で CRP が正常化した場合、短縮することが出来るものとする。投与を開始してから 2 週間を過ぎても効果が認められない場合には、投与を中止し、川崎病ガイドラインに記載されている他の治療を考慮する。

(2) 評価項目

① 主要評価項目：試験期間中における冠動脈病変合併頻度 (冠動脈病変の発生頻度)

② 副次的評価項目：

シクロスポリン服用後の有熱期間、発熱をはじめとする川崎病主要症状、白血球数および幼若好中球の占める割合、CRP 値 (CRP 陰性化までの日数)、川崎病に関連する肝機能・アルブミン・血小板数を中心としたその他の血液検査 (サイトカイン値 (soluble IL-2R, MMP))

③ 安全性評価項目：有害反応発現頻度 (検査値の異常を含む)、肝機能、腎機能、血圧、体重

(3) 観察項目 (表 1) を参照

(4) 症例収集

東京女子医科大学八千代医療センター (寺井)、和歌山県立医大附属病院 (鈴木啓) を基幹病院とし、両施設の関連病院の協力を得てすすめる。初年度、千葉大学臨床治験部の協力により、登録システムの構築をすすめた。症例収集は 3 年間の研究期間中、続けるが、2 年半以内に収集できた症例で解析し、結果を得る。参加施設 3~4 施設、目標症例数：50 例

(5) 統計解析

本試験は比較対照試験ではないので、統計解析は行わない。各評価項目の成績に関して、過去の文献値 (ヒストリカルデータ) との比較を行なう。

表1. 観察および検査項目

項目	初期治療		シクロスポリン投与				後観察期間
	IVIg治療前	初回 IVIG治療開始後48時間	CyA投与前追加 IVIG治療開始後24時間	投与2-3日	投与6-7日後	投与14日後または退院時	初期治療開始後4週間
有害事象 ^a	●	●	●	●	●	●	●
胸部レントゲン	●			●		●	
心電図	●		●	●		●	
心エコー検査	●		●		(●)	●	●
血液学的検査 ^b	●	●	●	●	●	●	●
血液生化学・血清検査 ^c	●	●	●	●	●	●	●
BNP	●	●	●		(●)	(●)	
IgG	●	●	●				
血沈 ^d	●						
尿検査 ^d	●			●		●	
血清保存 ^e	●	●	●		●	●	
シクロスポリン血中濃度(投与前の濃度)				●	●	●	
シクロスポリン血中濃度C2モニタリング				(●)	(●)	(●)	

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

川崎病の新規感受性遺伝子の探索と遺伝子解析

研究分担者 尾内 善広 理化学研究所ゲノム医科学研究センター・循環器疾患研究チーム

研究要旨

本分担研究は川崎病の新規感受性遺伝子の同定および ITPKC 遺伝子多型と IVIG 抵抗性との関連についての解析を目的としている。本年度は理化学研究所において相関を見だし現在解析中である新規候補遺伝子内の一塩基多型 (SNP) につき本研究計画実施以前に和歌山県立医科大学およびその関連施設において収集された川崎病患者 DNA を含む別集団での相関の再現性の確認を行った。また同時進行中であるゲノムワイド関連解析 (GWAS)にも同検体を用い、新規川崎病感受性遺伝子の探索を行った。

川崎病 638 人、対照 1031 人の関連解析で有意な相関が認められている遺伝子 X 上の SNP ($P=0.0000079$) は追加解析した川崎病 282 人、対照 378 人においても相関を示し ($P=0.0021$)、メタ解析の結果その有意性は極めて大きなものと確認された ($P=0.000000060$)。機能解析の結果、SNP の周辺配列に転写因子 NFATc2 が結合するエンハンサー機能があること、SNP の塩基置換によりその結合親和性が変化することが解明された。一方川崎病 440 人、対照 933 人、55 万カ所でのゲノムワイド関連解析により川崎病と強く相関する上位 150 SNP に注目し、その相関の再現性を川崎病 470 人、対照 376 人にて確認した。ITPKC、遺伝子 X を含む計 5 つの遺伝子領域に強い相関の再現性が確認され、今後遺伝子及び SNP の機能解析を行う予定である。GWAS にて ITPKC、遺伝子 X が上位に含まれていたという結果は $Ca^{2+}/NFAT$ 経路の川崎病の病態への関与の大きさを示唆するものであり、シクロスポリンの川崎病治療薬としての可能性を裏打ちする知見である。

IVIG 抵抗性を統一した基準により判定するための治療プロトコルを研究代表者を中心として決定した。今年度は同プロトコルに準じ治療を受けた川崎病事例 19 例よりゲノム DNA 検体を収集した。症例の蓄積を待ち、次年度以降に解析を行う予定である。

