

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

平成 22 年度分担研究報告書

研究項目：全国不明熱患者の遺伝子解析結果と情報収集のための全国規模組織
の確立

分担研究者：井田 弘明

(久留米大学医学部 呼吸器・神経・膠原病内科・准教授)

研究要旨

本研究では、不明熱として相談を受けた施設の症例の解析を行った。
症例は各施設から不明熱として紹介された 195 例(男性 96 例、女性 99 例)のうち、同意が取れた症例に、*TNFRSF1A* 遺伝子検索を行った。
180 例の遺伝子検索で、*TNFRSF1A* 遺伝子のエクソン 2,3,4 の突然変異は 10 例(T61I ; 7 例、C88Y ; 1 例、その他 2 例)にみられた。
全国規模で自己炎症疾患研究会を設立し、不明熱症例を相談する受け皿作りを行ってきた。平成 22 年度も第 3 回自己炎症疾患研究会を 8 月 6 日に東京で開催した。

A. 研究目的

自己炎症症候群は、本邦でも報告が増え、今や不明熱症例の鑑別診断としてかかせない疾患である。本研究では、全国の施設から不明熱として相談を受けた症例の解析を行い、*TNFRSF1A* 遺伝子変異の存在を検討することによって、TRAPS の診断をつけることを目的とした。さらに、全国規模で自己炎症疾患研究会をひらくことで、不明熱症例を相談する受け皿作りと家族性地中海熱などの自己炎症症候群の啓蒙活動を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. 不明熱症例の遺伝子解析

得られた血液から genomic DNA を分離、

TNFRSF1A (exon 2, 3, 4) を PCR で増幅後、シーケンスを行った。

2. 自己炎症疾患研究会の開催

平成 20 年 7 月 10 日に第 29 回日本炎症・再生医学会(都市センターホテル)で自己炎症疾患研究会を設立した。今年度は、3 回目であったが、昨年同様に学会と独立して平成 22 年 8 月 6 日に新宿 NS ビルで開催した。

C. 研究結果

1. 不明熱症例の遺伝子解析

全国の施設から相談を受けた 195 症例を解析した。下図は、全国の施設をプロットしたものである。



解析結果を以下に示す。

TNFRSF1A 遺伝子のエクソン 2,3,4 の突然変異は 10 例(T61I ; 7 例、C88Y ; 1 例、その他 2 例)5.6%にみられた。10 例中その他の 2 例は、世界でも報告のない変異をもつ周期熱の親子例であった(論文準備中)。

2. 自己炎症疾患研究会の開催

自己炎症疾患研究会は、平成 20 年 7 月 10 日に設立され、年 1 回会合を開いている。その目的を以下に記述する。「本研究会は、内科・小児科・皮膚科などの臨床家と基礎医学の研究者を中心に、本邦における自己炎症疾患の疫学、臨床像、定義、病因、治療法などを検討することを目的とする。自己炎症疾患を疑った場合、どのようなプロセスで診断、鑑別、治療するのか、ガイドラインを作成するとともに、本邦の自己炎症疾患の現状を把握し、迅速な診断と的確な治療が行えるように、研究会で議論する。そして、最終的には、それらの情報が自己炎症疾患患者へ還元できることを最大の目的とする。」

平成 22 年度の自己炎症疾患研究会のお知らせを以下に記載する。

『第 3 回自己炎症疾患研究会のお知らせ

平成 22 年 8 月 6 日午後 3 時から 6 時

新宿 NS ビル (西ブロック 304 号室; Tel 03-3342-4920 ; 次ページの地図参照)

入場無料

自己炎症疾患研究会を例年通り、日本炎症再生医学会 (8 月 5-6 日) の最終日に開催いたします。日本炎症再生学会でも自己炎症疾患関連のシンポジウムがあり、自己炎症疾患について知見を深める良い機会となればと考えております。今年プログラムでは、昨年と同様中心的な疾患の新たな知見、治療等についてお話しただけでなく、広義の自己炎症疾患と言われる PFAPA、ベーチェット病についてもご専門の先生にお話しいただくこととしました。また診断に苦慮している症例について供覧する時間を取りたいと考えております。奮ってご参加ください。

症例呈示を希望される方は 7 / 3 1 までに E-mail にて西小森まで御連絡いただけましたらと思います。

E-mail: rmishiko@kuhp.kyoto-u.ac.jp

発起人 井田弘明 (久留米大学 第一内科)、
西小森隆太 (京都大学 小児科)

研究会プログラム

I. 発起人挨拶

II. 演題 自己炎症疾患の最新の話

1. 細胞障害と自己炎症

増本純也 (信州大学 病理組織学)

2. NLRP3 out of exon 3 遺伝子異常の発症機序について

神戸直智 (千葉大学 皮膚科)

3. 中條・西村症候群の遺伝子異常について

井田弘明 (久留米大学 第一内科)

4. 自己炎症性疾患の治療について

今川智之 (横浜市立大学 小児科)

5. PFAPA の診断と治療

楠原浩一 (産業医科大学 小児科)

6. ベーチェット病について

岳野光洋 (横浜市立大学 リウマチ・血液・感染症内科)

7. 自己炎症疾患のこの 1 年での進歩について

西小森隆太(京都大学 小児科)

III. 症例検討会

IV. 今後の会のあり方について

V. 閉会の挨拶 』

今年度も活発な議論が展開された。

D. 考察

全国施設から 195 例の不明熱症例の相談があり、180 例の遺伝子解析を行った。

変異がみられた 10 例中 7 例は、浸透度の低い T61I であった。T61I は、浸透度が低い突然変異であり、健常者にも約数パーセントみられるため、遺伝子多型の可能性もある。欧米で多い R92Q は、T61I と同様に健常者に多く存在する突然変異(陽性率 1~3%)で、TRAPS 症状が軽く、他の疾患の合併の報告が多い。多発性硬化症(Multiple Sclerosis)患者の中で TRAPS 様症状を示す症例 25 例中 6 例(24%)に R92Q 変異がみられたという報告があった。さらに、R92Q は、動脈硬化の危険因子であるとの報告もある。R92Q 変異が、合併する疾患の発症・進展に何らかの影響を与えている可能性が十分考えられる。原因不明の急性腹膜炎症例で 2 回腹部手術を施行され、後に R92Q と F60V の変異が同時に存在(ひとりに 2 つの異なる突然変異が存在)していたことが判明した重症 TRAPS 症例もある。また、コルヒチンが効かない家族性地中海熱症例で家族性地中海熱の原因遺伝子 *MEFV* と TRAPS の原因遺伝子 *TNFRSF1A* の両方に突然変異を認めた Overlap 症候群(M694V homozygous, R92Q heterozygous)の報告もある。今後、浸透度が低いこのような突然変異分子が、実際にどのような振る舞いをしているのか、どのような分子と会合してシグナルを伝達し、炎症を増悪させているのか、検討する必要がある。

TRAPS などの自己炎症症候群は、疾患概念が提唱されて 10 年余りしかたっておらず、一般臨床家の認識まだまだ低い。さらに啓

蒙していく必要がある。そのためには、自己炎症疾患研究会の活動を通じて、これらの疾患がまれではないことを浸透させていく必要がある。現在開設準備中である、ホームページの設立、苦慮する症例の相談窓口の設定などを行っていきたい。

E. 結論

不明熱症例 180 例の遺伝子検索で、10 例に *TNFRSF1A* 遺伝子変異があった。

平成 22 年 8 月 6 日に第 3 回自己炎症疾患研究会を東京で開催した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Fujikawa K, Kawakami A, Hayashi T, Iwamoto N, Kawashiri SY, Aramaki T, Ichinose K, Tamai M, Arima K, Kamachi M, Yamasaki S, Nakamura H, Ida H, Origuchi T, Eguchi K Cutaneous vasculitis induced by TNF inhibitors: a report of three cases. *Mod Rheumatol*. 20(1):86-89, 2010

