

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

高 IgD 症候群の遺伝子診断に関する研究

研究分担者：小原 収

（かずさ DNA 研究所副所長）

研究要旨

高 IgD 症候群は、多くの臨床家において、未知の疾患である。本疾患に対する診療体系を確立するためには、その診断方法を確立し、治療基盤を提示する必要がある。しかし、日本における現状は、未だ確定診断方法すら存在しえない状況である。そのため、一般臨床家においては、周期性発熱疾患として、高 IgD 症候群が念頭に入っていない状況である。

高 IgD 症候群の原因は、メバロン酸キナーゼ（MK）活性低下であるが、メバロン酸キナーゼ活性測定系は日本では確立されておらず、欧米において報告されているメバロン酸キナーゼ(MVK)遺伝子の変異を同定することが、確定診断につながる方策である。しかし、我々の遺伝子解析データの蓄積から、疑い症例の中に MVK 遺伝子変異が見出される割合は極めて低いことが分かった。そこで、将来より大規模に高 IgD 症候群の原因遺伝子変異解析を効率的に行えるように、今年度は次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンスのパフォーマンスを検討し、解析プロトコルを確立した。

A. 研究目的

自己炎症性症候群の概念が提唱されるようになり、やっと10年が経過したばかりである。いわんや高 IgD 症候群は、多くの臨床医にとって、血清 IgD の高い疾患として理解されているのが現実である。しかしながら、京大グループにより、大多数の日本人の高 IgD 症候群の血清 IgD 値は、正常範囲内に留まることが明らかにされた。

このような背景もあり、我国の高 IgD 症候群に対する診療体系は、混乱を極めている。これを解決するに、現在、オランダの研究所にメバロン酸キナーゼ活性測定を依頼するケースが多い。しかし、これは煩雑であり、費用もかかるため、疑い症例すべてにおいて行える検査ではない。

このような背景のもと、現在行える現実的な確定診断方法は、メバロン酸キナーゼ遺伝子変異を同定し、欧米での報告例と対比することにより診断する方法である。このため、周期性発熱をきたし、診断に苦慮する患者さんに対して、高 IgD 症候群を含む自己炎症性疾患に対する遺伝子診断を行うとともに、遺伝子解析データの蓄積から新たな診断方法の創出を目指す。

B. 研究方法

遺伝子解析は、末梢血からゲノムDNAを抽出し、高IgD症候群の原因遺伝子であるMVK遺伝子のエクソン2からエクソン11までのコード領域すべて（エクソン1は非コード領域である）と、エクソン-イントロン・ジャンクション部位のシーケ

ンスを行った。解析結果はヒトゲノムリファレンス配列におけるMVK遺伝子配列と比較し、一塩基多型データベース (dbSNP) 並びに理研で開発されたMutation@A Glance (<http://rapid.rci.riken.jp/mutation>) を用いて見出された配列変化のアノテーションを行った。さらに、次世代シーケンサーによる複数臨床検体の一括解析のパフォーマンス評価実験は、市販のヒトゲノムDNAを用いて、ロッシュGS FLXチタニウムシステムもしくはGS Juniorシステムを用いて解析した。

C. 研究結果

昨年来京都大学からの検体を中心にMVK遺伝子の構造解析を行ってきたが、並行して、かずさDNA研究所では厚労省難治性疾患克服研究事業「原発性免疫不全症候群に関する調査研究」における調査研究班の多施設共同研究として広く免疫不全症の遺伝的原因の解析を進めている。今年度改めてその解析データを統計的に見直したところ、現在までにMVK遺伝子解析データが総数100件以上集積していた。しかし、その統計データ解析から、MVK疑い臨床例に実際に病因と考えられる変異が見出される頻度は多くても1%程度でしかないことが明らかとなった。この結果は、MVK遺伝子に原因変異があるかどうかを確定診断に用いるためには、従来のPCR法とキャピラリーシーケンシング技術に依存した方法では効率が悪すぎることを示している。そこで、多数の臨床検体の遺伝子解析を同時並行で進められるように、PCR法で調製したアンプリコンを迅速にロッシュ次世代シーケンサ

一で解析可能とすることを計画した。そのためには多検体のアンプリコン調製を効率化する必要があり、Multiplex Identifier (MID)を2段階でアンプリコンに付与するプロトコルを確立した。これにより、小型次世代シーケンサーであるロッシュ GSジュニアを用いてさえも、100種類程度の臨床検体を一度に1日でシーケンス解析する技術基盤が確立できた。これに要するコストも十万円程度に抑えることができ、広い疑い例に対して MVK 遺伝子変異の有無によるスクリーニングをかけることを現実的な選択肢とすることができた。

D. 考察

これまでの研究から、我国において、欧米で理解されている表現型とは異なる様式で高 IgD 症候群が診断不明のまま潜在、もしくは他の疾患群として診断・加療されている可能性が考えられてきた。このことは患者側からすれば、他疾患と診断を受け副腎皮質ホルモン剤などの投与を受けその副作用に晒されるリスクや、高 IgD 症候群が精神運動発達には影響を及ぼさないにも関わらず、欧州のレビューにあるように進学や就職において不利益を被るなどといった状況が想定される。

我国における高 IgD 症候群の正確な診断のためは、今後も臨床症状の可能性を広く捉えて遺伝子解析を続行すべきであり、今回の次世代シーケンサーを用いた解析基盤はより広く MVK 遺伝子変異の探索を可能にすると期待できる。