A 研究目的

川崎病は未だ明らかとされていない感染因子と宿主側の遺伝的要因が原因となって起こると考えられる。尾内は川崎病の罹患感受性に ITPKC 遺伝子内の一塩基多型 (SNP) が人種の壁を越えて関連することを

ゲノムワイド連鎖解析及び連鎖不平衡マッピングによって解明した。この SNP は川崎病に罹患した際の冠動脈合併症 (CAL) や免疫グロブリン (IVIG) 治療に対する抵抗性とも関連する傾向があり、テーラーメイド医療への応用が期待される。しかしなが

ら CAL 形成や IVIG 抵抗性には治療内容やその開始時期等の要素が大きく影響するため、その関連は明確なものとは言えない。本分担研究の目的は、川崎病の遺伝的背景解明のためにさらなる感受性遺伝子探索を行うこと、川崎病患者の IVIG 応答性を統一プロトコールで治療することにより評価し、ITPKC 遺伝子多型との相関を確認することである。

B 研究方法

II 新規川崎病感受性遺伝子の検索

(i) 候補遺伝子アプローチにて注目した遺伝子 X のエクソン 1 にある SNP の遺伝子型をインパーダー法により決定。川崎病群と対照群における頻度の違いを χ^2 乗検定にて統計学的に評価した。既に解析済みの川崎病 683 人、対照 1031 人のデータと、今回提供を受けた 194 人を含む川崎病 282 人、対照 378 人のデータを Mantel-Haenszel 法を用いたメタ解析で、また白人集団における川崎病との相関を 261 組の白人川崎病患者とその両親の検体を伝達不平衡試験にて調べた。SNP の機能をルシフェラーゼアッセイ及びゲルシフトアッセイにて検討した。

(ii) 川崎病 440 人、対照 933 人について、55 万カ所の SNP 遺伝子型を DNA チップにて決定、ゲノムワイド関連解析(GWAS)を行った。有意な相関を示した SNP を相関の強いものから順に今回提供を受けた 194 人を含む川崎病 470 人、対照 376 人にて再現性の確認を行った。

II] ITPKC 遺伝子の SNP と IVIG 抵抗性との関連検体の収集を行った。

C 研究結果

II-(i) 遺伝子 X のエクソン 1 にある SNP は追加解析した検体群でも相関を示し、その結果川崎病罹患感受性との有意な相関が確認された。メタ解析の結果この SNP と川崎病の相関は極めて強いことが判った。

(川崎病 920 人、対照 1409 人；
P=0.000000060)。コーカソイド集団での川崎病感受性との相関(川崎病親子 261 組；
P=0.0062)も確認出来、人種を越えた川崎病のリスクファクターであることも判った(表 1)。ルシフェラーゼアッセイにてこの SNP の位置にエンハンサー活性があり、感受性アレルにてその活性が低下すること、ゲルシフトアッセイにて転写因子 NFATc2 の同部位への結合が低下することが確認された。

(ii) ゲノムワイド関連解析において有意な相関を示した SNP 上位 150 カ所について相関の再現性の確認を行い、有意な相関の再現性が認められる 5 つの遺伝子領域を見いだした。そのうち 1 つは ITPKC の領域と、別の 1 つは遺伝子 X の領域と一致した。

II] 東京女子医科大学八千代医療センター及び、和歌山県立医科大学から今回設定した統一プロトコールにより治療を受けた川崎病患者計 19 名分の DNA の提供を受けた。

D 考察

ITPKC は Ca^{2+} /NFAT 経路を抑制する機能を持つことがこれまでの検討から明らかとなっているが、遺伝子 X の発現に NFATc2 が関与し、NFATc2 による転写調節が SNP の影響による変化することが川崎病の罹患感受性と関連するという今回の発見は川崎病の病態に Ca^{2+} /NFAT 経路の活性化が深く関与していること及び

Ca²⁺/NFAT 経路の阻害剤であるシクロスポリンが川崎病治療薬として有効である可能性を示唆するものと思われる。GWAS にて ITPKC、遺伝子 X 領域の SNP が上位に見いだされたことによりこれまでの解析手法が妥当であり Ca²⁺/NFAT 経路に関与する遺伝子内の多型が川崎病の罹患感受性形成の主軸である仮説の正しさを示していると思われる。

E 結論

遺伝子 X については論文作成中である。GWAS については今後も症例を追加し、相関の再現性をより確かなものとしていくと同時に Ca²⁺/NFAT 経路に関与する他の候補遺伝子についてより詳細な SNP 解析を実施していく予定である。IVIG 抵抗性と ITPKC 遺伝子の SNP との相関については統一プロトコールにて治療を受けた症例の蓄積を待ち次年度以降検討していく予定である。