2) Kawashiri SY, Kawakami A, Iwamoto N, Fujikawa K, Aramaki T, Tamai M, Arima K, Ichinose K, Kamachi M, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Eguchi K Switching to the anti-interleukin-6 receptor antibody tocilizumab in rheumatoid arthritis patients refractory to antitumor necrosis factor biologics. *Mod Rheumatol*. 20(1):40-45, 2010

3) Iwamoto N, Kawakami A, Arima K, Nakamura H, Kawashiri S, Tamai M, Kita J, Okada A, Koga T, Kamachi M, Yamasaki S, Ichinose K, Ida H, Origuchi T, Eguchi K Regulation of disease susceptibility and mononuclear cell infiltration into the labial salivary glands of Sjogren's syndrome by

- monocyte chemotactic protein-1. *Rheumatology (Oxford)* 49(8):1472-1478, 2010
- 4) Nakamura H, Fujikawa K, Kawakami A, Tamai M, Yamasaki S, Ida H, Eguchi K Long-term efficacy of intravenously administered immunoglobulin in a case of polymyositis with limited application of steroid therapy. *Mod Rheumatol.* 20(5):496-499, 2010
- 5) Kawashiri S, Kawakami A, Imazato T, Ueki Y, Iwamoto N, Fujikawa K, Aramaki T, Tamai M, Arima K, Kamachi M, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Eguchi K Decrement of serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis (RA) patients achieving remission after 6 months of etanercept treatment: comparison with CRP, IgM-RF, MMP-3 and anti-CCP Ab. *Joint Bone Spine* 77(5):418-420, 2010
- 6) Hida A, Imaizumi M, Sera N, Akahoshi M, Soda M, Maeda R, Nakashima E, Nakamura H, Ida H, Kawakami A, Eguchi K Association of human T lymphotropic virus type I with Sjogren syndrome. *Ann Rheum Dis.* 69(11):2056-2057, 2010
- 7) Kawashiri SY, Kawakami A, Fujikawa K, Iwamoto N, Aramaki T, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Eguchi K Type B insulin resistance complicated with systemic lupus erythematosus. *Intern Med.* 49(5):487-490, 2010
- 8) Nakamura H, Ichikawa T, Nakamura T, Kawakami A, Iwamoto N, Matsuzaki T, Miyaaki H, Yamasaki S, Ida H, Eguchi S, Hayashi T, Nakao K, Kanematsu T, Eguchi K. Macrophage-dominant sialadenitis in HTLV-I-associated myelopathy post living-donor liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 42(7): 2797-2799,2010
- 9) Nakamura H, Kawakami A, Iwamoto N, Okada A, Yamasaki S, Tamai M, Ida H, Takagi Y, Hayashi T, Aoyagi K, Nakamura T, Eguchi K A single centre retrospective analysis of AECG classification criteria for primary Sjogren's syndrome based on 112 minor salivary gland biopsies in a Japanese population. *Rheumatology (Oxford)* 49(7):1290-1293, 2010
- 10) Nakamura H, Okada A, Kawakami A, Yamasaki S, Ida H, Motomura M, Imanishi D, Eguchi K Isoniazid-triggered pure red cell aplasia in systemic lupus erythematosus complicated with myasthenia gravis. *Rheumatol Int* 30(12): 1643-1645, 2010
- 11) Nakamura H, Okada A, Kawakami A, Yamasaki S, Ida H, Masuda T, Fukuda T, Satoh K, Yoshimura T, Nakashima M, Hayashi T, Eguchi K. Rheumatoid vasculitis of crural muscles confirmed by muscle biopsy in the absence of inflammatory myopathy: histologic and MRI study. *Rheumatol Int* 30(10): 1381-1383, 2010
- 12) Nakamura H, Kawakami A, Hayashi T, Iwamoto N, Okada A, Tamai M, Yamasaki S, Ida H, Eguchi K Anti-centromere antibody-seropositive Sjogren's syndrome differs from conventional subgroup in clinical and pathological study. *BMC musculoskeletal disorders* 11(1):140, 2010
- 13) Ichinose K, Origuchi T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Fujikawa K, Aramaki T, Kamachi M, Arima K, Tamai M, Nakamura H, Ida H, Kawakami A, Tsukada T, Ueki Y, Eguchi K. Efficacy and safety of mizoribine by one single dose administration for patients with rheumatoid arthritis. *Intern Med* 49(20):2211-2218, 2010

14) Akazawa S, Ichinose K, Origuchi T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Fujikawa K, Aramaki T, Kamachi M, Arima K, Tamai M, Nakamura H, Ida H, Kawakami A, Eguchi K. Successful treatment of chronic lupus myocarditis with prednisolone and mizoribine. Mod Rheumatol 20(6):606-610, 2010

15) 井田弘明 自己炎症症候群 久留米医学会雑誌 73(11-12):312-318, 2010

16) 井田弘明、金澤伸雄 中條-西村症候群医学のあゆみ 235(12-13):1191-1195, 2010

17) 井田弘明 TRAPS の病態から炎症を考える 細胞 42(9):368-371, 2010

18) 井田弘明 自己炎症症候群 カレントセラピー 28(10):970-971, 2010

19) 井田弘明 抗 IL-1 製剤と cryopyrin 関連周期性発熱症候群 リウマチ科 44(3):343-347, 2010

20) 山崎聡士, 藤川敬太, 荒牧俊幸, 岩本直樹, 川尻真也, 玉井慎美, 中村英樹, 井田弘明, 川上 純, 江口勝美, 折口智樹 関節リウマチの生物学的製剤投与中に発症した結核感染 3 症例 九州リウマチ 30(1):43-48, 2010

21) 塚田敏昭, 藤川敬太, 井上祐一, 長郷国彦, 中村英樹, 井田弘明, 川上純, 江口勝美 生物学的製剤使用中に胸膜炎を発症した 2RA 症例 九州リウマチ 30(2):94-99, 2010

22) 折口智樹, 川尻真也, 岩本直樹, 玉井慎美, 井田弘明, 川上 純, 藤川敬太, 荒牧俊幸, 松岡直樹, 植木幸孝, 河部庸次郎, 峰 雅宣, 福田孝昭, 江口勝美 インフリキシマブの関節リウマチ患者の炎症所見、活動性と ADL に対する効果 日本 RA のリハビリ研究会誌

24:62-64, 2010

23) 塚田敏昭, 藤川敬太, 長郷国彦, 大田俊行, 中村英樹, 井田弘明, 川上純, 江口勝美 骨盤腔内の後腹膜線維症を合併した SLE の一例 九州リウマチ 30(1): 38-42, 2010

2. 学会発表

国内学会

第 57 回日本臨床検査医学会学術集会
2010.9.9-9.12

井田弘明 自己炎症疾患の診断と病態解析

第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会
2010.4.22-4.25

井田弘明, 有馬和彦, 金澤伸雄, 江口勝美 自己炎症症候群から学ぶポストゲノム時代の蛋白機能解析

喜多潤子, 川上 純, 玉井慎美, 岩本直樹, 川尻真也, 蒲池 誠, 有馬和彦, 岡田覚丈, 古賀智裕, 山崎聡士, 中村英樹, 折口智樹, 井田弘明, 青柳 潔, 上谷雅孝, 江口勝美 手指関節 MRI を用いた早期関節炎の治療評価