E. 結論

高 IgD 症候群の確定診断のためには、MVK

遺伝子の全コード領域の配列解析が現時点では最も確実な手段である。しかし、従来のキャピラリー電気泳動に依拠した解析では、その解析に要する時間的・人的コストが大きな負担となる。それを解消するために、近年進歩の著しい次世代シーケンシング技術を導入し、簡便な臨床検体のマルチプレックス解析のためのタグ付加法の有効性を証明した。こうして見出された遺伝子変異の機能的影響を評価するためのツールとして、新たに理化学研究所グループと共同で Mutation@AGlance を開発した。これらの基盤は、今後の MVK 遺伝子解析の迅速化と省力化に大きな貢献をするものと期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

- Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T. Clinical and Host Genetic Characteristics of Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases in Japan. *J Clin Immunol*. 2011 Jan 8. [Epub ahead of print]
- Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu H, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients. *Clin Immunol*. 2010 Dec 3. [Epub ahead of print]
- Aghamohammadi A, Imai K, Moazzami K, Abolhassani H, Tabatabaeiyan M, Parvaneh N, Nasiri Kalmarzi R, Nakagawa N, Ohshima K, Ohara O, Nonoyama S, Rezaei N. Ataxia-telangiectasia in a patient presenting with hyper-immunoglobulin M

- syndrome. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2010 20(5):442-445.
- Tsuge I, Kondo Y, Nakajima Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Ohara O, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Urisu A. Hyper IgM syndrome and complement Clq deficiency in an individual with systemic lupus erythematosus-like disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2010 28(4):558-60.
 - Hijikata A, Raju R, Keerthikumar S, Ramabadran S, Balakrishnan L, Ramadoss SK, Pandey A, Mohan S, Ohara O. Mutation@A Glance: an integrative web application for analysing mutations from human genetic diseases. *DNA Res.* 2010 Jun;17(3):197-208.

Diseases XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID2010) 2010年10月 Istanbul, Turkey

2) 学会発表

- 本間健一、今井耕輔、釜江智佳子、中川紀子、野々山恵章、大嶋宏一、満生紀子、小原收、Sheela Nampothiri, Deepti Suri, Amit Rawat, Surjiti Singh 最近3年間にインドより当科へ紹介された原発性免疫不全症に対する検討
第四回日本免疫不全症研究会 2011年1月22日 九州大学
- Kumar Ramadoss S, Keerthikumar S, Raju R, Kandasamy K, Balakrishnan L, Dhevi Nagarajha Selvan L, Raja Sekhar N, Mohan S, Bhattacharjee M, Hijikata A, Imai K, Kanegane H, Miyawaki T, Nonoyama S, Pandey A, Ohara O, Mohan S. Resource of Asian Primary Immunodeficiency Diseases (RAPID) update: an open web-based integrated molecular database on primary immunodeficiencies 9th European Conference on Computational Biology (ECCB10) 2010年9月 Ghent, Belgium
- Kumar Ramadoss S, Keerthikumar S, Raju R, Kandasamy K, Balakrishnan L, Dhevi Nagarajha Selvan L, Raja Sekhar N, Bhattacharjee M, Hijikata A, Imai K, Kanegane H, Miyawaki T, Nonoyama S, Pandey A, Ohara O, Mohan S. RAPID elucidation of autoimmune-mediated inflammatory disease regulatory mechanisms and depiction of signaling pathways in Primary Immunodeficiency

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

高 IgD 症候群の迅速鑑別診断に向けた尿中メバロン酸測定系の開発に関する研究

研究分担者：重松 陽介
(福井大学医学部看護学科健康科学教授)

研究要旨

高 IgD 症候群は、コレステロール合成に重要なメバロン酸キナーゼをコードする遺伝子の変異が原因であり、尿中のメバロン酸（MVA）排泄量が軽度上昇しているとされている。昨年度の研究で開発した尿中 MVA 分析法を更に改良し、疑い例の化学診断及び既診断例における病態や治療効果の評価に対応した。この方法は、安定同位体希釈法により MVA のラクトン体をガスクロマト質量分析計で簡便に高感度分析する方法であるが、標識体と非標識体の質量数差が 2 と少なく、キャピラリーカラムを用いても両者のピーク保持時間が重なる弱点がある点に関して、昇温分析条件の調整により精度を確保した。平成 22 年度に分析した疑い例 11 例では、尿中 MVA は 0.072-0.61 $\mu\text{g}/\text{mgCr}$ (mean \pm SD: 0.189 \pm 0.116) と増加しておらず、患者ではないと判断された。HIDS 患者 1 例（尿中 MVA：有熱時 107.8、無熱時 33.7 $\mu\text{g}/\text{mgCr}$ ）において、診断後の治療経過として尿中 MVA をモニターしたところ、46.1-63.0 $\mu\text{g}/\text{mgCr}$ で推移し、意味のある変動はみられなかった。本法は簡便かつ精度の保たれた分析法であり、本症候群のスクリーニング法としてだけでなく、HIDS 患者の経過を評価する上でも充分活用できると考えられた。

A. 研究目的

高 IgD 症候群 (HIDS) は、コレステロール合成に重要な酵素であるメバロン酸キナーゼをコードする遺伝子の変異が原因であり、尿中のメバロン酸 (MVA) 排泄量が軽度上昇しているとされている。

