

201128047B

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22～23年度 総合研究報告書

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 -----	1
研究代表者 松本直通	
(資料) 図 1. <i>CASP10</i> 内の 13kb 欠失	
(資料) 図 2. 19q に検出した不連続な重複	
(資料) 研究全体の流れと進行状況	

### II. 分担研究報告

若年性特発性関節炎発症および合併症に及ぼす遺伝的要因に関する研究 11	
トシリズマブ効果の検討	
横田俊平	

III. 班構成 -----	17
----------------	----

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	19
--------------------------	----

V. 研究成果の刊行物・別刷 -----	21
----------------------	----

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

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13Kb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。加えて全身型 JIA および全身型 JIA の重篤な合併症であるマクロファージ活性化症候群 (MAS) に関連する遺伝的要因を明らかにすることを目的とした。

## 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作製し、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。

### VI. MAS に関連する全身型 JIA の検討 (横田)

研究対象は横浜市立大学病院を受診した ILAR 分類の全身型 JIA のクライテリアに適合した 81 例の全身型 JIA である。うち MAS を合併した全身型 JIA は 33 例、非合併の全身型 JIA は 48 例である。MAS の診断は臨床症状と試験的診断ガイドライン (Ravelli A et al., J Pediatr 2005) に従った。全例に於いて *IRF5* の 3 つの多型 (rs729302, rs2004640, rs2280714) を TaqMan SNP タイピング法を用いて解析した。解析には ABI7500 リアルタイム PCR を用いた。統計学的解析は SNPAssoc パッケージを用いてロジスティッ

ク回帰分析法を用いた。

#### (倫理面への配慮)

申請する研究はヒトゲノム解析研究であり生命倫理・安全対策に対する取組として以下の措置を講じる。解析に用いる疾患患者試料は、全て第一群試料提供者によるものとする。試料等提供者に対する倫理的配慮として(1) 研究対象者の拒否権の尊重: 患者・および親権者(両親)が自由に同意・拒否できるように配慮し、(2) インフォームドコンセント: 本研究の主旨、方法、危険性の有無などを十分に説明した後、文書による同意を得て提供された試料を研究に用い、(3) 知る権利・知らないでいる権利の尊重: 保護者が希望すれば、研究結果は原則的に伝える(連結可能)。患者は各研究協力機関で匿名化されて集積されるため、個人情報漏洩の可能性は極めて低い。以上から倫理面において問題がないと判断している。本研究計画は、三省のヒトゲノム解析研究に関する共通指針(2001年・2004年および2005年改訂)を遵守して組織された横浜市立大学医学部倫理委員会において、本研究の申請・承認を得たうえで、承認された研究計画を遵守し研究を遂行する。個人情報保護法に十分留意しながら研究を施行していく。

### C. 研究結果

#### I. 症例集積と細胞株化

全身型 JIA50 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(図 1)。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 症例につい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 $\alpha/\beta$  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 JIA50 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 (図 2)。

#### 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包含され (*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。

#### VI. MAS に関連する全身型 JIA の検討

全身型 JIA 及び正常対照群において 3 種類の *IRF5* 多型の有意な頻度差は観察されなかった (いずれの多型も  $P=0.37\sim 0.80$  と有意で無かった)。一方全身型 JIA において MAS 合併群と非合併群の比較で rs2004640 T アリルが MAS 合併群と有意に高い相関を示した。T アリルを有する群では T アリルを

有さない群と比し MAS 発症リスクが Bonferroni correction 後に  $P=0.003$ , OR 4.12, 95% CI 1.84, 9.16 で、T アリルを有する群では MAS 発症リスクが有意に高かった。さらに 3 つの多型 (rs729302-rs2004640-rs2280714) の A-T-T ハプロタイプは MAS 発症と有意な相関を示した ( $P<0.0004$ , OR4.61, 95% CI 1.73-12.3)。

