

201128047A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

若年性特発性関節炎の遺伝的要因の実態

平成23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松本 直通

(横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学・教授)

平成24(2012)年 4月

目 次

I. 総括研究報告		
若年性特発性関節炎の遺伝的要因の実態 松本直通 (資料) 研究全体の流れと進行状況	-----	1
II. 分担研究報告		
1. トシリズマブ効果の検討 横田俊平	-----	9
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	15

平成23年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

若年性特発性関節炎の遺伝的要因の実態

研究代表者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科教授

若年性特発性関節炎（juvenile idiopathic arthritis, JIA）は、16歳未満で発症する関節を主病変とする慢性炎症性疾患で、その原因は未解明である。その発症には自己免疫が関与し、小児膠原病としては比較的頻度が高い。発症率は年間10万人に2-20人程度である。2008年に抗IL-6受容体抗体（tocilizumab）が、全身型JIAの症例に著効することが、研究分担者・横田らにより報告された（Lancet, 2008）。本研究は、JIAの遺伝的な原因解明を目的とした基礎・臨床研究を目指して開始した。1例でCASP10の13kbの遺伝子内欠失を認めたと、他の50症例での追試ではCASP10およびその機能的関連遺伝子CASP8の変異はなかった。さらに病的なCNVを探索するため全身型JIA50例に対して高密度マイクロアレー解析を行い両親には認めない約77Kbと622Kbの不連続な*de novo*重複（19番染色体）を1例に同定した。この重複領域内に存在する免疫系・炎症系に深く関与する10個の候補遺伝子をJIA責任遺伝子の有力な候補と考え変異スクリーニングを行ったが、明らかな変異は見出せなかった。

分担研究者

横田俊平・横浜市立大学医学部小児科

Kbにわたる遺伝子内欠失を同定した。本発見がJIAの根本的解明の突破口となる可能性が期待されたが、JIA50例を対象としてCASP10及びその機能的関連遺伝子CASP8の異常の遺伝的寄与度を調査することを目的とした。新たにJIAと関連する病的なCNVを探索するため全身型JIA50例に対して高密度マイクロアレー解析を行い染色体19番上に両親には認めない約77Kbと622Kbの不連続な*de novo*重複を1例に同定した。この重複領域内におよそ30程度の免疫系・炎症系に深く関与する候補遺伝子が包含されJIA責任遺伝子の有力な候補と考えられた。これらの候補遺伝子の変異スクリーニングを進めJIAの発症に寄与する遺伝子変異を同定することを目的とした。

A. 研究目的

若年性特発性関節炎（juvenile idiopathic arthritis, JIA）は、16歳未満で発症する関節を主病変とする慢性炎症性疾患で、その原因は未解明である。その発症には自己免疫が関与し、小児膠原病としては頻度が高い。発症率は年間小児人口10万人に2-20人程度である。2008年に抗IL-6受容体抗体（tocilizumab）が、全身型JIAの症例に著効することが、研究分担者・横田らにより報告された（Lancet, 2008）。本研究班は、JIAの遺伝的な原因解明を目的とした基礎・臨床研究を目指して構成された。研究代表者・松本は、全身型JIA50例に対して全ゲノムオリゴDNAアレー解析を開始した。その過程で、免疫系において極めて重要な遺伝子CASP10の13

B. 研究方法

I. 症例集積（横田・松本）

研究分担者横田は、横浜市大に於いて現在、JIA約200例を診療し、平成21年度

に全身型 JIA で Tolicizumab 治療例 50 例を解析対象とし集積し、現在各症例において末梢血リンパ球から DNA および細胞ペレットの調整とリンパ芽球化が完了している。発症率は年間 10 万人に 2-20 人程度で稀な疾患であるが、集積した検体は詳細な臨床情報が得られる質の高い貴重な研究リソースである。

II. CASP10 の JIA における寄与度を明らかにする (松本)

全身型 JIA 50 例を対象に高密度オリゴ DNA アレーを用いた全ゲノム CNV 解析を開始した。その過程で CASP10 の 13 Kb にわたる遺伝子内欠失を同定した。CASP10 の全身型 JIA 症例 50 例における変異解析を行った (研究代表・松本)。変異解析は、High Resolution Melting (HRM) 法を用いた。

III. 候補遺伝子アプローチ (松本)

CASP10 のコードするタンパク質の機能的関連する CASP8 も JIA の有力な責任候補遺伝子であり候補遺伝子を症例群で解析する。

IV. アレーによる全ゲノム微細構造異常解析 (松本)

Affymetrix 250K (全ゲノムに 25 万オリゴ DNA 搭載) または SNP 6.0 (全ゲノムに 185 万のオリゴ DNA 搭載) を用いて、JIA 症例群に対して全ゲノム微細構造異常解析を行う。同定された微細欠失・重複領域はカスタムアレー等で詳細に範囲を決定し、責任候補遺伝子リストを製作し、遺伝子変異探索を行う

V. 関連・責任遺伝子異常と JIA の臨床病型の比較検討 (横田・松本)

本研究で明らかになった各関連遺伝子型と JIA 症例の詳細な臨床情報を分析する。関連・責任遺伝子型に対応する臨床病型が明らかとなると期待される。

C. 研究結果

I. 症例集積と細胞株化

全身型 JIA 50 例の末梢血採取が完了し、DNA および細胞ペレットを調整しリンパ芽球株化も全て終了した。

II. CASP10 の解析

アレー解析を開始したが、その過程で免疫系において極めて重要な CASP10 の 13 Kb にわたる遺伝子内欠失を同定した。家系解析にて患児の父、妹にも同様の欠失がみられた。非常に興味深いことにこの遺伝子は既に優性遺伝性の Autoimmune lympho-proliferative syndrome (ALPS) の責任遺伝子としてミスセンス変異の報告がある。この欠失は *de novo* ではないが病的意義が疑われるため、患児の末梢血リンパ球由来のリンパ芽球から抽出した mRNA の sequence 解析ではフレームシフト変異による早期終始コドンの出現が確認された。その他の 49 症例に関しても同様にリンパ芽球から抽出した mRNA の変化を観察したが、異常サイズの mRNA が確認されたのは欠失症例のみで他の症例では正常サイズを示した。さらに、CASP10 の遺伝子内欠失を認めた JIA 患児において、ALPS に特徴的なリンパ球のアポトーシス障害や TCR α/β 陽性 CD4/CD8

陰性の double negative T cell の増加は認められなかった。このことは、*CASP10* が ALPS の責任遺伝子であるとする現在の説を覆す可能性のある極めて重要な知見であると考えられる。また集積した残りの 49 例を対象に HRM 法を用いて *CASP10* の変異解析を行ったが、変異は同定されなかった。以上の結果より、今回同定した *CASP10* の異常が JIA に及ぼす病的意義は小さい（稀）と考えられている。

III. 候補遺伝子アプローチ

CASP10 に機能的に関連する *CASP8* を候補として、II と同様に HRM 法を用いて変異解析を行ったが、病的な変異は同定されなかった。

IV. アレーによる全ゲノム微細構造異常解析

全身型 JIA 50 例を対象に高密度オリゴ DNA マイクロアレー (23 名 : Affymetrix Genechip Human Mapping 500K array , 27 名 : Genome-wide Human SNP array 6.0) を用いて、全ゲノムレベルの染色体微細構造異常解析を行い詳細について検討した。そして 1 例において染色体 19 番上に両親には認めない約 77 Kb と 622 Kb の不連続な *de novo* 重複を認めた。

