

- 14) Assmus B, et al: Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res* 100: 1234-1241, 2007.
- 15) Losordo DW, et al: Randomized, double blind, placebo controlled pilot trial of intramyocardial autologous CD34 Cell Therapy for Intractable Angina. *Circulation* 114(Suppl II): 714, 2006.
- 16) Tateno S, et al: Alleviation of myocardial ischemia after Kawasaki disease by heparin and exercise therapy. *Circulation* 103: 2591-2597, 2001.
- 17) Fujita M, et al: Improvement of treadmill capacity and collateral circulation as a result of exercise with heparin pretreatment in patients with effort angina. *Circulation* 77: 1022-1029, 1988.

川崎病の遺伝的背景と個別化医療の可能性

Susceptible genes for Kawasaki disease and its application for personalized medicine



羽田 明(写真) 尾内善広

Akira HATA¹ and Yoshihiro ONOUCHI²千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学¹, 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²

◎川崎富作博士が川崎病を新しい疾患として発表したのが1967年であるので、すでに40年が経過している。この間、2年ごとの全国的な疫学的調査により多くの知見が集積されてきた。基本的には自然治癒する疾患であるが、冠動脈瘤という重大な合併症がある。急性期治療としてアスピリン内服とγグロブリン療法が効果的であり、冠動脈瘤の発生も抑制するが、治療抵抗例もみられる。また、40年間にわたる精力的な研究にもかかわらず、原因となる病原体はいぜん不明のままである。一方、疫学的調査により、遺伝要因の大きいことが明らかになってきた。最近、著者らは人類遺伝学的手法により、川崎病への易罹患性に関与している感受性遺伝子のひとつを明らかにした。原因となる遺伝子多型が冠動脈瘤の発生および治療抵抗性に関与している可能性が示唆された。この知見を遺伝子型に基づいた初期治療の選択という個別化医療に応用できる可能性が開けた。



Key word: 川崎病, 感受性遺伝子, 冠動脈瘤, 治療抵抗性

川崎富作博士が1967年に自験例を中心にまとめ、『アレルギー』誌に発表して以来、川崎病の発見からすでに40年が経過している。発見から3年後の1970年には厚生省研究班が結成され、それ以後、2年ごとに全国調査が継続して行われており、2007年に行われた調査は第19回にあたる。この疫学調査により多くの知見が明らかにされてきた¹⁾。しかし、感染が重要な契機になっていることは強く示唆されるにもかかわらず、いまだに病原体が明らかでないなど、多くの未解決の問題が残っている。

本稿では川崎病に関してこれまでわかってきたことを概説した後、著者らが取り組んだ川崎病の感受性遺伝子を明らかにした経緯、得られた知見の臨床への応用の可能性を述べたい(「サイドメモ」参照)。

川崎病

川崎病はおもに乳幼児が罹患する疾患で、全身の中小血管に炎症が起こる。診断基準(厚生労働省川崎病研究班、2002年2月改訂5版)に従って、

つぎの6つの主要症状のうち5つ以上の症状を

 サイド
メモ

川崎病のなぞ

川崎病は、川崎富作博士が臨床医として働いていた日赤中央病院(現・日赤医療センター)で発見した。1例目は1961年、臨床小児科医として10年目に、一度も経験したことがない症例として遭遇した。翌年、当直現場で同じ症状の患者に出会い、新しい疾患だと確信したとのことである(日本臨牀、66:225-228, 2008)。原著を発表した1967年の3年後より厚生省研究班が組織され、現在まで疫学がかわってきているため、患者発生数の推移が確実に把握できている。患者数は3回の大流行があったものの、右肩あがりが増えてきている。これらの事実から、比較的最近発生してきた疾患であることがわかる。なぜ増加してきているのかまったくわからない。遺伝要因は変化しないので、環境要因であることは間違いない。同様のことはアレルギー疾患、Crohn病などでもいえる。感染症の関与が強く疑われるにもかかわらず、病原体がいまだに同定できていないのも不思議である。

伴うものを本症と診断する。①5日以上続く発熱、②両側眼球結膜の充血、③口唇の紅潮、莓舌、口腔咽頭粘膜のびまん性発赤、④不定形発疹、⑤四肢末端の変化(急性期の手足の硬性浮腫と回復期の指先からの膜様落屑)、⑥急性期における非化膿性頸部リンパ節腫脹。

わが国における患者数は1970年代より増加し、1979年、1982年、1986年の3回にわたって全国規模で大流行した。その後は毎年6,000人程度の発生数であったが、1990年半ばより徐々に増加し、2005年以降、年間10,000人を超えている。患者の性比は1.3~1.4程度と男児が多い。月別の患者数は毎年10月に少なく、1月にピークがあり、夏場はやや多めの傾向にある。患者の年齢分布は新生児期に低く、9~11カ月をピークとして急激に増加した後、年齢とともに低下する。1歳以下が26%、5歳以下では約90%を占める。流行の移動・年齢分布から感染症の関与が強く疑われる。

川崎病自体は自然に治癒することが多いが、臨床的に問題となるのは冠動脈病変合併である。川崎病はわが国だけではなく、頻度の低いアメリカ合衆国においても小児の後天性心疾患の最大原因である。発症後7~8日目に中膜の平滑筋層が侵され、発症12日目ごろには炎症が動脈全周に波及し、冠動脈の拡張、動脈瘤が形成される。炎症は1カ月ごろまで継続した後、徐々に治まる²⁾。その後、冠動脈瘤は縮小・退縮するが、狭窄を起こすこともある。心エコーで観察した研究によると、一過性のものも含めると20~30%に冠動脈の拡大性変化がみられるというが、現在の治療法導入後、減少している。急性期の致死率もかつて2%を超えていたが、第19回調査では0.01%となっている。また、川崎病経験者は中年期以降、虚血性心疾患などの冠動脈疾患のリスクが増える懸念もあり、疫学調査が進められている。

川崎病の急性期治療としてアセチルサリチル酸(アスピリン)投与とγグロブリン療法(以下、IVIG)はもっとも標準的な治療法である。現時点で、アスピリンは30~50 mg/kg/dayの内服からはじめて解熱後に5 mg/kg/dayに減量、IVIGは2 g/kgの単回投与がもっとも広く行われている治療法であると思われる。調査によると、IVIGは全国

平均で全症例の約85%に用いられている。治療開始時期は第7~8病日以前が望ましく、第10病日までに解熱すれば冠血管の合併症発生が低いとされている。治療にIVIGが導入されたことで、以前は15~20%の患者に心合併症の残存がみられたが、近年では急性期の心障害が約10%強、心後遺症が5%弱と大幅に軽減し、致命率も激減した。

感染症が強く疑われ、これまで精力的に研究されたにもかかわらず、原因となる病原体は不明のままである。一方、疫学調査により発症に遺伝要因(宿主要因)がかなり強く関与していることを示唆するデータも得られている。まとめると、①同胞例が約1%存在すること、②親子例が約0.4%存在すること、③患者の3~4%が再発例であること、④アジア、とくに日本人で頻度が高いという人種差が顕著なことがあげられる。

①に関して、川崎病の同胞は一般の同年齢の子どもの罹患率に比べて、約10倍も高率に発症することがわかっている。これを同胞再発危険率とよび、 $\lambda_s=10$ と記載するが、これは遺伝要因の関与を示す指標である。統合失調症では12、インスリン依存性糖尿病で10、そううつ病で7などの値であることを考えれば、川崎病の遺伝要因の関与はかなり高いといつてよいであろう。②の親子例の検討で、患児の親の小児期罹患が期待値よりも高いことがわかってきた。同胞および親は遺伝学的には第1度近親であり、遺伝子の半分を共有している。川崎病の感受性遺伝子があると仮定すると、第1度近親の発症率が一般頻度より高いことを説明できる。③の再発例が多いことも、保持する感受性遺伝子によると考えてよいであろう。