#### 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包含され (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。

また全身型 JIA において MAS は予後を左右する重要な合併症である。今回関連が明らかになった *IRF5* は、IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの遺伝子群の発現を誘導する。MAS においては IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  などのサイトカインの異常が特徴であり、今回明らかにされた *IRF5* との関連性は極めて興味深い結果である。

## 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。全身型 JIA における *IRF5* 多型が MAF 発症リスク予測等臨床上有用な指標になる可能性がある。

## 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が、その可能性・危険性等について把握した際には、迅速に対応していきたい。

## 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.
- Yokota S, Kishimoto T. Tocilizumab: molecular intervention therapy in children with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010; 6(5):735-743.
- 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):1781-1788
- Yokota S, Mori M, Imagawa T, Murata T, Tomiita M, Itoh Y, Fujikawa S, Takei S. Guidelines on the use of etanercept for juvenile idiopathic arthritis in Japan. *Pediatric Rheumatology Association of Japan. Mod Rheumatol.* 2010; 20(2):107-113
- 横田俊平 若年性特発性関節炎における生物学的製剤の安全性(解説) リウマチ科

45 (6) : 647-652, 2011

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59(7) : 785-794, 2010

森雅亮、横田俊平 関節症状を伴う若年性特発性関節炎におけるメトトレキサートの適応拡大の取得. 日本小児科学会雑誌 114 (3) : 415-425, 2010

横田俊平 ステロイドの使い方 小児に対するステロイドの使い方. 日本医師会雑誌 139 (3) : 650-651, 2010

横田俊平 小児難病を知る 若年性特発性関節炎. Journal of Clinical Rehabilitation 19 (5) : 475-477, 2010

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 36:745-747, 2010

横田俊平 目でみるシリーズ 若年性特発性関節炎(JIA). Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology 4 : 4-6, 2010

横田俊平 【小児におけるリウマチ・免疫疾患と生物学的製剤】生物学的製剤の臨床わが国における臨床成績を中心にして. アレルギー・免疫 17:237-243, 2010

横田俊平 進化する小児リウマチ医療. 第7回三島リウマチフォーラム 2010年3月6日(大阪)

Shumpei Yokota Clinical remission in children with systemic juvenile idiopathic arthritis receiving tocilizumab treatment. EULAR2010 June 16-19, 2010 (Rome, Italy)

横田俊平 Chronic Arthritis in Childhood and Molecular Intervention Therapy. 国際小児難病フォーラム 2010年7月17-18日(東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

