

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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 羽田 明

平成 22 (2010) 年 5 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－1	13
尾内 善広	
2. 川崎病の発症、動脈瘤発生へのマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 遺伝子群の関与	20
鈴木 洋一	
3. 難治性川崎病に対するシクロスポリン治療の検討－1	29
寺井 勝	
4. 難治性川崎病に対するシクロスポリン治療の検討－2	33
鈴木 啓之	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	36
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	39
-----------------	----

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ード治療法の確立

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。

21 年度は前年度の連鎖領域の詳細解析およびゲノムワイド関連解析(GWAS)において見いだされた川崎病の感受性遺伝子の候補について、疾患との関連性の確認、責任多型の絞り込み及び SNP 機能解析を進めた。その結果、川崎病の発症に *CASP3* 遺伝子が関与していることを新たに見だし、*Human Molecular Genetics* に発表した。さらに、これまで川崎病の病因や病態との関連が知られていない 2 つの既知遺伝子領域(遺伝子 Y および遺伝子 Z)に有意な関連の再現性が確認できた。また、統一プロトコールにより急性期治療を受けた新規川崎病罹患例における治療効果と *ITPKC* 遺伝子多型との関連について検討を行った。これまでに基幹病院 2、関連病院 9 の計 11 施設から川崎病患者 254 症例の DNA を収集した。同時に収集した臨床データを基に、発症、冠動脈病変および IVIG 治療反応性等との関連性を検討した。その結果、患者全体では健常対照群に対し、C アレル頻度および C アレル保有率が有意に高く、2008 年に論文発表した内容の追試に成功した。またこれらは IVIG 有効群に対し IVIG 不応群により高い傾向が日本人集団でも確認することができた。一方、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、11 番染色体に存在する *MMP* 遺伝子クラスターの 9 遺伝子の SNP について、症例対照研究を行った結果、*MMP8*、*MMP13*、*MMP20* 遺伝子の一塩基多型、ハプロタイプと疾患との相関が示唆された。今後、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 反応性等の予測精度向上が期待できる。

シクロスポリンの臨床研究に関しては、川崎病初期治療において初回 IVIG および追加 IVIG に対して不応の症例に対して、シクロスポリン A(CyA)の治療効果ならびに安全性を検討した。予備的なとりまとめでは、ほとんどの症例ですみやかな解熱効果が認められた。

投与した全症例において CyA による重篤な有害事象は認められなかった。CyA は、IVIG 不応の難治性川崎病に対する一つの治療オプションとして有用である可能性があり、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。安全性、投与時期、投与量について更なる検討を行う予定である。

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

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。

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-tri phosphate 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疾患感受性遺伝子である *ITPKC*が

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、以下の手順で行なった。

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。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。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った (図 2)。さらに可能性のある病院にも協力の呼びかけをおこなった。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った。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検討した。

前年度に引き続き参加研究者間でプロトコルの確認、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した。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。

[I] 新規川崎病感受性遺伝子の同定

① 連鎖領域からの同定

罹患同胞対法による連鎖領域である4番染色体長腕(4q35)近傍に局在する遺伝子群の解析により日本人および白人に共通して川崎病の罹患感受性と関連を示すことを見出したカスパーゼ3 (*CASP3*) 遺伝子上の SNP (rs72689236 G/A) につき、末梢血単核球内における *CASP3* の発現量と SNP の型との関連をアレル特異的転写物定量法(ASTQ 法)にて検討を行った。

② ゲノムワイド関連解析(GWAS)

川崎病 440 人、対照 933 人について、55 万カ所の SNP タイピングを行った。有意な関連を示した SNP のうち、上位 150 につき川崎病 470 人、対照 376 人 (パネル 1)、さらにセカンドセットとして川崎病 285 人、対照 568 人 (パネル 2) にて再現性の確認を行った。関連が確認できた遺伝子については定量 PCR 法、ルシフェラーゼアッセイなどによる機能解析を行った。

[II] *ITPKC* 遺伝子の SNP と IVIG 抵抗性との関連

昨年度から収集された川崎病患者 DNA につき、rs28493229 の遺伝子型を決定、臨床情報に基づき、IVIG 抵抗性及び CAL 合併リスクとの関連を解析した。

[III] 川崎病の発症、動脈瘤発生へのマトリックスメタロプロテアーゼ (*MMP*) 遺伝子群の関与

MMP 遺伝子群の解析では、HapMap の情報を基にタグ SNP を設定し、SNaP shot 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 の検出もおこなった。

川崎病患者については、本研究班への参加病院からの症例 188 例について、対照群としては、千葉市の小学生と大阪市の成人ボランティア合わせて 1,050 名における遺伝子型の頻度を決定した。各群における、遺伝子型ないしアレルの頻度は、 χ^2 検定にて検討した。有意水準については、多重比較を考慮しないで、0.05 以下を有意の関連とみなした。連鎖不平衡 (LD) の状況、タグ SNP による単一 SNP、ハプロタイプの相関解析は Haploview ver. 4.2 と SNPalyze V7.0 Pro を用いて行った。

2) 難治性川崎病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))