V. 重複内に存在する候補遺伝子解析

この域内には約 30 の遺伝子が存在し、免疫系に関与する興味深い遺伝子も多数含まれ (*NLRP* 遺伝子クラスター等)、HRM 法を用いてこれらの遺伝子の変異解析を開始した。今後遺伝子変異・変化が同定されれば、新規責任遺伝子となる。このうち 10 の

候補遺伝子を選択した : *NLRP2*, *PTPRH*, *PPP6R1*, *HSPBP1*, *SUV420H2*, *IL11*, *FIZ1*, *EPN1*, *NLRP9*, 及び *NLRP11*。HRM にてスクリーニングを終了するも病的な遺伝子多型・変異は同定されなかった。

本研究は横浜市立大学倫理委員会の承認を受け適切な倫理的配慮と手続きを経て行われた。

D. 考察

全身型 JIA の遺伝的背景はほとんど不明で本研究班が目指す責任・関連遺伝子が解明されれば学術的・臨床的意義は大きい。IL-6 受容体に対するモノクローナル抗体による治療の有効性は高いが、約 15% の症例で全身炎症は沈静化しても関節破壊が進行する症例が存在し、責任・関連遺伝子を同定しその分子病態を解明していく必要がある。当初責任遺伝子の可能性が高いと考えられた *CASP10* については残念ながら 1 例にのみ認められる異常であり、その機能的な関連遺伝子 *CASP8* についても変異を同定できなかったことから JIA の責任遺伝子であるとの結論には至らなかった。しかし同様な炎症性疾患である ALPS の責任遺伝子であると認識されている *CASP10* の明らかな異常を認めたにもかかわらず本症例では ALPS を呈していない点は学術的には重要である。全ゲノムマイクロアレー解析で 1 例において染色体 19 番上に両親には認めない約 77 Kb と 622 Kb の不連続な *de novo* 重複を認めた。この領域内には約 30 の遺伝子が存在し、免疫系に関与する興味深い遺伝子も多数含まれ (疾患責任遺伝子と相同性のある遺伝子を含む)、HRM 法を用い

てこれらの遺伝子のうち 10 個を候補遺伝子として変異解析を行ったが変異は同定できなかった。

E. 結論

当初有力な候補遺伝子と想定された CASP10 の異常は最終的には解析した 50 例のうち 1 例にのみ認められる異常で全身型 JIA を広く説明する責任遺伝子である可能性は低いと考えている。全ゲノムアレー解析を通して新たに 77 Kb と 622 Kb の *de novo* 重複を同定しこの領域中に存在する 10 個の遺伝子を有力な候補遺伝子と考え解析を進めたが明らかな遺伝子変異は同定されなかった。

F. 健康危険情報

本研究遂行上、健康危機に関わる問題は生じていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tadaki H, Saitsu H, Kanegane H, Miyake N, Imagawa T, Kikuchi M, Hara R, Kaneko U, Kishi T, Miyamae T, Nishimura A, Doi H, Tsurusaki Y, Sakai H, Yokota S, *Matsumoto N. Exonic deletion of *CASP10* in a patient presenting with systemic juvenile idiopathic arthritis, but not with autoimmune lymphoproliferative syndrome type IIa. *Int J Immunogenet* 38: 287-293, 2011

Tadaki H, Saitsu H, Nishimura-Tadaki A, Imagawa T, Kikuchi M, Hara R, Kaneko U, Kishi T, Miyamae T, Miyake N, Doi H, Tsurusaki Y, Sakai H, Yokota S, *Matsumoto N. *De novo* 19q13.42 duplications involving *NLRP* gene cluster

in a patient with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *J Hum Genet* 56: 343-347, 2011.

Ozawa R, Inaba Y, Mori M, Hara R, Kikuchi M, Higuchi R, Miyamae T, Imagawa T, Fujiwara T, Saito T, Yokota S. Definitive differences in laboratory and radiological characteristics between two subtypes of juvenile idiopathic arthritis: systemic arthritis and polyarthritis. *Mod Rheumatol* (in press).

Imagawa T, Yokota S, Mori M, Miyamae T, Takei S, Imanaka H, Nerome Y, Iwata N, Murata T, Miyoshi M, Nishimoto N, Kishimoto T. Safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6-receptor monoclonal antibody, in patients with polyarticular-course juvenile idiopathic arthritis. *Mod Rheumatol* (in press).

Mori M, Takei S, Imagawa T, Imanaka H, Nerome Y, Kurosawa R, Kawano Y, Yokota S, Sugiyama N, Yuasa H, Fletcher T, Wajdula JS. Etanercept in the treatment of disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD)-refractory polyarticular course juvenile idiopathic arthritis: experience from Japanese clinical trials. *Mod Rheumatol* (in press).

Mori M, Murata T, Takei S, Imagawa T, Yokota S. Acquisition of expanded indications for intravenous cyclophosphamide in the management of

childhood rheumatic disease in general.
Mod Rheumatol 21(5): 449-457, 2011.

Yanagimachi M, Naruto T, Miyamae T, Hara T, Kikuchi M, Hara R, Imagawa T, Mori M, Sato H, Goto H, Yokota S. Association of IRF5 Polymorphisms with Susceptibility to Macrophage Activation Syndrome in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis. J Rheumatol. 38(4): 769-774, 2011.

Yanagimachi M, Miyamae T, Naruto T, Hara T, Kikuchi M, Hara R, Imagawa T, Mori M, Kaneko T, Goto H, Morita S, Mizuki N, Kimura A, Yokota S. Association of HLA-A(*)02:06 and HLA-DRB1(*)04:05 with clinical subtypes of juvenile idiopathic arthritis. J Hum Genet. 56(3):196-199, 2011.

Kasai K, Mori M, Hara R, Miyamae T, Imagawa T, Yokota S. National survey of childhood febrile illness cases with fever of unknown origin in Japan. Pediatr Int. 53(4): 421-425, 2011.

Yanagimachi M, Naruto T, Hara T, Kikuchi M, Hara R, Miyamae T, Imagawa T, Mori M, Kaneko T, Morita S, Goto H, Yokota S. Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. Br J Clin Pharmacol. 2011; 71(2):237-243.

2. 学会発表

講演会「次世代シーケンサーを用いた最先

端研究」・松本直通「次世代シーケンサーを用いたヒト疾患ゲノム解析法」(徳島・徳島大学医学部臨床第一講堂 8月26日)

第一回サイトジェノミクスセミナー・松本直通(特別講演)「次世代シーケンス法による疾患研究の最前線」(三菱化学メディエンス志村事業所・東京9月17日)

第46回産婦人科研究会(順天堂大学) 松本直通(特別講演)「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析の現状」(順天堂大学医学部・東京9月20日)

第18回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会・松本直通(特別講演)「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析の現状」(佐賀大学医学部・佐賀10月1日)

日本人類遺伝学会第56回大会・松本直通「ヒト遺伝性疾患の原因解明を目指して」学会賞受賞講演(於・幕張メッセ11月11日)

日本人類遺伝学会第56回大会「次世代シーケンサーを用いたヒト疾患ゲノム解析法」松本直通(シンポジスト)シンポジウム11(超高速シーケンサーによる疾患ゲノム解析)(於・幕張メッセ11月12日)

国立精神・神経医療研究センターTMC棟/クラスター研究棟開棟記念講演会「遺伝性神経疾患のエクソーム解析」松本直通(招待講演)(国立精神・神経医療研究センター11月22日)

