

図 3. 臨床研究プロトコール（共同研究プロトコール）

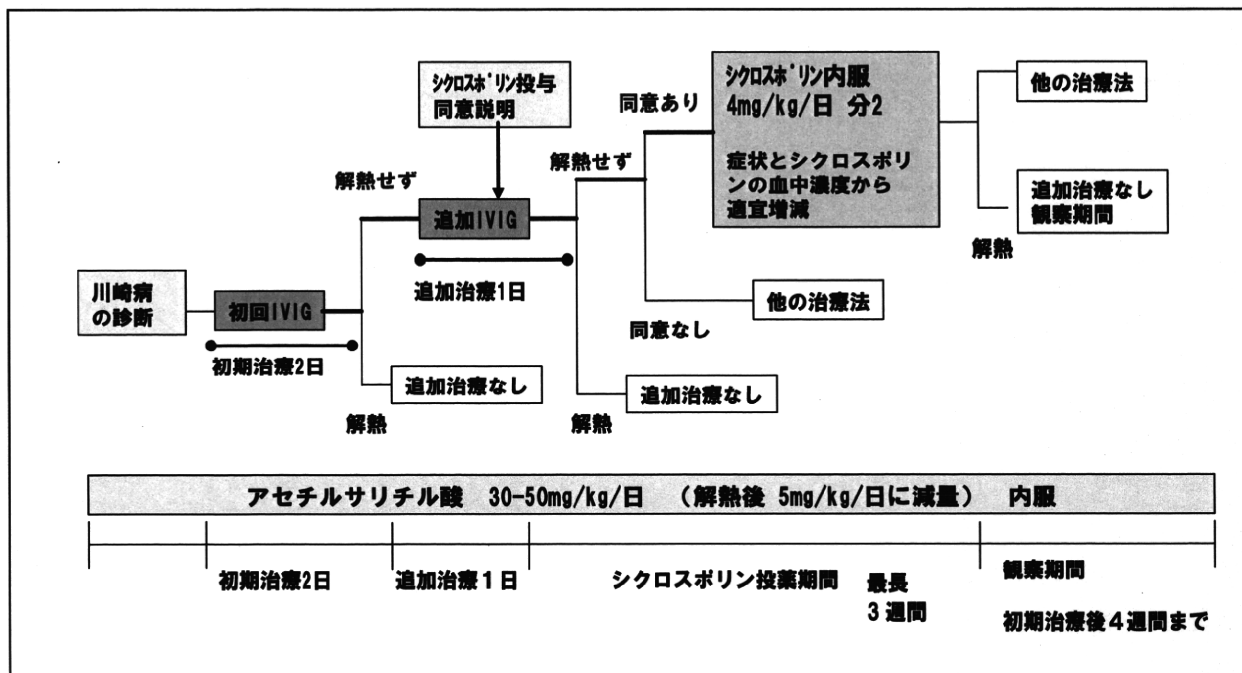


表1. 観察および検査項目

項 目	初期治療		シクロスポリン投与				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				(●)	(●)	(●)	

II. 分担研究報告

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

川崎病の遺伝背景の解明を目指し、ゲノムワイド関連解析(GWAS)による川崎病の新規感受性遺伝子の同定を行った。また遺伝子型に基づく川崎病重症化予測に結びつけるべく、罹患感受性遺伝子 ITPKC および CASP3 の機能的 SNP と免疫グロブリン治療(IVIG)抵抗性ならびに冠動脈病変(CAL)との関連についての検討を行った。

GWAS では ITPKC, CASP3 の既報遺伝子領域に加え、ゲノムワイド解析の有意水準を満たす 4 つの新たな関連領域が確認できた。

遺伝子多型と IVIG 抵抗性との関連についての検討では ITPKC と CASP3 両遺伝子のリスクアレルを一つ以上有すると IVIG 抵抗性リスクが有意に高まることが示された(オッズ比 2.72, $P=0.000062$)。同様の関連の傾向が CAL のリスクについても認められた(オッズ比 2.94, $P=0.0047$)。

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おり起こると考えられる。われわれはこれまでに罹患同胞対を用いた連鎖解析と連鎖不平衡マッピングの手法を用い、川崎病の罹患感受性遺伝子 ITPKC と CASP3 を同定してきた。しかしながらこれらの二つの遺伝子の SNP により説明されるのは川崎病の遺伝背景の一部に過ぎない。本分担研究では川崎病の遺伝背景の全貌解明に向けゲノムワイド関連解析によるさらなる感受性遺伝子の検索を実施する。

また ITPKC の SNP について認められた川崎病に罹患した際の冠動脈病変(CAL)や免疫グロブリン (IVIG) 治療に対する抵

抗性との関連の傾向を統一プロトコールで治療された患者の IVIG 応答性と照らし合わせることによって確認すること、同時に ITPKC とともに NFAT 経路の制御因子として機能している可能性のある CASP3 の SNP についても重症度との関連を探ることを目的とする。

B 研究方法

[I] 新規川崎病感受性遺伝子の検索ーゲノムワイド関連解析(GWAS)ー

川崎病 438 人、対照 3397 人について、GWAS の再解析を行った。関連を検討した 463,883 SNP のうち関連の優位性の上位 100 SNP につき、独立した川崎病 470 人、対照 378 人(パネル 1)、さらに川崎病 285

人, 対照 569 人 (パネル 2) にて再現性の確認を行った. 有意な関連の再現性が確認された複数のローカスにて川崎病発症予測モデルの作成を試みた. まず川崎病 1341 人, 対照 931 人を用い各ローカスにおける最も適合度の高い遺伝モデル (相加的, 優性, 劣勢) をロジスティック回帰分析により検討. 相加的モデルではリスクアレルの数により 0, 1, 2 の, 優性もしくは劣勢モデルでは 0, 1 のスコアを遺伝子型に基づき決定, 個人個人のスコアの合計 (遺伝的リスクスコア) を算出. 患者群および対照群におけるリスクスコア別保有者割合を比較した. 続いて各リスクスコア別の川崎病罹患リスクを検討した.

II] ITPKC および CASP3 の SNP と IVIG 抵抗性との関連

2008 年以前に千葉大学および和歌山医科大学にて治療を受けた川崎病患者 204 人 (1g/kg x2, 134 人, 2g/kg x1, 70 人) および本研究班初年度より統一プロトコールによる治療を受けた 342 人につき IVIG 抵抗性に対する両遺伝子の機能的感受性 SNP (ITPKC: rs28493229 G/C, CASP3: rs113420705* G/A) 単独さらには SNP の遺伝子型の様々なパターンでの組み合わせの効果について検討を行った.

*: 論文掲載時点では dbSNP データベースに rs72689236 と登録されていたがその後変更された.