研究代表者を中心に協議を重ねて川崎病の統一治療プロトコル (図 3) を作成した。本研究では、川崎病初期治療において初回 IVIG および追加 IVIG に対する反応性、さらに追加 IVIG に応答しない症例に対するシクロスポリン A (CyA) の治療効果ならびに安全性を検討し、プロトコルに同意を得て参加した全症例の川崎

病感受性遺伝子である *ITPKC* の SNP タイプとの関連を解析することを目的とした。東京女子医科大学八千代医療センターと和歌山県立医科大学小児科とその関連 6 施設(橋本市市民病院・公立那賀病院・和歌山ろうさい病院・国保日高病院・紀南病院・泉大津市立病院)において平成 20 年 5 月から統一プロトコールでの治療をおこなった。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本研究期間中に検証する。また、IVIG 治療の反応性、CyA の有効性と *ITPKC* 遺伝子型の関連についても検証する。

IVIG 不応の定義は以下の基準とする。免疫グロブリン治療 (IVIG) は 2g/kg の単回投与とし、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、CyA 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 を併用する。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。

(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) 川崎病の疾患関連遺伝子の探索

連鎖解析およびゲノムワイド関連解析 (GWAS) の結果を手がかりとして見いだされた川崎病の感受性遺伝子の候補について疾患との関連性の確認、責任多型の絞り込み及び SNP 機能解析を進めた。その結果、川崎病の発症に *CASP3* 遺伝子の SNP が関与していることを新たに発見し、*Human Molecular Genetics* 誌に発表した。また、これまで川崎病の病因や病態との関連が知られていない 2 つの既知遺伝子領域(遺伝子 Y および遺伝子 Z)に有意な関連の再現性が確認できた。

また、統一プロトコールにより急性期治

療を受けた新規川崎病罹患例における治療効果と *ITPKC* 遺伝子多型との関連について検討を行った。これまでに基幹病院 2、関連病院 9 の計 11 施設から川崎病患者 254 症例の DNA を収集し、同時に収集した臨床データを基に、発症、冠動脈病変および IVIG 治療反応性等との関連性を検討した。そのうちの 168 例の結果では、患者全体では健常対照群に対し、C アレル頻度、C アレル保有率がともに有意に高いこと、またこれらは IVIG 有効群に対し IVIG 不応群により高い傾向が認められた。一方、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、11 番染色体に存在する *MMP* 遺伝子クラスターの 9 遺伝子の SNP について、症例対照研究を行った結果、*MMP8*、*MMP13*、*MMP20* 遺伝子の SNP、ハプロタイプと疾患との相関が示唆された。

【I】新規川崎病感受性遺伝子の検索

①新規遺伝子の解析

昨年度実施した SNP 機能解析にて rs72689236 付近には NFATc2 が関与するエンハンサー活性があることが示唆されていた。そこで rs72689236 の遺伝子型がヘテロである 8 人の被験者についてそれぞれのアレル由来の *CASP3* mRNA の相対的な量を比較したところ、感受性アレル(A)に由来する転写物が非感受性アレル(G)に対し約 30% 程度少ないことが分かり、機能解析の結果が裏付けられた。

② GWAS による新規遺伝子の解析

パネル 1 および 2 でともに有意な相関を示す 2 つの遺伝子領域(遺伝子 Y, 遺伝子 Z)を発見した。いずれの遺伝子も既知であるが川崎病の病因や病態との関連が調べられたことはないものであった。不死化 B 細胞株における発現を検討した結果、遺伝子 Y

の発現量と SNP の遺伝子型との間に相関があることが分かった。川崎病と相関し、強い連鎖不平衡にある SNP 群の中のひとつが周辺配列のもつエンハンサー活性に影響を及ぼすことをルシフェラーゼアッセイにより明らかにした。一方遺伝子 Z についてはその機能に影響を及ぼすことが知られているスプライスバリエーションの出現頻度と、SNP の遺伝子型との間に関連があることが分かった。

【II】ITPKC 遺伝子の SNP と IVIG 抵抗性との関連

統一プロトコールにより治療を受けた川崎病患者計 168 名における rs28493229 C アレルの頻度および C アレル保有率はそれぞれ 21.4%、38.7%であった。一方 2008 年に論文に報告した集団とは別の日本人対照群 (751 人) ではそれぞれ 15.5%、29.3%であり、統計学的に有意な差を認めた。解析の時点で治療効果等の情報を有していた 135 名のうち 102 名が一度目の IVIG に対し有効、33 名が不応と判断された。C アレルの頻度および C アレル保有率はともに IVIG 不応群に高い傾向が認められたが、症例数が少ないため統計学的に有意とはならなかった。遺伝子 Y および Z の SNP に関しては IVIG 抵抗性との関連はみられていない (データ非提示)。

【III】川崎病の発症、動脈瘤発生へのマトリックスメタロプロテアーゼ (*MMP*) 遺伝子群の関与

11 番染色体 11q21-22.3 の *MMP* クラスターの 9 つの *MMP* 遺伝子の SNP について、一般集団サンプル 48 名のタイピングをおこなった。LD の状況より、9 遺伝子から 92 のタグ SNP を選ぶことが出来た。遺伝子と遺伝子の周りを中心としたこれらの SNP は、17 のハプロタイプブロック (HB) に分かれ

