

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293139

研究課題名(和文) 超重症川崎病の遺伝的要因解析に関する研究

研究課題名(英文) A genetic study of extremely severe Kawasaki disease patients

研究代表者

尾内 善広 (ONOUCHI, YOSHIHIRO)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30360522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：川崎病の遺伝的要因としてこれまでありふれた一塩基多型が複数見出されているが、本疾患の遺伝的背景には未解明な部分が多い。本研究では巨大冠動脈瘤形成や、頻回再発など川崎病においても稀で特異な表現型に關与する遺伝的要因の探索を行った。まず47人の巨大瘤合併症例を対象に全エクソーム解析を実施し、見出されたバリエーションをアレルの頻度や予想される機能的意義の大きさを4,400候補にまで絞込んだ。頻回再発者を含む2組の川崎病の同胞罹患例とその家族等、合計10名の本ゲノムシーケンス解析も実施、親子間での不一致の除外や予測されるタンパク機能への影響の大きさでの絞り込みを進めた。

研究成果の概要(英文)：To obtain clue to the unexplained part of genetic background of Kawasaki disease (KD), we focused on extreme phenotypes of KD such as developing giant coronary aneurysms and frequently recurrence which are not expected to be caused by common variations in the population. We collected 48 KD patients with giant coronary aneurysms and carried out whole exome sequencing for 47 of them. By excluding variants with frequencies of 0.3% or more in public and in-house databases and those with CADD scores smaller than 20, we obtained 4,400 candidate alleles. Whole genome sequence analysis for frequently recurring KD cases was also carried out. 2 sibling cases and their family members and one singleton KD patient were analyzed. Narrowing down of the candidates by considering consistency within families and the impacts of the variants on the genes was done.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：川崎病 巨大冠動脈瘤 頻回再発 遺伝的要因

## 1 . 研究開始当初の背景

川崎病は主に 5 歳未満の小児が罹患する発熱や発疹を主徴とする急性熱性疾患であり、原因は未だ解明されていない。その本態は全身の中小動脈の血管炎であり、適切な治療を受けずに経過すると、患児の 15-25% に冠動脈瘤などの病変 (CAL) が生じる。治療には免疫グロブリンの大量静注療法が有効であり、早期の解熱や症状の改善が多くの症例で得られる。しかしながら、治療によっても CAL を防ぎきれないケースが数% あることにより川崎病は先進国の小児期の後天性心疾患の最大の原因となっている。中でも 0.2~0.3% には破裂や血栓性閉塞により生命を脅かす恐れの大い内径 8mm を超す巨大冠動脈瘤が形成される。川崎病の罹患率は日本を中心に東アジアの人種に高く、欧米の 10 - 20 倍であること、同胞例や親子例が多いことから、人種間、個人間に遺伝的な罹患しやすさ (罹患感受性) の違いがあることが疫学研究から示されている。

ヒトゲノムの解読、一塩基多型 (SNP) によるハプロタイプ地図の整備と遺伝子タイピング技術の目覚ましい進歩により、川崎病罹患感受性に関連する SNP の検索が進んだ結果、現在までに再現性の高い感受性遺伝子座位が 6 箇所特定されているが、それら個々においても、複数の組み合わせによっても人種差や家族集積性の理由を説明することはできていない。

一方川崎病の重症化における遺伝的要因の関与について、我々は患児の治療への抵抗性や CAL 合併のリスクに *ITPKC* および *CASP3* 遺伝子の一塩基多型 (SNP) が関連するという事を見出し確認したが、それによって解明されたのは重症化のメカニズムの一端に過ぎず、重症化の予測や有効な対処法といった喫緊の課題の解決には至っていない。

従来、集団内で比較的頻度の高いコモンディーズ (ありふれた疾患) の遺伝的要因は複数のありふれた遺伝子多型 (コモンバリエーション) とそれらの相互作用によって形作られるという仮説が主流であったが、近年はより頻度が低いバリエーションの関与も少なからずあるとの考えに落ち着いている。しかし、多因子疾患に關与する低頻度のバリエーションの検索にはゲノムワイド関連解析のようなゴールドスタンダードがないのが実情である。

## 2 . 研究の目的

本研究の目的は川崎病重症化のメカニズムを更に追究し、その予測や対処法開発に結びつける第一歩として、極めて重篤な、あるいは特異な経過を辿った症例の遺伝的背景に焦点をあて、関与を想定する低頻度なバリエーションを同定、重症化に関わる遺伝子・パスウェイを明らかにし、対象を一般の川崎病患者に拡大した遺伝疫学研究への発展を目指すものである。具体的には