④の人種差であるが、これまでに60カ国以上から川崎病の報告がある。日本における罹患率は欧米の10~20倍に達すると推定されている。もっとも罹患率が高いのはわが国であるが、ついで中国、韓国、台湾、香港となる。アメリカでは欧米諸国のなかでもっとも早くから川崎病の研究がはじまり、各地のデータが蓄積されている。興味深いのは、人種別罹患率である。Holmanら³⁾は、ハワイ州における入院患者データベースの解析から人種別罹患率を計算しているが、日系人が198ともっとも高く、ついでハワイ系99、中国系81が続ぎ、

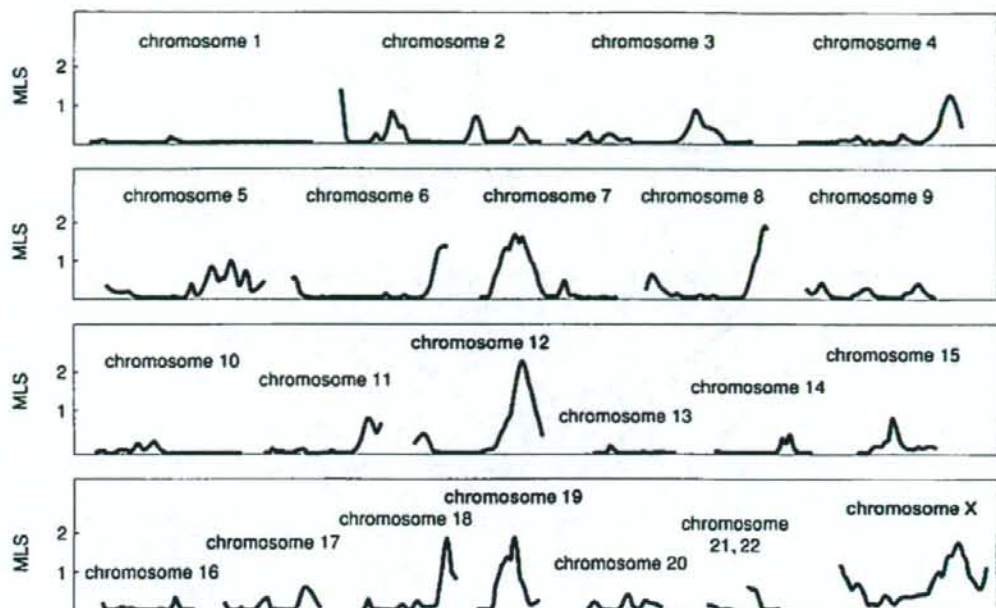


図1 罹患同胞対法による解析結果

罹患同胞対 79 ペアの検体を使って解析した。全染色体領域の結果を示す。比較的高いピークが得られた 7 番、12 番、19 番、X の各染色体の 4 座位周辺を候補遺伝子領域として解析を進めた。

白人は 35 となっている。環境がほぼ同じと仮定すれば、この違いは遺伝要因の関与と考えられるのである。病原体探索の研究が行き詰まっている現状では、川崎病の感受性遺伝子が明らかになることで、診断・治療・予防に大きく貢献することが期待できる。

現時点での川崎病臨床の最大の解決すべき課題は、IVIG 治療抵抗群の治療法開発である。IVIG 治療抵抗群の存在は導入当初から知られており、約 15~20%にみられるとされている。しかも冠動脈合併症はこの抵抗群に多発することがわかっている。解熱を効果の指標として、IVIG の無効であった場合の対応が試みられているが、その評価は確立していない。治療法として、①追加 IVIG、②コハク酸メチルプレドニゾンによるパルス療法、③蛋白合成酵素阻害薬であるウリナスタチン投与、④血漿交換療法、⑤免疫抑制剤などが試行されている。

川崎病の感受性遺伝子同定の戦略

さきに述べたように、川崎病の発症には遺伝要

因がかなり強く影響していると考えられる。複数の遺伝子が川崎病を発症しやすい体質を規定し、何らかの感染症(かならずしもひとつの病原体が原因であるとは限らない)が引き金となり、発症するという仮説がもっとも可能性がありそうである。病態は発熱・発疹を主徴とした血管をターゲットとする炎症性疾患であるので、何らかの免疫に関与した遺伝子が関与していることは間違いないであろう。これまで多くの研究者がこの観点から、候補となる遺伝子を対象として遺伝子解析を行い、関与の有無を研究してきたが、再現性のある結果は得られていないのが現状である。

そこで著者らは、以下のような戦略で川崎病の感受性遺伝子の同定を試みた。この方法では従来の候補遺伝子アプローチではみつけだすことが困難な、機能のわかっていなかった新しい遺伝子がみつかる可能性がある。

- ① ゲノム全体を対象とするアプローチにより、川崎病発症に関与する染色体領域を同定する。
- ② 連鎖の可能性のある領域から、有意性の高

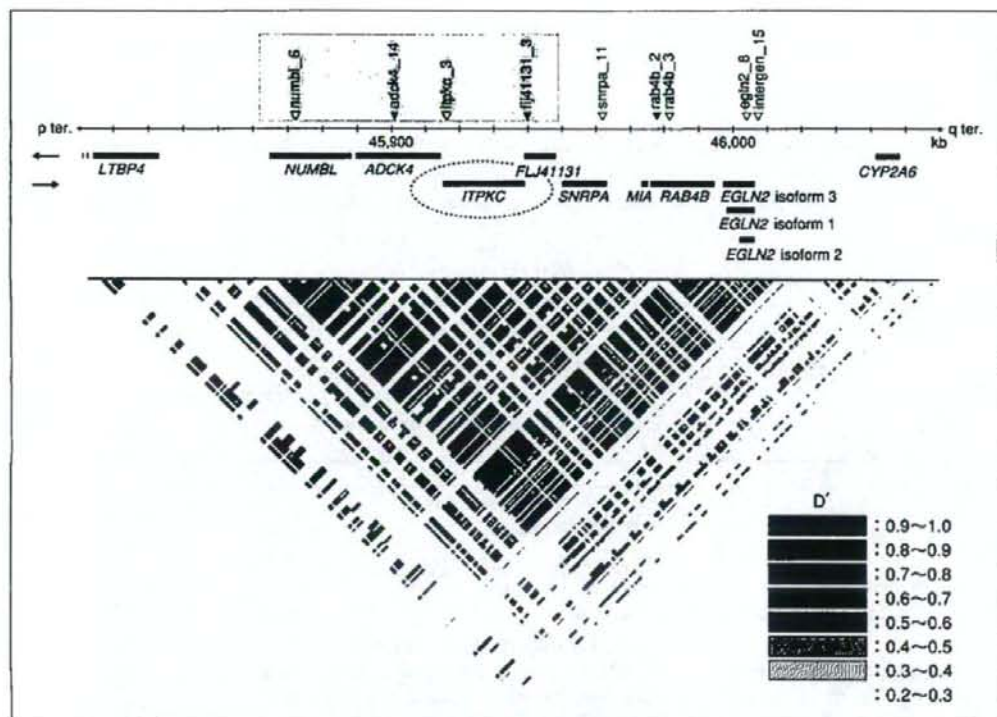


図2 19番染色体の候補遺伝子領域

上段：解析した SNP の位置を示す。黒い矢尻で示した 3SNP は最初に関連が証明された。白い矢尻で示した 6SNP は、最初の 3つと連鎖が強い SNP を探した結果見つかったもの。合計 9SNP が責任 SNP 候補となった。アメリカの検体を解析した結果、左側の 4SNP に絞られた(グレーの網で囲まれた部分)。

中段：この領域に存在する遺伝子を記載した。この領域の遺伝子のうち、*ITPKC* が感受性遺伝子であり、左から 3 番目の SNP が責任 SNP であった。

下段：連鎖不平衡マップであり、この領域内の遺伝子に対象が絞られる根拠となる。

いと思われる部位を複数選ぶ。

- ③ 連鎖不平衡ブロック(LD ブロック)内の SNPs 探索と関連解析を行う。
- ④ その結果から感受性遺伝子候補を決め、その遺伝子の機能に関与する責任 SNP を同定する。

まず、①のゲノム全体を対象とし、関与する遺伝子を見つけ出す方法は、本特集の“ゲノムワイド解析の技術と手法”の章に詳細に述べられているので、そちらを参照してほしい。現時点では、同胞が双方とも疾患に罹患したペアを全国から集め連鎖解析をする方法(罹患同胞対法)と、ゲノム全体の SNPs を使って関連解析を行い、疾患発症に関与する部位を検出する方法がある。著者らが研究をはじめたのが 10 年前で、その時期は後者の方法は事実上、存在しなかったため、前者の戦略