本症患者においては、生後 1 年以内に悪寒と発熱の反復性発作が始まるが、この遺伝子異常が本症候群の臨床症状を引き起こす機序は未だ明らかではない。即ち、先天代謝異常症として知られ進行性の中樞神経障害を呈する“メバロン酸血症”とは臨床症状およびその重症度が明らかに異なる。また、尿中 MVA 排泄量もメバロン酸血症の方が遙かに多い。

昨年度の研究では、既報のガスクロマト質量分析 (GC/MS) 法による MVA 測定法に改良を加え、簡便迅速でかつ精度の高いスクリーニング法を開発した。本年度においては、この方法に更に改良を加え、疑い例のスクリーニング検査法として有用であるか検討するとともに、既診断患者の経過や治療効果判定に利用できるかどうかについても検討した。

B. 研究方法

試料調製は、これまでと同様の手順で行った。即ち、尿 0.5(0.05)mgCr 相当量に、内部標準[4,5-¹³C₂]mevalonolactone 1.5 μg を加え、5 N・HCl で pH2.0 として尿中 MVA をラクトン化した後、CH₂Cl₂-isopropanol (9:1) による抽出操作を行った。抽出溶媒は無水硫酸ナトリウムで脱水した後、窒素気流下で乾涸し、BSTFA を加えて室温で一晩反応させ、MVA のラクトン体であるメバロノラクトンを TMS 誘導体化した。

GC/MS 分析は、Thermo-Fisher 社製 DSQ

を使用し、試料導入イオン化は EI 法により行った。GC には HP 社製 Ultra-1 キャピラリーカラムを使用し、昇温プログラムを複数採用して分析した。データ記録は、selected ion monitoring (SIM) により [M-15]⁺ イオンをモニターし、クロマトグラムのピーク面積を用いて定量を行った。

C. 研究結果

本年度に分析対象とした HIDS 疑い患者 11 例では、尿中 MVA 排泄量は 0.072-0.61 μg/mgCr (mean ± SD : 0.189 ± 0.116) であった。HIDS 患者 1 例 (尿中 MVA : 有熱時 107.8、無熱時 33.7 μg/mgCr) において、診断後の治療経過として尿中 MVA をモニターしたところ、46.1-63.0 μg/mgCr で推移した。また、本年度新たに分析対象とした既診断例での尿中 MVA は無熱時で 17.3 μg/mgCr であった。

D. 考察

本年度の HIDS 疑い患者 11 例の尿中 MVA 排泄量は、前年度の健常対照値 (0.163 ± 0.089) と比べても高い値ではなく、また患者での排泄量域から比べても低い値であったので、患者ではないと判断した。新たに測定した既診断 HIDS 患者の無熱時 MVA 排泄量は患者での排泄量域にあり、確実にスクリーニング出来ることが確認された。HIDS 患者の診断後の治療経過における尿中 MVA 排泄量は、有熱時排泄量よりやや低い値で推移し、特段の治療効果を反映したものではなかったものの、経過をモニターする方法の 1 つとして役立てられると思われた。

E. 結論

GC/MSにより尿中MVA排泄量を定量する本法は、簡便かつ精度の保たれた分析法であり、本症候群のスクリーニング法としてだけでなく、HIDS患者の経過を評価する上でも充分活用できると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

- 1) Shigematsu Y, Hata I, Tajima G: Useful second-tier tests in expanded newborn screening of isovaleric acidemia and methylmalonic aciduria. *J Inherit Metab Dis.* 33(Suppl.2); S283-288, 2010.
- 2) Shirao K, Okada S, Tajima G, Tsumura M, Hara K, Yasunaga S, Ohtsubo M, Hata I, Sakura N, Shigematsu Y, Takihara Y, Kobayashi M: Molecular pathogenesis of a novel mutation, G108D, in short-chain acyl-CoA dehydrogenase identified in subjects with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Hum Genet.* 127(6): 619-628, 2010.
- 3) Tsuburaya R, Sakamoto O, Arai N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shigematsu Y, Takayanagi M, Ohura T, Tsuchiya S: Molecular analysis of a presymptomatic case of carnitine palmitoyl transferase (CPT I) deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening in Japan. *Brain Dev* 32(5): 409-411, 2010.

2) 学会発表

1. 酒井秀政、西小森隆太、畑郁恵、重松陽介、大嶋宏一、小原収、八角高裕、平家俊男：高 IgD 症候群が隠れていませんか？ 酵素活性測定法による確定/除外診断法。第 113 回日本小児科学会学術集会。2010. 4. 盛岡市。日本小児科学会雑誌。114 巻 2 号；270, 2010.
2. Bijarnial S, Puri RD, Saxena R, Ramachandran V, Verma J, Shigematsu Y, Yamaguchi S, Verma IC: Biochemical and molecular diagnosis of Organic Acidurias – Experience at Sir Ganga Ram Hospital. The annual meeting of Indian Academy of Pediatrics. 2011,1. New-Dehli. India.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

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

自己免疫疾患の疫学に関する研究

研究分担者：横田 俊平

（横浜市立大学医学研究科小児科学教授）

研究要旨

反復性発熱を伴う高 IgD 症候群は、メバロン酸キナーゼ（MK）をコードする MVK 遺伝子の機能喪失型変異により発症する自己炎症性疾患の 1 つである。その臨床症状は、炎症症状としての発熱、関節炎に留まるものから、精神発達遅延、小脳失調、発育不全、白内障等の重度障害を来すものまで存在する。世界で 100 例以上が報告されているのに対し、日本では 2008 年末時点で 2 症例が報告されているのみであった。本症の特異な臨床的所見は周期性発熱のみであり、臨床所見からの確定診断は困難である。そのため、種々の自己免疫疾患とも混同されている場合もあるのではないかと推測される。