種々の治療に抵抗性で巨大冠動脈瘤を形

成した川崎病患者についての全エクソーム解析  
治療法や効果判定基準を統一した患者コホートにおける SNP 関連解析  
頻回に再発を繰り返す症例の全ゲノムシーケンス解析  
川崎病罹患感受性の位置的候補遺伝子として着目した *ORA11* 遺伝子内のありふれた遺伝子多型と低頻度なバリエーションの形質への関与の様態についての検討

である。

## 3 . 研究の方法

### (1) 試料の収集

本邦の多施設による川崎病遺伝学的共同研究である『川崎病遺伝コンソーシアム』に参加する医療機関、ならびに連携研究者である、中村が隔年で継続的に実施している川崎病全国調査において過去に巨大冠動脈瘤症例の診療を行ったことを報告している医療機関には、新たに遺伝コンソーシアムへの参加と併せて試料および臨床情報の提供を依頼し、全国の施設から巨大冠動脈瘤合併川崎病症例のゲノム DNA 試料を収集した。頻回罹患例については遺伝コンソーシアムに登録された川崎病症例のうち、3 回以上の頻回罹患例でありかつその同胞にも 1 回以上の川崎病罹患歴がある 2 組の同胞についてその両親および未罹患同胞の協力を仰ぎ、説明と同意の下、試料の提供を受けた。『川崎病遺伝コンソーシアム』の参加時に必須であるため、すべての DNA 試料および情報の提供施設においては「ヒト・ゲノム遺伝子解析研究の倫理指針」に沿った倫理審査委員会の承認を取得済みである。

### (2) 全エクソームシーケンス解析

#### 試料調製、シーケンシング

Agilent 社の SureSelect Human All Exon V5 を用い、エクソン領域の DNA 断片をキャプチャー、ライブラリーを作成し、HiSeq2000 および 2500 を用いてシーケンスデータを取得した。ヒトゲノム参照配列へのマッピングは samtools, BWA-MEM, picard のツールを用いて行い、バリエーションのコール、アノテーションには VCMM<sup>1</sup>, Annovar を用いた。

#### 候補バリエーションの絞り込み

公共のデータベース (1000genomes phase3, HGVD, ESP6500, 東北メディカルメガバンク), 理化学研究所統合生命医科学研究センターの所内データベースを参照し、川崎病患者集団における巨大冠動脈瘤の発生頻度である 0.3% 以上の頻度でいずれかのデータベースに登録されているバリエーションを除外した。バリエーションの遺伝子機能への影響の大きさを CADD (combined annotation dependent depletion) を用い予測し、20 ポイントを閾値として設定、それ以上のスコアが示されるものを有害バリエーションとして

抽出した。

候補遺伝子の絞込

頻度で絞り込まれた各バリエーションについて 47 人の対象者集団内で観察されたアレル数を遺伝子毎に合計した、バリエーションアレルの延べ数をその遺伝子のタンパクコード領域の長さで除した値によって有害バリエーションの集積の程度を評価した。さらに GTEX の Web サイトから得られる RNA-Seq 解析のデータにおいて、各遺伝子の mRNA のリード数の各臓器・組織内での順位（パーセンタイルランク）を比較することで臓器・組織特異性の検討も行った。

### (3) 頻回罹患同胞例家族の全ゲノムシーケンズ解析

川崎病に 3 回以上罹患した経験を持つ、頻回罹患症例とその家族を対象とした全ゲノムシーケンズ解析を実施した。合計 10 名（2 名の罹患同胞とその両親の計 4 名と 2 名の罹患同胞、1 名の未罹患同胞と 2 名の両親の計 5 名の 2 家族および患者本人のみ 1 名）の試料について外部委託により全ゲノムシーケンズ解析を行った。

### (4) ゲノムワイド関連解析

illumina 社の HumanOmniExpressExome SNP チップを用い 987,120 箇所の SNP の遺伝子型の決定が済んでいる約 906 人の川崎病患児について、重症化に関連する SNP の検索を行うため、罹患時の状況（発症時年齢、罹患季節、治療内容、治療効果、CAL の有無）の情報収集を行った。