The 34th annual meeting of the molecular biology society of Japan • Next generation sequencing technology enables a large scale medical genomic research (symposium)
「 Disease genome analysis using next generation sequencer 」 Naomichi Matsumoto (Invited speaker)(Dec 14, 2011 at Yokohama, Japan)

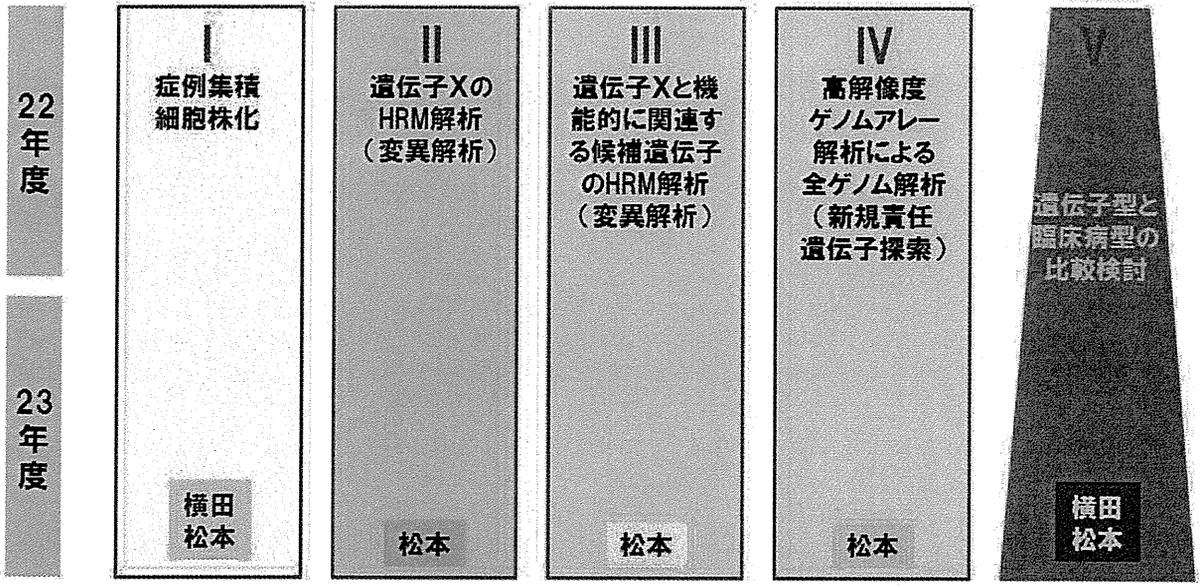
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究全体の流れと進行状況

研究代表者・松本 研究分担者・横田

横浜市立大学倫理審査委員会の承認・各検体供与機関での適切な倫理手続きと配慮



疾患診断法・バイオマーカー開発・治療への展開

若年性特発性関節炎の遺伝的要因の実態

分担研究課題： トシリズマブ効果の検討

分担研究者 横田俊平 横浜市立大学医学部小児科

研究要旨：

若年性特発性関節炎は四肢関節のみならず、顎関節や椎体関節にまで慢性炎症を生じるとともに、発熱、食思不振、著しい倦怠感を誘発する全身性疾患である。長期経過の中で、関節破壊・関節拘縮による運動障害、全身性症状による生活障害には著しいものがあり、成長期にある小児にとっては一生を左右する疾患である。我々は2001年よりこれまで世界に先駆けて炎症性サイトカインのひとつであるインターロイキン(IL)-6の受容体に対するモノクローナル抗体（トシリズマブ）の臨床試験を実施し、とくに全身型若年性特発性関節炎の治療に画期的な効果をもたらすこととなった。本年度は、トシリズマブの効果について基礎的な検討を行い、より安全性の高い使用方法を樹立し、全身型のみならず関節型若年性特発性関節炎に対する効果について検討した。

A. 研究目的

若年性特発性関節炎は四肢関節のみならず、顎関節や椎体関節にまで慢性炎症を生じるとともに、発熱、食思不振、著しい倦怠感を誘発する全身性疾患である。長期経過の中で、関節破壊・関節拘縮による運動障害、全身性症状による生活障害には著しいものがあり、成長期にある小児にとっては一生を左右する疾患である。しかし、当施設では2001年よりこれまで世界に先駆けて炎症性サイトカインのひとつであるインターロイキン(IL)-6の受容体に対するモノクローナル抗体（トシリズマブ）の臨床試験を実施し、とくに全身型若年性特発性関節炎の治療に画期的な効果をもたらすこととなった。

本年には、トシリズマブの効果について基礎的な検討を行い、より安全性の高い使用方法を樹立することと、全身型のみならず関節型若年性特発性関節炎に対する効果について検討することを目標とした。

B. 研究方法

1. 関節型若年性特発性関節炎に対するIL-6阻害療法の効果

全身型若年性特発性関節炎に対するトシリズマブの臨床試験から著しい効果が得られ、また有害事象の検討から副作用は容認できる範囲にあることが明らかになり、2008年にPMDAより使用承認が下りた。

多関節型若年性特発性関節炎は成人における関節リウマチと相同的な疾患であり、また全身型若年性特発性関節炎の臨床試験で小児における安全性も確認されており、関節型若年性特発性関節炎に対する効果、副作用を長期にわたり検討した。

トシリズマブは8 mg/kg量に設定し、4週間ごとの投与とした。効果はACR Pedi、DAS28を用いた。有害事象については全登録を行い、すべての報告を一括管理した。

2. 全身型若年性特発性関節炎における成長障害の解析と治療

全身型若年性特発性関節炎の大きな特徴は、罹患後の成長が著しく阻害されることである。そこで成長にかかわる生化学的マーカーとしてoligomeric matrix protein(COMP)についてその

消長を検討した。また、IL-6 の成長軟骨に対する抑制作用の有無を、ATDC5 細胞株を用いて検討した。

C. 研究結果

1. 関節型若年性特発性関節炎に対する IL-6 阻害療法の効果

若年性特発性関節炎の炎症を消退させる薬剤としてトシリズマブの臨床試験を終了しすでに厚生労働省の承認を得たが、関節型若年性特発性関節炎についての詳しい報告はこれまでなかった。そこで 19 例の関節型若年性特発性関節炎の小児（平均 11.6 歳、罹患年数 5.3 年）についてトシリズマブ(8 mg/kg)を 4 週間ごとに静脈内投与し、12 週間後および 48 週間後に ACR Pedi により評価した。

ACR Pedi 30、50、70、90 の結果は、12 週間後にはそれぞれ 94.7%、94.7%、57.9%、10.5%であったが、24 週間後には 100%、94.1%、88.2%、64.7%となった。この間、2 例が臨床試験から脱落した。1 例は無効、1 例は抗トシリズマブ抗体の出現により規定に則って中止となった。有害事象は上気道炎、感冒、下痢症など軽微なもので、重篤なものは認められなかった。以上より、関節型若年性特発性関節炎においてもトシリズマブの安全性は許容範囲内にあり、標準的治療に反応しない症例に用いることが適当であることが判明した。

2. 全身型若年性特発性関節炎における成長障害の解析と治療

全身型若年性特発性関節炎は発症とともに身長が伸びなくなる特徴がある。そこで、IL-6 が成長障害に関わる可能性について検討した。成長軟骨由来の細胞株 ATDC5 の培養系を樹立し、この培養系にさまざまな濃度の IL-6 を添加することにより細胞の分化・増殖に与える影響を検討した。