井上大輔, 古賀智裕, 岡田覚丈, 川尻真也, 岩本直樹, 山崎聡士, 中村英樹, 折口智樹, 井田弘明, 川上 純, 江口勝美 ITP の経過中に発症し、トロンボモジュリン製剤が有効であった敗血症性 DIC の 1 例

古賀智裕, 岡田覚丈, 川尻真也, 岩本直樹, 山崎聡士, 中村英樹, 有馬和彦, 折口智樹, 井田弘明, 川上 純, 江口勝美 抗体アレイ法を用いた関節リウマチに対するアダリムマブの治療効果の検討

中村英樹, 川上 純, 岩本直樹, 岡田覚丈,

玉井慎美, 山崎聡士, 井田弘明, 江口勝美
当科における抗セントロメア抗体陽性シェー
グレン症候群の臨床・病理学的検討

玉井慎美, 川上 純, 上谷雅彦, 有馬和彦,
岩本直樹, 藤川敬太, 中村英樹, 井田弘明,
折口智樹, 青柳 潔, 江口勝美 自己抗体
と手指関節非造影 MRI を用いる Nagasaki
score の評価

玉井慎美, 川上 純, 岩本直樹, 藤川敬太,
有馬和彦, 中村英樹, 折口智樹, 井田弘明,
青柳 潔, 上谷雅彦, 江口勝美 診断未確
定関節炎コホートをを用いた ACR 2009 新基
準の評価

折口智樹, 川尻真也, 山崎聡士, 岩本直樹,
有馬和彦, 玉井慎美, 中村英樹, 井田弘明,
川上 純, 植木幸孝, 江口勝美 トシリズ
マブの関節リウマチ患者のサブスタンス P
に対する効果

蒲池 誠, 井田弘明, 川上 純, 江口勝美
ポリクローナルな抗原刺激下の Treg 誘導を
ミゾリピンは促進し、プログラフは抑制す
る

岡田覚丈, 山崎聡士, 中村英樹, 井田弘明,
折口智樹, 川上 純, 江口勝美 骨髄浮腫
の細胞生物学的検討

川上 純, 喜多潤子, 玉井慎美, 岩本直樹,
川尻真也, 蒲池誠, 有馬和彦, 岡田覚丈,
古賀智裕, 山崎聡士, 中村英樹, 折口智樹,
井田弘明, 青柳 潔, 上谷雅彦, 江口勝美
早期関節炎の前向き治療臨床研究 :
Nagasaki-Early Trial

中村英樹, 川上 純, 岩本直樹, 山崎聡士,
井田弘明, 江口勝美 HTLV-I 関連シェーグ
レン症候群唾液腺における異所性胚中心の
頻度と CXCL13 の関与

岩本直樹, 川上 純, 中村英樹, 玉井慎美,
山崎聡士, 井田弘明, 折口智樹, 上谷雅彦,
江口勝美 関節症状を呈するシェーグレン
症候群における手関節 MRI および抗 CCP
抗体の検討

塚田敏昭, 藤川敬太, 中村英樹, 井田弘明,
川上 純, 江口勝美 関節リウマチに伴う胸
膜炎と結核性胸膜炎の胸水の免疫学的及び
生化学的比較検討

右田清志, 宮下賜一郎, 和泉泰衛, 鳥越雄
史, 本川 哲, 井田弘明 遷延する関
節水腫を主徴として発症した家族性地中海
熱 (FMF) の 1 例

日本臨床リウマチ学会

2010.11.27-11.28

玉井慎美, 川上 純, 上谷雅彦, 有馬和彦,
岩本直樹, 中村英樹, 折口智樹, 井田弘明,
江口勝美 早期関節リウマチの経過におけ
る手指関節 MRI 骨髄浮腫と抗 CCP 抗体価
変動の検討

九州リウマチ学会 2010.3.6-3.7

佐々木玲美, 古賀智裕, 岩本直樹, 山崎聡
士, 喜多潤子, 岡田覚丈, 川尻真也, 玉井
慎美, 中村英樹, 井田弘明, 川上 純, 嶋
田貴子, 折口智樹, 江口勝美 エンドキサ
ンパルス療法に対し卵巣機能温存目的に
GnRH アゴニストの投与を試みた SLE の 2
例

岡田覚丈, 喜多潤子, 古賀智裕, 川尻真也,
岩本直樹, 藤川敬太, 山崎聡士, 中村英樹,
井田弘明, 折口智樹, 川上 純, 江口勝美
重症成人発症スティル病に対するシクロス
ポリン静注療法の検討

川尻真也, 岩本直樹, 古賀智裕, 岡田覚丈,
喜多潤子, 玉井慎美, 山崎聡士, 中村英樹,

井田弘明, 川上 純, 折口智樹, 江口勝美
関節リウマチにおける関節超音波によるスコアリングとバイオマーカーとの関連

藤川敬太, 塚田敏昭, 中島好一, 芦田美輪,
西村香織, 玉井慎美, 山崎聡士, 中村英樹,
井田弘明, 折口智樹, 川上 純, 江口勝美
TNF 阻害薬に関連した皮膚病変の検討

由良博一, 岩本直樹, 岡田覚丈, 喜多潤子,
古賀智裕, 川尻真也, 蒲池 誠, 玉井慎美,
山崎聡士, 中村英樹, 井田弘明, 川上 純,
折口智樹, 江口勝美 タクロリムスにて長期寛解を得られているループス腎炎 ISN/RPS 分類 IV-G(A) の 1 例

塚田敏昭, 藤川敬太, 井上祐一, 中村英樹,
井田弘明, 川上 純, 江口勝美 生物学的製剤使用中に発症した胸膜炎を伴うRAの2症例

国際学会

6th International Congress on FMF and SAID (Autoinflammation 2010) 2010.9.2-9.6 Amsterdam

Ida H, Arima K, Kinoshita A, Nishima H, Kanazawa N, Furukawa F, Yoshiura K, Eguchi K Functional human protein analysis in the post-genome era learning to new autoinflammatory syndrome (Nakajo-Nishimura syndrome)

Kanazawa N, Nakatani Y, Ida H, Yoshiura K, Furukawa F National surveillance of Nakajo-Nishimura syndrome (familial Japanese fever) in Japan

Annual European Congress of Rheumatology (EULAR 2010) 2010.6.16-6.19 Rome

Koga T, Yamasaki S, Okada A, Kawashiri S, Iwamoto N, Ida H, Origuti T, Kawakami A,

Eguchi K Post-transcriptional regulation of IL-6 production by Zc3h12a in fibroblast-like synovial cells

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許得取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

成人スチル病に対する生物学的製剤治療の有用性に関する研究

分担研究者 高橋裕樹 札幌医科大学医学部第一内科准教授
協力者 山本元久 札幌医科大学医学部第一内科助教
鈴木知佐子 札幌医科大学医学部第一内科

研究要旨

成人スチル病は成人の不明熱の原因疾患として重要であり、従来膠原病類縁疾患として扱われてきた。しかしながら成人スチル病は自己免疫異常を伴わないことから、近年注目されている自己炎症症候群との関連性が注目されている。成人スチル病において多彩な炎症性サイトカインの上昇が病像形成に重要であることが判明し、抗サイトカイン作用を有する生物学的製剤を用いた分子標的療法の有効性が期待されている。当科経験例、および文献報告例により、アナキンラおよびトシリズマブの成人スチル病に対する臨床成績を解析した。TNF 阻害薬無効例を含む約 50 例におけるアナキンラの使用成績があり、8 割以上で全身症状・関節痛などの改善が認められたが、完全寛解は困難であった。トシリズマブはアナキンラ無効例を含む約 30 例の使用成績があり、高率に臨床症状の改善、およびステロイドの減量・中止が認められることに加え、完全寛解例も報告されていた。今後、多数例での検討が必要であるが、成人スチル病において抗 IL-1/IL-6 療法の有効性が期待された。