を採用した。その結果、想定どおり複数の染色体領域にピークを検出することができた(図1)⁴⁾。このうち、染色体 7, 12, 19, X の 4 領域を対象に以後の解析を進めた。X 染色体領域に関しては、川崎病の急性期に CD4⁺T 細胞上における CD40L の発現が亢進しているとの Wang らの報告⁵⁾があり、CD40L 遺伝子が著者らの検出した連鎖領域のピーク近傍に局在することから、この遺伝子が関与していると考え、解析をした。その結果、イントロン 4 にある SNP の関与を示すことができた⁶⁾。

7, 12, 19 の 3 染色体領域は同時に解析を進め、そのうち、これまでに 19 番染色体領域に存在する遺伝子を見つけることができた⁷⁾。詳細な探索経過は論文を参照してほしいが、その概略を説明する。連鎖領域内の SNPs を網羅的に解析し、関連解析で有意な SNPs を同定する。この時点で強い関連

表 1 階層化した関連解析結果

冠動脈合併症の有無							
Japanese (case-control association analysis)							
samples	genotype			χ^2	<i>p</i>	OR	95%CI
	GG	GC	CC				
KD with CALs	61	44	2	12.4	0.0044	2.05	1.37~3.08
KD without CALs	172	94	12	13.4	0.0025	1.68	1.27~2.21
control	756	249	29				
U. S. (TDT)							
	<i>n</i>	T/U	χ^2	<i>p</i>	OR	95%CI	
KD with CALs	108	37 : 11	14.1	0.00018	3.36	1.72~6.59	
KD without CALs	100	27 : 18	1.8	0.18	1.50	0.63~2.72	
IVIG 治療抵抗性の有無							
U. S. (TDT)							
	<i>n</i>	T/U	χ^2	<i>p</i>	OR	95%CI	
IVIG resistant	37	14 : 3	7.1	0.0076	4.67	1.34~16.24	
IVIG responder	138	39 : 22	4.7	0.030	1.77	1.05~2.99	

責任 SNP が冠動脈合併と治療抵抗性に関連していることを示している。上段が冠動脈合併症の有無で階層化した結果、下段が IVIG 治療抵抗性の有無で階層化した結果である。上段は日本人とアメリカ人の結果、冠動脈疾患の有無により、オッズ比(OR)が日本人では 1.68 から 2.05 へ、アメリカ人では 1.50 から 3.36 へ高くなることがわかった。下段の IVIG 治療抵抗性の有無では、治療が効果的であった群はオッズ比が 1.77 であるのに対し、抵抗群では 4.67 と高くなる。

を示す SNPs を 3 つ見出した。連鎖不平衡ブロック内を詳細に解析し、最初の 3SNPs と強く連鎖する SNPs をみつけ出す。この時点で 9 個の SNP に絞られた。アメリカの共同研究者より供与を受けた川崎病の検体で同様の解析をしたところ、9 個から 4 個の SNPs に絞ることができた。この領域に存在する遺伝子 5 個のうち、免疫反応に関与していると思われる遺伝子に絞って解析したところ、inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase C (ITPKC) が感受性遺伝子であることがわかった(図 2)。

ITPKC 遺伝子の機能と発症への関与

ITPKC はイノシトール三リン酸(IP3)を基質とするリン酸化酵素であり、IP4 を生成する。IP3 は小胞体および細胞外からカルシウムを動員し、細胞内カルシウム濃度を高める。ITPKC は IP3 を IP4 にすることで IP3 濃度を下げ、以後のシグナル伝達を抑えらると思われ。抗原提示を受けた T 細胞では細胞内カルシウム上昇が引き金となり、カルモデュリンなどを介して nuclear factor of activated T cells(NFAT)系の脱リン酸化を促し、活性

化した NFAT が核内に移行して IL-2 などのサイトカイン遺伝子の転写を促進する。著者らは、この一連の反応が川崎病発症において全身性の炎症につながるメカニズムではないかと考えている。ITPKC には A, B, C のイソ酵素が存在するが、白血球内で刺激に優位に反応しているのは ITPKC である。

著者らは、機能に関与している SNP はイントロン 1 に存在し、リスクの高くなる遺伝子型ではスプライシングに影響することで遺伝子の発現が低下することを明らかにした。すなわち、ある種の抗原提示が行われると、原因 SNP により ITPKC の機能が抑えられた個体では IL-2 などのサイトカイン産生が促進され、T 細胞活性化が起こると考えている。実際、川崎病では他の発熱性感染症に比べて IL-2 が高値であることが知られており、この仮説を支持していると思われる。

責任 SNP と冠動脈病変および IVIG 治療抵抗性

つぎに、責任 SNP が冠動脈合併症の有無およ

び IVIG 治療抵抗性に関与しているのではないかと考え、解析症例を階層化し、関連解析を行った(表1)。その結果、冠動脈合併症の起こった川崎病の症例を疾患群とした関連解析で、リスクを高める遺伝子型では、日米の双方の検体で、冠動脈疾患のなかった症例を疾患群とした場合に比べオッズ比が高くなることがわかった。また、IVIG 治療抵抗性群では、IVIG 治療が効果的だった症例を疾患群とした場合に比べてオッズ比が高くなることを見出した。これらの解析結果は、原因 SNP は冠動脈合併症および IVIG 治療への抵抗性に関与している可能性を示唆している。

そこで現在、著者らは川崎病の新規発症例を対象に、治療プロトコルを統一するコホート研究を準備している。このコホートで上記所見を支持する結果が得られれば、川崎病の初期治療における個別化医療が実現する可能性が高くなる。

川崎病の個別化医療の可能性

著者らが計画しているコホート研究により責任 SNP が冠動脈合併症と治療抵抗性に関与していることが証明された場合、以下のような臨床応用の可能性が考えられる。

- ① 川崎病の疑いで入院。
 - ② 病棟のベッドサイドで遺伝子タイピング。
 - ③ タイピング結果により治療方針を決定。
 - ④ IVIG 抵抗性群には IVIG 早期追加投与または他の治療法選択。
 - ⑤ 合併症発症確率の低減と合併症軽減。
- ITPKC が発症感受性に関与している機序が正

しいとすれば、さらに新しい治療薬が開発される可能性が出てくる。たとえば、代謝経路の各段階での阻害剤が川崎病の特効薬になる可能性も考えられる。また、他の候補領域の遺伝子の同定も進めているので、さらに正確な予後予測と治療選択につながる可能性が期待できる。臨床的に問題となっている IVIG 治療抵抗例への対応法開発につなげるべく、さらに研究を進めたい。

おわりに

これまで原因のわからなかった川崎病を対象に、ゲノム全体を対象とした人類遺伝学的手法で、易罹患性という遺伝要因を構成する感受性遺伝子を見つけ出すことに成功した。臨床的に重要な合併症である冠動脈疾患の発生と、一部にみられる IVIG 治療抵抗性に関連していることがわかり、個別化医療につながる可能性があることがわかった。ゲノム医学研究が多様性のある人類の医療に貢献することが証明されつつあり、今後の展開が期待できる。

文献

- 1) 中村好一：日本臨牀，66：229-234，2008。
- 2) 高橋 啓：小児科診療，69：1017-1020，2006。
- 3) Holman, R. C. et al. : *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 24 : 429-433, 2005.
- 4) Onouchi, Y. et al. : *J. Hum. Genet.*, 52 : 179-190, 2007.
- 5) Wang, C. L. et al. : *J. Pediatr.*, 146 : 662-667, 2005.
- 6) Onouchi, Y. et al. : *Eur. J. Hum. Genet.*, 12 : 1062-1068, 2004.
- 7) Onouchi, Y. et al. : *Nat. Genet.*, 40 : 35-42, 2008.