C 研究結果

[I]GWAS で検定を行った SNP の数 (463,883) から保守的に算出される関連解析の有意差の閾値は $P < 1 \times 10^{-7}$ となり, これを満たす SNP は 2 カ所のみであった. うち一カ所(rsxxxxxx)についてはパネル 1, 2 を

通じ再現性が確認され, 全てのサンプルについて実施したメタ解析における P 値は 2.0×10^{-21} と非常に低いものとなった. もう一方の SNP については関連の再現が確認出来なかった (データ非表示). 関連の上位 100 カ所の SNP のうち 41 は他の SNP と $r^2 > 0.8$ の連鎖不平衡にあることから多重検定の回数を 59 とみなし, パネル 1 および 2 での関連を有意と判断する閾値を $P < 8.5 \times 10^{-4}$ と設定した. 全てのサンプルのデータをメタ解析した結果, $P < 1 \times 10^{-7}$ の有意水準を満たす関連を示した SNP は合計 6 カ所であった (表 1). これらのうち 2 カ所はそれぞれ ITPKC および CASP3 の近傍の領域にあり, 先に報告した機能的感受性多型と強い連鎖不平衡にあった (図 1 および 2). 遺伝モデルの検討においては全 6 ローカスで相加的モデルが最も適合性が高いと判断された (表 2). また 2 ローカス間の交互作用はすべての組み合わせにおいて確認されなかった (図 3). 最適モデルが全ローカスで相加的モデルであったことから 6 ローカスのリスクアレル数の合計を遺伝的リスクスコアとし, 川崎病, 対照における頻度を比較することとした. 川崎病群と対照群におけるリスクアレル数の合計の頻度は図 4 A,B に示すように正規分布を示し, その平均および標準偏差は川崎病群 (7.02 ± 1.62), 対照群 (6.07 ± 1.67) であり, その差は統計学的に有意であった. 各リスクアレル数保有者群 (1-2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10-12) の川崎病発症リスクを当該群を除いた残りを reference とした際のオッズ比で示すと指数関数的な増加傾向が見られ (図 5), リスクアレル数 10-12 の最も高リスク群のオッズ比は 3.55 であった. 人数が少ないため信頼区間は大

きいが、リスクアレル数 11 の集団単独ではオッズ比 10.3 であった（データ非表示）。予測精度を評価する為作成した ROC 曲線の AUC 面積は 0.654 であった（図 6）。

4 カ所の新規川崎病感受性 SNP の他人種における関連を調べるため白人 248 組、非白人 255 組からなる合計 503 組の米国人川崎病患儿-両親の検体を用いた伝達不平衡試験を実施した。遺伝子 X に関しては白人、非白人ともに日本人同様 rsxxxxxx の G アレルが川崎病と関連する傾向を示し、両者を併せた解析で統計学的有意差（オッズ比 1.35, $P=0.017$ ）を認めた（表 3）。遺伝子 Y の rsyyyyyyy の C アレルはアジア人集団においてのみ日本人同様の関連を示し、白人、ヒスパニックその他の人種においては関連の傾向は確認されなかった（表 4）。

【II】研究班開始前の 204 人の検討において、1g/kg×2 群、2g/kg×1 群いずれにおいても rs28493229 C アレルアレル頻度が高い傾向を示し、これら 2 群を併せた解析において統計学的に有意となった（表 5）。rs113420705 A アレルは統計学的に有意ではないものの 2 群を併せた解析で IVIG 抵抗性と関連する傾向が見られた。統一プロトコールにより治療を受け、前向きに収集した 342 人においては 2 回目の IVIG に対する不応のリスクに rs113420705 A アレルが $P=0.032$ （優性遺伝モデル）の関連を示した（表 5）。続いてこれら 2 つの SNP の遺伝子型の組み合わせの効果を各 SNP の優性・劣勢遺伝モデルを含む 12 通りのモデルで検討した。研究班開始前に収集された 204 人についてそれぞれのモデルで IVIG 抵抗性との関連を調べたところ、両 SNP に少なくとも一つ感受性アレルを持つ群をハ

イルリスク群とみなすモデルが最も有意な関連（オッズ比 2.78, $P=0.0021$ ）を示した（図 7）。この組み合わせは統一プロトコール群 342 人においても 2 回目の IVIG 不応のリスクと有意な関連を示した（オッズ比 2.64, $P=0.011$; 表 6）。研究班開始前および統一プロトコール症例を併せた 546 例の解析ではこの 2 ローカスモデルと IVIG 抵抗性との関連はさらに強い有意性をもって示された（オッズ比 2.72, $P=0.000062$; 表 6）。最後に CAL 合併のリスクと rs28493229, rs113420705 との関連を検討したところ、やはり 2 ローカスを組み合わせたモデルで各 SNP の優性遺伝モデルを上回る高いオッズ比が有意性をもって示された（表 7）。

D 考察

川崎病発症の契機となる感染要因はこれまで様々なアプローチで解明が試みられたが未だ明らかではない。このような背景から川崎病の謎を解く糸口は川崎病の病因において感染要因と両輪をなす遺伝的要因を解明することにあると考え、これまでゲノムワイドアプローチによる川崎病の感受性遺伝子同定に取り組んできた。ITPKC および昨年度本研究班より報告した CASP3 遺伝子に加え、新たに 4 つの遺伝子領域の SNP と川崎病の罹患感受性との関連が見出された。遺伝子 A, B, X, Y はいずれも免疫系組織での発現が高く、また特に獲得免疫との関わりが深いため、同機能の川崎病病態との関連が示唆される。

ITPKC と CASP3 はともに川崎病の罹患感受性への関連遺伝子として同定されたが、今回の我々の検討により川崎病の重症化とも関連する可能性が高いことが示された。

過去の川崎病全国調査の結果から川崎病の致命率が同胞例や再発例で約3倍高いことが報告されており、川崎病への罹患感受性と罹患した際の重症化には一部共通する遺伝的背景があるものと考えられる。川崎病罹患時のIVIGに対する応答性を予測することはCALの予防の観点から非常に重要な課題であり、患者の性別、治療開始病日やALT、ビリルビンなどの検査データをスコア化しその合計を指標とするIVIG不応予測システムが開発されている。しかしながら重症化に関連する遺伝子多型はこれまでのところ前向き研究を含めて再現性を確かめられたものはなく、今回のITPKCおよびCASP3のSNPが初めてである。今後これら2つのSNPの現行のリスクスコアのパラメータとの関連や、追加のパラメータとしての有用性について検討していく予定である。

本研究の主目的の一つはIVIG不応例に対するシクロスポリンの安全性や有効性の検討であるが、今回Ca²⁺/NFAT経路の負の制御因子であるもしくはその可能性が高いITPKCとCASP3の機能的SNPがIVIG不応リスクと関連を示したことは、同経路の阻害剤であるシクロスポリンのIVIG不応例への使用の妥当性を強く示唆すると思われる。

遺伝子A, B, XおよびY近傍のSNPはその関連の再現性から日本人集団における川崎病の新規感受性遺伝子多型であることは間違いないと思われるが他人種での検討においては必ずしも有意な関連を示さなかった。理由として伝達不平衡試験特有の検出力の問題や人種間の連鎖不平衡のパターンの違いなどが考えられ、他人種における各

ローカスの関与の有無についての結論はさらに多数の検体を用いた詳細な検討の後なされるべきである。

川崎病に関する遺伝的背景には罹患感受性や罹患の際の重症化に関連する複数の要因が存在すると考えられる。今回、重症化に関連する遺伝子多型が確かに存在することが示され、遺伝子型に基づくオーダーメイド医療に道が拓けたと言える。更に多数の重症化関連遺伝子を探索する努力を続ける必要がある。