ており、ほとんどの遺伝子は一つのHBに属しているが、*MMP20*遺伝子は、他の*MMP*遺伝子より大きく、5つのHBとHBに属さない1つのSNPからなっていた。

また、単一SNPのアレル頻度の χ^2 検定の結果、0.05より小さいP値を示すSNPは、*MMP20*、*MMP8*、*MMP10*、*MMP13*に見出された。

ハプロタイプとの相関解析では、0.05以下のP値を示したハプロタイプは、*MMP20*遺伝子の存在するHB2、HB3、HB5、HB6に見出された。また、*MMP8*の存在するHB9、*MMP10*の存在するMB10、*MMP13*の存在するHB17のハプロタイプが疾患との相関のP値が0.05を切っていた。

*MMP20*遺伝子の領域HB5には、川崎病と相関を示した、3つのアミノ酸置換を伴う多型が存在していた。HB2、HB3、HB6の多型はイントロンに存在しており、遺伝子の発現に関係するハプロタイプである可能性が考えられる。

*MMP8*遺伝子には、単独で相関を示すアミノ酸置換を伴うSNPが見出された(SNP6, $P=0.02$)。疾患との相関のP値が0.05を示す多型(SNP3)も存在していた。*MMP13*遺伝子のSNP5は、本遺伝子の最後のエクソンの下流に存在するSNPであり、本遺伝子のプロモーター部に存在し、発現に影響を与えていることがわかっている-77G/A

(SNP6)とは別のHBに属していた。有意な相関を示したSNPのオッズ比(OR)は、1.5~2.4の範囲にあり、多因子遺伝子病に多く見られる値であり、極端に大きな影響のあるSNPは見出されなかった。*MMP10*のSNP11は遺伝子型としては、疾患との相関が0.05を切らなかった。

2) 難治性川崎病に対するシクロスポリン投与の有用性の検討

初回IVIGおよび追加IVIGに対し

て不応の症例に対して、CyAの治療効果ならびに安全性を検討した。平成20年5月から平成22年3月までに東京女子医科大学八千代医療センターと和歌山医大小児科および関連6施設に入院した新規川崎病入院患児の内、統一プロトコール治療を行った228例を対象とした。統一プロトコールで川崎病初期治療した228例中、初回IVIG反応例は174例(76.3%)、追加IVIG反応例31例(13.6%)、2回のIVIG不応例は23例(10.1%)であった。4か月齢以上の22例にCyAを投与した結果、18例は反応良好であり、CyAによる重篤な有害事象は認められなかった。高K血症を9例(40.9%)に認めたが、無症候性で有害事象は生じなかった。冠動脈病変はCyA反応不良の3例に瘤(3-5.8mm)とCyA投与前に瘤形成を発症した巨大瘤1例の4/228(1.8%)であった。

平成20年5月から平成21年12月31日までに和歌山医大小児科および関連6施設に入院した新規川崎病入院患児の内、統一プロトコール治療を行った117例を対象とした。この内、初回IVIGのみで解熱した症例は88(75.2%)例、初回IVIGに不応であったが追加IVIGで解熱した症例は14(12.0%)例、初回・追加IVIGともに不応でCyA投与を行った症例は15(12.8%)例であった。15例中7例は2日以内に、6例は5日以内に解熱した。残り2例は6日以上解熱しないCyA反応不良例で、CyAを増量し、解熱した。冠動脈病変はCyA投与15例中2例に生じた。この2例中1例は追加IVIG中にすでに冠動脈拡張を生じ、CyAを開始した8病日

に右側冠動脈に 5・6mm の瘤を認めた。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。他の 1 例も CyA 投与開始時にすでに左冠動脈主幹部に軽度の拡張を認め、CyA による解熱は 6 日を要した。左冠動脈は最終的に 5.8mm に瘤を残した。高 K 血症(≥ 6.0 または ≥ 5.5 mEq/L)を 9 例(40.9%)に認めたが、無症候性で有害事象は生じなかった。

東京女子医科大学八千代医療センターにおける平成 20 年 1 月から平成 22 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 141 例を対象とした。その内、初回 IVIG に反応せず解熱が得られなかった 35 例(24.8%)に追加 IVIG (2g/kg)を施行した。このうち、24 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 11 例の患者のうち、月齢 4 ヶ月以上の 10 例の患者に対して CyA 4mg/kg を経口で 2 週間投与した。その結果、10 例中 6 例ではすみやかな解熱効果が得られたが、4 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 に上げて解熱せず、冠状動脈に中等度の動脈瘤(4・5mm)が出現した。残りの 140 例(99.3%)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。冠動脈瘤を発生した 1 例に一過性の多毛がみられた。また、臨床症状のない高 K 血症を一過性に認めた。

CyA 投与前、投与開始後 3・6 日、投与終了時の血清中の炎症性サイトカインを網羅的に定量解析した。現在まで 7 例(CyA 有効例 5 例、不応例 2 例)の検討では、2 例の不応例では CyA 投与前に IL-6、G-CSF、sTNFR2

といったサイトカインが高値であった。CyA が抑制するとされる IL-2 に着目すると血清 IL-2 自体は治療前に上昇が認められなかったが、可溶性 IL-2 受容体 α が有効例に比して高値であった。