Annual Review 循環器 2009

2009年1月30日発行

中外医学社

5. 川崎病と *ITPKC* 遺伝子

千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学教授 羽田 明

理化学研究所横浜研究所ゲノム医科学研究センター上級研究員 尾内善広

key words Kawasaki disease, *ITPKC*, NFAT, T cell activation, splicing

動 向

1967年、川崎富作博士が自験例を中心にまとめ、アレルギー誌に発表して以来、川崎病の発見からすでに40年以上が経過している。発見から3年後の1970年からいまで2年ごとに全国調査が継続的に実施され、疫学面では多くの知見が集積されている。しかしながら、感染症が発症の重要な契機になっていることは強く示唆されるものの、精力的な研究にもかかわらず、いまだにその病原体は不明である。治療面においては、アスピリンとガンマグロブリン大量療法によって、最も重大な合併症である冠動脈瘤が大幅に軽減し、致死率が激減するという進歩があったが、現在、約15%にみられるガンマグロブリン治療抵抗群の対応は、大きな課題として残っている。これに対して、川崎病は疫学的知見から遺伝要因の関与がかなり強い、多因子疾患であることが明らかとなってきたため、その疾患感受性に関与している遺伝要因を明らかにすれば、川崎病研究のブレークスルーになるのではと期待されてきた。しかし、免疫や炎症関連の候補遺伝子による解析が盛んに行われ、多くの報告があるが、いずれも再現性が確認されず、決め手に欠く状況であった。我々は、ゲノム全体を対象とし、人類遺伝学的手法により、感受性遺伝子の染色体上の部位を明らか

にすることから始め、その中から最近、19番染色体領域にある*ITPKC*遺伝子が疾患感受性遺伝子のひとつであることを明らかにした。本稿では川崎病について簡単に概説し、現状の課題をまとめた後、解析手法、*ITPKC*が川崎病の疾患感受性に関与する機序、明らかになったSNPの臨床応用の可能性について、国内外の知見にもふれながら概説する。

A. 川崎病について

川崎病は主に乳幼児が罹患する疾患で、全身の中小血管に炎症が起こる。診断基準（厚生労働省川崎病研究班2002年2月改訂5版）にしたがって、次の6つの主要症状のうち5つ以上の症状を伴うものを本症と診断する。①5日以上続く発熱、②両側眼球結膜の充血、③口唇の紅潮、莓舌、口腔咽頭粘膜のびまん性発赤、④不定形発疹、⑤四肢末端の変化。急性期の手足の硬性浮腫と回復期の指先からの膜様落屑、⑥急性期における非化膿性頸部リンパ節腫脹。

わが国における患者数は1970年代より増加し、1979年、1982年、1986年の3回にわたって全国規模で大流行した。その後は毎年6,000人程度の発生数であったが、1990年半ばより徐々に

増加し、2005年以降、年間1万人を超えている。患者の性比は1.3~1.4程度と男児が多い。月別の患者数は毎年10月に少なく1月にピークがあり、夏場はやや多めの傾向にある。患者の年齢分布は新生児期に低く、急激に増加して9~11カ月にピークがあるが、その後、年齢とともに低下する。1歳以下が26%、5歳以下で約90%を占める。流行の移動、年齢分布から感染症の関与が強く疑われる¹⁾。

川崎病自体は自然に治癒することが多いが、臨床的に問題となるのは冠動脈病変合併である。川崎病は、わが国だけではなく頻度の低いアメリカ合衆国においても、小児の後天性心疾患の最大原因である。発症後7~8日目に、中膜の平滑筋層が侵され、発症12日目ごろには、炎症が動脈全周に波及し、冠動脈の拡張、動脈瘤が形成される。炎症は1カ月ごろまで継続したのち徐々に治まる²⁾。その後、冠動脈瘤は縮小・退縮するが狭窄を起こすこともある。また、川崎病経験者は、中年期以降、虚血性心疾患などの冠動脈疾患のリスクが増える懸念もあり、疫学調査が進められている。

川崎病の急性期治療として、アセチルサリチル酸(アスピリン)投与とガンマグロブリン療法(以下IVIg)は最も標準的な治療法である。調査によるとIVIgは全国平均で全症例の約85%に用いられている。治療にIVIgが導入されたことで、以前は15~20%の患者に心合併症の残存がみられたが、近年では急性期の心障害が約10%強、心後遺症が5%弱と大幅に軽減し、致命率も激減した。

疫学調査により、川崎病は発症に遺伝要因がかなり強く関与している多因子疾患であることが明らかとなった。根拠として、①同胞例が約1%存在すること、②親子例が約0.4%存在すること、③患者の3~4%が再発例であること、④アジア、特に日本人で頻度が高いという人種差が顕著なこ

と、あげられる。①に関して、川崎病の同胞は一般の同年齢のこどもの罹患率に比べて、約10倍も高率に発症することがわかっている。これを同胞再発リスクとよび、 $\lambda_s=10$ と記載するが、遺伝要因の関与を示す指標である。統合失調症では12、インスリン依存性糖尿病で10、そううつ病で7などの値であることを考えれば、川崎病の遺伝要因の関与はかなり高いといつてよいだろう。②の親子例が期待値よりも高いこと、③の再発例が多いことも、保持する感受性遺伝子の共有で説明できる。④の人種差であるが、日本における罹患率は欧米の10~20倍に達すると推定されている。最も罹患率が高いのはわが国であるが、ついで中国、韓国、台湾、香港となる。米国では、欧米諸国の中で最も早くから川崎病の研究が始まり、各地のデータが蓄積されている。興味深いのは、人種別罹患率である。Holmanら³⁾はハワイ州における入院患者データベースの解析から、人種別罹患率を計算しているが、日系人が198と最も高く、ついでハワイ系99、中国系81が続き、白人は35となっている。環境がほぼ同じと仮定すれば、この違いは遺伝要因の関与と考えられるのである。

現時点での川崎病臨床の最大の解決すべき課題は、IVIg治療抵抗群の治療法開発である。IVIg治療抵抗群の存在は導入当初から知られており、約15~20%にみられるとされている。しかも、冠動脈合併症はこの抵抗群に多発することがわかっている。これに対して、IVIgにより初期治療を行った750例の解析により、IVIg無効例の予測因子を抽出し、7変数によるリスクスコアの作成が行われた⁴⁾。このリスクスコアを用いて、IVIg治療抵抗群を早期に予測することで、他の治療法の有効性を検討することができると思われる。治療抵抗群への治療法として、ステロイド^{5,6)}や抗TNF- α 抗体(infliximab)⁷⁾などが試みられている。

B. 川崎病の感受性遺伝子同定

先に述べたように、川崎病の発症には遺伝要因がかなり強く影響していると考えられる。複数の遺伝子が川崎病を発症しやすい体質を規定し、何らかの感染症が引き金となり、発症するという仮説が最も可能性がありそうである。病態は発熱、発疹を主徴とした血管をターゲットとする炎症性疾患であるので、免疫や炎症に関与する遺伝子が関与していることは間違いないだろう。これまでも多くの研究者が、この観点から候補となる遺伝子を対象として、遺伝子解析を行い、関与の有無を研究してきたが、再現性のある結果は得られていないのが現状である。そこで、我々は以下のような戦略で、川崎病の感受性遺伝子の同定を試みた。この方法では、従来の候補遺伝子アプローチではみつけ出すことが困難な、機能のわかってい

なかった新しい遺伝子がみつけられる可能性がある。

- ① ゲノム全体を対象とするアプローチにより、川崎病発症に関与する染色体領域を同定。
- ② 連鎖の可能性のある領域から、有意性の高いと思われる部位を複数、選ぶ。
- ③ 連鎖不平衡ブロック (LDブロック) 内の SNPs 探索と関連解析。
- ④ その結果から感受性遺伝子候補を決め、その遺伝子の機能に関与する責任 SNP を同定する。

まず、①のゲノム全体を対象とし、関与する遺伝子をみつけ出す方法として、同胞が双方とも疾患に罹患したペアを全国から集め、連鎖解析をする方法 (罹患同胞対法) と、ゲノム全体の SNPs を使って関連解析を行い、疾患発症に関与する部位を検出する方法 [genome-wide association study (GWAS)] がある。我々が研究を始めたの