我々は、日本における小児自己免疫疾患について、網羅的に診療、解析を行っている。日本の小児自己免疫疾患の現状を再度評価することにより、自己炎症性疾患（高 IgD 症候群を含む）との鑑別について、考察する。

A. 研究目的

反復性発熱を伴う高 IgD 症候群はメバロン酸キナーゼ (MK) をコードする MVK 遺伝子の機能喪失型変異により発症する自己炎症性疾患の 1 つである。世界で 100 例以上が報告されているのに対し、日本では平成 20 年度末で 2 症例が報告されているのみである。また、高 IgD 症候群の学会報告は散発的に認めるものの、それらを体系的に評価した報告はない。反復性発熱を伴う高 IgD 症候群の主症状は周期性発熱であり、高 IgD 症候群の診療体系が確立されていない現在、自己免疫疾患との鑑別に苦慮する症例が存在することも推測される。

自己免疫疾患 (リウマチ・膠原病) は多くの症例で不明熱を初発症状として認めることから、高 IgD 症候群を鑑別するうえできわめて重要な疾患群である。とくに難治例の検討が重要であることから、難治例を対象に全国約 3,500 施設に一次調査を実施し、難治例を集計することとした。同時に炎症学的検討により、難治性病態の解明を行い、治療法の是非につき検討を行う。これらの研究の総合的な帰結として、現時点で最良と考えられる診断・治療ガイドラインの作成を行う。

B. 研究方法

小児期の自己免疫疾患は、臨床的にはリウマチ・膠原病の範疇に属し、わが国では依然発生頻度すら明らかにされていない。臨床的には難治例の発生とその病態を検討することが喫緊に課題であり、そのための調査研究をすすめる。方法としては、一次アンケート調査により難治例の全国的な発生数を把握し、ついで二次詳細調査により病態の詳しい検討を行う。国際的な文献検索から当調査より得られた難治例の

病態につき検討を加え、かつ死亡例の収集を行い、担当医と病理医からなる検討会を開催して難治性病態の解明に当たる。その結果をもって診断・治療ガイドラインへつなげる。

C. 研究結果

全国約 2,843 施設にアンケートを行った結果、1,123 施設から回答を得た。このうち難治例を経験した施設は 410 施設にのぼった。症例は 2,832 例であった。

また自己炎症症候群については、42 例の報告があり、PFAPA 15 例、家族性地中海熱 11 例、TRAPS 4 例、CINCA 症候群 2 例などであった。

難治例は、若年性特発性関節炎が 1,319 例、全身性エリテマトーデスが 633 例、若年性皮膚筋炎が 252 例、小児強皮症が 31 例、混合性結合組織病が 92 例、血管炎症候群が 110 例であった。

死亡例の報告も得たが、若年性皮膚筋炎で 4.8%、混合性結合組織病で 4.3%と、成人に比較しても極めて高い頻度であることが判明した。

反復性発熱を伴う高 IgD 症候群においても、長期的にはアミロイドーシスの有無が予後を決定することも報告されており、種々の自己炎症症候群および自己免疫疾患における炎症病態の検討が必要である。

そこで、若年性皮膚筋炎死亡例につき担当医と病理医からなる検討会を開催したところ、全国から 5 症例の発表の承諾を得て、臨床的・病理学的な検討を行う機会を得た。その結果、いずれも「急速進行性間質性肺炎」にて死亡していることが判明した。病態は、当初は間質性肺炎であるが、血清中 KL-6 が徐々に高値となり、凝固線溶系の過剰な機能亢進がすすみ肺臓の細小血管における microclots の形成が予後

に直接繋がっていることが報告された。したがって、まずは当初の間質性肺炎を収束させること、ついで肺内の凝固線溶系活性化をモニタリングして凝固調節因子の補充を積極的に行うことが重要であるという結論に至った。

D. 考察

反復性発熱を伴う高 IgD 症候群は周期性発熱、下肢痛などを主症状とする自己炎症症候群のひとつで、その鑑別疾患の主たるものとしてリウマチ・膠原病がある。今回、その難治性病態につき全国調査を踏まえ、実態の把握を行った。その結果、難治性病態を呈するリウマチ・膠原病は、全国くまなく存在しており、非専門施設での診断・治療に関する混乱が読み取れた。

とくに若年性皮膚筋炎、混合性結合組織病は、死亡率が4~5%に達しており、対策は喫緊の課題であることが判明した。

E. 結論

反復性発熱を伴う高IgD症候群との主要な鑑別疾患である小児リウマチ・膠原病の難治性病態の検討から、若年性皮膚筋炎、混合性結合組織において高い死亡率が把握された。その死亡原因については依然解明されておらず、今後、病理学的な検討が必須と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Yokota S, Kishimoto T. "Tocilizumab: molecular intervention therapy in children with systemic juvenile idiopathic arthritis." Expert Rev Clin Immunol.2010 ;6(5):735-43.