E 結論

ゲノムワイド関連解析により新規川崎病感受性遺伝子多型を4箇所同定した。

ITPKCおよびCASP3の遺伝子多型とIVIG不応およびCAL合併リスクとの間に関連を認めた。

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. 2010 19 (14): 2898-2906.
2. Onouchi Y, Suzuki Y, Suzuki H, Terai M, Yasukawa K, Hamada H, Suenaga T, Honda T, Honda A, Kobayashi H, Takeuchi T, Yoshikawa N, Sato J, Shibuta S, Miyawaki M, Oishi K, Yamaga H, Aoyagi N, Iwahashi S, Miyashita R, Murata Y, Ebata R, Higashi K, Ozaki K, Sasago K, Tanaka T, Hata A. *ITPKC* and *CASP3* polymorphisms and risks for IVIG unresponsiveness and coronary artery lesion formation in Kawasaki disease. Pharmacogenomics J, submitted
 3. Suzuki H, Terai M, Hamada H, Honda T, Suenaga T, Takeuchi T, Yoshikawa N, Shibuta S, Miyawaki M, Oishi K, Yamaga H, Aoyagi N, Iwahashi S, Miyashita R, Onouchi Y, Sasago K, Suzuki Y, Hata A, Cyclosporin A treatment for refractory Kawasaki disease -A pilot study of 28 patients with Kawasaki disease resistant to both initial and additional IVIG, Pediat Infect Dis J, in press.
 4. Onouchi Y and Hata A, Responsible genetic factors for vasculitis in Kawasaki disease, Vasculitis/ Book 1, InTech, 2011, Croatia, In press
 5. Shimizu C, Matsubara T, Onouchi Y, Jain S, Sun S, Nievergelt CM, Shike H, Brophy VH, Takegawa T, Furukawa S, Akagi T, Newburger JW, Baker AL, Burgner D, Hibberd ML, Davila S, Levin M, Mamtani M, He W, Ahuja SK, Burns JC, Matrix metalloproteinase haplotypes associated with coronary artery aneurysm formation in patients with Kawasaki disease, J Hum Genet, 55, 779-784, 2010
 6. Mamtani M, Matsubara T, Shimizu C, Furukawa S, Akagi T, Onouchi Y, Hata A, Fujino A, He W, Ahuja SK, Burns JC, Association of CCR2-CCR5 haplotypes and CCL3L1 copy number with Kawasaki Disease, coronary artery lesions, and IVIG responses in Japanese children. PloS One, 5, e11458, 2010
 7. 尾内善広, 川崎病の罹患感受性遺伝子の同定, 日本臨床免疫学会雑誌, 33, 73-80, 2010
 8. 尾内善広, 川崎病のゲノム解析からみた罹患関連遺伝子, Annual Review 循環器 2011, 54-59
2. 学会発表
1. Onouchi Y, Ozaki K, Burns JC, Shimizu C, Terai M, Suzuki H, Yasukawa K, Suzuki Y, Sasago K, 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 and Tanaka T. A functional polymorphism in CASP3 confers susceptibility to Kawasaki disease. The American Society of Human Genetics 60th annual meeting. 2010.11. 4 Washington DC (ポスター発表)
2. Onouchi Y, Identification of Susceptibility Genes of Kawasaki Disease, International forum of child Intractable diseases, 2010
 3. Hamada H, Suzuki H, Onouchi Y, Abe J, Suzuki Y, Terai M, Hata A, Personalized treatment based on genetic polymorphism in patients with Kawasaki disease, Periatric Cardiology and Cardiac Surgery, 26, s157, 2010
 4. 尾内善広 「川崎病感受性遺伝子の同定」第 37 回日本小児臨床薬理学会 2010 11 2 東京
 5. 尾内善広 「」国際難病フォーラム
 6. 尾内善広, 尾崎浩一, 角田達彦, 羽田明, 中村祐輔, 田中敏博「川崎病罹患感受性と相関する CASP3 遺伝子多型の同定」日本人類遺伝学会 2010.10.28 大宮 (口頭発表)
 7. 尾内善広, 寺井 勝, 鈴木啓之, 佐地勉, 安川久美, 濱本邦洋, 中村好一, 羽田 明「川崎病罹患感受性と相関する CASP3 遺伝子多型の同定」第 30 回日本川崎病学会 2010.10.10 京都
 8. 鈴木啓之, 寺井 勝, 濱田洋通, 本田隆文, 末永智浩, 武内 崇, 吉川徳重, 尾内善広, 鈴木洋一, 羽田 明. 「IVIG 不応例に対する治療プロトコール～シクロスポリン A 療法～」第 30 回日本川崎病学会 2010.10.10 京都 (指定口演)
 9. 濱田洋通, 寺井 勝, 阿部 淳, 鈴木啓之, 尾内善広, 本田隆文, 末永智浩, 武内 崇, 渋谷昌一, 吉川徳重, 鈴木洋一, 羽田 明. 「サイトカインプロファイルからみた免疫グロブリン不応の川崎病に対するシクロスポリン治療の効果」第 30 回日本川崎病学会 2010.10.10 京都 (口頭発表)
 10. 鈴木啓之, 寺井 勝, 尾内善広, 濱田洋通, 本田隆文, 末永智浩, 武内 崇, 吉川徳重, 鈴木洋一, 羽田 明. 「川崎病重症度と ITPKC 遺伝子多型との関連性の分析」第 30 回日本川崎病学会 2010.10.10 京都 (ポスター発表)
- H 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む.) : 該当せず

表 1. 川崎病のゲノムワイド関連解析のサマリー

SNP	Chr	Position ^a	Locus	risk allele	RAF		P
					KD	controls	
rs755535	4	185905369	MLF1IP - ACSL1 (CASP3)	A	0.45	0.38	5.4E-05
					0.43	0.36	2.6E-03
					0.43	0.37	0.031
					-	-	3.0E-04
					-	-	5.4E-08
rsxxxxxx	-	-	X	G	0.83	0.72	8.0E-12
					0.81	0.69	6.7E-08
					0.80	0.71	1.8E-04
					-	-	4.8E-11
					-	-	2.0E-21
rsaaaaaaa	-	-	A	C	0.52	0.44	1.5E-05
					0.51	0.45	0.015
					0.53	0.41	3.7E-06
					-	-	2.7E-07
					-	-	1.9E-11
rsbbbbbb	-	-	B	T	0.81	0.75	9.5E-06
					0.80	0.72	9.5E-05
					0.77	0.71	0.012
					-	-	4.5E-06
					-	-	1.7E-10
rs2233152	19	45972856	SNRPA - MIA (ITPKC)	A	0.22	0.16	8.0E-07
					0.21	0.14	3.5E-04
					0.19	0.15	2.8E-02
					-	-	4.2E-05
					-	-	1.5E-10
rsyyyyyy	-	-	Y	C	0.74	0.67	6.2E-05
					0.73	0.67	5.9E-03
					0.74	0.69	2.8E-02
					-	-	4.6E-04
					-	-	9.5E-08

a: SNP positions are derived from NCBI human genome reference sequence Build 36.3.

