

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15666

研究課題名(和文)川崎病患者のイムノグロブリン大量療法不応答性に関する遺伝要因の探索

研究課題名(英文) Exploring novel genetic factors associated with intravenous immunoglobulin therapy-unresponsiveness in Kawasaki disease patients

研究代表者

天野 勇治 (Amano, Yuji)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：50624681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：IVIG不応性川崎病患者に対してエクソーム解析、高深度pooled genome sequencingを実施し、8個の候補バリエントを得た。候補バリエントに対して個々にジェノタイピングを行った結果、SMURF2遺伝子に位置する低頻度ミスセンス変異バリエントがIVIG不応性川崎病患者に集積していることを見出した($p=4.5e-5$)。本バリエントを保有する患者の臨床的特徴を精査した結果、本バリエントはIVIG不応性川崎病患者の冠動脈障害発生における防御因子であることが示唆された($p=0.0365$)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SMURF2は、IVIG抗炎症作用および川崎病急性期炎症と密接に関連するTGF-betaシグナルのネガティブレギュレーターとして知られている。アミノ酸置換を伴う本バリエントは、SMURF2の分子機能に影響を及ぼす可能性が高い。その詳細解析はIVIGの抗炎症効果の分子機序解明につながる可能性を秘めている。更に本バリエントは日本人の約0.6%がヘテロに保有する低頻度バリエントであるにもかかわらず、約13%のIVIG不応性川崎病患者がヘテロに保有していた($OR(95\%CI)=25.9(8.3-80.6)$)。更なる検証を行うことにより、IVIG不応性予測指標へと繋がる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed exome sequencing followed by deep sequencing using pooled genomic DNA derived from 30 of IVIG-unresponsive Kawasaki disease (KD) patients. As a result, we selected 8 variants as candidates. Individual genotyping showed that a low frequency missense variant located in SMURF2 locus is concentrated in IVIG-unresponsive KD patients($p=4.5e-5$). We examined clinical characteristics of KD patients harboring this variant, and found that this variant is a protective factor for the development of coronary artery lesions in IVIG-unresponsive KD patients($p=0.0365$).

研究分野：細胞生物学

キーワード：川崎病 IVIG療法抵抗性 遺伝子解析 pooled genome sequencing

1. 研究開始当初の背景

川崎病は乳幼児に好発する全身性血管炎であり、冠動脈の炎症を合併することが問題となっている。冠動脈の炎症は病日ごとに進行し、約 12 病日には動脈瘤を形成する。従って、発症早期において最適の治療法を選択し、炎症を最小限に抑えることが治療戦略上重要である。

川崎病急性期の標準治療として、高用量免疫グロブリン静注 (IVIG) 療法がほぼ全ての患者に実施されている。IVIG 療法によって約 8 割の患者は早期に解熱し、冠動脈後遺症はほとんど残らない。しかしながら、約 2 割の患者は IVIG 療法に不応答であり、炎症の長期化により、不応答患者の約 10% に冠動脈病変を合併する。従って、診断後速やかに IVIG 療法に対する応答性を予測する「新たな予測システム」の構築が急務となっている。

従前の IVIG 療法不応予測スコアは、患者月齢や炎症強度を指標にしたものが主流となっている。これらは感度・特異度ともに約 80% 程度の精度を有し、初回 IVIG 療法不応症例の 2nd, 3rd line の治療法選択指針となっている。しかしながら現状では、ほぼ全ての患者の第二選択療法として IVIG の再投与が行われており、リスクスコアが治療法選択に有効な情報を与えているとは言えない。その結果、一部の患者において遷延性の炎症が起こり、深刻な冠動脈瘤が発生してしまう。一方、急性期における新たな治療法として、プレドニゾロン併用療法、抗 TNF α 抗体 (2015 年 12 月承認)、血漿交換などが注目されている。これらの治療法は今のところ 3rd line 以降で行われているが、より高精度な IVIG 療法不応予測が可能となれば、病初期から適切な治療法選択が可能となり、冠動脈瘤形成の根絶に繋がるものと考えられる。

申請者は、IVIG 不応性に何らかの遺伝的要因が関与するという仮説を立て、不応症例のゲノムシーケンス解析を開始した。その結果、インターロイキン 4 受容体 α 鎖遺伝子の 3' -UTR 領域に位置する一塩基バリエーション (SNV)、rs563535954 が有意に IVIG 療法不応の川崎病患者に集積していることを見出した。驚いたことに rs563535954 は日本人に特有の SNV であり、公開された日本人ゲノム情報データベースによると、この SNV は日本人 1,063 人中 20 人がヘテロで保有する低頻度遺伝子バリエーションであった (アレル保有率: 1.9%)。申請者のこれまでの解析結果によると、2 クールの IVIG 療法に不応であった 33 症例において、4 症例が rs563535954 をヘテロで保有していた (アレル保有率: 12%)。一方、応答群 42 症例では同アレルの保有は皆無であった ($P=0.0337$)。上記 4 症例を既存の IVIG 不応リスクスコアに当てはめると、4 症例中 3 症例 (久留米スコア)、4 症例中 2 症例 (群馬スコア) が非リスク群に分類されてしまうことが判明した。以上の結果は、rs563535954 が新たな IVIG 不応リスク指標となり、既存のリスクスコアを凌駕する新たな治療法選択指針となる可能性を強く示唆している。