D 考察：

川崎病の発症に *CASP3* 遺伝子の SNP が関与していることを新たに発見した。川崎病の回復期には一過性の T 細胞アナジーが観察されるといわれている。一方 NFATc2 による *CASP3* の発現誘導と T 細胞アナジーとの関連についても報告があり、川崎病の病態と NFAT の活性化との関連が改めて推察される。また別の報告では *CASP3* が NFATc2 を基質として分解するとされており、*CASP3* は ITPKC 同様 Ca^{2+} /NFAT 経路のシグナル伝達の調節を担っており、SNP によるその機能の変化が川崎病の感受性に影響している可能性を示唆する。

GWAS にて同定された Y は日本人集団における川崎病の感受性遺伝子であることは間違いないと思われる。これらが他人種でも当てはまるのか否かについて検討を予定している。遺伝子 Y についてはエンハンサー機能に関連する転写因子が未同定、遺伝子 Z の選択的スプライシングに SNP の及ぼす影響についてはそのメカニズムは不明であり、今後の課題である。GWAS の上位 150 以下の SNP についても再現性の確認作業を続けており、今後更に新たな感受性遺伝子が見出されると考えている。ITPKC の遺伝子多型と川崎病重症化との関連については今後も症例を追加し検討する必要がある。*ITPKC* を含めた複数の感受性遺伝子多型間の相互作用の有無について検討の必要がある。

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、11 番染色体に存在する *MMP* 遺伝子クラスターの 9 遺伝子の SNP について、症例対照研究を行った結果、*MMP8*、*MMP13*、*MMP20* 遺伝子の一塩基多型、ハプロタイプと疾患との相関が示唆された。これらの複数遺伝子の知見を加えると、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 反応性等の予測精度が上げることが期待できる。

シクロスポリンの臨床研究に関しては、CyA が、初回・追加 IVIG に不応な症例に対して解熱効果や抗炎症効果が明瞭で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存在するため、その *ITPKC* 遺伝子型など遺伝子型分析との相関の解析をすすめている。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、CyA の初期投与量を増量やより早期投与を考慮する必要があると考えられる。また CyA への反応性と遺伝子型との相関を検討し、プロトコルを再検討する際の参考としたい。さらに、投与前後のサイトカインプロファイルを解析して CyA の作用メカニズムの解明も明らかにしたい。

E 結論

新規川崎病感受性遺伝子の同定については順調に進んでいるといえる。*ITPKC* の遺伝子多型と川崎病重症化との関連については今後も症例を追加し検討する必要がある。

複数遺伝子の知見を加えると、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 反応性等の予測精度が上げることが期待できる。

CyA は、IVIG 不応の難治性川崎病に対する一つの治療オプションとして有用である可能性があり、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と考えられる。今後も症例を積み重ねて解析し、CyA の安全性、投与量、投与開始時期のさらなる検討を行う予定である。

F 健康危険情報： 該当せず

G 研究発表：

1. 論文発表

- (1) Onouchi Y, Ozaki K, Buns JC, Shimizu C, Hamada H, Honda T, Terai M, Honda A, Takeuchi T, Shibuta S, Suenaga T, Suzuki H, Higashi K, Yasukawa K, Suzuki Y, Sasago K, Kemmotsu Y, Takatsuki S, Saji T, Yoshikawa T, Nagai T, Hamamoto K, Kishi F, Ouchi K, Sato Y, Newburger JW, Baker AL, Shulman ST, Rowley AH, Yashiro M, Nakamura Y, Wakui K, Fukushima Y, Fujino A, Tsunoda T, Kawasaki T, Hata A, Nakamura Y, Tanaka T. Common variants in *CASP3* confer susceptibility to Kawasaki disease. Hum Mol Genet. May10 (e-pub) , 2010
- (2) Onouchi Y. Molecular Genetics of Kawasaki Disease. Pediatric Res. 2009; 65: 46R-53R.
- (3) Suenaga T, Suzuki H, Shibuta S, Takeuchi T, Yoshikawa N: Detection of multiple superantigen genes in stools of patients with Kawasaki disease. J Pediatr 155:266-270, 2009
- (4) Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Suzuki Y, Shimojo N, Kohno Y, Fujita K, Miyatake A,