A. 研究目的

日常診療において原因不明の発熱、関節痛、皮疹を呈する症例に遭遇する機会は稀ではないが、その鑑別疾患は多岐に渡る。一般に感染症や悪性リンパ腫などのリンパ増殖性疾患、さらに成人スチル病を含む自己免疫疾患が三大原因とされていたが、近年はTNF受容体関連周期性症候群（TNF receptor-associated periodic syndrome: TRAPS）に代表される自己炎症症候群も重要な原因疾患として注目が集まっている。臨床症状としての“発熱”とい

う表現形はこれら疾患で共通しているが、基盤にある病因・病態は異なっており、そのため、各種サイトカインや接着分子の動態は各疾患において様々であることが推測され、現在、遺伝的な背景も含め解明が進んでいる。このうち、成人の発熱性疾患として頻度の高い成人スチル病では、マクロファージやT細胞から過剰産生された炎症性サイトカインが病態形成に大きく寄与していることから、生物学的製剤を用いた分子標的療法が応用されつつある。自己炎症症候群に含まれるCINCA症

候群では抗IL-1療法が奏効することが既に知られているが、これら生物学的製剤の有用性を解析することはその病態の解明に加え、同じ発熱性疾患である成人スチル病と自己炎症症候群の関連を考える上でも有用であると考えられる。そこで自験例を含め、これまで報告された成人スチル病に対する生物学的製剤治療の有用性について検討を行った。

B. 研究方法

原則的に Yamaguchi らの分類 (1) により成人スチル病と診断され、生物学的製剤として抗 IL-1 アンタゴニストであるアナキンラ、および抗 IL-6 抗体であるトシリズマブの投与を受けた文献報告例 (~2011 年 3 月)、および札幌医科大学附属病院にてトシリズマブの投与を受けた 2 例を含め、解析を行った。

C. 研究結果

1) アナキンラによる臨床成績 (表1)

2003 年の Rudinskaya らの報告を嚆矢として、欧米では難治例での選択肢として高く評価されており、Kontzias らの提唱した治療アルゴリズム (2) ではメトトレキサート (MTX) 不応例における第一選択薬と位置づけられているほどである。ランダム化比較試験は行われていないが、2010 年までに Lequerre らの 15 例を含め、約 50 例ほどの使用報告例がある。ほとんどがステロイドに加え、MTX などへの抵抗例であり、約半数は TNF 阻害薬不応例である。発熱、倦怠感といった自覚症状に対して即効性であり、報告によっては初回投与数時間以内に症状の改善を認めたとの記載

もある。ただし、漸減、ないしは投与中断により速やかな症状の再燃がみられ、完全寛解例は認められなかった。

2) トシリズマブによる治療成績 (表2)

トシリズマブに関しては、本邦を中心に特に2009年以降、有効例の報告が増加している。当科経験例2例を含め、これまで報告されている30例をまとめると、投与時期は早いものではステロイドによる初回の寛解導入が失敗した直後から、10年以上の罹病後のものまで様々である。寛解導入に至らなかった前治療としてはステロイド (100%)、MTX (83%) に加え、TNF阻害薬 (57%)、アナキンラ (57%) がある。ステロイド併用下でのTCZ導入により発熱などの全身症状、関節症状の改善を認め、また速やかなステロイド減量効果が得られることに加え、ステロイドの完全中止例も散見される。当科経験例はいずれもステロイド減量困難例であり、MTXやTNF阻害薬での関節炎を含む疾患活動性のコントロールが困難なため導入した。感染症を含む有害事象は観察されず、寛解を達成後もステロイドの減量が可能となり、うち1例ではステロイド中止に至っている。

D. 考 按

成人スチル病の病態を踏まえた場合、生物学的製剤による分子標的療法、特に抗サイトカイン療法が有効であることが予測された。しかしながら、関節リウマチにおいてパラダイクシフトを来したとまで評価された TNF 阻害薬では必ずしも成人スチル病では高い評価

を得られなかった(3)。予想外であったが、関節リウマチ治療薬としてはTNF阻害薬に比較し劣性が印象づけられたアナキンラが成人スチル病において奏効することが証明されつつあり、さらにトシリズマブも高く評価されつつある。もちろんエビデンスレベルの低い症例報告が主体であり、今後、多数例を対象とした大規模臨床試験の実施が望ましいが、成人スチル病の希少性を考慮すると、ほかの自己免疫疾患と同様、実現には多くの困難が予想される。

アナキンラは本邦では関節リウマチ含めて保険診療上の適応疾患が取得されておらず、現実的には使用は不可能(個人輸入での使用報告例があり)であるが、病状を鎮静化させる即効性を示す一方、薬剤フリーとなる完全寛解導入が困難なことから、IL-1は病態に関わるサイトカインカスケードのより末梢で作用しており、そこをブロックすることで発熱などの臨床的な表現形を押さえ込んでいるものと推測される。

トシリズマブは成人スチル病のプロトタイプである若年性特発性関節炎(全身型)に保険適応があり、また関節リウマチの治療薬としても評価が確立していることから、今後一層の有効性が期待される。

なお、難治性成人スチル病病に対して抗サイトカイン作用を有する生物学的製剤を使用する場合、保険適応外であることを患者に十分説明した上で使用を考慮する必要がある。また、生物学的製剤導入が試みられる状況では、ステロイド大量投与を含む免疫抑制療法が既に施行され易感染性が助長されているこ

とが多く、通常の関節リウマチ診療で使用される以上に日和見感染症への対応が要求される。

E. 結 論

難治性成人スチル病に対してアナキンラやトシリズマブなどの生物学的製剤の有用性が証明されつつある。成人スチル病は基本的には予後良好な良性疾患であるが、長期のステロイド使用を要する症例も少なくなく、生物学的製剤による治療介入のリスク・ベネフィットを十分考慮した上で、その適応を検討する必要がある。また成人スチル病に対する生物学的製剤の使用経験は今後、自己炎症症候群に対してこれら薬剤を使用する場合の重要な情報を提供することが期待される。

F. 文 献

1. Yamaguchi M et al: Preliminary criteria for classification of adult Still's disease. *J Rheumatol* 19: 424-430, 1992
2. Kontzias A, Efthimiou P: Adult-onset Still's disease. Pathogenesis, clinical manifestation and therapeutic advances. *Drug* 68: 319-337, 2008
3. Fautrel B: Adult-onset Still disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22: 773-792, 2008

G. 研究発表

1. 論文発表

・Yamamoto M, Takahashi H, Suzuki C, et al.: Analysis of serum IgG subclasses in Churg-Strauss syndrome-the meaning of elevated serum levels of IgG4. Intern Med 49: 1365-1370, 2010

・Takahashi H, Yamamoto M, Suzuki C, et al.: The birthday of a new syndrome: IgG4-related diseases constitute a clinical entity. Autoimmunity Rev 9: 591-594, 2010

・Saeki T, Nishi S, Imai N, Ito T, Yamazaki H, Kawano M, Yamamoto M, Takahashi H, et al.: Clinicopathological characteristics of patients with IgG4-related tubulointestinal nephritis. Kidney Int 78: 1016-1023, 2010.

2. 学会発表

・Takahashi H, Yamamoto M, Naishiro Y, et al: Do IgG4-related disorders constitute a new clinical entity? In: 7th International Congress on autoimmunity: 2010 May 5-9: Ljubljana, Slovenia.