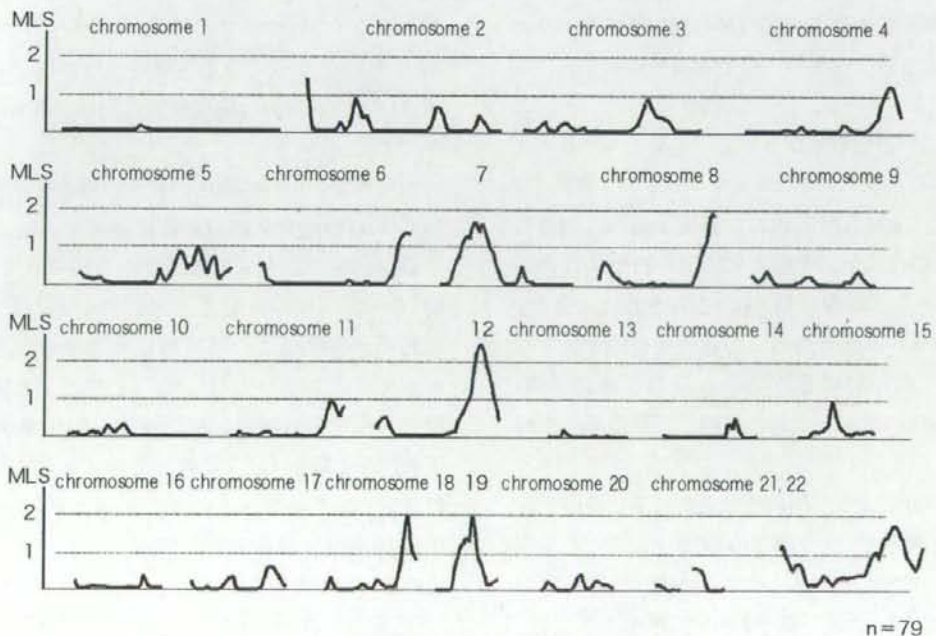


図1 罹患同胞対法による解析結果

罹患同胞対79ペアの検体を使って解析した。全染色体領域の結果を示す。比較的、高いピークが得られた、7番、12番、19番、Xの各染色体の4座位周辺を候補遺伝子領域として解析を進めた。

が10年前で、その時点では後者の方法は事実上、存在しなかったため、前者の戦略を採用した。その結果、想定通り複数の染色体領域にピークを検出することができた(図1)⁸⁾。このうち、染色体7, 12, 19, Xの4領域を対象に以後の解析をすすめた。X染色体領域に関しては、Wangらの川崎病の急性期にCD4⁺T細胞上におけるCD40Lの発現が亢進しているとの報告⁹⁾があり、CD40L遺伝子が我々の検出した連鎖領域のピーク近傍に局在することから、この遺伝子が関与し

ていると考え解析をした。その結果、イントロン4にあるSNPの関与を示すことができた¹⁰⁾。

7, 12, 19の3染色体領域は同時に解析を進め、そのうち、これまでに19番染色体領域に存在する遺伝子を見つけることができた¹¹⁾。探索経過の概略を説明する。連鎖領域内のSNPsを網羅的に解析し、関連解析で有意なSNPsを同定した。この時点で強い関連を示すSNPsを3つみいだした。連鎖不平衡ブロック内を詳細に解析し、最初の3SNPsと強く連鎖するSNPsを見つけ出した。

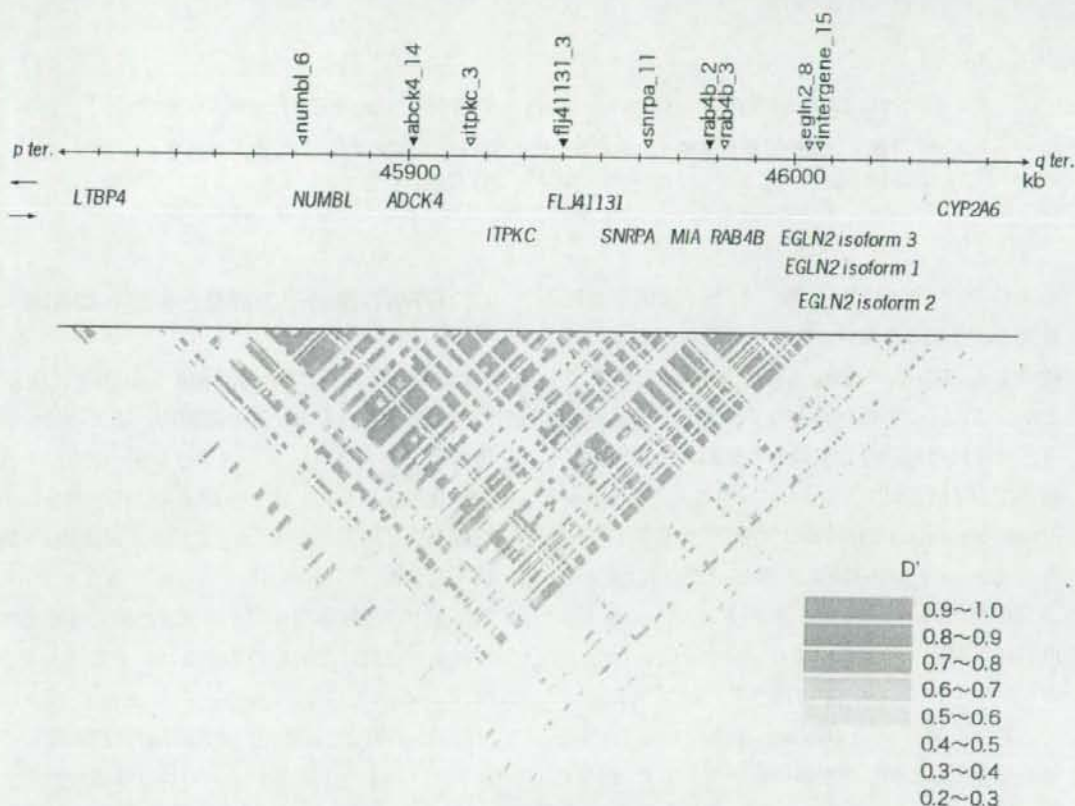
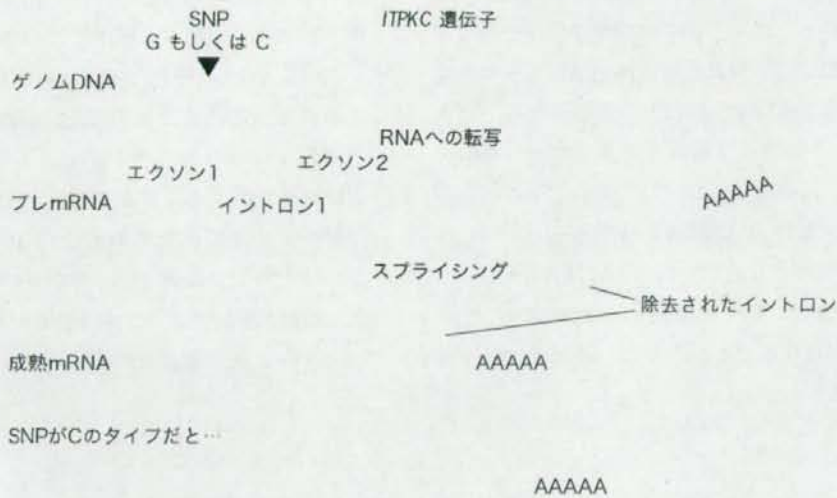


図2 19番染色体の候補遺伝子領域

上段に解析したSNPの位置を示す。黒い矢尻で示した3SNPは最初に関連が証明された。白い矢尻で示した6SNPは、最初の3つと連鎖が強いSNPを探した結果、みつかったもの。合計9SNPが責任SNP候補となった。米国の検体を解析した結果、左側の4SNPに絞られた(グレーで囲まれた部分)。中段に、この領域に存在する遺伝子を記載した。この領域の遺伝子の内、*ITPKC*が感受性遺伝子であり、左から3番目のSNPが責任SNPであった。下段は連鎖不平衡マップであり、この領域内の遺伝子に対象が絞られる根拠となる。



