

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 元 年 6 月 1 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10020

研究課題名(和文) 川崎病とサイトカイン受容体の変異および遺伝子多型との関連

研究課題名(英文) Mutations and single nucleotide polymorphisms of cytokine receptors in 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) 3,600,000 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、インターロイキン4レセプター遺伝子上に低頻度一塩基遺伝子多型を見出した。rs563535954は日本人1063人中20人が持つ、低頻度一塩基遺伝子多型(1.9%)であった。さらに免疫グロブリン療法に抵抗性を示した患者33人中4人が保持しており、オッズ比は7.19である。この遺伝子多型は免疫グロブリン療法に应答した42人は保持していないことから、川崎病発症に関連しているのではなく、免疫グロブリン療法抵抗性に関連する遺伝子多型であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

川崎病患者において免疫グロブリン療法抵抗性に関連する一塩基遺伝子多型、rs563535954を見出した。川崎病関連の一塩基遺伝子多型は人口の数十パーセントが保有する、一般的な一塩基遺伝子多型(common SNPs)と報告されてきた。これらの多型のオッズ比は1.5～2.0ほどで、オッズ比の低いcommon SNPsが多数関連して川崎病に関わると言われてきた。一方、我々は、人口の5%以下の低頻度一塩基遺伝子多型が川崎病の病態に関わると示唆した。この多型はオッズ比7.19と、川崎病関連common SNPsと比較して高く、免疫グロブリン不応答を予測する診断指標としての有用性が見込まれる。

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 that the single nucleotide variant (SNV) rs563535954, which is located in IL4R locus, is concentrated in KD patients who did not respond to an intravenous immunoglobulin (IVIG) therapy. While the minor allele of rs563535954 was detected in 4 individuals among 33 patients of IVIG-unresponsive KD, the minor allele was observed in 20 of 1,063 individuals according to Japanese genome variation database (odds ratio=7.19). The minor allele of rs563535954 was not found in 42 KD patients who responded to treatment with IVIG ($p=0.0337$), supporting the possibility that the rs563535954 is associated with IVIG-unresponsiveness rather than onset of KD.

研究分野：小児科学

キーワード：一塩基遺伝子多型 インターロイキン4レセプター 川崎病 サイトカインレセプター

1. 研究開始当初の背景

免疫系の過剰なシグナルはアレルギー等の疾患を引き起こすことが知られている。我々はこれまでサイトカインシグナルをオフにするサイトカイン受容体の小胞輸送について解析してきた。この過程でサイトカイン受容体の巧妙な動態制御を見出した。この知見から、一見微細に見えるサイトカイン受容体の変異や遺伝子多型も受容体の機能を修飾する可能性が考えられた。そこで免疫系が密接に関わると示唆されている川崎病において、サイトカイン受容体の変異や遺伝子多型を中心に解析を試みた。

IVIG 療法により川崎病の冠動脈病変の割合は減少した。しかし、重症の心障害に焦点を当てると、10 年前の比較で、瘤は 1.04% から 0.82%、巨大瘤は 0.35% から 0.13% と減少しているが、一方で患者数は、10,434 人 (2006) から 15,272 人 (2016) に増加したため、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ない、と判る。冠動脈病変に最も強く相関する要因は、IVIG 不応答であることから、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) スコアなどがあり、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% である。

患者数の増加がある一方、川崎病の原因は依然として不明である。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間には 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、人口の数十%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。即ち、オッズ比は低いに関連する免疫関連遺伝子多型が複数重なり合って、川崎病発症に関わる、と考えられている。オッズ比の値から見て、これら遺伝子多型がマーカーとしての IVIG 不応答性に応用されるのは難しいと考えられる。

2. 研究の目的

我々は、免疫系遺伝子の発現の安定性や細胞内での動態から川崎病に迫ることを試みた。我々はこれまで IL-2 受容体 鎖、IL-4 受容体 鎖の細胞内領域に細胞内輸送に関わる疎水性アミノ酸クラスターを見出している。この領域のアミノ酸の変異や欠失が受容体シグナルの増強をもたらしたことから、この領域の変異や遺伝子多型は免疫の過剰反応となることが予測された。川崎病は、特有の発疹、イチゴ舌、頸部リンパ節腫脹、趾指先端の紅斑や膜様落屑から免疫系の過剰反応に関わるものと推察される。そこで本研究ではこの疎水性アミノ酸クラスターを含む免疫系に関連するサイトカイン受容体全長について、遺伝子多型や変異が川崎病に見られる免疫系の過剰反応に関わっている可能性を探った。

3. 研究の方法

我々は先行研究で既に、川崎病患者の IL-2 受容体 鎖 (IL-2R β)、IL-2 受容体 鎖 (IL-2R γ) ならびに IL-4 受容体 鎖 (IL-4R α) のゲノム全長の塩基配列の解析を行った。IL-2 受容体 鎖は IL-2R β ならびに IL-4R α に共通のサブユニット鎖であることから、解析に加えた。次世代シーケンサーを用い、川崎病患者 30 例についてこれら受容体のゲノム全長の塩基配列を解読したところ、30 例中 3 例で同一の新規疾患関連一塩基多型を IL-4R α 遺伝子上に見出した。本研究では免疫系に関連する他のサイトカイン受容体 (対象とするのは 40 種) の一塩基遺伝子多型を解析した。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を検索したところ、この一塩基多型の頻度はハプロイドあたり 1% 以下であり、また、これまで疾患との関連も報告されていない。即ち、川崎病に非常に特異的な新規疾患関連一塩基多型であったことから、この一塩基遺伝子多型の統計的有意差を求めると共に、IL-4R α 遺伝子発現に及ぼす影響について検討を行った。