・高橋裕樹, 小原美琴子, 鈴木知佐子他: 皮膚型結節性多発動脈炎に対する TNF 阻害薬の有用性. 第 54 回日本リウマチ学会総会, 2010 年 4 月, 神戸

・高橋裕樹. TNF 以外をターゲットとする生物学的製剤の意義は? 第 20 回日本リウマチ学会北海道・東北支部学術集会, 2010 年 10 月, 札幌

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

表1 成人スチル病に対するアナキニンラ治療報告例

報告者	報告年	国	患者数	罹病期間	全身症状	前治療	観察期間	効果・関節症状	効果・全身症状	PSL減量
Rudinskaya A	(2003)	米国	1	17Y	あり	PSL (Max mPSL 240), MTX	12M	あり	あり	PSL→0
Fitzgerald AA	(2005)	カナダ	1	1.5Y	あり	PSL30, MTX	1.5Y	あり	あり	PSL20→7.5
			1	1Y	なし	IVMP→PSL60, MTX, ETN	14M	あり	—	PSL→0
			1	10M	なし	PSL60, ETN, MTX	6M	あり	—	PSL→0
			1	8M	なし	PSL20	1Y	あり	あり	PSL→0
Vasques Godinho FM	(2005)	ポルトガル	1	14Y	あり	MTX, SASP, CsA, IVIG, IFX, ETN	18M	あり	あり	PSL→0
Aarntzen EHJG	(2005)	オランダ	1	22Y	なし	MTX, ETN	<1Y	あり	—	PSL→0
Kalliolas GD	(2007)	ギリシャ	4	?	あり	PSL, MTX・ETN(1)	5-17M	あり	あり	3/4→0
Kotter I	(2007)	ドイツ	1	4Y	あり	PSL(-250), MTX, HCQ, CsA, AZA, CPA, MMF, IFX, ETN, LEF	44M	あり	あり	PSL→0 LEF→0
			1	6Y	あり	IVMP, PSL2/kg, AZA, MTX,	15M	あり	あり	PSL→0
			1	2W	あり	IVMP, MTX	12M	あり	あり	PSL→low
			1	10W	?	PSL, MTX	12M	あり	—	PSL→5
Maler J	(2008)	ドイツ	1	1M	あり	PSL, IVMP	8M	あり	あり	PSL→0
Lequerre T	(2008)	フランス	15	7.8	あり (87%)	MTX, aTNF (10/15), IVIG (5/15), RTX (2/15), AZA, MMF, SASP (1/15)	1-27M	73%	あり	2/11は中止, 8/15は45-95% 減量
Naumann L	(2010)	ドイツ	8	5.7Y	なし	MTX, LEF (4/8), CsA (2/8), CPA・AZA (1/8), ETN (5/8), IFX (1/8), ADA (1/8)	6-48M	あり	—	2~15
Franchini S	(2010)	イタリア	6	?	1/6	ETN, CsAなど	?	4/5	1/1	?
Tamaki H	(2010)	日本	1	2M	あり	IVIG, IVMPx2, MTX	1M	あり	あり	120→5

* PSL: プレドニゾロン, MTX: メトトレキサート, CsA: シクロスポリンA, IVMP: ステロイドパルス療法, IVIG: ガンマグロブリン大量療法,
SASP: サラゾルフアピリジン, AZA: アザチオプリン, LEF: レフルノミド, IFX: インフリキシマブ, CPA: シクロホスファミド, ADA: アダリムマブ,
ETN: エタネルセプト, RTX: リツキシマブ, ADA: アダリムマブ

表2 成人スチル病に対するトシリズマブ治療報告例

報告者(年)	国	患者数	罹病期間	全身症状	前治療	観察期間	効果	PSL減量
Iwamoto (2002)	日本	1	2Y	あり	PSL, GST, MTX, CsA, PE	18Y	改善	35→0
Matsumoto (2009)	日本	1	1M	なし	IVMP, CsA	4M	改善	50→10
Nakahara (2009)	日本	1	11Y	記載なし	PSL, MTX, BCL, GST, SASP, AZA, CsA	6Y	改善	15→0
Yoshimura (2010)	日本	1	11Y	なし	PSL, MTX, SASP, BCL, LEF, IFX, ETN	6M	改善	不明
Sumida (2010)	日本	1	6M	あり	IVMP, PSL, PE, ETN	4M	改善	20→10
Kishida (2010)	日本	1	22M	あり	PSL, MTX, AZA, CPA, SASP, CsA, FK	18M	改善	5→0
Rech (2010)	ドイツ	3	1-3Y	あり	PSL, MTX, ANK, ADA, RTX, ETN	6-12M	改善	→5
Thonhofer (2010)	オーストリア	2	1Y	あり	PSL, MTX, ADA, ETN	6-8M	改善	→0
Naniwa (2010)	日本	1	2Y	あり	PSL, IVMP, CsA, FK, IVIG	10M	改善	80→3
Sabnis (2010)	インド	1	6W	あり	IVMP, PSL, CsA	6M	改善	50→7.5
当科例 (2011)	日本	2	7Y, 12Y	あり	PSL, MTX, CsA, IFX, ETN 12M, 18M	17.5→15, 2.5→0	改善	
Puechal (2011)	フランス	14	13.6Y	50%	MTX (100%), aTNF (86%), ANK (100%)	6M	5.61→2.91, EULAR寛解は57%	23.3→10.3
Kobayashi (2011)	日本	1	1M	あり	PSL	5M	不明	→12

* PSL: プレドニゾン, GST: 注射金剤, MTX: メトトレキサート, CsA: シクロスポリンA, PE: 血漿交換, IVMP: ステロイドパルス療法, BCL: ブシラミン, SASP: サラソスルファピリジン, AZA: アザチオプリン, LEF: レフルノミド, IFX: インフリキシマブ, ETN: エタネルセプト, CPA: シクロホスファミド, FK: フログラーフ, ADA: アダリムマブ

自己抗体によるサイトカイン誘導に関する研究

分担研究者: 藤井 隆夫

京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学(准教授)

研究要旨

本研究では、抗 U1RNP 抗体陽性 MRL/*lpr* マウス脾細胞を用いてモノクローナル抗 U1RNP 抗体を産生する B 細胞ハイブリドーマをクローン化し、*in vitro* における抗 U1RNP 抗体免疫複合体(U1RNP-IC)のサイトカイン誘導能を調べることを目的とした。作成した多数のハイブリドーマのなかから RNA-免疫沈降法(IPP)と ELISA(MBL 社 MESACUP®-2 テスト RNP)により抗 U1RNP 抗体を産生する細胞をスクリーニングし、その後クローン化したものを 104-13 と命名した。104-13 が産生する IgG2b(104-13-IgG2b)は、HeLa 細胞を抗原とした WB と U1RNP 特異蛋白を抗原とした ELISA で C 抗原に対する抗体であることが確認された。なお 104-13-IgG2b は C 抗原の C 末端(136-159 アミノ酸)に反応した。この 104-13-IgG2b と、コントロール IgG2b である 4E11 mAb(抗 FLAG™ 抗体)をそれぞれ MRL/*lpr* マウス脾細胞と共培養したところ、104-13-IgG2b で IL-6 の産生が刺激された。しかし現時点で U1RNP-IC による誘導かどうかは確認できず、現在 104-13-IgG2b-IC の精製と同時に実験をすすめている。

A. 研究目的

自己炎症性症候群の代表的疾患として TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS)が注目されている。このようにサイトカインは難治性疾患に関して病因的意義を有するが、その誘導については不明な点が多い。近年、抗 U1RNP 抗体が形成する免疫複合体(U1RNP-IC)は、I 型インターフェロンである IFN- α の inducer として注目されている(Savarese E, *et al*, *Blood*, 2006, Ehlers M, *et al*, *Trend Immunol*, 2006)。血中 IFN- α 濃度は U1RNP を含む RNA-binding protein (RBP)に対する抗体(抗 RBP 抗体)や全身性エリテマトーデス(SLE)の皮膚症状や腎障害と相関する(Dall'Elra MC, *et al*, *Ann Rheum Dis*, 2005, Kyriakos A, *et al*, *Arthritis Rheum*, 2005)ため、ヒト SLE でも IFN- α は病因的なサイトカインのひとつと考えられているが、他