- Doi S, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Nakamura Y, Tamari M. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 124: 779-785 e776, 2009.
- (5) Imada Y, Fujimoto M, Hirata K, Hirota T, Suzuki Y, Saito H, Matsumoto K, Akazawa A, Katsunuma T, Yoshihara S, Ebisawa M, Shibasaki M, Arinami T, Tamari M, Noguchi E. Large scale genotyping study for asthma in the Japanese population. *BMC Res Notes* 2: 54, 2009.
- (6) Suzuki Y, Hattori S, Mashimo Y, Funamizu M, Kohno Y, Okamoto Y, Hata A, Shimojo N. CD14 and IL4R gene polymorphisms modify the effect of day care attendance on serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol* 123: 1408-1411 e1401, 2009.
- (7) Undarmaa S, Mashimo Y, Hattori S, Shimojo N, Fujita K, Miyatake A, Doi S, Kohno Y, Okamoto Y, Hirota T, Tamari M, Hata A, Suzuki Y. Replication of genetic association studies in asthma and related phenotypes. *J Hum Genet* (e-pub) 2010.
- (8) 尾内善広「川崎病の感受性遺伝子研究」*医学のあゆみ* 2009; 230 (9): 609-615.
- (9) 尾内善広「ゲノム解析からみた罹患遺伝子、冠動脈関連遺伝子を考察する」*Vascular Medicine* 6, 7-14, 2010.
- (10) 寺井勝：川崎病の診断と治療指針。「血管疾患を診る・治す」新心臓病診療プラクティス 15 小室一成編. 文光堂 (印刷中)
- (11) 寺井勝：川崎病. 特集：小児の治療指針, 小児科診療 73 巻 増刊号：297 - 299.
- (12) 津野嘉伸、南 孝臣、比嘉明日美、津田祐子、坊岡美奈、泉 鉉吉、宮脇正和、渋谷昌一、武内 崇、鈴木啓之、吉川徳茂：頸部リンパ節腫脹のフォロー中に発熱と冠動脈変化を認め、川崎病不全型と考えられた 1 例 *Prog Med* 29: 1645-1649, 2009
- (13) 鈴木啓之：病因・溶連菌毒素説 pp34-35. *小児科臨床 ピクシス 9 川崎病のすべて* 総編集：五十嵐 隆 専門編集：石井正浩 中山書店 2009
2. 学会発表
- (1) Onouchi Y, Ozaki K, Suzuki H, Terai M, Suzuki Y, Hata A, Nakamura Y, Tanaka T. Association between a functional polymorphism of ITPKC gene and Kawasaki disease: a replication study. The American Society of Human Genetics 59th annual meeting. 2009.10, Hawaii
- (2) Association of the MMP9 gene with childhood allergic rhinitis. The American Society of Human Genetics 59th annual meeting. 2009. 10, Hawaii
- (3) 尾内善広、尾崎浩一、鈴木啓之、寺井勝、鈴木洋一、羽田明、中村祐輔、田中敏博「川崎病と ITPKC 遺伝子多型との相関」*日本人類遺伝学会* 2009. 9 東京
- (4) 尾内善広「川崎病感受性遺伝子の同定」第 37 回日本臨床免疫学会総会 (招待講演) 2009. 11. 13 東京
- (5) 尾内善広「Susceptibility genes for

- Kawasaki Disease」第 74 回日本循環器学会・学術集会 2010.3 京都
- (6) 鈴木啓之、渋谷昌一、武内 崇、吉川徳茂、末永智浩、尾内善広：ITPKC 遺伝子多型と川崎病の重症度の分析 第 45 回日本小児循環器学会 2009.7. 神戸
- (7) 鈴木啓之、寺井 勝、浜田洋通、本田隆文、末永智浩、武内 崇、渋谷昌一、吉川徳茂、尾内善広、鈴木洋一、羽田明：2 回の IVIG に不応の川崎病 17 例に対するシクロスポリン治療の検討. 第 29 回日本川崎病研究会 2009.10. 名古屋
- (8) 末永智浩、鈴木啓之、武内 崇、吉川徳茂、渋谷昌一：川崎病冠動脈病変(CAL)合併例の CAL 発症病日からの検討 第 29 回日本川崎病研究会 2009.10. 名古屋
- (9) 鈴木啓之：難治性川崎病に対するシクロスポリン治療. 第 34 回近畿川崎病研究会 2010.3. 大阪
- (10) 末永智浩、鈴木啓之、武内崇、吉川徳茂：発症初期に新型インフルエンザ抗原が検出された川崎病の 2 例. 第 34 回近畿川崎病研究会 2010.3. 大阪
- (11) 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 2009.2
- (12) 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 2009.2
- (13) 浜田洋通、本田隆文、寺井 勝、尾内善広、羽田明：川崎病に対するシクロスポリン治療；ITPKC 遺伝子 SNP と治療への反応 第 25 回関東川崎病研究会 200.11
- (14) MMP13 遺伝子と喘息発症との相関
真下陽一、佐藤正子、下条直樹、広田朝光、土居 悟、宮武昭彦、岡本美孝、河野陽一、玉利真由美、羽田 明、鈴木洋一 日本人類遺伝学会 2009.9 東京
- (15) MMP13 遺伝子と喘息発症との相関
鈴木洋一、真下陽一、佐藤正子、下条直樹、広田朝光、土居 悟、宮武 昭彦、岡本美孝、河野陽一、玉利真由美、羽田 明 日本アレルギー学会 2009.10 秋田
- 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