F 健康危険情報： 該当せず

G 研究発表：

1. 論文発表

- 1) Hata A, Onouchi Y. Susceptibility genes for Kawasaki disease: toward implementation of personalized medicine. *J Hum Genet.* 2009;54(2):67-73.
- 2) 尾内善広「川崎病の遺伝的素因」小児内科 41 (1)、2009 14-20

2. 学会発表

- 1) Onouchi Y. Identification of a

susceptibility gene for Kawasaki disease. 4th Congress of Asian Society for Pediatric Research & Pediatric Academic Societies annual meeting. 2008.5.3. Hawaii (招待講演)

- 2) Onouchi Y. Identification of a susceptibility gene for Kawasaki disease. 国際川崎病シンポジウム 2008.4.10 台北 (招待講演)

- 3) Onouchi Y, Gunji T, Burns JC, Shimizu C, Newburger JW, Kawasaki T, Nakamura Y, Hata A. A functional polymorphism in ITPKC is associated with Kawasaki disease and formation of coronary artery aneurysms. 8th East Asia Unit of Human Genetics annual meeting. (ポスター発表) 2008.7.19 札幌

- 4) 尾内 善広「ゲノムワイドアプローチによる川崎病感受性遺伝子の同定」大阪小児免疫研究会 (特別講演) 2008.6.21 大阪

- 5) 尾内 善広「ゲノムワイドアプローチによる川崎病感受性遺伝子の同定」第 22 回関東川崎病研究会 (特別講演) 2008.6.21 東京

- 6) 尾内 善広「ゲノムワイドアプローチによる川崎病感受性遺伝子の同定」和歌山川崎病研究会 (特別講演) 2008.12.6 和歌山

- 7) 尾内 善広「ゲノムワイドアプローチによる川崎病感受性遺伝子の同定」Asahikawa Winter Conference of Molecular Medicine (特別講演) 2009.2.7 旭川

- 8) 尾内 善広「ゲノムワイドアプローチによる川崎病感受性遺伝子の同定」獨協大学臨床小児研究会 (特別講演) 2009.2.23 越谷

- 9) 尾内 善広「ゲノムワイドアプローチによる川崎病感受性遺伝子の同定」近畿川崎病研究会 (特別講演) 2009.3.7 大阪

- 10) 尾内 善広、羽田 明「川崎病の罹患感受性および重症化リスクに関与するイノシトール3リン酸キナーゼC遺伝子内SNPの同定」第15回日本遺伝子診療学会大会（一般口頭発表）2008.7.1 仙台
- 11) 尾内 善広「川崎病の罹患感受性遺伝子ITPKCの同定」日本人類遺伝学会第53回大会（奨励賞受賞講演）2008.9.28 横浜

H 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）： 該当せず

表1

	日本人						米白人		P
	コホート1*		コホート2**		メタ解析***		伝達:非伝達	オッズ比 (95% CI)	
	MAF	P	MAF	P	OR (95% CI)	P			
川崎病	0.46	7.9E-06	0.44	0.0021	1.39(1.23-1.57)	6.0E-08	121:82	1.48 (1.11 -1.95)	0.0062
対照	0.38		0.35						

*川崎病 638 vs 対照1031

**川崎病 282 vs 対照 378

***Mantel-Haenszel法により解析

研究分担者 鈴木洋一 千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学 准教授

研究要旨

川崎病の発症の感受性遺伝子として、マトリックスメタロプロテアーゼ MMP 遺伝子ファミリーに注目し、特に 11 番染色体に存在する MMP 遺伝子クラスターに存在する 9 つの遺伝子のうち、8 つについて、タグとなる一塩基多型(SNP)の一般集団におけるアレル頻度、SNP 間の連鎖不平衡の状態を明らかにした。血中 MMP 濃度の測定のための採血法について検討した。本研究計画における患者サンプルを用いた際の、遺伝子多型やその他の疫学要因の川崎病発症・心合併症リスクとの相関を検出するための統計学的検出力を算定した。

A. 研究目的

本分担者の研究目的は、(1)川崎病発症、冠動脈瘤発症のリスク因子としてのマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)遺伝子群を中心とした候補遺伝子の解析、(2)血中の MMP の濃度が、川崎病患者の重症度、冠動脈瘤の発生の予知因子となるかどうかの検討、(3)川崎病や合併症の発症リスクに関係する遺伝子多型、疫学要因の症例対照研究における統計学的検出力の算定である。

B 研究方法

MMP 遺伝子群の一塩基多型(SNP)の遺伝子型の決定には、HapMap の情報を元にタグ SNP を設定し、SNaPshot Multiplex Kit を利用して、複数の SNP を一度に同定する方法を用いた。一部の MMP 遺伝子に関しては、独自に、プロモーター部とエクソンの周りを中心にダイレクトシーケンシングを行い、新たな SNP の同定も行う。SNP のアレル頻度は千葉市の小学生の 411 名の調査から得られた DNA サンプルを用いて検討した。