のサイトカインの誘導については不明な点が多い。本研究では、抗 U1RNP 抗体陽性 MRL/*Mp-Fas^{lpr/lpr}* (MRL/*lpr*) マウス脾細胞を用いて、モノクローナル抗 U1RNP 抗体を産生する B 細胞ハイブリドーマをクローン化し、*in vitro* において U1RNP-IC の脾細胞からの IL-6 誘導能を調べることを目的とした。

B. 研究方法

抗 U1RNP 抗体陽性 MRL/*lpr* マウス脾細胞とマウスマイクロマ細胞 SP2/0-Ag14(Ag14)を融合し、ハイブリドーマを作成した。次にハイブリドーマ培養上清を用いて HeLa 細胞あるいは Ag14 の核抽出物を抗原とした RNA-免疫沈降法(IPP)および ELISA によりハイブリドーマ上清中の抗 U1RNP 抗体をスクリーニングした。抗 U1RNP 抗体を分泌するハイブリドーマと考えられる細胞

は限界希釈法によりクローン化し、そのサブクラスを調べた。クローン化された細胞(104-13)の上清を用いて、精製 U1RNP-C を抗原とした免疫ブロット法(WB)と、U1RNP-70K、A、C を固相化した ELISA により U1RNP の特異蛋白との反応性を明らかとした。さらに U1RNP-C(159 アミノ酸)の部分ペプチド(各 24 アミノ酸 [aa]、計 8 種類)を作成し、それらを固相化した ELISA で 104-13-IgG2b が認識するエピトープを調べた。

次に、104-13-IgG2b(終濃度 2-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)または 104-13-IgG2b と HeLa 細胞核抽出物を preincubation したのちに、C57BL/6(wt および *lpr*)または MRL(wt および *lpr*) マウス脾細胞($4 \times 10^6/\text{well}$)の培養系に加え、48 時間後にその上清中における IL-6 濃度を ELISA で調べた。なおコントロール IgG2b として、4E11 mAb(抗 FLAGTM抗体)を用いた。

C. 研究結果

作成した多数のハイブリドーマのなかから、RNA-IPP で U1RNA を沈降し(図 1)、ELISA(MBL 社 MESACUP[®]-2 テスト RNP)により陽性と判断されたハイブリドーマ株(104)を見いだした。その後限界希釈法でクローン化したものを 104-13 と命名した。104-13 が産生する免疫グロブリンは IgG2b(104-13-IgG2b)であった。精製 U1RNP-C を抗原とした WB(図 1)と U1RNP 特異蛋白を抗原とした ELISA で C 抗原に対する抗体であることが確認された。なお 104-13-IgG2b は U1RNP-C 抗原の C 末端(136-159aa)にエピトープを有することが確認された。この 104-13-IgG2b と、コントロール IgG2b である 4E11 mAb(抗 FLAGTM抗体)をそれぞれ B6 マウス脾細胞と共培養したところ、104-13-IgG2b のみで IL-6 の産生が刺激された(図 2)。またその分泌刺激は MRL background で明らかであった。しかし核抗原と preincubation した 104-13-IgG2b では IL-6 産生の誘導は認められなかった。両者の preincubation により

U1RNP-IC となっていることは確認しているが、核抗原すべてが培養系に加えられたために、IL-6 産生を抑制する蛋白やプロテアーゼが含まれてしまい、このような結果になったと考えている。一方、104-13-IgG2b は自己抗体であるため、培養を継続することで 104-13-IgG2b が U1RNP-IC となっている可能性もある。このように 104-13-IgG2b を加えることによる IL-6 分泌が、U1RNP-IC による誘導かどうか確認できておらず、現在 104-13-IgG2b-IC の精製をすすめている。

D. 考察

抗 U1RNP 抗体の病因的意義については以前から検討されてきた。古くは、大川らが抗 U1RNP 抗体や抗 dsDNA 抗体が末梢血単核球細胞の IL-1 α 、IL-1 β および IL-6 の産生を刺激することを示し、特に抗 U1RNP 抗体は Fab 部のみでも IL-1 α 産生の亢進を認めることを報告した(Okawa-Takatsuji M, *et al*, *Clin Exp Immunol*, 1994)。さらにヒト肺動脈内皮細胞(HPAEC)でも抗 U1RNP 抗体や抗 dsDNA 抗体が ICAM-1、ELAM-1、MHC class II などの発現を増強させることを証明している(Okawa-Takatsuji M, *et al*, *Clin Exp Immunol*, 1999)。抗 U1RNP 抗体が細胞内に取り込まれる(Ma J, *et al*, *Clin Exp Immunol*, 1993)との報告もある。しかし抗 U1RNP 抗体価が疾患活動性と相関せず、抗 U1RNP 抗体陽性でも無症状の症例が少なくないことなどから、抗 U1RNP 抗体が直接組織傷害を誘導したり、抗 U1RNP 抗体単独で病原性を示したりする可能性は低いと考えられる。

近年、SLE などの自己免疫疾患における免疫異常の活性化に、自然免疫に関与する Toll-like receptor (TLR)が重要であることが明確に示された(Christensen SR, *et al*, *Immunity*, 2006)。TLR9 のリガンドは unmethylated CpG DNA であり、TLR7 のリガンドは ssRNA であることが知られているが、抗核抗体が DNA

やRNAに関連する蛋白(あるいは核酸そのもの)を認識するIgGであることから、それらの免疫複合体がFcγRに認識されアダプター蛋白であるMyD88を介してTLR発現細胞を刺激する(Ehlers M, *et al*, *Trend Immunol*, 2006)。抗U1RNP抗体免疫複合体(U1RNP-IC)によりTLR7が刺激されると、plasmacytoid dendritic cellsからIFN-αが分泌され、その結果B細胞の活性化や自己抗原に対するトレランスの破綻を誘発する(Savarese E, *et al*, *Blood*, 2006)。一方、TLR9が刺激されることで、CD4⁺CD25⁺Tregが活性化され、IFN-αによるB細胞活性化を抑制し、トレランスの破綻を制御すると考えられている(Ehlers M, *et al*, *Trend Immunol*, 2006)。このように、たとえばウイルス感染による自己抗原に対するトレランス破綻の機序や抗核抗体の産生刺激については多くの知見があるが、いったん抗U1RNP抗体の産生が始まってしまった系(たとえばMCTD患者)においてそのU1RNP-ICがT細胞を介することなく自己反応性B細胞を刺激する(Herlands RA, *et al*, *Immunity*, 2008)のか、またIFN-αが、自己反応性T細胞を刺激してIFN-γを分泌するののかについては興味深いところである。さらに今回クローン化できた抗U1RNP-C抗体はIgG2bであり、FcγR IVに認識されることによりマクロファージなどからIL-6/TNF-αの分泌を刺激して組織傷害をおこすとの仮説が示されている(Ehlers M, *et al*, *J Exp Med*, 2006)が、それを証明するツールになりうると考えている。

E. 結論

1.MRL/*lpr* マウス脾細胞より、抗U1RNP-C IgG2bを産生するハイブリドーマ104-13を分離した。

2.104-13が産生するIgG2bは、MRL/+マウスあるいはMRL/*lpr* マウス脾細胞と共培養することにより、IL-6分泌を亢進させた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

Takeshi Sato, Takao Fujii, Tomoko Yokoyama, Yoshimasa Fujita, Yoshitaka Imura, Naoichiro Yukawa, Daisuke Kawabata, Takaki Nojima, Koichiro Ohmura, Takashi Usui, and Tsuneyo Mimori. Anti-U1 RNP antibodies in cerebrospinal fluid are associated with central neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 3730-3740, 2010.