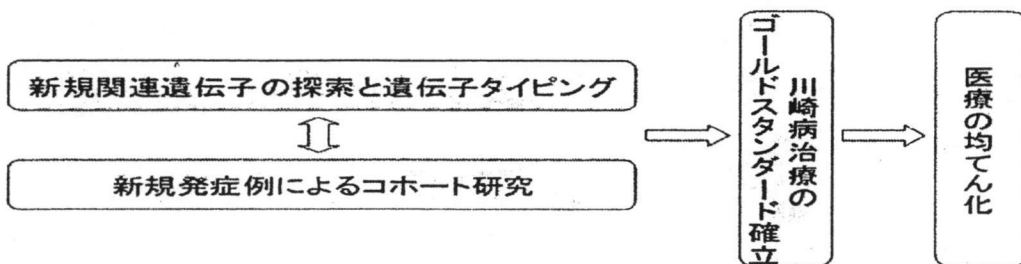
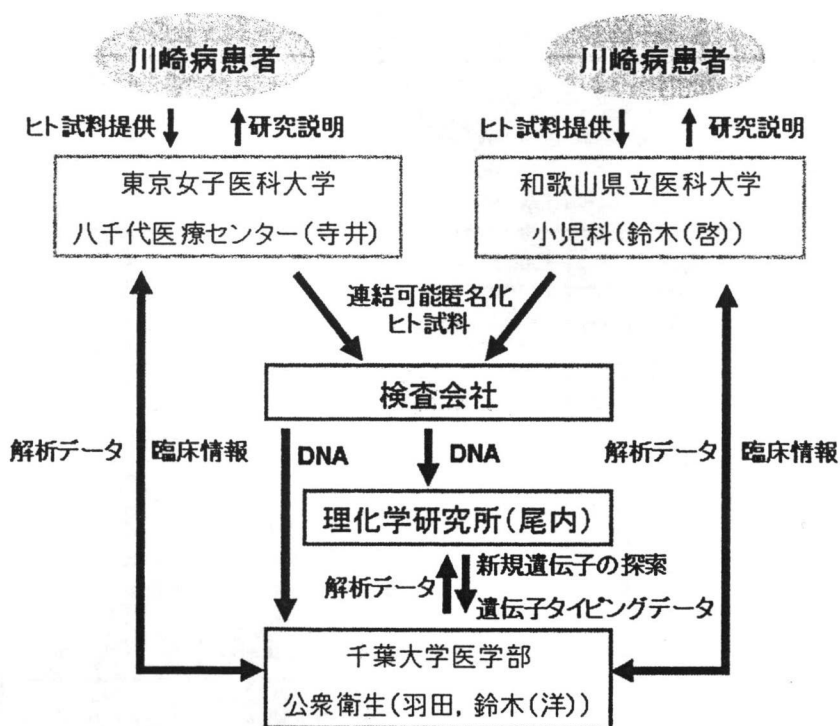


図 2 . ゲノムコホート研究



- (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）
- (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）

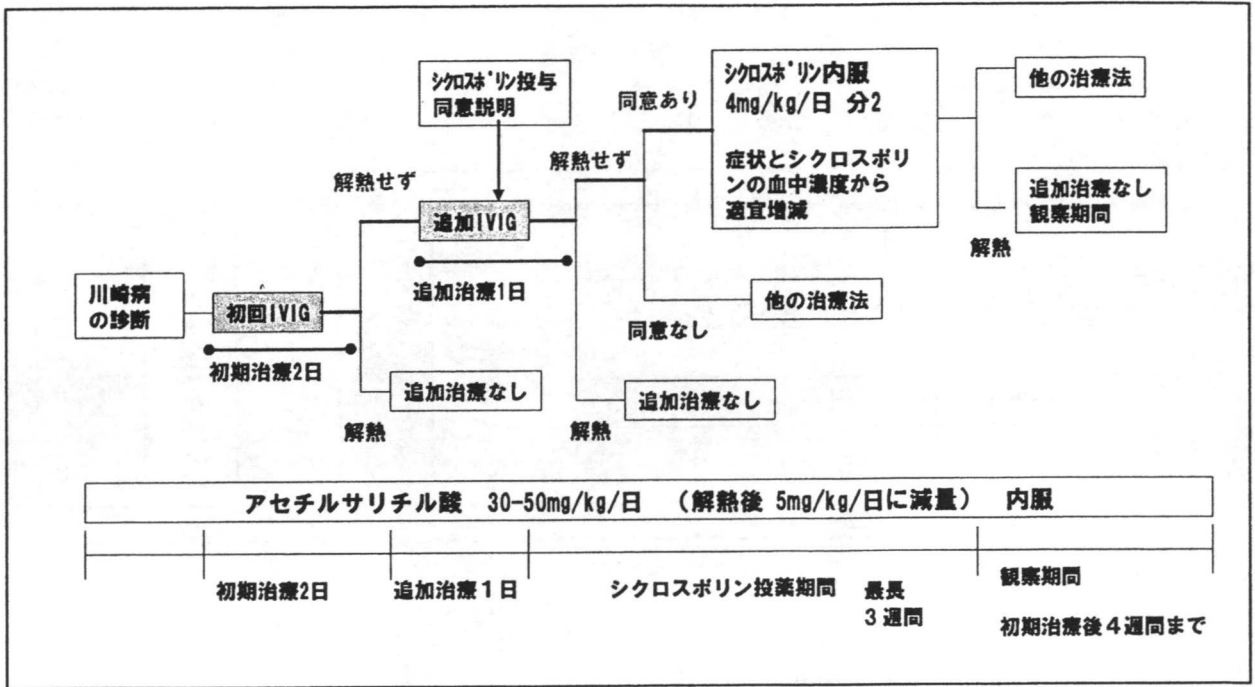


表1. 観察および検査項目

項 目	初期治療		シクロsporリン投与				後観察 期間
時 期	IVIG治療 前	初回 IV IG 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sporリン血中濃度 (投与前の濃度)				●	●	●	
シクロspor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