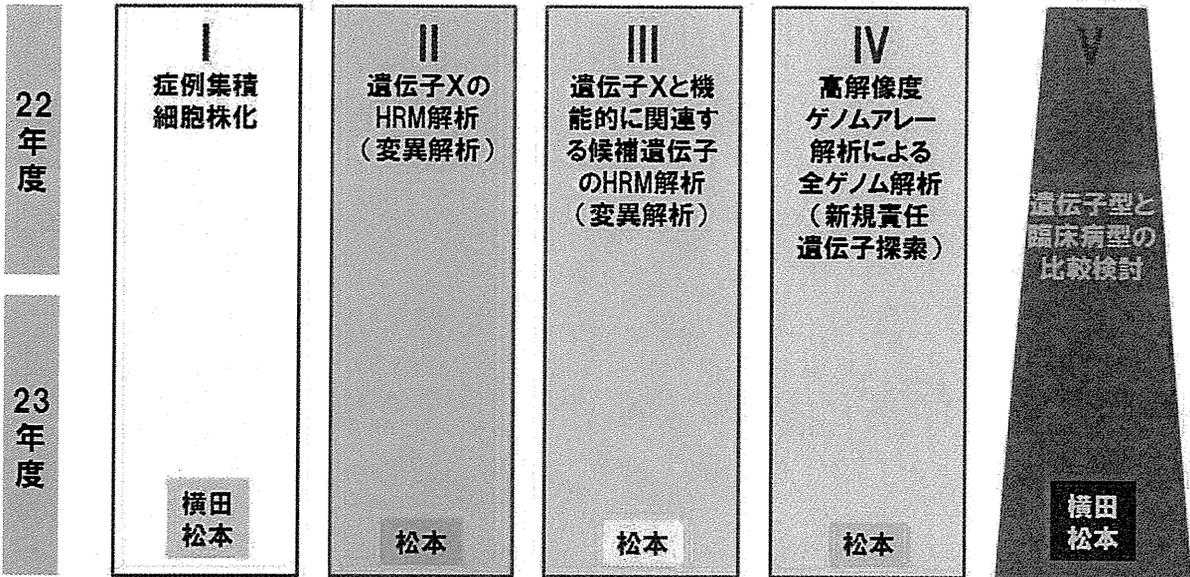
## 2. 学会発表



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

平成 22 年度： 若年性特発性関節炎発症および合併症に及ぼす遺伝的要因に関する研究

平成 23 年度： 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：

全身型若年性特発性関節炎 (s-JIA) および s-JIA の重篤な合併症であるマクロファージ活性化症候群 (MAS) に絡む遺伝的要因を探索した。Interferon regulatory factor 5 (IRF5)は炎症性サイトカインをコードする遺伝子群の活性化に関わるマスター転写因子でありこれまでに IRF5 多型と全身性ループス・エリテマトーデス (SLE) やリウマチ性関節炎などの自己免疫性疾患との関連が報告されてきた。81 例の s-JIA と 3 種類の IRF5 多型との関連性を調査したところ特に正常対照 190 例に比し有意な差は確認されなかった。しかし IRF5 多型の一つ rs2004640 T アリルは s-JIA の MAS 発症群に於いて非発症群と比較し高い相関を示し、IRF5 多型が s-JIA の MAS 発症に関与している可能性が示された (H22 年度)。

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。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 (H23 年度)。

A. 研究目的

全身型若年性特発性関節炎 (s-JIA) および s-JIA の重篤な合併症であるマクロファージ活性化症候群 (MAS) に絡む遺伝的要因を明らかにすることを目的とした。Interferon regulatory factor 5 (IRF5)は炎症性サイトカインをコードする遺伝子群の活性化に関わるマスター転写因子でありこれまでに IRF5 多型と全身性ループス・エリテマトーデス (SLE) やリウマチ性関節炎などの自己免疫性疾患と関連が報告されてきた。本研究では s-JIA および MAS 合併の有無における IRF5 多型との関連を中心にその相関を明らかにすることを目的とした (H22 年度)。

横浜市立大学では 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。この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(H23 年度)。

B. 研究方法

研究対象は横浜市立大学病院を受診した ILAR 分類の s-JIA のクライテリアに適合した 81 例の s-JIA である。うち MAS を合併した s-JIA は 33 例、非合併の s-JIA は 48 例である。MAS の診断は臨床症状と試験的診断ガイドライン (Ravelli A et al., J Pediatr 2005) に従った。全例に於いて IRF5 の 3 つの多型(rs729302, rs2004640, rs2280714) を TaqMan SNP タイピング法を用いて解析した。解析には ABI7500 リアルタイム PCR を用いた。統計学的解析は SNPAssoc パッケージを用いてロジスティック回帰分析法を

用いた (H22 年度)。

#### トシリズマブ効果の検討 (H23 年度)

##### 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

s-JIA 群及び正常対照群において 3 種類の IRF5 多型の有意な頻度差は観察されなかった (いずれの多型も  $P=0.37\sim 0.80$  と有意で無かった)。一方 s-JIA において MAS 合併群と非合併群の比較で rs2004640 T アリルが MAS 合併群と有意に高い相関を示した。T アリルを有する群では T アリルを有さない群と比し MAS 発症リスクが Bonferroni correction 後に  $P=0.003$ , OR 4.12, 95% CI 1.84, 9.16 で、T アリルを有する群では MAS 発症リスクが有意に高かった。さらに 3 つの多型

(rs729302-rs2004640-rs2280714) の A-T-T ハプロタイプは MAS 発症と有意な相関を示した ( $P<0.0004$ , OR4.61, 95% CI 1.73-12.3) (H22 年度)。

