

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08203

研究課題名(和文)川崎病の免疫グロブリン治療不応性の予測マーカーとしての遺伝子多型

研究課題名(英文) Single nucleotide variants that could serve as the predictive indicator of intravenous immunoglobulin therapy-unresponsive Kawasaki disease.

研究代表者

竹下 敏一 (Takeshita, toshikazu)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：60212023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病の病態は全身性の血管炎と捉えられ、頻度は少ないが心臓に冠動脈瘤が形成される。我々は免疫グロブリン療法に抵抗性を示した患者の遺伝子多型を解析し、Jun、Smurf2、PMAIP1、NCK1、WNT2、BCAN、MAPK9、ANGPTL4の遺伝子座において、病態に関連する低頻度一塩基遺伝子多型を見出した。また、川崎病の発症に関わることが報告されているIL-2について、炎症もしくはT細胞抑制の視点からその変異体を用いて解析を行った。さらにIL-2の細胞内動態がIL-2作用に与える影響について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病患者の免疫グロブリン療法抵抗性に関わる遺伝子多型の報告は多くなく、より詳細な情報の収集が期待されており、その候補遺伝子を見出した。また、川崎病そのもの治療、そして免疫グロブリン療法抵抗性の治療を進めるためにも、関連する遺伝の個々の分子基盤の理解が必要である。川崎病に関連する遺伝子多型として代表であるIL-2作用の分子基盤を解析した。

研究成果の概要(英文)：Kawasaki disease (KD) is a systemic vasculitis which may be associated with coronary artery aneurysms. We found possible candidates of the single nucleotide variant (SNV), which are concentrated in KD patients who did not respond to an intravenous immunoglobulin (IVIG) therapy. The SNVs are located in Jun, Smurf2, PMIP1, NCK1, WNT2, BCAN, MAPK9, ANGPTL4. While we analyzed IL-2 mutants, which affect the inflammatory effect and/or T cell-mediated suppression, we examined the intracellular dynamics, especially the internalization, of IL-2 receptor beta chain through the position of IL-2 effect.

研究分野：小児科学

キーワード：川崎病 一塩基遺伝子多型 IVIG不応性 IL-2 IL-4 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

川崎病の患者数は年々増加し続け1990年代に年間6,000人程であったのが、2015年に15,000人を越えた。患者数増加の原因も川崎病自体の原因も不明である。少なくとも感染症とそれに伴う炎症反応が引き金となり、患者の要因(遺伝的背景など)と合わさって発症すると考えられている。遺伝的背景として様々な遺伝子多型がこれまで報告されており、特に免疫系に関わる遺伝子多型の中では、インターロイキン2(IL-2)などのサイトカインとその発現調節に関わる分子が注目されている。

川崎病の冠動脈病変の割合は減少しているが、一方で、患者数は、10,434人(2006)から15,272人(2016)に増加しており、パーセントではなく実数としては、さほど減少したわけでは無い。冠動脈病変に最も強く相関する要因は、IVIG 不応答である事から、いくつかのIVIG 不応答を予測するスコアが提唱されている。小林(群馬)スコア、江上(久留米)スコア、佐野(大阪)スコアなどが有り、治療開始病日、月齢、好中球比率、血小板、肝機能(AST、ALTなど)、CRP 高値などにより評価する。個々の報告により幅はあるがおおよそ感度が45~77%、特異度が68~86%で、オッズ比は報告論文によって多少の増減はあるが、おおよそ4~5である。

川崎病の原因は依然として不明であるが、近年、患者の遺伝的背景が注目されている。罹患率は、血縁関係が無い場合に比べて兄弟が10倍高く、また、日本人を代表とするアジア人が、欧米のコカソイド系白人に比べて高いことが挙げられる。ゲノムワイド関連解析による遺伝子多型解析が行われた結果、川崎病では免疫関連遺伝子座に位置する遺伝子多型が統計的有意差を持って抽出された。見出された多型は、人口の数%を占める、いわゆる common single nucleotide polymorphism (common SNP)でオッズ比は1.5~2程度であった。例えば、TNF レセプターファミリーの CD40(rs4813003)が74%/67%(オッズ比1.41)、チロシンキナーゼの BLK(rs2254546)が82%/71%(オッズ比1.85)、HLA-DOB(rs2857151)が82%/75%(オッズ比1.47)、FCGR2A(rs1801274)が84%/80%(オッズ比1.30)と、これらもいわゆる人口の多数が持つ common SNP である。一方、オッズ比の値から見て、これら遺伝子多型を IVIG 不応答性のマーカーとして利用するには無理がある。