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 (rs28493229 G/C) と IVIG 抵抗性との関連についての解析を目的としている。本年度はゲノムワイド関連解析 (GWAS) において見いだされた川崎病の感受性遺伝子の候補について関連の確認、責任多型の絞り込み及び SNP 機能解析を進めた。また統一プロトコールにより急性期治療を受けた新規川崎病罹患例における治療効果と ITPKC 遺伝子多型との関連について検討を行った。

440 人の川崎病患者および 933 人の健常対照、55 万カ所の SNP につき行った GWAS については川崎病 470 人、対照 376 人（パネル 1）および川崎病 285 人、対照 568 人（パネル 2）での検討により、これまで川崎病の病因や病態との関連が知られていない 2 つの既知遺伝子領域（遺伝子 Y および遺伝子 Z）に優位な関連の再現性が確認できた。遺伝子 Y に関しては川崎病と相関を示す SNP の遺伝子型と不死化 B 細胞株内における遺伝子 Y 発現量との間に強い相関を認め、その発現量の変化を説明しうる機能的 SNP を遺伝子 Y の転写開始点より約 2kb 上流に見出した。遺伝子 Z に関しては遺伝子機能に影響を及ぼすことが報告されている選択的スプラッシングの起こる割合が川崎病と相関を示す SNP の遺伝子型と有意に相関することを見出した。

統一プロトコールにより治療を受けた新規川崎病症例 168 例の rs28493229 遺伝子型を検討した結果、患者全体では健常対照群に対し、C アレル頻度、C アレル保有率がともに有意に高く、2008 年に論文発表した内容の追試に成功した。またこれらは IVIG 有効群に対し IVIG 不応群により高い傾向が認められた。

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 遺伝子多型との関連を確認することである。

B 研究方法

[I] 新規川崎病感受性遺伝子の検索

① 候補遺伝子解析

罹患同胞対法により連鎖の傾向を示した 4 番染色体長腕(4q35)近傍の候補遺伝子解析により日本人および白人に共通して川崎病の罹患感受性と関連を示すことを見出していたカスパーゼ 3 (*CASP3*) 遺伝子上の SNP (rs72689236 G/A)につき、末梢血単核球内における *CASP3* の発現量と SNP の型との関連をアレル特異的転写物定量法(ASTQ 法)にて検討を行った。

② ゲノムワイド関連解析(GWAS)

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、GWAS を行った。有意な関連を示した SNP を上位 150 につき川崎病 470 人、対照 376 人 (パネル 1)、さらに川崎病 285 人、対照 568 人 (パネル 2) にて再現性の確認を行った。関連の確認が取れた遺伝子については定量 PCR 法、ルシフェラーゼアッセイなどと用い SNP の機能解析を行った。

[II] ITPKC 遺伝子の SNP と IVIG 抵抗性との関連

昨年度から収集された川崎病患者 DNA につき、rs28493229 の遺伝子型を決定、臨床情報に基づき、IVIG 抵抗性及び CAL 合併

リスクとの関連を解析した。

C 研究結果

[I]-①

昨年度実施した SNP 機能解析 (図 1) にて rs72689236 付近には NFATc2 が関与するエンハンサー活性があることが示唆されていた。そこで rs72689236 の遺伝子型がヘテロである 8 人の被験者についてそれぞれのアレル由来の *CASP3* mRNA の相対的な量を比較したところ、図 2 に示す様に感受性アレル(A)に由来する転写物が非感受性アレル(G)に対し約 30%程度少ないことが分かり、機能解析の結果が裏付けられた。

[I]-②

パネル 1 および 2 でともに有意な関連を示す 2 つの遺伝子領域 (遺伝子 Y, 遺伝子 Z) を発見した (表 1)。いずれの遺伝子も既知であるが川崎病の病因や病態との関連が調べられたことはないものであった。不死化 B 細胞株における発現を検討した結果、遺伝子 Y の発現量と SNP の遺伝子型との間に関連があることが分かった (図 3)。川崎病と関連し、強い連鎖不平衡にある SNP 群の中のひとつが周辺配列のもつエンハンサー活性に影響を及ぼすことをルシフェラーゼアッセイにより明らかにした (図 4)。一方遺伝子 Z についてはその機能に影響を及ぼすことが知られているスプライスバリエーションの出現頻度と、SNP の遺伝子型との間に関連があることが分かった (図 5)。

[II]統一プロトコールにより治療を受けた川崎病患者計 168 名における rs28493229 C アレルの頻度および C アレル保有率はそれぞれ 21.4%、38.7%であった。一方 2008 年に論文に報告した集団とは別の日本人対

照群（751 人）ではそれぞれ 15.5%, 29.3% であり、統計学的に有意な差を認めた（表 2）。解析の時点で治療効果等の情報を有していた 135 名のうち 102 名が一度目の IVIG に対し有効、33 名が不応と判断された（表 3）。C アレルの頻度および C アレル保有率はともに IVIG 不応群に高い傾向が認められたが、統計学的に有意とはならなかった（表 3）。遺伝子 Y および Z の SNP に関しては IVIG 抵抗性との関連はみられていない（データ非提示）。