4. 研究成果

これまで報告のある川崎病の罹患感受性遺伝子について見た場合、single nucleotide polymorphism:SNP の頻度は、川崎病/コントロール群で、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。低頻度一塩基遺伝子多型は低頻度で有ればあるほど、理論上そのオッズ比は高まる。一方、低頻度一塩基遺伝子多型の解析は膨大なデータ量を扱うことになるが、我々は 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った。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 を見出した。この 193SNVs を日本の 1000 ゲノムプロジェクト (1063 人分) と海外の 1000 ゲノムプロジェクト (2504 人分) で比較したところ、rs563535954 が川崎病患者において濃縮されていた。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、

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

この1名は日本人であった。免疫グロブリン療法に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。

冠動脈病変と rs563535954 の関連について述べる。冠動脈病変は川崎病の診断が遅れると増加する傾向にある。病理学的には8～10病日に血管炎が生じ、10～12病日に冠動脈病変が形成されると言われている。川崎病診断の主症状6つの内、4つ以下の非定型例は診断が遅れる傾向にあり、しばしは冠動脈病変の発生が報告される。そこで我々は、IVIGに不応答で非定型例の患者7例と上記のIVIG「応答例」42例を加えて検討した。合計82例の内、冠動脈病変有りは26例で rs563535954 の保有は4例であった。一方、冠動脈病変無しは56例で rs563535954 の保有は1例であった（オッズ比10.0）。即ち、冠動脈病変と rs563535954 の関連においてもオッズ比10.0の高い値が示された。この解析では非定型例の7名を加えなくとも、オッズ比は7となるので rs563535954 と冠動脈病変との関連は強く示唆される。本解析により rs563535954 保有の IVIG 不応答例と冠動脈病変との密接な関連が示唆されたことの意義は大きく、他に例を見ない遺伝子多型を同定したと判る。従って、rs563535954 は IVIG 不応答診断のマーカーとして、その後の冠動脈病変の予測も含めて有効性は高いと考える。

rs563535954 の IVIG 療法不応答診断のマーカーとしての解析を行った。rs563535954 と IVIG 療法不応答予測スコアである小林スコア、江上スコア、佐野スコアとの関連について個々に述べる。小林スコアでは rs563535954 を保持する4人中3人がリスク群に入る。一方、江上スコアでは4人中2人、佐野スコアでは4人中1人のみがリスク群となる。本研究で rs563535954 を持たず、また、IVIG 療法不応答な川崎病患者28人中23人が佐野スコアのリスク群に入ることから、本研究で集めた IVIG 療法不応答患者が佐野スコアの評価からかけ離れているわけではない。佐野スコアで rs563535954 を保持するのが4人中1人のみと言うことは、rs563535954 が CRP 値や肝障害マーカーなどと独立したマーカー（ $P=0.0393$ ）で有ることを示唆し、これまでの IVIG 療法不応答予測スコアで見逃されていた患者を検出できることを意味する。従って、IVIG 療法不応答診断のマーカーとしての有用性を示していると考ええる。

rs563535954 は3' UTR 領域にあることから、転写に関わることが考えられた。まずはじめに、rs563535954 を保有する3人の患者末梢血から抽出した mRNA を用いて rs563535954 を有するアレルからの mRNA と有さないアレルからの mRNA で量的な差があるかどうかを調べたが、差は認められなかった。次に rs563535954 を含むアレルの領域を発現レポーターに組み込んで、レポーターアッセイを行ったが、rs563535954 の有る無しに関わらず差は検出されなかった。転写の調節要因としてマイクロ RNA の関与が知られている。そこで rs563535954 を含む領域に結合することが考えられる4つのマイクロ RNA を、発現レポーターアッセイ系に加えて解析を行った。しかし、用いた4つのマイクロ RNA の影響は認められなかった。今回同定された一塩基遺伝子多型は3' UTR 領域にあり、生体内で炎症反応などの影響を受けることが予想されたが、その点を含めて転写の調節要因の解析は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yuji Amano, Yohei Akazawa, Jun Yasuda, Kazuhisa Yoshino, Katsuhiko Kojima, Norimoto Kobayashi, Satoshi Matsuzaki, Masao Nagasaki, Yosuke Kawai, Naoko Minegishi, Noriko Ishida, Noriko Motoki, Akira Hachiya, Yozo Nakazawa, Masayuki Yamamoto, Kenichi Koike, Toshikazu Takeshita.

A low-frequency IL4R locus variant in Japanese patients with intravenous immunoglobulin

therapy-unresponsive Kawasaki disease, *Pediatric Rheumatology*, 2019, in press. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

天野勇治、小嶋克彦、吉野和寿、竹下敏一、赤沢陽平、小林法元、元木倫子、蜂谷明、小池健一、他、「難治性川崎病の疾患感受性遺伝子多型の同定」、信州川崎病フォーラム、2016年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9、C K - 1 9 (共通)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小嶋 克彦

ローマ字氏名：(Katsuhiko KOJIMA)

研究協力者氏名：天野 勇治

ローマ字氏名：(Yuji AMANO)

研究協力者氏名：吉野 和寿

ローマ字氏名：(Kazuhisa YOSHINO)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。