イントロン1の除去が効率よく行われず、タンパクへと翻訳されない不安定なmRNAが増える

図3 *ITPKC* 遺伝子のイントロン1内のSNPによるスプライシングへの影響

川崎病と関連のあるSNPの位置を▼で示す。このSNPがC型であるとイントロン1のスプライシングの効率が低下するため、翻訳されるITPKCタンパク質の量が減少する。

この時点で9個のSNPに絞られた。米国の共同研究者より供与を受けた川崎病の検体で同様の解析をしたところ、9個から4個のSNPsに絞ることができた。この領域に存在する遺伝子5個のうち、免疫反応に関与していると思われる遺伝子に絞って解析したところ、inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase C (*ITPKC*) が感受性遺伝子であることがわかった (図2)。疾患感受性に関与するSNPは*ITPKC* 遺伝子のイントロン1にあり、川崎病に関連する遺伝子型はC (シトシン) 型であり、G (グアニン) 型に比べて、スプライシングの効率が悪く、その結果、産生されるITPKC量が少ないことが、感受性の機序であることがわかった (図3)。C型ではG型に比べて1.89倍、川崎病に罹患しやすく、米国人でも同様の傾向が認められることから、異なった人種で共通の遺伝要因であるといえる。

C. *ITPKC* 遺伝子の機能と発症への関与

inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase (ITPK) は細胞外からのシグナルを細胞内へ伝える情報伝達物質であるイノシトール3リン酸 (IP3) をリン酸化し、IP4を生成する酵素である。IP3は小胞体および細胞外からCaを動員し、細胞内Ca濃度を高める。ITPKはIP3をIP4にすることでIP3濃度を下げ、以後のシグナル伝達を抑えることでシグナルを受けた細胞の応答をコントロールする役割があると考えられる。これまでヒトでは*ITPKA*、*ITPKB*、*ITPKC* の3種類のITPK遺伝子がクローニングされている。この3種類のアイソザイムは、細胞内での局在、構造、Caに対する反応性などが異なっている。ITPKAが細胞骨格、ITPKCは細胞質、ITPKBは、細胞膜、細胞骨格および小胞体に局在している¹²⁾。また、ラットのITPKCは核と細胞質間で活発に行き来していることが報告されているが、ヒトでも同様の現象が

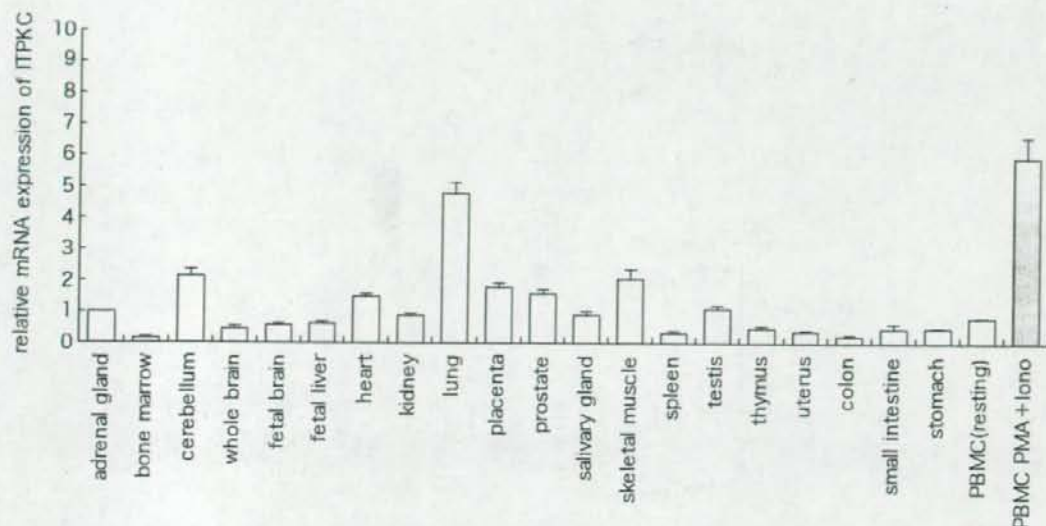


図4 T細胞内におけるIP3を介したシグナル伝達経路

ITPKCタンパク質がIP3をIP4へとリン酸化することにより、シグナル伝達は負に制御される。今回発見したITPKC遺伝子のSNPでは、ITPKCタンパク質の発現量が減少するため、この制御が弱まり、その結果シグナルはより多く伝達されT細胞の活性化が亢進すると考えられる。

観察されている¹³⁾。3つのアイソザイムは、構造上N端の配列が異なっていて、Ca²⁺/カルモジュリンへの反応性や局在を決定していると考えられる。Ca²⁺/カルモジュリンへの反応性はITPKBが10倍程度と最も強く反応するのに対し、ITPKAは2~3倍、ITPKCの反応性は他に比べかなり小さいことがわかっている^{13,14)}。しかし、それぞれどの細胞でどのような役割を担っているかについては、まだよくわかっていないのが現状である。

そこで我々はヒト組織から抽出したRNAを使って定量PCR法によりITPKCのmRNA量を比較した。その結果、肺で最も発現が高く、末梢単核球 peripheral blood mononuclear cell(PBMC)での発現が低かったが、PBMCをPMAとイオノマイシンで刺激・活性化させると発現が3~7倍誘導されることがわかった(図4)。さらに、PBMCおよびT細胞系、骨髄球系細胞株においてITPKの3種類のアイソザイム酵素の発現量を調