D 考察

川崎病の回復期には一過性の T 細胞アナジーが観察されるといわれている。一方 NFATc2 による CASP3 の発現誘導と T 細胞アナジーとの関連についても報告があり、川崎病の病態と NFAT の活性化との関連が改めて推察される。また別の報告では CASP3 が NFATc2 を基質として分解するとされており、CASP3 は ITPKC 同様 Ca^{2+} /NFAT 経路のシグナル伝達の調節を担っており、SNP によるその機能の変化が川崎病の感受性に影響している可能性を示唆する。

GWAS にて同定された遺伝子 Y および Z は日本人集団における川崎病の感受性遺伝子であることは間違いないと思われる。これらが他人種でも当てはまるのか否かについて検討を予定している。遺伝子 Y についてはエンハンサー機能に関連する転写因子が未同定、遺伝子 Z の選択的スプライシングに SNP の及ぼす影響についてはそのメカニズムは不明であり、今後の課題である。GWAS の上位 150 以下の SNP についても再現性の確認作業を続けており、今後更に

新たな感受性遺伝子が見出されると考えている。ITPKC を含めた複数の感受性遺伝子多型間の相互作用の有無について検討の必要がある。

E 結論

新規川崎病感受性遺伝子の同定については順調に進んでいるといえる。ITPKC の遺伝子多型と川崎病重症化との関連については今後も症例を追加し検討する必要がある。

F 健康危険情報： 該当せず

G 研究発表：

1. 論文発表

1) Onouchi Y, Ozaki K, Buns JC, Shimizu C, Hamada H, Honda T, Terai M, Honda A, Takeuchi T, Shibuta S, Suenaga T, Suzuki H, Higashi K, Yasukawa K, Suzuki Y, Sasago K, Kemmotsu Y, Takatsuki S, Saji T, Yoshikawa T, Nagai T, Hamamoto K, Kishi F, Ouchi K, Sato Y, Newburger JW, Baker AL, Shulman ST, Rowley AH, Yashiro M, Nakamura Y, Wakui K, Fukushima Y, Fujino A, Tsunoda T, Kawasaki T, Hata A, Nakamura Y, Tanaka T. Common variants in *CASP3* confer susceptibility to Kawasaki disease. Hum Mol Genet. May10 (Epub ahead of print) , 2010

2) Onouchi Y. Molecular Genetics of Kawasaki Disease. Pediatric Res. 2009; 65 (5): 46R-53R.

3) 尾内善広「川崎病の感受性遺伝子研究」医学のあゆみ 2009; 230 (9): 609-615.

- 4) 尾内善広「ゲノム解析からみた罹患遺伝子、冠動脈関連遺伝子を考察する」
Vascular Medicine 2010; 6(1): 7-14.
2. 学会発表
- 1) Onouchi Y, Ozaki K, Suzuki H, Terai M, Suzuki Y, Hata A, Nakamura Y, Tanaka T. Association between a functional polymorphism of ITPKC gene and Kawasaki disease: a replication study. The American Society of Human Genetics 59th annual meeting. 2009.10. 21 Hawaii (ポスター発表)
- 2) 尾内善広、尾崎浩一、鈴木啓之、寺井勝、鈴木洋一、羽田明、中村祐輔、田中敏博「川崎病と ITPKC 遺伝子多型との相関」
日本人類遺伝学会 2009. 9. 26 東京 (口頭発表)
- 3) 尾内善広「川崎病感受性遺伝子の同定」
第 37 回日本臨床免疫学会総会 (招待講演)
2009. 11. 13 東京
- 4) 尾内善広「Susceptibility genes for Kawasaki Disease」第 74 回日本循環器学会・学術集会 (招待講演) 2010. 3. 6 京都
- 5) 鈴木啓之、寺井 勝、浜田洋通、本田隆文、末永智浩、武内 崇、渋谷昌一、吉川徳茂、尾内善広、鈴木洋一、羽田明：2 回の IVIG に不応の川崎病 17 例に対するシクロスポリン治療の検討。第 29 回日本川崎病研究会 2009. 10. 名古屋
- 6) 浜田洋通、本田隆文、寺井 勝、尾内善広、羽田明：川崎病に対するシクロスポリン治療；ITPKC 遺伝子 SNP と治療への反応 第 25 回関東川崎病研究会 2009. 11
- H 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。) : 該当せず

[illegible]

Figure 1 is a dot plot showing the ratio of A-type to G-type for genome DNA and cDNA. The y-axis is labeled 'G型に対するA型の割合' (Ratio of A-type to G-type) and ranges from 0 to 1.0. The x-axis has two categories: 'ゲノム DNA' (Genome DNA) and 'cDNA'. For genome DNA, there are 10 data points clustered around 1.0. For cDNA, there are 5 data points clustered around 0.7. A horizontal bracket above the cDNA points indicates a p-value of $P = 3.0 \times 10^{-7}$.

Category	Ratio (A-type/G-type)
ゲノム DNA	1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00
cDNA	0.70, 0.70, 0.70, 0.70, 0.70

17