まず、ATDC5 に IL-6 レセプター、gp130 の発現の有無について FACS を用いて検討したところ、

充分量のレセプターの発現が認められた。ついで通常の培養系における ATDC5 の分化について RT-PCR 法を用いて検討したところ、培養 2 日目までは II 型コラーゲンを産生し、その後 aggrecan、6 日目以降には X 型コラーゲンを産生することが判明した。そこで培養開始時から培養系に IL-6 をさまざまな濃度で添加したところ、ATDC5 細胞は II 型コラーゲン産生にとどまり分化が進まなかった。次に、この培養系に抗 IL-6 レセプター・モノクローナル抗体を添加し IL-6 を除去した状態を作ったところ、ATDC5 の IL-6 による分化抑制機能は解除され、分化抑制は IL-6 により誘導されていることが証明された。

D. 考察

トシリズマブは全身型のみならず関節型においても関節炎の抑制に有用な薬剤であることが証明された。また、重篤な有害事象もなく、小児への投与についても安全性が確保されることが判明した。関節型若年性特発性関節炎の基本的な治療は、メトトレキサートを中心とした少量ステロイドとの併用療法である。約 70%の患児はこの方法で寛解に入るが、残り約 30%の患児は長期にわたる治療にも関わらず関節拘縮・変形をきたし、著しい生活障害をきたしていた。しかし、TNF α 阻害薬の治療が導入されその改善をみるようになったが、TNF α 阻害薬に不応な例、副作用によりその阻害薬が使用出来なくなる例、阻害薬の特異的な抗体産生のために使用出来なくなる例などがある。このような例にトシリズマブは使用できることになる。

全身型若年性特発性関節炎についてはトシリズマブの著しい効果により病状の改善が図られるようになり、欧米においても 2009~2010 年に各国で承認が得られ、わが国から発信された薬剤としては例外的に世界的展開をみている。

全身型若年性特発性関節炎では成長障害が子どものもっとも大きな愁訴となっている。診断が確定後、おおくの症例ではステロイドが使用されるが、ステロイド自体にも副作用として骨粗鬆症

と成長障害が挙げられる。しかし、例えば本態性ネフローゼ症候群もステロイドを必要とする疾患ではあるが、全身型若年性特発性関節炎のようにほとんど身長が伸びないという成長障害ではない。このことは高 IL-6 血症が疾患の本体と考えられる全身型若年性特発性関節炎においては IL-6 が低身長の原因となっている可能性がある。

そこで、成長軟骨の幹細胞と考えられる ATDC5 細胞株を用いて IL-6 の影響を調べる研究を実施したところ、実際に IL-6 が ATDC5 細胞の分化を抑制することを明らかにした。これまで炎症性サイトカインによる成長抑制に関する研究はほとんどなく、今後、IL-1 β や TNF α による成長抑制効果を検討することにより、サイトカイン阻害薬による治療の可能性について明らかにできるものと考え研究に取り組んでいる。

E. 結論

トシリズマブの効果について基礎的な検討を行い、より安全性の高い使用方法を樹立し、全身型のみならず関節型若年性特発性関節炎に対する効果についても確認した。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Imagawa T, Yokota S, Mori M, et al. Safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6-receptor monoclonal antibody, in patients with polyarticular-course juvenile idiopathic arthritis. Mod Rheumatol 2011, June 12, [Epub ahead of print]

Inaba Y, Ozawa R, Imagawa T, et al. Radiologic improvement of damaged large joints in children with systemic juvenile idiopathic arthritis following tocilizumab treatment. Ann Rheum Dis 2011;70:1693-5.

Yokota S, Imagawa T, Takei S, et al. Guidance on

using tocilizumab for juvenile idiopathic arthritis. Mod Rheumatol 2011;21:563-71.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
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

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
Tadaki H, et al., Yokota S, Matsumoto N	Exonic deletion of <i>CASP10</i> in a patient presenting with systemic juvenile idiopathic arthritis, but not with autoimmune lymphoproliferative syndrome type IIa.	Int J Immunogenet	38(4)	287-293	2011
Tadaki H, et al., Yokota S, Matsumoto N.	<i>De novo</i> 19q13.42 duplications involving <i>NLRP</i> gene cluster in a patient with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis.	J Hum Genet	56(5)	343-347	2011
Yanagimachi M, et al., Yokota S.	Association of IRF5 Polymorphisms with Susceptibility to Macrophage Activation Syndrome in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis.	J Rheumatol	38(4)	769-774	2011
Yanagimachi M, et al., Yokota S.	Association of HLA-A(*)02:06 and HLA-DRB1(*)04:05 with clinical subtypes of juvenile idiopathic arthritis.	J Hum Genet	56(3)	196-199	2011
Kasai K, et al., Yokota S.	National survey of childhood febrile illness cases with fever of unknown origin in Japan.	Pediatr Int	53(4)	421-425	2011
Yanagimachi M, et al., Yokota S.	Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis.	Br J Clin Pharmacol	71 (2)	237-243	2011

Exonic deletion of *CASP10* in a patient presenting with systemic juvenile idiopathic arthritis, but not with autoimmune lymphoproliferative syndrome type IIa

H. Tadaki*†, H. Saitsu*, H. Kanegane‡, N. Miyake*, T. Imagawa†, M. Kikuchi†, R. Harat, U. Kaneko†, T. Kishi†, T. Miyamae†, A. Nishimura*, H. Doi*, Y. Tsurusaki*, H. Sakai*, S. Yokota† & N. Matsumoto*

Summary

Systemic juvenile idiopathic arthritis (s-JIA) is a rare inflammatory disease classified as a subtype of chronic childhood arthritis, manifested by spiking fever, erythematous skin rash, pericarditis and hepatosplenomegaly. The genetic background underlying s-JIA remains poorly defined. To detect copy number variations, we performed single nucleotide polymorphism (SNP) array analysis in 50 patients with s-JIA. We found a 13-kb intragenic deletion of *CASP10* in one patient. RT-PCR of the mRNA extracted from the patient's lymphoblastoid cells revealed that *CASP10* mRNA was truncated. Sequencing the mRNA revealed that this deletion resulted in a frame shift with an early stop codon. *CASP10* is known as a causative gene for autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) type IIa, another childhood syndrome of lymphadenopathy and splenomegaly associated with autoimmune haemolytic anaemia and thrombocytopenia. TCR $\alpha\beta^+$ CD4/CD8 double-negative T cells in the peripheral blood as a diagnostic marker of ALPS were not high in this patient and lymphocyte apoptosis induced by anti-Fas antibody was normal, denying ALPS in the patient. The father and a sister of the patient showing no symptoms of ALPS or s-JIA, also had the same deletion. Furthermore, we found no other mutations of *CASP10* in the other 49 s-JIA patients. These data suggest that the pathogenic significance of *CASP10* mutations should be carefully evaluated in s-JIA or even ALPS type IIa in further studies.

* Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan, † Department of Pediatrics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan and ‡ Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, University of Toyama, Toyama, Japan

Received 19 October 2010; revised 27 January 2011; accepted 3 February 2011

Correspondence: Professor Naomichi Matsumoto, Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan. Tel: +81 45 787 2604; Fax: +81 45 786 5219; E-mail: naomat@yokohama-cu.ac.jp

Introduction

Systemic juvenile idiopathic arthritis (s-JIA) (OMIM #604302) is a rare inflammatory disease classified as a subtype of chronic childhood arthritis. The annual UK incidence of JIA is ten cases per 100 000 children under 16 years of age (Symmons *et al.*, 1996), and approximately 11% of patients with JIA suffer from s-JIA (Symmons *et al.*, 1996). s-JIA is a clinically heterogeneous febrile disease, manifested by spiking fever, erythematous skin rash, pericarditis and hepatosplenomegaly. Abnormalities in the innate immunity [cytokines such as interleukin (IL)-1, IL-6 and neutrophils and monocytes/macrophages] play a major role in the pathogenesis of s-JIA, being distinguished from other JIA subtypes. One of the major features of s-JIA is its progression to macrophage activation syndrome. On the basis of these features, consensus is emerging that s-JIA should be classified as an autoinflammatory syndrome rather than a classic autoimmune disease (Vastert *et al.*, 2009).

To date, two genetic factors, *HLA* and *PTPN22*, have been confirmed as JIA susceptibility genes in multiple populations (Hinks *et al.*, 2009). For example, *HLA-DR1* and *HLA-DR4* have been reported to increase risk for polyarticular JIA in many populations (Glass & Giannini, 1999). However, as seen in these reports, the associations are mainly seen in polyarticular JIA but not in s-JIA. There is some evidence which show other genes, such as *MIF*, *IL6*, *IL10*, *TNF*, *MUNC13-4* and *PRF1* being associated with s-JIA in different populations and subtypes (Fishman *et al.*, 1998; Donn *et al.*, 2001, 2002; Thomson & Donn, 2002; De Benedetti *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008; Vastert *et al.*, 2010). However, these genes account for only a small part of the total genetic contribution to JIA. Therefore, the genetic background underlying the s-JIA remains poorly defined.

Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) is a rare childhood syndrome characterized by chronic massive, nonmalignant lymphadenopathy and splenomegaly, expansion of TCR $\alpha\beta^+$ double-negative T cells

and an *in vitro* lymphocyte apoptotic defect (Su & Anderson, 2009). ALPS is classified into several groups, according to the genetic defects. ALPS type 0 is caused by homozygous mutations of *FAS* (Rieux-Laucat *et al.*, 1995; Kasahara *et al.*, 1998; van der Burg *et al.*, 2000), type Ia by heterozygous mutations of *FAS* (Jackson *et al.*, 1999; Rieux-Laucat *et al.*, 1999; Vaishnav *et al.*, 1999) and type Ib by heterozygous mutations in the Fas ligand (*FasL*) gene (Wu *et al.*, 1996). Heterozygous *CASP10* mutants are classified as ALPS type IIa, and homozygous *CASP8* mutations cause ALPS type IIb. In ALPS type III, the genetic defect is unknown.

Recently, genomic structural variations such as copy number variations (CNVs) are recognized as important causes for many human diseases including autoimmune diseases (Stankiewicz & Lupski, 2010). In this study, we performed genome-wide SNP array analysis to detect CNVs for the first time in s-JIA patients. In this process, we found an intragenic deletion of *CASP10* in one patient, a causative gene for ALPS type IIa, raising a question of the pathogenic significance of *CASP10* mutation in s-JIA.

Materials and method

Subjects

A total of 50 patients with s-JIA who had disease refractory to conventional treatment and were given tocilizumab were enrolled with informed consent in IRB-approved protocols at Yokohama City University Hospital. There were no family histories in each patient. Genomic DNA of peripheral blood leucocytes from all patients were isolated using DNA isolation systems (Quick Gene-800; Fujifilm, Tokyo, Japan). DNA of nail tissues and buccal cells from the patient with the *CASP10* deletion was isolated using ISO-HAIR (Wako, Tokyo, Japan) and Puregene Kit C (Quiagen, MD, USA), respectively, according to each manufacturer's protocol.

SNP array

To detect CNVs, two different commercially available SNP array platforms, the Genechip Human Mapping 250K array (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) (23 patients) and the Genome-wide Human SNP array 6.0 (Affymetrix Inc.) (27 patients) were used following the manufacturer's protocols. In brief, for the Genome-wide Human SNP array 6.0, 500-ng DNA was digested with *Nsp* I and *Sty* I (only *Nsp* I was used for 250K array). The adaptors were ligated to the digested DNA, and the ligation-mediated PCR with singleprimer was performed. PCR products were purified by magnetic beads (Ampure; Beckman Coulter Company, Beverly, MA, USA). Microcon YM-100 (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) was used for purification for the 250K array. The product was

fragmented, end labelled and hybridized to an array. CNAG3.0 (Nannya *et al.*, 2005), Genotyping Console (Copy Number Analyser for GeneChip, Affymetrix Inc.) and Partek Genomic Suite (Partek Inc., St. Louis, MO, USA) were used to validate copy number alterations. The qualities of the results were high in every sample [250K array: SNP call rate >95%, MDR >99%, (MDR-MCR) <5%, SNP array 6.0: Contrast QC >2, QC call rate >93%, MAPD <0.4].

Quantitative real-time PCR

The deletion breakpoints were analysed using genomic DNAs by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) with Quantifast SYBR Green PCR kit on Rotor-Gene™ 6200 HRM (Corbett Life Science, Sydney, Australia). The delta-delta Ct relative quantitative method was employed according to the manufacturer's protocol. Averages of duplicates were calculated by ROTOR-GENE 6000 SERIES software (Corbett Life Science).

Direct sequencing of a deletion junction

Fragments containing the deletion break point were amplified by PCR for direct sequencing. Long PCR primers adjacent to presumed deleted regions by qPCR were generated. PCR was cycled once at 94°C for 2 min, 35 times at 98°C for 10 s, and at 68°C for 3 min in 20-μL mixture using KODFX (Toyobo, Osaka, Japan). PCR products were purified with ExoSAP™ (USB Co., Cleveland, OH, USA) and sequenced using BigDye™ terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on the ABI 3100 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems).

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from lymphoblastoid cell line (LCL) of all patients using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Reverse transcription was performed with 3 μg of total RNA using PrimeScript™ first-strand cDNA Synthesis kit (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) according to the manufacturer's protocol. PCR was cycled once at 94°C for 2 min, 35 times at 94°C for 30 s, at 64°C for 30 s, and at 68°C for 2 min in 20-μL mixture using KODFX. Pre treatment of cells with cycloheximide (protein synthesis inhibitor, 150 μg/1.0 × 10⁶ cells) for 4 h was done to examine the influence of nonsense-mediated mRNA decay (NMD). Primers are listed below: *CASP10*-forward, 5'-CCTGTAGACAAGGAAGCCGAGTCGT-3' and *CASP10*-reverse, 5'-TTCGACTCACATCATCGTTGACAGC-3'.

Mutation search for *CASP10* and *CASP8*

Mutation of *CASP10* and *CASP8* was screened by high-resolution melt analysis. As *CASP10* and *CASP8*

are both causative for ALPS, showing similarity at the nucleotide level, we also looked for *CASP8* mutations. PCR and HRM were performed on Rotor-Gene™ 6200 HRM. PCR was cycled 35–40 times with denaturation for 10 s at 95°C, annealing for 20 s at 60°C, and extension for 30 s at 72°C in 12- μ L mixture using ExTaq (Takara Bio Inc.) and SYTO™ 9 green fluorescent (Invitrogen). The annealing temperature varied according to the amplicon. Variants were selected for sequencing when the melting profile deviated from control samples. PCR products showing variant melting profiles were sequenced using BigDye terminators by standard methods with the same primers used in HRM-PCR.