## 2. 研究の目的

本研究では IVIG 不応答のマーカーとなる一塩基遺伝子多型を探索するとともに川崎病の発症に関与することが示唆されているサイトカインの作用機序の解析を行う。

IVIG 不応答のマーカーとなるには高いオッズ比を有する遺伝子多型を探索する必要がある。オッズ比の高い遺伝子多型は、いわゆる common SNP の中には無いので、人口の数%もしくはそれ以下の頻度の低い一塩基遺伝子多型が探索の標的となる。他方、川崎病の発症に関わるとされる遺伝子多型の代表は、IL-2 発現制御に関連する遺伝子であり、また、我々がすでに報告した IL-4 レセプター 鎖遺伝子上の rs563535954 もまだ機序は不明であるが何らかの関与が考えられる。IL-2 と IL-4 はレセプターサブユニットとして 鎖を共有することから、IL-2 機能の分子基盤解析は IL-4 機能の分子基盤解析につながる。従って、これまで川崎病の関連遺伝子多型として確立している IL-2 の炎症反応作用面から解析して、治療に向けた一助とすべく情報収集を行った。

## 3. 研究の方法

次世代シーケンサーを用い、IVIG 不応答の川崎病患者30例についてサイトカイン並びに免疫系関連遺伝子のゲノム解析を行った。また、既に報告されているゲノムワイド解析の1000人を対象とした一塩基多型のデータベースと比較し、低頻度一塩基遺伝子多型を探索した。また、川崎病治療に向けた情報収集として、IL-2 の炎症反応と IL-2 が誘導する抑制性 T リンパ球への作用を IL-2 の mutant を用いて解析した。さらに、IL-2 レセプターの細胞での動態を、IL-2 レセプター 鎖を例に取り解析し、鎖の動態と T リンパ球増殖への影響を調べた。

## 4. 研究成果

我々はこれまで43種のサイトカイン受容体遺伝子に対象を絞って解析を行い、免疫グロブリン療法抵抗性の川崎病患者33人のDNAサンプルを用いてサイトカイン受容体遺伝子上に193の single nucleotide variants:SNVを見出し、その中からrs563535954を見出した。rs563535954は日本人1063人中20人が保持する低頻度一塩基遺伝子多型であり、オッズ比は7.19である。また、海外の2054人中1人が保持していたが、この1名は日本人であった。免疫グロブリン療法に不応答した川崎病患者42人にこの多型は検出されなかったことから、rs563535954は川崎病の発症に関わると言うより、免疫グロブリン療法抵抗性に関連することが示唆された。この様な背景の下に、30人分の2回IVIG治療抵抗性患者のリンパ球から抽出したDNAを用いてエクソーム解析を行った。1000ゲノムプロジェクトとの比較でオッズ比が4以上、minor allele frequency (MAF)が0.04以上を抽出(1883個)、さらに免疫関連分子であるもの(437個)を抽出、最終的に197個を候補として選んだ。この197個のvariantを含む領域を次世代シーケンサーで読み、確認できたものをさらに個別にシーケンスした。その結果得られたvariantは、第1番目として30人中3人(1000ゲノムプロジェクトあたり20人)、第2番目として30人中4人(1000ゲノムプロジェクトあたり5.9人、オッズ比25.8、p=0.0000448)、第3番目として30人中2人(1000ゲノムプロジェクトあたり1.78人)などが見出された。第1番目の遺伝子多型は、転写因子、Junの、第2番目はSmurf2の遺