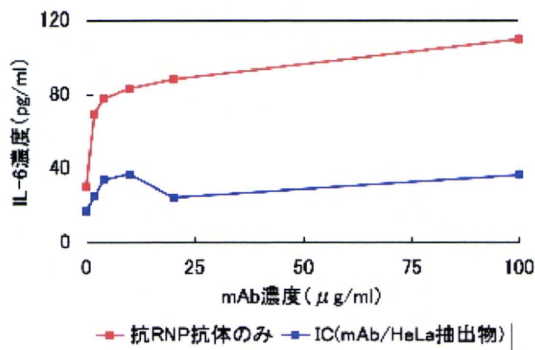
2.学会発表

Naoichiro Yukawa, Takao Fujii, Daisuke Kawabata, Takaki Nojima, Koichiro Ohmura, Takashi Usui, and Tsuneyo Mimori. Correlation of antinuclear antibodies and anti-DNA antibodies with clinical response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *EULAR 2010, Rome, Italy.*

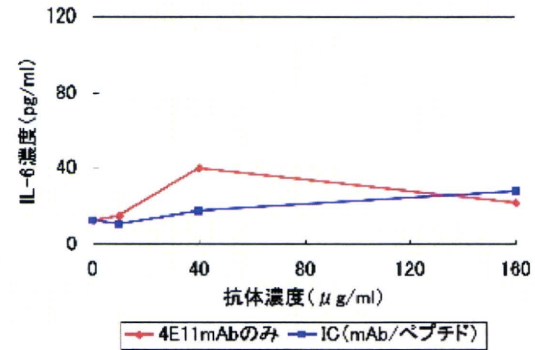
H. 知的財産権の出現・登録状況

なし

A



B



C

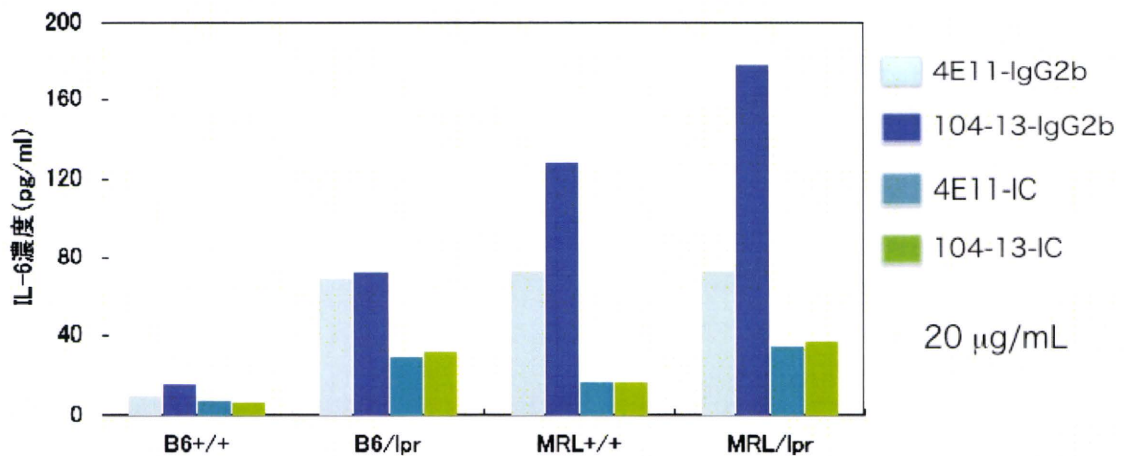


図 1. 抗 U1RNP 抗体が正常およびループモデルマウス由来脾細胞に及ぼす影響

A. 抗 U1RNP 抗体 (104-13-IgG2b) は低濃度で MRL/*lpr* マウス脾細胞から IL-6 の分泌を刺激した。

B. 一方、コントロール IgG2b (4E11 mAb) では明らかな IL-6 分泌刺激を認めなかった。刺激した細胞は A と同じである。

C. この抗 U1RNP 抗体による分泌刺激は、正常マウス (B6 マウス) に比し、MRL マウスでより明確であった。

なお HeLa 細胞抽出物を preincubation して作成した免疫複合体 (IC) を用いた場合、今回の系では IL-6 分泌は認められなかった。

TNF 受容体関連周期性症候群（TRAPS）および関連疾患の遺伝子解析

研究分担者 田平知子 九州大学生体防御医学研究所 助教

研究要旨

診断が困難な周期性発熱疾患には遺伝的背景をもつ自己炎症症候群が含まれており、TNF 受容体関連周期性症候群（TNF receptor-associated periodic syndrome: TRAPS）もその一つである。本疾患はTNF 受容体1 型の変異が原因であると考えられ、欧米では種々の変異が報告されているが、本邦での報告例は数少ない。原因不明の発熱疾患に占めるTRAPS の割合を知ること、および類似した臨床症状を呈する家族性地中海熱、メバロン酸キナーゼ欠損症等と鑑別するための診断基準の作成に役立てることを目的として、これら疾患の遺伝子解析システムを構築した。さらに大規模全国調査により収集された検体について遺伝子解析を行いTNF 受容体1 型遺伝子、家族性地中海熱の遺伝子にそれぞれリスクとなる可能性のある変異を見出した。また既知の疾患関連多型も多数同定し、今後病態との関連を調べるための患者群遺伝子型データを整備した。今後は解析サンプル数を増やすとともに、リスクプロタイプの同定および一般集団での変異・多型頻度の解析を行っていく。

づく診断基準の作成に役立てることをめざす。

A. 研究目的

周期性発熱には診断が困難なものが多く含まれており、そのなかに遺伝的要因の関与するものが多数あることが明らかになってきた。しかし、遺伝子変異が周期熱という特殊な病態にどのように関わっているのか、その発症機序への関与についてはほとんどわかっていない。本研究班では自己炎症症候群の典型的疾患であるTNF 受容体関連周期性症候群（TRAPS）の遺伝子解析による疾患関連変異の同定、疾患発症メカニズムの解明を目指している。遺伝子解析技術の進展とともに、主に海外の研究で自己炎症症候群の患者の疾患関連遺伝子に非常に多様な変異が同定されてきている。しかし、そのなかには日本人集団では一般人で頻度が高い多型や、これまで全く検出されていない変異が含まれており、また、その生物学的意味の解明は不十分である。遺伝子解析研究に共通の問題として、多数のサンプルによる統計学的手法を用いて疾患要因変異を絞り込み、その機能解析を行うことが必要となってきている。本研究では、本邦の症例での遺伝子型データを集積し臨床情報との関連を調べていくことにより、エビデンスに基

B. 研究方法

遺伝子解析は、TRAPS ならびにそれと鑑別が必要な家族性地中海熱、メバロン酸キナーゼ欠損症の原因遺伝子について行う。これら遺伝子（TNFRSF1A, MEFV, MVK）のすべてのエクソンをそれぞれ特異的に増幅するプライマーを設定し、これによるPCR産物のシーケンス解析を行う。ここでキャピラリー電気泳動により得られたクロマトファイルをリナックスサーバーに設置した一連のソフトウェアを利用して解析する。すなわち、Phred/Phrapにより塩基配列を相互に整理し、Polyphredにより変異を検出したあとConsedにより画面表示し、目視により確認する。検出された変異の周辺配列をUCSC genome browserのBLAT機能によりヒトゲノム参照配列と整理し、変異部位を確認する。更に、それが、dbSNPや、疾患遺伝子データベースに登録されているかどうかを検討する。また一般人サンプルでの同変異の出現頻度を同様の塩基配列解析により検討する。dbSNPのbuild132のデータには、1000ゲノム計画のパイロット解析データも含まれており、頻度の