As *CASP8* mutations in ALPS were reported to be homozygous mutations (Chun *et al.*, 2002), we performed HRM with samples which were spiked with 10% control DNA to detect homozygous mutations.

T-cell apoptosis assay

Peripheral blood mononuclear cells from the patient were activated with phytohemagglutinin and IL-2 for 10 days, and Fas-mediated apoptosis in these activated T cells was evaluated by a flow cytometric method after their incubation with anti-Fas monoclonal antibody (CH-11; MBL, Nagoya, Japan) for 24 h as previously described (Kasahara *et al.*, 1998).

Results

CASP10 intragenic deletion

A 13.4-kb intragenic deletion was detected in a patient with s-JIA who is unlikely to be affected with ALPS using Genome-wide Human SNP array 6.0 (Fig. 1a). We also confirmed the deletion by qPCR (Table 1, Fig. 1b). Sequencing a deletion junction successfully amplified by long PCR revealed that the deleted region contained exons 6–9 of *CASP10* (Figs 1a & 2). Proximal and distal breakpoints were located in two directly oriented *AluY* and *AluSx* elements. Identity between these *Alu* elements was 97% and the possible crossing-over region was 36 bp in length (Fig. 2). *Alu*-mediated nonallelic homologous recombination was the likely mechanism of this microdeletion. The father and sister, who had no symptoms of ALPS or s-JIA, also had the same deletion (Fig. 1d,e). This deletion was seen in the DNA extracted from blood, buccal cells and nails of the proband (Fig. 1e), suggesting that it was indeed a germline change (not somatic). RT-PCR of the mRNA extracted from the patient's LCL revealed that *CASP10* mRNA was truncated (Fig. 3). This was seen in both samples pretreated with or without cycloheximide (data not shown), indicating that the truncated *CASP10* mRNA does not suffer from NMD. We further sequenced the mRNA, and found that this deletion resulted in a frame shift with an early stop codon (the termination codon

appeared at the second amino acid in exon 10). No deletions containing *CASP10* were observed in 54 patients (108 alleles) with other diseases (29 patients with autism, 21 patients with mental retardation and multiple congenital disorders, and four patients with premature ovarian failure) by Genome-wide Human SNP array 6.0 or Nimblegen 385K array.

Mutation search for *CASP10* and *CASP8*

We could not detect any mutations in *CASP10* as well as *CASP8* in the other 49 s-JIA patients. Furthermore, to search for abnormal *CASP10* transcripts, we performed RT-PCR using mRNA extracted from LCLs of s-JIA patients, but no truncated mRNAs were found.

Clinical features of the proband and her family members with *CASP10* deletion

The proband is a 9-year-old girl who developed s-JIA with high fever, liver damage and enlargement of lymph nodes at 4 years of age. Although she recovered after symptomatic treatment, she suffered a recurrence of spiking fever, erythematous skin rash, pain and swelling of the knee and foot and was diagnosed as s-JIA at 6 years of age. The patient recovered after being given methylprednisolone pulse therapy twice. However, when the oral administration of prednisolone 15 mg day⁻¹ was reduced to 13 mg day⁻¹, the swelling of her knee worsened. Therefore, she was admitted to Yokohama City University Hospital. As she was resistant to conventional therapies, she received tocilizumab (anti-IL-6 receptor antibody) therapy. Her condition got stable since tocilizumab was medicated. The level of IgG was normal, and rheumatoid factor and antinuclear antibodies were not detected (Table 2). The levels of IL-10, IL-5, IL-4 and TNF- α were normal (Table 2), showing no shift to a Th2 cytokine production pattern. TCR $\alpha\beta^+$ CD4/CD8 double-negative T cells in the peripheral blood were not high in this patient (Fig. 4a), and lymphocyte apoptosis induced by anti-Fas antibody was normal (Fig. 4b). The patient's father and her sister, both having the same partial *CASP10* deletion, are totally healthy.

Discussion

In our study, we detected an intragenic deletion of *CASP10*, a causative gene for ALPS (OMIM #601859) type IIa. Although the exonic deletion may produce a truncated protein (if translated) in this patient lacking the entire CASc domain where all the reported missense mutations harboured (Wang *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2006) (Fig. 1c), she had no symptoms for ALPS. TCR $\alpha\beta^+$ CD4/CD8 double-negative T cells in her peripheral blood were not high, and lymphocyte apoptosis induced by anti-Fas antibody was normal (Fig. 4), denying ALPS.