## 4. 研究成果

48 人の巨大冠動脈瘤合併症例の協力を得ることができ、そのうち 47 例についての全エクソームシーケンズ解析を実施した。バリエーションコールの結果、参照ゲノム配列との違いが少なくとも 1 名に見られる場所が常染色体および X, Y 染色体上の 298,248 箇所あった。同一の箇所に複数のアレルのパターンがある場合はアレル毎に、HGVD, ESP6500, 東北メガバンク, 理化学研究所内の他疾患のエクソーム解析の蓄積データを用い、頻度によるフィルタリングを行った。少なくとも 1 つのデータベース内で 0.3%以上の頻度で観察されたことのあるアレルを削除した結果、42,454 箇所、のべ 42,540 タイプのバリエーションアレルに絞り込まれた。これらについて、CADD を用いて遺伝子機能に与える影響の大きさの予測を行い、指標である PHRED スコアが 20 位上のもを抽出した結果、候補は 4400 にさらに絞り込まれた。この段階でタンパクをコードしない機能的 RNA 遺伝子や biomart にコード領域長の情報がない遺伝子等は今回の検討から除外し、遺伝子毎に 47 人中に見られたバリエーションアレル数を合算し、さらに遺伝子のコード領域の長さで補正した値を算出したところ、上位 20 の遺伝子は表 1 のようになった。また、mRNA 発現量の臓器・

組織内での順位が他臓器・組織の平均より 10 パーセンタイル以上、上位にある遺伝子に絞ると、白血球（表 2）、冠動脈（表 3）、小腸（表 4）という結果となった。

表1. コード領域長あたりに観察された有害アレル数が多い上位20遺伝子

| 遺伝子名           | 有害アレル数 | コード領域長 | 1000塩基あたりのアレル数 |
|----------------|--------|--------|----------------|
| PRPF40B        | 1      | 18     | 55.6           |
| MIER3          | 1      | 72     | 13.9           |
| AC005493.1     | 1      | 84     | 11.9           |
| OR5AK2         | 11     | 930    | 11.8           |
| KRT18          | 13     | 1293   | 10.1           |
| IGHV3-66       | 3      | 348    | 8.6            |
| MIER2          | 13     | 1638   | 7.9            |
| CTC-487M23.8   | 1      | 132    | 7.6            |
| CTD-3105H18.14 | 1      | 141    | 7.1            |
| RPL22          | 1      | 143    | 7.0            |
| G0S2           | 2      | 312    | 6.4            |
| AP005482.1     | 1      | 159    | 6.3            |
| AL391152.1     | 1      | 171    | 5.8            |
| C19orf70       | 2      | 357    | 5.6            |
| C10orf35       | 2      | 366    | 5.5            |
| DEFB133        | 1      | 186    | 5.4            |
| MARK4          | 1      | 187    | 5.3            |
| ZNF550         | 2      | 378    | 5.3            |
| WDR89          | 6      | 1164   | 5.2            |
| RPL19          | 3      | 591    | 5.1            |
| AICDA          | 3      | 597    | 5.0            |

表2. コード領域長あたりに観察された有害アレル数が多い上位10遺伝子(白血球に特異性が高いもの)

| 遺伝子名      | 有害アレル数 | コード領域長 | 1000塩基あたりのアレル数 | パーセンタイルランクの他臓器組織・平均との差 |
|-----------|--------|--------|----------------|------------------------|
| IGHV3-66  | 3      | 348    | 8.6            | 61.1                   |
| G0S2      | 2      | 312    | 6.4            | 10.5                   |
| AICDA     | 3      | 597    | 5.0            | 35.4                   |
| S100P     | 1      | 288    | 3.5            | 25.5                   |
| LCN2      | 2      | 597    | 3.4            | 26.3                   |
| LST1      | 1      | 315    | 3.2            | 20.2                   |
| TRAV13-1  | 1      | 337    | 3.0            | 69.7                   |
| IGLV3-27  | 1      | 339    | 2.9            | 62.7                   |
| C17orf103 | 1      | 339    | 2.9            | 12.9                   |
| TRBV5-5   | 1      | 343    | 2.9            | 73.8                   |

表3. コード領域長あたりに観察された有害アレル数が多い上位10遺伝子(冠動脈に特異性が高いもの)

| 遺伝子名      | 有害アレル数 | コード領域長 | 1000塩基あたりのアレル数 | パーセンタイルランクの他臓器組織・平均との差 |
|-----------|--------|--------|----------------|------------------------|
| AICDA     | 3      | 597    | 5.0            | 26.6                   |
| C1orf227  | 1      | 297    | 3.4            | 10.2                   |
| TRAV13-1  | 1      | 337    | 3.0            | 41.2                   |
| TRGV3     | 1      | 354    | 2.8            | 17.2                   |
| IGKV2-24  | 1      | 360    | 2.8            | 35.9                   |
| TNFRSF12A | 1      | 390    | 2.6            | 10.8                   |
| TAC1      | 1      | 390    | 2.6            | 11.1                   |
| UPK1B     | 2      | 783    | 2.6            | 13.3                   |
| HIST2H2AB | 1      | 393    | 2.5            | 17.6                   |
| CA7       | 2      | 795    | 2.5            | 11.0                   |