血中 MMP の測定条件の検討の為には、ボラン

ティアから通常の血清の採取に加え、ヘパリン、EDTA、クエン酸等の抗凝固剤を用いて採取した血漿について、採決後の時間経過とともにどのように MMP 値が変化するか検討した。MMP の測定には、R&D 社の ELISA Kit を用いた。

遺伝子多型における統計学的検出力については、本研究が目指している 300 例の患者、すでに遺伝子型の情報のある対照として 350 名の集団を想定して検討した。冠動脈瘤の発生の頻度については過去に発表された疫学調査データと研究班の和歌山県立医大と東京女子医大八千代医療センターの小児科における症例を参考とした。

統計学的検出力の計算には SPSS 社の SamplePower 2 を、統計解析には同社の SPSS 15.0J を用いた。

C 研究結果

1. 川崎病発症における MMP 遺伝子群の遺伝子多型の影響

本年度は、11 番染色体 11q21-22.3 に存在する MMP クラスターの 9 つの MMP 遺伝子のうち

MMP20 遺伝子を除く 8 つの遺伝子に存在する SNP について、HapMap データベースから SNP を選び、それについて、一般集団サンプルのタイピングをおこなった。まず 48 名以下のサンプルで連鎖不平衡を検討し、タグとなる SNP を選んだ。8 遺伝子、70 の Tag SNP の 70 の連鎖不平衡マップを図 1 に示す。アミノ酸置換をとまなう SNP は、MMP7 に R77H、MMP27 に T24M、D447N、MMP8 に K87、T32I、MMP12 に I35V が見出された。また、70 の SNP については、小児コントロール 340 名の遺伝型の決定が終了した(表 1)。

MMP クラスター以外に存在する MMP 遺伝子では、12 番染色体に存在する MMP17 と MMP19、20 番染色体に存在する MMP24、16 番染色体の MMP25 について、連鎖不平衡マップの作成と、タグ SNP の選択、一般集団サンプルにおけるアレル頻度の検討が終了している。

MMP13 遺伝子については、ヒト各臓器の mRNA の相対発現量を Promega 社の cDNA パネルで検討したところ、骨髄と肺の 2 つの臓器での発現が他の臓器に比べて多いことが分かった。プロモーター部の SNP の遺伝子発現に及ぼす影響について Normal Human Bronchial cells (NHBC) 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ、すでに報告がある 77GA の他に新たに発現に影響を与える多型を見出した。

2. 血中 MMP 値測定条件の検討

血清、血漿中の MMP の蛋白レベルの測定値は、採血後の保存状態と、抗凝固剤の種類によって大きく変化するという報告があったため、これらの要因を検討した。結果を図 2 に示す。

血清採血の場合、MMP8 と MMP9 の値が保存時間とともに上昇することがわかった。また、MMP2 の値は EDTA 採血の値が他の方法に比べ数倍の値となった。クエン酸を加えて得られた血漿は、

調べた全ての MMP の値について、保存状態による影響が少ない傾向がみられ、複数の MMP を測定する場合は、この採血法が最も優れていると考えられた。

3. 遺伝子多型と疾患発症リスクの相関研究における統計学的検出力の検討

遺伝子が疾患と相関するかどうかは、一塩基多型 (SNP) のアレル頻度について独立性の検定を行うことで判断することとした。1 つの SNP が疾患との相関を示すと考える最低条件は χ^2 乗検定で有意確率 0.05 を切ったものとし、最終的に遺伝子が疾患と相関するかどうかの判断は、調べた SNP の数とそれらの連鎖不平衡の状態を考え、多重比較を考慮して結論を出すこととした。最低条件を満たす状態で、遺伝子多型と疾患の相関の検出力の算定の結果を表 2 に示す。患者、対照の症例数はそれぞれ 300 例、350 例であり、アレル数としては、それぞれ 600 アレル、700 アレルとなる。このサンプル数では、対照集団の頻度から 4 から 8 ポイントのアレル頻度差、オッズ比 (OR) では、1.37 以上または 0.73 以下の場合に検出力が 80% 以上となることが分かった。

4. 免疫グロブリン静注療法 (IVIg) 不応、急性期心障害発症リスクの相関研究に関する必要症例数の検討

第 19 回川崎病全国調査によると、川崎病では男性患者の約 15%、女性患者の 10% が急性期心障害を示し、男性患者の約 5%、女性患者の 3% 後遺症を残すという。

今回の我々の研究計画では、期間中に約 300 例の川崎病をエントリーすることになっている。遺伝子多型やその他の要因からこれらの発生と有意の相関を示すことのできる、症例対照間での頻度差、OR を推定することとした。