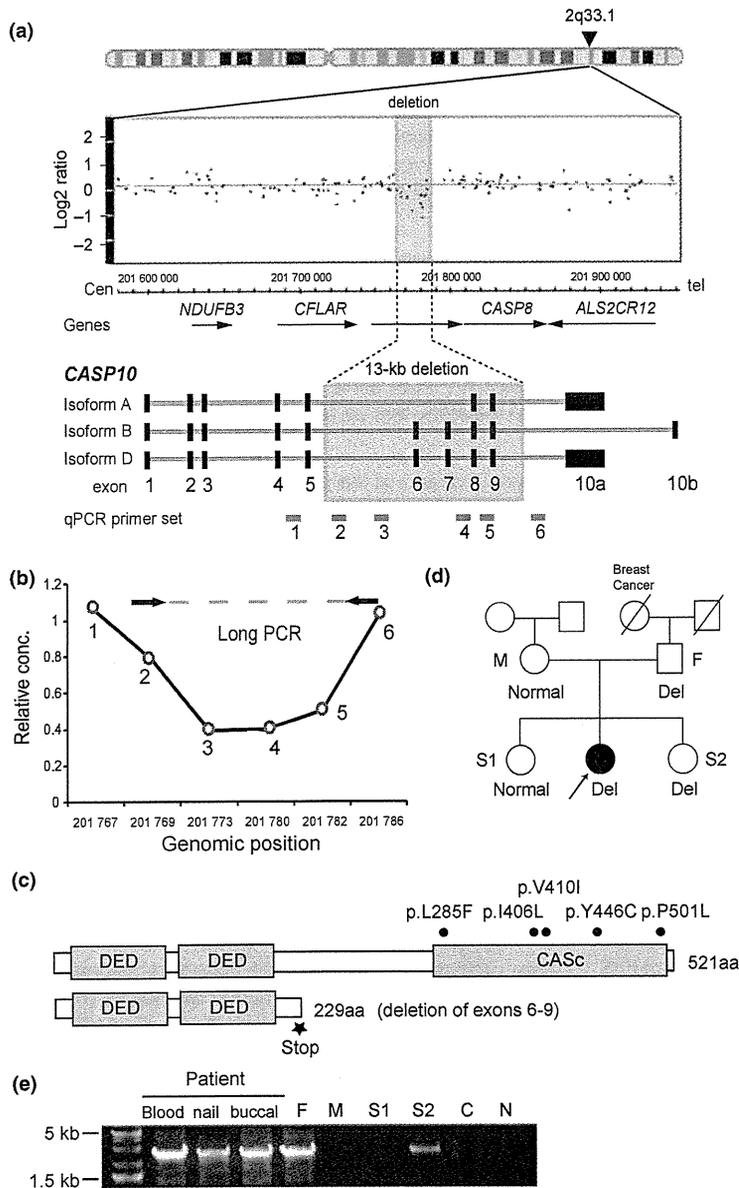


Figure 1. Characterization of the 2q33.1 microdeletion. (a) Result of Genome-wide human SNP array 6.0. The position (x-axis) matching the genomic location of chromosome 2 and log₂ ratio (y-axis) of each SNP probes are indicated. The 13-kb deletion is within *CASP10* encompassing exons 6–9. (b) Breakpoint analysis of the s-JIA patient. Result of quantitative RT-PCR is shown. Heterozygous deletion of positions 3, 4 and 5 was implied. Arrows show the primer positions for long PCR. (c) Protein structure of caspase 10. All the reported mutations clustered at the CASc domain. The deletion of exons 6–9 results in protein truncation lacking the entire CASc domain. (d) Family pedigree of the patient. Patient is indicated by arrow. Normal: no deletion, del: caspase 10 intragenic deletion. F: father, M: mother, S1: older sister, S2: younger sister. (e) Result of long PCR using DNAs of the patient's blood leucocytes, nails and buccal cells. Long PCR could successfully amplify 3.3-kb fragments from the patient and the patient's father (F) and sister (S2) respectively. DNA from father, mother and control was extracted from blood leucocytes, and DNA from the two sisters was extracted from their nails. F: father, M: mother, S1: older sister, S2: younger sister, C: control, N: negative control.

Table 1. Primers for quantitative real-time PCR and long PCR

Position (kb)		Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
Common primer			
1	2017671–2017674	AGTCAAACCTGGCTGCCTTA	TGCTCCTCAACTCATTCTGTG
2	2017694–2017695	GCAAGGGTTTCTGGTTTCTG	CCAAGTCTGCTGGAAGAACC
3	2017734–2017737	ACGCCACCTGAAGACTATG	AGGCGGAGGTGTTACCATTT
4	2017809–2017811	GATCCATTGGAGTGGTTGGT	TCAGGGAGGTAAGCTGTGG
5	2017822–2017824	AGTGCCCTAGACTGGCTGAA	GTGGCCAGACCAAGTAGGAA
6	2017859–2017861	GAAAGTGCATGCGACAGCTA	ATGCTCCATGCCTAACAC
Long PCR primer	2017695–2017855	GGGATTGTGGTTCTCCAGCAGAC	GACATGGCCAAGCAGATGCTAACAC

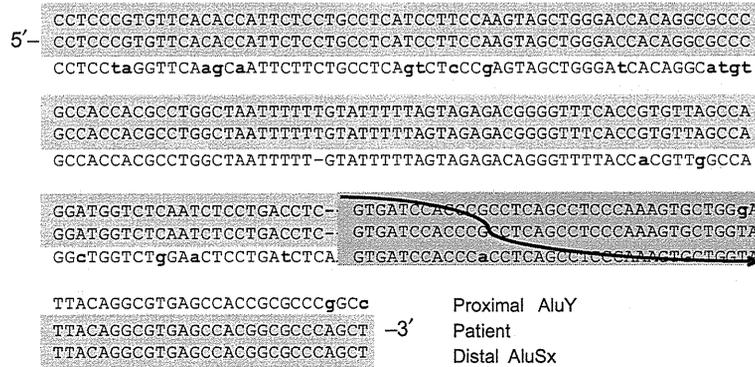


Figure 2. Result of deletion breakpoint sequence. The top, middle and bottom nucleotide strands show the proximal, recombinant and distal sequences respectively. Matched sequences are shown as uppercase letters and unmatched ones as lowercase letters. Pale grey boxes show the same sequences and darker grey ones indicate a possible crossing-over region. Curved arrow shows recombination.

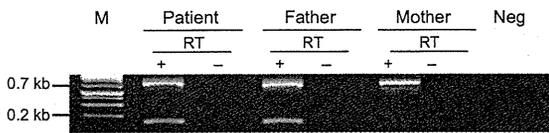


Figure 3. Result of *CASP10* RT-PCR. The lymphoblastoid cell lines which were not treated with cycloheximide were used. Forward primer was designed at exon 5 and reverse primer was designed at exon 10. The predicted size of the PCR product was 742 bp for normal cDNA and 145 bp for the deletion product. M: marker, Neg: negative control.

Table 2. Laboratory findings for the patient

Subject	Data	Normal range
IL-6	24.3 pg mL ⁻¹	<2.0 pg mL ⁻¹
sIL-6-R	37.5 pg mL ⁻¹	14–46 pg mL ⁻¹
IFN γ	<0.1 IU mL ⁻¹	<0.1 IU mL ⁻¹
IL-5	<7.8 pg mL ⁻¹	<10 pg mL ⁻¹
IL-4	7.3 pg mL ⁻¹	<6.0 pg mL ⁻¹
IL-10	<2 pg mL ⁻¹	<5 pg mL ⁻¹
TNF- α	0.8 pg mL ⁻¹	0.6–2.8 pg mL ⁻¹
sTNF-R1	828 pg mL ⁻¹	749–1966 pg mL ⁻¹
sTNF-R2	1720 pg mL ⁻¹	1003–3170 pg mL ⁻¹
IgG	1492 mg dL ⁻¹	870–1700 pg mL ⁻¹
RF	–	–
Antinuclear antibody	–	–

IL, interleukin.

The *CASP10* mutations are characterized by resistance to Fas-mediated apoptosis despite the presence of normal FasL and Fas. The reported mutations for *CASP10* are missense mutations within the CASC domain (Wang *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2006). Only two previous studies show ALPS patients having *CASP10* mutation so far, and both of them are reported to be inherited from nonaffected parents (Wang *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2006). Although both mutations decreased caspase 10 activity and exerted a dominant negative effect on the wild-type protein, neither report

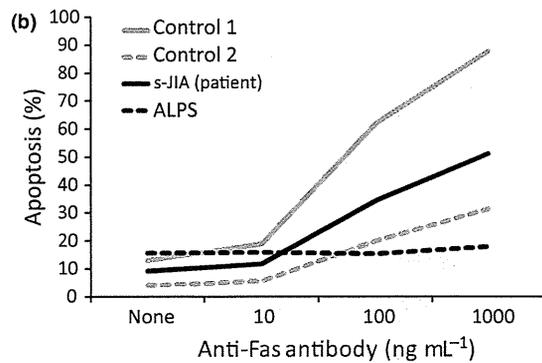
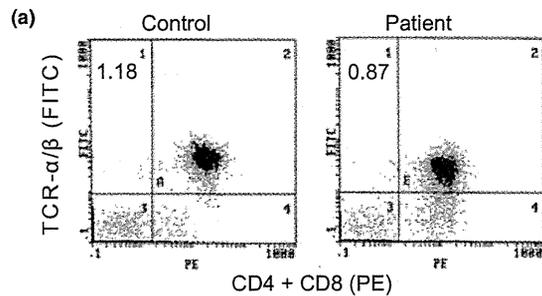


Figure 4. (a) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of TCR $\alpha\beta^+$ CD4/CD8 double-negative T cells. TCR $\alpha\beta^+$ CD4/CD8 double-negative T cells in the peripheral blood were not high in this patient. (b) Fas-induced T-cell apoptosis assay. Apoptosis of activated T cells were induced by anti-Fas monoclonal antibody for 24 h and percentage of apoptotic cells was analysed as previously described (Kasahara *et al.*, 1998).

was sufficient enough to prove that the mutations consistently induced the overt disease, as several mutated familial members were healthy, and some showed multiple autoantibodies and defective lymphocyte apoptosis. Moreover, in one previous report, two ALPS patients carried double heterozygous mutations in the *CASP10* and *FAS* genes, showing that mild *CASP10* mutations alone were not enough to exert a dominant

negative effect to the wild protein, and the concurrent effect of mutations hitting different genes involved in Fas function causes ALPS (Cerutti *et al.*, 2007). In our study, we detected a truncation mutation of *CASP10* in one s-JIA patient, which was inherited from the healthy father, and also was seen in the healthy sister. Although the *CASP10* mRNA extracted from the patient's LCL results in an early stop codon, the patient had no evidence of ALPS. As both previous studies and ours show mutations sharing with nonaffected parents and siblings, we need further evidence for supporting the pathogenic significance of *CASP10* mutations.