b: 438 KD and 3397 controls

c: 470 KD and 378 controls

d: 285 KD and 569 controls

e: Meta analyses with Cochrane Mantel Haenszel method

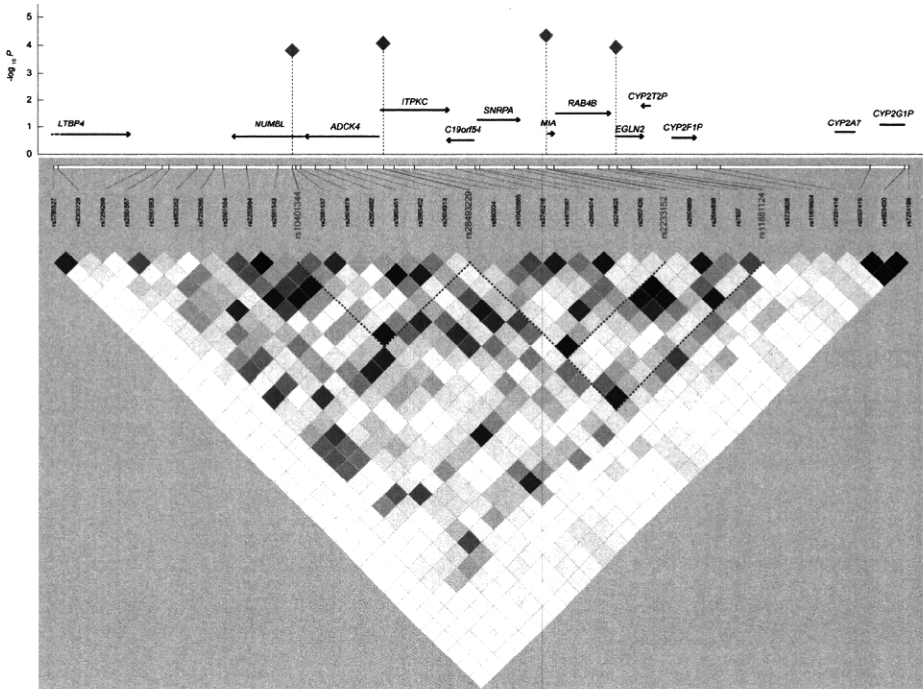


図1 ITPKC 遺伝子近傍の tagSNP と川崎病との関連

rs28493229 (赤) と GWAS で検討された SNP のうち rs28493229 と連鎖不平衡にあるもの (青) の replication panel1 および 2 のサンプルにおける川崎病との関連を trend test の P 値の $-\log$ で示す。

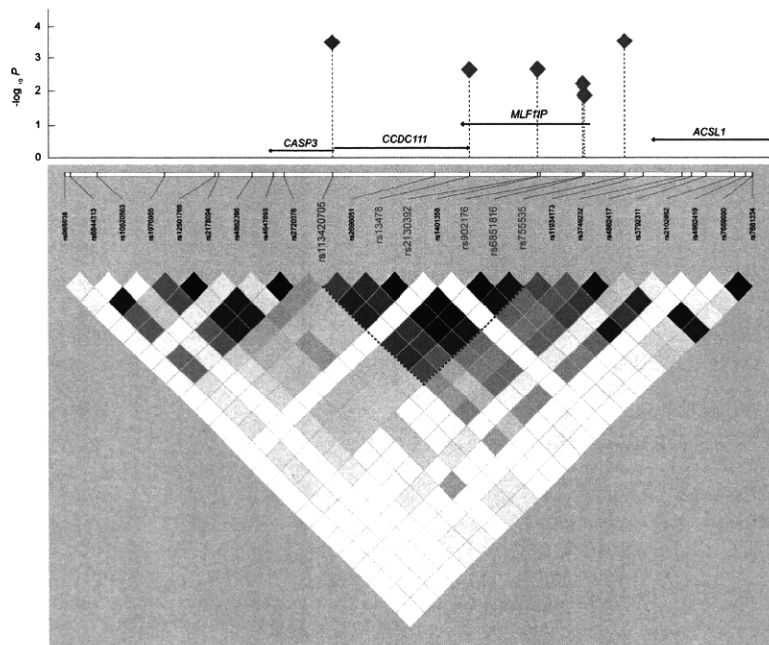


図2 CASP3 遺伝子近傍の tagSNP と川崎病との関連

rs113420705 (赤) と GWAS で検討された SNP のうち rs113420705 と連鎖不平衡にあるもの (青) の replication panel1 および 2 のサンプルにおける川崎病との関連を trend test の P 値の $-\log$ で示す。

表2川崎病の罹患感受性と関連する6つのSNPに関する遺伝形式の検討

SNP		相加的モデル	優性モデル	劣勢モデル
rs113420705	OR (95% CI)	1.40 (1.24 - 1.58)	1.49 (1.25 - 1.77)	1.70 (1.35 - 2.16)
CASP3	P	4.2E-08	7.9E-06	7.8E-06
rsxxxxx	OR (95% CI)	1.78 (1.55 - 2.05)	2.61 (1.80 - 3.78)	1.91 (1.61 - 1.15)
Gene X	P	1.4E-15	4.2E-07	1.3E-13
rsaaaaaa	OR (95% CI)	1.42 (1.27 - 1.61)	1.62 (1.34 - 1.95)	1.60 (1.30 - 1.96)
Gene A	P	7.0E-09	4.2E-07	1.0E-05
rsbbbbbb	OR (95% CI)	1.57 (1.37 - 1.80)	2.37 (1.66 - 3.38)	1.62 (1.37 - 1.93)
Gene B	P	1.9E-10	2.3E-06	2.5E-08
rs28493229	OR (95% CI)	1.58 (1.34 - 1.86)	1.57 (1.32 - 1.88)	3.72 (1.74 - 6.14)
ITPKC	P	2.9E-08	7.20E-07	0.00022
rszzzzzz	OR (95% CI)	1.29 (1.13 - 1.47)	1.52 (1.13 - 2.05)	1.34 (1.13 - 1.59)
Gene Z	P	0.00012	0.0053	0.00063

A

$$y = \beta_0 + \beta_1\chi_1 + \beta_2\chi_2 + \beta_3(\chi_1 \cdot \chi_2)$$

B

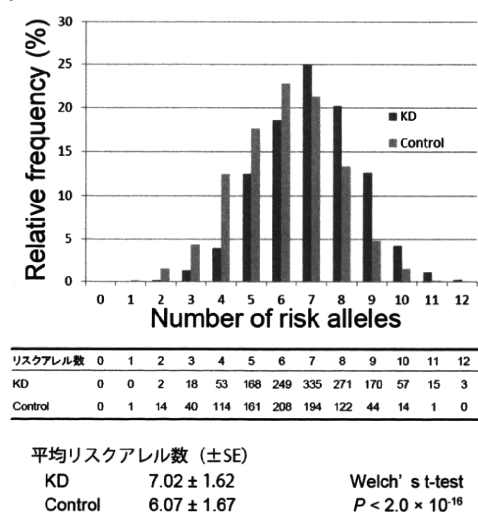
SNP1 (χ_1)	SNP2 (χ_2)	交互作用項のオッズ比 (95% 信頼限界)	モデル間 (交互作用有り/なし) ANOVAのP値
gene X	ITPKC	0.77 (0.58 - 1.02)	0.073
	CASP3	1.07 (0.87 - 1.31)	0.52
	gene A	1.91 (0.89 - 1.34)	0.41
	gene B	1.20 (0.95 - 1.53)	0.13
	gene Z	0.93 (0.74 - 1.16)	0.50
ITPKC	CASP3	1.06 (0.84 - 1.34)	0.60
	gene A	1.00 (0.80 - 1.26)	0.98
	gene B	0.87 (0.66 - 1.13)	0.29
	gene Z	0.95 (0.74 - 1.22)	0.67
CASP3	gene A	1.07 (0.90 - 1.27)	0.45
	gene B	1.12 (0.92 - 1.37)	0.27
	gene Z	0.99 (0.82 - 1.20)	0.92
gene A	gene B	1.01 (0.82 - 1.23)	0.95
	gene Z	0.97 (0.80 - 1.16)	0.72
gene B	gene Z	0.91 (0.73 - 1.13)	0.39

図3 2ローカス間の交互作用の検討

A 交互作用項ありのロジスティック回帰モデル. 独立変数 χ_1, χ_2 はSNP1, SNP2 のリスクアレル数 (0, 1, 2), 従属変数 y は罹患/非罹患の確率のオッズ.

B 交互作用項のオッズ比(e^{β_3})と95%信頼限界および交互作用あり/なしのモデル間ANOVAの結果.