高い一塩基多型 (SNP) はほぼ網羅されている。さらに次世代シーケンサでの解析結果をもとにしたアレル頻度の情報も多く、SNPについて提供されているので、その情報も利用する。

(倫理面への配慮)

TRAPS 疑い患者の遺伝子解析は、九州大学倫理委員会の承認を得ている。各施設から送られてきた患者検体は、九州大学病院医療情報部にて資料番号を付けて連結可能匿名化されている。健常人試料は、文部省がん特定研究「コホート研究による発がん要因の評価に関する研究班」によって1996年までに収集された検体の一部（連結不可能匿名化されたもの）の分与を受け、遺伝子解析に関する九州大学倫理委員会の承認を得たものである。

C. 研究結果

TRAPS 疑い患者37名について、TNFRSF1A, MEFV, MVKの3つの遺伝子のエクソン領域のシーケンス解析を行い、多数の変異・多型を見出した(図2)。今回は非同義置換についての解析結果を以下に示す。

1) TNF 受容体1 型遺伝子 (TNFRSF1A) 異常

・61 番目のアミノ酸、スレオニン (T)からイソロイシン(I) への置換: T61I

TRAPS 疑い患者のうち2名 (2.7%) にヘテロで検出した。これは、健常人359名における頻度 (1.1%)より、やや高い。

・321番目のセリン (S)からイソロイシン(I) への置換: S321I

患者1名にヘテロで検出した。これは、dbSNPにも自己炎症症候群遺伝子データベース (Infevers) にも登録されておらず、また健常人にも検出されていない新規の変異である。

・その他の多型、変異

欧米人においてR92Q, P46Lのアミノ酸置換をもたらす変異は、TRAPS 患者での頻度が健常人での頻度より高いことよりTRAPSの発症に関連した多型と考えられている。しかし、これらは日本人検体(患者・健常人合わせて396名)ではまったく

認められなかった。

2) 家族性地中海熱の原因遺伝子 (MEFV) がコードするタンパク質Pyrinの異常

・84 番目のグルタミン酸(E) からリジン (K) への置換: E84K

患者1名にヘテロで検出した。この変異は本邦のほかの家族性地中海熱患者でも報告されている。ただし、一般人でもヘテロの検体が見出されたので、今後検体を増やして確認していく必要がある。

・503番目のセリン(S)からシステイン(C) への置換: S503C

患者3名にヘテロで検出した。この変異は本邦のほかの家族性地中海熱患者でも報告されている。dbSNPには登録されていない。

・591番目のイソロイシン(I)からスレオニン(T) への置換: I591T

患者1名にヘテロで検出した。この変異は海外で報告がある。HapMapデータベースのアジア人健常人では見つからない。

・その他の多型、変異

非同義置換として、L110P, E148Q, R202Q, P369S, R408Q が患者検体で同定されたが、いずれも健常人試料あるいは1000ゲノムのアジア人 (JPT+CHB 60人)で2%以上のアレル頻度を示した。

3) メバロン酸キナーゼ欠損症の原因遺伝子 (MVK) の異常

これまでのところ、アミノ酸置換をもたらす変異は検出されていない。

D. 考察

周期性発熱を症状とする遺伝性疾患である TNF 受容体関連周期性症候群、家族性地中海熱、メバロン酸キナーゼ欠損症の遺伝子解析のシステムを構築し、TRAPS 疑いの患者検体として全国各施設より平成 22 年度に送付された試料の塩基配列解析を完了した。現在までに収集された検体では TRAPS の重篤な症例で報告されている TNF1 型受容体細胞外ドメインのシステイン残基のアミノ酸置換は検出されていない。より影響の小さいアミノ酸置換である T61I については TRAPS のリスク

となる遺伝子異常である可能性が報告されており、本研究でも初期サンプルの解析ではアレル頻度が高かった。しかし、サンプル数を増加することにより頻度が低下したので、この変異についての結論はさらにサンプル数を増やした結果を待つ必要がある。またこのほかの稀な遺伝子変異についてもさらに多くの患者・健常人でのアレル頻度を検討する必要がある。

今回鑑別診断のために行った家族性地中海熱の原因遺伝子(MEFV)解析では非常に多数の変異が見つかった。これらの多くは一般人にも低頻度一中頻度で見出される多型である。MEFVは常染色体劣性の遺伝様式を示すことから、リスクアレルが非発症者に見つかる可能性もあり、判定はより困難である。今後はサンプル数を増やしてこの遺伝子の稀な変異を含むハプロタイプを決定し、コンパウンドヘテロ接合体の症例を同定することを試みたい。

アミノ酸置換を伴う非同義置換については、それがタンパク質の構造・機能に及ぼす影響を調べていくことも重要であり、今後Polyphenなどのソフトウェアで解析を進める。それ以外の変異についても、mRNAの構造、翻訳効率や安定性に影響を与える可能性がある。たとえば、最近の報告ではクローン病の感受性に同義置換が関連するという報告があるが、これは置換部位がマイクロRNAの結合サイトであるという新しい疾患感受性メカニズムを提起するものであった。常に新しい情報学的ツールを利用して、臨床情報と統合して解析することが重要と考える。

E. 結論

全国調査によりTRAPS患者である疑いが持たれた37人のサンプルについて、TRAPSならびに鑑別すべき2疾患(家族性地中海熱、メバロン酸キナーゼ欠損症)の原因遺伝子解析に着手し、TNFI受容体あるいはpyrinタンパク質のアミノ酸配列変化をもたらす複数の変異を見出した。このなかには一般人集団にも数%の頻度で存在する一塩基多型によるものも含まれており、これらに関して

はさらにサンプル数を増やして統計的解析を行う必要がある。欧米の解析で見出されているTRAPS変異はいまのところ検出されておらず、変異のスペクトラムが本邦では異なっている可能性が示された。今後、遺伝子解析をさらに進めてより多数の患者検体および対照検体の遺伝子型情報を得るとともに、同定した変異の生物学的意義を実験的・情報学的に検討することが重要であると結論した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mutation in TSPAN12 gene in Japanese patients with familial exudative vitreoretinopathy. Kondo H, Kusaka S, Yoshinaga A, Uchio E, Tawara A, Hayashi K, Tahira T. *Am. J. Ophthalmol.* in press

2. A definitive haplotype map as determined by genotyping duplicated haploid genomes finds a predominant haplotype preference at copy number variation events. Kukita Y, Yahara K, Tahira T, Higasa K, Sonoda M, Yamamoto K, Kato K, Wake N, Hayashi K. *Am. J. Hum. Genet.*, 86(6):918-928 (2010)

3. Impact of group IVA cytosolic phospholipase A (2) gene polymorphisms on phenotypic features of patients with familial adenomatous polyposis. Umeno J, Matsumoto T, Esaki M, Kukita Y, Tahira T, Yanaru-Fujisawa R, Nakamura S, Arima H, Hirahashi M, Hayashi K, Iida M. *Int J Colorectal Dis.*, 25, 293-301 (2010)

2. 学会発表

Tahira T, Kukita Y, Yahara K, Sonoda M, Yamamoto K, Wake N, Hayashi K. A definitive haplotype map derived from homozygous genomes as a basis for disease gene study. 60th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Washington DC, U.S.A. Nov. 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得