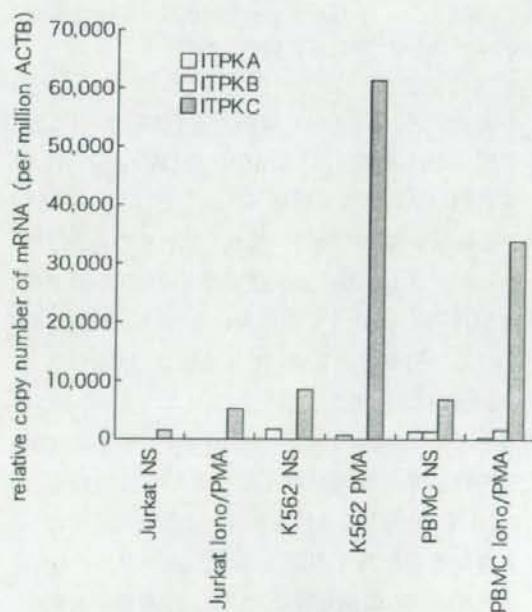


図5 ITPKCの臓器別発現比較

PBMCをPMAとイオノマイシンで刺激・活性化させると発現が3~7倍誘導される。

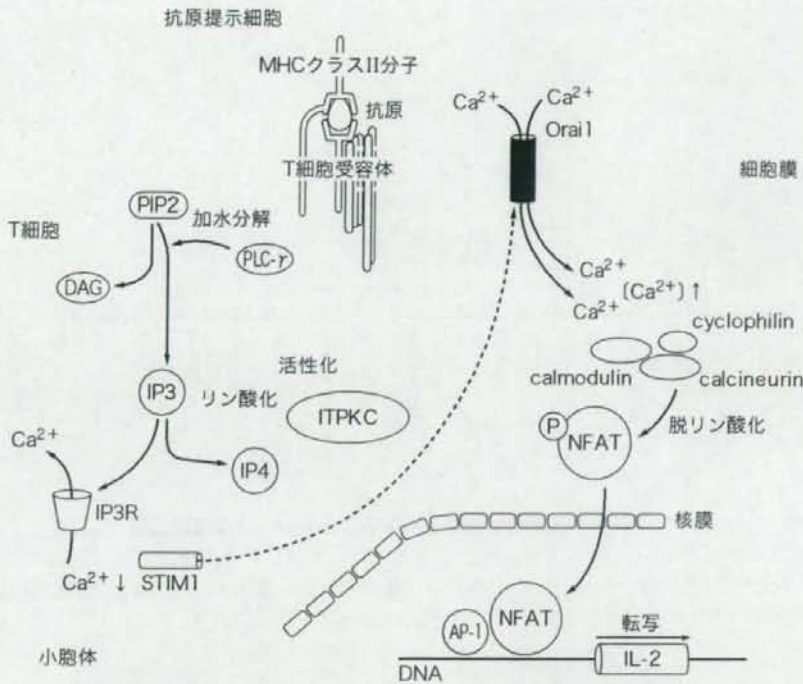


図6 *ITPKC* アイソザイムの白血球内発現量比較

PBMCおよびT細胞系、骨髄系細胞株において*ITPKC* アイソザイムの発現量が他に比べ優位である。

べたところ、いずれの細胞でも *ITPKC* が他に比べ明らかに発現が高く (図5)、免疫細胞が活性化する際に発現が強く誘導されることから、*ITPKC* がT細胞活性化の調節に関与していることが示唆された。以上より、抗原提示を受けたT細胞活性化が *ITPKC* によって調節されるという仮説が導かれる。抗原提示を受けたT細胞では、IP3による細胞内Ca上昇が引き金となりカルモジュリン等を介して、nuclear factor of activated T cells (NFAT) 系の脱リン酸化をうながし、活性化したNFATが核内に移行してIL2などのサイトカイン遺伝子の転写を促進する¹⁵⁾。我々は、この一連の反応が川崎病発症において、全身性の炎症につながるメカニズムではないかと考えている (図6)。この仮説は、T細胞由来のJurkat細胞株内において、*ITPKC* 遺伝子の発現を操作すれば、最

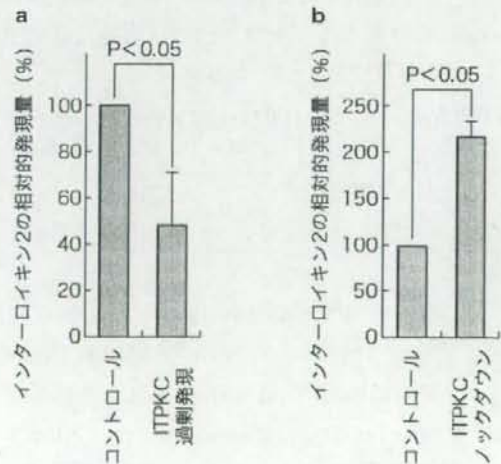


図7 *ITPKC* のインターロイキン2の発現に及ぼす影響

T細胞系の細胞株であるJurkat細胞内で*ITPKC* タンパク質を過剰に発現させると、インターロイキン2の発現量が低下し (a)、低下させると逆にインターロイキン2の発現量は増加する (b)。

終産物であるサイトカインであるインターロイキン2 (IL2) を指標として検証できると考えた。結果はITPKC遺伝子を過剰発現するとIL2産生が減少し、逆にshRNAを使って発現量を減らすと、IL2産生が増えた(図7)。以上より、ITPKCはT細胞活性化を抑制する働きがあることが明らかになった。すなわち、ある種の抗原提示が行われると、原因SNPによりITPKCの機能が抑えられた個体では、IL2などのサイトカイン産生が促進されると考えている。実際、川崎病では他の発熱性感染症に比べてIL2などの炎症性サイトカインが高値であることが知られており¹⁶⁾、この仮説を支持していると思われる。

D. 責任SNPと冠動脈病変およびIVIG治療抵抗性

次に、責任SNPが冠動脈合併症の有無およびIVIG治療抵抗性に関与しているのではないかと考え、解析症例を階層化し、関連解析を行った(表1)。その結果、冠動脈合併症の起こった川崎病の症例を疾患群とした関連解析で、リスクを高める遺伝子型では、日米双方の検体で、冠動脈疾患のなかった症例を疾患群とした場合に比し、オッズ比が高くなることがわかった。また、IVIG治療抵抗群では、効果的だった症例を疾患群とした場合に比べて、オッズ比が高くなることをみいだした。これらの解析結果は、原因SNPが冠動脈合併症およびIVIG治療への抵抗性に関与している可能性を示唆している。

表1 階層化した関連解析結果

冠動脈合併症の有無							
Japanese (case-control association analysis)							
samples	genotype			χ^2	P	OR	95%CI
	GG	GC	CC				
KD with CALs	61	44	2	12.4	0.0044	2.05	1.37-3.08
KD without CALs	172	94	12	13.4	0.0025	1.68	1.27-2.21
control	756	249	29				

U.S. (TDT)							
	n	T/U	χ^2	P	OR	95%CI	
KD with CALs	108	37 : 11	14.1	0.00018	3.36	1.72-6.59	
KD without CALs	100	27 : 18	1.8	0.18	1.50	0.63-2.72	

IVIG治療抵抗性の有無							
U.S. (TDT)							
	n	T/U	χ^2	P	OR	95%CI	
IVIG resistant	37	14 : 3	7.1	0.0076	4.67	1.34-16.24	
IVIG responder	138	39 : 22	4.7	0.030	1.77	1.05-2.99	

責任SNPが冠動脈合併と治療抵抗性に関連していることを示している。上段が冠動脈合併症の有無で階層化した結果、下段がIVIG治療抵抗性の有無で階層化した結果。上段は日本人と米国人の結果。冠動脈疾患の有無により、オッズ比(OR)が日本人では1.68から2.05へ、米国人では1.50から3.36へ高くなることがわかった。下段のIVIG治療抵抗性の有無では、治療が効果的であった群はオッズ比が1.77であるのに対し、抵抗群では4.67と高くなる。

そこで、現在、我々は、川崎病の新規発症例を対象に、治療プロトコルを統一したコホート研究を進めている。このコホートで、上記所見を支持する結果が得られれば、川崎病の初期治療における個別化医療が実現する可能性が高くなる。

E. 川崎病の個別化医療の可能性

上記のコホート研究により、責任SNPが冠動脈合併症と治療抵抗性に関与していることが証明された場合、以下のような臨床応用の可能性が考えられる。

- ① 川崎病の疑いで入院
- ② 病棟のベッドサイドで遺伝子タイピング
- ③ タイピング結果により治療方針を決定
- ④ IVIG抵抗性群にはIVIG早期追加投与または他の治療法選択
- ⑤ 合併症発症確率の低減と合併症軽減

上記のITPKCが発症感受性に関与している機序が正しいとすれば、さらに新しい治療薬を開発する可能性が出てくる。たとえば代謝経路の各段階での阻害剤が、川崎病の特効薬になる可能性も考えられる。また、他の候補領域の遺伝子の同定も進めているので、さらに正確な予後予測と治療選択につながる可能性が期待できる。

むすび

これまで、原因のわからなかった川崎病を対象に、ゲノム全体を対象とした人類遺伝学的手法で、疾患感受性という遺伝要因を構成する遺伝子を見つけ出すことに成功した。臨床的に重要な合併症である冠動脈疾患の発生と、一部にみられるIVIG治療抵抗性に関連していることがわかり、個別化医療につながる可能性があることがわかった。ITPKCが、T細胞を中心とした免疫応答の強さを制御する役割を果たしていることから、他の自己免疫疾患における発症機序にも関与している

可能性があり、解析が待たれる。

このようにゲノム医学研究が、多様性のある人類の医療に貢献することが証明されつつあり、今後の展開がますます期待できる。

文献

- 1) 第19回川崎病全国調査成績。子どもの病気に関する包括的データベース「難治性疾患に関する疫学研究データベース等を含む」の構築とその利用に関する研究2005-2007年度、川崎病全国調査担当グループ。
- 2) 高橋 啓. 川崎病冠動脈炎後遺病変の病理. 小児科診療. 2006; 69: 1017-20.
- 3) Holman RC, Curns AT, Belay ED, et al. Kawasaki syndrome in Hawaii. *Pediatr Infect Dis J*. 2005; 24: 429-33.
- 4) Kobayashi T, Inoue Y, Takeuchi K, et al. Prediction of intravenous immunoglobulin unresponsiveness in patients with Kawasaki disease. *Circulation*. 2006; 113: 2606-12.
- 5) Inoue Y, Okada Y, Shinohara M, et al. A multi-center prospective randomized trial of corticosteroids in primary therapy for Kawasaki disease: clinical course and coronary artery outcome. *J Pediatr*. 2006; 149: 336-41.
- 6) Wooditch AC, Aronoff SC. Effect of initial corticosteroid therapy on coronary artery aneurysm formation in Kawasaki disease: a meta-analysis of 862 children. *Pediatrics*. 2005; 116: 989-95.
- 7) Burns JC, Best BM, Mejias A, et al. Infliximab treatment of intravenous immunoglobulin-resistant Kawasaki disease. *J Pediatr*. 2008. In press.
- 8) Onouchi Y, Tamari M, Takahashi A, et al. A genome-wide linkage analysis of Kawasaki disease: evidence for linkage to chromosome 12. *J Hum Genet*. 2007; 52: 179-90.
- 9) Wang CL, Wu YT, Liu CA, et al. Expression of CD40 ligand on CD4+ T-cells and platelets correlated to the coronary artery lesion and disease progress in Kawasaki disease. *Pediatrics*. 2003; 111: E140-7.
- 10) Onouchi Y, Onoue S, Tamari M, et al. CD40 ligand gene and Kawasaki disease. *Eur J Hum Genet*. 2004; 12: 1062-8.
- 11) Onouchi Y, Gunji T, Burns JC, et al. ITPKC func-