A



B

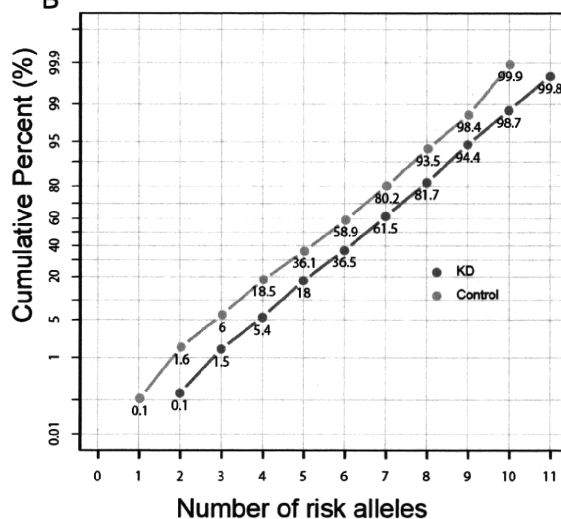


図4 川崎病の罹患感受性と関連する6つのSNPの合計リスクアレル数の相対度数(A上)と度数分布(A下)および正規確率プロット (B).

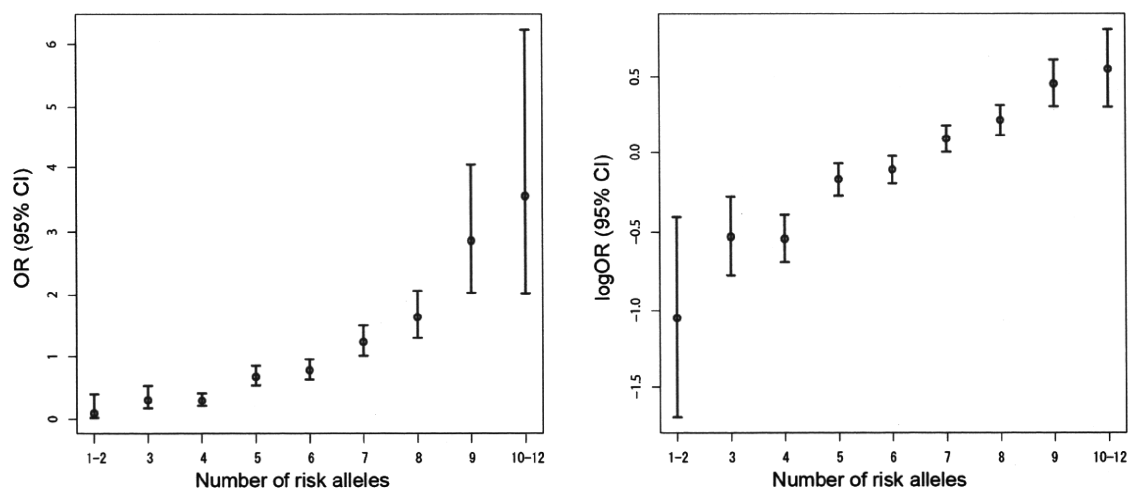


図5川崎病の罹患感受性に関連する6つのSNPの合計リスクアレル数とオッズ比（左）ならびにオッズ比の対数（右）との関係。

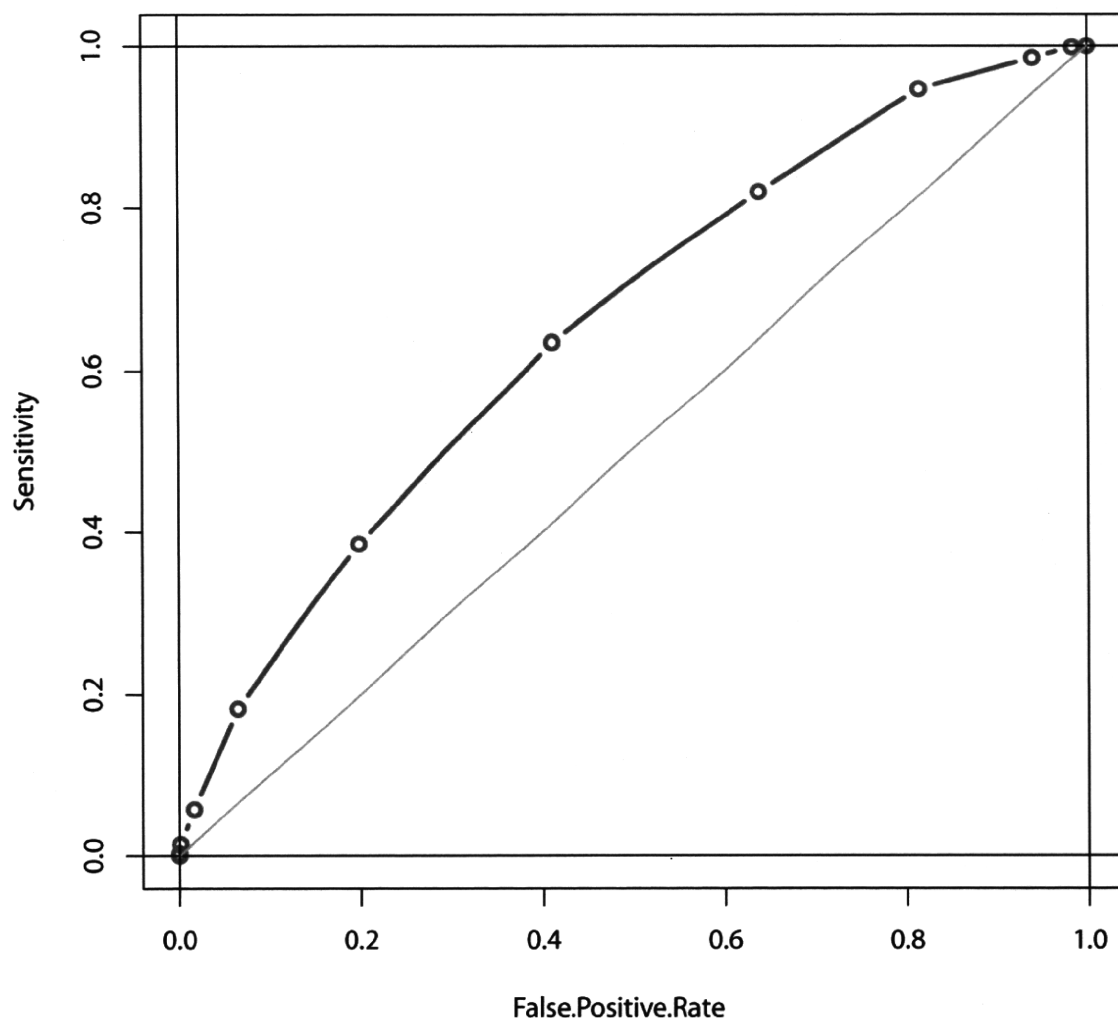


図6川崎病の罹患感受性に関連する6つのSNPの合計リスクアレル数に基づく発症予測の Receiver Operating Characteristic (ROC) カーブ。Area Under Curve (AUC)面積は0.654

表3 米国人におけるrsxxxxxxと川崎病との関連

Sub population	N	Overtransmitted allele	T /U	OR	95% CI	P
Caucasian	248	G	75:60	1.25	0.89 - 1.76	0.20
non-Caucasian	255	G	70:47	1.49	1.03 - 2.16	0.033
Asian	72	G	24:16	1.50	0.80-2.82	0.21
Hsipanic	94	G	21:12	1.75	0.86 - 3.56	0.12
others ^a	89	G	25:19	1.32	0.72 - 2.39	0.37
combined	503	G	144:107	1.35 ^c	1.05 - 1.74 ^c	0.017 ^b