#### トシリズマブ効果の検討 (H23 年度)

##### 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

s-JIA において MAS は予後を左右する重要な合併症である。今回多型との関連が明らかになった IRF5 は、IL-6、IL-12、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの遺伝子群の発現を誘導する。MAS においては IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  などのサイトカインの異常が特徴であり、今回明らかにされた IRF5 との関連性は極めて興味深い結果である。

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  $\alpha$  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  $\alpha$  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 $\beta$  や TNF  $\alpha$  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

81 例の s-JIA と 3 種類の IRF5 多型との関連性を調査したところ特に正常対照 190 例に比し有意な差は確認されなかった。しかし IRF5 多型の一つ rs2004640 T アリルは s-JIA の MAS 発症に於いて高い相関を示し、IRF5 が s-JIA の MAS 発症に関与している可能性が示された。s-JIA における IRF 多型の発症リスク予測等臨床上有用な指標になる可能性がある。

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

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.

Yokota S, Kishimoto T. Tocilizumab: molecular intervention therapy in children with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010; 6(5):735-743.

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):1781-1788

Yokota S, Mori M, Imagawa T, Murata T, Tomiita M, Itoh Y, Fujikawa S, Takei S. Guidelines on the use of etanercept for juvenile idiopathic arthritis in

Japan. Pediatric Rheumatology Association of Japan. Mod Rheumatol. 2010; 20(2):107-113

横田俊平 若年性特発性関節炎における生物学的製剤の安全性(解説) リウマチ科 45 (6) : 647-652, 2011

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 59(7) : 785-794, 2010

森雅亮、横田俊平 関節症状を伴う若年性特発性関節炎におけるメトトレキサートの適応拡大の取得. 日本小児科学会雑誌 114 (3) : 415-425, 2010

横田俊平 ステロイドの使い方 小児に対するステロイドの使い方. 日本医師会雑誌 139 (3) : 650-651, 2010

横田俊平 小児難病を知る 若年性特発性関節炎. Journal of Clinical Rehabilitation 19 (5) : 475-477, 2010

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 36:745-747, 2010

横田俊平 目でみるシリーズ 若年性特発性関節炎(JIA). Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology 4 : 4-6, 2010

横田俊平 【小児におけるリウマチ・免疫疾患と生物学的製剤】 生物学的製剤の臨床 わが国における臨床成績を中心にして. アレルギー・免疫 17:237-243, 2010

横田俊平 進化する小児リウマチ医療. 第7回三島リウマチフォーラム 2010年3月6日(大阪)

Shumpei Yokota Clinical remission in children with systemic juvenile idiopathic arthritis receiving tocilizumab treatment. EULAR2010 June 16-19, 2010 (Rome, Italy)

横田俊平 Chronic Arthritis in Childhood and Molecular Intervention Therapy. 国際小児難病フォーラム 2010年7月17-18日(東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 2. 学会発表

## 若年性特発性関節炎の遺伝的要因の実態班構成

研究代表者 横浜市立大学医学研究科環境分子医科学教授 松本直通

研究分担者 横浜市立大学医学部小児科学教授 横田俊平

研究協力者 鹿児島大学医学部保健学科 武井修治

宮城県立こども病院医師 梅林宏明

あいち小児保健医療総合センター医長 岩田直美

新潟大学医学部小児科講師 金子詩子

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
Yokota S, Kishimoto T.	Tocilizumab: molecular intervention therapy in children with systemic juvenile idiopathic arthritis.	Expert Rev Clin Immunol	6(5)	735-743	2010

Tateishi U, et al., Yokota S.	PET assessment of disease activity in children with juvenile idiopathic arthritis.	Pediatr Radiol.	40(11)	1781-1788	2010
Yokota S, et al.	Guidelines on the use of etanercept for juvenile idiopathic arthritis in Japan. Pediatric Rheumatology Association of Japan.	Mod Rheumatol	20(2)	107-113	2010

## 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. Harai†, 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