- tional polymorphism associated with Kawasaki disease susceptibility and formation of coronary artery aneurysms. *Nat Genet.* 2008; 40: 35-42.
- 12) Dewaste V, Moreau C, De Smedt F, et al. The three isozymes of human Inositol-1, 4, 5-triphosphate 3-kinase show specific intracellular localization but comparable Ca^{2+} responses on transfection in COS-7 cells. *Biochem J.* 2003; 374: 41-9.
- 13) Nalaskowski MM, Windhorst S, Stockebrand MC, et al. Subcellular localisation of human inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C: species-specific use of alternative export sites for nucleo-cytoplasmic shuttling indicates divergent roles of the catalytic and N-terminal domains. *Biol Chem.* 2006; 387: 583-93.
- 14) Irvine RF, Schell MJ. Back in the water: the return of the inositol phosphates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2: 327-38.
- 15) Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 472-84.
- 16) 古川 漸, 松原知代, 市山高志. 川崎病と炎症性サイトカイン. *日本臨牀.* 2008; 66: 258-64.

特集 小児科医に役立つ臨床遺伝学

IV. 臨床遺伝学のトピックス

川崎病の臨床遺伝学

羽 田 明 千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学
尾 内 善 広 理研横浜研究所ゲノム医科学研究センター

Key Words

川崎病
感受性遺伝子
冠動脈瘤
治療抵抗性

要旨

川崎病は、感染症の関与が強く疑われるにもかかわらず、病原体はいまだに不明である。一方、全国的な疫学調査により、同胞の罹患リスクが一般集団よりもかなり高いなど、遺伝要因が関与する多因子疾患であることがわかってきた。最近われわれは、人類遺伝学的手法により疾患感受性遺伝子のひとつを明らかにし、合併症である冠動脈瘤の発生と治療抵抗性への関連を明らかにした。この知見は個別化医療につながる可能性がある。

はじめに

川崎富作博士による川崎病の発見からすでに40年が経過している。この間、厚生省研究班による全国調査が継続して行われ、多くの知見が集積されてきた¹⁾。しかしながら、感染が重要な契機になっていることは強く示唆されるにもかかわらず、いまだに病原体が明らかでないなど、多くの未解決の問題が残っている。一方、川崎病は、遺伝要因が関与する多因子疾患であることが明らかになってきた。

本稿では最近、われわれが明らかにした川崎病の感受性遺伝子に関して説明し、得られた知見の臨床応用の可能性を述べる。

川崎病について

川崎病は、おもに乳幼児が罹患する疾患で、全身の中小血管に炎症がおこる。診断基準に

従って、次の六つの主要症状のうち五つ以上の症状を伴うものを本症と診断する。①5日以上続く発熱、②両側眼球結膜の充血、③口唇の紅潮、莓舌、口腔咽頭粘膜のびまん性発赤、④不定形発疹、⑤四肢末端の変化、急性期の手足の硬性浮腫と回復期の指先からの膜様落屑、⑥急性期における非化膿性頸部リンパ節腫脹。

わが国における患者数は1970年代より増加し、1979年、1982年、1986年の3回にわたって全国規模で大流行した。その後は毎年6,000人程度の発生数であったが、1990年半ばより徐々に増加し、2005年以降、年間1万人を超えている。患者の性比は1.3~1.4程度であり、男児が多い。患者の年齢分布は新生児期に低く、その後、急激に増加して9~11カ月にピークがある。川崎病自体は自然に治癒することが多いが、臨床的に問題となるのは冠動脈病変合併である。川崎病は、わが国だけではなく頻度の低い米国

においても、小児の後天性心疾患の最大原因である。

川崎病の急性期治療として、アセチルサリチル酸投与と γ -グロブリン療法（以下、IVIGと略す）がもっとも標準的である。治療にIVIGが導入されたことで、以前は15～20%の患者に心合併症の残存がみられたが、近年では、急性期の心障害が約10%強、心後遺症が5%弱と大幅に軽減し、致命率も激減した。

多因子疾患としての川崎病

疫学調査により、川崎病は発症に遺伝要因がかなり強く関与している多因子疾患であることが明らかとなった。根拠として、①同胞例が約1%存在すること、②親子例が約0.4%存在すること、③患者の3～4%が再発例であること、④アジア、とくに日本人で頻度が高いという人種差が顕著なことがあげられる。

①に関して、川崎病の同胞は一般の同年齢の子どもの罹患率に比べて、約10倍も高率に発症することがわかっている。これを同胞再発リスクとよび、 $\lambda_s=10$ と記載するが、これは遺伝要因の関与を示す指標のひとつである。統合失調症では12、インスリン依存性糖尿病で10、そううつ病で7などの値であることを考えれば、川崎病の遺伝要因の関与はかなり高いといつてよいだろう。②の親子例が期待値よりも高いこと、③の再発例が多いことも、保持する感受性遺伝子の共有で説明できる。④の人種差であるが、日本における罹患率は欧米の10～20倍に達すると推定されている。

米国では、欧米諸国の中でもっとも早くから川崎病の研究が始まり、各地のデータが蓄積されている。興味深いのは、人種別罹患率である。Holmanら²⁾はハワイ州における入院患者データベースの解析から、人種別罹患率を計算しているが、日系人が198ともっとも高く、ついでハワイ系99、中国系81が続き、白人は35となっ

ている。環境がほぼ同じと仮定すれば、この違いは遺伝要因の関与と考えられるのである。

川崎病臨床の最大の解決すべき課題は、IVIG治療抵抗群の治療法開発である。IVIG治療抵抗群の存在は導入当初から知られており、約15～20%にみられるとされている。しかも、冠動脈合併症はこの抵抗群に多発することがわかっている。病原体探索の研究が行き詰まっている現状では、川崎病の感受性遺伝子を明らかにすることで、診断・治療・予防へのブレークスルーが期待できる。

川崎病の感受性遺伝子同定の戦略

複数の遺伝子が川崎病を発症しやすい体質を規定し、なんらかの感染症が引き金となり発症するという仮説が、もっとも可能性がありそうである。病態は発熱、発疹を主徴とした血管をターゲットとする炎症性疾患であるので、なんらかの免疫に関与した遺伝子が関与していることは間違いないだろう。これまでも多くの研究者が、この観点から候補となる遺伝子を対象として遺伝子解析を行ってきたが、再現性のある結果は得られていない。そこで、われわれは次の4段階の戦略を採用した。①ゲノム全体を対象とするアプローチにより、川崎病の疾患感受性遺伝子の存在する染色体領域を同定、②連鎖の可能性のある領域から、有意性の高いと思われる部位を複数選ぶ、③連鎖不平衡ブロック(LDブロック)内のSNPs探索と関連解析、④その結果から感受性遺伝子候補を決め、その遺伝子の機能に関与する責任SNPを同定する。

まず、①のゲノム全体を対象とし、疾患感受性遺伝子を見出す方法として、同胞が双方とも疾患に罹患したペアを全国から集め、連鎖解析をする方法(罹患同胞対法)を採用し、複数の染色体領域にピークを検出することができた³⁾。このうち、染色体7、12、19、Xの4領域を対象に以後の解析をすすめた。X染色体領域に関し