T / U, transmitted / untransmitted; OR, odds ratio; CI, confidence interval

a: Mixed (n=64), African American (n=8), American Indian / Alaska Native / Pacific Islander (n=3), and no info (n=14)

b: Mantel Haenszel method

表4. 米国人におけるrsyyyyyyと川崎病との関連

Sub population	N	Overtransmitted allele	T /U	OR	95% CI	P
Caucasian	245	T	57:55	1.04	0.72 - 1.50	0.20
non-Caucasian	248	C	117:89	1.31	1.00 - 1.73	0.051
Asian	68	C	41:23	1.78	1.07 - 2.97	0.024
Hsipanic	93	C	48:40	1.20	0.79 - 1.83	0.40
others ^a	87	C	28:26	1.08	0.63 - 1.84	0.79
combined	493	C	172:146	1.18 ^c	0.94 - 1.47 ^c	0.15 ^b

T / U, transmitted / untransmitted; OR, odds ratio; CI, confidence interval

a: Mixed (n=63), African American (n=8), American Indian / Alaska Native / Pacific Islander (n=3), and no info (n=13)

b: Mantel Haenszel method

表5 rs28493229 と rs113420705 の IMG 抵抗性との関連

	rs28493229						rs113420705					
	allelic			dominant			allelic			dominant		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
Cohort 1												
1g/kg x 2	1.57 ^a	0.84 - 2.93 ^a	0.16 ^a	1.96 ^a	0.90 - 4.27 ^a	0.090 ^a	1.15 ^a	0.65 - 2.04 ^a	0.64 ^a	1.22 ^a	0.55 - 2.70 ^a	0.63 ^a
	2.65 ^a	1.13 - 6.19 ^a	0.025 ^a	2.39 ^a	0.88 - 6.52 ^a	0.088 ^a	1.60 ^a	0.76 - 3.30 ^a	0.20 ^a	2.91 ^a	0.89 - 9.53 ^a	0.077 ^a
Combined	1.84 ^b	1.13 - 2.98 ^b	0.014 ^b	2.03 ^b	1.11 - 3.73 ^b	0.022 ^b	1.33 ^b	0.86 - 2.08 ^b	0.20 ^b	1.62 ^b	0.84 - 3.13 ^b	0.15 ^b
Cohort 2												
1st IMG non-responder ^c	1.26 ^a	0.82 - 1.86 ^a	0.31 ^a	1.15 ^a	0.71 - 1.85 ^a	0.57 ^a	1.04 ^a	0.74 - 1.46 ^a	0.83 ^a	1.12 ^a	0.68 - 1.85 ^a	0.65 ^a
2nd IMG non-responder ^d	1.31 ^a	0.70 - 2.44 ^a	0.40 ^a	1.46 ^a	0.70 - 3.03 ^a	0.32 ^a	1.57 ^a	0.92 - 2.66 ^a	0.095 ^a	2.93 ^a	1.09 - 7.83 ^a	0.032 ^a

Abbreviations: IVIG, intravenous immunoglobulin; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

^a Adjusted for patients' gender, age^b Adjusted for patients' sex, gender and IMG regimen^c 1st IMG responder vs 1st IMG non-responder^d 1st or 2nd IMG responder VS 2nd IMG non-responder

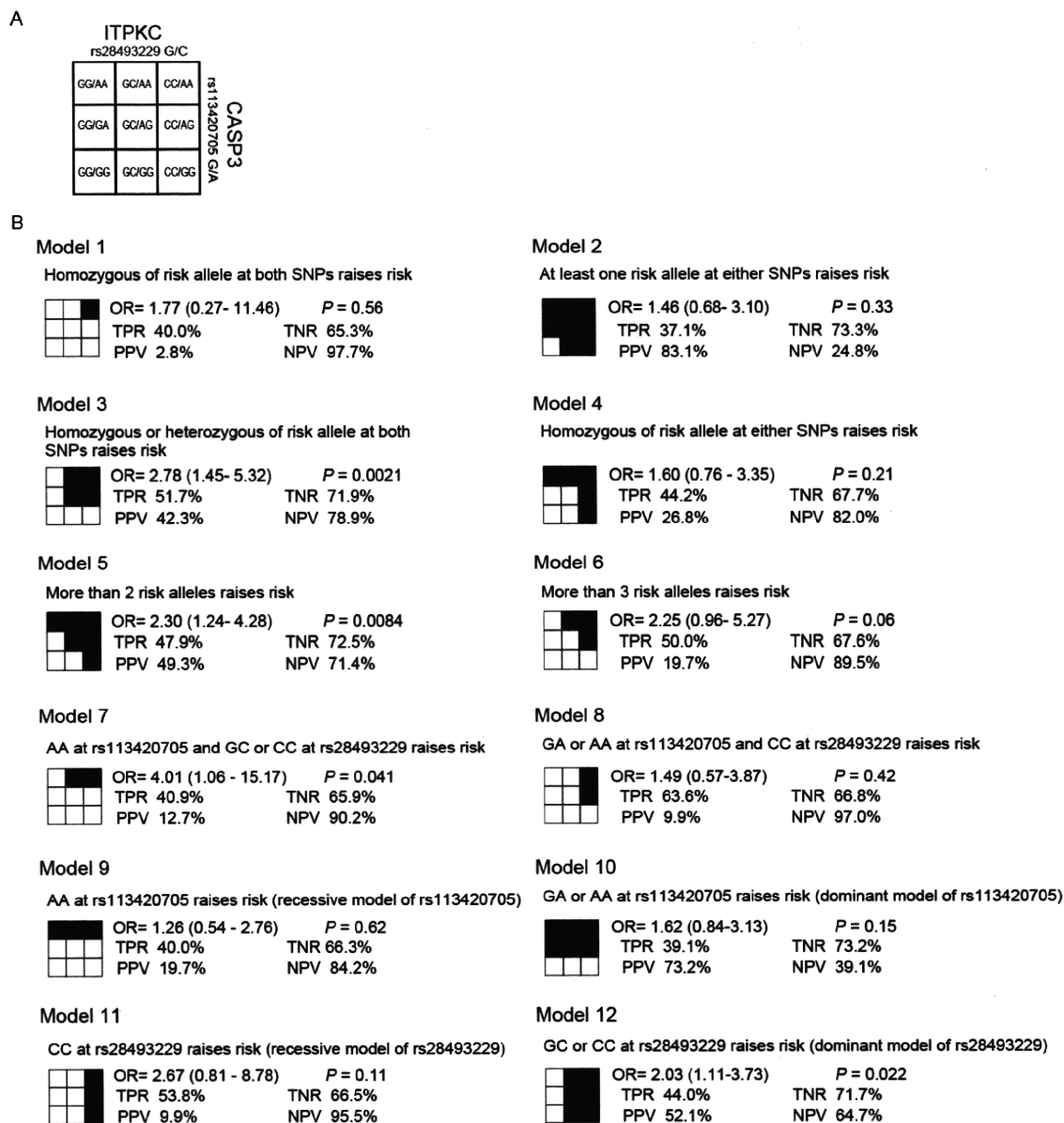


図7 rs28493229 と rs113420705 の IVIG 抵抗性との関連-2 ローカスモデルの検討.

(A) rs28493229 の C アレル, rs113420705 の A アレルがリスクアレルである. (B) 2つの SNP の遺伝子型の 12 の異なる組み合わせパターンによる関連の検討. 核モデルにおいて黒塗りで示された部分をハイリスク群とみなす. TPR: true positive rate (sensitivity); TNR: true negative rate (specificity); PPV: positive predictive value; and NPV: negative predictive value.