2. Tateishi U, Imagawa T, Kanezawa N, Okabe T, Shizukuishi K, Inoue T, Yokota S.
"PET assessment of disease activity in children with juvenile idiopathic arthritis."
Pediatr Radiol.2010;40(11):1781-8. Epub 2010 Jun 4.
3. Yokoyama U, Minamisawa S, Katayama A, Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, Iwasaki S, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Yokota S, Hammond HK, Ishikawa Y.
"Differential regulation of vascular tone and remodeling via stimulation of type 2 and type 6 adenylyl cyclases in the ductus arteriosus."
Circ Res. 2010;25;106(12):1882-92
4. Miyamae T, Sano F, Ozawa R, Imagawa T, Inayama Y, Yokota S.
"Efficacy of thalidomide in a girl with inflammatory calcinosis, a severe complication of juvenile dermatomyositis."
5. Sato M, Mori M, Nishimaki S, An H, Naruto T, Sugai T, Shima Y, Seki K, Yokota S.
"Soluble tumor necrosis factor receptor-1 in preterm infants with chronic lung disease."
Pediatr Int. 2010;52(2):268-72.
6. 横田俊平 "専門医のためのアレルギー学講座 アレルギー・免疫疾患の新規治療薬と治療法 小児における生物学的製剤の使い方. "
アレルギー 2010;59(7) : 785-794
7. 横田俊平 "【新法に向けての体制】 小

児における移植医療の課題と今後の展望 "移植 2010;45 (3) 211-217

なし

3. その他

8. 市川和志, 森雅亮, 大山宜孝, 小川真喜子, 塩島裕樹, 海老名奏子, 増田由香, 原田知典, 武下草生子, 菊池信行, 横田俊平("パンデミックインフルエンザ A(H1N1)2009 の感染により呼吸障害を呈した小児の 8 例 " 日本小児科学会雑誌 2010;114 (1) : 78-81
9. 横田俊平 "若年性特発性関節炎とマクロファージ活性化症候群 病態の把握とストラテジー " Source : Medical Science Digest 2010;36(4) 745-747
10. 横田俊平(2010) "目でみるシリーズ 若年性特発性関節炎(JIA) " Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology 4 (1) : 4-6

なし

2) 学会発表

1. Yokota,S. 「Clinical remission in children with systemic juvenile idiopathic arthritis receiving tocilizumab treatment」 E U L A R 2010.
2. Yokota,S. 「Management of Kawasaki Disease」 APLAR 2010
3. Yokota,S. 「Efficacy of Add-on Treatments of Tacrolimus and Methotrexate for patients with deteriorated articular manifestation of systemic-onset juvenile idiopathic arthritis during Tocilizumab Treatment」 PRES 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

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

日本人高 IgD 症候群の臨床所見の把握に関する研究

研究分担者：荒川 浩一 群馬大学大学院小児科学教授
研究協力者：水野 隆久 群馬大学医学部附属病院小児科

研究要旨

高 IgD 症候群はメバロン酸キナーゼ（MK）をコードする MVK 遺伝子の機能喪失型変異により発症する自己炎症性疾患の 1 つである。その臨床症状は、炎症症状としての発熱、関節炎に留まるものから、精神発達遅延、小脳失調、発育不全、白内障等の重度障害を来すものまで存在する。世界で 100 例以上が報告されているのに対し、日本では 2008 年末時点で 2 症例が報告されているのみであった。本症の特異な臨床的所見は周期性発熱のみであり、臨床所見からの確定診断は困難である。また、名前の由来となっている高 IgD 血症を呈さない症例の報告も多い。一方、確定診断に結びつく MK 活性測定、尿中メバロン酸測定は国内では確立されておらず、現時点での日本における高 IgD 症候群の診療体系は未整備である。

我々は、周期熱を示す 3 兄妹において、遺伝子検査、尿中メバロン酸測定、メバロン酸キナーゼ活性測定をすることにより、初めて高 IgD 症候群と診断しえた症例を経験した。この患者さんにおける臨床症状、検査所見等、患者プロフィールを集積し、欧米例と対比検討した。

A. 研究目的

高 IgD 症候群はメバロン酸キナーゼ (MK) をコードする MVK 遺伝子の機能喪失型変異により発症する自己炎症性疾患の 1 つである。世界で 100 例以上が報告されているのに対し、日本では H20 年度末で疑い 2 症例が報告されているのみである。また、高 IgD 症候群の学会報告は散発的に認めるものの、それらを体系的に評価した報告はない。

一方、高 IgD 症候群診断の精度という意味では、疑問の念が払拭しきれない。高 IgD 症候群の診断は、尿中メバロン酸高値、メバロン酸キナーゼ (MK) 活性欠損という分子学的基盤をもって確定診断となる。しかし、日本においては、尿中メバロン酸測定、メバロン酸キナーゼ (MK) 活性測定は確立されておらず、上記の症例がどのような経緯をもって診断されてきたのか、しっかり検証を行う必要がある。

今回、我々は、京都大学医学部小児科との共同研究のもと、高 IgD 症候群と確定診断し得た 3 兄妹例を経験したので、その詳細について報告する。

B. 研究方法

【症例 1】3 歳 6 カ月、男児。

【症例 2】1 歳 5 カ月、女児。

1 卵性双胎第 1 子。

【症例 3】1 歳 5 カ月、女児。

1 卵性双胎第 2 子。

3 症例ともに生後 1 カ月頃より炎症反応高値の発熱を繰り返したが、各種感染症検査、免疫能検査では異常所見はみられなかった。血清 IgA、IgD の上昇もみられなかった。この 3 症例に対して、高 IgD 症候群などの自己炎症症候群を疑って原因遺伝子の検索、尿中メバロン酸キナーゼ測定、メバロン酸キナーゼ活性測定を行った。