Approximately 24% of ALPS patients are classified as ALPS type III, in which no gene defects are found (Puck & Straus, 2004). In ALPS type III patients, somatic mutations of *Fas* in isolated double-negative T cells have been reported (Holzelova *et al.*, 2004). These mutations were found in a fraction of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, monocytes, and CD34⁺ hematopoietic precursors, but not in hair or mucosal epithelial cells (Holzelova *et al.*, 2004). Therefore, in our study, we investigated whether the *CASP10* deletion is somatic by examining not only blood leucocyte DNA but also nail and buccal cell DNAs, but no evidence of somatic changes was obtained.

As the phenotype and laboratory data of the patient with *CASP10* intragenic deletion were different from those of ALPS, we hypothesized that *CASP10* could be responsible for s-JIA. However, *CASP10* was not mutated at the level of genomic DNA and transcripts in other s-JIA patients. Furthermore, we searched for *CASP8* mutations, but no mutations were found. In conclusion, a 13.4-kb intragenic deletion of *CASP10* was detected in the s-JIA patient using genome-wide human SNP array. Our report provides a new insight into the pathogenic significance of caspase 10 in relation to apoptosis and human diseases. Further investigation is absolutely necessary.

Acknowledgements

We thank patients and their families for their participation in this study. This work was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (N.M.), the Japan Science and Technology Agency (N.M.), the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (S.Y. and N.M.) and Mother and Child Health Foundation (N.M.).

Conflict of Interest

Authors declare no conflict of interest in this study.

References

- van der Burg, M., de Groot, R., Comans-Bitter, W.M., den Hollander, J.C., Hooijkaas, H., Neijens, H.J. *et al.* (2000) Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in a child from consanguineous parents: a dominant or recessive disease? *Pediatric Research*, **47**, 336.
- Cerutti, E., Campagnoli, M.F., Ferretti, M., Garelli, E., Crescenzo, N., Rosolen, A. *et al.* (2007) Co-inherited mutations of Fas and caspase-10 in development of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *BMC Immunology*, **8**, 28.
- Chun, H.J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C.K., Siegel, R.M. *et al.* (2002) Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature*, **419**, 395.
- De Benedetti, F., Meazza, C., Vivarelli, M., Rossi, F., Pistorio, A., Lamb, R. *et al.* (2003) Functional and prognostic relevance of the -173 polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **48**, 1398.
- Donn, R.P., Shelley, E., Ollier, W.E. & Thomson, W. (2001) A novel 5'-flanking region polymorphism of macrophage migration inhibitory factor is associated with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **44**, 1782.
- Donn, R., Alourfi, Z., De Benedetti, F., Meazza, C., Zeggini, E., Lunt, M. *et al.* (2002) Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **46**, 2402.
- Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J.S., Humphries, S. *et al.* (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, **102**, 1369.
- Glass, D.N. & Giannini, E.H. (1999) Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait. *Arthritis and Rheumatism*, **42**, 2261.
- Hinks, A., Barton, A., Shephard, N., Eyre, S., Bowes, J., Cargill, M. *et al.* (2009) Identification of a novel susceptibility locus for juvenile idiopathic arthritis by genome-wide association analysis. *Arthritis and Rheumatism*, **60**, 258.
- Holzelova, E., Vonarbourg, C., Stolzenberg, M.C., Arkwright, P.D., Selz, F., Prieur, A.M. *et al.* (2004) Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *New England Journal of Medicine*, **351**, 1409.
- Jackson, C.E., Fischer, R.E., Hsu, A.P., Anderson, S.M., Choi, Y., Wang, J. *et al.* (1999) Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *American Journal of Human Genetics*, **64**, 1002.
- Kasahara, Y., Wada, T., Niida, Y., Yachie, A., Seki, H., Ishida, Y. *et al.* (1998) Novel Fas (CD95/Apo-1) mutations in infants with a lymphoproliferative disorder. *International Immunology*, **10**, 195.
- Nannya, Y., Sanada, M., Nakazaki, K., Hosoya, N., Wang, L., Hangaishi, A. *et al.* (2005) A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Research*, **65**, 6071.
- Puck, J.M. & Straus, S.E. (2004) Somatic mutations – not just for cancer anymore. *New England Journal of Medicine*, **351**, 1388.
- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I.A., Debatis, K.M., Fischer, A. *et al.* (1995) Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*, **268**, 1347.
- Rieux-Laucat, F., Blachere, S., Danielan, S., De Villartay, J.P., Oleastro, M., Solary, E. *et al.* (1999) Lymphoproliferative syndrome with autoimmunity: a possible genetic basis for dominant expression of the clinical manifestations. *Blood*, **94**, 2575.
- Stankiewicz, P. & Lupski, J.R. (2010) Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annual Review of Medicine*, **61**, 437.

- Su, M.A. & Anderson, M.S. (2009) Monogenic autoimmune diseases: insights into self-tolerance. *Pediatric Research*, **65**, 20R.
- Symmons, D.P., Jones, M., Osborne, J., Sills, J., Southwood, T.R. & Woo, P. (1996) Pediatric rheumatology in the United Kingdom: data from the British Pediatric Rheumatology Group National Diagnostic Register. *Journal of Rheumatology*, **23**, 1975.
- Thomson, W. & Donn, R. (2002) Juvenile idiopathic arthritis genetics – what's new? What's next? *Arthritis Research*, **4**, 302.
- Vaishnav, A.K., Orlinick, J.R., Chu, J.L., Krammer, P.H., Chao, M.V. & Elkon, K.B. (1999) The molecular basis for apoptotic defects in patients with CD95 (Fas/Apo-1) mutations. *Journal of Clinical Investigation*, **103**, 355.
- Vastert, S.J., Kuis, W. & Grom, A.A. (2009) Systemic jia: new developments in the understanding of the pathophysiology and therapy. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, **23**, 655.
- Vastert, S.J., van Wijk, R., D'Urbano, L.E., de Vooght, K.M., de Jager, W., Ravelli, A. *et al.* (2010) Mutations in the perforin gene can be linked to macrophage activation syndrome in patients with systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, **49**, 441.
- Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F.K., Dale, J., Sneller, M. *et al.* (1999) Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*, **98**, 47.
- Wu, J., Wilson, J., He, J., Xiang, L., Schur, P.H. & Mountz, J.D. (1996) Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *Journal of Clinical Investigation*, **98**, 1107.
- Zhang, K., Biroshak, J., Glass, D.N., Thompson, S.D., Finkel, T., Passo, M.H. *et al.* (2008) Macrophage activation syndrome in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis is associated with MUNC13-4 polymorphisms. *Arthritis and Rheumatism*, **58**, 2892.
- Zhu, S., Hsu, A.P., Vacek, M.M., Zheng, L., Schaffer, A.A., Dale, J.K. *et al.* (2006) Genetic alterations in caspase-10 may be causative or protective in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Human Genetics*, **119**, 284.