表6 rs28493229とrs113420705の2ローカスモデルによるIVIg抵抗性との関連

	Low risk group ^a	High risk group ^b	OR ^c	95%CI ^c	P ^c
Cohort 1					
1g/kg x 2					
IVIg responder	75	22	2.42	1.06 - 5.54	0.036
IVIg non-responder	22	15			
2g/kg x1					
IVIg responder	30	6	4.12	1.33 - 12.74	0.014
IVIg non-responder	19	15			
Combined					
IVIg responder	105	28	2.78	1.45 - 5.32	0.0021
IVIg non-responder	41	30			
Cohort 2					
1st+2nd IVIg responder	240	70	2.64	1.25 - 5.86	0.011
2nd IVIg non-responder	18	14			
Cohort 1 and 2					
IVIg responder ^d	345	98	2.72	1.67 - 4.44	0.000062
IVIg non-responder ^e	59	44			

Abbreviations: IVIg, intravenous immunoglobulin; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

^a KD patients with GG genotype at one or both loci.^b KD patients without GG genotype at both loci.^c Adjusted for patients' gender, age, and IVIg regimen.^d IVIg responders in Cohort 1 and 1st or 2nd IVIg responders in Cohort 2 were combined.^e IVIg non-responders in Cohort 1 and 2nd IVIg non-responders in Cohort 2 were combined.

表7 rs28493229とrs113420705のCALとの関連

	OR	95%CI	P
rs28493229 ^a	2.47	1.17 - 5.25	0.018
rs113420705 ^a	1.79	0.76 - 4.22	0.18
two-locus model	2.94	1.39 - 6.24	0.0047

Abbreviations: CAL, coronary artery lesion; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

All statistical values were adjusted for patients' age, gender and IVIg regimen.

^a Association was evaluated under a dominant inheritance model.

川崎病発症、臨床像と関連するマトリックスメタロプロテアーゼ遺伝子群の遺伝子多型

研究分担者 鈴木洋一 千葉大学大学院公衆衛生学 准教授

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、11番染色体に存在するMMP遺伝子クラスターの9遺伝子の一塩基多型(SNP)について、疾患発症との関連、臨床像との関連を検討した。MMP1、MMP3、MMP10、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。MMP13のプロモーター部の機能性SNPが川崎病の発症月齢、 γ グロブリン(IVIG)投与回数との相関を示した。MMP13は川崎病の年齢による発症感受性、IVIG治療反応性に影響を与えている可能性が示唆された。

A 研究目的

本分担者の研究目的は、川崎病(MCLS)発症、 γ グロブリン療法(IVIG)抵抗性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について、疾患との関連を明らかにすることである。

B 研究方法

1) 川崎病発症とMMP遺伝子多型との相関

MMP遺伝子群の一塩基多型(SNP)の遺伝子型の決定には、HapMapの情報を基に、タグとなる一塩基多型(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の検出も行った。

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282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1055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の差について、 χ^2 乗検定にて検討した。有意水準(P)については、多重比較を考慮しないで、0.05以下を有意の相関とみなした。

2) 川崎病における臨床データとの相関

臨床データが記録されている症例について、発症月齢、末梢血、炎症マーカー、IVIG投与回数、有熱期間との相関のスクリーニングを行った。相関は、Spearmanの ρ によって評価した。相関のスクリーニングで $P < 0.05$ 未満を示した関連については、重回帰分析、分散分析を行い、関連についてさらに詳しく検討した。

3) 統計解析法

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。その他の解析はIBM SPSS Statistics version 19を用いた。

C 研究結果

1)川崎病発症とMMP 遺伝子多型との相関

11 番染色体 11q21-22.3 の MMP クラスターの 9 つの MMP 遺伝子の 92 のタグ SNP についてコントロールのサンプルで検討したところ、17 のハプロタイプブロック(HB)(Four gamete rule)に分かれていた。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、5 つの HB と HB に属さない 1 つの SNP からなっていた。(図1)

タイピングをした SNP の情報と、アレル頻度についての症例対象研究の結果を表1に示す。0.05 より小さい P 値を示す SNP は、MMP20、MMP10、MMP1、MMP3 に見出された。

ハプロタイプとの相関解析の P 値の分布を図2に示す。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 HB4、HB5、HB6、HB7 に見出された。また、MMP1、MMP3、MMP10、MMP7 の HB のハプロタイプの P 値が 0.05 を切っていた。

遺伝子型の優性または劣性モデルでの検討で、有意な相関($P<0.05$)を示した SNP のオッズ比(OR)は、表2に示した。アレル頻度で有意差を示した、MMP1、MMP3、MMP10、MM20 に加え、MMP12 と MMP27 の SNP の OR が有意なものとして加わっている。

2)川崎病における臨床データとの相関

本年度末における患者の臨床像についてのまとめを表3に示した。発症月齢は1か月から144か月に分布し、平均約30か月であった。入院時病日の平均は約4日であった。表4に示すごとく、IVIG は 97% の症例で投与されており、反応不十分で、IVIG が 2 回以上投与されたものは約 25% となっていた。一ヶ月以内の心合

併症は 3%、一ヶ月を超えて残った心合併症は 2% に見られた。心合併症の症例数が少ないため、遺伝子多型との関連の解析には含めなかった。

遺伝子多型データと臨床データの両方がそろった症例数は、187 例であった。

解析可能な臨床データと MMP 遺伝子の関連をスクリーニングしたところ、MMP13 の SNP1、SNP4、SNP6 が発症月齢と有意の相関を示した。Spearman の ρ の P 値はそれぞれ、 8.5×10^{-4} 、0.0065、0.012 を示した。MMP13 の SNP6 は、IVIG 投与回数との相関も示した($P=0.0087$)。遺伝子型と発症月齢の関係を図3に示す。遺伝子型と IVIG 投与回数との関係は図4に示した。発症年齢についても、IVIG 投与回数についても A アレルのヘテロ、ホモとなるに従って、数値が直線的に小さくなっている。IVIG の投与回数を従属変数として、群馬スコア、MMP13 SNP6 を変数とした重回帰分析を行った結果を表5に示す。この際 MMP13 SNP6 の遺伝型は、GG=1、GA=2、AA=3 とした尺度変数として投入した。この解析でも本遺伝子多型は、群馬スコアと同様に有意な変数となった。MMP13 SNP6 と群馬スコア間の相関関係はほとんど無く (Spearman ρ , $R=0.058$, $P=0.429$)、本遺伝子多型は、群馬スコアに含まれる臨床的パラメータとは独立の IVIG 反応因子である可能性が示唆された。SNP6 は MMP13 遺伝子のプロモーター領域にあり、G アレルに比較して A アレルのプロモーター活性が低いという報告があり、我々も気道上皮細胞において、この SNP の影響について同様の結果を得ている(データ未発表)。

D 考察

MMP1、MMP3、MMP10、MMP20 内のいくつかの SNP と疾患の発症との相関解析の P 値が 0.05 を切っているが、現時点で最も有望な新規な感受性遺伝子は、MMP20 と思われる。最も強い相関を示している HB4 には、アミノ酸に影響を及ぼす SNP は見つかっていないので、遺伝子発現量への影響を検討する必要がある。

検討した、SNP の総数からみて、これらの遺伝子が真に疾患の感受性を示す多型を有すると結論づけるためには、さらに症例を解析し、多重比較の補正を凌駕する P 値を得る必要がある。疾患との有意性を、アレル頻度のみで検定するという条件下で、Bonferroni 補正を行うとすると、0.00054 以下の P 値が必要である。現時点で得られたアレル頻度が保持されるとして、対照群が 1050 名で固定すると、患者群としては千数百名必要であり、これまで収集されて来た患者数をはるかに上回っている。現時点で、遺伝子多型解析結果のみからは、疾患との関連の結論は出せない。