C. 研究結果

MVK 遺伝子では、gDNA direct シークエンスにて、3 例ともに MVK 遺伝子の Exon4 の 1 塩基手前に Heterozygous G>A の変異、Exon9 に Heterozygous T>C を認めた。また、両親も同様の検査を行い、Exon4 の 1 塩基手前の変異は父親由来、Exon9 の変異は母親由来と考えられた。さらに、mRNA RT-PCR for exon2-exon5(505bp)にて、Exon4 の 1 塩基手前に Heterozygous G>A の変異を持つ 4 人において、約 150bp の短いバンドを確認した。また、3 兄妹にて Subcloning cDNA Sequence を行い、cDNA の片方のアリル (Clone B) で Exon4 の欠失を、もう片方のアリル (Clone A) で Exon9 の変異を認めた。以上により、3 兄妹の MVK 遺伝子変異は Compound Heterozygous と確定した。

次に、3 兄妹におけるメバロン酸キナーゼ活性を測定したところ、コントロールと比較して著しく低下していた。また、発作時と間欠時における尿メバロン酸は、コントロールと比較して、いずれも高値を示した。以上により、3 症例ともに IgD 高値を認めなかったが、高 IgD 症候群と確定した。

D. 考察

Ammouri らによると (Rheumatology 46,1597-1600,2007)、高 IgD 症候群を臨床的に疑った患者 50 名のうち、IgD 上昇を認めたのは 38 名、IgD 上昇を認めなかったのは 12 名であった。この 12 名のうち、mvk 変異を認めたのは 5 名であり、IgD はスクリーニングとして有用ではないとしている。さらに、発熱発作の初回年齢が低いほど IgD 正常例は多いと報告しており、本症例のように、発症年齢が低い場合には、川崎病などの鑑別に際し、IgD がスクリーニングとして特に有用ではないと考えられた。

Steichen らは、HIDS の患者は、5 歳以下の発症で、14 日以上痛みが持続しないことが 100% の感度で 28% の特異性であることを報告した。このことは、これらの 2 つの基準を満たさない患者では、不要な遺伝子解析を排除できることを示唆している (J Rheumatol 2009; 36; 1677-1681)。本症例では、3 兄弟ともに、上記 2 基準をみたし、感度は良好であると考えられた。現在、本症例は HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるシンバスタチンで治療中であり、発作頻度の減少ならびに軽症化が見られている。

E. 結論

Compound heterozygous な変異をもつ高 IgD 症候群の 3 兄妹例を経験した。3 例ともに血清 IgD の上昇はみられず、遺伝子検査、尿中メバロン酸測定、メバロン酸キナーゼ活性測定を行うことで診断しえた。本邦においても高 IgD 症候群の診療体系を整備する必要があると考えられた。また、2 つの基準で症例を限定したうえで、メバロン酸キナーゼ活性を測定し、さらに遺伝子解析をしていくことが効果的である可能性が示唆される。

現在、京都大学で本症例の iPS 細胞の確立のために検体を採取したところである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1) Nagai Y, Mizuno T, Yoshizawa C, Ishikawa O. Fatal interstitial pneumonia in juvenile dermatomyositis. Eur J Dermatol 2010;20:1-3.

2) Shiba N, Kanazawa T, Park MJ, Okuno H, Tamura K, Tsukada S, Hayashi Y, Arakawa H. NOTCH1 mutation in a female with

myeloid/NK cell precursor acute leukemia. Pediatr Blood Cancer. 2010; 55:1406-9.

3) Shiba N, Kato M, Park MJ, Sanada M, Ito E, Fukushima K, Sako M, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in juvenile myelomonocytic leukemia and pediatric myelodysplastic syndrome. Leukemia 2010;24:1090-2

4) Ishige T, Tomomasa T, Takebayashi T, Asakura K, Watanabe M, Suzuki T, Miyazawa R, Arakawa H. Inflammatory bowel disease in children: epidemiological analysis of the nationwide IBD registry in Japan. J Gastroenterol. 2010;45:911-7

5) Seki M, Kobayashi T, Kobayashi T, Morikawa A, Otani T, Takeuchi K, Ayusawa M, Tsuchiya K, Yasuda K, Suzuki T, Shimoyama S, Ikeda K, Ishii Y, Arakawa H. External Validation of a Risk Score to Predict Intravenous Immunoglobulin Resistance in Patients With Kawasaki Disease. Pediatr Infect Dis J. 2011;30:145-7

2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 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

高 IgD 症候群の病態に関する検討

研究分担者：原 寿郎

（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野教授）

研究要旨

高IgD症候群はメバロン酸キナーゼをコードするMVK遺伝子の遺伝子変異によって起こる。高IgD症候群患者は通常乳児期に発症し、周期的に発熱がおこり、リンパ節腫大、腹痛、関節痛、発疹などを伴い、高IgD血症を呈する。世界で100例以上が報告されているのに対し、日本では数家系しか報告されていない。我々は平成20年度に原発性免疫不全症候群に関する全国疫学調査を行い、高IgD症候群は1次調査で4名が登録されたが、その内2名は二次調査で高IgD症候群ではないことが判明し、国内ではこの疾患は極めてまれであると考えられ、その病態の解明は進んでいない。今回、同じ自己炎症性疾患であり、発熱周期や発熱持続期間が高IgD症候群に類似するPFAPA

(periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, adenitis) 患者の一部が高IgD血症を呈していたことに注目し、高IgD血症のおこるメカニズムについて検討を行った。高IgD血症を5名のMVK遺伝子を解析したが異常を認めなかった。患者末梢血を抗CD19抗体、抗IgD抗体、抗CD27抗体で染色し、リンパ球領域をCD19陽性細胞にGateをかけ解析したところ、IgD⁺CD27⁻B細胞の割合がコントロールと比較して高いことが判明した。発熱時と非発熱時との比較では、明らかな差は認められなかった。IgD⁺CD27⁻B細胞はナイーブB細胞より未分化なB細胞と一般的に考えられているが、PFAPA患者ではB細胞分化は全体としては保たれており、成熟B細胞やメモリーB細胞も認められる。この点を考慮すると、高IgD血症を呈した患者ではナイーブB細胞のIgDの発現が低下していると考えられ、IgD産生亢進を反映している可能性がある。このようなB細胞の分化状態や活性化状態の特徴が高IgD症候群の病態に関連しているものと考えられる。

A. 研究目的

高 IgD 症候群はメバロン酸キナーゼをコードする MVK 遺伝子の遺伝子変異によって起こる。高 IgD 症候群患者は通常乳児期に発症し、周期的に発熱、リンパ節腫大、腹痛、関節痛、発疹がみられ、1回の発熱発作は4-8日程度であり、約4-8週間隔でおこる。また下痢や嘔吐、頭痛などを伴うこともある。世界で100例以上が報告されているのに対し、我が国からの報告は極めて少ない。我々が平成20年に行った原発性免疫不全症候群に関する全国疫学調査を行ったところ、自己炎症性疾患全体で157名が報告された。その内、高 IgD 症候群と診断された患者は4名であったが、その内例は二次調査の結果高 IgD 症候群ではなかった。このように高 IgD 症候群は国内では極めてまれであり、高 IgD 血症がおこるメカニズムを含め、病態の解明が進んでいない。

今回、同じ自己炎症性疾患であり、発熱周期や発熱持続期間が高 IgD 症候群に類似する PFAPA (periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, adenitis) 患者の一部が高 IgD 血症を呈していたことに注目し、高 IgD 血症のおこるメカニズムについて検討を行った。

B. 研究方法

九州大学病院に受診した18名のPFAPAと診断された患者を対象とした。血清のIgDを測定し、末梢血B細胞の分化状態を解析するためCD19陽性細胞のIgDおよびCD27の発現について解析した。

C. 研究結果

PFAPA患者の男女比は12:6と男性に多かった。年齢は1歳9か月から16歳であり、発症年齢は5か月から4歳であった。16歳の患者は扁桃摘出術にて一旦発熱がなくなっていたが、その後再発し、シメチジン内服にて寛解し、その後シメチジンも中止できた。血清IgD濃度がカットオフ値である14 mg/dlを超えた患者は5名認められた。PFAPAは発熱の周期、発熱持続期間が高IgD症候群に類似しているため、これら5名のMVK遺伝子を解析したが異常を認めなかった。

患者末梢血を抗CD19抗体、抗IgD抗体、抗CD27抗体で染色し、リンパ球領域をCD19陽性細胞にGateをかけ解析したところ、IgD⁺CD27⁻B細胞の割合がコントロールと比較して高かった。発熱時と非発熱時との比較では、明らかな差は認められなかった。

D. 考察

高 IgD 症候群は、国内ではまれであると考えられるが、この疾患に対する認識がたかまれば、より多くの患者数になる可能性もある。高 IgD 症候群で高 IgD 血症のおこるメカニズムやその意義については解明されていない。今回 PFAPA 患者を対象として、解析したところ、高 IgD 血症を呈していた PFAPA 患者では、IgD⁺CD27⁻B 細胞の割合が高いことが判明した。IgD⁺CD27⁻B 細胞はナイーブ B 細胞より未分化な B 細胞と一般的に考えられているが、PFAPA 患者では B 細胞分化は全体としては保たれており、成熟 B 細胞やメモリー B 細胞も認められる。この点を考慮

すると、高 IgD 血症を呈した患者ではナイーブ B 細胞の IgD の発現が低下しているものと考えられ、IgD 産生亢進を反映している可能性がある。このような B 細胞の分化状態や活性化状態の特徴が高 IgD 症候群の病態に関連しているものと考えられる。

E. 結論

高 IgD 血症を呈する PFAPA 患者では、IgD⁺CD27⁺B 細胞の割合が高かった。今後形質細胞や好塩基球の発熱時および非発熱時の IgD の発現についての解析が必要であると考えられる。PFAPA の治療薬であるシメチジンは好塩基球の遊走能を抑制することが知られており、これらの関連について解析することにより、高 IgD 血症を含めた高 IgD 症候群の病態を解明できる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusahara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T: Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan. *Journal of Clinical Immunology* (in press)

Takada H, Nomura A, Ishimura M, Ichiyama M, Ohga S, Hara T: NEMO mutation as a cause of familial occurrence of Behçet's disease in female patients. *Clin Genet* 78: 575-579, 2010

Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, Takahashi R, Asakawa M, Muto G, Mori T, Hasegawa E, Shizuya S, Hara T, Nomura M, Yoshimura A:

Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF- β -mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J Immunol* 185: 842-55, 2010

Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, Chrabieh M, Levy O, Arkwright PD, McDonald D, GeHA RS, Takada H, Krause JC, Creech CB, Ku CL, Ehl S, Maródi L, Al-Muhsen S, Al-Hajjar S, Al-Ghonaïum A, Day-Good NK, Holland SM, Gallin JI, Chapel H, Speert DP, Rodriguez-Gallego C, Colino E, Garty BZ, Roifman C, Hara T, Yoshikawa H, Nonoyama S, Domachowske J, Issekutz AC, Tang M, Smart J, Zitnik SE, Hoarau C, Kumararatne DS, Thrasher AJ, Davies EG, Bethune C, Sirvent N, de Ricaud D, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Guedes M, Vitor AB, Rodrigo C, Almazán F, Méndez M, Aróstegui JI, Alsina L, Fortuny C, Reichenbach J, Verbsky JW, Bossuyt X, Doffinger R, Abel L, Puel A, Casanova JL: Clinical Features and Outcome of Patients With IRAK-4 and MyD88 Deficiency. *Medicine (Baltimore)* 89: 403-425, 2010

Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Tabuchi T, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T, for The HLH/LCH and SCT Committees in the Japanese Society of Pediatric Hematology: Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatric Blood & Cancer* 54: 299-306, 2010

Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang R, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Sugita K, Ito E: Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica* 95: 1293-1299, 2010

Kusuda T, Hikino S, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Tokunaga S, Ihara K, Hata Y, Hara T: Genetic variation of vascular endothelial

growth factor pathway does not correlate with the severity of retinopathy of prematurity. J Perinatol 2010 (in press)

Kitajima J, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T: Serum prohepcidin concentrations at birth and one month after birth in premature infants. Pediatric Blood & Cancer 2010 (in press)

Tanabe F, Kasai H, Morimoto M, Oh S, Takada H, Hara T, Ito M: Novel heterogenous CHS1 mutations identified in five Japanese patients with Chediak-Higashi syndrome. Case report in Medicine (in press)

Ikeda K, Yamaguchi K, Tanaka T, Mizuno Y, Hijikata A, Ohara O, Takada H, Kusahara K, Hara T: Unique activation status of peripheral blood mononuclear cells at acute phase of Kawasaki disease. Clin Exp Immunol, 160, 246-55, 2010

Inoue H, Takada H, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Takahashi N, Morio T, Kosaki K, Hara T: Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism. Eur J Pediatr 169: 839-844, 2010

書籍

原 寿郎 自己炎症性症候群 今日の診断指針 症候編第6版、医学書院、東京、2010、印刷中

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
原 寿郎	自己炎症性症候群	金沢一郎 永井良三	今日の診断指針 症候編第6版	医学書院	日本	2010	印刷中
原 寿郎	小児疾患の動向	金沢一郎 永井良三	今日の診断指針 症候編第6版	医学書院	日本	2010	印刷中
土居岳彦、大賀正一、原寿郎	免疫疾患 慢性活動性EBウイルス感染症	五十嵐 隆	総合小児科診療のための小児科学レビュー-2010	総合医学社	日本	2010	印刷中

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tahara M, Sakai H, <u>Nishikomori R</u> , Yasumi T, <u>Heike T</u> , Nagata I, Inui A, Fujisawa T, Shigematsu Y, Nishijima K, Kuwakado K, Watabe S, Kameyama J	Patient with neonatal-onset chronic hepatitis presenting with mevalonate kinase deficiency with a novel MVK gene mutation	Rheumatology		in press	2011
Sakai H, Ito S, <u>Nishikomori R</u> , Takaoka Y, Kawai T, Saito M, Okafuji I, Yasumi T, <u>Heike T</u> , <u>Nakahata T</u>	A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gen	Rheumatology	49	194-196	2010
Nagai K, Yamamoto K, Fujiwara H, An J, Ochi T, Suemori K, Yasumi T, Tauchi H, Koh K, Sato M, Morimoto A, <u>Heike T</u> , Ishii E, Yasukawa M	Subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes	PLoS One	5	e14173	2010

Kambe N, Satoh T, Tanizaki H, Fujisawa A, Saito MK, <u>Nishikomori R</u>	Enhanced NF- κ B activation with an inflammasome activator correlates with activity of autoinflammatory disease associated with NLRP3 mutations outside of exon 3: comment on the article by Jéru et al.	Arthritis Rheum	62	3123-3124	2010
Kambe N, Nakamura Y, Saito M, <u>Nishikomori R</u>	The inflammasome, an innate immunity guardian, participates in skin urticarial reactions and contact hypersensitivity.	Allergol Int.	59	105-113	2010
Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusahara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, <u>Ohara O</u> , Hara T.	Clinical and Host Genetic Characteristics of Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases in Japan.	J Clin Immunol.		In press	2011
Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu H, Kamachi Y, <u>Ohara O</u> , Yachie A.	Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients.	Clin Immunol.	138	172-177	2011
Aghamohammadi A, Imai K, Moazzami K, Abolhassani H, Tabatabaeiyan M, Parvaneh N, Nasiri Kalmarzi R, Nakagawa N, Oshima K, <u>Ohara O</u> , Nonoyama S, Rezaei N.	Ataxia-telangiectasia in a patient presenting with hyperimmunoglobulin M syndrome.	J Investig Allergol Clin Immunol.	20	442-445	2010