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

伝子座に位置した。さらに低頻度一塩基遺伝子多型を持つ遺伝子候補としてPMAIP1、NCK1、WNT2、BCAN、MAPK9、ANGPTL4を見出した。

川崎病の発生機序が容易に解明されない原因に炎症に関わるサイトカインの二面性が推察される。IL-2 は生体防御を担うと同時に、制御性 T 細胞により免疫抑制機能にも関与する。IL-2 による炎症反応と免疫能のバランスの制御機構解析を目的として、NK 活性、障害性 T リンパ球 (CTL) 活性とそれと拮抗する制御性 T 細胞活性について検討した。免疫抑制に関わる制御性 T 細胞の活性化には高親和性 IL-2 レセプターの 鎖、鎖、鎖の 3 つのレセプターが関与し、細胞性免疫の CTL や NK 細胞の活性化には中親和性 IL-2 レセプターの 2 つのレセプター 鎖、鎖が関与する。

そこで 鎖に結合能の無い変異 IL-2 を作製して担癌マウスに投与、抗腫瘍効果で制御性 T 細胞活性、及び CTL 活性を評価した。作製した IL-2 変異体の中で MK-6 (K35A/R38A/K43A/Y45A) は CD8 陽性細胞障害性 T リンパ球の増殖を促進したが、CD4 陽性制御性 T 細胞の増殖はほぼ見られない。同時に通常の IL-2 投与において観察される血管内皮細胞障害による浮腫も認められない。さらにマウス大腸がん細胞 CT26 の腫瘍の増殖抑制が観察された。これらの結果より、IL-2 による炎症反応に 鎖を含む高親和性 IL-2 レセプターが関与していることが示され、川崎病における炎症反応にも関与することが示唆される。

川崎病の原因にサイトカインの関与が遺伝子多型研究からも明らかである。IL-2 は最もよく解析されているサイトカインで、分子的基盤解析に適していることから、IL-2 レセプターの動的な変化 (細胞表面からの取り込み: エンドサイトーシス) とシグナル伝達への関連を解析した。IL-2 レセプターは 鎖、鎖、鎖の 3 つのレセプターからなり、鎖は IL-4 レセプターとしても機能している。従って、鎖の解析は同時に IL-4 の機能解析につながる。細胞表面にある増殖因子の細胞内への取り込みは細胞内リジン残基へのユビキチン結合により誘導されることが知られている。IL-2 レセプター 鎖についてこの点を検討した。鎖レセプターの細胞内領域にあるリジン残基をアルギニンに変えたところ (K/R 変異体) 細胞内への取り込みが阻止された。さらに K/R 変異体の C 末端にユビキチンを結合すると細胞内への取り込みが回復した。すなわち、IL-2 レセプター 鎖も細胞内への取り込みにユビキチンが重要であると分かった。ところがマウス B リンパ球細胞株、BAF 細胞に K/R 変異体を導入して IL-2 刺激したところ、この BAF 細胞は IL-2 刺激で増殖し、IL-2 レセプターのシグナル伝達下流分子、STAT5 のリン酸化も生じていた。この点を詳細に解析するため、次に K/R 変異体をヒトの T リンパ球株細胞、MOLT 細胞に導入、IL-2 刺激下での細胞内取り込みを調べると、細胞内取り込みが確認された。このことから細胞内取り込みはもう一つの IL-2 レセプターサブユニット、鎖の関与が示唆された。鎖の細胞内取り込みがブロックされる変異体、d290 と鎖の K/R 変異体をマウス線維芽細胞、MEF 細胞に導入、IL-2 刺激して細胞内取り込みを調べると、鎖、鎖の両方とも細胞内取り込みは認められなかった。従って、IL-2 レセプターの細胞内取り込みは鎖が重要であると分かった。この解析過程で予想外の知見として 鎖の 278 アミノ酸残基以下を除去した変異体、d277 は細胞内取り込みが見られないが、これを BAF 細胞に導入して IL-2 刺激を加えると、IL-2 の感受性が増強され、低い濃度の IL-2 で十分な増殖が認められた。川崎病一遺伝子多型解析において IL-2 の発現誘導に関わる分子が有意に関連するとの報告があり、細胞表面の鎖の増加が IL-2 感受性の増強となったメカニズムは示唆的である。

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 Kobayashi Maki, Kojima Katsuhiko, Murayama Kazutaka, Amano Yuji, Koyama Takashi, Ogama Naoko, Takeshita Toshikazu, Fukuhara Tatsuro, Tanaka Nobuyuki	4. 巻 112
2. 論文標題 MK 6, a novel not IL 2, elicits a potent antitumor activity by improving the effector to regulatory T cell balance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4478 ~ 4489
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15127	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
---------	---------