MMP13 遺伝子の SNP6 は、疾患との相関は示していないが、発症月齢と、IVIG 投与回数との相関が認められた。発症月齢は、プロモーター活性の低い A アレルを持つものが低いという結果であった。一方、IVIG の治療には、A アレルを持つの方が、反応性が良いという傾向が見られた。プロモーター活性が低い A アレルを持つ者は、低年齢で川崎病になりやすいが、IVIG の治療には反応しやすいということになる。MMP13 の川崎病の炎症における役割はこれまでほとんど情報がないが、我々はこれまで MMP13 の SNP2、SNP7 と小児喘息との有意の関連をみている。また、MMP13 遺伝子の発現は、気道上皮への poly(I:C)刺激で数百倍以上に上昇し、それには 1 型インターフェロンが関

連していることが観察されており、ウイルス感染における、気道上皮等での免疫反応の調節因子としての機能が推定される。今後、川崎病の炎症における本遺伝子の各種臓器での発現とその機能について検討することは意義があると思われる。

MMP20 については歯のエナメル質形成との関連が調べられているが、その他の疾患との関連についての情報は無い。喘息との相関も見出されていない。本遺伝子においては、相互に弱い LD を示す複数の HB が疾患との相関を示しているため、疾患発症へ影響する機能性多型を同定するために、さらなる検討が必要である。

MMP10 については、アレル頻度の疾患との相関の P 値がぎりぎり 0.05 を切った SNP11 と一つのハプロタイプが見出されが、疾患との相関の強さと機能の面で、あまり有望な相関とは言えない。本遺伝子の機能についても、あまり情報がなく、川崎病と本遺伝子の関連を見出すのは難しいと思われる。

MMP3 では、SNP2 と SNP4 と疾患発症との関連が示唆されたが、これらの SNP はマーカーである可能性が高く、機能性 SNP である -1605 6T/5T との相関は見いだされなかった。相関のあった SNP と LD のある SNP について、さらなる検討が必要である。

MMP1 については、既に機能が報告されている SNP との相関であるが、 $P=0.04$ であり、症例数が増えないと結論は出せない。

E 結論

川崎病の感受性遺伝子の候補として、9 個の MMP 遺伝子を検討し MMP1、MMP3、MMP10、MMP20 の遺伝子多型との相関を見いだした。

MMP13 遺伝子の機能的 SNP である -77G/A

多型は、川崎病の発症月齢と IVIG 抵抗性に関連を示した。MMP13 は川崎病の年齢による発症感受性、IVIG 治療の反応性へ影響を与えている可能性がある。

F 健康危険情報

該当無し。

G 研究発表

1)論文発表

1. Onouchi Y, Ozaki K, Burns 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*, 19, 2898-2906, 2010
2. Suzuki H, Terai M, Hamada H, Honda T, Suenaga T, Takeuchi T, Yoshikawa N, Shibuta S, Miyawaki M, Oishi K, Yamaga H, Aoyagi N, Iwahashi S, Miyashita R, Onouchi Y, Sasago K, Suzuki Y, Hata A. Cyclosporin A treatment for refractory Kawasaki disease -A pilot study of 28 patients with Kawasaki disease resistant to both initial and additional IVIG *Pediat Infect Dis Journal*, in press
3. Onouchi Y, Suzuki Y, Suzuki H, Terai M, Yasukawa K, Hamada H, Suenaga T, Honda T, Honda A, Kobayashi H, Takeuchi T, Yoshikawa N, Sato J, Shibuta S, Miyawaki M, Oishi K, Yamaga H, Aoyagi N, Iwahashi S, Miyashita R, Murata Y, Ebata R, Higashi K, Kouichi Ozaki K, Sasago K, Tanaka T, Hata A. ITPKC and CASP3 polymorphisms and risks for IVIG unresponsiveness and coronary artery lesion formation in Kawasaki disease. *Pharmacogenomics J*, submitted
4. Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Niihori T, Ono M, Ishii N, Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet*, 56, 34-40, 2011
5. 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*, 55, 342-349, 2010
6. Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, Miyagawa T, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Suzuki Y, Yoshihara S, Adachi M, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakajima T, Mathias RA, Rafaels N, Barnes KC, Himes BE, Duan QL, Tantisira KG, Weiss ST, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. TSLP Promoter Polymorphisms are Associated with Susceptibility to Bronchial Asthma, *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010/doi: 10.1165/rcmb.2009-0418OC
7. Fukuda N, Suzuki Y, Sato K, Yajima D, Hayakawa M, Motani H, Kobayashi K, Otsuka

K, Nagasawa S, Iwase H Estimation of age from sclerotic glomeruli Forensic Sci Int 2010/197(1-3)/123 e1-4

学会発表

1. Y. Suzuki, Y. Mashimo, S. Hattori, K. Takeuchi, N. Shimojo, T. Hirota, K. Fujita, A. Miyatake, S. Doi, Y. Okamoto, Y. Kohno, M. Tamari, A. Hata. Association of the matrix metalloproteinase 13 gene with child-onset asthma. アメリカ人類遺伝学会 平成22年11月2-6日 ワシントンDC、アメリカ合衆国
2. Onouchi Y, Ozaki K, Bruns JC, Shimizu C, Terai M, Suzuki H, Yasukawa K, Suzuki Y, Sasago K, 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 and Tanaka T. A functional polymorphism in CASP3 confers susceptibility to Kawasaki disease. アメリカ人類遺伝学会 平成22年11月2-6日 ワシントンDC、アメリカ合衆国
3. Hamada H, Suzuki H, Onouchi Y, Abe J, Suzuki Y, Terai M, Hata A, Personalized treatment based on genetic polymorphism in patients with Kawasaki disease, Periatric Cardiology and Cardiac Surgery, 26, s157, 2010
4. 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：難治性川崎病に対するシクロスポリン治療の検討、第46回日本小児循環器学会 2010.7. 浦安市
5. 鈴木啓之、寺井 勝、尾内善広、浜田洋通、本田隆文、末永智浩、武内 崇、渋谷昌一、吉川徳茂、鈴木洋一、羽田 明：川崎病重症度とITPKC遺伝子多型との関連性の分析、第30回日本川崎病研究会 2010.10. 京都市
6. 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：IVIGに不応例に対する治療プロトコル～シクロスポリンA療法～ シンポジウム「難治性川崎病の治療戦略」～病態、作用機序から見た戦略～、第30回日本川崎病研究会 2010.10. 京都市
7. 鈴木洋一、シンポジウム 気管支喘息表現型の多様性～遺伝子から病態まで「遺伝子から見た小児気管支喘息の多様性」 第60回日本アレルギー学会 平成22年11月25-27日 東京
8. 竹内和秀、真下洋一、服部 聡、下条直樹、玉利真由美、羽田 明、鈴木洋一他、小児期発症喘息患者の重症度と呼吸機能に関連する遺伝子多型 第60回日本アレルギー学会 平成22年11月25-27日 東京
9. 竹内和秀、真下陽一、服部 聡、霜用直樹、玉利真由美、羽田 明、鈴木洋一他、小児期発症喘息患者の重症度と呼吸機能に関連する遺伝子多型 第55回日本人類遺伝学会 平成21年10月27-30日 東京
10. 羽田 明、鈴木洋一、成田 暁、細道一善、井ノ上逸郎、連鎖解析およびエクソーム解析による突発性四肢筋痛症の原因遺伝子探索の試み 第55回日本人類遺伝学会 平成21年10月27-30日 東京