表4. コード領域長あたりに観察された有害アレル数が多い上位10遺伝子(小腸に特異性が高いもの)

| 遺伝子名     | 有害アレル数 | コード領域長 | 1000塩基あたりのアレル数 | パーセンタイルランクの他臓器組織・平均との差 |
|----------|--------|--------|----------------|------------------------|
| KRT18    | 13     | 1293   | 10.1           | 13.3                   |
| IGHV3-66 | 3      | 348    | 8.6            | 59.2                   |
| AICDA    | 3      | 597    | 5.0            | 38.9                   |
| GNG13    | 1      | 204    | 4.9            | 45.0                   |
| FAM19A4  | 2      | 423    | 4.7            | 15.7                   |
| LCN2     | 2      | 597    | 3.4            | 16.7                   |
| HIST1H4A | 1      | 312    | 3.2            | 49.5                   |
| TRAV13-1 | 1      | 337    | 3.0            | 55.4                   |
| IGLV3-27 | 1      | 339    | 2.9            | 57.6                   |
| TRBV5-5  | 1      | 343    | 2.9            | 52.6                   |

現在、表 1 に示した有害バリエーション数の上位 250 程度までの候補遺伝子について、バリエーションの存在を直接シーケンズ法で確認を進めている。

ゲノムワイド関連解析に向けての臨床情報の収集は部分的収集も含め 906 例中 864 例人について、完了している。特に治療効果や冠動脈の転帰について情報の不足部分の収集に務め、SNP のゲノムワイド検索により見

出される一般的な川崎病重症化に関与が疑われる候補遺伝子群と、巨大冠動脈瘤症例のエクソーム解析で注目した候補遺伝子群と対比することで、それぞれの絞り込みに活用する予定である。

頻回罹患例の全ゲノムシーケンス解析は図1に示す2家族と、川崎病への3回の罹患歴がある1名の患者の合計10人について実施した。そのうち、このうち2つの家族について、それぞれの家族内で罹患歴のある同胞が共有し、なおかつ両親の遺伝子型と矛盾しないバリエーションを抽出した。

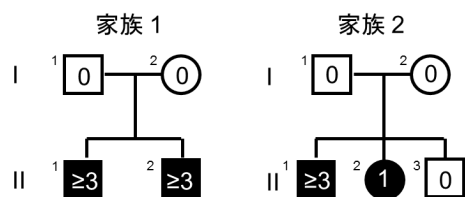


図1. 川崎病頻回罹患例を含む同胞症例の2家族  
記号内の数字は川崎病罹患回数を表す。

さらに、polyphenでpossibly damaging, probably damagingもしくはSIFTにてdeleteriousと予測される、スプライス供与、受容部位いずれかにある、終始コドンが生じる、開始もしくは終始コドンが喪失するバリエーションのいずれかに該当するバリエーションを抽出し、現在、バリエーションアレルの頻度による絞り込みが進行中である。

*ORA11*に関しては川崎病患者94人での遺伝子多型の検索と川崎病2,412人、対照2,635人についての関連解析を実施し、ありふれたSNPと集団中に頻度が0.1%を下回る低頻度なアミノ酸挿入バリエーションの両方に独立した川崎病罹患感受性への関連を見出し、論文に報告した。*ORA11*が2エクソンのみからなり、シーケンス解析が容易であることを利用し、現在対象者を川崎病3,849人、対照2,635人に増やし、低頻度バリエーションの深い検索を行っている。39箇所の新たなバリエーションを見出し、さらにフレームシフトバリエーションが川崎病患者群に少ない傾向を発見、論文作成中である。

#### 参考文献

1. Daichi Shigemizu et al., A practical method to detect SNVs and indels from whole genome and exome sequencing data. *Sci Rep.* 2013; 3: 2161.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Yoshihiro Onouchi (1番目), Kouichi Ozaki

(35番目)他,計44人.Variations in *ORA11* gene associated with Kawasaki disease. *PLoS ONE*, 11, 2016, e01454861, doi: 10.1371 (査読あり)

[学会発表](計16件)