2. 研究の目的

本課題では、先行研究より見出した rs563535954 が IL-4R α 発現に及ぼす影響について精査し、原因不明である IVIG 抵抗性発生機序の解明へと繋げる。さらに IVIG 不応性に関与する遺伝素因の全貌を明らかにし、超高精度な IVIG 不応リスク指標の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) mRNA 安定性に及ぼす影響: rs563535954 が mRNA 安定性に及ぼす影響について、患者 PBMC および EBV 不死化 B 細胞 (B-LCL) を用いた allele-specific transcript quantification により

検証する。rs563535954 アレルは BamHI 消化によって判別可能である。よって、各細胞より単離した mRNA より cDNA を合成し、これを鋳型に rs563535954 領域を PCR により増幅する。BamHI で完全消化した後アクリルアミドゲルで展開し、各アレル量を比較する。

(2)翻訳効率に及ぼす影響：Dual Luciferase assay system を用いて、rs563535954 マイナーアレルがタンパク発現に及ぼす影響について確認する。

(3)IVIG 抵抗性に関与するバリエントの網羅的探索：2 コースの IVIG 療法に不応であった川崎病患者 30 人に由来する pooled genomic DNA を用いてエクソームシーケンシングを行う。候補バリエントを絞り込み、高深度シーケンシングおよび個々のジェノタイピングを行い、IVIG 不応性川崎病患者に集積するバリエントを同定する。

4 . 研究成果

rs563535954 は 3' UTR に位置するバリエントであることから、mRNA の安定性および翻訳効率に影響する可能性が高い。申請者らはまず、rs563535954 をヘテロで有する IVIG 抵抗性川崎病患者 3 人の PBMC を用いて Allele-specific transcript quantification を行った。しかしながら、各アレル間に違いは見られなかった。次に申請者らはより詳細な解析を実施するために、rs563535954 をヘテロで有する健康人由来の B-LCL を入手した。まず、定常状態でのアレル間の mRNA 安定性を評価するために、Actinomycin D で新規 mRNA 合成を阻害し、安定性を確認した。わずかに rs563535954 マイナーアレルを有する mRNA 量比の増加を認めたが、大きな違いは見られなかった。次に炎症等の細胞外環境による影響を確認するために、B-LCL を IL-4、TNF α 、IFN γ でそれぞれ刺激し、アレル間の mRNA 量を比較したが、違いは見られなかった。次に申請者らは rs563535954 マイナーアレルが蛋白質発現に及ぼす影響を調べるために、Luciferase assay を行った。IL-4Ra の UTR は 3'、5' 共にタンパク発現を抑制する一方、rs563535954 マイナーアレルによる影響は見られなかった。次に rs563535954 領域への結合が見込まれる microRNA 存在下でのタンパク質合成を確認した。結果、rs563535954 による違いは見られなかった。以上の結果から、先行研究より見出した IVIG 不応性リスク因子である rs563535954 マイナーアレルは、IL-4R α の発現量にほとんど影響を与えないことが明らかとなった。

IVIG 不応性のような一般的な形質には一般的なバリエント (common SNPs) が関与すると考えられてきた。一方一般的な形質にも稀なバリエント (low frequency, rare variant) が関与することも明らかになってきた。申請者らは IVIG 不応性に関与する低頻度バリエントを網羅的に探索するために、申請者らは IVIG 不応性川崎病患者 30 人由来の pooled genome を用い、エクソームシーケンシングを実施した。得られたバリエントの検出頻度を日本人ゲノムリファレンスパネル (3.5KJPN) のアレル頻度と比較し、198 個の候補バリエントを選定した。次に候補バリエントを対象とした高深度シーケンシングを実施し、最終的に 8 個の候補バリエントを選出した。続けて、8 個の候補バリエントに対して個々にジェノタイピングを行い、正確なアレル保有率を確認した。その結果、SMURF2 遺伝子に位置する低頻度ミスセンス変異バリエントが、有意に IVIG 抵抗性川崎病患者群に集積していることを見出した ($p=4.5 \times 10^{-5}$)。本バリエントは日本人の約 0.6% がヘテロに保有する低頻度バリエントであるにもかかわらず、約 13% の IVIG 不応性川崎病患者がヘテロに保有していた (OR (95%CI) = 25.9 (8.3-80.6))。SMURF2 は、IVIG 抗炎症作用および川崎病急性期炎症と密接に関与する TGF β シグナルのネガティブレギュレーターである。アミノ酸置換を伴う本バリエントは、SMURF2 の分子機能に影響を及ぼす可能性が高い。その詳細解析は IVIG の抗炎症効果の分子機序解明につながる可能性を秘めており、今後の課題である。

次に、我々は本課題で見出した SMURF2 バリエントを有する IVIG 不応患者の臨床的特徴に関し

て精査した。その結果、本バリエントを有する患者は、有意に冠動脈障害を合併しないことが示唆された($p=0.0365$)。有意差が得られている一方、限られたサンプル数での結果であり、更なる解析が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Amano Yuji, Akazawa Yohei, Yasuda Jun, Yoshino Kazuhisa, Kojima Katsuhiko, Kobayashi Norimoto, Matsuzaki Satoshi, Nagasaki Masao, Kawai Yosuke, Minegishi Naoko, Ishida Noriko, Motoki Noriko, Hachiya Akira, Nakazawa Yozo, Yamamoto Masayuki, Koike Kenichi, Takeshita Toshikazu	4. 巻 17
2. 論文標題 A low-frequency IL4R locus variant in Japanese patients with intravenous immunoglobulin therapy-unresponsive Kawasaki disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12969-019-0337-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------