1. Yoshihiro Onouchi, Genetic Factors of Kawasaki Disease. (招待講演), the 18th International Vasculitis & ANCA Workshop, 2017.3.17, 東京大学伊藤国際学術研究センター(東京都,文京区)
2. 尾内善広, 中川英刀, 重水大智, 尾崎浩一, 中村好一, 浅見雄二, 関満, 小林徹, 高地雄太, 戸田達史, 佐竹涉, 羽田明, 角田達彦, 田中敏博, 伊藤薫「全エクソーム解析による川崎病巨大瘤の遺伝的リスクファクターの検索」第36回日本川崎病学会, 2016.10.30, ワークピア横浜(横浜市, 中区)
3. Yoshihiro Onouchi, Genetic factors of Kawasaki disease identified in genome-wide studies. (招待講演), 1st International Pediatric Precision Medicine Forum, 2016.9.24, Shanghai, China
4. 尾内善広「川崎病の遺伝的背景の解明への取り組み」(招待講演)第119回日本小児科学会, 2016,5,13, ロイトン札幌(札幌市, 中央区)
5. Yoshihiro Onouchi (1番目), Kouichi Ozaki (9番目), 他計22人 A meta-analysis of three Genome-wide association studies identifies a novel susceptibility locus for Kawasaki disease. The 13th International Congress of Human Genetics, 2016.4.4, 国立京都国際会館(京都市, 左京区)
6. 尾内善広「川崎病の遺伝的背景解明への取り組み」(招待講演)第11回神奈川県川崎病研究会, 2016.2.27, 新横浜プリンスホテル(横浜市, 港北区)
7. 尾内善広「次世代シーケンサーによる川崎病の遺伝的要因の解析」(招待講演)第7回川崎病セミナー in 千葉, 2016.2.26, ホテル・ザ・マンハッタン(千葉市, 幕張区)
8. Yoshihiro Onouchi, Susceptibility genes for Kawasaki Disease identified by genome-wide studies in Japan, (招待講演) 11th Congress of Asian Society for Pediatric Research, 2015.4.17, 大阪国際会議場(大阪市, 北区)
9. Yoshihiro Onouchi, Genetic Studies of Kawasaki Disease in Japan. (招待講演)

11<sup>th</sup> International Kawasaki Disease Symposium, 2015.2.3, Honolulu, USA

10. 尾内善広「Genetics of Kawasaki Disease」(招待講演)第34回日本川崎病学会, 2014.10.30, 学術総合センター(東京都, 千代田区)
11. 尾内善広「川崎病の遺伝背景解明でめざすもの -成果と課題-」(招待講演)第15回北海道川崎病研究会, 2014.9.20, 札幌アスペンホテル(札幌市, 北区)
12. Yoshihiro Onouchi, GWAS and Kawasaki Disease. (招待講演) The Pediatric Academic Societies and the Asian Society of Pediatric Research Joint Meeting 2014, 2014.5.5, Vancouver, Canada
13. Yoshihiro Onouchi, Pathophysiological Basis for Genetic Research in Kawasaki Disease. (招待講演) American College of Cardiology 63rd Annual Scientific Session, 2014.3.30, Washington DC, USA
14. 尾内善広「多因子遺伝性疾患研究の現状～川崎病を例に」(招待講演)第58回日本未熟児新生児学会 CLD 遺伝セミナー, 2013.12.1, ANA クラウンプラザホテル金沢(石川県金沢市)
15. Yoshihiro Onouchi, Genetic Factors of Kawasaki Disease. (招待講演) 2nd Oriental Congress of Pediatrics, 2013.10.19, Shanghai, China
16. 尾内善広「川崎病の遺伝要因解明の現状」(招待講演)第33回日本川崎病学会, 2013.9.27, 富山国際会議場(富山県富山市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

川崎病遺伝コンソーシアムホームページ  
<http://raise.umin.jp/jkdgc/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

尾内 善広 (ONOUCHI, Yoshihiro)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号: 30360522

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

中村 好一 (NAKAMURA, Yosikazu)  
自治医科大学・公衆衛生学・教授  
研究者番号: 50217915

尾崎 浩一 (OZAKI, Kouichi)  
理化学研究所・統合生命医科学研究センター・循環器疾患研究チーム・上級研究員  
(平成29年度より国立長寿医療研究所・メディカルゲノムセンター臨床ゲノム解析推進部・部長)  
研究者番号: 50373288

### (4)研究協力者

中川 英刀 (NAKAGAWA, Hidewaki)  
理化学研究所統合生命医科学研究センター・ゲノムシーケンス解析研究チーム・チームリーダー

重水 大智 (SHIGEMIZU, Daichi)  
東京医科歯科大学難治疾患研究所ゲノム応用医学研究部門医科学数理分野・助教  
(平成29年度より国立長寿医療研究所・メディカルゲノムセンター・臨床ゲノム解析推進部・室長)